



Title	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
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), 113-118
Issue Date	1990-03-31
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/12122">https://hdl.handle.net/2115/12122</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	17(1)_p113-118.pdf



## 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

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)

### Tailored Removal of Flanking Homopolymer Sequences from Rice Dwarf Virus Segment 10 cDNA Clones

Takeshi MATSUMURA\*, Ichiro UYEDA and Eishiro SHIKATA

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

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

#### I. 緒 言

通常使用されるクローニング法においては、cDNA 合成方法の手順の中で、二本鎖 cDNA の各 3' 末端にホモポリマー-DNA 鎖の付加が行われる<sup>2,4,5,7</sup>。この cDNA 合成過程の中で付加されたホモポリマー配列は、その *in vitro* 及び、*in vivo* の発現をしばしば阻害することが知られている。即ち、ホモポリマー配列が付加された cDNA から転写された RNA を用いて試験管内での蛋白合成を行った場合、実際の蛋白の発現量に比べて極端に少ないか、あるいは、異なった分子量の蛋白が多く合成されるという報告がある<sup>1,8,11</sup>。

当研究室では、植物レオウイルスグループに属するイネ萎縮ウイルスのいくつかの分節ゲノムについて、全長に近い cDNA の合成に成功し、その塩基配列を明らかにした<sup>6,9,10</sup>。

我々は、これらの cDNA から *in vivo* または、*in vitro* における発現の研究に使用できる cDNA を得るため、分節ゲノム 10 番の cDNA の両末端に付加されているホモポリマー配列を除去した完全長 cDNA の作成を行った。

#### II. 材料と方法

##### クローン及びベクター-DNA

イネ萎縮ウイルス分節ゲノム 10 番のクローンは、pBR322 の *Pst* I 部位にその cDNA が挿入されている。

クローン pRD545 は、5' 末端の最初の 1 塩基から 1295 番目の塩基までの分節ゲノム 10 番の cDNA を持ち、cDNA の両末端にオリゴ (dA) 鎖、(dC) 鎖が付加されている。クローン pRD367 は、制限酵素 *Sal* I 切断部位から 3' 末端の最後の塩基までの分節ゲノム 10 番の cDNA を持ち、5' 末端には、オリゴ (dC) 鎖を、3' 末端には、オリゴ (dA)、(dC) 鎖が付加されている。

クローニングベクターには pUC119 を、RNA 転写ベクターには pGEM4Zf (Promega 社) を用いた。

##### 転写ベクター-pGEM4Zf による pRD545、pRD367 の cDNA 相補 RNA の試験管内合成

分節ゲノム 10 番のクローン pRD545 と pRD367 を制限酵素 *Pst* I 及び、*Sal* I でそれぞれ切断し、得られた cDNA 断片を RNA 転写ベクター pGEM4Zf の制限酵素 *Pst* I 切断部位に DNA 連結酵素を用いて組み込んだ (Fig. 1)。DNA 連結反応は、TAKARA DNA Ligation Kit を用いて行った。

組換え体からの試験管内 RNA 転写反応は T7RNA ポリメラーゼ (Boehringer 社製) または、SP6RNA ポリメラーゼ (Boehringer 社製) を用いて

行った。即ち、制限酵素 *Xba* I で切断した組換え体 DNA には T7RNA ポリメラーゼを、制限酵素 *Pvu* II で切断した組換え体 DNA には SP6RNA ポリメラーゼをそれぞれ用い、40 mM トリシュー塩酸緩衝液、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 スペルミジン、0.4 mM ATP、GTP、CTP、UTP を含む反応液中に各 DNA 1  $\mu$ g と 20U の各 RNA ポリメラーゼを加え、37°C で 1 時間反応させた。反応は、更に 23U の DNase I RNase-free (Boehringer 社製) を加えて 37°C、15 分間反応させプラスミド DNA を分解させた。

#### DNA 合成装置によるオリゴ DNA 鎖プライマーの合成

ホモポリマー配列を除去した cDNA を得るために、26 塩基のプライマー-DNA、d(TGCAGCTGCAGGTA ACTTGCGCCTTT) と 57 塩基のプライマー-DNA、d(GGTCTAGATATCAGAATCCCTGCGCAGTGTGGGGCACGCATTAGTAGAACTAAG) を化学合成した。

