

ランダムcDNAシャッフリング選抜法による ウイルス宿主適応の実証的検証

平成12年度～平成14年度科学研究費補助金（基盤研究C2）

研究成果報告書

平成15年度3月

佐野 輝男

（弘前大学農学生命科学部・助教授）

研究組織

研究代表者： 佐野 輝男 （弘前大学 農学生命科学部 助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位；千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	1,800	0	1,800
平成13年度	900	0	900
平成14年度	800	0	800
総計	3,500	0	3,500

研究発表

（1）学会誌等

Sano, T., Mimura, R. and Ohshima, K. (2001) Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of hop stunt viroid supports a grapevine origin of hop stunt disease, *Virus Genes* 22(1): 53-59. (添付資料2) 平成13年

Sano, T., Yoshida, H., Momma, T., Kawasaki, H. and Ishizaki, K. (投稿中) Characterization of a new viroid emerged on hop: evidence for viroid specification by isolation in different host species.

（2）口頭発表

佐野輝男・戸塚良晃・田中真由美・山本晋玄・古賀聡・寺内英貴・日高操：ホップ矮化ウイルスの宿主適応に関する実験的解析，日本植物病理学会東北部会（秋田）平成13年10月4日

佐野輝男・戸塚良晃・田中真由美・山本晋玄・古賀聡・寺内英貴・日高操（2001）ランダムcDNAシャッフリング選抜法を用いたホップ矮化ウイルス-宿主適応の解析，日本分子生物学会年会，（横浜）平成13年12月12日

Sano, T., Totsuka, Y., Tanaka, M., Yamamoto, S., Koga, S., Terauchi, H. and Hidaka, S. (2002) Analysis of hop stunt viroid - host adaptation using random cDNA shuffling selection, XII th International Congress of Virology (Paris) 平成14年7月28日

（3）出版物

佐野輝男（2000）ホップ矮化病とホップ矮化ウイルス，東北地方における植物病理学のフロントライン 日本植物病理学会東北部会編 271-276. 仙台共同出版（添付資料1）平成12年

佐野輝男（2002）ウイルス（1-2）8-13頁、スモモ斑入果病 97-97頁、「原色果樹のウイルス・ウイルス病 診断・検定・防除」 家城洋之編 農文協 2002年 ISBN4-540-00198-7 平成14年

Sano, T. (2003) Hop stunt viroid, in *Viroids*, (Eds. Hadidi, A. et al.) CSIRO Publishing (Australia), Part IV: 29, pp. 207-212. ISBN 0 643 06789 2 (添付資料3) 平成15年

研究成果による工業所有権の出願・取得状況： 該当なし

はじめに

自然界には菌類、細菌類からウイルス・ウイロイドに至るまで様々なクラスのおびただしい数の病原体が存在する。あらゆる病原体には厳密な宿主特異性が存在し、多数の病原体のうちのごく一部がある特定の生物種を宿主とするに過ぎない。即ち、一握りの極めて特殊な能力を発達或いは偶然に獲得したもののみが、ある生物種を宿主として利用することが可能になるのである。

ウイロイドは塩基数わずか246から402の新しいクラスのRNA病原体である。400に満たないRNA分子の暗号文字或いはそれによって規定される分子構造中に、ある特定の生物種を宿主とするか否かの情報が存在している。ウイロイドは自律複製能を有するRNAで、子孫ウイロイドは親ウイロイドRNA（プラス鎖）から写しとられたRNA（マイナス鎖）を経て元の形に複製される。複製の過程でDNAに逆転写されたり、タンパク質に翻訳されたりする要素を一切含まない。これは、RNA分子のどこが、どのようにして宿主特異性決定因子になるかを解析するためのモデル実験系として、ウイロイドが極めて適した材料であることを意味している。

私達はホップ矮化病を中心とした研究において、自然界に存在するウイロイドには多様な（塩基配列上の）変異があり、宿主植物の違いにより各々特徴ある変異体が分離されることを観察してきた（Sano et al. 1986, 1989, 2000, 2001; 石黒ら. 1997）。またウイロイドの分子構造と病原性の関係を解析する過程で、様々な変異体を作成する方法について検討し（Sano et al. 1992, 佐野ら. 1999, 田中1999, 山本1999, 戸塚2000）、自然界に存在する変異を様々な組み合わせで持つ変異体ライブラリーを構築する方法を確立してきた（田中&佐野. 1999）。本研究は、これら一連の研究成果を踏まえて、自然界の様々な宿主に見出されるウイロイド変異体が各々の宿主に適応してきた過程を実験的に再現し検証することを試みたものである。即ち、自然界に存在する様々な変異をランダムに組み合わせた変異体集団を人為的に作成し、それが異なる宿主中で選抜され適応していく過程を観察することにより、自然界の様々な宿主に見出される変異体が分化して来た必然性或いは偶然性を実証的に検証した（第1章）。また、自然界の様々な宿主から分離したウイロイド変異体を特定の宿主に感染させ長期間継代培養した後、各々の変異体はその宿主中でどのように変異していくかを経時的に解析することにより、宿主の選択圧或いは病原体の宿主適応について考察した（第2章）。

第1章 病原体の宿主適応 --- 改良cDNAシャッフリング選抜法によるホップ矮化ウイルス宿主適応の実験的再現

1-1 研究の概略

ホップ矮化ウイルス (Hop stunt viroid : HSVd) は、果樹類を中心に世界中に広く分布しており、現在知られているウイルスの中では最も広く・多様な宿主に感染しているウイルスである (表1)。HSVdの自然感染宿主は、キュウリ、ホップ、ブドウ、カンキツ、スモモ、モモ、アンズ、アーモンド、ザクロなどである。これら自然感染宿主から分離されるHSVdは宿主に応じた特徴ある塩基配列を有している。全塩基配列情報に基づく分子系統樹解析は、種々の宿主から分離されるHSVdが大きくホップ・ブドウ、キュウリ・カンキツ、スモモ・モモ・アンズ・アーモンドの3グループとグループ間のリコンビネーションで生じたと考えられる2, 3のサブグループからなることを示している (図1)。

これらグループの存在とその分子系統関係は、自然感染宿主にHSVdがどのような経路で感染してきたか、つまり長い栽培の歴史の中でHSVdがどのような経路で分布域と宿主域を拡大してきたのかに関する私達の興味を刺激する。さらに、宿主によって特徴ある変異体が分離されることは、HSVdが宿主域を拡大する過程で、新しい宿主により良く適応した変異体が選抜されてきたことを予想させる。残念ながら、私達は今までこれらウイルスの過去に関する情報を手に入れることはほとんど不可能であった。何故なら、核酸のみから出来ているウイルスは、核タンパク質からなるウイルスと同様、まず化石として残ることはないからである。従って、私達は化石に残された証拠を基に、過去に起こったであろうウイルスの分化と宿主適応の過程を検証することはできないのである。

しかし、今私達はHSVdが各宿主に適応する過程で起こったであろう事、即ち「現在自然界に分布しているHSVdがどのように宿主域を拡大し、新宿主に適応してきたのか？」或いは「現在自然界に分布しているHSVd変異体が各宿主に適応する過程で、宿主側の選択圧は変異に対してどのように作用して来たのか？」などの問いに対して、(おそらく) 実験的に検証できる大変有効な手法を手に入れている。その可能性を秘めた魅力的な手法とは「ランダムDNAシャッフリング選抜法」と呼ばれる手法である。まず、自然界に存在する様々な変異を持つ相同な複製の遺伝子を人為的にランダムに分解後、混ぜ合わせて、再構築する。これによって自然界に存在する変異がランダムに組み合わせられた非常に多様な変異体集団ができあがる。次にこれに目的にかなった方法で選択圧を加えることで、自然界に存在するもの以上の機能を有する新規変異体を選抜することができる。さらにその選抜した変異体を基に同様な操作を繰り返すことにより、一層すぐれた新規変異体へと遺伝子を人為的に進化させることができるのである。この手法は「試験管内進化」とも呼ばれ、様々な機能性タンパク質の改良や創出への活用が期待されている。

本試験研究で、私達はこのランダムDNAシャッフリング法を一部改良して、ブドウ・スモモ・カンキツから分離されたHSVd変異体から、各々の変異を様々な組み合わせたランダム変異体集団を構築した。これをHSVdの自然感染宿主であるホップ、キュウリ、カンキツ、モモ、ブドウ及び非宿主であるシロイヌナズナに接種し、各感染個体中で生き延びてくる子孫HSVdの塩基配列を解析した。最後に、各宿主から最も頻繁に分離される子孫HSVd変異体の型、即ち各宿主に最も適応した変異体がどのようなものであるかを実験的に検証するによって、上に述べたような問い、即ち「現在自然界に分布しているHSVd変異体が各宿主に適応する過程で、宿主側の選択圧は変異に対してどのように作用して来たのか？」などに対する具体的な解答が得られるはずである。さらに本研究の結果から「自然界の宿主から分離される変異体はその宿主に最も

