

学位論文

ジャガイモやせいもウイルスの病原性に関する研究
— 病原性を制御する塩基変異と
ウイルス及び宿主スモール RNA の変動解析 —

対馬 大希

生物生産科学専攻

目次

緒言	1
研究史	3
第1章 PSTVd分子中の構造領域と病原性の相互作用	7
供試材料および実験方法	8
結果	28
考察	56
第2章 SI VirP1 の PSTVd 感染に与える影響	65
供試材料および実験方法	66
結果	67
考察	73
第3章 病原性の異なるPSTVd感染トマトにおけるPSTVd特異的 スモールRNA蓄積量の比較分析	74
供試材料および実験方法	75
結果	76
考察	87
第4章 病原性の異なるPSTVd感染トマトにおけるマイクロRNA の変動分析	88
供試材料および実験方法	89
結果	90
考察	94
摘要	96
引用文献	97
謝辞	104

緒言

植物病原体には菌類，細菌類，センチュウ，ウイルス，ファイトプラズマ，ウイロイド等様々なものが存在し，宿主植物に対して甚大な被害を引き起こすため，防除法を確立するために病原性発現機構の解明は必須である。

近年，農産物の国際化に伴い種苗類が流通・拡大する中で，検疫病害指定ウイロイドが世界的に蔓延しつつあり，植物保護の観点から大きな懸念材料となっている。ウイロイドは，現在知られている最小の植物病原体であり，広い宿主範囲を有し，感染後は様々な程度の病気を引き起こす。全長約 250-400 ヌクレオチドの環状一本鎖ノンコーディング RNA であり，細胞中で自己複製を行う。このタンパク質情報をコードしないウイロイドが何故，どのように病原性を発揮するのかといった課題の解決が急務である。

ウイロイド研究の始まりとしては，1920 年代に北アメリカでジャガイモやせいも病が発見された際に，当時はウイルス病として研究が進められた時であると考えられている。それからおよそ 50 年の時を経て，1971 年に Theodor Otto Diener 氏によってジャガイモやせいも病の病原菌が，低分子量 RNA であることが解明され，ウイロイドと名付けられた (Diener, 1971)。さらに 50 年近くが経過し，現在では 2 科，8 属，35 種 (未分類のウイロイドも合わせると 45 種) のウイロイドが知られている。この中でもジャガイモやせいもウイロイド (PSTVd) はポスピウロイド科の基準種であり，最も研究が盛んに行われているウイロイドである。ウイロイドの病原性決定因子の分子解析は，これまでも PSTVd 変異体のいくつかの組み合わせを用いて行われており PSTVd 分子構造中の P 領域が病原性の程度を決定する上で重要であることが示唆されてきたが，未だ詳細な病原性発現の分子機構は明らかになっていない。

このような背景の中，植物の病原体に対する防御反応である RNA サイレンシング機構が解明された。ウイロイドは強力な RNA サイレンシング誘導体であり，多量のウイロイド由来のスマール RNA (Viroid-sRNA) がウイロイド感染植物に蓄積することから，Viroid-sRNA は，RNA サイレンシングを介してウイロイドの病原性発現において重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら，PSTVd-sRNA が病原性或は病徴発現に関与することを決定づける事例は報告されていない。Viroid-sRNA だけではなく，ウイロイド感染によって発現量が変動するタンパク質をはじめとする宿主側因子の研究も精力的に行われてきたが，やはり病原性発現の分子機構の解明には至っていない。

本研究では、病原性の異なる PSTVd 株間に見られる塩基配列変異と分子構造の変化に着目し、PSTVd の病原性を制御する分子機構に関して、病原性の強弱と塩基変異及びスモール RNA 蓄積量の 3 者の関連性に焦点を当てて分析を行っている。また、宿主側因子に関して、RNAi を用いた遺伝子組換え作物を用いたり、マイクロ RNA 発現量の変動と病原性の強弱を関連付けて総合的に考察することで PSTVd の病原性発現分子機構に関する新たな知見を提供する。

研究史

ウイロイドは、現在知られている最小の植物病原体であり、広い宿主範囲をもち、感染後は様々な程度の症状を引き起こす。全長約 250-400 ヌクレオチド(nucleotides; nt) であり、宿主植物の転写系に依存して自己複製を行うノンコーディングな環状 RNA であり (Daros and Flores, 2004; Diener, 1987), 2 科, 8 属, 35 種に分類されている。ウイロイドは、細胞内局在や複製様式の違いによって、ポスピウイロイド科 (*Pospiviroidae*) とアブサンウイロイド科 (*Avsunviroidae*) の 2 科に大きく分けられる。ポスピウイロイド科のウイロイドは、5 つの構造・機能領域 (左から Terminal left: TL, Pathogenicity domain: P, Central domain: C, Variable domain: V, Terminal right: TR) で構成される棒状の 2 次構造を形成し (Keese and Symons, 1985), 属に特徴的な中央保存領域 (Central conserved region: CCR) を有し、感染細胞の核局在的に非対称型ローリングサークル様式で複製する。アブサンウイロイド科のウイロイドの多くは、枝分かれした棒状の 2 次構造を形成し、中央保存領域は見られず、ハンマーヘッド型リボザイムの保存配列を有し、感染細胞の葉緑体局在的に対称型ローリングサークル様式で複製する。さらに、ウイロイドは、宿主細胞に侵入後、宿主の転写系に依存した複製様式をとり、複製後はプラズモデスマータを通じて隣接細胞へ侵入し、師部輸送系を通じて全身に拡がること報告されている (Branch and Robertson, 1984; Ding, 2010; Ding and Itaya, 2007; Flores et al., 2005; Sanger, 1987; Tabler and Tsagris, 2004)。病原体としてその伝染と流行が国際検疫上の懸念材料となっているだけではなく、非常に矮小で特異な分子構造を持つウイロイドは、RNA 全般における複製能と病原性、植物体内における RNA 輸送、RNA の分子進化と宿主適応など、様々な宿主-病原体相互作用について研究するための魅力的なツールであるといえる。

ジャガイモやせいもウイロイド (*Potato spindle tuber viroid*; PSTVd) はポスピウイロイド科の基準種であり、ナス科 (*Solanaceae*), キク科 (*Asteraceae*), イワタバコ科 (*Gesneriaceae*), クスノキ科 (*Lauraceae*) 等、非常に広い宿主範囲を有している。ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) やトマト (*Solanum lycopersicum*) は、PSTVd の感受性宿主であり、矮化や上偏生長、葉の奇形、葉脈壊死、花の斑入り症状、塊茎のやせいもや亀裂症状 (ジャガイモ) 或は果実サイズの低下 (トマト) 等、様々な症状がその病徴として現れる。病徴の程度は、宿主と PSTVd 分離株間の組合せによって変化する。数多くの PSTVd 変異体が報告されており (Góra et al., 1994; Gross et al., 1978, 1981; Herold

et al., 1992; Lakshman and Tavantzis, 1993; Nie, 2012; Owens et al., 1992, 2009; Puchta et al., 1990), 大抵の場合その変異箇所は P 或は V 領域に集中している. 自然界から単離された病原性の異なる PSTVd 分離株の塩基配列比較分析によって, P 領域が病原性の決定において主要な役割を果たすことが強く支持されているが (Góra et al., 1994, 1996; Owens et al., 1995, 1996; Schmitz and Riesner, 1998; Schnölzer et al., 1985), PSTVd と同じポスピウイルス属に属する *Citrus exocortis viroid* (CEVd) では, 分子内の P 領域以外の構造領域も複製能や病原性に関与を示す結果が多数報告されている (Chaffai et al., 2007; Murcia et al., 2011; Sano et al., 1992; Škorić et al., 2001; Visvader and Symons, 1985, 1986). PSTVd の弱毒, 強毒或は致死型株間の P と V 領域を交換するように構築した 6 つのキメラ変異体を用いたトマトへの感染性試験では, P 領域が直接的に病徴の強さの決定に関与していたが, 病徴の程度は必ずしもウイルスの蓄積量に一致しなかった (Góra et al., 1996). P 領域内の突然変異解析は, pre-malting 領域 1 (PM1) を安定化させる塩基変異が PSTVd の複製及び蓄積量を減少させることを示した (Owens et al., 1995). P 領域に加えて, V 領域中の単一の塩基変異導入により PSTVd 蓄積量が激減或は複製能を失うことが知られ (Owens et al., 1991; Hu et al., 1996), タバコ (*Nicotiana tabacum*) では非感染であった KF440-2 分離株がループ E 内の 259 番塩基を C から U へ置換しただけで感染力を獲得する例も報告されている (Wassenegger et al., 1996). また, CCR 内の 257 番塩基の U から A への置換は, PSTVd 基準株 (PSTVd-Intermediate; 最も研究に用いられている変異体の 1 つであり, 中程度の症状を引き起こす) を感染植物の重篤な発育阻害及び早熟 (果実形成前に枯死する) をもたらす致死型株に変化させることから, P 領域から独立して機能する新たな病原性決定因子とも言える (Qi and Ding, 2003).

しかしながら, ウィロイドは病原体として発見されたものであるが, 宿主に感染したからといって必ずしもその病原性を発揮するわけではない. むしろ, 感染後にウィロイドは病気を引き起こすことなく潜伏感染して存在することが多い. 特に, 多くのキク科植物は, ウィロイドによる潜伏感染の多い宿主として知られている. このような背景が原因となり, 危険なウィロイドが世界中に拡大するという新たな状況の発生が懸念されている. すなわち, 世界の主要な作物に重大な影響をもたらすウィロイドが, 潜伏感染することによって, これまで宿主として見なされていなかった様々な宿主に感染し, 日本を含む世界中に拡大する例が見出され, 実際の生産現場において影響を及ぼし始めている. そのような状況の中, 2010年に本研究室において花卉植物であるダリアに

PSTVd が潜伏感染していることが発見された (Tsushima et al., 2011; 村上, 2010). 伊藤 (2012) はこのダリアから発見されたPSTVd (PSTVd-Dahlia) とPSTVdの基準株である Intermediate系統 (PSTVd-Intermediate) を比較・調査することで, PSTVd-Dahliaが トマトに対して弱毒系統であることを明らかにし, その塩基配列を決定した. PSTVd-IntermediateとPSTVd-Dahliaを比較したところ, その塩基配列相同性は約97%であり, 病原性 (P) 領域に6カ所, 可変 (V) 領域に2カ所, 右末端 (TR) 領域に1カ所の変異を有していた. 従来の研究により, PSTVdを基準種とするポスピウイルス科に属するウイルスが生体内で棒状の二次構造を形成した場合, 病原性 (P) 領域がその病原性の決定に関わっているということが知られている (Chaffai et al., 2007; Murcia et al., 2011; Owens et al., 1995, 1996; Sano et al., 1992; Schmitz and Riesner, 1998; Schnolzer et al., 1985; Škorić et al., 2001; Visvader and Symons, 1986). すなわち, 伊藤 (2012) やTsushimaら (2011) の報告から, PSTVd-DahliaのP領域中における 6箇所の塩基置換が, その弱毒性に関与していることが示唆された.

さらに, 近年, ウィロイド結合タンパク質 (Viroid RNA-binding protein 1: VirP1) と TR 領域中のVirP1 結合モチーフ (RY-motif) の特異的な相互作用が, PSTVdの複製或いは全身移行において重要な役割を果たすという報告がされた (Gozmanova et al., 2003; Kalantidis et al., 2007; Maniataki et al., 2003; Martinez et al., 2003). VirP1は転写因子に広く保存されるプロモドメインを有することが初めて報告された, 核局在シグナルを示す, ナス科植物由来のタンパク質であるが, PSTVd分子中のRY-motif に特異的に結合し, その複製或いは全身移行に関与するとされる宿主内におけるその本来の機能は未解明なタンパク質である. Kalantidis et al. (2007) は, VirP1の発現を促進・抑制した遺伝子組換えタバコ (*Nicotiana tabacum* と *Nicotiana benthamiana*) を用いて, PSTVdの複製或いは全身移行におけるVirP1の役割を分析した. その結果, VirP1発現促進形質転換タバコを用いた場合, 野生型 (Wild type: WT) と比較しても違いはみられなかったが, VirP1発現抑制形質転換タバコを用いた場合, PSTVdの複製或いは全身移行能力が著しく低下することが観察され, PSTVdの複製或いは全身移行におけるVirP1の重要性が示唆された.

一方, ウィロイドは強力な RNA サイレncing誘導体であり, 多量のウィロイド由来のスモール RNA (Viroid-sRNA) がウィロイド感染植物に蓄積することが明らかになってきたことから, Viroid-sRNA はウィロイドの病原性発現の謎を解くキー因子と位置づけられ, その生成機構と生物学的機能を分析する研究が欧米豪及び国内の複数の

研究グループで精力的に行われている (Ding, 2010; Hamman and Steger, 2010; Matoušek et al., 2011; Navarro et al., 2012). ウイロイドによって誘導される RNA サイレンシングは、ウイロイド複製を標的とするが、ウイロイドは RNA サイレンシングに抗って複製し続け、ウイロイド病の発症につながる。21~24 塩基程度の長さである Viroid sRNA は、全分子中のゲノム (positive) 鎖及びアンチゲノム (negative) 鎖いずれにも由来するが、それらは均等に生成されるのではなく、いくつかのホットスポット領域が存在することが知られている (Itaya et al. 2007; Machida et al. 2007). さらに、Wang et al. (2004) は、ウイロイドによって誘導される RNA サイレンシングがウイロイド病の病原性発現に関与するモデルを提唱した。この仮説に関しては、モモ潜在モザイクウイロイド (*Peach latent mosaic viroid*; PLMVd) のうち特定の変異体の感染によって生成する sRNA のターゲットになりえる葉緑体熱ショックタンパク質 90 (chloroplastic heat shock protein 90) をコードする mRNA の転写後抑制が発現するピーチキャリコ病 (peach calico disease) を引き起こすという研究によって支持されている (Navarro et al. 2012). その他にも、タバコ可溶性無機ピロホスファターゼ遺伝子 (Eamens et al., 2014), トマトカロース合成酵素遺伝子 (Adkar-Purushothama et al., 2015b), トマト WD40-repeat タンパク質遺伝子 (Avina-Padilla et al., 2015) などでウイロイド sRNA と関連な配列を有する遺伝子発現が転写後発現抑制を受けることが報告されている。

しかしながら、ウイロイドが植物病原体であると定義されて 45 年が経過しようとしている今現在も一般的なウイロイド感染によって引き起こされる矮化や葉巻、果実の奇形や変色のような形態異常の病徴発現の分子機構の主要因は未知のままである。本研究では、マルチプレックスディープシーケンシス解析によって病原性の異なる PSTVd 分離株及び変異体感染トマトに蓄積する Viroid-sRNA 及びマイクロ RNA (miRNA) を比較分析することで、ウイロイド誘発性 RNA サイレンシングとの関連性を調査するとともに、PSTVd の病原性発現モデルを提案する。

第 1 章 PSTVd 分子中の構造領域と病原性の相互作用

供試材料および実験方法

供試植物

接種には、PSTVd の指標植物トマト (品種: Rutgers) を用いた。各接種区画とも、Rutgers トマトを 3~5 本ずつ供試した。トマトは 25°C の恒温培養器内でバーミキュライトに播種し、約 1 週間後に 1 個体ずつ鉢に移植した。移植 1 週間後、子葉にカーボランダム接種した。

PSTVd 系統

本研究で用いる自然界から分離された PSTVd 分離株は以下の 4 系統である。

・ PSTVd-Intermediate (PSTVd-I), 359 nt (Accession No, M16826)

>PSTVd-I

```
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGAGCAGAAAAGAA
AAAAGAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCG
AACTGGCAAAAAAGGACGGTGGGGAGTGCCAGCGGCCGACAGGAGTAATTCCCG
CCGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCCTCGCGCCCGCAGG
ACCACCCCTCGCCCCCTTTGCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACAAC
GAAGCTCCCAGAAACCGCTTTTTCTCTATCTTACTTGCTTCGGGGCGAGGGTGT
AGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT
```

・ PSTVd-Dahlia (PSTVd-D), 361 nt (Accession No, AB623143)

>PSTVd-D

```
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCTCGAGCAGAAAAGAA
AAAAGAATGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGC
GAACTGGCAAAAAAGGCCGGTGGGGAGTGCCAGCGGCCGACAGGAGTAATTCCCG
CCGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTCGGGTTTCCTTCCTCGCGCCCGCAGG
ACCACCCCTCGCCCCCTTTGCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACAAC
GAAGCTCCCAGAAACCGCTTTTTCTCTATCTTCTTTGCTTCGGGGCGAGGGTGT
TTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT
```

• **PSTVd-RG1, 359 nt (Accession No, U23058)**

>PSTVd-RG1

CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGACAAGAAAAGAA
AAAAGAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCG
AACTGGCAAAAAAGGACGGTGGGGAGTGCCCAGCGGCCGACAGGAGTAATTCCCG
CCGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCCTCGCGCCCGCAGG
ACCACCCCTCGCCCCCTTTGCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACA
ACTGAAGCTCCCAGAAACCGCTTTTTCTCTATCTTACTTGCTCCGGGGCGAGGGT
GTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT

• **PSTVd-AS1, 359 nt (Accession No, AY518939)**

>PSTVd-AS1

CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGACTAGAAAAGAA
AAAAGAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCG
AACTGGCAAAAAAGGACGGTGGGGAGTGCCCAGCGGCCGACAGGAGTAATTCCCG
CCGAAACAGGGTTTTACCCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCCTCGCGCCCGCAGG
ACCACCCCTCGCCCCCTTTGCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACA
ACTGAAGCTCCCAGAAACCGCTTTTTCTCTATCTTACTAGCTCCGGGGCGAGGGT
GTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT

PSTVd 4 系統の塩基配列比較 (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment)

```
PSTVd-I      CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGAGCAGAAAAGAAAAA 60
PSTVd-D      CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGAGCAGAAAAGAAAAA 60
PSTVd-RG1    CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGACAAGAAAAGAAAAA 60
PSTVd-AS1    CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGACTAGAAAAGAAAAA 60
```

***** ** *****

```
PSTVd-I      GAA-GGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAA 119
PSTVd-D      GAATGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAA 120
PSTVd-RG1    GAA-GGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAA 119
PSTVd-AS1    GAA-GGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAA 119
```

*** *****

```
PSTVd-I      AAAAGGACGGTGGGGAGTGCCAGCGGCCGACAGGAGTAATCCCGCGAAACAGGGTTT 179
PSTVd-D      AAA-GGCGGCTGGGGAGTGCCAGCGGCCGACAGGAGTAATCCCGCGAAACAGGGTTT 179
PSTVd-RG1    AAAAGGACGGTGGGGAGTGCCAGCGGCCGACAGGAGTAATCCCGCGAAACAGGGTTT 179
PSTVd-AS1    AAAAGGACGGTGGGGAGTGCCAGCGGCCGACAGGAGTAATCCCGCGAAACAGGGTTT 179
```

*** * *****

```
PSTVd-I      TCACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCTCGCGCCCGCAGGACCACCCTCGCCCCCTT 239
PSTVd-D      TCACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCTCGCGCCCGCAGGACCACCCTCGCCCCCTT 239
PSTVd-RG1    TCACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCTCGCGCCCGCAGGACCACCCTCGCCCCCTT 239
PSTVd-AS1    TCACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCTCGCGCCCGCAGGACCACCCTCGCCCCCTT 239
```

***** *****

```
PSTVd-I      TGGCTGTGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCCTTTT 299
PSTVd-D      TGGCTGTGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCCTTTT 299
PSTVd-RG1    TGGCTGTGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCCTTTT 299
PSTVd-AS1    TGGCTGTGCTTCGGCTACTACCCGGTGGAAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCCTTTT 299
```

***** *****

```
PSTVd-I      TCTCTATCTTACTT--GCTTCGGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGAACCGCAGTTGGTTC 357
PSTVd-D      TCTCTATCTTCTTTTGTTCGGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGAACCGCAGTTGGTTC 359
PSTVd-RG1    TCTCTATCTTACTT--GCTCCGGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGAACCGCAGTTGGTTC 357
PSTVd-AS1    TCTCTATCTTACTA--GCTCCGGGGCGAGGGTGTGTTAGCCCTTGAACCGCAGTTGGTTC 357
```

***** ** *** *****

```
PSTVd-I      CT 359
PSTVd-D      CT 361
PSTVd-RG1    CT 359
PSTVd-AS1    CT 359
```

**

PSTVd 二量体感染性クローン構築

各 PSTVd 系統の感染性二量体 cDNA クローンを作成するために (PSTVd-I 及び PSTVd-D は修士課程で作成済み), まず単量体クローンを準備した. PSTVd-RG1 単量体クローンは FASMAC 社の人工遺伝子合成サービスに委託し, PSTVd-AS1 単量体クローンは, 北海道大学農学研究院の畑谷達児先生に分譲していただいた. PSTVd-RG1, -AS1 クローンはいずれも pUC9 系ベクターの *Bam*HI サイトに挿入するように設計し, *Bam*HI で切断することで単量体クローンを切り出した. その後の操作は, 以下の手順に従う.

①制限酵素処理

<u>反応液</u>	<u>(μl)</u>
単量体プラスミド DNA	X (1 μ g 相当量)
10X <i>Bam</i> HI buffer	5.0
<i>Bam</i> HI (10U/ μ l)	1.0
<u>滅菌蒸留水</u>	<u>44.0-X</u>
合計	50.0

- ・ 37°Cで一晩インキュベート
- ・ インキュベート後, 等量のフェノール・クロロホルム (1:1) を加え, 1 分間激しく攪拌
- ・ 13,000 rpm, 3 分遠心分離後, 上清を新しい 1.5 ml チューブへ回収
- ・ フェノール層の入っているチューブへ滅菌蒸留水 50 μ l を加え, 1 分間激しく攪拌
- ・ 13,000 rpm, 3 分遠心分離後, 上清を回収 (Total volume 100 μ l)
- ・ 2.5 倍量の 100%エタノール (250 μ l), 1/10 倍量の 3M 酢酸ナトリウム (10 μ l) を加え, 攪拌後-30°Cで一晩静置
- ・ 13,000 rpm, 10 分遠心分離
- ・ エタノール層を捨て, 70%エタノール 100 μ l を加える
- ・ 13,000 rpm, 5 分遠心分離後, エタノール層を完全に取り除く
- ・ アスピレーターで 5 分真空乾燥後, 滅菌蒸留水 10 μ l を加え, 完全に溶解し, 単位長 DNA 溶液とする

②単位長分子の分離

- ・単位長 DNA 溶液を 7.5%ポリアクリルアミドゲル (PAGE) (1X TAE) で電気泳動し、単位長分子を分離する
- ・目的のバンドをゲルから切り出す
- ・1 mm 角にきざみ、1.5 ml チューブに入れる
- ・溶出用緩衝液 500 μ l を加え、37°Cで一晩振とう
- ・振とう後、溶出用緩衝液を新しい 1.5 ml チューブへ回収
- ・100%エタノールとグリコーゲン溶液 1 μ l を加え、攪拌後、-30°Cで一晩静置
- ・13,000 rpm, 10 分遠心分離
- ・エタノール層を捨て、70%エタノール 100 μ l を加える
- ・13,000 rpm, 5 分遠心分離後、エタノール層を完全に取り除く
- ・アスピレーターで 5 分真空乾燥後、滅菌蒸留水 10 μ l を加え、完全に溶解し、*Bam*HI 切断単位長 DNA 溶液とする

③ライゲーション

i) セルフライゲーション

- ・*Bam*HI 切断単位長 DNA 溶液 3 μ l に等量の Ligation kit solution I (Takara Bio) を加え、16°C, 2 時間インキュベート

<u>反応液</u>	<u>(μl)</u>
<i>Bam</i> HI 切断単位長 DNA 溶液	3.0
<u>Ligation kit solution I</u>	<u>3.0</u>
合計	6.0

ii) *Bam*HI 切断脱リン酸プラスミドベクターとのライゲーション

- ・pBSII (SK-)/ *Bam*HI/ SAP ベクター 1 μ l と DNA ligation kit solution I 1 μ l を加え、16°C, 20 時間以上インキュベート
- ・インキュベート後の反応液をライゲーション溶液とする

<u>反応液</u>	<u>(μl)</u>
セルフライゲーション反応液	6.0
pBSII (SK-)/ <i>Bam</i> HI/ SAP ベクター	1.0
<u>Ligation kit solution I</u>	<u>1.0</u>
合計	8.0

④トランスフォーメーション

- ・氷上で JET コンピテントセル (Laboratory Inc.) を融解する
- ・新しい 1.5 ml チューブに JET コンピテントセルを 50 μ l ずつ分注する
- ・ライゲーション反応液 8 μ l のうち, 4 μ l (JET コンピテントセルの 1/10 量以下) を JET コンピテントセルに加える
- ・軽く攪拌後 (ピペッティング), 氷上静置 5 分
- ・付属のリカバリーメディアウム (37°C 予備加熱) を 500 μ l ずつ加える
- ・軽く攪拌後 (ピペッティング), 室温静置 5 分
- ・X-gal 50 μ l を加え (合計約 600 μ l), 軽く攪拌
- ・懸濁液のうち 200 μ l (適宜) を LB 寒天培地 (アンピシリン添加) に塗布
- ・室温静置 15–30 分後, プレーートを逆さまにして 37°C, 12–16 時間静置

⑤スクリーニング

12–16 時間静置後, LB 寒天培地には白或は青色のコロニーが多数出現する. 目的のインサートが挿入された場合は, X-gal は分解されずに白コロニーを形成するが, lacZ 遺伝子を保持したままがあれば (すなわち, インサートが挿入されていなければ) X-gal を分解して青コロニーを形成する. このカラーセレクションの原理を利用し, コロニー PCR で感染性二量体 cDNA クローンの選抜を行う.

<u>PCR 反応液の調製</u>	<u>(μl)</u>
EmeraldAmp PCR Master Mix (2X Premix)	5.0
Not M4 primer (20 pmol/ μ l)	0.4
Not RV primer (20 pmol/ μ l)	0.4
滅菌蒸留水	4.2
合計	10.0

NotM4 primer: AAGCGGCCGCGTTTTCCAGTCACGAC

NotRV primer: AAGCGGCCGCCAGGAAACAGCTATGAC

- ・サンプル数分の 200 μ l チューブに上記の PCR 反応液と LB 液体培地 (アンピシリン添加) 50 μ l をそれぞれ分注
- ・コロニーの生えた LB 固形培地からつま楊枝で白コロニーをつつき (軽く触れる程度), PCR 反応液の入ったチューブで 4–5 回洗浄
- ・LB 液体培地の入ったチューブで 4–5 回洗浄 (スクリーニングが終わるまで 4°C 保存)

- すべてのサンプルの洗浄を終えたら、軽くタッピングしてフラッシング
- 以下の条件で PCR を行う
 - 98°C, 1 分
 - 98°C, 10 秒・55°C, 30 秒・72°C, 1 分 — 30 サイクル
 - 72°C, 5 分
- PCR 後, 反応液全量を 1.5% アガロースゲル (AGE) (或は 7.5% PAGE) で電気泳動
- インサートが挿入されていれば, インサート+約 200 bp のバンドが検出され, 挿入されていなければ約 200 bp のバンドが検出される
- PSTVd 感染性二量体 cDNA クローンは約 720 bp であるため, 900 bp-1 kb 付近にバンドが検出されたサンプルのみ, 培養後プラスミド DNA 抽出を行う

⑥プラスミド DNA 抽出

- コロニーPCR の結果をもとに, 二量体であることが確認されたサンプルの LB 保存液を LB 液体培地 (アンピシリン添加) 2.5 ml へ加え, 37°C, 12-16 時間振とう培養
- 振とう後, 大腸菌培養液 2.5 ml のうち, 1.5 ml を新しい 2 ml チューブへうつす (残り的大腸菌培養液 1 ml は, -80°C に保存する)
- 日本ジェネティクス社の FastGene Plasmid Mini Kit を使用して, プラスミド DNA 抽出をする. 手順はキット付属のプロトコルに従う
- 吸光度を測定し, プラスミド DNA の核酸濃度を求める

⑦シーケンス解析

プラスミド DNA のシーケンス解析により, 得られた PSTVd 感染性二量体プラスミドの変異の挿入や欠失の有無を確認する. シーケンス解析は, 弘前大学農学生命科学部付属の遺伝子実験施設 (Gene research center; GRC) の ABI 3500 Genetic Analyzers で行った. 手順を以下に記す.

