

学 位 論 文 題 名

果樹類、園芸植物のウィロイド及び
ウィロイド性病害に関する研究

学位論文内容の要旨

ウィロイドによって起こる疾病は特に永年性作物（果樹類及び園芸植物）に発生し、潜在感染している場合が多く、時として甚大な被害を引き起こす場合も少なくない。本研究は、これまで病原不明であったセイヨウナシからウィロイド様 RNA の検出、ウィロイド RNA の構造解析、モモ、スモモのウィロイドの分離、同定及び発生状況の調査、及び、園芸植物のキクに病害を起こすキク矮化ウィロイド（CSVd）の分離、ゲノムの塩基配列の決定、検出法の確立及び実用的な遺伝子診断法を開発することを目的として行ったものである。

1)セイヨウナシウィロイドの検出、分離、同定：山形県に発生したくぼみ果病試料（山形株）及び福島県の粗皮病試料（福島株）の果皮及び葉から抽出した低分子 RNA をキュウリに接種した結果、ホップ矮化ウィロイド（HSVd）特有の矮化、葉巻病徴が現れた。本ウィロイドと HSVd 数系統を 8 M 尿素変性、5 % PAGE で移動度を比較した結果、福島株（粗皮病）と山形株（くぼみ果病）は共に 297 塩基を有する HSVd - plum と同じ移動度を示した。HSVd グループに共通の合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、ドットプロットハイブリダイゼーションを行ったところ、前述のセイヨウナシウィロイドの 2 分離株は共に反応して、HSVd グループに近縁なウィロイドであることが明らかになった。

セイヨウナシから分離したウィロイドをキュウリで増殖後、抽出した低分子 RNA を鋳型にし逆転写後、PCR で増幅した cDNA を pUC119 の SmaI 切断部位に挿入して、大腸菌 JM109 を形質転換させた。本ウィロイドの 2 分離株の塩基配列を決定した結果、山形株（くぼみ果病）及び福島株（粗皮病）は HSVd - hop 分離株に比べそれぞれ 4 塩基、2 塩基の置換が認められた。以上のことから、セイヨウナシから分離したウィロイドは共に HSVd グループに属する新しい分離株であり、HSVd - pear と結論した。

これとは別にセイヨウナシ 30 試料より抽出した全核酸をリターン PAGE で検定した結果、HSVd - pear より遅く泳動する約 315 塩基の大きさのウィロイドを分離した。

2) モモ及びスモモからホップ矮化ウイルス (HSVd) の検出, 同定: 山梨県から採集したモモ及び青森県と熊本県から採集したスモモから低分子 RNA を抽出し, キュウリで接種検定, 及び, 5 % PAGE 検定を行ったところ, HSVd が検出された。山梨県産のモモからは既に HSVd の検出が報告されていたが, 本研究によって初めて青森県及び熊本県のスモモにも HSVd が存在していることが確認された。また, 熊本県のスモモの苗木は山梨県に由来していることから, HSVd - plum が山梨県から苗木によって伝搬されたことが推測される。

3) キク矮化ウイルス (CSVd) の分離, 同定, 及び, 遺伝子診断法の開発: 日本産キク試料から抽出した低分子 RNA をキク, トマト, 及び, ビロードサンシチに接種した結果, キク (ミスルト品種) には黄色斑点, トマトには無病徴, 及び, ビロードサンシチには葉巻症状が現れた。

罹病キク (品種ポピュラー) の 2 株より抽出した低分子 RNA を鋳型にし, 逆転写した cDNA を PCR 法により増幅後, BamHI 分解により得られた完全長 CSVd・cDNA を pUC119 の BamHI 切断部位に挿入し, クローニングした。CSVd の全塩基配列を決定し, 354 塩基からなっていることを明らかにした。イギリス分離株 (CSVd - E) と比較すると 4 塩基の置換が認められ, これら分離株を CSVd - J (日本株) とした。

