

BNYVV(テンサイそう根病ウイルス)RNAゲノムのcDNAクローニング

誌名	てん菜研究会報 = Proceedings of the Sugar Beet Research Association
ISSN	09121048
著者	斉藤, 美奈子 原田, 竹雄 木口, 忠彦 木口, 忠彦 玉田, 哲男
巻/号	29号
掲載ページ	p. 44-49
発行年月	1988年9月

BNYVV (テンサイそう根病ウイルス) RNAゲノムのcDNAのクローニング

齊藤美奈子・原田竹雄・木口忠彦・玉田哲男

(北海道立中央農業試験場)

1. 緒 言

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)はテンサイそう根病の病原ウイルスであり、*Polymyxa betae*によって伝搬される¹³⁾。現在本病はヨーロッパを中心に広く分布し、被害が大きく、テンサイの重要な病害とされている。

BNYVVは、22kdの外被蛋白とシングルストランドプラス鎖RNAから成る桿状ウイルスであり、ウイルス粒子は長、中、短粒子をもち、系統によって短粒子の長さが異なる^{13) 15)}。

BNYVVのRNAゲノムについては、分子量の異なる4種類のRNAがあることがフランスの系統について調べられている^{11) 15)}。我々は、更に日本産BNYVVについてRNA成分を調べた結果、分子量 2.3×10^6 d (RNA1), 1.6×10^6 d (RNA2), 0.65×10^6 d (RNA3), 0.54×10^6 d (RNA4) およびそれより短い数個のRNAが検出されることを報告し、短いRNAが病原性に参与していることを明らかにした^{14) 16)}。

本研究では、日本産BNYVVについてウイルスの遺伝子を解析することと、cDNAをプローブとした診断技術を確認することとを目的として、ウイルスゲノムからcDNAを作成しクローニングを行った。

本実験を進めるにあたり、北海道大学農学部作物生理学教室の喜久田嘉郎教授にはご協力とご助言を賜ったので、お礼申しあげる。

2. 材料および方法

1) ウイルスの系統

供試ウイルスは、RNA1, RNA2, およびRNA4から成るS4分離株を用いた¹⁶⁾。

2) ウイルスの純化

ウイルスはツルナに接種し、接種後2-3週間の接種葉からウイルスを純化した。純化は玉田らの方法¹⁴⁾によって行った。

3) cDNAの作成とクローニング

BNYVV-RNAからのcDNAの作成は、GUBLER and

HOFFMAN⁴⁾の方法で行った。BNYVV-RNAは3'末端にポリA鎖をもつため、オリゴ(dT)セルロースカラムによってポリA分画のウイルスRNAを純化し、オリゴ(dT)をプライマーとして逆転写酵素によりRNAに相補的なDNA(ファースト・ストランドDNA)を作成した。次に、RNaseH(リボヌクレアーゼH)によりDNAと二重鎖を形成しているRNAを分解し、大腸菌DNAポリメラーゼIでRNAをDNAにおきかえて、セカンド・ストランドDNAを作成した。最後に、T4DNAポリメラーゼにより平滑末端のcDNAを完成させた。この二本鎖のcDNAを制限酵素HincIIで切断し、脱リン酸処理した⁹⁾プラスミドpUC19をライゲーションさせ⁵⁾、大腸菌TB-1を用いてクローニングを行った。

4) スクリーニング

スクリーニングは、ノザン・プロット・ハイブリダイゼーションとドット・プロット・ハイブリダイゼーションを用いた。HOLMES and QUIGLEYの方法(ラビッド・ポイリング・メソッド)⁶⁾によって取り出したクローンのDNAをニトロセルロースフィルター上にドット・プロットした⁹⁾。ノザン・プロットには、LEHRACHらの方法⁷⁾を用いた。即ち、RNAをホルマリン・ホルムアミドで変性して電気泳動し、ニトロセルロース・フィルター上にトランスファーして固定した。ハイブリダイゼーションには、プローブとなるDNAをパーオキシダーゼで酵素標識し、基質であるTMBZ(テトラメチルペンジジン)を加えて発色させて検出するRENZ and KURZの方法¹²⁾を用いた。

