

氏 名(本籍) おお 大 さき 崎 ひで 秀 き 樹

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 2 1 号

学位授与年月日 平 成 12 年 3 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 落葉果樹のウィロイドおよび2本鎖RNAの特性に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 江 原 淑 夫  
教 授 西 尾 剛  
教 授 羽 柴 輝 良

# 論文内容要旨

ウイロイド (viroid) は、高等植物に感染して、種々の病徴を引き起こす最も小さな植物病原体で、その本体は、約 250 ~ 380 塩基より成る 1 本鎖環状リボ核酸 (ribonucleic acid : RNA) 分子である。その伝搬は、罹病植物への接触、接木や汚染農作業器具により起こることが知られている。

果樹作物は、栄養繁殖、すなわち接木等により増殖され販売、普及されている。この果樹の特性は、接木伝搬性病原体の感染、増殖には好適であるため、ウイロイドを含むウイルス性病害が数多くある。果樹類ウイルス性病害の防疫上の要点は、健全母樹から採穂された苗木の栽植に尽きる。そのため、苗木段階での簡便で迅速な高感度の検定法の開発が必要とされていた。

本研究は、落葉果樹類のウイロイドおよび罹病樹に特異的に認められる dsRNA の特性を解明することを目的とした。すなわち、ニホンナシに発生した果実形態異常の植物病理学的原因究明 (第 3 章)、ニホンナシ粗皮病とナシ blister canker ウイロイド (PBCVd) の関連性およびニホンナシに存在する dsRNA の特性の解明 (第 4 章)、ニホンスモモ品種 'ハニーローザ' に発生した斑入果病の簡便な診断法の開発 (第 5 章)、モモ latent mosaic ウイロイド (PLMVd) の日本国内の感染状況 (第 6 章) 等について検討した。

## I ニホンナシ奇形果病とその病原の特性

ニホンナシで果面に凹凸を生じる障害が日本各地で発生した。'新高'の果面 (Fig. 1) は、大きい凹凸が、一方、'吉野'の果面 (Fig. 2)には細かい凹凸が生じ、果実内部および果実以外の樹体部位には、何ら障害は見い出せなかった。発症樹より核酸を抽出し、未変性 5% PAGE を行ったところ、発症樹すべての核酸試料から健全樹には見られない 2 本のバンドが検出された (Fig. 3)。RNase A に対する感受性より、移動度の大きい方 (RNA1) は ssRNA、移動度の小さい方 (RNA2) は dsRNA と推定された。また、RNA1 とリンゴさび果ウイロイド (ASSVd) の移動度は同一であった。リターンおよび 2 方向 PAGE で、変性条件下で、遅く泳動されるバンドが果実形態異常発症樹すべての核酸試料から検出された (Fig. 4)。二次元 PAGE で RNA1 は遅く、RNA2 は速く泳動されることが確認された。すなわち、RNA1 はウイロイド様 RNA、RNA2 は dsRNA の性質を有していた。RNA1 は特異的に ASSVd cDNA プローブとハイブリッドを形成した (Fig. 5)。

純化 RNA1 試料を供試し、ASSVd の全長を増幅するように設計された 2 種のプライマーペアをそれぞれ用い RT-PCR を行ったところ、両産物に、ASSVd の全長と期待される DNA 断片が確認された。その増幅断片をクローニングし塩基配列を解析したところ、発症樹から分離されたウイロイド (ASSVd-P) は、ASSVd-J (日本のリンゴから分離されたリンゴさび果ウイロイド) と比較し、3ヶ所で相違が見られ、ASSVd の 1 系統であることが分かった (Fig. 6)。

本発症樹由来とリンゴ由来の ASSVd をそれぞれ戻し接種した '新高' と '吉野' の果面に凹凸が発症した。そこで、本障害は ASSVd を病原とする病害であると結論し、この新しい病害を 'ニホンナシ奇形果病'、英名 'Japanese pear fruit dimple (JPFD)' と命名することを提案した。

刃物による本ウイロイドの罹病樹から健全樹への伝搬の可能性を解析するために、ナイフによる交互切り付け試験を実施した。剪定と新装管理をそれぞれ想定した 2 月および 8

月に、切り付け回数を変えて処理した。その結果、切り付けられたナシ実生へのウイロイドの伝搬は、時期に関わらず、また、どの回数でも認められなかった (Table 1)。

RT-PCR 検定法のための微量試料からの簡易核酸調整法を開発した。すなわち、微量組織を蒸留水に浸漬し、10 分間 95 °C で保温し、核酸を抽出する熱処理核酸抽出法と、同様に微量組織を万力を用いて押し潰し、その組織から滲出してきた溶液を核酸抽出試料とする万力核酸抽出法である (Fig. 7)。両法は、簡便で迅速であるため実用上有効な抽出法であることが示唆された。

## II ニホンナシ粗皮病とナシ blister canker ウイロイドとの関連性およびニホンナシに存在する 2 本鎖 RNA の特性

粗皮病病変部を観察したところ、内部にネクロシスが見られた。そのネクロシスの周辺にスペリンの発達とリグニンの集積が観察された。さらに、同一樹内でも枝により病徴の強弱に偏りが見られた (Fig. 8)。

粗皮病罹病樹に結実した果実より種子を採取し、粗皮病病原の種子伝搬性を調査したが、種子伝搬は起こらなかった。また、刃物により粗皮病病原が伝搬するか否かを試験したが、粗皮の発症は確認されず、剪定作業では伝搬しない可能性が示唆された。

外国では、粗皮病類似のセイヨウナシ病害 blister canker の病原は PBCVd とされている。3 種のプライマーペアを用い RT-PCR によって健全および典型的粗皮症状を現わすナシ樹の核酸試料から PBCVd を検出することを試みた。予想されるサイズ (315 bp) に増幅 DNA バンドが検出されたのは、健全セイヨウナシ 2 樹の核酸試料からプライマーペア 3 を用いて得られた産物のみであり、ニホンナシ粗皮病との関連はないと推測された。一方の分離株の塩基配列を解析した結果、それは 314 塩基から成り、フランス分離株 (P2098T) と 93.3% のホモロジーがあった (Fig. 9)。

