

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

誌名	兵庫県農業技術センター研究報告. 農業編 = Bulletin of the Hyogo Prefectural Agricultural Institute. Agricultural section
ISSN	13410326
著者名	塩飽, 邦子 山元, 義久 岩井, 豊通
発行元	兵庫県立中央農業技術センター
巻/号	44号
掲載ページ	p. 1-4
発行年月	1996年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



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

塩飽邦子*・山元義久*・岩井豊通*

要 約

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

- 1 CSVd の抽出には、斉藤の方法にフェノール/クロロホルム抽出を加えた変法が、夾雑物が少なく酵素反応を阻害せず、操作も簡単で優れていた。
- 2 イギリス分離株の塩基配列をもとに2組4種類のプライマーを合成して、逆転写-Polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い cDNA を合成し増幅した。
- 3 PCR 産物をプラントエンド化し pUC119 の Sma I サイトにクローニングし、塩基配列を決定した。兵庫県で分離した CSVd-RNA の塩基数は 354 塩基でイギリス分離株と同数、オーストラリア分離株より 2 塩基少なかった。RNA のホモロジーは、イギリス分離株とは 99.8%、オーストラリア分離株とは 97.8% であった。

Cloning and Nucleotide Sequence of Chrysanthemum Stunt Viroid

Kuniko SHIWAKU, Yoshihisa YAMAMOTO and Toyomichi IWAI

Summary

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

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

緒 言

キクわい化病はキクわい化ウイルス (CSVd) により起こる病害で、兵庫県下では10年ほど前から発生し、チャボとかスタントと呼んで問題になっていた。CSVd に感染したキクは、草丈が健全株の1/2から3/4になるため、著しく商品価値が低下し、栽培農家に大きな損害を与えている。

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

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

材料および方法

1 ウイルスの抽出

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

1995年8月31日受理

*中央農業技術センター

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

図1 CSVdの抽出方法(斉藤法の変法)

①相補 PCR プライマー	
(CSVC-1)	: TTCTTTCAAAGCAGCAGGGT
(CSVC-2)	: GCCCCAGCCGCGATCTCGTC
相同 PCR プライマー	
(CSVs-1)	: AAAGAAATGAGGCGAAGAAG
(CSVs-2)	: GACAGGAGTAATCCTAAAC
②逆転写反応	
CSVd液 (95°C、5分で熱変性後急冷)	1 μ l
相補 PCR プライマー (10 pmol/ μ l)	2
dNTP (各10nmol/ μ l)	2
10倍逆転写用緩衝液	2
RNase inhibitor (110U/ μ l)	0.1
RAV-2 逆転写酵素 (25U/ μ l)	0.1
滅菌蒸溜水を加えて20 μ lとする。	
室温10分、42°C 1時間反応、65°C10分間酵素失活処理	
③PCR 反応	
逆転写反応液	5 μ l
相同 PCR プライマー (10 pmol/ μ l)	0.5
10倍 PCR 用緩衝液	1.5
Taq DNA ポリメラーゼ (5U/ μ l)	0.2
滅菌蒸溜水を加えて20 μ lとする。	
94°C 5分	1回
94°C30秒・53°C 1分・72°C 1分	40回
72°C 5分	1回

図2 CSVd検出用 RT-PCR 条件

Gubler & Hoffman²⁾の方法で行った。プライマーは橋ら⁵⁾に準じ、CSVd イギリス分離株の36番から55番までの相補配列 (CSVC-1) を合成した (図2)。20 pmol のプライマー、各 20 nmol の dNTP、11U の RNase inhibitor、2.5U の逆転写酵素 (宝酒造株式会社製、RAV-2)、1 μ l の CSVd 液、20 μ l の反応液で室温 10分、42°C で 1 時間反応させ、cDNA を合成した。56番から75番までの相同配列のプライマー (CSVs-1) を合成して 5 pmol を先の逆転写反応液 5 μ l に加え、10 \times PCR 用緩衝液 1.5 μ l、Taq DNA 合成酵素 1U、水を加えて 20 μ l とし PCR を行った。PCR の反応条件は、94°C 5分を 1回、94°C 30秒、53°C 1分、72°C 1分を 40回繰返し、72°C 5分を 1回である。PCR の後、1.5% アガロースゲルで電気泳動し、増幅された cDNA を確認した。

2 クローニングおよび塩基配列の決定

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

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

結 果

1 ウイロイドの抽出

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

2 クローニングおよび塩基配列

プライマー CSVC-1 と CSVs-1 を使った PCR 産物が

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

考 察

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

1 ウィロイドの抽出

表1 各分離法によるキク生葉1g当たりのRNAの収量

分離法	健全キク	CSVd接種キク
上田法	2.9μg	ND ¹⁾
斉藤法	11.2	2.6μg
斉藤法変法	1.7	4.8

1) ND: Not Detected 分光光度計で測定できなかった。

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

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

2 塩基配列

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

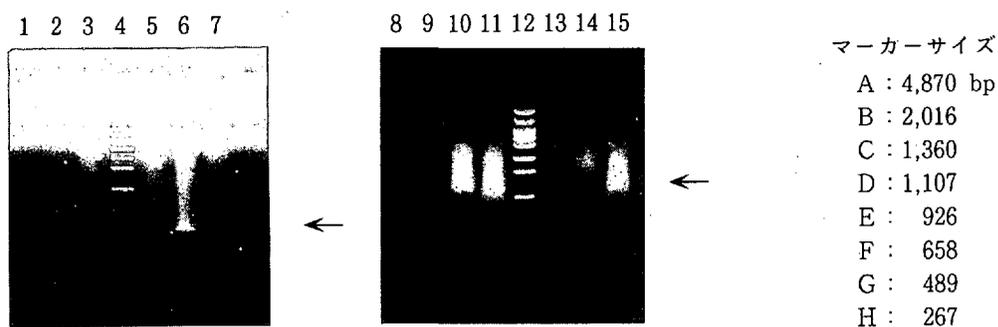


図3 CSVd抽出法の違いがRT-PCRに及ぼす影響

←はCSVd-cDNAのバンド

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

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

図4 兵庫県で発生したCSVd-RNAの塩基配列(DNAで表示)

H: 兵庫分離株

E: イギリス分離株

A: オーストラリア分離株

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

引用文献

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