

## ライボザイムを利用したイネ萎縮ウイルスの防除法

### Ribozyme-mediated protection against rice dwarf virus

代表研究者 秋田県立農業短期大学附属生物工学研究所講師 鈴木 信弘  
Lecturer, Biotech. Inst., Akita Pref. College of Agriculture  
Nobuhiro Suzuki

Rice dwarf virus (RDV), transmitted by leafhopper, occurs in rice plants in Asia including Japan, Korea and China. RDV-infected plants show dwarf symptoms with white specks on foliage. RDV is a member of the Phytoreovirus genus, one of the six genera making up the family Reoviridae. RDV is characterized by the following properties: 1) RDV has a genome composed of 12-segmented double-stranded (ds) RNAs (S1-S12 termed in increasing order of electrophoretic mobility in acrylamide gel, 2) virus core particles contain the transcriptase which catalyze the synthesis of viral mRNA from the genomic RNA. We have recently analysed the nucleotide sequences of all the segments but S2, and then established the genome-product assignment. Furthermore, the largest segment, S1, of RDV has been shown to encode the key enzyme of the transcriptase.

In the present study, we attempt to design a ribozyme which digests the S1 mRNA and introduce it into rice plant in order to protect against RDV.

#### 研究目的

イネ萎縮ウイルス (rice dwarf virus, RDV) はわが国を含むアジアで発生するイネの重要病害ウイルスで、感染イネでは株全体の萎縮、葉の白斑、無効分けつなどの症状が現われる。RDV はレオウイルス科に属する球形ウイルスである。この科のメンバーは RDV の他には哺乳類動物に感染するロタウイルスなどがあり、これらのウイルスに共通の特徴は (1) ゲノムに 10-12 本の分節 2 本鎖 (ds)RNA を保有する、(2) ウイルス粒子内に dsRNA から 1 本鎖 (ss)RNA を合成する転写酵素を含む、ことである。RDV は、S1-S12 の分節ゲノム (分子量の大きい方から順に S1-S12 と名付けられている) を有し、近年これらセグメントの遺伝子構造解析が精力的に行われてきた。その結果、S1 がウイルスコア蛋白質をコードし、この蛋白質がウイルス複製に関与する RNA 依存 RNA ポリメラーゼであることが明らかとなった。

本研究では、ウイルス複製のキーエンザイム

(RNA 依存 RNA ポリメラーゼ, RDRP) をコードする S1 の mRNA に特異的に働くようにデザインされたライボザイムをイネ体内で発現させることによって、イネ萎縮病の防除を試みる。目的とする形質転換体では、たとえ RDV が感染したとしても導入されたライボザイムによってウイルス複製に必須の酵素である RDRP の mRNA が消化され、ウイルス複製が妨げられる。

#### 研究経過

##### I) 関連する領域での研究経過

私は、これまで RDV のゲノムセグメントの遺伝子解析を進めてきた。具体的には、粒子が保有する転写酵素を用いて合成した RDV-mRNA の cDNA ライブラリーを作製し、S2 を除く全セグメントの cDNA クローンを選抜した。cDNA を、また、mRNA を直接シーケンスすることによって各セグメントの全塩基配列を決定した。これらのセグメントの完全長 cDNA を転写ベクターにクローン化し、試験管内で転写産物を得た。これらの mRNA をコムギ胚芽抽出液で翻訳

することによって、S1, S3, S7 がそれぞれ 170 kDa, 114 kDa, 58 kDa のウイルスコア蛋白を、S4, S6, S9, S10, S11 がそれぞれ 83 kDa, 89 kDa, 56 kDa, 49 kDa, 35 kDa, 23 kDa の非構造蛋白をコードすることを明らかにした。S12 についてはトリファンクショナルに 33 kDa, 8 kDa, 7 kDa の非構造蛋白をコードすることを明らかにした。これらのデータは形質転換体のウイルス抵抗性を RNA・蛋白レベルで検定する際、不可欠である。

これらの成果は論文リストの 6)-8), 10), 11), 15), 16) を参照されたい。

## II) 本研究の経過

S1-mRNA (RDV の複製に関与する RNA 依存 RNA ポリメラーゼをコードする) が基質となるようにライボザイムを設計し、それが *in vitro* で酵素活性を有することを確認した。

