

ヒトアデノウイルス 12 型誘発腫瘍細胞のウイルスゲノム

矢野 昭 起

札幌医科大学附属癌研究所分子生物部門 (主任 藤永蕙教授)

Viral Genome in Rodent Cells Transformed by Human Adenovirus Type 12

Shoki YANO

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

Adenovirus type 12, Huie strain, (Ad 12) DNA was cleaved with *Hind*III, a restriction endonuclease from *Hemophilus influenzae* (Rd strain), into 16 specific fragments (*Hind*III-A~*Hind*III-O). Several lines of Ad 12-transformed rodent cells were examined for the persisting viral DNA sequences by reassociation kinetics using DNA fragments as probes. As a result it was shown that each of the cell lines examined contained the nucleotide sequence of the *Hind*III-G fragment. This indicates that the detection and quantitation of the transforming segment (included in *Hind*III-G fragment) in cell DNA is important for the investigation of Ad 12 etiology of tumors including human neoplasia.

I. 緒 言

造腫瘍性ヒトアデノウイルス, SV 40, ポリオーマウイルスなどの DNA 型腫瘍ウイルスで誘発した腫瘍細胞では, 一般に, 誘発に用いたウイルスの増殖は認められない。しかし, 1966 年, アデノウイルス誘発腫瘍細胞 (Fujinaga と Green¹⁾) および, ポリオーマ誘発腫瘍細胞 (Benjamin²⁾) を場として, 腫瘍細胞中にウイルスの遺伝情報を担ったウイルス特異的核酸の合成が示され, ウイルスとウイルス誘発腫瘍細胞との間に直接的な関連が証明されて, ウイルス発癌機構に関するウイルスゲノムレベルでの研究が盛んにおこなわれるようになった。さらに, 1970 年, 2 本鎖 DNA の特定の塩基配列部位を認識して, その部位を切断する制限エンドヌクレアーゼがこの方面の研究に導入され³⁾, より詳細なウイルスゲノムの遺伝子解析が可能となった。

造腫瘍性アデノウイルスは, 造腫瘍性の程度により, A 群 (強造腫瘍性: 12, 18, および 31 型), B 群 (弱造腫瘍性: 3, 7, 14, 16, および 21 型), および C 群 (トランスフォーム: 1, 2, 5, および 6 型) に分けられる⁴⁾。B 群に属するアデノウイルス (Ad) 7 型により誘発された腫瘍細胞中にはウイルスゲノムの一部のみが存続すること⁵⁾, また C 群に属する Ad 2 あるいは Ad 5 により誘発したトランスフォーム細胞でもウイルスゲノムの全部ではなく一部のみ存続することが明らかとなった。とくに, C 群に属する Ad 2 型, および Ad 5 型について, 制限エンドヌクレアーゼ *Eco* RI, および *Hind*III による切断点地図が作成され^{6,7)},

検討されたすべての誘発トランスフォーム細胞の中に DNA 分子左端の *Hind*III-G フラグメントが見出された。一方, *Hind*III-G フラグメントのみでもラット細胞をトランスフォームする活性を示すことが判明した⁸⁾。すなわち, C 群に属する Ad 2, および Ad 5 のトランスフォーム遺伝子は, ウイルスゲノムのわずか 7.5% を占め, DNA 分子の左端に位置する *Hind*III-G フラグメントに含まれているということになる。本論文では, A 群 Ad 12 によって誘発された腫瘍細胞 DNA 中のウイルスゲノムについて検索をおこなった結果について報告する。

