

4. ウイロイド研究の新展開

佐野 輝男

弘前大学農学生命科学部

ウイロイドは小さな環状1本鎖RNA病原体で、宿主植物の転写系に依存して自律複製し、宿主の細胞内因子と干渉して病気を引き起こす。ユニークな分子構造を有するノンコーディングなウイロイドRNAは、病原性に関与する分子構造、細胞間或いは組織間のRNA輸送、分子進化と宿主適応など、様々なRNA機能を解析する魅力的な研究対象となっている。本稿では、新しいウイロイド病の流行、分子進化と宿主適応、そしてウイロイド感染で誘導されるRNAサイレンシングと病原性などに関する最新の研究を紹介する。

はじめに

ウイロイドは現在知られている最小の病原体で、様々な植物に感染し、時に深刻な被害をもたらす¹⁾。その本体は、タンパク質に翻訳される情報をコードしない約250–400ヌクレオチドの環状1本鎖RNAで、基本的にウイルスとは異なるクラスのサブウイルス病原と位置づけられ、ICTVによるウイルスの分類と同様の基準で2科(family)、7属(genus)、28種(species)に分類されている²⁾。ポスピウイロイド科(*Pospiviroidae*)のウイロイドは、5つの構造ドメイン³⁾で構成される棒状の2次構造を形成し、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(nuclear)で非対称型ローリングサークル⁴⁾と呼ばれる様式で複製する(図1)。アブサンウイロイド科(*Avsunviroidae*)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ないが、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(chloroplast)で対称型ローリングサークルで複製する(図1)。ウイロイドは、宿主細胞に侵入後、宿主の転写系に完全に依存して複製・増殖し、プラズモデ

スマータを通じて隣接細胞へ侵入し、やがて師部輸送系を通じて全身に拡がる^{5), 6), 7), 8)}。病原体としての重要性に加えて、小さくて特異な分子構造を持つウイロイドは、RNAの複製能と病原性、植物体内のRNA輸送、RNAの分子進化と宿主適応など、様々な宿主-病原体相互作用を研究するための魅力的な研究対象でもある。本稿では、ウイロイド病流行の現状、ウイロイドゲノムの多様性と分子進化・宿主適応、そして、ウイロイドの病原性とRNAサイレンシングなど、最新の研究成果をもとにウイロイド研究の現状を紹介したい。

1. ウイロイド病流行の現状—ポスピウイロイドの拡散

ウイロイドは病原体として発見されたものであるが、全てのウイロイドが常に病気を引き起こすわけではない。むしろ、多くの場合、ウイロイドは病気を起こすことなく潜在的に宿主に感染して自然界で存続している。例えば、*Hop latent viroid*(HLVd)—ホップ、*Columnnea latent viroid*(CLVd)—コルムネア(*columnnea*)、*Hop stunt viroid*(HpSVd)—ブドウ・カンキツ・核果類、*Peach latent mosaic viroid*(PLMVd)—モモと数種核果類、*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*(CChMVd)—大多数のキク品種、などは潜在感染の例として知られている。この場合、ウイロイドは宿主に経済的損失を与えないため防除対象として扱われてこなかった。実際、ブドウやカンキツでは世界中で栽培されている品種のほとんどが潜在的にHpSVdを含む複数のウイロイドに感染している⁹⁾。しかし近年、新たな状況が生まれ、生産現場に深刻な影響を及ぼし始めている。

Potato spindle tuber viroid(PSTVd)はジャガイモ

連絡先

〒036-8561 青森県弘前市文京町3
弘前大学農学生命科学部
TEL: 0172-39-3817
FAX: 0172-39-3817
E-mail: sano@cc.hirosaki-u.ac.jp

