

## キクわい化ウイルス (Chrysanthemum Stunt Viroid) 遺伝子のクローニングと全塩基配列

塩飽邦子\*・山元義久\*・岩井豊通\*

### 要 約

兵庫県で発生したキクわい化ウイルス (CSVd) を分離し、その塩基配列を決定した。

- 1 CSVd の抽出には、齊藤の方法にフェノール/クロロフォルム抽出を加えた変法が、夾雑物が少なく酵素反応を阻害せず、操作も簡単で優れていた。
- 2 イギリス分離株の塩基配列をもとに2組4種類のプライマーを合成して、逆転写—Polymerase chainreaction (RT-PCR) を行い cDNA を合成し増幅した。
- 3 PCR 産物をプラントエンド化し pUC 119 の Sma I サイトにクローニングし、塩基配列を決定した。兵庫県で分離した CSVd-RNA の塩基数は 354 塩基でイギリス分離株と同数、オーストラリア分離株より 2 塩基少なかった。RNA のホモロジーは、イギリス分離株とは 99.8%、オーストラリア分離株とは 97.8% であった。

### Cloning and Nucleotide Sequence of Chrysanthemum Stunt Viroid

Kuniko SHIWAKU, Yoshihisa YAMAMOTO and Toyomichi IWAI

### Summary

- (1) Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) was purified by the improved methods of Saito.
- (2) cDNAs of CSVd-RNA were made by the methods of Gubler and Hoffman and amplified by polymerase chain reaction (RT-PCR) using two sets of primers specific to an English isolate of CSVd and cloned in bacterial plasmid pUC119. Nucleotide sequencing was conducted by the dideoxy method.
- (3) CSVd RNA isolated in Hyogo prefecture consists of 354 nucleotides. Nucleotide sequence homology between the Hyogo and English isolates was 99.8% and the Hyogo and Australian isolates 97.8%.

キーワード：キクわい化ウイルス, CSVd, RNA, クローニング, 塩基配列

### 緒 言

キクわい化病はキクわい化ウイルス (CSVd) により起こる病害で、兵庫県下では10年ほど前から発生し、チャボとかスタントと呼んで問題になっていた。CSVd に感染したキクは、草丈が健全株の $\frac{1}{2}$ から $\frac{2}{3}$ になるため、著しく商品価値が低下し、栽培農家に大きな損害を与えている。

ウイルスはタンパク質も細胞膜も持たない裸の核酸で、塩基数が数百の環状、一本鎖 RNA である。CSVd の全塩基配列は Gross ら<sup>1)</sup> により 1982 年に明らかになった。それによると、イギリス分離株は、塩基数は 354

個で分子内に高い相補配列を持っている。Haseloff ら<sup>2)</sup> はオーストラリア分離株の塩基配列を決定し、その全塩基数が 356 個であったと報告している。兵庫県に発生しているキクわい化病の病原ウイルスの塩基配列を決定し、これら既報の系統と比較した。

### 材料および方法

#### 1 ウイルスの抽出

香川県農業試験場から分譲を受けた CSVd 感染キク品種「ミスルト」および非感染「ミスルト」を用いて抽出方法を検討した。上田らの方法<sup>3)</sup>、齊藤の方法<sup>4)</sup>、および齊藤の方法を一部改変した方法 (図 1) で RNA (CSVd を含む) を抽出し、抽出される RNA の量および逆転写、PCR 反応の可否を比較した。逆転写は、

1995年8月31日受理

\* 中央農業技術センター

キク生葉 (0.1 g)	
— 磨碎	+1.2ml 抽出液 (0.1M Tris-Hcl (pH 8.0)、2.8M Nacl、50mM EDTA、1% SDS、0.1%メルカプトエタノール、0.05 g ポリピニールピロリドン) +0.6ml フェノール/クロロフォルム
— 遠心	15,000rpm、30分
液 層	
— 攪拌	+エタノール (終濃度30%)、0.05 g CF-11 セルロース
— 洗浄	+1.5ml 30%エタノール/STE buffer 3回
— 溶出	+0.6ml STE (0.1M Nacl、0.05M Tris-Hcl、1 mM EDTA)
エタノール沈殿	
— 溶解	+0.4ml 1.25M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
— 攪拌	+0.4ml 2-メトキシエタノール
— 遠心	15,000rpm 10分
液 層	
— 攪拌	+酢酸ナトリウム (終濃度0.08M)、CTAB (終濃度0.2%)
— 静置	室温、30分
— 遠心	15,000rpm、10分
沈 殿	
— 洗浄	+1 ml 70%エタノール
— 乾燥	
— 溶解	+100 μl H <sub>2</sub> O
CSVd液	

