

南西諸島で発生したカンキツグリーンング病原菌 *rplKAJL-rpoBC* オペロン領域の遺伝子解析松本光史・田中裕子・奥田 充・岩波 徹
(九州沖縄農業研究センター)

Mitsuhiro Matsumoto, Yuko Tanaka, Mitsuru Okuda and Toru Iwanami :

Characterization of *rplKAJL-rpoBC* Operon Region of Citrus Greening Organism in South-western Islands of Japan

南西諸島で発生するカンキツグリーンング病 (CG) は、1988年に沖縄県西表島で確認されて以降、汚染地域が年々北に広がり有効な対策が求められている病害である。本研究では、簡易診断法を確立するための第一段階として、CG 病原菌の *rplKAJL-rpoBC* オペロン領域において新たな遺伝子配列解析を行うとともに、南西諸島検体の配列を比較することで病原菌の由来を探索した。

1. 材料および方法

1) Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)

rplKAJL-rpoBC オペロン領域の既報部分 (3.2kb)¹⁾ の上流側に3つの特異的アンチセンスプライマーを、また下流側に3つの特異的センスプライマーを作製した。CG 発病樹並びに健全樹の葉からそれぞれ抽出した DNA を鋳型として、上流および下流のそれぞれにおいて、3つの特異的プライマーと1つの非特異的プライマーとの組み合わせで、3回の TAIL-PCR²⁾ を行った。得られた増幅産物は、ダイレクトシーケンシングにより配列を決定した。

2) 南西諸島の CG 検体および遺伝子配列比較

石垣島、沖縄本島、および与論島の CG 発症樹の葉からそれぞれ抽出した DNA (合計8検体) を鋳型として、*rplKAJL-rpoBC* オペロン領域に作製した2組のプライマーペア FW13-RV2 および FW1-RV1 でそれぞれ PCR 増幅を行った。増幅産物を配列解析し、検体間で比較した。

2. 結果および考察

1) *rplKAJL-rpoBC* オペロン領域の上流および下流部分の解読

rplKAJL-rpoBC オペロン領域の上流側と下流側において、両者とも健全樹の DNA から増幅が起らなかったが、発病樹の DNA から約2.0kb (上流) と約1.4 kb (下流) のそれぞれ単一断片が増幅された (第1図)。増幅産物の末端は、両者とも既知の配列とそれに続く未知の配列を含むものであったため、全長を解読し、1,902bp (上流) と1,045bp (下流) の新たな配列を決定した。その結果、上流側では大腸菌遺伝子 *tufB* の一部、*secE*、および *nusG* に相当する部分とそれらの間の非翻訳領域が、また下流側では *rpoB* の一部に相当する部分が新たに解読され、既報部分¹⁾ と合わせて6,145bp の連続した配列が明らかになった (第2図)。

CG 病原菌の遺伝子配列は、16S リボソーム RNA や 16S / 23S 間領域について明らかにされている³⁾ が、簡易遺伝子診断法を模索する際、これらの領域では宿主遺伝子との相性の高さが問題となる可能性がある。今回解読した領域は細菌に特異的なものであり、今後さらに他の細菌との相性を考慮に入れて検討することで、簡易かつ確実な診断法が確立されることが期待される。

2) 南西諸島 CG 検体間での遺伝子配列の比較

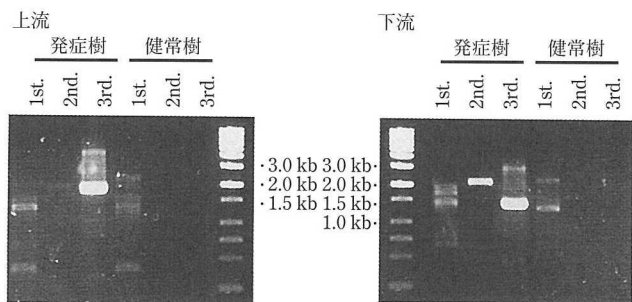
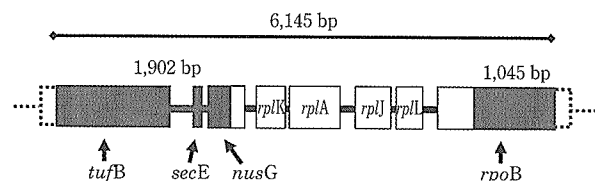
石垣島 (1分離株)、沖縄本島 (3分離株)、および与論島 (4分離株) の合計8分離株について、PCR で約

2.0kb と約1.7kb のそれぞれ単一断片が得られた (第3図)。これらを全て配列解析して、連続した3,022bp の配列を比較したところ、8検体の配列は全て同じであった。なお、これらの配列は既報¹⁾ の配列とは3塩基の相違が認められた。

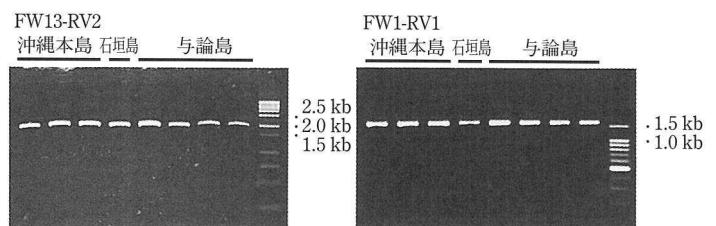
本研究で比較した3,022bp の部分には、比較的変異が起りやすいと考えられる非翻訳領域が合計676bp 含まれているが、解析した8検体には全く変異が認められなかった。従って、日本の分離株は極めてホモロガスな集団といえる。そのため、2003年に CG の発生が確認された徳之島より北においても、今後伝播していく可能性は十分にあり、より緊急な対策が必要であると考えられた。

引用文献

- 1) VILLECHANOUX, S., GARNIER, M., LAIGRET, F., RENAUDIN, J., and BOVE, J. M., *Curr. Microbiol.* **26**, 161-166, 1993.
- 2) LIU, Y. -G., and WHITTIER, R. F., *Genomics* **25**, 674-681, 1995.
- 3) SUBANDIYAH, S., IWANAMI, T., TSUYUMU, S., and IEKI, H., *Plant Dis.* **84**, 15-18, 2000.

第1図 *rplKAJL-rpoBC* オペロン領域遺伝子の TAIL-PCR による増幅第2図 *rplKAJL-rpoBC* オペロン領域付近の遺伝子図

注) 新たに解読した部位は灰色で示した。



第3図 南西諸島 CG 発症検体の病原体遺伝子断片増幅