

植物病原菌類の多剤耐性機構

農林水産省果樹試験場カキ・ブドウ支場

茨城大学農学部植物資源保護学教室

東京大学大学院農学生命科学研究科植物病理学研究室

なか
あ
阿
ひ
日
うね
く
久
津
び
比
りょう
かつ
克
ただ
忠
じ
み
己
あき
明

はじめに

植物病原菌類の薬剤耐性菌が出現し、病害防除効果の低下を招くようになってから四半世紀が経過した。これは選択性が高い合成農薬の使用の歴史にそのまま重なる。薬剤耐性菌が出現する要因として、DEKKER (1976) は薬剤透過性の低下、薬剤の分解・修飾による不活化、作用点の質的・量的変化などをあげている。近年、癌細胞やある種の細菌では薬剤排出機構による多剤耐性が大きな問題となっており、その原因としてABCトランスポーターと呼ばれる膜タンパク質の存在が明らかになった。植物病原菌類にも同様の機構が存在する可能性はすでに予想されていたが (De WAARD, 1997)、最近、筆者らは、実際に植物病原菌類においてもABCトランスポーターによる薬剤耐性機構が存在することを遺伝子レベルではじめて明らかにした (NAKAUNE et al., 1998)。本稿ではカンキツ緑かび病菌を中心にABCトランスポーターによる多剤耐性機構について紹介する。

I 多剤耐性のメカニズム

多剤耐性 (multidrug resistance) とは、医薬・農薬に限らず化学構造や作用機構が相互に異なる複数の薬剤に対して同時に耐性を示す現象をいう。ヒトの癌細胞やある種の病原細菌において多剤耐性が発達し、薬物による治療を困難にしているが、その原因の一つとして、薬剤排出トランスポーター (P-糖タンパク質) による薬剤の排出が関与していることが明らかになった。これまでに多くの薬剤排出トランスポーターが同定され、これらは構造上よく保存されたATP結合カセット (ATP-binding cassette, ABC) を持つことからABCトランスポーターと呼ばれている。では、ABCトランスポーターによる多剤耐性獲得のメカニズムはどのようなものであろうか？ その鍵はABCトランスポーターの発現量

にあるようである。一般に、多剤耐性を獲得した細胞ではABCトランスポーターの構成的発現が亢進しており、このABCトランスポーターがATPを駆動力として細胞質内または細胞膜内の薬剤を細胞外や液胞へ輸送・排出し、細胞内の薬剤濃度を低く維持することが耐性獲得のメカニズムであると考えられている。では、どのような薬剤が基質として認識され輸送・排出されるのだろうか？ 一般的には脂溶性の高い薬剤を基質とする傾向があるものの、ABCトランスポーターの基質特異性は低く、広範な化合物を基質とする。しかし、その基質認識のメカニズムについてはいまだ明らかでなく、早急に解明すべき課題の一つとして残されている。

このようなABCトランスポーターによる多剤耐性は、ヒトから酵母や細菌に至る多くの生物種で確認されており、生物に普遍的な生体防御機構の一つと考えられているが、それらの詳細については最近の総説 (石川ら, 1997; 植田ら, 1997; AMBUDKAR et al., 1998) を参照していただきたい。

II 植物病原菌類における多剤耐性

1 カンキツ緑かび病菌の多剤耐性

菌類のステロール合成系における脱メチル化反応を阻害する薬剤 (DMI 剤) は、その抗菌スペクトラムが広いことから、多くの植物病害に適用されており、現在使用されている殺菌剤の中で最も重要なグループの一つであるが、近年、本剤に対する耐性菌の出現が懸念されている。DMI 剤に対する耐性機構は、理論的にはDMI 剤のターゲットとされているシトクロム P 450 の変異であると考えられる (DELYE et al., 1997)。しかし、オランダのDe WAARDらは、カンキツ青かび病菌 *Penicillium italicum* によるDMI 剤の細胞内取り込み量の測定実験 (De WAARD and Van NISTELROOY, 1984) や非病原菌類である *Aspergillus nidulans* のABCトランスポーターに関する研究 (DEL-SORBO et al., 1997) の結果などから、植物病原菌類のDMI 剤耐性にもABCトランスポーターによる薬剤排出系が関与する可能性を示唆した (De WAARD, 1997)。一方、筆者らは、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた実験で、ABCトランスポーターの

Mechanism of Multidrug Resistance in Phytopathogenic Fungi. By Ryoji NAKAUNE, Katsumi AKUTSU and Tadaaki HIBI.

