特集2: RNA ウイルス研究の新展開

5. 昆虫小型 RNA ウイルス外被蛋白質遺伝子の
AUG コドンを紹介しない翻訳開始中島 信彦, 佐々木 潤¹⁾

(農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所生体情報部)

はじめに

昆虫に感染する小型 RNA ウイルスの一群の中に、昆虫ピコルナ様ウイルスと呼称されているウイルスがある。これらは直径約30nmの球状粒子で、一本のプラス鎖 RNA をゲノムとし、分子量約3万の主要な3種類の外被蛋白質を持つ^{17,29)}。現在までに、鱗翅目・半翅目・直翅目・膜翅目・双翅目などの主要な分類群に属する幅広い昆虫から約40種が分離されている¹⁾。しかし、1996年までゲノムの全塩基配列が明らかにされたものがなく、分類上の正確な位置づけはなされていなかった。1997年末以降、相次いで6種類の昆虫ピコルナ様ウイルスの全ゲノム塩基配列が報告され(表1)、その中には脊椎動物や植物のピコルナウイルス類とは異なるゲノム構造上の特徴を持つものが含まれていることが明らかになった。ピコルナウイルス類はゲノム上に一個の長大なオープンリーディングフレーム(ORF)を持ち、その5'側に外被蛋白質遺伝子を、3'側にヘリカーゼ・プロテアーゼ・RNA 依存

性 RNA ポリメラーゼの順に複製酵素類を持っている。また、ゲノム5'側の非翻訳領域には、IRES (Internal Ribosome Entry Site) と呼ばれるキャップ構造非依存的に翻訳を開始する配列を保持している。ここに進入したリボソームによってポリ蛋白質を合成、それをウイルス自身がコードするプロテアーゼにより切断し、個々の蛋白質が産生される。これに類似したゲノム構造をもつ昆虫ピコルナ様ウイルスは現在の所 IFV⁸⁾のみで、ほかの昆虫ピコルナ様ウイルスはすべて2個のORFを持ち、外被蛋白質遺伝子をゲノム3'側に持っている。それらの中のDCV, RhPV, PSIV, HiPV はゲノム構造上、今までに知られているいずれの分類群のウイルスとも異なる特徴を共有している。通常、外被蛋白質遺伝子をゲノム3'側に持つプラス鎖 RNA ウイルス(トガウイルス、カリシウイルス等)はサブゲノム RNA を合成してそれから外被蛋白質の翻訳を行う³⁰⁾。ところがこの4種の昆虫ウイルスでは、感染組織中に外被蛋白質遺伝子のサブゲノム RNA が検出されない。従って、ゲノムサイズの RNA から外被蛋白質を翻訳していると考えられる。また、外被蛋白質遺伝子には有効な AUG 翻訳開始コドンが存在しない。本稿では、我々が PSIV の外被蛋白質遺伝子の特異な翻訳機構を解析するために行った実験の結果を中心に述べる。昆虫ピコルナ様ウイルスのゲノム構造全般については昨年の本誌、第48巻第1号にまとめられているため¹⁾、あわせて御参照いただきたい。

ショウジョウバエ C ウイルス (DCV) とコオロギ
麻痺病ウイルス (CrPV) の研究歴

DCV と CrPV は、ゲノム RNA に VPg と poly(A) がついており、外被蛋白質の中に分子量が小さい VP 4 様のものが含まれることから、昆虫ピコルナウイル

Translation mechanism of the capsid protein gene of the insect small RNA viruses

Nobuhiko Nakashima and Jun Sasaki

National Institute of Sericultural and Entomological Science

Owashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan

〒305-8634 つくば市大わし1-2

TEL: 0298-38-6109 FAX: 0298-38-6028

Email: nakaji@nises.affrc.go.jp

1) Present address: Department of Virology and Parasitology, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

