

イネいもち病菌における MBI-D 耐性の機構と 遺伝子診断法

クミアイ化学工業株式会社生物科学研究所 **高** **垣** **真** **喜** **一**
たか がき ま き いち
すぎ はら み の る
 バイエルクロップサイエンス株式会社結城中央研究所 **楳** **原** **穂**
むら き お
 住友化学工業株式会社農業化学品研究所 **木** **村** **教** **男**
き むら のり お お

はじめに

シタロン脱水酵素阻害型メラニン合成阻害剤 (MBI-D) は、浸透移行性を有するイネいもち病防除薬剤であり、主に育苗箱処理剤として使用され、省力化や散布回数削減に貢献している。MBI-D としては、1998 年にカルプロバミド、2000 年にジクロシメット、2001 年にフェノキサニルがそれぞれ上市されている。

2001 年に佐賀県において、カルプロバミドを箱処理したにもかかわらず葉いもちが多発した。そこで、その原因を調べたところ、本剤に対する耐性菌の出現によるものであることがわかった (山口ら, 2002 ; 宗ら, 2002)。また、この耐性菌はジクロシメット、フェノキサニルにも交差耐性を示す (SAWADA et al., in press)。一方、還元酵素阻害型メラニン合成阻害剤 (MBI-R) は、30 年以上も使用されているが耐性菌の報告はないことから、MBI-D 耐性菌の耐性メカニズムに興味をもたれた。

ここでは、今後、MBI-D 耐性菌のモニタリング、拡大防止対策を行ううえで重要となる耐性機構と簡便な遺伝子診断法について紹介する。

I 耐性機構

1 ポット試験

佐賀県より分離されたイネいもち病菌に対する MBI-D、MBI-R の防除効果を図-1 に示した。いずれも茎葉散布による 10 ppm 処理の結果である。標準菌株 (クミアイ化学保存菌) SS35 と比較して、佐賀分離菌の 3 菌株 (A14・O4・C14) は明らかに MBI-D に対する感受性が低下していた。

Mechanism of Reduced Sensitivity to Melanin Biosynthesis Inhibitors Targeting Scytalone Dehydratase (MBI-D) in *Magnaporthe grisea* and Gene Diagnostic Method for Testing the Sensitivity. By Makiichi TAKAGAKI, Minoru SUGIHARA and Norio KIMURA

(キーワード: イネいもち病, MBI-D, 耐性菌, シタロン脱水酵素, 遺伝子診断法, PIRA-PCR)

2 メラニン合成経路

菌類のメラニンはジヒドロキシナフトレン (DHN) が酸化的に重合した黒色物質であり、DHN の合成はポリケチド合成酵素によるテトラヒドロキシナフトレンの生成とその後のヒドロキシナフトレン還元酵素 (HNR) による還元反応、シタロン脱水酵素 (SDH) による脱水反応が 2 回ずつ交互に起こることにより行われる (図-2) (BELL et al., 1976)。

メラニン合成阻害剤 (MBIs) は 1, 3, 6, 8-テトラヒドロキシナフトレン~シタロン、1, 3, 8-トリヒドロキシナフトレン~バーメロンの還元反応に関与する HNR を阻害する MBI-R (YAMAGUCHI et al., 1982 ; WHEELER and GREENBLATT, 1988) と、シタロン~1, 3, 8-トリヒドロキシナフトレン、バーメロン~1, 8-ジヒドロキシナフトレンの脱水反応に関与する SDH を阻害する MBI-D (KURAHASHI et al., 1998 ; MOTUYAMA et al., 1998) の二つに大別される (図-2)。図-1 で示したポット試験結果から推測すると、佐賀県より分離された耐性菌は後者の

