ヘパドナウイルスのエンハンサー領域の保存された配列に結合する核タンパク質の精製とその性質

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: 内嶋, 雅人
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8224

金沢大学十全医学会雑誌　第99巻　第5号　870－879 (1990)

ヘパドナウイルスのエンハンサー領域の保存された配列に結合する核タンパク質の精製とその性質

金沢大学がん研究所生物物理部門（主任：原田文夫教授）
内　嶋　雅　人

（平成2年10月13日受付）

ヘパドナウイルスの遺伝子においてエンハンサーはS遺伝子とX遺伝子の間に存在する．この領域には強く保存された 33basepair (bp) の配列 (conserved sequence of hepadnavirus enhancer, CSHE) が存在し，エンハンサー活性をもち，DNA・タンパク質複合体を形成する．特に，CSHE の中央部の 23bp の配列 (HE-C) がエンハンサー活性および複合体形成の双方に本質的である．HE-C に結合する核タンパク質を精製することがヘパドナウイルスのエンハンサーの機能を解明する上で重要であることから，筆者は DNA アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることによって HepG2 細胞から HE-C 結合タンパク質を精製した．ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate, SDS) ポリアクリルアミド電気泳動から，精製タンパク質は分子量 70kilodalton (kd) と 85kd の2成分からなることが明らかになった．さらに，これら2つのうち，70kd のタンパク質のみが直接 HE-C に結合することが UV クロスリンキングにより示された．また，精製タンパク質の DNA 複合体形成には，HE-C の2つのモチーフ，TGACG と CCCCC が寄与することが明らかになった．細胞内における HE-C およびその変異体のエンハンサー活性と精製タンパク質が HE-C の対する結合特異性が相関することから，この精製タンパク質がヘパドナウイルスのエンハンサーに重要なものであることが示唆された．

Key words hepadnavirus, enhancer, DNA-protein complex, DNA affinity chromatography, UV cross-linking

ヒトB型肝炎ウイルス (human hepatitis B virus, HBV) の感染は急性肝炎を引き起こすばかりでなく，慢性肝炎，肝硬変，さらに原発性肝細胞癌とも密接に関連する重大な病原ウイルスである[1]．HBV は 3.2 kilobase (kb) の不完全二重鎖 DNA からなる肝親和性小型 DNA ウイルスで，ヘパドナウイルスに属する．HBV 以外のヘパドナウイルスには，ウッドチャックにウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hepatitis virus, WHV)，アヒルにアヒルB型肝炎ウイルス (duck hepatitis B virus, DHBV)，地リスに地リス肝炎ウイルス (ground squirrel hepatitis B virus, GSHV) などが発見されている[2]．

4種のヘパドナウイルスは共通のゲノム構造を持ち，特にほ乳動物ウイルス間ではきわめて近似しており，これらのウイルスは共通の祖先から分岐したものと推定されている[3]．PerS-S, PreC-C, P の3つの遺伝子がウイルスゲノムに共通して存在し，さらにほ乳類のウイルスにはX遺伝子が共通して存在する．S遺伝子はウイルス粒子表面抗原をコードし，C遺伝子はウイルス内部に存在するコア抗原をコードする．P遺伝子は，レトロウイルスの逆転写酵素遺伝子と高い相同性を持ち，S，C，X領域と解読枠をずらして重複し，ポリメラーゼをコードしている．X遺伝子によってコードされている蛋白質は転写制御のトランス活性

Abbreviations: [α-^{32}P] dCTP, deoxycytidine 5'-[α-^{32}P] triphosphate; bp, base pair; CSHE, conserved sequence of hepadnavirus enhancer; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HBV, hepatitis B virus; HTLV-1, human T-cell

化能を持っていることが最近報告された[4~10]．しかし，これらのウイルスは癌遺伝子を持っておらず，肝癌発生におけるウイルスの関与を明らかにするにはウイルスの感染・増殖過程と宿主細胞の遺伝子発現と増殖の相互作用という局面からの研究が重要であると考えられている．

ヘパドナウイルスはその他のDNAウイルスとは異なり，その複製過程でRNAを経由する[1]．従って，ヘパドナウイルスの転写段階の制御はウイルス遺伝子発現だけではなく，ウイルスの複製においても重要である．転写調節には調節配列と調節因子が関わるが，真核細胞およびそのウイルスのゲノムには，プロモーターの近傍に存在してそのプロモーターからの転写を著しく促進するエンハンサー配列が存在する．HBVのエンハンサーはS遺伝子とX遺伝子の間で，P遺伝子のC末端部分と重複する約0.2kbの領域に限局されることが報告されている[11)12)]．この領域にはDNase Iフットプリント法やゲルシフトアッセイによっていくつかのタンパク質結合部位があることが報告されているが[13~17]，それぞれの部位のエンハンサー活性における役割，および，それらに結合するタンパク質については未だ詳しく理解されていない．

ほ乳類のヘパドナウイルスゲノム間でエンハンサー領域の塩基配列を比較すると，強く保存された33basepair (bp) の配列が見いだされた．ヘパドナウイルスが共通のゲノムをもつことから，同様の遺伝子発現の制御機構をもつ可能性があり，筆者らはこの33bp (conserved sequence of hepadnavirus enhancer, CSHE) の機能を検討してきた．細胞内でのCSHEのエンハンサー活性がMurakami ら[17]により報告された．

