

カンキツグリーニング病の媒介昆虫である ミカンキジラミ地域個体群の評価

農研機構 果樹研究所 ^{とみ}富 ^{むら}村 ^{けん}健 ^た太

はじめに

カンキツグリーニング病は、接ぎ木によって伝搬するほか、媒介昆虫であるミカンキジラミ（カメモシ目：キジラミ科）によって伝搬するカンキツの重要病害の一つである。また、本病の病原体は難培養性の細菌であり、世界中で3種の病原細菌が本病に関与すると言われている。アジア地域はもとより、米国やブラジルといったカンキツの大生産地で壊滅的な被害をもたらしている。我が国では1988年に西表島で初確認されて以来、沖縄県および鹿児島県の島嶼部を含んだ徳之島以南の地域に発生が確認されている。鹿児島県の喜界島においては2003年に本病の発生が確認されたが、本病原菌のまん延防止と根絶を図るため、農林水産省を中心として2007年度から植物防疫法に基づく緊急防除が実施された。多くの試験研究機関の関係者、ならびに地域の方々の並々ならぬご尽力のおかげで喜界島における本病原細菌の根絶が達成された。喜界島での成功例をもとに、我が国における本病の分布域が少しでも縮小することを願ってやまない。本稿では、カンキツグリーニング病原細菌の媒介昆虫であるミカンキジラミの地域個体群構造に関する研究について解説する。具体的には、まず筆者らが手がけたミカンキジラミのマイクロサテライトマーカーの開発について紹介し、さらにミトコンドリアCOI遺伝子領域を指標とした塩基配列の種内変異について既報の事例を踏まえながら紹介する。

I ミカンキジラミ日本産個体群の識別に有用な マイクロサテライトマーカーの開発

マイクロサテライトとは、1ないし数塩基の単位配列の繰り返しによって構成されるゲノム上の領域である。詳しくは本誌にて日本ら（2011）による詳細な解説がなされているので参照されたい。新規にマイクロサテライトマーカーを作成する前に、既に報告されたミカンキジラミのマーカーがあれば日本産個体群について解析でき

る可能性があるので、まず報告されたマーカーがないかどうかを文献検索した。その結果、ミカンキジラミのマイクロサテライトマーカーについて計12種類がBOYKIN et al. (2007) により報告されていた。そこで、これらマーカーをミカンキジラミ日本産個体群の解析に使うことができるかどうかについて予備実験を行った。使用した個体群は、2009年6月に鹿児島県徳之島にてゲッキツより採集した個体群（以下、徳之島個体群）である。ゲッキツはミカン科ゲッキツ属植物で、観葉植物として栽培されるほか、南西諸島では生け垣として用いられている。徳之島個体群50頭について計12種類のマーカーを用いてPCRを行った結果、5種類のマーカーでは多型が得られなかった。つまり、PCRによるDNA増幅産物の長さの違いが見られなかった。さらに、3種類のマーカーでは明瞭なDNA増幅産物が得られなかった。すなわち、残りの4種類のマーカーで多型が得られたことになる。しかしながら、徳之島個体群について50頭を解析したにもかかわらず、マーカー当たりの多型の数（対立遺伝子数）は2～4とやや少なかった。この結果から、本予備実験で用いたマーカーはアメリカ大陸産（フロリダ州、テキサス州およびブラジルサンパウロ州）のミカンキジラミ個体群の解析では用いることができたが、日本産個体群の解析には一部しか使えないことが明らかとなった。この事実は、ミカンキジラミのアメリカ大陸産個体群と日本産のものでは個体群（集団）構造が異なるかもしれないことを示唆している。なお、近年の急速なゲノム解析の進展により、昆虫を含めた様々な生物種のゲノム配列が公開されつつある。ミカンキジラミの全ゲノム配列が公開されていれば、マイクロサテライト配列を検索するソフトウェアを用いることでマーカー作成が格段に容易であったが、当時は公開されていなかった。