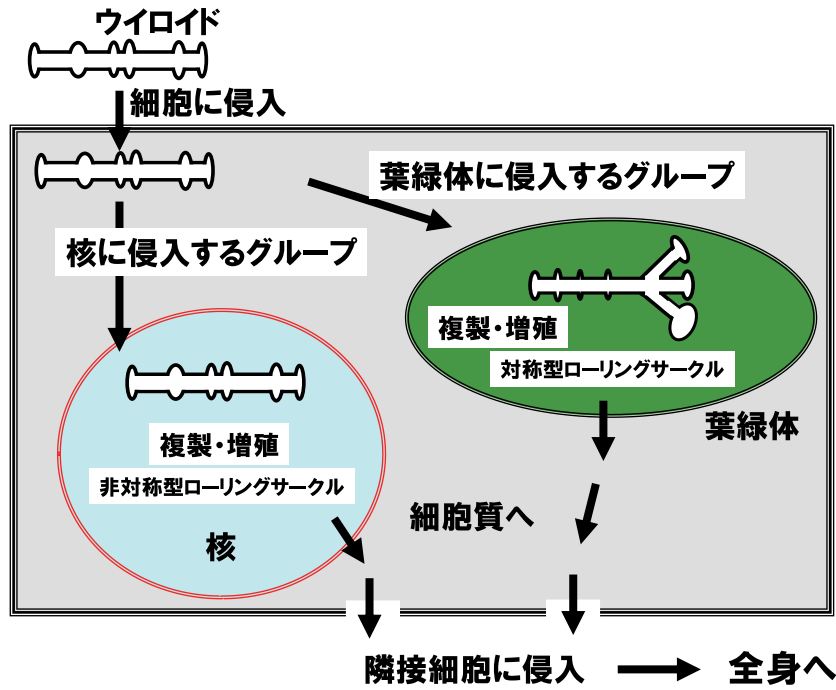


図1 ウィロイドの感染模式図

spindle tuber 病の病原である。本病は北米，南米，欧州の一部，アジアの一部など世界各地で発生が認められるが，日本はフリーゾーンである。国内への侵入を未然に防ぐため，特定重要病害に指定され植物輸出入検疫の対象となっている。本病は発見以来ジャガイモの病気と考えられてきたが，1988年頃からオランダで自国産或いは外国産トマトからウィロイドが検出されるようになり，診断の結果 *Citrus exocortis viroid* (CEVd), PSTVd, *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), CLVd など複数のウィロイドが検出された¹⁰⁾。感染株は様々な程度の黄化，葉巻，生育遅延などの病状を示し，感染率も様々であった。2006年，これを契機にオランダで観葉植物のウィロイド調査が実施され，さらにチュニジア産トマトから *Tomato apical stunt viroid* (TASVd)¹¹⁾，ベルギー産トマトから PSTVd¹²⁾，オランダ産の様々な観葉植物，すなわち，バーベーナから CEVd, *Brugmansia suaveolens* と *Solanum jasminoides* から PSTVd, *Cestrum* sp. から TASVd¹³⁾，オランダ産 *Streptosolen jamesonii* から PSTVd¹⁴⁾，トルコとドイツ産 *Physalis peruviana* から PSTVd¹⁵⁾ などが検出され，欧州各地の観葉植物に複数のポスピウィロイドが感染して流通していることが明らかになった。これらのサンプルのほとんどはイワタバコ科 (*Gesneriaceae*) とナス科 (*Solanaceae*) に属し，栄養体繁殖で増殖されたものであり，*Brugmansia* などの観葉植物は感染しても病徴が現れなかった¹⁶⁾。しかし，これらのポスピウィロイド，特に PSTVd や TCDVd はトマト

やジャガイモに感染すると激しい病徴を示し，多大な経済的損失の原因となるため¹⁷⁾，観葉植物だけの問題では片付けられない。

新たなポスピウィロイドの流行は欧州に留まらず，インド¹⁸⁾，北米¹⁹⁾，そして日本へも拡大し影響が出始めている。日本では，2006年広島県の施設栽培トマトに突発した退緑・黄化・えそ萎縮症状株から TCDVd が初めて検出された²⁰⁾。海外から輸入された汚染種子が伝染源と考えられている。世界中の市場に広く流通している観葉植物が危険なウィロイドの潜在的伝染源となり得ること，今までほとんど重要視されてこなかった汚染種子によるウィロイド病の突発的流行，いずれも今後，検疫の強化等を通じて対応が必要な課題である。

II. ウィロイドの伝染流行と分子進化—分子進化的解析から明らかにされた「ホップ矮化病発生」の原因

ウィロイドは一般に比較的狭い宿主域を有し，それぞれの種は一つ或いは数種類の植物種に感染する程度である。しかし，上述のように，一部のウィロイド種の自然宿主域は拡大しているように思われる^{10), 16)}。地球規模の農作物のグローバル化の加速，すなわち作物の栽培地域の急速な拡大と流通量の急増によって，ウィロイドが未遭遇の感受性宿主と出会うチャンスが格段に増大していることが原因である²¹⁾。宿主域の拡大は，病原体が新しい宿主環境に適応する新たな変異を生み出す原動力となり，それ

に伴う新たな性質により病原体がさらに適応・進化し続けるという点で、生物学的に重要な意味を持つ。実際に、たった1塩基の置換によって PSTVd がタバコに効率よく感染するようになった例が報告されている^{22), 23)}。カンキツ cachexia 病を起こす HpSVd 変異体も1塩基の変異で病徴が変化する²⁴⁾。Apple fruit crinkle viroid (AFCVd) はリンゴにゆず果病、ホップに矮化病類似症状を引き起こす多犯性のウイロイドであるが^{25), 26)}、両宿主から分離される AFCVd 変異体に本質的な違いは認められないことから、この2つの宿主に感染するようになってからの歴史は浅いものと推定されている。しかし、一部の特殊な変異体が栄養体繁殖で限られた地域に持ち込まれて隔離され、特殊な変異体集団を形成しているケースが報告されている²⁷⁾。

Gago ら (2009)²⁸⁾ は葉緑体で複製するアブサンウイロイド科の CChMVd が全てのレプリコン、すなわちウイルスを含めた全ての生物種の中で最速の変異率 (Mutation rate ; $0.0025 \pm 0.0006 / \text{site} / \text{replication cycle}$) を持つことを報告した。ゲノムサイズが小さくノンコーディングなウイロイド RNA がこのような高速の変異に耐える性質を有するとすると、宿主域の拡大により生じる変異の意味は計り知れない重要性を有するものと推定される。

