



Title	カンキツウイロイド病の病原学的研究
Author(s)	中原, 健二
Citation	北海道大学. 博士(農学) 乙第5469号
Issue Date	1999-03-25
DOI	10.11501/3151630
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/32795">http://hdl.handle.net/2115/32795</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	5469.pdf



[Instructions for use](#)

# カンキツウイロイド病の病原学的研究

中 原 健 二

# 目次

1.	緒言	1
2.	研究史	
2.1.	カンキツのウイロイド病	4
2.1.1.	ウイロイド	4
2.1.2.	エキソコーティス病と Cachexia 病	6
2.2.	ウイロイドの検出・診断	11
2.2.1.	ウイロイド診断の意義	11
2.2.2.	生物検定法	11
2.2.3.	ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE)	12
2.2.4.	遺伝子診断法	12
2.2.5.	遺伝子診断法の簡便化	17
2.2.6.	カンキツウイロイドの検出法	19
3.	材料及び方法	
3.1.	材料	21
3.2.	カンキツからの核酸抽出法及びカンキツウイロイドの純化法	21
3.2.1.	改良核酸抽出法	21
3.2.2.	簡易核酸抽出法	24
3.2.3.	ウイロイドのマイクロプレート吸着を利用した cDNA 簡便作成法	25
3.2.4.	カンキツウイロイド純化法	25
3.3.	カンキツウイロイド検出法	25
3.3.1.	連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sPAGE)	25
3.3.2.	DIG 標識 cRNA プローブによるハイブリダイゼーション	26
3.3.3.	RT-PCR	28
3.3.4.	NASBA	30
3.4.	カンキツウイロイド塩基配列の解析	31
3.4.1.	カンキツウイロイド RNA の cDNA のクローニング	31
3.4.2.	塩基配列の解析	34
4.	結果と考察	
4.1.	日本のカンキツに感染しているウイロイドの種類	36
4.1.1.	カンキツエキソコーティスウイロイド (CEVd)	36
4.1.2.	グループ I カンキツウイロイド (CVd-I)	40
4.1.3.	グループ III カンキツウイロイド (CVd-III)	47
4.1.4.	グループ IV カンキツウイロイド (CVd-IV)	67
4.1.5.	考察	74
4.2.	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	84
4.2.1.	核酸抽出法の改良	84
4.2.2.	sPAGE による検出	86
4.2.3.	ドットブロットハイブリダイゼーションによる診断	88

4.3.RT-PCR 及び DIG 標識 cRNA プローブを用いた 高感度簡易診断法の確立		95
4.3.1.RT-PCR とドットプロットハイブリダイゼーション法の検出感度		95
4.3.2.PEX を用いたウイロイドの溶出		97
4.3.3.PEX のウイロイド検出における有用性		99
4.3.4.RT-PCR 阻害物質の除去		101
4.3.5.ウイロイドのマイクロプレートへの吸着を利用した RT-PCR		103
4.3.6.RT-PCR 試料間の汚染防止前処理		108
4.3.7.RT-PCR による 5 種のカンキツウイロイドの同時検出		110
4.3.8.考察		112
4.4.NASBA によるカンキツウイロイドの診断		116
4.4.1.イノシン 5'三リン酸添加による NASBA の改良		116
4.4.2.NASBA の検出感度		119
4.4.3.NASBA によるカンキツウイロイドの検出		119
4.4.4.考察		122
5.	結 論	124
6.	摘 要	127
7.	引 用 文 献	130

## 1. 緒言

カンキツウイルスの診断法を確立するために本研究を行った。これまでに海外で5種のカンキツウイルス、すなわち、カンキツエキソコーティスウイルス (CEVd) とグループ I カンキツウイルス (CVd-I)、CVd-II、CVd-III、CVd-IV が同定されている。それらの中で、カンキツエキソコーティスウイルス (CEVd) がエキソコーティス病の病原体であることが知られていた。最近になって、CVd-IIb が cachexia 病の病原体であることが報告された。しかし、その他のカンキツウイルスについてもエキソコーティス病に関与していることが示唆されるもののその関係がはっきりしておらず、また、カンキツ栽培における接ぎ木性の有用因子、例えば樹体を矮化させるなど、としてウイルスとは知らずに利用されてきたことが報告されている。これは、カンキツの保毒するウイルスが、他の草本植物に比べ低濃度で存在しているために、その検出が困難であったからと思われる。カンキツ生産において、それらの病原性の解明及び防除、栽培における有用因子としてはそれらの性質の解明のためにカンキツウイルスのより信頼性の高い診断・同定法の確立が必要と思われた。

診断法の検討を行う前に、日本のカンキツが保毒するウイルスの解析を行うことにした。日本では、既報の5種のカンキツウイルスの中で、CEVd と CVd-II の一つである HSVd カンキツ変異株 (HSVd-cit) の存在が報告され、HSVd-cit の塩基配列だけが決定されている。しかし、他のカンキツウイルスについては、その存在は示唆されているものの同定されるには至っていなかった。連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sPAGE) により、CVd-III と思われるウイルス様 RNA を日本のカンキツより初めて検出した。そして、既報の塩基配列より設計したプライマーを用いた RT-PCR により cDNA を増幅し、その塩基配列を調べることにより CVd-III であることを確認した。他のウイルスについても既報の塩基配列から設計した特異プライマーによる RT-PCR により探索を行った結果、日本には、5種全てのカンキツウイルスが存在することが明らかとなった。また、それらの塩基配列を決定したところ、これまで海外でその塩基配列の報告がなかった CVd-Ia と CVd-IIIc の塩基配列を決定することができた。

そこで、従来の生物検定、電気泳動法よりも簡便で、高い感度が期待できる遺伝子診断法、すなわち、ディゴキシゲニン (DIG) 標識 cRNA プローブによるドットプロットハイ

ブリダイゼーション法と RT-PCR、NASBA によるカンキツウイルスの検出を試みた。遺伝子診断を行うためには、一般にカンキツからウイルスを含む核酸を抽出する必要がある。従来法により 5-10 g のカンキツから核酸を抽出したところ、安定して抽出できなかった。これは、カンキツ組織が比較的多くの多糖類とフェノール化合物を含むためと思われた。それらの夾雑物を効果的に核酸と分離できることが報告されている 2-ブトキシエタノールによる分画沈殿法を用いることにより従来法を改良したところ、安定して核酸を抽出することができた。また、その抽出核酸は、sPAGE とドットプロットハイブリダイゼーションに適用可能であった。しかしながら、圃場のカンキツからウイルスを検出するには、より高い感度の検出法が求められ、また、実用性を考慮した場合、核酸抽出法及び検出法の簡便化が必要と思われた。様々な検討の結果、検定カンキツ組織を磨砕することなくエチルキサントゲン酸カリウム (PEX) を含む溶液中で保温することによりウイルスが効果的に溶出されることを見出した。そして、PCR を阻害する多糖類は、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿と HCl 処理を併用することにより簡便に抽出核酸から取り除くことができ、RT-PCR に適用可能な簡便核酸抽出法を確立した。最近、標的核酸配列の cRNA を増幅する NASBA が開発された。この方法は、RT-PCR と比べて反応が 1 段階であること、一定温度で行うことができること、増幅速度が速いことなどの利点を持っている。検出法の簡便化を目的に通常条件下でウイルス cRNA の増幅を試みたところ、増幅が認められなかった。これは、ウイルスが GC 含量が高く、また、分子内の相補結合構造をとりうるからだと考えた。しかしながら、ウイルス cRNA は、イノシン 5'三リン酸を反応液中に添加することにより、感染カンキツからの全核酸を鋳型にして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ウイルス cRNA の特異性を調べた結果、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。確立した PEX を用いた簡便核酸抽出法と改良 NASBA 法の組み合わせることにより簡便な高感度検出法になり得ると考えられ、カンキツウイルスのさらなる病原性の解明とその防除に有効と思われる。

本研究を遂行するにあたり、北海道大学農学部前教授木村郁夫博士及び同教授上田一郎博士、同助手畑谷達児博士には種々のご援助と懇切なご指導を賜りました。さらに、上田一郎博士には本論文を草するにあたり、格別のご指導とご校閲を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。また、本論文を草するにあたり、懇切なご指導とご校閲を賜りました北海道大学農学部教授生越 明博士、喜久田嘉郎博士、格別のご援助とご理解を賜りまし

た果樹試験場リンゴ支場病害研究室長吉田幸二博士に厚くお礼申し上げます。

本研究にご指導とご鞭撻、カンキツ試料の提供など特段のご協力をいただいた次の各位に心から感謝申し上げます。弘前大学農学部助教授佐野輝男博士及び果樹試験場保護部病原機能研究室長家城洋之博士、同加納 健博士、同カンキツ部病害研究室伊藤隆男氏、横浜植物防疫所小原達二氏、兵庫県立中央農業技術センター生物工学研究所塩飽邦子氏、元広島県果樹試験場故佐々木篤博士、佐賀県果樹試験場田代暢哉氏。このほか、本研究は先人の膨大な蓄積のうえにはじめて遂行できたのであり、後人の研究の一助となれば幸いです。最後に、両親に最大の感謝を表します。

## 2.研究史

### 2.1.カンキツのウイロイド病

#### 2.1.1.ウイロイド

ウイロイドは、鎖長 246-399 塩基の環状 1 本鎖 RNA 分子からなる病原体で (表 2-1)、自立的に複製する最も小さい病原体である。Diener (1971) は、potato spindle tuber 病の病原体が、従来のウイルスと違い、外被蛋白質を持たない低分子 RNA であることを示してこの病原体及び同様の性質を持つものをウイロイドとした。そして、potato spindle tuber viroid (PSTVd) の塩基配列が、最初に解明されて以来 (Gross *et al.* 1978)、ほとんどのウイロイドの塩基配列が決定され、配列の特徴から表 2-1 のように分類されている (Koltunow & Rezaian, 1989A)。ウイロイドは、大きく二つのグループに分けられている。

一つは、avocado sunblotch viroid (ASBVd) を代表とするグループで、最大の特徴は、ハンマーヘッド構造として知られる自己切断配列を持つことである (図 2-1)。また、共通の塩基配列の特徴 (例えば、中央保存領域等、図 2-2A を参照) を持たないことや塩基配列の相同性が低い

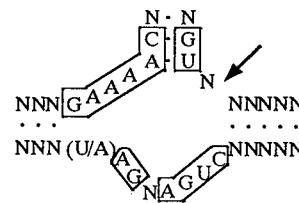


図 2-1. ハンマーヘッド型リボザイムの2次構造。  
矢印は、切断箇所

ことから区別されている。このグループのウイロイドには、他に peach latent mosaic viroid (PLMVd) と chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd; Navarro & Flores, 1997) がある。Navarro と Flores (1997) は、その報告の中で、下記のような特徴の違いにより ASBVd と他の PLMVd、CChMVd を分けるサブグループ (pelamoviroids) を提唱している (表 2-1)。即ち、1) 予想されるハンマーヘッド構造の形態が違うこと、例えば、PLMVd と CChMVd では、ASBVd で提唱されている多量体分子におけるダブルハンマーヘッド構造よりも、一量体におけるシングルハンマーヘッド構造において自己切断が効率的に起こることが *in vitro* の実験から予測されている。2) PLMVd と CChMVd の塩基配列から予測される 2 次構造は、ASBVd や他のほとんどのウイロイドで提唱されている、いわゆる棒状構造ではなく、枝分かれ構造をしていること。3) PLMVd と CChMVd は、ASBVd や他のウイロイドと違って 2 M LiCl 溶液に不溶性であることなどである。最近、オウトウから検出さ



表 2-1. ウイロイドの分類

グループ	サブグループ	ウイロイド	鎖長	塩基配列の初報告	日本での塩基配列の初報告
自己切断型	ASBVd (pelamoviroids)	Avocado sunblotch viroid (ASBVd) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) Peach latent mosaic viroid (PLMVd)	246-251 398、399 337	Symons、1981 Navarro & Flores、1997 Hernández & Flores、1992B	
PSTVd	PSTVd	カンキツエキソコーティスウイロイド (CEVd) キク矮化ウイロイド (CSVd) グループ IV カンキツウイロイド (CVd-IV) ホップ潜在ウイロイド (HLVd) ホップ矮化ウイロイド (HSVd) *2 ホップ矮化ウイロイドカンキツ分離株 (HSVd-cit; Group IIa citrus viroid、CVd-IIa) *2 Citrus cachexia viroid (CCaVd; Group IIb citrus viroid、CVd-IIb) *2 Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd) Coconut tinangaja viroid (CTIVd) Columnea latent viroid (CLVd) Mexican papita viroid (MPVd) Potato spindle tuber viroid (PSTVd) Tomato apical stunt viroid (TASVd) Tomato plant macho viroid (TPMVd) Iresine viroid (IrVd)	369、375 354、356 284、286 256 297 302 299 246、247 254 370 359、360 356-361 360、363 360 370 328、329 294 297 290-294	Gross <i>et al.</i> 1982; Visvader <i>et al.</i> 1982 Haseloff & Symons、1981 Puchta <i>et al.</i> 1991 Puchta <i>et al.</i> 1988 Ohno <i>et al.</i> 1983 Sano <i>et al.</i> 1988A Levy & Hadidi、1993 Haseloff <i>et al.</i> 1982 Keese <i>et al.</i> 1988 Hammond <i>et al.</i> 1989 Martínez-Soriano <i>et al.</i> 1996 Gross <i>et al.</i> 1978 Kiefer <i>et al.</i> 1983 Kiefer <i>et al.</i> 1983 Spieker 1996 Semancik <i>et al.</i> 1997 Rakowski <i>et al.</i> 1994 Rakowski <i>et al.</i> 1994 Semancik <i>et al.</i> 1997 伊藤ら、1997A *1	中原ら、1996B *1 Hataya <i>et al.</i> 1992
	ASSVd	グループ Ia カンキツウイロイド *3 グループ IIIa カンキツウイロイド (CVd-IIIa) *4 グループ IIIb カンキツウイロイド (CVd-IIIb) *4 グループ IIIc または IIId カンキツウイロイド (CVd-IIIc、d) *4	312-315 329 371 306 369 318 367 363 248-251 300、302 361-364	Hernández <i>et al.</i> 1992A Hashimoto & Koganezawa、1987 伊藤ら、1998 *1 Serio <i>et al.</i> 1996 Rezaian、1990 Ashulin <i>et al.</i> 1991 Koltunow & Rezaian、1988 Koltunow & Rezaian、1989B Spieker <i>et al.</i> 1990 Sänger <i>et al.</i> 1993 *1 Sänger <i>et al.</i> 1993 *1	Hataya <i>et al.</i> 1998 Nakahara <i>et al.</i> 1998C Nakahara <i>et al.</i> 1998C Sano <i>et al.</i> 1997A
	CbVd	ナシ blister canker ウイロイド (PBCVd) リンゴさび果ウイロイド (ASSVd) リンゴゆず果ウイロイド (AFCVd) Apple dimple fruit viroid (ADFVd) Australian grapevine (AGVd) Citrus bent leaf viroid (CBLVd; グループ Ib カンキツウイロイド、CVd-Ib) *3 Grapevine yellow speckle viroid1 (GYSVd1) Grapevine yellow speckle viroid2 (GYSVd2) ニシキジソから検出されたウイロイド ( <i>Coleus blumei</i> viroid 1) <i>Coleus blumei</i> viroid 2 (CbVd2) <i>Coleus blumei</i> viroid 3 (CbVd3)	312-315 329 371 306 369 318 367 363 248-251 300、302 361-364	Hernández <i>et al.</i> 1992A Hashimoto & Koganezawa、1987 伊藤ら、1998 *1 Serio <i>et al.</i> 1996 Rezaian、1990 Ashulin <i>et al.</i> 1991 Koltunow & Rezaian、1988 Koltunow & Rezaian、1989B Spieker <i>et al.</i> 1990 Sänger <i>et al.</i> 1993 *1 Sänger <i>et al.</i> 1993 *1	石黒ら、1996

青字は、本研究で塩基配列の解析を行ったウイロイド

\* 1. 講演要旨での報告

\* 2、3、4. 塩基配列の相同性から 1 種のウイロイドで、それぞれがその塩基配列変異株と考えられるが、カンキツウイロイドに限って分けて記述した。

れたウイロイド様 RNA (サテライト RNA であると推測されている) が他の数種のウイロイド様サテライト RNA とともに、PLMVd や CChMVd と似た特徴を持つことが報告されている (Serio *et al.* 1997)。これら pelamoviroids は、ウイロイド様サテライト RNA、いわゆるウイルソイド (virusoid) と近い関係があるのかもしれない。もう一つのグループは、PSTVd を代表とするグループである (表 2-1)。このグループは、さらに下記のような塩基配列の特徴から三つのサブグループ即ち、PSTVd サブグループ、ASSVd グループ及び CbVd グループに分けられている (Koltunow & Rezaian, 1989A、図 2-2)。そして、Keese と Symons (1985) により、PSTVd サブグループのウイロイドについて、図 2-2A のような領域モデルが提唱され、このモデルは基本的に他の二つのサブグループにも当てはまることわかっている。各ドメインの境界は、サブグループ内のウイロイド間の塩基配列の相同性が、大きく変化するところで区切られている。C 領域は、最も相同性が高い。各サブグループに対し、特異的な配列があり (図 2-2A)、この部分が複製中間体である多量体において、図 2-2B のようなパリンドローム構造をとり (Diener, 1986)、一量体へのプロセッシングに関与していることが示唆されている (Visvader *et al.* 1985B)。P 領域は、塩基配列の変異株の比較により病徴発現に関与していることがわかっている (Schnölzer *et al.* 1985; Visvader & Symons, 1985A)。V 領域は、最も相同性の低い領域で、ウイロイドの複製に関与していることが示唆されている (Sano *et al.* 1992)。また、T1 領域は、病原性への関与 (Sano *et al.* 1992)、T2 領域は、ウイロイドの複製への関与が示唆されている (Sano & Ishiguro, 1998)。

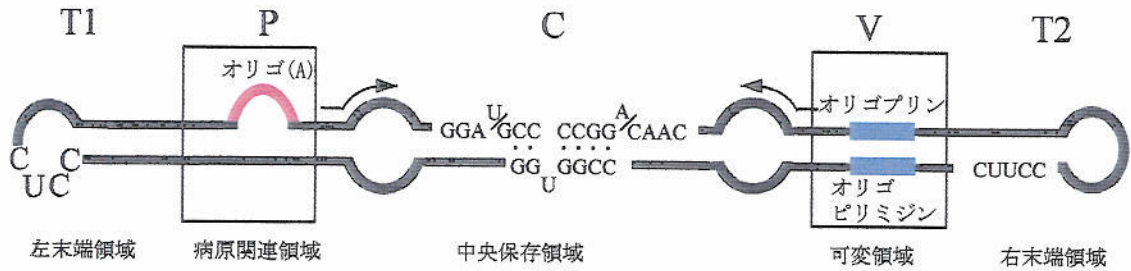
ASBVd は、主に葉緑体中に蓄積するのに対し (Bonfiglioli *et al.* 1994; Lima *et al.* 1994)、PSTVd グループのウイロイドのいくつかは、核内に蓄積することが報告されている (Harders *et al.* 1989; Bonfiglioli *et al.* 1996)。もしこれが、グループ内の共通の特徴であれば、グループ間の特徴の違いやウイロイド間の干渉を考察する上で、重要な意味を持っていると思われる (考察 4.1.5.3 章を参照)。

### 2.1.2. エキソコーティス病と Cachexia 病

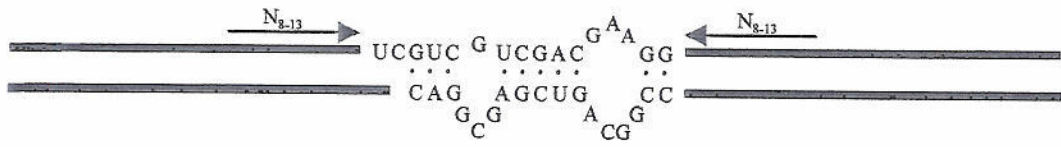
これまでにエキソコーティス病と Cachexia 病が、ウイロイドによるカンキツの病害として知られている。エキソコーティス病は、1948 年に最初に記述され、1949 年に芽継ぎにより伝染することが報告された (Broadbent & Garnsey, 1987)。エキソコーティス病は、一般のカンキツ生産品種、例えば、オレンジやグレープフルーツ、マンダリン、台木とし

A

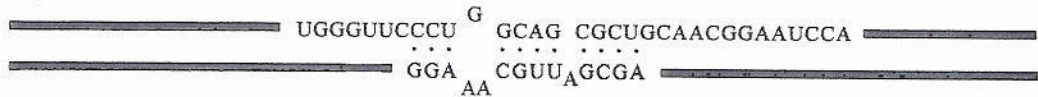
PSTVdサブグループ



ASSVdサブグループ

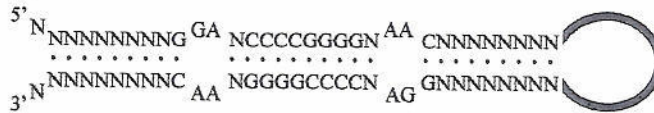


CbVdサブグループ

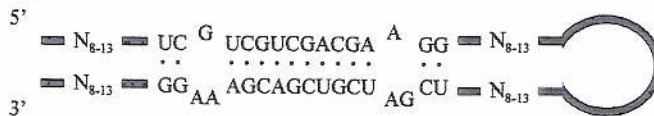


B

PSTVdサブグループ



ASSVdサブグループ



CbVdサブグループ

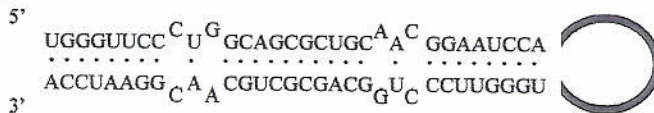


図 2-2. 3つのPSTVdサブグループの中央保存領域 (CCR、A) と多量体ウイロイドRNAのとりうるパンドローム構造 (B)。

McInnes & Symons (1991)、図7,8を改変

て欧米で広く使われているサワーオレンジに対して潜在性である (Garnsey & Randles, 1987)。このことが、この病気を広く世界に伝搬させる原因の一つと考えられ、アメリカ、オーストラリア、地中海地域などカンキツ生産地域のほとんどのに分布している (Broadbent & Garnsey, 1987)。中国や日本でも、エキソコーティス病は存在しているが、それらは、欧米地域から導入された品種が、エキソコーティス病に汚染していたためと思われる。なぜなら、これらの地域では、台木としてエキソコーティス病に感受性であるカラタチやラングブアーライムが主に用いられており、当初、その発生は、外来品種に限られていたからである (山田, 1984)。

エキソコーティス病の病原体には、感受性の台木に対する粗皮症や上に接いだ品種の矮化の程度の異なる系統が存在することが知られていた。しかし後に、エキソコーティス病は、下記のような複数の異なるウイルスが関与していることが明らかとなった。カンキツエキソコーティス病の病原体としてカンキツエキソコーティスウイルス (CEVd) が、最初に報告された (Semancik & Weathers, 1972; Sanger 1972)。さらに強毒、中間、弱毒などの病原性の異なるカンキツから CEVd より低分子量の数種のウイルス様 RNA が PAGE により検出された (Schlemmer *et al.* 1985; Duran-Vila *et al.* 1986)。Duran-vila ら (1986, 1988) は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に加え、生物検定及びハイブリダイゼーションによる相同性の解析によりエキソコーティス病は、CEVd の他に十数のウイルスが関与し、電気泳動における移動度の遅い順にグループ I、II、III と IV カンキツウイルス (CV-I, II, III と IV) の 4 つのグループに分けられると結論している。

CEVd は、カンキツウイルスの中で最初に塩基配列が決定され (Gross *et al.* 1982; Visvader *et al.* 1982)、鎖長 369-375 塩基であり多くの塩基配列変異株が報告されている (Visvader & Symons, 1983, 1985A; García-Arenal *et al.* 1987; Mishra *et al.* 1991; Semancik *et al.* 1993, 1994; Fagoaga & Duran-Vila, 1996)。CEVd は PSTVd サブグループに分類される (表 2-1)。宿主範囲は、他のカンキツウイルスと比べると広く、カンキツだけでなく、ブドウ (García-Arenal *et al.* 1987) やトマト (Mishra *et al.* 1991)、ソラマメ (Fagoaga *et al.* 1995)、ニンジン、ナス、カブ (Fagoaga & Duran-Vila, 1996) から病原因子として、または、潜在的に感染していることが報告されている。感受性台木に劇症のエキソコーティス病を起こす病原体であり、指標植物であるエトログシトロンアリゾナ 861-S1 に強い矮化と上偏成長、壊死をおこす (Duran-Vila *et al.* 1988)。

CVd-I は、さらに CVd-Ia と CVd-Ib の二つのサブグループに分けられている (Duran-Vila

*et al.* 1988)。CVd-Ib は、塩基配列が先に決定され citrus bent leaf viroid (CBLVd) と改名された (Ashulin *et al.* 1991)。鎖長 318 塩基からなり ASSVd グループに分類され (表 2-1)、このグループの他のウイロイドと同様に宿主範囲は狭い (Hadas *et al.* 1992)。CVd-Ia の塩基配列は、本研究で明らかにした (Hataya *et al.* 1998; 4.1.2 章を参照)。Hataya ら (1998) は、CBLVd との比較から CVd-Ia は、CBLVd の右末端領域の配列組換え (rearrangement) により生じたとする仮説を立てた。同様の例が、coconut cadang-cadang viroid と CEVd で報告されている (Haseloff *et al.* 1982; Semancik *et al.* 1994)。CVd-I は、感受性台木であるカラタチ及びエトログシトロンに弱いエキソコーティス病徴を起こすことが報告されている (Roistacher *et al.* 1993)。

CVd-II は、CVd-IIa と CVd-IIb のサブグループに分けられている (Duran-Vila *et al.* 1988)。このグループのカンキツウイロイドの塩基配列は、Sano ら (1986, 1988A) により、ホップ矮化ウイロイドカンキツ分離株 (HSVd-cit) として最初に報告された。カンキツ由来の HSVd の塩基配列変異株は、Puchta ら (1989) や Gillings ら (1991) から報告され、後に、CV-IIa 及び CV-IIb の全塩基配列が決定され、HSV-cit は、CV-IIa と 99% の相同性があることが報告された (Levy & Hadidi, 1993)。CVd-IIb は、CVd-IIa と比べて 3 塩基の欠損と 2 塩基の置換があり、Cachexia 病を引き起こす病原体として報告されている (Semancik *et al.* 1988)。但し、Cachexia 症を呈するのは、マンダリン、タンジェロとスウィートオレンジに限られ、他のほとんどのカンキツ種には、CVd-IIa と同様に潜在感染する。CVd-IIa は、カラタチとエトログシトロンに (Roistacher *et al.* 1993)、CVd-IIb は、エトログシトロンに (Duran-Vila *et al.* 1993) 弱いエキソコーティス病徴を示すことがわかっている。また、Puchta ら (1989) は、HSVd のカンキツ分離株を矮化因子として、栽培上の利用の可能性を報告している。

CVd-III は、CVd-IIIa-d の四つのサブグループに分けられている (Duran-Vila *et al.* 1988)。CVd-IIIa と CVd-IIIb の塩基配列が最初に決定され (Rakowski *et al.* 1994)、本研究により日本のカンキツから同一の塩基配列を持つ CVd-IIIa 及び CVd-IIIb が検出され (中原ら、1996A; Nakahara *et al.* 1998C; 4.1.3 章を参照)、さらに、CVd-IIIc または CVd-IIId の塩基配列を決定した (4.1.3 章を参照)。別に CVd-IIIc と思われる塩基配列変異株が、報告されている (Semancik *et al.* 1997; 伊藤ら、1997A)。CVd-III は、ASSVd グループに分類され (表 2-1)、カンキツ以外の宿主は見つかっていない。エキソコーティス病との関係は、明らかではないが、それぞれのサブグループが、エトログシトロンに中程度の矮化と様々

な程度の葉の上偏成長などを起こす (Duran-Vila *et al.* 1988)。また、CVd-IIIb は、カラタチ台木の上に接がれたバレンシアオレンジの天蓋の大きさを小さくするものの天蓋の大きさ当たりのカンキツの収穫量は増大させることがわかり、矮化因子としての栽培上の利用の可能性と、過去において、このことが解析されないまま利用されてきたことが報告されている (Semancik *et al.* 1997)。

CVd-IV は、Puchta ら (1991) により塩基配列が決定された。2 次構造上の右側部分の多くと中央部分は CEVd に、左側末端部分は HSVd にそれぞれに相同性が高く、キメラウイロイド様構造をしていることがわかった。本研究で、日本のカンキツからその塩基配列変異株を検出した (中原ら、1996B; 4.1.4 章を参照)。PSTVd グループに分類され (表 2-1)、宿主は、カンキツ以外に草本のキュウリに潜在感染することが報告されている (Duran-Vila *et al.* 1988)。CV-IV もまた、エキソコーティス病との関係がはっきりしていないが、エトログシロンに弱い病徴を示すことが報告されている。

上記のようにカンキツウイロイドグループとエキソコーティス病の病原性の違う系統との関係がはっきりしていないのは、当時のエキソコーティス病の系統を探る研究において、CEVd 以外のカンキツウイロイドの存在がわかっていなかった、または、その検出感度が低かったために病徴と病原体との相関付けが難しかったからである。例えば、Cachexia 病では、組織中の濃度が低いために圃場の発病樹から直接 CVd-IIb を検出することができず、指標植物であるエトログシロンに接いで、濃度を高めることにより、初めて検出できている (Semancik *et al.* 1988)。また、カンキツウイロイドは、重複感染すると指標植物であるエトログシロンの病徴が激症化することが知られ (Duran-Vila *et al.* 1988; Roistacher *et al.* 1993)、今後、圃場での病徴とこれらカンキツウイロイドの関係を探る上で、単独感染の場合に加え、重複感染した場合についても調べる必要があることが指摘されている (Duran-Vila *et al.* 1988; Nauer *et al.* 1993; Roistacher *et al.* 1991、1993)。

日本では、CEVd と上記の HSVd-cit の存在が報告された (Sano *et al.* 1986、1988A; 畑谷、1987)。また、他のカンキツウイロイドグループについては、その存在は示唆されているが同定されるに至っていなかった (松川、1987; 須田、1989)。本研究で、海外で同定されている 5 グループ全てのカンキツウイロイドが日本に存在することを示したが、別に、伊藤らも日本のカンキツに感染しているウイロイドを探索し、その塩基配列を解析している (伊藤ら、1997A、1997B)。その中で、5 グループのカンキツウイロイドとは相同性の低い 2 種の新しいウイロイドを検出している。

## 2.2. ウイロイドの検出・診断

### 2.2.1. ウイロイド診断の意義

ウイロイドの起源は、不明であり、また、PSTVd や CEVd、CSVd などでは、潜在的に感染する植物が多く報告されている (Diener, 1983)。また、CEVd は、多くのカンキツ栽培品種に潜在的に感染するだけでなく、最近カンキツ圃場から離れた畑の数種の野菜に潜在的に非常に低濃度で感染している塩基配列変異株が検出されている (Fagoaga & Duran-Vila, 1996)。そして、従来 of 育種法に利用できるようなウイロイドに対する抵抗性遺伝子を持つ作物の近縁種は、見つかっていないため、宿主作物は、依然としてウイロイドに対し感受性である。したがって、潜在性の感染宿主作物や作物以外のウイロイドを保持している圃場の周りの植物が感染源となり、今後、栽培法の変化等により流行する可能性は、否定できない。このような意味において病原ウイロイドは、圃場および圃場の周りから完全には除去されていないと考えられる。最近、ウイロイドに対する抵抗性を付与する目的で、ウイロイドのアンチセンス RNA やリボザイム (Atkins *et al.* 1995; Yang *et al.* 1997)、2 本鎖 RNA 特異的 RNA 分解酵素 (Sano *et al.* 1997B) を発現する形質転換植物が報告されている。また、組織培養技術や温度処理等を組み合わせて、栄養繁殖性作物やウイロイドが種子伝染する作物でウイロイドフリー植物の作出の試みが行われている。上記のことを踏まえるとウイロイド病の防除のためには、圃場や圃場の周りに潜在的にウイロイドに感染している植物の調査、ウイロイド抵抗性またはフリー化植物の評価のためのウイロイド診断は不可欠であり、植物中で低濃度で存在するウイロイドの検出、また、ウイロイド抵抗性やフリーを意味する陰性の判断を下すためには、高感度で、再現性の高い診断法が求められる。そして、多数の試料を処理するためには、より簡便で、短時間で行える診断法が必要である。

### 2.2.2. 生物検定法

ウイロイドの検出法には、主に生物検定とポリアクリルアミドゲル電気泳動、遺伝子診断法がある。生物検定法は、ウイロイド自身の生化学的研究が進む以前には、ウイロイド病診断の唯一の方法であった。非常に感度の高い方法ではあるが、指標植物を育てるための場所が必要となり、また、検定結果が出るまでに時間がかかる。特に CCCVd や ASBVd

(Garnsey & Randles, 1987) など果樹のウイロイド病では、草本の指標植物が見つからないため、検定に数年かかる場合もある。PSTVd と指標植物トマトの組み合わせでは、2-3 週間で検定できるが、ほとんど病徴を示さない PSTVd の弱毒系統が存在することも知られている (Fernow, 1967)。また、指標植物の生育環境が、PSTVd 病の病徴発現に良くない場合 (一般に、低温および少日照条件)、強毒系統でさえも見逃してしまう可能性がある。このようなことは、他のウイロイドと指標植物の組み合わせでも考えられることから生物検定法は、他の目的では依然として重要な手法ではあるが、診断が目的の場合、実用性は低いと考えられる。

### 2.2.3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE)

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は、当初ウイロイドが低分子 RNA であることの証明やその純化 (Diener, 1971; Semancik & Weathers, 1972) に用いられた。その後、診断のための手法として、改良が加えられた。ウイロイドは、宿主中の他の核酸と異なり環状の 1 本鎖 RNA で分子内相補結合をとりうる構造を持つ。したがって、未変性条件下では棒状構造をとるが、熱や尿素、ホルムアミド等による変性条件下では、1 本鎖の開いた環状構造になる。このことを利用して、未変性及び変性条件下の PAGE により宿主中の他の核酸と多糖類やフェノール化合物などの他の成分と分離する 2 次元電気泳動法が報告された (Schumacher *et al.* 1983)。さらに、線状分子と環状分子の分離能を高めるために泳動緩衝液とゲル内の塩の組成や pH を変えて行う改良法 (Rivera-Bustamante *et al.* 1986) が報告されている。また、より多数の試料を診断するために、2 次元電気泳動の簡便法としてリターンゲル電気泳動法が開発された (Schumacher *et al.* 1986)。PAGE は、ある未知の病害の病原体がウイロイドであることを証明する手段として病原学的に、重要な手法であるが、その結果からは、鎖長に関するある程度の情報は得られるが、塩基配列に関する情報は得られないためウイロイドを同定することは困難である。したがって、診断で用いるには、ウイロイドを同定するために核酸のハイブリダイゼーション法と組み合わせる必要がある。

### 2.2.4. 遺伝子診断法

塩基配列の相補結合を利用して標的核酸を検出するハイブリダイゼーションや標的核酸を増幅する逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法などの遺伝子診断法は、検出感度



が高く比較的簡便なため、実用的なウイロイド診断法の最も有力な候補である。

ハイブリダイゼーション法は、当初、水溶液中でハイブリダイゼーションを行う方法により研究され、ウイロイドの検出においても Owens ら(1978)が PSTVd に対し、Allen & Dale (1981)が、ASBVd に対して検討した。しかし、この方法は、操作が煩雑で多数試料の処理には向いておらず、実用的ではなかった。そこで、PSTVd の検出において固相を利用したハイブリダイゼーション法であるドットプロットハイブリダイゼーション法が、放射性同位元素  $^{32}\text{P}$  を標識した PSTVd に対する cDNA プロブを用いて検討された (Owens & Diener, 1981)。この方法は、一度に多くの試料を扱えること、ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) に比べ検出感度が高いこと、核酸試料の調整から検出まで 4 日間と比較的短い期間で行うことができる利点を持っている。その後、様々な改良が加えられた。

核酸同士の相補結合の安定性は、DNA:DNA < DNA:RNA < RNA:RNA の順に高く、相補結合している塩基配列の長さにも相関性があることが知られ (Meinkoth & Wahl, 1984 を参照)、検出感度の向上を目的に、cDNA のかわりに cRNA をプロブに用いた方法 (Lakshman *et al.* 1986; Schwinghamer & Broadbent, 1987B; Candresse, 1990) や全長ウイロイドの cDNA を数回つなぎ合わせた多量体 cDNA プロブ (Zekanowski *et al.* 1990; Welnicki & Hiruki, 1992)、多量体 cRNA プロブ (Singh *et al.* 1994) を用いた方法などが報告されている。Singh ら(1994)は、これら、1 量体及び多量体 cDNA プロブ、1 量体及び多量体 cRNA プロブの検出感度を比較検討し、多量体 cRNA プロブが最も検出感度が高く、6 量体 cRNA プロブは、0.48pg の PSTVd RNA 分子を検出可能であったと報告している。

一方、Bar-Joseph ら(1985)は、合成オリゴヌクレオチドをプロブとして用いて ASBVd を検出した。合成オリゴヌクレオチドは、プロブの作成において、純化ウイロイドやその組換えプラスミド cDNA クローンを必要とせず、既報の塩基配列に基づいて、DNA 合成機により合成可能な利点がある。そして、Sano ら (1988B) は、オリゴヌクレオチドプロブの標的配列中に 1 塩基のみでも変異が存在すると検出シグナルが大きく減少すること、また、ウイロイドの中央保存領域に設計することにより、3 種のウイロイドを一つのプロブで検出可能なことを報告した。これとは別に、オリゴヌクレオチドライゲーション検定法 (Landegren *et al.* 1988) が開発された。これは、二つのオリゴヌクレオチドプロブをある領域に連続して作成する。そして標的核酸を含む試料と両プロブでハイブリ

ダイゼーションを行った後、DNA ライゲースを反応させると、両プローブの間の接合部位の塩基に変異がなければ接合するが、変異がある場合、接合しない。その後、アルカリまたは熱変性させて、接合したプローブだけを検出することにより、一塩基の置換をはっきりと検出できるという方法である。最近、PCR と熱耐性の DNA ライゲースを用いる改良法が報告されている (Tobe *et al.* 1996)。このように cDNA プローブに比べ、特異性を高めることや、逆に全長の塩基配列の比較では相補性の低い数種のウイルスを同時に検出できる利点が示されている。しかし、合成オリゴヌクレオチドプローブは、cDNA プローブと比べ、検出感度が低いことが報告されている (Welnicki *et al.* 1989; Nakahara *et al.* 1998B; 中原, 1995)。そして、この問題を克服するために Welnicki ら (1989) は、87 塩基までプローブを長くすることにより、Nakahara ら (1998B) は、違う領域に作成した 5 種のオリゴヌクレオチドプローブを混合することにより検出感度を cDNA プローブと同程度まで高められることを報告した。また、Nakahara ら (1998B) は、cDNA プローブでは、検出感度が低下する 2 時間の短いハイブリダイゼーション時間でも、混合オリゴヌクレオチドプローブでは同程度の検出感度を維持することを報告し、オリゴヌクレオチドプローブでは、cDNA プローブに比べハイブリダイゼーションの時間を短縮できる利点を示した。一方、修飾オリゴヌクレオチドや核酸類似物質のプローブとしての利用が検討されている。通常の 2'-デオキシオリゴヌクレオチドに比べて 2'-メチルオリゴヌクレオチドは、標的が RNA の場合、 $T_m$  値が上昇し、また、ハイブリッドを形成する速度も速いことが報告されている (Majlessi *et al.* 1998)。その報告の中で、リボゾーム RNA において分子内で相補結合している領域に対して、この 2'-メチルオリゴヌクレオチドと通常のオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションさせたところ、2'-メチルオリゴヌクレオチドだけが、標的の相補結合を開き結合することができたことが報告されている。ウイルスも同様の分子内の高次構造を形成しうるということが知られているので (いわゆる棒状構造)、この診断に有効と思われる。ポリアミド核酸 (polyamide nucleic acid, PNA) は、塩基と N-(2-アミノエチル) グリシンからなり、この N-(2-アミノエチル) グリシンがペプチド結合により五炭糖・リン酸の骨格構造と同様になる核酸類似物質である (Nielsen *et al.* 1991; Egholm *et al.* 1993)。15 塩基の PNA:DNA と PNA:RNA の安定性は、DNA:DNA と DNA:RNA よりも高いこと、1 塩基の変異を配列内に導入したときの  $T_m$  値の低下の値も大きいことが報告されており、通常のオリゴヌクレオチドに比べ、より特異的にウイルスを検出可能であろう。また、PNA と核酸との相補結合の安定性は、塩濃度の影響をほ

とんどうけないという特徴がある。

当初、プローブの標識には放射性同位元素が使われていたが、代わってビオチン(BIO)やディゴキシゲニン(DIG)を用いた方法が報告されている。McInnes ら(1989)や Roy ら(1989)、Candresse (1990) などが、BIO 標識プローブ、また、Welnicki & Hiruki (1992)、Podleckis (1993)、Singh ら(1994)などが、DIG 標識プローブを用いてウイロイドを検出している。また、Kanematsu ら(1991)は、標識方法の違う 6 種類の BIO または DIG 標識プローブを作製し、比較した。これらの BIO や DIG を標識した非放射性プローブは、取り扱いが容易なこと、寿命が長い(半年から数年)ことなどの利点を持っている。また、その検出感度は、<sup>32</sup>P 標識放射性プローブと同程度であることが報告され (McInnes *et al.* 1989; Roy *et al.* 1989; Welnicki & Hiruki, 1992; Podleckis, 1993)、放射性プローブに代わる有効な手段になっている。

植物体において低濃度で存在するウイロイドの診断のために、逆転写 PCR (RT-PCR) 法 (Saiki *et al.* 1988) の診断への利用が検討されている (Hadidi & Yang, 1990; Yang *et al.* 1992; Hataya *et al.* 1992; Wah & Symons, 1997)。試料中のウイロイド濃度を高めることにより検出感度の向上が期待できる。Hadidi & Yang (1990) は、実際にリンゴさび果ウイロイド (ASSVd) の検出において、RT-PCR を用いた検出法は、従来法より検出感度が高く、リターンゲル電気泳動法<約 100 倍、ノーザンハイブリダイゼーション<約 10 倍、RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動法< 10-100 倍、RT-PCR 産物のサザンブロットハイブリダイゼーションという結果を報告している。

Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) は、標的 RNA を *in vitro* で増幅する方法である (Kievits *et al.* 1991)。この方法は self-sustained sequence replication technique (3SR; Guatelli *et al.* 1990) としても知られている。PCR が、DNA の *in vitro* 増幅系であるのに対し、NASBA は RNA の *in vitro* 増幅系である。3 種の酵素が、一つのチューブ中で連続的、循環的に反応することにより標的核酸に対する cRNA が指数関数的に増幅する。図 2-3 に、その原理を模式的に示した。NASBA も RT-PCR と同様、試料中の標的ウイロイドを増幅することが可能と考えられ、また、一定温度で、一度の反応で、RNA を増幅できるなど RT-PCR にはない利点がある。実際に、NASBA は、人免疫不全ウイルス (HIV、Guatelli *et al.* 1990; Kievits *et al.* 1991) や C 型肝炎ウイルス (HCV、Lunel *et al.* 1995)、人パピローマウイルス (HPV、Smits *et al.* 1995)、マイコバクテリア (van der Vliet *et al.* 1993)、植物では、カンキツトリステザウイルス (CTV、Lair *et al.* 1994)、ジャガイモ葉巻ウイル

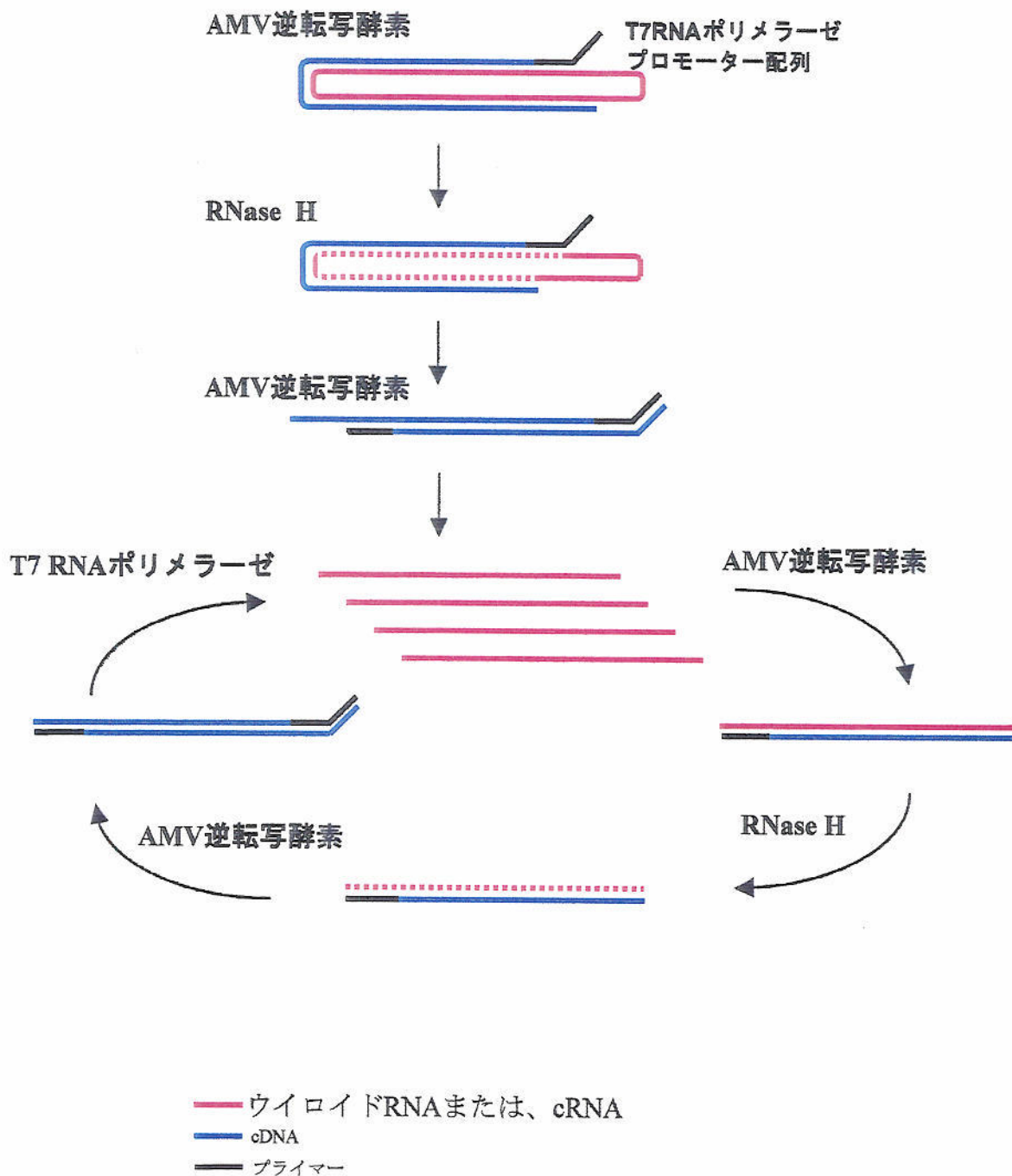


図 2-3. NASBA反応の模式図。T7RNAポリメラーゼのプロモーターを付加した相補鎖プライマーが、標的RNAに結合し、AMV逆転写酵素によりcDNAが合成される。次にRNA分解酵素H (RNaseH: RNA:DNA鎖のRNAを分解する)とAMV逆転写酵素自身の持つRNase H活性によりRNA鎖が分解され、相補鎖プライマーが、結合し相同鎖DNAが合成され、標的核酸をT7RNAポリメラーゼのプロモーター配列の下流に含む2本鎖DNAができあがる。これを鋳型として、T7RNAポリメラーゼにより相補鎖RNAが転写される。続けて、この転写RNAを鋳型として上に述べた反応が循環的に進むことになる。このとき、T7RNAポリメラーゼは、数十から数百のRNAを転写するため、多量の相補鎖RNAが蓄積されることになる。

