

リスザルレトロウイルス LTR 関連ヒト遺伝子の 分子クローニングと構造解析

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部門（指導：小田琢三教授）

長 尾 一 孝

（平成元年3月23日受稿）

Key words : ヒト内在性レトロウイルス, リスザルレトロウイルス,
Long terminal repeat, 分子クローニング

緒 言

レトロウイルスは細胞に感染後そのゲノム RNA が逆転写酵素で DNA に変換され、宿主染色体 DNA にプロウイルスとして組込まれる。この挿入プロウイルス DNA よりゲノム RNA およびウイルス構成蛋白質 mRNA が転写生成されてウイルス粒子が形成される。従来レトロウイルスはそのウイルス粒子の電子顕微鏡的形態より A, B, C, D 型に分類されている。レトロウイルスの研究は、古くからトリやマウスなどの動物を主体として展開されてきたが¹⁾、近年ヒトでも成人 T 細胞白血病の病因となるヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1)²⁻⁴⁾ や AIDS の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV)⁵⁻⁷⁾ 等が発見され、ヒトの病気との関連性が重要視されている。個体間で水平に伝播する外来性レトロウイルスは、時として生殖細胞を通じて染色体 DNA に組込まれ、内在性レトロウイルスとしてメンデルの法則にのっとり宿主遺伝子と同様に代々安定な形で継代遺伝されることがある^{8,9)}。ヒトゲノム DNA 中にも長い進化の間に多種類の内在性レトロウイルスが組込まれ、染色体上に散在していることが報告されており、現在これらプロウイルスの遺伝子のクローニングならびに遺伝子構造の解明がなされつつある¹⁰⁾。これまでにヒト内在性ウイルスとしてクローニングされたものは、現存の A 型・B 型あるいは C 型ウイルスの遺伝子をプローブとしてクローニングされたもの¹¹⁻¹⁸⁾、レトロウイルスの逆転写反応

に必要なプライマー tRNA 結合部位を指標にしてクローニングされたもの^{19,20)}、または他の遺伝子の研究中に偶然見出されたものなどである²¹⁻²³⁾。トリやマウスの内在性レトロウイルスでは細胞の分化・発生との関連^{24,25)} や癌・自己免疫疾患等の病気との関連性²⁶⁻²⁸⁾ を示唆する報告もあるが、ヒト内在性レトロウイルスの機能については未だ明確になっていない。

内在性レトロウイルスは定型のものとは通常のプロウイルスと同様に構成蛋白質 (*gag*)、逆転写酵素 (*pol*) 外被膜蛋白質 (*env*) をコードする遺伝子が LTR (long terminal repeat) にはさまれて存在する遺伝子配置をもち、これらの遺伝子はウイルスの粒子形成、増殖、感染などに必要である。しかしすでにクローニングされたヒト内在性レトロウイルスではそれらの遺伝子内に終止コドンが存在し、すでに蛋白質をコードすることができなくなっている場合^{14,15)} や遺伝子の一部が欠損している場合^{17,29)} も多くある。LTR は U3 (U: unique), R (repeat), U5 部分より構成され、U3 部分にはエンハンサー配列、および CAT box, TATA box などのプロモーター配列をもち、R (もしくは U3) 部分には poly(A) 付加シグナルなどがある³⁰⁾。すなわち LTR にはウイルス遺伝子の転写の開始、終止に関する情報が存在する。またこの LTR 中のプロモーターは染色体遺伝子のプロモーターとしても働くこともでき、ヒトの内在性レトロウイルス LTR が挿入部位近傍の宿主遺伝子を転写することも報告されている³¹⁾。

Odaらは、ヒトリンパ芽球様株化細胞(HLB)より産生するレトロウイルスを見出し^{32,33)},そのプロウイルスゲノムをクローニングして全塩基配列と遺伝子構造を決定した³⁴⁾.このウイルスゲノムは一部の塩基配列が報告されているリスザルレトロウイルス(SMRV)のLTRあるいは*pol*の一部の塩基配列^{35,36)}と高い相同性をもつことよりSMRV_{HLB}(SMRV-Hと略称)命名されている³⁴⁾.SMRVは代表的なD型レトロウイルスであり³⁷⁻³⁹⁾,新世界ザルであるリスザルの内在性ウイルスとして長い間垂直伝播されてきた^{40,41)}.SMRV-Hはレトロウイルス全体でよく保存されている*pol-env*の一部の領域を除いてはA,B,C型レトロウイルスとは関連性が余りなく,SMRVを除くD型レトロウイルスとも異なる³⁴⁾.特にLTR領域のDNA配列は固有のものである.またSMRV-Hはヒトの細胞に感染・増殖することができ³³⁾,特にリンパ球系細胞で強い転写活性を有する⁴²⁾.

本研究はSMRV-HのLTRをプローブとして,SMRVと相同性を持つヒト内在性レトロウイルスのクローニングとその遺伝子解析を目的として行なった.弱いサザンハイブリダイゼーションの条件下で,ヒトゲノムDNA中にSMRV関連遺伝子が検出できることが前段階の研究により示されている⁴³⁾.その条件でSMRV LTRをプローブとしてヒトゲノミックライブラリーをスクリーニングし,得られた陽性クローンを解析した結果,それらのクローンのうちいくつかのものがレトロウイルス様構造をもつことが示された.

材 料 と 方 法

1. 材 料

アガロースゲル電気泳動用のゲルはBio-Rad社(Low-Mr)より,制限酵素,DNAリカーゼ,Klenow酵素および大腸菌アルカリホスファターゼは東洋紡績株式会社または宝酒造株式会社より,ヒト白血球DNA由来ゲノミックライブラリーはCLONTECH社より, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3000Ci/mmol)はICN社より,ニックトランスレーションキットはAmersham社(N.5000)よりそれぞれ購入した.プローブDNA(図1)

はSMRV-HのcDNAをもつプラスミドpHVQ⁴⁴⁾およびSMRV-Hの全プロウイルスゲノムをもつプラスミドpSMH³⁴⁾より制限酵素で切出し,アガロースゲル電気泳動で分離・精製した後,ニックトランスレーションにより³²P標識した.*Alu*配列の検出にはBLUR8(*Bam*H I-linked ubiquitous repeat, Oxford大学, Dr T. Friedmanより恵与)⁴⁵⁾をプローブとしてもちいた. λ ファージの指示菌として*Escherichia coli* LE392を,プラスミドの宿主菌として*E. coli* HB101をもちいた.TB培地は1000ml当り10gのBacto-tryptone(Difco社),5gのNaCl,10mlの1M MgSO₄,および10mlの20%マルトースを含む.NZY培地は1000ml当り10gのNZ Amine(和光純薬工業株式会社,Type A),5gのNaCl,5gのBacto-yeast extract(Difco社),および2gのMgSO₄·7H₂Oを含む.LB培地は1000ml当り10gのBacto-tryptone,5gのBacto-yeast extract,および10gのNaClを含む.すべての組換えDNA実験は文部省のガイドラインに従って行なった.