図1 CSVdの抽出方法(斉藤法の変法)

Gubler & Hoffman<sup>2)</sup>の方法で行った。プライマーは補ら<sup>5)</sup>に準じ、CSVd イギリス分離株の36番から55番までの相補配列(CSVC-1)を合成した(図2)。20 pmolのプライマー、各20 nmolのdNTP、11UのRNase inhibitor、2.5Uの逆転写酵素(宝酒造株式会社製、RAV-2)、1 μlのCSVd液、20 μlの反応液で室温10分、42°Cで1時間反応させ、cDNAを合成した。56番から75番までの相同配列のプライマー(CSVS-1)を合成して5 pmolを先の逆転写反応液5 μlに加え、10×PCR用緩衝液1.5 μl、Taq DNA合成酵素1 U、水を加えて20 μlとしPCRを行った。PCRの反応条件は、94°C 5分を1回、94°C 30秒、53°C 1分、72°C 1分を40回繰返し、72°C 5分を1回である。PCRの後、1.5%アガロースゲルで電気泳動し、増幅されたcDNAを確認した。

## 2 クローニングおよび塩基配列の決定

兵庫県に発生したCSVd-RNAを鋳型とし、前述のプライマーを用いて、ファルマシアバイオテック株式会社製のFirst-Strand cDNA Synthesis KitとTaq DNA合成酵素を用いて逆転写—遺伝子増幅(RT-PCR)を行った。得られたPCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動し、約350塩基のところに現れたバンドを切り出し、宝酒造株式会社製のSUPRECT<sup>TM</sup>-01でDNA断片を回収した。T4 DNA合成酵素でcDNAをプラントエンド化し、pUC119のSma Iサイトに挿入した。また、

①相補PCRプライマー	
(CSVC-1):	TTCCTTTCAAAGCAGCAGGGT
(CSVC-2):	GCCCCAGCCGCGATCTCGTC
相同PCRプライマー	
(CSVS-1):	AAAGAAATGAGGCGAAGAAG
(CSVS-2):	GACAGGAGTAATCCTAAAC
②逆転写反応	
— CSVd液 (95°C、5分で熱変性後急冷)	1 μl
— 相補PCRプライマー (10 pmol/μl)	2
— dNTP (各10nmol/μl)	2
— 10倍逆転写用緩衝液	2
— RNase inhibitor (110U/μl)	0.1
— RAV-2 逆転写酵素 (25U/μl)	0.1
滅菌蒸留水を加えて20 μlとする。 室温10分、42°C 1時間反応、65°C 10分間酵素失活処理	
③PCR反応	
— 逆転写反応液	5 μl
— 相同PCRプライマー (10 pmol/μl)	0.5
— 10倍PCR用緩衝液	1.5
— Taq DNAポリメラーゼ (5U/μl)	0.2
滅菌蒸留水を加えて20 μlとする。 94°C 5分 1回 94°C 30秒・53°C 1分・72°C 1分 40回 72°C 5分 1回	

図2 CSVd検出用RT-PCR条件

プライマー部分の塩基配列の相違を見るため、イギリス分離株の113番から132番までの相補配列(CSVC-2)と153番から171番までの相同配列(CSVS-2)のプライマーを合成し(図2)、同様に逆転写と遺伝子増幅を行いcDNAをクローニングした。塩基配列の決定は、[α-<sup>32</sup>P] dATPを用いてジデオキシ法(宝酒造株式会社製、7-DEAZA Sequencing Kit)で行った。

