

氏名（本籍）	呉 梅花（中華人民共和国）
学位の種類	博 士（ 農学 ）
学位記番号	博 甲 第6707号
学位授与年月日	平成25年 9月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Isolation and Characterization of European Foulbrood Antagonistic Bacteria from the Gastrointestine of the Japanese Honeybee <i>Apis cerana japonica</i> (ヨーロッパ腐蛆病に拮抗作用を有するニホンミツバチ消化管細菌の単離と特性評価)

主査	筑波大学教授	Ph. D.	DeMar TAYLOR
副査	筑波大学教授	農学博士	本田 洋
副査	筑波大学教授（連携大学院）	Ph. D.	木村 澄
副査	筑波大学教授（連係大学院）	博士（獣医学）	三森 眞琴
副査	(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 主任研究員	博士(農学)	芳山 三喜雄

論 文 の 要 旨

ミツバチは蜂蜜を代表とした蜂製品の生産だけでなく、花粉媒介昆虫として果樹生産や畑作物生産において重要な役割を果たしている。しかし、ミツバチは細菌をはじめとする病原体によって引き起こされる多くの疾病の問題を抱えており、それらの制御は養蜂上最も重要な問題の一つである。本研究では、ミツバチの法定伝染病であるヨーロッパ腐蛆病 (European Foulbrood、EFB) 菌に対して拮抗作用を有する細菌をミツバチの消化管より単離し、それらの特性評価を行うとともに、EFBに対する予防の可能性について考究した。本論文の成果は以下の通りである。

新たな蜂病制御の手段としてのミツバチ消化管微生物の可能性を評価するためにセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) に比較して病原体に抵抗性を持つニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) の消化管内から細菌を単離し、EFBの原因細菌 *Melissococcus plutonius* に対する拮抗作用を *in vivo*、および *in vitro* でスクリーニングした。*M. plutonius* は人工培養下では感染性が低下するため、これまで実験的にEFBの症状を再現することは困難であったが、本研究において、日本で最近単離された非典型的なタイプの *M. plutonius* 菌株が実験条件下でもEFB症状を起こすことが明らかになったため、本菌株を用いることにより、感染評価が可能であることを示した。

本研究では、ビフィズス菌11株、乳酸菌17株、そのほかの菌17株の計45菌株の細菌をニホンミツバチの消化管から培養依存的方法で単離するとともに、各菌株の分子遺伝学的系統分析を16SrRNA遺伝子に基づいて行い、ニホンミツバチの腸内細菌相の一端も解明した。さらに、単離されたすべての細菌が、同じ種であっても菌株毎に異なる炭水化物の利用性を示すことを明らかにし、このような生化学的特徴は、それぞれの細菌の異なった資化機能に関連すると考えた。またこれらの細菌が産出する乳酸などの有機酸がEFBに対する拮抗性に関与する可能性も示し

た。*in vitro*の拮抗活性評価では、ビフィズス菌11株、乳酸菌17株、および枯草菌1株がEFB原因細菌である*M. plutonius*の増殖を阻害した。更に、*in vivo*においてもEFBに対するセイヨウミツバチ幼虫の抵抗性が向上する効果を見出した。

以上要約すると、ニホンミツバチは消化管内に多種多様な細菌を保持していた。これらの細菌の多くは、EFB原因菌である*M. plutonius*の増殖を抑制し、ミツバチのEFBに対する抵抗性を改善した。この結果から、ミツバチ消化管細菌は蜂病に対して防除機能を有し、新規の持続可能な蜂病制御方法の開発に貢献することが期待される。

審 査 の 要 旨

現在まで、ヨーロッパ腐蛆病 (European Foulbrood、 EFB) は、重篤な蜂病とは考えられてこなかったが、近年、高い病原性を有する菌が発見されたことから、養蜂業における被害の拡大が懸念されており、防除法の開発が望まれている。本研究の成果で評価される一点目は、これまで典型菌株では不可能であった実験室内でEFBの発病を非典型菌株を用いることで可能にし、世界に先駆けて感染実験系を確立したことである。二点目は、ミツバチ消化管内から*M. plutonius*に対して拮抗作用を持つ多くの細菌株を単離したことで今後のEFB研究の基盤材料を提供したことである。更に、腸内細菌の中で同拮抗性を持つ菌株の生化学的特徴を明らかにし、有機酸が拮抗性に関与する可能性が示されたことも特出している。また、単離した細菌がミツバチのEFB抵抗性を向上させることを示したことは、EFB制御への応用利用の可能性を強く示唆するもので極めて重要な知見である。

以上の成果は、今後のEFB研究に重要な道筋を示すとともに、ミツバチにおける新たなEFB制御法の開発に寄与する基礎研究として大いに評価できる。

平成25年7月8日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。