キクから抽出した低分子 RNA とジゴキシゲニン (DIG) で標識した cDNA プローブとドットプロットハイブリダイゼーションを行った後, 発色反応, 及び, 発光反応の検出感度を比較した結果, 両反応の間では差異が認められず, いずれも低分子 RNA 2 ng まで検出できた。CSVd 感染キクより抽出した全核酸を用いても低分子 RNA と同様, CSVd・cDNA プローブと特異的にハイブリダイゼーションすることが明らかとなった。ドットプロットハイブリダイゼーション法は少なくとも 7.5 % リターン PAGE より検出感度が 100 倍高いことが判明した。本法はプローブの作製が簡単で, 放射性同意元素のような半減期がなく, 取扱いが安全であることから, 優れた実用的な遺伝子診断法であると言える。

これまで日本では CSVd が報告されていたが, これは単なる伝搬試験によるものであり, 著者はキクから抽出した全核酸, 及び, 低分子 RNA を用いて, PAGE 検定, ^{32}P 及び DIG 標識 CSVd・cDNA をプローブとして用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより, 北海道, 栃木県, 静岡県, 及び, 香川県産キクより CSVd が検出され, 日本に広く分布していることを初めて明らかにした。

逆転写-ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (RT - PCR) 法で増幅した CSVd・cDNA を DIG 標識した CSVd・cDNA プローブとポリスチレン製のマイクロプレートでハイブリダイ

ゼーションを行い、その後アルカリホスファターゼ（ALP）標識抗 DIG 抗体と反応させ、発色反応により検出する PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーションによる CSVd の検定を検討した。その結果、本法は高感度の遺伝子診断法として実用性が高く、CSVd の検出に有効であることが確認された。

以上のように病原不明のセイヨウナシ、モモ、スモモより抽出した低分子 RNA の接種実験、PAGE 検定、遺伝子診断、ウィロイドゲノムの構造解析を通して、ウィロイドが果樹類に広く分布していることを確認した。また、キク矮化ウィロイドを中心としたウィロイドの検出法の開発を試み、実用的かつ簡易的な遺伝子診断法を確立した。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	木 村 郁 夫
副 査	教 授	生 越 明
副 査	教 授	喜久田 嘉 郎
副 査	助教授	上 田 一 郎

本論文は260ページの和文論文で表37, 図61, 引用文献146を含み 6 章で構成されている。別に参考論文 1 編が添えられている。

本研究はこれまで病原不明のセイヨウナシ、モモ、スモモ、及び、キクの疾病をウィロイド性病害であることを罹病組織から分離した低分子 RNA の接種試験、ウィロイドゲノムの全塩基配列を決定して構造解析、PAGE 検定により、病原ウィロイドを決定し、実用的な遺伝子診断法として、アルカリホスファターゼを標識した抗 DIG 抗体を用いた PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーション法を確立した。

1) セイヨウナシウィロイドの検出、分離、同定：ナシくぼみ果病（山形株）及び、粗皮病（福島株）の果皮及び葉から抽出した低分子 RNA をキュウリに接種した結果、ホップ矮化ウィロイド（HSVd）に特有な矮化、葉巻病徴が現れた。また、本試料と HSVd 数系統を 8 M 尿素変性、5 % PAGE で移動度を比較した結果、前記 2 株は共に HSVd - plum (297塩基) と同一移動度を示した。HSVd グループに共通の合成オリゴヌクレオチドをプローブとして、ドットプロットハイブリダイゼーションを行った結果、山形及び福島の 2 分離株は共に反応して、

HSVd グループに近縁なウイロイドであることを明らかにした。

セイヨウナシから分離したウイロイドをキュウリで増殖後、抽出した低分子 RNA を鋳型として、逆転写後、PCR で増幅した cDNA を pUC119 の制限酵素 SmaI 切断部位に挿入して、大腸菌 JM109 を形質転換させた。本ウイロイドの 2 分離株の塩基配列を決定した結果、山形及び福島 の分離株は HSVd - hop 分離株に比べ、それぞれ 4 塩基、2 塩基の置換が認められた。以上より、セイヨウナシの 2 分離株は共に HSVd グループに属する新しい分離株であり、HSVd - pear と結論した。