2. SMRV-H LTR 関連ヒト遺伝子のクローニング

ヒト白血球DNA由来ゲノミックライブラリーをSMRV-H LTR(図1,プローブa)をプローブとしてブランクハイブリダイゼーション^{46,47)}でスクリーニングした.もちいたライブラリーはEMBL 3⁴⁸⁾をベクターとして作成され,インサートDNAの平均長は16kbで,8.8×10⁵個の独立なファージクローンを含んでいる.*E. coli* LE392を25mlのTB培地で30°C,1晩培養し,集菌後10mlの10mM MgSO₄に懸濁した.ファージの感染時に指示菌懸濁液を600nmにおける吸光度が0.5になるようにファージ希釈液(0.1M NaCl,8mM MgSO₄,50mM Tris-HCl,pH7.5,および0.01%ゼラチンを含む)で希釈して使用した.指示菌液200 μ lに2×10⁴pfu(plaque forming unit)のファージ溶液を混ぜ37°C,20分間保温し感染させた.3mlの上層寒天培地(0.7%のアガロースを含むNZY培地)と混ぜ直径10cmのシャーレ(1.5%のBacto-agarを含むNZY培地)にまき,37°Cで培養した.全体で4.4×10⁵pfuのファージを22枚のシャーレにまいた.充分な

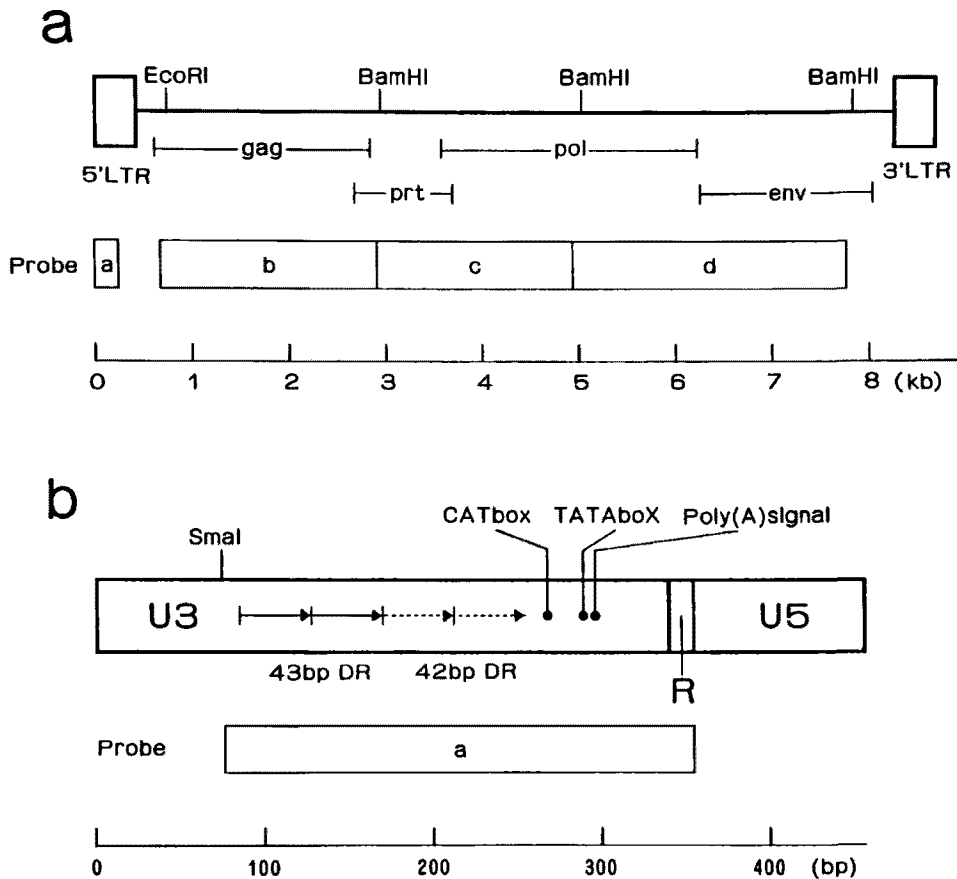


図1 SMRV-Hの構造と使用したプローブの領域
SMRV-Hの全遺伝子(a)とLTRの遺伝子構造(b)およびプローブとして使用した領域をOdaらの結果³⁴⁾をもとにして作成した。□で囲んだ領域(プローブa~d)をプローブとしてそれぞれのハイブリダイゼーションにもちいた。図中のDRはdirect repeatを意味する。

大きさのプラークが形成された後、シャーレを4℃に冷却した。円形のニトロセルロースフィルター(Schleicher & Schuell社, φ82mm, 0.45 μm)を寒天上に1分間置きファージを吸着させた。変性溶液(0.5M NaOHと1.5M NaClを含む)で1分間、中和溶液(0.5M Tris-HCl, pH7.5と1.5M NaClを含む)で5分間、2×SSPE(1×SSPEは0.18M NaCl, 0.01M リン酸ナトリウム, pH7.4, 0.002M EDTAを含む)で1分間、それぞれ処理した後、風乾しさらに80℃で2時間焼付けた。フィルターを6×SSC(1×SSCは0.15M NaClと0.015M クエン酸ナトリウムを含む)で湿らせた後、50mM Tris

-HCl (pH7.5), 1M NaCl, 1mM EDTAおよび0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含む溶液中で、42℃、3時間振とうした。ハイブリダイゼーションは後述する条件で行なった。陽性プラークの単離を行なうため、同様の操作をさらに2回行なった。

3. サザンブロッティング

制限酵素で切断したDNAを0.8%アガロースゲルで、小型電気泳動装置(アドバンス社, ミューピッド-2)を用いて電気泳動した。0.5 μg/mlのエチジウムブロミド溶液でDNAを染色した後、写真撮影した。ゲルを変性溶液(0.5M NaOHと1.5M NaClを含む)中で1時間振とうした後、

ブロットング溶液 (0.25M NaOH と 1.5M NaCl を含む) をもちいて DNA を毛細管法でナイロンフィルター (Amersham 社, Hybond-N) に移した⁴⁹⁾。約 16 時間ブロットングを行なった後、フィルターを 2×SSC で軽く洗浄し、風乾後ハイブリダイゼーションにもちいた。

4. ハイブリダイゼーション

ブランクハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーションおよびサザンハイブリダイゼーションは特別に記さない限り下記の条件⁴⁹⁾で行なった。フィルターを 35%ホルムアミド (ホルムアミドは Bio-Rad 社の AG501-X 8 イオン交換樹脂, 20~50 mesh, で脱イオンして使用した), 6×SSC, 10×Denhardt 溶液 [1×Denhardt 溶液は 0.02% フィコール (Sigma 社, Type400), 0.02% 牛血清アルブミン (Armour 社, F-V), 0.02% ポリビニルピロリドン (片山化学工業株式会社, K-90) を含む], 0.5% SDS と 0.1 mg/ml 変性サケ精子 DNA (Sigma 社, Type III) から成るハイブリダイゼーション緩衝液中で 42°C 約 16 時間加温した後, ³²P で標識した変性プローブ DNA (約 2 × 10⁶ cpm/ml) を加えたハイブリダイゼーション緩衝液中でハイブリダイゼーションを 37°C, 約 48 時間行なった。フィルターをそれぞれ 0.1% SDS を含む 6×SSC で 1 回, 3×SSC で 1 回, 1×SSC で 3 回, 順次 50°C, 20 分間ずつ洗浄した。洗浄したフィルターは風乾後サランラップに包み, 増感紙 (DuPont 社, Lightning-Plus) をもちいてフジ RX 医療用 X-線フィルム (フジ写真フィルム株式会社) に -60°C で 16~72 時間露出し, オートラジオグラフィを行なった。

