

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：24201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25892024

研究課題名(和文)植物病原菌ゲノミクス手法を用いた殺菌剤作用点同定基盤の確立およびその応用

研究課題名(英文)Identification of the mode of action of fungicides by whole genome analysis

研究代表者

泉津 弘佑 (Izumitsu, Kosuke)

滋賀県立大学・環境科学部・助教

研究者番号：20579263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究において、重要植物病原菌トモロコシごま葉枯病菌をモデルとして、新規殺菌剤を含む多重薬剤耐性変異株を人為的に作出し、その全ゲノム配列を決定した。本研究では、この多重変異株と野生株のゲノム配列の間で異なっている配列を薬剤耐性変異点の候補として解析をすすめた。その結果、トルニファニド耐性遺伝子TFR1はファルネシルトランスフェラーゼ遺伝子を、TFR2はゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子をコードしていることが示唆された。同様にポリオキシシン耐性遺伝子Pol2およびPol4はそれぞれ、フェロケラターゼ遺伝子およびポルフォプリノーゲンデアミナーゼ遺伝子をコードしていることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tolnifanide is an antifungal agent with sulfonamide structure, which inhibits mycelial growth of Pleosporales fungi including *Bipolaris* spp. For understanding its mode of the action, we developed tolmanifanide-resistant mutants of *Bipolaris maydis* by chemical mutagenesis and characterized them, genetically. By crossings, two mutant genes (Tfr1, Tfr2) were identified. Comparisons of whole genomes from the wild type and the resistant offsprings revealed TFR1 and TFR2 encode geranylgeranyl transferase and farnesyl diphosphate farnesyl transferase, respectively. We also revealed that polyoxin-resistant genes POL2 and POL4 encode ferrochelatase and porphobilinogen deaminase, respectively.

研究分野：菌類分子遺伝学

キーワード：殺菌剤 薬剤耐性 作用機構 プレニル化

1. 研究開始当初の背景

(1) さまざまな殺菌剤の作用機構および耐性化機構の完全なデータセットを作ること、殺菌剤研究の大きな夢の1つである。しかしながら、現在においても新規殺菌剤の作用点同定は極めて困難である。既存の薬剤と類似の作用点を持つものについては、同定手法が確立されているものの、完全に新規の作用点を持つ殺菌剤の作用点を同定する“常法”は存在しない。

(2) 植物病原菌類の場合、殺菌剤への耐性化の多くが「作用点となる遺伝子の突然変異」によって引き起こされることが知られている。ABC トランスポータの変異による耐性化なども知られているが、圃場で得られる薬剤耐性菌の多くが作用点の変異株である。このことから、我々は殺菌剤の耐性株を人為的に作出し、その耐性点を明らかにすることで、作用点も同時に明らかにできるのではないかと考えた。

(3) 先行研究(特別研究員奨励費 2011-2013 年度)により、作用点未知の殺菌剤トルニファニドの薬剤耐性株(*tfr1*株および*tfr2*株)を作出し、そのドラフトゲノム配列を決定した。このうち、*tfr1*株は通常の培地上で生育不全を示すもののトルニファニドに対して一定の耐性を示す菌株であり、*tfr2*株は培地上での生育不全は全く示さずトルニファニドに対してもほぼ完全な耐性を示す菌株である。

同様に先行研究において、ポリオキシン耐性株(*pol2*株および*pol4*株)のドラフトゲノム配列も決定した。これら2菌株はいずれも、通常の培地上で生育不全を示し、コロニーが赤く着色する形質を示すとともに、培地上でポリオキシンに耐性化を示す菌株である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、全ゲノム解析手法を用いた新規殺菌剤の作用点・耐性点の同定手法を構築することを最大の目的としている。すなわち、作用点未解明の殺菌剤の耐性株を人為的に作出し、全ゲノム解析手法により、薬剤耐性遺伝子を同定することにより、同時に作用点も明らかにすることを狙いとしている。

