

### ホルトノキ萎黄病およびグラジオラス首腐病 に関する研究

遠藤, 藍 / ENDO, Ai

---

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

60

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2019-03-31

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00022111>

# ホルトノキ萎黄病および グラジオラス首腐病に関する研究

STUDY ON THE CAUSAL AGENTS OF ELAEOCARPUS YELLOWS AND  
THE MOLECULAR MECHANISM OF GLADIOLUS ROT

遠藤 藍  
Ai ENDO  
指導教員 大島研郎

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻 修士課程

In recent years, yellowing symptom of leaves and penetration of tree crown occur in *Elaeocarpus zollingeri* throughout Japan, followed by a rapidly debilitating disease (ELY; Elaeocarpus yellows). I found that pathogenic phytoplasma causing ELY was identified as *Candidatus Phytoplasma malaysianum*. In addition, there is a genetic diversity among 'Ca. P. malaysianum' ELY strains. This is the first report showing the occurrence of 'Ca. P. malaysianum' in Japan.

*Burkholderia gladioli* is the pathogenic bacterium that causes disease in various plants. The aim of this study is to search for genes involved in the pathogenicity of *B. gladioli*. Mild pathogenic mutants were isolated with transposon mutagenesis. Identification of transposon insertion sites revealed that purine biosynthesis and serine biosynthesis pathway may be involved in the pathogenicity of *B. gladioli*. Thin-layer chromatography analysis suggested that purine biosynthesis pathway may be involved in toxoflavin production.

**Key Word** : *Elaeocarpus yellows*, *Phytoplasma*, *Burkholderia gladioli*, *toxoflavin*

## 1. 緒言

### (1) ホルトノキ萎黄病について

ファイトプラズマは *Mollicutes* 綱に属する植物病原細菌であり、世界各地で甚大な被害を与えている。ファイトプラズマは 16S rRNA 遺伝子の塩基配列によって分類され、世界で約 40 種、日本で 7 種が報告されている。

近年、日本各地のホルトノキ (*Elaeocarpus zollingeri*) において、葉の黄化や樹冠透過の症状が見られ、急激に衰弱、枯死する病害が発生している。ホルトノキは街路樹として用いられる常緑樹であると同時に、天然記念物や文化財に指定されている個体も多いが、本病発病により文化財等の指定が解除されるという問題も生じている。1999 年にファイトプラズマによる病害であることが報告されたが (Kawabe, 1999)、未だ種は特定されていなかった。本研究ではホルトノキ萎黄病について、病原ファイトプラズマの種を同定することを目的とした。

### (2) グラジオラス首腐病について

*Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* は、グラジオラス首腐病、タマネギりん片腐敗病、シンビジウム褐色腐敗病など、経

済的に重要な作物や高価な観葉植物に病害を引き起こす病原細菌である。*B. gladioli* が産生する二次代謝産物トキシソフラビンは植物に高い毒性を持ち、病徴の激化に関与すると考えられている。しかし、*B. gladioli* における病原メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では、*B. gladioli* の病原性に関与する遺伝子を探索することで、新たな防除方法の開発に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

## 2. 方法

### (1) ホルトノキ萎黄病ファイトプラズマの遺伝子解析

本研究では、東京都文京区の街路樹、港区の公園 3 箇所、徳島県、沖縄県本島、西表島の各地で採取したホルトノキ罹病樹を使用した。これらの罹病樹からファイトプラズマ DNA を含む植物 DNA を抽出した。抽出 DNA を鋳型とし、16S rRNA, *secA*, *rpoC* 遺伝子領域を標的としたファイトプラズマ特異的プライマーを用いて Nested PCR を行った (図 1)。これらの DNA 増幅産物をシーケンスし、遺伝子解析を行った。また MEGA7 を用いて最尤法により系統樹を作成した。

## (2) *B. gladioli* pv. *gladioli* の病原性因子の探索

本研究では、ジーンバンクから取り寄せた *B. gladioli* pv. *gladioli* MAFF302424 を材料に用いた。野生株のコンピテントセルに、Ez-Tn5 トランスポゾン (Epicentre 社製) をエレクトロポレーション法で導入することにより、無作為に遺伝子を変異した株を約 800 株作出した。各変異株をグラジオラス (*Gladiolus hybridus*) の葉に接種し、野生株よりも有意に病原性が低下した株 (弱毒株) をスクリーニングした。この弱毒株について、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いてトキソフラビン産生を評価した。さらに、Universal Genome Walker Kit (TaKaRa 製) を用いて、弱毒株のトランスポゾン挿入位置を特定した。

