



Title	イネ萎縮ウイルスゲノム転写産物の CDNA 合成
Author(s)	松村, 健; MATSUMURA, Takeshi; 上田, 一郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(2), 194-198
Issue Date	1988-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12093
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(2)_p194-198.pdf



イネ萎縮ウイルスゲノム転写産物の cDNA 合成

松村 健*・上田 一郎

佐野輝男・四方英四郎

(北海道大学農学部植物学教室)

(*北海道グリーンバイオ研究所)

(昭和63年6月7日受理)

cDNA Synthesis of Rice Dwarf Virus Transcripts

Takeshi MATSUMURA*, Ichiro UYEDA, Teruo SANO
and Eishiro SHIKATA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

(*Hokkaido Green-Bio Institute)

緒 言

植物 RNA ウイルスゲノムの cDNA を合成し、遺伝子レベルで解析する試みは、3' 末端にポリ A 鎖をもつウイルスが少ないことから立ち遅れていた。しかしながら、ポリ A ポリメラーゼの発見⁴⁾や、ランダムプライマーの開発⁵⁾などのクローニング技術の急速な進歩と共に近年では、ほとんどの植物ウイルスグループのクローニングに試みられる様になった。

イネ萎縮ウイルスは、植物レオウイルスに属し、12本に分節した二本鎖の RNA をゲノムとするウイルスである。更に粒子由来の転写酵素により各々に対応する mRNA を試験管内で合成する⁷⁾。そこで、イネ萎縮ウイルス粒子の遺伝子解析を目的として、この転写酵素を利用し、ゲノム RNA から転写された一本鎖 RNA の cDNA 合成及びそのクローニングを試みた。

実験材料及び方法

イネ萎縮ウイルスの *in vitro* 転写産物の調整

当研究室で継代保存しているイネ萎縮ウイルス感染イネより UYEDA and SHIKATA の方法⁶⁾でウイルスを純化した。純化ウイルスからの転写産物の試験管内合成は、UYEDA and SHIKATA の方法⁷⁾を用いて行った。

転写産物 3' 末端へのポリ A 鎖の付加

3' 末端へのポリ A 鎖の付加反応は、OHNO らの方法³⁾に準じて行った。反応に用いたポリ A ポリメラーゼは、

東京大学 岡田教授から分与された物を用いた。反応産物は、2% アガロースゲル電気泳動 (90 mM tris-90 mM boric acid-1 mM EDTA) で検定した。

一本鎖 cDNA 合成

一本鎖 cDNA 合成は、オリゴ dT 鎖をプライマーに用い、50 mM トリス塩酸緩衝液 (42°C で pH 7.9)、10 mM 塩化マグネシウム、30 mM 塩化カリウム、10 mM ジチオスレイトール、1 mM, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 7.4 pmol のポリ A 鎖を付加したイネ萎縮ウイルスゲノム転写産物、5 µg オリゴ dT プライマー、90 U RNasin (RNase 阻害剤) からなる反応液中に 52 U の逆転写酵素 (生化学工業) を加えて 42°C で 1 時間反応させた。cDNA 合成効率率は、反応液中に [α -³²P] dCTP を加え、計測される取り込み量から算出した。取り込み量は、酸不溶分画をトルエンシンチレーター中でアロカシンチレーションカウンターを用いて測定した。反応産物は、アルカリアガロースゲル電気泳動法²⁾で分析した。

二本鎖 cDNA 合成

二本鎖 cDNA 合成は、GUBLER and HOFFMAN¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、反応液中に、1.45 µg の合成された一本鎖 cDNA と転写産物のハイブリッド、10 µ Ci [α -³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) を加え、二本鎖 cDNA 合成効率を測定した。12°C、1 時間更に 22°C、1 時間反応させた後、反応産物を Sephadex G-50 パストールピペットカラムで精製した。