現住所: 藤田保健衛生大学医学部 ウイルス・寄生虫学講座
〒470-1192 愛知県豊田市杣掛町田楽ヶ窪1-98

表1 塩基配列が決定された昆虫ピコルナ様ウイルス

ウイルス名 (和名)	分離昆虫	外皮蛋白質遺伝子の ゲノム上の位置	ゲノム上の ORF の数	文献
Infectious flacherie virus (IFV) (伝染性軟化病ウイルス)	カイコ	5' 側	1	8)
Acyrtosiphon pisum virus (APV)	アブラムシ	3' 側	2	32)
Drosophila C virus (DCV) (ショウジョウバエ C ウイルス)	ショウジョウバエ	3' 側	2	11)
Cricket paralysis virus (CrPV)* (コオロギ麻痺病ウイルス)	コオロギ	3' 側	(2 ?)	12)
Rhopalosiphum padi virus (RhPV)	アブラムシ	3' 側	2	16)
Plautia stali intestine virus (PSIV) (チャバネアオカメムシ腸管ウイルス)	カメムシ	3' 側	2	27)
Himetobi P virus (HiPV) (ヒメトビウンカ P ウイルス)	ウンカ	3' 側	2	21)

*CrPV では 3' 側 約1600塩基のみが報告されている。

スと呼称されてきた。バクタマイシン（真核細胞の翻訳開始阻害剤）を用いたウイルス蛋白質の標識実験により、外被蛋白質が感染後早い時期に合成されることが確認され、ゲノムの上流側に外被蛋白質遺伝子があると予想された²⁴⁾。しかし、当時は、哺乳類のピコルナウイルスでは外被蛋白質前駆体と複製酵素類前駆体がほぼ同じモル比で合成されることに對し、CrPV と DCV では複製酵素類に比較して、外被蛋白質が大量に合成される理由については不明であった¹⁷⁾。さらに1987年にCrPV ゲノム 3' 側1600塩基の配列が報告され、予想されるアミノ酸配列の中に RNA ポリメラーゼのコアモチーフの一つ、GDD 配列が含まれていたことから、CrPV のゲノム構造もピコルナウイルスと同様、外被蛋白質遺伝子がゲノム 5' 側にコードされ、複製酵素類が 3' 側にあると思われるようになってしまった¹²⁾。ところが、1992年にCrPV 3' 側の遺伝子は脊椎動物のピコルナウイルスの外被蛋白質遺伝子と相同性があり、昆虫ピコルナウイルスのゲノム構造はカリシウイルスに近いかもしれないと報告され¹³⁾、昆虫ピコルナ様ウイルスのゲノム構造に関してはごく最近まで再考を要する状態であった³⁾。

チャバネアオカメムシ腸管ウイルス (PSIV) のゲノム構造

このウイルスは、福岡県農業試験場で飼育中に死亡したチャバネアオカメムシから分離された³¹⁾。その後、精製ウイルス粒子を摂食させたカメムシの体内におけるウイルス増殖部位を ELISA 法で調べた結果から、そのウイルスはチャバネアオカメムシ腸管ウイルス

(Plautia stali intestine virus, PSIV) と呼称されている²⁰⁾。精製した PSIV 粒子の物理化学的性状から、昆虫ピコルナ様ウイルスと判断し、ゲノムの全塩基配列を決定した。実はほぼ同じ時期に、オーストラリアでショウジョウバエから分離した DCV、アメリカでアブラムシの RhPV の塩基配列解析がなされ、相前後して ORF を 2 個持つ昆虫ピコルナ様ウイルスの配列データが公表された^{11, 16, 27)}。

ここで述べる PSIV のゲノム構造上の特徴は、基本的に DCV, RhPV, HiPV にも共通している。PSIV のゲノム RNA は poly (A) 部分を除いて、8797塩基である (図 1 A)。5' 側非翻訳領域は570塩基でその中には約10個の AUG コドンが含まれていることから、脊椎動物のピコルナウイルスのように、この部分に IRES を持っている可能性がある。ORF 1 には非構造蛋白質がコードされており、5' 側からヘリカーゼ・プロテアーゼ・RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの順番で共通保存配列が認められる。外被蛋白質前駆体のコード領域は、精製粒子から SDS-PAGE で分離したそれぞれの外被蛋白質 (35kDa (VP 0), 33kDa (VP 1), 30kDa (VP 2), 26kDa (VP 3), 4.5kDa (VP 4)) の N 末アミノ酸配列をエドマン法で決定し、ゲノム上にマップした。この結果から、外被蛋白質前駆体遺伝子に有効な AUG 翻訳開始コドンが存在しないことがわかった。さらに、PSIV の感染組織中に外被蛋白質遺伝子のサブゲノム RNA が検出されないことも確認され、PSIV はカリシウイルスとも異なる。ORF 1 の終止コドンから外被蛋白質前駆体コード領域の 5' 端まで約190塩基の非翻訳領域が存在する²⁷⁾。

