

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 28 年度博士課程進学

氏 名 宮崎 彰雄

指導教員名 山次 康幸

論文題目 熱帯作物に発生する萎黄叢生病の病原と診断技術に関する研究

植物は生物学的あるいは非生物学的ストレスにより様々な障害を被ることがあり、これらは植物病と総称される。中でも微生物による伝染性の植物病は、蔓延すると植物に壊滅的な被害をもたらす。ファイトプラズマ (*Candidatus Phytoplasma spp.*) は、植物に黄化や叢生などの症状 (萎黄叢生病) を引き起こして枯死させる病原細菌の一群であり、世界各地で作物生産を脅かしている。ファイトプラズマは農薬による防除が困難なことから、ひとたび蔓延すると根絶が難しい。一方で、昆虫と植物に交互に伝染するため、伝染源となる感染植物の処分や、媒介虫・中間宿主植物の除去によって伝染環を絶つことが、蔓延防止に有効である。その実現には、ファイトプラズマ病の発生状況を把握するための診断プロトコルの確立と、媒介虫や宿主植物の特定による病原ファイトプラズマの生態解明が不可欠である。

ココヤシやバナナ、キャッサバ等に代表される熱帯作物は主に発展途上国で栽培され、現地の食料生産を支えるのみならず、輸出産業としても極めて重要な地位を占める。これら熱帯作物にもファイトプラズマ病が大きな被害をもたらしているが、十分に研究されておらず有効な対策が実現できていない現状にある。そこで本研究では、熱帯作物に発生す

るファイトプラズマ病の防除に貢献することを目的として、病原ファイトプラズマの生態解明と診断プロトコルの開発に取り組んだ。

1. パプアニューギニアのココヤシとバナナに発生するファイトプラズマ病の研究

近年パプアニューギニア (PNG) のニューギニア島内において、主要農作物であるココヤシとバナナの生産を脅かす新たなファイトプラズマ病、*Bogia coconut syndrome* (BCS) と *banana wilt disease* (BW) が発見された。これらは葉が黄化して枯死に至る致死性の病害であり、蔓延して壊滅的被害に繋がるのが危惧されている。一方で、現地には実験設備が整備されておらず電力供給も安定しないことから、PCR 法を用いた一般的な遺伝子診断技術が利用できず、対策が困難であった。本研究では、PNG の公的機関から依頼を受け、当該病害に関する発生状況の調査と簡便な遺伝子診断プロトコルの開発を行った。

はじめに、病原ファイトプラズマを収集して塩基配列を解析することにより、類縁関係に基づく疫学的な観点から生態の解明を試みた。PNG のマダン州内でココヤシとバナナを採集し、特異的 PCR 法によって検定したところ、4 地区で採集した計 9 検体 (3 地区のココヤシ 5 検体、4 地区のバナナ 4 検体) について感染が確認された。検出されたファイトプラズマを宿主植物と採集地に基づいて 7 系統に整理し、16S rRNA 遺伝子とリボソームタンパク質オペロンの塩基配列を解読して比較したところ、いずれの領域についても 7 系統全てが同一の配列を有していた。このことから、採集した 7 系統は互いに非常に近縁であると考えられた。またこれら 7 系統は 16S rRNA 遺伝子塩基配列に関して、国際データベースに登録されている BCS 及び BW ファイトプラズマに加え、ニューギニア島のビンロウから検出された *arecanut yellow leaf* (AYL) ファイトプラズマとも 99%以上の高い同一性を示した。以上から、AYL・BCS・BW ファイトプラズマが互いに非常に近縁であると考えられた。続いて、解読した 16S rRNA 遺伝子塩基配列を既報のファイトプラズマ暫定種の基準株 (reference strain) と比較し、採集した 7 系統の分類を試みたところ、既報の暫定種とは異なる分類群を構成することが明らかになった。そのため、採集した 7 系統の構成する分類群を新種 '*Ca. P. noviguineense*' として記載し、非常に近縁であった国際デー

タベース上の AYL・BCS・BW ファイトプラズマもこの種に分類した。以上から、‘*Ca. P. noviguineense*’ がこれらの植物を宿主とする複雑な伝染環を持つことが想定され、中間宿主を考慮した総合的な防除対策が不可欠であると考えられた。

