

## ヒトアデノウイルス4型DNA及び*HindIII-C*断片による ラット3Y1細胞のトランスポーメーション

奈 良 祐 次

札幌医科大学内科学第3講座 (主任 鈴木 明 教授)

山 下 利 春

札幌医科大学癌研究所分子生物学部門 (主任 藤永 蕙 教授)

### Transformation of Rat 3Y1 Cells by Human Adenovirus Type 4 DNA and Its *HindIII-C* DNA Fragment

Yuji NARA

Department of Internal Medicine (Section 3), Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. A. Suzuki)

Toshiharu YAMASHITA

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College  
(Chief : Prof. K. Fujinaga)

To examine the transforming activity of human adenovirus type 4 (Ad4) of subgroup E, rat 3Y1 cells were transfected with Ad4 genomic DNA and *HindIII-C* DNA fragment (left-end 17.4%) by the calcium phosphate technique. The transforming efficiency by Ad4 DNA was compared with those of other Ad serotype DNAs, and the resulting transformed cells were analyzed for their transformation phenotypes and the presence of viral DNA sequences. The results obtained were as follows;

- 1) Ad4 genomic DNA and *HindIII-C* DNA fragment possessed transforming activity and the transforming gene was revealed to be located in the left-end 17.4% of the genome.
- 2) The transforming efficiency obtained by Ad4 DNA was extremely low as compared with that by Ad12, Ad7, Ad5, or Ad13 DNA.
- 3) Transformed rat cell lines, three by Ad4 DNA (4WY) and two by Ad4 *HindIII-C* (4CY), were established from single transformed foci.
- 4) Although the transformed cell lines showed high saturation densities, they showed incomplete transformation phenotypes with fibroblastoid morphology, no growth ability in soft-agar suspension culture, and low tumorigenic activity in syngeneic newborn rats.
- 5) By using the Southern blot hybridization technique, three lines (4WY2, 4CY4 and 4CY6) were revealed to at least contain viral DNA sequences of from 1.3 to 12.9 map units, one (4WY1) containing at least 1.3 to 10.2 map units. and another (4WY5) containing at least 1.3 to 5.0 map units.
- 6) Northern blot hybridization detected 1.1 to 1.3 kilobase (kb)-sized E1A mRNA in all the transformed cell lines examined, while it failed to detect 2.5 kb-sized E1B mRNA in lytically infected KB cells with Ad4.

(Received October 24, 1983 and accepted November 28, 1983)

**Key words:** Human adenovirus type 4, Calcium phosphate technique, Incomplete transformation, Southern blot hybridization, Northern blot hybridization

## 1 緒 言

ヒトアデノウイルス 1 型 (Ad1) から 31 型 (Ad31) までの 31 の血清型は DNA ゲノムホモロジーに従って A 亜群から E 亜群まで 5 亜群に分類されている<sup>1)</sup>。A 亜群に属する Ad12, Ad18, Ad31 は強造腫瘍性を示し、新生ハムスターに皮下接種した場合に腫瘍を誘発する。B 亜群に属する Ad3, Ad7, Ad14, Ad16, Ad21 は弱造腫瘍性で、長い潜伏期の後に腫瘍を誘発することができる。一方、C 亜群から E 亜群までの Ad は非腫瘍原性であるが、Ad4 を除いた全ての血清型は、げっ歯動物由来の培養細胞をトランスホームすることができます<sup>2)</sup>。Ad12<sup>3-7)</sup>, Ad31<sup>8)</sup>, Ad3<sup>9)</sup>, Ad7<sup>10)</sup>, Ad2<sup>11)</sup> および Ad5<sup>11)</sup> のトランスホーム遺伝子は、ウイルスゲノムの初期領域 1 (El) 内の左末端約 10% 内に局在し、この領域を含む制限酵素切断 DNA 断片は培養げっ歯動物細胞をトランスホームすることができる。Ad12<sup>12)</sup>, Ad7<sup>13,14)</sup>, および Ad2<sup>15)</sup> ゲノムの El 領域は増殖致死感染の初期から転写される二つの転写単位、ElA (1.3-4.5 マップ単位) と ElB (4.5-11.2 マップ単位) に分割される。Ad12<sup>16)</sup> または Ad31<sup>8)</sup> DNA の ElA コードしている領域のみを含む左端 DNA 断片は、不完全または非腫瘍原性トランスホーメーションのみを誘発し、単離されたトランスホーム細胞は、軟寒天培地でのコロニー形成能の欠如や同系新生ラットを場とした造腫瘍原性が低いなど、トランスホーメーションの特徴的表現の幾つかを欠いている。Ad12 の ElA 領域に加えて少なくとも Ad12 ElB 領域 (4.5-11.2 マップ単位) の一部が完全または腫瘍原性トランスホーメーションに必須である<sup>17-19)</sup>。一方、E 亜群を単独で構成するヒトアデノウイルス 4 型<sup>1)</sup> (Ad4) は青年期の急性呼吸器疾患の原因ウイルスとして知られているが、Ad4 粒子、Ad4 DNA または Ad4 DNA 断片のトランスホーム活性はこれまで報告されていない。本論文では、dimethylsulfoxide (DMSO) 処理を併用したリン酸カルシウム法によって、Ad4 DNA と Ad4 HindIII-C DNA 断片 (左端 17.4%<sup>20,21)</sup>) のトランスホーム活性をラット 3Y1 細胞を場として証明することができた。これによってトランスホーム活性を有する遺伝子は左端 17.4% を占める HindIII-C DNA 断片内に局在することが確認された。しかし、Ad4 DNA トランスホーム活性は Ad12 または Ad5 DNA に比較してはるかに低いものであった。われわれは、Ad4 DNA および Ad4 HindIII-C 断片で誘発したトランスホーム細胞株を樹立し、それらのトランスホーム細胞としての表現型、トランスホー

ム細胞に存続するウイルス DNA およびウイルス mRNA を解析した。

## 2 実験方法

### 2.1 細胞、ウイルスおよびウイルス DNA

F344 rat embryo 由来の細胞株 3Y1<sup>22)</sup> は 10% fetal calf serum (FCS) 添加 Eagle's minimum essential medium (MEM) で、トランスホーム細胞は 10% FCS 添加の 0.1 mM Ca<sup>++</sup> 含有 Eagle's MEM で培養した。3Y1 およびトランスホーム細胞は特に記述のない限り 10~15 回継代したものを使用した。実験に用いたウイルスはヒトアデノウイルス 12 型 (Ad12) Huie 株、Ad7 Grider 株、Ad5 Adenoid 75 株、Ad13 A·A 株、および Ad4 RI-67 株で KB 細胞を用いて増殖させた<sup>23)</sup>。ウイルス粒子およびウイルス DNA の精製は Green and Pina の方法<sup>24,25)</sup> に従った。

### 2.2 ウィルス DNA 断片の精製

Ad12 と Ad4 DNA を制限酵素で完全に消化し、各ウイルス DNA 断片を 1.4% アガロース電気泳動で分離した。分画した DNA 断片は再度アガロースゲルで電気泳動後、ゲル断片より精製した<sup>14)</sup>。

### 2.3 酶 素

制限酵素、EcoRI, HindIII, BamHI, PstI, AccI および KpnI は宝酒造株式会社より、SstI は Bethesda Research Laboratories Inc. より、BstEII は New England Biolabs, Inc. より購入した。E. coli DNA polymerase I および large fragment E. coli DNA polymerase I は Boehringer Mannheim Corp. より、T4 polynucleotide kinase (T4-PNKase) は宝酒造株式会社より購入した。臍 DNase I は Worthington Biochemical Corp. のものを使用した。

### 2.4 トランスホーム活性の測定とトランスホーム細胞株の樹立

ウイルス DNA とウイルス DNA 断片のトランスホーム活性の測定はリン酸カルシウム法<sup>26)</sup> に従って、6 cm plastic dish 内に subconfluent の状態で増殖しているラット 3Y1 細胞を場として行なった。Hepes-buffered saline (HeBS), pH 7.05 にウイルス DNA (0.5~2.0 μg/dish) またはウイルス DNA 断片 (0.5~2.0 μg ゲノム相当量/dish) および carrier として仔牛胸腺 DNA 7.0 μg を溶解し、CaCl<sub>2</sub> を最終濃度 125 mM となるよう加え、室温で 15 分間インキュベートした後、ラット 3Y1 細胞に接種した。37°C で 4 時間インキュベートした後、25% DMSO で 3 分間処理し<sup>27)</sup>、10% FCS 添加 0.1 mM Ca<sup>++</sup> 含有 Eagle's MEM で培養を続けた。

培地は 3 日毎に交換した。約 30 日の培養後、トランスポームフォーカスの出現が観察された。クローン化したトランスポーム細胞株は限界希釈法によって樹立した。

## 2・5 形 態

培養細胞をメタノールで固定し、Giemsa 染色後、光学顕微鏡で観察した。担癌ラットから摘出した腫瘍組織はホルマリンで固定し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。

## 2・6 細胞の増殖性質

トランスポーム細胞の飽和密度とプレート効率、および 0.3% 軟寒天培地中でのコロニー形成能を調べた<sup>8,28)</sup>。

## 2・7 トランスポーム細胞の造腫瘍能

$2 \times 10^6$ ~ $4 \times 10^7$  のトランスポーム細胞を PBS に suspend して同系ラットに皮下移植し、腫瘍形成の有無を 90 日またはそれ以上の期間観察した。

## 2・8 細胞 DNA の精製

Fujinaga らの方法<sup>29,30)</sup>に従い、sodium dodecyl sulfate (SDS)、プロナーゼ処理した培養細胞からフェノール法によって高分子量細胞 DNA を精製した。

## 2・9 ウィルス DNA の標識

高比放射活性の  $^{32}\text{P}$  標識 DNA 断片の調製には、nick translation<sup>31,32)</sup> 法を用いてウイルス DNA を、exonuclease III と large fragment *E. coli* DNA polymerase I を用いてウイルス DNA の 3' 末端を<sup>33,34)</sup>、[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP と T4-PNKase を用いてウイルス DNA の 5' 末端<sup>35)</sup> を試験管内で標識した。

## 2・10 制限酵素切断点地図の作製

Ad4 HindIII-C 断片またはその  $^{32}\text{P}$  末端標識断片を制限酵素 *Pst*I または *Sst*I によって、反応時間を短縮して部分消化し、DNA 断片をアガロース電気泳動で分離し、ethidium bromide ( $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) により染色、紫外線下で観察または autoradiography によって検出した。各 DNA 断片の大きさを Ad12 DNA の HindIII と EcoRI の消化断片との相対移動度から計算した<sup>36)</sup>。

## 2・11 Southern blot hybridization によるウイルス DNA の検出

細胞 DNA  $10 \mu\text{g}$  を、制限酵素を用いて消化し、0.9% アガロースゲル電気泳動によって分離した後、Southern の方法<sup>37)</sup> に従ってメンブレンフィルター上に移し、 $^{32}\text{P}$  で標識したウイルス DNA とハイブリダイゼーションを行ない、autoradiography によりウイルス DNA と相同性を示す細胞 DNA 断片を検出した<sup>29)</sup>。

## 2・12 細胞質 RNA の精製

トランスポーム細胞および Ad4 感染 KB 細胞(感染後 12 時間)を Zieve and Penman の方法<sup>38)</sup> に従って 0.5% NP-40 を含む低張緩衝液で lysis し、低速遠心で核を除いた上清に SDS (0.5%)、EDTA (10 mM) および NaCl (0.1 M) を加えフェノール・クロロホルム (2:1) で 3 回抽出した後、2 倍容のエタノールを加えて細胞質 RNA を沈殿させた。oligo dT cellulose column を用いて polyadenylic acid (poly(A)) 含有 RNA を細胞質 RNA より単離した<sup>39)</sup>。

## 2・13 ウィルス特異 RNA の検出

RNA blot hybridization は Rave<sup>40)</sup> and Thomas<sup>41)</sup> の方法を改変して行なった<sup>8)</sup>。poly (A) RNA (5.0 または  $10.0 \mu\text{g}$ ) は 50% formamide, 6% formaldehyde, 0.018 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.002 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10% glycerol, 0.2 mM EDTA に溶解し、65°C, 5 分間加熱した後、6% formaldehyde 含有 1.2% アガロースゲル電気泳動で分離した。ゲル内の RNA を Southern 法<sup>37)</sup> に従って  $10 \times \text{SSC}$  ( $1 \times \text{SSC}$ : 0.15 M NaCl, 0.015 M sodium acetate) を用いてニトロセルロースフィルターに移し固定した。RNA と  $^{32}\text{P}$  標識 DNA 断片とのハイブリダイゼーションは 50% formamide, 5×SSC, 1×Denhardt 溶液, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 1% glycine および  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  の変性仔牛胸腺 DNA よりなる反応液中で 45°C, 16~24 時間反応を行ない、洗浄後 autoradiography によってウイルス特異 RNA を検出した。

## 3 成 績

### 3・1 Ad4 DNA および Ad4 HindIII-C 断片のトランスポーム活性

Ad4 ウィルス DNA とその左端 DNA 断片のトランスポーム活性を調べるために、リン酸カルシウム法を用いて、ラット Y1 細胞にこれら DNA のトランスポーム実験を行なった。比較のため、Ad4 DNA と Ad4 HindIII-C (左端 17.4%) に加えて、Ad12 (A 群), Ad7 (B 群), Ad5 (C 群), Ad13 (D 群) DNA, Ad12 EcoRI-C 断片 (左端 16.2%) および Ad12 AccI-H 断片 (左端 4.6%) のトランスポーム活性も合わせて行なった。

Ad12 DNA と Ad5 DNA トランスポームの 4 時間後に細胞を 3 分間 25% DMSO で処理すると、トランスポーム活性の効率は処理しない場合より 5~8 倍上昇することが認められた (Table 1)。そこで DMSO 処理を併用したリン酸カルシウム法によってウイルス DNA のトランスポーム活性の検討を行なった。Ad12

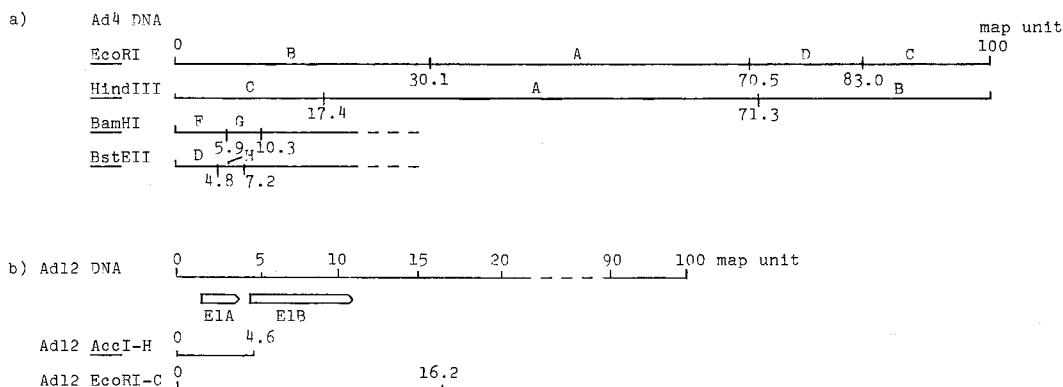
**Table 1 Transformation of rat 3Y1 cells with DNAs and DNA fragments of Ad4 and other Ad serotypes.**

Experiment <sup>a)</sup> number	DNAs	Input viral DNA ( $\mu$ g intact viral DNA or $\mu$ g genome equivalent/dish)	Number of focus	Mean (Number of focus/ $\mu$ g intact viral DNA or $\mu$ g genome equivalent)
Exp. I	Ad4 DNA	2.0	5, 9	4
	Ad4 HindIII-C <sup>b)</sup>	2.0	50, 52	26
Exp. II	Ad4 DNA	2.0	2, 4	2
	Ad4 HindIII-C <sup>b)</sup>	2.0	20, 21	10
Exp. III	Ad4 DNA	2.0	5, 6, 6	3
	Ad4 HindIII-C <sup>b)</sup>	2.0	19, 19, 22	10
Exp. IV	Ad12 DNA	0.5	56, 61, 64	120
	Ad13 DNA	0.5	13, 17, 18	32
	Ad4 DNA	0.5	3, 3, 4	7
	Calf thymus DNA	0.5	0, 0, 0	0
Exp. V	Ad12 DNA	1.0	111, 112, 150, 163	134
	Ad7 DNA	1.0	27, 30, 44, 47	37
Exp. VI	Ad12 DNA	0.5	57, 60, 61, 66	122
	Ad12 EcoRI-C <sup>c)</sup>	0.5	68, 71, 82, 137	179
	Ad12 AccI-H <sup>d)</sup>	1.0	17, 20, 27, 31	24
Exp. VII	Ad12 DNA	1.0 (DMSO(-)) <sup>e)</sup>	17, 21, 26	21
	Ad12 DNA	1.0	112, 121, 127	120
	Ad5 DNA	1.0 (DMSO(-)) <sup>e)</sup>	14, 16	15
	Ad5 DNA	1.0	110, 130	120

a) In the same Exp. number, the same aliquots of 3Y1 cultures were transfected.

b) 0.348  $\mu$ g/dish, c) 0.081  $\mu$ g/dish, d) 0.046  $\mu$ g/dish.

e) DMSO post-treatment was not done.



**Fig. 1** Cleavage maps of viral DNA and left-end DNA region of Ad4 and Ad12. (a) Ad4 DNA restriction maps with *Eco*RI, *Bam*HI, *Bst*EII, and *Hind*III were illustrated (Tokunaga *et al.*, 1982; Kitchingman, 1982). Ad4 genome is represented by horizontal lines divided into 100 units starting at the left end. (b) Left-end DNA fragments of Ad12, *Acc*I-H (left-end 4.6%) and *Eco*RI-C (left-end 16.2%), are represented. E1A and E1B mRNAs are illustrated by arrows in the E1 region.

DNA または Ad5 DNA のトランスポーム活性は 110~130 フォーカス/ $\mu$ g, Ad7 または Ad13 DNA は 26~44 フォーカス/ $\mu$ g であったが、Ad4 DNA のトランスポーム活性は 2~7 フォーカス/ $\mu$ g であった(Table

1). Ad4 の左端 17.4% を占める *Hind*III-C 断片 (Fig. 1, a) および Ad12 *Eco*RI-C 断片 (左端 16.2%) と Ad12 *Acc*I-H 断片 (左端 4.6%) (Fig. 1, b) のトランスポーム活性も同様の方法で検討した。Ad4 *Hind*III-C 断片

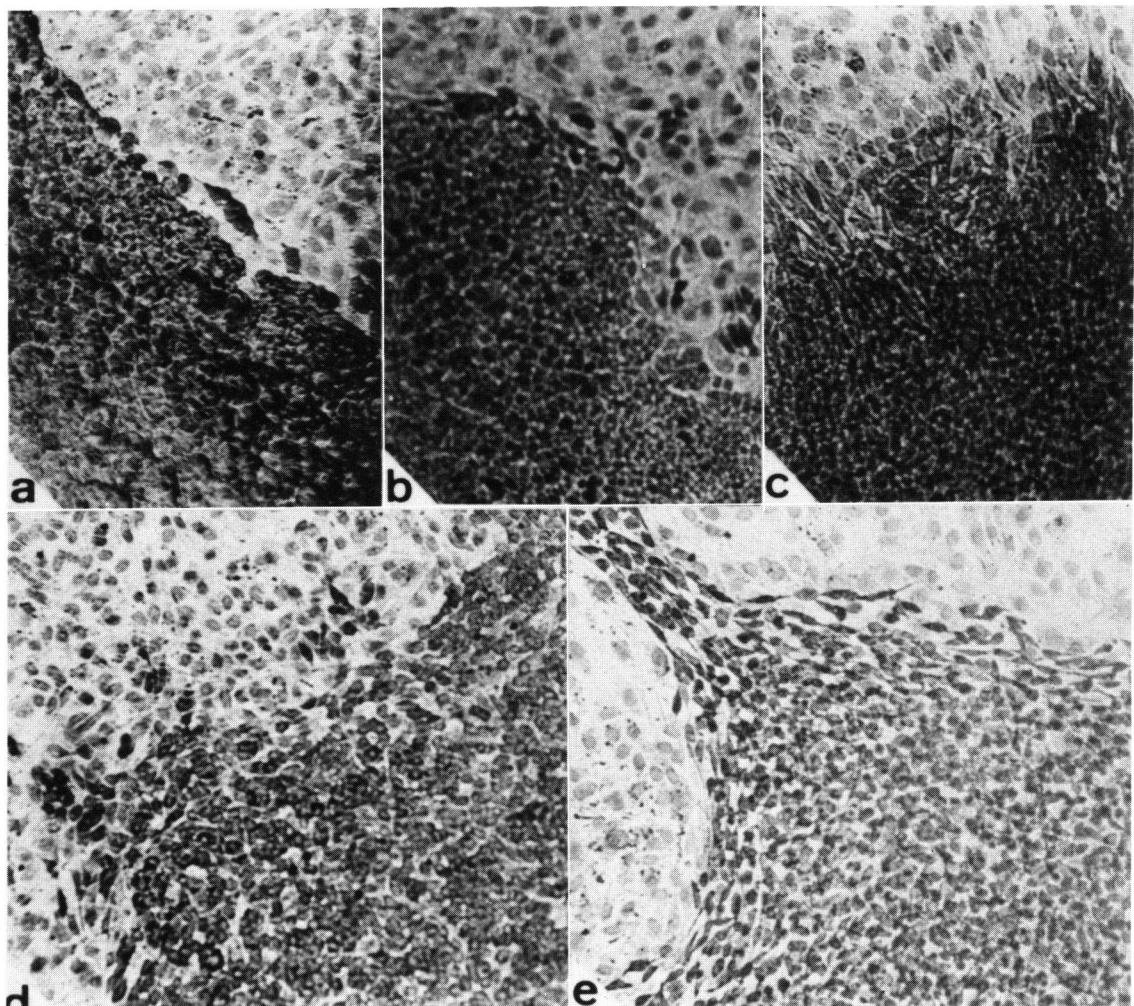
もまたトランスホームフォーカスを誘発することが見い出されたことから、Ad4のトランスホーム遺伝子はゲノムの左端17.4%内に局在することが示された。Ad4 *HindIII-C* 断片のトランスホーム効率は、Ad4全体のDNAによるものより3~5倍高い値を示した。以上Ad4 DNAのトランスホーム活性は検討したAd12, Ad7, Ad5, Ad13、およびAd4 DNAの中では最も低い値であった。

Ad12, Ad7, Ad5, Ad13 DNA、およびAd12 *EcoRI-C* 断片は非トランスホーム3Y1細胞と明らかに異なる多層性のトランスホームフォーカスを形成した

(Fig. 2, a, b, c) が、Ad4 DNA、Ad4 *HindIII-C* (左端17.4%)およびAd12 *AccI-H* 断片(左端4.6%)では3Y1細胞上にはほとんど単層のトランスホーム細胞塊からなるフォーカスを誘発した(Fig. 2, d, e)。すなわち、Ad4 DNAまたはAd4 *HindIII-C* 断片によるトランスホームフォーカスはAd12 E1A DNA部分によって誘発されるフォーカスに似ていた。

### 3・2 Ad4 トランスホーム細胞の性質

Ad4 DNAおよびAd4 *HindIII-C* 断片により誘発したトランスホーム細胞をそれぞれ別個のフォーカスから単離し、限界希釈法によってクローン化した後細胞



**Fig. 2** The edges of transformed foci induced by Ad12 DNA (a), Ad5 DNA (b), Ad13 DNA (c), Ad4 DNA (d), and Ad12 *AccI-H* fragment (left-end 4.6%) (e). The backgrounds of untransformed 3Y1 cells are in the upper regions of the fields. The cells were fixed, and stained with Giemsa. Magnification 100×.

