

学会賞受賞論文

(奨励賞)

## 負相関交差耐性剤ジエトフェンカルブの作用機構

藤村 真

住友化学工業株式会社農業化学品研究所

### Mode of Action of Diethofencarb to Benzimidazole-Resistant Strains in *Neurospora crassa*

Makoto FUJIMURA

*Agricultural Chemicals Research Laboratory, Sumitomo Chemical Co., Ltd.,  
Takatsukasa, Takarazuka 665, Japan*

#### はじめに

ベノミル, カルベンダジム (MBC), チオファネートメチル, チアベンダゾール (TBZ) などのベンズイミダゾール系剤 (Fig. 1) は, 農業用殺菌剤として広く使用されているが, 灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) などにおいて耐性菌問題が世界的に深刻化している<sup>1)</sup>. Leroux・Gredt<sup>2)</sup> は, *N*-フェニルカーバメート系除草剤がベンズイミダゾール耐性菌に特異的に高い抗菌活性を示すことを報告した. このようにある薬剤に耐性になると, 逆に, 別の薬剤に対し感受性を示すようになる現象は, 負相関交差耐性と呼ばれている. 住友化学では, *N*-フェニルカーバメート誘導体を検索し負相関交差耐性剤ジエトフェンカルブ (Fig. 1) を開発した<sup>3-9)</sup>. 負相関交差耐性剤ジエトフェンカルブは, 耐性菌を積極的に低下させる役割を果たしており, チオファネートメチル (ゲッター®), プロシミドン (スミブレンド®), カルベンダジム (Sumico®) などとの合剤として使用されている. ジエトフェンカルブ剤はおもに灰色かび病防除剤として使用されているが, ベンズイミダゾールとジエトフェンカルブ間の負相関交差耐性は, *B. cinerea* に限らず, 多くの植物病原菌の圃場分離株に一般的に認められている現象である. 本稿では, *Neurospora crassa* を用いて解析したジエトフェンカルブの作用メカニズムおよび負相関交差耐性メカニズムについて述べる.

#### 研究手法と材料の選択

負相関交差耐性剤であるジエトフェンカルブの作用メカニズムはベンズイミダゾール耐性メカニズムと密接な関係があると考えられる. ベンズイミダゾール系化合物は, 微小管の構成蛋白質であるチューブリンに結合し, 細胞分裂等の阻害を引き起こすことが知られている<sup>10)</sup>. ベンズイミダゾール耐性は, ベンズイミダゾール系化合物のチューブリンに対する結合活性の低下が原因となっていることが *Aspergillus nidulans* を用いた解析より明らかにされた<sup>10)</sup>. また, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *A. nidulans* 等を材料にした研究により, ベンズイミダゾール耐性は多くの場合  $\beta$ -チューブリンの変異によることが報告されていた<sup>11-13)</sup>. そこで,  $\beta$ -チューブリンの変異であることが判明している *S. pombe*, *A. nidulans* および *N. crassa* のベンズイミダゾール耐性株を入手し, ジエトフェンカルブ感受性を調べた. しかし, いずれの株もジエトフェンカルブに感受性を示さず, 植物病原菌では一般的である負相関交差耐性を示すベンズイミダゾール耐性が,  $\beta$ -チューブリンの変異によって起こっているか否かについての結論を得ることはできなかった.

著者らは, この点をまず解明することが, ジエトフェンカルブの作用メカニズムの解明につながると考え, 生化学的手法よりもむしろ, 遺伝学的, 遺伝子工学的な手法を用いることを選択した. ただし, 多くの植物病原菌の場合には遺伝学的なバックグラウンドが乏しいこと

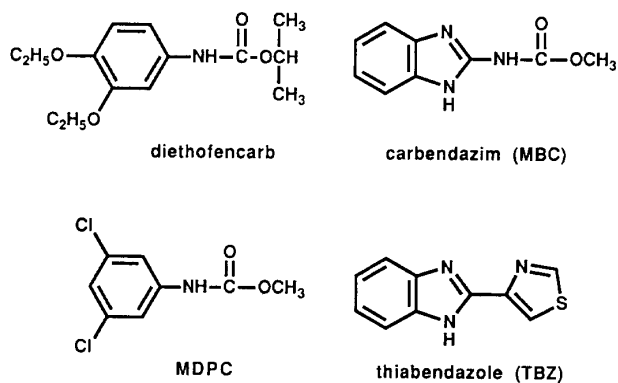


Fig. 1 The structural formulas of diethofencarb, MDPC, carbendazim and thiabendazole.

から、材料として適当でないと考えた。最初に、当時から遺伝子工学的手法がすでに確立されていた酵母菌 (*S. cerevisiae*, *S. pombe*) を材料として、約 30 株の MBC 耐性菌の分離をしたが負相関交差耐性株の単離には成功しなかった。酵母菌の場合には野生株の MBC 感受性が、植物病原菌である *B. cinerea* 等と比較して数十倍低かったことを考慮して、材料を糸状菌に変更した。*A. nidulans* は、ベンズイミダゾール耐性メカニズムが生化学的によく解析されていたが、 $\beta$ -チューブリン遺伝子が複数存在するとされていたことから<sup>12)</sup>、解析の複雑化を避けるために、 $\beta$ -チューブリン遺伝子が遺伝的に一つであるとされていた *N. crassa* を最終的に材料として選択した。