ス (PLRV、Leone *et al.* 1997) などの高感度検出に用いられている。本研究では、ウイロイドの高感度検出への適用を目的にして、NASBA によるウイロイド cRNA の増幅を試みたところ、反応液にイノシン -5'三リン酸 (ITP) を加えることにより、その増幅に成功した (Nakahara *et al.* 1998A; 4.4 章を参照)。

#### 2.2.5. 遺伝子診断法の簡便化

遺伝子診断法、特に RT-PCR 法は、検出感度が高く有効な方法ではあるが、実用的な診断法としては確立されていない。これは、操作の煩雑さと条件設定の難しさが原因と思われる。その操作過程で、病原ウイルス・ウイロイドゲノムを含む核酸抽出が、最も時間のかかる煩雑な操作の一つである。そこで、その簡便法がいくつか検討されている (例えば、Levy *et al.* 1994; Thomson & Dietzen, 1995; Zhang *et al.* 1998)。ウイルス病の診断では、マイクロプレートやマイクロ遠心チューブなどの固相に吸着させた特異抗体によりウイルス粒子を吸着し、その後洗浄することにより、簡便に宿主成分と分離して、直接それらの固相中で PCR または、RT-PCR を行うイムノキャプチャー PCR/RT-PCR 法が、報告されている (Jansen *et al.* 1990; Wetzel *et al.* 1992; Nolasco *et al.* 1993 など)。そして、Nolasco ら (1993) は、ウイルスに対する特異抗体のかわりに 2 本鎖 RNA に対するモノクローナル抗体を用いることにより、PSTVd とキュウリモザイクウイルス (CMV) サテライト RNA を検出できることを報告している。しかし、この方法では、試料を磨砕する必要がある。試料の磨砕は、特に試料数が多い場合、煩雑な作業である。また、その過程で、試料間のクロスコンタミネーションの危険性があり、検出感度の高い RT-PCR では、擬陽性の結果につながりかねない。そこで、検定植物組織を直接濾紙やメンブレンに押し当て、そのメンブレンに対して、ハイブリダイゼーションを行う、ティッシュロットハイブリダイゼーション (発現遺伝子の検出、McClure & Guilfoyle, 1989; 大豆モザイクウイルスの検出、Mansky *et al.* 1990; PSTVd と ASSVd の検出、Podleckis *et al.* 1993; CEVd と HSVd、CSVd、ASBVd の検出、Romero-Durban *et al.* 1995)、そのメンブレンからウイルスゲノムを溶出して PCR を行う方法 (プリントキャプチャー PCR 法、Olmos *et al.* 1996; スポット PCR 法、Notte *et al.* 1997)。さらに、検定植物組織の絞り汁を直接 PCR 反応液に入れて PCR を行う方法 (大崎ら、1997) が報告されている。ただし、これらの簡便法は、全ての植物種に適用できるわけではない。それは、植物体によって含まれる宿主成分の量や組成に違いがあるため、抽出される核酸試料の純度が違う、もしくは、核酸抽出が困難な場合があ

るため、それぞれの植物に適した抽出法を選択、開発する必要がある。本研究においても少量のカンキツ組織から安定してウイロイドを含む核酸を抽出するために従来法の改良を行い (Nakahara *et al.* 1998C; 4.2 章)、その簡便化を行った (Nakahara *et al.* 1998D; 4.3 章)。

核酸抽出後の検出過程の簡便化も検討されている。ハイブリダイゼーションの固相支持体として、ナイロンメンブレンのかわりに、マイクロプレートを用いて操作を簡便化し、また、定量的な解析を容易にしたマイクロプレートハイブリダイゼーション法 (DNA の結合、Nagata *et al.* 1985; RNA の結合、Sano *et al.* 1996) が報告されている。PCR/RT-PCR や NASBA 反応産物の検出は、当初、アガロースやポリアクリルアミドゲル電気泳動法が用いられ、また、増幅の特異性の検定には、そのゲルからメンブレン上に増幅産物を転写してハイブリダイゼーションを行うのが一般的であった。しかし、これらの方法は、煩雑で、多数試料の検定には向いていない。そこで、上に記したマイクロプレートハイブリダイゼーション法を用いて PCR 産物を検出する応用法が報告されている (Inouye & Hondo, 1990; Hataya *et al.* 1994)。一方、NASBA 産物の検出には、ペルオキシダーゼ標識したオリゴヌクレオチドをプローブに用いてハイブリダイゼーションを行い、NASBA 産物と結合したプローブのアクリルアミドゲル電気泳動における移動度が、小さくなることを利用して検出する酵素結合ゲル診断法 (ELGA 法) が報告されている (van der Vliet *et al.* 1993)。これらの簡便法においても、標的核酸配列と結合しているプローブを特異的に検出するために、PCR- マイクロプレートハイブリダイゼーション法においては余剰プローブの洗浄、ELGA 法においてはアクリルアミドゲル電気泳動が必要であった。この過程を省略可能な方法として、標的とハイブリダイゼーションしたときのみシグナルを発するように設計された特殊な蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた蛍光 5'ヌクレアーゼ PCR/RT-PCR (TaqMan) 法 (Schoen *et al.* 1996) と Molecular beacon 法 (Tyagi & Kramer, 1996) が報告されている。方法の概略を図 2-4 に示した。そして、この Molecular beacon 法と NASBA 法を組み合わせた AmpliDet RNA 法 (Leone *et al.* 1998) が報告されている。また、TaqMan 法と AmpliDet RNA 法は、励起波長の違う数種類の蛍光体を標識することが可能であり、複数の標的を 1 本のチューブ内で検出できる利点があり、有望な方法である。

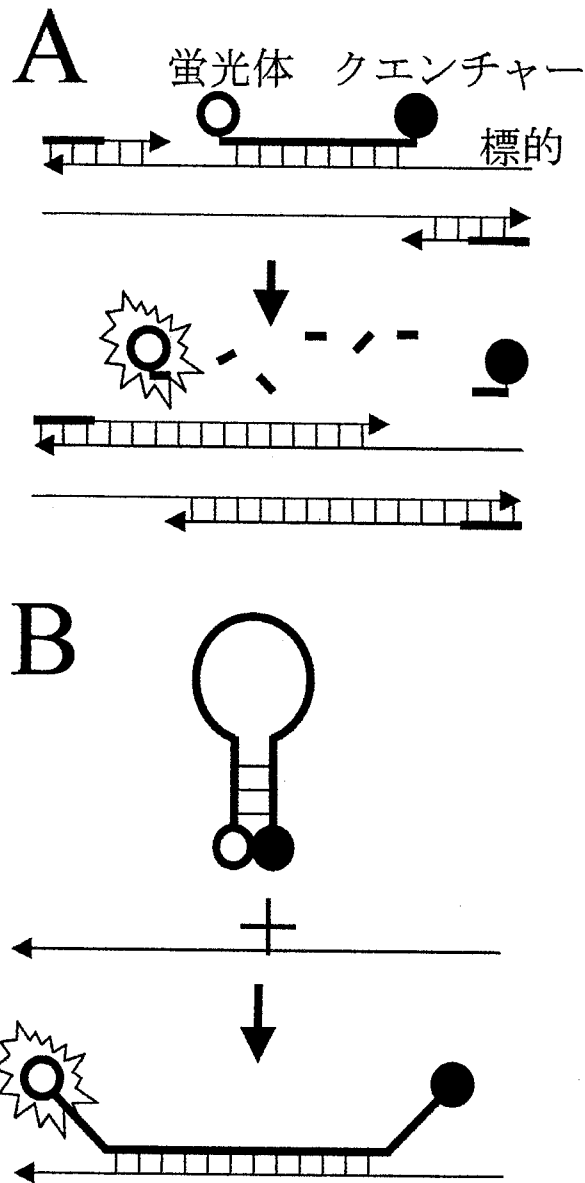


図 2-4. TaqMan (A) と molecular beacon (B) の原理。両プローブとも5'末端に蛍光体が標識され、3'末端には、クエンチャーと呼ばれる蛍光体と一定距離内にあるときその蛍光シグナルを消滅させる物質 (TAMARAやDABCYL) が標識されている。TaqManでは、PCRの途中で、増幅断片内の標的配列部分にプローブが結合するとTaq DNAポリメラーゼの5'-3'ヌクレアーゼ活性により、プローブが分解される (図1-4A)。それで、クエンチャーと蛍光体の距離が離れ、シグナルを発するようになる。一方、Molecular beaconでは、標的と結合していないプローブは、プローブの5'と3'末端の配列が相補的になっており、分子内で結合してループ構造をとり蛍光体とクエンチャーが接近して、蛍光シグナルが抑えられている (図1-4B)。それが、標的配列と結合することにより蛍光体とクエンチャーの距離が離れシグナルが検出されるようになる。

#### 2.2.6. カンキツウイロイドの検出法

当初、エキソコーティス病の診断は、生物検定により行われていた。カラタチとラングブアーライムの樹皮のうろこ状の症状やそれらの上に接いだ栽培品種の矮化などにより検定された (Broadbent & Garnsey, 1987 を参照)。その後、エキソコーティス病に対する感受性の高いエトログシトロンに接いで検定する方法が報告され、現在、エトログシトロン Arizona 861-S-1 (Roistercher *et al.* 1977) が、最も感受性の高い指標植物として用いられている。生化学的な方法として、連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sPAGE) が報告されている (Rivera-Bustamante *et al.* 1986)。最近、遺伝子診断法による検討も行われ、ドットプロットハイブリダイゼーションによる CEVd、HSVd の検出 (Flores, 1986; Li *et al.* 1995; Fonseca *et al.* 1996)、RT-PCR による CEVd と HSVd の検出法が報告されている (Yang *et al.* 1992)。それぞれの検出法は、カンキツウイロイドの検出においても、前述のような一般に報告されている利点、欠点が当てはまり、特に、遺伝子診断法については、実用的な段階まで方法が確立されていないので本研究を行った。



## 3.材料及び方法

### 3.1.材料

日本各地の 97 株のカンキツ試料を用いた (表 3-1)。それらの株は、圃場の栽培品種の組織を直接、または、指標植物エトログシトロンに接木して新たに生育してきたエトログシトロン組織を送付していただいた。試料提供者は、表 3-1 に示した。また、一部の試料については、それら組織から抽出された核酸試料を送付していただいた。

試料 ES から分離された CEVd (CEVd-H、Sano *et al.* 1986) と試料 EF と EM、ES から分離された HSVd (HSVd-cit、Sano *et al.* 1986、1988A)、ブドウから分離された HSVd (HSVd-g、Sano *et al.* 1985)、日本のホップから分離されたホップ矮化ウィロイド (HLVd、Hataya *et al.* 1992)、日本で分離されたキク矮化ウィロイド (CSVd、李ら 1997)、potato spindle tuber viroid (PSTVd、中原ら 1997) について、それらの感染植物からの抽出核酸、または、純化ウィロイドは、各検出法における陽性対照、ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるサイズマーカーに用いた。

### 3.2.カンキツからの核酸抽出法及びカンキツウィロイドの純化法

#### 3.2.1.改良核酸抽出法

本法は、ウィロイドを含む核酸を検定植物から抽出するために従来行われていた方法 (Sano *et al.* 1989) の改良法である。基本的には、従来法から CF11 セルロースカラムによる精製及びポリアクリドアミド電気泳動によるウィロイド分画の分離の段階を省いた方法と同じであるが、精製の途中で、多糖類とフェノール化合物を取り除く過程を 2-メトキシエタノールによる抽出とそれに続く、臭化セチルトリメチルアンモニウム沈殿から 2-ブトキシエタノールによる分画沈殿法 (Schultz *et al.* 1994) に変更した。

凍結組織 (5-10 g) を 0.5 ml の 2-メルカプトエタノールを加えた 35 ml の TESLP 緩衝液 (0.13 M Tris-HCl pH 8.9、0.83% SDS、5% PVP、1 M 塩化リチウム、17 mM EDTA pH 7.0) 中で、ジュースミキサー等を用いて磨砕した。50 ml 容コーニングチューブ、2 本に分注し、それぞれに、17 ml (等量) の水飽和フェノールクロロホルム (1:1) を加え、5 分間

表3-1. ウィロイド検定に用いたカンキツ試料

試料番号	植物または品種名	略号	受取日	生物検定				PAGE	トット(ノザン)				RT-PCR			
				シトロ	トト	Gynura	キウリ		CEV	CBLV	HSV	CVIII	CVIV	CEV	CBLV	HSV
<b>果樹試料(津支場)</b>																
E55K	ラブレモン	E55K-6:RL	87	++												
E83A	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861	E83A-5:EC	87	+~++		++		I, II, III								
E83AK	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861	E83AK	87	+~++				I, II, III	-	+	+					
E120P	エトログ'シトロ	E120P-5		++												
E120PK	エトログ'シトロ	E120PK-7:EC	940815	+				II, III								
E130	ラブレモン	E130-1:RL														
E130	ラブレモン	E130-4:RL														
E130	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861	E130-7:EC	87	+				III								
E130	エトログ'シトロ	E130	940815	+												
E131	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861	E130-8:EC		+												
E131K	エトログ'シトロ	E131K-1:EC		+												
E131K	エトログ'シトロ	E131K	940815	+				III								
E180	ラブレモン	E180-7:RL	87	+				I, II, III								
E180	ラブレモン	E180-8:RL		+				I, II, III								
E180 (愛媛産クレムユリス)	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	E180	940922 950224					I, II, III								
<b>(宮城 洋之)</b>																
No.2 不知火 Y-1	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	2Y2:S-EC	940922													
No.3 不知火 Y-3	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	3Y3:S-EC	940922													
No.6 不知火 A-10, 11	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	6A10, 11:S-EC	940922													
No.7 不知火 A-14, 15	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	7A14, 15:S-EC	940922													
No.8 不知火 A-17, 18	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	8A17, 18:S-EC	940922													
No.9 不知火 K	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	9K:S-EC	940922													
No.10 SA-1	不知火 エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1	10SA1	940922 950224					I, II, III								
No.11 不知火 Y-1		11Y1	950224													
不知火 フリ-①		VF-1	950224													
不知火 フリ-②		VF-2	950224													
不知火 フリ-③		VF-8	950413													
不知火 フリ-④		VF-9	950413													
不知火 フリ-⑤		VF-10	950413													
不知火 フリ-⑥		VF-13	950413													
不知火 フリ-⑦		VF-14	950413													
不知火 フリ-⑧		VF-16	950413													
E180 植物体	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1															
E120p⑤ 植物体	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1															
E131K 植物体	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1															
不知火 フリ-⑩ 植物体	エトログ'シトロ アリツ'ナ 861-S-1															
PLECE11	(核酸試料)	PLECE11	960722													
<b>佐賀県果樹試 (田代 暢哉)</b>																
No.1-1	不知火	S1-1:S	940830													
No.1-2	不知火	S1-2:S	940830													
No.1-3	口之津 15号	S1-3:K15	940830													
No.1-4	口之津 15号	S1-1:K15	940830													
No.1-5	不知火	S1-1:S	940830													
No.1-6	不知火	S1-1:S	940830													
No.1-7	不知火	S1-1:S	940830													
No.1-8	不知火	S1-1:S	940830													
No.1-9	不知火	S1-1:S	940830													
No.2-1	不知火	S2-1:S	940905													
No.2-2	不知火	S2-1:S	940905													
No.2-3	不知火	S2-1:S	940905													
No.2-4	伊予柑	S2-1:IV	940905													
No.2-5	口之津 10号	S2-1:K10	940905													
No.2-6	口之津 10号	S2-1:K10	940905													
No.2-7	口之津 10号	S2-1:K10	940905													
No.2-8	伊予柑	S2-1:IV	940905													
No.2-9	ハムリン	S2-1:HA	940905													
<b>広島県果樹試 (佐々木 篤)</b>																
エキローテイス フリ-	エトログ'シトロ	EF	850119	-												
エキローテイス 軽症株	エトログ'シトロ	EM	911011													
エキローテイス 激症株	エトログ'シトロ	ES	860227	+												
十萬温州	ミカン:実生フリ-	H-JU	911011	++												
石塚温州	ミカン:熱処理無毒化	H-TU														
イヨカン	イヨカン:ワイルドフリ-	H-IY														
清見	清見:ミカンとオレンジ'の交配種	H-KI	911011													
ハッサク	ハッサク:ミカンナリミカン台	H-HAS	911011	++												
<b>横浜植防 (小原 達二)</b>																
シキキ(6Y-1252)-シトロ	シキキ-エトログ'シトロ861-S-1 (植物体) (乾燥葉) (核酸試料)	P:SIK-EC	940801 941209 960219	++												
シキキ(6Y-1252)-ラブレモン	シキキ-ラブレモン(植物体)	P:SIK-RL	940801													
シキキ(6Y-1252)-カラタチ	シキキ-カラタチ(核酸試料)	P:SIK-KA	941209													
健全ラブレモン	ラブレモン(核酸試料)	RL	941209													
エキローテイス(激症)	エトログ'シトロ-激症(核酸試料)	Y-ES:EC	941209	++												
YCV-36(軽症)	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1 (核酸試料)	Y-EM36:EC	941209	+												
中国産シキキ NO.2	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1	C2:SIK-EC	960219													
中国産シキキ NO.6	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1	C6:SIK-EC	960219													
中国産シキキ NO.7	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1	C7:SIK-EC	960219													
中国産シキキ NO.8	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1	C8:SIK-EC	960219													
中国産シキキ NO.9	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1	C9:SIK-EC	960219													
中国産シキキ NO.10	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1	C10:SIK-EC	960219													
<b>兵庫県 (塩飽 邦子)</b>																
1. CEV接種	エトログ'シトロ (核酸試料)	Hy2:EC	960918													
2. 無接種	エトログ'シトロ・アリツ'ナ861-S-1 (核酸試料)	Hy2:EC	960918													
3. CEV接種	エトログ'シトロ 白木カラタチ	Hy3CEVd:EC	960918													
4. ウィロイド'フリ-、CTV-M16A	不知火 (核酸試料)	Hy4CTV1:S	960918													
5. ウィロイド'フリ-、CTV-M16A	不知火 (核酸試料)	Hy5CTV2:S	960918													
6. ウィロイド'フリ-、CTV-M16A	不知火 (核酸試料)	Hy6CTV3:S	960918													
7. ウィロイド'フリ-、CTV-M16A	不知火 (核酸試料)	Hy7CTV4:S	960918													
8. ウィロイド'フリ-、CTV-M16A	不知火 (核酸試料)	Hy8CTV5:S	960918													
9. 瀬地区 母樹	不知火 (核酸試料)	Hy9N:S	960918					II, III, IV								
10. 洲本地区 母樹	不知火 (核酸試料)	Hy10S:S	960918					I, II, III,	+	+	+	+	+			
<b>弘前大学農 (佐野 輝男)</b>																
コーンケーブガム(D1)	日向夏	D1	961216					II, III								
コーンケーブガム(D4)	日向夏	D4	961216					II, III								
無症状(H)	日向夏	H	961216					II, III								
<b>市販の果実</b>																
バナナ	バナナ		960520													
サンフルーツ	サンフルーツ		960520													
サザンフルーツ	サザンフルーツ		960520													
不知火果実・長崎	不知火		960520													
ネーブルオレンジ	ネーブルオレンジ		960520													
グレープフルーツ	グレープフルーツ		960520													
レモン	レモン		960520													
オレンジ?	オレンジ		960520													

本研究及び以前の報告におけるカンキツウィロイドの診断結果を右に示した。+と-は、それぞれ陽性、陰性を示し、+は、シグナルが弱く判定が困難なことを示す。

激しく攪拌した。その後、1,200 g で、20 分間遠心し、水層を別のチューブに集めた（フェノールクロロホルム抽出）。もう一度、フェノールクロロホルム抽出を行った後、2 倍容のエタノールを加え、1,200 g で、20 分間遠心し、抽出全核酸を集めた。沈殿を 15 ml の TBEN 緩衝液（25 mM ホウ酸、50 mM Tris-HCl pH7.6、1.25 mM EDTA pH 8.0、0.1 M 塩化ナトリウム）に溶解し、6 ml の 2-ブトキシエタノールを加え、攪拌した。30 分間氷上で静置し、1,200 g で、20 分間遠心した。上清を別のチューブに移し（この時、多糖類は、沈殿する）、9 ml の 2-ブトキシエタノールを更に加え攪拌後、氷上で 30 分間以上静置した。1,200 g で、20 分間遠心分離し、フェノール化合物を含む上清を捨て、沈殿を 70% ethanol で洗浄した。沈殿を 0.25 ml の蒸留水に溶解し、更に 0.25 ml の 4 M LiCl を加えた。氷上で、2 時間以上静置した後、1.6 ml 容遠心チューブに移し、上清を別のチューブに移し、2 倍容のエタノールを加え、15,000 g で、5 分間遠心分離を行い、2 M LiCl 可溶性核酸を沈殿させた。

必要に応じて更に精製を加えた。低分子 RNA は、以下のようにして得た。沈殿を 200  $\mu$ l の緩衝液（50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM 塩化ナトリウム、5 mM 塩化マグネシウム）に溶解し、70 ユニットの牛脾臓由来 DNA 分解酵素（DNase I、TaKaRa）を加え、30 分間室温で静置した。等量の TE 飽和フェノールクロロホルムを加え、3 分間激しく攪拌し、12,000 g で 3 分間遠心分離を行い、水層を別のチューブに集め、エタノール沈殿（基本的に DNA を含む溶液に対し、1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム pH 5.2 と 2-2.5 倍量のエタノールを加えて遠心分離により沈殿として DNA を回収すること）を行い、低分子 RNA を得た。

更に、必要に応じて CC41 セルロースによる精製を Dulieu & Bar-Joseph、1989 に従って行った。沈殿を 0.45 ml の蒸留水に溶解し、0.2 ml の 5  $\times$  STE 緩衝液（50 mM Tris-HCl pH7.0、0.1 M 塩化ナトリウム、1 mM EDTA pH 7.0）と 0.35 ml のエタノール、0.2 g CC41 セルロース粉末（Whatman）を加え、10 分間激しく攪拌した。15,000 g で 5 分間遠心分離し、上清を捨てた。次に洗浄操作として、1 ml の STE- エタノール（10 mM Tris-HCl pH7.0、0.02 M 塩化ナトリウム、1 mM EDTA pH 7.0、35% エタノール）を加え、激しく 5 分間攪拌し、15,000 g で 5 分間遠心分離し、上清を捨てた。この洗浄操作を更に 2 回繰り返した。減圧乾燥後、0.4 ml の蒸留水を加えて 5 分間激しく攪拌し、15,000 g で 5 分間遠心分離して上清を別のチューブに移し、エタノール沈殿により核酸を回収した。沈殿を蒸留水に溶解し、吸光度を測定して、OD<sub>260</sub>=1 の溶液を核酸濃度 40 mg/ml として核酸量、その溶液

の濃度等を計算した。そのまま使用するか、もしくは、-20℃のフリーザー内で保存した。

### 3.2.2. 簡易核酸抽出法

#### 3.2.2.1. 植物組織からのウイロイドを含む核酸の溶出

方法は、基本的に Williams & Ronald (1994)に従った。凍結組織 (0.1-0.3 g) を 1.6 ml 容マイクロ遠心チューブに入れ、300  $\mu$ l の 70%エタノールで洗浄し、次に加える緩衝液に対する親和性を高めた。500  $\mu$ l の PEX 緩衝液 (6.25 mM エチルキサントゲン酸カリウム、100 mM Tris-HCl pH 7.5、700 mM 塩化ナトリウム、10 mM EDTA pH 8.0) を加え、65℃で5分間保温した。組織に緩衝液をより浸透させるために、試料を真空ポンプ付きマイクロ遠心機に移し、6分間減圧下で遠心分離した。更に、試料を 65℃で15分間以上保温した。組織断片をオートクレーブした爪楊枝または、200  $\mu$ l スケールの使い捨てピペットチップで取り除き、残った溶液に 1 ml のエタノールを加えた。全核酸は、15,000 g で5分間の遠心分離により、沈殿にして回収した。沈殿は、70% エタノールにより洗浄し、蒸留水に溶解して遺伝子診断に利用するか、または、更に精製を必要とする場合、以下の操作を行った。(上記の精製過程を Step-PEX、抽出された核酸を NA-PEX とする。)

#### 3.2.2.2. 2-ブトキシエタノールによる分画沈殿及び塩酸処理-エタノール沈殿

2-ブトキシエタノールによる分画沈殿の方法は、Schultz ら (1994) の方法に従った。沈殿を 400  $\mu$ l の TBEN 緩衝液に溶解し、160  $\mu$ l (核酸溶液の 0.4 容) の 2-ブトキシエタノール (2-BE) を加えボルテックスで攪拌した。30分間氷上で静置し、15,000 g で5分間遠心分離した。上清を別のチューブに移し(ゲル状の沈殿には、不溶化した多糖類が含まれている)、240  $\mu$ l (0.6 容) の 2-ブトキシエタノールを加え、攪拌して氷上で30分間静置した。14,000 g で5分間遠心分離し、上清(フェノール化合物が含まれる)を捨て、沈殿を 400  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、40  $\mu$ l の 3 M 酢酸ナトリウム pH 5.2 と 27  $\mu$ l の 2 N HCl を加えて攪拌し、数分間静置する。1 ml (核酸溶液の 2 倍量) のエタノールを加えて攪拌し、14,000 g で5分間遠心分離し、沈殿を 70%エタノールで洗浄して減圧乾燥した。適量の蒸留水に溶解し使用するまで、-20℃ (GM フリーザー) で保存した。(上記の精製過程を Step-BEHC、抽出核酸を NA-BEHC とする。)

### 3.2.3. ウイロイドのマイクロプレート吸着を利用したcDNA 簡便作成法

凍結葉 0.1 mg と 0.4 ml 緩衝液 (15 × SSC、1%SDS) を 1.6 ml マイクロ遠心チューブに入れ、次亜塩素酸処理とオートクレーブ処理したマイクロ遠心チューブ用ペッスルで磨砕して、12,000 rpm で 5 分間遠心分離した後の上清、もしくは、3.2.2.1.章の方法、つまり PEX 緩衝液中で、保温と浸潤操作をして組織片を取り除いた溶出溶液を 100 °C で 5 分間熱変性し、氷上で急冷した。50 μl をマイクロタイタープレート (ヌンク社、マキシソープ II) のウェルに加え、37 °C で 2 時間保温した。ウェル中の溶液を捨て、300 μl の 1 × PBS (20 × PBS: 2.74 M NaCl、162 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、29.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、54 mM KCl) で 3 回洗浄し、逆転写反応液をウェルに加えた。37 °C で 1 時間保温し、逆転写反応液を PCR 用のマイクロ遠心チューブに移し、3.3.3.章に従って、PCR を行った。

### 3.2.4. カンキツウイロイド純化法

感染植物組織より 3.2.1 章の方法に従って抽出した 2M LiCl 可溶性核酸または、低分子 RNA を 15% 未変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、臭化エチジウムで染色した。ウイロイド分画を切り出し、1.5 ml 容マイクロ遠心チューブに移し、シリコン処理ペッスルでゲルを碎き 400 μl の RNA 抽出用緩衝液 (0.5 M 酢酸アンモニウム pH 7.5、1 ml EDTA、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム) を加え 37 °C で一晩攪拌した。限外濾過フィルター付きスパンカラムウルトラフリー C3HV(ミリポア社 孔径 0.45 μm)に移して 4,000 g で 8 分間遠心分離した。上清中のウイロイドをエタノール沈殿、減圧乾燥して蒸留水に溶解した。紫外部吸光度を測定し、1OD<sub>260</sub> を 40 μg/ml として濃度を計算した。

## 3.3. カンキツウイロイド検出法

### 3.3.1. 連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sPAGE)

電気泳動には、2M LiCl 可溶性分画または、低分子 RNA、CC41 セルロースで精製した RNA を用いた。未変性 5%PAGE は、基本的に Morris & Wright (1975) に従い、以下のように行った。ゲル板 (140 × 125 × 1 mm) に 5% ポリアクリルアミドゲル {5% アクリルアミド (アクリルアミド : ビス=19:1) 及び 40 mM Tris、20 mM 酢酸ナトリウム、2 mM EDTA pH 7.2} を流し込み 1 時間以上重合し、泳動に用いた。電気泳動は、ゲルの温度の

上昇を防ぐために室温 (6°C) で行った。1 × TAE (40 mM Tris、20 mM 酢酸ナトリウム、2 mM EDTA pH 7.2) 緩衝液中で、130 V 定電圧の条件で、キシレンシアノールが、ゲルの頂部から 90 mm のところまで泳動し、臭化エチジウムで染色し、ウイルス領域 (多くの場合、サイズマーカーとして CEVd と HLVd を泳動し、それらのバンドを含む部分) を切り出した。

8 M 尿素変性 5% PAGE は、Rivera-Bustamante ら 1986 に従った。ゲル板 (140 × 125 × 1.5 mm) に、8 M 尿素 5% ポリアクリルアミドゲル (5% アクリルアミド、8 M 尿素、12 mM Tris、6 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA pH 6.5) をゲル板の上部に高さ 30 mm の空間が出来るように流し込み、1 時間以上重合し泳動に用いた。切り出したゲル断片を上部にのせ、ゲルを泳動直前に 0.25 × TBE 緩衝液 (22.5 mM Tris、22.5 mM ホウ酸、0.5 mM EDTA pH 8.3) に浸し、12 mA 定電流でキシレンシアノールを下端まで泳動した。その後、銀染色または、ノーザンハイブリダイゼーションによりシグナルを検出した。

銀染色は、Schumacher ら (1986) の方法に従った。泳動後のゲルを 100 ml の固定液 (10% エタノール、0.5% 酢酸) で 10 分間振盪し固定液を捨て、もう一度、固定液を加え操作を繰り返した。次に硝酸銀溶液 {12 mM AgNO<sub>3</sub>、36 ml の 0.1 M 溶液 (ナカライ) を蒸留水で 300 ml にメスアップ} 中で 15 分間振盪し、蒸留水で 2-3 回洗浄した。水洗後、現像液 (375 mM 水酸化ナトリウム、2.3 mM 水素化ホウ素ナトリウム、0.4% ホルムアルデヒド) 中でゆっくり浸透し、適当な像が得られたら 10 分間定着液 (70 mM 炭酸ナトリウム) 中で振盪し、写真撮影または、カラーイメージスキャナー (エプソン) でデジタル情報として保存した。

ノーザンハイブリダイゼーションにおける核酸のゲルからメンブレンへの転写は、下記の 3.3.2.3.章、また、ハイブリダイゼーションは、3.3.2.4.章の方法を参照。

### 3.3.2.DIG 標識 cRNA プローブによるハイブリダイゼーション

#### 3.3.2.1.DIG 標識 cRNA プローブの作成

CEVd-Hgt の全長 cDNA (塩基 NO. 31-371 と続く 1-30) と、HSVd、PSTVd、CSVd 及び HLVd の制限酵素 *Bam*HI サイトを末端に有する全長 cDNA、CVd-Ia の制限酵素 *Pvu*II サイトを末端に有する全長 cDNA、CVd-IIIa の約 1.5 ユニット長の cDNA (塩基 NO. 142-297 と続く 1-278)、CVd-IV(Hy9N:S) の 245 塩基からなる cDNA (塩基 NO. 166-286 と続く

1-124) がプラスミド pBluescript II SK- に挿入されたプラスミドクローン (pBSCEVdH30,31-22, pBSHSVdcitB3, pBSPSTVdIB2, pBSCSVdJ23, pBSHLVd2, pBSCBLVd8, pBSCVdIIIa6, pBS9IVP1) からそれぞれのウイロイドに対する cRNA プローブを調製した。それぞれのプラスミドで形質転換した大腸菌 (MV1184 株) を 2 ml の培養液 (2 × YT) 中で一晚培養し、アルカリ SDS 法で抽出したプラスミドの 1/4 量を適当な (平滑または 5' 突出の末端を形成する) 制限酵素で切断した。フェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿により精製し、その全量又は半量を転写に用いた (1 µg 程度と思われる)。線状プラスミド DNA を加えた RNA 転写緩衝液 20 µl {1 × DIG RNA 標識混合物 (ベーリンガー)、1 × T7/T3 ポリメラーゼ緩衝液、5 mM ジチオスレイトール (DTT)、55 ユニットの RNA 分解酵素阻害剤 (タカラ)、50 ユニットの T7 または T3RNA ポリメラーゼ (ギブコ BRL)} を 37 °C で 2 時間保温した。2 µl の 0.2 M EDTA pH 8.0 を加え反応を止め、2.5 µl の 4 M LiCl と 75 µl のエタノールを加え、-80 °C で 30 分間静置した。15,000 g で 5 分間遠心分離し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、減圧乾燥した。100 µl の蒸留水を加え、37 °C で保温しながら 30 分間、攪拌し溶解した。4 µl を変性後 2% ホルムアルデヒド変性アガロースゲル中で電気泳動し、DIG 標識ウイロイド cRNA の転写を確認した。最後に、27.5 ユニットの RNA 分解酵素阻害剤を加え -20 °C (GM フリーザー) で保存した。

### 3.3.2.2. 核酸試料の変性とナイロンメンブレンへのスポット

核酸試料の変性は、Li ら (1995) の方法に従って行った。多くの場合、低分子 RNA を変性液 {50%ホルムアミド、6.5%ホルムアルデヒド、0.5 × SSC : 10 × SSC (1.5 M 塩化ナトリウム, 0.15 M クエン酸ナトリウム)} 中で、68 °C で 15 分間保温し、その後、等量の 20 × SSC を加えた。10 × SSC に浸し、濾紙上で乾燥したナイロンメンブレン Hybond-N (アマシャム) にスポットした。ナイロンメンブレンに UV クロスリンカー (バイオラッド) 中で、紫外線を照射し (150 mJoul/cm<sup>2</sup>)、架橋を行った。

### 3.3.2.3. ポリアクリルアミドゲル中の核酸試料のメンブレンへの転写

転写は、ミニトランス - プロット・エレクトロフォレティックトランスファーセル (バイオラッド) を使い、電気泳動により行った。方法は、その説明書にしたがった。転写するポリアクリドアミドゲルは、70 mm × 90 mm の大きさに切り取り、メンブレン (Hybond-N、アマシャム)、濾紙 (ワットマン、3 MM) とともに、装置にセットした。0.5

× TBE の泳動緩衝液中で、100 V 定電圧で 1 時間行った。その後、ナイロンメンブレンに UV クロスリンカー(バイオラッド)中で、紫外線を照射し(150 mJoul/cm<sup>2</sup>)、架橋を行った。

#### 3.3.2.4. ハイブリダイゼーション

基本的に Li ら (1995) の方法に従って行った。プレハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション溶液(50 % ホルムアミド、10% 硫酸デキストラン、0.18 M 塩化ナトリウム、20 mM カコジル酸ナトリウム、0.1 % ラウリル硫酸ナトリウム、500 µg/ml 酵母 tRNA、25 µg/ml サケ精子 DNA)中で 65 °C で 1 時間以上行い、ハイブリダイゼーションは同溶液にプローブを加え(10 ml のハイブリダイゼーション溶液に対し、0.2-1 µl のプローブを加え) 65 °C で一晩行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンは 2 × SSC 溶液中で、室温 5 分間振盪を 2 回、次いで 1 µg/µl の濃度で、RNA 分解酵素 (RNase A) を含む 2 × SSC で室温 30 分間、その後 0.1 × SSC、0.1 % SDS 溶液中で 70 °C 15 分間振盪を 2 回繰り返して洗浄した。シグナルの検出は、DIG 発光検出キット(ベーリンガー)の説明書に従って行った。また、発光基質は Lumigen PPD(ベーリンガー)を使用し、X 線フィルムへの露光は 1 時間行った。

#### 3.3.3. RT-PCR

方法は、基本的に Hataya ら (1994) の方法に従った。逆転写反応は、ランダムヘキサマーをプライマーとして用いて以下のような組成の溶液で行った。適当量の純化ウイロイドまたは、植物からの抽出核酸、20 pmol のランダムヘキサマーを含む 10 µl の反応液 {50 mM Tris-HCl pH 8.3 及び 75 mM 塩化カリウム、10 mM ジチオスレイトール、3 mM 塩化マグネシウム、0.5 mM d(G, A, T, C)TP、100 U M-MLV 逆転写酵素 (GIBCO-BRL)} は、その上にミネラルオイルを重層して 42 °C で 15 分間保温した。逆転写酵素は、一般に PCR に用いられる耐熱性酵素を阻害することが報告されているので (Sellner *et al.* 1992)、失活するために 94 °C まで溶液の温度を上げた後、40 µl の PCR 反応溶液 {7.5 mM Tris-HCl pH 8.9 及び 81.25 mM 塩化カリウム、1.125 mM 塩化マグネシウム、0.375 mg/ml 牛胸腺アルブミン、0.075% コール酸ナトリウム、0.075% Triton X-100、10 pmol の相同及び相補プライマー (表 3-2)、187.5 µM d(G, A, T, C)TP、1 U *Tth* DNA ポリメラーゼ (東洋紡)} を加えた。カンキツウイロイドの cDNA の増幅には、37.5 mM の塩化テトラメチルアン



表 3-2. ウィロイドの cDNA 増幅 (RT-PCR) 及び cRNA 増幅 (NASBA) に用いたプライマー

名前	塩基配列 (5'-3')	位置	標的	Tm (°C) <sup>a</sup>	引用文献 <sup>b</sup>
PCEV-1P (hc)	GCTCCACATCCGATCGTC	205-222 (CEVd)	CEVd (332 bp、337 nt <sup>d</sup> ) または CVd-IV (245 bp、250 nt)	58	Gross <i>et al.</i> 1982, Puchta <i>et al.</i> 1991
PCEV-1M (c)	TGGACGCCAGTGATCCGC	165-148 (CEVd)		64	
T7PCEV-1M (c)	AATTCTAATACGACTCACTATAGGG <sup>e</sup> GCTGGACGCCAGTGATCCGCGGC	167-145		84	
CEV-31 (h)	CACCTGACCTGCAGGCAGGAAAAG	31-55	CEVd (371 bp)	80	Gross <i>et al.</i> 1982
CEV-30 (c)	AGCACCACAGGAACCTCAAGAAAAG	30-6		74	
CBLV-1P (h)	TTCCAAGTCTCCCTCCCGA	227-245	CBLVd (274 bp)	60	Ashulin <i>et al.</i> 1991
CBLV-1M (c)	GTCCGTTACAGCTTAGAAGA	182-163		58	
CBLV-2P (h)	AGC <b>CTGCAG</b> <sup>f</sup> CTGCGGAGGTGGGGTC	112-131	CBLVd (336 bp)	78	Ashulin <i>et al.</i> 1991 及び本研究で決定した配列
CBLV-2M (c)	TTG <b>CTGCAG</b> CTGACGAGCCTTCGTG	117-98		76	
HSV-9 (h)	CGCGGTGCTCTGGAGTAGA	126-144	HSVd (285 bp、289 nt)	62	Sano <i>et al.</i> 1989
HSV-8 (c)	CGCCTCTCGCTGGATTCTG	113-95		62	
T7HSV-8M (c)	AATTCTAATACGACTCACTATAGGG- ACGCCTCTCGCTGGATTCTGAG	114-93		70	
CVIII-1P (h)	GCTAGTCGGAAGACTCCG	143-161	CVd-IIIa (267 bp)	60	Rakowski <i>et al.</i> 1994
CVIII-1M (c)	TCACCAACTTAGCTGCCTTC	112-93			
CVIII-2P (h)	GGAGGAAACTCCGTGTGGTTC	1-21	CVd-IIIa (278 bp)	66	Rakowski <i>et al.</i> 1994
CVIII-2M (c)	TTTACCCTGGAGGCCCAATCC	278-251		66	
CVIII-3P (h)	ATCAG <b>CTGCAG</b> <sup>f</sup> GAAGGCAGCTAAGTTG	87-108	CVd-IIIa (311 bp)	68	Rakowski <i>et al.</i> 1994 及び本研究で決定した配列
CVIII-3M (c)	AGGT <b>GTCGAC</b> GACGACAGGTAAG	92-74		60	
CVIV-1P (h)	ACAGCTTGTGGAGGGAACATAC	32-53	CVd-IV (228 bp)	66	Puchta <i>et al.</i> 1991
CVIV-1M (c)	TATTAACAAGCCTGGGAGGAACA	259-237		66	
CSV-1P (h)	CTTAGGACCCCACTCCTGCG	132-149	CSVd (348 bp)	66	李ら 1997
CSV-1M (c)	CCGCGATCTCGTCGGACTTC	125-106		66	
HLVd-1P (h)	GGATACTACTTTGAGCGCC	199-218	HLVd (250 bp)	62	Hataya <i>et al.</i> 1992
HLVd-1M (c)	TAGTTTCCAACCTCCGGCTGG	192-173		62	
PPSTV-1P (h)	CGCGCCCGCAGGACCAC	210-226	PSTVd (302 bp)	62	Gross <i>et al.</i> 1978
PPSTV-1M (c)	TGTCGCGCGCTGGGCACT	152-135		62	

a Tm 値は、次の式により計算した。なお、特異配列以外に付加した配列 (斜体) は、加えないで計算した。

$4 \times (\text{G と C の数}) + 2 \times (\text{A と T の数})$

b プライマーの設計のために参照した報告。

c h と c は、それぞれ相同鎖プライマー、相補鎖プライマーを示す。

d 予測される RT-PCR による増幅断片の塩基対の数 (bp) と NASBA による cRNA の塩基数 (nt) を示す。

e 斜体は、ウィロイドに対して特異的ではない配列を示し、特に T7PCEV-1M と T7HSV-8M については、T7RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を示す。

f 反転文字は cDNA のクローニングのために付加した制限酵素部位 (**CTGCAG** は PstI、**GTCGAC** は SalI の認識配列) を示す。

モニウムを加えた。基本的に 94 °C で 30 秒間 (1 回目だけ 5 分間)、50 °C で 1 分間、72 °C で 2 分間 (最後だけ 10 分間) のサイクルを 40 回行い、cDNA を増幅した。その後、1/5-1/10 量を 2%アガロースゲルで、電気泳動して cDNA の増幅を検出した。

### 3.3.4.NASBA

#### 3.3.4.1.NASBA 反応

CEVd と CVd-IV、HSVd の cRNA を増幅するために以下のようなプライマーの組を使用した。CEVd 及び CVd-IV の cRNA 増幅用にプライマー組、PCEV-1P と T7PCEV-1M を使用し、HSVd の cRNA 増幅用にプライマー組、HSV-9 と T7HSV-8M を使用した (表 3-2)。NASBA 反応は、基本的に van Gemen ら(1993)の方法に従った。反応溶液 23 $\mu$ l {40 mM Tris-HCl pH 8.5、12 mM 塩化マグネシウム、42 mM 塩化カリウム、5 mM ジチオスレイトール、15%ジメチルスルフォキシド(DMSO)、1 mM d(G、A、T、C)TP、2 mM r(G、A、T、C)TP、適当濃度 (通常 2 mM) の ITP、0.1 mg/ml 仔牛血清アルブミン、0.2 mM の T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列の付加された相補鎖プライマーと、相同鎖プライマー、純化 CEVd または HSVd-cit、鑄型となるカンキツウイロイドの感染したカンキツからの抽出核酸} は、65 °C で 5 分間保温し、鑄型 RNA の変性及びプライマーの特異的アニールを行った。その後、41 °C で 1 分以上保温してから、酵素溶液 2  $\mu$ l {0.1 U RNase H (TaKaRa)、40 U の T7RNA ポリメラーゼ (GIBCO BRL)、8 U AMV 逆転写酵素 (SEIKAGAKU)} を加えて 41 °C で 90 分間保温した。

#### 3.3.4.2. NASBA 増幅産物の検出：ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動と尿素変性 5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ホルムアミド変性アガロースゲル電気泳動は、植物バイオテクノロジー・実験マニュアル「クローニングとシークエンス」(1989) の RNA の電気泳動とノーザンハイブリダイゼーションの項 (p. 50-56) に従った。ただし、電気泳動装置は、ミューピッド-2 (コスモ・バイオ) を使用した。

尿素変性 5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、基本的に Marcos & Flores の方法 (1994) に従った。NASBA 反応液 5  $\mu$ l を 60  $\mu$ l のグリオキサール変性液 (10 mM リン酸ナトリウム pH 7.0、1 M 脱イオングリオキサール、50% DMSO) の入ったマイクロチュ

ープ中に移し、50 °Cで1時間保温し、RNAを変性した。等量の滅菌水を加え、12 µlの4 M LiCl溶液と300 µlのエタノールを加え、13,000 gで5分間遠心分離し、変性RNAを沈殿させた。1 × TBE (89 mM Tris- ホウ酸) に溶解して、ゲル (8 M 尿素、5%アクリルアミド、1 × TBE、ゲル板:106 mm × 100 mm × 1 mm) のウェルに積んだ。1 × TBEを泳動緩衝液に用い、キシレンシアノールがゲルの8分目に到達するまで、150 V定電圧で泳動した。

その後、銀染色によりNASBA増幅断片のシグナルを検出するか、もしくは、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。銀染色は、sPAGEと同様に行った(3.3.1章を参照)。ノーザンハイブリダイゼーションの方法は、3.3.2.3及び3.3.2.4章に基本的にしたがったが、ハイブリダイゼーション後の洗浄におけるRNase A処理は、行わなかった。

### 3.4.カンキツウイロイド塩基配列の解析

#### 3.4.1.カンキツウイロイドRNAのcDNAのクローニング

多くの場合(CVd-IとCVd-IIIの全長cDNAをクローニングした場合を除いて)、特異的プライマーによるRT-PCRで、cDNAを増幅し平滑末端化処理した。一方、プラスミドベクターpBluescript SK-を平滑末端を生ずる制限酵素(*Sma*Iまたは*Eco*RV)で切断し、先に述べたウイロイドcDNAと結合し、組み換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドで、大腸菌MV1184株を形質転換した。形質転換した大腸菌を培養し、組換えプラスミドDNAを抽出した。その後、ラジオアイソトープまたは、適当な蛍光体を標識に用いたシーケンス反応を各シーケンスキットを用いて行い、反応産物をポリアクリドアミドゲルで電気泳動し、ウイロイドcDNAの塩基配列を解析した。

##### 3.4.1.1. RT-PCR増幅断片の平滑末端化、または、制限酵素による切断

増幅cDNAは、フェノール:クロロホルム(1:1)抽出とエタノール沈殿により精製した。沈殿を31 µlの蒸留水で溶解後、4 µlの10 × T4DNAポリメラーゼ緩衝液(0.7 M Tris-HCl pH 7.4、0.1 M 塩化マグネシウム、0.05 M ジチオスレイトール)と4 µlの1 mM d(A, T, G, C)TPs、2ユニットのT4DNAポリメラーゼを加え、穏やかに攪拌後、37 °Cで15分間保温した。0.5 M EDTA pH 8.0を1 µl添加し反応を止めた。一方、CVd-Iのプライマ

ー CBLV-2P と CBLV-2M を用いた RT-PCR 及び、CVd-III のプライマー CVIII-3P と CVIII-3M を用いた RT-PCR による増幅断片は、精製後蒸留水に溶解し、適当な緩衝液を加え、それぞれ、制限酵素 *Pst*I または *Sa*II で切断した。フェノール：クロロホルム (1:1) 抽出、エタノール沈殿により精製後、蒸留水 20  $\mu$ l に溶解し、プラスミドベクターとの連結に用いた。

#### 3.4.1.2. カンキツウイロイド cDNA とプラスミドベクターとのライゲーション

プラスミドベクター 1-2  $\mu$ g を制限酵素 *Sma*I または、*Eco*RV、*Pst*I、*Sa*II で切断し線状化した。フェノール：クロロホルム (1:1) 抽出とエタノール沈殿により精製して cDNA との結合に用いた。50 ng の線状化 (平滑末端化した cDNA との縫合には、*Sma*I または *Eco*RV で線状化した、適当な制限酵素で切断した cDNA には、同じ制限酵素で線状化した) プラスミドと全体の 1/5-1/4 量の cDNA、2  $\mu$ l の 10  $\times$  T4DNA ライゲーション緩衝液 (660 mM Tris-HCl、50 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール、10 mM ATP pH 7.5)、蒸留水を加え 19  $\mu$ l とし、1  $\mu$ l の 5 ユニット/ $\mu$ l T4DNA リガーゼ (ベーリンガー) を加え、22  $^{\circ}$ C で一晩静置した。

