

ヒト型アデノウイルス2型のクロマチン構造と その生物学的意義

— アデノウイルス及びアデノウイルス
クロマチン蛋白の分離, 精製 —

川崎医科大学 生化学 I
(指導: 細川桂一教授)

稲垣安紀

(昭和58年12月20日受付)

The Structure and Biological Significance of Human Adenovirus Type 2 Chromatin

— Isolation and Purification of Chromatin
Protein from Adenovirion —

Yasunori Inagaki

Department of Biochemistry
Kawasaki Medical School

(Accepted on Dec. 20, 1983)

近年, 真核細胞の遺伝子発現機序の解析モデルとして研究されているヒト型アデノウイルス2型を使用し, 特に真核細胞のヒストン蛋白や動物精子中の小分子量強塩基性蛋白であるプロタミンの様に遺伝子発現制御に直接関与していると思われるウイルスクロマチン蛋白 μ , V, VII を分離した. その中で特に μ 蛋白について分離, 精製を試み, 電気泳動的に純粋な均一蛋白として回収することに成功した. その方法と合わせて μ , V, VII 蛋白のホスホセルロースカラムクロマトグラフィー, アルギニン高感度染色法の改良及び μ 蛋白の生物学的意義についても論じた.

Basic core polypeptides V, VII and μ of adenovirus type 2 were isolated and purified from the virion particles to study their role in the regulation of gene expression. From the extremely high contents of arginine, it has been implicated that polypeptides VII and μ at least partially mimic the action of protamine in masking the activity of genes in the early infection stage. In this context, I have tried and successfully been able to isolate the minor core polypeptide μ as electrophoretically pure acetone precipitates. The methods of preparation and highly sensitive detection using a modified guanidinium sensitive staining procedure were described.

The importance of the biological role of polypeptide μ was discussed in comparison with that of protamine.

Key Words ① Adenovirus ② Polypeptide μ ③ Core protein

はじめに

アデノウイルスは1953年(Rowe et al., 1953¹⁾; Hillman and Werner, 1954²⁾)により発見され, Enders ら (1956)³⁾により, ヒトや動物の気道から分離された一群のウイルスにこの名が与えられた。アデノウイルスは, 分子量約 1.8×10^8 dalton で直径約 80 nm の正 20 面体構造を有し, capsid と呼ばれる蛋白の外殻の中に分子量約 2.5×10^7 dalton の二重直鎖 DNA と 4 種類の蛋白の結合により構成されるコア (core) を内包している^{4), 5), 6)}。アデノウイルスの医学研究における重要な点は, 発癌性であり, 1962 年 Trentin ら⁷⁾ がヒト型アデノウイルス 12 型がハムスター新生児に発癌させる事を発見して以来, 当ウイルスの齧歯類に対する腫瘍原性は一般化され, 培養細胞のトランスフォーメーションとして *in vitro* で扱われるようになった。

一方, アデノウイルスの感染細胞中における増殖の分子機構も多くの研究者により, よく調べられ, 真核細胞における遺伝子発現のモデルとして詳細に研究されている。即ち, 真核細胞, 例えばヒトの細胞が 6×10^9 塩基対 (diploid) の DNA を持つ⁸⁾ のに対しアデノウイルスの DNA は約 36,000 塩基対と極めて小さく解析が可能であること, DNA の組み換えを頻繁に行うので遺伝解析が容易であること⁴⁾, 培養により充分量の均質なウイルスが得やすいこと等の理由により, アデノウイルスは, 感染病理学の研究対象としてだけでなく, 真核生物の遺伝子解析のモデルとして活発に研究されている。このアデノウイルスの 14 種の構造蛋白質⁴⁾のうち直接, 遺伝子の構造及び発現に関係している 4 種の塩基性蛋白質 (VII, V, μ , TP: terminal protein) の 1 つである μ 蛋白は, 1976 年, Hosokawa ら⁶⁾により報告され, 本研究では特にこの蛋白について検討を加えた。

試料と方法

I ヒト型アデノウイルス 2 型 (Ad-2) の分離

1. 細胞培養及び感染

ヒト喉頭癌由来細胞株である KB 細胞を宿

主として用いた。5% NCS (newborn calf serum) を含む, Joklik modified MEM (minimal essential medium) 中に 2.5×10^6 cells/ml の細胞密度に懸濁して 24 時間培養を行い, $1,500 \times g$ で 3 分間遠心し, 細胞を回収した。再び血清を含まない Joklik modified MEM 中に 5×10^6 cells/ml となる様, 懸濁した。seed virus を含む KB 細胞の lysate を MOI (multiplicity of infection) が 10 となる様, 加え 23°C で 1 時間攪拌した後, 5% NCS を含む Joklik modified MEM で 2.5×10^6 cells/ml となる様に希釈し, 0.2 M L-グルタミン及び 0.06 M L-アルギニンをそれぞれ 0.5% (v/v) となる様加え, 37°C で 48 時間懸濁培養を行った。感染細胞は $1,500 \times g$ 3 分間の遠心により回収し, RSB (reticulocyte standard buffer: 0.01 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl [pH 7.4], 1.5 mM MgCl_2)⁹⁾ に懸濁し, -70°C で保存した⁶⁾。

