

# わが国のカンキツから検出されるウイロイドの特性と検出法

北海道大学農学部植物ウイルス病学・菌学講座 <sup>はた</sup> <sup>や</sup> <sup>たつ</sup> <sup>じ</sup>  
 畑 谷 達 児

## はじめに

現在、わが国のカンキツ産地において「不知火」を初めとする新品種でウイロイド汚染が広がっており、深刻な問題となっている。ウイロイドによるカンキツの病害は、カンキツエクソコーティス病として以前より知られている。これまで、その病原体としてカンキツエクソコーティスウイロイド (CEVd) が知られていたが、軽症エクソコーティス病とされていた病害が CEVd によるものではなく、異なる数種のカンキツウイロイド (CVd) によることが最近明らかとなってきた。海外の研究者により、これまでに CVd グループ I, II, III, IV が検出されている。これらのウイロイドは重複感染していることが多く、組み合わせによっては激しい症状をもたらす。いまだ試験・研究中のことが多いが、本稿にこれまでわれわれが取り組んできたわが国のカンキツウイロイドと、その検出法について概説する。

## I ウイロイドについて

ウイロイドは、タンパク質を持たない裸の環状 1 本鎖 RNA で、自己複製する最も小さい植物病原体である。現在知られているウイロイドは 246~375 塩基からなり、多数の分子内相補結合を有した高次構造をとっていると考えられる。ウイロイドを尿素などの変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離すると、分子内相補結合が壊れて環状化し、同じ塩基数の線状分子に比べ、遅く泳動される。これがウイロイドの構造上の特性であり、この特性を持つ RNA をウイロイド様 RNA と呼ぶ。このウイロイド様 RNA が植物に感染し、自立複製して初めてウイロイドであることが証明される。ウイロイドは裸の RNA にもかかわらず、その高次構造のため、非常に安定な核酸病原体で、接木伝染だけでなくナイフやハサミで容易に汁液伝染する。ウイロイドの発病には高温条件が必要で、その病害は盛夏に現れやすいという特徴がある。ウイルス病と同様、治療法が開発されていないため、その早期検定・診断が重要となる。

Characteristics and Detection Methods of Viroids Detected from Citrus in Japan. By Tatsuji HATAYA

(キーワード: カンキツ, ウイロイド, カンキツウイロイド, 検出)

## II カンキツウイロイドについて

カンキツエクソコーティス病は、世界中に広範囲に発生している病害である。1972年にこの病原体はウイロイド (CEVd) と結論された。本病は、わが国では、矮性、耐寒性、耐病性、果実品質の面から台木として最も優れているカラタチやその交雑種の樹皮の剝離や樹勢の衰弱、枯死をもたらす重大病害である。カンキツ類の中では、エトログシトロンが激しく反応し、葉のエピナスティー (epinasty)、葉脈中肋のコルク化やえそ、葉柄基部のえそなどが認められ、樹は萎縮する。草本植物では、トマトとピロードサンシチ (*Gynura aurantiaca*) が明瞭な病徴を現す。

圃場栽植樹での症状の違いや検定植物での反応の差異により、CEVdには病原性の異なる系統が存在すると考えられていた。エトログシトロンに軽いエピナスティーあるいは下垂葉症状のみ認められ、トマト、ピロードサンシチに感染しないことから、当時それらは CEVd の弱毒系統と考えられていた。筆者らは、その病原体の検出を試みている過程で、ホップ矮化ウイロイド (HSVd) と類似のウイロイド様 RNA を発見し (SANO et al., 1986)、その塩基配列を決定して HSVd のカンキツ変異株 (HSVd-cit) として報告した (SANO et al., 1988)。

時を同じくして、1986~88年にかけてカンキツから CEVd とは異なる数種のウイロイド様 RNA が検出されることを、主にスペインの DURAN-VILA とアメリカの SEMANCIK の共同研究グループが報告した。それらのウイロイド様 RNA は、指標植物に対する反応とハイブリダイゼーションによる相同性比較により CVd グループ I~IV に整理、分類され、同じグループでも PAGE での移動度が異なるものに対しては、移動度の遅い順に a, b, c, d とつけて区別した (DURAN-VILA et al., 1988)。これらの内、CVd-II に属するウイロイドは、HSVd と類似のウイロイドであることが示唆されていた。またカンキツカクヘキシアウイロイド (CCaVd) はカクヘキシア (cachexia) 病の病原として報告されたが、CVd-IIb と同定されている (SEMANCIK et al., 1988)。なお、SCHLEMMER ら (1985) は、citron variable viroid (CVaV) を報告したが、後に名前の由来となった症状

