

カンキツグリーンング病の病原体の研究の現状と課題

農林水産省果樹試験場 おお
つ
よし
ひろ
大 津 善 弘

はじめに

カンキツグリーンング病は、果実および樹体の損失をもたらす最も重大な病害であり、アフリカ南部および東部、パキスタンから中国にいたるアジア、アラビア半島の南西部に広く発生している。本病は中国で1919年にフアングルンピン(イエローシュート)の名前で初めて報告された。その後、南アフリカで1937年にグリーンング病の名で報告されて以来、多くの国で発生が報告された。台湾ではリクピン(デクライン)、インドではダイバック、フィリピンではリーフモットリング、インドネシアではペインフローエムディゼネレーションと呼ばれたが、その後、これらは同一の推定病原体が関与する病害であることが判明して、グリーンング病と呼ばれることになった。わが国でも7年前に、沖縄県西表島のカンキツ品種シークワシャに本病の発生が確認された(MIYAKAWA and TSUNO, 1989)。

本病に関する文献は多く、OTAKE (1990) は本病の文献目録に556の論文を挙げた。DA GRACA (1991) はこのほかに86の論文を見だし、世界的視野で本病についての総説を書いている。本病の推定病原体(GO)は、その接ぎ木(LIN, 1956)および虫媒伝染性から、ウイルス説、マイコプラズマ様微生物(MLO)説(LAFLECHE and BOVE, 1970)を経てバクテリア様微生物(BLO)と呼ばれるに至った。しかし、GOはいまだ培養が困難であり、コッホの3原則が充たされていない。それにもかかわらず、1987年にGARNIERらがGOのインド系のBLOに対するモノクローナル抗体の作出に成功して以来、現在までの8年間に、GOの特性および分類学的位置が明らかになってきた。これらの経過を含めた総説をGARNIER and BOVE (1993)が書いている。筆者の引用文献リスト中にない論文は前出のDA GRACA (1991)か、このGARNIER and BOVE (1993)の総説に出ているので、ご参照いただきたい。

筆者は1994年7月から1995年7月まで国際農林水産業研究センターからタイ国農業局に派遣され、「タイにおけるカンキツグリーンング病の診断および防除法の開発」の共同研究を行った。本研究は1990年から実施されたプロジェクト研究「カンキツグリーンング病の生態お

よび防除に関する研究」の最後の1年に実施されたものである。

本稿では、現在までに明らかになっているGOの特性、分類学的位置の概要、診断法と、筆者らの研究の概要を述べる。

I グリーンング病推定病原体(GO)の性質

1 本病の病徴および媒介虫

罹病樹はわい化し、葉は黄化し、やがて小枝の枯死を生じて枝の枯死が広がり、ついには樹も枯れる。最も特徴ある病徴は葉の斑紋症状で、スイートオレンジで顕著に現れるが、マンダリンでは穏やかである。この斑紋は亜鉛欠乏症状にも似るが、本病の診断に最良の葉の病徴である。

媒介虫はアフリカのキジラミ *Trioza erythrae* (MCLEAN and OBERHO Iz, 1965) とアジアのミカンキジラミ *Diaphorina citri* (MARTINEZ and WALLACE, 1967) の2種である。両媒介虫の生物的防除が2種の天敵 *Tamarixia radiata* と *T. dryi* とを用いて、レユニオン島で成功した(AUBERT and QUILICI, 1984)。

2 GOのバクテリア様微生物(BLO)としての性質

GOのMLO説は発表後間もなく疑問視された。MLOの膜の厚さがおよそ7~10 nmであるのに、GOのそれは約25 nm とほぼ倍であった(SAGLIO et al., 1971) からである。さらに、GOはグラム陰性で膜状のペプチドグリカンを含む細胞膜を持つことが示され(GARNIER et al., 1984 a, b)、ガラス室および果樹園の罹病樹にペニシリンを処理すると病徴が薄らぎ、篩部にGOも見られなくなった(AUBERT and BOVE, 1980; BOVE et al., 1980) ことから、GOはグラム陰性のBLOと認められた。BLOは培養が困難であるが、GOと同一の構造物はアフリカおよびインド(LAFLECHE and BOVE, 1970)、台湾(CHEN et al., 1971; TANAKA and DOI, 1976)、中国(ZAO, 1981)のグリーンング罹病樹の篩部、並びに伝搬力のある媒介虫 *T. erythrae* (MOLL and MARTIN, 1973) と *D. citri* (CHEN et al., 1973) の唾液腺および血リンパにも存在することが認められており、病原体としての推定度は高い。

3 BLOの寄主植物

植物種によって本病感受性に幅があるが、BLOはすべてのカンキツに感染する。一方 *Murraya paniculata* (ゲ

ツキツ), *Atalantia missiois*, *Swinglea glutinosa* などの他のミカン科植物は媒介虫キジラミのよい寄主植物であるが、これらの植物の中に BLO が存在する証拠はない (GARNIER and BOVE, 1993)。GARNIER and BOVE (1983) は BLO のインドおよび南アフリカ系統をネナシカズラを用いてニチニチソウに伝搬させることに成功した。ニチニチソウにおいて BLO はカンキツの中よりも高い濃度に達する。GARNIER (未発表) は同様な方法で BLO をタバコ (キサンチ) に伝搬させた。タバコ植物中の BLO の濃度は低いが、病徴は激しい (GARNIER and BOVE, 1993)。

4 BLO のタイプおよび系統

アジアにおけるグリーンング病の病徴はアフリカのものより激しいが、それらは温度耐性を基準にしても明らかに区別される。アフリカのグリーンング病の場合、涼しい温室条件 (夜 8 時間 22°C, 昼 16 時間 24°C) 下で激しい病徴が現れたが、27~30°C 下では現れなかった。一方、アジア (インド株, フィリピン株) のグリーンング病の病徴は両方の温度域で激しく発現した (BOVE et al., 1974)。

5 モノクローナル抗体と血清型

GARNIER et al. (1987) は、篩部局在の原核生物に対するモノクローナル抗体 (MA) を作出する手法を開発した。この手法を用いて、BLO のインド (プーナ) 株に対する MA を初めて作出した (GARNIER et al., 1987)。その後、中国 (フージャン) 株 (GARNIER et al., 1991) や南アフリカ (ネルスプラート) 株 (GARNIER et al., 未発表) の MA も作出された。現在では 10 種の異なる MA が GARNIER らの研究室で得られている。これらの MA を直接エライザや蛍光抗体法によるグリーンング BLO の検出に用いたところ、これらの MA は高い系統特異性があった。すなわち、免疫に用いた分離株とのみ反応した。このことは異なる血清型の存在を示した。これらの中で、インドのプーナ株の MA である MA 10 A 6 は数か国からの株と反応できる唯一のものであった。GAO et al. (1993) は免疫アフィニティークロマトグラフィーによってこの MA 10 A 6 の抗原タンパク (P 42 と呼ぶ) を純化した。脾臓細胞の試験管内免疫によって P 42 を MA の作出に用いたところ、3 種の新たな MA が得られた。これらはいずれも以前のものより多くの分離株と反応したが、その中の一つ MA 1 A 5 は中国株を除いて供試したすべてのアジア系統と反応した。一方アフリカ系統とは反応しなかった。

6 BLO の純化とその形態

VILLECHANOUX et al. (1990) はモノクローナル抗体 MA 10 A 6 を用いた免疫アフィニティークロマトグラ

フィーによって BLO の純化を行った。純化した BLO を電顕と蛍光抗体法によって調べているが、BLO は長さ 1~4 μ m, 直径 0.15~0.3 μ m のひも状の形態であった。また直径 1 μ m の丸型構造物も観察された。これらの構造物は罹病したカンキツまたはニチニチソウの篩部組織中に見られる BLO の形態と一致している。この純化 BLO の蛍光抗体法および免疫金ラベル法による観察から、P 42 は BLO の表面タンパクであり、丸型およびひも状の構造物の表面に均等に分布していることがわかった。このことはまた、この二つの構造物が同じ BLO のものであることを示している。しかし、この論文の写真の BLO 像はかなり表面が痛んでいるように見える。彼らによる BLO の抗血清作製の論文がいまだ見られないことから、この純化法も改良を要するのかもしれない。

