

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：82111
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21780051
 研究課題名（和文） ミカンキジラミ体内におけるカンキツグリーニング病細菌の局在及び増殖部位の解明
 研究課題名（英文） Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)
 研究代表者
 井上 広光（INOUE HIROMITSU）
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・カンキツ研究領域・主任研究員
 研究者番号：80414663

研究成果の概要（和文）：カンキツグリーニング病の媒介虫ミカンキジラミは、病原細菌を保毒しても伝搬するとは限らない。このように伝搬しない保毒虫の体内においても高濃度の病原細菌が検出されることから、口器を通した細菌の吐き出し（伝搬）には直接関係しない腹部の消化管などにも病原細菌が定着し増殖することが強く疑われていた。そこで、保毒虫体内における病原細菌の局在部位を明らかにするために、*in situ* ハイブリダイゼーション法による病原細菌遺伝子の虫体内での原位置検出を試みた。その結果、伝搬しない保毒虫の体内においても、濾過室や中腸といった消化管のほか、卵巣にも病原細菌が存在することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： *Diaphorina citri* will not always transmit *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), the bacterium associated with the disease of huanglongbing or citrus greening, if the vector fed on infected citrus tree. We investigated the localization of Las in Las-positive but non-transmissible *D. citri* adults by oligonucleotide-probed *in situ* hybridization targeted to the bacterial 16S ribosomal RNA. The significant signals showing the targets were detected in the filter chamber, midgut, ovaries in tissue sections of non-transmissible Las-positive *D. citri*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫分子生物学、虫媒伝染性植物病害、*in situ*ハイブリダイゼーション

1. 研究開始当初の背景

カンキツグリーニング病（アジア型）は、師部局在性の細菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* によって引き起こされるカンキツ類の重要病害で、感染樹は数年で枯死に至る。日本国内では、1988年に沖縄県西表島で

感染樹が初確認されて以来、発生地域は年々北上してきており、2008年現在で鹿児島県喜界島および徳之島以南の南西諸島で広く発生が確認されている。

本病を媒介するのはミカンキジラミ（半翅目：キジラミ科）で、その成虫・幼虫ともに

感染樹の師管液を吸汁することで体内に病原細菌を取り込み（保毒）、成虫が健全樹上で吸汁する際に唾液とともに細菌を吐き出して伝搬すると考えられている。

しかし、その虫媒伝染様式については不明な点が多く、病原細菌は虫体内で定着・増殖すると考えられているが、その具体的部位については分子生物学的手法を用いて明らかにされたことはない。

研究代表者は、ミカンキジラミによる本病原細菌の保毒と伝搬の様式について定量 PCR 法等の分子生物学的手法を用いて研究してきた。これまでの成果として、成虫期と幼虫期から 25 日間獲得吸汁を続けた保毒虫について、唾液腺が位置する頭部～前胸部と中胸部～腹部に虫体を 2 分割し、各部位に含まれる病原細菌濃度を定量したところ、成虫期からの獲得吸汁条件では主として「中胸部～腹部」に細菌が存在するが、幼虫期からの獲得吸汁条件では羽化後一定の期間において「頭部～前胸部」で高濃度に保毒した（図 1）。

また、ミカンキジラミが病原細菌を体内に取り込んで保毒しても必ずしも伝搬するわけではなく、非伝搬性保毒虫の体内でも病原細菌が顕著に増殖することが明らかになっている。これらのことから、伝搬性保毒虫では唾液腺に高濃度保毒することが強く示唆される一方、非伝搬性保毒虫でも伝搬に関与しない中腸等の腹部消化管に高濃度保毒することが強く疑われていた。

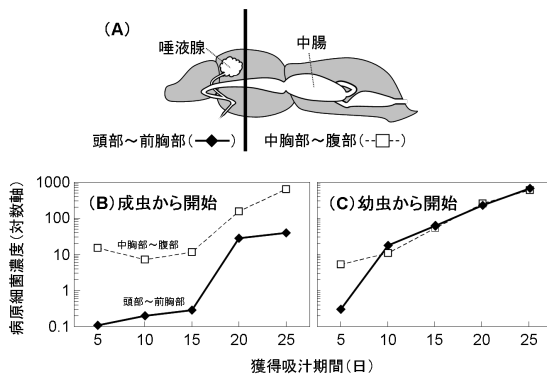


図 1 (A) ミカンキジラミ成虫体内の模式図と虫体の分割位置（胸部の縦線）。(B-C) 成虫と 5 齢幼虫から 25 日間の獲得吸汁を開始したミカンキジラミの部位別病原細菌濃度の推移。(C) の幼虫は 5 日目までに羽化済み。

