

# 食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

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	研究代表者 奥野哲郎（農学部・教授） 研究者分担者 原田 賢（農学部・助手）
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
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. 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開発にとって非常に重要である。そこで、申請者らは、イネいもち病やごま葉枯病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浸透性薬剤フェリムゾンに着目した。フェリムゾンは、イネいもち病菌に対して静菌的に作用し、呼吸を阻害せず、生体高分子の生合成代謝にほとんど影響しないが、細胞膜に作用し、膜透過性に影響を与えることが報告されている。本研究では、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、アグロバクテリウム形質転換法を用い、イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) とウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) に 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。菌糸生育において耐性を示した菌株を多数作出し、それらの遺伝子をいくつか同定する。次年度は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 (AtMT 法) によるイネいもち病菌とウリ類炭疽病菌への T-DNA 挿入条件の検討。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) 候補遺伝子導入による相補株の作成。7) 破壊株の菌糸生育、孢子形成、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。9) 薬剤ターゲット分子あるいは代謝経路の提示。

## 2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

### AtMT 法による T-DNA 挿入変異株の作出

イネいもち病菌とウリ類炭疽病菌において本研究目的に適した菌株を検討し、イネいもち病菌では P-2 株、ウリ類炭疽病菌では 104-T 株を選抜した。次に AtMT 法による 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。これまでにハイグロマイシン耐性を指標に約 7000 の T-DNA 挿入ウリ類炭疽病菌変異株を作出した。フェリムゾン(10-20  $\mu$ g/ml)含有ポテトデキストロース培地(PDA)での菌糸生育においてフェリムゾン感受性が低下、すなわち野生株に対して菌糸生育が旺盛な 22 菌株を取得した。それらの株における T-DNA 挿入部位と挿入により遺伝子発現が影響を受けると予想される遺伝子を表 1 に示す。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、より効率の良い条件を検討中である。

表 1. フェリムゾン耐性ウリ類炭疽病菌候補株:T-DNA 挿入部位と影響を受けると推定される遺伝子

T-DNA insertion line	Putative T-DNA insetion site	Putative T-DNA taged gene	Blast hit description
FT1	Cob_09448: uostream 327bp	Cob_09448	apses transcription factor
FT2	Cob_11293: upstream 192bp	Cob_11293	ABC fatty acid
FT3	Cob_03946: upstream 175bp	Cob_03946	alcohol dehydrogenase i
FT4	Cob_09448: downstream 67bp	Cob_09448	apses transcription factor
FT5	Cob_06075: ORF	Cob_06075	integral membrane protein
FT6	Cob_07328: upstream 827bp	Cob_07328 or Cob_07329	sexual development activator
	Cob_07329: downstream 517bp		hypothetical protein
FT7	Cob_00500: upstream 957bp	Cob_00500 or Cob_00501	f-box domain protein
	Cob_00501: upstream 2115bp		hypothetical protein
FT8	Cob_00162: upstream 325bp	Cob_00162	CCAAT-binding factor complex subunit
FT9	Cob_12260: OPF	Cob_12260	protein kinase domain protein
FT10	Cob_12498: downstream 197bp	Cob_12498	tripeptidyl peptidase a
FT11	Cob_03377: downstream 215bp	Cob_03377	hypothetical protein
FT12	Scaffold_409: 378,907		
FT13	Cob_00044: ORF	Cob_00044	nadh-ubiquinone oxidoreductase subunit grim-19
FT14	Scaffold_219: 333,547		
FT15	Cob_13449: upstream 194bp	Cob_13449	hypothetical protein
FT16	Cob_02771: upstream 691bp	Cob_02771	tat pathway signal sequence
	Cob_02772: upstream 781bp	Cob_02772	extracellular exo-polygalacturonase, putative
FT17	Cob_00974: upstream 583bp	Cob_00974	homocitrate synthase
FT18	Cob_09898: upstream 802bp	Cob_09898	hypothetical protein
FT19	Cob_04935: ORF	Cob_04935	myosin type ii heavy chain
FT20	Cob_09217: downstream 461bp	Cob_09217	dynactin subunit 5
FT21	Cob_10518: downstream 875bp	Cob_10518	hypothetical protein
FT22	Cob_11716: ORF	Cob_11716	iron copper transporter