表1、果樹類のウイルスと病気及び日本での発生

宿主	ウイルス (略号)	日本での発生	病原性・他
カンキツ類	カンキツエキソコーティスウイルス (CEVd)	有	エキソコーティス病
	Citrus bent leaf viroid (CBLVd)	無	葉柄の下垂症状
	カンキツウイルス I-LSH (CVd I-LSH)	有	CBLVdの変異体
	カンキツウイルス IIa, IIb (CVd IIa, IIb)	有	HSVd変異株 IIbはcachexia病
	カンキツウイルス IIIa, b, c (CVd IIIa,b,c)	有	矮化、葉脈の下垂症状
リンゴ	カンキツウイルス IV (CVd IV)	有	
	カンキツウイルス OS (CVd OS)	有	葉脈の下垂症状
	リンゴさび果ウイルス (ASSVd)	有	さび果病、斑入果病
	リンゴゆず果ウイルス (AFCVd)	有	ゆず果病
ブドウ	Apple dapple fruit viroid (ADFVd)	無	(斑入り果症状) ^{*2}
	ブドウyellow speckleウイルス 1 (GYSVd 1)	有	(イエロースペックル) ^{*1}
	ブドウyellow speckleウイルス 2 (GYSVd 2)	無	(イエロースペックル) ^{*2}
	Australian grapevine viroid (AGVd)	無	
ニホンナシ	カンキツエキソコーティスウイルス (CEVd)	無	
	ホップ矮化ウイルス (HSVd)	有	くぼみ果病
	リンゴさび果ウイルス (ASSVd)	有	有 (プリスタキャン)
セイヨウナシ カー) ^{*1}	セイヨウナシblister canker ウイルス (PBCVd)		
モモ	ホップ矮化ウイルス (HSVd)	有	
	モモ latent mosaic ウイルス (PLMVd)	有	
スモモ	ホップ矮化ウイルス (HSVd)	有	斑入果病
	ホップ矮化ウイルス (HSVd)	有	斑入果病、 ソルダム黄果病
ウメ	モモ latent mosaic ウイルス (PLMVd)	有	
	モモ latent mosaic ウイルス (PLMVd)	有	
オウトウ	モモ latent mosaic ウイルス (PLMVd)	有	
アンズ	ホップ矮化ウイルス (HSVd)	無	
アーモンド	ホップ矮化ウイルス (HSVd)	無	
ザクロ	ホップ矮化ウイルス (HSVd)	無	
アボカド	Avocado sunblotch viroid (ASBVd)	無	(サンブロッチ病) ^{*2}

* 1 : 日本の栽培品種での病原性は不明。

* 2 : 日本では未発生。

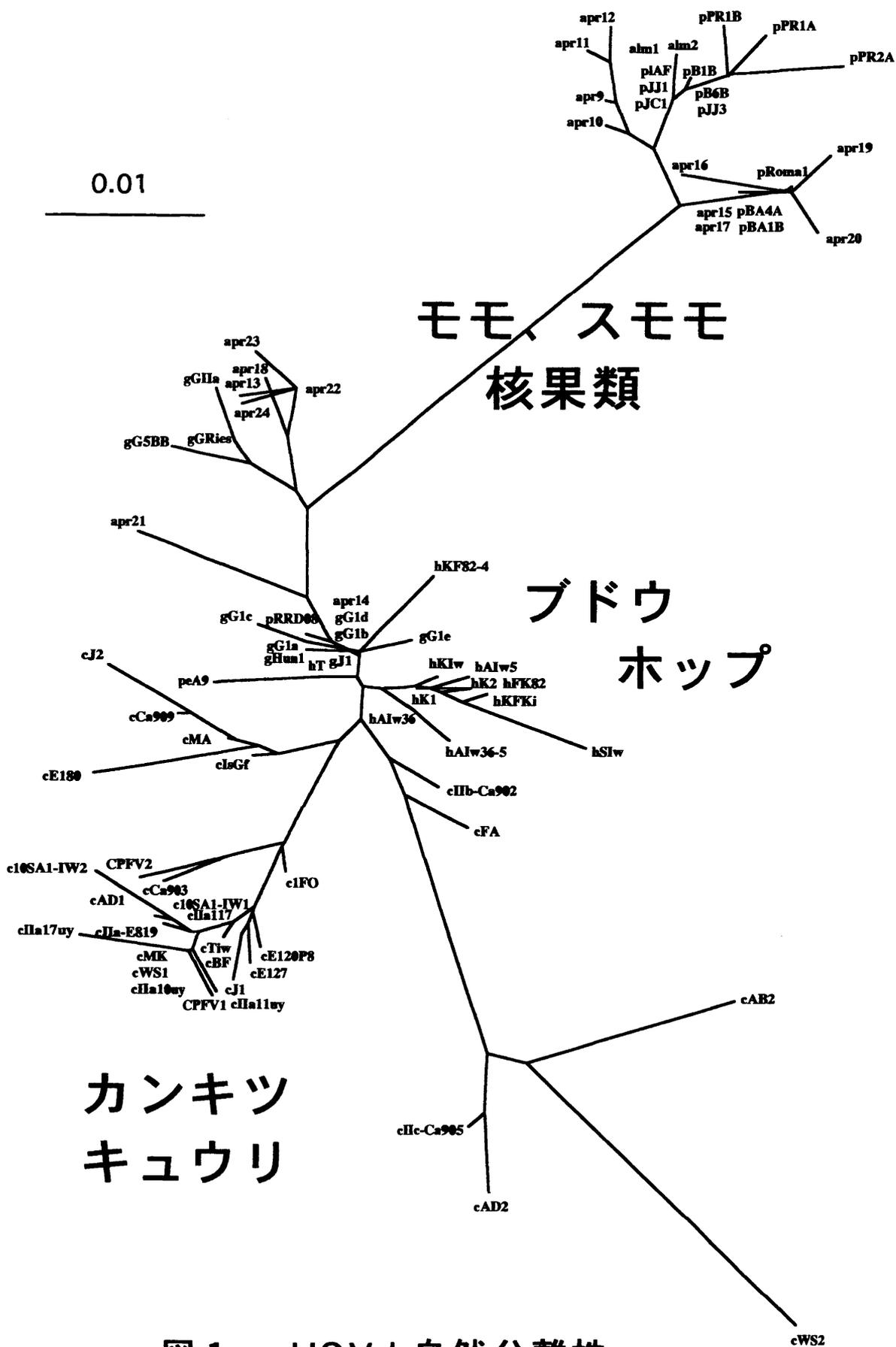


図1. HSVd 自然分離株

適応したものが必然的に選ばれてきたのか、或いは偶然選ばれたものがたまたま安定した型として定着しているのか？」という病原体の宿主適応に関する最も基本的で重要な問いかけに対する実証的な解答の一例を与えるであろう。

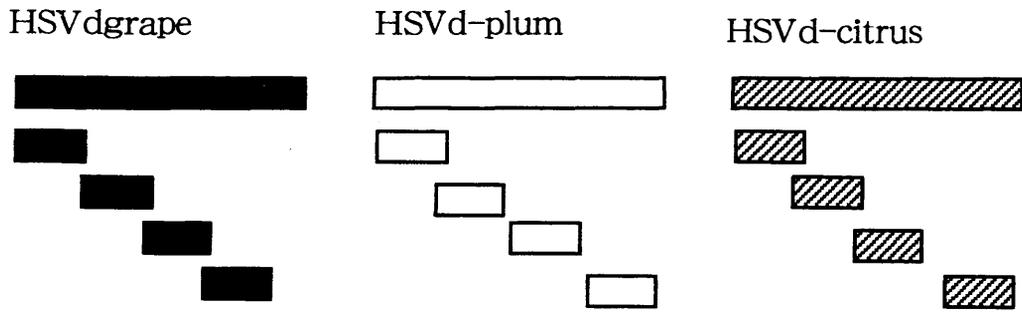
1-2 実験材料と方法

ウイロイド源：HSVd-ブドウ分離株 (HSVd-g)、-カンキツ分離株 (HSVd-cit) 及び-スモモ分離株 (HSVd-pl) は各々自然分離株から作出した完全長cDNAクローンをを用いた。全てダイマー化した完全長cDNAから試験管内で合成した転写物をキュウリに接種し、感染性を有することを確認したものである。

改良ランダムcDNAシャッフリング法によるHSVdランダム変異体集団の構築：HSVd-g、HSVd-cit、HSVd-pl各分離株の完全長cDNAクローンから4組の合成プライマーを用いたPCRで、各々を4つのcDNA断片に分けて増幅した (図2A)。また、HSVd-gの全長cDNAの上流にT7RNAポリメラーゼのプロモーター配列、下流にペーパークリップ型リボザイム配列、を含むプラスミドpHSV-Rb3-#11からT7RNAポリメラーゼプロモーター配列とペーパークリップ型リボザイム配列をPCRで増幅した (図2B)。3種類のHSVd分離株に由来する4断片 (合計12断片)、T7RNAプロモーター配列及びペーパークリップ型リボザイム配列をPAGEで分離・精製した後、各々 (14断片) が等モル比となるように混合し、低濃度 (0.25 μ g/ml) のDNaseI存在下で25 $^{\circ}$ C、5分間の限定分解を行なった (図2C)。その後、プライマー無添加PCRにより、ランダムな組み合わせでHSVd全長cDNAを再構築し、最終的に両端のプライマー、即ちT7RNAポリメラーゼプロモーターの5'末端とペーパークリップ型リボザイム配列の3'末端に対応するプライマー存在下でPCRを行ない、HSVdランダム変異体cDNAsを増幅した (図2D)。なお、PCR増幅中の複製ミスにより生じる人為的な変異の発生を最小限に抑えるために、全てのPCR反応は変異率の少ないPwoDNAポリメラーゼ (ペーリンガーマンハイム：ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて行なった。構築したHSVdランダム変異体cDNAsからMEGAscript RNA転写キット (Ambion) を用いて37 $^{\circ}$ C、一晚転写し、HSVdランダム変異体集団を作成した。この転写物を以下の試験の接種源とした。

