

ウィロイド・ウイルス性病害の検出と診断

弘前大学農学生命科学部生物資源学科

佐野 輝男

1 診断方法の変遷

1971 年、Diener がウィロイドを発見した当時、植物ウイルスの検出・診断技術は生物検定、血清診断、電子顕微鏡観察が主流であった。分離したウイルスを分画遠心分離とショ糖密度勾配遠心分離などで純化精製し、高純度のウイルス標品で家兎を免疫して抗血清を作り、血清学的診断に利用するのが定法だったように思う。1970 年代後半からエライザ (ELISA) 法が普及し、多検体を 1-2 日で診断することが可能になった。ウィロイドも同様で、より感受性の高い検定植物の探索から始まり、1970 年代後半にポリアクリルアミドゲル電気泳動、1980 年代に核酸ハイブリダイゼーション技術が導入された。1980 年代後半から PCR が高感度診断法として登場し、加速度的に増大を続ける遺伝子情報とその解析技術の進歩を背景に、病害診断の中核技術として普及している。

2 様々な診断方法

生物検定は最も伝統的な診断技術で、ウイルスが「ろ過性病原体」と呼ばれ、その本体が明らかでなかった時代から、感染性を頼りにウイルスの研究が進められた。Stanley はタバコモザイクウイルスの感染性を指標にウイルスの純化・精製を進めて結晶化に成功し、*Potato spindle tuber viroid* の発見には検定植物トマトの存在が大きかった。ホップ矮化ウィロイドの発見も矮化病の病原体がキュウリに感染することが見出されて進展し (Sasaki & Shikata, 1977)、キュウリ検定による大規模サーベイランスがホップ矮化病流行の終息に大きく貢献した。果樹ウイルスでは、リンゴ高接ぎ病の原因ウイルス解明にマルバカイドウ、ミツバカイドウ、バージニアクラブなどが利用され、ブドウ Fanleaf、Fleck、Rugose wood 症の検定には現在も St George、Kober 5BB、LN33 などが利用されている。

血清学的診断法はジャガイモウイルス病等の診断にスライド法、赤血球凝集反応法、ラテックス凝集反応法など、様々な手法・変法が考案・利用されてきた。ELISA の登場後は発色反応を読み取るマルチプレートリーダーが普及し、特異性の高い抗体を元にキット化された試薬も市販され、ウイルス病の診断・同定は精度、スピード、検体処理能力が格段に向上した。

粒子形態のみでウイルスの種を同定することはできないが、新病害やウイルス病類似症状の発生時に、それがウイルスに起因するものか否か、電子顕微鏡で確認することはその後の診断・同定を進める上で重要な情報となる。直接

ネガティブ染色法、超薄切片法など様々な手法が利用され、免疫電顕法は血清学的手法と組合せることで迅速に種を特定することができる。

1970 年代の後半からウイルス・ウィロイド性病害の検出法として電気泳動法 (PAGE) が利用されるようになった。特にウィロイドはその本体が外被タンパク質を持たない低分子量 RNA であるため、血清学的検出法が利用できず、電子顕微鏡観察も実用的ではない。Morris & Smith (1977) は PAGE をウィロイドの診断に利用し、生物検定で数週間から数ヶ月かかっていた検定日数は 2-3 日に短縮された。ウィロイドは環状 1 本鎖 RNA という特異な分子構造を有する。類似の RNA は、ソベモウイルス属の一部に付随するサテライト RNA (ウィルソイド)、B 型肝炎ウイルスに付随する δ 肝炎ウイルスゲノムなどに限られている。環状 1 本鎖 RNA を検出する PAGE 法として、リターン - PAGE (R-PAGE) (Schumacher *et al.*, 1983; Singh & Boucher, 1987)、Sequential - PAGE (sPAGE) (Flores *et al.*, 1985)、2 次元 PAGE (Schumacher *et al.*, 1983) が開発された。いずれの方法も、ウィロイド RNA を未変性状態 (棒状分子) で泳動する第 1 電気泳動と、8M 尿素存在下の変性状態 (開環状分子) で泳動する第 2 電気泳動を組み合わせ、植物の多様な RNA 分子種 (線状) からウィロイド環状 RNA を分離検出する方法である。例えば、sPAGE では第 1 電気泳動終了後、ウィロイド分画 (約 250-400 塩基) をゲルから切り出し、RNA を回収し、第 2 電気泳動で分離する。第 2 のゲルは 8M 尿素を含む 1 × TAE 緩衝液 (pH 6.5) で作成し、1 × TBE (pH 8.3) を泳動緩衝液として電気泳動を行う。ゲル中の緩衝液と異なる泳動緩衝液を用いることでウィロイド環状分子の分離効果を高めることができる (Rivera-Bustamante *et al.*, 1986)。PAGE 分析法はカンキツ類、ブドウ、観葉植物コリウスなどに混合感染している複数のウィロイド種の検出に威力を発揮した。

植物ウイルスの大多数は RNA 型で、複製過程で 2 本鎖 RNA を形成する。被検植物から直接 2 本鎖 RNA を分離して電気泳動で解析することで、既知或は未知の RNA ウイルス感染の有無を検定・探索することができる (Morris & Dodds, 1979)。植物から抽出した全核酸を 15% エタノール存在下で CF11-セルロースに吸着させる。この条件で CF11-セルロースは 2 本鎖 RNA を特異的に吸着し、1 本鎖 RNA や DNA は吸着されない。15% エタノールを含む緩衝液で十分に洗浄した後、エタノールを含まない緩衝液で 2 本鎖 RNA を溶出し、PAGE でバン

