

特集：DMI 剤耐性菌に関する最近の話題

# ウリ類うどんこ病菌における DMI 剤耐性菌の 遺伝子診断

神奈川県農業技術センター 久保 深雪・野村 研・植草 秀敏・北 宜裕  
JA 全農 営農・技術センター 武 田 敏 幸

## はじめに

ステロール脱メチル化酵素阻害剤 (DMI 剤) は優れた殺菌剤としてうどんこ病などの多くの植物病原糸状菌の防除に使用されている。しかし、卓越した効果を示すために薬剤が頻繁に使用され、結果として耐性菌が出現し、様々な場面で問題となっている。特にキュウリうどんこ病菌については、1988年に神奈川県や千葉県において DMI 剤の感受性低下事例が報告され (大塚ら, 1988; OHTSUKA et al., 1988; 竹内・村井, 1988), その後の調査で、全国的に耐性菌が分布していることが確認された (中澤ら, 1991)。最近の調査でも全国に耐性菌が分布し、より感受性が低下してきていることが示されている (武田ら, 2007)。

上記 DMI 剤は医療現場でも殺菌剤・抗真菌剤として使用されているが、やはり真菌症患者からアゾール抗真菌剤耐性の *Candida albicans* が多数分離されている (MARICHAL et al., 1999)。この耐性の原因として、薬剤の標的酵素である P-450<sub>14DM</sub> の変異や細胞外への薬剤排出に関与する ABC トランスポーターの変異などが報告されている (MARICHAL et al., 1999; 新見ら, 2005)。植物病原菌では、*Venturia inaequalis* (SCHNABEL et al., 2001), *Uncinula necator* (DÉLYE et al., 1997), *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (DÉLYE et al., 1998) で P-450<sub>14DM</sub> の遺伝子 (*CYP51*) 内の塩基置換が DMI 剤耐性の原因になっていることが報告されている。また、*Penicillium digitatum* (HAMAMOTO et al., 2000) および *Venturia inaequalis* (SCHNABEL et al., 2001) では、*CYP51* 遺伝子の 5' 側上流に挿入されたエンハンサー配列によって *CYP51* 遺伝子の発現量が増加し、DMI 剤耐性を高めることが示されている。そこで我々は、キュウリうどんこ病菌の *CYP51* 遺伝子を単離するとともにその遺伝子構造を明らかにし、

その塩基配列を元にした DMI 剤耐性菌の簡易診断技術の開発に取り組んだ。

## I キュウリうどんこ病菌の *CYP51* 遺伝子

まず、我々はキュウリうどんこ病菌の *CYP51* 遺伝子を単離・同定し、その遺伝子構造を解析した。その結果、単離された *CYP51* 遺伝子は C 末端領域にヘム鉄結合部位をもつ典型的なチトクローム P450 をコードし、推定アミノ酸配列で 525 残基より構成され、基質結合保存領域である CR1 から CR6 (AOYAMA et al., 1996) もよく保存されていることが明らかになった。そこで DMI 剤感受性菌株の K-7-2 および DMI 剤耐性の IB6-5, IB3-2, SG1-1, SG1-6, KN1-1 および KN2-1 を供試し、各菌株についてそれらの *CYP51* 遺伝子を単離し、塩基配列の解析を行った。なお、供試した耐性菌株は、いずれも単分生子分離株で、耐性菌株はトリフルミゾールおよびトリアジメホンに対して、それぞれ Rf 値 = 37.5 ~ 833.3, および 40.6 ~ 203.3 の耐性レベルを示すことをリーフディスク法 (中沢ら, 1994) による生物検定で別途確認した (表-1)。

解析の結果、*CYP51* 遺伝子の非翻訳領域 5' 側上流 1 kbp には菌株間で全く変異は認められなかった。これに対して *CYP51* 遺伝子のコード領域においては、DMI 剤に高度の耐性を示す IB6-5, SG1-6 および KN1-1 で 4 箇所、すなわち 1,225 番目の塩基が C から G に、1,230 番目の塩基が A から G に、1,455 番目の塩基が G から T に、1,491 番目の塩基が G から A に置換する変異が認められた (久保ら, 2006 a; 久保, 2007)。また、DMI 剤に対する耐性レベルの低い IB3-2, SG1-1 および KN2-1 では、1,491 番目の 1 塩基のみに G から A への変異が認められた (久保ら, 2006 b; 久保, 2007)。4 塩基変異はアミノ酸残基でそれぞれ A372G, I374V, V449L, G461S の、また、1 塩基のみの変異では G461S のアミノ酸置換を引き起こしているものと推定された。これを生物検定結果と合わせてみると、トリフルミゾールに対して Rf 値で 833.3 以上の高度の耐性を示した菌株すべてで 4 塩基変異が認められたのに対し、Rf 値 100

