

# Studies on the Mechanism of Transactivation of Immediate Early Gene c-fos by HTLV-1 Tax

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8424">http://hdl.handle.net/2297/8424</a>

## ヒトT細胞性白血病ウイルスI型 (HTLV-I) Tax 蛋白による 細胞性初期遺伝子 c-fos の転写活性化機構の解析

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

中 条 達 也

(平成5年1月19日受付)

ヒト細胞白血病ウイルスI型 (human T-cell leukemia virus type-I, HTLV-I) によってコードされる Tax 蛋白は種々の細胞遺伝子の発現を転写レベルで誘導する事が知られている。また、これらの発現誘導を介して白血病の発症に関与すると考えられている。Tax 応答性遺伝子のうちで c-fos, egr-1, egr-2 については、プロモーター領域中の CARG box がその作用を仲介している。この CARG box には serum responsive factor (SRF) を含む複数の細胞因子が結合するが Tax は直接結合しない。Tax がどのようにして CARG box を介した転写を活性化するかを明らかにする目的で SRF と酵母の転写因子 GAL4 蛋白の DNA 結合領域との融合蛋白 (GALSRF) を作成して、Tax との相互作用を細胞内 (in vivo) および試験管内 (in vitro) で解析した。Hela 細胞株に、Tax および GALSRF を発現するプラスミドと GAL4 蛋白結合配列によってレポーター遺伝子の発現が制御されるプラスミドを遺伝子導入することにより Tax 蛋白が GALSRF 蛋白を介して転写を活性化する事を見いだした。GALSRF 融合蛋白の SRF 部分欠失変異体を用いて、Tax による活性化には C 末端部分 (アミノ酸264番から508番) で十分であり、N 末端側に存在する DNA 結合、2 量体形成および ternary complex factor (TCF) との結合に関与するドメインを必要としないことが示された。また、それぞれ網状赤血球抽出液および大腸菌を用いて作製した SRF 蛋白と Tax 蛋白とは試験管内で直接結合し、その場合にも SRF の C 末端領域が関与していた。さらに、転写活性化能を消失した Tax の変異体が SRF と強い転写活性化領域を有する VP16 との融合蛋白により転写活性化能を回復することが示された。この結果は細胞内においても Tax と SRF とが複合体を形成することを示唆する。以上の結果から、Tax は SRF の C 末端部分に直接結合し、CARG box 依存性に c-fos, egr-1, egr-2 遺伝子の発現を誘導していると考えられる。

**Key words** HTLV-I, Tax, c-fos, CARG box, SRF

ヒト細胞白血病ウイルスI型 (human T-cell leukemia virus type-I, HTLV-I) は、ヒトで発見された最初のレトロウイルスである<sup>1)~3)</sup>。成人T細胞性白血病 (adult T cell leukemia, ATL) 患者の血清中にこのウイルスに対する特異的抗体が検出されること、同白血病細胞の染色体 DNA にウイルス DNA の組み込みが単クローン性に検出されること、さらに培養細胞の実験系においてこのウイルスが正常T細胞を形質転換すること等からその発症の直接的な原因と考えられている<sup>4)</sup>。

HTLV-I の全塩基配列が解読され、レトロウイルスに共通してみられる配列 gag, pol, env のほかに約1.6kb の特有の配列 pX 領域を持つことが明らかになった<sup>5)</sup>。典型的な動物発がんレトロウイルスの場合、細胞遺伝子に由来する癌遺伝子を持つが、pX 領域に相同性を示す細胞遺伝子は同定されていない<sup>6)</sup>。また、HTLV-I の細胞遺伝子への組み込み部位が患者によって異なる事から<sup>7)</sup>、特定の細胞遺伝子がウイルスプロモーターによって活性化される可能性については否定的である。従って、細胞遺伝子に相同性を持たないウイルス性トランスフォーミング因子の存在が推定された。その後、pX 領域にコードされる Tax 蛋白が培養細胞の実験系においてラット線維芽細胞

(Rat-1, rat embrional fibroblast) を形質転換する事<sup>8)</sup>、トランスジェニックマウスにおいて神経線維腫を誘発する事が示され<sup>9)</sup>、この蛋白が発がんに関与する key 因子と考えられるようになった。

Tax は元来、ウイルス遺伝子発現を転写レベルで活性化する因子として同定されたが<sup>4)</sup>、その後さらに種々のサイトカイン遺伝子 [インターロイキン2 (interleukin 2, IL2), 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), インターロイキン3 (interleukin 3, IL-3), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), 腫瘍壊死因子 (tumor necrosing factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), サイトカイン受容体遺伝子 [インターロイキン2受容体  $\alpha$  (IL-2 receptor  $\alpha$  subunit, IL-2R $\alpha$ )] および複数の細胞性初期遺伝子群 (c-fos, fra-1, c-jun, jun-D, egr-1, egr-2) の発現を誘導する事が示された<sup>10)~14)</sup>。Tax による細胞遺伝子の発現誘導活性と培養細胞の実験系における形質転換能とが相関する事から<sup>15)</sup>、Tax は細胞遺伝子の発現誘導を介して白血病発症に関与すると考えられている。

複数の Tax 応答性遺伝子について、プロモーター領域中に、

Abbreviations: ATL, adult T-cell leukemia; bp, basepair; BSA, bovine serum albumin; DEPC, diethyl pyrocarbonate; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylene-diamine-tetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GST,

Tax 応答性を示すエンハンサー配列が同定された。たとえば HTLV-I のウイルスエンハンサーの場合には long terminal repeat (LTR) 内の21塩基対 (21 basepair, 21bp) 配列が<sup>16-18)</sup>, IL-2 と IL-2-R $\alpha$  の場合には nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 配列が Tax に応答する<sup>19,20)</sup>。しかしながら、これらのエンハンサー配列に対して Tax の直接的結合活性は検出されない事から、細胞性因子が Tax の機能を仲介すると考えられている。また Tax と酵母の DNA 結合性転写因子 GAL4 との融合蛋白が GAL4 結合配列を介して転写を活性化する事、すなわち Tax が転写活性化領域 (転写の基本装置に対して働きかける領域) を有する事が報告されている<sup>21,22)</sup>。Tax がエンハンサー配列に直接結合しない事から、Tax は細胞性転写因子に会合し、自身の持つ転写活性化領域を介して転写装置に働きかけるといふ図式が推定された。従って、Tax の機能を仲介する転写因子の同定は Tax 転写活性化の作用機構ひいては Tax を介した発がん機構を解明する上で最も重要な課題の1つである。しかしながら、これまでのところそのような因子は報告されていない。

