

令和4年3月31日

安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進  
委託事業のうち短期課題解決型研究  
研究成果報告書

課題番号：3104

*Xylella fastidiosa*の宿主範囲及び検定方法に関する研究

研究期間：令和元年度～令和3年度（3年間）

研究総括者名：藤川 貴史

試験研究機関名：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
植物防疫研究部門

## <別紙様式3>最終年度報告書

### 1 研究目的

*Xylella fastidiosa*は多犯性の植物病原細菌であり、ブドウのピアース氏病（Pierce's disease）、モモフォニイ病（phony disease）、プラムleaf scald病、カンキツのCVC病（citrus variegated chlorosis）、オリーブscorch病、アーモンドscorch病等の種々の果樹病害が知られている。さらに、様々な樹木（ニレ、カシ、プラタナス、クワ、カエデ等）に対しても病害を引き起こす。また、*X. taiwaensis*は台湾でのみ見つかっている近縁細菌種であるが、ニホンナシに病原性を持っている。近年、*X. fastidiosa*は宿主範囲の違い等から様々な亜種が提案されており（*subsp. fastidiosa, pauca, multiplex, sandyi*等）、果樹や樹木だけでなく草本植物に対しても病原性を持つことが報告されている。これら*X. fastidiosa*（本報告書では便宜上*X. taiwaensis*も含む）は、現在までに台湾、トルコ、イタリア、フランス、スペイン、米国、カナダ、メキシコ、ブラジル、アルゼンチン等で発生している。本細菌は、一般的に、様々な植物に葉枯れ、枝枯れ等の症状を引き起こし、収量低下や枯死といった大きな被害を与えており、世界的に未発生地域への侵入が警戒されている。

わが国においては、これまでに本菌は侵入していないことから、植物防疫法により発生地域の輸出国に対しては、輸出前の宿主植物の検定が要求されている。しかしながら、近年の各国の研究によって、上述のように本病菌には宿主範囲の異なる様々な亜種が存在していることや、新たな宿主植物が相次いで発見報告されていることから、国内への侵入の危険性は高まっているところである。

このため、本研究では、

- ・ 宿主範囲の調査研究
- ・ 遺伝子情報に基づく*Xylella fastidiosa*の迅速な検出・同定技術とそのためのデータベースの開発

により、以下を研究目標とする。

- ・ *X. fastidiosa*菌株2種類に対して、国内植物6種以上について宿主範囲を決定する。
- ・ 海外で報告されている媒介虫および宿主植物に関する生物・遺伝子情報および小課題1に基づいて国内産植物6種の生物情報を掲載したデータベースを構築する。これをもとに、国内産植物6種で利用可能な簡易迅速な遺伝子検査法を開発する。

その結果、本菌の国内への侵入を水際で食い止めることや、万が一国内で発生した場合に迅速かつ的確な防除を行うことが期待される。

## 2 研究内容

### (1) 研究課題

#### 1) 宿主範囲の調査研究（小課題責任者：藤川貴史・農研機構植物防疫研究部門）

わが国未発生 of 植物病原細菌 *X. fastidiosa* について、海外ではその様々な亜種（病原性系統）の存在が報告されている。また、多くの果樹や樹木、作物がその宿主植物となりうる事が報告されている。しかし具体的な宿主の植物種や品種については海外の知見に頼らざるを得ない状況であり、国内主力の植物種や品種に関する病徴の有無や症状の特徴については不明である。また、近年わが国への輸入量が増えている果樹の中で本病菌の宿主となりうる植物については、国内への本病菌侵入経路になる危険性がある。加えて、温暖多雨な日本の気候において、本病菌宿主の病徴等が海外事例と同じであるかどうかという知見も無い。一方で、本病菌の国内への侵入防除や国内発生時に迅速かつ的確な防除を実施するためには、検疫や調査の対象とする果樹や作物等を明示すると共に、その病徴についても十分な情報を有する必要がある。そこでこれまでに海外で報告されている宿主植物（生物種や品種）だけでなく、宿主報告の事例が無い国内で生産されている品種等についても本病菌が宿主となり得るかどうかを明らかにし、宿主範囲の調査ならびに病徴等植物検疫上必要な生物学的・植物病理学的知見を得る。このため、以下の研究に取り組む。

本課題では、*X. fastidiosa* の各亜種菌株（例えば *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* や *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*）を接種源として、試験植物に接種し、感染の可否、病徴の有無を明らかにする。*X. fastidiosa* の各亜種菌株については、本病菌が国内未発生であることから、植物防疫法に従い輸入禁止品輸入許可を受けて、海外の遺伝資源機関（アメリカタイプカルチャーコレクション（米国）等）から購入する。また、海外遺伝資源機関で用意されていない亜種菌株については、必要に応じて関係機関より菌株または感染植物の分譲を同じく植物防疫法に従い輸入禁止品輸入許可を受けて導入する。これら亜種菌株を接種源として様々な植物に接種を行う。

対象とする植物は、まず宿主報告の事例が無い国内品種を扱う。具体的には、国内で生産されている生食用ブドウ品種（例：巨峰及びシャインマスカット）や、カンキツ品種（例：温州みかん及びせとか）とする。また、ニホンナシ、モモ、ウメ等の国内主力品種も接種対象の候補とする。さらに、近年国内への輸入量が増加している果樹についても接種試験を行う。具体的には、醸造用ブドウ品種（例：メルロー及びシャルドネ）や、オリーブ、キイチゴ属とする。なお、これら対象植物の選定に当たっては、国内栽培や輸入の状況に応じて委託元と協議して行う。