私達は、かつて日本のホップ栽培地に突如として大流行したウイロイド病—ホップ矮化病の発生原因を探ることを目的として、HpSVd の宿主適応過程に関する15年間にわたる分子進化的な検証実験を行なった²⁹⁾。ホップ矮化病の原因ウイロイド—HpSVd には様々な自然宿主が存在し、ホップ以外に、ブドウ、カンキツ、核果類 (モモ、スモモなど) に感染する。興味深いことに、各自然宿主から分離される HpSVd 変異体には宿主に特徴的な変異が認められることから、それぞれの宿主に感染している間に宿主適応の結果として新たな変異を生じてそれが集団内に固定され、各宿主に特徴的な変異体集団を形成して来たものと考えられた。ホップ矮化病は最近まで日本のホップにのみみられる病気だったのに対して、その他の宿主に感染している HpSVd は世界中の栽培地域に広く分布している。すなわち、ブドウ、カンキツ、スモモに感染している HpSVd のどれかがホップ矮化病発生の祖先種 (伝染源) となったものと考えられた。そこで、上記の4種の自然宿主 (ホップ、ブドウ、カンキツ、スモモ) から分離した HpSVd 変異体をホップに感染させ、持続感染状態で栽培し、毎年、経時的に HpSVd を抽出分離し、子孫 HpSVd の塩基変異を解析した。その結果、15年の持続感染の間にそれぞれの HpSVd 変異体には様々な適応変異が生じた。特に、ブドウから分離した変異体はゲノムの第25, 26, 54, 193, 281の5箇所に適応変異を生じて、新たな変異体に変化した。興味深いことに、この新たに生じた適応変異体はホップから分離した変異体から生じた変異体と塩基配列が一致したばかりでなく、日本の商業的ホップ栽培圃場で流行している矮化

病から分離された主要 HpSVd 変異体とも完全に一致した。すなわち、日本の栽培ホップに突如として発生した矮化病の原因が、ブドウに潜在感染していたウイロイドに起因したことが実験的に再現されたわけである。

主に農業・商業活動に伴う人為的な作業を通じて新たな感受性宿主に侵入し、高速進化に耐える性質を武器に、適応進化による新しい変異を獲得しながらより効率の良い伝染流行を繰り返していくという、ウイロイドの戦略が見えてきた。ウイロイドゲノムの多様性を分析することは、新規に発生した或は各地域で流行しているウイロイド病の由来や伝染経路等を特定する上で極めて重要な情報となってきた。

Ⅲ. ウイロイドの病原性・抵抗性戦略と RNA サイレncing

Ⅲ-1. 病徴発現と RNA サイレncing

ウイロイドはウイルス病研究の歴史の中で発見され、病原体としての側面から研究されてきたため、ウイルスの仲間或いはウイルスに近縁の病原というイメージが一般に定着していた。しかし、ウイロイドは独自のタンパク質情報をコードしない RNA 分子であるという概念が定着し、自己複製能—すなわち、感染能を備えた“ノンコーディング RNA”とみる考え方が一般的になってきた。

ウイロイドの複製能と病原性は、発見以来、ユニークな分子構造をベースに、病原性の異なる分離株或は人為的に作出した変異体の分析を基に説明されてきた。1980年代半ば、PSTVd に代表されるポスピウイロイド科のウイロイド分子は5つの構造ドメインで構成され (図2A)、いわゆる“病原性ドメイン (Pathogenicity domain)”と名付けられた領域の変異によって劇的な病徴の変化が生じることが報告された^{30), 31)}。しかし1990年代になって、様々なウイロイド種の分析から、他の構造ドメインに生じた塩基変異も病徴発現に影響を及ぼすことが示され^{32), 33), 34), 35), 36)}、ウイロイドの病原性には複数の領域が関与することが明らかになった。

一方、ウイロイドが示す病原性の分子機構に関して、ウイロイドは宿主の正常な遺伝子発現に影響を及ぼす一種の調節 RNA 因子 (Regulatory RNAs) として機能し、結果として病原性をもたらすものとの考えから、ウイロイドが持つユニークな分子構造や塩基配列 (或いはその高次構造) に基づく様々な病原性仮説が提出されてきた³⁷⁾。2本鎖 RNA 様の分子構造と RNA—RNA 経路による複製様式から当然予想されたことであるが、2001年、ウイロイドが強力な RNA サイレncing 誘導能を有することが明らかにされると、宿主の RNA サイレncing 機構との関連からウイロイドの病原性を分析しようとする試みが加速した。