DNA の化学合成は、DNA 合成装置 (Applied Biosystem 380A) を用い、 $\beta$ -シアノエチルアミダイト法により合成を行った。

#### 再置換 cDNA 合成反応

転写 RNA と合成 DNA を 10 mM トリシュー塩酸緩衝液、pH 7.5、1 mM EDTA、100 mM 塩化ナトリウム溶液中 68°C で 10 分、42°C で 2 時間の反応を行いアニーリングさせた後、Amersham 社製の cDNA 合成キット "cDNA puls" を用いて逆転写酵素反応を行った。反応後の DNA-RNA ハイブリッドは、0.05 N 水酸化ナトリウム-2 mM EDTA 溶液中に溶解し、65°C で 1 時間の加熱による RNA の分解を行った。この反応液に等量の 0.05 N 塩酸を加えて中性に戻した後、エタノール沈澱して DNA を回収した。

回収した DNA は、滅菌水中で 100°C、3 分間の加熱を行った後、等量のホルムアミドを加えて室温に一晩放置し、合成された +鎖と -鎖の cDNA をアニールさせた。アニール後、エタノール沈澱により回収した二本鎖 cDNA は、33 mM トリシュー塩酸緩衝液、pH 7.9、66 mM 酢酸カリウム、10 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM ジチオスレイトール、0.01% 仔牛血清アルブミン、0.5  $\mu$ M dATP、

dCTP、dTTP、dGTP、2U T4DNA ポリメラーゼ、2U DNA ポリメラーゼ I Klenow fragment を含む反応液中で 37°C、1 時間反応を行った。

#### クローンの選抜及び、解析

再置換 cDNA 合成により得られた二本鎖 cDNA は、制限酵素 *Pst* I、*Xba* I による切断を行い、pUC119 ベクターのポリリンカー部位に挿入した後、大腸菌 MV1184 株を形質転換させた。

得られた形質転換体から、プラスミド DNA を抽出後、1% アガロースゲル電気泳動し、完全長分節ゲノム 10 番 cDNA をもつクローンを選抜した。

### III. 実験結果

#### 試験管内 cDNA 相補 RNA 合成

分節ゲノム 10 番の cDNA クローン pRD545、pRD367 の両方の cDNA から作成したクローン pGEMpRD2 と pRD545cDNA の制限酵素 *Pst* I 断片をそのまま挿入したクローン pGEMpRD33 を得た (Fig. 1)。

両方のクローンを制限酵素 *Xba* I または、*Pvu* II 切断後、T7 または、SP6RNA ポリメラーゼを用いて試験管内 RNA 転写反応させた。この試料を 1.5% アガロースゲル電気泳動解析した結果、pGEMpRD2 は、反応前の DNA 断片とは異なる位置に新たな RNA バンドが検出され、cDNA に相補な RNA が転写されたと推測された (Fig. 2A lane3, 5)。転写産物の著しく少なかった pGEMpRD33 (Fig. 2A lane4, 6) からも再度反応を行った結果、明瞭な RNA バンドが得られた (Fig. 2B)。

#### 再置換 cDNA 合成及びクローンの分析

ホモポリマー配列を除去した cDNA を合成するために両末端に相補な配列を持ち、更に、ベクター DNA に組み込むための制限酵素切断配列を付加した DNA を DNA 合成装置により合成した。

即ち、+鎖 cDNA 合成のためのプライマー-DNA は、制限酵素 *Pst* I 認識配列の後に分節ゲノム 10 番の -鎖の 5' 末端に相補な 17 塩基対の配列を付加した DNA を合成し、-鎖 cDNA 合成のためのプライマー-DNA は、3' 末端の一部を欠落している cDNA をもつクローン pGEMpRD33 から転写させた RNA を用いて cDNA 合成が行えるように、制限酵素 *Xba* I と *Eco* RV の配列の後に +鎖の 3' 末端に相補な 46 塩基対の配列を付加した DNA を合成した (Fig. 3)。

