



Title	イネラギッドスタントウイルスゲノムの分子構造解析
Author(s)	須賀, 晴久
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第3888号
Issue Date	1996-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3112012
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51312
Type	doctoral thesis
File Information	000000297204.pdf



イネラギッドスタントウイルスゲノムの分子構造解析

北海道大学大学院農学研究科
農業生物学専攻 博士課程

須賀晴久

平成7年度

①

イネラギッドスタントウイルスゲノムの分子構造解析

北海道大学大学院農学研究科

農業生物学専攻 博士課程

須賀 晴久

平成7年度

謝辞

本研究の遂行及び、本論文の執筆にあたり、御指導いただいた北海道大学農学部植物ウイルス病学・菌学講座の木村郁夫元教授、上田一郎教授、畑谷達治助手、四方英四郎名誉教授、大島一里元助手、佐野輝男元助手、諸先輩方に厚くお礼申し上げます。また、本講座、並びに他講座の皆様に有益な御指導を賜ったことを深く感謝申し上げます。

目 次

I. 緒言	001
II. 研究史	003
1. 植物レオウイルスの分類	003
2. イネラギッドスタント病とその病原ウイルス	003
3. イネラギッドスタントウイルス (RRSV) の分子生物学的研究	006
4. <i>Oryzavirus</i> 属のウイルス	014
III. 材料と方法	016
1. ウイルス源と媒介昆虫	016
2. RRSV粒子の純化	016
3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	018
4. 罹病イネからのRRSVゲノムの抽出	019
5. トビイロウンカからのRRSVゲノムの簡易的抽出	021
6. RRSVゲノムのSDS-PAGE	021
7. PAGE (SSCP)	022
8. 銀染色 (核酸)	022
9. コロニーハイブリダイゼーション	023
① 塩化カルシウムによる大腸菌の形質転換	023
② プラスミドのナイロンメンブレンへの吸着	024
③ プローブの作成	024
④ ハイブリダイゼーション	026
10. ドットプロットハイブリダイゼーション	027
① セグメントのナイロンメンブレンへの吸着	027
② プローブの作成 (ランダムラベリング法)	028
③ ハイブリダイゼーション	029
11. サザンプロットハイブリダイゼーション	029
① ゲルからナイロンメンブレンへ核酸の転写	029
② プローブの作成	030
③ ハイブリダイゼーション	030
12. DMSO変性	031
13. 逆転写反応 (M-MLV逆転写酵素)	031
14. Polymerase chain reaction (PCR)	031
15. サブクローニングとDNAの平滑末端化	032
① プラスミドに挿入するDNA断片の調整	032
② プラスミドベクターの調整	034

③ ライゲーション	034
④ 大腸菌の形質転換	035
16. 大腸菌からのプラスミド抽出 (アルカリ法)	036
17. アガロースゲル電気泳動	037
18. シークエンサーを利用した塩基配列の決定	037
① 反応	037
② 電気泳動	039
19. ³² Pを使用した塩基配列の決定	039
20. 大腸菌によるタンパク質の発現とタンパク質のSDS-PAGE、 ウェスタンブロッティング	040
① 大腸菌によるタンパク質の発現	040
② タンパク質のSDS-PAGE	041
③ クマシー染色	042
④ 銀染色	042
⑤ ウェスタンブロッティング	043
21. アミロースレジンカラムによるMBP融合タンパク質の分離	045
22. 大腸菌タンパク質からGST-P10miniの分離	046
23. タンパク質の濃度測定 (Bradford法)	047
24. GST融合タンパク質でマウスを免疫する方法	047
25. 抗体の精製	049
26. SP6ポリメラーゼによる転写反応	049
27. コムギ胚芽抽出液による翻訳反応	050
IV. 結果と論議	051
1. S1-S8がコードするタンパク質の解析	051
結果	051
① cDNAとセグメントの対応	051
② S1-S8がコードするタンパク質の部分的発現	062
③ 発現タンパク質とRRSV純化粒子に対するポリクローナル抗 体 (抗RRSV粒子抗体) の反応	072
④ RRSV構造タンパク質と発現タンパク質に対するポリクロー ナル抗体の反応	073
論議	077
2. S9の解析	088
結果	088
① PAGEによるS9の変異の検出	088
② S9LとS9Uの塩基配列の比較	089
③ 843番目の塩基置換によるS9のPAGE上の移動度の変化	092

④ S9UとS9Lの簡易検定法の確立	096
⑤ トビイロウンカ各個体が保毒したRRSVのS9の検定	097
⑥ S9UとS9Lの両方が検出される罹病イネから伝搬したRRSV	102
⑦ S9がコードするタンパク質 (P9) の大腸菌による発現	104
⑧ P9と抗RRSV粒子抗体の反応	109
⑨ RRSVの構造タンパク質とMBP-P9に対するポリクローナル 抗体 (抗MBP-P9抗体) の反応	109
⑩ S9L RRSVの伝搬効率	110
論議	113
3. S10の解析	120
結果	123
① S10の主要なORFがコードするタンパク質 (P10) の大腸菌 による発現	123
② S10の小さいORFがコードするタンパク質 (P10mini) の大 腸菌による発現	127
③ P10とP10miniの検出	132
④ コムギ胚芽抽出液によるS10のmRNAの翻訳	138
論議	142
V. 総合論議	147
VI. 摘要	150
VII. 引用文献	154
付録 (略語と試薬)	164

(RRSVに関する略語は付録を参照のこと)

I. 緒言

レオウイルス科のrice ragged stunt *Oryzavirus* (RRSV) によって起こされるイネラギッドスタント病は、東南アジア各地で発生している重要病害である。RRSVのゲノムは10本に分節した2本鎖RNA (dsRNA) で、電気泳動で移動度の遅いものからセグメント (S1) からS10と呼ばれている。ゲノムに対するcDNAがクローニングされ、S9とS10の全塩基配列が決定された (Lee *et al.*, 1987; Yan *et al.*, 1995; Uyeda *et al.*, 1995b)。S9では通常のS9 (S9U) に混ざって電気泳動の移動度が早いもの (S9L) が検出されたが (Yan, 1992)、移動度の異なる原因が分からなかった。決定されたS9の塩基配列はS9Uのもので、片方の鎖に一つの読み取り枠 (ORF) が見出された。一方、S10では主要なORFとその上流に小さいORFが見出された。このようにRRSVではゲノムの解析が徐々に進んでいるが、遺伝子産物に関する情報は少ない。これまでの解析から、RRSVの遺伝子産物と唯一考えられるのは、粒子を構成するタンパク質 (構造タンパク質) である。RRSVでは純化粒子の解析から量比において主要なタンパク質5種類と主要ではないもの2種類が報告されている (Hagiwara *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989b)。

比較的ゲノムが小さいウイルスでは既に全塩基配列が決定され、感

染における遺伝子の機能が解明されつつある。構造遺伝子の場合、その塩基配列から得られるアミノ酸配列と既に機能が分かっているタンパク質のアミノ酸配列を比較することで遺伝子産物の機能が推定できる可能性がある。また、ウイルス感染で特異的に検出されるタンパク質では、発現時期や発現部位などの情報が機能の推定に役立つ。RRSVのように遺伝子操作系が確立していないウイルスでは、病徴や伝搬性など性状を異にする自然変異体のゲノムやタンパク質の比較から遺伝子産物の機能が推定できることがある。これらの研究ではウイルス遺伝子から発現しているタンパク質を同定しなければアミノ酸配列とタンパク質、両方の情報から遺伝子産物の機能を推定することができない。従って、感染の分子機構の解明するために遺伝子産物を同定することが重要である。

RRSVのS1-S8の塩基配列は決定されていないが、これまでのレオウイルス科ウイルスのゲノムの解析からそれぞれのセグメントに一つの長いORFがあると考えられる。本研究ではRRSVの各遺伝子の発現産物を同定することを目的とし、各セグメント上のORFと構造タンパク質の対応を調べた。また、S9ではS9Lの塩基配列を決定して移動度が早くなった原因を明らかにした。S10に関しては真核生物の通常のmRNAと異なるORFの構造を持つことから、特殊な翻訳機構があると考えられたので主要なORFと小さいORF、両方の翻訳産物の検出を試みた。

II. 研究史

1. 植物レオウイルスの分類

植物レオウイルスは分類学上、レオウイルス科に属し、ウンカまたはヨコバイにより永続的に媒介され、10本あるいは12本に分節した2本鎖RNA (dsRNA) のゲノムを持つ。植物レオウイルスはウイルス粒子の形態、セグメントの数、媒介昆虫の種類などにより、

Phytoreovirus 属、*Fijivirus* 属、*Oryzavirus* 属に分類されている。

イネラギッドスタントウイルスは *Oryzavirus* 属に分類されている。

2. イネラギッドスタント病とその病原ウイルス

イネがイネラギッドスタントウイルス (rice ragged stunt *Oryzavirus*: RRSV) に感染すると萎縮、葉が短くなる、葉先が捻転する、葉縁が切れ込む、葉脈に沿ってswellingが生じる、莖が分枝する、穂が異常となる、空籾が生ずるなどの症状を示す。この病気は、1977年までに知られていたイネのウイルス病とは異なる病徴を示すことからインドネシアとフィリピンで新しいウイルス病として報告され (Hibino *et al.*, 1977; Ling *et al.*, 1978)、その後、インド、

中国、日本、マレーシア、スリランカ、台湾、タイなど東南アジア各地でも発生が報告された (Milne *et al.*, 1982)。宿主範囲はイネ科に限られ、イネ (*Oryza sativa*) の他、人工接種ではトウモロコシ、オオムギ、ライムギ、コムギにも感染する (Hibino, 1979; 河野, 1984)。但し、トウモロコシ、オオムギに関しては感染しなかった報告もある (Senboku *et al.*, 1978; Shikata *et al.*, 1979)。品種に関して中野ら (1981) は実験に用いたすべてのイネ (日本イネ28品種、外国品種5品種) が感受性であったと報告している (大畑, 稲の病害 参照)。

電子顕微鏡観察の結果、RRSV罹病イネに50-60nmのレオウイルス様の球状粒子が確認された (Hibino *et al.*, 1977; Ling *et al.*, 1978; Shikata *et al.*, 1979; Hibino, 1979)。純化方法が確立するに従って、RRSV粒子は2重殻構造を持つ *Fijivirus* 属の subviral particle に一致する構造であるらしいことが分かった。しかし、外殻が壊れているのか (Hibino, 1979)、本来存在しないのかは明確ではない (Milne, 1980)。*Fijivirus* 属の subviral particle には円筒状のBスパイクがある。RRSV粒子にも同様に正20面体の各頂点にスパイクがあるが、円筒状ではなく、先端に対し基部が広がっている (Milne, 1980)。更に、MarkhamらのRotation法によってそれらは五角形であることが示された (Kawano *et al.*, 1984)。免疫電子顕微鏡法、寒天ゲル拡散法で *Fijivirus* 属の rice black-streaked

virus (RBSDV)、maize rough dwarf virus (MRDV)、oat sterile dwarf virus (OSDV) とRRSVは血清学的に関係ないことが示されている (仙北ら, 1979; Milne *et al.*, 1979; Hibino, 1979)。NaあるいはK phosphotungstate (pH7.5) 処理はMRDVのBスパイク、reovirus、leaf hopper A virus、cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) の粒子構造には影響しないが (Milne *et al.*, 1982)、*Fijivirus*属のウイルスではBスパイクが消失するものがある。また、100ng/ μ l α -キモトリプシン処理は同様の効果がある (Milne, 1980; Milne *et al.*, 1982)。RRSVでは、キモトリプシンによって、スパイクの分解が電子顕微鏡で観察された (Milne, 1980)。また、0.5M $MgCl_2$ 処理でもスパイクは分解される。但し、0.1M処理では効果はない (Hagiwara *et al.*, 1986; Yan, 1992)。

RRSVはトビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*) によって永続的に媒介され、他のウンカ、ヨコバイによる伝搬や機械的伝搬は認められていない (Hibino *et al.*, 1977; Ling *et al.*, 1978; 仙北ら, 1978; Hibino, 1979; Shikata *et al.*, 1979)。RRSV保毒媒介昆虫体内の唾腺、神経組織、筋肉、脂肪体、前腸の細胞質にパイロプラズム様の封入体を確認され、特に、脂肪体の細胞には多くのウイルス様粒子が認められた (Hibino, 1979; Hibino *et al.*, 1979)。RDVが植物宿主だけでなく媒介昆虫体内でも増殖することが示されて

以来 (Fukushi *et al.*, 1940)、それが植物レオウイルスに属するウイルスの特徴とされている。伝搬試験と電子顕微鏡観察の結果はトビロウンカ体内でRRSVが増殖していることを示している (Shikata, 1981; Milne *et al.*, 1982)。また、RDVはその媒介昆虫であるツマグロヨコバイ (*Nephotetix cincticeps*)、イナズマヨコバイ (*Recilia dorsalis*) で経卵伝染するが (Shikata *et al.*, 1981)、RRSVはトビロウンカで経卵伝染はしない (Ling *et al.*, 1978)。トビロウンカはRRSVを獲得するのに最低3時間の吸汁が必要で潜伏期間は平均で9日 (2-33日間)、接種は最低1時間の吸汁が必要である。接種後は10-36日で病徴が現れる。約40% (6-76%) のトビロウンカがウイルスを媒介する。媒介率は雌雄では変わらないが、成虫より若令の方が高い。潜伏期間を経たトビロウンカは持続的でないときもあるが、一生媒介能を持つ (Hibino, 1979; Milne *et al.*, 1982)。

3. イネラギッドスタントウイルス (RRSV) の分子生物学的研究

RRSV粒子にELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法、ISEM (immunosorbent electron microscopy) 法が適用され、検出が容易になった (Luisoni *et al.*, 1982)。また、Hibino and Kimura (1982) はRRSV保毒媒介昆虫からELISA法でウイルスの検出

を試み、磨碎液に pH7.0 の緩衝液を使用すると卵を保持している雌の非特異的反応が起きてしまうが、pH6.0 の緩衝液では抑えられることを示した。トビイロウンカに RRSV を注射して保毒させられることから、純化の際、感染性粒子の確認にこの方法が用いられた (仙北ら, 1978; Hibino, 1979; Shikata *et al.*, 1979; 仙北ら, 1979; Kawano *et al.*, 1983; Omura *et al.*, 1983)。Rice grassy stunt *Tenuivirus* (RGSV) の媒介昆虫は RRSV と同じトビイロウンカで、永続的に伝搬される。RRSV と RGSV では交叉免疫現象が起こらず、混合感染して両方の病徴が現れる (Hibino *et al.*, 1977; Ling *et al.*, 1978)。Noda *et al.* (1991b) はコロニーによってはトビイロウンカに *Nilaparvata lugens reovirus* (NLRV) が潜在感染していると報告し、そのウイルスは直径 65nm の 2 重殻で、10 本に分節した dsRNA のゲノムを持ち、垂直伝搬していることを示した。NLRV はイネを介して水平伝搬もするが、その際、イネでの増殖は認められていない (Noda and Nakashima, 1995)。媒介昆虫の組織培養も試みられており、Chiu and Black (1967) は potato yellow dwarf *Rhabdovirus* と WTV の媒介昆虫である *Agallia constricta* の細胞株の確立に初めて成功し、その培養細胞で WTV が増殖することを証明した。また、RDV の媒介昆虫であるヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*)、クロスジツマグロヨコバイ (*N. nigropictus*)、イナズマヨコバイ (*Recilia dorsalis*) の細胞株も確立され、RDV を感染させることに

成功した (木村, 1987)。しかし、トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*) では継代培養が成功していない (仙北と四方, 1980)。

RRSVの純化法については緩衝液として0.5Mリン酸、5mM ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) (pH6.0) (Shikata *et al.*, 1979)、0.4M リン酸カリウム、0.02M 硫酸ナトリウム、0.01M diethylditiocarbamate (pH7.6) (Milne *et al.*, 1982)、0.2M グリシン、5mM EDTA、0.5M sodium ascorbate (Hibino and Kimura, 1982)、Histidine緩衝液 (Omura *et al.*, 1983) を使用したものが報告されており、有機溶媒処理には四塩化炭素やフレオン (Shikata *et al.*, 1979; Milne *et al.*, 1979; Hibino and Kimura, 1982) が、また、界面活性剤としてトリトンX-100 (Omura *et al.*, 1983)、Nonidet P-40 (Milne *et al.*, 1982) が用いられた。純化の際、ショ糖密度勾配遠心分離後、2つのバンドが現れることがあるが、その場合は下側のバンドにのみに感染性が認められる (Hibino and Kimura, 1982; Milne *et al.*, 1982; Kawano *et al.*, 1983)。また、0.1M 酢酸アンモニウムで磨砕した場合、罹病イネ汁液は4°Cで7日以上、 10^5 倍希釈まで、保毒虫磨砕液は 10^6 倍希釈まで活性が認められ、罹病イネ汁液では60°C、10分間で失活し、凍結融解を3度繰り返しても活性は低下せず、pH6-9の範囲で安定であることが報告されている (仙北ら, 1979; Hibino, 1979)。

Boccardo and Milne (1980) は、RRSV感染葉から抽出したRNAがDNaseに対して抵抗性であること、2M LiCl処理で沈澱しないこと、0.15M 塩化ナトリウム、0.015M クエン酸ナトリウム (pH7.0) 緩衝液中で83°Cで濃色効果が認められることを示し、その核酸がdsRNAであるとした。また、5% Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) にて総分子量 11.63×10^6 Daになる8本のセグメントを確認し、10本のセグメントからなる *Fijivirus* とは分節数が異なり、MRDVとは移動度も異なることからRRSVは違うグループであることを示唆した。その後、Omura *et al.* (1983) は純化ウイルスから得られたdsRNAを7.5% PAGEで9本に分離し、densitometric tracingの結果からセグメント数が10本で総分子量は 22.91×10^6 Daであると報告した。Kawano *et al.* (1984) はRRSVのゲノムが7.5% PAGEで10本、5%、10%、15%では9本に分離し、総分子量 16.5×10^6 Daであると報告し、粒子構造の違い、核酸の総分子量の違いからRRSVが *Phytoreovirus* 属と *Fijivirus* 属のどちらにも属さないことを示唆した。Uyeda *et al.* (1990b) は、tobacco mosaic *Tobamovirus* (TMV) のdsRNAとRDVのセグメント10 (S10)、RRSVのS9を基準とし、電子顕微鏡観察によって各セグメントの分子量が 0.78×10^6 - 2.58×10^6 Daで、塩基配列数が1157-3849塩基対であると推定した。

動物レオウイルスにおいて、ウイルス粒子にRNA依存RNAポリメラーゼが存在することが示されて以来 (Shatkin and Sipe, 1968)、

植物レオウイルスでも *Phytoreovirus* 属の WTV (Black and Night, 1970; Reddy *et al.*, 1977; Nuss and Perterson, 1981)、RDV (Kodama and Suzuki, 1973; Uyeda and Shikata, 1984)、rice gall dwarf virus (RGDV) (Yokoyama *et al.*, 1984)、*Fijivirus* 属の Fiji disease virus (FDV) (Ikegami and Francki, 1976)、RBSDV (Uyeda *et al.*, 1987)、MRDV (Marzachi *et al.*, 1990) においてその存在が報告された。RRSV においても粒子にポリメラーゼ活性があり、10本の全セグメントが転写されることがハイブリダイゼーションによって確認された。更に、キモトリプシンによって、また、S-adenocyl-L-methionine (SAM) によってこのポリメラーゼ活性が促進されることが示され、RRSVの転写系にCPVで確認されているようなSAMによる転写調節部位が存在することが示唆された (Uyeda *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1988)。

Miura *et al.* (1974) によってCPVの核酸の5'末端がブロックされていることが発見された。その構造は $m^7G(5')ppp(5')GmpC$ であることが分かり (Furuichi and Miura, 1975)、初めてのキャップ構造の報告となった。植物レオウイルスではWTVのmRNAの5'末端にキャップ構造、 $m^7G(5')ppp(5')Amp$ が存在すると報告されているが (Rhodes *et al.*, 1977)、ゲノムのwondering-spotやcDNAの解析では5'GGUAUUであるのでWTVのゲノムの5'末端は分かっていない

(Nuss and Da11, 1990)。RRSVに関してはYan (1992) がRNA primer sequence法でS9の転写産物の5'末端にキャップ構造の存在を示唆している。

1982年、Cashdollar *et al.* はReovirus (Dearing株) のS2の塩基配列の決定に際して、dsRNAから相補鎖DNA (complementary DNA: cDNA) を合成し、dsDNAにしてプラスミドベクター (pBR322) に組み込む方法を開発した。また、1983年にはGubler and Hoffman がmRNAを鋳型として効率的にcDNAを合成する方法を確立した。既に、1977年、Sanger *et al.* が酵素的な手法によって、また、同年、Maxam and Gilbertが化学的分解法によって効率的なDNA塩基配列決定法を確立しており、これらを利用して植物レオウイルスの遺伝子構造の解析が始まった。1985年、Asamizu *et al.* はdsRNAを鋳型としてCashdollar *et al.* (1982) の方法でWTVのS4-S12の全長クローン、S1-S3の部分クローンを得、S12の全塩基配列を決定した。更に、wandering-spot解析でセグメントの末端塩基配列を決定し、その結果、WTVの各セグメントに共通の塩基配列 (+) 5' GGUAUU.....UGAU 3' が存在することを明かにした。RDV、RGDV、RBSDVのセグメント及び、MRDVの一部のセグメントにおいてもそれぞれ末端領域の共通配列の存在が示された (Kudo *et al.*, 1991; Marzachi *et al.*, 1991; Azuhata *et al.*, 1992)。RRSVにおいてはYan *et al.* (1992) が (+) 5' GAUAAA.....GUGC 3'であることを示した。Anzola *et al.*

(1987) は干渉性欠陥粒子 (DI) のS5は末端塩基配列を残していたことを示し、また、Xu *et al.* (1989) はS8の末端のパンハンドル構造を壊すことで発現効率が上昇することを示し、これらの末端共通配列はウイルスゲノムの複製、タンパク質発現、セグメントの格納などの機能に重要な役割を果たすことを示した。

植物レオウイルスのゲノムの塩基配列に関しては現在までにRDVで全セグメントが決定されており (Uyeda *et al.*, 1994)、WTVではS4-S12 (Asamizu *et al.*, 1985; Anzola *et al.*, 1987; Anzola *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1989; Dall *et al.*, 1989)、RGDVではS8-S10 (Koganezawa *et al.*, 1990; Noda *et al.*, 1991a)、RBSDVではS7、S8、S10 (Uyeda *et al.*, 1990a; Azuhata *et al.*, 1993)、MRDVではS6 (Marzachi *et al.*, 1991)、RRSVではS9とS10が決定している (Uyeda *et al.*, 1995a; Yan *et al.*, 1995)。近年、膨大な塩基配列の決定が要求され始め、Sanger *et al.* (1977)の方法を改変した反応とコンピューター解析を組み合わせたシーケンサーが開発された (Smith *et al.*, 1986)。RGDVのS8-S10はこれを利用して決定された (Koganezawa *et al.*, 1990; Noda *et al.*, 1991a)。更に、日本の各地から分離したRDV株にはゲノムの電気泳動で区別できる変異性が認められた。それらのRDV株ではS12の塩基配列が比較された (Murao *et al.*, 1994)。動物に感染するreovirusやrotavirusでは遺伝的再集合によりセグメントが交換する現象が知ら

れていたが、RDVでは2種類のウイルスを媒介昆虫に注射することでその現象が確かめられた (Uyeda *et al.*, 1995a)。

これまでにRRSVでは感染特異的タンパク質の報告がない。しかし、純化ウイルス粒子で7種類のタンパク質がPAGEによって確認されている。また、 $MgCl_2$ 処理でスパイクを分解することにより粒子表面に2種類のタンパク質が存在することが示された。(河野, 1984; Hagiwara *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989b; Yan, 1992)。

RDVでは各セグメントにコードされているタンパク質が罹病イネと保毒媒介昆虫の両方で発現されていることが確認された (Suzuki *et al.*, 1994; 村尾, 1994)。RDVはそれらのうちS1、S2、S3、S5、S7、S8からの翻訳産物で粒子が構成されている (Suzuki, 1995)。

WTVではヨコバイの培養細胞を利用して感染特異的タンパク質が検出され (Nuss and Peterson, 1980)、ゲノムのcDNAクローンをを用いてS4-S12とそれらのタンパク質の対応関係が明らかにされた (Asamizu *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 1989)。

昆虫で媒介をせずに宿主中で長年保持し続けた植物レオウイルスは昆虫伝搬性を失うことがある (Reddy and Black, 1974; Kimura, 1976)。昆虫伝搬性を失ったWTVのS2、S5、S7に変異が起きていた。S7では不完全であったが、S2とS5でそれぞれ変異セグメントに完全に置き換わった変異株が得られた。変異したS5は5'末端より319塩基、3'末端より205塩基を残して中間が欠損していたにもかかわらず、ウ

イルスの複製は可能だった (Anzola *et al.*, 1987)。同様に昆虫伝搬性を失ったRRSVのゲノムの解析ではS10に変異が起きていることが示唆された (Maoka *et al.*, 1993)。

4. *Oryzavirus*属のウイルス

植物レオウイルスの中では *Echinochloa ragged stunt* *Oryzavirus* (ERSV) のヒエでの病徴がRRSVに類似しており、また、RRSVと血清学的関係があること、セグメントと構造タンパク質のPAGEにおける分離パターンがそれぞれ似ていることが報告された (Chen, 1985; Chen *et al.*, 1989b)。Yan *et al.* (1994) が示したERSVのセグメントの末端共通塩基配列は5' GAUAAAU.....GGUGC 3'でRRSVの末端共通塩基配列とほぼ一致している。しかし、媒介昆虫においてRRSVはトビイロウンカ、ERSVは *Sogatella longifurcifera* と異なる。また、ERSVの粒子形態は2重殻でAスパイク様のスパイクを持つことからRRSVよりは *Fijivirus*属の粒子形態に近い (Chen *et al.*, 1989a)。更に、RRSVはトビイロウンカでヒエに伝搬しなかった (Yan, 1992)。これらのことからERSVとRRSVは異なるウイルスでありながら、非常に近縁なウイルスとされ (Chen *et al.*, 1989a)、*Oryzavirus*属に分類された。また、コロンビアのコムギで発生したNarino dwarf病でレオウイルス様の粒子が認められ、PAGE

におけるセグメントの分離パターンがRRSVに似ていることから病原ウイルスと考えられるNarino dwarf virusが*Oryzavirus*属に分類される可能性がある (Uyeda and Milne, 1995)。

Ⅲ. 材料と方法

(以下で使用する試薬類と基本的な実験操作は付録を参照のこと)

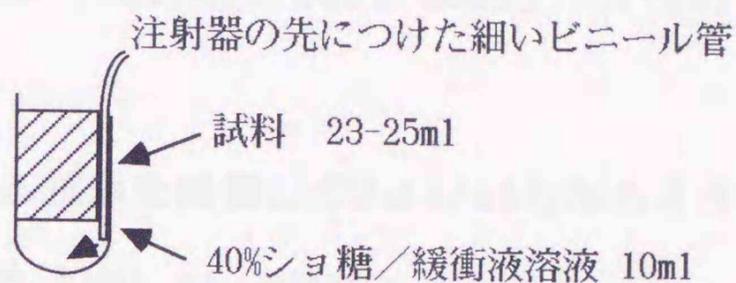
1. ウイルス源と媒介昆虫

イネラギッドスタントウイルス (RRSV) は1977年に国際イネ研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) より譲り受け、北海道大学 (北大) の温室にてイネで継代してきたもの (RRSV-H) と、IRRIで継代してきたものを1992年に北大に移したもの (RRSV-P) を用いた。トビイロウンカは同様に北大で継代してきたものとIRRIで継代してきたものを北大に移して用いた。また、イネの品種は金南風を用いた。

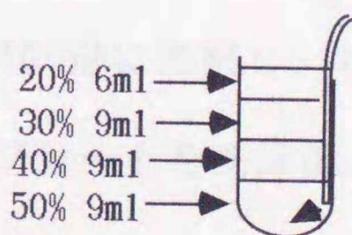
2. RRSV粒子の純化

抽出緩衝液はGMT {0.1M グリシン、0.01M $MgCl_2$ 、0.02M Tris-HCl (pH7.5)} あるいはリン酸緩衝液 {0.1M KH_2PO_4 に0.1M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を加えて最終のpHを6.0にした} を用いた。RRSV罹病イネ 100g を $1cm^2$ ぐらいに刻み、緩衝液 100ml を使用してミートチョッパーで3回程ひいた。ガーゼで粗抽出液を絞り、最終的に30%となるように四塩化炭素を加えてポリトロンホモジナイザーで5分間混合

した。6,000rpmで25分間遠心分離後（マルサン低速遠心分離機と9Bローターを使用）、上層をとって3%量のトリトンX-100をゆっくり滴下し、4-8°Cで30分以上スターラーで攪拌した。40PAチューブを用い、40% ショ糖／緩衝液溶液を試料の下に注射器で下図のようにゆっくり注入した。



4°Cで25,000rpm、90分間遠心分離した（日立65P超遠心分離機あるいは70PとRPS27ローターを使用）沈澱を緩衝液 2ml に溶かした。テフロンホモジナイザーで3分間ホモジナイズし、卓上遠心分離機にて4°Cで8,000rpm、2分間遠心分離した上清を20%-50% ショ糖密度勾配カラムにのせた。ショ糖密度勾配カラムはニトロセルロースチューブを用い、前日に下図のように注射器で作成した。



4°Cで22,000rpm、2時間遠心分離し（日立65P超遠心分離機あるいは70PとRPS27ローターを使用）、ISCOフラクショネーターでウイルスを回収した。ウイルス量が少ない場合はそのまま保存した。多い場合

は12PAチューブを使用し、4°Cで40,000rpm、1時間超遠心分離した
(日立70P超遠心分離機とRPS65アングルローターを使用)。OD₂₆₀の
吸光度を測定してウイルス濃度を算出し、-80°Cで保存した。

3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

RRSV粒子に対する抗体を精製して3 μ g/mlとなるように0.05M 炭
酸ナトリウム緩衝液 (pH9.6) で希釈した溶液をプレート (NUNC社製、
Maxi sorp 8 \times 12ウェル) の各ウェルに200 μ lずつ入れて37°Cで3時
間保温した。緩衝液を捨てて0.02M PBS-Tweenを1ウェルにつき200
 μ l入れ、3分間静置してから液を捨てるという操作を3回繰り返した
(洗浄) {プレートの洗浄には0.02M PBS-Tween (pH7.4) を使
用}。試料を200 μ lずつウェルに入れ (1試料につき2反復した)、4
°Cで一晩静置した。試料を捨てて洗浄し、冷蔵保存してあるRRSV粒子
に対するアルカリフォスファターゼ結合抗体 (希釈倍数試験済み) を
0.02M PBS-Tweenで400倍に希釈し、1ウェルにつき200 μ l入れて37
°Cで3時間保温した。プレートを洗浄後、基質溶液 {1mg P-
nitrophenyl phosphate/ml 10% Diethanolamine (pH9.8) } を
1ウェルにつき200 μ l入れて室温あるいは37°Cで発色が確認できるま
で (1時間-3時間) 保温した。各ウェルは MTP-100 マイクロプレー
トリーダ (コロナ電気社製) によって波長415nmの吸光度を測定し、
陽性と陰性を判定した。各プレートには0.02M PBS-Tween、陽性試料

としてRRSV罹病イネ、陰性試料として健全イネ、トビイロウンカの場合には更に無毒トビイロウンカ試料を用いたウェルを用意した。イネの場合は塩化ナトリウム 40g、 KH_2PO_4 1g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.5g、塩化カリウム 1g、 NaN_3 1g を混合して滅菌水で11としたものを保存緩衝液 (0.1M PBS) とし、使用時に滅菌水で5倍に希釈して11あたり Tween 20を0.5ml加えた {0.02M PBS-Tween (pH7.4)}。イネは生葉重の5倍量の緩衝液 {0.02M PBS-Tween (pH7.4)} を加えて乳鉢で磨碎し、マイクロ遠心チューブに移し、12,000rpm、1分間遠心分離し、上清をELISA試料とした。

トビイロウンカの場合は塩化ナトリウム 40g、 KH_2PO_4 11.34g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.5g、塩化カリウム 1g、 NaN_3 1g を混合して滅菌水で11としたものを保存緩衝液 (0.1M PBS) とし、使用時に滅菌水で5倍に希釈して11あたり Tween 20を0.5ml加えて使用した {0.02M PBS-Tween (pH6.5)}。-80°Cでマイクロ遠心チューブ中 (1つのチューブにつき1個体) に保存してあったトビイロウンカを氷冷しながら1×STE 180 μ l を加えてペッスルあるいは楊子で磨碎した。磨碎液は卓上遠心分離機にて12,000rpmで1分間遠心分離し、上清の36 μ lをマイクロ遠心チューブに移して緩衝液 {0.02M PBS-Tween (pH6.5)} 365 μ l で希釈してELISA試料とした。

4. 罹病イネからのRRSVゲノムの抽出

2-3gのRRSV罹病イネを細かく刻み、50ml用の遠沈ガラスチューブに入れ、1×STE 15ml、20% SDS 0.75ml、メルカプトエタノール 0.15ml、フェノール 7.5ml、クロロフォルム 7.5ml、ベントナイト 0.05gを混合して、ポリトロンホモジナイザーで室温で3-4分間磨砕した。SAKUMA Model 90-22で 2,500rpm、15分間、7°Cで遠心分離し、水層を移して、フェノール 9ml とクロロフォルム 9ml を加え、ヴォルテックスで3分間混合して、同様に遠心分離した。再び水層を移してエタノール沈澱し、TE 3ml に溶解した後、4M LiCl 3ml を混合し、一晩氷冷した。溶液は50ml用ナルゲンチューブに入れ、6Bローターを使用してSakuma Model M-160で10,000rpm、15分間、4°Cで遠心分離し、上清を移してエタノール 15ml だけを混合してエタノール沈澱した。沈澱を滅菌水 400 μ l に溶解し、再度エタノール沈澱した後、1×STE 400 μ l に溶解し、エタノール 200 μ l とCC₄₁ (Whatman社製 CELLULOSE POWDER) 50mg を加えて30分間ヴォルテックスで混合した。卓上遠心分離機で10,000rpm、1分間遠心分離し、上清を捨ててCC₄₁の沈澱に1×STE 400 μ l、エタノール 200 μ l、メルカプトエタノール 60 μ l を加え、15分間ヴォルテックスで混合し、同様に遠心分離してから上清を捨てた。1×STE 400 μ l とエタノール 100 μ l を加えてヴォルテックスしてから遠心分離をする操作を3回繰り返した後、エヴァポレーターで5分間、CC₄₁を乾燥させてから、200 μ lの滅菌水に懸濁した。遠心分離してCC₄₁を除き、上清をエタノール沈澱して10-20 μ lの滅菌水に溶解し、抽出試料とした。

5. トピイロウンカからのRRSVゲノムの簡易的抽出

ELISAに供試した残りの1×STE磨砕液 144 μ l に0.05g ベントナイト/ml 1×STE溶液 10 μ l、20% SDS 7.5 μ l、メルカプトエタノール 1.5 μ l、フェノール 75 μ l、クロロフォルム 75 μ l を混合して10分間ヴォルテックス後、卓上遠心分離機で室温、12,000rpm、5分間遠心分離した。上層をとってエタノール沈殿し、滅菌水 50 μ l に溶解して抽出液とした。

6. RRSVゲノムのSDS-PAGE

泳動緩衝液には0.05M Tris、0.38M グリシン、1% SDS溶液、泳動槽はマリソル社製スラブゲル電気泳動装置を用いた。ゲルの組成はタンパク質のSDS-PAGE (方法20.) 同様であるが、ゲル板は16×16×0.1cmを用いた。30% アクリルアミド保存溶液 8.325ml、20% SDS 0.125ml、3M Tris-HCl (pH8.93) 125ml、滅菌水 13.275ml を混合してSeparation gel溶液とし、10% APS 250 μ l、TEMED 12.5 μ l を混合してゲル板の上端から約2cmの位置まで流し込んでゲル化させた。30% アクリルアミド保存溶液 1ml、20% SDS 0.05ml、0.5M Tris-HCl (pH6.7) 1.25ml、滅菌水 7.59ml を混合してStacking gel溶液とし、10% APS 100 μ l とTEMED 5 μ l を混合し

てゲル化させ、2層のゲルを作製した。試料に等量の2×緩衝液 {0.1M Tris-HCl (pH6.7)、2%メルカプトエタノール、4mM EDTA、20%グリセロール} と泳動用色素液を混合してゲルにのせ、100V定電圧で電気泳動した (RRSVゲノムは通常、約20時間)。泳動後、核酸を検出するため、ゲルをアガロースゲル同様に0.5 μ g/ml EtBr溶液で染色 (方法17.) あるいは銀で染色した (方法8.)。

7. PAGE (SSCP)

SSCP解析の場合は10×TBE (0.9M Tris、0.9M ほう酸、40mM EDTA、最終のpHは8.3) を希釈した0.5×を電気泳動緩衝液とし、泳動槽はマリソル社製スラブゲル電気泳動装置を用いた。ゲル板は16×16×0.1cmを用い、30% アクリルアミド保存溶液 6ml、10×TBE 1.5ml、グリセロール 1.5ml、滅菌水 20.8ml を混合し、フィルター濾過後、10分間脱気して10% APS 200 μ l とTEMED 20 μ l を混合してゲル板に流し込み、コームを差し込んで1時間以上静置してゲルを作製した。室温にて5mA定電流で予備通電後、試料をつんでBPBが流出するまで電気泳動した。

8. 銀染色 (核酸)

電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを固定溶液 (10% エタノール、

0.5% 酢酸) に入れて10分間振盪した後、固定溶液を入れ換えて再度10分間振盪した。固定液を12mM 硝酸銀溶液 [{N/10 Silver nitrate solution (Nacalai社製) } 36ml に滅菌水 264ml を混合して作成] に換えて15分間振盪した後、溶液を除いて滅菌水で軽くすすいだ。ゲルを現像液 (375mM 水酸化ナトリウム、2.3mM NaBH_4 、0.4% HCHO) に入れて軽く振盪し、適当な染色像が得られたら、液を除いて定着液 (0.07M Na_2CO_3) を入れて10分間振盪した。ゲルは3MM紙 (Whatman社製) に移し、1時間乾燥機にかけてから保存した。

9. コロニーハイブリダイゼーション

① 塩化カルシウムによる大腸菌の形質転換

LB寒天培地 (10mg/ml Tryptone、5mg/ml Yeast extract、10mg/ml 塩化ナトリウム、1.5% Agar) 上の大腸菌HB101の単コロニーをLB液体培地 1ml に接種して37°Cで一晩振盪培養した。培養液 400 μl を新たなLB液体培地 40ml に接種して37°Cで90-120分間振盪培養し (ヘネロフラスコを使用)、 OD_{550} が約0.4 (0.2-0.6) になったところで培養を止めた。培養液を遠心分離して集菌し (50ml用ナルゲンチューブに入れ、6Bローターを使用してSakuma Model M-160で4,000rpm、5分間遠心分離)、沈殿を塩化カルシウム溶液 {50mM CaCl_2 、10mM Tris-HCl (pH8.0) } 15ml に穏やかに懸濁した。15分間氷上に静置後、再び集菌し、塩化カルシウム溶液 2ml に懸濁し

た（コンピーテントセル）。コンピーテントセル $100\mu\text{l}$ に pBR322 由来の各プラスミド保存液（濃度は不明） $0.5\mu\text{l}$ を混合して 42°C で1分間熱処理後、LB液体培地 $100\mu\text{l}$ を混合して $12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを含むLB寒天培地上にまいた。室温で数分間乾燥後、一晩 37°C 中で、形質転換した大腸菌のコロニーを形成させた。

② プラスミドのナイロンメンブレンへの吸着

$12.5\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを含むLB寒天培地に各形質転換体を分けるための枠を引いたナイロンメンブレンを敷き、その上にそれぞれの形質転換大腸菌をストリークして 37°C で一晩大腸菌を培養した。大腸菌側を上にしてナイロンメンブレンを室温で10分間乾燥後、 0.5% SDSを含む $2\times\text{SSC}$ に浸した濾紙上に3分間静置して溶液を浸透させた。大腸菌タンパク質を変性させるためにナイロンメンブレンをシャーレに移して1分間電子レンジ（ 960W ）にかけ、 0.1% SDSを含む $5\times\text{SSC}$ 溶液に浸した。大腸菌タンパク質は綿棒でこすって完全に除去した。ナイロンメンブレンは同溶液で洗浄を繰り返してから $2\times\text{SSC}$ 緩衝液で軽く洗浄し、室温で乾燥させてデシケーターで保存した。

③ プローブの作成

RRSVゲノム $10\mu\text{g}$ のTE溶液に泳動用色素を加え、 $5\mu\text{g}/\text{レーン}$ で 5% PAGEに供試した。PAGEは以下の条件で行った。 30% ポリアクリルアミドゲル保存溶液 5ml と $10\times\text{TAE}$ (0.4M Tris 、 0.2M 酢酸ナト

