



Title	イネ萎縮ウイルスゲノム転写産物 10 番の全塩基配列の解析
Author(s)	松村, 健; 上田, 一郎; 佐野, 輝男; 四方, 英四郎
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(2), 205-211
Issue Date	1988-10-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12095
Type	bulletin (article)
File Information	16(2)_p205-211.pdf



[Instructions for use](#)

イネ萎縮ウイルスゲノム転写産物 10番の全塩基配列の解析

松村 健*・上田 一郎

佐野 輝男・四方英四郎

(北海道大学農学部植物学教室)

(* 北海道グリーンバイオ研究所)

(昭和63年6月7日受理)

Complete Nucleotide Sequence of Rice Dwarf Virus Segment 10 Transcript

Takeshi MATSUMURA*, Ichiro UYEDA, Teruo SANO
and Eishiro SHIKATA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University 060, Japan)

(* Hokkaido Green-Bio Institute)

緒 言

植物ウイルスゲノムの全塩基配列を解析し、遺伝子レベルでウイルスの構造及び機能を明らかにしようとする試みは、1981年のジャガイモやせ薯病 (Potato spindle tuber viroid) に始まり¹⁾、現在まで多くの植物ウイルスグループの代表的なウイルスの塩基配列が解析されつつ

ある。本実験で用いたイネ萎縮ウイルスは、植物レオウイルスグループに属し二本鎖の RNA をゲノムとし、植物体内だけでなく媒介する昆虫体内でも増殖するウイルスであり、その複製過程など未だ明らかにされていない。そこで本報では、ウイルス粒子自身を持つ RNA 依存 RNA ポリメラーゼによって合成されウイルス粒子複製の際の鋳型になっているであろうと推測されるウイ

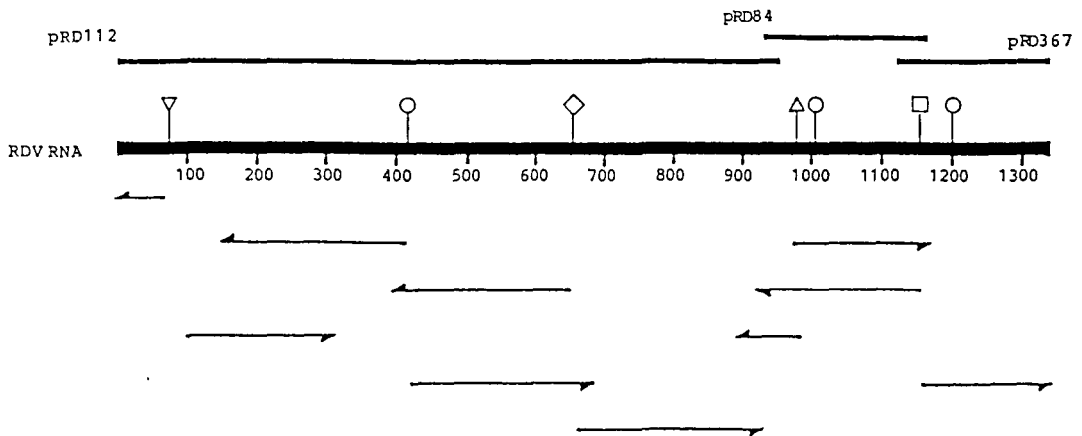


Fig. 1. Sequencing strategy of cDNA clones to RDV genome segment 10. The number of nucleotides is indicated below the top line. Symbols are restriction enzyme cleavage sites of *Sac* I (∇), *Sau* 3A (\circ), *Sph* I (\diamond), *Bam* HI (\triangle), *Sal* I (\square). The arrows indicated orientation of sequence determined.

