

学 位 論 文 題 名

カンキツウイロイド病の病原学的研究

学位論文内容の要旨

日本においてカンキツ台木として広く利用されているカラタチは、カンキツエキソコーティス病に対して感受性であり、その病原体の解明及びその防除が求められている。これまでに 5 種のカンキツウイロイドが海外で報告され、それらがカンキツエキソコーティス病に関与していることが知られている。日本のカンキツは 2 種のウイロイドを保毒することが報告されているが、他のカンキツウイロイドもその存在は示唆されているものの同定されるに至っていなかった。本研究により、日本のカンキツは、これら 5 種全てのカンキツウイロイドを保毒することを明らかにし、それらの高感度診断法を確立した。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1. 日本のカンキツに感染しているウイロイドの種類

日本のカンキツから核酸を抽出してカンキツウイロイドの検出を行ったところ、連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sPAGE) によりグループ III カンキツウイロイド (CVd-III) とおもわれるウイロイド様 RNA が検出された。また、既報の塩基配列から設計したプライマーによる RT-PCR により CVd-I と CVd-IV の cDNA と思われる増幅断片が検出された。それらの塩基配列を解析して既報の配列と比較した結果、それぞれ予想されたウイロイドであることが確認できた。従って、日本のカンキツは海外で報告されている 5 種全てのカンキツウイロイド、すなわち、カンキツエキソコーティスウイロイド (CEVd) と CVd-I, CVd-II, CVd-III, CVd-IV を保毒する事、更に、多くの果樹で、複数のウイロイドが複合感染していることが明らかとなった。

2. 日本のカンキツウイロイドの塩基配列の決定

日本のカンキツウイロイドの中では CVd-II の塩基配列が決定されているだけであった。そこで、日本のカンキツの保毒する CEVd と CVd-I, CVd-III, CVd-IV の塩基配列を決定したところ、Duran-Vila ら (1988) が sPAGE により検出した CVd-Ia と CVd-IIIc と思われる、海外においても塩基配列が決定されていなかった変異株の塩基配列を決定することができた。それら以外は既報の塩基配列変異株と相同性が高く、RT-PCR クローニングに用いたプライマーの塩基配列部分には二つのプライマーを除いて変異が見られなかった。従って、それらのプライマーの多

くは RT-PCR を用いた診断に利用できると思われた。

3. コーンケープガム様症状を呈するカンキツから特異的に検出された CVd-III

コーンケープガム様症状を呈する日向夏と無症状のその保毒するウイロイドの検出を sPAGE とノーザンハイブリダイゼーションにより試みたところ、CVd-II と CVd-III が症状を呈する株と無症状の株の両方から検出されたが、症状を呈する二株から、無症状の株の CVd-III と移動度の異なる CVd-III のバンドが二つ検出された。それらの中で、sPAGE と塩基配列の解析の結果よりそれら二株に共通の CVd-III の変異株は 290 塩基から成る CVd-IIIc と思われるものであった。この CVd-IIIc がコーンケープガム様症状を引き起こす病原体である可能性が考えられた。

4. CEVd の塩基配列に対する感染宿主の影響

広島産カンキツが保毒する CEVd (CEVd-H) を草本のトマトで増殖して塩基配列を決定した。一方、カンキツが保毒する CEVd-H の塩基配列が直接決定されている。それらの塩基配列を比較したところ、7 カ所の変異が認められた。これは、複数の塩基配列変異株集団から構成される CEVd-H が感染宿主の選択を受けて、多数を占める変異株が入れ替わったためと思われた。Semancik ら (1993) の仮説と実験を裏付ける結果であり、その遺伝子診断の確立を目的に塩基配列を解析する場合、診断する宿主の保毒するウイロイドを用いるべきであると思われた。

5. sPAGE とハイブリダイゼーションによるカンキツウイロイドの検出

ウイロイド診断のためにカンキツ組織 5-10 g から従来法により核酸抽出を試みたところ、抽出できない株があった。これは、粗抽出物中に含まれる宿主由来の多糖類やフェノール化合物が多いためと思われた。従来法における 2-メトキシエタノール抽出と CTAB 沈殿の代わりに 2-ブトキシエタノールによる分画沈殿法を用いる改良法により試みたところ、供試した全てのカンキツ株から核酸が抽出できた。それらの純度と量は、sPAGE とハイブリダイゼーションによるカンキツウイロイドの診断に充分であった。

6. ウイロイド診断のための簡易核酸抽出法の確立

簡易核酸抽出法の確立を目的に、エチルキサントゲン酸カリウム (PEX) を用いて磨砕を行わずに植物組織からウイロイドを含む核酸を溶出させることを試みたところ、カンキツだけでなくキク、ホップ、ジャガイモからも効果的に感染ウイロイドを溶出できた。ホップとジャガイモからの溶出核酸は、ドットプロットハイブリダイゼーションだけでなく RT-PCR によるウイロイドの高感度診断にも用いることができた。しかし、カンキツとキクからの溶出核酸は、ドットプロットハイブリダイゼーション法による診断に用いることができたが、それらに含まれる阻害物質、

おそらく、多糖類とフェノール化合物のために RT-PCR に適用できなかった。

7. RT-PCR による高感度簡易診断法の確立

カンキツ中に低濃度で存在するカンキツウイルスには RT-PCR 法による高感度検出が必要であった。PEX抽出後の溶出核酸の精製法を検討した結果、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿と塩酸処理及びエタノール沈殿により簡便にカンキツとキクから RT-PCR の阻害物質を取り除くことができた。本方法を用いて抽出したカンキツ 100 μ g に相当する核酸から 5 種全てのカンキツウイルスが検出できた。診断の簡易化には、全ての操作をマイクロ遠心チューブ中で行う必要がある。本抽出法では、これに十分なカンキツ組織量をチューブ内に確保でき、1 日に多数の検体の処理することが可能となった。