表-1 カンキツから検出されるウイロイドとその塩基数

カンキツウイロイド	塩基数	わが国での報告
CEVd	369-375 <sup>a)</sup>	371(畑谷ら, 未発表)
CVd-I a		328(畑谷ら, 1995)
CVd-I b CBLVd	318(ASHULIN et al., 1991) 315-319(BEN-SHAUL et al., 1995)	
CVd-I c		
CVd-II a	302(LEVY and HADIDI, 1993)	
	HSVd-cit	302(SANO et al., 1988)
	HSVd-cit(T)	303(HSU et al., 1994)
CVd-II b	CCaVd 299(LEVY and HADIDI, 1993) HSVd 299(PUCHTA et al., 1989)	
CVd-II c		
CVd-III a	297(RAKOWSKI et al., 1994)	297(中原ら, 1996 a)
CVd-III b	294(RAKOWSKI et al., 1994) (STASYS et al., 1995)	294(中原ら, 1996 a)
CVd-III c		
CVd-III d		
CVd-IV	284(PUCHTA et al., 1991)	286(中原ら, 1996 b)

<sup>a)</sup>: CEVdの塩基配列はカンキツ以外から検出されたものも含めると30種類以上が報告されており、文献については省略した。

が4種のウイロイド(CVd-I b, II a, II b, III b)の混合感染によるもので、彼らがPAGEで検出していたのはI bであったことが明らかとなって、その名前は撤回されている。

これらのカンキツウイロイドの塩基配列が報告されたのは、1991年以降のことである。まず、1991年にCVd-I bの塩基配列が報告され、citrus bent leaf vir-oid (CBLVd)と改名された(ASHULIN et al., 1991)、同年続いてCVd-IVの塩基配列が決定された(PUCHTA et al., 1991)。1993年にはCVd-II aおよびCCVaとされたCVd-II bの塩基配列が報告され、ホップ矮化ウイロイドの変異株であることが証明された(LEVY and HADIDI, 1993)。またCVd-IIIについては、1994年にRAKOWSKIら(1994)がCVd-III aとIII bの塩基配列を報告し、続いてSTASYSら(1995)もCVd-IIIの塩基配列を報告したが、彼らがCVd-III aとして発表した塩基配列は、先にRAKOWSKIら(1994)が発表したCVd-III bと全く同じ配列であった。

われわれは、これらの既報の各CVdの塩基配列を参考にして、本邦産カンキツからのCVdの検出を試み、CEVd, CVd-IIのHSVd-citを含め本邦未報告のCVd-I, III, IVの5グループについて、すべてcDNAクローニングを行い、その塩基配列を解析した(表-1)。これまでわれわれが本邦産カンキツを検定した経験では、CEVdが検出されることはほとんどなく、また、CVd-

IVもあまり検出されない。しかしながら、CVd-I, II, IIIは広く感染しているようで、多くの場合混合感染している。なお、グループ内のa, b, c, dについては、その基準となるのはアメリカとスペインの研究グループのCVdであり、われわれの検出したCVdのa, b, c, dについてはその塩基数から類推できるのみで、同定することはできない。実際われわれが決定したCVd-IVは286塩基で、既報の塩基数より2塩基大きかったが、CVd-IVではa, bの報告はなく、またPAGEで284塩基と286塩基が区別できるかどうかは明らかではない。

なお、以上述べた5種類のカンキツウイロイドは、エトログシトロンアリゾナ861 S-1に感染することから検出可能になったものであり、今後このほかにも新たなウイロイドが検出される可能性は否定できない。

### III カンキツウイロイドの栽培樹への影響

上記のようにカンキツウイロイドが整理されて、各ウイロイドのカンキツ栽培樹に対する影響が明らかになりつつあるが、栽培樹には、通常、複数のカンキツウイロイドが重複感染している場合が多いため、まだ十分把握されていない。最も病原性が強いのが、CEVdであるが、他のCVdは単独では症状が軽いものの、組み合わせによってはCEVdに近い、激しい症状を現すようである。CVd-I, II aおよびIII bの混合感染樹では、無

毒樹に比べ収量が低下し、樹も矮化することが報告されている (NAUER et al., 1987)。また、カラタチ台に接いだバレンシアオレンジに各 CVd を感染させ、9 年後に樹容積、樹幹径調査および台木部における病徴観察を行った報告では、CVd-Ia と IIIb をそれぞれ単独に接種した樹と Ia, IIa および IIIb が混合感染した樹では、樹容積、樹幹径ともに有意に減少し、これらウイロイド保毒樹のカラタチ台では、ピッチングや軽い亀裂などの病徴が確認されている (ROISTACHER et al., 1993)。