筆者は，本研究で，CSHEのエンハンサーとしての機能を解明するために不可欠である，この塩基配列に特異的に結合するタンパク質の精製をDNAアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて行い，その性質を解析したので報告する．

材料および方法

I．酵素および試薬類

Klenow fragmentは宝酒造（東京）の製品を，DNase I，micrococcal nuclease および poly (dI-dC) は Boeringer Mannheim 社（ペンツベルク，西ドイツ）の製品を用いた．deoxycytidine 5'-［α-^{32}P］triphosphate（［α-^{32}P］dCTP）(>3000Ci/mmol) はアマシャム・ジャパン（東京）より購入した．プロテアーゼ阻害剤．フッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethaneuslfonyl fluoride, PMSF)，アンチパイン，ロイペプチンは Sigma 社（セントルイス，米国）より購入した．カラムクロマトグラフィー用樹脂は，DE52は Whatman 社（クリフトン，米国），ヘパリン・アガロースは Sigma 社，DEAE-Sephacel および DNA セルロースはファルマシア（東京），ホルミルセルロファインは生化学工業（東京）の製品を用いた．これ以外の試薬で特に会社名の記載のないものはいずれも和光純薬（大阪），あるいは半井化学（京都）の製品を用いた．

II．HepG2 細胞核抽出液の調製およびエンハンサー結合タンパク質の精製

1．HepG2 細胞核抽出液の調製

HepG2 細胞を10%牛胎児血清 (General Scientific Laboratories，ロスアンゼルス，米国）を含むダルベッコ変法イーグル倍地 (GIBCO，ニューヨーク，米国）で培養し，ディシュ一面に増殖した時点で収穫し，Dignam ら[18]の方法を一部変更して以下のように核抽出液の調製を行った．phosphate-buffered saline (PBS，和光純薬）に懸濁した HepG2 細胞を 4 °Cで 2000rpm，10分遠心した後，沈澱をその5倍量のA緩衝液［10mM HEPES (pH7.9)，1.5mM 塩化マグネシウム，10mM 塩化カリウム，0.5mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT)］に懸濁し，10分放置した．さらに 2000rpm，10分遠心し，沈澱を2倍量のA緩衝液に懸濁した後，B型ペッスルホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした．ホモジネートを25,000 xg で20分遠心し，細胞核沈澱をC緩衝液［20mM HEPES (pH 7.9)，25%グリセロール，0.42M塩化ナトリウム，1.5mM 塩化マグネシウム，0.2mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)，0.5mM DTT，0.5mM PMSF，10μg/ml ロイペプチン，10μg/ml アンチパイン］に懸濁して，B型ペッスルホモジェナイザーで再度ホモジェナイズした後，スターラーで30分攪拌し，核タンパクの塩抽出を行った．このホモジネートを 25,000xg で35分遠心し，得られた上清，核抽出液を液体窒素中に凍結保存した．100mm ディッシュ200枚あたり通常 20mg の核タンパク質が得られた．タンパク質濃度の測定には

leukemia virus type 1; kb, kilobase; kd, kilodalton; LTR, long terminal repeat; ORF, open reading frame; PBS, phosphate-buffered saline; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecylsulfate

プロテインアッセイキット (BI0-RAD, リッチモンド, 米国) を用いた.

2. HE-C DNA アフィニティーカラムの作成

HE-C の＋鎖 3' 末端に 7 塩基の単鎖スペーサーを持つように設計した以下の 2 種類のオリゴヌクレオチドを自動 DNA 合成装置 (ABI 社, フォスターシティー, 米国) を用いて化学合成し, アニール後, DNA アフィティーカラム作製のためのリガンドとして用いた.

(+) 5'-TTGCTGACGCAACCCCC ACTGGCTGGGGCA-3'

(−) 5'-GCCAGTGGGGGTTGCGT CAGCAA-3'

0.2M燐酸緩衝液 (pH 8.2) に懸濁させた 2ml のホルミルセルロファイン (生化学工業) に合成オリゴヌクレオチド (15nmol/ml matrix) を加え, 室温で 4 時間攪拌した. 結合を安定化させると同時に未反応基を除去するために, 水素化ホウ素ナトリウム 14mg を加え, さらに室温で 8 時間攪拌した後, PBS で十分洗浄した. カラムは, 0.05%アジ化ナトリウムを含む TEN 緩衝液 (25mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 1M NaCl) に置換し, 4 ℃で保存した.

