



Title	イネ萎縮ウイルス分節ゲノム10番 RNA 転写産物の in vitro 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, 17(1), 107-112
Issue Date	1990-03-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/12121">https://hdl.handle.net/2115/12121</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	17(1)_p107-112.pdf



## イネ萎縮ウイルス分節ゲノム 10 番 RNA 転写産物の *in vitro* 合成

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)

(平成2年1月10日受理)

### Production of complete transcripts of Rice Dwarf Virus genome segment 10 *in vitro*

Takeshi MATSUMURA\*, Ichiro UYEDA and Eishiro SHIKATA

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

(\*Hokkaido Green-Bio Institute, 069-13 Naganuma, Japan)

#### I. 緒 言

イネ萎縮ウイルスと同じ植物レオウイルスグループ 1 に属する Wound Tumor Virus では、各分節ゲノムの 5' 末端の最初の 6 塩基と 3' 末端の 4 塩基の配列が各分節ゲノム間で保存されており、この配列の近傍に逆向き相同配列が認められる。

この各分節ゲノムの末端構造がウイルスゲノムの増殖及び、ウイルス粒子内に取り込まれる際の認識部位として働き、更には翻訳産物の合成量の調節を行っていると推測されている<sup>2,10)</sup>。

著者らはイネ萎縮ウイルス分節ゲノム 10 番で、5' 末端の最初の 4 塩基と 3' 末端の最後の 4 塩基が wound tumor virus と同一の配列を持ち、またこの配列を含む逆向き相同配列が存在することが明らかにした<sup>8,11)</sup>。

この事実から、wound tumor virus と同様にイネ萎縮ウイルスゲノムでも末端配列による構造が、ゲノム RNA の複製及び、発現に大きくかかわっていると推測される。

この仮説を明らかにしていく上で、試験管内でイネ萎縮ウイルスゲノムと全く同一な配列の RNA を合成する系が必要とされるが、現在の RNA 転写ベクターを用いた RNA 合成系では、cDNA の上流にベクター由来の配列が付加されたまま転写され、

従ってこれら重要な末端構造の配列が変化する。

この問題点を解決するため、新しく構築した RNA 転写ベクターを開発した。

更に、cDNA 合成の際に付加されたホモポリマー配列を除去した分節ゲノム 10 番の cDNA<sup>9)</sup> を用いて試験管内で完全長分節ゲノム RNA を転写する系を確立した。

#### II. 材料と方法

**転写ベクターの作成** DNA 合成装置により合成された T7 プロモーター配列を制限酵素 *Eco* RI で切断した pUC118、または 119 ベクターに挿入した (Fig. 1)。

連結反応は、Takara DNA ligation kit を用いて行った。連結反応後の組換え体 DNA を用いて大腸菌 MV1184 株の形質転換を行った。

**試験管内 RNA 転写合成** DNA 依存 RNA 合成反応は、40 mM トリス-塩酸緩衝液、pH 7.2、6 mM 塩化マグネシウム、10 mM ジチオスレイトール、4 mM スベルミジン、0.4 mM ATP、CTP、GTP、UTP、20U の T7 RNA ポリメラーゼを含む反応液中に DNA 1  $\mu$ g を加え、37°C、1 時間反応させた後、23U の DNase I (RNase-free) を加え、更に 15 分間反応させた。