カクヘキシア病は、世界中に発生している病原未知の接木伝染性病害である。カクヘキシア病はマンダリン類、タンジェリン類およびキンカン類に発生し、感染樹は樹皮下にピッチングを生じるとともに樹脂を漏出し、激しく発病した樹は、黄化、萎縮して衰弱症状を示し、時には枯死に至る。このカクヘキシア病の病原が CVd-IIIb であることが報告された。これに対し CVd-IIa は、カクヘキシア病を起こさないとされている (SEMANCIK et al., 1988)。CVd-IIIb は、CVd-IIa に 3 塩基の欠失と 2 塩基の置換が認められる配列をしており、共に HSVd の変異株である。HSVd は、わが国のホップ、カンキツのほか、ブドウ、スモモ、モモからも検出され、これまで異なる塩基配列がいくつも報告されている。塩基配列の違いによるウイロイドの病原性の違いは、いくつか報告されており、HSVd では佐野 (弘前大学農学部、私信) が、塩基配列の異なる HSVd 分離株をホップに接種し、その病原性の違いを認めている。ウイロイドの塩基配列では数塩基の違いはよく見られるので、われわれが報告したものは異なる塩基配列の各 CVd もわが国のカンキツには感染しているものと思われる。わが国ではカクヘキシア病は報告されておらず、植物防疫上、特定重要病害虫に指定されているが、HSVd はわが国のカンキツに広く感染している。カクヘキシア病の病原が報告された塩基配列の HSVd だけという保証はなく、その発生に注意が必要である。

#### IV カンキツウイロイドの検出法について

先に述べたように、ウイロイドはタンパク質を持たないため、ウイルスに用いられる ELISA 法などの血清学的診断法が適用できない。生物検定法としては、エトログシトロン、特に感受性で選抜されたエトログシトロンアリゾナ 861 S-1 が用いられ、すべてのカンキツウイロイドに感染して病徴を示す。CEVd の場合は、ピロードサンシチまたはトマトが明瞭な病徴を現し、検定植物として使われている。また、CVd-II の HSVd はキュウリに感染し発病するが、カンキツ樹内での HSVd 濃度

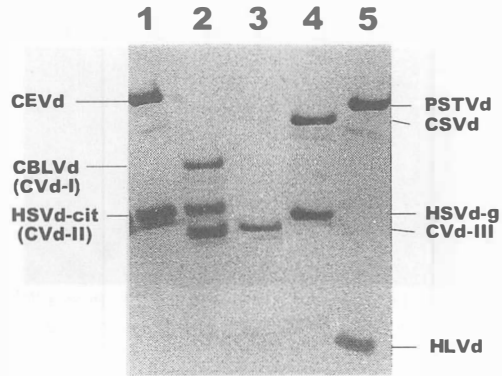


図-1 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sPAGE) によるカンキツウイロイドの検出 (銀染色像)  
 レーン 1 : CEVd, HSVd-cit 混合感染, レーン 2 : CBLVd (CVd-I), HSVd (CVd-II), CVd-III 混合感染, レーン 3 : CVd-III 単独感染, レーン 4 : キク矮化ウイロイド (CSVd) を含む核酸と HSVd-g (ブドウ変異株) を含む核酸の混合試料, レーン 5 : ジャガイモ spindle tuber ウイロイド (PSTVd : 本邦未発生, 許可を得て輸入) を含む核酸とホップ潜在ウイロイド (HLVd) を含む核酸の混合試料  
 レーン 1~3 はエトログシトロンから抽出した核酸試料

は低く、簡易核酸抽出を行って濃度を高めた濃縮液を接種する必要がある。CVd-I ではアボカドに感染することが報告されているものの検定には向かず、CVd-III では、カンキツ類以外の宿主は知られていない。CVd-IV ではキュウリ、トウガン (*Benincasa hispida*) が感染することが報告されているが、無病徴感染のようである。したがって、エトログシトロンへの接ぎ木検定が最も適しており、ウイロイドが増殖するためその検出感度は高いと思われるが、混合感染の場合、病徴からウイロイドの種類を同定することはできず、またウイロイドの発病には 30°C ぐらいの高温条件が必要で、判定までに 2~6 か月の病徴観察を必要とする。

ウイロイドでは、より短期間に感染を判定する方法として、植物から低分子 RNA を抽出し、PAGE でウイロイド特有の環状 1 本鎖 RNA を検出することが行われてきた。特にカンキツの場合、数種のウイロイドが混合感染しているため、分離能を高めた変性ゲル (sequential PAGE : sPAGE) が開発された (RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. et al., 1986)。いまだ未知のウイロイド様 RNA を検出するためにはこの検出法が必要となる。しかしながら、発病前の栽培樹では CVd 濃度が低くて検出困難な場合が多く、確実に診断するにはエトロ

