

イネもみ枯細菌病菌 *Burkholderia glumae* の oxolinic acid 耐性への GyrA タンパク質 83 番目のアミノ酸残基の関与と oxolinic acid 耐性株の生存適応

まえだ ゆきこ きば あきのり おおにし こうへい ひきち やすふみ

○ 前田 由紀子・木場 章範・大西 浩平*・曳地 康史

高知大学農学部植物工学研究室・*高知大学遺伝子実験施設

目的 *Burkholderia glumae* によってひきおこされるイネ苗腐敗症ともみ枯細菌病は、イネ生産に甚大な被害を及ぼす重要細菌病である。キノロン系薬剤 oxolinic acid (OA) は、種子処理と本田散布処理によって、それぞれ苗腐敗症ともみ枯細菌病に卓効を示すことから、近年、日本各地で使用されている。使用量の増加に伴い、OA 耐性菌の発生が報告されているが、耐性機構が未解明であるために、OA 耐性菌対策の開発が遅れている。本研究では、*B. glumae* 圃場分離株の OA 耐性機構を明らかにし、耐性株の生存適応能について考察する。

方法と結果 OA 耐性 *B. glumae* 35 圃場分離株は、OA の最小生育阻止濃度 (MIC) を基に、50 μ g/ml の中度耐性株 (MR) と 100 μ g/ml 以上の高度耐性株 (HR) に分別された。OA 感受性株 Pg-10 由来の *gyrA* で OA 耐性株を形質転換したところ、いずれも感受化した。*gyrA* の塩基配列解析の結果、GyrA タンパク質の 83 番目のアミノ酸残基 (GyrA83) が感受性株では Ser であったが、すべての MR と HR ではそれぞれ Arg と Ile に変異していた。Recombinant PCR により GyrA83 が Arg と Ile になるように対応する塩基に変異を導入した変異 *gyrA* をマーカーエクステンションにより感受性株ゲノムに導入したところ、OA の MIC はそれぞれ 50 μ g/ml と 100 μ g/ml となった。MR と HR から単離した *gyrA* に GyrA83 が Ser になるようにした変異 *gyrA* を MR と HR ゲノムに導入したところ、OA に対して感受化した。*in vitro* において感受性株から得られた MR と HR のうち多くの GyrA83 は、それぞれ Arg と Ile ではなかった。

考察 グラム陰性細菌のキノロン耐性の要因として、作用部位 DNA ジャイレースと薬剤の膜透過性の変異、および薬剤排出機構の活性化があげられる。DNA ジャイレースについて、構成タンパク質 GyrA にキノロン耐性に関わる領域 (Quinolone Resistance Determining Region, QRDR) があると報告されている。*B. glumae* 圃場分離株の OA 耐性とその程度は QRDR に存在する GyrA83 に依存することが明らかとなった。興味深いことに、*in vitro* 耐性菌の OA 耐性化は必ずしも GyrA83 のみに依存していないことが示された。*in vitro* 耐性株の多くは、OA 処理イネに感染した場合のみ、イネ体で増殖し病原性を示すことを先に報告した (Hikichi et al. 1998)。すなわち、OA 耐性株のうち、GyrA83 変異株のみがイネ体における生存適応を示し、他の耐性株は淘汰されると考えられる。GyrA83 に対応する塩基配列の違いを利用し、感受性菌、MR および HR 感染イネ種子を識別するために開発した PGSLM-MAMA PCR system (Maeda 2004ab) を用いて、MR と HR の環境適応について解析する予定である。

引用文献

Hikichi, Y. et al. (1998). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 147-152.

Maeda, Y. et al. (2004a). Appl. Environ. Microbiol., in press.

Maeda, Y. et al. (2004b). J. Gen. Plant Pathol. 70: 215-217.

e-mail: yhikichi@cc.kochi-u.ac.jp