- ・ サンプル数分 200 μ l チューブに以下の反応液を調製する

反応液	(μ l)
プラスミド DNA (200–500 ng)	X
5X Big Dye buffer	4.0
2.5 \times Reaction mix	1.0
Primer (3.2 pmol/ μ l)	1.0
滅菌蒸留水	14.0–X
合計	20

- ・ 以下の条件で PCR を行う

96 $^{\circ}$ C, 3 分

96 $^{\circ}$ C, 30 秒 \cdot 50 $^{\circ}$ C, 15 秒 \cdot 60 $^{\circ}$ C, 4 分 — 30 サイクル

- ・ 1.5 ml チューブに PCR 反応液 20 μ l をうつす
- ・ 100%エタノール (常温) 50 μ l, 3M 酢酸ナトリウム 2 μ l を加える
- ・ 攪拌 10 秒後, 常温静置 5 分
- ・ 13,000 rpm, 23 $^{\circ}$ C, 20 分遠心分離
- ・ 上清を取り除き, 70%エタノール (常温) を 100 μ l 加え, 13,000 rpm, 23 $^{\circ}$ C, 5 分遠心分離
- ・ 上清を完全に取り除く
- ・ 10–30 分風乾 (完全に乾燥させる)
- ・ 各サンプルに 15 μ l のホルムアミドを加え, ボルテックス 10 秒後, フラッシング
- ・ 10 回程度ピペッティングし, MicroAmp[®] Optical 96-well Reaction Plate へうつす
- ・ 96 $^{\circ}$ C, 3 分 Pre-heat 後, すぐに氷上へうつす
- ・ ABI 3500 Genetic Analyzers で解析を行う

PSTVd 二量体 RNA 転写産物の感染性試験

接種源用にゲノム鎖 RNA 転写産物を作成するため、シーケンス解析の結果をもとに PSTVd 感染性二量体プラスミドを適当な制限酵素で切断し、Thermo Fisher Scientific 社の T3 或は T7 RNA polymerase を用いて *in vitro* 転写を行った。本研究では制限酵素反応に T3 RNA polymerase で転写を行う場合は *Hind*III, T7 RNA polymerase の場合は *Sac*I を用いた。反応緩衝液はそれぞれ付属のものを使用し、リボヌクレアーゼ阻害剤は和光純薬工業社のヒト胎盤組み換え体溶液を用いた。手順を以下に記す。

① 転写反応（接種源用，二量体 RNA 転写産物作成）

- ・それぞれの PSTVd 感染性二量体プラスミドを *Hind*III 或は *Sac*I で切断する

反応液 *各 2 本ずつ調製	(μ l)
プラスミド DNA	X
10X Buffer	5.0
制限酵素	1.0
滅菌蒸留水	44.0-X
合計	50.0

- ・ 37°C で 2 時間以上（一晩が望ましい）インキュベート
- ・ インキュベート後，それぞれのチューブに等量（50 μ l）のフェノール・クロロホルム（1:1）を加え，1 分間激しく攪拌
- ・ 13,000 rpm，3 分遠心分離後，上清を新しい 1.5 ml チューブへ回収（2 本を 1 本にまとめる）
- ・ フェノール層の入っているチューブへ滅菌蒸留水 50 μ l を加え，1 分間激しく攪拌
- ・ 13,000 rpm，3 分遠心分離後，上清を回収（Total volume 200 μ l）
- ・ チューブに等量（200 μ l）のジエチルエーテルを加え攪拌後，13,000 rpm，1 分遠心分離
- ・ エーテル層を完全に取り除く
- ・ 2.5 倍量（500 μ l）の 100%エタノールを加え攪拌後，-30°C で 1 時間以上静置
- ・ 13,000 rpm，10 分遠心分離
- ・ 上清を捨て，70%エタノールを 100 μ l 加え，13,000 rpm，5 分遠心分離
- ・ 上清を完全に捨て，アスピレーターで 5 分真空乾燥
- ・ 滅菌蒸留水 10 μ l に完全溶解し，うち 8 μ l を RNA polymerase *in vitro* 転写反応に用いる（残りの 2 μ l も後に使うので保存しておく）

<i>in vitro</i> 転写反応	(μ l)
プラスミド DNA/ 制限酵素	8
5X Transcription buffer	4
10 mM each NTPs	2
RNA polymerase (20U/ μ l)	1
リボヌクレアーゼ阻害剤 (40U/ μ l)	1
滅菌蒸留水	4
合計	20

- ・ 37°C, 2-4 時間インキュベート
- ・ インキュベート後, 0.2M EDTA (pH8.0) 2.5 μ l, 4M LiCl 6.25 μ l, 100%エタノール 150 μ l を加え, 攪拌後 -30°C, 1 時間以上静置
- ・ 13,000 rpm, 10 分遠心分離
- ・ 上清を捨て, 70%エタノールを 100 μ l 加え, 13,000 rpm, 5 分遠心分離
- ・ 上清を完全に捨て, アスピレーターで 5 分真空乾燥
- ・ 滅菌蒸留水 50 μ l に完全溶解し, うち, 2 μ l を 1.5% AGE でチェック, このとき転写に用いなかった DNA 溶液 2 μ l も同じゲルでチェックする
- ・ 転写が確認されたら, 吸光度を測定し RNA 転写産物の核酸濃度を求め, 接種源に用いる

② 接種源調製 ～ 接種

i) 接種源調製

接種源	(μ l)
RNA 転写産物 (25 μ g 相当量)	X
0.5M リン酸緩衝液 (pH 7.0–7.5)	10.0
ベントナイト (10 mg/ml)	10.0
滅菌蒸留水	100.0–X
合計	100.0

ii) カーボランダム接種

- ・ 上記の接種源を Rutgers トマト 1 個体につき 20 μ l (RNA 転写産物 5 μ g 相当量) ずつカーボランダム接種する (接種源 100 μ l = RNA 転写産物 5 μ g/ 20 μ l/ トマト 5 個体分)
- ・ 本葉 2 枚にカーボランダムを振りかける
- ・ 本葉 2 枚に接種源液を乗せ、ペッスルの柄を用いて軽く 10 回程度擦り付ける
- ・ 蒸留水でカーボランダムを洗い流す

iii) 生育条件

PSTVd 感染性二量体 RNA 転写産物を接種した Rutgers トマトは 24°C, 16 時間照明条件に設定した GRC 内の恒温培養室で生育させた. 接種後 2 週目から 1 週間おきに上葉第一葉から葉ディスク 2 枚 (約 0.1 g) を 2 ml チューブでサンプリングし, 低分子量 RNA 抽出を行った. 接種後 1 か月目で葉 1 g 程度をサンプリングし, CTAB による RNA 大量抽出を行った. また, 感染の検定方法には RNA ゲルブロット分析と逆転写 (Reverse transcriptional; RT) PCR を用いた.

③ 検定用低分子量 RNA 抽出

- ・葉ディスク 2 枚 (0.1 g 程度) を 2 ml チューブに採取する
- ・ジルコニアボール ($\Phi = 5$ mm) を 2 個ずつ入れる
- ・磨砕緩衝液 (2X CTAB 緩衝液, 0.05% 2-メルカプトエタノール) 500 μ l を加える
- ・シェークマスターで 3 分破碎
- ・フェノール:クロロホルム (1:1) を 500 μ l 加え, 30 秒攪拌
- ・12,000 rpm, 5 分遠心分離
- ・上清 400 μ l を新しい 1.5 ml チューブにうつす
- ・100% エタノール 1 ml を加え, 軽く攪拌後, -30°C で 1 時間以上静置
- ・12,000 rpm, 4°C , 10 分遠心分離
- ・上清を捨て, 70% エタノール 100 μ l を加え, 軽く攪拌
- ・12,000 rpm, 5 分遠心分離
- ・上清を完全に捨て, アスピレーターで 5 分真空乾燥
- ・滅菌蒸留水 200 μ l を加え, 沈殿を完全溶解
- ・4M LiCl 200 μ l を加え, 攪拌後, 氷上 4 時間以上静置
- ・12,000 rpm, 10 分遠心分離
- ・新しいチューブに上清約 400 μ l を回収し, 100% エタノール 1 ml を加え, 軽く攪拌後, -30°C で 1 時間以上静置
- ・12,000 rpm, 10 分遠心分離
- ・上清を捨て, 70% エタノール 100 μ l を加え, 軽く攪拌
- ・12,000 rpm, 5 分遠心分離
- ・上清を完全に捨て, アスピレーターで 5 分真空乾燥
- ・滅菌蒸留水 100 μ l を加え, 沈殿を完全溶解し, 検定用低分子量 RNA 溶液とする
- ・吸光度を測定し低分子量 RNA 溶液の核酸濃度を求め, 検定に用いる

2X CTAB 緩衝液

1M Tris/ HCl pH9.5	5.0	ml
0.1M EDTA pH7.0	10.0	ml
3M NaCl	23.3	ml
CTAB	1.0	g
滅菌蒸留水	9.2	ml
<u>2-メルカプトエタノール</u>	<u>2.5</u>	<u>ml</u>
合計	50.0	ml

④ CTAB での低分子量 RNA 大量抽出

環状 viroid RNA 接種源確保のために、*in vitro* RNA 転写産物接種試験で感染が確認された Rutgers トマトから、2X CTAB 緩衝液を用いて低分子量 RNA を大量抽出する。手順を以下に記す

- ・感染葉（1 g 程度）を乳鉢にサンプリングする
- ・磨砕緩衝液（2X CTAB 緩衝液，0.05% 2-メルカプトエタノール）10 ml 添加
- ・どろどろになるまで磨砕
- ・フェノール：クロロホルム（1:1）5 ml 添加
- ・1 分激しく攪拌
- ・3,000 rpm，15 分，4℃で遠心分離後，上清を回収
- ・2.5 倍量の 100%エタノールを添加し，軽く攪拌後，−30℃で 1 時間以上静置
- ・3,000 rpm，20 分，4℃で遠心分離
- ・上清を捨て，アスピレーターで 5 分真空乾燥
- ・滅菌蒸留水 1 ml を添加し，沈殿を完全溶解
- ・2.5M K_2HPO_4 (pH 8.3) を 1 ml 添加（滅菌蒸留水と等量）
- ・2-メトキシエタノールを 1 ml 添加（滅菌蒸留水と等量）
- ・1 分激しく攪拌
- ・3,500 rpm，15 分，15℃で遠心分離
- ・上清を回収し，新しいチューブにうつす
- ・滅菌蒸留水を添加し，12.5ml に定量する（2.5M K_2HPO_4 の 12.5 倍量）
- ・2% CTAB 500 μ l を添加
- ・軽く攪拌し，10–30 分氷上静置（沈殿が少ないときは一晩）
- ・3,500 rpm，30 分，4℃で遠心分離
- ・上清を捨て，1M NaCl 400 μ l を加え，完全溶解
- ・新しい 1.5 ml チューブにうつし，100%エタノール 1 ml 添加（1M NaCl の 2.5 倍量）
- ・軽く攪拌後，−30℃で 1 時間以上静置
- ・13,000 rpm，10 分，4℃で遠心分離
- ・上清を捨て，70%エタノール 100 μ l を加え，軽く攪拌
- ・12,000 rpm，5 分遠心分離
- ・上清を完全に取り除き，アスピレーターで 5 分真空乾燥
- ・滅菌蒸留水 400 μ l を添加し，沈殿を完全溶解
- ・10M LiCl 100 μ l を添加し，軽く攪拌後，4 時間以上氷上静置
- ・13,000 rpm，10 分，4℃で遠心分離
- ・上清を新しい 1.5 ml チューブにうつす

- 100%エタノールを 1 ml 添加し，攪拌後， -30°C で 1 時間以上静置
 - 13,000 rpm, 10 分, 4°C で遠心分離
 - 上清を捨て，70%エタノール 100 μl を加え，軽く攪拌
 - 13,000 rpm, 5 分, 4°C で遠心分離
 - 上清を完全に取り除き，アスピレーターで 5 分真空乾燥
 - 滅菌蒸留水を 500 μl (適宜) 添加し，沈殿を完全溶解
 - 吸光度を測定し，抽出液の核酸濃度を求め，低分子量 RNA 溶液とする
 - ドットブロット分析により，低分子量 RNA 溶液中の PSTVd 含量を定量する
- *ドットブロット分析の手順は後述

⑤ RT-PCR

i) 逆転写 (RT)

- ・ 200 μ l チューブに以下の反応液を調製する

<u>RT 反応液</u>	<u>(μl)</u>
低分子量 RNA (100 ng/ μ l)	2.0
5X First Strand バッファー	5.0
2.5 mM each dNTPs	5.0
0.1M DTT	2.0
ランダムヘキサマープライマー	1.0
M-MLV RTase (Invitrogen)	1.0
滅菌蒸留水	9.0
合計	25.0

- ・ 37°C – 60 分インキュベート後, 70°C – 15 分不活性化処理
- ・ インキュベート後の反応液を RT 溶液とする

ii) PCR

<u>PCR</u>	<u>(μl)</u>
RT 溶液	2.0
10 \times LA PCR バッファー (Mg ²⁺ free)	2.5
25mM MgCl ₂	2.5
PS-Bam-CCR-P primer (20 pmol/ μ l)	1.0
PS-Bam-CCR-M primer (20 pmol/ μ l)	1.0
2 mM each dNTPs	2.5
LA Taq DNA polymerase (5U/ μ l)	0.25
滅菌蒸留水	13.25
合計	25.0

- ・ 以下の条件で PCR を行う

95°C, 5 分

94°C, 1 分・55°C, 1 分・72°C, 1 分 — 35 サイクル

72°C, 10 分

PS-Bam-CCR-P : 5'-TTTGGATCCCCGGGGAAACCTGGAG-3'

PS-Bam-CCR-M : 5'-TTTGGATCCCTGAAGCGCTCCTCCGAG-3'

⑥ 複製後の塩基配列解析

PCR 増幅産物は、「PSTVd 感染性クローン構築－②単位長分子の分離」と同様の手順で溶出し、エタノール沈殿処理後、滅菌蒸留水 10 μ l に溶解した溶液をイリュージョン溶液とする。イリュージョン溶液をクローニングする際、ベクターには pGEM-T Easy vector (Promega) を用いた。以下の反応液を調製し、1 時間室温静置 (或は 4°C で一晩)。インキュベート後の反応液をライゲーション溶液とした。

<u>ライゲーション反応液</u>	<u>(μl)</u>
イリュージョン溶液	3.0
2X Rapid Ligation buffer	5.0
pGEM-T Easy vevtor	1.0
<u>T4 DNA Ligase</u>	<u>1.0</u>
合計	10.0

その後のトランスフォーメーションからシーケンス解析までの操作は、「PSTVd 感染性クローン構築－④～⑦」に従う。

⑦ RNA ゲルブロット分析

i) サンプル調製

- ・ 100 ng 相当量の低分子量 RNA 量を 2.0 μ l に調製
- ・ RNA 溶液 2.0 μ l に RNA 変性バッファー 8.0 μ l を加え, 68°C, 15 分インキュベート
- ・ インキュベート後の反応液を検定用 RNA 溶液とする

<u>RNA 変性バッファー</u>	<u>(ml)</u>
ホルムアルデヒド	1.6
ホルムアミド	5.0
20×MOPS バッファー	0.5
グリセリン色素溶液	1.6

<u>グリセリン色素溶液</u>	<u>(ml)</u>
グリセロール	5.0
1 mg/ ml BPB	1.0
1 mg/ ml XC	1.0
0.5M EDTA (pH 8.0)	0.02
滅菌蒸留水	2.98

ii) ゲルの作成—電気泳動

- ・ 三角フラスコに以下の順で調製する

<u>RNA ゲルブロット用アガロースゲル</u>		
20X MOPS バッファー	3.0	ml
アガロース HS (和光)	0.7	g
滅菌蒸留水	53.3	ml
合計	57.0	ml

- ・ レンジで溶解後, 50°Cほどに冷やし, ホルムアルデヒド 3.0 ml を加え (終濃度: 0.66M) よく混ぜる
- ・ ゲル型にコームをセットしゲルを流し込み, 室温静置
- ・ ゲルが完全に固まったら, 電気泳動槽 (コスモバイオ社, i-MyRun. n) にセットする
- ・ 1X MOPS バッファーを泳動槽に加え, 検定用 RNA 溶液 10 をゲルにアプライする
- ・ 100V, 10 分電気泳動

iii) メンブレン作成ーハイブリダイゼーション

- ・バキュームプロッター（バイオラド社）でナイロンメンブレン（Life Sciences 社, Biotinylated PLUS 0.45 μm ）にブロットニングする
- ・UV クロスリンカー（BM 機器）で 1,200X 100 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 照射
- ・ハイブリダイゼーションバッファーをメンブレンを包んだハイブリシートに 9 ml 加え、55°C で 1 時間以上振とう（プレハイブリダイゼーション）
- ・プレハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーション液 1 ml に DIG 標識 PSTVd cRNA プローブ 2 μl を加え、55°C で一晩振とう

ハイブリダイゼーションバッファー	(ml)
ホルムアミド	40.0
0.5M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)	10.0
20% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	0.5
サケ精子 DNA (10 mg/ ml)	1.2
イースト tRNA (100 mg/ ml)	0.32
滅菌蒸留水	27.98
50% デキストラン硫酸ナトリウム	20.0
合計	100.0

iv) 洗浄ーケミルミ検出

- ・メンブレンを 2X SSC 100 ml に浸し、室温で 10 分振とう、2 回繰り返す
- ・メンブレンをハイブリシートで包み、2X SSC 10 ml に 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNaseA 1 μl を加えた溶液を加え室温で 15 分振とう
- ・メンブレンを 0.1X SSC-0.1% SDS 溶液 100 ml に浸し、65°C、10 分振とう、2 回繰り返す
- ・メンブレンをハイブリシートで包み、バッファー2 を 10 ml 加え室温で 30 分振とう
- ・ハイブリシートからバッファー2 を取り除き、バッファー2 10 ml に anti-DIG-AP, Fab fragments (Roche) 1 μl 添加したものをハイブリシートに加え室温で 30 分振とう
- ・メンブレンを洗浄バッファー100 ml に浸し、室温で 15 分振とう、2 回繰り返す
- ・メンブレンをバッファー3 30 ml に浸し、室温で 5 分振とう
- ・ハイブリシートに発光基質 CSPD (Roche) とバッファー3 をそれぞれ 500 μl ずつ混合させた発光気質液 1 ml を均等に滴下
- ・メンブレンをハイブリシートにのせ、上げ下げを数回繰り返す、ハイブリシートをポリシーラーで閉じる
- ・Chemidoc XRS (バイオラド社) で化学発光量を測定する (ケミルミ検出)

バッファー1

マレイン酸	5.8	g
塩化ナトリウム	4.38	g
滅菌蒸留水	500	ml に定量する
合計	500	ml

バッファー2

ブロッキング試薬	0.1	g
バッファー1	10	ml
合計	10	ml

洗浄バッファー

Tween 20	0.6	ml
バッファー1	200	ml
合計	200	ml

バッファー3

1M Tris/ HCl (pH 9.5)	3	ml
1M 塩化ナトリウム	3	ml
1M 塩化マグネシウム	1.5	ml
滅菌蒸留水	30	ml に定量する
合計	30	ml

⑧ ドットブロット分析

i) 試料の変性処理と希釈シリーズ作成

- ・環状 PSTVd 溶液の吸光度を測定し，RNA 濃度を求める
- ・各試料の一部をとり，濃度を 100 ng/μl に定量する（50 μl 程度）
- ・PSTVd RNA 転写産物を準備し，10 ng/μl に定量する（50 μl 程度）
- ・以下の組成で反応液を調製する

<u>ドットブロット用変性反応液</u>	<u>(μl)</u>
環状 RNA 溶液	5.0
Formamide	10.0
Formaldehyde	3.5
20×SSC	1.0
<u>MilliQ</u>	<u>0.5</u>
合計	20.0

- ・ 65°C，15 分インキュベート
- ・ 20X SSC を 20 μl 添加し軽く攪拌，この溶液を原液とする
- ・ 原液 10 μl を新しい 600 μl チューブに移し，10X SSC を 40 μl 加えよく攪拌する（5 倍希釈液作成）
- ・ 5² 倍希釈液を同様に希釈する
- ・ 以下同様に，4 乗倍程度まで希釈シリーズを作成する
- ・ ナイロンメンブレン（Life Sciences 社，Biodyne[®] PLUS 0.45 μm）に 10 mm 角のマスマ目印をつけ，各変性反応液 2.0 μl を 2 か所ずつスポットする
- ・ UV クロスリンカー（BM 機器）で 1,200X 100 μJ/cm² 照射

* 以下，「PSTVd 二量体 RNA 転写産物の感染性試験-⑦RNA ゲルブロット分析」に従い，DIG 標識 PSTVd cRNA プローブでハイブリダーゼーション，洗浄，ケミルミ検出後，希釈限界から RNA 転写産物の値をスタンダードとして環状 RNA 溶液中の PSTVd 換算濃度を求める

結果

PSTVd の右側分子中構造領域 (V, TR 領域) に生じた塩基変異の分析

伊藤 (2012) , Tsushima et al. (2011) の報告から, ダリアから発見された PSTVd 分離株 (PSTVd-D) は, PSTVd 基準株 (PSTVd-I) に比ベトマト に対して弱毒性の病徴を發揮することが示された. しかしながら, その病原性発現に至る詳細な分子機構は明らかになっていない.

そこで本研究ではまず, PSTVd-I と PSTVd-D の右側分子と左側分子を交換したキメラ変異体を構築し, PSTVd-D の左側分子と PSTVd-I の右側分子を有する変異体を PSTVd-DLIR (L, R はそれぞれ Left, Right の略称), 逆の組合せの変異体を PSTVd-ILDR と名付けた (修士課程で作成済み). その後, 感染性試験を行い, 未だ詳細が明らかになっていない PSTVd の病原性発現分子機構について分析を進めた. PSTVd-I と PSTVd-D を比較した場合, その塩基配列相同性は 97% であり分子中で 8 か所の違いが確認された. PSTVd-I を基準に PSTVd-D は 42, 43, 126, 201, 310 番塩基の塩基置換, 63-64 と 312-313 番塩基間への挿入変異, 118 番塩基の欠失変異を有する (図. 1). 特に, 右側分子に関しては, PSTVd-I と PSTVd-D 間の違いはわずか 3 塩基であったため, この 3 塩基に着目した PSTVd-D の 118 番と 126 番塩基を PSTVd-I 型へ組み換えた変異体 (D-118A/ C126A) と 201 番塩基のみ組み換えた変異体 (D-U201G) を追加で作成し分析に用いた. PSTVd 二量体感染性クローン構築手順に従ってゲノム鎖 RNA 転写産物接種源を作成し, Rutgers トマトへ各 5 個体ずつ接種した. 接種後 4, 5 週目でサンプリング・低分子量 RNA 抽出を行い, RNA ゲルブロット分析で感染を検定した結果, 今回接種試験に用いた PSTVd 変異体 4 系統のうち, D-118A/ C126A 以外の 3 系統で感染が確認された (図. 2). また, 感染個体由来の低分子 RNA をテンプレートに RT-PCR を行ったところ, いずれも 360 bp 付近にバンドが確認された. さらに, 「PSTVd 二量体 RNA 転写産物の感染性試験-⑥」に従い, それぞれ 10 クローンずつシーケンス解析したところ, いずれの PSTVd 系統も接種源の塩基配列に完全に一致しており, 安定に複製することが確認された.

次により正確な病原性比較分析を行うために, 低分子量 RNA 溶液中の PSTVd 含量をドットブロット分析で定量し, 環状 PSTVd RNA を接種源として 1 個体あたり PSTVd 換算濃度で 20 ng ずつトマトへ接種した. 一般的にウイロイドは, その環状構造を基盤とするローリングサークル型の複製様式をとる. 直鎖状 RNA である RNA 転写産物を接種源とした場合, ローリングサークル型複製に至るまでの過程でバイアスが生じる

可能性も否定できないため、本研究では病原性比較を行う場合は環状 RNA 溶液を用いた接種試験後の目視評価の結果を優先している。親株である PSTVd-I と PSTVd-D、PSTVd 変異体シリーズ PSTVd-DLIR, PSTVd-ILDR, D-U201G の環状 RNA 溶液をトマトへ各 3 個体ずつ接種した結果、接種後 4 週目で全てのトマトで感染が確認された (図. 3)。一方、接種後 1 か月目での目視評価の結果、PSTVd-DLIR と D-U201G は PSTVd-D の病徴に類似しており、PSTVd-ILDR は PSTVd-I と同程度或は PSTVd-I よりも若干弱毒な病徴を示していた (図. 4)。

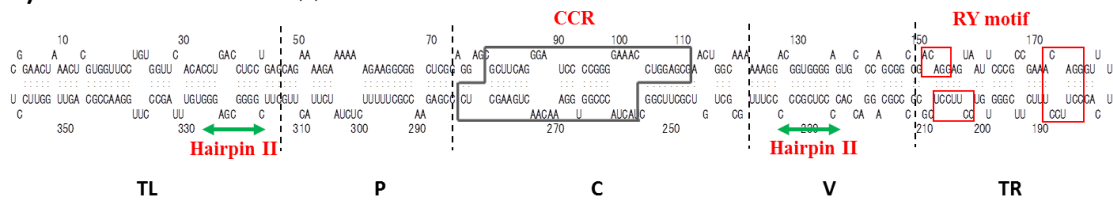
これらの結果から、PSTVd 右側分子中の 3 塩基 (118, 126, 201 番) に関しては、単独な塩基置換を伴っていてもトマトへ安定に感染することが確認されたため、さらに 10 系統の PSTVd キメラ変異体を作成した (図. 5)。PSTVd-DLIR, -ILDR と同様に、PSTVd-I 或は PSTVd-D を親株とし、118, 126, 201 番塩基を単独或は 2 塩基の組合せで交換したキメラ変異体である (例えば、I-118 Δ は PSTVd-I を親株とし、118 番塩基のみ PSTVd-D 型の欠失変異を導入)。また、PSTVd の 201 番塩基に関しては、G 或は U しか自然界で存在が確認されておらず、今回の変異体構築実験では G (或は U) 201A 及び G (或は U) 201C 型変異体を併せて作成し分析に用いた。各 PSTVd キメラ変異体の *in vitro* 二量体 RNA 転写産物接種試験の結果、親株が PSTVd-I, -D いずれの場合も 201C 型変異体のみトマトへ感染力を有していなかった。他の変異体は接種後 4 週目ですべての個体において変異導入箇所を保持したまま安定的に複製していた (図. 6)。

次いで、感染トマト由来の低分子量 RNA 溶液中の PSTVd 含量をドットプロット分析で定量し、環状 PSTVd RNA を接種源としてトマトへ接種した。*In vitro* 二量体 RNA 転写産物接種試験の場合と同様に、2, 3, 4 週目でサンプリング・検定用低分子量 RNA 抽出をし、RNA ゲルプロットで感染を検定した結果、接種後 2 週目で PSTVd-I 型変異体はすべての個体で感染が確認され、一方の PSTVd-D 型変異体は接種後 3 週目においても感染していない個体が確認された (図. 7)。そこで、接種後 2-4 週目のすべてのサンプルに関して、親株である PSTVd-I 及び PSTVd-D と分析済みであった PSTVd-DLIR, -ILDR, D-118A/C126A, D-U201G も分析対象に加え、RNA ゲルプロット分析後の化学発光シグナルを Chemidoc-XRS (バイオラド社) の Quantity One 1-D Analysis Software (Version 4.6.9) で定量解析した (図. 8)。今回の RNA ゲルプロット分析は、ケミルミ検出時のバイアスを考慮し、同じメンブレン上で各サンプル 2 反復ずつ (一方は逆向きで) 検定した。解析の結果、トマトへ感染した PSTVd 変異体のうち、PSTVd-DLIR, D-118A, D-C126A, D-U201A, D-U201G の 5 系統はかなり緩やかな複製速度を示し、

3-4 週目で PSTVd-D と同程度或は若干加速する傾向が見られた。対照的に、PSTVd-ILDR, I-A118Δ/ A126C, I-118AΔ, I-A126C, I-G201A そして I-G201U の 6 系統は、おおよそ PSTVd-I と同程度の複製速度であった。一方、各 PSTVd キメラ変異体の病原性に関しては、変異導入の有無にかかわらず複製速度に概ね比例する結果となった。すなわち、PSTVd-I 型変異体はトマトに対して PSTVd-I に類似した（同程度の）病徴を示し、PSTVd-D 型変異体は PSTVd-D に類似した病徴を示した（図. 9）。

図. 1) PSTVd-I と PSTVd-D の予測分子構造

i) PSTVd-Intermediate (I)



ii) PSTVd-dahlia (D)