8. NASBA によるカンキツウイルスの診断

RNA 増幅法 (NASBA) により通常の条件下でウイルス cRNA を増幅できなかった。この理由は、ウイルスは GC 含量が高く、分子内で相補結合構造をとりうるからだと考えた。しかしながら、ITP を反応液中に添加することにより、感染カンキツからの抽出核酸を鋳型にしてウイルス cRNA を増幅することができた。ノーザンハイブリダイゼーションによりこの増幅 cRNA を解析した結果、その増幅の量と増幅の正確性は、ウイルスの特異的高感度検出に充分であった。NASBA 法は、RT-PCR 法に比べると、1 種類の反応組成、一定温度、短時間で標的の核酸配列を増幅することができる利点があり、本研究による改良で RT-PCR よりも高感度にウイルスを検出可能であった。簡易核酸抽出法と組み合わせることにより、さらに実用的な診断法を確立できる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 教 授 生 越 明
副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

学 位 論 文 題 名

カンキツウイロイド病の病原学的研究

本論文は、7章で構成され、図53、表8、引用文献186、総頁数137の和論文で、他に参考論文6編が添えられている。

日本においてカンキツ台木として広く利用されているカラタチは、カンキツエキソコーティス病に対して感受性である。これまでに5種のカンキツウイロイドが海外で報告され、それらがカンキツエキソコーティス病に関与していることが知られている。日本のカンキツは2種のウイロイドを保毒することが報告されているが、他のカンキツウイロイドもその存在は示唆されているものの同定されるに至っていなかった。本研究により、日本のカンキツは、これら5種全てのカンキツウイロイドを保毒することを明らかにし、それらの高感度診断法を確立した。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

日本のカンキツからカンキツウイロイドの検出を試みたところ、連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sPAGE) とRT-PCRによりこれまで日本で報告のなかったグループIカンキツウイロイド (CVd-I)、CVd-IIIとCVd-IVが検出された。これによって日本のカンキツは海外で報告されている全てのカンキツウイロイド、すなわち、カンキツエキソコーティスウイロイド (CEVd) とCVd-I、CVd-II、CVd-III、CVd-IVを保毒する事、更に、多くの果樹で、複数のウイロイドが複合感染していることを明らかにした。それらの塩基配列の多くは、既報の塩基配列と相同性が高かったが、新たにCVd-IaとCVd-IIIcと思われる変異株の塩基配列を決定した。

コーンケープガム症状を呈するカンキツに対するCVd-IIIの関与が示唆された。即ち、コーンケープガム様症状を呈する日向夏から、sPAGEとノーザンハイブリダイゼーションによって、無症状の株に存在しないCVd-IIIのバンドが二つ検出された。それらの中で、sPAGEと塩基配列の解析結果より、症状を呈する二株に共通のCVd-IIIの変異株は290塩基から成るCVd-IIIcと思われた。よってこれがコーンケープガム様症状を引き起こす病原体であると示唆した。

広島産カンキツが保毒するCEVd (CEVd-H) を、草本のトマトで増殖すると、

もとのカンキツが保毒するCEVd-Hの塩基配列に比べて、7カ所の変異が認められた。これは、複数の塩基配列変異株集団から構成されるCEVd-Hが感染宿主の選択を受けて、多数を占める変異株が入り替わったためと思われた。そこで、遺伝子診断の確立を目的に塩基配列を解析する場合、診断する宿主の保毒するウイロイドを用いるべきと結論した。

遺伝子診断法に用いる簡易核酸抽出法を確立した。即ち、エチルキサントゲン酸カリウム (PEX) を用いて磨砕を行わずに植物組織から核酸を溶出させる方法により、カンキツだけでなくキク、ホップ、ジャガイモからも効果的に感染ウイロイドを溶出できた。ホップとジャガイモからの溶出核酸は、ドットプロットハイブリダイゼーションだけでなくRT-PCRによるウイロイドの高感度診断にも用いることができた。しかし、カンキツとキクからの溶出核酸は、ドットプロットハイブリダイゼーション法による診断に用いることができたが、それらに含まれる阻害物質（多糖類等）のためにRT-PCRに適用できなかった。カンキツ中において低濃度で存在するカンキツウイロイドにはRT-PCRによる高感度検出が必要であった。そこで精製法を検討した結果、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿と塩酸処理及びエタノール沈殿により簡便にカンキツとキクから阻害物質を取り除くことができた。

NASBAによるカンキツウイロイドの検出を試みた。通常の条件下ではウイロイドcRNAを増幅できなかった。これは、ウイロイドRNAの高いGC含量と分子内での相補結合構造が原因と考えられた。しかしながら、ITPを反応液中に添加することにより、感染カンキツからの抽出核酸を鋳型にしてウイロイドcRNAを増幅することができた。ノーザンハイブリダイゼーションにより、特異的高感度検出に充分であることが確かめられた。NASBA法は、RT-PCR法に比べて1度の反応、一定温度、短時間で標的の核酸配列を増幅することができる利点があり、また、本研究による改良でRT-PCRよりも高感度にウイロイドを検出可能であった。

以上のように本研究は、日本のカンキツから5種類のウイロイドを報告して病原性の解明における基礎的知見を得た上で、更にこれら全てのウイロイドの高感度診断法を確立してウイロイド病防除に大きく貢献したものである。よって審査員一同は、中原健二が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。