

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

HIV 等のマクロファージ潜伏感染ウイルスの再活性化に及ぼす影響の評価

分担研究者 天野 富美夫 国立感染症研究所細胞化学部主任研究官

研究要旨 HIV-1 の潜伏感染したマクロファージからのウイルスの再活性化に及ぼす生活環境中の脂溶性化学物質の影響を調べるため、本年度は HIV-1 の潜伏感染したヒト単球系細胞株 U1 細胞を用い、脂溶性化学物質としてトリブチルスズ(TBT)を用いて検討した。その結果、TBT は濃度依存的に U1 細胞を障害したため、HIV-1 の再活性化を調べるための基礎条件の検討が必要になった。そのため、U1 細胞の親株であるヒト単球系細胞株 U937 を用いて TBT の効果を調べ、低濃度における細胞増殖阻害と高濃度におけるアポトーシスを介した細胞障害性の二相性の作用があることを見出した。とくに、低濃度の TBT 作用は verapamil によって阻害される薬物排出機構によって調節され、また、高濃度の TBT 作用は quin-2 で阻害される細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇によって調節されることが示唆された。

A. 研究目的：

従来の研究から、種々の脂溶性化学物質は工業的な製造過程や産業廃棄物、あるいは最終的な製品の形で環境中に拡散し、再び食品等を通じて摂取され、生体内に濃縮されて様々な毒性を発現することが知られるようになった。とくに、ダイオキシンやビスフェノール、トリブチルスズ(TBT)等の内分泌系に及ぼす作用や胎

児に対する重篤な影響が知られるにつれて、国民の健康を守り生活の安全を確保する上からも、これらの脂溶性化学物質のヒトに対する生物影響を速やかに把握し、その危険性を回避する必要がある。本研究では、主課題としてこれらの化学物質の免疫系に及ぼす作用に注目し、「生活環境中の脂溶性化学物質の感染症抵抗性に及ぼす影響」を研究することを

目的とする。その中で、本研究課題は分担として「HIV 等のマクロファージ潜伏感染ウイルスの再活性化に及ぼす影響の評価」をかかげ、マクロファージ/単球に対する脂溶性化学物質の影響を調べ、細胞内に潜伏感染したウイルスの再活性化に及ぼす影響を評価してその制御を行うことを最終的な目的とする。

本年度は脂溶性化学物質の中から TBT に焦点を当てた。TBT は有害な環境汚染有機金属化合物として注目を集め、本研究課題の目指す、免疫系に及ぼす作用に関する研究も欧米諸国を始めとして報告されている。ただし、その大部分が *in vivo* における胸腺に対する作用に関するもの、および、*in vitro* においては T-リンパ球に対する細胞障害性に関するものであり、マクロファージ/単球に関するものはほとんどない。まして、HIV-1 等の潜伏感染ウイルス再活性化に関する報告はなく、本年度は、実験条件を決めるため、まず、TBT の濃度および作用時間、評価する細胞の機能等に関する検討を行った。

B. 研究方法：

(1) U1 細胞の培養と HIV-1 遺伝子の再活性化：

ヒト単球系細胞株の HIV-1 潜伏感染株 U1 細胞は、RPMI1640+10%FBS

中で培養し、増殖状態の良い状態で集め、 2×10^5 cells/ml に懸濁した。これを Costar48 穴プレートに 0.25ml ずつ分注し、TBT のエタノール溶液を終濃度 0.1-100 μ M となるように添加した後、さらに 3 群に分け、無添加、 1×10^5 MTPA 添加、あるいは 1ng/ml TNF α を添加して 37 $^{\circ}$ C で 5 日間培養した。その後上清を回収し、その中に含まれる HIV-1 の p24 タンパク質を ELISA で定量した。

(2) U937 細胞の培養と TBT の作用の評価法：

ヒト単球系細胞株 U937 の亜株 Cl.1-4 を RPMI1640+10%FBS 中で培養した。実験に際して、細胞増殖を見る場合には 4×10^4 cells/ml に懸濁したのち Costar24 穴プレートに 0.5ml ずつ分注し、これに TBT を終濃度 3nM-10 μ M になるように添加して 37 $^{\circ}$ C で 4 日間培養した。細胞数は Coulter counter によって計測して求めた。また、細胞障害性を調べる場合には 4×10^5 cells/ml に懸濁した細胞を Costar24 穴プレートに 0.5ml ずつ分注し、TBT を添加して一晩培養した。その後、培養上清を回収し、細胞内から漏出した乳酸脱水素酵素(LDH)の活性を測定して求めた。定量は極東の LDH アッセイキットを用いて行い、加温時間 0 時間をもってバックグラウンドの値とし、また、加温の最後

に 0.1% Triton X-100 を添加した細胞から漏出した LDH の活性を 100%とし、相対的な値(%)として求めた。

(3) アポトーシスの検出法:

TBT による U937 細胞の障害がアポトーシスによるか否かを検討するため、 4×10^5 cells/ml に懸濁した細胞を 2ml/dish でまき、これに TBT を添加して 37°C で数時間加温した。その後細胞を氷冷し、PBS で洗浄してマイクロフジチューブに集め、これを 0.1% TritonX-100 を含む細胞抽出液で処理して抽出した。Bradford 法でタンパク定量をしたのち、一定量を SDS-PAGE/Western blotting によって解析し、最終的に抗ヒト active caspase-3 抗体、あるいは抗 PARP(poly-(ADP ribose) polymerase)抗体を反応させ、2次抗体に HRP-結合抗体を用いて反応させた後、ECL system で X 線フィルムを感光させて定量した。

C. 研究結果:

(1) U1 細胞における HIV-1 遺伝子の再活性化の検討:

本実験条件下では、1-100 μ MTBT により U1 細胞が変性し、増殖が大幅に阻害されただけでなく細胞死が観察された。U1 細胞における HIV-1 遺伝子の再活性化には細胞の増殖シグナルが必須であるため、この TBT 濃度は明らかに高すぎる。また、TBT

濃度によっては細胞の変性に留まるものと細胞死まで誘導されるものがあり、これらの予備結果を試験もとに、TBT の添加条件等の検討が必要であることが明らかになった。従って、今年度は以下の項目に示すような U937 細胞を用いた TBT の作用の検討を主体にして、研究を進めることにした。