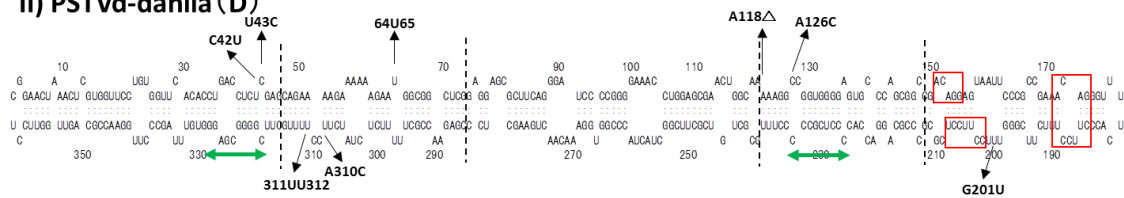
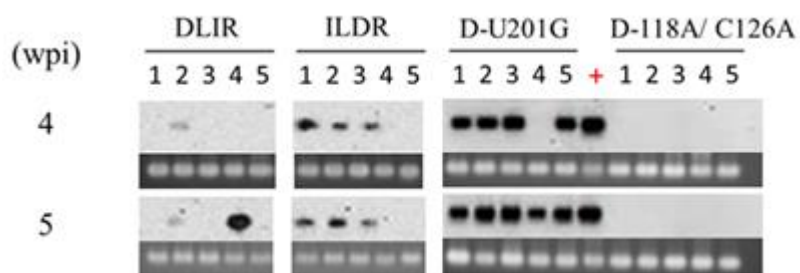


図. 2) RNA 転写産物接種後 4, 5 週目 RNA ゲルブロット分析結果



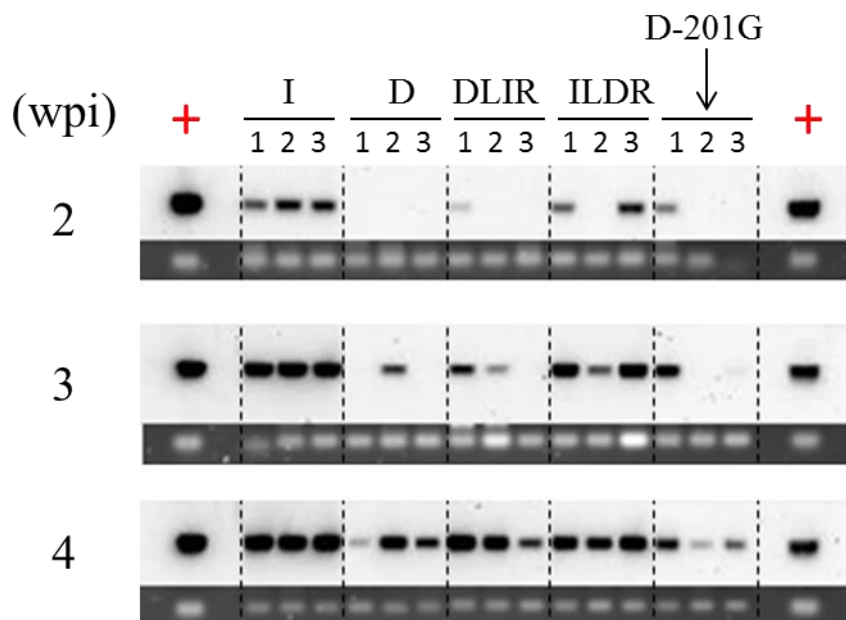
wpi: week post inoculation

+ : PSTVd positive control

* 1~5 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 3) 環状 RNA 接種後 2-4 週目 RNA ゲルブロット分析結果



wpi: week post inoculation

+ : PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 4) 環状 RNA 接種後 1 か月目の Rutgers トマト

左から健全トマト, PSTVd-I, -D, -DLIR, -ILDR, D-U201G 感染トマト

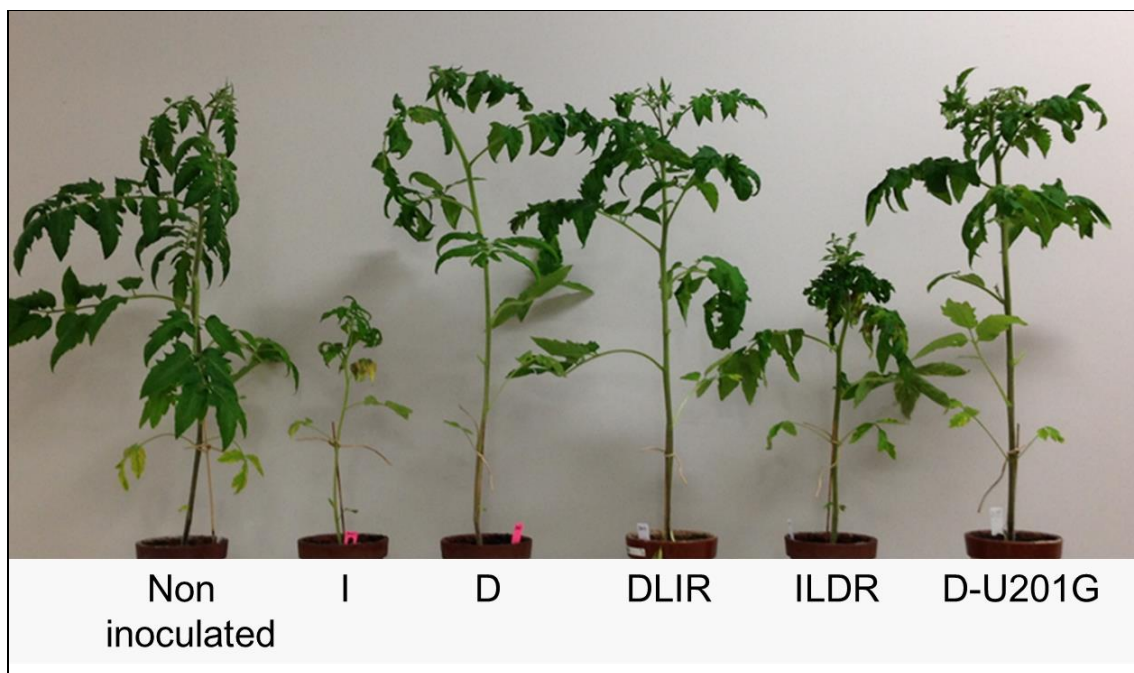


図. 5) PSTVd-I, -D シリーズ変異体 14 系統の RNA 転写産物接種試験概要

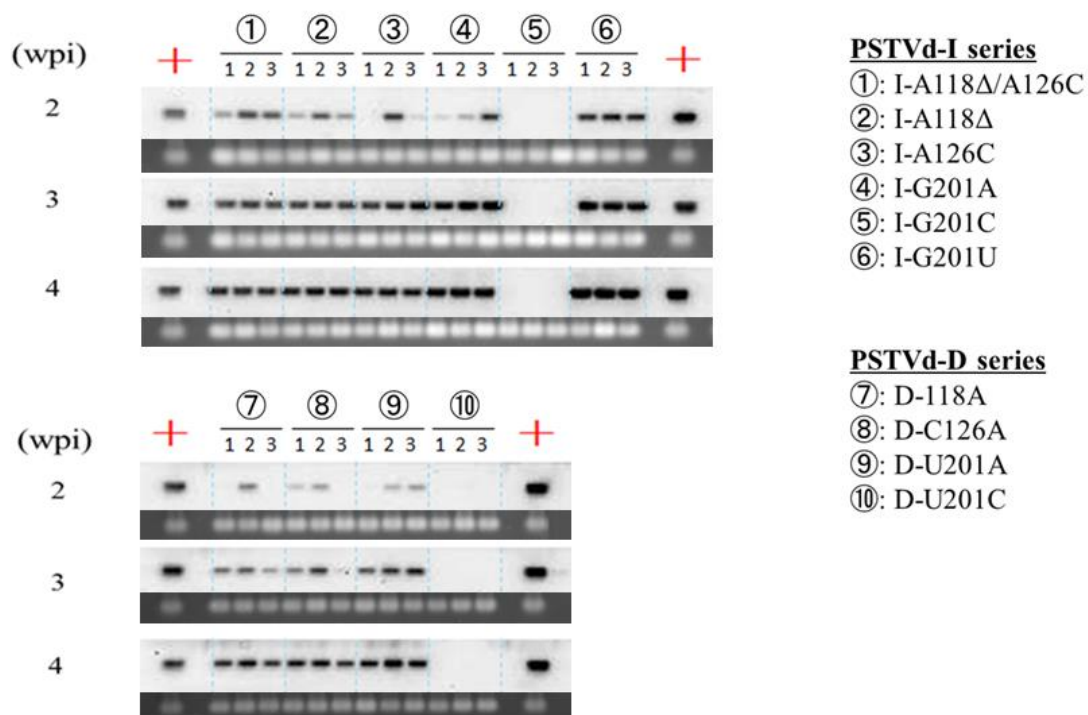
	Left Half (TL, P and C)	Mutation Positions in Right Half (V and TR)			Infectivity	Genetic Stability in Tomato	Systemic accumulation	Pathogenicity in Tomato
		118	126	201				
Wild Type								
PSTVd-Intermediate (I)	I	A	A	G	Yes	stable (10/10)*3	fast	severe
PSTVd-Dahlia (D)	D	Δ ¹	C	U	Yes	stable (10/10)	slow	mild
Mutant								
I-series								
PSTVd-ILDR	I	Δ	C	U	Yes	stable (10/10)	fast	severe
I-A118Δ/A126C	I	Δ	C	G	Yes	stable (10/10)	fast	severe
I-A118Δ	I	Δ	A	G	Yes	stable (10/10)	fast	severe
I-A126C	I	A	C	G	Yes	stable (10/10)	fast	severe
I-G201A	I	A	A	A	Yes	stable (9/10)	fast	severe
I-G201C	I	A	A	C	No	NT	none	none
I-G201U	I	A	A	U	Yes	stable (10/10)	fast	severe
D-series								
PSTVd-DLIR	D	A	A	G	Yes	stable (10/10)	slow	mild
D-118A/C126A	D	A	A	U	No	NT	none	none
D-118A	D	A	C	U	Yes	stable (10/10)	slow	mild
D-C126A	D	Δ	A	U	Yes	stable (10/10)	slow	mild
D-U201A	D	Δ	C	A	Yes	stable (9/10)	slow	mild
D-U201C	D	Δ	C	C	No	NT	none	none
D-U201G	D	Δ	C	G	Yes	stable (10/10)	slow	mild

*1: Δ = 欠失変異

*2: 青網掛け塩基は PSTVd-I 型の塩基を示す

*3: 括弧内の数値は、シーケンス解析したサンプル数あたりの安定的に複製した数を示す

図. 6) PSTVd キメラ変異体 (118, 126, 201 番塩基) 10 系統の RNA 転写産物接種後
2, 3, 4 週目 RNA ゲルブロット分析結果



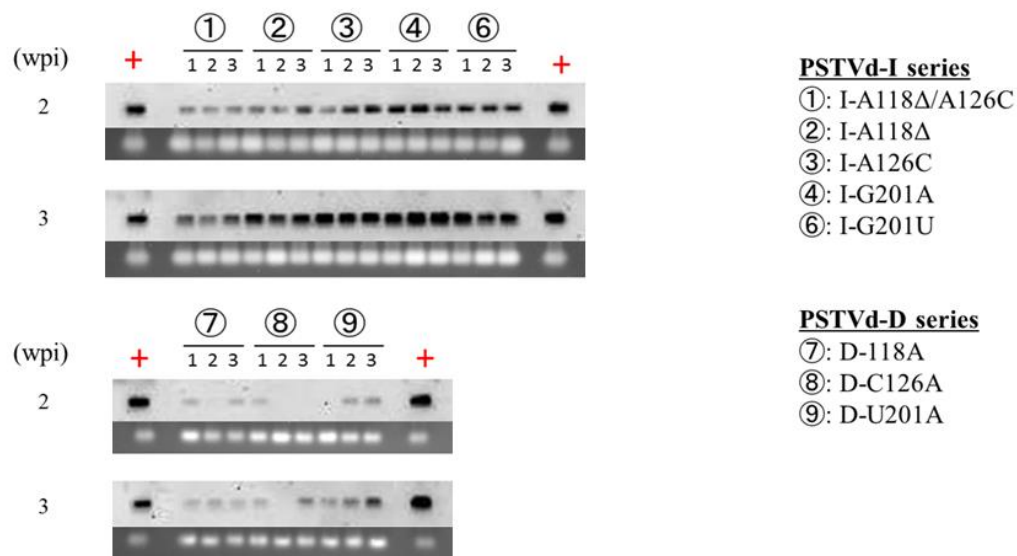
wpi: week post inoculation

+ : PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 7) PSTVd キメラ変異体 (118, 126, 201 番塩基) 感染 8 系統の環状 RNA 転写産物接種後 2, 3 週目 RNA ゲルブロット分析結果



wpi: week post inoculation

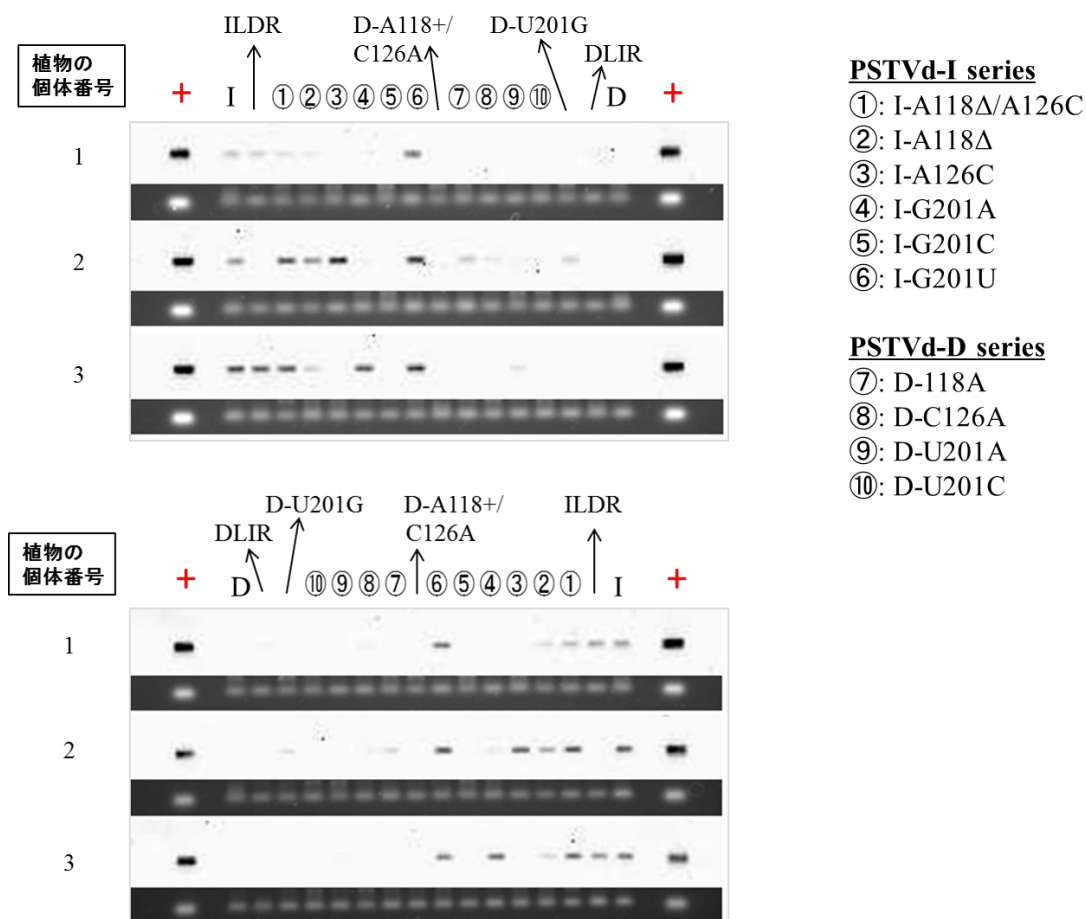
+: PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 8) 定量解析用 RNA 転写産物接種後 RNA ゲルブロット分析 (各 2 反復)

i) 接種後 2 週目 RNA ゲルブロット分析結果

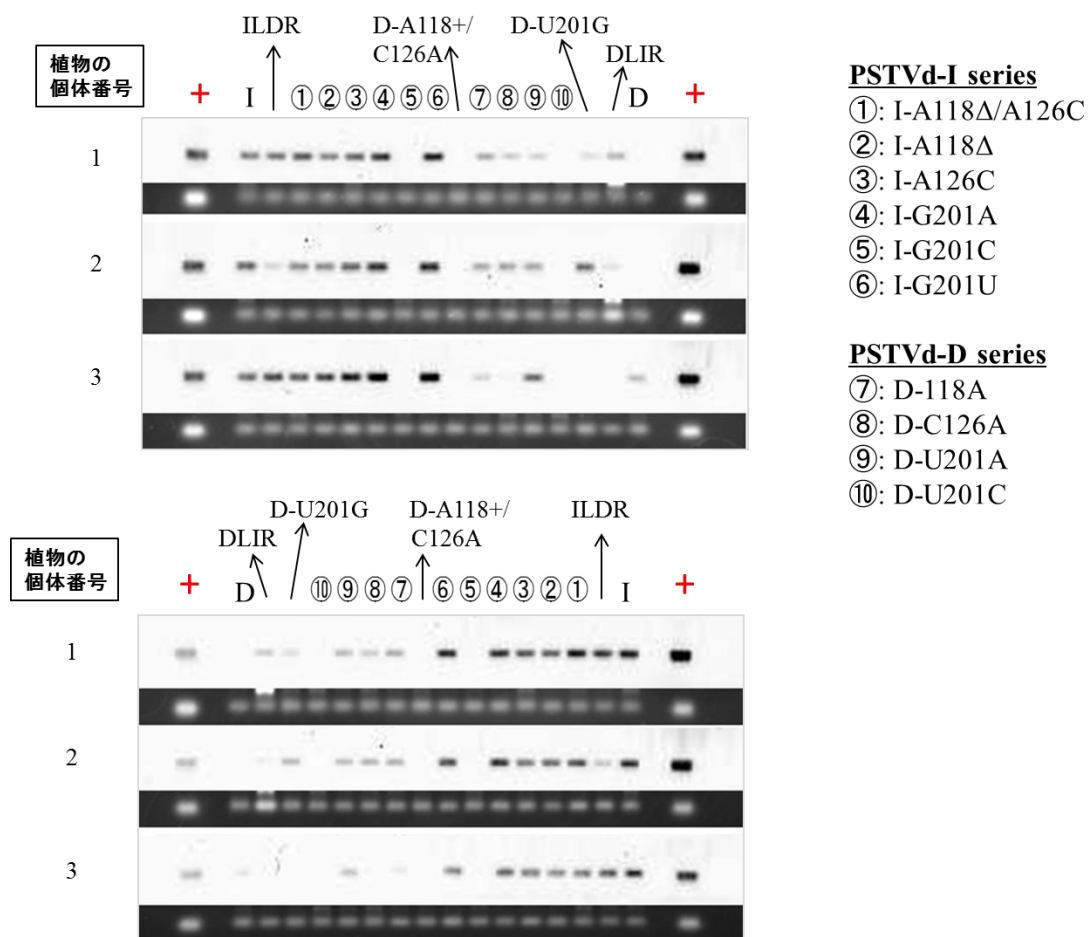


+ : PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

ii) 接種後 3 週目 RNA ゲルブロット分析結果

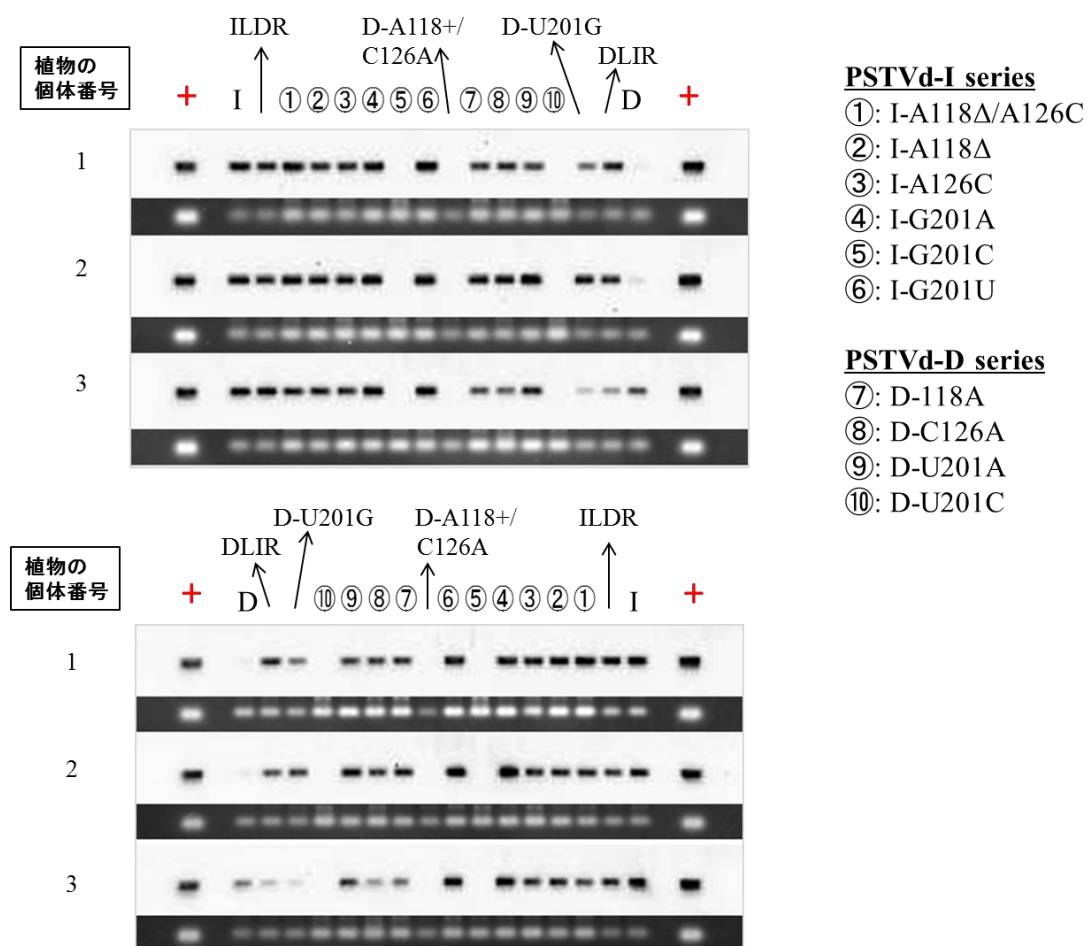


+ : PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

iii) 接種後 4 週目 RNA ゲルブロット分析結果



+ : PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

iv-1) 定量解析結果 (2×3 個体平均), ポリュームアレイ

Samples	Volume INT*mm2 (2 wpi の2×3個体平均)	Volume INT*mm2 (3 wpi の2×3個体平均)	Volume INT*mm2 (4 wpi の2×3個体平均)
PSTVd-I	0.319918342	0.61592023	0.820817364
PSTVd-ILDR	0.187747196	0.517936246	0.687107615
I-A118Δ/A126C	0.29286005	0.577832416	0.738778066
I-A118Δ	0.15604258	0.507888103	0.689503065
I-A126C	0.165710814	0.576996562	0.685510646
I-G201A	0.16246796	0.731575518	0.875287977
I-G201C	0.037945716	0.114512895	0.107299287
I-G201U	0.362917635	0.660053461	0.874800415
D-118A/C126A	0.047374074	0.096131005	0.081970089
D-118A	0.06379165	0.175127808	0.566166853
D-C126A	0.050587774	0.154985219	0.558818649
D-U201A	0.053404449	0.229857394	0.651470468
D-U201C	0.028908822	0.037839079	0.068222843
D-U201U	0.057802292	0.127671207	0.377741625
PSTVd-DLIR	0.038256827	0.102458818	0.450306628
PSTVd-D	0.029391857	0.062247918	0.182053477

iv-2) 定量解析結果 (2×3 個体平均), 折れ線グラフ

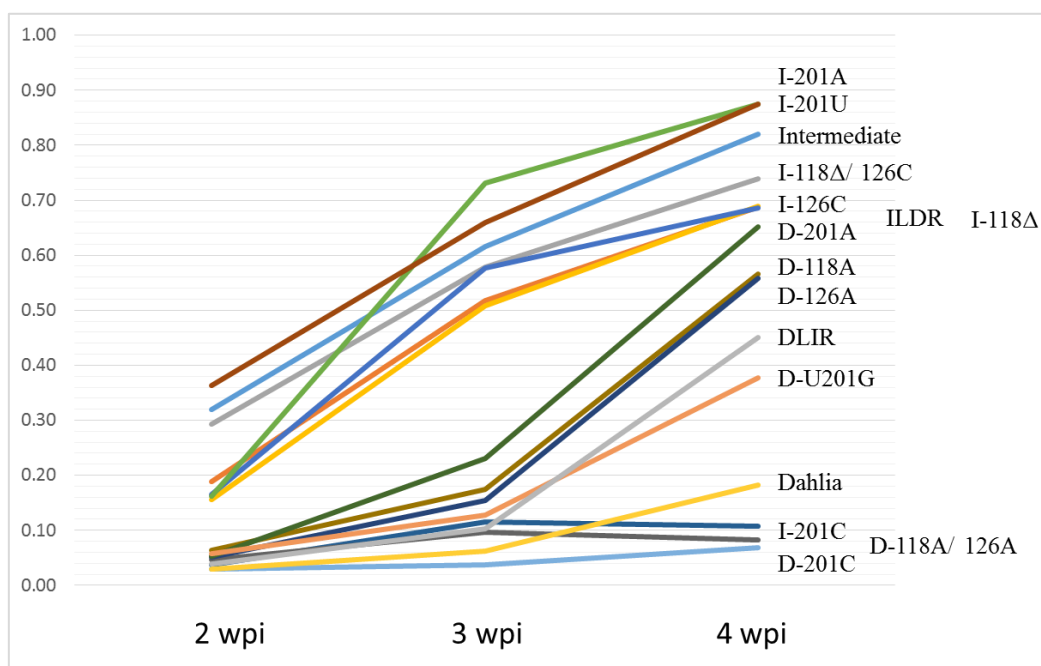
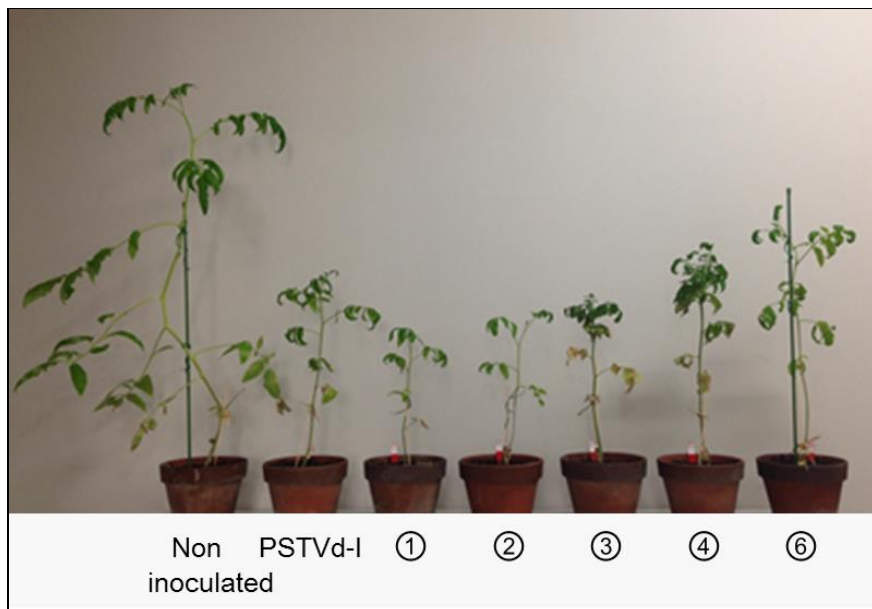
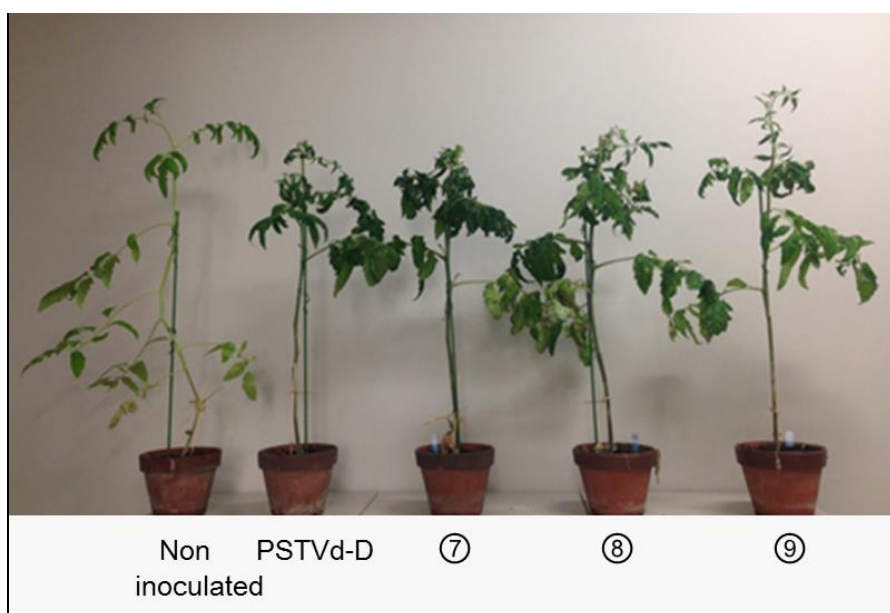


図. 9) PSTVd キメラ変異体 (118, 126, 201 番塩基) 感染系統の環状 RNA 接種後
2 か月目の Rutgers トマト

i) PSTVd-I シリーズ: 左から健全トマト, PSTVd-I, I-A118Δ/ A126C (①),
I-118Δ (②), I-A126C (③), I-G201A (④), I-G201U (⑥) 感染トマト



ii) PSTVd-D シリーズ: 左から健全トマト, PSTVd-D, D-118A (⑦), D-C126A (⑧),
D-U201A (⑨) 感染トマト



PSTVd の左側分子中構造領域 (TL, P 領域) に生じた塩基変異の解析-1

PSTVd 右側分子に関するキメラ変異体構築実験の結果, PSTVd-D の複製が PSTVd-I よりも遅い要因は, 主に左側分子 (TL, P 領域) 中の塩基置換とそれに伴う予測分子構造の変化が影響していることが明らかになった. 加えて, PSTVd-D の弱毒な病原性発現も左側分子が主要な役割を担っている可能性が示唆された. そこで次に, この病原性の違いについて左側分子中の PSTVd-I, -D 間の塩基置換に着目し, 右側分子の場合と同様に計 10 系統の新たな PSTVd キメラ変異体を作成した. さらに, 強毒系統 PSTVd-I と弱毒系統 PSTVd-D に加え, 致死型系統 PSTVd-RG1 株特有な P 領域中の 2 塩基 (46-47 番塩基) に着目し, この 2 塩基を導入した PSTVd-I 型, -D 型変異体の 2 系統も追加で作成した (図. 10, 11). これまでと同様に二量体感染性クローンを作成後に *in vitro* RNA 転写産物をトマトへ接種した結果, 接種後 4 週目で全ての個体で感染が確認された (図. 12-i).