#### ジエトフェンカルブ感受性を示すベンズイミダゾール耐性株の単離

圃場から分離される多くの植物病原菌のベンズイミダ

ゾール耐性菌は高度の耐性を示し、MBC に対する最小阻害濃度 (MIC) は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上であることから、*N. crassa* の野生株を紫外線処理することにより 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の MBC を含む培地で生育する耐性菌を分離した。MBC 高度耐性株の出現頻度は低く容易ではなかったが、19 株を単離したところ 2 株がジエトフェンカルブに感受性を示した<sup>14)</sup>。Table 1 に、MBC 耐性レベルの異なる代表的な株および Brock・Braymer<sup>15)</sup> により単離されたペノミル耐性 Bml-511 株と Bml-111 株に対する MBC とジエトフェンカルブの感受性を示した。F914 株と F939 株は MBC 高度耐性 (MIC は >100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を示し、一方、ジエトフェンカルブに対する MIC は、0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であり、野生株のジエトフェンカルブ感受性 (MIC > 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) と比較すると 1000 倍以上の感受性の獲得が認められた<sup>16)</sup>。F914 株および F939 株以外の株は、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度のジエトフェンカルブでも生育阻害を受けず、野生株、Bml-511 株および Bml-111 株と同様に非感受性であった。MBC 耐性レベルとジエトフェンカルブ感受性の関係は、MBC 耐性の程度が高くなればなるほどジエトフェンカルブ感受性が増加するわけではなく、むしろ MBC 耐性株のあるものがジエトフェンカルブ感受性を獲得すると推測された。

F914 株および F939 株は、ベンズイミダゾール系化合物 (MBC, TBZ, チオファネートメチル) に正相関交差耐性を示し、*N*-フェニルカーバメート系化合物 (ジエトフェンカルブ, MDPC<sup>3,4)</sup>, パーバン) に負相関交差耐性を示した。*N*-フェニルカーバメート系化合物の中ではジエトフェンカルブが、もっとも高い活性を示した。なお、F914 株のこれらの化合物に対する感受性は、

Table 1 The sensitivity of MBC-resistant strains to MBC and diethofencarb.

	Growth									
	MBC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					Diethofencarb ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )				
	0.01	0.1	1.0	10	100	0.01	0.1	1.0	10	100
Wild-type	++	—	—	—	—	++	++	++	++	++
Bml-111	++	++	++	—	—	++	++	++	++	++
Bml-511	++	++	++	+	—	++	++	++	++	++
F812	++	++	++	++	±	++	++	++	++	++
F934	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
F914	++	++	++	++	+	++	—	—	—	—
F939	++	++	++	++	+	++	—	—	—	—
F911	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
F936	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

—: no growth, ±: slight growth, +: growth inhibited but almost normal, ++: normal growth.

F939 株のものとはほぼ一致しており、両株間に薬剤感受性の差は認められなかった。ウニコナゾール、トリデモルフ、IBP、プラストサイジン S、トルクロホスメチルに対する F914 株 (および F939 株) の感受性は、野生株のものとは顕著な差は認められず、負相関交差耐性は、*N*-フェニルカーバメート系化合物に特異的なものであると考えられた。ただし、*B. cinerea* 等で *N*-フェニルカーバメート系化合物同様に負相関交差耐性を示すことが知られている化合物ジフェニルアミンに対しては、野生株の MIC が 25  $\mu\text{g/ml}$  であるのに対し、F914 株 (および F939 株) の MIC は 1.6  $\mu\text{g/ml}$  であり負相関交差耐性が認められた。

MBC 耐性株の中には、培地上での生育速度の低下あるいは菌糸形態に異常を示すものもあったが、負相関交差耐性株 (F914 株および F939 株) の生育速度、菌糸形態は、野生株のそれと同等であった。

#### 負相関交差耐性株に対するジエトフェンカルブの作用の細胞学的解析

ベンズイミダゾール耐性株 (F914 株) に対するジエトフェンカルブの作用を調べるために、分生胞子の発芽に及ぼす影響を調べた。ジエトフェンカルブは、100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度においても F914 株の分生胞子の発芽を阻害しなかったが、発芽管の形態異常は 0.5  $\mu\text{g/ml}$  の濃度においても認められた。ジエトフェンカルブ処理した発芽管は、膨潤しその極性を失っていた<sup>17)</sup>。この形態異常は MBC (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 処理した野生株のものとはよく一致していた。なお、MBC 処理した F914 株、および、ジエトフェンカルブ処理した野生株の胞子発芽管の形態に影響は認められず、無処理のものと同様であった。

ベンズイミダゾール殺菌剤は、微小管に作用し核の分裂を阻害することが知られている<sup>10)</sup>。そこで、ジエトフェンカルブ処理した F914 株の核の形態を DAPI 染色し観察した。無処理では、膨潤した卵型の核が菌糸内にはほぼ等間隔で存在するのに比べ、ジエトフェンカルブ処理した F914 株では、核が凝集した形態を示し、その分布に片寄りがあり、核を含まない発芽管が認められた<sup>17)</sup>。この核の形態的異常は、MBC の野生株に対する作用とよく一致しており、ジエトフェンカルブは、F914 株に特異的に核の分裂および移行を阻害していると考えられた。

これらの形態学的な観察は、*B. cinerea* における MBC、ジエトフェンカルブの作用とよく似ており<sup>9)</sup>、*N. crassa* (F914 株) に認められる負相関交差耐性のメカニズムは、植物病原菌のものと本質的には一致してい