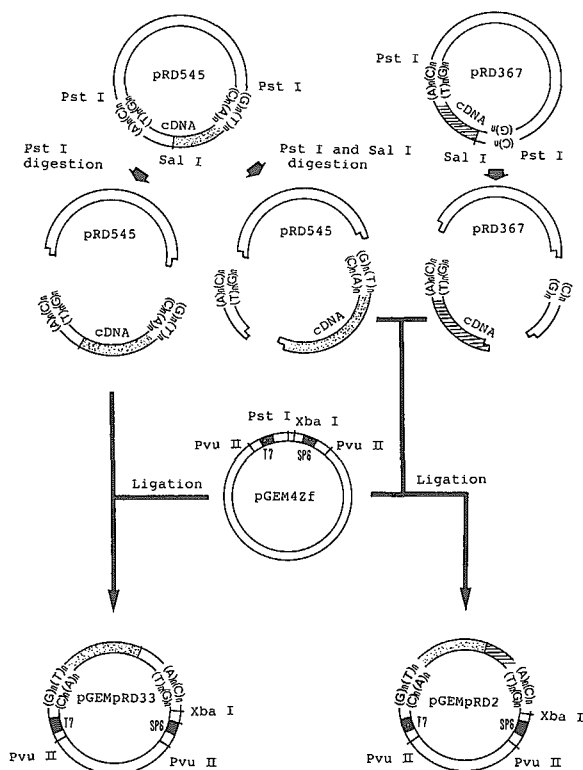


Fig. 1. Strategy for the synthesis of full length genome segment 10 cDNA. T7 and SP6 indicated the sequences of T7 promoter or SP6 promoter. Homopolymer flanking sequences were indicated by (A)<sub>n</sub>, (G)<sub>n</sub>, (C)<sub>n</sub>, (T)<sub>n</sub>.

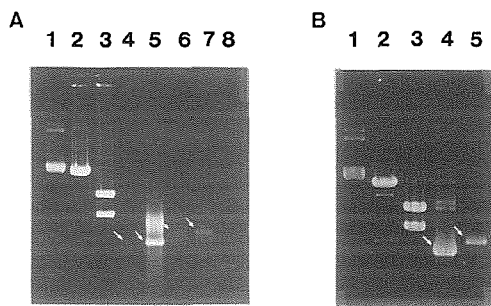
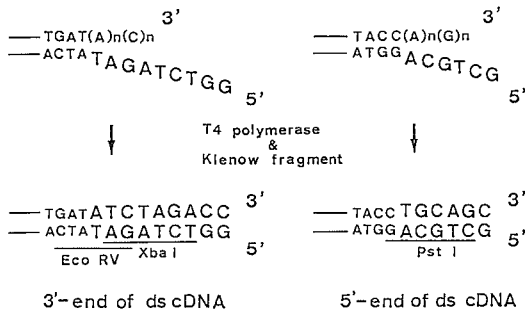
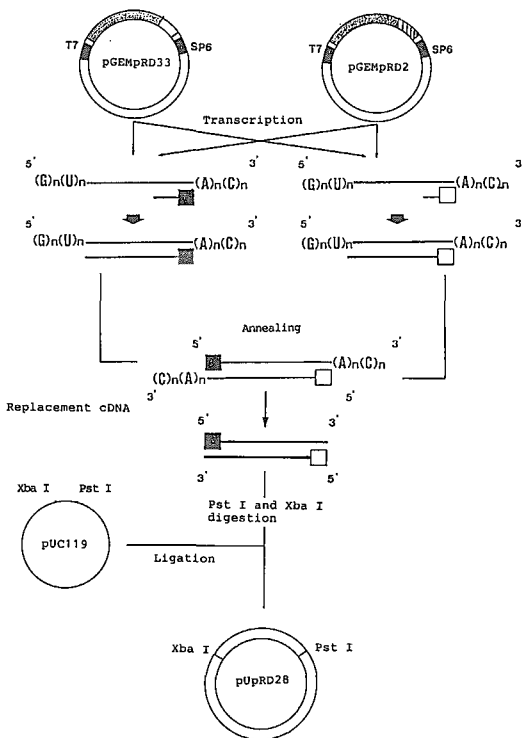


Fig. 2. Transcripts from pGEMpRD vectors analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis.

