

HTLV-I キャリアにおける pX mRNA発現量の解析

平田, 美樹
九州大学医学部附属病院総合診察部

<https://doi.org/10.15017/18468>

出版情報：福岡醫學雑誌. 87 (1), pp.23-34, 1996-01-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：

HTLV-I キャリアにおける pX mRNA 発現量の解析

九州大学医学部附属病院総合診療部 (指導: 柏木征三郎教授)

平 田 美 樹

Higher Expression Levels of Alternatively Spliced pX mRNA in Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Asymptomatic Carriers Positive for Antibodies to p40^{tax} Protein

Miki HIRATA

Department of General Medicine (Director: Prof. S. Kashiwagi),
Kyushu University Hospital 71, Fukuoka 812-82

We cloned and sequenced complementary DNA (cDNA) of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) pX gene mRNA expressed in peripheral blood lymphocytes of asymptomatic carriers and searched for a possible correlation between HTLV-I pX mRNA expression levels to viral load and anti-p40^{tax} status. Nine cDNA clones had four alternatively spliced forms of mRNA, three forms were identical to the reported cDNA sequences. One cDNA clone contained a novel splicing acceptor site, thereby indicating an unidentified form of pX mRNA, termed as pXΔ17Δ37. These results, together with previous observations, suggest that HTLV-I has complex pattern of splicing. The expression levels of the five pX mRNAs, pX, pXΔ17, p21^{rex}, orf II, and pXΔ17Δ37, were examined in twenty-one asymptomatic carriers. Alternatively spliced pX mRNA species were detected in all the carriers. Semiquantitation of pX mRNAs revealed that pX and pXΔ17 were the dominant mRNA species among alternatively spliced pX mRNA. All pX mRNAs but the orf II message correlated with amounts of proviral DNA significantly ($p < 0.05$). The levels of proviral DNA and mRNAs were significantly higher in anti-p40^{tax} positive carriers than in negative ones. These observations suggest that the alternatively spliced pX mRNAs are expressed ubiquitously in the peripheral blood lymphocytes of HTLV-I asymptomatic carriers with complex pattern of splicing and that the presence of anti-p40^{tax} may be a marker for a higher viral load and viral replication levels in HTLV-I asymptomatic carriers. Our observations may explain previous finding that the carriers rate is higher in the offspring of anti-p40^{tax} positive mothers than those of anti-p40^{tax} negative mothers.

はじめに

Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)は日本の南西部に高率に分布するレトロウイルスで⁴⁾²⁰⁾²¹⁾, 成人T細胞白血病(ATL)の病因ウイルスとされ¹⁴⁾⁴⁰⁾⁴²⁾, HTLV-I関連脊髄症(HAM/TSP)への関与も指摘されている¹¹⁾³¹⁾。そのウイルスゲノムはpXと呼ばれる特異な遺伝子領域を有している。HTLV-Iから転写される3種類のRNAのうち、2カ所spliceされたtax/rex mRNAは、HTLV-IゲノムのpX領域を含むためpX mRNAと呼ばれているが、このpX mRNAは少なくとも3種類の蛋白質、即ち

tax (p40^{tax}), rex (p27^{rex}), p21^{rex} 蛋白質をコードしている²⁵⁾²⁸⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾。これらの蛋白質の中でp40^{tax}蛋白質は、トランス活性と呼ばれる作用により integrate されている HTLV-I 遺伝子の LTR に働き、ウイルス遺伝子の転写やウイルス増殖を促進したり、細胞の IL-2 や IL-2 レセプターなどの遺伝子に働き、同様なしくみで IL-2 や IL-2 レセプターなどを活性化する機構を持つことが明らかにされている。また p27^{rex} 蛋白質は、splice の調節に関与することが知られている。これらの遺伝子の活性化作用は、ウイルスの複製や感染したT細胞の異常増殖に重要な役割を果たしていると考えられており、ATLの発症機構にも深く関与していることが推

定されている⁵⁾¹⁰⁾¹⁹⁾³⁶⁾³⁸⁾。

HTLV-I感染者のうち約半数が、p40^{tax} 蛋白に対する抗体 (p40^{tax} 抗体) をもつことが知られ、p40^{tax} 抗体陽性の母から生まれた子供の方が感染率が高いという報告から、p40^{tax} 抗体の有無と感染性との関与が示唆されている²³⁾。したがって、pX mRNA の発現について検討することは、白血病発症機構や感染性の研究においても重要なことと考えられる。

これまで、蛍光抗体法や northern blot 法といった従来の方法でウイルス遺伝子の発現は試みられていたが、ATL患者やキャリアの末梢血リンパ球から HTLV-I RNA や HTLV-I 抗原が検出されることはほとんどなかった。これは、ATL患者やキャリア末梢血リンパ球より得られるウイルス遺伝子が微量であったためかもしれない。しかし、polymerase chain reaction (PCR) 法が開発されてからは微量の mRNA を検出することが比較的容易となり、いろいろな splicing form をもつ pX mRNA が報告された²⁾⁷⁾²⁷⁾³⁰⁾。さらに、ATL患者や HAM患者、キャリアの末梢血リンパ球からも pX mRNA の発現が示されるようになった³⁾¹²⁾²⁴⁾³⁹⁾。しかしながら、キャリア状態で各種の pX mRNA がどのように分布し、どんな特徴を持つかは明らかにされていない。

本研究では、無症候性キャリアの末梢血リンパ球を用いて、HTLV-I pX mRNA の発現について検討した。その結果、HTLV-I pX mRNA の cDNA のクローニングおよび塩基配列解析では、すでに報告されていた mRNA に加えて今まで同定されていない新しい mRNA を検出し、HTLV-I pX mRNA が複雑な splicing パターンを持つことが示された。さらに、HTLV-I pX mRNA の発現量を調べるために、各種 pX mRNA の splicing junction に特異的なプライマーを合成し、PCR法により pX mRNA の半定量を行ったところ、各種 pX mRNA はキャリアの末梢血リンパ球に恒常的に発現していることが判明した。pX mRNA の発現量と p40^{tax} 抗体の有無との関連、そして proviral DNA 量との関連についても検討した。

対象および方法

1. 対象

21例の日本人 HTLV-I キャリアを対象とした。対象者は2年から5年の経過観察中、ATL、HAM/TSPあるいは他の HTLV-I 関連疾患を疑わせるような、臨床症状や検査データを認めない無症候性キャリアで、そのうち、9例が p40^{tax} 抗体陽性で、12例は陰性であ

った。対象者の背景については、Table 1 に示した。p40^{tax} 抗体の陽性、陰性者間で平均年齢、末梢血の白血球数、リンパ球数に有意な差は認めなかった。