5. サブクロニングと制限酵素地図の作成

単離された陽性ブランクからファージをつまようじでつりあげ, 指示菌 LE392 で大量増殖させ, ファージ DNA を抽出した。制限酵素 *Sal* I で切断しアガロースゲル電気泳動でインサート DNA とベクター DNA を分離した後, ガラスビーズ (Bio 101 社, GLASSMILK™) を用いてインサート DNA 断片を回収, 精製した。*Sal* I で切断し脱リン酸化した pBR322 DNA にインサート DNA を加えライゲーション反応を行なった後, *E. coli* HB101 の形質転換を行なった。

Ampicillin に耐性で tetracycline に感受性のコロニーを選択した後, プラスミド DNA を抽出し制限酵素による切断により組換え体の確認を行なった。

インサート DNA の制限酵素地図は pBR322 にサブクロニングされた組換え体プラスミドを用いて作成した。単一の酵素による切断, 複数の酵素による切断, またそれらの切断により生じた断片を低融点アガロースゲル (株式会社ニッポンジーン, Agarose L) を用いて取り出し⁴⁷⁾, さらに制限酵素による切断をおこなった後, アガロースゲル電気泳動で DNA 断片の長さを測定し作成した。サイズマーカーとして λ ファージ DNA を *Hind* III で切断したものと pBR322 DNA を *Bst* N I で切断したのもをもちいた。

結 果

1. SMRV LTR 関連ヒト遺伝子のクローニング

SMRV LTR に関連したヒト遺伝子を, 正常ヒト白血球由来ゲノミックライブラリーからス

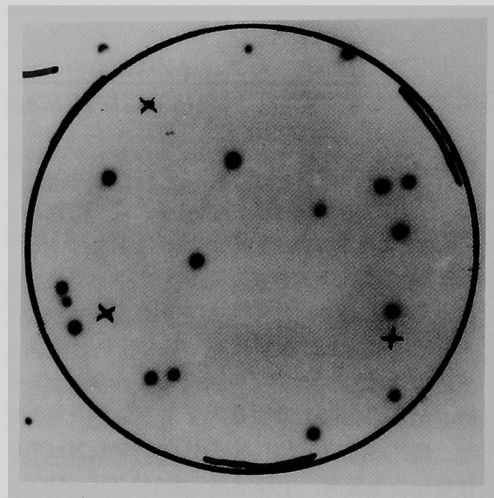


図 2 ブランクハイブリダイゼーションによる陽性クローン検出の一例
一次スクリーニングで陽性のブランクを, 1 シャーレ当たり約 10³ 個ブランクが出現するように希釈し感染させた。材料と方法に示したようにブランクハイブリダイゼーションを行なった所, 複数の陽性シグナルが検出された。x 印は目印に付けた pin hole である。

クローニングした。ヒトゲノム DNA 中の SMRV LTR 関連遺伝子は弱い条件でサザンハイブリダイゼーションを行なうことにより検出できることが前段階の研究⁴³⁾によりわかっている。そこで本研究においても材料と方法で示した弱いハイブリダイゼーションの条件でスクリーニングを

行なった。4.4×10⁵個のファージをプローブ a をもちいてブランクハイブリダイゼーションでスクリーニングしたところ50個以上の陽性クローンが得られ、その陽性クローンを λSRH (SMRV-related human sequence) と命名した。そのうち8個を選んで、ブランクの単離を行なった