リウム、0.02M EDTA、約2%量の酢酸でpH7-8に調整) 3ml、滅菌水 21.8ml を混合し、10分間エヴァポレーターで脱気後、10% APS 200 μ l と TEMED 20 μ l を混合して、ゲル板 (0.1 \times 16 \times 16cm) に流し込んだ。ゲルは1時間以上静置して作成した。1 \times TAEを電気泳動の緩衝液とし、マリソル社製スラブゲル電気泳動装置を用い、40mA定電流で30分間予備通電後、泳動用色素を混合したゲノムをつんで、約11時間電気泳動した。ゲルを0.5 μ g/ml EtBr溶液中で10分間以上緩やかに振盪してから紫外線照射下 (トランスイルミネーター上) で各セグメントの位置を確認した。各セグメントの位置のゲルをマイクロ遠心チューブに切り出してガラス棒で磨砕した。但し、ゲルが吸着しないようにマイクロ遠心チューブとガラス棒はドラフト中でジクロロシラン蒸気にあてた後、流水で良く洗浄し、更に蒸留水で洗浄してからオートクレーブしたものを用いた (シリコン処理)。ゲル片を核酸溶出用緩衝液 (0.5M 酢酸アンモニウム、0.1% SDS、1mM EDTA) に懸濁し、一晩振盪した。溶液はゲル片を除くために1ml用のマイクロピペットチップにつめたガラスウール (シリコン処理済) を通過させた (卓上遠心分離機で2,000rpm、5分間遠心分離した)。回収した溶液の2.5倍量のエタノール (この場合はエタノールのみ) を混合してエタノール沈殿した。ゲノムの5'末端の構造は明らかではないが、一応、リン酸基を除く操作をした。沈殿を滅菌水 44 μ l に溶解し、10 \times Ca1f intestine alkaline phosphatase (CIP) 用緩衝液 5 μ l と CIP (20units/ μ l) (ベーリンガー・マンハイム社製) 1 μ l を混合し

て50°Cで30分間保温後、再度 CIP 1 μ l を混合して同様に保温した。
20% SDS 2.5 μ l と1M 塩化ナトリウム 5 μ l を混合して反応を止め、
滅菌水で100 μ lとしてからフェノール・クロロフォルムで抽出した。
5'末端を³²Pで標識するため、2回以上エタノール沈殿した核酸を滅菌
水 33 μ l に溶解し、10 \times Kinase用緩衝液 {0.5M Tris-HCl
(pH7.5-8.0)、0.1M MgCl₂、0.05M DTT} 5 μ lと γ -³²PdATP (ICN
社製) 5 μ l (50 μ Ci) とT4 Polynucleotide Kinase (宝酒造社製)
2 μ l を混合して60分間37°Cで保温した。フェノール・クロロフォル
ムで核酸を抽出した後、未反応の γ -³²PdATPをゲル濾過で除いた。ゲル
濾過用のカラムを作成するため、0.5ml用マイクロ遠心チューブの底
に穴を開け、滅菌した綿を敷いて、G-50のTE溶液を適当量入れた。穴
から出る溶液を受け取るための1.5ml用マイクロ遠心チューブを付けて
卓上遠心分離機で5,000rpm、90秒遠心分離し、TEを除いた。等量の
TEを加えて遠心分離する洗浄操作を数回繰り返した後、TEに溶解した
核酸を入れ、遠心分離で下の1.5ml用マイクロ遠心チューブに回収さ
れた核酸溶液をプローブとした。プローブは1 μ lを液体シンチレーショ
ンカウンター (Aloka社製) にかけて³²P活性を測定し、10⁵cpm/ml以
上で使用した。

④ ハイブリダイゼーション

作成したナイロンメンブレン (約43cm²) を耐湯用のビニールバッ
クに入れ、プレハイブリダイゼーション溶液 {50% ホルムアミド、

5×SSC、50mM NaPO₄ (pH6.7)、500μg/ml tRNA、0.1% SDS、5×Denhard's solution} 3-4mlを入れ、気泡を除いてポリシーラーで口を閉じ、42℃で2時間保温した。プレハイブリダイゼーション溶液はハイブリダイゼーション溶液に換え、45℃で13時間保温した。ハイブリダイゼーション溶液はプローブを95℃で10分間熱処理後、急冷して変性させ、新たなプレハイブリダイゼーション溶液 1ml に混合して作成した。未反応のプローブを除くため、ハイブリダイゼーション後、ナイロンメンブレンを0.1% SDSを含む2×SSC溶液 100ml に入れ、室温で10分間緩やかに振盪した(洗浄)。再度同溶液で洗浄を繰り返した後、0.1% SDSを含む0.2×SSC溶液に換えて、60℃で20分間洗浄した。ナイロンメンブレンは乾燥させてからオートラジオグラフィにかけて反応を検出した。

10. ドットプロットハイブリダイゼーション

① セグメントのナイロンメンブレンへの吸着

RRSVのゲノム 12μg を2レーンに分けてSDS-PAGEに供試し、各セグメントを分離した。24時間で泳動用緩衝液を新しいものに換え、全体で48時間泳動した。0.5μg/ml EtBr溶液中で10分間以上緩やかに振盪してから紫外線照射下(トランスイルミネーター上)で核酸を確認したところ、S7とS8が流出していたため、S1、S2、S3、S4だけを抽出した(方法15.)。再度RRSVのゲノム 2μg を同様に全体で31時

間電気泳動して、S7とS8を得た。各セグメントは滅菌水に溶解して1/10量をSDS-PAGEに供試し（方法6.）、ゲルの銀染色をして分離できたことを確認した（方法8.）。残りの試料を10×SSC溶液とし、100°Cで5分間熱処理後、急冷して変性させた。抽出した量に対してS1、S2、S3、S4は約1/25量、S7とS8は1/5量を原液として1cm²枠のナイロンメンブレンにスポットした。変性した試料を冷10×SSCで希釈して同様にしてスポットした。ナイロンメンブレンの下には濾紙を敷き、一回に2μlで数回に分けてスポットした。ナイロンメンブレンは風乾後、0.05N 水酸化ナトリウムを染み込ませた濾紙上に5分間静置した。更に、1分間2×SSC中で洗浄してからGS Gene Linker（バイオラッド社製）C-3 Program（150mJ）で処理し、風乾してデシケーターで保存した。

② プロープの作成（ランダムラベリング法）

Pst Iで切断したプラスミド 75ng とランダムプライマー 9.6pmol（Hexadeoxynucleotide dp(N)6 宝酒造社製）の混合液 5μl を100°Cで3分間処理後、急冷した。試料 1μl にdCTPを除く 0.5mM dNTP 0.5μl、10×Klenow緩衝液 {0.5M Tris-HCl (pH7.5)、0.1M MgCl₂、10mM DTT、0.5mg/ml BSA} 0.5μl、2units/μl Klenow fragment 4μl、α³²PdCTP (6,000Ci/mmol)（アマシャム社製）1μl（10μCi）、滅菌水 1.6μl を混合して37°Cで2時間保温後、0.5M EDTA 0.2μl を混合して反応を停止

させた。反応しなかった α $^{32}\text{PdCTP}$ を除くため、ゲル濾過をした。

Sephadex G50 (ファルマシア社製) のTE懸濁液を下にグラスウールをつめたパスツールピペットに注いでカラムを作成し、上から0.1% SDSを含むTEを注いで下から溶液が出る状態にした。反応液に泳動用色素 $2\mu\text{l}$ を混合してカラムにつんだ後、0.1% SDSを含むTEを $100\mu\text{l}$ ずつ入れて行き、サーベイメーターで測定しながら2つに分かれたピークのうち、最初に出てきたピークを分取してプローブとした。プローブは $1\mu\text{l}$ を液体シンチレーションカウンター (Aloka社製) にかけて ^{32}P 活性を測定し、 10^6 cpm/ml以上で使用した。

③ ハイブリダイゼーション

コロニーハイブリダイゼーション (方法9.) と同様に、ハイブリダイゼーションを行った。但し、プレハイブリダイゼーション溶液は tRNAのかわりに $40\mu\text{g/ml}$ Salmon sperma DNA (和光社製) を使用した。

11. サザンプロットハイブリダイゼーション

① ゲルからナイロンメンブレンへ核酸の転写

1.5% アガロースゲル電気泳動後、 $0.5\mu\text{g/ml}$ EtBr溶液で染色して核酸を確認した (方法17.)。ゲルは0.4N 水酸化ナトリウム、1M 塩化ナトリウム溶液に入れ、15分間室温でゆっくりと振盪した。ナイ

ロンメンブレンは滅菌水に浸した後、 $20\times$ SSCに数分間浸した。0.4N水酸化ナトリウム、1M塩化ナトリウム溶液に浸漬したトランスファー用ブロックの上に、3MM紙(Whatman社製)、ゲル、ナイロンメンブレン、3MM紙、ペーパータオル、重しを順番に積み上げ、1-2時間核酸をナイロンメンブレンに転写した。ゲルを再びEtBrで染色して核酸がトランスファーしたことを確認した。ナイロンメンブレンは0.5M Tris-HCl (pH7.2)、1M塩化ナトリウム溶液に15分間浸した後、室温で乾燥し、更に、 80°C で2時間処理した。

② プロープの作成

ドットプロットと同様にランダムラベリング法で作成した。但し、Random labeling kit(宝酒造社製)を用い、緩衝液は添付のもの、アイソトープは α - ^{32}P dCTP (3,000Ci/mmol)(アマシャム社製) $5\mu\text{l}$ を使用し、全体量 $25\mu\text{l}$ の反応液として説明書に従って反応させた。プロープはSephadex G50(ファルマシア社製)カラムで精製して 1×10^6 cpm/mlに相当する量で使用した。

③ ハイブリダイゼーション

コロニーハイブリダイゼーションと同様に、ハイブリダイゼーションを行った。但し、プレハイブリダイゼーションは 40°C で2-3時間とし、プロープは 90°C 、4分間熱処理後、急冷して用いた。ハイブリダイゼーションは 45°C で一晩行った。

12. DMSO変性

dsRNA試料（水溶液） $5\mu\text{l}$ にDMSO（気体の窒素を0.5-1分間通したものの） $50\mu\text{l}$ を混合し、 50°C で30分間保温した後、 -80°C エタノールで急冷して固化させた。 3M 酢酸ナトリウム $5\mu\text{l}$ とエタノール $150\mu\text{l}$ を混合して、エタノール沈澱し、DMSO変性試料とした。

13. 逆転写反応（M-MLV逆転写酵素）

DMSO変性したゲノムの沈澱をプライマー（ $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ） $1\mu\text{l}$ と滅菌水 $8.5\mu\text{l}$ の混合溶液に溶解し、更に、 2.5mM dNTP $4\mu\text{l}$ 、 0.1M DTT $2\mu\text{l}$ 、 $5\times\text{M-MLV Reverse Transcriptase reaction buffer}$ (GIBCO BRL) $4\mu\text{l}$ 、M-MLV Reverse Transcriptase (GIBCO BRL) ($200\text{units}/\mu\text{l}$) $0.5-1\mu\text{l}$ を混合して 37°C で30-120分間保温した。

14. Polymerase chain reaction (PCR)

2.5mM dNTP $8\mu\text{l}$ と $10\times\text{Tth}$ ポリメラーゼ緩衝液（東洋紡績社製） $10\mu\text{l}$ 、プライマー1（ $0.5-1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ） $2\mu\text{l}$ 、プライマー2（ $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ） $2\mu\text{l}$ 、Tthポリメラーゼ（ $4-6\text{units}/\mu\text{l}$ ）（東洋紡績社製） 2

μ l、鋳型の混合液を滅菌水で100 μ lとした。また、全体量が50 μ lの場合は各試薬、酵素を半分量にした。反応液の蒸発を防ぐためにミネラルオイルを一滴加えてからプログラマブル テンプコントロールシステム PC-700 (アステック社製) にセットして以下の条件で温度を変えた。

S9の全長dsDNAの増幅

94°C 1分間、55°C 2分間、72°C 3分間を30サイクルして25°Cで終了。

SSCPのためにS9の部分的増幅

94°C 1分間、57°C 1分間、72°C 2分間を25サイクルして(最後のサイクルの72°Cは10分間とした) から57°C、40°C、30°Cをそれぞれ10分間ずつ行って25°Cで終了。

pMALに挿入するためのS9 ORFの増幅

95°C 1分間、55°C 0.5分間、75°C 4分間を25サイクルして25°Cで終了。

pMALに挿入するためのS10の主要なORFの増幅

94°C 1分間、55°C 2分間、72°C 3分間を25サイクルして(最後のサイクルの72°Cは10分間とした) から55°C、40°Cをそれぞれ5分間ずつ行って25°Cで終了。

pUC119に挿入するためのS10 の小さいORFの増幅

94°C 1分間、55°C 2分間、72°C 3分間を25サイクルして(最後のサイクルの72°Cは10分間とした) から55°C、40°Cをそれぞれ2分間ずつ行って25°Cで終了。

15. サブクローニングとDNAの平滑末端化

① プラスミドに挿入するDNA断片の調整

制限酵素処理したDNA試料はエタノール沈殿後、必要に応じて平滑末端化した。1-3 μ gのDNA 15 μ l に5 \times T4 DNA ポリメラーゼ緩衝液 {335mM Tris-HCl (pH8.8)、38.5mM MgCl₂、50mM メルカプトエタノール、33.5 μ M EDTA、83mM (NH₄)₂SO₄、0.0835% BSA、1.665mM dNTP}、4units/ μ l T4 DNA ポリメラーゼ 1 μ lを混合して37 $^{\circ}$ Cで1時間保温後、50mM EDTA (pH8.0) 5 μ l を混合して反応を止めた。滅菌水で反応液を50-100 μ lとしてからフェノール・クロロフォルムで抽出し、エタノール沈殿した。制限酵素処理したDNA試料 1-3 μ g をそのまま、あるいはエタノール沈殿した試料は滅菌水 5 μ l に溶解して5% PAGEに供試した。電気泳動は以下の条件で行った。

30% ポリアクリルアミドゲル保存溶液 1.63ml と10 \times TBE 1.96ml、滅菌水 19ml を混合し、10分間エヴァポレーターで脱気後、10% APS 100 μ l とTEMED 12.5 μ l を混合してゲル板 (0.1 \times 9.5 \times 9.5cm) に流し込んだ。ゲルは1時間以上静置して作成した。電気泳動の緩衝液は2 \times TBEとし、マリソル社製ミニスラブゲル電気泳動装置を使用して100V定電圧で30分間予備通電後、泳動用色素を混合したDNA試料をつんで電気泳動した。ゲルは0.5 μ g/ml EtBr溶液中で10分間以上緩やかに振盪した。分離したDNA断片の位置は紫外線照射下 (トランスイルミネーター上) で確認し、その部分のゲルを切り出し、コロニーハイブリダイゼーションのプロープ作成と同様にDNAを溶出してエタノール沈殿した。但し、ゲル片を除くためには、溶出液をSuprecTM-01 (卓上遠心分離機用限外濾過チューブ) に入れて

8,000rpmで10分間の遠心分離を行った。

② プラスミドベクターの調整

必要に応じた制限酵素で処理したプラスミドベクター $2\mu\text{g}$ は1/20量をアガロースゲル電気泳動に供試して切断を確認した(方法17.)。平滑末端化したPCR産物を挿入する場合以外は、すべてではないが、Calf intestine alkaline phosphatase (CIP) で処理した。 $10\times$ CIP緩衝液 $5\mu\text{l}$ と CIP ($20\text{units}/\mu\text{l}$) (ベーリンガー・マンハイム社製) $1\mu\text{l}$ を混合して5'末端が突出している場合は 37°C 、それ以外は 50°C で30分間保温した。制限酵素あるいはCIPを失活させるために滅菌水で $100\mu\text{l}$ とし、フェノール・クロロホルムで抽出した。プラスミドベクターは使用前にエタノール沈殿し、滅菌水 $20\mu\text{l}$ に溶解して用いた。

③ ライゲーション

プラスミドベクター $0.1-0.2\text{pmol}$ と挿入DNA $0.1-0.2\text{pmol}$ 以上を混合し、 $10\times$ ライゲーション緩衝液 $2\mu\text{l}$ 、 10mM dATP $1\mu\text{l}$ 、 $5\text{units}/\mu\text{l}$ T4 DNA リガーゼ (ベーリンガー・マンハイム社製) $1\mu\text{l}$ と滅菌水で全体量 $20\mu\text{l}$ とし、 16°C で8-24時間保温した。あるいはDNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造社製) を用いた。プラスミドベクターと挿入DNAのTE溶液 $10\mu\text{l}$ に等量のI液を混合して 16°C で1時間保温した。ライゲーション反応液の1/2量を大腸菌の形質転換に

用いた。

④ 大腸菌の形質転換

コロニーハイブリダイゼーション同様に大腸菌JM109のコンピートセルを用意した。但し、大腸菌の培養にはLBの代わりにSOB液体培地 (20mg/ml Tryptone、5mg/ml Yeast extract、10mM 塩化ナトリウム、2.5mM 塩化カリウム、10mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、塩化カルシウム溶液の代わりに形質転換用緩衝液 (35mM 酢酸カリウム、50mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.008% 酢酸、45mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、100mM $RuCl$ 、15% しょ糖、最終のpHは5.8) を用い、40ml 培養液から最終的に形質転換用緩衝液 2ml とした。コンピートセルはDMSO 70 μ l を混合して50 μ lずつ分注して-80 $^{\circ}C$ で保存した。コンピートセルとライゲーション反応液を混合して氷上で20-30分間静置した。42 $^{\circ}C$ で1分間熱処理後、SOC液体培地 (SOBに20mM グルコースを加えたもの) 250 μ l を混合して37 $^{\circ}C$ で30分間保温した。全量あるいは一部を50 μ g/ml アンピシリン (プラスミドベクターには抵抗性遺伝子がある) を含む2 \times YT寒天培地にまいて37 $^{\circ}C$ で一晩保温し、コロニーを形成させた。また、LacZ α を利用する場合は100mM IPTGと2% 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D ガラクトシド (X-gal) を予め培地上に塗布しておき、白色のコロニーを選抜した。これらからプラスミドを抽出して目的の断片の挿入を確認した。

16. 大腸菌からのプラスミド抽出 (アルカリ法)

pBR322の場合はテトラサイクリン ($12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)、pUC119の場合はアンピシリン ($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含む $2 \times \text{YT}$ 液体培地 ($16\text{mg}/\text{ml}$ Tryptone、 $10\text{mg}/\text{ml}$ Yeast extract、 $5\text{mg}/\text{ml}$ 塩化ナトリウム) 2ml に形質転換された大腸菌を接種して 37°C で一晩振盪培養した (15ml 用チューブにシリコ栓をしたものを使用)。大腸菌を集菌するために培養液をマイクロ遠心チューブに移し、卓上遠心分離機で $8,000\text{rpm}$ で1分間 (4°C) 遠心分離した。沈澱をTEG溶液 { 25mM Tris-HCl ($\text{pH}8.0$)、 10mM EDTA ($\text{pH}8.0$)、 50mM グルコース} $50 \mu\text{l}$ に懸濁して、 10mg リゾチーム/ ml TEG溶液 $50 \mu\text{l}$ を混合した。5分間室温にて静置した後、NaOH-SDS溶液 (0.2N 水酸化ナトリウム、 1% SDS) $200 \mu\text{l}$ を混合し、正確に5分間氷冷してから 5M 酢酸カリウム溶液 $150 \mu\text{l}$ を混合した。10分間氷冷した後、遠心分離して上清を移し、フェノール・クロロホルムで抽出してからエタノール沈澱した。沈澱は滅菌水 $49 \mu\text{l}$ に溶解し、 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNase A $1 \mu\text{l}$ を混合して 37°C で30分間保温後、 2.498M 塩化ナトリウムを含む 20% (W/V) ポリエチレングリコール $6,000$ 溶液 $30 \mu\text{l}$ を混合して1時間氷冷した。プラスミドは卓上遠心分離機で $14,000\text{rpm}$ (4°C) で10分間遠心分離して沈澱させた。エタノール沈澱同様に等量の 80% エタノールでリンスしてから乾燥させ、 $50\text{-}100 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解した。

17. アガロースゲル電気泳動

1×TBE緩衝液に分離する核酸の大きさに応じて1.0-2.0%量のアガロースを加え、熱を加えて溶解した。ゲルを作製するためにMupid-2 (コスモ・バイオ社製)の専用トレーに入れ、30分間以上静置した。泳動槽にはMupid-2、緩衝液は1×TBEを用い、核酸試料を泳動用色素と混合してウェルに入れ、100V定電圧で通電した。泳動後、ゲルは0.5μg/ml EtBr溶液中で10分間以上緩やかに振盪し、紫外線照射下 (トランスイルミネーター上) で核酸を確認した。

18. シークエンサーを利用した塩基配列の決定

① 反応

培養液 2ml からアルカリ法で抽出したプラスミド試料を滅菌水 100μl に溶解して鋳型試料とし、以下のように反応液を混合した。

A反応

Tth ポリメラーゼ	1μl
A Mix	2μl
JOE primer	1μl
5×Tth緩衝液	1.8μl
鋳型試料	3.2μl

C反応

Tth ポリメラーゼ	2μl
C Mix	2μl
FAM primer	1μl
5×Tth緩衝液	1.8μl
鋳型試料	3.2μl

G反応

Tth ポリメラーゼ	1μl
G Mix	4μl
TAMRA primer	2μl
5×Tth緩衝液	3.6μl
鋳型試料	6.4μl

T反応

Tth ポリメラーゼ	2μl
T Mix	4μl
ROX primer	2μl
5×Tth緩衝液	3.6μl
鋳型試料	6.4μl

但し、Tth ポリメラーゼは希釈緩衝液で0.4units/μlに調製し、

Tth緩衝液は添付の10×のものを滅菌水で希釈して5×で使用した。プライマーは市販のもの {Applied Biosystems (ABI) 社製の-21M13あるいはM13RP1} を使用し、A、C、G、T Mixの組成は以下の通りである。但し、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTPはここで示した値の80%濃度でも行った。

A Mix		C Mix	
ddATP	1275 μ M	ddCTP	248 μ M
dATP	45 μ M	dATP	156 μ M
dCTP	234 μ M	dCTP	32 μ M
C ⁷ -dGTP	351 μ M	C ⁷ -dGTP	234 μ M
dTTP	234 μ M	dTTP	156 μ M
G Mix		T Mix	
ddGTP	128 μ M	ddTTP	960 μ M
dATP	156 μ M	dATP	312 μ M
dCTP	156 μ M	dCTP	312 μ M
C ⁷ -dGTP	94 μ M	C ⁷ -dGTP	468 μ M
dTTP	156 μ M	dTTP	20 μ M

上記混合液にミネラルオイルを1滴加え、プログラマブル テンプコントロールシステム PC-700 (アステック社製) を用いて下記の条件で反応させた。95°Cで30秒保温、55°Cで30秒保温、70°Cで60秒保温を15サイクルした後、95°Cで30秒保温、70°Cで60秒保温を15サイクルして4°Cで保存した。反応終了後、A、C、G反応液をTの反応液に集め、軽く遠心分離してミネラルオイルと反応液を分離した。下層の反応液を別のマイクロ遠心チューブに移し、冷エタノール 200 μ l と3M 酢酸ナトリウム 6 μ l を混合し、-80°Cのかわりに10分以上氷冷してエタノール沈殿した。すぐに電気泳動する場合はホルムアミド溶液 (ホルムアミド:50mM EDTA=5:1の混合液) に溶解した。すぐに電気

泳動しない場合は乾燥したまま -30°C で遮光して保存した。

② 電気泳動

シークエンサー (ABI社製 型式370A) による電気泳動と解析はマニュアルに従った。6% ポリアクリルアミドゲルは尿素 30g、40% アクリルアミド保存溶液 9ml、 $10\times$ TBE 6ml、滅菌水 22.9ml を混合して $45-50^{\circ}\text{C}$ の熱で尿素を溶解し、フィルター濾過後、10分間脱気して10% APS $300\mu\text{l}$ 、TEMED $30\mu\text{l}$ を混合し、シークエンサー専用のゲル板に流し込んで作製した。但し、 $10\times$ TBEはTris 108g、ほう酸 55g、EDTA 8.3gを混合して滅菌水で1lにしたものを用いた。電気泳動の緩衝液には $1\times$ TBEを用い、電圧2,500V、電流40mA、電力30W、温度 40°C の条件で約30分間予備通電した。ウェルを良く洗い、 90°C で2分間熱処理してから急冷した試料をつんで、約14時間電気泳動をした。電気泳動の結果は373Aソフトウェア (ABI社製) で解析した。

19. ^{32}P を使用した塩基配列の決定

反応にはSequenaseTM Ver.2 (United States Biochemical Corporation製) を使用した。電気泳動は以下の条件で行った。尿素 20g、40% アクリルアミド保存溶液 5ml、 $10\times$ TBE 8ml、滅菌水 12.2mlを混合して $45-50^{\circ}\text{C}$ の熱で尿素を溶解し、フィルター濾過後、10分間脱気してから10% APS $225\mu\text{l}$ とTEMED $14\mu\text{l}$ を混合してゲ

ル板 (40×20×0.5cm) に流し込んで4時間以上静置して5% ポリアクリルアミドゲルを作製した。緩衝液に2×TBEを用い、1,800Vの電圧あるいは20mAの電流を上限として約30分間予備通電した。ウェルを良く洗って、90℃で3分間熱処理後、急冷した反応液をつみ、色素の移動度を目安にして (Bromophenol blueが約35塩基、Xylene cyanolが約130塩基) 電気泳動した。泳動後、ゲルを3MM紙 (Whatman社製) にゲルを移し、固定溶液 (10% メタノール、10% 酢酸溶液) 数mlをかけて約5分間静置後、乾燥機にかけてから、オートラジオグラフィーでバンドを検出した。

20. 大腸菌によるタンパク質の発現とタンパク質のSDS-PAGE、ウェスタンブロッティング

① 大腸菌によるタンパク質の発現

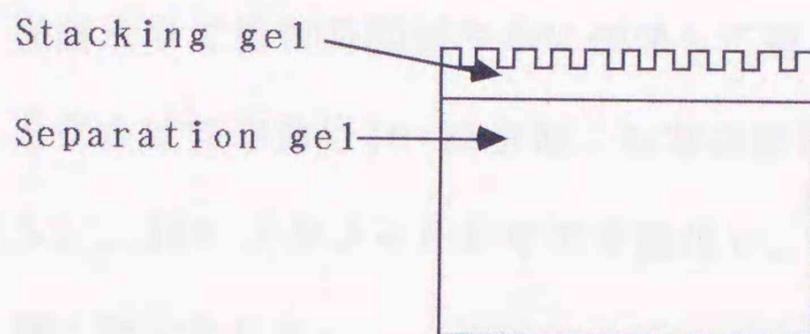
大腸菌発現用プラスミドベクターで形質転換した大腸菌を2×YT 2ml (50 μg/ml アンピシリンを含む) に接種し、37℃で一晩振盪培養した。培養液 10 μl を0.1mM IPTGを含むRich medium (1% Tryptone、0.5% Yeast extract、0.5% 塩化ナトリウム) 2ml に接種し、23℃で約5時間振盪培養した。この方法で発現しなかった場合は培養液 200 μl を液体培地 2ml に接種し、37℃で3-4時間振盪培養した。発現を誘導するために最終0.1-10mM IPTGを培養開始から0-3時間後に混合した。250 μl-500 μlの培養液をマイクロ遠心

チューブに移し、卓上遠心機で8,000rpmで2分間遠心分離した。大腸菌の沈殿は25 μ lのTEに懸濁した。

② タンパク質のSDS-PAGE

上記大腸菌試料を等量のSDS-PAGE用の2 \times 試料緩衝液 {0.25M Tris-HCl (pH6.8)、20% グリセロール、4% SDS、10% メルカプトエタノール、0.04% BPB} と混合して100 $^{\circ}$ Cで3-5分間熱処理した (SDS-PAGEに供試するタンパク質の調整法)。2-10 μ lを以下の条件のSDS-PAGEに供試した。サイズマーカーは通常Low molecular weight standard marker (バイオラッド社製) をTEで8倍に希釈し、試料と同様に調整して4 μ lを供試した。ゲルの作成と泳動はMini Protean II (Bio-Rad社製) (ゲル板10 \times 7 \times 0.075cm) あるいはV-Cell M (ACI社製) (ゲル板10 \times 9.5 \times 0.075cm) を使用した。Separation gel溶液 {0.375M Tris-HCl (pH8.8)、15-8% アクリルアミド (作成には30% ポリアクリルアミドゲル保存溶液を使用)、0.1% SDS} を10分間エヴァポレーターで脱気後、1/100量の10% APSと1/2,500-1,700量のTEMEDを混合してゲル板の上部が約1.5cm空くように流し込んだ。ゲルの上側表面が平らになるように少量のSec-Buthanolあるいは滅菌水を重層して1時間以上静置した。ゲル化した後、上側表面を水で洗浄し、濾紙で水を完全に除いた。次にStacking gel溶液 {0.125M Tris-HCl (pH6.8)、3% アクリルアミド (作成には30% ポリアクリルアミドゲル保存溶液を使用)、0.1%

SDS} を10分間エヴァポレーターで脱気後、1/100量の10% APSと1/666量のTEMEDを混合して、空けておいた上部に流し込み、コームをさして1時間以上静置した。このようにして作成したゲルの概略を下に示した。



電気泳動用緩衝液 (25mM Tris、192mM グリシン、0.1% SDS、最終のpHは8.3) を用い、試料をつんで150V定電圧で電気泳動後、タンパク質を検出するため、クマシー染色あるいは銀染色をした。

③ クマシー染色

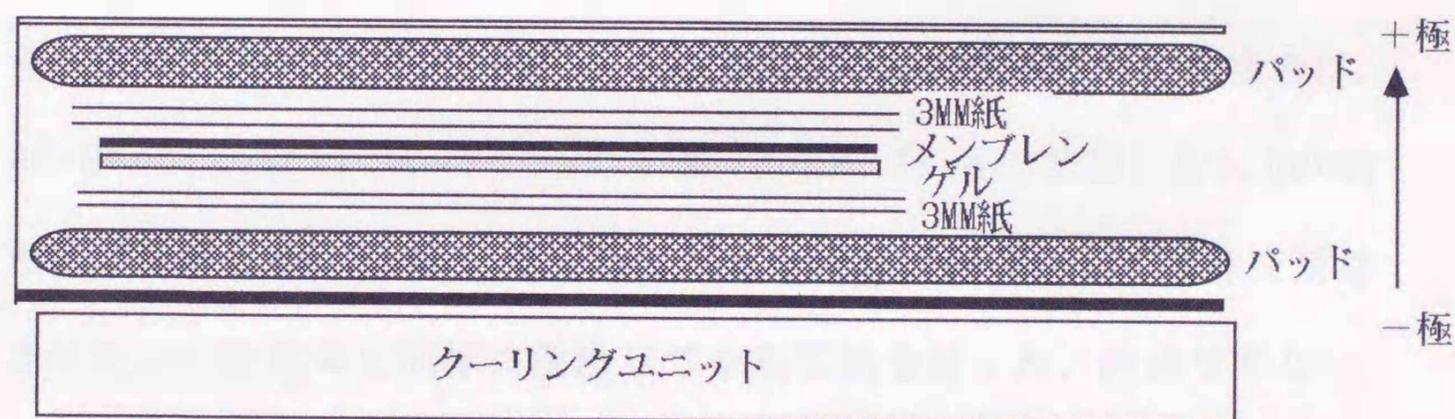
クマシー染色液 (0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250、45% メタノール、10% 酢酸) を浸透させるため、ゲルを溶液中で0.5-1時間緩やかに振盪した。脱染液 (45% メタノール、10% 酢酸) 中で振盪して余分なクマシーは除き、タンパク質のバンドを検出した。

④ 銀染色

銀染色IIキットワコーを使用した。但し、各操作で1枚あたりの試薬量は50mlとし、水は滅菌水を用いた。

⑤ ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE後、Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (バイオラッド社製) を使用してタンパク質をゲルからPVDFメンブレンに転写した。PVDFメンブレンはメタノールに数秒間浸してから滅菌水中で約10分間緩やかに振盪して親水性にした。PVDFメンブレンとゲルは転写前に10-15分間、転写緩衝液 (25mM Tris、192mM グリシン、20% メタノール) 中で平衡化し、気泡が入らないように下図の様にセットした。



溶液が混合するようにスターラーで攪拌しながら100V定電圧で1時間通電した。転写後、PVDFメンブレンをブロッキング溶液 [5% スキムミルク (雪印乳業) を含むTBS溶液 {50mM Tris-HCl (pH7.5) 、150mM 塩化ナトリウム}] でブロッキングした (37°Cで1時間あるいは6°Cで一晩溶液中に浸しておく)。PVDFメンブレンは室温の0.1% トリトンX-100を含むTBS溶液中で5分間振盪して余分なスキムミルクを除いてからビニールバックに入れ、更に、一次抗体を含むブロッキ

ング溶液（抗体は用いるものによって異なるが、血清の場合はおよそ200倍希釈を、また、精製した抗体の場合は5ng/ μ lを基準とした）1-2ml を入れてブロッキング同様にして抗体を反応させた。TBS溶液でPVDFメンブレンをかるく洗い、表面の抗体溶液を除いてから、0.1%トリトンX-100を含むTBS溶液 50ml 中で10-15分間室温で振盪した（洗浄操作）。液を入れ換えて同溶液で洗浄操作を2回繰り返した後、TBS溶液で2回洗浄操作をした。PVDFメンブレンをビニールバックに入れ、酵素結合抗体を含むブロッキング溶液〔酵素結合抗体は最初の抗体がウサギのものの場合、HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) あるいはAP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)、マウスのものの場合、AP-Rabbit Anti-Mouse IgG+A+M (H+L) (Zymed社製) を1,000倍希釈で使用した〕1-2ml を入れてブロッキング同様にして抗体を反応させた。一次抗体と同様に洗浄してから発色を行った。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体〔HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)〕の場合はKonica immunostaining HRD kit (コスモバイオ社製) を使用した。アルカリフォスファターゼ結合抗体〔AP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) あるいはAP-Rabbit Anti-Mouse IgG +A+M (H+L)〕の場合はPVDFメンブレンを発色用溶液〔0.1M Tris-HCl (pH9.5)、0.05M MgCl₂、0.1M 塩化ナトリウム、0.375mg/ml Nitro blue tetrazolium chloride (NBT)、0.1875mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate、4-toluidine salt; X-phosphate、4-toluidine salt (BCIP)〕5ml に浸してバンドを

検出した。どちらとも発色が終わってからPVDFメンブレンを数回水洗して乾燥させて保存した。

21. アミロースレジンカラムによるMBP融合タンパク質の分離

目的タンパク質を発現させた状態の大腸菌培養液 40ml を準備した。大腸菌を集菌して（培養液をナルゲン50ml用ナルゲンチューブに入れ、6Bローターを使用してSakuma Model M-160で6,000rpm、5分間遠心分離して沈殿させた）菌体の重さを測定した。沈殿1gに対して10mlの溶解液 [10mM Na_2HPO_4 、30mM 塩化ナトリウム、0.25% Tween 20、10mM メルカプトエタノール、10mM EDTA、10mM EGTA

{Ethyleneglycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid} 水酸化ナトリウムでpH7.0に調整したもの] を用いて懸濁し、直ちに次の操作をするか、 -20°C で一晩あるいは -80°C で一度凍結させた。10 μM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を加えて、あるいは加えないまま氷水中にて、30秒間の超音波処理と30秒間の放置を4-5回繰り返した。0.5M 塩化ナトリウムを混合し、Sakuma Model M-160で10,000rpm、 4°C で30分間遠心分離して、その上清をカラムにのせた。カラムは説明書に従ってBed Volumeで1ml準備した。0.25% Tween 20を含むカラム緩衝液 {10mM Na_2HPO_4 、0.5M 塩化ナトリウム、1mM NaN_3 、10mM メルカプトエタノール、1mM EGTA (pH7.0)} をカラムの3倍量通した後、5倍量のカラム緩衝液を通して

吸着しない大腸菌タンパク質を流し出した。10mM Maltoseを含むカラム緩衝液を0.5mlずつ入れ、その度に溶出液を分取した。最初の2-5分画をBradford法あるいは OD_{280} の吸光度を測定して濃度を算出した。

22. 大腸菌タンパク質からGST-P10miniの分離

目的タンパク質を発現した状態の大腸菌培養液 40ml を準備した。大腸菌を集菌して（培養液をナルゲン50ml用ナルゲンチューブに入れ、6Bローターを使用してSakuma Model M-160で6,000rpm、5分間遠心分離して沈殿させた）重さを測定した。10ml/gとなるように0.02M PBS (pH7.4) で沈殿を懸濁した後、直ちに次の操作をするか、 -20°C で一晩あるいは -80°C で一度凍結させた。10 μM PMSF

(phenylmethylsulfonyl fluoride) を加えて、あるいは加えないまま氷水中にて、30秒間の超音波処理と30秒間の放置を4-5回繰り返した。1% トリトンX-100を混合し、Sakuma Model M-160で10,000rpm、 4°C で30分間遠心分離して、その上清を試料とした。グルタチオンアガロースビーズ（シグマ社製）は20×量 (V/W) の0.02M PBS (pH7.4) で膨潤させて50% Slurryとした。その500 μl を用いてカラムを作成した。0.02M PBS (pH7.4) 50ml を通した後、上記で準備した試料を通して吸着させた。吸着しない大腸菌タンパク質は0.02M PBS (pH7.4) 75ml を通して流し出した。5mM 還元型グルタチオンを含む50mM Tris-HCl (pH8.0) を0.5mlずつ入れ、その

度に溶出液を分取した。最初の2-5分画を OD_{280} の吸光度を測定して濃度を算出した。

23. タンパク質の濃度測定 (Bradford法)

Bio-Rad Protein Assay Kit Iを使用した。スタンダードのIgGは0、1.37、6.0、10.0、16.0、20.0、27.4 μ g/mlとして300 μ l量にDye reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) 73 μ lを混合し、5分間以上室温で反応させた。 OD_{595} の吸光値を測定し、IgG濃度を横軸、吸光度を縦軸にスタンダードのグラフを作成した。タンパク質試料は同様に反応させて吸光値を測定した。グラフにその吸光度を対応させて濃度を算出した。

24. GST融合タンパク質でマウスを免疫する方法

目的タンパク質を発現させた状態の大腸菌培養液 40ml を準備した。大腸菌を集菌して(培養液をナルゲン50ml用ナルゲンチューブに入れ、6Bローターを使用してSakuma Model M-160で6,000rpm、5分間遠心分離して沈殿させた)菌体の重さを測定した。10ml/gとなるように試料緩衝液 {100mM 塩化ナトリウム、1mM EDTA (pH8.0)、50mM Tris-HCl (pH8.0)} で沈殿を懸濁し、氷水中にて、30秒間の超音波処理と30秒間の放置を全部で5分間行った。Sakuma Model M-160

で10,000rpm、10分間 4°Cで遠心分離してタンパク質を沈殿させ、重量を測定した。10ml/gとなるように試料緩衝液で沈殿を懸濁し、8mM MgCl₂、7units/ μ l DNase I (70units/ μ l)、0.1% リゾチーム、0.1% Nonidet P-40を混合して37°Cで30分間保温した。Sakuma Model M-160で10,000rpm、10分間 4°Cで遠心分離してできた沈殿の重量を測定し、5ml/gとなるようにTEで溶解し、SDS-PAGE用に試料調整して30-40 μ l/レーンで10% SDS-PAGEに供試した。タンパク質のSDS-PAGE同様であるが(方法20.)、ゲル板には16 \times 16 \times 0.1cm用を用い、マリソル社製スラブゲル電気泳動装置を用いて200V定電圧で通電した。発現させていない状態の培養液と発現させた状態の培養液1mlを準備し、そこから集菌したタンパク質をTE 50 μ lに懸濁してSDS-PAGE用に試料調整し、20 μ lを供試した。サイズマーカーはLow molecular weight standard marker (バイオラッド社製)をTEで8倍に希釈し、試料と同様に調整して6 μ lを供試した。サイズマーカー、発現させていないタンパク質、発現させたタンパク質、抗原用の両端のレーンの半分を切り取ってクマシーで染色して発現タンパク質の位置を確認した。抗原用としては6レーン分のゲルを切り出した。ゲルは乳鉢と乳棒で磨砕して50mM Tris-HCl (pH7.8) 3.6mlに懸濁した。マウスを免疫するためには腹腔内注射を行った。試料 300 μ lを等量の不完全アジバンドと乳化して1回の注射に用いた。2週間間隔で注射し、2回目の注射から2週間後に部分採血して、その血清を使用した。

25. 抗体の精製

操作は冷室（6-8°C）で行った。血清が凍結乾燥保存してあった場合は滅菌水でもと量にもどしてから使用した。2mlの血清を滅菌水で10mlに希釈し、スターラーで攪拌しながら液が白濁するまで水飽和硫酸アンモニウムを徐々に混ぜていった（5-6ml）。白濁が見られてから30分間攪拌し、その後4時間静置した。SAKUMA Model 90-22で3,600rpm、20分間遠心分離し、できた沈殿を0.01M PBS (pH7.4) (68.4mM 塩化ナトリウム、0.7mM KH_2PO_4 、4mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1.34mM 塩化カリウム、0.01% NaN_3) 1mlに溶解した。この溶液を透析膜 {沸騰水に3回通したSeamless cellulose tubing (VISKASE SALES CORP. 三光純薬社製)} に入れて、0.01M PBS (pH7.4) 500ml で透析した（1時間で新しい液に換え、更に1時間後にも液を換え、次に一晩透析した）。透析した試料は0.01M PBS (pH7.4) を用い、陰イオン交換セルロースカラム (DE-32 2-3g Whatmann社製) を通過させて（カラムは説明書に従って洗浄操作したものを用いた）抗体を分取した。抗体濃度は OD_{280} の吸光度を測定して算出した。