## 結 果

### 1 ウイロイドの抽出

各抽出方法で得られたRNAを表1に示した。分離方法、ウイロイド保毒の有無によるRNAの収量差には、一定の傾向はなかった。上田の方法はRNA量が非常に少なく、分光光度計では測定できなかった。RT-PCRの結果予想される大きさのPCR産物が得られたのは上田の方法によるものだけであった。過剰な鋳型RNAと夾雑物が反応を阻害していると考えられたので、RNAを希釈してRT-PCRを行ったところ、斉藤法ではcDNAの形成は確認できなかったが、変法では0.01ngまで希釈すればcDNAの増幅が見られた(図3)。RNA抽出に要する日数は、上田の方法が約4日間、その他は約2日間であった。

### 2 クローニングおよび塩基配列

プライマーCSVC-1とCSVS-1を使ったPCR産物が

入ったクローンが16個得られたがこのうち2量体と考えられる700塩基の大きさのものが4個あった。単量体と考えられるpUCSV 1-20とpUCSV 1-21を遺伝子分析に用いた。プライマー CSVC-2とCSVs-2を使ったPCR産物のクローンは13個得られ、このうちのpUCSV2-1を遺伝子の塩基配列決定に供試した。供試した3クローンの塩基配列はよく一致した。兵庫県で分離したCSVd-RNAの塩基数は354個で、その配列は図4の通りであった。

考 察

キクわい化ウイルスのRNAの塩基配列は、Grossらのイギリス分離株とHaseloffらのオーストラリア分離株についての報告がある。本県に発生しているキクわい化ウイルスの抽出方法を検討し、そのRNAの塩基配列を決定し、既報のCSVdと比較した。

1 ウィロイドの抽出

表1 各分離法によるキク生葉1g当たりのRNAの収量

分 離 法	健全キク	CSVd 接種キク
上田法	2.9 μg	ND <sup>1)</sup>
斉藤法	11.2	2.6 μg
斉藤法変法	1.7	4.8

1) ND: Not Detected 分光光度計で測定できなかった。

上田の方法による精製ウイルスは非常に微量しか得られないが、夾雑物が少なく、RT-PCRが正常に行われた。

上田の方法はcDNAの合成と増幅にもっとも適した方法と考えられるが、手法が煩雑で、抽出に4日間を要し、実用的ではなかった。斉藤の方法およびその変法では、cDNAは増幅されなかった。他の植物と比較してキクは多糖類が多く、逆転写反応、PCR反応のいずれかあるいは両方が阻害されたためと考えられる。そこで鋳型RNAをさらに希釈してRT-PCRを行った。斉藤の方法ではRT-PCR産物は見られなかったが、変法ではRNA量を0.01ngまで希釈すればCSVd-cDNAの特異的な増幅が見られた。以上のことから、RT-PCRを行うためには、CSVdの抽出は、斉藤の変法(斉藤法のキク葉磨砕後にフェノール/クロロフォルム抽出を加える)が操作が簡便で反応性もよく最も適していると考えられる。

2 塩基配列

分析したCSVd-cDNAの塩基数は354塩基で、Grossらの発表したイギリス株と同数でHaseloffらの発表したオーストラリア株より2塩基少なかった。塩基の置換はイギリス株とは254番目の塩基がAからTに変わっておりこの部分ではオーストラリア分離株と同じ塩基になっていた。イギリス株とのホモロジーは99.7%であった。オーストラリア株とは7カ所で塩基の違いまたは欠失が見られ、ホモロジーは97.8%となった。ジャガイ