(1) S1 の構造 (全塩基配列) を決定し、S1 が 4423 塩基対からなること、S1 に見いだされるオープンリーディングフレームは 1441 アミノ酸から成るウイルスコア蛋白をコードすること、さらにアミノ酸配列に照合により S1 コードの蛋白が RNA 依存 RNA 複製酵素であることを同定した。また、メジャーな ORF の上流に 7 アミノ酸コード可能なミニストロンも認められた。これらの結果は、論文リスト 14 で報告し、さらにウイルス学会で口頭発表の予定である。

(2) S1 の中からハンマーヘッド型ライボザイムの基質となりうる配列 (5'-GUX-3', X=A, C, U, S1 上では bases 2560-2584) を選び、ライボザイムをデザインした。なお、この領域は RDRP の四つのコンセンサス配列 (RNA 合成反応の活性中心と考えられている) にうち GDD モチーフを含む。

(3) デザインしたライボザイム (50 mer 程度) の相補的 DNA とさらにその逆鎖を DNA シンセサイザーを用いて合成した。

(4) 合成した DNA の両鎖をアニーリング後、転写ベクター (pBLUES CRIPT) に連結し、クローニングを行った。

(5) 組み替えフェージミドより、T3, T7 由来の DNA 依存 RNA ポリメラーゼを用いた *in*

*vitro* の系で転写産物 (デザインされたライボザイム) を得た。

(6) 基質となる S1 mRNA を RDV ウイルス粒子が保有する転写酵素を使用して *in vitro* 系で合成する。この系では S1 と同時に S2-S12 も合成される。また、S1 cDNA から S1 mRNA を合成した。

(7) (6) で合成した RDV-mRNA に (5) で得られたライボザイムを *in vitro* で処理し、S1-mRNA が切断されることをアクリルアミドゲル電気泳動によって確認した。

(8) カリフラワーモザイクウイルス由来の 35 S プロモーター、ポリアデニレーションサイトの間に設計したライボザイムの cDNA を保持したプラスミドを構築した。

(9) (8) と同様に選択マーカーのハイグロマイシンホストトランスフェラーゼ遺伝子を保持するプラスミドを構築した。

## 研究成果

RDV・S1 の一次構造を明らかにし、+鎖には長い ORF とそれに先行するミニストロンが存在することを明らかにした。長い ORF にコードされた RDRP をコムギ胚芽中で発現させ、その翻訳産物の SDS-PAGE の移動度からウイルスマイナーコア蛋白と同定した。

デザインしたライボザイムの活性を試験管内で検定した結果、Authentic な S1 mRNA に対しても、T3 ポリメラーゼで合成した S1 mRNA に対しても活性を示した。

## 意外な成果

無細胞蛋白合成実験結果からミニストロンの長い ORF 翻訳効率への影響を示唆するデータを得た。すなわち、ミニストロンの AUG を UUG に変えた変異型 S1 mRNA の方が野生型 S1 mRNA よりメジャー ORF にコードされた RNA ポリメラーゼの翻訳効率が高かった。

これまで RDRP の配列が明らかになっているレオウイルスメンバー (RDV, レオウイルス, ロタウイルス, ブルータングウイルス, RDV 以外は動物ウイルス) 進化的関係を調べた結果、RDV とロタウイルスが他に動物ウイルス間の関

係よりより近縁であるという分子進化学上極めて興味深いことが示された。

#### 今後の課題と発展

1991年度中にほぼ予定通りの成果を得た。現在、ウイルス抵抗性イネを作出すべく、ライボザイムと薬剤耐性遺伝子をエレクトロポレーションによって共導入し、プロトプラストからの再生を試みている。イネ形質転換体を得るためには、イネプロトプラストから植物体を高率に再生させる必要がある。この再生系の確立に苦慮しているのが現状である。未だどの研究室でも容易に成功しているという技術ではないので、イネプロトプラストへの外来遺伝子の導入については共同研究も考えている。実際の野外での試験では、ライボザイムの標的となるS1の領域が変異したウイルスストレインの出現も考慮しておく必要がある。

今後の発展性として、本研究によりイネ萎縮ウイルス耐病性イネの育種への応用が期待される。またRDVは、レオウイルス科に属するdsRNAウイルスである。これまで、ssRNA植物ウイルスの場合、そのキャプシド蛋白質の遺伝子をあらかじめ宿主植物に導入することで、ウイルス抵抗性が付与されることが証明されている（その作用機作は明らかでない）。一方、dsRNAウイルスの場合、粒子構造、感染、増殖過程がssRNAウイルスとは大きく異なり、同様の手法の応用が困難であると考えられており、新しい防除法の開発が期待されている。ライボザイムとRNA依存RNA合成酵素に着目した本手法が成功すれば、RDVと同じ遺伝子発現様式を有するほかのdsRNAウイルス（例えば、哺乳類動物感染性のレオウイルス、ロタウイルス、ブルータンングウイルスなど）への応用が期待される。

