

イネ萎縮ウイルスの全遺伝子構造

北海道大学農学部生物資源科学科植物ウイルス病学菌学講座 うえ だ いち ろう
上 田 一 郎

はじめに

イネ萎縮ウイルス (RDV) は約 65 nm の球形ウイルスで、その遺伝子は 12 本に分節した二本鎖の RNA である。分節した遺伝子は電気泳動移動度の遅いものから S1 ~ S12 と呼ばれる。分類学的には、レオウイルス科の *Phytoreovirus* 属に入り、この属にはほかに、wound tumor virus (WTV) と rice gall dwarf virus (GRDV) が属する。植物のレオウイルスでは、ほかに *Fijivirus* 属と *Oryzavirus* 属がある。

イネ萎縮ウイルス遺伝子の全塩基配列の決定は、UYEDA et al. (1987) と OMURA et al. (1988) が同時に S10 の全塩基配列を決定したことに始まり、1993 年に UYEDA et al. (1993) が S2 の構造解析を行い終了した。これで、全遺伝子構造が解明された最初の植物レオウイルスとなった。この 7 年間に、北海道大学、農林水産省生物資源研究所及び農業研究センター、秋田県立農業短大生物工学研究所の研究グループによって、精力的に構造解析が行われた。構造解析を始めた当初より、塩基配列を決定することによって、①ウイルスがいくつの遺伝子をコードしているか、②遺伝子の複製や発現にかかわる構造上の特徴が何かないか、③コードする遺伝子の機能が推測できないか、④ウイルスの分類に寄与する遺伝子レベルの特徴などがわかるのではないかと期待がもたれた。また 1985 年に、同じ *Phytoreovirus* 属の WTV S12 の全塩基配列がアメリカで報告されたことも (ASAMIZU et al., 1985)、大きな刺激になっていた。現在では、遺伝子構造の決定はウイルスの分子生物学の基礎となるだけでなく、トランスジェニック植物を用いてウイルス病を遺伝子工学的に防除するためにも、またウイルス病の遺伝子診断やウイルスの分類にも欠くことができなくなっている。

ここでは、RDV の全遺伝子構造が決定されて明らかになったことをまとめてみたい。

I 末端のゲノムセグメントに共通の保存配列

イネ萎縮ウイルスでは、S10 の全塩基配列が初めに決

定された (UYEDA et al., 1987; OMURA et al., 1988)。その末端には、WTV と同じ 5'GGUA-UGAU3' の配列が見いだされた。WTV では、RNA ゲノムの塩基配列を直接解析して、12 本のゲノムセグメントすべての末端で 5'GGUAUU-UGAU3' の共通保存配列が存在することが明らかになっていた (ASAMIZU et al., 1985)。このことから末端の共通保存配列が RDV と WTV で同じであろうと推測された。しかし、続いて解析された S8 (OMURA et al., 1989) と S9 (UYEDA et al., 1989) では、予想に反して末端の配列がそれぞれ 5'GGCA-UGAU3' と 5'GGUA-CGAU3' であった。すなわち S8 では 5' 末端から 3 番目の、また S9 では 3' 末端から 4 番目の塩基が異なっていた。末端の共通保存配列がどこまで保存されているのか調べるために、KUDO et al. (1991) は、全ゲノムセグメントの末端配列を RNA 塩基配列決定法により解析した。その配列は、5' 末端で 5'GGUAAA- と 5'GGCAA- であり、3' 末端で -UGAU3' と -CGAU3' であった。分節したゲノムを持つウイルスでは、それぞれのゲノムセグメントが同じ機構で複製・転写するために、セグメント間で共通の塩基配列または高次構造を持つはずである。イネ萎縮ウイルスでは、この末端共通保存配列がこれに当たると思われる。

イネ萎縮ウイルスゲノムセグメントの末端共通保存配列は、同じ *Phytoreovirus* 属の WTV 及び RGDV と非常によく似ており (KUDO et al., 1991)、属に特異的な配列を有している (表-1)。このことは、他の植物レオウイルス属について、ゲノムセグメント間の末端共通保存配列を解析して明らかとなった (YAN et al., 1992; AZUHATA et al., 1992)。したがって、末端共通保存配列は、ウイルス

表-1 植物レオウイルスゲノムの末端共通保存配列

ウイルス	ゲノムの末端配列共通配列
<i>Phytoreovirus</i> 属	
イネ萎縮ウイルス	5'GGUAAA.....UGAU3' C C
wound tumor virus	5'GGUAAA.....UGAU3'
<i>Fijivirus</i> 属	
イネ黒条萎縮ウイルス	5'AAGUUUUU...GUC3'
<i>Oryzavirus</i> 属	
イネラギッドスタントウイルス	5'GAUAAA.....GUGC3'

Complete Genome Structure of Rice Dwarf Virus.

