

ヒトアデノウイルス 12 型のトランスホーム遺伝子を含む 初期遺伝子領域 E1B の一次構造とその解析

木村 貴生

札幌医科大学がん研究所分子生物部門 (主任 藤永 蕙 教授)

Structure and Sequence Analysis of the Transforming Region E1B of Human Adenovirus Type 12

Takao KIMURA

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

The nucleotide sequence of the leftmost 4.5–11.2% of the highly oncogenic human adenovirus type 12(Ad12) DNA has been determined. This part of the Ad12 viral genome encompasses the transforming early region E1B. From the sequence of the E1B region and the structure of the E1B mRNAs, the gene organization of the E1B region of Ad12 was analyzed and compared with those of the E1B regions in other adenovirus serotypes. The results obtained are as follows:

- 1) The organization of the E1B regions of Ad12, Ad7 and Ad5 DNA is quite similar.
 - 2) Most of the sequences in the E1B region of Ad12 are highly homologous to that of other adenovirus serotypes.
 - 3) It is predicted that the Ad12 region E1B codes for polypeptides of 53.9, 19.1 and 11.6 kd. This situation is very similar to that of other adenovirus serotypes. On the basis of cell transformation experiments, it is suggested that in addition to the E1A polypeptides the 19.1kd polypeptide plays some role(s) of importance in establishing the complete transformation of cells.
 - 4) The predicted polypeptides encoded by the E1B regions of the three serotypes exhibit a large degree of homology in the amino acid sequence level.
 - 5) The possibility exists that a single mRNA encodes for two kinds of polypeptides, depending on which protein synthesis can be initiated at either the first or the second AUG triplet available in mRNA.
- (Received January 14, 1983 and accepted January 31, 1983)

Key words: Adenovirus transforming gene, Adenovirus E1 sequence, Adenovirus type 12

1 緒 言

ヒトアデノウイルス (Ad) は、真核細胞を場とする遺伝子発現のモデルとして、またウイルスによる発癌のモデルとして、これまで詳細に研究されて来た¹⁻³⁾。

ヒトアデノウイルス群は、現在までに少なくとも 37 の血清型が確認されている。そのうち比較的良好な性質の調べられている 31 の血清型は、ウイルス遺伝子 DNA の塩基配列の相同性から A-E の 5 亜群に分けられる⁴⁾。この分類は、ハムスター胎児に対する造腫瘍活性の程

度とよく対応している。A 亜群 (Ad12 など) は強発癌性で、短期間に高頻度で腫瘍を誘発する¹⁻³⁾。B 亜群 (Ad7 など) は弱発癌性で、腫瘍誘発までに長期間を要し、その頻度も低い¹⁻³⁾。C 亜群 (Ad2, Ad5 など)、D 亜群 (Ad8 など)、E 亜群 (Ad4) は非発癌性である¹⁻³⁾。これらいずれの亜群も *in vitro* 系においては、ハムスターやラットの培養細胞をトランスホームすることができる¹⁻³⁾。

近年、リン酸カルシウム法の開発によって、ウイルス DNA 断片を用いて齧歯動物の培養細胞をトランス

ホームさせることができるようになった。その結果、アデノウイルス DNA における発癌遺伝子の位置づけが容易になり、ヒトアデノウイルスの発癌遺伝子はウイルス DNA 分子の左端に存在することが明らかになった。すなわち、Ad12 DNA の *EcoRI*-C 断片 (左端 16.2%)⁵⁾ や *HindIII*-G 断片 (左端 6.8%)⁶⁾, Ad7 DNA の *HindIII*-I 断片 (左端 7.8%)⁷⁾, Ad2 および Ad5 DNA の *HindIII*-G 断片 (左端 7.5%)⁸⁾ だけでラット培養細胞を完全にトランスホームできる。また、Ad12 DNA の *AccI*-H 断片 (左端 4.7%)⁹⁾, Ad7 DNA の *BglII*-H 断片 (左端 4.5%)¹⁰⁾ および Ad5 DNA の *HpaI*-E 断片 (左端 4.3%)¹¹⁾ では典型的トランスホーム細胞は得られず、誘発細胞はトランスホーム細胞と正常細胞との中間の性質を示すことが知られている。

アデノウイルスは、感染初期において少なくとも五つの領域 (初期領域 EL, E1, E2, E3, E4) から mRNA の転写がはじまる¹⁻³⁾。ウイルスゲノムの左端に位置する E1 (0-11.2%) は、さらに E1A (0-4.5%) と E1B (4.5-11.2%) の二つの領域に分けられ、それぞれ独自の転写プロモーターをもっている¹⁻³⁾。これらのことから、アデノウイルスのトランスホーム活性が、基本的には初期領域 E1 の機能に依存していること、そして細胞を完全にトランスホームするためには、E1A 領域に加えて E1B 領域の一部の遺伝子の発現が必要であることが示唆された。

本論文では、強発癌性 A 亜群に属する Ad12 の発癌遺伝子を含む E1B 全領域の塩基配列を決定し、そこに含まれる遺伝情報を解析した。その結果、決定された塩基配列と S1 マッピング法やクローニング法によって明らかにされた mRNA の構造から、我々は転写される mRNA を鋳型 DNA 上に位置づけ、コードする各遺伝子産物のアミノ酸配列を推定することが可能になった。さらにこれらの結果を、最近相次いで決定された弱発癌性 B 亜群の Ad7¹²⁾ や非発癌性 C 亜群の Ad5^{13,14)} の E1B 領域の解析結果と比較検討してみた。

2 実験材料と方法

2.1 ウイルス DNA と DNA 断片の調製

Ad12 DNA は、Green and Pina^{15,16)} の方法により Ad12 感染 KBIII 細胞よりウイルス粒子を精製し、精製ウイルス粒子より DNA を抽出した。Ad12 DNA *HindIII*-G, -I, -F 断片および *AccI*-J, -F 断片は、Ad12 DNA をそれぞれ *HindIII*, *AccI* で 1 μ g 当り 2 単位を用いて切断し、1.4% アガロースゲルで電

気泳動することによって各断片を分離した。分離した DNA 断片を含むアガロースをトリス緩衝液 (0.1% SDS, 1mM EDTA 含む) 中でホモジナイズし 37°C で 12 時間振盪後フェノール抽出により精製した。

2.2 制限酵素および試薬類

HindIII は Takanami and Kojo¹⁷⁾ の方法および Lai and Nathans¹⁸⁾ の方法、*HphI* は Kleid *et al.*¹⁹⁾ の方法によって抽出精製した。*HaeIII*, *HhaI*, *HinfI* は高浪満博士 (京都大学, 化学研究所) より分与を受けた。*AccI*, *Sau 3 A*, *TaqI* は Boehringer Mannheim Corp., *AluI* は Takara Shuzo Co. Ltd., *XbaI* は New England Biolabs, Inc. の市販のものを使用した。T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (PNKase) とアルカリホスファターゼ (APase) は、Worthington Biochemicals Corp. より購入した。[γ -³²P] ATP は New England Nuclear 製のものを利用した。アクリルアミドと尿素は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 製品、ジメチル硫酸とヒドラジン は Eastman Chemicals 製品、ピペリジン は Nakarai Chemicals, Ltd. 製品を使用した。

2.3 塩基配列決定法

Ad12 DNA *HindIII*-G, -I, -F 断片および *AccI*-J, -F 断片は、適当な制限酵素でさらに切断し、5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で各 DNA 断片を分離した。分離精製した DNA 断片は APase で処理し 5'-ホスフェイト基をはずした後、[γ -³²P] ATP と T4-PNKase を用いて 5'末端を標識した。その後、別の適当な制限酵素で切断することによって、一端だけが標識された DNA 断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動から分離精製した。このように調製した DNA を四等分して、Maxam-Gilbert²⁰⁾ の方法に従い、四つの塩基に対応した異なる条件下 (塩基に対する特異性: G, C, T+C, A>C) で化学修飾反応を行なった。このようにして得られた最終試料を、7M 尿素を含む 23%, 10%, 8% ポリアクリルアミドゲル (厚さ: 0.5 mm) 電気泳動にかけ、泳動後 -70°C のフリーザー中でオートラジオグラフィを行なった。

3 実験成績

3.1 Ad12 E1B 領域の塩基配列

塩基配列の分析を進めるにあたって、Ad12 DNA E1B 領域の制限酵素による簡単な切断点地図を前もって作成しておいた²¹⁾ (Fig. 1)。これをもとに、各 DNA 断片の 5'末端から塩基配列を決定して行き、順次一次構造がわかるにつれ、各種制限酵素の切断点が明らか

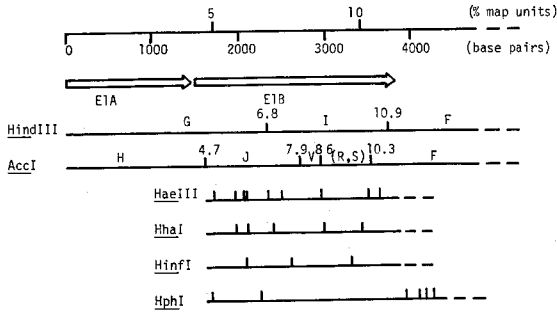


Fig. 1 Physical maps for restriction endonuclease cleavage sites in the left end of Ad12 DNA

Letters between cleavage sites show the nomenclature of the restriction fragments. The coordinates of the transcription units in this region are indicated by thick bars.