しかしながら, 複製後の安定性を確認するために接種後 4 週目の低分子量 RNA をテンプレートにシーケンス解析を行ったところ, PSTVd-I 型変異体では 6 系統のうち I-C42U, I-64U, I-A310C の 3 系統のみが安定的に複製しており, 一方の PSTVd-D 型変異体では 6 系統のうち D-C43U と D-312UU Δ の 2 系統のみが安定的に複製していた. これら 5 系統以外の変異体はいずれも高頻度で共変異を伴っていた (図. 11). まず I-C42U 及び D-C43U は変異導入箇所を安定的に保持したまま複製しており, 42-43UU の塩基配列を保持していることが確認された. I-U43C 及び D-U42C はそれぞれ 2/13, 10/11 で 42-43CU の塩基配列を保つように共変異を生じており, すなわち, 42-43CC の組合せは保持しがたい可能性が考えられる. PSTVd-D に特徴的な 64 番塩基に関しては, I-64U が変異箇所を安定的に保持していた一方で D-64U Δ は 311C の欠失を伴っていた. すなわち, PSTVd-D の左側分子に生じた塩基置換のうち, 64U と 311C は共変異することで PSTVd-D の弱毒性へ関与する可能性が示唆された. また, 310 番塩基に関しては D-C310A で 311-312UU のうち 1 塩基 U が 10/10 で欠失していた. 加えて, 310 番塩基と同じ下側鎖 (lower strand) に位置する 311-312UU の挿入 (PSTVd 弱毒株に特徴的) についても I-312UU で感染後に 1 塩基 U の欠失 (10/12) が確認されたことから, 310 番塩基と 312UU が相互に関係する可能性が示唆された. 致死型 PSTVd-RG1 株に特徴的な 46-47 番塩基を導入した I 或は D-GC46-47CA は, 感染後にいずれも U316C の致死型株に特徴的な塩基置換 (共変異) を生じており, さらに D-C46-47CA は 11/11 で 312UU の欠失を伴っていたことから上記の 312UU の挿入が PSTVd の弱毒性に関与

する一つの証拠になると言える。

次いで、病原性比較分析を行うために、*in vitro* RNA 転写産物接種試験で得られた低分子量 RNA 溶液中の PSTVd 含量をドットプロット分析で定量し、環状 PSTVd RNA を接種源としてトマトへ接種した。その結果、自明のことながらすべての変異体がトマトへ感染していた (図. 12-ii)。接種後 4 週目でシーケンス解析を行ったところ、興味深いことに、RNA 転写産物接種後に復帰変異や共変異、挿入・欠失変異が確認された系統は、環状 RNA 接種を介して完全に (100%) その変異を保持したままトマト中で複製していることが確認された (図. 13)。一方、トマトに感染後の病原性に関しては、右側分子キメラ変異体の場合とは異なり、いくつかの系統で症状に変化が現れた。それらは PSTVd-I 型変異体のうち I-C42U と I-64U の 2 系統であり、今回の分析ではどちらも親株である PSTVd-I よりも明らかに弱毒な症状を示し、特に I-C42U は PSTVd-D と同程度の病原性であった。他の感染系統に関しては、共変異の有無に関わらずいずれも親株に類似した病原性であった。致死型 PSTVd の 2 塩基を導入した I 及び D-GC46-47CA は、いずれも軽度の葉脈壞疽を生じていたものの、おおよそ親株と同程度の病原性であった。

図. 10) PSTVd-RG1 のアライメント解析 (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment: PSTVd-I と比較) と予測分子構造

i) アライメント解析結果

```

PSTVd-I      CGGAACTAAACTCGTGGTTCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGAGCAGAAAAGAAAAA 60
PSTVd-RG1    CGGAACTAAACTCGTGGTTCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGAGCAGAAAAGAAAAA 60
*****

PSTVd-I      GAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAA 120
PSTVd-RG1    GAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCCGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAA 120
*****

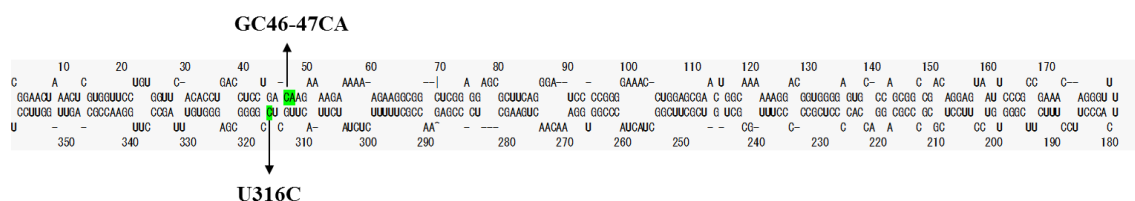
PSTVd-I      AAAGGACGGTGGGGAGTGCCAGCGCCGACAGGAGTAATCCGCGCGAAACAGGGTTTT 180
PSTVd-RG1    AAAGGACGGTGGGGAGTGCCAGCGCCGACAGGAGTAATCCGCGCGAAACAGGGTTTT 180
*****

PSTVd-I      CACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCCTCGCGCCGCGAGGACCACCCCTCGCCCCCTTT 240
PSTVd-RG1    CACCCTTCCTTTCTTCGGGTGTCCTTCCTCGCGCCGCGAGGACCACCCCTCGCCCCCTTT 240
*****

PSTVd-I      GCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCCGGTGAAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTT 300
PSTVd-RG1    GCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCCGGTGAAACAACCTGAAGCTCCCGAGAACCGCTTTTT 300
*****

PSTVd-I      CTCTATCTTACTTGCTTCGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT 359
PSTVd-RG1    CTCTATCTTACTTGCTTCGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT 359
*****
    
```

ii) PSTVd-RG1 の予測分子構造 (Mfold web server)



* PSTVd-D の 46-47 番塩基は PSTVd-I と同じ塩基配列. PSTVd-I, -D 型キメラ変異体 10 系統に加え, PSTVd-RG1 に特徴的な上鎖の 2 塩基を導入した変異体, すなわち, I-GC46-47CA と D-GC46-47CA を追加で作成した

図. 11) PSTVd 左側分子キメラ変異体 12 系統の RNA 転写産物接種試験概要

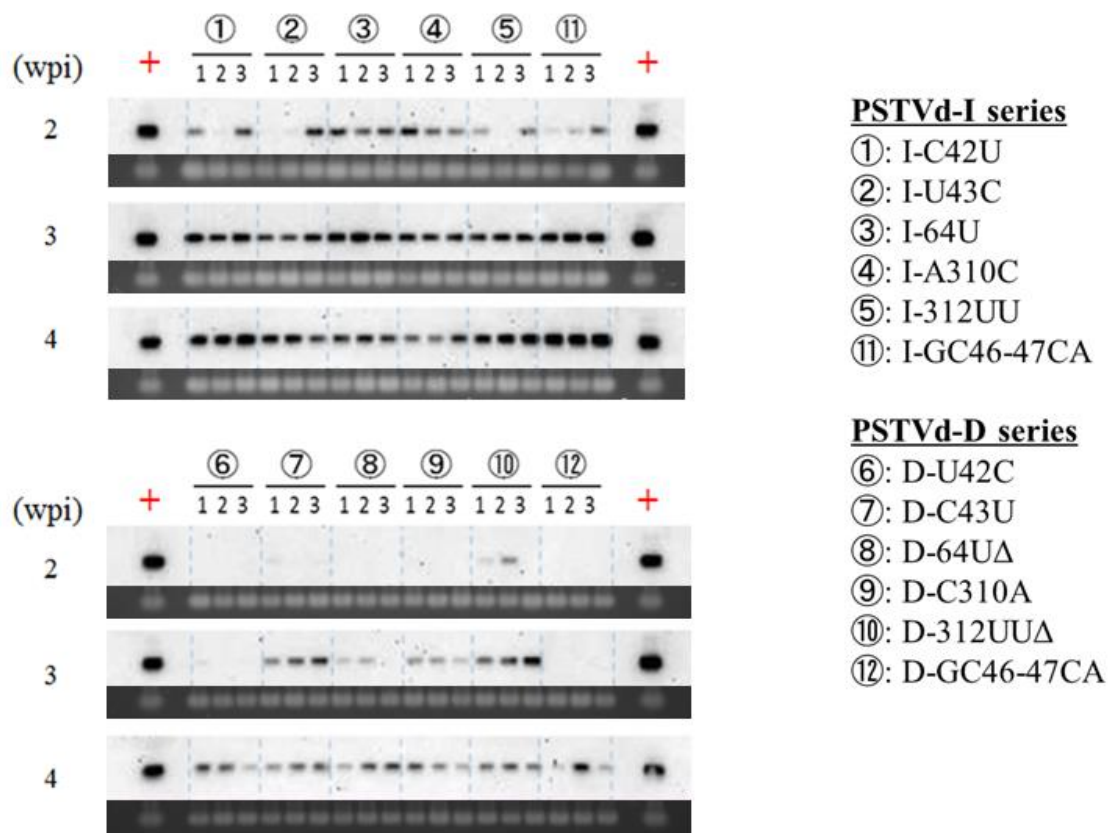
Table; Summary of native circular RNA infection assay of 14 PSTVd-I and PSTVd-D based mutants	Right Half (C, V and TR)	Mutation Positions in Left Half (TL and P)						Infectivity	Genetic Stability in Tomato (4wpi)	Systemic Accumulation
Mutants										
I-series										
I-C42U	I	U	U	-	A	-	Yes	stable (11/11)	fast	
I-U43C	I	C	C	-	A	-	Yes	revert (2/13) *1	fast	
I-64U	I	C	U	U	A	-	Yes	stable (14/14)	fast	
I-A310C	I	C	U	-	C	-	Yes	stable (13/13)	fast	
I-312UU	I	C	U	-	A	UU	Yes	unstable (UU→U; 10/12)	fast	
I-GC46-47CA	I	C	U	-	A	-	Yes	covariation (U316C; 1/10)*2	fast	
D-series										
D-U42C	D	C	C	U	C	UU	Yes	covariation (C43U; 10/11)	very slow	
D-C43U	D	U	U	U	C	UU	Yes	stable (12/12)	slow	
D-64Δ	D	U	C	-	C	UU	Yes	covariation (311CΔ; 5/12)	slow	
D-C310A	D	U	C	U	A	UU	Yes	covariation (312UΔ; 5/10)	slow	
D-312UUΔ	D	U	C	U	C	-	Yes	stable (12/12)	slow	
D-GC46-47CA	D	U	C	U	C	UU	Yes	covariation *3 (312UUΔ and U316C; 11/11)	very slow	

1. Δ は欠失変異，数字と塩基の組み合わせ（64U）は挿入変異を示す
2. 青網掛け塩基は PSTVd-I 型の塩基を示し，括弧内の数値は，シーケンス解析したサンプル数あたりの安定的に複製した数を示す
3. I-GC46-47CA 及び D-GC46-47CA 変異体は，トマトに致死性の病気を引き起こす RG1 株と PSTVd-I, -D 間で 46-47 番塩基を交換した変異体である

- *1. *In vitro* RNA 転写産物を接種したトマト苗木において，11 クローン中の 2 クローンは安定であったが，これらの植物から抽出された RNA をトマト苗木に再度接種したところ，検出された子孫配列はすべて PSTVd-I 型であった
- *2. *1 と同様に，環状 RNA 分子の再接種により全ての子孫配列は U316C の共変異を生じていた
- *3. PSTVd-D への RG1 型 P 領域塩基置換の導入は，病原性に大きな影響を与えず，軽度の葉脈壞疽が観察された程度であった

図. 12) PSTVd 左側分子キメラ変異体 12 系統の接種試験後 RNA ゲルブロット分析結果

i) *in vitro* RNA 転写産物接種結果



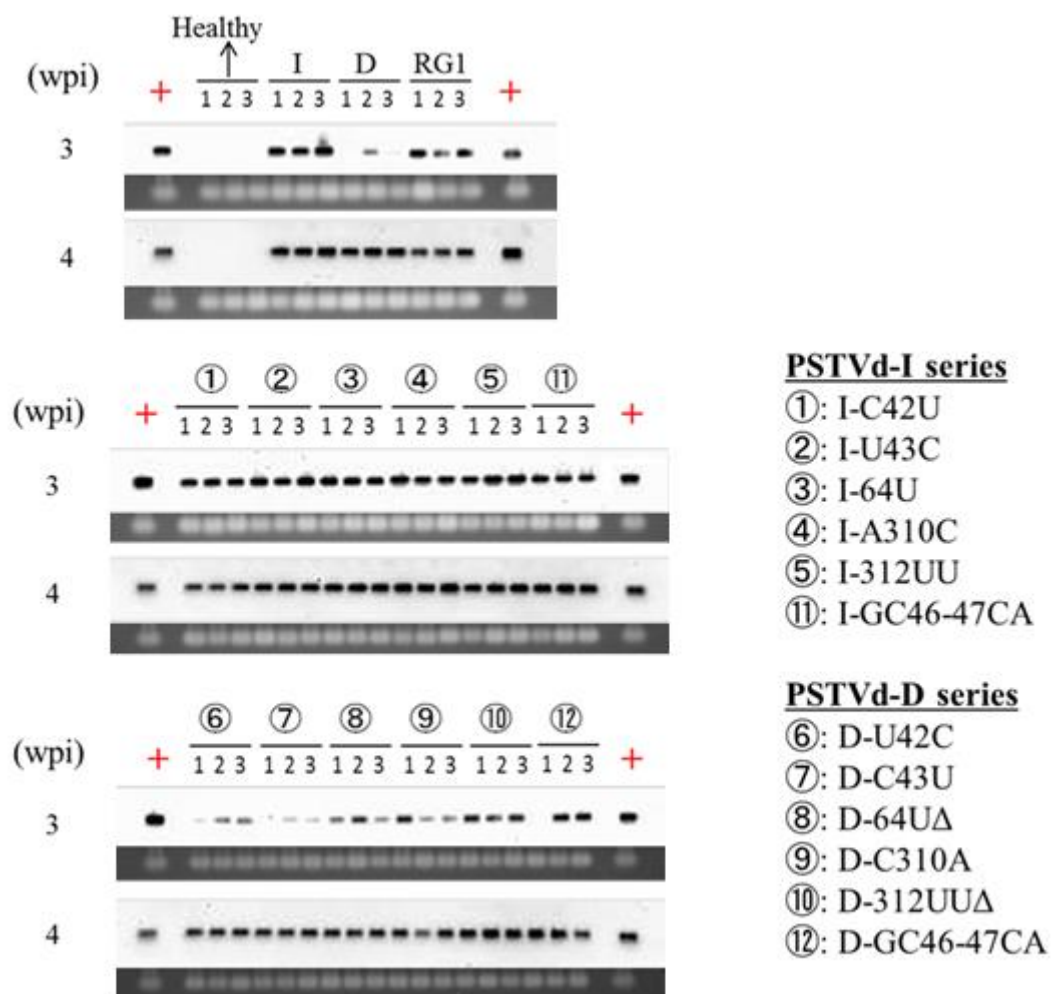
wpi: week post inoculation

+ : PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

ii) 環状 RNA 接種結果



wpi: week post inoculation

+ : PSTVd positive control

* 1~3 の数字は植物の個体番号

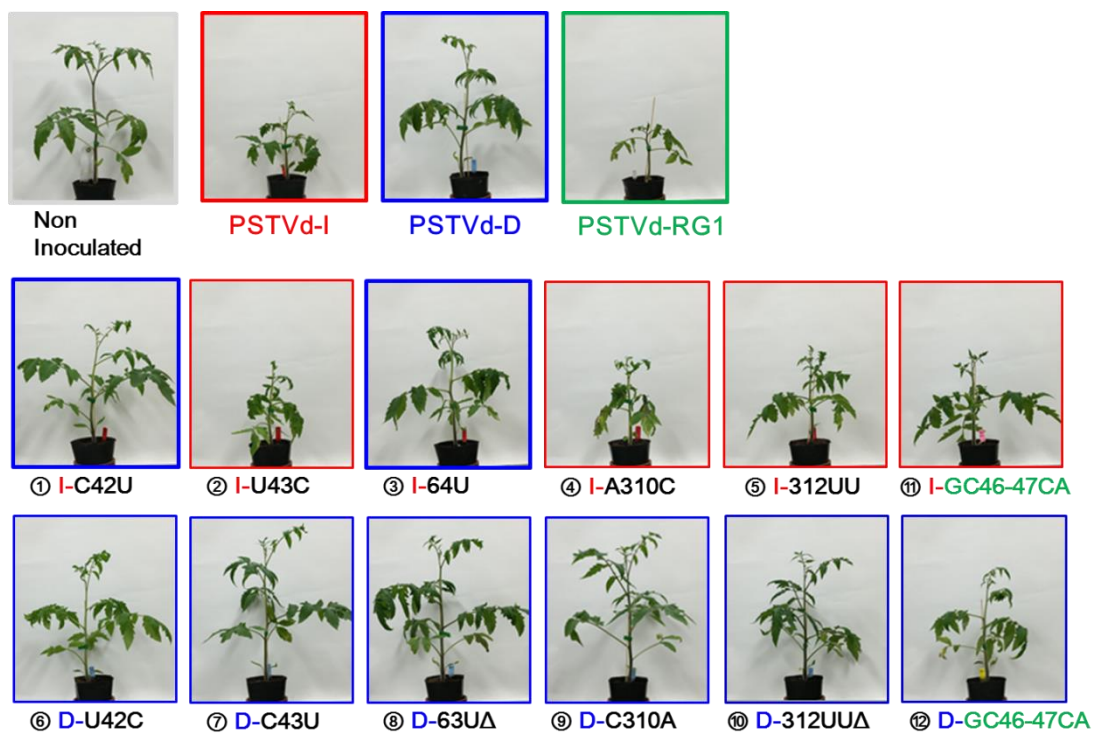
* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 13) PSTVd 左側分子キメラ変異体 12 系統の環状 RNA 接種試験概要

Table; Summary of native circular RNA infection assay of 14 PSTVd-I and PSTVd-D based mutants	Right Half (C, V and TR)	Mutation Positions in Left Half (TL and P)						Infectivity	Genetic Stability in Tomato (4wpi)	Systemic Accumulation	Pathogenicity in Tomato
		42	43	64	310	312-313					
Wild Type											
PSTVd-Intermediate (I)	I	C	U	-	A	-	Yes	stable (13/13)	fast	severe	
PSTVd-Dahlia (D)	D	U	C	U	C	UU	Yes	stable (10/10)	slow	mild	
PSTVd-RG1	I	C	U	-	A	-	Yes	stable (10/10)	fast	lethal	
Mutants											
I-series											
I-C42U	I	U	U	-	A	-	Yes	stable (11/11)	fast	mild	
I-U43C	I	C	C	-	A	-	Yes	revert (10/10)	fast	severe	
I-64U	I	C	U	U	A	-	Yes	stable (17/17)	fast	mild	
I-A310C	I	C	U	-	C	-	Yes	stable (11/11)	fast	severe	
I-312UU	I	C	U	-	A	UU	Yes	unstable (UU→U; 12/12)	fast	severe	
I-GC46-47CA	I	C	U	-	A	-	Yes	covariation (U316C; 10/10)	fast	severe	
D-series											
D-U42C	D	C	C	U	C	UU	Yes	covariation (C43U; 12/12)	slow	mild	
D-C43U	D	U	U	U	C	UU	Yes	stable (11/11)	slow	mild	
D-64Δ	D	U	C	-	C	UU	Yes	covariation (311CΔ; 10/10)	slow	mild	
D-C310A	D	U	C	U	A	UU	Yes	covariation (312UΔ; 10/10)	slow	mild	
D-312UUΔ	D	U	C	U	C	-	Yes	stable (10/10)	slow	mild	
D-GC46-47CA	D	U	C	U	C	UU	Yes	covariation (312UUΔ and U316C; 10/10)	slow	mild	

1. Δ は欠失変異，数字と塩基の組み合わせ（64U）は挿入変異を示す
2. 青網掛け塩基は PSTVd-I 型の塩基を示し，括弧内の数値は，シーケンス解析したサンプル数あたりの安定的に複製した数を示す
3. I-GC46-47CA 及び D-GC46-47CA 変異体は，トマトに致死性の病気を引き起こす RG1 株と PSTVd-I, -D 間で 46-47 番塩基を交換した変異体である

図. 14) PSTVd 左側分子キメラ変異体の環状 RNA 接種後 1 か月目の Rutgers トマト



* PSTVd-I 由来の変異体を赤字 (-I 型の病徴は赤枠), PSTVd-D 由来の変異体を青字 (-D 型の病徴は青枠), PSTVd-RG1 由来の変異箇所を緑字で示している

PSTVd の左側分子中構造領域 (TL, P 領域) に生じた塩基変異の解析-2

PSTVd-I, -D 及び-RG1 間の左側分子に関するキメラ変異体構築実験の結果, 複製に関しては右側分子よりも高頻度で塩基変異を生じながらも宿主へ適応し, 世代を重ねることで安定的な分子構造 (或は塩基配列) を保持するように進化する可能性が明らかになった. さらに興味深いことに, 強毒系統 PSTVd-I に弱毒系統 PSTVd-D 型の C42U の塩基置換或は及び 64U の挿入を導入することで弱毒化を誘発することができた. すなわち, PSTVd の病原性が単一或は数塩基の塩基変異誘導によってコントロールできる可能性を実証した. この結果を裏付けるために, さらに致死型 PSTVd 系統 AS1 株を分析対象に取り入れ, 北海道大学農学研究院の畑谷達児先生協力のもと, TL 及び P 領域中の塩基置換に着目した 6 種類のキメラ変異体を作成した (図. 15).

Rutgers トマトへの二量体 *in vitro* RNA 転写産物接種試験の結果, PSTVd-I/GC46-47CU のみ非感染であり, 他の 5 系統はすべて感染した (図. 16-i). これまでと同様に, 感染系統の複製後の安定性を確認するために接種後 4 週目の低分子量 RNA をテンプレートにシーケンス解析を行ったところ, I-U313A/U317C と AS1-C317C は変異導入箇所を保持したまま複製しており, I-U317C と AS1-A313U はそれぞれ親株への復帰変異が見られ, I-U313A は高確率 (8/10) で 303U の挿入変異を伴って複製していることが確認された (図. 17). 次いで, 低分子量 RNA 抽出溶液のドットプロット分析を経て, 環状 PSTVd RNA をトマトへ接種した (図. 16-ii). 目視評価による病原性比較の結果, 基本的にはいずれの変異体も親株と同程度の病原性であったが, 唯一, 303U の挿入変異を伴っていた I-U313A は若干弱毒化していた (図. 18). まず復帰変異した I-U317C と AS1-A313U のうち, I-U317C は本来 U である 317 番塩基は PSTVd-I 分子中で上側鎖の G とノンワトソンクリック型塩基対 (ゆらぎ塩基対) を組んでいるため, C に変異した場合は C:G 塩基対を組むことが可能であると考えられるが U へ復帰変異したことを考慮する限り, 第 7 ステム構造中の 5' 末端 G : U は周辺の塩基配列に依存し, 病原性の決定には直接関与しない可能性が示唆された (図. 21). 一方の AS1-A313U は A313U の塩基置換により第 7 ステム構造中に生じたインターナルループを打破することで感染性を取り戻したものと考えられる. I-GC46-47CU はこの 2 塩基の変異導入により, 第 7 ステム構造中に AS1-A313U と同じインターナルループを分子中で保有しており, このループが非感染性に関与しているものと推測される. さらに, PSTVd-I 型の I-313A/U317C が AS1-C317U を含む致死型 PSTVd に特徴的なバルジループを第 7 ステム中に有しているにも関わらず病原性が PSTVd-I と同程度であった結果から, 致死型

PSTVd の病原性発現の一つの要因として、第 7 ステム構造中の 5'末端側から 3 塩基目に生じるバルジループが考えられた。最後に、I-U313A は U313A の変異導入箇所を保持するために 303U の挿入変異を伴い、若干弱毒化したものと考えられる。この点に関しては追加の調査が求められる。

図. 15) PSTVd-AS1 のアライメント解析 (CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment: PSTVd-I と比較) と予測分子構造及び各変異体の特徴

i) PSTVd-I とのアライメント解析結果

```

PSTVd-I      CGGAACTAAACTCGTGGTTCTGTGGTTCCACACCTGACCTCCTGAGCAGAAAAGAAAAA 60
PSTVd-AS1   CGGAACTAAACTCGTGGTTCTGTGGTTCCACACCTGACCTCCTGACTAGAAAAGAAAAA 60
*****

PSTVd-I      GAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAA 120
PSTVd-AS1   GAAGGCGGCTCGGAGGAGCGCTTCAGGGATCCCGGGGAAACCTGGAGCGAACTGGCAAA 120
*****

PSTVd-I      AAAGGACGGTGGGAGTGCCAGCGCCGACAGGAGTAATCCCGCGAAACAGGGTTTT 180
PSTVd-AS1   AAAGGACGGTGGGAGTGCCAGCGCCGACAGGAGTAATCCCGCGAAACAGGGTTTT 180
*****

PSTVd-I      CACCCTTCCTTTCTTGGGTGTCTTCTCGCGCCGACAGGACCACCCCTCGCCCCCTT 240
PSTVd-AS1   CACCCTTCCTTTCTTGGGTGTCTTCTCGCGCCGACAGGACCACCCCTCGCCCCCTT 240
*****

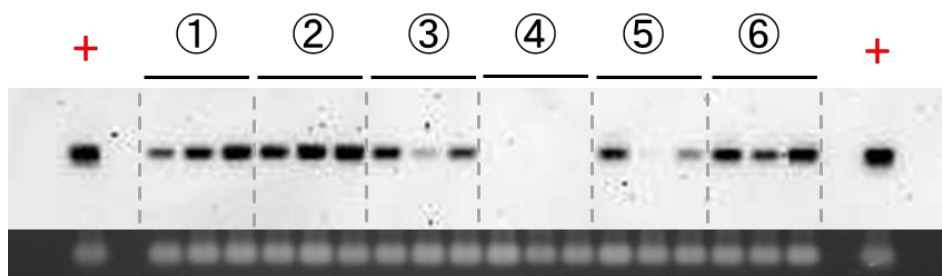
PSTVd-I      GCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCGGTGGAACAACCTGAAGCTCCGAGAACCGCTTTTT 300
PSTVd-AS1   GCGCTGTCGCTTCGGCTACTACCGGTGGAACAACCTGAAGCTCCGAGAACCGCTTTTT 300
*****

PSTVd-I      CTCTATCTTACTTGCTTCGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCT 359
PSTVd-AS1   CTCTATCTTACTAGCTCGGGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCT 359
*****

