

特集：果樹病原体の病原性検定法

ウイルスの病原性検定法

農研機構 果樹研究所 ブドウ・カキ研究領域 伊 藤 隆 男

はじめに

ウイルスは、246～401塩基の1本鎖環状RNAのみからなる最小の植物病原体である。ポスピウイルス科とアブサンウイルス科の2科に分けられ、前者は5属（ポスピウイルス属、ホスタウイルス属、ココドウイルス属、アブスカウイルス属、コレウイルス属）、後者は2属（アブサンウイルス属、パレモウイルス属）を含む。独自の遺伝情報をコードせず、宿主細胞の代謝系に依存して複製し増殖する。主な伝染経路は、栄養体や接ぎ木による繁殖、または汚染した農器具などを介した汁液伝染によるものであり、一部のウイルスでは種子伝染も大きな問題となっている。果樹類は、接ぎ木や挿し木等の栄養繁殖や、ナイフやハサミ等を使った作業等、ウイルスの感染機会が多い。結果的に、果樹類は、多くのウイルスの自然宿主になっている（家城，2002）。また、果樹類は、高接ぎなどにより、複数のウイルス・ウイルスが混合感染するものも多く、病原性とのかかわりを複雑にしている。本稿では、ウイルスの病原性を疫学的に推測するための方法として網羅的検出法と、生物学的に実証する技術として感染性クローンによる接種試験を、それぞれ総説的に述べる。定法のウイルス検定については成書（家城，2002）をご参考にしていただきたい。

I ウイルスの網羅的検出法

1 ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

以前から、ウイルスの検出には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）が、主として行われてきた。二段階PAGE、二次元PAGE、リターンPAGE、シーケンシャルPAGE等の手法がある。植物から抽出した全RNAより、2M LiCl処理などによって、ウイルスを含む低分子量RNAを抽出する。まず、未変性条件下でPAGEを行い、場合によってはウイルスを含むゲルを切り出し、さらに変性条件下でPAGEを行って、

核酸染色により、特異的バンドの有無を目視により確認する。ウイルスは環状1本鎖RNAであるため、未変性条件下では棒状構造を取り、実際の分子量よりも速く移動する。変性条件下では塩基対が離れて開いた環状構造を取り、実際の分子量よりも遅く移動するので、通常のRNAと区別することができる。環状1本鎖の構造を持つRNA分子であれば特異的に検出できるため、未知のものも含めて検出可能である（家城，2002）。本法でウイルス様RNAが検出されれば、精製し解析を行う。全体に煩雑な手法であり、既知のウイルスの同定には不適である。場合によっては、単一のバンドに、分子量の近い別種のウイルスが混在していることもあり、解析には注意が必要である。しかし、精製ウイルスを病原性試験に使える利点もあり、依然として有用な手法の一つである。

2 ユニバーサルプライマーを用いたRT-PCR

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）は、RNAを鋳型として逆転写を行い、得られたcDNAに特異的なプライマーを用いたPCRを行って、目的とする遺伝子断片を増幅する手法である。プライマーは、20塩基前後のオリゴヌクレオチドであり、標的とする遺伝子の塩基配列の相同鎖と相補鎖を一对用意する。このプライマー対に挟まれた遺伝子領域が増幅することになる。増幅産物は、アガロースゲル電気泳動したものを核酸染色により、バンドとして目視により確認する。PCR用の機械は必要になるが、操作自体は市販のキットも利用できるため、さほど難しい技術ではない。個別のウイルスに特異的なプライマーを用いたRT-PCRによるウイルスの遺伝子診断は、すでに一般的な手法になっている（家城，2002）。複数種のウイルスRNAに共通する塩基配列が存在する場合、この配列を標的としたプライマーを用いたRT-PCRを行うと、その配列を持つウイルスをすべて検出することができる。そのようなユニバーサルプライマーの一つとして、アブスカウイルス属特異的プライマー（PBCV100C, 5'-AGACCCTTCGTCGACGACGA-3'; PBCV194H, 5'-TGTCCCGC TAGTCGAGCGGA-3'）が挙げられる（SANO et al., 2004）。本プライマー対を用いたRT-PCRにより、いくつかのカキから、陽性のバンドが確認できた（図-1）。クロー