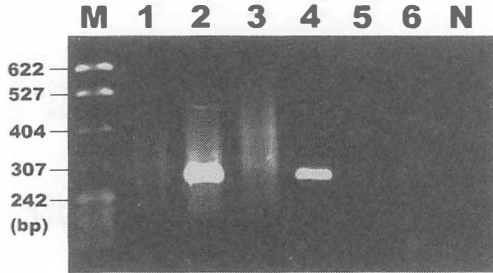


図-2 RT-PCRによるCBLVdの検定:RT-PCR産物のアガロースゲル電気泳動(臭化エチジウム染色像)

レーンM: DNA マーカー (pBR322の *Hap* II 分解), レーン1~6:カンキツ検定試料, レーンN:核酸試料を加えないでRT-PCRを行った陰性コントロール

レーン2と4に観察される約300塩基(bp)弱のバンドがCBLVdの増幅cDNA

グシトロンへの接ぎ木検定の後, エトログシトロンから核酸を抽出してsPAGEを行う必要がある(図-1)。

したがってCVdの感染診断には, 高感度で特異性の高い遺伝子診断法が有効と考えられる。既に塩基配列が決定されたウイロイドでは, カンキツから抽出した核酸に含まれるウイロイドRNAを逆転写(reverse transcription: RT)してcDNAを合成し, ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)により増幅し, 検定することが可能である(RT-PCR法)。また, そのcDNAをクローニングし, 診断用のプローブを作製することができるので, ハイブリダイゼーションによる遺伝子診断が可能である。ハイブリダイゼーションによる検定ではcDNAプローブでは感度が低く検定困難な場合があり, より高感度なcRNAプローブを用いたほうがよい。RT-PCRによる検定を行う場合には, カンキツから抽出した核酸には酵素反応を阻害する物質が多く含まれるので, 純度の高い核酸試料を抽出しないとRT-PCRの失敗を陰性と誤って判定してしまうため慎重に診断することが重要である。また, PCR検定で問題となるのは擬陽性である。これはPCRの感度が非常に高いため, 試料間で起こる微量の核酸試料の混入により, 本来陰性の試料から混入したウイロイドを検出してしまい, 誤って陽性と判断することである。この混入は核酸試料を調整するときにも最も起こりやすく, またわれわれのようにクローン化cDNAを扱う場合にはそのcDNAの混入にも十分注意する必要がある。陰性コントロールには陰性が確認されている試料のほか, RT-PCR時の陰性コントロールとして核酸試料を入れない区を設けて絶えず擬陽性でないか判断することが必要で



図-3 プライマーによる増幅効率の差:CEVdに対するRT-PCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動(臭化エチジウム染色像)

レーン1~7:各プライマー対によるCEVdに対するRT-PCR増幅, レーンN:核酸試料を加えないでRT-PCRを行った陰性コントロール, レーンM: DNA マーカー (pBR 322の *Hap* II 分解)

ある(図-2)。また検定用プライマーの塩基配列とその組み合わせ, PCR条件によっては増幅効率に差が認められる(図-3)。したがって増幅効率の高いプライマーとその条件を検討することが必要であるが, 考えられるプライマー設計の組み合わせは無限にあるので, ある程度増幅するプライマーであれば問題ないように思える。また, 核酸試料の純度とプライマーによっては非特異的増幅バンドが多数見られる場合がある。われわれは多数のバンドが出たときに判断する方法として, ELISA用のマイクロプレートにRT-PCR増幅断片を吸着させて, ウイロイド特異的プローブとハイブリダイゼーションを行い, ELISA同様吸光値で判定するPCR-マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法を報告している。本法およびRT-PCRについては, 斉藤ら(1994)の概説を参照されたい。

技術的にはPCRなどの高感度遺伝子診断法はあるものの, それらの技術をカンキツウイロイドの診断に適用するに当たり, 検討しなければならないことが多く残されている。検定に最適な組織や時期の検討も必要である。ウイロイドは, 葉, 樹皮, 果皮からも検出でき, 実際に店頭で売られている果実からも検出したことがある。CEVdの場合, 葉よりも樹皮のほうが濃度が高く, 他のCVdも同様と考えられるので, ハイブリダイゼーションで検定する場合には樹皮を用いたほうがよいと考えられる。しかしながら, 磨砕が困難で乳鉢, 乳棒などで行わなければならない, 微量の標的遺伝子の混入による擬陽性を避けなければならないRT-PCR検定では不適である。