(2) 上記の目的を達成するために、本研究では特に、作用点未解明の殺菌剤トルニファニドを研究モデルとし、まずは薬剤耐性遺伝子を同定することを目的とした。

(3) ポリオキシンについてはすでにその作用機構(キチン合成阻害)が同定されているものの、耐性化機構については解明されていない部分が多い。本研究では、ポリオキシンに対し耐性化(低感受性化)する機構についても同時に明らかとすることを狙いとし

た。

3. 研究の方法

(1) 先行研究により得られた薬剤耐性株のドラフトゲノム配列の中から、遺伝子の ORF 内部にアミノ酸変異を引き起こす、もしくは欠損をもたらす変異を薬剤耐性に関与している変異点候補として抽出した。

(2) 各薬剤耐性株を野生株と交配し、薬剤耐性および薬剤感受性の子孫株を複数作出した。変異点候補の中からこの薬剤耐性の形質と連鎖するものを探索した。

(3) 一部の遺伝子(*TFR1*)については、薬剤耐性遺伝子を野生株に人為的に導入することにより、薬剤耐性化が引き起こされることを実証した。

4. 研究成果

(1) トルニファニド耐性遺伝子の同定

先行研究において、重要植物病原菌であるトウモロコシごま葉枯病菌(*Cochliobolus heterostrophus*)をモデルとして、新規殺菌剤トルニファニドを含む多重薬剤耐性変異株を人為的に作出し、その全ゲノム配列を決定している。本研究では、この多重変異株のゲノム配列を足がかりに研究をスタートさせた。

まず、多重変異株のゲノム配列と親株(野生株)のゲノム配列の間で異なっている配列を“薬剤耐性変異点”の候補として解析をすすめた。その結果、約3,000箇所の変異点候補が得られた。次に、*perl* スクリプトおよび BLAST プログラムを使用して遺伝子 ORF 内部でアミノ酸配列に変異を引き起こすものを探索した結果、20-30 遺伝子の候補に絞ることができた。

さらに、各薬剤耐性株を野生株と交配し、薬剤耐性または薬剤感受性となる子孫株を複数株得た。薬剤耐性変異点の候補の中から、子孫株の薬剤耐性の形質と連鎖するものを探索した。その結果、トルニファニド耐性遺伝子 *TFR1* はファルネシルトランスフェラーゼ遺伝子を、*TFR2* はゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子をコードしていることが示唆され、これらの遺伝子の1アミノ酸変異が薬剤耐性化を引き起こしていると考えられた。



図 C409Y 変異型ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子の野生株への導入試験。左：野生株、右：C409Y 遺伝子導入株。トルニファニド含有培地に接種後3日目。

野生株に薬剤耐性変異型のゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子 (C409Y 変異型) を人為的に導入した場合、トルニファニドに対する完全な耐性化が起こることも確認した (上図)。この結果から、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子がトルニファニド薬剤耐性遺伝子であることを実証した。

ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼは、タンパク質のプレニル化機構において中心的な役割を果たす遺伝子である。これまでトルニファニドの作用機構は全くわかっていなかったが、この殺菌剤の作用性・耐性メカニズムにはタンパク質のプレニル化機構が関与していることが強く示唆された。

そこで、我々はトウモロコシごま葉枯病菌の全ゲノム配列を探索し、プレニル化修飾を受けると予測される遺伝子群を探索した。その結果、約 40 遺伝子の候補遺伝子を見出した。これらの遺伝子のうち約半数が RHO 型や RAS 型 GTPase など細胞内シグナル伝達因子をコードしていた。

以上の結果から、トルニファニドはタンパク質プレニル化を阻害 (もしくは攪乱) することにより、細胞内シグナル伝達にダメージを与えている可能性が示唆された。今後はこの仮説を検証していく予定である。

