

大腸菌発現系及び無細胞発現系を用いたウッドチャック肝炎ウイルスX遺伝子産物の発現

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: Woodchuck hepatitis virus X protein expression vector immunoprecipitation 作成者: 兎玉, 一八 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8019

大腸菌発現系及び無細胞発現系を用いたウッドチャック 肝炎ウイルス X 遺伝子産物の発現

金沢大学がん研究所生物物理部門 (主任: 原田文夫教授)

児 玉 一 八

(昭和63年2月3日受付)

ヒト B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) をはじめとするヘパドナウイルス科 (hepadnaviridae) ゲノムには、共通して4つの open reading frames (ORFs) が存在する。その中で X-ORF は、その遺伝子産物の機能及び局在がほとんど解明されていない“未知の蛋白”である。HBV 感染にひきつづく肝炎、肝硬変、肝細胞癌といった病理学的変化における HBV の役割の分子生物学的レベルでの解明には、HBV ゲノムの塩基配列及び蛋白の情報と機能の解析が一つの有効な方向である。中でも X 遺伝子産物は、いくつかの証拠から、重要な機能を有していることが示唆されている。今回、X 遺伝子産物の機能解析のための基礎的研究として、ヘパドナウイルス群に属し、最も発癌性の高いウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hepatitis virus, WHV) の X 遺伝子産物を、*in vitro* 発現系において産生させることに成功した。WHV の X-ORF を大腸菌発現ベクター pKK223-3 の *tac* プロモーター及び Shine Dalgarno (S.D.) 配列の下流に順方向に挿入したプラスミド pKX10 を大腸菌内に導入し、マキシセル法により発現させた。SDS-PAGE により、プラスミド由来の 17Kd, 11Kd の2種の蛋白を同定した。フレームシフト変異及び欠損変異を導入したプラスミドの発現蛋白の解析から、17Kd は X 遺伝子産物、11Kd は C 抗原 N 末端部分由来蛋白であることを明らかにした。生成した ³⁵S-メチオニン標識 X 蛋白を用い、WHV 感染ウッドチャック血清の免疫化学的検索を行ったところ、何例かで抗 X 抗体を検出した。非感染群では抗 X 抗体を認めなかった。また X 蛋白の発現効率の向上と操作の簡便化のために、SP6 RNA ポリメラーゼ、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 転写-翻訳系により、無細胞的に X 蛋白の産生を行ったところ、高収率で X 蛋白が得られた。生成 X 蛋白を用い血清の免疫学的検索を行ったところ、大腸菌系に比べ、より高感度な結果を得た。

Key words Woodchuck hepatitis virus, X protein, expression vector, immunoprecipitation

ヒト B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) は、主として血液を介して感染し、肝炎を発症させる DNA ウイルスである。HBV 感染としてヒト肝細胞癌 (肝癌) のあいだに、密接な因果関係があることは疫学的に明らかとなっている¹⁾。しかしヒト肝癌の発生機序において、HBV が実際にいかなる役割を担っているかについてはほとんど不明である。

HBV をはじめ、ウッドチャック²⁾³⁾、地リス⁴⁾、北京

アヒル⁵⁾などからそれぞれ肝炎ウイルスが分離されており、これらはヘパドナウイルス科 (hepadnaviridae) として分類されている。これらのウイルス粒子中には、3200 塩基対前後の不完全二重鎖 DNA 一分子が存在する。ヘパドナウイルス DNA 上にはそれぞれのウイルスに共通して4つの open reading frames (ORFs) が存在しており、長さ、相対的位置、構造などはよく保存されている。これらの ORF は各々 S, P,

Abbreviations: bp, base pairs; DHBV, duck hepatitis B virus; GSHV, ground squirrel hepatitis virus; HBV, hepatitis B virus; IgG, immunoglobulin G; kbp, kilobase pairs; ORF, open reading frame; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SV40, simian virus 40; WHV, woodchuck hepatitis virus.

X 領域とよばれている⁹⁾。

S 領域には 3 つの翻訳開始 ATG コドンがあり、このうち最後の ATG コドンからはじまり、約 220 アミノ酸残基のウイルス粒子表面抗原 (S 抗原) をコードするのが S 遺伝子である。C 領域は、ウイルス粒子内部に存在するコア抗原をコードしている。P 領域はゲノムの約 3/4 の長さを持ち、S, X, C の各領域と解読枠をずらして重複している。この領域のコードするアミノ酸配列の比較から逆転写酵素と考えられている。

X 領域は、約 140 アミノ酸残基の蛋白をコードしている。最近になって HBV キャリヤーの肝細胞および血清中で、X 遺伝子産物産生の履歴が同定されている⁷⁾⁸⁾が、その機能等についてはほとんどわかっていない。

筆者らは先に、ヘパドナウイルス科のなかの各々のウイルスゲノムの X 領域の塩基及びアミノ酸配列を比較し、HBV 亜型相互と、リス肝炎ウイルス (ウッドチャック肝炎ウイルス, woodchuck hepatitis virus, WHV; と地リス肝炎ウイルス, ground squirrel hepatitis virus, GSHV) 間では X 蛋白の変異速度に若干の違いがあることを見出した⁹⁾。これは、他の 3 つの ORF にはみられない特性である。ヘパドナウイルス科内の各ウイルスは、発癌性をはじめとした病理学的性質に大きな違いがみられる。ヘパドナウイルスはがん遺伝子をもっていないため、発がんがウイルスゲノム中の 4 つの領域の DNA 又は蛋白の構造の差異に起因すると考えるのは有理である。中でも機能未知の X 蛋白には特に興味もたれ、その基本的性質の記載や機能の同定は焦眉の課題である。

筆者は、HBV の良好なモデルとされる WHV の X 領域を、大腸菌発現ベクターに導入し、*in vitro* で非融合型 (non-fused) で full length の X 遺伝子産物の産生に成功した。生成した ³⁵S-メチオニン標識 X 蛋白を用いてウッドチャック血清内の抗 X 抗体の存在を免疫化学的に検索したところ、WHV マーカー陽性の血清の約半数で抗 X 抗体を検出し、陰性血清では検出されなかった。また、X 蛋白の産生効率の向上と操作の簡便化のため、SP6 依存性発現ベクター内に X 領域を導入し、SP6 ポリメラーゼ、ウサギ網状赤血球ライセートを用いて、無細胞 (cell free) 的に X 蛋白を産生させた。

材料および方法

I. プラスミド、バクテリア種、酵素類および試薬

大腸菌のラクトースオペロンの一部を大腸菌トリプトファンオペロンの一部で置換した *tac* オペロン⁹⁾ を持つ大腸菌発現ベクター、pKK223-3 (Pharmacia 社、

米国) を、WHV の X 遺伝子のゲノム内での発現に、また、バクテリオファージ SP6 の、SP6 RNA ポリメラーゼに厳密に特異的な SP6 プロモーターをもつ発現ベクター-pSP65 (Amersham 社、英国) を X 遺伝子の無細胞的な発現にそれぞれ用いた。pWH81 は、先に筆者らが全塩基配列を決定したクローン WHV₂⁹⁾ を、pBR325 の Eco RI 部位に挿入したプラスミドで、X 領域を含む DNA 断片を切り出して発現プラスミドを作製するのに用いた。プラスミドはすべて大腸菌 C600r⁻m⁻ 種にて調製した。

用いた大腸菌は、C600r⁻m⁻ (F⁻, *thi*-1, *leu*B6, *lac*Y₁, *ton*A₂₁, *sup*E₄₄, λ⁻), JM105 (Δ*lac*pro, *thi*, *str*A, *end*A, *sbc*B₁₅, *hsd*R4, F'*tra*D36, *pro*AB, *lac*I^q, Z Δ M15), N17-9 (W3623, *trp*⁻, SM^R, *rec*A₉₉, *uvr*A), SG12036 (C600, *lon* ∇ *Pst*, *sul*A, ∇ *gal*, *thr*⁻, *leu*⁻) の 4 種である。制限酵素 BamH I, EcoRI, Hind III, Nhe I, Pst I, Pvu I, Pvu II, Sal I, Xba I および T₄ DNA リガーゼは宝酒造から、制限酵素 Alu I, Nco I, Sma I は和光純薬から、制限酵素 Sph I は Boehringer Mannheim 社 (西独) からそれぞれ購入した。pMSG プラスミドは Pharmacia 社、L-³⁵S-メチオニン (>1000 Ci/mmol), α-³²P-UTP (>800 Ci/mmol) は、Amersham 社から、Protein A Sepharose は、Pharmacia 社から購入した。

II. バクテリアの生育、マキシセルの調製および標識蛋白の発現

大腸菌発現プラスミド pKX10 (図 1) を大腸菌、N17-9 種に導入後、M9C 培養液 10 ml (1 l 中にリン酸二ナトリウム 6 g, リン酸一カリウム 3 g, 塩化ナトリウム 0.5 g, 塩化アンモニウム 1 g, 硫酸マグネシウム 2 mmol, 塩化カルシウム 0.1 mmol, グルコース 2 g, casamino acids, Difco 社, 2 g を含む) に懸濁し、37°C にて振とう培養した。35 klett unit にまで生育後、菌液を 5 ml ずつガラスシャーレに分取し紫外線 (20 μW/cm²) を 2 分間照射した。照射後、菌液をさらに 37°C にて一晩振とう培養を続けた後、遠心し、沈澱させた菌体を M9⁺ 培養液 (M9C 培養液から casamino acids を除いたもの) 2 ml に再懸濁し、37°C で 1 時間培養し、含硫アミノ酸を枯渇させた。ひき続き 10 μCi の ³⁵S-メチオニンを培養液に添加、1 時間後遠心により菌体を回収し、水冷 1/2M9 溶液にて 3 回洗浄した。SDS-PAGE に使用する場合は、Laemmli sample buffer¹⁰⁾ に懸濁し、-20°C で保存した。免疫沈澱に使用する場合は、直ちに溶菌液を調製した。

III. 溶菌液の調製

一部を除き Kay らの方法⁹⁾ に従って行った。回収した ³⁵S-メチオニン標識マキシセルをエッペンドルフ

チューブに移し、25%スクロースを含む 50 mM Tris·Cl pH 8.0 緩衝液 0.45 ml に懸濁した後、10 mg/ml リゾチームを含む同緩衝液 50 μ l を添加し、水中で 5 分間放置した。更に 0.2 mM EDTA pH 8.0 を 0.1 ml 添加、水中で 5 分間放置後、250 mM p-メチルスルホニルフロリド (PMSF) 2.4 μ l, 1 mg/ml Leupeptin 6 μ l, 1 mg/ml Antipain 6 μ l を添加し 5 分間水冷し、菌体内のプロテアーゼ活性を阻害した。最後に lysis buffer (50 mM Tris·Cl pH 8.0; 25 mM EDTA; 0.2% Triton X-100) 0.5 ml を添加、30 分水冷後、4,000

g にて 5 分間遠心して上清を得、もう一度遠心して上清から沈澱を完全に除いた。

IV. 免疫沈澱法

一部を除き Schwyzer の方法¹¹⁾に従って行った。標識蛋白を含む大腸菌溶菌液 1 ml、もしくは lysis buffer 0.2 ml を加えたウサギ網状赤血球ライセート 10 μ l に、血清 10 μ l を加え、37°C で 30 分、その後 4°C で一晩放置し、抗原-抗体複合体を形成させた。反応液にあらかじめ lysis buffer で平衡化させておいた Protein A Sepharose 0.5 ml を加え、室温にて 2 時間

