薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
109 (2) 71-85 (1989)

細胞機能及びウイルス増殖における Protein Myristoylation の役割

庄司省三,* 久保田幸穂

熊本大学薬学部, 〒862 熊本市大江本町 5-1

Function of Protein Myristoylation in Cellular Regulation and Viral Proliferation

Shozo SHOJI* and Yukiho KUBOTA

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science,
Kumamoto University, Kumamoto, 862, Japan

Protein myristoylation was first discovered in the catalytic subunit of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. Subsequently, various cellular and viral myristoylated proteins were detected. In each case, the myristoyl moiety was found in an amide linkage with the amino terminal glycine residue of the modified proteins.

The biological functions of protein myristoylation of various cellular protein, oncogene product, and viral structural proteins have been studied by many biochemists. Two of the most thoroughly studies myristoylated proteins are the transforming protein of Rous sarcoma virus, pp60^{v-src}, and the proto-oncogene product, pp60^{c-src}. Deletion, modification of the first 14 NH₂-terminal amino acid of pp60^{v-src}, or chemical antimyristoylation of the protein with *N*-myristoyl glycinal diethylacetal dose not affect intrinsic tyrosine *src*-kinase activity, but prevents myristoylation and membrane association, and abolishes the transforming activity of the protein.

Protein myristoylations of some viral structural proteins were also studied by many investigators, and X-ray crystallographic studies of poliovirus suggest that myristate moiety may play a central role in capsid assembly.

Recently, human immunodeficiency virus, HIV-I, possesses a myristoylated p17^{gag} protein, which is proteolytically derived from the NH₂-terminus of a gag precursor protein, and its myristate moiety may be important for virus assembly. In this review, we detailed recent studies of the protein myristoylation in cellular regulation and virus proliferation.

Keywords—protein myristoylation; antimyristoylation; myristoyl peptide antibody; HIV-I; HTLV-I; pp60^{v-src}; p19^{gag}; p17^{gag}; Rous sarcoma virus

1. はじめに

タンパク質のアミノ末端に炭素鎖 14 個の長鎖飽和脂肪酸ミリスチン酸が酸アミド結合を介し, 共有結合している事が adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP)-依存性プロテインキナーゼ (触媒サブユニット, Mr. 40862) の全一次構造決定の途上, 1982 年に著者らによって初めて発見された.^{1,2)} 一般にある種のタンパク質のアミノ末端はアセチル基, ピログルタミル基, 及びホルミル基によってブロックされていることが知られている. 当時アミノ末端ミリスチル基は全く新しいブロック基として脚光を浴びると同時にその生物学的意義が特に注目された. 著者らの発見に続き, 相次いでアミノ末端ミリスチル基の同定がなされ始めている. アミノ末端ミリスチル化タンパク質として, 細胞由来のタンパク質及びウイルス構成タンパク質に大別することができる. 前者は cAMP-依存性プロテインキナーゼをはじめ, ホスホプロテインホスファターゼである calcineurin B, reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)-シトクロム b₅ レダクターゼ, BC₃H₁ 筋細胞系の細胞内タンパク質, pp60^{v-src} (*src*-gene 遺伝子産物, チロシンキナーゼ) の p36K 基質タンパク質, マクロファージ内の細胞内タンパク質, インシュリンレセプター, ビンキュリン等がある. 後者のミリスチル化を受けている

TABLE I. List of *N*-Myristoylated Proteins

<i>N</i> -Myristoylated proteins	References	<i>N</i> -Myristoylated proteins	References
1. Catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase	1, 2	13. Insulin receptor	14
2. Calcineurin B	3	14. Vinculin	15
3. p15 ^{gag} of Rauscher and Moloney murine leukemia viruses	4	15. gag Gene products of Mason-Pfizer monkey virus	16
4. gag-onc Fusion proteins in mammalian transforming retrovirus	5	16. Structural protein of polyoma virus and SV 40	17
5. NADH-Cytochrome b ₅ reductase	6	17. Pre S1 protein of Hepatitis B virus	18
6. Tyrosine protein kinase of the murine lymphoma cell line	7	18. Capsid protein VP 4 of picorna virus	19
7. p60 ^{src} of Rous sarcoma virus (RSV)	8	19. p19K 1B protein of human adenovirus type 5	20
8. Cellular proteins in BC ₃ H ₁ muscle cell line	9	20. α-Subunit GTP-binding protein	21
9. 36K Protein substrate for p60 ^{src} (tyrosine protein kinase)	10	21. Immunoglobulin heavy chain	22
10. p19 ^{gag} Protein in human T-cell leukemia virus (HTLV-I)	11	22. p27 ^{nef} of human immunodeficiency virus (HIV-I)	23
11. Specific macrophase proteins	12	23. Capsid protein VP 4 of poliovirus	24
12. Pr 65 ^{gag} of Moloney murine leukemia virus	13	24. Major substrate of protein kinase C	25
		25. p17 ^{gag} of HIV-I	26, 27
		26. Antimyristoylation of p19 ^{gag} in HTLV-I and p17 ^{gag} in HIV-I	27

ウイルス構成タンパク質として Rauscher and Moloney murine leukemia virus の Pr65^{gag} コアタンパク質, FeSV の gag-onc タンパク質, Moloney murine leukemia virus のチロシンプロテインキナーゼ, ラウス肉腫ウイルス (RSV) の pp60^{src}, 成人 T 細胞白血病 (ATL) ウイルス (HTLV-I) の p19^{gag} タンパク質, 後天性免疫不全症候群 (エイズ) の原因ウイルス (human immunodeficiency virus, HIV-I) の p17^{gag} タンパク質, polyoma virus 及び SV40 の外被タンパク質 VP2, Mason-Pfizer monkey virus のコアタンパク質, 肝炎 B 型ウイルス (HBV) のプレ S1 コアタンパク質, poliovirus のコアタンパク質 VP4 が知られている. ヒト癌遺伝子 (src-gene) 産物 pp60^{src}, グアノシントリホスフェート (GTP) 結合タンパク質の α-サブユニットにミリスチル基が見いだされ, また免疫グロブリンにもミリスチル基の結合が示唆されている. 以上のように, 種々の細胞内タンパク質, ウイルス構成タンパク質, あるいは発癌遺伝子産物のミリスチル化が見いだされ, ミリスチル化の生物学的意義が論じ始められている. 現在まで報告されている主なアミノ末端ミリスチルタンパク質の発見の順に Table I にまとめ, 本総説ではタンパク質のアミノ末端ミリスチル化とその生物学的意義について述べたい.

