

# カンキツグリーンング病根絶対策を加速する簡便迅速な検出法開発

藤川 貴史 (農研機構 果樹茶業研究部門)

ftakashi@affrc.go.jp

カンキツグリーンング病は世界のカンキツ栽培地で最も脅威となっている病害の一つであり、現在、日本国内においては沖縄県全域と奄美大島・喜界島を除く奄美群島で感染樹が確認されている。本病害は篩部に局在する難培養性の細菌によって引き起こされ、虫媒伝染及び接ぎ木伝染する。発病すると速やかに樹勢が衰え、早い場合二年程度で枯死する。病原細菌の生態や病原性の解明は他の植物病原細菌と比べれば遅れている上、本病害に対して抵抗性品種や有効薬剤は見つかっておらず本病害の根絶や発生分布域の縮小のためには、感染樹を速やかに発見し伐採することが現在為しうる最大の防除対策である。このため、高感度、高精度に加え、簡便で迅速なカンキツグリーンング病検出技術の開発が求められている。本研究では、これまでにわれわれが開発した検出技術についてカンキツグリーンング病の概要と共に紹介する。

## カンキツグリーンング病とは

カンキツグリーンング病。

この病害の名を初めて目にされる方は多い。あるいは、名前こそ知っていても、外国の病害や南西諸島の病害だと認識されているかもしれない。実際に、この病害は日本国内では、沖縄県と鹿児島県奄美群島の一部（徳之島、沖永良部島、与論島）でのみ発生しており、本州や九州、四国の主要なカンキツ経済園地では発生していない。しかし、世界のカンキツ産地（中国、アメリカ、ブラジル、東南アジア、南アフリカなど）では、経済栽培ができない地域が拡大するなど甚大な被害をもたらしており、日本国内でこの病害がまんえんしないように十分な警戒が必要である。カンキツグリーンング病にかかると、果実が小さくなったり味や香が悪くなったりするだけでなく、樹体そのものも衰弱し、時を経ずして枯れてしまう<sup>1,2)</sup> (図1)。この病害は、*Candidatus Liberibacter asiaticus* (カンジダタス・リベリバクター・アジアティカス) という細菌が引き起こす。接ぎ木によって感染する他に、ミカンキジラミという体長わずか三ミリメートルの吸汁昆虫によって媒介される。この昆虫は沖縄県や奄美群島に生息している。この昆虫が感染樹から健全樹に移動し樹液を吸汁することによって新たな感染樹が発生し得る。この病害にかかったカンキツは今のところ治癒することができない。したがって、ミカンキジラミを防除したり感染樹の



図1. カンキツグリーンング病

苗や穂木の移動を禁止したりして感染のリスクを抑えて予防することが重要である。またこの病害にかかったカンキツは二次感染を防ぐために取り除く必要がある。こうしたことから、いかに早く感染樹を見つけるかが重

要な課題となっている。

### カンキツグリーニング病検出技術

目視でカンキツの葉や果実を診断してこの病害にかかっているかどうか判断することがもっとも簡単な診断方法ではあることは言うまでもないが、当然ながら観察者個々の主観によるところが大きく、また感染樹自体、その病徴の程度はまちまちで、正確な診断はそもそも困難である。したがって客観的で科学的な診断法が利用されている。その代表は病原細菌由来の遺伝子の特異的に診断する方法で、PCR法や等温増幅法といった核酸増幅技術である<sup>1-13)</sup>。鹿児島県、沖縄県及び農林水産省植物防疫所ではPCR法、リアルタイムPCR法、等温増幅法であるLAMP法といった種々技術が現場の感染樹の診断に使われている。これらの技術は高精度に検出できる点で非常に有用で、しかも技術的な再現性にも優れている。この診断方法で陽性と判別された場合、(再確認を経ることもあるが)感染樹と見なされて、移動の禁止や伐採への手続きが取られることになる。この技術によって、これまでに国内でのカンキツグリーニング病感染樹は次々と発見され、病害の感染拡大を阻止することに貢献してきた。

