

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 慶 範

従来の形態や生理・生化学的形質に基づく分類法と化学分類的方法による細菌の分類・同定は新属新種の分類において欠かせないものだが、微生物の系統学的な分類に用いるには難点がある。近年の遺伝学的な技術の発展に伴い微生物の分類体系が変化してきた。遺伝形質による分類・同定は生育条件の影響をほとんど受けず、安定したデータが得られるし、そのデータは常に数値により評価しやすい。特に分子時計と呼ばれるリボゾーム RNA (rRNA) は系統学的分類において最も注目され、利用されている。これまで遺伝子 database に報告されてる rRNA (特に 16S rRNA) の数は数万件に至る。本論文では遺伝学的方法及び遺伝子 database の 16S rRNA 塩基配列の情報を利用して Proteobacteria の alpha、beta の 2 つの class に対する系統解析、植物根の蛍光性 *Pseudomonas* の系統的な分類を行った結果を 3 章でまとめた。

序論に続く第 2 章では、Proteobacteria の系統的体系を確立する研究をおこなった。16S rRNA の情報は DNA database に莫大な数が保存されているが、ARB database は特に 16S rRNA 配列だけを整理したもので、またアライメントデータや系統解析の情報も整理されているため、今回の研究ではこの Database の情報を基本として用いた。しかしながら、ARB のアライメントは菌種間で大きく 2 次構造の異なる部分を含めて系統解析が行われており、正確な系統樹を作成するには問題がある。そこで、本解析では GenBank/EMBL/DDBJ databases より引用したデータのうち 1,350bp 以上の塩基配列が決定されているもののみを使用し、系統解析は MOLPHY(version 2.3b3)を用いた最尤法で行い、比較した塩基配列は二次構造の変化の激しい部分と、欠失や解読不能な部分を除いたものを使用した。また、ARB database(ssujun02. arb version)と Bergey's Manual of Systematic Bacteriology を系統解析の比較対象として用いた。この研究の結果として得られた系統樹は ARB の系統樹とはクラスターのトポロジーは異なる。また、メインとなるクラスター間の中間的な位置にくる菌種を削除するとクラスター間のトポロジーは大きく変化するため、クラスター間のトポロジーは信頼性に欠けるものと考えられた。しかしながら、メインとなるクラスター自体は使用するデータセットを変えても変化しない安定なものであり、また、ARB のクラスターと基本的に同じ集団で構成されるものであった。したがって、メインとなる各クラスターは分類群としてしっかりと隔てら

れた集団と考えられ、これらを Order および Family の基本単位とすることはなんら問題のないことと判断した。本研究で作成される系統樹は ARB のものと比べてクラスター間を隔てる枝が非常に長くなり、またブートストラップ値も大きなクラスター間ではほとんどが 100% に近い数値を示し、信頼性の高いものと判断した。また、この研究において得られた系統関係は Bergey's Manual で示されている分類体系とも異なっていた。最終的には、Class Alphaproteobacteria については、7 目 14 科からなる分類体系を、Class Betaproteobacteria については、2 目 8 科からなる分類体系を提案した。

第 3 章では植物根に生息する蛍光性 *Pseudomonas* の分類体系を確立する研究を行った。植物根の蛍光性 *Pseudomonas* は植物に対して病原菌に対する拮抗性、植物病原性作用、植物ホルモン調節などさまざまな作用を行うことが報告されているが、系統学的な分類の報告は少ない。系統学的な分類の理解は植物と蛍光性 *Pseudomonas* の相互作用の理解の基礎となる。そこで、本研究では植物根からできるだけ多くの蛍光性 *Pseudomonas* を分離し、それらの系統的分類を行った。長野県の伍賀土壌などから分離された 471 株に対して biovar を識別する生理・生化学試験を行った。生理・生化学試験から選別された菌株に対して 16S rRNA の部分塩基配列により系統解析を行った。最後に蛍光性 *Pseudomonas* の既知種の基準株に対する DNA-DNA hybridization を行った。生理・生化学試験と 16S rRNA 塩基配列の系統樹では非常に多様な蛍光性 *Pseudomonas* の存在が確認された。さらに、DNA-DNA hybridization では、既知の種や *P. fluorescens* の 5 つの biovar および *P. putida* の 2 つの biovar と種レベルの類縁性を示さない非常に多様な種を含むことが示された。

以上、本論文は *Pseudomonas* 属を中心とした Proteobacteria の系統分類学的研究を行ったものであり、新しい分類体系を提案するなど、学術上貢献するところが少なくない。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があるものと認めた。