2. 研究の目的

本研究では、ミカンキジラミ保毒虫体内における病原細菌の局在部位及び濃度と伝搬能力の関係を解明することを目的とする。そのために、虫体内における病原細菌遺伝子の原位置検出技術を確認し、伝搬性保毒虫と非

伝搬性保毒虫における病原細菌局在部位を明らかにする。また、虫体部位別の病原細菌濃度と伝搬能力の相関の有無を数理統計モデルによって解析し、保毒虫個体の特定部位の病原細菌濃度から伝搬確率を高精度に予測する技術を構築する。

3. 研究の方法

(1) 保毒虫のパラフィン包埋組織切片上で病原細菌を原位置検出するため、病原細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子に相補的なジゴキシングニン標識オリゴヌクレオチドプローブを設計し、これを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法の技術を確立する。

(2) 5 齢幼虫期から感染樹上で 20 日間以上獲得吸汁した保毒成虫について、ユズ実生苗への伝搬試験を個体ごとに行い、伝搬能力の有無を確認した保毒虫体内における病原細菌の局在部位を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析する。

(3) 感染樹上で 20 日間獲得吸汁した保毒虫をユズ実生苗に 20 日間接種吸汁することで個体ごとに伝搬能力を確認し、すべて個体について頭部～前胸部と中胸部～腹部の病原細菌濃度をリアルタイム PCR 法によって定量する。各部位の病原細菌濃度と伝搬能力に相関があるかどうかをロジスティック回帰分析によって解明する。

4. 研究成果

(1) 新規に設計した病原細菌 16S rRNA 用プローブ 4 種のうち、3 種で病原細菌を特異的に検出することができた（図 2）。

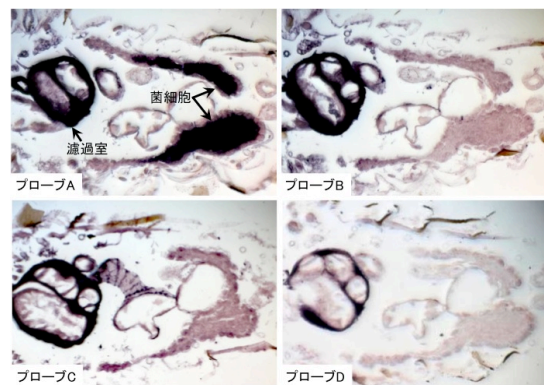


図 2 幼虫期から感染樹上で 30 日間以上獲得吸汁した保毒虫個体の腹部における病原細菌遺伝子の原位置検出結果（すべて同一個体の連続切片）。すべてのプローブで濾過室に強いシグナルが現れたが、A のプローブでは菌細胞にも非特異的な強いシグナルが見られた。

(2) 伝搬性保毒虫の一部の個体では前胸部の唾液腺と腹部の脂肪体に病原細菌を示すシグナルが見られ、全ての個体で腹部の濾過室 (filter chamber)、中腸、卵巣にもシグナルが見られた。非伝搬性保毒虫では唾液腺にシグナルが現れた個体はなかったが、ほぼ全ての個体で濾過室、中腸に極めて強いシグナルが見られた (図3)。濾過室は、カメムシ目昆虫のヨコバイ亜目や腹吻群に特有の器官で、吸汁した植物汁液から多量の水分を後腸へバイパスさせて、アミノ酸などの栄養分を濃縮した液体を中腸へ送る働きをする。師管液とともに病原細菌を吸汁した保毒虫では、伝搬能力の有無にかかわらず、濾し取られて濃縮された病原細菌が濾過室や中腸に定着することが示唆された。非伝搬性保毒虫の中胸部～腹部から抽出した全 DNA 中にも極めて高濃度の病原細菌遺伝子が検出されることがあるが、それらは濾過室や中腸といった消化管中の、伝搬現象には関与しない病原細菌を検出していたものと考えられた。