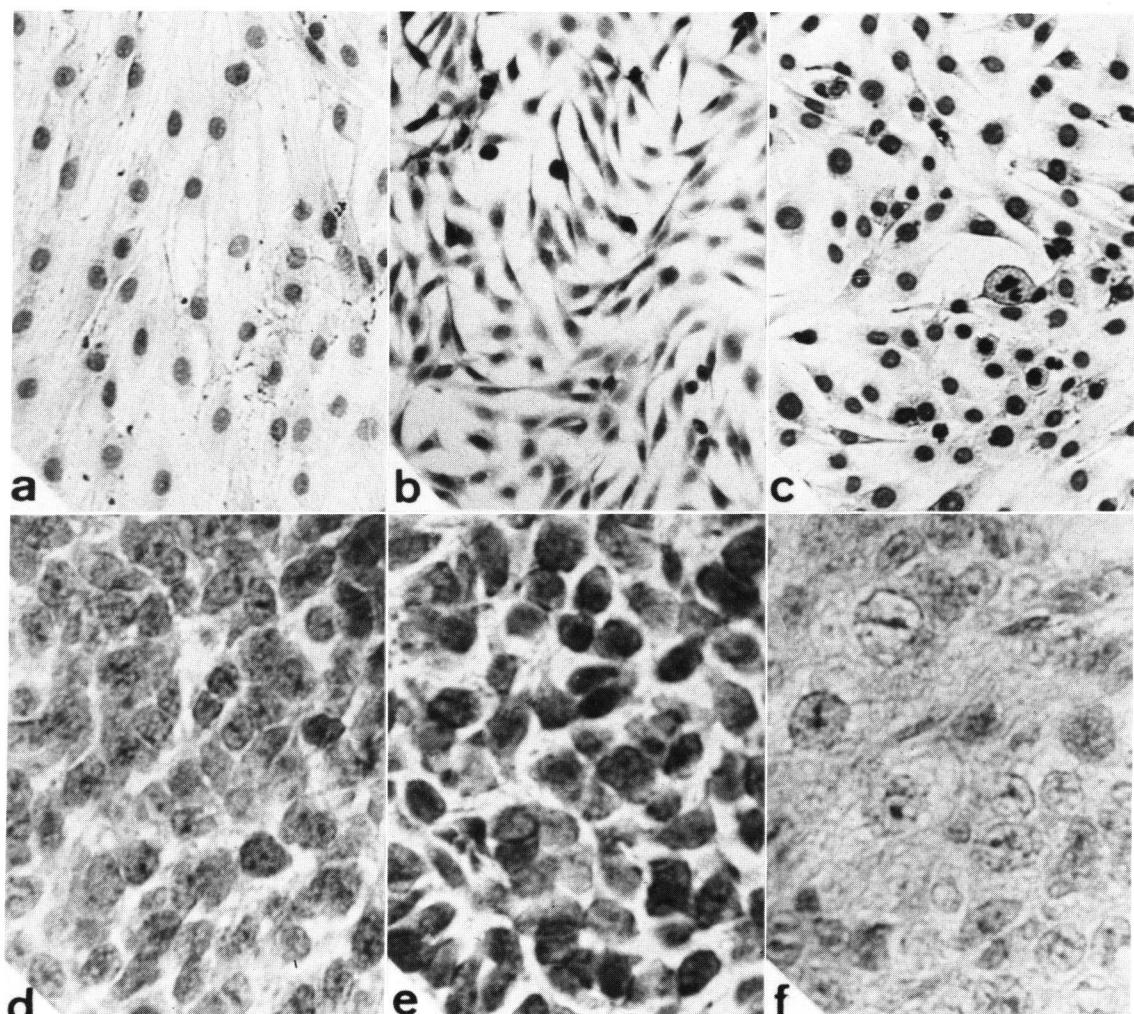
株として樹立した。Ad4 DNA トランスホーム細胞株として 4WY1, 4WY2 および 4WY5, Ad4 *HindIII-C* トランスホーム細胞株として 4CY4 および 4CY6 を得た。これらのトランスホーム細胞は形態学的に互いに似ており、非トランスホーム 3Y1 細胞より小型で、核/細胞質比も大きい。しかし、Ad12あるいはAd2 DNA によって誘発したトランスホーム細胞と異なり<sup>42)</sup>、線維芽細胞様形態を示す (Fig. 3, b, c)。

4WY および 4CY 株の増殖性質として、飽和密度、プレート効率、および 0.3% 軟寒天培地中での増殖能力を検討した (Table 2)。4WY と 4CY 細胞株は plastic 上で  $4.9 \sim 11.0 \times 10^4/\text{cm}^2$  で飽和し、非トランスホーム

3Y1 細胞の 10 倍以上の飽和密度を示した。しかし、2% FCS 添加 Eagle's MEM 中でのプレート効率は 4CY4 株を除いて 3Y1 細胞とほとんど同程度であった。さらに、全てのトランスホーム細胞株は 0.3% 軟寒天培地中で増殖することができなかった。これらの結果は、Ad4 のゲノム DNA と *HindIII-C* 断片は不完全または非腫瘍原性細胞トランスホーメーションのみを誘発することを示唆している。

### 3.3 トランスホーム細胞の腫瘍原性

トランスホーム細胞の腫瘍原性を調べるために  $5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^7$  個の細胞を PBS に suspend して新生同系ラットに皮下注射した (Table 3)。 $5 \times 10^6$  の WY3 細胞



**Fig. 3** Photomicrographs showing the morphology of cultured 3Y1 (a), 4WY1 (b), 4CY4 (c) cells and the histological features of WY3 (d), HY1 (e) and 4WY1 (f) tumors induced in newborn rats after transplantation. Magnification 100× in (a) to (c), and 400× in (d) to (f).

Table 2 *In vitro characteristics of 3Y1 and its Ad4 transformed derivatives.*

Cell lines <sup>a)</sup>	Origin	Saturation density	%plating efficiency		Colony formation in 0.3% soft agar (10% FCS)
		(10% FCS) ( $\times 10^4$ cells/cm $^2$ )	10% FCS	2% FCS	
3Y1	F344 rat embryo	0.4	46.4	2.6	(-)
4WY1	transformed by Ad4 DNA	8.7	62.4	4.9	(-)
4WY2	"	11.0	46.5	1.1	(-)
4WY5	"	5.1	42.5	1.8	(-)
4CY4	transformed by Ad4 HindIII-C	9.9	56.9	21.8	(-)
4CY6	"	4.9	25.7	1.3	(-)
WY3 <sup>b)</sup>	transformed by Ad12 DNA	18.8	N. T.	N. T.	(++) <sup>e)</sup>
GY1 <sup>c)</sup>	transformed by Ad12 HindIII-G	16.9	N. T.	N. T.	(++)
3IBY4 <sup>d)</sup>	transformed by Ad31 BamHI-B	13.8	44.3	40.7	(++)

a) Passage number (Pass. No.) of cell lines was of between 10 th and 15 th except for WY3 (Pass. No. of 34) and GY1 (Pass. No. of 28).

b), c) Shiroki *et al.*, 1979.

d) Yamashita and Fujinaga, 1983.

e) (++) indicates that more than 10% of cells formed detectable colonies.

(Ad12 DNA でトランスホームした 3Y1 細胞<sup>22)</sup>) は、1 カ月以内に、移植した全ラットに腫瘍を形成した。また、 $5 \times 10^6$  の HY1 細胞 (左端 4.6% の Ad12 AccI-H 断片でトランスホームした 3Y1 細胞<sup>16)</sup> もまた腫瘍を形成したが、50 日以上の潜伏期間を要した。一方、Ad4 DNA と Ad4 HindIII-C 断片でトランスホームした 4WY と 4CY 細胞では、 $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  の細胞を新生 2 日または 4 日目のラットに移植しても、腫瘍を形成しなかった。 $4 \times 10^7$  の 4WY1 細胞を新生 2 日目のラットに移植した場合にのみ、50~90 日の潜伏期の後

に腫瘍形成が観察された。以上の結果は、4WY と 4CY 細胞は、不完全トランスホーム細胞である HY1 より腫瘍原性が低いことを示している。

腫瘍断片を 10% ホルマリンによって固定し、ヘマトキシリンおよびエオジン染色後、光学顕微鏡下で観察した。WY3 と HY1 腫瘍は、橢円形の濃染色性核を持つ円形細胞からなり、低分化型の肉腫像を示している (Fig. 3, d, e)。一方、4WY1 腫瘍は明るい核を持った中程度の大きさの多形性細胞よりなっている分化度が高いようみえる (Fig. 3, f)。

Table 3 *Tumorigenicity of transformed cells.*

Cell lines <sup>a)</sup>	Number of rats injected	Day of rats injected	Number of cells injected	Number of rat with tumor/ Total number of rats						
				Days	0	15	30	60	90	120
WY3 <sup>b)</sup>	5	2	$5 \times 10^6$	0/5	1/5	5/5				
4WY1	5	2	$5 \times 10^6$	0/5					0/5	
HY1 <sup>c)</sup>	5	2	$5 \times 10^6$	0/5			1/5	3/5		
4WY1	9	2	$4 \times 10^7$	0/9			3/9	4/9	4/9	
4WY2	6	4	$10^7$	0/6					0/6	
4WY2	5	2	$2 \times 10^7$	0/5					0/5	
4WY5	5	2	$2 \times 10^7$	0/5					0/5	
4CY4	6	4	$2 \times 10^7$	0/6					0/6	
4CY4	8	4	$10^7$	0/8					0/8	

a) Cell lines used in this experiment were of passage number (Pass. No.) of between 10 th and 15 th, except for WY3 (Pass. No. 35) and HY1 (Pass. No. 18).

b) WY3 is a cell line derived from 3Y1 transformed by Ad12 whole DNA (Shiroki *et al.*, 1979).

c) HY1 was derived from 3Y1 transformed by Ad12 AccI-H (left-end 4.6%) (Shiroki *et al.*, 1979).