(キーワード: 多剤耐性, 薬剤排出機構, ABCトランスポーター, 植物病原菌類)

表-1 カンキツ緑かび病菌 *Penicillium digitatum* の多剤耐性

薬剤	各菌株 ^{a)} に対する EC ₅₀ および MIC ($\mu\text{g/ml}$)											
	PD 5		DF 1		U 1		LC 2		M 1		I 1	
	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC
Triflumizole	0.08	1	0.04	1	0.01	1	2.06	>100	1.28	>100	2.79	>100
Fenarimol	0.28	5	0.32	5	0.29	5	2.29	>100	2.67	>100	5.29	>100
Bitertanol	0.22	5	0.28	5	0.31	5	3.19	>100	2.72	>100	9.59	>100
Pyrifenoxy	0.37	10	0.64	10	0.75	10	>50	>100	>50	>100	>50	>100
Cycloheximide	0.07	1	0.04	1	0.09	1	0.16	2	0.28	2	0.18	2
4-NQO	0.36	5	0.45	5	0.24	5	1.70	10	1.79	10	1.38	10
Acridiflavin	0.77	5	1.10	5	0.44	5	1.58	50	1.74	50	1.16	50

^{a)}: PD 5, DF 1 および U 1 は DMI 剤感受性株; LC 2, M 1 および I 1 は DMI 剤耐性株.

遺伝子の一つである *PDR5* が DMI 剤耐性に深く関与していることを明らかにした (中畝ら, 1996)。そこで、植物病原菌類のカンキツ緑かび病菌 *Penicillium digitatum* の DMI 剤耐性野生株を対象に、本菌における DMI 剤耐性に ABC トランスポーターによる薬剤排出系が関与している可能性を検討した。最初に、カンキツ緑かび病菌の 6 菌株について、DMI 剤を含む各種の薬剤に対する感受性を調べた結果、DMI 剤耐性野生株である LC 2, M 1 および I 1 の 3 株は、DMI 剤感受性野生株である PD 5, DF 1 および U 1 の 3 株に比べ、トリフルミゾール、フェナリモルおよびピテルタノールなどの DMI 剤に対してのみならず、多剤耐性の研究によく使用されるタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド、突然変異誘起剤 4-nitroquinoline-*N*-oxide (4-NQO) およびアクリフラビンに対しても、いずれも高い耐性を示すことが示された (表-1)。すなわち、DMI 剤耐性とその他の化学構造や作用機作の異なる薬剤に対する耐性との間に正の相関関係が認められ、カンキツ緑かび病菌の DMI 剤耐性株は多剤耐性であることが明らかにされた (安達ら, 1996; NAKAUNE et al., 1998)。

2 カンキツ緑かび病菌の ABC トランスポーター

これまでにクローニングされている ABC トランスポーター遺伝子の塩基配列およびそのアミノ酸配列には、ATP 結合カセットと呼ばれる極めて保存性の高い配列が存在する。そこで酵母 *S. cerevisiae* の ABC トランスポーター遺伝子 *PDR5* から ATP 結合カセットをコードする配列を含む領域を PCR で増幅し、これをプローブとしてカンキツ緑かび病菌の相同遺伝子をクローニングすることとした。まず、灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* のゲノミックライブラリーのスクリーニングによって、ATP 結合カセットを含み、*PDR5* と相同性が高い *BMR1* 断片が得られた。次いで、この *BMR1* 断片をプローブとして *P. digitatum* のゲノミックライブラ

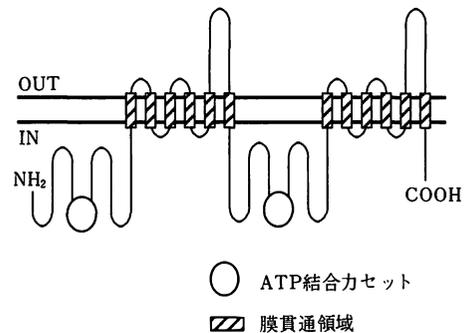


図-1 PMR1 の推定構造模式図

リーをスクリーニングし、4446 bp の open reading frame (ORF) からなる ABC トランスポーター遺伝子 *PMR1* をクローニングした。この ORF から推定されるアミノ酸配列中には、酵母の ABC トランスポーターである *PDR5* や *SNQ2* と同様に、2 箇所の ATP 結合カセットや 12 箇所の膜貫通領域が存在すると推定された (図-1)。さらに、*PMR1* が DMI 剤耐性を含む多剤耐性に関与していることを直接的に証明するため、カンキツ緑かび病菌の多剤耐性株 LC 2 の *PMR1* 遺伝子を破壊した株 DIS 07, DIS 33 および DIS 96 を作製した。これら遺伝子破壊株の各種 DMI 剤に対する感受性を調べたところ、これらの株は DMI 剤のトリフルミゾール、フェナリモルおよびピテルタノールに対していずれも顕著に耐性レベルが低下し (口絵写真①参照)、これら薬剤の遺伝子破壊株に対する 50% 生育阻止濃度 (EC₅₀) は感受性野生株に対する値とほぼ同じであった (表-2)。また、遺伝子破壊株は薬剤存在下で、感受性野生株と酷似した菌糸の生育異常 (菌糸先端の膨潤化や異常分岐) を起こし、菌糸の生育が阻害されることも確認された。以上のことから、カンキツ緑かび病菌のこれらの薬剤に対する耐性に、*PMR1* 遺伝子の翻訳産物であ

