



Title	イネ萎縮ウイルスとイネラギッドスタントウイルスの2本鎖 RNA に関する研究
Author(s)	李, 相龍; Lee, Sang Yong; 上田, 一郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(1), 129-161
Issue Date	1988-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12088
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(1)_p129-161.pdf



イネ萎縮ウイルスとイネラギッドスタント
ウイルスの2本鎖 RNA に関する研究

李 相龍・上田 一郎・四方英四郎

(北海道大学農学部植物学教室)

(昭和63年1月13日受理)

Studies on Double-Stranded RNA of Rice Dwarf
and Rice Ragged Stunt Viruses

Sang Yong LEE, Ichiro UYEDA
and Eishiro SHIKATA

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

目 次

第1章 緒 論	130	第3節 実験結果	137
第2章 蔗糖密度勾配遠心分離で得られた 4種類の RDV 粒子	130	1. 5'末端の標識	137
第1節 緒 言	130	2. ペーパークロマトグラフィー	137
第2節 実験材料および方法	130	第4節 考 察	138
1. ウイルスの純化	130	第4章 RRSV 粒子由来の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ	139
2. PAGE	130	第1節 緒 言	139
3. ポリメラーゼ反応	131	第2節 実験材料および方法	139
第3節 実験結果	131	1. ウイルスの純化	139
1. 蔗糖密度勾配遠心分離による4種類 の粒子の分離	131	2. 反応条件	139
2. 電顕による観察	133	3. 核酸の抽出	139
3. 核酸の PAGE	133	4. ハイブリダイゼーション	139
4. disc PAGE による蛋白質の分析	133	第3節 実験結果	139
5. 各粒子のポリメラーゼ活性の比較	134	1. 純化ウイルスのポリメラーゼ活性	139
6. EDTA 処理による B2 粒子の B1 粒子への位置変換	134	2. 最適反応条件	140
第4節 考 察	136	3. キモトリプシン処理による 活性の増加	141
第3章 RDV ゲノムの 5'末端解析	136	4. ハイブリダイゼーション	142
第1節 緒 言	136	第4節 考 察	142
第2節 実験材料および方法	136	第5章 RRS Vゲノム dsRNA の電顕による 分子量測定	144
1. ゲノム dsRNA の抽出	136	第1節 緒 言	144
2. 5'末端の標識	137	第2節 実験材料および方法	144
3. RNase P1 による dsRNA の分解	137	1. dsRNA の抽出と分離	144
4. ペーパークロマトグラフィー	137	2. シトクロム C 分子膜	144
		3. 検 鏡	147
		第3節 実験結果	147

1. 検 鏡	147
2. 分子量の測定	147
3. PAGE から算出した分子量との 比較	147
第4節 考 察	148
第6章 RRSV RNA のクローニングと 分節ゲノム No.9 の塩基配列決定	148
第1節 緒 言	148
第2節 実験材料および方法	148
1. RNA の抽出	148
2. cDNA の合成	149
3. 形質転換	149
4. DNA の抽出	149
5. ハイブリダイゼーション	149
6. シークエンス	149
第3節 実験結果	149
1. cDNA の分析	149
2. cDNA の選別	150
3. pRRS9 の制限酵素による 切断地図作成	151
4. pRRS9 の塩基配列決定	153
第4節 考 察	155
摘 要	155
引用文献	157
Summary	160

第1章 緒 論

植物レオウイルスは直径約60~70 nmの球形粒子であり^{27,29,42,43,72,75}、10~12本に分節される2本鎖RNAゲノムを有することから動物レオウイルスと類似性が認められ、植物レオウイルスと命名されている^{14,25,46,47,74}。

また、植物レオウイルスは昆虫体内で増殖して植物に伝染されること、すなわち昆虫と植物の両宿主体内で増殖する性質を持っていることが初めて明らかにされ^{15,16,17}、その当時の植物ウイルス学において新しい時代を開くことになった。最近の分子生物学の知見で見ると、植物細胞と動物細胞では遺伝子発現に関与するmRNAの構造には明らかな差が認められるので、植物レオウイルスは昆虫と植物体内での増殖機作を分子レベルで解明するのに興味深いウイルスである。

現在植物レオウイルスは、それらの粒子構造、ゲノム分節数、及び媒介昆虫の種類から subgroup 1・2・3に分類されているが⁸、各ウイルスによってその研究の進展度には大きな差がある。その中で wound tumor

virus (WTV) はすでに全分節ゲノムの両末端の塩基配列が決められたとともに分節ゲノム No. 12の全塩基配列が決定された²。また、イネ萎縮ウイルスでは分節ゲノム No. 10の全塩基配列が決定されるに至っている⁸⁸。

本研究では、植物レオウイルス subgroup 1に属するイネ萎縮ウイルス (RDV) と subgroup 3に属するイネラギッドスタントウイルス (RRSV) の2本鎖RNAに関して実験を行い、まず RDV に対しては蔗糖密度勾配遠心分離で得られた4層のバンドの中の粒子を分離し、各層粒子の諸性質を分析を行うとともにゲノムRNAの5'末端の塩基を決定した。一方 RRSV に対しては各分節ゲノムの分子量を電顕を用いて測定し、すでにポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いて測定された分子量と比較検討した。また、RRSV 粒子由来のRNA依存RNAポリメラーゼを同定し、そのポリメラーゼによって合成された転写産物を用いて cDNA を合成、その中で分節ゲノム No. 9の塩基配列を決定した。

第2章 蔗糖密度勾配遠心分離で得られた4種類の RDV 粒子

第1節 緒 言

NAKATA^ら⁵⁷)はRDV粒子をCsCl密度勾配遠心分離によってT1, M1, M2, Bの4種類の粒子に分け、それら粒子の構成蛋白とポリメラーゼ活性との関連性を示唆した。

本章では蔗糖密度勾配遠心分離によって得られたRDVの各粒子についてゲノム、構成蛋白質及びポリメラーゼ活性に関して比較検討した。

第2節 実験材料および方法

1. ウイルスの純化

ウイルス源は、RDV感染イネから2令期のツマグロヨコバイ (*Nephotettix cinciticeps* Uhl.) に獲得させ、4令期から親虫になったところで2~3葉期のイネ(農林8号)に放餌して接種した。感染したイネは3~4カ月後刈り取って-80°Cで保存し、UYEDA and SHIKATA⁸⁹)の方法に従ってRDVを純化した。

2. PAGE

電気泳動にはスラブゲル(19×20×0.15 cm)を用いた。核酸の分析には5%ポリアクリルアミドゲルを用いて20 mA, 40時間電気泳動を行った。緩衝液はLEONING⁴⁰)の緩衝液であった。

ウイルス構成蛋白質の分析にはMAIZEL⁴⁴)のdisc PAGEを用いて行った。stacking ゲルは3%, separation ゲルは10%ゲルで、緩衝液は0.05 M トリス, 0.38

M グリシン, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) であった。泳動は100 V で7時間行った。

3. ポリメラーゼ反応

各粒子のポリメラーゼ活性は UYEDA and SHIKATA⁹⁰⁾ の反応液の中で 35°C, 1~2 時間反応させた後, 反応産物の中に取込まれた α -³²P UTP の活性によって測定した。測定方法は, 各反応液から 5 μ l をガラスマイクロフィルタ (GF/C, 2.4 cm) に吸収させ, このフィルタを 5% trichloro acetic acid (TCA), 10 mM ピロリン酸ナトリウム 10~20 ml で 5 分間 4 回洗浄後, エタノールで洗滌, 乾燥させ toluene based scintillator で cpm を測定した。

第3節 実験結果

1. 蔗糖密度勾配遠心分離による4種類の粒子の分離

50 g の RDV 感染イネ組織から部分純化したウイルスより 10~40% の蔗糖密度勾配遠心分離によって各粒子を分離した。Fig. 1 は RPS 25 ロータで 25,000 rpm, 1 時間遠心分離した後の遠心チューブ内での分離パターンを示し, 各粒子の4つのバンドが見える。各バンドは上からそれぞれ Top 1 (T1) Top 2 (T2), Bottom 1 (B1), Bottom (B2) と名付けた。

遠心分離した各粒子は ISCO で分取し, T 粒子は $OD_{254} = 1.935$ で, B 粒子の $OD_{254} = 5.67$ に比べると約

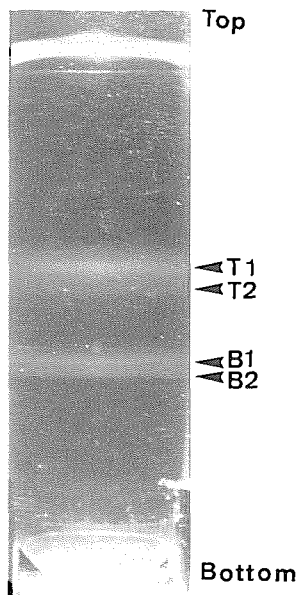


Fig. 1. Sedimentation pattern of RDV particles after 10-40% sucrose density gradient centrifugation for 1 hr at 25,000 rpm (Hitachi RPS-25 rotor).

1/3 の値であった。また T1 と T2, B1 と B2 はきわめて近接しているため各分画を分けるには Fig. 2 のように各粒子の ISCO 上でのピーク (矢印) 部分に分取した後, 高速遠心分離によって沈澱させ, さらに 10~40%

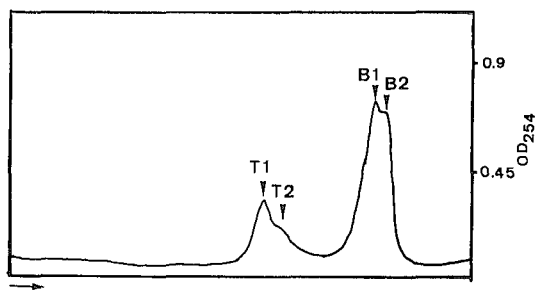


Fig. 2. Ultraviolet absorption pattern of RDV particles in density gradient fractionator (ISCO, Model UA-2). RDV particles were centrifuged in 10-40% sucrose density gradient, and fractionated. Arrow represents the direction of sedimentation.

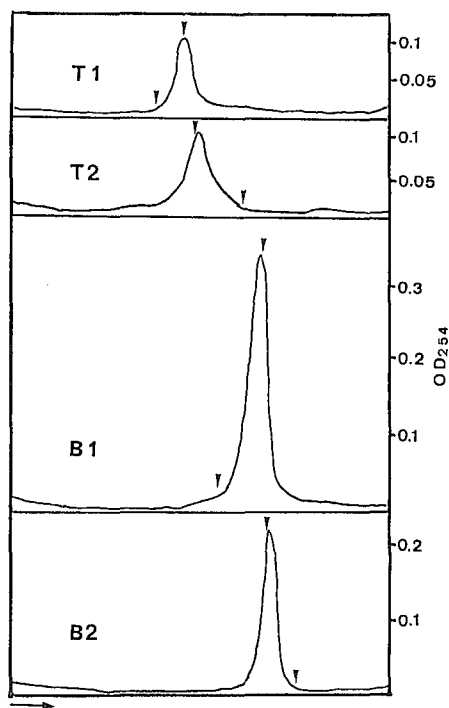


Fig. 3. Ultraviolet absorption patterns of RDV particles separated by 2nd 10-40% sucrose density gradient centrifugation. Arrow represents the direction of sedimentation. Arrow heads represent the collected zone of each particle.

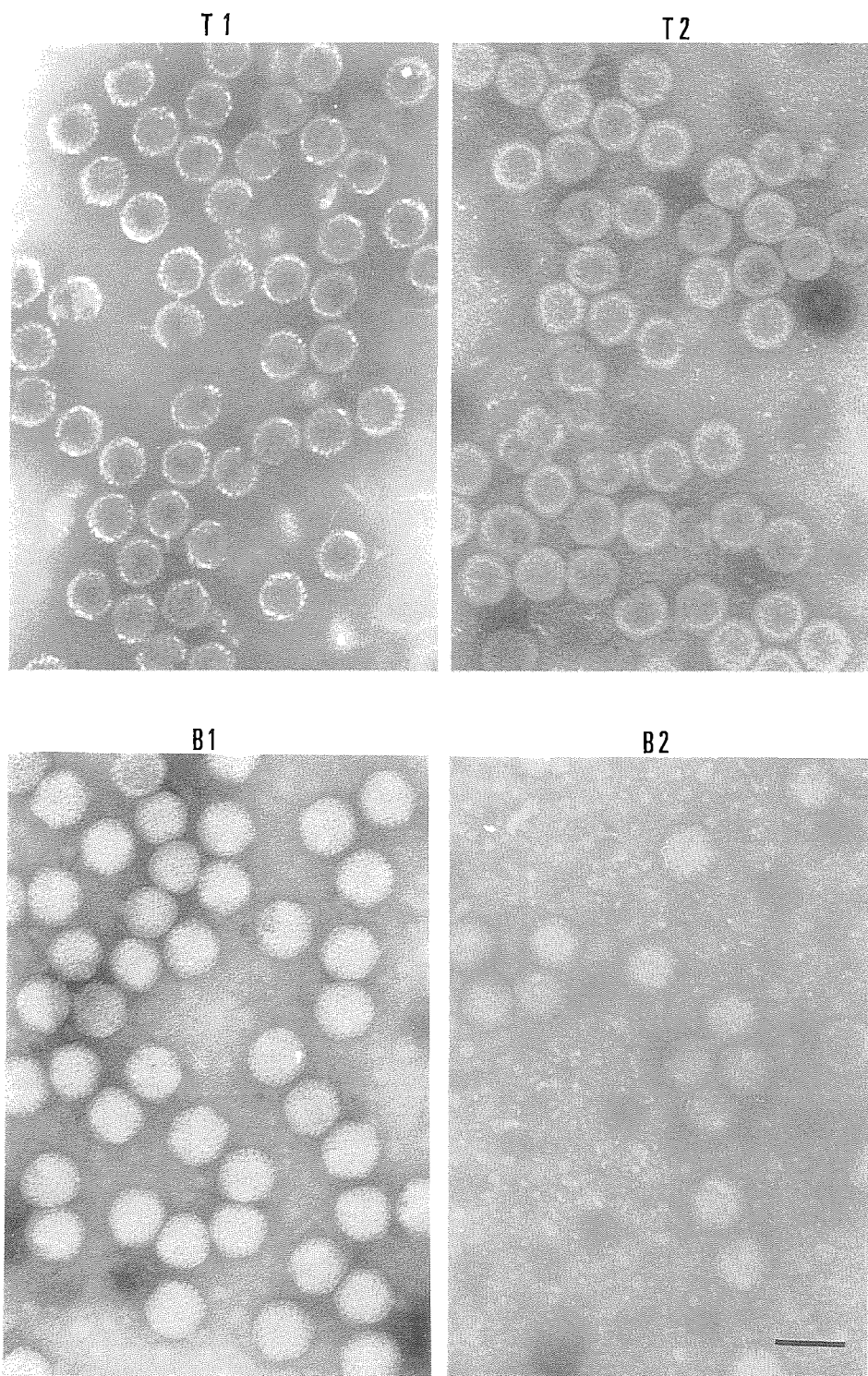


Fig. 4. Electron micrographs of RDV particles prepared after 2nd 10-40% sucrose density gradient centrifugation. Bar=100 nm.

の蔗糖密度勾配遠心分離した。

Fig. 3 は 2 回の蔗糖密度勾配遠心分離から成る ISCO 上での各粒子の分離パターンである。各粒子のピークは、その分離位置から見て完全に分離されたことが分かるが、T1 の後部と T2 の前部、B1 の後部と B2 の前部は混合状態であった。そこで、最終的に高速遠心分離でそれぞれのピーク部分 (矢印) のみ分取して沈澱させた。

2. 電顕による観察

2 回の蔗糖密度勾配遠心分離から得られた各粒子の構造を電顕で観察した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁した各粒子はカーボン蒸着と親水処理したホルムバル膜のグリッド (150 メッシュ) にのせ、2% の PTA (pH 6.0) で 3~5 分間染色し、同上の緩衝液で洗浄し検鏡した。検鏡に用いた電顕は JEM 100-B で、検鏡倍率は 20,000 倍であった。

その結果 Fig. 4 のように粒子、T1 は全粒子が、核酸を欠損している中空粒子、T2 粒子は僅かの核酸を含んでいる半中空粒子であった。また B1 と B2 粒子は粒子構造の差が見られず、両者とも核酸を含んでいる完全粒子であった。また、各粒子の直径は 4 種類ともに約 70 nm でその差は認められなかった。

3. 核酸の PAGE

各粒子の核酸の分析には 5% PAGE を用いた。各粒子 (約 2 μ g) は 0.1 M トリス塩酸 (pH 8.0)、1% SDS、0.1 M NaCl、2 mM EDTA で 40°C、15 分間放置し蛋白質を分解した後、フェノール:クロロホルム (1:1) で 2 回処理した。水相の核酸は 2.5 倍量のエタノールと 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え -30°C で 1 晩放置し、15,000 rpm で 5 分間遠心分離によって沈澱させた。電気泳動は 15 μ l の蒸留水に懸濁した核酸に 3 μ l の色素 (1% ブロモフェノールブルー、1% クサンシアノール、50% グリセロール) を加え、20 mA で 40 時間行った。泳動後ゲルは 1 μ g/ml のエチジウムブロマイドで染色、トランスイルミネータを用いて発色させ、撮影した。

その結果、Fig. 5 のように T1 粒子では核酸が検出されず、T2、B1、B2 粒子では量的な差はあるが、12 本の分節ゲノムすべてが検出された。ただし、分節ゲノム No. 11 と 12 は 1 つのバンドに見える。

4. disc PAGE TCA による蛋白質の分析

各ウイルス粒子は電気泳動のため、10% の TCA で 0°C 30 分間放置、低速遠心分離によって沈澱させ、5% TCA で 1 回、アセトンで 1 回洗滌した⁴⁾。得られた蛋白質は、1% SDS、1% 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール、2 mM EDTA、0.05 M トリス塩酸 (pH

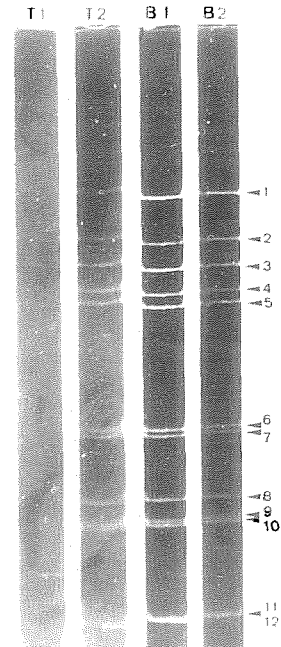


Fig. 5. Analysis of genome dsRNAs extracted from RDV particles. Genome dsRNAs were extracted as described in the text and separated in 5% PAGE for 40 hrs at 20 mA.