2. アデノウイルスの分離精製

アデノウイルス感染 KB 細胞をフリーズ, ソーイング (ドライアイスエタノール及び 37°C の温水に交互に漬ける凍結融解法) により破壊⁶⁾ し Beckman JA20 ローターを用い 10,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心し, ウイルスを含む上清をプールした。沈殿物を再度 RSB に懸濁し, グラステフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズし, 同ローターで 12,000 rpm で 4°C , 10 分間遠心後, 上清を先の上清と混合した。Beckman SW27 ローター用ニトロセルロース遠心チューブにクッションとして 5 ml の 42% (w/w) CsCl (in Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA) を用い, その上に静かにウイルスを含んだ上清を重層し, Beckman SW27 ローターを用い, 25,000 rpm, 15°C で 1 時間遠心し, CsCl 層に白いバンドを形成するウイルスを回収した^{6), 10)}。さらにウイルスを精製するため, 46% (w/v) CsCl (in Tris-HCl [pH 7.6], 0.01 M MET: β -mercaptoethanol, 1 mM EDTA) を用い Beckman SW 50.1 ローターで 36,000 rpm, 15°C , 16 時間の CsCl 平衡密

度勾配超遠心を行い、純粹な virion として回収した⁶⁾。CsCl を 0.01 M Tris-HCl [pH 7.6] に透析することにより除去し、Maizel らの方法により¹¹⁾ 260 nm における吸光度 (A_{260}) を測定し、ウイルス粒子の 13% (w/w) が DNA であることからウイルス濃度を計算した。(1 A_{260} unit=0.05mg DNA=0.28 mg protein 相当=1.1 $\times 10^{12}$ ウイルス粒子相当)

II ウイルス蛋白の分離、精製、同定

1. ウイルス蛋白サンプルの調整

前述の方法により分離したアデノウイルス (15.2 U/ml, 4.26 mg/ml protein 相当) 4.0 ml に 3M sodium acetate buffer [pH 7.0] を 0.3 M となる様調整し、全量の 2.5 倍の -20°C に冷した 95% エタノールを加え、-70°C で 15 分間以上静置した。4°C の水浴中にて解氷した後、Beckman JA20 ローターを用い 8,000 rpm で 4°C, 10 分間遠心し、上清をパスツールピペットで除去し、遠心チューブをろ紙上に倒立して 23°C にて 15 分間、乾燥させ、遠心チューブの底に沈着したウイルスを得た。7.0 ml の蒸留水に懸濁しフリーズ、ソーイングを行いウイルスの capsid を破壊し^{12), 13)} 1M Tris-HCl [pH 7.4] および 2M magnesium acetate をそれぞれ 0.02 M および 5 mM となる様に加え DNase I を 20 μ g/ml の濃度に加え、25°C で 1 時間、DNA を消化した⁶⁾。2M 酢酸にて pH 4.6 に調整し、尿素を 6M, 1M DTT (dithiothreitol) を 1 mM となる様、それぞれ加え、透明になるのを確認し、ウイルス蛋白のサンプルとして用いた⁶⁾。

2. ホスホセルロース (P-C) カラムクロマトグラフィー

a. P-C の活性化

P-C (Sigma 社) を 0.5N 水酸化ナトリウムに浸漬し蒸留水にて黄色調が抜けるまで吸引ろ過により充分洗浄し、手早く氷冷の 0.1N 塩酸でろ液が酸性となるまで洗浄した。ついで同様に、蒸留水洗浄を行った後 0.02 M sodium acetate buffer [pH 4.7] に懸濁し、pH を調整して再度吸引ろ過し、アセトンで洗浄後、乾

燥して保存した⁶⁾。

b. 緩衝系

P-C の膨潤及び蛋白吸着用として 0.05 M NaCl, 1 mM DTT, 6M 尿素, 0.02 M MAA (methylamine acetate) [pH 4.6] (buffer A) を用いた。また、蛋白溶出用には、buffer A の NaCl 濃度だけを変えてそれぞれ 0.8 M (buffer B), 1.1 M (buffer C), 1.4 M (buffer D) としたものを用いた。

c. カラムクロマトグラフィー

1.0 \times 60 cm のガラスジャケット付カラムを用い底部に 0.5 cm の厚さにセルローズパウダーを敷き、4°C で 12 時間 buffer A にて膨潤させ充分脱気した P-C を充填した。また、ガラスジャケットに、18°C の水を環流させ、カラムの温度を一定に保った。カラムを 200 ml の脱気した buffer A により洗浄した後、前述の方法に従って調整したアデノウイルスの蛋白サンプルをカラムに重層し、非吸着成分を 200 ml の buffer A にて wash out した。尚、この wash out 開始時より、Gilson エスカルゴ型フラクシオンコレクターにより 5 ml ずつの分取を開始した。P-C 吸着成分は、buffer A, buffer D を各々 200 ml 用い NaCl の直線濃度勾配を作成し、溶出した。蛋白濃度測定は、UV 法 (A_{230})¹⁴⁾ を使用し、BSA (bovine serum albumin) を標準として蛋白の検定直線を作った。(比色係数=200 μ g/ml)

d. μ 蛋白のカラムによる精製

前述のカラムクロマトグラフィーにより得られた μ 蛋白の画分を集め、希釈により NaCl 濃度が 0.05 M となる様、伝導度計を用いて調整した。この画分を 0.8 \times 10.5 cm の P-C カラムを通過させて再度吸着し、buffer B, buffer C, buffer D をそれぞれ 30 ml 用い段階的溶出法を行い、Gilson FC 80 型フラクシオンコレクターにより 0.5 ml ずつ分取した。