Ⅲ-2. ウイロイド誘導 RNA サイレncing とウイロイ

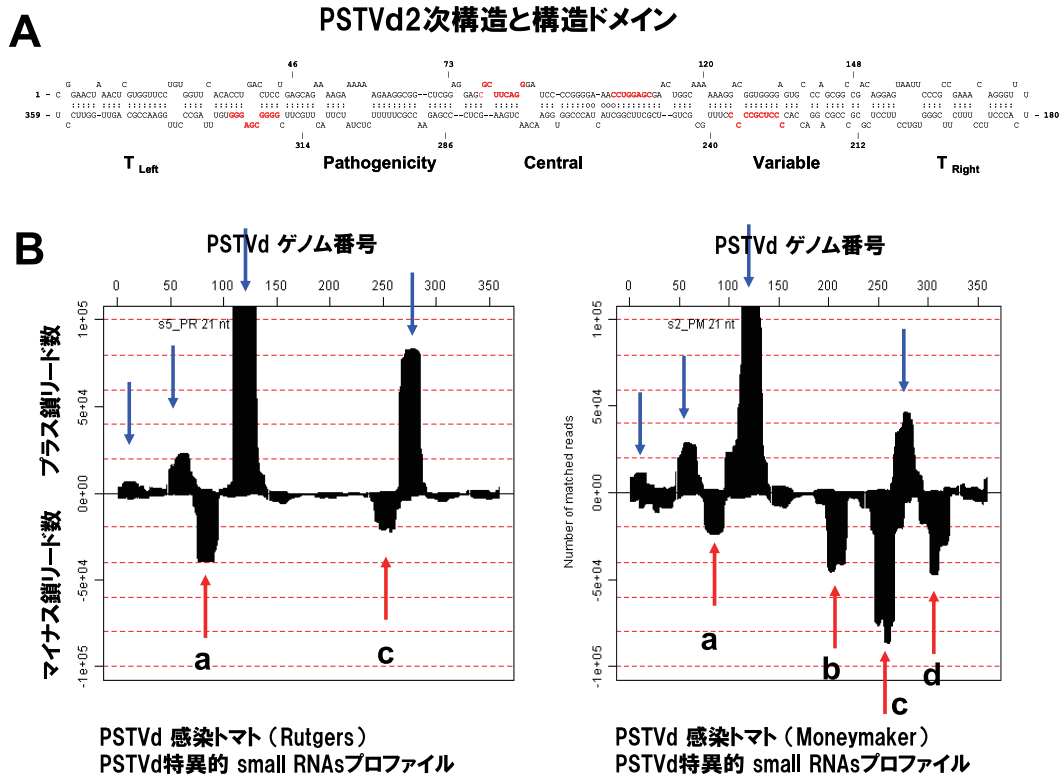


図2 ウイロイドの2次構造モデル (A) とウイロイド感染トマト葉組織に蓄積するウイロイド small RNA のプロファイル。(左) トマト品種 Rutgers (右) トマト品種 Moneymaker

ド特異的 small RNAs

Itaya ら(2001)³⁸⁾ は PSTVd 感染トマトから PSTVd に特異的な約 25ヌクレオチド(nt)の small RNA を検出し、PSTVd が RNA サイレncing を誘導することを示した。Papaefthimiou ら(2001)³⁹⁾ も PSTVd 感染トマトから PSTVd 配列と相同或は相補な 22 - 23 nt の small RNA を検出し、PSTVd の複製で転写後ジーンサイレンシング (Post-transcriptional Gene Silencing) が誘導されること、PSTVd 特異的 small RNAs (以下 PSTVd small RNA) はウイロイド分子の様々な領域のプラス鎖とマイナス鎖の両鎖に由来することを明らかにした。さらに、PLMVd 感染モモと CChMVd 感染キクからも約 21 - 23 nt の PLMVd 或は CChMVd small RNA が検出され⁴⁰⁾、核局在型のポスピウイロイド科だけでなく、葉緑体局在型のアブサンウイロイド科ウイロイドもウイロイド特異的 RNA サイレncing を誘導することが明らかになった。RNA サイレncing は生物が外来の RNA レプリコンから身を守るための防御システムである^{41), 42), 43), 44)}。ウイロイドが感染植物に効率よく RNA サイレncing を誘導することが明らかになると、RNA サイレncing とウイロイドの相互作用、特にウイロイド誘導 RNA サイレncing がウイロイドの病原性発現に果たす役割に焦点を当てた分析が開始された。

まず、病原性が異なる PSTVd 及び CChMVd 系統間でウイロイド small RNA 蓄積量が定量的に解析されたが違いは認められず^{38), 40)}、少なくともウイロイド感染で誘導されるウイロイド small RNA の蓄積量はウイロイドの病原性の強弱と関係しないと考えられた。しかし、RNA サイレncing が塩基配列特異的な遺伝子発現制御機構であることを考慮すると、異なる塩基配列変異を有するウイロイド系統は感染植物に質的 (配列的) に異なるウイロイド small RNA を生じ、異なる程度で宿主遺伝子発現に干渉し、結果として異なる病原性発現に至る可能性がある。また、ウイロイド誘導 RNA サイレncing が病徴発現の強さに及ぼす影響はウイロイド-宿主の組合せで異なる可能性もでてきた。例えば、病徴の異なる ASBVd 感染アボカド組織にはそれぞれ異なる ASBVd 変異体が優占しており、感染組織中の ASBVd 濃度に依存した ASBVd small RNA 濃度の違いが認められた。一方、2つの CEVd 変異体に感染したジヌラ (*Gynura aurantiaca*) に誘導される RNA サイレncing はウイロイドの濃度に影響しなかった⁴⁵⁾。さらに、ASBVd が高濃度に蓄積したアボカド組織から ASBVd small RNA が検出されず、逆に PLMVd と CChMVd が低濃度にしかな蓄積しないモモ或はキク組織から充分量のウイロイド small RNA が検出された⁴⁰⁾。すなわち、感染組織中のウ

イロイド濃度とウイロイド small RNA 蓄積量の間の相反する関係は、宿主の RNA サイレncing を介したウイロイド防御反応に small RNA が関与する可能性を示唆している。また、PSTVd 感染トマトの実験系で、ウイロイド small RNA の蓄積が病原性と関連していたこと⁴⁶⁾、或は感染後期に PSTVd 感染トマトの上位葉でウイロイド濃度の低下を伴う病徴“回復”現象が見られ、それに先立って PSTVd small RNA の蓄積が観察されたこと⁴⁷⁾などが報告され、ウイロイドの病原性と RNA サイレncing の関係は想像以上に複雑で、ウイロイドと宿主の組み合わせだけでなく、感染時期によっても異なる可能性が示唆されてきた。私達は、PSTVd 感染トマトに生成・蓄積する PSTVd small RNA の経時変化を RNA ゲルプロット法で解析し、感染初期の葉原基ではまず約 21 nt の PSTVd small RNA が蓄積し、発病した展開葉では約 21 nt と 24 nt の少なくとも 2 種の small RNA が蓄積することを明らかにした⁴⁸⁾。