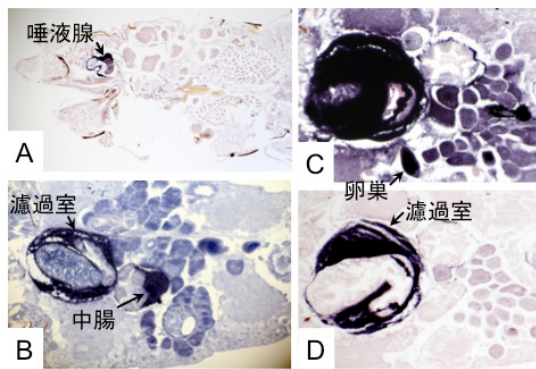


図3 保毒虫の体内における病原細菌遺伝子の原位置検出結果 (プローブは図2のプローブCを使用)。(A) 伝搬性保毒虫の頭部～胸部、(B-D) 非伝搬性保毒虫の腹部前半部。CとDは同一個体の連続切片で、Cは標識プローブのみ、Dは標識プローブに加えて、競合する同一塩基配列の未標識プローブを10倍量添加している。濾過室以外のシグナルは消失し、濾過室の病原細菌遺伝子量が特に多いことが示唆された。

(3) ユズ実生苗への個体伝搬試験によって伝搬能力の有無を確認した保毒虫について、頭部～前胸部と中胸部～腹部に虫体を2分割し、各部位から全DNAを抽出、リアルタイムPCR法によって病原細菌濃度を定量した。全303個体について、各部位の病原細菌濃度を独立変数、伝搬の有無を従属変数とする多重ロジスティック回帰分析を行った結果、頭部～前胸部の細菌濃度が伝搬結果に与える影響は有意で、中胸部～腹部の細菌濃度は有意ではなかった。また、頭部～前胸部に保毒

していない保毒虫 (中胸部～腹部のみに保毒する) 108個体は伝搬しなかった。さらに、頭部～前胸部の細菌濃度のみを独立変数とするロジスティック回帰分析の結果、統計的に有意な回帰式が得られ、この部位の細菌濃度が高いほど伝搬確率が上昇することが分かった。唾液腺における病原細菌の局在と増殖が、保毒虫の伝搬能力を左右することが強く示唆された。

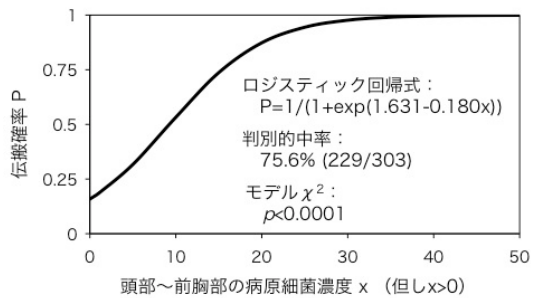


図4 個体伝搬確率のロジスティック曲線 (病原細菌濃度=病原細菌 *tufB* 遺伝子コピー数/ミカンキジラミ *wingless* 遺伝子コピー数)

南西諸島のカンキツグリーンング病発生地では、媒介虫ミカンキジラミのPCR検定による保毒虫 (率) 調査に基づいた媒介虫防除事業が行われている。しかし、これまでの保毒虫 (率) 調査では、虫体全体から抽出した全DNA中における病原細菌遺伝子の有無が重要で、伝搬能力の有無は問われていなかった。高濃度に保毒しながらも伝搬能力を持たない「非伝搬性保毒虫」が存在することが研究代表者によって明らかとなった今、本研究によって伝搬試験を行うことなく保毒虫サンプルの伝搬確率を高精度に予測することができるようになったことは、虫媒伝染による病害の拡大を効率的・効果的に防ぐ防除技術の開発に大きく寄与するものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T., Ashihara, W. 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology*, 155: 29-36. 査読有り. DOI:10.1111/j.1744-7348.2009.00317.x

〔学会発表〕（計3件）

① 井上広光、ミカンキジラミ体内におけるカンキツグリーニング病原細菌の原位置検出、第56回日本応用動物昆虫学会大会、2012年3月29日、近畿大学奈良キャンパス

② 井上広光、ミカンキジラミ保毒虫のカンキツグリーニング病伝搬確率を予測する、第55回日本応用動物昆虫学会大会、2011年3月28日、九州大学箱崎キャンパス

③ 井上広光、成虫期に獲得吸汁したミカンキジラミによるカンキツグリーニング病の虫媒伝染効率、第54回日本応用動物昆虫学会大会、2010年3月26日、千葉大学西千葉キャンパス

〔図書〕（計1件）

① 井上広光、2009. ミカンキジラミ体内でのカンキツグリーニング病原細菌の増殖と媒介特性. 植物防疫, 63: 499-502. 査読なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 広光 (INOUE HIROMTSU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・カンキツ研究領域・主任研究員

研究者番号：80414663

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし