

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	千 秋 祐 也
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 岩 井 久 (
	副査 鹿児島大学 教授 津 田 勝 男
	副査 佐賀大学 教授 大 島 一 里
	副査 佐賀大学 准教授 草 場 基 章
	副査 鹿児島大学 准教授 中 村 正 幸
審査協力者	印
実施年月日	平成 27年 12月 26日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成27年12月26日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

千 秋 祐 也

[質問 1]

スマトラ島内の東西南北から採取したバナナ葉より、BBTVに関連する DNA を抽出し、塩基配列を決定して、解析に供しているが、各サンプル葉につき何クローンを決定して供したのか？また同じサンプルから得たクローン間に異同はなかったか？

[回答 1]

RT-PCR 増幅産物をプラスミドにクローニングしたものを 3 クローンずつひろって配列を決定した。大半において 3 クローンの配列は一致していたものの、たまに数塩基異なるものが、1 クローンあった。その場合、他の 2 クローンを、そのサンプルの正しい配列と見做し、採集地域間の選択圧の比較や遺伝子交流の解析に供試した。

[質問 2]

その場合、解析から除外したクローンの配列も重視すべきではなかったか？ LB 寒天培地で拾えるクローンを、できるだけ多数比較することによって、個体内でのマイナーなウイルス遺伝子の存在を検知でき、地域間の比較に入る前に、1 樹体内での多様性を検出できた可能性がある。1 サンプル葉につき少なくとも 20 クローンくらいは解析してみる必要があったのではないか？

[回答 2]

地域間でのウイルスゲノムの比較に傾倒するあまり、個体内部でのウイルスゲノムの解析は後回しにしていた。確かに 3 クローン中 2 クローンの配列が、真にその個体でドミナント（優先的）なゲノムの性状を示しているのかどうかは厳密には担保されていない。現地の数本の個体を対象として、ご意見に従った検討をする必要がある。

[質問 3]

スマトラ島内の BBTV は多様性が低かったということだが、多様性が低いウイルス集団内で、組み換えを見つけることができるのか？

[回答 3]

スマトラ島の株のみを使って組み換え解析をしたのではなくて、現在までに報告されている他の地域・国の株を全て含んだ形で、組み換え解析を行った。

[質問 4]

BBTV の中立平衡解析において、日本の集団のみが、いずれの検定法においても DNA-R が負の値（集団増加傾向）で DNA-S が正の値（集団減少傾向）になったのはなぜか？

[回答 4]

日本の集団はサンプルの数が少なかったことと、DNA-S の相同性は異なった国や地域間で高い傾向にあるので、DNA-S 自体が集団サイズの解析には不向きなのかも知れない。なお、日本で発生した BBTV は 10 年ほど前に報告された数株のみで、現在の野外では認められず、病原力が低い特殊な集団であった可能性もある。

[質問 5]

BBTV の遺伝子流動解析において、全体的に交流が稀な場合が多いのはなぜか？アブラムシで伝染するならば、集団間の交流はもっと頻繁に起こると考えられるか？

[回答 5]

アブラムシは、地域間・他国間の長距離移動に、ほとんど関与していないと考えられる。感染した栄養繁殖体の人為的な運搬において、ウイルスのゲノムは安定した形で維持され、新しい地域に定着した後に当地で虫媒伝染が繰り返され、集団としての特徴がボトルネック的に生じるものとする。これは EAPV でも同様だと考える。

[質問 6]

EAPV の集団変異に関して、先行研究（2010 年）と今回（2014 年）のゲノム配列を比べると、（EAPV を含む）*Potyvirus* 属ウイルスの一般的な進化速度に比べて、スピードが速過ぎる印象を持った。集団の経年変化を検討する中で、そもそも、先行結果と今回の結果間で、異なる集団を比較した可能性はないか？すなわち 2010 年の集団内にも既に今回と同じ遺伝子型が存在していたにもかかわらず見逃していた可能性はないか？今回のような永年果樹の場合、同じ植物体内でも、十分に離れた部位には異なったウイルス集団（クアジスピーシーズ）が顕在化している可能性がある。採取方法やシーケンスの方法について、再度詳しく伺いたい。

[回答 6]

ここでは、先行研究と同一の植物体に対し、ダイレクトシーケンス法を用いた追跡調査を行った。ただし、まったく同じ枝から採取したわけではない。前回と今回とでは、同一植物ではあっても、その中から偶々別集団のウイルスを拾った可能性を否定はできない。今後この研究を継続する中で、同一植物体の距離的に離れた枝から罹病葉を採取し、それぞれの材料に対して、ダイレクトシーケンス法ではなく、クローニング法によって、できるだけ多くのゲノムの塩基配列を調べることにより、優先でないゲノムがどの程度存在しているかどうかを確認し、今回の結果を裏付けたい。

[質問 7]

EAPV の方が BBTV よりも変異が入り易いのは何故か？

[回答 7]

DNA ウイルス（BBTV）は宿主のポリメラーゼを使うので複製の際のミスマッチを修正できるが、RNA ウイルス（EAPV）の場合は自前の RNA ポリメラーゼを利用するので修正機能が無く、その結果、頻繁に突然変異が起こる。

[質問 8]

今回のような研究を行う場合は、時として、PCR の際のポリメラーゼのエラー率が影響するのではないか？

[回答 8]

今回は、既報において精度が高いと報告されている酵素を用いたが、厳密には、カタログ上のスペックを鵜呑みにせず、既知配列を組み込んだプラスミドをテンプレートにして、正確なエラー率を求める必要があるかもしれない。