ると考えられた。

#### 負相関交差耐性株の変異の遺伝学的解析

##### 1. 遺伝解析

ジエトフェンカルブに感受性を獲得したベンズイミダゾール耐性の遺伝学的メカニズムを解明する目的で、負相関交差耐性株 (F914 株) の変異の遺伝解析を行なった<sup>16)</sup>。F914 株を野生株と交配し、形成された子嚢胞子の形質を調べたところ、約半数の子孫が、MBC 耐性かつジエトフェンカルブ感受性 (F914 株の形質) を示し、残りの子孫は、MBC 感受性かつジエトフェンカルブ耐性 (野生株の形質) を示した (Table 2)。この交配において、MBC とジエトフェンカルブに両耐性あるいは両感受性を示す子孫は出現しなかった。このことは、F914 株の形質は、核由来の 1 遺伝子の変異により支配されていることを示している。

さらに、F914 株を Bml-511 株と交配した。Bml-511 株の変異は、第 6 染色体の左腕に Bml 座として Brock・Braymer<sup>15)</sup> により mapping され、Orbach<sup>18)</sup> により  $\beta$ -チューブリン遺伝子の変異であることが示されている。この交配において、すべての子孫が MBC 耐性を示し、そのうち約半数の子孫が、ジエトフェンカルブ感受性を示した (Table 2)。また、ジエトフェンカルブ感受性を示した子孫は、100  $\mu\text{g/ml}$  の MBC 含有培地で生育し MBC 高度耐性を示したが (F914 株の形質)、ジエトフェンカルブ耐性を示した子孫は、0.5  $\mu\text{g/ml}$  の MBC 含有培地では生育したものの、100  $\mu\text{g/ml}$  の MBC 含有培地では生育しなかった (Bml-511 株の形質)。組換え型として野生株の形質を示す子孫が出現しなかったことは、F914 株の変異は  $\beta$ -チューブリン遺伝子である Bml 座かその近傍に位置することを示している。

ジエトフェンカルブに負相関交差耐性を示さなかった MBC 耐性株 (F936 株等) についても遺伝解析を行なったが、同様に Bml 座に連鎖を示した。このことから、MBC 耐性株の多くは Bml 座に連鎖を示し、ジエトフェンカルブに対する感受性の獲得の有無は Bml 座の変異様式の差による可能性が示唆された。

さらに負相関交差耐性の変異について詳しく調べるため、遺伝的微小地図の解析を行なったが、F914 株の示す二つの異なる形質 (MBC 耐性、ジエトフェンカルブ感受性) の分離は認められず、同一変異により同時に支配されている可能性が高いと考えられた。また、遺伝的微小地図の解析において、F914 株の変異と F939 株の変異間にも組換え体の出現が認められなかった。F914

Table 2 Segregation pattern in cross of MBC-resistant mutants.

Cross	Number of progeny			Total
	MsDr <sup>a)</sup>	MrDs <sup>b)</sup>	MrDr <sup>c)</sup>	
Wild-type ×				
F914	98	105	0	203
F939	78	76	0	154
F936	70	0	73	143
Bml-511 ×				
F914	0	57	68	125
F939	0	54	50	104
F936	0	0	112	112
F914 ×				
F914	0	109	0	109
F939	0	149	0	149
F936	0	59	54	113

<sup>a)</sup> Sensitive to MBC (0.5 µg/ml) but not sensitive to diethofencarb (0.5 µg/ml).

<sup>b)</sup> Resistant to MBC (0.5 µg/ml) but sensitive to diethofencarb (0.5 µg/ml).

<sup>c)</sup> Resistant to both MBC (0.5 µg/ml) and diethofencarb (0.5 µg/ml).

株と F939 株のベンズイミダゾール系化合物および *N*-フェニルカーバメート系化合物に対する薬剤感受性がきわめてよく一致していることから考えて、両株は各々独立に単離されたが、同一の変異をもつ可能性が考えられた。

## 2. ヘテロカリオンの薬剤感受性

負相関交差耐性株 (F914 株) の示す形質が優性であるかどうかを調べるために、F914 株にパントテン酸要求性マーカーを導入し、野性株にはコリン要求性マーカーを導入し、強制的ヘテロカリオンを形成させた。それぞれの株は栄養要求性マーカーをもつため単独では最少培地上で生育しない。しかし、最少培地上に両株を混合接種すると、菌糸融合してお互いの栄養要求性を相補するヘテロカリオンを形成させることができる。得られたヘテロカリオンに対する MBC およびジエトフェンカルブ感受性を最少培地上で調べた。ヘテロカリオンは、MBC、ジエトフェンカルブを単独で含む最少培地上では生育阻害を受けるものの菌糸の生育が認められ、それぞれに耐性を示すことが判明した。Brock・Braymer<sup>15)</sup> は、Bml-511 株の MBC 耐性は優性形質であることを報告しているが、F914 株の MBC 耐性形質も同様に優性であることを示している。一方ジエトフェンカルブに対しては逆に野生株の示すジエトフェンカルブ耐性形質が優性であった。しかし、ヘテロカリオンは、MBC、

ジエトフェンカルブに対し、単独ではそれぞれの薬剤に耐性を示すにもかかわらず、MBC とジエトフェンカルブを同時に含有する最少培地上では生育しなかった。このことは、以下のように解釈できると考えられる。ヘテロカリオンにおいて、MBC により野生株由来の細胞分裂機能は失われるが、F914 株由来の細胞分裂機能は阻害を受けなため MBC 含有培地で生育が可能となる。逆にジエトフェンカルブを単独で含む最少培地上では、ジエトフェンカルブにより F914 株由来の細胞分裂機能は失われるが、野生株由来の細胞分裂機能は阻害を受けなためジエトフェンカルブ含有培地で生育可能となる。しかしながら、MBC とジエトフェンカルブを同時に含む培地上では野生株と F914 株由来の細胞分裂機能がともに阻害を受けるためヘテロカリオンは生育ができない。