2. cDNA の合成と PCR 法による pX mRNA の増幅

LSMにより分離された 10⁶ 個の末梢血リンパ球から¹⁶⁾、Total RNA を acid guanidine phenol chloroform methods⁶⁾ で抽出し、first strand cDNA は random hexamer と reverse transcriptase を用いて total RNA より合成した (SuperscriptTM Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)¹⁸⁾。cDNA を RNaseH で処理後、PCR法を以下の条件で行った。即ち、10 mM Tris-HCl (pH8.0); 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; 0.01% gelatin; 0.2 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 2.5 単位の Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) と 0.5 pM の HM5, HM3 primer を含む 50 μl の反応溶液に cDNA を加え、programmable thermal cycler (ASTEK, Fukuoka, Japan) で 30 サイクルの増幅を行った。HM5, HM3 primer の塩基配列は Table 2 に、位置については Figure 1 に示した。反応の温度条件は、denaturation が 94°C で 1 分、annealing が 55°C で 1.5 分、extension は 72°C で 2 分を 30 サイクル行った後、72°C で 5 分の extension を行った。そして、PCR 反応産物を 1.5% のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、紫外線照射下でバンドを確認した。

3. pX cDNA のクローニングと塩基配列の解析

TA cloning kit (Invitrogen, San Diego, CA) を用いて、case 5 と case 18 の PCR 産物を pCR1000 プラスミドベクターにクローニングした¹⁷⁾。プラスミド DNA を大腸菌のクローンより抽出し¹⁷⁾、10 ng のプラスミド DNA を PX1 と PX2 の primer で増幅することによって、目的の pX cDNA fragment の有無について確認した。PX1, PX2 primer の塩基配列は Table 2 に、位置は Figure 1 に示した。塩基配列は、FITC-labeled M13 universal と reverse primers, auto-cycle sequencing kit (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用いた Dideoxy sequencing reaction によって得た。その cDNA の塩基配列はすでに発表されている HTLV-I の sequence と比較し²⁶⁾³²⁾³³⁾³⁴⁾、塩基番号は、λATK-1 に従った。

4. PCR 法による各種 pX mRNA の同定

HTLV-I キャリアの末梢血リンパ球に発現している各種 pX mRNA を同定するために、2段階の PCR を行った。PCR に用いる primer の AS1, AS2,

Table 1 Demographic data and levels of proviral DNA and pX mRNAs expression among HTLV-I carriers.

Case	Age	Sex	Number of WBC (/mm ³)	CD4/8 比	Number of Lymphocytes (/mm ³)	Anti-p40 ^{tax}	Anti-HTLV-I titer(2 ⁿ)	Proviral DNA (copy/10 ⁶ cell)	mRNA(copy/10 ⁶ cell)				
									pX	Δ17	Δ17Δ37	orfII	p21 ^{rex}
1	83	M	5600	1.7	1570	+	9	1000	100	1000<	10	100	100
2	63	F	5600	1.8	1620	+	8	100	100	100	1>	100	10
3	66	F	6100	1.2	2320	+	10	10	1000	1000<	10	10	100
4	80	F	4900	1.8	1810	+	8	100	10	100	1	1>	1
5	87	F	3800	1.5	1370	+	8	1000	10	100	1>	100	10
6	98	M	4300	2.0	2800	+	7	1000<	100	1000<	10	1>	100
7	57	F	5400	3.2	1670	+	8	1000<	1000	1000<	10	10	100
8	81	F	3600	1.0	1120	+	11	1000<	1000	1000<	10	1	100
9	86	F	3400	1.6	1500	+	8	1000<	100	1000<	10	10	100
10	60	M	4800	1.4	2930	-	7	100	10	100	1	10	1
11	82	F	5060	1.9	1110	-	4	1	10	10	1>	1>	1
12	85	M	3300	1.6	1020	-	6	1	10	1	1>	1>	10
13	82	F	5000	1.8	1850	-	7	1>	1>	1	1	1	1
14	78	F	5700	1.9	1480	-	7	100	10	1	1>	1>	10
15	81	F	3800	0.8	1750	-	7	1>	100	10	1	1>	100
16	81	F	5200	1.5	1610	-	7	10	1>	1>	1>	1	10
17	74	M	5000	NT	1700	-	9	1>	1>	1>	1>	1000	1
18	81	F	7700	2.0	1620	-	7	100	1000	1000<	1	1>	100
19	83	F	5600	1.8	1340	-	6	10	10	1000	10	1	100
20	74	M	5400	0.9	1780	-	7	10	10	10	1	1>	1
21	86	F	4200	1.4	1600	-	7	1>	10	100	1	1>	10

NOTE. WBC, white blood cell; NT, not tested.

Table 2 Nucleotide sequences of the oligonucleotide primers used for PCR amplification of pX cDNA or proviral DNA.

Primer	Sequence	Nucleotide position	Orientation
HM5	5'-CATCCACGCCGGTTGAGTCGCG-3'	400-421	Sense
HM3	5'-AGGAACTGTAGAGCTGAGCCGAT-3'	7509-7487	Antisense
PX1	5'-ACCCAGTCTACGTGTTTGGA-3'	7341-7360	Sense
PX2	5'-TGATCTGATGCTCTGGACAG-3'	7460-7441	Antisense
AS1	5'-CCGCCGTCTAG/CTTCTGGTC-3'	461-471/4993-5002	Sense
AS2	5'-CCGCCGTCTAG/CCGCCAGTCC-3'	461-471/5010-5019	Sense
AS3	5'-CCGCCGTCTAG/CAGGTCCTCCG-3'	461-471/7227-7237	Sense
AS4	5'-CCGCCGTCTAG/CCCACTTCCCA-3'	461-471/7302-7312	Sense
AS5	5'-CAACACCATGG/ATACCCAGTC-3'	5173-5183/7339-7348	Sense
AS6	5'-CAACACCATGG/CCCACTTCCCA-3'	5173-5183/7302-7312	Sense

AS3, AS4, AS5 は、これまで報告されている HTLV-I の塩基配列と今回得られた cDNA の塩基配列を基に合成した。これらの primer の塩基配列は Table 2 に、その位置は Figure 1 に示した。HM5, HM3 primer で 1 段階目の増幅を行い、その反応産物の一部 (3 μl) を用いて、それぞれの 5' primer (AS1, AS2, AS3, AS4, AS5) と 3' primer PX2 で 2 段階目の PCR を行った。

PCR は 25 μl の系で行い、反応溶液の組成は前述した通りである。温度条件は denaturation が 94°C で 1 分、annealing が 56°C で 1 分、extension は 72°C で 1 分を 30 サイクルあるいは 40 サイクル行った後、72°C で 5 分の extension を行った。反応産物は 1.7% のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、各種 mRNA のバンドの同定を行った。得られたクロ