Tax の仲介因子を同定する上で、Tax が他の蛋白の発現を介さず直接的に転写を活性化すると考えられる遺伝子を選択する事は必須である。c-fos を始めとした細胞性初期遺伝子群は数多くの Tax 応答性遺伝子の中でもこの条件を満たす可能性が最も高い遺伝子群である。なぜならば、第1に Tax を細胞内に発現させると、ほぼ同時期にこれら遺伝子群の発現が誘導される事<sup>19)</sup>、第2に、これらの遺伝子発現が新たな蛋白合成を必要とせず、さまざまな刺激に応じて誘導される事がすでに示されているからである<sup>23)</sup>。

c-fos 遺伝子プロモーター内には2つの Tax 応答性エンハンサーが藤井らによって同定されている<sup>11)</sup>。これらは v-sis conditioned medium inducible element (SIE) および serum response element (SRE) をそれぞれ含んでいた。さらに SRE のコア配列である CArG box が c-fos のみならず egr-1 および egr-2 の Tax 応答性エンハンサーとして機能する事が Alexandre らによって示されている<sup>14,24)</sup>。その場合、Tax は CArG box に直接結合せず、細胞性転写因子 SRF (serum responsive factor) がこれらすべてに結合する。

SRF は増殖シグナルの入力前から恒常的に核に局在する磷酸化蛋白である<sup>25)</sup>。増殖シグナルは SRF の DNA 結合活性および磷酸化状態に変化を与えず、これまでのところいかにして SRF が増殖シグナルにより活性化され、細胞性初期遺伝子群の発現を誘導するかは明らかではない<sup>25)</sup>。

以上のような結果をふまえて、本研究では細胞性転写因子 SRF が Tax による細胞性初期遺伝子の発現誘導を仲介する転写因子として機能し得るか、さらに Tax による SRF の活性化のメカニズムについて検討した結果について報告する。

## 対象および方法

### I. 試薬類

試薬類でとくに会社名の記載の無いものはいずれも和光純薬 (大阪) の製品を用いた。

### II. 使用細胞

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Hyclone, Utah, USA) 加ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (日本, 東京) にて37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて培養した。

### III. レポータープラスミドの構築

レポータープラスミド pBCAT, pG10BCAT, pL8BCAT, CArGCAT はいずれも金沢大学癌研究所ウイルス部の藤井雅寛博士から分与をうけた。レポータープラスミド pBCAT はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) 遺伝子の上流にアデノウイルスの Elb 遺伝子の TATAbox を挿入されたプラスミドで、この CAT 遺伝子の転写がその上流の DNA 配列を介して活性化されるとこのプラスミドを遺伝子導入された細胞内で CAT 蛋白が発現され蓄積し、後述する CAT アッセイでその転写活性を定量することができる。その転写活性は CAT 遺伝子上流のエンハンサー配列とそこに結合する転写活性化因子と転写基本因子およびそれらの転写活性化能に依存する。レポータープラスミド pG10BCAT は pBCAT の TATAbox 上流に GAL4 蛋白の結合する17塩基対を10回繰り返した DNA 配列を GAL4 蛋白依存性のエンハンサーとして挿入し作製された。レポータープラスミド pL8BCAT は Lex 蛋白の結合する18塩基対を8回繰り返して Lex 蛋白依存性のエンハンサーとして pBCAT の TATAbox 上流に挿入した。レポータープラスミド CArGCAT は Elb 遺伝子の TATAbox のかわりに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子のプロモーターを使用しその上流に CArG box の DNA 配列 CACAGGATGTCCATATT-AGGACATCTGCGT を挿入した。

### IV. エフェクタープラスミドの構築

プラスミド pSG5 (東洋紡, 大阪) はウイルス SV40 のプロモーターの支配下にその下流にある遺伝子を真核細胞内で発現させる<sup>26)</sup>。このプラスミドをベクターとして下記のエフェクタープラスミドを作製した。

#### 1. GAL4 蛋白 DNA 結合領域と SRF の欠失変異体の融合蛋白発現プラスミド

GAL4 蛋白のアミノ酸の1番から147番に存在する DNA 結合領域を発現するプラスミド GAL (1-147) および SRF を発現するプラスミド pSGSRF は金沢大学癌研究所ウイルス部藤井雅寛博士から分与をうけた。pSGSRF から制限酵素にて SRF のアミノ酸10番からC末端, 10番から264番, 266番からC末端をコードする遺伝子を切断し、GAL4 (1-147) の DNA 結合領域をコードする遺伝子の3'側に読みとり枠をあわせて挿入した<sup>26)</sup> [GALSFRF (10-508), GALSFRF (10-264), GALSFRF (266-508)]。

#### 2. Lex 蛋白 DNA 結合領域と SRF の欠失変異体と VP16 蛋白転写活性化領域との融合蛋白発現プラスミド

Lex 蛋白の DNA 結合領域を発現するプラスミド Lex および同蛋白 DNA 結合領域と VP16 蛋白のアミノ酸の413番から490番に存在する転写活性化領域を発現するプラスミド LexVP は金沢大学癌研究所ウイルス部藤井雅寛博士から分与

glutathion-S-transferase; HBS, HEPES-buffered saline; HTLV-I, human T-cell leukemia virus type-I; IL-2, interleukin 2; IL-2R $\alpha$ , interleukin 2 receptor  $\alpha$  subunit; IL-3, interleukin 3; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; LTR, long terminal repeat; PBS, phosphate buffered saline; PAGE, polyacrylamide gel; SDS,

を受けた。Lex の DNA 結合領域の C 末端側に SRF 蛋白アミノ酸 264 番から 508 番をコードする遺伝子を読みとり枠をあわせて挿入し LexSRF (264-508) を作製した。LexVP の Lex 蛋白 DNA 結合領域遺伝子と VP16 転写活性化領域遺伝子の間に SRF のアミノ酸 266 番から 484 番をコードする遺伝子を読みとり枠をあわせて挿入し LexSRF (266-484) VP を作製した。

### 3. Tax 発現プラスミドおよび GAL4 蛋白 DNA 結合領域と Tax 欠失変異体との融合蛋白発現プラスミド

Tax 蛋白の発現プラスミド pSGTax, Tax 蛋白の欠失変異体発現プラスミド pSGTaxM および GAL4 蛋白 DNA 結合領域と Tax 蛋白, Tax 蛋白 C 末端欠失変異体との融合蛋白発現プラスミド [GALTax (2-353), GALTax (2-337), GALTax (2-322), GALTax (2-317), GALTax (2-312), GALTax (2-285)] は金沢大学癌研究所ウイルス部土屋晴夫博士より分与を受けた。

### 4. GAL4 蛋白 DNA 結合領域と Tax 欠失変異体と VP16 転写活性化領域との融合蛋白発現プラスミド

GAL4 蛋白 DNA 結合領域と Tax C 末端欠失変異体と VP16 蛋白転写活性化領域との融合蛋白発現プラスミド [GALTax (2-322) VP, GALTax (2-312) VP, GALTax (2-285) VP] も癌研究所ウイルス部土屋博士より分与を受けた。

### V. 遺伝子導入

CAT アッセイに使用する HeLa 細胞は約  $5.0 \times 10^6$  個/ml の濃度で 10% FCS 加 DMEM 4ml にて 37°C 24 時間培養後、磷酸カルシウム法にて遺伝子導入を行った。レポータープラスミド 5 $\mu$ g とエフェクタープラスミド 0.5-3.0 $\mu$ g を 0.26M 塩化カルシウム 276 $\mu$ l に混合し、その混合液を 2 $\times$ HEPES-buffered saline (2 $\times$ HBS) [NaCl 280mM, HEPES 緩衝液 pH 7.9 50mM, NaHPO<sub>4</sub> 2.8mM] 288 $\mu$ l に混合し室温にて 20 分静置した後、HeLa 細胞に加え 6 時間培養した。その後 10mM 磷酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) 4ml で洗浄し 10% FCS 加 DMEM 4ml で 37°C にて 48 時間培養した。