#### 3.4.1.3. コンピテントセルの調整

大腸菌 MV1184 株を単コロニー分離し、SOB 2 ml に接種し、37  $^{\circ}$ C で一晩、振盪培養した。0.5 ml を SOB {2% バクトトリプトン (DIFCO)、0.5% 酵母エキス (DIFCO)、1 mM 塩化ナトリウム、0.25 mM 塩化カリウムの溶液をオートクレーブし、100 ml あたり、1 ml の 1 M 塩化マグネシウム・6 水和物 (ろ過滅菌) と 1 ml の 1 M 硫酸マグネシウム・7 水和物 (ろ過滅菌) を添加し作成} 50 ml に接種して、培養液の吸光度 OD<sub>550</sub> が 0.4-0.6 になるまで 37  $^{\circ}$ C で振盪培養した。氷上にて 10 分間静置後、低速遠心分離 (200-300 g) により集菌し、氷冷した 17 ml の TB 溶液 {35 mM 酢酸カリウム、50 mM 塩化カルシウム・2 水和物、45 mM 塩化マンガン・4 水和物、100 mM 塩化ルビジウム、15% ショ糖、(酢酸で pH 5.8 に調製。ろ過滅菌後、20 ml ずつ分注して -20  $^{\circ}$ C 保存)} を加えて、穏やかに懸濁し、氷中にて 15-20 分間静置した。低速遠心により集菌し、氷冷した 2 ml の TB 溶液を加えて穏やかに懸濁し、氷中にて 15-20 分間静置した。さらに、DMSO 70  $\mu$ l を加え氷中にて 10 分間静置後、100  $\mu$ l ずつ分注して、使用するまで -80  $^{\circ}$ C で保存した。

#### 3.4.1.4. 大腸菌の形質転換

コンピテントセル (100  $\mu$ l) を氷上で融解し、ライゲーション産物 (3.4.1.2 章) を 10  $\mu$ l 加え、氷上で、30 分間静置した。42  $^{\circ}$ C で 1 分間熱処理し、大腸菌のエンドサイトーシスを促し、SOC (SOB に 20 mM グルコースを添加したもの) 250  $\mu$ l を加え、37  $^{\circ}$ C で 30 分間、極穏やかに振盪し、40  $\mu$ l の 100 mM イソプロピルチオ - $\beta$ -D- ガラクトシド (IPTG) を添加した。あらかじめ 40  $\mu$ l の 2% 5- ブロモ -4- クロロ -3- インドリル - $\beta$ -D- ガラクトシド (X-gal、ジメチルホルムアミド中に溶解) を塗布した 2  $\times$  YT 寒天培地 (1.6% バクトトリプトン、1% 酵母エキス、0.5% 塩化ナトリウム、1.5% アガロース) に上記の大腸菌を塗布して 37  $^{\circ}$ C で 16 時間保温した。形成したコロニーの中で、白色コロニー (形質転換体) を選び取った。

#### 3.4.1.5. 組換えプラスミド DNA の抽出

選び取った形質転換体の単コロニーを 2 ml の 2  $\times$  YT (50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む) に接種し、一晚培養した。プラスミド DNA は、アルカリ -SDS 法により抽出した。氷中にて 5 分間静置後、1.6 ml マイクロ遠心チューブへ移した。(残った培養液は、1/5 倍量のグリセロールを加え -80  $^{\circ}$ C で保存した。) 約 10,000 g で 2 分間の遠心分離により集菌し、沈殿を 60  $\mu$ l TEG 溶液 (50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl pH 8.0、10 mM EDTA pH8.0) に懸濁し、40  $\mu$ l リゾチーム溶液 (ベーリンガー、10 mg/ml の濃度になるように TEG 溶液に溶解) を加え懸濁した。室温で 5 分間静置し、200  $\mu$ l の 0.2 N 水酸化ナトリウム及び 1% SDS 溶液を加え転倒混和した。氷中にて 5 分間静置後、150  $\mu$ l の 3 M 酢酸カリウム溶液 pH 4.8 を加え、よく転倒混和し、氷中にて 5 分間静置した。12,000 g で 10 分間遠心分離し、上清を別のチューブに移した。フェノール : クロロホルム (1:1) 抽出とエタノール沈殿で精製し、50  $\mu$ l TE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA pH 8.0) に溶解した。{必要に応じて、2  $\mu$ l (1/25) を 1% アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドの移動度比較から組換え体の確認を行った。} 3  $\mu$ l の 0.5 mg/ml RNase A (100  $^{\circ}$ C で 15 分間加熱後、徐冷し DNA 分解酵素を失活化した溶液) を溶液中に加えて、37  $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。30  $\mu$ l の 20% PEG 及び 2.5 M 塩化ナトリウム溶液を加え攪拌して氷中で、1 時間以上静置した。12,000 g で 5 分間、4  $^{\circ}$ C で遠心分離して上清を捨て、沈殿を 70% エタノールで洗浄して、蒸留水に溶解した。

### 3.4.2.塩基配列の解析

#### 3.4.2.1.ラジオアイソトープと USB 社の標識キットを用いての塩基配列の解析

2 ml の培養液で培養した大腸菌から抽出されたプラスミド DNA の 1/5 量(1-2  $\mu\text{g}$  と考えられる)を 12  $\mu\text{l}$  の蒸留水に溶解し、2  $\mu\text{l}$  の 2 mM EDTA pH 8.0、2  $\mu\text{l}$  の 2 N 水酸化ナトリウムに溶解し、室温で 5 分間静置してプラスミド DNA を変性した。次に 8  $\mu\text{l}$  の 5 M 酢酸アンモニウム pH 4.8 と 100  $\mu\text{l}$  のエタノールを加えて、-80  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間静置した。15,000 g で 5 分間遠心分離し、沈殿を 80% エタノールで洗浄し、減圧乾燥を 5 分間行った。

次に変性プラスミド DNA とプライマーのアニーリングを行った。沈殿を 7  $\mu\text{l}$  の TE 溶液に溶解し、2  $\mu\text{l}$  の 5  $\times$  反応緩衝液 (USB)、1 pmol のプライマー (M13M4 または M13RV、T7、T3) を加え、65  $^{\circ}\text{C}$  で 2 分間保温した。30 分間かけて室温まで徐冷し、その後、氷上に静置した (4 時間以内に次の操作を行う)。

変性し、プライマーとアニーリングさせたプラスミド DNA 溶液 5  $\mu\text{l}$  に 0.1 M ジチオスレイトール 0.5  $\mu\text{l}$ 、ラベリングミックス 5 倍希釈液 1.0  $\mu\text{l}$ 、 $[\alpha^{32}\text{P}]$ dCTP(アマシャム)0.25  $\mu\text{l}$ 、Sequenase (DNA ポリメラーゼ) 希釈液 (酵素希釈液で 9 倍希釈) 1.0  $\mu\text{l}$  を加え、室温で 2-5 分間静置した。あらかじめ dd(A、T、G、C)TP をそれぞれ 1.25  $\mu\text{l}$  入れた 4 つのチューブを用意し、その中に上記の溶液を 1.75  $\mu\text{l}$  ずつ 4 つのチューブに分注し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 3-5 分間反応した。2  $\mu\text{l}$  の反応停止液を加え 80  $^{\circ}\text{C}$  で 2 分間熱変性後、氷水中で急冷した。

この溶液 2-3  $\mu\text{l}$  をシーケンス用のポリアクリドアミドゲルで、電気泳動した。シーケンスゲルは、400  $\times$  200 mm または 675  $\times$  200 mm のガラス板、厚さ 0.35 mm のスパーサー及びシャーク型コームを使用して、尿素変性 5%ポリアクリドアミドゲル {50%(W/V) 尿素、4.75% (W/V)アクリルアミド、0.25% (W/V)ビスアクリルアミド、1  $\times$  TBE (0.09 M Tris- ほう酸、0.002 M EDTA) の溶液に、脱気後 10% (W/V)過硫酸アンモニウム 0.25 ml と *N,N,N,N*-テトラメチルエチレンジアミン 0.012 ml} を作成した。電気泳動は、1,500-2,000 V(400  $\times$  200 mm のガラス板) または 2,000-2,500 V(600  $\times$  200 mm のガラス板) 定電圧で、BPB ゲル下端、または、キシレンシアノール 200 mm、キシレンシアノール 450 mm 前後まで行った。X 線フィルムへの露光は、電気泳動後のゲルを固定液 (10%メタノール、10%酢酸) 中で 30 分間固定後、ゲルドライヤーで乾燥し、X 線フィルムに室温で一晩露光した。

#### 3.4.2.2. Li-Cor シークエンサーによる塩基配列の解析

シークエンス反応は、Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7 - deaza - dGTP (アマシャム) を用いた。方法は、基本的に説明書に従った。2 ml の大腸菌培養液からアルカリ SDS 法で抽出されたプラスミドを滅菌水 120  $\mu$ l に溶解し、2.75  $\mu$ l ずつ 4 本のチューブに分注した。各チューブに 0.25  $\mu$ l の 1 pmol/ $\mu$ l 蛍光標識プライマーと 1  $\mu$ l の A または C、G、T 試薬を入れて混合した。反応は、95  $^{\circ}$ C で 5 分間を 1 回と 95  $^{\circ}$ C で 30 秒間、続いて 60  $^{\circ}$ C で 30 秒間を 25 回という温度条件で、PCR Thermal Cycler MP (TaKaRa) を用いて行った。反応停止液 2  $\mu$ l を入れて電気泳動に供試した。

電気泳動は、Li-Cor シーケンシング装置 (4000LS Long ReadIR™ ; Li-Cor) を使用した。60 ml のシークエンスゲル溶液 {4% LongRanger 溶液 (FMC)、7 M 尿素、1.2  $\times$  TBE} は、口径 0.2  $\mu$ m のフィルターで濾過後、減圧して脱気した。400  $\mu$ l の 10% APS と 40  $\mu$ l の TEMED を加えて攪拌し、ゲル板に流し込み 4 時間以上重合させた。上記の試料 1.5  $\mu$ l を 1  $\times$  TBE を電気泳動用緩衝液とし用いて、ゲル板を 45  $^{\circ}$ C に保ち、25 mA、2000 V の条件で一晩泳動した。

解析は、Li-Cor 赤外 DNA シーケンシング解析システム (アロカ) 及び DNASIS ver.3.5 (日立) を用いて行った。

## 4. 結果と考察

### 4.1.日本のカンキツに感染しているウイロイドの種類

#### 4.1.1.カンキツエキソコーティスウイロイド (CEVd)

日本において CEVd は、生物検定や PAGE により検出されているが (例えば、Sano *et al.* 1986)、その塩基配列の報告はない。そこで、広島県の圃場カンキツ樹に感染していた CEVd (CEVd-H、Sano *et al.* 1986) の塩基配列の解析を試みた。塩基配列の解析には、エキソコーティス病の指標植物エトログシトロンにより増殖され、ジヌラ (*Gynura aurantiaca*) で、他のカンキツウイロイドと分離後、トマトで増殖して純化した CEVd-H (CEVd-Hgt、畑谷、1987) を用いた。既報の CEVd オーストラリア株 (Gross *et al.* 1982; 図 4-2 の 2 次構造) に従って、2 組のプライマーを設計した (PCEV-1P と PCEV-1M、CEV-31 と CEV30)。これらのプライマー組を用いて RT-PCR を行いアガロースゲルにより増幅断片を電気泳動したところ、予想される位置にそれぞれバンドが検出された。この増幅断片をクローニングした。これらの塩基配列を基にして、CEVd-Hgt の塩基配列を決定した (図 4-2)。

塩基配列は、以下の 2 つの考え方、規則を基本にして決定した。1. 同じ部分について 3 クローン以上の塩基配列を解析する。2. クローン間での塩基配列の比較において変異がみられた場合、それが一つのクローンにおいてのみの変異については、基本的に RT-PCR の cDNA 増幅過程で生じた人工的な変異とみなす。以後の章で述べる全てのカンキツウイロイドの塩基配列は、基本的にこれに従って決定した。CEVd-Hgt については、プライマー組 CEV-31 と CEV-30 による RT-PCR 増幅断片由来の五つのクローン (CEVH3031-16 と 19、20、22、23) とプライマー組 PCEV-1P と PCEV-1M による RT-PCR 増幅断片由来のクローン (CEVHP1PM-6) の塩基配列を解析した (図 4-1)。プライマー CEVd31 と CEV30 の配列部分については、本実験では、クローン CEVHP1PM-6 の塩基配列のみの結果しかない。しかし、この部分については、別の実験で、3 つのクローンについて塩基配列を決定したところ、クローン CEVHP1PM-6 と同じ塩基配列であることを確かめている (中原、1995A)。クローン間の塩基配列を比較すると 4 カ所で他のクローンと変異していた。74 番目の G の欠損は、2 つのクローンでみられたので、解析に用いた純化 CEVd-Hgt は、この G が欠損しているものとしていないものが共存するヘテロな集団であると考えた。そ



クローン名				CEV30M←→CEV31P				
	1	10	20	30	40	50	60	
	CGGGATCTTTCTTGAGGTTCCCTGTGGTGCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAA							
CEVH3031-16	-----							
CEVH3031-19	-----							
CEVH3031-20	-----							
CEVH3031-22	-----							
CEVH3031-23	-----							
CEVHP1PM-6	-----							
	61	70	80	90	100	110	120	
	AGAGGCGGCGGGGGAAGAAGTCCCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGGAAAGTCGAGG							
CEVH3031-16	-----D-----							
CEVH3031-19	-----							
CEVH3031-20	-----							
CEVH3031-22	-----							
CEVH3031-23	-----D-----							
CEVHP1PM-6	-----							
				←PCEV-1M				
	121	130	140	150	160	170	180	
	TCGGGGGGGACAGCTGCTTCGGTCCCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAG							
CEVH3031-16	-----							
CEVH3031-19	-----							
CEVH3031-20	-----							
CEVH3031-22	-----							
CEVH3031-23	-----							
CEVHP1PM-6	-----T-----							
					PCEV-1P→			
	181	190	200	210	220	230	240	
	CTCGTCTCCTTCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCTGAAAGGCCACGCCCC							
CEVH3031-16	-----							
CEVH3031-19	-----							
CEVH3031-20	-----							
CEVH3031-22	-----							
CEVH3031-23	-----							
CEVHP1PM-6	-----							
	241	250	260	270	280	290	300	
	CTCGCCCGGAGCTTCTCTCTGGAGACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTTCAACCCCAA							
CEVH3031-16	-----							
CEVH3031-19	-----							
CEVH3031-20	-----							
CEVH3031-22	-----							
CEVH3031-23	-----CT-----							
CEVHP1PM-6	-----							
	301	310	320	330	340	350	360	
	ACCGCTTTTCTTGATCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAGCCCTCGGAACCCCTAG							
CEVH3031-16	-----							
CEVH3031-19	-----							
CEVH3031-20	-----							
CEVH3031-22	-----							
CEVH3031-23	-----							
CEVHP1PM-6	-----							
	361	370						
	ATTGGGTCCCT		371					
CEVH3031-16	-----							
CEVH3031-19	-----							
CEVH3031-20	-----							
CEVH3031-22	-----							
CEVH3031-23	-----							
CEVHP1PM-6	-----							

図4-1.広島産レモンを接木接種によりエトログシトロンで増殖し、ジヌラで単離、トマトで増殖、継代したCEVd (CEVd-Hgt) の各cDNAクローンの塩基配列。網掛けは、cDNA増幅のためのPCRに用いたプライマー部位。Dは、塩基の欠損を示す。クローンCEVH3031-16と19、20、22、23は、プライマーCEV31とCEV30を用いて増幅したcDNA由来のクローン、クローンCEVHP1PM-6は、プライマーPCEV-1PとPCEV-1Mを用いて増幅したcDNA由来のクローンを示す。(-)は、塩基配列を決定できた部分の中で、最上段に示した塩基配列と同じだったところ。違う部分は、その塩基を示した。(D)は、欠損を示す。空欄は、塩基配列を決定できなかった部分。

して、G の欠損している 2 つのクローンの中の一つのクローンは、263 番目と 264 番目の塩基が AG から CT に置換していた。この変異は、他のクローンには、みられないため、上に述べた考え方に従うと RT-PCR の過程で生じた人工的な変異とみなすことになるが、この変異だけは、純化 CEVd の中に存在した変異を反映していると考えた (中抜き文字)。下で述べる CEVd-Hc にみられた変異だからである。これらの変異を除くと CEVd-Hgt の塩基配列は、Gross ら (1982) により報告された CEVd と非常に相同性が高く、234 番目の U が A に置換しているだけであった (図 4-2)。

CEVd-H の塩基配列は、本実験とは別に堀崎 (1996) により解析されている。堀崎は、直接感染エトログシトロン中の CEVd-H (CEVd-Hc) の塩基配列を、RT-PCR クローニングにより決定した。CEVd-Hgt と CEVd-Hc の塩基配列を比較したところ、分離源は同一であるこれらの CEVd の間に 7 カ所の塩基置換がみられた (図 4-2)。Semancik ら (1993) は、スイートオレンジから分離された CEVd をエトログシトロンからジヌラ、トマト、トマトカルスと順々に継代して、それらの植物中の CEVd をそれぞれ CEVc と CEVg、CEVt、CEVcls 名付けてその塩基配列を決定している。CEVd-Hc と CEVd-Hgt とこれらの CEVd を比較したところ CEVd-Hc は、CEVc と相同性が高かった。CEVd-Hc の変異の中で、129 番目と 130 番目の塩基の間への U の挿入 (図 4-2、星印) だけが、CEVc にはみられない変異であった。さらに、CEVd-Hc と比べて CEVc だけでみられた変異が、4 カ所あるが、その中の 3 カ所の変異は、塩基配列を解析した全てのクローンに共通してはいなかったことが報告されている (図 4-2、中抜き文字)。つまり、CEVc はヘテロな集団であり、より CEVd-Hc の塩基配列に近いものが存在することを示している。CEVd-H は、カンキツからジヌラ、トマトと継代、増殖を重ねる過程で、その塩基配列は、CEVd-Hc から CEVd-Hgt へと変異した。そこでみられた 7 カ所の変異 (反転文字) の中で、74 番目の G の欠損を除いて、CEVg (ジヌラ) と CEVt (トマト) で共通の塩基へ変異していた。

RT-PCR に用いたプライマー組、CEV-31 と CEV-30、PCEV-1P と PCEV-1M の配列部分には、CEVd-Hc と CEVd-Hgt において変異はみられなかった。従って、これらのプライマー組は、CEVd-H の遺伝子診断に使用できると考えられた。

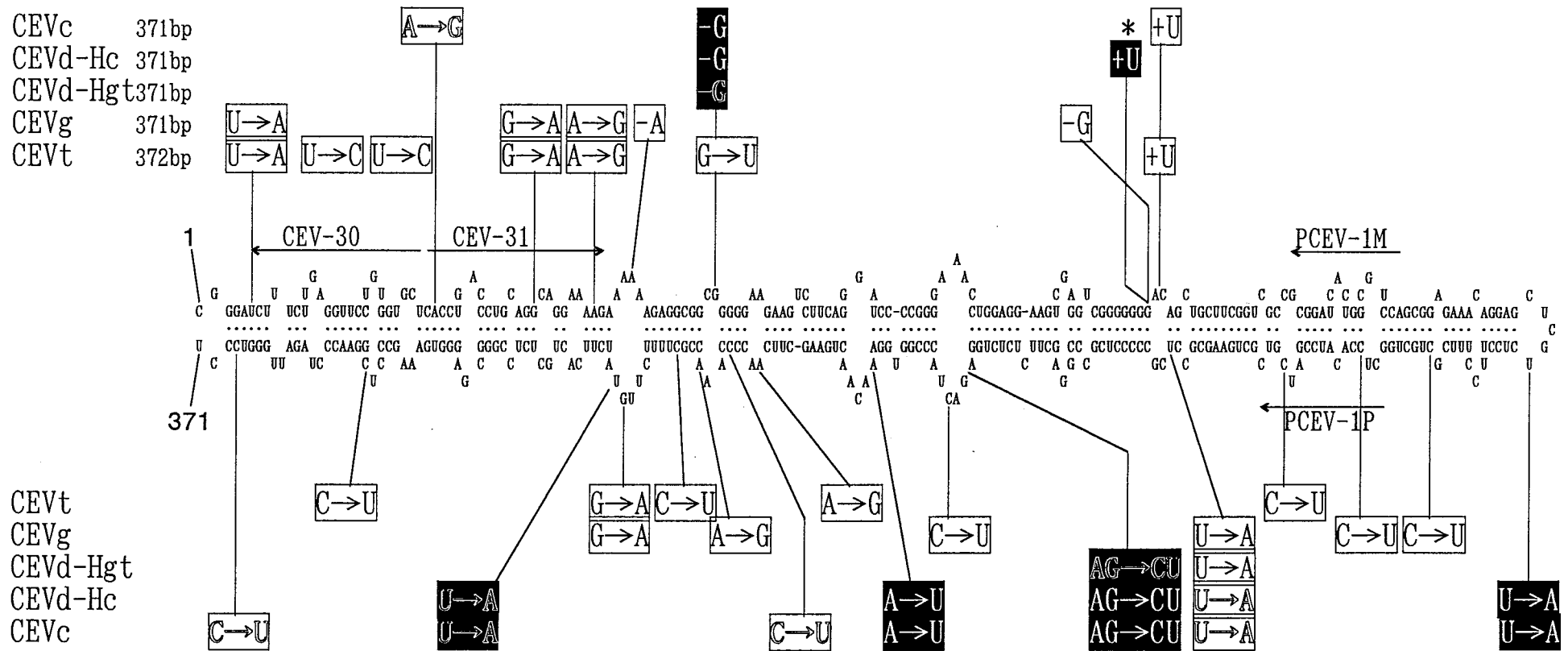


図4-2. CEVd-H (ジヌラとトマト継代型、CEVd-Hgt; シترون型、CEVd-Hc、堀崎、1996) と既報のCEVd、CEVg (ジヌラ) とCEVc (シترون)、CEVt (トマト) (Semancik *et al.* 1993) 及びCEVd (Gross *et al.* 1982) の比較。図のCEVdの予想される2次構造は、Grossら (1982) により報告された構造である。中抜きで示した変異、-Gは、CEVd-Hgの5クローンの中で、2クローンでみられた変異であり、AG→CUは、その2クローンの中の一つのクローンでみられた変異。CEVd-HcとCEVcの中抜きで示した変異は、解析したクローン全てにはみられなかった変異を示す。プライマー、CEV-31とCEV-30、PCEV-1P、PCEV-1Mは、CEVdのcDNAの増幅のためのRT-PCRに用いたプライマー。反転文字の変異は、CEVd-HcとCEVd-Hgtの間で変異している部分を示す。星印は、CEVcとCEVd-Hcとの間で共通ではない変異を示す。

#### 4.1.2. グループI カンキツウイロイド (CVd-I)

フィリピン産カンキツ (シキキツ、P:SIK-EC) は、当初、CEVd に感染しているため陽性対照として横浜植物防疫所内で保存されていた。本樹に感染している CEVd 以外のカンキツウイロイド検出を RT-PCR により試みた。CVd-I と HSVd、CEVd、CVd-IV の検出のために、既報のカンキツウイロイドの塩基配列に従って合成されたプライマー組、CBLV-1P と CBLV-1M、HSV-9 と HSV-8、PCEV-1P と PCEV-1M (表 3-2) を用いた。RT-PCR の鑄型として、ウイロイドをエトログシトロンに接ぎ木により感染させ、新たに生育してきた葉から全核酸を抽出して用いた。その結果、CEVd から増幅した cDNA と思われるバンド (図 4-3、レーン 3) の他に、CVd-I と HSVd からの増幅 cDNA の可能性のあるバンドが検出された (図 4-3、レーン 1 と 2)。さらに、CBLV-1P と CBLV-1M による RT-PCR により中国産のシキキツ (C9:SIK-EC) と日本のカンキツ (E180:EC) からレーン 1 と同様のバンドが検出された。ただし、C9:SIK-EC のバンドは、P:SIK-EC のそれよりも少し移動度が大きいと思われた。このことは 8%アクリルアミドゲル電気泳動で両方のバンドの移動度を比較することにより、はっきりと確認されている (Hataya *et al.* 1998 の図 1)。

上記の CVd-I 特異プライマーによる 3 つの増幅断片をクローニングしてその塩基配列を解析した。各増幅断片のクローン (P:SIK-EC 由来 4 クローンと C9:SIK-EC 由来 6 クローン、E180:EC 由来 4 クローン) の塩基配列を決定したところ、既報の CVd-I (CVd-Ib、CBLVd) の塩基配列 Ashulin ら (1991) と 90%以上の相同性があった。そして、それらの塩基配列中に制限酵素 *PvuII* 部位があり、その付近には 3 つの断片ともに変異が認められなかったことから、CVd-I の全長 cDNA をクローニングする目的で、この *PvuII* 部位を含み相補、相同鎖に対するプライマーを設計した (CBLV-2P と CBLV-2M、表 2-2)。両プライマーの 5'末端側にクローニングのための制限酵素 *PstI* 部位及び 3 塩基余分な塩基を付加した。このプライマー組により上記の 3 つのエトログシトロンからの抽出核酸に対し、RT-PCR を行って 2%アガロースゲル電気泳動で増幅断片を検出した。その結果、予想される位置に増幅断片が検出されたが、それ以外に、それより分子量の小さいと思われる非特異的な増幅断片が検出された。そこで、それぞれの増幅断片を *PstI* で切断して 7.5%未変性 PAGE で、分離して切り出してプラスミドベクター pBluescript II SK- の *PstI* 部位に挿入してクローニングした。P:SIK-EC 由来の 7 クローンと C9:SIK-EC 由来の 4 クローン、E180:EC 由来の 4 クローンの塩基配列を解析し、上記の部分配列と比較して 3 つのカンキツ由来の CVd-I の塩基配列を決定した (図 4-4 と 4-5、4-6)。

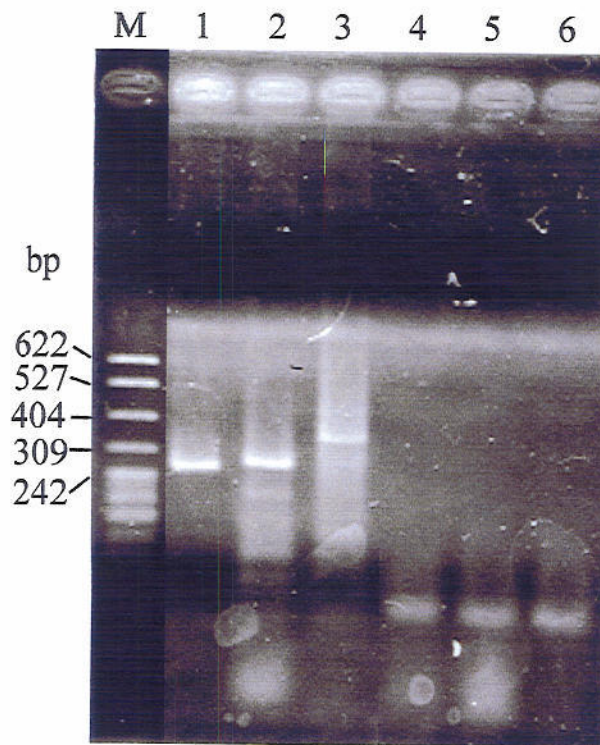


図 4-3.カンキツウイロイド特異プライマー (CBLV-1Pと CBLV-1M、レーン1; HSV-9とHSV-8、レーン2; PCEV-1PとPCEV-1M、レーン3)によるRT-PCR産物 (1/5量)の2%アガロースゲル電気泳動像。フィリピン産シキキツ(P:SIK-EC)を接いだエトログシトロンから抽出した核酸試料を鑄型に各プライマー組の相補鎖プライマーを逆転写反応に用いた。レーン4-6は、それぞれレーン1-3と同じプライマー組を用い、鑄型核酸試料を加えずに反応を行った陰性対照。レーンMは、DNAサイズマーカー、pBR322/HapII。

日本産カンキツ (E180) 由来の CVd-I {CVd-I(Jp)} は、328 塩基からなり CBLVd より 10 塩基長く、T2 領域 (2.1.1 章を参照) にその 2 次構造の棒状の相補結合構造を変えないかたちで 2 カ所の 5 塩基の挿入がみられた。実際に、CVd-I(Jp)と CBLVd の予測される 2 次構造 (棒状構造) の自由エネルギーが、それぞれ -152.8 kcal/mol、-143.9 kcal/mol であり、その安定性が大きく損なわれないことが報告されている (Hataya *et al.* 1998)。このほかに T2 または P 領域に 9 カ所、10 塩基の変異がみられた (図 4-4 と 4-7)。また、中抜き文字で示した U から A の変異 (図 4-7) は、11 クローンの中で 2 クローンにのみみられた (図 4-4)。CVd-I(Jp)は、CBLVd と 94%の相同性を示した。

フィリピン産シキキツ (P:SIK-EC) 由来の CVd-I の集団は、クロンの塩基配列の比較から二つの変異株 {CVd-I(P1)と CVd-I(P2)} からなると思われた (図 4-5)。部分配列のクロン 1P-1M/2 と 1P-1M/8、全長のクロン 2P-2M/2 と 2P-2M/5、2P-2M/6、2P-2M/7 は、CVd-I(P1)由来と考えられ、328 塩基からなり一部のクロンでみられた A から G への変異 (中抜き文字) を除くと CVd-I(Jp)と同一であった。部分配列のクロン 1P-1M/7 と 1P-1M/9、全長のクロン 2P-2M/3 と 2P-2M/4、2P-2M/8 は、CVd-I(P2)由来と考えられ、329 塩基からなり CVd-I(Jp)と比較すると 9 番目の T → C (一部のクロン) と 28 番目の A → U、266、267 番目の CU → UC の置換、及び 270 と 271 番目の間への A の挿入の変異がある。この中で、9 番目と 266、267 番目の変異は、既報の CVd-I の塩基配列 (Ben-Shaul *et al.* 1995; Önelge, 1996) では報告されていない変異であり、28 番目の変異は、Önelge が報告した変異株 (1996) と共通であった。CVd-I(P2)の塩基配列は、CBLVd と CVd-I(Jp)とそれぞれ 93%と 99%の相同性を示した。

中国産シキキツ (C9:SIK-EC) 由来の CVd-I {CVd-I(Ch)} は、CBLVd と同じ 318 塩基からなるが、6 カ所の変異がみられた (図 4-6)。この 6 カ所は、本研究で塩基配列を決定した他の CVd-I の 2 変異株全てに共通であった。また、この中の 2 カ所 (62 番目の U → A と 266 番目の A → G の置換) は、既報の感染カンキツ由来の CVd-I の 12 変異株 (Ben-Shaul *et al.* 1995; Önelge, 1996; Semancik *et al.* 1997) 全てに共通で、残りの 4 カ所は 1 または 2 変異株を除いて共通の変異であった。比較の対照に用いた CBLVd は、アボガドで単離、増殖したものの塩基配列を解析したことが報告されていることから (Ashulin *et al.* 1991)、上記の 6 カ所の変異は、カンキツ由来の CVd-I の変異株で非常に保存されていた。

CVd-I(Jp)と CVd-I(P1)、CVd-I(P2)は、最近報告された CVd-Ia (Semancik *et al.* 1997) と非常に相同性が高く、98-99%の相同性を示した。

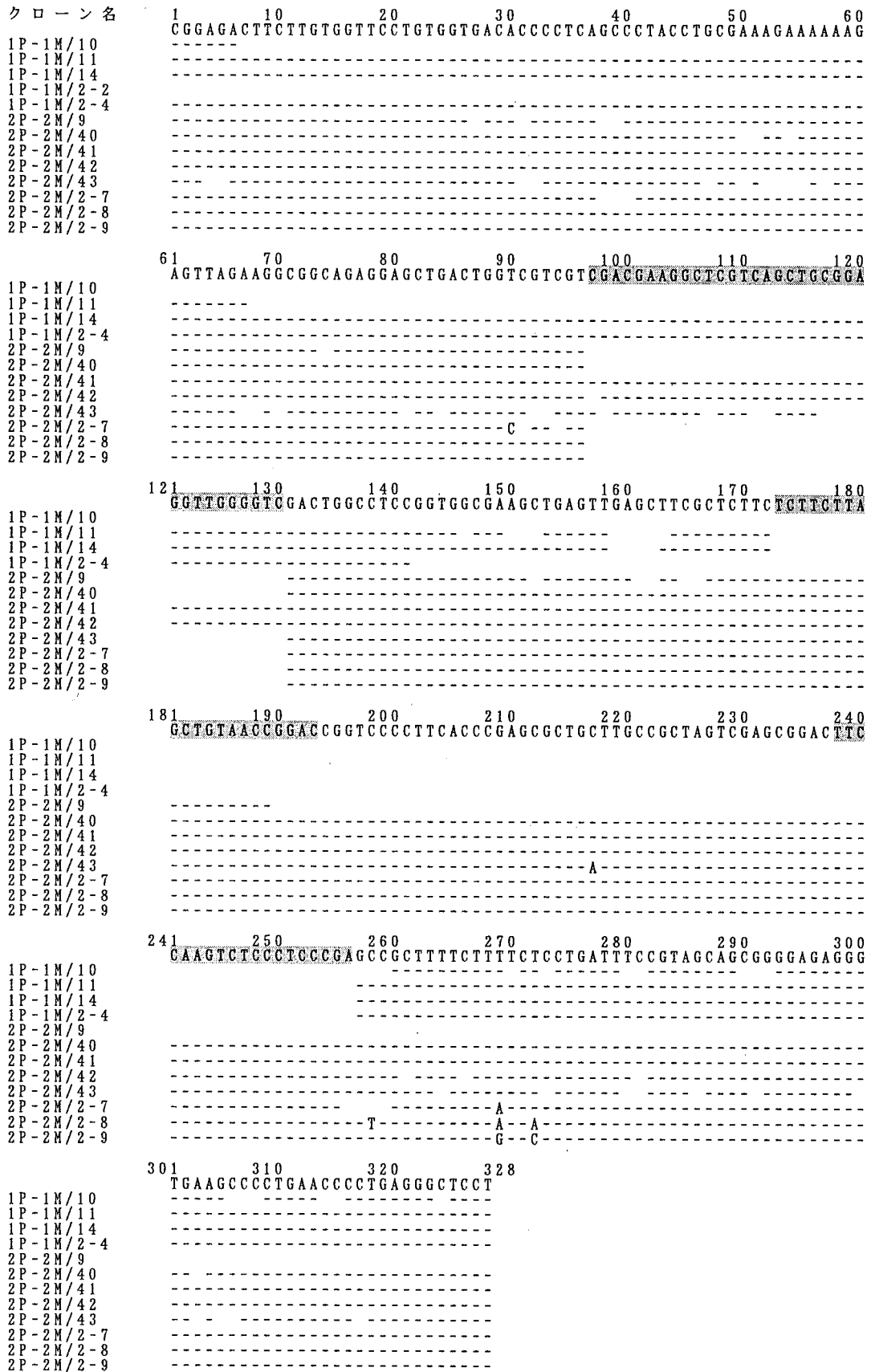


図 4-4. 日本産産カンキツ (E180) から検出された CVd-I の cDNA クローンの塩基配列。網掛けは、PCR クローニングに用いたプライマー部分。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-1 と同様にして示した。

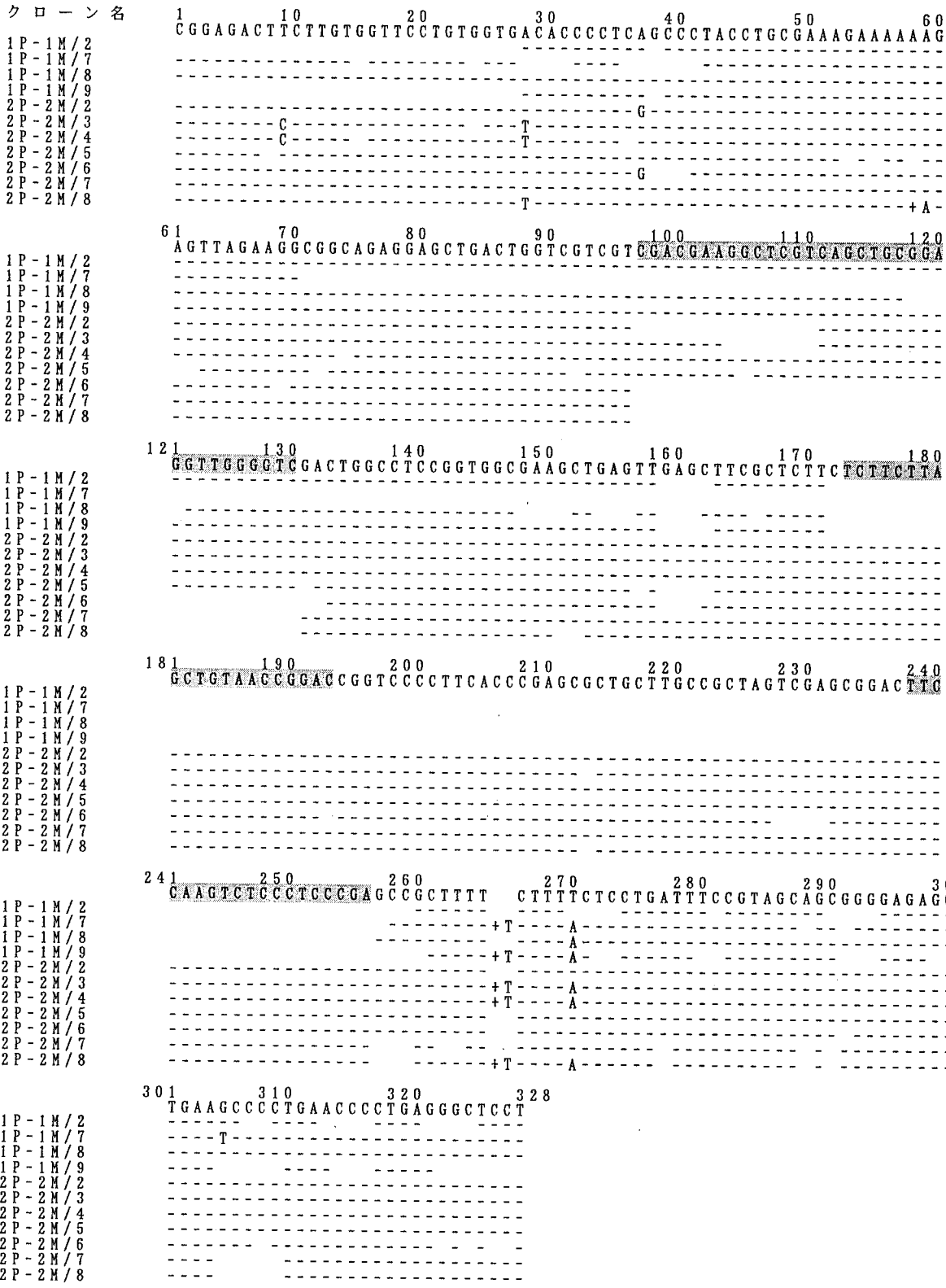


図 4-5. フィリピン産カンキツ (シキキツ、P: SIK-EC) から検出された CVd-I の cDNA クローンの塩基配列。網掛けは、PCR クローニングに用いたプライマー部分。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-1 と同様にして示した。なお、266 番目の + T は T の挿入を意味する。



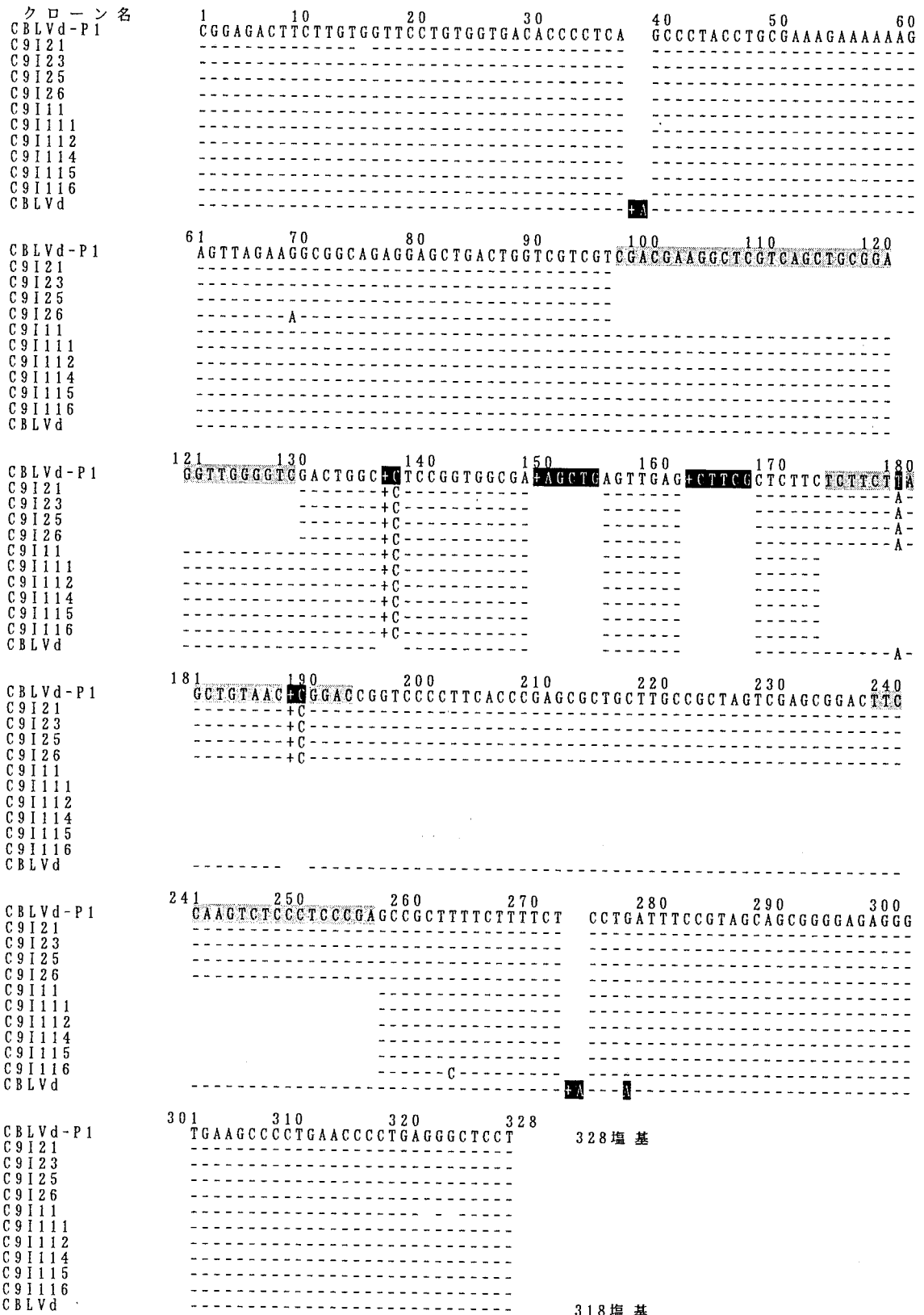


図 4.6. 中国産カンキツ (シキキツ, C9:SIK-EC) から検出された CVd-I の cDNA クロンの塩基配列。整列させた塩基配列の最上段には、フィリピン及び日本産カンキツから検出された CBLV-P1 (CVd-Ia)、最下段には、CBLVd (Ashulin *et al.* 1991、CVd-Ib) の塩基配列を挿入した。反転文字は、CBLV-P1 と CBLVd との間で変異している部分。網掛けは、PCR クローニングに用いたプライマー部分。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様に示した。

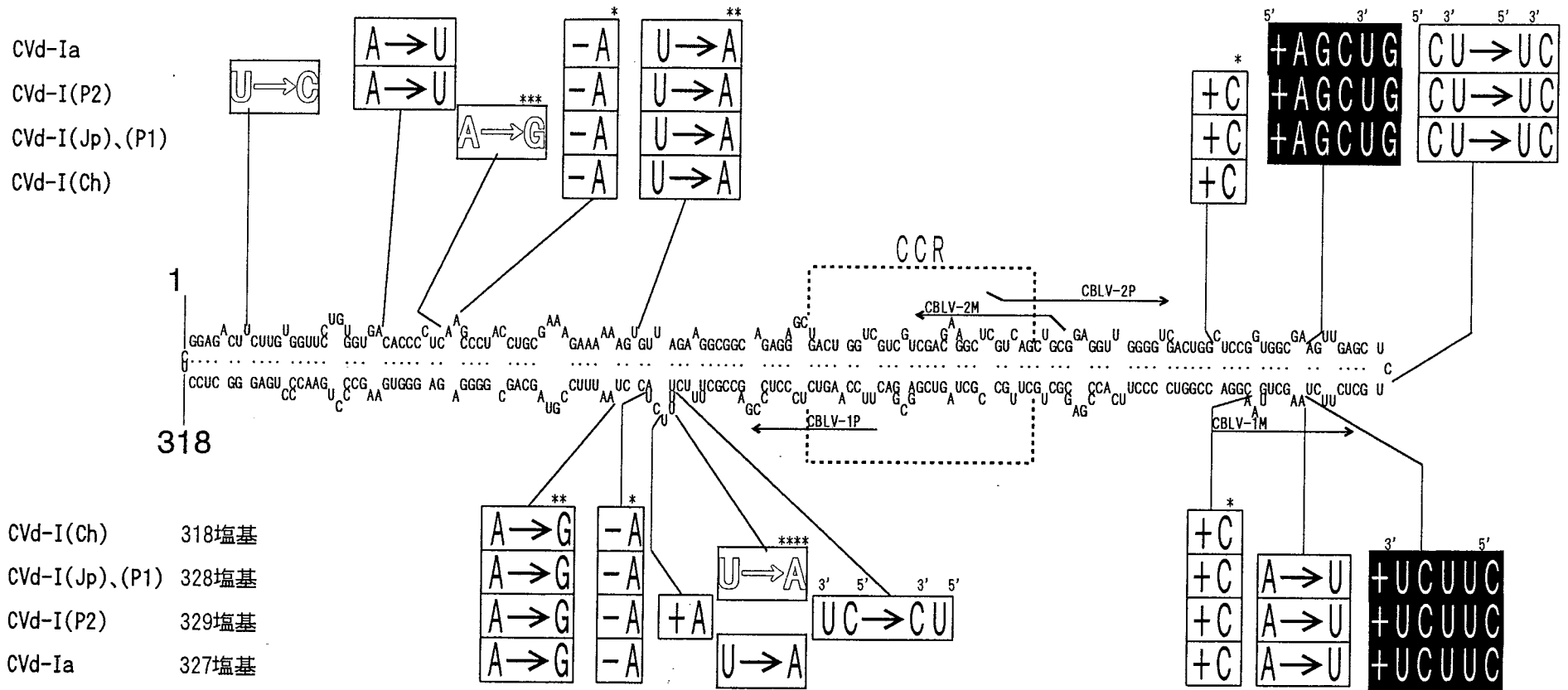


図4-7. CVd-I 3 系統 (P1 と P2、フィリピン由来; Jp、日本由来; Ch、中国由来) の塩基配列。示した塩基配列の 2 次構造は、既報の CBLVd のものであり (Ashulin *et al.* 1991)、CVd-Ia は、Semancik ら (1997) により報告されたものである。それぞれの系統において、塩基配列の違っている部分を実線で囲んで示した。CBLVd と比べ、既報の 12 の CVd-I 塩基配列変異株間 (Ben-Shaul *et al.* 1995; Onelge *et al.* 1996; Semancik *et al.* 1997) で共通の違い (\*\*) と 1 または 2 株を除いて共通の違いを示した (\*)。CVd-Ib より分子内の配列組換え (rearrangement) により生じたと予測されている (Hataya *et al.* 1998) 2 か所の挿入を反転文字で示した。CCR は、中央保存領域。CBLV-1P と 1M、2P、2M は、RT-PCR による cDNA 増幅に用いたプライマーの位置を示した。中抜き文字の変異は、それぞれのウイロイド (A→G の変異は P1、\*\*\*; U→A は Jp、\*\*\*\*) 由来のクローンの一部 (2 クローン以上) で見られた変異。

#### 4.1.3. グループIII カンキツウイロイド (CVd-III)

##### 3.1.3.1. 日本のカンキツから検出された CVd-III

上述のように、これまで日本でその存在が確認されていないカンキツウイロイドの一つである CVd-I が、日本のカンキツから検出された。さらに、これまで日本で報告のない CVd-III と CVd-IV の検出の検出を sPAGE により試みた (図 4-8a)。レーン 3 は、エトログシトロン E130 からの抽出核酸を泳動した。矢印で示したバンドは、CVd-II の変異株の一つである HSVd-cit (Sano *et al.* 1986、1988A) よりも若干低い位置に検出された。ドットプロットハイブリダイゼーションによりエトログシトロン E130 からは、HSVd は検出されていないことから (表 3-1)、このバンドは CVd-III と考えられた。他のエトログシトロン E83AK と E180 の抽出核酸の泳動像からもほぼ同じ位置にバンドが検出された (図 4-8a)。