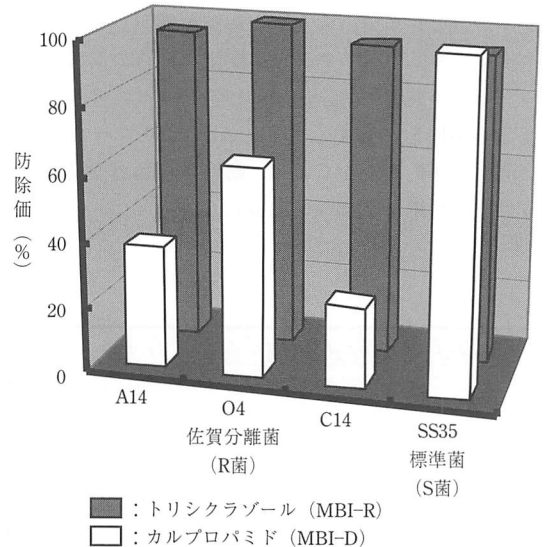


図-1 メラニン合成阻害剤のイネいもち病防除効果 (ポット試験)

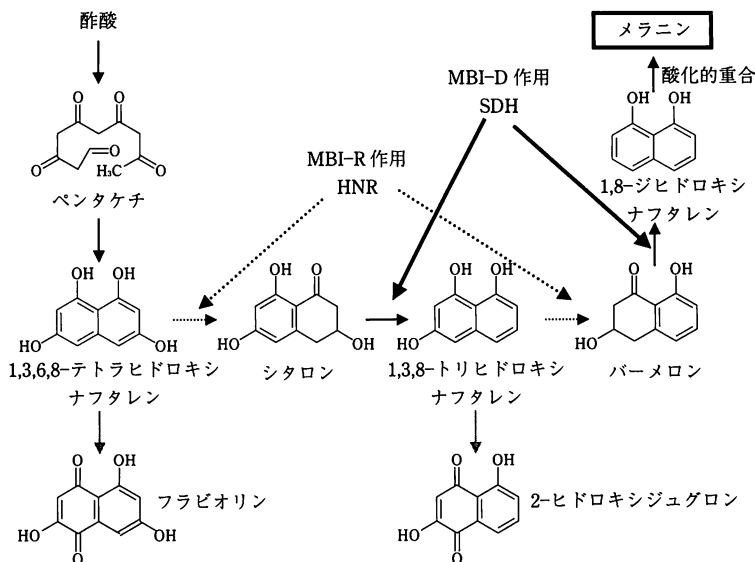


図-2 イネいもち病菌のメラニン合成経路

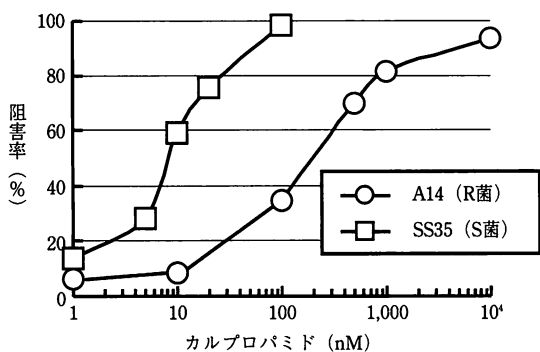


図-3 カルプロバミドのSDHに対する阻害活性

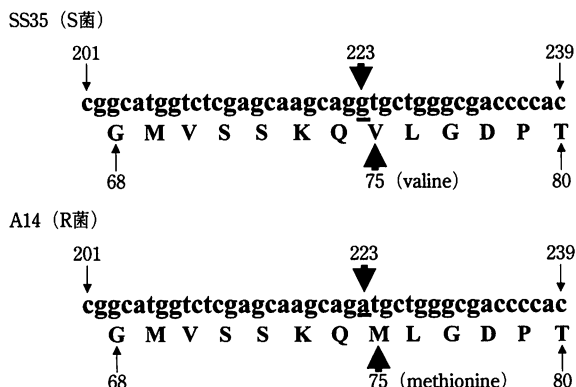


図-4 MBI-D 剤耐性菌の変異点

SDH に何らかの変異が生じている可能性が推測された。

3 シタロン脱水酵素 (SDH) に対する阻害活性

イネいもち病菌粗酵素 (SDH) を抽出後、カルプロバミドのSDHに対する阻害活性を確認した。耐性菌から調製したSDHに対する阻害活性は明らかに低下しており、感受性菌のSDHに対する阻害活性と比べ150値で1/20、190値で1/100であった(図-3)。以上の結果から、本酵素に対する阻害活性の低下が耐性機構となっている可能性が推察された。

