

学 位 論 文 要 旨

氏 名	池頭 靖夫
題 目	土壤微生物利用による土壤伝染性ウイルス病の感染抑制技術の開発 (Development of biocontrol techniques to suppress soil-borne viral diseases by soil microorganisms)

土壤伝染性ウイルス病の特効薬であった臭化メチル剤は、現在のところ代替薬剤がない。そこで本研究では、まず、ピーマンで深刻な被害をもたらす *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) の汚染度をモニタリングする技術の開発を行った。次に、対策技術として生物防除技術を開発するために、ウイルス媒介菌の抑制とウイルス不活化菌を探索し優良株を選抜するとともに、新規有効菌を発見した。さらに、それらの微生物資材を試作し、土壤伝染抑制技術を開発した。

まず、防除法を選択する上で土壤汚染程度を把握するため、血清学的手法を用いた ELISA による簡便な PMMoV の検出法を開発を試みた。従来の方法を利用した場合、非特異的な反応が問題となっていたが、抽出液にスキムミルクと界面活性剤を加えることで、土壤から効率よく検出することに成功した。陽性反応が PMMoV によるかを、インヒビジョンテスト等によって明らかにした。また、本システムを現地圃場の土壤に適用したところ、前作発病土壤は全て ELISA 値が 0.1 以上になり、非発病土壤との比較でその有効性が評価された。

次に、ウイルス病の生物防除技術について検討した。直接ウイルスを抑える技術は弱毒ウイルス以外にはないが、間接的防除法として、メロンえそ斑点病防除を目的とし、*Melon necrotic spot virus* を媒介する *O. brassicae* と同属の *O. bornovanus* に拮抗作用を示す菌を探索した。供試菌 61 菌株から、*O. bornovanus* の拮抗菌を選抜し、ポット試験による MNSV 抵抗性検定から 2 菌株 (BS-242、M-21) に選定した。

さらに、前に選定した菌株を含めて、今度は直接病原ウイルス (PMMoV) を不活化する土壤微生物を探索した。その結果、不活化検定により 253 菌株から 3 菌株が有望株として選抜された。次に、ポット試験により、有効な 2 菌株、M-21: *B. megaterium* と C-176: *P. pickettii* を PMMoV 不活化菌として選定した。最適な有機物と鉱物を用いて固体培養した M-21 の微生物資材を開発した。圃場試験で、M-21 資材の単独あるいは、C-176 菌液との併用で土壤伝染が抑制された。

以上、土壤検出技術により、定植前にその汚染程度を予測でき、抵抗性品種選択等の耕種的防除法が可能になった。また、M-21 菌株のような間接的及び直接的にウイルスを不活化する、あるいは各々の土壤伝染タイプのウイルスを不活化する微生物を発見した。さらに、これらの微生物及び微生物資材により、土壤伝染抑制効果を確認できた。本研究により新しい生物防除法の一つのアプローチになる、極めて重要な知見が得られた。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Yasuo Ikegashira
題 目	Development of biocontrol techniques to suppress soil-borne viral diseases by soil microorganisms (土壌微生物利用による土壌伝染性ウイルス病の感染抑制技術の開発)

Methyl bromide, known as a useful pesticide that well controls soil-borne viral disease, has been totally prohibited from 2005. Since then, no effective alternative pesticide is yet to be found by today. In this research, a monitoring method was first developed that measures the degree of infection by *Pepper Mild Mottle Virus* (PMMoV), virus in genus tobamovirus that causes serious damage in green pepper production. Then, as to develop biological control techniques, soil microorganisms that suppress and inactivate PMMoV were screened and best-performing strains were selected. The effective bacterial strains, which were found in this research, were further applied as bio-agents for soil treatment to develop new preventing techniques of the viral soil transmission.

Firstly, to develop a better controlling method, it is important to understand the degree of PMMoV infection in the soil. Thus, it was first attempted to develop a simplified serological method to detect the virus with DAS-ELISA. As nonspecific responses disturbed the detection by the ELISA method, skim milk and detergent, Tween-20, were added to phosphate buffer, so as to increase extraction efficiency and the specificity for PMMoV. Positive samples by DAS-ELISA were verified by inhibition testing using specific anti-PMMoV antibody, immuno-electron microscopy, reverse transcription-polymerase chain reaction, and inoculation tests on assay plants. Also, Our system for detecting PMMoV in soil was successfully tested on samples from 22 infected and uninfected field soils in Japan, showing ELISA value (A_{405}) marked more than 0.1 in all the eight plots where peppers had been infected in the previous crop.

Secondly, to prevent lettuce big-vein disease, this research attempted to isolate antagonistic microorganisms against a viral fungus vector, *Oplidium bornovanus*. Out of tested 61 strains, 15 antagonistic strains to *O. bornovanus* were screened and then, through the MNSV resistance test in pot experiments, two isolates (BS-242, M-21) were selected.