### T-DNA 挿入変異株と変異遺伝子の解析

興味深いことに、フェリムゾン耐性候補菌株の多くは菌糸コロニーでの色素生成、胞子形成、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。耐性候補株としてリストアップされた 22 株中 FT1, FT2, FT3, FT4, FT5, FT8, FT9, FT13, FT17, FT20, FT22 の 10 株については候補遺伝子をハイグロマイシン遺伝子と置換した破壊株を作成することに成功し、候補遺伝子とフェリムゾン耐性の関係を調べた。その結果、FT2, FT3, FT5, FT8, FT9, FT13, FT17, FT20 株では候補遺伝子を破壊してもフェリムゾン耐性を示さなかった。考えられる原因としては、T-DNA 挿入遺伝子以外の遺伝子で変異が起きたセクター株をフェリムゾン培地上で選抜した可能性、あるいは T-DNA 挿入がフェリムゾン感受性低下に関わる他の遺伝子の発現に影響を及ぼした可能性が考えられる。実際、T-DNA 挿入により標的遺伝子の隣接の遺伝子の発現低下が起きることがシロイヌナズナで報告がされている。

一方、FT1, FT4 と FT22 においては候補遺伝子のハイグロマイシン遺伝子との相同組み換えによる遺伝子破壊株 ( $\Delta costuA$  と  $\Delta coict1$ ) はそれぞれ FT1, FT4 と FT22 と同様の表現型を示した。また、 $\Delta costuA$  と  $\Delta coict1$  への野生型遺伝子導入

による相補株を作成したところ、野生株と同様の表現型に復帰したので、 $\Delta costuA$  と  $\Delta coict1$ それぞれで破壊された遺伝子 APSES ファミリーに属する転写因子 *CoSTUA* と *CoICT1*(iron copper transporter)がフェリムゾン感受性低下に関わることが明らかになった。さらに *CoSTUA* の相補実験において、孢子形成とメラニン化は野生型と同様であるが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数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。 $\Delta costuA$  と *CoSTUA(-G)c* で共通して発現量が減少する遺伝子の中に付着器形成に関連して発現する *CAD1* 遺伝子が存在した。そこで、*CAD1* 遺伝子の破壊株を作成しフェリムゾン耐性と病原性試験を行った。しかし、*CAD1* 遺伝子破壊株は野生型と同様の表現型を示し、フェリムゾン耐性には関連しないことが示唆された。RNAseq で得られた多くの遺伝子が機能未知の hypothetical protein でもあるため、現在、新たなデータベースの利用を含めさらなる解析を試みている。

#### 銅トランスポーターのフェリムゾン耐性と病原性との関係

FT22 での変異遺伝子 *CoICT1* は銅結合ドメインを持つ銅トランスポーター *CoIct1* をコードする遺伝子である。*CoICT1* 破壊株 ( $\Delta coict1$ ) はフェリムゾン (20  $\mu\text{g/ml}$ ) 含有 PDA 培地でフェリムゾン無添加培地とほぼ同等のコロニー生育を示した (図 1)。

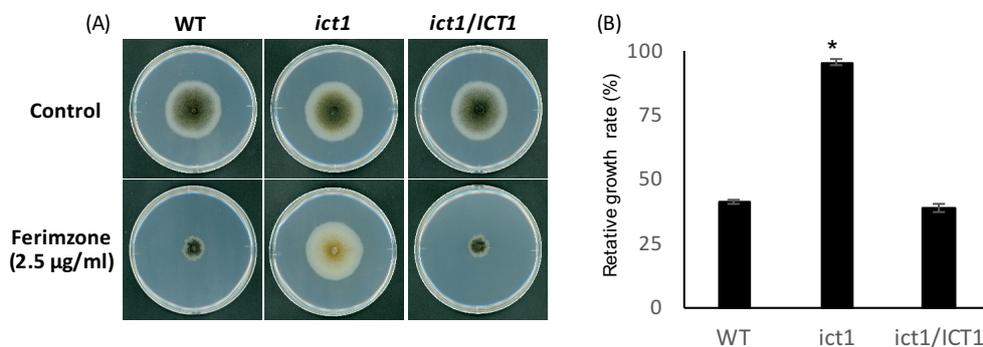


図 1. *CoICT1* 破壊株のフェリムゾン感受性. (A) PDA 培地で培養 6 日後の菌叢. (B) コントロールの菌叢直径に対するフェリムゾン添加培地での菌叢直径の比. WT: 野生株、*ict1*: *CoICT1* 破壊株、*ict1/ICT1* (*CoICT1* 相補株)