になり、塩基配列を分析するために好都合な制限酵素の組み合わせを選ぶことができた。Ad12 DNA *HindIII* -G, -I, -F 断片および *AccI*-J, -F 断片を Fig. 2 に示す各種制限酵素で適当に組み合わせて、一端だけ標

識された DNA 断片をつくり Maxam-Gilbert²⁰⁾法によって塩基配列を決定した。E1B 領域の制限酵素切断点地図上に、切断点の 5'末端から塩基配列の決定された範囲を示した (Fig. 2)。

この分析方法においては、一方の DNA 鎖において確認された A (アデニン) が、その相補鎖の対応する位置において T (チミン) として確認できない場合が数カ所で認められた。Ad12 DNA の塩基配列は、Sugisaki *et al.*²²⁾によって左端 6.8%まで明らかにされているが、一方の DNA 鎖だけ分析し、その相補鎖側では確認していない領域が相当残っている。このため、本実験においては、Sugisaki *et al.*²²⁾によって既に明らかにされた *HindIII*-G (0-6.8%) 部分を含め、E1B 領域を可能な限り DNA の両方鎖から塩基配列を決定していった。その結果、*l* 鎖において 1,574 番目、*r* 鎖において 2,073 番目の位置に A が存在することを確認した。

本研究において分析した Ad12 DNA の塩基配列は E1B 領域 (4.5-11.2%) を完全に含んでいる (Fig. 3)。

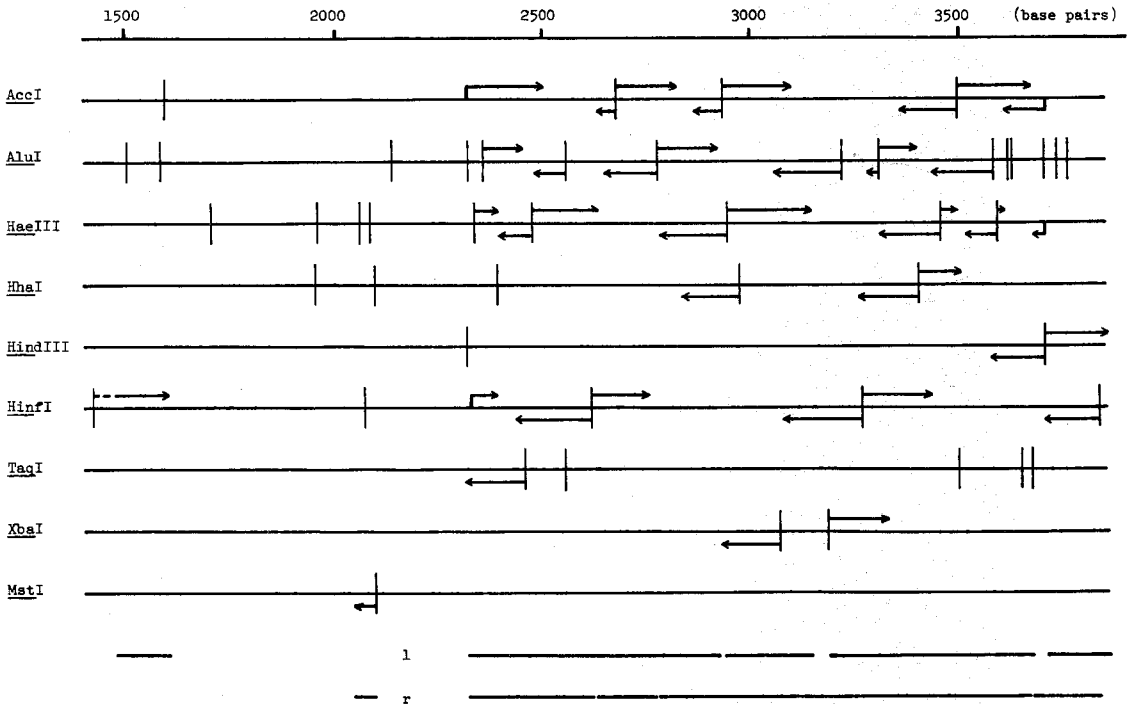


Fig. 2 Fine cleavage maps of Ad12 DNA in the E1B region and sequenced regions

Cleavage sites by restriction endonucleases are illustrated by vertical lines. Arrows indicate the direction of sequencing, and the solid line in each arrow denotes the region in which the sequence was determined. At the bottom of this figure are shown which parts of both strands (*l* and *r*) have been sequenced.