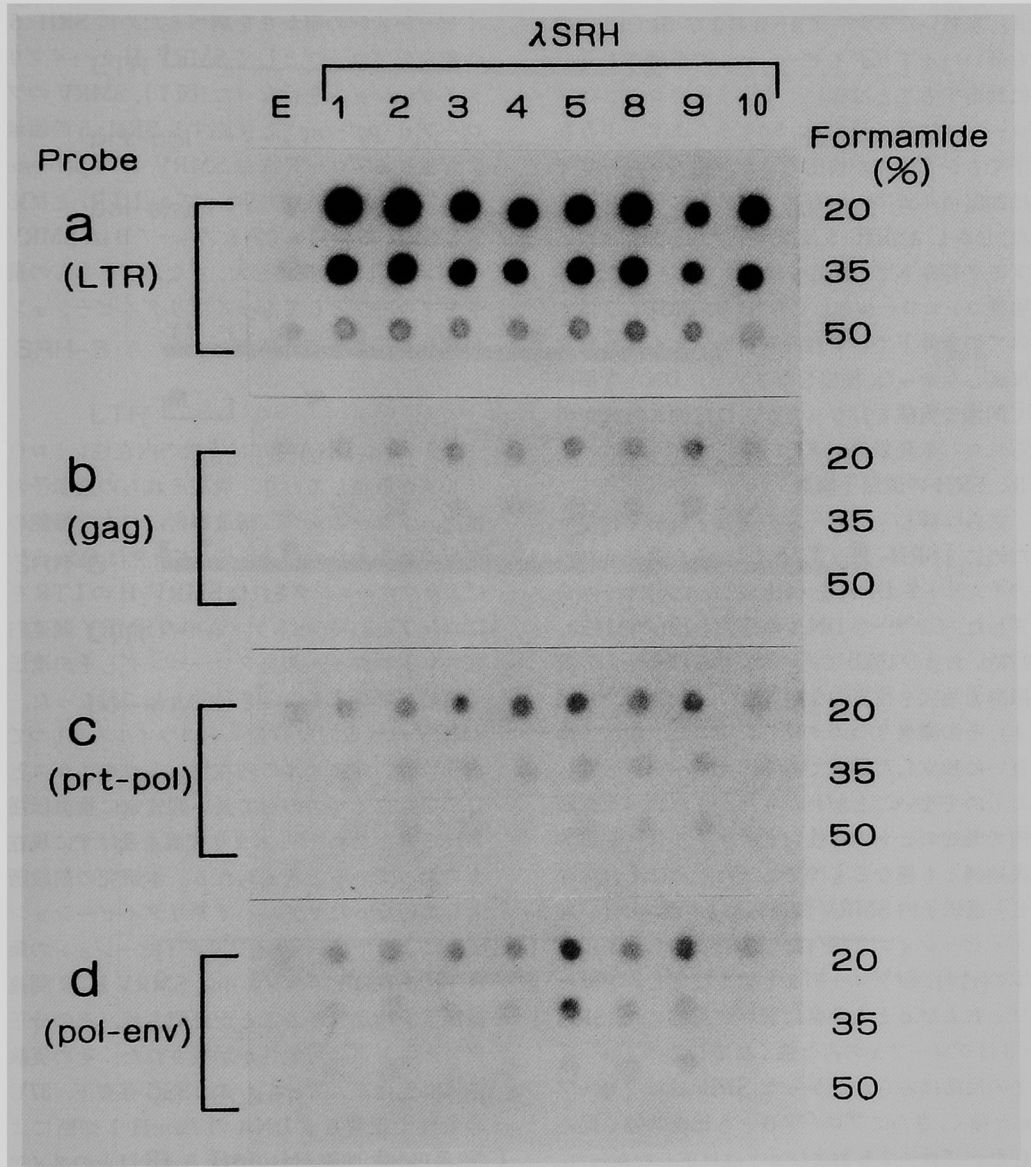


図3 SMRV LTR 関連ヒト遺伝子をもつファージクローンのドットハイブリダイゼーション
約10⁹pfu/mlのファージ溶液を1μlづつナイロンフィルターにスポットした。図中のEはベクターであるEMBL 3を、番号は各ファージクローン (λSRH) を示す。材料と方法に示したブランクハイブリダイゼーション法と同様な操作でハイブリダイゼーションを行なった。ただしハイブリダイゼーションの条件は図右に示したホルムアミド存在下で行なった。図左にもちいたプローブ名を示した。

(1例を図2に示す)。

2. λ SRH と SMRV プローブとの反応性

λ SRH と SMRV の LTR や他の遺伝子 (*gag*, *prt*, *pol*, および *env*) との相同性を調べるために、3種類のハイブリダイゼーションの条件下でドットハイブリダイゼーションを行なった(図3)。もちいたプローブ a~d および BLUR8 は最も弱いハイブリダイゼーションの条件でも互いに反応することはない。すべてのクローンはプローブ a に強く反応し、50%ホルムアミド存在下でもシグナルが検出できた。他のプローブでは20%ホルムアミド存在下で非常に弱く反応した。しかし λ SRH-5 はプローブ d と35%ホルムアミド存在下でも反応を検出することができた。陰性コンコントロールとしてもちいた EMBL 3 はすべての条件下でいずれのプローブともまったく反応しなかった。抽出したファージ DNA を用いて同様な実験を行なったが、ほぼ同じ結果が得られた(未発表データ)。

3. SRH の遺伝子構造

さらに詳しくクローンの遺伝子解析を行なうために λ SRH-1, -3, および-5 を選びそれらのインサート DNA を pBR322 にサブクローニングした。インサート DNA の長さはそれぞれ16kb, 12kb, および15kb であった。さらにそれらの制限酵素地図を代表的な酵素について作成した(図4)。その結果3つのクローン中のヒト遺伝子は互いに独立した領域であり、オーバーラップしたものでないことがわかった。また調べた範囲内で既知のヒト内在性レトロウイルスの制限酵素地図とも異なるものであった。次にそれらのヒト遺伝子内 SMRV 関連領域をサザンハイブリダイゼーションで調べた(図5)。SRH-1 は2本のバンドがプローブ a と強く反応し、プローブ c および d も非常に弱いが反応した。SRH-3 はプローブ a のみと強く反応し他のプローブとの反応はみられなかった。SRH-5 はプローブ a と強く、さらにプローブ d とも比較的強く反応したがプローブ b および c とは反応しなかった。他の制限酵素を用いた切断およびハイブリダイゼーションの結果とあわせて、SMRV のプローブと反応した領域をそれぞれ制限酵素地図内に示した(図4)。また SRH-5 中の SMRV LTR

や *pol-env* と反応する領域にヒト *Alu* がそれぞれ存在していることがわかった(図6)。

4. SRH をプローブとした SMRV とのハイブリダイゼーション

プローブ a の他にプローブ d とも比較的強く反応した SHR-5 の配列について、ハイブリダイゼーションの確かさを調べるために SRH-5 の断片をプローブとして SMRV-H とハイブリダイゼーションを行なった(図7)。SMRV のプローブ d (*pol-env*) と反応する SRH-5 の領域に含まれるプローブ A は SMRV-H の *pol-env* と反応し、SMRV のプローブ a (LTR) と反応する SRH-5 の領域であるプローブ B は、SMRV-H の 3'LTR と反応した。すなわちどちらの遺伝子をプローブとしてもハイブリダイゼーションが起きることが示された。

考 察

ヒトゲノム DNA 中には多数の内在性レトロウイルスが散在しており、現在それらの遺伝子の検出、クローニング、構造解析、および機能の解析が行なわれつつある¹⁰⁾。本研究は Oda ら³⁴⁾によりクローニングされた SMRV-H の LTR をプローブとして、ヒトゲノム中の SMRV 関連内在性レトロウイルスをクローニングしその遺伝子構造を解析することを目的として行なった。SMRV は代表的な D 型レトロウイルスの1つであり³⁷⁻³⁹⁾、リスザルの内在性レトロウイルスとしてプロウイルスの形で長い間安定に垂直伝播されて来たため^{40,41)}、あまり変異を受けずに現在まで至っていると考えられる。本研究の前段階として行なったサザンハイブリダイゼーション実験により⁴²⁾、弱いハイブリダイゼーションの条件下であればヒトゲノム中に SMRV LTR 関連遺伝子を検出できることが証明され、その分子クローニングの可能性が示唆された。その実験では35%ホルムアミド、6×SSC 存在下、37°C の条件で正常ヒト DNA の *Bam*H I 切断により、3.0kb の明瞭なバンドと 5 kb 以上のスメアー中に複数本のバンドが確認された。それらのバンドがヒト内在性レトロウイルスのものであるかどうかはその遺伝子のクローニングおよび構造解析を行なう必要がある。また SMRV-H は

