

論文の内容の要旨

論文題目 国内のカンキツが保毒するウイロイドの発生態と診断に関する研究

氏名 伊藤隆男

ウイロイドは、タンパク質の外殻を持たない裸の環状 1 本鎖 RNA のみからなり、自己複製する最も小さい植物病原体である。ゲノム構造や生物学的性質により、現在、2 科 7 属に分類され合計約 30 種のウイロイドが報告されているが、そのうちカンキツの保毒するウイロイドは最も種類が多く、また、複合感染の例も知られている。これまでに我が国のカンキツからも幾つかのウイロイドとその変異株が検出されていたがいずれも断片的な知見に過ぎず、その一方で、国内で最も広く用いられるカラタチ台木に対するウイロイド感染の悪影響が指摘され、さらに新品種への高接ぎ更新ともなう保毒樹の広がり問題となっていた。そこで本研究では、国内のカンキツが保毒するウイロイドについて、その病原性と種類を生物検定ならびに分子生物学的手法などにより解析するとともに、それらすべてのウイロイドを同時に検出できるマルチプレックス RT-PCR を開発し、多様なウイロイドが国内のカンキツ圃場に広く蔓延している現状を明らかにした。

I. 国内のカンキツが保毒するウイロイドの類別と病原性解析

1. sPAGE と RT-PCR によるウイロイドの検出

国内より樹勢衰弱を呈するカンキツ樹の穂木を多数収集し、それらから抽出した低分子 RNA について未変性及び変性条件を組合せた逐次的な同方向への電気泳動 (sPAGE) を行ったところ、非常に多様なウイロイド様 RNA が複合あるいは単独で検出された。次いで RT-PCR を行ったところ、カンキツエクソコーティスウイロイド (*Citrus exocortis viroid*, CEVd), カンキツベントリーフウイロイド (*Citrus bent leaf viroid*, CBLVd), ホップ矮化ウイロイド (*Hop stunt viroid*, HSVd), カンキツウイロイド III (*Citrus viroid III*, CVd-III) およびカンキツウイロイド IV (*Citrus viroid IV*, CVd-IV) の既報の全 5 種が検出された。sPAGE と RT-PCR の結果は基本的に一致したが、sPAGE で CBLVd 様 RNA が検出された試料からは RT-PCR により必ずしも既報の CBLVd が検出されず、新変異株あるいは新種ウイロイドの存在が示唆された。

2. カンキツウイロイド I-LSS の性状解析

既報の CBLVd とは異なる CBLVd 様 RNA を試料 VF10-S より精製し、エトログシトロン系統アリゾ

ナ 861-S1 に接種したところ、CBLVd によるものと類似した若干激しい病徴が観察された。全塩基配列を解析したところ、ウイロイドに特徴的な棒状 2 次構造を持つ 327 塩基の環状 1 本鎖 RNA であることが確認された。その配列は CBLVd と最も高い相同性 (約 84%) を示し、本研究当時 CBLVd は citrus viroid (CVd) -I と呼ばれていたため、便宜上、本ウイロイドをカンキツウイロイド I-LSS (Citrus viroid I-low sequence similarity, CVd-I-LSS) と名付けた。ウイロイドの分類では一般に 90% の塩基配列相同性が種のボーダーラインとされるが、CVd-I-LSS 株の病原性が CBLVd と類似していることから、現在のところ CBLVd の特殊な変異株と考えられる。一方、CBLVd や CVd-I-LSS と異なる CBLVd 様 RNA が確認され、さらに別のウイロイドの存在が考えられた。

3. カンキツウイロイド OS の性状解析

CBLVd とも CVd-I-LSS と異なる CBLVd 様 RNA を試料 OS より精製し、エトログシトロン系統アリゾナ 861-S1 に接種したところ、軽微な葉の下垂と葉柄の褐変を生じた。全塩基配列を解析したところ、ウイロイド特有の分岐した棒状 2 次構造をとる 330 塩基の環状 1 本鎖 RNA であり、中央保存領域の配列から *Apscaviroid* 属に分類された。塩基配列解析で最も近縁と考えられた CVd-III とその相同性が約 68% と低く、エトログシトロンにおける病徴も既報のウイロイドとは異なることから新種であると判断され、由来した試料の名前より、便宜上、カンキツウイロイド OS (Citrus viroid OS, CVd-OS) と名付けた。CVd-OS 特異的 RT-PCR を試みたところ、CBLVd 様 RNA を持つが CBLVd や CVd-I-LSS は検出されなかった試料のすべてから特異的増幅が認められた。以上により、国内のカンキツには、既報の CEVd, CBLVd, HSVd, CVd-III および CVd-IV の 5 種のウイロイドの他に、従来未報告の新ウイロイド CVd-OS および CBLVd の特殊な系統 CVd-I-LSS が存在することが明らかとなった。