2. HE-C 結合タンパク質の精製

精製に用いたすべての材料および機器は 4 ℃で保存し, すべての操作も 4 ℃で行った. カラムクロマトグラフィーに用いた緩衝液は使用前に, PMSF および DTT を加え, それぞれ 5mM に合わせた. BC 緩衝液の組成は, 20mM Tris-HCl (pH 7.9), 0.2mM EDTA, 20%グリセロールであり, BCN 緩衝液はこれらのほかに0.03% NP-40 を含んでいる. タンパク質の DNA 結合活性はゲルシフトアッセイにより検定した. 2ml の HepG2 細胞核抽出液を0.42M塩化カリウムを含む BC 緩衝液で透析した後, 同緩衝液で平衡化した 3ml の DE52 カラムに通し, 溶出液を BC 緩衝液で透析し塩化カリウムを除いた. これを 2ml のヘパリンアガロースカラムに添加し, 4 倍量の BC 緩衝液で洗浄した後に0.05Mから 1 Mまでの塩化カリウム濃度勾配 (20ml) を用いて溶離した. 活性画分 (0.2−0.5M KCl) を BC 緩衝液中で透析, 脱塩後, BC 緩衝液平衡化 DEAE-Sephacel カラム (2ml) に添加した. 4 倍量の BC 緩衝液で洗浄後, 塩化カリウム濃度勾配 (0.05−1M KCl, 20ml) で溶離し, 活性画分 (0.1−0.4M KCl) を採取した. 次に BCN 緩衝液中で透析し, BCN 緩衝液で平衡化した非特異的 DNA セルロースカラム (2ml) に添加し, 2 倍量の同緩衝液で洗浄, 塩化カリウム濃度勾配 (0.05−1M KCl, 20ml) により得られた活性画分 (0.55−0.7M KCl) をセントリコン10 (グレースジャパン, 東京) を用いて脱塩, 濃縮を行った. 最後に, あらかじめ BCN 緩衝液で平衡化しておいた HE-C•DNA カラム (1.5ml) にこの画分を添加し, 同様な方法により活性画分 (0.65−0.8M KCl) を分取した. セントリコン10により 0.2ml まで濃縮し, 種々の解析に用いた.

III. タンパク質およびタンパク質・DNA 複合体の検出

1. オリゴヌクレオチドの合成およびプローブの作成

以下のオリゴヌクレオチドを自動 DNA 合成装置 (ABI 社) を用いて化学合成した.

HE-C

(+) 5'-TTGCTGACGCAACCC-3'

(−) 5'-GCCAGTGGGGGTTGCGT-3'

HE-Cmlm2

(+) 5'-TTGCCAACGCAACCC-3'

(−) 5'-GCCAGTATGGGTTGCGT-3'

これらの合成オリゴヌクレオチドはポリアクリルアミドゲルで精製した後, アニールして [α-^{32}P] dCTP を含む 4 種類の基質と Klenow fragment を用いた修復反応による 3' 末端標識を行った.

2. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイの反応液は 20μl で, 10%グリセロール, 2%ポリビニルアルコール, 20mM HEPES (pH 7.9), 50mM KCl, 2mM DTT, 2μg poly (dI-dC), 7mM 塩化マグネシウム, ^{32}P 標識 DNA プローブ (0.5ng), コンペティターDNA (50ng) および核タンパク質 (0−5μg) を含んでいる. 反応液を 4 ℃で 5 分, さらに30℃で30分インキュベートした後, 4μl のゲルローディング緩衝液 (50%グリセロール, 0.1%ブロモフェノールブルー) を加え, 6%ポリアクリルアミドゲルにのせた. 泳動には TBE 緩衝液 [90mM Tris-H_3BO_3 (pH 8.0), 2mM EDTA] を用い, 200V 電圧下, 4 ℃で1.5時間電気泳動後, ゲルを濾紙上に移して乾燥させ, イメージングプレート (フジフイルム, 東京) に 1 時間感光させた後, イメージングアナライザー BA100 (フジフイルム) で解析した.

3. ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate, SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製されたタンパク質の分子量測定は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により行った. 各精製段階の活性画分 5μl を 20μl の Laemmli サンプル緩衝液[19] [62.5mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5%

```
                                  .....     ....
CSHE                    GTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGC
HE-C                        TTGCTGACGCAACCCCCACTGGC
HE-C-mlm2                   TTGCCAACGCAACCCATACTGGC

HTLV-1-LTR              AAGGCTCTGACGTCTCCCCCC
                        TAGGCCCTGACGTGTCCCCCT
                        CAGGCGTTGACGACAACCCCT
                         ----   -----     ----
                          A       B        C
```

Fig. 1. Sequence alignment of wild and mutated HE-C and comparison with three 21bp repeats in HTLV-I LTR. CSHE is shown at the top. HE-C is a center 23bp fragment of CSHE, and its mutant, HE-C-mlm2, has two set of two base substitutions (indicated by shadow). Bold sequences are those conserved in the three 21bp repeats in HTLV-1 LTR and named domain A, B, and C. Dots above the CSHE indicate homologous bases to 21bp repeats.

2-メルカプトエタノール，10%グリセロール，0.1%ブロモフェノールブルー］に加え，95°Cで5分間加熱し，8%SDSポリアクリルアミドスラブゲルにのせ，150V電圧下，室温で4時間電気泳動した．泳動にはTGE緩衝液［25mM Tris-glycine (pH 8.3)，0.1% SDS］を用いた．分子量マーカーとしてSDS-polyacrylamide gel elecrophoresis (PAGE) スタンダード (BIO-RAD) を用いた．泳動後，銀染色キット (和光純薬) を用いてタンパク質を染色し，濾紙上で乾燥させた．

4．UVクロスリンキング

2ngの ^{32}P標識DNAプローブを加えた総容量40 μlのゲルシフトアッセイ反応液を30°Cで30分インキュベートした後，4°Cで紫外線 (UV, 254nm) を反応液より5cmの距離から20分間照射する．この反応液に最終濃度10mMとなるよう塩化カルシウムを加えた後，DNase I (1 μg) およびmicrococcalnuclease (1U) を加えて37°Cで30分インキュベートし，上記のSDSポリアクリルアミド電気泳動を行い，イメージアナライザーを用いて解析した．

成　　績

I．DNAアフィニティーカラムの作製

エンハンサー活性を持つCSHEの33bpのうち，その活性に本質的であるHE-Cの23bp配列 (図1) に特異的に結合する核タンパク質を精製するためには塩基配列特異的DNAアフィニティーカラムの作製が必要とされた．ホルミルセルロファインにカップリングさせるために，単鎖スペーサーを持つ2重鎖HE-Cオリゴヌクレオチドを化学合成して反応させた．カップリング反応に用いた15nmolのオリゴヌクレオチドのうち約5nmolが樹脂に結合したことから，精製のために十分な許容量を有するDNAアフィニティーカラムが，作製されたといえる．

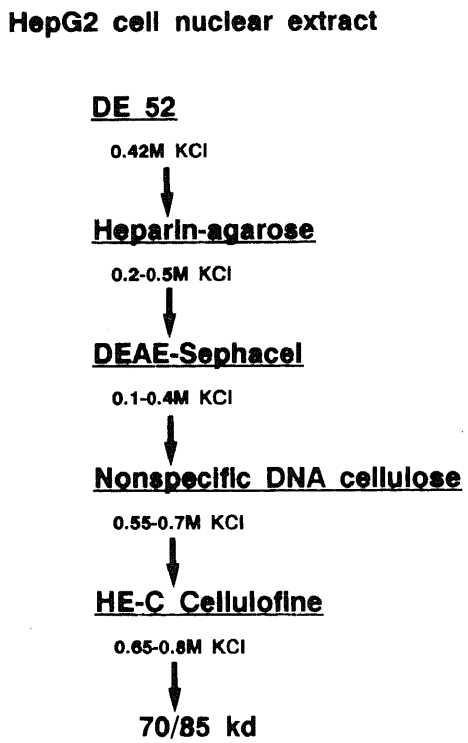

Fig. 2. Purification scheme for HE-C binding proteins. HepG2 nuclear extract was chromatographed on the various columns (underlined) and eluted with KCl gradient. The range of KCl concentrations of active fractions are indicated under each step of column chromatography.

II. HE-C 結合タンパク質の精製

粗製の核抽出液を直接 DNA アフィニティーカラムにかけた場合，純度および収量が低くなることが予想されるため，DNA アフィニティーカラムクロマトグラフィーを行う前に粗精製を行った．種々のカラムを用い，その組み合わせを検討した結果，図2に示した4段階のカラムクロマトグラフィーによる粗精製を行った後に DNA アフィニティークロマトグラフィーを行う最良の様式を確立した．核抽出液を，はじめに DE52 カラムを通すことにより核酸成分を取り除いた．透析，脱塩後，ヘパリンアガロースに添加し，非吸着成分を洗浄，溶出させた後，塩化カリウム濃度勾配で溶離し，ゲルシフトアッセイを用いて各画分の DNA タンパク質複合体の検出を行ったところ，塩濃度0.2－0.5Mで活性が観察された．この活性画分を脱塩し，DNAE-Sephacel カラムクロマトグラフィーを同様な操作により行った．塩濃度0.1－0.4Mに目的の低移動度の複合体のバンドも観察され，0.4－0.5Mにはこれ以外に高移動度のバンドも観測された (図3a)．高移動度のものは分解物と考えられるので，これを含む画分を除き，低移動度の複合体を形成する活性画分を集め，次の非特異的 (nonspecific) DNA セルロースカラムクロマトグラフィーを行った．塩濃度0.55－0.7Mの画分に複合体形成活性が認められたので，これらの画分の脱塩，濃縮操作を行った．濃縮は，クロマトグラフィーを繰り返すことにより活性タンパク質濃度が低下するために起こるタンパク質の不安化を避けることを目的として行った．この濃縮溶液を，作製した HE-C・DNA アフィニティーカラムに添加し，塩化カリウム濃度勾配で溶離したところ，非特異的結合タンパク質が溶出した後の塩濃度0.65－0.8MでHE-C と複合体形成活性を持つタンパク質が溶出した (図3b)．精製された HE-C 結合タンパク質は濃縮後種々の解析に用いたが，複合体形成活性は比較的熱安定性があり，液体窒素中においては数カ月間の長期保存が可能であった．

各精製段階の活性画分中のタンパク質の成分および量比の検討を SDS ポリアクリルアミド電気泳動により測定した．その結果，HE-C・DNA アフィニティーカラムロマトグラフィーの活性画分には，分子量70kilodalton (kd) と 85kd の2つのタンパク成分が検出され，両成分は等比であった (図4，レーン5)．また，各精製段階での純度はクロマトグラフィーを進めるにつれて高くなり，非特異的 DNA セルロースカラ