3. 結 果

1) cDNAの作成とクローニング

ファースト・ストランドとセカンド・ストランドの生成の効率を調べるため、それぞれの反応の終わりにサンプリングして電気泳動し、オートラジオグラムをとった(図1)。

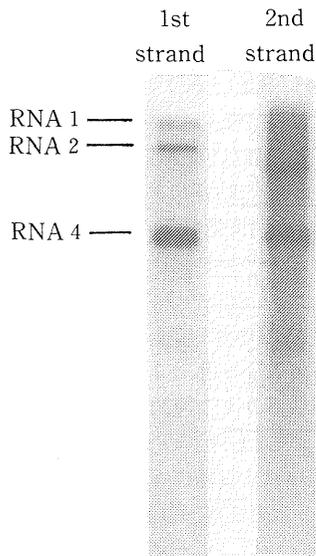


図1 cDNAのオートラジオグラム

ファースト・ストランドは、ほぼ完全に生成されていた。セカンド・ストランドについては、各RNA分子ともほぼ完全に生成されていたが、RNA1およびRNA2では、途中で反応止まっているものもあった。計算上、RNA5 μ gから約3 μ gのcDNAが生成されたことになる。

cDNAを含むプラスミドを大腸菌を用いてクローニングし、400個のコロニーが得られた。このうちの100個について、スクリーニングを行った。各クローンは、pMSD1~pMSD100と名づけた。

2) cDNAのサイズと特異性

得られたクローンについてノザン・プロット・ハイブリダイゼーションおよびドットプロット・ハイブリダイゼーションにより分析した。50個のクローンの分子量を求め、そのうちの4つのクローン(pMSD 8, 22, 25, 49,)のDNAをパーオキシダーゼで標識し、これをプローブとしてニトロセルロースフィルター上にトランスファーしたS4分離株の各RNAとハイブリダイズさせた。その結果、クローンpMSD8, 49はRNA1, pMSD25はRNA2, pMSD22はRNA4と特異的にハイブリダイズし、各RNAのバンドに発色が認められた(図2)。

次に、各RNA1, RNA2およびRNA4由来のクローンが得られたので、100個のクローンすべてをドット・プロットし、pMSD49, pMSD25, pMSD22のクロー

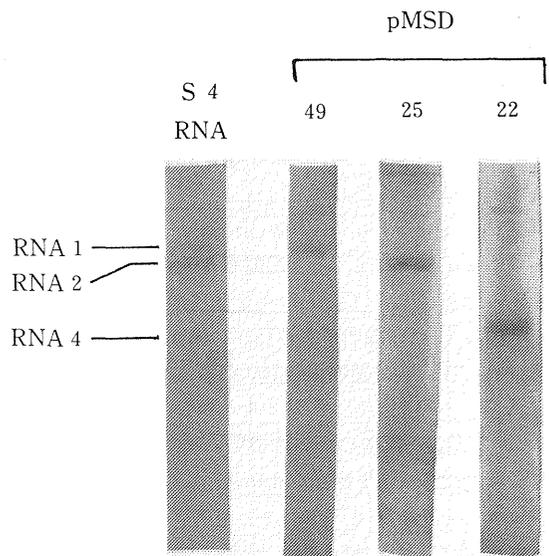


図2 ノザン・プロット・ハイブリダイゼーション

のDNAをプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、各クローンの由来を調べ、分子量を求めた。その結果、RNA1, RNA2, およびRNA4由来のクローンは、大きささまざまなが、ほぼ同数ずつ得られた。そのうちのいくつかを表1に示した。