26. SP6ポリメラーゼによる転写反応

反応液 {40mM Tris-HCl (pH 7.9)、6mM MgCl_2 、2mM

spermidine-(HCl)₃、1mM DTT、27.5-55units RNase inhibitor、0.5mM NTP、0.3 units/ μ l SP6 ポリメラーゼ、0.2 μ g/ μ l DNA} を37°Cで2時間保温した後、DNase I 70units を混合して37°Cで20-30分間保温してDNAを除去した。但し、5'末端にキャップ構造を付加する場合には0.5mM NTPのかわりに0.5mM ATP、CTP、UTP、0.05mM GTP、0.5mM GpppGを用い、SP6 ポリメラーゼは0.6units/ μ lとした。核酸はフェノール・クロロフォルム抽出してからエタノール沈殿して回収した。

27. コムギ胚芽抽出液による翻訳反応

変性したmRNA 1.6 μ l に小麦胚芽抽出液 6.25 μ l、1mM アミノ酸混合液 (メチオニンを除く) 1 μ l、1M 酢酸カリウム 1.625 μ l (130mMの場合) あるいは、0.625 μ l (50mMの場合) あるいは2.5 μ l (50mMの場合)、10mM DTT 1.25 μ l、RNase inhibitor (40units/ μ l) 0.25 μ l、³H メチオニン (83.4mCi/mmol) (アマシャム社製) 1.625 μ l を混合して反応液とした。また、15% SDS-PAGEにはV-Ce11 M (ACI社製) (ゲル板10×9.5×0.075cm) を使用した。

IV. 結果と論議

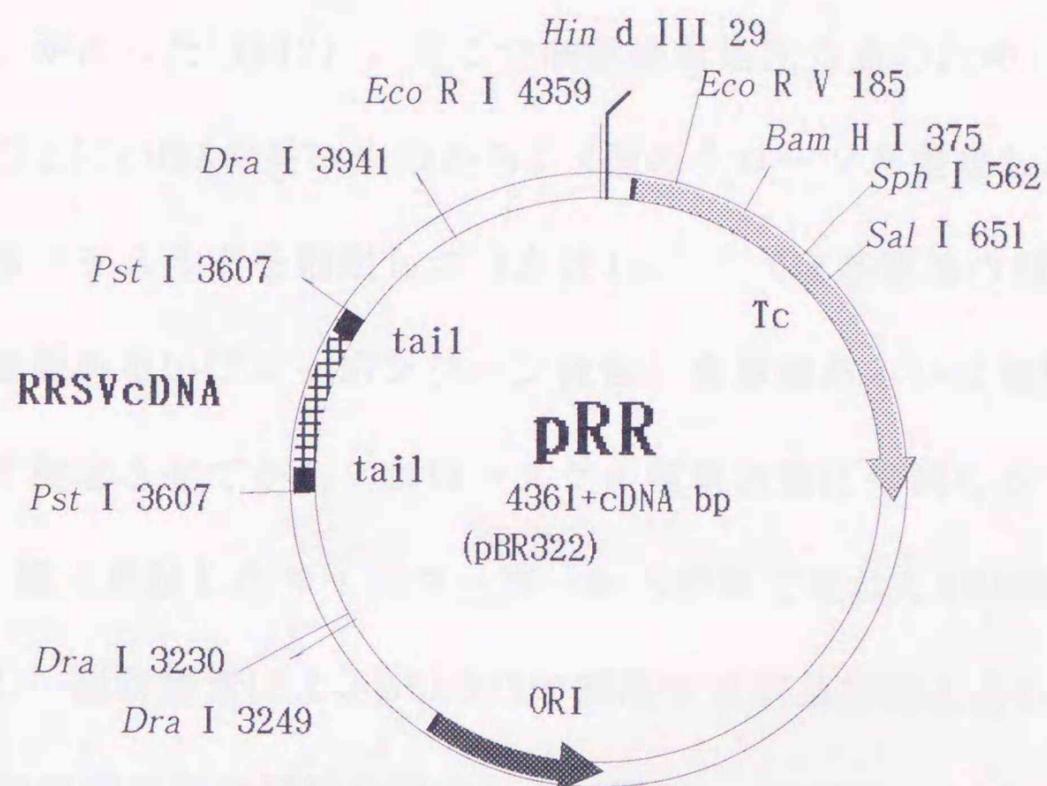
1. S1-S8がコードするタンパク質の解析

これまでにRRSVのS1-S8の塩基配列は決定されていないが、レオウイルス科ウイルスのゲノムの解析から各セグメントには一つの長いORFがあると考えられる。一方、RRSV粒子を構成する7種類のタンパク質（構造タンパク質）はRRSVの遺伝子から発現すると考えられる。そこでS1-S8がコードするタンパク質を同定するために、S1-S8中のORFと構造タンパク質の対応を調べることにした。

結果

① cDNAとセグメントの対応

Lee *et al.* (1987) はRRSVの全セグメント混合状態のmRNAからcDNAを合成し、pBR322の *Pst* I部位に組み込んだので (pRR) (図1)、まず、各プラスミドに組み込まれたcDNAがどのセグメントに由来するのかをコロニーハイブリダイゼーションで同定した (方法9.)。RRSVのゲノムをPAGEで各セグメントに分離し、それぞれを³²Pで標識してプローブとした。但し、セグメント1 (S1) とS2、S3とS4、



主な6塩基認識の制限酵素中、pBR322に存在しない制限酵素
Kpn I Not I Sac I Sma I Xba I Xho I

図1 pRRの制限酵素地図

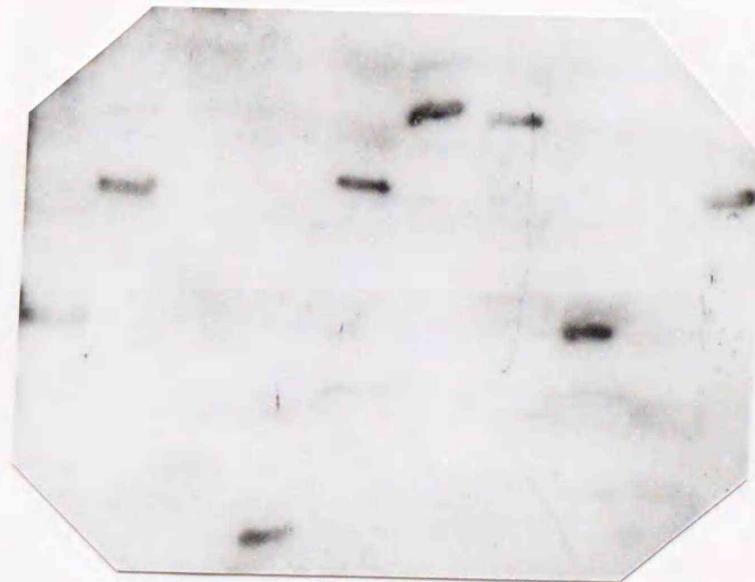
RRSVのmRNAから逆転写反応によって得られたcDNAにポリdCを付加し、pBR322の*Pst I* 部位にポリdGを付加して挿入した。そのため、cDNAのライゲーション部位にはポリdGdC塩基対 (tail) が存在する。制限酵素の横の数値はpBR322における位置を示し、Tcはテトラサイクリン耐性遺伝子、ORIは複製起点を示す。

S7とS8はPAGEで近接していたため、混合状態のままプローブとした。ハイブリダイゼーションの結果、各プローブについてそれぞれ反応したクローンがあった(図2)。そこで制限酵素地図作成のために用いたプローブごとにcDNAの長いものから2-4個のクローンを選抜した。大腸菌から各プラスミドを抽出して(方法16.)、6塩基認識の制限酵素(宝酒造社製あるいはニッポンジーン社製)を単独あるいは複数を組み合わせて反応させてからアガロースゲル電気泳動に供試した(方法17.)。一緒に供試したサイズマーカーから切断で現れたDNA断片の長さを計測し、制限酵素によるpBR322の制限酵素認識部位と合わせてcDNA上の制限酵素認識部位を同定した(図3)。コロニーハイブリダイゼーションで同じセグメント由来と同定したcDNAは制限酵素地図が重複していた。その重なり方によって、プローブが分離できなかったクローンをまとめると、S1とS2では3つのグループに、S3とS4、S7とS8では2つのグループに分かれた。そこでこれらのグループとセグメントの対応を明確にするため、ドットプロットハイブリダイゼーションを行った(方法10.)。各グループの中でcDNAの長いものを³²Pで標識してプローブとした。RRSVのゲノムをPAGEに供試してS1とS2、S3とS4、S7とS8をそれぞれ分離し、ゲルから抽出してナイロンメンブレンにスポットした。PAGEでは完全に分離できずに近接したセグメントどうしが混入することを考慮して、原液の他、原液を5倍と25倍に希釈してスポットした。ハイブリダイゼーションの結果、各プローブに

(A) プローブ: S1+S2



		27	97	99	106	107*	108		
	109	110	111*	117	118*	119	120	121	
122	123	124	125	126	127★	132	133	134	135
137★	138	139	141	142*	146	156	162*	163*	164
166★	172	184	193	203	204	224	207	208	212★
217	218★	220★	221	222	223	206*	225	226	227
	228	230	231	233	235	241	246	249	
		250	258	263	274	275	283		



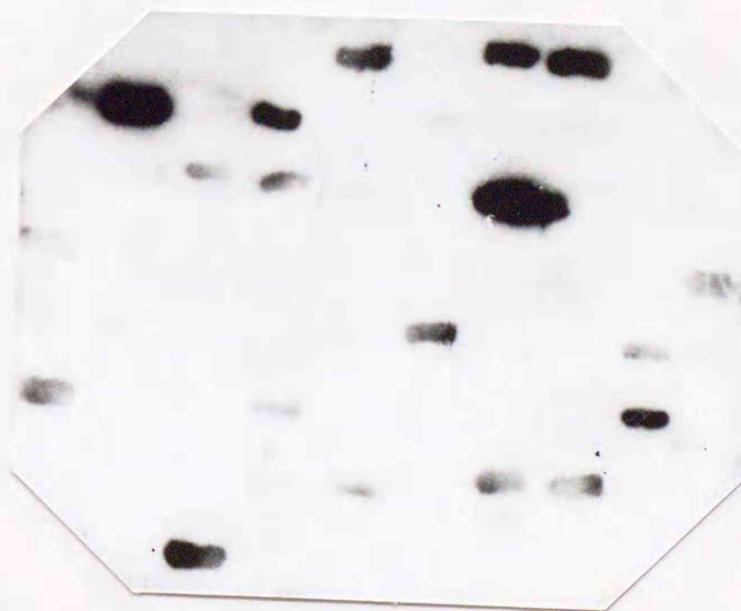
		286	287	288	290	291	293		
	303	305	307	314	316★	492	318	319	
320	336★	338	342	345★	350	351	355	356	373★
375	390	393	398	414	416	420	424	430	432
433*	434	438	441	443	448	451	454★	455	456
464	465	470	471	474	477	479	483	486	487
489	491	317	493	495	496	497	499		
		500★							

図2 コロニーハイブリダイゼーションによるcDNAクローンのセグメント同定

(B) プローブ : S3+S4

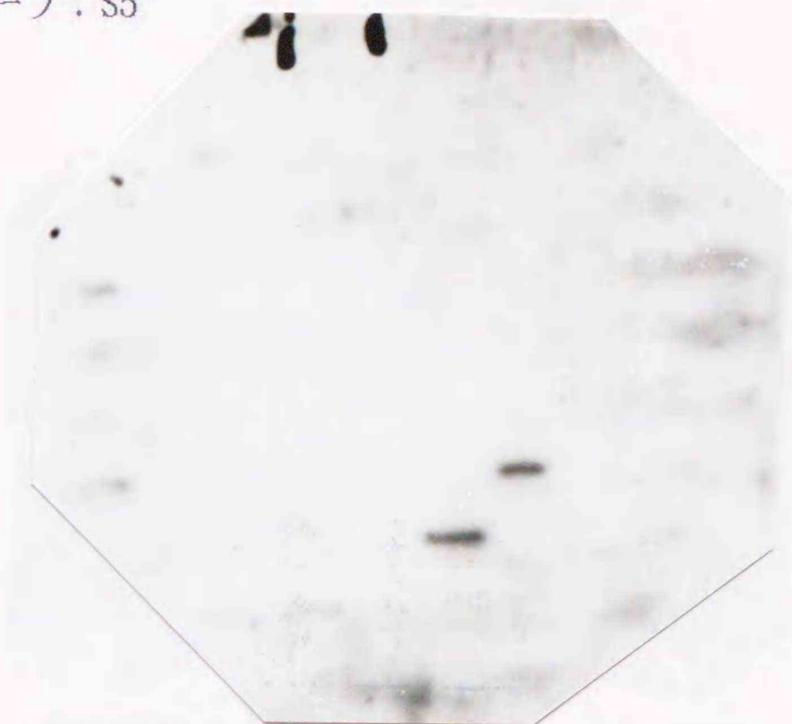


		27	97	99*	106*	107	108		
	109★	110*	111	117	118	119	120	121	
122	123	124	125	126	127	132	133	134	135*
137	138	139	141	142★	146	156	162	163	164★
166	172	184	193★	203★	204	224	207	208	212
217	218	220	221*	222	223	206	225	226	227
	228	230★	231	233	235	241★	246★	249	
		250	258	263*	274*	275	283★		

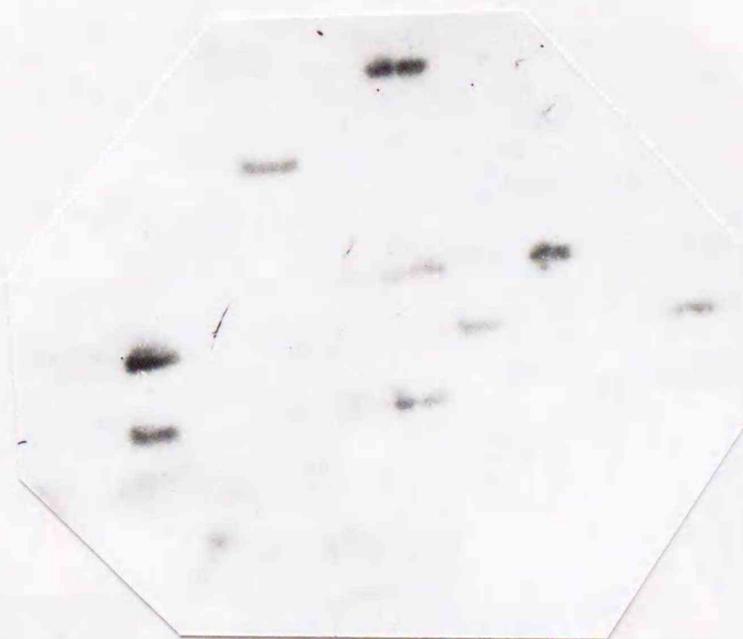


		286	287	288★	290	291★	293★		
	303★	305	307★	314	316	317	318	319	
320	336	338*	342*	345	350	351★	355	356	373
375*	390	393	398	414	416	420	424	430	432*
433	434	438	441	443	448*	451	454	455★	456*
464★	465		471*	474	477	479	483	486★	487
	489	470	492	493*	495	496★	497★	499	
		491★	500						

(C) プローブ: S5



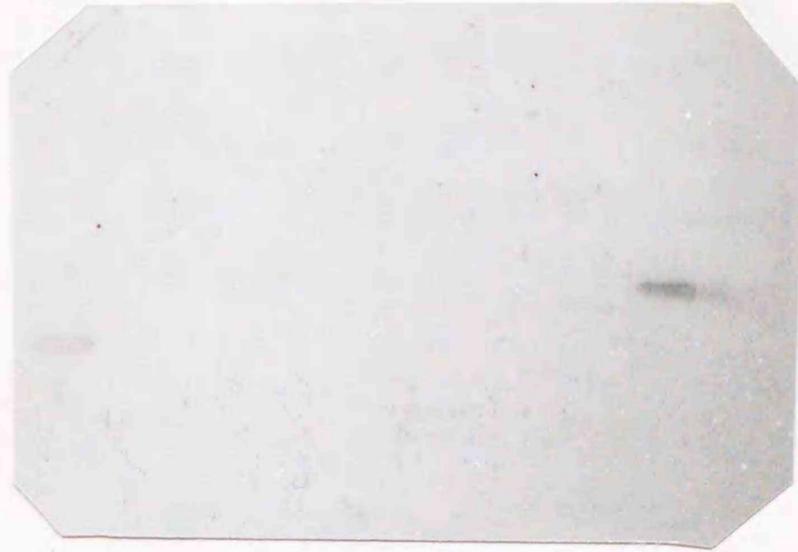
			27	97	99	106			
		107	108	109	110	111	117		
	118	119	120	121	122	123	124	125	
126★	127	132	133	134	135	137	138	139	141
142	146	156	162	163	164	166	172	184	193
203	204	206	207	208	212	217	218	220	221
222	223	224	225	226	227	228★	230	231	233
	235	241	246	249	250★	258	263	274	
		275	282	283	286	287	288		
			290	291	293	303			



			305	307	314★	316			
		317	318★	319	320	336	338		
	342	345	350	351	355	356	373	375	
390	393	398	414	416	420★	424	430★	432	433
448	451★	454	455	456	464	465★	470	471	474★
477	479★	483	486	487	489★	491	492	493	495
496	497	499	500						
		434	438	441	443				

図2 (続)

(D) プローブ: S6



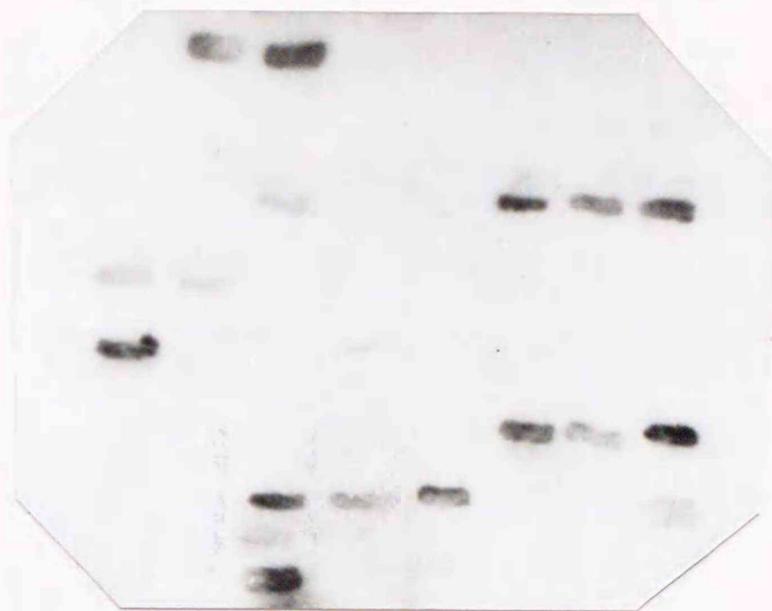
		27	97	99	106	107	108		
	109	110	111	117	118	119	120	121	
122	123	124	125	126	127	132	133	134	135
137	138	139	141	142	146	156	162	163	164
166	172	184	193	203	204	224	207	208★	212
217*	218	220	221	222	223	206	225	226	227
	228	230	231	233	235	241	246	249	
		250	258	263	274	275	283		



		286	287	288	290	291	293		
	303	305	307	314	316	317★	318	319	
320	336	338	342	345	350★	351	355	356	373
375	390	393	398	414	416	420	424	430	432
433	434	438★	441	443	448	451	454	455	456
464	465	470★	471	474	477	479	483	486	487
	489	491	492	493	495	496	497	499	
		500							

図2 (続)

(E) プローブ : S7+S8



		27★	97★	99	106	107	108		
	109	110	111	117	118	119	120	121	
122	123	124	125*	126	127	132★	133★	134★	135
137	138*	139	141	142	146	156	162	163	164
166	172★	184	193	203	204	206	207	208	212
217	218	220	221	222	223	224★	225★	226★	227
	228	230	231★	233*	235	241	246	249*	
		250	258★	263	274	275	283		



		286	287	288	290	291	293		
	303	305★	307	314	316	317	318	319★	
320★	336	338	342	345	350	351	355	356	373
375	390	393*	398	414*	416	420	424*	430	432
433	434	438	441	443★	448	451	454	455	456
464	465		471	474	477★	479	483★	486	487
	489	470	492	493	495	496	497	499★	
		491	500						

図2 (続)

図2 (続)

各プラスミドで形質転換した大腸菌をメンブレン上で増殖させ、その位置でタンパク質を変性させて、プラスミドを含む核酸をメンブレンに吸着させた。RRSVのゲノムを ^{32}P で標識後、各セグメントに分離したものをプローブとして用い、ハイブリダイゼーションを行った。X線フィルムで検出した結果を、用いたプローブによって(A)-(D)に分けて示した。各写真の下側の図は吸着させたプラスミドのメンブレン上の位置とハイブリダイゼーションの結果を示す。★は強い反応、*は弱い反応を示す。また、同じプラスミドが複数のセグメントに反応している場合があり、それらには反応の印を付けていない。

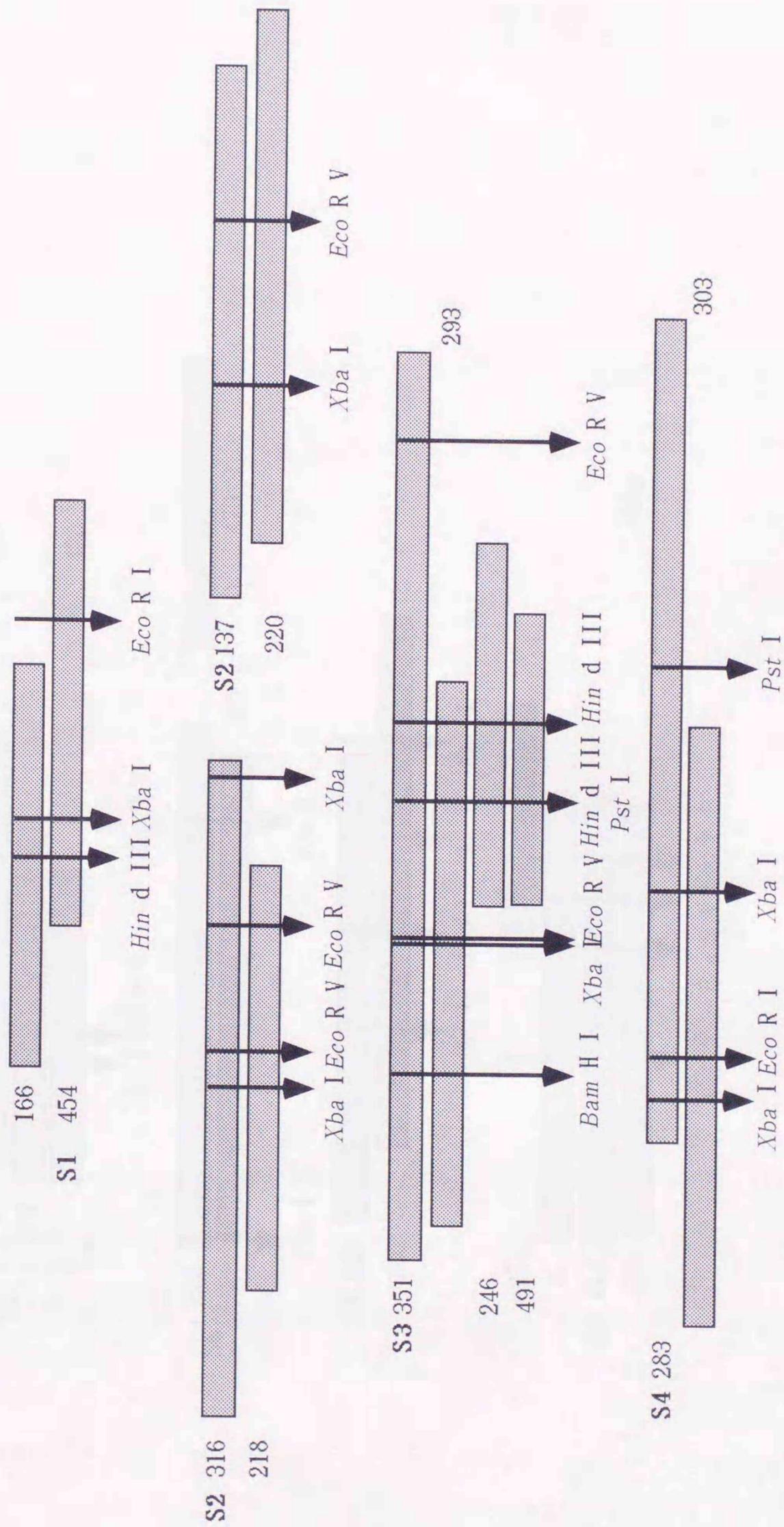


図3 RRSVcDNAの制限酵素地図

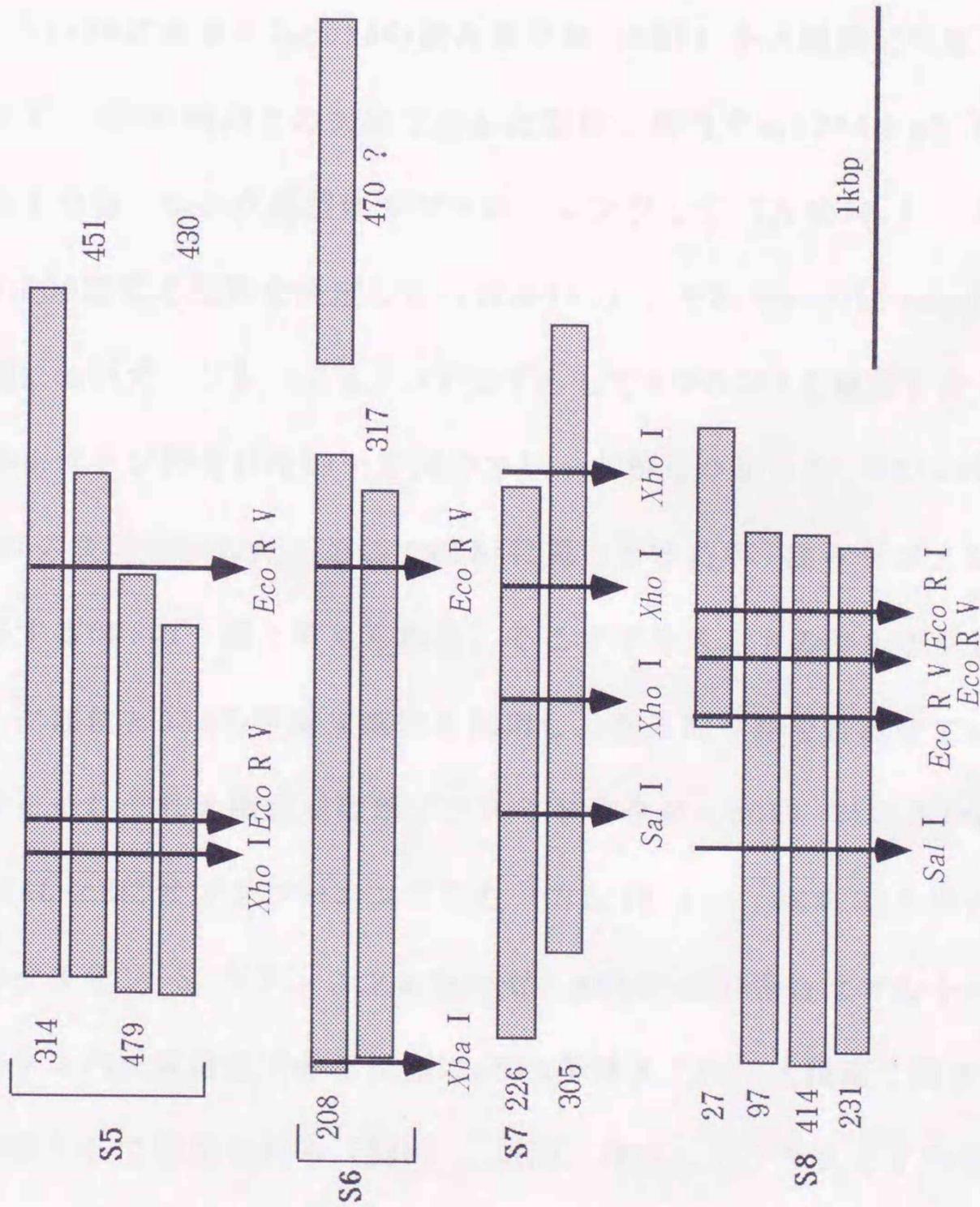


図3 (続)

制限酵素地図作成には *Eco* R I, *Bam* H I, *Sal* I, *Sma* I, *Dra* I, *Xho* I, *Hin* d III, *Eco* R V, *Kpn* I, *Pst* I, *Xba* I の他、S1-6 の場合は *Not* I と *Sac* I, S7, 8 の場合は *Sph* I を用いた。クロームの番号をプラスミドの *ori* 側に示し、コロニーハイブリダイゼーションあるいはドットブロットハイブリダイゼーションで同定したセグメントを太字で示した。

ついてそれぞれ反応があった(図4)。そこで現れた反応の強さから各プラスミドに対応するセグメントを同定した。これらのcDNAの解析結果は表1にまとめた。

② S1-S8がコードするタンパク質の部分的発現

S1-S8に由来するcDNAの読み取り枠(ORF)を大腸菌で発現させた。まず、図5の横向きの矢印で示した部位に相当するcDNAをpUC119のマルチクローニング部位にサブクローニングして(方法15.)、両端の約200塩基の配列を決定した(方法18.)。それぞれのcDNAの塩基配列において、フレームを1つずつずらして3つのORFを検索したところ、終止コドンの現れない一方向のフレームが見つかった。ORFの方向は図5の矢印で示した。ここでcDNAに見つかったORFは各セグメントがコードするORFの一部と考えられる。そこでプラスミドのマルチクローニング部位とDNAの平滑末端化を利用し、読み取り枠を合わせてcDNA断片をそれぞれ大腸菌発現用プラスミドベクターpGEX-3XあるいはpMAL-c2にサブクローニングした(方法15.)。pGEX-3Xの場合はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、pMAL-c2の場合はマルトース結合タンパク質遺伝子の下流側にcDNAが挿入され、大腸菌で融合タンパク質として発現される(図6)。以降、作成したプラスミドの名称を、“組み換えに用いたプラスミドベクター名の後に組み込んだDNA断片のもととなったpRRの番号”で示し、それから発現するタンパク質を

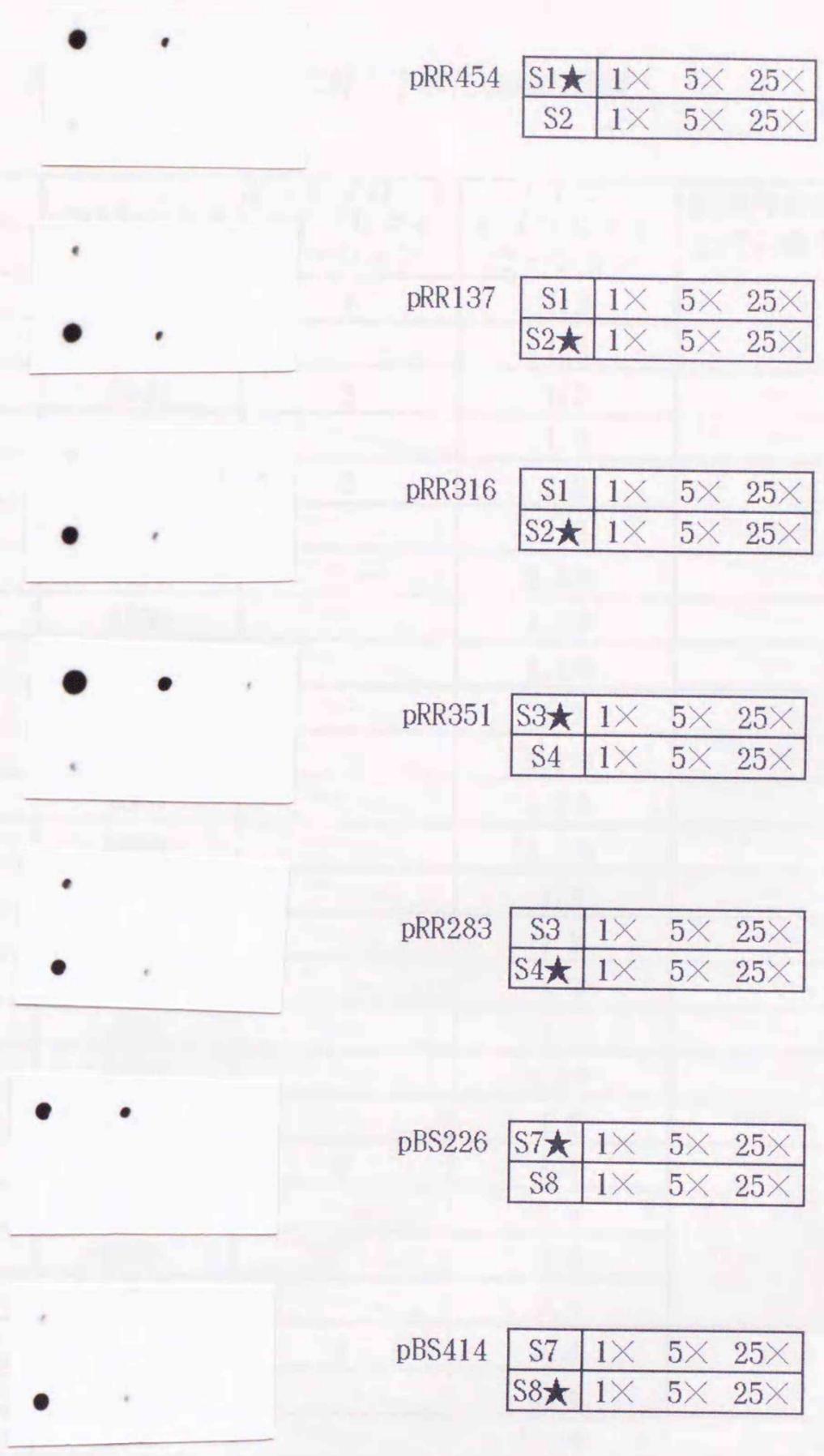


図4 cDNAクローンのセグメントの同定

RRSVのゲノムをセグメントに分離してメンブレンに吸着させ、各cDNAクローンを³²Pで標識して作成したプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。各セグメントをメンブレンに吸着させる際には原液とその5倍と25倍の希釈液を用いた。プローブ作成に用いたプラスミドとメンブレンに吸着させた各セグメントの希釈倍数及び、その位置を図の下側に示した。ハイブリダイゼーションの結果、判定したセグメントを★で示した。

表1 各プラスミドに挿入されたcDNAの性質

クローンNo.	cDNAの大きさ bp	ドットプロット ハイブリダイ ゼーション	コロニー ハイブリダイ ゼーション	制限酵素地図 上での重なり
454	1400	1	1, 2	☐
166	1400		1, 2	
137	2500	2	1, 2	
220	2400		1, 2	☐
316	1700	2	1, 2	
218	1800		1, 2	☐
107	1400		1, 2*	
111	1100		1, 2*	
118	1100		1, 2*	☐
127	1200		1, 2	
142	1100		1, 2*	
162	1000		1, 2*	☐
163	1000		1, 2*	
212	1100		1, 2	
336	1200		1, 2	☐
345	1200		1, 2	
373	1000		1, 2	
433	1100		1, 2*	☐
500	1100		1, 2	
351	1700	3	3, 4	
293	1600		3, 4	☐
246	1100		3, 4	
491	1400		3, 4	
283	1400	4	3, 4	☐
303	1700		3, 4	
99	1100		3, 4*	☐
106	1000		3, 4*	
109	1100		3, 4	
110	1400		3, 4*	☐
135	1400		3, 4*	
146	1000		3, 4	
164	1000		3, 4	

表1 (続)

クローンNo.	cDNAの大きさ bp	ドットプロット ハイブリダイ ゼーション	コロニー ハイブリダイ ゼーション	制限酵素地図 上での重なり
193	1400		3, 4	
203	1400		3, 4	
221	1100		3, 4*	
230	1100		3, 4	
241	1100		3, 4	
263	1100		3, 4*	
274	1100		3, 4*	
288	1700		3, 4	
291	1100		3, 4	
307	1300		3, 4	
338	1000		3, 4*	
342	1500		3, 4*	
375	1200		3, 4*	
432	1400		3, 4*	
448	1400		3, 4*	
455	1400		3, 4	
456	1400		3, 4*	
464	1400		3, 4	
471	1400		3, 4*	
486	1000		3, 4	
493	1500		3, 4*	
496	1700		3, 4	
497	1100		3, 4	
314	1500		5]
451	1400		5	
430	1400		5	
479	1100		5	
126	1100		5	
228	1100		5	
250	1400		5	
318	1200		5	
420	1100		5	

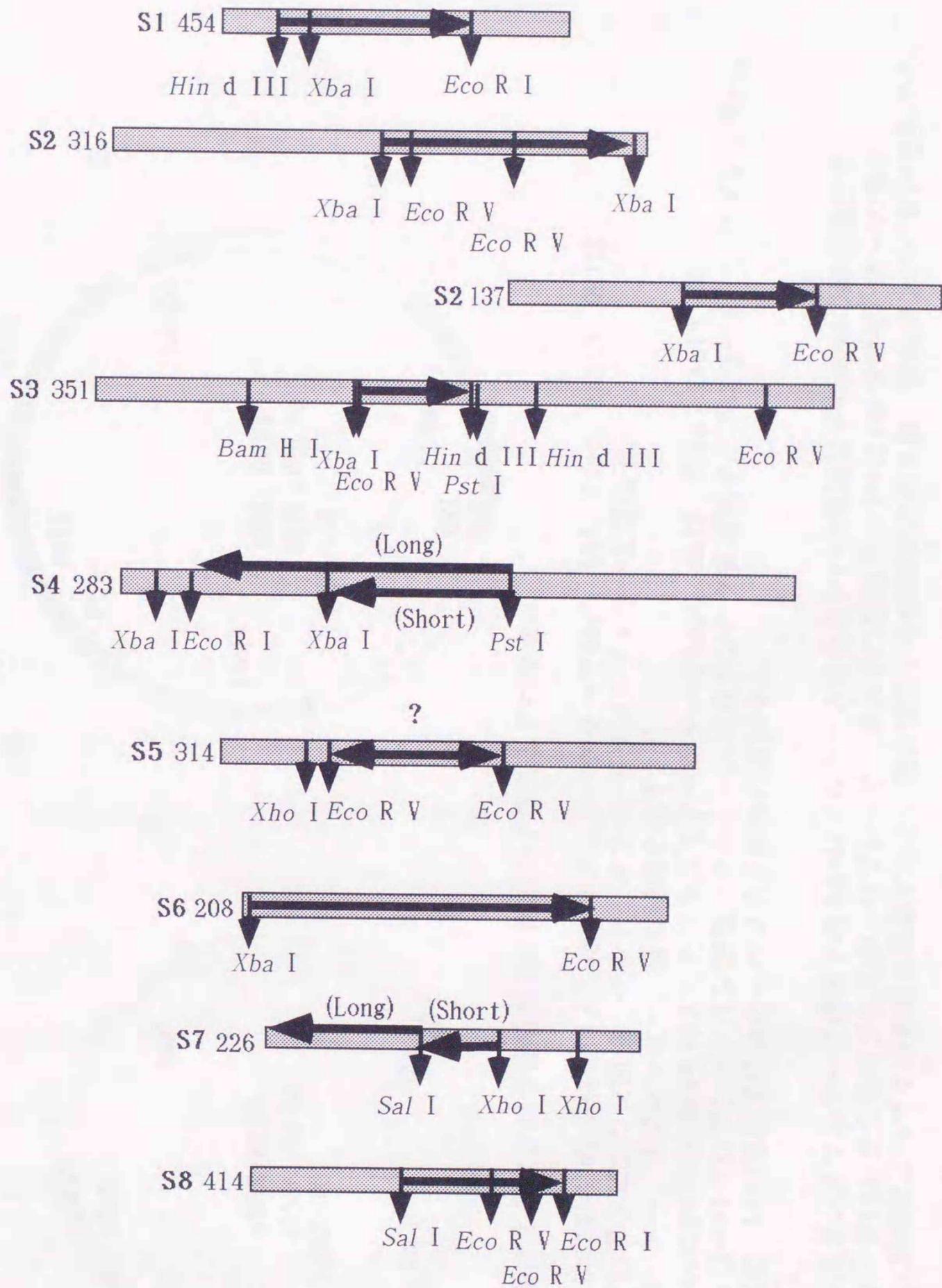


図5 発現用プラスミドベクターに組み込んだcDNAの部位

横向きの矢印の方向は読み取り枠の方向、長さは発現用プラスミドに組み込んだ部位を示す。但し、S5の場合はこの制限酵素地図上で向きを判定できなかった。

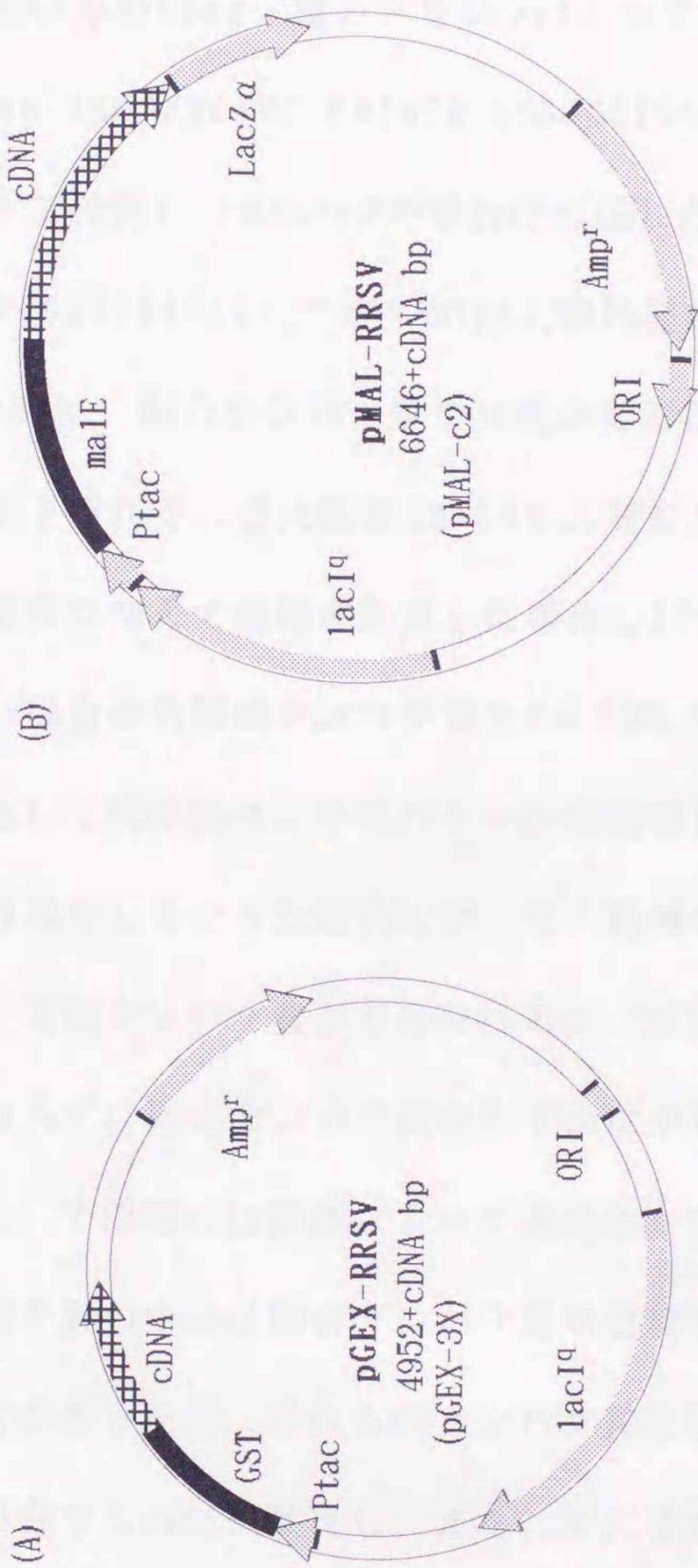


図6 大腸菌によるタンパク質の発現に用いたプラスミドベクター

- (A) pGEX-3XにRRSVのcDNAを挿入したプラスミドベクターでAmp^r、GST、Ptac、lacI^q、ORIはそれぞれアンピシリン耐性、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子、プロモーター、リプレッサー、複製起点を示す。
- (B) pMAL-c2にRRSVのcDNAを挿入したプラスミドベクターでAmp^r、maIE、Ptac、lacI^q、ORI、LacZ α はそれぞれアンピシリン耐性、マルトース結合タンパク質遺伝子、プロモーター、リプレッサー、複製起点、LacZ遺伝子産物の α ペプチド領域の遺伝子を示す。