接種については、海外の学術論文等で公表されている人工接種法を基本とする。すなわち、亜種菌株を定法に従って培養し、培養菌液を植物の葉の腋芽に注入接種することで行う。接種後の植物は指定された管理温室内で維持し、1か月後の植物体に病徴等が目視で確認できるか調べる。目視により病徴と考えられる症状が認められた時には、病徴部より接種菌の再分離を行い、本病菌が感染していることを明らかにする。感染植物は主に接種1か月以降の植物体について、経時的な病徴観察を行う。感染植物は適正な施肥や水分管理による栽培を行う。この際、成長による新葉の展開、新梢や新蔓の発達、開花等が期待できるため、これら各器官単位に症状の程度を調査する。定期的に組織の一部を回収し核酸抽出を行い、本結果を、国内の宿主範囲としてリスト化する。

なお、接種1か月後の植物体について、病徴の有無に関わらず組織の一部を回収して核酸抽出を行い、小課題2. (4) : 簡易迅速遺伝子検査法の試験材料に供する。

## 2) 遺伝子情報に基づく *Xylella fastidiosa* の迅速な検出・同定技術とそのためのデータベースの開発 (小課題責任者: 藤川貴史・農研機構植物防疫研究部門)

国内未発生である *X. fastidiosa* の国内への侵入防除や国内発生時に迅速かつ確かな防除を実施するためには、小課題1で明示されるような検疫や調査の対象とする果樹や作物等の情報に加えて、迅速な検出・同定技術が不可欠である。特に、本病菌の感染が疑わしい植物について、都道府県機関や植物防疫所支所等といった現場レベルで実施可能な簡易検査は本病菌に対する初動対応のための技術として重要である。そこで、*X. fastidiosa* の検出について、海外で報告されている遺伝子検査法を洗い出しPCR法等のプライマー配列等の標的箇所となる *X. fastidiosa* の遺伝子配列情報をカタログ化したデータベースの開発を行う。このうち、国内の簡易検査で実施可能な遺伝子検査法のうち、広範な宿主植物の生物種・品種や、器官、生育時期の違いに影響されにくい核酸抽出法及び遺伝子検査法を比較試験によって選定し、簡易検査法の開発を行う。また、宿主植物や *X. fastidiosa* の亜種菌株ごとの病徴等の違い、海外既報の媒介虫の生物学的情報についてもデータベースに搭載する。このため、以下の実行課題に取り組む。

### (1) 宿主植物及び媒介虫に関する生物情報及び遺伝子情報のデータベース化

本課題では、小課題1の成果となる国内の重要な宿主植物の生物情報を、海外の情報も加えてデータベースに搭載する。継続的に小課題1より宿主になり得る植物の情報を得て、データベースのアップデートを行い、現場レベルで閲覧できるように、植物ごとの病徴写真や病徴説明を提供する。また、*X. fastidiosa* の媒介虫については国内未確認であることから、海外で媒介虫として報告されている種の生物情報及び遺伝子情報をデータベースに搭載する。なお、*X. fastidiosa* の遺伝子情報については、簡易検査法に利用可能な遺伝子配列等の標的遺伝子情報のみで十分であるため、小課題2. (2) で取り組む。

データベースのフレームについては、委託元と協議の上、既存のデータベース (例えば、農林水産省委託プロジェクト研究「有害動植物の検出・同定技術の開発」で開発中のデータベース) のフレームを利用し時間的・コスト的な開発効率を図るとともにデータベース運用上の効率化を行う。

### (2) *Xylella fastidiosa* 遺伝子情報のデータベース化

本課題では、*X. fastidiosa* の遺伝子情報のうち、海外等で報告されている遺伝子検査法、とくにPCR法で用いられているプライマー配列等の標的箇所やその周辺情報をカタログ化しデータベースに搭載する。このカタログを参照することで *X. fastidiosa* の標的遺伝子を確認することができ、同時にPCRプライマー配列の情報も利用できるようにする。このデータベースと連動して、国内の広範な宿主植物の生物種・品種や、器官、生育時期の違いに影響されにくい遺伝子検査法の開発を、小課題2. (4) : 簡易迅速遺伝子検査法の開発の課題で取り組み、比較試験の結果についても本データベースで閲覧できるようにする。

### (3) 簡易核酸抽出法の比較

本課題では、*X. fastidiosa* の広範な宿主植物について、その種類 (生物種・品種)

や、器官、生育時期の違いに影響されにくく多検体の検査が可能な核酸抽出法を選定し、小課題2. (4) : 簡易迅速遺伝子検査法の開発に成果を受け渡す。*X. fastidiosa*の宿主となり得る植物、特に果樹については、その組織に糖類やフェノール物質等が多く含まれているため、核酸抽出量が少なくなったり、PCR時に増幅阻害が生じたりすることが懸念されている。そこで、簡易迅速遺伝子検査法へ悪影響を及ぼさない核酸抽出法について、国内外で報告されている方法や、国内で作成が容易な試薬、市販品として入手可能な簡易抽出キットを、それぞれPCR法の感度や精度を評価することで比較検討する。比較試験では、様々な植物組織から核酸抽出を行い、その植物由来の内在性遺伝子をPCR法によって検出可能かどうかで評価を行う。また、あらかじめ*X. fastidiosa*の菌体を加えた植物組織から核酸抽出を行い、標的遺伝子をPCR法によって検出することでも評価を行う。

#### (4) 簡易迅速遺伝子検査法の開発

本課題では、宿主植物の種類や器官、生育時期の違いに影響されにくい簡易迅速遺伝子検査法を選定する。小課題1で提供される植物試料から小課題2. (3)で選定される抽出法等に従い核酸を抽出し、これを鋳型としてPCR法による*X. fastidiosa*の標的遺伝子の検出を行う。小課題2. (2)でカタログ化されている標的遺伝子及びそのプライマー配列を用いて、様々な既報の増幅条件(酵素の種類や反応条件等)でPCR法を比較する。その結果に基づき、様々な試料に対して安定して感度及び精度の優れているものを選定する。本課題の比較試験の結果については、小課題2. (1)のデータベースに搭載し、宿主植物の種類や器官ごとの検出感度や精度について閲覧できるようにする。

