

ヒトアデノウイルス 5 型及び 12 型 E1A キメラ 組換え体の機能解析

浜松千秋

札幌医科大学内科学第 3 講座

(主任 鈴木 明 教授)

澤田幸治

札幌医科大学付属がん研究所分子生物学部門

(主任 藤永 薫 教授)

Functional Analyses of Human Adenovirus Types 5 and 12 Chimeric Early Region 1A Recombinants

Chiaki HAMAMATSU

Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College

(Chief: Prof. A. Suzuki)

Yukiharu SAWADA

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College

(Chief: Prof. K. Fujinaga)

ABSTRACT Human adenoviruses have the ability to transform rodent cells *in vitro*. They are classified into several subgroups based on their tumorigenicity *in vivo* and DNA sequence homology. Thus, the adenoviruses offer a valuable system with which transforming ability and tumorigenic potential can be analysed comparatively between oncogenic and non-oncogenic serotypes in terms of molecular genetics and molecular biology.

In order to analyse the transforming E1A genes of human adenoviruses, we constructed four chimeric E1A genes between non-oncogenic type 5 and highly oncogenic type 12 using restriction sites. They are i) type NI composed of type 12 first exon and type 5 second exon of the E1A genes, ii) type C with type 5 first exon and type 12 second exon, iii) type N carrying the N-terminal half of type 12 first exon and the rest from type 5 sequence, and iv) type NC composed of type N first exon and type 12 second exon.

By analyses of transcriptional regulatory activity and transforming activity of these chimeric E1A genes, the following results were obtained.

- 1) All the chimeric E1A genes exhibited transcriptional activation, showing the E1A sequences of Ad 5 and Ad 12 are interconvertible.
- 2) Type NI showed the strongest transcriptional activation among the four chimeric E1A genes.
- 3) Only type C showed weak transcriptional repression.
- 4) Types NI and C, but not types N or NC, showed the transforming ability on the established rat cell line 3Y1.
- 5) Primary baby rat kidney cells were transformed only by type C chimeric E1A gene.
- 6) The above results suggest the presence of interaction between intramolecular subregions of the E1A gene product.

(Received December 9, 1988 and accepted December 19, 1988)

Key words: Adenovirus E1A, Chimeric genes, Transcriptional regulation, Cell transformation

1 緒 言

ヒトアデノウイルス（以下アデノウイルス）はウイルス遺伝子間の相同性等により、現在A～Fの6つの亜群に分類されている¹⁾。新生ハムスターに接種すると、A亜群は強発癌性、B亜群は弱発癌性、C、D、E、Fの各亜群は非発癌性である²⁾。in vitro系においては、すべての群がげっ歯類の培養細胞をトランスフォームする能力がある³⁾。

増殖感染細胞におけるアデノウイルスゲノムの発現は、DNA複製開始前の感染初期とDNA複製開始後の感染後期の2相に分けられる。感染初期にはウイルスゲノム上の7つの領域、すなわちE1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4、及びELが発現する⁴⁾。これらの初期領域の左端にあるE1A及びE1B領域は、非許容性細胞においてはトランスフォーム遺伝子として機能し、細胞のトランスフォーメーションに密接な関連をもつ複数のタンパクをコードしている^{5,6)}。さらにE1A遺伝子は、その遺伝子産物であるタンパクを介して空間的に離れた遺伝子の転写プロモーターに働いて(transに働くという)、転写を調節することが明らかになった。すなわち、他のウイルスDNA初期領域⁷⁾並びに熱誘導タンパク遺伝子⁸⁾、 β -チューブリン遺伝子⁹⁾等の細胞遺伝子の転写促進(transactivation)、及びエンハンサーをもつ遺伝子の転写抑制(transrepression)機能をもつ^{10,11)}。最近になり、E1A遺伝子をもつこれらの諸機能について、それぞれに関与する独立した遺伝子内領域の解析がすすめられ、E1A領域がさらに機能的に大きく3つのドメインから成ることが分かってきた^{12,13)}。

われわれは非発癌性C亜群5型と強発癌性A亜群12型のE1A領域のキメラ組換え体を作製し、1) 転写調節活性(転写促進及び転写抑制活性)、2) トランスフォーメーション活性について調べ、各機能に関与する遺伝子内領域の解析とそれらの相互関係について検討した。

2 材料及び実験方法

2.1 アデノウイルス5型/12型E1Aキメラ組換え体の作製

2.1.1 大腸菌、プラスミド、及び酵素類

プラスミドのクローニングには2種類の大腸菌、MC1061株及びDH5株を用いた。

ベクタープラスミドとして、pUC118及びpML2

(pBR322の欠損誘導体)を用いた。

制限酵素は*Kpn*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Acc*I, *Hin*fi (宝酒造株式会社), *Ava*II, *Xba*I, *Hgi*AI (New England Biolabs社), *Sac*I (Bethesda Research Laboratories社)の各酵素を使用した。フラグメントの突出末端のヌクレオチド付加による平滑化にKlenow fragment (Boehringer Mannheim社)を、ヌクレオチド除去による平滑化にはS1 nuclease (Bethesda Research Laboratories社)を使用した。

フラグメントの結合にはDNA ligation kit (宝酒造株式会社)を使用した。

2.1.2 組換え体のクローニング

作製した組換え体は、いずれもアデノウイルス(以下Ad)5型及び12型のキメラ構造のE1A領域とAd5型の野生株(wt)のE1B領域をもつ(p5A12¹⁴⁾シリーズ)。1) E1A領域内のAd12型部分の占める位置がE1A領域の第1エクソン部分のもの(p5A12-NI)、2) 第2エクソン部分のもの(p5A12-C)、3) 第1エクソンのN末端側約半分のもの(p5A12-N)、及び4) 2)と3)を併せもつもの(p5A12-NC)の4種類である。ここでN、I、CはそれぞれE1A遺伝子コード領域中のN末領域、中間領域、C末領域を表わす(Fig. 1)。