II. 実験材料および実験方法

1. 細胞培養とウイルスの増殖

KB 細胞 (10% 仔牛血清添加 Eagle's MEM 培地にて単層培養のもの) にアデノウイルス 12 型 Huie 株 (Ad 12) を約 10 plaque forming units (PFU)/cell で感染させ, 37°C, 70 時間の培養後, 感染細胞を集め, ウイルス精製の出発材料とした。Ad 12 誘発ハムスター腫瘍細胞 (Ad 12 HE, Cl 9), Ad 12 誘発ラット腫瘍細胞 (W-2, W-3), Ad 12 DNA, Ad 12 DNA の *Eco*RI-C フラグメント, あるいは Ad 12 DNA の *Hind*III-G フラグメントによりトランスフォームしたラット腫瘍細胞 (それぞれ, WY-3, CY1, GY1^{9,10)} は, 10% 仔牛血清添加 Eagle's MEM 培地 (Ad 12 HE, Cl 9), または 10% 牛胎児血清添加, Ca⁺⁺ 濃度 0.1 mM の Eagle's MEM 培地 (各種ラット腫瘍細胞) にて単層培養を行い, 細胞 DNA 抽出の出発材料

とした。

2. ウイルス DNA の調製

Green and Pina の方法により^{11,12)}, Ad 12 感染 KB 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. ³²P-標識ウイルス DNA ([³²P]-Ad 12 DNA) の調製には, ウイルス感染 8 時間後に ³²P-正リン酸 (終濃度 50 μ Ci/ml) を培養液中 (5% 透析仔牛血清添加リン酸塩を含まない Eagle's MEM) に加え, 同様の方法で標識ウイルス粒子より精製した. なお, [³²P]-Ad 12 DNA の比放射活性は 5~10 \times 10⁵ cpm/ μ g を示した.

3. 細胞 DNA の調製

Ad 12 HE, W-2, W-3, WY3, CY1, はそれぞれ *in vitro* で培養し, 細胞 DNA はこれら培養細胞より SDS, pronase, クロロホルム, イソアミルアルコールを組み合わせた方法 (藤永ら, 1973¹³⁾) で抽出精製した.

4. 制限エンドヌクレアーゼの調製

*Hind*III, *Hind*II・*Hind*III は高浪らの方法¹⁴⁾, Lai and Nathans の方法¹⁵⁾ で *Hemophilus influenzae* (Rd 株) より抽出精製した. *Bam*HI¹⁶⁾, *Eco*RI¹⁷⁾ は, それぞれ下条寛人博士 (東京大学医科学研究所), 杉野幸夫博士 (武田薬品工業生物研究所) より分与をうけた.

5. 制限エンドヌクレアーゼによる Ad 12 DNA の切断と, ポリアクリルアミド電気泳動法による生成フラグメントの分離と精製

*Hind*III による切断は, 酵素標品 5 単位 (1 単位は Ad 2 型 DNA 1 μ g を 37°C 1 時間で完全に切断する量), Ad 12 DNA 5 μ g を含む全量 100 μ l の 10 mM, Tris-HCl, pH 7.4, 7 mM MgCl₂, 7 mM 2-メルカプトエタノール中でおこなった. *Bam*HI による切断は, 酵素標品 5 単位, Ad 12 DNA 5 μ g; を含む全量 100 μ l の 6 mM Tris-HCl, pH 7.4, 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-メルカプトエタノールの中でおこなった. *Eco*RI による切断の場合は, 酵素標品 5 単位, Ad 12 DNA 5 μ g, を含む全量 100 μ l の 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ 中でおこなった. いずれの場合も, 37°C, 1 時間後に EDTA を終濃度 20 mM にて添加し, 反応を停止した. ついで 2.66% ポリアクリルアミド [2.5% アクリルアミド (半井化学薬品 K.K.), 0.16% ビスアクリルアミド (半井化学薬品 K.K.)] デイスクゲル (25 cm \times 0.6 cm) にて電気泳動 (4 mA/tube, 24~36 時間室温にて泳動) をおこない, 酵素処理により生成した DNA フラグメントを分離した. 泳動完了後, エチジウムブロマイド (0.5 μ g/ml) を含む泳動用緩衝液 (36 mM Tris, pH 7.8, 32 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA) 中にゲルを浸し, 染色した後, UV 光線下にて, DNA フラグメントを蛍光を発するバンドとして観察した (図-1). 分

離した DNA フラグメントはゲルより電気泳動的に溶出し¹⁸⁾, Dowex 50 W (室町化学工業 K.K.) 5% を含む 10 \times SSC (SSC; 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) を外液として 12 時間透析し, エチジウムブロマイドを除き¹⁹⁾, ついで 0.1 \times SSC を外液として透析し, Ad 12 DNA フラグメント標品を得た. Ad 12 DNA フラグメントによるラット正常細胞 (3Y1) のトランスフェクション実験に用いる標品を調製する場合は, さらにフェノール, クロロホルム, イソアミルアルコールにより精製した^{9,10)}.