Gene Diagnosis of DM-resistance in *Podosphaera xanthii*. By Miyuki KUBO, Ken NOMURA, Toshiyuki TAKEDA, Hidetoshi UEKUSA and Nobuhiro KITA

(キーワード：ウリ類うどんこ病菌, DMI 剤耐性菌, *CYP51* 遺伝子, 遺伝子診断)

表-1 キュウリうどんこ病菌分離株における *CYP51* 遺伝子の推定アミノ酸置換と DMI 剤感受性の関係 (久保, 2007)

菌株 <sup>a)</sup>	推定アミノ酸置換	トリフルミゾール			トリアジメホン		
		MIC (ppm)	EC <sub>50</sub> (ppm)	Rf <sup>b)</sup>	MIC (ppm)	EC <sub>50</sub> (ppm)	Rf <sup>b)</sup>
IB6-5	A372G I374V V449L G461S	2.0	1.0	833.3	> 20	—	—
SG1-6		2.0	1.0	833.3	> 20	—	—
KN1-1		2.0	1.0	833.3	20	6.6	203.3
IB3-2	G461S	0.2	0.045	37.5	5	1.3	40.6
SG1-1	G461S	0.5	0.10	83.3	20	6.3	196.9
KN2-1	G461S	0.5	0.16	133.3	20	4.6	143.8
K-7-2		0.002	0.0012		0.05	0.032	

<sup>a)</sup> 2004年に採取したうどんこ病菌の単分生胞子分離菌株を供試した。感受性検定はリーフディスク法により行った。<sup>b)</sup> K-7-2菌株に対するEC<sub>50</sub>とのEC<sub>50</sub>の比。

前後の中等度耐性を示した菌株では G461S の 1 塩基変異のみであることが明らかになった (表-1)。

他の DMI 剤耐性菌株について同様の解析を行った結果、耐性菌のほとんどで 4 塩基置換または 1 塩基置換が認められた (久保ら, 2006 b)。このように、DMI 剤耐性菌には大きく分けて耐性程度の高い系統と低い系統の二つの型があり、それぞれ *CYP51* 遺伝子の 4 または 1 箇所に塩基置換が存在していることがわかった。また、結核菌 *CYP51* タンパク質の 3 次元立体構造 (Podust et al., 2001) に、今回明らかになった置換アミノ酸残基の位置をあてはめてみたところ、いずれの変異とも基質または薬剤結合部位周辺に存在することが明らかになった (口絵)。このことから、DMI 剤耐性キュウリうどんこ病菌では、標的酵素と DMI 剤との結合力が低下するために耐性が発達するものと考えられた (久保, 2007)。

## II ウリ類うどんこ病菌の DMI 剤耐性菌

### 1 *CYP51* 遺伝子からみた DMI 剤耐性菌

今回供試した菌株 IB6-5 および IB3-2 は茨城県、SG1-1 および SG1-6 は佐賀県、KN1-1 および KN2-1 は神奈川県で採取されたものであることから、4 塩基置換型および 1 塩基置換型の二つの DMI 剤耐性菌が各地に分布していることは明らかである。浅利ら (1994) によると、1994 年時点では、DMI 剤耐性キュウリうどんこ病菌に対する EC<sub>50</sub> 値の平均は、トリフルミゾールでは 0.32 ppm、トリアジメホンでは 2.4 ppm、Rf 値の平均はトリフルミゾールで 18、トリアジメホンで 75 を示した。当時、トリフルミゾールに対する感受性低下は他剤に比較して小さい傾向にあったため、効果的な薬剤と

してトリフルミゾールがより頻繁に使用される傾向にあった。これらの状況から考えて、1994 年当時の耐性菌は 1 塩基置換型であったが、その後トリフルミゾールの継続的な使用により、さらに感受性が低下した 4 塩基置換型菌株が選抜されたものと推定される。

