

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 志野

農業の生産性の向上を目指して開発された化学合成農薬は、高性能、安価、長期保存可能といった利点から広く使用されている。一方で、農薬の過度な使用は水質汚染、土壌汚染、農作物への残留などの理由から、人体への毒性、持続的農業への悪影響が危惧されている。また、娯楽目的で造成されているゴルフ場でも、農薬が水質汚染を引き起こし、国内でも緊急の課題として取り上げられるほど社会問題視されている。ゴルフ場で使用される芝草は年間を通して生育を良好に維持する必要があり、生育に不適切な気候環境下でも生育させなければならない。また利用目的上、輪作、混作ができないといった理由から、多量の農薬が散布されているのが現状である。従って、減農薬を目的とした防除効果の高い殺菌剤の検討、肥培管理技術の確立、病害耐性芝の創成とともに、農薬に代わる土壌病害防除法の確立が必要となっている。農薬に代わる防除法として、拮抗微生物による生物防除法が期待されている。生物防除法とは、土壌微生物生態系の中で微生物が獲得してきた機能を植物病害の抑制に利用する手法である。しかしながら、拮抗微生物の導入による生物防除は拮抗菌株の定着性、生残性の低さ、また、病害防除に必要な活性の不安定さなどの問題点もあげられているため、防除機構の解明が求められている。本論文では、芝草の病害を防除する細菌 HP72 株について、病害防除のメカニズムをブラウンプッチ病を中心に解明したもので、3章からなる。

第1章では、HP72 株の分類学的な位置を明らかとした。この菌株の種の同定を行うため生理性状試験、および分類の遺伝的指標である 16S rDNA 配列の解析を行った結果、*Pseudomonas fluorescens* の biovarIII であることが強く示唆された。HP72 株は拮抗性物質 Phl を生産する。これまでに、Phl を生産する蛍光性 *Pseudomonas* が各種病害の拮抗微生物としていくつか単離されている。*Pseudomonas* 属は、16S rDNA 配列による系統解析の結果、7つのクラスターに分けられることが報告されているが、Phl 生産菌はそれぞれいくつかの異なるクラスターに属し、Phl の生産性は 16S rDNA 配列による系統解析と関連していなかった。

第2章では HP72 株の生産する拮抗物質と病害防除との関連を調べた。HP72 株は対峙培養により各種シバ草病原性糸状菌に対して拮抗性を示し、培養上清中に Phl を生産することはすでに明らかにされていたが、他の拮抗物質を生産するの可能性も考えられたため、トランスポゾン Tn5 を導入し、HP72 株のランダム変異株を作製した。それらの変異株とシバ草病原性糸状菌との対峙培養を行い、拮抗性を示さない5つの拮抗能欠損変異株を単離した。これら5つの拮抗能欠損株の培養上清を薄層クロマトグラフィーにより解析した結果、すべての株で Phl を生産しなかった。このことから、HP72 株の *in vitro* における拮抗性に、Phl の重要性が示唆された。Tn5 挿入部位の周辺遺伝子

からは、Phl 合成遺伝子群との関連性は見いだせなかった。このことは、Phl 生産制御の複雑性を示していると考えられる。対峙培養により得られた5つの拮抗能欠損株のうち3株は、拮抗性との関与が指摘されているシアン化合物の生産も欠損していた。よって、Phl は生産せず、シアン化合物は生産する2つの HP72 変異株を用い、ブラウンパッチ病害防除能について評価した。その結果、野性株と比べ、Phl 非生産株はその防除能を低下させたことから、病害防除において Phl 生産は重要な役割を果たすことが示唆された。これまでいくつかの *Pseudomonas* 菌株で Phl 合成遺伝子の部分配列が報告されている。次に、Phl 合成遺伝子の推定アミノ酸配列を基にして PCR プライマーを合成し、HP72 株の Phl 合成遺伝子領域を単離した。この結果、すべての Phl 遺伝子で、報告されているものと高い相同性が確認された。

第3章では HP72 株の生産する植物成長制御因子 indole-3-acetic acid (IAA) と病害防除との関連を調べた。IAA は、植物ホルモンオーキシン様の作用を示す物質である。多くの根圏微生物は IAA を生産することが報告されており、いくつかの IAA 合成経路が決定されている。HP72 株は、L-tryptophan (Trp) を添加した培地で培養した際、その培養上清に IAA を生産することが確認された。HP72 株を数回継代培養した結果、Salkowsky 試薬で IAA 生産が検出されない IAA 低生産株が単離された。そこで、野性株およびこの IAA 低生産株を用い IAA の合成経路の決定を行った。これまで微生物による主要な IAA 合成経路として、Indole-3-acetamide (IAM) を介する IAM 経路と、Indole-3-pyruvic acid (IpyA) を介する IpyA 経路が報告され、その合成遺伝子に関する研究が進んでいる。そこで、休止菌体反応により HP72 株は IAM 経路、IpyA 経路の主要な中間物質である IAM、IpyA を利用して IAA を合成できるのかを指標とし、この経路の有無を確認した。IAA 低生産株は Trp から、野生株の約 6.8%しか IAA を合成せず、野性株、IAA 低生産株の両株とも、IAM、IpyA から IAA をほとんど合成しなかった。このことから、IAM、IpyA 経路により IAA を生産していないと考えられた。そこで、IAM 経路、IpyA 経路とは異なる IAA 合成経路の鍵酵素である Tryptophan side chain oxidase (TSO) の活性を調べた結果、野性株は高い活性をもち、IAA 低生産株では野性株の約 8.6%の活性しか持たないことが分かった。このことから、HP72 株は、TSO 経路により IAA を合成していることが示唆された。この両株を用い根圏への定着能を調べた結果、IAA 低生産株では、野生株の約 1/5 の定着数となり、IAA 生産が根圏への定着に関わる可能性が示唆された。また、野性株を接種したベントグラスでは、無接種のベントグラスに比べ、根の伸長が抑制される現象が見られたが、IAA 低生産株ではこの現象が見られず、無接種のベントグラスとほぼ同等の根の伸長が見られたことから、HP72 株の生産する IAA は根の伸長を抑制する可能性が示唆された。しかしながら、ブラウンパッチ病害防除能に関しては、両株間に有意な差は見られず、IAA 生産量と病害防除には直接的な関連性はなく、また 1/5 程度の定着数の減少は病害防除能に影響を与えないことが示された。

以上、本論文は微生物農薬として期待される *P. fluorescens* HP72 株の芝草病害の防除機能を生産物質の側面から解明を試みたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。