



Title	A defective proviral DNA with a 2.6kb deletion of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in a persistently HIV-1 infected cell clone
Author(s)	今井, 秀樹
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37563
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	いま	い	ひで	き
	今	井	秀	樹
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9559	号	
学位授与の日付	平成3年3月5日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	A defective proviral DNA with a 2.6kb deletion of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in a persistently HIV-1 infected cell clone (ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 持続感染細胞クローンにおける2.6kbの欠損を持つ不完全HIV-1プロウイルスDNA)			
論文審査委員	(主査)	教授	栗村	敬
	(副査)	教授	上田	重晴
		教授	中田	篤男

論文内容の要旨

(目的)

ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) をヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) により形質転換された株化培養細胞であるMT-4に感染させると、大部分の細胞は強い細胞変性効果を起こした後に死に絶えるが、一部の細胞は残存しHIV-1産生細胞となる。このHIV-1持続感染MT-4から限界希釈法によりクローン細胞を得てその性状を調べてみたところ、大部分のクローン細胞は、感染性のないドーナツ様のウイルス粒子を産生していた。また、各細胞クローンは、HIV-1蛋白質の発現、逆転写酵素活性、HIV-1非感染細胞との混合培養による多核巨細胞形成において多様性を示していた。本研究では、これらのクローン細胞の一つであるH2-5細胞 (以下H2-5) のHIV-1遺伝子構造を解明し、その性状を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

(方法ならびに成績)

① H2-5は、感染性がなく円錐形のコア構造の形成が見られない不完全なHIV-1ウイルス粒子を産生する。その細胞分画と培養上清から得たウイルス分画をHIV-1感染患者血清および抗gag p24モノクローナル抗体を用いて免疫沈澱し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動にて解析した。その結果、細胞分画ではHIV-1特異蛋白質であるgp160, gp120, p53, p24およびp17が観察されたが、ウイルス分画からはHIV-1特異蛋白質を検出することができなかった。電顕による観察ではH2-5の細胞膜上に不完全なウイルス粒子が見られるので、以上の結果は、H2-5はHIV-1特異蛋白質を産生し不完全なウイルス粒子を形成しているが、細胞上清中へのウイルス粒子の放出は極めて少ないことを示唆している。

- ② H 2 - 5 における HIV - 1 プロウイルス DNA の転写をノザン法にて解析した。通常、HIV - 1 持続感染細胞 (MOLT - 4 / HIV - 1) では、9.3kb、4.3kb および 1.8kb の転写物が観察されるが、H 2 - 5 では 7 kb、4.3kb および 1.8kb の転写物が観察された。これらの転写物の相対的な量は、MOLT - 4 / HIV - 1 のものに比べて H 2 - 5 では、分子サイズ 7 kb の転写物の量が、小さい転写物の量より極端に少なかった。このことから、H 2 - 5 のもつ HIV - 1 遺伝子には欠損またはスプライシング異常のあることが予想される。
- ③ 遺伝子欠損の有無を調べるために、H 2 - 5 における HIV - 1 プロウイルス DNA をサザン法にて解析した。H 2 - 5 DNA の Hind III または PvuII 消化物を、MOLT - 4 / HIV - 1 のものと比較したところ、H 2 - 5 の HIV - 1 プロウイルス DNA は、その中央部に約 2.5kb の欠失を持つことが明らかとなった。
- ④ 欠失している部位を詳細に調べるために、欠失部位の前後にあたる塩基配列をプライマーペアとして、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) による増幅を行って、H 2 - 5 で増幅された 0.2 kb の DNA 断片の塩基配列を決定した。その結果、pol 領域の中央部から tat 遺伝子 5' 末端部位まで (逆転写酵素の C 末端、RNaseH, エンドヌクレアーゼ、vif, vpr, tat の N 末端を含む) の 2558 塩基が欠失していることを見つけた。

(総括)

H 2 - 5 の HIV - 1 プロウイルスについて調べたところ、その中央部には 2558bp の欠失のあることが明らかとなった。この欠失が、転写される HIV - 1 RNA の分子サイズが 9.3kb から 7 kb に減少している原因であると考えられ、欠失している領域にコードされている逆転写酵素の C 末端部、RNase H, エンドヌクレアーゼ、vif, vpr, tat の N 末端部は産生されていないと推測された。この変異が、H 2 - 5 において不完全ウイルス粒子が産生され、その細胞上清中への放出が極めて少ないことの一因であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

ヒト免疫不全ウイルス (HIV - 1) を、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV - 1) により形質転換された株化培養細胞である MT - 4 に感染させ、生残した細胞から、MT - 4 に感染性がなく円錐形のコア構造の見られないウイルス粒子を産生するクローン細胞を多数得た。この中の一つである H 2 - 5 の性状について解析したところ、その HIV - 1 プロウイルス DNA 中央部には 2558bp の欠失のあることが明らかとなった。プロウイルス DNA 中に、これ程までに大きな欠失を持つ HIV - 1 でも、円錐形のコアは見られないが形態的にウイルス粒子を形成しうることは興味深い。また、HIV - 1 プロウイルス DNA に欠失のある H 2 - 5 は、HIV - 1 特異蛋白質を産生しているので抗原材料として有用であること、さらに、H 2 - 5 や他のクローン細胞は、HIV - 1 の生物学的特性の解明にとって重要であり、本研究は学位に価するものである。