By Ichiro UYEDA

を分類する上でも重要な基準になると思われる。

II 逆向きの繰返し配列

レオウイルスでは、一つのウイルス粒子の中に分節したゲノムが1セット取り込まれるとされている。したがって、ゲノムセグメント間では、複製や転写に必要な共通の高次構造や配列のほかに、取り込まれるためにおのおのセグメントを識別するシグナルも必要である。Wound tumor virusでゲノムセグメントの両末端に塩基の逆向きの繰返し配列が見いだされた。このパンハンドル構造は、12本のゲノムセグメントそれぞれに特徴的であることから、分節したゲノムセグメントが1コピーずつウイルス粒子に取り込まれるためのシグナルであろうと提唱された (ANZOLA et al., 1987)。同様の配列は、RDVの全ゲノムセグメントにも見いだされる (UYEDA et al., 1989; KUDO et al., 1991)。

III イネ萎縮ウイルスの全塩基配列と遺伝子構成

イネ萎縮ウイルスの全塩基配列は決定された。一つに分離株の全セグメントについて解析されたわけではないので、正確な数ではないが、総塩基数は、25,750~25,747である (表-2)。レオウイルス科の中では、レオウイルスタイプ3、ブルータングウイルス及びロタウイルスの総塩基数がそれぞれ23,549, 19,218及び18,555なので、RDVが一番大きいゲノムを持つことになる。どのゲノムセグメントも、基本的には、一つの長いオープンリーディングフレーム (ORF) を持つ。

Wound tumor virusのS4からS12の全塩基配列も決定されており、RDVの対応するセグメントと高いホ

表-2 イネ萎縮ウイルスゲノムの塩基数とコードするタンパク質

セグメント	塩基数	一番長い ORF		
		開始コドン	終止コドン	アミノ酸数
S1	4423	36	4368	1444
S2	3513	15	3363	1116
S3	3195	39	3096	1019
S4	2468	64	2247	727
S5	2571(2570)	27	2430	801
S6	1699	49	1576	509
S7	1698	26	1544	506
S8	1424	24	1284	420
S9	1305	25	1078	351
S10	1321(1319)	27	1086	353
S11	1067	30(6)	573	181(189)
S12	1066	42	978	312

モロジーが認められる (表-3)。

それぞれのセグメントについて、その構造の特徴を以下にまとめた。

1 S1

S1は、4,423塩基よりなり、36番目のAUGから4,368番目の終止コドン(UAG)までの1,444アミノ酸残基(164 kDa)の長いORF(P1)を持つ (SUZUKI et al., 1992a)。ほかに6番目から29番目の短いORFも存在するが、発現については明らかではない。P1は、RNAポリメラーゼにみられる共通モチーフを持っており、ウイルスコア粒子に存在する微量の構造タンパク質である (表-4)。

2 S2

S2は、3,513塩基よりなり、15番目のAUGから3,363番目の終止コドンまでの1,116アミノ酸残基(123 kDa)のタンパク質をコードしている (UYEDA et al., 1993)。分子量から推定すると、粒子に存在する130 kDaタンパク質(大村, 私信)をコードしていると思われる。5'末端の非翻訳領域は12本のゲノムセグメント中、最も短い。

3 S3

S3は、3,195塩基よりなり、39番目のAUGから

表-3 イネ萎縮ウイルスと wound tumor virus のコードするタンパク質のホモロジー比較

イネ萎縮ウイルス		wound tumor virus		ホモロジー (%)
ゲノム	タンパク質	ゲノム	タンパク質	
4	P4	4	P4	21.7
5	P5	5	P5	51.9
6	P6	6	Pns7	20.8
7	P7	7	P6	32.0
8	P8	8	P8	48.3
9	P9	11	P9	31.3
10	P10	10	Pns11	30.6
11	P11	12	Pns12	25.8
12	P12	9	Pns10	15.4
	P120a		P90P	29.3

表-4 イネ萎縮ウイルスの構造タンパク質とゲノムの対応

構造タンパク質	ゲノムセグメント	タンパク質分子量	ウイルス粒子中の存在場所
P1	S1	164 K	コア
130 kDa	S2	123 K	?
P3	S3	114 K	コア
P7	S7	55 K	コア
P8	S8	46 K	外殻カプシド

3,096 番目の終止コドンまでの1,019 アミノ酸残基 (114 kDa) のタンパク質 (P3) をコードする (YAMADA et al., 1990; SUZUKI et al., 1990b)。P3 は、コア粒子の主要構造タンパク質である (SUZUKI et al., 1990b; KANO et al., 1990)。