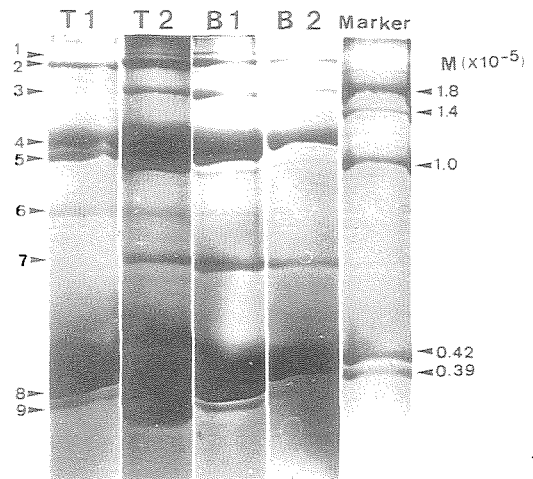


Fig. 6. Analysis of structural proteins of RDV particles. Proteins of RDV virions were prepared as described in the text and separated in disc-PAGE for 7 hrs at 100 V.

6.7) に溶し, 100°C で 90 秒間放置後電気泳動を行った。泳動時間は 100 V で 7 時間であった。泳動後ゲルはクマシーブリリアントブルー R 液 (2% クマシーブリリアントブルー R, 50% メタノール, 20% 酢酸) で 30 分間染色, 5% メタノール, 7% 酢酸で 14 時間脱色した。Fig. 6 は各粒子の構成蛋白質の分離パターンである。その時の分子量のマーカーは SDS-PAGE マーカー (Biochemical Tokyo) を使った。

その結果から検出された構成蛋白質は 9 種類で, その分子量は, 1: 184 K, 2: 178 K, 3: 159 K, 4: 122 K, 5: 109 K, 6: 83 K, 7: 65 K, 8: 38 K, 9: 36 K であった。各粒子における構成蛋白質の差を見ると, T 2, B 1, B 2 粒子は 9 つのすべての蛋白質が検出され, その中で 6 (83 K) の蛋白質は T 1 または T 2 のバンドの濃さと比べて B 粒子のバンドは非常に薄かった。また中空粒子である T 1 粒子の場合は, 1 (184 K), 3 (159 K), 7 (65 K) の蛋白質が欠損しており, それらをコア蛋白質であることを示唆している。NAKATA ら⁵⁷⁾ のコア蛋白質は I (193K), III (131K), V (62K) であった。また NAKATA ら⁵⁷⁾ は完全粒子のみを実験に用いて 7 種類の構成蛋白質を検出したことに対して本実験では完全粒子である B 1, B 2 では薄く, 中空粒子である T 1, T 2 で濃いバンドの 2 種類の蛋白質 (178 K, 83 K) を新しく検出した。

Table 1 は SDS-PAGE マーカーの分子量から算出した各構成蛋白質の分子量であって, これらを NAKATA の結果と比較した。

5. 各粒子のポリメラーゼ活性の比較

4 種類粒子のポリメラーゼ活性を測定するため, 2 回

Table 1. Structural proteins of RDV virions obtained on disc-PAGE and their comparison to those previously reported

No.	Mr	No. ¹⁾	Mr	Location
1	184K	I	193K	core
2	178K			
3	159K	II	152K	outer protein layer
4	122K	III	131K	core
5	109K	IV	110K	outer protein layer
6	83K			
7	65K	V	62K	core
8	38K	VI	46K	underlying capsomere
9	36K	VII	45K	underlying capsomere

1) NAKATA *et al.* (1978)

Table 2. Polymerase activity of RDV particles

RDV particle	cpm	
	1st experiment	2nd experiment
T 1	15	/
T 2	20	/
B 1	7470	10762
B 2	3780	3078

の蔗糖密度勾配遠心分離によって分離された各粒子 10 μ g を反応液の中で 1 時間反応させ, それらの活性は 50 μ l の反応液から 5 μ l を取り, 取り込まれた cpm の測定によって比較した。その結果 Table 2 のように, T 1, T 2 粒子には活性がなく, B 1, B 2 粒子には活性が認められたが, B 1 粒子の活性は B 2 粒子の 2~3 倍であった。

以上の結果から見ると, ポリメラーゼ活性は B 1 粒子に集中しており, 前述したように 2 回の蔗糖密度勾配遠心分離によって各粒子を完全に分離するのは不可能である点から考えると Table 2 における B 2 粒子の活性も B 1 から由来したものではないかと考えられる。そこで, 2 回の蔗糖密度勾配遠心分離後, B 1, B 2 粒子を ISCO を用いて 0.3 ml ずつ 10 分画を取り, 各分画 5 μ l が持つポリメラーゼ活性を一定量のウイルス (OD₂₆₀=0.05) 当り cpm に換算して見た (Fig. 7)。その結果 B 2 粒子の場合, B 1 粒子の分画に近くなるほど活性が高くなり, 結局ポリメラーゼ活性は B 1 粒子と強い相関を示した。

6. EDTA 処理による B 2 粒子の B 1 粒子への位置交換

レオウイルスはキモトリプシンによって粒子の外被蛋白質が分離され, ポリメラーゼが活性化する^{10,32,73)}, また heat shock によるポリメラーゼの活性化の報告もある¹¹⁾。ロタウイルスの場合も heat shock, または EDTA 処理によるポリメラーゼ活性化の報告がある⁸⁴⁾。

4 種類の RDV 粒子のポリメラーゼ活性を調べた結果, その活性は B 1 に集中しており, 電顕によって粒子構造の差が認められない B 2 粒子では活性が少ないことが分かった。そこで, B 2 粒子のポリメラーゼ活性の増加, または粒子構造の変化を与えるため, B 粒子を heat shock, EDTA またはキモトリプシン処理をし, 蔗糖密度勾配遠心分離での分離パターンの変化とポリメラーゼ活性の変化を試した。

キモトリプシン処理条件は 10 mg/ml キモトリプシン

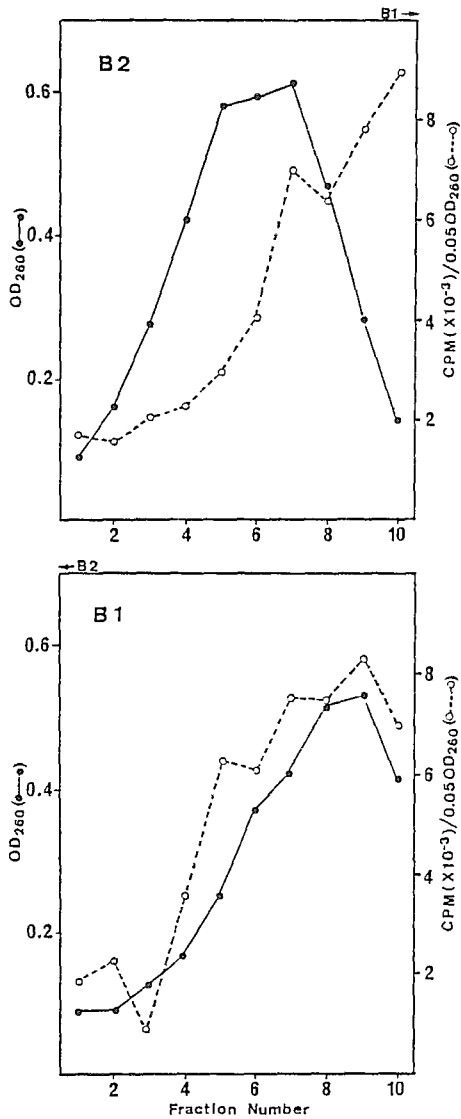


Fig. 7. Polymerase activity of RDV B1 and B2 particle. Each particle was prepared after 2nd 10-40% sucrose density gradient centrifugation and fractionated to 0.3 ml/fraction. Reaction mixture was described in text.

ン, 0.15 M NaCl, 10 mM トリス-塩酸 (pH 8.0) で 38°C, 1 時間行った。heat shock の条件は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 70°C, 40 秒間放置した。EDTA 処理条件は 10 mM EDTA, 10 mM トリス-塩酸 (pH 8.0) で 38°C, 40 分間放置した。各処理に用いられたウイルスの量は 0.1 mg で, 反応系は 1 ml であった。

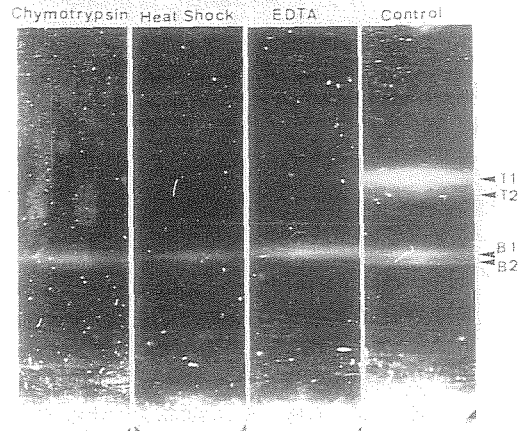


Fig. 8. Sedimentation patterns of RDV B particle treated with chymotrypsin, heat shock and EDTA after 10-40% sucrose density gradient centrifugation.

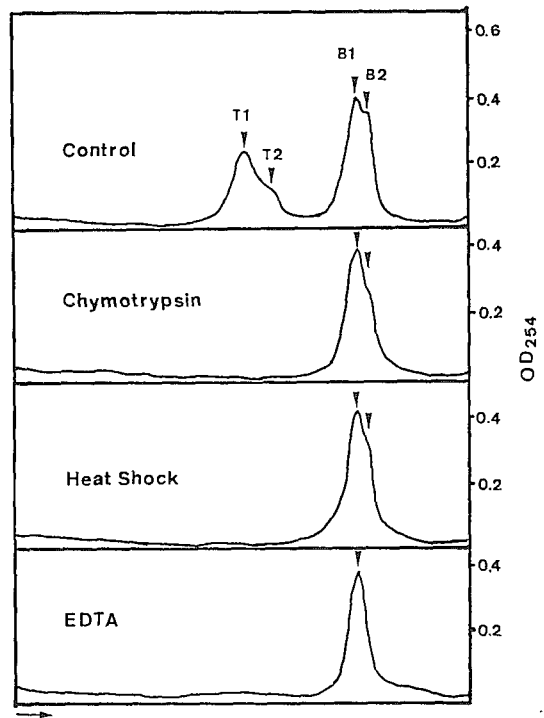


Fig. 9. Ultraviolet absorption patterns of RDV B particle treated with chymotrypsin, heat shock and EDTA in density gradient fractionator (ISCO, Model UA-2). Arrow represents the direction of sedimentation. Arrow heads represent RDV B1 and B2 particle zone respectively.

得られた dsRNA はイオン交換樹脂を用いてさらに精製した。すなわち、5 M 尿素、25 mM トリス塩酸 (pH 8.0) で懸濁した Sephadex A-25 カラム (直径 10 mm, 長さ 20 cm) に dsRNA 約 100 μ g を吸着させ、同上の緩衝液でカラムを洗い、多糖類等を除去した後、0.5 M NaCl, 5 M 尿素、25 mM トリス-塩酸 (pH 8.0) で dsRNA を溶出させた。溶出液は 1 ml ずつ分画を取り、各分画の吸光値を測定することによって dsRNA 分画を選別した。

2. 5' 末端の標識

dsRNA 5' 末端の標識は MAXAM and GILBERT⁴⁸⁾ の方法に従って行った。精製された dsRNA は calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) を用いて 5' 末端を脱リン酸化させた。脱リン酸化した dsRNA は T₄ polynucleotide kinase によって 5' 末端を γ -³²P ATP で標識した。標識された dsRNA は 10 mM トリス-塩酸 (pH 8.0), 1 mM EDTA で懸濁した Sephadex G-50 カラム (直径 0.3 cm, 長さ 3 cm) を通して遊離の ³²P を除去した。

3. RNase P₁ による dsRNA の分解

5' 末端の塩基を解析するため用いられた RNA 分解酵素は RNase P₁ (penicillium nuclease) であった。この酵素は非特異的な RNase の 1 種類で、5' 末端のリン酸基を残しながら RNA を分解するので、5' 末端を ³²P で標識した時、この酵素で分解することによってその塩基の解析が可能になる⁵⁶⁾。

³²P で標識した dsRNA 3 μ g は RNase P₁ で分解する前に 20 μ l の蒸留水に溶し、100°C で 4 分間熱処理した後 0°C に急冷、2 本鎖の RNA を 1 本鎖に変性した。変性の RNA にはキャリアとして *Escherichia coli* (*E. coli*) のトランスファー RNA (tRNA) 50 μ g を加え RNase P₁ 分解反応を行った。反応条件は 20 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 50 μ l に RNase P₁ 5 μ g を加え 37°C 19 時間でであった。

4. ペーパークロマトグラフィー

RNase P₁ 分解によって得られる mononucleotide は二次元展開のペーパークロマトグラフィー法に従って分析した。分解 RNA 25 μ l (1~5 \times 10⁴ cpm) を一次元展開液、イソ酪酸: アンモニア水 (5:3) に飽和させた Whatman 3 MM ペーパー (30 \times 30 cm) に吸収させ、同上の展開液の中で 23 時間展開させた。一次元展開が終ったペーパーは室温で 13 時間乾燥させた後、二次元展開イソプロパノール: 塩酸: 蒸留水 (70:15:15), を 35 時間行った。二次元展開が終ったペーパーは室温で 5~

6 時間乾燥させた後、X-線フィルムを用いてオートラジオグラフをとって、mononucleotide の移動位置を分析することによって 5' 末端の塩基を決定した。マーカーとして pA, pG, pC, pU (P-L Biochemical) が用いられた。

第3節 実験結果

1. 5' 末端を ³²P で標識した dsRNA は Sephadex G-50 カラムを通して遊離の ³²P を除去、精製した後、5% PAGE を用いて、その分析を行った。Fig. 10 はその時のオートラジオグラフであって、12 本の分節ゲノムすべてが標識されたことが分る。

2. ペーパークロマトグラフィー

RNase P₁ で分解された 5' 末端標識 RNA は二次元展開ペーパークロマトグラフィーによって分解産物を解析した。ペーパークロマトグラフィーでの分離パターンは 4 種類の塩基を用いて決定した。その分離パターンは、一次元展開では pA と pC が完全に分離されるが、pG と pU は同一の位置で検出される。しかし、pG と pU は二次元展開によって分離ができ、その結果 4 つの塩基のペーパーでの移動位置が可能になる (Fig. 11, A)。

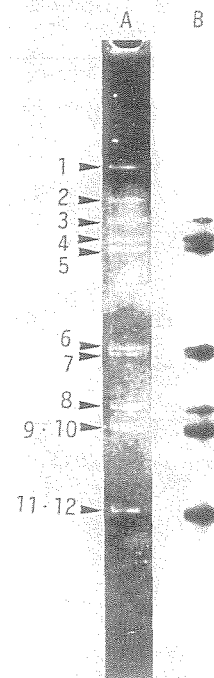


Fig. 10. Analysis of genome dsRNA (A), and ³²P-labeled genome dsRNA of RDV (B) by 5% PAGE for 24 hrs at 35 mA.

