

# サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統 (SPFMV-S) のクローニング： 核封入体遺伝子より上流域のcDNAクローン

酒井淳一・\*田中正美・森 昌樹・花田 薫・\*\*宇杉富雄・西口正通

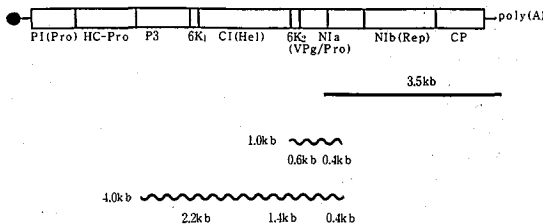
(九州農業試験場・\*熊本県農業研究センター・\*\*熱帯農業研究センター沖縄支所)

Jun-ichi SAKAI, Masami TANAKA, Masaki MORI, Kaoru HANADA, Tomio USUGI and Masamichi NISHIGUCHI : Molecular Cloning of the Genomic RNA of a Sweet Potato Feathery Mottle Virus Severs Strain (SPFMV-S) : cDNA Clones Covering the 5' Upstream Region of a Nuclear Inclusion Body Gene

サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系統 (SPFMV-S) はサツマイモ帯状粗皮病の病原ウイルスであり<sup>1)</sup>、ポティウイルスグループに属す。ポティウイルスは一本鎖の (+) 鎖RNAをゲノムとして持ち、まず巨大な前駆体ポリタンパク質が作られた後、各々の機能を持った短いタンパク質に切断される (第1図)。本ウイルスゲノムの3'末端より3.5kbのcDNA (第1図) については既にその全塩基配列を決定し、塩基配列から推定される外被タンパク質 (CP)、核封入体b (Nib) 及び核封入体aのプロテアーゼドメイン (Nla-Pro) のアミノ酸配列を明らかにし、既知のポティウイルスとの比較により、これらがいずれにもplum pox virus (PPV)<sup>2)</sup>と最も高い相同性を示すことを報告した<sup>3,4,5)</sup>。今回は上記cDNAの5'側上流域のクローニングを行い、目的とするcDNAクローンを得たのでここに報告する。

## 1. 研究方法

SPFMV-Sの純化は接種後10~14日のアサガオ葉を用い、宇杉ら<sup>6)</sup>の方法に従った。ウイルスRNAは純化ウイルスをSDS、プロテナーゼKで処理した後、フェノール抽出、あるいはショ糖密度勾配上に重層し超高速遠心分離によって精製した。クローニングは上記cDNAの5'末端から約250塩基下流の17塩基に相当する合成DNAをプライマーとしてGubler and Hoffman法<sup>7)</sup>により、ウイルスRNAから二本鎖にcDNAを合成した。これをプラスミドベクターpT7T3 (ファルマシア社) のEcoRI部位に挿入後、大腸菌JM109を形質転換しクローンを得た。シングルコロニー由来の大腸菌からプラスミドDNAを調製し、EcoRIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりcDNAの長さを確認した。塩基配列の決定は蛍光DNAシーケンサー (ABI社) を用い、ジデオキシ法により



第1図 ポティウイルスの遺伝子構造とSPFMV-SのcDNAクローニング領域を示す

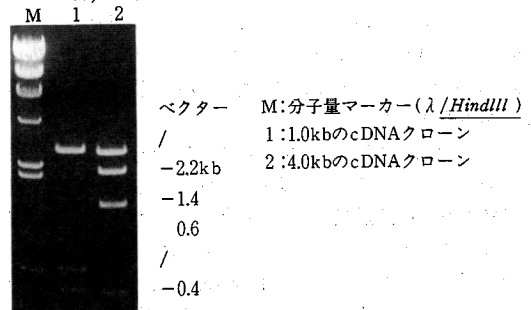
行った。

## 2. 結果及び考察

フェノール抽出したRNAを用いてクローニングを行い、最大で1.0kbのcDNAクローンを得た (第1図, 第2図)。次に、ショ糖密度勾配遠心分離により精製したRNAを用いて再度クローニングを行い、上記cDNAの一部をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより選抜した結果、最大で4.0kbのcDNAクローンを得られた (第1図, 第2図)。本cDNAの両末端の塩基配列を決定したところ、3'末端は3.5kbのcDNAとのオーバーラップ部分が完全に一致し、5'末端はPPV<sup>2)</sup>との比較からP3タンパク質 (P3) とヘルパー成分/プロテアーゼ (HC-Pro) との境界近傍に相当すると考えられた。

## 引用文献

- 1) 宇杉富雄・中野正明・大貫正俊・林 隆治：日植病報 56, 423, 1990.
- 2) Maisse, E., Timpe, U. Briske, A. Jelkmann, W. Casper, R. Himmler, G. Mattanovich, D. and Katinger, H.W.D. : J. gen. Virol. 70, 513-524, 1989.
- 3) 森 昌樹・酒井淳一・林 隆治・宇杉富雄・西口正通：日本分子生物学会年会講演要旨集 p.136, 1991.
- 4) 森 昌樹・酒井淳一・林 隆治・宇杉富雄・西口正通：日本農芸化学会誌 66, 487, 1992.
- 5) 森 昌樹・酒井淳一・林 隆治・宇杉富雄・西口正通：日植病報 58, 636, 1992.
- 6) 宇杉富雄・真岡哲夫・林 隆治：日植病報 58, 615-616, 1992.
- 7) Gubler, U. and Hoffman, B.J. : Gene 25, 263-269, 1983.



第2図 EcoRIで切断したプラスミドDNAのアガロースゲル電気泳動像