

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 竹嵌紋病毒缺失性 RNA 之研究

### Studies of defective RNAs of *Bamboo mosaic virus*

計畫編號：NSC89-2311-B-002-092

執行期限：89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：張雅君 執行單位：國立台灣大學植物病理學系

#### 一、中文摘要

為研究竹嵌紋病毒(*Bamboo mosaic virus*, 簡稱 BaMV)的缺失性 RNA, 本實驗室根據以往菸草原生質體接種實驗結果, 選擇增殖能力最佳的 D20 作為野生株, 構築四種 frame shift 突變株, 使終止碼提前出現; 如此即可在不影響 RNA 序列和二度結構下, 轉譯出不同長度之複製酵素。經菸草原生質體接種實驗證實, BaMV 缺失性 RNA 的轉譯架構長度必須不少於 99 個氨基酸, 才具有被增殖的能力, 且轉譯長度與其增殖能力成正相關。利用來自 BaMV 鞘蛋白基因或是以 EGFP 外來基因取代 D20 原有之轉譯架構, 雖然仍保有相似長度之轉譯架構, 但卻無法維持其增殖能力, 顯示除了轉譯架構的長度外, 轉譯架構中的序列部份亦有其重要性。將 D20 與無複製能力之 D20-CP 或 D20-EGFP, 與 BaMV 同時接種至菸草原生質體, 結果發現 D20 無法挽救兩者所喪失的能力。移除不同長度及不同區域之 D20 序列發現, 缺失性 RNA 至少需保有 BaMV 5'端 nt 1-551 與 3'端 nt 936-1118 之序列片段才能增殖; 當移除序列 nt 388-551 時會使 D20 增殖能力大幅下降, 因此其中應含有與增殖能力相關的序列(*cis-acting sequence*)。

**關鍵詞：**竹嵌紋病、竹嵌紋病毒、缺失性 RNA

#### Abstract

In order to study the defective RNAs (D RNAs) of *Bamboo mosaic virus* (BaMV), we chose D20, which had the highest level of accumulation in previous tobacco protoplast assay, as wild type to construct four frame shift mutants. These mutants with introduced pre-terminated stop codons had similar RNA sequences and secondary structures, but different length of open reading frame (ORF). The results indicated that the ORF of D RNAs must be no less than 99 amino acids in order to maintain their biological activities and the level of accumulation was correlated with the length of ORF. When the sequences of the ORF was replaced by BaMV coat protein (CP) gene or foreign EGFP gene, the mutants, D20-CP and D20-EGFP, were nonviable although their ORF lengths were similar to D20. The above results indicated that not only the lengths of the ORF but also the sequences within ORF are important for the accumulation of BaMV D RNA. When D20 were co-inoculated with D20-CP or D20-EGFP to test if it could complement the replication of both mutants, the

result was negative. According to the experimental results of D20 deletion mutants, the minimum sequences required for biological activities of BaMV D RNAs are from regions nt 1-551 and nt 936-1118. D20 mutants with nt 388-551 deleted greatly decreased the level of accumulation and suggested that these deleted sequences maybe contain *cis*-acting sequence of replication

**Keywords:** Bamboo Mosaic, BaMV, Defective RNA

## 二、計畫緣由與目的

病毒在寄主細胞內增殖時，由於複製過程發生錯誤，部分核酸序列未被複製或某些序列被重組(White and Morris, 1994)，使得一部分新產生的病毒喪失獨立複製的能力。這些有缺失的病毒往往要依賴正常的親源病毒(parental virus)或輔助病毒(helper virus)提供複製所需的酵素，才得以增殖(Morris and Knorr, 1990)。有缺失的病毒與正常病毒之間的競爭，常常會干擾後者的正常增殖(Schlesinger, 1988)。因此這些有缺失且具干擾能力之病毒，被稱為缺失干擾性病毒(defective interfering virus，簡稱 DI) (Huang and Baltimore, 1970)。若是這些有缺失的病毒不具干擾能力，則被稱為缺失性病毒(defective virus)。但對植物 RNA 病毒而言，這類核酸分子則較常被稱為缺失干擾性 RNA (defective interfering RNA，簡稱 DI RNA) (Hillman *et al.*, 1987)或缺失性 RNA (defective RNA，簡稱 D RNA) (White *et al.*, 1991)。