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子あるいはマルトース結合タンパク質遺伝子とcDNAの融合遺伝子はtacプロモーター(Ptac)から転写されるが、リプレッサー遺伝子の産物(lacI^q)はtacプロモーターの働きを抑制している。IPTGによってその抑制を解除すると、融合遺伝子のmRNAが合成され、融合タンパク質が発現する。

“GST (pGEX-3Xの場合)、あるいはMBP (pMAL-c2の場合) の後に組み込んだDNA断片のもととなったpRRの番号”で示す。また、1種類のpRRから2種類の発現用プラスミドを作成した場合は挿入したDNA断片の長い方をLong、短い方をShortとして区別した。pGEX-3Xの場合は、pGEX SEQUENCING PRIMER (dGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG、ファルマシア社製)、pMAL-c2の場合は合成したプライマー (dGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC) でcDNAの挿入開始部位の塩基配列を確認した(方法19.)。融合タンパク質を発現させるために、まず、作成したプラスミドそれぞれで大腸菌JM109を形質転換した(方法15.)。IPTGを培養液に加えて発現を誘導した場合とIPTGを加えないで発現を誘導しない場合の大腸菌タンパク質を8% SDS-PAGEに供試して、クマシーで染色して現れたバンドのパターンを比較した(方法20.)。IPTGによる誘導をしなかった場合に対して、誘導をした場合にのみ現れるバンドが発現タンパク質と考えられるが、実際には誘導していないにもかかわらず、融合タンパク質がわずかながら発現している場合があった。但し、その際には誘導によって発現量が特異的に増加した。大腸菌タンパク質の中には融合タンパク質が発現することでその量が変わるものがあったが、それらのタンパク質は種類の違うプラスミドを用いた場合でも同様に変わり、また、変化量が比較的小さいために目的の発現タンパク質とは区別できた。pGEX316、pMAL316、pGEX137、pGEX351、pGEX314、pGEX414では発現タンパク質が確認できたが、

pGEX283 (Long)、pGEX454、pGEX226 (Long) においては大腸菌培養の条件、発現の誘導を開始する時間などの条件を変えたにもかかわらず、発現タンパクが見られなかった。そこで、pGEX283 (Long)、pGEX226 (Long) においては挿入するcDNAを新たに替えて発現を試みた {pGEX283 (Short)、pGEX226 (Short)}。pGEX454に関しては発現ベクターをpMAL-c2に変え、同じDNA断片を使用した

(pMAL454)。IPTGで発現を誘導した結果、pGEX226とpMAL454で、発現タンパク質が確認できた。発現を誘導した際の大腸菌タンパク質を8% SDS-PAGEで解析した結果を図7に示した。アガロースゲル電気泳動の移動度からプラスミドに挿入した各DNAの長さを推定したところ、それぞれ1110 (pGEX316、pMAL316)、570 (pGEX137)、780 (pGEX454、pMAL454)、440 (pGEX351)、1280 (pGEX283 Long)、750 (pGEX283 Short)、730 (pGEX314)、1280 (pGEX208)、400 (pGEX414)、950 (pGEX226 Long)、300 (pGEX226 Short)塩基であった。pGEX-3Xの場合はGSTの27.5KDa、pMAL-c2の場合はMBPの42KDaを加えることとし、1アミノ酸を110Daとして発現する予定の分子量を推定したところ、pGEX316、pMAL316、pMAL454、pGEX314、pGEX414、pGEX226 (Short) では実際に発現したタンパク質の分子量と一致した。pGEX137、pGEX351では推定分子量より発現したタンパク質の分子量の方が約3-6KDa小さかった。pGEX454、pGEX283 (Long)、pGEX283 (Short)はクマシーの染色ではなく抗GST抗体を

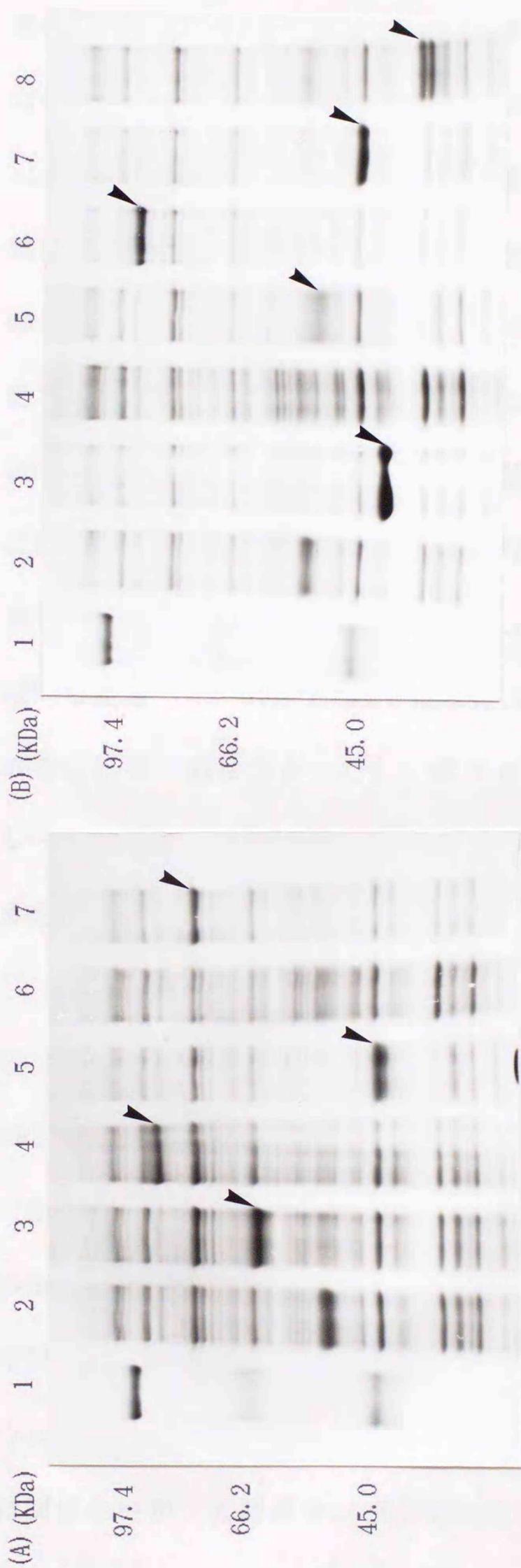


図7 大腸菌によるRRSVのゲノムがコードするタンパク質の発現

- (A) 1 : サイズマーカー
 2 : 非形質転換
 3 : pGEX316
 4 : pMAL316
 5 : pGEX137
 6 : pGEX454
 7 : pMAL454

- (B) 1 : サイズマーカー
 2 : 非形質転換
 3 : pGEX351
 4 : pGEX283 (Long)
 5 : pGEX314
 6 : pGEX208
 7 : pGEX414
 8 : pGEX226 (Short)

各プラスミドで大腸菌を形質転換し、融合タンパク質の発現を誘導した。大腸菌のタンパク質を8% SDS-PAGEに供試し、クマシールで染色した。各プラスミドに特異的なバンドを矢印で示した。pGEX454及び、pGEX283 (Long)には特異的なバンドが見つからなかった。

用いたウェスタンブロッティング（方法20.）で発現タンパク質の検出を試みたところ、pGEX454は反応が現れず、pGEX283（Long）、pGEX283（Short）ではほぼ同じ位置（8% SDS-PAGEではほぼ泳動の先端）に反応が現れた（結果は載せなかった）。pRR454のDNA断片のORFはpGEXでは発現できず、pMALでも発現量が少ないことから、ORFのアミノ酸配列が大腸菌による発現には適していないと考えられた。pGEX283は塩基配列を決定した際、制限酵素地図の *Pst* Iの *Xba* I側に通常ではみられないポリ dG配列があった。抗GST抗体を用いてウェスタンブロッティングでpGEX283（Long）、pGEX283（Short）ではほぼ同じ位置（8% SDS-PAGEではほぼ泳動の先端）に反応が現れたことから（結果は載せなかった）、ポリ dGの塩基数が解析と違っていてフレームが合っていないか、ポリ dG配列によって融合タンパク質の発現が阻害されていると予想した。

③ 発現タンパク質とRRSV純化粒子に対するポリクローナル抗体（抗RRSV粒子抗体）の反応

RRSV粒子の7種類の構造タンパク質はRRSVのゲノムにコードされていると考えられる。そこで発現させたこれらのタンパク質と抗RRSV粒子抗体（この抗体は7種類の構造タンパク質全てに反応する）の反応をウェスタンブロッティング法で調べた（方法20.）。発現タンパク質とは関係ないが、大腸菌タンパク質の中にはRRSV粒子に対するポリクロー

ナル抗体と反応するタンパク質があったので発現を誘導した大腸菌タンパク質と発現を誘導しなかった大腸菌タンパク質で比較した。タンパク質（クマシー染色で確認できる1/10量）は8% SDS-PAGE後、PVDFメンブレンに転写した。一次抗体には河野氏が純化RRSV粒子でウサギを免疫した血清で、凍結乾燥して6-10°Cで保存してあったものを用いた。但し、血清は精製し（方法25.）、波長280nmの吸光度から濃度を算出して70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にして使用した。二次抗体はアルカリフォスファターゼ結合抗体を使用した。NBTとBCIPでアルカリフォスファターゼを検出したところ、S1由来のMBP454、S2由来のGST137、GST316、MBP316、S3由来のGST351、S6由来のGST208、S8由来のGST414に反応があった（図8）。

④ RRSVの構造タンパク質と発現タンパク質に対するポリクローナル抗体の反応

抗体を作成するために、大腸菌タンパク質から発現タンパク質を分離した。MBP316とMBP454は発現を誘導した培養液 40ml からアミロースレジンカラムによって分離した（方法21.）。Bradford法によって濃度を測定したところ（方法23.）、MBP316は約300 μg 、MBP454は135 μg であった。MBP316は約50 μg を10mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム溶液として3日間間隔で5回ウサギの耳に静脈注射し、最後の注射の3日後に耳から採血した。MBP454は約10 μg を等

(A) 1 2 3 4 5 6 7 8 (B) 1 2 3 4 5 6 7 8

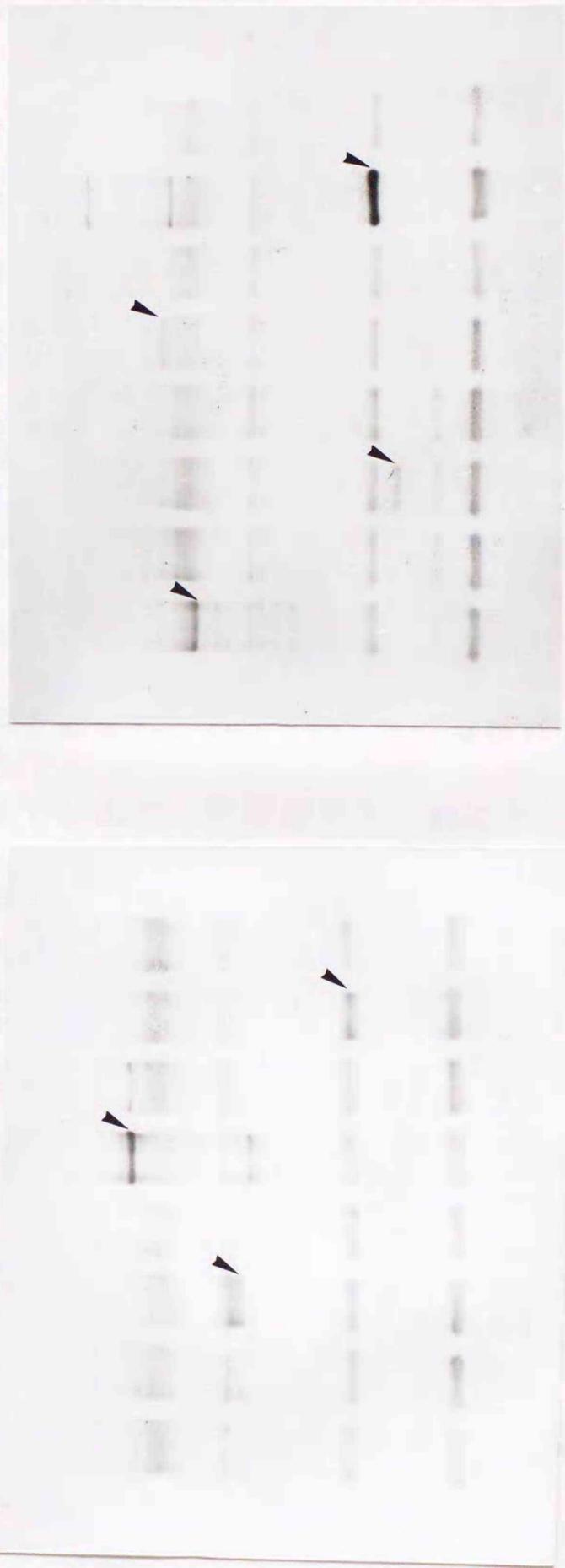


図8 抗RRSV粒子抗体と発現タンパク質の反応

(A) 1 : 非形質転換体/誘
2 : 非形質転換体/無
3 : pGEX316/誘
4 : pGEX316/無

5 : pMAL316/誘
6 : pMAL316/無
7 : pGEX137/誘
8 : pGEX137/無

(B) 1 : pMAL454/誘
2 : pMAL454/無
3 : pGEX351/誘
4 : pGEX351/無

5 : pGEX208/誘
6 : pGEX208/無
7 : pGEX414/誘
8 : pGEX414/無

“誘”は発現を誘導したこと、“無”は発現を誘導しなかったことを示す。

大腸菌タンパク質を8% SDS-PAGE後、PVDFメンブレンに移して抗RRSV粒子抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗RRSV粒子抗体はアルカリリフォスファターゼ結合抗体を用い、NBTとBCIPで検出した。発現タンパク質に反応したバンドを矢印で示した。

量 (V/V) の不完全アジュバントに乳化させ、2週間間隔で2回マウスの腹腔内に注射し、2回目の注射から2週間後に採血した。GST137、GST316、GST351、GST314、GST208、GST414、GST226は10% SDS-PAGEによって分離してマウスの腹腔内に注射して免疫した (方法24.)。RRSVの構造タンパク質はRRSV粒子を純化して得た (方法2) 。作成したこれらの抗体 (100倍希釈で使用) とRRSVの構造タンパク質 (1.4 μ g/レーン) の反応をウェスタンブロッティング法で調べた (方法20.) 。但し、大腸菌で発現したタンパク質が非構造タンパク質の一部である場合を考慮して、RRSV罹病イネもSDS-PAGEに供試しておいた。RRSV罹病イネは腫瘍部位を4倍量 (V/W) の0.02M PBS-Tween中で磨砕し、SDS-PAGE用に調整して10 μ lを用いた。また、抗体ができていることを確認するためにタンパク質の発現を誘導した大腸菌を用いた (銀染色で確認できる量) 。それらの結果は表2にまとめた。RRSV罹病イネの場合、ウェスタンブロッティングでは反応が全くなかったり、反応しても非特異的反応との区別が難しく判定はできなかった。抗RRSV粒子抗体と反応した発現タンパク質に対する抗体はRRSVの構造タンパク質のどれかに反応すると予想された。作成した抗体全てが反応したわけではなかったが、S6由来のGST208に対する抗体とS8由来のGST414発現タンパク質に対する抗体は構造タンパク質と反応した (表2) 。反応した位置からGST208の場合、Chen *et al.* (1989b) の88KDaの主要ではない構造タンパク質に相当すると考え

表2 発現タンパク質とその抗体による解析の結果

対応しているセグメント	プラスミド	発現タンパク質と抗RRSV粒子抗体の反応	発現タンパク質とそれに対して作成した抗体の反応	RRSV純化粒子と抗発現タンパク質抗体との反応	罹病イネと抗発現タンパク質抗体との反応
S1	pMAL454	反応する	反応する	反応しない	反応が弱く判定不可能
	pGEX454				
S2	pMAL316	反応する	反応する	反応しない	反応しない
	pGEX316	反応する	反応する	反応しない	反応しない
	pGEX137	反応する	反応する	反応しない	反応が弱く判定不可能
S3	pGEX351	反応する	反応する	反応しない	反応しない
S4	pGEX283 (Long)				
	pGEX283 (Short)				
S5	pGEX314	反応しない	反応する	反応しない	反応しない
S6	pGEX208	反応する	反応する	反応する	反応する
S7	pGEX226 (Long)				
	pGEX226 (Short)	反応しない	反応する	反応する	反応しない
S8	pGEX414	反応する	反応する	反応する	わずかに反応する

られた (図9 A、B)。GST414の場合は63KDaと50KDaの構造タンパク質両方に反応した (図9 C、D)。

論議

レオウイルス科ウイルスではゲノムが分節しており、その遺伝子構造の解明にはセグメントごとの解析が必要である。そこで本研究ではハイブリダイゼーションによって遺伝子ライブラリーの中からセグメントごとに、2-4個のcDNAクローンを選抜した (図2)。これらのcDNAの制限酵素地図には部分的な重なりがあることから、同一領域に対するcDNAクローンと考えられる (図3)。ウイルスゲノムの塩基配列の解析でしばしば変異が見つかるので、同一領域の2つ以上のcDNAを解析する必要がある。また、デリーションやサブクローニングには作成した制限酵素地図が利用できる。但し、図3には確実に存在する制限酵素認識部位だけを示しているため、同じ制限酵素認識配列が近接していたり、メチレーションで酵素が配列を認識できなくなっている場合までは分からない。RRSVの各セグメントの塩基数は電子顕微鏡観察で推定されている (Uyeda *et al.*, 1990b)。cDNAの重複領域を考慮すると、各セグメントそれぞれの約48% (S1)、100% (S2)、80% (S3)、86% (S4)、84% (S5)、60% (S6)、100% (S7)、90% (S8) が選抜したクローンに含まれると推定された。但し、この推定



(A) タンパク質を10% SDS-PAGEに供試して銀染色をした。RRSVの構造タンパク質の分子量はChen *et al.* (1989a)に準じ、主要ではないものは(◀)で示した。また、Chen (1985)とChen *et al.* (1989a)の泳動像にも現れているが、これまで未報告のタンパク質を(◁)で示した。

(B) (A)と全く同様にSDS-PAGEを行い、PVDFメンブレンに移して抗GST208抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗GST208抗体はアルカリフォスファターゼ結合抗体を用い、NBTとBCIPで検出した。反応したRRSVの構造タンパク質を矢印で示した。

- 1 : サイゾマーカー
- 2 : 発現を誘導していないpGEX208形質転換大腸菌
- 3 : 発現を誘導したpGEX208形質転換大腸菌
- 4 : RRSV純化粒子

図9 発現タンパク質に対する抗体とRRSVの構造タンパク質の反応



(C) タンパク質を10% SDS-PAGEに供試して銀染色をした。RRSVの構造タンパク質の分子量はChen *et al.* (1989a)に準じた。

(D) (C) と全く同様にSDS-PAGEを行い、PVDFメンブレンに移して抗GST414抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗GST414抗体はアルカリフォスファターゼ結合抗体を用い、NBTとBCIPで検出した。反応したRRSVの構造タンパク質は矢印で示した。

- 1 : サイズマーカー
- 2 : 発現を誘導していないpGEX414形質転換大腸菌
- 3 : 発現を誘導したpGEX414形質転換大腸菌
- 4 : RRSV純化粒子

図9 (続)

では制限酵素地図で重なりがなかったcDNAは別領域と仮定した。これらの結果から、遺伝子構造を解明するために有用なクローンが選抜できた。

これらのcDNAを利用してS1-S8のORFの一部を大腸菌で発現させた。cDNAの両端の塩基配列には一方向のORFが見出された。S4のcDNA {pGEX283 (Short) と (Long)} は発現せず、また、pGEX137とpGEX351では3-6kDa程小さかったが、ほぼ推定した分子量のタンパク質が発現した。これらのことから、各セグメントに長いORFがあるという推定が正しいと考えられる。RDV (S11を除く各セグメントで80-98%)、WTV (S4-S11で83-92%) のセグメントと同様に (Suzuki, 1995; Nuss and Dall, 1990)、RRSVのS9では90%に、S10では小さいものと主要なものをあわせて80%にORFが存在していた (Yan *et al.*, 1995)。そこでRRSVの各セグメントの推定塩基数をもとに (Uyeda *et al.*, 1990b)、その約90%にORFが存在すると仮定して、そこにコードされるタンパク質の分子量を推定した。RRSVの構造タンパク質はRRSVのセグメントから発現する産物と考えられる。そこで推定した分子量と構造タンパク質の分子量と比較した (表3)。ここでは7種類の構造タンパク質の分子量を載せたが、本研究ではそれら以外のバンドも現れた (図9 A中の白抜きの矢印で示した) (Hagiwara *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1989b)。それはChen (1985) とChen *et al.* (1989b) の電気泳動像にも同様に現れていることから、別の

表3 RRSVの各セグメントがコードするタンパク質の推定分子量と構造タンパク質

セグメント	推定塩基数 (bp)	コードするタンパク質の推定分子量 (kDa)	RRSVの構造タンパク質の分子量 (kDa)
S1	3849	127	129 ★
S2	3849	127	
S3	3767	124	123 ★
S4	3767	124	
S5	2795	92	113
S6	2337	77	88
S7	1993	66	63 ★
S8	1982	65	50 ★
S9	1197	40	
S10	1157	38	35 ★

推定塩基数は Uyeda *et al.* (1990b) の値を参照
 コードするタンパク質の推定分子量は
 推定塩基数 \times コードする割合 (0.9) \times アミノ酸数への変換 (1/3) \times アミノ酸の平均分子量 (0.11kDa)
 RRSVの構造タンパク質の分子量は Chen *et al.* (1989b) の値で、★は主要なものを示す

種類の構造タンパク質の可能性がある。

S1、S2、S3の部分的なcDNAから発現したタンパク質に対する抗体はRRSVの構造タンパク質と反応しなかったが、抗RRSV粒子抗体はこれらの発現タンパク質に反応した。表4にはRDV、rotavirus (SA11株)、reovirus (Dearing株) について各セグメントの塩基数とそれがコードしているタンパク質を示した。この表から約3,000bpより長いセグメントが必ず構造タンパク質をコードすることが分かる。従って、RRSVの場合もS1、S2、S3が構造タンパク質をコードしている可能性が高いと考えられる (図8)。大腸菌によって発現したGSTの融合タンパク質はほとんど不溶化したため、cDNAから発現した部分のタンパク質をFactorXaによって切り離せなかった。そのため、抗体は抗原として用いたGST-融合タンパク質に反応することで作成されたことを確認したが (表2)、cDNAから発現したタンパク質部分に反応することは確認できなかった。S1、S2、S3由来の発現タンパク質に対する抗体はRRSVの構造タンパク質と反応しなかった理由として、作成された抗体の検出限界が低いことや特異的結合力が低いことが考えられる。

一方、S6由来のGST208に対する抗体はウェスタンブロッティングで構造タンパク質と反応した (図9 B)。反応したバンドの位置からChen *et al.* (1989b) の88KDaの主要ではない構造タンパク質に相当すると考えられた。表3の推定ではS6は約77KDaのタンパク質をコードする。この約10KDaの違いは推定の誤差、あるいはタンパク質の修飾のためと

表4 各セグメントとタンパク質の対応

RDV		
セグメント	塩基数 (bp)	コードしているタンパク質の分子量と名称 (KDa)
S1	4423	164 (P1)
S2	3512	130 (P2)
S3	3195	114 (P3)
S4	2468	80 (Pns4)
S5	2570	91 (P5)
S6	1699	57 (Pns6)
S7	1696	55 (P7)
S8	1427	46 (P8)
S9	1305	39 (Pns9)
S10	1321	39 (Pns10)
S11	1067	20 (Pns11a) 21 (Pns11b)
S12	1066	34 (Pns12) 11 (Pns120Pa) 10 (Pns120Pb)

Suzuki (1995) を参照

タンパク質の名称のnsは非構造タンパク質
それ以外は構造タンパク質を示す。

Rotavirus		
セグメント	塩基数 (bp)	コードしているタンパク質の分子量と名称 (KDa)
S1	3302	125 (VP1)
S2	2690	103 (VP2)
S3	2591	98 (VP3)
S4	2362	87 (VP4)
S5	1611	58 (NSP1)
S6	1356	45 (VP6)
S7	1104	36 (NSP3)
S8	1059	37 (NSP2)
S9	1062	37 (VP7)
S10	751	20 (NSP4)
S11	667	22 (NSP5)

Taniguchi and Urasawa (1995) を参照
Rotavirus (SA11株) を示した。

タンパク質の名称のNSは非構造タンパク質
それ以外は構造タンパク質を示す。

Reovirus		
セグメント	塩基数 (bp)	コードしているタンパク質の分子量と名称 (KDa)
L1	3854	137 (λ 3)
L2	3916	144 (λ 2)
L3	3896	142 (λ 1)
M1	2304	83 (μ 2)
M2	2207	76 (μ 1) 72 (μ 1C)
M3	2235	80 (μ Ns)
S1	1416	49 (σ 1) 16 (σ 1s)
S2	1331	47 (σ 2)
S3	1198	41 (σ Ns)
S4	1196	41 (σ 3)

塩基対数は谷口と浦沢 (1992)
タンパク質の分子量と名称はSchiff and Fields
(1990) を参照
Reovirus (Dearing株) を示した。

タンパク質の名称のNsは非構造タンパク質
それ以外は構造タンパク質を示す。
但し、 σ 1sは非構造タンパク質である。

考えられる。*Oryzavirus*属にはRRSVの他にERSVがある。ERSVとRRSVでは媒介昆虫の種類が異なる。また、RRSVの粒子には外殻がないと考えられているのに対し、ERSV粒子は*Fijivirus*属と同様に2重殻である (Chen *et al.*, 1989a)。しかし、ヒエにおける病徴、ゲノムと量比を含めた構造タンパク質のPAGEによる分離パターンはRRSVと類似している (Chen *et al.*, 1989b) (図10)。そこでERSVについてもRRSV同様に各セグメントにコードされるタンパク質の分子量を推定し、その構造タンパク質の分子量と比較した (表5)。但し、塩基数はRRSVとERSVの各セグメントの分子量 (Chen *et al.*, 1989b) とRRSVの推定塩基数 (Uyeda *et al.*, 1990b) をもとにして推定した。RRSVのS6はERSVのS6より約300塩基短くなっており、それらが同じ分子量のタンパク質をコードしている可能性は低い (表3、表5)。構造タンパク質を比較すると、ERSVにはRRSVの88KDaに相当する構造タンパク質がない (図10)。ERSVとRRSVではゲノムと構造タンパク質の分離パターンが良く似ているが、S6と88KDaの構造タンパク質の両方に違いがある。このことはRRSVのS6が88KDaの構造タンパク質をコードしているという本研究の結果と一致している。

S8由来のGST414に対する抗体は50KDaと63KDaの主要な構造タンパク質に反応した (図9 D)。また、RRSVのS8は約65KDaのタンパク質をコードすると推定されることから (表3)、S8が63KDaの主要な構造タンパク質をコードしていると考えられる。RRSVのS8とERSVのS8の

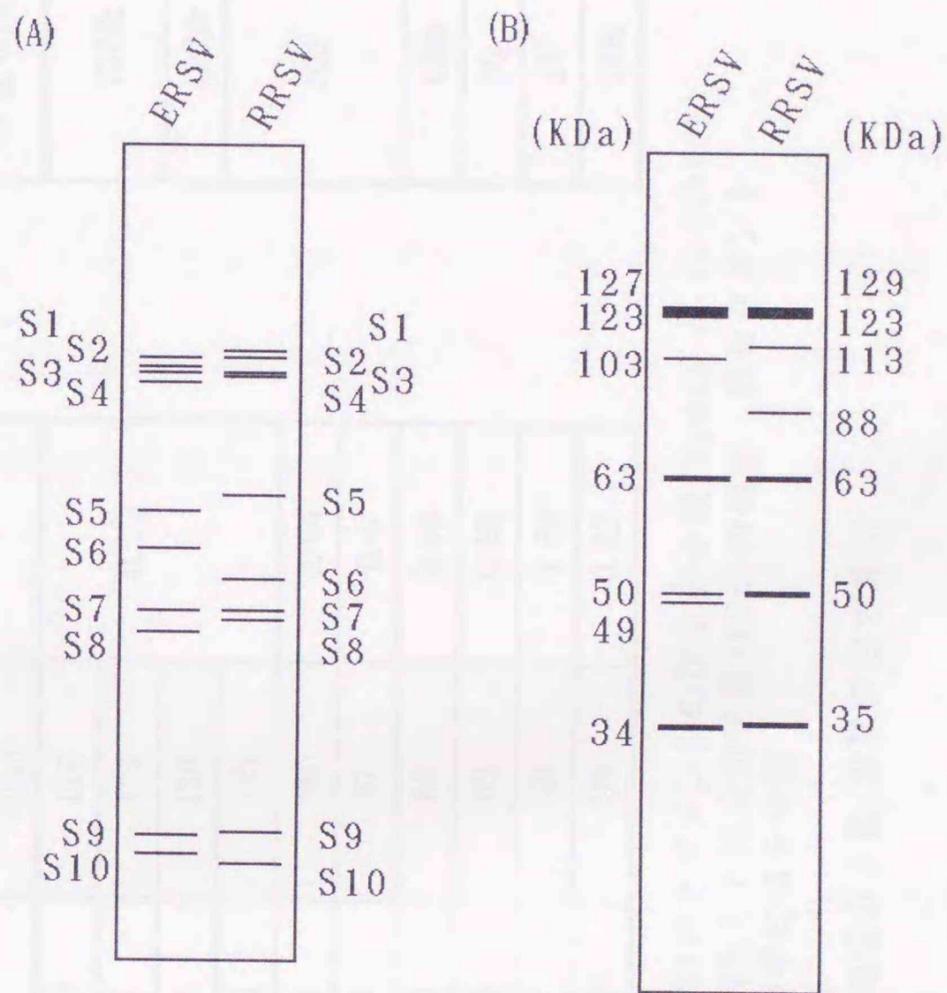


図10 ERSVとRRSVのゲノムと構造タンパク質の電気泳動像の模式図

Chen *et al.* (1989b)の結果を模式化したものである。

- (A) 各ゲノムを同一の10% PAGEで分離した結果を示す。
- (B) 各純化粒子を7.5-15% Gradient PAGEによって分離した結果を示す。構造タンパク質の太線は主要なもの、細線は主要でないものを示す。

表5 ERSVの各セグメントがコードするタンパク質の推定分子量と構造タンパク質

セグメント	推定分子量 (KDa)	推定塩基数 (bp)	コードするタンパク質の推定分子量 (KDa)	変換係数
S1	2800	3830	126	0.73
S2	2750	3761	124	
S3	2650	3625	120	
S4	2550	3488	115	
S5	1750	2734	90	0.64
S6	1580	2638	87	0.6
S7	1310	1993	66	0.66
S8	1250	1923	63	0.65
S9	640	1197	40	0.53
S10	610	1173	39	0.52

ERSVの構造タンパク質の分子量 (KDa)
127★
123★
103
63★
50
49
34★

変換係数はChen *et al.* (1989b)のRRSVのセグメントの推定分子量/Uyeda *et al.* (1990b)の推定塩基数で求めた1塩基当たりの推定分子量 (KDa)の値で、各セグメントごとに算出したが、S1-S4はそれらの平均値を使用

推定塩基数はChen *et al.* (1989b)の推定分子量/変換係数で算出

コードするタンパク質の推定分子量は推定塩基数×コードする割合(0.9)×アミノ酸数への変換(1/3)×アミノ酸の平均分子量(0.11KDa)

ERSVの構造タンパク質の分子量はChen *et al.* (1989b)の値で、★は主要なものを示す

推定塩基数は約60塩基違うだけであるので、それらが同じ分子量のタンパク質をコードしている可能性は高いと考えられる（表3、表5）。構造タンパク質を比較すると、ERSVとRRSVの両方に63KDaの主要な構造タンパク質がある。このことはRRSVのS8は63KDaの構造タンパク質をコードしているという本研究の結果と一致する。一方、50KDaのタンパク質は表3の計算をもとにして逆算すると、1515塩基のセグメントがこれをコードすることになる。RRSVにはこれに相当するセグメントはない。このことはRRSVのS8は63KDaだけでなく50KDaもコードしているという本研究の結果と一致している。50KDaの構造タンパク質はERSVにも存在するが、主要なものではない。RRSVとERSVの主要な構造タンパク質のうち、唯一50KDaの構造タンパク質に違いが認められることからERSVとRRSVの粒子構造の違いにこのタンパク質が関与していることが推察される。ERSVとRRSVでは同様にS8が63KDaの構造タンパク質をコードしていると予想されるが、50KDaの構造タンパク質には違いがある。RRSVのS8は50KDaの構造タンパク質をコードしていると考えられるのでERSVのS8との違いに興味を持たれる。GST414に対する抗体が63KDaと50KDaの構造タンパク質に反応したことはこれらの構造タンパク質が共通のアミノ酸配列を含むことを示している。

レオウイルス（Dearing株）の主な外殻タンパク質である $\mu 1$ （76.3KDa）は粒子を構成する際にN末端側の42アミノ酸（4.2KDa）が除かれて $\mu 1C$ となる（Jayasuriya *et al.*, 1988）。63KDaの構造

タンパク質も同様に一部が除かれて50KDaになるか、あるいはS8から mRNAの合成、翻訳の過程で50KDaのタンパク質が発現すると予想される。

2. S9の解析

RRSVのS9では通常のS9 (S9U) に混ざって電気泳動の移動度が早いもの (S9L) が検出された (Yan, 1992)。S9Uを持つRRSV (S9U RRSV) とS9Lを持つRRSV (S9L RRSV) が混合感染したイネを獲得源とした伝搬実験では、伝搬後のイネにS9U RRSVしか検出されていない (Yan, 1992)。また、S9Lを持つRRSV-PはIRRIで継代されているが、伝搬性が低いとされている。RRSVのS9はS9Uを用いて全塩基配列が決定され (Yan, 1992)、片方の鎖に一つのORFが見出されているが、コードされているタンパク質の検出は試みられていない。そこでまず、S9UとS9Lの塩基配列の違いを明らかにし、S9L RRSVの伝搬性を調べることにした。更に、S9がコードするタンパク質 (P9) を同定するために、構造タンパク質との関係を調べることにした。

結果

① PAGEによるS9の変異の検出

フィリピンで継代している株 (RRSV-P) のS9はS9Lであったことから (Yan, 1992)、本研究ではタイで継代している株 (RRSV-T) (上田氏提供) のS9の移動度を調べた。北海道大学で継代している株 (RRSV-H) のゲノムと共にRRSV-PとRRSV-Tのゲノムを10% SDS-PAGEに供試した (方法6.)。電気泳動後、ゲルの銀染色をして (方法8.)、分離した各セグメントを比較したところ、RRSV-TのS9はS9Lであった (図11)。RRSV-Hの場合、罹病イネの株ごとにゲノムを抽出して調べたところ (方法4.)、ほとんどの株のS9はS9Uであったが、中にはYan *et al.* (1992) 同様、S9UとS9L両方が検出される株があった (図11、レーン5)。

② S9LとS9Uの塩基配列の比較

RRSVのS9はRRSV-HのS9Uを材料にして塩基配列が決定された (Yan, 1992) (図12)。S9LはS9Uと同じ末端塩基配列を持つことから内部に変異を持つS9と考えられる (Yan *et al.*, 1992)。そこでS9Lの塩基配列を調べるため、RRSV-HのS9UとS9Lの混合状態のゲノムとRRSV-Pのゲノムを用い、5'と3'のそれぞれの末端塩基配列に *Pst* I の認識配列を組み込んだプライマーを使用して逆転写反応とPCRによってS9の全長DNAを増幅した。増幅したDNAは *Pst* Iを反応させ、pUC119の *Pst* I部位に挿入して (上田氏)、塩基配列を決定した (方法18.と19.)。決定には市販のM13 Sequencing Primer (-40) と

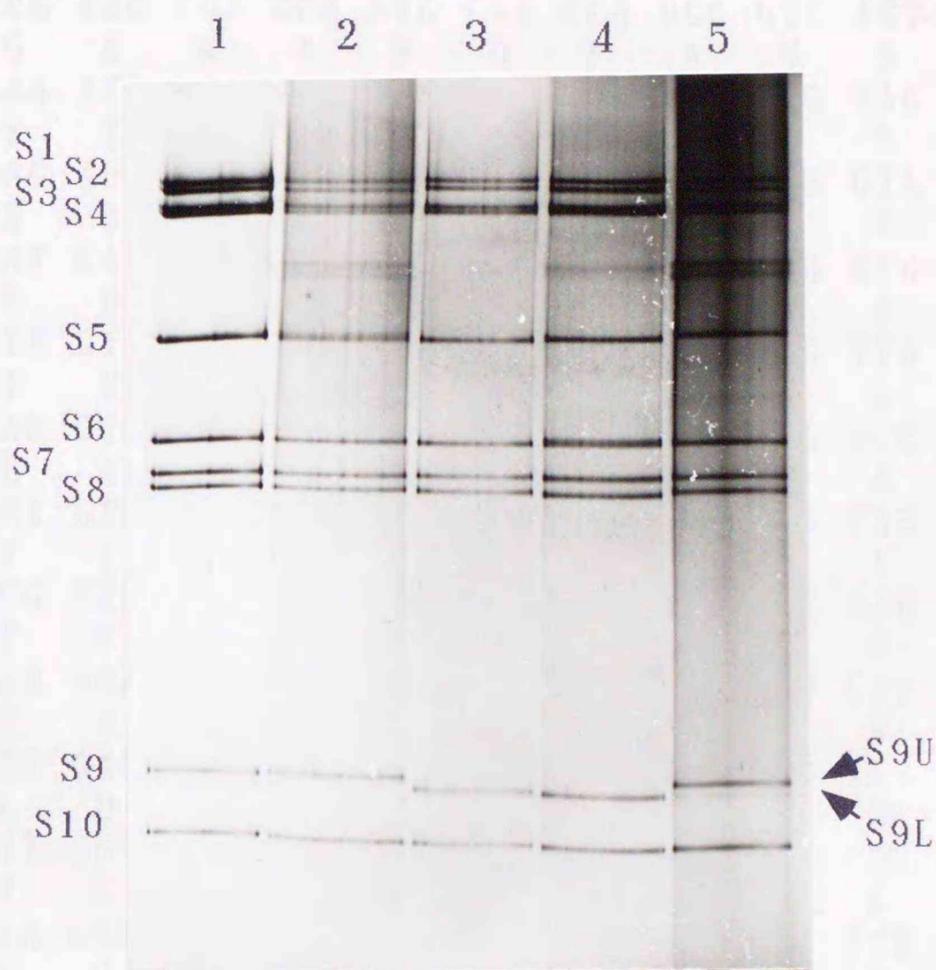


図11 RRSVのゲノムの電気泳動による比較

- 1 : 北海道大学で継代している株 (RRSV-H) の純化粒子から抽出したゲノム
- 2 と 5 : RRSV-Hの各感染イネからそれぞれ個別に抽出したゲノム
- 3 : フィリピンで継代している株 (RRSV-P) のゲノム
- 4 : タイで継代している株 (RRSV-T)のゲノム