5'
GGTAAACTTGGCCCTTTCTGACGAAC

27 **ATG** · GAA · GTA · GAC · ACT · GCT · ACG · TTT · GTT · CCG · CTT · CAT · CAT · GAG
Met- Glu- Val- Asp- Thr- Ala- Thr- Phe- Val- Arg- Leu- His- His- Glu

39 CTC · CTT · TGT · GCT · CAC · GAA · GGA · CCA · AGT · ATT · ATT · TCC · AAG · TTT
Leu- Leu- Cys- Ala- His- Glu- Gly- Pro- Ser- Ile- Ile- Ser- Lys- Phe

51 GAT · GCA · ATT · AAA · AAA · GTC · AAG · CTT · GGT · ACA · CTT · GCT · AAT · CAA
Asp- Ala- Ile- Lys- Lys- Val- Lys- Leu- Gly- Thr- Leu- Ala- Asn- Gln

63 TCT · GGT · GGT · GCT · AAT · AAC · ATC · ACC · GAA · GCT · TTC · TTG · GCT · AAG
Ser- Gly- Gly- Ala- Asn- Asn- Ile- Thr- Glu- Ala- Phe- Leu- Ala- Lys

75 CTT · CGA · AAT · TTT · GAA · AGA · AAG · TCC · GAA · GCC · TAT · TTG · GCA · TCA
Leu- Arg- Asn- Phe- Glu- Arg- Lys- Ser- Glu- Ala- Tyr- Leu- Ala- Ser

87 GAC · TTA · GCT · GAA · CGT · GAA · TTG · ACT · AGG · GAT · ACG · CAC · AAG · GCC
Asp- Leu- Ala- Glu- Arg- Glu- Leu- Thr- Arg- Asp- Thr- His- Lys- Ala

99 ATT · GTG · TTT · GTA · ACC · AAG · TCT · GTA · TTG · TTA · GGA · GGG · AAA · AGT
Ile- Val- Phe- Val- Thr- Lys- Ser- Val- Leu- Leu- Gly- Gly- Lys- Ser

111 TTG · AAA · GAC · TTG · CTA · CCT · TAT · GGA · GTG · ATA · GTG · TGT · GCT · TTT
Leu- Lys- Asp- Leu- Leu- Pro- Tyr- Gly- Val- Ile- Val- Cys- Ala- Phe

123 ATC · TTT · ATC · CCT · GAA · ACT · GCT · TCT · GTC · TTG · GAC · AAC · GTC · CCT
Ile- Phe- Ile- Pro- Glu- Thr- Ala- Ser- Val- Leu- Asp- Asn- Val- Pro

135 GTC · ATG · ATC · GGG · AAC · CAA · AAA · CGA · CCA · TTG · ACA · GTA · GCT · TTG
Val- Met- Ile- Gly- Asn- Gln- Lys- Arg- Pro- Leu- Thr- Val- Ala- Leu

147 ATA · AAA · TAC · ATC · GCT · AAA · TCT · TTG · AAT · TGC · GAT · TTA · GTT · GGT
Ile- Lys- Tyr- Ile- Ala- Lys- Ser- Leu- Asn- Cys- Asp- Leu- Val- Gly

159 GAC · TCA · TAT · GAT · ACT · TTT · TAT · TAC · TGC · AAT · TCG · TCT · GCT · TAT
Asp- Ser- Tyr- Asp- Thr- Phe- Tyr- Tyr- Cys- Asn- Ser- Ser- Ala- Tyr

171 GGT · AAG · AAT · CTG · ATT · TCA · GTA · TCA · GAC · AAT · GAT · TTT · TCT · AAT
Gly- Lys- Asn- Leu- Ile- Ser- Val- Ser- Asp- Asn- Asp- Phe- Ser- Asn

183 CCC · CAA · AGG · GCT · CTC · CTC · TCA · GTG · GGA · GAT · TTA · TGT · TAT · CAA
Pro- Gln- Arg- Ala- Leu- Leu- Ser- Val- Gly- Asp- Leu- Cys- Tyr- Gln

Fig. 2. Nucleotide and predicted amino acid sequences of RDV transcript segment 10 cDNA. Terminal tetra-nucleotides common to

