アデノウイルスのトランスホーム遺伝子

山下利春, 沢田幸治, 藤永 蕙

(札幌医科大学がん研究所分子生物学部門)

(受付: 昭和61年4月23日)

1. はじめに
2. アデノウイルスの増殖とウイルスゲノムの構造
3. アデノウイルスによるトランスホーマーションとトランスホーム遺伝子の同定
4. アデノウイルストランスホーム遺伝子の構造と発現
5. トランスホーマーションにおける E1A および E1B 遺伝子の役割
- 5.1 DNA 断片によるトランスホーマーション
- 5.2 トランスホーム領域内に変異を持つアデノウイルス変異株の解析
6. アデノウイルスとアデノウイルストランスホーム細胞の造腫瘍性
7. アデノウイルス E1A 遺伝子の機能
- 7.1 E1A 遺伝子産物の生化学的特性
- 7.2 E1A 遺伝子産物の転写調節活性
- 7.3 E1A 遺伝子産物の機能的特性とトランスホーマーション
8. アデノウイルス E1B 遺伝子の機能
9. おわりに

1. はじめに

アデノウイルスは、1953年、ヒトアデノイド組織を培養中に細胞変性を起こす因子として、Rowe らにより発見された¹⁾。1962年、ヒトアデノウイルス12型を新生ハムスターに注射すると腫瘍を形成することが見出され²⁾、その後、ヒトアデノウイルスは、より小型のパポーパウ

ウイルスとともに腫瘍ウイルスの代表の1つとして注目を集め、*in vivo* における腫瘍の誘発と *in vitro* における細胞のトランスホーマーションといったがんの基礎研究の重要なモデルとなった^{3,4)}。一方、いくつかの血清型のアデノウイルス（2型、5型、12型）は、最もよく分子レベルあるいは次分子レベルで研究された動物ウイルスの1つであり、真核細胞遺伝子の構造と発現の研究のための貴重な材料ともなっている。腫瘍ウイルスとしてのアデノウイルス研究の第1の目的は、正常細胞をがん細胞へ変える機能に関与するメカニズムを知ることにある。まず、ウイルス誘発トランスホーム細胞中のウイルス DNA の存続と発現が、ウイルス T 抗原、ウイルス mRNA、ウイルス DNA の順に証明され、トランスホーム細胞中に存在するウイルス DNA が解析された。次いで、ウイルス DNA 断片による細胞のトランスホーマーション実験やウイルス変異株の解析によって、ウイルスゲノム上にトランスホーム遺伝子が同定された。とりわけ、過去10年間における、DNA 塩基配列の決定法、分子クローニング、DNA トランスフェクションなどの新しい技術の開発は、トランスホーム遺伝子の構造と発現に関する研究を飛躍的に進歩させた。ここでは、アデノウイルストランスホーム遺伝子の構造、発現および機能について、最近の知見を中心にできるだけ平易にまとめる。

2. アデノウイルスの増殖とウイルスゲノムの構造

Huebner(1967) は、新生シリアンハムスターに注射後の腫瘍形成能を基にしてヒトアデノウイルス（以下アデノウイルス）を A, B, C の3つの亜群に分けた⁵⁾。C 亜群として分類された血清型は、その後、ウイルスコードタンパクやウイルス DNA 間の相溶性、あるいは G + C 含量などが検討されて C, D, E の3亜群に⁶⁻⁸⁾、また乳児下痢症患者の便から分離された難増殖性腸炎アデ

Transforming Genes of Human Adenoviruses, by Toshiharu Yamashita, Yukiharu Sawada and Kei Fujinaga. Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College, Sapporo 060 Japan

〒060 札幌市中央区南1条西11丁目

ノウイルス⁹⁻¹¹⁾は亜群Fに分類され^{12,13)}, アデノウイルスの41の血清型はA-Fの6つの亜群に分類されるに至った⁴⁾(最近では亜群 subgroup よりも亜属 subgenus¹⁴⁾と呼ばれることが多いがここでは亜群とする)。新生ハムスターに接種したとき, 強発がん性A亜群(12, 18, 31型)は, 早期に効率よく腫瘍を形成するが, 弱発がん性B亜群(3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35型)は, 発がん効率が低く潜伏期も長い。一方, 非発がん性C亜群(1, 2, 5, 6型), D亜群(8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39型), E亜群(4型), およびF亜群(40, 41型)にはハムスターに対する発がん性は認められない^{3,10,12)}。A, B亜群のメンバーだけが, ハムスターやその他の限られたげっ歯動物(ラット, マウス)に発がん性を示すが, A-F群のすべての血清型は, 調べられた限りラットやハムスターの細胞をトランスホームする能力がある^{3,15,16)}。最近のアデノウイルス研究で得られた知識の多くは, 強発がん性12型, 非発がん性2型および5型に関する研究を基にしている。

アデノウイルスは, 約 35,000 塩基対(分子量約 2.3×10^7 ダルトン)の直鎖状2本鎖DNAをゲノムとして持つ中型サイズのウイルスである。アデノウイルスの多くはKB, HeLaなどのヒト由来細胞でよく増殖し, 増殖感染過程については2型や5型で詳細に研究されている。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, 継時的にコントロールされている。以下, C亜群アデノウイルス2型と5型の場合について述べる。感染初期にはウイルスゲノム上の7つの領域が発現する¹⁷⁾(図1)。これらの初期RNAは, 初期領域1(E1A:1.3-4.5マップ単位, E1B:4.6-11.2マップ単位)のr鎖, 初期領域2(E2A:61.6-74.9マップ単位, E2B:11.2-23.5マップ単位)のl鎖, 初期領域3(E3:76.8-86.0マップ単位)のr鎖, および初期領域4(E4:91.4-99.1マップ単位)のl鎖から転写される¹⁸⁻²¹⁾。また, L1領域(16.5-40.0マップ単位)は, ウイルスDNA複製後に働く主要後期プロモーターから発現する塩基配列の一部であるが, 感染初期にもこのL1領域r鎖由来のRNAが少量検出される(EL遺伝子^{22,23)}。初期領域のうち, まずウイルスゲノム左端のE1A遺伝子が, 感染直後から発現を開始する²⁴⁻²⁶⁾。このため, E1A遺伝子はpre-earlyあるいはimmediate early geneと呼ばれる。E1A mRNAは感染後45分から検出され, 3時間後には最大となり6時間以上持続的に発現する²⁶⁾。続いて, E1A遺伝子産物の機能に依存して, 初期遺伝子E1B, E2A, E2B, E3, E4およびEL遺伝子の転写が開始され

る^{24,25,27-29)}。E1A領域の転写に引き続いてE3領域とE4領域の転写, さらに感染6時間後までにはE1B領域とE2A領域の転写が最大に達する²⁶⁾。ウイルス増殖感染系において, 初期領域の転写が継時的にコントロールされていることは, E1A遺伝子産物による初期プロモーター活性化の程度に差がある³⁰⁾ことや, 初期遺伝子の相互作用³¹⁻³⁵⁾などによるものと考えられる。ウイルス感染後約8時間でウイルスDNAの複製が始まる³⁾。これと同時に後期mRNAと後期タンパクの合成が始まり, 感染後約15時間でウイルス粒子が核内に蓄積してくる³⁾。ウイルスDNAの複製はゲノムの両末端から始まり, 一方のDNA鎖におきかわるような形で5'→3'方向に進行してゆく³⁶⁾。ウイルスDNA分子の両端には血清型によって異なる103(2型)から165(18型)塩基対の逆反復配列が認められる³⁷⁾が, 複製開始点はこの末端反復配列内に存在し³⁸⁾, アデノウイルス2型や5型の場合, 末端48塩基対がDNA複製に必要なものである³⁹⁻⁴⁵⁾。また, *in vitro*のDNA合成系が確立され⁴⁶⁾, 試験管内におけるウイルスDNA複製に必要な5種のタンパク質成分が同定された^{47,48)}。このうち3つはウイルス初期遺伝子産物の72キロダルトン(K)DNA結合タンパク質(DBP), 80K末端タンパク前駆体(pTP), および140KのアデノウイルスDNAポリメラーゼ(pol)であり, 他の2つは細胞由来核タンパク質(NFI, NFII)である。末端48塩基対は, pTP-pol複合体と細胞性タンパク質(NFI)が, それぞれ結合する部位を含むドメインI(0-20ヌクレオチド)とドメインII(17-48ヌクレオチド)から成る^{39,43,48)}。pTPとdCMPとの複合体がDNA合成のプライマーとして機能し, DBPはDNA鎖の伸長に必要である。pTPはウイルスにコードされるプロテアーゼによって消化され55Kの末端タンパクとなる⁴⁸⁾。

最近, E1AとE1B以外の初期領域についても, 感染過程やトランスホメーション過程における役割が次第に明らかになってきた。以下, 要点のみ述べる。E1AおよびE1B領域は, 非(半)許容性細胞においてはトランスホーム遺伝子として機能し, 細胞のトランスホメーションに密接な関連をもつ複数のタンパク質をコードしている。E1A遺伝子は他の初期領域の転写促進, あるいはエンハンサーを持つ遺伝子の転写抑制機能を持つ(詳細については後述)。E2A領域は72KのDNA結合タンパク質をコードし, ウイルスDNAの複製^{49,50)}, 初期遺伝子転写のスイッチオフ^{51,52)}, ウイルス粒子の集合⁵³⁾などに重要な役割を果たす。また, ウイルス粒子で誘発する場合には細胞のトランスホメーション効率にも影響を与える^{54,55)}。E2B遺伝子は140KのDNA

ポリメラーゼと 80 K のプライマータンパクをコードし、ウイルス DNA の複製に関与している(前述). E 3 領域にコードされる 19K のタンパクは、感染細胞やトランスホーム細胞中では糖タンパクとして細胞膜に結合して見出される^{56,57}. E3/19K タンパクは HLA-DR の α 鎖とホモロジーを持ち⁵⁸, ヒトの組織適合抗原である HLA クラス I 抗原と複合体を形成する^{59~62}. この複合体形成過程は HLA 抗原のグリコシル化阻害を伴ない, HLA 抗原の細胞膜上への発現を低下させる⁶³ことから, E3/19K タンパクは、宿主の細胞性免疫系によるウイルス感染細胞の認識に影響を与えることが示唆される. なお E3 領域は、培養細胞におけるウイルス増殖に必須ではない⁶⁴. ウイルスゲノム右端から発現する E4 遺伝子産物(34K)は、ウイルス DNA の複製, E2A 遺伝子産物や後期 mRNA の蓄積, 細胞 DNA およびタンパク合成の抑制などへの関与が示唆されている⁶⁵.

3. アデノウイルスによるトランスホーマーシオンとトランスホーム遺伝子の同定

一般にアデノウイルスはヒト由来の培養細胞であるヒト胎児腎細胞, KB 細胞, HeLa 細胞などでよく増殖し, ラット, ハムスター, マウスなどのげっ歯動物培養細胞をトランスホームする^{3,16}. ただし, ウイルスと宿主細胞の関係は血清型によって異なり, F 亜群アデノウイルス(40型, 41型)は例外的に KB 細胞や HeLa 細胞ではほとんど増殖しない^{9,10,66}. また, 非発がん性 2 型や 5 型はハムスター細胞である程度増殖するため, ハムスタ

ー細胞のトランスホーマーシオンには紫外線などで不活化したウイルスが用いられる^{3,16}. ラット細胞も 2 型と 5 型に対して半許容性を示す. 一方, ハムスターとラット細胞はアデノウイルス 12 型の複製に関しては完全に非許容性である. アデノウイルスの感染やアデノウイルス DNA のトランスフェクションによって, 非(半)許容性げっ歯動物細胞は再現性よくトランスホーマーシオンを起こしトランスホームフォーカスを形成する. ただし, トランスホーマーシオンを起こす細胞の割合はきわめて低く ($10^5 \sim 10^6$ 細胞あたり数個のフォーカス), 細胞集団からみるとトランスホーマーシオンはまれな出来事である¹⁶. アデノウイルス複製に許容性を示すヒト細胞をトランスホームすることはさらに難しいが, これまでにアデノウイルス 5 型 DNA 断片でトランスホームしたヒト胎児腎細胞株 (293)⁶⁷, クローン化したアデノウイルス 12 型 DNA 断片でトランスホームしたヒト網膜芽細胞株⁶⁸とヒト胎児腎細胞株⁶⁹の報告がある.

アデノウイルスで誘発したトランスホーム細胞は他の DNA 型腫瘍ウイルスや RNA 型腫瘍ウイルスで誘発したトランスホーム細胞と同様, がん組織由来の培養細胞とよく似た性質を示す³. すなわち, 細胞の形態変化(核/細胞質比の増大), 細胞の不活化(株化), 飽和密度の上昇, 血清要求性の低下, 軟寒天培地中でのコロニー形成能, 細胞表面の糖タンパクの変化, スードマウスや免疫抑制動物に移植後の腫瘍形成能などである. これらのうち, 動物における腫瘍形成能と相関し, 最も厳しい *in vitro* のクライテリアと考えられているのは, 軟

寒天培地におけるコロニー形成能である。

アデノウイルス・トランスホーム遺伝子のゲノム上の局在領域は2つの異なった実験的アプローチによって決定された。1つは、ウイルス粒子でトランスホームした細胞株中に共通して存続するウイルス DNA 部分を求めたもので、Cot 解析とサザンブロット法が用いられた⁴⁾。C 亜群アデノウイルス 2 型や 5 型で誘発した多くのトランスホーム細胞株を解析した結果、細胞 DNA 中に存続するウイルスゲノムのコピー数と DNA 部分は細胞株によって異なっていたが、すべての細胞株は必ずウイルス DNA の左端 14 % を含んでいた⁷⁰⁻⁷³⁾。従って、アデノウイルスゲノムの左端 14 % はトランスホメーションに必要な、あるいは少なくともトランスホーム状態を維持するのに必要なウイルス遺伝子を含むことが示唆される。もう 1 つの実験方法はリン酸カルシウム法⁷⁴⁾を用いたウイルス DNA 断片のトランスフェクション実験で、トランスホーム活性がウイルスゲノムの左端に局在することを直接証明するものであった。Graham ら (1974 年) は、精製したアデノウイルス 5 型 DNA の各種制限酵素切断断片を初代ラット腎細胞にトランスフェクトする一連の実験を行ない、左端 7.5 % の *Hind* III-G を含む DNA 断片にのみフォーカス形成能があることを見出した^{75,76)}。その後、強発がん性 12 型⁷⁷⁾、31 型⁷⁸⁾、弱発がん性 3 型⁷⁹⁾、7 型⁸⁰⁾、非発がん性 2 型⁸¹⁾、40 型¹⁵⁾、41 型¹⁵⁾においても、トランスホーム活性がウイルスゲノムの左端 7 ~ 8 % を含む DNA 断片に局在することが報告された。強発がん性 12 型の *Eco*RI-C 断片 (0-16.2 マップ単位)^{82,83)}、非発がん性 2 型、5 型の *Xho* I-C 断片 (0-16 マップ単位)^{81,84)}を初代ラット腎細胞、初代ハムスター腎細胞、あるいはラット 3Y1 細胞株にトランスフェクトすると、ほぼウイルス DNA の場合と同様の効率で再現性よくトランスホメーションを誘発する。得られたトランスホーム細胞は、ウイルス DNA やウイルス粒子で誘発したトランスホーム細胞と区別のつかない性質を示し、ヌードマウスや新生同系動物への腫瘍形成効率もウイルス粒子トランスホーム細胞と同様であった。さらに、効率は低いが、アデノウイルス 12 型 *Eco*RI-C 断片を直接注射した場合にも、新生ハムスターに腫瘍の形成が認められた⁸⁵⁾。左端 16 % のウイルス DNA 断片やウイルス粒子でトランスホームした細胞からは、必ず E1 領域 (1.3-11.2 マップ単位) 1 鎖由来のウイルス mRNA⁸⁶⁻⁸⁹⁾とこれらにコードされる複数種のウイルスタンパク⁹⁰⁻⁹⁷⁾が検出される。これらのことは、細胞のトランスホメーションと動物における造腫瘍活性が E1 領域の機能によることを示している。アデノウイルス 12 型や 5 型の *Hind* III-G 断片 (それぞれ左

端 6.8 % と左端 7.5 % に相当) は、E1 領域のうち E1A 領域および E1B 領域の左半分つまり 19K/21K コード領域を含む⁹⁸⁾(図 2) が、これら *Hind* III-G 断片は、ラットやハムスター細胞を効率よくトランスホームし、得られたトランスホーム細胞株の新生同系動物に対する腫瘍形成効率も高い^{77,84)}。しかし、E1B54K タンパクをコードする 12 型 *Eco*RI-C 断片誘発トランスホーム細胞と異なり、12 型 *Hind* III-G 断片誘発トランスホーム細胞はヌードマウスに腫瘍形成能を欠いており^{85,99)}、この点で E1 領域全体でトランスホームした細胞と異なっている。一方、E1A 領域だけを含むさらに小さな左端 DNA 断片でトランスホームした細胞は完全なトランスホーム細胞の形質をもたない (後述)。以上のことから、アデノウイルス・トランスホーム遺伝子は、ウイルスゲノムの左端 E1 領域内の E1A および E1B 遺伝子であるという結論となり、このことは一般に受け入れられている。しかし、左端領域以外にも発がん活性に影響を与える領域が存在するという報告もある^{100,101)}。

アデノウイルス DNA やウイルス粒子で誘発したトランスホーム細胞では、ウイルス DNA の複製や後期タンパクの合成は認められず、感染性ウイルスは検出されない³⁾。A 亜群アデノウイルス 12 型で誘発したラットあるいはハムスタートランスホーム細胞では、ウイルスゲノムのほぼ全域が 2 倍体細胞あたり 1-20 コピー組み込まれている場合が多い¹⁰²⁾。一方、C 亜群アデノウイルス 2 型、5 型で誘発したラットあるいはハムスタートランスホーム細胞では、ウイルス DNA 左端の E1A および E1B 領域を含むウイルスゲノムの一部のみが組み込まれている場合が多く、存続するウイルス DNA 部分やコピー数も多様である⁷⁰⁻⁷³⁾。アデノウイルス・トランスホーム細胞中に存続するウイルス DNA は、細胞染色体 DNA に共有結合によって組み込まれており、細胞 DNA とウイルス DNA の共有結合は安定である^{102,103)}。ウイルス DNA と細胞 DNA の組み換え領域には、両者の配列に部分的に相同性が認められる場合¹⁰⁴⁻¹⁰⁷⁾や 2 次構造を組める配列が認められる場合^{104,107,108)}があり、また隣接する細胞側の配列に 10塩基ほどの直列反復配列が存在する場合¹⁰⁶⁾が知られている。ただし、これらは必ずしも組み込み領域すべてに共通した特徴として観察されていない¹⁰²⁾。

4. アデノウイルス・トランスホーム遺伝子の構造と発現

前述のごとく、アデノウイルスのトランスホーム遺伝子は E1 領域に位置づけられる。E1 領域は隣接する 2

つの領域 E1A (1.3-4.5 マップ単位) と E1B (4.6-11.2 マップ単位) から成り、各領域はそれぞれ独自の転写プロモーターを持っている。このことは、DNA-RNA ハイブリッドの電顕像^{19,109)} や S1 スクレアゼ法¹⁸⁾ による解析、あるいは感染初期 RNA の転写プロモーターのマッピング実験^{110,111)} などによって明らかにされた。相補性テストでも E1 領域の突然変異株は2つの遺伝的相補群に分けられる¹¹²⁻¹¹⁴⁾。これまで調べられた

強発がん性12型^{98,115)}、弱発がん性7型^{116,117)}、非発がん性2型^{20,118)}、5型^{37,119,120)}のE1領域の構造はよく似ており、塩基配列に基づいた遺伝子構造が明らかになっている^{37,103)}(図2)。C垂直群アデノウイルス2型、5型(両ウイルスは塩基配列のホモロジーが99%と高い³⁷⁾)の場合、E1領域から、単一のプロモーターより転写される13S (1.0 キロ塩基 (kb))、12S (0.9 kb)、9S (0.5 kb) の3種の主要な mRNA が合成される^{18,118,121,122)}。

(A) アデノウイルス12型E1領域

(B) アデノウイルス5型E1領域

図2 アデノウイルス12型(A)および5型(B)の初期領域E1の構造と発現
(a) mRNAの転写地図: mRNAを実線で示す。破線はスプライスによって除かれる領域。
(b) 塩基配列から推定されるコード可能なタンパク質: mRNAにおいてタンパク質をコードしている領域を■で表わし、各タンパクの推定分子量とコードしている読み取り枠(frame)を示した。

