

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 澤 柳 利 実

ファイトプラズマは農業上重要な植物病原細菌であり、主にヨコバイにより伝搬され、感染した植物に萎縮・黄化・叢生などの症状を引き起こす。培養が不可能なことから、その分類学的研究は困難であったが、近年、16S rRNA 遺伝子の解析が可能となった結果、ようやくその分類学的位置が明らかになりつつある。1994年の国際細菌分類委員会において、ファイトプラズマの分類は16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づき系統解析により行い、暫定種を設定することが決定された。

本研究は「種」の概念の導入をふまえ、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。

国内およびアジア諸国より蒐集したファイトプラズマ40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108分離株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により評価した。ファイトプラズマを8つの16S-group (I-VIII) に、さらにその中を「種」に該当する分類群であることを基準として合計29のsubgroupに分類した。

アジサイ葉化病 (JHP) に感染したアジサイから、ファイトプラズマを検出した。増幅された16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いた分子系統解析の結果JHPは、海外に発生するアジサイのファイトプラズマとは全く異なり、16S-group Iの新たなsubgroupを構成することが明らかになった。そこで、JHPに対し暫定種 '*Candidatus Phytoplasma japonicum*' を提唱した。

日本及び東南アジアのイネ科植物 (イネ、サトウキビ、ギョウギシバ、brachiaria grass) に発生する各種ファイトプラズマの16S rRNA 遺伝子による系統解析を行った。その結果、rice orange leaf (ROL) ファイトプラズマは16S-group Iであるが、他はいずれも16S-group VIIに分類された。特にイネ萎黄病 (RYD) ファイトプラズマの2分離株は、16S-group VIIの他のファイトプラズマと異なる分類群を形成すると判断されたことから、暫定種で '*Candidatus Phytoplasma oryzae*' を提唱した。

ナツメてんぐ巢病 (JWB) ファイトプラズマの5分離株について、16S rRNA 遺伝子による系統解析を行った結果、各分離株は非常に相同性が高く、16S-group VIIに独立したクラスターを形成した。このことから、暫定種 '*Candidatus Phytoplasma zizyphi*' を提唱した。

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た。そこで、ファイトプラズマ27分離株について、ITS領域の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、媒介昆虫特異性の異なる極めて近縁なファイトプラズマの系統間差を明らかにすることができた。また、ファイトプラズマのITS領域にはtRNA遺伝子があり、その配置は動物マイコプラズマよりも *Bacillus* 属細菌に類似していた。

以上の知見をもとに、ファイトプラズマの種の分類基準について、次のように考察した。すなわち、あるファイトプラズマ分離株からなる分類群が、16S rDNA塩基配列において他のファイトプラズマとの相同性が97%以下である場合には「種」と認めてよい。また、その基準にわずかに達しない分類群であっても、媒介昆虫や植物宿主あるいは病徴が大きく異なるなどの条件を満たす場合には、「種」として認めてよい。なお、この場合には、分子生物学的手法により、異なることが明瞭に示されることが望ましい。

以上の結果をもとに、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。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、「暫定種」の提案を行った。また、16S/23S ITS領域は、ファイトプラズマの種内における系統間差を解析する上で有効であることを明らかにした。

以上を要するに、本研究ではファイトプラズマの分類体系を確立し、その分類学的研究を行うための基盤的な知見を明らかにし、適用の可能性を論じたものであり、学術上・実用上寄与するところが極めて大きいものと判断される。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。