6. [³²P] Ad 12 DNA の *Hind*III フラグメントの ³²P 放射活性分布

[³²P] Ad 12 DNA を *Hind*III で切断し, 各フラグメントを 2.66% ポリアクリルアミドゲルで分離し, ゲルをカミソリ刃で 1 mm 幅のスライスとし, それぞれのスライスに 30% H₂O₂ を 0.1 ml 添加し, 80°C 5 時間の加熱処理により可溶化し, 液体シンチレーションカウンタ (Beckman LS 230) で放射活性を測定した.

7. 電子顕微鏡による生成フラグメントの分子量測定

Davis らの方法を用いて²⁰⁾, フラグメント DNA の電顕用試料を作成し, JEM 100 B 型電子顕微鏡を用いてフラグメント DNA の長さを測定し, 分子量を算出した (表-1). なお, Ad 12 DNA 分子 (未酵素処理) を分子量測定の基準として用いた²¹⁾.

8. 2.66% ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に於ける相対的移動度からの分子量測定

すでに分子量の決定されている Ad 12 DNA の *Eco*RI DNA フラグメント *Eco*RI-D (2.42 \times 10⁶ ダルトン), および *Eco*RI-E (1.54 \times 10⁶ ダルトン) をマーカーとして用いて泳動させ, 分子量の充分に小さいところでは, 相対的移動度と, 分子量の対数値とが直線的関係にあることからこれらフラグメント DNA の分子量を計算した²²⁾.

9. 2本鎖 DNA 再形成反応

超音波処理 (Kubota 200 M sonic oscillator 0°C, 最大出力 10 分間) により 600~800 スクレオチド対の大きさに切断した DNA 試料 (0.4 M リン酸緩衝液, pH 6.8, 500 μ l) を加熱変性処理 (100°C, 10 分間) 後, 0°C 氷水中にて急冷し, ついで 68°C 恒温槽中にて, 2本鎖 DNA 再形成反応をおこなった. 反応停止後, 1本鎖 DNA と 2本鎖 DNA の分画操作は, ハイドロキシルアパタイトバッチ法によった²³⁾.

III. 実験結果

A. Ad 12 DNA の制限エンドヌクレアーゼによる切断

Ad 12 DNA を *Hind*III で切断し, 2.66% ポリアクリルアミドゲルにて分離すると, 図-1 の如く 16 種のフラ



図-1 *Hind*III により切断した Ad 12 DNA フラグメントを、2.66% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離したもの (0.6 cm×30 cm ディスクゲル, 4 mA/tube, 36 時間泳動) を、エチジウムブロマイド (0.5 μg/ml) を含む泳動用緩衝液に 30 分間浸した後、紫外線下にて観察したもの。

グメントがバンドとして認められた。分子量の大きいものから、順に、*Hind*III-A~*Hind*III-O とし、これらフラグメントの分子量を次の三つの方法により測定した。すなわち、1) 電子顕微鏡によるフラグメント DNA の長さの測定、2) ³²P 放射活性の分布比、3) 電気泳動に於ける相対的移動度である。*Hind*III-A~*Hind*III-F のフラグメントについては、1), 2) の方法を併用し、*Hind*III-F~*Hind*III-O のフラグメントについては、2), 3) の方法を用いてそれぞれの分子量を測定した。表-1 には、三つの異なる方法で算出した分子量が示してある。これら各フラグメントの分子量の総和は、 21.96×10^6 ダルトンとなり、Ad 12 DNA の分子量 (22×10^6 ダルトン) とよく一致した²¹⁾。