図 1 (A) PSIV の構造。(B) PSIV 外被蛋白質遺伝子の翻訳様式を解析するために作成した、ジストロニック RNA 転写用のプラスミド (pT7CAT-5375) の構造。(C) pT7CAT-5375 から転写した RNA のウサギ網状赤血球ライセート中での翻訳におけるキャップ構造の影響。(D) PSIV 外被蛋白質遺伝子の翻訳開始位置を決めるために作成した部位特異的な変異体の変異導入部位 (塩基配列上部の数値はゲノム上の位置を表す) と、それらからの翻訳産物 (E)。

PSIV の外被蛋白質は IRES を介して翻訳される

PSIV の 2 個の ORF は同じ読み枠上にあり、全コード領域上を通して、ORF 1 の終止コドンが 1 個あるのみで、ORF 1 の終止コドンと外被蛋白質前駆体の N 末に相当するコドンとの間には、AUG コドンも存在しない。このストップコドンさえなければ、ORF 1 のはじめから ORF 2 の終了点まで、同一の読み枠で ORF が開いてしまうのである。我々は当初、「ピコルナウイルスのゲノム上の ORF は一個である」という大原則に影響され、この終止コドンのリードス

ルーを想定して *in vitro* での翻訳実験を行った。PSIV ゲノムの 17 塩基目から 7096 塩基目までを含む cDNA のうち、1364 から 5374 塩基の約 4000 塩基を欠落させた cDNA を T7 プロモーター配列の下流に挿入したプラスミドを作成し、その転写 RNA の翻訳産物を解析した。もし ORF 1 の終止コドンのリードスルーが起きているのならば、約 85kDa の翻訳産物が検出されるはずであった。ところが想定に反して、約 39kDa の翻訳産物しか検出されなかった。この 39kDa 産物は精製 PSIV 粒子に対する抗体と反応することから、外被蛋白質の一部であることが分かった。さらに外被

図2 PSIV, HiPV, DCV, RhPV の外被蛋白質コード領域 (太字) 上流域の塩基配列
 双方向の矢印は各ウイルスで保存されている相補的配列の位置を示す。

蛋白質遺伝子コード領域の上流を欠落させた場合には、外被蛋白質の翻訳が全く起きなくなることから、ピコルナウイルスでよく知られている IRES の存在が示唆された²⁷⁾。

次に外被蛋白質の翻訳効率に対するキャップ構造の影響を調べるために、上流に CAT 遺伝子、下流に外被蛋白質遺伝子を持つジストロニック RNA を合成した (図 1 B)。RNA 5' 端のキャップ構造の有無、及びにキャップ依存性翻訳の競合的阻害剤であるキャップアナログ (m7 GTP) の翻訳反応液中への添加の有無による両シストロンの翻訳量を調査した。第 1 シストロンの CAT 遺伝子は翻訳効率にキャップ構造の影響を受けるのに対し、第 2 シストロンの外被蛋白質遺伝子はその影響を受けなかった (図 1 C)。従って、PSIV の外被タンパク質遺伝子はジストロニックの状態でもキャップ構造非依存的に翻訳されることが判明し、IRES を介して翻訳されることが分かった²⁶⁾。