**完全長分節ゲノム 10 番の RNA 転写ベクターの**

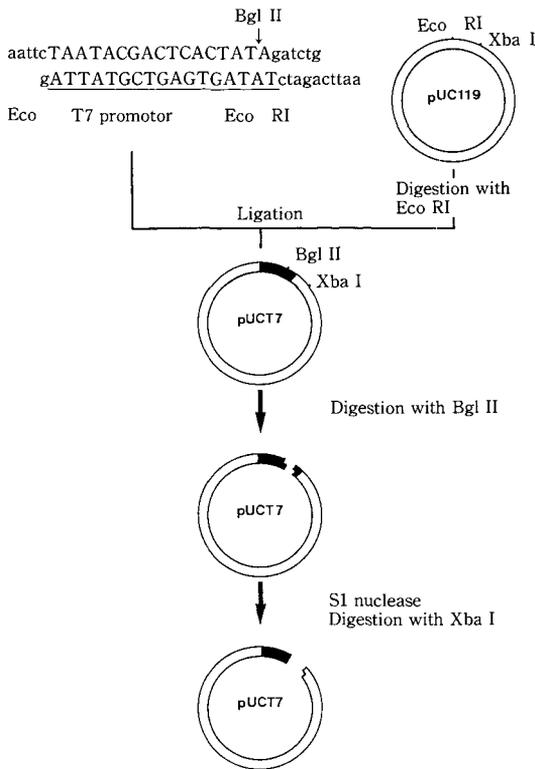


Fig. 1. Strategy for making a transcription vector pUCT7. The T7 promoter sequence are underlined.

**作成** 完全長分節ゲノム 10 番 RNA 転写クローンは、作成した pUCT7 転写ベクターと完全長分節ゲノム 10 番 cDNA を持つクローン pUpRD28 を用いて作成した (Fig. 2)。制限酵素 *Bgl* II で切断した pUCT7 119-12 と制限酵素 *Pst* I で切断した pUpRD28 の末端平滑化は、一本鎖 DNA を特異的に分解する酵素 S1 ヌクレアーゼを用いて行った。即ち、30 mM 酢酸ナトリウム pH 4.6, 100 mM 塩化ナトリウム, 1 mM 塩化亜鉛, 10~50 μg の DNA を含む反応液中に 20U S1 ヌクレアーゼ (TAKARA) を加え、37°C で反応を行った。

S1 ヌクレアーゼ末端を平滑化した各 DNA は、制限酵素 *Xba* I で切断を行った。プラスミド pUpRD28 は、7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (TBE 緩衝液, 20 mA 定電流, 6 時間) し、約 1300 塩基対のバンドを切り出した。ゲルから回収した DNA 断片と S1 ヌクレアーゼ処理後、制限酵素 *Xba* I で切断したプラスミド pUCT7 119-12 を Takara DNA Ligation Kit を用いて連結し、この

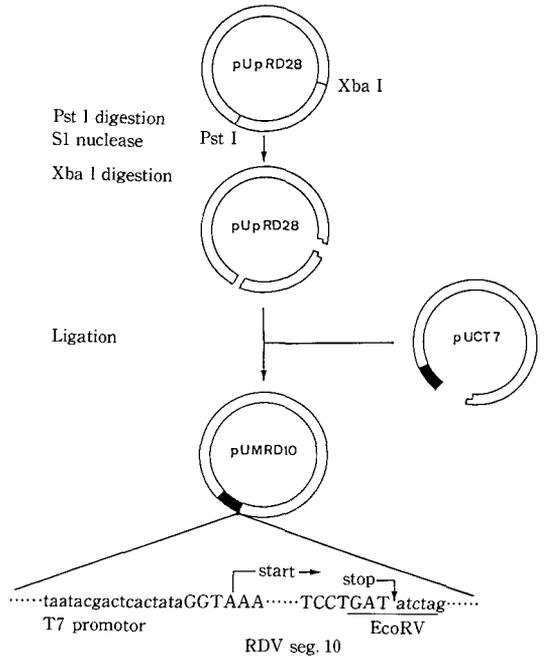


Fig. 2. Steps for the constructing the clone pUMRD10. The sequences of transcription start and stop sites were indicated.