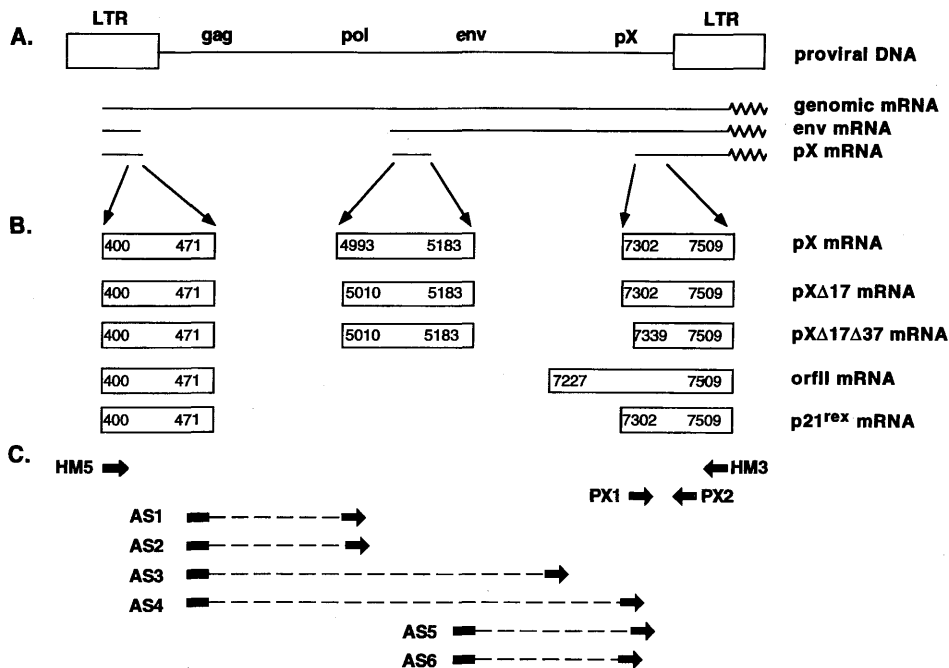


Figure 1 Schematic configurations of alternatively spliced pX mRNA species with locations of primers used for the PCR amplifications of each HTLV-I pX mRNA. A. Genomic organization of HTLV-I provirus and HTLV-I mRNAs. B. Five alternatively spliced pX mRNAs. The pX Δ 17, p21^{rex}, and orf II mRNAs have been reported by Berneman et al.²⁾ The pX Δ 17 Δ 37 was characterized in this study. Numbers indicate nucleotide positions at the RNA splicing site. Nucleotide number refers to the published HTLV-I genome sequence by Seiki et al.³⁴⁾ C. The locations of the primers. The arrow heads indicate the 3' end of the primers. Broken lines represent continuity of the primer.

ーンの中には、orfII mRNA に相当するものがなかったため、陽性コントロールには、orfII mRNA 以外の各種 mRNA に相当するプラスミド DNA を、陰性コントロールには HTLV-I 陰性者の末梢血リンパ球から得られた cDNA を用いた。

5. 5 種類の pX mRNA の半定量

合成した cDNA を template として用いるが、それぞれのキャリアの cDNA 量を標準化するために、従来から用いられている β -actin による増幅を行った²²⁾。即ち、 β -actin cDNA に特異的な primer を用いて 25 μ l の系で 20 サイクルの PCR を行い、その増幅された β -actin cDNA のバンドがエチジウムブロマイドで染色される強度によって、得られた cDNA の総量を判定した。そして、それぞれのキャリアの cDNA 量が一定になるように補正した量の cDNA と、既知量のコントロールプラスミド DNA を用いて、前述した条件で 1 段階目の PCR を行った。さらに、その反応産物を 5 倍、25 倍、125 倍に希釈し、そのうちの 2 μ l を 2 段階

目の PCR に用いた。2 段階目の PCR は、25 μ l の系で行い、primer は前述した通りである。各種 mRNA の量は、電気泳動によって得られたキャリアのバンドの強度を、既知量のコントロールプラスミドのバンドの強度と比較することによって判定したが、AS4 と P2 primer で増幅される mRNA (orfII) はプラスミドが得られていないので、K11 プラスミド DNA (p21^{rex}) の結果を用いて判定した。増幅された DNA バンドの強度はプラスミドのコピー数で示したが、ほとんどバンドが得られない場合を 1 > とし、それから 1, 10, 100, 1000 コピーの 4 段階に分け、1000 コピー以上の場合 1000 < と表示した。

6. pX Δ 17 mRNA と pX Δ 17 Δ 37 mRNA の同時増幅

pX Δ 17 mRNA と pX Δ 17 Δ 37 mRNA は 2 カ所 splice されるが、figure 1 の B に示すように 1 番目の splice の形式はまったく同じで、pX Δ 17 Δ 37 mRNA の 2 番目の SA (splicing acceptor site) が 37 塩基下

流にずれている。そのため pX Δ 17cDNA を増幅するために 5' primer として AS2 を用いると、pX Δ 17 Δ 37cDNA が同時に増幅されることになる。したがって、2つの cDNA がどんな割合で増幅されているかを知るために、新たな PCR を行った。即ち、1段階目の PCR を 5' primer AS2, 3' primer HM3 で行い、2段階目を 5' primer が AS5 あるいは AS6, 3' primer が PX2 で行った。この PCR では、pX Δ 17cDNA と pX Δ 17 Δ 37cDNA の 2種類の反応産物が得られることになり、37塩基長さが違うためどちらがより優位に増幅されているかを知ることができる。PCR産物は同様にアガロースゲルで電気泳動後、K7 (pX Δ 17) と K3 (pX Δ 17 Δ 37) プラスミド DNA の結果を陽性コントロールとして比較した。

7. pX 領域を用いた proviral DNA の半定量

ゲノム DNA は 10⁶個の末梢血リンパ球より抽出し、それぞれの DNA 濃度は吸光度計を用いて 260 nm の吸光度によって測定した。用いる DNA 量は 700 ng で β -actin による増幅でサンプル間の標準化を行った。1段階目の PCR は、primer として PX1 と HM3 を用い、denaturation が 93°C で 1分、annealing が 56°C で 1.5分、extension は 72°C で 2分を 30 サイクル行った後、72°C 5分の extension を行った。陽性コントロールとしては、既知量のプラスミド DNA (K35) を階段希釈し、同じ条件で PCR したものをを用いた。さらに、1段階目の反応産物を 5倍、25倍、125倍に希釈し、そのうちの 2 μ l を 2段階目の PCR に用いた。2段階

目の PCR は、25 μ l の系で primer として PX1 と PX2 を用い、denaturation が 94°C で 1分、annealing が 55°C で 1分、extension は 72°C で 1分を 20 サイクル行った後、72°C で 5分の extension を行った。反応産物は 1.5%のアガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色されるが、各 proviral DNA のコピー数は、電気泳動によって得られたキャリアのバンドの強度を、既知量のコントロールプラスミドのバンドの強度と比較することによって判定した。増幅された DNA バンドの強度はプラスミドのコピー数で示したが、ほとんどバンドが得られない場合を 1 > とし、それから 1, 10, 100, 1000 コピーの 4段階に分け、1000 コピー以上の場合 1000 < と表示した。HTLV-I 非感染例から得られた末梢血リンパ球より抽出したゲノム DNA を陰性コントロールとして用いた。