PSIV 外被蛋白質遺伝子の翻訳開始コドンの同定

PSIV の外被蛋白質遺伝子は上流のシストロンとは独立に、キャップ構造非依存的に翻訳されることから IRES を介して翻訳されるという結論が得られた。次に問題となるのはこの IRES を介した翻訳の翻訳開始点である。上述したように、PSIV ORF 1 の終止コドンから外被蛋白質遺伝子コード領域の 5' 端までの間には終止コドンも AUG コドンもない。そこで、翻訳開始点の上流に終止コドンをいれても外被蛋白質の翻訳開始にさほど影響はないと考え、部位特異的突然変異法によって人工的に終止コドンを上流域に挿入したプラスミドからの転写物の翻訳産物の解析を行った (図 1 D,E)。外被蛋白質遺伝子前駆体の N 末に相当する CAA コドンの 7 および 3 コドン上流の UGU と AUC コドンをそれぞれ UGA と UAA 終止コドンに変えた場合には、変異を入れていない pT7 CAT-

5375 (レーン 1) と比較して外被蛋白質遺伝子の翻訳量に変化はなかった (レーン 2, 3)。2 コドン上流の UCA を UGA にした場合には翻訳量が減少した (レーン 4) が、この場合にも外被蛋白質の翻訳は起きているため、開始コドンはそれより下流の CUU か CAA コドンということになる。次に 1 コドン上流の CUU を UAA 終止コドンにした場合には翻訳産物は全く検出されなかった (レーン 5)。この結果は、CUU コドンが開始コドンであるか、または CAA が開始コドンなのだが、CUU コドンを UAA に変異させたことによって翻訳開始が阻害されたかのどちらかを意味する。そこで次に、CUU の直下に 1 塩基 (C) を挿入して読み枠を CUU からずらしたものと、さらにその下流で 1 塩基欠失させて読み枠を CUU に戻したクローンを作成した (図 1 D-6, 7)。それらの翻訳効率を調べたところ、CUU 直下に 1 塩基挿入しても下流で読み枠を戻してやれば翻訳産物を再び検出できるようになった (レーン 6, 7) ことから、CUU が翻訳開始コドンであると考えられた²⁶⁾。

PSIV 外被蛋白質 IRES の領域

哺乳類のピコルナウイルスのゲノム 5' 側にある IRES の長さは約 500 塩基である。PSIV の外被蛋白質遺伝子上流の IRES の活性保持に必要な領域を決めるために、ジストロニック RNA の外被蛋白質遺伝子上流域を欠失させた RNA を作成し、IRES の 5' 側境界を調査したところ、5951 から 6001 塩基の間に境界が存在した。3' 側は CUU コドンの下流に外被蛋白質遺伝子の代わりにルシフェラーゼ遺伝子を挿入していき、6196 から 6201 塩基目までの間に境界が存在する事を確認した。従って、PSIV の IRES は長くとも 252 塩基あれば翻訳開始を行うことができることがわかった²⁶⁾。哺乳類のピコルナウイルス以外にも様々なウイルスで IRES の存在が明らかにされつつあるが、PSIV

の IRES はかなり短い部類に入る。また、C 型肝炎ウイルス同様、IRES 下流のコード領域も必要とされることも特徴の一つである^{25, 26)}。

リボソームスキャンによる翻訳開始時には PSIV の CUU コドンは機能しない

真核生物の細胞質で行われる翻訳の開始コドンには AUG が使われており、合成されるタンパク質の N 末にはメチオニンがついている。メチオニンと結合する tRNA には、翻訳開始用に使われる initiator tRNA とペプチド鎖の伸長反応に用いられる elongator tRNA の 2 種類が存在する。両者ともに AUG のアンチコドン配列をアンチコドンループに持つが、ほかの部分の塩基配列が異なるために、前者だけが eIF 2 と結合してリボソーム 40S サブユニットの P 部位に収まることのできる^{5, 23)}。initiator tRNA 以外の tRNA は翻訳開始複合体 (40S リボソームと eIF 3, eIF 2-GTP-initiator tRNA) を形成することができないため、メチオニン以外のアミノ酸から蛋白質が合成されることはなく、翻訳開始コドンとしては AUG が使われているのである。今までにその例外として CUG, GUG, ACG, AUU などの non-AUG 翻訳開始コドンの報告例^{2, 4, 6, 28)}があるが、これらはいずれも AUG とは 1 塩基しか違わない。その理由として、翻訳開始位置の特定にはスキャンしてきた翻訳開始複合体の中の initiator tRNA のアンチコドンループと mRNA 上の翻訳開始コドンとの塩基対形成が重要な役割を果たすため、せいぜい AUG とは 1 塩基違いの翻訳開始コドンしか自然界には存在せず、AUG とかけ離れたコドンは翻訳開始コドンとして機能しないと説明されている¹⁴⁾。non-AUG コドンから翻訳が始まる場合にも翻訳開始複合体の中には initiator tRNA が含まれているため、合成されるペプチドの N 末はメチオニンである。従って、今までに知られている non-AUG コドンによる翻訳開始では、それを AUG コドンに変異させると、翻訳効率が向上するのが普通である¹⁸⁾。