これら3種のE1A mRNAは、共通の5'および3'末端配列を持つが、スプライスドナー部位がそれぞれ異なるためイントロンとして除かれる内部の塩基配列の長さが異なる³⁷⁾。E1A 13S mRNAと12S mRNAは、それぞれ推定値が32K(289アミノ酸)と26K(243アミノ酸)のポリペプチドをコードしている^{20,123)}。13S mRNAと12S mRNA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アミノ酸の有無だけが異なっている^{120,124,125)}。感染初期の細胞やトランスホーム細胞中に検出されるE1A mRNAは主として13Sおよび12S mRNAであり、9S mRNAは感染後期の細胞中に見出される¹²²⁾。このE1A 9S mRNAにコードされるポリペプチドは、スプライス部位より3'側では13S mRNAや12S mRNAとは別のアミノ酸読み取り枠を利用して合成されるため、C末端側のアミノ酸配列が異なっている¹²⁶⁾。なお、E1A遺伝子上流の転写調節領域内には、TATAボックス(E1A mRNAの転写開始部位より上流24-31ヌクレオチドに位置³⁷⁾)に加えて、複数のエンハンサー配列(転写開始部位の上流302-349¹²⁷⁾, 141-305¹²⁸⁾, および45-188¹²⁹⁾ヌクレオチドに位置)が存在する。アデノウイルス5型E1A遺伝子上流のエンハンサー配列¹²⁸⁾は、内部にレトロウイルスやその他のウイルスのエンハンサー領域内のくり返し配列とホモロジーの高いコア配列: AGGAAGTGA_CAを持ち、E1B遺伝子の転写レベルにも影響を与える。さらに、免疫グロブリン遺伝子にみられるような遺伝子内部のエンハンサー配列が、E1A遺伝子内部に存在することも報告されている¹³⁰⁾。

一方、アデノウイルス2型や5型のE1B領域からは、22S、13S、9Sの3種の主要なmRNAが合成される^{18,122)}(アデノウイルス2型の場合、これらに加えてさらに14.5Sと14SのE1B mRNAが同定された^{122,131,132)})。これらのうち、22S(2.2 kb) mRNAと13S(1.0 kb) mRNAは同じプロモーターから転写され同一の5'および3'末端を持っているが、スプライスドナー部位が異なっている¹²²⁾。9S mRNAはE1B領域の3'末端近くの独自のプロモーターから転写され、ウイルス粒子構成タンパク質のpIXをコードしている^{133~135)}。感染初期にはE1B領域から13S mRNAも転写されるが、22S mRNAが主要産物である^{122,136)}。ところが、感染後期になると逆に22S mRNAの転写は著しく減少し、13S mRNAおよびpIXをコードする9S mRNAの転写が増大する^{122,134)}。感染後期にE1B 13S mRNAが優先的に転写されるのは、感染後期に細胞質の13S mRNAの安定性が高まることに加えて、

13S mRNAのスプライスドナーがより利用されやすくなるためと考えられている¹³⁷⁾。トランスホーム細胞中で検出されるのは主に22S mRNAで、このE1B mRNAはタンパクコード領域が一部重複するが異なったアミノ酸読み取り枠を利用して、推定分子量21Kと55Kの2種の主要なE1Bタンパクを合成する^{20,120)}(図2, 図4)。

アデノウイルス12型E1領域の構成も、基本的には2型や5型の場合と同じである(図2)。アデノウイルス12型E1A mRNAは2つの転写開始点、2つのスプライスドナー部位の組み合わせによって4種類ある^{87,103)}が、C亜群アデノウイルスE1A遺伝子の場合と同様、イントロンの大きさの違いにより30K(266アミノ酸)と26K(235アミノ酸)の2つのポリペプチドがコードされている^{98,103)}。E1B mRNAは3種で、大きなmRNAは54Kと19Kの2種のポリペプチドを、中型サイズのmRNAは19Kと12Kの2種のポリペプチドをコード可能である^{98,103)}。

5. トランスホメーションにおけるE1AおよびE1B遺伝子の役割

5.1 DNA断片によるトランスホメーション

アデノウイルス5型DNAを左端から削ってゆくと、欠損が1~2%以上になり、E1A転写単位に及ぶと急激なトランスホーム活性の低下が観察される⁷⁵⁾。一方、E1領域の右末端から徐々に削ってゆく実験は、種々のサイズの左端DNA断片を用いて行なわれた。その結果、安定にトランスホーム活性を示す最小の左端DNA断片は、E1A領域に相当する左端4.5%であることが、12型¹³⁸⁾、3型⁷⁹⁾、7型⁷⁹⁾、2型^{139,140)}、5型^{139,140)}の各左端DNA断片で示された。これらE1A領域だけを含むDNA断片では、ウイルスゲノムDNAを用いた場合に比べ細胞のトランスホメーション効率が低下するだけでなく、得られたトランスホーム細胞は線維芽細胞様形態を示し、増殖が遅く飽和密度が低いことや、同系新生動物へ移植後の腫瘍形成効率が低いなどの点で、左端7~8%より大きなDNA断片でトランスホームした細胞とは明らかに異なる。このようなアデノウイルスE1A遺伝子によって誘発される細胞の増殖性変化を、初代培養細胞の場合は不死化(株化, immortalization)とか、不完全(incomplete)あるいは部分的(partial)トランスホメーションと呼び、細胞株の場合は不完全(部分的)トランスホメーションと呼んでいる。E1A領域に加えてE1B領域を含むアデノウイルス左端DNA断片は、完全な細胞のトランスホメーションを誘発することから、E1B領域はトランスホメーション形質の

発現に必須であると考えられる。一方、E1B 領域だけが発現しても細胞はトランスホメーションを起こさないことが、2つの実験系から示されている。1つは宿主域変異株を用いた実験（宿主域変異株については後述）で、E1A 遺伝子に欠損があるが、正常な E1B タンパクを合成するアデノウイルス 5 型の宿主域変異株（H5 *in500*, *hr440*）は、初代ラット細胞をトランスホームすることができない^{141,142}。同様の結果は、E1B 領域だけを含む DNA 断片のトランスフェクション実験によっても示された¹⁴³。すなわち、E1A 遺伝子がなくとも E1B 遺伝子が発現しうるように、SV 40 プロモーター/エンハンサー配列を連結して作成された機能的なアデノウイルス 5 型 E1B プラスミドは、初代ラット腎細胞を不死化することも、ラット 3Y1 細胞株をトランスホームすることもできなかった。

アデノウイルス 12 型 E1 領域をプラスミドにクローン化した後、E1A 13S mRNA にユニークな領域（E1A 12S mRNA ではイントロンとして除かれる領域）内に小さな変異を導入することによって、E1A 12S mRNA の合成には影響しないが、正常な 13S mRNA を合成できないアデノウイルス 12 型 E1A プラスミドが作成された¹⁴⁴。この E1A 遺伝子は、トランスに働いて E1B 領域を発現させる転写促進活性（この機能については後述）を示したにもかかわらず、ラット腎細胞をトランスホームする活性は認められなかった¹⁴⁴。このことは、E1A 13S mRNA 産物が細胞のトランスホメーションに必須であることを示唆している。また、クローン化アデノウイルス 12 型 E1 領域でトランスホームしたラット腎細胞は 100% の効率でヌードマウスに腫瘍を形成するが、クローン化アデノウイルス 5 型 E1 領域でトランスホームしたラット腎細胞では、50% のヌードマウスにしかな腫瘍を形成せず、潜伏期も 2 カ月以上と長くなる。腫瘍原性に関与するアデノウイルス E1 遺伝子の同定を主たる目的として、アデノウイルス 12 型と 5 型の E1A-E1B キメラ組み換え体が作成され、これらによってトランスホームした細胞の性質が調べられた^{145,146}。その結果、トランスホーム細胞の *in vitro* の性質は、E1A と E1B が 12 型、5 型のいずれの組み合わせの場合もほぼ同様であったが、ヌードマウスにおける腫瘍形成には 19K と 54K の両方の E1B タンパクが必要であること、アデノウイルス 12 型 E1 領域の高造腫瘍性は E1B 54K タンパクによってもたらされることが見出された。

5.2 トランスホーム領域内に変異をもつアデノウイルス変異株の解析

トランスホーム遺伝子に変異をもつアデノウイルス変異株は、条件致死変異株（conditional mutant）と無条

件致死変異株（nonconditional mutant）に分けられる。前者のうち温度感受性変異株に関しては、いくつかの研究室の精力的な努力にも関わらず、SV 40 で得られたような、トランスホーム遺伝子に温度感受性欠損を持つアデノウイルス変異株は分離されていない。E1 領域内に変異をもつアデノウイルスの条件致死変異株はすべて宿主域（host-range, *hr*）変異株であり、E1A 13S mRNA 産物の合成に欠損を持つものと E1B 54K/55K タンパクの合成に欠損をもつものがある。ここでは、変異株の分離された歴史的な背景をふまえて、トランスホーム遺伝子に欠損を持つアデノウイルス変異株を、宿主域（*hr*）変異株、欠失（挿入）変異株、および E1B 19K/21K コード遺伝子の変異株の 3 つに分けて説明する。各変異株における変異の位置と遺伝子産物に対する影響を図 3～図 5 に示した。

a) 宿主域（*hr*）変異株

トランスホーム領域内に変異を持つ多数の変異株が、主としてアデノウイルス 5 型で分離されている。E1 領域に欠損のあるウイルス変異株を選択的に分離するために、まずアデノウイルス 5 型 DNA の左端 11% の組み込みと発現のあるトランスホームヒト腎細胞（293 細胞株）が樹立された^{67,146}。次いで、この 293 細胞で増殖できるが HeLa 細胞では増殖できないウイルス株を選択することによって、E1 領域に欠損のある *hr* 変異株が分離された。Harrison らによって分離された一群のアデノウイルス 5 型の宿主域（Ad5 *hr*）変異株は、化学的処理あるいは紫外線照射によってウイルスゲノムに変異を導入した後、293 細胞を場として分離されたものである¹¹²。Ad5 *hr* 変異株は I 群と II 群の 2 つの遺伝的相補群に分けられ¹¹²、I 群 *hr* 変異株は E1A 領域内に、II 群 *hr* 変異株は E1B 領域内に変異を持つことが、marker rescue 法によって確かめられた^{148,149}。E1A 領域内に変異をもつ I 群 *hr* 変異株は、初代ラット胎児細胞をトランスホームできず、また、初代ラット腎細胞にはトランスホームフォーカスを形成するが、フォーカス由来のトランスホーム細胞を単離・継代することができない、すなわち細胞株として樹立不能であること（abortive transformation）が見出された^{96,150}。一方、II 群の Ad5 *hr* 変異株は、E1B 領域内に変異があり、いずれのラット初代培養細胞にもトランスホメーションを誘発することができなかった¹⁵⁰。これらの実験結果から、当初は E1B 遺伝子にトランスホメーションを開始あるいは誘発する（initiation）機能があり、E1A 遺伝子にはトランスホーム状態を維持する（maintenance）機能があると推定された。その後、I 群 Ad5 *hr* 変異株における変異部位が同定されると同

時に, ウイルス変異株のトランスホーム活性が再検討された. Ho らは, いくつかの Ad5 *hr* 変異株を新たに分離し, 既存の Ad5 *hr* 変異株とともに, これらのもつトランスホーム活性を再検討した¹⁵¹⁾. その結果, I 群 Ad5 *hr* 変異株はトランスホーム活性によって2つのグループに分けられることが見出された. 1つは, Ad5 *hr1* や Ad5 *hr2* に代表されるように, 高温 (38.5℃) では野生株よりも高率に初代ラット細胞をトランスホームするが, 低温 (32.5℃~35.5℃) ではほとんどトランスホーム活性を示さない (cold-sensitive) 変異株である. なお, Ad5 *hr1* や Ad5 *hr2* は増殖に関しても低温感受性で, 38.5℃では HeLa 細胞でよく増殖するが 32.5℃では増殖が制限される. もう1つのグループの I 群 *hr* 変異株 (Ad5 *hr3*, Ad5 *hr4*, Ad5 *hr5*) は, いずれの温度においてもほとんどトランスホーム活性を示さない¹⁵¹⁾. Ad5 *hr1* (cold-sensitive mutant) は, E1A 13S mRNA (289 アミノ酸産物をコード) にユニークな領域内のヌクレオチドが1つ (1055番) 欠失し, これによってアミノ酸読み取り枠がずれ (frame-shift mutation), 完全な289アミノ酸産物の代わりにC末端のアミノ酸配列を欠いた 28K のポリペプチドを合成する¹⁵²⁾ (図3). Ad5 *hr3* と Ad5 *hr4* (transformation defective) は, E1A 13S mRNA にユニークな領域内にそれぞれ1塩基の置換が起こり (missense mutation), みかけ上は野生株と同じ大きさの E1A 289 アミノ酸産物を合成するが, それぞれアミノ酸1つが変化している¹⁵³⁾. いずれの場合も, E1A 12S mRNA (243 アミノ酸産物をコード) は正常である. Ad5 II 群変異株 *hr6* は, E1B 領域内の 6.1~9.0 マップ単位間に変異があり, E1B55K タンパクを合成することができない⁹³⁾ (ただし E1B mRNA レベルは正常²⁴⁾). II 群の Ad5 *hr* 変異株は細胞にトランスホームメーションを誘発しないと報告されたが, その後, Ad5 *hr6* と Ad5 *hr50* から抽出したウイルス DNA を用いて DNA トランスフェクションを行なうと, 野生株由来のウイルス DNA とほぼ同じ効率で新生ラットおよび新生ハムスター腎細胞を完全にトランスホームすることが見出された¹⁵⁴⁾.

b) 欠失 (挿入) 変異株

以上述べた古典的な Ad5 *hr* 変異株とは別に, より効率のよい方法で分離された一群の欠失および挿入変異株が存在する. これらの変異株は, クローン化された E1 領域の特定の部位に欠失や挿入を導入 (site-directed mutagenesis) した後, ウイルスゲノムの右端約 96% のアデノウイルス 5 型 DNA 断片 (Ad5 *dl309* *Xba* I-A¹¹³⁾) と組み換え体を形成させ, 293細胞で分離したも

のである¹⁵⁵⁾. これらのウイルス変異株は, 主として E1A 13S mRNA と 12S mRNA の機能を分離する目的で作成され, 一般に, E1A 13S mRNA に変異をもつものは宿主域依存性を示す (293 細胞で増殖できるが HeLa 細胞では増殖できない) が, E1A 12S mRNA に変異をもつものは HeLa 細胞でも増殖可能である. これらの欠失 (挿入) 変異株の中には, 正常な E1A 12S mRNA を合成するが 13S mRNA を合成しないもの^{156~158)} と, 正常な 12S mRNA と 13S mRNA 289 アミノ酸産物の N 末端断片を合成する^{141, 159)} 一群の変異株がある (図3). 正常な E1A 13S mRNA を合成しないこれらの変異株の多くは, Ad5 *hr1* や Ad5 *hr2* と同様, 低温感受性のトランスホームメーションを誘発する^{156, 158, 159)} が, 一部の變異株 (H5 *dl105*¹⁵⁹⁾) は Ad5 *hr3* や Ad5 *hr4* と同様にトランスホーム活性を欠いている. すなわち, E1A 13S mRNA の合成だけに欠損をもつウイルス変異株が, Harrison らによって分離された古典的な I 群の Ad5 *hr* 変異株と同様, トランスホーム能を異にする2つのグループに分けられたことになる. E1A 領域から 12S mRNA だけを合成するアデノウイルス 5 型変異株 (H5 *dl101*, H5 *dl106*¹⁵⁹⁾) によってトランスホームしたラット細胞株は, 37℃以上の条件下では軟寒天培地中でコロニーを形成する完全なトランスホームメーション形質を示した. また, これらのウイルス変異株によっていったんトランスホームした細胞は, 低温 (32℃) で軟寒天培地におけるコロニー形成能が低下する¹⁵⁹⁾ことから, E1A 12S mRNA 産物はトランスホームメーションの誘発だけでなく, トランスホームメーション形質の発現 (維持) にも関与すると考えられる. 低温感受性のトランスホームメーションを誘発する変異株の中には, E1A 13S mRNA 289 アミノ酸産物の N 末端断片を合成するグループ (Ad5 *hr1*¹⁵²⁾, H5 *dl101*¹⁵⁹⁾, H5 *in106*¹⁵⁹⁾など) もあるが, 一方, E1A 13S mRNA とこれにコードされる 289 アミノ酸産物を全く合成し得ない変異株 (H5 *dl520*¹⁵⁶⁾, Ad2 *dl1500*¹⁵⁸⁾など) も存在する (図3). 従って, 低温感受性トランスホームメーションの誘発とその形質は, E1A 13S mRNA 289 アミノ酸産物の N 末端断片によるものではなく, E1B 12S mRNA にコードされる 243 アミノ酸産物の細胞内機能の結果である. 一方, E1A 13S mRNA にユニークな領域内に1塩基の置換が起こり (missense mutation) アミノ酸1つが変化しているが, 野生株と同じ大きさの 289 アミノ酸産物を合成する Ad5 *hr3*, Ad5 *hr4* や, frame-shift mutation によって比較的大きな E1A 289 アミノ酸の部分産物 (47K) を合成する H5 *dl105* では, E1A 12S mRNA が正常であるにもかかわらず

いずれの温度においてもトランスホーム活性が検出されない^{151,159)}。この理由として、未知の変異部位の存在も否定できないが、変異をもった full-length あるいはそれに近い E1A 289 アミノ酸産物が、E1A 243 アミノ酸産物の細胞内作用を抑制することも考えられる¹⁵³⁾。Winberg と Shenk は、E1A 12S mRNA のみを合成するアデノウイルス 5 型変異株 *dl347* のトランスホーム活性について報告している¹⁵⁷⁾。*dl347* はラット胎児細胞をトランスホームするが、フォーカス由来の細胞はむしろ非トランスホーム細胞様の形態を示し、細胞株と

して樹立され難い (abortive transformation) という結果が得られた (温度シフトによるトランスホームーション実験は行っていない)。この実験結果は、Graham ら¹⁵⁰⁾が Ad5 *hr1* を用いて、初代ラット腎細胞で報告した実験結果とよく似ている。低温感受性のトランスホームーションを誘発する Ad5 *hr1* や Ad5 *hr2* は、35.5°C では初代ラット胎児細胞をトランスホームしない (Graham の報告¹⁵⁰⁾では 37°C でも初代ラット胎児細胞をトランスホームしないという) ことから、36°~37°C がトランスホームーションを誘発する境界温度で、

図3 E1A領域内に変異をもつ主要なアデノウイルス 5 型および 2 型の変異株と変異部位。アデノウイルス 5 (2)型の E1A 領域から転写される mRNA を□へ□で示した。へはイントロンで、エクソン(□ □)内の転写開始および終結部位とシグナル配列の位置を示したもので、それぞれ文献37と20に従った。各ウイルス変異株の変異部位と E1A 領域から転写される 13S および 12SmRNA と、これらのコードする各 E1A タンパクを転写地図の下に示した。単一のヌクレオチドの置換を I, 挿入を □, 欠失を ■ で示し、アミノ酸読み取り枠の変化によって出現した新たな終止コドンで示した。

この場合に abortive transformation が観察されるのかもしれない。しかし、32°C ではトランスホメーションを示さないが、37°C ではトランスホメーションを観察している研究グループが多い^{156,158,159)}ことから、温度以外の条件が E1A 12S mRNA 243 アミノ酸産物の細胞内活性に影響を与えることも考えられる。いずれにせよ、正常な E1A 13S mRNA を合成しないウイルス変異株は、すべて野生株と異なり、低温でトランスホメーション活性を示さないか、あるいは全く細胞をトランスホームしないことになり、E1A 13S mRNA にコードされる 289 アミノ酸産物が細胞のトランスホメーションに重要であることを示している。