本省竹類的病毒病害主要是由竹嵌紋病毒(*Bamboo mosaic virus*，簡稱 BaMV)所引起。竹嵌紋病自從 1970 年代被發現報導之後(Lin *et al.*, 1977；林等，1979)，至少有 4 屬 14 種竹類曾遭受 BaMV 危害(Lin *et al.*, 1993; 1995；陳、盧，1995)，罹病竹株除了葉片出現黃綠相間之條紋型嵌紋外，竹筍及竹桿亦會出現褐色條斑，發筍率銳減，竹筍木質化，粗硬難食，失去商品價值(陳，1985；Lin and Chen, 1991)。從 1989 到 1992 年之調查顯示，本省竹專業栽培區多處罹病率高達 80% 以上(Yeh *et al.*, 1993)。由此可知，竹嵌紋病是台灣竹類作物最嚴重且急需解決的問題。

BaMV 為絲狀、單鏈正股之 RNA 病毒，其蛋白質外鞘由許多 28 kDa 的鞘蛋白螺旋排列而成，隸屬於 *Potexvirus* 屬(Lin *et al.*, 1992)。BaMV 的核酸序列已全部被解出(Lin *et al.*, 1994)，其基因體(genome)含有五個轉譯架(open reading frame，簡稱 ORF)，與其他 potexvirus 相似。由於 BaMV 是台灣特有又極具經濟重要性之植物病毒，在林納生、徐堯輝等人的共同努力下，已有相當傑出的研究成果。前幾年林納生實驗室純化 BaMV RNA 時，發現疑似缺失性 RNA 之分子，經選殖、核酸定序後，確定其所獲得之 cDNA 株來自 BaMV 的缺失性 RNA，其核酸序列之特性與三葉草黃化嵌紋病毒(*Clover yellow mosaic virus*，簡稱 CIYMV)之缺失性 RNA (White *et al.*, 1991) 組成相似，含有一融合轉譯架(fusion open reading frame)，具有合成 29.7 kDa 蛋白之能力，唯生物活性尚待證實。本實驗室繼續 BaMV 缺失性 RNA 的研究，從含有缺失性 RNA 之 BaMV 病毒顆粒中，選殖出 35 個含有 0.7-1.3 kb DNA 片段的 cDNA 株，並且完成 9 個 cDNA 株的核酸定序

與序列分析，証實皆為 BaMV 缺失性 RNA，其基因體由 BaMV 5'端序列及 3'端序列組合而成，皆具有一個轉譯架構。根據菸草原生質體接種實驗結果，至少有 6 株缺失性 RNA 具有被增殖的能力，且其增殖的能力與轉譯架構的存在有絕對相關性。

本計劃主要之目的是利用先前所獲得之 BaMV 缺失性 RNA 為研究工具，以了解缺失性 RNA 複製、被病毒鞘蛋白包被，或在植物體內系統性移動時所必須具備的核酸序列，由此可進一步推論 BaMV 病毒之相關核酸序列。此外，探討其融合轉譯架對 BaMV 缺失性 RNA 之義意及重要性；若此缺失性 RNA 有干擾 BaMV 增殖之現象，則可對所謂的缺失干擾性 RNA 的干擾機制作深入研究。