ヒトの細胞に感染し、増殖することができ³³⁾, しかもそのLTRの転写プロモーター活性はヒトの細胞, 特にリンパ球系の細胞で他のプロモータ

ーと比べ非常に強いことが証明されている⁴²⁾. すなわちヒト DNA 中にも SMRV LTR と類似なプロモーター配列が存在し, それからの転写や

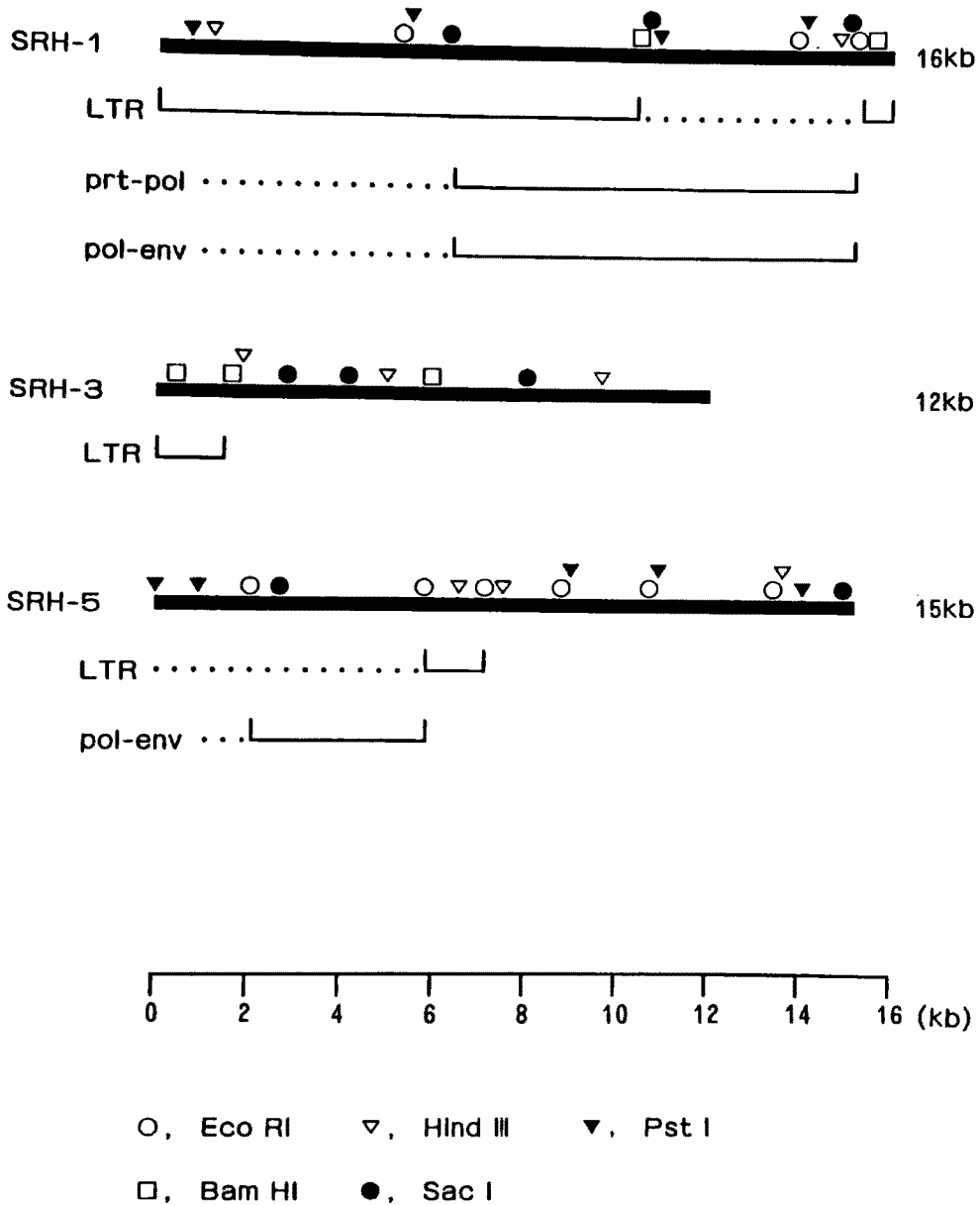


図4 SMRV LTR 関連ヒト遺伝子の制限酵素地図と SMRV に関連した領域
 各クローンを pBR322 にサブクローニングし制限酵素地図を作成した. 各制限酵素切断部位は図下に示す
 ような記号で示した. また図5に示すハイブリダイゼーション実験等により得られた SMRV 関連領域を
 地図の下に示した.

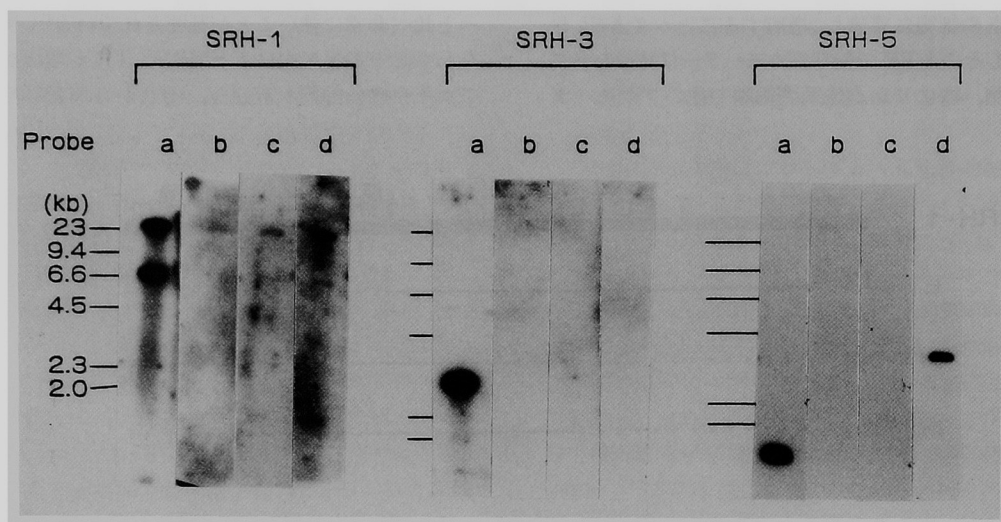


図5 SMRV LTR 関連ヒト遺伝子のサザンハイブリダイゼーション
pBR322にサブクローニングした SMRV LTR 関連ヒト遺伝子を *Sal* I で切り出し、回収・精製した後、*Eco*R I で切断しアガロースゲル電気泳動で断片を分離した。サザンプロットングした後、プローブ a ~d を用いてハイブリダイゼーションを行なった。SRH-1 は他のものより約3倍長く露出した。

転写調節を通常行なっている特異的な蛋白質が実験的に加えた SMRV LTR に作用したものと考えられる。従って弱いハイブリダイゼーションの条件下で検出されたバンドが内在性レトロウイルス以外のものである可能性も否定できない。

本研究ではサザンハイブリダイゼーションで見出した関連遺伝子を検出する条件をもちいてヒトゲノミックライブラリーをスクリーニングした。このライブラリーはヒト DNA を *Sau*3A I で部分消化し、ベクター EMBL 3 を用いて作成したものである。計算上 8×10^5 個の独立な組換え体ファージをスクリーニングすればヒトの全ゲノムをカバーすることができる⁴⁷⁾。SMRV LTR に特異的なプローブとして用いたプローブ a は LTR に含まれる転写およびその調節に関与する領域、すなわちエンハンサーと考えられる 43bp と 42bp の direct repeat (その内にはグルコルチコイドに反応する配列や転写因子 AP-1 の結合部位に関連した配列も存在する)、さらに CAT box, TATA box および poly (A) 付加シグナル等が存在する領域を含んでいる³⁴⁾(図 1-b)。今回約 4×10^5 個の独立なファージをこのプローブでスクリーニングしたところ 50 個以上

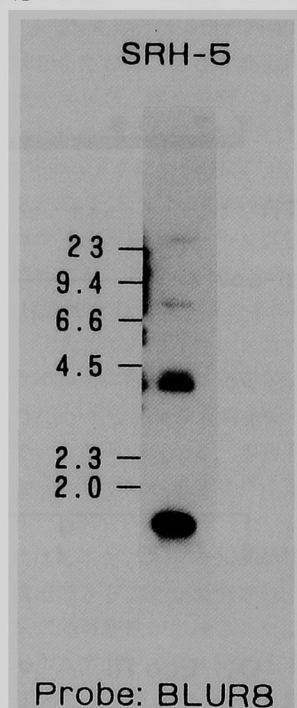


図6 SRH-5 に存在する *Alu* 配列の検出
図5に示した様に、作成した SRH-5 の *Eco*R I 断片と BLUR8 とのハイブリダイゼーションを行なった。図中 4.3kb のバンドは SMRV のプローブ d とまた 1.3kb のバンドはプローブ a とそれぞれ反応する。