一方、E1A 12S mRNA のスプライスドナー部位に 1 塩基の置換を導入したり (Ad 2/5 *pm* 975¹⁶⁰⁾、E1A 13S mRNA のイントロンを欠失させたり (Ad 2 *dl* 231¹⁶¹⁾、Ad 5 *dl*348¹⁵⁷⁾) することによって、E1A 13S mRNA の合成には影響を与えないが、E1A 12S mRNA を合成しないウイルス変異株も分離されている (図 3)。E1A 13S mRNA だけを合成するこれらのウイルス変異株は、HeLa 細胞では野生株ウイルスや親株ウイルスと同レベルの増殖能を示す^{157,160,161)}ことから、E1A 12S mRNA がコードする 243 アミノ酸産物は少なくとも HeLa 細胞におけるウイルス増殖に必要なではない。ただし、培養細胞は実際にウイルスの感染する生体組織と同じではなく、アデノウイルスは、通常生体内の分化した非分裂細胞に感染するものと考えられる。Spindler らは、静止期にあるヒト由来の肺線維芽細胞を用いてアデノウイルス変異株 (*pm*975) の感染実験を行ない、E1A 243 アミノ酸産物が、静止期にある細胞での効率よいウイルス増殖に必要なであることを見出した¹⁶²⁾。E1A 12S mRNA を合成しない変異株はいずれも初代ラット細胞をトランスホームする活性を保持しており、トランスホーム細胞株も容易に得られるが、フォーカス形成効率は野生株の 1/5 以下である^{157,157,163)}。また、得られたトランスホーム細胞は、飽和密度や軟寒天培地でのコロニー形成効率が低く、むしろ E1A 領域だけで誘発した不完全トランスホーム細胞に近い^{158,163)}。トランスホーム細胞中の E1B 転写レベルは、野生株ウイルスでトランスホームした細胞と同様であったことから、これらトランスホーム細胞の不完全トランスホメーション形質は、E1A 13S mRNA が合成されないことによるものと考えられる。

前述した Harrison らによる II 群の Ad 5 *hr* 変異株とは別に、Babiss らは、site-directed mutagenesis の技法によって、E1B 領域に変異を持つアデノウイルス 5 型の宿主域変異株を分離した¹⁶⁴⁾。前述した様に、E1

A 領域と E1B 19K/21K タンパクコード領域だけを含むウイルス DNA 左端断片は、ウイルス DNA と同様に完全な *in vitro* トランスホメーションを誘発することが知られている。しかし、E1B 55K タンパクコード領域内にそれぞれ 8 塩基対と 472 塩基対の欠失があり、frame shift によって完全な E1B 55K 産物の代わりに 55K の N 末端ポリペプチド断片を合成する変異株 (それぞれ *dl*163, *dl*110, 図 4) では、ラット細胞におけるフォーカス形成効率が 1/20 ~ 1/200 に低下する。このうち C 末端アミノ酸配列の欠損の少ない E1B 55K ポリペプチド断片を合成する *dl* 163 では、野生株ウイルスでトランスホームしたラット細胞と同様の完全型のトランスホメーションが誘発され、変異が 55K タンパクの N 末端に近く、より小さなポリペプチド断片を合成しうる *dl* 110 では、フォーカス形成効率はさらに低くなり、軟寒天培地でコロニーを形成しない不完全なトランスホメーションが誘発された。E1B 19K コード領域は正常であることから、E1B 55K タンパクがトランスホメーション効率と完全なトランスホメーション形質の発現に影響を与えることが示唆される。また、ここで示した Babiss らの実験結果は、アデノウイルス DNA の左端約 7% の DNA 断片で完全なトランスホメーションが誘発されるのは、E1B 19K/21K タンパクの発現よりも、むしろ E1B 54K/55K タンパクの N 末端ポリペプチド断片の機能によるという、van der Eb らの主張¹⁶⁾にも一致するようにみえる。一方、Shiroki らは、最近、E1B 54K コード領域に欠失をもつアデノウイルス 12 型変異株 (Ad 12 *dl*207, 図 5) を分離し、ウイルス増殖とトランスホーム能に関する性質を報告している¹⁶⁵⁾。Ad 12 *dl*207 は宿主域依存性を示し、293 細胞でのみ増殖可能であった。また、野生株ウイルスに比べて効率は低下するものの、Ad 12 *dl*207 はラット細胞にトランスホームフォーカスを形成し、フォーカス由来の細胞は完全なトランスホメーション形質を示した。変異株ウイルス自身はハムスターに腫瘍を形成しなかったことから、E1B 54K タンパクはトランスホメーションあるいは発がんの開始に関与するが、トランスホメーションの形質の発現には影響を与えないことが示唆された。

c) E1B 19K/21K コード遺伝子の変異株

細胞致死活性の上昇と造腫瘍能の低下によって特徴づけられる一群のアデノウイルス 12 型変異株が Takemori らによって分離され^{166~168)}、*cyt* 変異株と呼ばれている。アデノウイルス 2 型や 5 型の *cyt* 変異株も得られている¹⁶⁹⁾が、いずれの場合も、強い細胞致死を伴う大きなプラーク形成 (この形質は *cyt* と名付けられている)

図4 E1B領域内に変異をもつ主なアデノウイルス5型および2型の変異株と変異部位。

アデノウイルス5(2)型のE1B領域から転写されるmRNAを□／◇で、アミノ酸コード部分を斜線で示してある。数値は転写開始(終結)部位とシグナル配列の位置を示しており(2型はカッコ内)、文献37と20に従った。各ウイルス変異株と変異部位、およびE1B遺伝子産物を転写地図の下に示した(図3参照)。

を特徴としている。一方、Chinnaduraiらは、アデノウイルス2型で *cyt* 変異株とよく似た大きなプラーク形成を特徴とする (*lp* 形質) *lp* 変異株を分離している¹⁷⁰⁾。これらの *cyt* (*lp*) 変異株は、多くの場合、感染細胞DNAの傷害を誘発する *deg* 形質を示す¹⁷¹⁻¹⁷³⁾。 *cyt* 変異株感染細胞にみられる細胞およびウイルスDNAの傷害は宿主によって異なり、HeLa, KB, BHK-21細胞で起こるがCV1や293細胞では起こらないという¹⁷⁴⁾。また、ヒト細胞における *cyt* 作用は劣性の性質を示し、野生株ウイルスの混合感染によってウイルスDNAの傷害が阻止される¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾。アデノウイルス *cyt* 変異株の感染によって誘発されるDNA傷害作用は、細胞の酸性エンドヌクレアーゼのインヒビターを介して起こることが示唆されている¹⁷⁴⁾。

すべての *cyt* (*lp*) 変異株は単一の遺伝的相補群に属し、変異部位はE1B領域内にマップされる^{173, 175-179)}(図4)。変異の内容は missense mutation や non-sense mutation などさまざまであるが、いずれの場合も正常なE1B 19K/21Kタンパクが合成されない。E1B 19K/21Kタンパクは、感染初期から後期にかけての中間期にその50%が核内に局在し、残りの50%は膜分画に見い出される¹⁸⁰⁾が、核内のE1B 19K/21Kタンパクは、酸性エンドヌクレアーゼによるウイルスおよび細胞DNAの傷害を防御することが推定される。 *cyt* 変異株のトランスホーム活性については、強い細胞致死作用のため検討不能であったという報告¹⁷³⁾もあるが、一般

に、アデノウイルス12型や2型、5型の *cyt* 変異株や2型の *lp* 変異株は、トランスホーム活性を示さないか、あるいはフォーカス形成効率が著しく低下している^{169, 175, 177, 178)}。一部の *cyt* 変異株は、ラット3Y1細胞に、著しく低い効率で非典型的なフォーカスを形成する¹⁶⁹⁾。Subramanianらは、site-directed mutagenesisの技法を用いてE1B 21Kタンパクを合成しないアデノウイルス2型の *cyt* 変異株 (*dl250*) を分離し、そのトランスホーム活性を初代ラット細胞およびラット細胞株を場として検討した¹⁷⁵⁾。Ad2 *dl250* のトランスホーム活性は著しく低く(野生株ウイルスの2%程度)、また、得られたトランスホーム細胞は軟寒天培地でコロニー形成能をもたない不完全トランスホメーション形質を示した。Fukuiらによって分離されたアデノウイルス12型の変異株Ad12 *in205 B*, *in205 C*, および *dl205* は、E1B 19Kコード領域内に欠失あるいは挿入変異をもち、正常なE1B 54Kタンパクを合成するがE1B 19Kタンパクを合成しない変異株である^{181, 183)}(図5、なお *cyt*, *lp*, *deg* などの形質については不明)。これらの変異株はヒト胎児腎細胞で野生株と同レベルの増殖性を示し *hr* 変異株ではないが、トランスホーム能に関しては、ラット3Y1細胞でのフォーカス形成効率は野生株ウイルスに比べて低下しており、トランスホーム細胞は軟寒天培地でコロニー形成を示さない。これらの結果は、E1B 19K/21Kタンパクのみがトランスホームフォーカス形成効率とトランスホメーション形質

図5 E1B領域内に変異をもつ主なアデノウイルス12型の変異株と変異部位。

アデノウイルス12型のE1B領域から転写されるmRNA(□)と、アミノ酸コード領域(斜線の部分)を示した。数値は転写開始(終結)部位とシグナル配列の位置(文獻98と115より)を示している。各ウイルス変異株と変異部位、およびE1B遺伝子産物を転写地図の下に示した(図3参照)。

の発現に必要なであることを示している。

6. アデノウイルスとアデノウイルストランスホーム細胞の造腫瘍性

新生シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) に接種したとき、腫瘍を誘発する能力に基づいて、アデノウイルスは強発がん性A亜群、弱発がん性B亜群、および非発がん性C〜F亜群に分けられることは前に述べた。強発がん性12型は新生ハムスターの約60%に腫瘍(未分化肉腫)を誘発し^{2,183)}、ハムスター以外のげっ歯動物においても、効率は低いがSprague-Dawleyラット¹⁸⁴⁾、マストミス¹⁸⁵⁾、C3HおよびCBAマウス^{185,186)}に腫瘍を形成することが知られている。一方、非発がん性2型の場合、新生ハムスターに腫瘍を形成したという確かな報告はみられない^{183,187)}。しかし、免疫抑制を受けた新生ラットにアデノウイルス2型を接種すると、低頻度ながら腫瘍の形成が観察される¹⁸⁸⁾。アデノウイルス12型や2型で誘発したトランスホーム細胞の造腫瘍性も、ウイルス粒子によって誘発する場合と相関した傾向が観察されるが、一般に腫瘍形成効率は高くなる。アデノウイルス2型トランスホームラット細胞を新生ラットに移植した場合の腫瘍形成はきわめて低頻度であるが¹⁸⁹⁾、アデノウイルス2型トランスホームハムスター細胞を新生ハムスターに移植した場合は50%以上の動物に腫瘍形成が認められる^{190~192)}。アデノウイルス12型トランスホーム細胞の場合、新生同系ラット、新生および成熟同系ハムスターのほぼ100%に腫瘍を形成する^{189~192)}。アデノウイルス12型と2(5)型間の腫瘍誘発能の差異を説明する試みとして、まず培養細胞におけるトランスホメー

ション活性やトランスホーム細胞の性質の違いから、腫瘍原性の違いを説明しようとする試みがなされた。しかし、非発がん性D亜群に属するアデノウイルス19型は、12型よりも50倍もの高い効率でラット胎児細胞をトランスホームする^{6,193)}ことや、12型と2型の間にラット細胞を場としたトランスホメーション効率に差が認められない¹⁸⁹⁾などの実験事実がある。また、トランスホーム細胞の性質に関しても、12型および2型トランスホームラットあるいはハムスター細胞株のもつさまざまな*in vitro*のトランスホメーション形質のいずれも、腫瘍原性との相関を示さない^{189,194)}。すなわち、強発がん性12型と非発がん性2型によってトランスホームした細胞を*in vitro*で明確に区別できないにもかかわらず、同系動物はこれらの差異を見きわめていることになり、腫瘍誘発能を決定する因子は、トランスホーム(腫瘍)細胞とげっ歯動物宿主間の相互作用に基づくものであらうと考えられるに至った。アデノウイルス誘発トランスホーム細胞のもつ免疫原性(腫瘍特異移植抗原 tumor specific transplantation antigen: TSTA に対する免疫誘発能)のレベルの差が、宿主に異なった程度の拒絶反応を惹起し、腫瘍原性の違いをもたらす可能性が考えられた。

TSTAはアデノウイルスに限らず、腫瘍ウイルスや腫瘍細胞によって免疫された宿主に細胞性免疫反応を誘発する能力として検出され、これによってTSTAを含む腫瘍細胞の傷害致死がもたらされる¹⁹⁵⁾。実際には、前もってウイルス粒子で免疫しておくと、感作されたリンパ球によって、引き続いてのウイルス腫瘍細胞による腫瘍形成が抑制される^{196~198)}。TSTAは個々のウイルス

種に特異的であることから、ウイルスゲノム上に TSTA をコードする領域を決定する試みがなされた。E1, E2 および E3 の各領域に欠損をもつそれぞれのウイルス変異株を前もってラットに免疫しておき、次いでアデノウイルス 2 型で誘発したラット腫瘍細胞株を注射して、腫瘍形成の抑制の程度が調べられた¹⁹⁹⁾。その結果、E1 領域に欠損をもつウイルス変異株は、野生株および E1 領域以外に変異のあるウイルス変異株に比べて TSTA の誘導レベルが低いことが見出された。また、アデノウイルス 12 型左端断片でトランスホームしたラット細胞は、出生直後のハムスターに接種されたアデノウイルス 12 型による腫瘍形成を抑制する効果を示す、という実験事実を利用して、TSTA をコードする左端領域の同定が試みられた²⁰⁰⁾。E1B 19K タンパクをコードする左端 6.8 % 以上の左端 DNA 断片でトランスホームしたラット細胞に腫瘍増生の抑制効果があったこと、さらに E1A 断片で誘発したトランスホーム細胞はこの腫瘍形成抑制効果を示さないことから、E1B 領域内に TSTA がコードされていることが示唆された。同様に、アデノウイルス 12 型の各左端断片で誘発したトランスホーム細胞を免疫原として用いた *in vitro* の細胞障害テストによっても、12 型に特異的な表面抗原は E1B 領域にコードされることが示唆された²⁰¹⁾。これらは、E1A あるいは E1B 領域に欠損を持つ変異株ウイルスや、E1A 領域と種々の長さの E1B 領域を含むトランスホーム遺伝子断片でトランスホームした細胞を免疫原としているところに共通点がある。最近、このような遺伝的欠損を持たない 5 型/12 型組み換えアデノウイルスを用いて、E1A と E1B 領域のどちらが TSTA の誘導に関与するかが調べられた²⁰²⁾。この方法は、アデノウイルス 5 型と 12 型とでは誘導される TSTA が免疫学的に交叉しない事実に基づいている。E1A, E1B の一方または両方をアデノウイルス 12 型由来の遺伝子に置換した 5 型組み換えウイルスでラットを免疫し、12 型 E1 クローンで誘発した造腫瘍性の同系ラットトランスホーム細胞を移植したところ、12 型の E1A 遺伝子をもつ組み換えウイルスのみがアデノウイルス 12 型と同様の免疫効果を示して腫瘍の増生を阻止した。一方、2 型で誘発した造腫瘍性細胞の移植に対しては、5 型の E1A 遺伝子をもつ組み換えウイルスのみがアデノウイルス 5 型と同様の免疫効果を示した。これらの結果は、アデノウイルス 5 型の場合にも 12 型の場合にも、特異的な TSTA 誘導には E1A 遺伝子が強く関与し、E1B 遺伝子は少なくとも特異性には関与しないことを示すものである。

アデノウイルストランスホーム細胞における TSTA の発現の程度と腫瘍原性の強さの間に負の相関関係があ

るかどうかが検討された^{189,192,203)}。同じ様に高い免疫原性 (TSTA に対する免疫誘発能) を示す、いくつかのアデノウイルス 2 型トランスホーム細胞の造腫瘍能が調べられた結果、新生ラットにおける腫瘍形成能は同じではなく、抗ラット胸腺血清で処理した新生ラットにのみ腫瘍を形成するものから、新生ラットに腫瘍を形成するものまでさまざまであった¹⁸⁹⁾。また、アデノウイルス 12 型トランスホームハムスター細胞は、2 型トランスホーム細胞よりも免疫原性が高かったにもかかわらず、成熟ハムスターにも腫瘍を形成するなど、2 型トランスホーム細胞よりも明らかに腫瘍原性が高い¹⁹²⁾。一方、特異的に感作した同系宿主由来の 2 次細胞障害性 T 細胞を用いて、アデノウイルス 12 型および 2 型トランスホームラット細胞株の細胞致死効果を調べた *in vitro* 実験においても、大きな差は見出されていない^{204,205)}。従って、感作宿主における細胞障害性 T 細胞が TSTA 特異的な腫瘍拒絶に重要であるとしても、これらの結果は、アデノウイルストランスホーム細胞の免疫原性の差は腫瘍誘発能の差に相関しないことを示している。

細胞障害性 T リンパ球や補体結合性抗体などとは別に、前もって特異的な感作を受けることなしに腫瘍細胞を破壊する natural cell-mediated cytotoxicity が存在する。この非特異的な免疫細胞、natural killer (NK) 細胞は、マクロファージと共にがん細胞に対して最初に働く宿主の防御機構であるとされている²⁰⁶⁻²⁰⁸⁾。アデノウイルストランスホーム細胞を非感作脾細胞の標的とした細胞障害試験を用いて、この一次的な宿主免疫反応に対するアデノウイルス 12 型および 2 型トランスホーム細胞の感受性が調べられた。その結果、免疫抑制宿主にのみ腫瘍を誘発するアデノウイルス 2 型トランスホームハムスター細胞株は、アデノウイルス 12 型や SV 40 トランスホームハムスター細胞よりも非感作のハムスター脾細胞の細胞致死効果に感受性が高いことが見出された²⁰⁹⁾。アデノウイルス 12 型と 2 型のトランスホームラット細胞株間の比較においても、特異的に感作した細胞障害性 T 細胞には同じ程度の感受性を示したにもかかわらず、アデノウイルス 2 型トランスホームラット細胞は NK 細胞による細胞致死に最も感受性が高く、一方高発がん性 12 型トランスホームラット細胞株は、これら免疫細胞による細胞致死作用に抵抗性を示した²⁰⁴⁾。アデノウイルス 12 型および 2 型トランスホーム細胞と同系宿主動物を用いた実験系で得られた以上の結果から、アデノウイルス 12 型と 2 型 (トランスホーム細胞) の腫瘍形成能の差は、むしろ一次的な宿主免疫反応に対する感受性の差が重要であることを示唆している。

一方、van der Eb らを中心とする研究グループは、

造腫瘍性の異なるアデノウイルス血清型由来の E1A, E1B 領域のキメラ組み換え体を用いて, 発がん活性の差をもたらすウイルス DNA 配列をつきとめようとした。彼らはまず, 強発がん性12型と非発がん性5型の E1A, E1B 領域を含む DNA 断片をそれぞれクローン化し, 5型 E1A と12型 E1B およびそれぞれが反対の組み合わせとなるキメラ組み換え体を作成した¹⁴⁵⁾。次いで, 各組み合わせの E1A-E1B クローンでトランスホームした一連のラット腎細胞株をつくり, ノドマウスと同系の新生ラットに移植後の腫瘍形成能を検討した^{145, 146, 210)}。その結果, ノドマウスを場とした移植実験では, 12型 E1B 領域をもつ組み換え体でトランスホームしたラット細胞は常に高造腫瘍性を示したのに対し, 5型 E1B 領域を含む細胞は低造腫瘍性を示した。同系新生ラットにおいては, 5型 E1 トランスホーム細胞は非造腫瘍性(拒癌ラットは0%)であったが, 12型 E1 トランスホーム細胞は強造腫瘍性(100%)を示した。ところが, 5型 E1A+12型 E1B でトランスホームしたラット細胞は100%のノドマウスに腫瘍を形成したにもかかわらず, 同系新生ラットには完全に非発がん性(0%)であった。一方, 12型 E1A+5型 E1B でトランスホームした細胞は10%のノドマウスと10%の同系ラットに腫瘍を形成した。以上の実験結果から, 発がん活性に差をもたらす2つの因子, E1A 領域と E1B 領域の存在が示唆された。1つは E1B 領域で, 宿主の細胞性免疫が関与しなければ, 各血清型由来の E1B 領域が造腫瘍性の強弱を決定することが示唆され, 2つの E1B 遺伝子産物のうち 54K タンパクが重要であることは前に述べた。もう1つは E1A 領域で, 強発がん性12型 E1A 領域が発現した場合, トランスホーム細胞は免疫適格動物に拒絶されなくなるという説明がなされた。すなわち, トランスホーム細胞の造腫瘍性の程度は, ノドマウスにおける増殖能で測る場合, E1B 領域の由来によって決定され, 一方, 細胞性免疫機構を逃れる能力は E1A 領域で決定されるという説明である。次に, 彼らは, 非トランスホームラット腎細胞に対するマウスの抗血清を用いて, アデノウイルス12型 E1A 導入ラット細胞と5型 E1A 導入ラット細胞間で, 発現の異なる細胞タンパクを検索した²¹¹⁾。その結果, アデノウイルス5型 E1A 遺伝子が発現しているラット細胞と非トランスホームラット細胞の両者に存在する2種類の細胞性タンパクが, 12型 E1A 遺伝子が発現しているラット細胞では欠如することが見出された²¹¹⁾。このうち1つは, 主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex: MHC)によってコードされる分子量45Kのクラス I 抗原の重鎖であった(他の1つは不明)。12型