1) Ad12E1A領域(0-1597ヌクレオチド)をもつp12AccHの*Kpn*I-*Ava*IIフラグメントとAd5E1A領域(0-1343ヌクレオチド)をもつp5XbaEの*Ava*II-*Xba*Iフラグメントを、*Kpn*I及び*Xba*Iで切断したベクターpUC118と結合してpNIを作製した。このpNIの*Kpn*I-*Xba*IフラグメントとAd5E1A領域(192-1572ヌクレオチド)をAd12E1A領域(179-1390ヌクレオチド)に置換したプラスミドp5A12¹⁴⁾の*Eco*RI-*Kpn*Iフラグメントを、Ad5E1A及びE1B領域(0-5788ヌクレオチド)をもつp5XhoCの*Eco*RI-*Xba*Iフラグメントと結合してp5A12-NIを作製した。

2) Ad12E1AとE1Bの一部に加えてAd12E1BからのポリA領域(3706-4435ヌクレオチド)をもつp12GpAを*Eco*RI及び*Hind*IIIで切断し、p5XhoCの*Eco*RI-*Hind*IIIフラグメントと結合してp5GpAを作製した。p5A12の*Ava*II-*Sac*Iフラグメントとp5XbaEの*Acc*I-*Ava*IIフラグメントをp5GpAの*Acc*I-*Sac*Iフラグメントと結合してp5G-A12Cを作製した。このp5G-A12Cの*Eco*RI-*Hind*IIIフラグメントとp5XhoCの*Eco*RI-*Hind*IIIフラグメントを結合してp5A12-Cを作製した。

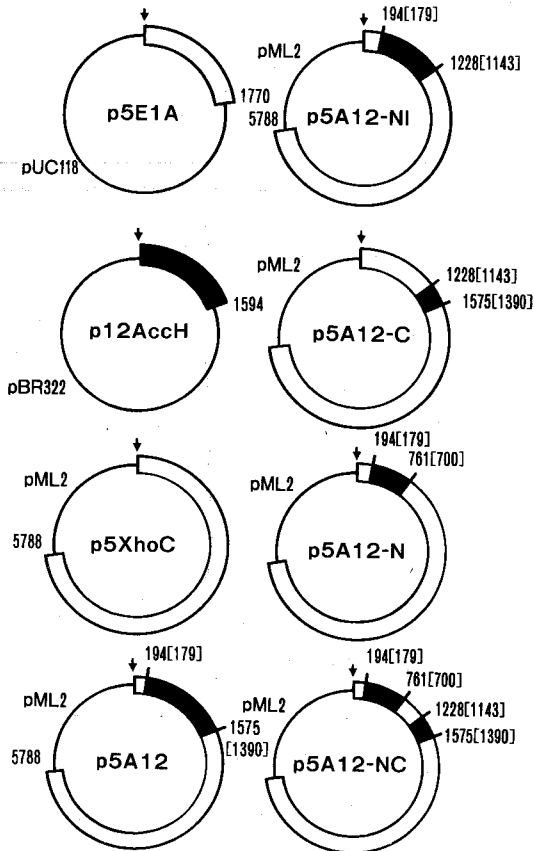


Fig. 1 Structure of recombinant plasmids. p5E1A and p5XhoC contain the left-most 1770 and 5788 nucleotides (nt), respectively, of Ad5. p12AccH contains the left-most 1599 nt of Ad12. p5A12 contains the whole Ad12 E1A region (nt 179 to 1392) in place of the whole Ad5 E1A region (nt 192 to 1574). p5A12-NI contains the first E1A exon of Ad12 (nt 179 to 1143) in place of the corresponding region (nt 192 to 1228) of Ad5. p5A12-C contains the second E1A exon of Ad12 (nt 1143 to 1392) in place of the corresponding region (nt 1228 to 1574) of Ad5. p5A12-N contains the upstream control region and the N-terminal portion of the first E1A exon of Ad12 (nt 179 to 700) in place of the corresponding E1A region (nt 192 to 761) of Ad5. p5A12-NC contains the chimeric first E1A exon of p5A12-N and the second E1A exon of Ad12. Open box indicates Ad5 sequence and solid box shows Ad12 sequence.

3) p12AccH の *Hgi*AI フラグメントを *Hinf*I により不完全消化し, Klenow fragment で末端平滑化後に *Kpn*I で切断したフラグメント, 及び p5XbaE の *Hinf*I 断片を S1 nuclease で末端平滑化後に *Xba*I で切断し

たフラグメントを, *Kpn*I 及び *Xba*I で切断した pUC118 と結合して pN を作製した. pN の *Kpn*I-*Xba*I フラグメントと p5A12 の *Eco*RI-*Kpn*I フラグメントを *Eco*RI 及び *Xba*I で切断した p5XhoC に結合して p5A12-N を作製した.

4) p5A12-N の *Eco*RI-*Acc*I フラグメント, 及び p5A12-C の *Acc*I-*Hind*III フラグメントを *Eco*RI 及び *Hind*III で切断した p5XhoC に結合して p5A12-NC を作製した.

なお, Fig. 1 において組換え体のクローニングの際, フラグメントの制限酵素による切り出し, 末端処理後の連結によって, 制限酵素の切り出し点と作製したプラスミド中の接合点の塩基番号が異なっている.

2・2 転写調節活性の測定

2・2・1 細胞及びトランスフェクション

HeLa 細胞は 5% ウシ胎児血清を加えたダルベッコ変法イーグル (DME) 培地 (Flow Laboratories 社) で培養した. トランスフェクションの前日に細胞数約 3×10^6 /100mm プレートに細胞密度を調整した.

トランスフェクションはリン酸カルシウム沈澱法^{15,16} によった. 250 μ l のプラスミド DNA (chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子をもつプラスミド DNA 10 μ g と AdE1 プラスミド DNA 10~20 μ g) 溶液に 250 μ l の 0.5 M 塩化カルシウム溶液, 及び 500 μ l の 50 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)・280 mM NaCl・1.4 mM リン酸緩衝液 (HEPES リン酸緩衝液) を加えて攪拌した後, 室温で 30 分間静置した. この溶液 1 ml を 100 mm プレートに加え 37°C で数時間培養した後, トランスフェクションの効率を高める目的で 25% グリセリン加 DME によるグリセリン処理を数分行った. その後細胞層を培地で洗浄し, 10% ウシ胎児血清を含む培地により一晩 37°C で培養した.

