

学 位 論 文 要 旨

氏 名 富高 保弘

題 目 東アジアにおけるカブモザイクウイルスの系統地理学的・集団遺伝学的研究
(A study on phylogeography and population genetics of *Turnip mosaic virus* in East Asia)

系統地理学的・集団遺伝学的アプローチにより動植物種および微生物種で集団遺伝構造の研究が行われている。ヒト免疫不全ウイルスやデングウイルスなどの動物ウイルスでは、そのアプローチから地理的分布や拡散が解析されているが、植物ウイルスではほとんど行われていなかった。そこで本研究では、多くの植物種、中でもアブラナ科植物に感染する *Potyvirus* 科、*Potyvirus* 属のカブモザイクウイルス (TuMV) を東アジアから採集し、それらの集団遺伝構造を系統地理学的・集団遺伝学的アプローチにより解析した。TuMV は 700-750 nm の紐状ウイルスで、約 10,000 塩基から構成される一本鎖のプラス鎖 RNA のシングルコピーのゲノムを粒子内に持つ。また TuMV ゲノムは両末端に非翻訳領域、その間に一つの大きなオープンリーディングフレームを持ち、翻訳後最低 10 種類のタンパク質に切断されると考えられている。

東アジアから TuMV 118 分離株を採集し、宿主型の決定および系統地理学的・集団遺伝学的アプローチから塩基配列の比較を行い、集団遺伝構造を調査した。その結果、中国産分離株のうち *Brassica* 属植物から採集した分離株は *Brassica* 属植物のみに感染し、一方本邦産分離株のほとんどが *Brassica* および *Raphanus* 属植物に感染した。それら分離株ゲノムの 5 遺伝子領域における組換え部位の解析結果は、分子系統解析で得られた結果と矛盾はなく、また非組換え体集団の 1 つの basal-BR リネージは九州全域で 2000 年以降に認められた。さらに中立平衡モデルからの偏り、低い遺伝的多様性および mismatch distribution 解析により basal-BR リネージの突発的拡散が支持されていた。以上より、中国と本邦では一部の集団は共通していたが、主な集団は異なることが明らかとなった。

次に、九州と本州中央部における TuMV の集団遺伝構造を系統地理学的・集団遺伝学的アプローチにより比較した。すなわち分離株の宿主型の決定および塩基配列の比較を行った。その結果、連結した 5 遺伝子領域の分子系統解析から、1997 年から 2001 年に採集された本州産 49 分離株中 32 分離株は、九州産分離株 64 分離株中 23 分離株と同様に basal-BR グループに属し、それら分離株はすべて *Brassica* および *Raphanus* 属植物に感染性を示した。しかしながら、最低 4 つのリネージ内組換え体型が連結した 5 遺伝子領域の組換え部位解析から認められ、それら組換え体型は九州と本州中央部で遺伝的に全く異なっていた。以上より、九州と本州中央部では異なる basal-BR サブ集団が拡散していると思われた。

以上より本研究は、植物ウイルスの集団遺伝構造について系統地理学的・集団遺伝学的アプローチにより詳細に調査した初めての報告と思われる。

学 位 論 文 要 旨

| | |
|-----|--|
| 氏 名 | Yasuhiro Tomitaka |
| 題 目 | A study on phylogeography and population genetics of <i>Turnip mosaic virus</i> in East Asia (東アジアにおけるカブモザイクウイルスの系統地理学的・集団遺伝学的研究) |

Studies on the genetic structures utilizing the phylogeographic and population genetic approach have been reported for many animal, plant and microorganism species. In case of animal viruses such as *Human immunodeficiency virus* and *Dengue virus*, their geographic distribution and migration were assessed, on the contrary, only few studies were assessed for plant viruses. In this study, the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* (TuMV) collected in East Asia was assessed utilizing phylogeographic and population genetic approach. TuMV belongs to the genus *Potyvirus* in the family *Potyviridae*, which infect a wide range of plant species, mostly from the family *Brassicaceae*. TuMV has flexuous filamentous particles 700-750 nm long, each of which contains a single copy of the genome, which is a single-stranded positive sense RNA molecule of about 10,000 nucleotides. TuMV genome has terminal untranslated regions flanking a single open reading frame. The single large polyprotein hydrolyses itself after translation into at least ten proteins.

The genetic structure of populations of TuMV in East Asia was assessed by making host range and gene sequence comparisons of 118 isolates utilizing the phylogeographic and population genetic approach. Most, but not all, isolates collected from *Brassica* plants in China infected only *Brassica* plants, whereas those from Japan infected both *Brassica* and *Raphanus* plants. Analyses of the positions of recombination sites in five regions of the genomes of the many recombinant isolates were fully congruent with the results of phylogenetic analysis, and at least one recombination pattern was shared between Chinese and Japanese populations. One lineage of nonrecombinant isolates from the basal-BR lineage was found in 2000 in Kyushu, Japan but none in China, and has since been found over the whole island. The sudden expansion of this basal-BR population was strongly supported by calculations showing the deviations from the neutral equilibrium model for the individual geographical lineages with overall lack of nucleotide diversity, and by analysis of mismatch distribution. This study shows that the Chinese and Japanese TuMV isolates are part of the same population but are discrete lineages.