E1A 遺伝子発現細胞内ではクラス I 遺伝子の細胞質 mRNA が検出されないことから, 12型 E1A 遺伝子によるクラス I 重鎖発現の抑制は転写レベルで起こると考えられている。なお, クラス I 軽鎖(β_2 ミクログロブリン)の合成は阻止されない。宿主細胞内の外来抗原はクラス I MHC 抗原とともに細胞性免疫システムによって認識されることから, クラス I 抗原を欠く細胞は, 細胞性免疫防御機構によっては排除され得ないことが予想される。従って, アデノウイルス5型 E1A 遺伝子が発現しているトランスホーム細胞は, 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てしまうために非発がん性であり, 一方, 12型 E1A 遺伝子が発現している細胞は, 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がん性を示すと考えられる。ただし, 指適しておくべきことは, 初代培養細胞を用いてトランスホーム細胞を作成し, 継代数の少ない時点で調べた場合に MHC クラス I 抗原の発現の抑制が観察されるが, 3Y1 細胞のような細胞株を用いた場合, クラス I 抗原遺伝子の発現のスイッチオフは認められないということである。van der Eb らのグループは, *in vitro* アッセイ系においても, アデノウイルス12型 E1A 導入細胞は, 5型 E1A 導入細胞よりも細胞障害性T細胞による細胞致死効果に感受性が低いことを報告している²¹⁰⁾。この結果は, 前述の Raska and Gallimore²⁰⁴⁾ と Föh-ring ら²⁰¹⁾の, 2次細胞障害性 T 細胞は *in vitro* でアデノウイルス12型トランスホーム細胞に反応を示す(ただし報告された細胞致死効果のレベルは高くない), という報告と必ずしも一致しない。Mellow らは, 腫瘍原性の異なるいくつかのアデノウイルス12型および2型トランスホームラット細胞におけるクラス I MHC 産物の発現量を, 間接蛍光抗体法を用いて調べた²¹²⁾。その結果, クラス I MHC 抗原(RI1^c)の濃度は, 非トランスホーム線維芽細胞やアデノウイルス2型トランスホーム細胞株よりも, 12型トランスホーム細胞ではやや低いという, van der Eb らのグループと関連する結果が得られた。ところが, アロ抗原で免疫した脾細胞による細胞障害の感受性と, 各トランスホーム細胞の示す腫瘍形成能との間に相関は見出せなかったと報告している。また Sawada らは, 前述の E1A, E1B 領域を組み換えたアデノウイルスを用いてラット胎児初代細胞をトランスホームして得た一連の細胞株について解析して, 12型 E1A を発現する細胞ではクラス I MHC 抗原量が少ないこと, および細胞障害性T細胞による障害に比較的抵抗性であるとともに, NK 細胞による障害に対しても抵抗性であることを示した²¹³⁾。5型 E1A を発現するトランスホーム細胞はすべて NK 細胞とアロ抗原感作

した細胞障害性T細胞の両者に感受性が高く、同系ラットに腫瘍を形成しなかった。しかし、12型E1Aを発現して両者に対し比較的抵抗性である細胞株が必ずしも強い腫瘍原性をもつとは限らず、中には全く腫瘍を形成しないものもあった。

以上述べてきたように、現時点では一致した結果が得られていないため、A亜群アデノウイルス12型とC亜群アデノウイルス2(5)型の腫瘍形成能の差を一元的に説明することはできない。しかし、非感作で動く natural cell-mediated cytotoxicity (2(5)型トランスホーム細胞は障害されやすい)、E1B 54K タンパク (12型E1B54K タンパクがヌードマウスにおける腫瘍形成に必要)、クラス I MHC 抗原発現に対する影響 (12型E1A遺伝子はこの発現を抑制する)などの複数の因子が、アデノウイルス発がん性の強弱に関与すると考えられる。

7. アデノウイルス E1A 遺伝子の機能

7.1 E1A 遺伝子産物の生化学的特性

アデノウイルス2型や5型のE1A遺伝子産物を、*in vitro* タンパク質合成系を用いてE1A mRNA から合成したり^{124,136,214,215)}、抗血清や特異抗体、あるいは単クローン抗体を用いて感染細胞やトランスホーム細胞から免疫沈降させ^{92,114,216~218)}、SDS ゲル電気泳動で分離すると、35~58K のサイズ間に複数のバンドとして検出される。担がん血清を用いた免疫沈降法では、これに加えて、10~15K や 25K の E1A タンパクがトランスホーム細胞中に検出される^{92,114)}。アデノウイルス2型や5型のE1A遺伝子産物のみかけ上の分子量は研究グループによって差があるが、少なくとも4種のE1Aポリペプチドが検出され、53K、47K、41K、35K¹²⁴⁾ や 58K、54K、48K、42K¹³⁶⁾ (*in vitro* タンパク質合成系)、あるいは52K、50K、48.5K、45K²¹⁶⁾ (免疫沈降法)などの報告がある。単離したE1A 13S、12S mRNAのそれぞれを用いた*in vitro* タンパク質合成実験^{124,131)}や、E1A 13S mRNAあるいは12S mRNAのいずれか一方のみを合成するウイルス変異株を用いた解析²¹⁶⁾によって、4種の主要なE1Aポリペプチド(例えば、52K、50K、48.5K、45Kの場合)のうち、52Kと48.5Kは13S mRNAにコードされ、50Kと45Kは12S mRNAにコードされることが見出された。アデノウイルス2型や5型のE1A遺伝子産物の分子量は、塩基配列の情報から得られる推定値(13S mRNAは32Kの289アミノ酸産物、12S mRNAは26Kの243アミノ酸産物をコードする¹¹⁸⁾)よりもかなり大きい(5型:16~18%)のためと考えられる。強発がん性アデノウイ

ルス12型のE1A遺伝子産物も、C亜群アデノウイルスの場合と同様、複数種が検出されている。ウイルス感染初期細胞やトランスホーム細胞由来のE1A mRNAを用いた*in vitro* タンパク質合成実験や担がん血清を用いた免疫沈降法によって、ペプチド種の少ない報告では41K⁸⁵⁾ や 40K と 38K^{219,220)}、多い報告では22~38Kにわたる少なくとも8種類⁹⁷⁾、あるいは15~17K、23~29K、41Kなど複数種²²¹⁾のE1Aタンパクが検出されている。また、C末端16アミノ酸残基から作成した特異抗体を用いた免疫沈降法では、47Kと45Kの2種のE1Aタンパクが、アデノウイルス12型感染初期細胞とトランスホーム細胞に見出された²²²⁾。

担がん血清やE1A遺伝子産物に特異的な抗体を用いて、E1Aタンパクの細胞内局在が調べられている^{217,223~225)}。ウイルス感染細胞やトランスホーム細胞の抽出物を遠心操作などによって5~6の分画に分けた後、抗血清を用いて免疫沈降反応を行なうと、E1Aタンパクは核質と細胞質からはほぼ同量づつ検出され、一部は細胞骨格分画にも見出される^{223,225)}。E1A 13S mRNA産物に特異的な抗体を用いた実験では、核内のE1A 289アミノ酸産物は核マトリックスに結合して存在することが示唆された²²⁴⁾。一方、蛍光抗体法によって、E1Aタンパクの細胞内局在を調べると、特異蛍光は感染細胞の核内に顆粒状あるいはパッチ状に散在して見出され、細胞質ではびまん性の蛍光が観察される^{217,223,226)}。

アデノウイルス5型E1A遺伝子産物N末端部の13のアミノ酸配列が、4種のE1Aタンパクの間で同一であること²²⁷⁾や、人工合成したN末端8アミノ酸残基やC末端6アミノ酸残基に対する特異抗体が、主要なE1Aタンパクのすべてを免疫沈降させる^{217,228)}などの実験事実があり、複数種のE1Aタンパクの存在は、複数の開始コドンの使用やN末端あるいはC末端部の部分的分解などにより生ずるものではなさそうである。C亜群アデノウイルスのE1A 13S mRNAと12S mRNAに相補的なcDNAが発現ベクターにクローン化され、*E. coli*中で合成されたE1A遺伝子産物が解析されている^{226,229~233)}。菌体内で合成されたE1Aタンパクはリン酸化を受けず、13S mRNA、12S mRNA産物のうち、それぞれ分子量の小さいタンパク(13S mRNA 289アミノ酸産物は48.5K、12S mRNA 243アミノ酸産物は45Kタンパク)のみが検出されるが、これらの各E1Aタンパクを*Xenopus oocyte*にマイクロ注入してやると、各E1Aタンパクは部分的に変化してそれぞれ大きい方の13S、あるいは12S mRNA産物(52Kと50K)として検出された^{231,234)}。この変化は、感染細胞やトランスホーム細胞内で起こるものと同一であるとは

表 1 アデノウイルストランスホーム遺伝子産物とその機能

遺伝子産物	mRNA	機 能
E1A 30K/32K (5型: 289 AA, 12型: 266 AA)	13 S mRNA	<ul style="list-style-type: none"> ・初代培養細胞を不死化(株化)する ・培養細胞を不完全にトランスホームする ・ヒトがん(活性型 <i>ras</i>) 遺伝子と協力して初代培養細胞をトランスホームする ・mRNA の転写促進 <ul style="list-style-type: none"> ウイルス初期遺伝子 (E1A 自身, E1B, E2, E3, E4) ーウイルス増殖に必須 細胞遺伝子 (熱誘導タンパクや β-チューブリン遺伝子) 導入遺伝子 (β-グロビン遺伝子) ・mRNA の転写抑制 <ul style="list-style-type: none"> 細胞遺伝子 (12型: クラス I 組織適合抗原) 導入エンハンサー型遺伝子 (SV 40, ポリオーマウイルス初期遺伝子) ・TSTA の特異的発現に関与 (13S mRNA 産物 and/or 12S mRNA 産物)
E1A 26K (5型: 243 AA, 12型: 235 AA)	12 S mRNA	<ul style="list-style-type: none"> ・静止期細胞におけるウイルス増殖に関与 ・低温感受性のトランスホーメーションを誘発 ・mRNA の転写促進 <ul style="list-style-type: none"> ウイルス初期遺伝子 ・mRNA の転写抑制 <ul style="list-style-type: none"> 後期プロモーターからの E2A 遺伝子の発現を抑制 SV 40 初期遺伝子
E1B 19K/21K および 22 S mRNA	13 S mRNA および 22 S mRNA	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞の完全なトランスホーメーションに必須 ・細胞 DNA およびウイルス DNA の安定化 ・ウイルス DNA 複製の効率を上げる ・ウイルス増殖には不必要
E1B 54K/55K	22 S mRNA	<ul style="list-style-type: none"> ・ウイルス増殖に必須 ・ウイルス後期 mRNA および後期タンパクの細胞質集積に関与 ・トランスホーメーションの開始に関与するがトランスホーメーション形質の発現には不必要 ・トランスホーム細胞のヌードマウスにおける造腫瘍性に必須 ・細胞性腫瘍抗原 p53 と結合 (5型トランスホーム細胞), E4/25K と結合

各項目の内容および文献については本文参照.

いえないにしても, 小さい方の E1A タンパクが 13S および 12S mRNA の完全な一次産物であり, それぞれ大きい方の E1A ポリペプチドの前駆体であることが示唆される. E1A 遺伝子産物は感染細胞内では比較的短命であるといわれていた^{223,235)}. 289 アミノ酸産物と 243 アミノ酸産物のいずれか一方のみを合成するウイルス変異株を用いて, 実際に各 E1A タンパクの感染細胞内の半減期を調べてみると, 289 アミノ酸産物は 35 分, 243 アミノ酸産物は 80 分であった²³⁵⁾. 一方, E1A 遺伝子産物をパルスラベルした後, 2次元電気泳動で展開

し, 4種の E1A タンパクの半減期をラベルの消長によって求めると, E1A 289 アミノ酸産物と 243 アミノ酸産物のうち, 小さい方の E1A タンパクの半減期は 289 アミノ酸 48.5 K は 45 分, 243 アミノ酸 45 K は 30 分であったのに対し, 大きい方の E1A タンパクは 289 アミノ酸 52K が 75 分, 243 アミノ酸 50K は 200 分と, 半減期の延長が認められた²³⁷⁾. この実験結果も, 小さい方の E1A タンパクが, それぞれ大きい方の E1A タンパクの前駆体であろうという推測に合致している.

Fergusson らが菌体内で合成した E1A 289 アミノ

酸産物と E1A 243 アミノ酸産物は、いずれも培養細胞の細胞質にマイクロ注入すると直ちに核へ移行することや、同量ずつ注入した場合には、アデノウイルス初期遺伝子の転写をほぼ同レベルで促進することが示されている²³²⁾。また、E1A 289 アミノ酸産物と 243 アミノ酸産物の一方のみを合成する E1A cDNA を静止期の細胞にマイクロ注入すると、2 種の E1A タンパクは同じ様に細胞 DNA 合成を誘発することが報告されている²³⁸⁾。Kriipple らは、C 亜群アデノウイルスの E1A コード領域内にさまざまな欠失を導入した一連の E1A cDNA クローンを作成し、*E. coli* 内で合成した種々の欠失をもった E1A タンパクを精製した²³³⁾。これらの E1A タンパクを Vero 細胞の細胞質へ注入し、E1A タンパクの細胞質から核への移行、および E1A 欠失変異株 H5 dl 312 の発現を誘発する活性を解析した²³³⁾。その結果、正常の E1A 13S および 12S mRNA 産物は 30 分以内に Vero 細胞の細胞質から核へ移行したのに対し、C 末端 66 アミノ酸を欠いた E1A 産物は、注入後 7～8 時間ようやく核への移行が観察された。また、H5 dl 312 遺伝子の発現に必須の E1A タンパク内の配列はタンパク分子内部 (23～222 アミノ酸残基) に含まれること、さらに第 1 エクソン単独でも低レベルながらアデノウイルス遺伝子の発現を誘発することが見出された。従って、急速な核移行に必要な情報と H5 dl 312 遺伝子発現 (転写の trans-activation 活性: 詳細は後述) に必要な情報は、E1A 遺伝子上で、離れたドメインにコードされていることになる。一方、菌体内で合成されたこれらの修飾 E1A 産物を *Xenopus oocyte* に注入して、核内に移行する E1A タンパクの割合と、同時に注入した E3 プロモーター / CAT 遺伝子の発現の程度が調べられた²³⁴⁾。その結果、13S mRNA 産物の第 1 エクソンにほぼ相当するペプチド (3～150 アミノ酸残基) は、その 76 % が、注入されてから 24 時間後には核内に見出されるようになること、また、13S mRNA 産物の第 1 エクソンに相当するペプチド (3～120 アミノ酸残基) に転写の trans-activation 活性がある (ただし効率は正常の 289 アミノ酸産物や 243 アミノ酸産物の約 60 % に低下) ことを報告している。

複数の研究グループが、アデノウイルス 5 型や 12 型の初期タンパクに関連したタンパクキナーゼ活性について報告している^{239～243)}。このタンパクキナーゼ活性は、担がん血清を用いてウイルス感染細胞から免疫沈降させたタンパク中に見出され、IgG 長鎖、ヒストン H3、E1B 55K 産物などをリン酸化するという (リン酸化チロシンは検出されない)。しかし、このタンパクキナーゼ活性の起源については同定されておらず、否定的な報告もあ

る²²⁵⁾。最近、Green を中心とする研究グループは、アデノウイルス 12 型 E1A 13S mRNA (266 アミノ酸産物をコード) と E1A 12S mRNA (235 アミノ酸産物をコード) のそれぞれに対する cDNA を *E. coli* の *trp-lac* プロモーターの下流にクローン化し、菌体内で合成した 12 型 E1A タンパクの生化学的特性を解析している^{222,224,245)}。*E. coli* 内で合成された 12 型 E1A タンパクは、酸性の等電点 (pI: 5.2～5.4) を持った 47 K のタンパクで、N 末端と C 末端のアミノ酸配列から推定されるものと同一であった^{222,244)}。E1A 遺伝子産物は菌体内ではリン酸化を受けず、*in vitro* でも autophosphorylation を受けないが、KB 細胞から抽出した cAMP および Ca^{2+} 非依存性のタンパクキナーゼの作用によって、感染細胞中の E1A タンパクと同様のリン酸化を受ける²⁴⁵⁾。E1A タンパク分子内のリン酸化アミノ酸はスレオニンやチロシン残基ではなく、もっぱらセリン残基であった。SV 40 大型 T 抗原 (セリンとスレオニンがリン酸化) やポリオマウイルス中型 T 抗原 (セリン、スレオニン、チロシンがリン酸化) のリン酸化に比べ、E1A タンパクのリン酸化は特徴的であるといえよう。

7.2 アデノウイルス E1A タンパクの転写調節活性

E1A 遺伝子に欠損のあるウイルス変異株 (Ad 5 dl 312 や Ad 5 hr1) の感染細胞中では、ウイルスゲノム上の初期領域からの転写が著しく低下する^{24,25)}。一方、正常な E1A 13S mRNA を合成するが、E1A 12S mRNA を合成しないウイルス変異株 (Ad 2/5 pm 975 や Ad 5 dl 348) は、感染 HeLa 細胞において野生株と同レベルの初期領域の発現とウイルス増殖を起こす^{157,160)}。これらのことから、E1A 13S mRNA 産物が初期領域の活性化に重要で、E1A 12S mRNA 産物はウイルス増殖に必須ではないと考えられた。ただし、Ad 5 dl 312 や Ad 5 hr1 を高 moi (multiplicity of infection) で細胞に接種したり、あるいはタンパク合成阻害剤で細胞を処理した後にウイルス変異株を接種すると、8～12 時間後には野生株と同レベルの初期 mRNA の集積が観察される²⁷⁾ことから、E1A タンパク質は初期領域の発現に促進的に働く。E1A タンパクによる初期遺伝子発現の促進は、転写開始のレベルで起こり、初期プロモーターからの転写速度が増大する^{27,246)}。E1A タンパクによる転写促進効果は、初期プロモーター間で同じではなく、E2 と E3 遺伝子は E1A タンパク依存性が強いが、E4 遺伝子は E1A タンパク依存性が低く、E1B 遺伝子はさらに低い³⁰⁾。E1A タンパクを産生しない変異株 Ad 5 hr440 が、感染細胞中で野生株と同レベルの E1B 22S mRNA および E4 mRNA を産生すること¹⁴²⁾

や, E1B 遺伝子をハムスター細胞にマイクロ注入すると, E1A タンパクの共存にかかわらずほぼ同レベルの E1B 遺伝子産物が検出される²⁴⁷⁾などの報告も, E1B と E4 領域は E1A タンパクに対する依存度が低いことを示唆している. いずれにしても, E1A 遺伝子は, タンパク質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) 転写を促進することが明らかとなり, E1A タンパクのこの機能を転写の *trans*-activation 作用と呼んでいる. 前述した様に, E1A 12S mRNA 産物は, 少なくとも HeLa 細胞におけるウイルス増殖に必要なではない. しかし, E1A 13S mRNA に欠損があるが野生株と同じ 12S mRNA を合成するウイルス変異株の中には, 低レベルながらも他のアデノウイルス初期領域の転写を誘発するものも認められる^{141, 157)}. 変異株の解析以外にも, E1A 12S mRNA 産物の転写促進機能に関する報告がいくつかみられる. Fergusson らは, 遺伝子工学によって菌体内で合成した E1A 13S および 12S mRNA 産物を, それぞれ同じ分子数 (感染細胞内と同レベルの 4×10^5 monomer) だけ細胞にマイクロ注入し, E3 遺伝子の転写促進性を調べた結果, 前記 2 種の E1A タンパクはいずれも同程度の転写促進活性をもつことを見出した²³²⁾. Leff らも, E1A 13S, 12S mRNA のそれぞれの cDNA のトランスフェクション実験によって同様の結果を得ている²⁴⁶⁾. E1A 13S mRNA を合成しないウイルス変異株感染細胞において, 他の初期領域の転写レベルが低下することについては, E1A 12S mRNA の発現そのものが, E1A 13S mRNA 産物の正のコントロールを受けるためかもしれない²⁴⁸⁾.

