

リ

殺菌剤ジエトフェンカルブの選択的殺菌メカニズムと
 β -チューブリンのアミノ酸置換に関する研究

1992年

藤 村 真

目次

第1章 緒論	1
第2章 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 <i>Neurospora</i> 変異株の単離およびその解析	8
2-1 緒言	8
2-2 材料と方法	9
2-3 ジエトフェンカルブ感受性を示すMBC耐性株（F914株）の 単離	12
2-4 F914株の薬剤感受性	13
2-5 F914株に対するジエトフェンカルブの作用に関する 細胞学的解析	15
2-6 F914株の変異の遺伝学的解析	18
2-6-1 F914株の変異の遺伝解析	18
2-6-2 F914株の変異の遺伝的微細地図	20
2-6-3 ヘテロカリオンの薬剤感受性	22
第3章 N-フェニルカルバマート耐性株（復帰突然変異株）の単離および その解析	25
3-1 緒言	25
3-2 材料と方法	26
3-3 復帰突然変異株の単離	26
3-3-1 ジエトフェンカルブ耐性株の単離	26
3-3-2 MDPC耐性株の単離	27
3-4 復帰突然変異株の薬剤感受性	29
3-5 復帰突然変異株の遺伝学的解析	34

第4章 負相関交差耐性の分子生物学的解析	37
4-1 緒言	37
4-2 材料と方法	37
4-3 F914株の変異の遺伝子工学的解析	43
4-3-1 F914株の β -チューブリン遺伝子のクローニング	43
4-3-2 F914株の β -チューブリン遺伝子による形質転換	43
4-3-3 F914株の β -チューブリン遺伝子の変異領域の決定	49
4-3-4 F914株の β -チューブリンのアミノ酸変異の決定	51
4-4 復帰突然変異株の変異の遺伝子工学的解析	54
4-4-1 復帰突然変異株の β -チューブリン遺伝子のクローニング	54
4-4-2 復帰突然変異株の β -チューブリンのアミノ酸変異の決定	55
4-5 人為的変異導入法による変異 β -チューブリン遺伝子の構築とその解析	61
4-5-1 β -チューブリンの198番目のアミノ酸置換と薬剤感受性の解析	61
4-5-2 β -チューブリンの198番目以外のアミノ酸置換と薬剤感受性の解析	65
第5章 負相関交差耐性の生化学的解析	68
5-1 緒言	68
5-2 材料と方法	68
5-3 野生株とF914株に対する ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブの結合活性の比較	70
5-3-1 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブの菌体への取り込みの比較	70
5-3-2 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブの菌体可溶性分画に対する結合活性の比較	71
5-4 ジエトフェンカルブ結合蛋白質の精製	72
第6章 総合考察および結論	76

引用文献	- - - - -	95
英文要旨	- - - - -	100

第1章 緒論

農産物の植物病原菌による病害の防除は、安定した食料生産を確保するうえで重要である。農業用殺菌剤が病害防除に果たす役割は大きく、薬剤を使用しなかったときの減収率は、稲で35%、麦で20%、リンゴで90%、ハウス栽培のキュウリで95%に及ぶとされている(森田 1982)。近年、病害防除において殺菌剤に対する植物病原菌の薬剤耐性が大きな問題となっている(Staub 1991)。殺菌剤耐性問題は、農業用殺菌剤の歴史と密接な関係にある。農業用殺菌剤の歴史は、1960年代までの非特異的殺菌剤の時代と、それ以降の特異的殺菌剤の時代に二分される(Spencer & Sisler 1977)。非特異的殺菌剤の例としては、ボルドー液(石灰と硫酸銅の混合物)で代表される無機塩類、ジチオカーバメート系化合物等があげられる。このような薬剤は、主として酵素のSH基と反応して呼吸阻害を引き起こすことにより殺菌活性を示す。非特異的殺菌剤は細胞の特異的部位に働くわけではないので、病原菌の種類を問わず活性を示すが、高濃度の施用量を必要とする。また、SH基を必要とする酵素は菌、植物、動物に共通しているので、概して作物に対する薬害、人畜に対する毒性問題が伴う。このため薬害を生じないように植物体内に移行しない形で用いるため予防剤としてのみ使用され、植物体内に病原菌が感染した後では、効果を示さない。こうした非特異的殺菌剤の欠点を補う特異的殺菌剤が有機化学の発展と生物活性検定技術の進歩をもとにして、1960年代後半より登場した。その例として、担子菌のコハク酸デヒドロゲナーゼを特異的に阻害するカルボキシン系化合物、菌のマイクロチューブルを阻害するベンズイミダゾール系化合物、菌のエルゴステロール合成を阻害するアゾール系化合物等があげられる(Lyr 1987)。特異的殺菌剤は、限られた作用部位の蛋白質に結合するため、防除病害は特定のものに限られ、また、化合物から見ると活性を有する構造への要求が厳しいが、低薬量でシャープな活性を示す。このことは一般的に薬害、人畜への毒性の軽減にも貢献している。しかし、一方で、これら特異的殺菌剤は、その作用点が特異的であるため耐性菌の出現による効力低下という

問題にさらされ易い。実際に、1970年以降、農業用殺菌剤の耐性問題が実用上重大化したのは、この頃より特異的殺菌剤が多く開発され始めたことと関連している (Dekker & Georgopoulos 1982)。旧来の殺菌剤が非特異的に多部位に作用する殺菌剤であったため作用点の変異による薬剤耐性化が起こりにくかったのに比べ、特異的殺菌剤では、変異による耐性化が容易であると考えられている。

耐性菌対策は、その発達を回避、または遅延のために薬剤の淘汰圧を減少する工夫、即ち、作用性の異なる2種以上の殺菌剤の混合または、交互使用、生物的、物理的防除法を組み入れた総合防除の手段により実際には対処されている (Staub 1991, Green 1990)。一方、耐性菌の発達に積極的に対抗する方法として、共力効果、及び、負相関交差耐性の利用がある。共力効果とは、殺菌剤に何らかの化合物を添加することにより、薬剤耐性レベルを低下させる現象である。負相関交差耐性とは、ある薬剤に対して耐性を獲得した株が逆にほかの特定の薬剤に対して、感受性になる現象である。負相関交差耐性の例をTable 1-1に示した (De Waad 1984)。

Table 1-1 Negatively correlated cross resistance in fungicides

Fungi	Fungicides	
	decreased sensitivity	increased sensitivity
<i>Ustilago maydis</i>	carboxin	Antimycin A
<i>Pyricularia oryzae</i>	IBP	phosphoroamidate
<i>Aspergillus nidulans</i>	thiabendazole	benomyl
<i>Penicillium italicum</i>	fenarimol	fenpropimorph
<i>Botrytis cinerea</i>	benzimidazoles	N-phenylcarbamates
<i>Venturia inaequalis</i>	benzimidazoles	N-phenylcarbamates
<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>	benzimidazoles	N-phenylcarbamates

負相関交差耐性の顕著な例は、ベンズイミダゾール系化合物耐性菌に認められるN-フェニルカルバマート感受性の獲得である。ベノミル、カルベンダジム（MBC）等のベン

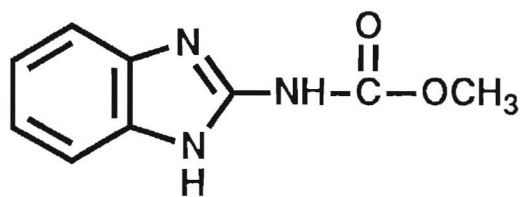
ズイミダゾール系化合物は強い殺菌活性、および植物体内への浸透移行性を有する特異的殺菌剤であるため、世界的に多用されている。しかし、一方で灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*, Fig 1-2) をはじめとする多くの対象病害において耐性菌問題は世界的な広がりを見せており深刻なものとなっている (Delp 1980)。

筆者らは、N-フェニルカルバマート系除草剤 (バーバン、クロロプロファム) がベンズイミダゾール耐性の灰色かび病菌に負相関交差耐性を示すという Leroux et al. (1979a, 1979b, 1980) の知見に興味を持ち、除草活性がなく、耐性菌に高い活性を示す化合物を検索し、ジエトフェンカルブを見いだした (Takahashi et al. 1988a, 1988b, 1989, Fujimura et al. 1990)。ベンズイミダゾール系化合物及びN-フェニルカルバマート系化合物の構造を Fig. 1-1a, 1-1b に示す。

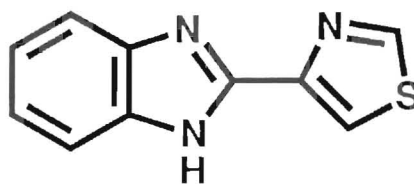
本研究の目的と概要

圃場より単離されるベンズイミダゾール系化合物耐性植物病原菌は、N-フェニルカルバマートに対して特異的に高い感受性を示す。Fig. 1-3 に示すように、野生株型 (ベンズイミダゾール感受性, S) の灰色かび病菌に対し、MBCは、 $1.6\mu\text{g/ml}$ の濃度で菌糸生育を完全に阻害するが、ジエトフェンカルブ(S-165)は、阻害しない。一方、ベンズイミダゾール耐性を示す株(R)に対し、MBCは、菌糸生育を阻害しないが、ジエトフェンカルブ(S-165)は、 $1.6\mu\text{g/ml}$ の濃度で菌糸生育を完全に阻害する。

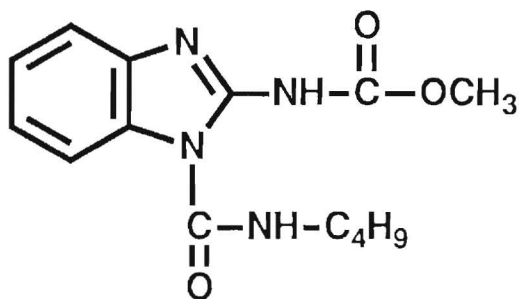
マイクロチューブル (微小管) は、 α -、 β -チューブリンのダイマーの重合により構成されており、すべての真核生物に存在し、細胞分裂、細胞の形態、細胞内物質移動、細胞運動等多くの機能を持っている (Dustin 1984)。ベンズイミダゾール系化合物は、マイクロチューブルの構成蛋白質であるチューブリンに結合することにより重合を阻害し、細胞分裂等の阻害を引き起こすことが知られている (Davidse 1977)。動植物に同様の阻害活性を示す薬剤として、コルヒチンが挙げられるが、コルヒチンは、かびに対して一般に抗菌活性を示さない (Davidse 1986)。Kilmartin(1981)は、MBCとコルヒチンに対す



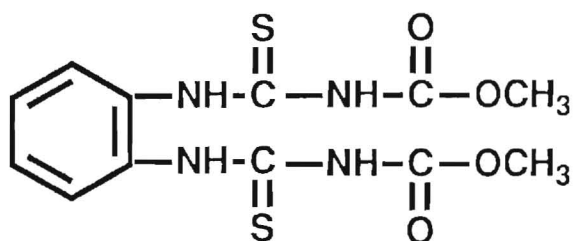
carbendazim (MBC)



thiabendazole (TBZ)

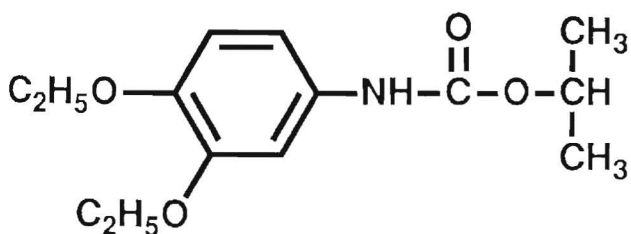


benomyl

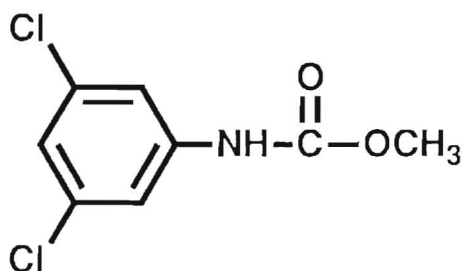


thiophanate-methyl

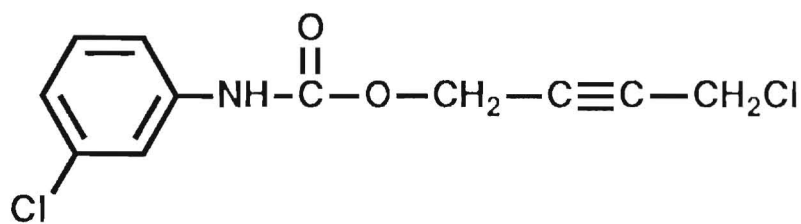
Fig. 1-1a The structural formulae of benzimidazoles



diethofencarb



MDPC



barban

Fig. 1-1b The structural formulae of N-phenylcarbamates



Fig. 1-2 Gray mold disease of grape

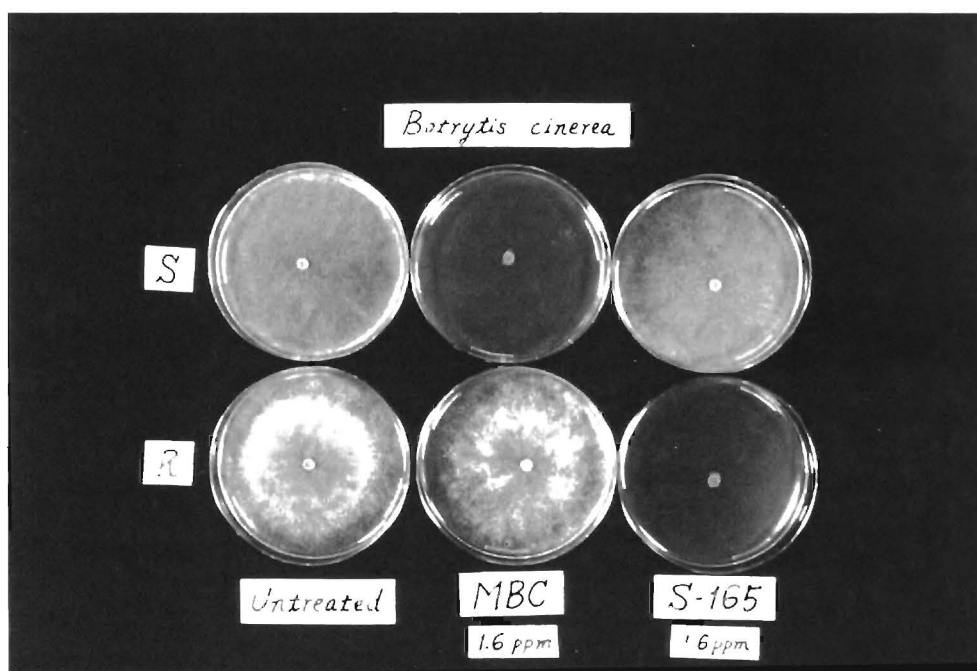


Fig. 1-3 Negatively correlated cross resistance between benzimidazoles and N-phenylcarbamates in *Botrytis cinerea*

るチューブリンの*in vitro*重合阻害を酵母菌とウシの脳由来のチューブリンをもちいて比較し、MBCは酵母菌特異的に、コルヒチンはウシ特異的に、それぞれマイクロチューブルの*in vitro*重合を阻害し、その差は、それぞれ1000倍であることを示している。菌の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*をもちいた解析より明かにされている (Davidse 1977)。また、ベンズイミダゾール耐性株の変異のほとんどが β -チューブリン遺伝子の変異であることが*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Neurospora crassa*、*Aspergillus nidulans*等をもちいた遺伝解析より明らかにされている (Neff et al. 1983, Hiraoka et al. 1984, Orbach 1986 et al., Sheir-Neiss&Thomas 1978, May et al.1987)。これらの菌において、 β -チューブリン遺伝子がクローニングされDNA配列よりベンズイミダゾール耐性を支配するアミノ酸置換が推定されている。しかしながら、これらのベンズイミダゾール耐性菌において、N-フェニルカルバマートに対する負相関交差耐性は認められておらず、負相関交差耐性を示すベンズイミダゾール耐性メカニズムに関しては、未解明であった。また、多くの負相関交差耐性を示す植物病原菌においては、その遺伝学的、生化学的な背景が乏しいことから、これまで、形態学的な研究 (Kato et al. 1984, Suzuki et al.1984, Nakamura et al.1986)を除いてほとんど未解明であった。

このベンズイミダゾールとN-フェニルカルバマート間に認められる負相関交差耐性のメカニズムを解明することは、マイクロチューブルの構造と機能及びその分類学的な特異性に関する知見を得るという基礎的な分野において重要であると同時に、農業分野におけるベンズイミダゾール耐性問題の打開策、ジェトフェンカルブの作用の選択性（安全性）、将来のジェトフェンカルブ耐性問題の可能性、新しい細胞分裂阻害剤の創製に関する知見を得るという応用分野において重要である。

本研究において著者は、圃場ベンズイミダゾール耐性植物病原菌に一般的に認められるN-フェニルカルバマートに対する負相関交差耐性のメカニズムをアカパンカビを用いて遺伝学的、分子生物学的、生化学的手法を用いて解析した。第2章では、N-フェニルカルバマートに感受性（負相関交差耐性）を示すMBC耐性株の単離とその性質について

述べる。第3章では、N-フェニルカルバマート感受性を示す株よりN-フェニルカルバマート耐性変異株の単離と、その性質について述べる。第4章においては、これらの変異株の変異を遺伝子工学的手法を用いて解析した。第5章においては、 ^{14}C ラベルしたジエトフェンカルブを用いて、ジエトフェンカルブ結合蛋白質について解析した。第6章では、これらの結果もとに総合的な議論及び考察を行なった。

第2章 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

Neurospora 変異株の単離およびその解析

2-1 緒言

著者は、植物病原菌において一般的に認められるベンズイミダゾール系化合物とN-フェニルカルバマート系化合物間の負相関交差耐性のメカニズムの解明に着手するにあたり、材料として、*Neurospora crassa*を用いた。その理由は以下の通りである。

1) 薬剤耐性のメカニズムの解析には遺伝学的手法が有効と考えられるが、多くの植物病原菌は、不完全菌に属し有性世代が認められないか、もしくは有性世代が認められていてもその遺伝学的背景が乏しいため十分な解析が望めない。一方、*N. crassa*は遺伝解析を行なう材料として適している。

2) *N. crassa*は多くの植物病原菌と同様に糸状子嚢胞子菌であり、ベンズイミダゾール系化合物に対して灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) 等と同様高い感受性を示す(Brock & Braymer 1974)。一方、*Saccharomyces cerevisiae*や*Schizosaccharomyces pombe*も1) の条件は満たしているが、これら酵母は植物病原菌と近縁とは言いがたくベンズイミダゾール系化合物に対する感受性も灰色かび病菌等と比較して低い(Thomas et al. 1985)。

3) *N. crassa*においては、ベンズイミダゾール耐性変異株が単離解析されており(Brock & Braymer 1974)、その変異を担う遺伝子 (β-チューブリン遺伝子) がクローニングされている(Orbach 1986)。Orbach et al.(1986)によると、*N. crassa*のβ-チューブリン遺伝子は1種類とされている。β-チューブリンは、ジエトフェンカルブの作用部位候補と考えられる。従って、*N. crassa*のβ-チューブリン遺伝子が1種類であることはその変異の解析の複雑化を避けることができる。一方、1)、2) の条件を満たしている*Aspergillus nidulans*には、2種類のβ-チューブリン遺伝子が知られている。

以上のことから、筆者は*N. crassa*を材料として、野生株をUV処理し、カルベンダジム (MBC) 耐性株を単離し、ジエトフェンカルブ感受性株を見いだした。以下に、その単

離方法及び変異株の解析について述べる。

2-2 材料と方法

使用菌株

MBC 耐性株を単離するための野生株として、*Neurospora crassa* 74-OR31-14a (*al-2*, *pan-2*, *cot-1 a*; FGSC4934)を用いた。MBC 耐性株の戻し交配のための野生株としては、C1-T10-37A (Tamaru & Inoue 1989)を用いた。MBC 耐性株の変異の遺伝学的解析のために、Brock & Braymer (1974)により単離されたペノミル耐性Bml-511株と Bml-111株 (FGSC2965, 3460, and 2964)を用いた。また、ヘテロカリオン形成には、野生株として FGSC4093を用いた。これらの*Neurospora* 株はFungal Genetics Stock Center (Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center, Kansas, USA)より入手した。

培地

菌糸栄養生殖のための培地としてVogel最少培地 (1.5 % ショ糖, 1.5 % 寒天添加)を用いた(Vogel 1964)。パントテン酸を要求する株に対しては最終濃度100 µg/mlのパントテン酸カリウムを培地に添加した。遺伝解析のための交配にはWestergaad & Michell (1947)の交配用培地 (0.5% ショ糖)を用いた。コロニー形成用培地としてはVogel最少培地 (1.0 % ソルボース, 0.2 % ショ糖, 1.5 % 寒天添加)を用いた。変異株の薬剤感受性は、Vogel最少培地 (1.0 % ソルボース, 0.2 % ショ糖, 1.5 % 寒天添加)に任意の濃度の薬剤を加え、培地上に胞子液を接種し、コロニー形成阻害を調べた。また、菌糸の生育を50% 阻害する濃度は、所定の濃度の薬剤を含むVogel最少培地 (1.5 % ショ糖, 1.5 % 寒天添加)に 菌糸ディスクを接種し、菌糸生育半径を測定することにより算出した。

Vogel's 最少培地 (X25 Stock solution)

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	62.5g
KH_2PO_4	125g
NH_4NO_3	50g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5g
Biotin solution (0.1mg/ml)	1.25ml
Trace elements solution *	2.5ml
H_2O	1000ml

Trace elements *

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.25g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05g
H_3BO_3	0.05g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05g
H_2O	95ml

交配用培地

KNO_3	1g
KH_2PO_4	1g
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g
NaCl	0.1g
CaCl_2	0.13g
Vogel最少培地	1ml
Biotin solution (10mg/250ml)	1ml
H_2O	1000ml

20 % KOHを加えてpH5.0-6.0に合わせる

孢子発芽管及び核の形態観察

分生胞子を薬剤含有培地に接種し28°Cで18時間培養後、発芽胞子を1000 x *g*で遠心し集菌後、蒸留水で2回洗浄した。核の染色効率を向上させるため菌体をエタノールで10分間処理し、さらに蒸留水で2回洗浄した。この菌体を1µg/mlの4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で5分間処理し、ニコン蛍光顕微鏡で発芽管及び核の形態を観察した。

MBC耐性株の単離及び遺伝解析

Neurospora crassa 74-OR31-14a株をVogel最少培地 (1.5 % ショ糖, 1.5 % 寒天添加)で1週間培養し、分生胞子を形成させ、滅菌蒸留水中に分生胞子を懸濁し、ガーゼで菌糸を除き、分生胞子液(10⁸胞子/ml)とした。この分生胞子液をシャーレ (10ml/径9cmシャーレ) に入れ、30Wの殺菌ランプ下で10%の生存率になるようにUV照射した。このUV照射した分生胞子を50µg/ml のMBCを含む培地にプレートし、27°Cで2日間培養した。MBC含有培地上で生育したコロニーを単離し、Vogel最少培地に再培養した。MBC 耐性株は、C1-T10-37A (Tamaru & Inoue 1989)に3回戻し交配し変異の純化を行なった。遺伝解析はDavis & de Serres (1971)によるランダム子嚢胞子解析により行なった。

ヘテロカリオンの形成

F 914株(*Bmf*⁻, *al-2*⁺, *pan-2*⁺, *cot-1*⁺, A)と74-OR31-14a(*al-2*, *pan-2*, *cot-1*, a; FGSC4934)を交配し、パントテン酸要求性のF 914-1(*pan-2*, A)株 (*al-2*⁺, *pan-2*, *cot-1*⁺ A)を単離した。このF 914-1(*pan-2*, A)株とWild-type (*chol-2*, A; FGSC4093)をVogel's 最少培地上に混合接種し、ヘテロカリオンを形成した。このヘテロカリオンの薬剤感受性を調べた。

薬剤

ジエトフェンカルブは3,4-diethoxyphenyl isocyanateと isopropyl alcoholを反応させることにより合成した (Takahashi 1989a)。MBC はO-phenylenediamineと dimethyl-2methyl-isothioureia-1, 3-dicarboxylateを反応させることにより合成した。TBZはSigma社より購入した。これらの薬剤はDimethylsulfoxideに溶解し、4°Cでストックした。薬剤感受性試験は、培地中のDimethylsulfoxideの最終濃度が0.1%以下になるように調整した。

2-3 ジエトフェンカルブ感受性を示すMBC耐性株の単離

Brock & Braymer (1974)は、*N. crassa* 野生株よりベノミル耐性Bml-511株及びBml-111株を単離し、その変異が第6染色体にマップされることを示している。さらに、Orbach et al.(1986)は、Bml-511株の β -チューブリン遺伝子を単離し、野生株の β -チューブリン遺伝子の塩基配列と比較し、167番目のアミノ酸がフェニルアラニン(Phe)からチロシン(Tyr)に置換していることを報告している。そこで、これらのベノミル耐性株 (Bml-511株及びBml-111株) が、ジエトフェンカルブに対して感受性を獲得しているか否かについて調べた。Table 2-1に示したように、Bml-511株及びBml-111株はMBCに対し明らかに耐性となっているが、ジエトフェンカルブに対する感受性は獲得しておらず、最少阻害濃度(MIC)は野生株と同様に100 μ g/ml以上であった。

そこで、ベノミル、チオフアネートメチルの活性本体であるMBCを用いて、新たにベンズイミダゾール耐性株を野生株よりUV処理により19株単離した。ベンズイミダゾール耐性植物病原菌の多くがMBCに対し高度耐性を示すことから(Leroux & Gredt 1979a, b)、50 μ g/mlのMBCを含む培地上で生育するMBC高度耐性株を単離した。これら19株のMBC耐性株のそれぞれについて、ジエトフェンカルブに対する感受性を調べたところ、2株 (F914株とF939株) がジエトフェンカルブ感受性を示した。Table2-1に、この2株 (F914株、F939株) 及びMBC耐性レベルの異なる代表的な株 (F812、F934、F911、F936株)に対するMBCとジエトフェンカルブ感受性を示した。F914株とF939株のMBCに対するMICは>100 μ g/mであった。一方、ジエトフェンカルブに対するMICは、0.1 μ g/mであり、野生株のMIC>100 μ g/mと比較すると1000倍以上のジエトフェンカルブ感受性の獲得が認められた。F914株およびF939株以外の株 (F812、F934、F911、F936株)のジエトフェンカルブに対するMICは野生株、Bml-511株及びBml-111株と同様>100 μ g/mlであった。Bml-511株、Bml-111株及びF812株は、F914株 (およびF939株) よりも低い