```


図. 16) PSTVd-I/AS1 変異体シリーズの RNA ゲルブロット分析結果

i) *in vitro* RNA 転写産物接種結果 (4 wpi)

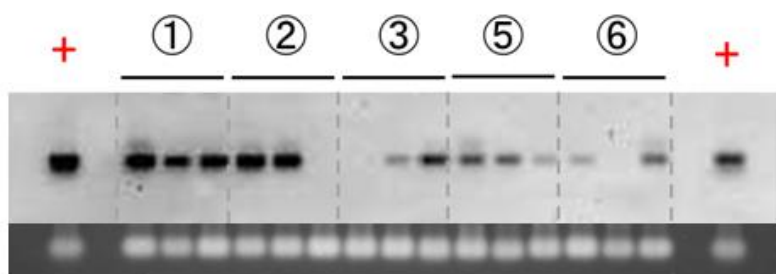


+ : PSTVd positive control

* プローブには DIG 標識 PSTVd
アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

① : PSTVd-I/U317C
② : PSTVd-I/U313A
③ : PSTVd-I/U313A/U317C
④ : PSTVd-I/GC46-47CU
⑤ : PSTVd-AS1/A313U
⑥ : PSTVd-AS1/C317U

ii) 環状 RNA 接種結果 (4 wpi)



+ : PSTVd positive control

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

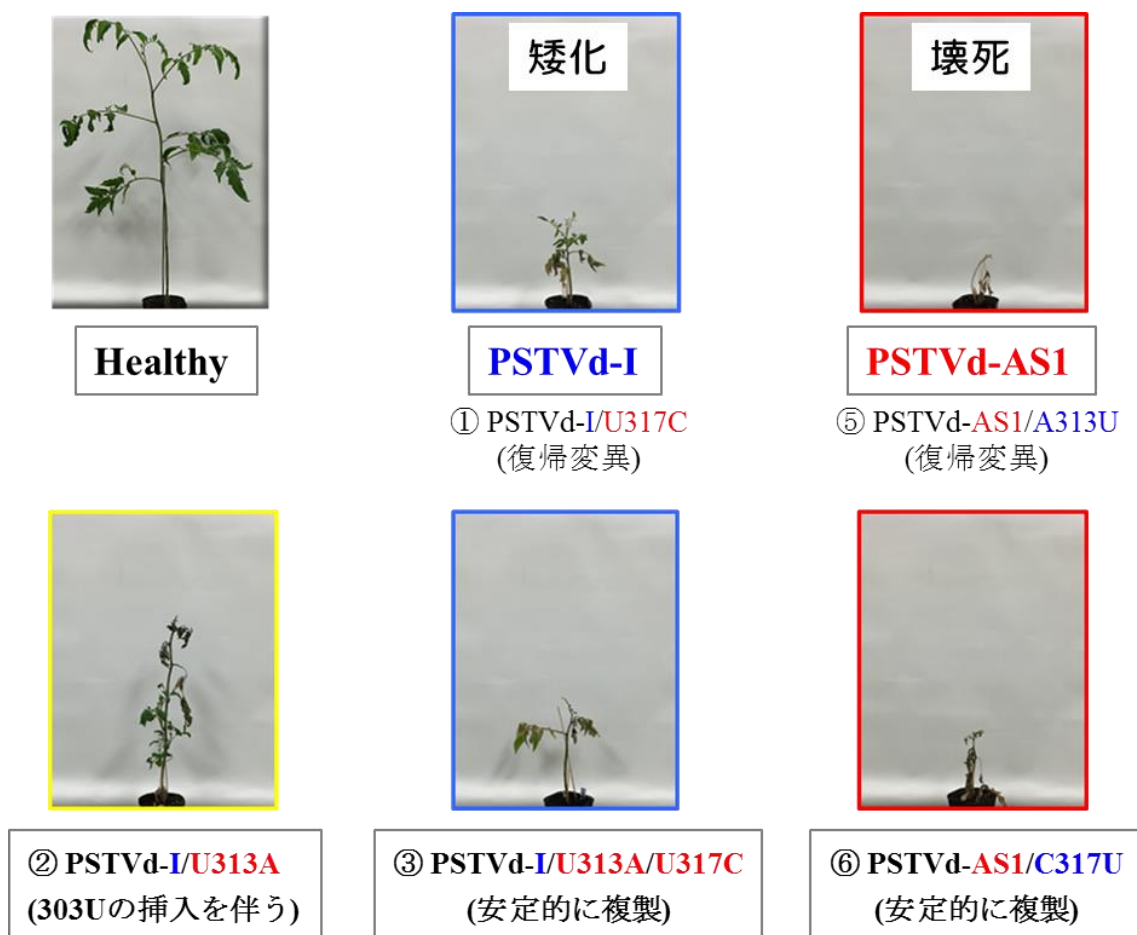
* ①-③, ⑤, ⑥は, i) *in vitro* RNA 転写産物接種結果に同じ

図. 17) PSTVd-I/AS1 変異体シリーズの RNA 転写産物接種試験概要

Table; Summary of native circular RNA infection assay of 14 PSTVd-I and PSTVd-D based mutants	Right Half (C, V and TR)	Mutation Positions in Left Half (TL and P)			Infectivity	Genetic Stability in Tomato (4wpi)	Systemic Accumulation
		46-47	313	317			
Mutants		46-47	313	317			
I-U317C	I	GC	U	C	Yes	revert (2/11)	fast
I-U313A	I	GC	A	U	Yes	covariation (303U insertion; 8/10)	fast
I-U313A/U317C	I	GC	A	C	Yes	stable (12/12)	fast
I-GC46-47CU	I	CU	U	U	No	NT	fast
AS1-A313U	I	CU	U	C	Yes	revert (11/11)	fast
AS1-C317U	I	CU	A	U	Yes	stable (13/13)	fast

1. 青網掛け塩基は PSTVd-I 型の塩基を示し、括弧内の数値は、シーケンス解析したサンプル数あたりの安定的に複製した数を示す
2. 赤色の塩基は PSTVd-AS1 株型の塩基を示す

図. 18) PSTVd-I/AS1 変異体の環状 RNA 接種後 2 か月目の Rutgers トマト



*PSTVd-I よりも
若干弱毒化

考察

PSTVd の病因決定因子の分子解析は、これまでも PSTVd 変異体のいくつかの組み合わせを用いて行われてきている (Góra et al., 1996; Itaya et al., 2001; Matoušek et al., 2012; Owens et al., 1995, 1996; Schnölzer et al., 1985). PSTVd-M や -RG1, -QFA, -C3 及び-AS1 のような自然界から分離されたもの (図. 19) や *in vitro* で作出された人工変異体或はキメラ組換え変異体を用い、P 領域がトマトにおける病徴発現の程度を決定する上で主要な役割を果たすことが示されてきた. 本研究で用いられているダリアから分離された PSTVd ダリア株 (PSTVd-D; Tsushima et al., 2011) は、宿主に対して弱毒な病気をもたらすが、PSTVd 基準株 (PSTVd-I) に代表される PSTVd 分離株は一般的にかなり重篤な病気を宿主へ引き起こす. 本研究ではまず、PSTVd-I 及び PSTVd-D の右側分子中の塩基変異 (或は構造領域) に基づく 14 種類の変異体を作成・分析することで PSTVd-D の弱毒性が TL 及び P 領域によって制御されることを確認した.

一方で、これまで PSTVd の病原性に関連する研究の大半は P 領域の機能に集中していたため、V 領域及び TR 領域に注目して変異体を分析した本研究は独創的であったと言える. PSTVd-D は、V (118 と 126 番塩基) 及び TR (201 番塩基) 領域において PSTVd-I とは異なり、PSTVd-D の弱毒性に関連する右側分子中の 3 塩基の重要性が本研究において実証された. まず、118A の欠失変異は PSTVd-D 特異的ではなく、他の弱毒株や強毒株にも保存されており (図. 19), 弱毒系統の Russian potato PSTVd (Owens et al., 2009) でも頻繁に確認された. I-A118Δ と D-118A の 2 つのキメラ変異体はそれぞれ PSTVd-I, PSTVd-D に類似した矮化・葉巻症状及び全身蓄積量であった. すなわち、118 番塩基のスイッチングは PSTVd の病原性に影響を与えないことが示唆された. A126C 及び G201U の塩基変異は PSTVd-D に特有であり、BLAST 検索の結果、subviral RNA database (Rocheleau and Pelchat., 2006) において 126 番位に A を有するトマト (Accession No. AY372397) や Iranian potato (Accession No. DQ308556) 由来の PSTVd 分離株は非常に稀であった. 実際に 156 種の PSTVd 分離株の塩基配列情報が登録されている中で、126C を有するものは 13 種しかなく残りはすべて 126A であった. 126C は稀ではあるが、今回の突然変異誘導分析では I-A126C がトマトへ感染力を有し、かつ複製後も安定な突然変異体であり、予測分子構造における 18 番目ループの一部を形成する 126 位で C が存在可能であることを示した. 本研究の比較感染性試験では 126 位の A-C 或は C-A のスイッチングが感染後の症状の程度に顕著な差を生じさせなかった、すなわち、I-A126C と PSTVd-I または D-C126A と PSTVd-D は、互いに非常に類似した矮化及び

葉巻症状を示していた。しかしながら、病原性の場合とは異なり、全身蓄積量においては各変異体は PSTVd-I, -D と若干異なる結果となった。とりわけ, I-A126C は PSTVd-I よりもゆっくりと複製し, D-C126A は PSTVd-D よりも早く複製することが確認できた (図. 8-iv)。これらの結果から 126 番塩基は病原性の決定にはさほど影響しないが, PSTVd の全身蓄積には影響を与えると結論付けられた。201 番塩基に関しては, これまで自然界から分離された PSTVd 種では G と U のみが確認されており, subviral RNA database では 17/ 156 が U を保持しており, 残り (138/ 157) は G であった。この 201 番塩基は, 保存性の高い RY モチーフ構造 (図. 1) の下側鎖 (lower strand) の右境界に位置するため, 4 つの塩基 (A, U, C, G) の感染力及び病原性への影響を調べた。その結果, 興味深いことに G と U だけではなく PSTVd-I, -D いずれの場合も 201A 型変異体 (I-G201A 及び D-U201A) は, 感染性に悪影響を受けることなく, かつ安定的に宿主細胞中で複製しており, 一方の 201C 型変異体 (I-G201C 及び D-U201C) のみ感染力を失っていた。201 番塩基への C の導入は, RY モチーフ構造の右境界中のループ構造を変化させる可能性があり, この構造の変化が Virp1 を認識する RY モチーフ構造の機能に負の影響を及ぼし, 結果として感染力が失われたと考えている (図. 20)。比較感染性試験では, I-G201U (或は A) 及び D-U201G (或は A) はそれぞれ親株である PSTVd-I 或は-D に類似した病徴を示しており, 201 位に存在可能な A, U 及び G はすべて PSTVd の病原性には関与しないことが明らかになった。しかしながら, それらは 126 位の場合と同様に, 全身蓄積量においては STVd-I, -D と若干異なる結果となった。I-G201U と I-G201A は PSTVd-I と同程度 (或は若干早い) の複製速度であり, D-U201 G と D-U201A は明らかに PSTVd-D よりも早い複製速度であった (図. 8-iv)。やはり右側分子中の 201 番塩基も病原性の決定にはさほど影響しないが, PSTVd の全身蓄積に影響を与えているものと考えられる。

PSTVd-I と-D 間の右側分子中に見られる 3 つの塩基変異は, 病原性 (病徴の程度) には顕著な影響を与えることなくスワッピングが可能であることを確認したが, いくらかの組合せで全身蓄積量に差が見られた。単一の PSTVd-I 型塩基置換を有する 3 つの PSTVd-D 型キメラ変異体は, 3 つ全ての変異を有する PSTVd-DLIR とほぼ同程度の蓄積量を示した。これらの結果を考慮する限り, 3 つの塩基変異は独立して, かつ比較的自由に変異することで PSTVd-D の弱毒性に関与しているのではないかと推測される。

しかしながら, PSTVd 右側分子 (V, TR 領域) の分析によって左側分子 (TL, P 領域) の重要性が再確認されたため, 次いで PSTVd-I, -D 間の左側分子中に見られる

5カ所の塩基変異に基づいた10種類のキメラ変異体を作成・分析した。加えて、PSTVd-I、-D 双方に致死型 PSTVd-RG1 株に特徴的な 46-47CA を導入した 2 種類の変異体 (I-GC46-47CA と D-GC46-47CA) を作成し分析に用いた。PSTVd-D は PSTVd-I と比較した場合、TL (42, 43 番) 及び P (64/65, 310, 311/312 番) 領域中に計 5 か所の塩基変異 (塩基置換, 挿入変異) を有しているため、これらの塩基と病原性を比較分析することは大変興味深い。例えば、ウイロイドの病原性における RNA サイレンシングの役割に関する仮説が提案されて以来 (Wang et al., 2004), 少なくとも 4 つの支持データが過去 4 年間で報告されている。その中でも、PSTVd-トマト (Adkar-Purushothama et al., 2015b), PSTVd-タバコ (Nicotiana species; Eamens et al., 2014), そして tomato planta macho viroid (TPMVd)-トマト (Avina-Padilla et al., 2015) の組合せで、相同塩基配列依存的に RNAi を介して宿主遺伝子発現を標的とし、サイレンシングすることができる 3 種の特異的 PSTVd スモール RNA (sRNA) が同定されている。これらの分析には他のウイロイド変異体或はウイロイド種が用いられているが、ターゲットとなる 3 つの PSTVd 或は TPMVd-sRNA 配列は、PSTVd-I の P 領域中の 39-59, 46-56 及び 293-313 番の塩基領域に一致している。PSTVd-I と PSTVd-D 間に見出される 42, 43, 64/65, 310, 311/312 番の塩基変異はすべて 3 つの PSTVd 或は TPMVd-sRNA 領域に含まれているため、これらの個々の塩基或はその構造領域の重要性に関して、さらに詳細な分析が必要であると考えられる。これまでに同定されてきた PSTVd 分離株での塩基変異及び分子構造の比較分析では、46G, 47C 及び 317U (PSTVd-I を基準とする) が中程度-強毒及び弱毒な分離株に共通し、一方で 310U/C 及び 311/312UU 或は U の挿入は、弱毒な分離株に特異的であった (図. 19)。BLAST データベース検索の結果、PSTVd-D の 310-318 の塩基配列 (³¹⁰(U/C) CUUUGCU³¹⁸; 下線の塩基は弱毒或は/及び強毒な PSTVd 分離株に特有のもの) は、弱毒系統として報告されているいくつか分離株やトマトに弱毒な症状をもたらす Russian potato 由来の PSTVd 分離株 (Accession No. JQ889841, JQ889850-JQ889853, EU879915-EU879923, etc.) (Owens et al., 2009) に保存されていた。

今回分析に用いた 12 種類の変異体のうち、まず 42, 43 番塩基に関しては、I-C42U と D-C43U はいずれも安定的に複製していた。すなわち、いずれの変異体も 42-43UU の塩基配列を保持できることが明らかになった。最も興味深い点は、D-C43U はトマトへ感染後も PSTVd-D と同程度の病原性であったが、一方の I-C42U は PSTVd-I と比較して明らかに弱毒化した (図. 14)。PSTVd-I の 42 位に U の塩基置換があった場合も分子構造上は全く変化しない点を考慮する限り、塩基配列特異的に PSTVd ゲノムを

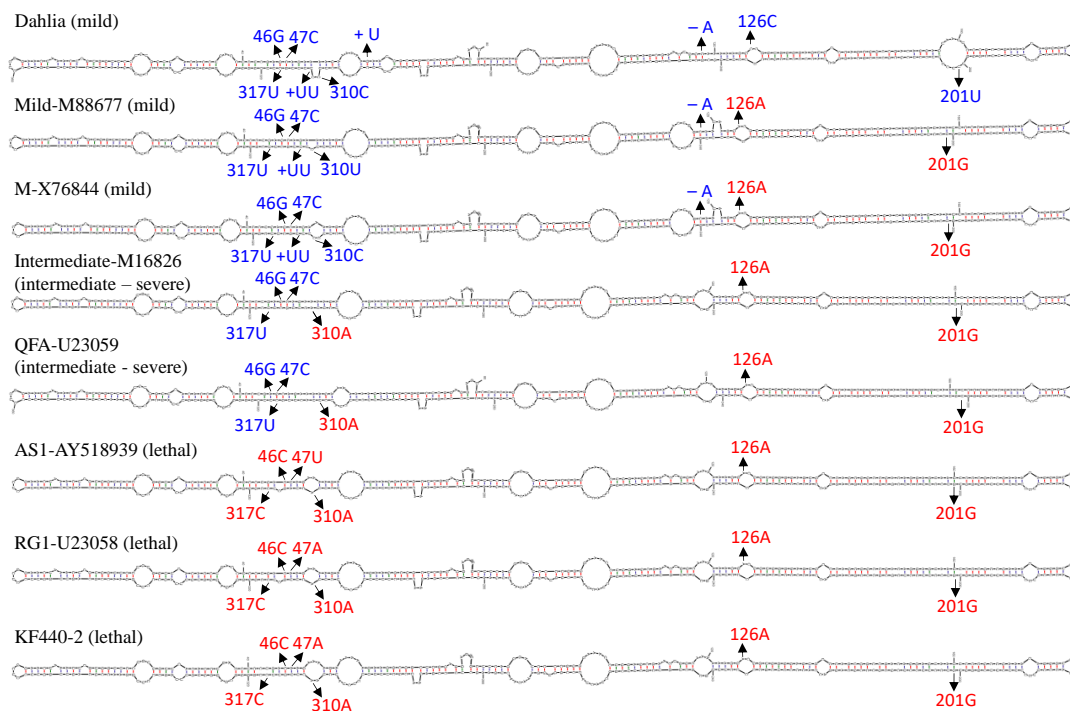
認識する宿主側因子が存在し、結果として PSTVd-I が RNA サイレンシングのターゲットとなることを回避できたことでその病原性を発揮しなかったのではないかと考えている。I-U43C 及び D-U42C は、複製後も変異導入箇所を保持していれば 42-43CC の配列をもつはずであるが、実際はいずれの変異体も環状 RNA 接種を経て 42-43CU へ完全に変異し、病原性に変化は見られなかった（親株と同程度であった）。すなわち、42-43 位は CC の配列をとりづらく CU へ変異する、もしくは UC 或は UU の配列で安定することが明らかとなり、さらに PSTVd は 42-43UU で弱毒化する可能性が示唆された。64 番塩基に関しては、2 つのキメラ変異体（I-64U 及び D-64UΔ）はいずれも変異導入箇所を安定的に保持し、複製速度もそれぞれの親株と同程度であった。しかしながら、トマトへ感染後 D-64UΔ は PSTVd-D と類似した症状であった一方、I-64U は PSTVd-I に比べて弱毒な病徴を示していた（図. 14）。これは 64U の挿入によって PSTVd-I 分子構造の第 9-10 ループの間のステム構造中に生じた新たなインターナルループがもたらした結果だと考えている。一方の D-64UΔ が 311C の欠失を伴いながらも弱毒な病徴を発現したことを考慮すると、PSTVd-D の弱毒性には 64U 以外の変異も関与している可能性が考えられる。次いで下側鎖（lower strand）の 310 番塩基の場合は、いずれの変異体（I-A310C 及び D-C310A）も変異導入箇所を安定的に保持していたが、D-C310A は 311-312UU のうち 1 塩基 U の欠失を伴っていた。この 310 位の結果に付随し、311-312UU をスワッピングした変異体（I-312UU 及び D-312UUΔ）のうち I-312UU でも共変異が生じていた。I-312UU は複製後も変異導入箇所を保持していれば分子構造中に PSTVd-D と同じ 8 番バルジループを形成するはずであったが、実際は 1 塩基 U の欠失を伴うことで本来の 8 番インターナルループ構造へ復帰することが確認された。この結果は I-312UU の場合と同様であり、310C と 312UUUU 及び 310A と 312UU の組合せで共変異する可能性が示唆された。312UUUU は PSTVd-D と一部の分離株特異的な非常にマイナーな塩基配列であり、他の分離株ではおよそ 2:1 で UU:UUU となっている。しかしながら、D-312UUΔ が 2 塩基 UU の欠失を保持した場合、本来バルジループである PSTVd-D 分子中の 8 番ループ構造がインターナルループへ変化するにもかかわらずトマトに弱毒な症状を示したことを考慮すると、8 番ループの構造よりも I-64U の弱毒化を誘発した第 9-10 ループ間のステム構造中のインターナルループが、PSTVd-D の弱毒性を発揮する上でより重要な役割を担っているのではないかと考えられる。そして、致死型 PSTVd-RG1 株特異的な上側鎖（upper strand）の 46-47CA を導入した 2 つのキメラ変異体（I-GC46-47CA 及び D-GC46-47CA）は、いずれも感染後に下側鎖での

共変異が見られた。両変異体は共通して U316C の共変異を生じており、I-GC46-47CA は完全に PSTVd-RG1 へ復帰変異した。D-GC46-47CA は U316C に加えて 312UU の欠失変異を生じており、周辺の塩基配列及び分子構造にまで影響が及んでいた。病原性に関しては、I-GC46-47CA は完全に PSTVd-RG1 に一致する塩基配列を有するにもかかわらず、トマトでの病徴は PSTVd-I と同程度であった (図. 14)。この点に関しては、*in vitro* RNA 転写産物接種時には I-GC46-47CA は 10 クローン中 1 クローンのみ U316C の共変異を有しており、環状 RNA 接種を経て完全な RG1 型へ変異したために、そのバイアス (時間差) による結果なのではないかと考えている (或は接種試験を繰り返すことでいずれ致死型の病徴が現れるかもしれない)。一方の D-GC46-47CA は、PSTVd の病原性発現において重要性が示唆されている第 7-8 ループ間のステム構造 (第 7 ステムとする) 中に致死型 PSTVd と同じ塩基置換及び分子構造が生じたにもかかわらず (Adkar-Purushothama et al., 2015b; Avina-Padilla et al., 2015; Eamens et al., 2014), その病原性は若干葉の壊死症状が現れた程度でおおよそ PSTVd-D と同程度であったことを考慮する限り、PSTVd-D の弱毒性は周辺の塩基配列及び分子構造の強固な相互作用によって保持されていることが推測される。

さらに、TL 及び P 領域と PSTVd の病原性の関係を詳細に分析するために、強毒系統 PSTVd-I と致死型系統 PSTVd-AS1 間の 4 塩基 (3 カ所) の違いに着目して新たな 6 種類のキメラ変異体を作成・分析したところ、I-GC46-47CU 以外の 5 系統で感染が確認された (図. 16)。しかし、感染 5 系統のうち I-U317C 及び AS1-A313U はそれぞれ PSTVd-I, PSTVd-AS1 へ復帰変異していた。I-U317C の結果から第 7 ステム構造中の 5'末端 G : U は、周辺の塩基配列に依存し、かつ PSTVd の 317 番塩基は単独では病原性に関与しない可能性が示唆された。一方の AS1-A313U がその変異導入を保持した場合、第 7 ステム構造中の致死型 PSTVd に特徴的な 5'末端側から 3 塩基目のバルジループがインターナルループへ変化してしまうため (図. 15-iii), この変化を回避するために復帰変異したものと考えられる。I-U313A は 303U の挿入変異を伴い、さらにトマトへの病原性が若干弱毒化していた。この 303U 挿入変異は 9 番ループ中に存在し、今回の分析にはさほど影響がないようにも思われるが、U313A の塩基置換を保持するために共変異した結果なのではないかと考えている (或は世代を重ねることで新たな変異が生じるかもしれない)。残りの I-313A/U317C と AS1-C317U は感染トマト中で安定的に複製後、それぞれの親株と同程度の病原性を発揮していた。I-313A/U317C は下側鎖に 2 塩基の AS1 型変異を有しているにも関わらず、病原性が PSTVd-I と同程度であったことを考慮

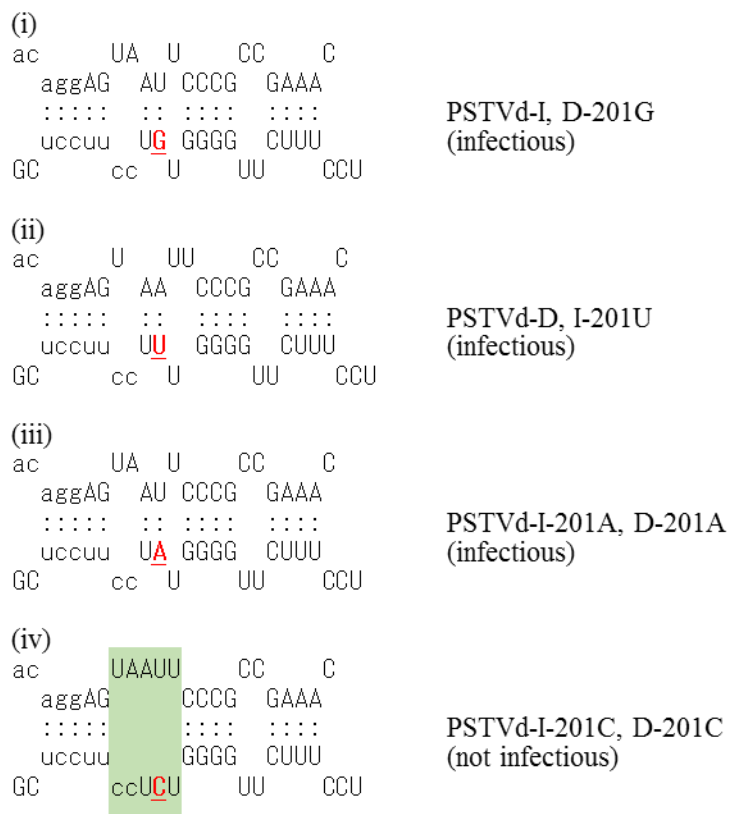
すると、塩基配列だけではなく第7ステム構造中バルジループの位置も致死性の病原性発現において重要なのではないかと考えられた。すなわち、PSTVd-AS1及びAS1-C317Uはこのステム構造中で5'末端側から3塩基目にバルジループが存在しているが、I-313A及びI-313A/U317Cは5'末端側から5塩基目の位置に変化しており、この違いが病原性の違いをもたらしているのではないかと推測される。これらの結果から、PSTVdの病原性に影響を及ぼす要因として、特に、i) 第7ステムの塩基対の長さ（長いほど安定、すなわち弱毒系統）、ii) 第7ステムの安定性及びバルジループの位置（5'末端側から3塩基目で最も病原性が強毒になる）、iii) 第7ステム周辺の塩基配列及びループ構造の3つを提案する（図. 21）。

図. 19) 弱毒, 強毒及び致死型の病徴を誘発する PSTVd の予測分子構造マッピング



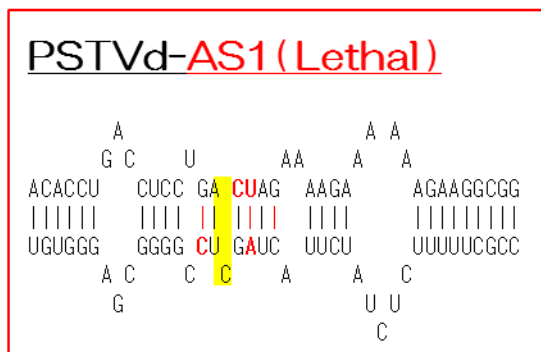
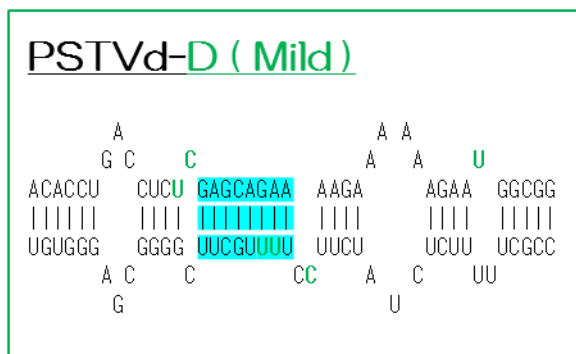
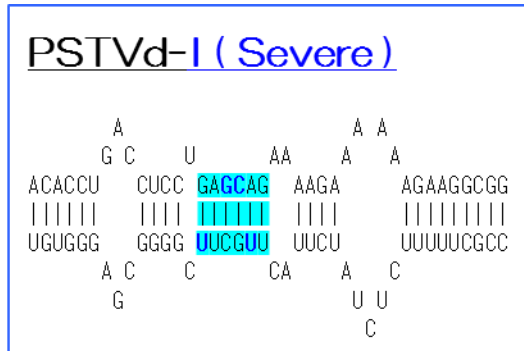
- 青字で示された塩基置換は PSTVd-D 特有の塩基を示し、赤字は致死型 PSTVd 特有の塩基を示す。 Mild-M88677 (Schnölzer et al., 1985), M-X76844 (Góra et al., 1996), QFA-U23059 (Gruner et al., 1995), AS1-AY518939 (Matoušek et al., 2012), RG1-U23058 (Owens et al., 1996), KF440-2 (Góra et al., 1996)