RRSVのゲノムを10% SDS-PAGEで各セグメント (S1-S10) に分離し、銀染色をした。矢印で示したように、移動度の違いからS9をS9U (上側) とS9L (下側) に区別した。

GATAAATCTCGCC ATG AAG ACT GCC TTT GCC AGA GAT CCT TTT ACA
 M K T A F A R D P F T
 GCT CCT GCT ACA GGT ACG TAC GGA ACC ATA TAT GCC TCC AGA TCA
 A P A T G T Y G T I Y A S R S
 TTA CCC CGA CTC TCT ATC TCT AAG TTC TTG GAA GAT GCA AAT CCA
 L P R L S I S K F L E D A N P
 GAA ATT TAT GAA CTA TCG AGA TAT GAA GCG CTC GGA ACC AAC AGA
 E I Y E L S R Y E A L G T N R
 CCC AGC TCA GGG AAG CGA GCA ATG CAA CCA GCC GTC AGT AAA CCA
 P S S G K R A M Q P A V S K P
 GCT TTA CTG GAA ACC GTA TTC ACA CTC GAT ATA TGG TAC AGA AGG
 A L L E T V F T L D I W Y R R
 ACG AAC AAC CAG AAC ATC GGC AAT TTA AGA GAT TCG GTA TCT CGA
 T N N Q N I G N L R D S V S R
 TTT CTA TCT GAT GAT CGA GTA AGA GAA GCG GTG ATG GTG CGA CTA
 F L S D D R V R E A V M V R L
 GAT TTA GAC ATT GTT GTC CAG CTA AAA GAA TAC TGG TTG ATA GTT
 D L D I V V Q L K E Y W L I V
 AAA GAC AAA GAA GCC CAG ACT TTC GCG GAC CGA TTG GCC TTT GAC
 K D K E A Q T F A D R L A F D
 TCG CAT CTA TTT GTC AAT CGC GGC GAA AAC GCG AAT TAT GAT CTT
 S H L F V N R G E N A N Y D L
 GTA ACT CAG ACG TTC ATT CCG AGT GAT GCT TTT CTT AAG GAT AAC
 V T Q T F I P S D A F L K D N
 TTT AAG ACG GAA GCA CTT AAG AAG TTG TTG CTA AGT GTC CAA AAC
 F K T E A L K K L L L S V Q N
 CAT ACG GGA CTA GAC GCT GGA TTG CAA GGT GAT AGT TCG AAA GCG
 H T G L D A G L Q G D S S K A
 ACT TAC AAC ATT GGC CTA GGA CAA TAT CTC GAG GAT GAG GCC CTC
 T Y N I G L G Q Y L E D E A L
 CTG TAC CGT CAA GGT GTG GCT CTA CAA CAA ATG GCT TTT GCG GAG
 L Y R Q G V A L Q Q M A F A E
 TTG GAA TTA GCT AGA GGA GCA GAG AAA GAG GCG TTT CCA TCA ACC
 L E L A R G A E K E A F P S T
 TTC GAT CTA AGC AAT AGA CCG GCT TGC AAC TTG ATC CTT AAG CGA
 F D L S N R P A C N L I L K R
 ACG TGT AAG TGG TAT CAA CAA ACG TTT AAG GAT GAG GAG AGA AAG
 T C K W Y Q Q T F K D E E R K
 GAA TTT GCG AAG AGT TTG TGG GTG GAT GAC TTT GCC GAG GCT AAT
 E F A K S L W V D D F A E A N
 TGG AAC ACA GGT AAT TTG TCT TTT GGC TTT TCA ACC ACA TTA AAT
 W N T G N L S F G F S T T L N
 GTA ATT GAG AGA TGG CGT TTG ACC AGA TTT TAT GTT CAT ATG TAC
 V I E R W R L T R F Y V H M Y
 TCA TCT GTG CAT ATA TAT TCT CAG AAG GCC TCG GGG TAG GAA
 S S V H I Y S Q K A S G *
 ACGCTGGGGATCAAGGTGAATTGAAATGAGGACTTCTCACCCTCATGGACATTC
 GGCTCTTCACGGGTGGCACCCCGAAAACGGCGAGACCATGGTGC

図12 RRSVのS9に対するcDNAの塩基配列と主要な読み取り枠のアミノ酸配列

M13 Reverse Sequenceing Primerの他、李 (1988) の塩基配列をもとにして合成したプライマー (301-317番目の+鎖のものと812-828番目の-鎖のもの) を使用した。各ゲノム材料につき最低3クローンの塩基配列を調べた結果を図13にまとめた。RRSV-PのS9Lには335番目のグアニンからアデニンへの置換と843番目のアデニンからシトシンへの置換があった。RRSV-HのS9UとS9Lの混合状態のゲノム試料のクローンにはRRSV-Pの843番目のアデニンからシトシンへの置換を持つものがあった。843番目の置換が共通に見つかったことからこの置換によってPAGE上の移動度の違いが起こったと推測した。

③ 843番目の塩基置換によるS9のPAGE上の移動度の変化

843番目の置換がPAGEにおけるS9の移動度を変えることを証明するために、843番目がアデニン-ウラシル塩基対 (A:U) のS9とシトシン-グアニン塩基対 (C:G) のS9を作成することにした。RNAの合成にはpUC119の *Eco* R I部位にSP6ポリメラーゼのプロモーター配列を挿入して作られたプラスミドベクターpSP6 (村尾氏提供) を用いた。組み込んだプロモーターの下流の転写開始部位に平滑末端をもつDNAを挿入できるように *Stu* Iの認識配列をあらかじめ入れておいた。塩基配列の決定に用いたクローンの一つから *Pst* IでS9の全長DNAを切り出し、平滑末端化してpSP6の *Stu* I部位に正方向と逆方向にサブクローニングした (方法15.)。但し、3'末端側の *Pst* I認識配列は再度クローニ

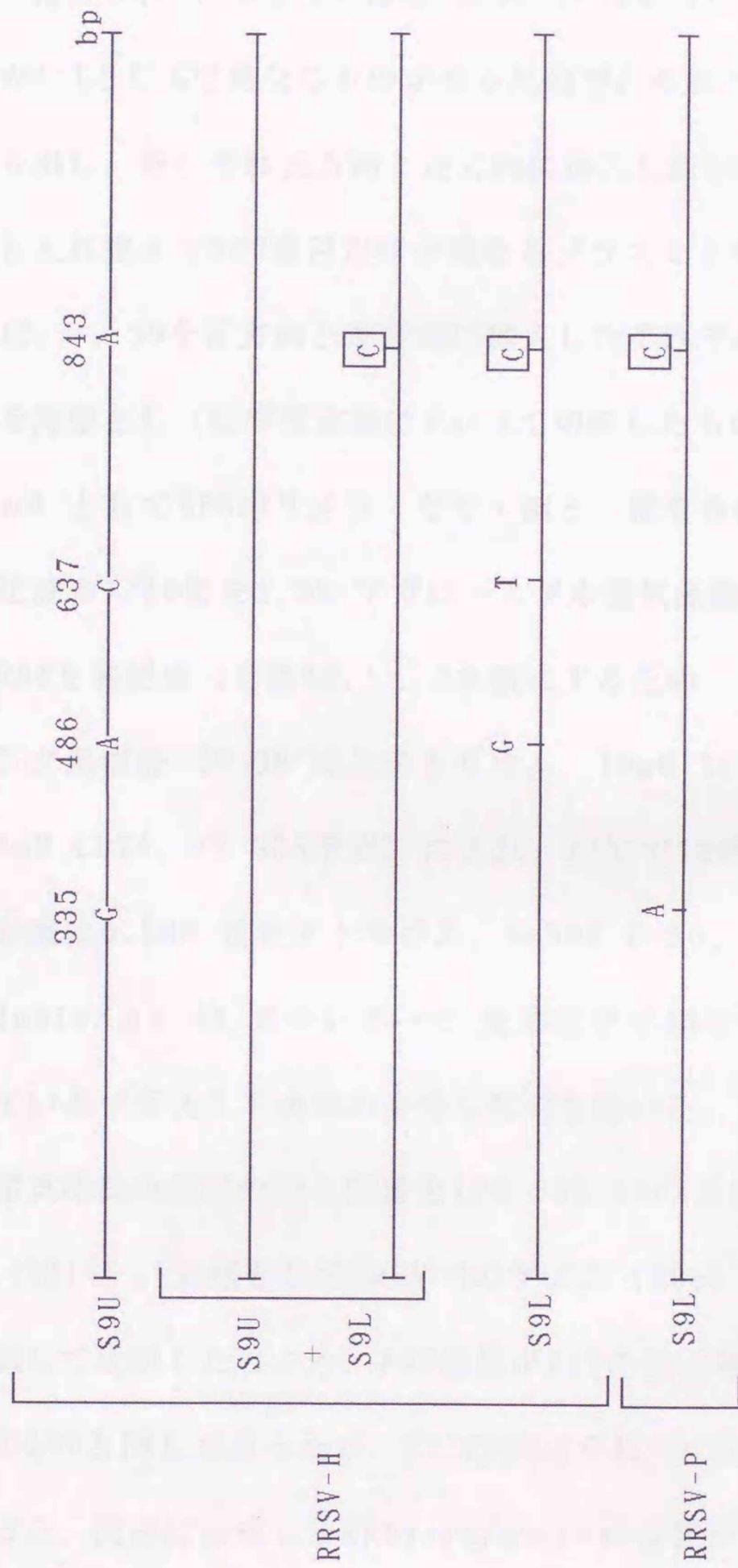


図13 S9UとS9LのcDNAの塩基配列の比較

逆転写反応とPCRによって増幅したS9のdsDNAをプラスミドに挿入して塩基配列を決定した。北海道大学で継代しているRRSV (RRSV-H) においてはS9Uのみが確認された株 (S9U) の他、S9UとS9Lの両方が確認された株 (S9U+S9L)、S9Lのみが確認された株 (S9L) を RRSVのゲノム抽出に用いた。ファミリーピンで継代しているRRSV (RRSV-P) のS9はS9Lである。S9UとS9Lで異なっていた部位の塩基を示した。すべてのS9Lに見られた843番目の塩基置換を枠で囲った。

ングの過程を経て構成し直した。塩基配列の決定に用いたクローンの中には *Xho* I-*Stu* I の領域 (659-1022 番目) において 843 番目だけが A:U と C:G で異なるものがあったので、それらの領域を制限酵素で切り出し、それぞれ正方向と逆方向に挿入した S9 の *Xho* I-*Stu* I の領域と入れ換えて 843 番目だけが異なるプラスミドを作成した (方法 15.)。S9 を正方向と逆方向に挿入したそれぞれのプラスミド $1\mu\text{g}$ を鋳型とし (転写反応前に *Pst* I で切断したもの)、全体の反応液 $50\mu\text{l}$ として SP6 ポリメラーゼで + 鎖と - 鎖を合成した (方法 26.)。反応液の 1/10 量を 1.5% アガロースゲル電気泳動に供試して合成した RNA を確認後 (方法 17.)、2 本鎖にするため、+ 鎖と - 鎖をアニーリング用溶液 {0.3M 塩化ナトリウム、10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、2% SDS 溶液} に入れ、74°C で 12 時間保温した。その後、核酸は 0.28M 塩化ナトリウム、4.5mM ZnSO_4 、50mM 酢酸ナトリウム、1unit/ μl S1ヌクレアーゼ 反応液中で 45°C で 1 時間保温して突出しているプラスミド由来の余分な配列を除いた。1.5% アガロースゲル電気泳動の確認の際と同量を 10% SDS-PAGE に供試した (方法 6.)

(図 14)。対照として RRSV-H のゲノム (S9U) $1\mu\text{g}$ を SDS-PAGE に供試して比較したところ、843 番目が A:U の S9 の移動度は RRSV のゲノムの S9U と同じであったが、C:G の S9 はそれらに比べて移動度が早かった。また、同様に合成した RRSV-P の S9 (843 番目が C:G、335 番目が A:U) の移動度はやはり早かった。

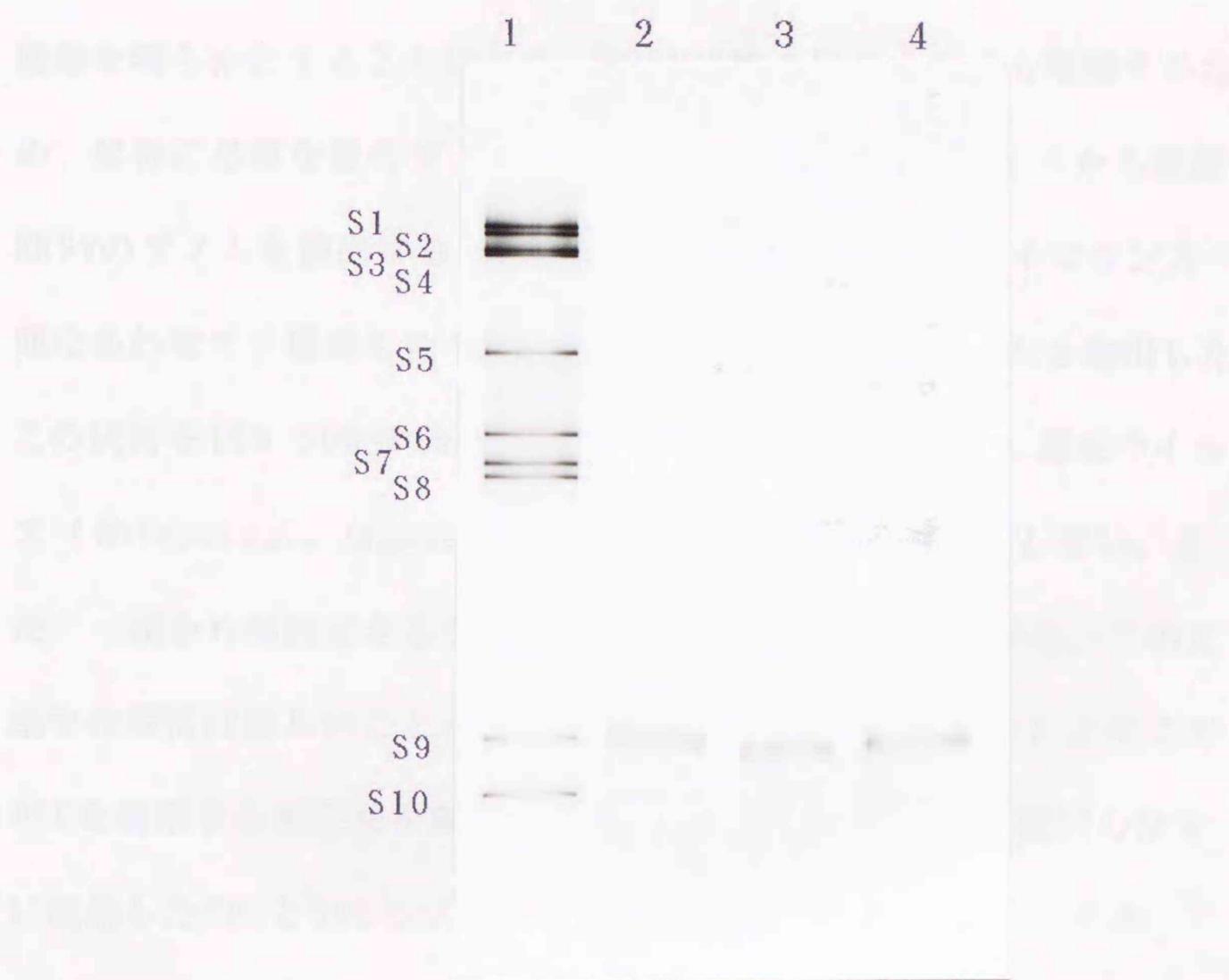


図14 一塩基対の置換によって電気泳動の移動度が変化したS9

- 1 : RRSVのゲノム
- 2 : 843番目がアデニン-ウラシル塩基対のS9
- 3 : 843番目がシトシン-グアニン塩基対のS9
- 4 : 843番目がシトシン-グアニン塩基対で更に335番目を通常
のシトシン-グアニン塩基対からアデニン-ウラシル
塩基対に変えたS9

試験管内で作成した各塩基対置換を持つS9をRRSVのゲノムと共に10% SDS-PAGEに供試し、銀染色をした。

④ S9UとS9Lの簡易検定法の確立

S9U RRSVとS9L RRSVの混合感染イネを獲得源とした場合のS9L RRSVの伝搬様式を調べるために、各媒介昆虫が保毒するRRSVのS9の種類を明らかにすることにした。RRSVは媒介昆虫体内でも増殖するため、解析に必要な量のゲノムが得られると考えた。罹病イネから直接RRSVのゲノムを抽出する方法（方法4.）の試薬量をトビイロウンカ一頭にあわせて、保毒したトビイロウンカからRRSVのゲノムを抽出した。この試料を10% SDS-PAGEに供試したところ、RRSVの他、潜在ウイルス（*Nilaparvata lugens reovirus*）のゲノムが現れてしまい、また、一頭から抽出できるゲノムの量が比較的少ないことから、この方法での解析は難しいことが分かった（結果は載せなかった）。そこでPCRを利用する検定法を確立することにした。まず、塩基配列の決定に使用したS9UとS9Lのプラスミドを抽出して（方法16.）、その1/100量を鋳型にして全量100 μ l系でPCRを行った（方法14.）。増幅したS9の全長DNAをフェノール・クロロホルムで抽出してエタノール沈殿後、10% SDS-PAGEに供試したところ、ゲノムで見られた様な違いは確認できなかった（結果は載せなかった）。そこで、S9UとS9Lは843番目の塩基の違いによることを利用する一本鎖多型分析（SSCP）を試みた。SSCPではわずかな塩基の違いが一本鎖核酸の高次構造に影響してPAGE上の移動度を変えることを利用する。SSCPは通常、数百塩基の核酸を対象にしているので、S9の全長の制限酵素認識部位

を検索し、843番目を含む約200bpの断片をつくる *Hap* II (785-788番目) と *Nde* I (983-988番目) を見出した。そこで上記のS9の全長DNAの1/2量に *Hap* II と *Nde* I を全量100 μ l系で反応させた。反応液の1/5量をエタノール沈殿し、変性溶液 (0.3M NaOH、1mM EDTA) 10 μ l に溶解して5% グリセロールを含む6% PAGEに供試した (方法7.)。また、対照として滅菌水で溶解した試料、pUC119を *Hin* f I で処理した試料も同時に供試した。電気泳動後、ゲルの銀染色をしたところ (方法8.)、複数のバンドが現れた。S9の全長DNAは *Hap* II (785-788番目) と *Nde* I で3つのDNA断片になるので、目的の断片は同定できなかったが、変性処理をした場合にS9UとS9Lの試料で明らかに移動度の異なるバンドがあった (図15)。以上の結果からSSCP解析でS9UとS9Lが識別できることが分かった。

⑤ トビイロウンカ各個体が保毒したRRSVのS9の検定

罹病イネからRRSVのゲノムを抽出して (方法4.)、10% SDS-PAGEに供試し、銀染色でS9UとS9Lを検定した (方法8.)。S9UとS9Lの両方が検出される罹病イネで若齢のトビイロウンカを4日間獲得吸汁させ、潜伏期間として健全イネで10日間育成後、イネの幼苗で個体別に2日間接種吸汁させた。また、対照としてS9Uだけが検出される罹病イネを獲得源として用いた。接種後、トビイロウンカは冷凍保存し、接種イネは温室で育成した。獲得吸汁した全てのトビイロウンカがRRSVを

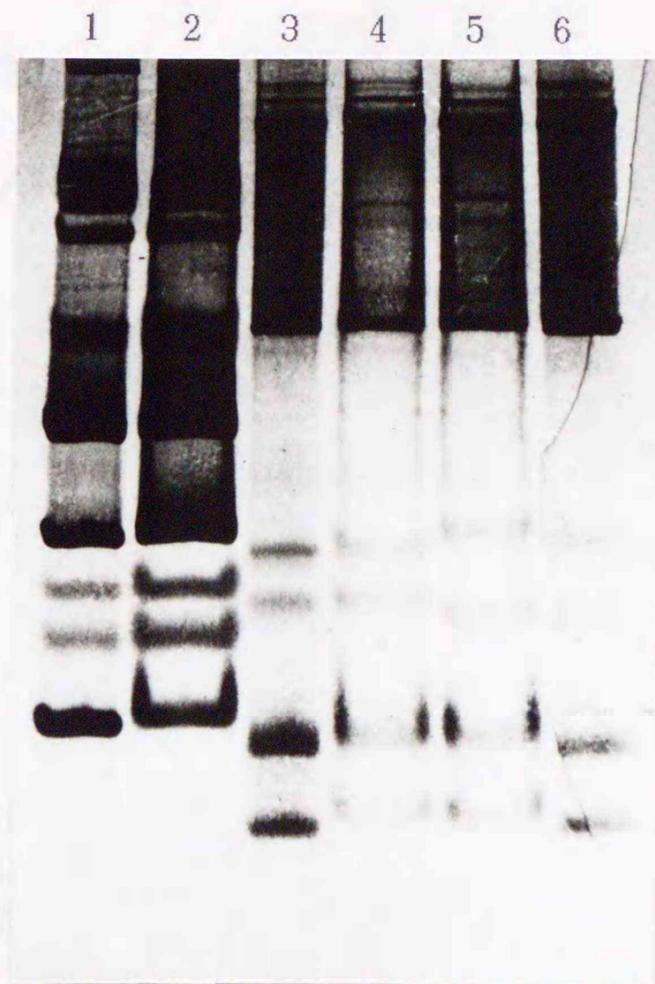


図15 843番目の塩基対を含む制限酵素切断片の一本鎖多型分析

- 1 : マーカー (pUC119を *Hin* f Iで切断したもの)
- 2 : レーン1の試料を泳動前に変性処理をしたもの
- 3 : 843番目にアデニン-チミン塩基対を持つS9の全長dsDNAを *Nde* Iと *Hap* IIで切断したもの
- 4 : レーン3の試料を泳動前に変性処理したもの
- 5 : 843番目にシトシン-グアニン塩基対を持つS9の全長dsDNAを *Nde* Iと *Hap* IIで切断し、泳動前に変性処理したもの
- 6 : レーン5の試料で変性処理をしなかったもの

843番目の塩基対が異なるS9の全長DNAをPCRで増幅し、843番目を含む約200bpの断片を作るために *Nde* Iと *Hap* IIで切断した。試料は泳動前にアルカリで変性したものとし、5% グリセロールを含む6% ポリアクリルアミドゲルで室温で泳動後、銀染色をした。

保毒するわけではないので（通常では約30%）、ELISA（方法3.）で保毒を確認したトビイロウンカからRRSVのゲノムを抽出した（方法5.）。上記のS9の843番目を含む約200bpの断片はPCRで増幅することにし、そのためのプライマー（786-805番目の+鎖と967-986番目の-鎖）を合成した。逆転写反応には967-986番目の-鎖を使用した。これらのプライマーで増幅する領域の+鎖の二次構造をDNASIS-Mac v2.0で予測したところ、843番目の塩基の違いだけで構造上の違いが見られた（図16）。トビイロウンカから抽出したRRSVのゲノムの1/4量をDMSO変性して（方法12.）から逆転写反応し（方法13.）、その1/20量を全量50 μ lの系のPCRの鋳型とした（方法14.）。また、対照としてS9の全長DNAを挿入したプラスミドを大腸菌から抽出して（方法16.）PCRの鋳型として用いた。反応液の1/10量を1.5% アガロースゲル電気泳動に供試したところ（方法17.）、約200bpの増幅産物が確認できた（図17 A）。この増幅産物がRRSVのS9由来であることを確かめるために、アガロースゲルからナイロンメンブレンへ核酸を転写して、サザンブロットハイブリダイゼーションを行った（方法11.）。プローブは上記のPCRで増幅したS9の全長DNA 約20ng を³²Pで標識して用いた。ハイブリダイゼーション結果、増幅産物の位置に反応が現れた（図17 B）。次に残りのPCR溶液のミネラルオイルをクロロフォルム抽出（反応液に等量のクロロフォルムを加え、2-3分間混合後、卓上遠心機を使用して、12,000rpmで2-3分間遠心分離した

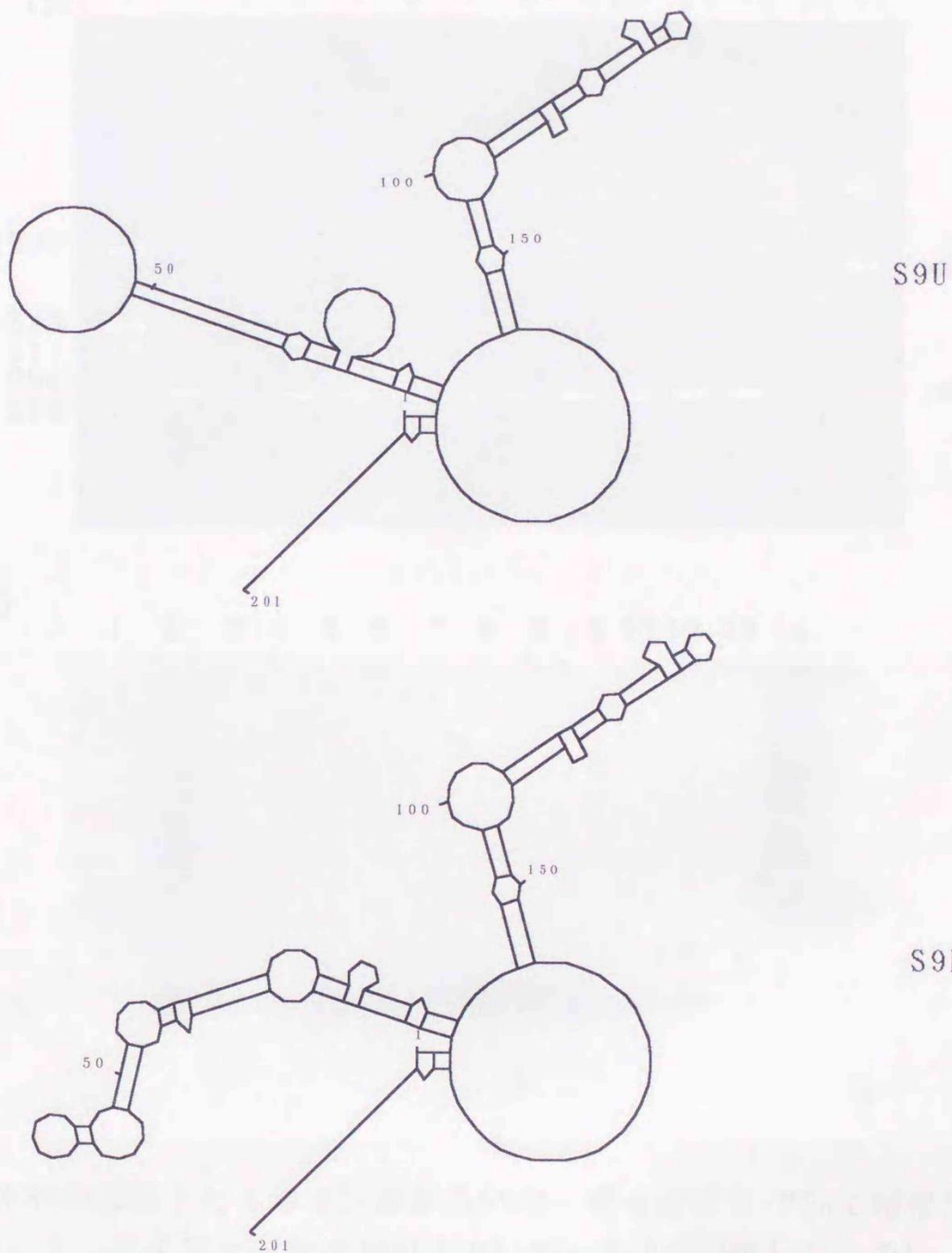


図16 一本鎖の二次構造の比較

PCRで増幅した領域（786-986番目）の+鎖の二次構造をDNASIS-Mac v2.0で予測した。843番目がアデニンのものをS9Uとし、シトシンのものをS9Lとした。実際に増幅したのはDNAであるが、ここに示したのはRNAの解析結果である。

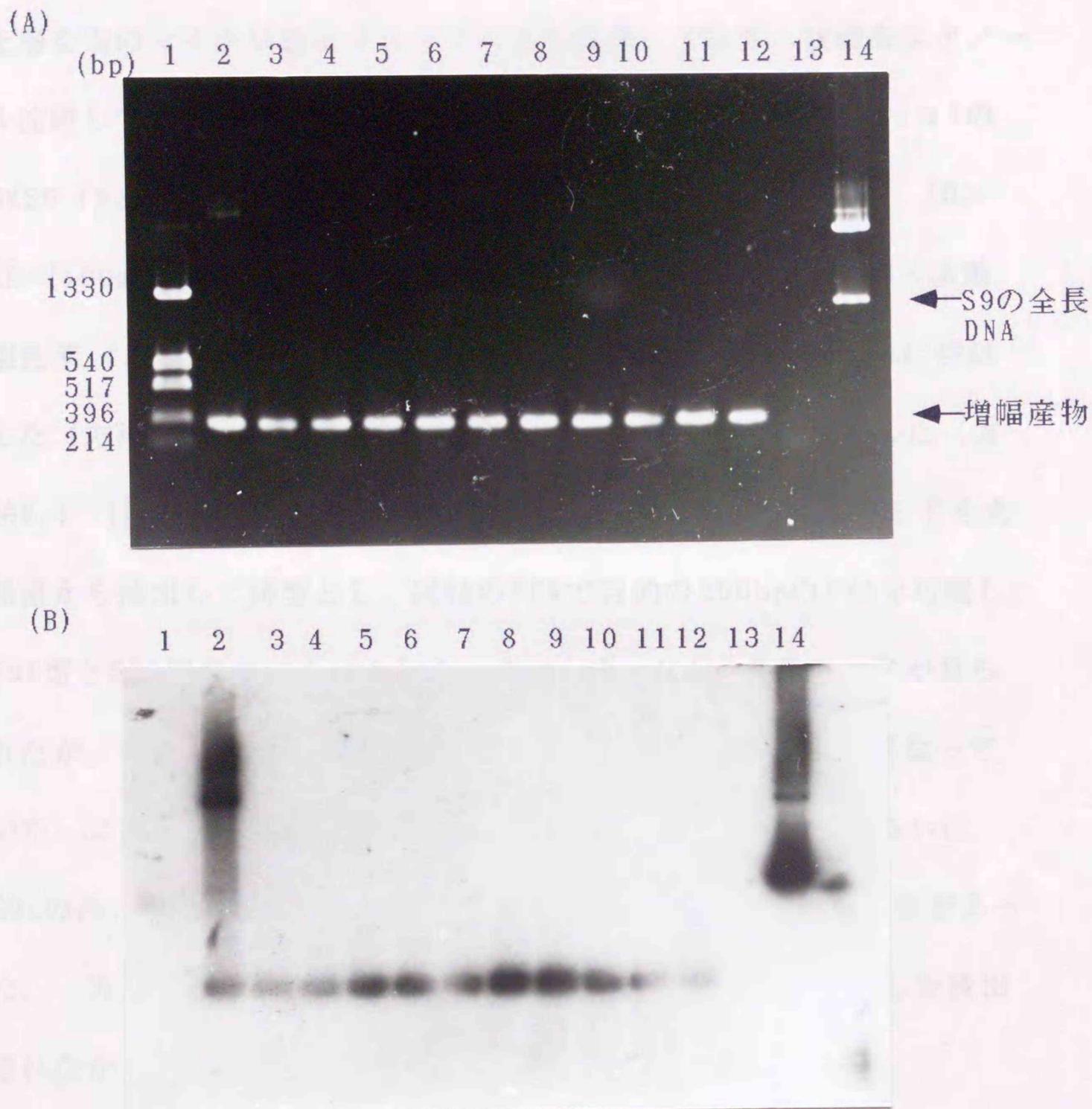


図17 RRSVの保毒トビロウンカからS9の一部を逆転写-PCRで増幅した産物

- 1 : サイズマーカー (pUC119を *Hin* f Iで切断したもの)
- 2 : S9のDNAを挿入したプラスミドを鋳型として用いたもの
- 3-12 : 保毒トビロウンカ各個体
- 13 : 保毒させなかったトビロウンカ
- 14 : プラスミドから制限酵素で切り出したS9の全長DNA

(A) : 各保毒トビロウンカごとに抽出した核酸を鋳型とし、S9の843番目を含む約200bpが増幅するように設定したプライマーを用いて逆転写反応とPCRを行った。増幅産物は1.5% アガロースゲルで電気泳動し、EtBrで染色した。

(B) : (A)と同様に泳動後、DNAをナイロンメンブレンに移し、 ^{32}P で標識したS9のDNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。結合したプローブはX線フィルムで検出した。

上層を別のマイクロ遠心チューブへとる操作)で除き、核酸をエタノール沈殿して20 μ lの滅菌水に溶解した。その4 μ lに変性のため1 μ lのDMSO (N₂ガスを数十秒間DMSO液に通したもの)を加え、更に、10 \times TE {100mM Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA} 0.9 μ l と6 \times 泳動用色素 1.5 μ l を混合して5% グリセロールを含む6% PAGEに供試した(方法7.)。泳動後、ゲルの銀染色をしてバンドを検出した(方法8.) (図18)。843番目がA:UのプラスミドとC:Gのプラスミドを大腸菌から抽出して鋳型とし、同様のPCRで目的の200bpのDNAを増幅し、S9U型とS9L型のマーカーとした。各マーカーには4本のバンドが見られたが、そのうち2本はS9U型とS9L型のマーカーで移動度が異なっていた。これを基準にS9UとS9Lを判定した結果、S9Uのみ、あるいはS9Lのみ、あるいはそれら両方が検出されるトビイロウンカ個体があった。一方、対照として用いたS9U RRSV罹病イネの場合はS9Uしか検出されなかった。

⑥ S9UとS9Lの両方が検出される罹病イネから伝搬したRRSV

S9U RRSVとS9L RRSVが一つのイネ株に混合感染したものを獲得源とした場合、最初の伝搬実験では、伝搬後のイネにS9U RRSVしか検出できなかった(Yan, 1992)。しかし、以上実験では混合感染イネを獲得源とした場合、S9L RRSVのみを保毒しているトビイロウンカが検出されたので、これらのトビイロウンカ(解析したトビイロウンカと

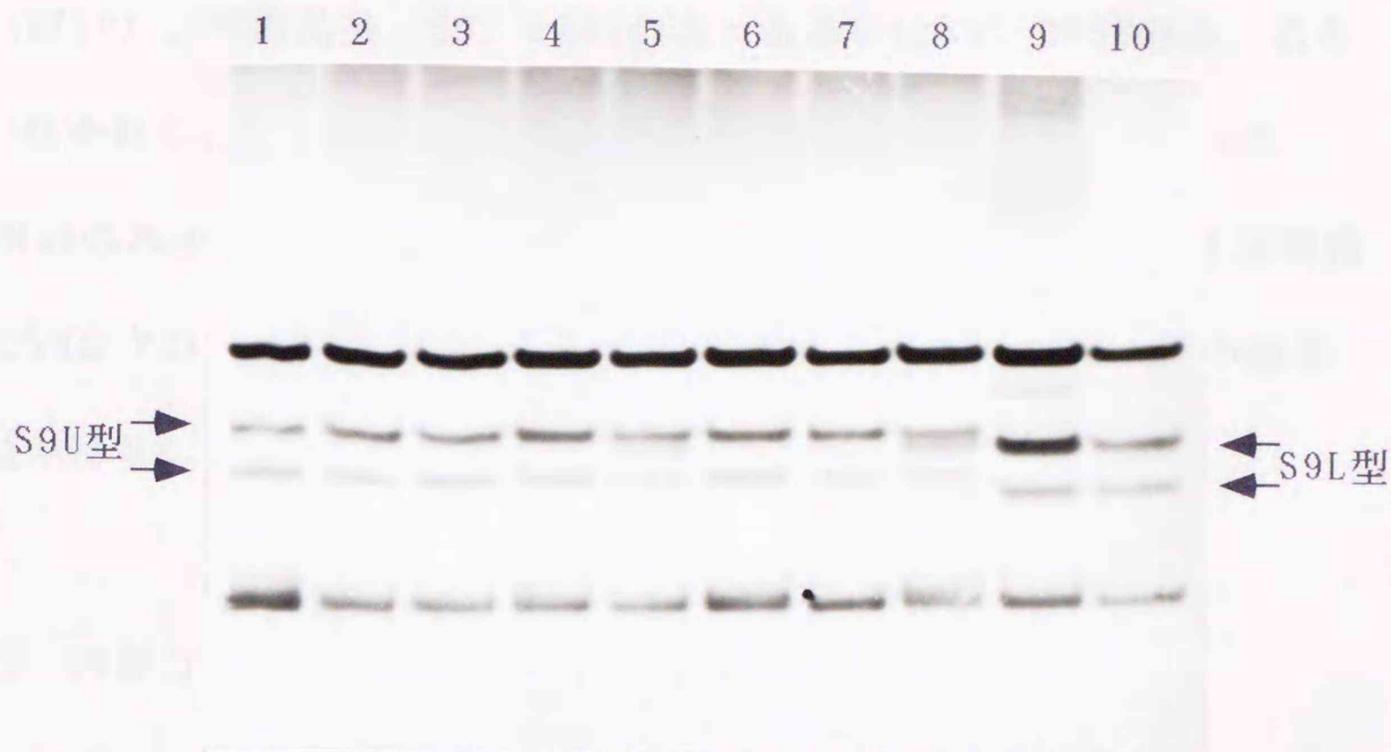


図18 PCRによる増幅産物の一本鎖多型分析

- 1 : S9U型マーカー (843番目にアデニン-チミン塩基対を持つS9のcDNAを挿入したプラスミドからPCRで増幅した産物)
- 2と3 : S9Uだけが検出される罹病イネを用いて保毒させたトビイロウンカ各個体
- 4-9 : S9UとS9Lの両方が検出される罹病イネを用いて保毒させたトビイロウンカ各個体
- 10 : S9L型マーカー (843番にシトシン-グアニン塩基対を持つS9 cDNAを挿入したプラスミドからPCRで増幅した産物)

各保毒トビイロウンカごとに抽出した核酸を鋳型とし、逆転写反応とPCRでS9の843番目を含む約200bpを増幅した。増幅産物をアルカリ変性後、5% グリセロールを含む6% ポリアクリルアミドゲルで室温で電気泳動し、銀染色をした。S9UとS9Lで移動度の異なるバンドを矢印で示した。

は異なるが、獲得から接種まで同じ群) でRRSVを接種し、発病したイネからRRSVのゲノムを抽出して(方法4.) 10% SDS-PAGEで解析した(図19)。その結果、S9U RRSVのみ、あるいはS9L RRSVのみ、あるいはそれら両方が検出されるイネ個体が見つかった。そこで、S9L RRSVのみが検出されたイネから直接RRSVのゲノムを抽出し、上記同様にS9をクローニングして塩基配列を決定したところ、843番目の塩基はやはりC:Gであった(図13)。

⑦ S9がコードするタンパク質(P9)の大腸菌による発現

S9がコードするP9を解析するために大腸菌による発現を行った。まず、RRSVのゲノムを鋳型に逆転写反応によってS9の全長のcDNAを作成した(上田氏提供)。濃度が分からなかったので10 μ lをPCRの鋳型とし(方法14.)、ORFの始まりの塩基配列のプライマー(13-30番目に *Eco* R Iの認識配列を加えたdGGGAATTCATGAAGACTGCCTTTGC)と+鎖の3'末端に相補の配列のプライマー(1116-1132番目に *Pst* Iの認識配列を加えたdGGGCTGCAGCACCATGGTCTCGCCG)を用いて全量50 μ l系のPCRを行った(方法14.)。反応後、1/10量を1% アガロースゲル電気泳動による確認に使用した(方法17.)。残りを滅菌水で100 μ lとしてフェノール・クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿後、100 μ lのproteinase K 反応液 {10mM Tris-HCl (pH8.0)、5mM EDTA、0.5% SDS、5 μ g proteinase K} 中で37 $^{\circ}$ C、30分間保温し

