

特集：薬剤抵抗性 (3)

灰色かび病菌の薬剤耐性出現機構

茨城大学農学部植物資源保護学研究室 ^あく^つ ^かつ ^み己

はじめに

作物の病害防除は、労力の省力化、経営費の節約などから、ほとんどの農家で殺菌剤などの農薬散布によって行われ、その使用量は年々増加の一途をたどっている。一方、農薬の安全性の面から、作用点の狭い選択性の高い農薬の開発が進められ、1960年以降、多くの選択的農薬が広く使用されるようになった。しかしその反動とでもいおうか、多くの薬剤に対して耐性を示す病原菌や害虫が出現し、その分布も年々拡大し、病害防除上新たな問題を引き起こした。ことに1970年以降、圃場での耐性菌の急激な出現は深刻な問題を引き起こし、その対策が迫られている。ここでは、多くの有用植物に病気を引き起こす多犯性病原菌であり、近年施設栽培の普及により特に果菜類に甚大な被害をもたらす灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea* PERSOON) の薬剤耐性について、耐性機構ならびに耐性菌の出現機構を中心に紹介する。

I 防除薬剤の変遷

灰色かび病を引き起こす *B. cinerea* は、宿主範囲の広い、生存能力が発達した糸状菌であることから、耕種的防除や抵抗性品種の育成による防除は難しく、その防除は殺菌剤に頼らざるを得ない。わが国では灰色かび病の防除薬剤として、1950年代にはジネブ、マンネブ、キャプタンなどが用いられ、1969年にはジクロロリンが本病の特効薬として開発され、その発生は一時減少したが、1972年に本剤の農薬登録が失効し製造が中止された。これに代わる安全性の高い選択的殺菌剤として、ペノミル、チオファネートメチルなどのベンズイミダゾール系薬剤が開発され、その普及により灰色かび病防除に成果を挙げた。

しかし、1971年にオランダで、1974年にはわが国でも耐性菌が出現し、短期間のうちに防除効果が著しく低下した。1979～81年にはベンズイミダゾール系薬剤に代わって、これらの耐性菌に高い防除効果を示すイプロジオン、ピンクロゾリン、プロシミドンのジカルボキシミド系薬剤が実用化され、当初、圃場ではこれらの薬剤に

対する耐性菌の出現は起こりにくいといわれていたことから、耐性菌問題は一時解決したようにみられたが、普及直後に、日本を含む世界各国で耐性菌が分離され、防除効果の低下が報告されている。今のところ、単一薬剤による灰色かび病の防除は難しく、作用点の異なる複数の薬剤を組み合わせた薬剤のローテーション散布がより効果的な防除法として用いられている (竹内, 1987年)。

II 薬剤耐性のメカニズム

薬剤耐性のメカニズムとして、①薬剤の菌体内への浸透移行量や蓄積量の減少、②薬剤の不活性化 (解毒能) の増大、③薬剤の活性化の減少、④作用点での薬剤作用の減少、⑤薬剤による阻害代謝系におけるバイパス経路形成、などが理論上考えられる (DEKKER, 1976)。しかし、薬剤 (農薬) の耐性機構に関する研究は、従来、主として、培養が簡単で遺伝解析が容易な非植物病原菌を対象に行われ、植物病原菌を対象にした研究は *Pyricularia oryzae* のカスガマイシン耐性 (多賀, 1981) *Venturia nashicola* (ISHII and YANASE, 1983), *Fusarium oxysporum* (GASZTONYI et al., 1987; MOLNAR et al., 1985) のベンズイミダゾール系薬剤耐性などに限られている。*B. cinerea* では、有性世代あるいは疑似有性世代が判明していないことから、この種の研究はきわめて少ないが、ここでは比較的研究が行われているベンズイミダゾール系薬剤に対する耐性機構について言及する。

1 β -チューブリン変異による耐性

ベンズイミダゾール系薬剤は、糸状菌、ことに子囊菌に対して強い抗菌活性を示す選択性薬剤である。本薬剤は植物体に散布されると加水分解されてカーベンダジン (MBC) に変換される (CLEMONS et al., 1969)。MBC は β -チューブリンと特異的に結合し、その重合を妨げて微小管形成を阻害する有糸核分裂阻害物質である (DAVIDSE, 1986)。