## 3. 結果および考察

### (1) ホルトノキ萎黄病ファイトプラズマの系統解析

ファイトプラズマの分類では、①1.2 kbp 以上の 16S rRNA 遺伝子配列を用いて解析を行い、②相同性が 97.5% 以上の場合に同種とされる。本研究で採取した全地域のサンプルを解析した結果、16S rRNA 遺伝子領域の配列は *Candidatus Phytoplasma malaysianum* タイプ系統 MaPV の配列と 99.3% の相同性を示したことから、ホルトノキ萎黄病の病原ファイトプラズマは同暫定種に分類されることが示された。本種はマレーシアで発見され、2013 年に新種として報告されたファイトプラズマであり、日本での発生が確認されたのは本研究が初めてである。日本のホルトノキ萎黄病ファイトプラズマは、16S rRNA 遺伝子の系統樹において MaPV など既報のマレーシア系統とは独立した 1 つのクラスターを形成した。MaPV と同種ではあるが異なる新系統であることが示唆されたため、日本で発生する系統を ELY 系統と命名した (図 2)。また西表島サンプルの *secA*, *rpoC* 配列は他の国内サンプルと系統樹上でも分離するなど、国内サンプル間でも遺伝的な多様性が認められた。

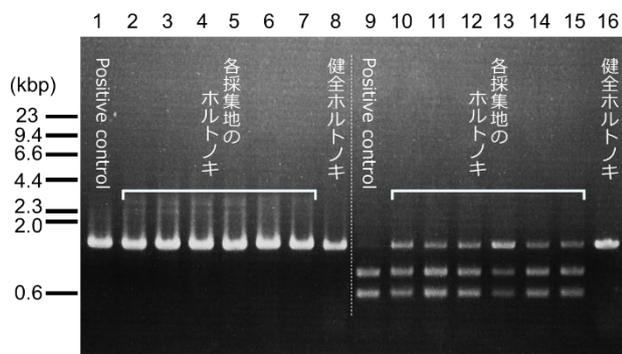


図 1. 16S rRNA 領域 PCR 産物・制限酵素 *ScaI* 処理産物。1, 9: *Ca. P. asteris*; 2-7, 10-15: 東京都文京区, 港区, 江東区, 徳島県, 沖縄県本島, 西表島の各罹病樹; 8, 16: 健全樹; 1-8: 16S rRNA 領域 PCR 産物; 9-16: 1-8 PCR 産物の制限酵素 *ScaI* 処理産物。

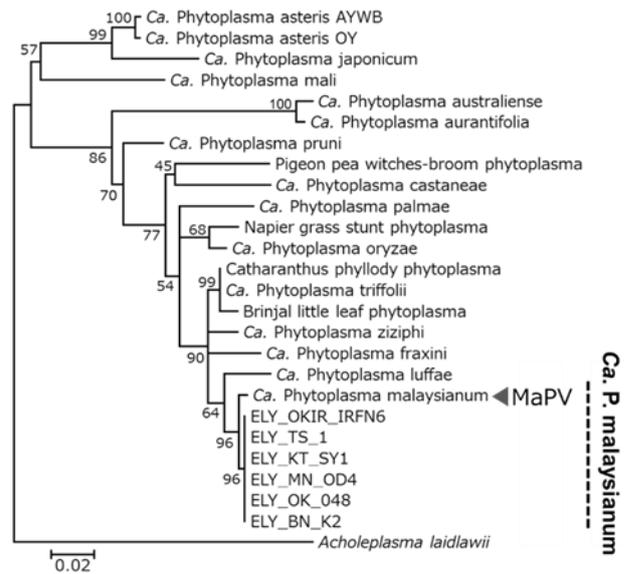


図 2. 16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統樹。General time reversible モデルによる最尤法を用い、ブートストラップ値 (%) は 1000 回のリサンプルに基づいて算出した。

### (2) *B. gladioli* pv. *gladioli* の病原性因子の解析

MAFF302424 を野生株 (WT) として作出した約 800 株の変異株をグラジオラス葉に接種したところ、4 株の弱毒株が得られた (図 3, 表 1)。

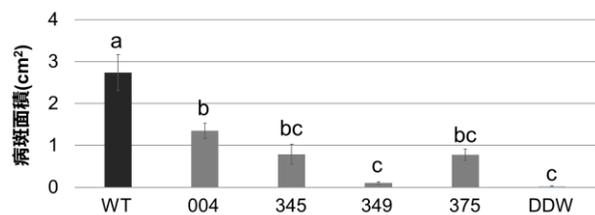


図 3. 接種 3 日目の病斑面積。試験は 20 反復行い、imageJ を用いて病斑面積を計測した。Negative control には DDW を用いた。アルファベットの違いは有意差があることを示す (tukey 検定,  $P < 0.05$ )。