4 S4

S4 は、2,468 塩基よりなり、64 番目の AUG から 2,245 番目の UAA までの 727 アミノ酸残基 (79.8 kDa) のタンパク質 (P4) をコードする (UYEDA et al., 1990; SUZUKI et al., 1990a)。P4 は、WTV の Pns4 とアミノ酸配列のホモロジーが高いことから、非構造タンパク質と推定されているが、直接の証明はまだない。また、zinc finger モチーフ類似の配列を持っているので、核酸結合能があると推定される (UYEDA et al., 1990)。5' 末端の非翻訳領域は 12 本のゲノムセグメント中で、最も長い。

5 S5

S5 は、2,570 あるいは 2,571 塩基よりなり、27 番目の AUG から 2,430 番目の UGA までの 801 アミノ酸残基 (90.5 kDa) のタンパク質 (P5) をコードする (SUZUKI et al., 1990a; HAYASHI et al., 1990)。P5 は、WTV の P5 とアミノ酸配列のホモロジーが高いことから、外被タンパク質をコードして、虫媒性に関与していると推定されるが、実証はまだない。

6 S6

S6 は、1,699 塩基よりなり、49 番目の AUG から 1,576 番目の UAA まで 509 アミノ酸残基 (57.4 kDa) のタンパク質 (P6) をコードする (SUZUKI et al., 1990a)。P6 は、WTV の Pns6 とアミノ酸配列のホモロジーが高いことから、非構造タンパク質であると推定される。

7 S7

S7 は、1,698 塩基よりなり、26 番目の AUG から 1,544 番目の UGA まで 506 アミノ酸残基 (55.3 kDa) のタンパク質 (P7) をコードしている (NAKASHIMA et al., 1990)。P7 はコアに存在するタンパク質である。

8 S8

S8 は、1,424 塩基よりなり、24 番目の AUG から 1,284 番目の UAG まで 420 アミノ酸残基 (46.3 kDa) のタンパク質 (P8) をコードしている (OMURA et al., 1989)。P8 は主要な外被タンパク質である。

9 S9

S9 は、1,305 塩基よりなり、25 番目の AUG から 1,078 番目の UGA まで 351 アミノ酸残基 (38.6 kDa) のタンパク質をコードしている (UYEDA et al., 1989; FUKUMOTO et al., 1989)。S9 のコードするタンパク質は

WTV の S11 がコードする構造タンパク質の P9 とホモロジーが高い。しかし RDV の粒子にはこの分子量に相当するタンパク質が見つかっていないことから、非構造タンパク質である可能性は否定できない。

10 S10

S10 は、1,321 または 1,319 塩基よりなり、27 番目の AUG から 1,086 番目の UAA まで 353 アミノ酸残基 (39.2 kDa) のタンパク質をコードしている (UYEDA et al., 1987; OMURA et al., 1988)。試験管内で発現させると、その分子量がどの構造タンパク質より小さいことと、またバクテリアで発現させたタンパク質に対する抗体とウイルス粒子が反応しないことから非構造タンパク質と推定される (MATSUMURA et al., 1992)。

11 S11

S11 は、1,067 塩基よりなり、6 番目と 30 番目の AUG から 573 番目の UAA まで 189 (20 kDa) あるいは 181 (20.8 kDa) アミノ酸残基のタンパク質 (P11) をコードしている (SUZUKI et al., 1991)。どちらの AUG が実際の感染細胞で用いられているのかは明らかではない。WTV の S12 がコードする非構造タンパク質の Pns12 はこのタンパク質とホモロジーが高いが、RDV の 6 番目に相当する AUG コドンはない。また 6 番目の AUG コドンは、コザックの“弱い開始コドン”に当たり、細胞内で働いているとしても効率はよくないと思われる。P11 の C-末端側約 1/3 は、セリンと塩基性タンパク質のリジンの含量が高く、ヒストン H1 タンパク質の C-末端側とホモロジーが高い。このことは、P11 が核酸結合能を持つことを示唆している (UYEDA et al., 1993)。12 本のゲノムセグメントの中で、最も 3' 末端の非翻訳領域が長い。

12 S12

S12 は、1,066 塩基よりなり、42 番目の AUG コドンから 978 番目の UGA まで 312 アミノ酸残基 (33.9 kDa) のタンパク質 (P12) をコードしている (SUZUKI et al., 1992b)。

イネ萎縮ウイルスの S4 から S11 までは WTV のいずれかのセグメントに対応している。Wound tumor virus に対応していないセグメントは S9 なのでこれが RDV の S12 に対応すると思われた。しかし P12 は WTV の S9 がコードする Pns10 とはホモロジーがきわめて低い (表-3)。これら P12 と Pns10 がそれぞれのウイルスに特異的であるので、その機能がウイルスに特徴的な表現形をつかさどっているのか否か興味深い。