### 三、結果與討論

根據本實驗室之前的實驗結果，我們以複製能力最佳的 D20 作為野生株，利用定點突變法(site-directed mutagenesis)構築各種 frame shift 突變株，使終止碼(stop codon)提前出現；如此即可在不影響 RNA 序列和二度結構下，轉譯出不同長度之複製酵素(White *et al.*, 1992; Pogany *et al.*, 1997)。目前共獲得 D20-51pml、D20-73nco、D20-99nco 及 D20-262nco 等四種突變株；預期之轉譯產物分別為 51 個氨基酸、73 個氨基酸、99 個氨基酸、以及 262 個氨基酸。此外，以完整的 BaMV 鞘蛋白基因和 EGFP 基因分別取代 D20 原有的轉譯架，構築出 D20-PC 和 D20-EGFP 兩種突變株。由於菸草原生質體接種實驗結果可知，BaMV 缺失性 RNA 的轉譯架構長度必須不少於 99 個氨基酸，才具有被增殖的能力，且轉譯長度與其增殖能力成正相關。但是 D20-PC 和 D20-EGFP 雖然仍保有相似長度之轉譯架構，但卻無法維持其增殖能力，顯示除了轉譯架構的長度外，轉譯架構中的序列部份亦有其重要性。由此可推論複製酵素基因 5'端之產物似乎對 BaMV 缺失性 RNA 之複製有決定性的影響。我們利用 BaMV 複製酵素 N 端的抗血清，以 Western blotting 檢測 D20 與各種 frame shift 突變株在 wheat germ 生體外轉譯系統中，可否產生預期大小之蛋白產物。目前結果顯示 D20 與 D20-262nco 皆能產生預期大小的產物，但其餘的 frame shift 突變株，可能因為產物太少，結果不明顯。除此之外，我們亦將 D20 與無複製能力之 D20-CP 或 D20-EGFP，與 BaMV 同時接種至菸草原生質體，探討 D20 是否能協助 D20-CP 或 D20-EGFP 進行複製；結果發現 D20 無法挽救兩者所喪失的能力。換言之，D20 如果能在寄主植物體內產生複製酵素之 N 端部份蛋白，亦只能作用在自己本身，而無法作用在其他缺失性 RNA 分子上。同樣以 D20 作為野生株，構築不同長短的 D20 刪除突變株(deletion mutant)，目前已獲得 Dpd1、Dpd2、Dpd3、Dpd4 及 Dpd5 等五種不同長度序列移除突變株，這些突變株保留有原來 D20 中來自 BaMV 3'部份之完整序列，但是移除了 D20 中來自 BaMV 5'端部份之不同長度序列。由核酸定序及序列分析証實 Dpd1 移除了 D20 中 nt 706-935 之間的序列；Dpd2 移除了 D20 中 nt 552-869 之間的序列；Dpd3 移除了 D20 中 nt 388-869 之間的序列；Dpd4 移除了 D20 中 nt 243-867 之間的序列；及 Dpd5 移除了 D20 中 nt 95-869 之間的序列。此外，構築 DM-II、DM-III 以及 DM-IV 等三個 D20 不同區域序列移除突變株，經由核酸定序及序列分析証實這些突變株保留有原來 D20 中來自 BaMV 3'部份之完整序列，但是移除了 D20 中來自 BaMV

5'端部份之不同區域片段之序列；其中 DM-II 移除了 D20 中 nt 243-385 之間的序列，其可能之轉譯產物為 172 個氨基酸；DM-III 移除了 D20 中 nt 388-551 之間的序列，其轉譯產物為 165 個氨基酸；以及 DM-IV 移除了 D20 中 nt 554-702 之間的序列，其轉譯產物亦為 165 個氨基酸。綜合分析菸草原生質體實驗結果發現 BaMV 缺失性 RNA 複製時至少需保有 BaMV 5'端 nt 1-551 與 3'端 nt 936-1118 之序列片段才能增殖；當移除序列 nt 388-551 時會使 D20 增殖能力大幅下降，因此其中應含有與增殖能力相關的 *cis*-acting sequence。

#### 四、計畫成果自評

本計畫主要目的為利用先前所獲得之 BaMV 缺失性 RNA 為研究工具，以了解缺失性 RNA 複製、被病毒鞘蛋白包被，或在植物體內系統性移動時所必須具備的核酸序列。目前結果顯示 BaMV 缺失性 RNA 之轉譯架構不能被其他基因取代，轉譯架構長度與其轉譯架構中的序列皆會影響缺失性 RNA 的增殖能力。缺失性 RNA 至少需保有 BaMV 5'端 nt 1-551 與 3'端 nt 936-1118 之序列片段才能增殖；當移除序列 nt 388-551 時會使 D20 增殖能力大幅下降，因此其中應含有與增殖能力相關的 *cis*-acting sequence。因此本計畫之研究成果除了有學術價值可發表在學術期刊外，所獲得之基本資料未來可應用於構築以 BaMV 缺失性 RNA 為基礎之載體，以轉殖竹株而防治竹嵌紋病。