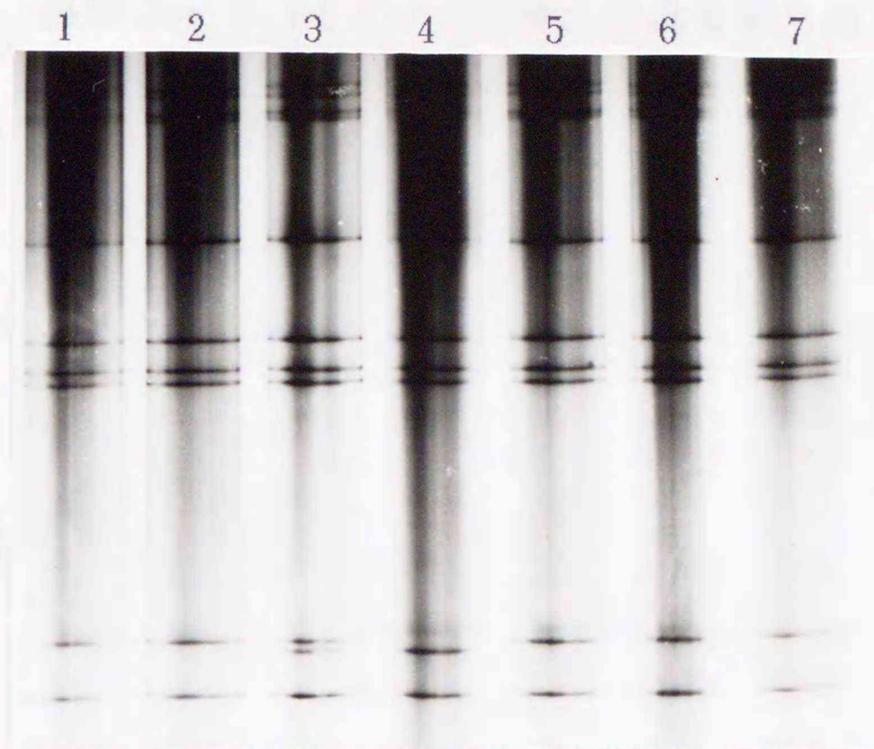


図19 S9UとS9Lの両方が検出される罹病イネから
トビイロウンカ各個体で伝搬したRRSVのゲノム

1と2：S9Uだけが検出される罹病イネを用いて保毒させた
トビイロウンカ各個体から伝搬したRRSVのゲノム

3-7：S9UとS9Lの両方が検出される罹病イネを用いて
保毒させたトビイロウンカ各個体から伝搬した
RRSVのゲノム

保毒トビイロウンカ各個体でRRSVをイネに接種した。
発病したイネから個体別に抽出したdsRNAを
10% SDS-PAGEに供試し、銀染色をした。

た。フェノール・クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿し、全量
50 μ l系で *Eco* R Iと *Pst* Iを反応させ、再びエタノール沈殿し、
pUC119に挿入した（方法15.）。このプラスミドを大腸菌から抽出し
（方法16.）、再び *Eco* R Iと *Pst* Iで挿入部位を切り出し、pMAL-c2
の *Eco* R Iと *Pst* I部位の間に挿入してpMAL-S9を作成した（方法
15.）（図6）。合成したプライマー（dGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGC
C）を使用してpMAL-S9の *Eco* R I 挿入開始部位、約200塩基の配列
を確認した（方法19.）。pMAL-S9で形質転換した大腸菌JM83と対照
として形質転換していない大腸菌JM83を2mlの2 \times YT（pMAL-S9の形
質転換体には50 μ g/ml アンピシリンを含む）に接種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩
振盪培養した。培養液 10 μ l を0.1mM IPTGを含むRich medium（1
% Tryptone、0.5% Yeast extract、0.5% 塩化ナトリウム）
2ml に接種し、23 $^{\circ}$ Cで約5時間振盪培養し、pMAL-S9で形質転換した
大腸菌は250 μ l、形質転換していない大腸菌は500 μ lの培養液をマイ
クロ遠心チューブに移した。卓上遠心機で8,000rpmで2分間遠心分離
し、沈殿をTE 25 μ l に懸濁した。SDS-PAGE用に試料を調整し、
pMAL-S9で形質転換した大腸菌は5 μ l、形質転換していない大腸菌は
7 μ lを12.5% SDS-PAGEに供試した（方法20.）（図20 レーン2、
3）。サイズマーカーは3.5 μ lを供試した。泳動後、ゲルの銀染色を
してタンパク質のバンドを検出した（方法20.）。塩基配列をもとに
したP9の推定分子量は約38kDaであり、マルトース結合タンパク質

(MBP) (約42KDa) との融合タンパク質 (MBP-P9) の推定分子量は約80KDaである。pMAL-S9で形質転換した大腸菌タンパク質中に約81KDaのバンドが特異的に認められた。MBP-P9を大腸菌タンパク質から分離精製し (方法21.)、波長280nmの吸光度を測定してMBP-P9の濃度を算出した。精製したMBP-P9を透析溶液 {10mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム} で透析し (方法25.)、その100 μ l (約40 μ g) に1 μ g/ μ l FactorXa 1 μ l を混合し、約20時間室温で反応させた。透析したMBP-P9とFactorXaで処理した試料をSDS-PAGE用に調整してそれぞれ10 μ lを上記の12.5% SDS-PAGEで解析した (方法20.) (図20 レーン4、5)。大腸菌タンパク質から分離したMBP-P9と、FactorXaで切り離したMBPとP9が確認できた。P9はサイズマーカーとその移動度からすると約36.2KDaであった。RRSVには35KDaの構造タンパク質が報告されているので (Chen *et al.*, 1989b)、これらの移動度を比較することにした。RRSV粒子は罹病イネから純化し (方法2.)、SDS-PAGE用に調整した。純化は100gの罹病イネを材料にしたが、収量が少なく濃度測定できなかつたのでここでは全量を最終20 μ lに調整し、10 μ lを上記の12.5% SDS-PAGEで解析した (方法20.) (図20 レーン6)。FactorXaによってMBPと分離して作られるP9にはN末端にプラスミド由来の4アミノ酸が付加されているため、大腸菌で発現したP9は35KDaの構造タンパク質よりわずかに移動度が遅かつたが、ほぼ同じ移動度を示した。

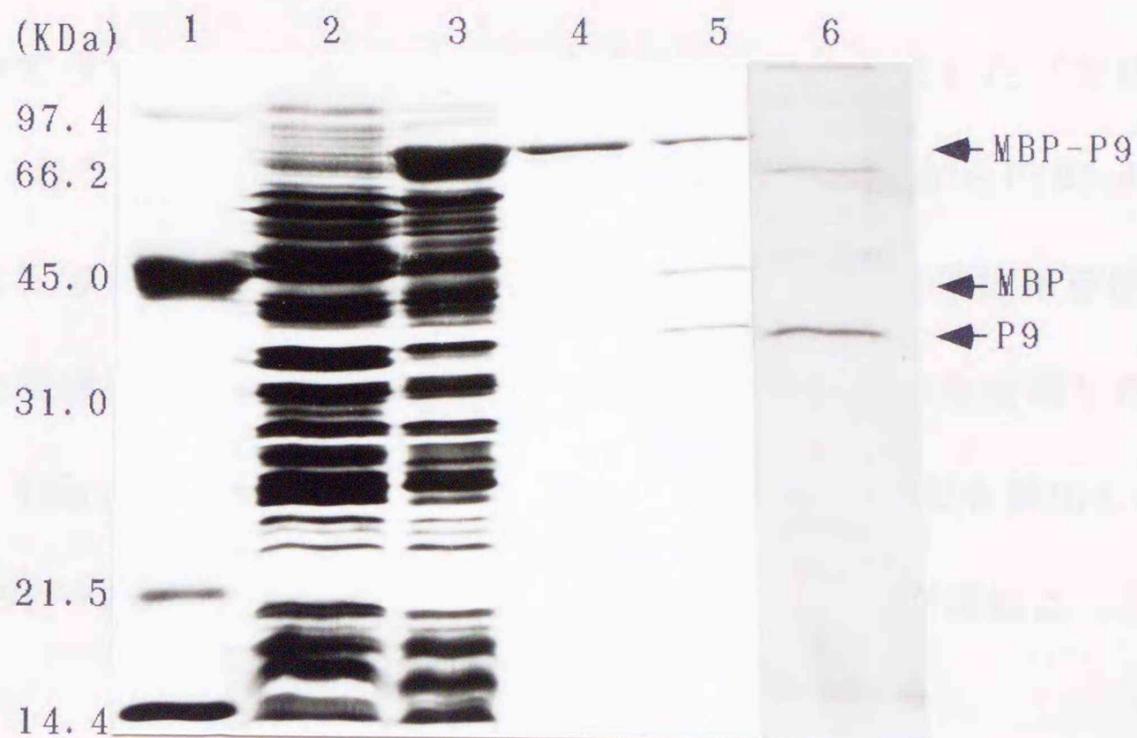


図20 大腸菌によるP9の発現

- 1 : サイズマーカー
- 2 : 非形質転換体
- 3 : 大腸菌をpMAL-S9で形質転換し、MBP-P9の発現を誘導したもの
- 4 : アミロースレジンによって大腸菌タンパク質から分離したMBP-P9
- 5 : P9を分離するためFactorXaで処理したMBP-P9
- 6 : RRSV純化粒子

各タンパク質を12.5% SDS-PAGEに供試して、銀染色をした。MBP-P9、MBP、P9の位置をまとめて右側の矢印で示した。

⑧ P9と抗RRSV粒子抗体の反応

P9はその分子量がほぼ同じであったことからChen *et al.* (1989b) の35KDaの構造タンパク質であると推測し、抗RRSV粒子抗体を用いてウェスタンブロッティングで確かめることにした(方法20.)。各タンパク質を図20同様に電気泳動後、ゲルからPVDFメンブレンに転写した。一次抗体には70 μ g/ml 抗RRSV粒子抗体を使用し、二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体を使用した。Konica immunostaining HRD Kitでペルオキシダーゼを検出したところ、MBP-P9とFactorXaによって分離したP9に反応が現れた(図21)。

⑨ RRSVの構造タンパク質とMBP-P9に対するポリクローナル抗体(抗MBP-P9抗体)の反応

P9は35KDaの構造タンパク質であることを更に確かめるため、MBP-P9に対する抗体を作成して、RRSVの35KDaの構造タンパク質の反応をウェスタンブロッティングで調べることにした(方法20.)。ウサギを免疫するため、大腸菌タンパク質から分離精製したMBP-P9 100 μ gを不完全アジュバンド(DIFCO)に乳化し、後肢のふくらはぎに筋肉注射した。10日間隔で2回筋肉注射し、その10日間後に100 μ gを耳に静脈注射した。3日後、耳から採血して37 $^{\circ}$ Cで約1時間、次に6-10 $^{\circ}$ Cに移して一晩静置した。SAKUMA Model 90-22で3,000rpm、5分間遠心

分離して血球成分と分離し、上澄みの血清を再度3,000rpmで15分間遠心分離して残りの血球成分を除いた。12.5% SDS-PAGEには上記同様に精製したMBP-P9とFactorXaで処理したMBP-P9の他、TEで8倍希釈してSDS-PAGE用に調整後、5倍希釈したサイズマーカー 3 μ l を供試した。RRSV粒子は罹病イネから純化し（方法2.）、SDS-PAGE用に調整した。純化は100gの罹病イネを材料にしたが、収量が少なく濃度測定できなかつたのでここでは全量を最終100 μ lに調整し、5 μ lを供試した。電気泳動後、タンパク質はゲルからPVDFメンブレンに転写した。一次抗体には血清を15倍希釈で使用し、二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体を使用した。Konica immunostaining HRD Kitでペルオキシダーゼを検出したところ、MBP-P9、FactorXaによって分離したMBPとP9、RRSVの35KDaの構造タンパク質に反応が認められた（図22）。

⑩ S9L RRSVの伝搬効率

S9Lの843番目の塩基置換は338アミノ酸からなるP9の277番目のアミノ酸を変える。また、35KDaの構造タンパク質は粒子の表面にあると考えられており（Hagiwara *et al.*, 1986; Chen *et al.*, 1989b）、ウイルスの細胞への侵入に関与していることもありうる。そこで伝搬効率にこの置換が影響しているかどうかを確認することにした。この実験の最初にはS9L RRSVが得られていなかったためS9U

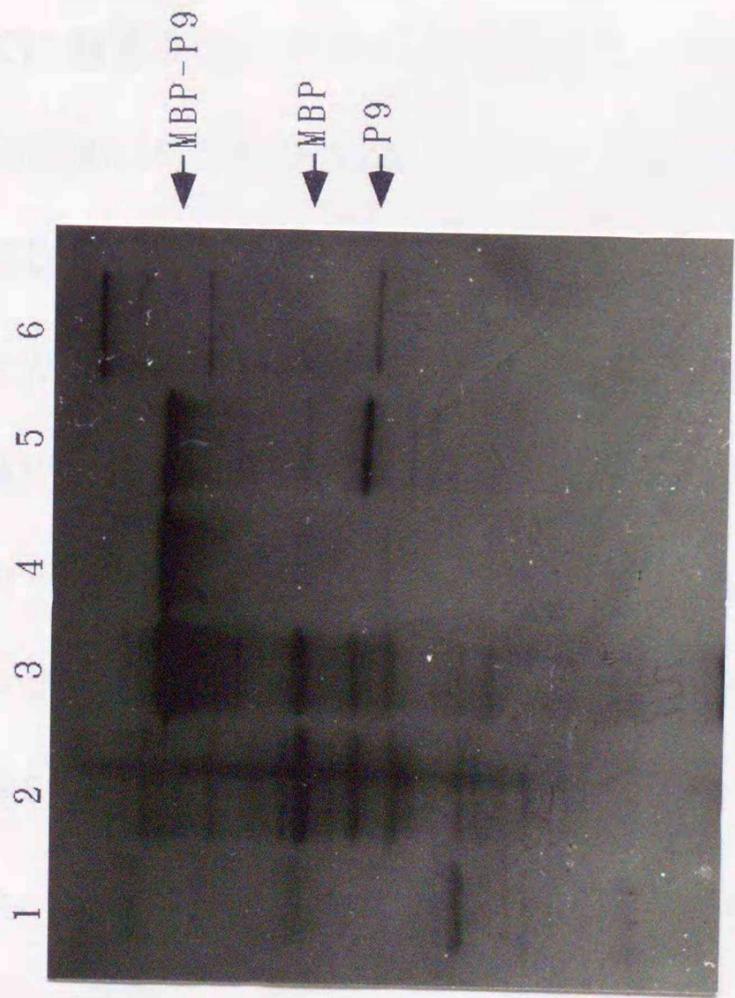


図21 発現したMBP-P9と抗RRSV粒子抗体の反応

1-6：図20と同じ

図20と同様に12.5% SDS-PAGE後、タンパク質をPVDFメンブレンに移して抗RRSV粒子抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体を用い、Konica immunostaining HRD Kitで検出した。MBP-P9、P9の位置をまとめて右側の矢印で示した。

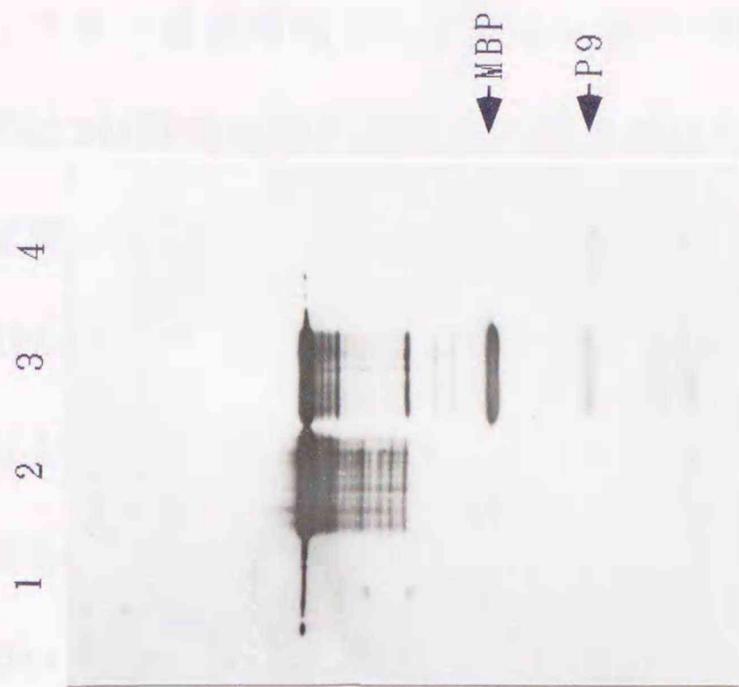


図22 RRSVの構造タンパク質と抗MBP-P9抗体の反応

1：サイゾマーカー

2：アミロースレジンカラムによって大腸菌タンパク質から分離したMBP-P9

3：P9を分離するためMBP-P9をFactorXaで処理したもの

4：RRSV純化粒子

12.5% SDS-PAGE後、タンパク質をPVDFメンブレンに移して抗MBP-P9抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体を用い、Konica immunostaining HRD Kitで検出した。反応したMBPとP9の位置をまとめて右側の矢印で示した。

RRSVとS9L RRSVに混合感染していたイネを獲得源にしてトビイロウンカによる保毒率とイネへの伝搬率をS9U RRSV単独感染の場合と比較した。1本植えにした罹病イネで若齢のトビイロウンカを4日間獲得吸汁させ、潜伏期間として健全イネで10日間育成後、イネの幼苗で個別に2日間接種吸汁させた。獲得源はウイルスの接種時期が同じで病徴が同程度のものを組として、全部で4組（J-1とJ-3、J-2とJ-4、Y1E6とY8 5-1、Y3とY8 5-2）を比較した。保毒トビイロウンカはELISAで検出し（方法3.）、イネは一ヶ月以上温室で育成後、病徴観察あるいはELISAで罹病個体を検出した（方法3.）。保毒率は接種に用いたトビイロウンカ50個体に対する保毒トビイロウンカ、伝搬率は接種イネ50個体に対する罹病イネを算出して図23に示した。この試験では顕著な違いが見られなかった。そこでS9L RRSVであるRRSV-PとS9U RRSVであるRRSV-Hで比較することにした。それぞれの獲得源を同じ状態にするために、まず、RRSV-PとRRSV-Hを北大のトビイロウンカでイネ（品種、金南風）に伝搬させた（この際は上記同様に獲得吸汁と潜伏期間をとり、トビイロウンカの集団でイネに伝搬させた）。約一ヶ月間、接種したイネを温室で育成し、病徴が同程度に現れたイネで若齢トビイロウンカを3日間獲得吸汁させた。トビイロウンカはRRSV-PとRRSV-Hそれぞれにつき北大のものとフィリピンのものを用い、潜伏期間として健全イネで10日間育成後、トビイロウンカを個別に2日間イネの幼苗で接種吸汁させた。獲得源に使用した罹病イネは

株全体を磨碎してELISAでウイルス濃度を比較した（方法3.）。

ELISAでは同じ時間だけ発色を行い、波長415nmの吸光度を測定したところ、RRSV-Hは約2.0でRRSV-Pは約1.3であった。接種したイネは生育状態が悪く、枯死したので伝搬率は分からなかったが、トビイロウンカは各区につき25頭をELISAで調べ（方法3.）、保毒率を算出した（図24 A）。北大のトビイロウンカではRRSV-P（20%）よりRRSV-H（36%）の方が保毒率がわずかに高く、フィリピンのトビイロウンカでは逆にRRSV-H（0%）よりRRSV-P（16%）の方が保毒率が高かった。更に、RRSV-Hから分離したS9L RRSVを用いて同様に保毒率を比較した。北大のトビイロウンカの場合、S9U RRSVの73%に対しS9L RRSVでは76%で差がなかった。また、この試験ではRRSV-Pも用いたが、保毒率は27%であった。（但し、この場合は獲得吸汁と潜伏期間の日長処理が事故のため通常とは違って24時間照明であった）

（図24 B）。フィリピンのトビイロウンカの場合はRRSV-HのS9U RRSVで23%に対しS9L RRSVでは30%で差がなかった。また、この試験でRRSV-Pの保毒率は23%であった（図24 C）。

論議

RRSV-HのS9Uに対して、RRSV-PとRRSV-H（分離したもの）のS9Lには塩基の欠失はなく、それぞれ2カ所と3カ所の置換しか認められな

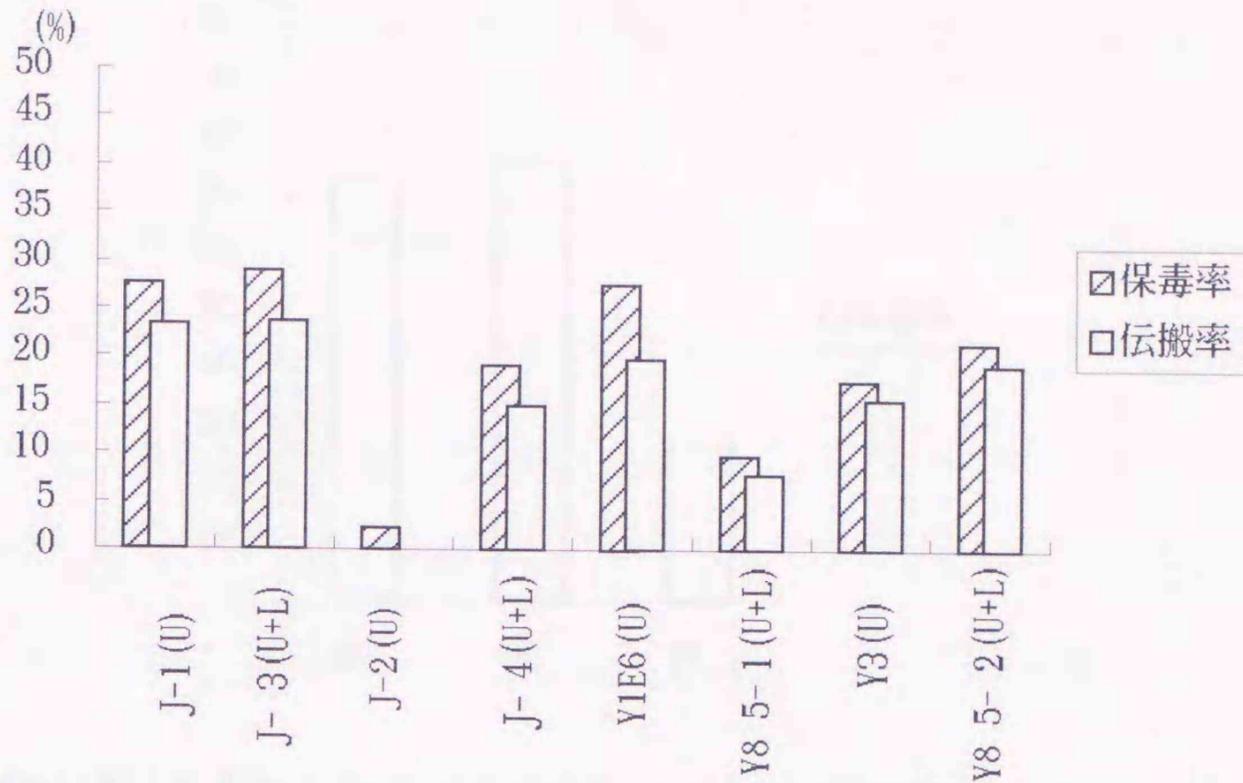


図23 S9U RRSV罹病イネとS9U RRSVとS9L RRSVの罹病イネにおける RRSV保毒率と伝搬率の比較

それぞれはRRSV罹病イネ個体で、UはS9U RRSV、U+LはS9U RRSVとS9L RRSVの混合感染株を獲得源に用いたことを示す。

保毒率 = RRSV保毒虫個体 / 全個体、伝搬率 = RRSV感染イネ個体 / 接種個体の百分率をグラフに表示した。

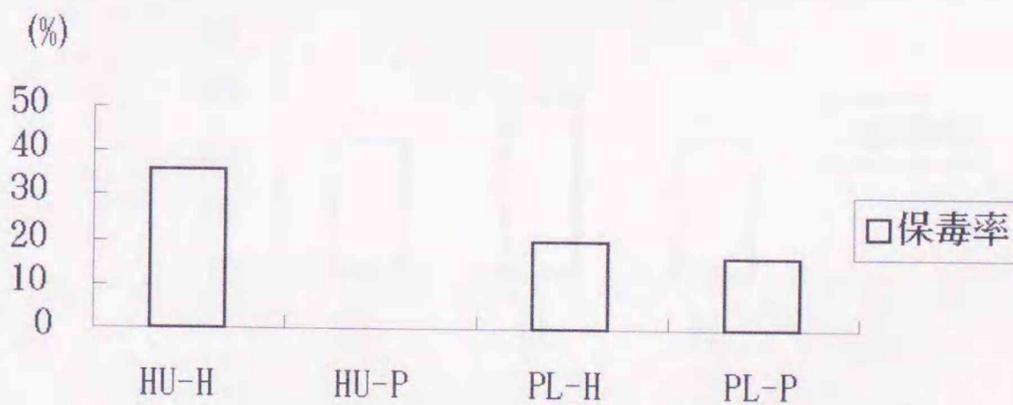


図24(A) S9U RRSV罹病イネとS9L RRSV罹病イネにおける保毒率の比較

RRSV-HのS9U RRSV (HU) とRRSV-PのS9L RRSV (PL) を獲得源として、北大のトビイロウンカ (H) とフィリピンのトビイロウンカ (P) に獲得させた。各区は“獲得源-トビイロウンカ”で表示した。保毒率 = RRSV保毒虫個体 / 全個体の百分率をグラフにした。

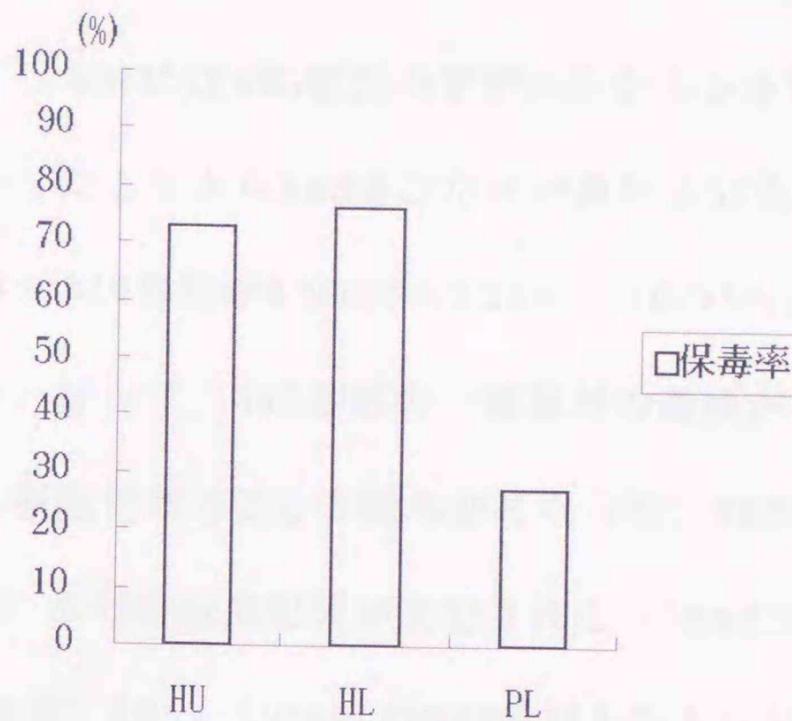


図24(B) 北大のトビイロウンカによるS9U RRSV罹病イネとS9L RRSV罹病イネの保毒率の比較

RRSV-HのS9U RRSV (HU) とS9L RRSV (HL)、RRSV-PのS9L RRSV (PL)を獲得源として、北大のトビイロウンカに獲得させた。
保毒率=RRSV保毒虫個体/全個体の百分率をグラフにした。

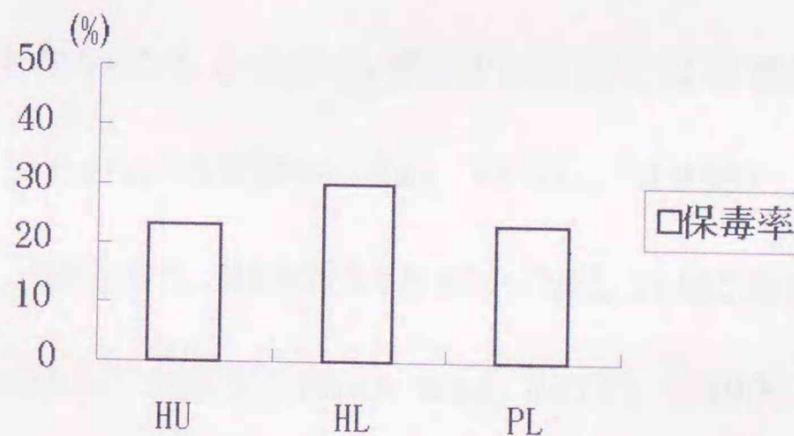


図24(C) フィリピンのトビイロウンカによるS9U RRSV罹病イネとS9L RRSV罹病イネの保毒率の比較

RRSV-HのS9U RRSV (HU) とS9L RRSV (HL)、RRSV-PのS9L RRSV (PL)を獲得源として、フィリピンのトビイロウンカに獲得させた。
保毒率=RRSV保毒虫個体/全個体の百分率をグラフにした。

かった (図13)。S9Lには843番目のアデニンからシトシンへの置換が共通して見つかったことから843番目だけが異なるS9を合成してPAGEで比較した結果、843番目がA:UのS9はS9U、C:GのS9はS9Lと同様の移動度を示した。従って、843番目の一塩基対の置換がPAGE上でS9の移動度を変える原因であることが明らかになった。RRSV-TとインドのRRSV (RRSV-I) でS9の塩基配列が決定された (Upadhyaya *et al.*, 1995)。その結果、RRSV-TのS9Lの843番目もシトシンであることが分かった。また、RRSV-Iの843番目もシトシンであることからS9Lを持つと推測される。通常、PAGEでは分子量の小さいものは移動度が早い。しかし、A:U (ATP+UTP=991.4Da) はC:G (CTP+GTP=1006.4Da) より分子量が小さいにもかかわらず、A:Uを持つS9UはC:Gを持つS9LよりPAGE上で移動度が遅かった。更に、RRSVのS9はS10より30塩基対少ないにもかかわらず、PAGE上では移動度が遅い (図14) (Uyeda *et al.*, 1995b; Yan *et al.*, 1995)。同様の現象はWTVのS4とS5、S6とS7、RDVのS4とS5、S9とS10にも認められていることから (Suzuki, 1995; Nuss and Da11, 1990)、PAGE上の移動度が分子量だけで決定されているわけではないと考えられる。PAGE上で移動度が異なっていたRDVのS12には塩基の置換のみが認められ、欠損や挿入はなかった (Murao *et al.*, 1994)。また、PAGE上の移動度が異なっていたrotavirusのS8には1塩基対の置換しか検出されなかった (Dunn *et al.*, 1993)。これらの結果は塩基対の置

換にはPAGE上の移動度に影響を与えるものがあることを示している。PAGE上の移動度に影響する因子として、dsDNAと同様にdsRNAが局部的に曲がることが考えられた (Wu and Crothers, 1984)。

S9Uを持つRRSV (S9U RRSV) とS9Lを持つRRSV (S9L RRSV) が混合感染したイネをRRSVの獲得源とした場合、最初の伝搬実験では、伝搬後のイネにS9U RRSVしか検出できなかった (Yan, 1992)。本研究では同様に混合感染したイネを獲得源にした場合、SSCPによってS9Uのみ、あるいはS9Lのみ、あるいはそれら両方が検出されるトビイロウンカ個体があった (図18)。RRSVはトビイロウンカ体内で増殖すると考えられている (Milne *et al.*, 1982)。S9UとS9Lが検出されるトビイロウンカ個体があったことは保毒の段階でこれらのRRSVでは干渉は起こらなかったことを示す。また、それはイネでも同様である (図19)。RRSV-Hから分離したS9L RRSVは以後の試験では単独で伝搬した。従って、最初の実験では (Yan, 1992) 多くの個体を調べるのが困難であったために、S9L RRSVが検出できなかったと考えられる。本実験ではSSCPによって多くの個体の判定が可能となった。別の系統のウイルスが宿主に混合感染した場合に片方の病徴しか現れないことがある (Giddings, 1949)。そのような場合、ゲノムを対象にして簡便に解析できることから、SSCPが有効であると考えられる。植物レオウイルスは宿主で局部病斑を形成せず、また、媒介昆虫の細胞にもプラークを作らないことから、混合感染しているウイルスを分離する

のは困難だった。しかし、媒介昆虫の個体別接種をすることで、分離できることが明らかになった。

RRSV-HのS9UのORFには338アミノ酸からなる38.6KDaのタンパク質(P9)がコードされている(Yan, 1992)。S9Lのアミノ酸配列はわずかに異なるが{RRSV-H(158番目Asn→Ser, 277番目Asp→Ala)、RRSV-P(108番目Val→Ile, 277番目Asp→Ala)、RRSV-T(277番目Asp→Ala)、RRSV-I(171番目Ala→Thr, 191番目Asn→Ser, 277番目Asp→Ala)}、すべてにナンセンス変異はなく、ORFは保存されていた(図12、図13)(Upadhyaya *et al.*, 1995)。従って、RRSVにとってP9は重要な機能を果たしていると考えられる。大腸菌で発現させたP9はSDS-PAGEでの移動度がRRSVの35KDaの構造タンパク質とほぼ同じだった(図20)。また、抗RRSV粒子抗体は発現したP9に反応し、MBP-P9に対する抗体はRRSVの35KDaの構造タンパク質と反応した(図21、図22)。これらのことからP9はRRSVの35KDaの構造タンパク質であることが明らかとなった。また、RRSV-Tを用いても同様の結果が得られている(Upadhyaya *et al.*, 1995)。分子量と他の構造タンパク質との量比からすると、RRSVの35KDaの構造タンパク質にはERSVの34KDaの構造タンパク質が対応している(図10)。推定分子量からすると、ERSVの34KDaの構造タンパク質はS9あるいはS10にコードされている可能性がある(表5)。PAGEによってERSVとRRSVのセグメントの移動度を比較すると、S9ではERSVの方がRRSVよ

りわずかに早いのに対し、S10ではERSVの方がRRSVよりわずかに遅い (Chen *et al.*, 1989)。従って、ERSVのS9はRRSVのS9よりわずかに分子量の小さいタンパク質を、S10はRRSVのS10よりわずかに大きいタンパク質をコードすると予想される。ERSVのS9と34KDaの構造タンパク質は共にRRSVのS9とP9より小さいことから、ERSVでもS9が34KDaの構造タンパク質をコードしている可能性が高いと考えられる。多くの植物ウイルスでは構造タンパク質の遺伝子を宿主植物に導入すると抵抗性になることが知られている。RRSVのP9は構造タンパク質であることから、RRSV-PのS9LのmRNAを発現するイネが作成されたが、そのイネは抵抗性を示さず、S9U RRSVに感染した (Matsumura and Tabayashi, 1995)。また、RDVでは媒介昆虫に2種類ウイルスを注射することによってセグメントの交換 (遺伝的再集合) が起こることから (Uyeda *et al.*, 1995a)、S9LのmRNAの存在下で増殖したRRSVにはS9Lが格納されていることが期待された。しかし、増殖したRRSVには、S9Uしか検出されなかった (Matsumura and Tabayashi, 1995)。

ウイルスは通常、粒子表面のタンパク質と宿主細胞のレセプターを介して細胞内に侵入する。P9は粒子の表面にあると考えられている (Hagiwara *et al.*, 1990)。RRSV-P (S9L RRSV) のP9のアミノ酸配列はS9UのP9と一部異なっており、継代の際に伝搬性が低いとされていた。そこでこれらのアミノ酸置換が伝搬性に影響していることが

考えられたが、北大とフィリピン、どちらのトビイロウンカを用いた場合でもS9U RRSVとS9L RRSVの保毒率に違いはなかった。フィリピンのトビイロウンカは1回目の試験ではS9U RRSVを全く保毒しなかったのに対し、2回目の試験では23%が保毒した。試験の際の条件は一定だが、獲得源の罹病イネは試験で枯死するため、同一の罹病イネを用いることができない。また、トビイロウンカは継代によって維持しなければならないので世代交代している。1回目と2回目の試験で保毒率が異なった理由として試験数が25個体と少なかったこと、獲得源の状態が異なったこと、トビイロウンカ集団が北大の環境に適応して変化したことなどが考えられた。北大のトビイロウンカの場合、1回目と2回目両方の試験でRRSV-PよりRRSV-Hの方が保毒率が高かったが（1回目、20%に対し36%）（2回目、27%に対し73%）（図24 A、B、C）、1回目の違いはわずかで2回目の試験では獲得吸汁と潜伏期間の照明が事故のため24時間であったことから通常の日長（16時間）と違っていた。従って、北大のトビイロウンカでは正確な比較ができなかったが、これら2回の試験でRRSV-Pを保毒できることが分かった。以上の結果からS9UとS9Lで見られるのP9のアミノ酸変化がRRSVのトビイロウンカによる保毒率に大きく影響することはないと考えられた。

3. S10の解析

ゲノムに対するcDNAがクローニングされ、S10の全塩基配列が決定された (Yan *et al.*, 1995)。1162塩基対からなるS10の片方の鎖の142-1035番目 (主要なORF) には297アミノ酸からなる32.4KDaのタンパク質 (P10) がコードされている (図25)。P10は一番分子量の小さい構造タンパク質のP9より分子量が小さいことから非構造タンパク質と予想される。そこでP10ではRRSV罹病イネ及び、保毒トビイロウンカからの検出を試みた。S10には主要なORFの上流に12アミノ酸からなる小さいORF (S10mini) が存在する。RDVのS1にも主要なORFの上流に7アミノ酸からなる小さいORFが存在する (Suzuki *et al.*, 1992)。通常、真核生物のmRNAには1つのORFがあり、5'側のAUGが翻訳の開始コドンとして働く。但し、開始コドンとしての認識されるにはAUGの周りの塩基も関与し、XNNAUGYのX (-3位) にはプリン基、Y (+4位) にはグアニンが適しているとされている (Kozak説)

(Kozak, 1981)。RDVのS1の小さいORFの開始コドンはKozak説によると適していない (-3位C、+4位A)。小さいORFの発現は分かっていないが、下流の主要なORFの発現産物 (P1) は保毒ツマグロヨコバイと罹病イネの両方で検出された (Suzuki *et al.*, 1994)。RRSVのS10の場合、Kozak説によると、主要なORFの方がS10miniより適している (S10miniは-3位U、+4位C、主要なORFは-3位A、+4位C)。しかし、AUGが開始コドンとしての認識されるには5'末端からの距離も重要とされている (Kozak, 1991)。これまでに発現が確認されたセグ

メントによれば {RDVの各セグメント (S2の15-17番目からS4の64-66番目) とRRSVのS9 (14-16番目) }、S10mini (20-22番目) の方が主要なORF (142-144番目) より適していると考えられる。そこで主要なORFの他、S10miniの発現も調べることにした。

結果

① S10の主要なORFがコードするタンパク質 (P10) の大腸菌による発現

まず、P10を大腸菌で発現させた。RRSVのゲノム $2.5 \mu\text{g}$ をDMSO変性して鋳型とし (方法12.)、+鎖の3'末端に相補の配列のプライマー (1149-1162番目に *Pst* Iの認識配列を加えた dGGGCTGCAGCACCTCTGTCTCTATGGTCTCGCCG) を用いて全量 $50 \mu\text{l}$ 系の逆転写反応によって 37°C で2時間保温してS10の全長のcDNAを作成した (方法13.)。核酸はフェノール・クロロホルムで抽出してエタノール沈殿し、 $25 \mu\text{l}$ の滅菌水に溶解した。その $2 \mu\text{l}$ をPCRの鋳型とし (方法14.)、主要なORFの始まりの塩基配列のプライマー (142-156番目に *Eco* R Iの認識配列を加えた dGGGAATTCATGCCTTTCGTGCAA) と+鎖の3'末端に相補の配列のプライマー (1151-1162番目に *Xho* Iの認識配列を加えた dCCTCGACACCTCTGTCT) をそれぞれ $1 \mu\text{g}$ 用いて全量 $100 \mu\text{l}$ 系のPCRを行った (方法14.)。反応後、 $1/20$ 量を1% アガロースゲル電

気泳動による確認に使用した(方法17.)。残りを滅菌水で100 μ lとしてフェノール・クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿後、50 μ lの滅菌水に溶解してpMAL-S9と同様にproteinase Kで処理した。核酸はフェノール・クロロホルムで抽出後、エタノール沈殿し、全量50 μ l系でEco R IとXho Iを反応させた。再びフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、pMAL-c2のEco R IとSal I部位の間にDNA断片を挿入してpMAL-S10を作成した(方法15.) (図26)。塩基配列にもとづいて合成したプライマーを用いてpMAL-S10の挿入塩基配列を確認した(方法19.)。pMAL-S10で形質転換した大腸菌JM83、対照としてpMAL-c2で形質転換した大腸菌JM83と形質転換していない大腸菌JM83を2mlの2 \times YT (pMAL-S10とpMAL-c2形質転換体には50 μ g/ml アンピシリンを含む)に接種し、37 $^{\circ}$ Cで一晩振盪培養した。培養液 200 μ l を0.1mM IPTGを含むRich medium (1% Tryptone、0.5% Yeast extract、0.5% 塩化ナトリウム) 40ml に接種し、23 $^{\circ}$ Cで約9時間振盪した培養液 500 μ l をマイクロ遠心チューブに移した。卓上遠心機で8,000rpmで2分間遠心分離し、沈殿をTE 25 μ l に懸濁した。SDS-PAGE用に試料を調整し、7 μ lを12.5% SDS-PAGEに供試した(方法20.) (図27 レーン2、3、4)。サイズマーカーはTEで8倍に希釈し、SDS-PAGE用に試料を調整して4 μ lを供試した。泳動後、ゲルをクマシーで染色してタンパク質のバンドを検出した。塩基配列をもとにしたP10の推定分子量は約