しかしこの方法は、カンキツから特別な試薬を用いてDNAを抽出し精製する必要があり、このために専門的な知識をもった人員が必要であり、また作業時間と経費がかかるという欠点がある。高精度な診断が必要であるため、多少の労力やコストは甘受すべきかもしれないものの、作業時間と経費の問題は、本質的な課題を抱えている。すなわち、現場でいかに早く感染樹かどうか診断しなければいけない時に、作業時間がかかるようでは、「早期診断」の足かせとなる。また経費がかかるようでは、カンキツグリーニング病が発生している地域に植わっているたくさんのカンキツ樹を十分に診断することにも支障がでるため、「効率的診断」を阻む原因となる。したがって、この病害が発生している現場で望まれることは、作業時間と経費を抑えた「早期診断・効率的診断」を可能とする診断技術である。そこでわれわれが開発したのが「カンキツグリーニング病のダイレクトPCR法」である<sup>14)</sup>。

### カンキツグリーニング病のダイレクトPCR法

この方法を一言で説明すると、DNAを抽出・精製することなく、PCR法によってカンキツグリーニング病原細菌を検出することができる。核酸増幅技術であるPCR法でありながら、その

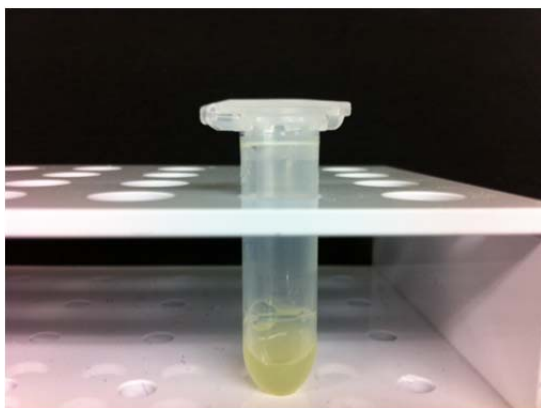


図2. カンキツグリーニング病原細菌を含む植物粗汁液

タイプPCR法やウイルス感染した植物粗汁液を用いたRT-PCR法にも似ている。この方法の要は、カンキツ樹から試薬を用いてDNAを抽出するかわりに、水だけで病原細菌そのものを分離するというものである。市販のプラスチックチューブ(実験室でよく使われるような微小遠心できるプラスチックチューブ)にカンキツ組織断片を入れて水を加えて軽くすりつぶし、遠心分離することによって病原細菌を高密度に含んだ沈殿物を得られることを見出した(図2)。病原細菌はDNAを含んだ細胞そのものであるため、これを

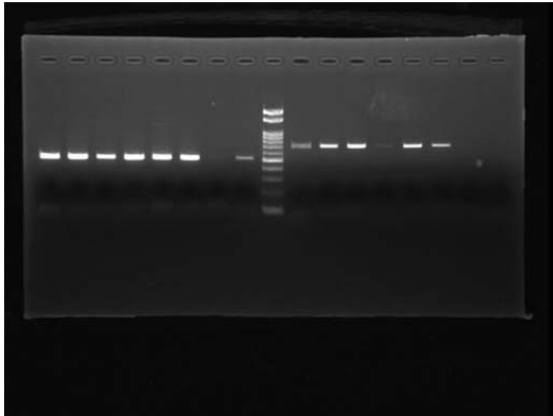


図3. ダイレクト PCR の結果 バンドが見られる試料に病原細菌の DNA が存在することを示す

試料として PCR 法を行うことによって、細胞から溶出した DNA を鋳型として核酸が増幅されるという原理である (図3)。この方法の技術的メリットは、とにかく簡単であるということに尽きる。PCR 法そのものは既存の検出法と同じだが、新規プライマーセットを開発することで<sup>13)</sup>、ダイレクト PCR 法がこれまでの遺伝子診断と同等以上の感度と精度を維持できるようにした。ダイレクト PCR 法では、その鋳型の調製に核酸抽出試薬が必要でなく、誰でも作業することができる。作業そのものもチューブに組織断片と水を入れてすりつぶすだけであるため、簡単であると同時に、作業そのものが非常に早くできる。早くて簡単

ということ、そのままカンキツグリーンング病の検出が「早期化・効率化」に結びつくと考えられる。実際に、沖縄県ではこの方法を採用して、カンキツグリーンング病の検出法として現場で活用して頂いている。従来の方法に比べて簡便であることから気軽に疑わしいカンキツを調査することにもつながっている。また、これまで DNA 抽出のためにはドラフトチャンバーのような排気設備内で化学的火傷の原因にもなるような試薬を用いたり、廃液を専用の産業廃棄物として処理する必要があったりと、作業環境の不便さがあったが、本方法ではその必要はない。このことも従来の方法と比べて相対的に労力やコストを低減させることにつながっている。