### 2 神奈川県内の DMI 剤耐性菌発生状況

神奈川県内における耐性菌分布を推定するために、施設キュウリおよび露地カボチャから採取したうどんこ病菌を供試し、PCR とダイレクトシーケンシングにより *CYP51* 遺伝子配列を調べ、変異型および野生型の識別を行った (表-2)。その結果、供試したウリ類うどんこ病菌からは感受性型塩基配列は検出されなかった。施設キュウリから採取したうどんこ病菌は、作付け前半の 3 月下旬は中等度耐性を示す 1 塩基置換型が多かったが、作付け後半の 5 月下旬に採取した菌はほとんどが高度耐性を示す 4 塩基置換型となっていた。露地カボチャで生育後半の 6 月下旬に採取したうどんこ病菌では、ほとんどが中等度耐性を示す 1 塩基置換型であった。また、うどんこ病単一病斑から葉組織を含んだまま抽出した全 DNA を鋳型に用いても、1 塩基置換型および 4 塩基置換型の両方が検出される事例があることから、現場では DMI 剤中等度および高度耐性の 2 系統のうどんこ病菌が混在しているものと考えられた。

## III PCR による耐性菌の診断

PCR による簡易診断法を開発するために、DMI 剤高度耐性菌に認められる四つの塩基変異のうち、1,225 番目の塩基および 1,492 番目の塩基が 3' 末端にくるようにプライマーを設計し、耐性菌および感受性菌の PCR に

表-2 神奈川県内で採取したウリ類うどんこ病菌における *CYP51* 遺伝子の塩基型

番号	採取場所	宿主	採取時期 <sup>a)</sup>	<i>CYP51</i> 遺伝子の塩基型 <sup>b)</sup>		
				感受性型	中等度耐性型	高度耐性型
1	平塚市 1			-	+	-
2	平塚市 2			-	+	-
3	平塚市 3	キュウリ	3月下旬	-	+	-
4	平塚市 4			-	+	-
5	平塚市 5			-	-	+
6	平塚市 6			-	-	+
7	平塚市 1			-	+	+
8	平塚市 7			-	-	+
9	平塚市 8			-	-	+
10	伊勢原市			-	-	+
11	藤沢市 1	キュウリ	5月下旬	-	-	+
12	藤沢市 2			-	-	+
13	綾瀬市			-	+	+
14	鎌倉市			-	-	+
15	大磯町			-	-	+
16	平塚市 1	キュウリ	6月上旬	-	+	+
17	平塚市 7			-	-	+
18	三浦市 1			-	+	-
19	三浦市 2			-	+	-
20	三浦市 3			-	+	-
21	三浦市 4			-	+	-
22	三浦市 5			-	+	-
23	三浦市 6			-	+	+
24	三浦市 7	カボチャ	6月下旬	-	-	+
25	三浦市 8			-	+	-
26	三浦市 9			-	+	-
27	三浦市 10			-	+	-
28	横須賀市 1			-	+	-
29	横須賀市 2			-	+	-
30	横須賀市 3			-	+	-
31	横須賀市 4			-	+	-

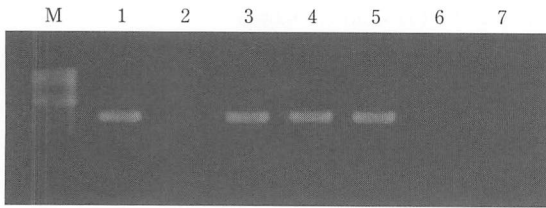
a) いずれも 2006 年に実施した。 b) 検出：+，未検出：-で示した。

よる検出を試みた(野村ら, 2006)。プライマーセット R1 では高度耐性菌株にのみ *CYP51* 遺伝子断片の増幅が見られ、プライマーセット S1 では感受性菌株にのみ増幅が見られた。これらの増幅産物の配列を特定したところ、目的とする *CYP51* 遺伝子の配列と相同であった。これらのプライマーセットを用いた DMI 剤耐性菌検出の、抽出した全 DNA に対する適応性を調べた。まず、うどんこ病菌の単一病斑約 0.01 g を切り抜いて 2 ml のエッペンドルフチューブに回収、ビーズを入れて凍結し、破碎機にて 2 分間破碎した。CTAB 抽出液 300  $\mu$ l を加えて混合し、50℃で 10 分間加熱後、フェノール・クロロホルム抽出を行った。DNA をエタノール沈殿後 20  $\mu$ l の TE に溶解して PCR のための試料とした。抽出

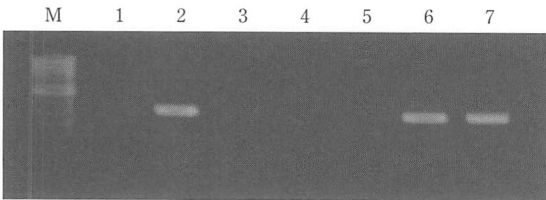
した全 DNA を鋳型に PCR を行った結果、4 塩基置換型の高度耐性菌と感受性菌をそれぞれ検出することができた(図-1)。

