

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鄭 熙英

韓国では、これまで約30種類の phytoplasma 病の発生が報告されているが、それらの分類体系と世界に発生する phytoplasma に対する系統学的位置づけは未だ確立されておらず、分類の指標となるデータベースも構築されていない。本研究では、新たに見出したこれまで未記載の韓国産 phytoplasma を記載・分類すると共に、既報の韓国産 phytoplasma と併せ、rRNA 遺伝子を用いた分子系統学的解析を行い、韓国産 phytoplasma の分類体系を確立するとともに、世界に発生する phytoplasma に対する系統学的位置を明らかにする目的で行った。

1. Ribosomal RNA operon (*rrn*) の構造解析と選択的 PCR 増幅法の確立

Onion yellows phytoplasma の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、その配列と既報の loofah witches' broom phytoplasma および Acholeplasma の *rrn* の塩基配列を比較し、phytoplasma 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を設計した。次いで、6つの 16S-group、22の phytoplasma 分離株について LA-PCR を行い、増幅 DNA 産物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。また、それぞれの分離株から得られた両 *rrn* の 16S rRNA 遺伝子 (16S) の相同性を比較した結果、99.6~100%であった。そこで、それぞれ一方の 16S を基に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には2種類の 16S 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。また、この手法は、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した。そこで本研究では、この手法により *rrnA* の 16S を用いた系統解析を行った。

2. 韓国に発生する phytoplasma の同定と系統分類

韓国各地より、典型的な phytoplasma 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、phytoplasma 特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、そのいずれからも健全植物には認められない phytoplasma 特異的な DNA 断片が増幅され、phytoplasma 感染を確認した。そこでそれらの phytoplasma の系統学的類縁関係を調べる目的で、上記手法を用いて *rrnA* の 16S による系統解析を行ったところ、water dropwort witches'

broom、paulownia witches' broom、porcelain vine witches' broom、mulberry dwarf および sumac witches' broom 病の罹病植物より検出された phytoplasma は、aster yellows (AY) 16S-group の AY subgroup (sg) に分類されるごく近縁な分離株であると考えられた。Potato witches' broom phytoplasma は elm yellows (EY) 16S-group の clover proliferation sg に分類された。Chestnut witches' broom phytoplasma は、既報の全ての phytoplasma との 16S の相同性が 95% 以下であり、既報の phytoplasma とは異なる独立した分類群と判断されたため、新暫定種 *Candidatus Phytoplasma castaneae* と命名した。Jujube witches' broom (JWB) phytoplasma は、EY 16S-group に属し、EY sg と近縁であるものの、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 phytoplasma の 16S の配列データを用いて phytoplasma の系統解析を行った結果、世界各地に発生する phytoplasma は 10 の 16S-group、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 phytoplasma を新たに見出し、記載・分類すると共に、既報の韓国産 phytoplasma 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 phytoplasma 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 を選択的に増幅する PCR 法を確立したほか、phytoplasma の分類体系を再検討し、phytoplasma は 10 の 16S-group、36 の sg に分類されることを明らかにした。これらの成果は、phytoplasma の系統分類法に新たな実験手法を導入し、韓国に発生する phytoplasma の分類体系を初めて明らかにしたものであり、学術上・応用上の価値もきわめて高く、特に防除および検疫の面においても今後非常に役立つ知見であり、高く評価される。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。