Thirdly, microorganisms that directly inactivate virus were screened. Through the inactivation test using tobacco plant, three promising strains were isolated from 253 bacterial strains, and two isolates, M-21 (*B. megaterium*) and C-176 (*P. pickettii*), were further examined for their inactivation ability to PMMoV through pot experiments. Of the two isolates, M-21 was selected to make new bio-agents by combining solid medium, organic matters and minerals. Under the condition of field experiment, sole application of M-21, and even in combination with C-176 liquid culture, suppressed the soil transmission of PMMoV.

By using the PMMoV detection method, newly developed by a series of researches as described above, the degree of PMMoV infection can be estimated prior to planting, thus cultural control has become applicable, in which resistant cultivar and/or other crops can be planted when PMMoV is detected. Moreover, as our microorganisms can directly and indirectly inactivate the viruses, they can be used as bio-agents to control soil-borne viruses. It was further confirmed that these microorganisms and bio-agents derived from them suppress soil-borne viral diseases effectively. These researches have revealed new findings that may serve as new approaches in biological control.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	イケガシラ ヤスオ 池頭 靖夫
審査委員	主査 佐 賀 大学 教授 井上 興一
	副査 佐 賀 大学 准教授 染谷 孝
	副査 佐 賀 大学 教授 大島 一里
	副査 鹿児島 大学 教授 境 雅夫
	副査 鹿児島 大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
題 目	土壌微生物利用による土壌伝染性ウイルス病の感染抑制技術の開発 (Development of biocontrol techniques to suppress soil-borne viral diseases by soil microorganisms)
<p>本論文は、土壌伝染性ウイルス病の特効薬であった臭化メチル剤の全廃後の対策技術として、土壌微生物利用による感染抑制技術を開発したものである。まず、ピーマンで深刻な被害をもたらすトウガラシマイルドモットルウイルス (PMMoV) の汚染土壌をモニタリングする技術を開発した。防除法を選択する上で土壌汚染程度を把握するため、血清学的手法を用いた ELISA による簡便な PMMoV の検出法を開発した。従来の方法を利用した場合、非特異的な反応が問題となっていたが、抽出液にスキムミルクと界面活性剤を加えることで、これを解決した。本法による陽性反応が PMMoV によるかを、免疫電顕法及び PMMoV の遺伝子検出によって確認した。さらに、無作為に選んだ現地圃場 22 ヶ所の土壌に本法を適用した結果、前作発病土壌では全て ELISA 値が 0.1 以上になり、それ未満の未発病土壌と明瞭に判別でき、その有効性が検証された。これによって、定植前にその汚染度を評価でき、抵抗性品種導入等の耕種的防除法の選択が可能になった。本法は現在、現地ピーマン栽培地域で普及利用されている。</p>	

次に、土壌伝染性ウイルス病害の生物防除技術について検討した。これには、ウイルスを直接抑える技術として弱毒ウイルスの利用が考えられるが、技術的にその作製が困難なウイルスの場合や、弱毒ウイルスと苗品種の相性が悪い場合もあることから、汎用性の高い微生物資材の開発を目的とした。まず、臭化メチル全廃後に問題となる土壌伝染性ウイルスのうちメロンえそ斑点ウイルス (MNSV) に注目し、このウイルスが引き起こす病害の間接的防除法の構築を目的に、MNSV を媒介する糸状菌 *Olpidium bornovanus* に拮抗作用を示す微生物を探索した。供試菌 61 菌株から、*O. bornovanus* の拮抗菌を選抜し、ポット試験による MNSV 抵抗性検定から 2 細菌株 (BS-242、M-21) を選抜した。BS-242 は *Bacillus* 属細菌で、軽度の汚染土壌において防除効果を発揮した。

さらに、PMMoV を直接不活化する土壌微生物を、上記菌株を含めて探索した。不活化検定により 253 菌株から細菌 3 菌株を有望株として選抜した。これらをポット試験により検定して、PMMoV 不活化菌として最も有効な 2 菌株、M-21 及び C-176 を得た。前者は *Bacillus megaterium*、後者は *Ralstonia pickettii* と同定され、ウイルス不活化菌として特許を取得した (特許 2003-178489)。M-21 は防除効果が最も高く、その機序として酸性プロテアーゼ活性が示唆された。固体培養の諸条件 (基質、担体等) を検討することにより、本菌を含有する微生物資材を開発した。圃場試験で M-21 微生物資材の単独、あるいは C-176 菌液との併用で PMMoV の土壌伝染が抑制された。M-21 微生物資材は、ウイルス病害の土壌伝染を抑制する世界初の生物的防除技術であり、今後の実用化と普及が期待される。