RNA1からは、最大3.0kb (pMSD49), RNA2からは最大3.5kb (pMSD52), RNA4からは最大1.5kb (pMSD96)のcDNAが得られた。pMSD96はRNA4の分子量にほぼ一致し、全長と推定された。

3) 制限酵素によるcDNAクローンの解析

各RNA由来の5つのクローン, pMSD8, pMSD49, pMSD25, pMSD52, pMSD96については制限酵素によって解析し、すでに塩基配列が決定されているフランスの系統と比較した(図3)。

RNA1由来のpMSD8とpMSD49は、Accl・HincII・Sallの部位とAcclの部位が一致しているため、RNA1の3'末端寄りの中央部分からきていると考えられるが、他の制限酵素の部位が一致しなかった。RNA2由来のpMSD25とpMSD52は、EcoRIの部位が一致しているため、3'末端を含む部分からきていると考えられるが、pMSD52は、SstI, XbaIの部位が一致しなかった。RNA4由来のpMSD96は、BamHIの部位が一致しており、大きさも同じであった。

以上S4分離株から作られたRNA1, RNA2, RNA4のcDNAとフランスのF2分離株のRNA1, RNA2,

表1 各RNAとハイブリダイズしたcDNAクローンの大きさ

species	mol.wt (kb)	pMSD clone	kb
RNA-1	2.3x10 ⁶ (7.1)	8	2.8
		49	3.0
		100	2.6
RNA-2	1.6	25	1.7
		52	3.5
		90	3.0
RNA-4	0.54	22	1.1
		92	1.2
		95	1.4
		96	1.5