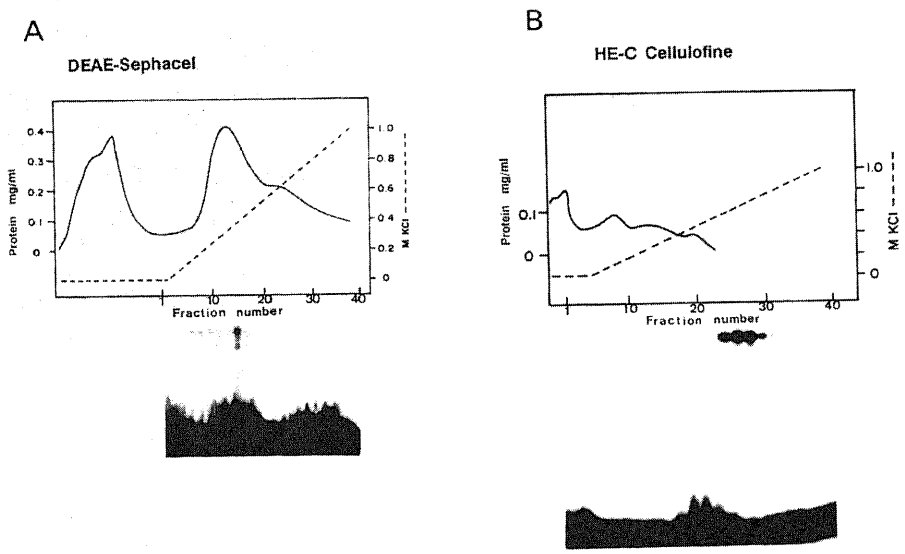

Fig. 3. Typical column chromatographies of HE-C binding protein. (A) The active pool of a heparin-agarose column was dialyzed and loaded onto DEAE-Sephacel and eluted with a KCl gradient as described. The binding activity of each fractions was measured by the gel shift assay. (B) The dialyzed active pool of the nonspecific DNA column was concentrated and loaded onto the HE-C DNA affinity column and eluted with a KCl gradient. Fractions were assayed as in (A).

ムが精製段階においてはかなり有効であることが認められた (図4，レーン4)．そして，最後の HE-C・DNA アフィニティーカラムによって，より効果的，特異的に精製が遂行されたことが確認された．

Ⅲ．精製タンパク質の HE-C・DNA 結合特異性

精製されたタンパク質の DNA 結合特異性を調べるために，^{32}P 標識 DNA をプローブに，非標識 DNA をコンペティター (competitor) として用いてゲルシフトアッセイを行った．比較対照のため出発材料として用いた核抽出液についても同様の実験を行った．プローブには HE-C と，HE-C に特徴的な2つのモチーフを塩基置換させた HE-C-mlm2 (以下，mlm2 と記載) オリゴヌクレオチドを用いた．HE-C をプローブとした場合，DNA・タンパク質複合体形成によるバンドが検出された (図5，レーン4)．一方，mlm2 をプローブにすると複合体の形成は見られなかった (図5，レーン5)．また，非標識 HE-C をコンペティターとして HE-C プローブの系に加えると，複合体のバンドは消失した (図5，レーン6)．これらの結果は未精製の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果と一致した (図5，レーン1～3)．これらの事実から，精製されたタンパク質は，HE-C 配列に対して特異的結合能を持ち，その結合には HE-C の2つのモチーフ，TGACG と CCCCC が必要であることが確認された．

SDS ポリアクリルアミド電気泳動の結果より，精製されたタンパク質は分子量 70kd と 85kd のものを含んでいることが示されたが，これらのタンパク質の HE-C 結合能をより直接的に調べるために UV クロスリンキング (cross-linking) 実験を行った．これは，形成された DNA・タンパク質複合体に UV を照射して DNA の ^{32}P 標識塩基をタンパク質のアミノ酸側鎖にクロスリンクさせ，SDS ポリアクリルアミド電気泳動によって，DNA 結合タンパク質の成分の同定を行う方法である．HE-C をプローブに，対照として行った未精製核抽出液を用いた結果では，分子量46，60，68，70kd のバンドが検出された (図6，レーン1)．精製タンパク質を用いて HE-C をプローブに UV クロスリンキングを行った場合，70kd のバンド

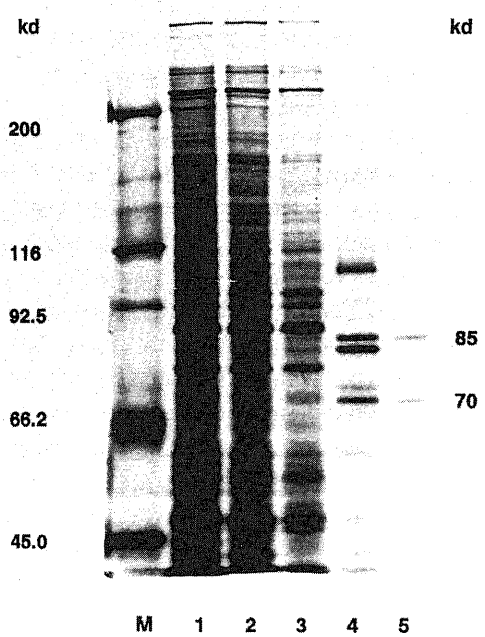

Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the affinity purified proteins. Protein components in the active fractions of each column chromatography were fractionated by 7.5% SDS-PAGE and visualized by silver staining. Marker proteins (lane M) and samples from DE52 (lane 1), heparin-agarose (lane 2), DEAE-Sephacel (lane 3), nonspecific DNA cellulose (lane 4), and the HE-C affinity column are shown. Molecular weights (kilodaltons, kd) of markers are indicated at the left.

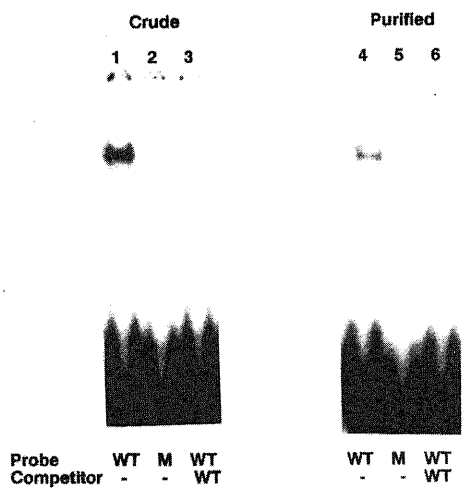

Fig. 5 Gel shift assays of crude and purified proteins. Crude nuclear extract (lane 1-3) and purified proteins (lane 4-6) were incubated with labeled HE-C (WT) or HE-C-mlm2 (M) probe in standard binding reaction mixture followed by electrophoresis analysis. In lane 3 and 6, unlabeled HE-C (WT) were added as the competitor DNA to binding reactions.

のみが検出され，85kd のバンドは検出されなかった(図6，レーン2)．また，mlm2 をプローブに用いると，70kd および 85kd のいずれのバンドも検出されなかった．これらのことより，精製タンパク質に含まれる2つの成分のうち分子量 70kd のものが HE-C に直接結合し，塩基配列特異的結合能を保持しているという結果が得られた．

考　　察

ヘパドナウイルスゲノムのエンハンサーはP遺伝子のC末端転写解読枠 (open reading frame, ORF) と重複して存在しているが，エンハンサーが ORF と重複する例はあまり知られていない．このことはウイルスゲノムがきわめてコンパクトであることと関連している．ヘパドナウイルスの遺伝子発現の制御および複製にエンハンサーが重要な役割を果たしていると考えられることから，筆者らは，このエンハンサー領域にほ乳類のヘパドナウイルス間で強く保存された 33bp の配列，CSHE に着目して系統的な研究を進めてきたが，CSHE による転写制御機構を解明するために CSHE に特異的に結合するタンパク質の精製が必要とされた．

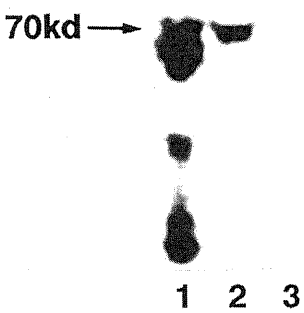

Fig. 6　UV cross-linking of the purified proteins to HE-C and HE-C-mlm2. HE-C probe or HE-C-mlm2 probe was used in UV cross-linking experiments with purified proteins. HE-C was cross-linked to nuclear extract as a control (lane 1), to purified proteins (lane 2) and HE-C-mlm2 to purified proteins (lane 3). The arrowhead points to a 70kd protein.

本研究では，DNA アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いることにより，CSHE のエンハンサー活性に本質的である中央の 23bp，HE-C に結合するタンパク質を精製し，その性質を検討した．DNA アフィニティーカラムによる塩基配列特異的 DNA 結合タンパク質の精製法は Kadonaga ら[20]により開発され，結合部位の塩基配列を縦列 (tandem) につないだオリゴマー (oligomer) DNA を樹脂に結合させる方法が一般的であり，効率も良いとされている．しかし，HE-C はウイルスゲノム中に1つの配列として存在しているため，縦列につないだことによる付加的な効果が起こる可能性がある．筆者はこのことを考慮して，HE-C をモノマー (monomer) として樹脂に結合させた DNA アフィニティーカラムを用いて精製を行う方法を取った．

精製タンパク質による HE-C との複合体形成には，2つのモチーフ，TGACG と CCCCC が必要であることが，ゲルシフトアッセイにより示されたが，これは，Murakami ら[17]によって報告された HE-C の2つのモチーフを塩基置換させるとエンハンサー活性が失われるという結果に相関している．従って，精製タンパク質が CSHE エンハンサー機能の発現に寄与するタンパク因子である可能性を示唆している．精製タンパク質の機能に関する直接的な証拠を得るためには，試験管内転写実験による検討を加える必要がある．

精製されたタンパク質は分子量 70kd と 85kd の2つの成分からなることが明らかになったが，UV クロスリンキング実験からは，HE-C に直接結合するのは 70kd のものであることが示され，85kd のタンパク質は非特異的なものである可能性も考えられた．しかし，非特異的 DNA カラムを通した後に HE-C カラムを通すことによって 85kd も濃縮されていること，さらには，2回 HE-C カラムを通しても 85kd が除去されず (結果示さず)，両成分が等比であるという事実からも，85kd が非特異的混入によるものである可能性は考えにくい．以上のことから，HE-C に直接 70kd が結合し，85kd はタンパク質とタンパク質の相互作用により "piggyback" (肩車) 型で 70kd に結合し2量体を形成していると推測される．

HE-C には，TGACG と CCCCC の2つの特徴的なモチーフが含まれているが，類似のモチーフ構成がヒトT細胞白血病ウイルス1型 (human T-cell leuke-

mia virus type 1, HTLV-1) の未端反復配列 (long terminal repeat, LTR) にある3つの 21bp 反復配列に見いだされる[21]. HTLV-1 の3つの 21bp 反復配列には大きく3つの領域が保存されており (図1), それぞれ, A, B, Cドメインと名付けられている[22]. 図1から明らかなように, HE-C の2つのモチーフはそれぞれBドメインとCドメインに高い相同性を持っている. HTLV-1 の 21bp 反復配列に結合するタンパク質は報告されているだけでも数種類あり[23~27], その結合にはBドメインが本質的で, 他の2つのドメインが部分的に関与して, 異なった複数のタンパク質の結合を可能にしていると考えられている. HE-C の場合も, 未精製核抽出液を用いた UV クロスリンキングでは 70kd 以外にバンドが検出されている事実から, HTLV-1 の 21bp 反復配列と同様に, 複数のタンパク質が結合すると推定され, 今回精製されたタンパク質はそのうちにひとつであると考えられる.