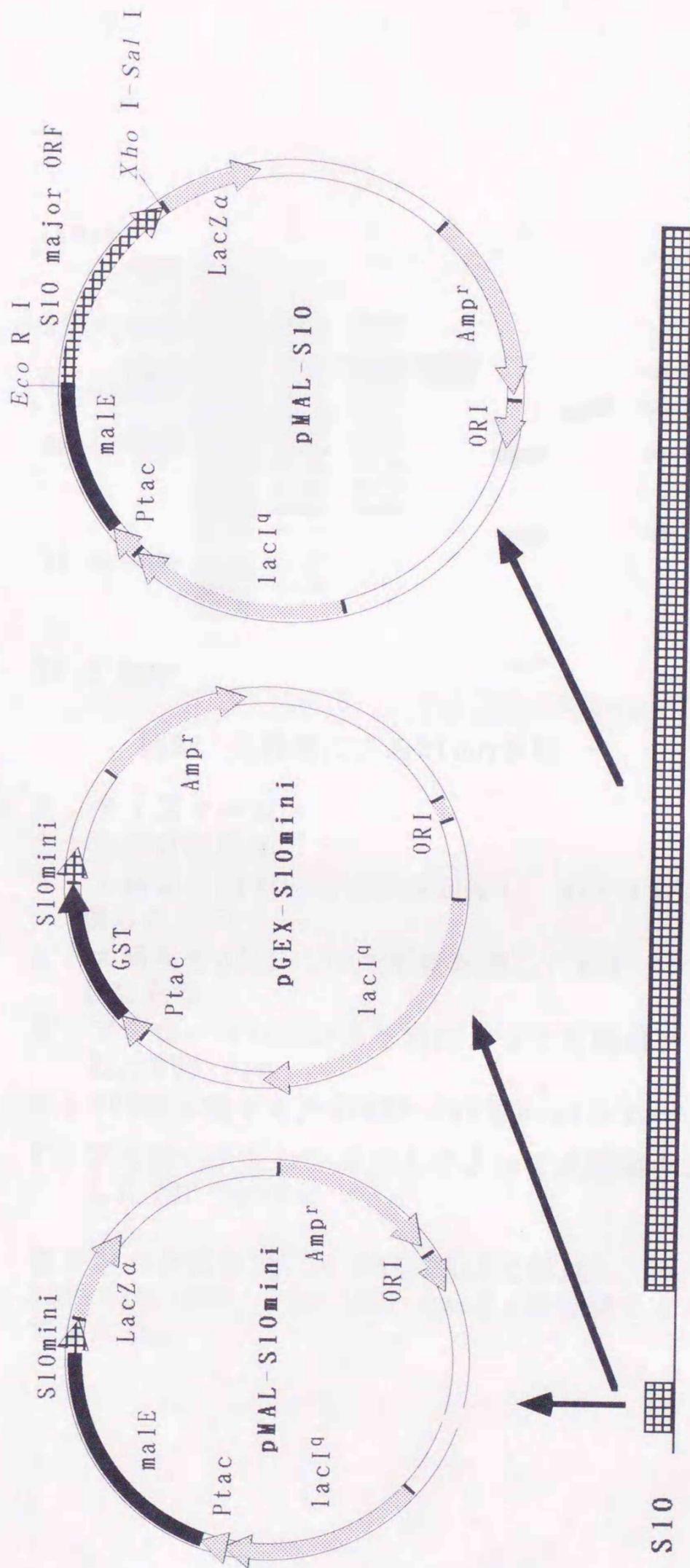


図26 S10の読み取り枠の発現のためのプラスミド

pMAL-c2のマルチトース結合タンパク質遺伝子(male)に読み取り枠(ORF)が連続する
 ようにRRSVのS10の小さいORF(S10mini)あるいは主要なORF(major ORF)を挿入した
 (pMAL-S10mini、pMAL-S10)。S10miniは、また、pGEX-3Xのグルタチオン-S-トラン
 スフェラーゼ遺伝子(GST)にORFが連続するように挿入した(pGEX-miniORF)。発現用プ
 ラズミドベクターに関しては図6を参照。

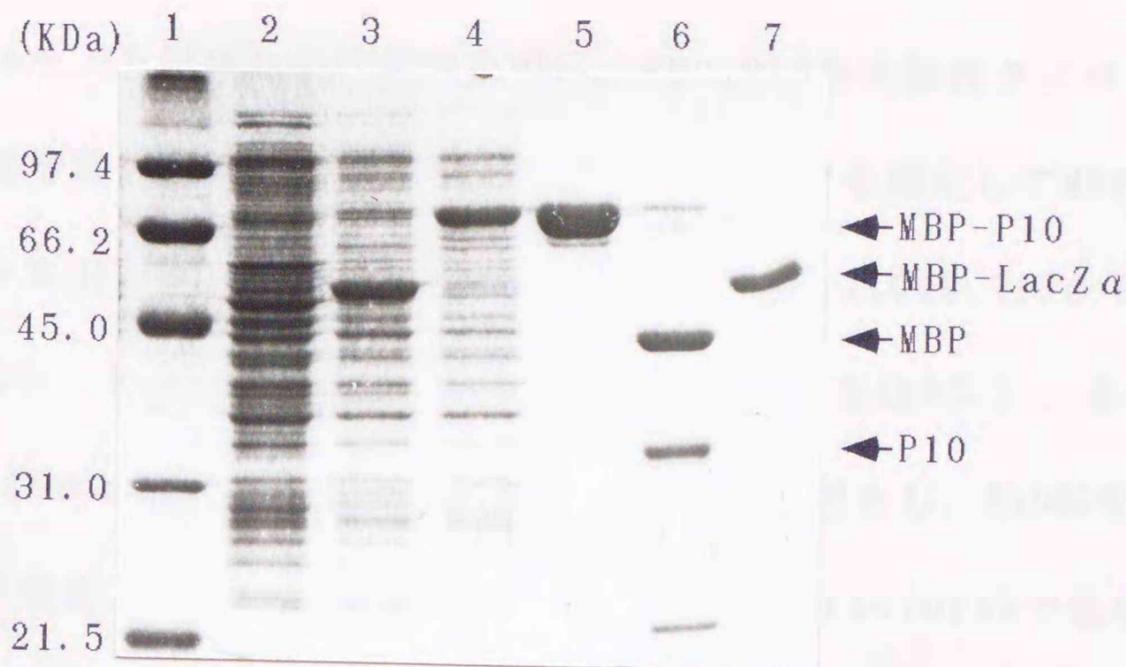


図27 大腸菌によるP10の発現

- 1 : サイズマーカー
- 2 : 非形質転換体
- 3 : 大腸菌をpMAL-c2で形質転換し、MBP-LacZ α の発現を誘導したもの
- 4 : 大腸菌をpMAL-S10で形質転換し、MBP-P10の発現を誘導したもの
- 5 : アミロースレジンカラムによって大腸菌タンパク質から分離したMBP-P10
- 6 : P10を分離するためMBP-P10をFactorXaで処理したもの
- 7 : アミロースレジンカラムによって大腸菌タンパク質から分離したMBP-LacZ α

各タンパク質を12.5% SDS-PAGEに供試し、クマシーで染色した。MBP-P10、MBP、P10、MBP-LacZ α の位置をまとめて右側の矢印で示した。

32.4KDaであり、マルトース結合タンパク質 (MBP) (約42KDa)との融合タンパク質 (MBP-P10) は約74.4KDaであると推定される。

pMAL-S10で形質転換した大腸菌タンパク質中には約72KDaのバンドが認められた。上記残りの培養液を用い、MBP-P10を大腸菌タンパク質から分離精製し (方法21.)、波長280nmの吸光度を測定してMBP-P10の濃度を算出した。精製したMBP-P10を透析溶液 {10mM Tris-HCl (pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム} で透析し (方法25.)、その48 μ l (約48 μ g) に1 μ g/ μ l FactorXa 2 μ l を混合し、約9時間室温で反応させた。透析したMBP-P10 (1 μ g/ μ l) とFactorXaで処理した試料をSDS-PAGE用に調整して、それぞれ5 μ lを上記の12.5% SDS-PAGEで解析した (方法20.) (図27 レーン5、6)。また、対照としてpMAL-c2で形質転換した大腸菌についても同様に大腸菌タンパク質からマルトース結合タンパク質 (MBP) (約42KDa) とLacZ遺伝子の α ペプチドとの融合タンパク質 (MBP-LacZ α , 約52KDa) を分離精製して上記の12.5% SDS-PAGEに供試した (図27 レーン7)。

FactorXaによって切り離したP10はサイズマーカーの移動度からすると約33KDaであった。

② S10の小さいORFがコードするタンパク質 (P10mini) の大腸菌による発現

S10の小さいORF (S10mini) がコードしているP10miniを大腸菌で

発現させた。S10の塩基配列の決定に使用したプラスミド (pUC119の *Pst* I部位にS10の1-967番目を挿入したもの) を大腸菌から抽出し (方法16.)、50 μ lの滅菌水に溶解して1 μ lをPCRの鋳型とした。S10miniの始まりの塩基配列のプライマー (20-33番目に *Eco* R Iの認識配列を加えたdTTTGAATTCATGCCAATAAGCAG) と主要なORFのすぐ上流に相補の配列のプライマー (128-141番目に *Pst* Iの認識配列を加えたdAAACTGCAGGATTGATGGTTTTG) をそれぞれ 1 μ g 用いて全量100 μ l系のPCRを行った (方法14.)。1/20量を2% アガロースゲル電気泳動による確認に使用した (方法17.)。ミネラルオイルを除くためクロロフォルムで抽出し、エタノール沈殿後 (但し、3M 酢酸ナトリウムの代わりに7.5M 酢酸アンモニウム 50 μ l を使用)、核酸を30 μ lの滅菌水に溶解した。この20 μ lを全量50 μ l系で *Eco* R Iと *Pst* Iを反応させ、フェノール・クロロフォルムで抽出し、上記同様にエタノール沈殿した。核酸を20 μ lの滅菌水に溶解し、再度エタノール沈殿して20 μ lの滅菌水に溶解し、1 μ lを1% アガロースゲル電気泳動に供試して核酸を確認した (方法17.)。DNA断片をpMAL-c2の *Eco* R Iと *Pst* I 部位に挿入するためにその2 μ lをライゲーション反応に使用した (方法15.)。PCRの際に鋳型としたプラスミドを除くため、反応液を *Bam* H Iで処理してから大腸菌の形質転換に用いたが、組み換えたプラスミドが得られなかった。また、プラスミドベクターにpUC119を用いてみたが、やはり組み換えたプラスミドが得られなかつ

た。そこで上記 30 μ l の残りの 10 μ l を全量 40 μ l で平滑末端化後 (方法 15.)、核酸を 10 μ l の滅菌水に溶解し、再度 1 μ l を 1% アガロースゲル電気泳動に供試して核酸を確認した (方法 15.)。DNA断片を pUC119 の *Sma* I 部位に挿入するためにその 2 μ l をライゲーション反応に使用した (方法 15.)。PCRの際に鋳型としたプラスミドを除くため、反応液を *Sma* I で処理し、大腸菌を形質転換したところ、組み換えたプラスミドが得られた。挿入部位の塩基配列を調べたところ (方法 18.)、128-141 番目に *Pst* I の認識配列を加えたプライマーの *Pst* I の認識配列を含む部位 ACTGCAG が TCAG となっていたため *Pst* I 認識部位を利用して組み換えができなかったことが分かった。そこで組み換えたプラスミドのマルチクローニング部位の *Pst* I 認識部位を利用して *Eco* R I-*Pst* I 断片を pMAL-c2 の *Eco* R I と *Pst* I 部位にサブクローニングし、pMAL-S10mini を作成した (方法 15.) (図 26)。pMAL-S10mini の挿入部位の塩基配列は合成したプライマー (dGGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC) を使用して確認した (方法 19.)。pMAL-S10mini で形質転換した大腸菌 JM83 と、対照として pMAL-c2 で形質転換した大腸菌 JM83、形質転換していない大腸菌 JM83 を用いて pMAL-S9 の場合と同様に発現させた。但し、発現の際は約 10 時間振盪培養した。pMAL-S10mini で形質転換した大腸菌と pMAL-c2 で形質転換した大腸菌の場合は培養液 500 μ l を、形質転換していない大腸菌の場合は 250 μ l をマイクロ遠心チューブに移した。卓上遠心

機で8,000rpmで2分間遠心分離し、沈殿をTE 100 μ l に溶解した。

この試料をSDS-PAGE用調整し、4 μ lを12.5% SDS-PAGEに供試した (方法20.) (図28 レーン2、6、7)。サイズマーカーはTEで16倍に希釈し、SDS-PAGE用に試料を調整して3 μ lを供試した。泳動後、ゲルの銀染色をしてタンパク質のバンドを検出した (方法20.)。pMAL-S10miniで発現されるMBP-P10miniはMBPに16アミノ酸 (約1.7KDa) を付加しているだけなので、その分子量 (43.7KDa) はpMAL-c2のMBP-LacZ α (約52KDa) より小さい。実際に発現したMBP-P10miniの移動度はMBP-LacZ α より早かった (図28 レーン6)。発現したMBP-P10miniをMBP-P10と同様に大腸菌タンパク質から分離を試みたが (方法21.)、アミロースレジンカラムに吸着しなかった。そこで大腸菌発現用ベクターをpGEX-3Xに換えることにした。pMAL-S10miniのEcoRI-PstI断片を平滑末端化してpGEX-3XのSmaI部位にサブクローニングし、pGEX-S10miniを作成した (方法15.) (図26)。pGEX-S10miniの挿入部位の塩基配列はPCRに使用したプライマーを用いて確認した (方法19.)。pGEX-S10miniで形質転換した大腸菌JM83を用いてpMAL-S10の場合と同様に発現を行った。但し、発現の際は約12時間振盪培養した。培養液 1ml をマイクロ遠心チューブに移し、卓上遠心機で8,000rpmで2分間遠心分離した。沈殿をTE 75 μ l に懸濁してSDS-PAGE用に試料を調整し、4 μ lを上記の12.5% SDS-PAGEに供試した (方法20.) (図28 レーン3)。pGEX-S10mini



図28 大腸菌によるP10miniの発現

- 1 : サイズマーカー
- 2 : 非形質転換体
- 3 : 大腸菌をpGEX-S10miniで形質転換し、GST-P10miniの発現を誘導したもの
- 4 : グルタチオンアガロースビーズによって大腸菌タンパク質から分離したGST-P10mini
- 5 : P10miniを分離するためGST-P10miniをFactorXaで処理したもの
- 6 : 大腸菌をpMAL-S10miniで形質転換し、MBP-P10miniの発現を誘導したもの
- 7 : 大腸菌をpMAL-c2で形質転換し、MBP-LacZ α の発現を誘導したもの

各タンパク質を12.5% SDS-PAGEに供試し、銀染色をした。MBP-LacZ α 、MBP-P10mini、GST-P10mini、GSTの位置をまとめて右側の矢印で示した。

で発現されるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ-P10mini (GST-P10mini) はGST (27.5KDa) に18アミノ酸 (約1.8KDa) を付加しているなのでその分子量は約29.3KDaである。SDS-PAGEによってほぼその分子量を持つ誘導特異的なタンパク質が確認できた。そこで残りの培養液を用い、GST-P10miniを大腸菌タンパク質から分離精製し (方法22.)、波長280nmの吸光度を測定してGST-P10miniの濃度を算出した。精製したGST-P10mini ($0.78 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $20 \mu\text{l}$ に1M 塩化ナトリウム $4 \mu\text{l}$ 、25mM CaCl_2 $1 \mu\text{l}$ 、 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ FactorXa $1 \mu\text{l}$ を混合して室温で2時間反応させた。精製したGST-P10miniとFactorXaで処理した試料を $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ にしてからSDS-PAGE用に調整してそれぞれ $4 \mu\text{l}$ を上記の12.5% SDS-PAGEで解析した (方法20.) (図28 レーン4、5)。FactorXaによって分離したP10mini (約1.8KDa) は確認できなかったが、切り離したことでGST-P10miniより分子量が少しだけ小さくなったGSTが確認できた。

③ P10とP10miniの検出

まず、イネがRRSVに感染した場合あるいはトビイロウンカがRRSVを保毒した場合に特異的なタンパク質ができているかをSDS-PAGEで調べた。健全イネと罹病イネは4倍量 (V/W) の0.02M PBS-Tween中で磨砕した。また、罹病イネの腫瘍部位を集めて同様に磨砕した。トビイロウンカは $1 \times \text{STE } 180 \mu\text{l}$ 中で磨砕し、ELISAで陽性を示した試料を

保毒虫として使用した（方法3.）。また、対照としてRRSVを保毒させていないトビイロウンカを同様に磨砕した。これらをSDS-PAGE用に調整してそれぞれ10 μ lを12.5% SDS-PAGEに供試した（方法20.）。上記の他、サイズマーカーはTEで26倍に希釈し、SDS-PAGE用に調整して10 μ lを供試した。また、純化したRRSV粒子（方法2.）1.4 μ gをSDS-PAGE用に調整して供試した。泳動後、ゲルの銀染色をしてタンパク質のバンドを検出した（方法20.）（図29 レーン1、4、5、6、7、8、9）。大腸菌で発現させたP10はSDS-PAGEでの移動度がP9より早かった。イネがRRSVに感染した場合とトビイロウンカがRRSVを保毒した場合で、特異的なタンパク質は認められなかった。そこでMBP-P10に対するポリクローナル抗体（抗MBP-P10抗体）とGST-P10miniに対するポリクローナル抗体（抗GST-P10mini抗体）を作成した。抗原量と注射の期間はMBP-P9の際と同様であるが、GST-P10miniの場合は分離後、透析でグルタチオンを除去しなかったため、筋肉注射の際は5倍、ブースターの際は2倍に50mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液で希釈して用いた。抗MBP-P10抗体の場合、P10に対するポリクローナル抗体が含まれていることはFactorXaで切り離されたP10との反応によって確認できる。しかし、抗GST-P10miniの場合はP10miniの分子量が小さいために同様の確認ができない。そこでこの場合は、MBP-P10miniとの反応で確認することにした（方法20.）。上記のMBP-P10miniの発現を解析した際と同様に電気泳動を行った。但し、供試

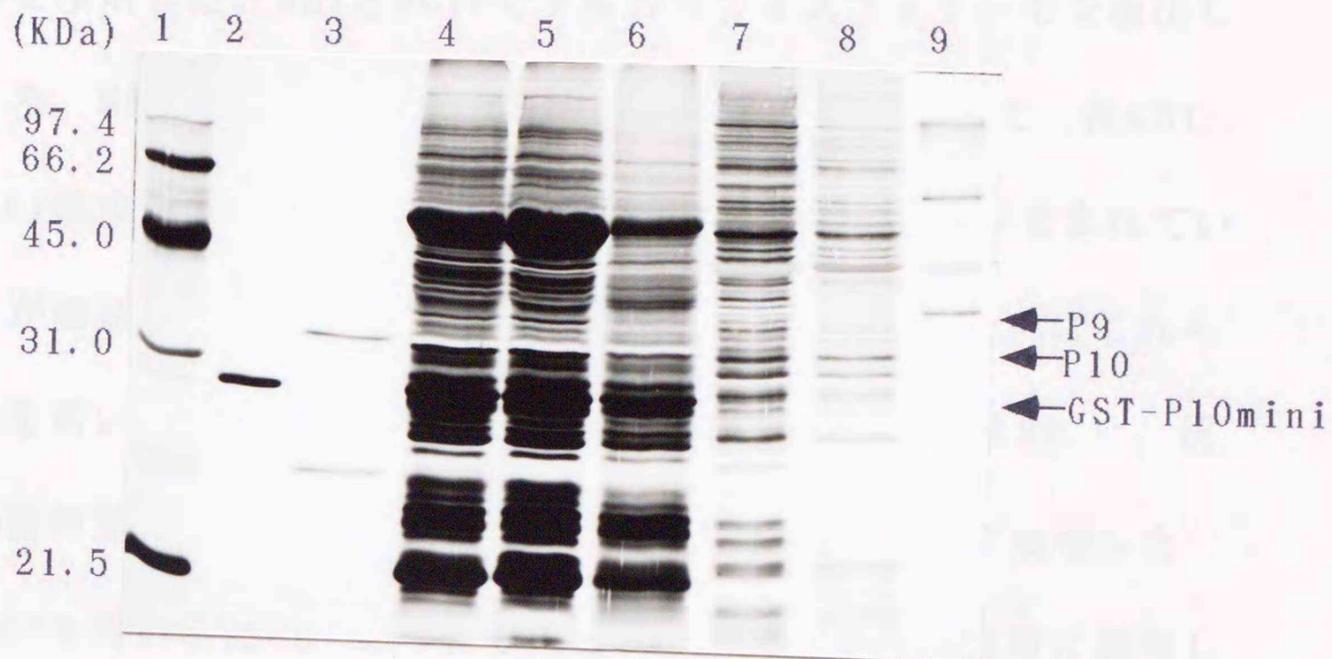


図29 RRSV罹病イネ及び保毒トビイロウンカのタンパク質

- 1 : サイズマーカー
- 2 : グルタチオンアガロースビーズによって大腸菌タンパク質から分離したGST-P10mini
- 3 : P10を分離するためMBP-P10をFactorXaで処理したもの
- 4 : 健全イネ
- 5 : RRSV罹病イネ
- 6 : 腫瘍部
- 7 : 保毒していないトビイロウンカ
- 8 : 保毒しているトビイロウンカ
- 9 : RRSV純化粒子

各タンパク質を12.5% SDS-PAGE後、銀染色をした。
P9、P10、GST-P10miniの位置をまとめて右側の矢印で示した。

した試料の量は上記の半分である。泳動後、タンパク質をゲルからPVDFメンブレンに転写した。一次抗体にGST-P10miniを抗原とした血清を750倍希釈で使用し、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ結合抗体を使用した。NBTとBCIPでアルカリフォスファターゼを検出したところ、MBP-P10miniに反応が現れた(図30)。従って、抗GST-P10mini抗体中にP10miniに対するポリクローナル抗体が含まれていることが確認できた。そこでP10とP10miniを検出するためにこれらの抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った(方法20.)。抗体の陽性対照としてそれぞれGST-P10miniとFactorXaで処理したMBP-P10を用いるため、あらかじめ各0.3 μ gをSDS-PAGE用に調整して上記の12.5% SDS-PAGEに供試しておいた(図29 レーン2、3)。P10を検出するために図29と同様に12.5% SDS-PAGEを行った。但し、この場合はGST-P10miniは供試しなかった。泳動後、タンパク質をゲルからPVDFメンブレンに転写した。一次抗体にはMBP-P10の血清を150倍希釈で使用し、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ結合抗体を使用した。NBTとBCIPでアルカリフォスファターゼを検出したところ、RRSVの構造タンパク質には反応がなかったが、RRSVの罹病イネと腫瘍部位、保毒トビイロウンカの約34KDaのタンパク質に反応が現れた(図31)。現れたバンドは全て同様にFactorXaで分離したP10より移動度が少し遅かった。また、腫瘍部位の試料、トビイロウンカ、罹病イネの順で反応が強かった。次に、P10miniを検出するために図



図30 抗GST-P10mini抗体とMBP-P10miniの反応

- 1 : サイズマーカー
- 2 : 非形質転換体
- 3 : 大腸菌をpGEX-S10miniで形質転換し、GST-P10miniの発現を誘導したもの
- 4 : グルタチオンアガロースビーズによって大腸菌タンパク質から分離したGST-P10mini
- 5 : P10miniを分離するためGST-P10miniをFactorXaで処理したもの
- 6 : 大腸菌をpMAL-S10miniで形質転換し、MBP-P10miniの発現を誘導したもの
- 7 : 大腸菌をpMAL-c2で形質転換し、MBP-LacZαの発現を誘導したもの

図28と同様に各タンパク質を12.5% SDS-PAGE後、タンパク質をPVDFメンブレンに移して抗GST-P10mini抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗体はアルカリフォスファターゼ結合抗体を用い、NBTとBCIPで検出した。MBP-P10mini、GST-P10mini、GSTの位置をまとめて右側の矢印で示した。

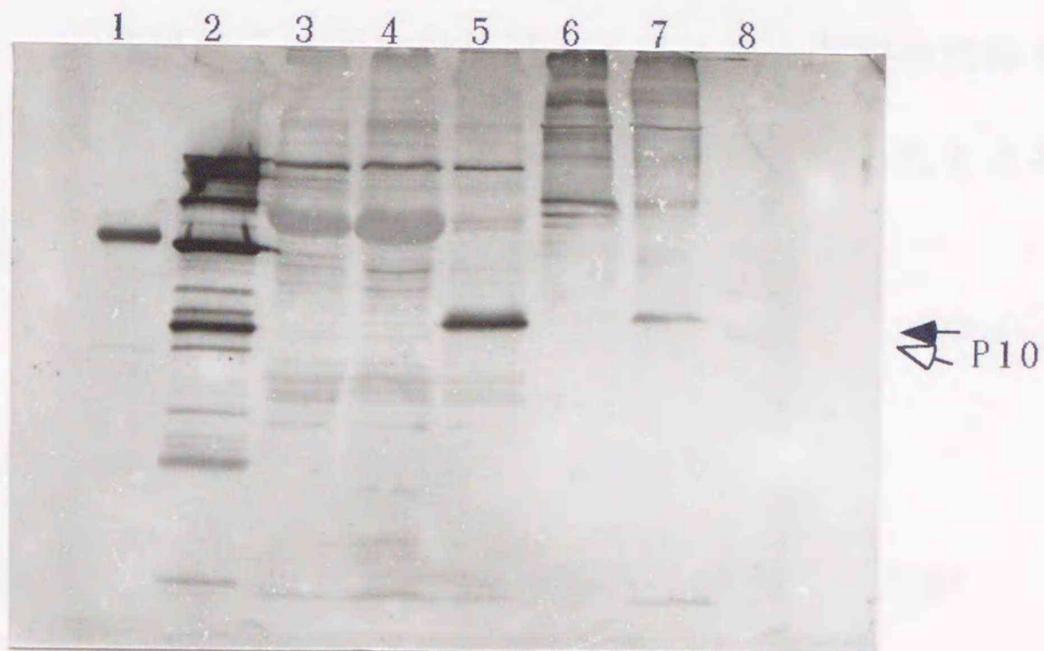


図31 RRSV罹病イネ及び保毒トビイロウンカからP10の検出

- 1 : サイズマーカー
- 2 : P10を分離するためMBP-P10をFactorXaで処理したもの
- 3 : 健全イネ
- 4 : RRSV罹病イネ
- 5 : 腫瘍部
- 6 : 保毒していないトビイロウンカ
- 7 : 保毒しているトビイロウンカ
- 8 : RRSV純化粒子

図29と同様に各タンパク質を12.5% SDS-PAGE後 (但し、GST-P10miniを除く)、タンパク質をPVDFメンブレンに移して抗MBP-P10抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗体はアルカリフォスファターゼ結合抗体を用い、NBTとBCIPで検出した。検出したP10の位置を (←) で、発現させたP10の位置を (◁) で右側にまとめて示した。

29と同様に12.5% SDS-PAGEを行った。但し、この場合はFactorXaで処理したMBP-P10を供試しなかった。泳動後、タンパク質をゲルからPVDFメンブレンに転写した。一次抗体にはMBP-P10の血清を750倍希釈で使用し、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ結合抗体を使用した。NBTとBCIPでアルカリフォスファターゼを検出したところ、保毒トビロウカの泳動先端部に反応が現れた(図32)。

④ コムギ胚芽抽出液によるS10のmRNAの翻訳

主要なORFは上記のように翻訳されていることが分かったが、S10miniに関しては分からない。そこでS10miniの開始コドンが機能しているかどうかを試験管内での翻訳で確かめることにした。S10miniから翻訳されるP10miniは12アミノ酸で、上記のようにPAGEによる検出ができない。そこでS10miniを主要なORFの一部に連結したmRNAを作成することで新たにできるORF(7KDa)の融合タンパク質を検出することにした。mRNAの作成にはpUC119にSP6ポリメラーゼのプロモーター配列を挿入して作られたプラスミドベクターpSP6を用いた。pSP6に挿入するS10のDNAは、S10miniの存在を確認するためにpUC119の*Pst* I部位にS10の1-967(*Pst* I)番目までを挿入したプラスミドを利用した。まず、*Pst* Iで挿入断片を切り出して平滑末端化し、pSP6のプロモーター配列のすぐ下流の*Stu* I部位にサブクローニングした(方法15.)。次にpUC119の*Pst* I部位にS10の全長を挿入したプ

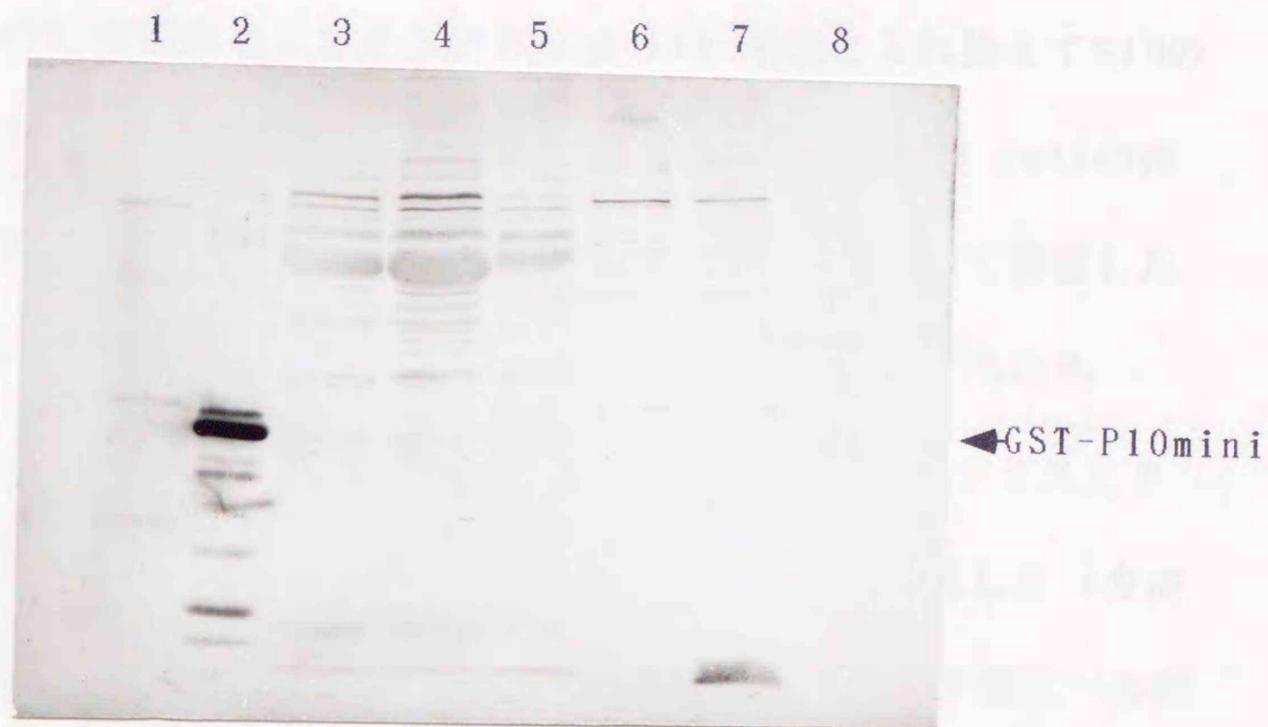


図32 RRSV罹病イネ及び保毒トビイロウンカからP10miniの検出

- 1 : サイズマーカー
- 2 : グルタチオンアガロースビーズによって大腸菌タンパク質から分離したGST-P10mini
- 3 : 健全イネ
- 4 : RRSV罹病イネ
- 5 : 腫瘍部
- 6 : 保毒していないトビイロウンカ
- 7 : 保毒しているトビイロウンカ
- 8 : RRSV純化粒子

図29と同様に各タンパク質を12.5% SDS-PAGE後 (但し、FactorXa処理したMBP-P10を除く)、タンパク質をPVDFメンブレンに移して抗GST-P10mini抗体と反応させた。タンパク質に結合した抗体はアルカリフォスファターゼ結合抗体を用い、NBTとBCIPで検出した。GST-P10miniの位置を矢印で右側に示した。

ラスミド (Yan, 1992) の *Hin* d III 断片を (S10の603番目から3'末端領域を含めてマルチクローニング部位の *Hin* d III) 作成したプラスミドの3'末端領域を含まない *Hin* d III 領域と入れ換えてS10の全長を挿入した (psp6-S10 full) (図33)。psp6-S10 fullの挿入塩基配列は塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて確認した (方法18.と19.)。更に、S10miniを主要なORFに連結するため、*Hin* c II (34-39番目)-*Sty* I (854-859)断片を除き、プラスミドを平滑末端化してライゲーションし、psp6-S10Delを作成した (方法15.) (図33)。 *Sph* Iの認識配列は挿入したS10の直ぐ下流に一カ所しかないので、プラスミドを *Sph* Iで処理してから全量25 μ l系の5'末端にキャップを付加するSP6ポリメラーゼの転写反応に用いた (方法26.)。反応後、2 μ lをアガロースゲル電気泳動に供試してmRNAを確認後 (方法17.)、鋳型DNAを除くため残りの反応液にDNase I 70units を混合して37 $^{\circ}$ Cで30分間保温した。核酸をフェノール・クロロホルムで抽出してエタノール沈殿した (但し、3M 酢酸ナトリウムの代わりに試料 200 μ l に対して7.5M 酢酸アンモニウム 27 μ l 使用)。沈殿を3.2 μ lの滅菌水に溶解後、67 $^{\circ}$ Cで10分間保温してから急冷してmRNAを変性させた。この半量を全量12.5 μ l系のコムギ胚芽抽出液の翻訳反応に使用した (方法27.)。対照としてルシフェラーゼのmRNA 1.6 μ g を同様に反応させた。反応液の酢酸カリウムの濃度が130mM場合は、対照としたルシフェラーゼが検出されたが、目的

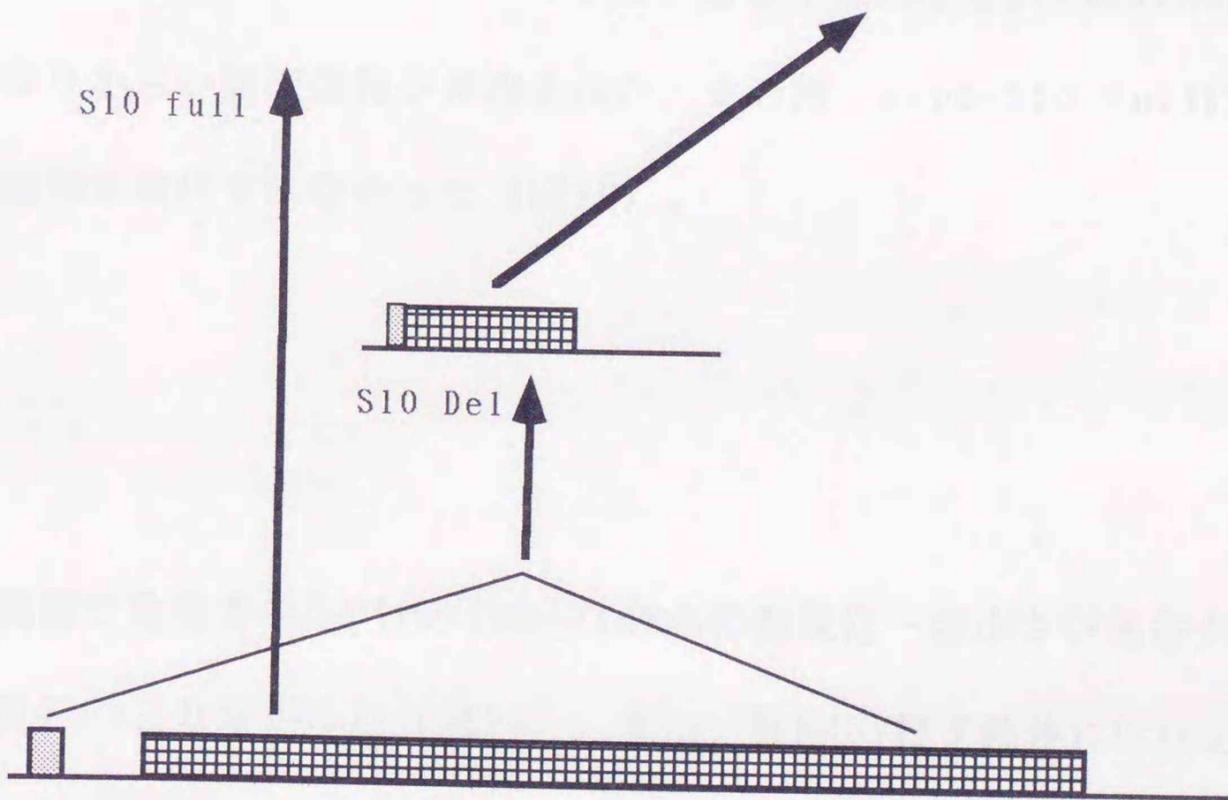
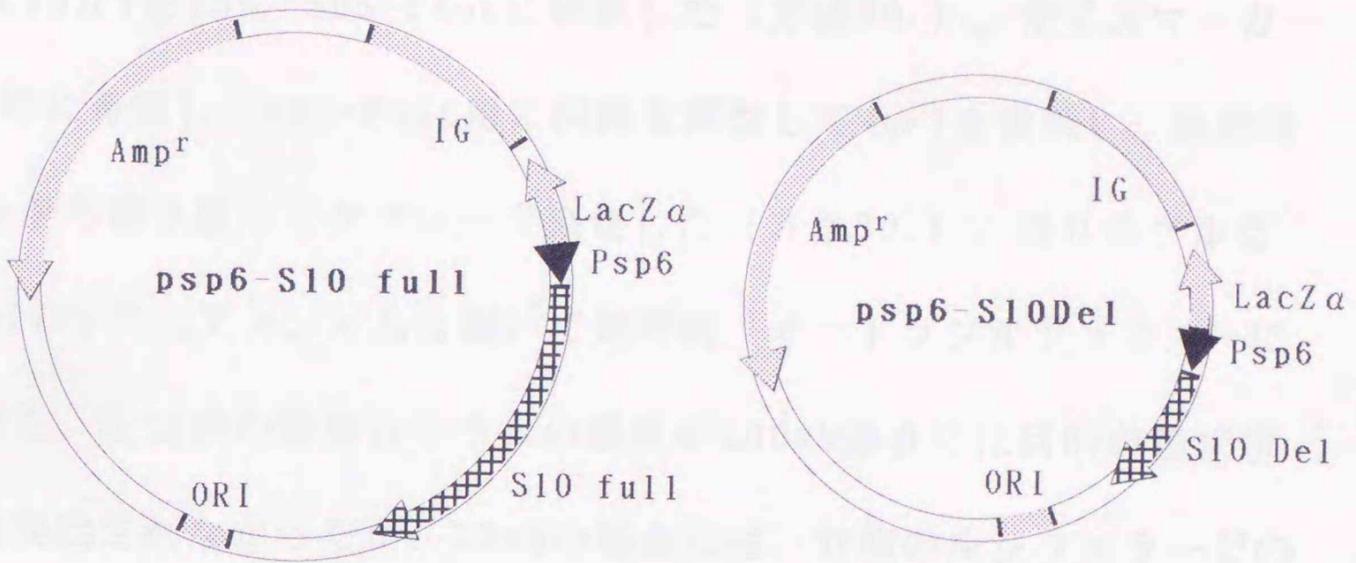


図33 RRSVのS10の転写プラスミドの作成

pUC119のEcoRI部位にsp6プロモーター配列 (Psp6) を挿入し、その下流に全長のS10 (S10 full)、あるいは中央部を欠損させたS10 (S10 Del) を挿入した。

の翻訳産物は検出されなかった。そこで酢酸カリウムの濃度は200mMあるいは50mMとして25°Cで2時間保温後、SDS-PAGE用に調整してそれぞれ15 μ lを15% SDS-PAGEに供試した(方法20.)。サイズマーカーは8倍に希釈し、SDS-PAGE用に試料を調整して4 μ lを供試し、泳動後、ゲルから切り取ってクマシーで染色した(方法20.)。残りのゲルをAmplify™ (アマシャム社製)で処理後、オートラジオグラフィーにかけた。反応液の酢酸カリウムの濃度が200mM場合には目的の翻訳産物は検出されなかったが、50mMの場合には、対照のルシフェラーゼの他、psp6-S10 Delにマーカーの中で一番分子量の小さい14.4kDaよりかなり小さい翻訳産物が検出された。その際、psp6-S10 fullには翻訳産物が検出されなかった(図10)。

論議

大腸菌で発現させたP10のSDS-PAGEの移動度は一番小さい構造タンパク質のP9より早かった(図29)。また、抗RRSV粒子抗体には反応せず(結果は載せなかった)、逆に抗MBP-P10抗体もRRSVの構造タンパク質に反応しなかった(図31)。これらのことからP10は非構造タンパク質と考えられる。抗MBP-P10抗体を用いたウェスタンブロッティングで罹病イネと保毒トビイロウンカに約34kDaのタンパク質が検出されたことからP10が発現されていることが明らかとなった(図

