

＜菌類講座 第4回＞

Trichoderma 属 後編

奥田 徹

前回 *Trichoderma* 属のイメージや分生子構造の2型性について解説した。後編では、いよいよ分子系統に基づく分類とオンラインの同定システムの紹介と代謝産物や今後の展開の予測について述べてみたい。

TrichOKEY

1990年頃からSamuelsらを柱にウィーンのKubicekとその弟子たちが分子系統に基づく *Trichoderma* 属の分類の再検討を行ってきた。その成果がDruzhininaら(2005, 2006)のTrichOKEYで、*Hypocrea*と*Trichoderma*の種レベルまでITS1とITS2のDNA塩基配列に基づき、かなり同定できるようになっている。最新版はTrichOKEY2で、複数の塩基配列を複合的に判断し、*Hypocrea*と*Trichoderma*の既存の塩基配列と相似度サーチが可能である。このシステムはオンラインでだれでも利用できるように整備され、現在では*Hypocrea*と*Trichoderma*が104種、ITS1と2のバーコードが153登録されている。

同じウェブサイトにはTrichoBLASTも用意されており、これによってITS1、ITS2、translation-elongation factor 1-*a* (*tef1*)の第4イントロン、*tef1*の第5イントロン、*tef1*の第6エキソン、RNA polymerase II (*rpb2*)を用いた検索が可能である。同時に形態による検索のシステムを提供しているSamuelsらの研究室のデータベース、*Trichoderma* Onlineにもリンクしている。

Samuels (2006)によれば、単一の遺伝子配列では*Trichoderma*属の同定や新種記載には不十分だという。ITSに加えて、先に述べた*tef1*、*rpb2*以外にactin、endonucleaseの遺伝子など複数の遺伝子配列が分子系統解析に用いられている。とくに*T. viride*を含む*Trichoderma*節の種は同一のITS配列を持つことがあり、*tef1*などが有用とな

る。*tef1*は2000bpもある領域であり、研究者によって異なった部分の配列が用いられるため、BLASTサーチで比較同定するのは困難だが、Samuelsらはプライマー *ef1-728*と*tef1 rev*を用いて第4、第5イントロンを含む約600bpの配列を増幅し、これを両方向から読んで配列を決めるとのことである(Samuels, 2006)。この部分が主流になる可能性は高い。

以上のように、これらのシステムを用いて種の見当をつけておき、次いで形態を精査して両者に矛盾がないかを考察するのが良い方法と考えられる。ただし往々にして該当なしとか、正しいのかもしれないが*Hypocrea lixii/Trichoderma harzianum*と同定される比率が結構高い。

*Trichoderma*の代謝産物

古くはviridin (図1A)やgliotoxin (図1B)が“*Trichoderma viride*”の生産物として報告されているが(Brian & Hemming, 1945; Brian & McGowan, 1945)、当時種名はBisbyが*Trichoderma*属が1属1種としていたため、正しい種の扱いではないと批判があった。さらに、これらは*Trichoderma*ではなく*Gliocladium*、中でも*G. virens*の生産物であると言われてきた。しかし*G. virens*はその後、*Trichoderma virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arxに新組み合わせが行われたため、結局、これら古い代謝産物も*Trichoderma*属の特徴的な生産物となった。

*Trichoderma*のココナッツ臭として知られている6-pentyl-*a*-pyrone (図1C)は、代謝産物として発見される以前から香料として合成されていた。本物質は抗カビ活性を有する揮発物質で、*T. atroviride*や*T. viride*の臭いとしても知られている。*T. harzianum*は生産しないらしい。

筆者らはかつて*Trichoderma*属の多くの種から5

員環を有するイソシアノ化合物, イソニトリル抗生物質(図1D)を多数報告した(Fujiwaraら, 1978 & 1982)。この抗生物質の生産性は *Trichoderma* の種群, とくに *Trichoderma harzianum* Rifai の細かい形態の差と相関があり(Okudaら, 1982:), さらに RAPD 解析でも相関性が確認された(Fujimori & Okuda, 1994)。すなわち *T. harzianum* と考えられる菌株でイソニトリル抗生物質を生産するものは, コロニーが青緑色, 二次分生子構造のフィアライドが盆栽の松の枝のように湾曲しかつ規則的には輪生せず, 分生子は直径 $3\ \mu\text{m}$ 以上だが, 非生産菌は黄緑から緑色のコロニーを形成し, ときに暗褐色の色素を寒天中に分泌, 二次分生子構造は規則正しい輪生で, フィアライドは太く短く, 分生子は $3\ \mu\text{m}$ 以下であることが分かった(図2)。その後, 前者は *Trichoderma atroviride* P. Karst. で, 後者が *T. harzianum* であることが判明した(Gams & Meyer, 1998)。