### 3.4 トランスホーム細胞中のウイルス DNA の存続

#### 3.4.1 Ad4 HindIII-C 断片の切断点地図

Ad4 HindIII-C 断片（左端 17.4%<sup>20)</sup>）の制限酵素 *Pst*I および *Sst*I による切断点地図を作製した。これらの酵素により *Hind*III-C 切断 DNA 断片を 1.0% アガロースまたは 5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、各 DNA 断片の大きさを既知の Ad12 *Eco*RI および *Hind*III 断片の相対移動度と比較することによって決定した (Table 4)。次いで末端標識した *Hind*III-C 断片を *Pst*I または *Sst*I で完全消化あるいは不完全消化し、autoradiography によって末端を含む部分消化を解析し、*Pst*I (4 カ所) および *Sst*I (3 カ所) の切断点を Ad4 HindIII-C 断片上に決定した (Fig. 4)。

#### 3.4.2 Southern 法によるウイルスゲノムの存続の検討

トランスホーム細胞中の Ad4 DNA 存続の有無、および Ad4 DNA のどの部分が存続しているかを検討するため、細胞から高分子量 DNA を調整し、<sup>32</sup>P 標識した Ad4 DNA と Ad4 DNA 断片をプローブとして Southern blot hybridization を行なった。4CY4 と 4CY6 の細胞 DNA を *Pst*I で切断後、0.9% アガロースゲル電気泳動で分離し、アルカリ処理後メンブレンフィルターに移して固定し、nick translation によって <sup>32</sup>P 標識した Ad4 HindIII-C 断片とハイブリダイゼーションを行なった。その結果、Ad4 HindIII-C/*Pst*I 切断断片 A (5.0–10.2 マップ単位), C (1.3–5.0 マップ単位)、および D (10.2–12.9 マップ単位) の 3 断片と同じ大きさの DNA 断片が検出されたが、*Hind*III-C/*Pst*I 切断断片 B (12.9–17.4 マップ単位) および E (0–1.3 マップ単位) DNA 断片は検出されなかった (Fig. 5, a–c, Fig. 4)。このことは、ウイルス DNA と細胞 DNA の組み換えは 0–1.3 マップ単位と 12.9–17.4 マップ単位間でおきており、ウイルス DNA の少なくとも 1.3–12.9 マップ単位が細胞 DNA 中に組み込まれていることを示唆している。同様に、4CY 細胞株を *Sst*I で切断し、Southern 法で分析した結果、*Hind*III-C/*Sst*I 切断断片のうち末端に位置しない断片 B

(10.0–13.6 マップ単位) および D (13.6–15.0 マップ単位) が標識 Ad4 HindIII-C プローブとハイブリダイズすることが見い出された (Fig. 5, d–f)。このことは、ウイルス DNA の少なくとも 1.3–15.0 マップ単位が細胞中に存続していることを示唆している。4WY の 3 株についても同様に *Pst*I 消化の後、標識 Ad4 HindIII-C をプローブとして Southern 法で分析した。4WY1 DNA はプローブとハイブリダイズする *Hind*III-C/*Pst*I 切断断片 A, B, C に加えて数本のバンドが検出された (Fig. 5, h)。B 断片が観察されたのは、*Pst*I が *Hind*III と同じ 17.4 マップ単位に切断点を待つためである (Fig. 4)。4WY2 では *Hind*III-C/*Pst*I 切断断片に A, C, D と同じ大きさのバンド (Fig. 5, i)、4WY5 では C 断片と同じ大きさのバンドのみ検出された (Fig. 5, j)。Fig. 6 にトランスホーム細胞 DNA 中の左端 17.4% のウイルス DNA の存続パターンをまとめた。4WY2, 4CY4 および 4CY6 は完全な E1 領域 (1.3–11.2 マップ単位)、4WY1 は E1A (1.3–4.5 マップ単位) とほとんどの E1B (4.5–11.2 マップ単位) 領域を含むが、4WY5 は E1A 領域のみを含んでいることが示唆された。さらに、4WY1, 4WY2 および 4WY5 のウイルス DNA の左端 17.4% 以外の領域の存続を検索した結果を Fig. 6 に示した (データ未掲載)。

#### 3.5 Northern blot hybridization

##### 3.5.1 Ad4 左端領域から転写される初期 mRNA

Ad4 感染 12 時間後の KB 細胞より poly (A) RNA を単離し、Ad4 左端 DNA 断片をプローブとして、Northern blot hybridization を行ない初期ウイルス RNA を解析した。トランスホーム活性のある *Hind*III-C 断片 (左端 17.4%) とハイブリダイズする初期 RNA として 2 種類の主要バンドが検出された (Fig. 7, [A])

Table 4 Size of Ad4 HindIII-C restriction fragments (kb).

Endo. R	Electrophoretic band					Total
	A	B	C	D	E	
<i>Pst</i> I	1.89	1.65	1.35	0.96	0.48	6.33 kb
<i>Sst</i> I	3.64	1.31	0.89	0.52	—	6.36 kb

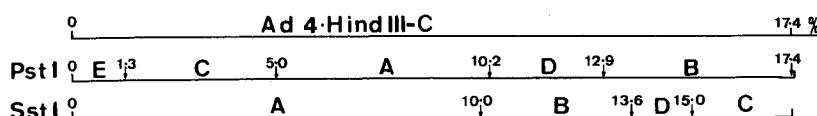
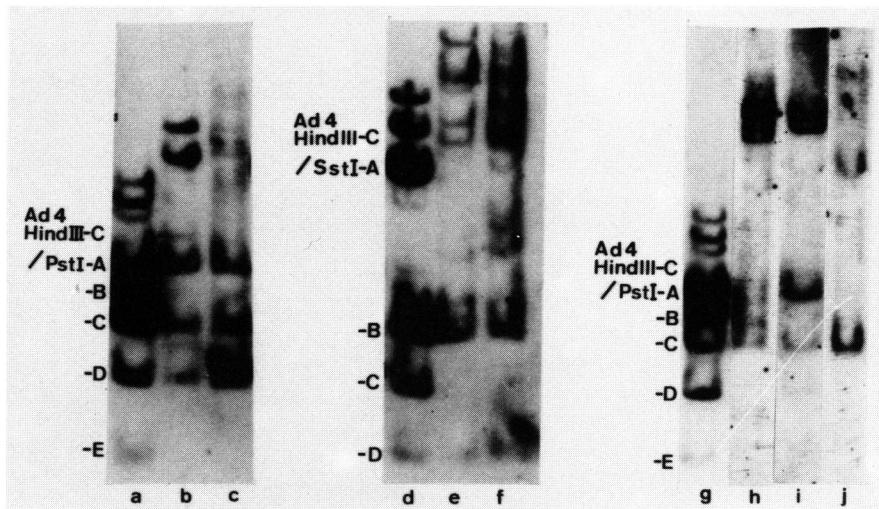
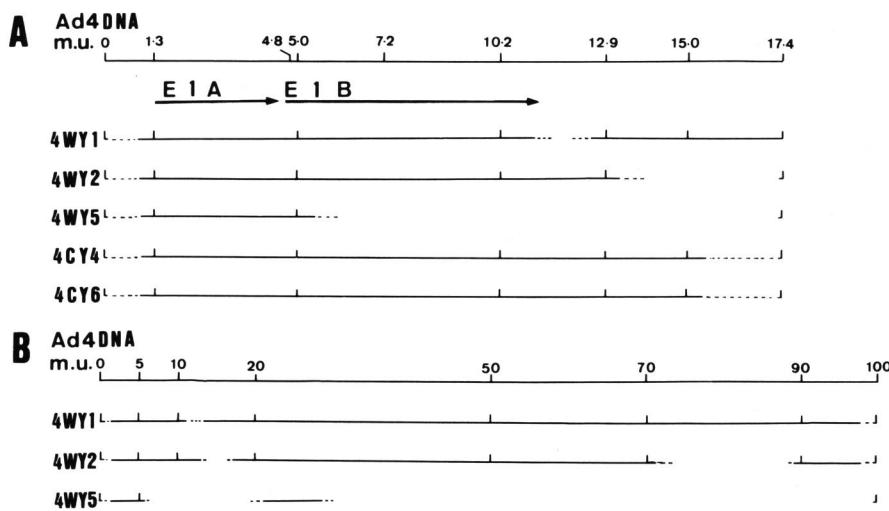


Fig. 4 Cleavage maps of Ad4 HindIII-C fragment. Arrows indicate the locations of cleavage sites of *Pst*I and *Sst*I on Ad4 HindIII-C DNA fragments represented as horizontal lines.