III-3. ウイロイド特異的 small RNAs の大規模シーケンス解析と生合成経路

現在、ウイロイドの病原性を RNA サイレncing の観点からとらえ、感染組織中に蓄積するウイロイド small RNA の生合成機構を明らかにすることを目的として、ウイロイド small RNA のシーケンス解析が活発に進められている。まず、従来型のシーケンス技術によって PSTVd 感染トマト^{48), 49), 50)}、CEVd 感染トマト⁵¹⁾、PLMVd 感染モモ⁵²⁾ 組織中の各ウイロイド small RNA が分析された。ウイロイド small RNA は 21 - 22 nt が優占し、ウイロイド分子のいくつかの限られた領域-ホットスポット-のプラス鎖及びマイナス鎖に由来することが明らかになった。さらに、次世代シーケンサーにより、HpSVd と GYSVd-1 に重複感染したブドウ⁵³⁾、PLMVd 感染モモ^{54), 55)}、HpSVd 感染キュウリ⁵⁶⁾、PSTVd 感染 *N. benthamiana*⁵⁷⁾ などのウイロイド-宿主の組合せでウイロイド small RNA の大規模シーケンス解析が実施された。大規模シーケンス解析でも、ウイロイド small RNA はいくつかのホットスポット領域から大量に生じることが再確認され、プラス鎖及びマイナス鎖に由来する 21 - 24 nt の多様なサイズの分子種が検出された。しかし、いずれの場合でも、ウイロイド分子の高次構造を形成しやすい領域とホットスポット領域には明確な関連性はみられず、複数の Dicer-like 酵素がウイロイド small RNA 生合成に関与しているものと考えられた⁵⁷⁾。上記の研究の中で、Martinez ら(2010)⁵⁶⁾ は、HpSVd に感染したキュウリの葉組織と茎節部浸出液から抽出した HpSVd small RNA の塩基配列と頻度を比較し、small RNA が師部へ或いは師部から輸送される時に選択的輸送が起こる可能性を示唆した。様々なウイロイド-宿主の組合せを用いた大規模シーケンス解析で出てきた

一つの疑問点は、プラス鎖に由来するものとマイナス鎖に由来するものの比率が一定しない点である。例えば、GYSVd-1 ブドウではマイナス鎖が 75 - 70 %、HpSVd ブドウではマイナス鎖由来が 67 - 60 %、HpSVd キュウリではマイナス鎖が 55.2%、とマイナス鎖が優占した。一方、PSTVd - *N. benthamiana* ではプラス鎖が 65 %、PLMVd-モモでは 2 報の報告があり、1 報ではプラス鎖が 70 - 50 %、もう 1 報では約 50 %、とプラス鎖が優占した。

私達は、PSTVd に感染した 2 品種のトマト (Rutgers, Moneymaker) を用いて、PSTVd small RNA の大規模シーケンス解析を行なった (論文投稿中)。Rutgers は PSTVd 感染で顕著な矮化・葉巻症状を示す品種、Moneymaker は軽い症状しか示さない品種である。両方から各々約 200 万リードの PSTVd small RNA の配列が得られ、それは全 small RNA リード数の約 10 % に相当していた。PSTVd 感染トマトでは莫大な量の PSTVd small RNA が生成されていることが分かる。得られた PSTVd small RNA 配列は PSTVd ゲノムのプラス鎖とマイナス鎖の全領域をカバーしていたが、それぞれの品種に特徴的な数箇所のホットスポット領域が見られた (図 2B)。興味深い点は、Rutgers ではプラス鎖が約 90 %、Moneymaker ではプラス鎖が 57 % と、品種によりプラス/マイナスの比率が大きく異なった点である。また、品種によってホットスポットの位置も異なり、図 2B に示したようにマイナス鎖のホットスポットは Moneymaker でより多様であった (図 2B、矢印 b と d)。一方、プラス鎖のパターンは両品種ともほぼ同一で、病原性 (Pathogenicity) 領域 (塩基 40 - 60 番付近)、中央保存 (Central) 領域上部 (100 - 130 番付近)、中央保存領域下部 (260 - 280 番付近) など、ウイロイドの複製と病原性に重要な役割を果たす領域にホットスポットが存在した。中央保存領域上部は PSTVd の複製の最終段階で cleavage/ligation が起こる重要サイトで「ループ E」と呼ばれる特殊な高次構造を形成する領域を含むことから^{58), 59), 60), 61)}、ウイロイドの複製と RNA サイレncing 機構の関連性も示唆されて今後の解析結果が興味深い。PSTVd small RNA は 20 nt 以下から 30 nt 以上まで多様なサイズの分子種で構成されており、特に 21 - 22 nt が最も多く、24 nt が 3 番目に多かった。以上、ウイロイド感染植物組織には夥しい数の多様なサイズのウイロイド small RNA が蓄積し、その種類と頻度は植物の品種レベルで異なることが明らかになった。

III-4. RNA サイレncing を利用したウイロイド抵抗性戦略

ウイロイド small RNA 生合成経路の解析とは別のアプローチで、ウイロイドの病徴発現に RNA サイレncing が関与する可能性が示唆されている。まず、Wang ら(2004)⁶²⁾ はゲノムの一部を欠失させ感染性を喪失させた PSTVd へ