このウイロイド様 RNA が、CVd-III であるかどうかクローニングと塩基配列の解析により確かめることにした。四つのエトログシトロンから 2 M LiCl 可溶性核酸を抽出し、それらを鋳型として 既報の配列から設計した CVd-III 特異プライマー組 (CVIII-1P と CVIII-1M、CVIII-2P と CVIII-2M、表 3-2) により RT-PCR を行った。この RT-PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により解析したところ、エトログシトロン E83AK (図 4-8b) と E130、E131K、11Y1 の全てにおいて特異的と思われるバンドが検出された。これらのフラグメントをプラスミドベクターに挿入し、大腸菌を形質転換した。エトログシトロン E83AK と E131K 由来の増幅断片の塩基配列を 3 から 6 クローンの塩基配列を解析することにより決定した。既報の CVd-IIIa と CVd-IIIb (Rakowski *et al.* 1994) の塩基配列と比較したところ、プライマー組 CVIII-1P と CVIII-1M による増幅断片のクローン 83III1-1 と 83III1-4、83III1-5、及びプライマー組 CVIII-2P と CVIII-2M による増幅断片のクローン 83III2-2 と 83III2-3、83III2-4 は、RT-PCR と続くクローニングの過程で人工的に導入されたと考えられる変異を除いて CVd-IIIa と同一であった。また、クローン 83III1-2 と 83III1-3、83III1-4、83III1-6 とクローン 83III2-1 と 83III2-6 は、CVd-IIIb と同一であった (図 4-9)。従って、エトログシトロン E83AK に感染している CVd-III の集団は、既報の CVd-IIIa と CVd-IIIb の 2 種類からなることがわかった。エトログシトロン E131K 由来の増幅断片のクローンの塩基配列は、RT-PCR を介したクローニング過程において生じた人工的な変異を除くと CVd-IIIa と同一であった (図 4-10) ことから、E131K に感染している CVd-III は、

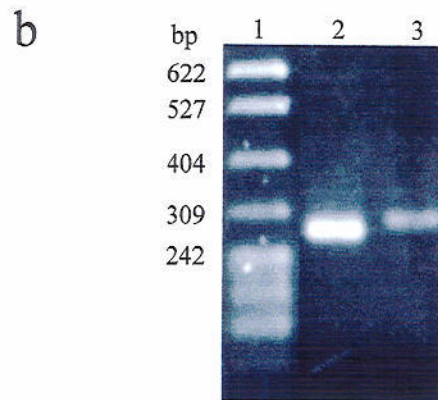
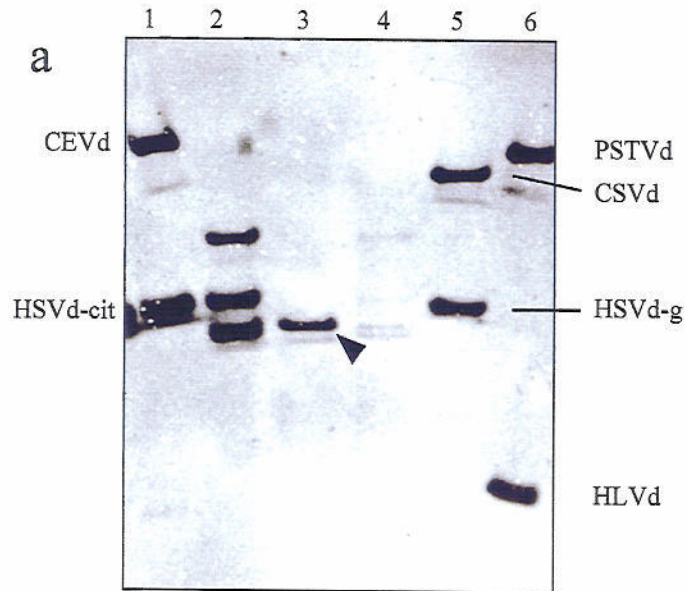


図4-8. a 連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sPAGE) 像。レーン1-4は、シトロンESとE83AK、E130、E180から抽出したCC 41RNAを泳動した。レーン5と6は、サイズマーカーで、キク矮化ウイルス (CSVd, 356塩基) とHSVdブドウ分離株 (297塩基) を含む核酸試料。レーン6は、PSTVdとホップ潜在ウイルス (HLVd, 256塩基) を含む核酸試料。レーン3の矢印は、CVd-IIIとみなされるバンドを示す。b 2%アガロースゲル電気泳動像。シトロンE83AKから抽出した2 M LiCl可溶性核酸を鋳型にランダムプライマーにより逆転写を行い、CVd-IIIに対する特異プライマー組 (CVIII-1PとCVIII-1M、レーン2; CVIII-2PとCVIII-2M、レーン3) によりPCRを行い、その1/5倍量を泳動した。

```

CVIII -2P->
CVd-III A  GGAGGAAACTCCGTGTGGTTCTGTGGGGCACACCCCTTGCCGAAAATAAAATGCAGAG  60
83III 1-1  -----
83III 1-2  -----C-----
83III 1-3  -----
83III 1-4  -----C-----
83III 1-5  DD-----
83III 1-6  -----C-----
83III 2-1  -----C-----
83III 2-2  -----
83III 2-3  -----
83III 2-4  -----
83III 2-6  -----G--C-----
CVd-III B  -----C-----

<- CVIII -1M
CVd-III A  AGGGGAAAGGGAA  CTTACCTGTCGTCGTCGACGAAGGCAGCTAAGTTGGTGAAGCCGAGT  120
83III 1-1  -----
83III 1-2  ---D-----+A-----
83III 1-3  ---D-----+A-----
83III 1-4  ---A-----+A-----
83III 1-5  -----
83III 1-6  ---D-----+A-----
83III 2-1  ---D-----+A-----C-----
83III 2-2  -----
83III 2-3  -----
83III 2-4  -----
83III 2-6  ---D-----+A-----C-----
CVd-III B  ---D-----+A-----C-----

CVIII -1P->
CVd-III A  GGAGTAAAGACGGAGAGTCTCCGCTAGTCGGAAAGACTCCGCATCTCCGGCTGACCCCTC  180
83III 1-1  -----
83III 1-2  -----A-----T
83III 1-3  -----A-----T
83III 1-4  -----T
83III 1-5  -----
83III 1-6  -----A-----T
83III 2-1  -----A-----T
83III 2-2  -----
83III 2-3  -----
83III 2-4  -----
83III 2-6  -----A-----T
CVd-III B  -----A-----T

CTTCAGCTCGCCGCTAGTCGAGCGGACAACCTGAGTGAGTAGCCCAACCCTAATCTGTTT  240
CVd-III A  -----
83III 1-1  --DD---D-----T-T---T-----
83III 1-2  --DD---D-----T-----
83III 1-3  --DD---D-----T-T---T-----
83III 1-4  --DD---D-----T-T---T-----
83III 1-5  -----DDDDDD
83III 1-6  --DD---D-----D-----T-T---T-----
83III 2-1  --DD---D-----T-T---T-----
83III 2-2  -----
83III 2-3  -----
83III 2-4  -----
83III 2-6  --DD---D-----T-T---T-----
CVd-III B  --DD---D-----T-T---T-----

<- CVIII -2M
CVd-III A  TTATCTAGGCTAGAAGGGGATTGGGCCTCCAGGGTAAAACACGATTGGTGTTCCCC  297
83III 1-1  -----
83III 1-2  -----
83III 1-3  -----
83III 1-4  -----
83III 1-5  DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD
83III 1-6  -----
83III 2-1  -----
83III 2-2  -----
83III 2-3  -----
83III 2-4  -----
83III 2-6  -----
CVd-III B  -----  294

```

図 4-9. カンキツ試料、E83AK の各 CVd-III cDNA クローンの塩基配列。整列させたクローンの塩基配列の上下は、既報の CVd-IIIa と CVd-IIIb (Semancik *et al.* 1994) の配列。D は、欠損を示す。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様にして示した。

クローン名

CVd-III A CVIII -2P→

E131K III -1-55 GGAGGAAACTCCGTGTTCCCTGTGGGGCACACCCCCTTGCCGAAAATAAAATGCAGAG 60

E131K III -1-66 -----

E131K III -1E-1 ----- A -----

E131K III -1E-2 -----

E131K III -1E-3 -----

E131K III -2-59 -----

E131K III -2-63 -----

E131K III -2E-5 -----

11Y1 III -1-2 -----

11Y1 III -1-3 -----

11Y1 III -1-4 -----

11Y1 III -1-8 ----- G -----

E130 III -1E-1 -----

E130 III -2E-1 -----

CVd-III B ----- C -----

CVd-III A AGGGGAAAGGGAA CTTACCTGTCGTCTCGAC ← CVIII -1M GAAGGCAGCTAAGTTGGTGAAGCCGAGT 120

E131K III -1-55 ----- G -----

E131K III -1-66 -----

E131K III -1E-1 -----

E131K III -1E-2 -----

E131K III -1E-3 -----

E131K III -2-59 -----

E131K III -2-63 -----

E131K III -2E-5 ----- C -----

11Y1 III -1-2 -----

11Y1 III -1-3 -----

11Y1 III -1-4 -----

11Y1 III -1-8 ----- G -----

E130 III -1E-1 -----

E130 III -2E-1 -----

CVd-III B ----- D ----- +A ----- C -----

CVd-III A GGAGTAAAGACGGAGAGTCTCCGCTAGTGGGAAAGACTCCGCATCCTCCGGGTGACCCTC 180

E131K III -1-55 -----

E131K III -1-66 -----

E131K III -1E-1 -----

E131K III -1E-2 -----

E131K III -1E-3 -----

E131K III -2-59 -----

E131K III -2-63 -----

E131K III -2E-5 -----

11Y1 III -1-2 -----

11Y1 III -1-3 -----

11Y1 III -1-4 -----

11Y1 III -1-8 -----

E130 III -1E-1 ----- G -----

E130 III -2E-1 -----

CVd-III B ----- A ----- T -----

CVd-III A CTTACAGCTCGCCGCTAGTCGAGCGGACAACCTGAGTGAGTAGCCCCAACCCCTAATCTGTTT 240

E131K III -1-55 -----

E131K III -1-66 -----

E131K III -1E-1 -----

E131K III -1E-2 -----

E131K III -1E-3 -----

E131K III -2-59 -----

E131K III -2-63 -----

E131K III -2E-5 ----- A -----

11Y1 III -1-2 -----

11Y1 III -1-3 -----

11Y1 III -1-4 -----

11Y1 III -1-8 -----

E130 III -1E-1 -----

E130 III -2E-1 -----

CVd-III B ----- DD ----- D ----- TT ----- T -----

CVd-III A TTATCTAGGCTAGAAGGGGATGGGGCTCCAGGGTAAACACGATTGGTGTTCCTCC 240

E131K III -1-55 ----- T -----

E131K III -1-66 -----

E131K III -1E-1 -----

E131K III -1E-2 ----- C -----

E131K III -1E-3 -----

E131K III -2-59 -----

E131K III -2-63 ----- C -----

E131K III -2E-5 -----

11Y1 III -1-2 -----

11Y1 III -1-3 -----

11Y1 III -1-4 ----- C -----

11Y1 III -1-8 -----

E130 III -1E-1 -----

E130 III -2E-1 -----

CVd-III B -----

図 4-10. カンキツ試料 (E131K、11Y1、E130) の各 CVd-III cDNA クローンの塩基配列。整理させた塩基配列の上下には、既報の CVd-IIIa と CVd-IIIb (Semancik *et al.* 1994) の配列を挿入した。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様にして示した。

CVd-IIIa と同一であることがわかった。プライマー組 CVIII-1P と CVIII-1M によるエトログシトロン 11Y1 の抽出核酸からの増幅断片の 4 クローンの塩基配列の解析から決定された部分配列は、CVd-IIIa と同一であった。CVd-III に対する特異プライマー 2 組によるエトログシトロン E130 の抽出核酸からの増幅断片のクローン一つずつの塩基配列を解析したところ、決定できた配列については 1 塩基の置換を除いて CVd-IIIa と同一であった。

#### 4.1.3.2. コーンケープガム様症状を呈するカンキツ (cv.日向夏) の CVd-III (CVd-IIIc)

カンキツ cv.日向夏のコーンケープガム症状の病原因子が、ウイロイドであるのかどうか調べるために、罹病株 (D1 と D4) と健全株 (H) からの抽出核酸をポリアクリルアミドゲル電気泳動及びハイブリダイゼーションにより解析したところ、日向夏 3 検体全てから 2 種類のウイロイド様 RNA が検出され、電気泳動における移動度の小さいバンドは、HSVd のプローブに反応し、CVd-II であることがわかった (佐野、未発表データ)。CVd-II より移動度の大きいバンドは、CVd-III または CVd-IV であることが予測された。しかも、そのバンドの移動度は、3 株間で若干違いがあることがわかった (佐野、未発表データ)。そこで、上記のウイロイド様 RNA の同定を目的に実験を行った。

佐野の用いた方法より解像度が高いと思われる sPAGE により上記の 3 株からの抽出核酸を解析した (図 4-11、sPAGE)。その結果、レーン M のサイズマーカーに用いた HSVd-cit とほぼ同じ位置に 3 株の抽出核酸からともにバンドが検出された。そして、そのバンドより移動度の大きいバンドが 3 株ともに検出され、それらのバンドは、それぞれに異なる移動度であり (図 4-11、下段の sPAGE 拡大図)、しかも罹病の日向夏 D4 株からは、少なくとも 3 本のバンドが検出された。1 番上のバンドは、健全株 H から検出されたバンドとほぼ同じ移動度を示し、3 番目のバンドは、罹病株 D1 から検出されたバンドとほぼ同じ移動度を示したが、バンドシグナルは、他の二つのバンドに比べて非常に弱く、果樹中で、低濃度で存在していることが考えられた。2 番目のバンドは、他の 2 株のバンドとは、違う移動度を示し、そのシグナルは、最も強かった。

これらのウイロイド様 RNA のバンドが、CVd-III であるのかどうか確かめるために、DIG 標識 cRNA プローブによるノーザンハイブリダイゼーションを試みた。プローブは、4.1.3.1 でクローニングした CVd-IIIa のクローンから調製した。その結果、HSVd-cit よりも大きい移動度を示したバンドは、全て CVd-III のプローブに反応した (図 4-11、Northern of CVd-III)。従って、上記のウイロイド様 RNA は CVd-III の変異株であり、電気泳動におけ

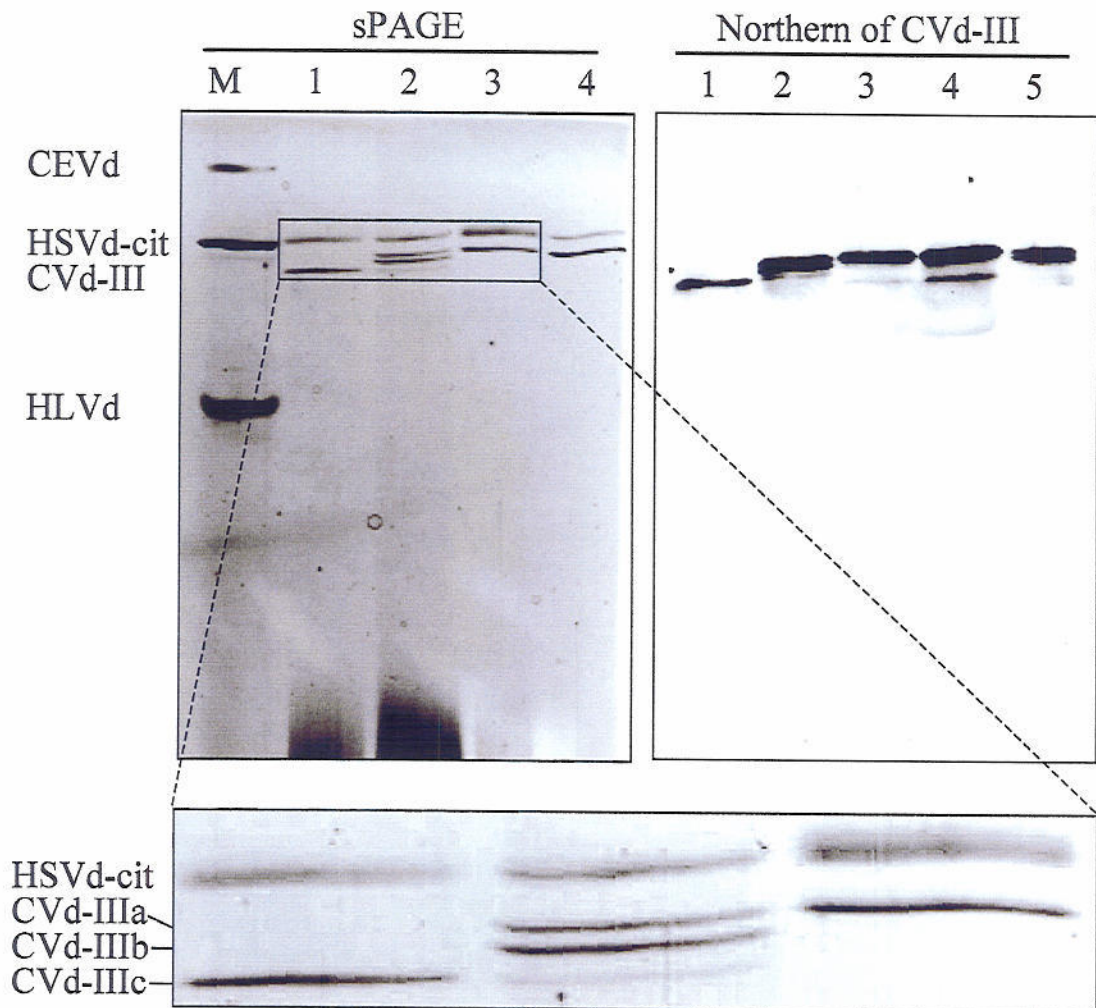


図4-11. コーンケーブガム症状を呈するカンキツ cv.日向夏(D1、レーン1; D4、レーン2)と無病徴のカンキツcv.日向夏(H、レーン3)からの抽出核酸の連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動像(sPAGE)とそのゲルをナイロン膜上に転写しDIG標識CVd-IIIのcRNAプローブにより行ったノーザンハイブリダイゼーションの発光による検出像(Northern of CVd-III)。レーンMは、対照であり、CEVd-HとHSVd-cit、HLVdを含む核酸を泳動した。レーン4には、カンキツ試料E120-8(HSVdとCVd-IIIに感染)からの抽出核酸を泳動した。レーン5は、カンキツ試料E83AK(CVd-IとHSVd、CVd-IIIa、CVd-IIIbに感染)からの抽出核酸を泳動し、転写後にハイブリダイゼーションを行った。



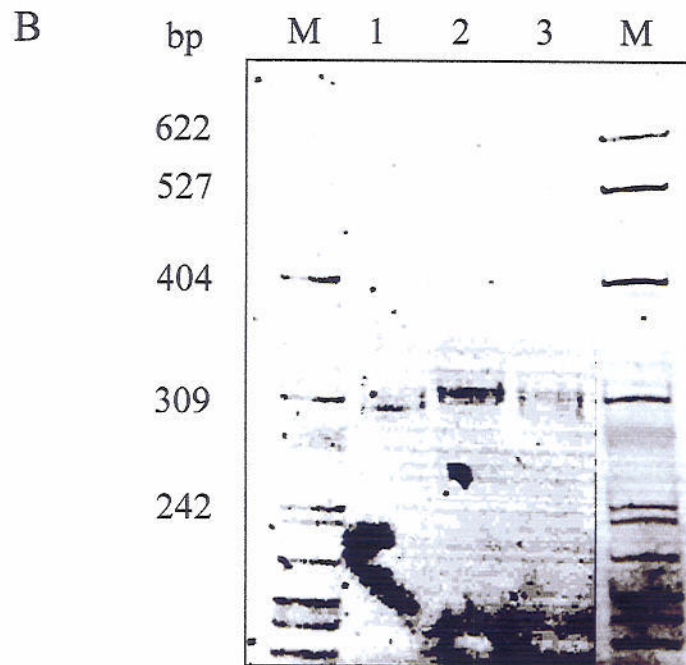
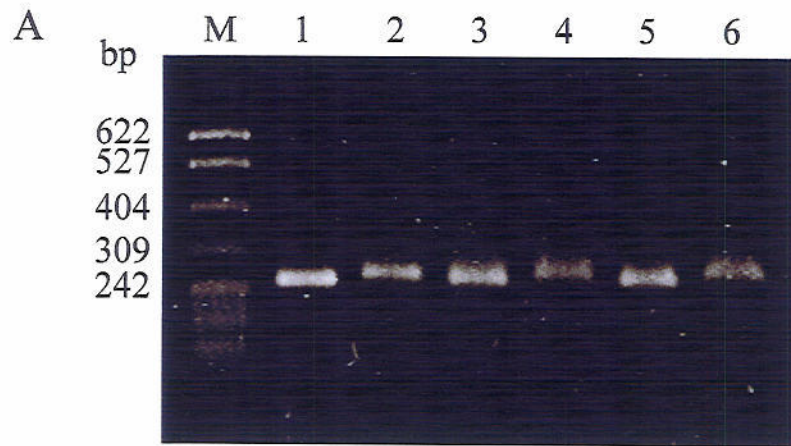


図4-12. コーンケープガム症状を呈する (Aのレーン1と2及びBのレーン1、D1; Aのレーン3と4及びBのレーン2、D4)、または、無病徴 (Aのレーン5と6及びBのレーン3、H) のカンキツ cv.日向夏から抽出された核酸試料に対するCVd-III特異プライマー組 (CVIII-1PとCVIII-1M、Aのレーン1、3、5; CVIII-2PとCVIII-2M、Aのレーン2、4、6; CVIII-3PとCVIII-3M、B) によるRT-PCR産物の2%アガロースゲル電気泳動像 (エチジウムブロマイド染色、A) と7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動像 (銀染色、B)。レーンMは、DNAサイズマーカー、pBR322/*HapII*

る移動度の差から少なくとも3種類の塩基配列変異株からなることが考えられた。レーン5は、CVd-IIIaとCVd-IIIbの両CVd-III変異株が検出されたエトログシトロンE83AKからの抽出核酸を泳動しハイブリダイゼーションした。近接した2本のバンドに分かれ、上からCVd-IIIaとCVd-IIIbのバンドと思われた。この2本のバンドと日向夏のCVd-IIIを比較するとH株のバンドとD4株の一番上のバンドは、CVd-IIIaと同じ移動度を示し、D4株の2番目のバンドは、CVd-IIIbと同じ移動度を示した。D4株の一番下のバンドとD1株のバンドは、Duran-Viraら(1988)により報告されている変異株CVd-IIIcまたはCVd-IIIdであることが考えられた。

次に日向夏3株から検出されたCVd-IIIの塩基配列を解析した。初めに、CVd-IIIの部分配列を増幅するプライマー組、CVIII-1PとCVIII-1M、CVIII-2PとCVIII-2MによりRT-PCRを行ったところ、3株ともに予想される位置にバンドが検出された(図4-12、A)。これらのバンドをクローニングして塩基配列を解析したところ、日向夏D4株のCVd-IIIのcDNAクローンの塩基配列は、クローン間で多くの変異がみられた。おそらくD4株のCVd-III RNAの部分配列のcDNAクローンは、sPAGEにおいて検出された3本のバンドのCVd-IIIを由来とするものが含まれていると思われ、それぞれのCVd-III塩基配列変異株の塩基配列を決定できなかった。そこで、全長cDNAを増幅するためのプライマー組を部分配列の塩基配列において変異の認められなかった部分に設計した(CVIII-3PとCVIII-3M、表3-2を参照)。このプライマー組によりRT-PCRを行った結果、アガロースゲル電気泳動において3株からの抽出核酸から同じ位置にCVd-IIIの全長cDNAと思われる増幅断片が検出された。さらにこれらの産物を7.5%ポリアクリルアミドで電気泳動したところ、それぞれの移動度に若干の差がみられた。D1株のCVd-IIIからの増幅cDNAは、他の2株のそれより若干移動度が大きく、D4株の増幅cDNAは、少しぼやけたバンドになった(図4-12、B)。sPAGEの結果と同様に、それぞれの全長cDNAの塩基数が若干違うことが予想された。

それぞれのcDNAをクローニングし、H株のCVd-III(CVd-III-H)のcDNAクローンを二つとD4株のCVd-III(CVd-III-D4)のcDNAクローンを17個、D1株のCVd-III(CVd-III-D1)のcDNAクローンを五つについて塩基配列を解析した。CVd-III-HのcDNAクローンの塩基配列を比較するとクローニング過程における人工的な変異を除くとクローン間で、塩基配列は完全に一致し(図4-13)、その塩基配列は297塩基からなり既報のCVd-IIIaと非常に相同性が高く、138から139番目の塩基ACがGUに置換しているだけ

であった (図 4-20)。

CVd-III-D4 の 17 個の cDNA クローンの塩基配列を決定したところ、全長の塩基数の違いから 4 種類に分けられた。それらの中で、8 クローンは 297 塩基で (図 4-14)、5 クローンは 294 塩基 (図 4-15)、4 クローンは 293 塩基 (図 4-16)、1 クローンは 290 塩基 (図 4-17) の長さで、それぞれの CVd-III-D4 変異株を CVd-III-D40、CVd-III-D41、CVd-III-D42、CVd-III-D43 とした。CVd-III-D40 は、クローニングにおける人工的と思われる変異を除くと CVd-IIIa と同一であった (図 4-14、図 4-20)。CVd-III-D41 の 5 クローンを比較して (図 4-15) 塩基配列を決定し、CVd-III-H の塩基配列と比較したところ (図 4-21)、2 次構造上の T2 領域にクローンの一部だけにみられる 3 種類の変異 (137-138 番目の AC → GU と同じカ所が AC → GC で 137 番目の A → U の置換を伴った変異、AC のまま) がみられた。それぞれをさらに CVd-III-D411、CVd-III-D412、CVd-III-D413 と名付けた。CVd-III-D411 は既報の CVd-IIIb と同一であった。CVd-III-D42 の 4 つの全長 cDNA クローンの塩基配列を比較することにより塩基配列を決定したところ (図 4-16)、一部のクローンにのみみられる変異が CVd-III-D41 と同様に T2 領域にみられ、さらに二つの塩基配列変異株に分けられた。両変異株ともに CVd-III-D41 の配列に非常に相同性が高く、違うのは T1 領域の 5-6 番目の GG の欠損と 288 番目の U の挿入のみであった (図 4-22)。CVd-III-D43 は、全長 cDNA クローン一つと部分配列のクローン三つにより塩基配列を決定した (図 4-17)。CVd-III-H と塩基配列を比較すると P と V 領域に変異が多くみられた (図 4-23)。

CVd-III-D1 は、部分配列の 6 クローンと全長の 5 クローンにより塩基配列を決定した (図 4-18)。245-246 番目のところに一部のクローンにおいて違いがみられ、さらに三つの塩基配列変異株に分かれた (CVd-III-D11 と CVd-III-D-12、CVd-III-D13、図 4-23)。ともに 290 塩基からなり CVd-III-D11 は、D4 株の CVd-III-D43 と同一であった。最近、CVd-IIIc と考えられるウイロイドの塩基配列が報告されている (Semancik *et al.* 1997)。塩基配列を比較したところ、非常に相同性が高く、違いは T1 領域の GG の欠損と U の挿入がみられず、T2 領域において AC → GU の置換があることだけであった。CVd-IIIc の塩基数は、291 塩基であり、CVd-III-D43 及び CVd-III-D1 よりも 1 塩基長かった。

クローン名	10	20	30	40	50
HV311	GGAGGAAACT	CCGTGTGGTT	CCTGTGGGGC	ACACCCCTT	GCCGAAAATA
HV313	-----	-----	-----	-----	-----
HV315	-----	-----	-----	-----	-----
HV323	-----	-----	-----	-----	-----
HV321	-----	-----	-----	-----	-----
HV331	-----	-----	-----	-----	-----A-----
HV332	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100
HV311	AAATGCAGAG	AGGGGAAAGG	GAACCTACCT	GTCGTCGTCG	ACGAAGGCAG
HV313	-----	-----	-----	-----	-----
HV315	-----	-----	-----	-----	-----
HV323	-----	-----	-----	-----	-----
HV321	-----	-----	-----	-----	-----
HV331	-----	-----	-----	-----	-----
HV332	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150
HV311	CTAAGTTGGT	GAAGCCGAGT	GGAGTAAAGA	CGGAGAACCT	CCGCTAGTCG
HV313	-----	-----	-----	-----	-----
HV315	-----	-----	-----	-----	-----
HV323	-----	-----	-----	-----	-----
HV321	-----	-----	-----	-----A-----	-----
HV331	-----	-----	-----	-----G-----	-----
HV332	-----	-----	-----	-----	-----
	160	170	180	190	200
HV311	GAAAGACTCC	GCATCCTCCG	GCTGACCCTC	CTTCAGCTCG	CCGCTAGTCG
HV313	-----	-----	-----	-----	-----
HV315	-----	-----	-----	-----	-----
HV323	-----	-----	-----	-----	-----
HV321	-----	-----	-----	-----	-----
HV331	-----	-----	-----	-----	-----
HV332	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250
HV311	AGCGGACAAC	TGAGTGAGTA	GCCCCAACCC	TAATCTGTTT	TTATCTAGGC
HV313	-----	-----	-----	-----	-----
HV315	-----	-----	-----	-----	-----
HV323	-----	-----	-----	-----	-----
HV321	-----	-----	-----	-----	-----
HV331	-----	-----	-----	-----	-----
HV332	-----	-----	-----	-----	-----
	260	270	280	290	300
HV311	TAGAAGGGGA	TTGGGCCTCC	AGGGTAAAAC	ACGATTGGTG	TTTCCCC.297
HV313	-----	-----	-----	-----	-----
HV315	-----	-----	-----	-----	-----
HV323	-----	-----	-----	-----	-----
HV321	-----	-----	-----	-----	-----
HV331	-----A-----	-----	-----	-----	-----
HV332	-----	-----	-----	-----	-----

図 4-13. コーンケイブガム症状を呈さないカンキツ cv.日向夏 (H株) に感染している CVd-III の各 cDNA クローンの塩基配列。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様にして示した。

クローン名	10	20	30	40	50
D4V3311	GGAGGAAACT	CCGTGTGGTT	CCTGTGGGGC	ACACCCCCTT	GCCGAAAATA
D4V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3314	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3315	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3316	-----	-----	-----	-----	-----
D4V333	-----	-----	-----	-----	-----
D4V336	-----	-----	-----	-----	-----
D4V339	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100
D4V3311	AAATGCAGAG	AGGGGAAAGG	GAACTTACCT	GTCGTCGTCG	ACGAAGGCAG
D4V3312	-----	-----	---	---	---
D4V3314	-----	-----	---	---	---
D4V3315	-----	-----	---	---	---
D4V3316	-----	-----	---	---	---
D4V333	-----	-----	---	---	---
D4V336	-----	-----	---	---	---
D4V339	-----	-----	---	---	---
	110	120	130	140	150
D4V3311	CTAAGTTGGT	GAAGCCGAGT	GGAGTAAAGA	CGGAGAGTCT	CCGCTAGTCG
D4V3312	---	---C---	---	---	---
D4V3314	---	---	---	---	---
D4V3315	---	---	---	---	---
D4V3316	---	---	---	---	---
D4V333	---	---	---	-----C-	---
D4V336	---	---	-----T-	---	---
D4V339	---	---	---	---	---
	160	170	180	190	200
D4V3311	GAAAGACTCC	GCATCCTCCG	GCTGACCCTC	CTTCAGCTCG	CCGCTAGTCG
D4V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3314	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3315	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3316	-----	-----	-----	-----	-----
D4V333	-----	-----	-----	-----	-----
D4V336	-----	-----	-----	-----	-----
D4V339	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250
D4V3311	AGCGGACAAC	TGAGTGAGTA	GCCCCAACCC	TAATCTGTTT	TTATCTAGGC
D4V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3314	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3315	-----	-----	-----	-----	-----C-----
D4V3316	-----	-----	-----	-----	-----
D4V333	-----	-----	-----	-----	-----
D4V336	-----	-----	-----	-----	-----
D4V339	-----	-----	-----	-----	-----
	260	270	280	290	300
D4V3311	TAGAAGGGGA	TTGGGCCTCC	AGGGTAAAAC	ACGATTGGTG	TTTCCCC.297
D4V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3314	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3315	---T---	-----	-----	-----	-----
D4V3316	-----	-----	-----	-----	-----
D4V333	-----	-----	-----	-----	-----
D4V336	-----	-----	-----	-----	-----
D4V339	-----	-----	-----	-----	-----

図 4-14. コーンケイブガム症状を呈するカンキツ cv.日向夏 (D4株) に感染している CVd-III-D40 の各 cDNA クローンの塩基配列。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様にして示した。

クローン名	10	20	30	40	50	
D4V331	GGAGGAAACT	CCGTGTGGTT	CCTGTGGGGC	ACACCCCCTT	GCCGAAAATA	50
D4V334	-----	-----	-----	-----	-----	50
D4V3317	-----	-----	-----	-----	-----	50
D4V3318	-----	-----	-----	-----	-----	50
D4V3320	-----	-----	-----	-----	-----	50
	60	70	80	90	100	
D4V331	AAACGCAGAG	AGGGAAAGGG	AAACTTACCT	GTCGTCGTCG	ACGAAGGCAG	100
D4V334	-----	-----	---	---	---	100
D4V3317	-----	-----	---	---	---	100
D4V3318	-----	-----	---	---	---	100
D4V3320	-----	-----	---	---	---	100
	110	120	130	140	150	
D4V331	CTAAGTTGGT	GACGCCGAGT	GGAGTAAAGA	CGGAGAGTCT	CCGCTAGTCG	150
D4V334	---	-----	-----	GC	-----	150
D4V3317	---	-----	T	AC	-----	150
D4V3318	---	-----	---	GC	-----	150
D4V3320	---	-----	---	GC	-----	150
	160	170	180	190	200	
D4V331	GAAAGACTCC	GCATCCTCCG	GCAGACCCTT	CTAGCTCCCG	CTAGTCGAGC	200
D4V334	-----	A	-----	-----	-----	200
D4V3317	-----	-----	-----	-----	-----	200
D4V3318	-----	-----	-----	G	-----	200
D4V3320	-----	-----	-----	-----	-----	200
	210	220	230	240	250	
D4V331	GGACAACCTGA	GTGAGTTGTC	CCAATCCTAA	TCTGTTTTTA	TCTAGGCTAG	250
D4V334	-----	-----	-----	-----	-----	250
D4V3317	-----	-----	-----	-----	-----	250
D4V3318	-----	-----	-----	-----	-----	250
D4V3320	-----	-----	-----	-----	-----	250
	260	270	280	290	300	
D4V331	AAGGGGATTG	GGCCTCCAGG	GTAAAACACG	ATTGGTGTTT	CCCC.294	
D4V334	-----	-----	-----	-----	-----	
D4V3317	-----	-----	C	-----	-----	
D4V3318	-----	-----	-----	-----	-----	
D4V3320	-----	-----	-----	-----	-----	

図4-15. コーンケイブガム症状を呈するカンキツ cv. 日向夏 (D4株) に感染しているCVd-III-D41の各cDNAクローンの塩基配列。クローン間の塩基配列の比較は、図4-5と同様にして示した。

クローン名	10	20	30	40	50
D4V311	GGAAAACCTCC	GTGTGGTTCC	TGTGGGGCAC	ACCCCTTGC	CGAAAATAAA
D4V312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V337	-----	-----	-----G-----	-----	-----
D4V338	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3319	-----	-----	-----	-----	-----
D4V332	-----	-----	-----	-----	-----
D4V322	-----	-----	-----	-----	-----
D4V323	-----	-----	-----	-----	-----
D4V324	-----	-----	-----	-----	-----
D4V325	-----	-----	-----	-----	-----
D4V321	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100
D4V311	ACGCAGAGAG	GGAAAGGGAA	ACTTACCTGT	CGTCGTCGAC	GAAGGCAGCT
D4V312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V337	-----	-----	-----	-----	-----
D4V338	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3319	-----	-----	-----	-----	-----
D4V332	-----	-----	-----	-----	-----
D4V322	-----	-----	-----	-----	-----
D4V323	-----	-----	-----C-----	-----	-----
D4V324	-----	-----	-----	-----	-----
D4V325	-----	-----	-----	-----	-----
D4V321	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150
D4V311	AAGTTGGTGA	CGCCGAGTGG	AGTAAAGACG	GAGAGTCTCC	GCTAGTCGGA
D4V312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V337	-----	-----	-----	-----	-----
D4V338	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3319	-----	-----	-----	-----	-----
D4V332	-----	-----	-----G-----T-----	-----AC-----	-----
D4V322	-----	-----	-----	-----	-----
D4V323	-----	-----	-----T-----	-----AC-----	-----
D4V324	-----	-----	-----	-----	-----
D4V325	-----	-----	-----	-----	-----
D4V321	-----	-----	-----	-----	-----
	160	170	180	190	200
D4V311	AAGACTCCGC	ATCCTCCGGC	AGACCCTTCT	AGCTCCCGCT	AGTCGAGCGG
D4V312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V337	-----	-----	-----	-----	-----
D4V338	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3319	-----	-----	-----	-----	-----
D4V332	-----	-----	-----	-----	-----
D4V322	-----	-----	-----	-----	-----
D4V323	-----	-----	-----	-----	-----
D4V324	-----	-----	-----	-----A-----	-----
D4V325	-----	-----	-----	-----	-----
D4V321	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250
D4V311	ACAACTGAGT	GAGTTGTCCC	AATCCTAATC	TGTTTTTATC	TAGGCTAGAA
D4V312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V337	-----	-----	-----	-----	-----G-----
D4V338	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3319	-----	-----	-----	-----	-----
D4V332	-----	-----	-----	-----	-----
D4V322	-----	-----	-----	-----	-----
D4V323	-----	-----	-----	-----	-----
D4V324	-----	-----	-----	-----	-----
D4V325	-----	-----	-----	-----	-----T-----
D4V321	-----	-----	-----	-----	-----
	260	270	280	290	300
D4V311	GGGGATTGGG	CCTCCAGGGT	AAAACACGAT	TGGTGTTC	CCC.293
D4V312	-----	-----	-----	-----	-----
D4V337	-----	-----	-----	-----	-----
D4V338	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3319	-----	-----	-----	-----	-----
D4V332	-----	-----	-----	-----	-----
D4V322	-----	-----	-----	-----	-----
D4V323	-----	-----	-----	-----	-----
D4V324	-----	-----	-----	-----	-----
D4V325	-----	-----	-----	-----	-----
D4V321	-----	-----	-----	-----	-----

図 4-16. コーンケイブガム症状を呈するカンキツ cv.日向夏 (D4株) に感染している CVd-III-D42 の各 cDNA クローンの塩基配列。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様にして示した。

クローン名	10	20	30	40	50
	GGAAAACTCC	GTGTGGTTCC	TGTGGGGCAC	ACCCCCTTGC	CGAAAATAAA
D4V313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V315	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V326	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100
	ACGCAGAGAG	GGAAAGGGAA	CTTACCTGTC	GTCGTCGACG	AAGGCAGCTA
D4V313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V315	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V326	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150
	AGTTGGTGAC	GCCGAGTGGA	GTAAAGACGG	AGAACCTCCG	CTAGTCGGAA
D4V313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V315	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V326	-----	-----	-----	-----	-----
	160	170	180	190	200
	AGACTCCGCT	TCCTCCGGCA	GACCCGCTAG	CTCGCCGCTA	GTCGAGCGGA
D4V313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V315	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V326	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250
	CCACGGGAAG	TAGCCCTACT	CCTAATCTGT	TTTTATCTAG	GCTAGAAGGG
D4V313	-----	-----	-----	-----	-----
D4V315	-----	-----	-----	-----	-----
D4V3313	-----	-----	-----	-----A-----	-----
D4V326	-----	-----	-----	-----	-----
	260	270	280	290	300
	GATTGGGCCT	CCAGGGTAAA	ACACGATTGG	TGTTTTCCCC..290	
D4V313	-----	-----	-----	-----	
D4V315	-----	-----	-----	-----	
D4V3313	-----	-----	-----	-----	
D4V326	-----	-----T-----	-----	-----	

図 4-17. コーンケイブガム症状を呈するカンキツ cv.日向夏 (D4株) に感染している CVd-III-D43 の各 cDNA クローンの塩基配列。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様にして示した。

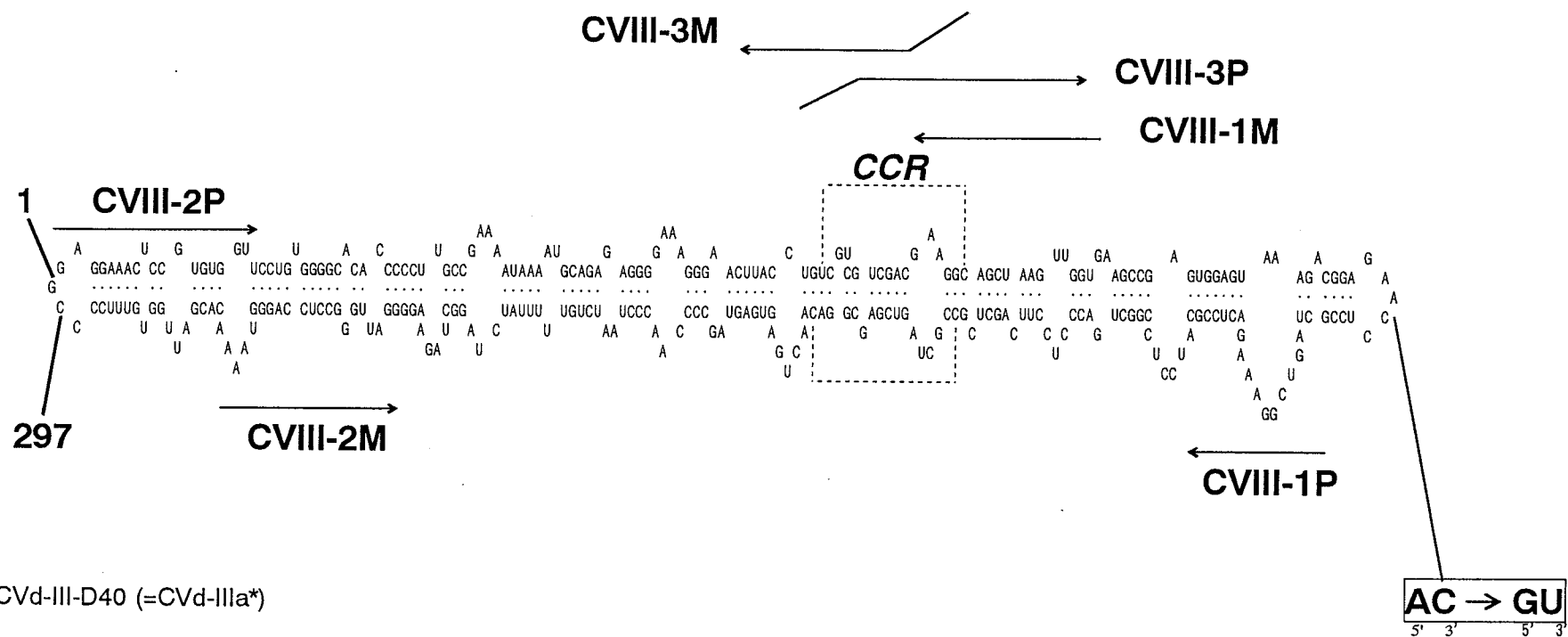


クローン名	10	20	30	40	50
D1V312	GGAAAACTCC	GTGTGGTTCC	TGTGGGGCAC	ACCCCTTGC	CGAAAAATAA
D1V313	-----	-----	-----	-----	-----
D1V315	-----	-----	-----	-----	-----
D1V322	-----	-----	-----	-----	-----
D1V325	-----	-----	-----	-----	-----
D1V321	-----	-----	-----	-----	-----
D1V331	-----	-----	-----	-----	-----
D1V332	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3311	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3313	-----	-----	-----	-----	-----
	60	70	80	90	100
D1V312	ACGCAGAGAG	GGAAAGGGAA	CTTACCTGTC	GTCGTCGACG	AAGGCAGCTA
D1V313	-----	-----	-----	-----	-----
D1V315	-----	-----	-----	-----	-----
D1V322	-----	-----	-----	-----	-----
D1V325	-----	-----	-----	-----	-----
D1V321	-----	-----	-----	-----	-----
D1V331	-----	-----	-----	-----	-----
D1V332	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3311	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3313	-----	-----	-----	-----	-----
	110	120	130	140	150
D1V312	AGTTGGTGAC	GCCGAGTGGA	GTAAGACGG	AGAACCTCCG	CTAGTCGGAA
D1V313	-----	-----	-----	-----	-----
D1V315	-----	-----	-----	-----	-----
D1V322	-----	-----	-----	-----	-----
D1V325	-----	-----	-----	-----	-----
D1V321	-----	-----	-----	-----	-----
D1V331	-----	-----	-----	-----	-----
D1V332	-----	-----	-----	-----GT-----	-----
D1V3311	-----C-----	-----	-----	-----	-----
D1V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3313	-----	-----	-----	-----	-----
	160	170	180	190	200
D1V312	AGACTCCGCT	TCCTCCGGCA	GACCCGCTAG	CTCGCCGCTA	GTCGAGCGGA
D1V313	-----	-----	-----	-----	-----
D1V315	-----	-----	-----	-----	-----
D1V322	-----	-----	-----	-----	-----
D1V325	-----	-----	-----	-----	-----
D1V321	-----	-----	-----	-----	-----
D1V331	-----	-----	-----	-----	-----
D1V332	-----A-----	-----	-----	-----	-----
D1V3311	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3313	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250
D1V312	CCACGGGAAG	TAGCCCTACT	CCTAATCTGT	TTTTATCTAG	GCTAGAAAGGG
D1V313	-----	-----	-----	-----	-----T-----
D1V315	-----	-----	-----	-----	-----T-----
D1V322	-----	-----A-----	-----	-----	-----AA-----
D1V325	-----	-----	-----	-----	-----T-----
D1V321	-----	-----	-----	-----	-----AA-----
D1V331	-----	-----	-----	-----	-----AA-----
D1V332	-----	-----	-----	-----	-----AA-----
D1V3311	-----	-----	-----	-----	-----AA-----
D1V3312	-----	-----	-----	-----	-----AA-----
D1V3313	-----	-----	-----	-----	-----T-----
	260	270	280	290	300
D1V312	GATTGGGCCT	CCAGGGTAAA	ACACGATTGG	TGTTTTCCCC	..290 300
D1V313	-----	-----	-----	-----	-----
D1V315	-----	-----	-----A-C-----	-----	-----
D1V322	-----	-----	-----	-----	-----
D1V325	-----	-----	-----	-----	-----
D1V321	-----	-----	-----	-----	-----
D1V331	-----	-----	-----	-----	-----
D1V332	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3311	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3312	-----	-----	-----	-----	-----
D1V3313	-----	-----	-----G-----	-----	-----

図 4-18. コーンケイブガム症状を呈するカンキツ cv.日向夏 (D1株) に感染している CVd-III の各 cDNA クローンの塩基配列。クローン間の塩基配列の比較は、図 4-5 と同様にして示した。