### おわりに

浅利ら(1994)は、DMI 剤耐性のキュウリうどんこ病菌であっても DMI 剤の使用を中止すると集団として感受性に戻ると報告している。P-450<sub>14DM</sub> は菌の生存に不可欠なエルゴステロールをはじめとするステロール合成に関与する。このため、耐性菌は薬剤が使用されている間は感受性菌より優勢となるが、薬剤の選択圧がなくなれば劣勢になると考えられる。実際、*Candida albicans* では基質結合部位のアミノ酸が置換することで P-



(a) DMI 剤耐性キュウリうどんこ病菌の *CYP51* 遺伝子のプライマーセット R1 を用いた PCR による検出



(b) DMI 剤感受性キュウリうどんこ病菌の *CYP51* 遺伝子のプライマーセット S1 を用いた PCR による検出

図-1 キュウリうどんこ病菌 *CYP51* 遺伝子の PCR による検出

レーン 1：耐性菌 (IB6-5) プラスミドクローン，2：感受性菌 (K-7-2) プラスミドクローン，3：耐性菌 (IB6-5)，4：耐性菌 (KN1-1)，5：耐性菌 (KN1-4)，6：感受性菌 (K-7-2)，7：感受性菌 (S231)。

45014DM と薬剤の結合能だけでなく基質との結合能が低下し、本来必要な酵素活性が低下する (Kudo et al., 2005)。しかし、今回供試したキュウリうどんこ病菌の DMI 剤耐性菌と感受性菌とでは、生育スピードなどにおいて大きな違いは観察されなかった。*CYP51* 遺伝子に変異をもつ耐性菌では *CYP51* 遺伝子発現が増加する傾向があるため、酵素活性の低下を発現量でカバーしている可能性は否定できない (久保, 2007)。このため、DMI 剤を使用しないと選択圧がかからないため感受性が戻ることもありうるが、限定的な現象であると推察さ

れる。いずれにしても、DMI 剤の使用を再開すると耐性菌が再び優占してしまう可能性が高いので、使用薬剤の選択には十分な注意が必要である。

病原菌の薬剤感受性の調査にはリーフディスク法などを用いた生物検定が一般的であるが、うどんこ病菌は人工培地上での培養が不可能であり、植物の育成、管理および検定には多くの労力や時間が必要となる。今回開発した簡易診断法により、ウリ類うどんこ病の単一病斑から PCR によって DMI 剤高度耐性菌 (4 塩基置換型) を検出することが可能となった。1 塩基置換型の中度耐性菌については、まだ PCR による検出は難しいが残された課題として今後取り組みたい。

なお、本研究は、農林水産省「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」による研究成果である。

## 引用文献

- 1) AOYAMA, Y. et al. (1996): J. Biochem. (Tokyo) **119**: 926 ~ 933.
- 2) 浅利 寛ら (1994): 関東東山病虫研報 **41**: 69 ~ 75.
- 3) DELYE, C. et al. (1997): Gene **195**: 29 ~ 33.
- 4) ——— et al. (1998): Curr. Genet. **34**: 399 ~ 403.
- 5) HAMAMOTO, H. et al. (2000): Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3421 ~ 3426.
- 6) 久保深雪ら (2006 a): 日植病報 **72**: 37 (講要).
- 7) ———ら (2006 b): 同上 **72**: 273 (講要).
- 8) ——— (2007): 第 17 回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講要集: 61 ~ 68.
- 9) KUDO, M. et al. (2005): J. Biochem. (Tokyo) **137**: 625 ~ 32.
- 10) MARICHAL, P. et al. (1999): Microbiology **145**: 2701 ~ 2713.
- 11) 中澤靖彦ら (1991): 日植病報 **57**: 431 ~ 434.
- 12) ———ら (1994): 植物防疫 **48**: 270 ~ 272.
- 13) 新見昌一ら (2005): Jpn. J. Med. Mycol. **46**: 249 ~ 260.
- 14) 野村 研ら (2006): 日植病報 **72**: 273.
- 15) OHTSUKA, N. et al. (1988): Ann. Phytopath. Soc. Japan **54**: 629 ~ 632.
- 16) 大塚範夫ら (1988): 日植病報 **54**: 389 (講要).
- 17) PODUST, L. M. et al. (2001): Proc. Natl. Acad. Sci. **98**: 3068 ~ 3073.
- 18) SCHNABEL, G. and A. L. JONES (2001): Phytopathology **91**: 102 ~ 110.
- 19) 竹内妙子・村井明夫 (1988): 日植病報 **54**: 389 (講要).
- 20) 武田敏幸ら (2007): 植物防疫 **61**: 410 ~ 412.