表-1 Ad 12 DNA の *Hind*III 切断フラグメントの分子量

フラグメント	電子顕微鏡法 (MW×10 ⁻⁶ ダルトン)	³² P-放射活性 分布法 (MW×10 ⁻⁶ ダルトン)	相対的移動度法 (MW×10 ⁻⁶ ダルトン)
A	3.63	3.89	
B	3.23	3.45	
C	2.46	2.42	
D	2.16	2.07	
E	2.02	1.91	
F	1.75	1.72	1.75
G		1.58	1.55
H		1.14	1.17
I		0.88	0.91
J1		0.67	0.68
J2		0.67	0.68
K		0.59	0.62
L		0.42	0.37
M		0.26	0.25
N		0.20	0.21
O		0.09	0.14

B. Ad 12 誘発ハムスター腫瘍細胞 (Ad 12 HE, Cl 9) 中のウイルスゲノム

[³²P]-Ad 12 DNA を *Hind*III で切断し、生成するフラグメントを単離精製し、これらを probe DNA として Ad 12 HE, Cl 9 細胞中のウイルスゲノムを 2 本鎖 DNA 再形成反応を用いてしらべた。すなわち、各フラグメントの 2 本鎖再形成反応系に、Ad 12 HE, Cl 9 細胞 DNA を添加することにより、各フラグメントの 2 本鎖 DNA 再形成反応が促進され、その促進の程度から、細胞 DNA 中の各フラグメントの copy 数を算出してみた。その結果は、表-2 に示すように、*Hind*III-B フラグメントを除く *Hind*III-A~*Hind*III-L のすべてのフラグメントが、1 倍体細胞 DNA 量あたり 5~10 copy の割合で存続していた。

表-2 Ad 12 誘発腫瘍細胞* 中のウイルスゲノム (I)

標識 フラグ メント	フラグ メント濃度 (×10 ⁻³ μg/ml)	細胞 DNA 濃度 (μg/ml)	反 応 速 度 増 加 率	細胞 DNA 中のフラグ メント数 (コピー/1倍体 細胞 DNA 量)
A	2.15	137	1.72	5.8
B	2.29	137	—**	—**
C	2.87	137	1.58	9.1
D	2.46	137	1.47	7.0
E	2.28	137	1.47	8.0
F	2.53	137	1.42	8.0
G	1.16	137	1.35	8.4
H	1.60	137	1.47	5.4
I	1.77	153	1.32	8.5
J(J1+J2)	1.73	137	1.50	8.5
K	1.73	217	1.56	9.5
L	1.71	307	1.32	9.3

* Ad 12 HE, Cl 9

** 2 本鎖 DNA 再形成反応が二次式に従わず、測定不可能。

ただし、*Hind*III-B フラグメントについては、細胞 DNA 添加による 2 本鎖 DNA 再形成反応が二次式にしたがわず、このことから *Hind*III-B フラグメントの一部が細胞中に存続していることが推察される⁵⁾。そこでこの点をさらに詳細に検討するために、*Hind*III-B フラグメントを *Hind*II で三つのフラグメント (*Hind*II·*Hind*III-B, *Hind*II·*Hind*III-D, *Hind*II·*Hind*III-I) に切断し、それぞれを Probe DNA として、同様の方法により、細胞 DNA 中のウイルスゲノムを検索した結果、*Hind*II·*Hind*III-I に相当する部分が細胞 DNA 中には

表-3 Ad 12 誘発腫瘍細胞中のウイルスゲノム (II)

Ad 12 誘発腫瘍細胞	細胞 DNA (mg/ml)	HindII・HindIII-I (ng/ml)	反応速度増加率	細胞 DNA 中のフラグメント数 (コピー/1倍体細胞 DNA 量)
W-2	1.66	10.3	0.981	<0.5
W-3	1.66	10.3	0.992	<0.5
WY3	1.66	10.3	0.981	<0.5
Ad 12 HE, Cl 9	1.66	10.3	1.031	<0.5