クローン名	10	20	30	40	50
CVIIIH	GGAGGAAACTCCGTGTGGTTCCCTGTGGGGCACACCCCCTTGCCGAAAATA				
CVIIID40	GGAGGAAACTCCGTGTGGTTCCCTGTGGGGCACACCCCCTTGCCGAAAATA				
CVIIID41	GGAGGAAACTCCGTGTGGTTCCCTGTGGGGCACACCCCCTTGCCGAAAATA				
CVIIID42	GGA·AAACTCCGTGTGGTTCCCTGTGGGGCACACCCCCTTGCCGAAAATA				
CVIIID43	GGA·AAACTCCGTGTGGTTCCCTGTGGGGCACACCCCCTTGCCGAAAATA				
CVIIID1	GGA·AAACTCCGTGTGGTTCCCTGTGGGGCACACCCCCTTGCCGAAAATA				
	★★				
	60	70	80	90	100
CVIIIH	AAATGCAGAGAGGGGAAAGGGAA·CTTACCTGTCGTCGTCGACGAAGGCA				
CVIIID40	AAATGCAGAGAGGGGAAAGGGAA·CTTACCTGTCGTCGTCGACGAAGGCA				
CVIIID41	AAACGCAGAGAGGG·AAAGGAAACTTACCTGTCGTCGTCGACGAAGGCA				
CVIIID42	AAACGCAGAGAGGG·AAAGGAAACTTACCTGTCGTCGTCGACGAAGGCA				
CVIIID43	AAACGCAGAGAGGG·AAAGGAA·CTTACCTGTCGTCGTCGACGAAGGCA				
CVIIID1	AAACGCAGAGAGGG·AAAGGGAA·CTTACCTGTCGTCGTCGACGAAGGCA				
	★	★	+		
	110	120	130	140	150
CVIIIH	GCTAAGTTGGTGAAGCCGAGTGGAGTAAAGACGGAGAACCCTCCGCTAGTC				
CVIIID40	GCTAAGTTGGTGAAGCCGAGTGGAGTAAAGACGGAGAGTCTCCGCTAGTC				
CVIIID41	GCTAAGTTGGTGACGCCGAGTGGAGTAAhGACGGAGAhhCTCCGCTAGTC				
CVIIID42	GCTAAGTTGGTGACGCCGAGTGGAGTAAhGACGGAGAhhCTCCGCTAGTC				
CVIIID43	GCTAAGTTGGTGACGCCGAGTGGAGTAAAGACGGAGAACCCTCCGCTAGTC				
CVIIID1	GCTAAGTTGGTGACGCCGAGTGGAGTAAAGACGGAGAACCCTCCGCTAGTC				
	★		+	++	
	160	170	180	190	200
CVIIIH	GGAAAGACTCCGCATCCTCCGGCTGACCCTCCTCAGCTCGCCGCTAGTC				
CVIIID40	GGAAAGACTCCGCATCCTCCGGCTGACCCTCCTCAGCTCGCCGCTAGTC				
CVIIID41	GGAAAGACTCCGCATCCTCCGGCAGACCCTTCT·AGCTC·CCGCTAGTC				
CVIIID42	GGAAAGACTCCGCATCCTCCGGCAGACCCTTCT·AGCTC·CCGCTAGTC				
CVIIID43	GGAAAGACTCCGCTTCTCCTCCGGCAGACCCGC·T·AGCTCGCCGCTAGTC				
CVIIID1	GGAAAGACTCCGCTTCTCCTCCGGCAGACCCGC·T·AGCTCGCCGCTAGTC				
	★	★	★★★	★★	+
	210	220	230	240	250
CVIIIH	GAGCGGACAACTGAGTGA·GTAGCCCCAACCCCTAATCTGTTTTTATCTAG				
CVIIID40	GAGCGGACAACTGAGTGA·GTAGCCCCAACCCCTAATCTGTTTTTATCTAG				
CVIIID41	GAGCGGACAACTGAGTGA·GTTGTCCCAATCCTAATCTGTTTTTATCTAG				
CVIIID42	GAGCGGACAACTGAGTGA·GTTGTCCCAATCCTAATCTGTTTTTATCTAG				
CVIIID43	GAGCGGACCAC·G·G·GAAGTAGCCCTACTCCTAATCTGTTTTTATCTAG				
CVIIID1	GAGCGGACCAC·G·G·GAAGTAGCCCTACTCCTAATCTGTTTTTATCTAG				
	★	★★★★	++	★★★	
	260	270	280	290	300
CVIIIH	GCTAGAAGGGGATTGGGCCTCCAGGGTAAAACACGATTGGTGTTT·CCCC				297
CVIIID40	GCTAGAAGGGGATTGGGCCTCCAGGGTAAAACACGATTGGTGTTT·CCCC				297
CVIIID41	GCTAGAAGGGGATTGGGCCTCCAGGGTAAAACACGATTGGTGTTT·CCCC				294
CVIIID42	GCTAGAAGGGGATTGGGCCTCCAGGGTAAAACACGATTGGTGTTTCCCC				293
CVIIID43	GCTAGAAGGGGATTGGGCCTCCAGGGTAAAACACGATTGGTGTTTCCCC				290
CVIIID1	GCTARWAGGGGATTGGGCCTCCAGGGTAAAACACGATTGGTGTTTCCCC				290
	★★			★	

図4-19.カンキツ cv.日向夏に感染している CVd-III の各塩基配列変異株の比較。星印は、コーンケイブガム症状を呈さない株に感染していた CVd-III-H と比べて症状を呈する CVd-III-D1 において変異していた箇所。+ は、症状を呈する CVd-III-D4 においてみられたそれ以外の変異。



CVd-III-D40 (=CVd-IIIa\*)

図4-20.コーンケーブガム症状を呈さない(H, cv.日向夏)から検出された全長297塩基のCVd-III(CVd-III-H)の塩基配列と予想される2次構造。CVd-III-Hと比較して、コーンケーブガム症状を呈する日向夏の株(D4)から検出された全長297塩基のCVd-III(CVd-III-D40)で見られた塩基置換を囲い文字で示した。CVd-III-D40は、既報のCVd-IIIa(Rakowskik *et al.* 1994)と同じ塩基配列であった(\*)。CVd-IIIのcDNA増幅のためのRT-PCRに用いたプライマー(CVIII-1PとCVIII-1M、CVIII-2P、CVIII-2M、CVIII-3P、CVIII-3M)の2次構造上の位置を示した。CCRは、中央保存領域を示す。

CVd-III-D411(=CVd-IIIb)  
 CVd-III-D412  
 CVd-III-D413

1  
 294

CVd-III-D413  
 CVd-III-D412  
 CVd-III-D411(=CVd-IIIb\*)

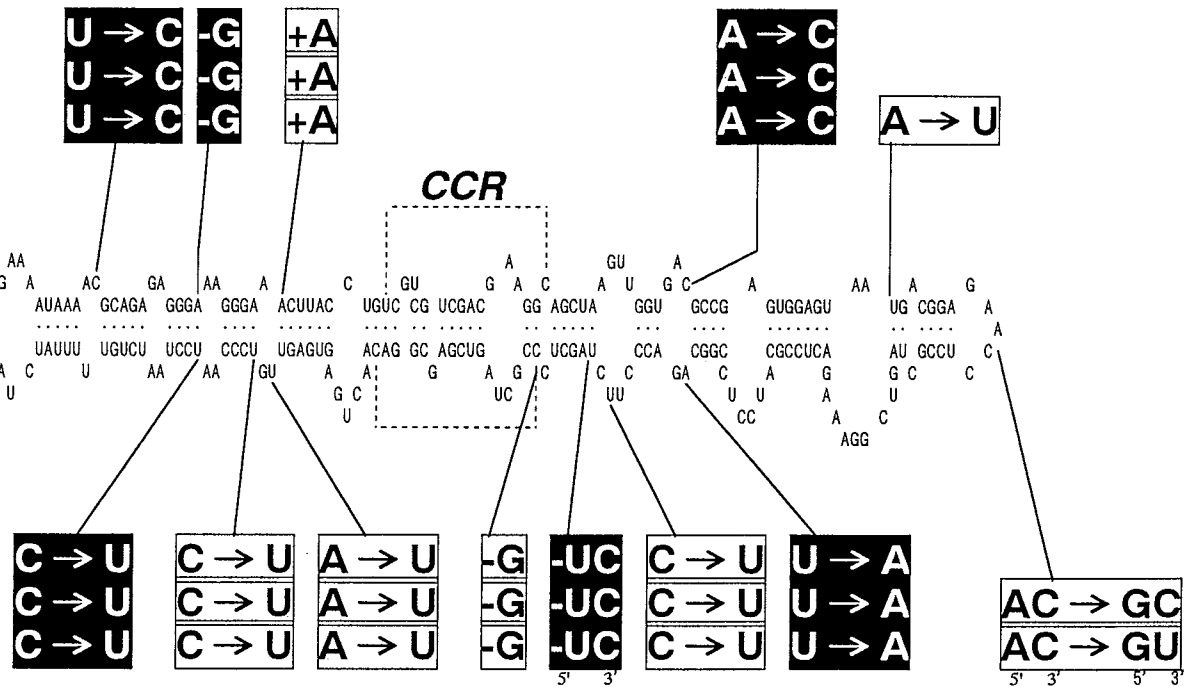


図4-21.コーンケーブガム症状を呈する日向夏の株 (D4) から検出された全長 294 塩基の CVd-III (CVd-III-D411 と CVd-III-D412、CVd-III-D413) の塩基配列と予想される 2次構造 (図の2次構造は、CVd-III-D413)。症状を呈さない日向夏 (H) 由来の CVd-III-H と比べ、変異のみられた部分を反転文字及び囲い文字で示した。同様に病徴を示す日向夏 (D1) から検出された CVd-III との間で、共通の変異を反転文字、それ以外を囲い文字で示した。CVd-III-D411 は、既報の CVd-IIIb (Rakowski *et al.* 1994) と同じ塩基配列であった (\*)。CCR は、中央保存領域を示す。

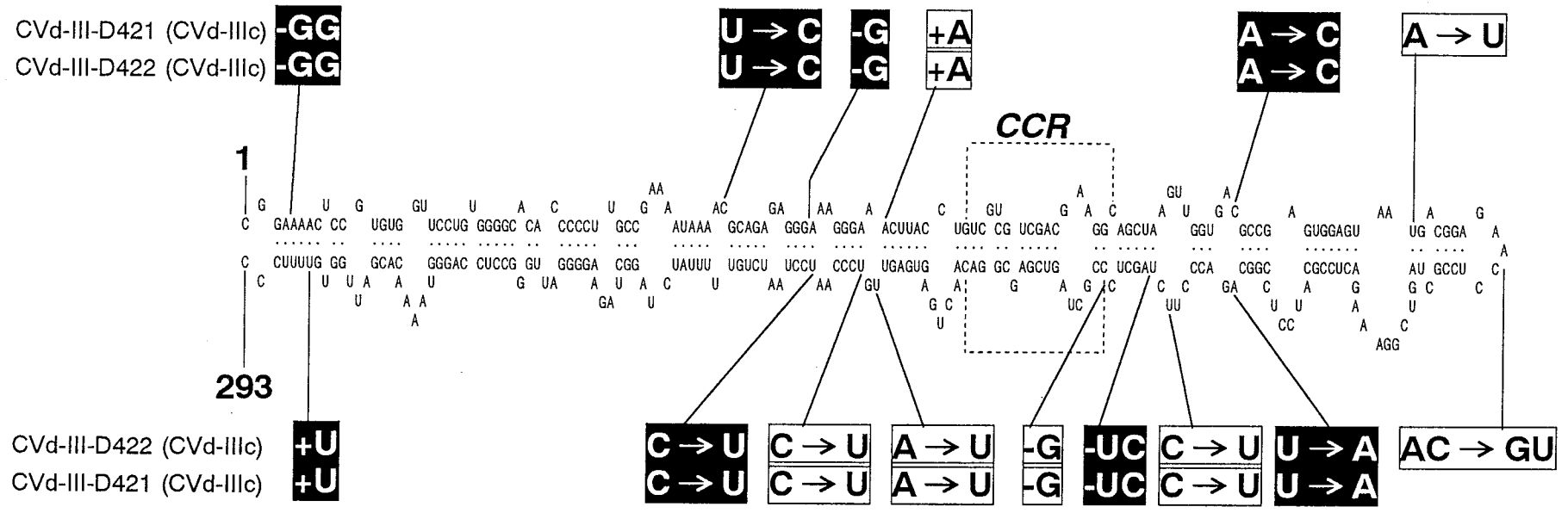


図4-22.コーンケープガム症状を呈する日向夏の株 (D4) から検出された全長 294 塩基の CVd-III (CVd-III-D421 と CVd-III-D422) の塩基配列と予想される2次構造 (図の2次構造は、CVd-III-D421)。症状を呈さない日向夏 (H) 由来のCVd-III-Hと比べ、変異のみられた部分を反転文字及び囲い文字で示した。同様に病徴を示す日向夏 (D1) から検出されたCVd-IIIとの間で、共通の変異を反転文字、それ以外を囲い文字で示した。CCR は、中央保存領域を示す。

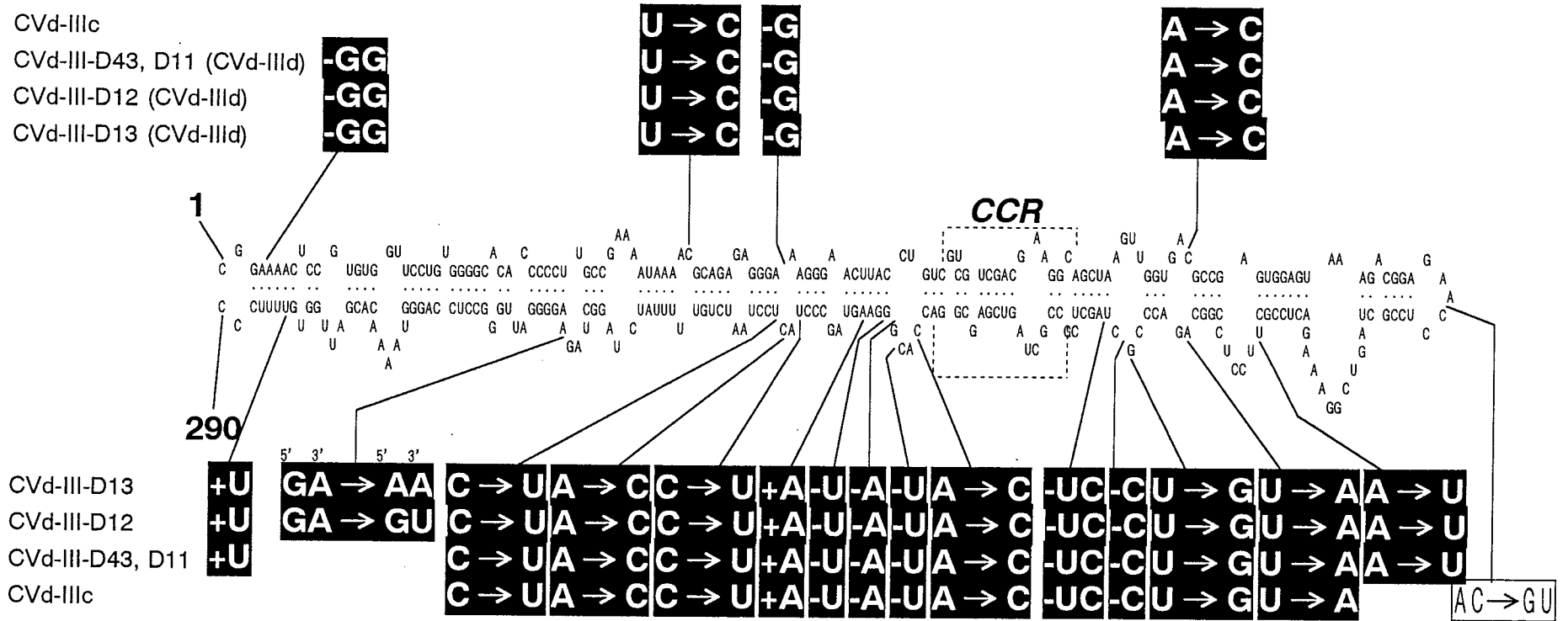


図4-23.コーンケープガム症状を呈する日向夏の株 (D4 と D1) から検出された全長 290 塩基の CVd-III (CVd-III-D43、D4 株由来; CVd-III-D11 と CVd-III-D12、CVd-III-D13) との塩基配列と予想される2次構造 (図の2次構造は、CVd-III-D43、D11)。症状を呈さない日向夏 (H) 由来のCVd-III-Hと比べ、変異のみられた部分を反転文字で示した。海外で報告されているCVd-IIIcとみなされている配列 (Semancik *et al.* 1997) も示した。このCVd-IIIcのみにみられた変異は、囲い文字で示した。CCR は、中央保存領域を示す。

#### 4.1.4. グループIV カンキツウイルス (CVd-IV)

CVd-IV は、RT-PCR により兵庫県産カンキツ cv.不知火 2 株から検出され、その塩基配列を決定した。既報の CVd-IV (Puchta *et al.* 1991) の塩基配列は、プライマー PCEV-1P と PCEV-1M (表 3-2) と完全に一致または相補していた。全長の塩基配列を決定するためにもう一組のプライマーを既報の配列に従って設計した (CVIV-1P と CVIV-1M、表 3-2)。塩飽らは、兵庫県産カンキツ 10 株からフェノールクロロホルム抽出と CF11 セルロース吸着、メトキシエタノール抽出、CTAB 沈殿により核酸を抽出してプライマー組 CVIV-1P と CVIV-1M により RT-PCR を行ったところ、カンキツ cv.不知火 Hy9N:S と Hy10S:S の抽出核酸から CVd-IV の cDNA の可能性のあるバンドが検出された (塩飽ら、未発表データ)。それらの抽出核酸を送付していただき、両プライマー組により RT-PCR を行ったところ、Hy9N:S においてプライマー組 CVIV-1P と CVIV-1M による RT-PCR 産物にのみ特異的と思われるバンドが検出された。しかし、そのシグナルは、非常に弱く RT-PCR が阻害されていることが考えられた。本研究で、カンキツからの抽出核酸からこの RT-PCR 阻害物質を取り除く方法を確立した (4.3.4 章)。その中の、HCl 処理後のエタノール沈殿による処理を送付された抽出核酸に施した。また、塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) を PCR 溶液に加えることにより、増幅の特異性を向上させることができた (4.3.7 章)。そこで、TMAC を加えて PCR を行ってみた。その結果、特異的と思われるバンドのシグナルが、両方の処理を行うことで著しく増強し、二組のプライマー組による RT-PCR において特異的と思われる増幅バンドが検出された (図 4-24)。カンキツ Hy10S:S においても同様の結果が得られた。

これらの増幅断片が CVd-IV の cDNA であることを確認するため、また、日本のカンキツに感染している CVd-IV の塩基配列を決定するためにクローニングと塩基配列の解析を行った。カンキツ Hy9N:S からの増幅断片の 9 クローンとカンキツ Hy10S:S の 6 クローンの塩基配列を解析して、それぞれの塩基配列を決定した (図 4-25、4-26)。その結果、カンキツ Hy9N:S と Hy10S:S からの増幅断片の塩基配列は、既報の CVd-IV の塩基配列と同一性が高く、日本のカンキツに CVd-IV が感染していることがわかった。その配列は、286 塩基からなり、既報の CVd-IV (Puchta *et al.* 1991; Önelge *et al.* 1996) より 1 または 2 塩基長かった (図 4-27)。

カンキツ Hy9N:S と Hy10S:S に感染している CVd-IV は、Puchta らが報告している CVd-IV と比べて、T2 領域に 3 カ所の変異が認められた。これらの変異は Önelge ら (1996)

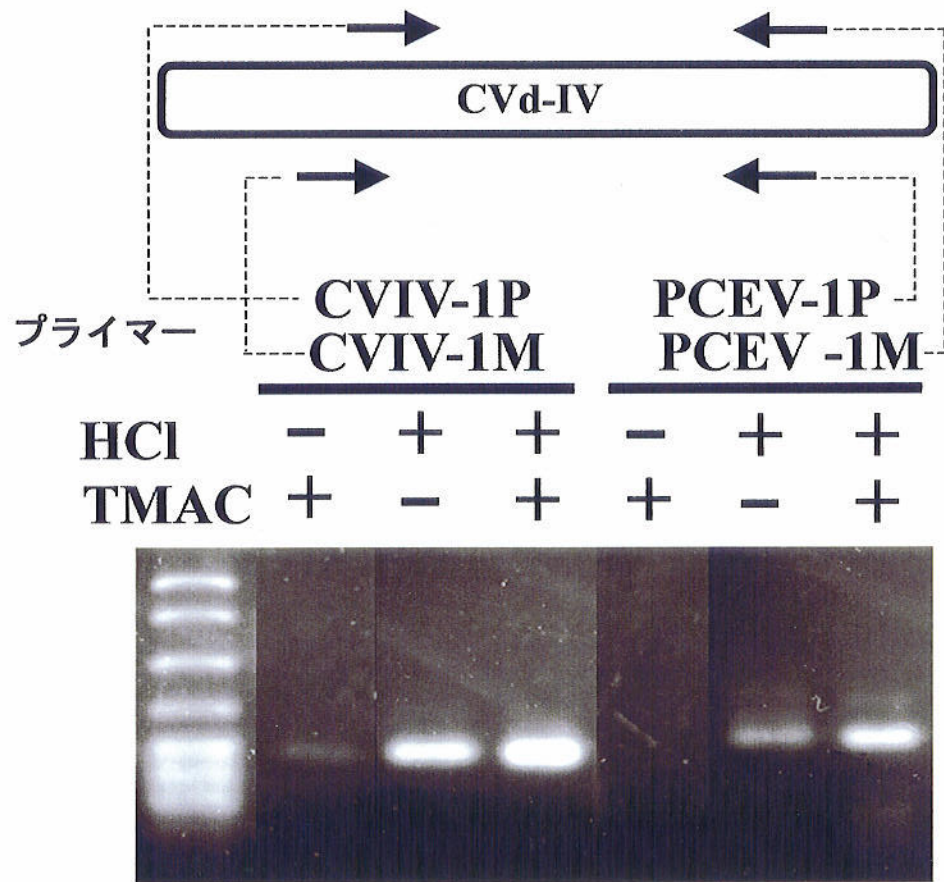


図4-24. CVd-IVの特異プライマー組 (CVIV-1PとCVIV-1M) とCEVdとCVd-IVに特異的なプライマー組 (PCEV-1PとPCEV-1M) を用いたRT-PCR産物の電気泳動像。兵庫県産カンキツcv.不知火 (Hy9N:S) から従来法により抽出された核酸 (HCl、-)、または、さらにHCl処理及びエタノール沈殿により精製した核酸 (HCl、+; 2.2.2.2.章を参照) を鋳型にRT-PCRを行った。PCRは、通常の方法 (TMAC、-) または、反応液にTMAC (終濃度30 mM) を加えて行った (TMAC、+; 2.3.3.章を参照)。



の報告した CVd-IV においてもみられた。カンキツ Hy10S:S の CVd-IV は、上記の変異の他に、35 番目の塩基が G → A に置換していた。用いたプライマー組の配列部分に変異はみられなかったことから、これらのプライマー組は、遺伝子診断のプライマーとして使用可能であると思われた。

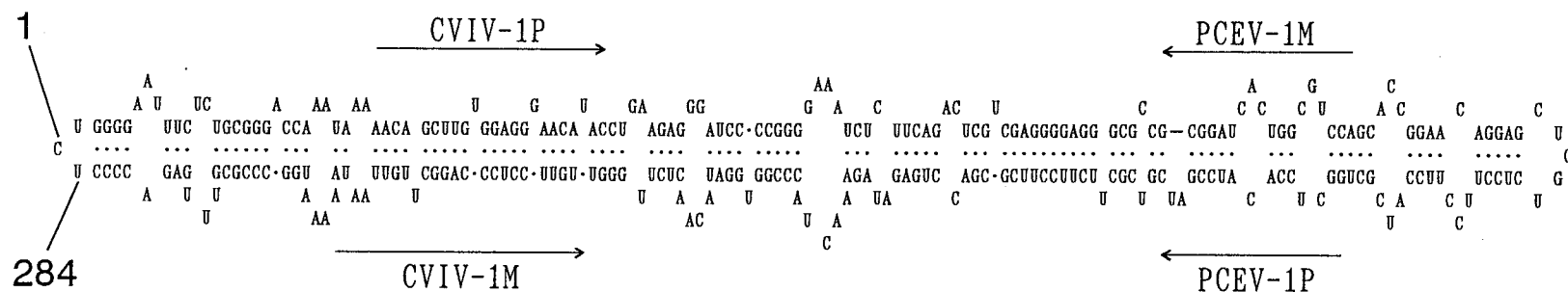
プライマー PCEV-1P と PCEV-1M により増幅した CVd-IV の cDNA クローンから DIG 標識 cRNA 転写してプローブとして用いて、カンキツ Hy9N:S からの抽出核酸に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った (図 4-28)。HSVd と CVd-III と思われるバンドより下に CVd-IV と思われるバンドが検出され (図 4-28、左の矢印 a)、そのバンドは CVd-IV の DIG 標識 cRNA プローブと特異的に反応した (図 4-28、右の矢印 a)。従って、日本のカンキツから CVd-IV の RNA を直接 sPAGE によって検出できた。

クローン名	CVIV-1P					
	10	20	30	40	50	
9IV11	CTGGGGAATT	TCTCTGCGGG	ACCAAATAAA	AACAGCTTGT	GGAGGGGAAC	
9IV12	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV13	-----	-----	-----	-----	-----G-----	
9IV15	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP1	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP3	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP4	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP6	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP7	-----	-----	-----	-----	-----	
		60	70	80	90	100
9IV11	ATACCTGAAG	AGGGATCCCC	GGGGAAATCT	CTTCAGACTC	GTCCGAGGGG	
9IV12	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV13	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV15	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP1	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP3	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP4	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP6	-----	-----	-----	-----G-----	-----+C-----	
9IVP7	-----	-----	-----	-----	-----	
		PCEV-1M				
		110	120	130	140	150
9IV11	AGGGCGCCG	CGGATCACTG	GCGTCCAGCA	CCGGAAACA	GGAGCTCGTC	
9IV12	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV13	-----	-----	-----	-----+A-----	-----A-----	
9IV15	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP1	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP3	G-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP4	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP6	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP7	-----	-----	-----	-----	-----	
		PCEV-1P				
		160	170	180	190	200
9IV11	TCCTTCCTTT	CCATCGCTGG	CTCCAGATCG	GATCGTCGCT	TCTTCCTTCG	
9IV12	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV13	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV15	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP1	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP3	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP4	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP6	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP7	-----	-----	-----	-----	-----	
		210	220	230	240	250
9IV11	CGACCTGAGA	TAGAAACTAC	CCGGTGGATA	CAACTCTTGG	GTGGTTGCTC	
9IV12	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV13	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV15	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP1	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP3	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP4	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP6	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP7	-----	-----	-----	-----	-----	
		CVIV-1M				
		260	270	280	290	286
9IV11	CCAGGCTTGT	TAATAAAAAAT	GGCCCGCGTT	TGAGACCCCT	..286	
9IV12	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV13	-----	-----	-----	-----	-----	
9IV15	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP1	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP3	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP4	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP6	-----	-----	-----	-----	-----	
9IVP7	-----	-----	-----	-----	-----	

図4-25. 兵庫県産カンキツ cv. 不知火 (Hy9N:S) から検出された CVd-IV の各 cDNA クローンの塩基配列。網掛けは、ウイルス cDNA 増幅に用いたプライマーの配列を示す。クローン間の塩基配列の比較は、図3-5と同様にして示した。



# CVd-IV (Puchta *et al.* 1991)



# CVd-IV (Hy9N:S, Hy10S:S)

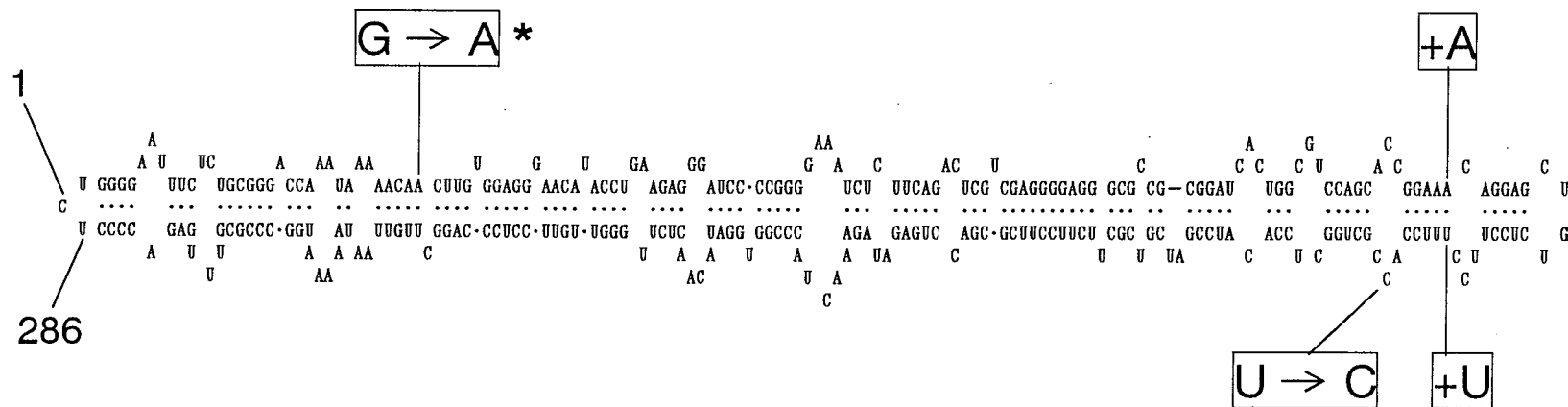


図4-27.日本のカンキツ (cv. 不知火、Hy9N:S とHy10S:S) から検出された CVd-IV の塩基配列の予測される 2 次構造 (下段)。2 次構造は、既報の CVd-IV の塩基配列の 2 次構造 (Puchta *et al.* 1991) を基本にした上段。また上段の 2 次構造上に RT-PCR に用いたプライマーの位置を示した。不知火 Hy10 だけにみられた塩基置換 (\*)。

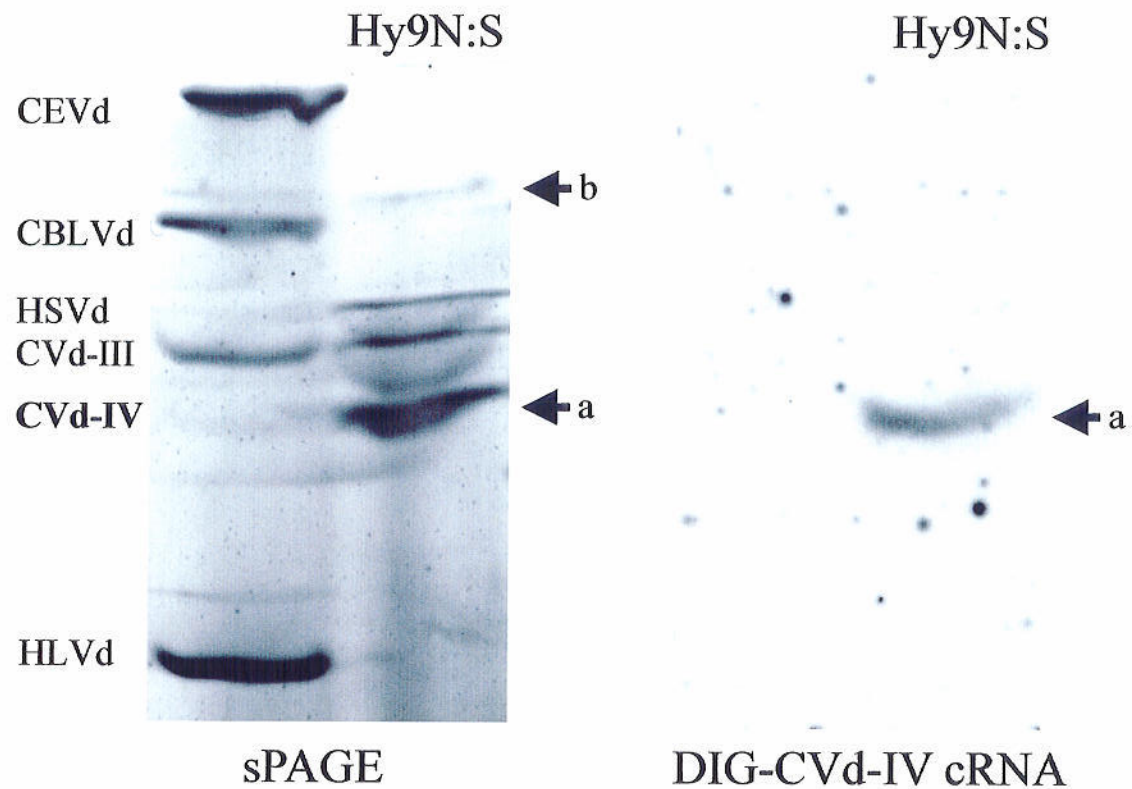


図4-28.兵庫県産カンキツ cv. 不知火母樹 (Hy9N:S) から抽出されたLMW RNAのsPAGEによる泳動像 (左、銀染色) とそのゲル中の核酸を転写したメンブレンに対してCVd-IVのDIG標識cRNAプローブを反応させたノーザンハイブリダイゼーション像 (右)。矢印aは、CVd-IVと思われるシグナルを示す。矢印bは、既知の5種のカンキツウイルスとは別の未知のウイルス様RNAのシグナルを示す。

#### 4.1.5. 考察

4.1.5.1. これまで海外で報告されている5種全てのカンキツウイロイドが検出され、さらに、5種のカンキツウイロイドと相同性の低いウイロイド様RNAが検出された。

カンキツウイロイドの遺伝子診断法を検討する上で、日本のカンキツに感染しているウイロイドの種類及びその塩基配列を解析しておく必要があると考えた。圃場カンキツを接いだとき何らかの病徴を示すエトログシトロンから、ウイロイドを含む核酸を抽出してカンキツウイロイドを探索した。その結果、これまで日本で報告のない CVd-I、CVd-III と CVd-IV が検出された。従って、日本には、海外で報告されている5種全てのカンキツウイロイドが存在した。しかし、日本のカンキツに感染しているウイロイドの中で、塩基配列が報告されているのは、CVd-II（本論文では、HSVd の塩基配列変異株の中でカンキツに感染しているウイロイドとして定義する）の塩基配列変異株である HSVd カンキツ変異株（HSVd-cit、Sano *et al.* 1988A）だけであった。本研究により、その他の4種のカンキツウイロイドについて塩基配列を決定した。

日本の CEVd (CEVd-Hgt) と CVd-IV の塩基配列は、既報の配列に非常に近く、よく保存されていた。日本のウイロイドでみられた変異の多くは、海外の別の変異株においてすでに報告されていた。また、静岡県興津より送付されたカンキツが保毒する CVd-III は、既報の CVd-IIIa または CVd-IIIb (Rakowski *et al.* 1994) と全く同一の塩基配列であった。コーンケープガム様症状を呈する日向夏の一つ (D4 株) の保毒する複数の CVd-III 塩基配列変異株の中に、CVd-IIIa 及び CVd-IIIb と全く同じ配列を示すものがあつた。さらに、Stasys ら (1995) により報告された CVd-IIIa は、CVd-IIIb と同一の塩基配列であつたことから、CVd-IIIb においては三つの地域、CVd-IIIa においては二つの地域のいくつかのカンキツにおいて同じ塩基配列の変異株が存在することが明らかとなった。最近、本実験とは別に伊藤ら (1997A) により日本のカンキツが保毒する CVd-III の塩基配列が報告されている。講演要旨であるため、塩基配列についてはわからないが、全長 291 と 294、295、297 塩基からなることが報告されている。これらの中の 297 塩基と 294 塩基の変異株は、CVd-IIIa と CVd-IIIb で、291 塩基の変異株は、コーンケープガム症の日向夏が保毒していた全長 290 塩基の CVd-III (CVd-III-D1 と CVd-III-D43) と非常に近い配列の可能性がある。

一方、塩基配列を決定した日本の CVd-I(Jp) と CVd-III-D1 及び CVd-III-D43 は、それぞれこれまで塩基配列の報告のなかつた CVd-Ia と CVd-IIIc または CVd-IIId と考えられた。

PAGE により検出して名付けた Duran-Vila ら (1988) は、それらの塩基配列を報告していないためはつきり確かめることができないが、CVd-I(Jp)は CBLVd (CVd-Ib) と比べて 10 塩基長いこと、CVd-III-D1 と D43 は CVd-IIIa と CVd-IIIb と比べて 7 塩基または 4 塩基短いことから sPAGE で分離可能と考えられるからである。実際、sPAGE における CVd-III-D1 のバンドは CVd-IIIa と CVd-IIIb のバンドより下に検出されることを確認した (図 4-11)。最近、CVd-Ia 及び CVd-IIIc とみなされる塩基配列が報告された (Semancik *et al.* 1997)。これらのウイロイドと CVd-I(Jp)と CVd-III-D1 及び CVd-III-D43 の塩基配列は、1-3 塩基の変異を除いて同一であることから、筆者の予想と一致した。そして、CVd-III-D1 と CVd-III-D43 が CVd-IIIc である可能性を完全に否定できないものの以下これらのウイロイドを CVd-IIIc として扱うことにする。本研究で、日本の CVd-II の塩基配列の解析は行わなかった。しかし、Sano ら (1988A) の報告した HSVd-cit は、CVd-IIa と 99%の相同性があることが報告され、その中で CVd-IIb (citrus cachexia viroid) は、299 塩基からなることが報告された。伊藤ら (1997A) の報告によると全長 296 と 301、302、303 塩基の CVd-II が日本のカンキツから検出されていることから、サブグループ CVd-IIa と CVd-IIc (296 塩基) が日本に存在していることが考えられた。以上のことから、海外で報告されているカンキツウイロイドの中で CEVd と CVd-Ia、CVd-IIa、CVd-IIc、CVd-IIIa、CVd-IIIb、CVd-IIIc、CVd-IV を日本のカンキツは保毒しており、CVd-Ib と CVd-IIb (citrus cachexia viroid)、CVd-IIIc については、これまでのところ見つかっていないと考えられた。

RT-PCR クローニングに用いたプライマーと決定された日本のカンキツウイロイドの塩基配列を比較すると、プライマー CBLV-1P と CVIII-2P を除いて完全に相同または相補であった。そして、完全な相補結合をとりえないプライマーとウイロイドの組み合わせにおいても (例えば CVd-Ia と CBLV-1P、図 4-7) RT-PCR において十分な cDNA の増幅がみられた。従って、これらのプライマーを使って、RT-PCR によるカンキツウイロイドの検出法を検討した (4.3 章)。

本研究を進める中で、海外で既報の 5 種のウイロイドとは相同性の低いと思われるウイロイド様 RNA が検出された。図 4-28 の矢印 (b) のバンドは、CVd-Ia と近い位置に検出されたことから CVd-I の変異株かと思われた。しかし、電気泳動したカンキツ Hy9N:S からの抽出核酸は、CVd-Ia のプローブには反応しなかった (図 4-33)。また、カンキツ 10SA1 からの抽出核酸を sPAGE で電気泳動したときにも、CVd-Ia と近い位置にバンドが検出されたが、その抽出核酸は、CVd-Ia のプローブと非常に弱くしか反応しなかった。これら

のウイロイド様 RNA は、電気泳動における移動度から約 330 塩基からなるものの、同様の分子量のカンキツウイロイドである CVd-I とは相同性が低いと考えられ、カンキツの保毒する新しいウイロイドの可能性もある。最近、伊藤ら (1997B) により日本のカンキツが保毒する 2 種の新しいウイロイドが報告されている。カンキツ Hy9N:S と 10SA1 の抽出核酸に含まれていた新しいウイロイド様 RNA は、CVd-Ia のプローブに対する反応性が若干違うことから、伊藤ら (1997B) の 2 種のウイロイドである可能性も考えられた。

#### 4.1.5.2.カンキツウイロイドは感染宿主中において複数の塩基配列変異株を含むヘテロな集団で存在し、その集団の構成は、感染植物種の影響を受けている。

筆者は CEVd-H の塩基配列の解析にあたり、カンキツからジヌラとトマトで増殖した CEVd-Hgt を用いた。ところが、Semancik ら (1993) により CEVd の一つのカンキツ分離株が、宿主を変えて継代することにより塩基配列が変化することが報告された。それより前に、カンキツ中の CEVd の集団は、複数の塩基配列変異株から構成されていることが報告されており (Visvader *et al.* 1985A)、宿主継代による塩基配列の変化は、複数変異株の中で最適なものが宿主毎に選抜されることにより集団の構成が変化しているためであることが示唆されている。本実験の過程においても同様なことが起こっているとすれば、カンキツ中の CEVd-H、つまり CEVd-Hc の塩基配列は、CEVd-Hgt と違う可能性が考えられた。そこで、堀崎 (1996) により決定された CEVd-Hc の塩基配列と比べたところ、7 カ所の変異がみられ、CEVd-Hc と CEVd-Hgt はそれぞれ Semancik ら (1993) の報告した CEVc (カンキツ型) と CEVg (ジヌラ型) 及び CEVt (トマト型) により相同な配列であった。最近、圃場の野菜、トマトとナス、ニンジン、カブから CEVd が検出されてその塩基配列が決定されている (Fagoaga & Duran-Vila, 1996)。それぞれの保毒する CEVd の塩基配列は少しずつ違っており宿主による影響が示唆されている。一方、Ashulin ら (1991) は、CBLVd の塩基配列を解析するにあたり、カンキツからアボガドで増殖させたウイロイドを用いた。その後、カンキツ樹が保毒する同じ CBLVd の塩基配列が解析され (Ben-Shaul *et al.* 1995)、いくつかの部位で変異が起こっていることが報告された。その中の 6 塩基の変異については、カンキツ中の CVd-I の塩基配列の他の報告 (Önelge, 1996; Semancik *et al.* 1997) においても共通で、さらに本実験の CVd-I においても共通に変異していた (図 4-7)。従って、最初に塩基配列の報告された CBLVd は、増殖に用いたアボガドの影響を受け選抜されてカンキツ中で少数であったのが多数になったものと考えられた。CVd-IV において最初の



塩基配列の解析は、草本の宿主である *Benincasa hispida* で増殖されたものが用いられた (Puchta *et al.* 1991)。本研究では2株のカンキツ中の CVd-IV の塩基配列を決定した結果、最初に報告された配列と比べて2カ所の挿入と1カ所の置換が共通にみられた。別にカンキツ中の CVd-IV の塩基配列は、Önelge (1996) により調べられ、本研究でみられた変異は共通に存在した。最初の報告の配列は、増殖宿主である *Benincasa hispida* の影響を受けて選抜されたもので、本研究で決定した配列がよりカンキツで多数を占めると思われる。以上より、宿主の違う CEVd-H の塩基配列の解析結果は、Semancik らの結果を裏付けることになり、CVd-I と CVd-IV の塩基配列の結果は、その仮説が多くのウイロイドで当てはまる可能性を示した。また、ウイロイドだけでなくウイルスにおいても、宿主中のその集団がいくつかのゲノム変異株から構成されていることが、リンゴとステムグルーピングウイルス (ASGV) との組み合わせで報告され (Magome *et al.* 1997)、筆者はリンゴとクロロティックリーフスポットウイルスの組み合わせで確かめている (中原ら、1998E)。また、宿主によりヘテロな ASGV ゲノム集団の一部の変異株が、草本のキノアで継代すると優先されることが報告されている (真籠ら、1998)。従って、ウイロイド・ウイルスの遺伝子診断の確立を目的としてそれらの塩基配列を解析する場合、検定宿主の保毒するそれらのゲノムを用いることが望まれる。

4.1.5.3. 重複感染樹においては、一つ一つの感染細胞では種類のウイロイドだけが多数を占めており、別々のウイロイドが単独で感染した細胞集団がキメラ状に分布していると思われた。

カンキツから複数のウイロイドが検出されており、それらを sPAGE で分離すると17に上ることがこれまでのところわかっている (伊藤、未発表データ)。これほど多くのウイロイドが感染する植物は他になく、しかも、表 3-1 で示したとおり、複数のウイロイドが重複感染している例が多くみられた。そして、他の木本植物、例えば、リンゴやブドウ、ナシなどでも、複数のウイロイドが重複感染しているものが見つかっている。一方、草本植物では、複数のウイロイドが重複感染している例はあまりない。

木本植物と草本植物の保毒するウイロイド間の干渉についてのこれまでの知見は以下のようにまとめられると思う。ウイルスの交差免疫では、一般に同一ウイルスの系統間で干渉がおこることが知られているが、ウイロイドでは異種間において交叉免疫のような現象がみられることが報告されている。Niblett ら (1978) は、PSTVd の強毒系統と中間系統、

CEVd、CSVd、chrysanthemum chlorotic mottle viroid (ChCMVd) をそれぞれ 1 次ウイルスまたは 2 次ウイルスに用いてトマトまたはキクにおいて交叉免疫の実験をしたところ、PSTVd の強毒と中間系統の間だけでなく、異種であり塩基配列の相同性の低い PSTVd と CEVd、CSVd との間で交叉免疫がみられたことを報告している。ただし、例外的に ChCMVd と他のウイロイドの間では、交叉免疫はみられなかったことを報告し、感染、増殖において生物学的に違った経路を利用している可能性を示唆している。最近、ChCMVd がクローニングされてその塩基配列が明らかになり、リボザイム活性をもつことから複製様式が他のグループと違うことが示唆されている ASBVd のグループに属することがわかった (Navarro & Flores, 1997)。ASBVd は葉緑体に (Bonfiglioli *et al.* 1994; Lima *et al.* 1994)、PSTVd グループのいくつかのウイロイドは核内に蓄積することがわかっている (Harders *et al.* 1989; Bonfiglioli *et al.* 1996)。これがグループ内の共通の特徴とすれば、ASBVd グループと PSTVd グループのウイロイドは、複製の場がそれぞれ葉緑体と核内というように違っていると考えられる。交叉免疫の機構には様々な仮説が立てられているが、ウイロイドの場合、1 次ウイロイドの感染により複製に用いる宿主因子の不足や競合により 2 次ウイロイドの複製が阻害されるためと仮定すると、ChCMVd と他の PSTVd グループのウイロイドの間で交叉免疫がみられなかった理由をうまく説明できると思われる。つまり、複製の場が違うためにそのような不足や競合がおこらないためということである。

上の実験では、交叉免疫の評価を感染植物の病徴で行っており、ウイロイドの増幅量を測定していないため上に示した仮説を確かめることはできない。その後、病徴に加えてウイロイドの増殖量を PAGE で評価した実験が行われた。トマトとジヌラに対して、CEVd と PSTVd を同時接種により感染させると、トマトにおいては PSTVd が、ジヌラにおいては CEVd しか検出されなかったこと。そして、CEVd が優性であったジヌラにおいて、交叉免疫の試験を 1 次ウイロイドとして PSTVd、2 次ウイロイドとして CEVd を用いて行った場合、交叉免疫はみられ、接種葉では 2 次ウイロイドである CEVd は、検出されないかその濃度は低く抑えられるものの一時的で、新葉においては CEVd のバンドしか電気泳動で検出できないことが報告された (Pallás & Flores, 1988)。つまり、これらの草本植物において違う種類のウイロイド間で複製段階の競合がみられ、重複感染では親和性の高いウイロイドが最終的に大多数をしめたことが考えられ、ウイロイドの別種間の交叉免疫の機構の仮説を裏付ける結果と思われる。さらに、細胞での感染や増幅におけるウイロイド間の競合を確かめる実験が行われている。PSTVd と HSVd の感染性の全長 cDNA タンデム

につなぎプラスミドベクターに挿入したクローンを作製しトマトに接種したところ、PSTVdだけがハイブリダイゼーションにより検出されたことが報告されている (Branch *et al.* 1989)。この場合、2種のウイロイドを同じ接種圧で一細胞に接種することになる。もし、複製における競合関係がなければ両ウイロイドが増幅し検出されることになるが、実際には、トマトの細胞に感染や増幅において適していた PSTVd が優性になり、HSVd の感染、増殖を阻害したことが考えられた。

しかし、もし上記の仮説が正しいとするとカンキツや他の木本に複数のウイロイドが重複感染している現象は、おかしいことになる。カンキツが保毒する5種類のウイロイドは全て PSTVd グループに属するウイロイドでありウイロイド間で増幅の競合が考えられ、やがて増幅効率の高い一つのウイロイドだけが多数を占めるはずだからである。また、重複感染は、異種のウイロイド間だけでみられるわけではなく、CVd-I や CVd-II、CVd-III においてはそれぞれの複数の変異株 (例えば、CVd-IIIa と CVd-IIIb、CVd-IIIc) が sPAGE により一つの樹の抽出核酸から検出されている。また、一つのカンキツ樹から CEVd の cDNA をクローニングして塩基配列を解析したところ、11 の塩基配列変異株が検出されている (Visvader & Symons, 1985A)。実際に、交叉免疫の実験が行われ、CEVd と他のカンキツウイロイドの間ではみられないことが報告されている (Semancik *et al.* 1992; Garnsey *et al.* 1993)。ただしその中で、同じウイロイドの変異株間である CVd-IIa と CVd-IIb において、不完全な交叉免疫が報告されている (Semancik *et al.* 1992)。このように前述の草本における交叉免疫実験とカンキツにおけるカンキツウイロイドによる実験の結果が違ったのは、植物に木本であるカンキツを用いたからなのか、それとも試験に用いたウイロイドの種類が違うからなのであろうか。それは、草本であるジヌラにおいて、CEVd の強毒系統と弱毒系統との間で交叉免疫が観察されることから (Duran-Villa & Semancik, 1990)、植物がカンキツであるからで、カンキツでは異種のウイロイド間だけでなく同種の塩基配列変異株間でも干渉効果の様子が草本と違ってくることが考えられる。草本とカンキツにおけるウイロイド間の干渉効果が違ったのは、これらの植物の間でウイロイドの感染や増殖、病原性発現において生物学的に違った経路があるのだろうか。筆者は、この理由について以下のような作業仮説を考えた。