**Fig. 5** Viral DNA sequences in transformed cells. Cellular DNA was cleaved with *Pst*I or *Sst*I, subjected to electrophoresis through 0.9% agarose gels, transferred to a nitrocellulose filter, hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled Ad4 *Hind*III-C (map units 0-17.4), and exposed to an X-ray film for 7 days as described in Materials and Methods. *Pst*I-cleaved *Hind*III-C DNA (0.04 ng) (a, g), *Pst*I-cleaved 4CY4 cell DNA (b), *Pst*I-cleaved 4CY6 cell DNA (c), *Sst*I-cleaved Ad4 *Hind*III-C DNA (0.04 ng) (d), *Sst*I-cleaved 4CY4 cell DNA (e), *Sst*I-cleaved 4CY6 cell DNA (f), *Pst*I-cleaved 4WY1 cell DNA (h), *Pst*I-cleaved 4WY2 cell DNA (i), and *Pst*I-cleaved 4WY5 cell DNA (j).



**Fig. 6** Viral DNAs persisted in transformed cells. [A] Diagram of early RNAs transcribed from left-end DNA region and persisted viral DNA sequences of Ad4 left-end region in 4WY and 4CY cells. Arrows indicate early RNAs transcribed from left-end 17.4% of the genome determined from the result of Northern's analysis. Solid lines indicate the persisted viral DNA sequences in 4WY and 4CY cell lines and dotted lines indicate the presumably persisted viral DNA sequences in the cell lines. [B] Persisted viral DNAs in 4WY cells are indicated by solid lines.

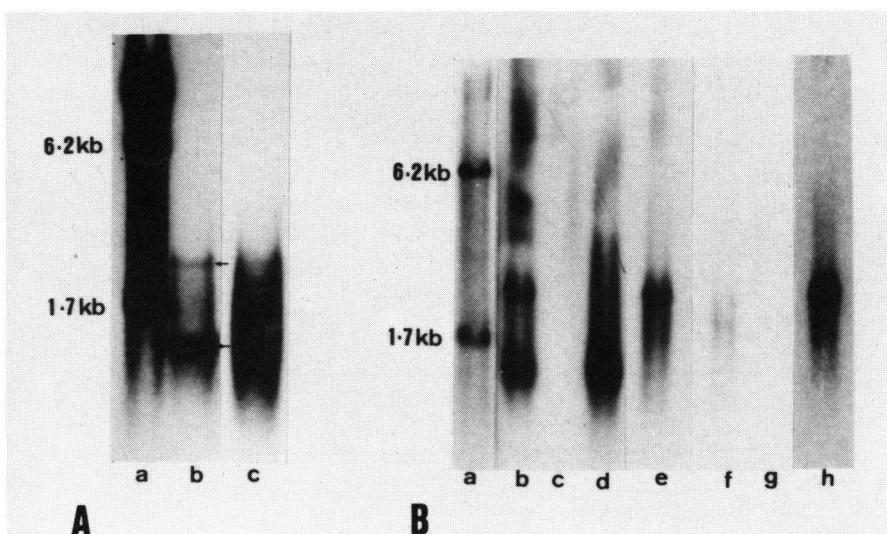
b). これらの RNA は 3' 末端を  $^{32}\text{P}$  標識した Ad4 ゲノム DNA 由来の *HindIII-C* プローベとハイブリダイズすることから r 鎖から転写されていることがわかった(データ未掲載). 1.1–1.3 kilobase (kb) の初期 mRNA が標識した *BstEII-D* (0–4.8 マップ単位) とハイブリダイズするが、*BstEII-H* (4.8–7.2 マップ単位), および *BamHI-G* (5.9–10.3 マップ単位) とはハイブリダイズしない. 一方, 2.5 kb の mRNA は、標識した *BstEII-H*, *BamHI-G* と、またわずかに *BstEII-D* とハイブリダイズするが、標識した *HindIII-C/PstI-E* (0–1.3 マップ単位) と *HindIII-C/PstI-B* (12.9–17.4 マップ単位) とはハイブリダイズしなかった(Fig. 7, [B] a-h). これらの結果から、感染初期に転写される mRNA の Ad4 E1 領域におけるおおよそのマップを Fig. 6 に示した.

### 3.5.2 トランシスホーム細胞中のウイルス特異 mRNA

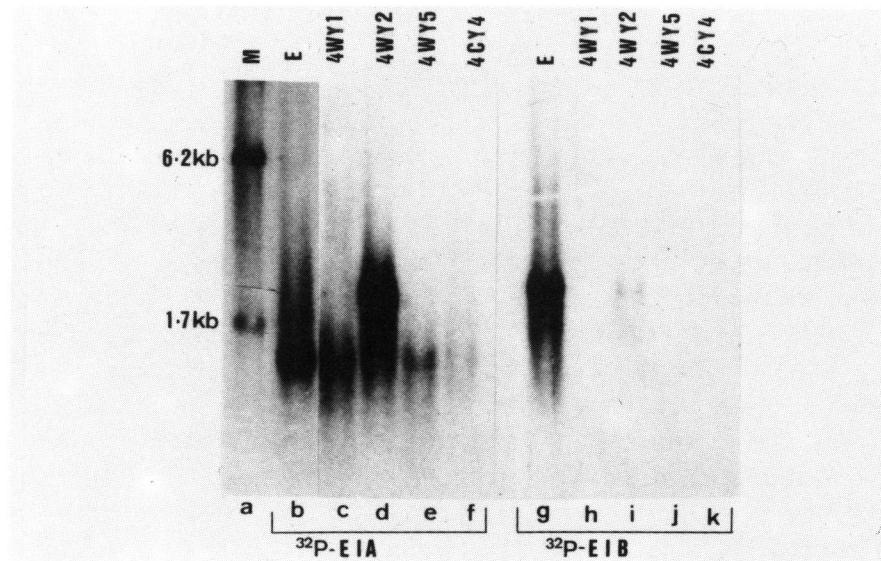
トランシスホーム細胞株, 4WY1, 4WY2, 4WY5, 4CY4 中で転写されるウイルス特異 RNA を、Northern 法を用いて検出した. *BstEII-D* (0–4.8 マップ単位) を *E1A*, *BamHI-G* (5.9–10.3 マップ単位) を *E1B* のプローベとして RNA blot hybridization を行なった結果、全てのトランシスホーム細胞で 1.1–1.3 kb の *E1A* mRNA が検出された (Fig. 8, c-f). 4WY2 はさらに *BstEII-D* と *BamHI-G* の両者とハイブリダイズする大きさ 2.2 kb の別種の RNA が検出された (Fig. 8, d, i). しかし、2.5 kb の大きさの固有の *E1B* mRNA はトランシスホーム細胞中には検出されなかつた (Fig. 8, h-k).

### 4 考 察

Ad4 は E 亜群を構成する唯一の血清型で、トランシスホーム活性の有無はいまだ報告されていなかった<sup>1)</sup>. 本論文では DMSO 処理<sup>27)</sup>を併用したリン酸カルシウム法<sup>26)</sup>



**Fig. 7** [A] Early RNAs in productively infected cells. Polyadenylic acid containing (poly (A)) cytoplasmic RNAs were purified from KB cells early after lytic infection with Ad4 (in the presence of 20  $\mu\text{g}$  of ara-C per ml of culture medium). DNA blots of Ad4 *BstEII-D* (0.03 ng) and Ad4 *HindIII-C* (0.05 ng) were hybridized with  $^{32}\text{P}$ -nickled labeled Ad4 *HindIII-C* DNA and used as size markers (a). Blots of Ad4 early RNA (5.0  $\mu\text{g}$ ) were hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled Ad4 *HindIII-C* (map units 0–17.4) (b) and Ad4 *HindIII-B* (map units 71.3–100) (c). Arrows indicate 1.1 to 1.3 kb-sized and 2.5 kb-sized RNA (b). [B] Ad4 *BstEII-D* (0.03 ng) and Ad4 *HindIII-C* (0.05 ng) were hybridized with  $^{32}\text{P}$ -labeled Ad4 *HindIII-C* as size markers (a). Blots of Ad4 early RNA (5.0  $\mu\text{g}$ ) were hybridized with labeled Ad4 *HindIII-C* (b), *HindIII-C/PstI-E* (map units 0–1.3) (c), *BstEII-D* (map units 0–4.8) (d), *BamHI-G* (map units 5.9–10.3) (e), *BamHI-A* (map units 10.3–34.7) (f), *HindIII-C/PstI-B* (map units 12.9–17.4) (g) and *BstEII-H* (map units 4.8–7.2) (h).



