

論文の内容の要旨

生産・環境生物学 専攻
平成12年度博士課程 入学
氏 名 鄭 熙英
指導教官 日比 忠明

論文題目 Phylogenetic classification of phytoplasmas that occur in Korea
(韓国に発生するファイトプラズマの系統分類)

ファイトプラズマは、世界各地に発生し、数百以上の植物種に感染する農業上重要な植物病原細菌の一群である。しかしながら韓国では、約30のファイトプラズマ病の発生がこれまで報告されているのみで、その異同の詳細については明らかではない。近年、16S リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の RFLP 解析や塩基配列の系統解析により、ファイトプラズマが種に相当する複数の集団 (subgroup, sg) からなることが明らかになり、暫定種名により分類することが承認され、分類体系が提案されている。しかし、韓国に発生するファイトプラズマの分類体系と世界に発生するファイトプラズマにおける系統学的位置づけは未だに確立されておらず、分類の指標となるデータベースも構築されていない。そこで本研究では、新たに見出したこれまで未記載の韓国産ファイトプラズマを記載・分類すると共に、既報の韓国産ファイトプラズマと併せて、rRNA 遺伝子を用いて分子系統学的解析を行い、韓国産ファイトプラズマの分類体系を確立するとともに、世界に発生するファイトプラズマに対するその位置づけとそれらを合わせた系統学的な分類体系を再検討することを目的に行った。

1. *rrn*の構造解析と選択的PCR増幅法の確立

まず 16S rRNA 遺伝子を用いた分子系統学的解析手法の再検討を行った。ファイトプラズマの染色体 DNA にはリボソーム RNA オペロン(*rrn*)が2つあり、それらの 16S rRNA 遺伝子の配列には時に違いのあることが RFLP 等の解析により示唆されていた。しかし、rRNA 遺伝子の塩基配列をもとにファイトプラズマの系統分類が行われているにもかかわらず、その配列の違いに配慮した系統分類はこれまでなされていなかった。特に、16S rRNA 遺伝子の PCR 産物内に異なる2種類の配列が混在することにより、ダイレクトシーケンシングによる配列決定に誤りや解析不能が生じる。そこで、本研究では2つの *rrn* の構造を初めて決定し、それぞれを判別して増幅できる PCR プライマーセットをデザインし、PCR 増幅および構造決定ののち系統解析を行い、ゲノム上の2つの 16S rRNA 遺伝子の構造的差異を考慮した系統解析を行い、系統分類を再検討した。

まず、ファイトプラズマで最大の分類群 aster yellows (AY) 16Sgroup の分離株の一つであるタマネギ萎黄病(OY)ファイトプラズマのゲノム DNA ライブラリーから *rrn* をスクリーニングし、2種類の異なる *rrns* (*rrnA*, *rrnB*)とその周辺領域の全塩基配列を決定した。その結果、両オペロンを通じて 5' -16S-23S-5S-3' という rRNAs の配置は保存されていたが、その周囲の遺伝子構成には差が認められた。すなわち、両者のプロモーター配列を含む上流域の相同性は低く、また、5S rRNA の下流域において、*rrnA* では、Val-Asn の順で tRNA 遺伝子が2つだけコードされていたが、*rrnB* では Val-Thr-Lys-Leu-Ala-Met-Met-Ser-Met-Asp-Phe の順で 11 個の tRNA 遺伝子が認められた。

そこで、ファイトプラズマの2つの *rrn* を PCR によりそれぞれ選択的に増幅するプライマーセット (*rrnAF/rrnAR*, *rrnBF/rrnBR*) を設計し、6つの 16S-group、22 のファイトプラズマ分離株について LA-PCR を行ったところ、そのいずれからも、予想される長さの *rrnA* (約 5.0-kbp) および *rrnB* (約 5.7-kbp) の増幅 DNA 断片がそれぞれ特異的に増幅された。それらの塩基配列を解析し、増幅された DNA がそれぞれ予想された *rrn* であることを確認した。しかも、両 *rrn* の rRNA 遺伝子および tRNA 遺伝子群の構成は、一部のファイトプラズマを除き保存されていたこのように、ファイトプラズマはそのゲノムサイズや 16SrRNA 遺伝子の系統学的関係において多様であるにも関わらず *rrn* の遺伝子構造は保存されており、他の *Mollicutes* 綱細菌とは異にすることが明らかになった。