カンキツと草本植物の間でそのような経路に大きな違いがあるわけではなく、カンキツにおいても細胞レベルでは、草本植物で得られた結果と同様の干渉効果があるのではないかと考えた。つまり、個々の細胞では、あるウイロイドの一つの系統が多数を占めており、

それぞれ別のウイロイドまたはその系統が多数を占める細胞がモザイク状に分布しているために個体全体としては、複数のウイロイドが重複感染しているという結果になった。そして、個体全体として最終的に親和性の高いあるウイロイドが多数を占めない理由は、以下のように考えた。カンキツのウイロイド濃度は、他の草本に感染するウイロイドに比べ1/10-1/100であった(表 4-2)。これは、細胞レベルで蓄積量が低いわけではなく、感染している細胞数が他の草本に比べ低いためではないか。そのために、それぞれのウイロイドが新たな細胞に移行して感染、増殖する上で、ウイロイド間の競合が生じにくいのではないかということである。実際に、PSTVd 感染トマトにおける *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析により、PSTVd が検出されるのは全細胞の 20%程度であることが報告されており (Harders *et al.* 1989)、カンキツではさらに低い割合 (0.2%程度) の細胞しかウイロイドが蓄積していない可能性が考えられる。カンキツウイロイドの検出、交叉免疫に関する過去の報告は、その評価を多数の細胞を含む植物組織、または植物個体全体について行ったためにこのような違いが見られたと考えた。

この作業仮説の可能性を示す結果が本研究より得られている。カンキツ VF-8 は、カンキツ (不知火) 9K:S の先端の芽を接ぐことによりウイロイドのフリー化を試みた個体である。このカンキツ VF-8 は、CVd-I を保毒しており (表 3-1)、ウイロイドのフリー化には失敗した。しかし、親株である 9K:S は CVd-I と CVd-II、CVd-III を保毒していたことから、この 3 種のウイロイドの中で CVd-I だけが接木した芽に残って感染していたことになる。他のフリー化を試みた個体の親株が保毒していたウイロイドは確かめられないものの、フリー化できなかった個体は全て、CVd-I だけを保毒していた (表 3-1、カンキツ VF-10、VF-14 と VF-16)。以上のことから、それぞれのカンキツウイロイドは、別々の細胞に単独感染の状態が存在する可能性が考えられ、しかも、CVd-I の芽部への移行、感染は、他のカンキツウイロイドよりも早いことが考えられた。

そして、この作業仮説を証明するための実験を考えた。植物としてリンゴ、ウイロイドにはリンゴさび果ウイロイド (ASSVd) とリンゴゆず果ウイロイド (AFCVd)、peach latent mosaic viroid (PLMVd、最近、ナシに感染していることが海外で報告され、おそらく、リンゴにも感染すると思われる) を用いる場合と仮定する。ASSVd と AFCVd はともに PSTVd グループのサブグループの一つ ASSVd グループに属する。一方、PLMVd は ASBVd グループのウイロイドであるため、他の二つのウイロイドと複製の場が異なることが考えられる。

1. ASSVd と AFCVd の単独感染及び重複感染した個体の組織について 2 色を用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (two FISH) によりそれぞれのウイルスを同時に別の色調で検出する。この実験により、植物個体全体として重複感染しているリンゴにおいて、それぞれの細胞で重複感染しているのか、それとも、単独のウイルスが感染した細胞がモザイク状に分布しているのか調べられる。また、全細胞の何割程度が、ウイルスに感染しているのかを調べることができる。

2. 3 種ウイルスそれぞれの感染性 cDNA を組み込んだ T-DNA ベクターによりリンゴを形質転換する。こうすることにより、通常の感染と違い全細胞にウイルスを感染させることができると思われる。育成した再生個体に対し、別のウイルスを接木により接種する。通常の感染個体に別のウイルスを接木接種した場合、重複感染するが、この場合、新たなウイルスが移行感染するとき、形質転換により全細胞に感染しているウイルスとの間での競合が起こり、先に多数が蓄積していると思われる形質転換による感染ウイルスが優性となり接種したウイルスは、感染増殖を阻害されるのではないと思われる。ただし、この結果は、同じグループに属する ASSVd と AFCVd との間でみられ、複製の場が違う PLMVd とそれらの 2 種のウイルスの間では、そのような干渉効果はみられず重複感染するということになるはずである。

3. 2 種のウイルスの感染性 cDNA をタンデムに繋いだ DNA 断片を挿入したプラスミドクローンを作製し、そのまま、または、RNA に転写してリンゴに機械接種、または、アグロインフェクションにより接種する。これは、Branch ら (1989) の実験と同様である。ASSVd と AFCVd を用いた場合では、それら 2 種のウイルスの感染や増殖における親和性を比較できると思われる。ASSVd グループの 2 種を用いた場合と ASBVd グループの PLMVd と ASSVd または AFCVd を用いた場合で、複製の場が違えば、違った結果が得られるかもしれない。

これらの実験を通して上に示した作業仮説が正しいと証明された場合、果樹産業においてどんな実用性があるだろうか。例えば、カンキツ栽培品種の多くに対するカンキツウイルスの病原性ははっきりしていないが、果実に対する影響はほとんど報告されていない。そして、カラタチ台に接いだ場合、いくつかのカンキツウイルスの感染により矮化することが報告されカンキツ栽培における矮化因子としての利用が考えられている (例えば、Semancik *et al.* 1997)。通常の感染ではなく、形質転換により感染させた場合、全細胞が感染するわけであるから矮化の程度も上昇するかもしれない。同時に、干渉効果により

CEVd や CCaVd といった病原性の知られるウイロイドに対する抵抗性を付与することができる可能性があると思われる。

#### 4.1.5.4. カンキツ *cv.* 日向夏のコーンケープガム症状の病原因子は、CVd-III の一部の塩基配列変異株 (CVd-IIIb と/または CVd-IIIc ?) である可能性が考えられた。

日向夏にコーンケープガム症状をおこす病原体として、ウイロイド、特に CVd-III である可能性について検討した。本症状をおこすのは、ウイルスやバクテリア、糸状菌などウイロイド以外の病原体である可能性について否定できないが、以下の考察は、その可能性がない場合として話を進める。

佐野は、コーンケープガム症状を示す二株と無症状の一株の日向夏から、ともに2種のウイロイド様 RNA を検出し、それらの内の一つは CVd-II であることを突き止めた (未発表データ)。もう一つのバンドについては、本研究によりともに CVd-III であることをノーザンハイブリダイゼーションにより突き止めた (図 4-11)。症状を呈する株だけでなく無症状の株からもこの両ウイロイドは検出されたわけであるから、一般的には、それらのウイロイドが病原体である可能性は否定されることになる。しかし、カンキツの cachexia 病の病原体は、CVd-II の中の一つの変異株、CVd-IIb であることが示されている (Semancik *et al.* 1988)。後に CVd-IIb (citrus cachexia viroid) の塩基配列が決定され、cachexia 病をおこさない CVd-II の変異株 CVd-IIa と比べ、2 塩基の欠損と 3 塩基の置換しかないことが示されている (Levy & Hadidi, 1993)。従って、CVd-II または CVd-III の中的一部分の変異株が、コーンケープガム症の病原体である可能性が考えられた。実際に、sPAGE において三つの日向夏が保毒する CVd-II のバンドの移動度は同じであったが、無症状株の CVd-III とは違う位置に症状を示す株の保毒する CVd-III のバンドが検出された (図 4-11、下段)。従って、この位置の違う CVd-III 変異株が病原体であるのかもしれない。無症状株の CVd-III は、CVd-IIIa と同じ位置に単一のバンドが検出されたことから、それ以外の CVd-IIIb と CVd-IIIc が病原体の候補として考えられた。そして、症状を示す二株ともに検出され、その内の一株 D1 株においては単一バンドとして検出された CVd-IIIc が、より有力な候補として考えられた。

それぞれの CVd-III 変異株の塩基配列を決定したところ、既報の CVd-IIIa と非常に相同性の高い無症状株の保毒する CVd-III (CVd-III-H) と比べると、CVd-IIIc (結果における CVd-III-D1 と CVd-III-D43) は病原性に関与することが示唆されている P や V 領域に多く

の変異がみられたことから (図 4-23)、CVd-III-H と CVd-IIIc は病原性に違いがある可能性が考えられた。また、海外において、Semancik ら (1997) は、(CVd-III-D1 や CVd-III-D43 と相同性が高い) CVd-IIIc として報告したウイロイドは、他の CVd-III の塩基配列変異株と病原性が違うことを報告している。これは、CVd-IIIc がコーンケープガム症の病原体である可能性を支持する結果と思われた。

しかし、症状を示した株の一方の D4 株における CVd-IIIc のバンドのシグナルは他の二つのバンドより弱かった。全長の増幅 cDNA をクローニングして 17 個の大腸菌コロニーのプラスミドクローンの塩基配列を決定したところ、CVd-IIIc のクローンは一つであった。これが、元の CVd-III 集団の構成を反映しているとするれば、CVd-IIIc は全体の 1/17 程度ということになる。D4 株におけるコーンケープガム症状は、CVd-IIIc よりも集団の中で多数を占める CVd-IIIa や CVd-IIIb の位置に検出された変異株が関与しているのかもしれない。その可能性を考慮して決定された D4 株の保毒する CVd-III の塩基配列を CVd-III-H と比較すると、CVd-III-D40 は、既報の CVd-IIIa と同一の塩基配列であり、CVd-III-H との間でみられた変異は CVd-IIIc にはみられない変異であることから、これがコーンケープガム症に関与している可能性は低いと思われた (図 4-19、4-20)。CVd-III-D41 は、CVd-IIIb と同一または非常に相同性の高い変異株であるが、CVd-III-H と比較して変異している箇所の中で (図 4-21)、反転文字で示した 6 カ所 7 塩基の変異は、CVd-IIIc と共通で、P と V 領域にみられた。CVd-III-D42 は、やはり CVd-IIIb と非常に相同性が高く、sPAGE 上で CVd-IIIb と同じ位置に検出されたと思われる。この変異株は、上記の 6 カ所 7 塩基の変異に加えて T1 領域に 2 カ所 3 塩基の CVd-IIIc と共通の変異がみられた。もし、これら CVd-IIIb の位置に PAGE により検出された変異株が D4 株ではコーンケープガム症の病原体であった場合、上記の CVd-IIIc と共通の変異 (反転文字) が、ウイロイド分子上のその病原性に関与している箇所ということになる。

今後、CVd-III の変異株 (CVd-IIIc や CVd-IIIb) がコーンケープガム症状の病原体であることを証明するために、それぞれの変異株を単独で戻し接種して症状が再現することを確認していく必要がある。しかし、それぞれの変異株の単離は、従来の手法、例えば単病斑分離などでは難しいと思われる。なぜなら、CVd-III に感受性の局部感染する草本植物は見つかっていないからである。それぞれの変異株の全長 cDNA クローンから感染性を示す多量体 cDNA クローンを作製する必要があると思われる。

## 4.2.sPAGE とハイブリダイゼーションによるカンキツウイルスの検出

通常、ウイルスをゲル電気泳動法または、遺伝子診断により検出する場合、ティッシュプロットハイブリダイゼーションなどを除き、検定植物から核酸を抽出する必要がある。しかし、植物や組織の種類の違いにより、診断に要求される量または（及び）高純度の核酸を抽出することが難しい場合があることが知られている。カンキツにおいても、5-10 g の少量の葉から核酸抽出を行うと、しばしば十分量の核酸が抽出されないことがあった。本実験は、従来の核酸抽出法を改良し、検定カンキツ試料から安定して、ウイルス診断に適する核酸を抽出する方法を確立することを目的に行った。

### 4.2.1.核酸抽出法の改良

エトログシトロンアリゾナ 861-S-1 (*Citrus medica* L.)10 個体と対照としてトマトの葉から、従来法により (Sano *et al.* 1989) 低分子 RNA の抽出を試みたところ、同じ環境で育成されているにもかかわらず、3 個体からは、低分子 RNA を抽出できなかった(表 4-1、VF-1 と VF-2、VF-10)。それら 3 個体からの核酸抽出においては、最初のエタノール沈殿において多量のゲル状の沈殿を生じ、続く CTAB 沈殿において核酸が回収されなかった。それらの 3 個体から再度核酸抽出を試みたが、やはり抽出できなかった。問題は、カンキツ中に比較的多くの多糖類やフェノール化合物が含まれているのではないかと考えた。つまり、2-メトキシエタノール抽出の過程で、核酸が多量に含まれる多糖類とともに除かれてしまった。エトログシトロンの中で、含まれる多糖類等の夾雑物の量に差があり、核酸を抽出できなかった個体では、特にその量が多かったのかもしれない。そして、そのような個体から核酸を抽出するためには、抽出方法を改良することが必要と思われた。最近、イチゴやガーデングラニウム、ブドウなどの多糖類やフェノール化合物を多く含む植物からの核酸抽出において、それらの夾雑物を取り除くために、2-ブトキシエタノールを用いた分画沈殿が有効なことが報告されている (Manning 1991、Schultz *et al.* 1994、Staub *et al.* 1995)。そこで、従来法における 2-メトキシエタノール抽出及び CTAB 沈殿の過程を 2-ブトキシエタノールによる分画沈殿法と置き換えた方法により、核酸抽出を試みた。その結果、検定葉 1 g 当たり 64.1-321 mg の低分子 RNA が抽出された (表 4-1)。従来法



と比較して、それぞれの個体からより多くの低分子 RNA が抽出された。

表 4-1.二つの方法でそれぞれの植物組織から抽出した低分子 RNA 量の比較

試料名	低分子 RNAs (mg/g tissue)	
	従来法 (2-ME/CTAB)	改良法 (2-BE)
VF-1	0	209
VF-2	0	72.8
VF-8	74.1	129
VF-9	49.8	69.5
VF-10	0	64.1
VF-13	43.2	76.0
VF-14	32.4	321
VF-16	59.1	262
E180	80.0	149
E130	48.1	81.0
Hassaku	55.1	119
Tomato	96.9	136

次に従来法と改良法で抽出された低分子 RNA の純度を、それぞれの核酸試料の 230 及び 260、280 nm の吸光値を測定して比較した(表 4-2)。抽出核酸試料の 260 nm と 230 nm の吸光値の比 (260/230) が、低分子 RNA と共存している多糖類とフェノール化合物を、そして、260 nm と 280 nm の吸光値の比 (260/280) が、共存しているタンパクの相対量を示すことが知られている (Logemann *et al.* 1987、Manning 1991)。改良法によりエトログシトロンから抽出された全ての核酸試料において、相対値 260/230 は、2 付近の値を示し、核酸試料中に含まれる多糖類やフェノール化合物が非常に少ないことがわかった。また、相対値 260/280 は、1.8-2.0 の値を示し、共存するタンパク質もほとんどないことがわかった。この値は、従来法で抽出された核酸試料で得られた数値とほぼ同じであり、核酸試料の純度は、従来法と改良法で、ほとんど差がないことがわかった。さらに、この改良法は、マイクロ遠心チューブ中で、操作ができる少量カンキツ葉 (約 0.2 g) から安定して核酸が抽出されることを確かめている (4.3.4 章を参照)。

表 4-2. エトログシトロンアリゾナ 861-S1 から  
の低分子 RNA 抽出法の比較

方法	A260/230	A260/280	低分子 RNAs ( $\mu\text{g/g}$ 組織 )
メトキシエタノール 抽出と CTAB 沈殿	3.01 * <sup>1</sup> ( 2.19-5.26 * <sup>2</sup> )	1.89 ( 1.73-1.96 )	32.2 ( 0-80 )
ブトキシエタノール による分画沈殿	2.48 ( 1.93-3.25 )	1.90 ( 1.78-1.96 )	143 ( 64.1-321 )

\*1. 平均値 (  $n=10$ , メトキシエタノール抽出と CTAB 沈殿  
の値は  $n=7$  )

\*2. 最高値と最低値

#### 4.2.2. sPAGE による検出

4.2.1 章の改良核酸抽出法のカンキツウイロイド検出への適応を検討する目的で、連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sPAGE) により、改良法により抽出された低分子 RNA 中のカンキツウイロイドの検出を試みた (図 4-29)。矢印で示した位置にバンドが、従来法及び改良法により抽出された低分子 RNA 中に検出された。このバンドの移動度は、CEVd より下で、CVd-II に属する HSVd-cit よりも上の位置に検出され、CVd-I であることが考えられた。しかし、そのバンドのシグナルの強さを比較すると、両方法で抽出された 100  $\mu\text{g}$  の低分子 RNA をそれぞれ泳動した場合、従来法で抽出された低分子 RNA を泳動したレーン 4 の方が、改良法のレーン 2 より強いシグナルが検出された。そして、レーン 4 は、改良法から抽出された 300  $\mu\text{g}$  の低分子 RNA を泳動したレーン 3 とほぼ同じシグナルであり、改良法の核酸試料中の CVd-I の濃度は、従来法の約 1/3 であると考えられた。つまり、改良法により抽出された核酸中には、ウイロイド以外の宿主由来の RNA が多く含まれていると考えられ、図 4-29 の改良法による低分子 RNA を泳動したレーンに見られる低分子領域の高いバックグラウンドのシグナルが、それを裏付けている。このバックグラウンドのシグナルは、HSVd-cit より低分子のウイロイド (CVd-III と CVd-IV) の検出を困難にすると考えられるが、核酸試料を、さらに、CC41 セルロースで精製することにより、解消できる。以上より、改良核酸抽出法で抽出された核酸試料中のカンキツウイロイドを sPAGE により検出する場合、低濃度、低分子で存在するウイロイドも検出できるように、CC41 等で、比較的高純度に精製し、できるだけ多くの核酸試量を泳動するべきであると思われる。300  $\mu\text{g}$  の低分子 RNA または、CC41 セルロースで精製した RNA 試料を泳動可能なことを既に確かめている。

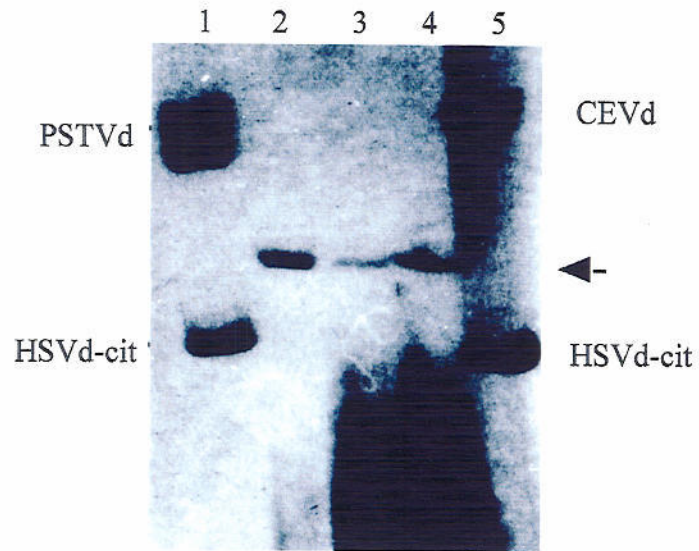


図4-29. 連続ポリアクリルアミドゲル電気泳動像。従来法及び改良法により感染シトロン葉(VF-14)より抽出した低分子RNA からのCVd-Iの検出。レーン2は、従来法で抽出した低分子RNA100  $\mu$ g。レーン3、4は、それぞれ改良法で抽出した低分子RNA 100  $\mu$ gまたは、300  $\mu$ g。レーン1と5は、サイズマーカーで、レーン1は、potato spindle tuber viroid (PSTVd、359塩基)と HSV-cit(302塩基)を含む核酸試料、レーン5は、CEVdとHSVd-citを含む核酸試料。矢印は、CVd-Iの特異バンドを示す。

#### 4.2.3. ドットプロットハイブリダイゼーションによる診断

初めに予備実験として、ハイブリダイゼーションの条件を検討した。Li ら (1995) の条件でハイブリダイゼーションを行ったところ、CEVd プローブが HSVd 単独感染エトログシトロンからの抽出核酸をスポットした区からシグナルが検出され、プローブが非特異的に結合していることが考えられた。そこで、プローブの特異性を高めるために、ハイブリダイゼーションの条件を厳しく、すなわち、ハイブリダイゼーションの温度を 55 °C から 65 °C、メンブレンの洗浄温度を 60 °C から 70 °C にあげて行った。CEVd、HSVd に加えて CVd-I に対する DIG 標識 cRNA プローブの特異性を、sPAGE から転写したメンブレンに対するノーザンハイブリダイゼーションにより検討したところ (図 4-30)、各プローブが、特異的にそれぞれのウイロイドに結合した結果と考えられるシグナルが検出された。以後の実験では、この条件でハイブリダイゼーションを行った。

CVd-I の cDNA クローンを用いて作成された DIG 標識 cRNA プローブを用いて、CVd-I の検出を試みた (図 4-31)。供試したエトログシトロン 10 個体の中で、先の sPAGE による検出 (4.2.2 章) で用いたエトログシトロン VF-14 を含む 5 個体において、強いシグナルが、改良法で抽出された低分子 RNA をスポットした全ての希釈段階 (低分子 RNA40、8、1.6 µg) から検出された。それ以外の個体の低分子 RNA をスポットした区から、シグナルは検出されなかった。対照として、従来法により低分子 RNA を抽出することができた個体について、それらの核酸をメンブレンにスポットして同様の試験を行ったところ、同じ結果が得られ、改良法により抽出された核酸試料がドットプロットハイブリダイゼーションに適用可能なことがわかった。

さらに、別の 2 種のカンキツウイロイド (CEVd と HSVd) を標的として加え、3 段階の純度の違う核酸試料、すなわち、2 M LiCl 可溶化分画 (低分子 RNA と宿主 DNA) と低分子 RNA (ウイロイドと宿主由来のリボゾーム RNA や tRNA 等)、低分子 RNA をさらに 2 本鎖核酸を吸着する CC41 セルロースで精製した RNA (CC41 RNA) (方法、3.2.1 章を参照) をメンブレンにスポットし、検出感度と特異性を検討した (図 4-32)。その結果、CEVd に対するプローブによるハイブリダイゼーションにおいて、sPAGE による診断により CVd-I 及び HSVd、CVd-III に感染していると思われるエトログシトロン E180 由来の核酸試料をスポットした全ての区からはシグナルが検出されなかった。また、CEVd と HSVd に感染していることの知られるエトログシトロン ES (Sano *et al.* 1986, 1988A; 畑谷, 1987) 由来の核酸試料をスポットした全ての区において、CVd-I に対するプローブを用いたハイ

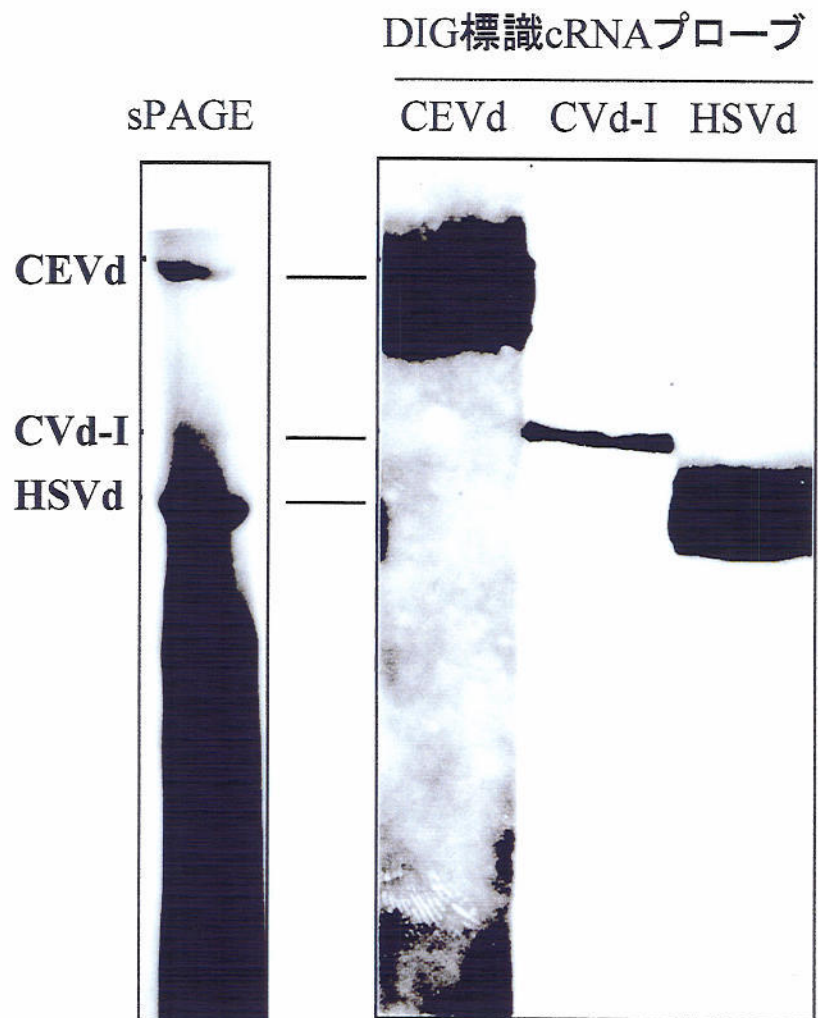


図4-30. DIG標識cRNAプローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションによるCEVdとCVd-I、HSVdの検出。左のsPAGEに泳動した抽出核酸量の1/10量を泳動したsPAGEのゲルから核酸をナイロンメンブレンに転写し、それぞれのプローブでハイブリダイゼーションを行った(右の像)。

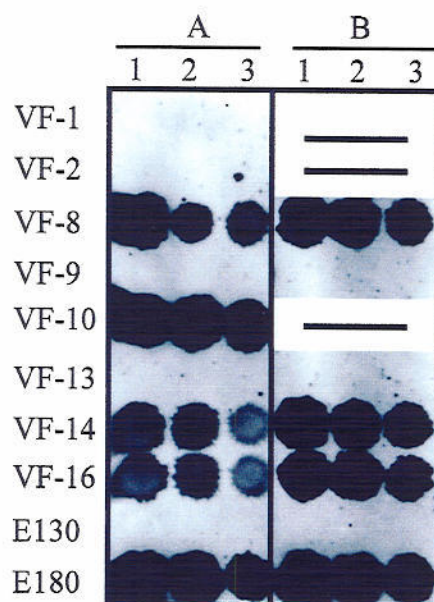


図4-31. 改良法(A)と従来法(B)により抽出された低分子RNA中のCVd-Iのドットプロットハイブリダイゼーションによる検出。VF-1からE180は、別々のカンキツ分離株を接いだシトロンを示す。希釈段階1、2、3は、それぞれ低分子RNA40、8、1.6 μgを示す。DIG標識RNAプローブを用い発光により検出した。

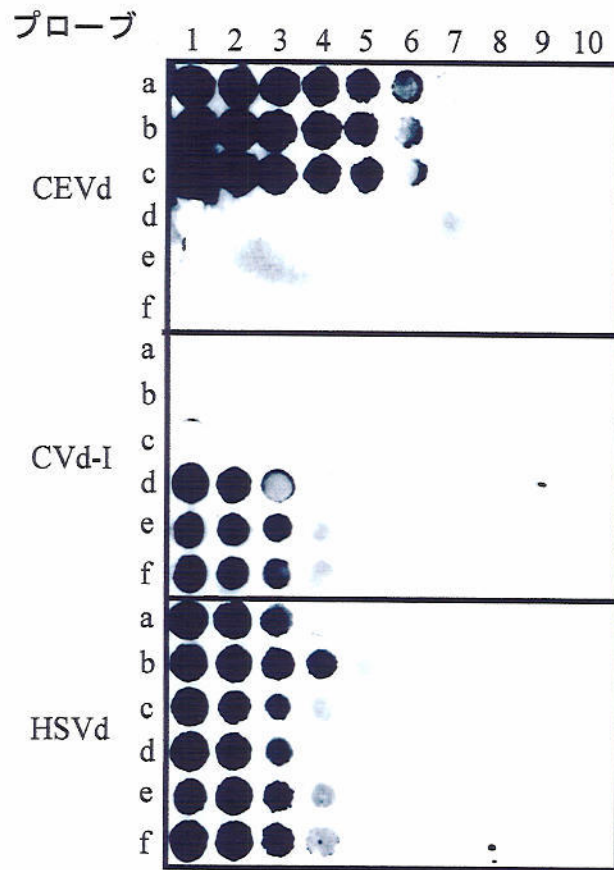


図4-32.純度の違う核酸試料中のCEVdとCVd-I, HSVdのドットプロットハイブリダイゼーション。aとd列は、2 M LiCl可溶性核酸、bとe列は、低分子RNA、cとf列は、CC41 RNA。a、b、c列は、CEVdとHSVdの感染したシトロンES。d、e、f列は、CVd-IとHSVd、CVd-IIIの感染したシトロンE180である。DIG標識cRNAプローブを用い、発光により検出した。

ブリダイゼーションにおいてシグナルは検出されず、本実験のハイブリダイゼーションの条件で、宿主由来の DNA を含む 2 M LiCl 可溶化分画においても、用いたプローブは特異的に働くことがわかった。シグナルの希釈限界点により検出感度を比較したところ、3 種のカンキツウイロイドは、2 M LiCl 可溶性核酸 320 ng、低分子 RNA 及び CC41 RNA については、64 ng の核酸から検出可能であった。従って、核酸試料の精製を加えた場合の検出感度の上昇は、5 倍以内であった。また、先の実験 (4.2.1 章) において、1 g のエトログシトロン葉から 143 mg の低分子 RNA が抽出されたことから (表 4-1)、三種のウイロイドは、0.45 mg のカンキツ葉に相当する低分子 RNA において検出可能であったことになる。以上のことから、核酸の純度は、2 M LiCl 可溶化分画、抽出のスケールは、マイクロ遠心チューブで、操作ができる少量のエトログシトロン葉 (約 0.2 g) で十分であり、DIG 標識 cRNA プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションは、特に多数の検体の診断に有効であると考えられた。

ドットプロットハイブリダイゼーションによるカンキツウイロイド診断の実用例として、圃場カンキツを接いだエトログシトロンからの抽出核酸に対して、5 種のカンキツウイロイドのプローブを用いて診断を行った (図 4-33)。右下に対照としてスポットした純化 CEVd と HSVd は、それぞれのプローブに対してのみ特異的に反応しており、プローブは特異的にウイロイドに結合していると考えられた。しかし、CVd-I と CVd-III の cDNA クローンからの転写物は、非特異的にプローブと反応して診断の対照としては使用できなると考えられた。転写プローブと転写 RNA は、pBluescript SK- という同じベクターから転写しているため、それぞれの末端には共通の配列を有しており、その部分で結合したシグナルが検出されたためかもしれない。カンキツから抽出した 2M LiCl 可溶性核酸をスポットした区については、陽性、陰性をはっきりと区別することができた。診断結果は、表 3-1 に示した。

上の実験では、検定カンキツ個体をカンキツエキソコーティス病の指標植物であるエトログシトロンに接ぎ木し、グリーンハウス内の比較的高温下で育成し、エトログシトロンの新葉を検定に用いており、圃場の他のカンキツ品種中よりもウイロイド濃度が高いことが考えられる。そこで、栽培品種である不知火 9K:S とハッサクからカンキツウイロイドの検出を試みた。不知火からの抽出核酸に対しては、CVd-I と HSVd プローブによるハイブリダイゼーションの区において、エトログシトロンの検定で見られたような強いシグナルが検出され、この二つのウイロイドに陽性であり、CEVd に陰性であると考えられた。



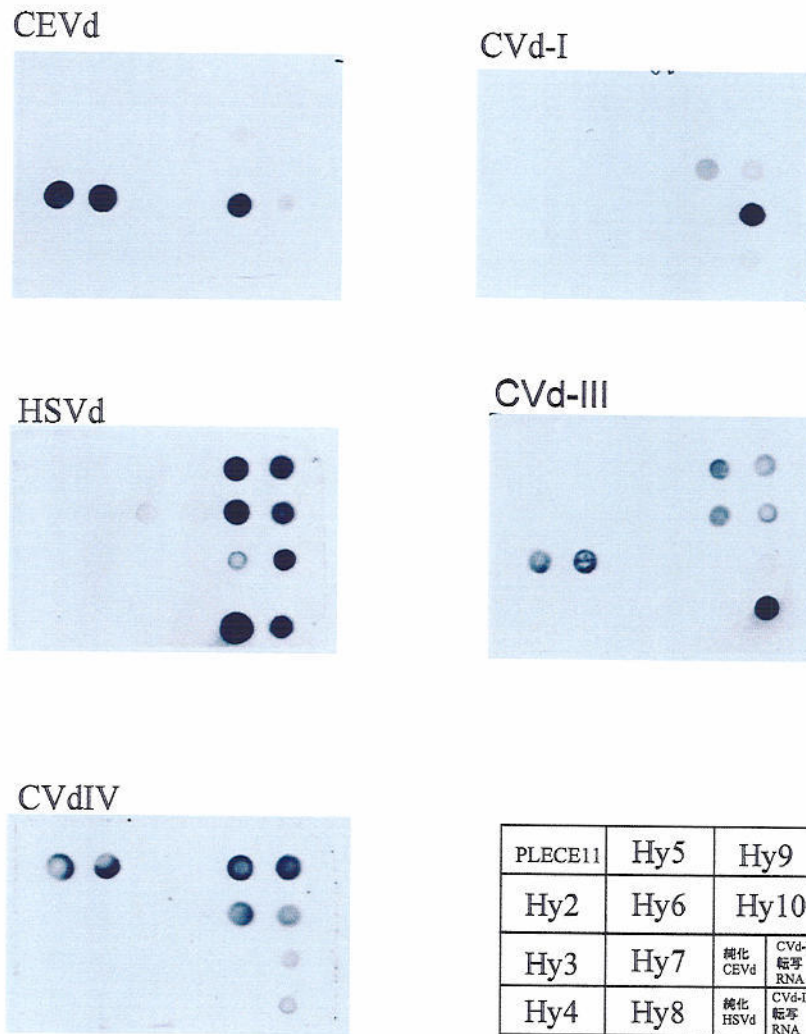


図4-33.5種のDIG標識cRNAプローブを用いたドットブロットハイブリダイゼーションによるCVdの検定。凍結葉から抽出した2 M LiCl可溶性核酸（各区左から20  $\mu$ gと4  $\mu$ g）メンブレンへのスポットしX線フィルムに1時間露光し、シグナルを検出した。Hy2-10は、それぞれカンキツHy2:EC、Hy3CEVd:EC、Hy4CTV1:S、Hy5CTV2:S、Hy6CTV3:S、Hy7CTV4:S、Hy8CTV5:S、Hy9N:SとHy10S:Sを示す。PLECE11は、カンキツ試料PLECE11を示す。

この結果は、この個体の接ぎ木されたエトログシトロン (9K:S-EC) の検定の結果と一致した (表 3-1)。一方、ハッサクでは、CEVd と HSVd にシグナルが検出されたが、それは、非常に弱く、診断の判定が困難であった。エトログシトロンや不知火に比べ、組織中のカンキツウイルス濃度が低いのかかもしれない。従って、不知火については、直接ドットブロットハイブリダイゼーションによる診断が、可能であるが、ハッサクについてはさらに検出感度の高い方法、例えば、RT-PCR 等の方法が必要と考えられた。

### 4.3.RT-PCR 及び DIG 標識 cRNA プロープを用いた高感度簡易診断法の確立

検定植物からの核酸抽出は、遺伝子診断の過程において煩雑な操作を伴い時間のかかる過程である。そして、その煩雑さは検定植物の組織や種類、また、診断方法により違ってくる。4.2 章の示したように、カンキツでは、sPAGE やドットプロットハイブリダイゼーションに求められる量及び高純度の核酸を得るために、従来とは別の精製過程を必要とした。また、カンキツからの核酸抽出で、問題となった多糖類やフェノール化合物は、PCR における DNA ポリメラーゼの酵素活性を阻害することが知られている (Staub et al. 1995、Pandey et al. 1996) ため、PCR による診断に適用するためには、さらなる精製が必要かもしれない。

本実験は、カンキツから RT-PCR によるカンキツウイロイドの高感度検出に適する核酸を抽出するための簡便な抽出法を開発することを目的に行った。同時に、純度の高い核酸を抽出することの難しいキク、HSVd の別の宿主であるホップ、ウイロイドの中で代表的で、その診断法について最も検討されている PSTVd の宿主であるジャガイモについても比較対照として検討した。

#### 4.3.1. RT-PCR とドットプロットハイブリダイゼーション法の検出感度

予備実験として、純化ウイロイド (CEVd と HSVd) を用いて、本実験で検出に用いる遺伝子診断法、すなわち、RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動による検出法と DIG 標識 RNA プロープを用いたドットプロットハイブリダイゼーションの検出感度を調べた。ドットプロットハイブリダイゼーションのシグナルの希釈限界点は、それぞれ 10 pg であった (図 4-34)。一方、それぞれのウイロイドの特異プライマー組を用いた RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動における希釈限界点を調べると、CEVd は、100 fg、HSVd は、1 pg であった。従って、RT-PCR の検出感度は、ドットプロットハイブリダイゼーションより、10-100 倍高かった。

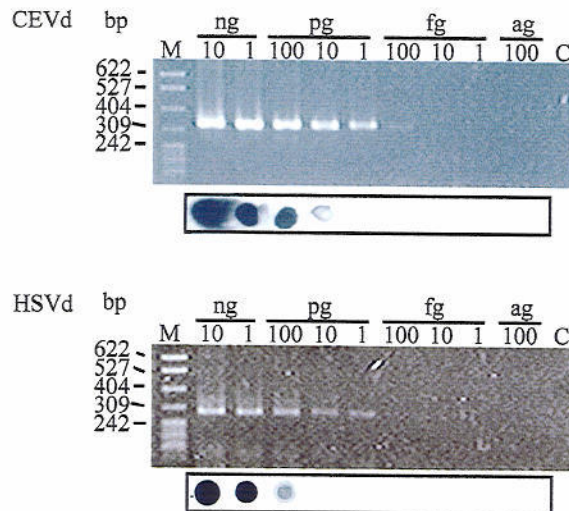


図4-34.ドットブロットハイブリダイゼーション（各下段）及びRT-PCR（各上段）による純化ウイルス（CEVdとHSVd）の検出における感度の比較。純化ウイルス10 ngまたは、その10倍希釈段階を逆転写の鋳型または、メンブレンへのスポットに用いた。1/5量のRT-PCR産物（プライマー組、PCEV-1PとPCEV-1Mまたは、プライマー組、HSV-9とHSV-8により増幅）を2%アガロースゲル電気泳動した。染色は、臭化エチジウムで行った。DNAサイズマーカーとして、pBR 322/*Hpa*II切断片を泳動した(レーンM)。レーンCは、鋳型となる核酸を加えずにRT-PCRを行った陰性対照の産物である。ハイブリダイゼーションのプロープには、DIG標識cRNAプロープを用いた。

#### 4.3.2. PEX を用いたウイロイドの溶出

Williams と Ronald (1994) のゲノム DNA 抽出法 (3.2.2.1 章を参照) を適用することにより、感染組織を磨砕することなしに、その中のウイロイドを溶出することを試みた。PSTVd 感染トマトから PEX 緩衝液中で保温することで溶出された核酸 (NA-PEX) を鋳型に PSTVd 特異プライマー組により RT-PCR を行ったところ (図 4-35)、矢印で示した 302 塩基の予想される位置にバンドが検出された (レーン 1-4)。PEX が含まれていない緩衝液中で保温して溶出した場合は (レーン 5)、バンドのシグナルが弱く、PEX によって、より効果的にウイロイドが溶出されることがわかった。レーン 1-4 は、3.2.2.章の PEX 過程において、遠心エバポレーターを用いた組織中への PEX 緩衝液浸潤の操作の時間を変えて行った結果である。予想された位置に見られた特異的と思われるバンドのシグナルの強さに大きな違いはなかった。しかし、この浸潤の操作を行わない (レーン 1) または、短い時間 (4 分間) だけ行った場合 (レーン 2)、さらに別の非特異的と思われるバンドが見られた。この非特異的バンドは、さらに長い時間この操作を行うこと (レーン 3 または、4) により、なくすことができた。以後の実験では、この遠心エバポレーターによる浸潤の操作を 6 分間行うことにした。

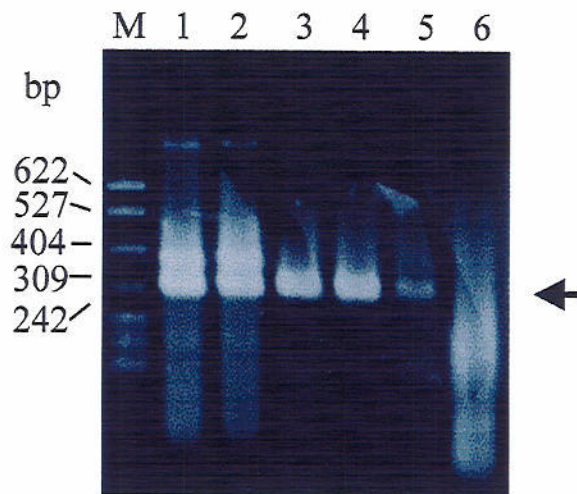


図4-35.PEXと減圧遠心のウイロイド溶出における効果。PSTVd感染トマト葉を用いた。試料は、PEX緩衝液中で保温後、0または、4、8、12分間減圧遠心し(レーン1-4)、以下2.2.2.1章に従って抽出した。レーン5は、PEXを含まない緩衝液を用いたこと以外、レーン3の試料と同様にして抽出した。4 mgの感染葉に相当する抽出核酸を逆転写反応の鑄型に用いた。プライマー組PPSTV-1PとPPSTV-1Mで増幅したRT-PCR産物(1/5量)を2%アガロースゲルで電気泳動した。レーン6は、RT-PCRに鑄型核酸を加えなかった陰性対照である。

#### 4.3.3. PEX のウイロイド検出における有用性

自然宿主または指標植物から抽出された NA-PEX 中のウイロイドのドットプロットハイブリダイゼーションまたは、RT-PCR による検出を検討した。それらの植物組織 10 mg に相当する NA-PEX とその 10 倍希釈段階からの検出を試みた。ジャガイモの目部と葉、ホップの葉から抽出された NA-PEX は、PSTVd と HLVd、HSVd のドットプロットハイブリダイゼーションと RT-PCR の両方法による診断に要求される純度と量を有していた。ドットプロットハイブリダイゼーションにおいて、陽性のシグナルは、組織 10-100  $\mu\text{g}$  に相当する NA-PEX において検出され、また、健全植物から抽出された NA-PEX からはシグナルは検出されなかった (図 4-36、A と B、C の下段)。一方、ウイロイド cDNA が、RT-PCR により特異的に増幅された (図 4-36、A と B、C の上段)。それらの増幅断片は、組織 100 ng -1  $\mu\text{g}$  に相当する NA-PEX において検出され、検出感度は、ドットプロットハイブリダイゼーションより 10-100 倍高かった。この検出感度の差は、純化ウイロイドの検出の場合と同様であった (4.2.1.章を参照)。

しかし、カンキツとキクから溶出された NA-PEX の純度及び量は、両遺伝子診断法によるウイロイドの診断に、必ずしも適してはいなかった。ドットプロットハイブリダイゼーションによる CEVd の検出で、陽性シグナルは、それぞれ、カンキツ葉 100  $\mu\text{g}$  及びカンキツ樹皮 1 mg、CEVd の指標植物であるジヌラ葉 10  $\mu\text{g}$  に相当する NA-PEX から検出できた。そして、CSVd は、キク葉 100  $\mu\text{g}$  に相当する NA-PEX から検出可能で、健全植物からの NA-PEX からシグナルは検出されなかった (図 4-37)。CEVd 以外の CVd の検出では、感染カンキツ葉 1-10 mg に相当する NA-PEX のスポットから CVd-I、HSVd、CVd-III に対する弱い陽性シグナルが見られたが、CVd-IV の検出においては、感染カンキツ葉 10 mg に相当する NA-PEX においても陽性シグナルは、検出できなかった。この低い検出感度は、NA-PEX 中に含まれる夾雑物が、プローブとウイロイドのハイブリダイゼーションを阻害している可能性があると考え、感染エトログシトロン由来の NA-PEX をさらに 2-ブトキシエタノールや 2 M LiCl 溶液 による分画沈殿で精製して、CVd-III に対するハイブリダイゼーションを行ったが、検出感度は上がらなかった。加えて、カンキツ葉 10 mg 以上に相当する NA-PEX をメンブレンにスポットするのは、粘性が増すために難しかった。従って、CEVd 以外の CVd のカンキツ中の濃度は、他の草本宿主中のウイロイド、PSTVd、HSVd、HLVd に比べ低いと思われ、ドットプロットハイブリダイゼーションより感度の高い方法を使用することが必要と思われた。しかし、カンキツ及びキク由来の

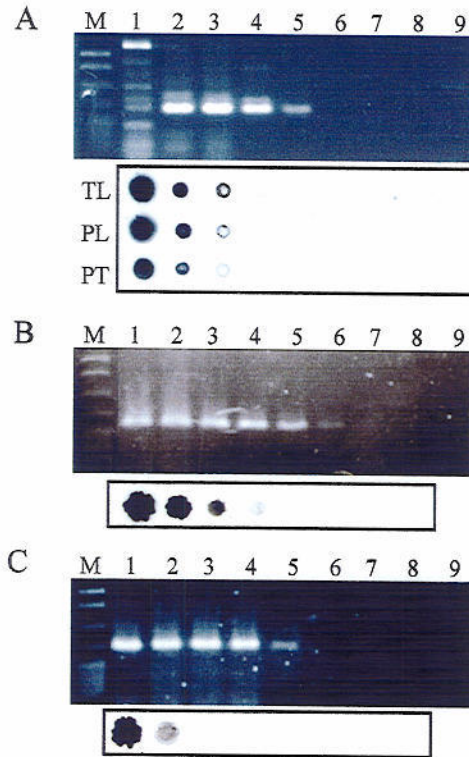


図4-36. RT-PCR(上段)とDIG標識cRNAプローブによるドットプロットハイブリダイゼーション(下段)によるPSTVd(A)及びHLVd(B)、HSVd(C)の検出。PSTVd感染ジャガイモcv.メイクイーンの葉から抽出したNA-PEXをRT-PCRの鋳型に用いた。感染トマト葉からのNA-PEX(TL)とジャガイモcv.メイクイーンの葉(PL)及び塊茎の目(PT)からのNA-PEXをドットプロットハイブリダイゼーションに用いた。組織10 mgまたは、1 mg、100  $\mu$ g、10  $\mu$ g、1  $\mu$ g、100 ng、10 ng and 1 ngに相当するNA-PEXは、RT-PCRに加えられるか、または、ナイロンメンブレンにスポットされた(レーン1-8、または、スポット1-8)。レーン9は、鋳型となる核酸を加えなかった陰性対照。スポット9は、それぞれ10 mgの組織に相当するNA-PEXがスポットされている。プライマー組、PSTV-1P and PSTV-1Mにより増幅した1/5量のRT-PCR産物は、図?と同様に解析した。ハイブリダイゼーションには、DIG標識cRNAプローブを用いた。HLVd(B)とHSVd(C)の検出には、重複感染葉からのNA-PEXを用いた。HLVdとHSVdのcDNAの増幅には、それぞれプライマー組、HLV-1PとHLV-1M、HSV-9とHSV-8を用いた。その他の過程は、PSTVdの検出(A)と同様に行った。