図. 20) Mfold による 201 番塩基周辺の予測分子構造比較



- 赤字塩基は 201 番塩基
- 予測分子構造は、感染系統 (i - iii) でステム構造、非染系統 (iv) でループ構造 (緑網掛け) になっている。小文字塩基は、PSTVd の全身移行 (輸送) に関する RY モチーフ構造を示している

図. 21) PSTVd の病原性に影響を及ぼす分子構造



- それぞれ PSTVd-I, -D, -AS1 に特徴的な塩基を青字，緑字，赤字で示している
- 青網掛け部は第 7 ステム構造を示している
- 黄色網掛け部は致死型 PSTVd に特徴的な第 7 ステム構造中のバルジループ（5'末端側から 3 塩基目の位置）

第 2 章 VirP1 の PSTVd 感染に与える影響に関する分析

供試材料および実験方法

供試植物

本研究で用いる RNAi を介した *SVirp1 pro IR* 導入トマト (cv. Micro-Tom) は、弘前大学農学生命科学部葛西厚史博士に分譲していただいた。3 系統の *SVirp1 pro IR* 導入トマトは、35S: *SVirP1 pro IR X41*, 35S: *SVirP1 pro IR 341*, 35S: *SVirP1 pro IR 221* であり、それぞれ 35S プロモーター領域下流に逆向き反復 (inverted repeat: IR) 配列を導入することで作出された (Kasai et al., 2010, 2013)。各 *SVirp1 pro IR* 導入トマトの *SVirp1* mRNA 発現量は野生型 (Wild type: WT) の場合と比較して、葉及び茎でそれぞれ 0.4–0.5 倍、0.2 倍程度に抑制されていた (葛西博士私信)。各接種区画で WT 及び *VirP1* 系統は 2–6 本ずつ供試した。トマトは 25°C の恒温培養器内でバーミキュライトに播種し、約 1 週間後に 1 個体ずつポットに移植した。約 2 週間後の本葉にカーボランダム接種した。接種後、日照 16 時間条件で育成した。

PSTVd 系統

本研究で用いた PSTVd 分離株は以下の 2 系統である。第一章で得られた環状 RNA 溶液を接種源とした (PSTVd 20 ng/ plants)。

- ・ **PSTVd-Intermediate (PSTVd-I), 359 bp (Accession No, M16826)**
- ・ **PSTVd-Dahlia (PSTVd-D), 361 bp (Accession No, AB623143)**

結果

Kalantidisら (2007) がVirP1の発現を抑制した遺伝子組換えタバコ (*Nicotiana tabacum* と *Nicotiana benthamiana*) を用いPSTVd感染におけるVirP1タンパク質の役割を分析した結果、形質転換タバコではWTの場合と比較してPSTVdの複製及び全身移行能力が著しく低下していた。すなわち、タバコでのPSTVd感染におけるVirP1の重要性が示唆された。そこで本研究では、RNAiを介した*S/Virp1 pro IR*導入トマト (cv. Micro-Tom) を用いた場合にタバコと同様にPSTVd感染が影響を受けるのかを調査した。まず、WTと分譲していただいた*S/Virp1 pro IR*導入トマト (T3世代) にPSTVd-I及び-Dの環状RNA分子を接種し、2-5週目でRNAゲルブロット分析により継時的に感染の検定を行った (図. 22)。その結果、接種後2週目ではPSTVd-I感染トマトのいくつかでかろうじてシグナルが検出される程度であったが、3週目になるとPSTVd-I感染WTで6個体中2個体、*S/Virp1 pro IR*導入トマトではほとんどすべての個体で感染が確認された。一方のPSTVd-D感染WTでは3週目ではまだ感染が確認されていなかったが、*S/Virp1 pro IR*導入トマトのいくつかの個体 (5/11個体) では目視でシグナルを確認された。接種後5週目の段階ではPSTVd-D感染WTが3/6の感染率であったのに対し*S/Virp1 pro IR*導入トマトは10/11の感染率であった。PSTVd-I 接種個体はほとんどすべての個体で感染が確認された。

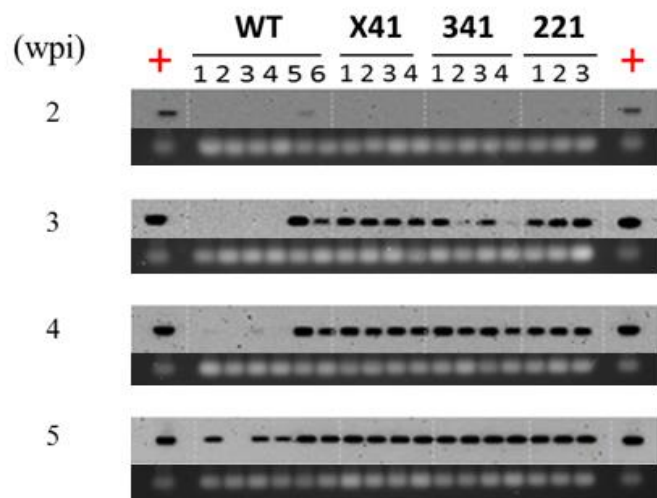
次に、この再現性を調査するためにそれぞれの系統の健全個体から種子を採集し (T4世代)、再び同じ条件下で接種試験を行った。接種後4週目で感染の検定を行った結果、WT、*S/Virp1 pro IR*導入トマト系統に関わらず全ての個体で感染が確認された。また、Rutgers トマトの場合 (第一章参照) と同様に PSTVd-I 感染よりも PSTVd-D 感染で蓄積レベルは低い傾向が見られた (図. 23)。

さらに、T5世代の*S/Virp1 pro IR*導入トマト X41 系統に PSTVd-I, -D, -RG1, -AS1 の環状 RNA 分子を各区画2個体ずつ接種したところ、接種後8日目ではすべての個体で非感染であったが、20日目になるとWTではPSTVd-D接種の1個体を除いたすべてで感染が確認された (図. 24)。しかしながら、X41系統ではPSTVd-RG1及び-AS1はどちらも2/2で感染していたが、PSTVd-Iで1/2 (感染個体のシグナルもかなり薄い)、PSTVd-Dは0/2という結果であった。この結果から*S/Virp1 pro IR* X41系統がPSTVd-I及び-Dに対して効果的であったと考えられたが、接種後48日ではWT、*S/Virp1 pro IR* X41系統に関わらず同程度のPSTVd蓄積量であった。また、病原性に関しては、WT、*S/Virp1 pro IR* X41系統どちらの場合も強毒或は致死型PSTVd (-I, -RG1及び-AS1)

感染トマトで果実サイズがかなり小さくなり (図. 25), それに伴い種子の数も激減した (PSTVd-AS1 感染個体に至っては 1 つも種子を形成していなかった). また, 複製後の塩基配列は PSTVd-I, -D いずれも安定であった.

図. 22) RNA ゲルブロット分析結果 (T3)

i) PSTVd-I 接種結果

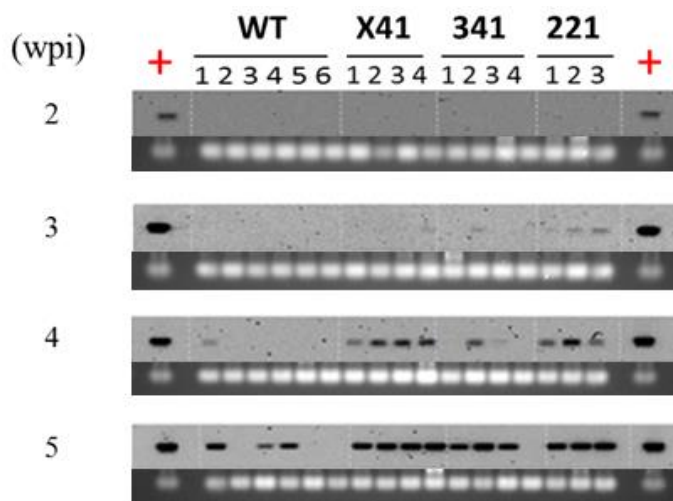


wpi: week post inoculation +: PSTVd positive control

*1~6 の数字は植物の個体番号

*プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

ii) PSTVd-D 接種結果

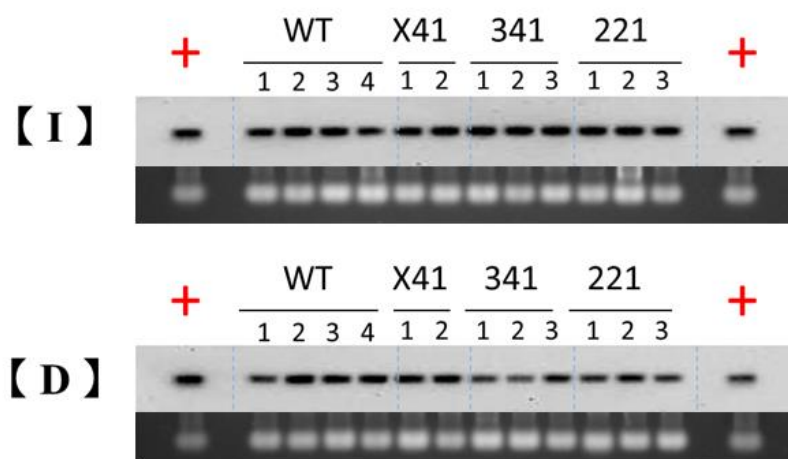


wpi: week post inoculation +: PSTVd positive control

*1~6 の数字は植物の個体番号

*プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 23) RNA ゲルブロット分析結果 (T4, 4 wpi)



・上パネルが PSTVd-I (I) , 下パネルが PSTVd-D (D) の結果

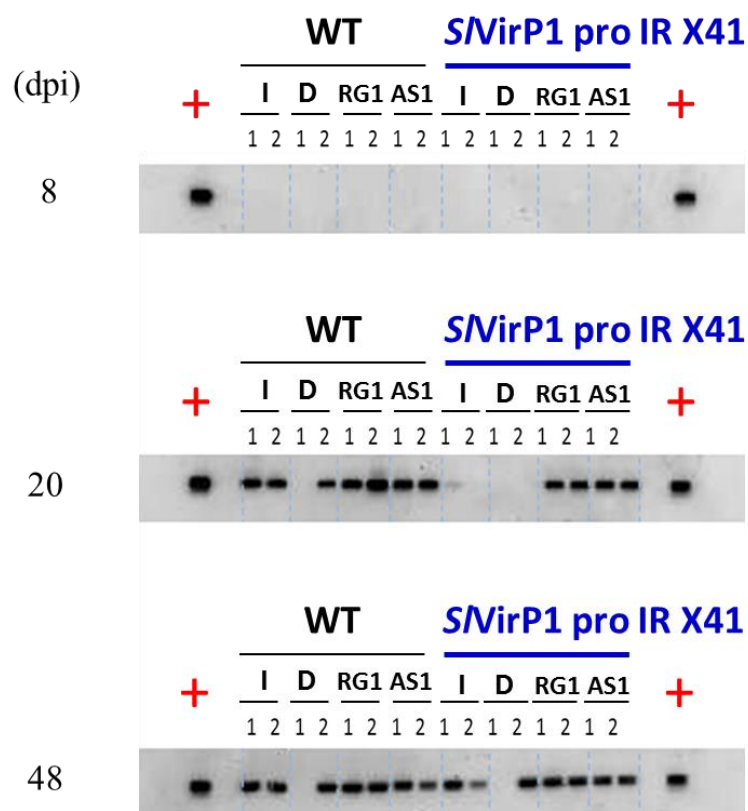
wpi: week post inoculation

+ : PSTVd positive control

* 1~4 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 24) WT 及び SI:Virp1 pro IR X41 系統の RNA ゲルブロット分析結果 (T5)



dpi: day post inoculation

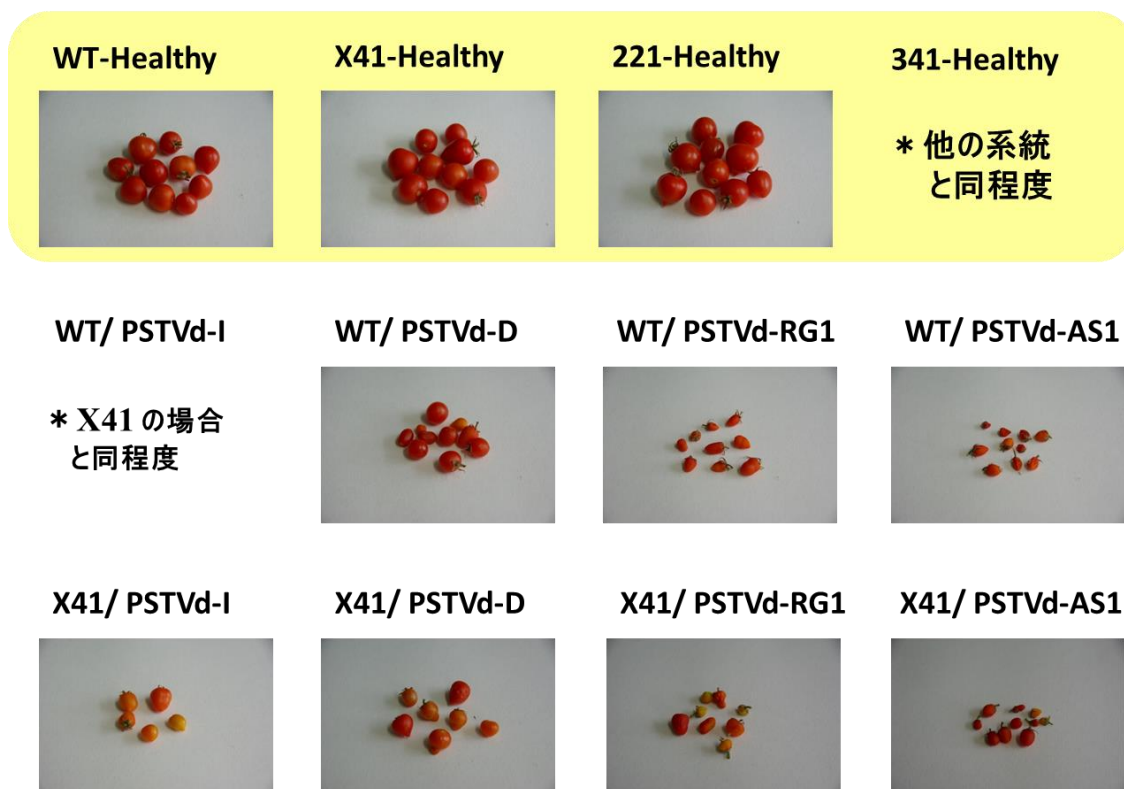
+ : PSTVd positive control

* 1, 2 は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

図. 25) PSTVd 感染後のトマト果実の病徴写真 (接種後 3 か月)

【健全リシーズ】



接種後 3 か月での健全 WT (cv. Micro-Tom) と *S/Virp1 pro IR X41* (X41) 及び PSTVd 感染トマト果実の様子. PSTVd-D 感染個体で果実は若干小型化しており, PSTVd-I, -RG1 及び-AS1 感染個体では果実サイズは激減していた.

考察

VirP1 タンパク質は、トマト (*Lycopersicon esculentum*) で発見された PSTVd 分子に特異的に結合することができるタンパク質であり (Martinez et al., 2003), トマト以外の PSTVd 宿主においても *LeVirP1* にオルソログ的な遺伝子 (共通祖先からの種分化に由来する遺伝子) が同定されている. 例えば, *N. benthamiana* 及び *N. tabacum* で 2 つ, ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) で 1 つの VirP1 遺伝子が同定されており, いずれの遺伝子も塩基配列及びアミノ酸レベルで高い相同性を有している (Kalantidis et al., 2007).

本研究では, PSTVd がタバコに感染するために不可欠であると報告された VirP1 タンパク質がトマト (*Solanum lycopersicum*) の場合でも同様の役割を果たすのかを調査するために, まず RNAi を介して作出された *SVirP1 pro IR* 導入トマト 3 系統の T3 世代に強毒 PSTVd-I 及び弱毒 PSTVd-D の環状 RNA 分子を接種した. Kalantidis ら (2007) のタバコでの結果同様にトマトでも影響が見られるのであれば PSTVd は VirP1 系統に感染しない或は著しく蓄積レベルが低減する予想であったが, 実際は接種後 3 週目の段階でほとんど全ての PSTVd-I 接種個体で感染が確認された. PSTVd-D 感染個体においても 3 週目から RNA ゲルブロット分析で薄いシグナルが確認され, 4 週目以降ははっきりと目視でシグナルが確認される程度の蓄積レベルであった. すなわち, 今回の *Sl: VirP1 pro IR* 導入トマトへの PSTVd 接種試験の結果から, *SVirP1* タンパク質は PSTVd 感染に影響しないという結論に至った. T4 世代の場合も同様に, WT と *SVirP1 pro IR* 導入トマト間で PSTVd 感染に対する感染力の違いは見受けられなかった. さらに, T5 世代で PSTVd-I, -D に加え, PSTVd-RG1 及び-AS1 を WT 及び *SVirP1 pro IR* 導入トマト (X41) へ接種したところ接種後 20 日目の段階では, 特に PSTVd-I 及び-D 接種区画で *SVirP1 pro IR* 導入トマトのほうが蓄積レベルが低いことが確認された. しかしながら, 接種後 48 日目では *SVirP1 pro IR* 導入トマトでも WT と比較して同程度の蓄積レベルであることを考慮する限り, やはりトマトでは VirP1 遺伝子の発現抑制によってタバコの場合のように PSTVd 感染を制御することができない, 或はほとんど影響しない可能性が示唆された. 今回の分析に用いた *SVirP1 pro IR* 導入トマト 3 系統は, VirP1 発現量が葉及び茎でそれぞれ 0.4–0.5 倍, 0.2 倍程度にノックダウンされているが, 仮に完全にノックアウトした系統を作出した場合にはどのような変化が生じるのかは興味深い. 結論として, トマトにおいては VirP1 タンパク質をウイロイド抵抗性遺伝子として用いる等の応用研究への発展は現時点では困難であり, VirP1 以外の宿主側因子との相互作用と関連付けての再調査が必要である.

第 3 章 病原性の異なる PSTVd 感染トマトにおける
スモール RNA 蓄積量の比較分析

供試材料および実験方法

供試植物

接種には、PSTVd の指標植物トマト (品種: Rutgers) を用いた。各接種区画とも、Rutgers トマトを 5 本ずつ供試した。トマトは 25°C の恒温培養器内でバーミキュライトに播種し、約 1 週間後に 1 個体ずつ鉢に移植した。移植 1 週間後、子葉にカーボランダム接種した。

PSTVd 系統

本研究で用いる自然界から分離された PSTVd 分離株は以下の 2 系統である。

- ・ **PSTVd-Intermediate (PSTVd-I), 359 bp (Accession No, M16826)**
- ・ **PSTVd-Dahlia (PSTVd-D), 361 bp (Accession No, AB623143)**

次世代シーケンス解析

北海道システムサイエンス (株) に委託解析, イルミナ社の HighseqII を使用

結果

強毒或は弱毒系統の PSTVd 分離株の全身蓄積及び病原性

まず，第一章で得られた PSTVd-I 或は-D 感染性トマト由来の低分子量 RNA をそれぞれ5個体のトマトへPSTVd換算濃度で20 ngずつ接種し，6週間にわたって育成した．PSTVd-I 感染トマトには接種後3週目で葉巻症状が現れ，4週目で明らかな矮化症状が見られた．対照的に，PSTVd-D 感染トマトには軽度の葉巻症状が確認されたが，接種後4週目の段階では健全トマトと差は見られない程度であった（図. 26）．

接種後2-5週目での RNA ゲルブロット分析の結果，PSTVd-I は接種後3週目でシグナルが検出されるレベルまで蓄積していたが，PSTVd-D は4週目でようやく薄いシグナルが検出される程度であった．すなわち，PSTVd-I は PSTVd-D の約1週間前には蓄積し始めており，病徴の発現時期及び病徴の強さに一致していた（図. 27）．すなわち，PSTVd-D 感染によって引き起こされたトマトでの弱毒な症状及び蓄積量（速度）の減少は，その塩基配列の違いに起因している可能性が考えられた．

図. 26) PSTVd-I, -D 接種後 4 週目のトマトの病徴

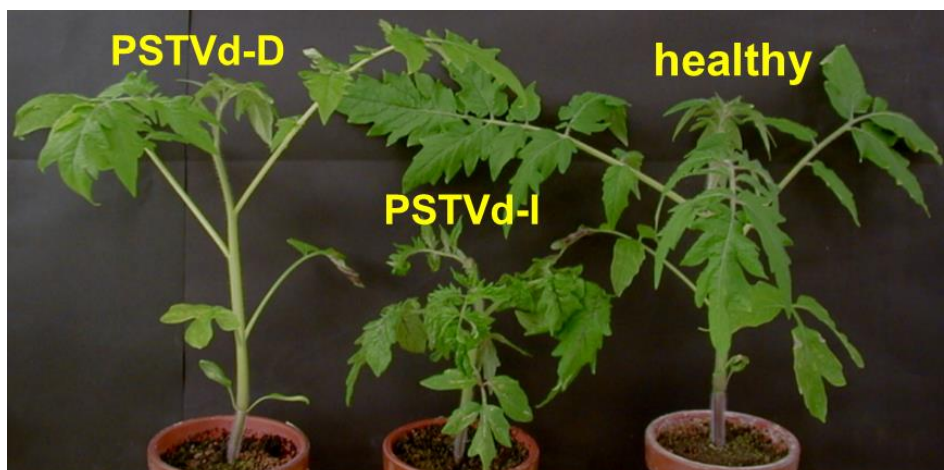
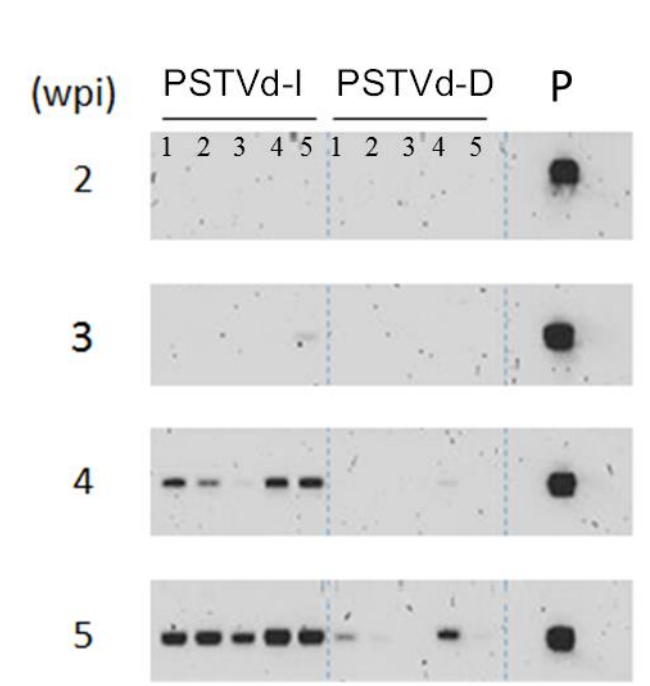


図. 27) RNA ゲルブロット分析結果



wpi: week post inoculation

P: PSTVd positive control

* PSTVd-I 及び-D 下線部下の 1~5 の数字は植物の個体番号

* プローブには DIG 標識 PSTVd アンチゲノム鎖 RNA プローブを使用

PSTVd-I 及び PSTVd-D 感染トマト中での PSTVd スモール RNA の蓄積

ウイロイド特異的スモール RNA (Viroid-sRNA) は、RNA サイレンシングを介してウイロイドの病原性発現において重要な役割を果たすと考えられている (Navarro et al. 2012; Wang et al. 2004) . 接種後 4 週目において PSTVd-I, -D 感染トマトの葉及び茎組織での PSTVd-sRNA 蓄積レベルを評価するために健全及び各 PSTVd 感染トマトの葉と茎から抽出した低分子量 RNA を北海道システムサイエンス (株) に送付し、イルミナ HiSeqII でマルチプレックスディープシーケンシング解析を行った。その結果、健康体及び PSTVd-I 及び-D 感染個体の葉と茎由来の低分子量 RNA から 15~43 nt の範囲で約 5.5~6 百万リードの sRNA が得られた。このようにディープシーケンシング解析で各 PSTVd 感染及び健全個体からはおよそ同程度の sRNA データが得られることが確認された。

生データをさらに解析した結果、各 PSTVd sRNA 蓄積量は PSTVd-I 感染葉中で 489,133 リード、PSTVd-I 感染茎中で 673,834 リード、PSTVd-D 感染葉中で 105,757 リード、PSTVd-D 感染茎中で 522,648 リードの PSTVd-sRNA が確認され (図. 28) , RNA ゲルブロット分析での PSTVd-sRNA 蓄積量の検出結果にも一致した (図. 29) . 実際は 1 塩基ミスマッチを含む条件下でも分析しているが、顕著な有意差が見られなかったため、ここでは厳密な条件下 (100% の一致) で得られたデータのみを分析に用いている。すなわち、PSTVd-sRNA はミスマッチを含有する場合もあるが、それらはわずかな割合でしか存在しないことが確認された。

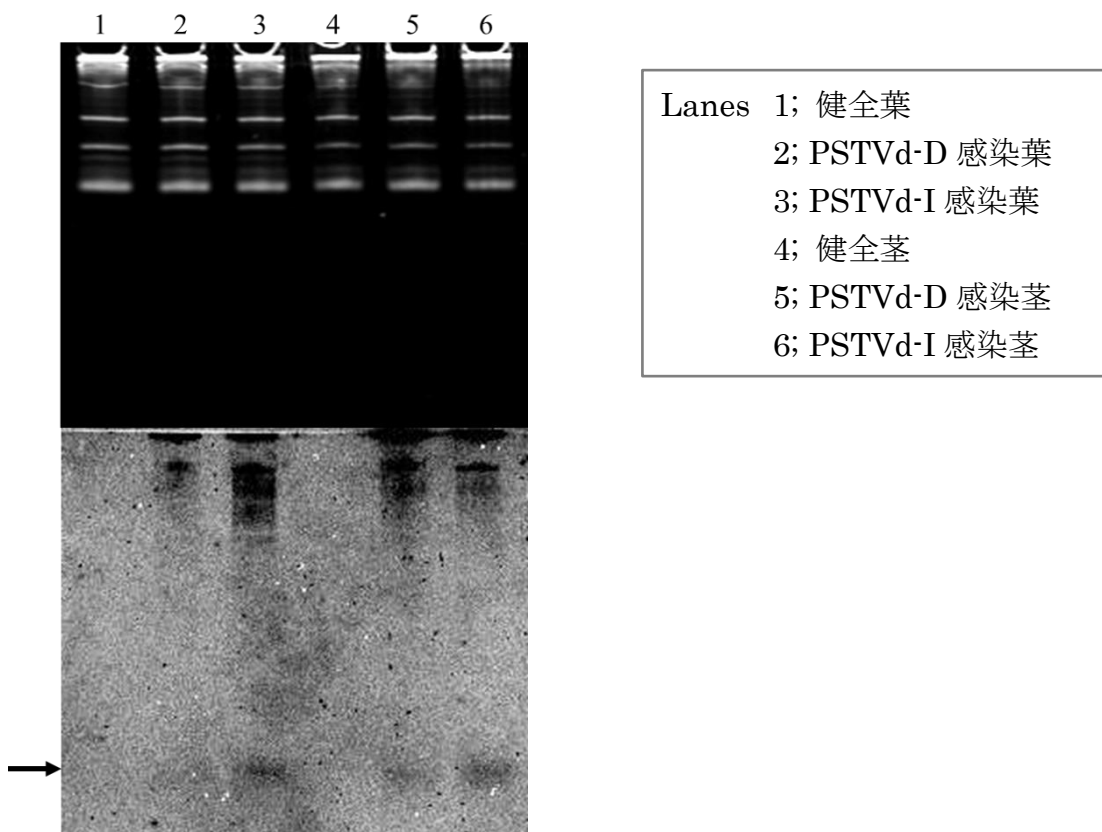
図. 28) PSTVd-I, -D 感染トマト葉及び茎組織における PSTVd-sRNA リード数