Indexing of Viroid Pathogenicity for Fruit Trees. By Takao Iro
 (キーワード：果樹，ウイルス，ポリアクリルアミドゲル電気泳動，ユニバーサルプライマー，ディープシーケンシング，感染性クローン)

ニングして解析したところ、リンゴゆず果ウイルス (AFCVd) とカンキツウイルス VI (CVd-VI) のほかに、新種のカキ潜在ウイルス (PLVd) の計3種がカキに感染していることが初めて明らかとなった (NAKAUNE and NAKANO, 2008)。果樹類からは、多くのアプスカウイルスがこれまでに検出されており (表-1)、同ユニバーサルプライマーを用いてアメリカガキからも新種のアプスカウイルスが検出された (Iro et al., 2013)。ポスピウイルス属では、検出キットもすでに市販されている (Pospiviroid RT-PCR detection kit, Norgen)。これらをうまく利用すれば、比較的簡易に、多種類のウイルスを検出できる。

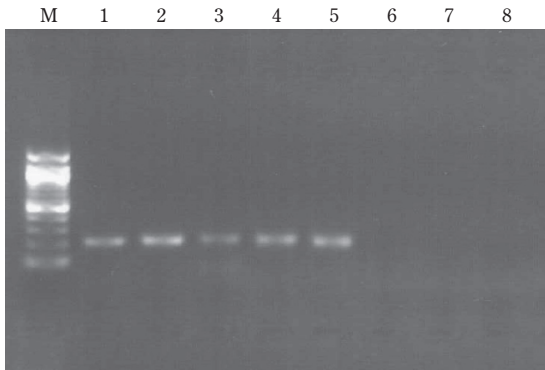


図-1 ユニバーサルプライマー PBCV100C/PBCV194H を用いた RT-PCR によるカキからのアプスカウイルス属の検出

M: DNA マーカー; 1~5: アプスカウイルス保毒カキ; 6, 7: カキ実生; 8: バッファー; 矢印: 特異的増幅断片。

3 次世代シーケンサーを用いたディープシーケンシング

近年、一度に大量の塩基配列データを取得する塩基配列解析装置 (シーケンサー) の開発が進められており、従来法によるシーケンサーに対して、次世代シーケンサーと呼ばれている。超並列的に、鋳型を逐次増幅したものを光検出するもの、鋳型の増幅をせずに光検出するもの、塩基の性質に基づいて検出するものなど様々な装置が研究され、一度に得られるデータ量も飛躍的に増加している。このような次世代シーケンサーを用いた、大規模シーケンス解析 (ディープシーケンシング, DS) により、鋳型とする RNA の塩基配列データを大量取得して、ウイルス・ウイルスに由来する配列を網羅的に検出することができるようになった。次世代シーケンスの装置と試薬は高価であるが、受託解析の費用は以前と比べると随分安くなり、利用しやすくなっている。

全 RNA 中には、リボソーム RNA (rRNA) が圧倒的に高い割合で存在しており、そのまま DS 解析すると rRNA の配列ばかりが検出されることになる。そのため、キットにより rRNA を除去したものや、ウイルス・ウイルスの感染時に生じる短鎖 (20~25 塩基程度) のスモール RNA (sRNA) を、鋳型として解析する。ポリフェノール類や多糖類が多く含まれる果樹から、精製度の高い高濃度の全 RNA を抽出する場合、ブドウやカキでは、化学的な方法として、Reid et al. (2006) の抽出法が有効であった。低分子量 RNA も抽出可能な独自のスピニングを用いた Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen) も全 RNA 抽出に有効であった。全 RNA を委託すれば、依頼内容に沿って、rRNA の除去または sRNA の精製から次世代シーケンサーによるデータ取得