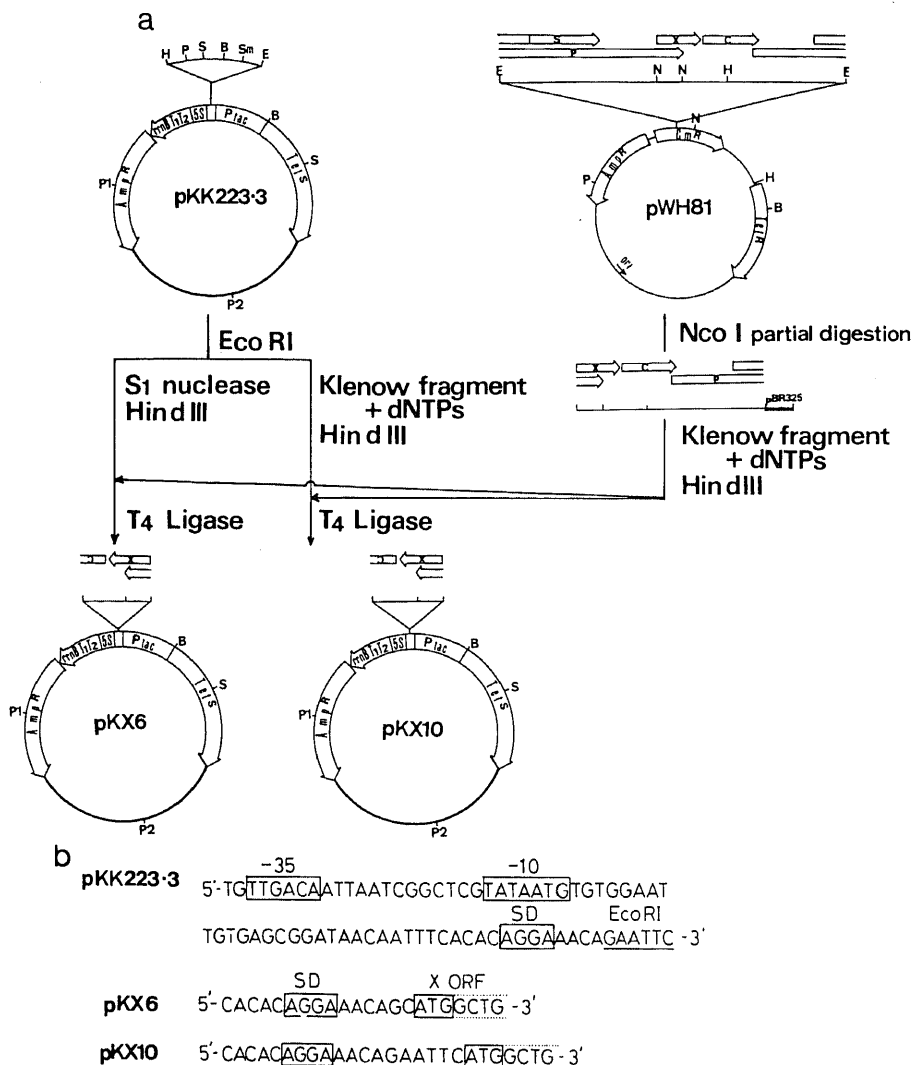


Fig. 1. Construction of *E. coli* expression plasmids.

(a) Outline of the major steps in construction of *E. coli* expression plasmid, pKX6 and pKX10. (b) DNA sequences from *lac* promoter to translation initiation codon of X ORF. E, Eco RI; Sm, Sma I; B, Bam HI; S, Sal I; P, Pst I; H, Hin d III; N, Nco I; P1, Pvu I; P2, Pvu II restriction enzyme sites.

振とうし、複合体を吸着させた。ビーズを RIPA buffer (50 mM Tris・Cl pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% SDS; 1% Triton X-100; 0.5% Na-deoxycholate; 1 mM PMSF) 3 ml で 3 回洗浄後、遠心によりビーズを回収し、Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris Cl pH 6.8; 2% SDS; 5% 2-メルカプトエタノール; 10% グリセロール; 0.1% ブロムフェノールブルー) 2 ml を加え、室温で 30 分振とうし、吸着蛋白を溶離した。遠心により上清を得、50% (w/v) トリクロロ酢酸 0.2 ml を加え、4°C で一晩保存し、蛋白を沈澱させた。10,000 g で 10 分間遠心して沈澱を得、アセトンで洗浄した。乾燥後、Laemmli sample buffer 50 μ l に溶解させた。使用まで -20°C にて保存した。

V. SDS-PAGE とフルオログラフィー

標識蛋白を含む溶液を加えた Laemmli sample buffer 20 μ l を、95°C で 5 分間加熱した。これを 15% SDS-ポリアクリルアミドスラブゲルにのせ、室温、150 V で、4~6 時間泳動した。泳動後、クマジブリリアントブルーにより蛋白を染色後、EN³HANCE (New England Nuclear 社、米国) によりフルオログラフィーを行った¹²⁾。ゲルを乾燥後、増感スクリーン共存下、-80°C にて一週間、X 線フィルム (Kodak 社、米国) に感光させた。

VI. *in vitro* 翻訳および *in vitro* 転写反応

SP6 プロモーターを含む発現プラスミド 20 μ g を、挿入 X 遺伝子の下流 1 ケ所を認識する制限酵素にて開裂し、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈澱後乾燥し、20 μ l の T₂₅E₁ (pH 7.5) 緩衝液に溶解し、鋳型 (テンプレート) とした。

鋳型 DNA 1 μ g を、SP6 ポリメラーゼ (Amersham 社) 10 U, 10 mM Tris・Cl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM spermidine, 50 mM NaCl, ATP, GTP, CTP, UTP 各 1 mM, ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター (Amersham 社) 30 U, 10 mM ジチオスレイトールを含む反応液 50 μ l と、40°C で 2 時間保温した。反応後、フェノール-CIAA (クロロホルム: イソアミルアルコール = 24: 1 (v/v)) にて 1 回ずつ抽出、エタノール沈澱、乾燥後ジエチルピロカーボネートで処理した蒸留水 20 μ l に溶解し、使用まで -20°C で保存した。なお、転写産物量を定量する場合は、反応系に ³²P-UTP (10 μ Ci) を添加して反応させた。反応後、RNA リナチュレイティングゲルにて電気泳動し、乾燥後 X 線フィルムに感光させ現像後、デンシトメーター (島津社 CS-900 型) により定量した。*in vitro* 翻訳反応は、非標識 X-mRNA 1 μ g を、ウサギ網状赤血球ライセート 20 μ l, ³⁵S-メチオニン 10 μ Ci を含む反応液 40 μ l と、30°C で 1 時間保温させて行った。SDS-PAGE に用

