

氏 名	矢澤 千佳子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 2 6 4 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	<i>Metarhizium</i> 属糸状菌の系統解析について (主査)
審 査 委 員	教 授 松本 継男 教 授 遠藤 泰久 教 授 山岡 亮平 九州大学大学院教授 清水 進

論文内容の要旨

Metarhizium 属糸状菌は広範な宿主域や特異性をもつことから、天敵微生物として害虫防除への利用が高まり、多数の分離株が報告されている。しかし、分生子の形状や培養性状のみに基づく従来の分類法では対応できない菌株が多く存在している。本論文は来歴不詳な *Metarhizium* 属糸状菌の類縁あるいは進化的関係をより明確にするために、rDNA の塩基配列や昆虫の糸状菌感染の主要なビルレンスであるセリンプロテアーゼをコードする Pr1 遺伝子の分子データをもとにして系統解析を行い、新知見を加えるとともに *Metarhizium* の分類に分子データが有効な手法であることを提案している。本論文は 4 章で構成されている。

第 1 章は *M. anisopliae* 従来法による分生子の形態と培養性状を調査し、分生子の形成速度に差異がありまた分生子の色調やコロニーも菌株個有であることを明らかにした。また分生子サイズは従来の基準に合致したが、その形態や生育のための栄養要求は菌株ごとに異なることを明らかにした。

第 2 章はパルスフィールド電気泳動 (PFGE) の核型解析により、*M. anisopliae* の染色体像を捉えた。その結果、染色体数 7 本以上、ゲノムサイズは 30.7 Mbp—33.4 Mbp と推定した。

第 3 章は rDNA 塩基配列を、internal transcribed spacer (ITS) 1—5.8S rDNA—ITS 2 領域について解析し、*M. anisopliae* 群 (グループ I) および *M. flavoviride* と *M. album* 群 (グループ II) に大別され、それぞれ独自の進化過程をたどった系統樹を明らかにした。さらにグループ I は遺伝的距離と高いブーツストラップ値で 4 つのサブグループ (I -A, B, C および D) に細分され、日本株や韓国株の東アジア由来株は全てサブグループ I -A に属することを明らかにした。

第 4 章は Pr1 遺伝子の分子データを基に系統進化の解析を行ない、*M. anisopliae* の各菌株間の相互関係と進化的関係を調査した。第 1 節は分離株の簡易スクリーニング法として、Pr1 遺伝子の restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析を行い、分岐価より系統樹を作成したところ、*M. anisopliae* var. *anisopliae* グループと var. *majus* グループに大別された。var. *anisopliae* グループはさらに細分され、韓国株と日本株間の近似性は高く、アメリカ株とブラジル株とは明らかに区別されることを明らかにした。また 第 2 節では、わが国由来の var. *anisopliae* 株について Pr1 遺伝子の成熟プロテイン領域の塩基配列を決定し系統解析を実施したところ、推定アミノ酸配列では、酵素活性部位やジスルフィド結合部位および糖鎖結合部位など

の配列は完全に保存され、また日本株間では極めて類似しているが、アメリカ株や来歴不詳の IFO5940 株との変異は大きいことを明らかにした。さらに系統樹では日本株、アメリカ株ならびに 5940 株の 3 つのグループに分岐し、わが国には独自の地理的変異株としての存在が示唆された。宿主特異性と Pr1 遺伝子間には特定の関係が認められなかったことから、同糸状菌の宿主特異性はその地理的な隔離が起こった後に生じたものと推定した。

以上の結果により *Metarhizium* 属菌株の系統や進化的位置付けを明確にするとともに、rDNA と Pr1 遺伝子などの分子データは、昆虫病原性糸状菌の種間および種内の系統や進化的関係の解析に利用できるばかりでなく、形態的特徴を主体とする従来の分類法に加えて大いに応用できることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

昆虫病原性糸状菌（不完全菌）は、培養性状や形態的特徴、特異な分生子胞子の形状からの分別を基本としている。*Metarhizium* 属糸状菌は特異な殺虫活性や広範な宿主域を持つことから、微生物殺虫剤として活発な開発が進められようとしているが、基本とする形態的特性に合致しない分離菌が多様な宿主昆虫から頻発している。本論文は、培養性状や分生子の形状、生理的形質など形態的特徴を主体とする従来の *Metarhizium* 属糸状菌の識別に、rDNA や Pr1 遺伝子の分子データを導入することにより、分離株の性状を正確に捉えるばかりでなく、菌株の来歴や系統を明確化しさらに進化過程を辿ることをも可能とした新しい分別法である。

審査員は、本研究は不完全菌類（糸状菌）の分類に客観性のある分子データを導入することにより、単なる菌株間識別だけでなく菌株の類縁関係や進化系統も考慮できる新しい分類手法として高く評価した。

本論文は下記に示す公表論文（いずれもレフリー制）を基にして作成されている。

1. 矢澤千佳子、清水進（2001）：*Metarhizium anisopliae* における細胞外エラスターゼ様セリンプロテアーゼ遺伝子の塩素配列比較、日本蚕糸学雑誌、70（3）、pp.167-170

Yazawa, C. and Shimizu, S.: Sequence comparison of the 5.58 rDNA region with the flanking among *Metarhizium anisopliae* and the related species. Journal of Insect Biotechnology & Sericology (in press)