Fig. 11. B は RNase P₁ で分解した 5' 末端標識 RNA を二次元展開後、オートラジオグラフをとった結果であって、pA が最も強い感度をもって検出され、また pG もわずかながらも検出された。

分離された4種類塩基は Whatman 3MM ペーパーでのそれらの移動部位を切り出し、その cpm を測定した (Table 4)。その結果、pA は総標識活性の50%に至っていて、また pG にも 20~25% の標識活性が確認さ

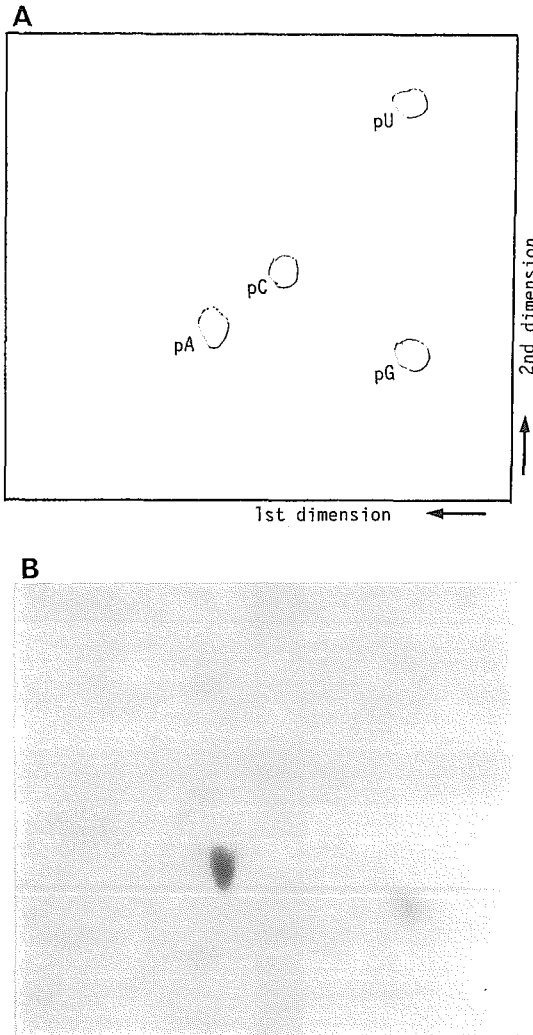
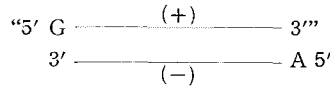


Fig. 11. Two-dimensional paper chromatography of the RNase P₁ digested products of RDV 5' ³²P-labeled RNA. The chromatogram of nucleotides was identified from the ultraviolet absorption of added markers (A). (B) is autoradiograph of the chromatogram.

れた。

以上の結果から RDV ゲノム dsRNA の 5' 末端の塩基は (-) 鎖が A であり, (+) 鎖の 5' 末端は何かの原因で一部のキャップ構造がなくなったのでキャップ構造の次の塩基が標識され, その結果 G が検出されたと考えられる。



第4節 考 察

MIURA⁵⁴⁾ は RDV ゲノム dsRNA の 5' 末端がキャップ構造であろうと推定した。

本実験の結果 RDV ゲノム sdRNA の 5' 末端に標識する時, (+) 鎖の 5' 末端がキャップ構造であると, (-) 鎖の 5' 末端のみに標識されるはずである。しかし、ペーパークロマトグラフィーによって 5' 末端の ³²P 標識塩基を分離した時、pA が50%の標識活性をもって検出されたとともに pG にも 23% の相対標識活性が検出された。もし、(+) 鎖の 5' 末端が非キャップ構造であれば、検出される種類の塩基がもつ標識活性は同量のはずである。そこで、考えられることは、ゲノム dsRNA のうち一部の (+) 鎖の 5' 末端はキャップ構造でない可能性がある。

SKUP ら^{78,79,80)} はレオウィルスの複製 cycle の中で感染初期にはキャップ構造をもっている mRNA が転写されるが、感染後期にはキャップをもっていない mRNA が転写されるという、キャップ依存転写と非キャップ依存転写の機作を明らかにした。RDV の複製 cycle に関してはまた充分な解析がないが、本実験の結果からみて、非キャップ構造のゲノム RNA が産生される可能性もありえるのではないかと思う。

また MIURA⁵⁴⁾ は RDV ゲノム dsRNA のキャップ構造の次の塩基が A で, (-) 鎖の 5' 末端が G であろう

Table 4. Radioactivity of nucleotide obtained from paper chromatography

Nucleotide	cpm		%
	1st experiment	2nd experiment	
pA	25570	3669	52
pC	6392	888	12
pG	10602	2162	23
pU	6976	1041	13
Total	49540	7767	100

と推定したが、本実験の結果はその反対で、キャップ構造の次の塩基が G で、(-)鎖の 5' 末端が A であったこの結果は UYEDA ら⁸⁸⁾ が RDV 分節ゲノム No. 10 の cDNA から決定した末端の塩基と一致した。

第4章 RRSV 粒子由来の dsRNA 依存 RNA ポリメラーゼ

第1節 緒言

RRSV は直径約 65 nm の球形のウイルスであり、その外被蛋白は inner capsid と spike をもつ不安定の outer capsid で構成されている点から CPV の粒子構造と類似性がある^{13,52,64,75)}。

RRSV のゲノムは分子量 $0.5\sim 2.7\times 10^6$ の 10 本に分節した dsRNA であり^{9,34,63)}、植物レオウイルス subgroup 3 に属する唯一のウイルスである⁸⁾。

植物レオウイルス粒子は RNA ポリメラーゼ活性をもつことが一般であって、subgroup 1 では WTV^{4,59,68)}、RDV^{38,39)}、rice gall dwarf virus (RGDV)³⁹⁾ で、また subgroup 2 では fiji disease virus (FDV)³¹⁾ でポリメラーゼ活性に関する報告がある。

本章では RRSV 粒子由来の RNA ポリメラーゼ活性を確認するとともに、*in vitro* での最適反応条件を明らかにし、その諸性質を他の植物レオウイルスの場合と比較した。

第2節 実験材料および方法

1. ウイルスの純化

RRSV は感染植物から 2 令期のトビイロウンカ (*Nilaparvata lugens* Stål) に 3~7 日間獲得させ、親虫になった時に 4~5 葉期のイネ (金南風) に放飼、接種した。感染イネは 3 カ月以上成長させてから刈り取り、ウイルスの純化に用いた。

ウイルスの純化は、感染イネ 50 g に 200 ml のリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) と 40 ml の CCl_4 を加え磨砕、攪拌、低速遠心分離した得られた。粗汁液に 40 ml のフレオンを加え 6°C で 3 分間攪拌し、さらに低速遠心分離した。次は 3% のトリトン M-100 を水相に加え 6°C で 1 時間攪拌、低速遠心分離によって得られた水相のウイルスは 20% 蔗糖クッションを用いて 4°C で 25,000 rpm、1 時間遠心分離し沈澱させた。沈澱したウイルスは 10 mM トリス-塩酸 (pH 8.0) に懸濁、20~50% 蔗糖密度勾配遠心分離し、ISCO を用いてウイルスの分画を選別した選別されたウイルスの分画は 6°C で 36,000 rpm、1 時間遠心分離を行い、沈澱させた。沈澱したウイルスは 10 mM トリス-塩酸 (pH 8.0) に懸濁して本実験に用いら

れた。

2. 反応条件

RRSV 粒子由来のポリメラーゼ活性の測定に用いた反応系は UYEDA and SHIKATA⁹⁰⁾ の反応系に準じて組成した。ただし、最適反応条件を決めるためには 0.1 M トリス-塩酸の pH は 7.5 から 9.5 まで、 MgCl_2 の濃度は 0 から 10 mM まで、S-adenosyl-L-methionine (SAM) の濃度は 0 から 10 mM まで、温度は 25°C から 45°C まで調節した。ポリメラーゼ活性の測定方法は第 2 章、第 2 節の 3 に述べたようである。

3. 核酸の抽出

ゲノム dsRNA および転写産物の ssRNA は proteinase K 処理によって抽出した²⁾。

純化ウイルス、または反応液を 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteipase K、25 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、0.1 M NaCl、7.5 mM EDTA、2.4% SDS になるように調節し、37°C で 30 分間放置した。次にフェノール処理 2 回、クロロホルム：イソアミルアルコール (24:1) 処理 2 回から得られた水相の RNA は 2.5 倍量のエタノールと 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加え沈澱させた。

4. ハイブリダイゼーション

転写産物とゲノム dsRNA とのハイブリダイゼーションは SMITH and FURUICHI⁸²⁾ の方法に従って行った。

ハイブリダイゼーションの前に転写産物 (5×10^4 cpm) とゲノム dsRNA (5 μg) を 90% DMSO、2 mM トリス-塩酸 (pH 8.0) に混合し、50°C で 1 時間変性させた。変性の RNA は 2.5 倍量のエタノールと 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え沈澱させ、ハイブリダイゼーション緩衝液 (0.3 M NaCl、10 mM トリス-塩酸、pH 7.5、1 mM EDTA、0.2% SDS) に溶し、73°C で 6 時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション反応が終了した RNA は 7 M 尿素-3% PAGE で分析する前に 78°C で 2 分間処理した。

第3節 実験結果

1. 純化ウイルスのポリメラーゼ活性

RRSV 粒子由来のポリメラーゼ活性を確認するため、部分純化したウイルスは 20~50% 蔗糖密度勾配遠心分離後 ISCO を用いて 1.5 ml ずつ分画を取った。Fig. 12 はその時ウイルスを含む分画を 2% uranyl acetate (UA) で染色し、電顕 (JEM 100-B) で観察した結果であって、ウイルス粒子は RRSV に特異な spike をもっていた。

Fig. 13 は各分画がもつポリメラーゼ活性を測定した

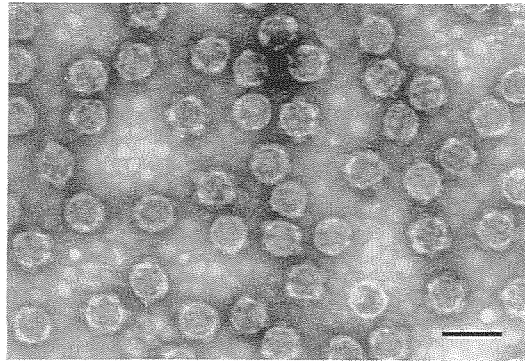


Fig. 12. Electron micrograph of purified RRSV virions. Bar=100 nm.

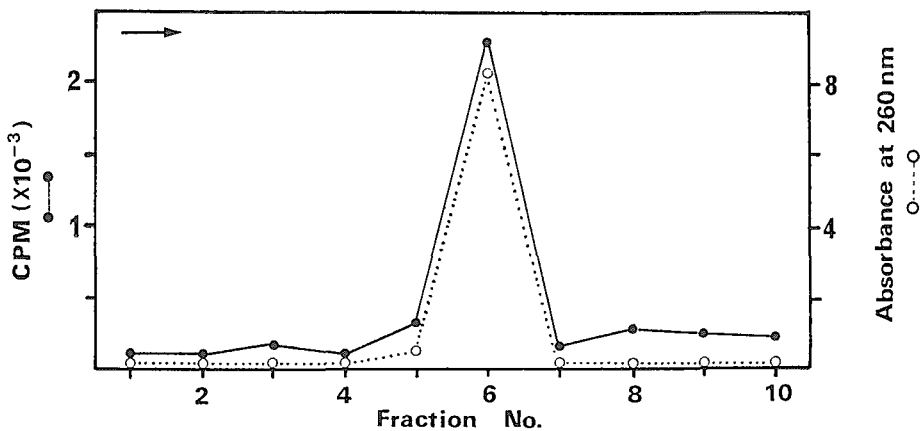


Fig. 13. Association of RNA polymerase activity with RRSV particles. Columns after sucrose density gradient centrifugation were divided into 10 fractions (1.5 ml/fraction) and assayed for absorbance at 260 nm. The fractions were pelleted and assayed for polymerase activity for 2hr at 35 C. Sedimentation was from left to right arrow).

結果であって、それらの活性は RRSV の吸光度と比例していることから RRSV 粒子はポリメラーゼ活性をもっていることが認められる。

また、50 μ l の反応液に純化 RRSV 15~20 μ g を入れ、時間経過によるその活性の変化を調べてみた (Fig. 14)。その結果、2回の反復実験において、ともに同様のパターンで、時間が経過することによって活性も増加した。この結果からも RRSV 粒子はポリメラーゼ活性をもち、その活性は持続的に増加することが分った。

2. 最適反応条件

RRSV ポリメラーゼ反応の最適条件を決めるため、RDV のポリメラーゼの最適反応条件を基にして^{38,90)}、pH, MgCl₂ の濃度, SAM の濃度, および温度を変えながら各条件での活性を比較した (Fig. 15)。

その結果、0.1 M トリス-塩酸の場合は pH 8.5 でポリメラーゼ活性が最も高く達し、それ以上の pH になると活性が落ち始めた。温度は 30~40°C で活性が最高値を示し、45°C では急激に落ちた。MgCl₂ の濃度は 8 mM で活性が最も高く達し、10 mM からはわずかながらも落ち始めた。また、RRSV ポリメラーゼ活性は SAM によって増加し、1~5 mM の SAM を加えた時活性は 0 mM SAM の活性と比べて約 5 倍の増加が認められた。

以上の結果から得られた最適反応条件に基づいて RRSV の標準反応系は、0.1 M トリス-塩酸 (pH 8.5), 8 mM MgCl₂, 4 mM phosphoenol pyruvate, 40 U/ml pyruvate kinase, 1 mM NTPs 5 μ Ci ³²P-UTP, 5 mM SAM, 0.6 mg/ml ベントナイト, 5~10 μ g RRSV (反応系は 50 μ l) に組成した。

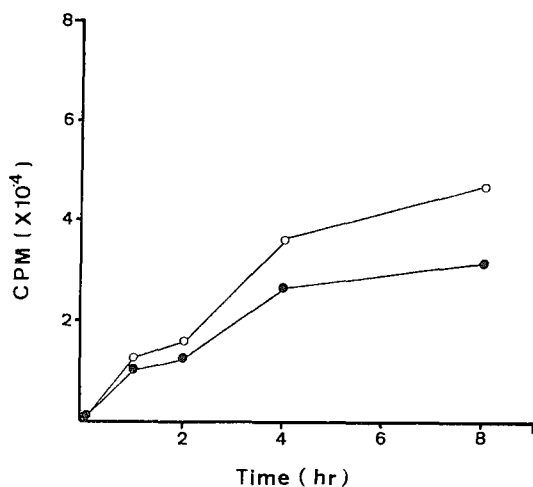


Fig. 14. Kinetics of polymerase activity associated with RRSV.

○—○ : 1st experiment
 ●—● : 2nd experiment.

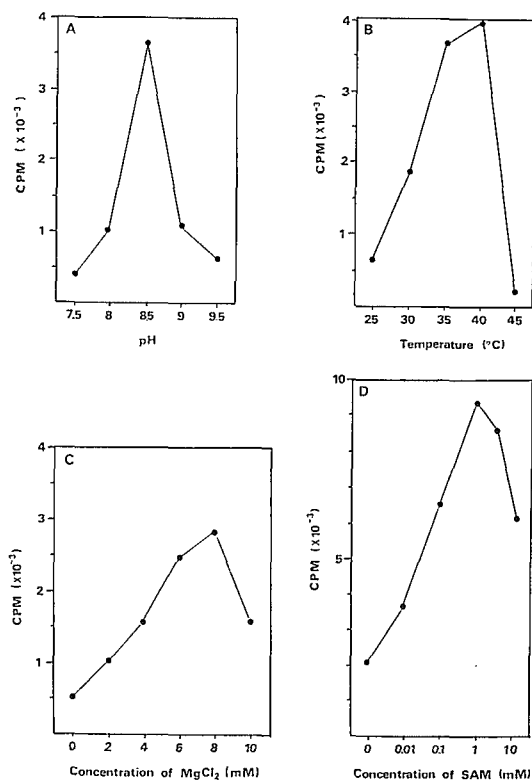


Fig. 15. Effect of various parameters on the RNA polymerase activity *in vitro* was assayed as described in the text.

前述の標準反応系で40°C 2時間反応させた後得られた転写産物を7M 尿素-3% PAGE を用いて分析した。分子量の測定のためにマーカーとして TMV RNA (2.1×10⁶), MS 2 フェージ RNA (1.24×10⁶), *E. coli* 23S RNA (1.0×10⁶) と 16S RNA (0.53×10⁶) を用いた。

その結果, Fig. 16 のように転写産物の分節 No. 1~4, 7 と 8, 9 と 10 はこのゲル上では分離せず, 1本のバンドにみえたが, 各分節のバンドの分子量はゲノム dsRNA のほぼ 1/2 であって, これはゲノム dsRNA の全長の転写産物であると認められる。

3. キモトリプシン処理による活性の増加

RRSV 粒子ポリメラーゼ活性の特性を明らかにするため, Table 5 のように反応系を組成し, その時の活性の変化を調べてみた。

その結果, phosphoenol pyruvate と pyruvate kinase

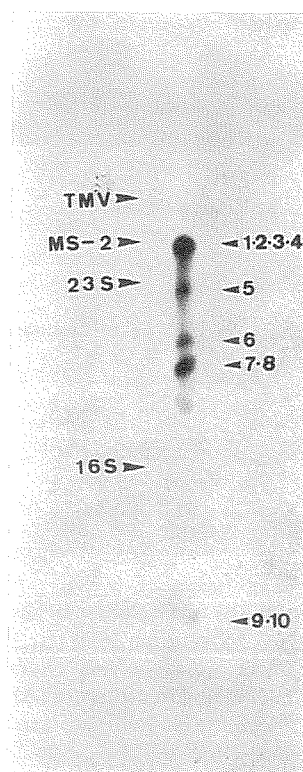


Fig. 16. Analysis of the RNA synthesized *in vitro*. The product was applied to 7M urea-3% PAGE for 21 hrs at 10 mA. *Escherichia coli* RNA (16S and 23S), MS 2 phage RNA and tobacco mosaic virus RNA were applied as standards.

Table 5. Characteristics of RRSV RNA polymerase activity

Reactionmixture	³² P-UTP incorporated, (cpm)	%
Standard ¹⁾	2600	100
-PEP and P. kinase ²⁾	1220	47
+Chymotrypsin (200 µg/ml)	4350	167
+DNase I (50 µg/ml)	2670	103
+RNase A (50 µg/ml)	50	2

- 1) Standard reaction mixture prepared as described in the text.
 2) PEP=phosphoenol pyruvate; P. kinase=pyruvate kinase.

