

[成果情報名]カンキツグリーニング病原細菌の高効率人工培養法

[要約]新規に開発したカンキツグリーニング病原細菌 (CLas) 培地により、人工条件下で CLas を再現性よく高効率に培養できる。さらに、本培地にオキシテトラサイクリンを添加することで、CLas の増殖促進作用が認められる。

[キーワード] *Candidatus Liberibacter asiaticus*、人工培養法、カンキツグリーニング病

[担当]九州沖縄農業研究センター・生産環境研究領域・病害グループ

[代表連絡先]電話 029-838-8885

[分類]研究成果情報

[背景・ねらい]

カンキツグリーニング病は世界のカンキツ生産に甚大な被害を及ぼす植物検疫上の重要病害である。日本では沖縄県および鹿児島県徳之島以南の 3 島で発生しているが、鹿児島県においては緊急防除や根絶事業の実施、沖縄県においては本病多発地域から無病地域への移行といった公的措置により発生地域が限定できるよう不断の努力が続けられている。そこで、植物検疫行政においてカンキツグリーニング病罹病樹を見逃すことなく高精度に検出できる技術を開発することで、国内のカンキツ産地を守り、カンキツ産産を支援することができると考えられる。このようなニーズに答える要素技術として、カンキツグリーニング病原細菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) の人工培養法を利用した早期検出技術の開発が考えられる。これまでにカンキツ粗汁液を利用した人工培地の報告があるものの、粗汁液成分や培養条件が一定でないため再現性が低く実用化には至っていない。また、CLas の選択培養が可能な抗生物質の選抜も求められている。そこで、CLas の培養条件および抗生物質への感受性を明らかにすることで、CLas 人工培養法を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. KEGG データベースを利用した CLas と近縁細菌種である α -proteobacteria 属細菌群との代謝経路の比較解析の結果から、CLas を含む *Ca. Liberibacter* 属細菌では 6 つの代謝経路 (糖代謝関連経路、脂肪酸代謝経路、分枝鎖アミノ酸代謝経路、ヒスチジン代謝経路、芳香族アミノ酸代謝経路、およびポリアミン合成経路) が特異的に欠損していることがわかる (図 1)。
2. 酵母エキスやデンプンを含む培地に、前に述べた欠損代謝経路の主要産物 9 項目 (グルコース、補酵素 A、バリン、イソロイシン、プロリン、オルニチン、チロシン、トリプトファン、およびヒスチジン) もしくはその誘導体を補完した培地を利用することで CLas の培養が可能になる。
3. カンキツグリーニング病罹病樹の葉から調整した粗汁液を本培地に添加し、25°C で培養すると、培養 2 週間後に CLas の増殖が認められる。各種抗生物質のうち、オキシテトラサイクリン 1000ppm を培地に添加すると、雑菌の繁殖を抑制するとともに、CLas の増殖促進が認められる (図 2)。

[成果の活用面・留意点]

1. カンキツグリーニング病罹病が疑われるカンキツ樹等について、培地上での CLas の培養の有無による感染の確認が可能となり、早期発見技術の開発に活用される。したがって、本病感染樹の早期発見による国内カンキツ産地の保護に貢献できる。

[具体的データ]