(2) U937 細胞に対する細胞障害性の検討:

1) 4 日間の培養により、U937 細胞に対して最終濃度 3nM 以上の TBT によって細胞増殖抑制が認められ、100nM 以上ではほとんど細胞増殖が停止した。また、一晩の培養で、300nM 以上の TBT による急激な細胞障害性が認められ、細胞内の酵素である乳酸脱水素酵素(LDH)の遊離が認められ、細胞死が誘導されたことが示された(図 1)。

2) LDH の遊離を伴わないにも拘わらず、100nMTBT は添加後 1 時間以内に核の濃縮ならびに断裂を主な形態上の変化とするアポトーシスが誘導され、TBT が 300nM 以上になるとさらに大きな変化が見られた。特に、1 μ MTBT を添加後 15 分目にはアポトーシスの指標である Caspase-3 の活性化による 12kDa および 17kDa ペプチドの出現(図 2)ならびに PARP の分解と 20kDa のフラグメント (図 3;

Caspase-3 の基質として、アポトーシスの指標に用いられる) が認められた。

3) 添加後 2 時間目には、 $1\mu\text{M}$ TBT で誘導されるアポトーシスは、既に T-リンパ球で報告されているように、細胞内の free Ca^{++} を消去する BAPTA AM, Quin-2 AM 等で部分的だが有意に阻害された(data not shown)。しかし、 Ca^{++} 依存性の疎水性物質の排出トランスポーターである MDR1 を阻害することが知られている verapamil では、このアポトーシスをごく僅かに阻害したがその値は大きな変化ではなかった。

4) 100nM 以上の低濃度領域の TBT による細胞増殖阻害は、verapamil を 10 g/ml 共存させることによって感受性が増大し、 IC_{50} 値がほぼ $1/10$ 以下に低下した。

D. 考察:

1) U937 細胞に対する TBT の細胞毒性には、 $1\text{-}3\text{nM}$ で認められる長時間を必要とする細胞増殖抑制と、 $1\mu\text{M}$ で明らかに認められるアポトーシスを介した短時間で起こる細胞障害性に分かれることが示された。

2) 低濃度の TBT の作用は、verapamil に感受性な transporter としての MDR1 が関与していることが示唆された。

この結果は、脂溶性化学物質一般にとって、その入り口とも言える細胞内への薬物の流入と排出に関わる重要な問題であることが示唆され、今後、核内に移行した化学物質の作用機作の検討とともに、特に重点的に研究を進めたいと考えている。実際、*mdr1* 遺伝子を導入した細胞における TBT の毒性発現の評価や細胞内動態についての解析を進める準備に入ったところである。

3) 高濃度の TBT の作用は、quin-2 に感受性の細胞内 free Ca^{++} の上昇を介した反応で、これまでに T リンパ球に対する細胞障害性で報告されているように、TBT が細胞内の Ca^{++} プールに対して作用することによるものであると思われる。実際、この濃度領域の TBT 作用は verapamil によって影響を受けなかった。さらに、アポトーシスの誘導に対して、細胞内 free Ca^{++} の上昇がマクロファージ/単球において如何なる役割を果たしているのかについて検討する必要がある。

4) U1 細胞における HIV-1 遺伝子の再活性化のための条件として、U937 細胞で得られた知見をもとに、細胞増殖をあまり強く阻害しない $0.1\text{-}10\text{nM}$ 程度の TBT を用い、さらに 1×10^8 MTPA、あるいは 1ng/ml TNF α を添加する条件を採用したいと考えて

いる。

E. 結論：

HIV-1 の潜伏感染したマクロファージからのウイルスの再活性化に及ぼす TBT の影響を調べた。ヒト単球系細胞株 U1 細胞を用い、HIV-1 の再活性化を調べるための基礎条件の検討のため、U1 細胞の親株であるヒト単球系細胞株 U937 を用いて TBT の効果を調べた結果、低濃度における細胞増殖阻害と高濃度におけるアポトーシスを介した細胞障害性の二相性の作用があることを見出した。

とくに、低濃度の TBT 作用は verapamil によって阻害される薬物排出機構によって調節され、また、高濃度の TBT 作用は quin-2 で阻害される細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇によって調節されることが示唆され、今後の U1 細胞における HIV-1 遺伝子再活性化の研究のためには 0.1-10nM 程度の TBT を用いるのが適当であることが示唆された。

F. 研究発表：

1. 論文発表

1. Karahashi, H., Amano, E. Lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death of C3H mouse peritoneal

macrophages in the presence of cycloheximide: different susceptibilities of C3H/HeN and C3H/HeJ mice macrophages. *J. Endotoxin Res.* 6, (2000) 33-39.

2. Karahashi, H., Nagata, K., Ishii, K., Amano, E. A selective inhibitor of p38 MAP kinase, SB202190, induced apoptotic cell death of a lipopolysaccharide (LPS)-treated macrophage-like cell line, J774.1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1502, (2000) 207-223.

2. 学会発表

1. 天野富美夫、唐橋久恵：リポ多糖 (LPS) のマクロファージ細胞障害性におけるシグナル伝達機構。第 73 回日本生化学会大会。2000 年 10 月、横浜。