CAT プラスミドとして, 転写促進活性の測定には CAT 遺伝子の upstream に Ad5 型 E3 プロモーター領域を, 下流に SV40 ウイルスのスプライス及びポリ A 付加領域をもつ pKCAT23¹⁷ を用いた. 転写抑制活性の測定には CAT 遺伝子上流に SV40 ウイルスの初期プロモーター領域を, さらにその上流にポリオーマウイルスのエンハンサー領域をもつ pA₁₀CATpy¹⁸ を用いた.

2・2・2 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 活性の測定

CAT は哺乳類細胞には存在しないが, 上記の CAT 遺伝子発現ベクターを哺乳類細胞にトランスフェクトすると, 一過性に細胞内で CAT 遺伝子が発現する. ト

ランスフェクション後 48 時間目の HeLa 細胞を集め、その抽出液中の CAT 活性を測定した。測定法は Gorman らの方法¹⁹⁾ に基づいて行った。

phosphate-buffered saline で洗浄した細胞を集めて 100 μ l の 0.25 M Tris \cdot HCl (pH 8.0) に懸濁し、液体窒素を用いた凍結破砕により細胞抽出液を得た。抽出液の吸光度 (OD₂₈₀) を測定し、各実験毎にサンプル間の推定タンパク量を統一した (ウシ血清アルブミン換算で 41~121.5 μ g 相当)。50 μ l の細胞抽出液に 8 μ l の [¹⁴C] chloramphenicol (54mCi/mmol; Amersham 社)、30 μ l の H₂O、10 μ l の 1M Tris \cdot HCl (pH 7.5)、及び 2 μ l の 40 mM acetyl coenzymeA (Pharmacia 社) を加え、37°C で 30 分間反応させた。氷上で反応を停止し、反応液に 0.6 ml の酢酸エチルを加え攪拌した後、有機層を取り出し真空ポンプで乾燥させた。再び 20 μ l の酢酸エチルに溶かしたサンプルを、シリカゲル薄層クロマトグラフィー・プレート (Merck 社) 上に spot し、クロロホルム-メタノール (95:5) で 1 時間展開後にオートラジオグラフィーを行った。放射活性を示すシリカゲル部分を集めてカウントした。

2.3 トランスフォーメーション活性の測定

2.3.1 細胞及びトランスフェクション

細胞はラット樹立細胞株の 3Y1 細胞、及び初代培養細胞の baby rat kidney (BRK) 細胞を用いた。BRK 細胞は、生後 5 日目の Fisher rat の腎臓を取り出し、collagenase (和光純薬株式会社)-dispase (合同酒精) 処理によって得られた。細胞の培養には 5% ウシ胎児血清を加えた DME 培地を用いた。

トランスフェクションは細胞数を約 5×10^5 /60mm プレートに調整した後に、前述のリン酸カルシウム法により行った。

3Y1 細胞のトランスフェクションには、100 μ l の DNA 溶液 (AdE1 プラスミド DNA 1~4 μ g とニシン精巢の DNA 16~17 μ g)、100 μ l の塩化カルシウム溶液、及び 200 μ l の HEPES リン酸緩衝液を加えた溶液 400 μ l を 30 分間室温で静置後細胞培養液に加え、37°C で培養した。

BRK 細胞のトランスフェクションには、AdE1 プラスミド DNA 5 μ g とヒト膀胱癌 EJ 細胞から分離した細胞癌遺伝子、Ha-ras-1²⁰⁾ の DNA 1 μ g を用いた。3Y1 細胞のトランスフェクションと同様、DNA 溶液、塩化カルシウム溶液、及び HEPES リン酸緩衝液から成る 400 μ l の溶液を静置後細胞培養液に加え、37°C で培養した。

トランスフェクション後 24 時間以内に細胞層を培地

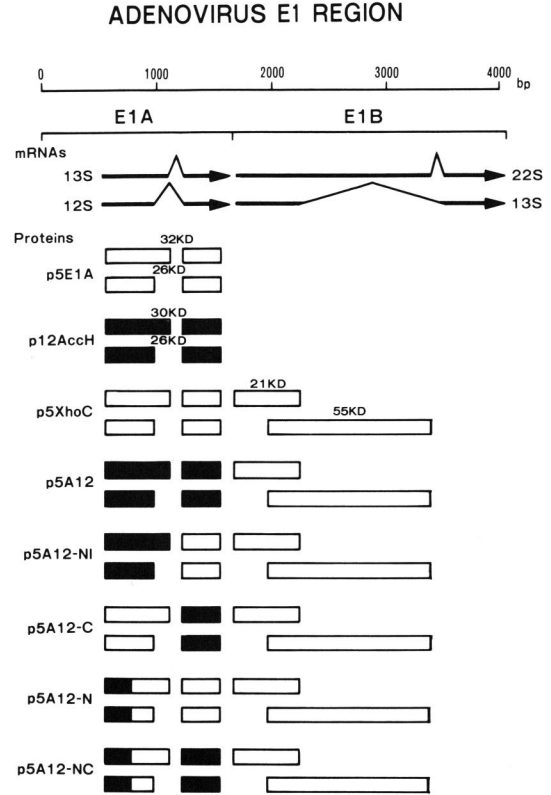


Fig. 2 Schematic representation of E1 mRNAs and proteins encoded by recombinant plasmids. The top line represents the left-end portion of the Ad genome demarcated in kilobase pairs. The exon of the E1 mRNA is represented by the bold line. The arrowhead indicates the 3' end of the mRNA. The predicted structure of the wild type and the chimeric protein are shown by the open box for Ad5 sequence and by the solid box for Ad12 sequence.