2. *N*-ミリスチル (Myr)-ペプチドの分析

アセチル基, ピログルタミル基, 及びホルミル基によってブロックされているタンパク質のアミノ末端ブロック基の同定法及びそのアミノ末端周辺構造の決定法はそれぞれ確立されている. Edman 法による全自動アミノ酸配列装置の工夫・改良がなされ, 気相法による超微量ペプチドのアミノ酸配列も可能な時代に, アミノ末端ミリスチル基の分離・分析・同定は当時 (1982 年), 難しい課題でそのミリスチル基の生物学的意義は最大の関心事の 1 つであった.

cAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットのアミノ末端ブロック基の決定は本酵素の一次構造解析上最大の難関で, 従来の確立されたブロックペプチドの分離・分析法では本ブロックペプチドの分析は不可能であった. またアミノ末端ブロック基はアセチル基, ピログルタル基及びホルミル基であるという固定観念から脱皮するのに多くの時間を費やし, また *N*-Myr-ペプチドの性状が極めて特異的で, その取り扱いに苦慮した.

cAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットの場合, 本サブユニットを臭化シアンで化学的に切断した. 得られたブロックペプチドを酵素消化し, 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でブロックペプチドを精製し, gas-mass spectrometry 法で *N*-Myr-ペプチドを決定した.^{1,2)}

Fig. 1. HPLC of NH_2 -Terminal Blocked Peptides

a. NH_2 -terminal blocked peptides (<Glu-His-Gly, <Glu-Ala, HCO-Met-Leu-Phe, and Ac-Gly-Lys-OMe) and Ac-Arg-OMe, 330 nmol each, were separately injected into the HPLC system. Column: polyvinylalcohol resin packed column (Asahipack GS-310 Φ , 150 $\times$ 8 mm i.d.). Eluent A: 50 mM sodium hydrogen carbonate, pH 8.3, containing 5% CH_3CN . Eluent B: 50 mM sodium hydrogen carbonate, pH 8.3, containing 60% CH_3CN . Gradient: 0–100% B in 20 min on a linear gradient (number 6), and then 100% B for 30 min. Detector: UV (214 nm) at 0.2 a.u.f.; fluorescence (F_{425} nm), excitation at 380 nm and emission at 425 nm, gain 4. Flow rate: 0.5 ml/min.

b. HPLC of NH_2 -blocked amino acid esters was exhibited. The NH_2 -blocked amino acids and their esters used are shown in the figures. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1a.

c. The myristoyl-peptides used are shown in the figures. Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1a. Myr-: *N*-myristoyl-.

d. HPLC of a peptic digest of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase type II from bovine heart. The peptic digest of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II was prepared as described earlier². Experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1a.

ig. 2. HPLC of the Mixture of *N*-Myr-peptides

The *N*-Myr-peptides (12–100 nmol) were dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid containing 60% CH_3CN (50–100 μl). The column ($\mu\text{Bondasphere } 5 \mu\text{C}_{18}$, 150 $\times$ 39 mm i.d.) was chromatographed with 0.1% trifluoroacetic acid containing 60% CH_3CN .

The other experimental conditions were as described in the legend to Fig. 1a.

1. *N*-Myr-Gly-Gly-Try-Arg, 2. *N*-Myr-Gly-Asn, 3. *N*-Myr-Gly-Gly-Gly, 4. *N*-Myr-Gly-Ser, 5. *N*-Myr-Gly-Glu, 6. *N*-Myr-Gly-Gly, 7. *N*-Myr-Gly-Ala, 8. *N*-Myr-Gly-Pro, 9. *N*-Myr-Gly

Fig. 3. HPLC of Standard Fatty Acids

Standard fatty acids, 100 pmol each, were derivatized with *p*-bromophenacyl bromide. Column: Radial Pak C_{18} cartilage column (particle size 10 μm , 100 $\times$ 8 mm i.d.) Eluent A: 40% CH_3CN . Eluent B: 95% CH_3CN . Gradient: 0–100% B in 30 min on a convex curve (number 5), and then 100% B held for 5 min. Detector: UV (254 nm) at 0.001 a.u.f. Flow rate: 3.0 ml/min.

現在、著者らは下記のように *N*-Mry-ペプチドの選択的同定法を確立し、細胞中のミリストイルタンパク質の分析に応用している。

2-1. *N*-Myr-ペプチド及び脂肪酸の HPLC による分析^{28,29)} *N*-ミリストイルタンパク質から酵素消化によって得られた *N*-Myr-ペプチドは一般的に極めて疎水性が高いので、この点に注目し、本来ゲル濾過用開発された HPLC 用カラム (Asahipak GS-310M, ポリビニールアルコール樹脂) の弱い疎水性を利用し、選択的に ν -長鎖アシルペプチドの分離・精製を試みた。ピログルタミン (<Glu), ホルミル (HCO), 及びアセチル基 (Ac) により *N*-末端がブロックされたペプチド類と *N*-Myr-ペプチドは本カラムを用いて明らかに分離され、*N*-Myr-ペプチド類は retention time 約 20–30 min の位置に溶出した (Fig. 1 a, b, c). なおフェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンの *N*-Ac-体は早い位置に、そのエチルエステル類は疎水性が高く、*N*-Myr-ペプチドとほぼ同じ位置に溶出したが、一般に酵素消化物から得られるペプチドはエステルとして存在しないので、これらの疎水性 *N*-Ac-アミノ酸は *N*-Myr-ペプチドの分析に影響を与えない。同じ条件下で cAMP-依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニットのペプシン消化物から、Fig. 1 d に示すように *N*-Myr-Gly-Ala を同定することができた。

著者らは *N*-Myr-ペプチドの簡便な分析法として、まず始めにミリストイル化タンパク質を適当な酵素 (トリプシン、ペプシン、プロナーゼ等) で消化し、上記の Asahipak GS-310M カラムを用いる HPLC で retention time 20–30 min の位置に溶出するペプチドを分取する。得られたペプチドを $\mu\text{Bondasphere } \text{C}_{18}$ カラムを用いる HPLC で精製し、ペプチドを加水分解後フェニルイソチオシアネート (PITC) 法²⁸⁾によるアミノ酸分析及び *p*-ブロムフェナシルブロミド法²⁹⁾により脂肪酸を分析し、*N*-アシルペプチドを同定する。Fig. 2 は種々の *N*-Myr-ペプチドの HPLC による分析の結果を、Fig. 3 は脂肪酸分析の結果を示す。

