

学 位 論 文 要 旨

氏 名	三根 崇幸
題 目	海苔スミノリ病の発症要因解析と防除法開発に関する研究 (Studies on the incidence factors of suminori disease and the development of the biological control in laver cultivation using bacteriophage)

ノリ養殖では、細菌感染症であるスミノリ病が冷凍網養殖期にしばしば発生し、その生産に被害を及ぼしている。本研究では、スミノリ病の発生要因を明らかにするとともに、スミノリ病原細菌感染ファージを用いた海苔スミノリ病防除法の開発を目的とした。

本病ノリ葉体から分離・保存されていた細菌 8 菌株について、病原性の確認と細菌種の同定を行った。その結果、1985、2002、2003、および 2004 年に分離された 4 菌株では同様に本病の症状を引き起こしたものの、1985 年に分離された菌株は *Arthrobacter tumbae*、2002 年以降に分離された 3 菌株は *Gaetbulibacter saemankumensis* に最も近縁な細菌と同定された。

正常および冷凍保存した養殖ノリ葉体から本病菌を検索した結果、いずれの養殖ノリ葉体にも *Gaetbulibacter* sp. が付着していることが明らかとなった。一方、冷凍処理によりノリ葉体の生理状態は悪化し、低塩分条件下での冷凍処理ではさらに悪化することが判明した。さらに、本病菌感染に対するノリ葉体の感受性は生理状態の悪化に伴い上昇することが明らかとなった。以上の結果から、本病の発生には、本病菌感染だけでなく、ノリ葉体の生理状態も大きく関係することが明らかとなり、本病の発生要因は多様性を有することが強く示唆された。

有明海の海水および干潟泥土からスミノリ病原細菌に感染するファージを 3 種類分離し、その性状解析を行った。ファージの形態およびゲノム制限酵素解析の結果、これらのファージは 2 種類のグループに分けられた。分離した各ファージの宿主特異性、感染力、温度安定性、pH 安定性について検討し、本病の防除に最も適したファージを選抜した。

選抜したファージを用いてノリ葉体に対する本病の発症防除試験を行った結果、本病菌の接種直後にファージ処理したノリ葉体では、本病菌に対する感染防止効果が認められた。さらに、細菌感染 24 時間後にファージ処理を行った場合でも、本病の発病抑制効果が認められた。

本病菌を人為的に感染させ冷凍保存したノリ葉体に対するファージ処理の効果を酸処理と比較検討した。その結果、ファージ処理および酸処理を行ったノリ葉体ではいずれも本病の発病阻止効果が認められたが、ファージ処理を行ったノリ葉体上の本病菌は、酸処理を行ったノリ葉体よりも比較的穏やかに減少してゆくことが明らかとなった。さらに、酸処理したノリ葉体の生長はファージ処理したノリ葉体と比較して明らかに劣ることも明らかとなった。以上のことから、ノリ葉体の生長に与える影響を考えると、本病の防除には酸処理よりもファージ処理の方が好ましいことが強く示唆された。