7 DNA プローブと系統

MA は特異性が高すぎて、すべての BLO 系統を検出できなかったため、VILLECHANOUX et al. (1992) は BLO の DNA プローブを開発した。BLO のインド (プーナ) 株に感染したニチニチソウの全篩部から DNA を純化し、この DNA を制限酵素 *Hind* III で消化して生じた DNA 断片を M 13 mp 18 ファージにクローニングした。グリーンングに罹病したニチニチソウの中肋から抽出した DNA と反応する 3 種の DNA インサートが選抜されたが、それらは 2.6 Kbp, 1.0 Kbp, 0.6 Kbp の長さがあり、それぞれ In 2.6, In 1.0, In 0.6 と名づけられた。サザンハイブリダイゼーションまたはドットハイブリダイゼーションのプローブとしてこれらの特異性を高める条件 (60 C, 0.1 \times SSC) で用いると、In 0.6 は同じインド (プーナ) 株に感染したニチニチソウまたはカンキツの DNA とのみ反応した。In 1.0 は台湾株を除いて、供試したすべてのアジア系分離株と反応した。また、In 2.6 は供試したすべてのアジア系分離株と反応した。この条件下では、三つのプローブすべてが、健全植物から抽出した DNA 並びにアフリカ (ネルスプラート) 株から抽出した DNA と反応しなかった。

三つのインサートの性質を調べるために、VILLECHANOUX et al. (1993) はこれらの塩基配列を決定し、その推定される配列を既知遺伝子のそれと比較した。その結果、In 2.6 は nusG-rplKAJL-rpoBC オペロンの遺伝子を含んでいた。nusG は抗転写終結作用に関連するタンパクをコードしており、rplK, A, J, L, はリボゾームタンパク L 11, L 1, L 10, L 12 をそれぞれコードし、rpoB と C は RNA ポリメラーゼサブユニット β および β' をコードしている。グリーンング BLO の場合、これらの遺伝子は他の真正細菌目の種の場合と同じ順序に存

在している。この知見はグリーンング BLO が真正細菌であることを分子レベルで初めて確かめたものである。In 1.0 はバクテリオファージ DNA ポリメラーゼの遺伝子を含んでおり、In 0.6 は既知の遺伝子の中に同じものはなかった。

II BLO の分類学的位置

BLO の系統発生的位置並びに BLO のアフリカ系とアジア系間の進化上の距離を決めるために、JAGOUËIX et al. (1994) はグリーンング BLO のアジア系統ブーナ株とアフリカ系統ネルスブルート株の 16 S rDNA を PCR 増幅後、クローニングし、塩基配列を決定した。用いたプライマーは WEISBURG et al. (1991) の原核生物の 16 S rDNA 用のユニバーサルプライマーで、一つは AGAGTTTGATCATGGCTCAG で他の一つは AAGGAGGTGATCCAGCCGC である。得られた塩基配列をジーンバンクのデータベースから得られたバクテリアの 16 S rDNA 配列と比較した。その結果、グリーンング BLO はプロテオバクテリアの α サブディビジョンの新しいメンバーであることが明らかになった。アジア系統とアフリカ系統との関係では、16 S rDNA の比較において 97.7% の同質性があった。一方で、In 2.6 に保存される rplKAJL-rpoBC のオペロンの比較において 70% の同質性しかなかった (GARNIER et al., 未発表)。以上のことから、この新しいメンバーをリベロバクター (*Liberobacter*; ラテン語の liber [bark] と bacter [bacteria] から取った) と呼ぶことが提案された。最近 MURRAY and SCHLEIFER (1994) が提案した原核生物の推定分類群の記録法にしたがって、彼らはさらに、*Liberobacter* インド株を *L. asiaticum* とし、次のように表示した。“Candidatus *L. asiaticum*” [(α -Proteobacteria) NC; G-F; NAS (GenBank number L 22532), oligonucleotide sequence complementary to unique region of 16 S rRNA 5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA -3', S (*citrus*, phloem; *Diaphorina citri* (Psyllidae), hemolymph, salivary glands); M;] また、アフリカ由来の株を *L. africanum* とし次のように示した。“Candidatus *L. africanum*” [(α -Proteobacteria) NC; G-F; NAS (GenBank number L 22533), oligonucleotide sequence complementary to unique region of 16 S rRNA 5'-GCGCGTATTTATACGAGCGGCA -3', S (*Citrus*, phloem; *Trioza erythrae* (Psyllidae), hemolymph, salivary glands); M;]。