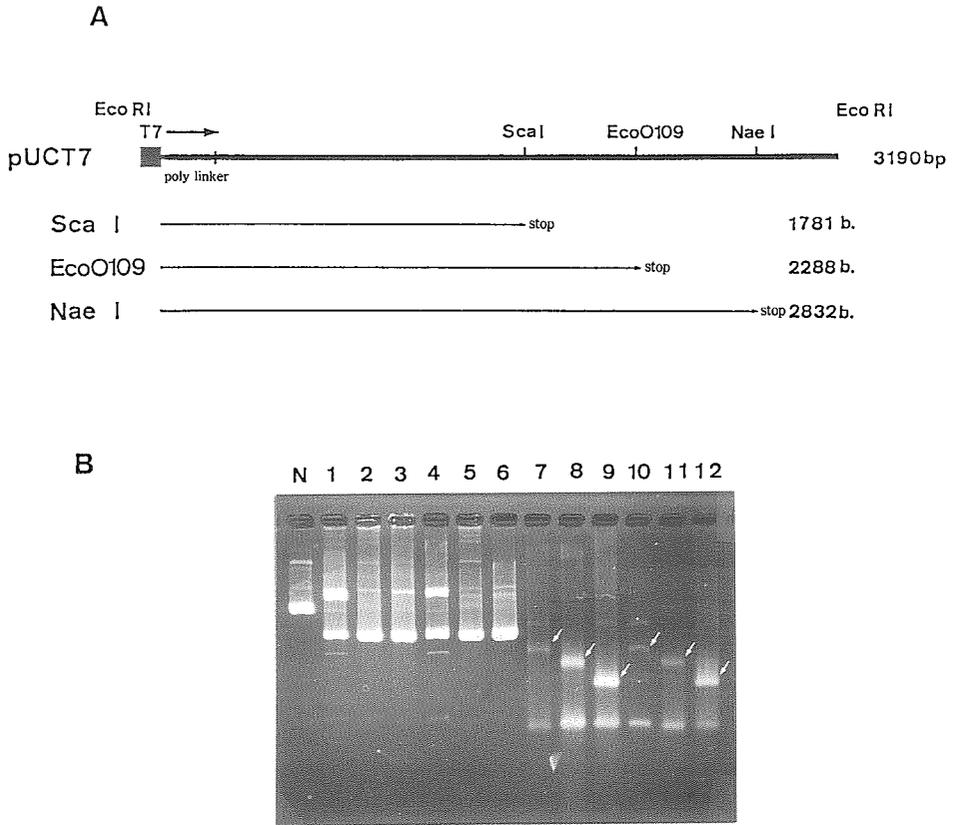
DNA を大腸菌 MV1184 株の形質転換に用いた。

**塩基配列の解析** 作成した完全長分節ゲノム 10 番を含む RNA 転写ベクター pUMRD10 の転写開始部位の塩基配列解析は、7-DEAZA DNA シークエンスキット (TAKARA) を用い、プラスミド DNA をアルカリ変性して行った。プラスミド DNA のアルカリ変性は、キットの操作手順にしたがって行った。

### III. 実験結果

**転写ベクターの作成** 合成した T7 プロモーター配列と制限酵素 *Eco* RI 切断したベクター pUC119 を用いて連結反応を行った後、大腸菌 MV1184 株を形質転換させた結果、数個のクローンが得られ、以後このクローンを pUCT7 とした (Fig. 1)。

得られた pUCT7 が、実際に RNA 転写活性を持っているか、また、転写の方向がポリリンカー側に向かって行われるかを解析するために、pUCT7 119-9 と pUCT7 119-12 をそれぞれ制限酵素 *Sca* I, *Eco*0109, *Nae* I を用いて切断後、T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写反応を行った。



**Fig. 3.** A: Physical map of pUCT7 and expected length of transcripts from pUCT7 which digested with restriction enzymes.

B: Analysis of transcripts from pUCT7 vector DNA which digested with each restriction enzymes *Sca* I, *EcoO109*, *Nae* I. Restriction enzyme digested pUCT7 and it's transcripts were analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis.

lane N: pUCT7 119-9 DNA.

pUCT7 119-9 digested with *Nae* I (lane 1), *EcoO109* (lane 2), *Sca* I (lane 3) and transcripts of each restriction enzyme digested pUCT7 119-9 DNA, *Nae* I (lane 7), *EcoO109* (lane 8), *Sca* I (lane 9).

pUVT7 119-12 digested with *Nae* I (lane 4), *EcoO109* (lane 5), *Sca* I (lane 6) and transcripts of each restriction enzyme digested pUCT7 119-12 DNA, *Nae* I (lane 10), *EcoO109* (lane 11), *Sca* I (lane 12) Arrows indicate resulting transcripts.