MBC耐性を示し、F 934株は、ほぼ同等のMBC耐性を示し、F 911株及びF 936株は、F 914株（およびF 939株）よりも高いMBC耐性を示した (Table2-1)。このことは、ジエトフェンカルブ感受性はMBC耐性株に常に認められる現象ではなく、一部の変異株において認められることを示している。

Table 2-1 The sensitivity of MBC-resistant strains to MBC and diethofencarb

	Growth									
	MBC (μg/ml)					Diethofencarb (μg/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

2-4 F 914株の薬剤感受性

F 914株およびF 939株の薬剤感受性をベンズイミダゾール系化合物（MBC、TBZ、チオフアネートメチル）及びN-フェニルカルバマート系化合物（ジエトフェンカルブ、MDPC、バーバン）に対して調べた。Table2-2 に示したようにF 914株およびF 939株は、これらのベンズイミダゾール系化合物に正相関交差耐性を示し、N-フェニルカルバマート系化合物に負相関交差耐性を示した。N-フェニルカルバマート系化合物の中ではジエ

トフェンカルブが、最も高い活性を示した。F914株のこれら化合物に対する感受性は、F939株におけるものとよく一致していた。このことは、F914株およびF939株はそれぞれ独立に単離された株であるが、同一の変異をもつ可能性を示唆している。Bml-511株は、試験に供したいかなるN-フェニルカルバマート系化合物に対しても負相関交差耐性を示さなかった。

Table 2-2 The sensitivity of MBC-resistant mutants to benzimidazoles and N-phenylcarbamates

	Minimum inhibitory concentration (μg/ml)					
	Benzimidazoles			N-phenylcarbamates		
	MBC	Thiophanate-methyl	TBZ	Diethofencarb	MDPC	Barban
Wild-type	0.4	1.6	1.6	>100	100	50
F914	>100	>100	100	0.1	0.8	6.2
F939	>100	>100	100	0.1	0.8	6.2
Bml-511	50	100	>100	>100	100	50

MDPCとバーバンは、高い濃度においてすべての菌株に抗菌活性を示したが、これらの化合物の高濃度での抗菌活性は、F914株およびF939株に対する低濃度における抗菌作用とは異なる（2-6で示す）。ベンズイミダゾール系化合物、N-フェニルカルバマート系化合物以外の殺菌剤（ウニコナゾール、トリデモルフ、IBP、ブラストサイジン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、野生株のものと顕著な差は認められなかった。従って、F914株およびF939株のN-フェニルカルバマート系化合物に対する感受性の増加は、N-フェニルカルバマート系化合物に特異的なものであると考えられた。また、ベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌に対しN-フェニルカルバマート系化合物同様に負相関交差耐性を示す化合物ジフェニルアミンは、野生株のMICが25μg/mlであるのに対し、F914株（及びF939株）のMICは1.6μg/mlであり負相関交差

耐性が認められた。これらのことは、アカパンカビF914株（及びF939株）に認められる負相関交差耐性のメカニズムが、圃場から分離されるベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌のものと本質的に同一のものであることを示唆していると考えられた。

また、ベンズイミダゾール耐性株のなかには、その生育に温度感受性を示すものがあることが知られている(Thomas et al. 1985, Oakley & Morris 1981)。しかし、F914株およびF939株は、10°Cおよび34°Cでの生育は、野生株のそれと同等であった。

2-5 F914株に対するジエトフェンカルブの作用に関する細胞学的解析

ベンズイミダゾール耐性株に対するジエトフェンカルブの作用を調べるために、F914株の分生胞子の発芽に及ぼすジエトフェンカルブの影響を調べた。ジエトフェンカルブは、100μg/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、0.5μg/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（Fig2-1）。この形態異常はMBC（0.5μg/ml）で処理した野生株のものとよく一致していた。なお、MBC（0.5μg/ml）で処理したF914株、及び、ジエトフェンカルブ（0.5μg/ml）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、マイクロチューブルに作用し核の分裂を阻害することが知られている (Davidse 1977)。そこで、ジエトフェンカルブのF914株に対する核の形態に及ぼす影響を上記と同一のサンプルを用いて調べた。核はDAPIにより染色した。無処理の核は、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で処理されたF914株においては、核が凝集した形態を示し、その分布には片寄りがあり、核を含まない発芽管が認められた (Fig2-2)。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いた。このことは、ジエトフェンカルブは、F914株に対して特異的に核分裂、核の移行を阻害していると考えられた。なお、MBC

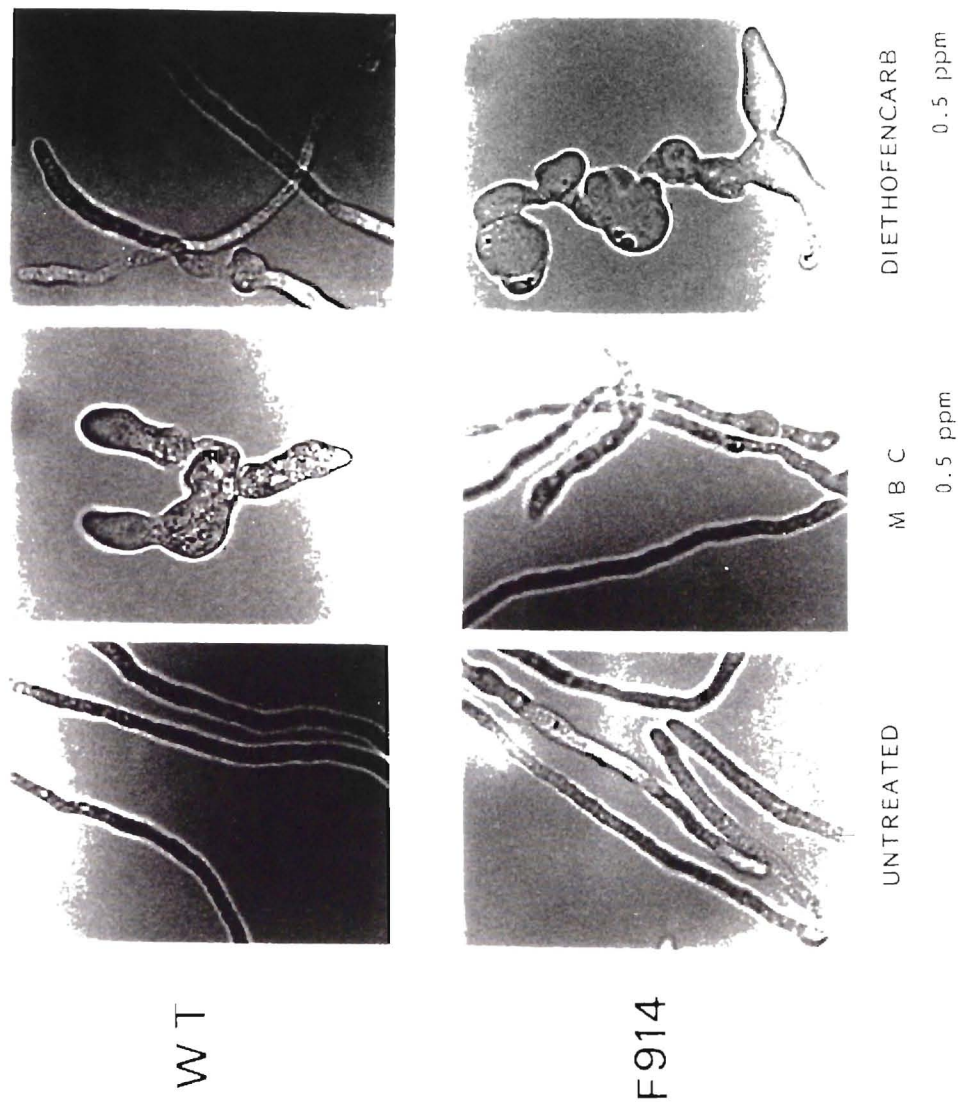


Fig. 2-1a Effects of diethofencarb and MBC on mycelial morphology of *N. crassa*

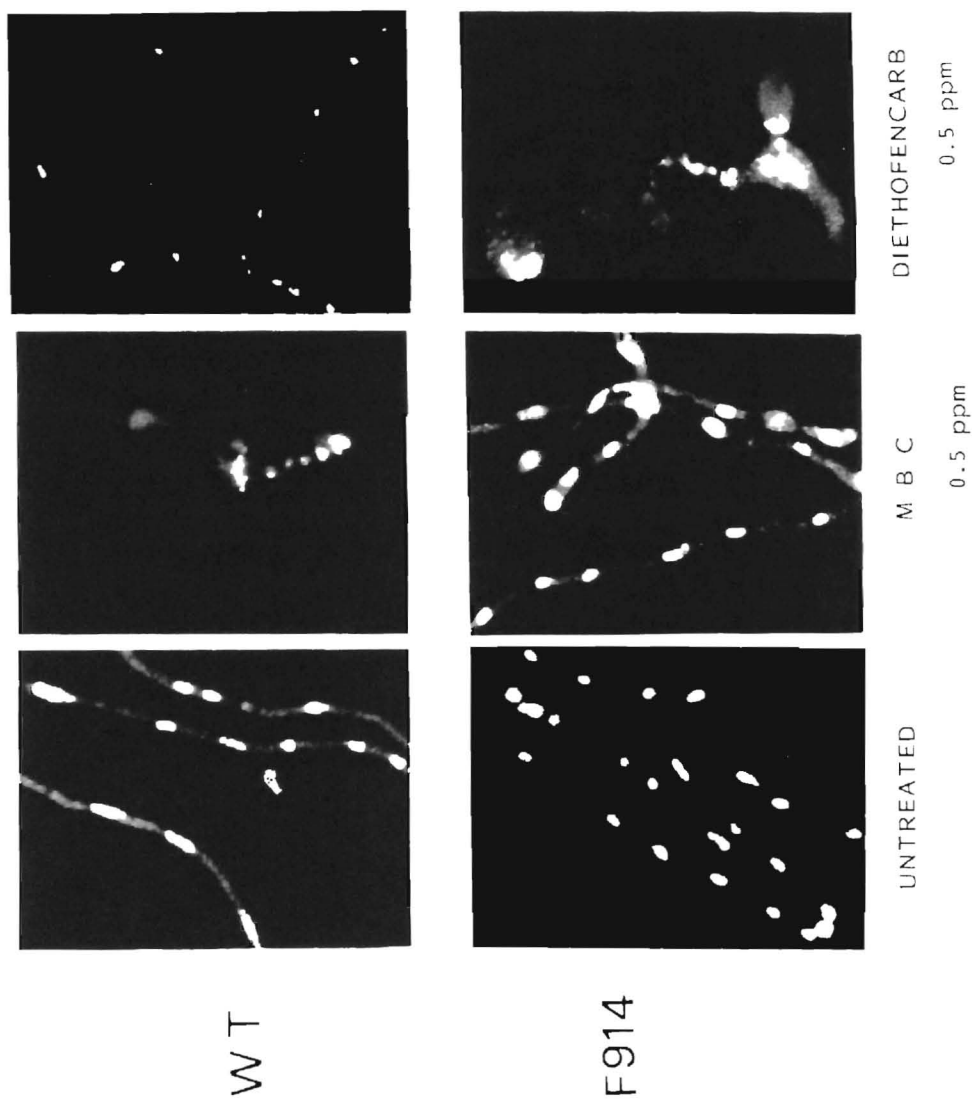


Fig. 2-1b Effects of diethofencarb and MBC on nuclear morphology of *N. crassa*

で処理したF914株、及び、ジエトフェンカルブ処理した野生株の核の形態に異常は認められず、無処理のものと同様であった。

これらの形態学的な観察は、灰色かび病菌におけるMBC、ジエトフェンカルブの作用とよく似ており(Fujimura et al. 1990)、アカパンカビF914株に認められる負相関交差耐性のメカニズムは、圃場から分離されるベンズイミダゾール耐性灰色かび病菌のものと本質的には一致していると考えられた。

なお、MDPCおよびバーバンも低濃度（それぞれ、1 μ g/ml、5 μ g/ml）においては、ジエトフェンカルブと同様にF914株特異的に分生胞子の発芽管の形態異常を引き起こした。しかしながら、ジエトフェンカルブが100 μ g/mlの濃度においても野生株の分生胞子の発芽管の形態に影響を示さないのに対し、MDPCおよびバーバンは、100 μ g/mlの濃度において野生株、F914株両者に対し分生胞子の発芽を阻害した。このことは、MDPCおよびバーバンの高濃度における野生株に対する抗菌活性は、ジエトフェンカルブのF914株に対して示す作用とは異なる二次的な作用であると推定された。

2-6 F914株の変異の遺伝学的解析

2-6-1 F914株の変異の遺伝解析

ジエトフェンカルブに対する感受性を獲得したMBC耐性株の遺伝学的メカニズムを解明する目的で、F914株及びF939株の遺伝解析を行なった。F914株を野生株と交配し、その子孫（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（野生株株の形質）を示した(Table 2-3)。この交配において、MBC及び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、F 914株（及びF 939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(1974)によりmappingされており、さらに、Orbach et al. (1986)により β -チューブリン遺伝子をコードしてい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 (Table2-3)。また、ジエトフェンカルブ感受性を示した子孫は、100 μ g/mlのMBC含有培地で生育しMBC高度耐性を示したが（F 914株の形質）、ジエトフェンカルブ耐性を示した子孫は、0.5 μ g/mlのMBC含有培地では生育したものの、100 μ g/mlのMBC含有培地では生育しなかった（Bml-511株の形質）。野生株型の形質を示す子孫が出現しなかったことは、F 914株の変異は β -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。F 914株のMBC耐性ジエトフェンカルブ感受性変異が*pan-2*(第6染色体右腕)の変異と12%の組換え率で連鎖を示したが、*al-2*（第1染色体右腕）及び*cot-1*（第4染色体右腕）とは連鎖を示さなかったことは、F 914株の変異がBml座と連鎖していることを裏付けている。

さらに、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F 812株、F 934株、F 911株、F 936株をF 914株と交配し、その子嚢胞子の形質を調べたところ、すべての子孫がMBCに耐性を示し、このうち約半数の子孫がジエトフェンカルブ耐性を示した (Table2-3)。このことは、これらの株の変異もまたBml座かその近傍に位置することを示している。従って、MBC耐性株のうち、ジエトフェンカルブに対する感受性を示す株も、感受性を示さない株もBml座に連鎖を示す。即ち、 β -チューブリン遺伝子の変異様式の差がジエトフェンカルブ感受性、耐性を支配している可能性を示唆している。

Table 2-3 Segregation pattern in cross of MBC-resistant mutants

Cross	Number of progeny			Total
	MsDr ^a	MrDs ^b	MrDr ^c	
Wild-type x				
F914	98	105	0	203
F939	78	76	0	154
F936	70	0	73	143
Bml-511 x				
F914	0	57	68	125
F939	0	54	50	104
F936	0	0	112	112
F914 x				
F914	0	109	0	109
F939	0	149	0	149
F812	0	97	68	165
F934	0	56	51	107
F911	0	72	78	150
F936	0	59	54	113

^aSensitive to MBC (0.5μg/ml) but not sensitive to diethofencarb (0.5μg/ml)

^bResistant to MBC (0.5μg/ml) but sensitive to diethofencarb (0.5μg/ml)

^cResistant to both MBC (0.5μg/ml) and diethofencarb (0.5μg/ml)

2-6-2 F914株の変異の遺伝的微小地図

F914株のベンズイミダゾール系化合物及びN-フェニルカルバマート系化合物に対する薬剤感受性は、F939株のものと極めてよく一致していた。そこで、F914株及びF939株間の遺伝的微小地図の解析を行なった。F914株及びF939株は、共にジエトフェンカルブ感受性を示す。この両株の変異がBml座の異なる部位にあると仮定すると、両者の交配においてそれぞれの変異間に組換えが起こり、結果として、ある確率でジエトフェンカルブ耐性子孫（野生株型）が生じると考えられる。そこで、F914株とF939株

を交配し、約 5×10^6 の有性胞子を集め、これをジエトフェンカルブ($0.5 \mu\text{g/ml}$)を含む培地にプレートしたところ生育するコロニーは認められなかった (Table 2-4)。このことは、F 914株の変異と F 939株の変異が全く同一の部位に起こっているか、あるいは極めて近傍に位置することを示している。

さらに、F 914株のもつ2つの異なる形質 (MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性) が、Bml座の異なる変異によりそれぞれ独立に支配されているか否かを調べるため、F 914株と野生株を交配し、約 2×10^6 の子孫を集め、MBC($0.5 \mu\text{g/ml}$)とジエトフェンカルブ($0.5 \mu\text{g/ml}$)を同時に含む培地にプレートしたところ生育するコロニーは認められなかった (Table 2-4)。このことから、1) F 914株の1つの変異が、2つの異なる形質、(MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性) を同時に支配している。2) F 914株の変異は2箇所以上でおこっているが、お互いの変異が極めて近い。3) F 914株の変異は2箇所以上でおこっているが、それぞれ単独の変異のみでは、2つの異なる形質 (MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性) を示さない。という可能性が考えられた。

Table 2 - 4 Fine-mapping of the mutation of diethofencarb sensitive strains

Cross	Number of total progeny ($\times 10^6$)	Number of recombinant progeny	
		BsDr ^a	BrDr ^b
F 914 x F 939	4.8	0	-
Wild-type x F 914	1.8	-	0
Wild-type x F 939	0.5	-	0

^aSensitive to MBC ($0.5 \mu\text{g/ml}$) but not sensitive to diethofencarb ($0.5 \mu\text{g/ml}$)

^bResistant to both MBC ($0.5 \mu\text{g/ml}$) and diethofencarb ($0.5 \mu\text{g/ml}$)

2-6-3 ヘテロカリオンの薬剤感受性

F 914株(*Bm1*, *al-2*⁺, *pan-2*⁺, *cot-1*⁺ A)と74-OR31-14a(*al-2*, *pan-2*, *cot-1* a; FGSC4934)を交配し、F 914-1(*pan-2*, A)株 (*Bm1*, *al-2*⁺, *pan-2*, *cot-1*⁺ A)を単離した。F 914-1(*pan-2*, A)株はパントテン酸要求性をもち、Wild-type (*chol-2*, A; FGSC4093)株はコリン要求性を持つため、それぞれ単独ではVogel's 最少培地上で生育しない。しかしVogel's 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ことができるヘテロカリオンが形成される(Fig. 2-2)。得られたヘテロカリオンに対するMBC及びジエトフェンカルブ感受性を最少培地上で調べた (Table 2-5)。なお、F 914-1(*pan-2*, A)株及びWild-type (*chol-2*, A; FGSC4093)株の薬剤感受性は、それぞれパントテン酸、コリンを添加した最少培地を用いて調べた。F 914-1(*pan-2*, A)株は、MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性を示し、逆にWild-type (*chol-2*, A; FGSC4093)株は、MBC感受性、ジエトフェンカルブ耐性を示した。一方、両株間のヘテロカリオンは、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 (1974)は、Bm1-511株のベノミル耐性は優性形質であることを報告しているが、F 914株のMBC耐性変異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ることを示している。しかしながら、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、F 914株由来の細胞分裂機能は阻害を受けないためMBC 含有培地で生育可能となる。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F 914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い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F 914株由来の細胞分裂機能が共に阻害を受けるためヘテロカリオンは生育ができない (Fig. 2-3)。

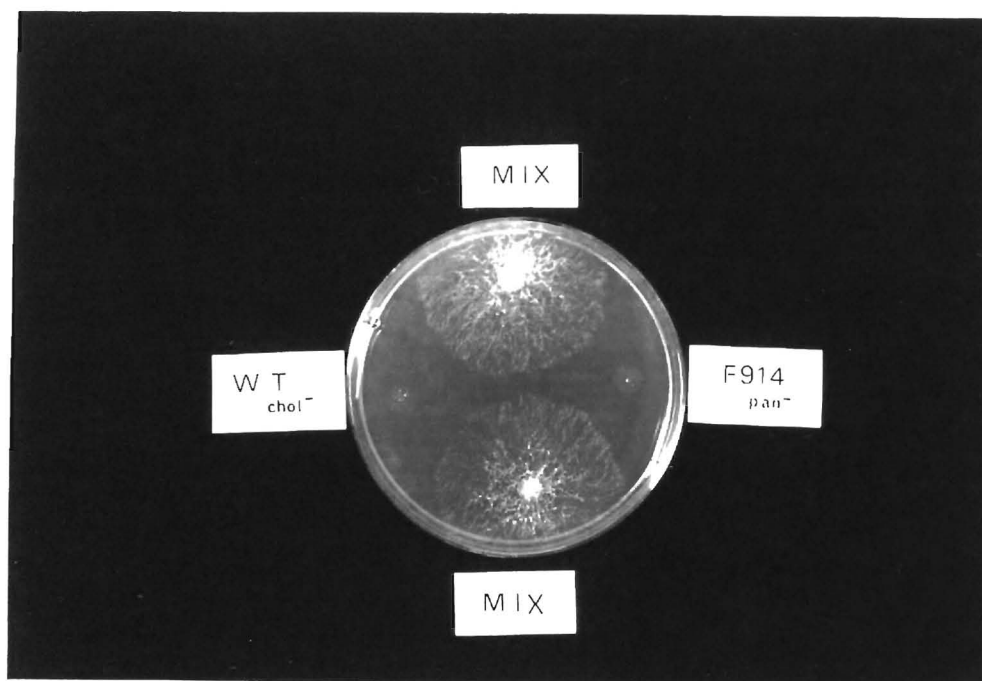


Fig. 2 - 2 Formation of heterokaryon between the wild-type strain and the F914 strain

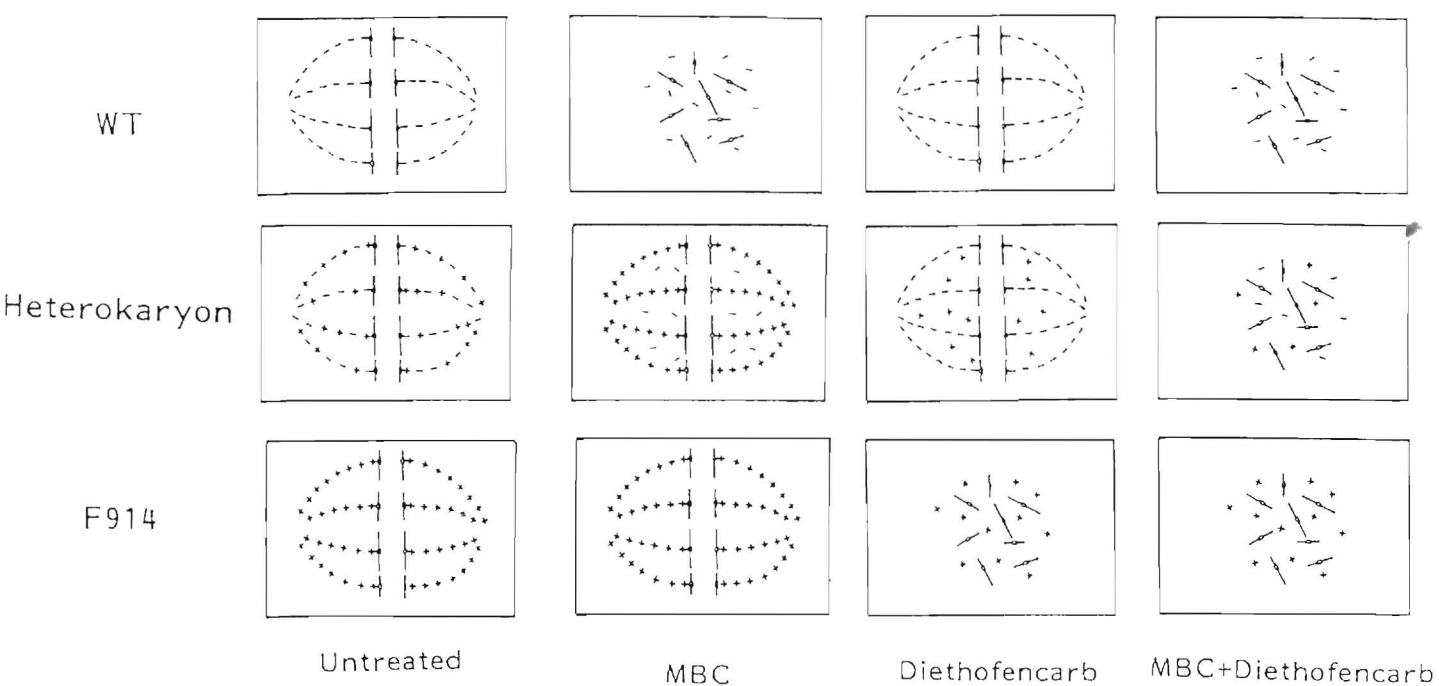


Fig. 2 - 3 A putative action mechanism of MBC and diethofencarb to heterokaryon in *N. crassa*

Table 2-5 The sensitivity of heterokaryon to MBC and diethofencarb in *N. crassa*

Strains	Mycelial growth on the medium containing chemicals (mm/12hr)			
	None	MBC	Diethofencarb	MBC+Dioethofencarb
		0.2 μ g/ml	0.1 μ g/ml	0.2 μ g/ml+0.1 μ g/ml
Wild-type (<i>chol-2</i>)	5 6	0	5 6	0
Heterokaryon	4 0	1 0	1 4	0
F914 (<i>pan-2</i> , A)	5 4	5 5	0	0

第3章 N-フェニルカルバマート耐性株（復帰突然変異株）の単離 およびその解析

3-1 緒言

第2章で示したように、ジエトフェンカルブ感受性を示すMBC耐性F914株の変異は、Bml座（ β -チューブリン遺伝子座）に連鎖を示した。また、ジエトフェンカルブは、F914株の細胞分裂を特異的に阻害し、その阻害様式は、MBCの野生株に対する阻害様式と極めてよく似ていた。本章では、ジエトフェンカルブ感受性を示すF914株を親株としてN-フェニルカルバマート耐性株を単離し、その性質について解析した。その目的及び理由は、以下の3点による。第1点は、MBC耐性とジエトフェンカルブ感受性という2つの形質を示すF914株の変異が単一の点突然変異によるか否かに関する知見を得る。F914株の変異が点突然変異であると仮定すると、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）を示す株が復帰変異株（真性復帰株）として単離されると期待される。第2点は、ジエトフェンカルブ耐性変異株の性質及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メカニズムに関する知見を得る。MBCはチューブリンに結合し、その機能を阻害することにより抗菌活性を示すとされているが (Davidse 1977)、仮に、ジエトフェンカルブがMBCと同様にF914株のチューブリンに特異的に結合して選択的抗菌活性を示すとする、ジエトフェンカルブ耐性株として真性復帰変異以外の β -チューブリン変異 (new additional mutation) を持つ変異株が得られると期待される。このnew additional mutationを持つジエトフェンカルブ耐性株の性質を調べることにより、MBC、ジエトフェンカルブ間に認められる負相関交差耐性のメカニズムに関する知見が得られる。逆に、ジエトフェンカルブの直接の作用点が β -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なか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。この解析により、ジエトフェンカルブの直接の作用点に関する知見が得られる可能性がある。第3点は、N.

