

イネいもち病菌の QoI 剤耐性変異に関する解析

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 応用分子微生物学 児玉 葵

1. はじめに

イネいもち病はイネの最重要病害である。その防除には殺菌剤が広く使用されているが、耐性菌が出現し問題になっている。近年開発された QoI 殺菌剤は、優れた薬効によりいもち病の防除において重要であるが、使用の開始からわずか数年で耐性菌の発生が相次いで報告された。本剤は電子伝達鎖に結合する呼吸阻害剤である。耐性化の原因はミトコンドリア *Cytb* 遺伝子の点変異 (G143A) であり、それに伴い薬剤との結合親和性が低下するためと考えられている。ミトコンドリアは各細胞内に多数存在しており、一つのミトコンドリア内にも複数の遺伝子コピーが存在する。本研究では、遺伝子 1 コピー内での突然変異発生から個体や集団が耐性形質を獲得する機構の解明を目的とした。

2. 方法

①QoI 耐性が表現型として顕在化するためには細胞中に耐性型ミトコンドリアが発生し、野生型ミトコンドリアに対しての存在割合を高める必要があると考えられる。そこで、QoI 剤に対する耐性/感受性の表現型と変異/通常ミトコンドリアの割合の相関解析のため、qPCR にて野生型、変異型のミトコンドリアを識別して定量する実験系を構築し、培養菌体内での割合変化を調べた。

②これまでの結果で、分生子と菌糸を繰り返すいもち病菌の無性生活環におけるミトコンドリアの挙動を解析するため、ミトコンドリアの活性に依存する特異的な生体染色試薬マイトトラッカーにより染色し検鏡したが、菌糸においては観察できたものの分生子においては明瞭なミトコンドリアを観察することができなかった。このことから、ミトコンドリアは分生子の発芽の前後で急速に数を増やし、分生子内ではごく少数であるか、ミトコンドリアの活性の低下により観察不可能であった可能性が考えられた。その検証の為、活性に依存しない緑色蛍光タンパク質 (GFP) によるミトコンドリア染色を試みた。

3. 結果と考察

①野生型、変異型 *Cytb* 遺伝子をクローニングしたものをスタンダードとして解析を行ったところ、野生型・変異型共に $10^4 \sim 10^8$ コピーにおいて定量性が認められた。この系を用いて日本国内の圃場で採取された菌株および実験室保有菌株より抽出した DNA を解析した結果、QoI 耐性菌においては変異ミトコンドリアの割合が野生型ミトコンドリアの少なくとも 10^3 倍以上であることが分かった。また、耐性菌を QoI 無添加培地で 63 日間、5 回継代した際の割合変化を調べたところ、耐性配列を有意に減少させないことが分かった。そこで、感受性菌と耐性菌の細胞融合により野生型、変異型 *Cytb* 遺伝子をほぼ半数ずつ持つキメラを作成した。今後、これを用いて、QoI 添加・無添加条件でのミトコンドリア DNA、表現型の変化を調べる事が可能である。

②核 DNA にコードされ、ミトコンドリアに局在するクエン酸合成酵素と GFP の融合タンパク質の発現ベクターの作成に成功した。今後、これをいもち病菌に形質転換し、顕微鏡により分生子を観察する予定である。