3. 電気泳動によるウイルス蛋白の検出

a. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

厚さ 2 mm のスラブゲルを使用し、長さ 1.5 cm の 5% ポリアクリルアミドの濃縮ゲル及び

10 cm の 12 % ポリアクリルアミド分離ゲルを用いた¹⁵⁾. また, 電極 buffer として 0.05 M Tris-glycine buffer [pH 8.5] を用いた. 電気泳動用試料は, 蛋白試料と SDS mixture (1M Tris-HCl [pH 7.0], 5 μ l; 20 % SDS, 10 μ l; 7 % BTB: bromothymol blue, 0.5 μ l; glycerol, 10 μ l; MET, 5 μ l) を 7:3 に混合し, 沸騰水中で 1 分 30 秒間加温して作成した. 温度を室温に下げた後, 濃縮ゲルのスロット中に試料を載せ, 流水でゲルを冷却しながら 20 mA の定電流で 5 時間泳動後, 25°C で 0.1 % Coomassie brilliant blue, 10 % 酢酸, 25 % メタノール溶液に漬けてゲル中の蛋白の固定及び染色を行い, 7 % 酢酸, 25 % メタノール溶液中でゲル中の余剰の色素を脱色した⁶⁾.

b. スターチゲル電気泳動

Sung らの方法¹⁶⁾ の変法を行った. urea-aluminum lactate-aluminum citrate-starch gel を用い, 0.05M aluminum lactate-aluminum citrate buffer [pH 3.5] で 200 V, 4°C, 20 時間電気泳動を行った. そしてゲルをナイロンテグスで 3 枚にスライスし, 中間のゲルスラブを 7 % 酢酸 20 % amido black 溶液中で 40 分間, 25°C にて染色し, 1N 硫酸で分別脱色するアルギニン高感度染色¹⁶⁾ を行った.

c. DNA のアガロースゲル電気泳動

アデノウイルス蛋白サンプル作製時の DNase I の効果判定のため, 同サンプルよりフェノール, クロロホルム法で DNA を抽出し, クロロホルム, イソアミルアルコール処理後エタノール沈殿法で濃縮し, 0.8 % アガロースゲル, TBE (Tris-Borate-EDTA) buffer で電気泳動後, ethidium bromide 染色を行った.

4. μ 蛋白の濃縮

P-C カラムの段階的溶出法により精製した (2, d), μ 蛋白の画分を集め, 分子量 1,000 以下の物質のみ透過させる透析膜 (Spectrapore 6 MWCO 1,000) を用い, 0.1M sodium acetate buffer [pH 5.6] に対して 4°C, 10 時

間透析して尿素及び塩を除いた後, 5 倍容のアセトン (特級) を加え, 軽く振とうし, -70°C で静置した. 1 時間後 4°C の水浴にて融解し, 12,000 rpm で 4°C 10 分間遠心し, 上清を巴斯ツールピペットで除去し, Speed Vac concentrator で真空乾燥し, μ 蛋白を回収した.

結 果

I アデノウイルス2型 (Ad-2) の分離

CsCl 密度勾配遠心法により premature virion よりなる upper shell (US), lower shell (LS) 及び mature virion (V) のバンドが検出された (Fig. 1). この mature virion を電

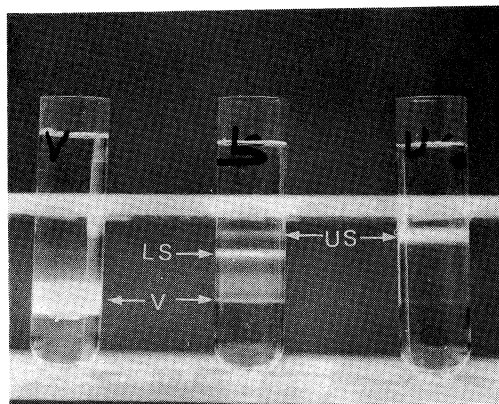


Fig. 1. Preparation of adenovirus by equilibrium CsCl density gradient ultracentrifugation.

US: upper shell, LS: lower shell,
V: mature virion

子顕微鏡で観察すると, 正 20 面体のウイルス粒子が確認された (Fig. 2). また, このウイルスを用いて KB 細胞に感染が成立することより, 形態的にも機能的にも, 完全な形でウイルス粒子が回収されていることが示された.

II アデノウイルス2型 (Ad-2) の構成蛋白

アデノウイルスの構成蛋白は, 約 14 種ある^{4), 5)} ことが知られており, そのうちの主要な蛋白の配置を Fig. 3 に示した^{4), 5)}. ヘキソン (II), ペントン基部 (III), ファイバー (IV), ヘキソン付随蛋白 (VI, VIII), ヘキソン 9 量体 特異性蛋白