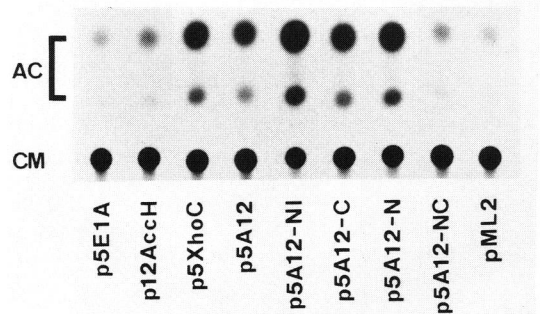


Fig. 3 Expression of E3-CAT plasmid in HeLa cells transfected together with pML2 (control) and various E1 alleles. The position of chloramphenicol (CM) and its acetylated forms (AC) are shown.

Table 1 *Transactivation of Ad E3 promoter. CAT activities expressed in the presence of various E1 genes are shown by relative amounts of acetylation products as compared to that of control experiment in the presence of pML2.*

Plasmid	CAT activity					Average
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	
p5E1A	ND ^{a)}	ND	ND	1.35	1.80	1.58
p12AccH	4.94	2.20	1.47	ND	1.44	2.51
p5XhoC	16.23	3.93	10.61	8.90	9.20	9.77
p5A12	7.70	3.23	7.63	18.43	5.40	8.48
p5A12-NI	20.96	28.19	24.72	77.83	15.31	33.40
p5A12-C	15.92	4.72	2.60	47.35	7.07	15.53
p5A12-N	7.43	4.37	3.36	46.15	4.62	13.19
p5A12-NC	3.24	1.92	2.52	7.77	1.78	3.45
pML2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

a) ND; Not done.

で洗浄し培地交換をした後は、3日毎に培地を交換した。

2・3・2 トランスフォーム細胞の検出

3Y1 及び BRK 細胞はトランスフェクション後 3~4 週間培養した後、ギムザ染色をしてフォーカス出現の有無を光学顕微鏡で確認した。

3 成績

3・1 アデノウイルス 5 型/12 型 E1A キメラ組換え体の構造

Ad5 型 E1A 領域からは、単一のプロモーターより転写される 12S, 13S, 9S の 3 種類の mRNA が合成される。感染初期の細胞やトランスフォーム細胞中に検出される E1AmRNA は主に 13S と 12SmRNA で、9SmRNA は感染後期の細胞中に見出される²¹⁾。E1A13SmRNA と 12SmRNA は、共通のアミノ酸読み取り枠を利用するが、イントロンの違いによって生ずる内部の 46 アミノ酸の有無のみが異なり、それぞれ 32 K (289 アミノ酸) と 26 K (243 アミノ酸) のポリペプチドをコードしている。Ad12 型 E1A 領域も、基本的には 5 型と同様の構成である。Ad12 型 E1AmRNA は、二つの転写開始点、二つのスプライスドナー部位の組み合わせにより 4 種類あるが、5 型の場合と同様、イントロンの大きさの違いにより 30 K (266 アミノ酸) と 26 K (235 アミノ酸) の二つのペプチドをコードしている²²⁾ (Fig. 2)。

本実験に用いたプラスミドの AdE1A 構造は以下の通りである。1) p5XhoC の E1A は wt の Ad5 型 E1A, 2) p5A12 の E1A は wt の Ad12 型 E1A, 3) p5A12-

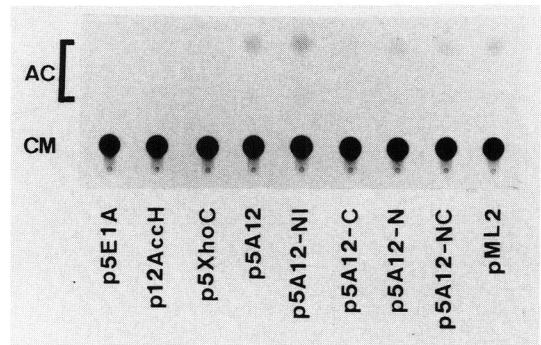


Fig. 4 Expression of CAT gene dependent on polyoma virus enhancer in the presence of various E1 genes and pML2 (control).

Table 2 *Transrepression of polyoma virus enhancer. Relative CAT activities expressed in the presence of various E1 genes are shown.*

Plasmid	CAT activity		
	Exp 1	Exp 2	Average
p5E1A	ND ^{b)}	0.12	0.12 ^{a)}
p12AccH	0.56	0.60	0.58
p5XhoC	0.62	0.46	0.54
p5A12	1.02	0.44	0.73
p5A12-NI	1.02	1.36	1.19
p5A12-C	0.48	0.31	0.40
p5A12-N	1.29	2.88	2.09
p5A12-NC	1.25	1.55	1.40
pML2	1.00	1.00	1.00

a) The number is the result of exp. 2.

b) ND: Not done.

NIは第1エクソン(NI領域)が12型で第2エクソン(C領域)が5型のE1A構造, 4) p5A12-Cは前者と逆に第1エクソンが5型で第2エクソンが12型のE1A構造, 5) p5A12-Nは第1エクソンのN末端から700ヌクレオチドまで(N領域)が12型, それ以降(I領域, C領域)は5型(761ヌクレオチド)のE1A構造を, 6) p5A12-NCは第1エクソンはp5A12-Nと同様の構造をもつが, 第2エクソンが12型のE1A構造をもっている. 以上の6種類のプラスミドはE1B領域については共通で, wtのAd5型E1B構造をもっている

Table 3 Focus formation on 3Y1 cells. Listed are the numbers of foci based on counts of 5 dishes 4 weeks after transfection.

Plasmid	No. of foci/5dishes		
	Exp 1 ^{a)}	Exp 2 ^{b)}	Exp 3 ^{c)}
p5E1A	ND ^{d)}	407	20
p12AccH	71	126	21
p5XhoC	337	814	193
p5A12	99	308	19
p5A12-NI	235	533	138
p5A12-C	197	452	98
p5A12-N	0	0	0
p5A12-NC	0	0	0
pML2	0	0	0

a) 1 μ g DNA.

b) 4 μ g DNA and 16 μ g carrier DNA.

c) 3 μ g DNA and 17 μ g carrier DNA.

d) ND; Not done.