### カンキツグリーンング病根絶対策を加速する更なる技術

感染の疑わしい樹を診断するに当たり、「ダイレクト PCR 法」や従来 of 遺伝子診断法では検出できないような極低濃度感染している無病徴樹を取りこぼす可能性がある。このリスクを減らすために、無病徴樹から挿し穂を取り特定の条件下で挿し木繁殖させることにより、本病害の病徴を顕在化させ病原細菌濃度も高める方法を開発した<sup>15)</sup>。特に新規合成される根部では病原細菌の増殖が著しく、ダイレクト PCR 法を始めとする遺伝子診断によって早期に無病徴感染樹を診断できるようになりつつある。また本病原細菌の選択的培養技術の開発<sup>16)</sup>やバイオマーカーに成りうる発現遺伝子の探索にも取り組んでいる<sup>17)</sup>。このような技術もまた、本病害の根絶に役立つ診断技術になると考えている。

### 今後の展開

「ダイレクト PCR 法」や挿し木繁殖後の診断技術によって、本病害発生地で感染樹を早期に検出することが可能になりつつある。更には病原細菌の培養や薬剤感受性といった試験も近く現実的に可能となるだろう。そうなれば感染樹の確定診断や病原細菌の防除薬剤の開発等が可能になる。また難培養性細菌であっても人工接種に成功すれば、その病原性因子の探索や耐病性植物の選抜も可能となる。これら種々技術は、日本国内における本病害の根絶や防除に利用できるだけでなく、カンキツグリーンング病が発生している全ての国・地域にも役立つことになるだろう。世界中のカンキツ産業に関わる多くの人々がより笑顔になれるような研究を今後も続けていきたいと思う。

## 謝辞

本賞の受賞に当たっては、農研機構果樹茶業研究部門よりご推薦頂きました。また、本研究を遂行するに当たり、農研機構果樹茶業研究部門の岩波徹博士には終始ご指導とご支援を賜りました。さらにカンキツグリーニング病研究を行うために、その発生地ですべて、研究開発や防除対策、現地調査や検疫業務を続けている農研機構、沖縄県病害虫防除技術センター、沖縄県農業研究センター、鹿児島県農業開発総合センター、農林水産省植物防疫所の皆様及び各市町村の担当者、関係者の方々にも大変お世話になりました。ここに深くお礼申し上げます。最後に多大なご協力とご支援を頂きました研究室の皆様やご助言頂きました恩師、先輩各位にも深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Bové JM.: J Plant Pathol 88:7-37 (2006).
- 2) Committee on the strategic planning for the Florida citrus industry: addressing citrus greening disease (huanglongbing): The National academic press (2010).
- 3) Jagoueix S., Bové JM., Garnier M.: Int J Sys Bacteriol 44:379-386 (1994).
- 4) Jagoueix S., Bové JM., Garnier M.: Mol Cell Probes 10:43-50 (1996).
- 5) Hocquellet A., Toorawa P., Bové JM., Garnier M.: Mol Cell Probes 13:373-379 (1999).
- 6) Teixeira DC., Saillard C., Couture C., Martins EC., Wulff NA., et al.: Mol Cell Probes 22:139-150 (2008).
- 7) Ding F., Wang G., Yi G., Zhong Y., Zeng J., et al.: J Plant Pathol 87:207-212 (2005).
- 8) Li W., Hartung JS., Levy L.: J Microbiol Methods 66:104-115 (2006).
- 9) Wang Z., Yin Y., Hu H., Yuan Q., Peng G., et al.: Plant Pathol 55:630-638 (2006).
- 10) Li W., Hartung JS., Levy L.: Plant Dis 91:51-58 (2007).
- 11) Tatineni S., Sagaram US., Gowda S., Robertson CJ., Dawson WO., et al.: Phytopathol 98:592-599 (2008).
- 12) Li W., Levy L., Hartung JS.: Phytopathol 99:139-144 (2009).
- 13) Fujikawa T., Iwanami T.: Mol Cell Probes 26:194-197 (2012).
- 14) Fujikawa T., Miyata S., Iwanami T.: PLoS One 8:e55011 (2013).
- 15) 藤原和樹・藤川貴史：特願 2016-045274 (2016).
- 16) 藤川貴史：JATAFF ジャーナル 3(5):10-15 (2015).
- 17) Fujikawa T., Miyata S., Iwanami T.: Proceedings of III International Symposium on Citrus Biotechnology; Acta Horticulturae (2016).