8. 血清学的検査

HTLV-I 抗体は、PA 法を用いて測定し、western blot 法で確認した³⁴⁾³⁵⁾。HTLV-I 抗体価は、PA 法で陽性を示す最高希釈倍数の逆数を用いた。また、p40^{tax} 抗体は、ELISA 法で測定したが、抗原には、完全な長さの HTLV-I Tax 遺伝子を形質転換した大腸菌に発現した、recombinant の p40^{tax} 蛋白を用いた³⁷⁾。HTLV-I 陰性例の吸光度の平均および標準偏差を測定し、平均値に標準偏差の 3 倍を加えた値を、カットオフ値とした。

9. 統計学的解析

5種類の pX mRNA 発現レベルと他の因子との関

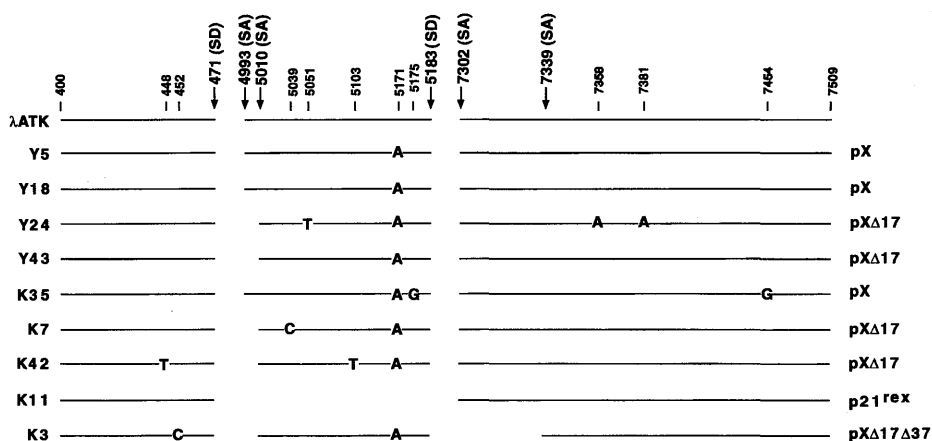


Figure 2 Structure and nucleic acid differences in the isolated cDNA clones from the λ ATK sequence. Numbers on the top indicate nucleotide positions of substitutions. The vertical arrows depict the RNA splicing site. SA, splicing acceptor site; SD, splicing donor site. Horizontal lines indicate nucleotide identity to the reported HTLV-I sequence³⁴⁾.

連は, Spearman's rank test を用いて検定を行った。また, p40^{tax} 抗体の有無による各因子の差は, Mann-Whitney test と chi-square test を用いて検定した。

実験結果

1. alternatively spliced pX mRNA の解析

case 5 と case 18 から得られた 9 個の cDNA クローンの塩基配列を Figure 2 に示した。これらの中には, 4 種類の splicing の形式が含まれており, 3 種類はこれまでに報告されている形と一致した²⁾²⁸⁾。即ち, 3 クローン (Y5, Y18, K35) は classical な doubly spliced pX mRNA と一致しており²⁸⁾, 4 クローン (Y24, Y43, K7, K42) は Berneman²⁾ らが報告した pXΔ17 mRNA と同一で, K11 クローンは p21^{rex} mRNA と一致していた。そして, K3 クローンは今まで報告されていない新しい splicing の形式を持ち, pXΔ17Δ37 mRNA と命名した。この cDNA は 3 つの exon を持ち, 最初の exon はウイルスゲノムの 471 番塩基で終わり, 2 番目は 5010 番塩基から 5183 番塩基で, 3 番目の exon は pXΔ17 より 37 塩基下流の 7339 番塩基から始まるが, この 2 番目の splicing acceptor site は, 今まで知られていない新しいものである。pXΔ17Δ37 mRNA がコードする蛋白は 3 つ存在し, 最初の蛋白は p27^{rex} の開始コドン (5124 番塩基) で始まる。frame shift が 2 番目の splicing junction site で起こり, その下流のアミノ酸配列は p40^{tax} と一致する。2 番目の蛋白は, p40^{tax} の開始コドン (5180 番塩基) で始まり, frame shift が splicing junction site で起こり, その下流のアミノ酸配列は p27^{rex} と一致する。3 番目の蛋白は p21^{rex} と同一である。

2. pX cDNA 塩基配列の intrastrain variation

塩基配列の解析を行った領域で全部で 9 個の塩基変異が認められた。このうち case18 から得られた 4 つのクローン (Y5, Y18, Y24, Y43) では, Y24 クローンにのみ 3 個の変異が認められ, 他の 3 クローンには変

異はなかった。また case 5 から得られた 5 つのクローン (K3, K7, K11, K35, K42) にはあわせて 6 個の変異が認められたが, どの変異もそのクローンのみに存在し, 2 つ以上のクローンに認められる変異はなかった。結局, 総塩基の変異率は 9/3513 (1 塩基につき 0.26%) で, これは Taq DNA ポリメラーゼ error として報告されている率より少し高いものだった¹²⁾。またこの実験系で用いた PCR では, モノクローナルな cDNA を増幅すると 1 塩基につき 0.033% の変異があることが分かっている。したがって, 塩基変異のほとんどは, クローン内あるいはクローン間の多様性によって生じたものと考えられる。LTR, env, pX 領域の変異率はそれぞれ 2/450 (1 塩基につき 0.44%), 4/1435 (1 塩基につき 0.28%), 3/1628 (1 塩基につき 0.18%) で, このうち 4 個の塩基変異が推定される蛋白のコード領域にある。Table 3 に, 塩基の変異によっておこると推定される p27^{rex} と p40^{tax} のアミノ酸変化を示したが, この中には停止コドンに変わる塩基変異も認められた。

3. alternatively spliced pX mRNA の半定量

Table 1 に 5 種類の pX mRNA の半定量の結果を示した。すべての対象者にいずれか 1 種類の pX mRNA が認められたが, HTLV-I 陰性例の末梢血リンパ球からの cDNA では増幅されなかった。5 種類の mRNA の発現量は個人間で様々であるが, pX と pXΔ17 の 2 つの mRNA はほとんどの例で発現していた。また, 1 段階目と 2 段階目の PCR のサイクル数を 40 回にあげるとこの 2 つの mRNA はすべての対象者に認められ, このことからこれらの pX mRNA は無症候性キャリアの末梢血リンパ球に恒常的に発現していることが明らかになった。さらに, p40^{tax} 抗体陽性例 9 例のうち 8 例は, 5 つの mRNA の中で pXΔ17 mRNA が最も高度に発現しており, p40^{tax} 抗体陰性例でもほとんどが pX と pXΔ17 mRNA を高度に発現していることから, 無症候性キャリアでは 5 種類の

Table 3 Nucleotide substitutions of cDNA clones within coding regions and resulting amino acid changes.

