

[ 別紙 2 ]

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 金 芸 鋒

本研究はレトロウイルスの生活環において子孫ウイルスの増殖と感染に重要な役割を演じる宿主染色体への組込み過程に着目し、宿主細胞の機能に多様な影響を与えると考えているプロウイルスの組込み部位の特異性を明らかにするため、ラット繊維芽細胞 Rat 2 を用い、新たに開発した Solo LTR Inverse PCR 法で感染細胞集団におけるプロウイルス組込みの標的となる宿主 DNA の解析を試みたもので、下記の結果を得ている。

1、Solo LTR Inverse PCR 法に Cre-loxP 組換え機構と Nested Inverse PCR 法を導入することにより、プロウイルス組込み部位の上流と下流の宿主 DNA を同時にクローニングでき、感染細胞集団における組込み部位のライブラリーの作製に有用であることが認められた。また、ライブラリーから得られたプラズミドには、ほぼ一つのインサートを含めていることが認められた。

2、LTL(lox)ウイルスを Rat 2 に感染する 5 つの独立した感染実験から、合計 151 カ所の組込みイベントが得られ、異なる宿主 DNA 配列を持つ組込み部位 38 カ所が同定できた。この 38 カ所の組込み部位の各塩基位置ごとの A/T 含有量を解析した結果、上流-2 位と下流+2 位は A/T リッチ、下流+27 位は G/C リッチな傾向が認められた。前者の上流-2 位と下流

+2位の A/T リッチな傾向は、ウイルス integrase の標的 DNA の選択に関与する可能性が示唆された。

- 3、単離された38カ所の組込み部位を用いて既知の配列との相同性を検索した結果、40%弱の部位は多種類の反復配列の中あるいは近傍領域によく似ていることが明らかとなった。3カ所には、プロウイルスが $(G_1-2T_1-2)_n$ 、 $(CATA)_n$ 、 $(CCTT)_n$  などの単純反復モチーフの中に組込まれ、integrase の標的 DNA 選択とノンランダムな cross-over に関与していると示唆された。
- 4、8カ所の組込み部位のプロウイルス-宿主 DNA ジャンクションに非典型的な重復配列が見つけれ、その中の6カ所には5塩基、1カ所には3塩基、1カ所には二組の上下異なる4塩基の重復配列を持つ同じ組込みクローンが得られた。これらの非典型的な重復配列は、ウイルス integrase がウイルス DNA の3' -プロセッシングと標的 DNA の切断におけるエラーによって、生じたと考えられた。
- 5、プール#5において、HAT と BVdU などの試薬が組込み部位の解析に与える影響を検討した結果、長期の HAT 選択は HAT 耐性細胞集団における組込み部位の多様性を減少させる傾向があり、それはプロウイルスの組込みにより感染細胞が異なる増殖能を獲得し、HAT は異なるレベルで細胞の分裂増殖に影響を与えていると考えられた。同様な結果は BVdU の選択からは認められなかった。

以上、本論文はモロニーマウス白血病ウイルスの感染細胞集団において、プ

ロウイルス組込みの標的となる宿主 DNA の一次構造の解析から、Solo LTR Inverse PCR 法はプロウイルス組込み部位周辺の宿主 DNA の特異性の解析に有用であることが明らかにした。本研究は、これまで知られていなかったプロウイルスの上流-2 位と下流+2 位の AT リッチな傾向は標的 DNA の選択、ウイルス integrase のエラーによる非典型的な重複配列の形成メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。