NA-PEX の純度は、RT-PCR 検定に適してはいなかった。CEVd、CVd-III、CSVd の検出において、ドットプロットハイブリダイゼーションで検出できた区において、RT-PCR の増幅産物は、ほとんど検出されなかったからである。つまり、鑄型となるウイロイド量は、十分であるから、それら NA-PEX 中の夾雑物が、RT-PCR における酵素活性を阻害しているのだろう。NA-PEX を希釈したり、フェノール：クロロホルム(1:1)抽出や 2 M LiCl 溶液で分画して精製して、RT-PCR を行ったが増幅産物は検出されなかった。

#### 4.3.4. RT-PCR 阻害物質の除去

短時間で行える 2 段階の精製過程（精製 BEHC）を加えることで、カンキツとキクの RT-PCR 阻害物質を除去することができた。1) 2-ブトキシエタノールを用いた分画沈殿による多糖類及びフェノール化合物の除去 (Schultz *et. al.* 1994)。この過程は、いくつかの植物からの RNA の抽出において、2 次生成物の多い場合に有効なことが報告されており、ウイロイドの抽出にも適用可能なことを確認している (4.2 章を参照)。2) 塩酸処理とそれに続くエタノール沈殿。野口ら (1995) は、この過程が、カイコだけでなくその排泄物や糞の混じった試料から核多核体ウイルスの PCR による検出における感度の上昇に有効であることを報告している。

この 2 つの過程をカンキツ及びキク由来の阻害物質の除去への適用を検討した結果が、図 4-38 である。2-ブトキシエタノールによる分画沈殿のみの精製を加えた場合、特異 DNA 断片は増幅されるが、希釈限界点を見るとドットプロットハイブリダイゼーションと同じか、検出感度が 10 倍高いだけであった (A と B の上段)。増幅の阻害は、完全には除かれていないと思われた。さらに、塩酸処理も行った場合、それぞれ検出感度が、ドットプロットハイブリダイゼーションより 100 倍高くなった。特に、CSVd の増幅 cDNA のシグナルが、希釈段階を通して、著しく強くなった。ドットプロットハイブリダイゼーションと RT-PCR の検出感度の差は、純化ウイロイドの検出と同様となり、RT-PCR の阻害物質は、2 つの過程を通してよく除去されたと考えられた。

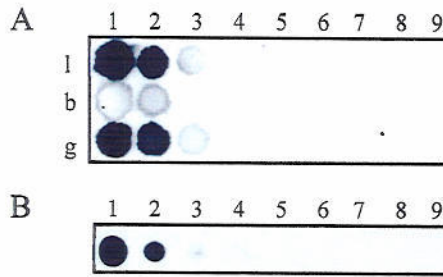


図4-37. DIG標識cRNAプローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションによる CEVd (A)と CSVd (B)の検出。組織10 mgと1 mg、100  $\mu$ g、10  $\mu$ g、1  $\mu$ g、100 ng、10 ng、1 ngに相当する感染エトログシトロン(葉(l)と樹皮(b)、感染ジヌラの葉(g))、CSVd感染キクの葉から抽出したNA-PEXをメンブレンにスポットした(スポット1-8)。スポット9は、それぞれの健全植物組織10 mgに相当するNA-PEX。

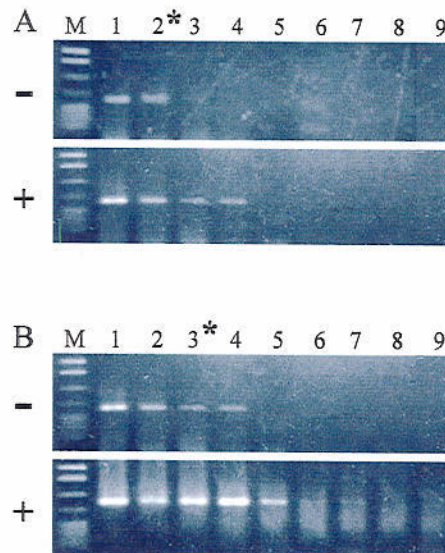


図4-38. 2-ブトキシエタノール抽出とHCl処理後のエタノール沈殿のRT-PCRに対する効果。2.2.2.章にしたがって抽出されたCVd-III感染シトロンE130の葉(A)とCSVd感染キク葉(B)からのNA-BEHC(+)と、HCl処理と続くエタノール沈殿を行わないで同様にして抽出した核酸試料(-)をRT-PCRの鑄型として使用した。組織10 mgと1 mg、100  $\mu$ g、10  $\mu$ g、1  $\mu$ g、100 ng、10 ng、1 ngに相当する抽出核酸を逆転写反応に供試した(レーン1-8)。レーン9は、鑄型核酸試料を加えなかった陰性対照。1/5量のRT-PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動した。RT-PCRに供試した核酸に相当するNA-PEXに対してDIG標識cRNAプローブによるドットプロットハイブリダイゼーションを行ったときの検出限界点を示した(\*)。

#### 4.3.5. ウイロイドのマイクロプレートへの吸着を利用した RT-PCR

4.3.2 章とは、別の視点で、核酸試料の簡便調整法を検討した。最近、ウイルスの PCR による診断において、マイクロプレート、マイクロ遠心チューブ等を支持体として、ウイルスの特異抗体結合を利用した簡便法、いわゆる、イムノキャプチャー PCR が報告され (Nolasco *et al.* 1993)、多くのウイルスで、検討されつつある。一方、核酸のハイブリダイゼーションにおいて、核酸を吸着させる固相支持体として、メンブレンの代わりにマイクロプレートが使えることが知られている (例えば、Hataya *et al.* 1994)。そこで、感染植物の粗抽出試料をマイクロプレートのウェル中に入れ、ウイロイドをウェル表面に直接吸着し、その後、宿主成分をウェルの洗浄で除去して逆転写反応液を入れ、逆転写を行いマイクロ遠心チューブに移し、PCR を行うという方法でウイロイド cDNA の増幅を試みた (図 4-39)。初めに、予備実験として、磨砕粗汁液から純化ウイロイドまで、純度の違う試料を用いて宿主中のウイロイド濃度の高い PSTVd の検出を試みた。純化ウイロイドの区で、cDNA と思われる増幅産物の強いシグナルが検出され、マイクロプレートには、cDNA だけでなくウイロイド RNA も吸着することが明らかとなった。また、磨砕粗汁液まで、全ての精製段階で、特異的と思われる増幅産物が検出され、本方法は、ウイロイド診断のための簡便調整法として可能性があると考えられた。マイクロプレートハイブリダイゼーションで報告されているとおり、磨砕と吸着における緩衝液を変えると、シグナルが検出されず、ウイロイド RNA の吸着効率、塩濃度によってかわってくるということが考えられた。そこで、塩の濃度、種類の違う緩衝液中で磨砕してキクからの CSVd の検出を試みたところ (図 4-40)、磨砕溶液中に塩が含まれていないもの (0.5% SDS; レーン 7) 以外は、特異的と思われる DNA 断片の増幅が見られた。そして、それらの増幅バンド間で、シグナルの強さに大きな差はなかった。実際にキク (cv. ミスルトー、トモタチ、ポピュラー) 6 個体について、CSVd の診断を試みたところ (図 4-41)、5 個体については、以前 (李、1994) の結果と一致し、陽性の個体については、はっきりとした増幅シグナルが見られ、NO.18 の健全ミスルトーでは、そのバンドは見られなかった (レーン 5、6)。また、NO.60 については、陰性と判断することができた (レーン 13、14)。しかし、本方法で、エトログシトロン ES から CEVd の検出を試みたが、特異的 cDNA は、増幅されなかった。

さらに、簡便化を目指し、感染トマトからの PSTVd の検出において、磨砕粗汁液の代わりに、磨砕を行わず、ウイロイドを植物体から PEX 緩衝液中で溶出した溶液 (3.2.3 章を参照) を用いたところ (図 4-42)、特異断片が検出され、適用可能であることがわかっ

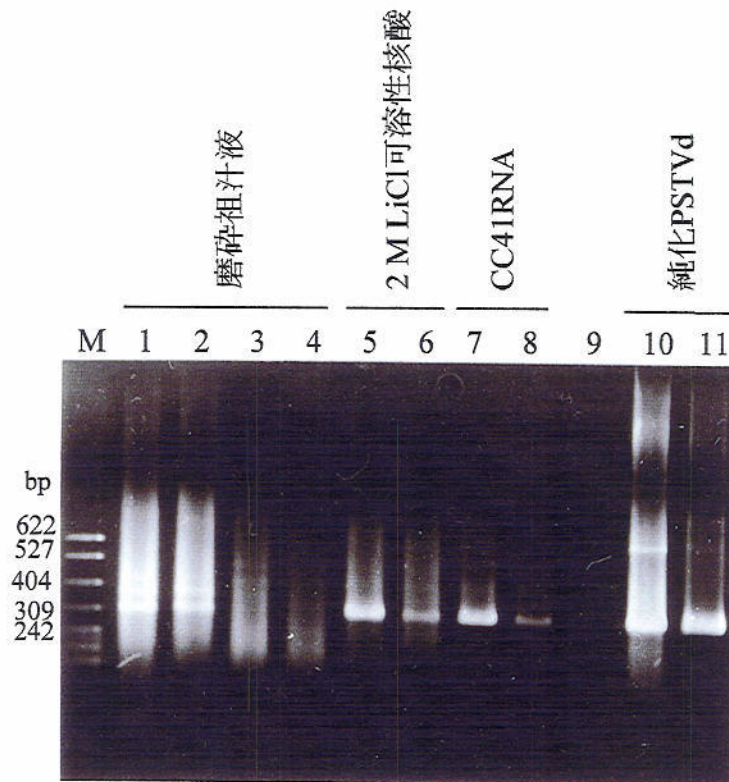


図4-39.感染トマト葉の磨砕祖汁液（レーン1-4）または、抽出核酸（レーン5-8）のマイクロプレートへの吸着、洗浄による簡便調整試料からのPSTVdのRT-PCRによる検出。感染葉は、15×SSC（レーン1-2）、1% SDS（レーン3-4）または、PBSで磨砕して以下の操作に用いた（2.2.3.章を参照）。レーン5と6は、0.64 μgと0.064 μgの2 M LiCl可溶性核酸であり、レーン7と8は、0.29 μgと0.029 μgのCC41RNA、レーン10と11は、純化PSTVd100 ngと10 ngで、50 μlの10×SSCに溶解しマイクロプレートウェルに供試した。、1/5量のRT-PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動した。レーンMは、DNAサイズマーカー（pBR322/HapII）。レーン9は、マイクロプレートウェルに鋳型核酸を含まない10×SSCを加えた陰性対照。

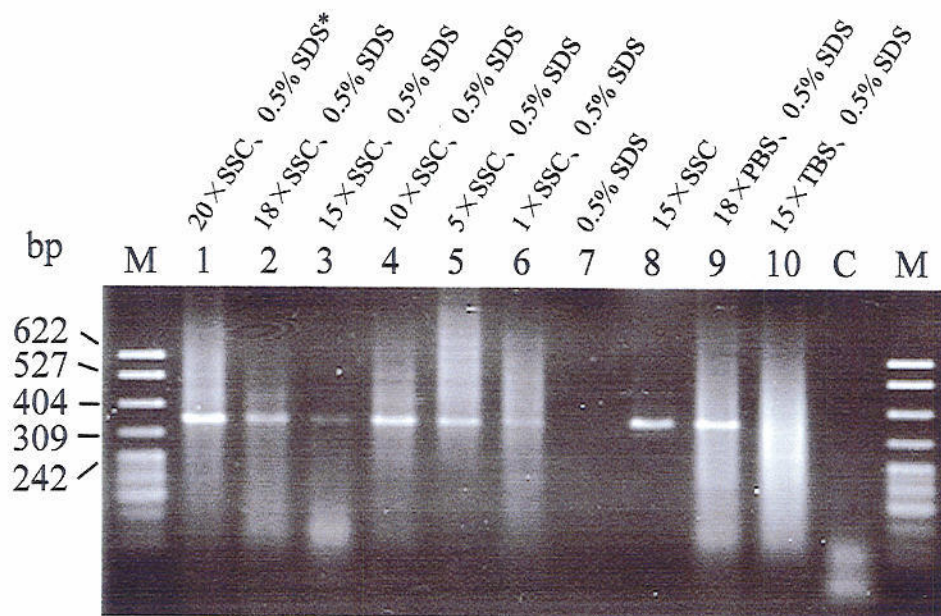


図4-40.CSVdのマイクロプレート吸着による簡易調製法における磨砕緩衝液の組成の影響。それぞれのレーンの上を示した緩衝液で磨砕し（20×SSC: 3 M塩化ナトリウム、0.3 Mクエン酸ナトリウム、20×TBS: 2M Tris-HCl pH 7.5、3 M塩化ナトリウム、20×PBS: 2.74 M NaCl、162 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、29.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、54 mM KCl）、以下の操作は、2.2.3.章の方法に従った。レーンCは、鋳型核酸を逆転写に加えなかった陰性対照。レーンMは、DNAサイズマーカー、pBR322/HapII。

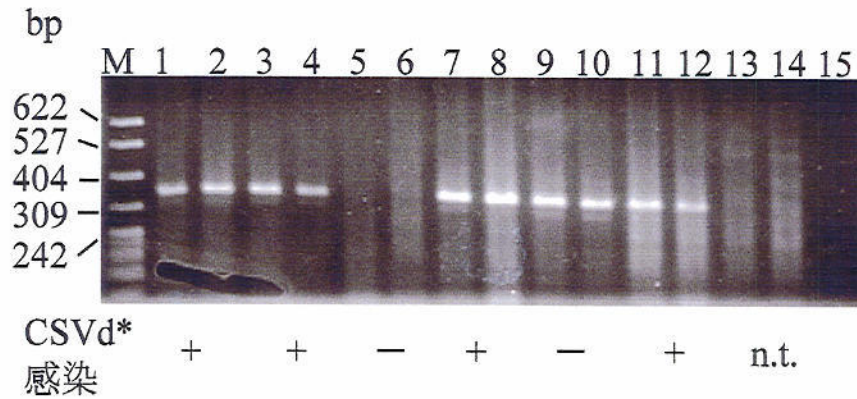


図4-41.マイクロプレートへの直接吸着させたキク矮化ウイルス (CSVd) に対して行ったRT-PCR産物の2%アガロースゲル電気泳動像。キクNo. 1 cv.ミスルトー (レーン1-2)、No. 2 (レーン3-4) cv. ポピュラー、No. 18 (レーン5-6) cv.ミスルトー、No. 44 (レーン7-8) 及びNo. 45 (レーン9-10) cv.アルカデア、No. 50 (レーン11-12) 及びNo. 60 (レーン13-14) cv.トモタチの凍結葉を磨砕に用いた。逆転写には、相補鎖プライマーCSV-1Mを用い、PCRは、プライマー組CSV-1P、CSV-1Mで行った。レーン15は、鋳型を加えないでRT-PCRを行った陰性対照。  
\*李 (博論、1994) が、DIG標識cDNAプローブによるドットプロットハイブリダイゼーションにより行った検定結果。+は陽性を、-は陰性を示す。No. 60 cv.トモタチについては、検定されていなかった (n.t.)。

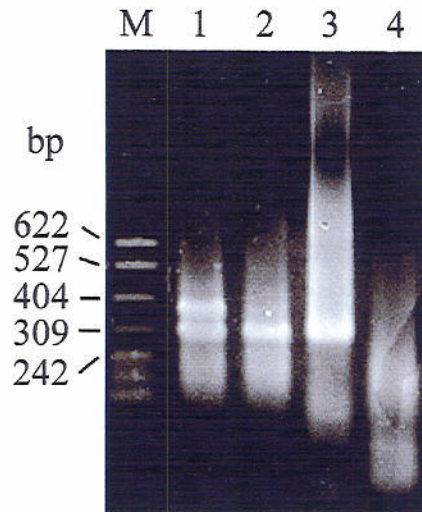


図4-42.PEX溶液で磨砕を行わずに溶出した試料のマイクロプレート吸着によるRT-PCRのための簡易調整法。PSTVd感染トマト葉から2.2.2.1.章に従って（レーン1）、または、緩衝液（400 mM Tris-HCl pH 7.5、2.8 M NaCl、40 mM EDTA、6.25 mM PEX）でPSTVdを溶出し（レーン2）、溶出液50  $\mu$ lをマイクロプレートウェルに入れ、以下の操作は、2.3.章に従った。レーン3は、純化PSTVd 10 ngを逆転写の鋳型に加えた陽性対照。レーン4は、鋳型核酸を加えずにRT-PCRを行った陰性対照。

た。しかし、本方法で、エトログシトロン ES から CEVd の検出を試みたが、特異的 cDNA は、増幅されなかった。

#### 4.3.6. RT-PCR 試料間の汚染防止前処理

試験を行っていく過程で、RT-PCR とドットプロットハイブリダイゼーションの結果が一致しない場合があった。この理由の一つとして、カンキツから核酸を抽出する操作過程において試料間のクロスコンタミネーションをおこしてしまった可能性が考えられた。この問題を解決するために本実験を行った。

兵庫県産カンキツ cv. 不知火 Hy9N:S は CVd-IV の塩基配列の解析に用いた株であり、RT-PCR と sPAGE、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション (図 4-33) により CVd-IV 陽性であることが確認されている。一方、不知火 Hy8CTV5:S は、CVd-IV プローブによるドットプロットハイブリダイゼーションでは、シグナルは検出されず陰性であった。ところが、これらのカンキツから核酸を抽出し RT-PCR により CVd-IV の検出を試みたところ、両試料から特異シグナルが検出された (図 4-43、レーン 1 と 6)。抽出に用いた試薬にコンタミネーションしている可能性を考えて、試薬を全て新しいものに変えて行った。その結果、やはり両試料からバンドが検出された (図 4-43、レーン 2 と 7)。カンキツ葉をマイクロ遠心チューブに移す過程で、コンタミネーションしている可能性を考えて、1 試料ごとにカンキツ葉をさわる手袋を水酸化ナトリウムとホルムアルデヒドの混合溶液で、消毒して行ったところ、カンキツ Hy9N:S のバンドのシグナルは変わらなかったけれども、カンキツ Hy8CTV5:S のバンドシグナルは減少した。従って、カンキツ葉の表面に、採取等の過程でコンタミネーションした可能性が考えられた。しかしながら、バンドは完全にはなくならず、上記の方法は完全ではないと思われた。そこで、手袋の消毒に加えてマイクロチューブ中のカンキツ葉を水酸化ナトリウムとホルムアルデヒドの溶液または、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ナカライ) でさらに消毒してから核酸を抽出した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム溶液で消毒したレーン 5 において完全にバンドが消失し、一方、Hy9N:S からの抽出核酸においては、バンドの強さはむしろ若干強くなった。



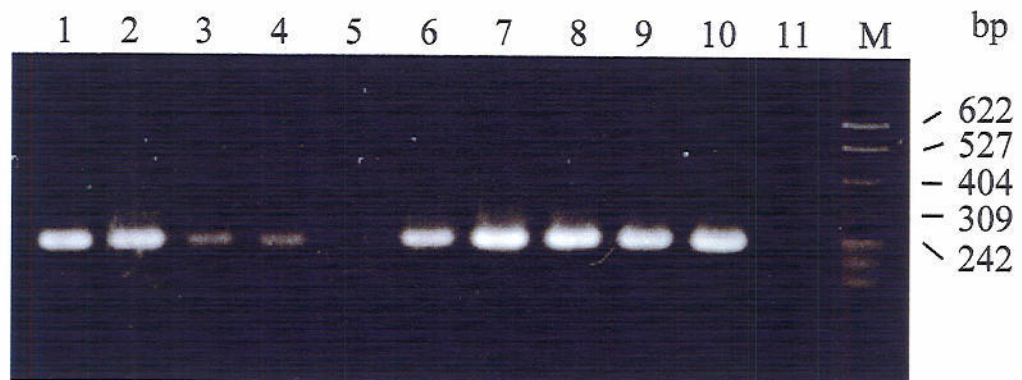


図4-43. RT-PCRによる高感度検出における試料間のコンタミネーションを防ぐための処理の比較。カンキツ cv.不知火の葉（レーン1-5、CVd-IV陰性のHy8CTV5:S；レーン6-10、CVd-IV陽性のHy9N:S）からの抽出核酸に対しCVd-IV特異プライマー組、CVIV-1PとCVIV-1MによるRT-PCRを行った。レーン1と6は、2.2.2.章に従って核酸抽出を行った試料。レーン2と7は、抽出に用いる試薬を全て、新しいものに変えてレーン1と6と同じ方法で行った試料。レーン3と8は、カンキツ葉をマイクロ遠心チューブに移す過程で、2% NaOHと2%ホルムアルデヒドを含む溶液で処理した手袋を用いて行い、以下レーン1、2、6、7と同様に行った、または、さらに、チューブ中の試料を70%エタノールの代わりに、2% NaOH及び2%ホルムアルデヒドを含む溶液（レーン4と9）または、次亜塩素酸ナトリウム溶液（ナカライ；レーン5と10）で前処理し、滅菌水で洗浄して2.2.2.章にしたがって核酸抽出した。レーン11は、鋳型核酸を加えないでRT-PCRを行った陰性対照。レーンMは、DNAサイズマーカー（pBR322/HapII）。1/5量のRT-PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動した。

#### 4.3.7.RT-PCR による5種のカンキツウイロイドの同時検出

PCRは、*in vitro*で標的核酸配列を指数関数的に増幅することにより、標的核酸配列を高感度に検出できる。しかし、その増幅効率や特異性は、標的核酸とプライマー組の配列や長さ、反応の温度条件によりかわることが知られている。用いたプライマーの標的配列との相補結合の安定性 ( $T_m$  値) は違っており、それぞれについて cDNA を効率よく特異的に増幅するための条件検討が必要と思われた。本実験では、実用性を考慮してその条件を検討した。

感染カンキツから抽出した NA-BEHC (10 mg 相当) を RT-PCR の鋳型として用いた。配列から予測される  $T_m$  値は、プライマー間で違っているが (表 3-2)、全ての CVd を同一の温度とサイクル条件で PCR を行ってみた。予想される cDNA 増幅断片は、CEVd と CVd-I においてのみ、特異的に増幅された (図 4-44、レーン 1 と 3)。しかし、HSVd と CVd-III、CVd-IV の cDNA の増幅において、特異的と思われる増幅断片に加えて、非特異的な増幅断片が検出された。これは、宿主由来の核酸にプライマーが非特異的にアニールしたためと思われた。また、特異バンドのシグナルは、CVd-I と CVd-III、CVd-IV のレーンでは、弱かった。非特異的増幅と特異的 cDNA の増幅量を上昇させるために、少量の (30 mM) TMAC を加えた PCR (Chevet et al. 1995) を検討した。この時、温度条件及びサイクル条件は、変更しなかった。その結果、非特異断片のシグナルはなくなるか、弱くなり PCR の特異性が上昇した (図 4-44、レーン 6 と 8、10)。また、特異断片のシグナルは、同じように強いのか (図 4-44、レーン 2-CEVd、レーン 6-HSVd)、強くなり (図 4-44、レーン 4-CVd-I、レーン 8-CVd-III、レーン 10-CVd-IV) 特異断片の増幅量も上昇させることができた。この条件で、RT-PCR によるカンキツウイロイドの検出感度を検討した。図 4-45 に CEVd と CVd-I、HSVd、CVd-IV の結果を示した。5 種のカンキツウイロイドは、感染葉 100  $\mu$ g の抽出物に相当する NA-BEHC より検出可能であった。CVd-IV を除くカンキツウイロイドの検出感度は、ドットプロットハイブリダイゼーションと比べて 100 から 10,000 倍高かった。

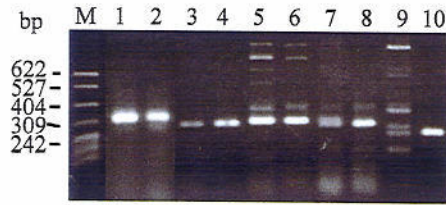


図4-44. CEVd (レーン1と2)とCVd-I (レーン3と4)、HSVd (レーン5と6)、CVd-III (レーン7と8)、CVd-IV (レーン9と10)のRT-PCRによる検出におけるTMACの効果。10 mgのカンキツES (レーン1と2)とE83AK (レーン3と4)、Hy9N:S (レーン5-10)の葉に相当するNA-BEHCは、逆転写の鋳型として加えた。PCRは、反応液に終濃度30 mMのTMACを加える(レーン2と4、6、8、10)または、加えないで(レーン1と3、5、7、9)で行った。CEVd及びCVd-I、HSVd、CVd-III、CVd-IVの検出には、それぞれPCRプライマーの組、PCEV-1PとPCEV-1M、CBLV-1PとCBLV-1M、HSV-9とHSV-8、CVIII-2PとCVIII-2M、CVIV-1PとCVIV-1Mを用いた。1/5量のRT-PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動した。レーンMは、DNAサイズマーカー(pBR322/HapII)。

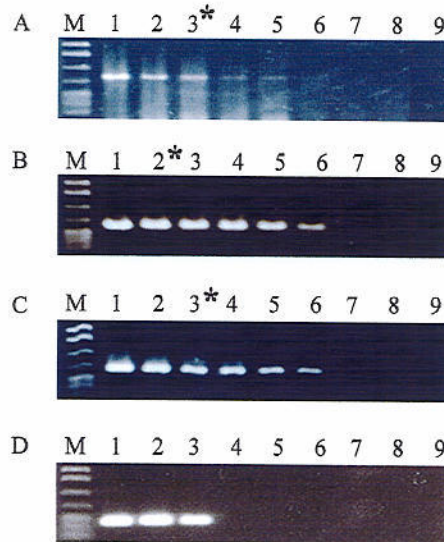


図4-45. CEVd (A)とCVd-I (B)、HSVd (C)、CVd-IV (D)のRT-PCRによる検出。カンキツ試料ES (A)とE83AK (B and C)、Hy9N:S (D)の葉10 mgまたは、1 mg、100  $\mu$ g、10  $\mu$ g、1  $\mu$ g、100 ng、10 ng、1 ng (レーン1-8)に相当するNA-BEHCは、逆転写の鋳型として用いた。レーン9は、鋳型核酸を加えない陰性対照。1/5量のRT-PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動した。星印は、RT-PCRに供試したNA-BEHCに相当するNA-PEXに対してそれぞれのウィロイドDIG標識cRNAプローブによるドットプロットハイブリダイゼーションによる琉希積限界点を示す。

#### 4.3.8. 考察

4.3.8.1. 2-ブトキシエタノールによる分画沈殿法を用いることによりカンキツから安定してウイロイドを含む核酸を抽出でき、sPAGE とハイブリダイゼーション法による検定に適用可能であった。

カンキツウイロイドを sPAGE や遺伝子診断法により検定するために核酸抽出法の検討を行った。できるだけ簡便にするために従来法 (Sano *et al.* 1989) について全ての操作を 50 ml 容遠心チューブと 1.6 ml 容マイクロ遠心チューブで行えるようにスケールダウンして行った。その結果、カンキツ試料ごとに抽出される核酸量に違いがあり、時には、抽出できないものがあった。植物から核酸を抽出する場合、その種によっては抽出過程で二次的に酸化化合物、すなわち、多糖類やフェノール化合物が合成され、それが核酸抽出を阻害したり純度の高い核酸を精製することを困難にする。抽出できなかったカンキツについても同様の理由によるものと考え、その解決法として報告された 2-ブトキシエタノールを用いる方法 (Schultz *et al.* 1994) により従来法を改良したところ、従来法とほぼ同じ純度でより多く核酸を抽出することができた (表 4-1)。また、sPAGE とドットプロットハイブリダイゼーションにより抽出核酸中に含まれるカンキツウイロイドの検出も可能であり、ウイロイドも抽出されていることがわかった。また、4.3.4 章で示したとおり、2-ブトキシエタノールを用いた分画沈殿法はマイクロ遠心チューブスケールまでスケールダウンすることが可能であり、カンキツウイロイドの RT-PCR による診断のための簡易核酸抽出法を確立するための一助となった。

4.3.8.2. エチルキサントゲン酸カリウム (PEX) を用いることにより組織の磨砕を行わずに宿主植物からウイロイドを簡便に溶出できる。

この方法の最大の利点は、組織をを磨砕することなく植物組織からウイロイドを溶出することである。組織磨砕は、特に多数の試料を磨砕するときに、非常に時間を費やす過程である。カンキツの葉や樹皮のように堅くて繊維質の組織を磨砕することは骨が折れ、難しい。また、組織を磨砕した場合、より多くの宿主構成成分や抽出過程での二次産物がウイロイドと共に抽出されるため、より多くの精製過程が必要とされる。それらの不便に加えて、通常、再使用する乳鉢、ホモジュナイザー、ジュースプレスなどを用いた磨砕では、試料間の汚染の危険性があり、結果として擬陽性を招く危険が、特に高感度 RT-PCR 検

定において考えられる。本簡易抽出法は、先に述べた欠点や危険性を回避して、核酸抽出を行えるため、実用性が高いと思われる。

磨砕を行わないことによる欠点も考えられる。一つは、抽出される核酸量が組織の磨砕を伴う従来の方法よりも少ないことが、過去の報告から予想されること (Jhingan, 1992; Thomson & Dietzgen, 1995)。二つ目は、ウイロイドが溶出してくる効率も、植物組織の種類により違ってくることである。なぜなら、CEVd の組織中の濃度は、葉よりも樹皮の方が高いことが知られている (Li *et al.* 1995) にもかかわらず、CEVd は樹皮より葉の方がより少ない組織重量に相当する核酸から検出された (図 4-37) からである。おそらく樹皮の比較的繊維質で堅い組織が、ウイロイドの溶出を妨げているのであろう。しかしながら、図 4-35 で示したように PEX によって植物組織を化学的に分解することにより、ウイロイドは、より効果的に溶出することがわかった。そして、本実験で用いた全てのウイロイドは、PEX を用いた簡易抽出法で抽出された、それぞれの自然宿主植物葉 100  $\mu\text{g}$  に相当する核酸から検出できた。これは、全抽出量の約 1/2,000 に当たり、ウイロイドの検出には十分量の核酸が、全てマイクロ遠心チューブ中で操作できる植物組織から溶出されることが示され、従って、一日に多数の試料を処理できると思われる。

本簡易抽出法は、大きく 2 つの過程に分けられる。最初の過程は、PEX 緩衝液で保温することにより葉から核酸を溶出する過程である。この過程で抽出された核酸 (NA-PEX) からは、PSTVd と HLVd、HSVd が、ジャガイモ葉及び塊茎、ホップ葉からドットプロットハイブリダイゼーションと RT-PCR の両方法により検出可能であった。しかも、RT-PCR による検出感度は、ドットプロットハイブリダイゼーションよりも高かった。これは、純化ウイロイドの検出の時と同様であり、その核酸抽出物中の夾雑物による酵素反応の阻害効果はないことが考えられる。この過程は、ソラマメとオオムギ、トウモロコシ、エンバク、イネ、コムギ、マカロニコムギ、トリティカル (コムギとライムギの雑種) から PCR に使用可能なゲノム DNA の抽出のために以前に報告された方法であり (Williams & Ronald, 1994)、これらの植物体からの DNA 及び RNA ウイルスの検出に適用できると思われた。

4.3.8.3. 2- ブトキシエタノールによる分画沈殿及び塩酸処理とエタノール沈殿を組み合わせることで、カンキツからの抽出核酸中の RT-PCR の阻害物質を取り除くことができる。

続く過程は、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿と塩酸処理に続くエタノール沈殿である。この過程は、カンキツ及びキクから RT-PCR の阻害物質を取り除くために検討し、確立した。4.2 章で、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿によりカンキツから安定にウイロイドが抽出されることを示した (中原ら、1995B; Nakahara *et al.* 1998C)。一方、多糖類とフェノール化合物を多く含むブドウからのウイロイドの抽出にも有効なことが報告されている (Staub *et al.* 1995)。その報告の中で、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿により抽出された核酸試料は、酵素反応を伴う実験 (RT-PCR) には、完全には適用できないことが報告されている。本実験で検討したカンキツとキクについても、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿だけでは、精製が不十分であることがわかった (4.3.4 章、図 4-38)。しかし、さらにその核酸試料を HCl 処理及びエタノール沈殿により精製することにより、RT-PCR を阻害する夾雑物を素早く除去することができた。この過程を開発した論文 (野口ら 1995) は、何故 HCl 処理及びエタノール沈殿により PCR の阻害物質が取り除かれるのか記述していない。阻害物質が多糖類だとすると、2-ブトキシエタノールによる分画沈殿により除去しきれなかったそれらが、HCl により加水分解されて溶解性が増して、エタノール沈殿で、沈殿しないようになったのかもしれない。

#### 4.3.8.4. 核酸抽出に用いるカンキツ葉を次亜塩素酸で前処理することにより、RT-PCR 法による高感度検出における試料間のクロスコンタミネーションを回避できる。

複数の検定カンキツ樹から葉を採取してマイクロチューブに移す時、その操作過程でカンキツウイロイドを保毒する微量のカンキツ組織が、手を介して別のカンキツ葉の表面に付着するなどしてコンタミネーションをおこす可能性があると思われる。本研究でカンキツウイロイドの検定を行う中で、ドットブロットハイブリダイゼーションにおいては陰性にも関わらず RT-PCR によりカンキツウイロイドの特異断片が増幅される試料がみられた。RT-PCR における陰性対照では、バンドは検出されず、また、核酸抽出に用いる試薬を新しくしてやり直してもやはり特異断片が検出されたことから、上に記した理由で、葉を採取してこちらに送付してもらうとき、または、それをマイクロチューブに移す過程でクロスコンタミネーションを起こしてしまったことが考えられた。そこで、検討した結果、次亜塩素酸で表面に付着した別のカンキツからコンタミネーションしたウイロイドを分解することにより、この問題を解決することができた (図 4-43)。それだけでなく、カンキツウイロイドの陽性試料に対し同様の処理を加えると特異バンドのシグナルが強くなった

ことから、次亜塩素酸処理によりウイロイドの溶出効率も高まる利点があった。

RT-PCR 法による高感度検定では、検定樹から葉などの組織を採取するときから、試料間のコンタミネーションが起こらないように使い捨ての手袋を試料毎に変えて使うなどの注意が必要であり、その上で、上に記した処理を施すことにより、検定の信頼性が向上すると思われる。

#### 4.3.8.5. RT-PCR の反応液に TMAC を加えることにより、5 種全てのカンキツウイロイドをより特異的に検出できる。

5 種のカンキツウイロイドを検出するための RT-PCR の条件について検討した。本実験で、用いたプライマーは、日本に存在するカンキツウイロイドを調べる別の実験 (4.1 章参照) で用いたものを使用したために、それぞれの  $T_m$  値は、同じではない (表 3-2 参照)。従って、それぞれのプライマー組に合った温度条件で RT-PCR を行うと、5 種のカンキツウイロイドを検出するために数回の PCR を行わなければいけない。これを回避して、一度に 5 種のカンキツウイロイドの検出を行うためには、 $T_m$  値の等しいプライマーを設計し直すことが、最初に考えられる。ただし、理論上  $T_m$  値の等しい複数のプライマーの実際の至適温度が正しいとは限らない。本実験では、別の手段、TMAC を用いることを検討し、同じ条件下で 5 種のカンキツウイロイドに対する cDNA を同時にほぼ特異的に増幅することができた。AT の相補結合の安定性は、通常の条件下と比べ 3 M TMAC 中で上昇し、ほぼ GC の相補結合の安定性と等しくなることが知られている。Chevet ら (1995) は、PCR 反応液に低濃度の TMAC を加えることで、標的の核酸配列の塩基組成に関係なく特異性と増幅産物の量が上昇することを報告している。そして、カンキツウイロイドの RT-PCR 検出においても同様の効果が示された (図 4-44)。TMAC の使用は、至適条件の違う複数のプライマー組を複数使用する場合、その条件設定を容易にすると思われる。これは、例えば、ブドウやリンゴなど複数のウイロイドの混合感染を診断するときに有効で、一つのチューブ中で、複数の標的を検出するマルチプレックス PCR にも有効と思われた。

#### 4.4.NASBA によるカンキツウイルスの診断

標的核酸に対する cRNA を指数関数的に増幅する NASBA 法が知られている。本法は、PCR と同様、カンキツウイルスの簡便な高感度診断法を確立する上で有効であることが考えられた (2.2.4 章を参照)。そこで、NASBA 法によるカンキツウイルス cRNA を効率的に増幅する方法を検討した。

##### 4.4.1.イノシン5'三リン酸添加によるNASBAの改良

予備実験として、純化ウイルス (CEVd、HSVd) からの cRNA の増幅を試みた。NASBA では、プライマーとして相同プライマーと T7RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加した相補プライマーを用いる。相同プライマーには、RT-PCR で検出に用いたプライマー PCEV-1P と HSV-9 を使用した。相補プライマーは、RT-PCR でそれぞれ用いた PCEV-1M と HSV-8 をもとにして設計した T7PCEV-1M と T7HSV-8 を使用した (表 3-2、図 4-46A)。これらのプライマーを用いて CEVd と CVd-IV (PCEV-1P と T7PCEV-1M)、HSVd (HSV-9 と T7HSV-8) に対し、334 及び 247、290 塩基の cRNA が増幅されることになる。初めに、報告されている通常系 (van German *et al.* 1993) で純化ウイルス (CEVd と HSVd) からウイルス cRNA の増幅を試みたところ、増幅 cRNA のシグナルは、検出されなかった (図 4-47A、上段及び下段のレーン 2)。これは、標的ウイルス RNA が、GC 含量が多く、いわゆる棒状構造と呼ばれる分子内相補結合構造をとり得ることが原因と考え、この構造の安定性を低下する目的で、反応系に ITP を加えることを検討した。NASBA の反応系に 0-4 mM の濃度で ITP を加えたところ、増幅効率の改善が見られた。特異的と思われる増幅断片のシグナルが、CEVd で ITP 濃度 1-4 mM、HSVd で 0.5-4mM の領域でそれぞれ検出された (図 4-47)。その増幅効率のピークは、1.5-2 mM と考えられた (図 4-47B)。最適条件を ITP 濃度 2 mM と定めて以下の実験の NASBA は、この条件で行った。



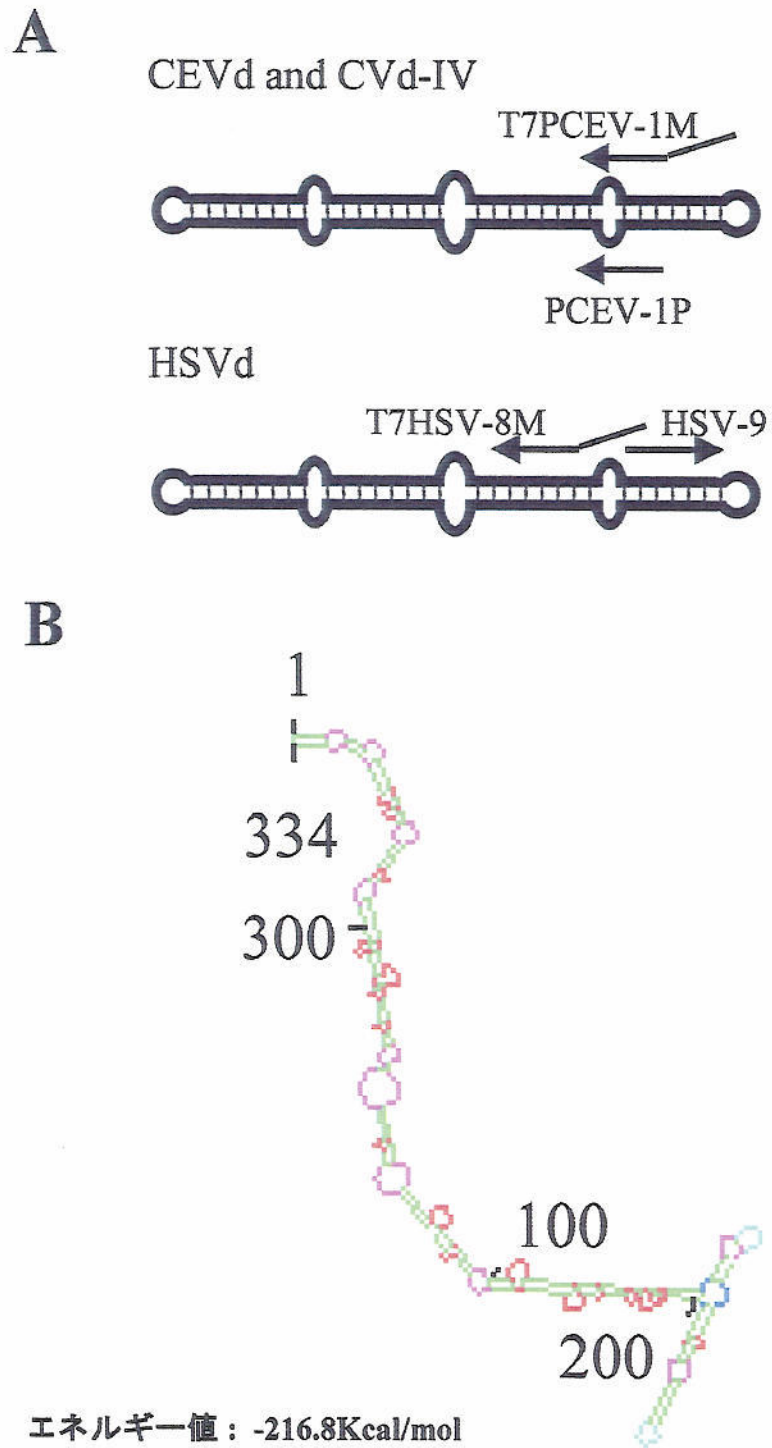


図4-46. CVd増幅用の特異プライマーの相補結合する位置 (A) とCEVdのPCR cRNAの予測される2次構造 (B) の模式図

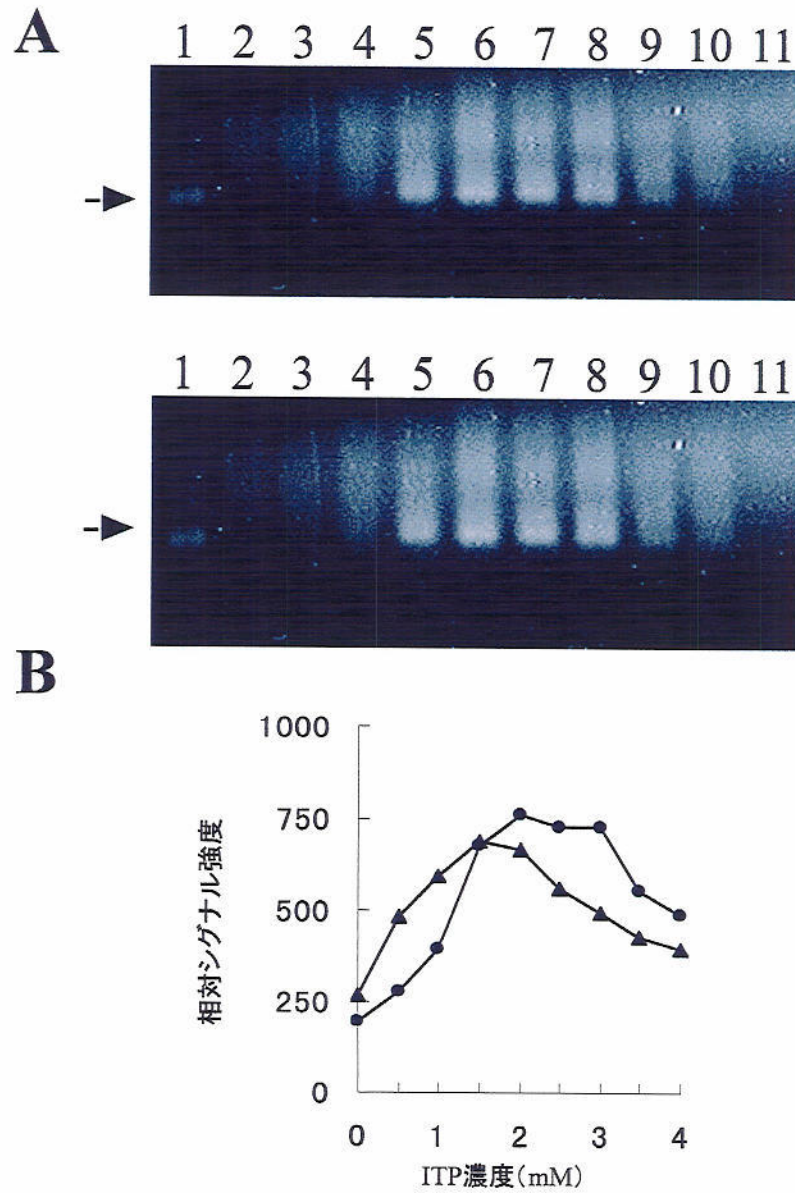


図4-47. (A) 各レーン1 ngの純化CEVd (上段) または、純化HSVd (下段) から増幅したNASBA産物のホルムアルデヒド変性2%アガロースゲル電気泳動像。NASBA反応液の組成は、基本的にvan Gemenら (1993) に従い、それに0または、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 mMのITPを加えて行った (レーン2-10)。レーン11は、純化ウイルスを加えないで行った陰性対照。(B) NASBA産物のシグナルの強さに対するITPの各濃度における効果の比較。CEVd (●) とHSVd (▲) のNASBA産物のシグナルの強さは、アトー社Densitograph 4.0により解析した。

#### 4.4.2. NASBA の検出感度

純化 CEVd の 10 倍の希釈段階 (100 pg-100 ag) から ITP を加えた改良 NASBA により cRNA の増幅し、その増幅産物を尿素変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して銀染色と DIG 標識相同 RNA (hRNA) によるハイブリダイゼーションにより検出した。その結果、両方法により 1 fg の純化 CEVd から検出可能であった (図 4-48、A と B)。他の従来法の検出感度は、DIG 標識 cRNA プローブによるドットプロットハイブリダイゼーションで純化 CEVd 10 pg から検出可能であった (図 4-34)。また、同方法で、純化 CEVd 100 pg から検出可能であることが報告されている (Fonseca *et al.* 1996)。また、NASBA に用いたプライマーとほぼ同じ位置に設計されたプライマー組 PCEV-1P と PCEV-1M を用いた RT-PCR により 100 fg から検出可能であった (図 4-34)。それぞれシグナルの検出法が、違ってはいるため、正確な比較とはいえないが、この改良 NASBA 法は、これらの方法より  $1 \times 10^2$ - $10^5$  倍高い検出感度を示した。一方、CEVd の hRNA プローブを用いて改良 NASBA 法で増幅された HSVd の cRNA とハイブリダイゼーションを行ったところ、プローブと HSVd の cRNA の結合由来のシグナルは検出されなかった。しかし、CEVd の hRNA プローブと純化 HSVd では、弱い非特異シグナルが検出された。また、逆の組み合わせ、つまり HSVd の hRNA プローブと CEVd の NASBA 増幅産物及び純化 CEVd の組み合わせでは、弱い非特異シグナルが観察され、それぞれの hRNA プローブと純化ウイロイドでは、強いシグナルが検出された。そこで、ハイブリダイゼーションの厳密性を高めるために、ハイブリダイゼーション後の洗浄で RNA 分解酵素 (RNase A) による処理を加えたところ、シグナルが減少し、検出感度が大きく低下した。

#### 4.4.3. NASBA によるカンキツウイロイドの検出

カンキツウイロイドの実用診断への適用を目的に、感染カンキツ葉からの抽出核酸からのカンキツウイロイドの検出を試みた。核酸抽出は、RT-PCR での検出のために確立した方法 (Step-BEHC、3.2.2 と 4.3.4 章参照) により抽出した NA-BEHC (感染葉 10 mg 相当分) を鋳型として、CEVd と CVd-IV の検出を試みた (図 4-49)。その結果、それぞれのウイロイドに対し、特異的と思われるバンドが検出された。ただし、CVd-IV の検出においては、プライマーの宿主由来核酸に対する非特異的と思われるバンドが検出された。