Ad 5	CTTAAAGGGTATAATAATGCGCCGTGGGGTAAATCTTGGTTA---CATCGACCT-----CATCGAGGCTTGGGAGTGTTTGGAAAG	1738
Ad 7	GGTCTTGGATATAAGTAGGAGCAGATCTGTGT-GGTT-AGCPCACAGCAACTTGCCTGCCATCCATCGAGGTTTGGGCTATCTTGGAAAG	1626
Ad 12	TTAAACAGGGATATAAGTGGGTGGTGTGGCTTTGAAATGATTCATCTTAG-T-----A-ATGGAGTTTGGAAACGTGCTGCAAA	1565
	"ATA box" mRNA E1B 5'end init 19.1kd	
	ATTTTTCTGCTGTGGCTAACTTGTCTGGAAACAGAGCTTAACAGTACCTTGGTTTTGGAGGTTTCTGTGGGCTCATCCAGGCAAAAGT	1828
	ACCTCAGACAGACTAGCTACTACTAGAAAACGCCTCGGACGGAGTCTCTGGCCCTTGGAGATTCTGGTTCTGGTGGTATCTAGCTAGGC	1716
	GTTTTACAGAGCGTTCGCCAGCTCTTGCAGGTACCTCTAAAACACTTACAGGTTTTTGGAGGTATCTGTTTGGCTCTACCTTAAGCAAGG	1655
	TAGTCTGCAGAAATTAAGGAGGATTACAAGTGGGAATTTGAAGAGCTTTTGAATCCTGTGGTGGAGCTGTTTGATCTTGAATCTGGGTC	1918
	ATCAGGCTCATTTTAAAGGAGAGGTTTATCATAGTTTTAGATTTTTTCTACTCTGTGGTAGAACTGTCTGCTGCTGATGTTTTCTTACTTTTA	1806
	TGGTAAATAGGGTAAAGAAGACTATAGAGAGGAATTTGAAAACATATTTGGCCGACTGCTCCAGGGCTTTTGGCTCAGTACTGTTGTT	1745
	ACCAGGCGCTTTCCAAAGAGAAGGTTCATCAAGACTTTGGATTTCACACACCGGGGCCGCTGTGGCTGCTGCTGTCTTTTGGTTTTAGTTTTTA	2008
	ATCAGGCTCATTTTAAAGGAGAGGTTTATCATAGTTTTAGATTTTTTCTACTCTGTGGTAGAACTGTCTGCTGCTGATGTTTTCTTACTTTTA	1896
	ACCAGCTGGTGTTCAGGAAAAAGTGGTCAGATCCTTAGATTTTTCTACTCTGTGGACGAAACGTTGTCTGCTGATTTTGGTTGGCAACCA	1835
	ribosome binding site	
	TAAAGGATAAATGAGGAGGAAGAACCCATCTGGCGGGGGTACTGCTGGATTCTTGGCCATGCATCTGTGGAGAGCGGTTGTGAGAC	2098
	TATTTGGATAAATGATCCGCCAACTCACTTCAAGAGGATACGTTTTGGATTTCATAGCAGGAGCTTTGTGGAGAACATGGAAGGCTC	1986
	TATTTGGATAAATGAGGAGGAAGCCACCTGAGTTGGATTACATGCTGGATTACATGCAATGCAGCTGTGGAGGGCATGGCTGAAGA	1925
	init 53.9kd, 11.6kd	
	ACAAGATCCTGCTACTGTTGTCTCTC---CGTCCGCCCCGGGATA---ATACCGACGGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAAGCCA	2182
	CGAGGATGAGGCAAACTTAGATTTACTGGCCAGTGCAGCCTCTGGGA--G-TAGCAGGG--AT-A-CTGAGACACCACGACCATGCCAG	2070
	GGAGGGTTTGCATTTACTCTGCTGGCGCGCCCTTG-A-CC-ATGCGCCCGTGGCCAGC--T---TG-----TG-----	1984
	GGCGCGCGCGGAGGAGCAGAGCCC--AT-GGAACCCGAGAGCGCGCTTGGACCCCTCGGGAATGATGTTGTCACAGCTGGCTGAAGCTGTA	2269
	CGGTTCTCAGGAGGAGCAGCAGGAGGA-C--AATCCGAGAGCGCGCCTGGACCCCTCCGGT-----GGAGAGTAGCTGACCTGTT	2148
	-----CAAGAGGAGAAGGAGGAGGAGCGGAACCT--GCGTGGTGGAGAGTAACAATGGAA--CAACAGCTGCAAGAAGGCCA	2060
	term 19.lkd splice donor 1(DI)	
	TCCAGAACTGAGACGCATTTTGCACAAAT---ACAGAGGATGGCGAGGGGCTAAGGGGGTAAAGGGGGAGCGGGGGCTTGTGAGGCTAC	2356
	TCCGTAACCTCTACCGCTGCTTACTAGT---CTACGACAGTGGACAGAACAGGGGAATTAAGAGGGAGAGGAATCTAGTGGGAATAA	2235
	TGTACTTGAAGCGTGGCGAAGGGCTAGTTGCGCAGATGATAGAGAT-----AAGCAGGAAAAAAAGAA---AGTTTTAAAGGAAGCTGC	2141
	AGAGGAGGCTAGGAATCTAGCTTTTGTGTTAATGACCAGACACCCCTCTGAGTGTATTACTTTTCAACAGATCAAGGATAATTTGGCTAA	2446
	TTCAGAACCCGAG---TTGGCTTTAAGTTTAAATGAGCCG CAGGCTTCTGAACCTGTTTTGGTGGCATGAGGTTTCAGAGCGAAGCCAGGGA	2322
	TGTTCTTAGTAGG---CTAACTGTTAATCTGATGCTCCCGCCCGCTTTGGAAACTGTATATTGGCAGGAGTTCAGGATGAATTTACAGG	2228
	TGAGCTTGATCTGCTGGCGAGAAAGTATTCATAGAGCAGCTGACCACTTACTGGCTGCAGCCAGGGGATGATTTTGGAGGCGTATTAG	2536
	TGAATTTCAATATTGCAGGAGAAATATTCCTACTAGAACAACCTTAAGACCCTGTGGTTGGAACTGAGGATGATTTGGGAGTTGGCCATTAG	2412
	GGGTGATATGCATTTACAGTACAATAACAGTTTTTGAACAATAAAAACCCACTGGTTAGAGCCATGGGAGGATATGAGGTGTGCTATTAA	2318
	GGTATATGCAAAAGTGGCAGCTTAGGCCAGATGCAAGTACAAGATCAGCAAACTTGAATAATTCAGGAATTTGTGCTACATATTCGGGAA	2626
	GAATTAATGCTAAGATATCTTGAAGCCCTGAGGCCTGAACAAATAGAAATTAAGAACTTAATAATTAGAAATGCTATGCATAGAGGAA	2502
	AGCTTTTGTCAAATTTGGCTTACGTTCTGATTGTAGTACAGAACTTAAACAGTAACCACTTACTCTCATGCCCTATATTATAGGTTAA	2408
	CGGGCCCGAGCTGGAGATAGATACGGAGCATAGGGTGGCCCTTTAGATGTAGCATGATAAATATGTGGCCGGGGGCTTTGGCATGGACGG	2716
	TGGGGCAATGGTTATATAAGATACACAAGATAAAGCAGCTTTTGTAGATTTGTATGATGGGATGTTGGCCAGGGGTTGTCGGCATGGAAGC	2592
	CGGGCCAGAAGTTGAGGTAGATACAAGCGACAGAGTGTCTTTTGTAGATGTGAAATGCAGGGTATGGGCCAGGGGGTGGTGGTGGTATGG	2498
	GGTGGTTATTGAATGTAAGTTTTACTGGCCCAATTTAGCCGTACGGTTTTTCTGGCCAAATACCAACCTTATCCTACCGGTGTAAAG	2806
	AATAACACTTATGAATATAGGTTTGTAGAGGGATGGGTATAATGGCATTGTATTATGGCTAACACATAAGCTGATTTCTACATGGTGTAG	2682
	AATTACATTTATAAATGTTAGTTTGTCTGGAGATAAGTTTAAAGGCATATTGTTCGAGGCTAATACTGTCTTGTCTTGCATGGTGTTTA	2588
	CTTCTATGGGTTTAAACATACCTCTGGGAAAGCTGTGACCGATGTAAGGGTTTGGGGCTTCTTACTGCTGTGAAAGGGGGTGGT	2896
	CTTTTTTGGTATAATAACCTGTGTAGAGCTTGGGGCAAGTTAGTGTGAGGGGTTGTAGTTTTTATGATGCTGGATTGCAACATC	2772
	CTTTCTTAACTTTAGTAACTTTGTGTAGAGTCTTGGAAATAAGGTTTTGCTGTAGGGGCTGTACTTTTTTATGATGTTGGAAGGGTTTGGT	2678
	GTGTCGCCCCAAAAGCAGGGCTCAATTAAGAAATGCCTCTTGAAGGTTTACCTTGGGTTACCTGTCTGAGGGTAACTCAGGGTTGCC	2986
	AGTTAGGGTGAAGAGTCACTTGTCTGTAAGAAATGCATGTTTTGAGAGATGATAACTTGGCTTAATTTGTAAGGTTAAGCAAGGATGCTCCG	2862
	GGGTAGACAAAAGTAAACTGTCTGTAAAAAGTGTTTGTTGAAAATGTGTACTTGTCTATACGTAATGAGGGGATGCACATATTAG	2768
	CCACAATGTTGGCTCCTCGCTGTGTTCTTCACTGCTAGTGAAGAGCCTGTGCTGATTAAAGCATAAATGGTATCTGGCAACTGCGAGGA	3076
	CCACTGCGCAGCTCAGAAAACCTGCTGCTTCACTTCAATAAAGGAAATGCCAGTGTGAAGCATAAATGATCTGTGGACATTCGGATGA	2952
	GCATAATGCGACTTCAGAAAATGCTGTTTTGTATTATTGAAGGAAATGGCTATTTAAAGCATAAATAGGTTTGTGGGGTGTCTGATCA	2858
	CAGGGCTTACAGATGCTGACCTGTGGAGCGCAACTGTACCTGTGAAGACCATTACGTAAGCCAGCCACTCTCGCAAGGCGCTGGCC	3166
	GAGCGCTTACAGATGCTAACTGCGTGTGTGCACATGTCAATATTTCTGCTACCTGTCATATCCTTTCAATGCACCGCAAGAATAAGGCC	3042
	AACATGCGCAGCTTTGTTACTGTGTGATGGAAATTTGATACCTTAAAACCTTTGATATTGTGTAGCCACAGTAGACATTTGTGGCC	2948
	AGTGTGTGACATAACACTGACCCGCTGTCTTCTTCATTTGGGTAACAGGAGGGGGTGTTCCTACCTTTACCATGCAATTTGAGTCA	3256
	TGTAATTTGAACATAATGTGATTTACCAAGTACCATTGCATATAGGTGGTCGACGGGAATGTTTATGCTTTACCACTGTAACATGTAATCA	3132
	TGTATGTGATCATAACATGTTTATGCGCTGTACCATACATTTAGGCTTAAGGGGGGTATGTTTAGACCTTCCCAATGTAACATTCAGCCA	3038

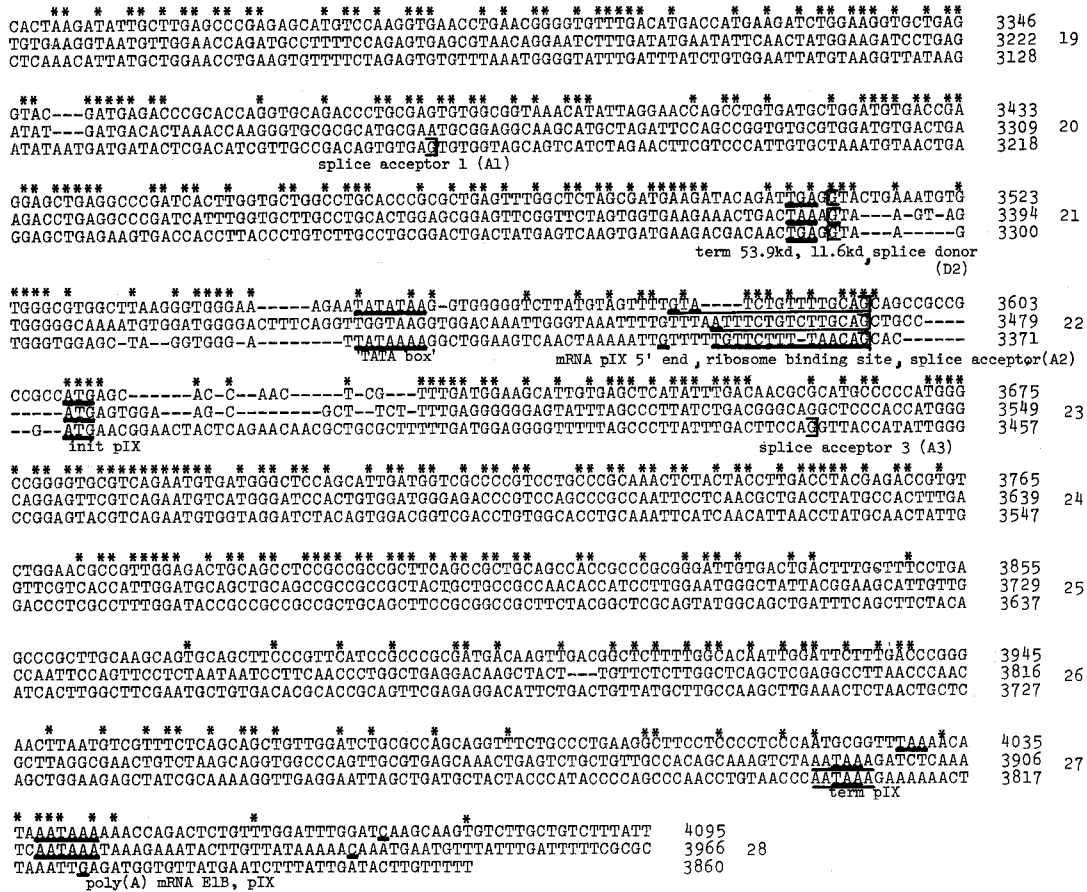


Fig. 3 The nucleotide sequence of the *l*-strand of the region E1B of Ad12, Ad7 and Ad5

The DNA sequences (upper row Ad5, middle row Ad7, bottom row Ad12) of the E1B regions of Ad12, Ad7 and Ad5 aligned to give maximum homology. The dashes (—) are the result of manipulating the sequences so as to obtain maximum homology. The asterisks above the top row indicate positions where there are common nucleotides between the three strains. We have underlined 'TATA boxes', the 5' ends of the mRNAs, strategic ribosome binding sites, postulated initiation and termination codons, the polyadenylation sites of the mRNAs and the sequence AATAAA. The splice sites of the messengers in which they occur are indicated by brackets.