(2) ポリオキシン耐性遺伝子の同定

ポリオキシンはキチン合成阻害剤として作用機構はすでに知られている。一方で、どのような機構であればこの殺菌剤に耐性化 (低感受性化) するのかについてはあまり知られていない。

我々は今から 10 年以上前、実験室内で化学突然変異剤を利用することで、トウモロコシごま葉枯病菌のポリオキシン耐性突然変異株を 2 株 (*pol2* 株および *pol4* 株) 作出していた。興味深いことにこれらの菌株はいずれも、培地上でポリオキシシンに耐性化する一方で、コロニーが赤く着色する形質を併せ持っていた。分析の結果、この赤い化合物がエモジンであることも明らかとしていた。このため、ポリオキシン耐性化とエモジンの異常蓄積を同時に引き起こす突然変異を同定したいと考えていた。

そこで今回、トルニファニドと同様の手法を用いて全ゲノム解析手法によるポリオキシン耐性遺伝子の同定を試みた。その結果、ポリオキシン耐性遺伝子 *POL2* および *POL4* はそれぞれ、フェロケラターゼ遺伝子およびポルフォプリノーゲンデアミナーゼ遺伝子をコードしており、これら遺伝子の 1 アミノ酸変異が薬剤耐性化を引き起こすことが強く示唆された。

興味深いことに、これら両遺伝子はいずれもヘムの生合成に必須の遺伝子として知られている。ヘムの生合成には 8 段階の反応が知られているが、第 3 段階 (*POL4*) と第 8 階

階 (*POL2*) の酵素の突然変異がポリオキシンへの耐性化を示す結果となった。これまで知られていなかったポリオキシンの耐性化とヘムの生合成過程の強い関連性が示唆された。

今後、薬剤耐性遺伝子を野生株に導入する、もしくは、薬剤感受性遺伝子を耐性株に導入するなどの方法により、これらが薬剤耐性遺伝子であることを実証することが必要となるが、現時点において、これらが耐性遺伝子である可能性は極めて高いと言える。

一方で、ヘムの生合成は生存に必須と考えられており、実際に *pol2* 株、*pol4* 株のいずれも通常の培地上で強い生育阻害を示している。このことから、ヘムの生合成の変異株が直ちに圃場における薬剤耐性株となるとは考えにくい。今後はこの点についても検証が必要となるだろう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

K. Izumitsu, H. Miyagawa, C. Tanaka. Mechanism of tolnifanide resistance: Single amino acid substitutions of geranylgeranyl transferase and farnesyl transferase confer tolnifanide resistances. 13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, San Francisco, August 10-14.

泉津弘佑、宮川恒、田中千尋 (2013) 全ゲノム手法を用いた殺菌剤 tolnifanide 耐性点の同定, 日本農薬学会第 39 回大会, 京都市 (2014 年 3 月 13 日~3 月 15 日)

泉津弘佑、宮川恒、田中千尋 (2014) 全ゲノム手法を用いた殺菌剤耐性点の網羅的同定, 平成 26 年度日本植物病理学会大会, 札幌市 (2014 年 6 月 2 日~6 月 4 日)

升本 宙、泉津弘佑、北出雄生、田中千尋 (2014) 殺菌剤ポリオキシン耐性遺伝子の同定, 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 仙台市 (2014 年 11 月 15 日~11 月 16 日)

田中千尋、吉田裕史、八木貴史、泉津弘佑、宮川恒 (2015) Tolnifanide 耐性遺伝子の解析, 日本農薬学会第 40 回大会, 町田市 (2015 年 3 月 18 日~3 月 20 日)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉津 弘佑 (IZUMITSU, Kosuke)
滋賀県立大学・環境科学部・助教
研究者番号：20579263

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

宮川 恒 (MIYAGAWA, Hisashi)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：10219735

田中 千尋 (TANAKA, Chihiro)
京都大学・農学研究科・教授
研究者番号：60263133

鈴木 一実 (Suzuki, Kazumi)
滋賀県立大学・環境科学部・教授
研究者番号：90390880