- A: lane 1: pGEMpRD2 non digested.  
 lane 2: pGEMpRD2 digested with *Xba* I.  
 lane 3: pGEMpRD2 digested with *Pvu* II.  
 lane 4: Transcripts of *Xba* I digested pGEMpRD33.  
 lane 5: Transcripts of *Xba* I digested pGEMpRD2.  
 lane 6: Transcripts of *Pvu* II digested pGEMpRD33.  
 lane 7: Transcripts of *Pvu* II digested pGEMpRD2.
- B: Restriction enzyme digestion of pGEMpRD33 and its transcripts analyzed on 1.5% agarose gel electrophoresis.  
 lane 1: pGEMpRD33.  
 lane 2: pGEMpRD33 digested with *Xba* I.  
 lane 3: pGEMpRD33 digested with *Pvu* II.  
 lane 4: Transcripts of *Xba* I digested pGEMpRD33.  
 lane 5: Transcripts of *Pvu* II digested pGEMpRD33.

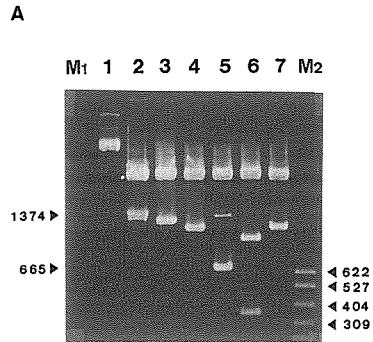


**Fig. 3.** Strategy of tailoring de-tailed termini to contain cohesive or recessive restriction sites. The noncomplementary priming sequence that specifies *Pst* I, *Eco* RV and *Xba* I sites were indicated in bold letters.



**Fig. 4.** Steps involved in tailored removal of homopolymer flanking sequence. Oligonucleotide primers are represented by filled and opened boxes. Homopolymer flanking sequences are indicated by (A)<sub>n</sub>, (C)<sub>n</sub>.

再置換 cDNA 合成法により得られたクローンは、プラスミド DNA を抽出し、1%アガロースゲル電気泳動によって選抜した。その結果、末端に付加されたホモポリマーな配列を除去し、かつ、完全長の分節ゲノム 10 番 cDNA を含むと思われるクローンを



**Fig. 5.** Restriction enzyme analysis of cDNA fragment of pUpRD28.

**A:** Analyses of pUpRD28 digested with restriction enzymes by 2% agarose gel electrophoresis.

- lane 1: pUpRD28 DNA not digested
- lane 2: pUpRD28 digested with *Pst* I and *Xba* I.
- lane 3: pUpRD28 digested with *Pst* I, *Xba* I and *Sac* I.
- lane 4: pUpRD28 digested with *Pst* I, *Xba* I and *Hind* III.
- lane 5: pUpRD28 digested with *Pst* I, *Xba* I and *Sph* I.
- lane 6: pUpRD28 digested with *Pst* I, *Xba* I and *Bam* HI.
- lane 7: pUpRD28 digested with *Pst* I, *Xba* I and *Sal* I.
- lane M1: pBR322 digested with *Sau* 3A I.
- lane M2: pBR322 digested with *Hpa* II.

**B:** Physical map of RDV genome segment 10. Symbols are restriction enzyme cleavage sites of *Sac* I (▽), *Hind* III (○), *Sph* I (●), *Bam* HI (■), *Sal* I (△).

pUpRD28 を得た (Fig. 4)。

クローン pUpRD28 から制限酵素 *Pst* I 及び、*Xba* I により cDNA 部分を切り出した後、2%アガロースゲル電気泳動解析した結果、約 1320 塩基対の cDNA バンドが検出された (Fig. 5A lane2)。

このことから pUpRD28 は、cDNA の両末端に付加されていた数十塩基対に及ぶホモポリマー配列が除去されていることが明らかになった。

また、この cDNA 断片を更に、分節ゲノム 10 番を 1 カ所切断する酵素で切断した結果、予測される

cDNA 断片 (Fig. 5B) が検出されたため、pUpRD28 は、完全長分節ゲノム 10 番の cDNA をもつクローンであることが明らかにされた。

#### IV. 考 察

一般に用いられる cDNA 合成方法により合成を行って得られるクローンは、その cDNA の末端に特定されない塩基数のホモポリマー配列を保持している<sup>2,4,5,7)</sup>。