ミカンキジラミ日本産個体群を詳細に解析するマイクロサテライトマーカーの必要性を感じたので、筆者らは独自にマーカー作成を行った。マーカー作成法については様々な方法が報告されているが、今回はLIAN and HOGETSU (2002) の方法により行った。詳細な方法について本稿では割愛する。六つの制限酵素ライブラリーからマイクロサテライト配列を含んだ138クローンを選抜

Evaluation of the Population of the Asian Citrus Psyllid, the Vector for Citrus Greening Disease. By Kenta TOMIMURA

（キーワード：カンキツ、グリーニング病、ミカンキジラミ、マイクロサテライト、ミトコンドリアCOI遺伝子）

し、最終的に 9 種類のマーカーを作成することに成功した (Tomimura et al., 2014)。これらマーカーを徳之島個体群に用いた結果、マーカー当たりの対立遺伝子数は 5 ~ 24 であり、平均 9.7 であった (表-1)。残念ながら、本研究で開発したマーカーを海外産ミカンキジラミ個体群で用いることができるかどうかについては検討できなかったが、海外産個体群でも用いることができれば日本産個体群との比較が容易になり、世界的に見たミカンキジラミの集団遺伝構造が明らかになるかもしれない。現在、本研究で開発したマイクロサテライトマーカーに加え予備実験で多型を示した Boykin et al. (2007) のマーカーを用いて南西諸島各地から採集したミカンキジラミ個体群の解析を行っている。

II ミトコンドリア COI 遺伝子領域を用いたミカンキジラミ個体群構造の解析

本章では、まず海外での研究事例について、それぞれの結果の概要を紹介する。

1 Boykin et al. (2012)

Boykin et al. (2012) は、世界中の 15 개국からミカンキジラミを採集し、216 頭についてミトコンドリア COI 遺伝子の一部領域について塩基配列を決定した。その結果、世界中のミカンキジラミ個体群は Dcit-1 から Dcit-8 で示した 8 種類のハプロタイプに区別できることを明らかにした (図-1)。さらに、世界中のミカンキジラミ個体群で観察されたハプロタイプの国別内訳を筆者らの解析結果も含めて表-2 にまとめた。Dcit-9 から Dcit-11 については後述する。8 種類のハプロタイプの中でも比較的個体数が多いハプロタイプは Dcit-1 および Dcit-2 であった。Dcit-1 はサウジアラビア、パキスタン、イラン、インドおよびインドネシアといった南西アジア地

域の個体群で構成されており、本ハプロタイプには米国 (フロリダ州およびテキサス州)、メキシコ、ブラジルおよびフランス領レユニオン島の個体群が含まれた。もう一つの主要ハプロタイプである Dcit-2 は中国、台湾、ベトナム、タイ、インドネシアといった東南アジア地域の個体群で構成されており、本ハプロタイプには後述する日本産個体群をはじめ、ブラジル、モーリシャスおよびフランス領レユニオン島の個体群の一部が含まれた。主要ハプロタイプのほかにも、Dcit-3 から Dcit-8 のマイナーなハプロタイプも観察されたが、Dcit-3 を除いて主要ハプロタイプ Dcit-1 および Dcit-2 から派生したハプロタイプであることが推察された。なお、ハプロタイプ Dcit-3 は北アメリカ大陸および南アメリカ大陸の中央に位置するカリブ海地域の個体群 (プエルトリコおよびフランス領グアドループ島) が含まれた。図-1 を見てもわかるとおり、主要ハプロタイプである Dcit-1 および Dcit-2 の塩基配列とそれぞれ 3 塩基しか違いがないことから、どのハプロタイプが祖先なのかを特定することができなかった。以上の結果より、世界中のミカンキジラミ個体群は大きく南西アジアおよび東南アジアグループに類別できることを明らかにした。米国やメキシコへのミカンキジラミ侵入は南西アジアグループに由来し、ブラジルへの侵入は南西アジアグループと東南アジアグループの両グループに由来すると結論づけた。なお、本報告は世界中のミカンキジラミを採集・解析したものであるが、解析個体数の約半数が米国フロリダ州の個体群であった。このため、世界のミカンキジラミ個体群構造について論ずるには採集地に偏りがあるので、米国以外の地域からも多くの個体群を採集・解析する必要があると思われる。