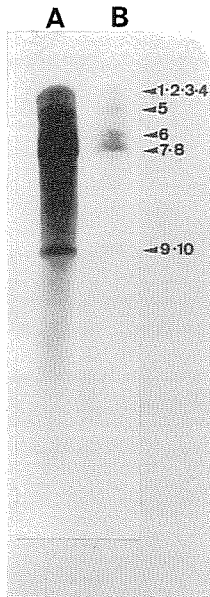


Fig. 17. Stimulation of RNA synthesis *in vitro* by adding chymotrypsin (200 µg/ml) to reaction mixture. RNA products prepared from chymotrypsin-added reaction mixture (A) and that without (B) were analyzed in 7M urea-3% PAGE.

が欠損された場合、その活性は標準反応系での活性の47%であった。DNase I を添加した時はその活性には変化がなかったが、RNase A を加えた時は活性がほぼ完全になくなり、RRSV ポリメラーゼは RNA 依存 RNA ポリメラーゼであると認められる。また、反応系にキモトリプシンを添加することによってその活性は

167% 増加した。Fig. 17 はキモトリプシン添加の反応液から得られた転写産物を 7M 尿素-3% PAGE で分析した結果であって、キモトリプシンを加えなかった反応液から得られた転写産物より大量の転写産物が得られたことが分る。

キモトリプシンを添加した反応液中のウイルス粒子を電顕で観察した時、粒子の spike が分解され、小さくなっていることが確認された (Fig. 18)。一方キモトリプシン無添加の反応液でのウイルス粒子は、spike をもつ完全粒子であった。これはキモトリプシン添加によって粒子の spike が分離され、それによってポリメラーゼ活性が増加したことを考えられる。

4. ハイブリダイゼーション

得られた転写産物が RRSV の転写産物であることを確認するため、前述のハイブリダイゼーション方法を用いてゲノム dsRNA とハイブリダイゼーションを行い、5% PAGE で分析した (Fig. 19)。その結果、10 本の分節ゲノムと一致するハイブリダイゼーションのバンドが検出され、これは RRSV 粒子由来のポリメラーゼが 10 本の分節ゲノム RNA の全長を転写したものと考えられる。

第4節 考 察

RRSV 粒子も他の植物レオウイルスと同様にポリメラーゼ活性をもっていることが本実験によって明らかになった。ポリメラーゼ反応においての最適条件はすでに報告された他の植物レオウイルスの反応条件と大きい差はなかった (Table 6)。しかし、RRSV のポリメラーゼ活性は他の植物レオウイルスとはちがって SAM によって増加する。WTV⁶⁹⁾、RDV またはイネ黒条萎縮ウイルス (RBSDV)⁸⁷⁾ は SAM による活性の増加は見られなかった。

RRSV 粒子構造は CPV と類縁関係があるが、SAM によってポリメラーゼ活性が増加する点でも類縁性があった。CPV は、SAM が methyltransferase あるいは CPV 転写複合体の SAM 認識蛋白と結合することによって mRNA の合成がはじまる⁹¹⁾。また、CPV の転写複合体には少なくとも 2 個所の SAM 結合部位があって、その 1 つは転写調節部位であり、もう 1 つは RNA methyl 化部位である⁴⁰⁾。RRSV の場合、1~5 mM の SAM を反応系に加えることによって活性が約 5 倍増加したことから RRSV の転写系には少なくとも SAM による転写調節部位が存在すると考えられる。

またレオウイルスはキモトリプシン処理によって外被蛋白が分解され、その結果ポリメラーゼが活性化す

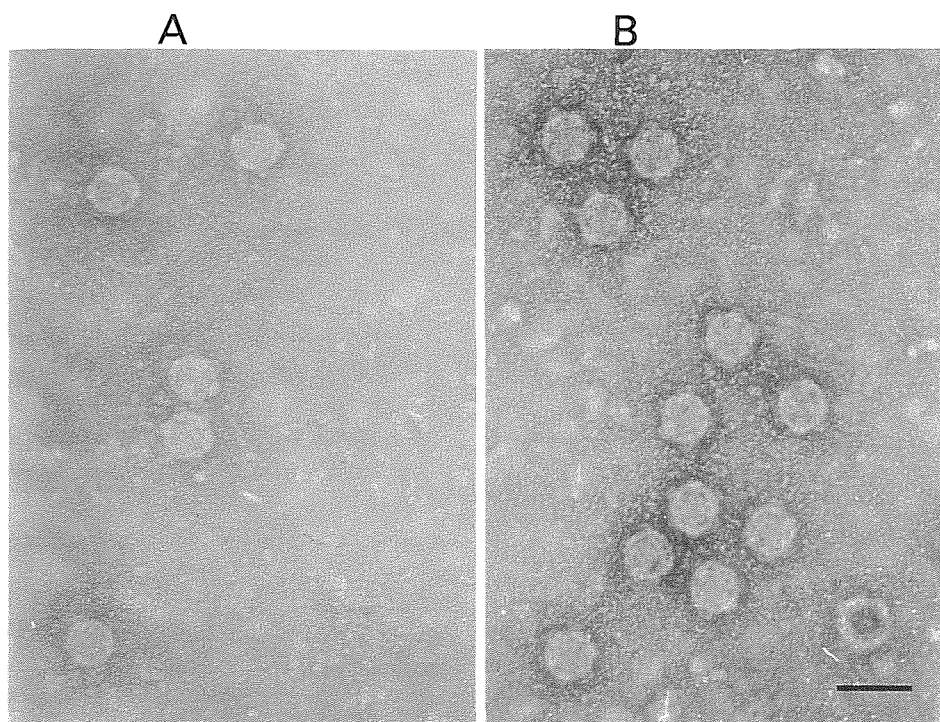


Fig. 18. Conversion of the RRSV spike by chymotrypsin. Virus particles were incubated for 30 min at 35°C in the reaction mixture. The preparations were stained with 2% uranyl acetate and examined under a electron microscope (JEM 100-B). (A) Particles showing partilly digested spikes after chymotrypsin treatment (200 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$). (B) Particles showing the spikes before treatment with chymotrypsin. Bar=100 nm.

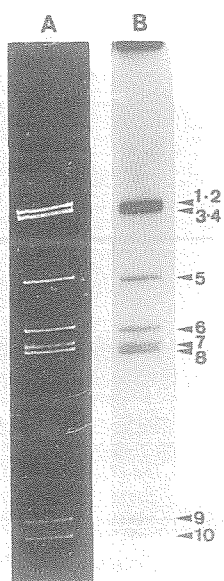


Fig. 19. Hybridization of the RNA products to RRSV genome RNAs. (A) Ethidium bromide-stained RRSV genome RNAs. (B) The RNA products ($\times 10$ cpm) were hybridized to RRSV genome RNAs (5 μg) as described in the text and separated in 5% PAGE for 24 hrs at 30 mA.

Table 6. Optimum conditions of RNA polymerase activity *in vitro* of plant reoviruses

Viruses	Temperature (°C)	pH	MgCl ₂ (mM)
WTV ¹⁾	28-30	8.2-8.5	7.5
RDV ²⁾	35	8.5-9.0	4.0
RGDV ³⁾	25	8.0-8.5	2.0
FDV ⁴⁾	35	8.5-9.0	8.0
RRSV	35-40	8.5	8.0

- 1) BLACK and KNIGHT (1970); REDDY *et al.* (1977)
- 2) KODAMA and SUZUKI (1973); UYEDA and SHIKATA (1984)
- 3) YOKOYAMA *et al.* (1984)
- 4) IKEGAMI and FRANCKI (1976)

る^{10,32)}。一方植物レオウイルスの場合はキモトリプシン処理によるポリメラーゼ活性の増加に関する報告はない。しかし、RRSVはキモトリプシン(200 µg/ml)を反応液に加えることによってその活性が約167%増加した。キモトリプシン処理を受けた RRSV 粒子を電顕で観察した時、粒子の spike が分解されて小さくなったことが確認され、キモトリプシン処理による RRSV 粒子構造の変化がポリメラーゼ活性を増加させたと考えられる。

第5章 RRSV ゲノム dsRNA の電顕による分子量測定

第1節 緒言

10本のRRSV分節ゲノムの分子量は0.49~2.70×10⁶であって、この値はCPVまたはRDVゲノムをマーカーとしてPAGEでの移動度から算出した分子量である^{9,34,61)}。

GALYNSKIら²¹⁾はCPVゲノムdsRNAをglyoxalで完全変性させた後アガロースゲルを用いてそれらの分子量を測定した結果、以前のCPVゲノムの分子量より高い値を得た。この結果から考えると、CPVゲノムをマーカーとして算出したRRSV, RDV等のゲノムの分子量も高くなるべきである。実際に、UYEDA and SHIKATA⁹⁰⁾はTMV RNA, MS2 フェージ PNA, *E. coli* 23S と 16S RNA を分子量のマーカーとしてRDVゲノム dsRNA を glyoxal で変性させ、PAGEを用いてそれらの分子量を測定した結果、分節ゲノム No. 8 から 12 までの分子量がすでに報告された分子量

より高かった。このような結果からも RDV ゲノムを分子量のマーカーとして算出した RRSV ゲノムの分子量も高くなるべきである。

そこで、本章では電顕を用いて RRSV ゲノムの分子量を測定し、すでに PAGE によって算出された分子量と比較検討した。

第2節 実験材料および方法

1. dsRNA の抽出と分離

dsRNA は第4章、第2節の3の方法に従って抽出し、5% PAGE で15 mA, 44時間泳動、10本の分節ゲノムを分離した。泳動後ゲルはエチジウムブロマイド(1 µg/ml)で染色、トランスイルミネータで発色させカミソリを用いて各分節ゲノムのバンドを切り出した。ゲルから dsRNA の回収は MAXAM and GILBERT⁴⁸⁾の方法に従って行った。すなわち、切り出したゲルは3 mlの核酸抽出用緩衝液(0.5 M 酢酸アンモニウム, 0.01 M 酢酸マグネシウム, 0.5 M EDTA, 1% SDS)を加え磨砕し、室温で1晩間振盪させた後低速遠心分離によってゲルから RNA を分離した。水相の RNA はイソブタノール処理によってその量を約0.3 mlに減らしてから2.5倍量のエタノールと1/10量の3 M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)を加え、沈澱させた。

2. シトクロム C 分子膜

ゲルから回収した各分節ゲノムはシトクロム C 分子膜を用いてグリッド上に吸着させた³⁷⁾。0.25 µg の RNA を 25 µl の hyperphase (60 µg/ml シトクロム C, 50% ホルムアミド, 10 mM トリス-塩酸, pH 8.0, 1 mM EDTA) に懸濁し、直径 5.7 cm のペトリ皿の hypop-

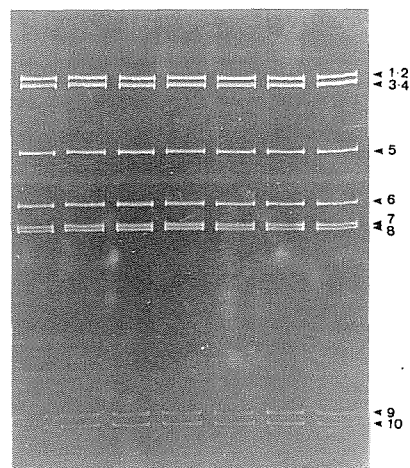


Fig. 20. Separation of RRSV genome dsRNA segments in 5% PAGE.

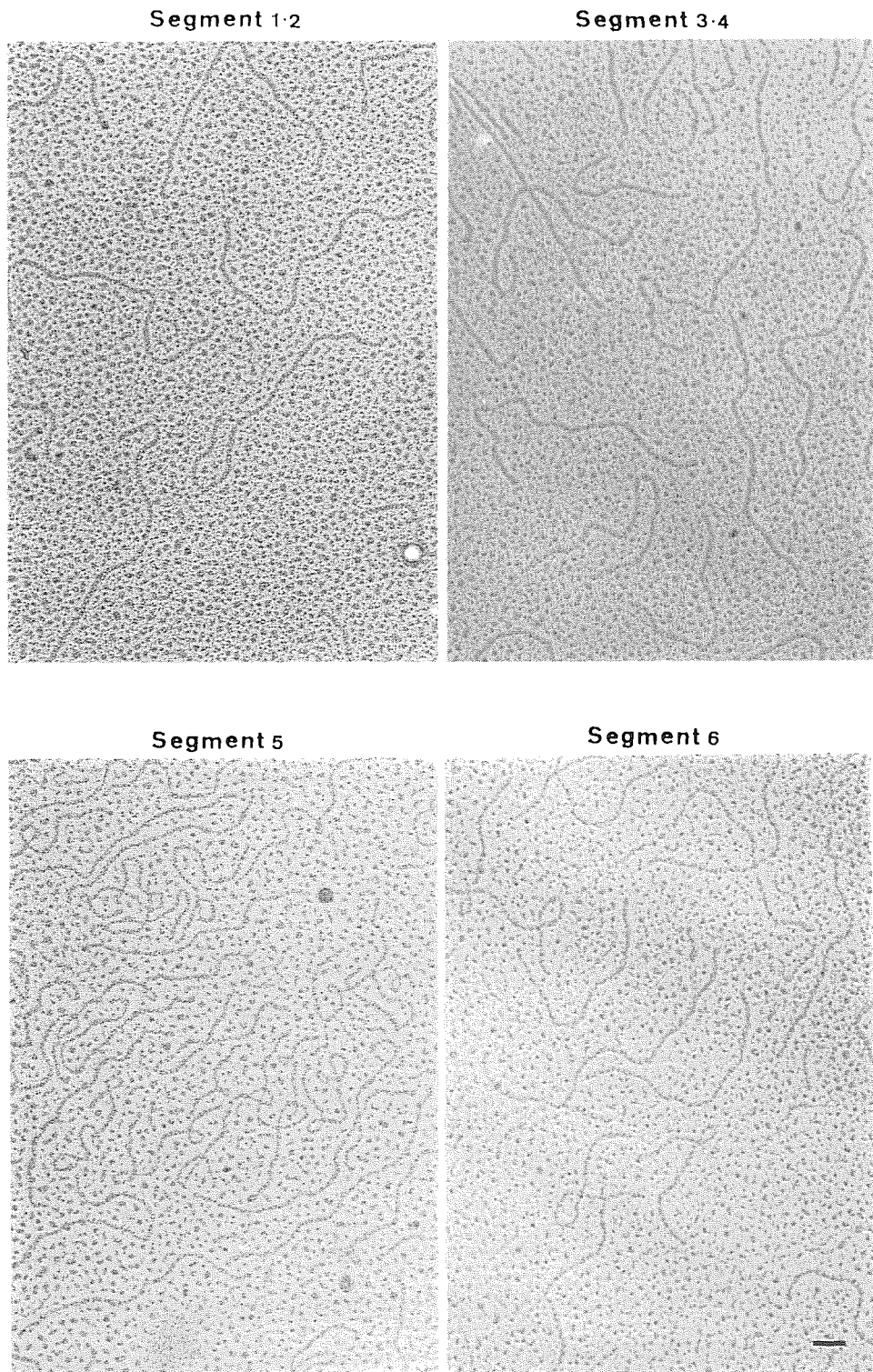
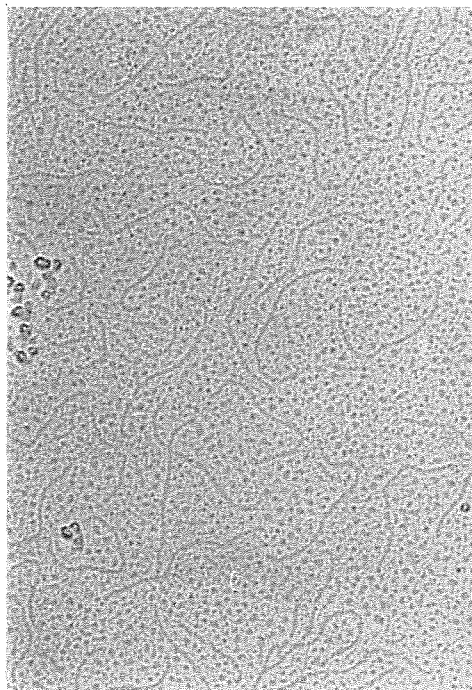
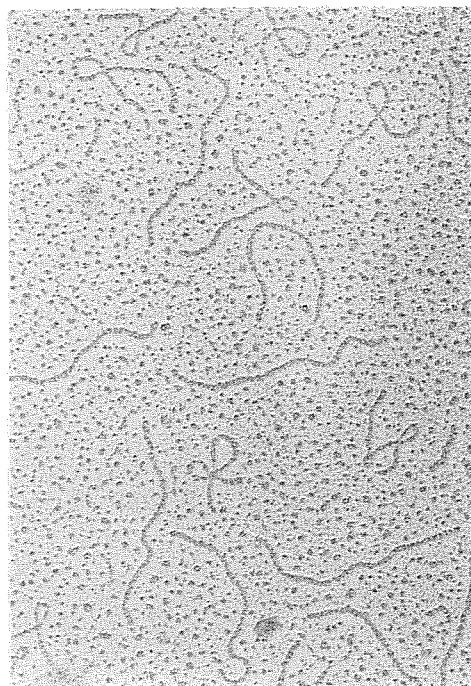


Fig. 21. Electron micrograph of RRSV genome dsRNA segments. Bar=100 nm.