Table 4 Focus formation on primary BRK cells. Various Ad E1 genes were transfected with or without the activated H-ras gene. Numbers of foci are shown based on counts of 5 dishes 3 weeks after transfection.

Plasmid	No. of foci/5 dishes			
	Exp 1 ^{a)}		Exp 2 ^{a)}	
	ras		ras	
	-	+	-	+
p5E1A	101	135	16	42
p12AccH	1	0	1	0
p5XhoC	158	261	95	176
p5A12	0	0	0	0
p5A12-NI	0	0	0	0
p5A12-C	87	157	64	101
p5A12-N	0	1	1	6
p5A12-NC	0	3	0	1
pML2	0	0	0	4

a) 5 μ g DNA and 1 μ g ras DNA.

る (Fig 2).

3.2 転写調節活性の測定

3.2.1 転写促進活性

プラスミド pKCAT23はCAT遺伝子の5'上流にAd5型E3プロモーターが組み込まれているため, AdE1AプラスミドとともにHeLa細胞にトランスフェクトすると, AdE1Aの転写促進活性によりAdE3プロモーター活性が促進され, その結果CAT活性が上昇する.

本実験に用いたAdE1組換え体によるCAT活性の発現促進効果はFig. 3, Table 1に示す通りである. CAT活性の測定法の項で述べた通り, HeLa細胞中に一過性に発現したCATの作用で [¹⁴C] chloramphenicolがアセチル化を受ける. 薄層クロマトグラフィーによりこの反応産物を分離し, 全体の放射活性に占める百分率を求めた. さらに, AdE1領域をもたないプラスミドpML2共存下の値を基準値(1.00)とし, それぞれのプラスミド存在下における相対値を示したのがTable中の数値である.

Ad12型E1Aのみをもつp12AccHと12型E1A及び5型E1Bをもつp5A12とでは, 前者に比べ後者で高いCAT活性がみられた. 同様に, 5型E1Aのみをもつp5E1Aと5型E1A及びE1Bをもつp5XhoCとでは, 前者に比べ後者で高い活性がみられた. 5型/12型キメラ組換え体では, p5A12-NIがp5XhoCよりはるかに高い活性を示し, 実験に用いたプラスミド中で最も高い値であった. p5A12-C及びp5A12-Nはp5XhoC, p5A12と同様, 中等度の活性を示し, p5A12-NCのCAT活性はキメラ組換え体の中では一番低く, p12AccHと同程度であった.

3.2.2 転写抑制活性

プラスミド pA₁₀CAT_{py}はCAT遺伝子の5'上流にポリオーマウイルスのエンハンサーが組み込まれているため, AdE1Aを発現するプラスミドとともにHeLa細胞にトランスフェクトすると, AdE1Aの転写抑制活性によりポリオーマウイルスのエンハンサー活性が抑制され, その結果CAT活性が低下する.

本実験に用いたAdE1A組換え体によるCAT活性発現調節効果はFig. 4, Table 2の通りである. Table中の数値は, 転写促進活性と同様の方法で記載されている.

CAT活性の低下は, p5E1A, p12AccH, p5XhoC, p5A12及び5型/12型キメラ組換え体のp5A12-Cで認められた. 他のキメラ組換え体ではCAT活性の有意な低下はみられなかった.

3.3 トランスフォーメーション活性の測定

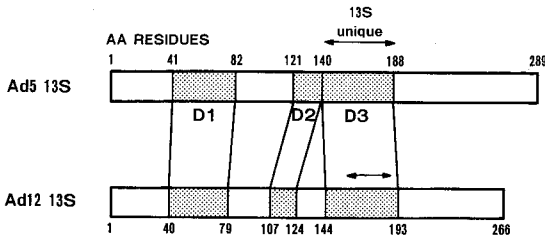


Fig. 5 Schematic representation of conserved amino acid sequences of E1A gene products between different serotypes. Stippled boxes show three conserved regions D1, D2 and D3. The number on the border of the region indicates the position of the amino acid residue relative to the N-terminal residue shown by the number 1.

3.3.1 樹立細胞株(3Y1細胞)のトランスフォーメーション

Table 3 に示した数値は、各プラスミドのトランスフェクションによって形成されたトランスフォーム細胞のフォーカス数の合計値 (各プレート 5 枚) である。

5 型、12 型の E1A のみをもつ p5E1A, p12AccH と、両者にそれぞれ 5 型 E1B が加わった p5XhoC, p5A12 でフォーカス形成がみられた。5 型/12 型キメラ組換え体の中では、p5A12-NI と p5A12-C が p5A12 より高いフォーカス形成能を示した。p5A12-N, p5A12-NC にはフォーカス形成が認められなかった。

3.3.2 初代培養細胞(BRK細胞)のトランスフォーメーション

E1A 遺伝子は活性型 ras 細胞癌遺伝子とともに BRK 細胞に導入された場合、これを完全にトランス

フォームすることが知られている^{23,24,25}。本実験では活性型 ras 癌遺伝子の共存下と非共存下におけるフォーカス形成を比較した。Table 4 に示した数値は、3Y1 細胞のトランスフォーム実験と同様、トランスフォーム細胞のフォーカス数の合計値 (各プレート 5 枚) である。

5 型 E1A のみをもつ p5E1A と 5 型 E1A, E1B をもつ p5XhoC とでフォーカス形成がみられたのに対し、12 型 E1A のみをもつ p12AccH と 12 型 E1A, 5 型 E1B をもつ p5A12 とではフォーカス形成がほとんどみられなかった。5 型/12 型キメラ組換え体の中では、p5A12-C のみがフォーカス形成能を示し、他の組換え体ではフォーカス形成はほとんどみられなかった。フォーカス形成がみられた組換え体は構造上、いずれも 5 型 E1A の第 1 エクソンをもち、しかも ras 癌遺伝子とともにトランスフェクトしたときに、フォーカス形成能は高くなった。

4 考 察

アデノウイルスの初期遺伝子 E1A の主要な機能の一つに、その遺伝子産物であるタンパクを介して、ウイルスゲノム上の他の初期領域や細胞遺伝子の転写を促進あるいは抑制して調節することがある。このアデノウイルス E1A 領域による転写調節については 5 型を用いた研究が多く、明らかにされたことのうち主要なものは以下の通りである。

アデノウイルス E1A 遺伝子中には、血清型間でコードされるアミノ酸配列がよく保存されている領域が 3 箇

Table 5 Summary of Ad E1 mutant phenotypes. Mutants are characterized by serotypic origin of coding regions and phenotypes. 5 denotes Ad5 sequences and 12 indicates Ad12 sequences.