G. 知的所有権の取得状況：

特になし

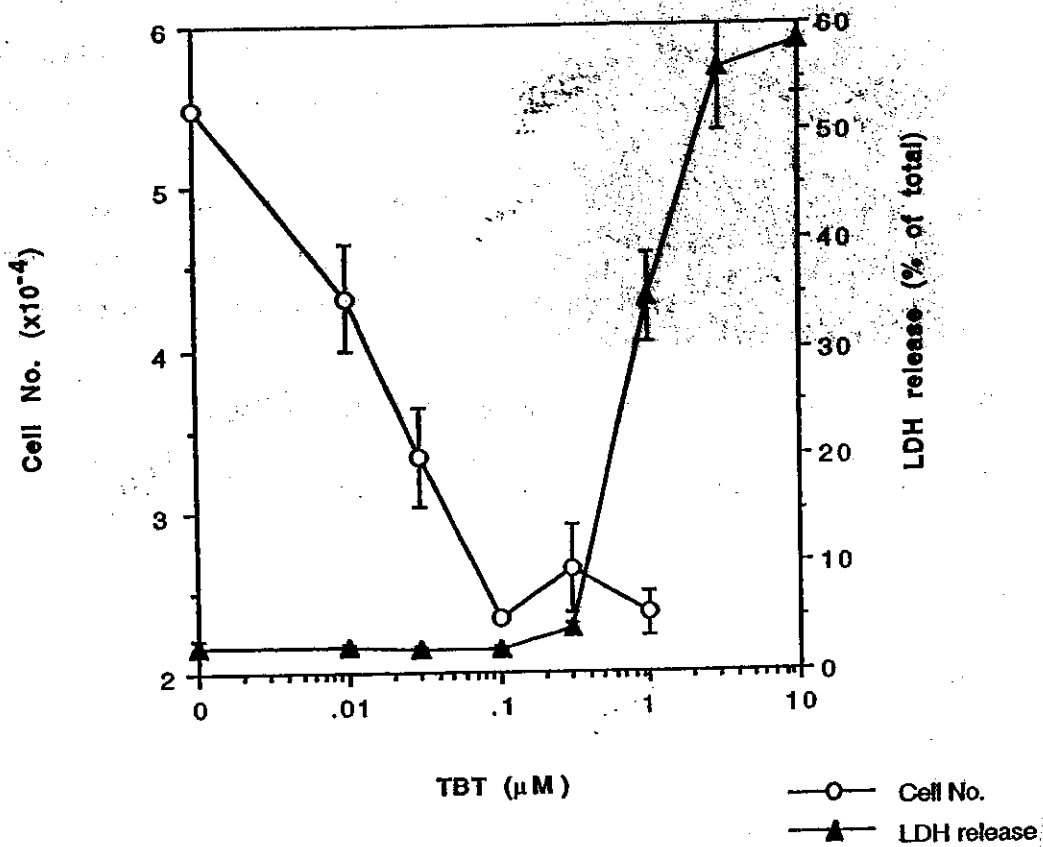


図1. TBTで誘導されるU937細胞の増殖阻害と細胞障害性

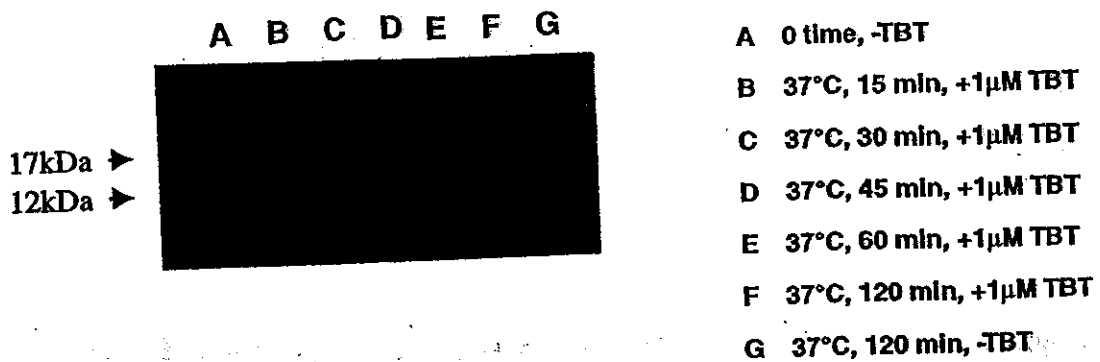


図2. TBTによるCaspase3の活性化と活性型フラグメントの生成

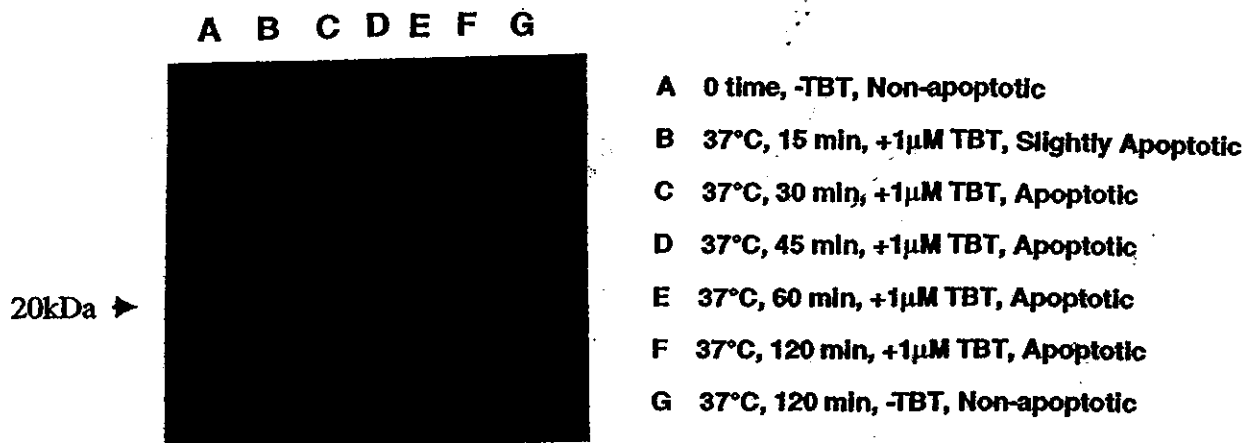


図3. TBTによるアポトーシスの誘導とPARPの限定分解

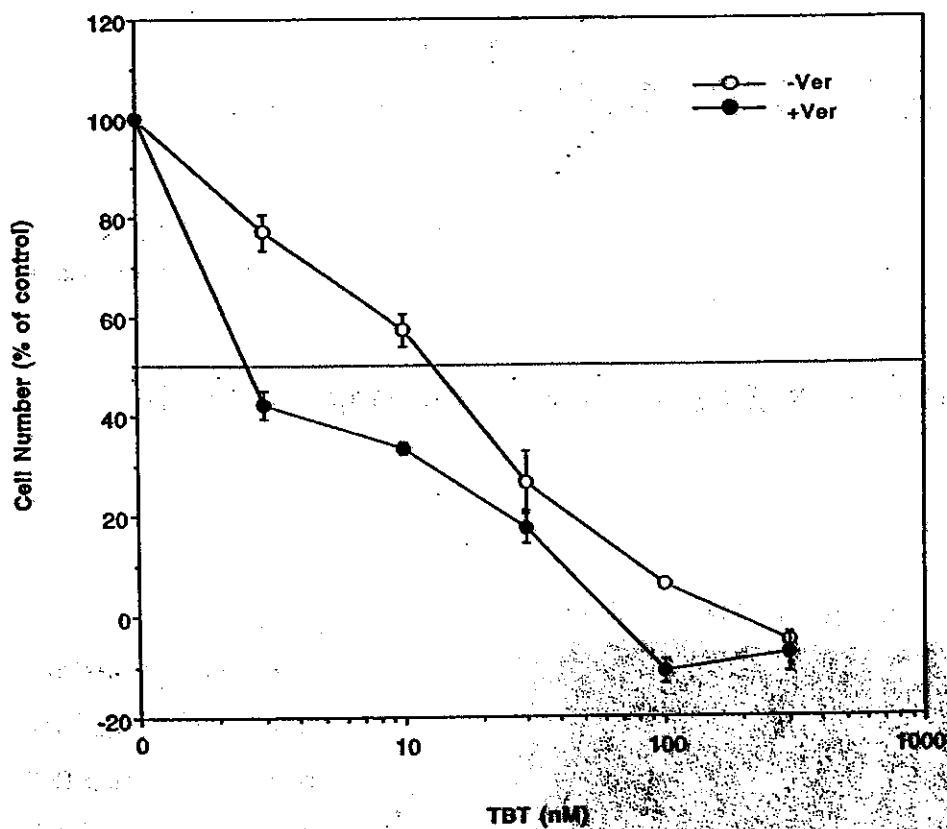


図4. 低濃度のTBTによるU937細胞の増殖阻害に対するverapamilの影響

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

脂溶性化学物質のヒト腸管上皮細胞への影響

分担研究者 小西 良子 国立感染症研究所

研究要旨

食品や水を介して有害化学物質が生体に摂取される場合、最初に暴露される部位は消化管である。消化管の中でも小腸はその本来の機能から表面積が広く、有害化学物質の毒性を受けやすい危険性を持っている。そこで本研究では、腸管が有する防御機構の一つである薬物トランスポーターであるP-糖タンパク質（P-gp；MDR）に着目し、この機能に対してダイオキシン類等の脂溶性有害化学物質の及ぼす影響を検討した。その結果化学物質の中には、P-gpの機能に短期的・長期的に変化を及ぼす可能性のあるものが存在することが示唆された。

A. 研究目的

腸管（小腸）の管腔側は一層の細胞に被われており、これが上皮細胞層である。上皮細胞層では、細胞がタイトジャンクションと呼ばれる接着装置によって互いに強く結合しており、体内と体外を区別する障壁を形成している。腸管上皮細胞層には大きくわけて3つの機能があると考えられる。