### VI. CAT アッセイ

遺伝子導入し培養後の細胞を PBS にて洗浄し、Tris NaCl EDTA (TNE) [Tris-HCl pH 8.0 40mM, NaCl 150mM, ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) 1mM] 1mM にて回収、10,000rpm 10 秒遠心し沈殿に 0.25mM Tris-HCl pH 8.0 を 100 $\mu$ l 加え、超音波ホモジナイザー MODEL UR-20P (トミー精工, 東京) にて最大出力で 8 秒間処理し細胞を破壊、10,000 rpm 10 分遠心後、上清 50 $\mu$ l に 1M Tris-HCl pH 7.5 70 $\mu$ l, 4mg/ml アセチル CoA (acetyl coenzyme A) (Sigma, St. Louis, USA) 20 $\mu$ l, <sup>14</sup>C-クロラムフェニコール (D-threo- [dichloroscetyl 1-<sup>14</sup>C] chloramphenicol) (アマジャムジャパン, 東京) 0.5 $\mu$ l, 蒸留水 0.95 $\mu$ l を加え 37°C 120 分インキュベートした。そして、酢酸エチル (半井, 京都) 500 $\mu$ l を加え激しく混和し 10,000rpm 1 分間遠心、上層を回収し乾燥後酢酸エチル 15 $\mu$ l に溶解し、シリカゲル薄層プレート (メルク, Darmstadt, ドイツ) にスポット後クロロホルム:メタノール 19:1 混合液を溶媒として展開した。プレートを乾燥後アセチル化されたクロラムフェニコールとアセチル化されていないクロラムフェニ

コールのそれぞれのスポットの放射活性をイメージアナライザー (フジフィルム, 東京) でカウントした。

### VI. グルタチオン S トラंसフェラーゼ (glutathion-S-transferase, GST) 融合蛋白の発現および精製

プラスミド pGEX-2T は isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) の存在下で GST を大腸菌内に大量に産生できる<sup>29)</sup>。このプラスミドの GST 遺伝子の直後のポリリンカー部に Tax 遺伝子とアデノウイルスの E1A 遺伝子を挿入し大腸菌に導入し GST-Tax 融合蛋白と GST-E1A 融合蛋白を発現させた。この大腸菌を 2 $\times$ YT 培地 (トリプトン 16g, NaCl 15g, 酵母エキス 10g, アンピシリン 50mg/l, pH 7.6) 400ml に 37°C で培養し OD<sub>600</sub> が 1.0 に達した段階で IPTG を最終濃度 0.1mM とするように加えさらに 20 時間 25°C にて培養し、6,000rpm にて遠心し集菌した。菌体を PBS にて洗浄、遠心後 1% TritonX PBS に懸濁後超音波ホモジナイザーにて 1 分 $\times$ 5 回処理し細胞を破壊し 15,000rpm 5 分遠心し上清を回収した。この上清をグルタチオンセファロース (Pharmacia, Uppsala, Sweden) と 4°C にて 20 分ゆっくり振倒混和し 1% TritonX PBS にて洗浄、遠心した。このグルタチオンセファロースにエリューションバッファ [Tris-HCl pH 9.6 50mM グルタチオン (Sigma) 5mM] 5ml を加えよく混和後 3,000rpm にて遠心し上清を回収、透析液 (100mM 磷酸水素ナトリウム pH 7.8) 4.5l にて 12 時間透析した。

### VII. <sup>35</sup>S 標識蛋白の合成

前述したプラスミド pSG5 は試験管内では T7 プロモーターの支配下にその下流の遺伝子を T7 RNA ポリメラーゼにより転写できる。SRF, SRF (10-317), RB, GALVP 遺伝子を挿入した pSG5 2 $\mu$ g と 5 $\times$ 転写バッファ (200mM Tris-HCl pH 7.5, 30mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM spermidine, 50mM NaCl) (Promega, Wisconsin, USA) 20 $\mu$ l, 0.75M DTT (Promega) 1.3 $\mu$ l, 2.5mM NTP (Promega) 20 $\mu$ l, T7 RNA ポリメラーゼ (Promega) 2 $\mu$ l, RNasin (Promega) 1 $\mu$ l, diethyl pyro carbonate (DEPC) 処理蒸留水 55 $\mu$ l を加え 37°C 1 時間反応後 DNase (Promega) 1 $\mu$ l を加え 37°C 15 分処理しエタノール沈殿した。遠心後乾燥した RNA を 50 $\mu$ l の DEPC 処理蒸留水に溶解した。溶解した RNA 2.3 $\mu$ l にくさぎの網状赤血球抽出液 [reticulocyte lysate (Promega)] 32 $\mu$ l, 1mM アミノ酸混合液 (Promega) 3 $\mu$ l, <sup>35</sup>S-メチオニン (アマジャムジャパン) 3 $\mu$ l, RNasin 1.5 $\mu$ l, DEPC 処理蒸留水 3.2 $\mu$ l を加え 30°C にて 1 時間反応した。

### IX. GST 融合蛋白と標識蛋白の結合実験

グルタチオンセファロース 10 $\mu$ l を 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 1% TritonX PBS にて 3 回洗浄後 GST 融合蛋白 2 $\mu$ g と 50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> 1% TritonX PBS 10 $\mu$ l を加え 4°C 1 時間混和、50 $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> PBS にて 3 回洗浄後結合バッファ [HEPS pH 7.9 20mM, グリセロール (半井化学, 京都) 20%, dithiothreitol (DTT) 2mM, ZnCl<sub>2</sub> 50 $\mu$ M, bovine serum albumin (BSA) (Boehringer, Mannheim, ドイツ), KCl 30mM] にて 1 回洗浄し、3,000rpm 15 秒遠心上清を除き結合バッファ 15 $\mu$ l と標識蛋白 8 $\mu$ l を加え 4°C にて 1 時間ゆっくり転倒混和した。その後、洗浄バッファ (HEPES pH 7.9 20mM, グリセロール 20%, DTT 2mM, ZnCl<sub>2</sub> 50 $\mu$ M,

sodium dodecylsulfate; SIE, v-sis conditioned medium inducible factor; SRE, serum response element; SRF, serum responsive factor; TCF, ternary complex factor; TGF $\beta$ , transforming growth factor  $\beta$ ; TNE, Tris NaCl EDTA; TNF $\alpha$ , tumor necrosing factor  $\alpha$