#### (2) 達成目標及び進捗目標

- ・ *X. fastidiosa*菌株2種類に対して、国内植物6種以上について宿主範囲を決定する。
- ・ 海外で報告されている媒介虫および宿主植物に関する生物・遺伝子情報および小課題1に基づいて国内産植物6種の生物情報を掲載したデータベースを構築する。これをもとに、国内産植物6種で利用可能な簡易迅速な遺伝子検査法を開発する。

#### (3) 研究成果の行政施策・措置への貢献

本研究で得られる成果は、都道府県の検査機関(病虫害防除所や公設試験場等)や植物防疫所支所等、検査機関が国内の果樹等農作物において、検査機関が*X. fastidiosa*の感染が疑わしい植物体の早期発見、簡易検査による初動調査を確実な実施に貢献する。その結果、本菌の国内への侵入を水際で防止すること、万が一国内で発生した場合に迅速かつ的確な防除を行うことで、国内農業生産の保護に寄与するものと考えられる。

得られた成果は委託元である農林水産省に提供した上で、知的財産権となり得る成果については協議の上、特許出願等を行う。また、知的財産権とならない成果や特許出願済の成果については学術論文等により国際的な情報提供を行う。

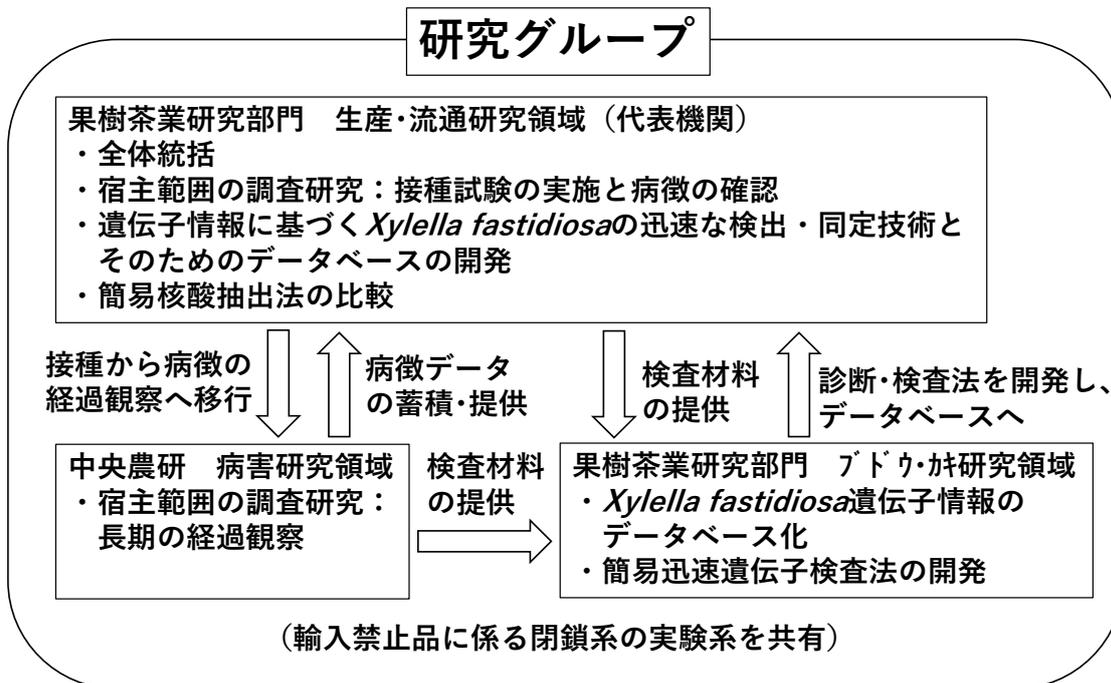
(4) 年次計画

研究課題	令和元年度	令和2年度	令和3年度
1. 宿主範囲の調査研究 宿主範囲の調査研究	国内産植物への接種試験・ 病徴観察		
2. 遺伝子情報に基づく <i>Xylella fastidiosa</i> の迅速な検出・同定技術とそのためのデータベースの開発	宿主植物および媒介虫に関する 生物・遺伝子情報のデータベース化		
(1) 宿主植物及び媒介虫に関する生物情報及び遺伝子情報のデータベース化	<i>X. fastidiosa</i> の同定・検出に関する 遺伝子情報のデータベース化		
(2) <i>Xylella fastidiosa</i> 遺伝子情報のデータベース化	PCRに適した簡易迅速な核酸抽出法の選抜		
(3) 簡易核酸抽出法の比較	国内産植物で利用できる 遺伝子検査法の開発		
(4) 簡易迅速遺伝子検査法の開発			

