

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 Elucidating the molecular mechanisms of epichloae endophyte in plant protection against grass pathogens.
(牧草共生糸状菌 epichloae エンドファイトによる宿主植物の病害抵抗性向上の分子機構)

氏名 NIONES Jennifer Tagubase

論文内容の要旨

植物体内で共生的に生活している糸状菌や細菌などはエンドファイトと総称されている。*Epichloë/Neotyphodium*属エンドファイト (epichloaeエンドファイト) は、イネ科 (イチゴツナギ亜科) の牧草や芝草の地上部組織の細胞間隙で生育し、共生関係を保っている糸状菌エンドファイトである。Epichloaeエンドファイトは植物細胞間隙で生育することにより外界の微生物から遮断され、植物の細胞間隙から栄養を獲得することで生育しており、繁殖および生育の両面で宿主植物に大きく依存している。一方、エンドファイトは、宿主植物感染時に様々な二次代謝産物を生成し、生産された物質が植物に昆虫による補食の抑制、病原菌に対する耐性向上などの効果をもたらすことが知られている。耐虫性に関わる生理活性物質が単離され、また耐虫性を向上させる菌株が害虫防除に実用的に利用されている一方で、病原菌に対する耐性を向上させる機構は殆ど明らかになっていない。

本学位論文では、多様な地域から分離された *Epichloë festucae* 菌株から病原菌の生育を抑制する活性の強い菌株を選抜し、さらにその菌株を用いて抗菌性物質の生成に必要な遺伝子の単離、およびその機能解析を行なった。

まず世界の様々な地域から分離された 14 の *E. festucae* 菌株と、epichloae エンドファイトの宿主植物であるペレニアルライグラスの病原糸状菌である、いもち病菌 *Magnaporthe grisea*、ダラースポット病菌 *Sclerotinia homoeocarpa*、斑点病菌 *Drechslera erythrospila*、*D. siccans*、網斑病菌 *D. dictyoides*、炭疽病菌 *Colletotrichum graminicola*、夏斑点病菌 *Bipolaris sorokiniana* および葉腐病菌 *Rhizoctonia solani* との対峙培養を行った。その結果、これら病原菌の培地上での生育を抑制するエンドファイト菌株が見出された。抗菌活性を示した *E. festucae* 菌株のうち、E437 株は最も多くの病原菌に対して抗菌活性を示し、*D. erythrospila*、*D. siccans*、*D. dictyoides*、*C. graminicola* および

B. sorokiniana の生育を阻害した。また *E. festucae* 菌株の培養濾液を *D. erythrospila* の胞子懸濁液に処理したところ、14 の *E. festucae* 菌株のうち E437 株の培養濾液のみが病原菌の胞子発芽を著しく阻害した。そこで、E437 株を抗菌性株としてさらに解析をすることとした。

E. festucae E437 株との対峙培養によってコロニー生育の阻害が認められる *D. erythrospila* 菌糸の形態を詳細に観察した。細胞壁成分を染色するカリコフローを用いて病原菌菌糸を染色したところ、菌糸の分解や形態異常は殆ど観察されなかった。一方、カリコフロー染色した菌糸で通常認められる菌糸先端の強い染色が、対峙培養をした病原菌の菌糸では、単独で培養した場合と比較して有意に減少していた。この結果から、E437 株による病原菌の生育阻害は、病原菌の菌糸分解ではなく、極性生長の阻害であることが示唆された。また、E437 株の感染による宿主植物の病害抵抗性への影響を調べた。E437 株および抗菌活性を示さなかった F11 株をペレニアルライグラスに接種し、それぞれの菌株が感染した植物に *D. erythrospila* を接種した。その結果、エンドファイト非感染株および F11 感染株と比較して、E437 株が感染した植物における病徴の軽減が認められた。この結果から、E437 株の産生する抗菌物質が宿主植物を病原菌から守る活性があることが示唆された。

