



Title	イネ萎縮ウイルスゲノム CDNA を用いたハイブリダイゼーションによる分節ゲノム10番の特異的検出
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), 199-204
Issue Date	1988-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12094
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(2)_p199-204.pdf



イネ萎縮ウイルスゲノム cDNA を用いた ハイブリダイゼーションによる分節 ゲノム 10 番の特異的検出

松村 健*・上田 一郎・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)

Specific Detection of the Segment 10 by Hybridization Using Rice Dwarf Virus cDNA Clones

Takeshi MATSUMURA*, Ichiro UYEDA
and Eishiro SHIKATA

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

(* Hokkaido Green-Bio Institute)

緒 言

イネ萎縮ウイルスは、12本に分節した dsRNA をゲノムとし、各々が1つの遺伝子をコードしていると推定される⁴⁾。ウイルス感染細胞中での各々の遺伝子の発現と複製を解析するに当っては、各々のゲノムセグメントとハイブリダイゼーション法で特異的に検出する方法を確立する必要がある。分節ゲノム 10 番は、分節ゲノム 9 番とほとんど同じ分子量でありポリアクリルアミドゲルを用いても完全に両者を分離することは難しくゲノム RNA を直接ハイブリダイゼーション用プローブとして用いるのは不適当である。そこで、各々のゲノムセグメントの cDNA をクローン化して、これをプローブとしたハイブリダイゼーション法でこれらゲノムセグメントを検出することが期待される。既に cDNA を用いたウイルスゲノムの検出はいくつかの植物ウイルスで行われている^{1,7,9)}。

そこで、本報では前報⁶⁾で得られたイネ萎縮ウイルスゲノムの cDNA よりゲノムセグメント 10 と特異的に反応するクローンを選抜し、ハイブリダイゼーション法によるこのセグメントの特異的検出を行った。

材料と方法

クローンの選抜

前報⁶⁾で得られた 164 個のクローンから Boilling Method³⁾ でプラスミドを抽出後、1% アガロースゲル電気泳動し、クローンに含まれている cDNA の長さで選抜を行った。

イネ萎縮ウイルスゲノム RNA プローブの作成

純化したイネ萎縮ウイルスからフェノール抽出によりゲノム RNA を精製した後、10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (40 mM Tris, 20 mM sodium acetate, 2 mM EDTA, 0.2% acetic acid 40 mA 36 時間) した。泳動後、各バンドをゲルから切り出し破砕、RNA 溶出緩衝液 (500 mM 酢酸アンモニウム, 0.1 mM EDTA 0.1% SDS) 中で一晚振盪、RNA を溶出した後、100% ホルムアミドに溶解し 100°C 15 分加熱、氷中にて急冷した後、エタノール沈澱にて回収し、5' 末端標識反応に用いた。

cDNA プローブの作製

プローブに用いたプラスミドは、アルカリー SDS 法²⁾により抽出、塩化セシウム密度勾配遠心分離により精製した後、プラスミド中の cDNA 部分を突出した 5' 末端を形成する制限酵素により切断した。制限酵素により切断されたプラスミドは、50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 9.0,

1 mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM 塩化亜鉛, 1 mM スベルミジン, 0.1 U 仔牛の腸由来アルカリフォスファターゼを加えた反応液を 37°C 30 分反応させ, 5' 末端の脱リン化を行い, 5' 末端のアイソトープ標識反応に用いた。

核酸の 5' 末端アイソトープ標識

50 mM トリス-塩酸緩衝液 pH 7.6, 10 mM 塩化マグネシウム, 5 mM ジチオスレイトール, 0.1 mM, スベルミジン, 0.1 mM EDTA を含む反応液中に 10~20 μ Ci [γ - 32 P] ATP (3000 μ Ci/mmol), 1~50 pmol の 5' 末端を脱リン化した核酸と 10 U の T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (TAKARA) を加えて, 37°C 1 時間反応させた。反応後の反応液は, Sephadex G-50 パスツールカラムにて, 未反応のアイソトープを分離した後, トルエン系液体シンチレーターで放射活性を測定, 1×10^6 cpm/ml となるようにプローブ液を調整した。