HSVdランダム変異体集団 (接種源) の多様性の検定：本試験においては、如何に均一にシャッフリングされた変異体集団を作製できたかが重要なポイントになる。偏りのある変異体集団を接種源とすれば、選抜されてくる子孫ウイロイドの種類と頻度にも大きな偏りが生じるはずであり、ウイロイドの宿主適応或いは宿主による選択圧の客観的で正確な評価は難しい。ランダムcDNAシャッフリングに用いたHSVdの3変異株間には、3分離株全てで異なっている塩基が1箇所、2分離株で異なっている塩基が32箇所、存在する。従って、もし完全にランダムなシャッフリングができれば、 $3^3 \times 2^{27} = 3,623,878,656$ 通りの組合せ、つまり、30億種以上の変異体を含むHSVdランダム変異体集団 (接種源) が構築できるはずである。作成した接種源がどれくらい多様な変異体から構成されているかを解析するために、上記の転写RNA試料からHSVdの中央保存領域に対応する1組のプライマー (HSV83MとHSVd78P) を用いてRT-PCRを行ない、HSVdの全長cDNAを合成・増幅した。これをpGEM-Tベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。約60個のcDNAクローンをランダムに選抜してその塩基配列を決定し、接種源に含まれるHSVd変異体の種類とその頻度を解析した。

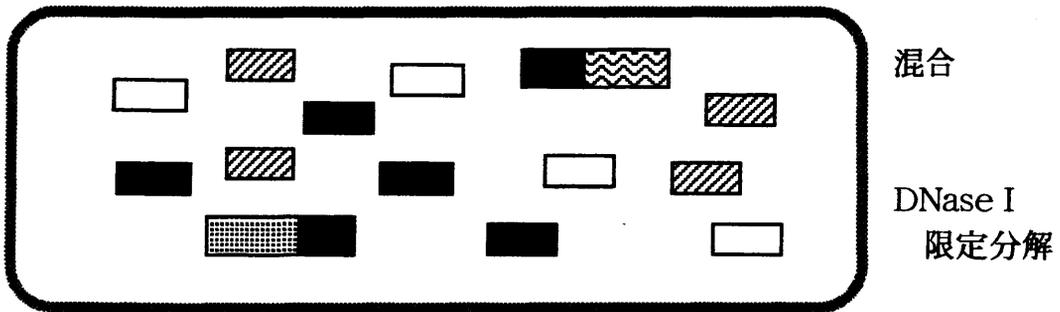
A



B



C



D

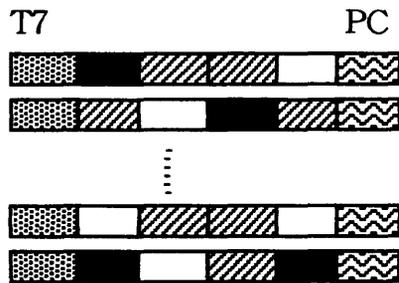


図 2 . cDNA ランダムシャフリング 略図

接種源の調製と接種：HSVdランダム変異体cDNAsから試験管内で合成した転写物100ng及び1000ngを20 μ lの接種用緩衝液（100mMリン酸緩衝液,pH7.5、10mg/mlベントナイトを含む）に溶解し、キュウリ（品種：四葉）は子葉に汁液接種、ホップ（品種：キリン2号）・カンキツ（エトログシトロン）・ブドウ（品種：スチューベン実生）・モモ（品種：改良川中島白桃）は新展開葉に汁液接種と茎に切り付け接種を行なった。各濃度とも各植物5本ずつを供試した。ただし、100ngの転写物接種区のキュウリは10本を供試した。シロイヌナズナは20種のエコタイプをそれぞれ5本ずつ供試し、6～8葉期の十分に展開した葉に汁液接種した。接種後、各植物は20～30℃、補助ランプで日長を16時間に調整した隔離温室で栽培した。

感染の確認及び子孫HSVdの塩基配列解析：接種後適当な時期に、各接种植物から茎葉を採取し、ISOPLANT（ニッポンジーン）或いはLiら（1995）の手順に従って低分子量RNAを抽出した。感染の確認はノザンハイブリダイゼーションで以下のように行なった。抽出した低分子量RNA5～50 μ gを8M尿素-5%PAGEで分離後、ポジティブチャージナイロンメンブレン（バイオダイン、ポール社）に転写した。DIG標識HSVd cRNAをプローブとして、Liら（1995）の手順に従いハイブリダイゼーションを行ない、HSVd感染の有無を確認した。感染が確認された試料は、さらに前出のHSVd中央保存領域に対応する1組のプライマー（HSV83M、HSVd78P）を用いてRT-PCRを行ない、HSVdの全長cDNAを合成・増幅した。これをpGEM-Tベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。各試料から5或いは10個のcDNAクローンをランダムに選抜してその塩基配列を決定し、子孫HSVd変異体の種類とその頻度を解析した。

1-3 実験結果

HSVdランダム変異体集団（接種源）の多様性

接種源としたHSVdランダム変異体集団（接種源）から65個の独立のcDNAクローンを任意に選抜し、全長塩基配列を決定した。得られた59個のcDNAクローンの全塩基配列を多重整列させた結果、独立の塩基配列を有するもの44個、2個のcDNAクローンで塩基配列が一致したもの6組（12個）、3個のcDNAクローンで塩基配列が一致したもの1組（3個）であった。また、HSVdの3つの変異株間のいずれかで変異が認められた30箇所について、65個全てのcDNAクローンにおける各々の変異型の出現頻度をまとめて示した。塩基番号58と59間のカンキツ変異株に見られるGの挿入、塩基番号59のスモモ変異株のG、塩基番号265のカンキツ変異株のAなど、出現頻度が極端に低いものが一部に認められた。また、連続した変異、例えば[148/149, 151, 152]、[204, 205, 206, 207]などではほとんど出現頻度が同一であることから、隣接した変異の中にはDNase Iによる限定分解では分離できなかったものがあったことが予想された。しかし、全体として、各々の変異型の出現頻度特に大きな偏りは認められず、変異体集団の宿主適応或いは宿主の選択圧を評価するに十分なランダム変異体集団を構築できたものと考えた。

59個のcDNAクローンの多重配列をもとに分子系統樹を作製した（図3）。

各宿主で選抜された子孫HSVd変異体の解析

キュウリ

100ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、1ヶ月後、接種した10本中6本にHSVd感染に特徴的な葉巻・矮化症状が観察された。この6本から低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで感染を確認後、RT-PCRにより子孫HSVdを増幅した。増幅した子孫HSVd cDNAを7.5%PAGEで分離・回収し、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。それぞれの感染植物から10個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。

その結果、感染個体によってそれぞれ異なる変異体が検出された。HSVd-gの塩基配列を基準として変異していた塩基の番号と変異を各個体毎に以下に示した。例えば、HSVd-gの100番目のGがAに変化していた時には、100G→Aと示した。また、100番目と101番目の塩基の間にGが挿入されていた時には、100/101 +Gと示した。キュウリはC、接種源濃度100ng/plantはC100、個体番号1はC100-1、同じ塩基配列のcDNAクローンが5個検出された時にはC100-1(5)、異なるcDNAクローンが1個ずつ3つ検出された場合にはC100-1(1a)、C100-1(1b)、C100-1(1c)と示した。なお、任意に選抜した形質転換体の中にはHSVd以外の配列を含む場合があったため、状況に応じてcDNAクローンを追加して解析した。そのため以下に示すように、解析したcDNAクローン数が5或いは10以外のケースを含んでいる。

個体No.1

C100-1(10):(10 clones; 39A→del)

個体No.2

C100-3(9):(9 clones; 58U→AG)

個体No.5

C100-5(8):(8 clones; 108G→A, 114/115 +A, 148/149 +U, 151G→U, 152C→G, 185/186 +U, 193U→C, 204C→del, 206/207 +G)

C100-5(2):(2 clones; 58U→AG)

個体No.6

C100-6(8):(8 clones; the same to grape type)

C100-6(1a):(1 clone; 204C→U)

C100-6(1b):(1 clone; 173U→C)

個体No.8

C100-8(7):(7 clones; 114/115 +A, 148/149 +U, 151G→U, 152C→G, 185/186 +U)

C100-8(3):(3 clones; the same to grape type)

個体No.9

C100-9(8):(8 clones; the same to grape type)

C100-9(1a):(1 clone; 38/39 +A)

C100-9(1b):(1 clone; 286U→C)

また、1000ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、1ヶ月後、接種した5本中3本にHSVd感染に特徴的な葉巻・矮化症状が観察された。この3本から低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイ

ゼーションで感染を確認後、RT-PCRにより子孫HSVdを増幅した。増幅した子孫HSVd-cDNAを7.5% PAGEで分離・回収し、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。それぞれの感染植物から5個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。

結果を同様に以下に示した。

個体No.1

C1000-1(4); (4 clones; 204C->del, 206/207 +G, citrus type)

C1000-1(1a); (1 clone; 175C->U, 204C->del, 206/207 +G)

C1000-1(1b); (1 clone; 38/39 +A)

個体No.3

C1000-3(4); (4 clones; the same to grape type)

C1000-3(1a); (1 clone; 19G->A, 24A->U, 38/39 +A, 185U->del, 212C->U, 241U->C,

246A->G) C1000-3(1b); (1 clone; 24A->U, 38/39 +A, 185U->del, 239C->A, 241U->C, 246A->G)

個体No.5

C1000-5(3); (3 clones; 204C->del, 205G->U, 206A->U, 207U->G)

C1000-5(1a); (1 clone; 204C->del, 205G->U, 206A->U, 207U->G, 213G->C, 215G->A)

C1000-5(1b); (1 clone, 204C->del, 205G->U, 206A->U, 207U->G, 230C->U)

C1000-5(1c); (1 clone, 144A->G, 204C->del, 205G->U, 206A->U, 207U->G)

ホップ

100ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、4ヶ月後（接種1年目の秋）及び1年後（接種2年目の春）の2回、接種した5本の植物から低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定したが、全く感染は認められなかった。

一方、1000ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、3ヶ月半後（接種1年の秋）に低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、5本中2本（No.1, No.2）でHSVd感染が確認された。RT-PCRで子孫HSVdを増幅し、7.5%PAGEで分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。それぞれの感染植物につき5-10個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。

HSVd-gの塩基配列を基準として変異していた塩基の番号と変異を各個体毎に以下に示した。例えば、HSVd-gの100番目のGがAに変化していた時には、100G->Aと示した。また、100番目と101番目の塩基の間にGが挿入されていた時には、100/101+Gと示した。ホップはHと表記し、接種源濃度は1000ng/plantのみ感染が認められたので表記しなかった。接種3ヵ月後に検定したとするとH3M、接種1年後ならH1Y、個体番号1はH3M-1、一つの個体から同じ配列のcDNAクローンが5個検出された時にはH3M-1(5)、異なるcDNAクローンが1個ずつ3つ検出された時にはH3M-1(1a)、H3M-1(1b)、H3M-1(1c)と表記した。

個体No.1

H3.5M-1(2); (2 clones; 58U->AG, 114/15 +A, 148/149 +U, 51G->U, 152C->G, 226U->del, 228A->C, 231/232 +G)

H3.5M-1(1a); (1 clones; 58U->AG, 114/15 +A, 116G->A, 148/149 +U, 51G->U, 152C->G, 226U->del, 228A->C, 231/232 +G)

H3.5M-1(1b); (1 clone; 58U->AG, 114/115 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

個体No.2

H3.5M-2(8); (8 clones; 204C->U, 205G->U, 206A->G. 207U->del)

H3.5M-2(1a); (1 clone; 181U->C, 204C->U, 205G->U, 206A->G. 207U->del)

H3.5M-2(1b); (1 clone; 150U->C, 204C->U, 205G->U, 206A->G. 207U->del)

H3.5M-2(1c); (1 clone; 204C->U, 205G->U, 206A->G. 207U->del, 246A->G)

さらに、接種植物を温室内で継代培養して、接種1年半後（接種2年目の秋）に低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、5本中3本（No.1, No.2, No.3）でHSVdの感染が確認された。RT-PCRで子孫HSV dを増幅し、7.5%PAGE分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。それぞれの感染植物につき5-10個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。

個体No.1

H1.5Y-1(2); (2 clones; 38/39 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

H1.5Y-1(1a); (1 clone; 26/27 +C, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

H1.5Y-1(1b); (1 clone; 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 255U->C)

H1.5Y-1(1c); (1 clone; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 185/186 +U, 226U->del, 228A->C, 231/232 +G)

H1.5Y-1(1d); (1 clone; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

個体No.2

H1.5Y-2(4); (4 clones; the same to grape type)

H1.5Y-2(1a); (1 clone; 130G->A, 84U->C, 220G->A)

H1.5Y-2(1b); (1 clone; 38/39 +A,)

H1.5Y-2(1c); (1 clone; 258U->C)

H1.5Y-2(1d); (1 clone, 39A-<del)

個体No.3

H1.5Y-3(1a); (1 clone; 44A->G, 204C->U. 205G->C, 206A->G, 207U->del)

H1.5Y-3(1b); (1 clone; 204C->UU)

H1.5Y-3(1c); (1 clone; 204C->U, 205G->U, 206A->G, 207U->A)

H1.5Y-3(1d); (1 clone, 18U->C, 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

H1.5Y-3(1e); (1 clone; 204C->del, 205G->U, 206A->U, 207U->G)

H1.5Y-3(1f); (1 clone; 39A->del, 204C->U, 206A->del, 207U->del)

カンキツ

100ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、4ヶ月後（接種1年目の秋）及び1年後（接種2年目の春）の2回、接種した5本の植物から低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定したが、全く感染は認められなかった。

一方、1000ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、6ヶ月後（接種1年の秋）に低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、5本中1本（No.5）でHSVd感染が確認された。さらにRT-PCRで確認したところ、No.5の他、No.3からもわずかながら増幅が確認された。増幅断片を7.5%PAGEで分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。感染個体No.1につき10個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。検定植物にはエトログシトロンを用いたので選抜・増殖してきたcDNAクローンはEと表記した。クローン及びその変異の表記はホップの場合に準じた。

個体No.5

E6M-5(2): (2 clones: 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 192U->C)

E6M-5(1a): (1 clone: 26C->del, 27A->G, 58U->del, 242/243 +UU)

E6M-5(1b): (1 clone: 38/39 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

E6M-5(1c): (1 clone, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

E6M-5(1d): (1 clone: 26C-<del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

E6M-5(1e): (1 clone: 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 288U->A)

E6M-5(1f): (1 clone: 47A->G, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

E6M-5(1g): (1 clone: 26C->del, 27A->G, 242/243 +UU, 245A->U)

モモ

100ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、4ヶ月後（接種1年目の秋）及び1年後（接種2年目の春）の2回、接種した5本の植物から低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定したが、全く感染は認められなかった。

1000ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、2ヶ月後（接種1年の夏）に低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、5本中2本（No.2, No.5）でHSVd感染が確認された。RT-PCRで子孫HSVdを増幅し、7.5%PAGEで分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。それぞれの感染植物につき5-9個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。モモで選抜・増殖してきたcDNAクローンはPと表記した。クローン及びその変異の表記はホップの場合に準じた。

個体No.2

P2M-2(2): (2 clones; the same to grape type)

P2M-2(1a): (1 clone: 255U->C)

P2M-2(1b): (1 clone: 45C->A, 183U->C)

P2M-2(1c): (1 clone: 40A->G)

個体No.5

P2M-5(1a): (1 clone: 26C->del, 27A->G, 58U->AG, 114U->C, 136U->C, 204C->del, 205G->U, 206A->G, 207U->G, 215G->U, 239C->del, 242/243 +UU)

P2M-5(1b): (1 clone: 131U->C, 209A->G)

P2M-5(1c): (1 clone: 2U->A, 25U->A, 26C->A, 32A->U, 38/39 +A, 46A->U, 105C->U, 114/115 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 162A->C, 276G->C)

P2M-5(1d): (1 clone: 18U->A, 26C->del, 27A->G, 36A->G, 58AU->AG, 204C->U, 272U->A)

P2M-5(1e): (1 clone: 40A->G, 249U->C)

P2M-5(1f): (1 clone: 26C->del, 27A->G, 58U->AG, 114U->C, 204C->del, 205G->U, 206A->U, 207U->G, 242/243 +UU)

P2M-5(1g): (1 clone: 138G->U, 204C->del, 205G->U, 206A->U, 207U->G, 242/243 +UU)

P2M-5(1h): (1 clone: 98A->U, 114/115 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 226U->del, 228A->C, 231/232 +G, 241U->C, 242C->U, 256U->G, 257G->U)

P2M-5(1i): (1 clone: 226U->del, 228A->C, 232/232 +G, 242/243 +UU)

また、3ヶ月半後（接種1年の秋）に前回感染の認められなかった3本（No.1, No.3, No.4）から低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、3本（No.1, No.3, No.4）でHSVd感染が確認された。RT-PCRで子孫HSVdを増幅し、7.5%PAGEで分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。感染植物（No.3, No.4）につき5個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。

個体No.3

P3.5M-3(2): (2 clones: 204C->U, 205G->U, 206A->G, 207U->del)

P3.5M-3(1a): (1 clone: 33G->A, 126C->U, 184U->C, 204C->U, 205G->U, 206A->G, 207U->del)

P3.5M-3(1b): (1 clone: 97G->A, 204C->U, 205G->U, 206A->G, 207U->del, 245A->U)

個体No.4

P3.5M-4(3): (3 clones: 58U->AG, 114/115 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 226U->del, 228A->C, 231/232 +G)