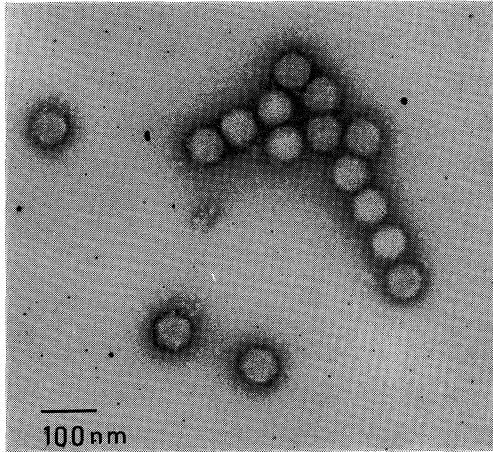


Fig. 2. Electron micrograph of isolated mature virions. Negatively stained by 1% PTA (phosphotangstic acid [pH 7.2] adjusted by KOH.)
HITACHI Model H-500 Electron microscope
magnification: $\times 30,000$.
accelerating voltage: 75KV

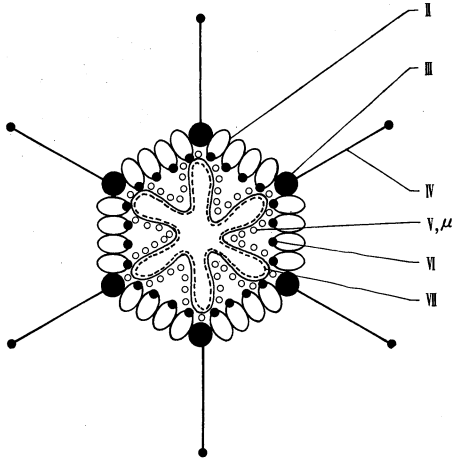


Fig. 3. Schematic appearance of the cut surface of an adenovirion.

(IX), より構成されるウイルスの capsid の中に分子量 2.3×10^7 dalton, 36,000 塩基対の二重直鎖 DNA がクロマチン様構造をとって規則的に折りたたまれて^{4), 5)}, 納まっている^{17)~21)}. このクロマチン構造を維持するのに, DNA に接して強塩基性ヒストン様蛋白 V, VII, μ の 3 種が関与していると考えられている^{6), 18), 21)~23)}.

このためウイルス蛋白サンプルの作製時には, ウイルスの capsid をフリーズ, ソーイング⁶⁾, ^{11), 13)} 等により破壊し, また DNA 結合蛋白を DNase I 処理等によってウイルスのコアより遊出させる必要がある⁶⁾. **Fig. 4** にウイルス蛋

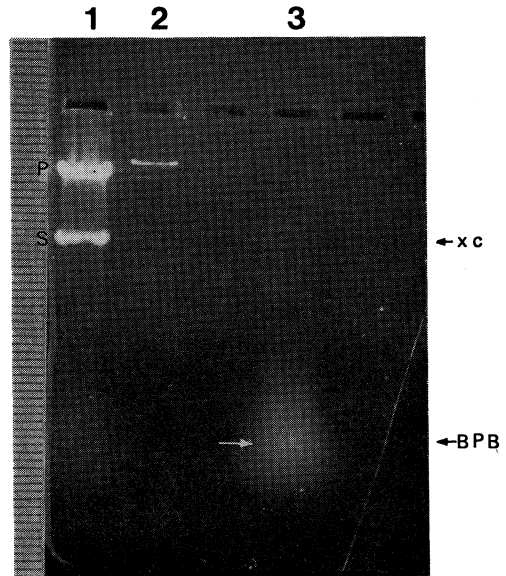


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of DNA recovered from DNase I treated Ad-2 virions.

lane 1: P(pBR 313, 8.9Kb), S(Ad-2 Sma I-F fragment, 2.4Kb)
lane 2: Total Ad-2 DNA, 36Kb
lane 3: Adenovirus type 2 DNA recovered from DNase I digested virions.
BPB: Bromphenolblue, XC: Xylenecyanol

白サンプルより抽出した DNA の電気泳動の結果を示した. lane 2 が Ad-2 の完全な DNA であり lane 3 が DNase I 処理を行ったウイルス蛋白サンプルより抽出した DNA である. 図のごとく充分 DNA が消化されて高分子量の DNA のバンドが消失していることが確認された.

Fig. 5 にウイルス蛋白の 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す. lane 1, 2, 3 は, それぞれウイルス全蛋白を 25 μ g, 50 μ g, 100 μ g 用いている. また, 下図は, lane 3 の Beckman DU-8 による 600 nm でのゲルスキャンの結果である. 主要コア蛋白のバンドを図中に矢印で指示した. 一方, 同サン