ヘパドナウイルスにはウイルス自身によってコードされるトランス活性化因子, Xタンパク質が存在する. 最近, Unger ら[28]らによって HBV のXタンパクがエンハンサーのEエレメントをトランス活性化するということが報告された. このEエレメントと HE-C とほとんど一致しており, 本研究で精製されたタンパク質がXタンパク質によるトランス活性化に関係している可能性がある. 興味深いことに, HTLV-1 の 21bp 反復配列エンハンサーは HTLV-1 自身によってコードされるタンパク質, Tax によって細胞性因子を介して活性化されることが知られており[21], Tax によるウイルス遺伝子発現の調節機構およびウイルス性細胞癌化機構に関する研究が精力的に進められている. ヘパドナウイルス遺伝子の, そのトランス活性化因子Xタンパク質による発現制御, さらには肝細胞の発癌の観点からも, CSHE に作用する細胞性タンパク因子の検索は興味のもたれることである.

HBV を含むヘパドナウイルスの遺伝子発現の制御機構の解明において, 筆者により精製された HE-C 結合タンパク質の解析が重要な役割を果たすことが示唆されることから, 今後, これらのアミノ酸配列の決定, 遺伝子のクローニングを行い, さらには, 細胞内発現系を用いた解析を進めていく計画である.

結　　論

HepG2 細胞の核抽出液から, ヘパドナウイルスのエンハンサーに強く保存された領域に結合するタンパク質を精製し, その性質を調べ, 以下の結論を得た.

1. HE-C に特異的に結合するタンパク質を精製するために, DNA アフィニティーカラムを作製した.

2. 5段階のカラムクロマトグラムフィーによる精製様式を確立し, HE-C 結合タンパク質の精製に成功し, これが分子量 70kd と 85kd の2つの成分からなることを明らかにした.

3. HE-C に含まれる TGACG と CCCCC の2つのモチーフを変異させたプローブを用いると精製タンパク質による複合体形成が阻害されたことより, 精製タンパク質の HE-C に対する高い結合特異性が確認された.

4. UV クロスリンキングを用いて精製タンパク質の2つの成分のうち, 分子量 70kd のものが直接 HE-C に結合していることを明らかにした.

謝　　辞

稿を終えるに臨み, 御懇篤なる御指導と御校閲を賜った原田文夫教授に深甚の謝意を表します. また, 直接の御指導をいただいた, 金沢大学がん研究所生物物理部門, 村上清史助教授に心から感謝致します. 有益な御討論をいただいた, 金沢大学がん研究所ウイルス部門, 清木元治教授, 藤井雅寛博士に深謝致します. 本研究のために御援助, 御協力いただいた金沢大学第一内科, 小林健一教授, 同第二研究室肝臓グループの各位に深く感謝致します. また. 多大なる御協力をいただいた, 金沢大学がん研究所生物物理部門各位に心より感謝致します.

文　　献

1) **Ganem, D. & Varmus, H. E.:** The molecular biology of the hepatitis B viruses. Annu. Rev. Biochem., **56,** 651-693 (1987).

2) **Summers, J.:** Three recently described animal virus models for human hepatitis B virus. Hepatology, **1,** 179-183 (1981).

3) **Kodama, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H. & Murakami, S.:** Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: Evolutional relationship between hepadnaviruses. J. Virol., **56,** 978-986 (1985).

4) **Twu, J. & Schloemer, R. H.:** Transcriptional *trans*-acting function of hepatitis B virus. J. Virol., **61,** 3448-3453 (1987).

5) **Spandou, D. F. & Lee, C. H.:** *trans*-Activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. J. Virol., **62,** 427-434 (1988).

6) **Seto, E., Mitchell, P. J. & Yen, B.:** Trans activation by the hepatitis B virus X protein depends on AP-2 and other transcription factors. Nature, **344,** 72-74 (1988).

7) **Twu, J. & Robinson, W. S.:** Hepatitis B virus X protein can transactivate heterologous viral sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86,** 2046-2050 (1989).

8) **Twu, J., Chu, K. & Robinson, W. S.:** Hepatitis B virus X gene activates κB-like enhancer saquences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86,** 5168-5172 (1989).

9) **Colgrobe, R., Simon, G. & Ganem, D.:** Transcriptional activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis B virus X gene product in cells permissive for viral replication. J. Virol., **63,** 4019-4026 (1989).

10) **Aufiero, B. & Schneider R. J,:** The hapatitis B virus X gene product *trans*-activates both RNA polymerase II and III promoters. EMBO J., **9,** 497-504 (1990).