## ジエトフェンカルブ耐性株 (復帰突然変異株) の単離

以下にあげる理由から、ジエトフェンカルブ感受性 F914 株を親株としてジエトフェンカルブ耐性株を単離した。第一に、F914 株の変異が 1 遺伝子内の点突然変異であるかどうかの知見を得る。点突然変異と仮定すると、ジエトフェンカルブ耐性変異株として野生株の形質 (MBC 感受性) を示す株が復帰突然変異株 (真性復帰株) として単離されると期待される。第二に、ジエトフェンカルブ耐性変異株の性質および耐性メカニズムを調べることによりジエトフェンカルブの作用点に関する知見を得る。仮に、ジエトフェンカルブの直接の作用点が  $\beta$ -チューブリンでないと仮定した場合、ジエトフェンカルブ耐性株の中にその変異がジエトフェンカルブの作用点に由来する変異株が含まれることが期待される。第三に、圃場における植物病原菌のジエトフェンカルブ耐性問題を予測するための参考資料とする。

F914 株を親株として、紫外線処理により、 $1.0 \mu\text{g}/\text{m}^4$  の濃度のジエトフェンカルブに耐性を示す 11 株を単離したところ、二つのグループに大別された (Table 3)<sup>19)</sup>。第一のグループ (FR422, FR424 株等) は、ジエトフェンカルブ高度耐性を示したが、逆に、MBC に対する感受性を回復していた。これらのジエトフェンカルブ高度耐性株のベンズイミダゾール、*N*-フェニルカーバメート系化合物に対する感受性は、野性株のものと良く一致しており、野生株への真性復帰突然変異により得られた可能性が示唆された。遺伝解析の結果、これらの株の変異が Bml 座 ( $\beta$ -チューブリン遺伝子座) に連鎖を示したこともこれを支持していた。このように真性復帰変異が単離されることから、F914 株の変異は、点突然変異

による可能性が高いと考えられた。

第二のグループ (FRB3, FR511, FR513, FR421 株等) は、親株 F914 株よりもジエトフェンカルブ耐性を示したものの、野生株と比較するとジエトフェンカルブに対する感受性が高く、中等度耐性を示した。なお、FRB3 株はジエトフェンカルブに対して高度耐性を示したが、MDPC に対しては野生株よりも高い感受性を示したのでジエトフェンカルブ中等度耐性株に含めた。これらのジエトフェンカルブ中等度耐性株は、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の MBC を含む培地上でも生育を示し、MBC に対する感受性の回復は認められなかった。さらに詳細に調べるために、ベンズイミダゾール系化合物 (MBC, TBZ) に対する耐性の程度を菌糸生育を 50% 阻害する濃度で比較したところ、ジエトフェンカルブ中等度耐性株はいずれも、F914 株よりもベンズイミダゾールに対する耐性の程度が高くなっていることが判明した (Table 3)。すなわち、ジエトフェンカルブ中等度耐性株の場合には、ジエトフェンカルブのみならず MBC に対しても親株 (F914 株) より高度の耐性を示し、両剤間に負ではなく正相関交差耐性が認められたことになる。正相関交差耐性は、一般に、同じグループに属する化合物群内で認められる現象であることから、両系統化合物群は、変異の様式によっては共通の化合物群と考えることができることが示唆された。また、単離したジエトフェンカルブ感受性の異なる耐性株の変異はすべて  $\beta$ -チューブリン遺伝子である Bml 座に連鎖を示した。

このことは、間接的にはあるが、ジエトフェンカルブの作用点が、チューブリンであることを支持していた。

ジエトフェンカルブ高度耐性株は、野生株と同等の生育を示したが、ジエトフェンカルブ中等度耐性株の場合には、FRB3 株を除いて、その菌糸生育速度は野生株より明らかに低下していた。さらに、FR511 株等は、低濃度の MBC 処理された野生株 (あるいは、低濃度のジエトフェンカルブ処理された F914 株) の菌糸形態を示した。これらの株の変異は、微小管の正常な機能に何らかの影響を与えていると考えられ、同じ変異をもつ植物病原菌が圃場で出現したとしても、優勢になる可能性は低いと考えられた。

### 遺伝子解析

#### 1. 負相関交差耐性株の変異の同定

負相関交差耐性株 (F914 株) の  $\beta$ -チューブリン遺伝子のクローニングに着手してまもなく、Orbach ら<sup>18)</sup> が、形質転換系のベクターの薬剤耐性マーカーとするため、Bml-511 株の  $\beta$ -チューブリン遺伝子をクローニングし、さらに、その変異が、167 番目のアミノ酸の Phe  $\rightarrow$  Tyr であることを報告した。現在では、ベンズイミダゾール耐性マーカーをもつベクターは広く糸状菌の形質転換に用いられている。 $\beta$ -チューブリン遺伝子のクローニングとベクターの構築という意味では彼らにさきを越されたが、Bml-511 株の  $\beta$ -チューブリン遺伝子をプローブとして、F914 株の  $\beta$ -チューブリン遺伝子を比

Table 3 The sensitivity of *Neurospora* mutants to *N*-phenylcarbamates and benzimidazoles.