4 シタロン脱水酵素 (SDH) の遺伝子解析

酵素と薬剤の親和性が酵素のアミノ酸変異により変化したかを確認するため、遺伝子解析を実施した。イネいもち病菌のSDHのcDNA塩基配列は既に報告されている [DDBJ/Gen-Bank/EMBL accession No. AB004741]。

そこで、これらの遺伝子情報に基づきプライマーを合成後、RT-PCR、ゲノムPCR産物の直接的塩基配列決定により、感受性菌、耐性菌を比較した。その結果、mRNAを鋳型としたcDNA上では、転写開始コドンの塩基を1番とすると223番目の塩基がGからAに変異しており、対応するゲノムDNA上にも同じ変異が確認された。これはアミノ酸の配列番号へ置き換えると75番目のバリン (Valine) のメチオニン (Methionine) への変異 (V75M) に相当していた(図-4)。

5 形質転換体による耐性機構の証明

SDH遺伝子の1塩基置換が、MBI-Dに対して耐性を引き起こしていることをさらに検証するため、感受性型および耐性型SDH遺伝子をタンパク質発現ベクターに組み込み、大腸菌を形質転換し、GST融合SDHを発

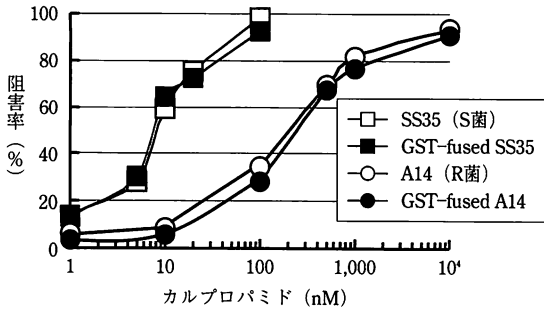


図-5 カルプロバミドのGST融合SDHに対する阻害活性

現させた。感受性菌，耐性菌の組み換え体中で発現させたGST融合SDHに対するカルプロバミドの阻害活性は，それぞれイネいもち病菌由来粗酵素中のSDHと同等であった(図-5)。

以上の結果から，イネいもち病菌のMBI-D耐性機構としては，SDHの遺伝的変異により薬剤との結合力に変化が生じたことが主因であると推察された。

II 遺伝子診断法

1 感受性検定方法の確立

イネいもち病菌のMBI-Dに対する感受性検定方法としては，ポット試験やセロファン膜上での付着器のメラニン化阻害試験(EIZUKA et al., 2001)が考えられるが，判定するまでに要する時間や労力，結果の正確さ等で難点がある。また，薬剤添加培地上でのメラニン蓄積で判定する方法も考えられるが，イネいもち病菌の培地上でのメラニン蓄積は安定しない場合もあり，最適な手法とはいえない。そこで，耐性菌の動向を迅速かつ正確に把握できる遺伝子診断法を検討した。

MBI-D耐性菌の1塩基置換は，狭義の意味でのSNPs(1塩基多型)といえることができる。SNPs検出には様々な手法が考えられるが，一般的にはPCR-RFLP法が簡便で安価な方法として知られており，既にジカルボキシイミド系(藤村, 2003)，ストロビルリン系(Ishii, 2002)薬剤耐性菌の検出にも適用されている。PCR-RFLP法を適用するには偶然，当該サイトが何らかの制限酵素認識部位と一致している必要がある。MBI-D耐性菌はSDH cDNA上の223番目のグアノシン(G)がアデニン(A)へ変異している。そこで，当該サイト周辺を含め適用可能な制限酵素を種々調査した結果，制限酵素*Sfa*N I(New England Biolabs)で変異部分が切断されることを確認した。イネいもち病菌から抽出したゲノムDNAを鋳型として，センスプライマーSCDH3(5'-ATGGGTTTCGCAAGTTCAAAAG-3')とアンチセ

ンスプライマーSCDH4(5'-TTATTTGTCGCCAAAG-GTCTCC-3')で増幅されたPCR産物(686 bp)を*Sfa*N Iで処理したところ，耐性菌のみ303 bpと383 bpに切断された。しかしながら，本酵素は極めて高価なため，多量のサンプルを検定するには不相当と考えられた。