イネ萎縮ウイルスの S12 には、313 番目と 337 番目の AUG から 589 番目の UAG までのおのおの 92 アミノ

酸残基 (P120a) と 84 アミノ酸残基 (P120b) をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が見いだされた (SUZUKI et al., 1992)。さらに, WTV と RGDV の S9 にも P120b に相当するホモロジーの高い ORF が存在した。したがって, 進化的には RDV の S12 と WTV 及び RGDV の S9 は対応していると考えられる。

おわりに

イネ萎縮ウイルスゲノムの全塩基配列が明らかになって, そのゲノム構成や構造タンパク質をコードするセグメントは明らかにできた。さらにゲノムの末端構造は植物レオウイルスの分子レベルでの分類にも利用できた。しかし, ウイルスの病原性や複製に関与する遺伝子については, S1 が RNA ポリメラーゼをコードすること以外は, なにもわかっていない。今後, ウイルスの生物学的性質の分子レベルの解析が, 塩基配列を基礎にして発展することが期待される。

引用文献

1) ANZOLA, J. V. et al. (1989) : *Virology* 171: 222~228.

- 2) ASAMIZU, T. et al. (1985) : *ibid.* 144: 398~409.
- 3) AZUHATA, F. et al. (1992) : *J. gen. Virology* 73: 1593~1595.
- 4) FUKUMOTO, F. et al. (1989) : *Arch Virol.* 107: 135~139.
- 5) HAYASHI, N. and Y. MINOBE (1990) : *J. gen. Virology* 71: 3081~3083.
- 6) KANO, H. et al. (1990) : *Nucl. Acids Res.* 18: 6700.
- 7) KUDO, H. et al. (1991) : *J. gen. Virology* 72: 2857~2866.
- 8) MATSUMURA, T. et al. (1992) : *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 65: 351~357.
- 9) NAKASHIMA, K. et al. (1990) : *J. gen. Virology* 71: 725~729.
- 10) OMURA, T. et al. (1988) : *ibid.* 69: 227~231.
- 11) ——— et al. (1989) : *ibid.* 70: 2759~2764.
- 12) SUZUKI, N. et al. (1990a) : *Virology* 179: 446~454.
- 13) ——— et al. (1990b) : *ibid.* 179: 455~459.
- 14) ——— et al. (1991) : *J. gen. Virology* 72: 2233~2237.
- 15) ——— et al. (1992a) : *Virology* 190: 240~247.
- 16) ——— et al. (1992b) : *ibid.* 191: 992~995.
- 17) UYEDA, I. et al. (1987) : *Proc. Japan Acad.* 63: 227~230.
- 18) ——— et al. (1989) : *J. gen. Virology* 70: 1289~1300.
- 19) ——— et al. (1990) : *ibid.* 71: 2217~2222.
- 20) ——— et al. (1993) : *Intervirology* (投稿中).
- 21) YAMADA, N. et al. (1990) : *Nucleic Acids Research* 18: 6419.
- 22) YAN, J. et al. (1992) : *J. gen. Virology* 73: 785~789.

お知らせ

○理化学研究所第16回科学講演会開催のお知らせ

日時: 平成5年10月22日(金) 13:30~17:00

場所: 仙台市・仙台ホテル(青葉の間)

主催: 理化学研究所

後援: 科学技術庁, 宮城県, 仙台市, 東北経済連合会, 仙台商工会議所, 東北インテリジェントコスモス構想推進協議会

協賛: 関係学・協会

入場: 無料

講演会:

〈プログラム〉

開会 (13:40)

(1) 眼と光

(理研・フォトダイナミクス研究センターセンター長)

田崎 京二氏

(2) 電子移動という単純な反応——亀の甲ばかりが化学ではない——(理研・反応物理化学研究室主任研究員)

吉良 爽氏

(3) 花成ホルモンを追う——花芽の形成を誘導するホルモンを求めて——(理研・植物生活環境制御研究室主任研究員)

桜井 成氏

閉会 (17:00)

連絡先: 理化学研究所 開発調査室

Tel 0484-62-1111 (内線 2472~2474)

新刊!

本会発行図書

農薬適用一覽表 (平成5農薬年度)

農林水産省農薬検査所 監修

定価 3,000円 (本体 2,913円) 送料 380円

A5判 394ページ

平成5年9月30日現在, 当該病害虫(除草剤は主要作物)に適用のある登録農薬をすべて網羅した一覽表で, 殺菌剤, 殺虫剤, 除草剤, 植物成長調整剤に分け, 各作物ごとに適用のある農薬名とその使用時期, 使用回数を分かりやすく一覽表としてまとめ, 付録として, 毒性及び魚毒性一覽表及び農薬商品名・一般名対比表を付した。農薬取扱業者の方はもちろんのこと病害虫防除に関係する方の必携書として好評です。