オリゴ dC 鎖の付加及び形質転換

合成された二本鎖 cDNA の各 3' 末端へのオリゴ dC 鎖の付加は、140 mM カコジル酸ナトリウム、30 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)、2 mM 塩化コバルト、0.2 mM ジチオスレイトール、0.25 mM dCTP 中に合成された二本鎖 cDNA と 4 U の terminal deoxynucleotidyl transferase を加え 30°C で行った。反応時間は、制限酵素 *Pvu II* で 1 カ所切断したプラスミド pBR 322 を用い、³H-dCTP の取り込み量から算出した。オリゴ dC 鎖を付加した二本鎖 cDNA は、プラスミド pBR 322 の *Pst I* 切断部位にオリゴ dG 鎖を付加したベクター (BRL 社製) 0.03 pmol とアニーリングした後、塩化カルシウム処理した大腸菌 HB 101 に取り込ませた。形質転換の方法は、MANIATIS ら²⁾ の方法に準じて行った。

実験結果

転写産物へのポリ A 鎖の付加

ポリ A 鎖付加反応 2 分、5 分、10 分の各試料を 2% アガロースゲル電気泳動した結果、反応時間が進むにつれて転写産物の各バンドがわずかに上方へ移動しているのがみられた (Fig. 1)。この結果は、転写産物の 3' 末端にポリ A 鎖が付加されていくにつれて移動度が遅くなったためである。

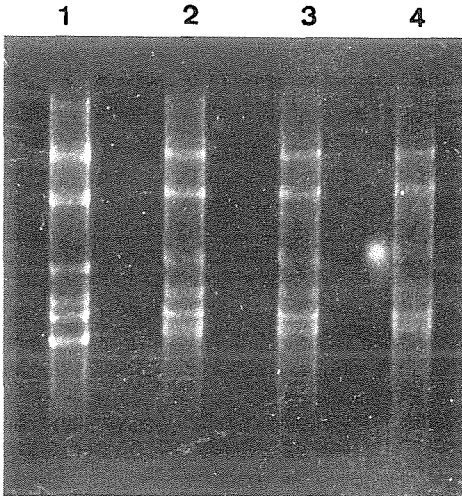


Fig. 1. Effect of reaction time on polyadenylation of RDV transcripts. Polyadenylated RDV transcripts were analyzed on 2% agarose gel.

lane 1: RDV transcripts.
lane 2: 2 min.
lane 3: 5 min.
lane 4: 10 min.

一本鎖 cDNA 合成

ポリ A 鎖付加反応 2 分、10 分の各転写産物を用いて一本鎖 cDNA の合成を行った結果、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP の取り込みが認められたが、ポリ A 鎖付加反応 2 分の転写産物を用いた方が合成効率はよかった (Fig. 2)。一本鎖 cDNA 合成反応時の塩濃度の影響を調べた結果、塩化カリウム濃度 30 mM の方が $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP の取り込み量が多く (Fig. 3)、また、合成反応 20 分、40 分、60 分の各試料の 2% アルカリアガロースゲル電気泳動の結果

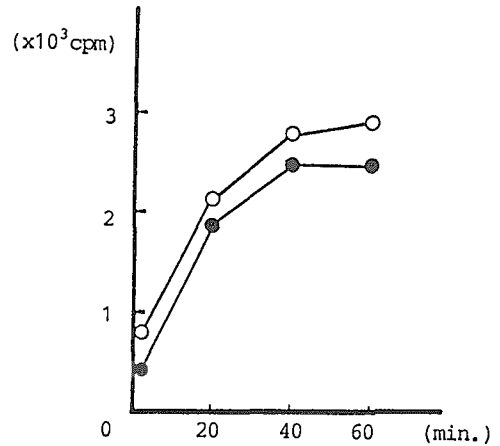


Fig. 2. Incorporation of ^{32}P -dCTP to single strand cDNA. Poly A tailing reaction: ○, 2 min. ●, 10 min.

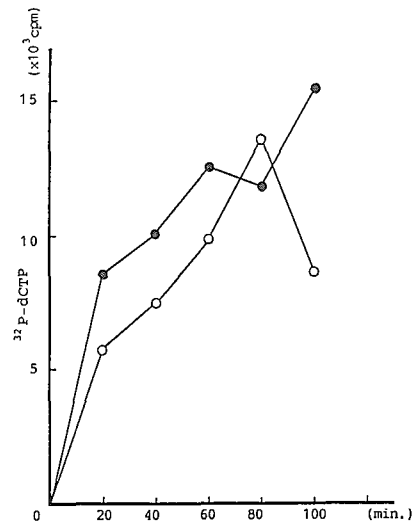


Fig. 3. Effect of KCl concentration on reverse transcription of RDV RNA.