決定した E1B 領域の *l* 鎖の塩基配列を Fig. 3 に示した。E1B 領域から転写される mRNA は *l* 鎖を鋳型とし、結果として *l* 鎖と同じ極性を持つ。

3.2 Ad12 E1B 領域の遺伝情報の解析

3.2.1 翻訳停止信号のない領域

3 個の塩基が 1 個のアミノ酸を規定するから、DNA 塩基配列上には可能な三通りの読み取り枠 (reading frame) が考えられる。Fig. 4A に三通りの読み取り枠上に翻訳停止信号の位置を示した。frame 1 には 1,843 番目-3,292 番目と 3,292 番目-3,805 番目の 2 カ所に、停止信号のない大きく開いた領域 (open frame)

が存在している。また、frame 2 には 1,526 番目-2,030 番目に open frame があるが、frame 3 には存在しない。

3.2.2 mRNA の転写地図

Ad12 の E1B 領域における mRNA の転写地図は、Sawada and Fujinaga²³⁾によりヌクレアーゼ S1 マップ法によって既に作られているが、ごく最近、Virtanen *et al.*²⁴⁾ は mRNA の相補 DNA (cDNA) をつくり、その塩基配列を決定することによってスプライスやポリ (A) 付加部位の正確な位置を決定した。Fig. 4B にその結果をまとめた。E1B 領域からは、転写開始点とポリ

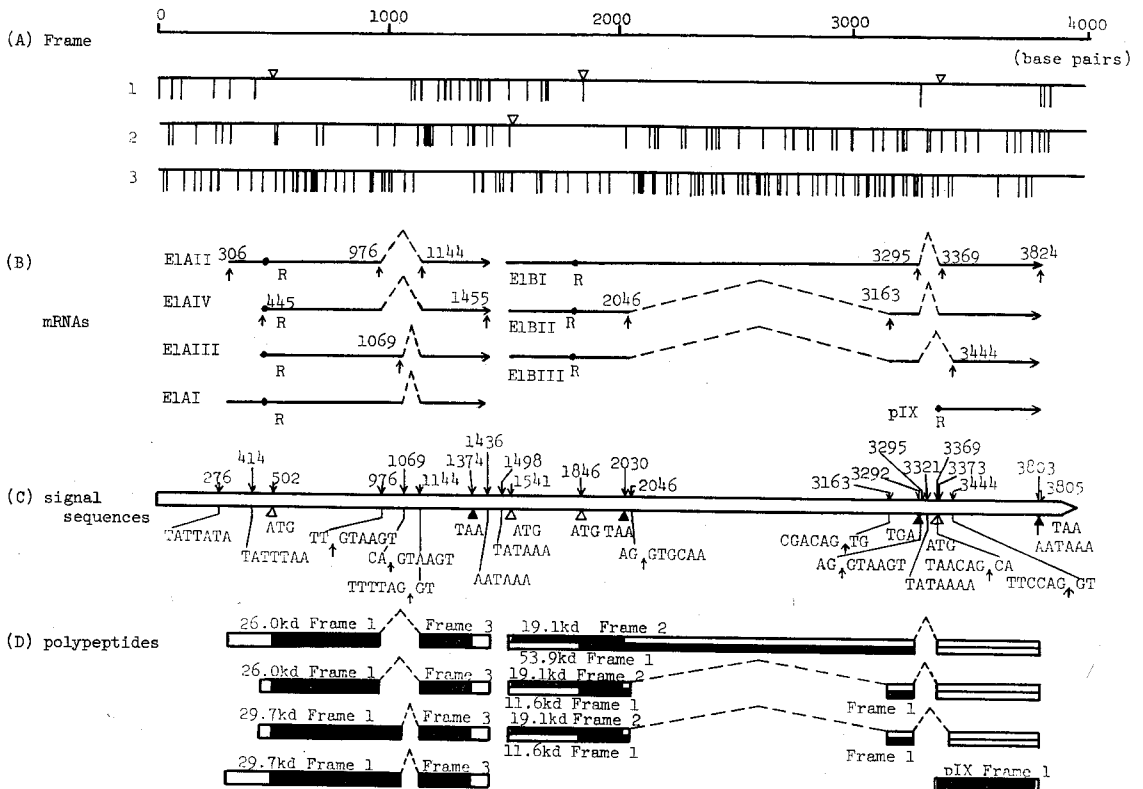


Fig. 4 Diagrams of the transcription map and predicted coding regions in the early region E1 of Ad12

- (A) The occurrence of termination codons in a left to right direction. The nonsense codons (TAA, TAG, TGA) in the *l*-strand of the E1B region of Ad12 DNA are arranged according to each of three possible reading frames, and indicated by vertical lines. In the long stop codon-free stretches inverse triangles indicate the suspected initiation codons (ATG).
- (B) The transcription map deduced by the nuclease S1-mapping method and cDNA clones of E1 mRNAs. mRNA species identified are numbered I to IV, and indicated by lines below the corresponding early regions E1A and E1B. The continuous lines represent the areas found to anneal to mRNA, and the interrupted lines are the intron sequences. Numbers above the lines represent the nucleotide positions of each mRNA. The dots marked R indicate the potential ribosome binding sites.
- (C) Signal sequences in the early region E1 of Ad12 DNA. Numbers above the line represent nucleotide positions of assigned initiation and termination codons (open and filled triangles), splices and signal sequences for transcription start and stop. These sequences are also shown below the line. Numbers above the donor and acceptor sequences for splices indicate positions of the end nucleotides of the exons.
- (D) Predicted coding regions on each mRNA. The assigned coding regions are indicated by full or half-filled lines in the regions corresponding to mRNA E1B I and the mRNA E1B II, III, which can code for 53.9kd and/or 19.1kd and 19.1kd and/or 11.6kd polypeptides, respectively. Their estimated molecular weights and coding frame numbers are also shown near full and half-filled lines.

(A) 付加部位が共通で、スプライス構造の異なる3種のmRNA E1BI, II, IIIと、これら3種のmRNAとは転写開始点が異なり、スプライス構造のないウイルス粒子構成蛋白質IX (pIX) のmRNAの全部で4種のmRNAが転写する。

3・2・3 遺伝情報のシグナル配列

近年、いくつかの真核細胞のmRNAの転写開始点付近、スプライス部位、ポリ(A)付加部位付近に、それぞれ特徴のある塩基配列(シグナル配列)が存在することがわかってきた。要約すると鋳型DNA上には、①

mRNA のキャップ部位 (cap site, 5'末端) の上流約 30 塩基に, TAT (A, T) n で代表される 'TATA box'²⁵⁾ (Goldberg-Hogness box), ②スプライスの連結部位には 'Chambon 則'²⁶⁾に従って, 介在配列の 5'末端は GT, 3'末端は AG となり, ドナー部位 (5'側) が /GTAAGT, アクセプター部位 (3'側) が PyPyXPyAG/ (Py:ピリミジン, X:ピリミジンあるいはプリン) で代表される塩基配列²⁷⁾, ③mRNA のポリ (A) 付加部位より 10-30 塩基上流に AATAAA が, それぞれ見いだされる²⁸⁻³⁰⁾.

ウイルス遺伝子 DNA の塩基配列と mRNA の転写地図から, これらのシグナル配列を鋳型 DNA 上に位置づけることが可能になり, Fig. 4C にそれをまとめた. 転写開始点の約 30 塩基上流に 'TATA box' が存在していて, mRNA E1B I, II, III の場合, 1,498 番目に TATAAA, mRNA pIX の場合, 3,321 番目に TATAAAA が見出される. また 4 種の mRNA において, 共通のポリ (A) 付加部位の上流, 3,803 番目に AATAAA が存在する. E1B 領域において, スプライスのドナー部位は 2 カ所あって, 2,046 番目に AG/GTGCAA, 3,295 番目に AG/GTAAGT が, またアクセプター部位は 3 カ所あって, 3,163 番目に CGACAG/TG, 3,369 番目に TAACAG/CA, 3,444 番目に TTCCAG/GT の 3 種が認められる. また, Fig. 4C には各 open frame 上存在する最初の翻訳開始信号 (ATG) の位置も示した.