また、粗皮病病原の探索のため、dsRNA の解析をしたところ、分子量  $3.10 \times 10^6$  と  $13.3 \times 10^6$  の間に泳動される 2 ~ 3 本のバンドが検出された。非発症樹でも若干見られるものの、発症樹で高率に見い出せるため、粗皮病と何らかの関連があることが示唆された (Fig. 10)。

dsRNA 解析による粗皮病病原探索の過程で、3 種の dsRNA (dsRNA1, 2, 3) が、品種に特異的に検出された。すなわち、果樹試験場保存 53 品種のうち、12 品種から見い出された。その他に 2 種の dsRNA (dsRNA4, 5) は、唯一ニホンナシ品種 '秋田田沢 3 号' で、3 種の dsRNA と重複して、特異的に検出された (Fig. 11)。これら dsRNA の接木伝搬は確認されなかった。しかし、交配によって、高い確率で後代に伝染することが判明した (Table 2)。これらの諸性質は種子伝染性潜伏ウイルスに類似していた。dsRNA1 の塩基配列を解析したところ、1434 塩基からなる 1 つの長い翻訳領域が見い出された (Fig. 12)。それは、477 アミノ酸からなり、分子量約 54.9 kDa と考えられるポリペプチドをコードしていると推測された。ss および dsRNA ウイルスの RNA 依存 RNA 複製酵素 (RDRP) のアミノ酸配列で保存されている 4 種の配列モチーフが見られ、このポリペプチドが RDRP である可能性が示唆された。このポリペプチドのホモロジー検索をしたところ、beet cryptic virus 3 (BCV3) の dsRNA2、寄生性プロトゾア *Cryptosporidium parvum* に見い出された dsRNA、植物病原糸状菌 *Fusarium solani* のウイルス (FusoV) のそれぞれの RDRP とのホモロジーが認められた。

また、dsRNA1の5'末端の配列は、BCV3のdsRNA1と2の5'末端配列と同一であった。このこともまた、ニホンナシのdsRNA1が、BCV3のdsRNA2に類似することを示唆している。また、本dsRNAの宿主であるニホンナシ中での濃度は、種子伝染性潜伏ウイルスであるダイコン葉縁黄化ウイルスのdsRNA濃度の約16倍高濃度であると概算できた。しかし、本dsRNAに関連するウイルス様粒子は確認できなかった。

### III ニホンスモモ品種‘ハニーローザ’に発生したスモモ斑入果病とホップ矮化ウイロイドの迅速な検定法

近年、香川県の現地圃場で果樹試験場育成ニホンスモモ品種‘ハニーローザ’に斑入果病類似の症状が発生した。当初現地では、この障害が生理的のものであると認識していた。病果の症状は、山梨県で品種‘太陽’に発生している斑入果症状に類似していた (Fig. 13)。リターン PAGE したところ、ウイロイドは検出されなかった。泳動後、ウイロイドが泳動されると推定される部位からゲル片を切り取り核酸を溶出させ、ホップ矮化ウイロイド (HSVd) の全長を増幅するプライマーペアを用いて RT-PCR に供試した結果、発症樹試料から期待される cDNA が増幅された (Fig. 14) 。‘ハニーローザ’ 2 樹より見いだされた HSVd の塩基配列を解析したところ、両分離株とも 297 bp で Sano *et al.* が決定した山梨県産の‘太陽’ から見いだされた HSVd の配列と一致した。斑入果病罹病樹樹皮から SDS-フェノール法により抽出した核酸試料とその希釈液を用いて、RT-PCR による HSVd の検出限界を調べた (Fig. 15) 。また、微量試料からの簡易核酸調整法として、熱処理核酸抽出法および万力核酸抽出法について RT-PCR 検定法への適用を試みた。

### IV モモ latent mosaic ウイロイドの日本の核果類での感染状況

PLMVd の日本国内の核果類樹での感染状況を知るため、RT-PCR 法の開発を行い、非特異的バンドがなく、PLMVd の検出に適したプライマーペア 2 を選抜した (Fig. 16) 。モモ由来の PLMVd 2 分離株、中津白桃 (茨城県産) とあかつき (長野県産) 分離株、の塩基配列を解析した。2 分離株とも 337 塩基から成り、それぞれフランスの基準分離株と比較し、91 と 92% のホモロジーが認められた (Fig. 17) 。果樹試験場に保存されている多くのモモ品種とアンズ 1 品種から PLMVd が検出された。かつて斑葉、油斑モザイク各病原を保毒しているとされていた果樹試験場保存各品種はすべて陽性であった。また、PLMVd は、日本各地のモモ樹から高率に (94.3%) 検出された。果樹試験場の被検定樹のうち、PLMVd 陽性のモモ品種 ‘倉方早生’ のみが、4 月に葉にモザイク症状を呈したが、他の PLMVd 陽性の品種はモザイク症状を示さなかった (Table 3) 。

### V まとめ

日本の落葉果樹、ニホンナシおよび核果類のウイロイドおよび感染個体に発現する dsRNA の特性を解析した。ASSVd は、ニホンナシ品種 ‘新高’ と ‘吉野’ において、果実形態異常を引き起こすことをつきとめ、本病を ‘ニホンナシ奇形果病’、英名 ‘Japanese pear fruit dimple’ と命名することを提案した。本病害診断において、微量の組織を用いて短時間で検定可能であれば、大量の苗木を処理する際に、非常に有効である。そこで、熱処理および万力核酸抽出法を確立した。かつては 10 サンプルの核酸抽出は 8 時間を要していたが、現在はこれら 2 種の抽出方法を用いることにより、30 分に短縮することができた。

また、ニホンナシで問題になっている粗皮病病原の探索を発症樹の dsRNA 解析をとおして行ったところ、発症樹の核酸試料から高率に 2～3 種の dsRNA バンドが検出された。これら dsRNA は、ニホンナシ粗皮病と何らかの関連があると思われ、早急の解析が待たれる。さらに、これら dsRNA の解析の過程で、品種に特異的に存在する dsRNA が見い出された。しかし、起源や機能、ニホンナシ内での役割については謎が多く今後の解析が待たれる。これら dsRNA の解析は、植物ウイルス学の範疇にとどまらず、植物界に広く存在する dsRNA との類縁関係とその進化という大きな課題との関連性からも注目されよう。また、これら dsRNA を解析、同定していくことは、ニホンナシの他の病原未定接木伝搬性病害の研究の一助となる。

