

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 Studies on the host chromosomal DNA structure at
retroviral proviral DNA integration sites

和訳 レトロウイルスのプロウイルス DNA 組込み部位の宿主染色
体 DNA 構造に関する研究

指導教官 野本 明男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 1 1 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 金 芸鋒

レトロウイルスの宿主染色体への組込み過程においては、染色体の高次構造が最も重要であると考えられるが、宿主 DNA の一次構造もプロウイルスの組込み標的の選択に関与する可能性が考えられる。

最近、当研究室で樹立された Solo LTR Inverse PCR 法で、モロニーマウス白血病ウイルスのモノクローンのプロウイルス組込み部位の解析が報告された。Solo LTR Inverse PCR 法のプロウイルスと宿主 DNA junction の上流、下流

の塩基配列を同時に解析できる特徴を用いて、多クローンのプロウイルスを持つウイルス感染細胞集団の解析に着目し、組込み部位における細胞側 DNA 配列の特徴を検討した。

両末端の LTR の R 領域に *loxP* 配列を挿入し、HSV-1 の *tk* 遺伝子を選択マーカーとするモロニーマウス白血病ウイルスベースのベクター pLTL(*lox*) を作製し、齧歯類の繊維芽細胞 Rat2 に感染させた。その後、アデノウイルスベクターを用いて Cre 蛋白を発現し、Cre-*loxP* 組換え機構によりプロウイルスを切り出した。プロウイルスの切り出された *tk*⁻ 細胞を BVdU で選択し、そこから DNA を抽出して Inverse PCR 法で解析を行った。

5 つの独立した感染実験から、総数 1 5 1 個の組込みイベントが得られ、その中から 3 8 カ所の異なる組込み部位が同定できた。これらの標的配列の GC 含有量は 4 2 . 6 % で、宿主細胞染色体 DNA とほぼ同じであった。3 8 カ所の組込み部位の約半数の標的配列は種々の反復配列によく類似していることが BLAST 検索から明らかとなった (表 1)。

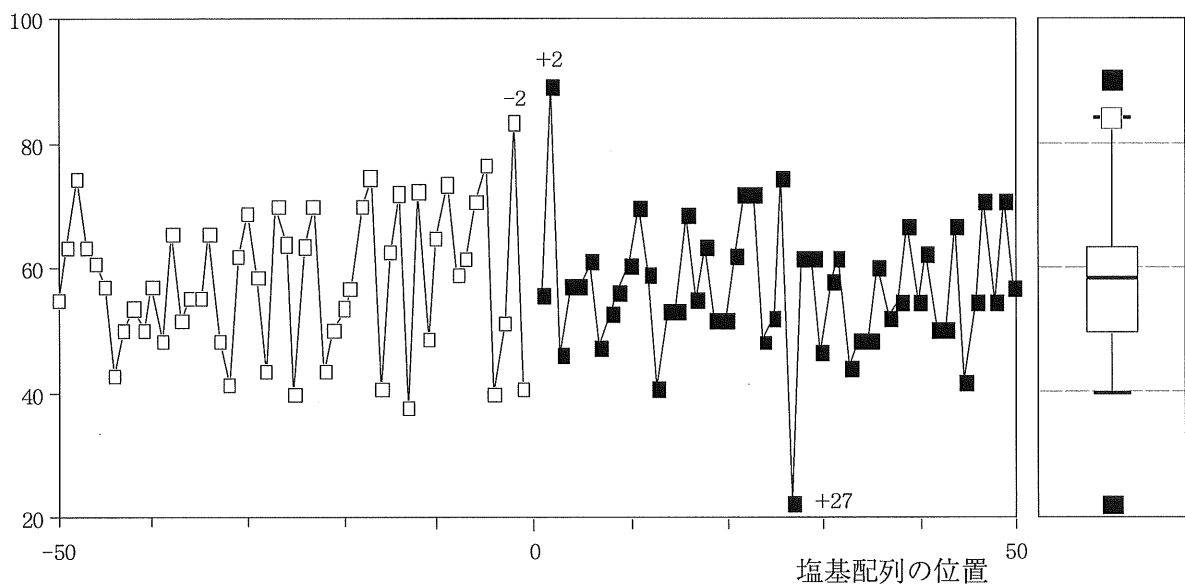
表 1、 組込み塩基配列の分類

配列種類	数	比例 (%)
反復配列		
SINE	8	2 1 . 0
LINE/L1	3	7 . 9
Satellite DNA	2	5 . 3
単純反復配列	3	7 . 9
その他	2	5 . 3
未知の配列	2 0	5 2 . 6

特に3カ所の組込み部位からは、 $(G_1-2T_1-2)_n$ 、 $(CATA)_n$ 、 $(CCTT)_n$ という単純反復配列に極めて似ていることが明らかとなった。これらの反復モチーフは integrase の標的選択に関与している可能性が示唆された (表1)。

同定できた38カ所の組込み部位の各塩基ごとの AT 含有量 (%) を算出した結果、プロウイルスの上流-2位と下流+2位は A/T リッチ、下流+27位は G/C リッチである傾向が見出された。さらに Box Plox 分析を行い、下流+2位と+27位は中央値 (Median) の1.5倍以上外れた値 (Outlier) になり、上流-2位は残りの98塩基位の AT 含有量の中の一番高い数字であることがわかった (図1)。このような組込み部位の近傍塩基配列の特徴は integrase の宿主 DNA の選択に関与している可能性が示唆された。

図1、プロウイルス組込み部位塩基配列の位置ごとのAT含有量



モロニー Maus 白血病ウイルスは、プロウイルスの両側に宿主 DNA 由来の4塩基の重複配列を生じることが知られている。本研究で同定された38カ所の組込み部位のうちの30カ所はそれに相当し、4塩基の重複配列の真ん中の

2塩基が AA、TT、AT からなる傾向があった。残りの7カ所は5あるいは3塩基からなる重複配列を有していた。これらのプロウイルスと宿主 DNA junction 構造を解析した結果、ウイルス integrase が組込み過程を触媒する際、特に DNA プロセッシング過程と宿主 DNA の認識、切断の過程においてのエラーによって生じた可能性が示唆された。また、1カ所の組込み部位から2組の上下異なる重複配列を持つ姉妹クローンが得られた。その1つは上流が5' -CTAG-3'、下流が5' -TTAG-3' で、もう1つは上流が5' -CTAA-3'、下流が5' -CTAG-3' であった。このクローンにおいては、修復過程でウイルス塩基の除去が阻害され、それが修復されないまま、宿主細胞の分裂を伴う DNA 複製が起こった可能性が示唆された。

また、本研究の解析法は導入された遺伝子の発現効率に依存するため、選択試薬がプロウイルス組込み部位の解析に与える影響を検討した。その結果、長期的に感染細胞を HAT 存在下で継代すると、異なるプロウイルス組込み部位を持つ細胞クローンの多様性が減少する傾向が認められた。これは、HAT は異なるレベルで各細胞クローンの増殖に影響を与えていると考えられる。同様な傾向は BVdU によるネガティブ選択過程では認められなかった。

本研究により、Solo LTR Inverse PCR 法がレトロウイルスの組込み部位の特異性の解析に有効であることが明らかとなった。しかし、感染細胞集団のプロウイルス組込み部位の解析を自然感染に近い状況下で行うためには、Solo LTR Inverse PCR 法のさらなる改良が必要である。自己増殖可能な組換えモロニーマウス白血病ウイルスを用いて感染実験を行い、プロウイルスの発現効率に非依存的な解析を行う必要がある。