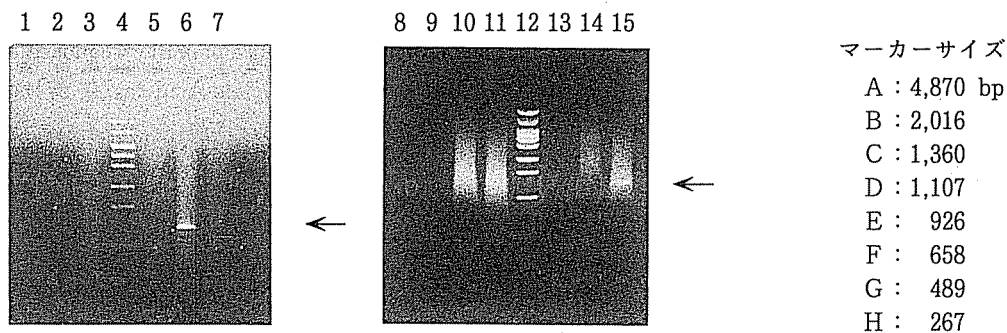


図3 CSVd抽出法の違いがRT-PCRに及ぼす影響

←はCSVd-cDNAのバンド

レーン1: 斉藤法のRNA 100ngを逆転写 (CSVd接種株)	レーン8: 斉藤法のRNA 1ngを逆転写 (健全株)
" 2: " 100ng " (健全株)	" 9: " 1ng " (CSVd接種株)
" 3: 変法のRNA 100ng " (CSVd接種株)	" 10: " 0.1ng " ( " )
" 5: " 100ng " (健全株)	" 11: " 0.01ng " ( " )
" 6: 上田法のRNA 100ng " (CSVd接種株)	" 13: 変法のRNA 1ng " ( " )
" 7: " 100ng " (健全株)	" 14: " 0.1ng " ( " )
" 4,12: pHY マーカー	" 15: " 0.01ng ( " )

H	CGGGACTTAC	TTGTGGTTCC	TGTGGTGCAC	TCCTGACCCT	GCTGCTTTGA	AAGAAAAAGA	60
E	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
						A C	
H	AATGAGGCGA	AGAAGTCCTT	CAGGGATCCC	CGGGGAAACC	TGGAGGAAGT	CCGACGAGAT	120
E	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
H	CGCGGCTGGG	GCTTAGGACC	CCACTCCTGC	GAGACAGGAG	TAATCCTAAA	CAGGGTTTTTC	180
E	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
H	ACCCTTCCTT	TAGTTTCCTT	CCTCTCCTGG	AGAGGTCTTC	TGCCCTAGCC	CGGTCTTCGA	240
E	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
H	AGCTTCCTTT	GGCTACTACC	CGGTGAAAC	AACTGAAGCT	TCAACGCCTT	TTTTTCCAAT	300
E	-----	---A-----	-----	-----	-----	-----	
A	-----	-----	-----	-----	-----	-----C	
H	CTTCTTTAGC	ACCGGGCTAG	GGAGTAAGCC	CGTGGAACCT	TAGTTTTGTT	CCCT	354
E	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A	-----	-----C-----	-----T-----	-----T-----	-----A-----	-----	

図4 兵庫県で発生したCSVd-RNAの塩基配列(DNAで表示)

H: 兵庫分離株

E: イギリス分離株

A: オーストラリア分離株

モ瘦せいもウイロイド (PSTVd), カンキツエキソコーティスウイロイド (CEVd) などでは塩基配列の置換, 挿入, 欠失に伴う病原性の相違が報告されている<sup>9)</sup>。CSVdにおける病原性の相違はまだ確認していないが, 今後病徴の変化と遺伝子配列の相違についても検討していく必要があると考える。

#### 引用文献

- (1) Gross, H. J., G. Krupp, H. Domdey, M. raba, P. Jank, C. Lossow, H. Alberty, K. Ramm and H. L. Saenger (1982): Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid: *European J. of Biochem.* 121, 249-257
- (2) Gubler, V. and M. J. Hoffman (1983): A simple and very efficient method for generating cDNA libraries: *Gene* 30, 263-269
- (3) Haseloff, J and R. H. Symons (1981): Chrysanthemum stunt viroid: primary sequence and secondary structure: *Nucleic Acid res.* 9, 2741-2752
- (4) 平井篤造ら (1988): 新編植物ウイルス学 (養賢堂), 298-304
- (5) 楠 幹生・寺見文宏・寺内英貴・十河和博 (1993): 逆転写-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) によるキク矮化ウイロイドの検出: *関西病虫研報* 35, 7-12
- (6) 斉藤真悦 (1989) 岩手大学農学部修士論文
- (7) Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467
- (8) Uyeda, I., T. Sano and E. Shikata (1984): Purification of cucumber pale fruit viroid: *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 50, 331-338