核果類においてもウイロイド病が発生し問題となっている。香川県産の斑入果病罹病ニホンスモモ品種‘ハニーローザ’より見い出された HSVd の塩基配列を解析したところ、以前国内各地で分離解析された株と同一であることから、国内のスモモから見い出される HSVd は、同一の伝染源から派生し、流通した可能性が示唆された。また、罹病樹から抽出した核酸試料をリターン PAGE で解析したが、ウイロイドバンドが検出されなかった。PAGE による検定はスモモ植物組織に含まれるウイロイドの量が極微量であるため、時期によっては困難な場合があることが報告されている。しかし、RT-PCR 法は、極微量の HSVd を検出できるため供試するスモモ組織も微量で済み、さらに、熱処理および万力核酸調整法を用いると迅速さを増し、実用場面で有効な方法であると思われた。

次に、PLMVd の国内核果類樹での感染状況を調査した。PLMVd は、日本各地の多くのモモ樹で検出され(94.3%)、国内のモモ樹に広範囲に感染分布していることが判明した。しかし、陽性モモ 30 品種での生育は一般に良好で、モザイク症状を葉に表したのは、1 品種のみであった。この結果は、ヨーロッパの品種では激しい病徴が報告されているけれども、ほとんどの日本のモモ品種は無病徴である可能性を示唆している。しかし、今後新たに育種される品種が強い病徴を示すことも考えられ、PLMVd フリー樹の育成を進める必要がある。

本研究により、落葉果樹類のウイロイド病およびニホンナシに存在する dsRNA に関して、数多くのことが明らかになった。開発された検定法の適用により、ウイロイドの健全苗木の管理、検疫等は格段に迅速になるであろう。また、ニホンナシに存在する dsRNA の研究は、生物界の多様な RNA ワールドの研究の一助に成るであろう。これらの成果は、落葉果樹類のウイロイド病および dsRNA の研究の今後の発展に寄与するところ大であると確信する。

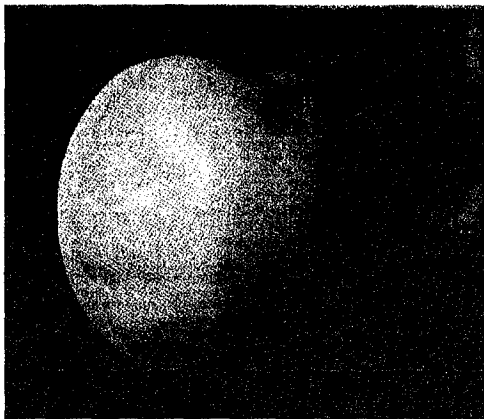


Fig. 1. Typical fruit symptoms of JPFD on Japanese pear cv. Niitaka.

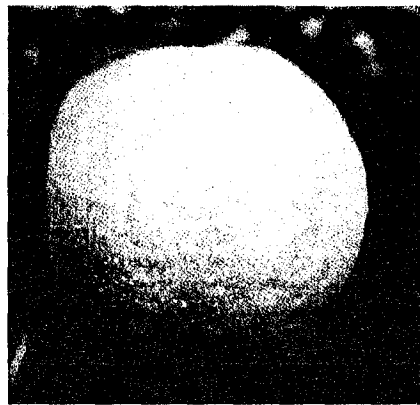


Fig. 2. Typical fruit symptoms of JPFD on Japanese pear cv. Yoshino.



Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of nucleic acid preparations from bark tissues of Japanese pears. Lanes 1 and 2 correspond to extracts of healthy and fruit-dimpling trees, respectively.

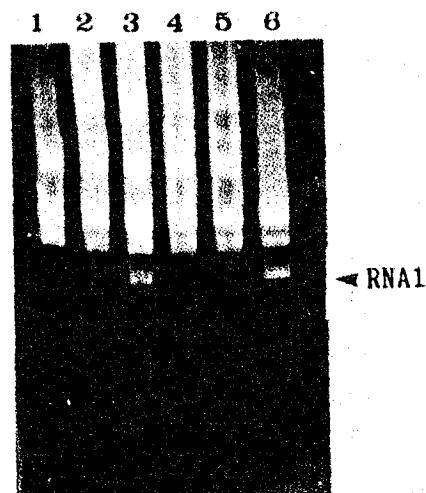


Fig. 4. Return gel electrophoresis of nucleic acid preparations from bark tissues of Japanese pears. Lanes 1, 2, 4 and 5, extracts of healthy trees. Lanes 3 and 6, extracts of fruit-dimpling trees. The first electrophoresis is carried out from top to bottom under native conditions. The second electrophoresis is carried out from bottom to top under denaturing conditions.

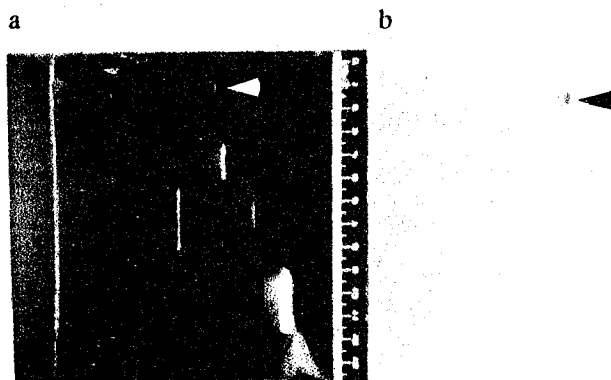


Fig. 5. Analysis by two-dimensional gel electrophoresis of nucleic acid preparation from bark tissues of fruit-dimpling Japanese pear tree, CDN1. (a) The sample was electrophoresed and the gel was stained ethidium bromide. (b) The same sample was electrophoresed, then transferred to a nylon membrane, which was hybridized with a  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA probe prepared from ASSVd cDNA clone (pUAS-14) and autoradiographed. Direction of non-denaturing electrophoresis in the first dimension was from left to right and in the second denaturing dimension (presented here) from top to bottom. Arrows indicated the position of RNA1.

