

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 落合弘和

Xanthomonas 属細菌は、各種植物に病原性を有する細菌で構成されている。近年、本属細菌は、DNA相同性解析に基づいて再分類が行われ、遺伝的類縁関係を評価する基準として利用されてきたが、DNA相同性が客観性を示せるかという問題が指摘されている。また、本属細菌は多数の病原型 (pathovar) として細分類がなされており、それらの系統解析も必要である。そこで本研究では、rRNAオペロン、*gyrB*遺伝子および病原性関連遺伝子等を指標とした多型解析や塩基配列解析によって、本属細菌群の遺伝的な類縁関係と多様性について解析した。

1. *Xanthomonas* 属細菌の遺伝的類縁関係

まず、rRNAオペロンを指標としたPCR-RFLPによる多型解析および23S rRNA遺伝子と16S-23Sスペーサー領域の塩基配列解析を行ったところ、本属細菌は13のタイプに類別され、さらに、大きく2つの系統に類別されることが示された。一方、*gyrB*遺伝子の塩基配列解析では、本属細菌は大きく3つの系統に類別されることが示された。*gyrB*遺伝子の変異は同義的塩基置換が多いことなどが示された。*hrpX*遺伝子の塩基配列解析では、本遺伝子がより変異に富み、多様性が大きいこと、その塩基配列にはアミノ酸置換を伴う塩基置換が多数存在することが示された。さらに、*hrp*遺伝子クラスターの多型解析から、本属細菌は38タイプに類別された。また、非病原性遺伝子群はその分布や遺伝子数ともに多様性に富んでいることが示された。挿入配列の解析では、それらが一様に分布しているのではなく、菌種ごとに分布パターン及びコピー数に特徴があることが明らかになった。

2. イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) とイネ条斑細菌病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzicola*) の遺伝的関係

X. oryzae 種は、イネ白葉枯病菌とイネ条斑細菌病菌の2つの病原型で構成されているが、両者の感染様式は大きく異なっている。しかし、両病原型は生理・生化学的諸性質が非常に類似しているため、それらの特性によって両病原型を明確に識別することは困難である。そこで、DNA

レベルでの両病原型間の差異を解析した。その結果、*gumD*で多型が見出されたが、さらに*gyrB*遺伝子など合計5種の遺伝子の塩基配列を比較したところ、両病原型の差異は僅か数塩基であった。しかし、得られたすべての塩基配列を基に系統解析を行った結果、両病原型は近縁ではあるが分子系統的には互いに異なることが明らかになった。また、*hrp*遺伝子クラスター内に新たに見出された遺伝子を指標としたPCRによって、両病原型を特異的に検出する技術を開発した。一方、各種挿入配列の比較によって、それぞれの挿入配列は両病原型においてゲノム内でのコピー数が異なるとともに、多型パターンがそれぞれ特徴的であることが明らかになった。なお、菌体外加水分解酵素類の分泌について比較した結果、イネ白葉枯病菌のみにカルボキシメチルセルラーゼ活性が、イネ条斑細菌病菌のみにプロテアーゼ活性が、それぞれ検出された。

3. イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) の遺伝的多様性

イネ白葉枯病菌にはイネ品種に対し病原性を異にする多数のレースの存在が知られている。そこで、本細菌の系統関係や病原性(レース)分化についてDNA解析を行った。その結果、スリランカ産菌株群はスリランカ在来型系統と近隣のインド型系統、日本産菌株群は日本在来型系統と近隣の中国型系統によって、それぞれ構成されていることが明らかになった。最後に、日本産菌株の*avr* / *pth*遺伝子群を単離し、それらの塩基配列及びその近傍領域の構造を決定した結果、*avr*遺伝子群は複数のクラスターを形成し、ゲノム上の異なる7カ所に分散していることが明らかになった。

以上を要するに、本研究によって、*Xanthomonas* 属細菌群は*gyrB*遺伝子等の塩基配列に基づいた系統解析から、3つの分子系統的グループで構成されることが明らかになった。一方、イネ白葉枯病菌とイネ条斑細菌病菌の比較から、病原型の分化は、*hrp*遺伝子などの病原性関連遺伝子群の連続的な変異の蓄積や挿入配列によるダイナミックなゲノム構造の変化に伴って、特定の表現型が変異することによって引き起こされると推定した。また、イネ白葉枯病菌におけるレース分化の要因は、挿入配列等を介した*avr*遺伝子群の導入や複製、栽培品種の変遷等による*avr*遺伝子の変異の蓄積などによって引き起こされると推察した。本研究で得られた成果は学術上、応用上寄与するところが大きい。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あるものと認めた。