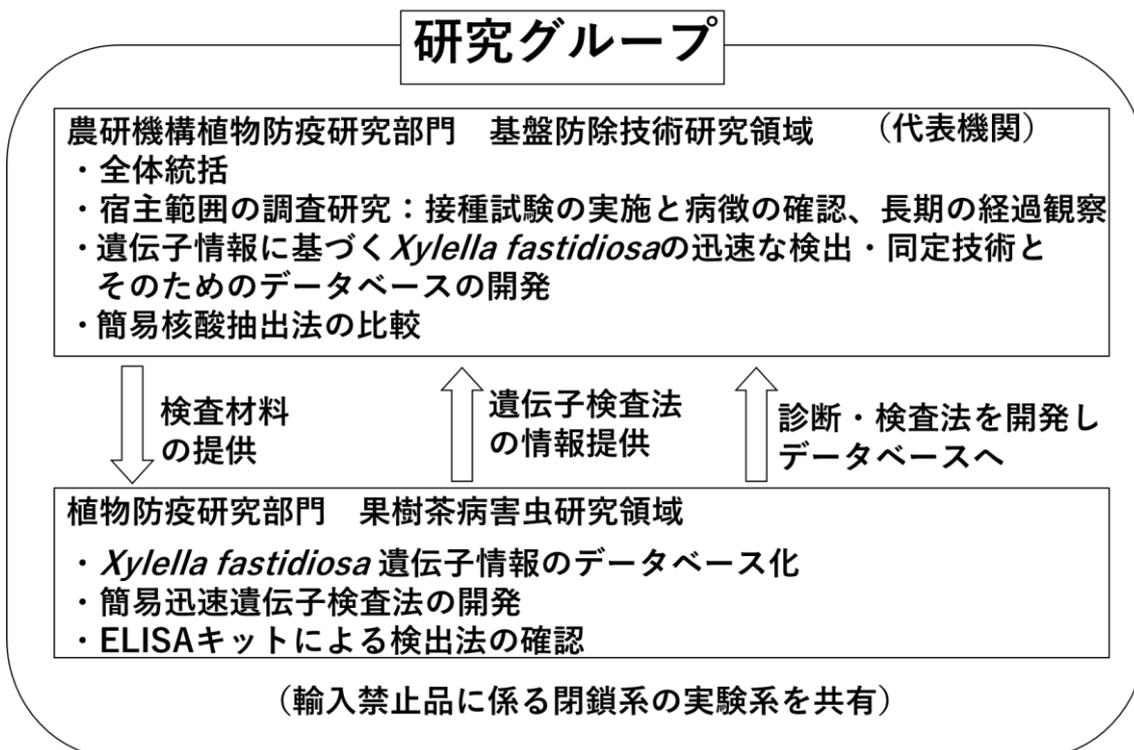
研究課題「宿主範囲の調査研究」については、当初「接種試験による宿主範囲の決定」と「感染植物の病徴等経時観察調査」の2つの実行課題を設定し、前者で本菌の培養等の検討を含めていたが、培養法についてはほぼ確立し、海外の試験事例に沿って接種試験の実施に至っていることから、2つの課題を区別せず、接種試験から一か月後の病徴確認、その後、経過観察をシームレスに実施した方が合理的と判断された。

(5) 研究体制

令和元年度～令和2年度



令和3年度（組織改編によりグループが変更。研究実施内容等に変更はない。）



(6) 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室*		研究担当者**	エフォート (%)
	機関	研究室		
研究総括者	農研機構 植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域越境性・高リスク病害虫対策グループ	藤川 貴史	30
1. 宿主範囲の調査研究	農研機構 植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域越境性・高リスク病害虫対策グループ	○ 藤川 貴史	前出
		果樹茶業病害虫研究領域検疫対策グループ	足立 嘉彦 千秋 祐也	5 20
	農研機構 植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域越境性・高リスク病害虫対策グループ	久保田 健嗣	5
2. 遺伝子情報に基づく <i>Xylella fastidiosa</i> の迅速な検出・同定技術とそのためのデータベースの開発 (1) 宿主植物及び媒介虫に関する生物情報及び遺伝子情報のデータベース化 (2) <i>Xylella fastidiosa</i> 遺伝子情報のデータベース化 (3) 簡易核酸抽出法の比較 (4) 簡易迅速遺伝子検査法の開発	農研機構 植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域越境性・高リスク病害虫対策グループ	○ 藤川 貴史	前出
	農研機構 植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域越境性・高リスク病害虫対策グループ	△ 藤川 貴史	前出
	農研機構 植物防疫研究部門	果樹茶業病害虫研究領域生物防除研究グループ	△ 伊藤 隆男	20
		果樹茶業病害虫研究領域検疫対策グループ	千秋 祐也	前出
	農研機構 植物防疫研究部門	基盤防除技術研究領域越境性・高リスク病害虫対策グループ	△ 藤川 貴史	前出
	農研機構 植物防疫研究部門	果樹茶業病害虫研究領域生物防除研究グループ	△ 伊藤 隆男	前出

		果樹茶業病害虫研究 領域検疫対策グルー プ	千秋 祐也	前出
--	--	-----------------------------	-------	----

(注1) 研究総括者には◎、小課題責任者には○、実行課題責任者には△を付すこと。

(注2) 代表機関及び共同研究機関並びに研究総括者の変更を行う必要が生じた場合はその理由を明記した書面を添付すること。

\*本事業に参画する研究機関・研究室は、国立研究開発法人農研機構の組織改編によって、植物防疫研究部門に集約された。

\*\*本事業に参画する研究担当者のうち、研究総括者は参画者内で変更した（連絡済、病気療養のため）。

#### (7) 各年度の研究費

令和元年度 6, 730, 478円

令和2年度 6, 755, 048円

令和3年度 6, 700, 000円

### 3 研究推進会議の開催状況 別添のとおり。

### 4 研究成果の概要（別紙参照）

#### (1) 主な成果

##### 1) 成果の内容

わが国未発生の植物病原細菌 *Xylella fastidiosa* について、国内で栽培されている果樹等に人工接種により感染させることに成功した。また、植物で疑似症状を呈した場合に遺伝子検査法等で病原細菌の感染を調べることで感染の有無を確認できることを示すことができた。