crassa のジエトフェンカルブ耐性メカニズムに関する知見を得、圃場に於けるジエトフェンカルブ耐性菌問題を予測し、これに対する対策をあらかじめ検討するための参考資料となり得ると考えられる。

3-2 材料と方法

本章において用いた変異株の単離、変異株の薬剤感受性、遺伝解析の手法は、基本的には第2章で用いた方法に準ずる。ただし、N-フェニルカルバマート耐性株を単離するにあたり、親株として F914-1(*pan-2* A)株を用い、ジエトフェンカルブ耐性株の単離は 1.0 μ g/ml の濃度のジエトフェンカルブを選択培地に加え、MDPC耐性株の単離は 5.0 μ g/ml の濃度の MDPC を選択培地に加えることにより行なった。変異株の変異の純化には、*Neurospora crassa* 74-OR31-14a (*al-2*, *pan-2*, *cot-1* a ; FGSC4934)を用いて、3回の戻し交配を行なった。

3-3 復帰突然変異株の単離

3-3-1 ジエトフェンカルブ耐性株の単離

F914株を親株として、UV処理により、1.0 μ g/ml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。Table3-1に示すように、ジエトフェンカルブ耐性株は、MBC及びジエトフェンカルブ感受性により2つのグループに大別された。第1のグループ（FR422、FR424、FR514、FR524株）は、ジエトフェンカルブ高度耐性を示し、親株F914の、ジエトフェンカルブに対する最少阻害濃度（MIC）が0.1 μ g/mlであるのに対し、これらのジエトフェンカルブ耐性株は、100 μ g/mlの濃度のジエトフェンカルブを含む培地上においても生育を示した。しかし、これらの株（FR422、FR424、FR514、FR524株）

は、野生株と同様にMBCを0.1 μ g/ml含む培地上において生育しなかった。第2のグループ（FR421、FR423、FR511、FR512、FR513、FR521、FR B3）は、0.1 μ g/mlの濃度のジエトフェンカルブに耐性を示すものの100 μ g/mlの濃度のジエトフェンカルブに対しては感受性を保持しており、野生株よりもジエトフェンカルブ感受性は高く、中等度耐性を示した。なお、FR B3株のジエトフェンカルブに対する最少阻害濃度（MIC）は、野生株と同様に100 μ g/ml以上であったが、菌糸生育50%阻害濃度（ED₅₀）は、野生株が100 μ g/ml以上であるのに対し、FR B3株は100 μ g/mlであり、他のジエトフェンカルブ中等度耐性株同様にジエトフェンカルブ感受性は野生株よりも高かった。また、FR B3株のMDPCに対するMICは、野生株が、100 μ g/mlであるのに対し、FR B3株は12.5 μ g/mlであり、やはり、野生株よりも高いMDPC感受性を示した（Table 3-3）。従って、FR B3株も、中等度耐性株であると考えられた。

これらのジエトフェンカルブ中等度耐性株は、100 μ g/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。

3-3-2 MDPC耐性株の単離

同様に、F914株を親株として5株のMDPC耐性株の単離を行なった。ジエトフェンカルブ耐性株同様に、MDPC高度耐性2株（FR441、FR443株）は、MBCに対する感受性を回復していた。MDPC中等度耐性株（FR442、FR445、FR449株）は、MBC感受性の回復は認められなかった（Table 3-2）。

Table 3 - 1 Characterization of diethofencarb-resistant mutants from the F914 strain

Strain	Growth			
	MBC ($\mu\text{g/ml}$)		Diethofencarb ($\mu\text{g/ml}$)	
	0.1	100	0.1	100
Wild-type	-	-	+	+
F914	+	+	-	-
FR422	-	-	+	+
FR424	-	-	+	+
FR514	-	-	+	+
FR524	-	-	+	+
FR421	+	+	+	-
FR423	+	+	+	-
FR511	+	+	+	-
FR512	+	+	+	-
FR513	+	+	+	-
FR521	+	+	+	-
FRB3	+	+	+	+

+, Growth

-, No growth

Table 3 - 2 Characterization of MDPC-resistant mutants from the F914 strain

Strain	Growth			
	MBC ($\mu\text{g/ml}$)		MDPC ($\mu\text{g/ml}$)	
	0.1	100	0.1	100
Wild-type	-	-	+	+
F914	+	+	-	-
FR441	-	-	+	+
FR443	-	-	+	+
FR442	+	+	+	-
FR445	+	+	+	-
FR449	+	+	+	-

+, Growth

-, No growth

3-4 復帰突然変異株の薬剤感受性

N-フェニルカルバマート耐性変異株（ジエトフェンカルブ耐性株及びMDPC耐性株）の薬剤感受性をベンズイミダゾール系化合物（MBC、TBZ）、N-フェニルカルバマート系化合物（ジエトフェンカルブ、MDPC）及びグリセオフルビンについて調べた。N-フェニルカルバマート系化合物に対する感受性は、MICにより比較した。ベンズイミダゾール系化合物及びグリセオフルビンに対する感受性は、親株F914株がベンズイミダゾール系化合物に対して高度耐性（MIC>100 μ g/ml）であること、グリセオフルビンは、低濃度から抗菌活性を示すにもかかわらず高濃度においても生育を完全に阻害しないことから、これらの化合物に対してはED₅₀値により比較した。

Table3-3に示したようにMBC感受性を回復したN-フェニルカルバマート高度耐性変異株（FR422、FR424、FR441、FR443株）は、ベンズイミダゾール（MBC、TBZ）に感受性を示し、N-フェニルカルバマート（ジエトフェンカルブ、MDPC）に対し高度耐性を示した。N-フェニルカルバマート高度耐性変異株（FR422、FR424、FR441、FR443株）のこれらの化合物に対する感受性は、野生株のものと極めてよく一致しており区別できなかった。なお、N-フェニルカルバマート高度耐性変異株は、すべて、パントテン酸要求性を示し、mating type Aであった。従って、これらの株は、野生株の混入によるものではなく、F914-1(*pan*-2, A)株より生じた変異株であると考えられた。

一方、N-フェニルカルバマート中等度耐性株（FR421、FR423、FR511、FR513、FR521、FRB 3、FR442、FR445、FR449株）は、ベンズイミダゾール系化合物（MBC、TBZ）に対し、F914株よりも高い耐性を示した。F914株及びN-フェニルカルバマート高度耐性株においては、N-フェニルカルバマート系化合物とベンズイミダゾール系化合物間には負相関交差耐性が認められた。しかし、N-フェニルカルバマート中等度耐性株は、いずれもベンズイミダゾール系化合物（MBC、TBZ）に対しF914株よりも高い耐性を示し、N-フェニルカルバマート系化合物とベンズイミダゾール系化合物間には正相

Table 3-3 The sensitivity of revertants to N-phenylcarbamates, benzimidazoles and griseofulvin.

Strains	Antifungal activity ($\mu\text{g/ml}$)				
	N-phenylcarbamates ^(a)		Benzimidazoles ^(b)		Griseofulvin ^(b)
	Diethofencarb	MDPC	MBC	TBZ	
wild-type	>100	1 0 0	0.07	0.32	4.5
F914	0.1	0.8	1 0	3.5	2.1
FR422	>100	1 0 0	0.06	0.28	3.5
FR424	>100	1 0 0	0.07	0.35	n t
FR441	>100	1 0 0	0.07	0.32	n t
FR443	>100	1 0 0	0.07	0.35	5.5
FR421	5 0	3.2	>100	6 1	8 0
FR511	12.5	6.2	>100	2 1	6.2
FR513	2 5	0.4	1 0 0	6 7	7.1
FR521	1 0 0	1 0 0	>100	>100	>100
FRB3	>100	12.5	>100	1 3	1.9
FR442	2 5	12.5	>100	4 2	9.8
FR445	12.5	2 5	>100	2 8	3.1
FR449	0.1	6.2	>100	1 1	6.1

^(a)Minimal concentration to inhibit colonial growth.

^(b)Concentration to inhibit radial growth at 50% level.

関交差耐性が認められた。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と思われた。

これらのN-フェニルカルバマート中等度耐性株は、N-フェニルカルバマート系化合物（ジエトフェンカルブ、MDPC）及びグリセオフルビンに対する感受性からさらに3つのグループに大別された。第1のグループは、FR511株、FRB3株、FR442株、FR445株に代表されるグループで、ジエトフェンカルブとMDPC両剤に対し、共に親株F914株より耐性を獲得していた（正相関交差耐性）。しかし、グリセオフルビンに対する感受性は、F914株及び野生株とほぼ同等であった。第2のグループは、FR513株、FR449株に代表されるグループでグリセオフルビンに対する感受性は、F914株及び野生株とほぼ同等であったが、ジエトフェンカルブとMDPCとの間に正相関交差耐性が認められなかった。即ち、FR513株（ジエトフェンカルブ耐性株）は、ジエトフェンカルブには耐性を示すが、MDPCに対しては、親株F914株と同等の感受性を示した。逆に、FR449株（MDPC耐性株）は、MDPCには耐性を示したが、ジエトフェンカルブには耐性を示さなかった。第3のグループは、FR421株とFR521株に代表されるグループでN-フェニルカルバマート系、ベンズイミダゾール系化合物のみならずグリセオフルビンに対しても耐性を示した。グリセオフルビンは、野生株F914株に対し、低濃度から抗菌活性を示したが高い濃度においても完全には菌糸の生育をおさえなかった。従って、グリセオフルビンの濃度の増加による抗菌活性の増加がベンズイミダゾール、N-フェニルカルバマート系化合物と比較して緩やかであり、ED₅₀値は、試験による誤差をある程度含んでいると考えられる。しかしながら、FR521株及びFR421株のグリセオフルビンに対する耐性は極めて高いものであり、あきらかに耐性を獲得していると考えられた。グリセオフルビンは、細胞分裂阻害剤であるとされているが、その阻害様式は、ベンズイミダゾール系化合物とは異なり、チューブリンに直接結合して作用するのではなく、microtubule associate protein に結合することにより細胞分裂の阻害をされるとされている (Roobol et al.)。また、グリセオフルビンとベンズイミダゾール系化合物間には、交差耐性は、一般に認

められていない。なお、これらの変異株は、細胞分裂阻害剤以外の殺菌剤プロシミドン、ジニコナゾール、トリデモルフ等に対する感受性は、野生株におけるものと同様であった。従って、第3のグループのジエトフェンカルブ中程度耐性株（FR421株、FR521株）において認められたグリセオフルビン耐性は、多剤耐性によるものではなくグリセオフルビン特異的なものであると考えられた。一つの可能性として、これらのジエトフェンカルブ中程度耐性株の変異は、1) グリセオフルビンの結合蛋白質の高次構造に影響を与える変異である。2) マイクロチューブルの安定性を高める働き（あるいは、チューブリンの生産の増強）を支配している変異である等の可能性が考えられる。

ジエトフェンカルブ高度耐性を示しMBCに対する感受性を回復した変異株（FR422、FR424、FR522、FR524株）は、薬剤を含有しない最少培地上で野生株と同等の生育を示し、その菌糸生育形態及び分生孢子形成に異常は認められなかった。一方、ジエトフェンカルブ中程度耐性株（FR421、FR423、FR511、FR512、FR513、FR521、FR B 3）及び、MDPC中程度耐性株（FR449、FR442、FR445株）のうち、FR B 3株、FR449株を除いて、その菌糸生育速度は野生株より遅かった（Table 3-4）。特にFR511、FR512及びFR521株は、その生育速度は野生株の40%以下であり、菌糸の形態は、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F 914株）の菌糸形態を示した。薬剤無添加培地においてもMBC処理された野生株の菌糸形態を示すことは、その変異が、マイクロチューブルの機能に影響を与える変異である可能性を示していると考えられる。

以上の結果から、N-フェニルカルバマート高度耐性株（FR422、FR424、FR441、FR443株）は、野生株への復帰変異により得られた株であると推定される。一方、N-フェニルカルバマート中程度耐性株は、new additional mutationにより得られていると考えられた。

なお、FR511株のこれらの薬剤（MBC、TBZ、ジエトフェンカルブ、MDPC及びグリセオフルビン）に対する感受性は、FR512株のものと極めて良く一致していた。また、FR513株のこれらの薬剤（MBC、TBZ、ジエトフェンカルブ、MDPC及びグリセオフル

ピン) に対する感受性は、FR423株のものと極めて良く一致していた。従って、これらの変異株はそれぞれ同一の変異株である可能性が示唆された。薬剤無添加培地上に於ける菌糸の生育速度及びその形態においても、FR511株とFR512株、及びFR513株とFR423株は良く似ており、FR511株はFR512株と同一変異株であり、FR513株はFR423株と同一変異株であることを支持している。

Table 3 - 4 The growth of the mutants on the chemical free medium

Strains	Phenotype of the strain	Growth on the chemical free medium (mm)
Wild-type	MBC sensitive	90
F914	MBC resistant (diethofencarb sensitive)	86
Bml511	MBC resistant (diethofencarb resistant)	84
FR422	Diethofencarb high-resistant	89
FR424	Diethofencarb high-resistant	90
FR511	Diethofencarb moderate-resistant	38
FR512	Diethofencarb moderate-resistant	39
FR513	Diethofencarb moderate-resistant	68
FR521	Diethofencarb moderate-resistant	39
FR421	Diethofencarb moderate-resistant	59
FR423	Diethofencarb moderate-resistant	65
FRB3	Diethofencarb moderate-resistant	80
FR449	MDPC moderate-resistant	80
FR422	MDPC moderate-resistant	55

3-5 復帰突然変異株の遺伝解析

N-フェニルカルバマート耐性メカニズムを遺伝的に解析するために、N-フェニルカルバマート耐性株をF914株及び野生株と交配し、その子孫の形質を調べた (Table 3-5)。ベンズイミダゾール感受性を回復しているジエトフェンカルブ高度耐性株 (F422株及びF424株) と野生株の交配において、すべての子孫がMBC感受性かつジエトフェンカルブ耐性を示し、親株であるF914株の形質 (MBC耐性かつジエトフェンカルブ感受性) を示す子孫は得られなかった。さらに、F422株 (及びF424株) を親株であるF914株と交配したところ、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。この交配において、MBC及び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。これらのことは、ジエトフェンカルブの高度耐性株の変異は β -チューブリン遺伝子であるBml座かその近傍にマップされることを示している。このことは、これらのジエトフェンカルブ高度耐性 (MBC感受性) 株は、親株F914株の変異が野生株型に復帰することにより得られた可能性を示唆している。さらに、このように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ことを示している。

ベンズイミダゾール感受性を回復していないジエトフェンカルブ中等度耐性株 (FR511、FR513、FR521、FR421、FRB3株) を親株であるF914株と交配したところ、すべての子孫がMBC耐性を示したが、約半数の子孫は、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、ジエトフェンカルブ中等度耐性 (ジエトフェンカルブ中等度耐性株の形質) を示した。

さらに、ジエトフェンカルブ中等度耐性株 (FR511、FR513、FR521、FR421、FRB3株) と野生株の交配において、約半数の子孫は、MBC感受性を示した。MBC感受性を示した子孫は例外なくジエトフェンカルブ高度感受性を示し、MBC耐性を示した子孫は

例外なくジエトフェンカルブ中等度耐性を示した。このことは、ジエトフェンカルブの中等度耐性株の変異も β -チューブリン遺伝子であるBml座かその近傍にマップされることを示唆している。

Table 3 - 5 Segregation patterns in crosses of diethofencarb-resistant mutants

Cross	Number of progeny			Total
	$M_S D_R^a$	$M_R D_S^b$	$M_R D_R^c$	
Wild-type x				
FR422	76	0	0	76
FR424	84	0	0	84
FR421	58	0	63	121
FR511	53	0	58	111
FR513	55	0	50	105
FR521	57	0	61	118
FRB3	66	0	69	135
F914 x				
FR421	50	49	0	99
FR424	59	53	0	112
FR421	0	62	52	114
FR513	0	64	59	123
FR511	0	53	56	109
FR521	0	61	57	118
FRB3	0	60	65	125

^aSensitive to MBC (0.5 μ g/ml) but not sensitive to diethofencarb (0.5 μ g/ml)

^bResistant to MBC (0.5 μ g/ml) but sensitive to diethofencarb (0.5 μ g/ml)

^cResistant to both MBC (0.5 μ g/ml) and diethofencarb (0.5 μ g/ml)

同様に、MDPC耐性株（FR441、FR443、FR442、FR449株）を野生株及びF914株と交配し、その子孫の薬剤感受性を調べたところ、MDPC耐性株の変異も β -チューブリン遺伝子であるBml座かその近傍にマップされることが判明した。

遺伝解析を行なったすべてのN-フェニルカルバマート耐性株の変異が、 β -チューブリン

ン遺伝子と連鎖を示すことから、N-フェニルカルバマートの作用点は、 β -チューブリンそのものであるか、あるいは、 β -チューブリンに密接に関連をもつ部位であると考えられる。

Table 3 - 6 Segregation patterns in crosses of MDPC-resistant mutants

Cross	Number of progeny			Total
	$M_S D_R^a$	$M_R D_S^b$	$M_R D_R^c$	
Wild-type x				
FR441	108	0	0	108
FR443	96	0	0	96
FR442	51	0	50	101
FR449	60	0	58	118
F914 x				
FR441	47	45	0	92
FR443	45	53	0	98
FR442	0	50	57	107
FR449	0	49	43	92

^aSensitive to MBC (0.5 μ g/ml) but not sensitive to MDPC (5.0 μ g/ml)

^bResistant to MBC (0.5 μ g/ml) but sensitive to MDPC (5.0 μ g/ml)

^cResistant to both MBC (0.5 μ g/ml) and MDPC (5.0 μ g/ml)

第4章 負相関交差耐性の分子生物学的解析

4-1 緒言

Aspergillus nidulans、*Sacchromyces cerevisiae*、*Shizosaccharomyces pombe*において、ベンズイミダゾール耐性は、 β -チューブリン遺伝子の変異により引き起こされることが知られている。しかし、これらの株においてはジエトフェンカルブの感受性の獲得は認められていない。一方、*N. crassa*において、ジエトフェンカルブ感受性を獲得したMBC耐性F914株の変異はBml座（ β -チューブリン）かその近傍に位置することを第2章で示した。さらにF914株を親株として単離した復帰突然変異株（ジエトフェンカルブ耐性株）において、野生株の形質（MBC感受性、ジエトフェンカルブ耐性）を示す復帰変異株が得られたことから、F914株の変異は、点突然変異による可能性が示唆された（第3章、参照）。そこで、F914株に認められるベンズイミダゾール系化合物とN-フェニルカルバマート系化合物間に認められる負相関交差耐性のメカニズムを遺伝子工学的に解明するために、F914株の β -チューブリン遺伝子をクローニングし解析した。また、3章で示したように、ジエトフェンカルブ耐性変異はすべて β -チューブリン遺伝子座にマップされた。そこで、ジエトフェンカルブの作用メカニズム、及び β -チューブリン遺伝子の変異の負相関交差耐性に及ぼす影響を調べるために復帰突然変異株（ジエトフェンカルブ中等度耐性株）の β -チューブリン遺伝子をクローニングし解析した。

4-2 材料と方法

菌株

遺伝子ライブラリーの作成、プラスミド構築のための宿主大腸菌としてJM109を用いた。プラスミドの形質転換は、*E. coli* JM109 Competent Cells (TAKARA, Japan)を使用した。 β -チューブリン遺伝子のクローニングを行なった*Neurospora* 株は、F914株（

MBC耐性、ジエオトフェンカルブ感受性株）及び、ジエトフェンカルブ中等度耐性株（FRB 3株、FR511株、FR513株、FR421株）である。

E. coli JM109

recA 1, Δ (*lac-proAB*), *endA* 1, *gyrA* 96, *thi*-1,
hsdR 17, *relA* 1, *supE* 44, ϕ ' *traDF36*, *pro AB*⁺,
lac^f $Z\Delta$ M15

プラスミドによる形質転換に用いた *N. crassa* は、野生株及び F 914株を用いた。

Neurospora crassa

野生株-----74-OR31-14a (*al-2*, *pan-2*, and *cot-1 a* ; FGSC4934)

F 914株----- F 914 -1(*pan-2*, A)

培地

E. coli JM109 の培養には、LB培地を使用し、寒天培地には、1.7%の寒天を加えた。

アンピシリン耐性の選択には、アンピシリンを最終濃度50 μ g/mlになるように培地に加えた。

*lac Z'*にマルチクローニングサイトをもつプラスミドの外来DNA挿入の有無の確認はIPTGとX-galをそれぞれ最終濃度5 μ g/ml、10 μ g/mlになるように培地中に加えた。

プラスミド

野生株の β -チューブリン遺伝子をpUC12に挿入したプラスミドpBT-Wは、Dr. Orbachより分譲していただいた(Fig.4- 4参照)。Bml511株の β -チューブリン遺伝子挿入したプラスミドpSV50は、Dr. Vollmerにより分譲していただいた(Fig.4-4参照)。pUC13とpUC19はPharmaciaより購入した。M13mp19 RFはBoi-Radより購入した。

*Neurospora crassa*の遺伝子ライブラリーの構築

*Neurospora*の核DNAは、Vollmer & Yanofsky (1986)による方法に従って単離した。F 914株の遺伝子ライブラリーは、核DNAを制限酵素*Hind* IIIで完全に切断し、プラスミドpUC13の*Hind* IIIサイトに導入し、*E. coli* JM109 に形質転換することにより構築した。復帰突然変異株 (FRB 3株、FR511株、FR513株、FR421株) の遺伝子ライブラリーは、実験の過程で約3.1Kbの*Hind* III切断DNAフラグメント内にβ-チューブリン遺伝子が含まれることが判明したので、スクリーニング効率を良くするため核DNAを制限酵素*Hind* IIIで完全に切断し、アガロース電気泳動後、約3KbのDNAフラグメントを切り出しGene Clean II (BIO 109)を用いて精製し、プラスミドpUC19の*Hind* IIIサイトに導入し、*E. coli* JM109 に形質転換することにより構築した。

DNAハイブリダイゼーション

E. coli を用いた遺伝子工学に関する手法、プラスミドの構築、サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーションは、Maniatis et al. (1982)に準じて行なった。

F 914株のβ-チューブリン遺伝子を持つコロニーを遺伝子ライブラリー中に検索するため、コロニーハイブリダイゼーションを行なった。遺伝子ライブラリーをLB培地にプレート (1000~2000コロニー/9cmシャーレ) し、コロニーをニトロセルロースメンブランに写した。このメンブランを0.5N NaOHで処理することによりコロニーを溶菌後、1M Tris-HCl (pH7.5)、1M Tris-HCl (pH7.5) 1.5M NaClで順次処理することにより中和し、風乾後、真空中で80°Cで30時間熱処理することにより、DNAのメンブランへの結合を行なった。このメンブランを4 x SSC(0.15 M NaCl, 0.015 M Na₃-Citrate pH7.5), 0.1 % SDSで60°C、15分間、2回洗浄しメンブラン上の細胞残さを取り除いた。さらに、4 x SSC、10 x Denhardt(0.02 % Ficoll, 0.02 % Polyvinylpyrrolidone, 0.02 % BSA)、100μg/ml ssDNAで68°Cで3時間プレハイブリダイゼーションを行ない、4 x SSC、10 x Denhardt、100μg/ml ssDNA、プローブで68°C、1晩ハイブリダイゼーションを行なった。このメンブランを最終SSC濃度0.1 %、0.1 % SDS、68°Cで洗浄し、風乾後、メンブラン上の放射能

活性の検出を行ない、ポジティブクローンを検出した。なお、プローブは、Dr. Vollmerより入手した Bml511株由来の β -チューブリン遺伝子(pSV50)の *Sal*Iフラグメント(2.6Kb)を Nick Translation Kit (TAKARA, Japan)を用いてラベルした。核DNAおよびクローンしたDNAのサザンハイブリダゼーションは、DNAフラグメントのアガロース電気泳動後、ニトロセルロースメンブランに転写し、コロニーハイブリダイゼーションと同一の条件で、ポジティブフラグメントの検出を行なった。

復帰突然変異株の β -チューブリン遺伝子のクローニングも基本的にはF914株と同様にして行なったが、コロニーハイブリダゼーション及びサザンハイブリダゼーションは、DNA Labeling and detection Kit (Boehringer-Mannheim)により非放射能ラベルで十分な検出感度を得られることが実験の過程で見いだされたのでこれを使用した。ハイブリダゼーションに用いた条件は、1.0 % ブロッキング試薬を含むハイブリダゼーション液を用い、68°Cで行なった。プローブは、F914株由来の β -チューブリン遺伝子 (*Hind*III 3.1Kbフラグメント)を用い、DNA Labeling and detection Kit (Boehringer-Mannheim)によりラベルした。

Neurospora の形質転換

Neurospora の形質転換は、Vollmer & Yanofsky (1986)による方法に従って行なった。形質転換は、スフェロプラストの再生培地 (1M ソルビトールを含む最少培地) と選択培地 (薬剤を含む最少培地) を用いた。選択培地として、MBC (0.5 μ g/ml)、ジエトフェンカルブ (0.5 μ g/ml or 75 μ g/ml) 及びMBC (0.5 μ g/ml) とジエトフェンカルブ (0.5 μ g/ml) を同時に含む培地を使用した。プラスミドにより形質転換したスフェロプラストは再生培地と混合し、選択培地上にプレートした。

キメラ β -チューブリン遺伝子の構築

β -チューブリン遺伝子内の変異領域を推定するために2セットのキメラ β -チューブリン遺伝子を構築した。F914株の β -チューブリン遺伝子(PEF50)と野生株の β -チューブリン

遺伝子(PBT-W、Orbachより入手)との間のキメラβ-チューブリン遺伝子(pEF55, pEF56, pEF57, pEF58)と、さらに、F 914株のβ-チューブリン遺伝子(PEF50)とBml511株のβ-チューブリン遺伝子(pSV50、Vollmerより入手) との間のキメラβ-チューブリン遺伝子(pEF51, pEF52, pEF53, pEF54)を作成した (Fig 4-5参照)。キメラβ-チューブリン遺伝子の構築は、制限酵素部位 (*Eco* RI および *Bam* HI ; それぞれβ-チューブリン遺伝子内に単一切断部位を持つ。 Fig. 4-4参照) においてそれぞれのβ-チューブリン遺伝子の断片と組換えることにより作成した。復帰突然変異株のキメラβ-チューブリン遺伝子の構築も同様に行なった。ただし、復帰突然変異株のキメラβ-チューブリン遺伝子は、復帰突然変異株のβ-チューブリン遺伝子 (pNF)と野生株のβ-チューブリン遺伝子(PBT-W)の間のキメラβ-チューブリン遺伝子(pNF-1, pNF-2, pNF-3, pNF-4)と、復帰突然変異株のβ-チューブリン遺伝子 (pNF)と F 914株のβ-チューブリン遺伝子(PEF50)の間のキメラβ-チューブリン遺伝子(pNF-5, pNF-6, pNF-7, pNF-8)の2セットのキメラβ-チューブリン遺伝子を構築した(Fig. 4-7参照)。これらのキメラβ-チューブリン遺伝子を野生株及びF 914株に形質転換し、キメラβ-チューブリン遺伝子の支配する形質を調べた。