$\Delta coict1$  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。また、 $\Delta coict1$  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。さらに、イネいもち病菌で同遺伝子のオルソログ遺伝子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。

*CoIct1N* 末端のアミノ酸配列 MSCGGC(12-17aa) の M12, S13, C14, C17 は InterPro 検索より銅結合部位として推定されている。そこで、本領域のアミノ酸をアラニンに置換した一アミノ酸変異株 (M12A, S13A, C14A, C17A) を作出し、本結合部位のフェリムゾン感受性への関与を調べた。S13A を除く一アミノ酸変異株はフェリム

ゾン含有培地で顕著なコロニー生育を示し、フェリムゾン感受性に *CoIct1* の銅結合部位が必要であることが分かった。

次に、出芽酵母における *CoIct1* のホモログ *Atx1* は銅シャペロンタンパク質 *Ccc2* に銅イオンを輸送することから、ウリ類炭疽病菌の *CoCcc2* を破壊した *coccc2* 株を作成しフェリムゾン感受性検定を行った。*coccc2* 株はフェリムゾン含有培地上で野生株と同等の菌糸生育を示し、フェリムゾン感受性因子として *CoCCC2* を同定した。

*CoICT1* や *CoCCC2* などの銅トランスポーターは細胞内の銅の恒常性に関わると考えられる。そこで、ウリ類炭疽病菌野生株と *coict1* 株の菌糸生育におけるフェリムゾン感受性に及ぼす硫酸銅添加の影響を調べるとともに、菌糸乾重量あたりの銅含量を測定した。硫酸銅 (10  $\mu$ M) 添加は野生株と *coict1* 株の菌糸生育には影響しなかった。ただし、興味深いことに銅含有培地では *coict1* 株は野生株とほぼ同等のフェリムゾン感受性を示した (図 2)。

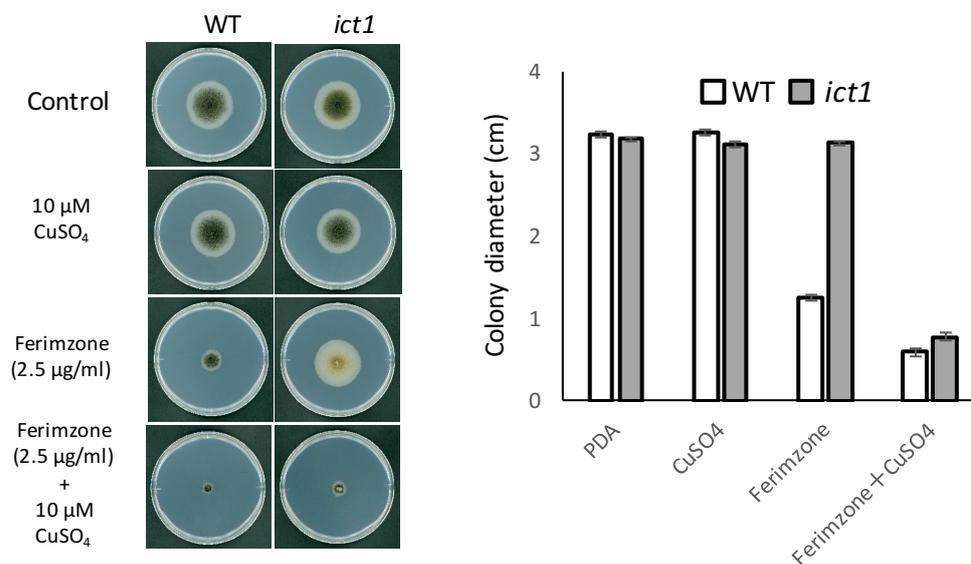


図 2. 銅添加培地における *CoICT1* 破壊株のフェリムゾン感受性. PDA 培地で培養 6 日後の菌叢写真 (左) と菌叢直径 (右). WT: 野生株、*ict1*: *CoICT1* 破壊株