代謝産物の生産性と系統分類が相関するかどうかは, 培養条件や分類体系にもより, 判断が難しいが, 最近注目されている代謝産物にペプタイボルがある(表1)。ペプタイボルはN-末

端, C-末端がそれぞれアセチル基, アミノアルコールにより保護され, α -aminoisobutyric acid (Aib), Isovaline (Iva) を多く含む分子量が 1,000 ~ 10,000 のペプチド化合物で, 抗菌活性を有するが, 実用性はない。ペプタイボルは多数の *Trichoderma* 属菌から報告があり, 同族体が極めて多いことから完全に単離精製することは至難とされている(Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998)。最近, 分子系統とペプタイボルのサブクラスの生産性に関連性があるという報告がなされている(Degenkolbら, 2006, 2008)。我々も, 系統的に類縁関係のある *Trichoderma* の複数の菌株を用いてペプタイボルを LC/MS で検出し, 相関性が認められるという結果を得ている(奥田・五十嵐, 2010)。

セルラーゼ

Trichoderma 属は一般にセルラーゼ活性が高いことでも知られている。*T. longibrachiatum* Rifai のグループ (*Hypocrea schweinitzii*-complex) にセルラーゼ高生産株が多い(Kubicekら, 1996)。なかでも QM6a という *Trichoderma* 属菌株は極め

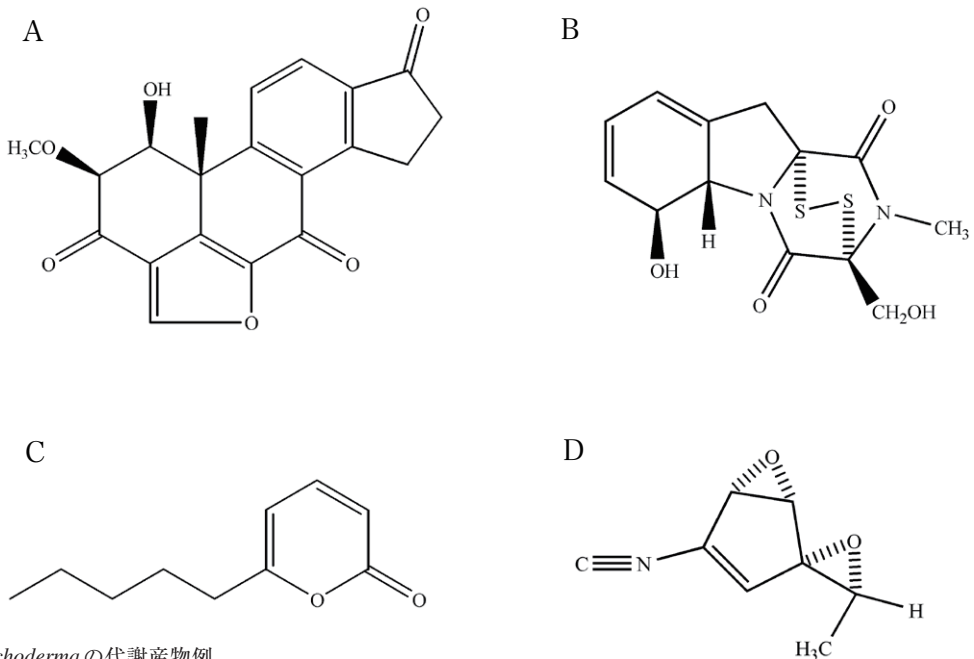


図1 *Trichoderma* の代謝産物例
A: viridin, B: gliotoxin, C: 6-pentyl- α -pyrone, D: isonitrin A