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 ASSVd-J 1 GGTAAACACC GTGCGGTCC TGTGGTTCCG CCCGCCAACG CAGATAAGAT AAAGAAAACG AGGAGAAGAA GGAAGTACC TGTCGTCGTC GACGAAGGCC  
 ASSVd-C 1 GGTAAACACC GTGCGGTCC TGTGGTTCCG CCCGCCAACG CAGATAAGAT AAAGAAAACG AGGAGAAGAA GGAAGTACC TGTCGTCGTC GACGAAGGCC  
 ASSVd-P 1 GGTAAACACC GTGCGGTCC TGTGGTTCCG CCCGCCAACG CAGATAAGAT AAAGAAAACG AGGAGAAGAA GGAAGTACC TGTCGTCGTC GACGAAGGCC  
 DAVd 1 GGTAAACACC GTGCGGTCC TGTGGTTCCG CCCGCCAACG CAGATAAGAT AAAGAAAACG AGGAGAAGAA GGAAGTACC TGTCGTCGTC GACGAAGGCC  
 PRSVd 1 GGTAAACACC GTGCGGTCC TGTGGTTCCG CCCGCCAACG CAGATAAGAT AAAGAAAACG AGGAGAAGAA GGAAGTACC TGTCGTCGTC GACGAAGGCC  
  
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
 GGTGAGAAAG GAGCTGCCAG CACTAAGCCG GACGCGCCG TCGCACCAG TTCCGCTGTG GGTTCGCCTA CAAGAACGTA CGGTGTTGAG GCCCTGTCCG  
 GGTGAGAAAG GAGCTGCCAG CACTAAGCCG GACGCGCCG TCGCACCAG TTCCGCTGTG GGTTCGCCTA CAAGAACGTA CGGTGTTGAG GCCCTGTCCG  
 GGTGAGAAAG GAGCTGCCAG CACTAAGCCG GACGCGCCG TCGCACCAG TTCCGCTGTG GGTTCGCCTA CAAGAACGTA CGGTGTTGAG GCCCTGTCCG  
 GGTGAGAAAG GAGCTGCCAG CACTAAGCCG GACGCGCCG TCGCACCAG TTCCGCTGTG GGTTCGCCTA CAAGAACGTA CGGTGTTGAG GCCCTGTCCG  
 GGTGAGAAAG GAGCTGCCAG CACTAAGCCG GACGCGCCG TCGCACCAG TTCCGCTGTG GGTTCGCCTA CAAGAACGTA CGGTGTTGAG GCCCTGTCCG  
  
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
 CCGTGCCTT GCCACCTACT CTTGCGCCG CTAGTCGAGC GGAAGTCCGG TGTAGCCCC CTGTTCTCTC ACGTCTTTT TCTTTGACG CAGCGGCCGG  
 CCGTGCCTT GCCACCTACT CTTGCGCCG CTAGTCGAGC GGAAGTCCGG TGTAGCCCC CTGTTCTCTC ACGTCTTTT TCTTTGACG CAGCGGCCGG  
 CCGTGCCTT GCCACCTACT CTTGCGCCG CTAGTCGAGC GGAAGTCCGG TGTAGCCCC CTGTTCTCTC ACGTCTTTT TCTTTGACG CAGCGGCCGG  
 CCGTGCCTT GCCACCTACT CTTGCGCCG CTAGTCGAGC GGAAGTCCGG TGTAGCCCC CTGTTCTCTC ACGTCTTTT TCTTTGACG CAGCGGCCGG  
 CCGTGCCTT GCCACCTACT CTTGCGCCG CTAGTCGAGC GGAAGTCCGG TGTAGCCCC CTGTTCTCTC ACGTCTTTT TCTTTGACG CAGCGGCCGG  
  
 310 320 330 340  
 TGGGTCCCA GGGTAAAACA CAATAGGTGT TTCC.....  
 TGGGTCCCA GGGTAAAACA CAATAGGTGT TTCC.....  
 TGGGTCCCA GGGTAAAACA CAATAGGTGT TTCC.....  
 TGGGTCCCA GGGTAAAACA CAATAGGTGT TTCC.....  
 TGGGTCCCA GGGTAAAACA CAATAGGTGT TTCC.....

Fig. 6. Comparison of the nucleotide sequence of viroid RNA genome between ASSVd isolated from apples in Japan (ASSVd-J), ASSVd isolated from apples in China (ASSVd-C), ASSVd isolated from Japanese pears showing symptoms of fruit dimpling (ASSVd-P), dapple apple viroid (DAVd) and pear rusty skin viroid (PRSVd). The differences indicate reversed letters.

Table 1. Transmission of ASSVd from infected Japanese pear trees to pear seedlings by inoculation with the direct knife-cut method.

Cutting period	Number of knife-cuts			
	5	10	20	40
August	0/6 <sup>a)</sup>	0/6	0/6	0/6
February	0/6	0/6	0/6	0/6

a) Number of pear seedlings infected/inoculated. ASSVd was assayed by RT-PCR.

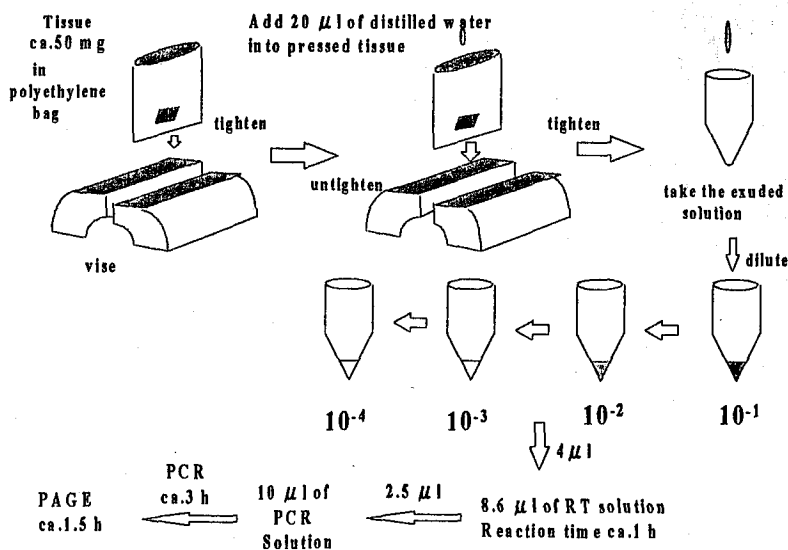


Fig. 7. Illustration scheme of preparation by vise and detection method of ASSVd.

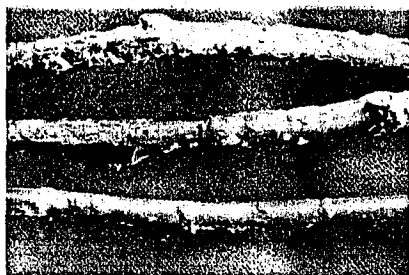


Fig. 8. Bark disorders on shoots of Japanese pear cv. Chikusui.