NP40 1%, KCl 130mM) 200 $\mu$ l にて 3 回ゆっくり転倒混和して洗浄し 3,000rpm 15秒遠心し上清を除きサンプルバッファ [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate, SDS), 5% 2-メルカプトエタノール, 10%グリセロール, 0.1%プロモフェノールブルー] 15 $\mu$ l を加え 2分煮沸した。煮沸後 15,000rpm 1分遠心し上清を 8% SDS-ポリアクリルアミドゲル (polyacrylamide gel, PAGE) にのせ約 100V で電気泳動し乾燥させイメージアナライザーにてバンドを画像にした。

## 成 績

### 1. Tax 蛋白は SRF を介して転写を活性化する

c-fos, egr-1 および egr-2 遺伝子は 5' 上流領域に存在する CARG box によって Tax 依存性に活性化される<sup>14,24</sup>。Tax はこの配列に直接結合しないことから, CARG box 結合因子の転写活性化能に作用していると考えられる。そこで SRF と転写因子 GAL4 の DNA 結合領域 GAL (1-47) との融合蛋白 GALSFRF (10-508) を作製し Tax との相互作用を調べた。もし Tax が SRF の転写活性化能を増強することが, CARG box を介した転写の活性化の原因であれば, この融合蛋白存在下で GAL4 結合配列依存性に転写が活性化される事が期待される。レポーターとして, CAT 遺伝子上流にアデノウイルス Elb 遺伝子上流にアデノウイルス Elb 遺伝子の TATAbox および GAL4 の DNA 結合配列を組み込んだプラスミド pG10BCAT を使用した。レポーター, Tax 発現プラスミドを融合発現プラスミドとともに磷酸カルシウム法により Hela 細胞に一過性に遺伝子導入し, GAL4 結合配列依存性の転写活性化能を CAT の酵素活性を指標として測定した。GAL4 の DNA 結合領域 GAL4 (1-147), GALSFRF (10-508) あるいは Tax を単独で発現させた場合, GAL4 結合配列を介した転写の活性化はほとんど観察されなかった (図 1)。しかしながら, GALSFRF (10-508) を Tax を共に発現させると CAT 遺伝子発現の著明な増強が観察された。この転写活性化は GAL4 蛋白結合配列を持たないレポーターを用いた場合には観察されない。また Tax と共に GAL (1-147) あるいは SRF を発現した場合においても観察されないことから, 融合蛋白の SRF 部分を介した, GAL4 結合配列に依存した現象と考えられた。さらに, CARG box に対する転写活性化能を失った Tax 変異体 (TaxM) ではこのような転

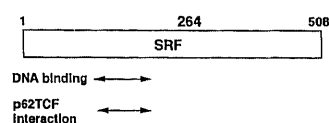
Effector	GAL4 sites	Tax1	CAT conversion (%)	
			1 $\mu$	2 $\mu$
GAL4	+	-	0.1	
		+	0.2	
SRF	+	-	<0.1	
		+	<0.1	
GALSFRF	+	-	0.1	
		+	18.3	
		TaxM	0.1	
	-	+	<0.1	

Fig. 1. Tax activates transcriptional activation function of GAL-SRF hybrid protein. Plasmids pG10BCAT with GAL4 binding sites or pBCAT without GAL4 binding sites was transfected into Hela cells together with effector plasmids [GAL (1-147), SRF, GALSFRF (10-508), Tax, TaxM]. CAT activity (percent conversion) are presented.

写活性化はみられず, CARG box を介した転写活性化に意義ある現象である事が示唆された。

### II. Tax 蛋白による SRF の C 末端領域を介した転写活性化

これまでの研究から, SRF がホモ 2 量体として egr-1, egr-2 および c-fos の CARG box に結合する事が示されている<sup>26,30</sup>。また c-fos の場合, SRF 2 量体がさらに転写因子 p62 ternary complex factor (TCF) と 3 量体 (Ternary complex) を形成して c-fos の CARG box に結合する事が知られている<sup>31</sup>。この場合, CARG box に隣接した c-fos 独自の配列が三量体形成に関与している<sup>31</sup>。これらの最小機能領域として, SRF のアミノ酸 133 番から 222 番の部分に DNA 結合領域が<sup>30</sup>, 168 番から 222 番の部分にホモダイマー形成領域が<sup>30</sup>, さらに 93 番から 222 番の部分に三量体形成に関与する領域が同定されている<sup>32</sup>。そ



Effector	Tax1	CAT conversion (%) 5 $\mu$
-	-	<0.1
	+	<0.1
GALSFRF(10-508)	-	0.1
	+	18.3
GALSFRF(10-264)	-	0.1
	+	0.2
GALSFRF(266-508)	-	0.1
	+	18.3

Fig. 2. The C-terminal half of SRF mediates the activation by Tax. Upper scheme shows the domain of SRF for DNA binding and p62 TCF interaction. Plasmid pG10BCAT was transfected into Hela cells together with effector plasmids expressing GAL-SRF [GALSFRF (10-508), GALSFRF (10-264), GALSFRF (266-508)] and Tax. The CAT activity (percent conversion) are presented.

Reporter Effector	GAL4 site	LexSRF + LexA site	CARG box
-	<0.1	12.6	3.1
GALTax(2-353)	75.3	47.4	21.8
GALTax(2-337)	77.5	52.6	21.7
GALTax(2-322)	0.3	13.1	5.1
GALTax(2-317)	ND	13.3	ND
GALTax(2-312)	<0.1	8.5	ND
GALTax(2-285)	<0.1	8.2	1.8
GALTax(2-322)VP	95.0	71.8	17.9
GALTax(2-312)VP	92.4	79.5	ND
GALTax(2-285)VP	95.5	10.3	1.3

Fig. 3. The Tax domain responsible for the activation for SRF of CARG box. Reporter plasmids used were pG10BCAT for GAL4 site, pL8CAT and LexSRF for SRF, CARGCAT for CARG box. Reporter plasmids were transfected with plasmids expressing series of GALTax deletion mutants. The CAT activity (percent conversion) are presented.

ここで同定された機能領域を含むN末端側(アミノ酸10番から264番)と含まないC末端側(アミノ酸266番から508番)のそれぞれについて GAL4 融合蛋白を作製し、いずれの部分を通して Tax 蛋白が転写を活性化するかを検討した。(図2) N末端領域のみを有する GALSFRF (10-264) は Tax に対する応答性を消失した。一方、C末端領域のみを有する GALSFRF (266-508) の場合、単独で GAL4 結合配列を介して転写を活性化すると共に、GALSFRF (10-508) と同様 Tax によってその活性が増強された。従って、Tax は SRF の C末端領域(アミノ酸266番から508番)を介して転写を活性化すると考えられる。

### Ⅲ. SRF 活性化に関与する Tax 蛋白の機能領域

次に、SRF 活性化に関与する Tax 側のドメイン解析を試みた。Fujii 等は Tax と GAL4 の DNA 結合領域との融合蛋白を作製し、Tax が転写活性化領域(GALTax の GAL4 結合配列に対する転写活性化能、すなわち転写の基本装置に対して働きかける能力を持つと考えられている領域)を有する事、さらにこの活性が HTLV-I ウイルスエンハンサー(21塩基対)の活性化に関与している事を示唆した<sup>29)</sup>。この活性の SRF および CARG box 活性化における意義を合わせて検討するために、種々の GALTax 変異体を用いて実験を行った。そのため SRF の方は大腸菌の DNA 結合蛋白 LexA との融合蛋白として、LexA 結合配列を介した転写活性化能として検討した。(図