次にPCRで増幅する際，プライマーに制限酵素サイトを導入するPrimer-introduced Restriction Enzyme Analysis PCR(PIRA-PCR)法(HALLASSOS et al., 1989; VUORIO et al., 1999)について検討した。耐性菌では変異点で[A]が取り込まれ，その直前の2塩基[AG]とともに[AGA]という配列が形成される。そこで，制限酵素*Xba*Iが[TCTAGA]という配列でDNAを切断することを利用し，[TCT]という人為的配列を導入したセンスプライマーSCDH-13(5'-TTCGTCGGCAT-GGTCTCGAGCATCTAG-3')を設計した(図-6)。SCDH-13とSCDH4のプライマーセットで増幅されたPCR産物(324 bp)を制限酵素*Xba*Iで処理した結果，耐性菌のみ25 bpと299 bpに切断された(図-7)。

PIRA-PCR法により，多量のサンプルを迅速に検定することが可能となったが，まだ解決すべき問題があった。多量のサンプルから，PCR用の鋳型となるイネいもち病菌のゲノムDNAを抽出する作業である。市販のDNA抽出キットを使用する場合でも，各菌株ごとに液体培養をする必要があるため，非効率で時間も掛かる。そこで，培地上の菌叢の極一部を掻き取り，microwave照射(電子レンジ)により鋳型DNAを簡便に得る手法(GOODWIN and LEE, 1993)を適用した。さらに本法を改変することにより，葉いもち病斑から鋳型DNAを簡便に得ることが可能となった。

以下に，microwaveを利用した鋳型DNAの抽出とPIRA-PCR法の組み合わせによる多量のサンプルから耐性菌動向を迅速かつ正確に把握できる遺伝子診断法を記す。

2 遺伝子診断(PIRA-PCR)法の実験プロトコール

(1) イネいもち病菌ゲノムDNAの抽出

【菌糸からの抽出】

イネいもち病菌を常法に従いシャーレ上で培養後，気中菌糸(移植後14日以内の若い菌糸体を使用)の極一部を爪楊枝で掻き取り，1.5 mlのマイクロチューブに移す。蓋をして，電子レンジ(500~600 W)で5~7分間microwaveを照射し，細胞壁を破壊する。50 μ lのTEバッファー(pH 8.0)を加え，ボルテックスを用いて激しくかくはん後，14,000 rpmで5分間遠心する。遊離したゲノムDNAが溶け込んだ上清を別のマイクロチ