アピン RNA を発現する形質転換トマトに PSTVd 感染と類似した矮化・葉巻症状が現れることを報告した。感染性のない PSTVd 配列で形質転換することで PSTVd 類似の病徴が現れたのである。すなわち、形質転換したトマト組織中で発現した PSTVd 由来のヘアピン RNA が RNA サイレンシングを誘導し、PSTVd 配列を分解すると共に、植物側の PSTVd 類似配列を含有する遺伝子の発現を阻害したと解釈できるのである。これはノンコーディング RNA であるウイロイドの病原性を説明できる非常に魅力的な説であるが、PSTVd 類似配列を含有し、PSTVd 感染で発現量が低下する標的遺伝子が同定されていないこと、Wang ら (2004)⁶²⁾ が作出した形質転換トマト系統の T3 世代は PSTVd 類似の病徴を示さなかったこと⁶³⁾ などから、さらに解析と仮説の検証が必要である。一方、この形質転換トマト系統は細胞組織中に多量の PSTVd small RNA を生成蓄積し、PSTVd 感染に抵抗性を示すことから、RNA サイレンシングを利用したウイロイド抵抗性植物作出の可能性でできた⁶³⁾。Carbonell ら (2008)⁶⁴⁾ は、CEVd - ジヌラ、CEVd - トマト、PSTVd - トマト、CChMVd - キクの組合せで、各ウイロイド RNA とそれと相同な配列を有する過剰量の 2 本鎖 RNA を混合接種すると、ウイロイドの感染が配列特異的に阻害されることを報告した。植物 RNA ウイルスの場合⁶⁵⁾ と同様、RNA サイレンシングを介したウイロイド抵抗性戦略の可能性が示唆されている。また、Gomez ら (2008, 2009)^{66), 67)} は、HpSVd に感染した *N.benthamiana* の病徴発現が RNA 依存 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) の活性に依存することを報告した。RDR6 は RNA サイレンシングと small RNA の生合成に関与する酵素として知られている。ここでもウイロイドの病徴発現と RNA サイレンシングの関連性が示唆されており、今後の進展が興味深い。

まとめ—ウイロイド病の流行、防除戦略と今後の展望

ウイロイドは独自のタンパク質情報をコードしないノンコーディングな RNA レプリコンである。主に人為的な農業・商業活動を通じて宿主域と分布域を拡大しており、高い変異率を武器に新しい宿主環境に適応進化しながら遺伝的多様性を増大させている。近年、PSTVd や TCDVd に代表されるポスピウロイド科ウイロイドが、今まで宿主と考えられていなかったナス科及びイワタバコ科観葉植物に感染して市場に流通し、新たなウイロイド病流行の危険性をもたらしている。これらの宿主は一般に無病徴で感染に気付かれずに流通・蔓延し、感受性の高いジャガイモやトマトなどの農作物に伝染して経済的被害を生じることが危惧されている。

ウイロイドは感染した宿主植物に効率よく RNA サイレンシングを誘導し、それ自身が RNA サイレンシングの標的となり複数の Dicer-like の攻撃を受け、21 - 24 nt を中心に 20 nt 以下 ~ 30 nt 以上のマイナー種を含む多様なサ

イズの夥しい数のウイロイド small RNA を生成する。PSTVd 感染トマト葉組織中の PSTVd small RNA は全 small RNA の 10 % にも達することから、最近の総説で論議されているように^{43), 68)}、それが宿主の miRNA 機能にどのような影響を及ぼすのか、今後の分析が必要である。しかし、それにもかかわらず、興味深いことに、ウイロイドは自己を標的とする強力な RNA サイレンシング誘導状態下でも十分な複製・増殖を維持することができる。すなわち、ウイロイドは RNA サイレンシングに耐性を示すのである^{49), 50), 51)}。PSTVd small RNA の生成ホットスポットの一つがウイロイド環状化の際の cleavage/ligation 部位周辺に存在することは、RNA サイレンシングがウイロイドの複製とも何らかの関わりを持つことが示唆されて興味深い。ウイロイド感染で誘導される RNA サイレンシングの研究から得られる新知見をもとに、ウイロイドの生物学的機能の解明が進められ、新たなウイロイド病防除戦略が模索されている。

引用文献

- 1) Diener TO.: Biological properties. In: The Viroids (TO Diener, ed.), pp. 9-35. Plenum Press, New York, USA, 1987.
- 2) Flores R, Randles JW, Owens RA, Bar-Joseph M, Diener TO.: Viroids. In: Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses (Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses) (CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, LA Ball, eds.), pp.1147-1161. Elsevier, London, 2005.
- 3) Keese P, Symons RH.: Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4582-4586, 1985.
- 4) Branch AD, Robertson HD.: A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science* 223:450-455, 1984.
- 5) Ding B.: Viroids: self-replication, mobile, and fast-evolving noncoding regulatory RNAs, Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, Volume 1, Issue 3, pages 362-375, November/December 2010.
- 6) Ding B, Itaya A.: Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:7-20, 2007.
- 7) Flores R, Hernandez C, Martínez de Alba AE, Daros JA, Di Serio F.: Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev. Phytopathol.* 43:117-139, 2005.
- 8) Tabler M, Tsagris M.: Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* 9:339-348, 2004.
- 9) Shikata E.: New viroids from Japan. *Seminars in Virology* 1:107-116, 1990.
- 10) Verhoeven JThJ, Jansen CCC, Willems TM, Kox LFF, Owens RA, Roenhorst JW.: Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic

- dwarf viroid. *European J Pl Pathol* 110:823–831, 2004.
- 11) Verhoeven JThJ, Jansen CCC, Roenhorst JW.: First report of Tomato apical stunt viroid in tomato in Tunisia. *Plant Disease* 90:528, 2006.
 - 12) Verhoeven JThJ, Jansen CCC, Roenhorst JW, Steyer S, Michelante D.: First report of Potato spindle tuber viroid in tomato in Belgium. *Plant Disease* 91:1055, 2007.
 - 13) Verhoeven JThJ, Jansen CCC, Roenhorst JW.: First report of pospiviroids infecting ornamentals in the Netherlands: Citrus exocortis viroid in Verbena sp., Potato spindle tuber viroid in Brugmansia suaveolens and Solanum jasminoides, and Tomato apical stunt viroid in Cestrum sp. *Plant Pathology* 57:399, 2008.
 - 14) Verhoeven JThJ, Jansen CCC, Roenhorst JW.: *Streptosolen jamesonii* ‘Yellow’, a new host plant of Potato spindle tuber viroid. *Plant Pathology* 57:399, 2008.
 - 15) Verhoeven JThJ, Botermans M, Roenhorst JW, Westerhof J, Meeke ETM.: First report of Potato spindle tuber viroid in Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) from Turkey and Germany. *Plant Disease* 93:316, 2009.
 - 16) Verhoeven JThJ, Jansen CCC, Botermans M, Roenhorst JW.: Epidemiological evidence that vegetatively propagated, solanaceous plant species act as sources of Potato spindle tuber viroid inoculum for tomato. *Plant Pathology* 59:3–12, 2010.
 - 17) Singh RP, Dilworth AD, Ao X, Singh M, Misra S.: Molecular and biological characterization of a severe isolate of Tomato chlorotic dwarf viroid containing a novel terminal right (TR) domain sequence. *Eur J Plant Pathol* 127:63–72, 2010.
 - 18) Singh RP, Dilworth AD, Baranwai VK, Gupta KN.: Detection of Citrus exocortis viroid, Iresine viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid in new ornamental host plants in India. *Plant Disease* 90:145, 2006.
 - 19) Ling K-S, Verhoeven JThJ, Singh RP, Brown JK.: First report of Tomato chlorotic dwarf viroid in greenhouse tomatoes in Arizona. *Plant Disease*, doi:10.1094/PDIS-93-10-1075B, 2009.
 - 20) Matsushita Y, Kanda A, Usugi T, Tsuda S.: First report of a Tomato chlorotic dwarf viroid disease on tomato plants in Japan. *J. Gen. Pl. Pathol.* 74:182–184, 2008.
 - 21) Bar-Joseph M.: Natural history of viroids—Horticultural aspects. In *Viroids*, eds. Hadidi A, Flores R, Randles JW, and Semancik JS. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 246–251, 2003.
 - 22) Wassenegger M, Spieker RL, Thalmeir S, Gast FU, Riedel L, Sanger HL.: A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *nicotiana tabacum*. *Virology* 226:191–197, 1996.
 - 23) Zhu Y, Qi Y, Xun Y, Owens R, Ding B.: Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiol.* 130:138–146, 2002.
 - 24) Serra P, Gago S, Duran-Vila N.: A single nucleotide change in Hop stunt viroid modulates citrus cachexia symptoms. *Virus Research* 138:130–134, 2008.
 - 25) Ito T, Kanematsu S, Koganezawa H, Tsuchizaki T, Yoshida K.: Detection of a viroid associated with apple fruit crinkle disease. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59:520–527, 1993.
 - 26) Sano T, Yoshida H, Goshono M, Monma T, Kawasaki H, Ishizaki K.: Characterization of a new viroid strain from hops: evidence for viroid speciation by isolation in different host species. *J. Gen. Pl. Pathol.* 70:181–187, 2004.
 - 27) Sano T, Isono S, Matsuki K, Kawaguchi-Ito Y, Tanaka K, Kondo K, Iijima A, Bar-Joseph M.: Vegetative propagation and its possible role as a genetic bottleneck in the shaping of the Apple fruit crinkle viroid populations in apple and hop plants. *Virus Genes* 37:298–303, 2008.
 - 28) Gago S, Elena SF, Flores R, Sanjuan R.: Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science* 323:1308, 2009.
 - 29) Kawaguchi-Ito Y, Li SF, Tagawa M, Araki H, Goshono M, Yamamoto S, Tanaka M, Narita M, Tanaka K, Liu SX, Shikata E, Sano T.: Cultivated grapevines represent a symptomless reservoir for the transmission of hop stunt viroid to hop crops: 15 years of evolutionary analysis. *PLoS ONE*, 4:e8386, 2009.
 - 30) Schnolzer M, Haas B, Ramm K, Hofmann H, Sanger HL: Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *EMBO J.* 4:2181–2190, 1985.
 - 31) Visvader JE, Symons RH.: Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Res.* 13:2907–2920, 1985.
 - 32) Sano T, Candresse T, Hammond RW, Diener TO, Owens RA.: Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10104–10108, 1992.
 - 33) Rodriguez MJB, Randles JW.: Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd) mutants associated with severe diseases vary in both the pathogenicity domain and central conserved region. *Nucleic Acids Res.* 21:2771, 1993.
 - 34) Reanwarakorn K, Semancik JS.: Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. Gen. Virol.* 79:3163–3171, 1998.
 - 35) Sano T, Ishiguro A.: Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology* 240:238–244, 1998.
 - 36) Qi Y, Ding B.: Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *Plant Cell* 15:1360–1374, 2003.
 - 37) Semancik JS.: Pathogenesis. In *Viroids*, eds. Hadidi A, Flores R, Randles JW, and Semancik JS. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 61–66, 2003.
 - 38) Itaya A, Folimonov A, Matsuda Y, Nelson RS, Ding B.: Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1332–1334, 2001.