3. 発癌遺伝子 (*src*-Gene) 産物 pp60^{v-src} のアミノ末端ミリストイル基の分析とミリストイル基の生物学的意義
動物レトロウイルスである RSV の遺伝子の中に癌遺伝子 (*src*-gene) が見いだされ、その癌遺伝子産物 pp60^{v-src} のアミノ末端がミリストイル化を受けていることが Schults ら³⁾ によって明らかにされた。ミリストイル化を受けるタンパク質のアミノ末端はミリストイル化タンパク質の種にかかわらずそのアミノ末端は必ずグリシン残基でその遺伝子構造は開始コドン (ATG) から始まりグリシンをコードする共通した塩基配列を示す。

Pellman ら³⁰⁾は *src* 遺伝子の pp60^{v-src} のアミノ末端をコードする遺伝子を組み換え、アミノ末端がグリシン残基以外のアミノ酸に変異させる変異株を作成し、そのタンパク質のミリスチル化及び細胞の癌化を調べた。その結果、アミノ末端がグリシン以外の他のアミノ酸に置換された pp60^{v-src} のアミノ末端はミリスチル化されず、細胞が癌化しない事をつきとめた。

このミリスチル化を受けていない異常な pp60^{v-src} は正常な pp60^{v-src} と同じチロシンプロテインキナーゼ活性を示し、正常な pp60^{v-src} の細胞の癌化には pp60^{v-src} のチロシンプロテインキナーゼ活性に加えて、pp60^{v-src} のアミノ末端ミリスチル化が必須である事を示した。³¹⁾

3-1. pp60^{v-src} を特異的に識別する Mono Specific 抗体の調製及び抗体の免疫学的特性³²⁾ 著者らは発癌遺伝子産物である pp60^{v-src} を特異的に検出するために、pp60^{v-src} のアミノ末端周辺構造 *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys 分子に着目し、この *N*-Myr-ペプチド分子識別抗体を調製した。また本抗体を *src*-gene が発現している癌細胞の分析に利用し、合わせてミリスチル化の生物学的意義を調べた。*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys をペプチド合成機で合成し、リジン残基の ε-アミノ基をシトラコニール化³²⁾して保護したのち、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) に water soluble carbodiimide (EDC) 活性化法で結合させ、*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-KLH を調製した。なお、*N*-Myr-peptidyl-タンパク質の分析は上記の方法^{28,29,32)}によった。この *N*-Myr-peptidyl-KLH を抗原として常法によりウサギに免疫し、抗血清を得た。硫酸塩析後、*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys を結合させたウシ血清アルブミン (BSA) をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーにより部分精製した。本抗体は *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-[¹²⁵I]BSA と免疫化学的に反応し、この免疫反応は *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-BSA, *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-KLH によって強く抑制され、BSA, KLH, Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys では抑制されなかった (Fig. 4 A)。また本抗体はペプチド抗原 *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-[¹²⁵I]tyramine と免疫化学的に反応し、この免疫反応も *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys ペプチドで阻害され、Gly-Ser-Ser-Lys ペプチドでは阻害されなかった (Fig. 4 B)。上記のことから本抗体は *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys 分子を特異的に識別している事が判明した。³²⁾

3-2. Anti-*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys 抗体による pp60^{v-src} の同定 次に、本抗体を用いて radioimmunoprecipitation analysis (RIPA)³³⁾ を行い、RSV (tsNY68 株) 感染ニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) 中に発現している pp60^{v-src} の同定を試みた。対照として anti-*src*-gene product 抗体 (RSV-tumor bearing rabbit antiserum, トランスフォーメーション社, U.S.A.) を用いて比較した結果, Fig. 5 lane A に示すように本抗体は主に p60K タンパク質と反応し, anti-*src*-gene product 抗体 (Fig. 5 lane B) に比較し, 特異性が高い事が認められた。本抗体をリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーによ

Fig. 4. Immunochemical Specificity of the Antibody

Percentage of *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-[¹²⁵I]BSA (A) and *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-[¹²⁵I]tyramine (B) bound to the antibody as determined in the presence and absence of effectors. Effectors used were: underivatized BSA, (—△—) and KLH, (—□—); Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys, (—▲—); *N*-Myr-Gly-BSA, (—■—); *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-BSA, (—○—); *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-KLH, (—●—); *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-tyramine, (—●—); *N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys, (—×—). Each point represents the mean of two determinations. pmol are expressed as pico mols per radioimmunoassay system.³²⁾

Fig. 5. Immunological Detection of a 60K Protein from Lysates of tsNY68-Transformed CEF

The lysates obtained from [^3H]myristoyl-labeled CEF transformed with tsNY68 were subjected to immunoprecipitation with anti-*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys antibody (lane A) or anti-*src*-gene product antiserum (lane B). The immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and fluorography. Left arrows show 60 K and 28 K proteins and right arrows show molecular markers.

Fig. 7. Immunofluorescence Microscopy with the Anti-*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys Antibody

Transformed cells were stained with the anti-*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys antibody (A) and the anti-*src*-gene product antibody (B). $\times 300$.

Fig. 6. Identification of a 60K Protein as $\text{pp60}^{\text{v-src}}$

The delipidated lysate obtained from [^3H]myristoyl-labeled CEF transformed with tsNY68 was subjected to an antibody-affinity chromatography (A), followed by HPLC(B) of *N*-[^3H]Myr-Gly-Ser-Ser-Lys (indicated by a horizontal bar) generated from the tryptic digest of the radioactive protein.