**Fig. 8** Northern blot hybridization of mRNAs from 4WY1, 4WY2, 4WY5, 4CY4 and infected early cells. Polyadenylic acid containing (poly (A)) cytoplasmic RNAs were purified from 4WY1, 4WY2, 4WY5, 4CY4 and KB cells early after lytic infection with Ad4 in the presence of cytosine arabinoside. DNA blots of Ad4 *HindIII-C* (0.05 ng) and Ad4 *BstEII-D* (0.03 ng) were hybridized with <sup>32</sup>P-labeled Ad4 *HindIII-C* DNA and used as size markers (a). Blots of Ad4 early RNA (5.0  $\mu$ g) were hybridized with <sup>32</sup>P-labeled *BstEII-D* (0-4.8 map units) (EIA) probe (b) or *BamHI-G* (5.9-10.3 map units) (EIB) probe (g), RNA blots (10.0  $\mu$ g) of 4WY1 cells hybridized with labeled *BstEII-D* (c) or *BamHI-G* (h), RNA blots (10.0  $\mu$ g) of 4WY2 cells hybridized with labeled *BstEII-D* (d) or *BamHI-G* (i), RNA blots (10.0  $\mu$ g) of 4WY5 cells hybridized with labeled *BstEII-D* (e) or *BamHI-G* (j), RNA blots (10.0  $\mu$ g) of 4CY4 cells hybridized with labeled *BstEII-D* (f) or *BamHI-G* (k). 1.1 to 1.3 kb-sized mRNA hybridized with *BstEII-D* probe in all the transformed cell lines, and 2.2 kb-sized mRNA also hybridized with both *BstEII-D* and *BamHI-G* probes in 4WY2.

によって Ad4 DNA および *HindIII-C* 断片（左端 17.4%）のトランスポーム活性の存在を示した。これによって Ad4 のトランスポーム遺伝子はゲノムの左端 17.4% 内に存在することが確認され、*HindIII-C* 断片を含む末端が左端であることが確実となった。

Ad4 DNA のトランスポーム活性は A 群の Ad12, B 群の Ad7, C 群の Ad5, D 群の Ad13 および E 群の Ad4 DNA 中最も効率が低いことが見い出された。一方、EIA コード領域のみを含有する Ad12 *AccI-H* 断片（左端 4.6%）は Ad12 DNA に比べ培養ラット細胞に対するトランスポーメーションの効率は低く、また誘導されたトランスポーム細胞は軟寒天培地でコロニー形成が低く、新生ラットに対する腫瘍形成能も低いなど不完全または非腫瘍原性トランスポーメーションの表現型を示す<sup>16)</sup>。Ad4 と *HindIII-C* 断片もまたト

ランスポーム効率が低いことに加え、Ad12 *AccI-H* 誘発トランスポームフォーカスに類似したフォーカスを形成した。

フォーカスよりトランスポーム細胞を単離し、トランスポーム細胞株として、Ad4 DNA による 3 株 (4WY1, 4WY2 および 4WY5) と Ad4 *HindIII-C* による 2 株 (4CY4 および 4CY6) を樹立し、形態、増殖性および同系新生ラットに対する腫瘍原性などの検索を行なった。4WY と 4CY 株は線維芽細胞様形態を示し、2% FCS 添加 Eagle's MEM 中のプレート効率の低下、0.3% 軟寒天培地中での増殖能の欠如、あるいは  $5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$  のトランスポーム細胞の皮下移植によって新生ラットに腫瘍を形成しないなど不完全トランスポーメーションの表現型を示した。それ故、Ad4 の EIA 領域のみが細胞 DNA に存続しているのか、あるいは

EIA 領域のみがトランスポーム細胞内で転写されていることが予想された。 $4 \times 10^7$  の 4WY1 細胞が新生 2 日のラットに移植された時のみ、腫瘍形成が観察されたが、潜伏期は 50 日以上と長かった。移植実験により Ad4(E 亜群) は他の A-D 亜群と同様、低ながら腫瘍原性を持つことが示された<sup>2)</sup>。しかし、腫瘍形成には大量の 4WY1 細胞を必要とし、その腫瘍組織は HY 細胞<sup>16)</sup>(Ad12 EIA 断片により誘発した不完全トランスポーム細胞) 誘発腫瘍より組織学的に分化度が高いなどから Ad4 トランスポームラット細胞は HY 細胞よりもさらに非トランスポーム細胞に近い性質を持っている。

Southern blot hybridization によって 4WY1 には 1.3-10.2 マップ単位、4WY2 には 1.3-12.9 マップ単位、4CY4 と 4CY6 には 1.3-15.0 マップ単位のウイルス DNA 部分が存続していることが見い出され、このことはほぼ完全な E1 領域(E1A; 1.3-4.5 マップ単位, E1B; 4.5-11.2 マップ単位) を組み込んでいることを示唆している。

Northern blot hybridization によって 1.1-1.3 kb の大きさの E1A mRNA は調べられた全ての Ad4 トランスポーム細胞株で転写されているが、約 2.5 kb の固有の E1B mRNA は検出されなかった。Ad4 トランスポーム細胞中に組み込まれた E1B 領域から E1B mRNA が検出しうる量に転写されていない理由は明らかでないが、これが Ad4 DNA の低いトランスポーム活性と不完全トランスポーム表現型を示す理由の一つと考えられる。細胞トランスポームマーケーションに関して Ad 血清型間の E1A 領域の機能に差があるかどうか明白でなく、トランスポーム細胞中で Ad4 E1A 領域の有効な表現が HY 細胞のレベルまで腫瘍原性の増加を導きうるかどうかも明白でない。

4CY4 および 4CY6 株には Ad4 HindIII-C 以外の DNA 断片の存続は認められなかった(データ未掲載)。また、4WY 株について E2, E3, および E4 領域に相当するウイルス DNA をプローブとして Northern hybridization を行ない、トランスポーム細胞中の E2-E4 mRNA の転写の有無を調べたところ、いずれのトランスポーム細胞においてもこれらの初期 mRNA は検出されなかった(データ未掲載)。E2, E3 および E4 領域に相当する部分がこのトランスポーム細胞に存続している転写が認められない理由については不明である。

## 5 結語

E 亜群に属するヒトアデノウイルス 4 型(Ad4) のトランスポーム活性を検索した結果、以下の結論を得た。

1) Ad4 ゲノム DNA および HindIII-C 断片のいずれもトランスポーム活性を持ち、トランスポーム遺伝子はゲノムの左端 17.4% 内に位置していた。

2) Ad4 DNA によるトランスポームマーケーション効率は Ad12, Ad7, Ad5 または Ad13 DNA に比較してはるかに低かった。

3) Ad4 DNA でトランスポームした 4WY の 3 株および HindIII-C 断片でトランスポームした 4CY の 2 株の細胞株を樹立した。

4) トランスポーム細胞は高い飽和密度を示したが、線維芽細胞様形態、軟寒天培地での増殖能の欠如、および同系新生ラットへ移植した場合に造腫瘍能が極端に低いことなどから不完全トランスポーム細胞としての表現型を示した。

5) トランスポーム細胞中に存続するウイルス DNA を Southern 法により検索した結果、3 株(4WY2, 4CY4 および 4CY6) はウイルス DNA の 1.3-12.9 マップ単位、1 株(4WY1) は 1.3-10.2 マップ単位、そして 1 株(4WY5) は 1.3-5.0 マップ単位の存続が示された。

6) Northern blot hybridization によりトランスポーム細胞中のウイルス特異 mRNA の検出を試みたところ、検索した全てのトランスポーム細胞には 1.1-1.3 kb の E1A mRNA が検出されたが、感染初期 KB 細胞で認められる固有の 2.5 kb の E1B mRNA は検出されなかった。

