

HTLV-I環状核外遺伝子の2LTR連結部のPCRを用いたクローニングと塩基配列の決定

平松 啓一

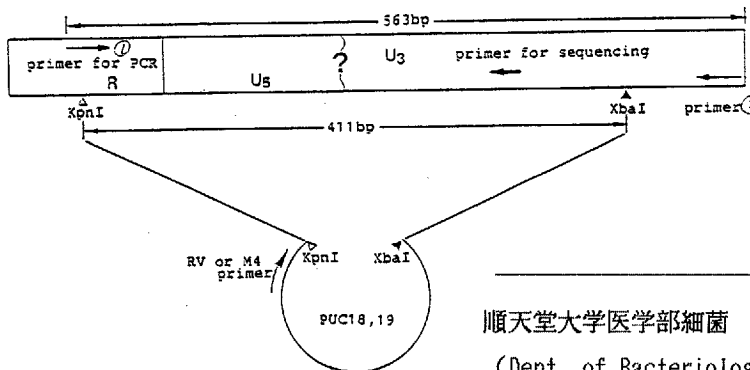
要約： レトロウイルスの核外遺伝子は、感染宿主細胞染色体への組み込み前駆体であり、このDNAの構造の研究は、レトロウイルスの宿主への感染成立のメカニズムを解明する上で重要である。HTLV-Iの場合には、このDNA（特に2-LTR環状体）はきわめて微量であるのみならず、遺伝子クローニングに用いる宿主大腸菌内での相同組換えによるゲノム欠失が頻発するため、その構造の研究はきわめて困難であった。著者らは昨年までにPCRを用いて効率よく2-LTR環状体の連結部をクローン化できることを示した。本年度は、さらにそのクローン数を増やし、MMLV (Moloney murine leukemia virus) の感染細胞から同様の方法でクローン化した2-LTR連結部と併せてその構造を解析した。

見出し語：PCR、LTR、核外遺伝子

研究方法： 成人T細胞白血病ウイルス環状体の調製は昨年抄録に記載した。MMLVの環状体の調製は以下のようにした。MMLV clone48をMOI 1でNIH3T3細胞に感染させ、16時間後に 10^7 個の細胞からHirtの方法で核外遺伝

子を抽出し、さらにCs-Cl Ethidium bromide超遠心により環状DNAを精製した。使用したプライマーの位置は、図1に示した。塩基配列の決定は、dideoxy法によった。PCRはannealing temp. 37°Cで35 cycleおこなった。

FIG.1A CLONING AND SEQUENCING STRATEGY OF 2-LTR JUNCTION DNA OF Mo-MLV



順天堂大学医学部細菌

(Dept. of Bacteriology, Juntendo Univ.)

FIG.1B

CLONING AND SEQUENCING STRATEGY OF 2-LTR JUNCTION DNA OF HTLV-I

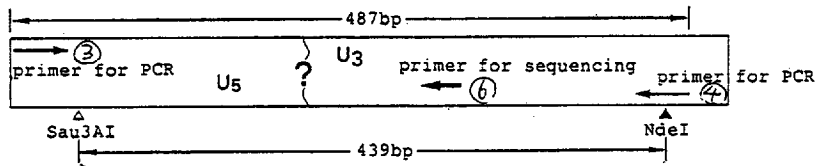


FIG.2

CLONE No.	U5	Junction	U3
3.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
4.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
5.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
6.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
7.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
8.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
9.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
11.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
1.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG	
10.	AGTGATTGACTACCCGTCAGCGGGGGTCTTTCATT	AAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAG ACA	

結果：MMLVの2-LTR連結部の塩基配列を図2に、HTLV-I 2-LTR連結部の塩基配列を図3に示す。MMLVの10個のクローンのうち8個は従来のhead-to-tailによる連結構造を示した。他の2つのクローンでは、LTR間に、それぞれ nucleotide 'A' の欠失 (clone 1)、'ACA'のinsertion (clone 10) がみとめられた。しかしその他の部分の塩基配列は10クローン間ですべて同一であり、PCR法によるクローニングの信頼性が高いことを示している。

HTLV-Iの2-LTR塩基配列は著しい多様性を示した。24クローンは5つのグループに分類された。グループ1は5クローンからなり、その配列は'GTGA'であった。これはLTRのhead-to-tailの結合によると思われる。グループ2は5クローンからなり、U5の端2残基

の欠失したものである。グループ3は、逆にU3端の2残基が欠失したもので、8クローンからなっていた。グループ4は2クローンからなり、LTR端から2残基以上の欠失のあるものである。グループ5はLTR間に1残基 'G' の挿入のあるもの。グループ6はクローン19と26からなる。クローン19は4残基'GTGA'の欠失と37残基の挿入がみられ、クローン26は上記の4残基とU3の6残基計10残基の欠失と36残基の挿入をともなっていた。このうちクローン26の挿入配列はHTLV-Iゲノム自体に由来していた(図4)。しかもこの挿入配列の両端にはdirect repeatが存在しない。したがってこのクローンは自身へのmultiple autointegrationにより生じた環状体由来したものと考えられる。クローン19の挿入配列はHTLV-Iでなく由来は不明であるが特