り [^3H]ミリスチン酸でラベルした RSV 感染 CEF 中の $\text{pp60}^{\text{v-src}}$ を部分精製し、得られた放射活性タンパク質 (Fig. 6 A) のトリプシン消化物から放射活性ペプチドを逆相系 HPLC で分離し、*N*-[^3H]Myr-Gly-Ser-Ser-Lys を同定した (Fig. 6 B). 上記の事から、本抗体が免疫化学的に反応した RSV 感染 CEF 中のタンパク質は $\text{pp60}^{\text{v-src}}$ である事が確認され、本抗体の有用性、特異性が認められた。³²⁾

3-3. Anti-*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys 抗体を用いる間接蛍光抗体法による $\text{pp60}^{\text{v-src}}$ の細胞内分布 RSV 感染 CEF を無蛍光ガラスプレートにのせ、アセトン固定後、anti-*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys 抗体あるいは anti-*src*-gene product 抗体を一次抗体として、次にフルオロイソチオシアナート (FITC)-ラ

ベルウサギ免疫グロブリン G (IgG) を二次抗体として用い、常法に従って間接蛍光抗体 (IF) 法⁸⁴⁾を行った。Anti-*N*-Myr-Gly-Ser-Ser-Lys 抗体による IF の結果 (Fig. 7 A), 細胞膜により鮮明な蛍光が認められ、本抗体が細胞膜に極在している pp60^{v-src} と特異的に反応している事が確認され、anti-*src*-gene product 抗体の結果 (Fig. 7 B) と比較して、本研究で調製した抗体がより鮮明に pp60^{v-src} の膜への局在を明らかにした。

3-4. *N*-Myr-Gly-peptide 誘導体による pp60^{v-src} のミリスチル化抑制とそれに伴う RSV 感染 CEF の形質転換阻止 上記のように、RSV 感染細胞の癌細胞への形質転換には *src*-gene 産物 pp60^{v-src} のアミノ末端ミリスチル化と pp60^{v-src} のチロシンキナーゼ活性の双方が必須である事が判明した。タンパク質のアミノ末端ミリスチル化を触媒する酵素は酵母⁸⁵⁾あるいは動物組織⁸⁶⁾から見いだされ、部分精製されているがその酵素化学的諸性質は明確でない。本酵素はミリスチル-CoA をミリスチル供与体、Gly-peptide を受容体とし、

Fig. 8. Effect of *N*-Myr-GOA on the Morphological Transformation of CEF Infected with tsNY68. $\times 150$

A and B, non infected CEF grown in MEM at 37°C for 48 h in the absence (A) and presence (B) of *N*-Myr-GOA (50 μ M) are shown, respectively.

C and D, infected CEF grown in MEM at 37°C for 48 h in the absence (C) and presence (D) of *N*-Myr-GOA (50 μ M) are exhibited, respectively.

その間のミリストイル基の授受を触媒する事から本酵素はミリストイル基と結合する部位が存在すると考えられる。そこで、著者らは数種の *N*-Myr-Gly 化合物を合成し、ミリストイル化抑制を調べた。RSV 感染細胞の形質転換作用は軟寒天培地中におけるフォーカス形成、あるいはニワトリに接種し腫瘍形成を測定し、求める事が通常用いられているが、著者らは RSV の温度変異株を用いて温度による形態変化阻止作用を有する化合物の検索を行った。RSV の温度変異株 (tsNY68) によって感染した CEF は 41°C では正常細胞の形態すなわち細胞は細く長く一定方向に向かってプレートに接着して増殖する。培養温度を 37°C に下げ 48 h 培養すると細胞は丸くなり、方向性を失い、プレートに接着せず激しく分裂・増殖を繰り返す (Fig. 8 C)。抑制作用が認められた化合物のうち、もっとも抑制効果の高い簡単な化合物 *N*-Myr-glycinal diethyl acetal (*N*-Myr-GOA) について pp60^{v-src} のミリストイル化抑制作用を調べた。

N-Myr-GOA (50 μM) を 41°C, 24 h 培養後培地に加え、同温度で 24 h 培養後、温度を 37°C に下げると、*N*-Myr-GOA の加えられていない細胞は形質転換し激しく分裂するが、*N*-Myr-GOA 添加により細胞は鎮静化し正常細胞様形態を示す (Fig. 8 D)。この細胞に [³H]ミリスチン酸を加え、ラベル化して pp60^{v-src} のミリストイル化を調べた。 [³H]ミリスチン酸 (20–100 μCi) を加えて 37°C, 24 h 培養し、常法により細胞を集め、一定量の細胞を RIPA 緩衝液で可溶化後、cell lysate のタンパク質量を調べ、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行い、一方は乾燥後フルオログラフイー³⁷⁾を行って [³H]ミリスチン酸を取り込んだタンパク質を分析した。他の一方は同じく SDS-PAGE 後、トランスプロット³⁸⁾したのち anti-*src*-gene 抗体を用いて RSV の viral protein を検出し、pp60^{v-src} を同定した。*N*-Myr-GOA 非存在下では pp60^{v-src} のミリストイル化 (Fig. 9 lane A) が明確に認められ、*N*-Myr-GOA 存在下では pp60^{v-src} のミリストイル化 (Fig. 9 lane B) は認められなかった。また同じ試料を anti-*src*-gene product 抗体を用いるウエスタンブロット法³⁹⁾によりウイルス由来のタンパク質を同定した結果、*N*-Myr-GOA 存在下細胞の可溶性画分中に lane B に示す放射活性の認められていない画分中にも pp60^{v-src} が他のウイルス由来のタンパク質と同じように検出されている事 (lane B') が確認され、放射活性ネガティブで、すなわちミリストイル化を受けていない pp60^{v-src} が存在する事を明らかにし、*N*-Myr-GOA が pp60^{v-src} のミリストイル化を阻止している事を示している。³⁹⁾

3-5. *N*-Myr-GOA により処理された tsNY68 感染細胞の間接蛍光抗体法による観察 tsNY68 感染細胞の *N*-Myr-GOA による処理及び未処理の細胞を anti-*src*-gene product 抗体を一次抗体として、FITC ラベル IgG (ウサギ) を二次抗体として用い間接蛍光抗体法により観察した結果を Fig. 10 に示す。*N*-Myr-GOA 未処理群の細胞では主に細胞膜への蛍光局在が認められた (Fig. 10 A)。一方、*N*-Myr-GOA 処理群の細胞では細胞膜への局在は認められず、細胞全体に蛍光が認められ (Fig. 10 B)、これは *N*-Myr-GOA により pp60^{v-src} のミリストイル化が抑制され、ミリストイル化を受けていない pp60^{v-src} は膜への局在能を失い、細胞質に分布している事を示している。³⁹⁾