表-1 アプスカウイルス属

ウイルス名	自然宿主	病原性*
リンゴくぼみ果ウイルス (ADFVd)	リンゴ, イチジク	果実の黄斑
リンゴゆず果ウイルス (AFCVd)	リンゴ, ホップ, カキ	ゆず果病
リンゴさび果ウイルス (ASSVd)	リンゴ, ナシ, モモ, アンズ, オウトウ	さび果病, 斑入果病, 奇形果病
ブドウオーストラリアウイルス (AGVd)	ブドウ	
カンキツベントリーフウイルス (CBLVd)	カンキツ	葉の下垂
カンキツ矮化ウイルス (CDVd)	カンキツ	わい化, 葉の下垂
カンキツウイルス V (CVd-V)	カンキツ	葉の下垂
カンキツウイルス VI (CVd-VI)	カンキツ, カキ	葉の下垂
ブドウ黄色斑点ウイルス 1 (GYSVd-1)	ブドウ	葉の黄色斑点
ブドウ黄色斑点ウイルス 2 (GYSVd-2)	ブドウ	葉の黄色斑点
ナシプリスタキャンカウイルス (PBCVd)	ナシ, リンゴ	プリスタキャンカ
カキ潜在ウイルス (PLVd)	カキ	
カキウイルス 2 (PVd2)	カキ	

*種、品種により異なり、無病徴感染も多い。

まで業者が行う。データの解析には、CLC Genomics Workbench (CLC Bio) などのゲノミクス用のソフトウェアを利用するのが便利である。高価なソフトであり、ある程度スペックの高いコンピュータも必要になる。受託解析してもらうことも可能であるが、トライアル版を納品してくれる業者もあり、一定期間に限って、自分で解析を進めることができる。インターネット上には、フリーソフトもあるようなので、自分の環境に合わせて選択すればよいだろう。

得られる塩基配列(リード)の数と長さは、次世代シーケンサーと解析法、鋳型の種類により異なる。例えば、sRNAを鋳型に500万リードが得られたとすると、重複も含めて500万分子のsRNAの配列データが得られたことになる。その後、得られたリードの配列を一定のアルゴリズムに従って結合して、より長い塩基配列断片(コンティグ)を作成する。コンティグの塩基配列について、National Center for Biotechnology Information (NCBI)などの配列情報データベースに対して、BLASTN(塩基配列相同性検索)あるいはBLASTX(アミノ酸配列に変換したものの相同性検索)を行う。既知のウイルス・ウイロイドに由来する配列であれば、E-value(期待値)は0に近く、相同性は100%に近くなる(表-2)。未知のものであっても、他のウイルスやウイロイドに、ある程度有意な相同性があれば検出できる。属レベルで異なる新種ウイルスも検出され、RNAウイルスやウイロイドに限らず、DNAウイルスも検出されている(KREUZE et al., 2009; WU et al., 2010; LOCONSOLE et al., 2012; POOJARI et al., 2013)。一方で、他のウイルス・ウイロイドと有意な相同性のないものであれば、本法でも見つけることはできない。しかし、データベースの拡充は日々進んでいるので、今は検出できないものでも、データベースの更新により、検出できるようになる可能性はある。また、相同性検索に頼らずに、ウイロイドRNAを検出するアルゴリズム(Progressive Filtering of Overlapping small RNAs)も開発された(WU et al., 2012)。sRNAリードの塩基配列のうち、両端が他のsRNAと重複するものだけを残してコンティグを作製すると、環状構造の塩基配列が得られる。本法により、ブドウやモモから既知のウイロイドだけでなく、アブサンウイロイド科の特徴を持つ新規のウイロイド様RNA(Grapevine hammerhead viroid-like RNA, GHVd RNA)が発見された。GHVd RNAは、他のウイロイドとは塩基配列相同性が非常に低く、相同性検索では検出できないレベルのものであった。