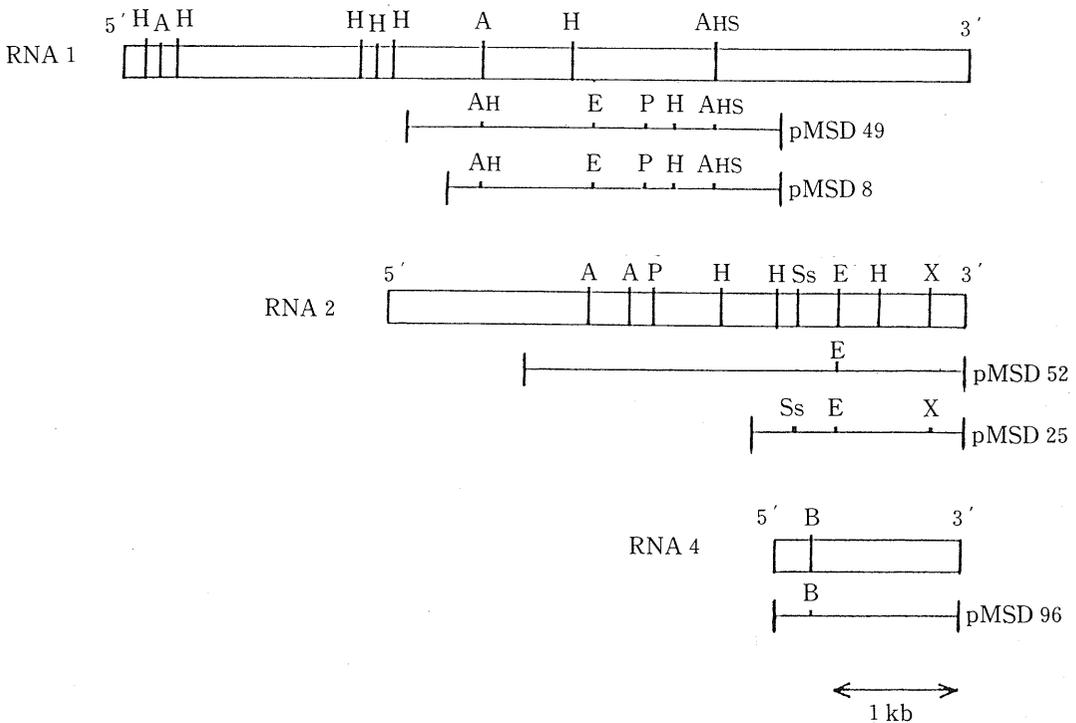


図3 制限酵素による各クローンの解析

RNA4との相同性を確かめるために制限酵素で解析したが、切断部位が一致しているクローンもあったが、一致しないクローンもあった。

4. 考 察

本実験の結果、日本産BANYVVのS4分離株から各RNAに由来するcDNAクローンを作成することがで

きた。S4分離株は、北海道斜里産病土 (S) より分離したもので、ツルナの単一局部病斑単離によって選抜を行った分離株の一つであり、RNA1, RNA2およびRNA4の3種類の異なったRNAが含まれている¹⁶⁾。RNA1からは最大3.0kb(完全長を7.1kbとすれば42%の部分)、RNA2からは最大3.5kb(完全長を4.8kbとすれば73%の部分)、RNA4からは最大1.5kbのクローンが得られた。このクローンは、サイズからRNA4のほぼ全長と推定せれる。これらのcDNAクローンは、ノザンブロットニングによって3種のRNAにそれぞれ特異的にハイブリダイズし、ドットブロットによってもお互いのクローンを区別できることがわかった。

ごく最近、BOUZOU BAA^ら¹⁾²⁾³⁾はフランス産BNYVVについてウイルスゲノムの解析を行い、同様に4種類のRNAについて全塩基配列を決定している。そこで本実験で得られたクローンについて、制限酵素解析で各クローンの切断部位を比較した。その結果RNA4由来の1.5kbのクローンはフランスのRNA4とサイズおよび切断部位も一致しており、ほぼ同じであると考えられる。しかしながら、RNA1とRNA2については一部一致しない箇所があり、これらの差異についてはさらに検討を要する。

最近ウイルスRNAに対するcDNAは、DNA-RNAの相補性を利用して、ウイルス間の比較やウイルスの検出のための有力な武器として利用され始めている。これは現在広く用いられている抗原抗体反応と比べて、ウイルスゲノムレベルの相同性についてもっとも詳細な情報が得られるからである。現在までのところBNYVVの系統間には血清的な差異は認められておらず、ELISA法など血清的手法によってウイルスの検出、診断が行われている。

本実験から、BNYVVのRNA1, RNA2およびRNA4は、塩基レベルで明らかに異なっており、ドットブロット法によって十分識別できることが判明した。RNA1はウイルスRNAの複製酵素(?)⁴⁾、RNA2は外被蛋白をコード³⁾しており、さらに短いRNA3とRNA4は病原性に関与していることが明らかにされている¹⁶⁾。このように個別の機能をもった核酸を識別し、検出するためにはcDNAプローブの手法は不可欠である。将来遺伝子診断技術の一つとしてエライザ法とともにそう根病の診断に利用できるかも知れない。本実験で用いたパーオキシダーゼ標識法は、従来の³²Pラベル法と比べて標識時間が短く、手法も簡単であったが、検出感度は従来の方法と比べてかなり低かった。しかし、ここで検討した条件で3種類のRNA

の識別が十分可能であった。検出のためのプローブの改良、さらにピオチンによる標識法などさらに高感度の検出法としての利用法について検討を加えたい。

5. 要 約

日本産Beet necrotic yellow vein virus S4分離株からウイルスRNAを抽出し、オリゴ (dT) セルロースカラムで純化し、オリゴ (dT) をプライマーとして逆転写酵素を用いてcDNAを作成した。このcDNAをプラスミドpUC19のHincII部位に挿入し、大腸菌TB-1を用いてクローニングを行った。