#### 論文リスト

- 1) Suzuki, N., Kudo, T., Shirako, Y., Ehara, Y. and Tachibana, T.: Distribution of cylindrical inclusion, amorphous inclusion and capsid protein of watermelon mosaic virus 2 in systemically infected pumpkin leaves. *J. of General Virology*, **70**, 1085-1091 (1989).
- 2) Suzuki, N., Shirako, Y. and Ehara, Y.: The use of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis to assess purification procedure of three poty-

viruses infecting cucurbitaceous plants. *Ann. Phytopathological Society of Japan*, **55**, 586-593 (1989).

- 3) Suzuki, N., Watanabe, Y., Kusano, T. and Kitagawa, Y.: Nucleotide sequence of rice dwarf virus segments 5. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 8858 (1989).
- 4) Suzuki, N., Shirako, Y. and Ehara, Y.: Isolation and serological comparison of virus-coded proteins of three potyviruses infecting cucurbitaceous plants. *Intervirology*, **31**, 43-49 (1990).
- 5) Aguan, K., Kusano, T., Suzuki, N. and Kitagawa, Y.: An improved method for the construction of high efficiency cDNA library in plasmid or lambda vector. *Nucleic Acid Research*, **18**, 1071 (1990).
- 6) Suzuki, N., Shirako, Y. and Ehara, Y.: A simple method for elimination of non-specific reactions in non-precoated and electroblot enzyme-linked immunosorbent assay procedures used for detection of zucchini yellow mosaic virus. *Ann. Phytopathological Society of Japan*, **56**, 337-341 (1990).
- 7) Suzuki, N., Watanabe, Y., Kusano, T. and Kitagawa, Y.: Sequence analysis of the rice dwarf phytoeovirus segment S3 transcript encoding for the major structural core protein of 114 kDa. *Virology*, **179**, 455-459 (1990).
- 8) Suzuki, N., Watanabe, Y., Kusano, T. and Kitagawa, Y.: Sequence analysis of the rice dwarf phytoeovirus genome segments S4, S5 and S6: Comparison with the equivalent wound tumor virus segments. *Virology*, **179**, 446-454 (1990).
- 9) Kusano, T., Sugawara, K., Inoue, C., Takeshima, T. and Suzuki, N.: Molecular cloning and expression of Thiobacillus ferrooxidans chromosomal ribulose biphosphate carboxylase genes in Escherichia coli. *Current Microbiology*, **22**, 35-41 (1991).
- 10) Suzuki, N. and Sugawara, M.: Outer capsid protein heterogeneity of rice dwarf phytoeovirus. *J. General Virology*, **72**, 2239-2242 (1991).
- 11) Suzuki, N., Harada, M. and Kusano T.: Molecular analysis of rice dwarf phytoeovirus S11 corresponding to wound tumor phytoeovirus S12. *J. General Virology*, **72**, 2233-2238 (1991).
- 12) Suzuki, N., Shirako, Y. and Ehara.: Reactivities of monoclonal antibodies to cylindrical inclusion, amorphous inclusion, and capsid proteins of watermelon mosaic virus 2. *Ann. Phytopathological Society of Japan*, **57**, 706-710

- (1991).
- 13) Aguan, K., Sugawara, K., Suzuki, N. and Kusano, K.: Isolation of genes encoding low-temperature-induced proteins in rice using a simple subtractive method. *Plant and Cell Physiology*, **32**, 1285-1289 (1991).
  - 14) Suzuki, N., Tanimura, M., Watanabe, Y., Kusano, T., Kitagawa, Y., Kudo, H. Uyeda, I. and Shikata, E.: 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 (1992).
  - 15) Suzuki, N., Sugawara, M. and Kusano, T.: Rice dwarf phytoreovirus segment S12 transcript is tricistronic *in vitro*. *Virology*, **191**, 992-995 (1992).
  - 16) Suzuki, N.: *In vitro* translation of rice dwarf phytoreovirus genome segments S4 to S10. *Archives of Virology* (in press).