DNA塩基配列の決定

DNA塩基配列は、dideoxy chain-termination 法により決定した。F 914株由来のβ-チューブリン遺伝子のDNA塩基配列は、[α-³²P]dCTPを用いて、7-DEAZA Sequencing Kit (TAKARA, Japan)にて行なった。復帰突然変異株のDNA塩基配列は、[α-³²P]dATPを用いて、GeneATAQ Sequencing Kit (Pharmacia)にて行なった。また、DNA塩基配列の決定を効率的に行なうために、3種類のDNAプライマーを化学合成した。合成したプライマーは、

5'-ACCCACTCCCTCGGTGGTGGT-3'	DNA塩基配列上926番目-946番目
5'-ATGGCTACCTACTCCGTCGTG-3'	DNA塩基配列上1010番目-1030番目
5'-AACTCCGACGGGACCTTCTGC-3'	DNA塩基配列上1103-1023

である。

人為的変異導入法による変異β-チューブリン遺伝子の構築

人為的変異導入法による変異β-チューブリン遺伝子はKunkel (1985) による方法により構築した。β-チューブリン遺伝子の *Sal*I フラグメント (2.6Kb) を M13mp19 の *Sal*I サイトに導入し、一本鎖DNAを単離後、MUTA-GENE M13 In Vitro Mutagenesis Kit (BIO-RAD) を用いて人為的変異導入を行なった。人為的変異導入のためのDNAプライマーとして次のプライマーを化学合成した。

β-チューブリンの198番目のアミノ酸をグルタミン酸 (Glu) に変換するためのプライマーとして、

5'-AACTCCGACGAGACCTTCTGC-3' DNA塩基配列上1103番目-1023番目

β-チューブリンの198番目のアミノ酸をアラニン (Ala) に変換するためのプライマーとして、

5'-AACTCCGACGCGACCTTCTGC-3' DNA塩基配列上1103番目-1023番目

β-チューブリンの198番目のアミノ酸をグルタミン (Gln) に変換するためのプライマーとして、

5'-AACTCCGACCAGACCTTCTGC-3' DNA塩基配列上1103番目-1023番目

を合成した。なお、DNA合成は、DNA合成機 (Applied Biosystem) により合成し、これを精製して用いた。

変異導入の確認はDNA塩基配列の決定により確認した。これらの変異β-チューブリン遺伝子を、*Neurospora* のスフェロプラストに形質転換することによりその支配する形質を調べた。

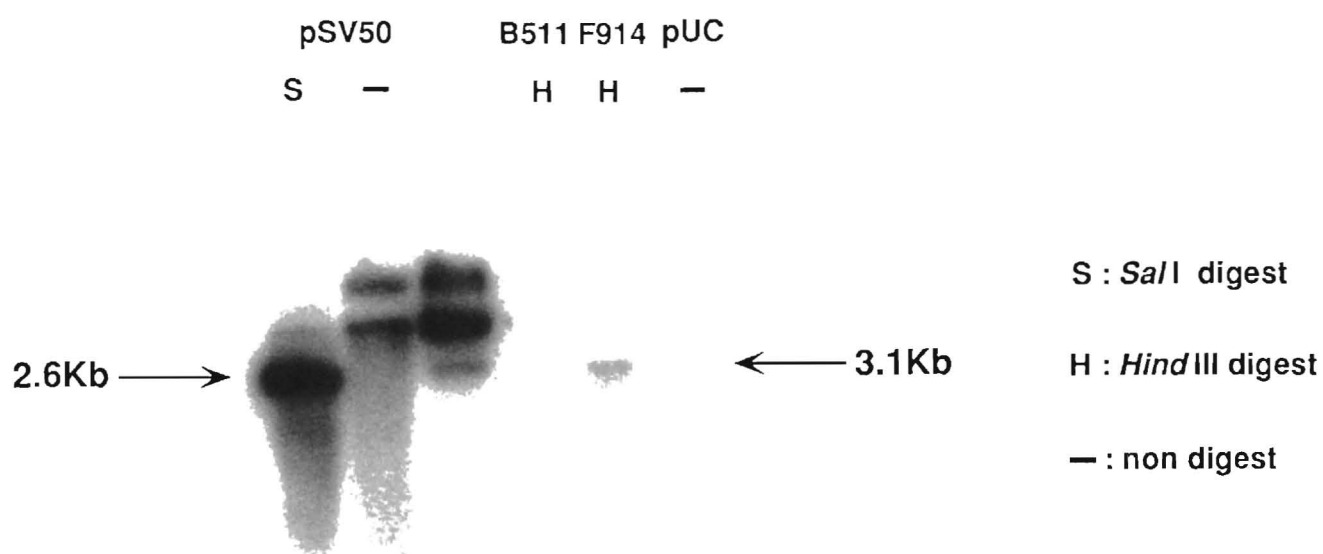
4-3 F914株の変異の遺伝子工学的解析

4-3-1 F914株の β -チューブリン遺伝子のクローニング

Vollmer & Yanofsky (1986)による方法に従ってF914株の核DNAを単離し、制限酵素 *Hind* IIIで完全に切断し、サザンハイブリダイゼーションにより β -チューブリン遺伝子の検出を行なったところ、約3Kbの断片に相当する部位にのみプローブ (Bml511株由来の β -チューブリン遺伝子) とハイブリダイズするバンドが検出された (Fig. 4-1)。これは、Orbach et al. (1986)により報告されているデータと一致した。そこで、F914株より単離した核DNAの制限酵素 *Hind* III断片をpUC13 *Hind* III部位に組込み大腸菌 J M109に形質転換し、アンピシリン耐性形質転換体を遺伝子ライブラリーとした。Bml-511株由来の β -チューブリン遺伝子をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより、約20,000コロニーのライブラリーをスクリーニングしたところ、1つのコロニーが、プローブと強くハイブリダイズした。このポジティブコロニー及びその周辺コロニーのシスタークローンによるコロニーハイブリダイゼーションの結果をFig.4-2に示す。ポジティブコロニーのシスタークローンにおいてのみハイブリダイズを示す強いシグナルが認められた。このクローンよりプラスミドを単離し制限酵素で切断し、pSV50(Bml-511株由来の β -チューブリン遺伝子)と比較した。両プラスミドの *Sal* I、*Sst* I及び *Eco* RI+*Bam* HI切断により、それぞれ2.6Kb、1.1Kb、1.0Kbのフラグメントが共通に認められた (Fig. 4-3)。これは、Bml-511株由来の β -チューブリン遺伝子の制限酵素地図と良く一致しており、このプラスミドが β -チューブリン遺伝子をコードしていると推定された。このプラスミドをpEF50と命名した (Fig. 4-4)。

4-3-2 F914株の β -チューブリン遺伝子による形質転換

F914株由来の β -チューブリン遺伝子をコードしているpEF50が、MBC耐性とN-フェニルカルバマート感受性を支配しているか否かを調べるために、pEF50を野生株及びF914



pSV50 : plasmid encoded β -tubulin of Bml 511 strain

B511 : genomic DNA of Bml 511 strain

F914 : genomic DNA of F914 strain

pUC : pUC13

Fig. 4-1 Southern hybridization of *Hind* III fragments of genomic DNA of the F914 strain by using β -tubulin gene of the plasmid pSV50 as a probe

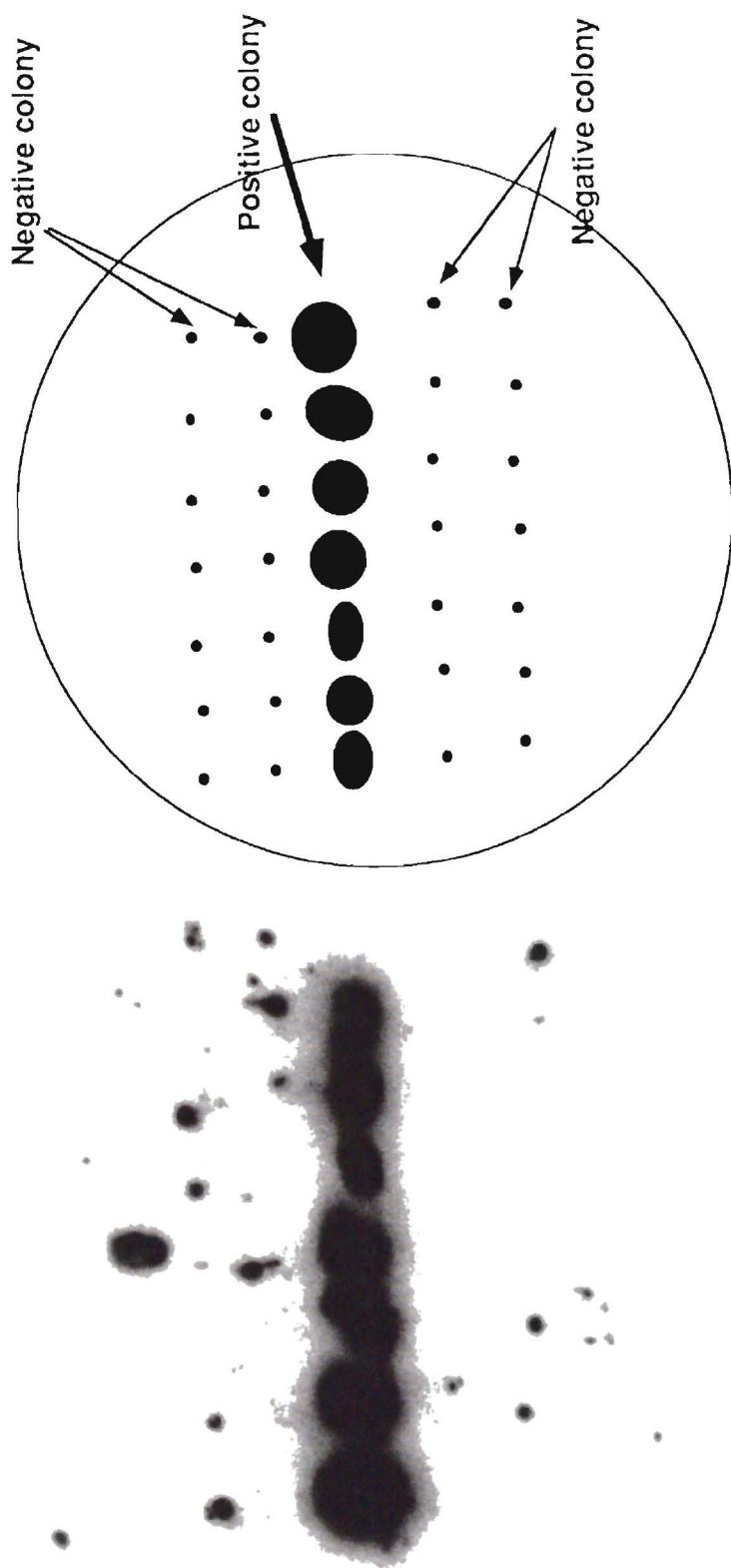
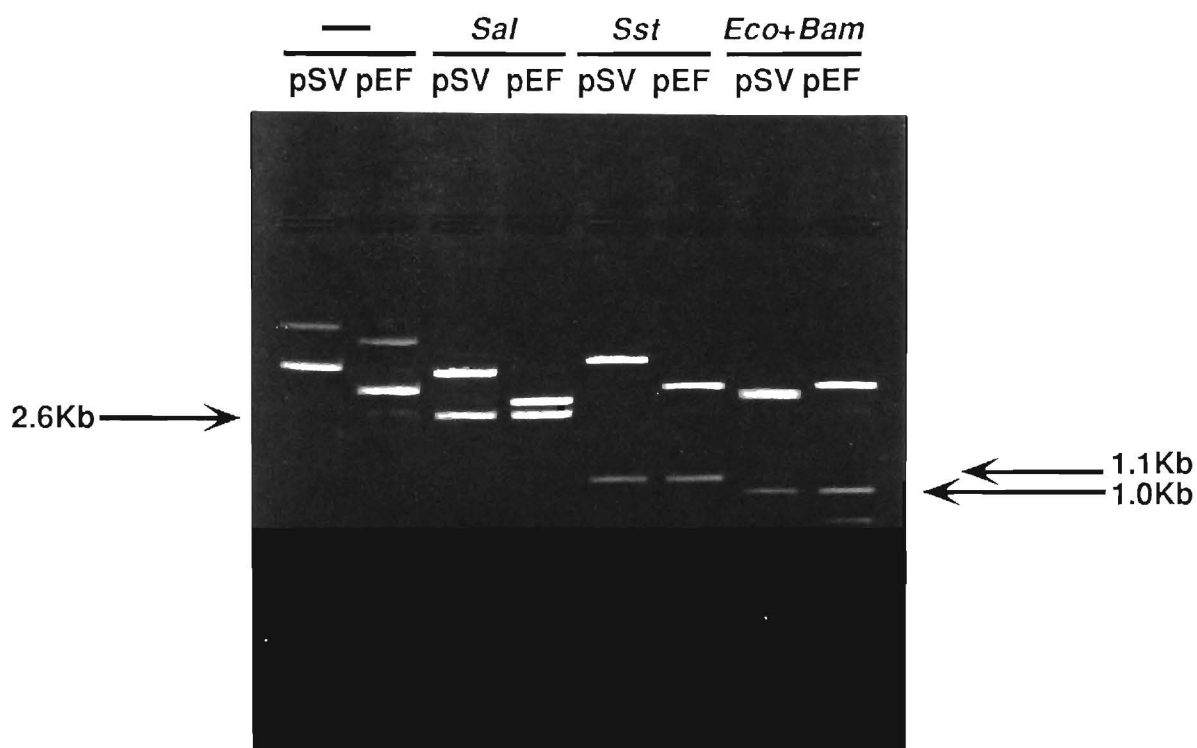


Fig. 4-2 Colony hybridization by using β -tubulin gene of the plasmid pSV50 as a probe



pSV : pSV50	— : non digest
pEF : pEF50	<i>Sal</i> : <i>Sal</i> I digest
	<i>Sst</i> : <i>Sst</i> I digest
	<i>Eco+Bam</i> : <i>Eco</i> RI + <i>Bam</i> HI digest

Fig. 4-3 Digestion patterns of pEF50 by restriction enzymes



Fig. 4-4 Restriction maps of the plasmids pEF50, pBT-W and pSV50

株に形質転換した(Fig. 4-5)。pEF50により野生株のスフェロプラストを形質転換し、MBC (0.5 μ g/ml) を含む培地にプレートしたところ、MBC耐性を示す形質転換体の生育が認められた。しかし、pEF50により形質転換した野生株のスフェロプラストは、MBC (0.5 μ g/ml) とジエトフェンカルブ (0.5 μ g/ml) を共に含む培地にプレート上では生育は認められなかった。一方、pEF50によりF914株のスフェロプラストを形質転換し、ジエトフェンカルブ (0.5 μ g/ml) を含む培地にプレートしたところ、ジエトフェンカルブ耐性を示す形質転換体の生育は認められなかった。

野生株由来の β -チューブリン遺伝子をコードしているpBT-Wを野生株及びF914株に形質転換した。pBT-WによりF914株のスフェロプラストを形質転換し、ジエトフェンカルブ (0.5 μ g/ml) を含む培地にプレートしたところ、ジエトフェンカルブ耐性を示す形質転換体の生育が認められた。即ち、F914株のジエトフェンカルブ感受性は野生株の β -チューブリン遺伝子(pBT-W)による形質転換において打ち消されることが判明した。なお、F914株をpBT-Wにより形質転換した形質転換体は、MBC (0.5 μ g/ml) とジエトフェンカルブ (0.5 μ g/ml) を同時に含む培地にプレート上では生育は認められなかった。また、pBT-Wは、野生株をMBC耐性に形質転換しなかった。

さらに、Bml-511株 (MBC、ジエトフェンカルブ両耐性株) 由来の β -チューブリン遺伝子をコードしているpSV50は、野生株及びF914株をMBC、ジエトフェンカルブ両耐性に形質転換した。

このことは、次のように考えられる。アカパンカビにおいては、形質転換されたDNAはほとんどの場合、染色体にランダムに組み込まれることが知られている(Akins & Lambowitz 1985, Case et al. 1979, Paietta & Marzluf 1985)。従って、pEF50を野生株に形質転換した場合、形質転換体において宿主のもつ β -チューブリン遺伝子とベクター由来の β -チューブリン遺伝子の2種類の β -チューブリン遺伝子が存在し共に働いていると考えられる。このとき、MBCが存在すると宿主 (野生株) 由来の β -チューブリンはMBCにより機能を失うが、ベクター由来の β -チューブリンはMBCにより影響を受けないためMBC培地上で生育するが、MBCとジエトフェンカルブを共に含む培地上では両方の β

-チューブリンが共に機能を失うため生育できない。pBT-WをF914株に形質転換した場合も同様に、ジエトフェンカルブが存在すると宿主（F914株）由来の β -チューブリンは機能を失うが、ベクター由来の β -チューブリンは影響を受けないためジエトフェンカルブ培地上で生育するが、MBCとジエトフェンカルブを共に含む培地上では宿主とベクターの両方の β -チューブリンが共に機能を失うため生育できない。pSV50の場合、宿主由来の β -チューブリンは、MBCあるいはジエトフェンカルブによりその機能を失うが、ベクター由来の β -チューブリンがMBCおよびジエトフェンカルブにより影響を受けないためMBCとジエトフェンカルブを共に含む培地上で生育する。

このことは、ヘテロカリオンを用いた実験によっても裏付けられる。野生株とF914株間のヘテロカリオンにおいて野生株由来の β -チューブリン遺伝子とF914株由来の β -チューブリン遺伝子の2種類の β -チューブリン遺伝子が存在し共に働いていると考えられ、形質転換体と同様の現象が起こっていると考えられる。即ち、野生株とF914株間のヘテロカリオンは、MBC及びジエトフェンカルブを単独で含む培地においては生育するが、両剤を同時に含む培地では生育しない（第2章, 25頁）。

以上のことから、F914株の β -チューブリン遺伝子は、MBC耐性とジエトフェンカルブ感受性の形質を同時に支配していると結論した。一方、野生株の β -チューブリン遺伝子はMBC感受性とジエトフェンカルブ耐性の形質を支配し、Bml511株の β -チューブリン遺伝子は、MBC耐性とジエトフェンカルブの両者に耐性を示す形質を支配していると結論される。従って、F914株の2つの形質（MBC耐性とジエトフェンカルブ感受性）は、 β -チューブリン遺伝子の変異により共に支配されていると考えられた。

4-3-3 F914株の β -チューブリン遺伝子の変異領域の決定

MBC耐性とジエトフェンカルブ感受性を支配しているF914株の β -チューブリン遺伝子の変異領域を決定するために、pEF50とpBT-W間におけるキメラ β -チューブリン遺伝子を構築した。制限酵素EcoRI及びBamHI部位で組換えたキメラ β -チューブリン遺伝子を野生株、及びF914株に形質転換し、その支配する形質を調べることにより変異領域

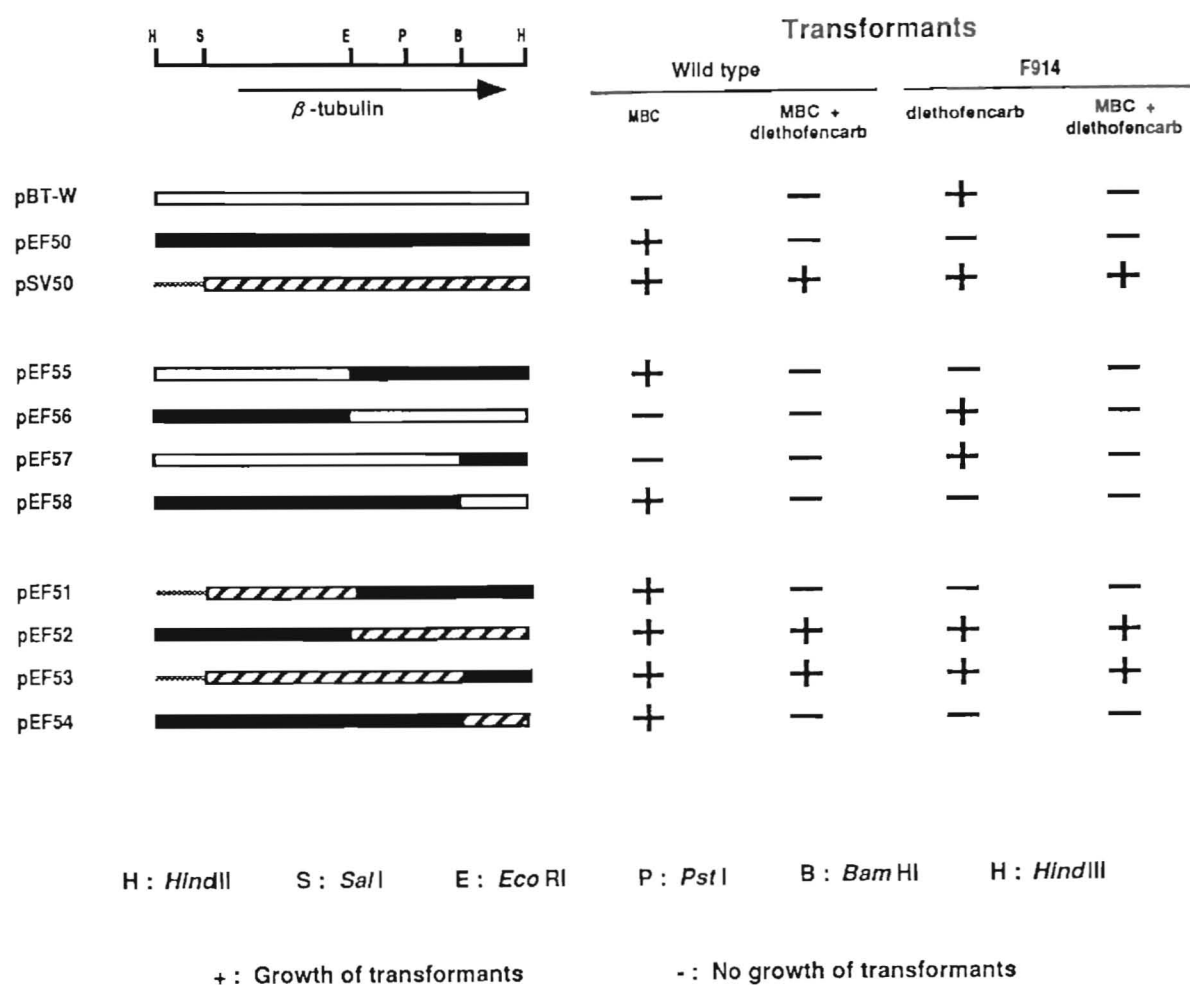


Fig. 4-5 Characterization of transformants by plasmids carrying the chimeric β -tubulin genes

の決定をおこなった。Fig.4-5に示したように*Eco* RI-*Bam* HI領域がpEF50に由来するキメラβ-チューブリン遺伝子(pEF55とpEF58)の場合のみ、形質転換体はMBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性(pEF50と同じ形質)を示した。この領域がpBT-Wに由来する(pEF56とpEF57)場合、形質転換体は、MBC感受性、ジエトフェンカルブ耐性(pBT-Wと同じ形質)を示した。さらに、pEF50とpSV50間におけるキメラβ-チューブリン遺伝子の場合も、同様に*Eco* RI-*Bam* HI領域の由来が、それぞれの形質をになっており、*Eco* RI-*Bam* HI領域がpEF50に由来するキメラβ-チューブリン遺伝子(pEF51とpEF54)の場合のみ、形質転換体はMBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性(pEF50の同じ形質)を示し、*Eco* RI-*Bam* HI領域がpSV50に由来するキメラβ-チューブリン遺伝子(pEF52とpEF53)は、pSV50と同一の形質を示した。従って、F914株のMBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性を支配する変異は、*Eco* RI-*Bam* HI領域(0.9 K b)に存在することが判明した。なお、Orbach et al. (1986)により決定されたpSV50の変異も、この領域内に存在する。

4-3-4 F914株のβ-チューブリンのアミノ酸変異の決定

F914株のβ-チューブリン遺伝子において変異が存在する*Eco* RI-*Bam* HI領域のDNA塩基配列の決定をdideoxy chain-termination法により行なった。この領域のDNA塩基配列をOrbach et al. (1986)により決定されたBml-511株由来のβ-チューブリン遺伝子のDNA塩基配列と比較したところ、4つの塩基置換が同定された。この中で、DNA配列上の1326番目のGからCの1塩基置換、1359番目のTからCの1塩基置換は、それぞれ、269番目のアミノ酸のGly、280番目のアミノ酸Hisの3番目のコドンの置換に相当するが、ともにアミノ酸置換を起こさない。DNA配列上の1019番目のAからTへの塩基置換は、167番目のアミノ酸のTyrからPheへの置換を示すが、このアミノ酸置換は、Orbach et al.により決定されたBml511株のアミノ酸置換部位であり、167番目のアミノ酸Pheは、元来野生株のアミノ酸に相当する。DNA配列上の1112番目のAからGへの塩基置換は(Fig.4-6)、198番目のアミノ酸の2番目のコドンの置換でありGluからGlyへの置換を意味する(Table 4-2参照)。したがって、F914株のβ-チューブリン遺伝子の変異を含む領域*Eco* RI-*Bam* HI断片に存在

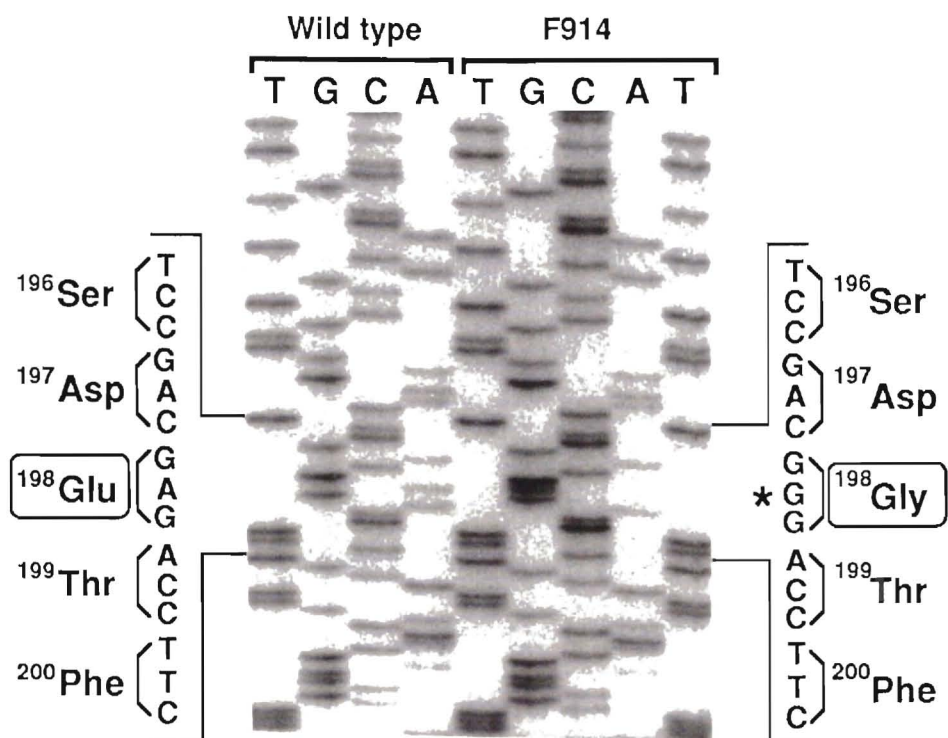


Fig. 4-6 The nucleotide sequence of the β -tubulin gene of the F914 strain and the wild-type strain.