KCl concentration: ● = 30 mM, ○ = 50 mM,

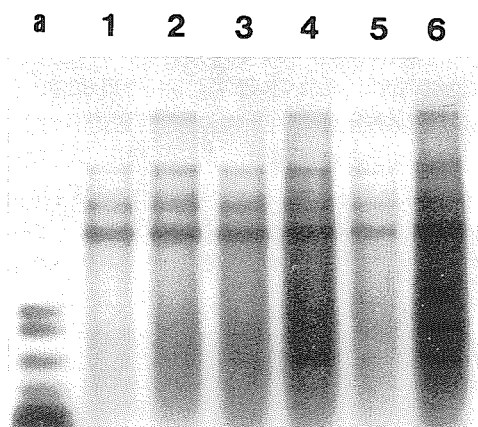


Fig. 4. Autoradiograph of single strand cDNA synthesized in different concentration of KCl. Synthesized ssDNA was analyzed on 2% alkaline agarose gel.

KCl concentration; lane 1, 3, 5: 30 mM
lane 2, 4, 6: 50 mM

Reaction time; lane 1, 2: 20 min.

lane 3, 4: 40 min.

lane 5, 6: 60 min.

lane a; *Hpa*II digested of pBR 322

でも、バンド間にみられる不完全長 cDNA の量が少なかった (Fig. 4)。これらの結果から一本鎖 cDNA 合成は、ポリ A 鎖付加反応を 2 分行った転写産物を用い、塩化カリウム濃度 30 mM で反応を行ったところ、一本鎖 cDNA の合成効率、約 48% であった。

二本鎖 cDNA 合成

二本鎖 cDNA 合成反応での [α - 32 P] dCTP の取り込み量を調べた結果 12°C, 1 時間では、おもにリボヌクレアーゼ H の働きにより一本鎖 cDNA とハイブリッドを形成している転写産物の部分が分解され、22°C では、二本鎖の cDNA が合成された (Fig. 5)。

22°C 反応後の試料を 2% アルカリアガロースゲル電気泳動した結果、二本鎖 cDNA が合成されたが、低分子の cDNA が多かった (Fig. 6)。

二本鎖 cDNA 各 3' 末端へのオリゴ dC 鎖の付加及び形質転換

二本鎖 cDNA の各 3' 末端に付加するオリゴ dC 鎖の数は 10~15 個であることが望ましいとされている。そこで、pBR 322 を *Pvu* II で切断し、反応液中に加えた 3 H-dCTP の取り込み量と pBR 322 のモル数から反応時間を 5 分から 10 分と決定した。この条件でオリゴ dC 鎖付加反応を行った二本鎖 cDNA を sephadex G-50

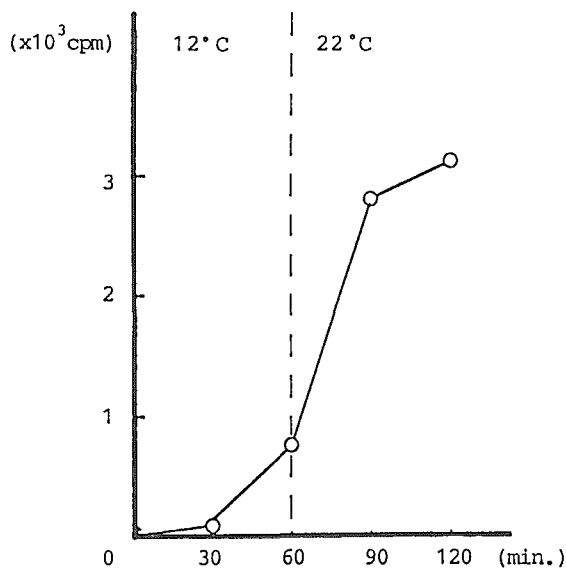


Fig. 5. Incorporation of 32 P-dCTP to double strand cDNA. Incubation temperature was changed from 12°C to 22°C.

