

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和 2 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

新規殺菌剤ターゲットとして見出したタンパク質プレニル化機構の中心因子 Geranylgeranyl transferase の分子遺伝学的研究

筆頭研究者氏名 泉津 弘佑

所属 滋賀県立大学環境科学部

共同研究者名 (所属)

田中千尋 (京都大学大学院農学研究科・教授)

宮川恒 (京都大学大学院農学研究科・教授)

重吉沙衣 (滋賀県立大学大学院環境科学研究科・学振特別研究員 DC2)

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【目的】

既存の殺菌剤の多くで耐性菌が問題となっており、新規作用点をもつ殺菌剤の開発は重要である。しかし、植物病原菌を多数含む子嚢菌では新規作用点をもつ殺菌剤の報告は比較的少ない状況にある。旧・武田薬品アグロカンパニー (現・住友化学) が開発した抗真菌性化合物 Tolnifanide は、*Alternaria* 属や *Bipolaris* 属を含むプレオスポラ目菌に卓効を示し、新規作用点を持つことが示唆されていたが、長年の間、その作用点を同定することができていなかった。申請者らは、Tolnifanide 耐性株を人為的に作出し、野生株と耐性株の全ゲノムと比較することにより、薬剤耐性の原因遺伝子として Geranylgeranyl transferase type I beta subunit (GGT) をコードする *GGTI* を見出した。さらに、分子遺伝学的手法により、この GGT が Tolnifanide の作用点であることを実証した (第 43 回農薬学会大会)。GGT はタンパク質プレニル化機構 (ゲラニルゲラニル化) の中心因子であり、これまでになかったタイプの新しい殺菌剤ターゲットサイトである。そのため、今後の殺菌剤開発の有力な候補と考えられる。そこで本研究では、Tolnifanide をモデルとした基礎的な作用機構研究をすすめるとともに、「プレオスポラ目菌以外にも GGT 阻害剤の開発は有効であるのか?」、「ヒト細胞を対象とした既存の GGT (およびプレニル化) 阻害剤は子嚢菌にも作用するのか?」についても検証をおこなった。

【方法】

(1) Tolnifanide をモデルとした GGT 阻害剤の作用機構研究

Tolnifanide の毒性は「GGT によりプレニル化修飾を受けるタンパク質群の機能が一斉にダウンすること」によって発揮されるという仮説をたて、作用機構研究をすすめている。本申請研究ではインシリコ解析を詳細に行い、GGT によりプレニル化修飾を受けるタンパク質群を子嚢菌全体で正確に予測した。また、トウモロコシごま葉枯病菌については、これらのタンパク質をコードする遺伝子の破壊株作出も試み、その機能を調査した。

(2) GGT 阻害剤が幅広い菌類に作用可能であるかの検証実験

プレオスポラ目に含まれないイネいもち病菌やウリ類炭疽病菌に対しては、Tolnifanide は毒性を発揮することができない。この点に着目し、イネいもち病菌またはウリ類炭疽病菌の本来持っている *GGTI* 遺伝子を相同性組換えにより、トウモロコシごま葉枯病菌 (*Bipolaris* 属) 由来の *GGTI* 遺伝子と置換した。この *GGTI* 遺伝子置換株に Tolnifanide を処理することにより、それぞれの菌に GGT 阻害剤が有効であるかを検討した。

(3) 既存のヒト用 GGT 阻害剤の作用性の検証

GGT は殺菌剤ターゲットとしてはほとんど知られていないが、ヒト細胞においては抗癌剤の有望なターゲット候補として盛んに研究されてきた。そこで、ヒトの GGT 阻害剤として知られる 3 種類の薬剤 (*GGTI*-287, *GGTI*-298, *GGTI*-2133) について、トウモロコシごま葉枯病菌、灰色かび病菌、およびトマト葉かび病菌の 3 種の植物病原性子囊菌類に作用するのかを顕微鏡レベルで検証した。

【結果】

(1) Tolnifanide をモデルとした GGT 阻害剤の作用機構研究

インシリコ解析の結果、GGT によりプレニル化修飾を受けると予測されるタンパク質は多くの子囊菌類で共通しており、いずれの菌種においても 5 種類の RHO 型 GTPase (RH01, RH02, RH04, RAC1, CDC42) および 2 種類の RAS 型 GTPase (RAS2, RSR1) を含む 10 種程度であった。

トウモロコシごま葉枯病菌の遺伝子破壊試験の結果などから、特に RH01, RH04, RAC1, CDC42, RAS2 の 5 種類のタンパク質の機能が一斉にダウンすることが GGT 阻害剤の作用性の本体であると推測された。

(2) GGT 阻害剤が幅広い菌類に作用可能であるかの検証実験

トウモロコシごま葉枯病菌由来の *GGTI* 遺伝子に置換したイネいもち病菌の遺伝子組換え体に対して、Tolnifanide は寒天培地上で著しい生育阻害効果を示した。顕微鏡で観察すると、菌糸の肥大やセルバーストといった Tolnifanide に特徴的な形態変化が認められた。一方、野生株に対しては、Tolnifanide は全く効果を示さなかった。ウリ類炭疽病菌の *GGTI* 置換株については、過去にも報告 (第 43 回農薬学会大会) しているが、イネいもち病菌同様に Tolnifanide は卓効を示した。

以上の点から、Tolnifanide の高い選択性は *GGTI* 遺伝子配列の微妙な違いによって生じていること、つまりプレオスポラ目菌の保有する *GGTI* の配列が Tolnifanide と高い親和性を持っていることが強く示唆された。一方で、イネいもち病菌やウリ類炭疽病菌においても、GGT が阻害されれば菌糸の肥大やセルバーストが引き起こされ、著しい生育阻害効果が起こることも明らかとなった。このことから、GGT 阻害剤は子囊菌類において有望な殺菌剤開発ターゲットであると言える。

(3) 既存のヒト用 GGT 阻害剤の作用性の検証

ヒトと子囊菌の *GGT1* は進化的に同一起源をもつオーソログであり、同一の機能を持っていると推測されているが、アミノ酸配列では約 30% 程度の一致率しかないことから、ヒト細胞で利用される GGT 阻害剤は子囊菌に全く作用しない可能性も予測していた。しかし、少なくとも *GGTI*-287 および *GGTI*-298 はトウモロコシごま葉枯病菌、灰色かび病菌、およびトマト葉かび病菌の全ての子囊菌に対して、顕微鏡観察レベルでは菌糸に形態変化を引き起こし、生育阻害効果を示した。本実験の結果から、いくつかのヒト細胞用の GGT 阻害剤は子囊菌類にも作用し、菌糸に形態変化を引き起こし、生育阻害効果をもたらすことが明らかとなった。