コロニーハイブリダイゼーション

コロニーハイブリダイゼーションは, MANIATIS ら⁵⁾の方法を改変して行った。すなわち, バクテリアを生育させたニトロセルロースフィルターを, 0.5 N 水酸化ナトリウム上で 10 分間静置して溶菌し, 更に 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) 上に 10 分間, 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0)-1.5 M 塩化ナトリウム上に 5 分間静置して中性にした後, クロロフォルムで洗浄, 0.3 M 塩化ナトリウム溶液に 20 分間浸漬後 80°C で 2 時間固定させた後ハイブリダイゼーションに用いた。

ザザンプロットハイブリダイゼーション

pRD82, pRD84, pRD108, pRD112 の各クローンを制限酵素 *Pst*I で切断, 2% アガロースゲル電気泳動後ザザンプロットハイブリダイゼーションを行った⁸⁾。

ドットプロットハイブリダイゼーション

1.5 ml の LB 液体培地で一晩培養後, アルカリ-SDS 法²⁾により抽出したプラスミドを 200 μ l の滅菌水に溶解した後 50 μ l を 100°C, 10 分間加熱後, 水中にて急冷, 1 M 水酸化ナトリウム溶液を 50 μ l 加え 20 分間静置した。更に, 400 μ l の 1.5 M 塩化ナトリウム-1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) を加えた後ニトロセルロースフィルターにスッポットした。

ハイブリダイゼーション

各ハイブリダイゼーションの条件は, MANIATIS ら⁵⁾の方法に準じて行った。

実験結果

コロニーハイブリダイゼーション

Boiling Method により抽出したプラスミドを電気

泳動した結果, 約 600 塩基対以上の cDNA を含んでいると思われるクローンが 34 個得られた。

得られた 34 個のクローンをイネ萎縮ウイルスの各分節ゲノムをプローブとし, コロニーハイブリダイゼーションを行った。Fig. 1 に分節ゲノム 10 番をプローブに用いてハイブリダイゼーションを行った結果を示す。明らかに, pRD82, pRD84, pRD89, pRD108, pRD112 の 5 個のクローンが反応した。これら 5 個のクローンを大量培養し, プラスミドを塩化セシウム密度勾配遠心分離により精製し, 以後の実験に用いた。

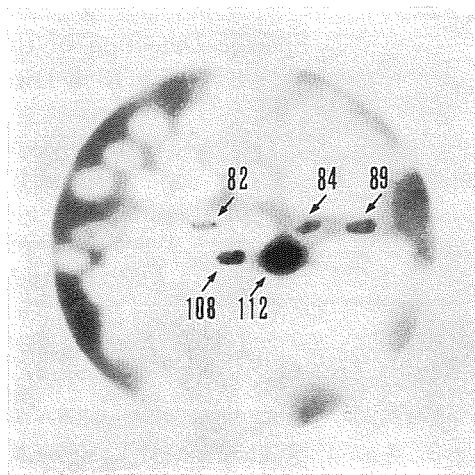


Fig. 1. Colony hybridization of pRD clones with RDV genome segment 10. Hybridized colonies were numbered as shown.

ドットプロットハイブリダイゼーション

新たに行ったクローニングでえられたクローン pRD 367 と pRD84, pRD112, コントロールとして pBR322 のプラスミドを分節ゲノム 10 番の RNA をプローブとしてドットプロットハイブリダイゼーションを行った結果, 明らかに pRD84, pRD112, pRD367 の 3 つのクローンは分節ゲノム 10 番と反応したが, pBR322 は全く反応しなかった (Fig. 2)。

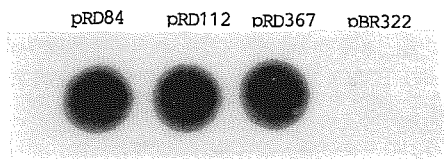


Fig. 2. Dot blot hybridization of pRD clones. Probe: 32 P-ATP labelled RDV genome segment 10.