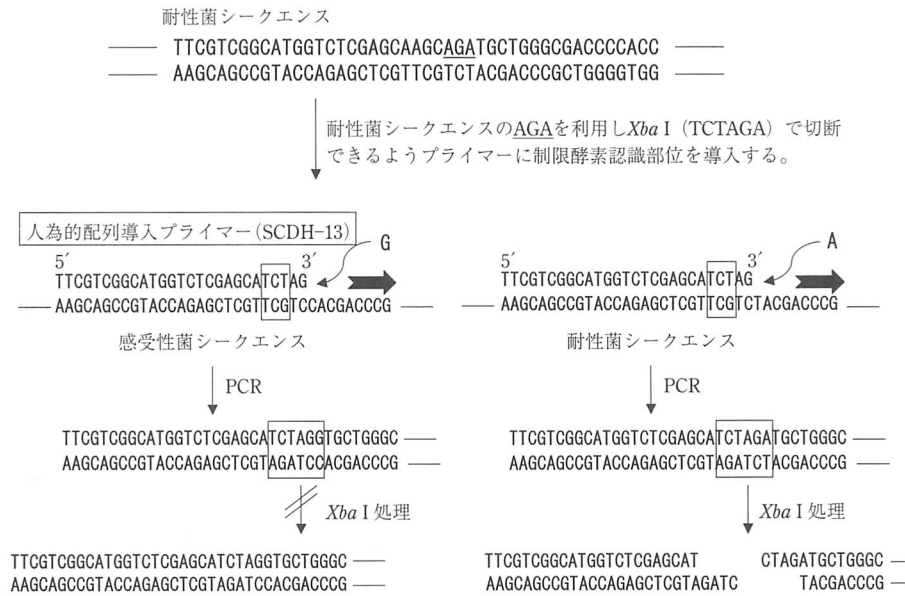


図-6 PIRA-PCR法の原理

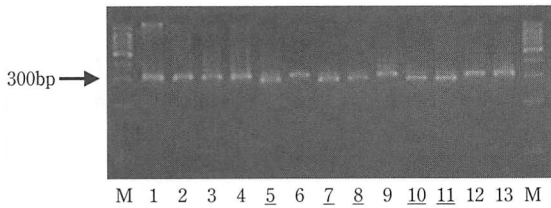


図-7 制限酵素 Xba I で処理したイネいもち病菌 SDH 遺伝子の電気泳動パターン (PIRA-PCR 法)
S 菌 : Lane 1-4, 6, 9, 12-13, R 菌 : Lane 5, 7-8, 10-11, M : 100 bp ladder.

ューブに移し、-20℃で保存する (簡易的に DNA を抽出しているため、経時的劣化が起きるようである。抽出後なるべく早く PCR を行う必要がある)。

【葉いもち病斑からの抽出】

葉いもち病斑を 5 mm 角程度に切り取り、1.5 ml のマイクロチューブに移す。蓋をして、電子レンジ (500 ~ 600 W) で 5 ~ 7 分間 microwave を照射する。50 μl の TE バッファー (pH 8.0) を加え、ボルテックスを用いて激しくかくはん後、罹病葉を取り除く。菌糸からの抽出と同様に -20℃での保存が可能であるが、やはり経時的劣化が起るので、なるべく早く PCR を行う必要がある。なお、褐点型病斑からの DNA 抽出はできない。

(2) PCR によるイネいもち病菌 SDH 遺伝子の増幅市販の耐熱性 DNA ポリメラーゼのほとんどが利用可

能と思われるが、本項では不特定要因を排除するため、実際に行っている PCR 反応条件を記載する。

【First PCR】

Takara EX Taq™ (TaKaRa) を使用し、最終容量が 25 μl となるよう鋳型 DNA 5 μl、センスプライマー SCDH-3 (25 pmol/μl) 1 μl、アンチセンスプライマー SCDH-4 (25 pmol/μl) 1 μl、Takara EX Taq™ 0.2 μl、10 × EX Taq Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μl、dNTPs (2.5 mM each) 2 μl および滅菌蒸留水 13.3 μl を混合する。PCR 反応は 95℃ (30 秒)、60℃ (1 分)、72℃ (2 分) のステップを 40 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃ (7 分) で反応を完結させる。

【Second (Nested) PCR】

Takara Taq™ を使用し、最終容量が 25 μl となるよう 1 回目の PCR 産物 (1/10 に希釈したもの) 1 μl、人為的配列を導入したセンスプライマー SCDH-13 (25 pmol/μl) 1 μl、アンチセンスプライマー SCDH-4 (25 pmol/μl) 1 μl、Takara Taq™ 0.2 μl、10 × PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μl、dNTPs (2.5 mM each) 2 μl および滅菌蒸留水 17.3 μl を混合する。PCR 反応は 95℃ (30 秒)、60℃ (1 分)、72℃ (2 分) のステップを 30 サイクル繰り返し、最終サイクルの後、72℃ (7 分) で反応を完結させる。なお、3' → 5' exonuclease 活性 (proof reading 活性) を有する耐熱性 DNA ポリメラーゼは、導入した人為的配列部分を修復してしまうので絶対に使用しない。

(3) *Xba* IによるPCR産物の消化 (RFLP解析)

上記で得られた324 bpのPCR産物 5 μ l, *Xba* I (TOYOBO) 0.5 μ l, 10 \times M buffer 1 μ lおよび滅菌蒸留水 3.5 μ lを混合後, 37°Cで1時間反応させる。本来は, PCR産物を市販のキット等で精製後に制限酵素処理することが好ましいが, サンプル数が多くなると時間や費用がかかる。しかし, 本試験系では, PCR産物を精製せずに*Xba* Iによる消化が可能であることを確認している。最後に2.5~3.0%アガロースゲルで電気泳動し, 324 bpのバンドが切断されるか否か(耐性菌は299 bpに切断)により耐性菌の診断を行う。