	10	20	30	40	50	
PBCVD.SEQ	1	CTTTC- TGA	GGTTCCTGTG	GTGCTCCCCT	GACCTGCGTT	CCAAAAAGCG
FUKU.SEQ	1	TTTCCCTGA	GGTTCCTGTG	GTGCTCCCCT	GACCTGCGTT	CCAAAAAGCG-
YAMA.SEQ	1	TTTCCCTGA	GGTTCCTGTG	GTGCTCCCCT	GACCTGCGTT	CCAAAAAGCG-
NP.SEQ	1	TTTCCCTGA	GGTTCCTGTG	GTGCTCCCCT	GACCTGCGTT	CCAAAAAGCG
	60	70	80	90	100	
PBCVD.SEQ	51	AAAAA--GT	GAGAGGCCCT	AGGGGCTTCT	CGGCTCGTCC	TCGACGAAGG
FUKU.SEQ	51	AAAAAAA- GT	GAGAGGCCCT	AGGGGCTTCT	CGGCTCGTCC	TCGACGAAGG
YAMA.SEQ	51	AAAAAAA- GT	GAGAGGCCCT	AGGGGCTTCT	CGGCTCGTCC	TCGACGAAGG
NP.SEQ	51	AAAAA--GT	GAGAGGCCCT	AGGGGCTTCT	CGGCTCGTCC	TCGACGAAGG
	110	120	130	140	150	
PBCVD.SEQ	101	CTCTAGAAGC	CTGGG- TCGG	GCTGGAGCCG	GCGGCTGTGA	GTAATCGCTC
FUKU.SEQ	101	CTCTAGAAGC	CTGGG- TCGG	GCTGGAGCCG	GCGGCTGTGA	GTAATCGCTC
YAMA.SEQ	101	CTCTAGAAGC	CTGGG- TCGG	GCTGGAGCCG	GCGGCTGTGA	GTAATCGCTC
NP.SEQ	101	CTCTAGAAGC	CTGGG- TCGG	GCTGGAGCCG	GCGGCTGTGA	GTAATCGCTC
	160	170	180	190	200	
PBCVD.SEQ	151	CTTTGGAGAA	GAAAACCAGC	CTTGCTTCTC	CCCTTCTCTC	CGTCTTCTGT
FUKU.SEQ	151	CTTTGGAGAA	GAAAACCAGC	CTTGCTTCTC	CCCTTCTCTC	CGTCTTCTGT
YAMA.SEQ	151	CTTTGGAGAA	GAAAACCAGC	CTTGCTTCTC	CCCTTCTCTC	CGTCTTCTGT
NP.SEQ	151	CTTTGGAGAA	GAAAACCAGC	CTTGCTTCTC	CCCTTCTCTC	CGTCTTCTGT
	210	220	230	240	250	
PBCVD.SEQ	201	CCCGCTAGTC	GAGCGGACAA	CCCGAGCACC	GCCGAAGCCG	TTTTTCTTTT
FUKU.SEQ	201	CCCGCTAGTC	GAGCGGACAA	CCCGAGCACC	GCCGAAG--C	TTTTTCTTTT
YAMA.SEQ	201	CCCGCTAGTC	GAGCGGACAA	CCCGAGCACC	GCCGAAG--C	TTTTTCTTTT
NP.SEQ	201	CCCGCTAGTC	GAGCGGACAA	CCCGAGCACC	GCCGAAGCCG	TTTTTCTTTT
	260	270	280	290	300	
PBCVD.SEQ	251	TATAGCAGCT	TGGCTTCGCG	GCGAGGGTGG	AAGT-TACCG	GGAAGCCGCG
FUKU.SEQ	251	TGAAGCAGCT	TGGT-TTCGCG	GCGAGGGTGG	AAGT-GACCG	GGAAGCTCCTG
YAMA.SEQ	251	TGAAGCAGCT	TGGT-TTCGCG	GCGAGGGTGG	AAGT-GACCG	GGAAGCTCCTG
NP.SEQ	251	TATAGCAGCT	TGGCTTCGCG	GCGAGGGTGG	AAGT-GACCG	GGAAGCTCCTG
	310	320	330	340	350	
PBCVD.SEQ	301	GAAGGAGGCC	CTCGGCTCC	.....	.....	.....
FUKU.SEQ	301	GAAGGAGGCC	CTCGGCTCC	.....	.....	.....
YAMA.SEQ	301	GAAGGAGGCC	CTCGGCTCC	.....	.....	.....
NP.SEQ	301	GAAGGAGGCC	CTCGGCTCC	.....	.....	.....

Fig. 9. Comparison of the nucleotide sequence of viroid RNA genome among PBCVd isolated from European pear cv. Nouveau Poiteau (NP.SEQ), the French (PBCVD.SEQ) and Fukushima (FUKU.SEQ) and Yamagata (YAMA.SEQ) isolates of PBCVd. The letters in white indicate the differences.

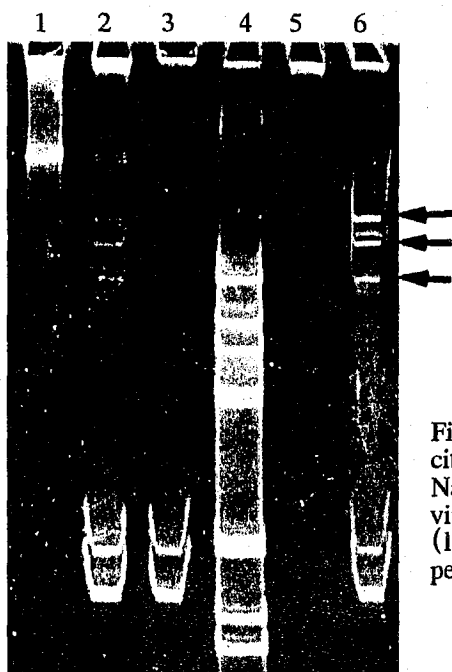


Fig. 10. Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNAs isolated from citrus tristeza virus-infected orange (lane 1), Japanese pear cv. Nansui showing symptoms of sohi (lanes 2, 3 and 6), rice dwarf virus (RDV) dsRNAs (lane 4), healthy Japanese pear cv. Chikusui (lane 5). Arrows indicate the positions of dsRNAs from Japanese pear cv. Nansui showing symptoms of sohi.