2 De León et al. (2012)

約 70 年前にはブラジル (南アメリカ大陸) にミカンキジラミが生息していたとされるが、いったい近年の北アメリカ大陸への侵入は南アメリカ大陸を経由して侵入したのだろうか？これらの疑問に答えるべく De León et al. (2012) は同様に、南アメリカ産 (ブラジル、アルゼンチン、パラグアイおよびウルグアイ) および北アメリカ産 (米国、メキシコ、コスタリカおよびベリーズ) およびハワイ州のミカンキジラミ個体群についてミトコンドリア COI 遺伝子の一部領域について塩基配列を決定した。その結果、全 23 地域個体群から選んだ 132 頭のミカンキジラミ個体は 23 のハプロタイプより構成されることを明らかにした (図-2)。さらに、これらハプロタイプネットワーク解析の結果、二つの主要なグループに大別できることを明らかにした。この結果は、アメリ

表-1 本研究で開発したミカンキジラミのマイクロサテライトマーカーの特徴 (Tomimura et al., 2014 より改変)

マーカー名	繰り返しモチーフ	対立遺伝子数
Dci-Alu13	(AC) ₂₁	9
Dci-Eco5	(AC) ₁₉ (AGAC) ₂	24
Dci-Eco23	(AC) ₇ (TC) ₁₉ (AC) ₁₈	9
Dci-Eco29	(TC) ₁₆ (AC) ₂₃	12
Dci-Eco33	(AC) ₅ CC(AC) ₂₁	9
Dci-Hinc3	(TC) ₄ (AC) ₁₀	6
Dci-Hinc46	(AC) ₁₁	6
Dci-Hinc65	(AC) ₁₁ AA(AC) ₃	5
Dci-Ssp9	(CT) ₂₀ CA(CT) ₃ (CA) ₁₁	7

