

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05658

研究課題名(和文) 静菌的殺菌剤フェリムゾンの作用機構解明に基づく耐性菌の出ない薬剤ターゲットの提示

研究課題名(英文) Mode of action of fungistatic fungicide ferimzone: search for target pathways that circumvent the emergence of tolerant strains

研究代表者

奥野 哲郎 (Okuno, Tetsuro)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：00221151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：耐性菌の出現回避は、農業における病害管理にとって重要である。殺菌剤フェリムゾンは、いもち病を含むイネの病害防除に使用されてきたが、いまだに薬剤耐性株の出現は報告されていない。本研究では、フェリムゾン感受性に関わる遺伝子として銅輸送系のICT1遺伝子とCCC2遺伝子をウリ類炭疽病菌とイネいもち菌において同定した。分子生物学的及細胞学的分析により、ICT1とCCC2からなる銅輸送系の機能障害はフェリムゾン感受性低下につながる一方、付着器のメラニン化低下による病原性喪失にもつながることが分かった。すなわち、フェリムゾンに対する感受性と病原性発現との間にトレードオフの関係があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物病害防除において殺菌剤の果たす役割は大きい。しかし、薬剤耐性菌株が多発して農業上大きな問題となっている。本研究では、イネ病害防除剤として市販されてから約30年間、圃場で薬剤耐性菌株出現の報告のない静菌性殺菌剤フェリムゾンの作用機構研究を行い、薬剤感受性に関わる代謝系(銅輸送系)とその関連遺伝子を明らかにした。このことは、糸状菌病害防除において薬剤耐性菌の出現を回避できる薬剤ターゲット分子と代謝系を提示したことであり、その成果は新規薬剤開発にとって意義がある。また、フェリムゾン感受性と銅輸送系の関連性の発見は糸状菌における銅輸送系ネットワーク解明の重要な情報源となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Circumventing the emergence of fungicide-resistant strains is a crucial issue for robust disease management in agriculture. The fungicide ferimzone has been used for the control of rice diseases including rice blast. The emergence of ferimzone-resistant strains in rice fields has not been reported. In this research, we identified the copper transport ICT1 gene and the CCC2 gene as the ferimzone sensitivity genes in *Colletotrichum orbiculare* and the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Genetic and cytological analyses showed that functional defects in the copper transport pathways, consisting of Ict1 and Ccc2, led to the low sensitivity to ferimzone and the pathogenicity defect due to attenuated melanization in the appressorium. Importantly, the presence of CuSO₄ induced high sensitivity to ferimzone even in the ict1 mutant. This study shows that there is a trade-off relation between the sensitivity to ferimzone and fungal pathogenicity.

研究分野：植物病理学

キーワード：殺菌剤 フェリムゾン 作用機構 銅トランスポーター いもち病菌 ウリ類炭疽病菌 静菌作用 耐性菌問題

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物病害による農作物の損失は農業上の重要問題である。病原体から農作物を保護し、安定的な食糧供給を実現するための植物病害対策として、抵抗性品種の利用、耕種的防除、農薬による化学的防除などが挙げられる。それらを用いた総合的防除は重要であり、なかでも農薬による防除は最も有効で欠かせない防除法の一つである。従って、安全で防除効果が高く、スペクトラムの広い農薬の開発が望まれている。しかし、農薬の開発には、少なくとも10年以上の期間と龐大な経費が必要である。さらに、近年開発されてきた多くの優秀な殺菌剤に対して、全てではないにしても耐性菌の出現が運命付けられている。一旦耐性菌が出現するとその薬剤による防除効果は激減してしまう。このように耐性菌問題は、医薬と同様、農薬においても社会が抱える重要課題の一つである。したがって、耐性菌が出現しない薬剤の開発は病害防除にとって重要課題の一つである。

申請代表者は、フェリムゾンの開発に携わった研究者の一人である。本薬剤が静菌的作用を示すことから、圃場においては耐性菌出現の可能性は低いと考えられた。実際、当時の数年間の圃場実験においても耐性菌は検出されなかった。その後今日に至るまで多くの優れた薬剤が開発され利用されているが、その多くが耐性菌対策に悩まされているのが現状である。そこで、フェリムゾンのユニークな静菌機構を解明することで、耐性菌の出ない薬剤ターゲットを提示できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1991年に登録されて以来今日に至るまで耐性菌の報告のないイネ病害防除剤フェリムゾンに焦点を当て、その作用機作と圃場耐性菌不出現の機構を解明し、耐性菌の出現しない薬剤ターゲットを提示することである。さらに、学術的には、植物病原糸状菌の孢子発芽、菌糸伸長、付着器形成、メラニン化などに関わる代謝系間の新たなネットワークの発見を目的とする。

3. 研究の方法

フェリムゾン感受性に関わる遺伝子を同定するため、アグロバクテリウム形質転換法を用い、まず、ウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)にハイグロマイシン耐性遺伝子を含むT-DNAをランダムに挿入した変異株を作成した。ハイグロマイシン耐性を指標に約7000のT-DNA挿入変異株を得た。それらをフェリムゾン(10-20 µg/ml)含有ポテトデキストロース培地(PDA)で培養し、野生株と比較して菌糸生育が旺盛な株をフェリムゾン感受性低下候補株として選抜した。T-DNAが挿入された領域のDNA配列はTAIL-PCRにより決定し、その配列を用いて候補遺伝子を推測した。最終的には、野生株において候補遺伝子を相同組替えにより破壊し、フェリムゾン感受性低下変異株とした。それらの株を用い、孢子形成、孢子発芽、付着器形成、付着器のメラニン化、菌糸成長、ラッカーゼ活性、銅含量、植物への病原性などにおけるフェリムゾンの影響を野生株と比較した。