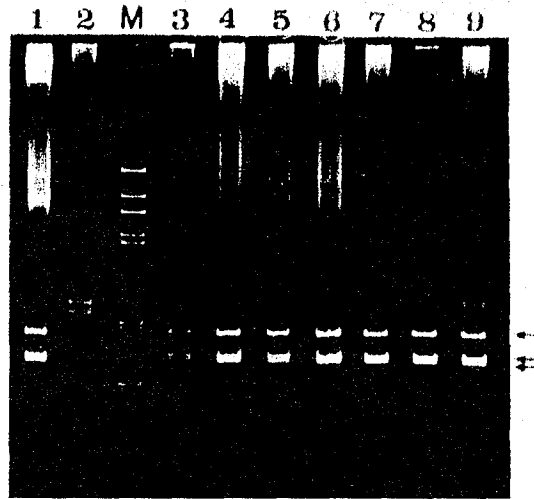


Fig. 11. Polyacrylamide gel electrophoresis of dsRNAs isolated from Japanese pear. Lane M, RDV dsRNA as marker; lane 1, Aichi Mamenashi; lane 2, radish cv. Minowase; lane 3, Niitaka; lane 4, Nansui; lane 5, Okusankichi; lane 6, Yanaga; lane 7, Echigonishiki; lane 8, Mamenashi 4; lane 9, Akita Tazawa 3 Gou. Arrows indicate the positions of dsRNAs. Three bands in lane 2 were dsRNAs from radish yellow edge virus, a cryptovirus.

Table 2. Transmission of dsRNAs to next generation by crossing.

Seed parent × Pollen parent	No. of seedlings detected / No. of seedlings tested
162-29 × Shinsei (+ × -) <sup>a)</sup>	31/40
HG-8 × Okusankichi (- × +)	12/12
HG-7 × Okusankichi (+ × +)	5/5

a) +: with dsRNAs, -: without dsRNAs.

```

AGAAUUUCAUCCAGUCAUAGACUACCCAGGACGAAGUCCUGGCCGGAUGAGCGUUGGCGUGGAUUUGAAAGGAUUUUUCAUUACGACUGCUACCAGUAUGGAGCAGAACGCCAUUUAAUGG 120
                                     H E Q N A F N G 8
AUUUGAAUUUGUGUAUUUUCCGAGGAAUUGGAGAAUCUUAUUAUCAAUCCACAAAAGUAGACGUGAGUCUUAACACUACGUUUGACAAAUUCGUGAACGCGAACCUAAUCGA 240
F E F V D Y S E E L E N L N Q N H I H E V R R E S N T T Y V D K F A E R R L I D 48
CUUACACCCCGAGUACCAUCGGCAGUUCUACCAAGGAGUCCGGGAGUUUUUAUAAACCCGAAAGACACAUUGGAGCCUACUGAAUUUAGGCACUCGAAAUUACCCGUAGACAACGU 360
L H P E Y H R Q F I Q G W S R S Y Y N T E R H H E A L L N Y G T R N I P V D N V 88
GGAAUACAUCUCUACAGGGAUGUAUUGACACUGUCAAGAACGGGUUACGUAGCCUCCAGCGUGAAGGCAUUUGACGUAUCUGAGUUAACUUAUGUCUGUACAACUUGUCUAC 480
D Y N L Y Q G C I D T V K N G L R S L P R V K A F D V L T E L N L V S Y K S S T 128
AGCGGGGGGCUACAACUACUAGGGGUGCAAAGGACCUUUUGAUGGUUAUAAACACAAACAGGGCGAUUCGACGAGCUAGGGGCUACAGUAGGUGAUGUCUACAGACAUUGGGAUUGAAGGCUU 600
A A G Y N Y H G A K G P F D G Y N H K Q A I R R A R A T V G D V S D N G I E G L 168
GAGAAGAGCUAUCACUACGGCAGUACCCAGUUCGGGUUAACACGCACACAGCUAACCGACCUUACGGGAAACGAAGAUUAGAAUUGAUGGGGAAGAGCAUCCACUUAUUUUUGAU 720
R R A I T T A V P D V G Y T R T Q L T D L T E K T K I R N V W G R A F H Y I L I 208
UGAAGGAACUACGUGAUCUAGUAGCAGGAUGUUUAGCAAAAACAAAUUUUAUCAUAUACGGCCGUGAUCGGUUGGUAUGCGUACAGAUUACUUGAUAACAGCAGGCAAAAGC 840
E G T S A D P L I R H F S K T K S F Y H I G R D P L D S V P D V L S E T A G K A 248
UAGAUGGCUUAACCCAUAGACUGGAAACAGUUAUGCAACCGUACGGCAGUUCGAGAUCAACGCAUUCGUAUUAUUUAGGACCUCUAGAGUCCCAAUUUUAUCCGCAUAUGU 960
R W L Y A I D W E Q F D A T M S R F E I N A A F D I I N D L I E F P N Y P T Y V 288
                                     Motif I
UGCCUUCGAGUUGAGUAGACAGUUUAUCCAUAAAGAAGAUUGCAGCACCAGAUUGGUUAUUAUACUGGUCACAUAAAGGAUACCUUCAGGUAGUUAUUUCACUUAUUUAUGGAUC 1080
A F E L S R Q L F I H K K I A A P D G Y I Y W S H K G I P S G S Y F T S I I G S 328
                                     1h 6c
                                     Motif II
GAUUUAAAUCGACUCAGAAUAGAGUAUUUUAUGCGAAAAGAUUACUGGACAUUGGACACUCCGAGUUAACACUACUACAGGAGANGACUUCUUAUGGUGACGACGAAUUCACACCACAGAA 1200
I I N R L R I E Y L W R K I T G H G P L A C U T Q G D D S L S Q D D E F T P P E 368
                                     Motif III
GAAGUUCGUGAAAUAGCAAACAAAAGGCGUGGUUUUAACCCAGAGAAAACAGAAUUAUUAACCAUUAACGGAAGUACAGUUCUAGGAAAGGACGUAUCUCGGUGGACUCAACAC 1320
K F A E I A N Q I G W V L N P E K T E Y S T I P S E V H F L G R T M L G G L N T 408
                                     7h 4c
                                     Motif IV
UCGCGAAAUAAGAGAUUUUAAGACUACUGAUUUUAUCCAGAGUAUCCUGUGGAUUCAGGAAGGAUUUCGCAUUAUCGACGAAUUCGAUCAGUGGUAAGACUUAAGUGAGCU 1440
R E I K R C L R L L I Y P E Y P V D S G R I S A Y R A K S I S E D V G R L S E L 448
ACUUACAAGAUCGAGGAGAUUGCAAGGUAUUGGUAUUCGCUACAGACGAAGAAGUACCGGAUUAUUUAGAGAUACGUUUUGUAACAUUUUAGUACUUAACAUCUUUUAAUG 1560
L N K I E R R L Q G Q Y G I A S D E E V P D Y F K R Y V L * 477
AUUGACGGUGAGGGCUACAACCCACACCAA 1592