Aspergillus nidulans などの非植物病原菌で、人為的に誘発した MBC 耐性菌株の菌糸体からチューブリンタンパクを抽出し、MBC との親和性を調べた結果、耐性菌株から抽出されたチューブリンは、感性菌株に比べて親和性が著しく低いことが見いだされ (DAVIDSE et al., 1977)、ベンズイミダゾール系薬剤に対する耐性化は、 β -チュ

ープリンのMBC結合部位における化学構造の変化による親和性の低下に起因するものと考えられている。その後 *A. nidulans* や *Saccharomyces cerevisiae* などの非植物病原菌で、本薬剤耐性遺伝子として β -チューブリン変異遺伝子がクローニングされ、その塩基配列や発現制御様式及び遺伝様式について、分子レベルで解析が進められている (DAVIDSE, 1986)。

植物病原菌では *B. cinerea* (DAVIDSE et al., 1977) や *V. nashicola* (ISHII and DAVIDSE, 1986) などで、耐性菌株から抽出されたチューブリンタンパクのMBC親和性が、感性菌株に比べて低いことが報告されている。一方、*B. cinerea* では、圃場から耐性値だけではなく諸性質も異なる多数の耐性菌株が分離され、その中にはチューブリンのMBC親和性に低下がみられない菌株が存在することから(阿久津ら, 未発表)、 β -チューブリン変異のほかに耐性化を引き起こす別の機構が存在することが示唆されている。

2 無糸核分裂による耐性

圃場から分離された *B. cinerea* のベンズイミダゾール系薬剤耐性菌株について核行動を調べると、感性菌株・IPCR-1と同様に有糸核分裂して菌糸が生育する耐性菌株・IHES-4とともに、核行動が異なる耐性菌株・IHES-3が見いだされた。IHES-3株は生育が非常に遅く、菌糸細胞内には多数の球状の小核と、核膜が多数突出した大核が密在するが、これらの核内には紡錘体極構造や微小管などの有糸分裂器官は認められなかった(口絵写真参照)。また、IHES-3株は数種の有糸分裂阻害剤に対して耐性を示したが、別の耐性菌株・IHES-4はビンブラスチンに対して感受性であった(表-1)。これらのことからIHES-3株の菌糸細胞では、核が無糸核分裂によって増殖していることが示唆される。糸状菌は、その生活環に有糸核分裂するステージと無糸核分裂するステージがあるが(MOORE, 1965)、*B. cinerea* では第二次付着器の形成時に無糸核分裂が行われる可能性が高いことが報告されて

いる (AKUTSU et al., 1986)。本薬剤の耐性化に、糸状菌が本来獲得している無糸核分裂機構がかかわることが考えられる。なお、耐性菌株における無糸核分裂の直接的証明と、このような核分裂で生じた小核に含まれる遺伝情報の解析について、現在、研究を進めている。

耐性菌株・IHES-3は、栄養生長、繁殖生長及び病原性が著しく劣る菌で、薬剤選択圧なしには野外から分離が難しい菌と思われる。薬剤散布の有無にかかわらず、野外には既にこのような菌が自然耐性菌として生息している可能性がある。

III 耐性菌の出現メカニズム

薬剤耐性菌の出現機構については、従来、次のように説明されている。一つは、自然界において薬剤散布とは無関係に、もともと生息していた少数の野生の耐性菌、あるいは、偶発的突然変異の結果形成されたごく少数の耐性菌が、薬剤選択圧の下で淘汰されて生き残り、増殖した結果、耐性菌の割合が高まる場合である。もう一つは薬剤の散布により、感性菌内で突然変異が誘発され、薬剤が耐性突然変異体を淘汰した結果、耐性菌の割合が高まる場合である(津田ら, 1979)。

B. cinerea のベンズイミダゾール系薬剤耐性菌の出現については、本薬剤が高い選択性を持つことから、自然界に野生の耐性菌が存在することは不思議ではなく、競合能力の点で感性菌より劣性であった耐性菌が、薬剤という淘汰圧を利用して、圃場での優勢を獲得し密度を高めていくと考えられている(村越, 1982)。この場合、耐性菌密度の増加には薬剤による淘汰圧が必要なことから、薬剤散布を中止すれば、耐性菌の密度は低下するはずである。ところが、実際の圃場において薬剤散布を中止した後の耐性菌の推移を追ったところ、耐性菌密度が低下する場合もあるが、低下しない場合があることが示された(竹内, 1987)。さらに、薬剤を一度も散布していない圃場で、耐性菌検出頻度が100%に達したという報告もある(斎藤ら, 1978)。これらのことは、薬剤の淘汰を必要とせずに優勢になりうる耐性菌の出現を示唆している。このような耐性菌の出現は、突然変異あるいは薬剤適応化だけで説明できるだろうか。圃場から互いに性質が異なる多数の耐性菌株が分離される状況と合わせて考えると、耐性菌を生み出し、増やす別のメカニズムが潜んでいるものと思われる。

