



# 三重県における薬剤耐性いもち病菌の個体群構造と動態

鈴木, 啓史

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2013-09-25

(Date of Publication)

2014-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第5925号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005925>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



別紙様式3 (博士論文審査等内規第2条関係)

## 博士論文内容の要旨

氏 名 鈴木啓史

専攻・講座 生命機能科学専攻・農環境生物学講座

論文題目 三重県における薬剤耐性いもち病菌の個体群構造と動態

イネ科栽培植物いもち病菌 *Pyricularia oryzae* によるイネいもち病は、イネ栽培の最重要病害である。本病防除剤として、1998年、MBI-D剤が、長期残効型箱処理剤として市場にリリースされた。MBI-D剤はメラニン合成に関わるシタロン脱水酵素(SDH)の阻害剤で、「菌を殺さない防除剤」として注目を集め、その卓越した防除効果と持続性から全国的に普及が進んだ。しかし、2001年、佐賀県で本剤耐性いもち病菌が確認され、その後西日本を中心に拡大していった。そのような中、三重県においても、2005年に本剤耐性いもち病菌が確認された。本研究では、耐性菌の拡大阻止を目標に、発生した耐性菌の由来と個体群動態の解析を行った。

第1章で、本剤の作用機構とその耐性化のメカニズム、佐賀県で発生した耐性菌に関わるこれまでの情報を概観したのち、第2章では、三重県で2006-2007年に採集された527菌株の解析を行った。本剤耐性は、SDH遺伝子の一塩基置換で生ずることが知られている。そこでまず、PCRを用いて、それらの菌株が耐性突然変異を保有しているか否かを検討した。その結果、集めた菌株のほぼ半数(233/527菌株)はSDH遺伝子にMBI-D剤耐性の点突然変異を有していた。つぎに、耐性菌と感受性菌の個体群構造を比較するため、*Pot2*rep-PCRによるDNAフィンガープリント解析を行った。その結果、大多数の耐性菌は、一つのDNAハプロタイプ(Mie1)に分類された。Mie1耐性菌が三重県内に広く分布しているにもかかわらず、同じハプロタイプの感受性菌は検出されなかった。さらに、DNAフィンガープリントパターンから作成した系統樹の中で、Mie1と他の6つハプロタイプのグループは、耐性菌だけのクラスターを形成した。これらの結果から、ハプロタイプMie1を含むクラスターに属する

耐性菌株は、三重県外から移入し、三重県内で短い期間に選択的に増殖したと考えた。

そこで、そのオリジンを明らかにすべく、日本における耐性菌初発地域(佐賀県)で採集された菌株とフィンガープリントを比較した。その結果、Mie1のバンドパターンは佐賀県で採集されたSa18のそれと完全に一致した。このことから、三重県における主要な耐性菌は、九州地方から伝播したものであることが示唆された。

なお、ハプロタイプの中には、耐性菌と感受性菌を両方含むもの(Mie2, Mie12, Mie17)も存在した。それらは、三重県土着の感受性菌の突然変異に由来すると考えるのが自然であるが、Mie1耐性菌と土着の感受性菌が遭遇し、いもち病病斑内で菌糸融合を介して準有性的組み換えが起こり、耐性化に関わる遺伝子を土着の感受性菌が取りこんだ可能性もあると考えた。

第3章では、MBI-D耐性突然変異が自然界でどの程度起こるのか、あるいは定着しうるか否かを明らかにするため、MBI-D剤と遭遇していない菌株を用いてSDH遺伝子の変異を調べようと考えた。神戸大学植物病理学研究室保存いもち病菌代表100菌系は、イネ菌のみならず、アワ菌、キビ菌、コムギ菌、シコクビエ菌など、さまざまな宿主由来の菌系を含んでおり、それらはいずれもMBI-D剤が開発・販売される前に採集されたものである。そこで、これらの菌系におけるMBI-D剤耐性変異の有無を検討したところ、供試したいずれの菌株においても、耐性変異は検出されなかった。メヒシバ菌等、*P. oryzae*とは別種の菌においては、遺伝子全体としてみるとかなりの変異が蓄積されているにも関わらず、耐性化に関わる塩基は全く変異していなかった。以上、MBI-D剤に遭遇する前のいもち病菌、および遭遇した後のいもち病菌両方の解析結果を総合し、MBI-D剤耐性を引き起こすSDH遺伝子の変異は、ある一定頻度ではおこっているもののMBI-D剤がない状況では淘汰されること、すなわち、最近イネ菌において耐性菌が出現しその分布域を拡大したのは、MBI-D剤という強力な選択圧が存在したためであると結論した。このことから、MBI-D剤の使用中止により選択圧が無くなれば、耐性菌は徐々に減少していくことが期待された。

第4章では、この予想が正しいか否かを検討した。三重県においては、2007年から県内全域の農家にMBI-D剤の使用中止を指導した。その結果、耐性菌率は、使用中止3年目の2009年に18.8%まで低下した。このことから、MBI-D剤耐性イネいもち病菌は、野生株と比較すると適応度が低く、MBI-D剤の使用を中止することで、いもち病菌の感受性の回復(感受性菌集団の拡大)が期待できると考えられた。

