

学 位 論 文 題 名

ジャガイモそうか病菌 *Streptomyces scabies* の
定量法に関する研究

学位論文内容の要旨

ジャガイモそうか病は放線菌である *Streptomyces* 属菌によって引き起こされる土壤病害であり、世界中のジャガイモ生産地帯で確認されている。本病に罹病した塊茎は外観を著しく損なうため商品価値を失う。また、デンプン含量・品質を低下させることが知られている。

近年、北海道においても本病における被害が増加傾向にあり、生産者にとって深刻な問題となっている。本病の防除策としては土壤消毒、土壤の酸性矯正、灌水による効果が古くから認められているが、広大な作付面積をもつ北海道においてはこのような防除法を適用することは困難である。また、本病原菌は根菜類にも寄生することや、宿主がなくとも土壤中で長期間生存するため輪作による被害の軽減を期待することが困難である。そのため一刻も早い有効な防除法の確立が望まれている。防除を考える上で土壤中の病原菌の生態を明らかにすることは重要である。しかし、土壤中の病原菌を分離することの困難さから、土壤中の病原菌に関する報告は皆無であった。病原菌の定量法が可能となれば病原菌の生態を解明することができ、資材、薬剤による病原菌への影響を評価することも可能となる。また、土壤中の病原菌量と発病度の間に相関が認められれば土壤診断法にも応用できる可能性がある。

本研究では数種報告されているジャガイモそうか病菌のうち世界中の優占種である *Streptomyces scabies* を対象とし、本菌を土壤から定量することを目的として行った。定量を行うためには土壤からの分離用培地および *S. scabies* と他種 *Streptomyces* 属菌を識別するための血清学的方法の開発が必要であり、両者を用いて定量を行うことを考えた。

土壤からの *S. scabies* の分離用培地を作成するため、培地に添加する抗生物質と抗菌物質並びに NaCl 濃度を検討した。その結果、0.5%NaCl を含む STR 培地の基礎培地にシクロヘキシミド 100ppm、ナリジキシン酸 20ppm、デヒドロ酢酸ナトリウム 350ppm、リファンピシン 0.5ppm、トリメソプリム 20ppm、ポリミキシム B 硫酸塩 1ppm、LiCl 2000ppm を加えることで、分離の障害となる土壤細菌の抑制効果が高く、*S. scabies* の分離に有効な No. 11 培地を作成することができた。また、Kenneth *et al.* (1998) の STR 培地の有効性も明らかとなった。

S. scabies を他種 *Streptomyces* 属菌と識別する目的で *S. scabies* subsp. *achromogenes* SNS-39 株の菌体破碎液上清を 30%飽和で硫酸塩析した沈殿画分を免疫原とし、ウサギを用いてポリクローナル抗体を作成した。得られた抗体を *S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes*、*S. turgidiscabies* の生菌体で吸収した精製抗

体は ELISA において *S. scabies*、*S. scabies* subsp. *achromogenes* との反応性が高く *S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes* 以外の菌種とは交差反応は見られず、識別性は高かった。未精製の本抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、*S. scabies* と *S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes*、*S. neyagawaensis* の 4 菌種の抗原構造は非常に酷似しており、血清学的に近縁であることが明らかとなった。一方で本抗体から *S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes* に対する交差反応を除くことは困難であると考えられた。さらに、SNS-39 株の胞子懸濁液、オートミール培地で培養した菌体の磨砕液、加熱菌体磨砕液のそれぞれを免疫原としてポリクローナル抗体を作成したが、いずれも上記抗体の識別能力をしのぐものではなかった。

ポリクローナル抗体の結果を踏まえ SNS-39 株に対するモノクローナル抗体を 3 種（胞子懸濁液、菌体破碎液、菌体磨砕液）の抗原に対し作成した。その結果、胞子懸濁液、菌体破碎液を免疫原としたものから得られた抗体は、*S. scabies* に強く反応するが、*S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes*、*S. neyagawaensis* のいずれかに交差反応を示すものであった。一方、菌体磨砕液を免疫原として得られた抗体のうち 6 つの抗体は *S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes*、*S. neyagawaensis* に交差反応を示さなかった。そのうち 4 つは *S. griseus* subsp. *griseuse* の 1 菌株に反応したが、2 つの抗体（7F11H10、78EH10）は他種 *Streptomyces* 属菌に対して反応は認められず、*S. scabies* に特異的な抗体であることが示唆された。7F11H10、78EH10 の両抗体はウエスタンブロッティングにおいて *S. scabies* の抗原を異なる分子量のバンドで認識しているが、両抗体で DAS-ELISA を行うことが可能であった。本結果から両抗体は同一の抗原上の異なる抗原決定基を認識していることが考えられた。また、7F11H10、78EH10 の両抗体の認識する抗原物質の特性を調べるため、抗原にプロテイナーゼ K、熱、クロロホルム処理をおこない、ELISA で活性を調べた。その結果、プロテイナーゼ K、熱処理抗原では反応が認められず、クロロホルム処理抗原では無処理の抗原に比べ発色値が低下した。そのため、両抗体の認識する抗原はタンパク質と考えられた。

S. scabies の分離培地とモノクローナル抗体（7F11H10、78EH10）を用いて 14 のジャガイモそうか病発病圃場からの *S. scabies* 定量を行った結果、中発生以上の圃場の菌量は $2.60 \times 10^3 \sim 5.75 \times 10^4$ cfu/g soil であった。少発生圃場では 1 圃場で 3.09×10^3 cfu/g soil であったが、他の 3 圃場からは定量することはできなかった。また、十勝農試コンクリート枠圃場における *S. scabies* の経時的変化を調べた結果、植付け時に 3.13×10^3 cfu/g soil であった菌量は植付け後 50 日には最大菌量 2.57×10^4 cfu/g soil に達し、収穫時の菌量は 1.44×10^4 cfu/g soil であった。植付け後 50 日目は塊茎形成期から肥大期に相当し、本病の感染時期と考えられている。そのため感染に伴い *S. scabies* の菌量が増加したことが考えられた。