Plasmid	E1A			E1B		Transformation		
	Exon 1	Exon 2		Trans-activation	Trans-repression	3Y1	BRK	
Domain 1	Domain 2	Domain 3						
p5E1A	5	5	5	5	-	+	+	+
p12AccH	12	12	12	12	-	+	+	-
p5XhoC	5	5	5	5	5	+	+	+
p5A12	12	12	12	12	5	+	+	-
p5A12-NI	12	12	12	5	5	+	-	-
p5A12-C	5	5	5	12	5	+	+	+
p5A12-N	12/5	5	5	5	5	+	-	-
p5A12-NC	12/5	5	5	12	5	+	-	-

所あり、これらの領域はE1A 遺伝子の本質的な機能に重要であると考えられている。これらの3領域は、ゲノム上のN末端側からそれぞれ、ドメイン1、ドメイン2、及びドメイン3と呼ばれている^{12,13)}(Fig. 5)。このうち、ドメイン1と2でコードされるポリペプチド部分が転写抑制活性に関与することが明らかになった¹¹⁾。転写抑制を受ける遺伝子はエンハンサーにより転写レベルが保たれているようなエンハンサー型遺伝子であり¹⁰⁾、またAd12型によるトランスフォーム細胞中では主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex; MHC)の発現が転写レベルで抑制されることが知られている²⁶⁾。このドメイン1及び2領域はまた、トランスフォーメーション活性にも関与することが知られており^{27,28,29)}、トランスフォーメーションの機構として、細胞増殖の調節機構の修飾や前述のMHCの転写抑制を含む細胞遺伝子の転写抑制による免疫応答の修飾などが関与する可能性が考えられている^{26,31)}。一方、ドメイン3は、12SmRNAには存在しない13SmRNAに固有のアミノ酸配列コード領域であるが、この領域は他のアデノウイルス遺伝子初期領域や細胞遺伝子の転写促進活性に関与するポリペプチド部分をコードすると考えられている^{12,13,32)}。

われわれが本実験で行ったアデノウイルス5型/12型組換え体による転写調節活性及びトランスフォーメーション活性の測定結果をまとめたのがTable 5である。転写調節活性のうち、転写促進活性に関しては、組換え単位としたE1Aコード領域内のN、I、Cの3つの部分は5型と12型との間で基本的に互換性であった。転写促進に関与するとされるE1Aの第1エクソンI領域内のドメイン3に注目すると、最もCAT活性の高かったp5A12-NIのドメイン3は12型であり、p5A12-NIの構造中でドメイン3を含むE1A第1エクソンの中間領域からC末端にかけてのI領域を5型に置換したp5A12-Nでは、p5A12-NIに比べ活性が低下した。同様にE1Aコード領域全体が12型であるp5A12と、I領域のみを5型に置換したp5A12-NCとでは、後者で活性が低下した。一方、ドメイン3が同じ構造でも、E1A第2エクソン(C領域)が変化すると、活性が異なることが観察された。しかしながら、この第2エクソンについての血清型の影響は一定していなかった。例えば、p5A12とp5A12-NIでは、第2エクソンが5型の後者の活性が高く、p5XhoCとp5A12-Cでは、第2エクソンが12型の後者の活性が高かった。これらの結果は、転写促進活性がドメイン3を含むI領域のみで規定されるのではなく、E1Aコード領域内の他の構造部分との

間に強い相互作用が存在することを示唆するものである。今後、この分子内領域間の相互作用に関する解析を進めることがE1Aの多機能性の理解に必要であると考えられる。

転写抑制活性に関する実験では、p5E1A、p12AccH、p5XhoC、p5A12及びp5A12-Cで抑制活性がみられたが、転写抑制活性に関して血清型間の差やコード領域内の特定部分との相関は明らかではない。今後、12S遺伝子と13S遺伝子の一方のみを発現するcDNA組換え体や、E1Bをもたない組換え体の使用を検討する必要があると考えられる。

アデノウイルスE1A及びE1B遺伝子産物の機能として、最も重要なのは発癌活性である。すなわち、*in vitro*においては培養細胞のトランスフォーメーションを引き起こし、これらのトランスフォームした細胞をヌードマウスや同系新生児に接種すると腫瘍形成がみられる。はじめにも述べたように、アデノウイルスの*in vivo*での造腫瘍性はトランスフォーム細胞の同系個体における造腫瘍性と同様に血清型によって異なり、強発癌性、弱発癌性、及び非発癌性に分類されている²⁾。

この血清型間で造腫瘍性の違いに関与する因子の解明のための研究も数多く行われている。*in vitro*の系では、非発癌性5型と強発癌性12型のE1A及びE1B領域からなるキメラ組換え体を用いて、BRK細胞のトランスフォーメーション活性を比較する一連の実験がvan der Ebらのグループによってなされている^{26,30,31,33)}。その結果、細胞のトランスフォーメーション活性については5型が12型の約20倍高いこと^{33,34)}や、トランスフォーメーション活性に重要なのはE1A内の第1エクソン領域らしいこと³¹⁾などが明らかにされている。これらの*in vitro*のトランスフォーム細胞の同系ラット新生児における造腫瘍性は12型E1Aに強く相関したが、この造腫瘍性に対するE1A領域の機能としては、細胞性免疫機構を逃れる能力に関与するという説がたてられた。この説の根拠としては、転写抑制活性で触れたように、Ad12型によるトランスフォーム細胞中ではMHCの発現が転写レベルで抑制されているという事実があげられる。Ad5型トランスフォーム細胞ではこの現象がみられなかった。以上のことより、Ad5型E1A遺伝子を発現するトランスフォーム細胞は、免疫適格動物においては細胞性免疫機構によって排除されるために非発癌性であり、12型E1A遺伝子を発現する細胞は、細胞性免疫に認識されるのに十分なクラスI抗原を欠くために発癌性を示すとする説である^{26,31)}。