Strain	Antifungal activity ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	<i>N</i> -Phenylcarbamates <sup>a)</sup>		Benzimidazoles <sup>b)</sup>	
	Diethofencarb	MDPC	MBC	TBZ
Wild-type	>100	100	0.07	0.32
Benzimidazole resistance				
Bml-511	>100	100	5.0	20
F914	0.1	0.8	10	3.5
Diethofencarb resistance				
FR422	>100	100	0.06	0.28
FR424	>100	100	0.07	0.35
FRB3	>100	12.5	>100	13
FR511	12.5	6.2	>100	21
FR513	25	0.4	100	67
FR421	50	3.2	>100	61

<sup>a)</sup> Minimal concentration to inhibit colonial growth.

<sup>b)</sup> Concentration to inhibit radial growth at 50% level.

較的容易に単離することができた<sup>14,16</sup>). 単離した  $\beta$ -チューブリン遺伝子 (pEF50) が, 負相関交差耐性を支配しているかどうかについては, 形質転換により確認した (Table 4). F914 株由来の  $\beta$ -チューブリン遺伝子 (pEF50) を, 野生株に形質転換すると MBC 耐性を示す形質転換体が得られた. しかし, MBC とジエトフェンカルブを同時に含む培地上では形質転換体は生育を示さなかった. 逆に, 野生株由来の  $\beta$ -チューブリン遺伝子 (pBT-W) を F914 株に形質転換した場合には, ジエトフェンカルブ耐性を示す形質転換体が得られ, F914 株のジエトフェンカルブ感受性が打ち消された. このことから, F914 株由来の  $\beta$ -チューブリン遺伝子が, MBC

耐性とジエトフェンカルブ感受性を同時に支配していると考えられた. なお, MBC とジエトフェンカルブに同時に耐性を示す Bml-511 株由来の  $\beta$ -チューブリン遺伝子 (pSV50) は野生株および F914 株を両剤に耐性に形質転換した. DNA 塩基配列の決定により, F914 株の  $\beta$ -チューブリン遺伝子の変異は, 198 番目のアミノ酸 Glu から Gly への置換であると同定され, この 1 アミノ酸置換が, 負相関交差耐性を支配していると考えられた (Table 5). 人為的変異導入法により, F914 株の  $\beta$ -チューブリン遺伝子の 198 番目のアミノ酸を野生株型の Glu に変換すると, MBC 耐性とジエトフェンカルブ感受性の両方の性質が, 同時に消失した. なお, この

Table 4 Chemical sensitivity of strains transformed by  $\beta$ -tubulin genes with wild-type and altered amino acid sequences.

Plasmids	Amino acid substitution		Transformation			
			Wild-type		F914	
	198	Other	MBC (0.5 $\mu$ g/ml)	MBC (75 $\mu$ g/ml)	Diethofencarb (0.5 $\mu$ g/ml)	Diethofencarb (75 $\mu$ g/ml)
pBT-W	Glu		-	-	+	+
pEF50	Gly		+	+	-	-
pBT- <sup>198</sup> Ala	Ala		+	+	+	-
pNFB3	Lys		+	+	+	+
pNF511	Gly	<sup>250</sup> Phe	+	+	+	-
pNF513	Gly	<sup>165</sup> Val	+	+	+	-
pNF421	Gly	<sup>237</sup> Ala	+	+	+	-
pNF511- <sup>198</sup> Glu	Glu	<sup>250</sup> Phe	+	+	+	+
pNF513- <sup>198</sup> Glu	Glu	<sup>165</sup> Val	-	-	+	+
pNF421- <sup>198</sup> Glu	Glu	<sup>237</sup> Ala	+	+	+	+

+ : growth of transformants was not inhibited, - : growth of transformants was inhibited.

Table 5 Point mutations and deduced amino acid substitutions of the  $\beta$ -tubulin gene in *Neurospora* mutants.

Strain	Plasmid	Codon substitution	Amino acid position				
			165	167	198	237	250
Wild-type	pBT-W	None	Ala	Phe	Glu	Thr	Leu
F914	pFE50	GAG to GGG	Ala	Phe	<u>Gly</u>	Thr	Leu
Bml-511	pSV50	TTC to TAC	Ala	<u>Tyr</u>	Glu	Thr	Leu
FRB3	pNFB3	GGG to AAG	Ala	Phe	<u>Lys</u>	Thr	Leu
FR511	pNF511	CTC to TTC	Ala	Phe	<u>Gly</u>	Thr	<u>Phe</u>
FR513	pNF513	GCT to GTT	<u>Val</u>	Phe	<u>Gly</u>	Thr	Leu
FR421	pNF421	ACC to GCC	Ala	Phe	<u>Gly</u>	<u>Ala</u>	Leu

時点で、ベンズイミダゾール耐性として酵母で  $\beta$ -チューブリンの 241 番目、*N. crassa* で 167 番目のアミノ酸の変異が報告されていたが、198 番目のアミノ酸置換ははじめての報告であり、負相関交差耐性を示す変異としてはじめて報告された変異であった<sup>14)</sup>。

## 2. ジエトフェンカルブ中等度耐性株の変異の同定

MBC, ジエトフェンカルブ両剤間に正相関交差耐性が認められたジエトフェンカルブ中等度耐性株 (FRB3, FR511, FR513, FR421 株) の  $\beta$ -チューブリン遺伝子も同様にクローニングし、その DNA 塩基配列を決定した。それぞれの株に <sup>198</sup>Gly $\rightarrow$ Lys/FRB3 株, <sup>250</sup>Leu $\rightarrow$ Phe/FR511 株, <sup>165</sup>Ala $\rightarrow$ Val/FR513 株, <sup>237</sup>Thr $\rightarrow$ Ala/FR421 株のアミノ酸置換が同定された (Table 5)<sup>19,20)</sup>。なお、FRB3 株以外の株の  $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸は親株 (F914 株) と同様にジエトフェンカルブ感受性型の Gly であった。形質転換実験により、それぞれのアミノ酸置換がジエトフェンカルブ中等度耐性株の形質を支配していることを確認した。