この cDNA を用いてゲノム RNA の構造及び機能の解析をすることは、得られた実験結果に対して cDNA の末端に付加されているホモポリマー配列の影響を常に考慮しなければならないため不適当と考えられる。

そこで、本実験においては、既に塩基配列が明らかにされているイネ萎縮ウイルス分節ゲノム 10 番の cDNA を用い、その cDNA 末端に付加されているホモポリマー配列を除去した完全長 cDNA の合成方法を確立した。

完全長 cDNA 合成の際に用いる鋳型 RNA には、RNA ポリメラーゼを用いて試験管内で合成した RNA を鋳型に用いた。その RNA 合成反応の結果は、反応産物の電気泳動解析により、単一のシャープな RNA バンドが確認されたことで実際に cDNA に相補な RNA の合成が行われたことが証明された (Fig. 2A, B)。この結果から、試験管内 RNA 合成反応は、鋳型となる cDNA の存在するオリゴ (dG) 鎖及び、オリゴ (dC) 鎖の影響を受けることなく鋳型 cDNA に相補な全長の RNA 合成が行われていることが明らかにされ、cDNA 合成の鋳型として十分使用でき得るものであった。

合成した cDNA に付加されたホモポリマー配列の除去は、ヌクレアーゼ *Bal* 31 を用いても行うことができる<sup>3)</sup>と報告されている。

しかし、この酵素は、オリゴ (dG) 鎖やオリゴ (dC) 鎖などのホモポリマー配列を分解していく速度が、ヘテロポリマーな配列を分解していく速度に比べて遅くなるといわれている<sup>8)</sup>。そのため、この酵素の反応条件を決定すること及び、この方法で行って得られたクローンからホモポリマー配列が除去されたクローンを選抜するなどにおいて問題点が残される。

しかし、今回本実験で用いた方法のように、3'→5' エキソヌクレアーゼ、5'→3' ポリメラーゼの二つ

の酵素活性を同時に持つ酵素と、合成プライマーを用いることにより、これらの問題点は解決される (Fig. 3)。即ち、エキソヌクレアーゼ反応によるホモポリマー配列解速度に依存する事なく、期待する末端配列を持った cDNA を合成することが可能である。

本実験においては、制限酵素 *Pst* I 及び、*Eco* RV 切断部位を構築することにより分節ゲノム 10 番の 5' 末端の最初の一塩基から 3' 末端の最後の一塩基までの cDNA 断片を得ることを可能にした。しかし、T4DNA ポリメラーゼは DNA が高次構造を取る場合、そのエキソヌクレアーゼ活性が阻害されるという報告もあり、本実験においても、再置換 cDNA 合成反応において、T4DNA ポリメラーゼだけで反応を行った場合、完全長 cDNA を得ることができなかった。

そこで、配列の高次構造に関係なくエキソヌクレアーゼ活性を示す DNA ポリメラーゼ I Klenow fragment を同時に反応に用いることにより、完全長 cDNA 合成が確認され、イネ萎縮ウイルス分節ゲノムの完全長 cDNA 合成方法の確立に成功した。

#### V. 摘 要

1. イネ萎縮病ウイルス分節ゲノム 10 番のクローン pRD545 と pRD367 を制限酵素 *Pst* I 及び *Sal* I で切断し、ベクター-pGEM4Zf の *Pst* I 切断部位に組み込み、クローン pGEMpRD2 を得た。  
また、クローン pRD545 の分節ゲノム 10 番 cDNA を制限酵素 *Pst* I 切断した断片を同様にベクター-pGEM4Zf の *Pst* I 切断部位に挿入したクローン pGEMpRD33 も得た。
2. 制限酵素 *Xba* I または、*Pvu* II で切断したクローン pGEMpRD2 及び pGEMpRD33 を T7RNA ポリメラーゼまたは SP6RNA ポリメラーゼをもちい、試験管内で分節ゲノム 10 番の +鎖または -鎖 RNA にそれぞれ相補な配列を持つ RNA の転写を行った。
3. -鎖 RNA の 3' 末端に相補な配列と制限酵素 *Pst* I 認識配列を持つプライマー-DNA 及び +鎖の 3' 末端に相補な配列と制限酵素 *Xba* I 及び *Eco* RV の認識配列を持つプライマー-DNA をそれぞれ DNA 合成装置を用いて合成した。
4. DNA 合成装置で合成したプライマー-DNA と