Fig. 11 に RSV の CEF への感染、発症、細胞の癌化の様子を示した。RSV が感染すると RSV の ribonucleic acid を鋳型に complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) が逆転写酵素の作用により作られ、2 本鎖 DNA を形成したのち、宿主の遺伝子に組み込まれる。RSV はプロウイルスとして存在し、この遺伝子が発現し、*src*-gene 産物 p60^{v-src} が合成されると同時にミリストイル化を受け、リン酸化され、機能を持った *N*-Myr-p60^{v-src} として細胞膜に特異的に局在し、pp60^{v-src} の作用により細胞を形質転換させる。*N*-Myr-GOA の RSV 感染細胞の癌化阻止作用を前述の実験結果に基づき Fig. 11 を参考に考察すると、*N*-Myr-GOA は Myr-CoA あるいは *N*-Myr-ペプチドを合成する酵素に作用し、タンパク質のミリストイル化を抑制すると考えられる。*N*-Myr-GOA によりミリストイル化を抑制された pp60^{v-src} は膜へ局在する能力を欠損し、細胞質中に漂い、pp60^{v-src} (チロシンキナーゼ) の基質タンパク質 (p36K と考えられる) のリン酸化を間接的に阻止し、その結果、感染細胞が形質転換しないと考えられる。

4. ミリストイル化酵素活性の測定法^{35,36)}

ミリストイル化酵素の活性は下記の方法により行われているが簡便な方法は開発されていない。原理的には標識されたミリストイル基供与体すなわち [³H]Myr-CoA かあるいはミリストイル基受容体すなわちグリシルペプチドを標識して酵素反応により生じた標識された *N*-Myr-ペプチドを HPLC で分析して求める。いずれも長

Fig. 9. Effect of *N*-Myr-GOA on Protein Myristoylation in CEF Infected with tsNY68

The infected-CEF were labeled with [3 H]myristate in MEM at 37°C for 24 h in the absence (lane A and A') and presence (lane B and B') of *N*-Myr-GOA (50 μ M), lysed in RIPA buffer, and submitted to SDS-PAGE and processed for fluorography. One half or the other one half of the each lysate which contains equivalent quantities of protein were used for analyses of [3 H]myristatebound proteins and *src*-gene products by fluorography (lane A and B) or immunoblotting analyses (lane A' and B') after SDS-PAGE, respectively. Lane C represents RIPA of the lysate with anti-*src*-gene product antibody. The arrow indicates p60K. Molecular weight markers are shown on the right. The experimental details are given in ref. 32.

Fig. 10. Immunofluorescence Microscopy of the Infected-cells Treated with *N*-Myr-GOA

Transformed-cells (A) and the infected-cells treated with *N*-Myr-GOA (B) were stained with anti-*src*-gene product antibody. $\times 400$.

Fig. 11. Scheme of Cell Transformation with Rous Sarcoma Virus

RSV: Rous sarcoma virus; cDNA: complementary DNA; dsDNA: double strain DNA; *src*: *src*-gene.

所、欠点があり前者の [3 H]Myr-CoA を用いる方法は化学的に高品質の [3 H]Myr-CoA (Myr-CoA がかなり不安定であるので、厳密な管理が必要) が入手困難であるので、用時、 [3 H]ミリスチン酸、CoA 及び Myr-CoA シンセターゼで酵素的に [3 H]Myr-CoA を合成する必要がある事と、酵素反応で生じた *N*- [3 H]Myr-ペプチド及び未反応の [3 H]ミリスチン酸の HPLC による分離がペプチド鎖の種類によっては不正確になる場合がある。一方、ミリスチル基受容体であるグリシルペプチドを標識して用いる方法は高感度で精度が高いがペプチド鎖の C-末端側にチロシンを結合させ 125 I ラベルして用いるため、おのおののペプチドをそれぞれ別々にラベル化して用いねばならない欠点を有する。より簡便な酵素活性測定法の開発が望まれている。

5. ヒトレトロウイルスのコアタンパク質のアミノ末端ミリストイル基の分析と *N*-Myr-化合物による ミリストイル化抑制²⁷⁾

ヒトレトロウイルス感染症は、1977年高月 清ら⁴⁰⁾によってはじめて見い出され、adult T-cell leukemia あるいはヒト T 細胞白血病 (ATL, あるいは HTL) という疾病名が与えられている。この疾病はカリブ海、西日本に

Fig. 12. Detection of NH₂-Terminal Myristoyl Proteins of HTLV-I and MT-2 Cell Lysates

Virion lysates (lanes A to E, E, NH₂OH-treated), cell lysates (lanes F to H, G, NH₂OH-treated), and immunoprecipitation of cell lysate (lane H) with a patient's anti-serum of ATL were analyzed by 14% SDS-page and processed for fluorography. Arrows represent p28K and p19K. Molecular markers are shown on the right.

HTLV-I-producing MT-2 cells (approximately 7×10^6 /10 ml/75 cm²) are grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. The cells were labeled separately with [1-¹⁴C]myristate (25 μCi) at 37°C for 0h (laneA), 3h (laneB), 6h (laneC), and 9h (laneD). Cells and virions were harvested from a MT-2 cell-cultivated medium. The cells were collected by centrifuging (1000 × *g*, 10 min) and washed two times with a cold phosphate buffer saline (PBS), and were then lysed in 500 μl of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM phenylmethane sulfonyl fluoride). Prior to collecting the virions from the medium eliminated cells, the medium was submitted to centrifugation (15000 × *g*, 30 min) to remove insoluble materials. The virions were collected by centrifuging (100000 × *g*, 90 min), and were lysed in 50 μl of a lysis buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.4, 2% SDS). The lysates were treated with 1 M NH₂OH in 50 mM Tris buffer, pH 7.4 at room temperature. Equivalent quantities of proteins from each lysate were used for analysis of [1-¹⁴C]myristate-bound proteins by SDS-page. All radiolabeled compounds were obtained from Amersham (Buckinghamshire, England).

Fig. 13. Detection of NH₂-Terminal Myristoyl Proteins of HIV and CEM/LAV Cell Lysates

Virion lysates (lanes A to C) from CEM/LAV-cell medium, lysates (lane D and E) of the fraction corresponding to virions from the CEM-cell medium cultivated under the identical conditions, the cell lysate of CEM/LAV (lanes F and G) and CEM (lane H), immunoprecipitation of the CEM/LAV cell lysate (lane I) and the virion lysate (lane J), and the NH₂OH-treated virion lysate (lane K) were exhibited. Arrows represent p17K and p24K. Molecular weight markers are shown on the right.