する4種類の塩基置換のうち1112番目のAからGへの塩基置換が唯一アミノ酸置換（ ^{198}Glu から ^{198}Gly ）を示す変異であることが判明した。このアミノ酸置換がMBC耐性とジエトフェンカルブ感受性を支配していると考えられた。なお、DNA配列上の1326番目と1359番目の1塩基置換はUV処理により導入された塩基置換である可能性も否定できないが、F914株と Bml511株の親株の違いによる塩基置換の可能性も考えられる。

4-4 復帰突然変異株の遺伝子工学的解析

4-4-1 復帰突然変異株の β -チューブリン遺伝子のクローニング

F 914株及びBml-511株同様に、FR511、FR421、FR513、及びFR B 3株の核DNAを単離し、制限酵素*Hind* IIIで完全に切断し、サザンハイブリダイゼーションにより β -チューブリン遺伝子の検出を行なったところ、約3Kbの断片に相当する部位にのみプローブ（F 914株由来の β -チューブリン遺伝子）とハイブリダイズするバンドが検出された。そこで、 β -チューブリン遺伝子のスクリーニング効率を高めるため、この約3Kbの*Hind* III消化DNA断片を電気泳動により分離後、切り出し、精製し、pUC19の*Hind* III部位に組み込むことによりライブラリーとした。このライブラリーをF 914株由来の β -チューブリン遺伝子をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションにより、それぞれ約7000コロニーのライブラリーをスクリーニングしたところ、各々のライブラリーに数個のコロニーが、プローブと強くハイブリダイズした。このクローンよりプラスミドを単離し制限酵素で切断し、F 914株由来の β -チューブリン遺伝子(pEF50)の制限酵素地図と比較したところ、完全に一致しており、このプラスミドが β -チューブリン遺伝子をコードしていることが確認された。クローニングしたジエトフェンカルブ中等度耐性株（FR421、FR511、FR513、FR B 3株）の β -チューブリン遺伝子をpNF421、pNF511、pNF513及びpNFB3とそれぞれ命名した。

これらのジエトフェンカルブ中等度耐性株由来の β -チューブリン遺伝子をコードしているプラスミドpNF421、pNF511、pNF513及びpNFB3が、MBC耐性およびN-フェニルカルバマート耐性を支配しているか否かを調べるために、これらのプラスミドを野生株及びF 914株に形質転換した。Table 4-1に示したように、pNF421、pNF511、pNF513及びpNFB3により形質転換した野生株(及びF 914株)のスフェロプラストは、MBC（0.5 μ g/ml）とジエトフェンカルブ（0.5 μ g/ml）を共に含む培地にプレート上で生育した。

Table 4 - 1 Chemical sensitivity of strains transformed by β -tubulin gene of revertant strains.

Plasmids	Transformation				
	wild-type		F914		
	MBC (0.5 μ g/ml)	MBC + (0.5 μ g/ml)	Diethofencarb (0.5 μ g/ml)	Diethofencarb (7.5 μ g/ml)	MBC + (0.5 μ g/ml)
	Diethofencarb (0.5 μ g/ml)		Diethofencarb (0.5 μ g/ml)		
pBT-W	-	-	+	+	-
pEF50	+	-	-	-	-
pNF421	+	+	+	-	+
pNF511	+	+	+	-	+
pNF513	+	+	+	-	+
pNFB3	+	+	+	+	+

このことは、これらのジエトフェンカルブ中等度耐性株の β -チューブリン遺伝子は、ジエトフェンカルブ耐性とMBC耐性を支配していることを示している。しかも、pNFB3以外のプラスミド(pNF421、pNF511、pNF513)で、F914株を形質転換した場合、ジエトフェンカルブ (0.5 μ g/ml) を含む培地にプレート上では生育が認められたが、ジエトフェンカルブ (7.5 μ g/ml) を含む培地にプレート上では生育が認められなかった。このことは、これらのジエトフェンカルブ中等度耐性株のジエトフェンカルブ感受性が、FRB3株の場合MIC値で>100 μ g/mlで、FR421、FR511及びFR513株の場合は、MIC値で<50 μ g/mlであることと一致していた。

4-4-2 復帰突然変異株の β -チューブリンのアミノ酸変異の決定

pEF50の場合と同様にpNF (pNF421、pNF511、pNF513及びpNFB3) の β -チューブリン遺伝子の変異領域を限定するためにpBT-W (及びpEF50) との間のキメラ β -チューブ

リン遺伝子を構築し、野生株及びF914株に形質転換した。これらのキメラβ-チューブリン遺伝子において、*Eco* RI-*Bam* HI領域の由来が、それぞれの形質をになっていた (Fig. 4-7)。即ち、すべてのジエトフェンカルブ中等度耐性株において、*Eco* RI-*Bam* HI領域の由来が、ジエトフェンカルブ中等度耐性株のβ-チューブリン遺伝子である場合 (pNF-1, pNF-4, pNF-6, pNF-7)のみ、MBC及びジエトフェンカルブに両耐性となった。したがって、pEF50の場合と同様にジエトフェンカルブ中等度耐性株のβ-チューブリン遺伝子(pNF)においてもジエトフェンカルブ耐性、及びMBC耐性を支配する領域は、制限酵素地図の*Eco* RI-*Bam* HI断片 (0.9Kb) 内に限定された。

ジエトフェンカルブ中等度耐性株のβ-チューブリン遺伝子の変異を決定するため*Eco* RI-*Bam* HI領域のDNA塩基配列を行なった。この領域のDNA塩基配列をF914株由来のβ-チューブリン遺伝子のDNA塩基配列と比較したところ、それぞれのβ-チューブリン遺伝子にFig.4-8に示した塩基置換が同定された。FRB3株由来のβ-チューブリン遺伝子の場合にはDNA塩基配列上の1111、1112番目のGGからAAの2塩基置換が認められ、これは、198番目のアミノ酸のグリシン(Gly)からリジン(Lys)への置換を示す。F511株由来のβ-チューブリン遺伝子の場合にはDNA塩基配列上の1267番目のCからTの1塩基置換が認められ、これは、250番目のアミノ酸のロイシン(Leu)からフェニルアラニン(Phe)への置換を示す。F421株由来のβ-チューブリン遺伝子の場合には、DNA塩基配列上の1228番目のAからGの1塩基置換が認められ、これは、237番目のアミノ酸のでありスレオニン(Thr)からアラニン(Ala)への置換を示す。FR513株由来のβ-チューブリン遺伝子の場合には、DNA塩基配列上の1013番目のCからGの1塩基置換が認められ、これは、165番目のアミノ酸のでありアラニン(Ala)からバリン(Val)への置換を示す。なお、FR511株、FR513株、FR421株のβ-チューブリンの198番目のアミノ酸は、F914株のものと同様にグリシン(Gly)であった(Table 4-2)。

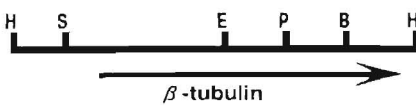











		Transformants			
		Wild type		F914	
		MBC	MBC + diethofencarb	diethofencarb	MBC + diethofencarb
					
pBT-W		—	—	+	—
pEF50		+	—	—	—
pNF		+	+	+	+
pNF-1		+	+	+	+
pNF-2		—	—	+	—
pNF-3		—	—	+	—
pNF-4		+	+	+	+
pNF-5		+	—	—	—
pNF-6		+	+	+	+
pNF-7		+	+	+	+
pN-8		+	—	—	—

Fig. 4-7 Characterization of transformants by plasmids carrying the chimeric β -tubulin genes

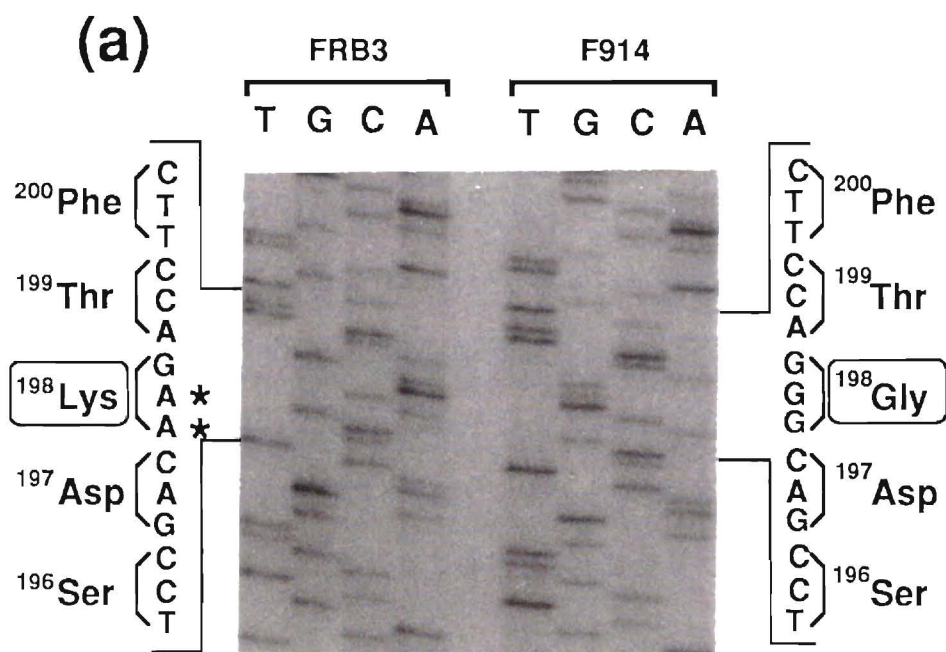


Fig. 4-8a The nucleotide sequence of the β -tubulin gene of the F914 strain and the FRB3 strain.

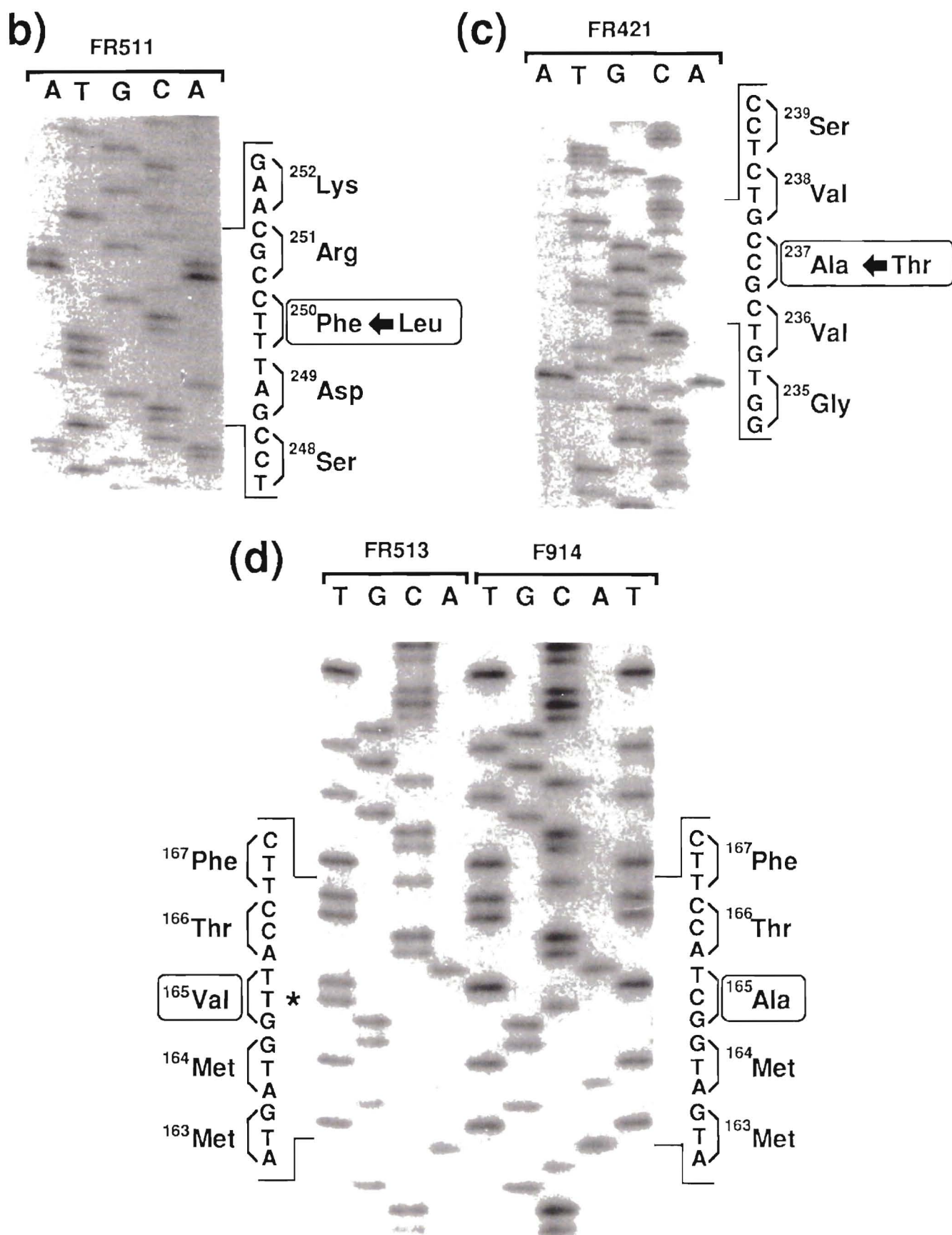


Fig. 4-8b,c,d The nucleotide sequence of the β -tubulin gene of the FR511 strain, the FR421 and the FR513 strain.

Table 4-2 Amino acid substitutions of diethofencarb resistant mutants

	Position of amino acid substitution				
	165	167	198	237	250
wild-type	Ala	Phe	Glu	Thr	Leu
Bml511	Ala	<i>Tyr</i>	Glu	Thr	Leu
F914	Ala	Phe	<i>Gly</i>	Thr	Leu
FRB3	Ala	Phe	<u>Lys</u>	Thr	Leu
FR511	Ala	Phe	<i>Gly</i>	Thr	<u>Phe</u>
FR513	<u>Val</u>	Phe	<i>Gly</i>	Thr	Leu
FR421	Ala	Phe	<i>Gly</i>	<u>Ala</u>	Leu

FRB3株のβ-チューブリン遺伝子に認められたアミノ酸置換は、その置換アミノ酸の種類はF914株と異なるが、置換部位（198番目）は、F914株と同一であった。即ち、野生株、F914株及びFRB3株のβ-チューブリンは、それぞれ1アミノ酸置換をもち、198番目のアミノ酸が、Glu、Gly、Lysである。この198番目のアミノ酸が異なるβ-チューブリンをもつ3株のMBC及びジエトフェンカルブに対する感受性を比較すると、FRB3株は、MBC、ジエトフェンカルブ両剤に対しF914株よりも高い耐性を示し、MBCとジエトフェンカルブ間の正相関交差耐性が認められる。しかし、野生株とFRB3株を比較した場合には、FRB3株はMBCに対し耐性を示し、ジエトフェンカルブに対しては、野生株よりも感受性が高いことから、弱い負相関交差耐性を示すことがわかる。このことは、198番目のアミノ酸の置換とその様式が負相関交差耐性を支配している可能性を示している。

野生株と比較すると2つのアミノ酸置換を含むβ-チューブリンを有するジエトフェンカルブ中等度耐性株（FR511、FR513、FR421株）は、ジエトフェンカルブ感受性を残しているが、これは、β-チューブリンの198番目のアミノ酸が、F914株のものと同様に

Glyであることによる可能性が考えられる。一方、FR511株、FR513株、FR421株は、F914株と比較してMBC、ジエトフェンカルブ両剤に対しより耐性となっている（正相関交差耐性）。このことは、これらの株の β -チューブリン遺伝子のforward mutationが、両剤に対する耐性（正相関交差耐性）を支配している可能性を示唆している。即ち、FR513株の β -チューブリンの変異（165番目のアミノ酸のAlaからValへの置換）、F511株の β -チューブリンの変異（250番目のアミノ酸のLeuからPheへの置換）、及びF421株の β -チューブリンの変異（237番目のアミノ酸のThrからAlaへの置換）は、それぞれ独立でMBC、ジエトフェンカルブ両剤に対する耐性を支配している可能性がある。実際に、*A. nidulans* のTBZ耐性株として単離されたBenA16株の変異は、 β -チューブリンの165番目のアミノ酸のAlaからValへの置換であることが知られている (Jung & Oakley 1990)。このBenA16株の変異はFR513株の変異と全く同一である（ただし、BenA16株の β -チューブリンの198番目のアミノ酸はGlu）。FR513株は、ジエトフェンカルブ耐性株として単離された株であり、BenA16株はTBZ耐性株として単離された株である。この両株の変異が、全く同一アミノ酸置換を示すことは興味深い。なお、FR513株の変異部位（165番目のアミノ酸）は、Orbach et al.により示された*N. crassa* Bml511株の変異部位（167番目のアミノ酸）の近傍に位置する。また、FR511株、FR421株の変異部位（それぞれ237番目、250番目のアミノ酸）は、Thomas et al.(1985)により示されたベノミル耐性株の変異部位（241番目のアミノ酸のArgからHis）の比較的近傍に存在する。

以上のことは、ジエトフェンカルブとMBC間に認められる負相関交差耐性は、198番目のアミノ酸により支配されており、それ以外の部位においては、正相関交差耐性を支配していると考えられた。

4-5 人為的変異導入法による変異 β -チューブリン遺伝子の構築とその解析

4-5-1 β -チューブリンの198番目のアミノ酸置換と薬剤感受性の解析

F914株及びFRB3株の β -チューブリン遺伝子の解析により、両株の変異は、 β -チューブリンの198番目のアミノ酸Gluが、それぞれ、Gly及びLysに変換していること、また、この変異が、MBCとジエトフェンカルブ間の負相関交差耐性を支配していると推定された。このことをさらに裏付けるため、F914株及びFRB3株の β -チューブリンの198番目のアミノ酸を人為的変異導入法により野生株型のGluに変換した β -チューブリン遺伝子（それぞれ、pEF50-¹⁹⁸Glu、pNFB3-¹⁹⁸Glu）を作成した。これらの変異 β -チューブリン遺伝子を野生株及びF914株に形質転換することにより、その支配する形質について調べた。pEF50-¹⁹⁸Glu、pNFB3-¹⁹⁸Gluは、F914株をジエトフェンカルブ高度耐性(75 μ g/ml)に形質転換したが、MBC(0.5 μ g/ml)とジエトフェンカルブ(0.5 μ g/ml)を同時に含む培地上では形質転換体は得られなかった (Table4-3)。また、これらの変異遺伝子 (pEF50-¹⁹⁸Glu、pNFB3-¹⁹⁸Glu) は、野生株をMBC耐性に形質転換しなかった。即ち、pEF50-¹⁹⁸Glu、pNFB3-¹⁹⁸Gluの支配する形質は、MBC感受性かつジエトフェンカルブ高度耐性であり、この性質は、野生株の β -チューブリン遺伝子(pBT-W)の性質と同じであった。このことは、F914株のMBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性、及びFRB3株のMBC耐性、ジエトフェンカルブ中等度耐性は、それぞれ β -チューブリンの198番目のアミノ酸変異によることを支持している。

さらに、 β -チューブリンの198番目のアミノ酸変異がMBCとジエトフェンカルブ間の負相関交差耐性に及ぼす影響を調べるため、198番目のアミノ酸としてAlaをコードする β -チューブリン遺伝子(pBT-¹⁹⁸Ala)を同様に人為的変異導入法により作成し (Fig.4-9)、その形質を野生株及びF914株に形質転換することにより調べた (Table 4-3)。pBT-¹⁹⁸AlaをF914株に形質転換すると、形質転換体は、0.5 μ g/mlの濃度のジエトフェンカルブを含む

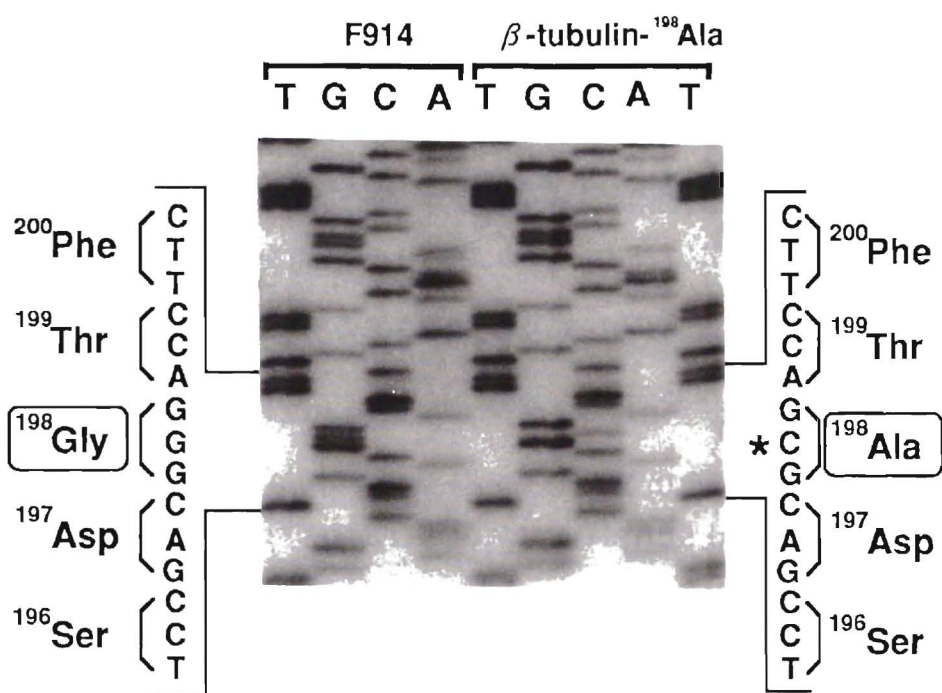


Fig. 4-9 The nucleotide sequence of the β -tubulin gene constructed by site direct mutagenesis

培地、及びMBC(0.5μg/ml)とジエトフェンカルブ(0.5μg/ml)を同時に含む培地上では生育したが、75μg/mlの濃度のジエトフェンカルブを含む培地上では、生育しなかった。また、pBT-¹⁹⁸Alaを野生株に形質転換した場合には、形質転換体は、MBC(0.5μg/ml)を含む培地、及びMBC(0.5μg/ml)とジエトフェンカルブ(0.5μg/ml)を同時に含む培地上で生育した。このことは、pBT-¹⁹⁸Alaは、F914株及びFRB3株のβ-チューブリン遺伝子同様にMBC耐性形質を支配することを示す。

Table 4 - 3 Chemical sensitivity of strains transformed by mutagenized β-tubulin gene.