ところが PSIV の場合には、ジシストロニック RNA の状態で、CUU コドンを AUG に変えて翻訳させると、逆に外被蛋白質遺伝子の翻訳量が低下した (図 1 E レーン 8)。この結果は、PSIV の外被蛋白質の翻訳開始の様式が、現在までに知られている non-AUG コドンによる翻訳開始機構では説明できないことを示唆している。ここで、PSIV 外被蛋白質遺伝子の CUU コドンがリボソームスキャンによる翻訳開始時にも翻訳開始コドンとして機能するのかという疑問が生じた

ため、IRES の殆どの領域を欠失させた cDNA を作成し、モノシストロニック RNA の状態にして 5' 端からのリボソームスキャンによる翻訳を試みた。その結果、CUU はリボソームスキャンによる翻訳では開始コドンとして機能せず、IRES を介した翻訳開始時のみに機能することが判明した²⁶⁾。

他の昆虫ピコルナ様ウイルスとの外被蛋白質 翻訳開始機構の共通性

現在までに PSIV と同じようなゲノム構造を持つウイルスの塩基配列は DCV, RhPV, HiPV で決定されている。これらのウイルスはいずれも外被蛋白質遺伝子が 3' 側の独立した ORF 上にあり、それに対するサブゲノム RNA を合成せず、AUG 翻訳開始コドンも持っていない。従って、PSIV と共通した外被タンパク質の翻訳様式を持っていると推測される。PSIV の外被蛋白質遺伝子の翻訳開始コドンと考えられる CUU コドンの位置が外被蛋白質コード領域の 1 コドン上流であるというデータが得られた時点で、これら 4 ウイルスの外被蛋白質遺伝子の上流域の塩基配列のアライメントとその部分の二次構造予測を行った。すると、いずれのウイルスの場合もよく似たステムループ構造をこの領域にとり得ることが分かり、ループ構造中には 4 種のウイルスで共通した配列も存在する²⁶⁾。さらに各ウイルスで個々の配列は異なるが、CUU コドン (DCV と RhPV では CCU, HiPV では CUA) を含む 5 塩基に対する相補的な配列が、その約 25 塩基上流に保存されており、この部分がステムループ構造のループ部分に相当することがわかった (図 2)²⁶⁾。PSIV 外被蛋白質遺伝子を 5' 側からのリボソームスキャンで翻訳させた時に CUU コドンが翻訳開始コドンとして機能しない事と、その領域の二次構造予測の結果から、IRES を介した PSIV 外被蛋白質の翻訳開始時にはこの相補的な配列が CUU コドンの部分とシュドノットを形成して翻訳開始位置を決めているのではないかと考えられる。そこで、CUU コドン付近 (図 2 矢印 b) と、その上流のループ配列 (図 2 矢印 a) の部分に様々な変異を導入した cDNA を作り、それらから転写した RNA の外被蛋白質翻訳量を調査した。その結果、この部分の高次構造を阻害するような変異を導入すると翻訳量が減少し、相補性を回復させると翻訳量も回復することがわかった (未発表)。但し、両者の相補的な配列さえ保たれていればどのような配列でも良いというわけでもなく、PSIV 外被蛋白質遺伝子の効率的な翻訳開始に必要な条件について