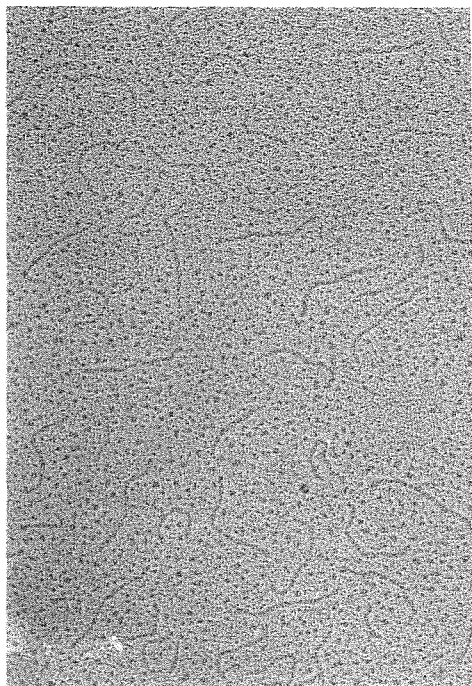
Segment 7



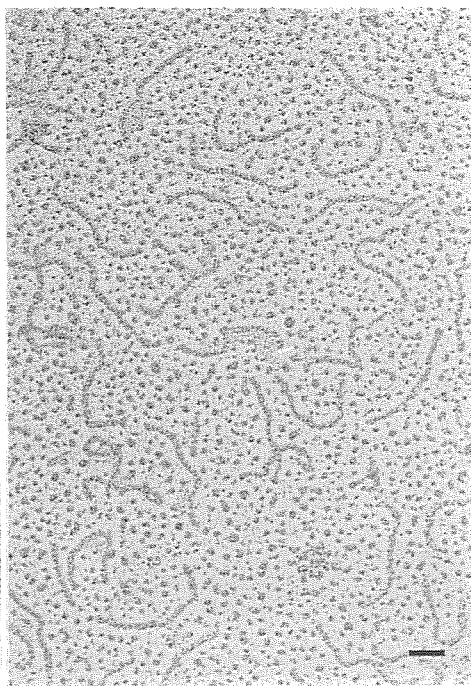
Segment 8



Segment 9



Segment 10



hase (20% ホルムアミド 1 mM トリス-塩酸, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) 上にスライドガラスを用いて落とし, その時 hypophase 上にできるシトクロム C 分子膜をコロジオン支持膜のグリッド (150メッシュ) で吸着させた。シトクロム C 分子膜をグリッドの支持膜上に吸着させた後, 50 mM UA, 90% エタノールで 30 秒間染色, イソペンタンで脱水し, 乾燥した。

3. 検 鏡

検鏡のためシトクロム C 分子膜を吸着させたグリッドは, 白金: パラジウム (8:2) を蒸着金属に用いて回転 shadowing を行った。グリッドと蒸着源との距離は 7 cm, 角度は 10 度, 回転速度は約 60 rpm であった。グリッドはさらにカーボン蒸着をして支持膜を補強してから電顕 (JEM 100-B) を用いて 10,000 倍で観察, 撮影した。

第3節 実験結果

1. 検 鏡

Fig. 20 は RRSV の分節ゲノムを 5% PAGE で分離した時の分離パターンであって, 分節 5 から 10 までまでは単一のバンドで検出されたが, 分節 1 と 2, 3 と 4 は重複されたバンドで検出された。したがって検鏡には分節 1 と 2, 3 と 4 が混合されている状態で行った。

Fig. 21 は前述のシトクロム C 分子膜の方法に従って製作したグリッドを電顕, JEM 100-B を用いて 1 万倍で撮影し, さらに 6 倍拡大した時の RRSV ゲノムの分節である。各分節 dsRNA は一様な蛋白質 (シトクロム C) の中に線として観察される。

2. 分子量の測定

6 万倍に拡大した各分節は, 幅 1 mm のコンパスを用いて各分節当り 100 分子ずつその長さを測定した。測定された各分節ゲノムの平均長さから分子量および塩基対類を算出するためには, 同様の条件で撮影した TMV の dsRNA とすでに全塩基配列が決定された RDV の分節ゲノム No. 10 の平均長さをを用いた (Table 7)。Fig. 22 は各分節ゲノムの測定長さの histogram である。

3. PAGE から算出した分子量との比較

前述のように算出した各分節ゲノムの分子量をすでに PAGE によって測定, 報告された分子量と比較した (Table 8)。

BOCCARDO and MILNE⁹⁾ が報告した分子量は FUJII-KAWATA ら¹⁴⁾ の CPV ゲノムの分子量をマーカーとして測定した分子量であって, 一方 OMURA ら⁶¹⁾ が報告した分子量は GALYNSKI ら²¹⁾ の CPV ゲノムの分子量をマーカーとして測定した値である。そこで, GALYNSKI ら²¹⁾ は glyoxal 変性によって CPV ゲノムの分子量を

Table 7. Size estimates of rice ragged stunt virus genome segments

Segment No.	No. of estimated molecules	Length (nm)	No. of nucleotide	M_r ($\times 10^6$)
1~2	100	1100	3935	2.48
3~4	100	1082	3871	2.43
5	100	798	2855	1.80
6	100	680	2432	1.53
7	100	577	2064	1.29
8	100	573	2050	1.28
9	100	348	1245	0.78
10	100	338	1209	0.76
TMV dsRNA	71	1983	6395	4.38
RDV S. 10	100	369	1320	0.88

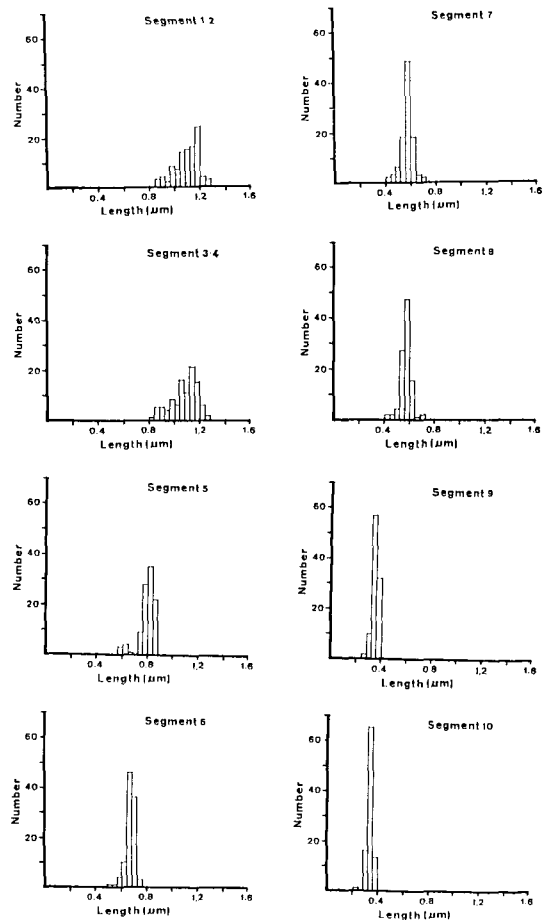


Fig. 22. Length distribution histogram of RRSV genome dsRNA segments.

Table 8. Molecular weight of rice ragged stunt virus gemome segments and its compariso to previously determined values

Segment No.	M_r ($\times 10^6$)	M_r ($\times 10^6$)		
		BOCCARDO & MILNE (1985)	KAWANO <i>et al.</i> (1984)	OMURA <i>et al.</i> (1983)
1	2.48	2.45	2.45	3.64
2		2.43		3.35
3	2.43	2.30	2.38	3.40
4			2.37	3.38
5	1.80	1.75	1.73	2.38
6	1.53	1.30	1.36	1.76
7	1.29	1.15	1.26	1.55
8	1.28	1.10	1.22	1.52
9	0.78	0.50	0.59	0.88
10	0.76	0.49	0.53	0.85

FUJII-KAWATA ら¹⁴⁾ の値より高く得たためにその分子量をマーカーとして測定した RRSV ゲノムの分子量も当然高くなったものと考えられる。また KAWANO ら³⁴⁾ は RDV ゲノムの分子量をマーカーとして RRSV ゲノムの分子量を測定したが、その RDV ゲノムの分子量も FUJII-KAWATA ら¹⁴⁾ の CPV ゲノムの分子量から算出した値であって、その結果 BOCCARDO and MILNE⁹⁾ の RRSV ゲノムの分子量とほぼ同じであることが分る。

本実験の結果から得られた RRSV ゲノムの分子量は OMURA ら⁶¹⁾ の分子量とは全分節において大きい差があった。一方 BOCCARDO and MILNE⁹⁾、または KAWANO ら³⁴⁾ の分子量とは分節ゲノム No. 1 から 5 まではほぼ同じかわずかの差しかなかったが、分節ゲノム No. 6 からはその差が大きくなり、低分子の分節ゲノムへ行くほどその差が大きくなることが認められた。

第4節 考 察

RRSV ゲノム dsRNA の分子量を電顕を用いて測定したが、FUJII-KAWATA ら¹⁴⁾ の CPV ゲノムの分子量をマーカーとして測定した PAGE による分子量よりは高い値を、GALYNSKI ら²¹⁾ の CPV ゲノムの分子量をマーカーとして測定した RRSV ゲノムの分子量よりは低い値を得た。すなわち、ゲノムの分子量を測定する時は、用いられるマーカーの分子量の正確性が要求される。

RDV ゲノムの分子量を同様の方法によって測定した時、RRSV の場合と同じく、低分子の分節へ行くほど

PAGE によって算出した分子量より高い値が得られた⁸⁶⁾。一方、TMV, RNA, MS 2 フェージ RNA, *E. coli* 23 S と 16 S RNA をマーカーとして算出した RDV 分節ゲノムの分子量は、電顕によって算出した分子量とほぼ同じであって、その結果からもマーカーの重要性が認められる。ただし、PAGE による分子量の測定は、PAGE その組成が変わることによって移動度も変化し、分子量の算出に影響を与えることがあるので³⁴⁾、PAGE による分子量測定の問題性を示唆している。

電顕によって測定された RRSV 分節ゲノムの分子量の正確さは、その後分節ゲノム No. 9 の塩基配列が決定されることによって明らかになったが、電顕によって算出された分節ゲノム No. 9 の塩基対数 1,245 に対し、決定された塩基配列は 1,121 であった。

第6章 RRSV RNA のクローニングと分節ゲノム No. 9 の塩基配列決定

第1節 緒 言

植物レオウイルスは昆虫と植物の両方の体内での biomechanism を研究するのに非常に有用なウイルスであって、その究明のためには分子レベルでの解析が要求される次第である⁵⁸⁾。

最近、植物レオウイルス subgroup 1 に属する WTV は、遺伝子組換え技術を用いて 12 本の分節ゲノムの cDNA の遺伝子ライブラリを作り、その中で分節ゲノム No. 12 の全塩基配列が決定された²⁾。また WTV と同一の group である RDV の場合は、分節ゲノム No. 10 の全塩基配列が決定され、その両末端の 4 つの塩基配列が WTV と一致していることが明らかになった⁸⁸⁾。

本章では RRSV の遺伝子解析の第一歩として、ゲノムのクローニングとその塩基配列の決定を試した。第4章では RRSV 粒子がポリメラーゼ活性をもち、そのポリメラーゼ活性は 10 本の全分節ゲノムを転写することを明らかにした。そこで、本実験では RRSV 粒子のポリメラーゼから転写される 1 本鎖 RNA を用いてクローニングを行い、ゲノムの 2 本鎖 RNA を用いてクローニングした時の効率と比較検討した。また合成した cDNA の中で分節ゲノム No. 9 cDNA のに関してはその全塩基配列を決定した。

第2節 実験材料および方法

1. RNA の抽出

純化ウイルスからは dsRNA 第4章、第2節の3の方法に従って抽出し、5% PAGE を用いて 15 mA, 44 時間泳動し、各分節を分離した。ゲルから RNA の回収

は ZASSENHAUS ら⁴⁾の電気泳動による回収方法に従って行った。

一方転写産物の合成は、第4章、第3節の2に述べた標準反応系に準じて行った。ただし、反応系は1.2 ml、純化 RRSV は0.7 mg であって、ポリメラーゼ活性を増加させるために0.2 mg/ml キモトリプシンを添加した。RNA を抽出した後、粒子由来のゲノム dsRNA から ssRNA を分離するため、水相の RNA を2 M LiCl で4°C 1晩間放置し、低速遠心分離した。沈澱の ssRNA は蒸留水に溶し、2.5 倍量のエタノールと1/10 量の3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を加えて澱沈させ、cDNA の合成に用いた。

2. cDNA の合成

dsRNA からの cDNA 合成は CASHDOLLAR ら¹²⁾の方法に準じて行った。すなわち、dsRNA は熱処理によって変性させ、3' 末端に poly (A)-tail を付けた後逆転写酵素を用いて first-strand cDNA を合成した。鋳型の RNA は NaOH で分解し、残った first-strand cDNA はアニーリング、RNA ポリメラーゼを用いて修復させることによって cDNA を合成した。合成された cDNA の3' 末端には dC-tail を付け、プラスミドベクター pBR 322 (*Pst*I cut, poly dG-tail) とアニーリングし *E. coli* HB 101 への形質転換に用いた。

転写産物 (ssRNA) からの cDNA 合成は GUBLER and HOFFMAN²²⁾の方法に準じて行った。まず dsRNA の場合と同様に3' 末端に poly (A)-tail を付けた後、逆転写酵素を用いて 1st-strand cDNA を合成した。次に RNase H で鋳型の RNA を分解しながら DNA ポリメラーゼで2本鎖の cDNA を合成した。Poly (dC)-tailing とベクター pBR 322 とのアニーリングは dsRNA の場合と同様であった。

3. 形質転換

ベクター pBR 322 とアニーリングした合成の cDNA は SLEIGH ら⁸¹⁾の CaCl₂ 処理法に準じて *E. coli* HB 101 への形質転換を行った。また、増殖されたコロニーは ampicillin 培地を用いて合成の cDNA が pBR 322 の *Pst*I 部位に取込まれたと推定されるコロニーを選別した。

クローニングから得られた cDNA をファージ M13 にサブクローニングするため、ファージベクター M13 とアニーリングした cDNA は、HANAHAN²⁴⁾の CaCl₂ RbCl 処理法に準じて *E. coli* JM 109 への形質転換を行った。

4. DNA の抽出

挿入 cDNA の分析には alkaline lysis 法で³⁾、ベクターファージ M13 のサブクローニングには CsCl 勾配遠心分離法^{45,92)}で抽出した DNA を用いた。また JM 109 感染ファージの ssDNA はフェノールを用いて抽出し^{50,51)}、シーケンス反応に用いた。

5. ハイブリダイゼーション

クローニングから得られた cDNA は ³²P で標識した分節ゲノム dsRNA をプローブとしてドットプロットハイブリダイゼーション³³⁾を行い、各分節ゲノムのクローンを選別した。プローブとして用いた RNA の変性条件はホルムアミドで100°C、10分であった。

ドットプロットハイブリダイゼーションから選別した cDNA はシーケンスに用いる前、サーゼントランスファーハイブリダイゼーション⁸³⁾を行い、ベクター pBR 322 の *Pst*I 部位に挿入された cDNA と分節ゲノム RNA との相同性を確めた。

6. シーケンス

cDNA の塩基配列決定は、ベクター M13 mp 18、または mp 19 を用いて dideoxy シーケンス法に従って行った^{50,51,70,71)}。すなわち、cDNA を制限酵素で切断し、得られた cDNA 断片をファージ M13 にサブクローニングして、そこで得られた透明のプラークから ssDNA を抽出し、シーケンスキット (Takara Bio-medical) を用いて dideoxy シーケンス反応を行った。

制限酵素で切断された cDNA の断片によっては決定できない塩基配列は、exonuclease III によるデレージョン法²⁶⁾に従って決定した。

ゲノム RNA の末端の塩基配列は、cDNA の5' または3' 末端部位に存在する制限酵素による切断断片をプライマーとして、プライマエクステンションを行い、塩基配列を決定した。その時、鋳型として5' 末端の場合は転写産物の ssRNA を、3' 末端の場合はゲノム dsRNA の(-)鎖を用いた。また、³²P で標識したプライマーは熱処理によって変性させ、7 M 尿素-8% PAGE で1本鎖の DNA に分離、実験に用いた。

第3節 実験結果

1. cDNA の分析

ゲノム dsRNA からの cDNA 合成は、5% PAGE で各分節ゲノムを分離し、その中で分節ゲノム No. 9 の cDNA を合成した。転写産物からの cDNA 合成は、全分節ゲノムの混合状態で行った。

1st-strand cDNA を合成した後、ssRNA からの cDNA 合成の場合は Bio-gel カラムを、dsRNA から

の cDNA 合成の場合は Sephadex G-100 カラムを通して分画を取り、低分子の合成 DNA (約 300 塩基対以下のもの) を除去することができた。

dsRNA からのクローニングの場合、5 μ g の分節ゲノム No. 9 から 12 個のクローンが ampicillin 培地によって選別された。それらの挿入 cDNA の長さは 300~400 塩基対のものが 9 つ、600 塩基対のものが 3 つであった。

一方、ssRNA からのクローニングを行った結果、20 μ g の ssRNA から約 1,000 のクローンが得られた。その中で 500 クローンに対して ampicillin 感受性を調べた結果 493 のクローンが選別された。選別された cDNA の長さはアガロースゲルを用いて測定した。Fig. 23 は測定された 493 cDNA の長さの分布図であってそれらの 90% 以上が 500~1,800 塩基対の挿入 cDNA を含んでおり、最大 3,400 塩基対の cDNA が合成されたことが分る。

2. cDNA の選別

dsRNA のクローニングから得られた cDNA の中で、約 600 塩基対の挿入 cDNA をもつ 3 つの cDNA クローンに対し、分節ゲノム No. 9 をプローブとしてドットブロットハイブリダイゼーションを行った。その結果、Fig. 24 のように 3 つの cDNA クローンともにハイブ

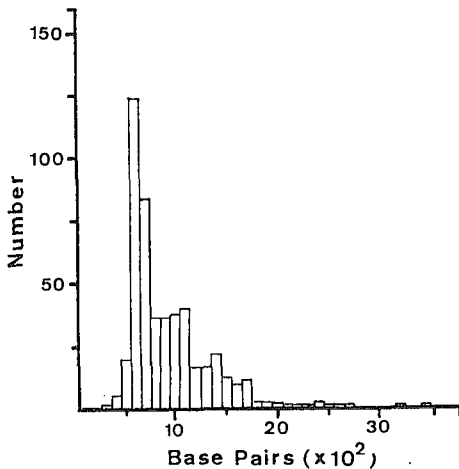


Fig. 23. Histogram of the size of insert DNAs. Approximately 1,000 transformants were from 20 μ g single-stranded transcript RNA. Five hundred colonies selected randomly were tested for ampicillin and 493 colonies were screened. Base pairs of insert DNAs, using pRD of 600, 1,100 and 1,400 base pairs, were estimated by 1% agarose gel.