3) LexSRF (264-508) は GALSFRF (264-508) と同様に Tax によってその活性が著明に増強された。すなわち、Tax は2つの異なる配列に結合する SRF の融合蛋白を介して転写を活性化する。この事は Tax が SRF の DNA 結合活性に対してではなく転写活性化能に作用する事をさらに支持する。GALTax 変異体の中で、GALTax (2-353) および GALTax (2-337) のみが GAL4 結合配列を介して転写を活性化したが、これらはいずれも LexSRF を活性化した。一方で、GAL4 結合配列に対する活性を失ったすべての変異体が LexSRF に対する活性を同時に失った。さらに、GAL4 結合配列に対する転写活性化能を失った変異体 GALTax (2-322) および GALTax (2-312) にヘテロの転写活性化領域(VP16 のC末端領域)を付加すると GAL4 結合配列に対する活性のみならず、SRF に対する活性をも回復した。これらの結果は SRF を介した転写活性化においても、Tax の転写活性化領域に関与している事を強く示唆する。GALTax (2-322), GALTax (2-312) 等とは対照的に、GALTax (2-285) の場合には VP16 を付加しても GAL4 に対する作用のみが回復し、SRF に対する作用は回復しなかった。この事は Tax アミノ酸2番から312番の内部に転写活性化領域とは異なる SRF 活性化に必須な機能が含まれている事を示唆する。次に用いた GALTax 変異体について CARGbox に対する転写活性化能を検討したところ、LexSRF の活性化能と全く一致していた。すなわち、SRF に対する Tax の作用は CARGbox を介した転写活性化を仲介する現象である事が示唆される。

### Ⅳ. 試験管内における Tax 蛋白と SRF との結合活性

上述のように Tax が SRF を介して転写を活性化する事が示された。つぎに試験管内の結合実験を行い、この活性化が Tax の SRF に対する直接的な作用なのかあるいは間接的な作用なのかを検討した。まず Tax 蛋白と GST 蛋白との融合蛋白を作製した(GSTTax)。この融合蛋白をグルタチオンを固定化したグルタチオンセファロースに結合させた。一方で、網状赤血球の抽出液を用いた翻訳系によって、SRF を <sup>35</sup>S-メチオニンで標識した。標識した SRF 蛋白と GSTTax-セファロースとを試験管内で結合させ、130mM の KCl を含むバッファにて洗浄後にも融合蛋白に結合していた標識蛋白を SDS-PAGE にて分析した(図4)。標識した SRF 蛋白の GSTTax-セファロースに対する結合活性が観察された。SRF が GST-セファロースには結合しないことから、この結合活性は Tax 部分を認識した結合であると考えられた。さらに、コントロールとして用いた EIA 蛋白(アデノウイルスの転写因子)および GAL VP 蛋白(GAL4 の DNA 結合領域と VP16 との融合蛋白)は GSTTax-セファロースに結合せず、Tax 蛋白の非特異的結合活性の可能性は否定された。更に Tax による活性化能を消失した SRF の N末端蛋白(アミノ酸1番から264番)の場合、Tax に対する結合活性を失っている事が明らかになった。以上の事から、Tax は SRF の C末端領域を認識して特異的に結合すると考えられる。次に特異的な結合活性がすでに報告されている RB(網膜芽細胞腫の原因とされる癌抑制遺伝子産物)と EIA を用いて検討したところ、同様に特異的結合が観察された<sup>30)</sup>。また、この結合活性と比較すると Tax と SRF との結合活性がかなり弱い事が明らかになった。Tax と SRF との複合体は CARG box を用いたゲルシフト法あるいはそれぞれの抗体を用いた免疫沈降法によっても検出されず、この結果は矛盾しない

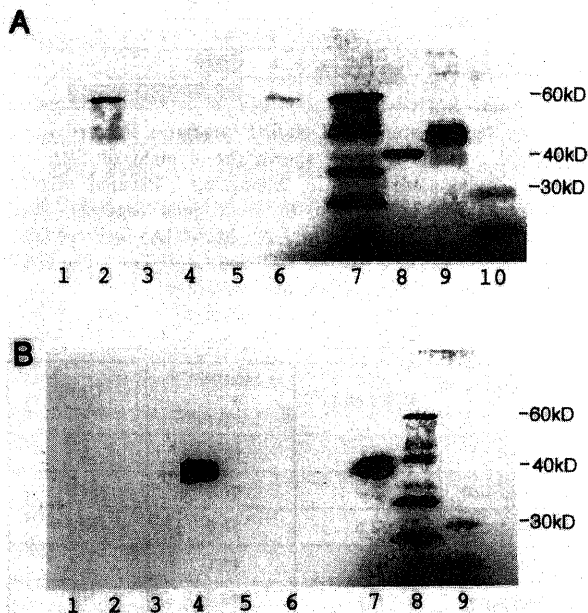


Fig. 4. *in vitro* binding activity of Tax with SRF. The glutathion-Sepharose binding with GST fusion protein was incubated with isotope-labeled protein overnight. The Sepharose was then washed, and the bound proteins to the Sepharose were eluted in the SDS sample buffer and analyzed by SDS-PAGE. (A) lane 1, GST and SRF; lane 2, GSTTax and SRF; lane 3, GSTTax and SRF (1-264); lane 4, GSTTax and EIA; lane 5, GSTTax and GALVP; lane 6, GSTTax (2-284) and SRF; lane 7, SRF; lane 8, SRF (1-264); lane 9, EIA; lane 10, GALVP (B) lane 1, GST and EIA; lane 2, GST and SRF; lane 3, GST and GALVP; lane 4, GSTRB and EIA; lane 5, GSTRB and SRF; lane 6, GSTRB and GALVP; lane 7, EIA; lane 8, SRF; lane 9, GALVP.

と考えられた。すなわち、Tax と SRF との結合活性は特異的であるがその結合親和性は低いと考えられる。

#### V. Tax と SRF との細胞内における複合体形成能

つぎに、細胞内で両者が複合体を形成するかどうかについて、以下のようなアッセイ系により検討した(図5)。GALTax (2-322) は GAL4 結合配列に対する転写活性化能を失っているが SRF に対する特異性は保持している。LexSRF (266-484) VP は SRF の Tax 結合領域、VP16 の転写活性化領域及び Lex 蛋白の核移行シグナルを有している。もし LexSRF (264-484) VP が GALTax (2-322) と細胞内において複合体を形成すれば、VP16 の転写活性化能により GAL4 結合配列依存性に転写が活性化される事が期待される。GALTax (2-322) あるいは LexSRF (264-484) VP は単独では GAL4 結合配列を介して転写を活性化しなかった(図6)。しかしながら、両者を同時に発現させると GAL4 結合配列依存性に CAT 遺伝子の発現誘導が観察された。SRF 部分を含まない LexVP の場合、活性化が観察されない事から、この活性化は SRF 部分に特異的な現象であると考えられた。LexVP および LexSRF (266-484) VP 蛋白が核内において発現している事については、Lex 結合配列を介して転写を活性化する事から確認された。一方で、SRF に対する特異性を失った GALTax (2-285) の存在下では LexSRF (266-484) VP は転写を活性化しなかった。以上のことから Tax は SRF と細胞内において複合体を形成していると考えられる。