P3.5M-4(1a): (1 clone, 58U->AG, 114/115 +A, 148/149 +U, 150U->A, 151G->U, 152C->G, 226U->del, 228A->C, 231/232 +G)

P3.5M-4(1b): (1 clone: 58U->AG, 136U->C, 243C->UU)

さらに、接種1年半後（接種2年目の秋）に低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、5本中2本（No.1, No.3）でHSVdの感染が確認された。RT-PCRで子孫HSVdを増幅し、7.5%PAGE分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。感染植物4個体（No.1, No.2, No.3, No.4）につき各々5-10個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決

定した。

個体No.1

P1.5Y-1(2); (2 clones; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

P1.5Y-1(1a); (1 clone; 17U->del, 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

P1.5Y-1(1b); (1 clone; 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 286U->C)

P1.5Y-1(1c); (1 clone; 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

P1.5Y-1(1d); (1 clone; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 192U->C)

個体No.2

P1.5Y-2(3); (3 clones; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

P1.5Y-2(1a); (1 clone; 8A->G, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 157G->A)

P1.5Y-2(1b); (1 clone; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 192U->C)

P1.5Y-2(1c); (1 clone; 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->A)

個体No.3

P1.5Y-3(1a); (1 clone; 26C->del, 27A->G, 242/243 +UU)

P1.5Y-3(1b); (1 clone; 38/39 +A, 131U->A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

P1.5Y-3(1c); (1 clone; 38/39 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 169/170 +U)

P1.5Y-3(1d); (1 clone; 228A->G, 242/243 +UU)

P1.5Y-3(1e); (1 clone; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

P1.5Y-3(1f); (1 clone; 26C->del, 27A->G, 39A->del, 242/243 +UU)

個体No.4

P1.5Y-4(2a); (2 clones; 38/39 +A, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G)

P1.5Y-4(2b); (2 clone; 26C->del, 27A->G, 39A->del, 242/243 +UU)

P1.5Y-4(1a); (1 clone; 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 200C->U)

P1.5Y-4(1b); (1 clone; 26C->del, 148/149 +U, 151G->U, 152C->G, 177U->C)

ブドウ

100ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、4ヶ月後（接種1年目の秋）及び1年後（接種2年目の春）の2回、接種した5本の植物から低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定したが、全く感染は認められなかった。

一方、1000ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、4ヶ月後（接種1年の秋）に低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、5本中1本（No.2）で感染が確認された。さらにRT-PCRで確認したところ、No.2の他、2本（No.1, No.3）でHSVd感染が確認された。増幅断片を7.5%PAGEで分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。それぞれの感染植物につき5-10個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。ブドウで選抜・増殖してきたcDNAクローンはGと表記した。クローン及びその変異の表記はホップの場合に準じた。

個体No.1

- G4M-1(3); (3 clones; the same to grape type)
- G4M-1(1a); (1 clone; 157G->A)
- G4M-1(1b); (1 clone; 38/39 +A, 96A->G, 180/181 +A, 264U->A)
- G4M-1(1c); (1 clone; 36A->G)
- G4M-1(1d); (1 clone; 38/39+A, 180U->A)
- G4M-1(1e); (1 clone; 39A->del, 157G->A)
- G4M-1(1f); (1 clone; 38/39 +A, 96A->G, 180/181 +A, 264U->A)
- G4M-1(1g); (1 clone; 36A->G)
- G4M-1(1h); (1 clone; 38/39 +A, 180U->A)

個体No.2

- G4M-2(8); (8 clones; the same to grape type)
- G4M-2(1a); (1 clone; 20C->U)
- G4M-2(1b); (1 clone; 244C->A, 266A->U, 273G->U)

個体No.3

- G4M-3(3); (3 clones; the same to grape type)
- G4M-3(1a); (1 clone; 221U->A)
- G4M-3(1b); (1 clone; 262U->C)

さらに、接種 1 年半後（接種 2 年目の秋）に低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、5 本中 2 本（No.1, No.2）でHSVdの感染が確認された。RT-PCRで子孫HSV dを増幅し、7.5%PAGE分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。それぞれの感染植物につき 5-10 個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決定した。

個体No.1

- G1.5Y-1(6); (6 clones; the same to grape type)

個体No.2

- G1.5Y-2(4); (4 clones; the same to grape type)

シロイヌナズナ

100ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、1ヶ月後、20種類のエコタイプ毎に、5本の植物をひとまとめにして低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定したが、全てのエコタイプでHSVdの感染は認められなかった。RT-PCRでも確認したが、結果は全て陰性であった。

また、1000ngのHSVdランダム変異体転写物を接種した区では、2ヶ月後、20種類のエコタイプ、5本ずつの植物を全てひとまとめにして低分子量RNAを抽出し、ノザンハイブリダイゼーションで検定した結果、HSVdの若干の増殖を示唆する薄い陽性シグナルが確認された。RT-PCRで確認したところ、HSVdに相当するDNA断片の増幅が確認されたので、増幅断片を7.5%PAGEで分離・回収後、pGEM-Tベクターに挿入し、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。5個の形質転換体を任意に選抜し、塩基配列を決

定した結果、HSVd - gとHSVd - plのキメラ構造を持つ変異体が検出された。そこで、この変異体を含むRNA抽出液を再度20種類のエコタイプ各5本に接種し、1ヶ月後、今度は各エコタイプ毎に5本の植物をひとまとめにして低分子量RNAを抽出した。しかし、ノザンハイブリダイゼーションの結果、HSVd感染を示唆するシグナルはいずれのエコタイプからも検出されず、これがシロイヌナズナで安定に増殖する或いはシロイヌナズナに適応した変異体とは考えられなかった。

第2章 宿主選択圧 --- ホップ、ブドウ、スモモ、カンキツに適応したホップ矮化ウイロイド変異体はホップでどのような選択圧を受けるか？

2-1 実験の概略

ホップ矮化ウイロイド (Hop stunt viroid : HSVd) は、果樹類を中心に世界中に広く分布しており、現在知られているウイロイドの中では最も広く・多様な宿主に感染しているウイロイドである。HSVdの自然感染宿主は、キュウリ、ホップ、ブドウ、カンキツ、スモモ、モモ、アンズ、アーモンド、ザクロなどである。これら自然感染宿主から分離されるHSVdは宿主に応じた特徴ある塩基配列を有している。全塩基配列情報に基づく分子系統樹解析は、種々の宿主から分離されるHSVdが大きくホップ・ブドウ、キュウリ・カンキツ、スモモ・モモ・アンズ・アーモンドの3グループとグループ間のリコンビネーションで生じたと考えられる2、3のサブグループからなることを示している (図1)。

宿主によって特徴ある変異体が分離されることは、HSVdが宿主域を拡大する過程で、新しい宿主により良く適応した変異体が選抜されてきたことを示唆している。また、それぞれの宿主に適応した変異体は、その宿主上で準安定な形に落ち着いていて、さらに変異する速度は極めて遅くなっているものと考えられる。即ち、それぞれの宿主から分離される特徴ある変異体は適応地形における準安定な穴に落ち込んでいる状態で、容易にそこから抜け出し新たな変異体へと変化できない状況に置かれている。それでは、ある宿主から分離されるHSVd変異体が、その形に落ち着く過程で、宿主の選択圧はどのように関わって来たのだろうか？例えば、現在ブドウから分離される変異体はブドウという宿主に準安定な形に適応しており、今後ブドウの品種或いは栽培形態によほどの大きな変化が起こらない限り、少なくともブドウ上では短期間のうちにそう大きく変化することはないと考えられる。しかし、このブドウ変異体が何らかの要因で他の宿主に種の壁を越えて感染した場合、何が起こるだろうか？おそらく、ブドウ変異体は新しい宿主中で準安定な状態から抜け出し、その宿主中でより安定な形へと変化するはずである。そして、新宿主中で安定を失った変異体が再び準安定な形に落ち着く過程で、新宿主の選択圧が新しい適応の型に何らかの影響を及ぼすはずである。変異の方向は、少なくとも偶然だけで決定されていないものと予想される。

本試験研究で、我々はホップ・ブドウ・スモモ・カンキツから分離されたHSVd変異体をホップに接種した。各々の変異体に感染した株を圃場に定植して、自然栽培条件下で10年間隔離栽培した。ホップは宿根性の一年生草本植物で、地上部は毎年新しいものに生え変わるが、地下茎が残り翌年の新生個体を生じる。つまり、自然界のブドウ・スモモ・カンキツに準安定な形で適応した変異体をホップという新しい宿主中で10年間を継代培養したわけである。10年後、それぞれの感染株からHSVdを再分離し、全塩基配列を解析した。それを接種前の各変異体の全塩基配列と比較することで、ホップという新宿主中でそれぞれの変異体がどのように変化したか？即ち、ホップという宿主の選択圧はそれぞれの変異体にどのような影響を及ぼしたかが明らかになるはずである。また、それぞれの変異株がホップという宿主で10年間の継代培養の間にどのくらい変異したか (変異率) も算出できるはずである。