リダイズし、分節ゲノム No. 9 の cDNA であることが認められた。

しかし、選別された 3 つの cDNA は、*Pst* I で切断し、7.5% RAGE でその挿入 cDNA の長さを測定した結果、3 つとも約 600 塩基対であって、また 4 塩基認識酵素である *Sau* 3 AI *Hpa* II による切断部位が同じであることが確認された (Fig. 25)。

一方、ssRNA のクローニングから得られた cDNA クローンの中 100 の cDNA に対して分節ゲノム No. 7, 8, 9, 10 をプローブとしてドットブロットハイブリダイゼーションを行った結果、分節ゲノム No. 7 は 10, 分節ゲノム No. 8 は 5 つ、分節ゲノム No. 9 は 3 つ、分節ゲノム No. 10 は 4 つの cDNA とハイブリダイズした (Fig. 26)。

選別された各分節ゲノムの cDNA は、さらに *Pst* I

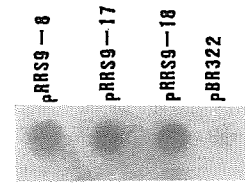


Fig. 24. Screening of cloned genome dsRNA segment 9 (pRRS9) by dot blot hybridization. pBR 322 was used as control.

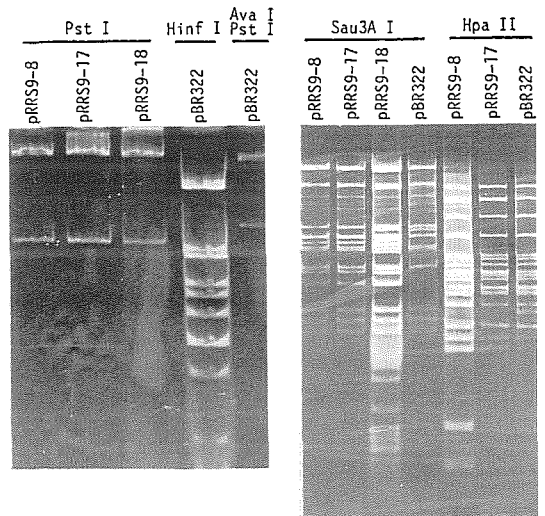


Fig. 25. Analysis of cleavage sites in pRRS9 by *Pst* I, *Sau*3A I and *Hpa* II. pBR 322 was used as size marker.

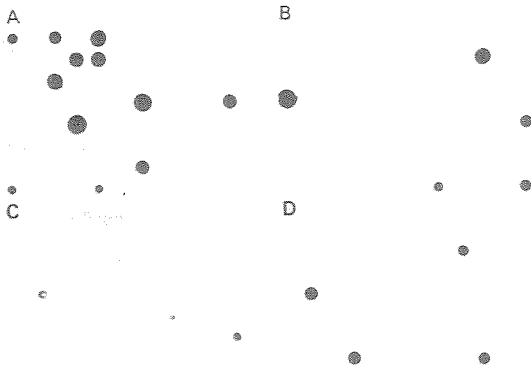


Fig. 26. Screening of cloned genome segments by dot blot hybridization. Ninety five cDNAs were prepared randomly from 493 transformants by alkaline lysis procedure. The cDNAs were dotted onto nitrocellulose filters (11×8 cm), and then hybridized individually with ³²P-labeled genome dsRNA segment 7 (A), 8 (B), 9 (C) and 10 (D).

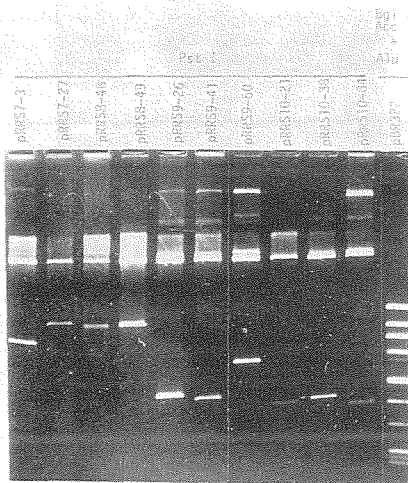


Fig. 27. Sizing of insert DNAs by *Pst* I digestion. Size markers were *Bgl* I/*Acc* I and *Alu* I fragments of pBR322.

で切断し挿入 cDNA の長さ (塩基対数) を測定した (Fig. 27)。以上の結果から決められた各分節ゲノムの cDNA を Table 9 に示した。

3. pRRS 9 の制限酵素による切断地図作成

ドットプロットハイブリダイゼーションによって選別された分節ゲノム No. 9 の cDNA (pRRS 9) は、さら

Table 9. Size estimates of the insert cDNAs screened by dot blot hybridization.

Clone No.	No. of base pair	Estimate condition
pRRS 7- 1	600	Non cut
3	1000	<i>Pst</i> I cut
5	1200	Non cut
16	500	"
17	1000	"
27	1350	<i>Pst</i> I cut
43	800	Non cut
47	600	"
52	1200	"
80	400	"
<hr/>		
pRRS 8-15	400	Non cut
48	1300	<i>Pst</i> I cut
49	1350	"
87	400	Non cut
91	400	"
<hr/>		
pRRS 9-26	610	<i>Pst</i> I cut
41	620	"
60	900	"
<hr/>		
pRRS 10-21	610	<i>Pst</i> I cut
	620	"
	400	Non cut
	610	<i>Pst</i> I cut

にサーザントランスファーハイブリダイゼーションを行い、挿入 cDNA の分節ゲノム No. 9 との相同性を確認した (Fig. 28)。すなわち、pRRS9-26 (lane 1) 41 (lane 2), 16 (lane 3), を *Pst* I で切断し、1% アグロースゲルで挿入 cDNA を分離した。その時、対照として pRRS 10 を用いた (Fig. 28. A)。分離された挿入 cDNA をニトロセルロースフィルターペーパーに移し、分節ゲノム No. 9 をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った結果、pRRS 10 とはハイブリダイズしなかったのに対して、pRRS 9 の 3 つの cDNA とはハイブリダイズしたことが確認されたので (Fig. 28. B), pRRS 9 つの cDNA は分節ゲノム No. 9 のクローンであることが認められた。

そこで、選別された cDNA は制限酵素による切断地図の作成のため、4 塩基認識酵素または 6 塩基認識酵素

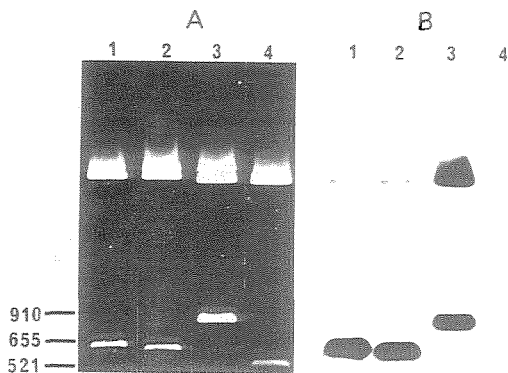


Fig. 28. Identification of insert DNAs corresponding to genome dsRNA segment 9. (A) Insert DNAs, pRRS9-26 (lane 1), pRRS9-41 (lane 2), pRRS-60 (lane 3), were digested with *Pst* I and electrophoresed in 1% agarose gel together with pRR10 (lane 4). The figure on the left represent length in numbers of base pairs. Size markers were *Alu* I fragments of pBR 322. (B) Digested DNAs were transferred onto nitrocellulose filter (4×7 cm), and hybridized with ³²P-labeled genome dsRNA segment 9. Lane 1-3: pRRS 9-26, 41, and 60, respectively; lane 4: pRRS 10 as control.

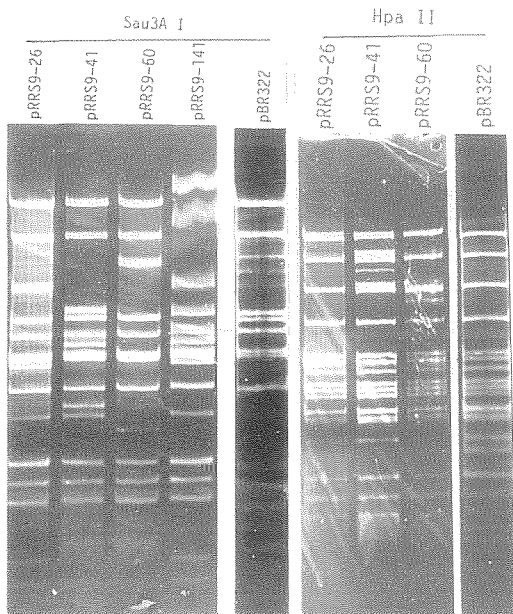


Fig. 29. Analysis of cleavage sites in pRRS 9 by *Sau*3A I and *Hpa* II. pBR 322 was used as size marker.

を用いて切断部位の有無を調べた。その結果、4塩基認識酵素の中では、*Sau* 3 AI と *Hpa* II の認識部位が存在し (Fig. 29), 6塩基認識酵素の中では *Ava* I の認識部位が存在することが確認された (Fig. 30)。そこで、pRRS 9-141は、900以上の塩基対をもつ50のcDNAクローンの中でドットプロットハイブリダイゼーションによって選別されたクローンであって、その挿入cDNAの長さは約900塩基対であった。

以上の結果から得られた制限酵素の認識部位を基にして制限酵素切断地図を作成した (Fig. 31)。その結果、各クローンから作成された pRRS 9 の全長は約1,100塩基

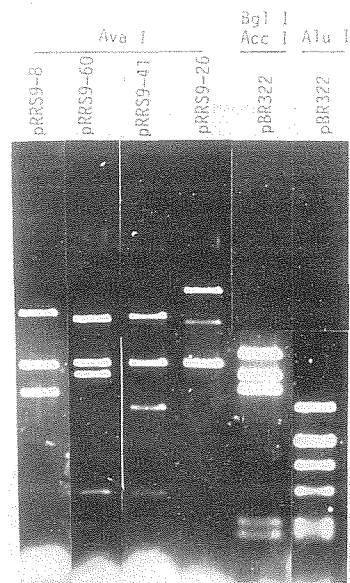


Fig. 30. Analysis of cleavage sites in pRRS 9 by *Ava* I. Size markers were *Bgl* I/*Acc* I and *Alu* I fragments of pBR 322.

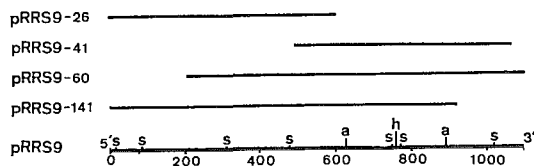


Fig. 31. Analysis of cleavage sites in pRRS 9. The number of nucleotides are indicated below the gene frame. a, h and s represent of *Ava* I, *Hpa* II and *Sau*3A I cleavage sites, respectively.

対であった。

4. pRRS9 の塩基配列決定

pRRS9 の塩基配列は主に、制限酵素による切断片をフェージ M 13 mp 19 にサブクローニングし、dideoxy シークエンス法に従って決定した。また 5' 末端の約 350 塩基配列はデレション法によってシークエンスを行い、Sau 3 AI 断片と断片の連結部位の塩基配列を確認した (Fig. 32)。すなわち、pRRS9-26 の Sau 3 AI 切断断片、pRRS9-60 の Sau 3 AI 断片と Hpa

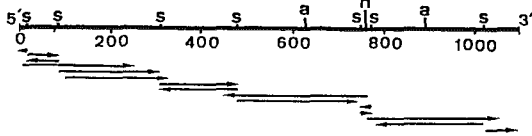


Fig. 32. Strategy for determining the nucleotide sequence of cloned genome segment 9. The number of nucleotides are indicated below the gene frame. The arrows show the location and direction of nucleotide sequence determined. a, h and s represent of *Ava* I, *Hpa* II and *Sau* 3 A I cleavage sites respectively.

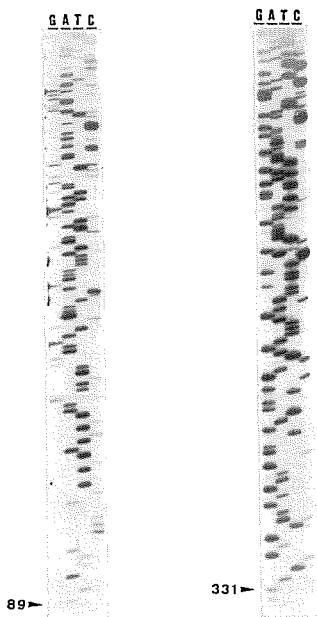


Fig. 33. Autoradiograph of a dideoxynucleotide sequencing ladder. Numbers represent the position of nucleotide in the gene frame.

II 断片をフェージ M 13 mp 19 の *Bam* HI, *Bam* HI-*Pst* I, *Acc* I-*Pst* I 部位にサブクローニングすることによって pRRS9 の全塩基配列を決定した。またデレ

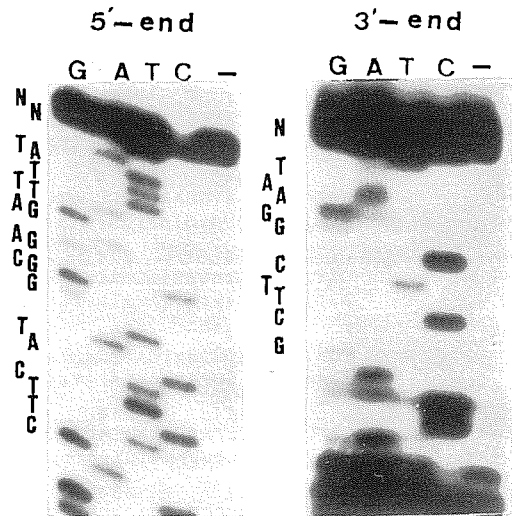


Fig. 34. Autoradiograph of a dideoxynucleotide sequencing ladder representing the 5' and 3'-end. 5'-end sequence was complementary to that of genome RNA.

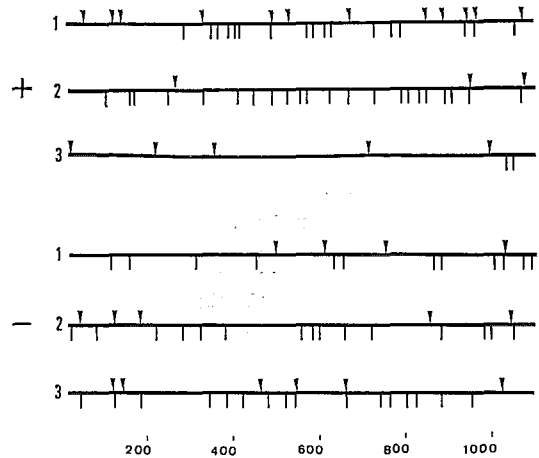


Fig. 35. Distribution of open reading frames (ORFs) in cloned genome segment 9. Computer translation of the sequence was performed in all three reading frames for + and - strand. The number on the left indicate the three different reading frames.

▼ : initiation codon, | : termination codon.