以上のように本論文は、臭化メチル代替技術として新しい生物的防除法の実用化に向けた技術開発に成功しており、植物病理学的及び社会的価値が高く、学位論文として十分価値のあるものと判定した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏 名	イケガシラ ヤスオ 池頭 靖夫
審査委員	主査 佐 賀 大学 教授 井上 興一
	副査 佐 賀 大学 准教授 染谷 孝
	副査 佐 賀 大学 教授 大島 一里
	副査 鹿児島 大学 教授 境 雅夫
	副査 鹿児島 大学 准教授 樗木 直也
審査協力者	
実施年月日	平成 2 2 年 1 月 2 0 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答 	
<p>主査及び副査の 5 名は、平成 2 2 年 1 月 2 0 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆答により外国語 (英語) の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から審査委員会は、申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士 (農学) の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏名	イケガシラ ヤスオ 池頭 靖夫
<p>[質問 1] ELISA法で使用した土壌の種類は？ 土壌の種類によって検出感度等は異なるか？</p> <p>[回答 1] 茨城県のピーマン栽培地の砂質土壌を主に使いました。黒ボク土ではウイルスが土壌に吸着して検出しにくいとの報告がありましたが、本法では十分使用できました。</p> <p>[質問 2] 黒ボク土でも同じ条件での検出か？</p> <p>[回答 2] 同じ条件で、使用できました。</p> <p>[質問 3] スキムミルク添加により非特異反応を抑えたとのことだが、実は抽出効率が上がったためという可能性はないか？</p> <p>[回答 3] 本論文中で考察していますが、その可能性もあると考えられます。非特異反応抑制と効率的な抽出の両方が可能になったと考えています。</p> <p>[質問 4] ELISAの値のcriteriaはどのくらいか？</p> <p>[回答 4] 茨城県の現地圃場では、実際にELISA値0.1を基準にして防除指針が作られています。通常はL3抵抗性品種が使われていますが、0.1を超える場合、L4抵抗性品種に切り替えられています。L4抵抗性品種は、抵抗性は高いのですが収量は劣ります。また抵抗性品種の最後の砦として、極力使用しないようにしているのです。</p> <p>[質問 5] 葉の発病斑とELISA値との関係は？</p> <p>[回答 5] あまり有意な相関は認められなかったです。</p> <p>[質問 6] 発病度とELISA値との関係は？</p> <p>[回答 6] 相関は見られなかったです。しかし、発病土と非発病土とで吸光度0.1ですっきり分けられるということから、現場での判断基準としています。</p> <p>[質問 7] ELISAの0.1前後で発病土と非発病土に近い値となっているが。疑似陽性の可能性は？</p> <p>[回答 7] 0.1でほぼ分けられていますので、その可能性は低いと考えています。</p> <p>[質問 8] 抗体とconjugateの量を変えてpositive反応をあげるという感度向上の方向は検討されましたか？</p> <p>[回答 8] そこまで手が回りませんでした。抽出効率の検討で成果が出ましたので。</p> <p>[質問 9] <i>Olpidium</i>抑制菌のメカニズムは？</p> <p>[回答 9] M-21と同様に、プロテアーゼによる失活の可能性を考えています。</p>	

[質問10] ウイルス自体の不活化とはどのようなメカニズム？

[回答10] プロテアーゼ活性によりウイルスの外被タンパク質の構造が変性することを電顕で確認しています。

[質問11] 微生物資材を開発したわけですが、その商品化は？

[回答11] 今後の課題です。

[質問12] 発病をよく抑えている結果が得られているが。

[回答12] はい、そのため有望かと思えます。

[質問13] トウガラシマイルドモットルウイルスの防除で、不活化菌は弱毒ウイルスと比べて優劣は？

[回答13] 汎用性が高いという点で優れていると考えています。弱毒ウイルスは効果が高いですが、適用できない場合や変異がありますので。

[質問14] このウイルス以外への適用の可能性は？ さらには、動物ウイルスへも適用できるかやってみたら？ 大きな適用範囲が広まる可能性がある。

[回答14] プロテアーゼ活性によるタンパク質変性というメカニズムを考えると、他のウイルスへの適用可能性はあると思えます。今後は是非検討したいと思えます。

[質問15] プロテアーゼインヒビターを用いると、メカニズム解析ができそうです。

[回答15] はい、そのような手段を用いながら、是非いろいろなウイルスに適用できるか試験したいです。

[質問16] ELISAで土壌採取のタイミングは？

[回答16] 栽培後の土壌です。

[質問17] 土壌中のウイルスの増減はありますか？

[回答17] 作付けを重ねると土壌中でウイルスが増えます。

[質問18] ELISA値と発病率との相関がないが、0.1という値に普遍性があるか？

[回答18] 現在、普及所で現場検証されていますが、0.1が基準になるというデータが蓄積されています。これは、本論文の後のことなので、紹介していませんが。

[質問19] 1株でも病害が出てはいけなないと考えますか？

[回答19] はい、そうです。圃場全体への蔓延の可能性があるので。

[質問20] 検査法のキット化は？

[回答20] 現在のところ、考えていません。