われわれはトランスフォーメーション活性に関連す

ると考えられる E1A 領域内の構造をさらに詳しく検討するために、5 型と 12 型の E1A 内キメラ組換え体を用いて、樹立細胞株である 3Y1 細胞と初代培養細胞である BRK 細胞のトランスフォーメーション実験を行った。

3Y1 細胞を用いたトランスフォーメーション実験では、5 型及び 12 型の wtE1A をもつ p5E1A, p5XhoC, p12AccH, p5A12 はいずれもトランスフォーム能を示した。このうち、5 型 E1B をもつ p5XhoC, p5A12 ではそれぞれ p5E1A, p12AccH よりもトランスフォーム活性が高く、E1B による増強効果が認められた。5 型/12 型 E1A キメラ組換え体では、E1A の第 1 エクソンが 12 型、第 2 エクソンが 5 型の p5A12-NI と、その反対に第 1 エクソンが 5 型、第 2 エクソンが 12 型の p5A12-C がトランスフォーム能を示した。しかし、p5A12-N と p5A12-NC ではフォーカス形成が認められなかった。N 領域と I 領域の組換え点がドメイン 1 内にあることから、ドメイン 1 の構造あるいはドメイン 1 とドメイン 2 または N 末領域との間の相互作用の保持が、トランスフォーム活性に重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。

BRK 細胞を用いたトランスフォーメーション実験の結果、トランスフォーム能を示したのは p5E1A, p5XhoC, 及び p5A12-C で、いずれも E1A の第 1 エクソンが 5 型であった。第 1 エクソンが 12 型、あるいは第 1 エクソンの N 末端からの中間領域までが 12 型である組換え体ではトランスフォーム能がほとんどみられなかった。これらの結果は、トランスフォーム能は 5 型の方が 12 型より強力で、E1A 内では第 1 エクソン領域が重要であるという van der Eb らの説に合致していた。

3Y1 及び BRK 細胞でみられた、培養細胞の違いによるトランスフォーム能の変化の原因としては BRK 細胞のような初代培養細胞では、細胞の不死化のために一連の細胞遺伝子の発現の修飾が必要であることがあげられる。すなわち、12 型 E1A では 5 型 E1A に比べて BRK 細胞を不死化する機能が極めて弱いためと考えられる。5 型の不活化機能はドメイン 2 に位置づけられている³²⁾が、本実験の結果はこのことと矛盾しない。

強発癌性 Ad12 型のウイルス接種による造腫瘍性は、E1A を 5 型 E1A に置換することで完全に失われることが示されている¹⁴⁾。本実験で作製したキメラ E1A 遺伝子が、*in vivo* で腫瘍原性を示すかどうか、また E1A 依存性の血清型特異的な腫瘍特異移植抗原 (tumor specific transplantation antigen; TSTA) の発現³³⁾にどのような効果をもつか、今後の課題として興味あるところである。

アデノウイルス E1A 遺伝子は、細胞癌遺伝子 *myc*, *myb*, *fos*, 細胞性腫瘍抗原 p53, ポリオーマウイルス大型 T 抗原遺伝子などのように細胞の核内で働く癌遺伝子であり、この癌遺伝子産物のもつ転写調節活性が細胞のトランスフォーメーションに重要な役割を果たしていると考えられる。最近、発癌抑制遺伝子と考えられている retinoblastoma (RB) 遺伝子産物が、E1A 遺伝子産物と複合体を形成することが報告されたところであり³⁴⁾、今後、アデノウイルス E1A 癌遺伝子による細胞の発癌機構の研究を種々の変異遺伝子を用いて分子遺伝学的に解析するとともに遺伝子産物であるタンパクレベルですすめることは、他の DNA 型腫瘍ウイルスやレトロウイルス癌遺伝子、さらにはヒト癌遺伝子の研究とともに発癌機構の解明に重要な手がかりを与えるものと考えられる。

5 結 論

ヒトアデノウイルスの癌遺伝子である E1A の機能を解析する目的で、非発癌性 5 型と強発癌性 12 型の E1A を制限酵素切断部位を利用して交互に組換えて、4 種類のキメラ E1A 遺伝子を構築した。それらは i) 12 型第 1 エクソンと 5 型第 2 エクソンから成る NI 型、ii) 5 型第 1 エクソンと 12 型第 2 エクソンから成る C 型、iii) 第 1 エクソンのコード領域の N 末側約 1/2 が 12 型で他は 5 型から成る N 型及び iv) N 型と同じ第 1 エクソンと 12 型第 2 エクソンから成る NC 型である。

これらのキメラ E1A 遺伝子のもつ転写調節活性及びトランスフォーム活性を解析して次の結果を得た。

- 1) キメラ E1A はいずれも転写促進活性を示し、5 型と 12 型 E1A の対応部分は基本的に互換性であった。
- 2) NI 型に最も強い転写促進活性を認めた。
- 3) C 型についてのみ弱い転写抑制効果を認めた。
- 4) 株化 3Y1 細胞をトランスフォームする活性は NI 型と C 型に認められ、N 型と NC 型には認められなかった。
- 5) ラット腎初代細胞をトランスフォームする活性は C 型にのみ認められた。
- 6) 以上の結果から、E1A 遺伝子産物内部の各領域間に相互作用のあることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた藤永 蕙教授、鈴木 明教授に深く謝意を表します。