Plasmids	Transformation				
	wild-type		F914		
	MBC (0.5μg/ml)	MBC + (0.5μg/ml)	Diethofencarb (0.5μg/ml)	Diethofencarb (75μg/ml)	MBC + (0.5μg/ml)
	Diethofencarb (0.5μg/ml)		Diethofencarb (0.5μg/ml)		
pBT-W	-	-	+	+	-
pEF50	+	-	-	-	-
pNFB3	+	+	+	+	+
pEF50- ¹⁹⁸ Glu	-	-	+	+	-
pNFB3- ¹⁹⁸ Glu	-	-	+	+	-
pBT- ¹⁹⁸ Ala	+	+	+	-	+

一方、ジエトフェンカルブに対しては、F914株のβ-チューブリン遺伝子(pEF50)をF914株に形質転換した場合、0.5μg/mlの濃度のジエトフェンカルブを含む培地上で生育しない、また、FRB3株のβ-チューブリン遺伝子(pNFB3)の場合は75μg/mlの濃度のジエトフェンカルブを含む培地上で生育することから、pBT-¹⁹⁸Alaは、F914株のβ-チューブリン遺伝子(pEF50 ; ¹⁹⁸Gly)よりは、ジエトフェンカルブ耐性であり、FRB3株のβ-チューブリン遺伝子(pNFB3 ; ¹⁹⁸Lys)よりはジエトフェンカルブ感受性であることが判明した。ま

た、pBT-¹⁹⁸Alaを野生株のβ-チューブリン遺伝子(pBT-W ; ¹⁹⁸Glu)と比較した場合、pBT-¹⁹⁸Alaは、MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性を示し、負相関交差耐性を示す。従って、β-チューブリンの198番目のアミノ酸Alaもまた、負相関交差耐性を担っていることが明かとなった。

198番目のアミノ酸としてGlnをコードする種類のβ-チューブリン遺伝子(pBT-¹⁹⁸Gln)を同様に作成し、野生株及びF 914株に形質転換し、MBC(0.5μg/ml)を含む培地あるいは、ジエトフェンカルブ(0.5μg/ml)を含む培地、及びMBC(0.5μg/ml)とジエトフェンカルブ(0.5μg/ml)を同時に含む培地上にプレートしたが、いずれにおいても形質転換体は、得られなかった。この理由として、次の2点が考えられる。第1点として、pBT-¹⁹⁸Glnは、MBCとジエトフェンカルブに対し共に感受性を獲得しているため、形質転換体を得られない。第2点は、198番目のアミノ酸がGlnに置換したβ-チューブリンは、その機能を失うため、形質転換体を得られないことが考えられる。*N. crassa*において、β-チューブリンの198番目のアミノ酸が、Glu、Gly、Lys、Alaの場合形質転換体を得られること、また、これらの変異を持つF 914株、FR B 3株の培地上での生育は、野生株と比較して悪くないこと(Table 3-4)は、β-チューブリンの198番目のアミノ酸の置換様式には、かなりの許容範囲があるように考えられる。しかしながら一方で、これまで、哺乳動物、植物、原生動物等でβ-チューブリン遺伝子が単離されその塩基配列が決定されているが、ほとんどすべての生物のβ-チューブリンの198番目のアミノ酸は、Gluであり非常によく保存されている(May et al. 1987, Neff et al. 1987, Hiraoka et al. 1984, Guoltinan et al. 1987, Marks et al. 1987, Lewis et al. 1987, Cleveland & Sullivan 1985)。このことは逆にβ-チューブリンの198番目のアミノ酸の置換様式の許容範囲が狭い可能性を示している。198番目のアミノ酸Glnへの変換が、チューブリンの機能を保持しているか否かについては、β-チューブリン遺伝子を相同組換えした形質転換体を作成し、この性質について調べる必要があり、今後の課題の一つである。

以上の結果から、β-チューブリンの198番目のアミノ酸とMBC及びジエトフェンカルブ感受性の関係は、次のように考えられる。MBC耐性に関しては、野生株< F 914株<

FRB3株の順に耐性の程度が高くなることから、 β -チューブリンの198番目のアミノ酸は、 $\text{Glu} < \text{Gly} < \text{Lys}$ の順に耐性の程度が高くなると考えられる。さらに β -チューブリンの198番目のアミノ酸Alaは野生株をMBC耐性に形質転換することから、 $\text{Glu} < \text{Ala}$ となる。 β -チューブリンの198番目のアミノ酸Alaが、GlyあるいはLysよりも高い耐性を示すか否かについては、これらのアミノ酸を持つ β -チューブリン遺伝子は、いずれも75 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のMBCを含む培地上で形質転換体を得られたためAla、Gly及びLys間の差は検定できなかったが、いずれにしてもかなりの高度耐性を示していると考えられる。従って、MBC感受性のためには、 β -チューブリンの198番目のアミノ酸Gluが必須であり、これが置換するとMBC高度耐性となると考えられた。

一方、ジエトフェンカルブ感受性に関しては、野生株 $<$ FRB3株 $<$ F914株の順にジエトフェンカルブ感受性が高くなることから、 β -チューブリンの198番目のアミノ酸は、 $\text{Glu} < \text{Lys} < \text{Gly}$ の順に感受性の程度が高くなると考えられる。野生株(^{198}Glu)及びFRB3株(^{198}Lys)の β -チューブリン遺伝子は、75 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のジエトフェンカルブ培地上で形質転換体を得られるが、198番目のアミノ酸がAlaである β -チューブリン遺伝子(pBT- ^{198}Ala)は、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度のジエトフェンカルブ培地上でのみ形質転換体を得られる。このことは、ジエトフェンカルブ感受性は Glu 、 $\text{Lys} < \text{Ala} < \text{Gly}$ の順であることを示している。これを統合すると、ジエトフェンカルブ感受性に関しては、 β -チューブリンの198番目のアミノ酸は、 $\text{Glu} < \text{Lys} < \text{Ala} < \text{Gly}$ の順にジエトフェンカルブ感受性の程度が高くなると考えられる。即ち、ジエトフェンカルブ感受性獲得のためには、198番目のアミノ酸Gluの置換が必須で、そのアミノ酸残基の立体的な大きさが、小さいものの方が高いジエトフェンカルブ感受性を獲得する傾向にある。

4-5-2 β -チューブリンの198番目以外のアミノ酸置換と薬剤感受性の解析

FR511株、FR513株、FR421株は、ジエトフェンカルブに中等度耐性であり、ジエトフェンカルブ感受性を残しているが、これは、これらの β -チューブリンの198番目のアミノ酸が、F914株のものと同様にGlyであることによる可能性が考えられる。一方、

FR511株、FR513株、FR421株は、親株F914株と比較してMBC、ジエトフェンカルブ両剤に対しより耐性となっている。このことは、これらの株の β -チューブリン遺伝子の forward mutationが、両剤に対する正相関交差耐性を支配している可能性がある。

そこで、FR511株、FR513株、FR421株の β -チューブリンの198番目のアミノ酸Glyを、人為的変異導入法により野生株型のGluに変換した β -チューブリン遺伝子（それぞれ pNF511-¹⁹⁸Glu、pNF513-¹⁹⁸Glu、pNF421-¹⁹⁸Glu）を作成し、その形質を形質転換により調べた。

pNF511-¹⁹⁸Glu、pNF513-¹⁹⁸Glu、pNF421-¹⁹⁸Gluは、いずれもF914株をジエトフェンカルブ高度耐性に形質転換した。このことは、FR511株、FR513株、FR421株が、野生株よりジエトフェンカルブ感受性である理由として、これらの β -チューブリンの198番目のアミノ酸が、ジエトフェンカルブ感受性型（F914株型）のGlyであることによるという推定を支持している。一方、pNF511-¹⁹⁸Glu、pNF513-¹⁹⁸Glu、pNF421-¹⁹⁸Gluを野生株に形質転換したところ、pNF511-¹⁹⁸GluとpNF421-¹⁹⁸Gluは、野生株をMBC耐性に形質転換した。このことは、FR511株とFR421株の β -チューブリン遺伝子の forward mutation（それぞれ、250番目のアミノ酸のLeuからPheへの置換、及び237番目のアミノ酸のThrからAlaへの置換）が、単独でジエトフェンカルブのみならずMBCに対する耐性をも支配していることを示している。一方、pNF513-¹⁹⁸Gluは、野生株をMBC耐性に形質転換しなかった。このことは、pNF513-¹⁹⁸Gluと同じアミノ酸置換 *A. nidulans* のTBZ耐性Ben16株が、TBZには耐性であるが、MBCに対しては、耐性を獲得していないことと一致している(Jung & Oakley 1990)。しかしながら、FR513株が、F914株よりもMBC耐性を示すこと（第3章、33頁）は、逆に、FR513株の β -チューブリンの165番目のアミノ酸のAlaからValへの置換は、MBC耐性を担っている可能性を示している。この矛盾を現段階では明確に説明することはできないが、1つの可能性として、198番目のアミノ酸と、165番目のアミノ酸は、 β -チューブリンの立体構造上近い位置に存在し、何らかの相互作用をしている可能性があると考えられる。なお、*A. nidulans* のBen16株は、TBZには耐性であるが、MBCに対しては、耐性を獲得していないが、一方で、FR513株は、ジエトフェンカルブに耐性を

示すが、MDPCには、耐性を示さない。

Table 4-4 Chemical sensitivity of strains transformed by mutagenized cloned β -tubulin gene.

Plasmids	Transformation				
	wild-type		F914		
	MBC	MBC+ Diethofencarb	Diethofencarb (0.5 μ g/ml)	Diethofencarb (75 μ g/ml)	MBC+ Diethofencarb
pBT-W	-	-	+	+	-
pEF50	+	-	-	-	-
pNF511	+	+	+	-	+
pNF513	+	+	+	-	+
pNF421	+	+	+	-	+
pNF511- ¹⁹⁸ Glu	+	+	+	+	+
pNF513- ¹⁹⁸ Glu	-	-	+	+	-
pNF421- ¹⁹⁸ Glu	+	+	+	+	+

以上のことから、MBCとジエトフェンカルブ間に認められる負相関交差耐性は、 β -チューブリン198番目のアミノ酸により支配されており、250番目及び237番目のアミノ酸の置換は、正相関交差耐性を支配していることを示している。言い換えると、ベンズイミダゾールとN-フェニルカルバメートは、極めて類似した化合物群に属し、従って、両者の間には一般に正相関交差耐性が認められる。ただし、ジエトフェンカルブ感受性獲得のためには198番目のアミノ酸Gluの置換が必須であり、この部位の置換においてのみ両化合物群に負相関交差耐性が認められると考えられる。

第5章 負相関交差耐性の生化学的解析

5-1 緒言

これまでの章において、ベンズイミダゾール系化合物とN-フェニルカルバマート系化合物間に認められる負相関交差耐性は、 β -チューブリンの1アミノ酸置換により引き起こされることを明らかにした。また、ジエトフェンカルブ耐性株の遺伝解析の結果、すべての株の変異が β -チューブリン座に連鎖を示した。これらのことは、ジエトフェンカルブの作用点が β -チューブリンそのものである可能性を示している。しかしながら、マイクロチューブルは、 α -チューブリン、 β -チューブリンおよび数種のマイクロチューブル関連蛋白質から構成されている。従って、 β -チューブリンの変異が他の関連蛋白質の高次構造に影響を及ぼし、ジエトフェンカルブはそのコンフォメーションの変化した蛋白質に特異的に結合し、結果として負相関交差耐性を示す可能性も依然として否定できない。本章では、 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブをもちいてジエトフェンカルブ結合蛋白質について生化学的手法を用いて調べた。

5-2 材料と方法

菌株

Neurospora crassa MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性株としてF914aを用い、野生株として、74-OR31-14a (*al-2*, *pan-2*, *cot-1 a*; FGSC4934)を用いた。

ジエトフェンカルブ結合活性の測定

野生株、F914株の分生胞子を最終濃度 5×10^5 分生胞子/mlの濃度で、100mlのVogel's 最少培地を含む500mlの坂口フラスコを用いて、28°Cで、20時間振盪培養し、菌糸体を吸引濾過により集めた。この菌糸体を液体窒素下で破碎し、PIPES 緩衝液 I に懸濁した。

この懸濁液に ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブを加え、 4°C で1時間インキュベートし、 $50,000\times g$ で45分遠心し、上清と沈殿に分けた。沈殿は、PIPES 緩衝液 I で2回洗浄したあとアセトン抽出し、アセトン分画の放射能活性を測定した。上清は、Sephadex G-25 (PIPES 緩衝液 II で平衡化) を通し非結合 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブを除き、高分子分画の放射能活性を測定した。なお、タンパク質の含量の測定は、BCA Protein Assay Reagent (Pierce) をもちいて測定した。

PIPES buffer I

0.1 M PIPES-Na, pH 6.9, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM GTP, and 1/100 solution P (87 mg of *p*-methylphenylsulfonyl fluoride and 1.5 mg of pepstatin A in 5 ml of ethanol)

PIPES buffer II

0.1 M PIPES-Na, pH 6.9, 0.2 M KCl, 0.2 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, and 1/1000 solution P

ジエトフェンカルブ結合蛋白質の精製

菌糸体破碎液を $50,000\times g$ で45分遠心し、その上清を ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブで 4°C 、1時間インキュベートし、DEAE Sephadex A-50 (PIPES 緩衝液 II で平衡化) に通した。3 bed volume のPIPES 緩衝液 II で、カラムを洗浄後、順次、0.5 M KCl、1.0 M KCl を含むPIPES 緩衝液 II で溶出し、各フラクションの放射能活性を測定した。高い放射能活性を示したフラクションをCentricon-10 (Amicon) により脱塩濃縮し、緩衝液の交換を行なった。この濃縮液を、再度 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブで 4°C 、1時間インキュベートし、Sephacryl S-200によりゲル濾過を行ない、ジエトフェンカルブ結合蛋白質の分子量の測定を行なった。なお、カラムのキャリブレーションは、gel filtration calibration kit (pharmacia) を用いて行なった。

放射能活性の測定

各液体フラクションをEmulsifier Scintillator 299を10ml含むガラスバイアルに添加し、放射能活性は、Tri-Carb 460 CD liquid scintillation spectrometer (Packard, USA)により測定した。

使用した ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブは、ジエトフェンカルブのベンゼン環にラベルされた[phenyl ^{14}C] diethofencarb を使用し、その比活性は、1.82 GBq/ mmolである。なお、 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブの純度は、[n-hexane-acetone (4/1, v/v) and toluene-ethyl acetate (5/2, v/v)]系のTLCにより調べたところ、99%以上であった。

5-3 野生株とF914株に対する ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブの結合活性の比較

5-3-1 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブの菌体へ取り込みの比較

F914株及び野生株のジエトフェンカルブ取り込みの差を調べるために、それぞれの培養液に ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブを加え4時間インキュベートし、集菌した。この菌体を蒸留水で3回洗浄後、プロトプラスト化した。プロトプラストと酵素消化液とに分離し、両者の放射能活性を測定した(Talbe 5-1)。F914株、野生株共に酵素消化液分画にはほとんど放射能活性は認められなかった。プロトプラスト分画には、放射能活性は認められたが、両株に顕著な差は認められなかった。このことは、F914株と野生株に認められるジエトフェンカルブに対する感受性の差は、ジエトフェンカルブ取り込み能の差ではない可能性が考えられる。しかしながら、このプロトプラスト分画に認められた放射能活性は、膜分画に対する非特異的な吸着である可能性も充分考えられ、野生株と耐性株間に取り込みに差があるか否かを結論するためには、さらに詳細に調べる必要があり、今後の課題である。

Table 5-1 Uptake of diethofencarb by the wild-type strain and the F914 strain

	Radioactivity	
	digested cell wall (dpm/1ml digested solution)	protoplast (dpm/10 ¹⁰ protoplasts)
Wild-type	27	896
Resistant F914	32	1032

5-3-2 ¹⁴C ラベル-ジエトフェンカルブの菌体可溶分画に対する 結合活性 の比較

次に、液体培養した F914 株及び野生株の菌糸体（湿重量 10 g）を液体窒素下で破碎後緩衝液 II に懸濁し、¹⁴C ラベル-ジエトフェンカルブで 4°C で 1 時間インキュベートし、50,000xg で 45 分間遠心し、上清と沈殿物に分けた。沈殿物の放射能活性は、緩衝液 II で 2 回洗浄後アセトン抽出し、アセトン分画の放射能活性を測定したが、野生株、F914 株共に低い放射能活性を示すにとどまり両者に顕著な差は認められなかった。遠心の上清は、Sephadex G-25 カラムを通すことによりフリーの ¹⁴C ラベル-ジエトフェンカルブを除いた後放射能活性を測定したところ、野生株には放射能活性はほとんど認められなかったが、F914 株に特異的に高い放射能活性が認められた (Table 5-2)。なお、遠心上清の蛋白質含量は、F914 株、野生株間に顕著な差は、認められなかった。このことは、F914 株の可溶性高分子分画にのみジエトフェンカルブ結合物質が存在することを示していると考えられる。

Table 5-2 Diethofencarb binding activity in mycelial extract of benzimidazole-resistant strain

Strains	MIC (μ g/ml)	protein conc. (mg/ml)	bound diethofencarb (dpm)
wild-type	>100	29.5	171
resistant F914	0.1	26.1	30229

5-4 ジエトフェンカルブ結合蛋白質の精製

液体培養したF914株の菌体（湿重量10 g）を液体窒素下で破碎後、50,000xgで45分間遠心し、その上清を4°Cで1時間 ¹⁴Cラベル-ジエトフェンカルブとインキュベートした。この上清を、イオン交換DEAE-Sephadex A-50カラムに通した。このカラムを0.2MKClを含むPIPES緩衝液IIで洗浄した。さらに、0.5MKClを含むPIPES緩衝液II、1MKClを含むPIPES緩衝液IIで順次溶出した。カラム通過分画、洗浄分画、0.5M溶出分画及び1M溶出分画の放射能活性を測定した(Fig. 5-1)。カラム通過洗浄分画には高い放射能活性が認められたが、このカラム通過洗浄分画(Fraction No. 12-16)の放射能活性分画をSephadex G-25を通したところ、高分子分画に放射能活性がほとんど認められなかった。従って、

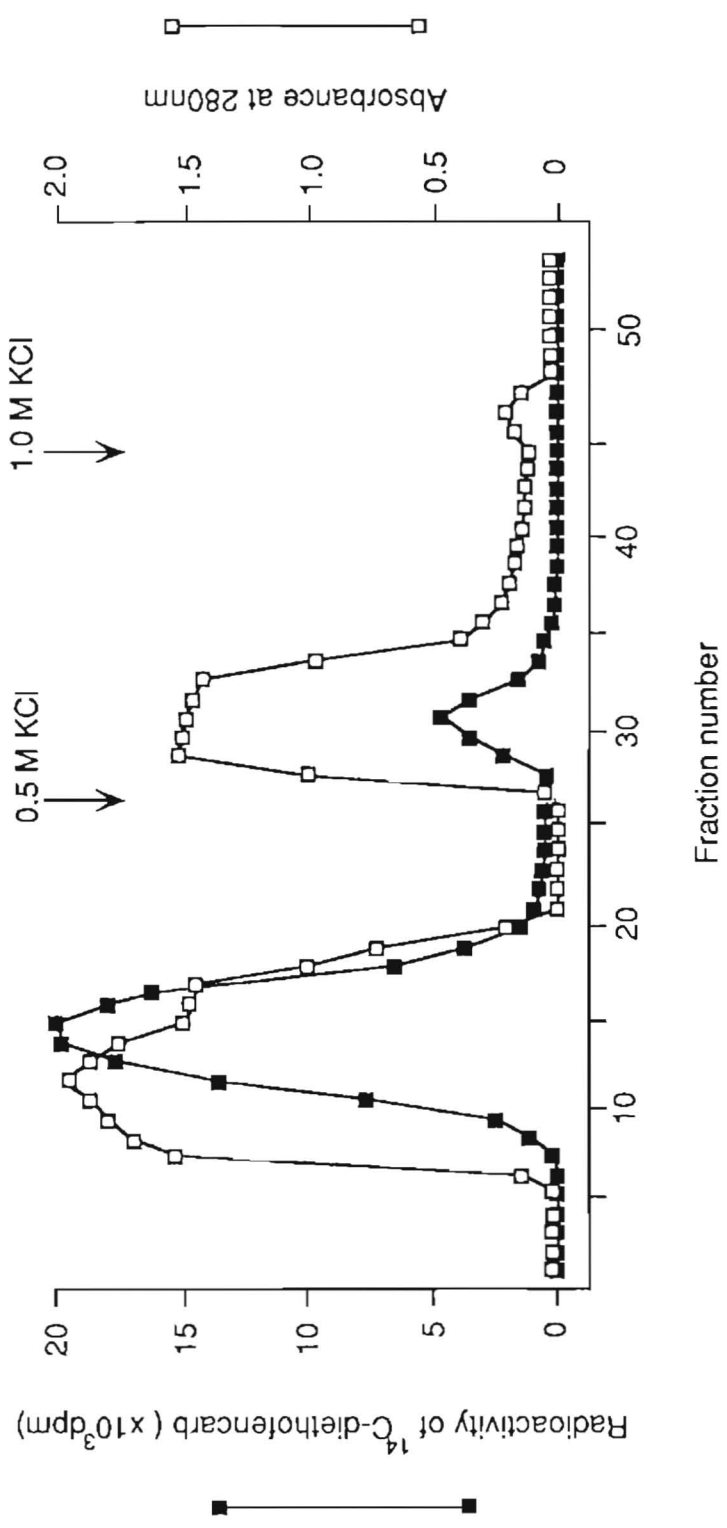


Fig. 5-1 DEAE Sephadex A50 column chromatography of 50,000 x g supernatant mycelial extracts of strain F914 of *N. crassa*

DEAE-Sephadex A-50カラム通過洗浄分画の放射能活性は、フリーの ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブによるものであると考えられた。洗浄分画後期には放射能活性がほとんど認められなかったが、0.5M溶出分画において放射能活性の溶出が認められた。なお、0.5M溶出分画における放射能活性ピークは OD_{280} による蛋白質溶出ピークよりやや遅れて認められた。1M溶出分画には、もはや放射能活性は認められなかった。

この0.5M溶出分画における放射能活性ピークフラクション(Fraction No. 31-33)をCentricon-10により脱塩濃縮し、濃縮液に再度 4°C で1時間 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブとインキュベートし、Sephacryl-S200に通すことにより、ゲル濾過を行なった。同一の実験を3回繰り返し溶出放射能活性ピークの分子量を推定したところ、約105,000ダルトンであることが判明した(Fig. 5-2)。F914株における ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブ放射能活性ピークのイオン交換DEAE-Sephadex A-50カラムにおける挙動及びゲル濾過Sephacryl-S200による分子量は、野生株におけるMBC結合蛋白質の挙動と極めて似ていることから(Davidse & Flach 1977)、ジエトフェンカルブのF914株における結合蛋白質は α 、 β -チューブリンのダイマーである可能性が高いと考えられる。即ち、ジエトフェンカルブは、F914株のチューブリン蛋白質に選択的に結合し微小管の形成を阻害することにより、選択的抗菌活性を示すと考えられた。

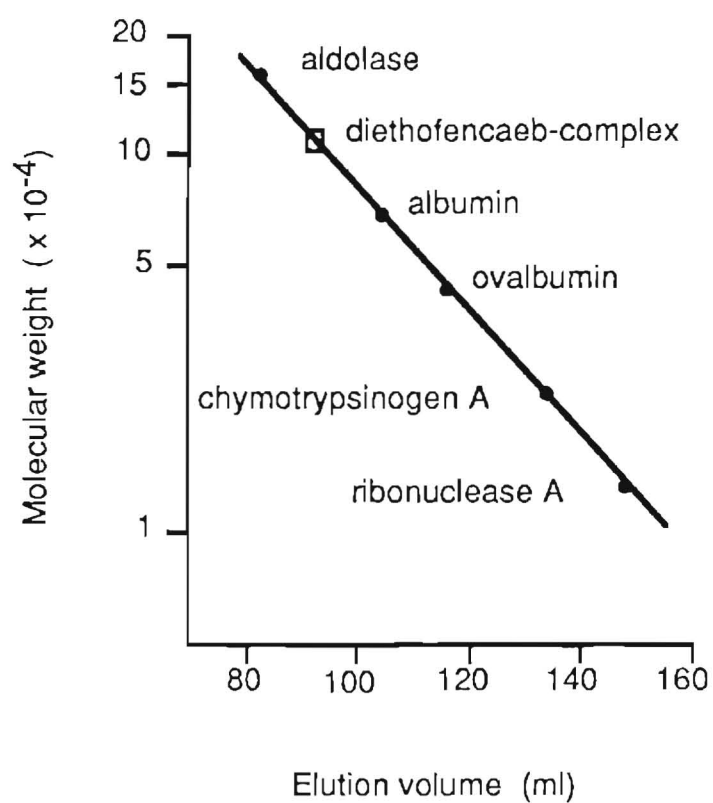


Fig. 5-2 Molecular weight determination of the diethofencarb-protein complex

第6章 総合考察及び結論

緒論

ジエトフェンカルブは、実用圃場で問題となっているベンズイミダゾール耐性植物病原菌(*Botrytis cinerea* 等)に特異的に抗菌活性を示す。このベンズイミダゾールとN-フェニルカルバマート間に認められる負相関交差耐性メカニズム及びジエトフェンカルブの耐性株に対する作用メカニズムを*N. crassa*をモデル菌としてもちいて解明した。以下に、各章についてまとめ、負相関交差耐性メカニズムのモデルを提唱する。さらに、本研究結果から得られた知見をもとにベンズイミダゾール及びジエトフェンカルブ耐性問題を論じ、本研究成果の、基礎科学分野への応用と展開について考察する。

各章のまとめ

第2章では、野生株よりMBC耐性19株を単離し、解析した。これら19株のMBC耐性株のうち、2株(F914株とF939株)のみがジエトフェンカルブ感受性を示した。F914株とF939株のMBCに対するMICは $>100\mu\text{g}/\text{m}$ であった。一方、ジエトフェンカルブに対するMICは、 $0.1\mu\text{g}/\text{m}$ であり、野生株のMIC $>100\mu\text{g}/\text{m}$ と比較すると1000倍以上の感受性の獲得が認められた。19株のMBC耐性株のMBC、ジエトフェンカルブ感受性を比較したところ、MBC耐性の程度が高くなるとジエトフェンカルブ感受性というわけではなく、むしろ一部の変異株においてジエトフェンカルブ感受性の獲得が認められることが判明した。F914株とF939株の変異は遺伝解析により、他のジエトフェンカルブ非感受性変異株の変異と同様に β -チューブリン遺伝子であるBml座に連鎖を示すことが判明した。ジエトフェンカルブは、F914株に対して特異的に発芽管、及び核の形態異常を引き起こし、この様式は、MBCの野生株に対する形態異常と極めて良く似ていた。なお、F914株のジエトフェンカルブ感受性の程度、及び発芽管、核に対する形態変化は、実用圃場から分離されたベンズイミダゾール耐性植物病原菌*Botrytis cinerea*におけるものと極

めてよく一致していた。このことは、*Neurospora crassa*の変異株F914株（及びF939株）は、植物病原菌*Botrytis cinerea*の圃場耐性株のモデルとして使用できると考えられた。また、遺伝的微細地図により、F914株とF939株は同一変異による変異株である可能性、F914株の1つの変異が、2つの異なる形質（MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性）を同時に支配している可能性が示唆された。

第3章では、F914株を親株としてジエトフェンカルブ及びMDPC耐性株を単離した。N-フェニルカルバマート耐性株は、MBC及びジエトフェンカルブ感受性により2つのグループに大別された。第1のグループ（FR421、FR424、FR514、FR524、FR441、FR443株）は、ジエトフェンカルブ高度耐性を示すが、MBCに対する感受性を回復しており、薬剤感受性及び遺伝解析より、野生株への復帰突然変異により得られた株である可能性が示された。第2のグループ（FR511、FR512、FR513、FR521、FR421、FR423、FRB3、FR442、FR445、FR449株）は、ジエトフェンカルブに耐性を示すものの野生株に比較すると感受性を保持しており、N-フェニルカルバマート中等度耐性を示した。これらのN-フェニルカルバマート中等度耐性株は、MBCに対する感受性の回復は認められず、むしろMBCに対する耐性の程度が高くなっていた（正相関交差耐性）。これらのジエトフェンカルブの中等度耐性株の変異も β -チューブリン遺伝子であるBml座にマップされることが判明した。即ち、遺伝解析を行なったすべてのN-フェニルカルバマート耐性株の変異が、 β -チューブリン遺伝子と連鎖を示すことから、N-フェニルカルバマートの作用点は、 β -チューブリンそのものであるか、あるいは、 β -チューブリンに密接に関連をもつと考えられた。

これらのN-フェニルカルバマート中等度耐性株は、さらに3つのグループに大別された。第1のグループは、FR511株、FRB3株、FR445株、FR442株に代表されるグループで、ジエトフェンカルブとMDPC両剤に対し耐性（正相関交差耐性）を示し、グリセオフルビンに対しては、野生株と同等の感受性を示した。第2のグループは、FR513株、FR449株に代表されるグループでグリセオフルビンに対する感受性は野生株と同等であったが、ジエトフェンカルブとMDPCとの間に正相関交差耐性が認められない。即ち、