CEM/LAV cells (approximately 1.1×10^7 cells/10 ml/75 cm²) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum at 37°C for 0h (lanes A and F) and 24h (other lanes) in humidified 5% CO₂ atmosphere. The cells were incubated with either [1-¹⁴C]myristate (25 μCi, lane B and D), myristate (100 μCi, lanes I to K) or DL-[1-¹⁴C]leucine (5 μCi, lane C and E). The other experimental conditions are the same as Fig. 12.

多発し、その病因ウイルスは *onco* ウイルス亜科に属するヒトレトロウイルス (human T-cell leukemia virus, HTLV-I) である。ATL が発見されて数年経過後、レンチウイルス亜科に属するもう1つのヒトレトロウイルス (human immunodeficiency virus, HIV-I) が見い出され、このウイルスは後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) を引き起こす。AIDS は現在大きな社会問題の1つである。HTLV-I 及び HIV-I の遺伝子解析からこれらヒトレトロウイルスのコアタンパク質 (*gag* タンパク質) の遺伝子配列はそれぞれ開始コドン ATG から始まり、グリシンをコードする塩基配列を示したことから、このタンパク質は *N*-ミリスチル化を受けている事が推定されていた。Ootsuyama ら¹¹⁾は HTLV-I の p19^{gag} タンパク質のミリスチル化を見い出した。著者ら²⁷⁾は HTLV-I 及び HIV-I の p19^{gag}, p17^{gag} タンパク質のミリスチル化を同定し、更に著者らはこれら *gag* タンパク質の *N*-ミリスチル化が *N*-Myr-GOA により抑制される事を報告した。

HTLV-I の持続産生株として MT-2, HIV-I の持続産生株として CEM/LAV 細胞系を用い、 7×10^6 cells を RPMI-1640 培地中で培養し *N*-Myr-GOA (0—200 μ M) 処理及び未処理の細胞を [¹⁴C] 及び [³H]ミリスチン酸でラベル化した。ラベル化した細胞を集め、RIPA 緩衝液で可溶化後ラベル化タンパク質をそれぞれヒト ATL 患者血清及び HIV-I p17^{gag} に対するモノクローン抗体を用いて RIPA を行った。Fig. 12 に示すように HTLV-I

Fig. 14. Effects of *N*-Myr-GOA on Protein Myristoylation of HTLV-I and HIV-I

Figure 14A shows the effects of *N*-Myr-GOA on protein myristoylation of HTLV-I (lanes 1 to 4) and MT-2 (lanes 5 to 8), and the incorporation of [¹⁴C]leucine into HTLV-I (lanes 9 to 12) at various concentrations as follows: 0 μ M: lanes 1, 5, and 9; 50 μ M: lanes 2, 6, and 10; 100 μ M: lanes 3, 7, and 11; 200 μ M: lanes 4, 8, and 12.

Figure 14B illustrates the effects of *N*-Myr-GOA on the protein myristoylation of HIV-I (lanes 13 to 16) and CEM/LAV (lanes 17 to 20), and the incorporation of [¹⁴C]leucine into HIV-I (lanes 21 to 24) at various concentrations as follows: 0 μ M: lanes 13, 17, and 21; 10 μ M: lanes 14, 18, and 22; 40 μ M: lanes 15, 19, and 23; 200 μ M: lanes 16, 20, and 24.

MT-2 cells and CEM/LAV cells (approximately 1.5×10^6 cells/10 ml/75 cm) were grown separately in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere. The cells were precultivated for 15h with either *N*-Myr-GOA or the other *N*-Myr compounds at concentrations of 0, 5, 20, 50, and 100 μ M, respectively. Further additions of either *N*-Myr-GOA or the other *N*-Myr compounds were administered to each of the precultivated media which were then allowed to sit for 1 h under the same conditions. The final concentrations of *N*-Myr-GOA or the other *N*-Myr compounds are 0, 10, 40, 50, 100, and 200 μ M, respectively. The mixture was then incubated separately with [¹⁴C]myristate (25 μ Ci) and DL-[1-¹⁴C]leucine (5 μ Ci) for 24h at 37°C. The cells and virions were harvested separately from the cultivated medium. The other experimental conditions are the same as Fig. 12.

の p19 タンパク質の [^{14}C] ミリスチン酸によるミリスチル化が経時的に認められ、このミリスチル化を受けたタンパク質はヒドロキシルアミンに対して抵抗性を示したことからミリスチン酸が酸アミド結合を介して結合している事を示唆している。²⁷⁾ また p19 タンパク質は ATL 患者血清と反応する事から HTLV-I の p19^{gag} タンパク質である事が確認された。同様に HIV-I においても p17^{gag} タンパク質のミリスチル化が見い出された (Fig. 13).²⁷⁾ これら p19^{gag} 及び p17^{gag} タンパク質の N-ミリスチル化が N-Myr-GOA により強く抑制された (Fig. 14).

Fig. 15. Structures of Human Retrovirus Gene and Their Gene Products⁴⁹⁾

A, HTLV-I; B, HIV-I; Myr-, myristoyl; *tax*, transactivator; *rex*, regulator of expression; *lat*, transactivator, *rev*, regulator of expression of virion proteins; *vif*, virion infectivity factor; *vpr*, unknown; *nef*, negative factor.

現在、本薬剤の抗ウイルス活性は NIH AIDS プロジェクトチーム Dr. McGowan を中心に検討されている。HTLV-I 及び HIV-I の遺伝子の構造及びその遺伝子産物のプロセッシングの過程とミリスチル化を受けるタンパク質を Fig. 15 A, B に示した。なおここには記述していないが、HIV-I の *nef* protein (p27^{nef}) のミリスチル化が認められている。

6. Protein Myristoylation の今後の展望

Protein myristoylation は 1982 年、著者らによって初めて cAMP-依存性プロテインキナーゼ (触媒サブユニット) に発見されたものであるが、発見後 6 年経過した現在、種々の細胞機能に直接係わるタンパク質あるいはウイルス構成タンパク質等に多く見い出され始めている。ミリスチル化を受けるタンパク質のアミノ末端は必ずグリシン残基であり、アミノ末端より 5 残基目はセリン残基で占められるタンパク質が多い (Table II)。グリシン残基及びセリン残基の生産学的意義は現在明確ではないが、ミリスチル化酵素の基質認識に必要と考えられる。