それぞれのマイクロサテライトマーカーに含まれる繰り返しモチーフは、マーカー作成に用いた奄美大島産ミカンキジラミ累代飼育個体群で観察されたモチーフである。

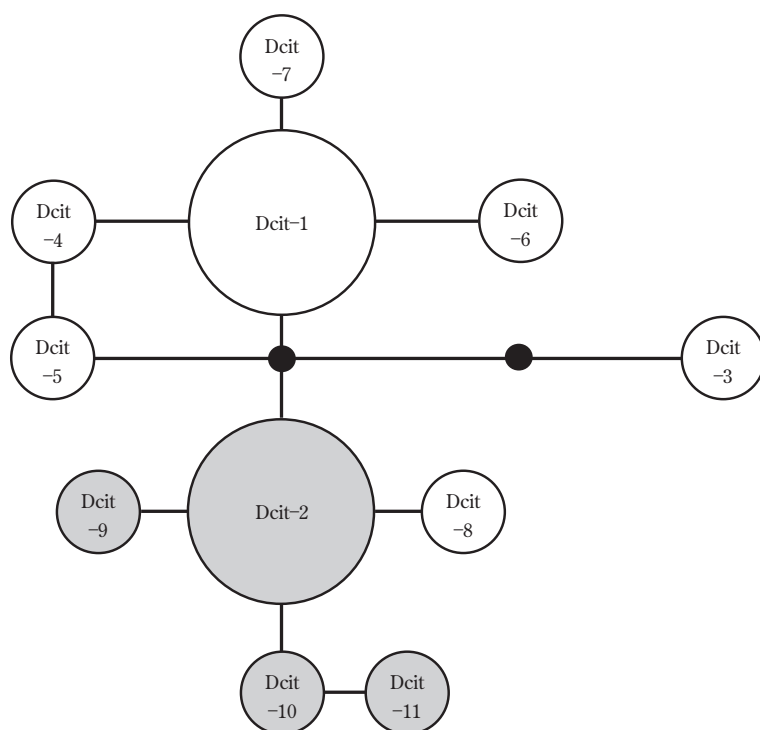


図-1 ミカンキジラミ個体群のハプロタイプネットワーク

BOYKIN et al., 2012 および LASHKARI et al., 2014 のデータに日本産ミカンキジラミ個体群の解析で取得したデータを加えて解析した。円中の名前はそれぞれ異なるハプロタイプを示し、●印は本研究では観察されなかった推定上のハプロタイプを示す。灰色のハプロタイプは日本産ミカンキジラミ個体群で観察されたハプロタイプを示す。

表-2 世界中のミカンキジラミ個体群で観察されたハプロタイプの国（地域）別内訳

ハプロタイプ	国名（括弧中は個体数）	個体数の合計
Dcit-1	米国, フロリダ州 (95); 米国, テキサス州 (5); メキシコ, ヌエボ・レオン州 (4); ブラジル (4); サウジアラビア (5); パキスタン (3); イラン (10); インド (4); インドネシア (3); フランス領レユニオン島 (1)	134
Dcit-2	日本 (74); ブラジル (13); 中国 (12); 台湾 (5); ベトナム (10); タイ (4); インドネシア (13); モーリシャス (5); フランス領レユニオン島 (3)	139
Dcit-3	プエルトリコ (3); フランス領グアドループ島 (11)	14
Dcit-4	メキシコ, ユカタン州 (6)	6
Dcit-5	中国, 浙江省 (3)	3
Dcit-6	パキスタン (4)	4
Dcit-7	米国, フロリダ州 (1)	1
Dcit-8	中国, 広東省 (1)	1
Dcit-9	日本, 与論島 (1)	1
Dcit-10	日本, 宮古島 (4)	4
Dcit-11	日本, 宮古島 (2)	2

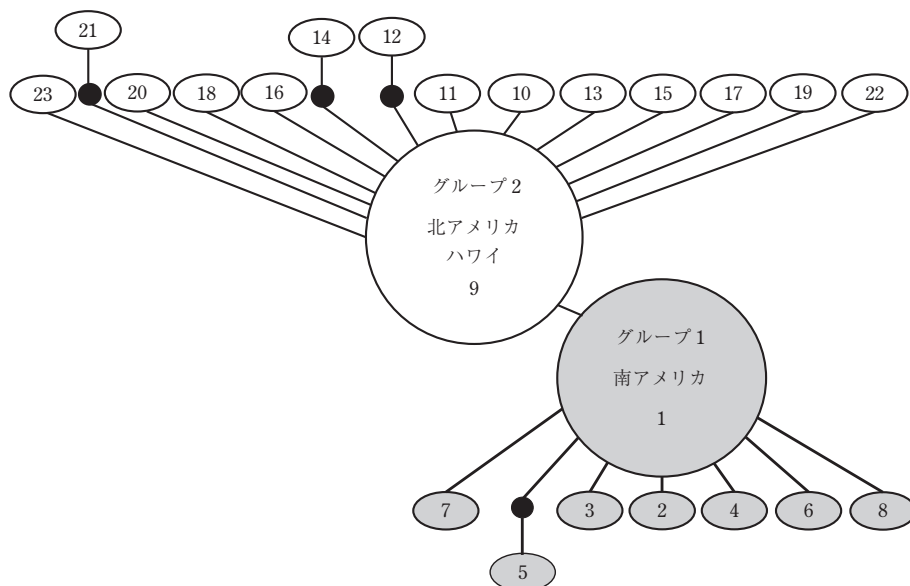


図-2 南北アメリカ大陸産ミカンキジラミ個体群のハプロタイプネットワーク (De LEÓN et al., 2011 より作図)