検出できなかった (検出感度は、1倍体細胞 DNA 量あたり、0.5 copy) さらに他の Ad 12 誘発腫瘍細胞について、HindII・HindIII-I の部分が同様に欠損しているか否かを検索してみると、表-3に示すように W-2, W-3, WY3 についても同様の結果が得られた。

以上より、Ad 12 HE, Cl 9 細胞には全ウイルスゲノムの 87% 以上、96% 以下の部分が、1倍体細胞 DNA 量あたり 5~10 copy の割合で存続していると結論できる。

C. Ad 12 フラグメント DNA によりトランスフォームした細胞中のウイルスゲノム

W-2, W-3, WY3, Ad 12 HE, などの細胞 DNA はす

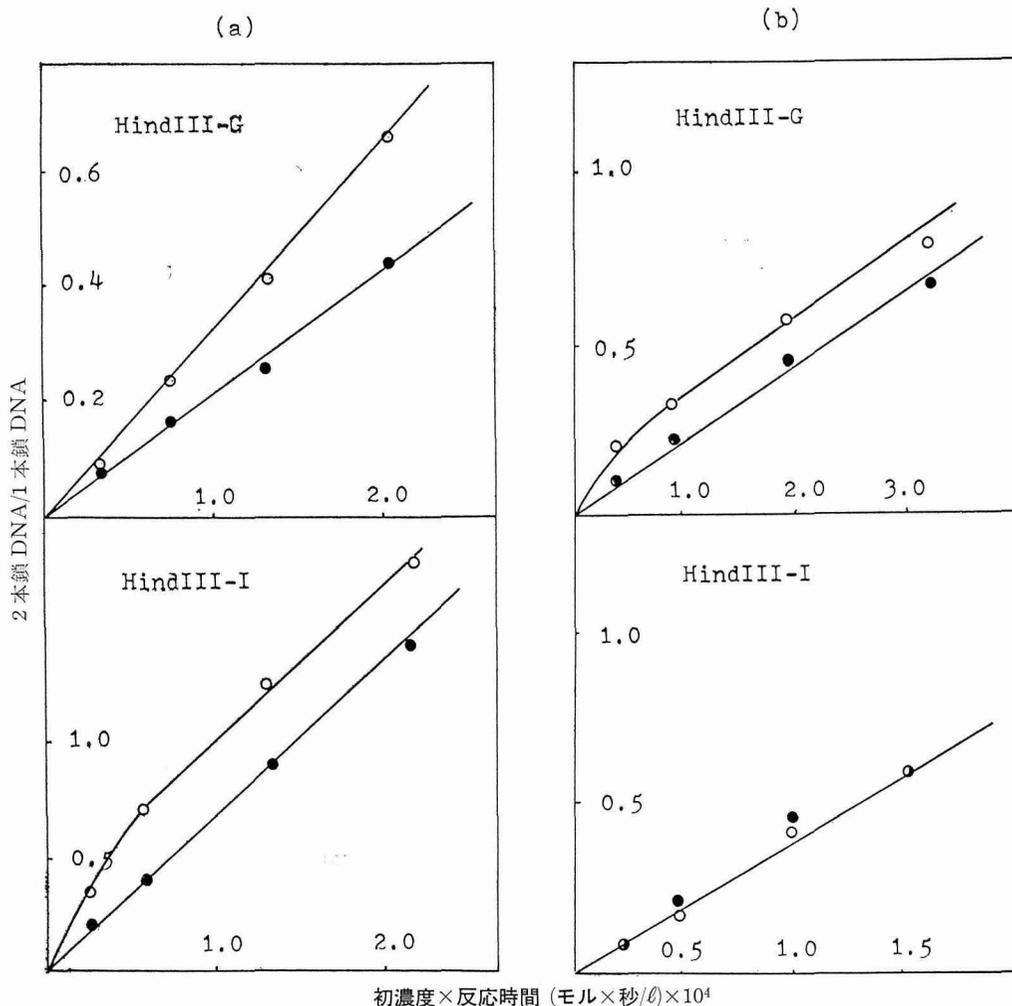


図-2 a) CY1 DNA (460 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下 (○) あるいは牛胸腺 DNA 存在下 (●) における HindIII-G ($1.57 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$), あるいは HindIII-I ($2.72 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$) の 2 本鎖 DNA 再形成反応。
b) GY1 DNA (266 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下 (○) あるいは牛胸腺 DNA 存在下 (●) における HindIII-G ($2.20 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$), あるいは HindIII-I ($2.40 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{ml}$) の 2 本鎖 DNA 再形成反応