III グリーンング病の診断法

1 遺伝子診断法

VILLECHANOUX et al. (1992) は、DNA プローブ、In 2.6 が BLO のアフリカ系統を除いて、すべてのアジア系統を特異性を高める条件下で検出するのに使用できたことを報告した。これは I-7 にも述べた。II でも述べた二つのユニバーサルプライマーを用いた PCR 法 (JAGOUËIX et al., 1994) によって、アジア系統とアフリカ系統の両方が検出・診断され得る。さらに GO の 16 S rDNA に特異的な二つのプライマー GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA と GCCTCGCGACTTCGCAACCAT を用いた PCR 法で約 1,160 bp の 16 S rDNA 断片を検出でき、両系統を検定できる。また JAGOUËIX et al. (1995) は上記の方法に加えて、プローブ As 1.7 を用いた DNA-DNA ハイブリダイゼーションによって *L. africanum* を罹病カンキツから検出できること、16 S rDNA の塩基配列に由来する複数のプライマーを用いた PCR 検出法も開発したこと、これらのプライマーによって 2 種の *Liberobacter* の 16 S rDNA を増幅できるが、かいよう病菌・バリエゲイテッドクロロシス・スタボーン・ライムのウィッチーズブルームなどの病原または *Agrobacterium tumefaciens* や *Acinetobacter lwoffii* などのバクテリアは増幅されないこと、この PCR 増幅された rDNA を *Xba*I で消化すれば、*L. asiaticum* の DNA または *L. africanum* の DNA の特異的な泳動パターンが得られることを口頭発表した。以上で遺伝子診断法の形が整ったと思われる。しかし本法はまだ二、三の国の研究グループのものでしかない。GARNIER and BOVE (1995) は上記の方法を用いて、*L. asiaticum* のみが検出される国はインド、ネパール、スリランカ、ベトナム、カンボジア、マレーシア、インドネシア、タイ、フィリピン、台湾、中国で、*L. africanum* のみの国は南アフリカとジンバブエで、両 2 種が存在する国はレユニオンとモーリシャスであると報告した。

2 その他の診断法

電子顕微鏡による診断法は、病原バクテリアそのものを検出でき、信頼度のきわめて高い方法である。篩部組織中に、長さ 1~4 μ m、幅 0.2~0.3 μ m のひも状構造物および直径約 1 μ m の丸型構造物のバクテリアで、約 25 nm の三層の細胞膜をもつ構造物の存在を確認することで診断できる。本病菌では、現在のところ、その精度は遺伝子診断法と同じレベルとされている。モノクローナル抗体による診断では、ほとんどのアジア系統と反応する MAIA 5 を GARNIER et al. が所持しているが、その他の

ものはその高い特異性がかえって障害となっている。ポリクローナル抗体による血清診断も試みられてはいるが、成功したとする論文はまだ出ていない。カンキツのグリーンング病感受性品種（マダムバイナスなど）を用いた接ぎ木による本木検定は日数がかかるものの安価で精度が高いので利用範囲がきわめて広い。組織化学的方法の報告もあるが、精度に問題がある。安価、簡易、迅速、高精度、そして多量処理性を備えた抗血清診断法の開発が期待される。