人為的変異導入法により、198 番目のアミノ酸として Ala をもつ  $\beta$ -チューブリン遺伝子 (pBT-<sup>198</sup>Ala) を作成し、<sup>198</sup>Glu/野生株, <sup>198</sup>Gly/F914 株, <sup>198</sup>Lys/FRB3 株をもつ  $\beta$ -チューブリン遺伝子と比較した (Table 4)。形質転換体および変異株の薬剤感受性より、これらの  $\beta$ -チューブリン遺伝子の示すジエトフェンカルブ感受性は、<sup>198</sup>Glu $<$ <sup>198</sup>Lys $<$ <sup>198</sup>Ala $<$ <sup>198</sup>Gly の順に高くなると考えられた<sup>19)</sup>。一方、<sup>198</sup>Glu 以外のアミノ酸をもつ  $\beta$ -チューブリン遺伝子はいずれも野生株を MBC 高度耐性に形質転換した。このことから、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸残基の性質により負相関交差耐性は決定されていると推定された。

一方、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目以外に第二の変異をもつジエトフェンカルブ中等度耐性株 (FR511 株と FR421 株) の  $\beta$ -チューブリン遺伝子の <sup>198</sup>Gly (F914 型) を <sup>198</sup>Glu (野生株型) に、人為的変異導入法により変換し、野生株に導入すると、形質転換体は MBC 耐性を示した (Table 4)。すなわち、198 番目以外の変異 (<sup>250</sup>Leu $\rightarrow$ Phe, <sup>237</sup>Thr $\rightarrow$ Ala) は単独で、ジエトフェンカルブ耐性と MBC 耐性を同時に支配していると推定された<sup>20)</sup>。なお、FR513 株の  $\beta$ -チューブリンの <sup>165</sup>Ala $\rightarrow$ Val 置換は、*A. nidulans* の TBZ 耐性株の変異<sup>21)</sup> と同一アミノ酸部位の同一置換である。このアミノ酸置換は、*N. crassa* のペノミル耐性 Bml-511 株の変異部位 (167 番目のアミノ酸)<sup>18)</sup> の近傍にも位置している。さらに、FR511 株、FR421 株の第二の変異部位は、*S. cerevisiae* のペノミル耐性株の変異部位 (241 番

目の変異)<sup>18)</sup> の比較的近傍に存在する。このように、ジエトフェンカルブ耐性として得られた  $\beta$ -チューブリンの変異がベンズイミダゾール耐性変異と同一であったり、近傍に位置することは、これらの領域が、ジエトフェンカルブとベンズイミダゾールの共通の結合部位である可能性が考えられる。なお、FR513 株の第二の変異 (<sup>165</sup>Ala $\rightarrow$ Val) は、単独では、MBC 耐性を示さなかった。このことは、*Aspergillus* の同一変異が、TBZ には耐性を示すが、MBC には感受性であることと一致している。しかし、*Neurospora* の FR513 株は、親株 F914 株より高い MBC 耐性を示す。この理由は不明であるが、一つの可能性として、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸と 165 番目のアミノ酸間に立体構造的な相互作用があることが考えられる。

## ジエトフェンカルブの結合蛋白質の生化学的解析

*Neurospora* におけるベンズイミダゾールとジエトフェンカルブ間の負相関交差耐性が  $\beta$ -チューブリンの変異で起こること、さらに、解析したジエトフェンカルブ耐性株の変異がすべて  $\beta$ -チューブリンの変異であったことから、ジエトフェンカルブの結合蛋白質もチューブリンと考えられた。そこで、<sup>14</sup>C-ジエトフェンカルブを用いて、結合蛋白質の検索を行なったところ、F914 株の細胞破砕液の遠心 (50,000 $\times g$ ) の上清の高分子分画に対し選択的に、結合蛋白質の存在を示唆する高い放射能活性が認められた (Table 6)。このジエトフェンカルブ結合蛋白質は、DEAE Sephadex A-50 に吸着され、0.5 M KCl で溶出された。その分子量は、Sephacryl S-200 によるゲル濾過により約 105,000 であると推定された<sup>17)</sup>。これらの結果は、ベンズイミダゾール感受性菌の MBC 結合蛋白質 (チューブリン) と良く一致していた。したがって、MBC は野生株のチューブリンに結合して細胞分裂を阻害するが、ジエトフェンカルブのベンズイミダゾール耐性株に対する選択的抗菌活性は、ジエトフェンカルブが耐性株の変異チューブリンに選択的に結合し細胞分裂を阻害することによると考えられた。

Table 6 Diethofencarb binding activity in mycelial extract of benzimidazole-resistant strain.

Strains	MIC ( $\mu$ g/ml)	Protein (mg/ml)	Bound diethofencarb (dpm)
Wild-type	> 100	29.5	171
Resistant F914	0.1	26.1	30,229

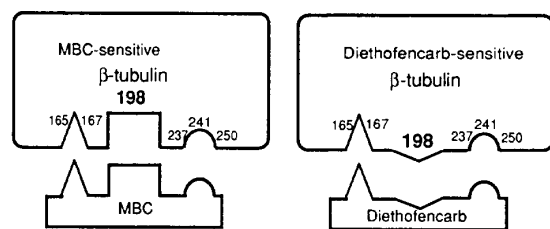


Fig. 2 A model for negatively correlated cross-resistance between carbendazim and diethofencarb.