べて *HindIII*-G フラグメントを含んでいる (矢野・藤永: 発表準備中)。一方, Ad 12 DNA の *EcoRI*-C フラグメントあるいは Ad 12 DNA の *HindIII*-G フラグメントで, 正常ラット胎児由来の 3Y1 細胞がトランスフォームできることが示され, それぞれ, トランスフォーム細胞 CY1, GY1 がえられた^{9,10}。これら CY1, GY1 は, Ad 12 特異的 T-抗原を産生していることが確認された¹⁰。これら CY1, GY1 はいずれもラット腹腔内に移植すると, 腫瘍化することが確かめられている¹⁰。そこで ³²P で標識した Ad 12 DNA の *EcoRI*-C フラグメントを *HindIII* で切断して生じる *HindIII*-G, *HindIII*-I フラグメントをそれぞれ probe DNA として, 2本鎖 DNA 再形成反応を用いて, CY1, GY1 細胞中のウイルス特異的 DNA 塩基配列を検索したところ, 図-2 に示すように, CY1 細胞 DNA 添加により, *EcoRI*-C フラグメントの一部である *HindIII*-G, *HindIII*-I フラグメントの 2本鎖 DNA 再形成反応は促進された。反応速度の増加率から計算すると, CY1 細胞中には *HindIII*-G フラグメントが 1 倍体細胞 DNA 量あたり, 1.69 コピー存在することとなる。CY1 細胞中の *HindIII*-I フラグメントに関しては, 細胞 DNA 存在下における 2本鎖 DNA 再形成反応が二次式に従わないことから, コピー数の算出は不可能であった。すなわち, CY1 細胞には細胞をトランスフォームするのに用いた *EcoRI*-C フラグメントの全部ではなくその一部が存続している事が推察される⁵。また, GY1 細胞 DNA 添加により *HindIII*-G フラグメントの 2本鎖 DNA 再形成反応は促進されるが, この場合も反応は二次式には従わず, やはり *HindIII*-G フラグメントの一部のみが GY1 細胞中に存続していると推察される⁵。

考 按

本研究により, 強造腫瘍性ヒトアデノウイルス A 群に属する Ad 12 で誘発したトランスフォーム細胞 (Ad 12 HE) 中には, 全ウイルスゲノムの 87% 以上, 96% 以下の部分が 1 倍体細胞 DNA 量あたり, 5~10 copy 存続していることが判明した。一方, 他の造腫瘍性アデノウイルス群, すなわち, B 群の Ad 7⁵, 或は C 群の Ad 2, Ad 5 によって誘発した腫瘍細胞も含めていずれの場合も, 腫瘍細胞がウイルス DNA 分子の左端を必ず組み込んでおり, ウイルス DNA の左端 10% 以下の部分で細胞をトランスフォームすることが出来る事実⁸⁻¹⁰) は, 組み込みに好都合な分子構造と造腫瘍性との関連を示唆するのかもしれない。Ad 12 により誘発した Ad 12 HE, Cl 9, W-2, W-3, WY-3 細胞において, Ad 12 DNA の全ウイルスゲノムが存続しているのではなく, *HindII*・*HindIII*-I に相当