IV タイ国におけるグリーンング病診断法の開発

前出のプロジェクトの中で、筆者らはまずグリーンング推定病原体 (GO) が多量に存在する罹病葉を多量に得る方法を確立することから研究を始めた。GO のタイ株をネナシカズラで伝搬させたニチニチソウの穂木を用いて接ぎ木接種し、24~27°C に 14 日間置いて活着したニチニチソウを 20~25°C と 25~30°C に置いて病徴の進展を調べ、GO の所在を電顕観察した。その結果、接ぎ木接種後に生じた新しい枝の複数の葉は処理 24 日後に濃いオレンジ色 (20~25°C) ~黄色 (25~30°C) になること、両方の罹病葉で GO は増殖していることに加えて、接ぎ木接種時に既に展開していて、感染後にオレンジ色および黄色になった成熟葉の篩部細胞においても多数の GO が存在することが新たに明らかになった (大津ら, 1995 a)。これらの罹病葉約 50 g から中肋を取り、セルラーゼ・マセロザイムの処理をして篩部組織を採取した。0.6 M マンニトール等から成る抽出液で 5 回洗浄した篩部組織から GO を部分純化し、4% グルタルアルデヒドで固定した。この GO 試料を 5 回家兎に注射後に得た抗血清は、微量法で 8 倍の力価があった (大津ら, 1995 b)。今後、本抗血清の診断への利用を検討する。また筆者らのグループは、JAGOUËIX et al. (1994) により開発された PCR による GO の 16 S rDNA の検出法に準じて、GO

のタイ株 (3 株) の 16 S rDNA を検出することに成功した。さらに DNA 抽出法を簡易化することにより、4.5 時間以内に GO を検出することが可能になり、大幅に改良できた。またタイ株の一つ Nakorn Pathum 株の 16 S rDNA の塩基配列が決定され、本株が GO のアジア系インド株に極めて近いことも明らかになった (中島ら, 1995)。また話題は異なるが、KOIZUMI et al. (1995) はタイにおいて GO の媒介虫ミカンキジラミがよく繁殖し、GO 感染により黄化し、篩部細胞中に多数の GO が存在する野生の寄主植物 *Limonia acidissima* (wood apple) を新たに報告した。

おわりに

今後の研究の課題としては、*L. asiaticum* と *L. africanum* がグリーンングの病原であることを証明するためにコッホの 3 原則を充たすこと、開発途上国や広い地域で簡易に使える診断法の開発、抵抗性品種の作出に向けた基礎的研究、媒介虫防除法の開発などがある。特に GO がプロテオバクテリアの α サブディビジョンに属することがわかったことから、今後、本菌の培養の研究に進展が見られるかもしれない。

引用文献

- 1) DA GRACA, J. V. (1991): Annu. Rev. Phytopathol. 29: 109~36.
- 2) GAO, S. J. et al. (1993): ibid. : 244~249.
- 3) ——— et al. (1995): Proc. 13th Conf. Int. Org. Citr. Virol.: 103 (abstract).
- 4) GARNIER, M. and J-M. BOVE (1993): Proc. 12th Conf. Int. Org. Citr. Virol.: 212~219.
- 5) JAGOUËIX, S. et al. (1994): Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 379~386.
- 6) ——— et al. (1995): Proc. 13th Conf. Int. Org. Citr. Virol.: 101 (abstract).
- 7) KOIZUMI, M. et al. (1995): ibid.: 108 (abstract).
- 8) 中島一雄ら (1995): 日植病報 61: 610 (講要).
- 9) 大津善弘ら (1995 a): 同上 61: 609~610 (講要).
- 10) 大津善弘ら (1995 b): 同上 61: 610 (講要).
- 11) VILLECHANOUX, S. et al. (1993): Cur. Microbiol. 26: 161~166.