

学位論文審査の結果の要旨

氏名	MEHBUB HASAN
審査委員	主査 大西 浩平 副査 小林 括平 副査 田淵 光昭 副査 曳地 康史 副査 木場 章範

論文名

Elucidation of infection mechanism of *Ralstonia solanacearum* on ginger

(青枯病菌のショウガへの感染機構の解明)

審査結果の要旨

青枯病菌は200種類以上の宿主植物に感染し、萎ちょう症状を誘起し枯死させる難防除病害細菌である。感染機構の解明は主にトマト、ナス、タバコといった双子葉作物を宿主として行われてきた。一方で、青枯病菌はショウガ科作物を含む単子葉植物にも感染し、葉の黄化から枯死させる。青枯病菌の宿主域は非常に広く、トマトやナスに感染する株はショウガにも感染する場合がある。またショウガにしか感染しない株も存在する。青枯病菌のショウガへの宿主特異性や感染機構の解明はいまだ不十分である。

ショウガの栽培は種ショウガである根茎を利用しておこなわれるため、病原菌接種のための個体を準備するのに多くの時間と場所を必要とする。また、得られる個体が均一ではないという欠点がある。本研究では、細胞培養したショウガを宿主として用いる感染実験系を確立し、青枯病菌の感染機構解明のための第一歩を踏み出した。また、ショウガに感染する青枯病菌株のゲノム解析を行い、ショウガへの宿主特異性を決める3型エフェクターの同定を試みた。

ショウガ品種土佐一の種ショウガを湿潤条件 25℃で保管し、発芽させた。芽を切り取りエタノールと次亜塩素酸で表面殺菌したのち、2種類のホルモン、4.5 mg/L 6-benzyl adenine (BA) と 0.5 mg/L 1-naphthalene acid (NAA)、を加えた Murashige and Skoog (MS)寒天培地に静置し、無菌的に個体を再生させた。容器内で葉、偽茎、根が十分成長するのに数か月を要する(一次再生体)が、ひとたび無菌的に再生された個体が得られれば、次の二次再生体を十分に得ることができるため、例えば年に2回程度一次再生体を調製すればよい。一次再生体の茎の部分が無菌的に切り出し、同じ MS 寒天培地に静置することで、二次再生体を得ることができる。二次再生体そのものは、青枯病菌の接種試験に用いず、二次再生体を株分けし、NAAのみを含む MS 液体培地でひと月程度培養することで、接種試験に用いることのできる無菌培養個体が準備できる。

感染実験は、青枯病菌の菌液 (10^8 cfu/ml) に根を20分間浸漬したのち、滅菌水で洗浄後、ホルモンを含まない MS 液体培地に戻し、病徴を観察することで行った (root dipping)。それ以外に従来法である偽茎への穿刺接種、近年開発された菌液に浸したハサミで葉を切り取

る leaf-clipping 法、さらに菌液を MS 寒天培地に直接接種する直接法を用いた。青枯病菌の供試株はショウガに感染する MAFF 211479 と感染タバコから単離されショウガには感染性を示さない MAFF 301069 を用いた。また MAFF 211479 の 3 型分泌系変異株 *hrpY*, *hrcJ*, *hrpG*, *hrpB* も用いた。

無菌的に調製されたショウガ培養個体に root dipping 法により上記 2 株を接種したところ、MAFF 211479 接種ショウガは 15 日目から葉の黄化が始まり、28 日後にはすべての葉が黄色くなり枯死した。一方、MAFF 301069 接種ショウガは 28 日後においても全く病徴を示すことはなかった。以上のことから、無菌培養個体も慣行的に栽培されたショウガと同様に病徴試験に供することが可能であることが明らかとなった。無菌培養個体は根茎を持たないが、根茎の有無は病徴の発現には無関係であることも判明した。

青枯病菌の 3 型分泌装置はナスやトマトを宿主とした場合の病徴発現に必須である。そこで、ショウガへの感染にも同様に重要であるか調べた。MAFF 211479 由来の 4 種類の 3 型分泌系変異株を構築し、root dipping 法で無菌培養個体に感染させたところ、いずれの変異体もショウガに病徴を示すことはなかった。感染方法を偽茎への穿刺接種と leaf-clipping 法に変えたが、やはり変異株はショウガに病徴を示すことはなかった。また、感染させたショウガ葉内での青枯病菌の増殖を調べた。3 型分泌装置変異株は野生株に比べて増殖能が著しく減少していた。これらの結果、ショウガへの感染においても 3 型分泌装置は必須であることが示された。

ショウガに感染する青枯病菌 6 株の完全長ゲノム配列を決定した。イルミナ MiSeq を用いた short reads とナノポア MinION を用いた long reads を組み合わせるハイブリッドシーケンシングにより、完全長配列を決めることができた。得られたゲノム配列から、青枯病菌の 3 型エフェクターの検索を Ralstonia T3E (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/site/prj/T3Ev3/>) を利用して行った。感染ナスから分離された OE1-1 株の持つ 3 型エフェクターとの比較によってショウガへの感染に特異的な 3 型エフェクターの抽出を試みた。しかしながら、本研究により OE1-1 株はショウガに対する感染能を有していることが判明したため、今後は MAFF 301069 のゲノム配列解析により本株の 3 型エフェクターとの比較を行う予定である。

本論文に関する公開審査会は、令和 5 年 2 月 5 日に愛媛大学農学部で開催され、論文発表と質疑応答が行われた。引き続き行われた学位論文審査委員会で、本論文の内容を慎重に審査した結果、審査委員全員一致して博士（学術）の学位を授与するものと判定した。