FIG. 3

CLONE No.	U5	Junction	U3
	-30 -20 -10 -1	1	10 20 30 72
type 1	4. AGCACTCTCCAGGAGAGAAATTTAGTACACAGT	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	5. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	6. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	12. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
13. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG		
type 2	8. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACA	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	10. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACA	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	14. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACA	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	18. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACA	GA TGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
7. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACA		TCCCCCGGG	
type 3	3. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	TGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	16. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	TGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	21. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	TGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	23. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	TGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	25. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	TGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	11. AG	TGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	9. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	TGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
17. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	TG	GGG	
type 4	1. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAAT	GATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	15. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT		AA
type 5	2. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	GGATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	22. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACAGT	GGATGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
type 6	19. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACA ()	TGACAATGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
	26. AGCACTCTCCAGGAGAGAGAAATTTAGTACACA ()	(GTTGGCTCCCAACGTAGCCAGATGGTGTGTACATCA) TGACCATGAGCCCCAAATATCCCCCGGG	
		(ATGGTCATTGTCATCTGCCTCTTTTTCGTTAAAAAG)	

徴的なLTR末端の欠失から、これもまた integration process によって生じたものと考えられる。

HTLV-I LTR末端の塩基配列には他のレトロウイルスに存在するinverted repeatが認められなかった(図5)。またU3末端部にはdirect repeat sequenceが認められ、下流側のdirect repeat塩基配列に接してU3末端部のゲノム欠失がおきたクローンが複数見られた(クローン9、18、26)。このことは、HTLV-I integraseが認識しnickをいれるため生じた可能性がある。

考察：HTLV-I 2-LTR連結部の塩基配列の大きな部分を占めるグループ2と3はそのLTR末端部の特徴的な2残基欠失のパターンからautointegrationにより生じたものと考えられる。グループ6を加えると、15/24 (63%)が premature integration を起していると考えられる。このような現象の原因となっている条件として以下のことが考えられる。1) LTR末端のinverted repeatが存在しないこと、2) HTLV-I 感染実験に使用したcats + L-細胞はHTLV-Iの自然宿主でないこと、3) 感染後1週間での核外遺伝子を材料としたことなどである。今後これらを鑑別する実験が必要となる。

HTLV-I integraseが認識すると考えられる塩基配列がU3側に重複して存在する。このこ

FIG. 4

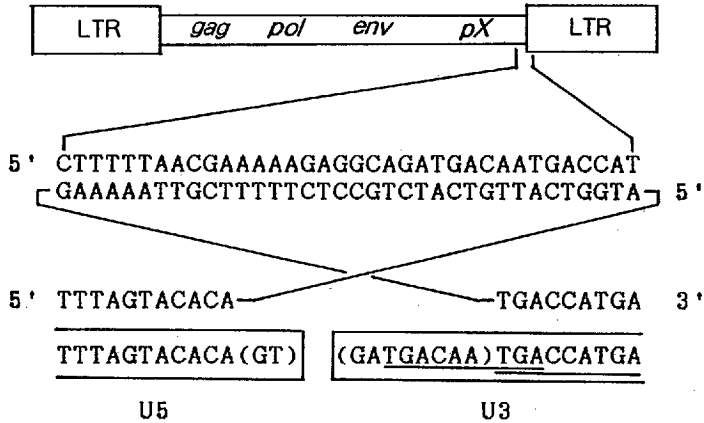


FIG. 5

Inverted repeat sequences of LTR termini of various retroviruses

	U5	U3
RSV	<u>GCAGAAAGCCTTCATT</u>	<u>AATGTAGTCATTATGC</u>
MoMLV	<u>GGGGTCTTTCATT</u>	<u>AATGAAAGACCCC</u>
MMTV	<u>GCGGCAGC</u>	<u>AATGCCGC</u>
BLV	<u>CCGGCAAACA</u>	<u>TGTATGAAAG</u>
LAV/HTLV-III	<u>ATCTCTAGCA</u>	<u>TGGAAGGGCT</u>
HTLV-I*	<u>TTAGTACACAGT</u>	<u>GATGACAATGAC</u>
HTLV-II	<u>AAGACAAACA</u>	<u>TGACAATGGC</u>

とは、U5 に比してU3側にゲノム欠失したクローンが多くみられること(2:6図3)、および以前著者が報告したHTLV-Iのプロウイルスの上流側のLTRにゲノムの部分欠失が多くみられること(文献1参照)と関連している可能性がある。

文献:

1. Hiramatsu, K., and H. Yoshikura. Frequent partial deletion of human T cell leukemia virus type 1 proviruses in experimental transmission: Pattern and possible implication. 1986. J. Virol. 58:508-512.
2. Hiramatsu, K., K. Yamamoto, and H. Yoshikura. Molecular cloning and sequence analysis of 2-LTR junction of HTLV-I closed circular proviruses. submitted.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:レトロウイルスの核外遺伝子は、感染宿主細胞染色体への組み込み前駆体であり、この DNA の構造の研究は、レトロウイルスの宿主への感染成立のメカニズムを解明する上で重要である。HTLV-1 の場合には、この DNA(特に 2-LTR 環状体)はきわめて微量であるのみならず、遺伝子クローニングに用いる宿主大腸菌内での相同組換えによるゲノム欠失が頻発するため、その構造の研究は極めて困難であった。著者らは昨年までに PCR を用いて効率よく 2-LTR 環状体の連結部をクローン化できることを示した。本年度は、さらにそのクローン数を増やし、MMLV(Moloney Murine leukemia virus)の感染細胞から同様の方法でクローン化した 2-LTR 連結部と併せてその構造を解析した。