各変異体が特定の宿主中で一定期間中にどのように・どのくらい変化したかを実験的に検証するによって、本報告書の冒頭に述べたような問い、即ち「現在自然界に分布しているHSVd変異体が各宿主に適応する過程で、宿主側の選択圧は変異に対してどのように作用して来たのか？」などに対する具体的な解答が得られるはずである。さらに本研究の結果から「自然界の宿主から分離される変異体はその宿主に最も適応したものが必然的に選ばれてきたのか、或いは偶然選ばれたものがたまたま安定した型として定着しているの

か？」という病原体の宿主適応に関する最も基本的で重要な問いかけに対する実証的な解答の一例を与えるであろう。

2-2 実験の方法と材料

ウイロイド源：HSVd-ブドウ分離株 (HSVd-g)、-カンキツ分離株 (HSVd-cit)、-スモモ分離株 (HSVd-pl)、及び-ホップ分離株 (HSVd-hop) は各々自然界の感染株から分離し、キュウリで継代培養した。各感染キュウリからウイロイドを抽出し接種源とした。また一部を凍結保存し、接種前の全塩基配列の解析に用いた。

接種源の調製と接種：各HSVd分離株感染キュウリから抽出した低分子量RNA約100 μ gを500 μ lの接種用緩衝液 (100mM Tris-HCl, pH7.5、10mg/mlベントナイトを含む) に溶解し、ウイルスフリーホップ (品種：キリン2号) 1本あたり100 μ lを接種した。接種は、新展開葉への汁液接種と茎への切り付け接種で行なった。接種は1993年5月に実施し、各分離株とも5本ずつ供試した。接種後、各植物は無加温のガラス室で10月まで栽培し、感染を確認した後、圃場に仮植して休眠・越冬させた。翌1994年4月、圃場に定植し、10年間それぞれの感染株間で伝染が起こらないように厳密な管理のもとで隔離栽培を行なった。

各HSVd分離株の接種前後の塩基配列決定：接種に用いた各HSVd分離株抽出液、及び10年間圃場で隔離栽培した各HSVd分離株感染ホップから再抽出したHSVd抽出液を用いた。それぞれのウイロイド試料からHSVdの中央保存領域に対応する1セットのプライマー (HSV83M、HSVd78P) を用いてRT-PCRを行ない、HSVdの全長cDNAを合成・増幅した。これをpGEM-Tベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して多数の形質転換体を得た。各HSVd変異体の接種前及び接種10年後の試料からそれぞれ10個のcDNAクローンをランダムに選抜してその塩基配列を決定し、それぞれのHSVd変異体の種類とその頻度を解析した。

2-3 実験の結果

HSVd-ホップ分離株：HSVd-ホップ分離株の1993年5月接種前の試料から得た10個のcDNAクローンのコンセンサス塩基配列をもとに、接種10年後 (2002年) にホップから再抽出した試料から得た9個のcDNAクローンに認められた全ての塩基変異を、cDNAクローン毎に示した。分母は解析したcDNAクローン数、分子は観察されたcDNAクローン数を示す。すなわち、5/9は塩基配列を解析した9個のcDNA中5個でそうであったことを示す。

5/9: same to the original

1/9: 42A→G, 121A→G, 261A→G

1/9: 281A→U

1/9: 281A→U, 284U→C

1/9: 199U→C

9個のcDNAクローン中、5個のcDNAには変異は認められず、4個のcDNAクローンに合計7箇所の変異が認められた。281A→Uの変異が2個のcDNAクローンで検出された以外、単独のマイナー変異であった。総変異数(7)を、HSVd-ホップ分離株の総塩基数(297)に解析したcDNAクローン数(9)を乗じた数(2673)で割った値が1塩基当たりの変異率となる。HSVd-ホップ分離株のホップ継代10年間の1塩基当たりの変異率は「0.0026」、1年間の1塩基当たりの変異率は「0.00026」であった。

HSVd-ブドウ分離株 : HSVd-ブドウ分離株の1993年5月接種前の試料から得た10個のcDNAクローンのコンセンサス塩基配列をもとに、接種10年後にホップから再抽出した試料から得た9個のcDNAクローンに認められた全ての塩基変異を、cDNAクローン毎に示した。分母は解析したcDNAクローン数、分子は観察されたcDNAクローン数を示す。すなわち、4/9は塩基配列を解析した9個のcDNA中4個でそうであったことを示す。

4/9: 26C→A, 281U→A (only 54G is different from HSVd-hop)

2/9: 25U→del, 54G→A (25U→del and 281U are different from HSVd-hop)

2/9: 26C→A, 54G→A (only 281U is different from HSVd-hop)

1/9: same to the original HSVd-hop

25C→A、25C→del、54G→A、281U→Aの4つの変異が各々複数のcDNAクローンで認められた。大変興味深いことに、これらの変異はいずれもHSVd-ホップ分離株と同じになる変異で有り、明らかにHSVd-ブドウ分離株がホップで継代中にHSVd-ホップ分離株と同一化する方向に変化していることが明らかになった。特に、一つのcDNAクローンはHSVd-ホップ分離株と全く同じ配列に変化していた。

9つのcDNAクローン中に合計16個の変異が認められた。総変異数(16)を、HSVd-ブドウ分離株の総塩基数(297)に解析したcDNAクローン数(9)を乗じた数(2673)で割った値が1塩基当たりの変異率となる。HSVd-ブドウ分離株のホップ継代10年間の1塩基当たりの変異率は「0.0060」、1年間の1塩基当たりの変異率は「0.00060」であり、ホップ分離株の2.3倍の変異率であった。

HSVd-スモモ分離株 : HSVd-スモモ分離株の1993年5月接種前の試料から得た10個のcDNAクローンのコンセンサス塩基配列をもとに、接種10年後にホップから再抽出した試料から得た10個のcDNAクローンに認められた全ての塩基変異を、cDNAクローン毎に示した。分母は解析したcDNAクローン数、分子は観察されたcDNAクローン数を示す。すなわち、6/10は塩基配列を解析した10個のcDNA中6個でそうであったことを示す。

6/10: 59U→AA, 60G→A, 206U→C

1/10: 59U→AA, 60G→A, 182U→C, 206U→C

1/10: 61C→A, 151U→C, 206U→C

1/10: 59U→A, 60/61 +A, 206U→C

1/10: 59U→AA, 200U→C, 206U→C

59U→AA, 60G→A, 206U→C などが複数のcDNAクローンに共通して見られた変異であった。ただし、この変異とHSVd-ホップ分離株の配列の関連は認められなかった。

10個のcDNAクローン中に合計39個の変異が認められた。総変異数(39)を、HSVd-スモモ分離株の総塩基数(297)に解析したcDNAクローン数(10)を乗じた数(2970)で割った値が1塩基当たりの変異率となる。HSVd-スモモ分離株のホップ継代10年間の1塩基当たりの変異率は「0.0131」、1年間の1塩基当たりの変異率は「0.00131」であり、ホップ分離株の5.1倍の変異率であった。

HSVd-カンキツ分離株 : HSVd-カンキツ分離株の1993年5月接種前の試料から得た10個のcDNAクローンのコンセンサス塩基配列をもとに、接種10年後にホップから再抽出した試料から得た10個のcDNAクローンに認められた全ての塩基変異を、cDNAクローン毎に示した。分母は解析したcDNAクローン数、分子は観察されたcDNAクローン数を示す。すなわち、3/10は塩基配列を解析した10個のcDNA中3個でそうであったことを示す。

3/10: 25U→AA, 26G→A, 31A→U, 107A→G, 153U→A, 286U→C (the same position to 281 of HSVd-hop and grapevine)

1/10: 25U→AA, 31A→U, 39A→G, 107A→G, 153U→A, 286U→C

1/10: 25U→AA, 26G→A, 31A→U, 107A→G, 153U→A, 219A→G, 286U→C

1/10: 3G→A, 25U→AA, 26G→A, 31A→U, 34A→del, 107A→G, 152U→A, 286U→C

1/10: 25U→AA, 26G→A, 31A→U, 107A→G, 117G→A, 153U→A, 286U→C

1/10: 25U→AA, 26G→A, 31A→U, 39A→G, 107A→G, 153U→A, 286U→C

1/10: 25U→AA, 26G→A, 31A→U, 107A→G, 286U→C

1/10: 25U→AA, 250A→G, 270A→G

25U→AA、26G→A、31A→U、107A→G、153U→A、286U→C などが複数のcDNAクローンに共通して観察された。25U→AA、26G→A、31A→UなどはHSVd-ホップ分離株の配列と類似していた。286U→Cはホップ分離株の281に相当する塩基であるが、変異の型(ホップではA)は異なっていた。

10個のcDNAクローン中に合計51個の変異が認められた。総変異数(51)を、HSVd-カンキツ分離株の総塩基数(302)に解析したcDNAクローン数(10)を乗じた数(3020)で割った値が1塩基当たりの変異率となる。HSVd-カンキツ分離株のホップ継代10年間の1塩基当たりの変異率は「0.0168」、1年間の1塩基当たりの変異率は「0.00168」であり、ホップ分離株の6.5倍の変異率であった。