Sample	organ	Total sRNA	PSTVd-sRNA	plus (+)	minus (-)	+/- ratio
Healthy	leaf	5,945,163	N.A.			
PSTVd-I	leaf	5,875,050	489,133 (8.1%)	370,964	118,169	3.1
PSTVd-D	leaf	6,168,293	105,757 (1.7%)	77,626	28,131	2.8
Healthy	stem	5,067,116	N.A.			
PSTVd-I	stem	5,562,415	673,834 (12.2%)	510,338	163,496	3.1
PSTVd-D	stem	6,015,597	522,648 (8.7%)	446,758	75,890	5.9

N.A.: not associated

図. 29) 低分子量 RNA の変性 PAGE と RNA ゲルブロット分析結果

- 2 μ g の低分子量 RNA を 12% 8M 尿素変性 PAGE (アクリルアミド : ビスアクリルアミド = 38 : 2) (上図) で分離し, DIG 標識 PSTVd cRNA プローブで検出した (下図)
- PSTVd-I 感染個体由来のサンプルでは強いシグナルが見られ (lanes 3 と 6), PSTVd-D 感染個体由来のサンプルでは弱いシグナルが確認された (lanes 2 と 5)



- 矢印は PSTVd-sRNA 位置を示している

PSTVd-sRNA 蓄積量は茎よりも葉で低く、PSTVd-D 感染で PSTVd-I の場合よりも低い傾向が見られた。ウイロイド蓄積量は PSTVd-I 感染トマトの茎由来の場合に最も高い傾向が見られ、この結果からも PSTVd-sRNA のトータル数がウイロイド蓄積量に比例することが示唆される。弱毒と強毒株 (RG1) (Itaya et al. 2001: RG1 を強毒株として使用) 或は弱毒 (QFA) と致死型株 (AS1) (Matoušek et al. 2007) の 2 つの PSTVd 分離株を用いた RNA ゲルブロット分析結果と比較しても、今回のディープシーケンシング解析結果は弱毒系統の PSTVd よりも病原性の強い PSTVd 系統のほうが高レベルの PSTVd-sRNA を誘導することを示している。

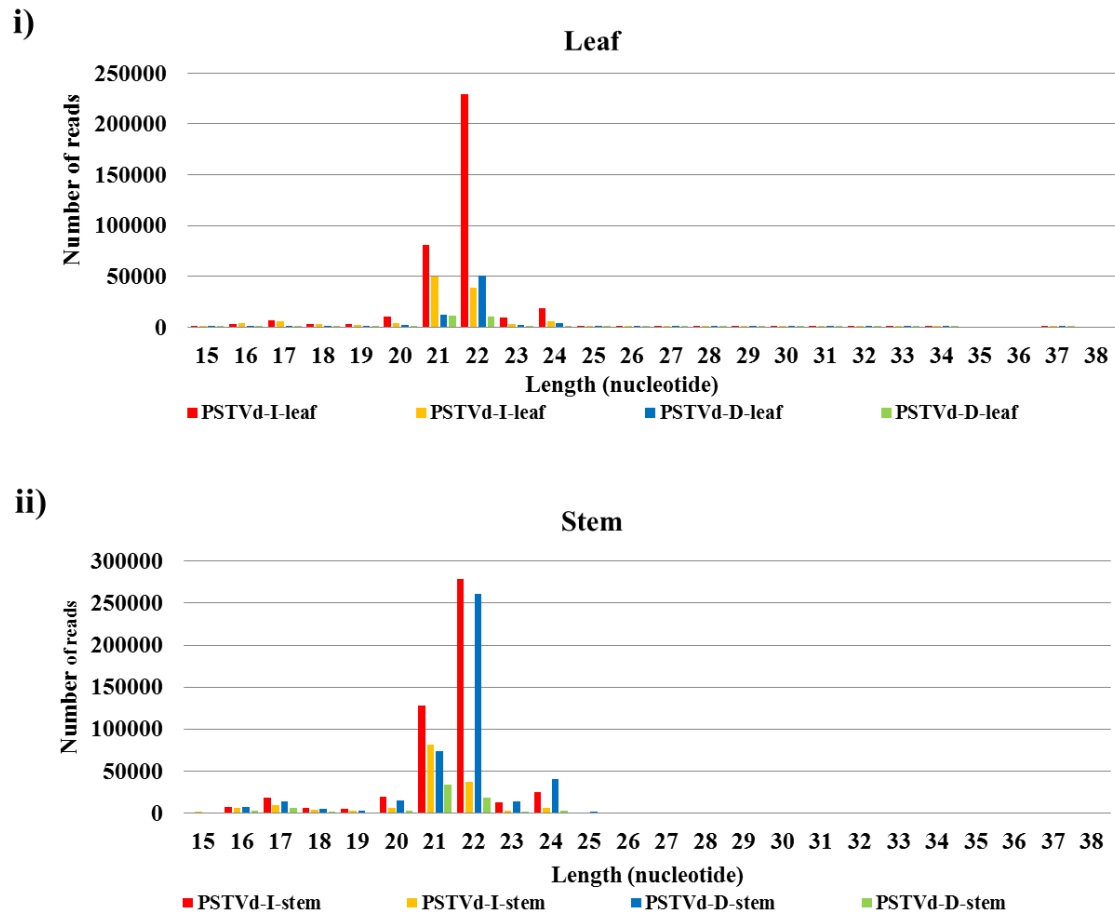
PSTVd-sRNA のサイズごとの分布を比較したところ 21–24 nt の範囲に集中しており (図. 30), これまでに報告されている様々なウイロイド-宿主の組合せの結果と一致していたため (Di Serio et al. 2009; Martinez et al. 2010; Navarro et al. 2009; Owens et al. 2012; St-Pierre et al. 2009; Wang et al. 2011), 今回の分析では 21–24 塩基の sRNA 種について分析した。一方で、全てのサイズの分布中で 70–86 番塩基 (5'-AGGCGGCTCGGAGGAGC-3') に一致するゲノム鎖由来の PSTVd-sRNA が小さなピークとして検出されており、この sRNA の機能及び役割に関してはさらなる分析が必要である。ゲノム鎖 (positive) 由来の PSTVd-sRNA は 22 nt 種で最大のリード数を示し、次いで 21, 24, 23 nt 種の順であったが、アンチゲノム鎖 (negative) 由来の場合は 21 nt 種で最大となり、次いで 22, 24, 23 nt 種の順であった。PSTVd-I 感染トマトの葉及び茎における positive/negative 比はどちらも 3.1 であったが、PSTVd-D 感染トマトの場合では葉で 2.8, 茎で 5.9 の比であった (図. 28)。また、5'末端塩基は C の場合が多かった。

さらに 21 及び 22 nt 種に焦点を絞り分析を進めた結果、PSTVd-I 及び-D 感染組織によってリード数に変化が見られた PSTVd sRNA 種を確認した。その結果は 図 31-i), ii) に要約されており、縦軸に PSTVd-D, 横軸に PSTVd-I のリード数を示す散布図として示されている。全体的には、PSTVd-D 感染で PSTVd-I 感染よりも少ないリード数であることが確認でき (PSTVd-I 感染の葉と茎でそれぞれ 15–28%, 50–90%), PSTVd-sRNA も PSTVd-D 感染組織で明らかに減少していた (図. 32)。例えば、茎でのゲノム鎖由来の 21 nt 種では、PSTVd-D (y 軸) と PSTVd-I (x 軸) のリード数間の回帰直線は $y = 0.5086x + 28.492$ となっており (図. 27-b), そのうちの 185–205 nt 種 (以後、PST-sRNA21P-185) は、PSTVd-I 感染で 14,925 リードであったが、PSTVd-D 感染ではわずか 1,870 リード (12.5%) であった。より顕著な例でいうと、茎でのゲノム鎖由来 21 nt 種のうち相対的に多い種 (ここでは 500 リードを超えるもの) の中でも、PST-sRNA21P-49, -50, -51, -59, -69, -107, -109, -110, -111, -113, -202 は PSTVd-D 感染トマト中で PSTVd-I 感染の場合の 10%未満でしかなかった。簡潔に説明すると、PST-sRNA21P-49 は PSTVd-I 感染で 501 リードだが PSTVd-D の場合ではわずか 1 リード (0.2%) となっており、

同様に PST-sRNA21P-50 では 1,981 : 1 (0.1%), PST-sRNA21P-51 では 642 : 23 (3.6%), PST-sRNA21P-69 では, 1,563 : 92 (5.9%) という結果であった. 注目すべきは, 図. 32 に列挙された 44 種の sRNA のうち 27 種は PSTVd-I と -D 間に見られる塩基変異箇所に少なくとも 1 塩基オーバーラップする領域に由来し, この結果からも PSTVd-sRNA 蓄積が PSTVd-I, -D 間の塩基変異によって有意に影響されることが示唆された.

上記の PSTVd-sRNA 種の蓄積パターンの違いは, PSTVd ゲノム上に PSTVd-sRNA をプロットしていくことで全体を把握することができる. 118 及び 126 位の塩基置換箇所を有する 100–140 番塩基周辺領域 (上側鎖 CCR, V 領域の境界周辺) と 201 位を含む 180–220 番塩基周辺領域 (下側鎖 V, TR 領域の境界周辺) 由来の 21 及び 22 nt 種のゲノム鎖 PSTVd-sRNA リード数は, 葉及び茎のどちらの場合も PSTVd-D 感染で著しく低下していた (図. 33-i). それ故に, この 3 塩基の違い (118, 126 及び 201 番塩基) が PSTVd-sRNA ホットスポットパターンを変化させている可能性が示唆された. 加えて, 5'末端塩基が 49–68 番塩基領域 (上鎖側 P 領域) 或は 294–312 番塩基領域 (下側鎖 P 領域) に位置する 21 及び 22 nt 種のゲノム鎖 PSTVd-sRNA リード数も葉及び茎ともに PSTVd-D 感染で激減していた (図. 33-ii). 例えば, 5'末端塩基が 49–68 番に位置する 21 及び 22 nt 種のゲノム鎖 PSTVd-sRNA のトータルリード数は PSTVd-I 感染トマト葉で 8,018 (茎では 9,918) リードであったが, PSTVd-D の場合はわずか 30 (茎では 128) リードであった. すなわち, PSTVd-sRNA 蓄積量における顕著な変化は, P 領域の上側鎖 (63/64 位への A 挿入変異) 或は及び下側鎖 (A310C の塩基置換及び 312/313 位への UU 挿入変異) で見られる塩基の違いに影響を受けている可能性が示唆された.

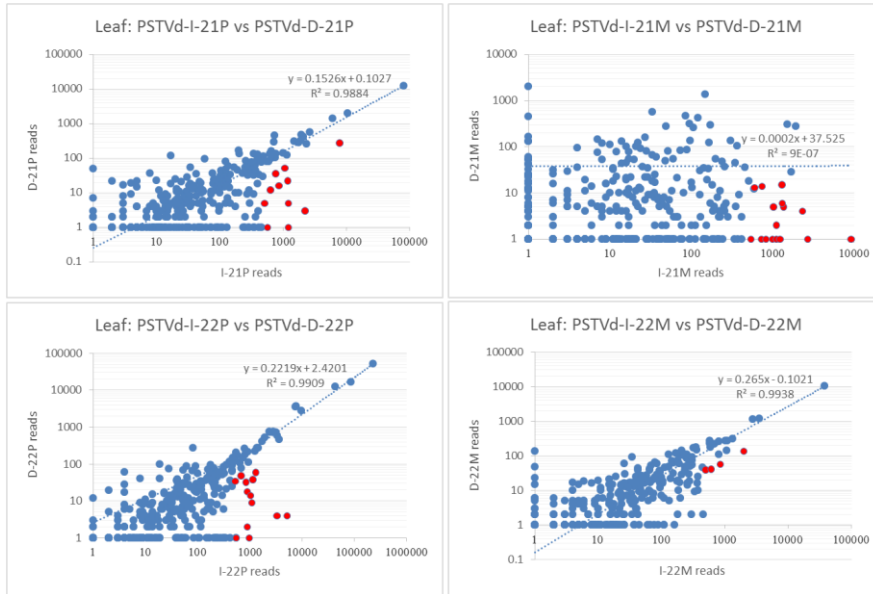
図. 30) ディープシーケンス解析での葉 (i) 及び茎 (ii) における PSTVd-sRNA のサイズ分布



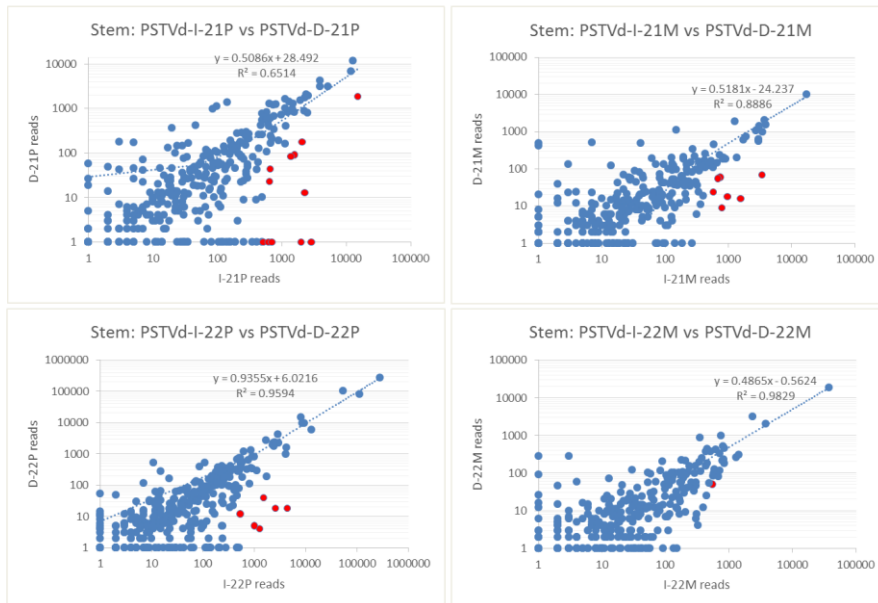
- ・ 横軸は sRNA のサイズ，縦軸はリード数を示す
- ・ 赤色バーはゲノム鎖 PSTVd-I (トマト葉及び茎) 由来の sRNA を示し，同様に黄色バーはアンチゲノム鎖 PSTVd-I，青色バーはゲノム鎖 PSTVd-D，緑色バーはアンチゲノム鎖 PSTVd-D 由来の sRNA を示す

図. 31) PSTVd-D (y 軸) 及び PSTVd-I (x 軸) 感染トマト葉 (i) 及び茎 (ii) における 21 及び 22 nt 種の PSTVd-sRNA 散布図

i)



ii)



- ・ P はゲノム鎖 (positive strand), M はアンチゲノム鎖 (negative strand) を示す
- ・ 赤色ドットは 500 リード以上の sRNA 種のうち, PSTVd-I 感染植物中の sRNA リード

数と比較して PSTVd-D で 10%未満の割合であったものを示す

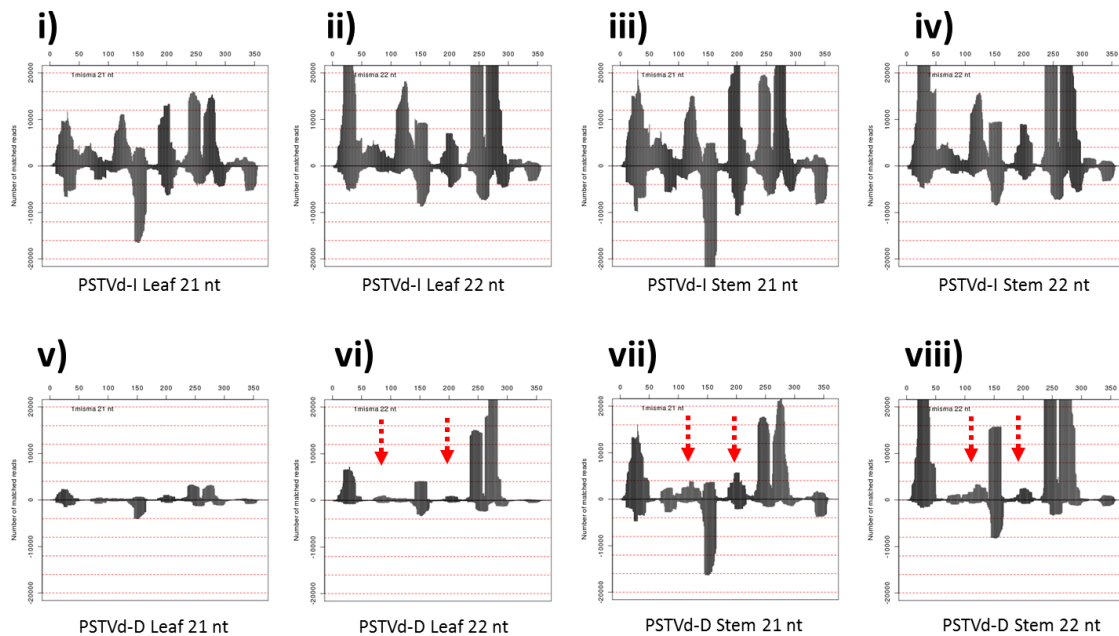
図. 32) PSTVd-I, -D 感染トマト (葉及び茎) での 21 及び 22 nt 種の PSTVd-sRNA 一覧
(特に PSTVd-D 感染で減少率が著しかったものを抜粋)

Nucleotide No.	Leaf								Stem								Nucleotide change (between PSTVd-I, -D) included			
	21P		21M		22P		22M		21P		21M		22P		22M					
	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D				
2																	544	50		
22								35	16										42	43
23								502	39										42	43
24			2674	1															42	43
25			995	0								960	18						42	43
49					969	1				501	1				1274	4			64	
50	1214	0								1981	1								64	
51										642	23								64	
57					549	0									512	0			64	
59										514	0								64	
60					545	0	240	47											64	
69	638	12	589	12			263	51	1563	92	744	60								
76				1702	28															
95												790	9							
107	1188	22			3288	4			2052	179				2568	18				119	127
108	516	5			1094	9			659	44				1517	39				119	127
109	1224	5			5194	4			2269	13				4350	18				119	127
110	2230	3							2870	1									119	127
111	574	0							619	1									119	127
113									699	1				528	12				119	127
117					894	18													119	127
118	863	16			841	32													119	127
119	768	36			1309	59													119	127
120	1068	52			527	34														127
123					1035	14														127
135			506	18																
141			1364	5																
145			9201	0																
184					1135	38														202
185	7909	275																		202
186			1019	5							1557	16								202
188					681	48														202
191			2331	4																202
197			1106	2																202
202									1380	84										202
232			737	14																
246			539	0																
279			723	1																
280			1223	0																
281			1223	0																
302					892	2								996	5				311	312-313
333			1300	15																
334			1312	6																
335			822	1																
Total reads	80999	12377	49683	12395	229286	51264	38427	10169	127946	74390	81622	34631	278407	261416	37552	18182				

- Nucleotide number (No.) は PSTVd ゲノムの塩基番号を示す
- 21P はゲノム鎖 (plus (=positive) strand) 由来 21 nt の PSTVd-sRNA, 21M はアンチゲノム鎖 (minus (=negative) strand) 由来の 21 nt の PSTVd-sRNA, 22P はゲノム鎖 22 nt, 22M はアンチゲノム鎖 22 nt を示す
- I は PSTVd-I, D は PSTVd-D の略称
- グレー格子内の数値は PSTVd-sRNA のリード数を示す

図. 33) ディープシーケンス解析結果

i) PSTVd-I (i-iv), -D (v-viii) 感染トマト (葉及び茎) 中の PSTVd-sRNA
シーケンスプロフィール

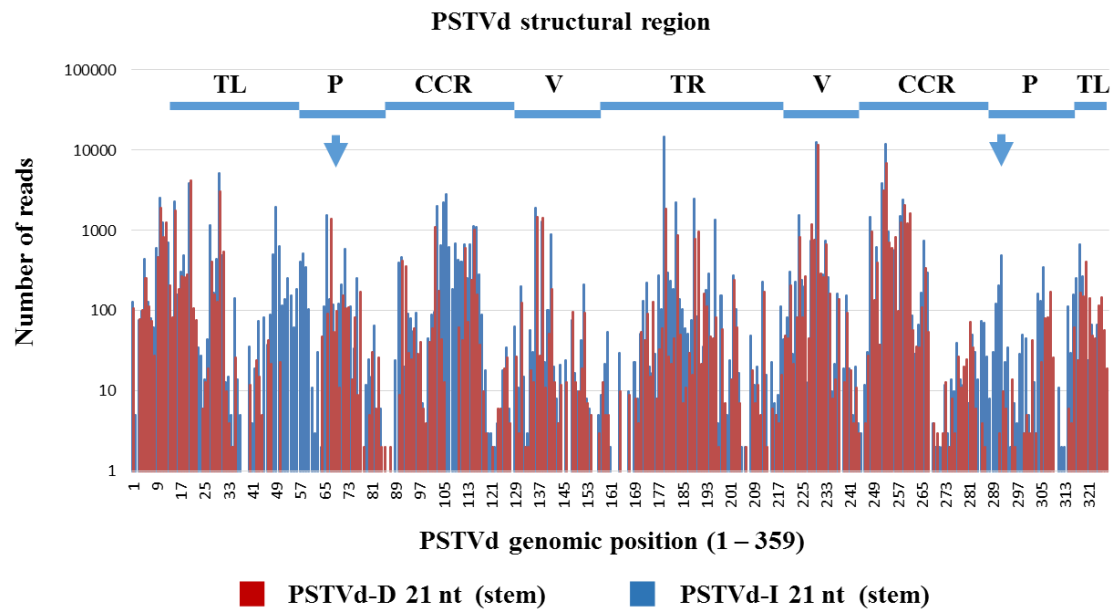


i) : PSTVd-I 感染葉由来の 21 nt 種
 ii) : PSTVd-I 感染葉由来の 22 nt 種
 iii) : PSTVd-I 感染茎由来の 21 nt 種
 iv) : PSTVd-I 感染茎由来の 22 nt 種

v) : PSTVd-D 感染葉由来の 21 nt 種
 vi) : PSTVd-D 感染葉由来の 22 nt 種
 vii) : PSTVd-D 感染茎由来の 21 nt 種
 viii) : PSTVd-D 感染茎由来の 22 nt 種

- i)–viii) 各パネルの 0–350 (x 軸) は PSTVd ゲノムの塩基番号に一致し、縦軸 (y 軸) の 0 より上側半分はゲノム鎖由来の sRNA リード数、下側半分はアンチゲノム鎖由来の sRNA リード数を示す
- PSTVd-D 感染で特に減少が見られた特定のピークは赤矢印で示す

ii) ゲノム鎖由来の 21 及び 22 nt 種の PSTVd-sRNA 5'末端のヒストグラム



- ・ 青色バーは PSTVd-I, 赤色バーは PSTVd-D 感染トマト由来の sRNA リード数を示す
- ・ 5 つの PSTVd 構造領域はパネル上部に示されている
- ・ PSTVd-D 感染で特に減少が見られた 5' 末端塩基が 49–68 番塩基領域（上鎖側 P 領域）或は 294–312 番塩基領域（下側鎖 P 領域）に位置する 21 及び 22 nt 種のゲノム鎖 PSTVd-sRNA 領域は矢印で示されている

考察

第一章で分析した通り、PSTVd-I は PSTVd-D よりも複製速度が速く蓄積量も多い。またディープシーケンス解析の結果、強毒な病徴を引き起こす PSTVd-I 感染で PSTVd-D 感染より多くの PSTVd-sRNA が蓄積していることが確認された。すなわち、PSTVd-sRNA 蓄積量は宿主中でのウイロイドレベルに比例することが明らかになった。PSTVd や citrus exocortis viroid (CEVd), hop stunt viroid (HSVd), grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1) 及び peach latent mosaic viroid (PLMVd) に感染した宿主におけるウイロイド特異的 sRNA のディープシーケンス解析データはこれまでも報告されているが、それぞれのウイロイド特異的 sRNA 種に関してはまだ十分に評価されていなかった。それ故に、今回の分析では強毒或は弱毒な病原性を示す PSTVd 分離株 (PSTVd-I 及び-D) 感染によって誘発される PSTVd-sRNA 種の蓄積レベルの違いを評価した。RNA ゲルブロット分析の結果から予想されていたように、トータルの PSTVd sRNA リード数は弱毒な病徴を引き起こす PSTVd 分離株 (PSTVd-D) に感染した宿主においてより低い蓄積レベルであることが確認された。一方で、PSTVd-I の場合と比較して 118, 126 及び 201 番塩基 (PSTVd-I, -D 間に見られる塩基変異箇所) を有する PSTVd-sRNA 蓄積レベルは PSTVd-D 感染で激減することが明らかになった。すなわち、ウイロイド分子の突然変異 (塩基変異) はウイロイド特異的 sRNA の蓄積レベルに有意に影響する可能性が示唆された。さらに興味深いことに、5'末端塩基が 49-68 番塩基領域に位置するゲノム鎖 PSTVd-sRNA 種の蓄積レベルも弱毒型 PSTVd (PSTVd-D) 感染後に激減し、実質無いに等しいレベルであった。この 49-68 番塩基領域は、PSTVd 分子の P 領域中の A リッチ配列 (ポスピウイロイド科のウイロイドに特徴的な配列) を含む上側鎖 (upper strand) に位置する。ウイロイドの病原性とウイロイド誘発性 RNA サイレンシング間に存在する相関についてはこれまでの先行研究においても予測、議論されてきたが (Itaya et al. 2001, 2007; Papaefthimiou et al. 2001; Wang et al. 2004), ウイロイドの病原性と P 領域に由来するウイロイド特異的 sRNA との関連性を示唆する証拠は報告されていない。それ故、本研究で得られた知見に関してさらなる分析が求められる。

第4章 PSTVd の病原性に影響を与える標的宿主因子の探索

— マイクロ RNA 蓄積量の比較分析 —

供試材料および実験方法

供試植物

第 3 章に従う

PSTVd 系統

第 3 章に従う

結果

PSTVd-I 及び PSTVd-D 感染トマトにおける miRNA 発現分析

マイクロ RNA (microRNA: miRNA) は 20–25 nt 程度の一本鎖 RNA 分子であり、真核生物の遺伝子発現調節に関与し、植物のライフサイクルにおいても欠かせない存在である。近年の研究では、特定の宿主 miRNA の相対的な発現レベルがウイロイド感染植物において変動することが示されており (Diermann et al. 2010; Ivanova et al. 2014; Owens et al. 2012)、病原性の異なるウイロイド感染宿主における miRNA 発現レベルの潜在的な違いについて sRNA データを分析することは非常に興味深い。そこで、第 3 章の sRNA マルチプレックスディープシーケンシング解析データをもとに、miRNA 発現レベルが強毒或は弱毒系統の PSTVd 感染によってどのように変動するのかを調査した。PSTVd-I 及び -D 感染トマト組織 (葉及び茎) での miRNA リード数は、miRNA 塩基配列情報と注釈が公開されている miRBase データベース (<http://www.mirbase.org/>) を参照して抽出し、図. 34 に要約している。ほとんどの葉及び茎間で miRNA リード数に大差はなかったが、いくつかの興味深い違いが確認された。例えば、健全体の茎では miR319 はおよそ 50 倍の蓄積レベルを示している一方で、miR6023 や miR6024 は葉で茎のおよそ 4 倍であった。PSTVd-I 及び PSTVd-D 感染での変動は、健全体のリード数を横軸に、PSTVd-I 及び PSTVd-D 感染組織におけるリード数を縦軸として散布図で示している (図. 35)。一部の miRNA ではリード数がかかなり低レベルであったため、少なくとも 100 万リード中で 100 リードを超えるデータのみを評価に用いた。

PSTVd 感染後の miRNA 蓄積レベルの変動は、安定、下方制御 (downregulation) 及び上方制御 (upregulation) の 3 つのカテゴリーに分けられた。多くの miRNA 種が PSTVd 感染後に変動する中で、miR6022 は葉及び茎どちらの場合も顕著な差は生じていなかった。下方制御されていたグループの中で、miR159 で植物組織全体で多量に存在し、PSTVd 感染葉及び茎でのリード数は、健全体の場合と比較してそれぞれ 60–78%、43–47% に減少していた。MiR162 の場合も同様に、健全体と比較して PSTVd 感染葉及び茎でそれぞれ 61–76%、51–57% に減少していた。先に記したように miR319 は茎で葉のおよそ 50 倍の蓄積レベルを示しており、PSTVd 感染個体の茎では健全体に比べ 33–63% とさらに顕著に減少していたが、葉では差が見られなかった (図. 35)。MiR172a 及び 172b は茎でより多量に存在しており、健全体と比較した場合は 67–94% 程度であった。すなわち、これらの miRNA 種は PSTVd-I (宿主に強毒な病気を引き起こす) 感染で PSTVd-D (弱毒) よりも茎特異的に蓄積レベルが低下した。MiR156a、156b