図中の数字はそれぞれ異なるハプロタイプを示し、●印は本研究では観察されなかった推定上のハプロタイプを示す。

カ大陸に二つのグループが別々に侵入してきたことを示唆している。筆者は本報告のデータに Boykin et al. (2012) のデータを加えることで、より詳細なミカンキジラミ個体群の世界的なハプロタイプ分布が明らかになるかもしれないと思い、解析を試みた。残念ながら、それぞれの研究グループが塩基配列を決定した遺伝子領域は、同じ遺伝子領域でありながらわずかに 10 塩基しか重複しておらず、直接比較することはできなかった。しかしながら少なくとも北アメリカ大陸および南アメリカ大陸へのミカンキジラミの侵入個体群は同じ個体群ではないという結論では一致しているようだ。

3 LASHKARI et al. (2014)

イラン・イスラム共和国 (イラン) においてはミカンキジラミの初発生は 1997 年であり、近年発生が報告されたアジア地域の一つである。ミカンキジラミの発生に引き続き、2005 年になってカンキツグリーニング病の初発生が確認された。LASHKARI らは、イランを中心にパキスタン産個体群を加えた 6 地域個体群について、ミトコンドリア COI 遺伝子の一部領域について塩基配列を決定・解析を行った。それぞれの地域個体群から 2 頭ずつ、すなわち 12 頭のミカンキジラミについて解析を行った結果、ミトコンドリア COI 遺伝子の塩基配列の違いでイラン産個体群とパキスタンのものを区別することができた。さらに既報の Boykin et al. (2012) が解析し

た世界中から採集したミカンキジラミ個体群のデータと比較した結果、イラン産個体群はすべて Dcit-1 であった (図-1)。一方、パキスタン産個体群は他の地域に見られないユニークな Dcit-6 であった (図-1)。以上の結果より、南西アジアグループのミカンキジラミ個体群が近年イランへ侵入したのではないかと結論づけた。

III ミトコンドリア COI 遺伝子領域を指標とした日本産ミカンキジラミ個体群構造の解析

前章では、ミトコンドリア COI 遺伝子領域の塩基配列の比較により、世界中のミカンキジラミ個体群構造について評価した研究事例を述べた。そこで筆者らは、南西諸島を中心に採集したミカンキジラミ 12 地域個体群 (図-3) について、Boykin et al. (2012) らが用いた PCR プライマーペアを用いて本遺伝子領域の塩基配列を計 72 頭について決定した。本研究で取得した塩基配列情報に加え、Boykin et al. (2012) および LASHKARI et al. (2014) のデータを解析に加えてハプロタイプネットワーク解析を行った。その結果、日本産のほとんどの個体群は南西アジアグループに属する Dcit-2 であった (図-1)。しかしながら、与論島および宮古島の一部個体でこれまでに知られていない新規のハプロタイプ (Dcit-9 ~ 11) が観察された。そして、これら新規ハプロタイプはほとんどの日本産個体群が属する Dcit-2 に極めて近縁である