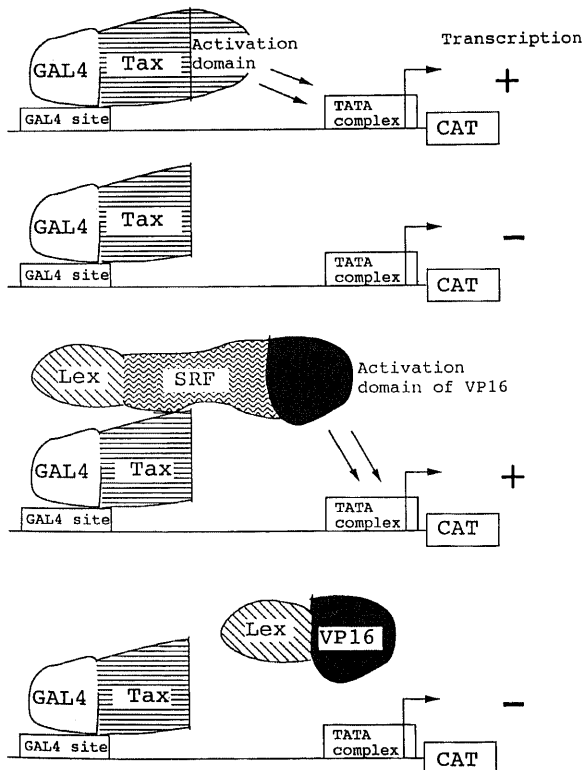


Fig. 5. Schematic illustration of the experimental design. GALTax (2-353) activates transcription through GAL4 site, but GALTax (2-322) loses the function of transactivation. LexSRF (266-484) VP binds to GALTax (2-322) in vivo and recovers the function of transactivation.

#### 考 察

Tax はこれまでにさまざまな細胞遺伝子の発現を誘導する事が示されており、これらの発現誘導を介してT細胞の異常増殖に関与すると考えられてきた。しかしながら、Tax が実際にどの遺伝子に直接作用しているのか、さらにはいかにして遺伝子発現を誘導するのかについてはこれまで不明であった。解析を困難にしていた問題点としては、複数の遺伝子について Tax 応答性エンハンサーの解析が精力的に進められたにもかかわらず、これらのエンハンサー配列に Tax が直接結合せず、さらに Tax の機能を仲介する細胞因子が同定されていない事が挙げ

Effector \ Reporter	-	GAL4 site	LexA site
-	ND	<0.1	<0.1
GALTax(2-353)	ND	75.3	ND
GALTax(2-322)	ND	0.1	ND
GALTax(2-322) + LexSRFVP	<0.1	20.2	95.8
GALTax(2-322) + LexVP	ND	0.1	97.4
GALTax(2-285)	ND	<0.1	ND
GALTax(2-285) + LexSRFVP	ND	<0.1	ND

Fig. 6. Evidence that Tax forms a complex with SRF in vivo. pBCAT, pG10BCAT, pL8BCAT were transfected into Hela cell together with effector plasmids [GALTax (2-353), GALTax (2-322), GALTax (2-285), LexSRF (266-484) VP, LexVP]. The CAT activity (percent conversion) are presented.

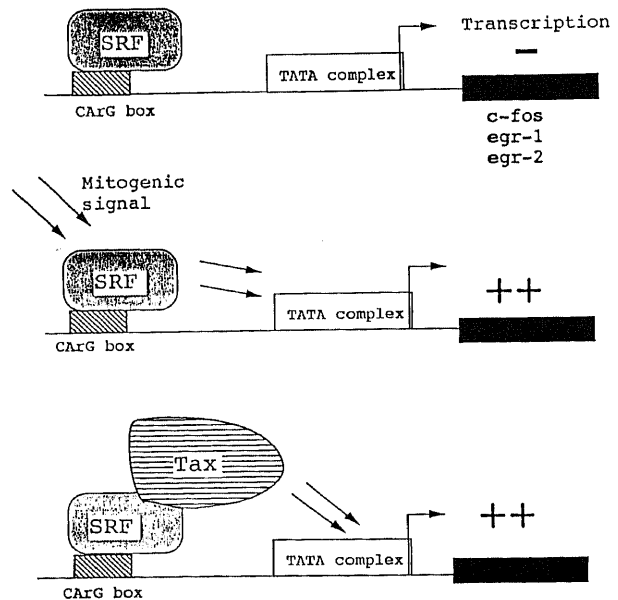


Fig. 7. Model for Tax transactivation of the immediate early genes through the CARg box. In normal cells, the CARg box binding factor SRF was activated by mitogenic signal, and then induces the expression of the immediate early genes. In HTLV-1 infected cells, Tax interacts with SRF and activates the transcription through CARg box without mitogenic signals.

られる。

本研究では、Tax が細胞性転写因子 SRF に直接作用し (図 7), その結合配列である CARG box を介して細胞性初期遺伝子群の発現を誘導する事を示した。SRF についてはすでに増殖シグナルを介した細胞性初期遺伝子群の発現制御に関わっている事が示されている<sup>29)</sup>。従って、SRF がウイルス感染に伴って増殖シグナルとは独立した形で活性化され、T細胞の異常増殖が誘発される可能性が示唆される。

Alexandre らは c-fos, egr-1, egr-2 遺伝子の Tax による発現誘導がこれらのプロモーター領域内の CARG box を介している事を示した<sup>14)20)</sup>。これらの CARG box には複数の転写因子が結合するが、その中で三つの遺伝子の CARG box に共通して結合することが知られているのは SRF である。そこで SRF と GAL4 の DNA 結合領域との融合蛋白を作製し、Tax がこの融合蛋白を GAL4 結合配列依存性に活性化する事を示した。この融合蛋白の GAL4 部分を大腸菌の転写因子 LexA の DNA 結合領域と置き換えると同様に Lex 結合配列依存性の Tax による活性化が観察される事から、Tax は SRF 部分を認識して、SRF の DNA 結合活性ではなく転写活性化能に働きかけている事が示された。さらに、Tax と SRF が試験管内において直接結合すること、細胞内において複合体を形成している事が示された。試験管内における結合親和性はすでに報告された Rb 蛋白と E1A 蛋白との結合親和性<sup>39)</sup>、SRF のホモ 2 量体形成能 (未発表) よりかなり弱い事が示された。細胞内において SRF が Tax によって強く活性化される事と考え合わせると、SRF と Tax の結合を安定化する第 3 の細胞因子の存在もしくは SRF あるいは Tax が細胞内において修飾を受けている可能性が考えられる。