また、これまでの遺伝子検査法よりも偽陰性が生じにくい新規プライマーセットの設計及びそれを用いたPCR法の開発にも成功した。

これら宿主情報や培養や接種の知見、画像、及びプライマー配列情報等をデータベースに搭載し、検疫等の必要時に容易に閲覧可能な体制を整えた。

##### 2) 成果の活用

上記研究成果は日本の植物検疫行政における基礎情報として活用できる。とくに、新規遺伝子検査法は従来海外で報告されているものよりも、偽陰性が出にくいいため、適切に感染疑いのある植物を検出することが期待できる。また国内果樹品種等における病徴等についても画像としてデータベースに搭載しており、必要に応じて閲覧できる。

#### (2) 各研究課題の成果

##### 1) 小課題名：宿主範囲の調査研究

## (ア) 研究目標

わが国未発生の植物病原細菌 *Xylella fastidiosa* について、海外ではその様々な亜種（病原性系統）の存在が報告されている。また、多くの果樹や樹木、作物がその宿主植物となりうる事が報告されている。しかし具体的な宿主の植物種や品種については海外の知見に頼らざるを得ない状況であり、国内主力の植物種や品種に関する病徴の有無や症状の特徴については不明である。また、近年わが国への輸入量が増えている果樹の中で本病菌の宿主となりうる植物については、国内への本病菌侵入経路になる危険性がある。加えて、温暖多雨な日本の気候において、本病菌宿主の病徴等が海外事例と同じであるかどうかという知見も無い。一方で、本病菌の国内への侵入防除や国内発生時に迅速かつ確かな防除を実施するためには、検疫や調査の対象とする果樹や作物等を明示すると共に、その病徴についても十分な情報を有する必要がある。そこでこれまでに海外で報告されている宿主植物（生物種や品種）だけでなく、宿主報告の事例が無い国内で生産されている品種等についても本病菌が宿主となり得るかどうかを明らかにし、宿主範囲の調査ならびに病徴等植物検疫上必要な生物学的・植物病理学的知見を得る。

## (イ) 研究内容

本課題では、*X. fastidiosa* の各亜種菌株（例えば *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* や *X. fastidiosa* subsp. *multiplex*）を接種源として、試験植物に接種し、感染の可否、病徴の有無を明らかにする。*X. fastidiosa* の各亜種菌株については、本病菌が国内未発生であることから、植物防疫法に従い輸入禁止品輸入許可を受けて、海外の遺伝資源機関（アメリカタイプカルチャーコレクション（米国）等）から購入する。また、海外遺伝資源機関で用意されていない亜種菌株については、必要に応じて関係機関より菌株または感染植物の分譲を同じく植物防疫法に従い輸入禁止品輸入許可を受けて導入する。これら亜種菌株を接種源として様々な植物に接種を行う。

対象とする植物は、まず宿主報告の事例が無い国内品種を扱う。具体的には、国内で生産されている生食用ブドウ品種（例：巨峰及びシャインマスカット）や、カンキツ品種（例：温州みかん及びせとか）とする。また、ニホンナシ、モモ、ウメ等の国内主力品種も接種対象の候補とする。さらに、近年国内への輸入量が増加している果樹についても接種試験を行う。具体的には、醸造用ブドウ品種（例：メルロー及びシャルドネ）や、オリーブ、キイチゴ属とする。なお、これら対象植物の選定に当たっては、国内栽培や輸入の状況に応じて委託元と協議して行う。

接種については、海外の学術論文等で公表されている人工接種法を基本とする。すなわち、亜種菌株を定法に従って培養し、培養菌液を植物の葉の腋芽に注入接種することで行う。接種後の植物は指定された管理温室内で維持し、1か月後の植物体に病徴等が目視で確認できるか調べる。目視により病徴と考えられる症状が認められた時には、病徴部より接種菌の再分離を行い、本病菌が感染していることを明らかにする。感染植物は主に接種1か月以降の植物体について、経時的な病徴観察を行う。感染植物は適正な施肥や水分管理による栽培を行う。この際、成長による新葉の展開、新梢や新蔓の発達、開花等が期待できるため、これら各器官単位に症状の程度を調査する。定期的に組織の一部を回収し核酸抽出を行い、本結果を、国内の宿主範囲としてリスト化する。

## (ウ) 研究結果

果樹を含む植物種への接種試験を3年間に渡って実施、観察した結果、*Xylella* 亜種の接種によってブドウ（シャインマスカット、ピオーネ）、カンキツ（ナツダイダイ、せと

か)、トマトで疑似症状を確認することができ、また遺伝子検査によっても陽性を確認できるものがあった。国内において*Xylella fastidiosa*亜種の人工接種による宿主調査は本研究が初めてであり、国内果樹品種の病徴を示すことができた。一方で、イチゴ、バラ、キク、ツツジ、リンゴ、モモともに花が枯れるまで観察したが病徴らしいものは出ず、また遺伝子検査も陰性であった。また、クリ、オリーブ、チャノキに接種した場合には、葉縁部で枯死や黒点等の異常が見られたが遺伝子検査では陰性であり、宿主となり得るかどうか本研究器官では判然としないものもあった。

*Xylella fastidiosa*各亜種の培養については、様々な培地を試験した結果、BCYE培地がコロニーの見やすさ等の点から推奨できる結果となった。確立した培養系は、現場で採集される疑わしい試料から、本細菌分離への利用が考えられる。さらに、接種によって得られた感染植物や、細菌を混入した様々な植物試料を用いて、市販のELISAキットの有効性を検証することができるなど、病虫害防除所等でも実際に利用可能な技術・知見が得られた。

#### (エ) 研究成果の活用における留意点

今回の接種試験は隔離温室内における人工接種であることから、その得られた病徴は品種等によって典型的なものであり、野外で実際に発生した場合に同じ病徴を呈するとは断言できない。また葉焼けや他の病虫害の影響によって疑似症状が発生することが考えられるため、病徴だけで判断せずに、遺伝子検査法やELISA検査法等複数の検査によって感染の有無を確認する必要がある。