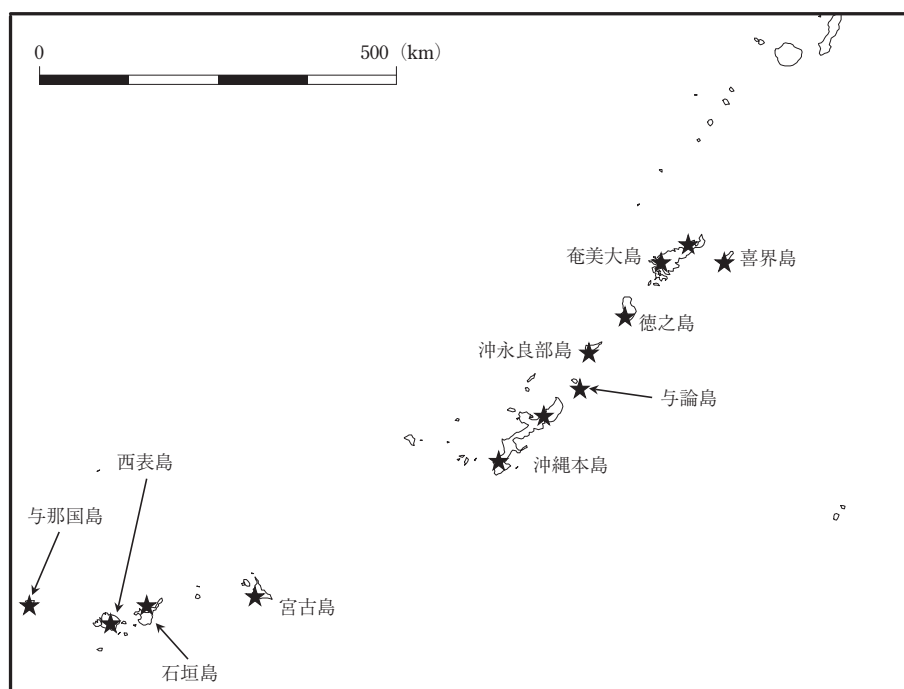


図-3 南西諸島における日本産ミカンキジラミ個体群の採集地
地図上の星印 (★) はそれぞれのミカンキジラミ個体群の採集地を示す。

ことが明らかとなった。今回これら新規ハプロタイプが日本で確認されたが、世界中のミカンキジラミ個体群では発見されていないことから、もともと日本に土着していた主要な個体群 (Dcit-2) から派生した個体群であると考えerのほうが合理的である。

おわりに

これまで、カンキツグリーンング病の媒介昆虫であるミカンキジラミ地域個体群構造の解析に関する研究について、筆者らが手がけた研究内容に加え、海外の研究事例について紹介してきた。これら研究に共通する目的は、「どのミカンキジラミ個体群が侵入してきたのか?」という疑問に答えるためである。およその由来の推定は可能になった感もあるが、実際の現場では島単位、地域単位および圃場単位といった高精度なミカンキジラミ個体群の由来推定技術が必要である。ミトコンドリア COI 遺伝子領域を用いた日本産個体群構造の解析では、ミカンキジラミ個体群のほとんどが同じハプロタイプで

あった。すなわち、島内や国内といった限定された地域におけるミカンキジラミ個体群を評価する場合にはあまり適していないかもしれない。解決する一つの手段としては、ミトコンドリアゲノムの様々な遺伝子領域で多型を示す領域を探索することも考えられる。今後、ミカンキジラミのマイクロサテライトマーカーを用いた集団遺伝学的解析やミトコンドリア COI 遺伝子領域を用いたハプロタイプネットワーク解析等を駆使することにより、日本国内におけるミカンキジラミの個体群構造について明らかにしていきたいと考えている。

引用文献

- 1) BOYKIN, L. M. et al. (2007): Mol. Ecol. Notes 7: 1202 ~ 1204.
- 2) ——— et al. (2012): Bull. Entomol. Res. 102: 573 ~ 582.
- 3) DE LEÓN, J. H. et al. (2012): Ann. Entomol. Soc. Am. 104: 1392 ~ 1398.
- 4) 日本典秀ら (2011): 植物防疫 65: 274 ~ 279.
- 5) LASHKARI, M. et al. (2014): Pest Manag. Sci. 70: 1033 ~ 1040.
- 6) LIAN, C. and T. HOGETSU (2002): Mol. Ecol. Notes 2: 211 ~ 213.
- 7) TOMIMURA, K. et al. (2014): Appl. Entomol. Zool. 49: 353 ~ 357.