615 GCA · GCG · CGT · TCA · CTC · CAC · GTT · GCA · GCA · GCT · AAT · TAT · ATA · AGG
 Ala- Ala- Arg- Ser- Leu- His- Val- Ala- Ala- Ala- Asn- Tyr- Ile- Arg
 657 ATA · TTT · GAC · CGC · ATG · CCT · CCT · GGC · TTT · CAG · CCG · TCA · AAA · CAC
 Ile- Phe- Asp- Arg- Met- Pro- Pro- Gly- Phe- Gln- Pro- Ser- Lys- His
 697 CTT · TTC · CGT · ATC · ATA · GGT · GTA · CTA · GAT · ATG · GAA · ACT · TTG · AAG
 Leu- Phe- Arg- Ile- Ile- Gly- Val- Leu- Asp- Met- Glu- Thr- Leu- Lys
 739 ACT · ATG · GTG · ACA · TCA · AAC · ATT · GCT · CGT · GAG · CCA · GGC · ATG · TTT
 Thr- Met- Val- Thr- Ser- Asn- Ile- Ala- Arg- Glu- Pro- Gly- Met- Phe
 771 TGT · CAT · GAT · AAT · GTT · AAA · GAT · GTA · CTG · CAC · CGT · ATA · GGT · GTT
 Cys- His- Asp- Asn- Val- Lys- Asp- Val- Leu- His- Arg- Ile- Gly- Val
 813 TAC · TCT · CCG · AAC · CAC · CAC · TTT · TCC · GCA · GTC · ATC · TTG · TGG · AGG
 Tyr- Ser- Pro- Asn- His- His- Phe- Ser- Ala- Val- Ile- Leu- Trp- Arg
 855 GGG · TGG · GCT · TCC · ACG · TAT · GCA · TAT · ATG · TTT · AAC · CAA · GAA · CAA
 Gly- Trp- Ala- Ser- Thr- Tyr- Ala- Tyr- Met- Phe- Asn- Gln- Glu- Gln
 897 TTA · AAT · ATG · CTA · TCA · GGA · ACA · TCT · GGT · TTA · GCT · GGA · GAC · TTT
 Leu- Asn- Met- Leu- Ser- Gly- Thr- Ser- Gly- Leu- Ala- Gly- Asp- Phe
 939 GGC · AAG · TAC · AAA · TTA · ACA · TAT · GGA · TCC · ACT · TTC · GAT · GAA · GGT
 Gly- Lys- Tyr- Lys- Leu- Thr- Tyr- Gly- Ser- Thr- Phe- Asp- Glu- Gly
 981 GTT · ATT · CAT · GTG · CAA · TAT · CAA · TTT · GTT · ACT · CCA · GAA · GTC · GTC
 Val- Ile- His- Val- Gln- Tyr- Gln- Phe- Val- Thr- Pro- Glu- Val- Val
 1023 CGC · AAG · CGA · AAT · ATA · TAC · CCG · GAT · CTG · TCT · GCC · CTT · AAA · GGC
 Arg- Lys- Arg- Asn- Ile- Tyr- Pro- Asp- Leu- Ser- Ala- Leu- Lys- Gly
 1065 GGC · AGT · TCC · TAATCGCACTGATGATAGTGCTTATCATT↓TATCAAAATATTACGGTGGGGTCA
 Gly- Ser- Ser
 1126 TCACCATCGTGTAATACGTCGACGGATTGGGTGAATTATCCGTCTTGCAACTGCTGAACAACCCAACC
 1198 AGTTGATCCCCATGTTCAAAAACCTGCCGAGCTTCCCATAGGGTGGGGTTAGAGTCGTGTGCCACGCC
 1278 ACTTAGTCTACTAATGCGTGCCCCCACACTGCGCAGGGATTCTGAT3'

those of would tumor virus are underlined. ↓ is not homologous to RDV genome segment 10 sequence reported by OMURA *et al.*⁶⁾