液体培養菌糸を用い ICP 発光分析装置により菌糸の銅含量を測定したところ、銅 (10  $\mu$ M) 添加により銅含量は野生株と *coict1* 株いずれにおいても 4-5 倍増大した。銅含有量は、銅添加、無添加、フェリムゾン添加、無添加いずれにおいても *coict1* 株が野生株よりわずかに低い傾向を示した。しかし、興味深いことに、銅とフェリムゾンを同時に添加した場合は *coict1* 株の銅含量が野生株のほぼ倍に達した。この増加がフェリムゾン存在下での菌糸生育阻害、すなわちフェリムゾン感受性の増大の 1 つの要因であるのかもしれない。

### フェリムゾンはイネいもち病菌の栄養菌糸先端の活性酸素種 (ROS) 産生を抑制する

イネいもち病菌における ROS 産生は菌糸伸長のシグナルとして知られている。フェリムゾン処理したイネいもち病菌の菌糸生育は阻害されることから、生育菌糸先端の ROS 産生を nitroblue tetrazolium (NBT) 染色を用いて調べた。フェリムゾン (20  $\mu$ g/ml) 処理した栄養菌糸先端の NBT 染色率は無処理区と比較し、顕著に低下した (図 3)。このことから、フェリムゾンはイネいもち病菌の栄養菌糸先端の ROS 蓄積に影響することが示唆された。

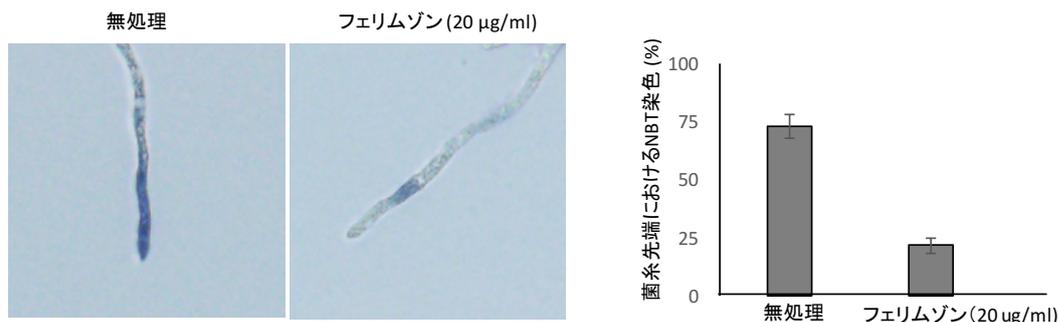


図3. フェリムゾン処理下におけるイネいもち病菌の栄養菌糸先端のROS産生

いもち病菌胞子を0.1% yeast extract液でカバーガラス上、28℃、24時間培養後、0.05% NBTで30分染色した。

### フェリムゾンはいもち病菌菌糸の細胞膜におけるエンドサイトーシスの機能を低下させる

フェリムゾンはいもち病菌菌糸の細胞膜機能に影響し、菌糸生育において静菌的に作用すると考えられている。そこで、いもち病菌栄養菌糸細胞膜のエンドサイトーシス機能に及ぼすフェリムゾンの影響について調べるため膜に可逆的に挿入される脂質結合染色化合物 FM4-64 を用いその挙動を観察した。イネいもち病菌胞子を yeast extract (0.1%) を含む滅菌水 (YDW)、およびフェリムゾン (20 µg/ml) を含む YDW で 24 時間培養後、FM4-64 で染色し、菌糸先端から 15 µm の領域において蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (Leica MICROSYSTEMS TCS SP8) で観察した。フェリムゾン無処理の栄養菌糸では細胞膜と膜内で赤色蛍光が見られた (図4)。一方、フェリムゾン処理の栄養菌糸では主に細胞膜で赤色蛍光が見られ、細胞膜内で蛍光が観察される割合は無処理区と比べて少なかった (図4)。菌糸先端から 15 µm の領域における細胞内の FM4-64 蛍光強度を測定した結果、フェリムゾン処理区の蛍光強度は無処理区と比較して顕著に低かった。このことからフェリムゾンはイネいもち病菌の栄養菌糸におけるエンドサイトーシスを阻害することが示唆された。

