

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Galarza Romero Luis Lenin
審査委員	<p>主査 児玉 基一郎 (印)</p> <p>副査 板井 章浩 (印)</p> <p>副査 伊藤 真一 (印)</p> <p>副査 前川 二太郎 (印)</p> <p>副査 井藤 和人 (印)</p>
題目	<p>Characterization of <i>Trichoderma</i> Species Isolated in Ecuador and Their Potential as a Biocontrol Agent Against Phytopathogenic Fungi from Ecuador and Japan (エクアドルにおいて分離された <i>Trichoderma</i> 属菌の同定・機能解析とエクアドルおよび日本産植物病原菌に対する生物防除剤としての可能性)</p> <p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p><i>Trichoderma</i> 属菌は、世界中で普遍的に分布する土壌生息菌であるが、一方で植物病原菌に対する重要なバイオコントロール菌でもある。<i>Trichoderma</i> をバイオコントロール菌として使用する際、留意すべき点は、導入する資材の防除効率とともに環境保全の観点からみた生態系への影響である。そのためには、本菌の分類学的特徴づけを明確にする必要がある。さらに、環境への影響を考慮するならば、外来の菌株ではなく、その対象国の国内で分離された菌株を使用すべきである。そこで本研究では、まず、エクアドル各地から分離した菌株を対象に、形態的観察および rDNA internal transcribed spacer 領域、elongation factor-1α 遺伝子、RNA polymerase subunit II 遺伝子配列を利用した分子生物学的同定を試みた。その結果、<i>Trichoderma</i> 属菌 15 株に関して、<i>T. harzianum</i> (<i>Th</i>) (T1, T3, T15, T19, T20 および T36)、<i>T. asperellum</i> (T2, T4, T5, T9, T10, T13 および T18)、<i>T. virens</i> (T43) および <i>T. reesei</i> (T29) の 4 種を同定した。</p> <p>これら候補菌株に関して、ターゲットとなる病原菌との対峙培養法により、拮抗作用を検討した。病原菌としては、エクアドルにおける重要病原菌であるバナナ病原菌、<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> (<i>Foc</i>) (パナマ病菌) や <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (ブラック・シガトカ病菌)、カカオの病原菌である <i>Moniliophthora roreri</i> (frosty pod rot 病菌) や <i>Moniliophthora perniciosa</i> (てんぐ巣病菌)、また、日本産病原菌として、<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (トマト萎凋病菌)、<i>Alternaria alternata</i> tomato pathotype (トマトアルターナリア茎枯病菌) および <i>Rosellinia necatrix</i> (白紋羽病菌) を対象とした。これら病原菌に対して、<i>Th</i> T15、T19 および T36 は他の菌株と比較して高い拮抗作用を示した。現在、現地圃場において、候補菌株を使用した圃場試験が進行中である。</p> <p>従来、<i>Trichoderma</i> による菌寄生過程を詳細に観察することは困難であった。そこで本研究では、緑色蛍光タンパク質 (GFP) あるいは赤色蛍光タンパク質 (RFP) 発現マーカー菌株を利用して、菌寄生過程の観察を試みた。菌寄生株として <i>Th</i> T36 株、植物病原菌として <i>Foc</i> Fo-01 分離株を使用し、それぞれ、RFP 遺伝子 <i>dsred2</i> および GFP 遺伝子 <i>egfp</i> を導入した。その結果、GFP 発現 <i>Foc</i> に対して、RFP 発現 <i>Th</i> が感染する過程が明確に観察された。</p>

Trichoderma による菌寄生過程においては、各種細胞壁分解酵素の生産が関与すると考えられている。しかし、これら分解酵素の菌寄生における意義、役割に関しては明確となっていない。その主要因は、これら酵素は協調的に働く場合が多く、また個々の酵素遺伝子も複数コピー存在することから、単一酵素遺伝子の欠失実験などでは、明確な結論を得ることが困難な点である。

SNF1 は酵母で見出されたプロテインキナーゼであり、植物病原糸状菌において、多数の細胞壁分解酵素遺伝子発現を正に制御していることが明らかにされている。そこで、*Trichoderma* の菌寄生性における細胞壁分解酵素の役割を解明するため、本研究では、*Th* T36 株のゲノムドラフトシーケンス解析を行い、本菌が保有する SNF1 ホモログの同定と機能解析を試みた。その結果、本菌ゲノムより SNF1 ホモログ (*ThSNF1* と命名) を同定した。遺伝子ターゲティング法により得られた *ThSNF1* 変異株 (Δ *ThSNF1*) では、炭素源としてキチンを添加した最少培地上で、野生株に比べ著しい成長阻害が認められた。 Δ *ThSNF1* 株においては、キチナーゼおよびポリガラクトツロナーゼ遺伝子の発現が、野生株に比べ低下していた。さらに、*Foc* に対する菌寄生性も大きく低下した。以上の結果より、*ThSNF1* および細胞壁分解酵素が本菌の菌寄生過程において重要な役割を果たしており、バイオコントロール能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

本研究により得られた成果は、*Trichoderma* を用いた植物病害のバイオコントロールにおいて、基礎および応用両面から大きく貢献するものである。また、本論文は、高い独創性、新規性を含み、学位論文として十分な価値を有すると判定した。