```

Fig. 12. Nucleotide sequence of dsRNA1 and deduced amino acid sequence. The termination codon is indicated by an asterisk. The conserved amino acid sequence motifs are boxed. The arrowheads indicate the 3' end of the region where the primers anneal.

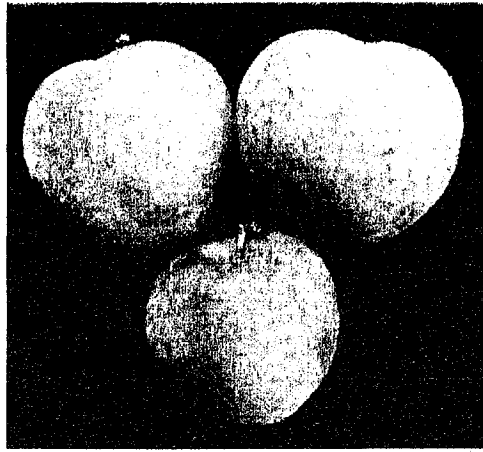


Fig. 13. Typical fruit symptoms of dapple fruit disease on Japanese plum cv. Honey Rosa.



Fig. 14. Polyacrylamide gel electrophoresis of RT-PCR amplified cDNA products from purified viroid preparations. Lane 1, 100 bp ladder DNA maker ; lane 2, amplified by primer pair 1 ; lane 3, amplified by primer pair 2.

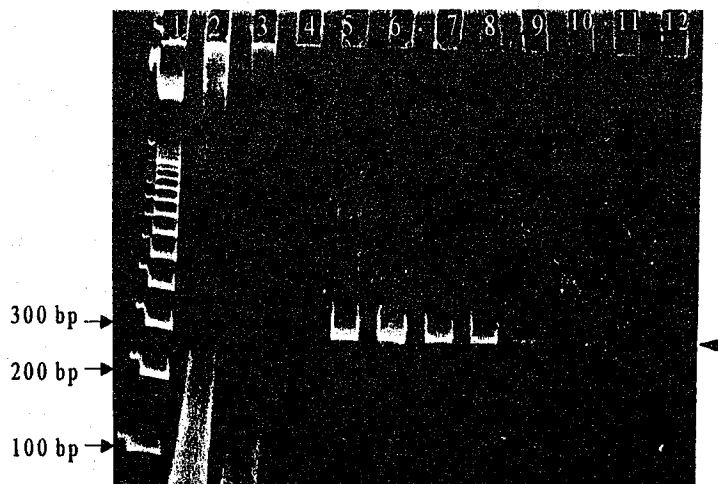


Fig. 15. Polyacrylamide gel electrophoresis of RT-PCR products from dilution series of nucleic acid preparations. Lane 1, 100 base pair ladder DNA marker ; lane 2, original ( $10^0$ ) nucleic acid preparation ; lane 3,  $10^{-1}$  ; lane 4,  $10^{-2}$  ; lane 5,  $10^{-3}$  ; lane 6,  $10^{-4}$  ; lane 7,  $10^{-5}$  ; lane 8,  $10^{-6}$  ; lane 9,  $10^{-7}$  ; lane 10,  $10^{-8}$  ; lane 11,  $10^{-9}$  ; lane 12,  $10^{-10}$  diluted preparation.

Table 3. Leaf symptoms on cultivars of stone fruits at the National Institute of Fruit Tree Science.

Stone fruit type	Cultivar	Yellow mosaic Oil blotch	PLMVD RT-PCR	Date of observation			
				April	May	June	July
Peach	Abe Hakutou		+				
	Akatsuki		+				
	Chiyouared		+				
	Chiyouhime		-				
	Chiyoumaru		-				
	Fantasia		+				
	Flavor Gold		+				
	Flavortop		+				
	Fujinamiwase		+				
	GF 305		YM <sup>a</sup> , OB				
	Hakuhou		YM, OB				
	Hakuhou-Fukushima		+				
	Hakutou		+				
	Hikawa Hakuhou		+				
	Hiratsuka Red		+				
	Hitachired		+				
	Kanouiwa Hakutou		+				
	Kantou 14 Gou		YM				
	Kurakata Wase		+				
	Masahime		+				
	Hatsumori Wase		+				
	Nagayama Hakuhou		+				
	Nakayama Kantou		OB				
	Nishio Gold		+				
	Nunome Wase		YM, OB				
	Okitsu		YM, OB				
	Okubou		YM				
	Ougontou		+				
	Reimei		+				
	Saotome		+				
	Shibuya Hakutou		+				
	Shingyoku		OB				
	Shizukured		+				
Shunou		+					
Yamato Hakutou		YM					
Yamato Wase		OB					
Yawata Hakuhou		+					
Yoshihime		+					
Majories Seedling		+					
Stanley		+					
Sugar		+					
Formosa		+					
Ooishi Wase Sumomo		+					
Ooishi Nakate		+					
Santa Rosa		+					
Alexander		+					
America Anzu		+					
Aomorisananzu		+					
Heiwa		+					
Jinzhou Daxing		+					
Jinshiro		+					
Kinrei		+					
Koushuoimi		+					
Shinshuoomi		+					
Shouwa		+					
Toua		+					
Baigou		+					
Gessekai		+					
Gojiro		+					
Jizoume		+					
Kairyuu Uchidaume		+					
Koushusaishou		+					
Kankou		+					
Orihime		+					
Cushuku		+					
Ryukyou Koume		+					
Taiwan Yaseiune		+					
Takadaume		+					

a) YM: yellow mosaic-infected, OB: oil blotch-infected, according to report by Kishi et al.  
 b) +: positive, -: negative.  
 c) -: no symptoms, M: mosaic, observed in 1998.