DSは、ブドウなどの果樹母樹検疫において、将来的な無毒化検定の切り札となる可能性がある。未知のもの

も含めてウイルス・ウイロイドを網羅的に検出できるので、原因不明のウイルス性病害の病原探索に、現状で最も有効な方法の一つだろう。一方で、本法は、多量の分子を一度に検出できるので、微量のコンタミでも検出してしまふ可能性がある。筆者の解析では、逆転写反応に使用した酵素溶液に微量に含まれるレトロウイルス遺伝子が検出されたことがある。また、データベースが、すべて正しい情報を含んでいるとは限らない。例えば、カンキツエクソコーティスウイロイド(CEVd)の登録塩基配列の一部(アクセッション番号DQ318790, FJ751934)は、論文化されておらず、配列を見ると、CEVdに特異的なプライマーを用いたPCRで増幅した植物ゲノム由来の配列ではないかと考えられるのだが、それらをウイロイドとして引用した論文がPLoS ONEで報告されている(POOJARI et al., 2013)。ウイルス・ウイロイドと相同性を示す配列は多く見つかるが、宿主由来の類似配列や環境からのコンタミが原因と考えられるものは多い。解析で生じた人工的なエラーが配列に含まれることもあり、データの精査は必要である。特に、未知のものを同定する場合、他手法と併用しながら確認を進める必要がある。

II 感染性クローンを用いたウイロイドの接種試験

上述の手法で、新規のウイロイド様RNAが見つかった場合、本当にウイロイドであるかどうかを実証する必要がある。少なくとも、接ぎ木などにより伝染性があるかどうかを確認することは必須である。ウイロイドであることを正式に結論付けるためには、PAGEによって得られた精製RNAの戻し接種や、感染性クローンの接種試験を行うことが求められる。しかし、果樹類のウイロイドは樹体内に低濃度で存在するものも多く、精製RNAを得ることが困難な場合がある。ウイロイドの感染性クローン作製にもコツと労力は必要だが、比較的に利用しやすい技術だろう。感染性クローンは、クローニングしたcDNAの全長ユニットをタンデム(head-to-tail)につないで2量体を作製し、*in vitro* 転写反応により、2量体ウイロイドRNA分子を得るのが基本になる(伊藤ら, 2002)。以下に、CEVdを例として、その概略を紹介する(図-2)。

- ① CEVdゲノムの塩基配列を1箇所のみ切断する制限酵素(BamHIなど)を選択する。
- ② 制限酵素部分の塩基配列を互いの5'末端に重複させて全長を増幅するプライマー対を設計する(CEV-BP, 5'-cgGGATCCCCGGGAAACCTGGA GGAA-3'; CEV-BM, 5'-cgGGATCCCTGAAGGACT TCTTCCC-

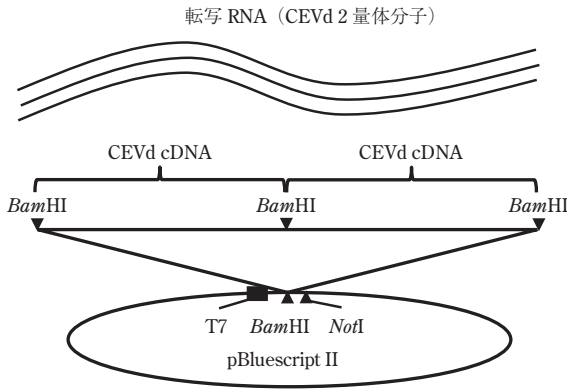


図-2 CEVd 感染性クローンの模式図

3', 下線は BamHI, 小文字は付加配列)。

- ③ RT-PCR を行い, 増幅産物を制限酵素により切断し, 単位長のウイロイド cDNA を精製する。
- ④ 同じ制限酵素で切断処理された, T7 や T3 等の転写反応用プロモーター配列を持つプラスミドベクター (pBluescript II など) を用意する。
- ⑤ ウイロイド cDNA 同士をライゲーション (核酸連結反応) する。
- ⑥ プラスミドベクターを混合し, さらにライゲーションを続ける。
- ⑦ ライゲーション産物を大腸菌に形質転換。
- ⑧ プラスミド DNA の精製を行い, アガロースゲル電気泳動などにより分子量の大きいものを選抜。