アメリカ産 *S. scabies* に対するポリクローナル抗体による ELISA の反応は、全ての菌株に反応した。しかし、基準菌株と DNA の相同性が 70% よりも低い 3 菌株では ELISA の発色値が低く認められた。モノクローナル抗体の ELISA による反応はこれら 3 菌株を除き全ての菌株に反応した。PCR における反応もこれら 3 菌株を除き全ての菌株に反応した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 生 越 明
副 査 教 授 小 林 喜 六
副 査 助 教 授 近 藤 則 夫

学 位 論 文 題 名

ジャガイモそうか病菌 *Streptomyces scabies* の 定量法に関する研究

本論文は、図 5、表 36、図版 4、引用文献 129 を含み、9 章からなる総頁数 136 の和文論文である。別に参考論文 5 編が添えられている。

本研究は、土壌中の *Streptomyces scabies* の生態を明らかにするため、土壌からの分離用培地の作成、血清学的方法を用いた識別法を開発し、土壌中における病原菌の定量法を確立することを目的としたものである。また、多様な集団と報告されているアメリカ産 *S. scabies* に対する血清学的方法、*S. scabies* に特異的なプライマーを用いた PCR 法による識別能力を検討した。その概要は以下の通りである。

1. ジャガイモそうか病菌 *S. scabies* の分離用培地の作成

数種抗生物質および抗菌性物質の効果を検討した結果、0.5%の NaCl を含む *Streptomyces* selective 培地 (Kenneth *et al.*, 1998) の基礎培地にデヒドロ酢酸ナトリウム 350ppm、ナリジキシン酸 20ppm、シクロヘキシミド 100ppm、トリメソプリム 20ppm、リファンピシン 0.5ppm、ポリミキシン B 硫酸塩 1ppm、LiCl 2000ppm を加えることで *S. scabies* の分離に適した培地 (No.11 培地) を作成することが可能となった。

2. ジャガイモそうか病菌 *S. scabies* の血清学的方法による識別

S. scabies subsp. *achromogenes* SNS-39 株の菌体破碎液上清を 30%飽和で硫酸塩析した沈殿画分を免疫原とし、ウサギを用いて抗体を作成した。得られた抗体を *S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes*、*S. turgidiscabies* の生菌体で吸収した精製抗体は、*S. scabies*、*S. scabies* subsp. *achromogenes* との反応性が高く、*S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes* 2 菌種に強い交差反応が認められたが、他種 *Streptomyces* 属菌とは交差反応は見られず、識別性は高いものであった。しかし、ウエスタンブロッティングの結果からも、本抗体では *S. scabies* と *S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes* を識別することは困難であった。

特異抗体を得る目的で孢子懸濁液、オートミール培地で培養した菌体磨碎液、加熱菌体のそれぞれを免疫原としてポリクローナル抗体を作成したが、いずれも上記抗体の特異性

をしのぐものではなかった。

ポリクローナル抗体の結果を踏まえ *S. scabies* subsp. *achromogenes* SNS-39 株に対するモノクローナル抗体を 3 種の抗原に対し作成した。胞子懸濁液、菌体破碎液を免疫原としたものでは、*S. scabies* に強く反応するが、*S. bottropensis*、*S. diastatochromogenes*、*S. neyagawaensis* のいずれかに交差反応を示す抗体しか得られなかった。一方、菌体磨碎液から得られた抗体のうち 2 つの抗体 (7F11H10、78EH10) は *S. scabies* 以外の *Streptomyces* 属菌に対して反応は認められず、高い識別能力を示した。

また、両抗体の認識する抗原物質はクロロホルム、熱、プロティナーゼ K 処理を行った ELISA の結果から、タンパク質であることが考えられた。

3. ジャガイモそうか病菌 *S. scabies* の定量

S. scabies の分離用培地とモノクローナル抗体 (7F11H10、78EH10) を用いて異なる 14 のジャガイモそうか病発病圃場から *S. scabies* の定量を行った結果、中発生以上の圃場の菌量は $2.60 \times 10^3 \sim 5.75 \times 10^4$ cfu/g soil であった。少発生圃場では 1 圃場で 3.09×10^3 cfu/g soil であったが、他の 3 圃場では定量することはできなかった。また、十勝農試コンクリート枠圃場における *S. scabies* の経時的变化を調べることが初めて可能となり、植付け時 3.13×10^3 cfu/g soil であった菌量は、50 日後には最大菌量 2.51×10^4 cfu/g soil に達した。本時期はジャガイモの塊茎形成期から肥大期に相当し、本病の感染時期に相当する。そのため感染に伴い土壤中の病原菌量が増加したことが一つの要因として考えられた。

本研究の結果得られた定量法は土壤中における *S. scabies* の菌量を評価する上で有効であることが明らかとなった。

4. アメリカ産 *S. scabies* に対する血清学的方法および PCR による識別

アメリカ産 *S. scabies* に対するポリクローナル抗体の反応は、全ての菌株に反応したが、基準菌株と DNA の相同性が 70% 未満の 3 菌株では ELISA の発色値が低く認められた。モノクローナル抗体ではこれら 3 菌株を除き全ての菌株に反応した。PCR における結果もこれら 3 菌株を除く全ての菌株で 236bp の DNA 断片が認められた。

以上の研究成果は、土壤中におけるジャガイモそうか病菌 *S. scabies* の定量法を開発したものであり、学術上応用上高く評価される。よって審査員一同は、前田征之が博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。