する部分が欠損していることが判明したが, この欠損部分は Ad 12 後期遺伝子の一部に含まれており²⁴, これら腫瘍細胞でウイルスの増殖が認められないことは, ウイルス後期遺伝情報の欠損に基づくものであろうことを示唆している。Ad 12, Ad 5, Ad 2 のウイルス DNA 分子の左端のせいぜい 7~8% の部位にトランスフォーム活性が認められ, この部分が誘発腫瘍細胞に見出されたことは⁸⁻¹⁰)²⁵, この部位にいわゆるトランスフォーム遺伝子が位置することを意味し, その大きさはせいぜい 2×10^6 ダルトン以下, 1~2 個の蛋白質を規定するサイズである。この部位はウイルスの初期遺伝子部位の一つで, どのようなタンパクが対応しているのか興味深い。これら初期タンパクの精製とその作用点の検索が今後に残された重要な問題となろう。また *HindIII*-G フラグメントが細胞 DNA に組み込まれた結果, 細胞は恒常的な腫瘍細胞としての性格を保持すると考える時, *HindIII*-G フラグメントの細胞 DNA への組み込み部位の特異性の有無, 組み込みによって細胞側の遺伝情報発現に生じるであろう新たな変化もまた重要な問題と考えられる。

以上強造腫瘍性 A 群 Ad 12 によって誘発された腫瘍細胞には, ウイルス DNA 分子の左端に位置する *HindIII*-G フラグメントの存続が例外なく認められ, また *HindIII*-G フラグメントのみでも細胞をトランスフォームすることが明らかになったことは重要な意味をもっている。すなわち, Ad 12 DNA の *HindIII*-G フラグメントの腫瘍細胞における存否をしらべることにより, 造腫瘍における Ad 12 の関与の可能性の有無を推察することができることを意味している。実際に, ヒトバークリットリンパ腫由来の細胞株 (Raji と P3HRI), とヒト上皮癌由来細胞株 (KB), 急性および慢性骨髄性白血病患者の白血病細胞より抽出した DNA について, Ad 12 DNA の *HindIII*-G フラグメントの DNA 塩基配列の有無を検索したところ, すべての例に於いて検出できなかった (検出感度は 1 倍体細胞 DNA 量あたり 0.5 copy) (矢野, および沢田, 藤永: 発表準備中)。このことはこれらヒト腫瘍に Ad 12 が主原因とはなっていないことを示唆している。このように, 造腫瘍性における既知ウイルス関与の否定もまた重要なことと考えられる。

結 語

ヒトアデノウイルス 12 型 Huie 株 (Ad 12) は, 制限エンドヌクレアーゼ *HindIII* によって 16 種の特異的なフラグメント (*HindIII*-A~*HindIII*-O) に切断され, これら 16 種のフラグメントを用いた 2本鎖 DNA 再形成反応を利用して, Ad 12 誘発腫瘍細胞中のウイルスゲノムを

検索した結果、全ウイルスゲノムを保持している腫瘍細胞は見出し得なかったが、いずれの細胞株に於いても、細胞 DNA 中にはトランスフォーム活性を保持している *Hind*III-G フラグメントの存続が認められた。すなわち、ヒト腫瘍を含めて、腫瘍発生に於ける Ad 12 の関与の可能性を検討するためには、Ad 12 DNA の *Hind*III-G フラグメントの腫瘍細胞中における存否を確かめる事が重要となる。

本論文の一部は、第 35 回日本癌学会総会 (昭和 51 年、東京都) において発表した。なお本研究の一部は、文部省科学研究助成金 (藤永) および高松宮妃癌研究基金研究助成金 (藤永) により行われた。(昭和 52.5.11 受付)