表-2 カキのsmall RNA より得られたコンティグのBLASTN 検索結果 (一部)

Query	Number of hits	Lowest E-value	Accession (E-value)	Description (E-value)
NODE_32_length_178_cov_164.252808	160	9.13E-104	JN867592	Chrysanthemum indicum voucher NJ026 chloroplast, complete genome
NODE_34_length_19_cov_762.947388	0		not available	not available
NODE_36_length_156_cov_106.737183	174	1.227E-90	JN867592	Chrysanthemum indicum voucher NJ026 chloroplast, complete genome
NODE_37_length_181_cov_42.823204	100	4.672E-87	JF321292	Fouquieria splendens trnH-psbA intergenic spacer, partial sequence; PsbA (psbA) gene, complete cds; and psbA-trnK intergenic spacer, partial sequence; chloroplast
NODE_38_length_28_cov_7167.714355	228	0.399231	CP002684	Arabidopsis thaliana chromosome 1, complete sequence
NODE_40_length_24_cov_1396.916626	100	7.24E-12	JX159237	Musa environmental sample clone CEg750 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
NODE_41_length_40_cov_14.925000	31	0.0016377	AC245828	Solanum lycopersicum strain Heinz 1706 chromosome 1 clone sle-10 g22 map 1, complete sequence
NODE_49_length_40_cov_1499.224976	100	2.05E-21	JX088669	Xiphidium caeruleum plastid, partial genome
NODE_63_length_39_cov_5.333333	5	6.23333	XM_003650770	Thielavia terrestris NRRL 8126 hypothetical protein (THITE_2110656) mRNA, complete cds
NODE_64_length_74_cov_225.148651	100	1.053E-41	JX159234	Manilkara environmental sample clone CEg747 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
NODE_65_length_201_cov_402.378113	100	1.72E-117	AY727957	Diospyros lotus 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
NODE_66_length_37_cov_23.378378	100	1.265E-19	AB429214	Apple fruit crinkle viroid RNA, Apscaviroid central conserved region, strain: apple isolate, clone: AN-SG24-7
NODE_69_length_17_cov_887.117676	105	1.089E-07	XM_004174010	PREDICTED: Cucumis sativus uncharacterized LOC101229121 (LOC101229121), mRNA
NODE_73_length_43_cov_61.162792	2	0.399231	XM_002934612	PREDICTED: Xenopus (Silurana) tropicalis kelch-like protein 23-like (LOC100496894), mRNA
NODE_78_length_56_cov_1310.035767	102	5.805E-31	XM_004162750	PREDICTED: Cucumis sativus uncharacterized LOC101232254 (LOC101232254), mRNA

太字: ウイロイド由来のコンティグ配列。

⑨ PstI などによる制限酵素断片長多形解析や、シーケンス解析等により、タンデムな多量体であることと、ベクターへの挿入方向を確認する。

⑩ ウィロイド cDNA インサートの下流配列まで転写すると非効率なので、インサートの下流にあり、ウィロイドを切断しない制限酵素 (図-2 では NotI) によりプラスミドを切断し精製。