### ジエトフェンカルブと MBC の $\beta$ -チューブリン結合モデル

以上のことから Fig. 2 に示したモデルを提唱している<sup>20)</sup>。  $\beta$ -チューブリンの 198 番目のグルタミン酸残基の  $-COOH$  がベンズイミダゾールのイミダゾール環の窒素原子と相互作用をもつことにより、MBC は野生株の  $\beta$ -チューブリンに結合するが、ジエトフェンカルブが結合するためには、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目のグルタミン酸の変換が必要であり、そのアミノ酸残基の立体的大きさの小さいもののほうが好ましい。負相関交差耐性は、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸により支配されているが、それ以外の部位では、MBC とジエトフェンカルブは、結合部位を共有していると考えられる。したがって、一方の化合物の結合に好ましくない置換は他方の化合物の結合に対しても都合が悪いため両剤間に正相関交差耐性が認められると推察される。

### おわりに

非植物病原菌である *N. crassa* の負相関交差耐性株が示す *N*-フェニルカーバメート系化合物に対する感受性やジエトフェンカルブ処理による核分裂阻害様式は、*B. cinerea* 等の植物病原菌におけるものとよく一致していること。また、負相関交差耐性という現象が、比較的稀に起こる特異な現象であることを考えると、*N. crassa* をモデルとして解析した結果は基本的には植物病原菌においても当てはまると考えられる。最近になり、圃場から分離された植物病原菌のベンズイミダゾール耐性の  $\beta$ -チューブリン遺伝子の解析結果が続々と報告され、著者らが *N. crassa* を用いて解析した結果と基本的には良く一致していることが判明した<sup>22-24)</sup>。植物病原菌においても負相関交差耐性を支配しているのは例外なく  $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸である。*Venturia inaequalis* (リング黒星病菌) の圃場分離株を例にあげると、ベンズイミダゾール感受性株の  $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸は Glu であり、Gly, Ala,

Lys はベンズイミダゾール耐性を示し、*N. crassa* の場合と同様に Gly と Ala の場合はジエトフェンカルブ感受性で、Lys の場合はジエトフェンカルブには感受性を示さないが MDPC には感受性を示す。また、 $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸置換以外のベンズイミダゾール耐性変異としては、200 番目の Phe $\rightarrow$ Tyr が同定されたが、負相関交差耐性を示さない。その他の植物病原菌のベンズイミダゾール耐性変異も原則的には *V. inaequalis* の場合に準じている。このように、*Neurospora* と植物病原菌の負相関交差耐性のメカニズムは共通しているが、*Neurospora* 等の非植物病原菌を用いたベンズイミダゾール室内耐性菌の変異は  $\beta$ -チューブリンのアミノ酸置換部位として数種類報告されているのに対し<sup>13,18,21,25)</sup>、圃場で分離された植物病原菌のベンズイミダゾール耐性株の変異は  $\beta$ -チューブリンの 198 番目と 200 番目のアミノ酸置換に限られている<sup>22-24)</sup>。これは、室内耐性菌の場合には、基本的には培地上で生育可能な株であれば単離できるが、植物病原菌の圃場耐性菌の場合には、環境適合性、病原性等に影響のある変異株は実用圃場では淘汰されてしまい分離されないためと考えられる。

ジエトフェンカルブは実用的にはおもに灰色かび病用殺菌剤として使用されている。これは、*B. cinerea* の場合には、ベンズイミダゾール耐性菌のほとんどが、ジエトフェンカルブに感受性であることによる。*B. cinerea* のベンズイミダゾール耐性を支配する  $\beta$ -チューブリンの変異も同定され  $\beta$ -チューブリンの 198 番目のアミノ酸が Ala であることが報告された<sup>23)</sup>。一方で、*V. inaequalis* 等ではジエトフェンカルブを使用していないにもかかわらずジエトフェンカルブ非感受性型のベンズイミダゾール耐性菌 (<sup>200</sup>Phe $\rightarrow$ Tyr および <sup>198</sup>Glu $\rightarrow$ Lys) が存在している<sup>22)</sup>。このことは、*B. cinerea* においても負相関交差耐性を示さないベンズイミダゾール耐性菌が生存し得る可能性を示唆している。実際に、ジエトフェンカルブ剤の使用により、罹病葉からジエトフェンカルブに負相関交差耐性を示さない変異株 (<sup>200</sup>Phe $\rightarrow$ Tyr および <sup>198</sup>Glu $\rightarrow$ Lys) の分離が報告され、一面では *B. cinerea*, *V. inaequalis* と *N. crassa* 間に基本的には差がないことを示している。しかし、これらの変異株は、ジエトフェンカルブの使用の有無にかかわらず、ベンズイミダゾール単独の使用で理論的には出現するはずの変異株である。灰色かび病の防除には、ベンズイミダゾール剤は長年にわたって世界中で使用されてきたにもかかわらずほとんどの *B. cinerea* のベンズイミダゾール耐性菌は、ジエトフェンカルブに感受性である。した

がって、*B. cinerea* の場合には、何らかの理由で両耐性菌の圃場での適応性に問題がある可能性も考えられる。また、*Neurospora* から分離したジエトフェンカルブ耐性菌の変異が、解析した株すべて  $\beta$ -チューブリンの変異であり、そのほとんどの耐性株の生育速度が低下していたこと、さらに、 $\beta$ -チューブリンは非常に保存性の高い蛋白質であり、糸状菌間ではアミノ酸配列で約 95% の相同性があることなどを考えあわせると、ジエトフェンカルブ剤が必ずしも従来剤と比較して耐性問題が起こりやすい剤とは考えにくい。しかし、特異的作用点を阻害する剤であることは上述のとおりであり、耐性菌が生存し得ることは理論的には示されている。また、ほとんどの灰色かび病防除剤がこれまで比較的使用し始めてから短期間で耐性菌問題に直面している。したがって過度の連用をさけ、他剤との交互散布等により耐性菌の出現あるいはその蔓延を防ぐことが重要であると考えられる。

