

氏 名 (本 国 籍)	Yuyun Fitriana (インドネシア共和国)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 3 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 7 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物環境科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	Traits Improvement by Ion-beam and Gamma-ray Irradiation in Entomopathogenic Fungi (イオンビームおよびガンマ線を用いた昆虫病原糸状菌の改良)
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 小 川 直 人 副査 静岡大学 教授 西 東 力 副査 岐阜大学 教授 土 田 浩 治 副査 静岡大学 准教授 田 上 陽 介

論 文 の 内 容 の 要 旨

害虫の防除法には、農薬による化学的防除法、天敵を用いる生物的防除法、侵入防止を図る物理的防除法などがあるが、いずれも一長一短があり、単独技術に依存した防除対策には限界がある。このため、各種防除法を組み合わせ、それぞれが抱える課題を補完しあう IPM (総合害虫管理技術) の構築が世界的な潮流となっている。

IPM の中で生物的防除法は基幹技術と目されている。なかでも昆虫に感染する昆虫病原糸状菌 (*Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* など) は生物的防除法の主要な素材と位置づけられている。しかし、昆虫病原糸状菌は大きな課題を抱えている。ひとつは、殺菌剤との併用が困難であること、もうひとつは高温下においては十分な効果を発揮できないことである。その抜本的な解決策は、殺菌剤耐性および高温耐性の昆虫病原糸状菌を育種することである。

昆虫病原糸状菌の育種には、淘汰、突然変異 (UV、NaNO₂、ガンマ線など) などが用いられているが、いずれも病原力の向上などを目指したものである。一方、近年、イオンビームによる微生物の育種が注目されている。イオンビームはピンポイントの変異を特徴としており、不要な変異は少ないとされている。事実、昆虫病原糸状菌に対してもイオンビームが利用されている。しかし、これは医薬成分の多生産系統の作出を目指したものであり、天敵としての機能性の改良を目的とした研究事例は見当たらない。本研究は、世界に先駆け、イオンビームとガンマ線による突然変異育種を用いて、殺菌剤

耐性および高温耐性の昆虫病原糸状菌変異体の創出を試みたものである。

殺菌剤耐性については、ベノミル（代表的な殺菌剤のひとつ）に対して高度の耐性を示す *I. fumosorosea* 変異体（ $EC_{50} = > 5000$ ppm、親株の 2000 倍以上）および *B. bassiana* 変異体（ $EC_{50} = > 500$ ppm、親株の 500 倍以上）の作出に成功した。これら変異体のベノミル耐性は本剤との混用が可能なレベルに達していた。さらに、これら変異体はベノミルとは作用機作の異なるいくつかの殺菌剤に対しても耐性を高めていた。反対に、耐性が低下した殺菌剤も認められた。これらの現象はベノミルとの正あるいは負の交差耐性によるものと考えられる。*B. bassiana* 変異体の場合、 β チューブリン遺伝子のコドン 198 が変異しており、これがベノミル耐性に深く関与していると考えられる。コドン 198 はベノミル耐性の植物病原菌でも知られており、本研究の結果が支持された。一方、*I. fumosorosea* 変異体では β チューブリン遺伝子に変異が認められなかったことから、これとは別の遺伝子（たとえば、*iftI*）がベノミル耐性に関与しているものとみられる。

高温耐性については、*M. anisopliae s.l.* において菌糸の発育上限温度を 3°C 高めることに成功した。この変異体は分生子の高温耐性も向上させていた。高温耐性変異体について、3 つの遺伝子（ β チューブリン、*iftI* および *NtI*）を解析したが、いずれにも変異は認められなかった。高温耐性には別の遺伝子が関与しているものとみられる。高温耐性変異体の中から、親株と同等の病原性を示すものが得られた。こうした高温耐性変異体は、熱帯・亜熱帯地域や温室栽培など高温になりやすい環境条件において利用価値が高いと思われる。

以上の結果から、イオンビームとガンマ線による突然変異は昆虫病原糸状菌の改良にとって極めて有効な手法であることが明らかとなった。本育種法は、遺伝子組み換え技術と異なり、社会的なコンセンサスが得やすいと考えられる。ただし、得られた変異体には目的外の変異も認められたことから、変異体の諸性質（とくに、病原力、分生子形成量、保存性など）について、今後、詳細な調査が必要であろう。そのうえで、実用化を目指した実証試験を積み重ねる必要があるだろう。ピンポイントの変異が特徴とされるイオンビームについては、植物病原菌における殺菌剤耐性メカニズムの解析をはじめとする幅広い研究分野に利用できるものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