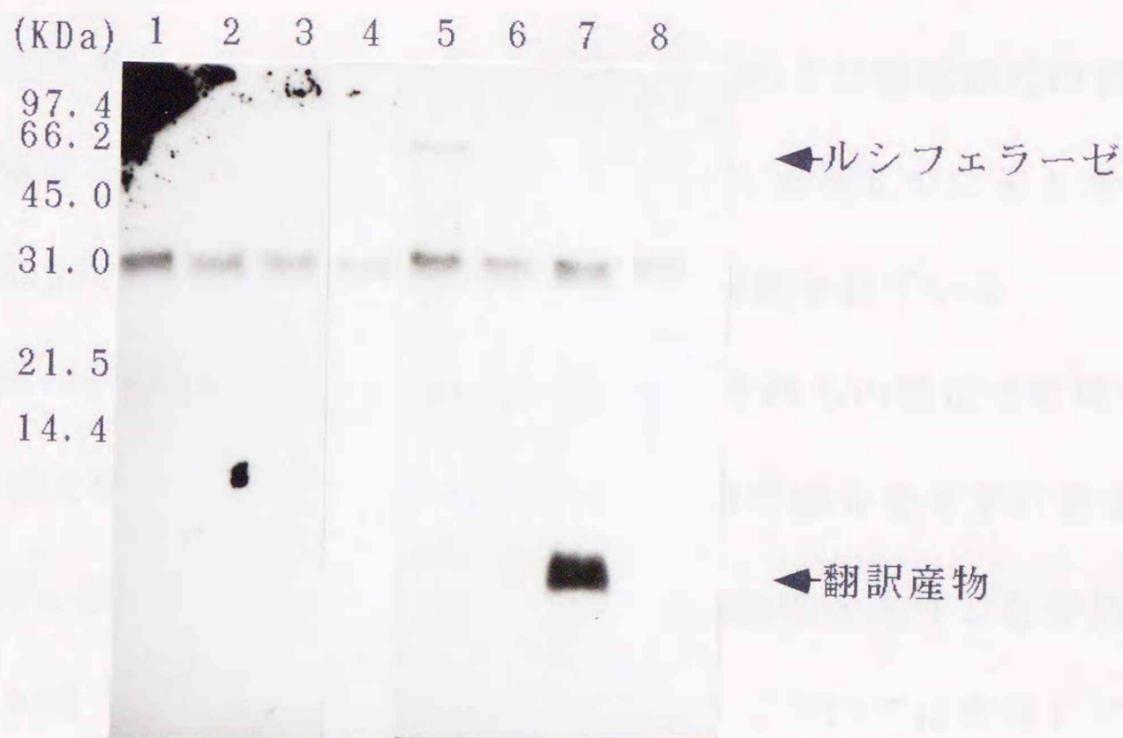


図34 S10のmRNAの試験管内での翻訳

- | | |
|-------------------|------------------|
| 1 : ルシフェラーゼ/200mM | 5 : ルシフェラーゼ/50mM |
| 2 : S10/200mM | 6 : S10/50mM |
| 3 : S10D/200mM | 7 : S10D/50mM |
| 4 : 無し/200mM | 8 : 無し/50mM |

“用いたmRNA/反応液中の酢酸カリウム濃度”で示した。

反応は合成したmRNAとコムギ胚芽抽出液を用い、翻訳産物には³H-Metを取り込ませた。ルシフェラーゼは翻訳反応の確認のために用いた。各反応液は15% SDS-PAGEに供試し、X線フィルムで翻訳産物を検出した。但し、サイズマーカーは切り取ってクマシーで染色して対応させた。ルシフェラーゼと翻訳産物の位置をまとめて右側の矢印で示した。

31)。現れたバンドの移動度は全て同様にFactorXaで分離したP10より少し遅かった。タンパク質はリン酸化によってPAGEの移動度が少し遅れる現象が知られていることから (Atkins *et al.*, 1991)、P10もその可能性が考えられる。また、罹病イネ全体より腫瘍部位の試料で反応が強かったことからその部位でP10が多く発現していると考えられる。RRSVの粒子は師部や腫瘍部位で多く観察されている

(Shikata *et al.*, 1979)。従って、P10もそれらの部位で発現し、RRSVの増殖に関与することが考えられる。昆虫で媒介をせずに宿主中で長年保持し続けた植物レオウイルスは昆虫伝搬性を失うことがある (Reddy and Black, 1974; Kimura, 1976)。WTVでは変異していたS5の解析の結果、5'末端より319塩基、3'末端より205塩基を残して中間が欠損していた (Anzola *et al.*, 1987)。RRSVでも同様に昆虫伝搬性を失ったウイルスが得られた。このRRSVのゲノム解析では、PAGE上の移動度が異常に早まっていたセグメントが見つかっており、それがS10であることが示唆されている。(Maoka *et al.*, 1993)。末端共通配列はウイルスゲノムの複製、タンパク質発現、セグメントの格納などの機能に重要な役割を果たすと考えられているので (Xu *et al.*, 1989)、S10も内部領域が欠損し、P10の発現が変化していることが考えられる。

上流のS10miniを発現させてそれに対する抗体を作成した (図28、図30)。罹病イネと保毒トビイロウンカで検出したP10は大腸菌で発

現させたP10よりPAGEの移動度が少し遅かったため、P10miniがP10に含まれている可能性も考えられた。しかし、この抗体は生体内のP10に反応しなかったことからその可能性は否定できる。また、この抗体はRRSV保毒トビイロウンカの泳動先端部に反応した(図32)。しかし、この反応は非特異的反応の可能性もあるので他のトビイロウンカで再度確認する必要がある。このような小さいタンパク質はPAGEで分離するのが難しいため、他の方法で発現を調べる必要がある。そこでRRSVの宿主に含まれているコムギの胚芽抽出液を用いて試験管内でS10のmRNAを翻訳したところ、P10miniとP10は検出されなかった(図10)。P10miniの分子量は1.3KDaと小さいことからPAGEでは検出できないと考えた。そこでS10miniの途中から主要なORFに連続させて約7KDaのタンパク質をコードするmRNAを作った。このmRNAでは翻訳産物が検出されたのでS10miniの開始コドンは認識されている。S10miniの存在は数回のウイルス継代後も確認されたので(結果は載せなかった)、RRSVにはS10miniを保つ必要があると考えられる。S10miniのような小さいORFの場合、そこから発現するタンパク質が機能するよりもその存在が下流のORFの発現を調節すると考えられる(Kozak, 1986)。RDVのS1では小さいORFの開始コドンをAAGに変えたところ試験管内の翻訳、下流のP1の発現量が上昇した(Suzuki *et al.*, 1992)。RRSVのS10はS10miniの開始コドンが認識され、下流のP10が検出されなかった。これらのことから上流の小さいORFは下流の

主要なORFの発現を抑制するためにあると考えられる。しかし、RDVのPIとRRSVのP10は罹病イネ及び保毒媒介昆虫で発現が確認されている(図31) (Suzuki *et al.*, 1994)。試験管内でmRNAの翻訳するにはウサギ網状赤血球可溶化物あるいはコムギの胚芽抽出液を用いるが、その条件は必ずしも生体内と同じではない。RRSVがイネに感染する、あるいはトビイロウンカに保毒される機構の中でS10のmRNAが機能していることを考慮する必要がある。

V. 総合論議

RRSVではいままでに各セグメントの遺伝子産物が同定されていなかった。本研究ではS6とS9がそれぞれ88KDaと35KDa (P9) の、また、S8が63KDaと50KDaの構造タンパク質をコードしていることを明らかにした。更に、S10の主要なORFの翻訳産物が非構造タンパク質 (P10) であり、RRSV罹病イネと保毒トビイロウンカでその産物が検出できることを示した。

ウイルスの構造タンパク質は単にゲノムを保護するだけでなく、感染において多くの役割を担っている。粒子表面の構造タンパク質はウイルスが細胞に侵入するのに関与していると考えられる。Reovirusでは粒子の外殻に存在する $\sigma 1$ タンパク質が宿主細胞の受容体と作用する (Lee *et al.*, 1981)。RRSVでもトビイロウンカに獲得される際に粒子表面のタンパク質が受容体と作用することが予想される。P9と50KDaのタンパク質は粒子表面に存在していることからその候補と考えられる。P9が受容体と相互作用する可能性を調べるために、本研究ではP9にアミノ酸置換を伴うS9U RRSVとS9L RRSVのトビイロウンカの保毒率を比較したが、違いは見られなかった。今後は更に、S9に変異を持つRRSVを探索し、その性状を解析することで、P9がトビイロウンカのウイルス獲得に関与するかが明らかになると考えられる。また、

RRSV粒子にはポリメラーゼ活性が認められている (Uyeda *et al.*, 1987)。レオウイルス科ウイルスのゲノムはdsRNAで、侵入直後に宿主細胞でmRNAとしては働けない。従ってレオウイルス科ウイルスではウイルス粒子自体にポリメラーゼ活性があり、mRNAを合成することができる。更に、reovirusでは粒子成熟の最終段階で一鎖を合成することから一鎖合成の機構も粒子に存在する (Morgan and Zweerink, 1975)。RNAウイルスではRNA依存RNAポリメラーゼのアミノ酸配列モチーフからポリメラーゼの候補となるタンパク質が上げられている。これまでに全塩基配列が報告されたRDV、rotavirus、reovirus、bluetongue virusでは一番長いセグメントがコードしているタンパク質が候補である (Suzuki *et al.*, 1992)。これらの結果からRRSVもS1がポリメラーゼをコードしている可能性が高いと考えられる。しかし、一つのタンパク質だけがポリメラーゼの機能に関与しているとは限らない。Reovirusの構造タンパク質の一つである $\sigma 3$ (41KDa) はmRNA合成の負の制御因子と考えられている (Astell *et al.*, 1972)。従ってS1以外にコードされている88KDa、63KDa、50KDaのような構造タンパク質がポリメラーゼの機能に関与している可能性もある。ホモロジー検索でタンパク質の機能を推定するためにS6とS8の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を明らかにする必要がある。一方、P10ではアミノ酸配列の相同性からはその機能を推定することができなかった。伝搬性がなくなったRRSVの解析でS10が伝搬性に関与する

ことが示唆されたが (Maoka *et al.*, 1993)、その翻訳産物のP10の機能は分かっていない。今後はRRSVが宿主細胞に侵入後、P10がどのように発現されるのかを詳しく調べる必要がある。また、RRSVの残りセグメントに関しても塩基配列を決定し、遺伝子の翻訳産物を同定することが必要である。

VI. 摘要

ウイルス感染において遺伝子が果たす機能を解明するために、遺伝子がコードするタンパク質を同定しなければならない。RRSVではS9とS10の塩基配列が決定され、片方の鎖に長いORFが見つかった (Yan, 1992)。S1-S8の塩基配列は決定されていないが、やはり長いORFがあると考えられる。一方、RRSV粒子を構成する7種類のタンパク質 (構造タンパク質) はRRSVの遺伝子から発現すると考えられる。そこで本研究ではRRSVの各遺伝子が発現するタンパク質を同定することを目的とし、各セグメントがコードするタンパク質と構造タンパク質の関係を調べた。更に、S9の解析ではYan (1992) が見つけたS9Lを、S10の解析では主要なORFとその上流の小さいORFの翻訳機構を調べた。

1. Lee *et al.* (1987) が作成した遺伝子ライブラリーはRRSVのゲノム全体を対象としていた。本研究ではハイブリダイゼーションによってS1-S8それぞれのクローンを同定した。
2. S1-S8それぞれにおいてcDNAの長い2-4クローンの制限酵素地図を作成し、cDNA間の重複を調べた。また、各セグメントに対してこれらのクローンが含む割合を推定した。

3. cDNAの一部を大腸菌発現用プラスミドベクター、pMAL-c2あるいはpGEX-3Xに挿入してS1-S8がコードすると推定されるタンパク質の一部を発現させた。挿入したDNAの長さから推定した分子量より約3-6KDa小さいものもあったが、S4のcDNAを除いてほぼ推定した分子量のタンパク質が発現した。抗RRSV粒子抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、S1、S2、S3、S6、S8由来のタンパク質が反応した。

4. 発現タンパク質に対する抗体を作成してウェスタンブロッティングを行ったところ、S6由来のcDNAの発現タンパク質に対する抗体とRRSVの88KDaの構造タンパク質が反応した。また、S8由来のcDNAの発現タンパク質に対する抗体は63KDaと50KDaの構造タンパク質に反応した。

5. RRSVのゲノムのPAGEによってフィリピンのRRSV (RRSV-P) に加え、タイのRRSV (RRSV-T) もS9Lであることが判明した。更に、RRSV-Pと北大のRRSV (RRSV-H) のS9Lの塩基配列を決定し、S9Uに対する塩基置換を検出した。

6. 843番目の塩基が異なるRRSVのS9を合成してPAGEで比較し、ア

デニンの場合はS9U、シトシンの場合はS9Lであることを明らかにした。

7. 微量のゲノム試料のS9UとS9Lを検定できるSSCPを確立した。

S9U RRSVとS9L RRSVの混合感染イネからトビイロウンカが保毒したRRSVのS9をSSCPで調べたところ、S9Uのみ、あるいはS9Lのみ、あるいはそれら両方が検出されるトビイロウンカ個体があった。また、伝搬後のイネを調べた結果も同様だった。

8. S9がコードするORFのcDNAを大腸菌発現用プラスミドベク

ター、pMAL-c2に挿入してMBP-P9を発現させ、抗体を作成した。

発現させたP9はPAGEの移動度がRRSVの35KDaの構造タンパク質と同じだった。抗RRSV粒子抗体は発現したP9に反応し、抗MBP-P9抗体はRRSVの35KDaの構造タンパク質と反応した。

9. S9U RRSVとS9L RRSV (RRSV-HとRRSV-P) の保毒率を比較し

たが、大きな違いがなかった。

10. S10の主要なORFのcDNAを大腸菌発現用プラスミドベクター、

pMAL-c2に挿入してMBP-P10を発現させ、抗体を作成した。P10の

PAGE上の移動度は一番小さい構造タンパク質のP9より早かった。

抗MBP-P10抗体はRRSVの構造タンパク質に反応せず、罹病イネと保毒トビイロウンカの約34KDaのタンパク質に反応した。

11. S10のS10miniのcDNAを大腸菌発現用プラスミドベクター、pGEX-3Xに挿入してGST-P10miniを発現させ、抗体を作成した。抗GST-P10mini抗体は保毒トビイロウンカの泳動先端部に反応した。

12. S10のmRNAを用いてコムギの胚芽抽出液の試験管内翻訳を行ったところ、翻訳産物は検出されなかった。PAGEでは1.3KDaのP10miniは検出できないため、S10miniの途中から主要なORFに連続させたmRNAを作成して試験管内翻訳を行ったところ、翻訳産物が検出された。

以上の結果からRRSVのS6とS9がそれぞれ88KDaと35KDa (P9) の、また、S8が63KDaと50KDaの構造タンパク質をコードしていることが明らかになった。更に、S9Lの解析によって843番目の一塩基置換がS9の移動度を変えていたことを明らかにした。S10の解析では主要なORFの翻訳産物が非構造タンパク質 (P10) であり、RRSV罹病イネと保毒トビイロウンカで発現していることを明らかにすると共に、上流の小さいORFの開始コドンが機能している可能性を示した。

VII. 参考文献

Anzola, J. V., Xu, Z., Asamizu, T. and Nuss, D. L. (1987). Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8301-8305.

Anzola, J. V., Xu, Z. and Nuss, D. L. (1989). Complete nucleotide sequence of wound tumor virus genomic segment S7. *Nucleic Acids Res.* 17: 3300.

Asamizu, T., Summers, D., Motika, M. B., Anzola, J. V. and Nuss, D. L. (1985). Molecular cloning and characterization of the genome of wound tumor virus: a tumor-inducing plant reovirus. *Virology* 144: 398-409.

Astell, C., Silverstein, S. C., Levin, D. H. and ACS, G. (1972). Regulation of the reovirus RNA transcriptase by a viral capsomere protein. *Virology* 48: 648-654.

Atkins, D., Roberts, K., Hull, R., Prehaud, C. and Bishop, D. H. L. (1991). Expression of the tobacco mosaic virus movement protein using a baculovirus expression vector. *J. Gen. Virol.* 72: 2831-2835.

Azuhata, F., Uyeda, I., Kimura, I. and Shikata, E. (1993). Close similarity between genome structures of rice black-streaked dwarf virus and maize rough dwarf viruses. *J. Gen. Virol.* 74: 1227-1232.

Azuhata, F., Uyeda, I. and Shikata, E. (1992). Conserved terminal nucleotide sequences in the genome of rice black streaked dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 73: 1593-1595.

Black, D. R. and Knight, C. A. (1970). Ribonucleic acid transcriptase activity in purified wound tumor virus. *J. Virol.* 6(2): 194-198.

Boccardo, G. and Milne, R. G. (1980). Electrophoretic fractionation of the double-stranded RNA genome of rice ragged stunt virus. *Intervirology* 14: 57-60.

Boccardo, G. and Milne, R. G. (1984). Plant reovirus group. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 294

Cashdollar, L. W., Esparza, J., Hudson, G. R., Chmelo, R., Lee, P. W. K. and Joklik, W. K. (1982). Cloning the double-stranded RNA genes of reovirus: sequence of the cloned S2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7644-7648.

Chen, C. (1985). Studies on the *Echinochloa* ragged stunt and its comparison with rice ragged stunt. *Doctorial thesis National Chung-Hsing University*.

Chen, C., Chen, R. J. and Hsu, H. T. (1989a). Morphological comparisons of *Echinochloa* ragged stunt and rice ragged stunt viruses by electron microscopy. *Phytopathology* 79: 235-241.

Chen, C., Hsu, Y. H., Chen, M. and Ren-Jong, C. (1989b). Comparison of proteins and nucleic acids of *Echinochloa* ragged stunt and rice ragged stunt viruses. *Intervirology* 30: 278-284.

Chiu, R. j. and Black, L. M. (1967). Monolayer cultures of insect cell lines and their inoculation with a plant virus. *Nature (Lond.)* 215(5105): 1076-1078.

Dall, D. J., Anzola, J. V., Xu, Z. and Nuss, D. L. (1989). Complete nucleotide sequence of wound tumor virus genomic segment S11. *Nucleic Acids Res.* 17: 3599.

Dunn, S. J., Ward, R. L., Mcneal, M. M., Cross, T. L. and Greenberg, H. B. (1993). Identification of a new neutralization epitope on VP7 of human serotype 2 rotavirus and evidence for electropherotype differences caused by single nucleotide substitutions. *Virology* 197: 397-404.

Fukushi, T., Shikata, E., Kimura, I. and Nemoto, M. (1960). Electron microscopic studies on the raice dwarf virus. *Proc. Japan. Acad.* 36(6): 352-357.

Furuichi, Y. and Miura, K. (1975). A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature (Lond.)* 253: 374-375.

Giddings, N. J. (1949). Some interrelationships of virus strains in sugar-beet curly top. *Phytopathology* 40: 377-388.

- Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25: 263-269.
- Hagiwara, K., Minobe, Y., Nozu, Y., Hibino, H., Kimura, I. and Omura, T. (1986). Component proteins and structure of rice ragged stunt virus. *J. Gen. Virol.* 67: 1711-1715.
- Hibino, H. (1979). Rice ragged stunt, a new virus disease occurring in tropical asia. *Rev. Plant Protec. Res.* 12: 98-110.
- Hibino, H. and Kimura, I. (1982). Detection of rice ragged stunt virus in insect vectors by enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytopathology* 72: 656-659.
- Hibino, H., Roechan, M., Sudarisman, S. and Tantera, D. M. (1977). A virus disease of rice (kerdil hampa) transmitted by brown planthopper, *Nilaparvata lugens* stal, in Indonesia. *Contr. Centr. Res. Inst. Agric. Bogor* 35: 1-15.
- Hibino, H., Saleh, N. and Roechan, M. (1979). Reovirus-like particles associated with rice ragged stunt diseased rice and insect vector cells. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45: 228-239.
- Ikegami, M. and Francki, R. I. B. (1976). RNA-dependent RNA polymerase associated with subviral particles of Fiji disease virus. *Virology* 70: 292-300.
- Jayasuriya, A. K., Nibert, M. L. and Fields, B. N. (1988). Complete nucleotide sequence of the M2 gene segment of reovirus type 3 dearing and analysis of its protein products μ 1. *Virology* 163: 591-602.
- Kawano, S., Shikata, E. and Senboku, T. (1983). Purification and morphology of rice ragged stunt virus. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 61(2): 209-218.
- 河野 伸二 (1984). 植物レオウイルスに関する研究. 北海道大学 農学博士論文.
- Kawano, S., Uyeda, I. and Shikata, E. (1984). Particle structure and double-stranded RNA of rice ragged stunt virus. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 61(4): 408-418.
- Kimura, I. (1976). Loss of vector-transmissibility in an isolate of rice

dwarf virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 42: 322-324.

木村 郁夫 (1987). 媒介昆虫の培養細胞における植物ウイルスの感染・増殖. 植物防疫 41(6)

Kodama, T. and Suzuki, N. (1973). RNA polymerase activity in purified rice dwarf virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 39: 251-258.

Koganezawa, H., Hibino, H., Motoyoshi, F., Kato, H., Noda, H., Ishikawa, K. and Omura, T. (1990). Nucleotide sequence of segment S9 of the genome of rice gall dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 71: 1861-1863.

Kozak, M. (1981). Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9: 5233-5252.

Kozak, M. (1986). Bifunctional messenger RNAs in Eukaryotes. *Cell* 47 (minireview): 481-483.

Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *The Journal of Cell Biology* 114(4): 887-903.

Kudo, H., Uyeda, I. and Shikata, E. (1991). Viruses in the Phytoreovirus genus of the Reoviridae family have the same conserved terminal sequences. *J. Gen. Virol.* 72: 2857-2866.

Lee, S., Uyeda, I. and Shikata, E. (1988). Studies on double-stranded RNA of rice dwarf and rice ragged stunt viruses. *Memoirs of the Faculty of Agriculture Hokkaido University* 116(1): 129-161.

Lee, P. W. K., Hayes, E. C. and Joklik, W. K. (1981). Protein $\sigma 1$ is the reovirus cell attachment protein. *Virology* 108: 156-163.

Lee, S., Uyeda, I., Yan, J., Ao, G. and Shikata, E. (1987). Molecular cloning of the genome of rice ragged stunt virus. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 63(3): 269-276.

Ling, K. C., Tiongco, E. R. and Aguiro, V. M. (1978). Rice ragged stunt, a new virus disease. *Plant Dis. Repr.* 62(8): 701-705.

Luisoni, E., Milne, R. G. and Roggero, P. (1982). Diagnosis of rice ragged

stunt virus by enzyme-linked immunosorbent assay and immunosorbent electron microscopy. *Plant Disease* 66: 929-932.

Maoka, T., Omura, T., Harjosudarmo, J., Usugi, T., Hibino, H. and Tsuchizaki, T. (1993). Loss of vector-transmissibility by maintaining rice ragged stunt virus in rice plants without vector transmission. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59(2): 185-187.

Marzachi, C., Accotto, G. P., d'Aquilio, M., Caciagli, P. and Boccardo, G. (1990). In vitro transcription of the double-stranded RNA genome of maize rough dwarf virus (Reoviridae). *J. Gen. Virol.* 71: 707-711.

Marzachi, C., Boccardo, G. and Nuss, D. L. (1991). Cloning of the maize rough dwarf virus genome: molecular confirmation of the plant-reovirus classification scheme and identification of two large nonoverlapping coding domains within a single genomic segment. *Virology* 180: 518-526.

Matsumura, T. and Tabayashi, N. (1995). Transformation of rice plants by plant reovirus genes. *Semin. Virol.* 6(2): 133-139.

Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(2): 560-564.

Milne, R. G. (1980). Does rice ragged stunt virus lack the typical double shell of the Reoviridae? *Intervirology* 14: 331-336.

Milne, R. G., Boccardo, G. and Ling, K. C. (1982). Rice ragged stunt virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* No. 248

Milne, R. G., Luisoni, E. and Ling, K. C. (1979). Preparation and use of an antiserum to rice ragged stunt virus subviral particles. *Plant Dis. Repr.* 63 (6): 445-448.

Miura, K., Watanabe, K., Sugiura, M. and Shatkin, A. J. (1974). The 5'-terminal nucleotides sequences of the double-stranded RNA of human reovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71(10): 3979-3983.

Morgan, E. M. and Zweerink, H. J. (1975). Characterization of transcriptase and replicase particles isolated from reovirus-infected cells. *Virology* 68: 455-466.

Murao, K., Suda, N., Uyeda, I., Isogai, M., Suga, H., Yamada, N., Kimura, I. and Shikata, E. (1994). Genetic heterogeneity of rice dwarf phyto-reovirus field isolates and nucleotide sequences of variants of genome segment 12. *J. Gen. Virol.* 75: 1843-1848.

村尾 和則 (1995). イネ萎縮ウイルスゲノムの変異に関する研究. 北海道大学 農学博士論文.

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Larvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers, M. D. (1995). Classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Springer-Verlag Wien New York*.

Noda, H., Ishikawa, K., Hibino, H., Kato, H. and Omura, T. (1991a). Nucleotide sequences of genome segments S8, encoding a capsid protein, and S10, encoding a 36K protein, of rice gall dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 72: 2837-2842.

Noda, H., Ishikawa, K., Hibino, H. and Omura, T. (1991b). A reovirus in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Gen. Virol.* 72: 2425-2430.

Noda, H. and Nakashima, N. (1995). Non-pathogenic reoviruses of leafhoppers and planthoppers. *Semin. Virol.* 6(2): 109-116.

Nuss, D. L. and Dall, D. J. (1990). Structural and functional properties of plant reovirus genomes. *Adv. Virus Res.* 38: 249-306.

Nuss, D. L. and Peterson, A. J. (1980). Expression of wound tumor virus gene products in vivo and in vitro. *J. Virol.* 34(2): 532-541.

Nuss, D. L. and Peterson, A. J. (1981). Resolution and genome assignment of mRNA transcripts synthesized in vitro by wound tumor virus. *Virology* 114: 399-404.

Omura, T., Minobe, Y., Kimura, I., Hibino, H., Tsuchizaki, T. and Saito, Y. (1983). Improved purification procedure and RNA segments of rice ragged stunt virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 49: 670-675.

大畑 貫一 (1989). 稲の病害 -診断・生態・防除-. 全国農村教協会.

Reddy, D. V. R. and Black, L. M. (1974). Deletion mutations of the genome segments of wound tumor virus. *Virology* 61: 458-473.

Reddy, D. V. R., Rhodes, D. P., Lesnaw, J. A., Macleod, R., Banerjee, A. K. and Black, L. M. (1977). In vitro transcription of wound tumor virus RNA by virion-associated RNA transcriptase. *Virology* 80: 356-361.

Rhodes, D. P., Reddy, D. V. R., Macleod, R., Black, L. M. and Banerjee, A. K. (1977). In vitro synthesis of RNA containing 5'-terminal structure 7mG (5')ppp(5')Apm... by purified wound tumor virus. *Virology* 76: 554-559.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12): 5463-5467.

Schiff, L. A. and Fields, B. N. (1990). Reoviruses and Their Replication. (Fields Virology) New York, Raven Press.

仙北 俊弘・青柳 明典・Leelapanang, K.・四方 英四郎・Tiongco, E. R.・Ling, K. C. (1978). フィリピンに発生したイネ ragged stunt ウイルスについて. 日本植物病理学会報 44(3): 393 (講演要旨).

仙北 俊弘・周延 光・野田 聡・四方 英四郎 (1979). イネ ragged stunt ウイルス (RRSV) の諸性質と血清反応について. 日本植物病理学会報 45(4): 564 (講演要旨).

仙北 俊弘・四方 英四郎 (1980). クロスジツマグロヨコバイ (*Nephotettix nigropictus* Stal), トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens* Stal) 胚子の組織培養について. 北海道大学農学部邦文紀要 12(2): 101-108.

Shatkin, A. J. and Sipe, J. D. (1968). RNA polymerase activity in purified reoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61: 1462-1469.

Shikata, E. (1981). Reovirus (Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis). Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Shikata, E., Senboku, T., Kamjaipai, K., Chou, T., Tiongco, E. R. and Ling, K. C. (1979). Rice ragged stunt virus, a new member of plant reovirus group. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 45: 436-443.

Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell,

C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H. and Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature (Lond.)* 321: 674-679.

Suzuki, N. (1995). Molecular analysis of the rice dwarf virus genome. *Semin. Virol.* 6 (2): 89-95.

Suzuki, N., Sugawara, M., Kusano, T., Mori, H. and Matsuura, Y. (1994). Immunodetection of rice dwarf Phytoreoviral proteins in both insect and plant hosts. *Virology* 202: 41-48.

Suzuki, N., Tanimura, M., Watanabe, Y., Kusano, T., Kitagawa, Y., Suda, N., Kudo, H., Uyeda, I. and Shikata, E. (1992). Molecular analysis of rice dwarf *Phytoreovirus* segment S1: interviral homology of the putative RNA-dependent RNA polymerase between plant- and animal-infecting reoviruses. *Virology* 190: 240-247.

谷口 孝喜・浦沢 正三 (1992). ロタウイルス及びレオウイルスの遺伝子構造. 蛋白質 核酸 酵素 37(14): 2447-2452.

Taniguchi, K. and Urasawa, S. (1995). Diversity in rotavirus genomes. *Semin. Virol.* 6 (2): 123-131.

Upadhyaya, N. M., Yang, M., Kositratana, W., Ghosh, A. and Waterhouse, P. M. (1995). Molecular analysis of rice ragged stunt oryzavirus segment S9 and sequence conservation among isolates from Thailand and India. *Arch. Virol.* (accepted)

Uyeda, I., Azuhata, F. and Shikata, E. (1990a). Nucleotide sequence of rice black-streaked dwarf virus genome segment 10. *Proc. Japan Acad. Ser. B* 66: 37-40.

Uyeda, I., Lee, S. Y., Leng, G. W., Ao, G. M., Deng, Z. P., Liang, X. S., Ohshima, K. and Shikata, E. (1990b). Size of dsRNA genome segments of rice dwarf and rice ragged stunt viruses determined by electron microscopy. *J. Electron Microsc.* 39: 54-58.

Uyeda, I., Lee, S. Y., Yoshimoto, H. and Shikata, E. (1987). RNA polymerase activity of rice ragged stunt and rice black-streaked dwarf viruses. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 53: 60-62.

Uyeda, I. and Milne, R., G. (1995). Introduction: Genomic organization,

diversity and evolution of plant reoviruses. *Semin. Virol.* 6(2): 85-88.

Uyeda, I., Murao, K., Ando, Y., Suga, H. and Kimura, I. (1995a). Variation and reassortment within the rice dwarf virus genome. *Semin. Virol.* 6(2): 117-122.

Uyeda, I. and Shikata, E. (1984). Characterization of RNAs synthesized by the virion-associated transcriptase of rice dwarf virus in vitro. *Virus Research* 1: 527-532.

Uyeda, I., Suda, N., Yamada, N., Kudo, H., Suga, H., Kimura, I., Shikata, E., Kitagawa, Y., Kusano, T., Sugawara, M. and Suzuki, N. (1994). Nucleotide sequence of rice dwarf Phytoreovirus genome segment 2: Completion of sequence analyses of rice dwarf virus. *Intervirology* 37: 6-11.

Uyeda, I., Suga, H., Lee, S. Y., Yan, J., Hataya, T., Kimura, I. and Shikata, E. (1995b). Rice ragged stunt *Oryzavirus* genome segment 9 encodes a 38600 Mr structural protein. *J. Gen. Virol.* 76: 975-978.

Wu, H. and Crothers, D. M. (1984). The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature (Lond.)* 308: 509-513.

Xu, Z., Anzola, J. V., Nalin, C. M. and Nuss, D. L. (1989). The 3'-terminal sequence of a wound tumor virus transcript can influence conformational and functional properties associated with the 5'-terminus. *Virology* 170: 511-522.

Yan, J. (1992). Studies on genome structure of rice ragged stunt virus. *Doctorial thesis of Hokkaido University (Faculty of agriculture)*.

Yan, J., Kudo, H., Uyeda, I., Lee, S. and Shikata, E. (1992). Conserved terminal sequences of rice ragged stunt virus genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 73: 785-789.

Yan, J., Suga, H., Uyeda, I., Lee, S., Kimura, I. and Shikata, E. (1995). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of rice ragged stunt *Oryzavirus* genome segment 10. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61(3): 189-193.

Yan, J., Uyeda, I., Kimura, I., Shikata, E., Chen, C. and Chen, M. (1994). *Echinochloa* ragged stunt virus belongs to the same genus as rice ragged stunt virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 60(5): 613-616.

Yokoyama, M., Nozu, Y., Hashimoto, J. and Omura, T. (1984). In vitro transcription by RNA polymerase associated with rice gall dwarf virus. *J. Gen. Virol.* 65: 533-538.

付録 (略語と試薬類)

1. イネラギッドスタントウイルスゲノムの研究に関する略語と名称

ORF: 読み取り枠

P9: セグメント9の読み取り枠がコードするタンパク質

P10: セグメント10の主要な読み取り枠がコードするタンパク質

P10mini: S10の主要な読み取り枠の上流の小さい読み取り枠がコードするタンパク質

pRR: pBR322の *Pst* I部位にRRSVのゲノムのcDNAを挿入したプラスミド

RRSV: イネラギッドスタントウイルス

RRSV-H: 北海道大学で継代されていたイネラギッドスタントウイルス

RRSV-P: フィリピンで継代されていたイネラギッドスタントウイルス

RRSV-T: タイで継代されていたイネラギッドスタントウイルス

S: セグメント

S9U: ポリアクリルアミドゲル電気泳動で認められる移動度の異なるセグメント9のうち、移動度の遅い方

S9L: ポリアクリルアミドゲル電気泳動で認められる移動度の異なる

るセグメント9のうち、移動度の早い方

S10mini:S10の主要な読み取り枠の上流の小さい読み取り枠

2. 試薬類と実験上の略語

APS:Ammonium peroxodisulfate

BSA:Bovine serum albumin

100×Denhard's solution:Ficoll 10g と

Polyvinylpyrrolidone 10g とBSA 10g を滅菌水で溶解
して500mlとしたもの

DTT:Dithiothreitol

DMSO:Dimethyl sulfoxide

5mM dNTP:dATP、dTTP、dCTP、dGTPが各5mMの混合液

泳動用色素:6×濃度保存液(0.25% Bromophenol blue、0.25%

Xylene cyanol、30% グリセロール)を試料と混合して
1×にして使用

EDTA:Ethylenediaminetetraacetic acid、disodium salt

ELISA:Enzyme-linked immunosobent assay

EtBr:エチジウムブロマイド

フェノール:固体フェノールをTEに溶解して飽和させ、Trisで

pH7.6に調整したもの

GST:グルタチオン-S-トランスフェラーゼ

IPTG:イソプロピル- β -D-チオ-ガラクトシド

クロロホルム:クロロホルムとイソアミルアルコールを24:1

(V:V) で混合したもの

LacZ α :LacZ遺伝子産物の α ペプチド

MBP:マルトース結合タンパク質

ナイロンメンブレン:アマシャム社製のHybond N⁺を使用

5mM NTP:ATP、UTP、CTP、GTPが各5mMの混合液

滅菌水:ミリポアフィルターを通過させた水 (Milli Q水) をオー

トクレーブで滅菌したもの

PAGE:ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PCR:Polymerase chain reaction

30% ポリアクリルアミドゲル保存溶液:アクリルアミド 30g とビ

スアクリルアミド 0.8g を滅菌水で100mlとしたもの

40% ポリアクリルアミドゲル保存溶液:アクリルアミド 38g とビ

スアクリルアミド 2g を滅菌水で100mlとしたもの

Polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン:Millipor社

製の Immobilon™ (Pore size:0.45 μ m) を使用

SSC緩衝液:20 \times 濃度保存溶液 (3M 塩化ナトリウム、0.3M クエ

ン酸ナトリウム) を必要に応じた濃度に希釈して使用

5M 酢酸カリウム溶液 (アルカリ法) :5M 酢酸カリウム溶液 60ml

に酢酸11.5ml と滅菌水 28.5ml を加えたもの

SDS:Sodium lauryl sulfate

SSCP:一本鎖多型分析

STE溶液:10×濃度保存液 {100mM Tris-HCl (pH6.8)、1M 塩化ナトリウム、10mM EDTA} を必要に応じて希釈して使用

TE:10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0) 溶液

TEMED:N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine

Tris-HCl:HClでpHを調整したTris (hydroxymethyl) aminomethane溶液

TBE緩衝液:10×濃度保存溶液 {0.5M Tris、0.5M ほう酸、10mM EDTA (pH8.3)} を必要に応じた濃度に希釈して使用

3. 基本的実験操作

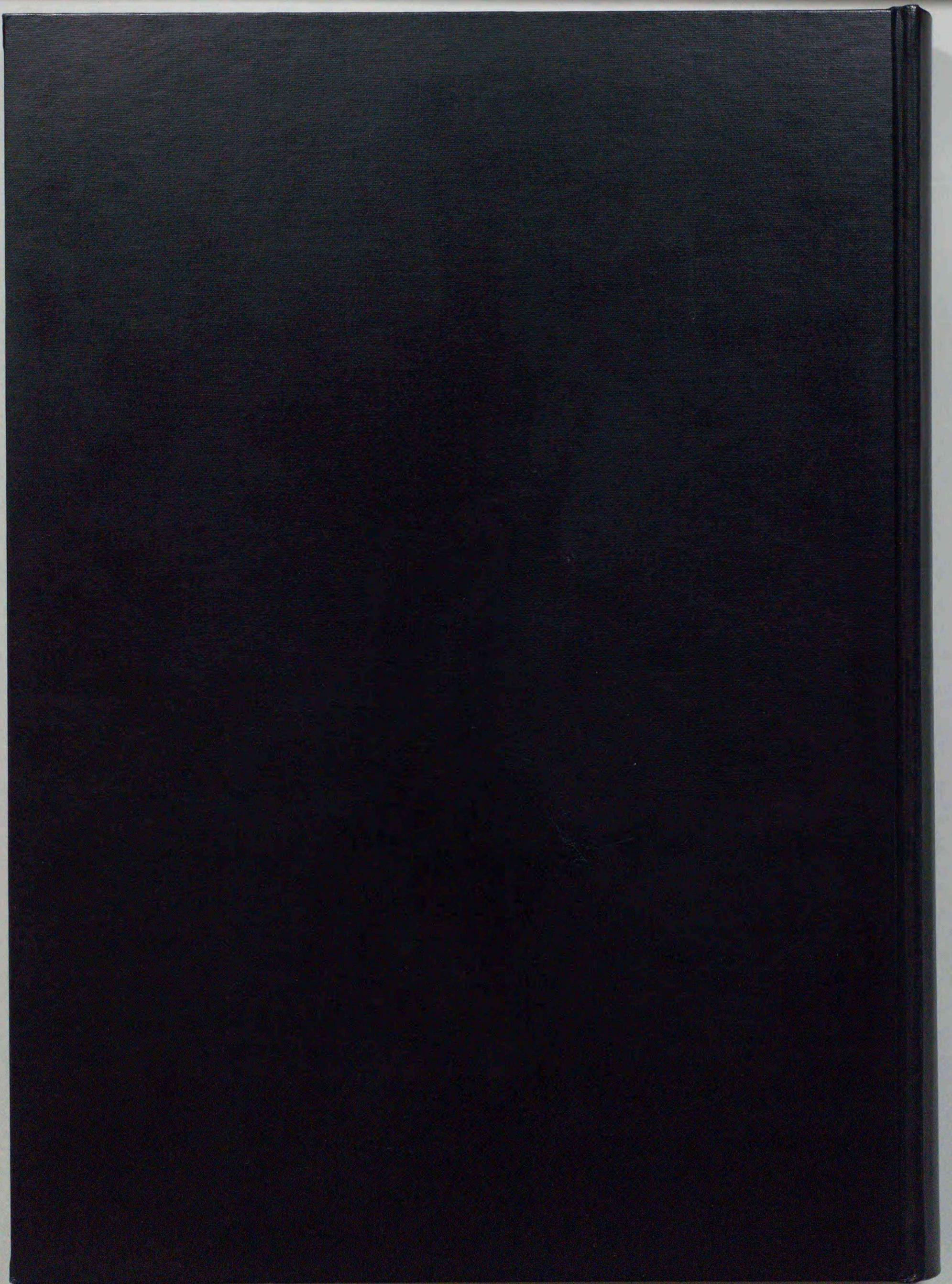
核酸をフェノール・クロロホルムで抽出する:試料液に等量のフェノール・クロロホルム液 (フェノールとクロロホルムを1:1で混合した溶液) を加え、室温で数分間混合後、卓上遠心分離機で12,000から14,000rpmで2分間以上遠心分離し、上層を移しとる操作

エタノール沈殿:核酸試料水溶液に1/10量の3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) と2.5倍量のエタノールを混合し、-30℃で一晩、あるいは-80℃で30分以上静置後、卓上遠心分離機で14,000rpm (4℃) で10分間以上遠心分離して (容量が多い場合はそれに相当する遠心分離機を使用して) 核酸を沈殿

させる操作を示す。上清を除いた沈澱には上清と等量の冷
80% エタノールを沈澱の逆側からゆっくり注ぎ入れて再度
同様に5分間以上遠心分離して塩を除き、沈殿をエヴァポレー
ターで（約5分間）乾燥させる操作

この量多量に... (faint text)

... (faint text)

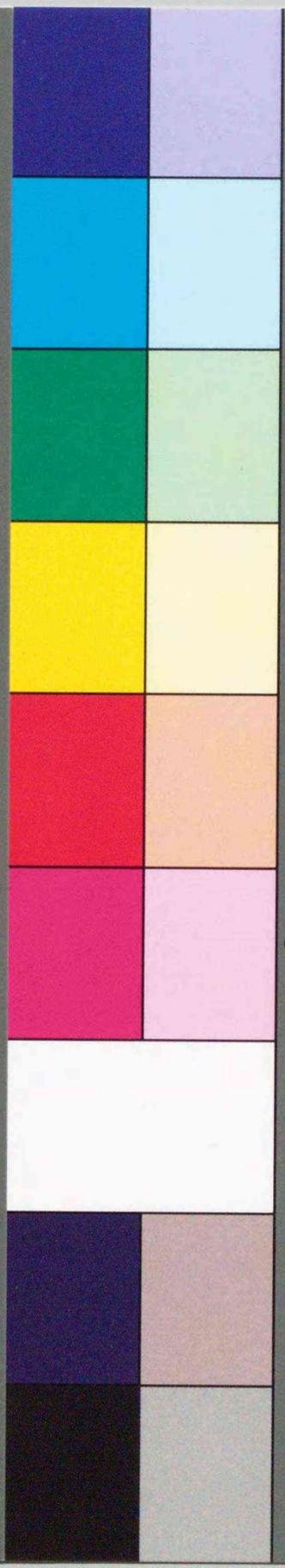


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