⑪ MEGAscript T7 (T3) Transcription kit (Ambion) などにより、転写 RNA を作製。

ライゲーションの効率は下がるが、全長ユニットを PCR 増幅してリン酸化した後、ベクターの EcoRV などの平滑末端サイトにクローニングして 2 量体 cDNA を作製しても良い (GANDÍA et al., 2005)。転写された 2 量体 RNA は、ウィロイド分子の全長ユニットを必ず含む。ポスピウィロイド科のウィロイドには、RNA プロセシングに必須の構造領域が存在し、植物体内でその部分が切断され、アブサンウィロイド科であれば、ハンマーヘッド型リボザイム活性により自己切断して、それぞれ単位長ウィロイドが生じ、自律的に増殖すると考えられる。果樹類では、転写 RNA をナイフやカミソリにより、枝に切付けて接種することが多い。品種によって感染率も異なると考えられ、CEVd では、検定植物であるエトログシトロンに切り付けると高い感染率が得られやすい。一方、ウィロイドの感染性クローンとして機能を果たすのは、必ずしも 2 量体 RNA だけではない。1 量体の転写 RNA や、ウィロイド cDNA を組み込んだプラスミド DNA も感染性を示すことが知られる (REANWARAKORN and SEMANCIK, 1998; GANDÍA et al., 2005; MATSUSHITA and PENMETCHA, 2009)。

おわりに

検定植物のあるウィロイドであれば、病原性検定は、さほど難しいものではない (家城, 2002)。しかし、検定植物がなかったり、混合感染の影響があったり、品種

によって無病徴だったり、病徴発現に時間がかかるなど、ウィロイド保毒と病原性とを関連付けることは必ずしも容易ではない。わずかの塩基配列の変異で病徴が大きく異なる点も、解析に厄介な特徴の一つである (REANWARAKORN and SEMANCIK, 1998)。現状では、何らかのウイルス性病害と病原とのかかわりを解析する場合、上述のような手法を用いて、保毒するウイルス・ウィロイドを網羅的に解析し、感染性クローンなどを利用して、それらの病原性を評価するという流れがよいのだろう。分子生物学的手法の進展は今後も続き、技術はもっと利用しやすくなると期待される。ウィロイドの病徴発現には RNA サイレンシングがかかるとする報告もあり (PARISI et al., 2010)、将来的には、病原性とのかかわりについて、異なる角度から解析が進むようになるかもしれない。なお、本稿で紹介した CEVd 感染性クローン作製法については、弘前大学農学生命科学部の佐野輝男教授にご指導いただいた。この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) GANDÍA, M. et al. (2005): Arch. Virol. **150**: 1945 ~ 1957.
- 2) 家城洋之 編 (2002): 原色 果樹のウイルス・ウィロイド病診断・検定・防除, 農山漁村文化協会, 東京, 111 pp.
- 3) 伊藤隆男ら (2002): 日植病報 **68**: 220 (講要).
- 4) ITO, T. et al. (2013): Arch. Virol. **158**: 2629 ~ 2631.
- 5) KREUZE, J. F. et al. (2009): Virology **388**: 1 ~ 7.
- 6) LOCONSOLE, G. et al. (2012): ibid. **432**: 162 ~ 172.
- 7) MATSUSHITA, Y. and K. K. R. PENMETCHA (2009): Phytopathology **99**: 58 ~ 66.
- 8) NAKAUNE, R. and M. NAKANO (2008): Arch. Virol. **153**: 969 ~ 972.
- 9) PARISI, O. et al. (2010): Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **14**: 461 ~ 470.
- 10) POOJARI, S. et al. (2013): PLoS ONE **8**: e64194.
- 11) REANWARAKORN, K. and J. S. SEMANCIK (1998): J. Gen. Virol. **79**: 3163 ~ 3171.
- 12) REID, K. E. et al. (2006): BMC Plant Biol. **6**: 27.
- 13) SANO, T. et al. (2004): J. Gen. Plant Pathol. **70**: 181 ~ 187.
- 14) WU, Q. et al. (2010): Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **107**: 1606 ~ 1611.
- 15) ——— et al. (2012): ibid. **109**: 3938 ~ 3943.