F 513株は、ジエトフェンカルブには耐性を示すが、MDPCに対しては、親株F 914株と同等の感受性を示した。逆に、F 449株は、MDPCには耐性を示したが、ジエトフェンカルブには耐性を示さなかった。第3のグループは、F 521株とF 421株に代表されるグループで、ベンズイミダゾール、N-フェニルカルバマート系化合物のみならずグリセオフルビンに対しても耐性を示した。グリセオフルビンとベンズイミダゾール系化合物間には、交差耐性は、一般に認められていない。これらの変異が、すべて、 β -チューブリン遺伝子の変異であると考えられ、その変異の様式を明らかにすることは、薬剤感受性とマイクロチューブルの構造及び機能の関連を明らかにするために有意義と考えられた。

第4章では、ジエトフェンカルブ感受性を示すMBC耐性株（F 914株）及びジエトフェンカルブ中等度耐性株（FRB 3、FR511、FR513、FR421株）の β -チューブリン遺伝子の単離を行ないその解析を行なった。

F 914株由来の β -チューブリン遺伝子（pEF50）は、野生株をMBC耐性に形質転換するが、MBCと、ジエトフェンカルブを同時に含む培地上では生育は認められなかった。逆に、野生株由来の β -チューブリン遺伝子をコードしているpBT-WをF 914株に形質転換すると、F 914株のジエトフェンカルブ感受性が打ち消されることから、F 914株由来の β -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結論した。

ジエトフェンカルブ中等度耐性株（FRB 3、FR511、FR513、FR421株）の β -チューブリン遺伝子（pNF511、pNF421、pNF511及びpNFB3）は、野生株及びF 914株を、MBCとジエトフェンカルブ両剤に耐性に形質転換した。それぞれの形質転換体の薬剤感受性は、それぞれの β -チューブリン遺伝子由来株（ジエトフェンカルブ中等度耐性株）のジエトフェンカルブ感受性と一致していた。従って、ジエトフェンカルブ中等度耐性株（FRB 3、FR511、FR513、FR421株）のMBC耐性及びジエトフェンカルブ中等度耐性は、それぞれ、 β -チューブリン遺伝子の変異により支配されていることが判明した。

これらの変異 β -チューブリン遺伝子のDNA塩基配列より、アミノ酸置換を推定した。Table 6-1（91頁）に示すように、F 914株（MBC耐性、ジエトフェンカルブ感受性株）

のβ-チューブリン遺伝子の変異として、DNA配列上の1112番目のAからGへの1塩基置換が認められ、これは、198番目のアミノ酸の2番目のコドンの置換でありGluからGlyへの置換を意味した。F914株のβ-チューブリン遺伝子のこの変異（198番目のアミノ酸Gly）を人為的変異導入法により野生株型（198番目のアミノ酸Glu）に変換したβ-チューブリン遺伝子（pEF50-¹⁹⁸Glu）は、野生株由来のβ-チューブリン遺伝子の形質を示したことより、この変異がMBC耐性とジエトフェンカルブ感受性を支配していることが明かとなった。FRB3株（ジエトフェンカルブ中等度耐性株）由来のβ-チューブリン遺伝子の場合にはDNA塩基配列上の1111、1112番目のGGからAAの2塩基置換が認められ、これは、198番目のアミノ酸GlyからLysへの置換を示す。FR513株由来のβ-チューブリン遺伝子の場合には、DNA塩基配列上の1013番目のCからGの1塩基置換が認められ、これは、165番目のアミノ酸AlaからValへの置換を示す。F511株由来のβ-チューブリン遺伝子の場合には、DNA塩基配列上の1267番目のCからTの1塩基置換が認められ、これは、250番目のアミノ酸LeuからPheへの置換を示す。F421株由来のβ-チューブリン遺伝子の場合には、DNA塩基配列上の1228番目のAからGの1塩基置換が認められ、これは、237番目のアミノ酸ThrからAlaへの置換を示す。なお、FR511株、FR513株、FR421株のβ-チューブリンの198番目のアミノ酸は、F914株のものと同様にGlyであった。

ここで、ジエトフェンカルブ中等度耐性株の変異のうち、FRB3株のβ-チューブリン遺伝子に認められた変異アミノ酸の置換部位（198番目）は、F914株のものと同一であった。FRB3株はMBCに対し耐性を示し、ジエトフェンカルブに対しては、野生株よりも感受性が高いことから、弱い負相関交差耐性を示すことがわかった。さらに人為的変異導入法により構築した198番目のアミノ酸がAlaであるβ-チューブリン遺伝子（pBT-¹⁹⁸Ala）は、pEF50（F914株のβ-チューブリン遺伝子）とpNFB3（FRB3株のβ-チューブリン遺伝子）の中間的なジエトフェンカルブ感受性を示し、やはりMBC、ジエトフェンカルブ間の負相関交差耐性を示すことが判明した。β-チューブリン遺伝子の198番目のアミノ酸の種類が、MBC及びジエトフェンカルブの感受性に及ぼす影響は、野生株、F914株、FRB3株の薬剤感受性、及びそれぞれのβ-チューブリン遺伝子による形質転換

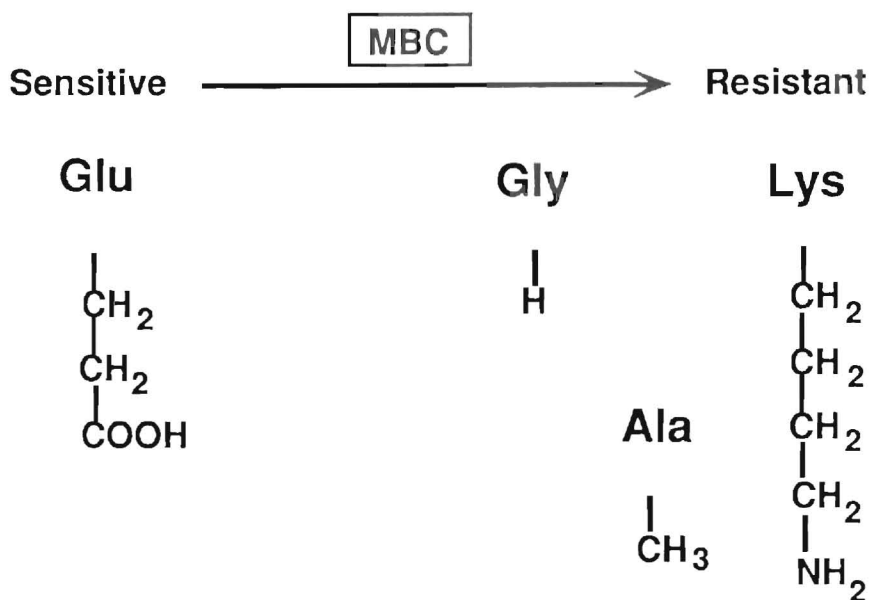


Fig.6-1 Effects of amino acid substitutions at 198 in β -tubulin on MBC sensitivity

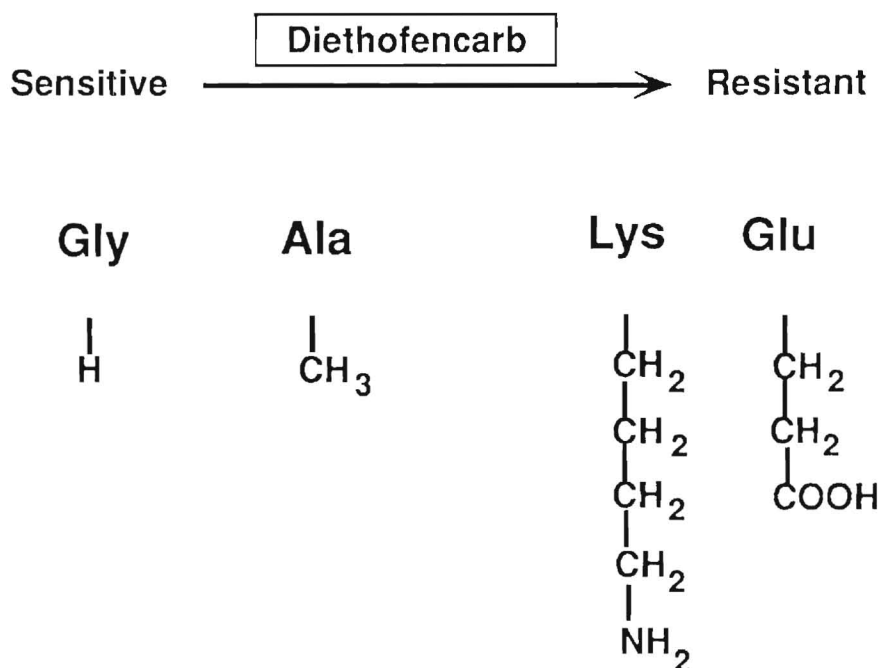


Fig. 6-2 Effects of amino acid substitutions at 198 in β -tubulin on diethofencarb sensitivity

体の薬剤感受性から、Fig 6-1及びFig 6-2に示したように推定することができる。β-チューブリン遺伝子198番目のアミノ酸の置換とその様式が負相関交差耐性を支配していると考えられる。ジエトフェンカルブが感受性を獲得するためには、198番目のアミノ酸Gluが変換することが必要であり、変換アミノ酸は、その残基の立体的な大きさが小さいものが望ましい。同時に198番目のアミノ酸の置換はその置換アミノ酸の種類にかかわらずいずれもMBC高度耐性を支配する。

FR511株、FR513株、FR421株は、ジエトフェンカルブに中等度耐性であり、ジエトフェンカルブ感受性を残しているが、これらのβ-チューブリンの198番目のアミノ酸を野生株型のGluに変換するとジエトフェンカルブに高度度耐性になることから、これらの株のジエトフェンカルブ感受性は198番目のアミノ酸がF914型のGlyであるためと考えられた。また、FR511株、FR513株、FR421株は、F914株と比較してMBC、ジエトフェンカルブ両剤に対しより耐性となっていることより、forward mutationが単独で、両剤に対する耐性を支配している可能性を示唆していた。即ち、これらの198番目以外のアミノ酸置換は、MBC、ジエトフェンカルブ両剤に対する耐性（正相関交差耐性）を支配していると考えられた。実際に、β-チューブリンの250番目のアミノ酸のLeuからPheへの置換（FR511株のforward mutation）及び237番目のアミノ酸のThrからAlaへの置換（FR421株のforward mutation）のみをもつβ-チューブリン遺伝子(pNF511-¹⁹⁸Glu、pNF421-¹⁹⁸Glu)は、それぞれMBC、ジエトフェンカルブ両剤に対する耐性を支配していた。また、FR513株のβ-チューブリンの165番目のアミノ酸のAlaからValへの置換は、*A. nidullans* のTBZ耐性株として単離されたBenA16株の変異と同一アミノ酸部位の同一置換である。なお、FR513株の変異部位（165番目のアミノ酸）は、Orbach et al.により示された*N. crassa* Bml511株の変異部位（167番目のアミノ酸）の近傍にも位置している。また、FR511株、FR421株の変異部位（それぞれ237番目、250番目のアミノ酸）は、Thomas et al.により示されたベノミル耐性株の変異部位（241番目のアミノ酸のArgからHis）の比較的近傍に存在する。ジエトフェンカルブ耐性株として単離された変異株のβ-チューブリン遺伝子の変異が、このようにベンズイミダゾール耐性株として単離され

た変異と同一あるいは近傍に位置することは、言い換えると、ベンズイミダゾールとN-フェニルカルバメートは、極めて類似した化合物群に属し、従って、両者の間には一般に正相関交差耐性が認められる。ただし、198番目のアミノ酸に置換が生じるとジエトフェンカルブ感受性となり、この部位の置換においてのみ両化合物群に負相関交差耐性が認められると考えられる(Fig. 6-3)。

第5章において、 ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブを用いて、ジエトフェンカルブ結合蛋白質について解析した。F914株及び野生株に対するジエトフェンカルブの取り込みに差は認められなかったが、F914株の可溶性高分子分画に特異的に高い放射能活性が認められ、ジエトフェンカルブ結合物質が存在すると考えられた。このF914株の可溶性高分子分画を、チューブリンの精製に一般的に使用されているDEAE-Sephadex A-50カラムでイオン交換を行なったところ、0.5M溶出分画において放射能活性が溶出された。

この0.5M溶出分画をSephacryl S-200により、ゲル濾過を行い、分子量を推定したところ、約105,000ダルトンであることが判明した。F914株における ^{14}C ラベル-ジエトフェンカルブ放射能活性ピークのイオン交換DEAE-Sephadex A-50カラムにおける挙動及びゲル濾過Sephacryl S-200による分子量は、野生株におけるMBC結合蛋白質の挙動(Davidse & Flach 1977)と極めて似ていることから、ジエトフェンカルブのF914株における結合蛋白質は α 、 β -チューブリンのダイマーである可能性が高いと考えられる。これらのことから、ジエトフェンカルブのF914株に対する特異的な抗菌活性は、F914株のチューブリン蛋白質に選択的に結合し微小管形成を阻害することによると考えられる。

負相関交差耐性のモデル

以上を総括すると、ベンズイミダゾールとN-フェニルカルバメート間に認められる負相関交差耐性は、 β -チューブリンの198番目のアミノ酸の置換により起こり、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メカニズムは、ジエトフェンカルブが、変異した β -チューブリンに特異的に結合するためと推定される。ベン

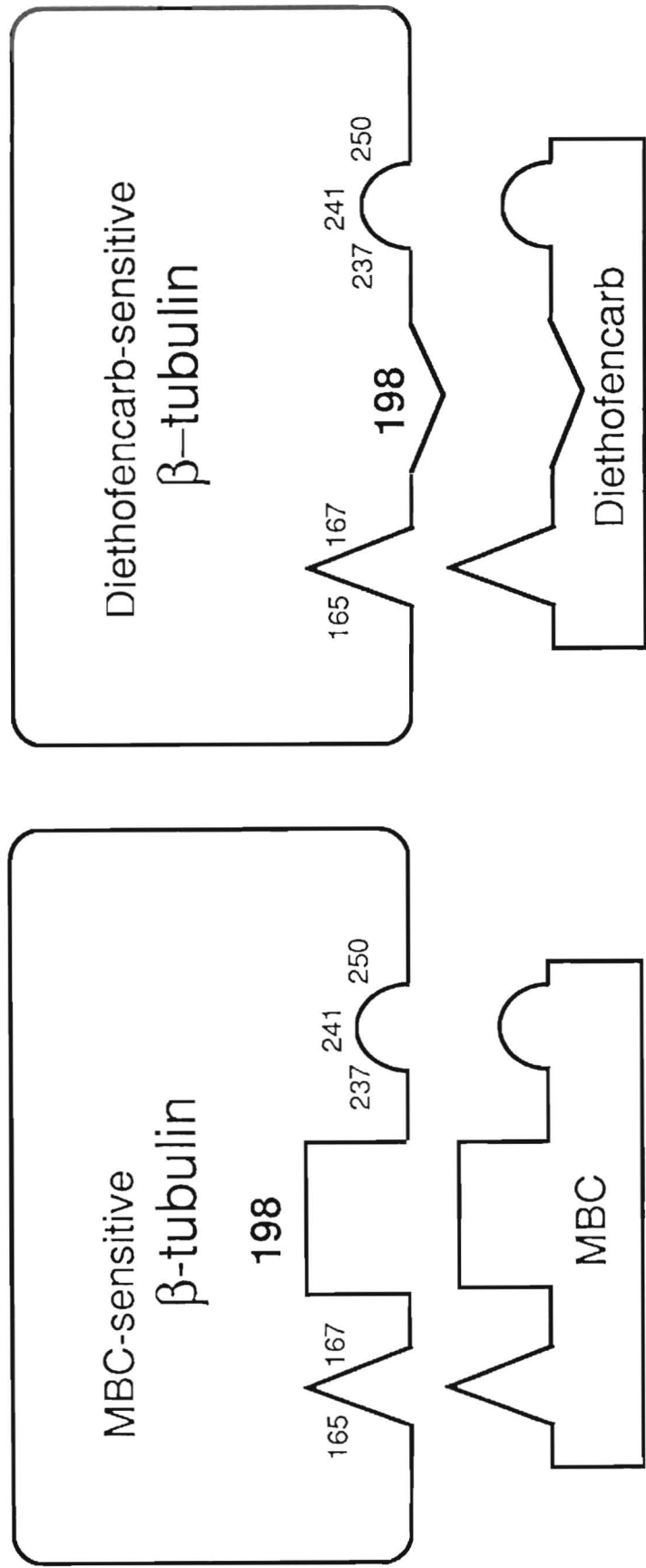


Fig. 6-3 A model for negatively correlated cross resistance between benzimidazoles and N-phenylcarbamates

ズイミダゾールとN-フェニルカルバマートのβ-チューブリンに対する結合様式のモデルをFig 6-3に示す。

β-チューブリンの198番目のグルタミン酸残基-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持つことによりベンズイミダゾール殺菌剤は、野生株のβ-チューブリンに結合するが、N-フェニルカルバマート系化合物が結合するためには、β-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方が好ましい。負相関交差耐性は、β-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、ベンズイミダゾールとN-フェニルカルバマートは、結合部位を共有していると考えられ、従って、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と推察される。

植物病原菌と*N. crassa*の相同性及び相異性

*N. crassa*を用いてベンズイミダゾールとN-フェニルカルバマート間に認められる負相関交差耐性のメカニズムを解明した。*N. crassa* F914株は、N-フェニルカルバマート（ジエトフェンカルブ、MDPC）のみならずジフェニルアミンに対してもベンズイミダゾール系化合物と明確な負相関交差耐性を示し、灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）のものと極めてよく似ている。しかもF914株に対してジエトフェンカルブは、発芽管及び核形態変化を引き起こすが、この形態異常は、同様に灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）のものと極めてよく一致している。負相関交差耐性という現象そのものは、極めてまれな現象でありそのメカニズムが多くの原因によりおこるとは考えにくい。従って、この*N. crassa*における負相関交差耐性メカニズムは基本的には実用圃場で実際に問題となっている植物病原菌に認められる負相関交差耐性と同じであると考えられる。しかしながらいくつかの点で相違点が認められる。ジエトフェンカルブの実用上の対象病害である灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）の場合、圃場より分離されるベンズイミダゾール耐性株はほとんど例外なくジエトフェンカルブ感受性である。一方、*N. crassa*のベンズイミダゾール耐性株は、ほとんどが、ジエトフェンカルブ非感受性である。この理由としては、室内耐性

株と圃場耐性株の差が考えられる。*N. crassa*の場合、寒天培地上で生育できる変異株は理論上すべて単離される。一方、圃場より単離される耐性株の場合には、圃場における競合に打ち勝つ性質、病原性の保持、厳しい気候条件に耐えうる性質の保持なくしては現実には単離されてこない。このことは、圃場で事実上問題になっているベンズイミダゾール耐性菌(Leroux & Gredt 1979a 1979b 1980, 竹内 1987)、ジカルボキシイミド耐性菌(Beever & Brien 1983, 竹内 1987)、アシルアラニン(Staub et al. 1990)耐性菌等において、極めて限られた変異株(薬剤感受性から判断して)のみが圃場耐性菌として単離されることから裏付けられる。なお、ベンズイミダゾール耐性菌の場合、植物病原菌の種類により単離される耐性菌種類に差があることが知られている。リンゴ黒星病菌(Sabi 1988)、ムギ眼紋病菌(Leroux 1988)等では、2種類以上のベンズイミダゾール耐性株が存在することが知られている。この中には、ジエトフェンカルブ感受性の異なる株があることが知られている。最近、リンゴ黒星病菌の圃場耐性株の β -チューブリン遺伝子が単離解析された(Jones et al. personal communication, Table 6-1)。このリンゴ黒星病菌における β -チューブリンの変異は、そのアミノ酸置換200番目のPheからTyrへの置換を除いて、すべて、筆者が*N. crassa*をもちいた本研究において、解析したものと同一であり、その薬剤感受性は、*N. crassa*のものと基本的に良く一致している。198番目のアミノ酸がAla、Glyに置換したものは、N-フェニルカルバマートに負相関交差耐性を示している。Lysに置換したものについては、負相関交差耐性は認められていないが、これは、この置換が比較的N-フェニルカルバマート高度耐性を示すため、Jonesらの試験している濃度では検出できなかったためと考えられる。200番目の置換が、負相関交差耐性を示さないことも、著者の仮説を支持している。このことは、著者の*N. crassa*を用いた本研究が、基本的には植物病原菌のモデルとして有効なことを示していると考えられる。

Table 6-1 圃場より単離されたリンゴ黒星病菌のMBC耐性メカニズム
(by Dr Jones et al.)

菌株	薬剤感受性		β-tubulinのアミノ酸置換	
	Benzimidazoles	N-phenylcarbamates	198	200
野生株	S	HR	<u>Glu</u>	Phe
MBC耐性株				
1	MR	HR	Glu	<u>Tyr</u>
2	R	S	<u>Gly</u>	Phe
3	R	HR	<u>Lys</u>	Phe
4	VHR	S	<u>Ala</u>	Phe

S : Sensitive
HR : High resistant

MR : Moderately resistant
VHR : Very high resistant

R : Resistant

圃場におけるジエトフェンカルブ耐性菌の出現の可能性とその予測

実用圃場における耐性菌の発生と発達を予測することは極めて困難であり、植物病原菌ではない *N. crassa* を用いた本研究から、ジエトフェンカルブ耐性菌出現問題を予測することは多くの危険性を含んでいることは否めない。しかし、著者は、ジエトフェンカルブ耐性株を単離し、その解析を行ない、上記の本研究結果が、基本的に植物病原菌のモデルとなりうると考えられることから、ジエトフェンカルブ耐性問題の予測についてある程度の知見が得られると考えている。ジエトフェンカルブは、198番目のアミノ酸の変異したチューブリンに結合して抗菌活性を示すと考えられる。したがって、本化合物は、極めて選択性の高い殺菌剤でありこのことは、第1章の緒論で触れたとおり耐性菌の発生しやすいと考えられる殺菌剤である。選択性の高い殺菌剤においては、耐性菌問題は、宿命と考えられ、ジエトフェンカルブにおいても例外ではないと思われる。しかも、*N. crassa* においてMBC、ジエトフェンカルブに両耐性を示す株が単離されていること、また、ジエトフェンカルブを使用していない圃場のリング黒星病菌、ムギ眼紋病菌等でもMBC、ジエトフェンカルブに両耐性を示す株が単離されていることは、ジエトフェンカルブの使用分野である、灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) においてもMBC、ジエトフェンカルブに両耐性を示す株が理論的には、発生、発達の可能性があることを強く示唆している。しかしながら、*N. crassa* における研究より、ジエトフェンカルブ感受性株から得られるジエトフェンカルブ高度耐性株は、MBC感受性を回復することから実質的には、ベンズイミダゾールの使用により防除が可能であり問題とはならないと考えられる。一方、ジエトフェンカルブ中等度耐性株は、MBC、ジエトフェンカルブに両耐性を示すため問題となる可能性を秘めている。しかしながら、ジエトフェンカルブ中等度耐性株のうち、その変異が198番目以外のアミノ酸が置換した株に関しては、そのほとんどが、生育に異常を起こしている (Table 3-4, Fig. 6-4)。これは、 β -チューブリンがすべての生物で保存性の高い蛋白質であり (動物、植物及び糸状菌でそれぞれ約70%のアミノ酸配列の相補性) 多くの変異がその生育等に影響すると考えられる。さらに、ジエトフェンカルブ中等度耐性株 (198番目以外のアミノ酸が置換した株) が生育に異常を

示す理由の一つとして、これらの株においては、 β -チューブリンに2つの変異が入っていることが挙げられる。このことを考慮すると、厳しい条件の要求される実用圃場において、MBC、ジエトフェンカルブに両耐性を示す株は、容易にはジエトフェンカルブ感受性株からは生じないと考えられる。しかし、ジエトフェンカルブ中等度耐性株のうち、その変異が198番目のアミノ酸がMBC、ジエトフェンカルブに両耐性型に置換した株（FRB3株タイプ）は、問題となる可能性を秘めている。たとえば、FRB3株の様に198番目のアミノ酸がLysに置換した株は、少なくとも培地上での生育に異常は認められない。かつ、リンゴ黒星病菌において実用圃場から同一変異を持つMBC、ジエトフェンカルブに両耐性株が単離されていることから、このタイプの変異株は病原性等に大きな影響を及ぼさないと考えられ、灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）においても将来出現の可能性があると考えられる。また、野生株より出現するMBC耐性菌のなかで、ジエトフェンカルブ感受性を獲得しない株（Bml511タイプ）の出現も懸念される(Fig. 6-4)。しかし、逆に考えると、FRB3タイプの株あるいはBml511タイプの株は、理論的には野生株から1アミノ酸置換でベンズイミダゾール耐性株として発生し得る株である。ベンズイミダゾールは、灰色かび病菌に対し、すでに約20年世界的に使用されている。にもかかわらず、灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）においては、ベンズイミダゾール耐性株のほとんどが、ジエトフェンカルブ感受性株1種類である。このことは、灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）に限定した場合、FRB3株型及びBml511株型の耐性菌は、何らかの理由により、圃場における競合に勝てない性質となっている可能性がある。フランスの灰色かび病菌（*Botrytis cinerea*）に対し、ジエトフェンカルブを長期連続使用している試験圃場においてジエトフェンカルブ感受性のモニタリングを行なっているLerouxによると、MBC、ジエトフェンカルブに両耐性株の発生が認められているが、これらの株は、圃場での生存競争に欠陥を持っているため、ジエトフェンカルブの使用を中断すると急激に両耐性菌の密度が低下するとしている(personal communication)。以上のことは、ジエトフェンカルブ耐性の発達が、急激に起こり実用上の大問題となることを否定している。しかしながら、耐性菌問題は、病原菌の持つ多様性との戦いであり、その淘汰圧と密接な関係があ