アデノウイルス E1A タンパクは, ウイルスゲノム上の初期領域だけでなく, ヒト β -チューブリン遺伝子²⁴⁹⁾, ヒト熱誘発性遺伝子^{250, 251)}, ヒト β -グロビン遺伝子^{252, 253)},あるいはラットプレプロインスリン遺伝子²⁵⁴⁾などの哺乳動物遺伝子の発現を転写レベルで促進する. これらのうち前 2 者は内在性細胞遺伝子の活性化であり, ヒト β -グロビン遺伝子の場合は E1A 遺伝子と共に外から導入したときの活性化であり, ラットプレプロインスリン遺伝子の場合はウイルスゲノムに組み込んだ細胞遺伝子の活性化である. さまざまな細胞遺伝子が E1A タンパクによって活性化される印象を受けるが, ウイルス感染細胞中で E1A 遺伝子が持続的に発現しても, 細胞遺伝子由来の hnRNA のレベルは変わらない²⁵⁵⁾ことから, E1A タンパクは単に RNA ポリメラーゼ II による転写を促進するわけではないらしい. 実際, ヒト β -グロビン遺伝子とラットプレプロインスリン遺伝子は, E1A 遺伝子と共に外から細胞に導入した場合に限って活

性化され, 一方, これらに対応する細胞内在性遺伝子発現の誘発は認められない^{252, 254)}. E1A タンパクは新たに細胞に導入された非ウイルス性遺伝子の転写を促進するが, この作用はいくつかの点でウイルス感染細胞におけるアデノウイルス初期遺伝子転写の促進とは異なっている. 1 つは, ラットプレプロインスリン遺伝子をアデノウイルスとの組み換え体として感染によって細胞に導入しても, ウイルス初期領域からの転写に比べ発現が遅れる²⁵⁴⁾. また, 赤芽細胞や脾の β 細胞中では, β -グロビン, プレプロインスリン遺伝子の転写は, ほとんどが cap 部位から起こるが, E1A タンパクに活性化されたこれら細胞遺伝子の転写のかなりのものが cap 部位の上流 100 塩基対までの領域のさまざまな場所から始まっていた^{252, 254)}. 従って, 細胞に新たに導入されるという特殊な条件下では, E1A タンパクは非ウイルス性遺伝子の転写を促進し得るが, 既して, アデノウイルス初期遺伝子と 70K 熱誘発性遺伝子が多くの非ウイルス性遺伝子よりも, E1A タンパクの転写促進活性により反応性が強いといえよう. なお, E1A タンパクは, RNA ポリメラーゼ II による転写を促進し得るだけでなく, RNA ポリメラーゼ III によって転写される遺伝子の発現をも活性化する²⁵⁶⁾. 複数の細胞およびアデノウイルス初期遺伝子の発現がアデノウイルス E1A タンパクによって活性化されることや, ヘルペス (仮性狂犬病) ウイルス IE (immediate early) 遺伝子によってもアデノウイルス初期領域の転写が活性化される²⁵⁷⁾ ことなどから, E1A タンパクによる転写の *trans*-activation 作用は, 塩基配列の特異性に基づくものではないらしい. E1A タンパクによる転写の *trans*-activation に必要な初期プロモーター内の塩基配列は, 転写開始に必要なコントロール領域と分離できず, E1A タンパクに特異的に影響を受けるプロモーター内の配列は見出せないことが, E1A 自身²⁴⁸⁾, E1B²⁵⁴⁾, E2A²⁵⁹⁻²⁶²⁾, E3²⁶³⁾の各プロモーターで報告されている. E4 領域だけは例外的に, E1A タンパクによる転写促進に関係する上流領域の塩基配列が存在する²⁶⁴⁾. 単純ヘルペスウイルス 1 型の糖タンパク D 遺伝子プロモーターの実験系においても, IE 遺伝子による転写の *trans*-activation に特異的な塩基配列は見出されていない²⁶⁵⁾. E1A タンパクによる転写の *trans*-activation のメカニズムは不明であるが, 1) E1A タンパクが細胞側に働きかけ (リプレッサーの不活化など) プロモーターからの転写を促進する^{27, 257)}, 2) E1A タンパクは, DNA が集合して安定な転写複合体を形成するのを促進する²⁹⁾, などの仮説が考えられている.

アデノウイルス E1A 遺伝子産物は, トランスに働いて他の遺伝子の発現に影響を与えるが, 転写の促進だけ

でなく、転写の抑制という負のコントロール作用も合わせてもっている。E2A 初期プロモーターおよび E2A 後期プロモーターの一方のみを上流に連結した E2A 遺伝子 DNA を、E1A 遺伝子とともにハムスター細胞にマイクロ注入し、E2A 遺伝子産物の発現を蛍光抗体法で調べると、初期プロモーターから転写の始まる E2A タンパクは E1A の存在下で産生量が高まるが、一方、後期プロモーターを連結した E2A 遺伝子の発現は、E1A タンパクが共存すると逆に低下することが見出された^{247,266}。このことは、E1A 遺伝子産物が E2A タンパクの発現を別々にコントロールすることを示しているが、後期プロモーターからの E2A 遺伝子発現の抑制は、E1A 12S mRNA のコードする 243 アミノ酸産物によって誘発されることが示された⁶²⁸。Borrelli らは、SV40 やポリオマウイルスのエンハンサー配列をウサギβグロビン遺伝子に連結し、このキメラ組み換え体を HeLa 細胞にトランスフェクトして、グロビン遺伝子の発現を調べた²⁶⁷。このとき、アデノウイルス 2 型 E1A DNA を同時に細胞に導入するとβグロビン mRNA の転写が抑制されることを見出した。エンハンサー DNA を同時にトランスフェクトする競合実験を行なうと、βグロビン遺伝子の発現は E1A 遺伝子による抑制から開放されることから、エンハンサー自身が E1A タンパクによる転写抑制の標的であることが示唆された。Velcich と Ziff も、E1A タンパクがエンハンサーに依存する SV40 初期プロモーターから始まる転写を抑制すること、E1A 289 アミノ酸産物と E1A 243 アミノ酸産物の両者とも同程度の転写抑制活性を示すことを報告している²⁶⁸。このように、アデノウイルス E1A 遺伝子は、エンハンサーによって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の転写を抑制すると考えられる。アデノウイルス E1A 遺伝子産物は、E1A 遺伝子自身に働いてその転写を抑制することを示唆する実験結果も得られている一方、E1A 13S mRNA と 12S mRNA の発現には、E1A 13S mRNA にコードされる 289 アミノ酸産物の発現が必要であるという報告もあり²⁴⁸、ウイルス感染過程やトランスホメーション過程における E1A 発現のコントロールについてはさらに検討を重ねる必要がある。一方、アデノウイルス E1A 遺伝子の導入によって、トランスホーム細胞中でスイッチオンあるいはスイッチオフされる細胞遺伝子の解析が進められているが、アデノウイルス 5 型 E1A 13S mRNA、12S mRNA のそれぞれをコードする cDNA を導入したマウス細胞では、フィブロネクチンとコラーゲンタイプ I 遺伝子の発現が抑制されるという報告がある²⁷⁰。アデノウイルス 12 型 E1A 遺伝子による MHC クラス I 遺伝

子の発現抑制については前に述べた。

7.3 E1A 遺伝子産物の機能的特性とトランスホメーション

細胞のトランスホメーションに中心的な役割を果たすアデノウイルス E1A 遺伝子の、どのような生化学的あるいは酵素学的活性が細胞にトランスホメーションを誘発するのであろうか？ 細胞の増殖性変化に関連すると思われるアデノウイルス E1A 遺伝子の機能として、細胞骨格に対する影響、細胞 DNA 合成の誘導、あるいは転写調節活性などがあるが、細胞のトランスホメーションが未知の E1A タンパクの細胞内機能による可能性も否定できない。アデノウイルス E1A 遺伝子は、導入された細胞において、チミジンキナーゼ遺伝子の発現を誘導し²⁷¹、染色体異常やアクチンマイクロフィラメントの減少、あるいは細胞 DNA の合成と細胞周期の変化を誘発する^{272~276}。Liu らは、*c-myc*、*c-H-ras*、p53 遺伝子など細胞周期に依存して誘発される10種類の細胞遺伝子を取り上げ、アデノウイルス 2 型感染によってこれらの遺伝子の発現が誘発されるかどうかを調べた²⁷⁷。ここで取り上げた細胞周期依存性の細胞遺伝子のうち、アデノウイルス 2 型感染によって発現が上昇するものはそのうち5種 (2F1, ornithine decarboxylase, p53, thymidine kinase, histone H3) で、*c-myc*、p53 など他の5種の遺伝子は誘発されなかった。このことは、アデノウイルス感染 (E1A 遺伝子) によって誘発される細胞 DNA 合成のメカニズムは、血清刺激によって起こるものとは同一でないことを示唆している。E1A 289 アミノ酸産物と E1A 243 アミノ酸産物のどちらが欠けても完全な細胞のトランスホメーションは誘発されなくなるが、一方、転写促進および抑制活性に関しても、2種の E1A タンパクが同様の転写促進 (抑制) 活性をもつことを複数の研究グループが報告している^{232,263,268}。この意味では、E1A タンパクのもつ転写促進活性と細胞のトランスホメーション活性は分離される¹⁵⁸ という以前の結論は修正されなければならない。C 亜群アデノウイルス E1A タンパクの第1エクソンコードドメインは、*Xenopus oocyte* の細胞質へ注入後核内に局在すること、また転写の trans-activation 活性を有することが報告されている²³⁴。トランスホメーション活性に関しても、Haley らは、9S mRNA しか合成できないアデノウイルス 5 型の E1A プラスミド pD1/D2 が、SV 40 エンハンサーを連結した場合に限って初代ラット腎細胞を不死化することを見出している¹⁵⁶。このことは、発現が高まれば E1A タンパクの N 末端アミノ酸残基で初代培養細胞の不死化が可能であることを意味するのかもしれない。また、van der Eb らのグループは、

キメラ E1A プラスミドのうち E1A 第 1 エクソンが 12 型由来である場合, ラットトランスホーム細胞内の MHC クラス I 抗原遺伝子の転写を抑制するが, 第 1 エクソンが 5 型由来である場合, MHC 遺伝子の転写抑制は観察されないことを報告している²⁷⁸⁾. これらのことは, E1A タンパクの核内局在や転写促進活性, あるいはアデノウイルス 12 型の場合には MHC クラス I 抗原遺伝子の発現抑制活性と, 弱いながらも細胞を不死化する活性が, 主として E1A タンパクの第 1 エクソンコードドメインによって行なわれることを示している. しかし, E1A タンパクの転写調節活性が, 最終的に細胞のトランスホメーションをもたらす生化学的活性であるかどうかは今のところ不明である. Bos らは, アデノウイルス 12 型 E1A 領域内の *Rru* I 部位 (1055 番目のヌクレオチド) 周辺に変異を導入した *Eco*RI-C 断片 (0-16.2 マップ単位) をクローン化し, トランスホーム活性と E1B プロモーター領域に働く転写促進活性を調べた¹⁴⁴⁾. その結果, E1A 13S mRNA に変異のある E1A プラスミド (pR7) と 13S および 12S mRNA の両者に影響を与える E1A プラスミド (pR11) は, 正常の E1A 遺伝子と同レベルかそれ以上の E1B 転写活性を示したにもかかわらず, ラット腎細胞に対するトランスホメーション活性は検出されなかった (ただし, SV40 エンハンサーを連結するとフォーカス形成を認める). この実験結果に一般性があるとすれば, E1A 遺伝子による転写促進活性の程度と細胞のトランスホメーション活性の程度は相関しないことを示唆しているが, 転写調節活性とトランスホーム活性との関連を確立するためにはさらに多くの検討が必要である. E1A 遺伝子は *myc* 遺伝子と同様, 活性型 *c-ras* がん遺伝子とともに初代ラット細胞に導入された場合, これを完全にトランスホームすることが知られている^{279,280)}. E1A 遺伝子産物と *myc* 遺伝子産物はいずれも核内で働くがん遺伝子で, ある程度のアミノ酸配列のホモロジーが見出されている²⁸¹⁾. しかし, アデノウイルス E1A 遺伝子と *myc* 遺伝子は, DNA 結合能の有無 (アデノウイルス E1A 遺伝子は *myc* 遺伝子と異なり DNA 結合能を持たない²³²⁾) や, 細胞に与える増殖性変化 (*myc* 遺伝子単独で初代培養細胞を株化できるというはっきりした報告はない) が異なり, また, *myc* 遺伝子には trans-activation 活性は報告されている²⁸²⁾ものの, アデノウイルス初期遺伝子の転写を促進する機能は認められない²³²⁾など, 機能的に異なった点も多い.

8. アデノウイルス E1B 遺伝子の機能

トランスホーム細胞中の E1B 領域からは, 主として

22S mRNA が合成され, 54K/55K と 19K/21K の E1B 遺伝子産物が検出される. これら主要な E1B タンパクに加えて, しばしば E1B 54K/55K 産物に関連したいくつかの E1B タンパクも検出される^{95,96,131,140)}. とくにアデノウイルス 2 型の感染細胞やトランスホーム細胞から, E1B 55K 産物と共通のアミノ酸配列をもった 17-20 K の E1B タンパクが検出されている^{95,131,140)}. これは新しく見出された 2 つのイントロンを持った E1B 14S mRNA (155 アミノ酸産物をコード) から合成されるものと考えられている^{131,132)}. E1B 54K/55K タンパクも, E1A タンパクと同様, 感染細胞の核質と細胞質に見出される^{217,223)}が, 細胞骨格との関連は見出されていない²²³⁾. アデノウイルス 5 型でトランスホームした各種細胞株や E1B 領域を含む左端 DNA 断片でトランスホームしたラット細胞では, E1B 55K 産物は細胞性 p 53 タンパクと複合体を形成して存在する^{283,284)}. p 53 タンパクは, SV 40 や EB ウイルスなどの DNA 型腫瘍ウイルス, レトロウイルス, 化学発癌剤によって誘発したトランスホーム細胞や, 各種ヒト細胞などにおいて, 量的増加が認められる³⁾ことから, p 53 の細胞内蓄積と細胞のトランスホメーションとの関連が注目されている. SV 40 やアデノウイルスでトランスホームした細胞中には, 非トランスホーム細胞におけるよりも多量の p 53 タンパクの存在が認められるが, これは主として, ウイルス T 抗原との複合体形成によって p 53 タンパクの細胞内寿命が延長するためである^{285,286)}. 初代ラット腎細胞やアデノウイルス 5 型 E1A 領域で誘発した不完全トランスホームラット細胞では, p 53 の細胞内の half life は 1 時間以下であるのに対し, E1B 55K タンパクの合成が認められるアデノウイルス 5 型や 12 型でトランスホームしたラット腎細胞では, half life は約 10 時間に延長する²⁸⁶⁾. なお, トランスホーム細胞と異なり, 増殖感染細胞における E1B 54K/55K タンパクは細胞性 p 53 タンパクとは結合していない²⁸³⁾. アデノウイルス 5 型トランスホーム細胞中の E1B 55K タンパクは, 細胞性 p 53 タンパクと複合体を形成して細胞質の小体を集積して存在する²⁸⁴⁾. この細胞質小体における E1B 55K タンパクの集合は, アデノウイルストランスホーム細胞に一般的な現象ではない. アデノウイルス 12 型左端 DNA 断片でトランスホームしたラット腎細胞の場合, p 53 タンパクと E1B 54K タンパクの複合体は検出されず, これら 2 種のタンパクはいずれも核内に見出される²⁸⁶⁾. アデノウイルス 12 型および 5 型トランスホーム細胞において, p 53 タンパクの細胞内濃度と安定性は同じ様に上昇している²⁸⁶⁾ことから, ウイルスタンパクとの複合体形成は p 53 タンパクの安

定性や濃度の増加の必要条件ではないらしい。E1B 55K タンパクは 25K の E4 遺伝子産物とも複合体を形成することが報告されている²⁸⁷⁾。また、アデノウイルス感染後期には、宿主の細胞 mRNA の細胞質への輸送が阻害され細胞タンパクの翻訳が著しく制限される^{255, 288)}が、このことは感染後期における E1B 55K タンパクの核内集積と関連があると推測されていた²²³⁾。Babiss らは、正常な E1B 55K タンパクを合成できないアデノウイルス 5 型変異株 (*dl118*, *dl163*) を分離し、感染細胞中の細胞性およびウイルス性 mRNA とタンパク合成に対する影響を検討した^{289, 290)}。正常な E1B 55K タンパクを合成できないこれらウイルス変異株の感染によって、感染細胞の核内ではウイルス DNA の複製と後期 mRNA の合成は正常に起こるが、細胞質における後期 mRNA の集積と後期タンパクの翻訳、および宿主細胞タンパク翻訳の阻止が効率よく行なわれない。この理由として、E1B 55K タンパクが、ウイルス後期 mRNA の細胞質への輸送や安定性に関与する、あるいはウイルス後期タンパクの翻訳を阻害する細胞因子を不活化するなどの可能性が考えられるが、詳細は不明である。

Persson らは、アデノウイルス 2 型感染細胞から E1B 15K タンパク (21K 産物に相当) を生化学的に精製し、これに対するウサギ血清を得て、E1B 15K タンパクが感染細胞やトランスホーム細胞の膜分画に存在することを見出した¹⁸⁰⁾。Grand らも、担がん血清と細胞分画法によってアデノウイルス 12 型 E1B 19K タンパクの細胞内局在を検討し、同様の結果を得ている²²⁵⁾。White らは、E1B 21K の C 末端に対する抗ペプチド抗体を用いた間接蛍光抗体法と免疫電顕法によって、感染細胞中の E1B 21K タンパクの細胞内局在を検討した結果、感染中期 (感染後 12~17 時間) には E1B 21K は核膜周辺と細胞質に局在するが、感染後期 (感染後 40 時間) には、もっぱら核膜に沿って強い蛍光 (標識) が観察されることを報告している²⁹¹⁾。また、*deg* 形質を示さない *lp* 変異株 (Ad2 *lp* 3) 感染細胞中の E1B 21K タンパクは、野生株ウイルスの場合と同様の細胞内局在を示したのに対し、細胞 DNA の強い傷害を起こす *cyt* (*lp*) 変異株 (Ad2 *cyt*106, Ad2 *lp*5) の場合、感染細胞中の E1B 21K タンパクは核膜から離れた核質内に弱い蛍光として観察された²⁹¹⁾。このことは、核膜に一致して存在する E1B 21K タンパクが、ウイルス感染細胞中で細胞のエンドスクレアーゼによるウイルスおよび細胞 DNA の傷害を防御する機能を持つことを示唆している。なお、アデノウイルス E1B タンパクは細胞の完全なトランスホメーション形質の発現に必須であるが、この分子機構についてはわかっていない。

9. おわりに

アデノウイルストランスホーム遺伝子の構造と発現が、トランスホーム細胞の形質との関連で精力的に研究され、多数の業績が積み重ねられてきた。ここ数年の間に、E1A 領域の重複する 2 つのトランスホーム遺伝子を機能的に分離し、それぞれの E1A タンパクを *E. coli* 内で合成できるようになった。アデノウイルスの E1A 遺伝子は、*myc*, *myb*, *fos*, p53, ポリオーマウイルス大型 T 抗原遺伝子などと共に核内で働くがん遺伝子であり、この点からも E1A 遺伝子のもつ転写調節活性の研究は、今後も盛んに行なわれるものと思われる。しかし、最終的に細胞のトランスホメーションをもたらす E1A 遺伝子産物の機能が転写調節活性であるかどうかは不明である。腫瘍ウイルスとしてのこれまでのアデノウイルス研究は、がん原物質としてのアデノウイルストランスホーム遺伝子と、結果的に生じたがん (トランスホーム) 細胞の解析が、主として行なわれてきた。それでは、アデノウイルストランスホーム遺伝子が細胞内のどこで (細胞内局在)、何に (基質) 働き、どのようにして (生化学的活性)、正常細胞をトランスホーム細胞に変えるのか、という最も重要な問題に関して私たちは多くを知らない。アデノウイルスのトランスホーム遺伝子に限らず、他の DNA 型腫瘍ウイルスやレトロウイルス、さらにがん組織から分離されたヒトがん遺伝子についても、がん遺伝子産物がどのようにして細胞をがん化させるかをつきとめることは、細胞分裂を含めた正常細胞の機能を明らかにすることであり、細胞病理学といった 1 つの学問大系を確立するに等しいと思われる。発がんの分子機構の解明はがんの治療に結びつくだけでなく、生命そのものの研究であり、アデノウイルスによるトランスホメーション機構の研究は、今後も着実に、しかし益々精力的に行なわれてゆくであろう。

