

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成8年度博士課程入学

氏名 澤柳利実

指導教官 難波成任

論文題目 ファイトプラズマの分子系統分類

ファイトプラズマは植物の篩部細胞内に寄生する最小の細菌であり、世界中で300種以上の植物に600種類以上の病気を引き起こす農業上重要な植物病原細菌である。主にヨコバイにより伝搬され、感染・発病した植物には萎縮・黄化・緑化・葉化・叢生などの症状を引き起こす。しかし培養不可能なことから、検出・診断はもっぱら病徴観察や昆虫伝搬試験、電子顕微鏡観察などに頼っており、多大な労力と時間を要する一方で、「一病害一病原」の習慣に従って整理するほかはなかった。しかし近年、ファイトプラズマのDNAの分離とその解析が可能となり、ファイトプラズマの分子レベルでの系統学的位置付けと分類が可能となった。その結果、ファイトプラズマは動物マイコプラズマよりもむしろ *Acholeplasma* 属菌や *Anaeroplasm* 属菌に近縁で、ともに *Anaeroplasm* group を構成することが明らかになった。1994年の国際細菌分類委員会において、ファイトプラズマに '*Candidatus* genus name and species name' の概念が導入され、種の分類基準は16S rRNA 遺伝子の塩基配列の系統解析により行うこととなった。

本研究は「種」の概念の導入当初より研究を進め、ファイトプラズマの16S rRNA 遺伝子および16S/23S ITS領域の塩基配列をもとに、分子系統学的解析を行い、ファイトプラズマの系統関係を明らかにし、分類体系を確立することを目的として行った。

1. ファイトプラズマの 16S rDNA を用いた系統分類

国内およびアジア諸国より蒐集したファイトプラズマ 30 分離株の 16S rRNA 遺伝子を解析するとともに、データベース上に登録された世界中のファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列データを加え、CLASTAL W を用いてアラインメントを行い近隣結合法により分子系統樹を作成した。系統樹の信頼性は、100 サンプルのブートストラップ解析を行った。系統の分岐パターンおよびブートストラップ値から、ファイトプラズマを 8 つの Group (I-VIII) に、さらに各 Group の中を 28 の subgroup に分類した。subgroup は他の細菌でも用いられている相同性と進化距離をもとに「種」に該当する taxon であることを基準として分類した。その結果、我が国に発生するファイトプラズマは、従来通り、4 つの群にわたるが、これまで I 群に分類されていたファイトプラズマ (OY など) は Group I に、II 群 (TWB など) は Group IV に、III 群 (RYD など) は Group VII に、IV 群 (JWB など) は Group VIII に再分類された。これ以外の Groups II・III・V・VI は国内での発生が確認されていないファイトプラズマ群であり 38 種類余りの分離株にのぼった。

2. ファイトプラズマ属の確立と種名の提唱

2.1. アジサイ葉化病ファイトプラズマ ('*Candidatus Phytoplasma japonicum*')

典型的な花の葉化症状を示す栽培アジサイから、ユニバーサルプライマー (ファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子を特異的に増幅する PCR プライマー) を用いた PCR により、ファイトプラズマが検出された。増幅された 16S rDNA の RFLP パターンから、海外で発生する 6 分離株全てのアジサイに発生するファイトプラズマとは異なることが判明し、これをアジサイ葉化病 (Japanese Hydrangea phyllody, JHP) ファイトプラズマと命名した。JHP の 16S rDNA 塩基配列データを用いた系統解析により、JHP は Group I ファイトプラズマであるが、新たな subgroup を構成することが明らかになり、JHP-subgroup と命名した。JHP は Australian grapevine yellows、Phormium yellow leaf、Stolbur of pepper、vergilbungskrankheit of grapevine と共通の祖先より派生したものと考えられた。以上の結果、JHP ファイトプラズマは独立した taxon を形成すると判断されたことから、暫定種 '*Candidatus Phytoplasma japonicum*' を提唱した [(*Mollicutes*) NC; NA; O; NAS (GenBank ac. no. AB010425), oligonucleotide sequences of unique regions of the 16S rRNA gene 5'-GTGTAGCCGGGCTGAGAGGTCA-3' and 5'-TCCAACCTCTAGCTAAACAGTTTCTG-3', P (*Hydrangea*, phloem); M]。

2.2. イネ黄萎病ファイトプラズマ ('*Candidatus Phytoplasma oryzae*')