は今後さらに検討する必要がある。

おわりに

IRES を介した翻訳開始は、ピコルナ (ポリオ) ウイルスで最初に発見され²²⁾、その後、他のウイルスや真核生物の mRNA にも IRES が存在することが指摘されている^{7,9,10)}。PSIV の外被蛋白質遺伝子の IRES は、脊椎動物のピコルナウイルスのものと比較して、ゲノムの中間部分に存在するという点と、翻訳開始に AUG コドンを必要としない点に特徴がある。1995 年版の ICTV レポート¹⁹⁾で昆虫ピコルナ様ウイルスはピコルナウイルス科の中の属名不詳のウイルスとして扱われていた。PSIV, DCV, RhPV, HiPV, CrPV の 5 種のウイルスは今回の ICTV レポートで新しいグループのウイルスとしてまとめられる予定である。これらのウイルスが 500塩基以上の 5' NCR を持っていることを考えると、非構造蛋白質も IRES を介して翻訳されている可能性が高いと思われる。これが証明されれば、かつて遺伝子工学的に作出されたジシストロニックピコルナウイルス¹⁵⁾が実在することになり、これらのウイルスは RNA ウイルス進化の上からも興味深い研究対象である。また、PSIV IRES の AUG コドンを介しない翻訳開始は、ウサギの網状赤血球ライセート中で起きるため、昆虫特異的あるいはウイルス特異的な因子は必須ではないと考えられる。従って、真核生物の mRNA の中にもこのような翻訳開始を行っている例があるのかも知れない。

文 献

- 1) 伴戸久徳, 伊澤晴彦 (1998) 昆虫ピコルナ様ウイルスのゲノム構造. ウイルス **48**, 89-96.
- 2) Boeck, R., Curran, J., Matsuoka, Y., Compans, R., and Kolakofsky, D. (1992) The parainfluenza virus type 1 P/C gene uses a very efficient GUG codon to start its C' protein. J. Virol. **66**, 1765-1768.
- 3) Christian, P. D., and Scotti, P. D. (1998) Picornalike viruses of Insects. In: The Insect Viruses. (ed. by Miller, L. K., and Ball, L. A.) Plenum Press, New York. pp301-336.
- 4) Curran, J., and Kolakofsky, D. (1988) Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. EMBO J. **7**, 245-251.
- 5) Drabkin, H. J., Estrella, M., and RajBhandary, U. L. (1998) Initiator-elongator discrimination in vertebrate tRNAs for protein synthesis. Mol. Cell. Biol. **18**, 1459-1466.
- 6) Hann, S. R. (1994) Regulation and function of non-AUG-initiated proto-oncogenes. Biochemie **76**, 880-886.
- 7) Iizuka, N., Chen, C., Yang, Q., Johannes, G., and Sarnow, P. (1995) Cap-independent translation and internal initiation of translation in eukaryotic cellular mRNA molecules. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **203**, 155-177.
- 8) Isawa, H., Asano, S., Sahara, K., Iizuka, T. and Bando, H. (1998) Analysis of genetic information of an insect picorna-like virus, infectious flacherie virus of silkworm: evidence for evolutionary relationships among insect, mammalian and plant picorna(-like) viruses. Arch. Virol. **143**, 127-143.
- 9) 磯山 毅, 白木和子 (1999) 真核生物の翻訳開始制御—最近の展開—. 蛋白質核酸酵素 **44**巻149-156.
- 10) Jackson, R. J., and Kaminski, A. (1995) Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. RNA **1**, 985-1000.
- 11) Johnson, K. N., and Christian, P. D. (1998) The novel genome organization of the insect picorna-like virus Drosophila C virus belongs to a previously undescribed virus family. J. Gen. Virol. **79**, 191-203.
- 12) King, L. A., Pullin, J. S. K., Stanway, G., Almond, J. W., and Moore, N. F. (1987) Cloning of the genome of cricket paralysis virus: sequence of the 3' end. Virus Res. **6**, 331-344.
- 13) Koonin, E. V. and Gorbalenya, A. E. (1992) An insect picornavirus may have genome organization similar to that of caliciviruses. FEBS Lett. **297**, 81-86.
- 14) Kozak, M. (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. Mamm. Genome **7**, 563-574.
- 15) Molla, A., Jang, S. K., Paul, A. V., Reuer, Q., and Wimmer, E. (1998) Cardiovascular internal ribosomal entry site is functional in a genetically engineered dicistronic poliovirus. Nature **356**, 255-257.
- 16) Moon, J. S., Domier, L. L., McCoppin, N. K., D'Arcy, C. J., and Hua, J. (1998) Nucleotide sequence analysis shows that Rhopalosiphum padi virus is a member of a novel group of insect-infecting RNA viruses. Virology **243**, 54-65.
- 17) Moore, N. F., Reavy, B., and King, L. A. (1985) General characteristics, gene organization and expression of small RNA viruses of insects. J. Gen. Virol. **66**, 647-659.
- 18) Muralidhar, S., Becerra, S. P., and Rose, J. A. (1994) Site-directed mutagenesis of adeno-associated virus type 2 structural protein initiation codons: effects on regulation of synthesis and bio-