#### (オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

本事業が3年間という期間であったため、長期に渡る経過観察ができていない。このため*Xylella fastidiosa*各亜種が感染しているにも関わらず無病徴及び遺伝子検査で陰性となったまま(低密度で感染しており、遺伝子検査の検出限界以下が想定される)の植物が残っているかもしれない。このため事業終了後も暫くは経過観察を続け、最終的な宿主範囲等については、委託元と協議の上、学会発表等で公表するべきと考える。

#### <引用文献>

藤川貴史・大西淳・伊藤隆男・久保田健嗣・千秋祐也・足立嘉彦 (2021) *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*を接種した生食用ブドウ品種の病徴確認及び病原体の早期検出法、日本植物病理学会報 87(1) p11.

## 2) 小課題名：遺伝子情報の基づく*Xylella fastidiosa*の迅速な検出・同定技術とそのためのデータベースの開発

### (ア) 研究目標

国内未発生である*X. fastidiosa*の国内への侵入防除や国内発生時に迅速かつ的確な防除を実施するためには、小課題1で明示されるような検疫や調査の対象とする果樹や作物等の情報に加えて、迅速な検出・同定技術が不可欠である。特に、本病菌の感染が疑わしい植物について、都道府県機関や植物防疫所支所等といった現場レベルで実施可能な簡易検査は本病菌に対する初動対応のための技術として重要である。そこで、*X. fastidiosa*の検出について、海外で報告されている遺伝子検査法を洗い出しPCR法等のプライマー配列等の標的箇所となる*X. fastidiosa*の遺伝子配列情報をカタログ化したデータベースの開発を行う。このうち、国内の簡易検査で実施可能な遺伝子検査法のう

ち、広範な宿主植物の生物種・品種や、器官、生育時期の違いに影響されにくい核酸抽出法及び遺伝子検査法を比較試験によって選定し、簡易検査法の開発を行う。また、宿主植物や *X. fastidiosa* の亜種菌株ごとの病徴等の違い、海外既報の媒介虫の生物的情報についてもデータベースに搭載する。

#### (イ) 研究内容

本課題では、小課題1の成果となる国内の重要な宿主植物の生物情報を、海外の情報を加えてデータベースに搭載する。継続的に小課題1より宿主になり得る植物の情報を得て、データベースのアップデートを行い、現場レベルで閲覧できるように、植物ごとの病徴写真や病徴説明を提供する。また、*X. fastidiosa*の媒介虫については国内未確認であることから、海外で媒介虫として報告されている種の生物情報及び遺伝子情報をデータベースに搭載する。さらに、*X. fastidiosa*の遺伝子情報のうち、海外等で報告されている遺伝子検査法、とくにPCR法で用いられているプライマー配列等の標的箇所やその周辺情報をカタログ化しデータベースに搭載する。このカタログを参照することで*X. fastidiosa*の標的遺伝子を確認することができ、同時にPCRプライマー配列の情報も利用できるようにする。このデータベースと連動して、国内の広範な宿主植物の生物種・品種や、器官、生育時期の違いに影響されにくい遺伝子検査法の開発を行う。すなわち、簡易迅速遺伝子検査法へ悪影響を及ぼさない核酸抽出法について、国内外で報告されている方法や、国内で作成が容易な試薬、市販品として入手可能な簡易抽出キットを、それぞれPCR法の感度や精度を評価することで比較検討した上で、上記カタログ化されている標的遺伝子及びそのプライマー配列を用いて、様々な既報の増幅条件（酵素の種類や反応条件等）でPCR法を比較する。その結果に基づき、様々な試料に対して安定して感度及び精度の優れているものを選定する。

#### (ウ) 研究結果

海外で報告されている*X. fastidiosa*の媒介虫に関する情報を基に、日本昆虫目録の準新翅類に記載されている国内の近縁昆虫（ヨコバイ科、アワフキムシ科、トゲアワフキムシ科、ツノゼミ科、セミ科、カメムシ類）を媒介可能性昆虫としてリスト化し、データベースに搭載した。媒介可能性昆虫の中でも、海外で媒介虫として問題となっているオオヨコバイ（*Cicadella viridis*）やホソアワフキ（*Philaenus spumarius*）については、国内でも広く分布していることが知られており、本病が国内で発生した場合のまん延が懸念されることが分かった。また媒介昆虫の条件として、樹液（道管液）吸汁性が挙げられ、ヨコバイ科、アワフキムシ科、トゲアワフキムシ科、ツノゼミ科、セミ科、ヒラタカメムシ科のいずれも媒介リスクを有していると考えられる。

また上述の小課題、宿主範囲の調査研究で得られた病徴写真や培養写真等の画像、既報の遺伝子検査法のPCRプライマーの配列情報等についてデータベースに搭載し閲覧できるようにした。

遺伝子検査法については、既報の遺伝子検査法よりも偽陰性の出にくい新規の*Xylella*属（*Xylella fastidiosa*の亜種だけでなく*Xylella taiwanensis*についても標的とする）検出プライマーセットによる遺伝子検査法を開発した。

#### (エ) 研究成果の活用における留意点

国内では*Xylella*属細菌の感染植物は未発生であることから、国内のヨコバイ科やアワフキムシ科等の媒介可能性昆虫が病原細菌を保菌するかどうかは不明である。また海外で知られていない媒介虫の存在も否定できないため、媒介可能性昆虫については引き

続き海外の知見等の収集を続ける必要がある。

遺伝子検査法については、本研究で新規開発した手法が偽陰性が出にくいいため検疫の現場では推奨できるが、病原細菌が検出限界以下で感染している場合も想定されるため、注意を要する。

#### (オ) 研究目標の達成に当たっての問題点

遺伝子検査法の開発について問題点はない。一方でデータベースについては引き続き関係機関が閲覧や更新できるような体制が必要であると考ええる。

#### <引用文献>

Ito T and Chiaki Y. (2021) Two new superior primer pairs for universal detection of *Xylella* spp. in conventional PCR and TaqMan quantitative real-time PCR、*Journal of Microbiological Methods*、189:106321

伊藤隆男・千秋祐也 (2021) *Xylella* 属細菌を検出するエンドポイント PCR 用のユニバーサルプライマー、*日本植物病理学会報*、87(3) p193.