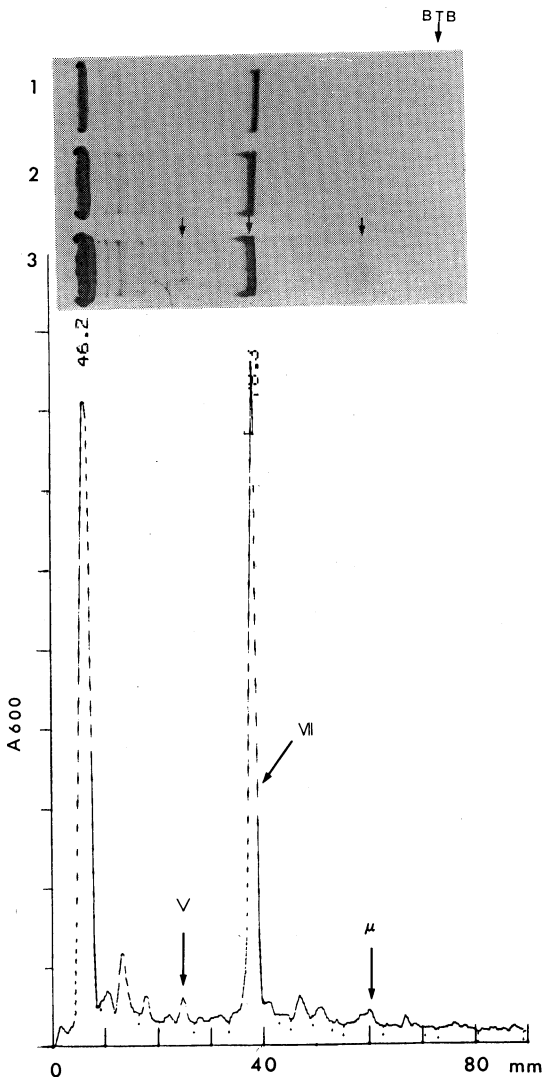


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of adenoviral proteins and the gel scanning.

Top: Total proteins of adenovirus were applied in increasing amounts.

Bottom: Lane 3 on the top gel was scanned by Beckman Model DU-8 automatic scanning spectrophotometer with absorbance at 600 nm.

BTB: Bromothymolblue was used as a marker.

ブルのスターチゲル電気泳動及びアルギニン高感度染色では (Fig. 7 lane C), ウイルス蛋白を1スロットあたり, 15 μg しか用いていない

のにもかかわらず, より高感度に高塩基性蛋白を検出できることが確認された. 一般に行われている amido black による染色に対して約200倍の検出感度を持つことが報告されている^{9), 16)}.

Fig. 6 に前述の方法によるアデノウイルス蛋白の P-C カラムクロマトグラフィーの溶出パターンを示した. 図中の点線は, NaCl の直線濃度勾配を示す. 蛋白濃度測定は, 前述の UV 法 (A_{230}) によって行った. それぞれの矢印で示すピークの画分をサンプリングし, スターチゲル電気泳動後, アルギニン高感度染色を行った. その結果を **Fig. 7** に示した. 一番右の lane C は, アデノウイルス全蛋白を用いたコントロールである. A_{230} において高吸収度を示すピーク 4 は, そのほとんどが消化された DNA 断片であるがアルギニン高感度染色において異染性を示し, 7% 酢酸処理により濃く染色されるポリペプチド II (ヘキソン蛋白) を含んでいることがわかる (**Fig. 7** lane 4, **Fig. 8**). また, V (**Fig. 6** ピーク 9, **Fig. 7** lane 9), VII (**Fig. 6** ピーク 12, **Fig. 7** lane 12) も分離されているのが確認された. μ 蛋白は, No. 14 の低いピークに分離, 溶出されていることがわかった (**Fig. 6**, **Fig. 7** lane 14). この μ 蛋白を含むピーク (fraction 105-113) を集めた. これは, 約 1.1 M の NaCl 濃度から溶出されているため前述のとうり 0.8 M, 1.1 M, 1.4 M のそれぞれの NaCl 濃度の buffer を用いて段階的溶出法による P-C カラムクロマトグラフィーを行い, μ 蛋白の精製及び濃縮を試みた. その結果を **Fig. 9** に示した. lane 4-12 (0.8 M の後半から 1.1 M の前半の画分) に μ 蛋白が溶出されていることが確認された. この段階ではじめのカラムクロマトグラフィーから約 5 倍濃縮されており, また電気泳動的純粋にまですることができた. これらの分画より前述の方法で従来, 精製が困難とされていた μ 蛋白をアセトン沈殿として回収することに成功し, そのアセトン沈殿を再度溶解しスターチゲル電気泳動後アルギニン高感度染色を施し, μ 蛋

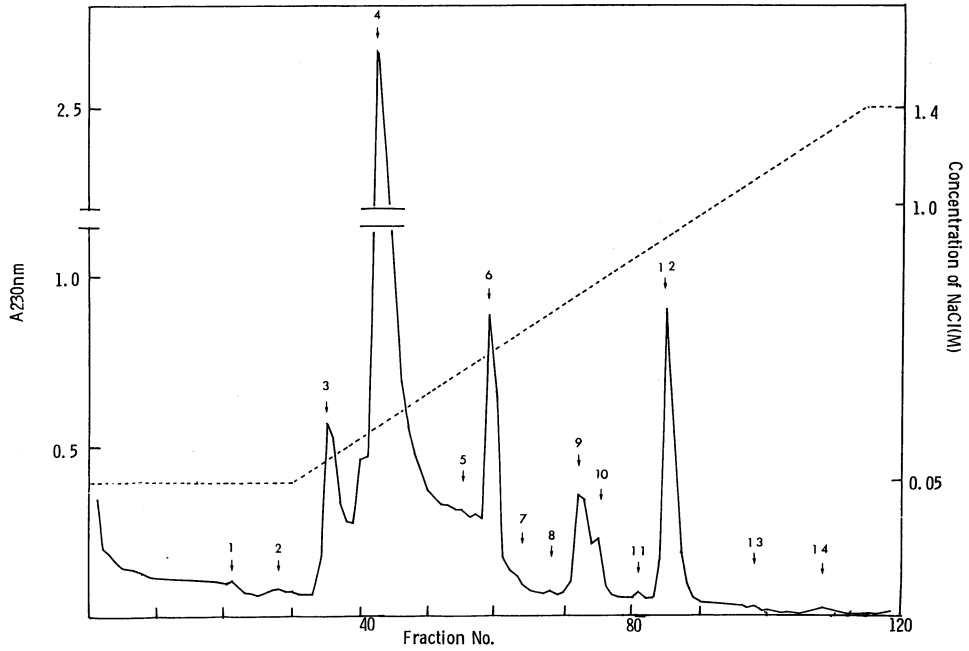


Fig. 6. The pattern of elution of total adenoviral protein off the phosphocellulose column chromatography.