即ち、作成したベクターがポリリンカー方向に働くプロモーターを持っていれば、制限酵素 *Sca* I で切断した DNA から約 1781 塩基対の RNA が、制限酵素 *EcoO109* 及び *Nae* I で切断された DNA からは、それぞれ約 2288, 2832 塩基対の RNA が転写されるはずである。

この DNA を用いて行った RNA 転写反応産物を 1.5% アガロースゲル電気泳動解析した結果、予測される位置に RNA のバンドが検出され、その移動

度は、ベクター DNA を切断に用いた制限酵素によって異なっていた (Fig. 3B)。

即ち、制限酵素 *Nae* I 切断された DNA から転写された RNA の移動度が最も遅く (Fig. 2A lane 7, 10), *Sca* I 切断された DNA から転写された RNA の移動度が最も早かった (Fig. 3A lane 9, 12)。このことから両方のベクター DNA ともポリリンカー方向に働く RNA 転写プロモーターが組み込まれていることが明らかにされた。

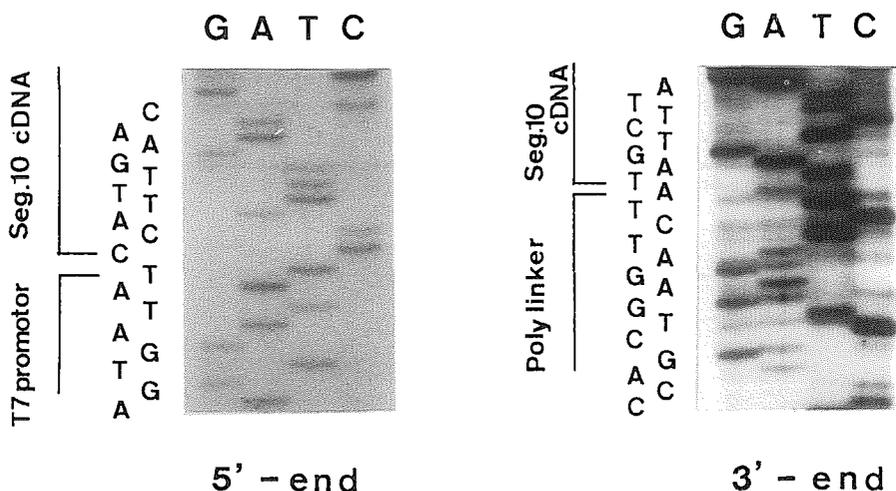


Fig. 4. The 5'-end and 3'-end sequences of inserted cDNA fragment of pUMRD10.

分節ゲノム10番完全長RNA転写ベクターの作成 制限酵素 *Pst* I で切断した後のクローン pUpRD28 及び、制限酵素 *Bgl* II で切断した後のクローン pUCT7 の両方とも、S1ヌクレアーゼで反応開始から5分、10分、15分でそれぞれ反応液の一部を取り、反応を停止させた。これら両DNAをDAN連結反応に用いた。

形質転換操作の後、得られたクローンのプラスミドDNAを抽出し、1%アガロースゲル電気泳動により分節ゲノム10番cDNAの組み込まれた数個のクローンを得た。

これらのクローンの塩基配列解析した結果、3'末端に構築した *Eco* RV 認識配列の内、Aが欠失していることが明らかにされたため、gapped mutagenesis 法<sup>6)</sup>を用いて修正し、欠失していた塩基を挿入した (Fig. 4)。

また、5'末端は、プロモーター配列のすぐ後に分節ゲノム10番の5'末端の配列が認められた (Fig. 4)。即ち、分節ゲノム10番RNAの最初の塩基から最後の塩基まで相同な配列のRNAを転写するクローン pUMRD10 が得られた。

*In vitro*分節ゲノム10番完全長RNAの転写塩基配列解析の結果、完全長分節ゲノム10番RNAを転写することが予測されたクローン pUMRD10DNAを制限酵素 *Eco* RVで切断した後、T7RNAポリメラーゼ反応した反応産物を1.5%アガロースゲル電気泳動を行った結果、単一のRNAバンドが認められ、分節ゲノム10番完全