第3章 まとめ

ランダムcDNAシャッフリング法で作製したHSVdランダム変異体集団を接種したキュウリ、ホップ、ブドウ、カンキツ、モモから経時的に子孫HSVdを抽出し全塩基配列を解析した。得られた全てのcDNAクローンの全塩基配列を親HSVdであるブドウ、スモモ、カンキツ変異株の全塩基配列と多重整列させ、系統樹解析を行なった(図4)。また、3種の親HSVd間で変異が認められた30箇所の変異型を抽出して多重整列させ、同様に系統樹解析を行なった(図5)。全塩基配列情報に基づく系統樹も変異箇所のみの情報に基づく系統樹もほぼ同様の結果を導いたが、細部に若干の違いが認められた。

全塩基配列に基づく系統樹で、子孫HSVdは大きく3つのグループに分かれた。各々のグループに見られた特徴を以下に示した。

- (1) HSVd-スモモ変異株に類似したグループは、モモとホップで選抜された変異体のみを含んでいた。
- (2) HSVd-カンキツ変異株に類似したグループは、キュウリ、エトログシトロン、ホップ、モモで選抜された変異体を含んでいた。特に100ng/mlの転写物を接種したキュウリ-個体No.8で選抜された変異体「C100-5(8)」はカンキツ変異株と極めてよく類似していた。また、エトログシトロンで選抜されたものの多くもこのグループに属した。
- (3) HSVd-ブドウ変異株に類似したグループは、全ての宿主で選抜されたものを含んでいた。特にHSVd-ブドウ変異株と全く同じ配列をもつものが、全ての宿主から高頻度に検出されたことから、この型は全ての宿主にもっともよく適応した変異体であることが明らかになった。

また、宿主別に見ると、

- (4) ブドウでは、HSVd-ブドウ変異体或いはそれに極めて類似した変異体のみが選抜されてきた。これは、自然界の栽培ブドウから分離されるもののほとんどがこの型であることと極めてよく一致した。つまり、ブドウという宿主は本来HSVdにはそれほど適した宿主ではなく、極めて限られた型のみが感染増殖を許されるのではないかと考えられる。この考えは、自然界でブドウはHSVdの潜在感染宿主であり、ウイロイド濃度も低いという事実からも裏付けられる。
- (5) 一方、ホップとモモでは、多様な変異体が選抜されてきたことから、比較的ルーズにHSVd変異体の感染増殖を許すものと考えられた。自然界のスモモ、モモ、アンズなど核果類から分離された変異体にも、典型的なスモモ型のほか、ブドウ型変異体が複数含まれていることから、本研究で確認された傾向は、自然界の変異体の分布状況を良く反映させている結果と考えられる。また、本研究において、ホップでは比較的ルーズ(多様)な変異体の選抜が認められたのに反して、自然界のホップではブドウ変異株類似のもののみが報告されている。これは、既に申請者(Sano et al. 2001、添付資料3)が示唆したように、日本のホップ矮化病はブドウに感染しているHSVd-ブドウ変異株がホップに感染して発生したとする仮説を裏付ける結果と考えることが出来るだろう。
- (6) カンキツでは、まだ解析した感染個体数が1本であるため、明確な傾向を論じることはできない。ただ、解析した限りでは、カンキツ変異株に類似の変異を有する変異体が選抜される傾向が認められたので、ブドウ同様に、感染増殖できる変異体の許容範囲は限られている可能性がある。今後さらに解析が必要である。

以上、ランダムcDNAシャッフリング選抜法で、HSVdランダム変異体の異なる宿主中での選抜の方向性を実験的に解析した結果、自然界の感染宿主で認められる変異体の分布様式と類似の傾向が認められた。こ

のことは、現在自然界の様々な宿主に感染しているHSVd分離株に認められる特徴ある変異が、各々の宿主による方向性のある（正の）選択圧によって生じてきたとする考えを強く示唆するものであった。

また、表2に3種の親ウイルスで変異が認められた30箇所の変異について、各々の変異の型毎に接種前と接種後の出現頻度をまとめて示した。部位によってどの型が選ばれるかについて明らかな傾向が認められた。以下に概略を示した。

- (1) 塩基番号25～59番までの範囲ではブドウ或いは／及びカンキツに見られる変異が選択され、スモモに見られる変異は淘汰される傾向が認められた。
- (2) 塩基番号114～152番までの範囲ではブドウ及びスモモに見られる変異が選択され、カンキツの変異は淘汰される傾向が認められた。
- (3) 塩基番号193～206番までの範囲ではブドウに見られる変異が強く選択され、カンキツ或いは／及びスモモに見られる変異は強く淘汰される傾向が認められた。
- (4) 塩基番号207～266番までの範囲ではブドウとカンキツに見られる変異が強く選択され、スモモの変異は強く淘汰される傾向が認められた。
- (5) 一般にブドウ変異株に認められる変異の型は選抜される傾向にあったが、塩基番号58/59、185/186の2カ所の欠失は淘汰される傾向が認められた。

今後は宿主別に各部位の接種後出現頻度をより詳細に分析し、宿主によって選択と淘汰の嗜好に異なる方向性があるかどうか調査する必要がある。

自然界のホップ、ブドウ、スモモ、カンキツから分離したHSVd変異株をホップに接種し、自然条件下で継代栽培した。10年後HSVdを再分離して全塩基配列を決定して、接種前の全塩基配列と比較した。その結果、以下のような事実が明らかになった。

- (1) ホップ分離株は10年間ほとんど変化しなかった。
- (2) ブドウ分離株はホップ分離株と同一化する方向に変化していた。特に驚くべきことに、一つのcDNAクローンはホップ分離株と全く同一の形に変化していた。即ち、ブドウ変異株は、ホップ中では一定の方向性をもって変異し、それは自然界のホップから分離される形と同一化するものであることが明らかになった。このことは、ホップ矮化病の病原がブドウに感染しているHSVd変異株に由来するとする申請者らの仮説を直接裏付ける証拠である。
- (3) 各分離株に認められた変異数から1年間1部位当りの変異率を算出した。その結果、ホップ変異株(0.00026)、ブドウ変異株(0.0006)、カンキツ変異株(0.00131)、スモモ変異株(0.00168)であった。植物ウイルス或いはウイルスで、1年間1部位当りの変異率が実験的に明らかになったのはこれが初めてと考えられる。また、変異体によって変異率が異なることが明確に示されたのもこれが初めてと考えられる。

以上の結果から、各々の宿主に対する適応度の違いによって継代中の変異率に大きな違いが出る可能性が示唆された。これは病原体の宿主適応及び変異の問題を考える上で極めて重要な概念に関わる点である。今後、この実験データを再確認して、適応度と変異率に関する概念を明確にして行く予定である。