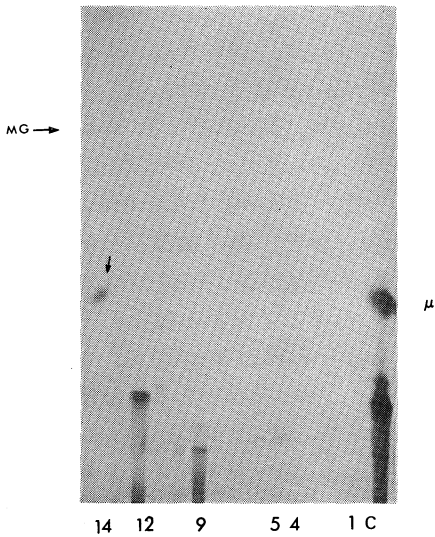


Fig. 7. Starch gel electrophoresis with the modified guanidinium-sensitive staining. Lane Nos. are derived from Fig. 6. C: Total Ad-2 proteins as a control. MG: Methylgreen added as a marker.

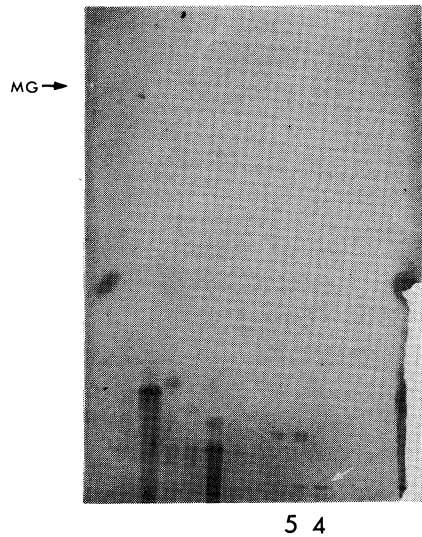


Fig. 8. Starch gel electrophoresis with normal amido black stain. Starch gel of Fig. 7 was destained with 7% acetic acid. White arrow shows polypeptide II. MG: Methylgreen added as a marker.

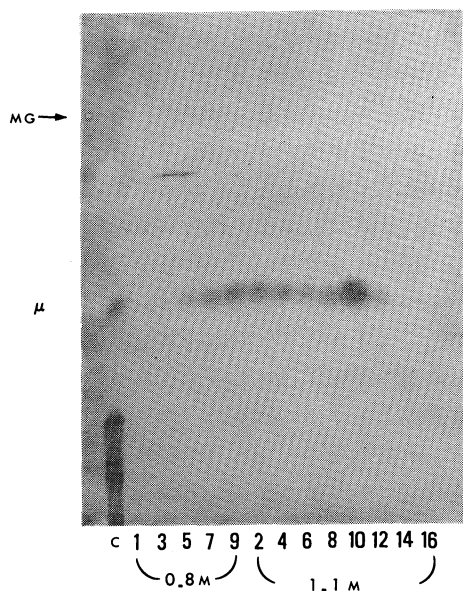


Fig. 9. Starch gel electrophoresis of polypeptide μ . The fractions of polypeptide μ were collected by stepwise elution from phosphocellulose column and subjected to urea-aluminum-lactate starch gel electrophoresis. The starch gel was then stained by modified guanidinium sensitive staining technique.

白が抽出段階で変化していないことを確認した。(data not shown)

考 察

μ 蛋白は、1976年に Hosokawa and Sung⁶⁾ によりはじめて、ヒト型アデノウイルス5型での存在が報告された高塩基性蛋白である。分子量は、約4,000 dalton でそのうち、アルギニンが約54%、ヒスチジンが約14%、リジンが約2%、含まれた小分子量高塩基性の蛋白である⁶⁾。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上では、ウイルス1つあたりの分子数が少ないこと(約180分子)、分子量が小さいこと、強塩基性であることなどにより同定が難しく、従来から言われていたウイルスの構成蛋白のうち、X-XII蛋白群の先端附近にバンドができるため鑑別に困難を要した^{6),16)}。しかし、スターチゲル電気泳動とアルギニン高感度染色を併用すれば、明確に μ , V, VII 等のウイルスクロマチン

構造に関与している塩基性蛋白の検出ができる^{6),16)}。また、宿主としている真核細胞中にも、その遺伝子発現に必要と考えられている小分子量蛋白 HMG (high mobility group) 14, 17 等があることが知られており電気泳動上、同様に高移動度を示すがそのアミノ酸組成等の性質は、 μ 蛋白と全く異なっている^{6),24),25)}。また、宿主細胞中の代表的な塩基性蛋白であるヒストン蛋白とも μ 蛋白は、アミノ酸組成の共通部は認めないし、ヒストン蛋白の分子量は、11,300-15,300 dalton⁹⁾ で μ 蛋白より大きい。

