

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川西 剛史

---

自然界には多様な微生物が存在しているが、それらの中には動植物に病原性を有するものも数多く存在する。このような病原体の脅威から、動植物を保護するためには、自然界における病原体の発生生態を調査し、防除指針を確立する必要がある。本研究課題は、植物病原細菌のひとつである、カーネーション萎凋細菌病菌の研究が端緒となった。本病原細菌の検出系の開発から始まり、栽培圃場における動態調査まで、病原体の性状や生態を明らかにした。

### 1. カーネーション萎凋細菌病菌の検出系開発と生態調査

本項では、花卉栽培において甚大な経済的被害をもたらすカーネーション萎凋細菌病を対象として、土壌からの検出系の確立、ならびに土壌における生態調査を行った。まず、高感度検出法として知られる PCR 法を用いて、萎凋細菌病発生圃場の土壌からの本病原の検出を試みた。しかし、PCR 法では検出感度が低かったため、土壌からの病原体の特異的検出に適さないと考えられた。そこで病原体を特異的に生育させる選択培地の開発に着手した。培地に添加する抗生物質の種類と濃度を検討した結果、シクロヘキシミド 50 ppm, クリスタルバイオレット 5 ppm, ポリミキシン 50 ppm, クロラムフェニコール 10 ppm, アンピシリン 50 ppm を添加した培地において、カーネーション栽培土壌に含まれる雑菌を効率的に抑制し、カーネーション萎凋細菌病菌を特異的に検出する選択培地（APCA 培地）が完成した。

APCA 選択培地を用い、カーネーション栽培圃場における本病原の水平分布を調査した。本結果から、カーネーション萎凋細菌病菌を低減させるには、良質な有機物を継続的に施与し、罹病根残渣の早期分解を促進すること、また深耕などで圃場の排水を改良し、土壌水分が高くないよう管理することが重要であると考えられた。これらの知見は萎凋細菌病の防除指針を考える上で、極めて有用である。

### 2. 高感度選択培地設計のための SMART 法の確立

これまで、選択培地には設計理論のようなものはなく、試作できる範囲でできる限り、雑菌を抑制するよう開発された培地が多かった。これらの選択培地では、病原体以外の微生物群（雑菌）も生育してしまうため、培地上に形成されたコロニーの色や形状に基づき、病原体か否かを判断

する専門的知識と長年の経験が必要であり、病原体を正確に検出することは困難であった。

そこで本項では、雑菌を抑制し、標的となる病原細菌を特異的に生育させる高感度選択培地の設計手法（SMART 法）を確立した。SMART 法は、ベースとなる基礎塩類に、（１）標的細菌が代謝可能であり、かつ雑菌が代謝しにくい炭素源、および（２）標的細菌が耐性を有する抗生物質数種類を加える選択培地の設計法であり、ゲノム情報を活用し培地組成を設計できる点に特徴がある。SMART 法で決定した炭素源および抗生物質を添加した選択培地を用い、汚染土壌から本菌の分離を試みたところ、雑菌の生育が効率的に抑制され、従来の選択培地に比べ、病原体コロニーの識別が飛躍的に容易であった。SMART 法に基づき、５種の植物病原細菌について高感度選択培地を開発できたため、本知見は広範な病原細菌に適用できる理論であると考えられた。審査会においては、委員より、ゲノム情報を用いた選択培地作成(SMART 法)を菌類へも応用できるのではないかと、今後の研究の方向性について示唆があった。

### 3. 高感度選択培地をベースとした新たな検出系の提唱

新規選択培地の特性を利用し、平板培地よりコンパクトな、セレクトストリップ（紙を媒体とする選択培地）およびセレクトカクテル（液体選択培地）を開発した。セレクトストリップについては、これまでに紙の培地上で細菌を生育させる手法が確立されていなかったため、紙の栄養成分や材質、保湿条件、殺菌成分を検討し、紙上におけるカーネーション萎凋細菌病菌の選択培養を実現した。一方、セレクトカクテルについては特に液体選択培地中で増殖した標的細菌をモニターする方法について検討を行い、培地に添加した BTB 液の色の変化を検出の指標とする系とフローサイトメータによる粒子計測を利用する系を開発した。セレクトストリップおよびカクテルでは、検出までに要する時間がそれぞれ 3 日間、1 日間となり、平板の選択培地に比べ、大幅に短縮された。以上より、コンパクトさの点だけでなく、検出の迅速性の点においても優れた新たな検出系が提唱された。

以上を要するに、本研究では主に土壌伝染性の植物病原細菌を対象として、特定の細菌を高感度かつ選択的に生育可能な培地設計技術を開発し、作物生産現場における植物病害の診断に応用した。本研究の成果は植物病理学分野にとどまらず、微生物学全般に応用可能な普遍性の極めて高い成果であると考えられ、今後の展開が期待される。以上のように本研究の成果は学術上、応用上、極めて価値が高い。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文に値するものと認めた。