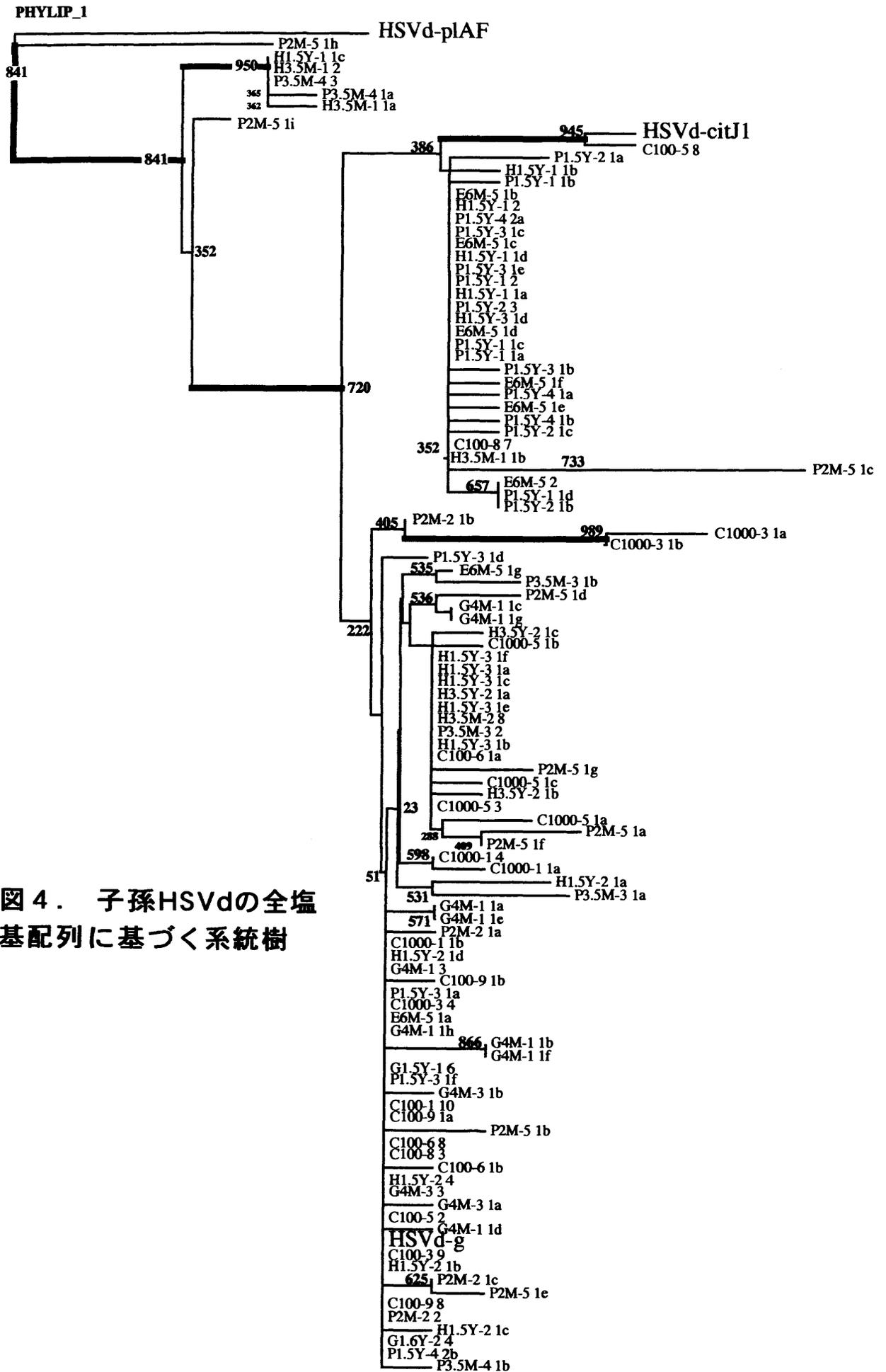


図4. 子孫HSVdの全塩基配列に基づく系統樹

0.01

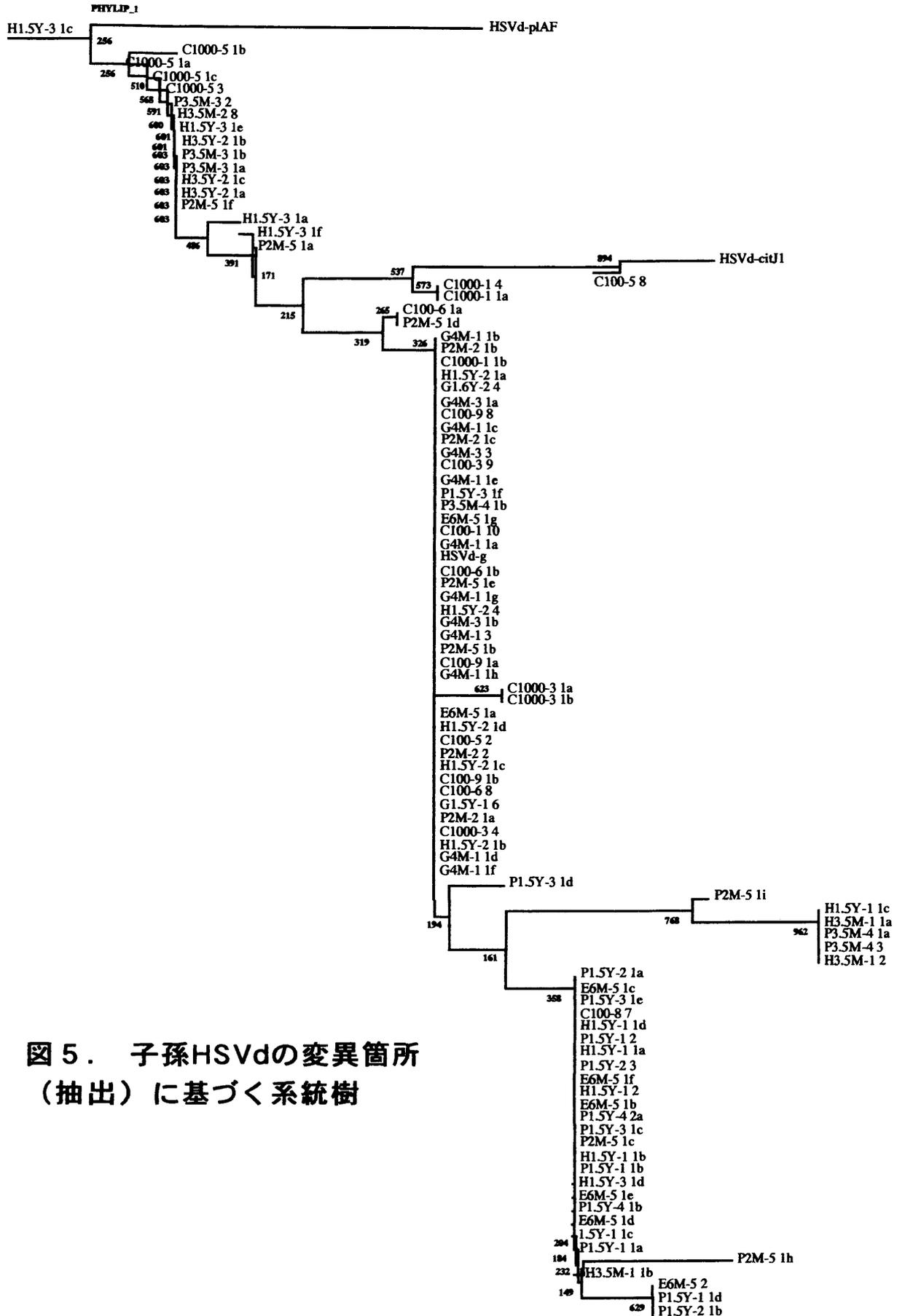


図 5. 子孫HSVdの変異箇所
(抽出)に基づく系統樹

表 2. 接種前（親）及び接種後（子孫）HSVdに見られた各変異型（type）の出現頻度

site * 1	grape type				citrus type				plum type									
	接種前		接種後		接種前		接種後		接種前		接種後							
	塩基数	頻度	塩基数	頻度	塩基数	頻度	塩基数	頻度	塩基数	頻度	塩基数	頻度						
025	U	58	89	101	99	↑	U	58	89	101	99	↑	A	7	11	1	1	↓
026	C	53	82	84	82	⇒	-	5	8	17	16	↑	A	7	11	1	1	↓
027	A	59	91	94	92	⇒	G	6	9	9	9	⇒	A	59	91	94	92	⇒
032	A	59	91	101	99	↑	A	59	91	101	99	↑	U	6	9	1	1	↓
038/039	-	55	85	87	85	⇒	-	56	85	87	85	⇒	A	10	15	15	15	⇒
046	A	62	95	101	99	↑	A	62	95	101	99	↑	U	3	5	1	1	↓
058	U	53	82	90	88	↑	A	3	5	11	11	↑	U	53	82	90	88	↑
058/059	-	62	95	91	89	↓	G	3	5	11	11	↑	-	62	95	91	89	↓
059	A	65	100	102	100	⇒	A	65	100	102	100	⇒	G	0	0	0	0	⇒
114/115	-	32	49	93	89	↑↑	A	33	51	9	9	↓↓	-	32	49	93	89	↑↑
148/149	-	36	55	68	67	↑	U	29	45	34	33	↓	-	36	55	68	67	↑
151	G	38	58	68	67	↑	U	27	42	34	33	↓	G	38	58	68	67	↑
152	C	38	58	68	67	↑	G	26	40	34	33	↓	C	38	58	68	67	↑
185/186	-	57	88	68	67	↓↓	U	8	12	34	33	↑↑	-	57	88	68	67	↓↓
193	U	55	85	98	96	↑↑	C	10	15	1	1	↓↓	U	55	85	98	96	↑↑
204	C	34	52	79	77	↑↑	G	16	25	3	3	↓↓	U	15	23	20	20	↓
205	G	34	52	84	82	↑↑	A	17	26	3	3	↓↓	U	14	22	15	15	↓
206	A	35	54	81	79	↑↑	G	30	46	21	21	↓↓	G	30	46	21	21	↓↓
207	U	51	78	84	82	↑	U	51	78	84	82	↑	-	14	22	17	17	↓
226	U	33	51	94	92	↑↑	U	33	51	94	92	↑↑	C	32	49	6	6	↓↓
228	A	33	51	95	93	↑↑	A	33	51	95	93	↑↑	C	32	49	7	7	↓↓
230	C	33	51	94	92	↑↑	C	33	51	94	92	↑↑	U	32	49	8	8	↓↓
231	U	33	51	95	93	↑↑	U	33	51	95	93	↑↑	G	32	49	7	7	↓↓
241	U	34	52	101	99	↑↑	U	34	52	101	99	↑↑	C	31	48	1	1	↓↓
242	C	33	51	101	99	↑↑	C	33	51	101	99	↑↑	U	31	48	1	1	↓↓
242/243	-	47	72	53	52	↓↓	UU	16	16	11	11	↓	-	47	72	53	52	↓↓
256	U	34	52	101	99	↑↑	U	34	52	101	99	↑↑	G	31	48	1	1	↓↓
257	G	34	52	101	99	↑↑	G	34	52	101	99	↑↑	U	31	48	1	1	↓↓
265	G	63	98	102	100	↑	A	1	1	0	0	↓	G	63	98	102	100	↑
266	A	38	58	102	100	↑↑	A	38	58	102	100	↑↑	C	27	42	0	0	↓↓

前: C9 ↓

後: C38 ↑

* : HSVd-ぶどう分離株の塩基番号に基づく。

* : 接種後、出現頻度がやや上昇（↑）、20%以上上昇（↑↑）、やや低下（↓）、20%以上低下（↓↓）、ほとんど変化しない（⇒）。