アデノウイルスは、許容細胞 (permissive host) に感染すると初期(感染後6-8時間)には、ウイルスDNAの合成に必要で直接、ウイルスの構成に関与しない蛋白や、発癌遺伝子蛋白が合成され、感染後6時間以後の後期に入ってよりはじめて、ウイルスの構造蛋白の合成が始まる。 μ 蛋白は、ウイルス感染後16-20時間後つまり後期に入ってから合成されることが報告されている⁶⁾。上記の理由により μ 蛋白は、ウイルスゲノムでコードされるウイルス構造蛋白と考えられる。また、高塩基性蛋白 VII は、前駆体蛋白 (p-VII) として合成され、ウイルスコアの集合に用いられるがウイルスの成熟過程においてNH₂末端から約20アミノ酸残基を含むペプチドが切断され、断片の構造は、 μ 蛋白とは異なっている^{6),22),26)}。また、 μ 蛋白と類似の挙動を行うもう一つの蛋白Vは、合成されてから切断されることはない。

以上より μ 蛋白は、既に報告されている蛋白前駆体 pVI, pVII, pVIII, pTP からの副産物とも考えられない。Vayda ら²¹⁾ によりアデノウイルス5型のコアを緩和な条件で抽出するとDNA, V, VII, μ の複合体の形で得られることが報告されており、UVクロスリンク法^{18),27)}、マイクロコッカスクレアーゼによる消化法^{19),21)} 及び電顕的観察^{19),21)} 等により、アデノウイルスのコアは、真核細胞のDNAの様なヌクレオゾーム構造をとることが知られている。真核細胞のヒストン8量体(H3×2, H2A×2, H2B×2, H4×2)にあたるVII6量体にDNAが約2回巻きつき、2つのVII6量体をつなぐDNA

鎖にヒストン(H1)にあたる Vが1分子, リンカー (スパーサー) として結合していると考えられている^{18), 19), 21), 28)}. μ 蛋白も高塩基性でコア附近に存在し, その分子比が VII : V : μ = 6 : 1 : 1 であること^{*)},^{18), 19), 28), 2)} (*: 細川 unpublished results) よりこのヌクレオゾーム構造のサブユニットに μ 蛋白が各1分子ずつ結合していると考えられる.

μ 蛋白に類似の分子量, アミノ酸組成及び立体構造を持つ, 代表的な蛋白として動物精子中の protamine が知られており^{29), 30), 31)}, 移植腫瘍への血管新生の抑制作用が認められている³²⁾. この protamine の役割は, haploid cell の受精が完了し, 卵割が始まるまで, 遺伝子発現を何らかの機序で抑制しているのではないかと考えられる. その蛋白中の α -helix 構造がヒストン蛋白様に, DNA の double helix 構造に結合して, DNA 発現を抑制するというモデルも提唱されている^{33), 34)} が詳細については, 今後の検討が待たれるところである. μ 蛋白についても同様にアデノウイルスでは, 感染初期にウイルス DNA が宿主細胞の核に到達するまで及び新しく合成され集合したウイルスの capsid に複製された DNA がパッケージングされるまで遺伝子発現を抑制する必要がある, これに μ 蛋白が関与しているものと考えている.

ま と め

μ 蛋白を単離, 精製し, アセトン沈殿として回収することができた. 今後, この蛋白のアデノウイルスクロマチンの発現への影響やクロマチン構造上における位置を調べることが必要と思われる. また, 従来, 行われていた DNA を用いた遺伝子発現及び抑制の機序の解明から, in vivo におけると同様の “native” クロマチン構造に含まれる DNA の形質発現及びその抑制の機序の解析に移って行くことが今後の重要研究課題となり, この点で, ウイルスクロマチンは, 真核細胞のクロマチンの機能的解析のための最適のモデルとなると思われる.

(稿を終えるにあたり, 御指導及び御校閲をいただいた恩師細川桂一教授, 稿中の電子顕微鏡写真作製にあたり多大な御協力をいただき, 同電子顕微鏡写真の使用を快諾いただいた当大学微生物学教室助教授松本明先生, また多大な御援助を頂いた生化学 (I), 生化学センター (前田香恵子さん, 児子弥生さん), 組織培養センター (北昭子さん) に厚く御礼申し上げます.)

(本研究の一部は, 文部省科学研究費 501024号, 244027号 (研究代表者細川桂一), および川崎医科大学研究計画助成金 53-403号, 54-404号, 55-302号 (研究代表者 同上) により, 又一部は米国 National Institute of Health Grant P07-CA-12708 により支持されました.)