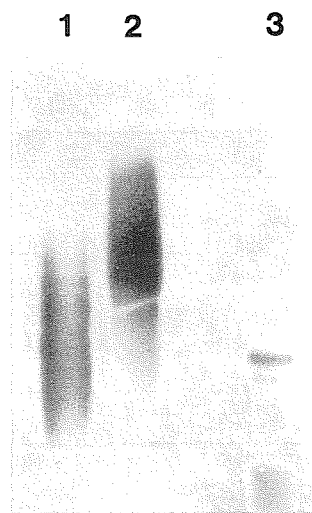


Fig. 6. Autoradiograph of synthesized double strand cDNA. Double strand cDNA was analyzed on 2% alkaline agarose gel.

lane 1: double strand cDNA.

lane 2: single strand cDNA.

lane 3: *Hpa*II digested of plasmid pBR 322.

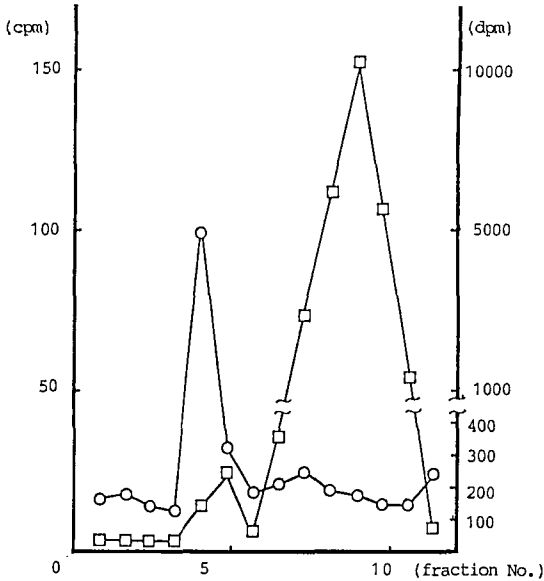


Fig. 7. ^{32}P -cpm and ^3H -dpm of the Sephadex G-50 fractions after dC tailing reaction of double strand cDNA.

○ = ^{32}P cpm, □ = ^3H dpm.

パスツールピペットカラムで分画し、各分画の ^{32}P 量及び ^3H 量を測定した結果、二本鎖 cDNA を含む分画、すなわち、 ^{32}P の取り込みのある分画にも ^3H の取り込みがあり dC 鎖が付加されていた (Fig. 7)。

オリゴ dC 鎖を付加した二本鎖 cDNA で大腸菌 HB 101 を形質転換し、テトラサイクリン又はアンピシリンを含む培地上で選抜したところ 5 μg の鋳型 RNA より合成した cDNA より 164 個のクローンを得た。

論議及び考察

植物 RNA ウィルスは、ゲノムの 3' 末端にポリ A 鎖を持っていることが少なく、そのため、cDNA 合成の際にプライマーとアニールする相補配列を付加することが必要である。

本実験で用いたポリ A ポリメラーゼは、付加される RNA の塩基数に関係なく均等にポリ A 鎖が付加された (Fig. 1)。一本鎖 cDNA 合成反応では、反応液中の塩化カリウム濃度が 30 mM の時が合成効率が良く、反応開始後 20 分ですでに各分節の全長に相当する一本鎖が合成されていた。この反応系での一本鎖 cDNA 合成効率は、48% であった (Fig. 4)。二本鎖 cDNA 合成で用いた GUBLER and HOFFMAN の方法は、今までの cDNA 合成方法に比べて実験操作が少ない上、比較的容