第1は吸収／輸送機能である。上皮細胞の管腔側（粘膜側）には、刷子縁膜酵素と呼ばれる消化酵素や、栄養素の特異的な輸送に関わるトランスポーターが発現している。一方、脂溶性ビタミンなどは細胞内の特異的な結合タンパク質を介して輸送される。さらに、オリゴペプチド、親水性のフラボノイドなど近年その生理機能が注目されている水溶性成分の吸収経路としては、細胞間隙を受動拡散で通る細胞間経路の重要性が指摘されている。

腸管上皮の第2の機能はバリアー機能である。腸管内に存在する様々な有害な物質、

異物が体内に取り込まれないようにするために、腸管上皮は細胞同士が緊密に結合しあって連続性のある障壁を形成している。また、上皮細胞には異物排出にかかわるトランスポーターであるP-糖タンパク質（P-gp；MDR）が発現していることが知られている。これも異物の侵入を抑制する機構のひとつと考えられる。

第3の機能は、食品成分の持つ情報を生体内に伝える「シグナル伝達」あるいは「シグナル変換」作用とでも呼ぶべき機能である。消化管内へ糖や脂質が進入して来たときにそれを受容内分泌細胞が感知して血液側に消化管ホルモンを放出する作用はこのシグナル変換機能の好例である。

我々は、ダイオキシンなどの脂溶性化学物質がこのような腸管上皮の機能にどのような影響を及ぼすのかについて検討を開始している。本年度は、特に化学物質の排出にも関与する可能性のある腸管の異物排出トランスポーター（P-gp）に注目するこ

of *Fusarium* mycotoxins: Use in co-culture system with human intestinal cells. *Mycotoxins*, 51, 37-40 (2001)

