

氏名	からすだ しゅうじ 鳥田 修二
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	乙第46号
学位授与年月日	平成16年 9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Application of Yam Class IV Chitinase as a Biocontrol Agent (ヤマイモ ClassIVキチナーゼのバイオ農薬としての応用)
学位論文審査委員	(主査) 古賀大三 (副査) 森嶋伊佐夫 荊木康臣 松田英幸 加藤昭夫

学位論文の内容の要旨

現在、人口増加によって起こる食料不足を補うために、たくさんの作物供給が必要とされている。そこで十分な供給量を確保するため、植物病原菌による作物の被害を化学農薬によって防いでいる。しかし、この化学農薬は環境問題や人間への健康被害など、多くの問題を引き起こしている。そこで私たちは、この化学農薬を自然界にある有効物質によって代替え出来ないかと思いい、これまでに研究、解明してきたヤマイモキチナーゼをバイオ農薬としての利用を考えた。

キチナーゼは、植物病原菌の構成物質であるキチンをエンドタイプに加水分解する酵素で、私たちはこれまでにヤマイモ塊茎より、family18, 19 に属すいくつかのキチナーゼアイソザイムを精製し、諸性質について解明してきた。また、これらのキチナーゼアイソザイムは異なるエリシターによって誘導され病原菌抵抗性を示すと考えられる。特に遺伝子解析によってクラスが判明している Family 19 Class IV ヤマイモキチナーゼ E は、フザリウム菌に対して強い溶菌活性を持っている。そこで本論文では、このキチナーゼ E を用いてバイオ農薬(酵素農薬)としての利用を考えた。

第一章ではヤマイモより抽出したキチナーゼ E を使用して、ビニールハウス内でのフィールド実験を行った。イチゴうどんこ病に感染しているイチゴ苗に対してキチナーゼ溶液を直接散布しその効果を観察したところ、ヤマイモキチナーゼ E がイチゴうどんこ病を溶菌するがわかった。また、ヤマイモキチナーゼ E と β , 1, 3 グルカナーゼを含む Zymolyase との混合溶液を直接散布し

たところ、同様にうどんこ病に対して溶菌性を示した。このように実際のイチゴ栽培に近い、ビニールハウス内での実験により、ヤマイモキチナーゼ E が溶菌性を示すことより、バイオ農薬としての可能性が示唆された。

次に第二章で、ヤマイモキチナーゼ E の諸性質を他のキチナーゼと比較するために、マダイキチナーゼの諸性質を明らかにした。結果、マダイキチナーゼはアノマー解析により β アノマーを生成し、アロサミジンによって阻害されること、また C 末端アミノ酸配列が他の family18 キチナーゼと高い相同性があることから family18 に属することが解った。また、*Rizoctonia* 菌や *Fusarium* 菌に対する溶菌性をみたところ、マダイキチナーゼはこれらの菌を溶菌しなかった。そこで、バイオ農薬としては family19 に属すヤマイモキチナーゼ E が有効であると考えられた。

第三章において、キチナーゼ E のバイオ農薬（酵素農薬）としての実用化に向け、酵素の大量生産を行うために外来遺伝子を発現させるシステムとしてよく使われ、比較的簡単に高発現がみられる酵母 *Pichia pastoris* を用いた大量培養をこころみた。*P. pastoris* はキチナーゼを 60mg/L 発現したが、発現したキチナーゼは約 34kDa の N 結合型糖鎖が付加した。糖鎖が付加したキチナーゼはイチゴうどんこ病に対して溶菌性を示さなかった。Endo H により糖鎖を切除したキチナーゼはイチゴうどんこ病に対してヤマイモキチナーゼ E と同様に溶菌性を示した。さらに発現したキチナーゼが他の植物病原菌 (*Rizoctonia sorani*, *Fusarium roseum*) に対して溶菌性を示すかどうかを調べたところ、病原菌構成のキチン、グルカンの含有量の違いにより、特異的な溶菌性を示すことが解った。

これらの結果より、ヤマイモキチナーゼ E はバイオ農薬として利用が可能であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

植物キチナーゼの生体防御としての役割が明らかになるにつれ、そのバイオ農薬としての応用が考えられるようになった。しかし、酵素を農薬としてフィールドで使用することはこれまで調べられたことはなかった。本研究は、ファミリー19 のクラス IV のヤマイモキチナーゼがイチゴのうどんこ病に対しバイオ農薬（酵素農薬）としての可能性を示したものである。

第一章では、ヤマイモの塊茎から精製したファミリー19 のクラス IV のヤマイモキチナーゼの溶液を単独で、また β -1,3-グルカナーゼ（商品名：Zymolyase）との共存で、うどんこ病が感染したイチゴの実と葉スプレーし、イチゴうどんこ病の消失を目視と走査電子顕微鏡で観察した。その結果、本ヤマイモキチナーゼ単独でも、スプレー後1日目で白いうどんこ病が消失し、1週間後の走査電子顕微鏡観察でも、そのうどんこ病の菌糸体が分解されている様子が見られた。この溶菌作用には、キチナーゼ単独 (0.3 micro M) でも効果が見られたが、 β -1,3-グルカナーゼの共存で、さらに効果が増加することがわかった。しかし、 β -1,3-グルカナーゼ単独ではその効

果は見られなかった。以上の結果、ファミリー19のクラスIVのヤマイモキチナーゼがイチゴのうどんこ病に対しバイオ農薬（酵素農薬）としての可能性を示すことができた。

第二章では、他の生物由来のキチナーゼについて、バイオ農薬としての可能性を調べるため、マダイのキチナーゼを精製して、その酵素の特性を調べた。その結果、ファミリー18に属することが分かったが、しかし、リゾクトニア菌やフザリウム菌に対する溶菌活性が見られなかった。一方、ファミリー19のクラスIVのヤマイモキチナーゼはフザリウム菌に対して溶菌活性があったため、バイオ農薬として使用可能なキチナーゼはファミリー19のクラスIVのキチナーゼが有効であると思われた。

第三章では、ファミリー19のクラスIVのヤマイモキチナーゼをバイオ農薬として使用するためには、大量に安価に調製しなければならない。そのため、*Pichia pastoris* にそのヤマイモキチナーゼ遺伝子を導入し、大量発現（60 mg/L）させ、そのキチナーゼがイチゴのうどんこ病に対しバイオ農薬（酵素農薬）として使用の可否を調べた。結果は、*Pichia pastoris* が産生するキチナーゼは予想以上に糖鎖付加が起こり、イチゴうどんこ病に対し、オリジナルのヤマイモキチナーゼに比べ効果が見られなかった。しかし、Endo H処理による糖鎖切断後は、オリジナルのヤマイモキチナーゼと同等の効果が見られた。

以上、研究成果として、ファミリー19のクラスIVのヤマイモキチナーゼがイチゴのうどんこ病に対し、バイオ農薬（酵素農薬）として使用できることをはじめて示したことである。すなわち、バイオ農薬（酵素農薬）の誕生を意味するものであり、今後、化学農薬に替わるものとして、世界中に普及することが期待される。