Clone	Nucleotide Position	Nucleotide Substitution	Amino Acid Change			
			p27 ^{rex}		p40 ^{tax}	
Y24	7358	G to A	Silent		Gly	to Arg
	7381	G to A	Gly	to Asp	Try	to Term
K35	5175	A to G	Thr	to Ala	—	
	7454	C to G	Ile	to Met	Gln	to Glu

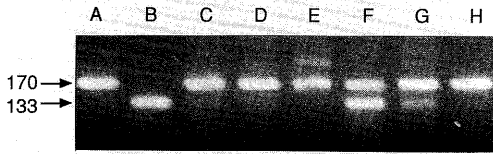


Figure 3 Simultaneous PCR amplification of two cDNA species, pX Δ 17 and pX Δ 17 Δ 37. Lane A, control plasmid K7; lane B, control plasmid K3; lane C to H, case 6, 7, 8, 13, 19 and 20 listed in Table 1. Molecular size in bps are at left.

pX mRNAのうちpXとpX Δ 17 mRNAが優位なpX mRNAであることが示唆された。これに対して, orfIIとpX Δ 17 Δ 37 mRNAはpXとpX Δ 17 mRNAに比べてその発現量は低かった。ただ例外的に1例に, pXとpX Δ 17 mRNAは検出レベル以下でありながら, orfIIが高度に発現していた。この対象者は, p40^{tax}抗体が陰性であったが, 他の陰性例に比べてHTLV-I抗体価が比較的高い傾向にあった。p21^{rex} mRNAについては全対象者に認められ, pXとpX Δ 17 mRNAの場合とは対象的に個人間でその発現量にあまり差がなかった。ここでは示していないが, Koralknik²⁷⁾らによって報告されているpX-rer-orfI (Rof)とpX-tax-orfII (Tof)の2つのmRNAは, 今回それらのsplicing junctionに特異的なprimerを用いたPCRでは検出されなかった。Koralknikらの報告でもRofとTof mRNAは発症者に比べてキャリアでの検出率が低く, RofとTof mRNAはpXやpX Δ 17やp21^{rex} mRNAに比べてキャリア状態では, 発現量が低いのかもしいない。

4. pX Δ 17 mRNAとpX Δ 17 Δ 37 mRNAの同時増幅

pX Δ 17 mRNAとpX Δ 17 Δ 37 mRNAを同時にPCRで増幅した結果をFigure 3に示した。それぞれのmRNAのsplicing junctionに特異的なprimerを用いた2段階目のPCRの結果, pX Δ 17 mRNAから増幅されるバンドは170塩基の長さで検出され, pX Δ 17 Δ 37 mRNAから増幅されるバンドは133塩基で検出される。case 6, 7, 8は半定量でpX Δ 17 mRNAが強く発現していた例だが, その3例では170塩基のバンドが強く検出された。またcase 13ではpX Δ 17 mRNAとpX Δ 17 Δ 37 mRNAが同じくらい発

現していた例であり, 今回のPCRでpX Δ 17 mRNAの170塩基とpX Δ 17 Δ 37 mRNAの133塩基の2本のバンドが同程度の強さで検出された。case 19は定量でpX Δ 17 mRNAが1000コピー, pX Δ 17 Δ 37 mRNAが10コピーの例であるが, 定量の結果通り170塩基のバンドが133塩基のバンドよりずっと強く検出された。case 20ではどちらのmRNAも発現度が低く, 170塩基のバンドのみ検出された。以上の結果よりpX Δ 17 mRNAを増幅する際, pX Δ 17 Δ 37 mRNAの影響はほとんど無く, 半定量でpX Δ 17 mRNAの発現量が多いのは, pX Δ 17 mRNA自体の発現が本来高度なためであることが明らかとなった。

5. pX領域を用いたproviral DNAの半定量

pX領域を用いたproviral DNAの半定量の結果をTable 1に示した。genomic DNA 700ngを材料にHTLV-I proviral DNAを半定量したが, その結果検出感度以下から1000コピー以上まで様々だった。21例中6例は10コピー以下であったが, これは全例p40^{tax}抗体陰性例だった。proviral DNAは, 増幅サイクル数を増やすとすべての対象者に検出された。同様の実験でHTLV-I陰性例の末梢血リンパ球からのDNAではバンドは検出されず, 偽陽性の可能性は考えられなかった。

6. p40^{tax}抗体の有無によるpX mRNA量とproviral DNA量の関係

p40^{tax}抗体の有無による5種類のpX mRNAの発現量をFigure 4のpanel AからEに示した。どのmRNAもp40^{tax}抗体陽性例が陰性例に比べ高度に発現しており, Mann-Whitneyテストによる有意差検定ではそれぞれPが0.008, 0.002, 0.035, 0.052, 0.053であった。したがってHTLV-Iウイルスの転写活性は, p40^{tax}抗体陽性キャリアが陰性キャリアに比べてより活発であることが示唆された。またp40^{tax}抗体の有無によるproviral DNA量の違いについても, Figure 4のpanel Fに示しているが, ウイルス量としてもp40^{tax}抗体陽性の方が高いことが明らかとなった。

7. 各種pX mRNAと他の因子との関連

Table 4に各種pX mRNAと各因子の関連係数(coefficient)およびSpearmanのrank testによるp-valueを示した。5種類のpX mRNAの発現量は, 年齢, 白血球数, リンパ球数, CD4/CD8比との間に有意な関連を認めなかった。pXおよびpX Δ 17 mRNA量は, proviral DNA量および, p40^{tax}抗体OD値との間に有意な正の相関を認め, またHTLV-I抗体価については有意ではないが, 正の相関傾向を認めた。

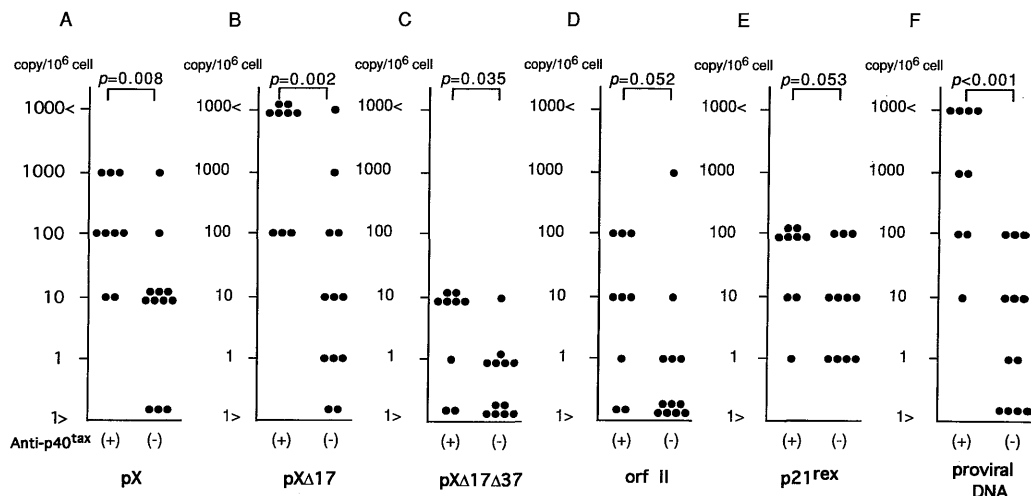


Figure 4 The expression levels of five pX mRNA species and proviral DNA amounts by anti-p40^{tax} status. The p-values by Mann-Whitney test are shown at the top.

Table 4 Correlation of five HTLV-I pX mRNAs to variables.