表-2 *PMR 1* 遺伝子破壊株の DMI 剤感受性

薬剤	各菌株 ^{a)} に対する EC ₅₀ および MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	PD 5		DIS 07		DIS 33		DIS 96		LC 2	
	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC	EC ₅₀	MIC
Triflumizole	0.08	1	0.44	10	0.37	10	0.48	10	2.06	>100
Fenarimol	0.28	5	0.33	5	0.28	5	0.37	5	2.06	>100
Bitertanol	0.22	5	0.20	5	0.17	5	0.24	5	3.19	>100
Pyrifenoxy	0.37	10	34.4	>100	26.8	>100	19.2	>100	>50	>100

^{a)}: PD 5 は DMI 剤感受性株; DIS 07, DIS 33 および DIS 96 は *PMR 1* 遺伝子破壊株; LC 2 は DMI 剤耐性株 (多剤耐性株)。

る ABC トランスポーターが関与することが明らかになった (NAKAUNE et al., 1998)。しかしながら、同じ DMI 剤に分類されるピリフェノックスやシクロヘキシミドなどその他の薬剤に対しては、感受性の変化はほとんど認められないか、あるいはわずかに変化しただけであった。酵母 *S. cerevisiae* ではゲノム解析によって少なくとも 22 種の ABC トランスポーター遺伝子が同定されており、その多剤耐性には基質特異性の異なる複数の ABC トランスポーターが関与していると考えられている。このことから、筆者らは、ピリフェノックスなどに対する耐性には *PMR 1* とは基質特異性の異なる他の ABC トランスポーターが関与しているのではないかと推測している。既に、カンキツ緑かび病菌から degenerate primer (縮重プライマー) を用いた PCR で *PMR 1* 以外の複数の ABC トランスポーター遺伝子をクローニングしており、現在、これらホモログ遺伝子について解析を進めている。

3 *PMR 1* 遺伝子の発現解析

DMI 剤耐性株と感受性株の間で、*PMR 1* 遺伝子の発現量に差があるかどうかを調べるためにノーザンブロット解析を行った。その結果、DMI 剤を含まない液体培地で培養した場合、耐性株では感受性株に比べて *PMR 1* の構成的な発現量が数倍多いことが示された (NAKAUNE et al., 1998)。この結果は、多剤耐性を獲得したヒトの癌細胞や酵母では ABC トランスポーターの発現が亢進しているという結果とよく一致する。一方、DMI 剤を添加した液体培地で培養した後、経時的に同様のノーザンブロット解析を行った実験では、DMI 剤耐性株および感受性株ともに DMI 剤の添加 5 分後から *PMR 1* の発現が顕著に誘導されることが明らかになった (NAKAUNE et al., 1998)。この誘導的な発現量は 10~40 分後に最大となり、80 分後には減少するというパターンを示したが、両株間で発現量や時間に大きな差は認められなかった (網田ら, 1998)。これらの結果から、耐性株では *PMR 1* 遺伝子のプロモーター領域あるいは

その発現を制御する遺伝子に何らかの変異が生じ、*PMR 1* 遺伝子が構成的に高発現しているという可能性が考えられた。以上から、耐性と感受性の差は *PMR 1* 遺伝子の構成的発現量の差に起因し、耐性株では、高発現している *PMR 1* が極めて迅速に DMI 剤を細胞外に排出することにより DMI 剤による阻害からまぬがれ、結果として高い薬剤耐性を示すようになるものと推定された。ただし、これに加えて、DMI 剤の標的となるシトクロム P 450 の脱メチル化酵素 (P 450_{14DM}) の変異あるいはその高発現なども耐性に関与している可能性は否定できないことから、現在、この点についても詳細な解析を進めている。

4 各種植物病原菌類における ABC トランスポーター遺伝子の存在

上記のように、ABC トランスポーターがカンキツ緑かび病菌の DMI 剤耐性に関与することが明らかになった。そこで、カンキツ緑かび病菌以外の各種植物病原菌類にも ABC トランスポーター遺伝子が存在するか否かを検討した。すなわち、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*)、イネ紋枯病菌 (*Thanatephorus cucumeris*)、タバコ赤星病菌 (*Alternaria alternata tobacco pathotype*)、ウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum lagenarium*)、トマト萎凋病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*)、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) およびジャガイモ疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) の計 7 種について、*P. digitatum* の *PMR 1* 遺伝子と他の ABC トランスポーター遺伝子間で特に保存性の高い ATP 結合カセットをコードする領域をプローブとして、ゲノミックスアンプ解析を行った。その結果、すべての菌株において明瞭なシグナルが検出され、ABC トランスポーター遺伝子が各種植物病原菌類にも普遍的に存在する可能性が示唆された (口絵写真②参照) (李ら, 1997)。すでに、灰色かび病菌からは、*BMR 1* をクローニングして全塩基配列を決定し、これが ABC トランスポーター遺伝子であることを確認している (牧住ら,