次に、現地で実施可能な診断プロトコルの開発の確立を目的として、利便性（迅速性及び簡便性）と正確性（検出感度及び特異性）に優れた等温遺伝子増幅法（Loop-mediated Isothermal Amplification; LAMP）による遺伝子診断キット（ファイトプラズマユニバーサル検出キット，ニッポンジーン）の活用を検討した。まず感染植物から CTAB 法により精製した DNA を本キットに供試し、BCS・BW ファイトプラズマの DNA が検出されることを確認した。次に、現地で実施できる簡便なサンプル調製方法として、キット付属の簡易プロトコルの適用を検討した。この簡易プロトコルでは、検体（葉脈切片）を抽出バッファーに浸漬して加熱処理をするだけでサンプル調製が完結する。そのため、CTAB 法による DNA 調整法とは異なり、遠心機などの機器とフェノールやクロロホルムなどの試薬が不要で、野外でも実施可能である。まず、従来通りに葉脈を供試することの妥当性を検証するため、ココヤシとバナナにおけるファイトプラズマの局在を調べた。ココヤシにおいては葉ではなく幹にファイトプラズマが蓄積していたため、幹から穿孔により採集したおが屑を検定に供した。おが屑の供試量と抽出バッファー量を最適化し、感染検体（陽性対照）と健全検体（陰性対照）を正しく検定できるサンプル調製方法を確立した。一方、バナナにおいては葉と偽茎の両方にファイトプラズマが蓄積していたため、従来の簡易プロトコルに従って葉脈を供し、感染検体（陽性対照）と健全検体（陰性対照）を正しく検定できることを確認した。以上から、LAMP キットを BCS と BW の検定に応用することにより、現地で実施できる実用的な遺伝子診断プロトコルを初めて確立した。

2. 東南アジア地域のキャッサバに発生するファイトプラズマ病の研究

東南アジア地域では、食糧や工業原料として重要なキャッサバに cassava witches' broom (CaWB) が蔓延して甚大な被害をもたらしている。CaWB は、茎葉が黄化・叢生して生育不良になり、塊茎の肥大とデンプン蓄積が妨げられて減収する病害である。罹病植物から ‘*Ca. P. asteris*’ が検出された報告に基づき、CaWB はファイトプラズマ病であると考えら

れてきた。そこで本研究では、キャッサバのファイトプラズマ感染を検定する遺伝子診断プロトコルの確立と、当該地域における感染状況の調査に取り組んだ。

はじめに、現地で実施可能な検定手法の確立を目指し、利便性と正確性に優れた先述の LAMP キットの活用を検討した。まず '*Ca. P. asteris*' の CTAB 法により精製した DNA を供試し、本キットで検出されることを確認した。次に、現地で実施できる簡便な手法として、キット付属の簡易プロトコルの適用を検討した。'*Ca. P. asteris*' 感染キャッサバを入手できなかったため、'*Ca. P. pruni*' 感染キャッサバを感染検体（陽性対照）として用いた。最初に、植物体の各部位を簡易プロトコルに供したところ、葉脈（主脈）・葉脈（側脈）・葉柄では感染検体・健全検体ともに検定に成功したが、茎と根では感染検体で偽陰性が見られた。また、検定に成功した部位のうち、葉脈（主脈）を用いた際に LAMP 反応が最も迅速に起きたため、検定部位として最適であると考えられた。続いて供試量を検討し、2mm × 5 mm に切り出した葉脈（主脈）1 切片が供試量として最適であった。以上より、キャッサバにおけるファイトプラズマ病の実用的な遺伝子診断プロトコルを確立した。

続いて、現地のキャッサバのファイトプラズマ感染状況を調べるため、ベトナム・カンボジア・タイにおいて収集された CaWB の症状を呈するキャッサバ 106 検体（ベトナム 58 検体、カンボジア 23 検体、タイ 25 検体）に関して特異的 PCR 法及び特異的 LAMP 法による検定を行なった。その結果、いずれの方法でも全ての検体が陰性と判定された。以上より、現地で発生する CaWB の病因がファイトプラズマだけとは限らない可能性が強く示唆され、病因について再検証の必要があると考えられた。

本研究により、BCS と BW については伝染環の解明、CaWB については病因の再検証の必要性が示された。これらは各病害の防除指針を決定するうえで重要な知見である。また、主要な熱帯作物 3 品目に対して、現地で実施できる簡便なファイトプラズマ病検定プロトコルを初めて確立した。これらの検定プロトコルはいずれも、利便性と正確性に優れた LAMP 法による遺伝子診断を応用したものであり、世界各地の熱帯作物に発生しているファイトプラズマ病の防除に資することが期待される。