以上のように、非植物病原菌である *N. crassa* を材料に、ジエトフェンカルブのベンズイミダゾール耐性菌に対する作用メカニズムを遺伝子レベルで解明すると同時に、植物病原菌に広く認められるジエトフェンカルブに感受性を示すベンズイミダゾール耐性メカニズムを解明した。従来、農業用殺菌剤の作用メカニズムあるいは、耐性メカニズムは、生化学的な手法がおもに用いられてきたが、近年、糸状菌の遺伝子工学が急激な進歩をみせており、今後、本研究のように遺伝子工学的な手法を用いた研究が増加してくると考えられる。

ジエトフェンカルブの作用機構の研究は、社内外の多くの方々のご指導とご支援をいただいた。とくに、復帰突然変異株の解析、人為的変異導入法を用いた解析、生化学的な解析は、理化学研究所(微生物制御研究室)で、山口 勇博士、鎌倉高志博士のご指導のもとに行なった研究であり、両先生および微生物制御研究室の皆さんに感謝いたします。また、*Neurospora* を用いた本研究の遂行に際し、*Neurospora* に関する基礎的な技術の供与と、終始ご助言、ご協力いただいた、埼玉大学理学部生体制御学科の井上弘一博士に深く感謝いたします。本研究の着手にあたり、深いご理解を示され、ご協力くださった住友化学工業(株)農業化学品研究所主席研究員・加藤寿郎博士、および遺伝子工学に関する技術の供与とご助言いただいた同社生命工学研究所主任研究員・大江田憲治博士に深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) C. J. Delp: *Plant Dis.* **64**, 651 (1980)
- 2) P. Leroux & M. Gredt: *Weed Res.* **20**, 249 (1980)
- 3) T. Kato, K. Suzuki, J. Takahashi & K. Kamoshita: *J. Pesticide Sci.* **9**, 489 (1984)
- 4) K. Suzuki, T. Kato, J. Takahashi & K. Kamoshita: *J. Pesticide Sci.* **9**, 497 (1984)
- 5) J. Takahashi, O. Kirino, C. Takayama, S. Nakamura, H. Noguchi, T. Kato & K. Kamoshita: *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**, 262 (1988)
- 6) J. Takahashi, O. Kirino, C. Takayama, S. Nakamura, H. Noguchi, T. Kato & K. Kamoshita: *J. Pesticide Sci.* **13**, 587 (1988)
- 7) J. Takahashi, S. Nakamura, H. Noguchi, T. Kato & K. Kamoshita: *J. Pesticide Sci.* **13**, 63 (1988)
- 8) K. Kamoshita, T. Kato, J. Takahashi & H. Kaneko: *J. Pesticide Sci.* **18**, S79 (1993)
- 9) 藤村 真: *植物防疫* **47**, 222 (1993)
- 10) L. C. Davidse & W. Flach: *J. Cell Biol.* **72**, 174 (1977)
- 11) Y. Hiraoka, T. Toda & M. Yanagida: *Cell* **39**, 349 (1984)
- 12) G. Sheir-Neiss, M. Lai & N. R. Morris: *Cell* **15**, 639 (1978)
- 13) J. H. Thomas, N. F. Neff & D. Botstein: *Genetics* **112**, 715 (1985)
- 14) M. Fujimura, K. Oeda, H. Inoue & T. Kato: "Managing Resistance to Agrochemicals," ed. by M. B. Green, H. M. LeBaron & W. K. Moberg, ACS Symposium Series No. 421, American Chemical Society, Washington, D. C., pp. 224-236, 1990
- 15) K. Brock & H. D. Braymer: *J. Gen. Microbiol.* **85**, 51 (1974)
- 16) M. Fujimura, K. Oeda, H. Inoue & T. Kato: *Curr. Genet.* **12**, 339 (1992)
- 17) M. Fujimura, T. Kamakura & I. Yamaguchi: *J. Pesticide Sci.* **17**, 237 (1992)
- 18) M. J. Orbach, E. B. Porro & C. Yanofsky: *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2452 (1986)
- 19) M. Fujimura, T. Kamakura, H. Inoue, S. Inoue & I. Yamaguchi: *Pestic. Biochem. Physiol.* **44**, 165 (1992)
- 20) M. Fujimura, T. Kamakura, H. Inoue & I. Yamaguchi: *Curr. Genet.* **25**, 418 (1994)
- 21) M. K. Jung & B. R. Oakley: *Cell Motil. Cytoskeleton* **17**, 87 (1990)
- 22) H. Koenraad, S. C. Somerville & A. L. Jones: *Phytopathology* **82**, 1348 (1992)
- 23) L. A. Martin, R. T. V. Fox, C. Baldwin & I. F. Connerton: Proc.; Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis., 3C-8, 1992
- 24) O. Yarden & T. Katan: *Phytopathology* **83**, 1478 (1993)

- 25) M. K. Jung, I. B. Wilder & B. R. Oakley: *Cell Motil. Cytoskeleton* **22**, 170 (1992)

略歴

藤村 真

生年月日: 1958年4月23日

最終学歴: 名古屋大学理学研究科修士課程

趣 味: 旅行