10
NNATAAATCT CGCC

24 34 44 54 64 74
ATGAAGACTGCCTTTGCCAGAGATCCTTTTACAGCTCCTGCTACAGGTACGTACGGAAACC
MetLysThrAlaPheAlaArgAspProPheThrAlaProAlaThrGlyThrTyrGlyThr

84 94 104 114 124 134
ATATATGCCTCCAGATCATTGCCCGACTCTCTATCTCTAAGTTCTTGGAAAGATGCAAAAT
IleTyrAlaSerArgSerLeuProArgLeuSerIleSerLysPheLeuGluAspAlaAsn

144 154 164 174 184 194
CCAGAAATTTATGAACTACGAGATATGAAGCGCTCGGAACCAACAGACCCAGCTCAGGG
ProGluIleTyrGluLeuSerArgTyrGluAlaLeuGlyThrAsnArgProSerSerGly

204 214 224 234 244 254
AAGCGAGCAATGCAACCAGCCGTCAGTAAACCAGCTTTACTGGAAACCGTATTCACACTC
LysArgAlaMetGlnProAlaValSerLysProAlaLeuLeuGluThrValPheThrLeu

264 274 284 294 304 314
GATATATGGTACAGAAGGACGAACAACCAACAGAACATCGGCAATTTAAGAGATTCGGTATCT
AspIleTrpTyrArgArgThrAsnAsnGlnAsnIleGlyAsnLeuArgAspSerValSer

324 334 344 354 364 374
CGATTTCTATCTGATGATCGAGTAAGAGAAGCGGTGATGGTGCCTAGACTTAGACATT
ArgPheLeuSerAspAspArgValArgGluAlaValMetValArgLeuAspLeuAspIle

384 394 404 414 424 434
GTTGTCCAGCTAAAAGAATACTGGTTGATAGTTAAAGACAAAGAAGCCAGACTTTCGCG
ValValGlnLeuLysGluTyrTrpLeuIleValLysAspLysGluAlaGlnThrPheAla

444 454 464 474 484 494
GACCGATTGGCCTTTGACTCGCATCTATTTGTCAATCGCGGCGAAAACGCGAATTATGAT
AspArgLeuAlaPheAspSerHisLeuPheValAsnArgGlyGluAsnAlaAsnTyrAsp

504 514 524 534 544 554
CTTGTAACTCAGACGTTTCATTCCGAGTGATGCTTTTCTTAAGGATAACTTTAAGACGGAA
LeuValThrGlnThrPheIleProSerAspAlaPheLeuLysAspAsnPheLysThrGlu

564 574 584 594 604 614
GCACTTAAGAAGTTGTTGCTAAGTGTCCAAAACCATACGGGACTAGACGCTGGATTGCAA
AlaLeuLysLysLeuLeuSerValGlnAsnHisThrGlyLeuAspAlaGlyLeuGln

624 634 644 654 664 674
GGTGTAGTTTGAAGCGACTTACAACATTGGCCTAGGACATATTTCTCGAGGATGAGGCC
GlyAspSerLeuLysAlaThrTyrAsnIleGlyLeuGlyHisIleLeuGluAspGluAla

684 694 704 714 724 734
CTCCTGTACCGTCAAGGTGTGGCTCTACAACAAATGGCTTTTGGCGAGTTGGAATTAGCT
LeuLeuTyrArgGlnGlyValAlaLeuGlnGlnMetAlaPheAlaGluLeuGluLeuAla

744 754 764 774 784 794
AGAGGAGCAGAGAAAGAGGCGTTTCCAGCAACCTTCGATCTAAGCAATAGACCGGCTTGC
ArgGlyAlaGluLysGluAlaPheProAlaThrPheAspLeuSerAsnArgProAlaCys

804 814 824 834 844 854
AACTTGATCCTTAAGCGAACGTGTAAGTGGTATCAACAAACGTTTAAAGGATGAGGAGAGA
AsnLeuIleLeuLysArgThrCysLysTrpTyrGlnGlnThrPheLysAspGluGluArg

864 874 884 894 904 914
AAGGAATTTGCGAAGAGTTTGTGGGTGGATGAGTTTGGCAGGCTAATTGGAACACAGGT
LysGluPheAlaLysSerLeuTrpValAspGluPheAlaGluAlaAsnTrpAsnThrGly

924 934 944 954 964 974
AATTTGTCTTTTGGCTTTTCAACCACATTAATGTAATTGAGAGATGGCGTTTGACCAGA
AsnLeuSerPheGlyPheSerThrThrLeuAsnValIleGluArgTrpArgLeuThrArg

984 994 1004 1014 1024 1030
TTTTATGTTTATGTAATCTCATCTGTGCATATATATCTCAGAAGGCTCGGGTA GGA
PheTyrValHisMetTyrSerSerValHisIleTyrSerGlnLysAlaSerGly

1040 1050 1060 1070 1080
AACGCTG GGGATCAAGG TGAATTGAAA TGAGGACTTC TCACCCTCAT GGACATT

1090 1100 1110 1120
CGG CCTCTTCACG GGTGGCACCA GCTTCGGAAT N

Fig. 36. Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of RRSV genome segment 9 cDNA.

ーション法に用いられたクローンは pRRS-141 であって、exonuclease III の反応時間は 30 秒であった。

シーケンスの分析に用いたゲルは 7M 尿素-8% PAGE であって、泳動は 1,200~1,500 V で 4~8 時間行い、-80°C で 12~16 時間オートラジオグラフをとった。Fig. 33 はその結果から得られたオートラジオグラフの 1 例であってそれぞれ 5' 末端の 89 塩基と 331 塩基から 3' 末端への塩基配列を読むことができる (Fig. 36 参照)。

分節ゲノム No. 9 の両末端の塩基配列はプライマーエクステンション法に従って決定した。用いられたプライマーは、5' 末端の場合は pRRS 9-26 の 5' 末端側に存在する 41 塩基対の *Alu I/Sau 3 AI* 切断断片であり、3' 末端の場合 pRRS 9-60 は 3' の末端に存在する 46 塩基対の *Hae III/Sau 3 AI* 切断断片であった。その結果、5' 末端では 20 の塩基配列が、また 3' 末端では 11 の塩基配列が決定された (Fig. 34)。そこで、3' 末端の第 1 番目の塩基配列はシーケンス反応が停止することによって 1 つの濃いバンド (N) で検出されたことに対して、5' 末端の場合は第 1 と 2 番目の塩基配列が濃いバンド (NN) で検出され、これは 5' 末端の第 1 番目の塩基はキャップ構造を逆転写酵素が誤読した可能性もあるが、その解析は今後検討の必要がある。

以上の結果から得られた分節ゲノム No. 9 の総塩基数は 1,121 であった。そこで分節ゲノム No. 9 に存在する open reading frame (ORF) を調べるため、1 方向に対してその相補性の方向をもつ塩基配列を作成し、その時できる initiation codon (ATG) および termination codon (TGA, TAG, TAA) を 1 つの塩基をずらしながら調べた (Fig. 35)。その結果、Fig. 35 の +3 frame のように最長の ORF が見つかった。この ORF を基にして作成した分節ゲノム No. 9 の塩基配列およびアミノ酸配列が Fig. 36 で、ORF は 5' 末端から 15 番目の塩基 (ATG) からはじめ、1,028 番目の塩基 (TAG) で終り、そこからできるアミノ酸は 338、分子量は 38,592 であった。

第 4 節 考 察

RRSV の RNA クローニングをゲノム dsRNA と転写産物を用いて行った。dsRNA からのクローニングは PAGE によって各分節ゲノムを分離し、その中で分節ゲノム No. 9 の cDNA を合成したが合成効率は低く、約 5 μ g の dsRNA から 12 のクローンが得られ、それら挿入 cDNA の長さは 300~600 塩基対であった。また 600 塩基対の 3 つの cDNA は制限酵素による分析から同様のクローンであることが認められた。このような

結果は dsRNA を鋳型として 1st-strand DNA を合成する時、変性させた RNA が反応中にまたアニーリングされた結果であろうと考えられる。

一方、転写産物からの cDNA 合成は、その方法も簡単で、合成効率も高く、約 20 μ g の転写産物から 1,000 以上のクローンが得られた。dsRNA から合成した cDNA と比較のため、まず分節ゲノム No. 9 の cDNA クローンを選別し、制限酵素を用いてその長さを測定した結果、約 1,100 塩基対の cDNA であることが分った。

得られた cDNA を用いて分節ゲノム No. 9 の塩基配列を決定した結果、その全長は 1,121 塩基であることが分った。また分節ゲノム No. 9 の cDNA に存在する ORF の initiation codon 付近の塩基配列 CGCC-ATGA) は、KOZAK³⁹⁾ が報告した真核細胞 mRNA の initiation codon 付近に存在する共通の塩基配列 ($C^A_G CCAUG^G_A$) と一致した。この ORF からは合成される蛋白質の分子量は 38,592 であって、HAGIWARA ら²³⁾ が報告した RRSV の構成蛋白質の中 spike の構成蛋白質の分子量 (37 K) とほぼ同様であった。

摘 要

1. 蔗糖密度勾配遠心分離から得られた 4 種類の RDV 粒子

RDV 粒子は 10~40% 蔗糖密度勾配遠心分離によって 4 種類の粒子に分けられる。各粒子の移動位置から T1, T2, B1, B2 と名付けて、それらの粒子の構造、構成蛋白質、核酸、ポリメラーゼ活性の差を調べた。各粒子は蔗糖密度勾配遠心分離を 2 反復して分離した。

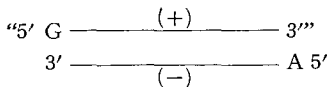
電顕では T1 は完全中空粒子、T2 は半中空粒子であった。B1 と B2 は核酸を含んでいる完全粒子で両者の差は認められなかった。各粒子の蛋白質は disc-PAGE で分子量 1.84~0.36 $\times 10^5$ の 9 本のバンドが得られた。T1 は上から 1, 3, 7 番のバンドが欠損し、T2, B1, B2 では量的な差はあるが、すべて 9 本のバンドが検出された。各粒子の核酸を 5% PAGE で分析すると、T1 では核酸がなく、T2, B1, B2 では 12 本の分節ゲノムが検出された。ポリメラーゼ活性は T1 と T2 ではなく、B1 と B2 を蔗糖密度勾配遠心分離によって分画し、各分画の活性を比べると、B1 と最も強い相関を示した。B2 は EDTA 添加によって蔗糖密度勾配遠心分離で B1 に移行した。

2. RDV ゲノム RNA の 5' 末端解析

二次元ペーパークロマトグラフィーを用いて RDV ゲノム dsRNA の 5' 末端塩基を分析した。純化ウイルス

から抽出した dsRNA を CIP で処理し、5' 末端のリン酸基を除去した後、T₄ polynucleotide kinase を用いて γ -³²P で 5' 末端を標識した。³²P-標識 RNA は RNase P₁ で 5' 側のリン酸基を残しながら完全分解し、二次元ペーパークロマトグラフィーに展開、オトラジオグラフをとるとともに 4 つの塩基がもつ ³²P 活性を測定、5' 末端の塩基を決定した。

その結果、A と G の 2 つの塩基が検出されたが、A の相対活性が 52% に対し、G は 23% であった。その原因は (+) 鎖 RNA の 5' 末端がキャップ構造であるが、その約半分にキャップをなくした分子が含まれているため、キャップ構造の次の塩基 G が標識されたものと考えられる。以上の結果から RDV ゲノム dsRNA の 5' 末端は：



と解析される。この結果は UYEDA ら⁸⁸⁾ が RDV 分節ゲノム No. 10 の cDNA から決定した塩基配列の結果と一致した。

3. RRSV 粒子由来の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ

RRSV 粒子の RNA ポリメラーゼ活性を調べた。反応液は UYEDA and SHIKATA⁹⁰⁾ に準じて調製し、RNA ポリメラーゼ活性は 40°C で 2 時間反応させた後、5% TCA 不溶分画への α -³²P UTP の取込を測定して調べた。

その結果、蔗糖密度勾配遠心分離液のカラムを 15 分画に分け、各分画のポリメラーゼ活性を測定したところ、RRSV 粒子を含む分画のみ活性を示した。電顕で観察した時、この RRSV 粒子の分画にはすべて RRSV 特有の spike をもつ完全粒子が認められた。

最適反応条件は、35~40°C で pH は 8.5、8 mM の MgCl₂ であった。反応液の中に DNase を加えても活性に変化がなく、RNase の添加によって活性が消失した。またポリメラーゼ活性は、1~5 mM の SAM、または 0.2 mg/ml キモトリプシンの添加によって増加した。

合成された転写産物を PAGE によって分析し、また RNA とハイブリダイゼーションを行った結果、全ての分節ゲノムに対応する全長の相補 RNA が合成されたことが認められた。

4. RRSV ゲノム dsRNA の電顕による分子量測定

RRSV ゲノム dsRNA の分子量を電顕を用いて測定、PAGE によって測定された分子量と比較検討した。各

分節ゲノムは 5% PAGE で分離抽出し、シトクロム C 分子膜を用いて展開、白金蒸着を行った。検鏡は電顕、JEM 100-B で 1 万倍で行い、その時分子量のマーカとして、TMV dsRNA と RDV の分節ゲノム No. 10 も同様の条件で検鏡した。分子量の算出は、各分節ゲノム 100 分子の平均長を測定し、同様の条件から測定した TMV の dsRNA と RDV の分節ゲノム No. 10 の平均長から換算した。

その結果、OMURA ら⁶¹⁾ が報告した分子量に対しては全ての分節ゲノムにおいて低い値になり、一方 BOC-CARDO and MILNE⁹⁾、または KAWANO ら³⁴⁾ が報告した分子量とは、分節ゲノム No. 1 から 5 まではほぼ同じであったが、分節ゲノム No. 6 からは電顕によって測定された分子量の方が大きくなり、特に分節ゲノム No. 9 と 10 の場合は 0.25×10^6 以上の差が認められた。

5. RRSV RNA のクローニングと分節ゲノム No. 9 の塩基配列決定

RRSV RNA のクローニングをゲノム dsRNA、または転写産物を用いて行った。

dsRNA からのクローニングは CASHDOLLAR¹²⁾ の方法に準じて分節ゲノム No. 9 の cDNA を合成したが、その効率は低く、取れた 3 つの cDNA も同一のクローンであった。

一方、転写産物からのクローニングは GUBLER and HOFFMAN²²⁾ の方法に準じて cDNA を合成した結果、約 20 μ g の転写産物から 1,000 以上のクローンが得られた。

cDNA の中で分節ゲノム No. 9 のクローンを選別するためドットプロット、またはサーザントランスファーハイブリダイゼーションを行い、その結果 4 つの cDNA が選別された。これら 4 つの cDNA は制限酵素による分析から全長約 1,100 塩基対の cDNA であることが分かった。

塩基配列はデレーション法または制限酵素で切断した DNA 断片を M 13 ファージでサブクローニングし、dideoxy シークエンス法に従って解析し、1,090 の塩基配列を決定した。また 5' と 3' 末端の塩基配列は、転写産物またはゲノム RNA を鋳型としてプライマーエクステンションを行い、5' 末端から 20 の塩基配列を、3' 末端からは 11 の塩基配列を決定した。その結果、RRSV 分節ゲノム No. 9 の全長の 1,121 の塩基配列が決定され、その中に 338 アミノ酸の蛋白質をコードする ORF が見つかった。その蛋白質の分子量は 38,592 であった。

引用文献

1. AHLQUIST, P. and JANDA, M.: cDNA cloning and *in vitro* transcription of the complete bromo mosaicvirus genome. *Mol. Cell. Biol.*, **4**: 2876-2882. 1984
2. ASAMIZU, T., SUMMERS, D., MOTIKA, M. B., ANZOLA, J. V. and NUSS, D. L.: Molecular cloning and characterization of wound tumor virus: tumor-inducing plant reovirus. *Virology*, **144**: 398-409. 1985
3. BIRNBOIM, H. C. and DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**: 1513-1522. 1979
4. BLACK, D. R. and KNIGHT, C. A.: Ribonucleic acid transcriptase activity in purified wound tumor virus. *J. Virol.*, **6**: 194-198. 1970
5. BLACK, L. M.: Physiology of virus-induced tumors in plants. In "Hand buch der Pflanzen physiologie" (W. RUHLAND *et al.*, eds.), Vol. 15, Part 2: 236-266. Springer-Verlag, Berlin. 1965
6. BOCCARDO, G. and MILNE, R. G.: The maize rough dwarf virion. 1. Protein composition and distribution of RNA in different viral fraction. *Virology*, **63**: 79-85. 1975
7. BOCCARDO, G. and MILNE, R. G.: Electrophoretic fractionation of the double stranded RNA genome of rice ragged stunt virus. *Intervirology* **14**: 57-60. 1980
8. BOCCARDO, G. and MILNE, R. G.: Plant reovirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 294. 1984
9. BOCCARDO, G. and MILNE, R. G.: Morphology and nucleic acid of rice gall dwarf virus. *Intervirology*, **23**: 167-171. 1985
10. BORSA, J., COPPS, T. P., SARGENT, M. D., LONG, D. G. and CHAPMAN, J. D.: New intermediate subviral particles in the *in vitro* uncoating of reovirus by chymotrypsin. *J. Virol.*, **11**: 552-564. 1973
11. BORSA, J. and GRAHAM, A. F.: Reovirus: RNA polymerase activity in purified virion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **33**: 895-901. 1968
12. CASHDOLLAR, L. W., ESPARZA, J., HUDSON, G. R., CHMELO, R., LEE, P. W. K. and JOKLIK, W. K.: Cloning the double-stranded RNA genes of reovirus: Sequence of the cloned S2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7644-7648. 1982
13. FRANCKI, R. I. B., MILNE, R. G. and HATTA, T.: Plant reoviridae, In Atlas of plant viruses. vol. 1, pp. 47-72, CRC Press, Boca Raton. 1985
14. FUJII-KAWATA, I., MIURA, K. and FUKE, M.: Segements of genome of viruses containing double-stranded ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.*, **51**: 247-253. 1970
15. FUKUSHI, T. and KIMURA, I.: On some properties of the rice dwarf virus. *Proc. Japan Acad.*, **35**: 482-484. 1959
16. FUKUSHI, T., SHIKATA, E., KIMURA, I. and NEMOTO, M.: Electron microscopic studies on the rice dwarf virus. *Proc. Japan Acad.*, **36**: 352-357. 1960
17. FUKUSHI, T., SHIKATA, E. and KIMURA, I.: Some morphological characters of riced warf virus. *Virology*, **18**: 192-205. 1962
18. FURUICHI, Y. and MIURA, K.: Identity of 3'-terminal sequences in ten genome segments of silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus, *Virology* **55**: 418-425. 1973
19. FURUICHI, Y. and MIURA, K.: A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, **253**: 374-375. 1975
20. FURUICHI, Y., MUTHUKRISHNAN, S. and SHATKIN, J.: 5'-terminal ⁷mG (5') ppp (5') Gmp *in vivo*: Identification in reovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. USA*, **72**: 742-745. 1975
21. GALINSKI, M. S., CHOW, K. C., ROHRMANN, G. F., PEARSON, G. D. and BEAUDREAU G. S.: Size determination of Orgyia pseudotsugata cytoplasmic polyhedrosis virus genomic RNA. *Virology*, **123**: 328-335. 1982
22. GUBLER, U. and HOFFMAN, B. J.: A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25**: 263-269. 1983
23. HAGIWARA, K., MINOBE, Y., NOZU, Y., HIBINO, H., KIMURA, I. and OMURA, T.: Component proteins and structure of rice ragged stunt virus, *J. Gen. Virol.*, **67**: 1711-1715. 1986
24. HANAHAN, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plamids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580. 1983
25. HATTA, T. and FRANCKI, R. I. B.: Similarity in the structure of cytoplasmic polyhedrosis