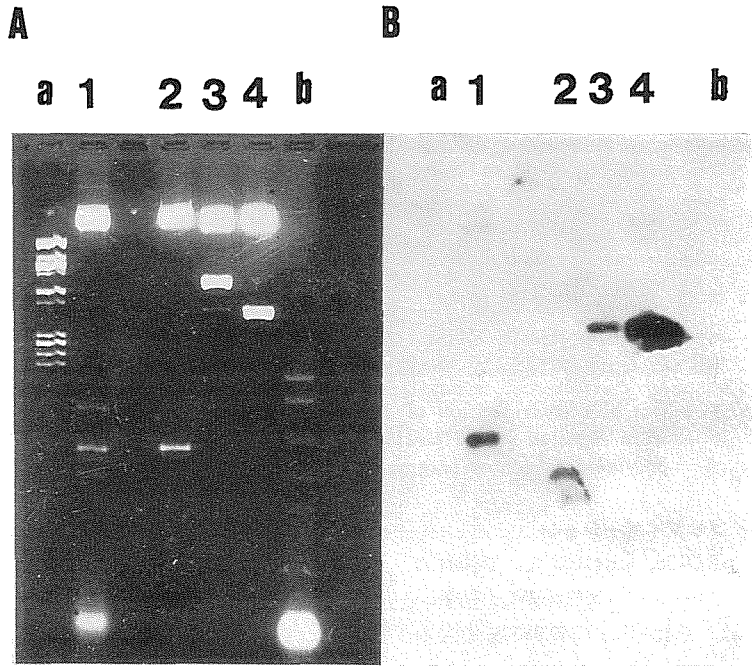


Fig. 3. Southern blot hybridization analysis of pRD clones.

A : pRD clones digested with *Pst I* were analyzed on 2% agarose gel.
 B : Autoradiograph of pRD clone fragments hybridized with RDV genome segment 10.

- lane 1: pRD 82
- lane 2: pRD 84
- lane 3: pRD108
- lane 4: pRD112
- lane a: *EcoR I*, *Bam HI* and *Pst I* digested of pBR322 and *Hind III*, *Ava I* and *Pvu II* digested of pBR322.
- lane b: *Hpa II* digested of pBR322.

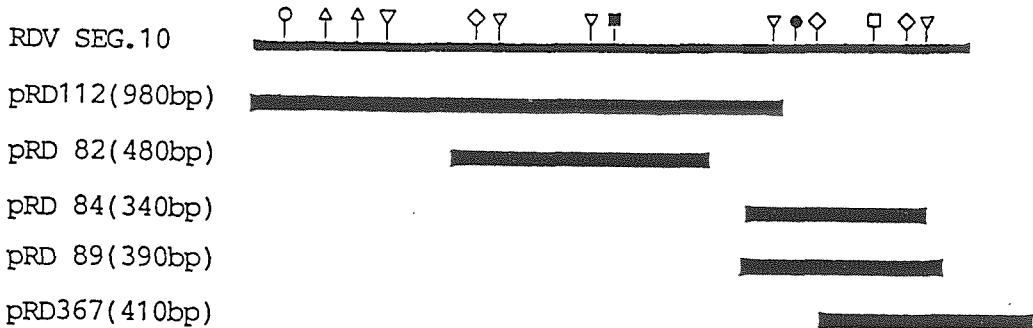


Fig. 4. Restriction endonuclease cleavage map of cDNA clones to RDV genome segment 10. Symbols are restriction enzyme cleavage sites of *Sac I* (○), *Hind III* (△), *Alu I* (▽), *Sau 3A* (◇), *Sph I* (■), *Bam HI* (●), *Sal I* (□).

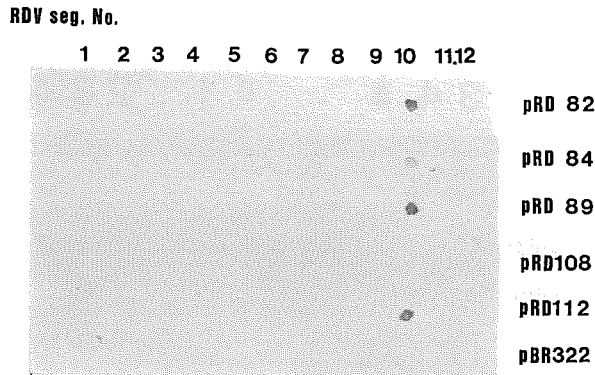


Fig. 5. Dot blot hybridization of RDV genome segments. pRD clones were digested with Hpa II and filled in with ^{32}P -dCTP by DNA polymerase klenow fragment as a probe.