ルスゲノム転写産物の塩基配列の解析を行った。

材料と方法

M13 ライブラリーの作成

前報⁵⁾で得られた cDNA クローン pRD112, 84, 367 から制限酵素で cDNA 部分を切り出し M13 のポリリンカー部位にサブクローニングを行った。制限酵素で切断された cDNA は, TAKARA Ligation Kit を用いて DNA 結合反応を行い, 塩化ルビジウム法を用いて大腸菌 JM109 に取り込ませた。即ち, $OD_{600}=0.4\sim 0.6$ になるまで SOB 液体培地 (Difco Bacto tryptone 2 g, Difco Bacto Yeast extract 0.5 g, 1 M 塩化ナトリウム 1 ml, 1 M 塩化カリウム 0.25 ml を滅菌水 100 ml に溶解, 高圧滅菌後濾過滅菌した 1 M 塩化マグネシウム, 1 M 硫酸マグネシウムをそれぞれ 1 ml 加える) 中で培養した大腸菌 JM109 を 5,000 rpm, 5 分の遠心分離により集菌し, TB 緩衝液 (35 mM 酢酸カリウム, 50 mM 塩化カルシウム, 35 mM 酢酸, 45 mM 塩化マンガン 100 mM 塩化ルビジウム, 15% ショ糖) 中に懸濁後, 4,000 rpm, 5 分の遠心分離により再び集菌した後, 1/20 量の TB 緩衝液に懸濁して形質転換に用いた。形質転換反応は, 調整した大腸菌 1 ml に 35 μ l のジメチルスルホキシドを加え氷中に 10 分間静置した後, 結合反応した DNA を加え, 氷中に 40 分間以上静置した。更に, 42°C, 90 秒の処理後, 0.5 ml の SOC 培地を加え 37°C, 30 分静置させた後, 指示菌 (JM 109 $OD_{550}=0.8\sim 1.0$) 200 μ l, 100 mM IPTG 30 μ l, 2% X-gal 30 μ l を加え, 45°C に保温した H 上層寒天培地を 2.5 ml 加え攪拌して H 寒天培地上にプレートした。

プラークの選抜

37°C で生育した透明プラークを液体培地に接種し, 37°C で一晩培養した培養上清を 20 μ l 取り 2% SDS 3 μ l と 1 μ l 泳動用色素 (0.02% ブロムフェノールブルー, 0.02% キシレンシアール, 50% グリセロール) を加え, 0.7% アガロースゲル電気泳動した。

塩基配列の決定

ssDNA の調整は, MESSING⁴⁾ の方法に準じ PEG-塩化ナトリウム法で行った。

塩基配列の決定は, TAKARA シークエンスキットを用いダイデオキシチェンターミネーター法⁸⁾で行った。

RNA 5' 末端の塩基配列の決定

プライマー伸長反応を用いて直接 RNA の塩基配列を決定した。即ち, pRD112 を制限酵素 *Sac I* と *Hind*

III で切断後, アイソトープによる末端標識を行い, 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で +鎖と -鎖に分離した。精製したプライマーは, ゲノム転写産物とアニーリングし逆転写酵素を用いたダイデオキシチェンターミネーター法により RNA の塩基配列を決定した⁹⁾。

実験結果

イネ萎縮ウイルス分節ゲノム 10 番の制限酵素切断地図より Fig. 1 に示す方向に塩基配列の解析を行った結果, pRD112 の 3' 末端側の塩基配列と pRD84 の 5' 末端側の塩基配列は, 共通の塩基配列を持っていた。得られたクローンの全塩基配列は, 1321 塩基対であった