REFERENCES

- 1) Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gillmore, L. K., Parrott, R. H. and Ward, T. G. (1953) Isolation of a cytogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84, 570
- 2) Trentin, J. J., Yabe, Y. and Taylor, G. (1962) The quest for human cancer viruses. *Science* 137, 835-841.
- 3) Tooze, J. (ed) (1981) *Molecular Biology of Tumor Viruses*, 2nd ed. Part 2, DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 4) 藤永 薫 (1985) がん遺伝子の分子生物学 講談社

- 5) Huebner, R. J. (1967) Adenovirus-directed tumor and T antigens. In : Pollard, M. (ed) Perspectives in Virology, Vol 5, Academic, New York, pp 147-166.
- 6) McAllister, R. M., Nicolson, M. O., Reed, G., Kern, J. I., Gilden, R. V., Huebner, R. J. (1969) Transformation of rodent cells by adenovirus 19 and other group D adenoviruses. J. Natl. Cancer Inst. 43, 917-927.
- 7) Green, M., Mackey, J. K., Wold, W. S. M. and Rigden, P. (1979) Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad 1-Ad 31) form five groups (A-E) based upon DNA genome homologies. Virology 93, 481-492.
- 8) Wadell, G., Hammarskjöld, M.-L., Winberg, G., Varsanyi, T. W. and Sundell, G. (1980) Genetic variability of adenoviruses. Ann. N.Y. Acad. Sci. 354, 16-42.
- 9) Johansson, M. E., Uhnöo, I., Kidd, A. H., Madeley, C. R. and Wadell, G. (1980) Direct identification of enteric adenovirus, a candidate new serotype associated with infantile gastroenteritis. J. Clin. Microbiol. 12, 95-100.
- 10) De Jong, J. C., Wigand, R., Kidd, A. H., Wadell, G., Kapsenberg, G., Muzerie, C. J., Wermenbol, A. G. and Firtzlaff, R. G. (1983) Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infantile stool. J. Med. Virol. 11, 215-231.
- 11) Chiba, S., Nakata, S., Nakamura, I., Taniguchi, K., Urasawa, S., Fujinaga, K. and Nakao, T. (1983) Outbreak of infantile gastroenteritis due to type 40 adenovirus. Lancet II, 954-957.
- 12) Wadell, G. (1984) Molecular epidemiology of human adenoviruses In : Doerfler, W. (ed) Current Topics in Microbiology and Immunology 110, The Molecular Biology of Adenoviruses 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 191-220.
- 13) van Loon, A. E., Rozijn, Th. H., de Jong, J. C. and Sussenbach, J. S. (1985) Physicochemical properties of the DNAs of the fastidious adenovirus species 40 and 41. Virology 140, 197-200.
- 14) Wigand, R., Bartha, A., Dreizin, R. S., Esche, H., Ginsberg, H. S., Green, M., Hierholzer, J. C., Kalter, S. S., McFerran, J. B., Pettersson, U., Russell, W. C. and Wadell, G. (1982) Adenoviridae: second report. Intervirology 18, 169-176.
- 15) van Loon, A. E., Mass, R., Vaessen, R. T. M. J., Reemst, A. M. C. B., Sussenbach, J. S. and Rozijn, Th. H. (1985) Cell transformation by the left terminal regions of the adenovirus 40 and 41 genomes. Virology 147, 227-230.
- 16) van der Eb, A. J. and Bernards, R. (1984) Transformation and Oncogenicity by Adenoviruses. In : Doerfler, W. (ed.) Current Topics in Microbiology and Immunology 110, The Molecular Biology of Adenovirus 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 23-51.
- 17) Flint, S. J. (1982) Expression of adenoviral genetic information in productively infected cells. Biochem. Biophys. Acta. 651, 175-208.
- 18) Berk, A. J. and Sharp, P. A. (1978) Structure of adenovirus 2 early mRNAs. Cell 14, 695-711.
- 19) Chow, L. T., Broker, T. R. and Lewis, J. B. (1979) Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2. J. Mol. Biol. 134, 265-303.
- 20) Gingeras, T. R., Sciaky, D., Gelinas, R. E., Jiang, B. D., Yen, C. E., Kelly, M. M., Bullock, P. A., Parsons, B. L., O'Neill, K. E. and Roberts, R. J. (1982) Nucleotide sequences from the adenovirus 2 genome. J. Biol. Chem. 257, 13475-13491.
- 21) Stillman, B. W., Lewis, J. B., Chow, L. T., Mathews, M. B. and Smart, J. E. (1981) Identification of the gene and mRNA for the adenovirus terminal protein precursor. Cell 23, 497-508.
- 22) Lewis, J. B. and Mathews, M. B. (1980) Control of adenovirus early gene expression: a class of immediate early products. Cell 21, 303-313.
- 23) Shaw, A. R. and Ziff, E. B. (1980) Transcripts from the adenovirus 2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families. Cell 22, 905-916.
- 24) Jones, N. and Shenk, T. (1979) An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3665-3669.
- 25) Berk, A. J., Lee, F., Harrison, T., Williams, J. and Sharp, P. A. (1979) Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. Cell 17, 935-944.
- 26) Nevins, J. R., Ginsberg, H. S., Blanchard, J. M., Wilson, M. C. and Darnell, J. E. (1979) Regulation of the primary expression of early adenovirus transcription units. J. Virol. 32, 727-733.
- 27) Nevins, J. R. (1981) Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. Cell 26, 213-220.
- 28) Persson, H., Monstein, H.-J., Akusjärvi, G. and Philipson, L. (1981) Adenovirus early gene products may control viral mRNA accumulation and translation *in vivo*. Cell, 23, 485-496.
- 29) Gaynor, R. B. and Berk, A. J. (1983) *Cis*-acting induction of adenovirus transcription. Cell 33, 683-693.
- 30) Osborne, T. F., Gaynor, R. B. and Berk, A. J. (1982) The TATA homology and the mRNA 5' untranslated sequence are not required for

- expression of essential adenovirus E1A functions. Cell. 29, 139-148.
- 31) Babich, A. and Nevins, J.R.(1981) The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the 72 Kd DNA-binding protein. Cell. 26, 371-379.
- 32) Nevins, J. R. and Winkler, J. J.(1980) Regulation of early adenovirus transcription: a protein product of early region 2 specifically represses region 4 transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1893-1897.
- 33) Handa, H., Kingston, R. E. and Sharp, P. A. (1983) Inhibition of adenovirus early region IV transcription *in vitro* by a purified DNA binding protein. Nature (London) 302, 545-547.
- 34) Goding, C., Jalinot, P., Zajchowski, D., Boeuf, H. and Kédinger, C. (1985) Sequence specific trans-activation of the adenovirus E1a early promoter by the viral E1V transcription unit. EMBO J. 4, 1523-1528.
- 35) Ross, S. R., Levine, A. J., Galos, R. S., Williams, J. and Shenk, T. (1980) Early viral proteins in HeLa cells infected with adenovirus type 5 host-range mutants. Virology 103, 475-492.
- 36) Lechner, R. L. and Kelly, T. J. Jr.(1977) The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. Cell. 12, 1007-1020.
- 37) van Ormondt, H. and Galibert, F. (1984) Nucleotide Sequences of Adenovirus DNAs. In Doerfler, W. (ed.) Current Topics in Microbiology and Immunology 110, The Molecular Biology of Adenoviruses 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 73-142.
- 38) Hay, R. T., Stow, N. D. and McDougall, I. M. (1984) Replication of adenovirus mini-chromosomes. J. Mol. Biol. 175, 493-510.
- 39) Tamanoi, F. and Stillman, B. W. (1983) Initiation of adenovirus DNA replication *in vitro* requires a specific DNA sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6446-6450.
- 40) van Bergen, B. G. M., van der Ley, P. A., van Driel, W., van Mansfeld, A. D. M. and van der Vliet, P. C. (1983) Replication of origin containing adenovirus DNA fragments that do not carry the terminal protein. Nucleic Acids Res. 11, 1975-1989.
- 41) Challberg, M. D. and Rawlins, D. R. (1984) Template requirements for the initiation of adenovirus DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 100-104.
- 42) Lally, C., Dörper, T., Gröger, W., Antoine, G. and Winnacker, E.-L. (1984) A size analysis of the adenovirus replicon. EMBO J. 3, 333-337.
- 43) Guggenheimer, R. A., Stillman, B. W., Nagata, K., Tamanoi, F. and Hurwitz, J. (1984) DNA sequences required for the *in vitro* replication of adenovirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3069-3073.
- 44) Rawlins, D. R., Rosenfeld, P. J., Wides, R. J., Challberg, M. D. and Kelly, T. J.(1984) Structure and function of the adenovirus origin of replication. Cell, 37, 309-319.
- 45) Hay, R. T. (1985) The origin of adenovirus DNA replication: minimal DNA sequence requirement *in vitro*. EMBO J. 4, 421-426.
- 46) Challberg, M. D. and Kelly, T. J. Jr. (1982) Eukaryotic DNA replication: viral and plasmid model systems. Annu. Rev. Biochem. 51, 901-934.
- 47) Nagata, K., Guggenheimer, R. A. and Hurwitz, J. (1983) Adenovirus DNA replication *in vitro*: synthesis of full-length DNA with purified proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4266-4270.
- 48) Friefeld, B. R., Lichy, J. H., Field, J., Gronostajski, R. M., Guggenheimer, R. A., Krevolin, M. D., Nagata, K., Hurwitz, J. and Horwitz, M. S.(1984) The *In vitro* Replication of Adenovirus DNA. In Doerfler, W (ed) Current Topics in Microbiology and Immunology 110, The Molecular Biology of Adenoviruses 2. Springer-Verlag, Berlin, pp 221-255.
- 49) Ensinger, M. J. and Ginsberg, H. S. (1972) Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus. J. Virol. 10, 328-339.
- 50) Horwitz, M. S. (1978) . Temperature-sensitive replication of H5ts125 adenovirus DNA *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4291-4295.
- 51) Carter, T. H. and Blanton, R. A. (1978) Auto-regulation of adenovirus type 5 early gene expression. II. Effect of temperature-sensitive early mutations on virus RNA accumulation. Virology. 28, 450-456.
- 52) Carter, T. H. and Blanton, R. A. (1978) Possible role of the 72,000-dalton DNA-binding protein in regulation of adenovirus type 5 early gene expression. J. Virol. 25, 664-674.
- 53) Nicolas, J. C., Sarnow, P., Girard, M. and Levine, A. J. (1983) Host range temperature conditional mutants in the adenovirus DNA binding protein are defective in the assembly of infectious virus. Virology 126, 228-239.
- 54) Ginsberg, H. S., Ensinger, M. S. Kauffman, R. S., Mayer, A. J. and Lundholm, U. (1974) Cell transformation: a study of regulation with types 5 and 12 adenovirus temperature-sensitive mutants. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 419-426.
- 55) Williams, J. F., Young, C. S. H. and Austin, P. E. (1974) Genetic analysis of human adenovirus type 5 in permissive and nonpermissive cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 427-438.
- 56) Persson, H. and Philipson, L.(1982) Regulation

- of adenovirus gene expression. *In*: Cooper M. *et al.* (eds) Current Topics in Microbiology and Immunology 97, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp157-203
- 57) Chin, W. W. and Maizel, J. V. (1976) Polypeptides of adenovirus. VII. Further studies of early polypeptides in vivo and localization of E3 and E2A to the cell plasma membrane. *Virology* 71, 518-530.
 - 58) Chatterjee, D. and Maizel, J. V. Jr. (1984) Homology of adenoviral E3 glycoprotein with HLA-DR heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6039-6043.
 - 59) Kvist, S., Östberg, L., Persson, H. and Philipson, L. (1978) Molecular association between transplantation antigens and a cell surface antigen in an adenovirus-transformed cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5674-5678.
 - 60) Signäs, C., Katze, M. G., Persson, H. and Philipson, L. (1982) An adenovirus glycoprotein binds heavy chains of class I transplantation antigens from man and mouse. *Nature* 299, 175-178.
 - 61) Pääbo, S., Weber, F., Kämpe, O., Schaffner, W. and Peterson, P. A. (1983) Association between transplantation antigens and a viral membrane protein synthesized from a mammalian expression vector. *Cell* 33, 445-453.
 - 62) Kämpe, O., Bellgrau, D., Hämmerling, V., Lind, P., Pääbo, S., Severinsson, L. and Peterson, P. A. (1983) Complex-formation of class I transplantation antigens and a viral glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 258, 10594-10598.
 - 63) Burgert, H.-G. and Kvist, S. (1985) An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens. *Cell* 41, 987-997.
 - 64) Shenk, T. and Williams, J. (1984) Genetic analysis of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 111, 1-39.
 - 65) Halbert, D. N., Cutt, J. R. and Shenk, T. (1985) Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.* 56, 250-257.
 - 66) Takiff, H. E., Straus, S. E. and Garron, C. F. (1981) Propagation and in vitro studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet* II, 832-834.
 - 67) Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. and Nairn, R. (1977) Characterization of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
 - 68) Byrd, P., Brown, K. W. and Gallimore, P. H. (1982) Malignant transformation of human embryo retinoblasts by cloned adenovirus 12 DNA. *Nature* 298, 69-71.
 - 69) Whittaker, J. L., Byrd, P. J., Grand, R. J. A. and Gallimore, P. H. (1984) Isolation and characterization of four adenovirus type 12-transformed human embryonic kidney cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 4, 110-116.
 - 70) Gallimore, P. H., Sharp, P. A. and Sambrook, J. (1974) 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.
 - 71) Sharp, P. A., Pettersson, U. and Sambrook, J. (1974). Viral DNA in transformed cells. I A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in a line of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. *J. Mol. Biol.* 86, 709-726.
 - 72) Sambrook, J., Botchan, M., Gallimore, P., Orzanne, B., Pettersson, U., Williams, J. and Sharp, P. A. (1975) Viral DNA sequences in cells transformed by simian virus 40, adenovirus type 2 and adenovirus type 5. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39, 615-632.
 - 73) Flint, S. J., Sambrook, J., Williams, J. and Sharp, P. A. (1976) Viral nucleic acid sequences in transformed cells IV. A study of the sequences of adenovirus 5 DNA and RNA in four lines of adenovirus 5 transformed rodent cells using specific fragments of the viral genome. *Virology* 72, 456-470.
 - 74) Graham, F. L. and van der Eb, A. J. (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus DNA. *Virology* 52, 456-467.
 - 75) 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. (1974) 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.
 - 76) Graham, F. L., van der Eb, A. J. and Heijneker, H. L. (1974) Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA. *Nature* 251, 687-691.
 - 77) Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H., Yano, S., Ojima, S. and Fujinaga, K. (1977) Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA. *Virology* 82, 462-471.
 - 78) Yamashita, T. and Fujinaga, K. (1983) Establishment and characterization of rat cell lines transformed by the left-end DNA fragments of adenovirus type 31. *Gann* 74, 77-85.
 - 79) Dijkema, R., Dekker, B. M. M., van der Feltz, M. J. M. and van der Eb, A. J. (1979) Transformation of primary rat kidney cells by fragments of weakly oncogenic adenoviruses. *J. Virol.* 32, 943-950.
 - 80) Sekikawa, K., Shiroki, K., Shimojo, H., Ojima,

- S. and Fujinaga, K., (1978) Transformation of a rat cell line by an adenovirus 7 DNA fragment. *Virology* 88, 1-7.
- 81) van der Eb, A. J., Mulder, C. Graham, F. L. and Houweling, A. (1977) Transformation with specific fragments of adenovirus DNAs. I. Isolation of specific fragments with transforming activity of adenovirus 2 and 5 DNA. *Gene* 2, 115-132.
- 82) Yano, S., Ojima, S., Fujinaga, K., Shiroki, K. and Shimojo, H. (1977) Transformation of a rat cell line by an adenovirus type 12 DNA fragment. *Virology* 82, 214-220.
- 83) Mak, S., Mak, I., Smiley, J. R. and Graham, F. L. (1979) Tumorigenicity and viral gene expression in rat cells transformed by Ad 12 virions or by the EcoRI-C fragment of Ad 12 DNA. *Virology* 98, 456-460.
- 84) Rowe, D. T., Branton, P. E., Yee, S-P., Bacchetti, S. and Graham, F. L. (1984) Establishment and characterization of hamster cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus type 5. *J. Virol.* 49, 162-170.
- 85) Jochemsen, H., Daniëls, G. S. G., Hertoghs, J. J. L., Schrier, P. I., van den Elsen, P. J. and van der Eb, A. J. (1982) Identification of adenovirus type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis. *Virology* 122, 15-28.
- 86) Wilson, M. C., Sawicki, S. G., Salditt-Georgieff, M. and Darnell, J. E. (1978) Adenovirus type 2 mRNA in transformed cells: map positions and difference in transport time. *J. Virol.*, 25, 97-103.
- 87) Sawada, Y. and Fujinaga, K. (1980) Mapping of adenovirus 12 mRNAs transcribed from the transforming region. *J. Virol.*, 36, 639-651.
- 88) Green, M., Wold, W. S. M. and Buttner, W. (1981) Integration and transcription of group C human adenovirus sequences in the DNA of five lines of transformed rat cells. *J. Mol. Biol.* 151, 337-366.
- 89) Lewis, J. B. and Mathews, M. B. (1981) Viral messenger RNA in six lines of adenovirus transformed cells. *Virology* 115, 345-360.
- 90) Levinson, A. D. and Levine, A. J. (1977) The group C adenovirus tumor antigens: identification in infected and transformed cells and a peptide map analysis. *Cell*, 11, 871-879.
- 91) Johansson, K., Persson, H., Lewis, A. M., Pettersson, U., Tibbitts, C. and Philipson, L. (1978) Viral DNA sequences and gene products in hamster cells transformed by adenovirus type 2. *J. Virol.* 27, 628-639.
- 92) Schrier, P. I., van den Elsen, P. J., Hertoghs, J. J. L. and van der Eb, A. J. (1979) Characterization of tumor antigens in cells transformed by fragments of adenovirus type 5 DNA. *Virology* 99, 372-385.
- 93) Lassam, N. J., Bayley, S. T. and Graham, F. L. (1979) Tumor antigens of human Ad5 in transformed cells and in cells infected with transformation-defective host-range mutants. *Cell* 18, 781-791.
- 94) Persson, H., Katze, M. G. and Philipson, L. (1981) Control of adenovirus early gene expression: accumulation of viral mRNA after infection of transformed cells. *J. Virol.* 40, 358-366.
- 95) Matsuo, T., Wold, W. S. M., Hashimoto, S., Rankin, A., Symington, J. and Green, M. (1982) Polypeptides encoded by the transforming E1b of human adenovirus 2. Immunoprecipitation from transformed and infected cells and cell-free translation of E1b-specific mRNA. *Virology* 118, 456-465.
- 96) Ruben, M., Bacchetti, S. and Graham, F. L. (1982) Integration and expression of viral DNA in cells transformed by host-range mutants of adenovirus type 5. *J. Virol.* 41, 674-685.
- 97) Esche, H. and Siegmund, B. (1982) Expression of early viral gene products in adenovirus type 12-infected and transformed cells. *J. Gen. Virol.* 60, 99-113.
- 98) Kimura, T., Sawada, Y., Shinagawa, M., Shimizu, Y., Shiroki, K., Shimojo, H., Sugisaki, H., Takanami, M., Uemizu, Y. and Fujinaga, K. (1981) Nucleotide sequence of the transforming region E1B of adenovirus 12 DNA: structure and gene organization, and comparison with those of adenovirus type 5 DNA. *Nucleic Acids Res.* 9, 6571-6589.
- 99) 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. (1979) Structure and function of the transforming genes of human adenoviruses and SV40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44, 383-399.
- 100) Raska, K. Jr., Morrongiello, M. P. and Föhling, B. (1980) Adenovirus type 12 tumor antigen. III. Tumorigenicity and immune response to syngeneic rat cells transformed with virions and isolated transforming fragment of adenovirus 12 DNA. *Int. J. Cancer* 26, 79-86.
- 101) Bernards, R., de Leeuw, M. G. W., Vaessen, M.-J., Houweling, A. and van der Eb, A. J. (1984) Oncogenicity of adenovirus is not determined by the transforming region only. *J. Virol.* 50, 847-853.
- 102) Doerfler, W., Gahlmann, R., Stabel, S., Deuring, R., Lichtenberg, U., Schulz, M., Eick, D., Leisten, R. (1983) On the mechanism of recombination between adenoviral and cellular DNAs:

