

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小松 雅史

マツ材線虫病 (Pine wilt disease) はマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*, 以下、線虫とする) によって引き起こされるマツ属樹木の萎凋病害である。本病は日本だけでなく、中国・韓国においても猛威をふるっている重大樹木病害の一つである。マツ材線虫病によるマツの枯死過程では、主要な病徴として柔組織の細胞死および通水障害が発生することが知られている。しかし、線虫感染からマツの枯死にいたる本病の病徴進展過程の中で、両者がどのような関係にあるのかは、依然として不明である。本論文の研究は、この両者の関係を明らかにするべく行われた。

本論文の前半では、両者の関係を検証すべく、線虫を接種したマツの木部水への細胞質漏出と表面張力の低下との関係を、時間を追って解析している。一方後半では、柔組織の細胞死をもたらす線虫の加害に着目して、組織内の個々の線虫の分布を容易に特定できる蛍光染色法を新たに開発した後、同一試料中での線虫分布と宿主の細胞死との空間的關係を解析している。

第一章では、これまでの材線虫病研究を広く概観している。

第二章では、線虫を接種したクロマツ組織における電解質漏出現象を調べている。苗木、切り枝、樹皮片の三つのスケールでクロマツへの接種実験を行い、DAPI 染色により組織壊死過程における細胞死を、また漏出電解質測定により細胞質漏出度を調べ、両者の関係を明らかにしている。その結果、材線虫病に感染した組織からは一定の細胞が加害されると細胞質が異常漏出し始めることが解った。なお、本研究のように、両者の関係を詳細にしかも様々なスケールで調べた例は、これまで報告されていない。

第三章では、マツ材線虫病における木部水への電解質漏出と表面張力の低下の関係を調べている。線虫を接種したクロマツポット苗より加圧法により採取した木部水の電気伝導度と表面張力を測定している。材線虫病の進行に伴って木部水中の電解質は増加し表面張力は低下することを明らかにしている。更に、この結果から、「細胞死が進行し

た組織において電解質の漏出異常が発生し、電解質を含む細胞質が木部水へと漏出する。細胞質は表面張力を低下させる成分を含み、木部水の表面張力が低下した結果、通水障害が発生する」という斬新かつ検証可能な仮説を提案している。なお、材線虫病進展に伴う木部水の電解質増加と表面張力低下とに相関関係があることを明らかにしたのは、この研究が初めてである。

第四章では、線虫の蛍光標識レクチンに対する染色性を調べ、新たな材線虫に特異的な染色法を確立している。様々なレクチンをサーベイした結果、フルオレセイン標識小麦胚芽レクチン (F-WGA) によって、マツ組織の細胞は染まらないが、分離した線虫が強く染まることを見いだしている。また同時に、線虫の F-WGA に対する染色性が線虫の培養条件によって変化するという、興味深い知見も得ている。この F-WGA による染色方法が、パラフィン組織切片内の線虫でも特異的に染色できることを確認しており、樹体内の線虫動態の詳細を見るための画期的な方法として評価できる。

第五章では、F-WGA 染色法と DAPI 染色の二重染色により、樹皮片における線虫の分布と生きているマツ細胞の分布を同一試料中で観察し、線虫の分布と細胞死の分布との空間的関係を調べている。その結果、細胞死は線虫の周辺を中心として発生するのではなく、むしろ線虫の分布とは関係なく、樹皮片組織全体で一様に発生することが解った。この結果は、細胞死が線虫の直接的な加害ではなく間接的な加害によって起こることを示唆しており、今後の新たな研究展開の出発点として期待される。

第六章では、今後の展開を含め総合考察を行っている。

以上のように本論文では、我が国最大の樹木病害であるマツ材線虫病の病理学的解析を行い、それに基づいて、病徴進展に伴って起こる柔組織の細胞死と通水障害とを、細胞質漏出を介して関係づける斬新かつ検証可能な仮説が提案された。加えて、線虫の特異的染色法を新たに確立することにより、個々の線虫と細胞死の空間的關係も明らかにされた。得られた成果は、本病の病徴進展過程の解明に大きく貢献するものと考えられる。従って、本研究は応用上および学術上の意義が極めて大きく、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。