3.2.4 蛋白質をコードしうる領域

塩基配列の解析から open frame の大きさが明らかになり (Fig. 4A), 鋳型 DNA 上に mRNA が位置づけられた (Fig. 4B). Fig. 4C に示した open frame 上の最初の ATG だけが蛋白質の翻訳開始に利用されていると仮定すると, 以上の結果から各 mRNA 上にコード可能な蛋白質のアミノ酸配列を推定することができる.

mRNA E1B I, II, III の 3 種は共通して frame 2 の open frame を使い, 1,541 番目の ATG で始まり, 2,030 番目の TAA で終る 163 個のアミノ酸からなる分子量 19,103 (19.1 kd, kd:キロダルトン) の蛋白質をコードしうる. また, mRNA E1B I は frame 1 の 1,846 番目の ATG で始まり, 3,292 番目の TGA で終る open frame を使って, 482 個のアミノ酸からなる分子量 53,870 (53.9 kd) の蛋白質をコードしうる. 一方, mRNA E1B II, III も frame 1 の open frame を使い, 1,846 番目の ATG で始まり, 2,046 番目-3,163 番目までをスプライスによって除外し, 3,292 番目の TGA で終る 110 個のアミノ酸からなる分子量 11,611 (11.6

kd) の蛋白質をコードしうる. したがって, この 11.6 kd の蛋白質は, スプライスをはさんで N 末端側, C 末端側とも 53.8 kd の蛋白質と同じアミノ酸配列である. pIX の mRNA は, frame 1 の open frame を使って, 3,373 番目の ATG で始まり, 3,805 番目の TAA で終る 144 個のアミノ酸からなる分子量 15,000 の蛋白質をコードできる. Fig. 4D に, これら蛋白質をコードしうる領域を mRNA 上に示した.

これら Ad12 E1B 領域の遺伝情報の解析結果は, 最近相次いで決定された弱発癌性 B 亜群 Ad7¹²⁾, 非発癌性 C 亜群 Ad5^{13,14)} の E1B 領域の解析結果と比較検討することができるようになった.

3.3 Ad12, Ad7, Ad5 の E1B 領域の遺伝子構成の比較

Ad12, Ad7, Ad5 の E1A 領域の遺伝子構成が互いによく似ていることは, 既に報告されている³¹⁾. 塩基配列を精密に調べるに先だち, E1B 領域の遺伝子構成を比較してみた.

Fig. 5 に, Ad12, Ad7, Ad5 の E1B 領域の open frame の利用と mRNA の転写の様相をまとめた. この領域から転写される mRNA を比較してみると, Ad5 には Ad7, Ad12 にみられる二回スプライスした構造の mRNA は認められない. 一方, Ad12 には Ad5, Ad7 にみられる一回だけ大きくスプライスした構造の mRNA が検出されていない. 以上のことを除いて, 転写される mRNA は三つの血清型間においてよく似ており, Ad7 は Ad5 と Ad12 の中間的存在である. 同様に, reading frame 上に存在する open frame の相対的位置や大きさ, スプライスによる利用のされ方も, 三者間で類似していることがわかる. なお, Ad7 の二回スプライス構造の mRNA において, 大きい方のスプライスのアクセプター部位 (A1) の正確な位置がまだ決定されていないので, この mRNA にコードしうる 21 kd 以外のもうひとつの蛋白質の分子量およびアミノ酸配列を推定することはまだできない.

3.4 Ad12, Ad7, Ad5 の E1B 領域の塩基配列の比較

Ad12, Ad7, Ad5 の E1B 領域の塩基配列を比較するため, Fig. 3 にこれらの塩基配列を並べ, 三者の血清型間で相同性 (ホモロジー) を示す塩基配列を検索した. もし, Ad 12, Ad7, Ad5 の三者の塩基配列がまったく有意の関係がないランダムな配列であるならば, ある与えられた位置の塩基が三者間でまったく同じである確率は, 6.25% である. また, 三者のうち二つの血清型間だけが同じである確率は 52.25% であり, 三者がすべて違う塩基である確率は 37.5% である.

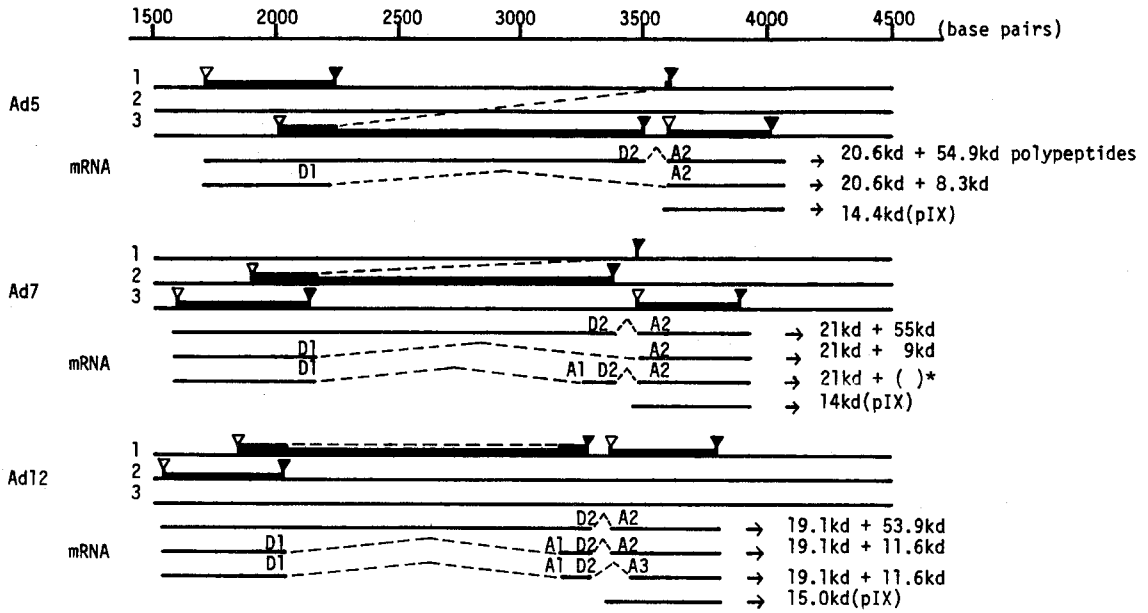


Fig. 5 The coding areas in the E1B regions of Ad12, Ad7 and Ad5

The thick lines in three plausible frames indicate the predicted coding regions for polypeptides. The E1B mRNAs encoded by Ad12, Ad7 and Ad5 are represented by the continuous lines. The mRNA splicings are also shown by the broken lines which connect the regions composing mRNAs and coding for polypeptides. The different acceptor (A) and donor (D) sites used to splice E1B mRNAs are indicated.

* Since the correct location of the first splice acceptor site of this mRNA has not been determined yet, we were not able to compute the molecular weight of the polypeptide encoded by this mRNA except the 21 kd polypeptide.

既に報告されている E1A 領域の場合、三つの血清型間でホモロジーの高い領域が、非相同領域の間にはさんで、E1A 領域 6 カ所に散在している²⁹⁾。この非相同領域には、対応して並べる塩基配列が欠損しているため、ダッシュ (—) を挿入しなければならない配列部分(欠損配列)がかなり含まれている。この結果、E1A 領域全体を通して、Ad12, Ad7, Ad5 の三者間で塩基が完全に一致する率は 36.9% と高い値を示すが、一方まったく一致しない率も 36.9% とランダムな配列と有意差のない値をとる。これに比べ、E1B 領域の場合、三つの血清型間でホモロジーの高い領域が全体を通じ広範に認められ、欠損配列部分を含む比較的低ホモロジーの低い領域は、Fig. 3 の 6-9 列目と 22-23 列目前半にみられる程度である。したがって、E1B 領域全体を通して、Ad12, Ad7, Ad5 の三者間で塩基が完全に一致する率は 41.3% にも達し、偶然の確率 6.25% をはるかに越えている。同様に、まったく一致しない率も 16.1% と有意に低い値である。

Fig. 3 の 1-5 列目は、1 列目に少し欠損配列が認められるが、ホモロジーの高い領域である。1 列目に、E1B

mRNA の 'TATA box,' キャップ部位、E1B 蛋白質 19.1-21 kd の翻訳開始信号 ATG がコードされている。この 1 列目の ATG から 5 列目までの領域は、E1B 蛋白質 19.1-21 kd の N 末端側 70% 以上にも及んでいる。5 列目には E1B 蛋白質 53.9-55 kd の ATG が存在し、この蛋白質の N 末端をコードしている。この 53.9-55 kd の ATG の前、4 列目にリボソーム 18 SRNA の 3' 末端と二本鎖を形成できる塩基配列部位 (ribosome binding site)³²⁾ が認められる。Fig. 3 の 6-9 列目は比較的低ホモロジーの低い領域で、欠損配列部位を含み、特に Ad12 に多く認められる。7 列目に 19.1-21 kd の翻訳停止信号がコードされており、Ad12 と Ad5 ではこの直後に、大きなスプライスのドナー部位 (第 1 ドナー部位 : D1) が存在している。Ad7 では、少し下流の 8 列目に認められる。この 6-9 列目は、19.1-21 kd の C 端側、および 53.9-55 kd の N 端側をコードしている。Fig. 3 の 10-21 列目までは、ホモロジーの高い領域で、21 列目に 53.9-55 kd の停止信号が認められ、この蛋白質の C 端側の約 70% を占めている。この停止信号の上流、20 列目に Ad12 の大きな