これらの遺伝子診断法を行うためには検定組織からの核酸抽出が不可欠であるが, この操作がELISA法と比べ労力を要し, また試料間の混入を起こさないように注

意深く行わなければならないので、簡便な核酸抽出法の開発が望まれる。そこで、われわれは検定組織を磨砕しない方法として、検定葉をジチオ炭酸 *O*-エチルカリウム溶液に入れて細胞壁を溶解させ、核酸を抽出する方法を検討して良好な結果が得られたので（中原ら、1996 a）、現在さらに改良法を検討中である。

### おわりに

以上述べたように、わが国のカンキツには海外で報告されている5種のウイロイドがすべて感染していることが明らかとなったが、その感染の実態は十分把握されていない。検定法にはそれぞれ長所、短所があり、われわれは本稿に述べた検定法のそれぞれの結果より総合的に判断している。また、圃場樹の直接診断では、生育条件、品種、時期の違いにより、カンキツ樹内のウイロイドの濃度が低く不均一であることが考えられ、また検定組織の状態などにより感染診断の判定が困難になる。したがって、母樹検定などでは、時間はかかるが、一度エトログシトロンに接いで高温条件下で生育させてウイロイド濃度を高めてからハイブリダイゼーションおよびRT-PCRを併用して診断するのが最も確実と考えられる。今後はさらに検討を重ね、短期間で確実に診断できる検定法を確立していきたいと考えている。

なお、本稿で述べた研究を行うに当たり、試料を提供していただいた横浜植物防疫所の小原達二氏、果樹試験場の家城洋之博士、兵庫県立中央農業技術センターの塩

飽邦子女士に感謝の意を表す。また、現在ともにカンキツウイロイドの研究を行っている当研究室博士課程の中原健二氏に感謝の意を表す。

### 引用文献

- 1) ASHULIN, L. et al. (1991): *Nucleic Acids Res.* 19: 4767.
- 2) BEN-SHAUL, A. et al. (1995): *Phytopathology* 85: 359~364.
- 3) DURAN-VILA, N. et al. (1988): *J. Gen. Virol.* 69: 3069~3080.
- 4) 畑谷達児ら (1995): *日植病報* 61: 279 (講要).
- 5) HSU, Y.-H. et al. (1994): *Virus Genes* 9: 193~195.
- 6) LEVY, L. and A. HADIDI (1993): *Proc. 12th Conf. IOCV, Riverside*: 180~186.
- 7) 中原健二ら (1995): *日植病報* 61: 647 (講要).
- 8) ———ら (1996 a): 同上 62: 322 (講要).
- 9) ———ら (1996 b): 同上 62: 649 (講要).
- 10) NAUER, et al. (1987): *Proc. 10th Conf. IOCV, Riverside*: 204~210.
- 11) PUCHTA, H. et al. (1989): *Nucleic Acids Res.* 17: 1247.
- 12) ——— et al. (1991): *ibid* 19: 6640.
- 13) RAKOWSKI, A. G. et al. (1994): *J. Gen. Virol.* 75: 3581~3584.
- 14) RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. et al. (1986): *Anal. Biochem.* 156: 91~95.
- 15) ROISTACHER, C. N. et al. (1993): *Proc. 12th Conf. IOCV, Riverside*: 173~179.
- 16) 斉藤範彦ら (1994): *植物防疫* 48: 169~173.
- 17) SANO, T. et al. (1986): *Proc. Japan Acad.* 62: 325~328.
- 18) ——— et al. (1988): *Nucleic Acids Res.* 16: 347.
- 19) SCHLEMMER, A. et al. (1985): *Phytopathology* 75: 946~949.
- 20) SEMANCIK, J. S. et al. (1988): *J. Gen. Virol.* 69: 3059~3068.
- 21) STASYS, R. A. et al. (1995): *FEBS Letters* 358: 182~184.

本 会 発 行 図 書

## 『応用植物病理学用語集』

濱屋悦次（前 農林水産省農業環境技術研究所微生物管理科長） 編著

定価 4,893 円（本体 4,660 円） 送料 340 円 B6 版 本文 506 ページ

植物病理学研究に必要な用語について、植物病理学はもちろん、農薬、防除、生化学、分子生物学などについても取り上げ（約 6,800 語）、紛らわしい用語には簡単な説明を付けそれぞれを英和、和英に分けてアルファベット順に掲載し、また、付録には植物のウイルス、細菌、線虫の分類表を付した用語集です。植物病理学の専門家はもちろん広く植物防疫の関係者にとってご活用いただきたい用語集です。

お申し込みは前金（現金書留・郵便振替）で直接本会までお申し込み下さい。