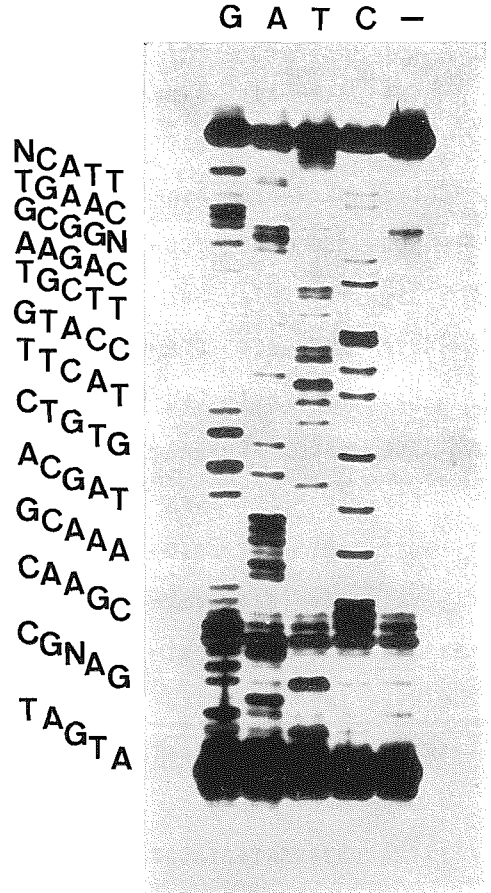


Fig. 3. RNA sequencing of 5' end of segment 10 using reverse transcriptase by dideoxy chain termination method. *Hind III-Sac I* fragment was used as a primer and viral transcripts as a template. Direct reading of a minus sense was shown.