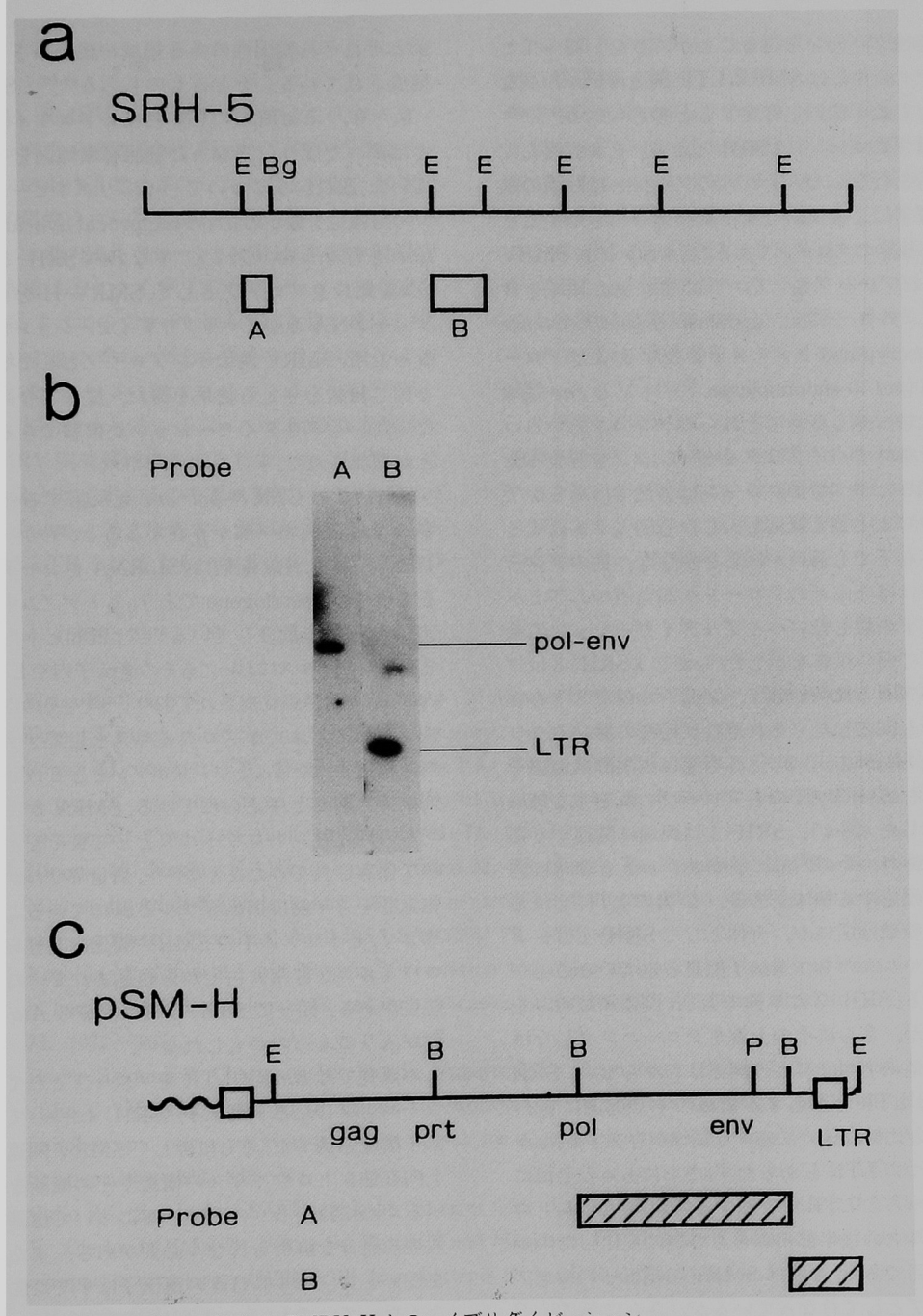


図7 SRH-5をプローブとしたSMRV-Hとのハイブリダイゼーション
 (a) SRH-5の0.5kb *EcoR* I - *Bgl* II断片 (A)と1.3kb *EcoR* I断片 (B)をアガロースゲル電気泳動で回収、精製しプローブとした。
 (b) pSM-Hの8.2kb *EcoR* I断片を *Bam*H Iで切断、サザンブロッティングし、プローブAおよびBをもちいてハイブリダイゼーションを行なった。
 (c) 上記の結果を図示した。SMRV-Hの の領域がそれぞれのプローブと反応した。(a)と(c)の図中の制限酵素切断部位は以下の様に略記した。E, *EcoR* I ; B, *Bam*H I ; Bg, *Bgl* II

の陽性クローンを得ることができた。従ってヒトゲノム中には SMRV LTR 関連遺伝子が少なくとも数十個以上存在すると考えられる。

陽性クローン (λ SRH と命名) を 8 個選んで解析を行なった。それらのクローンは数種の制限酵素による切断で異なるパターンを示すことより独立のクローンであることがわかった。SMRV-H のプローブ a, プروب b (主に *gag* 領域を含む), プローブ c (protease と *pol* の reverse transcriptase ドメインを含む), およびプローブ d (*pol* の endonuclease ドメインと *env* 領域を含む) をもちいてそれらのクローンといろいろな条件でハイブリダイゼーションを行なった (図 3)。すべてのクローンは当然ではあるがプローブ a と強く反応し、しかも 50%ホルムアミド存在下でも弱い反応を示した。他のプローブではほとんどのクローンが 20%ホルムアミド存在下の最も低いハイブリダイゼーションの条件下で弱い反応を示した。しかし λ SRH-5 はプローブ d と比較的強く、35%ホルムアミド存在下でも反応した。それぞれ反応性の異なるクローン SRH-1, -3, -5 を選び制限酵素地図を作成し SMRV-H の各プローブの反応する領域を示した (図 4)。SRH-1 は両端に関連する領域があり、その内部に *prt-pol-env* と非常に弱い反応する領域がある。5'側の LTR と反応する領域は広いが、全体として SRH-1 はレトロウイルスのもつ遺伝子配置と以ていることがわかる。SRH-3 は単独の LTR 関連領域のみをもつが、さらにその上流をクローニングしなければ他のプローブとの関連はわからない。SRH-5 は LTR と反応する領域のすぐ上流に *pol-env* と比較的強く反応する領域が存在する。しかし 1 つの LTR しかもたず、さらにもっと上流にもう一方の LTR が存在するのか、またはレトロウイルスの後半部のみをもつ型に変化したのかは不明である。今回は SMRV の遺伝子のみをプローブとして行なっているが、さらに A 型、B 型や C 型レトロウイルスの遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行なってみる必要がある。事実、すでにクローニングされた内在性レトロウイルスで現存のウイルスから考えるとモザイク構造 (数種のレトロウイルスの一