以上の研究により、スミノリ病の発生要因が明らかとなり、また、スミノリ病原細菌感染ファージを用いた海苔スミノリ病の防除法確立の可能性が強く示唆された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Takayuki Mine
題 目	Studies on the incidence factors of suminori disease and the development of the biological control in laver cultivation using bacteriophage (海苔スミノリ病の発症要因解析と防除法開発に関する研究)
<p>The cultivation of laver, <i>Porphyra</i> spp., is one of the major marine farming industries in Japan. However, the occurrence of suminori disease caused by pathogenic bacterial infection during the period using frozen laver thalli is a serious problem. The present study was carried out to elucidate the factors that influence the occurrence of suminori disease and to develop a biological control of suminori disease by bacteriophages that infected suminori pathogenic bacteria.</p> <p>Pathogenicity was determined in four stocked bacterial strains, isolated from suminori-diseased laver thalli of <i>Porphyra</i> spp. in 1985, 2002, 2003, and 2004 when the suminori disease occurred in the Ariake Sea. Even though all isolates caused the same symptoms of the disease on infected laver thalli of <i>P. yezoensis</i>, they belonged to completely different families. Among them, in 1985 an isolate was identified as being closely related to <i>Arthrobacter tumbae</i>, whereas the other three recent isolates were related to <i>Gaetbulibacter saemankumensis</i>.</p> <p>The detection of the pathogen revealed that the isolate of <i>Gaetbulibacter</i> sp. was commonly found on normal and frozen cultivated laver thalli. Furthermore, it was revealed that the physiological condition of the laver thalli deteriorated due to the freezing treatment and the deterioration was accelerated under low salinity. It was also observed that the sensitivity to bacterial infection corresponded to the deterioration in the physiological condition of the laver thalli. It was strongly suggested that several factors influence the incidence of suminori disease, since the disease is induced by a combination of the number of pathogens present and the physiological condition of laver thalli.</p> <p>Three types of bacteriophages that infected suminori pathogenic bacterium, <i>Gaetbulibacter</i> sp., were isolated from seawater and tideland mud of the Ariake Sea. These bacteriophages were classified into two groups according to their morphology and restriction analysis of their genomes. Their host range, virulence, storage stability, and pH stability was investigated.</p> <p>Suminori disease control was also attempted using one isolated bacteriophage selected by its virulence and the storage stability. The incidence of the disease was apparently repressed in phage-treated laver thalli immediately after bacterial infection. Furthermore, phage treatment was effective even after 24 h of bacterial infection.</p> <p>The effect of phage treatment on laver thalli that were frozen after the bacterial infection was investigated and compared with that of acid treatment. The incidence of the disease was protected in both phage-treated laver and organic acid-treated laver. It was also revealed that the bacteria on phage-treated laver decreased more slowly than those of organic acid-treated laver during the experimental period. In addition, it was observed that the mean length of organic acid-treated laver was significantly shorter than that of phage-treated laver. It was suggested that phage treatment is an effective suminori disease control without a significant reduction of the growth of laver thalli.</p> <p>The results obtained in this study reveal the incidence factors of suminori disease, and suggest the possibility of using bacteriophages for suminori disease control in laver cultivation.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	三根 崇幸
審査委員	主査 佐賀大学 教授 神田 康三
	副査 佐賀大学 准教授 濱 洋一郎
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 佐賀大学 准教授 小林 元太
	副査 鹿児島大学 准教授 吉川 毅
審査協力者	
題目	海苔スミノリ病の発症要因解析と防除法開発に関する研究 (Studies on the incidence factors of suminori disease and the development of the biological control in laver cultivation using bacteriophage)
<p>我が国におけるノリ <i>Porphyra</i> spp. 養殖では、ノリの人工採苗技術の確立や多収穫性品種の開発など様々な養殖技術の改良によってノリの生産量は養殖初期に比較して飛躍的に躍進した。特にノリ網の冷凍保存技術の開発は、ノリ網が生産不能となった時期に冷凍保存していた網を張り替えることで継続した養殖を可能とし、現在では採苗したノリ網を育苗養殖する「秋芽網期」と秋芽網期に冷凍保存していた一部のノリ網を再度養殖する「冷凍網期」の2期養殖が一般化している。佐賀県有明海では冷凍網期におけるノリの品質、生産量および生産金額は秋芽網期と比較していずれも高く、ノリ養殖にとって冷凍網期は最も重要な時期となっている。しかしながら、この冷凍網期のノリ葉体には細菌感染症である海苔スミノリ病がしばしば大発生し、これまでもノリ養殖産業に多大の被害を与えている。本病の発生にはスミノリ病原細菌が関与していると考えられているが、これまで報告された病原細菌の細菌種は様々であり、その発生の規模や程度はノリ葉体の養殖条件によっても変動することが指摘されることから、スミノリ病の発生機構はその発症原因細菌を含めて明確には解明されていないのが現状である。</p>	

本研究では、海苔スミノリ病防除を目的としてスミノリ病の発生要因を明らかにすると共に、その防除法としてバクテリオファージを用いた微生物学的防除法の可能性を検討した。

