

食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究経過報告書

研究課題	汎用性植物病害防除薬剤フェリムゾンの作用機作
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	奥野哲郎（農学部・教授）研究代表者 原田 賢（農学部・助手）研究者分担者
キーワード	(1) 殺菌剤 (2) フェリムゾン (3) 作用機作 (4) 薬剤耐性 (5) イネいもち病菌 (6) ウリ類炭疽病菌

1. 2017 年度の研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

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。したがって、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あるいは代謝経路を明らかにすることは新規薬剤の開発のためにも非常に重要である。そこで、申請者らは、イネいもち病や葉枯病防除剤として市販されてから 30 年間、圃場で薬剤耐性菌株出現の報告のない浸透性薬剤フェリムゾンに着目した。本研究では、静菌的作用を持つフェリムゾンの作用機作を明らかにすることにより、耐性菌が出現しない新規薬剤開発のためのターゲットを提示することを目指す。初年度は、まず、イネいもち病菌(*Pyricularia oryzae*)とウリ類炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)にアグロバクテリウム形質転換法を用い T-DNA をランダムに挿入することにより菌糸生育においてフェリムゾンに耐性を示す菌株をスクリーニングできる実験系を構築する。耐性を示した菌株の遺伝子を同定し、それら遺伝子の機能を明らかにするための研究を計画した。

研究実験プロセスを以下に示す。

- 1) アグロバクテリウム形質転換法によるイネいもち病菌とウリ類炭疽病菌への T-DNA 挿入。
- 2) 抗生物質マーカーによる T-DNA 挿入株の選抜。
- 3) フェリムゾン含有培地で菌糸生育できるフェリムゾン耐性株の選抜。
- 4) 選抜株での T-DNA 挿入部位と破壊された候補遺伝子の同定。
- 5) 相同組換えによる候補遺伝子破壊株の作成。
- 6) 野生型遺伝子による相補株の作成。
- 7) 破壊株の菌糸生育、胞子形成、付着器形成、病原性などの性状解析
- 8) 候補遺伝子がコードするタンパク質の細胞内局在、発現時期等の解析。

2. 研究成果の概要(1 ページ程度)

本研究目的に適した菌株を再検討し、イネいもち病菌 P-2 株とウリ類炭疽病菌 104-T 株を選抜した。まず、アグロバクテリウム形質転換法により T-DNA 挿入菌株の取得効率を検討し、ウリ類炭疽病菌 104-T 株で効率よく良く T-DNA 挿入菌株を作出できる条件を確立した。これまでに約 7000 の T-DNA 挿入ウリ類炭疽病菌変異株を作出し、フェリムゾン感受性低下を示した 22 菌株を取得した。イネいもち病菌の T-DNA 挿入菌株作出については T-DNA 挿入の効率が炭疽病菌の 10%ほどであったので、現在より効率の良い条件を検討中である。

上記の炭疽病菌 22 菌株で T-DNA 挿入により破壊された遺伝子を推定した。興味深いことに、それらフェリムゾン耐性候補株の多くはコロニーでの色素生成、孢子形成、付着器形成など病原性発現で重要な何らかの性質が欠損していた。候補遺伝子としてリストアップされた 22 遺伝子のうち APSES ファミリーに属する転写因子 *CoSTUA* と *CoICT1*(iron copper transporter)については相同組み換えによる遺伝子破壊株と野生型遺伝子導入による相補株を作成し、それら遺伝子の機能がフェリムゾン感受性低下に関わることを明らかにした。

CoSTUA の相補実験においては、フェリムゾン感受性のみ野生型レベルに復帰しない株が偶然得られた。その株の *CoSTUA* 遺伝子を調べたところ *CoSTUA* 遺伝子のストップコドンの数塩基上流でグアニン塩基が 1 つ欠失していた。その変異株を [*CoSTUA*(-G)c] と命名した。そこで *CoSTUA* 遺伝子破壊株 ($\Delta costuA$)、*CoSTUA*(-G)c、野性株の 3 株から全 RNA を抽出しトランスクリプトーム解析 (RNAseq) を行った。その結果、 $\Delta costuA$ と *CoSTUA*(-G)c で共通して発現量が減少あるいは増加し、両株間での発現量には有意な差はなく、野性株との比較では発現量に有意な差が認められる多くの遺伝子をフェリムゾン感受性関連候補遺伝子としてリストアップすることができた。ただし、多くの遺伝子が hypothetical protein と表記されるため、現在、新たなデータベースの利用を含めさらなる解析法の改良を試みている。

CoICT1 破壊株 ($\Delta coict1$) はフェリムゾン含有 PDA 培地でフェリムゾン無添加培地と同等のコロニー生育を示し、*CoICT1* がフェリムゾン耐性に関与することが示唆されたが、 $\Delta coict1$ 株の病原性と感染器官の形態形成の観察結果から、 $\Delta coict1$ は付着器のメラニン化低下により宿主への病原性を欠損することが分かった。さらに、 $\Delta coict1$ 株ではウリ類炭疽病菌のメラニン生合成に必要なラッカーゼの活性が顕著に低下していた。また、イネいもち病菌で同遺伝子のオルソログ破壊株を作出し、解析したところ、炭疽病菌と同様の結果が得られた。

以上の結果から、ウリ類炭疽病菌とイネいもち病菌のフェリムゾン耐性獲得は宿主感染に必要な機構とトレードオフの関係にあることが示唆された。研究成果は本年 3 月に神戸国際会議場で開催された日本植物病理学会大会で発表した。

3. 収支報告

(非公開)

4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

< 学会発表 >

糸状菌分子生物学会 (2017 年 11 月 佐賀)

原田 賢, 奥野哲郎

ウリ類炭疽病菌トレオニンシンターゼ *CoTHR4* は病原性と胞子発芽に關与する

日本植物病理学会 (2018 年 3 月 神戸)

奥野 哲郎, 原田 賢

圃場耐性菌出現を回避できる殺菌剤ターゲットの探索: フェリムゾンの作用機作

原田 賢, 奥野哲郎

ウリ類炭疽病菌における殺菌剤フェリムゾン感受性と病原性のトレードオフな關係性

< 発表論文 (査読有り) >

Yuri Tajima, Hiro-oki Iwakawa, Kiwamu Hyodo, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, and **Tetsuro Okuno**. Requirement for eukaryotic translation initiation factors in cap-independent translation differs between bipartite genomic RNAs of red clover necrotic mosaic virus. *Virology* 509, 152-158, 2017.

Kiwamu Hyodo, Hikari Nagai, **Tetsuro Okuno**. Dual function of a *cis*-acting RNA element that acts as a replication enhancer and a translation repressor in a plant positive-stranded RNA virus. *Virology* 512, 74-82, 2017.

< 学外資金獲得状況 >

H27年度-29年度 科学研究費基盤研究 B (一般) 研究代表

「植物 RNA ウイルスの複製を正あるいは負に制御する宿主因子の探索と機能解明」

1664 万円