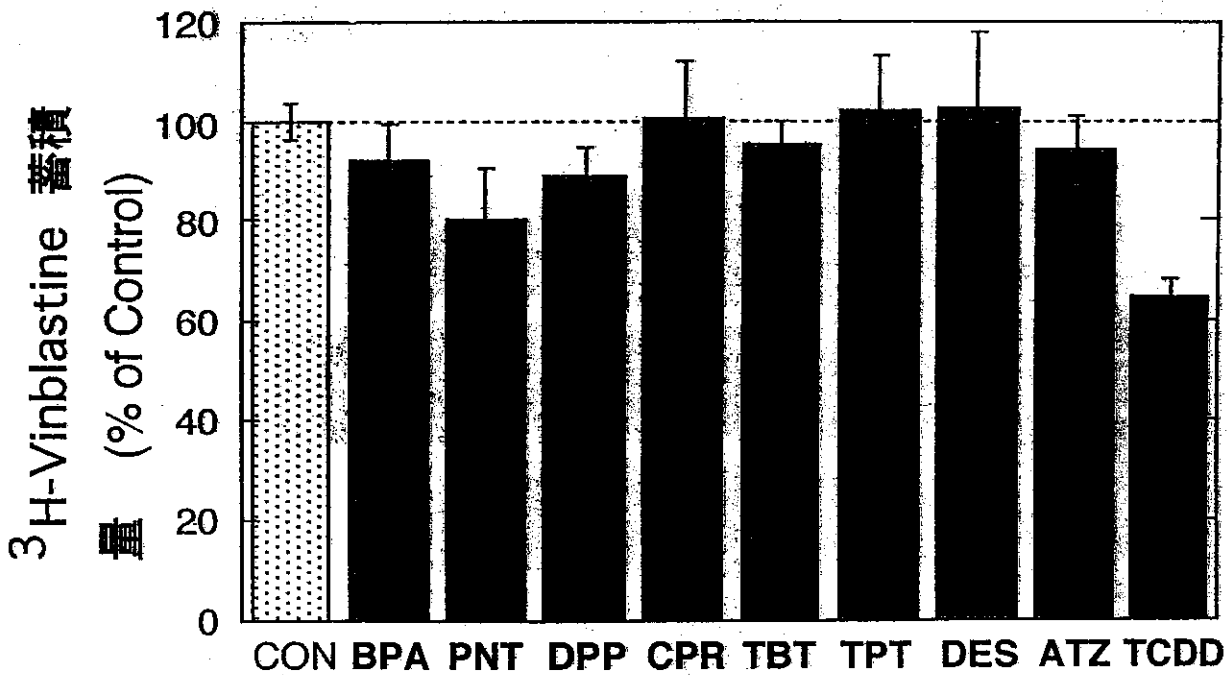
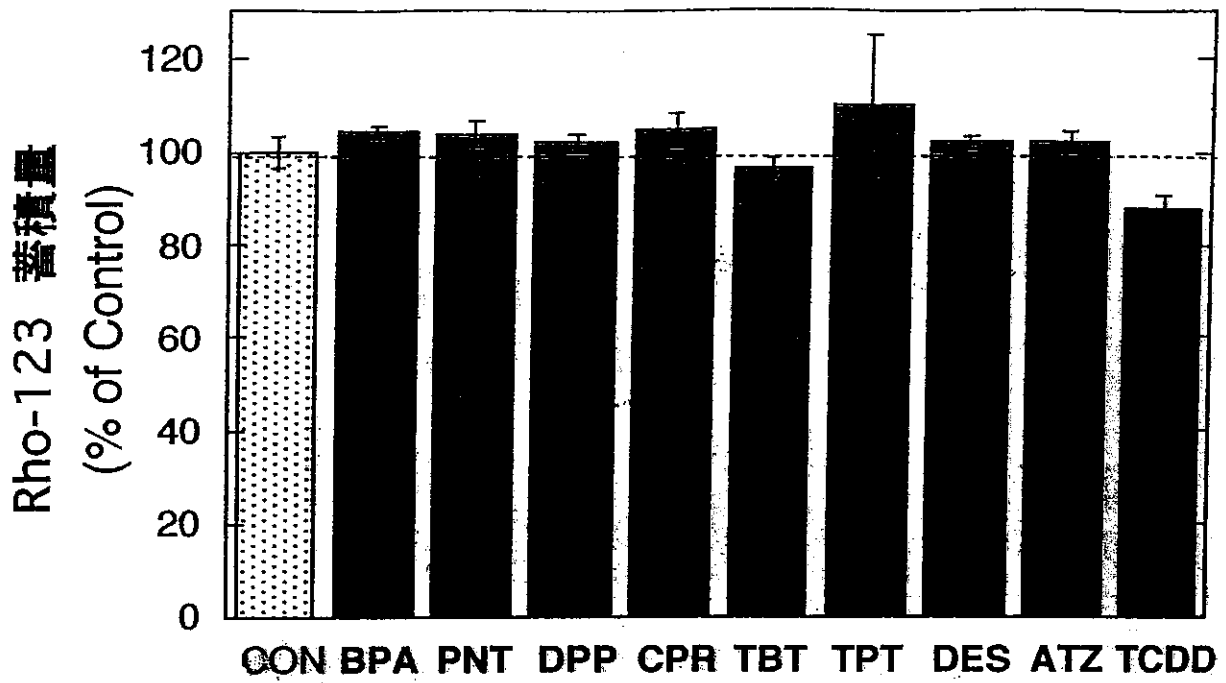


図1 内分泌攪乱物質によるRho-123及び³H-Vinblastine蓄積量の変化

BPA : bisphenol A	TBT : tributyltin chloride
PNT : <i>p</i> -nitrotoluene	TPT : triphenyltin chloride
DPP : diphenylpropane	DES : diethylbestrol
CPR : cypermethrin	ATZ : atrazine
TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin	(100 nM)

Rho-123 蓄積量
(% of Control)

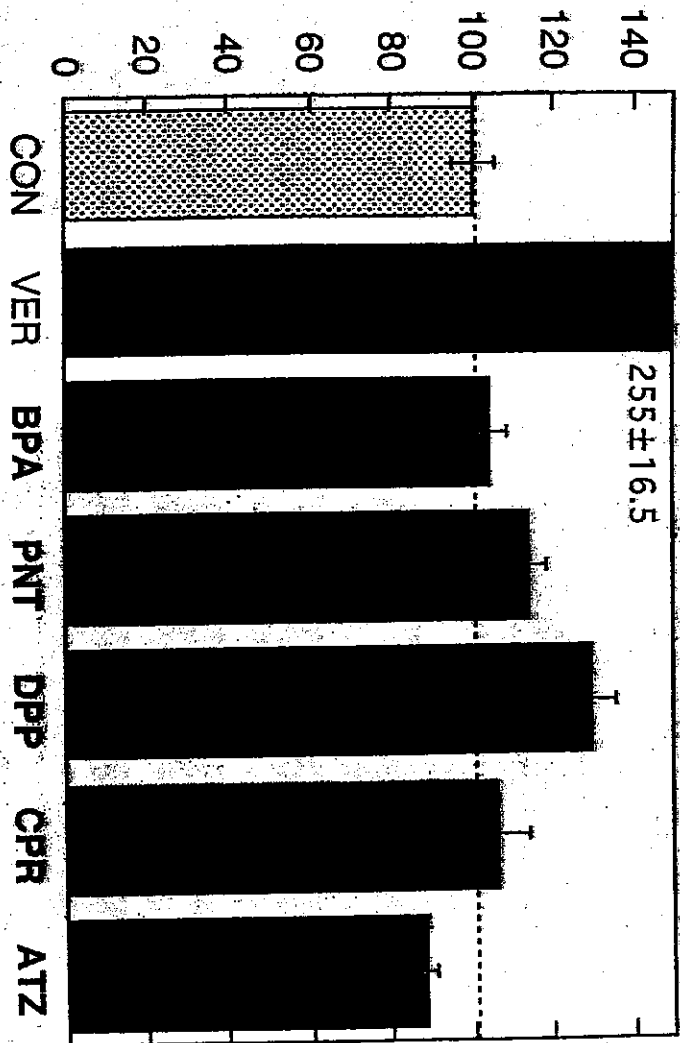


図2

Caco-2における内分泌攪乱物質共存下
でのRhodamine-123の蓄積量の変化

VER : verapamil DPP : diphenylpropane
 BPA : bisphenol A CPR : cypermethrin
 PNT : p-nitrotoluene ATZ : atrazine (100 μM)