伊藤隆 (2022) *Xylella* 属細菌の感染植物を早期発見するための PCR 検定法、*農研機構研究成果情報*

### 5 研究成果の発表 別添のとおり。

### 6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等

本研究目的は、国内未発生であり、海外で深刻な被害を及ぼしている *Xylella fastidiosa* について、その宿主範囲と病徴等を把握し、疑似症状を呈する植物があった場合に速やかに検査できるための技術の確立を行うことであるため、概ね達成できたと考える。

ただし、本病害は宿主植物によっては潜伏期間が長いことや、また無病徴感染や低菌密度感染している事例も海外では多く知られていることから、長期的な経過観察等が不可欠である。そのため、事業終了後も経過観察を続ける必要がある。また、本病害に関する基礎知見が得られる場合には、都度委託元と情報共有できるように取り組む必要もあると考える。

<研究総括者の自己評価>

項目		評価結果
試験研究全体		B：概ね順調
研究小課題	宿主範囲の調査研究	B：概ね順調
	遺伝子情報に基づく <i>Xylella fastidiosa</i> の迅速な検出・同定技術とそのためデータベースの開発	A：順調
自己評価コメント		
<p>国内で初めて <i>Xylella fastidiosa</i> の接種試験を成功させ、病徴等の観察を行うことができたことは評価できると考える。また、国内ブドウ品種であるシャインマスカットやピオーネ、カンキツ品種せとかについて、それぞれ病徴を示すことができたことから、これら知見は海外には無く国内だけのものとして関係機関で共有することができる。ただし長期観察を引き続き要する果樹（オリーブ、クリ等）もあり、小課題「宿主範囲の調査研究」については「概ね順調」とした。</p> <p>データベースへの情報の搭載や、新規遺伝子検査法の開発に成功したことについては、予定通り目標を達成することができたため「遺伝子情報に基づく <i>Xylella fastidiosa</i> の迅速な検出・同定技術とそのためデータベースの開発」は「順調」とした。</p>		

研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	Xylella fastidiosaの宿主範囲及び検定方法に関する研究
---------	-------------------------------------

課題番号	(1) 研究推進会議等開催回数	(2) 行政が活用しうる成果の有無	(3) 学術論文数		(4) 口頭発表回数		(5) 出版図書数	(6) 国内特許権等数		(7) 国際特許権等数		(8) 報道件数	(9) 物品購入の有無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
3104	5	無		1	2								無

(1) 研究推進会議等の開催実績

区分: ①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者数	消費・安全局担当官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	平成31年度安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業「Xylella fastidiosaの宿主範囲及び検定方法に関する研究」研究推進会議	2019.8.7	農研機構中央農研・環境保全型病害虫防除技術開発共同実験棟セミナールーム	10名	有	プロジェクト開始にあたり、研究計画全体の確認および2019年度の試験内容の検討
①	平成31年度安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業「Xylella fastidiosaの宿主範囲及び検定方法に関する研究」研究推進会議	2020.2.27	メール協議にて開催 文部科学省研究交流センター(つくば市)において開催することとしていたが、新型コロナウイルスが国内発生早期(ステージ2)になったことを踏まえ、同会議をメールによる開催に代え、2月27日までに意見集約を行った。		有	2019年度の成果および次年度以降の研究計画の検討
①	令和2年度安全な農林水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究委託事業「Xylella fastidiosaの宿主範囲及び検定方法に関する研究」研究推進会議	2021.1.27	Microsoft Teamsによるオンライン会議にて開催 新型コロナウイルス感染症が引き続きまん延していることを踏まえ、同会議をオンラインによる開催とし、意見集約を行った。	10名	有	2020年度の成果および次年度の研究計画の検討
①	令和3年度安全な農林水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究委託事業「Xylella fastidiosaの宿主範囲及び検定方法に関する研究」進捗報告会議	2021.7.19	Microsoft Teamsによるオンライン会議にて開催 新型コロナウイルス感染症が引き続きまん延していることを踏まえ、同会議をオンラインによる開催とし、意見集約を行った。	10名	有	2021年度の研究計画の確認
①	令和3年度安全な農林水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究委託事業「Xylella fastidiosaの宿主範囲及び検定方法に関する研究」研究推進会議	2022.2.28	Microsoft Teamsによるオンライン会議にて開催 新型コロナウイルス感染症が引き続きまん延していることを踏まえ、同会議をオンラインによる開催とし、意見集約を行った。	10名	有	2021年度の成果及びこれまでのまとめの確認

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
Two new superior primer pairs for universal detection of Xylella spp. in conventional PCR and TaqMan quantitative real-time PCR, T. Ito and Y. Chiaki, Journal of Microbiological Methods, 189, 106321, 2021	農研機構植物防疫研究部門