#### 五、參考文獻

林納生、陳脈紀、江濤、林維治。1979。台灣竹類嵌紋病之初步研究。台灣林試所試驗報告第 317 號。

陳滄海。1985。竹類嵌紋病病原病毒之鑑定。植保會刊 27:111-116。

陳滄海、盧耀村。1995。台灣竹嵌紋病病毒特性及生態學之探討。植病會刊 4:83-90。

Hillman, B. I., Carrington, J. C., and Morris, T. J. 1987. A defective interfering RNA that contains a mosaic of a plant virus genome. *Cell* 51:427-433.

Huang, A. S., and Baltimore, D. 1970. Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226:325-327.

Lin, M. T., Kitajima, E. W., Cupertino, F. P., and Costa, C. L. 1977. Partial purification and some properties of bamboo mosaic virus. *Phytopathology* 67:1439-1443.

Lin, N.-S., Chai, Y.-J., Huang, T.-Y., Chang, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1993. Incidence of bamboo mosaic potexvirus in Taiwan. *Plant Dis.* 77:448-450.

- Lin, N.-S., and Chen, C.-C. 1991. Association of bamboo mosaic virus (BoMV) and BoMV-specific electron-dense crystalline bodies with chloroplasts. *Phytopathology* 81:1551-1555.
- Lin, N.-S., Lin, B.-Y., Lo, N.-W., Hu, C.-C., Chow, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1994. Nucleotide sequence of the genomic RNA of bamboo mosaic potexvirus. *J. Gen. Virol.* 75:2513-1518.
- Lin, N.-S., Lin, B.-Y., Yeh, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1995. First report of bamboo mosaic virus and its associated satellite RNA on bamboo in the U. S. *Plant Dis.* 79:1249.
- Lin, N.-S., Lin, F.-Z., Huang, T.-Y., and Hsu, Y.-H. 1992. Genome properties of bamboo mosaic virus. *Phytopathology* 82:731-734.
- Morris, T. J., and Knorr, D. A. 1990. Defective interfering RNAs associated with plant virus infections. In "New Aspects of Positive-Strand RNA Viruses" (M. A. Brinton and F. X. Heinz, eds.), pp. 123-127. Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C.
- Pogany, J., Romero, J., and Bujarski, J. J. 1997. Effect of 5' and 3' terminal sequences, overall length, and coding capacity on the accumulation of defective RNAs associated with broad bean mottle bromovirus *in planta*. *Virology* 228:236-243.
- Schlesinger, S. 1988. The generation and amplification of defective interfering RNAs. In "RNA Genetics. Retroviruses, Viroids and RNA Recombination" (E. Domingo, J. J. Holland and P. Ahlquist, eds.), Vol. 2, pp. 167-185. CRC Press, Boca Raton, FL.
- White, K. A., Bancroft, J. B., and Mackie, G. A. 1991. Defective RNAs of clover yellow mosaic virus encode nonstructural/coat protein fusion products. *Virology* 183:479-486.
- White, K. A., Bancroft, J. B., and Mackie, G. A. 1992. Coding capacity determines in vivo accumulation of defective RNA of clover yellow mosaic virus. *J. Virol.* 66:3069-3076.
- White, K. A., and Morris, T. J. 1994. Nonhomologous RNA recombination in tombusviruses: Generation and evolution of defective interfering RNAs by stepwise deletions. *J. Virol.* 68: 14-24.
- Yeh, C.-C., Cheng, A.-H., and Hwang, H.-Y. 1993. Indexing of bamboo mosaic virus and propagation of virus-free bamboo. In "Proceedings of the Symposium on Plant Virus and Virus-like Diseases, Council of Agriculture, Plant Protection Series No. 1." (R.-J. Chiu and Y.

Yeh, eds). pp. 275-281. Council of Agriculture, Taiwan.