て高い活性を示し特許になったが、その菌株に *T. reesei* E. G. Simmons という新種が提唱された (Simmons, 1977)。この種は *T. longibrachiatum* と形態的に区別が出来ず (Bissett, 1984)、特許を取るために新種記載がなされたと揶揄されたことも

ある。しかし分子系統的手法により、*T. reesei* は *T. longibrachiatum* とは異なり、*Hypocrea jecorina* Berk. & Broome が、そのテレオモルフであることが判明した (Kuhlsら, 1996)。この *H. jecorina* は興味深い種で、多くが熱帯、亜熱帯由来らしく、

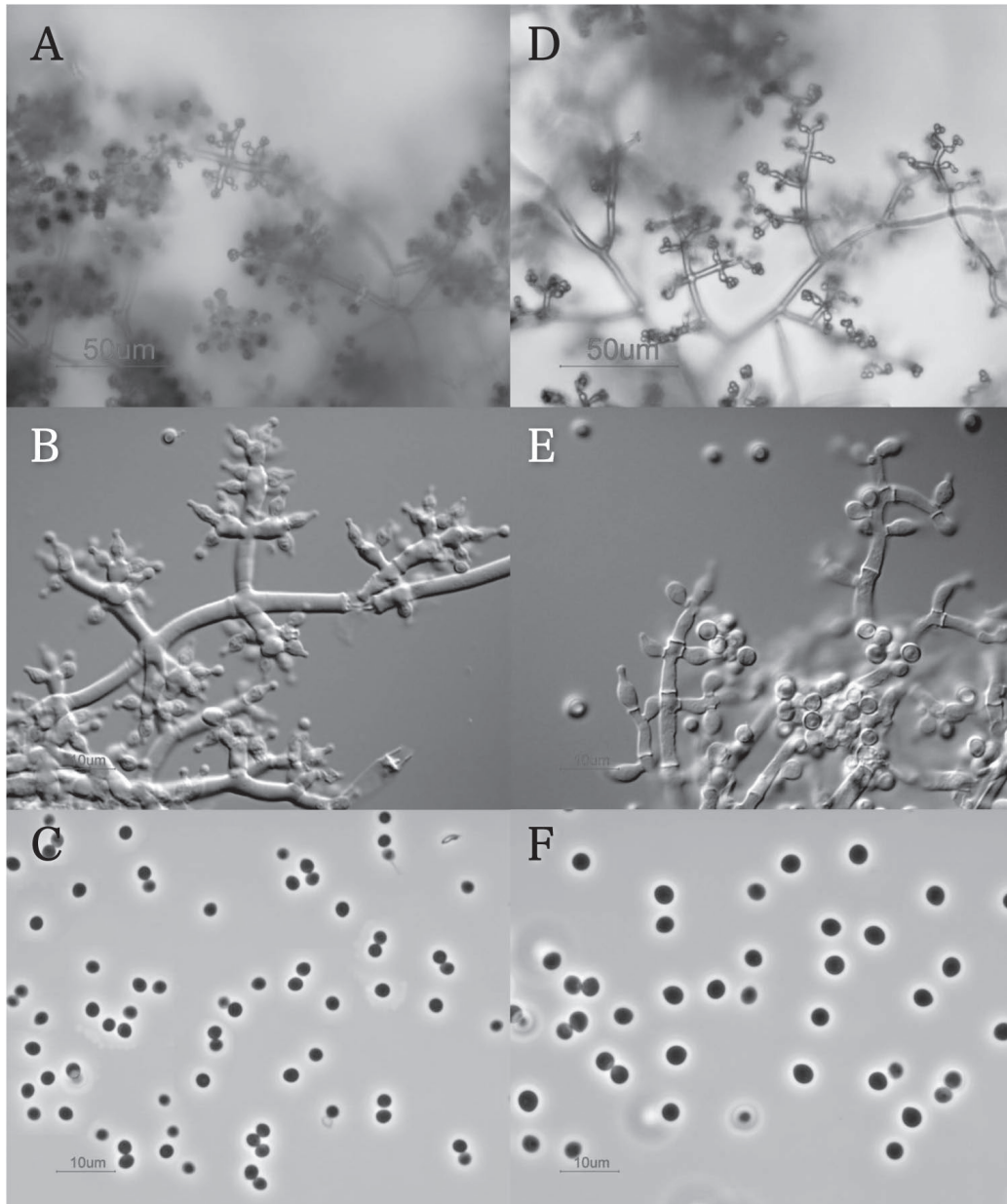


図2 *Trichoderma harzianum* と *T. atroviride* の比較
Trichoderma harzianum KRCF 131 A: 分生子構造, B: フィアライド, C: 分生子
T. atroviride KRCF 222 D: 分生子構造, E: フィアライド, F: 分生子

表1 代表的なペプチド

Alamethicins	Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu-Gln-Pheol
Suzukacillins	Ac-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Aib-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Gln-Gln-Pheol
Trichovirins	Ac-Aib-Asn-Leu-Aib-Pro-Ser-Val-Aib-Pro-Aib-Leu-Aib-Pro-Leuol

Aib: *a*-aminobutyric acid, Leuol: leucinol, Pheol: phenylalaninol.

かつてはテレオモルフしか知られていなかったが、菌株によっては寒天培地上で *Hypocrea* の子座を形成する。本種は典型的な二極性ヘテロタリズムで、子囊の中で子嚢胞子の交配型は4:4に別れているが、*Trichoderma/Hypocrea* ではこういう例は珍しいらしい(Lieckfeldtら, 2000; Samuels, 2006)。筆者らもオーストラリア産の同種菌株で同じ現象を見たことがある。

なお、セルラーゼは繊維産業などで、すでに用いられているが、デンマークのノヴォザイムズ社ではセルラーゼ関連遺伝子を導入した *Trichoderma* 由来のセルラーゼを用いたバイオエタノール生産を数年以内に商業ベースにのせるべく、欧米で実証試験中である(anon, 2010)。

今後の発展