一方、それぞれの分離株から得られた両 *rrn* にコードされる 16S rRNA 遺伝子の相同性を比較したところ、99.6~100%であった。しかし、それぞれ一方の 16S rRNA 遺伝子をもとに Clustal W を用いてアラインメントを行い、Parsimony 法および近隣結合法により系統樹を作成したところ、クラスター形成や進化距離および Bootstrap 値に差が認められたことから、より正確な系統解析を行う際には 2 種類の 16S rRNA 遺伝子のうち、どちらか一方の配列を用いて解析すべきであると考えられた。そこで本研究では *rrnA* の 16S rRNA 遺伝子を用いることにした。2 つの *rrn* を PCR によりそれぞれ選択的に増幅するこのプライマーセットは、これまで区別できなかった両オペロンの違いを明らかにできるのみならず、ダイレクトシーケンシングにおける解析不能なケースを解消するものであり、より正確な系統分類ができるものと期待される。本研究では、本手法を用いて系統解析を行った。

2. 韓国に発生するファイトプラズマの同定と系統分類

韓国各地より、典型的なファイトプラズマ病の症状を呈するセリ、ノブドウ、クリ、ジャガイモ、キリ、クワ、ナツメ、ヌルデを蒐集し、ファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子や 16S/23S spacer 領域を特異的に増幅するユニバーサルプライマー(SN910601/SN011119)を用いた PCR により、ファイトプラズマの検出を試みた。その結果、そのいずれからもファイトプラズマに特異的な約 1.8-kbp の健全植物には認められない DNA 断片が増幅され、ファイトプラズマ感染が確認された。そこでそれらのファイトプラズマの系統学的類縁関係を調べる目的で、選択的に PCR 増幅した 2 つの *rrn* にコードされる 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定し、それぞれについて分離株間の相同性をしらべたところ、99.7~100%であった。

一方、*rrnA* の 16S rRNA 遺伝子を用いて系統解析を行ったところ、**i)**water dropwort witches' broom (WDWB)病罹病株より分離されたファイトプラズマは、日本産 OY ファイトプラズマと 100%の相同性を示し、AY 16S-group AY sg に分類された。**ii)**paulownia witches' broom (PaWB)病罹病キリより検出されたファイトプラズマは、WDWB と 99.7%の相同性を、他の AY sg のファイトプラズマとは 99.1~99.9%の相同性を示し、同様に AY sg に分類された。**iii)**新規に porcelain vine witches' broom (PvWB)病罹病ノブドウより検出されたファイトプラズマは mulberry dwarf 病罹病クワより検出されたファイトプラズマや sumac witches' broom (SWB) 病罹病ヌルデより検出されたファイトプラズマと同一であり、さらに、チェコ

産 rape phyllody (RaP) phytoplasmaとも 100%の相同性を示したことから、この4つの宿主から分離されたファイトプラズマは、AY sg に分類されるごく近縁な分離株であると考えられた。iv) potato witches' broom (PWB)病罹病ジャガイモより検出されたファイトプラズマは elm yellows (EY) 16Sgroupの clover proliferation (CP)sg の分離株と 98.6~99.7%の相同性を示し、近隣結合法による系統樹の解析から PWB phytoplasmaは CP sg に分類された。v) chestnut witches' broom (CnWB)病罹病クリより検出されたファイトプラズマは、既報の全てのファイトプラズマとの 16S rRNA 遺伝子の相同性が 95%以下であり、近隣結合法により作成した系統樹による解析から *Pinus sylvestris*yellows phytoplasma と共に新規の 16S-group を形成する既報のファイトプラズマとは異なる独立した分類群と判断されたため、このファイトプラズマを新暫定種 *Candidatus* Phytoplasma castaneaeと命名した。vi)jujube witches' broom (JWB)病に罹病した多数のナツメから検出されたファイトプラズマは、既報の中国産、日本産及び韓国産 JWB phytoplasmaとと共に EY 16S-groupの中に JWB sg を形成した。JWB ファイトプラズマは宿主や発生地域が特徴的なことから、独立した分類群として新暫定種 *Candidatus* Phytoplasma ziziphi を登録した。また、これらのデータをもとに、世界中のファイトプラズマの 16S rRNA 遺伝子のデータを用いてファイトプラズマの系統分類解析を行った結果、世界各地に発生するファイトプラズマは 10 の 16S-group に分類され、それらはさらに、36 の sg に分類された。

以上を要するに、本研究では、これまで未記載の韓国産ファイトプラズマを新たに見出し、記載・分類すると共に、既報の韓国産ファイトプラズマと併せて、系統学的解析を行った結果、韓国に発生する既報のファイトプラズマは少なくとも3つの 16S-group と4つの sg に分類されることを明らかにした。また、ゲノムに2つコードされる 16S rRNA 遺伝子を選択的に増幅する PCR 法を確立したほか、ファイトプラズマの分類体系を再検討し、ファイトプラズマは 10 の 16S-group、36 の sg に分類されることを明らかにした。以上の成果は、ファイトプラズマの系統分類法の新たな実験手法を確立し、韓国に発生するファイトプラズマを初めて系統学的に解析するとともに、ファイトプラズマの最新の分類体系を明らかにした。