サザンブロットハイブリダイゼーション

pRD82, pRD84, pRD108, pRD112 を, 制限酵素 *Pst* I で切断後 2% アガロースゲル電気泳動した結果, pRD84 と pRD112 は, それぞれ約 340,980 塩基対の cDNA を含んでいたが, pRD82 と pRD108 は, 明らかに 2 本のバンドが認められることから 2 種類の cDNA を含んでいると考えられた。泳動後のゲルをサザンブロットハイブリダイゼーションした結果, pRD84 と pRD112 は明らかに反応したが, pRD82 は, 上のバンドのみが反応し, pRD108 は, 下の非常に薄いバンドのみ反応した (Fig. 3)。そこで, pRD82 は再形質転換を行い分節ゲノム 10 番と反応するクローンのみを単離した。

分節ゲノム 10 番の制限酵素切断地図

ハイブリダイゼーションの結果から, 5つのクローンはいずれも分節ゲノム 10 番の cDNA を含んでいると思われる。そこでこれらのクローンを各種制限酵素で切断し分節ゲノム 10 番の制限酵素切断地図を作成した (Fig. 4)。分節ゲノム 10 番は, *Alu* I, *Bam* HI, *Hind* III, *Sac* I, *Sph* I, *Sal* I, *Sau* 3A で切断され, *Dra* I, *Kpn* I, *Eco* RI, *Ava* I, *Pvu* II, *Pst* I で切断されなかった。

cDNA をプローブとしたゲノム RNA とのドットブロットハイブリダイゼーション

塩化セシウム密度勾配遠心分離により精製し各プラスミドを制限酵素 *Hpa* II で切断後, 反応液中に $10\ \mu\text{Ci}$ の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP と 10 U の DNA ポリメラーゼ I Klenow fragment を加え 37°C で 30 分反応させプローブに用いた。イネ萎縮ウイルス各分節ゲノムは泳動後のゲルから溶出後 $10\ \text{ng}/\mu\text{l}$ の濃度にした RNA 溶液 $8\ \mu\text{l}$

をニトロセルロース膜にスポットし, ハイブリダイゼーションを行った結果, 分節ゲノム 10 番が特異的に強く反応した (Fig. 5)。

論議及び考察

イネ萎縮ウイルスゲノムの内, 最短の分節ゲノム 12 番の長さが電気泳動の結果から約 800 塩基対と推定される。前報⁹⁾ で得られた 164 個のクローンの含まれている cDNA の長さで選抜した結果, 600 塩基対以上を含んでいると思われるクローンが 34 個得られたが, 他の約 4/5 のクローンは非常に短い cDNA を含んでいると思われる。更に効率よく全長のクローンを得るには cDNA 合成効率をあげるか, 形質転換の直前に cDNA の長さで選抜する必要があると思われる。

イネ萎縮ウイルス各分節ゲノムをプローブとしコロニーハイブリダイゼーションを行った結果, pRD84 の様にわずか 340 塩基対の cDNA を含むクローンも明瞭に反応したことから, 短い断片を含むクローンもこの方法で検出されることが明らかになった。

同様の結果が, ドットブロットハイブリダイゼーションについても得られた。又, 両方のハイブリダイゼーションの結果ともコントロールとして用いた pBR322 は全く反応しなかったことから反応が合成された cDNA に特異的であることが示された。

コロニーハイブリダイゼーション及び, ドットブロットハイブリダイゼーションにより分節ゲノム 10 番の cDNA を持つことが明らかになったクローンの制限酵素切断地図から, pRD84, pRD89, pRD367 は, 共通の cDNA 部分をもち又 pRD82 は pRD112 の一部である