表 1. 弱毒株のトランスポゾン挿入位置

弱毒株	トランスポゾン挿入位置
004	16S rRNA (シトシン(1402)-N(4)-メチル基転移酵素 RsmH) <i>rsmH</i>
345	3-ホスホセリン/ホスホヒドロキシレオニンアミノ基転移酵素 SerC <i>serC</i>
349	ホスホリボシルホルミルグリシンアミジンサイクロリガーゼ PurM <i>purM</i>
375	FAD結合オキシダーゼ GlpD <i>glpD</i>

遺伝子地図におけるバーは 1 kbp を示し、矢頭 ▼ はトランスポゾン挿入位置を示す。

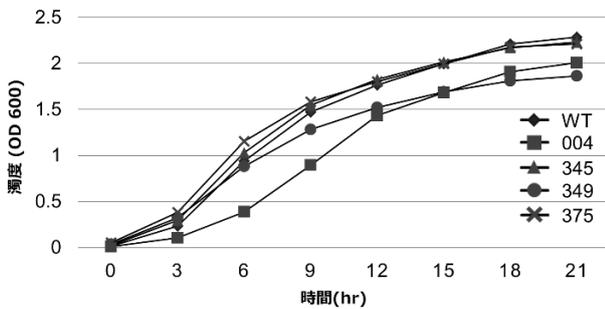


図 4. 弱毒株と野生株の増殖能の比較. 試験は 3 反復行った. 横軸は測定時間, 縦軸は濁度 (吸光度 600 nm) を示す.

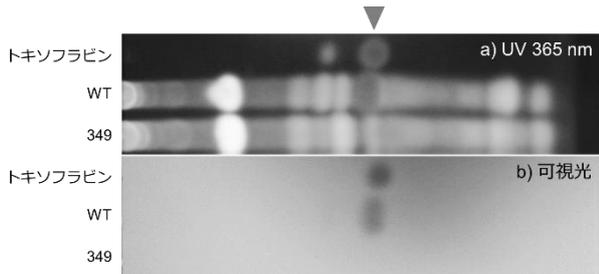


図 5. TLC におけるトキシフラビン産生量の比較. a) UV 照射下, b) 可視光照射下でのシリカゲルプレートの様子. 矢頭 ▼ はトキシフラビンのスポット位置を示す.

004 株では, 遺伝子の翻訳に関与する *rsmH* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されており, 増殖能に低下がみられた (図 4). 345 株では, セリン合成系に関与する *serC* 遺伝子にトランスポゾンが導入されていた. 培地上での増殖能に

は変化がみられなかったが, 植物体内でのアミノ酸合成の不足により生育が低下し, 病原性に影響した可能性も考えられる. 349 株では, プリン合成系に関与する *purM* 遺伝子にトランスポゾンが挿入されており, 培養後期の増殖能がやや低下していた (図 4). プリン合成系遺伝子の変異による病原性低下は, 以前に *Pectobacterium carotovorum* において報告されている. また TLC による評価の結果, 349 株ではトキシフラビン産生量が大幅に低下していた (図 5).

以上の結果より, セリン合成系やプリン合成系が *B. gladioli* pv. *gladioli* の病原性に関与することが示唆された. また, プリン合成系は病原性だけでなくトキシフラビン産生にも大きな影響を及ぼすことが示唆された.

### 謝辞および成果の公表

本研究を行うにあたり, ご指導・ご援助を賜りました琉球大学 亀山統一先生, 徳島大学 佐藤征弥先生, 沖縄県森林資源研究センター 伊藤俊輔様, 東京港埠頭株式会社 鈴木健一様, 元農業茶研 畔上耕児様, 東京大学 難波成任先生, 前島健作先生, 岩渕望様, 法政大学 堀江博道先生, 西尾健先生, 多々良明夫先生, 廣岡裕吏先生, そして協力していただいた多くの皆様に, 厚く御礼申し上げます.

なお, 本研究における主要成果は, *Journal of Plant Pathology* vol.84, *樹木医学研究* vol.22, 平成 29, 30 年度日本植物病理学会大会, 第 22 回 樹木医学会, 第 7 回 アジアマイコプラズマ学会・第 45 回 日本マイコプラズマ学会において報告しました.