文 献

- 1) Fujinaga, K. and Green, M.: The mechanism of viral carcinogenesis by DNA mammalian viruses: viral-specific RNA in polyribosomes of adenovirus tumor and transformed cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 1567-1574 (1966).
- 2) Benjamin, T. L.: Virus-specific RNA in cells productively infected or transformed by polyoma virus. *J. Mol. Biol.* **16**, 359-373 (1966).
- 3) Kelly, T. J. and Smith, O. H.: A restriction enzyme from hemophilus influenzae. II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* **51**, 393-409 (1970).
- 4) Green, M.: Oncogenic viruses. *Ann. Rev. Biochem.* **39**, 701-756 (1970).
- 5) Fujinaga, K., Sekikawa, K., Yamazaki, H., and Green, M.: Analysis of multiple viral genome fragments in adenovirus 7-transformed hamster cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**, 633-636 (1974).
- 6) Pettersson, U., Tibbetts, C., and Philipson, L.: Hybridization Maps of Early and Late Messenger RNA Sequences on the Adenovirus Type 2 Genome. *J. Mol. Biol.*, **101**, 479-501 (1976).
- 7) Mulder, C., Arrand, J. R., Delius, H., Keller, W., Pettersson, U., Roberts, R. J., and Sharp, P. A.: Cleavage maps of DNA from adenovirus type 2 and 5 by restriction endonuclease *Eco* RI and *Hpa* I. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**, 394-400 (1974).
- 8) Graham, F. L., Abrahams, P. J., Mulder, C., Heijneker, 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).
- 9) Yano, S., Ojima, S., Fujinaga, K., Shiroki, K., and Shimojo, H.: Transformation of a rat cell line by an adenovirus type 12 DNA fragment. *Virology* **82**, in press (1977).
- 10) Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H. and 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**, in press (1977).
- 11) Green, M. and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification, and chemical analysis of adenoviruses. *Virology* **20**, 199-207 (1963).
- 12) Green, M., and Pina, M.: Biochemical studies on adenovirus multiplication. VI. Properties of highly purified tumorigenic human adenovirus and their DNA's. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **51**, 1251-1259 (1964).
- 13) Fujinaga, K., Rankin, A., Yamazaki, H. Sekikawa, K., Bragdon, J. and Green, M.: RD-114 virus: analysis of viral gene sequences in feline and human cells by DNA-DNA reassociation kinetics and RNA-DNA hybridization. *Virology* **56**, 484-495 (1973).
- 14) Takanami, M., and Kojo, H.: Cleavage site specificity of an endonuclease prepared from hemophilus influenzae strain H-I. *FEBS Letters* **29**, 267-270 (1973).
- 15) Lai, C.-J. 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).
- 16) Wilson, G. A., and Young, F. E.: Isolation of a sequence-specific endonuclease (*Bam* I) from *Bacillus amyloliquefaciens* H. *J. Mol. Biol.* **97**, 123-125 (1975).
- 17) Yoshimori, R. N.: A genetic and biochemical analysis of the restriction and modification of DNA by resistance transfer factors. Ph. D. thesis, University of California, San Francisco (1971).
- 18) Pettersson, U., Mulder, C., Delius, H., and Sharp, P. A.: Cleavage of adenovirus type 2 DNA into six unique fragments by endonuclease *R* RI. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 200-204 (1973).
- 19) Brown, W. M. and Vinograd, J.: Restriction endonuclease cleavage maps of animal mitochondria.

- drial DNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 4617-4621 (1974).
- 20) Davis, R. W., Simon, M., Davidson, N.: *Methods Enzymol.* **21**, part B. 413-428 (1971).
- 21) Green, M., Pina, M., Kimes, R., Wensink, P. C., Machattie, L. A. and Thomas, C. A.: Adenovirus DNA. I. Molecular weight and conformation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **57**, 1302-1309 (1967).
- 22) Yano, S., Tsuchida, N., Fujinaga, K.: Analysis of DNA from adenovirus 12-transformed cells for virus-specific DNA sequence with viral DNA fragments cleaved with restriction endonuclease. *Gann* **68**, 107-114 (1977).
- 23) Tsuchida, N., Robin, M., and Green, M.: Viral RNA subunits in cells transformed by RNA tumor viruses. *Science* **176**, 1418-1420 (1972).
- 24) Ortin, J., Scheidtmann, K-H., Greenberg, R., Westphal, M., and Doerfler, W.: Transcription of the genome of adenovirus type 12. III. Maps of stable RNA from productively infected human cells and abortively infected and transformed hamster cells. *J. Virol.*, **20**, 355-372 (1976).
- 25) Gallimore, P. H., Sharp, P. A., Sambrook, J.: Viral DNA in transformed cells. II. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in nine lines of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. *J. Mol. Biol.*, **89**, 49-72 (1974).