- the structure of junction sites. In : Doerfler, W. (ed) The Molecular Biology of Adenoviruses 1. Current Topics in Microbiology and Immunology 109. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 193-228
- 103) Fujinaga, K., Yoshida, K., Yamashita, T. and Shimizu, Y. (1984) Organization, Integration, and Transcription of Transforming Genes of Oncogenic Human Adenovirus Type 12 and 7. In : Doerfler, W. (ed.) The Molecular Biology of Adenoviruses 2. Current Topics in Microbiology and Immunology 110. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp 53-72.
 - 104) Deuring, R., Winterhoff, U., Tamanoi, F., Stabel, S. and Doerfler, W. (1981) Site of linkage between adenovirus type 12 and cell DNAs in hamster tumor line CLAC 3. *Nature (London)* 293, 81-84.
 - 105) Gahlmann, R., Leisten, R., Vardimon, L. and Doerfler, W. (1982) Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells. *EMBO J.* 1, 1101-1104.
 - 106) Stabel, S. and Doerfler, W. (1982) Nucleotide sequence at the site of junction between adenovirus type 12 DNA and repetitive hamster cell DNA in transformed cell line CLAC1. *Nucleic Acids Res.* 10, 8007-8023.
 - 107) Visser, L., Reemst, A. C. M. B., van Mansfeld, A. D. M. and Rozijn, T. H. (1982) Nucleotide sequence analysis of the linked left and right hand terminal regions of adenovirus type 5 DNA present in the transformed cell line 5RK 20. *Nucleic Acids Res.* 10, 2189-2198.
 - 107) Kudo, S., Sugisaki, H., Takanami, M., Yamashita, T., Ishino, M., Shimizu, Y., Iida, Y. and Fujinaga, K. (1986) Structure of viral DNA in a rat cell line, GY1, transformed by Ad12 Hind III fragment G. *Virology* 148, 146-158.
 - 109) Chow, L. T., Roberts, J. M., Lewis, J. B. and Broker, T. R. (1977) A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA : DNA hybrids. *Cell.* 11, 819-836.
 - 110) Berk, A. J. and Sharp, P. A. (1977) Ultraviolet mapping of adenovirus 2 early promoters. *Cell.* 12, 45-55.
 - 111) Wilson, M., Fraser, N. and Darnell, J. (1979) Mapping of RNA initiation sites by high doses of UV irradiation. Evidence of three independent promoters within the left 11% of the Ad2 genome. *Virology* 94, 175-184.
 - 112) Harrison, T., Graham, F. and Williams, J. (1977) Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. *Virology* 77, 319-329.
 - 113) Jones, N. and Shenk, T. (1979) Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cells. *Cell.* 17, 683-689.
 - 114) Ross, S. R., Flint, S. J. and Levine, A. J. (1980) Identification of the adenovirus early proteins and their genomic map positions. *Virology* 100, 419-432.
 - 115) Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroki, K., Saito, I., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y., Uesugi, S. and Fujinaga, K. (1980) Structure and gene organization in the transforming HindIII-G fragment of Ad12. *Cell* 20, 777-786.
 - 116) Dijkema, R., Dekker, B. M. M. and van Ormondt, H. (1982) Gene organization of the transforming region of adenovirus type 7 DNA. *Gene.* 18, 143-156.
 - 117) Yoshida, K. and Fujinaga, K. (1984) The nucleotide sequences of the transforming HindIII - I · J fragment of adenovirus type 7 DNA. *Tumor Res.* 19, 39-47.
 - 118) van Ormondt, H., Maat, J. and van Beveren, C. P. (1980) The nucleotide sequence of the transforming early region E1 of adenovirus type 5 DNA. *Gene* 11, 299-309.
 - 119) 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. (1981) The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets. *Cell.* 27, 121-131.
 - 120) Perricaudet, M., Akusjärvi, G., Virtanen, A. and Petterson, U. (1979) Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses. *Nature (London)* 281, 694-696.
 - 121) Baker, C. C. and Ziff, E. B. (1981) Promoters and heterogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2. *J. Mol. Biol.* 149, 189-221.
 - 122) Petterson, U., Virtanen, A., Perricaudet, M., Akusjärvi, G. (1983) The messenger RNAs from the transforming region of human adenoviruses. In : Doerfler, W. (ed.) The Molecular Biology of Adenoviruses 1. Current Topics in Microbiology and Immunology 109. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg pp 107-123
 - 123) van Ormondt, H., Maat, J., Dewaard, A. and van der Eb, A. J. (1978) The nucleotide sequence of the transforming *Hpa*I-E fragment of adenovirus type 5 DNA. *Gene* 4, 309-328.
 - 124) Halbert, D. N., Spector, D. J. and Raskas, H. J. (1979) In vitro translation products specified by the transforming region of adenovirus type 2 J. *Virol.* 31, 621-629.
 - 125) Smart, J. E., Lewis, J. B., Mathews, M. B., Harter, M. L. and Anderson, C. W. (1981) Adenovirus type 2 early proteins: Assignment of the early region 1A proteins synthesized in

- vivo* and *in vitro* to specific mRNAs. Virology 112, 703-713.
- 126) Svensson, C., Pettersson, U. and Akusjärvi, G. (1983) Splicing of adenovirus 2 early region 1A mRNAs is nonsequential. J. Mol. Biol. 165, 475-499.
- 127) Hen, R., Borrelli, E., Sassone-Corsi, P. and Chambon, P. (1983) An enhancer element is located 340 base pairs upstream from the adenovirus-2 E1A capsite. Nucleic Acids Res. 11, 8747-8760.
- 128) Hearing, P. and Shenk T. (1983) The adenovirus type 5 E1A transcription control region contains duplicated enhancer elements. Cell. 33, 695-703.
- 129) Imperiale, M. J., Feldman, L. T. and Nevins, J. R. (1983) Activation of gene expression by adenovirus and herpesvirus regulatory genes acting in *trans* and by a *cis*-acting adenovirus enhancer element. Cell 35, 127-136.
- 130) Osborne, T. F., Arvidson, D. N., Tyau, E. S., Dunsworth-Browne, M. and Berk, A. J. (1984) Transcriptional control region within the protein-coding portion of adenovirus E1A genes. Mol. Cell. Biol. 4, 1293-1305.
- 131) Anderson, C. W., Schmitt, R. C., Smart, J. E. and Lewis, J. B. (1984) Early region 1B of adenovirus 2 encodes two coterminal proteins of 495 and 155 amino acid residues, J. Virol. 50, 387-396.
- 132) Virtanen, A. and Pettersson, U. (1985) Organization of early region 1B of human adenovirus type 2: Identification of four differentially spliced mRNAs. J. Virology 54, 383-391.
- 133) Pettersson, U. and Mathews, M.B. (1977) The gene and messenger RNA for adenovirus polypeptide IX. Cell 12, 741-750.
- 134) Persson, H., Pettersson, U. and Mathews, M. B. (1978) Synthesis of a structural adenovirus polypeptide in the absence of viral DNA replication. Virology 90, 67-79.
- 135) Aleström, P., Akusjärvi, G., Perricaudet, M., Mathews, M. B., Klessig, D. F. and Pettersson, U. (1980) The gene for polypeptide IX of adenovirus type 2 and its unspliced messenger RNA. Cell 19, 671-681.
- 136) Esche, H., Mathews, M. B. and Lewis, J. B. (1980) Proteins and messenger RNAs of the transforming region of wild-type and mutant adenoviruses. J. Mol. Biol. 142, 399-417.
- 137) Montell, C., Fisher, E. F., Caruthers, M. H. and Berk, A. J. (1984) Control of adenovirus E1B mRNA synthesis by a shift in the activities of RNA splice sites. Mol. Cell. Biol. 4, 966-972.
- 138) Shiroki, K., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y. and Fujinaga, K. (1979) Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA. Virology 95, 127-136.
- 139) Houweling, A., van den Elsen, P. J. and van der Eb, A. J. (1980) Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. Virology 105, 537-550.
- 140) van den Elsen, P. J., de Pater, S., Houweling, A., van der Veer, J. and van der Eb, A. J. (1982) The relationship between region E1a and E1b of human adenoviruses in cell transformation. Gene 18, 175-185.
- 141) Carlock, L. R. and Jones, N. C. (1981) Transformation-defective mutant of adenovirus type 5 containing a single altered E1a mRNA species. J. Virol. 40, 657-664.
- 142) Solnick, D. and Anderson, M. A. (1982) Transformation-deficient adenovirus mutant defective in expression of region E1A but not region E-1B. Virol. 42, 106-113.
- 143) van den Elsen, P. J., Houweling, A. and van der Eb, A. J. (1983) Expression of region E1b of human adenoviruses in the absence of region E1a is not sufficient for complete transformation. Virology 128, 377-390.
- 144) Bos, J. L., Jochemsen, A. G., Bernards, R., Schrier, P. I., van Ormondt, H. and van der Eb, A. J. (1983) Deletion mutants of region E1a of Ad 12 E1 plasmids: Effect on oncogenic transformation. Virology 129, 393-400.
- 145) Bernards, R., Houweling, A., Schrier, P. I., Bos, J. L. and van der Eb, A. J. (1982) Characterization of cells transformed by Ad 5/Ad 12 hybrid early region 1 plasmids. Virology 120, 422-432.
- 146) Bernards, R., Schrier, P. I., Bos, J. L., van der Eb, A. J. (1983) Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. Virology 127, 45-54.
- 147) Aiello, L., Guilfoyle, R., Huebner, K. and Weinmann, R. (1979) Adenovirus 5 DNA sequences present and RNA sequences transcribed in transformed human embryo kidney cells (HEK-Ad5 or 293). Virology 94, 460-469.
- 148) Frost, E. and Williams, J. (1978) Mapping temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue. Virology 91, 39-50.
- 149) Galos, R. S., Williams, J., Shenk, T. and Jones, N. (1980) Physical location of adenovirus type 5: deletion and marker rescue mapping. Virology 104, 510-513.
- 150) Graham, F. L., Harrison, T. and Williams, J. (1978) Defective transforming capacity of adenovirus type 5 host-range mutants. Virology 86, 10-21.
- 151) Ho, Y-S., Galos, R. and Williams, J. (1982) Isolation of type 5 adenovirus mutants with a

- cold-sensitive host range phenotype : genetic evidence of an adenovirus transformation maintenance function. *Virology* 122, 109-124.
- 152) Riccardi, R. P., Jones, R. L., Cepko, C. L., Sharp, P. A. and Roberts, B. E. (1981) Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6121-6125.
 - 153) Glenn, G. M. and Riccardi, R. P. (1985) Adenovirus 5 early region 1 A host range mutants hr 3, hr 4, and hr 5 contain point mutations which generate single amino acid substitutions. *J. Virol.* 56, 66-74.
 - 154) Rowe, D. T. and Graham, F. L. (1983) Transformations of rodent cells by DNA extracted from transformation defective adenovirus mutants. *J. Virol.* 46, 1093-1044.
 - 155) Stow, N. (1981) Cloning of a DNA fragment from the left-hand terminus of the adenovirus type 2 genome and its use in site-directed mutagenesis. *J. Virol.* 37, 171-180.
 - 156) Haley, K. P., Overhauser, J., Babiss, L. E., Ginsberg, H. S. and Jones, N. C. (1984) Transformation properties of type 5 adenovirus that differentially express the E1A gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5734-5738.
 - 157) Winberg, G. and Shenk, T. (1984) Dissection of overlapping functions within the adenovirus type 5 E1A gene. *EMBO J.* 3, 1907-1912.
 - 158) Montell, C., Courtois, G., Eng, C. and Berk, A. (1984) Complete transformation by adenovirus 2 requires both E1A proteins. *Cell* 36, 951-961.
 - 159) Babiss, L. E., Fisher, P. B. and Ginsberg, H. S. (1984) Deletion and Insertion mutations in early region 1a of type 5 adenovirus that produce cold-sensitive or defective phenotypes for transformation. *J. Virol.* 49, 731-740.
 - 160) Montell, C., Fisher, E. F., Caruthers, M. H. and Berk, A. J. (1982) Resolving the functions of overlapping viral genes by site-specific mutagenesis at mRNA splice site. *Nature* 295, 380-384.
 - 161) Hurwitz, D. R. and Chinnadurai, G. (1985) Evidence that a second tumor antigen coded by adenovirus early gene region E1a is required for efficient cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 163-167.
 - 162) Spindler, K. R., Eng, C. Y. and Berk, A. J. (1985) An adenovirus early region 1 A protein is required for maximal viral DNA replication in growth-arrested human cells. *J. Virol.* 53, 742-750.
 - 163) Hurwitz, D. R. and Chinnadurai, G. (1985) immortalization of rat embryo fibroblasts by an adenovirus 2 mutant expressing a single functional E1a protein. *J. Virol.* 54, 358-363.
 - 164) Babiss, L. E., Fisher, P. B. and Ginsberg, H. S. (1984) Effect on transformation of mutations in the early region 1b-encoded 21- and 55-kilodalton proteins of adenovirus 5. *J. Virol.* 52, 389-395.
 - 165) Shiroki, K., Ohshima, K., Fukui, Y. and Ariga, H. (1986) The adenovirus type 12 early-region 1B 58,000 - Mr gene product is required for viral DNA synthesis and for initiation of cell transformation. *J. Virol.* 57, 792-801.
 - 166) Takemori, N., Riggs, J. L. and Aldrich, C. (1968) Genetic studies with tumorigenic adenoviruses. I. Isolation of cytotoxic (*cyt*) mutants of adenovirus type 12. *Virology* 36, 575-586.
 - 167) Takemori, N., Riggs, J. L. and Aldrich, C. (1969) Genetic studies with tumorigenic adenoviruses. II. Heterogeneity of *cyt* mutants of adenovirus type 12. *Virology* 38, 8-15.
 - 168) Takemori, N. (1972) Genetic studies with tumorigenic adenoviruses III. Recombination in adenovirus type 12. *Virology* 47, 157-167.
 - 169) Takemori, N., Cladaras, C., Bhat, B., Conley, A. J. and Wold W. S. M. (1984) *cyt* gene of adenoviruses 2 and 5 is an oncogene for transforming function in early region E1B and encodes the E1B 19,000-molecular-weight polypeptide. *J. Virol.* 52, 793-805.
 - 170) Chinnadurai, G., Chinnadurai, S. and Brusca, J. (1979) Physical mapping of a large plaque mutation of adenovirus type 2. *J. Virol.* 32, 623-628.
 - 171) Ezoe, H., Lai Fatt, R. B. and Mak, S. (1981) Degradation of intracellular DNA in KB cells infected with *cyt* mutants of human adenovirus type 12. *J. Virol.* 40, 20-27.
 - 172) Stillman, B. W., White, E. and Grodzicker, T. (1984) Independent mutations in Ad2 *ts111* cause degradation of cellular DNA and defective viral DNA replication. *J. Virol.* 50, 598-605.
 - 173) White, E., Grodzicker, T. and Stillman, B. W. (1984) Mutation in the gene encoding the adenovirus E1B 19 K tumor antigen causes the degradation of chromosomal DNA. *J. Virol.* 52, 410-419.
 - 174) D'halluin, J.-C., Delsert, C., Milleville, M. and Boulanger, P. (1985) An adenovirus cytotoxic function related to the control of a cellular pH4 endonuclease activity. *J. Gen. Virol.* 66, 1873-1887.
 - 175) Subramanian, T., Kuppuswamy, M., Mak, S. and Chinnadurai, G. (1984) Adenovirus *cyt* locus, which controls cell transformation and tumorigenicity, is an allele of 1p+locus, which codes for a 19-Kilodalton tumor antigen. *J. Virol.* 52, 336-343.
 - 176) Lai Fatt, R. B. and Mak, S. (1982) Mapping of an adenovirus function involved in the inhi-

- bition of DNA degradation. *J. Virol.* 42, 969-977.
- 177) Mak, I. and Mak, S. (1983) Transformation of rat cells by *cyt* mutants of adenovirus type 12 and mutants of adenovirus type 5. *J. Virol.* 45, 1107-1117.
- 178) Chinnadurai, G. (1983) Adenovirus 2 1p⁺ locus codes for a 19kd tumor antigen that plays an essential role in cell transformation. *cell* 33, 759-766.
- 179) Pilder, S., Logan, J. and Shenk, T. (1984) Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1B-21,000-molecular weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. *J. Virol.* 52, 664-671.
- 180) Persson, H., Katze, M. G. and Philipson, L. (1982) Purification of a native membrane-associated adenovirus tumor antigen. *J. Virol.* 42, 905-917.
- 181) Fukui, Y., Saito, I., Shiroki, K. and Shimojo, H. (1984) Isolation of transformation-defective replication-nondefective early region 1B mutants of adenovirus 12. *J. Virol.* 49, 154-161.
- 182) Fukui, Y., Shiroki, K., Saito, I. and Shimojo, H. (1984) Characterization of a host-range mutant of human adenovirus 12 defective in early region 1B. *J. Virol.* 50, 132-136.
- 183) Lewis, A. M. Jr. and Cook, J. L. (1984) The interface between adenovirus-transformed cells and cellular immune response in the challenged host. *In*: Doerfler, W. (ed.) *The Molecular Biology of Adenovirus 2. Current Topics in Microbiology and Immunology*, 110. Spriger-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp 1-22.
- 184) Huebner, R. J., Rowe, W. P., Turner, H. C. and Lane, W. T. (1963) Specific adenovirus complement-fixing antigenes in virus-free hamster and rat tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 50, 379-389.
- 185) Rabson, A. S., Kirschstein, R. L. and Paul, F. J. (1964) Tumors produced by adenovirus 12 in mastomys and mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 32, 77-87.
- 186) Yabe, Y., Samper, L., Bryan, E., Taylor, G. and Trentin, J. (1964) Oncogenic effect of human adenovirus type 12 in mice. *Science* 143, 46-47.
- 187) Lewis, A. M. Jr. and Cook, J. L. (1979) Association of tumor induction by ultraviolet light-inactivated adenovirus 2-simian virus 40 recombinants with a specific segment of simian virus 40 DNA. *J. Natl. Cancer Inst.* 63, 695-705.
- 188) Harwood, L. M. J. and Gallimore, P. H. (1975) A study of the oncogenicity of adenovirus type 2 transformed rat embryo cells. *Int. J. Cancer* 16, 498-508.
- 189) Gallimore, P. H. and Paraskeva, C. (1980) 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.
- 190) Cook, J. L. and Lewis, A. M. Jr. (1979) Host response to adenovirus 2-transformed hamster embryo cells. *Cancer Res.* 39, 1455-1461.
- 191) Lewis, A. M. Jr. and Cook, J. L. (1980) Presence of allograft-rejection resistance in simian virus 40-transformed hamster cells and its possible role in tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2886-2889.
- 192) Lewis, A. M. Jr. and Cook, J. L. (1982) Spectrum of tumorigenic phenotypes among adenovirus 12, and simian virus 40-transformed Syrian hamster cells defined by host cellular immune-tumor cell interactions. *Cancer Res.* 42, 939-944.
- 193) McAllister, R. M. and MacPherson, I. (1968) Transformation of a hamster cell line by adenovirus 12. *J. Gen. Virol.* 2, 99-106.
- 194) Gallimore, P. H., McDougall, J. K. and Chen, L. B. (1977) In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice. *Cell* 10, 669-678.
- 195) Berman, L. D. (1967) On the nature of transplantation immunity in the adenovirus tumor system. *J. Exp. Med.* 125, 983-999.
- 196) Sjögren, H. O., Minowada, J. and Ankerst, J. (1967) Specific transplantation antigens of mouse sarcomas induced by adenovirus type 12. *J. Exp. Med.* 125., 689-701.
- 197) Ankerst, J. and Sjögren, H. O. (1969) Cross-reacting TSTAs in adeno 7 and 12 tumors demonstrated by ⁵¹Cr-cytotoxicity and isograft rejection tests. *Int. J. Cancer* 4, 279-287.
- 198) Ankerst, J. and Sjögren, H. O. (1970) Cross-reacting tumor-specific transplantation of antigens in tumors induced by adenoviruses 3, 14, and 12. *Cancer Res.* 30, 1499-1505.
- 199) Gallimore, P. H. and Williams, J. (1982) An examination of adenovirus type 5 mutants for their ability to induce group C adenovirus tumor specific transplantation antigenicity in rats. *Virology* 120, 146-156.
- 200) Shiroki, K., Shimojo, H., Maeta, Y. and Hamada, C. (1979) Tumor-specific transplantation and surface antigen in cells transformed by the adenovirus 12 DNA fragments. *Virology* 99, 188-191.
- 201) Föhrling, B., Gallimore, P. H., Mellow, G. H. and Raska, K. Jr. (1983) Adenovirus type 12 specific cell surface antigen in transformed cells in a product of the E1b early region. *Virology* 131, 463-472.
- 202) Sawada, Y., Urbanelli, D., Raskova, J., Shenk, T. E. and Raska, K. Jr. (1986) Adenovirus tu-