Factors	Coefficient of HTLV-I pX mRNAs (p-value)*				
	pX	pXΔ17	pXΔ17Δ37	orf II	p21 ^{rex}
Age	-0.126 (0.587)	0.109 (0.639)	0.092 (0.692)	-0.228 (0.321)	0.234 (0.307)
Number of WBC	0.149 (0.521)	0.110 (0.637)	0.034 (0.884)	0.097 (0.676)	0.086 (0.713)
Number of lymphocytes	0.028 (0.905)	0.064 (0.785)	0.236 (0.303)	0.053 (0.821)	-0.168 (0.468)
CD4/CD8 ratio	0.076 (0.751)	0.164 (0.490)	-0.016 (0.947)	-0.086 (0.718)	0.068 (0.775)
Proviral DNA	0.583 (0.006)	0.707 (0.000)	0.461 (0.036)	0.259 (0.257)	0.474 (0.030)
Anti-HTLV-I titer	0.413 (0.063)	0.416 (0.061)	0.324 (0.153)	0.651 (0.001)	0.251 (0.272)
Anti-p40 ^{tax} OD value	0.452 (0.040)	0.480 (0.028)	0.241 (0.293)	0.439 (0.046)	0.220 (0.339)

*p-values below 0.05 are underlined.

pXΔ17Δ37 mRNA 量については proviral DNA 量との間だけに有意な正の相関を認めた。orfII mRNA 量は、HTLV-I 抗体価および p40^{tax} 抗体 OD 値の両方に、p21^{rex} mRNA 量は proviral DNA 量だけに有意な正の相関が認められた。

考 察

本研究では、無症候性 HTLV-I キャリアの末梢血リンパ球から HTLV-I pX mRNA の cDNA クロー

ンを分離し、splicing site に特異的な primer を用いた PCR 法により alternative に splice された 4 種類の pX mRNA の塩基配列を解析することができた。その結果、その一つはこれまで報告されていない pX mRNA 種であった。また、PCR 法を用いて pX mRNA の定量化も行うことができた。

これまで、northern blot 法および蛍光抗体法で ATL 患者やキャリアの末梢血リンパ球から HTLV-I RNA や HTLV-I 抗原を検出する試みが行われていた

が、おそらく、末梢血リンパ球に含まれる pX mRNA の量自体が微量であったため、検出されない場合がほとんどであった。近年、PCR 法が用いられるようになって ATL 患者や HAM 患者、また無症候性キャリアの末梢血リンパ球からも、splice された pX mRNA が検出され報告されているが³⁾¹²⁾²⁴⁾²⁷⁾³⁹⁾、その検出頻度は報告によって様々である。今回の実験では、無症候性キャリアの末梢血リンパ球からいずれか 1 種類の pX mRNA は検出することができ、その検出率は 100% であった。他の報告より検出率が高い理由については明らかではないが、本研究では HTLV-I 陰性コントロールから pX mRNA は検出されておらず、したがってサンプルのコンタミネーションや非特異的な増幅がその要因であるとは考えられない。今回、splicing site に特異的なプライマーを合成し、2 段階 PCR 法を用いたことが、splice された pX mRNA を高感度に検出できた理由かもしれない。

2 例の対象者より分離された 9 クロンのうち 8 クロンは、これまでに報告されている 3 種類の mRNA、即ち pX、pXΔ17、p21^{rex} のいずれかと同一の splicing の形式を有していた。しかし、残り 1 つのクロンは、pXΔ17 の 2 番目の acceptor site が 37 塩基下流にずれた新しい splicing の形式をもつ pX mRNA と考えられ、今回 pXΔ17Δ37 mRNA と名付けた。以前の報告とあわせると pX の mRNA は現在、少なくとも 8 種類は存在すると考えられる²⁾⁷⁾²⁷⁾²⁸⁾³⁰⁾³⁵⁾。このような HTLV-I ウイルスの複雑な splicing のメカニズムが、ウイルスの複製や維持に関与する様々な蛋白やその isoform の形成を可能にすることによって、HTLV-I のキャリア状態の継続に役立っているのかもしれない。

pX 遺伝子は p40^{tax} と p27^{rex} 蛋白をコードするが、p40^{tax} 蛋白はウイルス遺伝子の転写や⁵⁾¹⁰⁾¹⁹⁾³⁶⁾³⁸⁾ 他の細胞遺伝子の転写を活性化し¹⁾⁸⁾⁹⁾、p27^{rex} 蛋白はウイルスの複製や、mRNA の splicing を調節する役目を担うことが報告されている¹³⁾。これらの機能はキャリア状態にとってのウイルスの複製や、維持において重要な役割を果たしている。今回の実験は、対象者の数が少なく若年者が欠けているという点で不十分ではあるが、無症候性キャリアに alternative に splice された pX mRNA が恒常的に発現しているという事実を強く示唆するものである。その中でも pX と pXΔ17 mRNA は他の mRNA より優位に発現して、すべての対象者で検出されており、この結果は Koralknik ら²⁷⁾ の報告とも一致していた。したがって、これらの 2 つ

の mRNA はすべての HTLV-I 感染細胞に存在すると考えられる。さらに、これらの 2 つの mRNA は、蛋白コードという点ではまったく同じで p40^{tax}、p27^{rex}、p21^{rex} 蛋白をコードしている。したがって、これらの蛋白は、キャリア状態の維持には重要であると考えられ、HTLV-I 感染細胞の悪性化と直接的に関連している可能性は低いと思われたが、ATL 患者の末梢血リンパ球を用いた今後の検討も必要であろう。

各種の pX mRNA 量に影響を与える因子としては、proviral DNA 量、HTLV-I 抗体価、p40^{tax} 抗体 OD 値の 3 つがあげられるが、5 種類の mRNA でそのパターンに差が認められた。即ち、p40^{tax} 蛋白、p27^{rex} 蛋白をコードする主たる pX mRNA である pX と pXΔ17 mRNA は、proviral DNA 量と p40^{tax} 抗体 OD 値の 2 つの因子と正の相関があり、同様のパターンをとっていた。これに対して p21^{rex} mRNA は proviral DNA 量のみと有意な関連を認め、発現量に関しても、全例に比較的中等量検出されており、pX と pXΔ17 mRNA が、検出感度以下から 1,000 コピー以上と様々であるのとは異なる結果を呈していた。また、orfII mRNA 量は、HTLV-I 抗体価と p40^{tax} 抗体 OD 値との間に有意な関連を認めたが、proviral DNA 量との関連はなく、検出率も 5 種類の中で最も低かった。おそらく、p21^{rex}、orfII mRNA は pX や pXΔ17 mRNA と異なる転写調節機構下に入り、RNA それ自体あるいは合成蛋白が感染維持のために pX および pXΔ17 mRNA と異なる役目を果たしている可能性が示唆された。Orita ら²⁹⁾ の、p21^{rex} mRNA は完全なウイルスゲノムからは発現せず、defective なゲノムからのみ発現するという報告はこの点からも興味深い。今回同定された pXΔ17Δ37 mRNA 量については p21^{rex} mRNA 同様、proviral DNA 量のみと相関を認めたが、その発現量は最も少なかった。pXΔ17Δ37 mRNA からは、前述したように、2 種類の fusion 蛋白と p21^{rex} 蛋白がコードされるが、その機能を含め今後の検討が必要である。

pX mRNA 発現量と proviral DNA 量がよく相関していることから、ウイルスの複製に pX 遺伝子産物が関与している可能性が示唆される。したがって、pX 遺伝子産物は、HTLV-I の複製の際に産生され、その免疫的な刺激を通して HTLV-I や p40^{tax} の抗体価を増加させている可能性が考えられた。