得られたクローン100個について調べたところ、サイズは分子量0.1~3.5kbの範囲であった。ノザンブロットとドットブロットハイブリダイゼーションによる解析の結果、RNA1, RNA2およびRNA4をそれぞれ識別できるクローンがほぼ同数ずつ得られた。RNA1からは最大3.0kb、RNA2からは最大3.5kb、RNA4からは1.5kbのcDNAクローンが得られ、1.5kbのクローンはほぼ完全長と考えられた。制限酵素による解析の結果、RNA4はフランス系統のRNAとほぼ一致していたが、RNA1, RNA2については一致しない部分もあった。

6. 参考文献

- 1) BOUZOU BAA, S., GUILLEY, H., JONARD, G., RICHARDS, K., and PUTZ, C. (1985) J. gen. Virol., 66 : 1553-1564.
- 2) BOUZOU BAA, S., QUILLET, L., GUILLEY, H., JONARD, G. and RICHARDS, K. (1987) J. gen. Virol., 68 :
- 3) BOUZOU BAA, S., ZIEGLER, V., BECK, D., GUILLEY, H., RICHARDS, K. and JONARD, G. (1981) J. gen. Virol., 67 : 1689-1770.
- 4) GUBLER, U. and HOFFMAN, J. (1983) Gene, 25 : 163-169.
- 5) HAYASHI, K., NAKAZAWA, M., ISHIZAKI, Y., HIRAOKA, N. and OBAYASHI, A. (1986) Nucleic Acids Res., 14 : 7617-7631.
- 6) HOLMES, D.S. and QUIGLEY, M. (1981) Anal. Biochem., 114 : 193-197.
- 7) LEHRACH, H., DIAMOND, D., WOZENY, J.M. and BOEDTKEK, R. (1977) Biochemistry, 16 : 4743-4751.
- 8) MANDEL, M. and HIGA, A. (1970) J. Mol.

- Biol.,53 : 159-162.
- 9) MANIATIS, T., FRITSCH, D.F. and SAMBROOK, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. pp545. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.
- 10) RENZ, M. and KURZ, C. (1984) Nucleic Acids Res., 12 : 3435-3444.
- 11) PUTZ, C. (1977) J. gen. Virol., 35 : 397-401.
- 12) SRICHARDS, K., JONARD, G., GUILLEY, H., ZIEGLER, V. and PUTZ, C. (1985) J. gen. Virol., 66 : 345-350.
- 13) TAMADA, T. (1975) CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No.144.
- 14) 玉田哲男, 阿部秀夫, 齊藤美奈子, 木口忠彦, 原田竹雄 (1987) てん菜研究会報 :
- 15) TAMADA, T. and BABA, T. (1973) Ann. Phytophath. Soc. Japan, 39 : 325-332.
- 16) 玉田哲男, 白子幸男, 原田竹雄, 齊藤美奈子, 阿部秀夫 (1987) 日植病報, 53 : 430.

Cloning of cDNA to beet necrotic yellow vein virus RNA (S4 isolate)

Minako SAITO, Takeo HARADA, Tadahiko KIGUCHI, Tetsuo TAMADA

Hokkaido Central Agric. Exp. Stn., Naganuma 069-13

Summary

Complimentary DNAs (cDNAs) were prepared by reverse transcription of S4 isolate of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) which consists of RNA-1, RNA-2 and RNA-4. The duplexes of these cDNAs were incorporated in the plasmid pUC19 and cloned into *E. coli* strain TB-1. The size of cDNA clones obtained was ranging 0.1kb to 3.5kb. In Northern blot hybridization and dot blot hybridization, the cDNA clones were divided into three groups, which hybridized specifically with each three RNA species, indicating that the clones correspond to RNA-1, RNA-2 and RNA-4. The largest size of the clones to RNA-1, RNA-2 and RNA-4 was 3.0kb, 3.5kb, and 1.5kb, respectively. The cDNA clone to RNA-4 was considered to be almost full-length. Restriction enzyme analysis revealed that our cDNA to RNA-4 had the same cleavage site as RNA-4 clone of French isolate. However, the clones to RNA-1 and RNA-2 did not always correspond with those of French isolates in some of the cleavage sites.