班会議開催記録

日時：平成13年3月14日 15:00-17:00

場所：国立感染症研究所 戸山庁舎 3階セミナー室

参加研究者

- | | |
|------------------------|-------|
| 1. 国立感染症研究所 細胞化学部 | 天野富美夫 |
| 2. 国立感染症研究所 食品衛生微生物部 | 小西 良子 |
| 3. 香川医科大学 第2病理学研究室 | 阪本晴彦 |
| 4. 東京理科大学 薬学部 | 杉浦義紹 |
| 5. 国立感染症研究所 つくば霊長類センター | 向井鏡三郎 |
| 6. 国立感染症研究所 つくば霊長類センター | 山田章雄 |

議題

1. 本年度研究項目の提案・確認

- (1) トリブチルスズの免疫系への影響、感染症に対する抵抗性への影響
- (2) 感染実験の確立
- (3) サルを用いる実験計画
- (4) ヒト培養細胞を用いた脂溶性化学物質の毒性の評価法の確立

2. 研究分担事項の研究報告

- (1) トリブチルスズの次世代への免疫毒性に関する研究—ラットを用いた実験
- (2) トリブチルスズの次世代への免疫毒性に関する研究—病理学的考察
- (3) トリブチルスズの次世代へのリステリア菌に対する感染抵抗性への影響
- (4) 脂溶性化学物質のカンジダ菌に対する感染抵抗性への影響
- (5) 潜伏感染ウイルスの再活性化の検出、評価法の検討に関する研究
- (5) ダイオキシシン類などの脂溶性化学物質のヒト腸管上皮細胞へ影響

2. その他

報告書作成の説明など

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hirano M, Nakamura S, Okada M, Ueda M, Mukai R	Rapid Discrimination of monkey B virus from human herpes simplex viruses by PCR in the presence of betain.	J.Clin. Microbiol	38	1225-1257	2000
Shimizu N; Soda Y; Kanbe K; Liu HY; Mukai R Kitamura T Hoshino H	A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses.	J. Virol.	74	619-626	2000
Matunaga, S, Mukai, R, Murayama, M Yoshikawa, Y Murayama, Y	Sequence and functional properties of African green monkey CD4 silencer.	Immunol. Lett.	75	47-53	2000
Sugita-Konishi, Y. Ogawa, M., Arai, S., Kumagai, S., Igimi, S. Shimizu, M.	Blockade of Salmonella enteritidis passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody.	Microbiol. Immunol.	44	473-479	2000
Sugita-Konishi, Y.	An approach to toxicity of Fusarium mycotoxins: Use in co-culture system with human intestinal cells.	Mycotoxins	51	37-40	2000
Karahashi, H., Amano, F.	Lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death of C3H mouse peritoneal macrophages in the presence of cycloheximide	J. Endotoxin Res.	6	33-39	2000
Karahashi, H., Nagata, K., Ishii, K., Amano, F.	A selective inhibitor of p38 MAP kinase, SB202190, induced apoptotic cell death of a lipopolysaccharide (LPS)-treated macrophage-like cell line, J774.1.	Biochim. Biophys. Acta.	1502	207-223	2000

20000761

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

霊長類センターで繁殖に用いられていた野生由来アフリカミドリザルに関して IFA 法にて検査したところ、47 頭中 41 頭 (87%) が SIV 抗体陽性であった。

PCR 法による SIV 遺伝子の検出

我々は最近、サルエイズ脳炎組織由来の SIVBM5 株の全塩基配列を決定したが、そのため、独自にデザインした PCR 用のプライマーおよびその反応条件を図 3、4 に示す。このうちの 2 セット (S.pol 2 - A.pol 1 と S.pol 3 - A.pol 2) は アフリカミドリザルの SIVagm の PCR 検出にも用いることができ、検出感度は数 100 コピーであった。

2. サルヘルペスウイルス感染の検出

カニクイザルの EB ウイルス感染

筑波霊長類センターではコロニーのサルの定期健康診断のためにサルの採血を行っているが、平成 12 年度に採血された血清 126 検体を用い、EB ウイルス VCA 抗原を用いた IFA 法により、抗 EB ウイルス抗体の有無を調査したところそのうちの 76% が陽性であった。

つぎに、当センターで分離された EB ウイルス産生細胞株 (Ts-B9) 株のゲノム DNA を用い、Hayashi ら

(Lab. Invest. 79, 823, 1999) のプライマーセット (S. BRRF1; 11a - A. BRRF1; 11b) および (S. BGRF1; 13a - A. BGRF1; 13b) を用いて PCR を行ったところ、それぞれ 678bp と 1078bp のバンドが検出されたので、検出感度を上げるため、nested PCR を開発中である。

カニクイザルの CMV 感染の検出

SA6 感染 OMK 細胞を用い、IFA 法にてカニクイザルのサイトメガロウイルス (CMV) による感染の検出を行った。

1 才から 2 才までの保存サル血清 69 検体を調査したところ、陽性率は 84% であり、ほとんどのサルで本ウイルスによる感染があるものと思われる。CMV は尿や唾液中に排出されると言われており、現在 PCR 法による検出法の開発を行っている。

D. 考察

生活環境中の脂溶性有害物質が食品や水などを介して生体に暴露した時の宿主の感染症に対する抵抗性及ばす影響を調べるにあたり、サル類を用いることは、サル類がヒトと同じ霊長類に属するため、ヒトにおける脂溶性有害物質の及ばす影響をより直接的に推測することができる可能性が高い。実際に、サル EB ウ

イルス、サルCMVなどやサルエイズウイルスにおいては、その抗原性においても、ウイルス遺伝子塩基配列においてもヒトウイルスと相同性が高く、ヒトの検査用のプローブがそのまま使えることが多い。

今回、サルレトロウイルス2種類、サルヘルペスウイルス2種類の検査検出系を開発したが、当センターのカニクイザルには4種類のウイルスに感染している個体が多いことがあきらかになった。

