

論文審査の結果の要旨および担当者

| | | | |
|------|---|---|---|
| 報告番号 | ※ | 第 | 号 |
|------|---|---|---|

氏 名 NIONES Jennifer Tagubase

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)

論文審査担当者

| | | |
|----|----------|-------|
| 主査 | 名古屋大学准教授 | 竹本 大吾 |
| | 名古屋大学教授 | 川北 一人 |
| | 名古屋大学教授 | 柘植 尚志 |
| | 名古屋大学教授 | 小鹿 一 |

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* 属エンドファイト (*epichloae* エンドファイト) は、イネ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。*Epichloae* 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。耐虫性に関わる生理活性物質が単離され、耐虫性を向上させる菌株が害虫防除に利用される一方で、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、複数の *Epichloë festucae* 菌株から病原菌の生育抑制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とその機能解析を行なった。研究成果の概要は次の通りである。

まず様々な地域から分離された 14 の *E. festucae* 菌株と、エンドファイトの宿主植物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、これら病原菌のの生育を抑制する菌株が見出された。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。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* 菌糸の形態を観察した。細胞壁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、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 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たところ、培地上での対峙培養時における抗菌性および培養濾液の病原菌の孢子発芽阻害活性が失われていた。また、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示された。

アカパンカビの Vib1 は、*het-c* 遺伝子座の異なる 2 つの菌株間での細胞融合により誘導されるヘテロカリオン不和合性に伴う細胞死を制御する転写制御因子であり、プロテアーゼ生成に関与する。そこで、*E. festucae* 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。その結果、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* 破壊株では活性が失われた。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、E437 株の培養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の制御下で *vibA* を発現させた。*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 種の病原菌に対する抗菌性が著しく上昇しており、さらに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 *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担う転写制御因子であることが示された。

以上のように、NIONES Jennifer Tagubase はこれまで殆ど明らかになっていなかった *epichloae* エンドファイトの菌株間での抗菌活性の多様性を明らかにし、さらに抗菌物質生成に関連する遺伝子の単離に初めて成功した。これらの研究成果は、この学問領域に新たな知見を提供し、学術と応用の両面において植物病理学分野の進展に資するものである。よって、本審査委員会は本論文の内容が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。