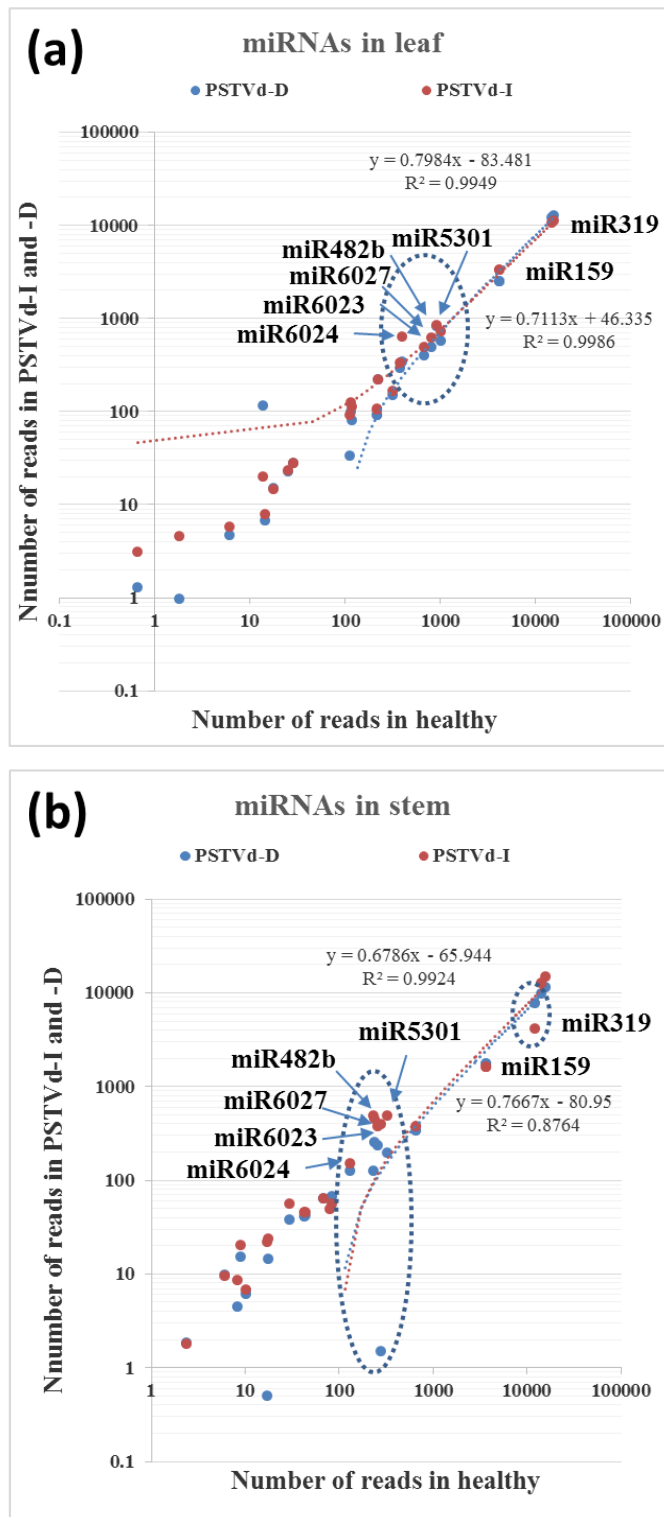
及び 156c はいずれも葉で茎のおよそ 5 倍の蓄積レベルであり， PSTVd 感染後は健全体の場合と比較して 42–52% に減少していた。加えて， miR171a 及び 171c も葉でより高レベルであり， PSTVd 感染後はわずかに減少傾向であった。葉及び茎のどちらの組織においても miRNA シリーズのうち miR166a と 166b が最も多量に存在していたが，それらの PSTVd 感染後の蓄積レベルの減少率はおよそ 20% 程度でしかなかった。一方，上方制御されていたグループの中では， miR6027 は茎及び葉で PSTVd-I 感染でのみおよそ 1.5 倍の蓄積レベルであったが PSTVd-D 感染では変動していなかった。MiR482b, miR5301, miR6023 及び miR6024 も同様に PSTVd-I 感染個体の茎で高レベルであったが， PSTVd-D 感染では減少傾向であった (図. 35)。miR482b, MiR6023, miR6024 及び miR6027 は病害抵抗性に関与するマイクロ RNA であると注釈づけられており (図. 34)，強毒型の PSTVd (今回は PSTVd-I) 感染によって蓄積レベルが増加した可能性が示唆された。

図. 34) PSTVd-I 及び-D 感染後の葉及び茎での miRNA 蓄積レベル概要

miRNA	Healthy leaf % (X10000)	PSTVd-D leaf % (X10000)	PSTVd-I leaf % (X10000)	Healthy stem % (X10000)	PSTVd-D stem % (X10000)	PSTVd-I stem % (X10000)	Significance	
miR482a	1.848	0.972	4.59	8.274	4.482	8.592	Disease resistance	
miR482b	384.552	291.438	330.82	279.937	1.494	398.096		
miR482c	14.616	6.642	7.82	17.139	0.498	22.017		
miR6022	117.096	99.306	123.93	131.793	126.16	148.928		
miR6023	1022.952	568.458	729.3	235.218	125.164	491.176		
miR6024	927.024	818.748	831.13	242.507	250.328	453.228		
miR6026	6.216	4.698	5.78	10.244	6.142	6.802		
miR6027	406.056	344.25	626.28	262.01	234.226	375.721		
miR319	221.928	217.242	218.11	12338.11	7780.42	4102.143		Leaf development, TCP transcription factor
miR172a	25.536	22.842	23.29	80.573	63.246	49.404		leaf curling
miR172b	28.56	28.026	27.54	85.104	67.396	56.206	AP2-like ethylene responsive transcription factor and Glutamate permease	
miR160a	0.672	1.296	3.06	2.364	1.826	1.79	Auxin response factor 16	
miR166a	15714.384	12721.374	11227.99	15819.297	11248.658	14943.636	Class III homeodomain-leucine zipper	
miR166b	15063.216	12088.926	10611.74	14220.839	9774.246	12763.953	Class III homeodomain-leucine zipper	
miR162	811.44	494.424	616.25	662.117	336.648	374.11	putative Dicer1	
miR171a	119.784	80.352	113.05	29.55	38.014	56.385	GRAS family transcription factor	
miR171b	13.944	116.154	19.72	6.107	9.794	9.487		
miR171c	114.24	32.886	90.95	9.062	14.94	20.406		
miR171d	17.976	14.904	14.62	17.73	14.442	23.628		
miR5301	688.464	394.794	485.52	325.05	192.56	482.763	MYB-like TF	
miR156a	317.856	150.012	165.41	68.556	63.246	63.366	S60quamosa promoter binding protein, Tosspovirus resistance protein, lateral uppressor protein, DNA methyltransferase	
miR156b	218.232	91.368	105.06	43.537	40.836	45.466		
miR156c	217.392	91.368	104.89	44.522	41.334	45.466		
miR159	4185.216	2510.028	3278.28	3737.484	1742.004	1608.673	early flowering, leaf curling - MYB transcription factor	

- ・各数値はトータルのスモール RNA 100 万リード中の miRNA リード数を示し、少なくとも 100 万リード中で 100 リードを超える miRNA を評価している
- ・各 miRNA 蓄積レベルのうち、健全体と比較して 80%未満の蓄積レベルであったものを青色で、120%以上であったものを赤色で示している

図. 35) PSTVd-I 及び-D 感染後の葉 (a) 及び茎 (b) での miRNA リード数の散布図



・ y 軸は PSTVd-I (赤色ドット) 及び PSTVd-D (青色ドット) の miRNA リード数を示し, x 軸は健全体由来のリード数を示す

考察

MiRNA の蓄積レベルにおいても PSTVd-sRNA 種の分析結果と同様に、全体を通して病原性に関わらず PSTVd 感染葉で下方制御 (downregulation) される傾向にあったが、組織間 (葉-茎) では若干蓄積レベルに違いが見られ、いくらかの miRNA 種は上方制御 (upregulation) されていた。例えば、miR482b や miR482c, miR6023, miR6024, miR6027 のような病害抵抗性に関わる miRNA 種及び miR171a や miR171b, miR171c, miR171d, miR5031 のような GRAS (植物固有の転写因子) 遺伝子ファミリーの発現に関わる miRNA 種は、強毒な病徴を示す PSTVd-I 感染個体の茎で上方制御されていた。これらの上方制御は、PSTVd-I 感染個体で誘発される激しい矮化症状 (節間の短縮) に対する宿主側の強固な抵抗力によるものであると推測される。

一方の PSTVd 感染によって下方制御されていた miRNA 種の中でも、miR159 及び miR319 の変動は興味深い結果であった。どちらの miRNA も病原性に関わらず (PSTVd-I, -D いずれの場合も) PSTVd 感染で下方制御されていたが、miR159 が葉及び茎両方で高い蓄積レベルであった一方で miR319 は茎でのみ高レベルであった。特筆すべきは、茎では miR159 及び miR319 両方で下方制御が見られたが、弱毒 PSTVd (-D) よりも強毒 PSTVd (-I) 感染個体でより大きな下方制御が確認された点を考慮する限り、両 miRNA 種の蓄積レベルの低下は病原性の強さに一致 (比例) してもたらされた結果であると考えられる。Diermann et al. (2010) の報告によると、PSTVd-AS1 (致死型株) 感染トマト (cv. Rutgers) で誘発される sRNA をディープシーケンス解析により分析したところ miR159 及び miR319 の蓄積レベルは、健全体の場合と比較しおよそ 1/3 に減少していた。同様に、Owens et al. (2012) の報告でも PSTVd-I 感染トマト (cv. Rutgers) における sRNA のディープシーケンス解析の結果、miR159 の蓄積レベルは健全体の場合と比較しておよそ 1/3 に減少していた。加えて、Ivanova et al. (2014) はマイクロアレイ解析を用い PSTVd 感染 *Phelipanche ramosa* (ハマウツボ科の根寄生雑草) での miRNA 発現レベルの変動を分析したところ、有意なシグナルを示した 43 種の miRNA のうち、2 種 (miR156 及び miR395) 以外の全ての miRNA 種で PSTVd 感染による下方制御が確認され、miR159 及び miR319 は健全体の場合と比較してそれぞれ 1/4 及び 1/8 程度に減少していた。本研究の分析結果では、PSTVd-I 及び -D 感染トマト (cv. Rutgers) の茎での miR319 発現レベルは、健全体と比較してそれぞれ 1/3 及び 2/3 に減少していた。PSTVd-I 及び -D 感染トマトにおける miR159 発現レベルは、葉及び茎どちらの場合もおよそ 1/2 に減少していた。すなわち、これらの結果を総合的に考察するに、

PSTVd 感染が miRNA (特に miR159 と miR319) の発現レベルに有意な影響を及ぼすという確かな証拠が得られた。

MiR159 及び miR319 遺伝子は, *Arabidopsis thaliana* において最初に同定され, 共通の原種から進化したと考えられる高度に保存された 8 つの miRNA ファミリーのうちの 1 つとして知られている (Cuperus et al. 2011). また miR159 及び miR319 は, 転写後調節を介して siRNA 経路を調節するように作用する (Li et al. 2011). *Mir159* 遺伝子ファミリーのターゲットは, アリユーロン細胞, 花および種子, ならびに栄養組織の成長における転写因子として重要な役割を果たすことが知られる高度に保存された GAMYB (MYB33) 遺伝子ファミリーのメンバーである (Allen et al. 2007). *Arabidopsis* における miR159 の過剰発現 (Overexpression) は AtMyb33 の発現レベルを減少させ, 結果として短日条件下で開花が遅れることが知られている (Achard et al. 2004). 加えて, miR159 は短光周期下での花成における負の制御因子としても知られており, miR159 発現レベルを抑制することによって, グロキシニア (*Sinningia speciosa*) の開花時期を制御することができる (Li et al. 2013). *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) に感染した菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) が同種の健康体よりも数日から 3 週間早期開花するという報告を考慮すると (Bouwen and van Zaayen 2003), miR159 は PSTVd 感染で下方制御されるという現象は非常に興味深い. また, Owens ら (2012) は, マイクロアレイ解析を用いて PSTVd 感染トマトにおける遺伝子発現の変動を分析し, ジベレリン生合成に参与するジベレリン β -ヒドロキシラーゼ遺伝子が PSTVd 感染によって有意に下方制御されることを見出した. さらに, MiR159 は GAMYB を標的とするため, GAI (DELLA), GAMYB 及び LEAFY (GA シグナル伝達経路の中心的な役割を果たす遺伝子) の発現レベルを分析したが, PSTVd 感染はこれらの遺伝子に限定的に (わずかに) 影響する程度であった. 結論として, ウイロイド研究の分野におけるマイクロ RNA 分析は未だ初期段階にあり, マイクロ RNA 種 (miR159 及び miR319 を含む) の発現レベルに対するウイロイド感染の影響を GA シグナル伝達経路を介したウイロイドの病原性発現メカニズムと関連付けて調査することが求められる.

摘要

- PSTVd ダリア株 (PSTVd-D) の右側分子中の 3 塩基の塩基置換 (118, 124, 201 番塩基) は, 独立して比較的自由に変異する. また, PSTVd 右側分子中の塩基置換は, 病原性の決定にはさほど影響しないが複製能 (蓄積レベル) に影響を与える.
- PSTVd 左側分子への塩基変異導入は, 高確率 (7/12 : およそ 60%) で共変異 (復帰変異, 欠失及び挿入変異を含む) を誘導するが, 共変異した場合も病原性への影響はほとんど見られない. 一方の右側分子への塩基変異導入は, 共変異は見られなかったが, 201C の塩基変異導入で感染力を失う.
- PSTVd 強毒株 (PSTVd-I) への単一な PSTVd-D 型塩基変異導入 (C42U 及び 64U) により弱毒化を誘発した. すなわち, 単一な塩基変異導入により PSTVd の病原性が制御できる可能性を実証した.
- 今回の PSTVd キメラ変異体構築実験から, PSTVd の病原性に関わる新たな決定因子として以下の 3 つを提案する
 - i) 第 7 ステム構造の長さ (弱毒系統ほど長い=安定)
 - ii) 第 7 ステムの安定性及びバルジループの位置 (5'末端側から 3 塩基目)
 - iii) 第 7 ステム周辺の塩基配列及びループ構造
- タバコの場合と異なり, *SVirP1 pro IR* 導入トマトは PSTVd 感染にほとんど影響しない.
- PSTVd 分子に生じる突然変異 (塩基変異) は, PSTVd 特異的 sRNA (PSTVd-sRNA) の蓄積レベルに影響し, 特定の領域から生成する PSTVd-sRNA は病原性に相関を示す
- PSTVd 感染によりマイクロ RNA (miRNA) 蓄積レベルは変動し, 特に miR159 及び miR319 は PSTVd の病原性の強弱に一致した. しかしながら, ウイロイド研究における miRNA 分析は未だ初期段階であり, ウイロイドの病原性と関連付けてさらなる分析が求められる.

引用文献

- Adkar-Purushothama, C.J., Zhang, Z.-X., Li, S.-F., Sano, T., (2015a) Analysis and application of viroid-specific small RNAs generated by viroid-inducing RNA silencing. *Methods Mol. Biol.* 1236:135–170
- Adkar-Purushothama, C.R., Brosseau, C., Giguère, T., Sano, T., Moffett, P., Perreault, J.P., (2015b) Small RNA derived from the virulence modulating region of the potato spindle tuber viroid silences callose synthase genes of tomato plants. *Plant Cell* 27: 2178–2194
- Avina-Padilla, K., Martinez de la Vega, O., Rivera-Bustamante, R., Martinez-Soriano, J.P., Owens, R.A., Hammond, R.W., Vielle-Calzada, J.-P., (2015) In silico prediction and validation of potential gene targets for potyvirus-derived small RNAs during tomato infection. *Gene* 564:197–205
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C., Harberd, N.P. (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131:3357–3365
- Allen, R.S., Li, J., Stahle, M.I., Dubroue, A., Gubler, F., Millar, A.A. (2007) Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target gene of the Arabidopsis miR159 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:16371–16376
- Bouwen, I. van Zaayen, A., (2003) Chrysanthemum stunt viroid. In: Hadidi, A. et al (eds) *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, pp 218–223
- Branch, A.D., Robertson, H.D., (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science* 223:450–455
- Chaffai, M., Serra, P., Gandia, M., Hernandez, C., Duran-Vila, N., (2007) Molecular characterization of CEVd strains that induce different phenotypes in *Gynura aurantiaca*: structure-pathogenicity relationships. *Arch. Virol.* 152:1283–1294
- Cuperus, J.T., Fahlgren, N., Carrington, J.C. (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell* 23: 431–442
- Daro's, J.A., Flores, R., (2004) Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6792–6797

- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J.Th.J., Li, S.-F., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T., Vidalakis, G., Owens, R.A., (2014) Current status of viroid taxonomy. *Arch. Virol.* 159:3467–3478
- Di Serio, F., Gisel, A., Navarro, B., Delgado, S., de Alba, A.E.M., Donvito, G., Flores, R., (2009) Deep sequencing of the small RNAs derived from two symptomatic variants of a chloroplastic viroid: implications for their genesis and for pathogenesis. *PLoS One* 4:e7539
- Diener, T.O. (1979) *Viroids and Viroid Diseases*. Wiley, New York
- Diener, T.O. (ed) (1987) *The viroids*. Plenum Press, New York
- Diermann, N., Matoušek, J., Junge, M., Riesner, D., Steger, G., (2010) Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in infected tomato. *Biol Chem* 391:1379–1390
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Dennis, E.S., Wassenegger, M., Wang, M.-B., (2014) In *Nicotiana* species, an artificial microRNA corresponding to the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid directs RNA silencing of a soluble inorganic pyrophosphatase gene and the development of abnormal phenotypes. *Virology* 450–451:266–277
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.A., Di Serio, F., (2005) Viroids and viroid–host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:117–139
- Góra, A., Candresse, T., Zagórski, W., (1994) Analysis of the population structure of three phenotypically different PSTVd isolates. *Arch. Virol.* 138:233–245
- Góra, A., Candresse, T., Zagórski, W., (1996) Use of intramolecular chimeras to map molecular determinants of symptom severity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *Arch. Virol.* 141:2045–2055
- Gozmanova, M., Denti, M.A., Minkov, I.N., Tsagris, M., Tabler, M., (2003) Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Res.* 31:5534–5543
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., Sängler, H.L., (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273:203–208

- Gross, H.J., Liebel, U., Alberty, H., Krupp, G., Domdey, H., Ramm, K., Sanger, H.L., (1981) A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in threenucleotide exchanges only. *Biosci. Rep.* 1:235–241
- Gruner, R., Fels, A., Qu, F., Zimmat, R., Steger, G., Riesner, D., (1995) Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *Virology* 209:60–69
- Hammond, R.W., (1994) Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology* 201:36–45
- Herold, T., Haas, B., Singh, R.P., Boucher, A., Sanger, H.L., (1992) Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids. *Plant Mol. Biol.* 19:329–333
- Hu, Y., Feldstein, P.A., Bottino, P.J., Owens, R.A., (1996) Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication. *Virology* 219:45–56
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S., Ding, B., (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 1332–1334
- Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, Harris AR, Molina C, Nelson RS, Ding B (2007) A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol* 81: 2980–2994
- 伊藤寛次 (2012) ポテトスピンドルチューバーウイルス-DARIA株の病原性の評価とウイルス間相互作用. 弘前大学大学院農学生命科学研究科, 修士論文
- Ivanova, D., Milev, I., Vachev, T., Baev, V., Yahubyan, G., Minkov, G., Gozmanova, M. (2014) Small RNA analysis of Potato spindle tuber viroid infected *Phelipanche ramosa*. *Plant Physiol Biochem* 74:276–282
- Kalantidis, K., Denti, M.A., Tzortzakaki, S., Marinou, E., Tabler, M., Tsagris, M., (2007) Virp1 is a host protein with a major role in Potato spindle tuber viroid infection in Nicotiana plants. *Virology* 357:12872–12880
- Kasai, A., Bai, S., Li, T., Harada, T. (2010) Graft-transmitted siRNA signal from the root induces visual manifestation of endogenous post-transcriptional gene silencing in the scion. *PLoS One* 6(2): e16895

- Kasai, A., Sano, T., Harada, T. (2013) Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLoS One* 8(2): e57736
- Keese, P., Symons, R.H., (1985) Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:4582–4586
- Lakshman, D.K., Tavantzis, S.M., (1993) Primary and secondary structure of a 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *Arch. Virol.* 128:319–331
- Levy, L., Lee, I.M., Hadidi, A., (1994) Simple and rapid preparation of infected plant tissue extracts for PCR amplification of virus, viroid, and MLO nucleic acids. *J. Virol. Methods* 49: 295–304
- Li, Y., Li, C., Ding, G., Jin, Y., (2011) Evolution of MIR159/319 microRNA genes and their post-transcriptional regulatory link to siRNA pathways. *BMC Evol Biol* 11:122
- Li, X., Bian, H., Song, D., Ma, S., Han, N., Wang, J., Zhu, M., (2013) Flowering time control in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*) by manipulation of miR159 expression. *Ann Bot* 111:791–799
- Machida, S., Yamahata, N., Watanuki, H., Owens, R.A., Sano, T., (2007) Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in Potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J Gen Virol* 88:3452–3457
- Maniatakis, E., Tabler, M., Tsagris, M., (2003) Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* 9:346–354
- Martínez de Alba, A.E., Sagesser, R., Tabler, M., Tsagris, M., (2003) A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds Potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. *Virology* 77:9685–9694
- Martinez, G., Donaire, L., Llave, C., Pallas, V., Gomez, G., (2010) High throughput sequencing of Hop stunt viroid-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Mol Plant Pathol* 11:347–359
- Matoušek, J., Kozlova, P., Orctova, L., Schmitz, A., Pešina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G., Riesner, D., (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol Chem* 388:1–13

- Matoušek, J., Stehlík, J., Procházková, J., Orctová, L., Wullenweber, J., Füßy, Z., Kovácik, J., Duraisamy, G.S., Ziegler, A., Schubert, J., Steger, G., (2012) Biological and molecular analysis of the pathogenic variant C3 of potato spindle tuber viroid (PSTVd) evolved during adaptation to chamomile (*Matricaria chamomilla*). *Biol. Chem.* 393:605–615
- Murcia, N., Bernad, L., Duran-Vila, N., Serra, P., (2011) Two nucleotide positions in the Citrus exocortis viroid RNA associated with symptom expression in Citrus but not in experimental herbaceous hosts. *Mol. Plant Pathol.* 12:203–208
- Nie, X., (2012) Analysis of sequence polymorphism and population structure of Tomato chlorotic dwarf viroid and Potato spindle tuber viroid in viroid-infected tomato plants. *Viruses* 4, 940–953
- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Di Serio, F., Burgya'n, J. (2009) Deep sequencing of viroid-derived small RNAs from grapevine provides new insights on the role of RNA silencing in plant–viroid interaction. *PLoS One* 4:e7686
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R., Di Serio, F., (2012) Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J* 70:991–1003
- Owens, R.A., Chen, W., Hu, Y., Hsu, Y.H., (1995) Suppression of potato spindle tuber viroid replication and symptom expression by mutations which stabilize the pathogenicity domain. *Virology* 208:554–564
- Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A., Kastalyeva, T.B., (2009) Russian isolates of potato spindle tuber viroid exhibit low sequence diversity. *Plant Dis.* 93:752–759
- Owens, R.A., Khurana, S.M., Smith, D.R., Singh, M.N., Garg, I.D., (1992) A new mild strain of potato spindle tuber viroid isolated from wild *Solanum* spp. in India. *Plant Dis.* 76:527–529
- Owens, R.A., Steger, G., Hu, Y., Fles, A., Hammond, R.W., Riesner, D., (1996) RNA structural features responsible for Potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* 222:144–158

- Owens, R.A., Tech, K.B., Shao, J.Y., Sano, T., Baker, C.J. (2012) Global analysis of tomato gene expression during Potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 25:582–598
- Owens, R.A., Thompson, S.M., Steger, G., (1991) Effects of random mutagenesis upon potato spindle tuber viroid replication and symptom expression. *Virology* 185:18–31
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., Tabler, M., (2001) Replicating Potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res* 29:2395–2400
- Puchta, H., Herold, T., Verhoeven, K., Roenhorst, A., Ramm, K., Schmidt-Puchta, W., Sanger, H.L., (1990) A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Mol. Biol.* 15:509–511
- Qi, Y. and Ding, B., (2003) Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* 15:1360–1374
- Rocheleau, L., Pelchat, M., (2006) The subviral RNA database: a toolbox for viroids, the hepatitis delta virus and satellite RNAs research. *BMC Microbiol.* 6:24
- Sanger, H.L., 1987. Viroid function. In: *The Viroids*. Plenum Press, New York and London, pp. 117–166, Chapter 5
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., Owens, R.A., (1992) Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10104–10108
- Sano, T., Yoshida, H., Goshono, M., Monma, T., Kawasaki, H., Ishizaki, K., (2004) Characterization of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species. *J. Gen. Plant Pathol.* 70:181–187
- Schmitz, A. and Riesner, D., (1998) Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. *RNA* 4:1295–1303
- Schnolzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H., Sanger, H.L., (1985) Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.* 4, 2181–2190

- Singh, R.P., (1973) Experimental host range of the Potato spindle tuber 'virus'. *Am Potato J* 50:111–123
- Škorić, D., Conerly, M., Szychowski, J.A., Semancik, J.S., (2001) CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature-sensitivereaction. *Virology* 280:115–123
- St-Pierre, P., Hassen, I.F., Thompson, D., Perreault, J.P. (2009) Characterization of the siRNAs associated with Peach latent mosaic viroid infection. *Virology* 383:178–182
- Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., He, Y.H., Adkar-Purushothama, C.R., Sano, T., (2011) Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:253–256
- Tsushima, D., Adkar-Purushothama, C.R., Taneda, A., Sano, T., (2015) Changes in relative expression levels of viroid-specific small RNAs and microRNAs in tomato plants infected with severe and mild symptom-inducing isolates of potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Plant Pathol.* 81:49–62
- Visvader, J.E. and Symons, R.H., (1985) Eleven new sequence variants of citrus exocortisviroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res.* 13:2907–2920
- Visvader, J.E. and Symons, R.H., (1986) Replication of in vitro constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortisviroid. *EMBO J.* 5:2051–2055
- Wang, M.B., Bian, X.Y., Wu, M., Liu, L.X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., Waterhouse, P.M., (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:3275–3280
- Wang, Y., Shibuya, M., Taneda, A., Kurauchi, T., Senda, M., Owens, R.A., Sano, T., (2011) Accumulation of Potato spindle tuber viroid specific small RNAs is accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars. *Virology* 413:72–83
- Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmer, S., Gast, F.-U., Riedel, L., Sanger, H.L., (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology* 226:191–197
- Weidemann, H.L. and Buchta, U., (1998) A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Res.* 41:1–8

謝辞

まず初めに、本研究を遂行するにあたりご指導・ご鞭撻をいただいた弘前大学農学生命科学部の佐野輝男教授、田中和明准教授、原田幸雄名誉教授に心より謝意を表します。また、岩手大学農部の磯貝雅道准教授及び山形大学農学部の長谷修准教授には懇切なご指導、ご校閲を賜りました。弘前大学農学生命科学部の千田峰生教授には学部生時代において現在に通ずる研究の基礎をご教授いただきました。弘前大学理工学部の種田晃人准教授にはゲノム情報のデータ解析にご協力いただきました。北海道大学農学研究院の畑谷達児先生及び弘前大学客員研究員の葛西厚史博士には実験試料を分譲していただきました。秋田県立大学生物資源科学部の藤晋一教授、農研機構花き研究所の松下陽介博士及びシエルブルック大学（カナダ）の Charith Raj Adkar-Purushothama 博士には有益なご助言をいただきました。最後に、植物病理学研究室の卒業生及び学生各位には、様々な面でご協力いただきました。先生方、家族をはじめ本研究に携わってくださった全ての皆様にこの場をお借りして御礼申し上げます。

また、本研究は岩手大学大学院連合農学研究科長裁量経費（学生研究プロジェクト経費）、笹川科学研究助成金、日本学術振興会研究奨励金及び特別研究員奨励費、日本学生支援機構奨学金により研究遂行費並びに生活面でご援助いただきました。ここに記し謝辞といたします。