部とそれぞれ相同性のある領域が組合わさって構成されている) をとるものもある^{49,50}。SRH-1, -3, -5 は既知のヒト内在レトロウイルスとは調べた限り、異なった制限酵素地図をもっていた。SRH-5 についてハイブリダイゼーションの信頼性を確かめるため reciprocal hybridization を行なった (図 7)。すなわち SRH-5 の DNA 断片をプローブとして、SMRV-H をターゲット DNA としてハイブリダイゼーションを行なった所、SMRV 遺伝子をプローブとした場合と同じ結論を与える結果を得た。従って今回行なったハイブリダイゼーションが信頼できることが確認された。

SRH-5 の LTR や *pol-env* と反応する領域中に *Alu* 配列の一部が存在することがわかった (図 5, 6)。*Alu* 配列は 7SL RNA をコードする遺伝子の pseudogene であり、ヒトゲノム中に 10^4 コピー以上散在している^{51,52}。既知ヒト内在性レトロウイルスにおいてもその遺伝子内や LTR 内に *Alu* 配列が見出されており^{17,20,21}、その内在性レトロウイルスがプロウイルスとしてゲノム内に組込まれた後にトランスポゾンとして *Alu* 配列が挿入したと考えられている。SMRV がリスザルの内在性レトロウイルスとして長く安定な形で保存されてきたことや^{40,41}、新世界ザルが進化上 5 千万年前に旧世界ザルと別れていること等より、ヒトゲノム中の SMRV 関連内在性レトロウイルスが非常に古くから組込まれていた可能性がある。従って SRH-5 内に後から *Alu* 配列が入りこんだのかもしれない。

本研究では SMRV LTR をプローブとしてクローニングしたヒト遺伝子 (SRH) について遺伝子構造を調べた。さらに詳しく SMRV 関連ヒト内在性レトロウイルスの構造やその機能を調べるためには、多くのクローンについて塩基配列等の充分な解析を行なう必要がある。また内在性レトロウイルス自身の遺伝子はすでに働かなくなっているが、その LTR の転写プロモーター活性により下流の遺伝子の発現が起こることも報告されており^{10,31}、LTR とその近傍の遺伝子との関連も考慮し研究する必要がある。

結 論

1. SMRV LTR をプローブとしてヒトゲノミックライブラリーを弱いハイブリダイゼーションの条件下でスクリーニングした所、50個以上の陽性クローンを得た。

2. 8個の陽性クローン(λSRH)を選びSMRVの各遺伝子とハイブリダイゼーションを行なった所、すべてのクローンはLTRと強く反応した。さらに他のプローブとも反応するクローンも存在した。

3. SRH-1, -3, -5について制限酵素地図とSMRV 関連領域の決定を行なった。SRH-1はLTRと反応する2つの領域をもちその内部に *prt-pol-env* と弱く反応する領域があった。SRH-3はLTRと反応する一領域のみをもつ。SRH

-5はLTRおよび *pol-env* に反応する領域が隣接して存在していた。SRH-1, -3, -5の制限酵素地図は既知のヒトウイルスとは調べたかぎり異なっていた。またSRH-5のSMRV LTRおよび *pol-env* と反応する領域に高度反復配列である *Alu* 配列が存在していた。

4. 本研究ではSMRV LTR 関連ヒト遺伝子のクローニングを行ない、3つのクローンについてその遺伝子構造を解析した結果、それらがレトロウイルス様構造をもつことを示した。

本研究を遂行するにあたり、始終、御指導と、御校閲を賜りました恩師、小田琢三教授に深く感謝の意を捧げます。さらに、実験遂行にあたり始終快く御協力下さいました池田正五博士ならびに研究室の皆様にご心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin J : Molecular Biology of Tumor Viruses, 2nd Ed, RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982) .
- 2) Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD and Gallo RC : Detection and isolation of type C retrovirus from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci USA (1980) **77**, 7415—7419.
- 3) Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S and Miyoshi I : Adult T-cell leukemia : Antigen in an ATL cell line detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc Natl Acad Sci USA (1981) **78**, 6476—6480.
- 4) Yoshida M, Miyoshi I and Hinuma Y : Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. Proc Natl Acad Sci USA (1982) **79**, 2031—2035.
- 5) Barr'e-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Daugest C, Axler-Blin C, Vezinet-Brum F, Rouzioux C, Rozenbaum W and Montagnier L : Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) . Science (1983) **220**, 868—871.
- 6) Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P and Markham PD : Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science (1984) **224**, 500—503.
- 7) Gallo RC and Montagnier L : AIDS in 1988. Scientific American (1988) **259**, 25—32.
- 8) Jaenisch R : Endogenous retroviruses. Cell (1983) **32**, 5—6.
- 9) Coffin J : Endogenous viruses ; in RNA tumor viruses. Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin J eds, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1984) pp1109—1203.
- 10) 加藤宣之, 加藤美枝子 : ヒト内在性レトロウイルス遺伝子の構造と発現. 蛋・核・酵 (1988) **33**, 2357—2370.

- 11) Martin MA, Bryan T, Rasheed S and Khan AS : Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) **78**, 4892—4896.
- 12) Callahan R, Drohan W, Tronick S and Schlom J : Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 5503—5507.
- 13) Repaske R, O'Neill RR, Steele PE and Martin MA : Characterization and partial nucleotide sequence of endogenous type C retrovirus segments in human chromosomal DNA. : *Proc Natl Acad Sci USA* (1983) **80**, 678—682.
- 14) O'Connell C, O'Brien S, Nash WG and Cohen M : ERV3, a full-length human endogenous provirus : chromosomal localization and evolutionary relationships. *Virology* (1984) **138**, 225—235.
- 15) Ono M, Yasunaga T, Miyata T and Ushikubo H : Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* (1986) **60**, 589—598.
- 16) Deen KC and Sweet RW : Murine mammary tumor virus *pol*-related sequences in human DNA : characterization and sequence comparison with the complete murine mammary tumor virus *pol* gene. *J Virol* (1986) **57**, 422—432.
- 17) Leib-Mosch C, Brack R, Werner T, Erfle V and Hehlmann R : Isolation of an SSAV-related endogenous sequence from human DNA. *Virology* (1986) **115**, 666—677.
- 18) Silver J, Rabson A, Bryan T, Willey R and Martin MA : Human retroviral sequences on the Y chromosome. *Mol Cell Biol* (1987) **7**, 1559—1562.
- 19) Noda M, Kurihara M and Takano T : Retrovirus-related sequences in human DNA : detection and cloning of sequences which hybridize with the long terminal repeat of baboon endogenous virus. *Nucleic Acids Res* (1982) **10**, 2865—2878.
- 20) Harada F, Tsukada N and kato N : Isolation of three kinds of human endogenous retrovirus-like sequences using tRNA^{pro} as a probe. *Nucleic Acids Res* (1987) **15**, 9153—9162.
- 21) Maeda N : Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair : the haptoglobin-related gene contains a retrovirus-like element. *J Biol Chem* (1985) **260**, 6698—6709.
- 22) Mager DL and Freeman JD : Human endogenous retrovirus-like genome with type C *pol* sequences and *gag* sequences related to human T-cell lymphotropic viruses. *J Virol* (1987) **61**, 4060—406.
- 23) Emi M, Horii A, Nishida N, Ogawa M, Mori T and Matubara K : Overlapping two genes in human DNA : a salivary amylase gene overlaps with a gamma-actin pseudogene that carries an integrated human endogenous retroviral DNA. *Gene* (1988) **62**, 229—235.
- 24) Liebermann D, Hoffman-Liebermann B and Sachs L : Regulation of endogenous type C virus expression during normal myeloid cell differentiation. *Virology* (1980) **107**, 121—134.
- 25) Rasheed S : Role of endogenous cat retrovirus in cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1982) **79**, 7371-7375.
- 26) 佐方功幸 : マウス内在性ウイルスと発癌一組み換え (MCF) ウイルスとマウス白血病一。細胞工学 (1982) **11**, 181—191.
- 27) Merrigaert J, Janowski M and Reddy EP : Nucleotide sequence of a radiation leukemia virus genome. *Virology* (1987) **158**, 82—102.
- 28) Query CC and Keene JD : A human autoimmune protein associated with U1 RNA contains a region of homology that is cross-reactive with retroviral p30^{gag} antigen. *Cell* (1987) **51**, 211—220.
- 29) Steele PE, Rabson AB, Bryan T and Martin MA : Distinctive termini characterize two families of human endogenous retroviral sequences. *Science* (1984) **225**, 943—947.