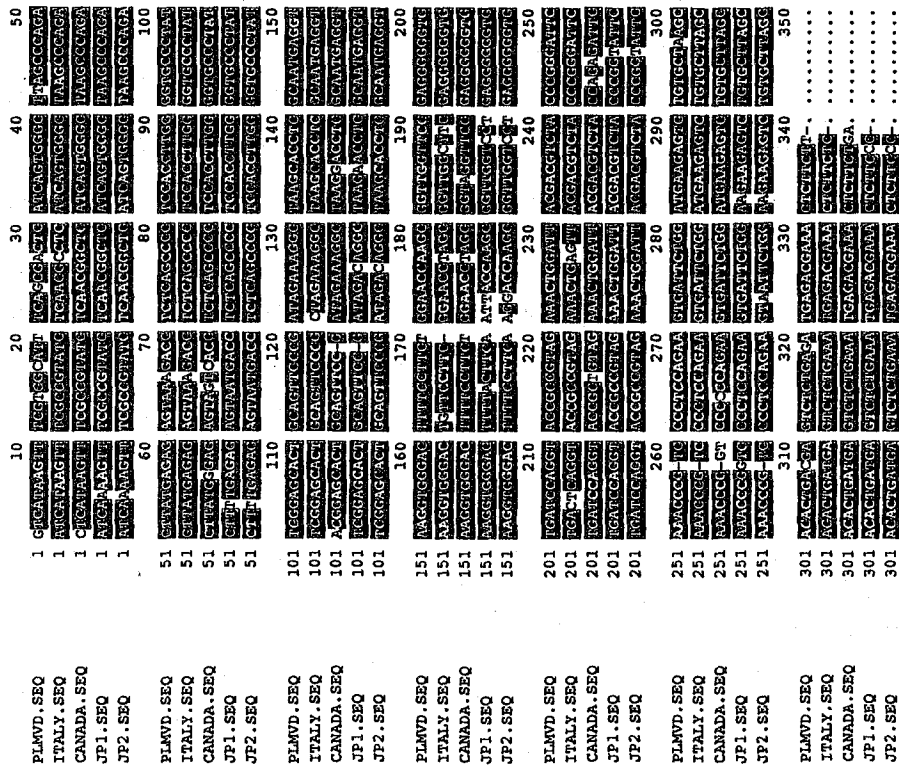


Fig. 16. Polyacrylamide gel electrophoresis of RT-PCR products from  $10^3$  diluted nucleic acid preparation of cv. Hakuhou. Lane 1, amplified by primer pair 1; lane 2, amplified by primer pair 2; lane 3, amplified by primer pair 3. The size (in base pairs) of marker DNAs are indicated on the left. The arrow indicates bands with expected size (337 bp).

Fig. 17. Comparison of the nucleotide sequence of viroid RNA genome among two PLMVD isolated from peach cvs. Nakatsu hakutou (JPI1.SEQ) and Akatsuki (JP2.SEQ) in Japan, the French (PLMVD.SEQ) and Italian (ITALY.SEQ) peach isolates of PLMVD and Canadian (CANADA.SEQ) sweet cherry isolate of PLMVD. The letters in white indicate the differences.

## 論文審査結果要旨

日本の落葉果樹、ニホンナシと核果樹に異常をもたらす病原ウイルスおよび感染個体に発現する dsRNA の特性を解析した。ニホンナシで果面に凹凸を生じる障害が日本各地で発生した。発症樹より核酸を抽出し、各種 PAGE により解析し、病原ウイルスを検出した。塩基配列から、それがリンゴサビ果ウイルス (ASSVd) の 1 系統であることを明かにした。本発症樹とリンゴ由来の ASSVd をそれぞれ戻し接種したところ、異常が再現された。そこで、本障害は ASSVd を病原とする病害であると結論し、この新病害を ‘ニホンナシ奇形果病’、英名 ‘Japanesepear fruit dimple’ と命名した。また、RT-PCR 検定法のための微量試料からの簡易核酸調整法を開発した。

ニホンナシ粗皮病と類似病害 blister canker の病原ナシ blister canker ウイルスとの関連がないことを明らかにした。粗皮病病原の探索のため、dsRNA を解析し、分子量  $3.10 \sim 13.3 \times 10^6$  の 3 種を検出した。これは罹病樹で高率に検出されるため、粗皮病との関連が示唆された。dsRNA 解析の過程でこれらとは別に 5 種の dsRNA (dsRNA1,2,3,4,5) が、品種に特異的に検出された。本 dsRNA が接木伝染せず、種子花粉によって後代に伝搬することを明らかにした。dsRNA1 の塩基配列の解析から、コードされているポリペプチドが、RNA 依存 RNA 複製酵素である可能性が示唆された。これらの諸性質は種子伝染性潜伏ウイルスに類似しているが、本 dsRNA に関連するウイルス様粒子は確認できなかった。

核果類では、ニホンスモモの品種 ‘ハニーローザ’ に斑入果病類似の症状が発生した。この試料からは、ウイルスは検出されなかった。しかし、ホップ矮化ウイルス (HSVd) 塩基配列から設計したプライマーペアを用いた RT-PCR 解析をした結果、発症樹試料から期待される cDNA が増幅された。PAGE による検出は、スモモ植物組織に含まれるウイルスの量が極微量であるため不可能であった。しかし、RT-PCR 法は、極微量の HSVd を検出できるため供試するスモモ組織も微量で済み、さらに、熱処理および万力核酸調整法を用いると迅速さを増し、実用場面で有効な方法であることが分かった。

モモ latent mosaic ウイルス (PLMVd) は日本各地の多くのモモ樹で検出され (94.3%)、国内のモモ樹に広範囲に感染分布していることが判明した。しかし、陽性モモ 30 品種の生育は一般に良好で、モザイク症状を葉に表したのは、1 品種のみであった。この結果は、PLMVd がヨーロッパの品種には激しい症状を引き起こすが、ほとんどの日本の品種には潜伏感染することを示唆している。

以上のように、本研究はこれまで不明であった数種の落葉果樹に異常をもたらす病原ウイルスの性状を明らかにした。よって審査員一同は、本論文は博士(農学)に値する内容であると判定した。