4. 国内のカンキツが保毒するウイロイドの多様性と病原性

国内のカンキツが保毒するウイロイドについて、それぞれの特異的 RT-PCR による増幅断片の塩基配列を解析したところ、種内に多様な塩基配列変異株が存在することが確認された。そのうちの幾つかは海外の既報のものと類似あるいは同一の配列を持つもので、保毒穂木の形で国内に侵入あるいは国外へ流出したものと推察された。特に HSVd 変異株の中には、カクヘキシア病を引き起こす変異株と全く同じ配列を持つものの他、カクヘキシア病変異株に特徴的な 6 塩基置換を持つ変異株が 8 株以上あることを見いだした。さらに、パーソンズスペシャルマンダリンによる生物検定を行い、これらがカクヘキシア病の病徴を引き起こすことを確認した。カクヘキシア病の病原 HSVd 変異株を国内で見いだしたのはこれが初めてである。カクヘキシア病はマンダリンなどに樹皮の変色と樹脂の堆積を生じ、激しい場合は萎縮や葉の退緑に加えて樹体が衰弱し、時に枯死する。これらの変異株は潜在感染性のレモンやオレンジから検出されたものであり、その被害は不明であるが、本ウイロイドは植物検疫上の特定重要病害虫に指定されており、わが国のカンキツ栽培の脅威となる恐れがあり警戒が必要である。一方、カンキツにおけるウイロイドの複合感染は単独感染に比べ症状が激しくなることが

知られるが、本研究でも、保毒ウイロイドの種類と変異株数が増えるに従い、エトログシトロン上の症状は激しくなる傾向が見られた。また、台木にエクソコーティス病様の激しい剥皮症状を示すカラタチ台カンキツ樹のいくつかからは CEVd は検出されず、その他のウイロイドの複合感染が認められた。それらのパターンは、CBLVd, HSVd, CVd-III および CVd-IV の複合感染、CBLVd, CVd-I-LSS, HSVd, CVd-III, CVd-IV および CVd-OS の複合感染などであり、接木による複製樹のカラタチ台にも同様の症状が観察された。海外で、CBLVd, HSVd, CVd-III および CVd-IV と考えられるウイロイドの実験的な複合感染によりカラタチ台木に激しい剥皮症状を発現した例はあるが、国内の圃場でエクソコーティス病様症状のいくつかは CEVd 以外のウイロイドの複合感染により引き起こされている可能性が考えられ、病原性が弱いとされている CEVd 以外のウイロイドについても、これまで以上の警戒が必要であると考えられた。

II. カンキツのウイロイドとリンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) の国内での発生調査

1. カンキツのウイロイドと ASGV を同時検出するマルチプレックス RT-PCR の

開発

ウイロイドの診断には遺伝子診断が最も簡易かつ迅速であるが、カンキツのウイロイドは種類が多く個別診断は手間と費用と時間の面で問題があった。そこで、近縁な CBLVd と CVd-I-LSS を相互に判別できるようにした上、カンキツの 6 種の全ウイロイドならびにカラタチ台カンキツ樹の接木部異常病の病原であるリンゴステムグルーピングウイルス (*Apple stem grooving virus*, ASGV, 別名: カンキツタターリーフウイルス) をも含めて、これらすべてを同時に検出できるマルチプレックス RT-PCR を開発した。すなわち、各病原体特異的な 8 組のプライマー対を混合した RT-PCR を行い、反応産物を 6% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、銀染色により検出した。その結果、各病原体特異的で互いに大きさも異なる 1~8 種の増幅断片が確認でき、各病原体単独の RT-PCR の結果とも完全に一致した。

2. マルチプレックス RT-PCR によるカンキツのウイロイドと ASGV の圃場発生調査

一般圃場を中心に採集した国内のカンキツ 217 樹について、マルチプレックス RT-PCR により各ウイロイドおよび ASGV の発生調査を行った。その結果、HSVd が最も頻繁に、次いで CVd-III が多くの樹から検出された。CVd-OS はウンシュウミカンや‘不知火’から、CVd-I-LSS は‘不知火’から多く検出された。CEVd, CBLVd, CVd-IV および ASGV はさほど頻繁には検出されなかった。これらは単独感染もあったが、様々な組合せの複合感染が多く確認され、HSVd, CVd-III および CVd-OS の組合せが最も多く、‘不知火’ではさらに CVd-I-LSS も含めた組合せが多く認められた。‘不知火’は生産者および消費者の人气が高く、初期に未検定の穂木が多く出回り、特に高接ぎ樹でウイロイドの複合感染が多かった。無毒化処理を行って検定済みの穂木、苗木を導入していくことが、その防除対策として重

要であると考えられた。