Fujii らおよび Fujisawa らは Tax と GAL4 との融合蛋白を作製し、Tax が転写の活性化領域 (転写の基本装置に働きかける領域、アミノ酸 2 番から 337 番) を有すること、この活性化がウイルスエンハンサー (21塩基対) の活性化に関与することを報告している<sup>21)22)</sup>。本研究において、この転写活性化領域が SRF を介した転写の活性化にも関与している事が示された。すなわち、GAL4 結合配列に対する作用を失った GALTax 変異体はすべて SRF に対する作用をも失った。さらにこの活性はヘテロ (VP16 蛋白) の転写活性化領域によって置き換えが可能であった。この事は Tax が SRF と直接結合すると共に、転写の基本装置に対しても働きかけている事を示唆する。アデノウイルスの転写活性化因子 E1A 蛋白の場合、細胞性転写因子 ATF-2 (CRE-BP1) に結合すると共に転写の基本装置を構成する細胞因子 TF-II B および TF-II D と結合する事が示されている<sup>34)38)</sup>。Tax もこれら転写の基本因子と結合し、SRF と基本因子を繋ぐ架け橋として機能する事が類推される。

Tax は転写活性化領域のみならず SRF (CARG box) に対する特異性を規定する領域 (アミノ酸 2 番から 312 番) を有していた。さらに、この領域は Tax と SRF との結合領域を含む事が示唆された {SRF に対する特異性を失った Tax (2-285) は細胞内の結合実験では弱い SRF 結合活性を示した}。興味深い事に、この SRF に対する特異性を規定する領域 (アミノ酸 2 番から 312 番) は Fujii らがすでに報告している HTLV-I ウイルスエンハンサー (21塩基対) に対する特異性を規定する領域と一致していた。SRF は 21塩基対配列には結合しない事から、すくなくとも 2 つの可能性が推定される。第 1 の可能性としては

SRF を介して誘導された転写因子によって二次的にウイルス遺伝子が誘導することが考えられる。実際に、c-fos が c-jun とヘテロ結合体を形成し、ウイルスエンハンサーを活性化する事を見いだしており、この仮説はウイルスエンハンサーの Tax による活性化を部分的に説明し得ると考えられる。第 2 の可能性は SRF の Tax 結合領域と類似性を有する転写因子によってウイルスエンハンサーが活性化されることである。しかしながら、これまでに知られている 21塩基対結合蛋白の中にアミノ酸レベルで SRF の C 末端領域と有為な類似性を有する因子は見いだされなかった<sup>37)</sup>。

SRF は MADS box を有する転写因子群に属している。MADS box とは MCM-1, Agamous, ARG80, Deficience および SRF の頭文字であり、2 量体形成及び DNA 結合領域を構成している。それぞれの MADS box ファミリーは増殖、分化および発生に関与する key 因子と考えられている。例えば、MCM1 は酵母の雌雄 ( $\alpha$ , a 細胞) の決定に関与している<sup>38)</sup>。Deficience は花卉形成に関与するホメオ遺伝子である<sup>39)</sup>。本研究において、SRF の C 末端領域に Tax 結合領域が同定された。MADS box 転写因子群の C 末端領域はファミリー間で保存されておらず、それぞれの固有な機能に関与する事が推定される。従って、SRF の C 末端領域が SRF 固有の機能、増殖シグナル伝達に関与する可能性が考えられる。DNA 腫瘍ウイルス (アデノウイルス) のトランスフォーミング蛋白 E1A の例を見ても、細胞因子のウイルス蛋白結合領域は活性制御領域として機能しており、今後実際にこの領域が増殖シグナルを介した SRF の活性化にどのように関与しているのか、さらにこの領域に結合する細胞因子が存在しているかについて検討していきたい。

## 結 論

HTLV-I Tax による細胞性初期遺伝子 c-fos の CARG box を介した転写活性化機構について以下の結論を得た。

1. Tax は GALSRF (CARG box 結合因子 SRF と転写因子 GAL4 の DNA 結合領域との融合蛋白) を介して転写を活性化した。
2. SRF の C 末端領域 (アミノ酸 264 番から 508 番) が Tax による活性化に関与していた。SRF の N 末端側に同定される DNA 結合、2 量体形成および p62TCF 結合領域は Tax による活性化に関与していない。
3. GALTax (GAL4DNA 結合領域と Tax との融合蛋白) の GAL4 結合配列に対する活性 (転写活性化領域、Tax のアミノ酸 2 番から 337 番に規定される) が SRF の活性化に関与しており、この活性はヘテロの転写活性化因子 (VP16 の転写活性化領域) で置き換えが可能であった。
4. 転写活性化領域に加えて、Tax のアミノ酸 2 番から 312 番の領域が SRF 活性化に関与していた。この領域は SRF に対する特異性を規定していた。
5. 試験管内において Tax と SRF が直接結合する事が示された。
6. 細胞内において Tax と SRF が複合体を形成している事が示された。

以上の結果から Tax は CARG box 結合因子 SRF の C 末端領域に直接結合し、c-fos 遺伝子の発現を転写レベルで活性化していると考えられる。



## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を賜りました金沢大学癌研究所ウイルス部藤井雅寛博士および清水元治教授に深謝します。さらに多大なる御協力を賜りました金沢大学医学部第三内科教室ならびに金沢大学癌研究所ウイルス部の皆様に感謝致します。