11) **Shau, Y., Rutter, W. J. & Laub, O.:** A human hepatitis B enhancer element. EMBO J., **4,** 427-430 (1985).

12) **Tognoni, A., Cattanero, R., Serfling, E. Schaffner, W.:** A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer. Nucleic Acids Res., **13,** 7457-74-64 (1985).

13) **Shaul, Y. & Ben-Levy, R.:** Multiple nuclear proteins in liver cells are bound to hepatitis B virus enhancer element and its upstream sequences. EMBO J., **6,** 1913-1920 (1987).

14) **Karpen, S., Banerjee, R., Zelent, A., Price, P. & Acs, G.:** Identification of protein-binding sites in the hepatitis B virus enhancer and core promoter domains. Mol. Cell. Biol., **8,** 5159-5165 (1988).

15) **Ben-levy, R., Faktor, O., Berger, I. & Shaul, Y.:** Cellular factors that interact with hepatitis B virus enhancer. Mol. Cell. Biol., **9,** 1804-1809 (1989).

16) **Ostapchuk, P., Scheirle, G.& Hearing, P.:** Binding of nuclear factor EF-C to a functional domain of the hepatitis B virus enhancer region. Mol. Cell. Biol., **9,** 2787-2797 (1989).

17) **Murakami, S., Uchijima, M., Shimoda, A., Kaneko, S., Kobayashi, K. & Hattori, N.:** Hepadnavirus enhancer and its binding protein Gastroenterol. Jpn., **25,** 1030-1038 (1990).

18) **Dignam, J. D., Levovitz, R. & Roeder, R. G.:** Accurate transcription initiation by polymerase II in a soluble extract from isolated mammalin nuclei. Nucleic Acid Res., **11,** 1475-1489 (1983).

19) **Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227,** 680-685 (1970).

20) **Kadonaga, J. T. & Tjian R.:** Affinity purification of sequence-specific DNA binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83,** 5889-58-93 (1986).

21) **Yoshida, M.:** Expression of the HTLV-1 genome and its association with a unique T-cell malignancy. Biochem. Biophys. Acta, **907,** 145-161 (1987).

22) **Fujisawa, J., Toita, M. & Yoshida, M.:** A unique enhancer element for the *trans* activator ($p40^{tax}$) of human T-cell leukemia virus type I that is distinct from cyclic AMP- and 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element. J. Virol., **63,** 3234-3239 (1989).

23) **Nyborg, J. K., Dynan, W. S., Chen, I. S. Y. & Wachsman, W.:** Binding of host cell factors of human T-cell leukemia virus type I: implications for viral gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85,** 1457-1461 (1988).

24) **Jeang, K., Boros, I., Brady, J., Radonovich, M. & Khoury, G.:** Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I $p40^{x}$-responsive 21-base-pair sequence. J. Virol., **62,** 4499-4509 (1988).

25) **Tan, T., Horikoshi, M. & Roeder, R. G.:** Purification and characterization of multiple nuclear factors that bind to the TAX-inducible enhancer within the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Mol. Cell. Biol., **9,** 1733-1745 (1989).

26) **Montagne, J., Beraud, C., Crenon, I., Lambard-Platet, G., Gazzolo, L., Sergeant, A. & Jalinot, P.:** Tax1 induction of the HTLV-I 21bp enhancer requires cooperation between two cellular DNA-binding proteins. EMBO J., **9,** 957-964 (1990).

27) **Yoshimura, T., Fujisawa, J. & Yoshida, M.:** Multiple cDNA clones encoding nuclear

proteins that bind to the *tax*- dependent enhancer of HTLV-1 : all contain a leucine zipper structure and basic amino acid domain. EMBO J., **9**, 2537-2542 (1990).

28) **Unger, T. & Shaul, Y.:** The X protein of the hepatitis B virus acts as a transcription factor when targeted to its responsive element. EMBO J., **9**, 1889-1895 (1990).

Purification and Properties of Nuclear Proteins That Bind to the Conserved Sequence of Hepadnavirus Enhancer

Masato Uchijima, Department of Biophysics, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med. Soc., **99**, 870—879 (1990)

Key words hepadnavirus, enhancer, DNA-protein complex, DNA affinity chromatography, UV cross-linking

Abstract

A hepadnavirus enhancer element was mapped between the S gene and the X gene. Within this region, there is a highly conserved 33 bp sequence (conserved sequence of hepadnavirus enhancer, CSHE) which has enhancer activity and can form a DNA-protein complex with cellular factors. The center 23 bp of CSHE (HE-C) are essential for both the enhancer activity and DNA-protein complex formation. The purification of nuclear protein that interacts with the HE-C sequence is an important step toward elucidation of the mechanism of the hepadnavirus enhancer. The author describes here the purification, from HepG2, of those proteins using sequence-specific DNA affinity chromatography. Electrophoresis of the purified protein in SDS-polyacrylamide gels revealed the presence of two peptides with molecular masses of 70 and 85 kd. UV cross-linking experiments demonstrated that the 70 kd peptide bound directly to HE-C while 85 kd did not. It was also demonstrated that the two motifs, TGACG and CCCCC in HE-C contribute to the specific binding of the purified protein. Correlation of the *in vivo* enhancer activity of wild-type and mutated HE-C, with the binding activity of the purified protein to these HE-Cs, suggests that these proteins are important for the hepadnavirus enhancer.