文 献

- 1) Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., and Ward, T. G.: Isolation of a cytogenic agent from human adenoids under-going spontaneous degeneration in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84 : 570—573, 1953
- 2) Hilleman, M. R. and Werner, J. H.: Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. Proc. Soc. Exp. Biol. 85 : 183—188, 1954
- 3) Enders, J. F., Bell, J. A., Dingle, J. H., Francis, T. Jr., Hilleman, M. R., Huebner, R. J. and Payne, A. M. M.: Adenoviruses: Group name proposed for new respiratory tract viruses. Science 124 : 119—120, 1956
- 4) 細川桂一: アデノウイルス科. 高野利也, 渡辺格編: ウイルス学. 東京, 講談社. 1980, pp. 324—336
- 5) Flint, S. J.: Structure and genomic organization of adenoviruses. In Molecular biology of tumor viruses. DNA tumor viruses, ed by Tooze, J. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. 1980, pp. 383—441
- 6) Hosokawa, K. and Sung, M. T.: Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5. J. Virol. 17 : 924—934, 1976

- 7) Trentin, J. J., Yabe, Y. and Taylor, G.: The quest for human cancer viruses. *Science* 137 : 835—841, 1964
- 8) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roff, M., Roberts K. and Watson, J. D.: *Molecular biology of the cell*. 1st ed. New York, Garland Publishing Inc., 1983, pp. 386—406
- 9) Penman, S.: Preparation of purified nuclei and nucleoli from mammalian cells. In *Fundamental techniques in virology*, ed. by Habel, K., and Salzman, N. P. New York, Academic Press Inc., 1969, pp. 35—48
- 10) Crawford, L. V.: A study of the Rous sarcoma virus by density gradient centrifugation. *Virology* 12 : 143—153, 1960
- 11) Maizel, J. V., Jr., White, D. O. and Scharff, M. D.: The polypeptides of adenovirus. I. Evidence of multiple protein components in the virion and a comparison of type 2, 7 and 12. *Virology* 36 : 115—126, 1968
- 12) Prage, L. and Pettersson, U.: Structural proteins of adenoviruses. VII. Purification and properties of an arginine-rich core protein from adenovirus type 2 and type 3. *Virology* 45 : 364—373, 1971
- 13) Prage, L., Pettersson, U. and Philipson, L.: Internal basic proteins in adenovirus. *Virology* 36 : 508—511, 1968
- 14) Groves, W. E., Davis, F. C. and Sells, B. H.: Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. *Anal. Biochem.* 22 : 195—210, 1968
- 15) Maizel, J. V., Jr.: Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. In *Methods in virology*. vol. 5, ed. by Maramorosch, K. and Koprowski, H.: New York, Academic Press Inc., 1971, pp. 179—246
- 16) Sung, M. and Smithies, O.: Differential elution of histones from gel-trapped nuclei. *Biopolymers* 7 : 39—58, 1969
- 17) Corden, J., Engelking, H. M. and Pearson, G. D.: Chromatin-like organization of the adenovirus chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73 : 401—404, 1976
- 18) Sato, K. and Hosokawa, K.: The structure of adenovirion chromatin revealed by ultraviolet light-induced cross-linking. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 101 : 1318—1323, 1981
- 19) Mirza, M. A. and Weber, J.: Structure of adenovirus chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 696 : 76—86, 1982
- 20) Sergeant, A., Tigges, M. A. and Raskas, H. J.: Nucleosome-like structural subunits of intranuclear parental adenovirus type 2 DNA. *J. Virol.* 29 : 888—898, 1979
- 21) Vayda, M. E., Rogers, A. E. and Flint, S. J.: The structure of nucleoprotein cores released from adenovirions. *Nucleic Acid Res.* 11 : 441—460, 1983
- 22) Sung, M. T., Lischwe, M. A., Richards, J. C. and Hosokawa, K.: Adenovirus chromatin. I. Isolation and characterization of the major core protein VII and precursor pro-VII. *J. Biol. Chem.* 252 : 4981—4987, 1977
- 23) Hosokawa, K. and Sung, M. T.: Structural organization of adenovirus DNA core. *Proceedings of the 1976 molecular biology meeting of Japan.* : 5—6, 1976
- 24) Mathew, C. G. P., Goodwis, G. H. and Johns, E. W.: Studies on the association of the high mobility group non-histone chromatin proteins with isolated nucleosomes. *Nucleic Acid Res.* 6 : 167—179, 1979
- 25) Walton, G. M., Spiess, J. and Gill, G. N.: Phosphorylation of high mobility group 14 protein by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 257 : 4661—4668, 1982
- 26) Sung, M. T., Cao, T. M., Lischwe, M. A. and Coleman, R. T.: Molecular processing of adenovirus proteins. *J. Biol. Chem.* 258 : 8266—8272, 1983

- 27) Sato, K. and Hosokawa, K.: DNA-binding domain in adenovirus core protein VII. *Biochem. Int.* 7 : 443—448, 1983
- 28) Brown, M. and Weber, J.: Virion core-like organization of intranuclear adenovirus chromatin late in infection. *Virology* 107 : 306—310, 1980
- 29) Bishop, D.: Biochemistry of spermatogenesis. Introduction. *Federation Proc.* 37 : 2510—2511, 1978
- 30) Kierszenbaum, A. L. and Tres, L. L.: RNA transcription and chromatin structure during meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis. *Federation Proc.* 37 : 2512—2516, 1978
- 31) Meistrich, M. L., Brock, W. A., Grimes, S. R., Platz, R. D. and Hnilica, L. S.: Nuclear Protein transitions during spermatogenesis. *Federation Proc.* 37 : 2522—2525, 1978
- 32) Folkman, J. and Taylor, S.: Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* 297 : 307—312, 1982
- 33) Cao, T. M. and Sung, M. T.: A protamine-like domain in basic adenovirus core protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 108 : 1061—1066, 1982
- 34) Sung, M. T., Cao, T. M., Coleman, R. T. and Budelier, K. A.: Gene and protein sequence of adenovirus protein VII, a hybrid basic chromosomal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 : 2902—2906, 1983