1 菌糸融合による耐性獲得・伝達

糸状菌において、菌糸融合は形質交換の一機構と考えられ、植物病原菌に限っていても病原性などの変異の原因として重要な役目を果たしている (PARMETER et al.,

表-1 *B. cinerea* のベノミル耐性菌株に対する有糸分裂阻害剤の影響

薬 剤 ^{a)}	IHES-3	IHES-4	IPCR-1
コルヒチン	-	-	-
ステガナシン	-	-	-
ビンブラスチン	-	+	-
ポドフィロキシン	-	-	-
メイタンシン	-	-	-
ベノミル	-	-	+

^{a)} 処理濃度=10 ppm, IHES-3, -4: 耐性菌株, IPCR-1: 感性菌株。+: 菌糸生育阻害(有), -: 菌糸生育阻害(無)。

表-2 *B. cinerea* のベノミル耐性菌株と感性菌株の菌糸融合

組み合わせ	融合頻度(%) ^{a)}
IHES-3+IPCR-1	2.5
IHES-3+IHES-3	1.4
IPCR-1+IPCR-1	5.1

^{a)} 接種分生孢子数当たりの融合数
IHES-3: 耐性菌株, IPCR-1: 感性菌株

表-3 菌糸融合で出現した *B. cinerea* ベノミル耐性菌株の諸性質^{a)}

菌株	耐性値 (ppm) ^{b)}	菌糸生長 ^{c)}	胞子形成 ^{d)}	発病率 (%) ^{e)}
PHDF-6	2,250	++++	13	62.5
PHGF-1	3,500	+++++	83	100
IHES-3	<3,250	+	8	35.7
IPCR-1	<3	++++	1	72.1
CAES-7	3,000	++++	5	83.8

^{a)} ベノミル耐性菌株 (IHES-3) と菌糸融合した感性菌株 (IPCR-1) から単菌糸を分離し、耐性獲得菌体を採取した。^{b)} ベノミルの最小生育阻止濃度、^{c)} PSA 培地上での菌叢径、^{d)} PSA 培地上での IPCR-1 株の胞子形成数に対する各菌株の形成数の比、^{e)} 分生孢子接種によるキュウリ葉での発病率。PHDF-6: 新耐性菌株 (菌糸融合数=1), PHGF-1: 新耐性菌株 (菌糸融合数=複数), CAES-7: 圃場分離耐性菌株。

1963; 内藤, 1982; Akutsu et al., 1983; Adams et al., 1987)。

B. cinerea では、ベンズイミダゾール系薬剤あるいはジカルボキシイミド系薬剤耐性菌株と感性菌株が比較的高い頻度で菌糸融合し (表-2)、感性菌株は薬剤耐性を獲得した (表-3)。この場合、接合管を通して核の移動がみられることから、菌糸融合によって薬剤耐性の遺伝形質が感性菌株に移行すると考えられる (Akutsu et al., 1987, 1988 b, c)。また、融合頻度や融合した耐性菌株の胞子数によって、耐性値だけでなく菌糸の生育速度、胞子形成、病原性などの性質が異なる種々の耐性菌株が出現し、なかには、圃場において防除上問題になるような栄養生長、繁殖生長、病原性がともに優れた耐性菌株も出現した (表-3)。これら菌株の菌糸では、異なる形状の核が共存していることから、ヘテロカリオンである可能性が高い。一方、耐性、病原性などが親株より優れた株で、親株とは異なる比較的均一な形状をした核が観察された (口絵写真参照)。この菌株は、継代培養を繰り返してもきわめて安定しており、おそらく核融合が起こったものと推察される。このような形状の核は、圃場から分離された防除上問題となる耐性菌株でも認められている。さらに、菌糸融合による薬剤耐性獲得が *Botrytis* 属の種間でも起こ