今後、脂溶性有害物質が潜伏感染しているウイルスにどのような影響を及ぼすのかを明らかにするためには、コルチゾール等のストレスマーカーの測定を行い、環境要因による血中ウイルス量の変動を把握しておく必要がある。次年度の前半はこのような観点で、今年度確立できたウイルス感染の測定法を用いて、サルレトロウイルス (SRV、SIV) やサルヘルペスウイルス (EB ウイルス、CMV) のバックグラウンドレベルの血中ウイルス量を測定し、安定した値を示すサルの選別が必要であると考えられる。

一方、小動物において脂溶性有害物質が病原体の感染 dose を著しく低下させるようなウイルス等が明らかになった場合には、サルを用いて同等の病原体の感染 dose を調べる

ことも計画の一部として考慮する必要があると思われる。

E. 結論

1. レトロウイルスの分離培養系を確立し、その遺伝子、抗体検出系を確立した (SRV, SIV)。

2. ヘルペスウイルス感染の検出系をEBウイルスに関して確立した。CMVに関してはPCR系を引き続き開発する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) J. Takano, T. Narita, K. Fujimoto, R. Mukai, and A. Yamada: Detection of B virus infection in cynomolgus monkeys by ELISA using simian agent 8 as alternative antigen. *Exp. Anim.*, In press.

2) Shimizu N., Soda Y., Kanbe K., Liu H.Y., Mukai R., Kitamura T., Hoshino H : A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 74 : 619-626 (2000)

3) Matunaga, S, Mukai, R, Murayama. M. I Yoshikawa, Y, Murayama, Y: Sequence and functional properties of African green monkey CD4 silencer. *Immunol. Lett.* (Accepted)

2. 学会発表

1) 小松原博文、菊池俊彦、佐多徹太郎、松田基夫、宇田晶彦、山田章雄、向井鏝三郎：中枢神経指向性 SIV の解析

第 14 回日本エイズ学会（京都）2000 年

2) 棚林 清、向井鏝三郎、山田章雄：B ウイルス糖タンパクの発現と血清診断用抗原としての可能性、第 129 回日本獣医学会 2000

3) 棚林 清、向井鏝三郎、山田章雄：人獣共通伝染病としての B ウイルス

感染症、サル類における B ウイルス抗体検査、第 15 回ヘルペスウイルス研究会 2000 年 6 月

棚林 清、向井鏝三郎、山田章雄：組換え発現蛋白を用いた B ウイルスサル血清抗体検出法の開発、第 48 回日本ウイルス学会 2000 年 10 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

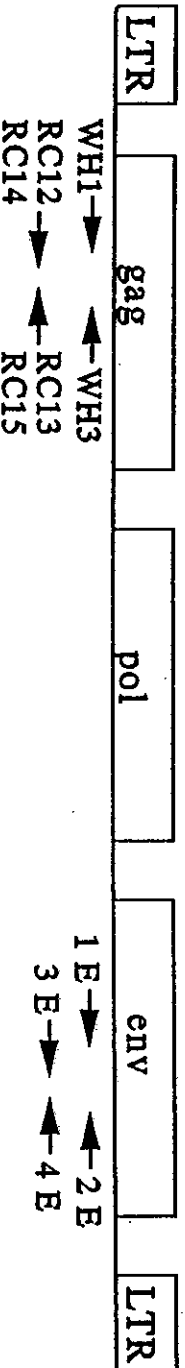
1

Simian retrovirus typed env and gag specific primers for PCR

Primers * 1	sequence (5' - 3')	Predicted env product size (bp)			
		SRV/D-1	SRV/D-2	SRV/D-3	N27 T150
Standard PCR					
SRVenV 1E	GCCCCGTGGTAAAGAAAATTG	728	701	725	(713) (713)
SRVenV 2E	ACTTCTACTAGAGAGTCTAC				
Nested PCR					
SRVenV 3E	GAAGATTGCTGGCTGTGCTT	422	398	422	(410) (410)
SRVenV 4E	ATAGCTGGAATGGGACACAGG				
* 2					
Primers	sequence (5' - 3')	Predicted gag product size (bp)			
Standard PCR					
WH1/M	CCACTGTAATGGCGGTTGTTAATCC	266		266	
WH3/M	CTGGGAAAATATCTTTGGGATTTGTTT				
WH1/2	CCGCTGTGATGGCGGTAGTCAATCC				
WH3/2	CTGGGAAAATATCTTTGGGAGGATATTTC	266			
Nested PCR					
RC12	TAATCCAAAAGAGGAGCTCAAGA	222		222	(232) (232)
RC13	TGTCTCTCCCTTCTGACTGGC				
RC14	CAATCCTAAGAAGAACTCAAGA				
RC15	TATCTCTCTGTGTTTATTATAAAGG	222			

* 1 AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSE, Vol 13, No 5, Number, 1997 : 433 - 437

* 2 Laboratory Animal Science, Vol 47, No 3, June, 1997 : 263 - 268



Homology in Nucleic Acid \ Amino Acid in env and gag of SRVs TPC

(env)

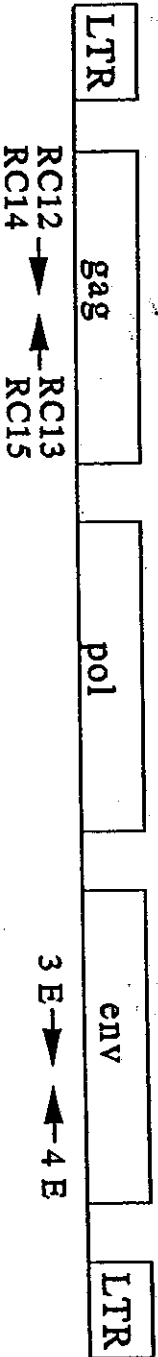
	SRV-1	SRV-2	SRV-3	N27	T150
SRV-1		60.8	81.9	72.1	72.1
SRV-2			62.9	62.6	62.6
SRV-3				70.4	70.4
N27					100
T150					

(gag)