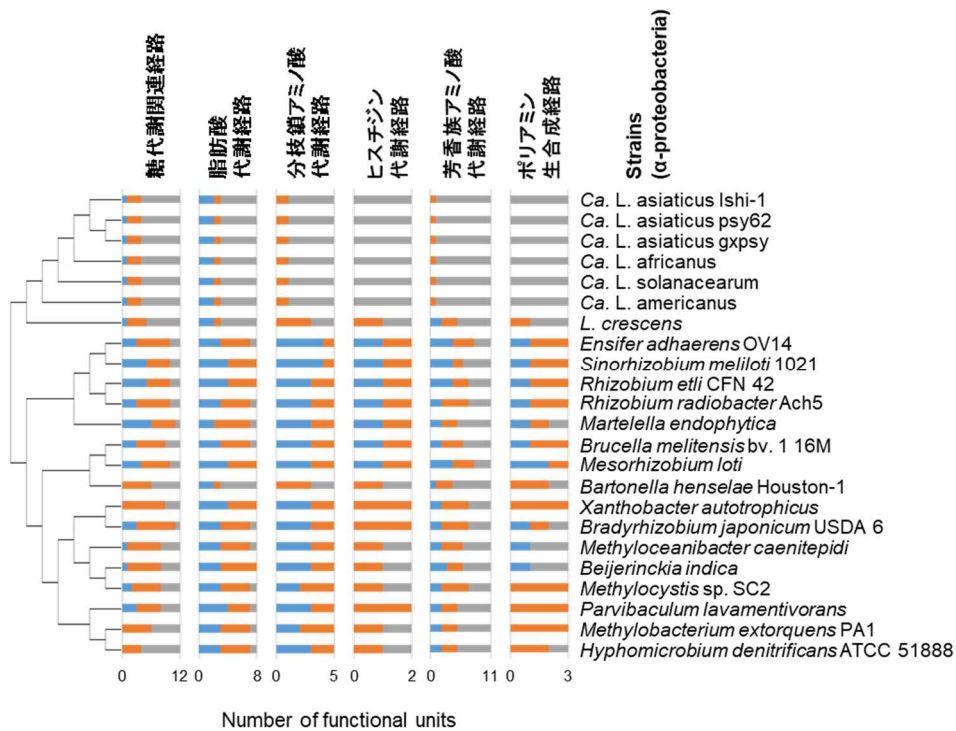


図1 α-proteobacteria 属細菌種間での代謝経路の比較解析から *Candidatus Liberibacter* 属細菌に見いだされた KEGG 代謝経路の特異的欠損

KEGG 代謝経路を構成する反応経路 (functional unit) について、KEGG データベースを利用し α-proteobacteria 属細菌種間で代謝経路を比較解析。保存 (青色)、一部欠損 (オレンジ) および欠損 (灰色) の3つに大別。系統樹は、16S ribosomal DNA 配列を用いて、Neighbor-joining 法 (bootstrap 解析: 1000 回) で作成。

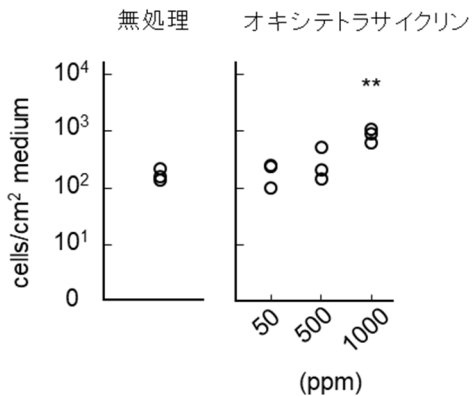


図2 CLas 培地オキシテトラサイクリン処理による CLas の増殖促進作用

培養 2 週間後の固形培地断片 1 cm²あたりの CLas 菌密度は CLas 特異的 PCR プライマーセットを用いたリアルタイム PCR により定量的に解析できる。培地にオキシテトラサイクリン 1000ppm を添加することにより CLas の増殖促進が認められる。Dunnett's test (無処理区に対して**P < 0.01)。

(藤原和樹、藤川貴史)

[その他]

予算区分: 交付金、競争的資金 (科研費、イノベーション強化)

研究期間: 2015~2018 年度

研究担当者: 藤原和樹、藤川貴史

発表論文等:

1) Fujiwara K. et.al. (2018) Front. Microbiol. 9:3089

doi: 10.3389/fmicb.2018.03089

2) 藤川、藤原「リベリバクター属細菌を培養および検出するための培地、キットおよび検出方法」特開 2018 - 130058 (2018 年 8 月 23 日)