

氏名	AHMAD YUNUS
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博 甲 第 1903 号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生産開発科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	<i>iaaM</i> 遺伝子導入によるネオティフォディウムエンドファイト の形質転換
論文審査委員	教授 山田 哲治 教授 白石 友紀 教授 杉尾 剛

学位論文内容の要旨

ネオティフォディウム・エンドファイトは多くの寒冷地牧草と共生関係にある糸状菌である。エンドファイトとの共生により宿主牧草は乾燥、や植物病害虫などに対する耐性を高め、種子を含む生産量の増大をもたらすことが知られている。

本研究では、植物病原細菌の生産するインドールアセトアミドを中間代謝産物とするIAA生産が植物との共生関係構築に寄与していると考えられることから、本仮説を検証する為の基礎研究として、ネオティフォディウムエンドファイトの形質転換法を確立し、*iaaM*遺伝子導入形質転換体における*iaaM*遺伝子発現の解析を行った。

ネオティフォディウム・エンドファイトへの*iaaM*遺伝子の導入は、菌糸から調製したプロトプラストに、ハイグロマイシンB耐性遺伝子と*iaaM*遺伝子を有するプラスミドpAY2を形質転換した。

TF 91006株及び、Ti 91093株、Ti 92093株に対する形質転換の可否はPCR法により1.7kbの*iaaM*遺伝子と560bpの*hph*遺伝子のDNA断片が増幅されることによって確認した。また、*iaaM*遺伝子をプローブとしたゲノミックサザン解析では、*iaaM*遺伝子に相同なハイブリダイズシグナルが、TF 91006株、Ti 91093株、Ti 92093株では1本ずつ検出された。一方、非形質転換体ではシグナルが得られなかったことから*iaaM*遺伝子は形質転換体のゲノムに導入されていると推察された。

また形質転換体の培養ろ液におけるIAMの蓄積量をHPLCで解析した。TF 91006株、Ti 91093、Ti 92093の各形質転換体のIAMの蓄積量は、各々57.0、36.4、20.9 $\mu\text{M/g cells}$ であったが、非形質転換体の培養ろ液におけるIAMの蓄積はHPLC解析によっては検出されなかった。

論文審査結果の要旨

ネオティフォディウム・エンドファイトは多くの寒冷地牧草と共生関係にある糸状菌である。エンドファイトとの共生により宿主牧草は乾燥や植物病害虫などに対する耐性を高め、種子を含む生産量の増大をもたらすことが知られている。

本博士論文研究では、植物病原細菌の生産するインドールアセトアミドを中間代謝産物とする植物ホルモン・オーキシシン(IAA)の生産が植物との共生関係構築に寄与していると考えられることから、本仮説を検証する為の基礎研究として、ネオティフォディウム・エンドファイトの形質転換法を確立し、*iaaM*遺伝子導入形質転換体における*iaaM*遺伝子発現の解析を行った。

ネオティフォディウム・エンドファイト、TF 91006株及び、Ti 91093株、Ti 92093株への*iaaM*遺伝子の導入は、菌糸から調製したプロトプラストに、ハイグロマイシンB耐性遺伝子と*iaaM*遺伝子を有するプラスミドpAY2を形質転換した後、PCR法により1.7kbの*iaaM*遺伝子と560bpの*hph*遺伝子のDNA断片が増幅され高否かによって確認した。また、形質転換体の培養ろ液におけるインドールアセトアミド(IAM)の蓄積量をHPLCで解析したところ、TF 91006株、Ti 91093、Ti 92093の各形質転換体のIAMの蓄積量は、各々57.0、36.4、20.9 μ M/g cellsであったが、非形質転換体の培養ろ液におけるIAMの蓄積はHPLC解析によっては検出されなかった。現在、組換え体エンドファイトを牧草類に接種し、その効果を検討中である。

以上のように本研究は宿主牧草への有用形質賦与を、その内棲共生菌であるエンドファイトへの遺伝子組換えによって試みた非常にユニークな応用研究であり、植物病理・植物分子生物学上高く評価され、学位に十分値すると思われる。