本病に罹病したノリ葉体から分離・保存されていた細菌 8 菌株について、病原性の確認と細菌種の同定を行った。その結果、1985, 2002, 2003, および 2004 年に分離された 4 菌株は全て同様な本病の症状を引き起こしたものの、1985 年分離菌株は *Arthrobacter tumbae* であり、2002 年以降に分離された 3 菌株は前者とは全く異なる *Gaetbulibacter saemankumensis* に最も近縁な細菌と同定された。さらに、スミノリ病の発生が認められなかった正常および冷凍保存した養殖ノリ葉体上の付着細菌を検索した結果、いずれの養殖ノリ葉体にも病原性が確認された細菌 *Gaetbulibacter* sp. が付着していることを見出し、本病の発生は細菌感染のみによるものではないことが示唆された。また、養殖条件下におけるノリの生理状態を光合成量を指標として検討した結果、スミノリ病が多発する冷凍網期と同条件となるように冷凍処理したノリ葉体では生理状態は悪化し、低塩分条件下での冷凍処理のノリ葉体では生理状態はさらに悪化することを明らかにした。さらに、病原細菌感染に対するノリ葉体の感受性は生理状態の悪化に伴い上昇することを証明した。以上の結果から、本病の発生には病原細菌の感染だけでなく、ノリ葉体の生理状態も大きく関係することを明らかにし、本病の発生要因は多様性を有することを明確に示した。

次に、宿主特異性の高いバクテリオファージによる新規防除法の開発では、有明海の海水および干潟泥土からスミノリ病原細菌に感染するファージを 3 種類分離し、各分離ファージの宿主特異性、感染力、温度安定性、pH 安定性について検討し、本病の防除に最も適したファージを選抜した。選抜したファージを用いてノリ葉体に対する本病の発症防除試験を行い、本病菌の接種直後のファージ処理は本病菌に対する感染防止に有効であることを明らかにしたが、細菌感染 24 時間後にファージ処理を行った場合でも、本病の発病抑制効果があることを見出した。また、現行の本病発生防除法であるノリ網の酸処理との比較においては、ファージ処理および酸処理したノリ葉体ではいずれも本病の発病阻止効果が認められたものの、酸処理したノリ葉体の生長はファージ処理したノリ葉体と比較して明らかに劣ることを明らかにした。以上のことから、本病の防除におけるファージ処理の有効性を明確にしたことで、スミノリ病発生に対する微生物学的防除法確立の可能性を強く示すことができた。

本論文はスミノリ病の発生要因の解明と共に、スミノリ病原細菌感染ファージを用いた海苔スミノリ病の新規防除法確立の可能性を提供するものであり、これらの新知見は今後のノリ養殖の発展にとって重要かつ貢献度の大きいものであると期待される。このことから、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	三根 崇幸
審査委員	主査 佐賀大学 教授 神田 康三
	副査 佐賀大学 准教授 濱 洋一郎
	副査 鹿児島大学 教授 山本 淳
	副査 佐賀大学 准教授 小林 元太
	副査 鹿児島大学 准教授 吉川 毅
審査協力者	
実施年月日	平成 22 年 6 月 29 日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査 4 名は、平成 22 年 6 月 29 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>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	三根 崇幸
主な質疑応答	
<p>Q1. スミノリ病を発症させる病原細菌が1種類では無く、属さえかけ離れた細菌であるにも関わらず同一症状を引き起こすことについて、それらに共通する病原因子はどのようなものかを考えているか。</p>	
<p>A1. スミノリ病の病状から見て、ノリ葉体の細胞壁に損傷を与える因子であることは間違いないと考えている。その病原因子は酵素の可能性もあるが、細菌の生育条件に最も適した養殖前期の秋芽網期では発病がほとんど見られないことや、正常ノリ葉体上にも病原性が認められた細菌種が比較的多数検出されたことから、細菌のもつ酵素が直接の病原因子と考えることには疑問を持つ。ただし、生理状態が悪化したノリ葉体が感染しやすいことを考えれば、活性の弱い酵素であっても可能性はあると思う。</p>	
<p>Q2. 特定の細菌種の感染は必ずしもスミノリ病の発病に必須ではないと言う事か。</p>	
<p>A2. スミノリ病発症ノリ葉体から分離された細菌でも、感染実験で病原性がない細菌の存在も認められたことから、特定種の細菌による感染はスミノリ病発症に必須であることは間違いではなく、本病が生育環境の悪化等による単なる生理病ではないこと明らかである。しかしながら、冷凍処理したノリ葉体を使用する冷凍網期前半に発病が多発することや、冷凍処理によるノリ葉体の光合成量の低下、つまり生理活性の低下が病原細菌に対する感受性を大きく助長することも確かな事実である。</p>	
<p>Q3. ノリ葉体の主要構成多糖類はマンナンとキシランだが、養殖期によってそれらの含量が異なる。特に、冷凍網期では養殖全期間を通して冷凍網期では含量が最低となるが、このことと発病との関係はどのように考えるか。</p>	
<p>A3. ノリ葉体の養殖時期による多糖類の変動については検討していなかったため、その原因が冷凍処理によるかどうかは不明である。しかしノリ葉体を保護する多糖類の含量が低下することは細菌感染に対する防御力も低下するように思う。</p>	
<p>Q4. ノリ葉体の細菌感染防御力の低下では、葉体の構成多糖類のマンナンとキシランを分解するような酵素を今回同定された細菌が出しているとは考えられないか。</p>	
<p>A4. 今回の研究ではスミノリ病の発症原因追究に重点を置いた結果、本病の発症が細菌感染のみではなく、養殖条件による生理状態も関与していることを明らかにした。今後は今回得られた知見に基づいて、酵素等を含めた細菌学的な立場からも感染のメカニズムをさらに詳しく調べてゆく必要がある。</p>	