ミリスチル化が種々様々なタンパク質に見い出され、その生物学的意義は多種多様のように見え、特にウイルス構成タンパク質にミリスチル化が多く発見されている事は、ウイルスの機能にとってタンパク質のミリスチル化が必須であると推定される。タンパク質のアミノ末端ミリスチル化に関する研究は数種ウイルスについてかなり研究が進んでおり、Picornavirus 科の poliovirus (RNA ウイルス) の 4 種のポリオンタンパク質 (virion VP1, VP2, VP3, VP4) が 60 分子会合し、ウイルス RNA を包むカプシドを形成する。その中の VP1 及び VP4 のアミノ末端は *N*-ミリスチル化を受け、X 線結晶学的解析から VP4 の *N*-ミリスチル基は VP3 のロイシンの側鎖に疎水的に結合し、カプシドの形成に必須である事が最近報告された。¹⁹⁾ また polyoma virus,

TABLE II. Amino-terminal Sequences of Myristoylated Proteins

	<i>N</i> -Myristoylated proteins	References
cAMP-dependent protein kinase	<i>N</i> -Myr-Gly-Asn-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-	1, 2
Calcineurin B	<i>N</i> -Myr-Gly-Asn-Glu-Ala-Ser-Tyr-Pro-Leu-	3
Cytochrome b ₅ reductase	<i>N</i> -Myr-Gly-Ala-Gln-Leu-Ser-Thr-Leu-Gly-	6
LSTRA T-cell-lymphoma kinase pp56 ^{lck}	<i>N</i> -Myr-Gly-Cys-Val-Cys-Ser-Ser-Asn-Pro-	7, 41
<i>gag</i> proteins		
Murine leukemia virus p15	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Thr-Val-Thr-Thr-Pro-Leu-	4, 18, 43
Feline sarcoma virus p15	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Thr-Ile-Thr-Thr-Pro-Leu-	5, 24, 42
Baboon endogenous virus p12	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Thr-Leu-Thr-Thr-Pro-Leu-	24, 42
Avian reticuloendotheliosis virus p12	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Ala-Gly-Ser-Lys-	24, 42
HTLV-I p19	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Ile-Phe-Ser-Arg-Ser-Ala-	11, 27
HTLV-II p15	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Ile-His-Gly-Leu-Ser-Pro-	11, 44
HIV-I p17	<i>N</i> -Myr-Gly-Ala-Arg-Ala-Ser-Val-Leu-Ser-	26, 27
HIV-I p27 (<i>nef</i>)	<i>N</i> -Myr-Gly-Gly-Lys-Trp-Ser-Lys-Arg-Ser-	23
Bovine leukemia virus p15	<i>N</i> -Myr-Gly-Asn-Ser-Pro-Ser-Tyr-Asn-Pro-	5, 19, 45
Mouse mammary tumor virus p10	<i>N</i> -Myr-Gly-Val-Ser-Ser-Gly-Ser-Lys-Gly-	24, 42
Mason-Pfizer monkey virus p10	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Glu-Leu-Ser-Gln-His-Glu-	24, 42
RSV p 60 ^{v-src}	<i>N</i> -Myr-Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys-	8, 24
Poliovirus VP 4	<i>N</i> -Myr-Gly-Ala-Gln-Val-Ser-Ser-Gln-Lys-	24, 46
Simian virus (SV) 40 VP 2	<i>N</i> -Myr-Gly-Ala-Ala-Leu-Thr-Leu-Leu-Gly-	24, 42
Encephalomyocarditis virus VP 4	<i>N</i> -Myr-Gly-Asn-Ser-Thr-Ser-Ser-Asp-Lys-	19, 47
Foot and mouth disease virus VP 4	<i>N</i> -Myr-Gly-Ala-Gly-Gln-Ser-Ser-Pro-Ala-	19, 48
Pre S1 protein of Hepatitis B virus (HBV)		
Ground squirrel HBV	<i>N</i> -Myr-Gly-Asn-Asn-Ile-Lys-Val-Thr-Phe-	18
Woodchuck HBV	<i>N</i> -Myr-Gly-Asn-Asn-Ile-Lys-Val-Thr-Phe-	18
Duck HBV	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-His-Pro-Ala-Leu-Ser-Met-	18
Human HBV (ayw)	<i>N</i> -Myr-Gly-Gln-Asn-Leu-Ser-Thr-Ser-Asn-	18
Human HBV (adw 2)	<i>N</i> -Myr-Gly-Gly-Thr-Ser-Ser-Leu-Pro-Ala-	18

N-Myr-, *N*-myristoyl-.

SV40 virus, 肝炎 B 型ウイルス (DNA ウイルス) 構造タンパク質がミリストイル化を受け、カプシド化あるいは脱核に参与し、ウイルスの会合に必要であろうと述べられている。前記のように動物レトロウイルス (RSV) の pp60^{p-src} の形質転換作用には pp60^{n-src} のアミノ末端ミリストイル化が必須である事が見いだされている。また最近、ヒトレトロウイルス HTLV-I, HIV-I のコアタンパク質のミリストイル化が発見されるに至り、protein myristoylation は生命維持あるいはウイルスの機能維持に係わる大きな問題として展開しつつある。

謝辞 本研究の一部は文部省科学研究費により行いました。ヒトレトロウイルスの実験につきましては化学及び血清療法研究所所長、野中実男博士の御厚意により、同研究所の P3 レベルバイオハザード対策設備を備えた放射性同位元素実験室で行ったものです。本研究は本学、田代 昭氏をはじめ大学院生諸氏との共同研究により行いました。また、抗体作成に関する研究は熊本大学 堀内正公博士との共同研究により行いました。ATL 患者血清は琉球大学 荒木弘一博士、ヒトレトロウイルス持続産生株は熊本大学 高月 清博士、RSV (tsNY68) は東京大学 河井貞明博士からいただきました。深く感謝いたします。