スプライスのアクセプター部位 (第 1 アクセプター部位: A1) が認められ, 停止信号の直後には, 小さなスプライスのドナー部位 (第 2 ドナー部位: D2) が存在している. Fig. 3 の 22-23 列目前半までは, やはり欠損配列部分の多い, 比較的ホモロジーの低い領域である. 22 列目には, pIX mRNA の 'TATA box', リボソーム結合部位, キャップ部位, そして E1B mRNA の小さなスプライスのアクセプター部位 (第 2 アクセプター部位: A2) が認められる. また 23 列前半には, pIX の ATG が三者間で保存されてコードされている. Fig. 3 の 23 列後半-28 列目までは, pIX をコードしていてホモロジーの高い領域で, 特に前半において顕著である. 27 および 28 列目に, この蛋白質の停止信号と, E1B mRNA と pIX mRNA 共通のポリ (A) 付加のシグナル配列がコードされている. また, 23 列後半には Ad12 E1B mRNA の第 3 のアクセプター部位 (A3) が認められる. さらに詳細に, 三つの血清型間における塩基配列のホモロジーを比較してみた.

3.4.1 転写プロモーター領域および転写開始点の比較

E1B mRNA の 'TATA box' と キャップ部位は Fig. 3 の 1 列目に, pIX mRNA の場合は 22 列目に認められる. E1B mRNA の 'TATA box' の配列は, 三者間でよく保存されており, 特に Ad7 と Ad5 では完全に一致している. pIX mRNA の 'TATA box' は, Ad12 と Ad5 の間では高度に保存されているが, 対応する Ad7 の配列は TGGAAAG であり, その前後にも TAT(A, T)_n 様の配列は認められない. 近年, 'TATA box' の転写調節に果たす役割について重要な報告がいくつかあり, 'TATA box' の中の特定の塩基を人工的に変異させた結果から, 三番目の塩基を含めて, 四, 五番目に至る 'TATA box' の中心部分がきわめて重要であることが示された^{33,34)}. Ad12 の E1B mRNA と pIX mRNA の 'TATA box' は, 四, 五番目とも A であり, これは感染後期の遺伝子の 'TATA box' にみられる特徴である. このことは, Ad12 の E1B mRNA が感染初期においては転写効率が低く, 後期に入ってはっきりと確認されることとよく一致する. E1B mRNA のキャップ部位は, Ad5 では 2 カ所の A であるが, Ad7 では 1 カ所で G である. Ad12 の E1B mRNA のキャップ部位は, 1,525 番目付近であるという報告はあるが²⁴⁾, Ad5 のように 2 カ所なのか, Ad7 のように 1 カ所なのかはまだ不明である.

3.4.2 スプライス領域の比較

Ad12, Ad7, Ad5 のスプライスのドナー部位とアク

セプター部位は, Fig. 3 に示すようにすべて 'Chambon 則' に従い, 5'末端が GT, 3'末端が AG の配列をとって例外はない. 第 1 ドナー部位 (D1) は Fig. 3 の 7 列目にみられるように, Ad12 と Ad5 の間で高度に保存されている. これに対応する位置の Ad7 の配列も/GT であるが, 実際のドナー部位は少し下流の 8 列目の/GT に存在している. これら D1 は, 三者間で相似の配列 ACA(G)G/GTG をとっている. 第 2 ドナー部位 (D2) は, Fig. 3 の 21 列目にみられるように, 三者間で保存されていて, 特に Ad7 と Ad12 では/GTAAAG と, 典型的な配列をとっている. これとは対照的に, 20 列目の Ad12 の第 1 アクセプター部位 (A1) は, Ad7 と Ad5 では AG/が存在せず, したがってアクセプターとして実際には機能できないと思われる. Ad7 の E1B mRNA で認められる A1 は, この付近の他の位置に存在すると考えられる. 三者間で, 第 2 アクセプター部位 (A2) はよく保存されている. Ad12 の場合は, さらに Ad7, Ad5 にはみられない第 3 アクセプター部位 (A3) が存在する. Fig. 3 の 23 列目にみられるように, 対応する位置において, 三者間の塩基配列のホモロジーが低く, Ad5 では AG/が存在しない. Ad7 には AG/が存在するが, この手前の配列はアクセプター部位に特徴的なピリミジン塩基ではなく, プリン塩基である G が連続している. 直接的な証拠ではないが, これらスプライス領域の比較は, ウイルス進化上 Ad7 が Ad12 と Ad5 の中間的存在であることを示唆している.

3.4.3 ポリ (A) 付加部位付近の比較

E1B mRNA と pIX mRNA のポリ (A) 付加部位は共通で, Fig. 3 の 27, 28 列目にみられるように, シグナル配列 AATAAA は Ad7 を仲介してよく保存されている. つまり, Ad7 は 2 個の AATAAA を持っていて, Ad12 と Ad5 のそれぞれの AATAAA と対応する位置に存在する. DNA 鋳型上において, Ad7 のポリ (A) 付加部位は, Ad12 より Ad5 に近い. したがって, Ad7 の 2 個のシグナル配列のうち, 実際に機能しているのは, Ad5 と対応する後者 (28 列目) であると考えられる. このように, ポリ (A) 付加部位付近の比較においても, Ad7 は Ad12 と Ad5 の中間的存在であり, ウイルス進化上 Ad5 により近いことが示唆される.

3.4.4 リボソーム結合部位の比較

普遍的現象ではないが, 真核細胞の多くの mRNA は, その翻訳開始信号 ATG の上流の領域にリボソーム 18SRNA の 3'末端に対して相補性の高い塩基配列を持つ例が多い³²⁾. また, mRNA のキャップ構造の 7-メチルグアニン (7mG) 自身がリボソームに強い親和性を示

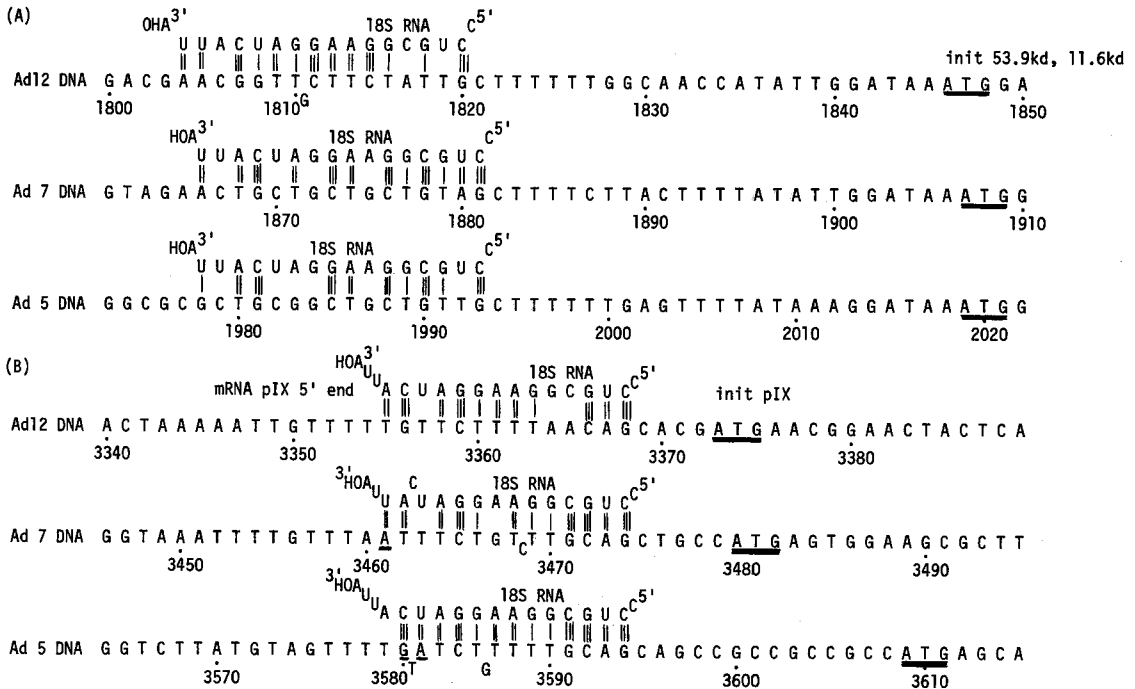


Fig. 6 Strategic ribosome binding sequences of the predicted coding regions for (A) E1B (B) pIX
G : C pairs are shown by three vertical lines, A : U(T) pairs by two vertical lines and
G : U(T) by one vertical line, respectively.