ドの有無、本数、サイズを分析する。さらに① DNA 分解酵素 (DNase I) 耐性、② 2 × SSC 溶液中で RNA 分解酵素 (RNase A) 耐性、③ 0.1 × SSC 溶液中で RNase A 感受性、の 3 条件を分析して 2 本鎖 RNA を確認する。果樹や木本類の未知ウイルス性因子の探索、複合ウイルス感染の解明、草本検定植物によるウイルス分離が困難な場合などに有効な方法である。

遺伝子診断法は核酸ハイブリダイゼーション法と PCR に大別される。核酸ハイブリダイゼーション法は 1980 年代初めからウイルス・ウィロイドの検出診断法として利用されてきた (Owens & Diener, 1981)。被検植物から抽出した核酸をニトロセルロース或はナイロンのメンブレンに滴下するドットプロット法、電気泳動で分離後にメンブレンに転写するゲルプロット法、被検植物の切り口から出る汁液を直接メンブレンに押し付けるティッシュプロット法などが考案されている。メンブレン上に固定した核酸は、放射性同位元素或はジゴキシゲニン (DIG) 標識した標的ウイルス・ウィロイドの cDNA や cRNA (プローブ) とハイブリダイゼーションさせて検出する。逆に多数の病原体の cDNA をメンブレンやスライドガラスに吸着させて複数の病原を一括診断するマクロアレイ法も考案されている。

1980 年代後半に実用化された PCR は、ウイルス・ウィロイドに限らず現在最も一般的に利用されている遺伝子増幅型病害検出診断技術である。PCR 反応後、電気泳動で標的遺伝子断片の増幅を検出するが、リアルタイム PCR は反応中の増幅を検出する。また、ICAN 法や LAMP 法など、鎖置換型 DNA ポリメラーゼを使用する等温 DNA 増幅法も遺伝子増幅装置不要の簡便で高感度な診断方法としてキット化され市販されるようになった。

3 私達のウイルス・ウィロイド性病害の診断方法

栽培現場から持込まれる新病害を含む様々な検体を診断する場合、発生状況に応じて様々な手法を段階的に組合せて診断する必要がある。私達も外部機関から個人の栽培者までいろいろな形で病害の診断依頼を受けることがある。最後に、そのような場合の診断手順の流れを紹介したい。

まず検体試料はできるだけ生きた状態で入手する。果樹類では果実の持込みが多いが、可能な限り被検樹の枝も提供してもらい接木等で維持する。非生物的因子に起因する場合は、土を入れ替えて栽培しているうちに回復してくることが多い。ウイルス・ウィロイドに起因する場合は新展葉にも新たな病徴が出現してくる。同時にタバコ、トマト、キュウリ、アカザなどに汁液接種し、ウイルスの分離と病徴の特徴をおさえる。必要に応じて電子顕微鏡観察でウイル

スの種を絞り込み、ELISA や PCR で診断する。PCR で期待される DNA 断片が増幅された場合は、可能な限り塩基配列を解析する。増幅断片のサイズ情報だけでは確定できない。塩基配列情報はウイルスの系統、伝染源及び侵入経路の特定につながる重要な情報となる。特にウィロイドの関与が疑われる場合、まず、被検植物から核酸を抽出する。トリス緩衝液、リン酸緩衝液、CTAB 緩衝液など様々な抽出緩衝液が利用できるが、TRIZOL、Tri Reagent、ISOPANT II、ISOGEN、RNeasy など各種核酸抽出試薬が市販されている。植物種により適不適があるので最初に吟味が必要である。全核酸を抽出後、2M LiCl 可溶性分画を回収することで 400 ヌクレオチド以下の低分子 RNA を濃縮分離できる。この核酸試料を sPAGE、2D-PAGE、R-PAGE 等で分析し、環状 1 本鎖 RNA の有無を調べる。陽性の場合には既知のウィロイドを指標に sPAGE で分子サイズを推定する。さらに、RNA ゲルプロット法で既知ウィロイドー DIG 標識 cRNA プローブと反応させて種を同定し、最終的に種或は属特異的な RT-PCR プライマーでウィロイドの一部或は全部を増幅して塩基配列を解析し、変異体情報を含め、種を確定する。RT-PCR の結果だけで新宿主等の発見を報告する例が見られるが、電気泳動と RNA ゲルプロットなど他の手法と合わせて確認することが必須である。

引用文献

- FLORES, R., N.DURAN-VILA, V. PALLAS, J.S. SEMANCIK (1985) Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine. *J. gen. Virol.* 66: 2095-2102.
- MORRIS, T.J., E.M. SMITH (1977) Potato spindle tuber disease: procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease-free potato tubers. *Phytopathology* 67: 145-150.
- MORRIS, T.J., J.A. DODDS (1979) Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69: 854-858.
- OWENS, R.A., T.O. DIENER (1981) Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic Acid hybridization. *Science* 213: 670-672.
- RIVERA-BUSTAMANTE, R., R. GIN, J.S. SEMANCIK (1986) Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Anal. Biochem.* 156:91-95.
- SASAKI, M., E. SHIKATA (1977) On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proc. Jpn. Acad. Ser.B*, 53: 109-112.
- SCHUMACHER, J., J.W. RANDLES, D. RIESNER (1983) A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Analytical Biochemistry* 135: 288-295.
- SCHUMACHER, J., N. MEYER, D. RIESNER, H.L. WEIDEMAN (1986) Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by 'return' -gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* 115: 332-343.
- SINGH, R.P., A. BOUCHER (1987) Electrophoretic separation of a severe from mild strains of potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* 77: 1588-1591.