

氏名	よし 吉	み 見	あきら 啓
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 1554 号		
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科・専攻	農学研究科地域環境科学専攻		
学位論文題目	Studies on dicarboximide fungicide resistance and osmoregulatory signaling system in <i>Cochliobolus heterostrophus</i> (トウモロコシごま葉枯病菌におけるジカルボキシイミド系殺菌剤耐性と浸透圧調節情報伝達系に関する研究)		
論文調査委員	(主査) 教授 二井 一 禎	教授 東 順 一	教授 渡邊 隆 司

論 文 内 容 の 要 旨

ジカルボキシイミド剤は、果菜類の灰色かび病をはじめとする多くの植物病害の防除に卓効を示す殺菌剤である。しかし、近年、本剤に対する耐性菌が出現し、病害防除上大きな問題となっている。これまで、本剤の作用機作は、芳香族塩素系の殺菌剤と同じく活性酸素種の生成に基づくとされてきた。また、耐性機構については、活性酸素種代謝系の関与が考えられてきた。これは、本剤に対する耐性菌が芳香族塩素剤との交差耐性を示すことや、耐性菌においてカタラーゼ活性の上昇が認められることが根拠として挙げられている。一方、アカパンカビなどの本剤に対する耐性株は、浸透圧感受性（高浸透圧下での生育が抑制される性質）を併せ持つことが知られている。このことから、菌類の浸透圧調節システムと本剤耐性化との間には何らかの関係があると思われた。本論文は、トウモロコシごま葉枯病菌を供試して、菌の浸透圧応答シグナル伝達系と薬剤耐性との関係について研究し、植物病原菌のジカルボキシイミド剤耐性機構を明らかにするとともに、本剤の作用機作の解明に新たな展開をもたらせたものである。これらの研究の主な内容は次のとおりである。

第 2 章では、トウモロコシごま葉枯病菌のジカルボキシイミド剤耐性株の性状および耐性遺伝子の遺伝様式を調査した。まず、化学突然変異原処理により、本菌の耐性株を分離し、その表現型を解析した。その結果、本菌の耐性株は全て浸透圧感受性を併せ持つことが明らかになった。また、他薬剤との交差耐性について調査し、本剤耐性株がフェニルピロール系の殺菌剤と正の交差耐性を示すことを明らかにした。次に、交配実験による遺伝解析を行い、本菌におけるジカルボキシイミド剤耐性および浸透圧感受性には、少なくとも 3 種の遺伝子 (*Dic1*, *Dic2* および *Dic3*) が関与しており、本剤耐性と浸透圧感受性が同一遺伝子に支配されていることを明らかにした。このことから、本菌の浸透圧調節機構を理解することによって、ジカルボキシイミド剤の本菌に対する作用機作や、耐性菌の同剤に対する耐性機構に関する知見が得られるものと考えた。

そこで、第 3 章では、菌類の浸透圧センサーと考えられているヒスチジンキナーゼについて研究を行った。トウモロコシごま葉枯病菌のヒスチジンキナーゼ遺伝子をクローニングし、本遺伝子と第 2 章で同定したジカルボキシイミド剤耐性および浸透圧感受性に関与する遺伝子の関係を調査した結果、*Dic1* 遺伝子がヒスチジンキナーゼをコードしていることが判明した。また、ヒスチジンキナーゼ遺伝子の構造解析から、*Dic1* は、HAMP ドメインリピートと呼ばれる構造を持つ糸状菌に特異的なヒスチジンキナーゼであることが明らかになった。さらに、数種の *dic1* 変異株における本遺伝子上の変異を同定することによって、機能未知であった HAMP ドメインがヒスチジンキナーゼの機能に必須であることを見出した。

第 4 章では、菌類の浸透圧応答に関与すると考えられている HOG 経路について調査した。出芽酵母の HOG 経路は、細胞内シグナル伝達に関与する酵素群のうち MAPK である Hog1, MAPKK である Pbs2, MAPKKK である Ssk2/Ssk22 より構成されている。トウモロコシごま葉枯病菌において、これらの酵素に相同のタンパク質をコードする遺伝子 (*BmHog1*, *BmPbs2* および *BmSsk2*) をクローニングし、各遺伝子の破壊株を作出した。これらの破壊株のうち *BmHog1* および *BmPbs2* 破壊株がジカルボキシイミド剤耐性を示したことから、トウモロコシごま葉枯病菌の HOG 経路は本剤耐

性に関与していることが明らかになった。また、活性化型 MAPK を特異的に認識する抗体を用いたウエスタン解析により、ジカルボキシイミド剤が高浸透圧刺激と同様に HOG 経路を活性化することを明らかにした。一方、*BmSsk2* 遺伝子については、その破壊株と野生型株との間に表現型の差異が認められなかったことから、トウモロコシごま葉枯病菌は Ssk2 型 MAPKKK と機能的に重複する別のタンパク質を有していることが示唆された。