1998)。なお、カンキツ緑かび病菌以外の植物病原菌類では、本稿の執筆時点で、欧米においてイネいもち病菌と灰色かび病菌から ABC トランスポーター遺伝子がそれぞれクローニングされ、塩基配列データベースに登録されている。

おわりに

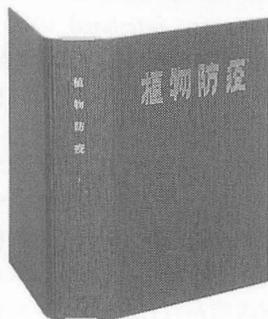
カンキツ緑かび病菌の ABC トランスポーターが DMI 剤耐性に関与することが明らかになり、さらに各種の植物病原菌類が広く ABC トランスポーターを備えていることが判明した。今のところ、他の植物病原菌類では ABC トランスポーターの薬剤耐性への関与は明確に証明されていないが、ABC トランスポーターによる薬剤排出機構は生物に普遍的な生体防御システムの一つであることから、他の植物病原菌類の薬剤耐性にも何らかの関与をしていると考えるのが妥当であろう。従来、植物病原菌類の薬剤耐性機構として、このような ABC トランスポーターが関与する薬剤排出機構の存在はほとんど知られていなかったが、今後はこの機構の重要性が広く認識されるようになるものと思われる。さらに、この薬剤排出機構が薬剤の抗菌スペクトラムを決定する要因の一つである可能性も十分考えられるので、以後、これらの点についても検討する必要がある。一方、数種の菌類の ABC トランスポーター遺伝子がファイトアレキシン耐性や毒素などの分泌にも関与する可能性が指摘されている (DEL-SORBO et al., 1997; DE WAARD, 1997; 中

畝ら, 1999)。また最近、イネいもち病菌において、ABC トランスポーター遺伝子 *ABC 1* に変異を持つ株はイネに対して病原性を示さないことが報告された (URBAN et al., 1999)。これらのことは ABC トランスポーターが薬剤耐性のみならず、菌類の病原性にも関与している可能性を強く示唆している。今後、植物病原菌類の ABC トランスポーターに関する研究が進展し、その機能の詳細が明らかにされることを大いに期待したい。

引用文献

- 1) 安達喜一ら (1996): 日植病報 62: 284 (講要)
- 2) AMBUDKAR, S. V. et al. eds. (1998): Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego. 292: 853 pp.
- 3) DEKKER, J. (1976): Ann. Rev. Phytopathol. 14: 405~428.
- 4) DEL-SORBO, G. et al. (1997): Mol. Gen. Genet. 254: 417~426.
- 5) DELYE, C. et al. (1997): Appl. Environ. Microbiol. 63: 2966~2970.
- 6) DE WAARD, M. A. (1997): Pestic. Sci. 51: 271~275.
- 7) ——— and J.G.M. Van NISTERLOOY (1984): Neth. J. Pl. Pathol. 90: 143~153.
- 8) 石川智久ら (1997): 蛋白質 核酸 酵素 42: 1251~1294.
- 9) 李 栄珍ら (1997): 日植病報 63: 500~501 (講要)
- 10) 牧住芳之ら (1998): 同上 64: 366~367 (講要)
- 11) 中畝良二ら (1996): 同上 62: 284 (講要)
- 12) NAKAUNE et al. (1998): Appl. Environ. Microbiol. 64: 3983~3988.
- 13) 中畝良二ら (1999): 平成 11 年度日本植物病理学会大会 講演要旨予稿集, p. 48.
- 14) 縄田 治ら (1998): 日植病報 64: 367 (講要)
- 15) 植田和光ら (1997): 日本農芸化学会誌 71: 783~820
- 16) URBAN, M. et al. (1999): EMBO J. 18: 512~521.

便利にご利用いただけます。『植物防疫』専用合本ファイル



本誌 1 年分 (12 冊) が簡単に製本できます。

〈本誌名金文字〉

定価 733 円 (本体 699 円 + 税)

送料 390 円

- 書棚を飾る美しい外観
- 冊誌を傷めず保存ができる
- 取り外しが簡単にできる
- ビニールクロスで長期保存ができる

ご希望の方は、現金・郵便振替で直接本会へお申し込み下さい