次にプラスミド挿入による遺伝子変異法を用いて、*E. festucae* E437 株のもつ抗菌活性を失う変異株の単離を行なった。1200 の形質転換体と *D. erythrospila* の対峙培養の結果、抗菌性を失った変異株 830 を単離した。830 株は、E437 株が抗菌活性を示した 5 種の病原菌すべてに対する抗菌活性を失っており、E437 株のこれら病原菌に対する抗菌活性が同じ抗菌物質によって発揮されていることが示唆された。830 株においてプラスミドが挿入された部位に隣接する DNA 配列を特定し、*E. festucae* のゲノム配列に対する相同性検索によりプラスミド挿入部位を特定したところ、推定転写制御因子のプロモーター領域に挿入されていることが明らかとなった。この遺伝子にコードされている転写制御因子は、アカパンカビ (*Neurospora crassa*) の非自己認識とそれに伴う細胞死の誘導を司る Ndt80/PhoG DNA 結合ドメインをもつ転写制御因子である Vib-1 と相同性を示したことより、VibA と名付けた。vibA 遺伝子の欠損株を新たに作出し、その抗菌活性を調べたところ培地上での対峙培養時における抗菌活性および培養濾液の病原菌の胞子発芽阻害活性が失われていた。また、遺伝子欠損株に vibA 遺伝子を再導入することで、抗菌活性が回復することも確認した。さらに、830 株における vibA 遺伝子の発現量を調べたところ、野生株の 20%程度に低下していたことから、830 株の抗菌活性の欠損は、ベクター挿入による vibA 遺伝子のプロモーター活性の阻害によって起こっていることが示された。以上の結果から、vibA 遺伝子がエンドファイトの抗菌活性に必須な遺伝子であることが確認された。

アカパンカビの Vib1 は、*het-c* 遺伝子座の異なる 2 つの菌株間で細胞融合が起こることにより誘導される、ヘテロカリオン不和合性 (heterokaryon incompatibility) に伴う細胞死を制御する転写制御因子であり、細胞外プロテアーゼの生成に関与することが知られている。そこで、*E. festucae* の非抗菌性株、E437 株および vibA 破壊株にお

ける細胞外プロテアーゼ活性の検出を行なった。ゼラチンを基質にした活性測定の結果、E437株のコロニー周辺でプロテアーゼ活性が検出されたのに対して、*vibA*破壊株ではその活性が失われていた。この結果より、VibAはエンドファイトの細胞外プロテアーゼ活性の発現に必須であることが示された。さらに、病原菌に抗菌性を示さないエンドファイト株群における細胞外プロテアーゼ活性を調べたところ、抗菌性の有無とプロテアーゼ活性には相関が認められなかったことから、細胞外プロテアーゼ活性はVibAによる制御を受けているものの、抗菌性には直接寄与しないことが示唆された。そこで、E437株の培養濾液中の抗菌活性物質の性状について調査した。E437株の培養濾液に対して煮沸による熱処理、低温処理、透析処理などを行なったところ、培養濾液の活性は熱及び低温に対して極めて耐性が高いことが明らかとなった。一方、分画分子量3 kDaの透析膜を用いた透析の結果、透析膜中の培養液の抗菌活性が失われた。以上の結果より、培養濾液に含まれている抗菌物質はプロテアーゼなどの酵素ではなく、低分子量の化合物である可能性が示された。

次に、*E. festucae* E437株に過剰発現プロモーター（Tefプロモーター）の制御下で*vibA*を発現させた。得られた*vibA*高発現株の抗菌活性を調べたところ、E437株が培地上で抗菌活性を示した5種の病原菌すべてに対する抗菌性が著しく上昇していた。さらに、*vibA*過剰発現株は、野生株が抗菌性を示さなかった*M. grisea*、*S. homoeocarpa*および*R. solani*に対する抗菌性を獲得していた。また、抗菌活性をもたない*E. festucae* F11株に同様に*vibA*を過剰発現したところ、病原菌に対する抗菌性を獲得した。これらの結果から、*vibA*は*epichloae*エンドファイトの抗菌物質生成において主導的な役割をになう転写制御因子であることが示唆された。