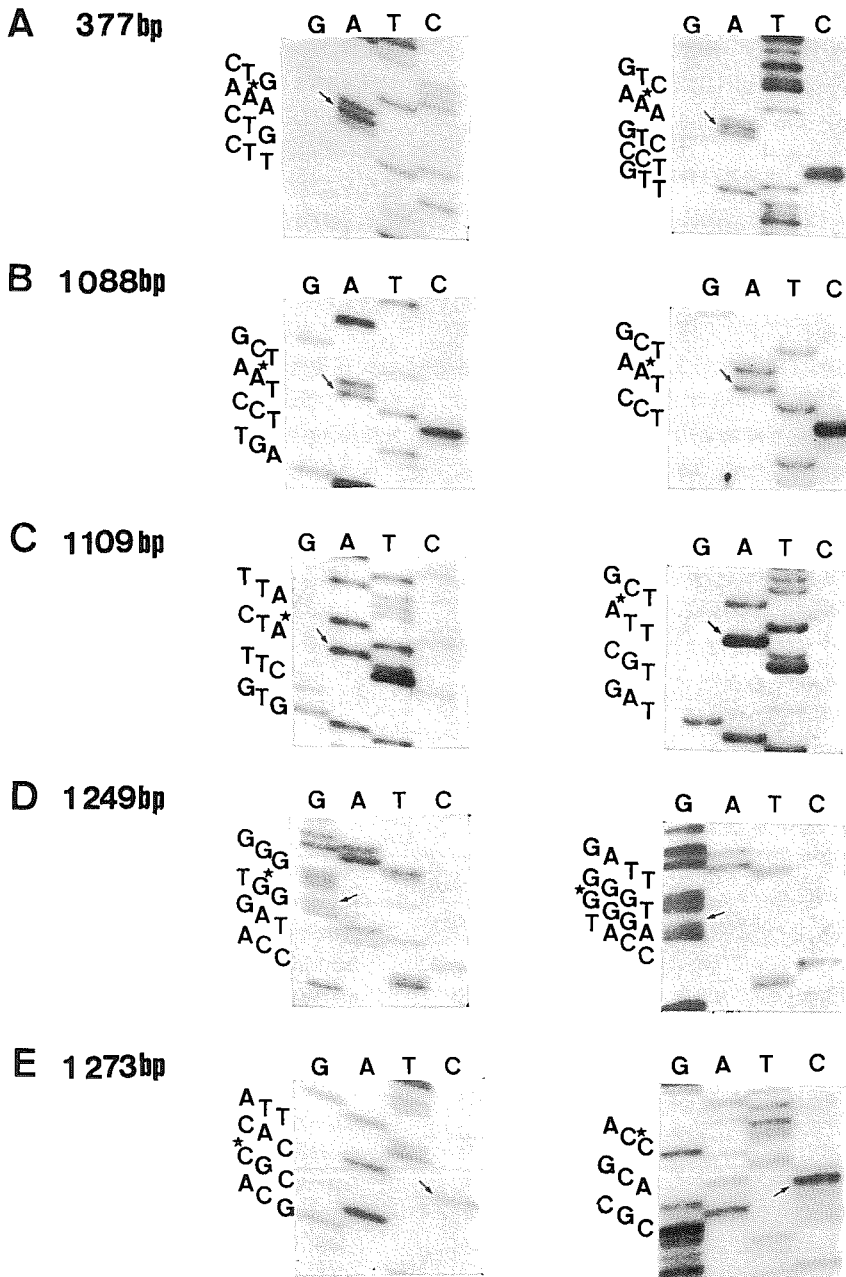


Fig. 4. Portion of the sequencing ladder showing different sequences from those reported by OMURA *et al.*⁶⁾ Numbers indicate the position of the nucleotide. Sequences of cDNAs made from both the genome (right) and transcripts (left) were presented. Reading of the sequence was from either + or - sense of the cDNA. Different sequences at nucleotides (A) 377, (B) 1088, (C) 1109, (D) 1249, (E) 1273 are marked.

(Fig. 2)。更に、プライマーを用いて解析した RNA の塩基配列と pRD112 の 5' 末端部分の塩基配列が全く同じであったことから、pRD112 は分節ゲノム10番の 5' 末端側のクローンであることが明らかになった (Fig. 3)。

論議及び考察

先に著者らは、ゲノム dsRNA より得た cDNA クローン pRD545 の塩基配列を決定し、本クローンが分節ゲノム 10 番の 5' 末端より 1300 番目までの塩基配列を持つことを明らかにした⁹⁾。今回転写産物より得たクローン pRD112, 84 の塩基配列は、pRD545 のそれと完全に一致した。1301 番目から 3' 末端までの塩基配列は、先の報告⁹⁾と同じ転写産物より得た cDNA クローン pRD367 を再度解析したが、1304 番目の塩基 C を見落としていたことが判明した。即ちイネ萎縮ウイルス分節ゲノム 10 番は 1321 塩基対よりなり、5' 末端から 27 番目の AUG を開始コドンとすると 1087 番目の UAA まで一つの長い翻訳領域を持ち、分子量約 39 K のポリペプチドをコードすると推測された。また 27 番目の開始コドンは KOZAK²⁾ の提唱する“強い”ものであった。この塩基配列は、OMURA⁶⁾ 等が報告した分節ゲノム 10 番の塩基配列と比較して 3 カ所で置換、2 カ所で挿入が認められた (Figs. 2, 4)。しかし、これらの変異は 1 カ所を除いて全て 3' 末端側の非翻訳領域であり、しかもアミノ酸翻訳領域での変異はコドンの 3 番目であり変異によっても翻訳されるアミノ酸に変化はなかった。このことから、同じイネ萎縮ウイルスに於いてもアミノ酸の翻訳に影響のない部分で RNA の変異が起きている可能性が示唆された。又、イネ萎縮ウイルスと同じ植物レオウイルスのサブグループ 1 に属する wound tumor virus の分節ゲノム 12 番の塩基配列¹⁾と比較すると 5' 末端の最初の 4 塩基と 3' 末端の最後の 4 塩基の配列が全く同じであったことは、少なくともレオウイルスの同じサブグループ内のウイルスゲノムにこの塩基が保存されている可能性があると思われる。又、ウイルスの各分節ゲノム間にも同様な保存された塩基配列が存在するのにか更に研究する必要があると思われる。

摘 要

1. pRD112, pRD84, pRD367 の各クローンを制限酵素で切断、M13 ファージのポリリンカー部位と DNA 結合反応を行った後、大腸菌 JM109 を形質転換させた。