- virus. leafhopper A virus and fiji disease virus particles. *Intervirology*, **18**: 203-208. 1982
26. HENIKOFF, S.: Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene*, **28**: 351-359. 1984
 27. HIBINO, H.: Rice ragged stunt, a new viruses disease occurring in tropical asia. *Review of Plant Protection Research*, **12**: 98-110. 1979
 28. HIBINO, H. and KIMURA, I.: Detection of rice ragged stunt virus in insect vectors by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology*, **72**: 656-659. 1982
 29. HIBINO, H., SALEH, N. and ROECHAN, M.: Reovirus-like particles associated with rice ragged stunt diseased rice and insect vector cells. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **45**: 228-239. 1979
 30. HU, N. and MESSING, J.: The making of strand-specific M13 probes. *Gene*, **17**: 271-277. 1982
 31. IKEGAMI, M. and FRANCKI, R. I. B.: RNA-dependent RNA polymerase associated with subviral particles of Fiji disease virus. *Virology*, **70**: 292-300. 1976
 32. JOKLIK, W. K.: Studies on the effect of chymotrypsin on reovirions. *Virology*, **49**: 700-715. 1972
 33. JORDAN, R. L. and DODDS, J. A.: Hybridization of 5'-end-labelled RNA to plant RNA in agarose and acrylamide gels. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**: 31-37. 1983
 34. KAWANO, S., UYEDA, I. and SHIKATA, E.: Particle structure and doublestrandedRNA of rice ragged stunt virus. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **61**: 408-418. 1984
 35. KIMURA, I. and SHIKATA, E.: Structural model of rice dwarf virus. *Proc. Japan Acad.*, **44**: 538-543. 1968
 36. KISSELEV, L. L., HAENNI, A. and CHAPEVILLE, F.: Reverse transcription of a plant viral RNA. *FEBS Letters*, **62**: 64-68. 1976
 37. KLEINSCHMIDT, A. K.: Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acid molecules. *Methods in Enzymology*, **12**: 361-377. 1968
 38. KODAMA, T. and SUZUKI, N.: RNA polymerase activity in purified rice dwarf virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **39**: 251-258. 1973
 39. KOZAK, M.: Point mutation define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosome. *Cell*, **44**: 283-292. 1986
 40. LEONING, U. E.: The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem. J.*, **102**: 251-257. 1967
 41. LEWANDOWSKI, L. J., KALMAKOFF, J. and TANADA, Y.: Characterization of a Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori*. *J. Virol.*, **4**: 857-865. 1969
 42. LING, K. C., TIONGCO, E. R. and AUGUIERO, V. M.: Rice ragged stunt virus disease. *Plant Disease Reporter*, **62**: 701-705. 1978
 43. LING, K. C., TIONGCO, E. R., AUGUIERO, V. M. and CABAUTAN, P. Q.: Rice ragged stunt disease in the Philippines. *IRRI Res. Paper Series No. 16*. 1978
 44. MAIZEL, J. V.: Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *In "Methods in Virology" V*, pp. 179-246. 1971
 45. MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. and SAMBROOK, J.: "Molecular Cloning", A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 93-94. 1982
 46. MATTHEWS, R. E. F.: Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, **12**: No. 3-5. 1979
 47. MATTHEWS, R. E. F.: Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, **17**: No. 1-3. 1982
 48. MAXAM, A. M. and GILBERT, W.: Sequencing end-labeled DNA with basespecific chemical cleavages. *In "Methods in Enzymology"*, Vol 65: 499-560. Academic press, New York. 1980
 49. MERTENS, P. P. C. and PAYNE, C. C.: The effects of S-adenosyl methionine (AdoMet) and its analogues on the control of transcription *in vitro* of the mRNA products of two cytoplasmic polyhedrosis viruses. *Virology*, **131**: 18-29. 1983
 50. MESSING, J.: New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology*, **101**: 20-78. 1983
 51. MESSING, J. and VIEIRA, J.: A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. *Gene*, **19**: 269-276. 1982
 52. MILNE, R. G.: Does rice ragged stunt virus lack the typical double shell of the Reoviridae?

- Intervirology, 14: 331-336. 1980
53. MILNE, R. G., LUISONI, E. and LING, K. C.: Preparation and use of an antiserum to rice ragged stunt virus subviral particles. *Plant Dis. Repr.*, **63**: 445-448. 1979
 54. MIURA, K.: The cap structure in eukaryotic messenger RNA as a mark of a strand carrying protein information. *Adv. Biophys.*, **14**: 205-238, 1981
 55. MIURA, K., KIMURA, I. and SUZUKI, N.: Double-stranded ribonucleic acid from rice dwarf virus. *Virology*, **28**: 571-579. 1966
 56. MIURA, K., WATANABE, K. and SUGIURA, M.: 5'-terminal nucleotide sequences of the double-stranded RNA of silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus. *J. Mol. Biol.*, **86**: 31-48. 1974
 57. NAKATA, M., FUKUNAGA, K. and SUZUKI, N.: Polypeptide components of rice dwarf virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **44**: 288-296. 1978
 58. NUSS, D. L.: Molecular biology of wound tumor virus. *In "Advances in Virus Research"*, Vol. **29**: 57-93. 1984
 59. NUSS, D. L. and PETERSON, A. J.: Resolution and genome assignment of RNA transcripts synthesized *in vitro* by wound tumor virus, *Virology*, **114**: 399-404. 1981
 60. OMURA, T., INOUE, H., MORINAKA, T., SAITO, Y., CHETTANACHIT, D., PUTTA, M., PAREJAREARN, A. and DISTHAPARN, S.: Rice gall dwarf, a new virus disease. *Plant Disease*, **64**: 795-797. 1980
 61. OMURA, T., MINOBE, Y., KIMURA, I., HIBINO, H., TSUCHIZAKI, T. and SAITO, Y.: Improved purification procedure and RNA segments of rice ragged stunt virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **49**: 670-675. 1983
 62. OMURA, T., MINOBE, Y., MATSUOKA, M., NOZU, Y., TSUCHIZAKI, T. and SAITO, Y.: Location of structural proteins in particles of rice gall dwarf virus. *J. Gen. Virol.*, **66**: 811-815. 1985
 63. OMURA, T., MORINAKA, T., INOUE, H. and SAITO, Y.: Purification and some properties of rice gall dwarf virus, a new phyto-reovirus. *Phytopathology*, **72**: 1246-1249. 1982
 64. PAYNE, C. C. and HARRAP, K. A.: Cytoplasmic polyhedrosis virus. *Maramorosch ed., The atlas of insect and plant viruses*, vol. 8, pp. 105-129. Academic Press, New York. 1977
 65. REDDY, D. V. R. and BLACK, L. M.: Electrophoretic separation of all components of the double-stranded RNA of wound tumor virus. *Virology*, **54**: 557-562. 1973
 66. REDDY, D. V. R., KIMURA, I. and BLACK, L. M.: Co-electrophoresis of dsRNA from wound tumor virus and rice dwarf viruses. *Virology*, **60**: 293-296. 1974
 67. REDDY, D. V. R. and MACLEOD, R.: Polypeptide components of wound tumor virus. *Virology*, **70**: 274-282. 1976
 68. REDDY, D. V. R., RHODES, D. P., LESNAW, J. A., MACLEOD, R., BANERJEE, A. K. and BLACK, L. M.: *In vitro* transcription of wound tumor virus RNA by virion-associated RNA transcriptase. *Virology*, **80**: 356-361. 1977
 69. RHODES, D. P., REDDY, D. V. R., MACLEOD, R., BLACK, L. M. and BANERJEE, A. K.: *In vitro* synthesis of RNA containing 5'-terminal structure 7mG (5') ppp (5') Apm... by purified wound tumor virus. *Virology*, **76**: 554-559. 1977
 70. SÄNGER, F. and COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467. 1977
 71. SÄNGER, F. and COULSON, A. R.: The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letters*, **87**: 107-110. 1978
 72. SENBOKU, T., CHOU, T. G. and SHIKATA, E.: Some physical properties of rice ragged stunt virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **45**: 735-737. 1979
 73. SHATKIN, A. J. and LAFIANDRA, A. J.: Transcription by infectious subviral particles of reovirus. *J. Virol.*, **10**: 698-706. 1972
 74. SHIKATA, E.: Plant reovirus group. *In The atlas of insect and plant viruses*. pp. 377-403. *Ultrastructure in Biology System 8*. 1977
 75. SHIKATA, E., SENBOKU, T., KAMJAIPAI, K., CHOU, T., TIONGCO, E. R. and LING, K. C.: Rice ragged stunt virus, a new member of plant reovirus group. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **45**: 436-443. 1979
 76. SHIMOTOHNO, K. and MIURA, K.: 5'-terminal structure of messenger RNA transcribed by the RNA polymerase of silkworm cytoplasmic polyhedrosis virus containing double-stranded RNA. *J. Mol. Biol.*, **86**: 21-30. 1974
 77. SILVERSTEIN, S. C., ASTELL, C., LEVIN, D. H., SCHONBERG, M. and ACS, G.: The mecha-

- nisms of reovirus uncoating and gene activation *in vivo*. *Virology*, **47**: 797-806. 1972
78. SKUP, D. and MILLWARD, S.: Reovirus induced modification of cap dependent translation in infected L cells. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 152-156. 1980
 79. SKUP, D. and MILLWARD, S.: mRNA capping enzymes are masked in reovirus progeny subviral particles. *J. Virol.*, **34**: 490-496. 1980
 80. SKUP, D. ZARBL, H. and MILLWARD, S.: Regulation of translation in L-cells infected with reovirus. *J. Mol. Biol.*, **151**: 35-55. 1981
 81. SLEIGH, M. S., BOTH, G. W. and BROWNLEE, G. G.: The influenza virus haemagglutinin gene: cloning and characterisation of a double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**: 879-893. 1979
 82. SMITH, R. E. and FURUICHI, Y.: Gene mapping of cytoplasmic polyhedrosis virus of silkworm by the full length mRNA prepared under optimized condition of transcription *in vitro*. *Virology*, **103**: 279-290. 1980
 83. SOUTHERN, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**: 503-517. 1975
 84. SPENCER, E. and GARCIA, B. I.: Effect of S-adenosylmethionine on human rotavirus RNA synthesis. *J. Virol.*, **52**: 188-197. 1984
 85. TOYODA, S., KIMURA, I. and SUZUKI, N.: Purification of rice dwarf virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **30**: 225-230. 1965
 86. UYEDA, I., LEE, S. Y., OHSHIMA, K., KAWANO, S., SHIKATA, E., LENG, G. W., AO, G. M. and DENG, Z. P.: Sizing of plant reovirus dsRNA segments by electron microscopy. *J. Electron Microscopy, Japan*, **35**: 98. 1986
 87. UYEDA, I., LEE, S. Y., YOSHIMOTO, H. and SHIKATA, E.: RNA polymerase activity of rice ragged stunt and rice black-streaked dwarf viruses. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **53**: 60-63. 1986
 88. UYEDA, I., MATSUMURA, T., SANO, T., OHSHIMA, K. and SHIKATA, E.: Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 10. *Proc. Japan Acad.*, **63**: 227-230. 1987
 89. UYEDA, I. and SHIKATA, E.: Ultrastructure of rice dwarf virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **48**: 295-300. 1982
 90. UYEDA, I. and SHIKATA, E.: Characterization of RNAs synthesized by the virion-associated transcriptase of rice dwarf virus *in vitro*. *Virus Res.*, **1**: 527-32. 1984
 91. WERTHEIMER, A. M., CHEN, S., BORCHARDT, R. T. and FURUICHI, Y.: S-Adenosyl methionine and its analogs. *J. Biol. Chem.*, **255**: 5924-5930. 1980
 92. YAMAMOTO, K. R. and ALBERTS, B. M.: Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. *Virology*, **40**: 734-744. 1970
 93. YOKOYAMA, M., NOZU, Y., HASHIMOTO, J. and OMURA, T.: *In vitro* transcription by RNA polymerase associated with rice gall dwarf virus. *J. Gen. Virol.*, **65**: 533-538. 1984
 94. ZASSENHAUS, H. P., BUTOW, R. A. and HANNON, Y. P.: Rapid electroelution of Nucleic acids from agarose and acrylamide gel. *Analytical Biochemistry*, **125**: 125-130. 1982

Summary

1. Four RDV particles obtained from 10-40% sucrose density gradient centrifugation.

RDV particles were separated into 4 zones, upper-top (T1), lower-top (T2), upper-bottom (B1), and lower-bottom (B2), by their sedimentation position in 10-40% sucrose density gradient centrifugation. Structure, genome dsRNA, structural protein, and polymerase activity of the particles were analyzed and compared each other.

Electron microscopy and 5% PAGE of T1 showed complete loss of genome dsRNA, and disc-PAGE of T1 showed complete loss of structural protein No. 1, 3, 7 which indicated as a core protein. Twelve genome dsRNA segments and 9 structural proteins of RDV were detected in T2, B1 and B2, even if there are concentration differences of the components.

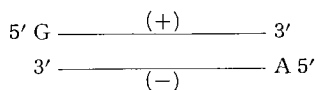
T1 and T2 had no polymerase activity. Analysis of B1 and B2 polymerase activity fractionated by 2nd sucrose density gradient centrifugation showed that B1 had strong correlation with the polymerase activity than B2. The sedimentation position of B2 in sucrose density gradient centrifugation was moved into B1 zone by EDTA treatment.

2. Identification of 5'-terminal nucleotide of RDV genome dsRNA.

The 5'-terminal nucleotide of RDV genome

dsRNA was analysed. In order to label the 5'-terminal of the dsRNA, it was necessary to remove phosphates of 5'-terminal with calf intestinal phosphatase (CIP), and then 5'-terminal nucleotides labeled with $r\text{-}^{32}\text{P}$. ^{32}P labeled dsRNA was digested by RNase P1 and analyzed by two-dimensional paper chromatography.

A and G were detected by autoradiograph of the two-dimensional paper chromatography, and the labeled ratio of radioactivity was 52% (A), 23% (G) respectively. If the 5'-terminal of + strand RNA is cap structure ($\text{mGpppNp}\cdots$), only one nucleotide should be detected. It indicated that about one-half of + strand RNA had no cap structure and their 5'-terminal was labeled. From these results, the 5'-terminal was analyzed as follow;



3. Characterization of RNA polymerase associated with RRSV.

The RNA polymerase associated with RRSV was characterized. Activity was optimum at 35–40°C in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) and 6–8 mM MgCl_2 . S-Adenosyl-L-methionine stimulated the activity about 5–6 fold. It was also stimulated in the presence of chymotrypsin (200 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$).

The molecular weights of RNAs synthesized *in vitro* were calculated to be about half those of the respective genome segments. The synthesized RNAs hybridized to the genome RNAs, and the hybrids migrated identically to the genome RNAs in PAGE. These results indicate that RRSV particles transcribe full-length copies of the genome RNAs. The characteristics of the polymerase are discussed in relation to those of other

members of the Reoviridae.

4. Size of dsRNA genome segments of RRSV by electron microscopy.

Molecular weight of genome dsRNA segments of RRSV was estimated by electron microscopy. The segments separated by 5% PAGE were examined using a cytochrome c method. TMV dsRNA and RDV dsRNA segment 10 were used as size markers.

Estimated molecular weights of the dsRNA segments were S.1–2: 2.48, S.3–4: 2.43, S.5: 1.80, S.6: 1.53, S.7: 1.29, S.8: 1.28, S.9: 0.78, S.10: 0.76×10^6 , respectively. The values of S.1–5 were in agreement with those previously reported by PAGE. However, in the case of the S.6–10, the values were higher than those previously reported by PAGE. Reliability of sizing of dsRNA by electron microscopy is discussed.

5. Molecular cloning and nucleotide sequence of RRSV genome segment 9.

Single-stranded RNA, which was transcribed by RNA polymerase associated with RRSV, was converted to cDNA and cloned into plasmid pBR 322. Approximately 1,000 transformants were generated from 20 μg of transcript RNAs and about 90% of insert DNAs had 500–1,800 base pairs. Virus specific DNAs screened by dot blot or southern transfer hybridization, and four cDNA were corresponded to genome dsRNA segment 9. The sequence of genome dsRNA segment 9 cDNA was determined.

The genome segment 9 cDNA was 1,121 nucleotides in length and possessed a open reading frame that extended 338 codons from the first ATG codon. The open reading frame encoded a protein with a predicted *Mr* of 38,592.