## 文 献

- 1) Hinuma, Y., Nagata, K., Misaka, M., Nakai, M., Matsumoto, T., Kinoshita, K., Shirakawa, S. & Miyoshi, I.: Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 6476-6480 (1981).
- 2) Poiesz, B., Ruscetti, F., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D. & Gallo, R. C.: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 7415-7419 (1980).
- 3) Yoshida, M., Mitoshi, I. & Hinuma, Y.: Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 2032-2035 (1982).
- 4) Yoshida, M. & Seiki, M.: Recent advances in the molecular biology of HTLV-1: *trans*-activation of viral and cellular genes. Annu. Rev. Immunol., **5**, 541-559 (1987).
- 5) Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y. & Yoshida, M.: Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 3618-3622 (1983).
- 6) Seiki, M., Eddy, R., Shows, T. B. & Yoshida, M.: Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukemia cells. Nature, **309**, 640-642 (1984).
- 7) Tanaka, Y., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M. & Hatanaka, M.: Oncogenic transformation by the *tax* gene of human T-cell leukemia virus type I *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 1071-1075 (1990).
- 8) Pozzatti, R., Vogel, J. & Jay, G.: The human T-lymphotropic virus type I *tax* gene can cooperate with the *ras* oncogene to induce neoplastic transformation of cells. Mol. Cell. Biol., **10**, 413-417 (1990).
- 9) Nerenberg, M., Hinricks, S. H., Reynolds, R. K., Khoury, G. & Jay, G.: The *tat* gene of human T-lymphotropic virus type I induces mesenchymal tumors in transgenic mice. Science, **237**, 1324-1329 (1988).
- 10) Kim, S. J., Kehrl, J. H., Burton, J., Tendler, C. L., Jeang, K. T., Danielpour, D., Thevenin, C., Kim, K. Y., Sporn, M. B. & Roberts, A. B.: Transactivation of the transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 Tax: a potential mechanism for the increased production of TGF- $\beta$ 1 in adult T cell leukemia. J. Exp. Med., **172**, 121-129 (1990).
- 11) Fujii, M., Sassone-Corsi, P. & Verma, I. M.: *c-fos* promoter trans-activation by the *tax*<sub>1</sub> protein of human T-cell leukemia virus type I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 8526-8530 (1988).
- 12) Nagata, K., Ohtani, K., Nakamura, M. & Sugamura, K.: Activation of endogenous *c-fos* proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40 tax protein in the human T-cell line. J. Virol., **68**, 3220-3226 (1989).
- 13) Fujii, M., Niki, T., Mori, T., Matsuda, T., Matsui, M., Nomura, N. & Seiki, M.: HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. Oncogene, **6**, 1023-1029 (1991).
- 14) Alexandre, C., Charnay, P. & Verrier, B.: Transactivation of *Krox-20* and *Krox-24* promoters by the HTLV-1 Tax protein through common regulatory elements. Oncogene, **6**, 1851-1857 (1991).
- 15) Smith, M. R. & Greene, W. C.: Type I human T cell leukemia virus Tax protein transforms rat fibroblasts through the cyclic adenosine monophosphate response element binding protein/activating transcription factor pathway. J. Clin. Invest., **88**, 1038-1042 (1991).
- 16) Shimotohno, K., Takano, M., Teruchi, T. & Miwa, M.: Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 region of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 8112-8116 (1986).
- 17) Paskaris, H., Felber, B. K. & Pavlakis, G. N.: cis-acting sequences responsible for the transcriptional activation of a human T-cell leukemia virus type I constitute a conditional enhancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 275-279 (1986).
- 18) Fujisawa, J., Seiki, M., Sato, M. & Yoshida, M.: A transcriptional enhancer sequence of HTLV-I is responsible for transactivation mediated by p40x of HTLV-I. EMBO J., **4**, 713-718 (1986).
- 19) Ballard, D. W., Bohnlein, E., Lowenthal, J. W., Wano, Y., Franza, R. & Greene, W. C.: HTLV-1 tax induces cellular proteins that activate the  $\kappa$ B element in the IL-2 receptor  $\alpha$  gene. Science, **241**, 1652-1655 (1988).
- 20) Leung, K. & Nabel, G. J.: HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- $\kappa$ B like factor. Nature, **333**, 776-778 (1988).
- 21) Fujisawa, J., Toita, M., Yoshimura, T. & Yoshida, M.: The indirect association of human T-cell leukemia virus tax protein with DNA results in transcriptional activation. J. Virol., **65**, 4525-4528 (1991).
- 22) Fujii, M., Tsuchiya, H. & Seiki, M.: HTLV-1 Tax has distinct but overlapping domains for transcriptional activation and for enhancer specificity. Oncogene, **6**, 2349-2352 (1991).
- 23) Verma, I. M. & Sassone-Corsi, P.: Prote-oncogene *fos*: complex but versatile regulation. Cell, **51**, 513-514 (1987).
- 24) Alexandre, C. & Verrier, B.: Four regulatory elements in the human *c-fos* promoter mediate transactivation by

HTLV-1 Tax protein. *Oncogene*, 6, 543-551 (1991).

25) Misra, R. P., Rivera, V. M., Wang, J. M., Fan, P.-D. & Greenberg, M. E.: The serum response factor is extensively modified by phosphorylation following its synthesis in serum-stimulated fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, 11, 4545-4554 (1991).

26) Treisman, R.: The serum response element. *TIBS*, 17, 423-426 (1992).

27) Green, S., Issemann, I. & Elisabeth, S.: A versatile *in vitro* and *in vivo* eucaryotic expression vector for protein engineering. *Nucleic Acids Res.*, 16, 369 (1988).

28) Ma, J. & Ptashne, M.: Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell*, 48, 847-853 (1987).

29) Smith, D. B. & Johnson, K. S.: Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione *S*-transferase. *Gene*, 67, 31-40 (1988).

30) Shaw, P. E., Schroter, H. & Nordheim, A.: The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human *c-fos* promoter. *Cell*, 56, 563-572 (1989).

31) Norman, C., Runswick, M., Pollock, R. & Treisman, R.: Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the *c-fos* serum response element. *Cell*, 55, 989-1003 (1988).

32) Schroter, H., Mueller, C. G. F., Meese, K. & Nordheim, A.: Synergism in ternary complex formation between the dimeric glycoprotein p67<sup>SRF</sup>, polypeptide p62<sup>TCF</sup> and the *c-fos* serum response element. *EMBO J.*, 9, 1123-1130 (1990).

33) White, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. & Harlow, E.: Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334, 124-129 (1988).

34) Liu, F. & Green, M. R.: A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by adenovirus E1A protein. *Cell*, 61, 1217-1224 (1990).

35) Lee, W. S., Kao, C., Bryant, G. O., Liu, X. & Berk, A. J.: Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell*, 67, 365-376 (1991).

36) Horikoshi, M., Maguire, K., Kralli, A., Maldonado, E., Reinberg, D. & Weinmann, R.: Direct interaction between adenovirus E1A protein and TATA box binding transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5124-5128 (1991).

37) Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H. & Sommer, H.: Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 250, 931-936 (1990).

38) Dolan, J. W. & Fields, S.: Cell-type-specific transcription in yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088, 155-169 (1991).

39) Sommer, H., Beltran, J.-P., Huijser, P., Pape, H., Lonngig, W.-E., Saedler, H. & Schwartz-Sommer, Z.: Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.*, 9, 605-613 (1990).

**Studies on the Mechanism of Transactivation of Immediate Early Gene *c-fos* by HTLV-1 Tax** Tatsuya Chuhjo, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 124—132 (1993)

**Key words** HTLV-1, Tax, *c-fos*, CArG box, SRF

#### Abstract

The Tax protein of Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) has been shown to activate various cellular genes the activation of which is thought to be involved in the leukemogenesis by this virus. Among the Tax-inducible genes, *c-fos*, *egr-1* and *egr-2* were activated through the CArG boxes in their 5' flanking regions. Tax does not bind to these CArG boxes, whereas various cellular factors including serum response factor (SRF) does. Using a chimeric protein consisting of SRF and a DNA binding domain of a yeast transcription factor GAL4, we show that Tax activated a transcriptional activity of SRF through GAL4 binding site. The C-terminal portion in a SRF which lacks the domain for a CArG box binding, homo-dimerization and the complex formation with p62 TCF was sufficient for activation by Tax to occur. SRF synthesized in a reticulocyte lysate bind specifically to Tax produced in bacteria and the binding was abolished by the truncation of the C-terminal portion of SRF. The complex formation *in vivo* was further indicated by the finding that a mutant GAL-Tax chimeric protein, defective in the GAL4 binding site, recovered its activity by the coexpression of a SRF fused with the transcriptional activation domain of VP16. Taken together, these data indicated that Tax directly interacts with SRF to activate, through the CArG boxes, the transcription of various cellular immediate early genes including *c-fos*.