

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 赫 宇曦

植物病害はその原因によって、伝染性または非伝染性の二つに大別される。伝染性の病害は糸状菌、細菌、マイコプラズマ、ウイルス、ウイロイドなどによって起こる。現在のところ、伝染性の植物病害防除には農薬（殺菌剤など）が最も一般的に使用されているが、その他、耕種的防除法、物理的防除法、及び生物的防除法もある。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、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。減農薬、環境保全型の農業が課題とされている今、農薬にかわる有効な植物病害防除法の確立が必要となっている。本論文はシバクサに対して病害抑止性を示す蛍光性 *Pseudomonas* について、その病害抑止のメカニズムを解明したもので3章で構成されている。

序論に続く第一章では、*Pseudomonas fluorescens* HP72 株が生産する拮抗物質 2,4-diacetylphloroglucinol(PhI)が病害抑止性に関与することを明らかとした。HP72 株は PhI、HCN、fluorescent siderophore などの拮抗物質を生産する。シバクサ病原菌である *Rhizoctonia solani* AG2-2 IIIB、*Pythium aphanidermatum*、*Sclerotinia homoeocarpa* を用いた対峙培養で拮抗性を示さない Tn5 変異株を5株作製したところ、全ての株が PhI の生産能を失い、シバクサに対する病害抑止性も失われたことから、病害抑止性には PhI が関与していることが明らかとなった。

第二章では、HP72 株の、PhI 合成遺伝子および上記の非生産性変異株の遺伝子領域を分離して、どのような遺伝子が PhI の合成に関与しているか解明することを試みた。その結果、PhI 合成遺伝子とされる *phlA*、*phlC*、*phlB*、*phlD*、転写リプレッサータンパク質をコードする遺伝子とされる *phlF* および放出タンパク質をコードする遺伝子とされる *phlE* をコードする領域を取得した。PhlACBDF 部分の推定アミノ酸配列については、これまで報告された Q2-87 株や F113 株と 90%以上の高い相同性を示したが、CHA0 株とやや低い約 80%の相同性を示した。次に、ゲノムライブラリの作製および PCR 増幅などの遺伝子単離手法を用いて、PhI 非生産変異株から、Tn5 挿入部位の周辺遺伝子を取得した。この結果、すべての Tn5 挿入周辺遺伝子領域は、PhI 合成遺伝子群との関連性が見られなかった。さらに、これらの領域の複数の遺伝子部分を相同組換えにより破壊し、PhI 合成と関与する遺伝子を絞り出した。その結果、1つの遺伝子領域から *P. putida* の GntR family 転写因子と 63%の相同性を示す遺伝子が生産制御に関与

ることが確認された。GntR family 転写因子に関する研究報告によると、GntR family タンパク質は炭素代謝において、カルボン酸塩を有する触媒タンパク質のリプレッサーとして働くことが多く、転写促進因子として働くという報告もある。もうひとつの遺伝子領域からは、5つの open reading frame が確認され、一つのオペロンになっていると推定された。これらの遺伝子群は 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (73%)、BNR domain protein (44%)、推定トランスポータータンパク質(63%)などに相同性を示したことから、炭素代謝または物質輸送に関わると推定された。

第三章では、第二章で得られた Phl 生産制御遺伝子について制御メカニズムを解明するための実験を行った。相同組換えにより HP72 株、Phl 非生産変異株の *phlF* 破壊株を作製し、RT-PCR 分析および培養液抽出物の TLC 分析を行った。その結果、野生株の Phl 生産能が大幅に増加したが、Phl 非生産株では、Phl 合成遺伝子の転写が回復されたにも関わらず、Phl 生産能は、全く回復されていなかった。これらの株では Phl の生産と密接に関わるとされている褐色色素は生産されていた。その褐色色素の正体はまだ不明だが、Phl 生産菌から共通に生産され、Phl 生産で生じた一つの間産物と考えられている。よって、これらの株では破壊された領域の遺伝子がリプレッサータンパク質 PhlF を通じて Phl 合成遺伝子の転写に影響する一方、別の制御システムで Phl の生産を制御することが示唆された。また、Phl 非生産株の培養液抽出物を GC-MS で解析した結果、Phl 前駆体とされる MAPG の生産もされていなかったことから、それらの遺伝子は Phl 合成遺伝子を発現レベルで制御するか、または MAPG のさらなる前駆体の生産に関わると考えられる。次に、quorum sensing 反応 が Phl 生産制御に関与するか検討した。HP72 株について、培養液の上清からシグナル因子 AHLs は検出できなかったが、King's B 培地へこの上清抽出物を添加すると、HP72 株の生育が著しく遅くなり、また Phl の生産と合成遺伝子の転写が促進されたことから、AHLs 以外のシグナル因子が存在する可能性が示唆された。

以上、本論文は植物病害抑止性の蛍光性 *Pseudomonas* の病態抑止のメカニズムの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、審査委員一同は、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。