- Q5. フェージを用いたスミノリ病防除法について、フェージのもつ高い宿主特異性を挙げて
いるが、何故 20℃で安定性の最も高かったフェージを候補に選ばなかったのか。
- A5. 確かにフェージは高い宿主特異性を有するが、有明海のような半閉鎖的海域に人為的に
多量散布した場合にどのような影響を生態系に及ぼすかについては全く未知である。
そのため、防除に有効と考えられる期間（約 1 ヶ月）は安定性を有するが、その後は
安定性を失うものとしてフェージ U2 を候補にした。
- Q6. 本論ではスミノリ病防除法の確立について新たな方法を考案する必要があると記述して
あるが、新たな方法とは具体的にどのような方法なのか。
- A6. 現在スミノリ病防除には有機酸処理によるノリ葉体の消毒が唯一の手段で、即効性も認
められている。しかしながら、フェージ処理の場合は有機酸処理に比べて除菌効果は
やや穏やかであるが防除には十分であり、酸処理に見られるノリ葉体の一部損傷が全
くない利点がある。またフェージは酸性にすると不活化されるので、酸処理との同時
併用は避けて行うなど、フェージによる防除法を導入するためには、それぞれの防除
法の施行方法を有効に生かす新たな方法を生産当事者に示すことが必要と考える。
- Q7. スミノリ病原細菌が必ずしも特定された 1 細菌種ではないことが明らかにされたこと
で、宿主体の狭いフェージ処理によるスミノリ病原細菌防除には不安が残る。この事
についてどのような考えをもっているか。
- A7. 確かに、スミノリ病の発生では分離された病原細菌が 1985 年のものと 2000 年以降の
ものとは全く属が異なる細菌種である。この菌相の変化が何に由来するかは不明だが、
菌相の変化があることは事実であることから、常にノリ葉体付着細菌のモニタリング
を行ってゆくことで対応するしかないのではないかと。もし、菌相の変化が認められた
場合は、新しいフェージ分離まで従来の有機酸処理で凌げるのではないかと思う。
- Q10. 分離された 2 種類の病原細菌の系統樹解析で、算出された両者の **confidence limits**
が低いように思う。2 点同時に解析したのか。
- A10. 同時に行っている。2 点別で行うと確かにご指摘どおりの結果が得られると思う。
- Q11. 冷凍処理したノリ葉体上の菌数を real time PCR や抗体で検討しているが、その菌数
の変化に興味がある。この菌数の変化が現場でのスミノリ病発生とどのように関わっ
てくるのか、その検討は行っているのか。
- A11. 養殖現場では 2004 年以降スミノリ病の大発生が起こっていないので、菌数の変化と
発病との関係は明確にしていない。