ことが明らかになった。pRD84 と pRD112 は、制限酵素 *Alu I* による切断部位を共有していると推測された。更に、分節ゲノム 10 番の長さが電気泳動から約 1200 塩基対と推定されるので、これらのクローンではほぼ全長に近い部分をカバーしていると考えられた。これらのクローンをプローブに用いてイネ萎縮ウイルス各分節ゲノムとドットプロットハイブリダイゼーションを行った結果、pRD82, pRD84, pRD89, pRD112 は分節ゲノム 10 番と反応し、pRD108 とコントロールに用いた pBR322 はいずれの分節ゲノムとも反応しなかったことから、この反応は非常に分節ゲノムに特異的であることが明らかになった。更にプローブ濃度を pBR322 中に含まれる cDNA 1 µg 当り 5×10^5 cpm に調整することにより 80 ng の RNA まで容易に検出可能であった。この結果から、今回の実験では異なった比活性の cDNA プローブによる検出限界を調べていないが、更に少量のウイルス核酸でも検出可能であると考えられる。

摘 要

1) 前報で得られた 164 個のクローンから Boiling Method で抽出したプラスミドを 1% アガロースゲル電気泳動し、約 600 塩基対以上の cDNA を含んでいると思われるクローンを 34 個選抜した。

2) イネ萎縮ウイルス分節ゲノムをプローブにし、コロニーハイブリダイゼーションを行った結果、分節ゲノム 10 番に反応する 5 個のクローンを得た。

3) pRD84, pRD112, pRD367 を分節ゲノム 10 番の RNA をプローブに用いたドットプロットハイブリダイゼーションした結果、いずれのクローンも明らかに反応したが、コントロールとして加えた pBR322 は全く反応しなかった。

4) 分節ゲノム 10 番のクローンの制限酵素切断地図を作成した結果、全長に近い cDNA が得られていた。

5) 各クローンをプローブにし、イネ萎縮ウイルス各分節ゲノムとドットプロットハイブリダイゼーションした結果、分節ゲノム 10 番の cDNA を持ついずれのクローンも分節ゲノムに特異的に反応した。

引用文献

1. BAULCOMBE, D., FLAVELL, R. B. BOULTON, R. E. and JELLIS, G. J.: The sensitivity and specificity of potato virus X in crude sap samples. *Plant Pathology* **33**: 361-370. 1984
2. BIRNBOIM, H. C. and DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening

recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523. 1979

3. HOLMES, D. S. and QUIGLEY, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197. 1981
4. JOKLIK, W. K.: The members of the family reoviridae. "The Reoviridae" pp. 1-8. Plenum press New York and London. 1983
5. MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. and SAMBROOK, J.: "Molecular Cloning": A laboratory manual. pp. 545. Cold Spring Harbor Laboratory. 1982
6. 松村 健・上田 一郎・佐野 輝男・四方 英四郎: イネ萎縮ウイルスゲノム転写産物の cDNA 合成, 北大農学部紀要, **16**: 194-198. 1988
7. ROSNER, A. and BAR-JOSEPH, M.: Diversity of Citrus Tristeza Virus Strain indicated by Hybridization with Cloned cDNA Sequence. *Virology* **139**: 189-193. 1984
8. SOUTHERN, E.: Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503. 1975
9. VANCE, B. C. and BEACHY, N. R.: Detection of Genomic-Length Soybean Mosaic Virus RNA on Polyribosomes of Infected Soybean Leaves. *Virology* **138**: 26-36. 1984

Summary

Rice dwarf virus (RDV) clones made from the viral transcripts were screened by 1% agarose gel electrophoresis. Out of screened 34 clones with more than 600 bp inserts, five colonies hybridized with RDV genome segment 10. The segment assignment of the hybridized clones, pRD84, pRD112 and pRD367 which were obtained in another experiment was further confirmed by dot blot hybridization with RDV genome segment 10. The clones, pRD82, pRD84, pRD108, pRD112 were digested with *Pst I* and DNA fragments were analyzed on 2% agarose gel. The cDNA inserts of pRD84 and pRD112 were determined to be 340 bp and 980 bp, respectively. pRD82 and pRD108 gave two bands on the gel. The gel was southern transferred to a membrane and hybridized with RDV genome segment 10. The clones, pRD84 and pRD112 were reacted clearly but the lower band of pRD82 and the upper band of pRD108 did not. Restriction endonuclease cleavage map of pRD

clones suggested that near full-length of RDV genome segment 10 was covered by cDNAs. Separated RDV genome segments was spotted on

a membrane and hybridized with the obtained pRD clones. The tested pRD clones hybridized with RDV segment 10 specifically.