## (4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
Xylella fastidiosa subsp. fastidiosaを接種した生食用ブドウ品種の病徴確認及び病原体の早期検出法、藤川貴史・大西純・伊藤隆男・久保田健嗣・千秋祐也・足立嘉彦、令和二年度日本植物病理学会関東部会、2020年9月	農研機構果樹茶業研究部門、農研機構中央研究センター
Xylella属細菌を検出するエンドポイントPCR用のユニバーサルプライマー、伊藤隆男・千秋祐也、令和3年度日本植物病理学会大会、2021年3月	農研機構果樹茶業研究部門

## (5) 出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
⑤	農研機構研究成果情報、(Xylella属細菌の感染植物を早期発見するためのPCR検定法)、伊藤隆男、農研機構、2022年	農研機構植物防疫研究部門

## (6) 国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

## (7) 国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

## (8) 報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

## (9) 購入物品

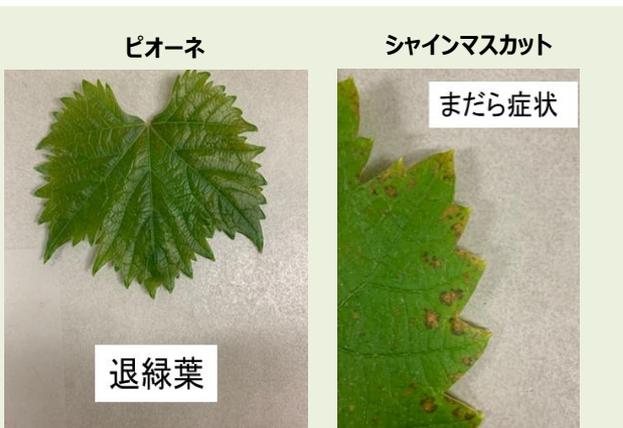
品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		

# Xylella fastidiosaの宿主範囲及び検定方法に関する研究

**背景・目的：** 植物病原細菌*Xylella fastidiosa*はブドウやカンキツ、オリーブ等様々な果樹を枯死させるため世界の農業生産に深刻な影響を及ぼしている。本病害はわが国では未発生であることから、わが国への侵入を水際で食い止めるため、また万が一国内で発生した場合に迅速かつ的確な防除を行うことができるよう、国内における果樹品種が宿主となり得るかどうかを明らかにし、簡易迅速な遺伝子検査法を開発する。

**研究成果：** *Xylella fastidiosa*の複数亜種(subsp. *fastidiosa*、subsp. *multiplex*等)を様々な植物及び国内品種に接種したところ、*X. f. subsp. fastidiosa*を接種したブドウの国内品種であるピオーネやシャインマスカットで特徴的な病徴を示すことが分かった。カンキツの国内品種であるウンシュウミカンやせとかで病徴を示すことが分かった。加えてトマトに*X. f. subsp. multiplex*を接種した場合には、斑点症状が現れた。これらでは接種した病原菌の遺伝子が検出されたことから、感染が成立する宿主であることが確認された。

またこれまで既報の遺伝子検査法を見直し、簡易な核酸抽出法を決定し、新規に設計したPCRプライマーセットによる高精度で迅速な遺伝子検査法を開発することができた。



**図 1. 人工接種による病徴の確認**

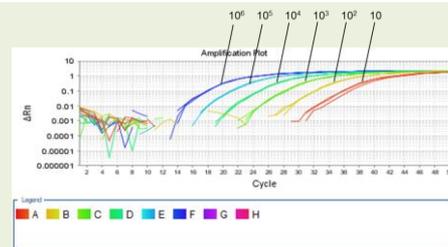
*Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa*を接種したブドウ品種ピオーネでは葉が退緑化する病徴を、ブドウ品種シャインマスカットでは葉縁部がまだら症状となる病徴を示した。カンキツ品種せとかに接種した場合には葉の黄化が認められた。また、*X. f. subsp. multiplex*を接種したトマトでは斑点症状が現れた。

PCR	対象	塩基配列	増幅塩基数
エンドポイント	<i>X. fastidiosa</i>	X0838S: GCAAATTGGCACTCAGTATCG	622
		X1439A: CTCCTCGGGTTAAGGTAC	
	<i>X. fastidiosa</i>	X67S1: GGACGGCAGCACATTGGTA	604
		XL2r: CCTGTACCACACTCTAGGTATC	
植物	E1141r2: AGGAATTGACGGGAAGGGCACCAC	548	
	C18Sr8: GCGATCGGAACACTTCACCGGA		
(リアルタイムPCR機器設置環境)			
リアルタイム	<i>X. fastidiosa</i>	XrDf1: GGCTCATCCAATCGCACAA	172
		XLr4: CGGACGGCAGCACRKTGGT	
	XrD-Pf (P): FAM-CCTAAGGTCCCTGCTT-MGB		

P: TaqMan プローブ (FAM: 6-carboxyfluorescein, MGB: minor-groove-binding non-fluorescent quencher)

**表 1. Xylella検出用新規PCRプライマー情報**

*Xylella*属を特異的に検出する新規PCRプライマーの配列及び増幅塩基数。エンドポイントPCR及びリアルタイムPCRでそれぞれ設計された。



**図 2. Xylella特異的リアルタイムPCRにおける標的DNA量の検出限界**

*Xylella*属を特異的に検出するリアルタイムPCRにおいて、標的である*Xylella* DNA量の検出限界を調べた結果。標的DNAは10コピー程度まで検出可能であり極めて高精度であることがわかった。

**成果の効果・活用：** 本研究によって、*Xylella fastidiosa*の国内における果樹品種や植物種の宿主範囲が明らかとなり、万が一国内で発生した場合に植物の調査範囲を決定することに役立つと考えられる。また、簡易迅速で高精度な遺伝子検査法を開発したことから、本技術を用いることで、わが国への侵入を水際で食い止めると共に、国内での発生調査に利用することができる。

研究機関: 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
研究総括者: 藤川 貴史