2. M13 ファージ、サブクローンから PEG-塩化ナトリウム法により ssDNA を精製し、塩基配列解析の鋳型

に用いダイデオキシシチエンターミネーター法により塩基配列の解析を行った結果、得られたクローンの全塩基配列は 1321 塩基であった。

3. pRD112 の制限酵素 *Hind III-Sac I* 断片をプライマーに用いてイネ萎縮ウイルスゲノム転写産物の塩基配列を直接決定した結果、転写産物の 5' 末端の塩基配列と pRD112 の 5' 末端側の塩基配列が同じであった。即ち、pRD112 は 5' 末端の最初の 1 塩基目からの cDNA を含んでいた。

4. イネ萎縮ウイルスゲノム転写産物10番は、5' 末端から 27 塩基目の AUG から 1087 塩基目の UAA までの一つの翻訳領域を持ち、翻訳産物の分子量は約 39 K と推測された。

5. 今回決定された分節ゲノム 10 番の塩基配列は、OMURA らによって得られた結果とは 5 塩基の違いが認められ、その内の一つはアミノ酸翻訳領域であったが、翻訳されるアミノ酸に変化はなかった。又、同じ植物レオウイルスのサブグループ 1 に属する wound tumor virus の分節ゲノム 12 番の塩基配列と比較した結果 5' 及び 3' 末端の 4 塩基の配列が保存されていた。

引用文献

1. ASAMIZU, T., SUMMERS, D. MOTIKA, M. B. ANZORA, J. V. and NUSS, D. L.: Molecular cloning and characterization of the genome of wound tumor virus: a tumor-inducing plant reovirus. *Virology* **144**: 398-409. 1985
2. KOZAK, M.: Point mutation define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by Eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292. 1986
3. MESH, T., ISHIKAWA, M., TAKAMATSU, N. OHNO, T. and OKADA, Y.: The 5'-terminal sequence of TMV RNA question on the polymorphism found in *wargare* strain. *FEBS letters* **162**: 282-285. 1983
4. MESSING, J.: New vectors for cloning gene. *Methods in Enzymology* **101**, 20-122. 1983
5. 松村 健・上田一郎・四方英四郎: イネ萎縮ウイルスゲノム cDNA を用いたハイブリダイゼーションによる分節ゲノム 10 番の特異的検出. 北大農学部紀要, **16**: 199-204. 1988
6. OMURA, T. MINOBE, Y. and TSUCHIZAKI, T.: Nucleotide sequence of segment 10 of the Rice Dwarf Virus Genome. *J. gen. Viol.* **69**, 227-231. 1988
7. RHODE, W., SCHNOLZER, M., RACKWITZ, H.

- R., HASS, B. SELIGER, H. and SANGER, H. L.: Specifically primed synthesis *in vitro* of full-length DNA complementary to potato-spindle-tuber-viroid. *Eur. J. Biochem.* **118**: 151-157. 1981
8. SANGER, F. and COULSON, A. R.: A rapid Method for determining sequences in DNA by primed synthesis. *J. Mol. Biol.* **94**: 441. 1975
9. UYEDA, I., MATSUMURA, T., SANO, T., OHSHIMA, K. and E. SHIKATA. Nucleotide sequence of Rice Dwarf Virus genome segment 10. *Proc. Japan Academy* **63**: 227-230. 1987

Summary

Plasmids which have cDNA of RDV segment 10, pRD84, pRD112, pRD367 were digested with

restriction endonucleases and subcloned to M13 phage for nucleotide sequencing. Subcloned phages were sequenced by dideoxy chain terminator method. RDV segment 10 transcript was 1321 nucleotides and had a long open reading frame started from the first AUG codon to 1087th UAA. It was found that the previous sequencing of the segment⁹⁾ missed C residue at the position of 1304th nucleotide. The other sequence of RDV segment 10 reported by OMURA *et al.*⁶⁾ had 4 different nucleotides in down stream of the open reading frame and one nucleotide change in the open reading frame with no change of amino acid.

First and last 4 nucleotides were identical to wound tumor virus genome segment 12 which belongs to the same plant reovirus subgroup 1.