日本及び東南アジアのイネ科植物 (イネ、sugarcane、Bermuda grass、brachiaria grass) に発生するイネ黄萎病ファイトプラズマ (rice yellow dwarf, RYD) をはじめとする各種ファイトプラズマ (RYD-Japanese isolate (RYD-J)、RYD-Thailand isolate (RYD-Th)、bermuda grass white leaf (BGWL-KK)、brachiaria grass white leaf (BRAWL-KK)、sugarcane white leaf (SCWL-Ud)、および rice orange leaf (ROL)) の 16S rRNA 遺伝子による系統解析を行った。RYD-Th, BRAWL-KK, BGWL-KK および ROL に関しては、初めて 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定した。その結果、ROL は Group I であるが、RYD-Th, SCWL-Ud, BRAWL-KK および

BGWL-KK は、Group VII であった。特に RYD-J と RYD-Th は Group VII 他 のファイトプラズマと異なる taxon を形成すると判断されたことから、暫定種 '*Candidatus Phytoplasma oryzae*' を提唱した[(*Mollicutes*) NC; NA; O; NAS (GenBank ac. no. XXXXXX), oligonucleotide sequences of unique regions of the 16S rRNA gene 5'-ATGCAAGTCGAACGGAAAT-3' and 5'-TGATAACCTCCACTATATTG-3', P (*Oryzae*, phloem); M]。

2.3. ナツメてんぐ巢病ファイトプラズマ ('*Candidatus Phytoplasma zizyphi*')
ナツメてんぐ巢病ファイトプラズマ (jujube witches' broom, JWB) の日本産 4 分離株、韓国産 1 分離株について、16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定し 系統解析を行った結果、各分離株は非常に相同性が高く、Group VIII に分類さ れ、EY-subgroup と同一のクラスター上に存在したが、明らかに JWB のみの 独立した taxon を形成した。このことから、暫定種 '*Candidatus Phytoplasma zizyphi*' を提唱した[(*Mollicutes*) NC; NA; O; NAS (GenBank ac. no. XXXXX), oligonucleotide sequences of unique regions of the 16S rRNA gene 5'- AAGACTGGATAGGAAATAA-3' and 5'- AATCCGGACTAAG ACTGTC-3', P (*Zizyphus*, phloem); M]。

3. 16S/23S rDNA の Internal transcribed spacer (ITS) 領域を用いた系統分類
16S rRNA 遺伝子は高度に保存されているため、ファイトプラズマの種内の 進化距離がわずかで、系統関係を知ることは難しい。ITS 領域は、16S および 23S の rRNA 遺伝子の間に位置する非コード領域で、進化上の制約が rRNA 遺伝子 などのコード領域に比べ、より少ないと考えられ、種内の系統関係を知るのに 有効であると考えられる。そこで、本研究で用いたファイトプラズマ 30 分離 株について、ITS 領域を PCR 増幅し、塩基配列を決定して系統解析を行った。 その結果、同一種内の、発生地、宿主、媒介昆虫等の異なる極めて近縁なファ イトプラズマの系統関係を明らかにすることが出来たことから、種内の系統分 類に有効であることが確認された。また、ITS 領域は Group 特異的であること から、解析の容易な塩基数 250bp 程度の短い ITS 領域を用いることで、Group の簡易同定に有効である。ITS 領域には tRNA 遺伝子があり、その配置を比較 したところ、ファイトプラズマの属する *Anaeroplasmata* group は動物マイコプラズ マよりも *Bacillus* 属により近縁であることを示唆した。

4. 種の分類基準

本研究結果から、ファイトプラズマの種の分類基準について、次のように結 論された。すなわち、16S rDNA 塩基配列の相同性が 97%以下の場合は、別種 としてよいと考えられる。それ以上の場合は、(1)媒介昆虫が異なる、(2)植物宿 主が異なる、あるいは明らかに病徴が異なる、(3)分子生物学的手法により、違 いを明らかにすることが可能である場合に、別種とすることができる。また、 既に暫定種の登録されている例を考慮すると、16S rDNA の相同性が 98.5%以上 の場合は、系統樹上の進化距離とブートストラップ値を考慮し、明らかに独立 したクラスターを構成している場合は、別種としてよいと考えられる。

以上を要するに、本研究ではアジア地域に発生するファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子の構造を決定し、データベース上で入手可能な全てのファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子とともに分子系統解析を行い、ファイトプラズマの分類体系を確立し、種の分類基準を提案した。その結果、*Phytoplasma* 属は 8 つの Group、28 の「暫定種」に相当する subgroup に分類した。この分類体系に基づいて、本研究で解析したファイトプラズマの一部について、近縁な subgroup との比較を詳細に行い、「暫定種」に分類されるべきものであることを明らかにし、提唱した。また、16S/23S ITS 領域は、種内の系統関係や *Phytoplasma* 属の系統学的位置を解析する上で有効であることを明らかにした。本研究により、ファイトプラズマの分子遺伝学的研究を行うための基盤的な知見を得ることが出来た。