引用文献

- BELL, A. A. et al. (1976) : Tetrahedron 32 : 1353 ~ 1356.
- ELZUKA, T. et al. (2001) : Jpn. Pestic. Sci. 26 : 385 ~ 389.
- 藤村 真 (2003) : 第13回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集 : 17 ~ 27.
- GOODWIN, D. C. and S. B. LEE (1993) : Biotechniques 15 (3) : 438 ~ 444.
- HALASSOS, A. et al. (1989) : Nucleic Acids Research 17 : 8093 ~ 8099.
- ISHII, H. Agrochemical Resistance : Extent, Mechanism, and Detection. American Chemical Society, Washington. D.C., USA. pp242 ~ 259.
- KURAHASHI, Y. et al. (1998) : Jpn. Pestic. Sci. 23 : 22 ~ 28.
- MOTOYAMA, T. et al. (1998) : ibid. 23 : 58 ~ 61.
- SAWADA, H. et al. : Pest Manag. Sci. in press.
- 宗 和弘ら (2002) : 日植病報 68 : 262 (講要) .
- VUORIO, A. F. et al. (1999) : Molecular and Cellular Probes 14 : 421 ~ 424.
- WHEELER, M. H. and G. A. GREENBLATT (1988) : Exp. Mycol. 12 : 151 ~ 160.
- 山口純一郎ら (2002) : 日植病報 68 : 261 (講要) .
- YAMAGUCHI, I. et al. (1982) : Jpn. Pestic. Sci. 7 : 523 ~ 529.

新刊図書

世界におけるいもち病研究の軌跡

—21世紀の研究発展をめざして—

浅賀宏一・加藤 肇・山田昌雄・吉野嶺一 編 B5判 261頁
定価 9,975円税込み (本体9,500円) 送料340円

1971年以降に世界で発表された稲いもち病の関係論文延べ6,000件以上を分類別に収録し, その分野の専門家に研究内容の概論を執筆いただきました。巻末には「日本植物病理学会」のいもち病関係の講演要旨も収録してあります。いもち病研究に不可欠な書です。

お申し込みは直接当協会へ, 前金(現金書留・郵便振替)で申し込むか, お近くの書店でお取り寄せ下さい。
社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561(代) FAX (03) 3944-2103 メール : order@jppa.or.jp

! 当協会発行の年刊図書・資料!

農薬概説 第四版 2003年版

—農薬取扱業者研修テキスト—

農林水産省消費・安全局農産安全管理課・植物防疫課 監修
植物防疫全国協議会 編集

定価 1,890円 (本体1,800円) 送料310円

農薬取扱者が知っておかなければならない事項を解説したテキスト。法律や基礎などの詳しい解説を掲載。

内容目次

植物防疫概要

- 植物防疫の仕組み
- 農薬行政

関係法令

- 農薬取締法 解説

農薬一般

- 農薬の種類
- 農薬の特性
- 農薬の開発
- 農薬の生産と流通

農薬の安全性評価

- 農薬の安全性評価の仕組み
- 毒性試験の概要
- 農薬の残留とその安全性
- その他の安全性に関する試験

病害虫・雑草防除

- 病害概論と防除
- 害虫概論と防除
- 雑草概論と防除及び植物の生長調節
- 散布(施用)技術

農薬の安全・適正使用

- 農薬使用者の責務
- 安全使用の基本事項

- 安全使用のための知識
- 使用上の諸注意

農薬管理指導士等

- 農薬管理指導士等
- 農薬適正使用アドバイザー
- 緑の安全管理士
- その他の資格研修

資料

- 農薬取締法
- 水道法
- 消防法
- 施行令・通達等

お申し込みは直接当協会へ, 前金(現金書留・郵便振替)で申し込むか, お近くの書店でお取り寄せ下さい。
社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込1-43-11
郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561(代) FAX (03) 3944-2103 メール : order@jppa.or.jp