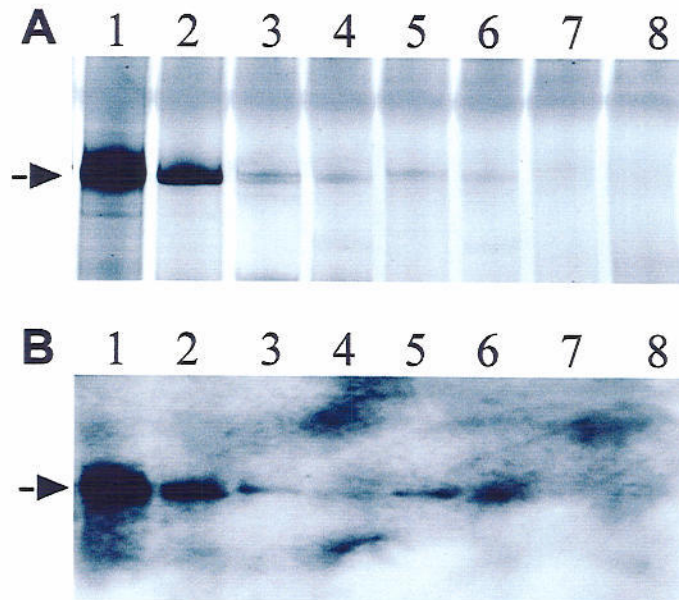


図4-48. 2 mM ITPを加えた改良NASBA法によるCEVdの検出。(A) Marcos & Flores (1994)の方法に従って、NASBA産物をglyoxal/DMSO溶液中において50°Cで1時間保温してエタノール沈殿で精製して、1/5量を尿素変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。検出は、銀染色法により行った。(B) 1/25量のNASBA産物をAと同様に電気泳動し、ナイロンメンブレンに電氣的に転写してDIG標識hRNAプローブでハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは、基本的にLiら(1995)の方法に従ったが、ハイブリダイゼーションは、50°C、その後の高温での洗浄は、60°Cで行い、Rnase A処理は、行わなかった。レーン1-8は、それぞれ、100、10、1 pg、100、10、1 fg、100 agの純化CEVdより増幅したNASBA産物を泳動した。

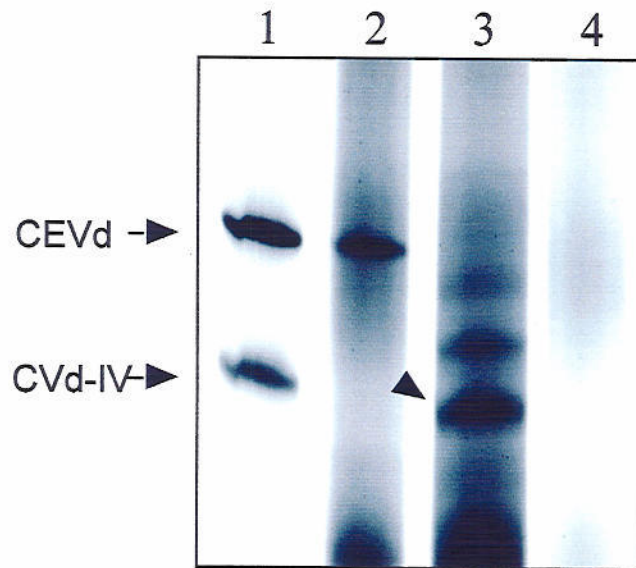


図4-49. 2 mM ITPを加える改良NASBA法による感染カンキツ葉からの抽出核酸中のCEVdとCVd-IVの検出。3ユニットの長のCEVdとCVd-IVの転写RNA (レーン1) とCEVdとCVd-III感染カンキツ葉からの抽出核酸 (レーン2)、HSVdとCVd-III、CVd-IV感染カンキツ葉からの抽出核酸 (レーン3) から増幅したNASBA産物の1/5量をMarcos & Flores (1994)の方法に従って、変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動法した。レーン3の矢印は、CVd-IV由来と思われるバンドを示す。

#### 4.4.4. 考察

##### 4.4.4.1. イノシン 5'三リン酸を加える改良 NASBA 法により、ウイロイド cRNA の増幅量を飛躍的高められる。

カンキツ組織中で、低濃度で存在している CVd の高感度検出法を確立するために、CEVd と CVd-IV、HSVd-cit の NASBA による検出を検討した。しかし、通常の条件下 (van Gemen et al. 1993) で、CEVd と HSVd-cit の cRNA は、増幅しなかった。この理由は、ウイロイドと増幅される cRNA は、GC 含量が高く (CEVd では、約 60%)、また、分子内の相補結合構造 (CEVd の場合、いわゆる棒状構造と呼ばれる構造の時、約 66%の塩基が相補結合する) をとりえるため、結果的に、AMV 逆転写酵素の伸長が阻害されるからであると思われる。一方、RT-PCR 法によりウイロイドの cDNA を増幅する場合もまた、その 2 次構造は、逆転写酵素の伸長活性を低下させると思われる。この場合、反応前の熱変性やより高い温度における逆転写反応が、効果があることが考えられる。しかしながら、その解決策は、NASBA においては使えない。なぜなら、NASBA は、標的ウイロイドと同様の構造をとりうる増幅 cRNA (図 4-46B) を次の鋳型として使いながら、反応が進むため、反応前の熱変性の効果があまり期待できない。実際に、反応前の熱変性により cRNA の増幅の改善は、見られなかった。また、NASBA は、3 つの酵素が協調して反応が進むため、逆転写酵素以外について耐熱性の酵素がこれまで、報告されていないことを考えると、より高温での反応はできないためである。

この問題を解決するために、イノシン (ITP の塩基部分で、グアニンの 2-アミノグループを欠いたもの) の使用を検討した。イノシンは、2 重らせん構造を損なうことなくシトシンとチミン、アデニンと相補結合を組むことができる。従って、イノシンが、他の塩基にかわって増幅 RNA 中に取り込まれ、その 2 次構造に影響を与える可能性があると考えた。実際に、グアニンをイノシンと置換するするとオリゴヌクレオチド RNA の 2 次構造の形態や安定性に影響があることが示されている (SantaLucia et al. 1992)。置換させる前の 2 次構造でグアニンとシトシンで 3 つの水素結合を形成していた部分は、置換後イノシンとシトシンの 2 つの水素結合にかわり安定性が低下するためだろう。本実験においても、反応液に加えるイノシンの濃度を高めるに従って、増幅 cRNA の量が増加し、上に示した仮説と同様の効果があったと思われる。

イノシンを NASBA に加える場合に考慮すべきことが 2 つ考えられる。一つは、増幅

cRNA は、イノシンを鎖上に含んでいるために分子内での 2 次構造の安定性が低下すると同時に、分子間でも低下する可能性である。しかし、図 4-48 で示したように、RNA プローブとのハイブリダイゼーションにおいて、十分なシグナルのが得られた。ただし、通常、RNA プローブを用いたとき、特異性を高めるために行われる RNase A 処理をすることにより、バックグラウンドの非特異シグナルばかりでなく特異シグナルも著しく低下した。通常、2 本差を形成している部分は、分解されないにもかかわらず、特異シグナルが減少したことから、取り込まれたイノシンの部分の 2 本鎖構造は、部分的に不安定になり RNase A に対し感受性になっている可能性が考えられた。ハイブリダイゼーションによる検出には、より特異性の高いオリゴヌクレオチドプローブの使用を検討する必要があると思われた。

もう一つ考慮しなければならないのは、イノシンが取り込まれることによる AMV 逆転写酵素と T7RNA ポリメラーゼによる増幅、複製の正確さが損なわれる可能性である。しかしながら、イノシンは、グアニンと同様シトシンとの結合を好むことが報告されているため (Bass & Weintraub, 1988)、増幅 cRNA 中の変異はグアニンからイノシンへの置換だけの可能性が考えられる。実際に、NASBA 増幅産物をクローニングして、クローンの塩基配列約 3,000 塩基を解析して間違いの割合を調べた実験では (Sooknanan *et al.* 1994)、イノシンを加えた場合、間違いの割合が、逆に 0.26-0.29% から 0.03% に低下する結果がでている。本研究でも、増幅 RNA をゲル電気泳動だけでなく、ハイブリダイゼーションでもある程度特異的に検出できているため、ウイロイドの検出同定には十分な増幅 cRNA の正確性は保たれていた。

この改良 NASBA は、リボゾーム RNA やトランスファー RNA、いくつかのウイルスのサテライト RNA などウイロイドと同様の構造を持つ RNA の増幅に有効であろう。

## 5. 結 論

本研究により日本のカンキツには CEVd と CVd-II (HSVd-cit) の他に、CVd-I、CVd-III と CVd-IV が感染していることを明らかにできた。これらのウイロイドを診断する遺伝子診断法として3つの方法、即ち DIG 標識 cRNA プローブによるドットプロットハイブリダイゼーション、RT-PCR と NASBA を用いた。NASBA > RT-PCR > ドットプロットハイブリダイゼーションの順により高感度にウイロイドを検出することができたが、NASBA や RT-PCR によりカンキツとキクからの抽出核酸からウイロイドを検出する場合、さらなる精製過程が必要であった。実用性を考慮すると、高感度の NASBA や RT-PCR がいつも適しているとは限らなく、その目的や植物材料に応じて適した方法を選択するべきである。表 5-1 に、自然宿主からウイロイドを両方法により検出する場合に求められる抽出核酸の純度と量を示した。キクでは、ドットプロットハイブリダイゼーションにより充分検出可能であり、より簡便に核酸を抽出できることを考えると、多数試料の診断では、RT-PCR より実用的と思われる。一方、5 種のカンキツウイロイド全てを診断するためには、標的を核酸試料中で増幅する RT-PCR や改良 NASBA が不可欠と考えられた。

表 5-1. それぞれのウイロイドを検出するために必要な宿主植物からの抽出核酸の量と純度の比較

宿主植物	組織	ウイロイド	検出法			
			ハイブリダイゼーション		RT-PCR	
カンキツ	葉	CEVd	PEX	100 µg	BEHC	1 µg
		CVds	PEX	>10,000 µg	BEHC	100 µg
	樹皮	CEVd	PEX	1,000 µg	n.d.	
キク	葉	CSVd	PEX	100 µg	BEHC	0.1 µg
ホップ	葉	HLVd	PEX	10 µg	PEX	0.1 µg
		HSVd	PEX	100 µg	PEX	1 µg
ジャガイモ	葉	PSTVd	PEX	10 µg	PEX	1 µg
	塊茎	PSTVd	PEX	10 µg	n.d.	

・求められる抽出核酸の純度: PEX と BEHC は、それぞれ抽出核酸 NA-PEX と NA-BEHC を示す。

・求められる抽出核酸の最低量に相当する組織重量。

・CVd-IV は、10 mg のカンキツ葉に相当する抽出核酸においても検出できなかった。

・決定していないことを示す。

NASBA 法は RT-PCR 法と比較すると (表 4-2)、例えば、鋳型核酸中の RNA を選択的に増幅できるため、ゲノム DNA と区別して転写された mRNA やレトロウイルスの RNA ゲノムを特異的に増幅できる利点がある。また、T7RNA ポリメラーゼのプロモーターを



付加するプライマーをかえることにより、相同鎖と相補鎖を区別して増幅することも可能であるため、例えば、RNA ウイルスのゲノムと区別して複製中間体（ゲノム cRNA）からのみ相同鎖 RNA を増幅することもできる。ウイロイドの遺伝子診断に用いる場合を考えると反応時間が短い（最初の 15 分間で  $10^5$  倍まで増幅する、Guatelli *et al.* 1990）、一度の反応で行える、一定温度であるなどの利点を持っている。そして、本研究で改良した NASBA 法は、RT-PCR よりも高感度に CEVd (1 fg) を検出することができた。但し、多数の検定試料を扱う場合、本実験で用いた電気泳動法では実用性が低く増幅産物の解析方法を改良する必要があると思われる。本研究の PEX を用いた簡便核酸抽出法と改良 NASBA 法に、研究史 2.2.5 章で述べた TaqMan 法や AmpliDet 法を組み合わせることにより実用的な高感度検定法が確立できるものと思われる。

表 5-2. NASBA と RT-PCR の比較

	NASBA	RT-PCR
鋳型	ssRNA、(dsRNA と ssDNA、dsDNA) <sup>a</sup>	ssRNA と ssDNA、dsDNA、(dsRNA) <sup>a</sup>
増幅産物	相補鎖 RNA、(二本鎖 RNA) <sup>b</sup>	二本鎖 DNA
反応時間	通常 90 分間	逆転写 30-60 分間と PCR 60-180 分間 <sup>c</sup>
反応条件	41 °C で一定	2-3 段階の温度のサイクルを 30-40 回

a. 反応前に熱変性を加えることによりそれらを鋳型に増幅可能

b. 用いるプライマー組の両方に T7RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を付加した場合

c. 用いる温度制御装置の性能や DNA ポリメラーゼの種類により違ってくる

本研究で用いた方法のカンキツウイロイドの検出における有効性は、表 5-3 に示したようであると考えられた。以上の結果をふまえて、最も感度よく正確に、そして、簡便にカンキツウイロイドを検出するには以下の方法が有効であると結論した。

1. 偽陽性の結果を招かぬように検定カンキツ組織を次亜塩素酸溶液で表面消毒し滅菌水で洗淨する。
2. PEX を用いた簡易法でウイロイドを含む全核酸を抽出し (Step-PEX)、RT-PCR や NASBA の鋳型試料に用いるために、2-ブトキシエタノール抽出及び HCl 処理を行う (Step-BEHC)。
3. 抽出核酸中で低濃度に存在する標的カンキツウイロイドの塩基配列を RT-PCR または NASBA 法により増幅する。
4. 3 の増幅断片をゲル電気泳動により検出するか、増幅断片の特異性を確認するために核酸のハイブリダイゼーションを組み合わせた方法で検出する。

表 5-3. 本研究で用いたカンキツウイロイド検出法の有効性

カンキツウイロイド抽出及び検出法		カンキツウイロイド				
		CEVd	CVd-I	CVd-II	CVd-III	CVd-IV
抽出法 従来法 (3.2.1 と 4.2 章)	検出法 sPAGE DOT *1	N.T.*2	(○)*3 (◎)*3	N.T.	(○)*3	N.T.
2-ブトキシエタノールを用いた改良法 (3.2.1 と 4.2 章)	sPAGE DOT	N.T. ◎	○ ◎	N.T. ◎	N.T. ◎	○ ◎
PEX を用いた簡易法 (3.2.2 と 4.3 章)	Step-PEX	○	○	○	○	×
	Step-PEX + 2-ブトキシエタノールによる分画沈殿	×	N.T.	N.T.	×	N.T.
	Step-PEX + step BEHC	◎	◎	◎	◎	◎
	従来 NASBA 改良 NASBA	×	N.T. ◎	×	N.T. ◎	N.T. ◎

試料間のコンタミネーションを防ぐための検定試料の核酸抽出前処理法 (4.3.6 章)

前処理	抽出法と検出法	CEVd	CVd-I	CVd-II	CVd-III	CVd-IV
処理なし	Step-BECH/RT-PCR	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	×
2% NaOH 及び 2%ホルムアルデヒド溶液による組織表面消毒	Step-BEHC/RT-PCR	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	×
次亜塩素酸ナトリウム溶液による組織表面消毒	Step-BECH/RT-PCR	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.	◎

\* 1. DOT は、DIG 標識 cRNA プローブによるドットプロットハイブリダイゼーション法をしめす。

\* 2. N.T.は、未試験区。

\* 3. 従来法では、カンキツ組織から充分量の核酸が抽出されない場合がある。括弧の中は充分量の核酸が抽出された場合。

## 6. 摘 要

これまで海外で既報の5種のカンキツウイロイドの中で、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。他のカンキツウイロイド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。また、カンキツウイロイドは他の草本植物に感染するウイロイドに比べてカンキツ中で低濃度で存在するために、検出が難しく実用的な診断法が確立されていなかった。これら5種のカンキツウイロイドは、カンキツエキソコーティス病に関与することが示唆されている。そこで、日本のカンキツウイロイドの同定とそれらの高感度検出法の確立を目的に本研究を行った。

1.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、sPAGEにより 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、CEVd と CVd-I、CVd-II、CVd-III、CVd-IV を保毒する事が明らかとなった。

2.日本のカンキツウイロイドの中では CVd-II の一つの塩基配列変異株 (HSVd-cit、Sano *et al.* 1988) 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 の一つ以上の塩基配列変異株の全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.広島産カンキツが保毒する CEVd (CEVd-H) を草本のジヌラとトマトで単離、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 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。

4. 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。

5. 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、祖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 とドットプロット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. 簡易核酸抽出法の確立を目的に、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超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.カンキツとキクの保毒するウイロイドの RT-PCR 法による超高感度検出法の確立を目的に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 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  $\mu\text{g}$  に相当する核酸から 5 種全てのカンキツウイロイドが検出できた。診断のための核酸抽出には、全ての操作をマイクロ遠心チューブ中で行えるカンキツ組織量で充分であり、1 日に多数の検体の処理が可能であると思われた。

8.塩基配列基底増幅法 (NASBA) により通常の条件下でウイロイド cRNA を増幅できなかった。この理由は、ウイロイドが GC 含量が高く、また、分子内の相補結合構造をとりうるからだと考えた。しかしながら、ウイロイド cRNA は、ITP を反応液中に添加することにより、カンキツからの全核酸を鋳型にしても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ウイロイド cRNA の特異性を調べた結果、その増幅の量と増幅の正確性は、ウイロイド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、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。簡易核酸抽出法と組み合わせることにより簡便な実用診断法を確立できると思われる。

## 7. 引用文献

- Allen, R. N. and Dale, J. L. (1981) Application of rapid biochemical methods for detecting avocado sunblotch disease. *Ann. appl. Biol.* 98, 451-461.
- Ashulin, L., Lachman, O., Hadas, R. and Bar-Joseph, M. (1991) Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* 19, 4767.
- Atkins, D., Young, M., Uzzell, S., Kelly, L., Fillatti, J. and Gerlach, L. (1995) The expression of antisense and ribozyme genes targeting citrus exocortis viroid in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* 76, 1781-1790.
- Bass, B. L. and Weintraub, H. (1988) An unwinding activity that covalently modifies its double-stranded RNA substrate. *Cell*, 55, 1089-1098.
- Bar-Joseph, M., Segev, D., Twizer, S. and Rosner, A. (1985) Detection of avocado sunblotch viroid by hybridization with synthetic oligo-nucleotide probes. *J. Virol. Methods* 10, 69-73.
- Ben-Shaul, A., Guang, Y., Mogilner, N., Hadas, R., Mawassi, M., Gafny, R. and Bar-Joseph, M. (1995) Genomic diversity among populations of two citrus viroids from different graft-transmissible dwarfing complexes in Israel. *Phytopathology* 85, 359-364.
- Bonfiglioli, R. G., McFadden, G. I. and Symons, R. H. (1994) In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant J.* 6, 99-103.
- Bonfiglioli, R. G., Webb, D. R., Symons, R. H. (1996) Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by in situ hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.* 9, 457-465.
- Branch, A. D., Benefeld, B. J., Franck, E. R., Shaw, J. F., Varban, M. L., Willis, K. K., Rosen, D. L. and Robertson, H. D. (1989) Interference between coinoculated viroids. *Virology* 163, 538-546.
- Broadbent, P. and Garnsey, S. (1987) Citrus exocortis. In Diener, T. O. (Ed.) *The viroids*, Plenum Press, New York, pp. 235-245.
- Candresse, T., Macquaire, G., Brault, V., Monsion, M. and Dunez, J. (1990) <sup>32</sup>P- and biotin-labeled in vitro transcribed cRNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid and chrysanthemumstunt viroid. *Res. Virol.* 141, 97-107.
- Chevet, E. and Katinka, M.D. (1995) Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* 23, 3343-3344.
- Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F. (1986) Basic Methods in Molecular Biology. *Elsevier*, New York.
- Diener, T. O. (1971) Potato spindle tuber "virus", IV. a replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45, 411-428.
- Diener, T. O. (1983) Viroids. *Adv. Virus. Res.* 28, 241-279.
- Diener, T. O. (1986) Viroid processing a model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 58-62.
- Dulieu, P. and Bar-Joseph, M. (1989) Rapid isolation of double stranded RNA segments from disulphide crosslinked polyacrylamide gels. *J. Virol. Methods* 24, 77-84.
- Duran-Vila, N., Flores, R. and Semancik, J. S. (1986) Characterization of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome. *Virology* 150, 75-84.
- Duran-Vila, N., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R. and Semancik, J. S. (1988) A definition of citrus viroid groups and their relationship to the exocortis disease. *J. Gen. Virol.* 69, 3069-3080.
- Duran-Vila, N. and Semancik, J. S. (1990) Variation in the "cross protection" effect between two strains of citrus exocortis viroid. *Ann. appl. Biol.* 117, 367-377.
- Duran-Vila, N., Pina, J. A. and Navarro, L. (1993) Improved indexing of citrus viroids. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists* 12, 202-211.
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B. and Nielsen, P. E. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules. *Nature* 365, 566-568.
- Fagoaga, C., Semancik, J. S. and Duran-Vila, N. (1995) A citrus exocortis viroid variant from broad bean (*Vicia faba* L.): infectivity and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 76, 2271-2277.
- Fagoaga, C. and Duran-Vila, N. (1996) Naturally occurring variants of citrus exocortis viroid in vegetable crops. *Plant Pathol.* 45, 45-53.
- Fernow, K. H. (1967) Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology* 57, 1347-1352.
- Flores, R. (1986) Detection of citrus exocortis viroid in crude extracts by dot-blot hybridization:

- conditions for reducing spurious hybridization results and for enhancing the sensitivity of the technique. *J. Virol. Methods* 13, 161-169.
- Fonseca, M. E. N., Marcellino, L. H. and Gander, E. (1996) A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in *Citrus Medica* with digoxigenin-labeled RNA probes. *J. Virol. Methods* 57, 203-207.
- García-Arenal, F., Pallas, V. and Flores, R. (1987) The sequence of a viroid from grapevine closely related to severe isolates of citrus exocortis viroid. *Nucleic Acids Res.* 15, 4203-4210.
- Garnsey, S. M. and Randles, J. W. (1987) Biological interactions and agricultural implications of viroids. In Semancik, J. S. (Ed.) *Viroids and viroid-like pathogens*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 127-160.
- Garnsey, S. M., Lee, R. F. and Semancik, J. S. (1993) Lack of cross-protection between citrus exocortis viroid and citrus viroids associated with mild symptoms in Etrog citron. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists* 12, 187-195.
- Gillings, M. R., Broadbent, P., and Gollnow, B. I. (1991) Viroid in Australian citrus: relationship to exocortis, cachexia and citrus dwarfing. *Aust. J. Plant Physiol.* 18, 559-570.
- Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Rala, M. and Alberty, H. (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273, 203-208.
- Gross, H. J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., Alberty, H., Ramm, K. and Sanger, H. L. (1982) Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.* 121, 249-257.
- Guatelli, J. C., Whitfield, K. M., Kwoh, D. Y., Barringer, K. J., Richman, D. D. and Gingeras, T. R. (1990) Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1874-1878.
- Hadas, R., Ashulin, L. and Bar-Joseph, M. (1992) Transmission of a citrus viroid to avocado by heterologous grafting. *Plant Dis.* 76, 357-359.
- Hadidi, A. and Yang, X. (1990) Detection of pine fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods* 30, 261-270.
- Hammond, R., Smith, D. R. and Diener, T. O. (1989) Nucleotide sequence and proposed secondary structure of Columnea latent viroid: a natural mosaic of viroid sequence. *Nucleic Acids Res.* 23, 10083-10094.
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoult, M., Jovin, T. M. and Riesner, D. (1989) Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridization and confocal laser scanning. *EMBO J.* 8, 3941-3949.
- Haseloff, J. and Symons, R. H. (1981) Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 9, 2741-2752.
- Haseloff, J., Mohamed, N. A. and Symons, R. H. (1982) Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature* 299, 316-321.
- Hashimoto, J. and Koganezawa, H. (1987) Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Res.* 15, 7045-7051.
- 畑谷 達児 (1987) ウイロイドの検出に関する研究. 北海道大学農学部修士論文.
- Hataya, T., Hikage, K., Suda, N., Nagata, T., Li, S., Itoga, Y., Tanikoshi, T. and Shikata, E. (1992) Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 58, 677-684.
- Hataya, T., Inoue, A. K. and Shikata, E. (1994) A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection. *J. Virol. Methods* 46, 223-236.
- Hataya, T., Nakahara, K., Ohara, T., Ieki, H. and Kano, T. (1998) Citrus viroid Ia is a derivative of citrus bent leaf viroid (CVd-Ib) by partial sequence duplications in the right terminal region. *Arch. Virol.* 143, 971-980.
- Hernandez, C., Elena, S. F. and Flores, R. (1992A) Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup (apscaviroids) and also has sequence homology with viroids from other subgroups. *J. Gen. Virol.* 73, 2503-2507.
- Hernandez, C. and Flores, R. (1992B) Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in-vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 3711-3715.
- 堀崎 篤史 (1996) カンキツエキソコーティスウイロイドの PCR プライマーの検討と広島分離株の塩基配列の変異について. 北海道大学農学部卒業論文.
- Inouye, S. and Hondo, R. (1990) Microplate hybridization of amplified viral DNA segment. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1469-1472.
- 石黒 亮・佐野 輝男・原田 幸雄 (1996) 我が国のコリウス (*Coleus blumei* Benth.) から検出されたウイロイドの全塩基配列と宿主範囲. *日植病報* 62, 84-86.
- 伊藤 隆男・家城 洋之・尾崎 克巳 (1997A) 国内のカンキツの保毒するウイロイド群の

- クローニングおよび塩基配列の決定. *日植病報* 63, 193. (講演要旨)
- 伊藤 隆男・家城 洋之・尾崎 克巳 (1997B) 国内のカンキツより見出された2種の新ウイロイド. *日植病報* 63, 484. (講演要旨)
- 伊藤 伝・佐野 輝男・吉田 幸二 (1998) リンゴゆず果ウイロイド(AFCVd)の塩基配列. *日植病報* 64, 印刷中 (講演要旨)
- Jansen, R. W., Siegl, G. and Leon, S. M. (1990) Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2867-2871.
- Jhingan, A. K. (1992) A novel technology for DNA isolation. *Methods Mol. Cell. Biol.* 3, 15-22.
- Kanematsu, S., Hibi, T., Hashimoto, J. and Tsuchizaki, T. (1991) Comparison of nonradioactive cDNA probes for detection of potato spindle tuber viroid by dot-blot hybridization assay. *J. Virol. Methods* 35, 189-197.
- Keese, P. and Symons, R. H. (1985) Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4582-4586.
- Keese, P., Osorio-Keese, M. E. and Symons, R. H. (1988) Coconut tinangaja viroid sequence homology with coconut cadang-cadang viroid and other potato spindle tuber viroid related RNAs. *Virology* 162, 508-510.
- Kiefer, M. C., Owens, R. A. and Diener, T. O. (1983) Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6234-6238.
- Kievits, T., van Gemen, B., van Strijp, D., Schukkink, R., Dircks, M., Adriaanse, H., Malek, L., Sooknanan, R. and Lens, P. (1991) NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol. Methods* 35, 273-286.
- Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. (1988) Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* 16, 849-864.
- Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. (1989A) A Scheme for viroid classification. *Intervirology* 30, 194-201.
- Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. (1989B) Grapevine viroid 1B, a new member of apple scar skin viroid group contains the left terminal region of tomato planta macho viroid. *Virology* 170, 575-578.
- Lair, S. V., Mirkov, T. E., Dodds, J. A. and Murphy, M. F. (1994) A single temperature amplification technique applied to the detection of citrus tristeza viral RNA in plant nucleic acid extracts. *J. Virol. Methods* 47, 141-152.
- Lakshman, D. K., Hiruki, C., Wu, X. N. and Leung, W. C. (1986) Use of [<sup>32</sup>P]-RNA probes for the dot-hybridization detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods* 14, 309-319.
- Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J. and Hood, L. (1988) A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241, 1077-1080.
- Leone, G., van Schijndel, H. B., van Gemen, B., Schoen, C. D. (1997) Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. *J. Virol. Methods* 66, 1997.
- Leone, G., van Schijndel, H., van Gemen, B., Kramer, F. R. and Schoen, C. D. (1998) Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 2150-2155.
- Levy, L. and Hadidi, A. (1993) Direct nucleotide sequencing of PCR-amplified DNAs of the closely related citrus viroids IIa and IIb (cachecia). *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologist* 12, 180-186.
- Levy, L., Lee, I.-M. and Hadidi, A. (1994) Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *J. Virol. Methods* 49, 295-304.
- Li, S., Onodera, S., Sano, T., Yoshida, K., Wang, G. and Shikata, E. (1995) Gene diagnosis of viroids: comparisons of return-PAGE and hybridization using DIG-labeled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61, 381-390.
- 李世訪・畑谷 達児・古田 和義・堀田 治邦・佐野 輝男・四方 英四郎 (1997) 北海道におけるキク矮化病の発生と電気泳動およびハイブリダイゼーション法によるキク矮化ウイロイドの検出. *北日本病虫研報* 48, 113-117.
- Lima, M. I., Fonseca, M. E. N., Flores, R. and Kitajima, E. W. (1994) Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplast of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch. Virol.* 138, 385-390.
- Logemann, J., Schell, J. and Willmitzew, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* 163, 16-20.
- Lunel, F., Mariotti, M., Cresta, P., de la Croix, I., Huraux, J.-M. and Lefrere, J.-J. (1995) Comparative study of conventional and novel strategies for the detection of hepatitis C virus RNA in serum: amplicor, branched-DNA, NASBA and in-house PCR. *J. Virol. Methods* 54, 159-171.



- Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T. and Miyakawa, T.** (1997) Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* 87, 389-396.
- 真籠 洋・吉川 信幸・高橋 壮 (1998) SSCP 法によるリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) quasispecies の分析. *日植病報* 64, 印刷中 (講演要旨).
- Majlessi, M., Nelson, N. C. and Becher, M. M.** (1998) Advantages of 2'-O-methyl oligonucleotide probes for detecting RNA targets. *Nucleic Acids Res.* 26, 2224-2229.
- Manning, K.** (1991) Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. *Anal. Biochem.* 195, 45-50.
- Mansky, L. M., Andrews, R. E., Durand, D. P. and Hill, J. H.** (1990) Plant virus location in leaf tissue by press blotting. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8, 13-17.
- Marcos, J. F. and Flores, R.** (1994) Improved separation of glyoxalated viroid RNAs and other small nucleic acids in polyacrylamide gels containing urea. *BioTechniques*, 16, 212-214.
- Martínez-Soriano, J. P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C. J. M., Yucel, I., Smith, D. R. and Diener, T. O.** (1996) Mexican papaya viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9397-9401.
- 松川 みどり (1987) ホップ矮化ウイルスのホップ及びカンキツ分離株の検出に関する研究. 北海道大学農学部卒業論文.
- McClure, B. A. and Guilfoyle, T. J.** (1989) Tissue print hybridization. A simple technique for detecting organ- and tissue-specific gene expression. *Plant Mol. Biol.* 12, 517-524.
- McInnes, J. L., Habili, N., and Symons, R. H.** (1989) Nonradioactive, photobiotin-labeled DNA probes for routine diagnosis of viroids in plant extracts. *J. Virol. Methods* 23, 299-312.
- Meinkoth, J. and Wahl, G.** (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138, 267-284.
- Mishra, M. D., Hammond, R. W., Owens, R. A., Smith, D. R. and Diener, T. O.** (1991) Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *J. Gen. Virol.* 72, 1781-1785.
- Morris, T. J., and Wright, N. S.** (1975) Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Amer. Potato J.* 52, 57-63.
- Nagata, Y., Yokota, H., Kosuda, O., Yokoo, K., Takemura, K. and Kikuchi, T.** (1985) Quantification of picogram levels of specific DNA immobilized in microtiter wells. *FEBS Let.* 183, 379-382.
- 中原 健二 (1995A) ウィロイド遺伝子診断法の研究. 北海道大学農学部修士論文.
- 中原 健二・畑谷 達児・上田 一郎 (1995B) カンキツ組織からの核酸抽出の改良法とカンキツウィロイドの遺伝子診断への適用. *日植病報* 61, 647. (講演要旨)
- 中原 健二・畑谷 達児・家城 洋之 (1996A) カンキツ組織からの迅速簡易核酸抽出法とカンキツウィロイドの遺伝子診断への適用. *日植病報* 62, 322. (講演要旨)
- 中原 健二・畑谷 達児・塩飽 邦子・上谷 安正. (1996B) カンキツウィロイドグループ IV の検出と塩基配列. *日植病報* 62, 649. (講演要旨)
- 中原 健二・畑谷 達児・木村 郁夫・四方 英四郎. (1997) 日本で栽培されているジャガイモ品種の potato spindle tuber viroid に対する反応と遺伝子診断. *北日本病虫研報*. 48, 113-117.
- Nakahara, K., Hataya, T. and Uyeda, I.** (1998A) Inosine 5'-triphosphate can dramatically increase the yield of NASBA products targeting GC-rich and intramolecular base-paired viroid RNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 1854-1856.
- Nakahara, K., Hataya, T., Hayashi, Y., Sugimoto, T., Kimura, I. and Shikata, E.** (1998B) A mixture of synthetic oligonucleotide probes labeled with biotin for the sensitive detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods* 71, 219-227.
- Nakahara, K., Hataya, T., Uyeda, I. and Ieki, H.** (1998C) An improved procedure for extracting nucleic acids from citrus tissues for diagnosis of citrus viroids. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, in press.
- Nakahara, K., Hataya, T. and Uyeda, I.** (1998D) A simple, rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridization and RT-PCR. *J. Virol. Methods*, in press.
- 中原 健二・伊藤 伝・吉田 幸二・須崎 浩一 (1998E) リンゴ樹が保毒する ACLSV 分離株のゲノム多様性. *日植病報* 64, 印刷中 (講演要旨).
- Nauer, E. M., Roistacher, C. N., Calavan, E. C. and Carson, T. L.** (1993) The effect of citrus exocortis viroid (CEV) and related mild citrus viroids (CV) on field performance of Washington navel orange on rootstocks. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists* 12, 204-210.
- Navarro, B. and Flores, R.** (1997) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94,

- 11262-11267.
- Niblett, C. L., Dickson, E., Fernow, K. H., Horst, R. K. and Zaitlin, M.** (1978) Cross protection among four viroids. *Virology* 91, 198-203.
- Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. and Buchardt, O.** (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254, 1497-1500.
- 野口 洋子・小林 正彦・嶋田 透 (1995) ポリメラーゼ連続反応によるカイコ核多核体病ウイルス検出技術の簡易化. *日蚕雑* 64, 352-359.
- Nolasco, G., Blas, C., Torres, V. and Ponz, F.** (1993) A method combining immunocapture and PCR amplification in amicrotiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J. Virol. Methods* 45, 201-218.
- Notte, P. L., Minafra, A. and Saldarelli, P.** (1997) A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. *J. Virol. Methods* 66, 103-108.
- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T. and Okada, Y.** (1983) Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res.* 11, 6185-6197.
- 大崎 秀樹・工藤 晟・大津 善弘 (1997) RT-PCR によるリンゴさび果ウイロイド (ASSVd) とホップわい化ウイロイド (HSVd) 検出のための 2 種の迅速抽出法. *日植病報* 63, 193. (講演要旨)
- Olmos, A., Dasi, M. A., Candresse, T. and Cambra, M.** (1996) Print-capture PCR: A simple and highly sensitive method for the detection of Plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 24, 2192-2193.
- Önelge, N.** (1996) Nucleotide sequence of CVd-Ib and CVd-IV viroids collected from citrus gummy bark-diseased sweet orange trees in the east Mediterranean region of Turkey. *J. Plant Dis. Protect.* 103, 482-487.
- Owens, R. A., Smith, D. R. and Diener, T. O.** (1978) Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared in vitro. *Virology* 89, 388-394.
- Owens, R. A. and Diener, T. O.** (1981) Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid spot hybridization. *Science* 213, 670-672.
- Pallás, V. and Flores, R.** (1988) Interaction between citrus exocortis and potato spindle tuber viroids in plants of *Gynura anurantiaca* and *Lycopersicon esculentum*. *Intervirology* 30, 10-17.
- Pandey, R. N., Adams, R. P. and Flournoy, L. E.** (1996) Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol. Bio. Repr.* 14, 17-22.
- Podleckis, E. V., Hammond, R. W., Hurtt, S. S. and Hadidi, A.** (1993) Chemi-luminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot blot and tissue blot hybridization. *J. Virol. Methods* 43, 147-158.
- Puchta, H., Ramm, K., Sängler, H. L.** (1988) The molecular structure of hop latent viroid a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* 16, 4197-4216.
- Puchta, H., Ramm, K., Hadas, R., Bar-Joseph, M., Luckinger, R., Freimueller, K. and Sängler, H. L.** (1989) Nucleotide sequence of a hop stunt viroid HSVd isolate from grapefruit in israel. *Nucleic Acids Res.* 17, 1247.
- Puchta, H., Ramm, K., Luckinger, R., Hakas, R., Bar-Joseph, M. and Sängler, H. L.** (1991) Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* 19, 6640.
- Rakowski, A. G., Szychowski, J. A., Avena, Z. S. and Semancik, J. S.** (1994) Nucleotide sequence and structural features of the Group III citrus viroids. *J. Gen. Virol.* 75, 3581-3584.
- Rezaian, M. A.** (1990) Australian grapevine viroid-evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* 18, 1813-1818.
- Rivera-Bustamante, R. F., Gin, R. and Semancik, J. S.** (1986) Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Anal. Bio-chemistry* 156, 91-95.
- Roistacher, C. N., Calavan, E. C., Blue, R. L., Navapro, L. and Gonzaler, R.** (1977) A new more sensitive citron indicator for detection of mild isolates of citrus exocortis viroid (CEV). *Plant Disease Rep.* 53, 333-336.
- Roistacher, C. N., Pehrson, J. E. and Semancik, J. S.** (1991) Effect of citrus viroids and the influence of rootstocks on field performance of navel orange. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists* 11, 234-239.
- Roistacher, C. N., Bash, J. S. and Semancik, J. S.** (1993) Distinct disease symptoms in *Poncirus trifoliata* induced by three citrus viroids from three specific groups. *Proceedings of the International Organization of Citrus Virologists* 12, 173-179.
- Romero-Durban, J., Cambra, M. and Duran-Vila, N.** (1995) A simple imprint-hybridization method for detection of viroids. *J. Virol. Methods* 55, 37-47.

- Roy, B. P., AbouHaidar, M. G. and Alexander, A. (1989) Biotinylated RNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTV) in plants. *J. Virol. Methods* 23, 149-156.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S., Horn, G. T. Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sänger, H. L. (1972) An infectious and replicating RNA of low molecular weight: the agent of the exocortis disease of citrus. *Adv. Biosci.* 8, 103-116.
- Sänger, H. L., Henkel, J. and Spieker, R. L. (1993) The three viroids of the coleus viroid system demonstrate that new viroid species arise via recombination between the RNA of two parent viroids. *6th Int. Cong. Plant Pathol.* 318. Montreal, Canada. (Abstract)
- Sano, T., Ohshima, K., Uyeda, I., Shikata, E., Meshi, T. and Okada, Y. (1985) Nucleotide sequence of grapevine viroid: a grape vine isolate of hop stunt viroid. *Proc. Jpn. Acad.* 61B, 265-268.
- Sano, T., Hataya, T., Sasaki, A. and Shikata, E. (1986) Etrog citron is latently infected with hop stunt viroid-like RNA. *Proc. Jpn. Acad.* 62B, 325-328.
- Sano, T., Hataya, T. and Shikata, E. (1988A) Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of hop stunt viroid group. *Nucleic Acids Res.* 16, 347.
- Sano, T., Kudo, H., Sugimoto, T. and Shikata, E. (1988B) Synthetic oligo-nucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and citrus exocortis viroid. *J. Virol. Methods* 19, 109-120.
- Sano, T., Hataya, T., Terai, Y. and Shikata, E. (1989) Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen. Virol.* 70, 1311-1319.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R. W., Diener, T. O. and Owens, R. A. (1992) Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10104-10108.
- Sano, T. and Ishiguro, A. (1996) A simple and sensitive non-radioactive microplate hybridization for the detection and quantification of picograms of viroid and viral RNA. *J. Phytopath.* 30, 303-312.
- Sano, T., Li, S-F., Ogata, T., Ochiai, M., Suzuki, C., Ohnuma, S. and Shikata, E. (1997A) Pear blister canker viroid isolated from European pear in Japan. *Annal. Phytopathol. Soc. Jpn* 63, 89-94.
- Sano, T., Nagayama, A., Ogawa, T., Ishida, I. and Okada, Y. (1997B) Transgenic potato expressing a double-stranded RNA-specific ribonuclease is resistant to potato spindle tuber viroid. *Nat. Biotechnol.* 15, 1290-1294.
- Sano, T. and Ishiguro, A. (1998) Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology* 240, 238-244.
- SantaLucia, J. Jr., Kierzek, R. and Turner, D. H. (1992) Context dependence of hydrogen bond free energy revealed by substitution in an RNA hairpin. *Science*, 256, 217-219.
- Schlemmer, A., Roistacher, C. N. and Semancik, S. (1985) A unique, infectious RNA associated with citrus showing symptoms typical of citrus exocortis disease. *Phytopathology* 75, 946-949.
- Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. and Sängner, L. (1985) Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.* 4, 2181-2190.
- Schoen, C. D., Knorr, D. and Leone, G. (1996) Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immunocapture and a fluorogenic 5' nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology* 86, 993-999.
- Schultz, D. J., Craig, R., Cox-Foster, D. L., Mumma, R. O. and Medford, J. I. (1994) RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Mol. Bio. Repr.* 12, 310-316.
- Schumacher, J., Randles, J. W. and Riesner, D. (1983) A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.* 135, 288-295.
- Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D. and Weidemann, H.L. (1986) Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by "return-gel" electrophoresis. *J. Phytopathol.* 115, 332-343.
- Schwingamer, M. W. and Broadbent, P. (1987A) Association of viroids with a graft-transmissible dwarfing symptom in Australian orange trees. *Phytopathology* 77, 205-209.
- Schwingamer, M. W. and Broadbent, P. (1987B) Detection of viroids in dwarfed orange trees by transmission to chrysanthemum. *Phytopathology* 77, 210-215.
- Sellner, L. N., Coelen, R. J. and Mackenzie, J. S. (1992) Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res.* 20, 1487-1490.
- Semancik, J. S. and Weathers, L. G. (1972) Exocortis disease: evidence for a new species of 'infectious' low molecular weight RNA in plants. *Nat. New Biol.* 237, 242-244.
- Semancik, J. S., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R. and Duran-Vila, N. (1988) Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69, 3059-3068.
- Semancik, J. S., Gumpf, D. J. and Bash, J. A. (1992) Interference between viroids inducing exocortis and cachexia diseases of citrus. *Ann. appl. Biol.* 121, 577-583.

- Semancik, J. S., Szychowski, J. A., Rakowski, A. G., Symons, R. H. (1993) Isolates of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *J. Gen. Virol.* 74, 2427-2436.
- Semancik, J. S., Szychowski, J. A., Rakowski, A. G., Symons, R. H. (1994) A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J. Gen. Virol.* 75, 727-732.
- Semancik, J. S., Rakowski, A. G., Bash, J. A. and Gumpf, D. J. (1997) Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of 'valencia' orange. *J. Hort. Sci.* 72, 563-570.
- Serio, F. D., Aparicio, F., Alioto, D., Ragozzino, A. and Flores, R. (1996) Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. *J. Gen. Virol.* 77, 2833-2837.
- Serio, F. D., Daros, J. A., Ragozzino, A. and Flores, R. (1997) A 451-nucleotide circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. *J. Virol.* 71, 6603-6610.
- Singh, R. P., Boucher, A., Lakshman, D. K. and Tavantzis, S. M. (1994) Multimeric non-radioactive cRNA probes improve detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *J. Virol. Methods* 49, 221-234.
- Smits, H. L., van Gemin, B., Schukkink, R., van der Velden, J., Tjong-A-Hung, S. P., Jebbink, M. F. and ter Schegget, J. (1995) Application of the NASBA nucleic acid amplification method for the detection of human papillomavirus type 16 E6-E7 transcripts. *J. Virol. Methods* 54, 75-81.
- Sooknanan, R., Howes, M., Read, L. and Malek, L. T. (1994) Fidelity of nucleic acid amplification with avian myeloblastosis virus reverse transcriptase and T7 RNA polymerase. *BioTechniques* 17, 1077-1085.
- Spieker, R. L., Haas, B., Charng, Y., Freimuller, K. and Sanger, H. L. (1990) Primary and secondary structure of a new viroid 'species' (CbVd1) present in the *Coleus blumei* cultivar 'Bienvenue'. *Nucleic Acids Res.* 18, 3998.
- Spieker, R. L. (1996) The molecular structure of *Iresine* viroid, a new viroid species from *Iresine herbstii* ('beefsteak plant'). *J. Gen. Virol.* 77, 2631-2635.
- Stasys, R. A., Dry, I. B. and Rezaian, M. A. (1995) The termini of a new citrus viroid contain duplications of the central conserved regions from two viroid groups. *FEBS Lett.* 358, 182-184.
- Staub, U., Polivka, H. and Gross, H.J. (1995) Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids. *J. Virol. Methods* 52, 209-218.
- 須田 成志 (1989) ウイロイドの RT-PCR における遺伝子診断法と生物検定、PAGE 検定の比較検定. 北海道大学農学部卒業論文.
- Symons, R. H. (1981) Avocado sunblotch viroid: Primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acid Res.* 9, 6527-6537.
- 田中 彰一 (1963) カンキツの Exocortis について. *日植病報* 28, 88. (講演要旨)
- Thomson, D. and Dietzgen, G. (1995) Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J. Virol. Methods* 54, 85-95.
- Tobe, V. O., Taylor, S. L. and Nickerson, D. A. (1996) Single-well genotyping of diallelic sequence variations by a two-color ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Nucleic Acids Res.* 24, 3728-3732.
- Tyagi, S. and Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol.* 14, 303-308.
- van der Vliet, G. M. E., Schukkink, R. A. F., van Gemen, B., Schepers, P. and Klatser, P. R. (1993) Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) for the identification of mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2423-2429.
- van Gemen, B., Kievits, T., Schukkink, R., van Strijip, D., Malck, L., Sooknanan, R., Huisman, H. G. and Lens, P. (1993) Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBATM during HIV-1 primary infection. *J. Virol. Methods* 43, 177-188.
- Visvader, J. E., Gould, A. R., Bruening, G. E. and Symons, R. H. (1982) Citrus exocortis viroid: Nucleotide sequence and secondary structure of an Australian isolate. *FEBS Lett.* 137, 288-292.
- Visvader, J. E. and Symons, R. H. (1983) Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid. *Virology* 130, 232-237.
- Visvader, J. E. and Symons, R. H. (1985A) Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res.* 13, 2907-2920.
- Visvader, J. E., Forster, A. C. and Symons, R. H. (1985B) Infectivity and in vitro mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicates the site of processing of viroid precursors. *Nucleic Acids Res.* 13, 5843-5856.
- Wah, Y. F. W. C. and Symons, R. H. (1997) A high sensitivity RT-PCR assay for the diagnosis of grapevine viroids in field and tissue culture samples. *J. Virol. Methods* 63, 57-69.
- Welnicki, M., Skrzeczkowski, J., Soltynska, A., Jonczyk, P., Markiewicz, W., Kierzek, R., Imiolczyk,

- B., Zagorski, W.** (1989) Characterisation of synthetic DNA probe detecting potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods* 24, 141-152.
- Welnicki, M. and Hiruki, C.** (1992) Highly sensitive digoxigenin-labelled DNA probe for the detection of potato spindle tuber viroid. *J. Virol. Methods* 39, 91-99.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M., Dunez, J.** (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J. Virol. Methods* 39, 27-37.
- Williams, C. E. and Ronald, P. C.** (1994) PCR template-DNA isolated quickly from monocot and dicot leaves without tissue homogenization. *Nucleic Acids Res.* 22, 1917-1918.
- 山田 峻一 (1984) 病害虫とその防除(14)-4-6. 佐藤 公一・森 英男・北島 博・千葉 勉 (編著) 果樹園芸大事典, 養賢堂, 東京, pp. 1218-1219
- Yang, X., Hadidi, A. and Garnsey, S.M.** (1992) Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* 82, 279-285.
- Yang, X., Yie, Y., Zhu, F., Liu, Y., Kang, L., Wang, X. and Tien, P.** (1997) Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4861-4865.
- Zekanowski, C., Welnicki, M., Skrzeczkowski, J. and Zagorski, W.** (1990) Detection of potato spindle tuber viroid (PSTV) in dormant potato by concatameric cDNA probe. *J. Virol. Methods* 30, 127-130.
- Zhang, Y.-P., Uyemoto, J. K. and Kirkpatrick, B. C.** (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J. Virol. Methods* 71, 45-50.