害虫の防除法には、農薬による化学的防除法、天敵を用いる生物的防除法、侵入防止を図る物理的防除法などがあるが、いずれも一長一短があり、単独技術に依存した防除対策には限界がある。このため、各種防除法を組み合わせ、それぞれが抱える課題を補完しあう IPM（総合害虫管理技術）の構築が世界的な潮流となっている。

IPM の中で生物的防除法は基幹技術と目されている。なかでも昆虫に感染する昆虫病原糸状菌（*Isaria fumosorosea*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* など）は生物的防除法の主要な素材と位置づけられている。しかし、昆虫病原糸状菌は大きな課題を抱えている。ひとつは、殺菌剤との併用が困難であること、もうひとつは高温下

においては十分な効果を発揮できないことである。その抜本的な解決策は、殺菌剤耐性および高温耐性の昆虫病原糸状菌を育種することである。

昆虫病原糸状菌の育種には、淘汰、突然変異、遺伝子組換えなどの手法が用いられているが、近年、イオンビームによる突然変異育種が注目されている。イオンビームはピンポイント変異を特徴とし、不要な変異は少ないとされている。事実、昆虫病原糸状菌に対してイオンビームが利用されているが、これは医薬成分の多生産システムの作出を目指したものであり、天敵としての機能性の改良を目的とした事例は見当たらない。本研究は、世界に先駆け、イオンビームとガンマ線による突然変異育種を用いて、殺菌剤耐性および高温耐性の昆虫病原糸状菌変異体の創出を試みたものである。

殺菌剤耐性については、*I. fumosorosea* と *B. bassiana* を供試し、ベノミル耐性変異体を作成した。*I. fumosorosea* 変異体では親株の 2000 倍以上の耐性を、*B. bassiana* 変異体では親株の 500 倍以上の耐性が確認された。これらの変異体はベノミルとは作用機作の異なるいくつかの殺菌剤に対しても耐性を高めていたが、逆に耐性が低下している殺菌剤も検出された。これらの現象はベノミルとの正あるいは負の交差耐性によるものと考えられる。*B. bassiana* 変異体の場合、 β チューブリン遺伝子のコドン 198 の変異がベノミル耐性に関与していることを突き止めた。一方、*I. fumosorosea* 変異体では β チューブリン遺伝子に変異が認められず、ベノミル耐性に関与する遺伝子の特定は今後の課題である。

高温耐性については、*M. anisopliae s.l.* において菌糸の発育上限温度を 3°C 高めることに成功した。この変異体は分生子の高温耐性も向上していた。高温耐性に関与する遺伝子の変異については、3 つの遺伝子 (β チューブリン、*iftI* および *Ntl*) を解析したが、いずれにも変異は認められなかった。このことから、高温耐性にはこれらとは別の遺伝子の関与が示唆された。高温耐性変異体の中には親株と同等の病原性を示すものが認められ、こうした変異体は熱帯地域や温室栽培など高温条件になりやすい環境においても高い感染率をもたらす可能性がある。

本研究によって、イオンビームとガンマ線による突然変異育種は昆虫病原糸状菌の改良にとって極めて有効な手法であることが明らかとなった。本育種法は、遺伝子組換え技術と異なり、社会的なコンセンサスが得やすいと考えられる。ただし、得られた変異体には目的外の変異も認められたことから、とくに病原性の低下について詳細な調査が必要である。

以上について、1 月 22 日に審査委員会を開き、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Yuyun Fitriana, Katsuya Satoh, Issay Narumi and Tsutomu Saito: Ion-beam and gamma-ray irradiations induce thermotolerant mutants in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae s.l.* *Biocontrol Science and Technology* 24:1052-1061.

2. Yuyun Fitriana, Shinobu Shinohara, Katsuya Satoh, Issay Narumi and Tsutomu Saito: Benomyl-resistant *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) mutants induced by ion beams. *Applied Entomology and Zoology* (DOI 10.1007/s13355-014-0314-7: Published online:18 December 2014).