- 39) Papaefthimiou I, Hamilton AJ, Denti MA, Baulcombe DC, Tsagris M, Tabler M.: Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of posttranscriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29:2395-2400, 2001.
- 40) Martínez de Alba AE, Flores R, Hernández C.: Two chloroplastic viroids induce the accumulation of the small RNAs associated with post-transcriptional gene silencing. *J. Virol.* 76:13094-13096, 2002.
- 41) Baulcombe D.: RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363, 2004.
- 42) Daros JA, Elena SF, Flores R.: Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep.* 7:593-598, 2006.
- 43) Ruiz-Ferrer V, Voinnet O.: Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:485-510, 2009.
- 44) Ding SW.: RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10:632-644, 2010.
- 45) Markarian N, Li HE, Ding SW, Semancik JS.: RNA silencing as related to viroid-induced symptom expression. *Arch. Virol.* 149:397-406, 2004.
- 46) Matoušek J, Kozlová P, Orctová L, Schmitz A, Pesina K, Bannach O, Diermann N, Steger G, Riesner D.: Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* 388:1-13, 2007.
- 47) Sano T, Matsuura Y.: Accumulation of short interfering RNAs characteristic of RNA silencing precedes recovery of tomato plants from severe symptoms of *Potato spindle tuber viroid* infection. *J. Gen. Pl. Pathol.* 70:50-53, 2004.
- 48) Machida S, Yamahata N, Watanuki H, Owens RA, Sano T.: 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, 2007.
- 49) Itaya A, Zhong X, Bundschuh R, Qi Y, Wang Y, Takeda R, Harris AR, Molina C, Nelson RS, Ding B.: A structured viroid RNA is substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RISC-mediated degradation. *J Virol.* 81:2980-2994, 2007.
- 50) Machida S, Shibuya M, Sano T.: Enrichment of viroid small RNAs by hybridization selection using biotinylated RNA transcripts to analyze viroid induced RNA silencing. *J. Gen. Pl. Pathol.* 74:204-207, 2008.
- 51) Martín R, Arenas C, Daròs JA, Covarrubias A, Reyes JL, Chua NH.: Characterization of small RNAs derived from citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367:135-146, 2007.
- 52) St-Pierre PI, Hassen F, Thompson D, Perreault JP.: Characterization of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *Virology* 383:178-182, 2009.
- 53) Navarro B, Pantaleo V, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Di Serio F, Burgyan J.: 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(11): e7686. doi:10.1371/journal.pone.0007686, 2009.
- 54) Di Serio F, Gisel A, Navarro B, Delgado S, Martínez de Alba AE, Donvito G, Flores R.: 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(10): e7539. doi:10.1371/journal.pone.0007539, 2009.
- 55) Bolduc F, Hoareau C, St-Pierre P, Perreault J-P.: In-depth sequencing of the siRNA associated with peach latent mosaic viroid infection. *BMC Molecular Biology* 11: 16. doi:10.1186/1471-2199-11-16, 2010
- 56) Martínez G, Donaire L, Llave C, Pallas V, Gomez G.: High-throughput sequencing of *Hop stunt viroid*-derived small RNAs from cucumber leaves and phloem. *Mol. Plant Pathol.* 11:347-359, 2010.
- 57) Di Serio F, Martínez de Alba AE, Navarro B, Gisel A, Flores R.: RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *J. Virol.* 84: 477-2489, 2010.
- 58) Diener TO.: Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:58-62, 1986.
- 59) Baumstark T, Schröder ARW, Riesner D.: Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* 16:599-610, 1997.
- 60) Gas ME, Hernández C, Flores R, Daròs JA.: Processing of nuclear viroids in vivo: An interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog.* 3:1813-1826, 2007.
- 61) Gas ME, Molina-Serrano D, Hernández C, Flores R, Daròs JA.: Monomeric linear RNA of citrus exocortis viroid resulting from processing in vivo has 5'-phosphomonoester and 3'-hydroxyl termini: implications for the RNase and RNA ligase involved in replication. *J. Virol.* 82: 10321-10325, 2008.
- 62) Wang MB, Bian XY, Wu LM, Liu LX, Smith NA, Isenegger D, Wu RM, Masuta C, Vance VB, Watson JM, Rezaian A, Dennis ES, Waterhouse PM.: On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3275-3280, 2004.
- 63) Schwind N, Zwiebel M, Itaya A, Ding B, Wang MB, Krczal G, Wassenegger M.: RNAi-mediated resistance to Potato spindle tuber viroid in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Mol. Plant Pathol.* 10:459-469, 2009.
- 64) Carbonell A, Martínez de Alba AE, Flores R, Gago S.: Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371:44-53, 2008
- 65) Tenllado F, Díaz-Ruiz JR.: Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *J. Virol.* 75:12288-12297, 2001.
- 66) Gómez G, Martínez G, Pallás V.: Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity. *Plant Physiol.* 148:414-423, 2008.

- 67) Gómez G, Martínez G, Pallás V.: Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends in Plant Science* 14: 264-269, 2009.
- 68) Umbach JL, Cullen BR.: The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev.* 23:1151-1164, 2009.

Current progress in viroid research

Teruo SANO

Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University

Viroids are autonomously replicating, small single-stranded circular RNA pathogens that cause diseases in infected, susceptible plants. They are non-coding RNA replicon which replicate depending on host transcriptional machinery and develop disease symptoms through interactions with cellular components of the host. The small size and unique molecular structure of viroid RNA makes them an attractive system to analyze molecular features responsible for pathogenesis, RNA transport, or molecular evolution and adaptation to specific host species. Here we show the latest progress in viroid research on new disease epidemics, molecular evolution and host adaptation, and pathogenesis in relation to viroid-induced RNA silencing.