し、結合できることが知られている³⁵⁾。このように、真核細胞の蛋白質合成は、mRNA分子左端に位置する7mGやリボソーム18SRNA3'末端と相補性の高い配列によってリボソームに結合した後、開始信号ATGのある3'方向へ移動すると考えられている³⁶⁾。非常に興味深いことに、リボソーム18SRNA3'末端と二本鎖を形成できる相補性のある塩基配列は、Ad12, Ad7, Ad5の三者いずれのE1B mRNAの場合とも、2カ所のopen frameのそれぞれ最初のATGのうち、第1のATGの上流には認められず、その下流の第2のATGの手前に存在している(Fig. 3の4列目)。この領域は三者間でよく保存されていて、Fig. 6 Aにリボソーム18SRNA3'末端と可能な結合様式を示す。このように、mRNA上に2カ所open frameがあって、リボソーム結合部位が下流側のopjn frameのATGの前に存在する構造は、1種類のmRNAにおいて2種類の蛋白質がコードしうる機構を説明するひとつの留意点である。最近、*in vitro*合成系において、E1B mRNAから実際に、19-20 kdと54-55 kdの2種類の蛋白質が合成されることが報告されている¹⁴⁾。一方、Fig. 3の22列目に示したように、pIX mRNAの5'末端付近の領域には、リボソーム18SRNA3'末端と相補性のある配列がみつかると。Fig. 6

Bにその可能な結合様式を示す。この領域は、E1B mRNAにおいてはスプライスによって巧妙に除去されている。

3.5 Ad12, Ad7, Ad5のE1B領域にコード可能な蛋白質の比較

これまで述べてきたように、mRNAの正確な転写位置や鋳型DNAの塩基配列が決定された結果、E1B領域の遺伝子構成はAd12, Ad7, Ad5の三者間で似ていて、ウイルス粒子蛋白質のpIXと3種の初期蛋白質8.3-11.6 kd, 19.1-21 kd, 53.9-55 kdがコード可能であり、それらのアミノ酸配列も推定できる。Table 1にE1B領域にコード可能な初期蛋白質のアミノ酸組成を示した。三者間において、そのアミノ酸組成は非常に似ていることがわかる。E1A蛋白質は高プロリン含量を示し、酸性アミノ酸の比率が非常に高いという特徴が示唆されたが³¹⁾、E1B蛋白質は特にプロリン含量は高くなく、また酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸の比率もほぼ等しいと思われる。実際に、*in vitro*系や*in vivo*系で検出される蛋白質の大きさは、55-65 kd, 15-19 kdの2種類で³⁷⁾、一次構造から推定される値とよく一致している。しかし、8.3-11.6 kdに対応する蛋白質は検出されていない。

Table 1 Amino acid composition of the hypothetical early polypeptides encoded for in the E1B regions of Ad12, Ad7 and Ad5

	Ad 5 54.9kd	Ad 7 55 kd	Ad 12 53.9 kd	Ad 5 20.6 kd	Ad 7 21 kd	Ad 12 19.1 kd	Ad 5 8.3 kd	Ad 7 9 kd	Ad 12 11.6 kd
Asp (D)	22	22	26	7	12	7	2	6	7
Glu (E)	36	32	38	18	13	14	8	6	17
Arg (R)	37	37	31	14	14	11	5	6	5
Lys (K)	21	21	22	9	7	9	—	—	—
His (H)	13	15	21	4	4	2	1	2	6
Gly (G)	39	45	38	7	11	4	12	13	13
Ser (S)	31	38	29	16	5	16	8	14	6
Thr (T)	27	26	20	5	8	8	3	3	3
Cys (C)	27	21	26	3	—	3	1	—	4
Tyr (Y)	10	9	9	2	3	7	—	—	1
Asn (N)	27	25	20	5	3	4	3	3	4
Gln (Q)	12	16	13	11	8	7	4	4	2
Ala (A)	36	33	33	14	16	8	13	8	13
Val (V)	39	31	38	7	11	13	6	2	6
Leu (L)	37	30	44	23	24	23	—	7	13
Ile (I)	21	27	19	5	8	4	—	1	2
Pro (P)	22	18	13	6	10	6	13	7	4
Phe (F)	18	19	20	10	11	7	2	4	1
Trp (W)	6	9	6	8	7	5	—	—	—
Met (M)	15	18	16	2	3	5	3	2	3
total	496	492	482	176	178	163	84	88	110

Fig. 7A に 19.1–21 kd, Fig. 7B に 53.9–55 kd のアミノ酸配列を Ad12, Ad7, Ad5 の三者間で比較してみた. 19.1–21 kd の蛋白質では C 端側の一部, また 53.9–55 kd の蛋白質では N 端側の一部を除いて, そのアミノ酸配列はよく似ている. また, pIX のアミノ酸配列の比較も Fig. 7C に示した. N 末端付近の欠損配列部分を除いて非常によく似ており, 特に N 端側において高いホモロジーを示す.

4 考 察

緒言に述べたように, アデノウイルスの研究には二つの意義がある. そのひとつは, 真核細胞における遺伝情報発現機構の解明のモデルとしてであり, もうひとつは, ウイルスによる発癌のモデルとしてである. アデノウイルス DNA の一次構造を明らかにすることは, これらの研究をより詳細に, 分子レベルで解析するために必須である.

本研究の Ad12 DNA E1B 領域においても, 真核細胞系の遺伝子に特徴的なシグナル配列が存在している.

今後, 一次構造を様々に修飾することによって, 一次構造と遺伝子発現の詳細な関係を分子レベルで明らかにできると考えられる. 現在, 転写プロモーター領域については, *in vitro* の転写系がはやく開発されたためかなり進んでいて³⁶⁾, 'TATA box' が重要であることが示唆されているが, その上流や下流も転写を制御しており, *in vivo* における場合も含めて, まだ統一的な見解を出すに至っていない. Ad12, Ad7, Ad5 の E1B 領域の比較の結果から, Ad7 の pIX mRNA の転写プロモーター領域には 'TATA box' が存在せず, 対応する位置に TGGTAAG の配列が存在しており, これが機能を持っているか興味深い. また, E1A 領域においては, E1A mRNA のキャップ部位から上流 80–90 塩基付近に, やはり真核細胞の転写制御に関連すると考えられる 'CAAT box' が三者すべてにみられるが, E1B 領域には認められない. E1A 領域が他の初期領域に先んじて発現することと関連があるのかもしれない. スプライスやポリ(A)付加についても, *in vitro* の系が開発されはじめており, 今後研究が進むと思わ

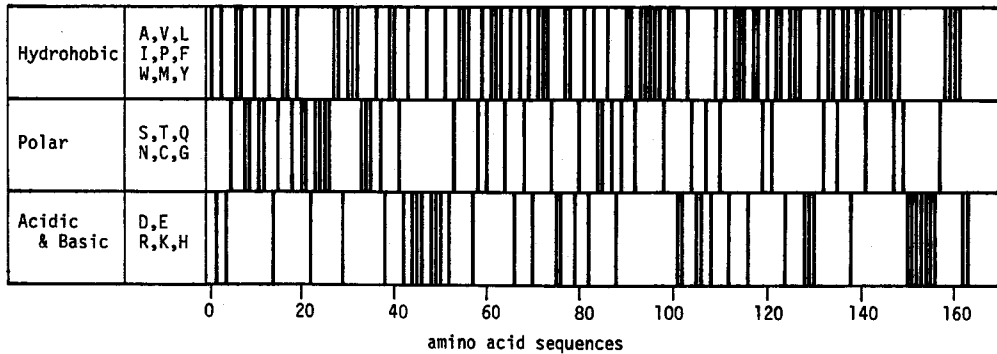


Fig. 8 Each amino acid is assigned to one of three classes: acidic & basic (D, E, R, K, H), polar (S, T, Q, N, C, G) or hydrophobic (V, A, L, I, P, F, Y, W, M) by the amino acid sequences of the 19.1kd polypeptide of the Ad12 E1B polypeptide.

53.9–55 kd)の中で、細胞のトランスホメーションに必須な領域に完全に含まれているのは 19.1–21 kd の蛋白質である。以上の結果から、E1A 蛋白質と共に、完全なトランスホーム細胞の確立に参与する E1B 蛋白質は 19.1–21 kd の蛋白質であると考えられる。最近、この E1B 蛋白質 19.1–21 kd が合成されない変異株が分離されて、トランスホメーションに欠損があるが、ウイルス増殖に影響がないことが示された³⁷⁾。また、抗体を使って、19.1–21 kd 蛋白質は細胞膜分画に存在することが報告されたが³⁸⁾、塩基配列の一次構造より推定されるアミノ酸配列を調べると、C 端側に疎水性アミノ酸が偏在しており、電荷を持つアミノ酸とクラスターを形成している (Fig. 8)。

アデノウイルスの血清型間には、齧歯動物に対する明確な造腫瘍性の違いがあるにもかかわらず、発癌遺伝子を含む E1B 領域の遺伝情報の解析結果からは、その遺伝子構成やそこにコードされる蛋白質がよく似ていて、E1A 同様血清型間の発癌性の程度を説明できるような決定的な違いを見つけ出すことはできなかった。しかし最近、遺伝子組み換え技術を用いて、Ad12 と Ad5 のそれぞれの E1A, E1B 領域を組み換えた、E1A–E1B DNA 組み換えプラスミドをつくり、これによってトランスホームした細胞をラットに接種することによって、その発癌活性が調べられた⁴¹⁾。その結果、Ad5 の E1B 領域より Ad12 の E1B 領域を持つ組み換え体のほうが、高い発癌性を示した。このことは、アデノウイルスの発癌活性の程度は、E1A 領域より E1B 領域に依存していることを示唆していて興味深い。今後、E1B 領域を組み換えた変異株の作成や、遺伝子産物の単離精製などによって、E1B 蛋白質、特に 19.1–21 kd の蛋白質の持つ機能の解明へと進むと考えられる。