Samuels (2006) や Jaklitsch (2009) によれば、樹木由来の *Hypocrea* の多様性はかなり地域性があり、*H. lixii* Pat. (*T. harzianum* のテレオモルフ) のように汎世界種もあるが、北米のみとかヨーロッパにのみ分布する種が多いらしい。そこから、かれらは日本の *Hypocrea* はまだ新種の宝庫であろうと推定している。筆者の印象でも、関東の土壌から一般的に分離される *Trichoderma* にはあまり多様性がないが、九州や沖縄に行くと異なった形態のものが見られるように思われる。さらに土壌ではなく、基質を変え、例えばきのこ栽培の菌床などからは温帯でもかなり多様性のある *Trichoderma* が分離できるように思われる。このあたりをもう少し整理すると興味深い知見が得られると予測される(奥田・五十嵐, 2010)。

事実、鶴海ら(2010)と山口ら(2010)は、それぞれ菅平の滝周辺やタイの溪流から分離した半水生不完全菌は、松島(1975)が原記載した *Papulaspora*

viridis Matsushima, すなわちその後 Abdullah & Webster (1983) が属を移した *Pseudoaegerita matsuhimae* Abdullah & J. Webster であったが、分子系統解析から *Trichoderma* 属の *Hamatum* クレードに位置することがわかり、*Trichoderma* 属への組換えの必要があると述べており、分子系統解析技術の発達のおかげで、今後もこのような例の出ることが期待される。

お詫びと訂正

先に発表した「*Trichoderma* 属 前編」にいくつかの誤植があるので、お詫びして訂正したい。24 ページ右5行目「*catenulatum*」のあとの「.」が余計。同じく右6行目の「*Mariannnaea*」の「n」が1つ余計。

引用文献

- Abdullah SK, Webster J. 1983. The aero-aquatic genus *Pseudoaegerita*. Trans. Br. Mycol. Soc. 80: 247-254.
- Anon. 2010. Novozymes社ウェブサイトのセルラーゼを用いたバイオ燃料の情報
<http://bioenergy.novozymes.com/cellulosic-biofuel/cellic-ctec2-product-information/>
- Bissett J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachium* sect. nov. Can. J. Bot. 62: 924-931.
- Brian PW, Hemming HG. 1945. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. 32: 214-220.
- Brian PW, McGowan JC. 1945. Viridin: a highly fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*. Nature 156: 144-145.
- Degenkolb T, Gräfenhan T, Nirenberg HI, Gams W, Brückner H. 2006. *Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent

- plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). J. Agric. Food Chem. 54: 7047-7061.
- Degenkolb T, von Dchren H, Nielsen KF, Samuels GJ, Brückner H. 2008. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. Chem. Biodiv. 5: 671-680.
- Druzhinina IS, Komon-Zlazowska M, Kopchinskiy AG. 2006. TrichOKEY2. <http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>
- Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fun. Gen. Biol. 42: 813-828.
- Fujimori F, Okuda T. 1994. Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. I. Fungi. J. Antibiot. 47: 173-182.
- Fujiwara A, Okuda T, Masuda S, Shiomi Y, Miyamoto C, Sekine Y, Tazoe M, Fujiwara M. 1982. Fermentation, isolation and characterization of isonitrile antibiotics. Agric. Biol. Chem. 46: 1803-1809.
- Fujiwara M, Fujiwara A, Okuda T. 1978. Antibiotic from *Trichoderma* culture. Japan Kokai 78 26,395.
- Gams W, Meyer W. 1998. What exactly is *Trichoderma harzianum*? Mycologia 90: 904-915.
- Jaklitsch WM. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. Stud. in Mycol. 63: 1-93.
- Kubicek CP, Bölzlbauer UM, Kovacs W, Mach RL, Kuhls K, Lieckfeldt E, Börner T, Samuels GJ. 1996. Cellulase formation by species of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* and of *Hypocrea* spp. with anamorphs referable to *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. Fung. Gen. and Biol. 20: 105-114.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyervii W, Petrini O, Gams W, Börner T, Kubicek CP. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7755-7760.
- Lieckfeldt E, Kullnig C, Samuels GJ, Kubicek CP. 2000. Sexually competent, sucrose- and nitrate-assimilating strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from South American soils. Mycologia 92: 374-480.
- Matsushima T. 1975. Icones microfungorum a Matsushima lectorum. Pub. by the author, Kobe. 106p.
- Okuda T, Fujiwara A, Fujiwara M. 1982. Correlation between species of *Trichoderma* and production patterns of isonitrile antibiotics. Agric. Biol. Chem. 46: 1811-1822.
- 奥田 徹・五十嵐 康弘 2010. き の こ 栽培 の 害 菌, *Trichoderma* 属 菌 の 探 索, 分 子 系 統 解 析 と 代 謝 産 物 パ タ ー ン 解 析 微 探 収 報 投 稿 中
- Samuels, GJ. 2006. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. Phytomathology 96: 195-206.
- Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF, & McCray EB. 2010. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved May 8, 2010, from <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>
- Simmons EG. 1977. Classification of some cellulase-producing *Trichoderma* species. In: Bigelow HE, Simmons EG, eds. Abstracts, 2nd International Mycological Congress (Tampa) 2: 618.
- Sivasithamparam K, Ghisalberti EL. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In "*Trichoderma* & *Gliocladium*, Vol. 1. Basic biology, taxonomy and genetics" ed. Kubicek CP & Harman GE. Taloer & Francis Ltd., London. 139-191pp.
- 山口 薫・鶴海 泰久・鈴木 里江子・Charuwan Chuasee haronnacha・Veera Sri-indrasutdhi・Nattawut Boonyuen・伴 さ や か・岡根 泉・中桐 昭・安藤 勝彦・鈴木 健 一 朗 2010 P09 半 水 生 菌 *Pseudaegerita matsushimae* は *Trichoderma* な の か ? 日 本 菌 学 会 第 54 回 大 会 (玉 川 大 学, 町 田) 講 演 要 旨 集 ポ ス タ ー 発 表 83p.
- 鶴海 泰久・鈴木 里江子・壬生 淑子・上條 知昭・稲葉 重樹・山口 薫・安藤 勝彦 2010 平 成 22 年 度 日 本 菌 学 会 関 東 支 部 年 次 大 会 (日 本 大 学 薬 学 部, 船 橋 市) 講 演 要 旨 集 9p.

(おくだ・とおる 玉川大学学術研究所)