試験管内でクローン pGEMpRD2 及び、pGEMpRD33 から転写させた RNA を用いて再置換 cDNA 合成反応を行った。反応後、得られた二本鎖 DNA を制限酵素 *Pst* I 及び *Xba* I で切断後ベクター pUC119 に組み込んだ。

5. 形質転換反応後、得られた組換え体を制限酵素切断した cDNA 断片を解析した結果、cDNA の両末端からホモポリマーな配列を除去された完全長分節ゲノム 10 番 cDNA が得られたことが証明された。

### 引用文献

1. GALILI, G., KAWATA, E. E., CUELLAR, R. E., SMITH, L. D., and LARKINS, B. A. (1986) "Synthetic oligonucleotide tails inhibit *in vitro* and *in vivo* translation of SP6 transcripts of maize zein cDNA clones." *Nucleic Acids Res.* **14**, 1511-1523.
2. GUBLER, U., and HOFFMAN, B. J. (1983) "A simple and very efficient method for generating cDNA libraries." *Gene* **25**, 263-269.
3. KILPATRICK, M. W., WEI, C. F., GRAY, H. B., Jr., and WELLS, R. D. (1983) "Bal 31 nuclease as a probe in concentrated salt for the B-Z DNA junction." *Nucleic Acid. Res.* **11**, 3811-3822.
4. MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., and SAMBROOK, J. (1982) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
5. MANIATIS, T., KEES, G., EFSTRATIADIS, A., and KFATOS, F. C. (1976) "Amplification and characterization of a  $\beta$ -globin gene synthesized *in vitro*" *Cell* **8**, 163-182.
6. 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.
7. OKAYAMA, H., and BERG, P. (1982) "High-Efficiency cloning of fulllength cDNA." *Mol. Cell Biol.* **2**, 161-170.
8. STUBER, D., IBRAHIMI, I., CUTLER, D., DOBBESTEIN, B., and BUJARD, H. (1984) "A noble *in vitro* transcription-translation system: Accurate and efficient synthesis of single proteins

from cloned DNA sequences." *EMBO J.* **3**, 3143-3148.

9. UYEDA, I., MATSUMURA, T., SANNO, T., OHSHIMA, K., and SHIKATA, E. (1987) "Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 10," *Pro. Japan Acad. Ser.* **63**, 227-230.
10. UYEDA, I., KUDO, H., TAKAHASHI, T., SANNO, T., OHSHIMA, K., MATSUMURA, T., and SHIKATA, E. (1989) "Nucleotide sequence of rice dwarf virus genome segment 9" *J. Gen. Virol.* **70**, 1297-1300.
11. XU, Z., ANZOLA, J. V., and NUSS, D. L. (1987) "Tailored Removal of flanking homopolymer sequence from cDNA clones." *DNA* **6**, 505-513.

### Summary

Commonly used protocols for cloning cDNA copies of mRNAs include steps that add homopolymer tails to the sequence of interest. A technical problem often encountered in cDNA expression studies involves interference by these flanking sequence. We have obtained cDNA clones to RDV genome segment 10 and constructed full-length cDNA that is identical to authentic RDV genome segment 10.

RDV genome segment 10 cDNA fragment of pRD545 and pRD367 were subcloned into transcription vector pGEM4Zf and named pGEMpRD2 and pGEMpRD33.

Transcript of each polarity for use as a cDNA template were synthesized from each linearized clone by using the SP6 and T7 RNA polymerases.

Synthetic oligonucleotides complementary to the cDNA sequences immediately adjacent to the 3'-terminal homopolymer sequences serve as primers for reverse transcription. After replacement cDNA synthesis by T4 DNA polymerase, double stranded cDNAs that was removed homopolymer flanking sequences were digested with *Pst* I and *Xba* I. Then it was subcloned into pUC119 vector. We obtained complete full length cDNA clone of RDV genome segment 10 and it was named pUpRD28.