5 結 論

強発癌性ヒトアデノウイルス 12 型 DNA の左端 4.5–11.2% の塩基配列を決定した。この領域は、ウイルスの初期遺伝子領域 E1B を完全に含んでいる。mRNA の転写部位の解析結果から、発癌遺伝子部分を含む E1B 領域の遺伝子構成、遺伝情報が解析され、発癌性の異なる他の血清型と比較することが可能になった。以下にその結果をまとめた。

- 1) Ad12 の E1B 領域の遺伝子構成は、Ad7 や Ad5 とよく似ていた。
- 2) Ad12 の E1B 領域の大部分において、その塩基配列は、Ad7 や Ad5 とホモロジーが高かった。
- 3) Ad12 の E1B 領域には、53.9 kd, 19.1 kd, 11.6 kd の 3 種の初期蛋白質がコードできると推定され、Ad7, Ad5 の場合もよく似ていた。このうち、19.1 kd の蛋白質が、E1A 蛋白質と共に細胞の完全なトランスホメーションの確立に参与すると考えられた。
- 4) E1B 領域にコード可能な蛋白質は、塩基配列から推定されるアミノ酸配列レベルで比較すると、Ad12, Ad7, Ad5 の三者間で非常によく似ていた。
- 5) E1B mRNA は、別々の open frame の二つの ATG を利用して、1 種類の mRNA から 2 種類の蛋白質を合成できる可能性があることが示唆された。

本研究の一部は、文部省科学研究助成金 (藤永) により行なわれた。

文 献

1. Flint, S. J.: Structure and genomic organization of adenoviruses, In: Tooze, J.: Molecular

- Biology of Tumor Viruses. 2nd Ed., 383-441, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1981).
2. Flint, S. J. and Broker, T. R.: Lytic infection by adenoviruses, In: Tooze, J.: Molecular Biology of Tumor Viruses. 2nd Ed., 443-546, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1981).
 3. Flint, S. J.: Cell transformation induced by adenoviruses, In: Tooze, J.: Molecular Biology of Tumor Viruses. Second Edition, 547-575, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1981).
 4. 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).
 5. Yano, S., Ojima, S., Fujinaga, K., Shiroki, K. and Shimojo, H.: Transformation of rat cell line by an adenovirus 12 DNA fragment. *Virology* **82**, 214-220 (1977).
 6. Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H., Yano, 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).
 7. Sekikawa, K., Shiroki, K., Shimojo, H., Ojima, S. and Fujinaga, K.: Transformation of rat cell line by adenovirus 7 DNA fragment. *Virology* **88**, 1-7 (1978).
 8. Graham, F. L., van der Eb, A. J. and Heijnecker, H. L.: Site and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature* **251**, 687-691 (1971).
 9. 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).
 10. van der Eb, A. J., van Ormondt, H., Schrier, P. I., Lupker, J. H., Jochemson, 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 SV 40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 383-399 (1979).
 11. 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).
 12. Dijkema, R., Dekker, B. M. M. and van Ormondt, H.: Gene organization of the transforming region of adenovirus type 7 DNA. *Gene* **18**, 143-156 (1982).
 13. van Ormondt, H., Maat, J. and van Beveren, C. P.: The nucleotide sequence of the transforming early region E1 of adenovirus type 5 DNA. *Gene* **11**, 299-309 (1980).
 14. Bos, J. L., Polder, L. J., Bernards, R., Schrier, P. I., van den Elsen, P. J., van der Eb, A. J. and van Ormondt, H.: The 2.2kd E1b mRNA of human adenovirus 12 and adenovirus 5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets. *Cell* **27**, 121 (1981).
 15. Green, M. and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. VI. Isolation, purification and chemical analysis of adenovirus. *Virology* **20**, 199-207 (1963).
 16. Green, M. and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Properties of highly purified tumorigenic human adenoviruses and their DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**, 1251-1259 (1964).
 17. Takanami, M. and Kojo, H.: Cleavage site specificity of an endonuclease prepared from *Haemophilus influenzae* strain H-I. *FEBS Lett.* **29**, 267-270 (1973).
 18. Lai, C-L. and Nathans, D.: Deletion mutants of simian virus 40 generated by enzymatic excision of DNA segments from the viral genome. *J. Mol. Biol.* **89**, 179-193 (1974).
 19. Kleid, D., Humayun, Z., Jeffrey, A. and Ptashne, M.: Novel properties of a restriction endonuclease isolated from *Haemophilus parahaemolyticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 293-297 (1976).
 20. Maxam, A. A. and Gilbert, W.: A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 560-564 (1977).
 21. Kimura, T., Sawada, Y., Uesugi, S. and Fujinaga, K.: Cleavage maps of adenovirus type 12 transforming segment by restriction endonucleases *Acc* I, *Hae* III, *Hha* I, *Hind* II, *Hinf* I and *Hph* I. *Tumor Res.* **15**, 44-55 (1980).
 22. Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroki, K., Saito, I., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y., Uesugi, S. and Fujinaga, K.: Structure and gene organization in the transforming *Hind* III-G fragment of adenovirus 12. *Cell* **20**, 777-786 (1980).
 23. Sawada, Y. and Fujinaga, K.: Mapping of adenovirus 12 mRNA's transcribed from the trans-

- forming region. *J. Virol.* **36**, 337-352 (1980).
24. Virtanen, A., Pettersson, U., Le Moullec, J.-M., Tiollais, P. and Perricaudet, M.: Different mRNAs from the transforming region of highly oncogenic and non-oncogenic human adenoviruses. *Nature* **295**, 705-707 (1982).
 25. Proudfoot, N. J.: Eukaryotic promoters. *Nature* **297**, 376 (1979).
 26. Breathnach, R., Benoist, C., o' Hare, K., Gannon, F. and Chambon, P.: Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4853-4857 (1978).
 27. Seif, I., Khoury, G. and Dhar, R.: BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *Nucleic Acids Res.* **6**, 3387-3398 (1979).
 28. Proudfoot, N. J. and Brownlee, G. G.: 3' non-coding region sequences in eukaryotic mRNA. *Nature* **263**, 211-214 (1976).
 29. Seeburg, P. H., Shine, J., Martial, J. A., Baxter, J. D. and Goodman, H. M.: Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* **270**, 486-494 (1977).
 30. Merregaert, J., van Emmelo, J., Devos, R., Porter, A., Fellner, P. and Fiers, W.: The 3'-terminal nucleotide sequence of encephalomyocarditis virus RNA. *Eur. J. Biochem.* **82**, 55-63 (1978).
 31. van Ormondt, H., Maat, J. and Dijkema, R.: Comparison of nucleotide sequences of the early Ela regions for subgroups A, B and C of human adenoviruses. *Gene* **12**, 63-76 (1980).
 32. Hagenbüchle, O., Santer, M., Steiz, J. A. and Mans, R. J.: Conservation of the primary structure at the 3' end of 18S rRNA from eucaryotic cells. *Cell* **13**, 551-563 (1978).
 33. Talkington, C. A., Nishioka, Y. and Leder, P.: *In vitro* transcription of normal, mutant, and truncated mouse α -globin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7132-7136 (1980).
 34. Sassone-Corsi, P., Corden, J., Kedingler, C., Chambon, P.: Promotion of specific *in vitro* transcription by excised "TATA" box sequences inserted in a foreign nucleotide environment. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3941-3958 (1981).
 35. Filipowicz, W., Furuichi, Y., Sierra, J., Muthukrishnan, S., Shatkin, A. J. and Ochoa, S.: A protein binding the methylated 5'-terminal sequence, m⁷GpppN, of eukaryotic messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1559-1563 (1976).
 36. 中島邦夫, 坪井昭三: 真核生物のタンパク質合成開始時における mRNA-18S rRNA 相互作用. *生化学* **53**, 137-153 (1981).
 37. 白木和子: アデノウイルス遺伝子産物. 蛋白質・核酸・酵素 **27**, 2466-2475 (1982).
 38. 半田宏: アデノウイルス遺伝子の *in vitro* 転写系. 蛋白質・核酸・酵素 **27**, 2457-2465 (1982).
 39. 安江博, 石橋正英: アデノウイルスの腫瘍原性. 蛋白質・核酸・酵素 **27**, 2476-2491 (1982).
 40. Persson, H., Katze, M. G. and Philipson, L.: Purification of a native membrane-associated adenovirus tumor antigen. *J. Virol.* **42**, 905-917 (1982).
 41. van den Elsen, P., de Pater, S., Houweling, A., van der Veer, J. and van der Eb, A.: The relationship between region Ela and Elb of human adenoviruses in cell transformation. *Gene* **18**, 175-185 (1982).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学附属がん研究所分子生物学部門

藤永 蕙