- 30) Varmus HE : Form and Function of retroviral proviruses. *Science* (1982) **216**, 812-820.
- 31) Kato N, Pfeifer-Ohlsson, Kato M, Larsson E, Rydnert J, Ohlsson R and Cohen M : Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta : two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences. *J Virol* (1987) **61**, 2182-2191.
- 32) Oda T, Hatsushika M, Watanabe S, Ikeda S, Sumi H, Arakaki Y, Nakamura T, Tsutsui K, Seki k, Akiyama K, Wada T, Nakashima A, Suma H and Murakami M : Immunoelectron microscopic and immunoblotting analysis of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line with a monoclonal antibody. *Cell Mol Biol* (1986) **32**, 342-345.
- 33) Oda T, Watanabe S, Maki Y, Ikeda S, Seki S, Murakami M, Endo S, Asonuma H and Matsubara T : Authentication of a human lymphoblastoid cell line producing a retrovirus and the infectivity of human T-cell and B-cell lines with the virus. *Cell Mol Biol* (1988) **34**, 529-537.
- 34) Oda T, Ikeda S, Watanabe S, Hatsushika M, Akiyama K and Mitsunobu F : Molecular cloning, complete nucleotide sequence, and gene structure of the provirus genome of a retrovirus produced in a human lymphoblastoid cell line. *Virology* (1988) **167**, 468-476.
- 35) Chiu I-M, Callahan R, Tronick SR, Schlom J and Aaronson SA : Major *pol* gene progenitors in the evolution of oncoviruses. *Science* (1984) **223**, 364-370.
- 36) Chiu I-M and Skuntz SF : Nucleotide sequence analysis of squirrel monkey retrovirus reveals a novel primerbinding site tRNA_{1,2}^{Lys}. *J Virol* (1986) **58**, 983-987.
- 37) Heberling RL, Barker ST, Kalter SS, Smith GC and Helmke RJ : Oncornavirus : isolation from a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) lung culture. *Science* (1977) **195**, 289-292.
- 38) Hino S, Tronick SR, Heberling RL, Kalter SS, Hellman A and Aaronson SA : Endogenous New World primate retrovirus : interspecies antigenic determinants shared with the major structural protein of type-D RNA viruses of Old World monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* (1977) **74**, 5734-5738.
- 39) Fine D and Schochetman G : Type D primate retroviruses : a review. *Cancer Res* (1978) **38**, 3123-3139.
- 40) Colcher D, Heberling RL, Kalter SS and Schlom J : Squirrel monkey retrovirus : an endogenous virus of a New World primate. *J Virol* (1977) **23**, 294-301.
- 41) Chiu I-M, Andersen PR, Aaronson SA and Tronick SR : Molecular cloning of the unintegrated squirrel monkey retrovirus genome : organization and distribution of related sequences in primate DNAs. *J Virol* (1983) **47**, 434-441.
- 42) 光延文裕 : 組み換えプロウイルス LTR の遺伝子転写プロモーター活性. *岡山医誌* (1988) **100**, 507-517.
- 43) 阿曾沼裕彦 : ヒトゲノム DNA 中のリスザルレトロウイルス関連遺伝子の検出. *岡山医誌* (1989) p101 (印刷中).
- 44) 池田正五, 秋山公祐, 光延文裕, 渡辺晰子, 小田琢三 : ヒトリンパ芽球様株化細胞産生レトロウイルスの cDNA クローニングと構造解析. *生化学* (1987) **59**, 949.
- 45) Jelinek WR, Toomey TP, Leinwand L, Duncan CH, Biro PA, Choudary PV, Weissman SM, Rubin CM, Houck CM, Deininger PL and Schmid CW : Ubiquitous, interspersed repeated sequences in mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) **77**, 1398-1402.
- 46) Benton WD and Davis RW : Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* (1977) **196**, 180-182.
- 47) Maniatis T, Fritsch EF and Sambrook J : Molecular cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York (1982).

- 48) Frischauf A-M, Lehrach H, Poustka A and Murray N : Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol* (1983) **170**, 827-842.
- 49) Callahan R, Chiu I-M, Wong JFH, Tronick SR, Roe BA, Aaronson SA and Schlom J : A new class of endogenous retroviral genomes. *Science* (1985) **228**, 1208-1211.
- 50) Callahan R, Ali L, Fetherston J, Horn T and Schlom J : マウス乳癌ウイルス関連ヒト内在性レトロウイルス. *細胞工学* (1984) **13**, 1103-1108.
- 51) Ullu E and Tschudi : *Alu* sequences are processed 7 SL RNA genes. *Nature* (1984) **312**, 171-172.
- 52) Jelinek WR and Schmid CW : Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. *Annu Rev Biochem* (1982) **51**, 813-844.

**Molecular cloning and structural analyses of human DNA
sequences related to the squirrel monkey retrovirus LTR**

Kazutaka NAGAO

Department of Biochemistry, Cancer Institute,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. T. Oda)

Sequences related to the squirrel monkey retrovirus(SMRV) LTR were isolated from a genomic library of human DNA by screening under conditions of relaxed stringency. The probe contains several transcriptional signals and its regulatory sequences in SMRV-H LTR, such as the enhancer sequence, CAT box, TATA box, and polyadenylation signal. More than 50 positive signals were detected in 4.4×10^5 recombinant phages. The cloned human sequences named SRH strongly hybridized with SMRV-H LTR and some of them weakly hybridized with SMRV-H structural genes. In SRH-1, the region related to SMRV-H *prt-pol-env* was flanked by the two separately located sequences related to the LTR. SRH-3 has a solitary LTR-related region, whereas, in SRH-5, the LTR-related region was adjacent to the *pol-env*-related sequence. The reliability of these hybridization experiments was confirmed by reciprocal hybridization. The restriction enzyme cleavage maps of these clones were different from those of known human endogenous retroviruses. *Alu* sequences, a human highly repetitive sequences, were inserted to the LTR—and *pol-env*-related regions in SRH-5.