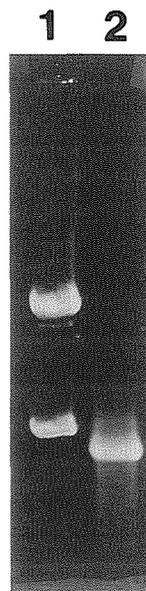


Fig. 5. Transcripts of pUMRD10 analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis.

lane 1: Plasmid pUMRD10 digested with *Eco* RI and *Eco* RV.

lane 2: Transcripts from *Eco* RI and *Eco* RV digested fragment of pUMRD10 by T7 RND polymerase.

長RNAの転写反応が行われたことが確認された (Fig. 5)。

#### IV. 考 察

本実験に用いたイネ萎縮ウイルスの属するレオウイルスグループでは、末端の数塩基対が各分節ゲノ

ムにおいて保存されていること、また、この保存された配列の近傍に逆向き相同配列が存在することが知られており<sup>1,2,4,5,7)</sup>、イネ萎縮ウイルスの分節ゲノムにも同様な配列が見いだされている<sup>8,11)</sup>。これらの配列、及び、5'末端の非翻訳領域の配列が、*in vivo* または、*in vitro* における翻訳調整を行っていることが明らかにされている<sup>3,10)</sup>。

このような事実から、実際のウイルスゲノム RNA の機能を解析するには、その cDNA を用いて完全にウイルスゲノム RNA と相同な RNA を試験管内で合成する系を持つことが必要である。

本実験では、イネ萎縮ウイルスゲノムの完全長 RNA を転写するベクター系を開発し、試験管内で分節ゲノム 10 番の完全長 RNA の転写を行うことに成功した。

即ち、DNA 合成装置により T7 プロモーター配列の 3' 末端に制限酵素 *Bgl* II 認識配列を持つ DNA 鎖を合成した。このプロモーター鎖をポリリンカー部位を持つベクター-DNA に組み込んだ後、制限酵素 *Bgl* II を用いて切断し、S1 ヌクレアーゼ処理により平滑末端を形成させた。

このようにして、プロモーター配列の直後に平滑末端を形成させ、どのような配列の DNA でも平滑末端を形成させることによりベクター-DNA 配列が付加される事なく期待する配列をもつ転写産物が得られることになった。

イネ萎縮ウイルス分節ゲノム 10 番は、5' 末端の配列が<sup>9)</sup> GGUAAA- であり、cDNA 合成の際に 5' 末端に制限酵素 *Pst* I 切断部位を構築することにより最初の塩基から始まる cDNA を得ることが可能である。即ち、この cDNA を制限酵素 *Pst* I で切断し、更に末端を平滑にすることにより最初の塩基から始まる cDNA 断片を得ることが可能となり、この cDNA 断片を RNA 転写ベクター-pUCT7 に挿入することにより完全長の分節ゲノム 10 番 RNA を転写させることが可能となる (Fig. 2)。

この 5' 末端の 6 塩基対はイネ萎縮ウイルス全分節ゲノムに共通していると考えられるため、全ての分節ゲノムにおいて同様の方法を用いることにより完全長分節ゲノム RNA 転写ベクターを構築することが可能である。

## V. 摘 要

1. DNA 合成装置により合成した T7RNA プロ

モーター配列をベクター-pUC119 のポリリンカー上に組み込み新しく RNA 転写ベクター-pUCT7 を作成した。

2. 作成した RNA 転写ベクター-pUCT7 を制限酵素 *Sca* I, *Nae* I, *Eco*0109 でそれぞれ切断後、T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写反応を行い、pUCT7 ベクターがポリリンカー方向に働く T7 プロモーターを持っていることを確認した。

3. S1 ヌクレアーゼ処理により平滑末端を形成させた完全長分節ゲノム 10 番 cDNA 断片と、同様な平滑末端を形成させた RNA 転写ベクター-pUCT7 を用いて完全長分節ゲノム 10 番の RNA 転写ベクター-pUMRD10 を作成した。