第5章では、以上の結果を基に総合考察を行った。まず、三重県で発生した耐性菌

(氏名： 鈴木啓史 NO. 3 )

が短期間に三重県全域に広がったのは、耐性菌の分布状況、その拡大のスピードから種子伝染によるものと考えた。また、MBI-D 剤使用を中止すれば耐性菌は速やかに減少すること、ならびに他のさまざまな報告を総合し、前年の耐性菌率が約5%以下で、当該年使用種子の耐性菌保菌率が検出限界以下の場合には、本剤の再使用が可能であると考えた。

指導教員 土佐幸雄

氏名	鈴木啓史		
論文 題目	三重県における薬剤耐性いもち病菌の個体群構造と動態		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	土佐幸雄
	副査	教授	中屋敷均
	副査	准教授	池田健一
	副査		
副査			印
要 旨			
<p>イネ科栽培植物いもち病菌 <i>Pyricularia oryzae</i> によるイネいもち病は、イネ栽培の最重要病害である。本病防除剤として、1998年、MBI-D 剤が、長期残効型箱処理剤として市場にリリースされた。MBI-D 剤はメラニン合成に関わるシタロン脱水酵素 (SDH) の阻害剤で、「菌を殺さない防除剤」として注目を集め、その卓越した防除効果と持続性から全国的に普及が進んだ。しかし、2001年、佐賀県で本剤耐性いもち病菌が確認され、その後西日本を中心に拡大していった。そのような中、三重県においても、2005年に本剤耐性いもち病菌が確認された。本研究では、耐性菌の拡大阻止を目標に、発生した耐性菌の由来と個体群動態の解析を行った。</p> <p>第1章で、本剤の作用機構とその耐性化のメカニズム、佐賀県で発生した耐性菌に関わるこれまでの情報を概観したのち、第2章では、三重県で2006-2007年に採集された527菌株の解析を行った。集めた菌株のほぼ半数(233/527菌株)はSDH遺伝子に薬剤耐性の点突然変異を伴っていた。つぎに、耐性菌と感受性菌の個体群構造を比較するため、<i>Pot2</i> rep-PCRによるDNAフィンガープリント解析を行った。その結果、大多数の耐性菌は、一つのDNAハプロタイプ(Mie1)に分類された。Mie1耐性菌が三重県内に広く分布しているにもかかわらず、同じハプロタイプの感受性菌は検出されなかった。さらに、DNAフィンガープリントパターンから作成した系統樹の中で、Mie1と他の6つハプロタイプのグループは、耐性菌だけのクラスターを形成した。これらの結果から、ハプロタイプMie1を含むクラスターに属する耐性菌株は、三重県外から移入し、三重県内で短い期間に選択的に増殖したと考えた。</p>			

氏名	鈴木啓史
<p>そこで、そのオリジンを明らかにすべく、日本における耐性菌初発地域(佐賀県)で採集された菌株とフィンガープリントを比較した。その結果、Mie1のバンドパターンは佐賀県で採集されたSa18のそれと完全に一致した。このことから、三重県における主要な耐性菌は、九州地方から伝播したものであることが示唆された。</p> <p>第3章では、MBI-D耐性突然変異が自然界でどの程度起こるのか、あるいは定着しうるか否かを明らかにするため、MBI-D剤と遭遇していない菌株を用いてSDH遺伝子の変異を調べた。その結果、供試したいずれの菌株においても、耐性変異は検出されなかった。MBI-D剤に遭遇する前のいもち病菌、および遭遇した後のいもち病菌両方の解析結果から、MBI-D剤耐性を引き起こすSDH遺伝子の変異はMBI-D剤がない状況では淘汰されること、すなわち、最近イネ菌において耐性菌が出現しその分布域を拡大したのは、MBI-D剤という強力な選択圧が存在したためであることが示唆された。このことから、MBI-D剤の使用中止により選択圧が無くなれば、耐性菌は徐々に減少していくことが期待された。</p> <p>第4章では、この予想が正しいか否かを検討した。三重県においては、2007年から県内全域の農家にMBI-D剤の使用中止を指導した。その結果、耐性菌率は、使用中止3年目の2009年に18.8%まで低下した。このことから、MBI-D剤耐性イネいもち病菌は、野生株と比較すると適応度が低く、MBI-D剤の使用を中止することで、いもち病菌の感受性の回復(感受性菌集団の拡大)が期待できると考えられた。</p> <p>以上、本研究は、薬剤耐性菌の由来を個体群構造解析によって明らかにするとともに、「一度耐性菌が出た薬剤は、再利用できるか」という現場の切実な問いに、一つの示唆を与えた、価値ある業績と考えられる。よって、学位申請者 鈴木啓史 は、博士(農学)の学位を得る資格があるものと認める。</p>	