The genetic structure of the populations of TuMV in Kyushu and central Honshu, Japan was assessed by the phylogeographic and population genetic approach. The host specificity of isolates was determined, and their gene sequences compared. Phylogenetic analysis of five regions of the concatenated genomic sequences revealed that 32 out of 49 Honshu isolates collected during 1997-2001 belonged to the basal-BR group as too did 23 out of 64 isolates from Kyushu. All these basal-BR isolates infected both *Brassica* and *Raphanus* plants. However analyses of the positions of recombination sites in five regions of the genome showed that at least four intralinesage recombinants were present in these populations. These analyses showed that Kyushu and Honshu shared none of these subpopulations, and genetically distinct basal-BR populations were present in the two districts. It seems that different basal-BR subpopulations had expanded in those districts.

This study shows the first report on the detailed genetic structure of a plant virus population utilizing phylogeographic and population genetic approach.

学位論文審査結果の要旨

| | |
|---|---|
| 学位申請者 氏名 | 富高 保弘 |
| 審査委員 | 主査 佐賀大学 教授 大島 一里 |
| | 副査 佐賀大学 助教授 草場 基章 |
| | 副査 宮崎大学 教授 上運天 博 |
| | 副査 鹿児島大学 教授 岩井 久 |
| | 副査 琉球大学 教授 諸見里 善一 |
| 審査協力者 | |
| 題目 | <p>東アジアにおけるカブモザイクウイルスの系統地理学的・集団遺伝学的研究 (A study on phylogeography and population genetics of <i>Turnip mosaic virus</i> in East Asia)</p> |
| <p>系統地理学的・集団遺伝学的解析により、様々な動植物、微生物さらに効果的なワクチン開発のために動物ウイルスで集団遺伝構造の研究が盛んに行われている。一方、植物ウイルスの集団遺伝構造の研究は、植物防疫や植物ウイルス病防除に重要な提言をするにも係わらず、これまで蓄積された各種植物ウイルスのゲノム情報が乏しいために大幅に遅れていた。そこで本論文では、アブラナ科植物などの農作物に大きな被害を与えている <i>Potyvirus</i> 科、<i>Potyvirus</i> 属のカブモザイクウイルス (<i>Turnip mosaic virus</i>; TuMV) を本邦から大量に採集後、それらゲノム構造の一部を明らかにし、東アジア中でも中華人民共和国と本邦、さらに本邦内の2地方間の集団遺伝構造を系統地理学的・集団遺伝学的に比較し考察した。</p> <p>中華人民共和国と本邦の九州地方の約120分離株について宿主型を調査したところ、<i>Brassica</i> 属植物から採集した中華人民共和国産分離株の多くは <i>Brassica</i> 属植物のみに感染する <i>Brassica</i> (B) 宿主型であるのに対して、ほとんどの本邦産分離株は <i>Brassica</i> および <i>Raphanus</i> 属植物に感染する <i>Brassica-Raphanus</i> (BR) 宿主型であり、ウイルスを分離した植物とウイルスの病原性との関係は両国間で異なっていた。九州地方産分離株ゲノムの一部領域(各分離株約3000塩基)について</p> | |

塩基配列を決定し、中華人民共和国と本邦産分離株の塩基配列について組換え部位を解析したところ、最低1つの組換え体型が両国間で共通して見られたが、多くは異なる組換え体型であった。分子系統解析から、中華人民共和国では Asian-BR および world-B 遺伝集団に属する分離株が見られたのに対して、九州地方では中華人民共和国には見られない basal-BR 遺伝集団に属する分離株が多く認められた。そこで中華人民共和国および九州地方産分離株を 1999 年以前と 2000 年以降に採集された分離株に分けて分子系統解析を行ったところ、九州地方では basal-BR 遺伝集団が 2000 年以降の系統樹にのみ見られ、低い遺伝的多様性、中立平衡モデルからの偏りおよび mismatch distribution 解析により、九州地方の basal-BR 遺伝集団の中の一サブ集団は 2000 年以降突発的に拡散してきたことが明らかとなった。

研究を進展させ、九州地方と本州中央部に位置する中部地方における TuMV の集団遺伝構造を約 110 分離株用いて比較した。2 地方間のウイルスを分離した植物とウイルスの病原性との関係は似たような結果を示したことから、本邦内の集団は生物学的に類似した集団であることが明らかとなった。中部地方産分離株のゲノム中央部の約 1000 塩基について分子系統解析を行ったところ、九州地方だけでなく中部地方でも多くの分離株が basal-BR 遺伝集団に属し、この集団が中部地方でも優位に存在していたが、basal-BR 各分離株ゲノムの約 3000 塩基の塩基配列における組換え部位解析と分子系統解析からは、組換え体型さらに非組換え型共に異なっており、両地方では異なる basal-BR 遺伝集団が拡散したように思われた。低い遺伝的多様性、中立平衡モデルからの偏りおよび mismatch distribution 解析により、両地方で basal-BR サブ集団が最近突発的に拡散してきたことが明らかとなったが、この優位な集団がどちらの地方で先に拡散したのかは明らかでなかった。