る可能性が高いことが報告されている (Akutsu et al., 1990)。以上のことから、菌糸融合は自然界においても、糸状菌の薬剤耐性獲得・伝達に深くかかわると考えられる。

圃場における耐性菌の出現に関して、突然変異及び薬剤淘汰圧による機構だけでは説明しにくい現象も、菌糸融合を加えることで容易に説明することができる。なお、菌糸融合で移行した核がどのようなメカニズムで耐性を発現するかは今後の課題である。

2 薬剤耐性誘発機構

最近、*B. cinerea* の薬剤耐性に関して興味深い実験結果が得られた (Akutsu et al., 1988a)。すなわち、ジカルボキシイミド系薬剤耐性菌株の培養液で感性菌株を培養すると、感性菌株がきわめて高率で本薬剤に対する耐性を獲得することが示された。新たに耐性を獲得した菌株は、もとの感性菌株はもとより、培養液作成に供試した耐性菌株と比べても、薬剤耐性値が高く、コロニー形状、生育速度、胞子形成、病原性においても、両親株とは異なった性状を示した (表-4)。また、これらの形質は後代に安定して遺伝した。プロトプラスト実験系を用いて、このような培養液処理による薬剤耐性の誘発効果を数的に検定した結果、6~10%の誘発率を示し、感性菌株の培養液あるいは通常の培養基処理に比べてきわめて高い誘発効果が認められた (阿久津ら、未発表)。また、分生孢子を用いた実験系でも同様の結果が得られて

表-4 *B. cinerea* の薬剤耐性菌株培養液により誘発したジカルボキシイミド系薬剤耐性菌株の諸性質^{a)}

菌株	耐性値 (ppm) ^{b)}	菌糸生長 ^{c)}	胞子形成 ^{d)}	発病率 (%) ^{e)}
C2I-P	5,000	++	<0.3	52.5
CAES-2	500	++	9.3	55
C3I-V	5,000	+++	<0.3	17.5
CAES-3	200	+++++	81.7	62.5
C4I-V	5,000	++	<0.3	70
CAES-4	500	+++	48.3	82.5
IPI	<5	+++	4.3	95
IPCR-1	<5	+++++	1	100

^{a)} ジカルボキシイミド系薬剤耐性菌株 (CAES-2, -3, -4) の各培養液で感性菌株 (IPCR-1) を培養し、耐性獲得菌体を採取した。^{b)} ピンクロゾリンの最小生育阻止濃度、^{c)} PSA 培地上での菌叢径、^{d)} PSA 培地上での IPCR-1 の胞子形成数に対する各菌株の胞子形成数の比、^{e)} 菌糸体接種によるキュウリ葉での発病率。C2I-P: 新耐性菌株 (CAES-2 培養液処理), C3I-V: 新耐性菌株 (CAES-3 培養液処理), C4I-V: 新耐性菌株 (CAES-4 培養液処理), IPI: 感性菌株 (IPCR-1 培養液処理)。

いる。このことは、耐性菌株の培養液の中に、単なる変異原としてではなく、むしろ積極的にジカルボキシイミド系薬剤耐性を誘発する物質が存在することを示唆する。この薬剤耐性誘発物質は 120°C、15 分の熱処理によって失活せず、透析膜を透過できることから、プラスミドなどとは異なる、熱安定性の分子量 20,000 以下の低分子物質と推定され、現在、その単離・精製を進めている。

糸状菌においては、このような物質の報告はまだ見当たらないが、*Streptomyces griseus* などの放線菌で、ストレプトマイシンなどの抗生物質の生産、それらに対する自己耐性及び菌の形態分化などを、極微量で運動的に制御する低分子の自己調節因子が報告されており、そのうち、A-ファクター、B-ファクター、ファクター-C、パナマイシンなどが単離・精製されている。A-ファクターについては、化学構造が決定され、ブタノライド骨格を持つ物質であることが明らかにされている。さらに、A-ファクターの形質発現制御機構について、その合成、制御に関連する遺伝子がクローニングされ、その構造及び機能に関する研究成果も報告されている（別府ら、1989）。このような因子は酵母の二次代謝産物中にも見いだされており、微生物のホルモン様物質として注目されている。

今回、*B. cinerea* 耐性菌株の培養液の中に見いだされた薬剤耐性誘発物質は、薬剤耐性と同時に、コロニー形状、生育速度、孢子形成、病原性などの変化にも関与している点及び熱安定性低分子物質である点で、上記の自己調節因子と類似しており、きわめて興味深い。