また、別にセイヨウナシ 30 試料より抽出した全核酸をリターン PAGE で検定の結果、2 試料から HSVd - pear より遅く泳動し、約 315 塩基の大きさの別のウイロイドを分離した。

2) モモ及びスモモからホップ矮化ウイロイド (HSVd) の検出、同定：山梨県から採集したモモ及び青森県と熊本県から採集したスモモから抽出した低分子 RNA をキュウリで接種検定、及び、5 % PAGE 検定の結果、HSVd が検出された。山梨県産のスモモ・モモからは既に HSVd の検出が報告されていたが、本研究によって初めて青森県及び熊本県のスモモにも HSVd が存在していることが確認された。また、熊本県のスモモの苗木は山梨県に由来していることから、HSVd - plum が山梨県から苗木によって伝搬されたことが推測される。

3) キク矮化ウイロイド (CSVd) 分離、同定、及び、遺伝子診断法の開発：日本産罹病キクから抽出した低分子 RNA を、キク、トマト及び、ビロードサンシチに接種すると、キク (ミスルト品種) には黄色斑点、トマトには無病徴、及び、ビロードサンシチには葉巻症状が現れた。

罹病キク (品種ポピュラー) より抽出した低分子 RNA を鋳型とし、逆転写した cDNA を PCR 法により増幅後、制限酵素 BamHI 分解によって得られた完全な長さの CSVd・cDNA を pUC119 の BamHI 切断部位に挿入し、クローニングした。そして、CSVd の全塩基配列を決定し、354 塩基からなっていることを明らかにした。イギリス分離株 (CSVd - E) と比較すると 4 塩基の置換が認められ、これら分離株を CSVd - J (日本株) とした。

これまで、日本では CSVd が報告されていたが、これは単なる伝搬試験によるもので、著者はキクから抽出した全核酸、及び、低分子 RNA を用いて、PAGE 検定、³²P、及び、ジギキシゲニン (DIG) 標識 CSVd・cDNA をプローブとして用いたドットブロットハイブリダイゼーションにより、北海道、栃木県、静岡県、及び、香川県産キクより CSVd が検出され、日本に広く分布していることを初めて明確にした。

キクから抽出した低分子 RNA と DIG で標識した CSVd・cDNA プローブとドットブロットハイブリダイゼーションを行った後、発色反応、及び、発光反応の検出感度を比較した結果、

両反応の間では差異が認められず、いずれも低分子 RNA 2 ng まで検出できた。また、CSVd 感染キクより抽出した全核酸を用いても低分子 RNA と同様、CSVd・cDNA プローブと特異的にハイブリダイゼーションすることが明らかとなった。本法は少なくとも 7.5% リターン PAGE より検出感度が 100 倍高く、また、プローブの作製が簡単で、放射性同位元素のような半減期がなく、取扱いが安全であることから、優れた遺伝子診断法を確立したと言える。

逆転写-ポリメラーゼ・チェーン・リアクション (RT-PCR) 法で増幅した CSVd・cDNA を DIG 標識したプローブとポリスチレン製のマイクロプレートでハイブリダイゼーションを行い、その後アルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体と反応させ、発色反応により検出する PCR-マイクロプレートハイブリダイゼーションによる CSVd の検定の結果、高感度の遺伝子診断法として実用性が高く、CSVd の検出に有効であることが確認された。

以上のように病原不明の果樹類から抽出した低分子 RNA の接種実験、PAGE 検定、遺伝子診断、ウイロイドゲノムの構造解析を通して、ウイロイドが果樹類に広く分布していることを確認した。また、キク矮化ウイロイドを中心としたウイロイドの検出法の開発を試み、実用的かつ簡易的な遺伝子診断法を確立した。これらの研究はウイロイド研究上重要な基礎的知見を与えるもので、ウイロイドの研究上寄与するところが極めて大きく、この成果は高く評価されている。

よって審査員一同は最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者李世訪は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。