第 5 章では、ヒスチジinkinナーゼと HOG 経路との関係を分析した。*dic1* 遺伝子非発現株における HOG 経路の活性化様式を解析し、Dic1 が HOG 経路の活性化を正に制御することおよびジカルボキシイミド剤が Dic1 を介して HOG 経路を異常活性化させることを示した。さらに、高濃度の薬剤あるいは高浸透圧刺激により、HOG 経路の活性化を制御する別の因子の存在を明らかにした。また、モデル糸状菌であるアカパンカビを供試した研究においても同様の結果が得られたことから、一般的に、糸状菌では、Dic1 型のヒスチジinkinナーゼが HOG 経路の活性を制御しており、ジカルボキシイミド剤が糸状菌の HOG 経路を異常に活性化させることが示唆された。

本研究により、ジカルボキシイミド剤は糸状菌の浸透圧応答シグナル伝達系を攪乱することによって抗菌性を発現していることが示唆された。従来、菌類のシグナル伝達系に作用する殺菌剤は知られておらず、本剤が新たな作用機作のカテゴリーに分類される殺菌剤であることが明らかになった。また、浸透圧応答シグナル伝達系に関与する遺伝子の変異が本剤に対する耐性化を引き起こし、同時に浸透圧感受性をもたらすものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

1970年代に開発されたジカルボキシイミド剤は灰色かび病をはじめとする様々な植物病害の防除に有効な殺菌剤である。しかし、本剤が広範に利用されるようになって間もなく、国内外を問わず耐性菌が確認されるようになり、防除効果の低下をもたらしている。このような背景から、ジカルボキシイミド剤の作用機作および耐性機構に関する研究は数多くなされてきたが、全容の解明には至っていない。本論文は、菌類の浸透圧応答シグナル伝達系とジカルボキシイミド剤耐性との関係に着目し、植物病原菌の本剤耐性メカニズムを明らかにしただけでなく、本剤の作用機作をも解明したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ジカルボキシイミド剤耐性菌における浸透圧感受性がトウモロコシごま葉枯病菌に認められることを見出し、本菌の浸透圧調節に関与する複数の遺伝子がジカルボキシイミド剤耐性を支配していることを示した。
2. トウモロコシごま葉枯病菌のジカルボキシイミド剤耐性株が、フェニルピロール剤と交差耐性を示すことを明らかにした。これは、構造的に異なる両系統の薬剤が同様の作用性を有することを示唆するものである。
3. トウモロコシごま葉枯病菌からヒスチジinkinナーゼ遺伝子を単離し、その機能解析を行うことによって、ヒスチジinkinナーゼがジカルボキシイミド剤耐性に関与することを明らかにした。また、糸状菌のヒスチジinkinナーゼに特異的な HAMP ドメインが本酵素の機能に必須であることを見出した。
4. トウモロコシごま葉枯病菌において、菌類の浸透圧応答に関与すると考えられている HOG 経路に関与する遺伝子の機能解析を行い、本経路がジカルボキシイミド剤耐性にも関与していることを明らかにした。また、ジカルボキシイミド剤が HOG 経路の異常活性化を引き起こすことを初めて明らかにした。
5. トウモロコシごま葉枯病菌において、従来、糸状菌では知られていなかった Ssk2 型 MAPKKK の機能に重複する別のタンパク質の存在を示した。
6. トウモロコシごま葉枯病菌およびアカパンカビにおいて、ヒスチジinkinナーゼと HOG 経路の関係を解析し、糸状菌におけるヒスチジinkinナーゼを介した HOG 経路の制御様式を初めて明らかにした。また、HOG 経路の活性を制御する別経路の存在を示した。
7. ジカルボキシイミド剤がヒスチジinkinナーゼを介して HOG 経路の異常活性化を引き起こすことを明らかにした。これは、本剤が糸状菌の浸透圧応答シグナル伝達経路を攪乱することを示唆しており、本剤が新たな作用機作のカテゴリーに分類される殺菌剤であることが明らかになった。
8. 糸状菌におけるジカルボキシイミド剤耐性化の要因が浸透圧応答シグナル伝達系に関与する遺伝子の機能不全によることを明らかにした。

以上のように、本論文は植物病原菌のジカルボキシイミド剤耐性と浸透圧応答機構との関係を解明するとともに本剤の作用機作を解明したものであり、微生物環境制御学、植物病理学、農薬学などに寄与するところが大きい。また、糸状菌の浸透圧応答シグナル伝達経路の制御様式を解明したことは、菌類生理学にも大きく寄与するものである。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。