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

## 文 献

- Green, M., Mackey, J. K., Wold, W. S. M., and Rigden, P.: Thirty-one human adenovirus serotypes (adenovirus 1-adenovirus 31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homologies. *Virology* **93**, 481-492 (1979).
- Toozé, J.: "Molecular Biology of Tumor Viruses, Second Edition, DNA Tumor Viruses." Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. (1981).
- Yano, S., Ojima, S., Fujinaga, K., Shiroki, K., and Shimojo, H.: Transformation of rat cell line by an adenovirus type 12 DNA fragment. *Virology* **82**, 214-220 (1977).
- Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H., Yano, S., Ojima, S., and Fujinaga, K.: Establishment and characterization of rat cell lines transformed by

- restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA. *Virology* **82**, 462-471 (1977).
5. Mak, S., Mak, I., Smiley, J. R., and Graham, F. L.: Tumorigenicity and viral gene expression in rat cells transformed by Ad12 virion or by the EcoRI-C fragment of Ad12 DNA. *Virology* **98**, 456-460 (1979).
  6. Byrd, P., Chia, W., Rigby, P. W. J., and Gal-limore, P. H.: Cloning of DNA fragments from the left end of the adenovirus type 12 genome: transformation by cloned early region 1. *J. Gen. Virol.* **60**, 279-293 (1982).
  7. Yamashita, T., Sugisaki, H., Nara, Y., Kanazawa, S., Takanami, S., and Fujinaga, K.: Transformation of rat cells by the cloned EcoRI-C fragment of human adenovirus type 12. *Tumor Res.* **17**, 9-22 (1982).
  8. Yamashita, T., and Fujinaga, K.: Establishment and characterization of rat cell lines transformed by the left-end DNA fragments of adenovirus type 31. *Gann* **74**, 77-85 (1983).
  9. Dijkema, R., Dekker, B. M. M., van der Feltz, M. J. M. and van der Eb, A. J.: Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. *J. Virol.* **32**, 943-950 (1979).
  10. Sekikawa, K., Shiroki, K., Shimojo, H., Ojima, S., and Fujinaga, K.: Transformation of rat cell line by an adenovirus 7 DNA fragment. *Virology* **88**, 1-7 (1978).
  11. Graham, F. L., Abrahams, P. J., Mulder, C., Heijnecker, H. L., Warnaar, S. O., de Vries, F. A. J., Fiers, W., and van der Eb, A. J.: Studies on *in vitro* transformation by DNA and DNA fragments of human adenoviruses and simian virus 40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**, 637-650 (1974).
  12. Fujinaga, K., Sawada, Y., Uemizu, Y., Yamashita, T., Shimojo, H., Shiroki, K., Sugisaki, H., Sugimoto, K., and Takanami, M.: Nucleic sequences, integration and transcription of the adenovirus 12 transforming genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 703-713 (1979).
  13. Yoshida, K., and Fujinaga, K.: Unique species of mRNA from adenovirus type 7 early region 1 in cells transformed by adenovirus type 7 DNA fragment. *J. Virol.* **36**, 337-352 (1980).
  14. Fujinaga, K., Yoshida, K., Yamashita, T., and Shimizu, Y.: Organization, integration, and transcription of transforming genes of oncogenic human adenovirus type 12 and 7. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1983, in press).
  15. Chow, L. T., Broker, T. R., and Lewis, J. B.: Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2. *J. Mol. Biol.* **134**, 265-303 (1979).
  16. Shiroki, K., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y., and Fujinaga, K.: Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA. *Virology* **95**, 127-136 (1979).
  17. van den Elsen, P. J., De Pater, S., Houweling, A., van der Veer, J., and van der Eb, A. J.: The relationship between region Ela and Elb of human adenoviruses in cell transformation. *Gene* **18**, 175-185 (1982).
  18. Bernards, R., Schrier, P. I., Bos, J. L., and van der Eb, A. J.: Role of adenovirus type 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology* **127**, 45-53 (1983).
  19. van der Eb, A. J., Bernards, R., van den Elsen, P. J., Bos, J. L., and Schrier, P. I.: Studies on the role of adenovirus E1 genes in transformation and oncogenesis. *Carcinogenesis* (1983, in press).
  20. Tokunaga, O., Shinagawa, M., and Padmanabhan, R.: Physical mapping of the genome and sequence analysis at the inverted terminal repetition of adenovirus type 4 DNA. *Gene* **18**, 329-334 (1982).
  21. Kitchingman, G. R.: Restriction mapping and molecular cloning of adenovirus type 4 (subgroup E) DNA. *Gene* **20**, 205-210 (1982).
  22. Kimura, G., Itagaki, A., and Summers, J.: Rat cell line 3Y1 and its virogenic polyoma- and SV40-transformed derivatives. *Int. J. Cancer* **15**, 694-706 (1975).
  23. Suzuki, N., Ueno, T., Yamashita, T., and Fujinaga, K.: Grouping of adenovirus and identification of restriction endonuclease cleavage patterns of adenovirus DNAs using infected cell DNA: Simple and practical method. *Microbiol. Immunol.* **25**, 1291-1301 (1981).
  24. Green, M., and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenovirus. *Virology* **20**, 199-207 (1963).
  25. Green, M., and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenoviruses and their DNA's. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 1251-1259 (1964).
  26. van der Eb, A. J., and Graham, F. L.: Assay of

- transforming activity of tumor virus DNA. *Methods Enzymol.* **65**, 826-839 (1980).
27. Stowe, N. D., and Wilkie, N. M.: An improved technique for obtaining enhanced infectivity with herpes simplex type 1 DNA. *J. Gen. Virol.* **33**, 447-458 (1976).
28. Macpherson, I.: Agar Suspension Culture for Quantitation of Transformed Cells. In; *Fundamental Techniques in Virology*, ed. K. Habel and N. P. Salzman, 214-219. Academic Press, (1969).
29. Fujinaga, K., Sawada, Y., and Sekikawa, K.: Three different classes of human adenovirus transforming DNA sequences; highly oncogenic subgroup A, weakly oncogenic subgroup B, and subgroup C specific transforming DNA sequences. *Virology* **93**, 578-581 (1979).
30. Fujinaga, K., Sawada, Y., and Uemizu, Y.: A rapid screening for the specific DNA sequence: analysis of the transforming DNA segments in adenovirus transformed cells. *Gann* **70**, 239-243 (1979).
31. Mackey, J. K., Brackmann, K. H., Green, M. R., and Green, M.: Preparation and characterization of highly radioactive *in vitro* labeled adenovirus DNA and DNA fragments. *Biochemistry* **16**, 4478-4483 (1977).
32. Sawada, Y., Ojima, S., Shimojo, H., Shiroki, K., and Fujinaga, K.: Transforming DNA sequences in rat cells transformed by DNA fragments of highly oncogenic human adenovirus type 12. *J. Virol.* **32**, 379-386 (1979).
33. Englund, P. T.: The 3'-terminal nucleotide sequences of T7 DNA. *J. Mol. Biol.* **66**, 209-224 (1972).
34. Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroki, K., Saito, I., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y., Uesugi, S., Fujinaga, K.: Structure and gene organization in the transforming HindIII-G fragment of Ad12. *Cell* **20**, 777-786 (1980).
35. Maxam, A. M., and Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560-564 (1977).
36. Kimura, T., Sawada, Y., Uesugi, S., and Fujinaga, K.: Cleavage maps of adenovirus type 12 transforming segment by restriction endonucleases AccI, HaeIII, Hhal, HindII, Hinfl and HphI. *Tumor Res.* **15**, 44-55 (1980).
37. Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517 (1975).
38. Zieve, G., and Penman, S. H.: Small RNA species of the HeLa cell; metabolism and subcellular localization. *Cell* **8**, 19-31 (1976).
39. Sawada, Y., and Fujinaga, K.: Mapping of adenovirus 12 mRNAs transcribed from the transforming region. *J. Virol.* **6**, 639-651 (1980).
40. Rave, N., Crkvenjakov, R., and Boediker, H.: Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzylmethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acid Res.* **6**, 3559-3567 (1979).
41. Thomas, P. S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5201-5205 (1980).
42. Gallimore, P. H., and Paraskeva, C.: A study to determine the reasons for differences in the tumorigenicity of rat cell lines transformed by adenovirus 2 and adenovirus 12. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 703-713 (1980).

---

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 奈良祐次