文 献

1. 藤永 蕙： がん遺伝子の分子生物学。73。講談社、

- 東京 (1985).
2. Wadell, G.: Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **110**, 191-220 (1984).
 3. van der Eb, A. J. and Bernards, R.: Transformation and oncogenicity by adenoviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **110**, 23-51 (1984).
 4. Flint, S. J.: Expression of adenoviral genetic information in productively infected cells. **Biochim. Biophys. Acta** **651**, 175-208 (1982).
 5. van der Eb, A. J., van Ormondt, H., Schrier, P. I., Lupker, J. H., Jochemsen, H., van den Elsen, P. J., DeLeys, R. J., Maat, J., van Beveren, C. P., Dijkema, R. and de Waard, A.: Structure and function of the transforming genes of human adenoviruses and SV40. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** **44**, 383-399 (1979).
 6. Lassam, N. J., Bayley, S. T. and Graham, F. L.: Transforming proteins of human adenovirus 5: studies with infected and transformed cells. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** **44**, 477-491 (1979).
 7. Jones, N. and Shenk, T.: An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**, 3665-3669 (1979).
 8. Nevins, J. R.: Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. **Cell** **29**, 913-919 (1982).
 9. Stein, R. and Ziff, E. B.: HeLa cell β -tubulin gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel with viral early genes by an E1a-dependent mechanism. **Mol. Cell Biol.** **4**, 2792-2801 (1984).
 10. Borrelli, E., Hen, R. and Chambon, P.: Adenovirus-2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. **Nature** **312**, 608-612 (1984).
 11. Velcich, A. and Ziff, E.: Adenovirus E1a proteins repress transcription from the SV40 early promoter. **Cell** **40**, 705-716 (1985).
 12. Zerler, B., Roberts, R. J., Mathews, M. B. and Moran, E.: Different functional domains of the adenovirus E1A gene are involved in regulation of host cell cycle products. **Mol. Cell Biol.** **7**, 821-829 (1987).
 13. Lillie, J. W., Loewenstein, P. M., Green, M. R. and Green, M.: Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. **Cell** **50**, 1091-1100 (1987).
 14. Sawada, Y., Raska, K. Jr and Shenk, T.: Adenovirus type 5 and adenovirus type 12 recombinant viruses containing heterologous E1 genes are viable, transform rat cells, but are not tumorigenic in rats. **Virology** **166**, 281-284 (1988).
 15. Graham, F. L. and van der Eb, A. J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology** **52**, 456-467 (1973).
 16. Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G. and Chasin, L.: DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **76**, 1373-1376 (1979).
 17. Weeks, D. L. and Jones, N. C.: E1A control of gene expression is mediated by sequences 5' to the transcriptional starts of the early viral genes. **Mol. Cell Biol.** **3**, 1222-1234 (1983).
 18. Satake, M., Ibaraki, T. and Ito, Y.: Modulation of polyomavirus enhancer binding proteins by Ha-*ras* oncogene. **Oncogene** **3**, 69-78 (1988).
 19. Gorman, C. M., Moffat, L. F. and Howard, B. H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. **Mol. Cell Biol.** **2**, 1044-1051 (1982).
 20. Shih, C. and Weinberg, R. A.: Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. **Cell** **29**, 161-169 (1982).
 21. Pettersson, U., Virtanen, A., Perricaudet, M. and Akusjärvi, G.: The messenger RNAs from the transforming region of human adenoviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **109**, 107-123 (1983).
 22. 木村貴生, 澤田幸治, 藤永 蕙: アデノウイルス遺伝子の構造. **蛋白質・核酸・酵素** **27**, 2420-2439 (1982).
 23. Ruley, H. E.: Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. **Nature** **304**, 602-606 (1983).
 24. Jochemsen, A. G., Bernards, R., van Kranen, H. J., Houweling, A., Bos, J. L. and van der Eb, A. J.: Different activities of the adenovirus type 5 and 12 E1A regions in transformation with the EJ Ha-*ras* oncogene. **J. Virol.** **59**, 684-691 (1986).
 25. Zerler, B., Moran, B., Maruyama, K., Moomaw, J., Grodzicker, T. and Ruley, H. E.: Adenovirus E1A coding sequences that enable *ras* and *pmt* oncogenes to transform cultured primary cells. **Mol. Cell Biol.** **6**, 887-899 (1986).
 26. Schrier, P. I., Bernards, R., Vaessen, R. T. M. J., Houweling, A. and van der Eb, A. J.: Expression of class I major histocompatibility antigens

- switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. **Nature** **305**, 771-775 (1983).
27. Montell, C., Courtois, G., Eng, C. and Berk, A.: Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins. **Cell** **36**, 951-961 (1984).
28. Lillie, J. W., Green, M. and Green, M. R.: An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. **Cell** **46**, 1043-1051 (1986).
29. Schneider, J. F., Fisher, F., Goding, C. R. and Jones, N. C.: Mutational analysis of the adenovirus E1a gene: the role of transcriptional regulation in transformation. **EMBO J.** **6**, 2053-2060 (1987).
30. Bernards, R., Schrier, P. I., Bos, J. L. and van der Eb, A. J.: Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigen in oncogenic transformation. **Virology** **127**, 45-53 (1983).
31. Jochemsen, A. G., Bos, J. L. and van der Eb, A. J.: The first exon of region E1a genes of adenoviruses 5 and 12 encodes a separate functional protein domain. **EMBO J.** **3**, 2923-2927 (1984).
32. Moran, E., Zerler, B., Harrison, T. M. and Mathews, M. B.: Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. **Mol. Cell Biol.** **6**, 3470-3480 (1986).
33. Bernards, R., Houweling, A., Schrier, P. I., Bos, J. L. and van der Eb, A. J.: Characterization of cells transformed by Ad5/Ad12 hybrid early region 1 plasmids. **Virology** **120**, 422-432 (1982).
34. Jochemsen, H., Daniëls, G. S. G., Hertoghs, J. J. L., Schrier, P. I., van den Elsen, P. J. and van der Eb, A. J.: Identification of adenovirus-type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis. **Virology** **122**, 15-28 (1982).
35. Sawada, Y., Urbanelli, D., Raskova, J., Shenk, T. E. and Raska, K. Jr.: Adenovirus tumor-specific transplantation antigen is a function of the E1A early region. **J. Exp. Med.** **163**, 563-572 (1986).
36. Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. and Harlow, E.: Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. **Nature** **334**, 124-129 (1988).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第3講座 浜松千秋