引用文献

- 1) S. A. Carr, K. Biemann, S. Shoji, D. C. Parmelee, K. Titani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6128 (1982).
- 2) S. Shoji, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, E. H. Fischer, K. Titani, *Biochemistry*, **22**, 3702 (1983).
- 3) A. Aitken, P. Cohen, S. Santikarn, D. H. Williams, A. G. Calder, A. Smith, C. B. Klee, *FEBS Lett.*, **150**, 314 (1982).
- 4) L. E. Henderson, H. C. Krutzsch, S. Oroszlan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 339 (1983).
- 5) A. Schultz, S. Oroszlan, *Virology*, **133**, 431 (1984).
- 6) J. Ozols, S. A. Carr, P. Strittmatter, *J. Biol. Chem.*, **259**, 13349 (1984).
- 7) G. A. Marchildon, J. E. Casnellie, K. A. Walsh, E. G. Krebs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 7679 (1984).
- 8) A. M. Schultz, L. E. Henderson, S. Oroszlan, E. A. Garber, H. Hanafusa, *Science*, **227**, 427 (1985).
- 9) E. N. Olson, D. A. Towler, L. Glaser, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3784 (1985).
- 10) J. Soric, J. A. Gordon, *Science*, **230**, 563 (1985).
- 11) Y. Ootsuyama, K. Shimotohno, M. Miwa, S. Oroszlan, T. Sugimura, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 1132 (1985).
- 12) A. A. Aderem, M. M. Keum, E. Pure, Z. A. Cohn, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5817 (1986).
- 13) A. Rein, M. R. McClure, N. R. Rice, R. B. Luftig, A. M. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 7246 (1986).
- 14) J. A. Hedo, E. Collier, A. Watkinson, *J. Biol. Chem.*, **262**, 954 (1987).
- 15) S. Kellie, N. M. Wigglesworth, *FEBS Lett.*, **213**, 428 (1987).
- 16) S. S. Rhee, E. Hunter, *J. Virol.*, **61**, 1045 (1987).
- 17) C. H. Streuli, B. E. Griffin, *Nature (London)*, **326**, 619 (1987).
- 18) D. H. Persing, H. E. Varmus, D. Ganer, *J. Virol.*, **61**, 1672 (1987).
- 19) M. Chow, J. F. E. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands, F. Brown, *Nature (London)*, **327**, 482 (1987).
- 20) C. J. Mcglade, M. L. Tremblay, S. Yee, R. Ross, P. E. Branton, *J. Virol.*, **61**, 3227 (1987).
- 21) J. E. Buss, S. M. Mumby, P. J. Casey, A. G. Gilman, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7493 (1987).
- 22) S. Pillai, D. Baltimore, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7654 (1987).
- 23) B. Guy, M. P. Kieny, Y. Riviere, C. L. Peuch, K. Dott, M. Girard, L. Montagnier, J-P. Lecocq, *Nature (London)*, **330**, 266 (1987).
- 24) A. V. Paul, A. Schultz, S. E. Pincus, S. Oroszlan, E. Wimmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7827 (1987).
- 25) A. A. Aderem, K. A. Albert, M. M. Keum, J. K. T. Wang, P. Greengard, Z. A. Cohn, *Nature (London)*, **332**, 362 (1988).

- 26) F. D. M. Veronese, T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo, M. G. Sarngadharan, *J. Virol.*, **62**, 795 (1988).
- 27) S. Shoji, A. Tashiro, Y. Kubota, *J. Biochem.*, **103**, 747 (1988).
- 28) S. Shoji, M. Hayashi, T. Funakoshi, Y. Kubota, *J. Chromatogr.*, **356**, 179 (1986).
- 29) S. Shoji, M. Ichikawa, T. Yamaoka, T. Funakoshi, Y. Kubota, *J. Chromatogr.*, **354**, 463 (1986).
- 30) D. Pellman, E. A. Garber, F. R. Cross, H. Hanafusa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 1623 (1985).
- 31) D. Pellman, E. A. Garber, F. R. Cross, H. Hanafusa, *Nature (London)*, **314**, 374 (1985).
- 32) S. Shoji, O. Takenaka, Y. Kida, M. Matsunaga, M. Hayashi, S. Horiuchi, Y. Kubota, *Mol. Cell. Probes*, in press.
- 33) S. Hattori, T. Kiyokawa, K. Imagawa, F. Shimizu, E. Hashimura, M. Seiki, M. Yoshida, *Virology*, **136**, 338 (1984).
- 34) A. W. Stoker, S. Kellie, J. A. Wyke, *J. Virol.*, **58**, 876 (1986).
- 35) D. A. Towler, S. R. Eubanks, D. S. Towery, S. P. Adams, L. Glaser, *J. Biol. Chem.*, **262**, 1030, (1987); *idem*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2708 (1987); *idem*, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1784 (1988).
- 36) C. J. Glover, C. Goddard, R. L. Felsted, *Biochem. J.*, **250**, 485 (1988).
- 37) J. P. Chamberlain, *Anal. Biochem.*, **98**, 132 (1979).
- 38) H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4350 (1979).
- 39) S. Shoji, M. Matsunaga, R. Tsujita, Y. Kubota, *Biochemistry Inter.*, in press.
- 40) K. Takatsuki, T. Uchiyama, K. Sagawa, J. Yodoi, "Topics in Hematology," S. Seno, F. Takaku, S. Irino, eds., Excerpta Medica, Amsterdam, 1977, p. 73.
- 41) J. D. Marth, R. Peet, E. G. Krebs, R. M. Pearlmutter, *Cell*, **43**, 393 (1985).
- 42) A. Mschults, S. Oroszlan, *J. Virol.*, **46**, 355 (1983).
- 43) T. M. Shinnick, R. A. Lerner, J. G. Sutcliffe, *Nature (London)*, **293**, 543 (1981).
- 44) K. Shimotohno, Y. Takahashi, N. Shimizu, T. Gojobori, D. W. Golde, I. S. Y. Chen, M. Miwa, T. Sugimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3101 (1985).
- 45) N. R. Rice, R. W. Stephens, A. Burny, R. V. Gilden, *Virology*, **142**, 357 (1985).
- 46) A. J. Dorner, L. F. Dorner, G. R. Larsen, E. Wimmer, C. W. Anderson, *J. Virol.*, **42**, 1017 (1982).
- 47) A. C. Palmenberg, E. M. Kirby, M. R. Janda, N. L. Drake, G. M. Duke, K. F. Potratz, M. S. Collett, *Nucleic Acids*, **12**, 2969 (1984).
- 48) E. Beck, S. Forss, K. Strebel, R. Cattaneo, G. Feil, *Nucleic Acids*, **11**, 7873 (1983).
- 49) R. Gallo, F. W-Staal, L. Montagnier, W. A. Haseltine, M. Yoshida, *Nature (London)*, **333**, 504 (1988).