本研究で認められたもう 1 つの興味深い知見として、proviral DNA 量と、pX、pXΔ17、pXΔ17Δ37 mRNA 発現量は、p40^{tax} 抗体陽性例の方が陰性例より有意に

高く、残り2つの mRNA にも同様の傾向が認められた。著者は以前、p40^{tax} 抗体陽性の母親から生まれた子供の方が感染率が高く、p40^{tax} 抗体の存在が感染性と関連をもつことを報告したが¹⁵⁾²³⁾、p40^{tax} 抗体陽性のキャリアが pX mRNA の発現量が多く、ウイルス量も多いという本研究の結果は、この事実を遺伝子レベルから支持するものであると考えられた。さらに、無症候性キャリア状態での p40^{tax} 抗体の存在は、ウイルス複製や感染性のマーカーになると考えられた。

HTLV-I ゲノムの遺伝子変異については HAM/TSP 患者から得られた末梢血リンパ球や CSF の培養株で注目され⁴¹⁾、in vitro での株内の変異が調べられているが²⁾、その頻度は1塩基あたり0.26%で他の報告と一致しており²⁾、この頻度は in vitro や in viro で報告されている他のレトロウイルスと比べて低いものだった。また塩基変異の頻度は pX 領域で最も低く、この結果も他の報告と一致していた²⁾²⁶⁾³²⁾。したがって pX 領域が遺伝子レベルで保存されていることが示唆された。

以上今回の検討より、alternative に splice された pX mRNA は無症候性キャリアにおいて恒常的に発現していることが明らかとなった。さらに p40^{tax} 抗体陽性のキャリアは陰性例に比べて pX mRNA の発現量と proviral DNA 量が有意に高く、p40^{tax} 抗体は無症候性キャリアにおいてウイルス複製や感染性のマーカーになる可能性が示唆された。

結 論

HTLV-I には、ウイルス蛋白の転写活性や複製に関与する tax 蛋白が存在するが、この tax 蛋白は pX 遺伝子によってコードされており、tax 蛋白に対する抗体 (p40^{tax} 抗体) の存在が、感染性の指標となる可能性が示唆されている。本研究では、p40^{tax} 抗体の有無と HTLV-I の感染性との関連について、遺伝子レベルより解明するために、キャリアの末梢血リンパ球に発現している pX mRNA 種の同定を行い、その発現量と p40^{tax} 抗体の有無との関連について検討した。

HTLV-I キャリアの末梢血リンパ球より pX mRNA の cDNA をクローニングし、9つの cDNA クローンを得た。その塩基配列を解析した結果、4種類の alternative に splice された pX mRNA が同定された。そのうちの3種類は、これまで報告されていた pX, pXΔ17, p21^{rex} mRNA の塩基配列のいずれかと同一であったが、残りの一つはこれまで報告されていない splicing acceptor site を有している新しい

mRNA 種で、pXΔ17Δ37 mRNA と命名した。以前の報告と合わせて考えると、HTLV-I は複雑な splicing のパターンを持つことが示唆された。

さらに、HTLV-I pX mRNA の発現量と p40^{tax} 抗体の有無との関連について検討するために、21例のキャリアについて末梢血リンパ球の pX, pXΔ17, p21^{rex} orfII, pXΔ17Δ37 の5つの pX mRNA の発現量と proviral DNA 量を調べた。pX mRNA および proviral DNA を PCR 法で半定量した結果、いずれか1種類の mRNA は全対象者に認められ、主として pX, pXΔ17 の2つの mRNA が発現されており、orfII 以外の mRNA 量は proviral DNA 量と有意な相関が認められた ($p < 0.05$)。また、proviral DNA 量と pX, pXΔ17, pXΔ17Δ37 mRNA 発現量は、p40^{tax} 抗体陽性例の方が陰性例より有意に高く、残り2つの mRNA にも同様の傾向が認められた。以上の結果から、alternative に splice された各種の pX mRNA は、キャリアの末梢血リンパ球に恒常的に発現しており、また、p40^{tax} 抗体陽性のキャリアはウイルス量が多く、ウイルス複製レベルも高度であることから母児感染における感染性の指標として p40^{tax} 抗体の重要性を遺伝子レベルで裏付けている可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました九州大学総合診療部柏木征三郎教授、林純助教授に心から感謝致します。また、本研究を直接御指導頂いた原土井病院池松秀之先生、患者検体および臨床資料を提供して頂いた原土井病院院長原寛先生、ならびに臨床検査室の方々に深く感謝致します。また、研究の遂行に御協力頂きました、研究室の諸先生方に深く感謝致します。

References

- 1) Ballard DW, Böhlein E, Lowenthal JW, Wano Y, Franza BR and Greene WC: HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the α B element in the IL-2 receptor α gene. *Science*. 241: 1652-1655, 1988.
- 2) Berneman ZN, Gartenhaus RB, Reitz MS, Klotman ME and Gallo RC: cDNA sequencing confirms HTLV-I expression in adults T-cell leukemia/lymphoma and different sequence variations in vivo and in vitro. *Leukemia*. 6Suppl 3: 67S-71S, 1992.
- 3) Berneman ZN, Gartenhaus RB, Reitz MS, Blattner WA, Manns A, Hanchard B, Ikehara O, Gallo RC and Klotman ME: Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary

uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. Proc Acad Sci USA 89: 3005-3009, 1992.

4) Blattner WA, Blayney DW, Robert-Guroff M, Sarngadnaran MG, Kalyanaraman VS, Sarin PS, Jaffe ES and Gallo RC: Epidemiology of human T-cell leukemia/lymphoma virus. J Infect Dis. 147: 406-416, 1983.

5) Chen ISY, Slamon DJ, Rosenblatt JD, Shah NP, Quan SG and Wachsman W: The c gene is essential for HTLV replication. Science. 229: 54-58, 1985.

6) Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162: 156-159, 1987.

7) Ciminale V, Pavlakis GN, Derse D, Cunningham CP and Felber BK: Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: Novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. J Virology. 66: 1737-1745, 1992.

8) Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F and Leonard WJ: Regulation of the human interleukin-2 receptor α chain promoter: activation of a nonfunctional promoter by the trans-activator gene of HTLV-I. Cell. 49: 47-56, 1987.

9) Depper JM, Leonard WJ, Kronke M, Waldmann TA and Treene WC: Augmented T cell growth factor receptor expression in HTLV-I-infected human leukemia T cells. J Immunol. 133: 1691-1695, 1984.