以上、*B. cinerea* の薬剤耐性機構ならびに薬剤耐性菌の出現機構に関して、筆者らの実験結果を交えながら、研究の現状を概略紹介したが、いずれに関しても従来の理論だけでは説明しきれないような現象が観察されていることから、これらの機構の全容の解明には、まだかなりの時間を要しよう。しかしながら、今回、紹介した薬剤耐性誘発物質の存在は、耐性菌の出現が偶発的突然変異だけで起こるのではなく、もともと菌の遺伝子にコードされた薬剤耐性情報が、誘発的に発現することによって起こるという可能性を示唆している。今後、このような観点から研究を進めていくことによって、あるいは薬剤耐性問題を根本的に解決する何らかの糸口をつかむことができるかもしれない。

おわりに

作物の病害防除を農業に頼らざるを得ない現状では、

これからも薬剤耐性問題から逃げることはできないように思える。病原菌を調べれば調べるほど、菌の持つ巧みな適応能力のすごさに驚かされる。今回、ご紹介した灰色かび病菌の薬剤耐性メカニズムの多様性、あるいは、薬剤耐性の誘発機構や菌糸融合による耐性獲得・伝達機構は、この菌の持つ適応能力の一部にすぎないのかもしれない。

では灰色かび病の発生を効果的に防ぐにはどうしたらよいのであろうか。現時点でいえることは、いかに卓効のある薬剤が開発されようとも、単一薬剤による長期的防除はほぼ不可能と考えられることから、作用点の異なる数種の薬剤を組み合わせて計画的に使用するとともに、本病菌による作物へのひより見感染を防ぐ日ごろの栽培管理が大切であろう。

引用文献

- 1) ADAMS, G. et al. (1987) : *Exp. Mycol.* 11 : 339~353.
- 2) AKUTSU, K. et al. (1988a) : *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54 (5) : 593~599.
- 3) ——— et al. (1981) : *ibid.* 47 (1) : 15~23.
- 4) ——— et al. (1986) : *ibid.* 52 (2) : 292~301.
- 5) ——— et al. (1987) : *ibid.* 53 (4) : 495~506.
- 6) ——— et al. (1988b) : *ibid.* 54 (3) : 290~295.
- 7) ——— et al. (1988c) : *ibid.* 54 (3) : 309~316.
- 8) ——— et al. (1990) : *ibid.* (in contribution).
- 9) 別府輝彦・堀之内末治 (1989) : *細胞工学 別冊* 2 : 66~74.
- 10) CLEMONS, G. P. and H. D. SISLER (1969) : *Phytopathology* 59 : 705~706.
- 11) DAVIDSE, L. C. (1986) : *Ann. Rev. Phytopathol.* 24 : 43~65.
- 12) ——— and W. FLACH (1977) : *J. Cell Biol.* 72 : 174~193.
- 13) DEKKER, J. (1976) : *Ann. Rev. Phytopathol.* 14 : 405~428.
- 14) GASZTONYI, M. et al. (1987) : *Pestic. Biochem. Physiol.* 29 : 17~24.
- 15) ISHII, H. and L. C. DAVIDSE (1986) : *Proc. 1986 Br. Crop Prot. Conf. - Pests and Disease* 4C - 11 : 567~573.
- 16) ——— and YANASE, Y. (1983) : *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 49 (2) : 153~159.
- 17) MOORE, R. T. (1965) : *The fungi*, Academic Press, New York, pp. 95~118.
- 18) MOLNAR, A. et al. (1985) : *Exp. Mycol.* 9 : 326~333.
- 19) 村越重雄 (1982) : *神奈川園試研報* 29 : 47~53.
- 20) 内藤秀樹 (1982) : *東北農試研報* 66 : 101~206.
- 21) PARMETER, Jr., J. R. et al. (1963) : *Ann. Rev. Phytopathol.* 1 : 51~76.
- 22) 斎藤 正・古谷真二 (1978) : *今月の農薬* 22 (10) : 74~76.
- 23) 多賀正節 (1981) : *農業生物学報* 1 : 1~75.
- 24) 竹内妙子 (1987) : *千葉農試特報* 14 : 1~75.
- 25) 津田盛也ら (1979) : *遺伝* 33 : 20~25.