ウリ類炭疽病菌でフェリムゾン感受性低下関連遺伝子として同定された2遺伝子についてはイネいもち病菌(*Magnaporthe oryzae*)でオルソローグ遺伝子を単離し、ウリ類炭疽病菌と同様の解析(銅解析は除く)をイネいもち病菌において行った。

4. 研究成果

フェリムゾン感受性低下菌株は菌糸コロニーでの色素生成、孢子形成、付着器のメラニン化など病原性発現において重要な性質が欠損していた。感受性低下菌株として選抜したウリ類炭疽病菌2菌株の変異遺伝子と薬剤感受性の関係を解析した結果、銅輸送に関わる*CoICT1*遺伝子と*Colct1*から銅を受け取ると考えられる銅イオン輸送P型ATPase(銅シャペロンタンパク質)をコードする*CoCCC2*遺伝子がフェリムゾン感受性低下に関わることが分かった。また、イネいもち病菌で同遺伝子のオルソローグ遺伝子(*MoICT1*と*MoCCC2*)の破壊株を作出し解析したところ、ウリ類炭疽病菌と同様の結果が得られた。さらに*Colct1*の銅結合ドメインの一アミノ酸変異でも遺伝子破壊と同等の効果を示すことが分かった。これらのことからウリ類炭疽病菌とイネいもち病菌の菌糸生育におけるフェリムゾン感受性低下は銅輸送系の機能障害に関係することが示唆された。

一方、*CoICT1*遺伝子と*CoCCC2*遺伝子の破壊株はいずれもメラニン欠損のアルビノタイプの表現型を示し、付着器のメラニン化低下により宿主への侵入能を欠損して病原性を失っていた。すなわち、これらの破壊株ではメラニン生合成に必要なラッカーゼ活性が顕著に低下していた。ラッカーゼは銅結合ドメインを持つタンパク質であり活性は銅に依存することが知られている。イネいもち病菌の*MoICT1*遺伝子破壊株と*MoCCC2*遺伝子破壊株もメラニン欠損のアルビノタイプの表現型を示し、病原性を失っていた。これらのことから、重要

病原体であるイネいもち病菌とウリ類炭疽病菌のフェリムゾン感受性低下と菌の病原性発現能力の間にはトレードオフの関係が成立することが明らかとなった。

興味深いことに、*CoICT1* 遺伝子破壊株と *CoCCC2* 遺伝子破壊株のフェリムゾン感受性低下は硫酸銅の添加でキャンセルされた。すなわち、フェリムゾンと硫酸銅が共存するとフェリムゾン感受性低下株の菌糸伸長はほぼ完全に阻害された。そこで、ウリ類炭疽病菌の培養菌糸における銅などの重金属含量を ICP 分析により測定した結果、硫酸銅とフェリムゾンを同時に処理するとフェリムゾン感受性低下株特異的に銅イオン含量が増大することが分かった。銅含量が許容範囲以上に上がったことが菌糸生育の阻害につながった可能性が示唆された。

本研究では、圃場で薬剤耐性菌株出現の報告のない静菌性殺菌剤フェリムゾンの作用機作研究を行い、イネいもち病菌とウリ類炭疽病菌のフェリムゾン感受性に関わる代謝系（銅輸送系）とその関連遺伝子を明らかにした。銅代謝系は糸状菌の病原性発現に重要な代謝系でもあることから、本研究は、糸状菌病害防除において薬剤耐性菌の出現を回避できる可能性を持つ薬剤ターゲット代謝系を提示したもので、その成果は新規薬剤開発にとって意義あるものと考えられる。また、静菌作用薬剤フェリムゾンに対する感受性と銅輸送系との関連性の発見は、糸状菌における銅輸送ネットワークの生体機能での役割解明に向けての重要な情報源となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ken Harata, Tetsuro Okuno	4. 巻 137
2. 論文標題 Threonine synthase CoTHR4 is involved in infection-related morphogenesis during the pre-penetration stage in <i>Colletotrichum orbiculare</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2019.103746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiwamu Hyodo, Nobuhiro Suzuki and Tetsuro Okuno	4. 巻 221(2)
2. 論文標題 Hijacking a host scaffold protein, RACK1, for replication of a plant RNA virus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 935-945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.15412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ken Harata, Hiroyuki Daimon, and Tetsuro Okuno	4. 巻 23
2. 論文標題 Trade-Off Relation between Fungicide Sensitivity and Melanin Biosynthesis in Plant Pathogenic Fungi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101660	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠永隼・西山雄大・原田賢・奥野哲郎
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌の病原性関連遺伝子GRIM-19の機能解析
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田 賢, 奥野哲郎
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌におけるフェリムゾン感受性とメラニン生成の関係
3. 学会等名 日本農薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 賢, 奥野哲郎
2. 発表標題 ウリ類炭疽病菌における銅輸送経路は殺菌剤フェリムゾン感受性に関与する
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------