4. 制限酵素 *Eco* RV 切断を行った pUMRD-10DNA と T7RNA ポリメラーゼを用いて試験管内で完全長分節ゲノム 10 番 RNA の転写を行った結果、完全長分節ゲノム 10 番 RNA の転写が行われた。

## 引用文献

1. ANTczak, J. B., CHMERO, R., PICKUP, D. J., and JOKLIK, W. K. (1982) "Sequence at both termini of the genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing)." *Virology* **121**, 307-319.
2. ANZOLA, J. V., Xu, Z., ASAMIZU, T., and NUSS, D. L. (1987) "Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequence in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8301-8305.
3. ANZOLA, J. V., DALL, D. J., Xu, Z., and NUSS, D. L. (1989) "Complete nucleotide sequence of wound tumor virus genomic segments encoding nonstructural polypeptides." *Virology* **171**, 222-228.
4. BOTH, G. W., BELLAMY, A. R., STREET, J. E., and SIEGMAN, L. J. (1982) "A general strategy for cloning double stranded RNA: Nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene 8."
5. IBA, H., WATANABE, T., EMORI, Y., and OKADA, Y. (1982) "3 double stranded genome segment of bacteriophage  $\phi$ 6 have homologous terminal sequences." *FEBS Lett.* **141**, 111-115.
6. KRAMER, W., and FRITZ, H. J. (1987) *Methods in enzymology* **154**, pp. 555. Academic Press Nucleic Acids Res. **10**, 7075-7088.

7. KUCHINO, Y., NISHIMURA, S., SMITH, R. E., and FURUICHI, Y. (1982) "Homologous terminal sequence in the double stranded RNA genome segments of cytoplasmic polyhedrosis virus of the silkworm *Bombyx mori*." J. Virol. **44**, 538-543.
8. 松村 健・上田一郎・四方英四郎: イネ萎縮ウイルスゲノム転写産物10番の全塩基配列の解析. 北大農学部紀要, **16**: 199-204. 1988.
9. 松村 健・上田一郎・四方英四郎: イネ萎縮ウイルス分節ゲノム10番cDNAからのホモポリマー配列の除去. 北大農学部紀要.
10. RONER, M. R., GAILLARD, R. K., and JOKLIK, W. K. (1989) "Control of reovirus messenger RNA translation efficiency by the regions upstream of initiation codon." Virology **168**, 292-301.
11. UYEDA, I., MATNUMURA, T., SANO, T., OHSHIMA, K., and SHIKATA, E. (1987) "Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 10." Pro. Japan Acad. Ser. **63**, 227-230.
12. UYEDA, I., KUDO, H., TAKAHASHI, T., SANO, T., OHSHIMA, K., MATUMURA, T., and SHIKATA, E. (1989) "Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 9" J. Gen. Virol. **70**, 1297-1300.

### Summary

All genome segments of a virus in the Reoviridae

share common 5' and 3' terminal sequences and segment-specific inverted repeats.

Both the conserved terminal sequences and segment-specific domains of inverted repeats play a significant role in the sorting and assembly of segmented RNA genomes.

We therefore have constructed a transcription vector that yielded transcripts containing 5' and 3' terminal sequences identical to authentic RDV transcripts.

Synthesized T7 promotor DNA fragments were subcloned into pUC119 vector to construct a transcription vector pUCT7. The pUCT7 119-12 which has transcription activity, was digested with *Bgl* II and treated with S1 nuclease for constructing a blunt end at the 3' end of promotor sequence.

The clone pUpRD28 which has removed homopolymer franking sequence from full length cDNA of RDV genome segment 10, was digested with *Pst* I and treated with S1 nuclease to form a blunt end at 5'-end of the cDNA.

Both S1 nuclease treated pUCT7 vector and pUpRD28 cDNA were digested with *Xba* I. Then cDNA fragment of pUpRD28 was inserted to pUCT7 to construct the RNA transcription vector pUMRD10 from which the RDV genomesegment 10 was transcribed.

The transcriptional activity of *Eco* RV digested pUMRD10 was confirmed by 1.5% agarose gel electrophoresis after T7 RNA polymerase reaction.