- logical activity. *J. Virol.* **68**, 170–176.
- 19) Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D. (eds) (1995) *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of viruses*. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag, Wien New York.
- 20) Nakashima, N., Sasaki, J., Tsuda, K., Yasunaga, C., Noda, H. (1998) Properties of a new picorna-like virus of the brown-winged green bug, *Plautia stali*. *J. Invertebr. Pathol.* **71**, 151–158.
- 21) Nakashima, N., Sasaki, J., and Toriyama, S. (1999) Determining the nucleotide sequence and capsid-coding region of Himetobi P virus: A member of a novel group of RNA viruses that infect insects. *Arch. Virol.* (inpress)
- 22) Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**, 320–325.
- 23) RajBhandary, U. L., and Chow, C. M. (1995) Initiator tRNAs and initiation of protein synthesis. In: *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. American Society for Microbiology, Washington D. C. pp511–528.
- 24) Reavy, B., and Moore, N. F. (1983) The gene organization of a small RNA-containing insect virus: Comparison with that of mammalian picornaviruses. *Virology* **131**, 551–554.
- 25) Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carrol, A. R., Rowlands, D. J., and Jackson, R. J. (1995) Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.* **14**, 6010–6020.
- 26) Sasaki, J. and Nakashima, N. (1999) Translation initiation at the CUU codon is mediated by the internal ribosome entry site of an insect picorna-like virus in vitro. *J. Virol.* **73**, 1219–1226.
- 27) Sasaki, J., Nakashima, N., Saito, H., and Noda, H. (1998) An insect picorna-like virus, *Plautia stali* intestine virus has genes of capsid proteins in the 3' part of the genome. *Virology* **244**, 50–58.
- 28) Schmitz, J., Prufer, D., Rohde, W., and Tacke, E. (1996) Non-canonical translation mechanisms in plants: efficient in vitro and in planta initiation at AUU codons of the tobacco mosaic virus enhancer sequence. *Nucleic Acids Res.* **24**, 257–263.
- 29) Scotti, P. D., Longworth, J. F., Plus, N., Croizier, G., and Reinganum, C. (1981) The biology and ecology of strains of an insect small RNA virus complex. *Adv. Virus Res.* **26**, 117–143.
- 30) Strauss, E. G., Strauss, J. H., and Levine, A. J. (1996) Virus evolution. In: *Fields Virology 3rd ed.* (Fields B. N., Knipe D. M., and Howley P. M. ed.) Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pp.153–171.
- 31) 津田勝男, 中島信彦, 山中正博, 大平喜男, 河原畑勇 (1997) チャバネアオカメムシから分離されたウイルス様病原体の性状. *日本応用動物昆虫学会誌* **41**, 39–44.
- 32) Van der Wilk, F., Dulleman, A. M., Verbeek, M., and van den Heuvel, J. F. J. M. (1997) Nucleotide sequence and genome organization of *Acyrtosiphon pisum* virus. *Virology* **238**, 353–362.