10) Felber BK, Paskalis H, Kleinman-Ewing C, Wong-Staal F and Pavlakis GN: The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. Science. 229: 675-679, 1985.

11) Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A and De The G: Antibodies to human T lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet. ii: 407-409, 1985.

12) Gessain A, Louie A, Gout O, Gallo RC and Franchini G: Human T-cell leukemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. J Virol. 65: 1628-1633, 1991.

13) Hidaka M, Inoue J, Yoshida M and Seiki M: Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-I initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. EMBO J. 7: 519-523, 1988.

14) Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita K, Shirakawa S and Miyoshi I: Adult T-cell leukemia: antigen in an

ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc Natl Acad Sci USA. 78: 6476-6480, 1981.

15) Hirata M, Hayashi J, Noguchi A, Nakashima K, Kajiyama W, Kashiwagi S and Sawada T: The effects of breastfeeding and presence of antibody to p40^{tax} protein of human T cell lymphotropic virus type-I on mother to child transmission. Int J Epidemiol. 21: 989-994, 1992.

16) Ikematsu H, Goldfarb IS, Harindranath N, Kasaian MT and Casali P: Generation of human monoclonal antibody-producing cell lines by Epstein-Barr virus (EBV)-transformation of B lymphocytes and somatic cell hybridization techniques. J Tiss Cult Meth. 14: 9-12, 1992.

17) Ikematsu H, Harindranath N, Ueki Y, Notkins AL and Casali P: Clonal analysis of a human antibody response. II. Sequences of the VH genes of human IgM, IgG, and IgA to rabies virus reveal preferential utilization of VHIII segments and somatic hypermutation. J Immunol. 150: 1325-37, 1993.

18) Ikematsu W, Ikematsu H, Okamura S, Otsuka T, Harada M, and Niho Y: Surface phenotype and Ig heavy-chain gene usage in chronic B-cell leukemias: expression of myelomonocytic surface markers in CD5-chronic B-cell leukemia. Blood. 83: 2602-2610, 1994.

19) Inoue J, Yoshida M and Seiki M, Transcriptional (p40x) and post-transcriptional (p27x - III) regulators are required for the expression and replication of human T cell leukemia virus type I genes. Proc Natl Acad Sci USA. 84: 3653-3657, 1987.

20) Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H and Okochi K: Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. J Infect Dis. 154: 851-857, 1986.

21) Kajiyama W, Kashiwagi S, Nomura H, Ikematsu H, Hayashi J and Ikematsu W: Seroepidemiologic study of antibody to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japan. Am J Epidemiol. 123: 41-47, 1986.

22) Kasaian MT, Ikematsu H and Casali P: Identification and analysis of a novel CD5-B lymphocyte subset producing natural antibodies. J Immunol. 148: 2690-2702, 1992.

23) Kashiwagi S, Kajiyama W, Hayashi J, Noguchi A, Nakashima K, Nomura H, Ikematsu H, Sawada T, Kida S and Koide A: Antibody to p40^{tax} protein of human T cell leukemia virus I and infectivity. J Infect Dis. 161: 426-429, 1990.

24) Kinoshita T, Shimoyama M, Tobinai K, Ito M, Ito S, Ikeda S, Tajima K, Shimotohno K and Sugimura T: Detection of mRNA for the tax₁/rex₁

gene of human T-cell leukemia virus type I in fresh peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukemia patients and viral carriers by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 5620-5624, 1989.

25) Kiyokawa T, Seiki M, Iwashita S, Imagawa K, Shimizu F and Yoshida M: p27x-III and p21x-III, proteins encoded by the pX sequence of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 8359-8363, 1985.

26) Komurian F, Pelloquin F and De The G: In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J Virol* 1991; 65: 3770-3778.

27) Koralknik IJ, Gessain A, Klotman ME, Monico AL, Berneman ZN and Franchini G: Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89: 8813-8817, 1992.

28) Nagashima K, Yoshida M and Seiki M: A single species of pX mRNA of HTLV-I encodes trans-activator p40x and two other phosphoproteins. *J Virol*. 60: 394-399, 1986.

29) Orita S, Kobayashi H, Aono Y, Saiga A, Maeda M and Igarashi H: p21X mRNA is expressed as a singly spliced pX transcript from defective provirus genomes having a partial deletion of the pol-env region in human T-cell leukemia virus type I-infected cells. *Nucleic Acids Research*. 21: 3799-3807, 1993.

30) Orita S, Sato S, Aono Y, Minoura N, Yamashita T, Hinuma Y and Igarashi H: Identification of novel singly spliced pX mRNA transcripts common to all human T-cell leukemia virus type I-related retroviruses. *Virus Genes*. 7: 2: 197-204, 1993.

31) Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amintini H and Igata A: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. i: 1031-1032, 1986.

32) Paine E, Garcia J, Philpott TC, Shaw G and Ratner L: Limited sequence variation in human T-lymphotropic virus type I isolates from North American and African patients. *Virology*. 182: 111-123, 1991.

33) Ratner L, Josephs SF, Starcich B, Hahn B, Shaw GM, Gallo RC and Wong-Staal F: Nucleotide sequence analysis of a variant human T-cell leukemia virus (HTLV-Ib) provirus with a deletion in pX-I. *J Virol*. 54: 781-790, 1985.

34) Seiki M, Hattori S, Hirayama Y and Yoshida M: Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome intergrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80: 3618-3622, 1983.

35) Seiki M, Hikikoshi A, Taniguchi T and Yoshida M: Expression of the pX gene of HTLV-I: General splicing mechanism in the HTLV family. *Science*. 228: 1532-1534, 1985.

36) Seiki M, Inoue J, Takeda T and Yoshida M: Direct evidence that p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting transcriptional activator. *EMBO J*. 5: 561-565, 1986.

37) Sliwkowski M, Teramoto Y, Ferrer M, Akita R, Keitelman E, Lie HL, Florine D, Slamon D and Brandis J: Characterization of human T-cell leukemia virus type I p40^{tax} protein expressed in *E. coli*. *Adv Gene Tech*. 8: 228, 1988.

38) Sodroski JG, Rosen CA, Goh WC and Haseltine WA: A transcriptional activator protein encoded by the x-lor region of the human T-cell leukemia virus. *Science*. 228: 1430-1434, 1985.

39) Tandler CL, Greenberg SJ, Blattner WA, Manns A, Murphy E, Fleisher T, Hanchard B, Morgan O, Burton JD, Nelson DL and Waldmann TA: Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy: Pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 5218-5222, 1990.

40) 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 disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79: 2031-2035, 1982.

41) Yoshida M, Osame M, Usuku K, Matsumoto M and Igata A: Viruses detected in HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia are identical on DNA blotting. *Lancet*. ii: 1085-1086, 1987.

42) Yoshida M, Seiki M, Yamaguchi K and Takatsuki K: Monoclonal integration of HTLV in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of HTLV in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81: 2534-2537, 1984.

(受付 1995-11-20)