- mor-specific transplantation antigen is a function of E1a early region. *J. Exp. Med.* 163. in press
- 203) Akagi, T. and Ogawa, K. (1972) Relationship among tumorigenicity, T antigen, and virus-specific transplantation antigen in adenovirus type 12 transformed and tumor cells. *Gann* 63, 307-312.
 - 204) Raska, K. Jr. and Gallimore, P. H. (1982) An inverse relation of the oncogenic potential of adenovirus transformed cells and their sensitivity to killing by syngeneic natural killer cells. *Virology* 123, 8-18.
 - 250) Raska, K. Jr., Dougherty, J. and Gallimore, P. H. (1982) Product of adenovirus type 2 early gene block E1 in transformed cells elicits cytolytic response in syngeneic rats. *Virology* 117, 530-535.
 - 206) Haller, O., Orn, A., Gidlund, M. and Wigzell, H. (1980) In vivo activity of murine NK cells. *In*: Herberman, R. B. (ed) Natural cell-mediated immunity against tumors. Academic, New York, pp 1105-1116.
 - 207) Herberman, R. (1981) Overview of role of macrophages, natural killer cells, and antibody dependent cellular cytotoxicity as mediators of biological response modification. *In*: Chirigos M. A., Mitchel M., Mastrangelo M. J., Krim M. (eds) Mediation of cellular immunity in cancer by immune modifiers. Raven, New York, pp 261-267.
 - 208) Herberman, R. B. and Ortaldo, J. R. (1981) Natural killer cells: their role in defenses against disease. *Science* 214, 24-30.
 - 209) Cook, J. L., Hibbs, J. B. Jr. and Lewis, A. M. Jr. (1982) DNA virus-transformed hamster cell-host effector cell interactions: level of resistance to cytolysis correlated with tumorigenicity. *Int. J. Cancer* 30, 795-803.
 - 210) Bernards, R., Schrier, P. I., Houweling, A., Bos, J. L., van der Eb, A. J., Zijlstra, M. and Melief, C. J. M. (1983) Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* 305, 776-779.
 - 211) Schrier, P. I., Bernards, R., Vaessen, R. T. M. J., Houweling, A. and van der Eb, A. J. (1983) Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature* 305, 771-775.
 - 212) Mellow, G. H., Föhring, B., Dougherty, J., Gallimore, P. H. and Raska, K. Jr. (1984) Tumorigenicity of adenovirus-transformed rat cells and expression of class I major histocompatibility antigen. *Virology* 134, 460-465.
 - 213) Sawada, Y., Föhring, B., Shenk, T. E. and Raska, K. Jr. (1985) Tumorigenicity of adenovirus-transformed cells: region E1A of adenovirus 12 confers resistance to natural killer cells. *Virology* 147, 413-421.
 - 214) Harter, M. L. and Lewis, J. B. (1978) Adenovirus type 2 early proteins synthesized in vitro and in vivo: identification in infected cells of the 38000- to 50000- molecular-weight protein encoded by the left end of the adenovirus type 2 genome. *J. Virol.* 26, 736-749.
 - 215) Lupker, J. H., Davis, A., Jochemsen, H. and van der Eb, A. J. (1981) In vitro synthesis of adenovirus type 5 T antigens. I. Translation of early region 1-specific RNA from lytically infected cells. *J. Virol.* 37, 524-529.
 - 216) Rowe, D. T., Yee, S-P., Otis, J., Graham, F. L. and Branton, P. E. (1983) Characterization of human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides using antitumor serum specific for the carboxy terminus. *Virology* 127, 253-271.
 - 217) Yee, S-P., Rowe, D. T., Tremblay, M. L., McDermott, M. and Branton, P. E. (1983) Identification of human adenovirus early region 1 products using antisera against synthetic peptides corresponding to the predicted carboxy termini. *J. Virol.* 46, 1003-1013.
 - 218) Harlow, E., Franza, B. R. Jr. and Schley, C. (1985) Monoclonal antibodies specific for adenovirus early region 1A proteins: extensive heterogeneity in early region 1A products. *J. Virol.* 55, 533-546.
 - 219) Shiroki, K., Segawa, K. and Shimojo, H. (1980) Two tumor antigens and their polypeptides in adenovirus type 12-infected and transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2274-2278.
 - 220) Segawa, K., Saito, I., Shiroki, K. and Shimojo, H. (1980) *in vitro* translation of adenovirus type 12-specific mRNA complementary to the transforming gene. *Virology* 107, 61-70.
 - 221) Jochemsen, H., Daniëls, G. S. G., Lupker, J. H. and van der Eb, A. J. (1980) Identification and mapping of early gene products of adenovirus type 12. *Virology* 105, 551-563.
 - 222) Lucher, L. A., Kimelman, D., Symington, J. S., Brackmann, K. H., Cartas, M. A., Thornton, H. and Green, M. (1984) Identification of adenovirus 12-encoded E1A tumor antigens synthesized in infected and transformed mammalian cells and in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 52, 136-144.
 - 223) Rowe, D. T., Graham, F. L. and Branton, P. E. (1983) Intracellular localization of adenovirus type 5 tumor antigens in productively infected cells. *Virology* 129, 456-468.
 - 224) Feldman, L. T. and Nevins, J. R. (1983) Localization of the adenovirus E1a protein, a positive-acting transcriptional factor in infected cells. *Mol. Cell. Biol.* 3, 829-838.

- 225) Grand, R. J. A. and Gallimore, P. H. (1984) Adenovirus type 12 early region 1 proteins: A study of their subcellular localization and protein-protein interactions. *J. Gen. Virol.* 65, 2149-2166.
- 226) Kripl, B., Ferguson, B., Rosenberg, M. and Westphal, H. (1984) Functions of purified E1A protein microinjected into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6988-6992.
- 227) Downey, J. F., Eveleigh, C. M., Branton, P. E. and Bayley, S. T. (1984) Peptide maps and N-terminal sequences of polypeptides from early region 1A of human adenovirus 5. *J. Virol.* 50, 30-37.
- 228) Yee, S-P. and Branton, P. E. (1985) Analysis of multiple forms of human adenovirus type 5 E1A polypeptides using an anti-peptide antiserum specific for the amino terminus. *Virology* 146, 315-322.
- 229) Ko, J. -L. and Harter, M. L. (1984) Plasmid-directed synthesis of genuine adenovirus 2 early-region 1A and 1B proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1427-1439.
- 230) Ferguson, B., Jones, N., Richter, J. and Rosenberg, M. (1984) Adenovirus E1a gene product expressed at high levels in *Escherichia coli* is functional. *Science* 224, 1343-1346.
- 231) Ferguson, B., Kripl, B., Jones, N., Richter, J., Westphal, H. and Rosenberg, M. (1985) Functional characterization of purified adenovirus E1A proteins expressed in *Escherichia coli*. In: Feramisco, J., Ozanne, B. and Stiles, C. (ed.), *Cancer Cells*, vol. 3. Growth factors and Transformation. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., pp265-274
- 232) Ferguson, B., Kripl, B., Andrisani, O. Jones, N., Westphal, H. and Rosenberg, M. (1985) E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherichia coli* both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2653-2661.
- 233) Kripl, B., Ferguson, B., Jones, M., Rosenberg, M. and Westphal, H. (1985) Mapping of functional domains in adenovirus E1A proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7480-7484.
- 234) Richter, J. D., Young, P., Jones, N. C., Kripl, B., Rosenberg, M. and Ferguson, B. (1985) A first exon encoded domain of E1A sufficient for posttranslational modification, nuclear-localization, and induction of adenovirus E3 promoter expression in *Xenopus oocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8434-8438.
- 235) Branton, P. E., Rowe, D. T., Yee, S-P., Tremblay, M. L. and Graham, F. L. (1984) Transforming Proteins of Human Adenoviruses, In: Bishop, J. M., Greaves, M. and Rowley J. D.(ed.), *Genes and Cancer*, Alan R. Liss Inc., New York, pp339-350
- 236) Spindler, K. R. and Berk, A. J. (1984) Rapid intracellular turnover of adenovirus 5 early region 1A proteins. *J. Virol.* 52, 706-710.
- 237) Branton, P. E. and Rowe, D. T. (1985) Stabilities and interrelations of multiple species of human adenovirus type 5 early region 1 proteins in infected and transformed cells. *J. Virol.* 56, 633-635.
- 238) Stabel, S., Argos, P. and Philipson, L. (1985) The release of growth arrest by microinjection of adenovirus E1A DNA. *EMBO Journal* 4, 2329-2336.
- 239) Branton, P. E., Lassam, N. J., Graham, F. L., Mak, S. and Bailey, S. T. (1979) T antigen-related protein kinase activity in cells infected and transformed by human adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44, 487-491.
- 240) Branton, P. E., Lassam, N. J., Downey, J. F., Yee, S-P., Graham, F. L., Mak, S. and Bailey, S. T. (1981) Protein kinase activity immunoprecipitated from adenovirus-infected cells by sera from tumor-bearing hamsters. *J. Virol.* 37, 601-608.
- 241) Lassam, N. J., Bailey, S. T., Graham, F. L. and Branton, P. E. (1979) Immunoprecipitation of protein kinase activity from adenovirus 5-infected cells using antiserum directed against tumour antigens. *Nature* 277, 241-243.
- 242) Raška, K., Geis, A. and Föhring, B. (1979) Adenovirus type 12 tumour antigen. II. Immunoprecipitation of protein kinase from infected and transformed cells by antisera to T antigen and some normal rat sera. *Virology* 99, 174-178.
- 243) Malette, P., Yee, S-P. and Branton, P. E. (1983) Studies on the phosphorylation of the 58000 dalton early region 1B protein of human adenovirus type 5. *J. Virol.* 64, 1069-1078.
- 244) Kimelman, D., Lucher, L. A., Brackman, K. H., Smington, J. S., Ptashne, M. and Green, M. (1984) Synthesis in *Escherichia coli* of human adenovirus type 12 transforming proteins encoded by early region 1A 13S mRNA and 12S mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6300-6304.
- 245) Lucher, L. A., Loewenstein, P. M. and Green, M. (1985) Phosphorylation *in vitro* of *Escherichia coli*-produced 235R and 266R tumor antigens encoded by human adenovirus type 12 early transformaiton region 1A. *J. Virol.* 56, 183-193.
- 246) Leff, T., Elkaim, R., Goding, C. R., Jalinot, P., Sassone-Corsi, P., Perricaudet, M., Kédinger, C. and Chambon, P. (1984) Individual products of the adenovirus 12S and 13S E1a mRNAs stimulate viral EIIa and EIII expression at the transcriptional level. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA, 81, 4381-4385.
- 247) Rossini, M. (1983) The role of adenovirus early region 1A in the regulation of early region 2A and 1B expression. *Virology* 131, 49-58.
 - 248) Hearing, P. and Shenk, T. (1985) sequence-independent autoregulation of the adenovirus type 5 E1A transcription unit. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3214-3221.
 - 249) Stein, R. and Ziff, E. B. (1984) 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.
 - 250) Nevins, J. R. (1982) Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell.* 913-919.
 - 251) Kao, H-T. and Nevins, J. R. (1983) Transcriptional activation and subsequent control of the human heat shock gene during adenovirus infection. *Mol. Cell. Biol.* 3, 2058-2065.
 - 252) Green, M. R., Treisman, R. and Maniatis, T. (1983) Transcriptional activation of cloned human β -globin genes by viral immediate-early gene products. *Cell.* 35, 137-148.
 - 253) Treisman, R., Green, M. R. and Maniatis, T. (1983) *Cis*- and *trans*-activation of globin gene transcription in transient assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7428-7432.
 - 254) Gaynor, R. B., Hillman, D. and Berk, A. J. (1984) Adenovirus early region 1A protein activates transcription of a nonviral gene introduced into mammalian cells by infection or transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1193-1197.
 - 255) Beltz, G. A. and Flint, S. J. (1979) Inhibition of HeLa cell protein synthesis during adenovirus infection: restriction of cellular messenger RNA sequences to the nucleus. *J. Mol. Biol.* 131, 353-373.
 - 256) Hoeffe, W. K. and Roeder, R. G. (1985) Enhancement of RNA polymerase III transcription by the E1A gene product of adenovirus. *Cell.* 41, 955-963.
 - 257) Feldman, L. T., Imperiale, M. J. and Nevins, J. R. (1982) Activation of early adenovirus transcription by the herpesvirus immediate early gene: evidence for a common cellular control factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4952-4956.
 - 258) Bos, J. L. and ten Wolde-Kraamwinkel, H. C. (1983) The E1b promoter of Ad12 in mouse L tk-cells is activated by adenovirus region E1A. *EMBO J.* 2, 73-76.
 - 259) Elkaim, R., Goding, C. and Kdinger, C. (1983) The adenovirus-2 E2A early gene promoter: sequences required for efficient *in vitro* and *in vivo* transcription. *Nucleic Acids Res.* 11, 7105-7117.
 - 260) Imperiale, M. J., Hart, R. P. and Nevins, J. R. (1985) An enhancer-like element in the adenovirus E2 promoter contains sequences essential for uninduced and E1A-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 381-385.
 - 261) Kingston, R. E., Kaufman, R. J. and Sharp, P. A. (1984) Regulation of the adenovirus EII promoter by E1A gene products: adsence of sequence specificity. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1970-1977.
 - 262) Murthy, S. C. S., Bhat, G. P. and Thimmapaya, B. (1985) Adenovirus E2A early promoter: transcription control elements and inducibility by the viral pre-early E1A gene, which appears to be sequence independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2230-2234.
 - 263) Leff, T., Cordeu, J., Elkaim, R. and Sassone-Corsi, P. (1985) Transcriptional analysis of the adenovirus-5 E3 promoter: absence of sequence specificity for stimulation by E1A gene products. *Nucleic Acids Res.* 13, 1209-1221.
 - 264) Gilardi, P. and Perriacaudet, M. (1984) The E4 transcription unit of Ad2: far upstream sequences are required for its transactivation by E1A. *Nucleic Acids Res.* 12, 7877-7888.
 - 265) Everett, R. D., (1984) A detailed analysis of an HSV-1 early promoter: sequences involved in trans-activation by viral immediate-early gene products are not early-gene specific *Nucleic Acids Res.* 12, 3037-3056.
 - 266) Guilfoyle, R. A., Osheroff, W. P. and Rossini, M. (1985) Two functions encoded by adenovirus early region 1A are responsible for the activation and repression of the DNA-binding protein gene. *EMBO Journal* 4, 707-713.
 - 267) Borrelli, E., Hen, R. and Chambon, P. (1984) Adenovirus-2 E1A products repress enhancer-induced stimulation of transcription. *Nature* 312, 608-612.
 - 268) Velcich, A. and Ziff, E. (1985) Adenovirus E1a proteins repress transcription from the SV40 early promoter. *Cell.* 40, 705-716.
 - 269) Smith, D. H., Kegler, D. K. and Ziff, E. B. (1985) Vector expression of adenovirus type 5 E1a proteins: Evidence for E1a autoregulation. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2684-2696.
 - 270) Roberts, B. E., Miller, J. S., Kimelman, D., Cepko, c. L., Lemischka, I. R. and Mulligan, R. C. (1985) Individual adenovirus type 5 early region 1A gene products elicit distinct alterations of cellular morphology and gene expression. *J. Virol.* 56, 404-413.
 - 271) Cheetham, B. F. and Cellett, A. J. D. (1982) A biochemical investigation of the adenovirus induced G1 to S phase progression: thymidine

- kinase, ornithine decarboxylase, and inhibitors of polyamine biosynthesis. *J. Cell. Physiol.* 110, 114-1122.
- 272) Bellett, A. J. D., Braithwaite, A. W., Li, P. and Cheetham, B. F. (1983) Adenovirus transforming genes in early region E1a alter the program of gene expression during the cell growth cycle. *In*: Nagley, P., Linnane, A. W., Peacock, W. J. and Pateman, J. A. (ed.), *Manipulation and expression of genes in eucaryotes*. Academic press Inc., Sydney.
- 273) Bellett, A. J. D., Li, P., David, E. T., Mackey, E. J., Braithwaite, A. W. and Cutt, J. R. (1985) Control functions of adenovirus transformation region E1a gene products in rat and human cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 1933-1939.
- 274) Braithwaite, A. W., Cheetham, B. F., Li, P., Parish, C. R., Waldron-Stevens, L. K. and Bellett, A. J. D. (1983) Adenovirus induced alterations of the cell growth cycle: a requirement for expression of E1a but not of E1b. *J. Virol.* 45, 192-199.
- 275) Braithwaite, A. W., Murray, J. D. and Bellett, A. J. D. (1981) Alterations to controls of cellular DNA synthesis by adenovirus infection. *J. Virol.* 39, 331-340.
- 276) Jackson, P. and Bellett, A. J. D. (1985) Reduced microfilament organization in adenovirus type 5-infected rat embryo cells: a function of early region 1a. *J. Virol.* 55, 644-650.
- 277) Liu, H. T., Baserga, R. and Mercer, E. W. (1985) Adenovirus type 2 activates cell cycle-dependent genes that are a subset of those activated by serum. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2936-2942.
- 278) Jochimsen, A. G., Bos, J. L. and van der Eb, A. J. (1984) The first exon of region E1a genes of adenoviruses 5 and 12 encodes a separate functional protein domain. *EMBO Journal* 3, 2923-2927.
- 279) Land, H., Parada, F. L. and Weinberg, R. A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperative oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- 280) Ruley, H. E. (1983) Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature (London)* 304, 602-606.
- 281) Ralston, R. and Bishop, J. M. (1983) The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus E1a are structurally related. *Nature* 306, 803-806.
- 282) Kingston, R. E., Baldwin, A. S. Jr. and Sharp, P. A. (1984) Regulation of heat shock protein 70 gene expression by *c-myc*. *Nature* 312, 280-282.
- 283) Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J. and Levine, A. J. (1982) Adenovirus E1B-55kd tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28, 387-394.
- 284) Zantema, A., Fransen, J. A. M., Davis-Olivier, A., Ramaekers, F. C. S., Vooijs, G. P., DeLeys, B. and van der Eb, A. J. (1985) Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology* 142, 44-58.
- 285) Oren, M., Malzman, W. and Levine, A. J. (1981) Post-translational regulation of the 54 K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 1, 101-110.
- 286) Zantema, A., Schrier, P. I., Davis-Olivier, A., van Laar, T., Vaessen, R. T. M. J. and van der Eb, A. J. (1985) Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p 53 in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3084-3091.
- 287) Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C. W., Halbert, D. N., Shenk, T. and Levine, A. J. (1984) Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000 dalton protein in productively infected cells. *J. Virol.* 49, 692-700.
- 288) Babich, A., Feldman, L. T., Nevins, J. R., Darnell, J. E. and Weinberger, C. (1983) Effect of adenovirus on metabolism of specific host mRNAs: transport control and specific translational discrimination. *Mol. Cell. Biol.* 3, 1212-1221.
- 289) Babiss, L. E. and Ginsberg, H. S. (1984) Adenovirus type 5 early region 1b gene product is required for efficient shutoff of host protein synthesis. *J. Virol.* 50, 202-212.
- 290) Babiss, L. E., Ginsberg, H. S. and Darnell, J. E. Jr. (1985) Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2442-2558.
- 291) White, E., Blose, S. H. and Stillman, B. W. (1984) Nuclear envelope localization of an adenovirus tumor antigen maintains the integrity of cellular DNA. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2865-2875.
- 292) Green, M., Brackmann, K. H., Lucher, L. A. and Symington, J. S. (1983) Antibodies to Synthetic Peptides Targeted to the Transforming Genes of Human Adenoviruses: An Approach to Understanding Early Viral Gene Function *In*: Doerfler, W. (ed) *The Molecular Biology of Adenoviruses 1, Current Topics in Microbiology and Immunology* 109. Springer-verlag Berlin-Heidelberg pp167-192.