	SRV-1	SRV-2	SRV-3	N27	T150
SRV-1		69.9	95.9	75.3	75.3
SRV-2			68.5	65.8	65.8
SRV-3				74.0	74.0
N27					100
T150					

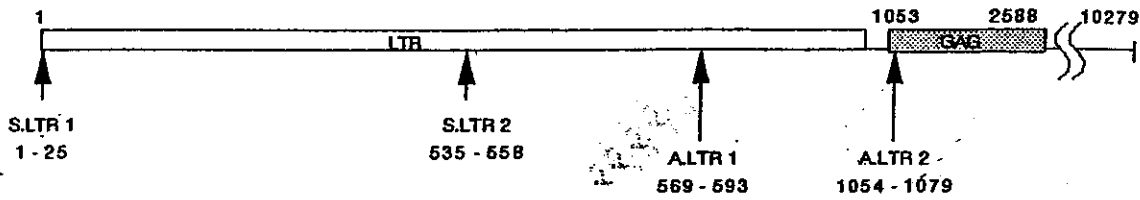
Nucleic acid : 410bp
Amino acid : 136 residue

Nucleic acid : 232bp
Amino acid : 77 residue

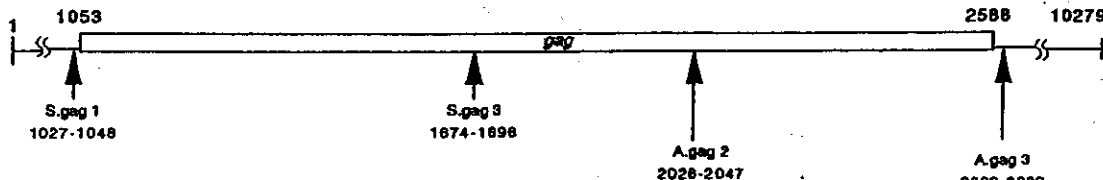


3

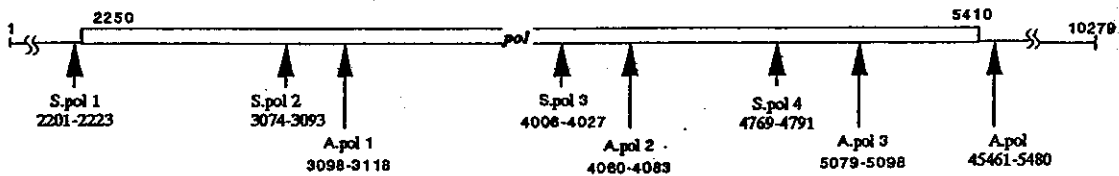
SIV Sequencing Strategy



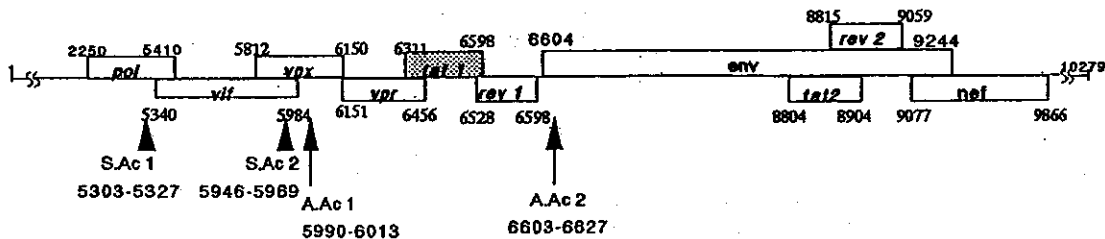
S.LTR 1 : TGGAAGGGATTATTACAGTGC AAG / A.LTR 1 : ACACCCAGGCTCTACCTGCTAGTGC → 593 bp
 S.LTR 2 : AGGCTGGCAGATTGAGCCCTGGGAG / S.LTR 2 : TGACAAGACGGAGTTTCTCACGCCCA → 545 bp



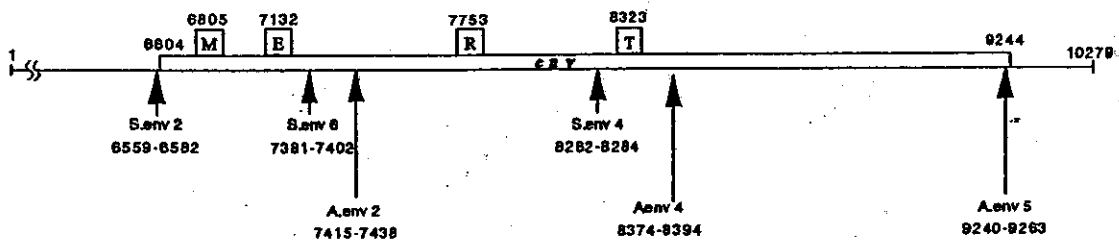
S.gag 1 : GAAGGGGTAATAAGATAGAGTG / A.gag 2 : TTACATCTGGGTTAGCATTTT → 1021 bp
 S.gag 3 : AATGAGGAAGCAGCAGAATGGGA / A.gag 3 : TAATACTTCTACAGGCTGTCC → 950 bp



S.pol 1 : ACAGAGGGGACCAAGAAAGCCAA / A.pol 1 : TTCCGTAAGTCCCTGAGTGAC → 918 bp
 S.pol 2 : ATAGATTTTAGGGAAGCTAAA / A.pol 2 : GGTATCCAGGTTACCTGCCAATAG → 1010 bp
 S.pol 3 : CCCAAAATTCACCTTACCAGTT / A.pol 3 : TCCTCCCTTTCTTTAAAAT → 1093 bp
 S.pol 4 : AGTGGATTATAGAAAGCAGAGGT / A.pol 4 : GACCTTAAATGGGGCACAT → 712 bp



S.Ac 1 : GTAGTACCCAGAAGAAAGGCTAAAA / A.Ac 1 : TTACATAGCTTGGTGACATCCCTT → 711 bp
 S.Ac 2 : TTCCAGGTTTGCAAAGGTCTTG / A.Ac 2 : CAGCTGATTCCCAAGACATCCATA → 682 bp



S.env 2 : GAAAAAGGCTAAGGCTAATACATC / A.env 2 : CATTAAGCCAAACCAAGTAGAAG → 880 bp
 S.env 6 : GTCTCTTCATGCACAAGGATGA / A.env 4 : CTCGATGGCAGTGACCTAGT → 1014 bp
 S.env 4 : GTCCGAACTTATTGGCTGGGA / A.env 5 : CCTGATTGTATTCTGTCCTCAC → 1002 bp



S.nef1 : GGACTGAACTGACCTACCTACAAT / A.nef1 : TTATACATCAAGAAAGTGGGCGTTT → 901 bp