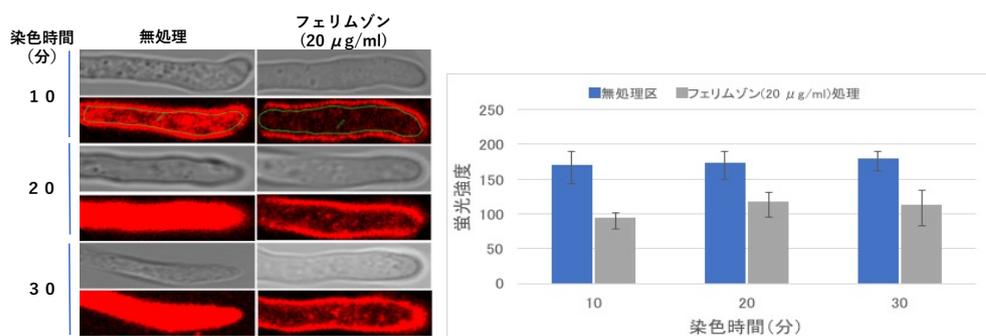


図4. イネいもち病菌胞子を yeast extract (0.1%) を含む滅菌水 (YDW) およびフェリムゾン (20 µg/ml) を含む YDW で 24 時間培養後、FM4-64 で染色し、菌糸先端から 15 µm の領域において蛍光を観察した。

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感受性に銅輸送経路、活性酸素発生経路、エンドサイトーシスなどの膜輸送系が関与することが分かった。また、これまでに本研究で得られたフェリムゾン耐性ウリ類炭疽病菌株とイネいもち病菌株は、菌糸コロニーでの色素生成、胞子形成、付着器のメラニン化など病原性発現において重要ないずれかの性質を欠損していた。このことから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。

#### 4. 研究発表等(研究代表者及び研究分担者)

学会発表・発表論文・著書・学外資金獲得状況 等

##### <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関与する

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関係性

末森 彩洋子, 峯 彰, **奥野 哲郎**, 竹田 篤史

AGO2 発現誘導に必要な RCNMV 因子に関する研究

兵頭究, 鈴木信弘, **奥野哲郎**

宿主足場タンパク質 RACK1 は植物 RNA ウイルスの増殖を正に制御する

日本植物病理学会関西部会 (2018年9月 山口)

兵頭究, 鈴木信弘, **奥野哲郎**

宿主足場タンパク質 RACK1 のハイジャックによる植物ウイルス増殖機構

日本農薬学会 (2019年3月 名古屋)

**原田 賢, 奥野哲郎**

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合成の関係

日本植物病理学会 (2019年3月 つくば)

**原田 賢, 奥野哲郎**

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

##### <発表論文(査読有り)>

Hyodo K, Suzuki N, Mise K, **Okuno T**. Roles of superoxide anion and hydrogen peroxide during replication of two unrelated plant RNA viruses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Signal Behav.* 12(6): e1338223, 2017.

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.

Kiwamu Hyodo, Nobuhiro Suzuki and **Tetsuro Okuno**. Hijacking a host scaffold protein, RACK1, for replication of a plant RNA virus. *New Phytologist*, 221(2):935-945, 2018.

[10.1111/nph.15412](https://doi.org/10.1111/nph.15412)

**Ken Harata**, and **Tetsuro Okuno**. Threonine synthase *CoTHR4* is involved in infection-related morphogenesis during the pre-penetration stage in *Colletotrichum orbiculare*. *Microbial Pathogenesis* 137 (2019). [10.1016/j.micpath.2019.103746](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103746)

---

### <学外資金獲得状況>

2015 年度-2017 年度 科学研究費基盤研究 B（一般）研究代表 奥野哲郎

「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」

2018 年度-2020 年度 科学研究費基盤研究 C（一般）研究代表 奥野哲郎

「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」