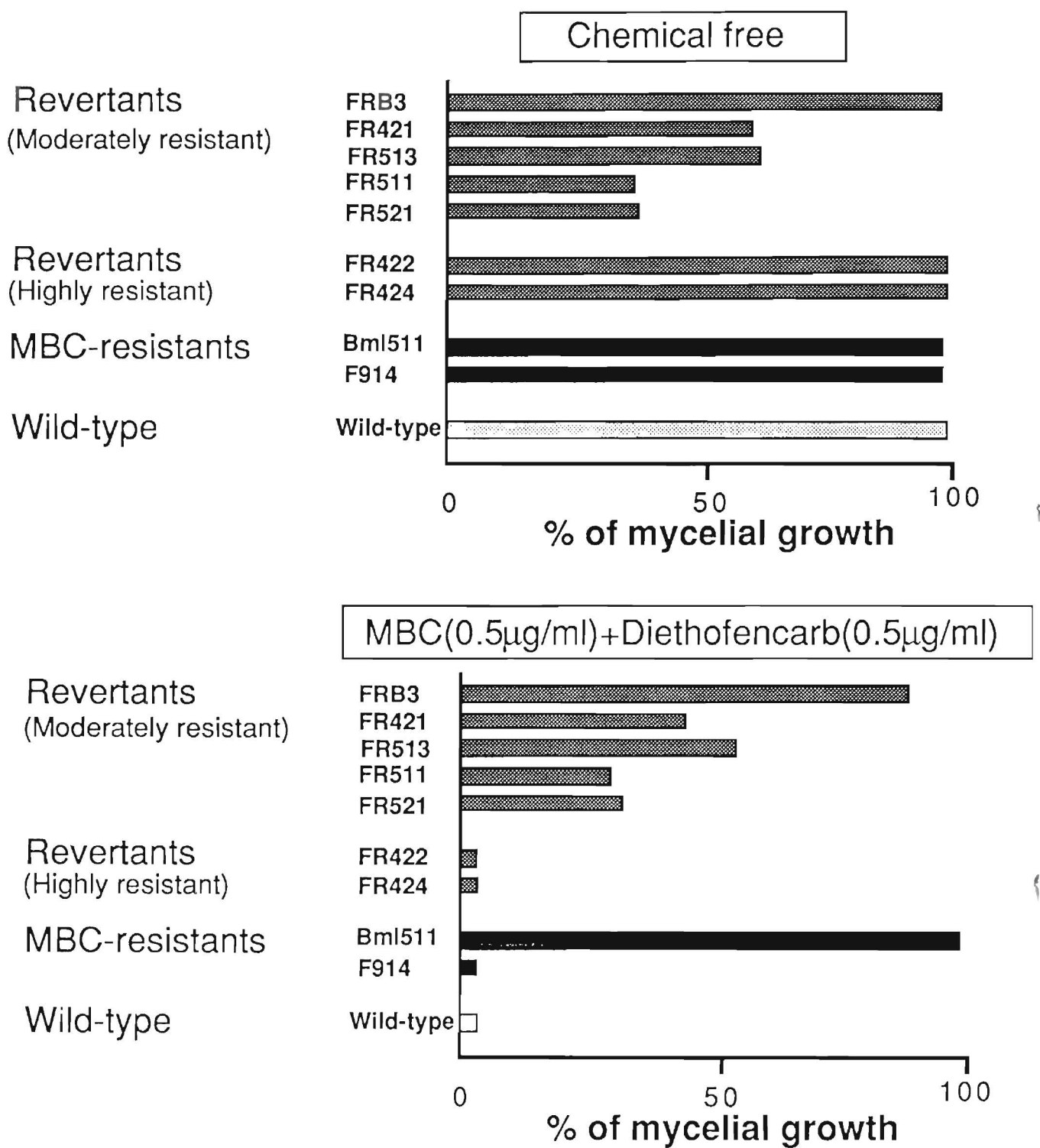


Fig. 6-4 Mycelial growth of *Neurospora* mutants

る。また、環境問題を考慮し、必要以上に使用しないことが重要である。

ジエトフェンカルブの選択的抗菌活性と安全性

ジエトフェンカルブの開発においては、数多くの毒性試験が実施され、その安全性は十分に確認され登録を取得している。ジエトフェンカルブの安全性に関する研究は本研究テーマからはずれるが、先に示したように、ジエトフェンカルブの作用点は β -チューブリンと考えられ、 β -チューブリンがすべての生物で保存性の高い蛋白質であり、人を含め哺乳動物に対するマイクロチューブルに対する影響が懸念される。しかし、本研究より、ジエトフェンカルブが β -チューブリンに結合するためには、その198番目のアミノ酸Gluが置換することが必要である。これまで知られているすべての生物において198番目のアミノ酸は、*Neurospora* の野生株同様にGluである(Table 6-2)。このことは、ジエトフェンカルブは、基本的には、動植物の β -チューブリンに結合しないと考えられ、菌と動植物の選択性が明確であると考えられる。

β -チューブリンのアミノ酸配列と薬剤感受性

マイクロチューブル（微小管）は、 α -、 β -チューブリンのダイマーの重合により構成されており、すべての真核生物に存在し、細胞分裂、細胞の形態、細胞内物質移動、細胞運動等多くの機能を持っている (Dustin 1984)。ベンズイミダゾール系化合物は、マイクロチューブルの構成蛋白質であるチューブリンに結合することによりマイクロチューブルの重合を阻害し、細胞分裂等の阻害を引き起こすことが知られている (Davidse 1977)。動植物に同様の阻害活性を示す薬剤として、コルヒチンが挙げられるが、コルヒチンは、かびに対して一般に抗菌活性を示さない。Kilmartin(1981)らは、MBCとコルヒチンに対するチューブリンの*in vitro*重合阻害を酵母菌とウシの脳由来のチューブリンをもちいて比較し、MBCは酵母菌特異的に、コルヒチンはウシの脳のチューブリンの*in vitro*重合を特異的に阻害を示し、その差は、それぞれ1000倍であることを示している。コルヒチンとベンズイミダゾール間に認められる選択性と β -チューブリンのアミノ酸配列に関する

Table 6 - 2 Comparition of amino acids of β -tubulin

	Position of amino acid substitution						
	165	167	198	237	241	250	350
<i>N. crassa</i>							
wild-type	Ala	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	Gln
Bml511	Ala	<u>Tyr</u>	Glu	Thr	Arg	Ler	Gln
F914	Ala	Phe	<u>Gly</u>	Thr	Arg	Leu	Gln
FRB3	Ala	Phe	<u>Lys</u>	Thr	Arg	Leu	Gln
FR511	Ala	Phe	<u>Gly</u>	Thr	Arg	<u>Phe</u>	Gln
FR513	<u>Val</u>	Phe	<u>Gly</u>	Thr	Arg	Leu	Gln
FR421	Ala	Phe	<u>Gly</u>	<u>Ala</u>	Arg	Leu	Gln
<i>A. nudulans</i>							
wild-type	Ala	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	Gln
benA19	<u>Val</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	Gln
<i>S. cereviciae</i>							
wild-type	Ala	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	Gln
ben-r	Ala	Phe	Glu	Thr	<u>His</u>	Leu	Gln
<i>Glycinemax</i>							
<i>Arabidopsis</i>	<u>Leu</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	<u>Lys</u>
	<u>Leu</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	<u>Lys</u>
<i>Chlamydomonas</i>							
wild-type	<u>Leu</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	<u>Lys</u>
ColR4	<u>Leu</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	<u>Glu</u>
ColR15	<u>Leu</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	<u>Met</u>
Human							
Chikin	<u>Asn</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	<u>Lys</u>
	<u>Asn</u>	Phe	Glu	Thr	Arg	Leu	<u>Lys</u>

研究は少ないが、コルヒチン耐性*Chlamydomonas*株の変異は、350番目のアミノ酸のLysからGluあるいはMetへの置換が知られており、この350番目のアミノ酸が、*N. crassa*, *A. nidulans*, *S. cerevisiae*等では、Glnであることが知られている(Lee & Huang 1990)。また、*A. nidulans*のT B Z耐性BenA16株及びジエトフェンカルブ中等度耐性FR513株のアミノ酸置換は、AlaからValへの置換が認められたが、165番目のアミノ酸は、植物では、Leu、動物ではAsnである。これらのアミノ酸部位は、薬剤の選択性を説明するアミノ酸の候補と考えられ、今後の研究の進展が期待される。

新規細胞分裂阻害剤の創製の可能性

これまで、論理的殺菌剤のデザインの方法として、構造活性相関が用いられてきたが、その成功例は、さほど多くない。この理由の1つとして、これまでの構造活性相関は、化合物の構造変換と抗菌活性（あるいは、*in vitro*酵素阻害活性）の関係を解析したものであり、そのターゲット蛋白質の構造に関する知見は、解析の対象になっていない。本研究により、筆者は、ベンズイミダゾールおよびN-フェニルカルバマート系化合物のターゲット蛋白質 β -チューブリンのアミノ酸置換と薬剤感受性の関係を明らかにした。現在、N-フェニルカルバマート系化合物の構造変換と置換アミノ酸との関係を調べるため、変異株における構造活性相関及び変異株間の活性活性相関について研究している。この試みは、従来の構造活性相関にターゲット蛋白質の変換の情報を導入することを目指しており、この解析より、薬剤の構造、ターゲット蛋白質の立体構造と生理活性の相関に関するより多くの情報が得られるものと考えている。現時点では、 β -チューブリンのX線解析像が得られていないため、ベンズイミダゾールおよびN-フェニルカルバマート系化合物の β -チューブリン上での結合様式を視覚的にみることができず、実際の新規活性化合物の創製は極めて困難と言わざるを得ない。しかし、将来、 β -チューブリンのX線解析像（あるいはNMR解析）が得られれば、本研究により得られた知見を元に、動植物の β -チューブリンの立体構造を考慮しながら、高活性で、選択性の高い新規殺菌剤の論理的創製が可能になると考える。

pEF50のベクターとしての利用価値

Orbach et al. (1986)により単離された*N. crassa* Bml511株由来の β -チューブリン遺伝子は、ベンズイミダゾール耐性という薬剤耐性優性マーカーとして使用できるため、*N. crassa*の形質転換ベクターとして使用され、*N. crassa*の分子生物学を飛躍的に進歩させた。このプラスミドpBT3は、*N. crassa*以外のかび、植物病原菌においても有効であることが報告されている(Henson et al. 1988, Orbach et al. 1986)。しかしながら、Bml511株由来の β -チューブリン遺伝子は、MBC耐性の程度が低いためベンズイミダゾールに対する感受性の低いかび（植物病原菌）においては、ベクターとしての使用が実質的に不可能である。一方、本研究において単離したF914株由来の β -チューブリン遺伝子(pEF50)は、Bml511株由来のpBT3よりMBC高度耐性（75mg/mlのMBC存在下でも形質転換可能）を示す。従って、pEF50は、より多くの糸状菌のベクターとしての利用が可能であると考えられる。さらに、F914株由来の β -チューブリン遺伝子(pEF50)は、MBC耐性形質のみでなく、ジエトフェンカルブ感受性形質を示し、1つの遺伝子が2つの形質を支配しており、pBT3にない特徴を持っている。

謝辞

本研究の完成は、理化学研究所微生物制御研究室において、山口勇博士の指導の下に行なったものである。本研究の完成にあたり、終始、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました山口勇博士に深く謝意を表します。

また、*Neurospora* をもち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、終始御助言、御協力いただいた、埼玉大学理学部生体制御学科遺伝学研究室井上弘一助教授に深く感謝致します。

さらに、本研究を完成させるにあたり、数多くの有益な討論と御協力をいただいた理化学研究所微生物制御研究室鎌倉高志博士を始め、有江力博士及び研究室の皆様に深く感謝致します。

本研究の着手にあたり、深い御理解を示され、御協力くださった住友化学（株）農業化学管理部長加藤寿郎博士、及び遺伝子工学に関する技術の供与と御助言いただいた同社生命工学研究所大江田憲治博士に深く感謝致します。また、本研究に御支援御助言いただいた同社農業科学研究所主席研究員鴨下克三博士、主席研究員大塩裕陸博士、主任研究員小栗幸男氏、主任研究員高橋淳也博士ならびに同社海外開発部長補佐井上悟博士に深く感謝します。

参考文献

1. Akins, R.A. and A.M. Lambowitz, A general method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants. Mol. Cell. Biol., 1985. 5: p. 2272-2278.
2. Beever, R.E. and H.M.R. Brien, A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in *Botrytis cinerea*. New Zealand J. Agri. Res., 1983. 26: p. 391-400.
3. Borck, K. and H.D. Braymer, The genetic analysis of resistance to benomyl in *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol., 1974. 85: p. 51-56.
4. Carmeron, L.E., J. Hutsul, L. Thorlacius and H. B. LeJohon, Cloning and analysis of β -tubulin gene from a protoctist. J. Bio. Chem., 1990. 265: p. 15245-15252.
5. Case, M.E., Schweizer, M. Kushner, S.R. and Giles, N.H., Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979. 76: p. 5259-5263.
6. Cleveland, D.W. and K.F. Sullivan, Molecular biology and genetics of tubulin. Annu. Rev. Biochem., 1985. 54: p. 331-365.
7. Davidse, L.C. and F. W. Flach, Differential binding of methyl benzimidazole-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimittotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. J. Cell Biol., 1977. 72: p. 174-193.
8. Davidse, L.C., Benzimidazole compounds: selectivity and resistance, *In* Fungal resistance in crop protection. ed. J. Dekker and S.G. Georgopoulos. 1982, Pudoc: Wageningen. 60-70.
9. Davidse, L.C., Benzimidazole fungicides: mechanism action and biological impact. Ann. Rev. Phytopathol., 1986. 24: p. 43-65.
10. Davis, R.H. and F.J. de Serres, Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. Methods Enzymol., 1971. 17: p. 79-143.
11. Dekker, J. and S.G. Georgopoulos, Fungicide resistance in crop protection. 1982, Wageningen: pudoc.
12. Delp, C.J., Coping with resistance to plant disease control agents. Plant diseases, 1980. 64: p. 651-657.
13. Dustin, P., Microtubules. ed. 2nd. 1984, New York: Springer-Verlag. 1-452.
14. Fujimura, M., M. Hayashi, and Y. Hisada, Development of a new fungicide, diethofencarb, coping with fungicide resistance. J. Pest. Inf., 1990. 57: p. 7-11.

15. Fujimura, M., K. Oeda, H. Inoue and T. Kato, A single amino acid of beta-tubulin in *Neurospora crassa* confers MBC resistance and diethofencarb sensitivity. *Current Genetics*, 1992. 21 p399.
16. Green, M.B., H.M. LeBaron and W.K. Moberg, Managing Resistance to Agrochemicals. ACS Symposium Series, 1990, Washington, DC: American Chemical Society.
17. Grunstein, M. and D.S. Hogness, Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that containing a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975. 72: p. 3961.
18. Guiltinan, M.J., D.-P. Ma, R.F. Barker, M.M. Bustos, R.J. Cyr, R. Yadegari and D.E. Fosket, The isolation, characterization and sequence of two divergent beta-tubulin genes from soy bean (*Glycine max* L.). *Plant. Mol. Biol.*, 1987. 10: p. 171-184.
19. Henson, J.M., N.K. Blake and A.L. Pilgeram, Transformation of *Gaeumannomyces graminis* to benomyl resistance. *Curr. Genet.*, 1988. 14: p. 113-117.
20. Hiraoka, Y., T. Toda, and M. Yanagida, The *NDA3* gene of fission yeast encodes beat-tubulin: a cold-sensitive *nda3* mutation reversibly blocks spindle formation and chromosome movement in mitosis. *Cell*, 1984. 39: p. 349-358.
21. Inoue, H., R.C. Harvey, D.F. Callen and F.J. de Serres, Mutagenesis at the *ad-3A* and *ad-3B* loci in haploid UV-sensitive strains of *Neurospora crassa*. *Mutat. Res.*, 1981. 84: p. 49-71.
22. Inoue, H. and C. Ishii, Isolation and Characterization of MMS-sensitive mutants of *Neurospora crassa*. *Mutation Research*, 1984. 125: p. 185-194.
23. Jung, M.K. and B.R. Oakley, Identification of an amino acid substitution in the ben A, β -tubulin gene of *Aspergillus nidulans* that confers thiabendazole resistance and benomyl supersensitivity. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1990. 17: p. 87-94.
24. Kato, T., K. Suzuki, J. Takahashi and K. Kamoshita, Negatively correlated cross resistance between benzimidazole fungicides and methyl N-(3,5-dichlorophenyl)carbamate. *J. of Pesticide Sci.*, 1984. 9: p. 489-495.
25. Kilmartin, J.V., Purification of yeast tubulin by self-assembly in vitro. *Biochemistry.*, 1981. 20: p. 3629-3633.
26. Kunkel, T.A., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985. 82: p. 488-495.
27. Lee, V.D. and B. Huang, Missense Mutations at Lysine 350 in β 2-tubulin confer altered sensitivity to microtubule inhibitors in *Chlamydomonas*. *The Plant Cell*, 1990. 2: p. 1051-1057.

28. Leroux, P. and M. Gredt, Effets du barbane, du chlorbufame, du chlorprophame et du prophanen sur diverses souches de *Botrytis cinerea* Pers et de *Penicillium expansum* Link sensibles ou tolérantes as carbendazime et au thiabendazole. C. R. Acad. Sc. Paris serie D, 1979. 289: p. 691-693.
29. Leroux, P. and M. Gredt, Phytiatr. Phytopharm, 1979. 28: p. 79-86.
30. Leroux, P. and M. Gredt, Effets de divers herbicides sur la croissance mycelienne de souches de *Botrytis cinerea* Pers et de *Penicillium expansum* Link, sensibles ou résistantes à certains fongicides. Weed Res., 1980. 20: p. 249-254.
31. Leroux, P. and M. Gredt, Characterizations of strains of *Pseudocercospora herpotrichoides*, the causal agent of cereal eyespot, resistant to carbendazim and thiabendazole. C. R. Acad. Sci. Paris, 1987. 305: p. 395-398.
32. Lewis, S.A., M.E. Gilmartin, J.L. Hall, N.J. Cowman, Three expressed sequences within the human beta-tubulin multi-gene family each define a distinct isotype. J. Mol. Biol., 1985. 182: p. 11-20.
33. Lyr, H., Modern selective fungicides. 1987, Jena Germany: VEB Gustav Fischer Ver.
34. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular cloning. A laboratory manual. 1982, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
35. Marks, M.D., J. West and D.P. Weeks, The relatively large beta-tubulin gene family of *Arabidopsis* contains a member with an unusual transcribed 5' noncoding sequence. Plant Mol. Biol., 1987. 10: p. 91-104.
36. May, G.S., M.L.-S. Tsang, H. Smith, S. Fidel and N.R. Morris, *Aspergillus nidulans* beta-tubulin genes are unusually divergent. Gene, 1987. 55: p. 231-243.
37. 森田利夫, 植物防疫, 1982. 36(1): p. 2-4.
38. Nakamura, S., T. Kato, H. Noguchi, J. Takahashi and K. Kamoshita, Biological activity and mode of action of a resistant breaker, diethofencarb. in 6th Int. Congr. Pestic. Chem. 1986. Ottawa, Canada:
39. Neff, N.F., J.H. Thomas, P. Grisafi and D. Botstein, Isolation of the beta-tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo. Cell, 1983. 33: p. 211-219.
40. Oakley, B.R. and N.M. Morris, A beta-tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. Cell, 1981. 24: p. 837-845.
41. Orbach, M.J., E.B. Porro and C. Yanofsky, Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a

- dominant selective marker. *Mol. Cell. Biol.*, 1986. 6: p. 2452-2461.
42. Paietta, J.V. and G.A. Marzluf, Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.*, 1985. 5: p. 1554-1557.
 43. Roobol, A., K. Gull and C.I. Pogson, Evidence that griseofulvin binds to a microtubule associated protein. *FEBS Letters*, 1977. 57: p. 149-.
 44. Shabi, E., H. Koenraadt and J. Dekker, Negatively correlated cross-resistance to phenylcarbamate fungicides in benomyl-resistant *Venturia inaequalis* and *V. pirina*. *Neth. J. Pl. Path.*, 1987. 93: p. 33-41.
 45. Sheir-Neiss, G., M. Lai and N.R. Morris, Identification of a gene for beta-tubulin in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, 1978. 15: p. 639-647.
 46. Sijpesteijn, A.K., Fungal resistance in crop protection. ed. J. Dekker and S.G. Georgopoulos. 1982, Wageningen: Pudoc. 32-45.
 47. Spencer, E.Y. and H.D. Sisler, Antifungal compounds. History of fungicides, ed. M.R. Siegel and H.D. Sisler. Vol. 2. 1977, New York: Marcel Dekker Inc. 674.
 48. Staub, T., Fungicide resistance: Practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Ann. Rev. phytopathol.*, 1991. 29: p. 443-467.
 49. Suzuki, K., T.Kato, J.Takahashi and K. Kamoshita, Mode of action of Methyl N-(3,5-dichlorophenyl)-carbamate in the benzimidazole-resistant isolate of *Botrytis cinerea*. *J. of Pesticide Sci.*, 1984. 9: p. 497-501.
 50. Takahashi, J., S.Nakamura, H.Noguchi, T.Kato and K.Kamoshita, Fungicidal activity of N-phenylcarbamates against benzimidazole resistant fungi. *J. Pestic. Sci.*, 1988. 13: p. 63-69.
 51. Takahashi, J., O.Kirino, C.Takayama, S.Nakamura, H.Noguchi, T.Kato and K.Kamoshita, Quantitative structure-activity relationships of the fungicidal methyl N-phenylcarbamates. *Pestic Biochem. Physiol.*, 1988. 30: p. 262-271.
 52. Takahashi, J., O.Kirino, C.Takayama, S.Nakamura, H.Noguchi, T.Kato and K.Kamoshita, Quantitative structure-activity relationships of the fungicidal N-(3,4-diethoxyphenyl)carbamates. *J. Pestic. Sci.*, 1988. 13: p. 587-593.
 53. 竹内妙子, 薬剤耐性灰色かび病菌の発生生態と防除対策に関する研究. 千葉農試特報, 1987. 14: p. 1-75.
 54. Tamaru, H. and H. Inoue, Isolation and characterization of a laccase-derepressed mutant of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, 1989. 171(11): p. 6288-6293.

55. Thomas, J.H., N.F. Neff and D. Botstein, Isolation and characterization of mutations in the beta-tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1985. 112: p. 715-734.
56. Vogel, H.J., Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *American Naturalist*, 1964. 98: p. 435-446.
57. Vollmer, S.J. and C. Yanofsky, Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986. 83: p. 4869-4873.
58. de Waard, M.A., Negatively correlated cross-resistance and synergism as strategies in coping with fungicide resistance. *Proc. Brit. Crop Protec. Conf.*, 1984. 2: p. 573-584.
59. Westergaard, M. and H.K. Mitchell, *Neurospora*, V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Am. J. Bot.*, 1947. 34: p. 573-577.

MOLECULAR MECHANISM OF SELECTIVE FUNGITOXICITY OF
DIETHOFENCARB TO BENZIMIDAZOLE-RESISTANT MUTANTS IN
NEUROSPORA CRASSA : EFFECT OF AMINO ACID SUBSTITUTIONS
IN β -TUBULIN

Makoto Fujimura

Two carbendazim(MBC)-resistant mutants of *Neurospora crassa*, F914 and F939, were sensitive to diethofencarb at the concentration of 0.1 μ g/ml, while the wild-type strain and other MBC-resistant mutants showed resistance to diethofencarb at the concentration of 100 μ g/ml. Genetic analysis indicated that the mutations in these two strains were closely linked to the *Bml* locus which codes for β -tubulin. When the wild-type strain was transformed by the cloned β -tubulin gene of the strain F914, the transformants showed MBC resistance as well as diethofencarb sensitivity in the presence of MBC. On the other hand, the diethofencarb sensitivity of the F914 strain was cancelled by transformation with the wild-type β -tubulin gene. DNA sequencing of the F914 β -tubulin gene revealed that glutamic acid at position 198 of β -tubulin in the wild-type strain was substituted by glycine in the F914 strain. Therefore, a single base change in the β -tubulin gene was proved to confer both the MBC resistance and diethofencarb sensitivity.

In the presence of 0.5 μ g/ml diethofencarb, conidia of a benzimidazole-resistant mutant of *N. crassa*, F914, germinated with distorted and swollen germ tubes. Diethofencarb induced scattering of nuclei and inhibited mitotic nuclear division in the F914 strain. The morphological abnormality was quite similar to the one

observed in the wild-type strain treated with MBC. Diethofencarb, however, did not morphologically affect the germ tubes and nuclei of the wild-type strain. Diethofencarb formed a complex *in vitro* with a protein present in the mycelial extracts of the F914 strain, but such a complex was not observed in the extracts of the wild type strain. The binding protein of the F914 strain was retained on a DEAE-Sephadex A-50 column and eluted with 0.5 M KCl. The molecular weight of the binding protein was estimated to be 105,000 by gel filtration on Sephacryl S-200. The data coincide with those on the MBC-binding protein in the wild-type strain, suggesting that diethofencarb was selectively toxic to the benzimidazole-resistant strain by binding to the mutated tubulin.

After UV-treatment of the F914 strain, revertants resistant to diethofencarb were isolated and characterized. Two revertant strains FR422 and FR424 showed high resistance to N-phenylcarbamates and sensitivity to benzimidazoles, as can be seen in the wild-type strain. Other five revertants, FR511, FR513, FR521, FR421 and FRB3, were more resistant to diethofencarb than the strain F914 but less resistant to diethofencarb than the wild-type strain. These moderately resistant strains were more resistant to benzimidazoles than the parent strain F914. Among the strains, FR421 and FR521 were resistant to griseofulvin as well. All the diethofencarb-resistant mutations were linked to the *Bml* (β -tubulin) locus. To identify the changes in the β -tubulin genes in the diethofencarb-resistant revertants, gene cloning and sequencing were carried out. The results showed that the amino acid changes, 250Leu to Phe, 165Ala to Val, 237Thr to Ala and 198Gly to Lys, were responsible for revertant phenotypes in the strains FR511, FR513, FR421 and FRB3, respectively.

The amino acid substitution (¹⁶⁵Ala to Val) of the β -tubulin in the FR513 strain was same to that of the thiabendazole-resistant mutant (benA-16) of *Aspergillus nidulans*, and this amino acid position was close to that of the mutation (¹⁶⁷Phe to Tyr) of the benomyl-resistant mutant (Bml 511) of *N. crassa*. Furthermore, the position of amino acid substitution (²³⁷Thr to Ala) in FR421 strain was close to that of the mutation (²⁴¹Arg to His) of a benomyl-resistant mutant (Ben-R) of *Saccharomyces cerevisiae*, suggesting that diethofencarb shares the binding sites on β -tubulin with benzimidazoles.

In strains FRB3, F914 and wild-type, the amino acid at position 198 were Lys, Gly and Glu, respectively. A new β -tubulin gene with Ala at position 198 was constructed by site-directed mutagenesis. This gene transformed the wild-type strain to MBC resistance, while transformation of F914 strain with this gene resulted in growth on a medium containing 0.5 μ g/ml diethofencarb but not on that containing 75 μ g/ml diethofencarb. The F914 strain transformed by β -tubulin genes of the wild-type strain and the FRB3 strain grew even on a medium containing 75 μ g/ml diethofencarb. These data suggest that the Glu at position 198 in β -tubulin is responsible for MBC sensitivity. Different amino acid substitutions at position 198 confer different sensitivities to diethofencarb and the order of amino acids that results in increasing sensitivity is Glu, Ala and Gly (most sensitive).

Based on these data, a model for binding mode of diethofencarb and MBC to β -tubulin is described. These approaches should work in clarifying the function of β -tubulin and also aid in designing new potent fungicides to circumbate the drug resistance problem.