易に全長の cDNA を合成し得る方法であるが、本実験では、一本鎖 cDNA 反応程の高い二本鎖 cDNA 合成効率は得られず、二本鎖 cDNA の合成効率は一本鎖 cDNA に対して 16% であった。これは、二本鎖 cDNA 合成の際鋳型となる一本鎖 cDNA に不完全な長さの分子が多かったためと考えられる。二本鎖 cDNA 各 3' 末端への dC 鎖の付加反応は、pBR 322 を用いた予備実験では 5 分から 10 分で完了した。しかし、本実験では、二本鎖 cDNA のモル数は予備実験で算出した pBR 322 のモル数より数 10 倍以上であったにも関わらず反応時間 5 分から 10 分で目的とされるオリゴ dC 鎖が付加されていたため、反応系に過剰の dCTP があれば 5 分から 10 分で反応が完了することが判明した。抗生物質によるスクリーニングの結果得られたクローンは、組み込まれた cDNA の長さによる選抜が行われていないため数十塩基対からなるクローンも得ていると思われるが、短い cDNA 断片を含んだクローンの数が多くなればクローニング後のスクリーニング量が多くなるため、形質転換に用いる前の cDNA のサイズによる分画をカラムないしは電気泳動を用いて行う必要があると思われる。

摘 要

1. 試験管内で合成したイネ萎縮ウイルスゲノム転写産物の 3' 末端にポリ A ポリメラーゼを用いてポリ A 鎖を付加した結果、各分節に均等にポリ A 鎖が付加された。

2. ポリ A 鎖付加反応 2 分または 10 分行った転写産物を鋳型にしオリゴ dT 鎖プライマーと逆転写酵素により一本鎖 cDNA 合成を試みたところ、付加反応 2 分の転写産物を用いた方が合成効率はよかった。

3. 一本鎖 cDNA 合成反応に対する塩濃度の影響を調べた結果、塩化カリウム濃度 30 mM の時の合成効率が高かった。決定された条件で一本鎖 cDNA 合成を行った結果、一本鎖 cDNA 合成効率は、約 48% であった。

4. 二本鎖 cDNA を合成した結果、合成効率は一本鎖 cDNA に対して約 16% であった。合成後の試料を 2% アルカリアガロースゲル電気泳動したところ全長に相当すると思われる cDNA よりも断片的な長さの cDNA がより多くみられた。

5. 合成された二本鎖 cDNA にオリゴ dC 鎖を付加、pBR 322 に組み込んだ後大腸菌に取り込ませた結果、164 個のクローンが得られた。

参 考 文 献

1. GUBLER, U. and HOFFMAN, B. J.: A simple and very efficient method of generating cDNA libraries. *Gene* **25**: 263-269. 1983
2. MANIATIS, T. FRITSCH, E. F. and SAMBROOK, J.: "Molecular Cloning": A laboratory manual. pp. 545. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982
3. OHNO, T. TAKAMATSU, N. MESHI, T. and OKADA, Y.: Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucl. Acids Res.* **11**: 6185-6197. 1983
4. SIPPEL, A. E.: Purification and characterization of adenosine triphosphate: Ribonucleic acid adenylyltransferase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **37**: 31. 1973
5. TAYLAR, J. M., ILLEMENSEE, R. and SUMMERS, J.: Efficient transcription of RNA into DNA by avian sarcoma virus polymerase. *Biochem. Biophys. Acta.* **442**: 324. 1976
6. UYEDA, I. and SHIKATA, E.: Ultrastructure of rice dwarf virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* **48**: 295-300. 1982
7. UYEDA, I. and SHIKATA, E.: Characteriza-

tion of RNAs synthesized by the virion-associated transcriptase of rice dwarf virus *in vitro*. *Virus Res.* **1**: 527-532. 1984

Summary

Conditions for cDNA synthesis of rice dwarf virus (RDV) were investigated. Rice dwarf virus transcripts synthesized by RDV virus particle *in vitro* were polyadenylated for single strand cDNA synthesis.

The RNAs were polyadenylated for 2 minutes and 10 minutes. Single strand cDNA synthesis was found to dependent on the time of polyadenylate reaction. Two minutes reaction was superior to ten minutes reaction in this experiment. The efficiency of the optimal concentration of KCl for single strand cDNA synthesis was determined to be 30 mM. The efficiency of single strand cDNA synthesis was 48% for RDV transcripts. Double strand cDNA synthesis was made by Gubbler-Hoffman method and efficeincy was 16% of the single strand cDNA. The double strand cDNA obtained in this experiment generated 164 clones after transformation of *E. coli* HB 101 by using pBR 322 as a vector.