以上より本論文は、中華人民共和国と本邦の TuMV 集団の遺伝構造は異なり、九州地方では 2000 年以降に中華人民共和国には見られない新興集団が出現し優位な集団として存在していること、また本邦のような小さな国でも地方により集団遺伝構造が異なっていることを明らかとした。

本論文は、系統地理学的・集団遺伝学的解析により東アジア地域のウイルス集団について集団遺伝構造を詳細に解析した植物ウイルスとしての最初の研究と思われ、本研究で得られた知見は、各国の植物防疫のあり方やアブラナ科植物の育種に影響を与え、さらに国内の罹病植物の移動についても注意を促したことから、植物病理学上の貢献は大きいと思われる。従って、博士（農学）の学位論文として十分に価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨

| | | | |
|--|-------------------|----------|--|
| 学位申請者 氏名 | 富高 保弘 | | |
| 審査委員 | 主査 | 佐賀大学 教授 | 大島 一里 |
| | 副査 | 佐賀大学 助教授 | 草場 基章 |
| | 副査 | 宮崎大学 教授 | 上運天 博 |
| | 副査 | 鹿児島大学 教授 | 岩井 久 |
| | 副査 | 琉球大学 教授 | 諸見里 善一 |
| 審査協力者 | | | |
| 実施年月日 | 平成 18 年 12 月 25 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>主査及び副査は、平成 18 年 12 月 25 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

富高 保弘

[質問1] 九州においてbasal-BR遺伝集団はどのような分布を示すのか。

[回答1] basal-BR遺伝集団に属する分離株は九州全域で発生が認められますが、特に九州南部で多く認められる傾向にあります。

[質問2] 九州へのbasal-BR遺伝集団の侵入経路として南西諸島について検討したか。

[回答2] 本研究では南西諸島からの進入経路については検討していませんので、今後検討したいと思います。

[質問3] これまでにTuMVの種子伝染の報告はあるか。

[回答3] TuMVはダイコンの未熟種子で種子伝染すると報告されていますが、口頭発表の要旨としてのみであり論文としては公表されていません。

[質問4] 組換えに重要な宿主タンパク質は知られているか。

[回答4] 植物体ではそのような報告は認められないが、酵母における植物ウイルスの組換えの研究では、宿主のタンパク質が組換えに影響することが報告されています。

[質問5] TuMVは多くの宿主に感染することができるが、宿主の属を超えて感染する際、例えば*Brassica*属から*Raphanus*属植物に宿主を変える際に、どのようなメカニズムが考えられるか。

[回答5] TuMVのP3タンパク質遺伝子における1つのアミノ酸が*Raphanus*属植物への初期適応に重要であることが知られています。

[質問6] ソフトウェアで解析した結果はあくまで推測であると思うが、その推測が正しいと判断するため、解析において重要な点はあるか。

[回答6] より多くのデータを用いて解析を行うことが重要であると考えられます。特に、TuMVの組換え部位の解析においては、多くのデータを用いて解析を行うことで、より明確な結果が得られることが以前に報告されています。

[質問7] 東アジアのTuMVには多くの組換え部位が認められているが、さらに多くの分離株を用いて解析を行うことで、新しい組換え部位を検出できるか。

[回答7] ご指摘のとおり、さらに多くの分離株を用いて解析を行うことにより、より多くの組換え部位を検出できると思われれます。しかしながら、ある程度大量の分離株を用いた組換え解析の結果からは、組換え部位の検出は難しくなることが報告されています。

[質問8] 病原性に関与するP1タンパク質遺伝子の選択圧解析によりbasal-BR遺伝集団が正の選択を受けているかどうか分かるか。

[回答8] Asian-BR、world-Bおよびbasal-BR遺伝集団の各遺伝子領域について選択圧の解析を行いました。いずれも正の選択圧を受けている証拠は得られませんでした。また各遺伝集団の選択圧係数に有意な差は認められませんでした。

[質問9] 総合考察が短いので、もっと踏み込んで書くべきではないか。中華人民共和国などの貿易が最近盛んに行われているが、そのような点を踏まえて考察できないか。また、地球の温暖化などの気候の変化とウイルスが最近拡散したことと結び付けて書くことはできないか。

[回答9] はい。総合考察については、再考し、書き直します。

[質問10] 本州中央部とウイルス採集場所について大まかな書き方をしているが、具体的な地方名で書くことはできないか。

[回答10] 中部地方など具体的な地方名に書き直します。