いる場合は、Laemmli sample buffer 添加により反応停止した。免疫沈澱に用いる場合は、氷冷して反応停止後、使用まで -20°C で保存した。なお、無細胞 X 発現系の対照群として、WHV C 遺伝子を pSP65 に挿入した発現プラスミド pSPC を用いた¹³⁾。

成 績

I. 大腸菌発現プラスミド pKX6, pKX10 の構成

WHV の X 遺伝子が大腸菌内で発現させるための発現プラスミド pKX6, pKX10 は、大腸菌由来の *lac* プロモーターを持つ発現ベクター pKK223-3 のポリリンカー部位内に、WHV₂ の X 領域 141 アミノ酸残基全てをコードする DNA 断片を挿入することにより構成した。*lac* プロモーターは、大腸菌の *trp* プロモーターの -35 配列と *lac* UV5 プロモーターの -10 配列を融合させたハイブリッド・プロモーターで、強い転写活性を有する。これまでの HBV の X 遺伝子の発現系は、SV40 VP2 蛋白⁷⁾、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ蛋白⁸⁾¹⁴⁾、大腸菌アンスラニル酸シンターゼ蛋白¹⁵⁾ の N 末端部分と X 蛋白との融合蛋白の産生系であり、翻訳開始 ATG コドンは X 蛋白のものを用いておらず、X 蛋白の N 末端から 9~22 残基を欠いたものである。しかし、筆者の系では、翻訳開始コドンは WHV X 遺伝子の第 1 位の ATG コドンを使用することになり、融合していない (non-fused), full-length の X 蛋白が産生されると考えられた。

図 1 に pKX6, pKX10 の作製手順を示す。pWH81 を Nco I で部分消化し、X 遺伝子の N 末端の Nco I 部分から pBR325 のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (Cm^r) 遺伝子の Nco I 部位まで 1.9 kbp の DNA 断片を切り出した後、基質存在下 Klenow fragment により repair し、Hin d III にて消化、X 遺伝子全てを含む 668bp の DNA 断片を得た。これとは別に、発現ベクター pKK223-3 を Eco RI 消化した後、これを 2 つに分け、一方はヌクレアーゼ S₁ 処理、他方は基質存在下 Klenow fragment により repair した。両者を Hin d III 消化し、これに先の WHV 668bp 断片を T₄ リガーゼにより挿入、閉環した。ベクターの nuclease S₁ 処理又は repair 処理により、ベクター内 Shine-Dalgarno 配列 (AGGA) から X 遺伝子の ATG コドンまでの間が、6bp と 10bp の二種類のプラスミド pKX6, pKX10 がそれぞれ作製された。なお、転写終結は、挿入配列下流の *rrmB* T₁T₂ ターミネーター¹⁶⁾ により行われる。

II. マキシセル法による WHV X 遺伝子産物の発現

発現プラスミド pKX6, pKX10 を大腸菌 JM105 に

導入した. *lac* オペロンは, JM105 のような *lac* ⁱ 宿主内では抑制 (repress) されており, IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) 添加により脱抑制 (derepress) される⁹⁾. pKX6, pKX10 形質転換 JM105 を, IPTG 存在下, 非存在下で ³⁵S-メチオニンによりパルス標識を行ったが, X 遺伝子挿入に起因すると考えられるバンドは認められなかった (結果示さず). 外来性遺伝子を大腸菌内で発現させると, 内在性プロテアーゼ活性により分解され, 見かけ上の発現量が低下することが観察されており¹⁷⁾, 形質転換 JM105 内で, X 遺伝子産物特異的なバンドが認められないことの原因として, この可能性が考えられた.

プロテアーゼ欠損 (*lon*⁻) 株である大腸菌 SG12036 に, pKX6, pKX10 を導し, パルス標識後, 生成蛋白を JM105 の結果と比較したが, X 遺伝子産物特異的なバンドは認められなかった (結果示さず). このことから, 内在性プロテアーゼ活性による分解の可能性は否定された.

次に, マキシセル法¹⁸⁾による発現を試みた. *recA*, *uvrA* の宿主 N17-9 に, pKX6, pKX10 を導入し, 常法に従って ³⁵S-メチオニンによる標識を行い, 発現蛋白を SDS-PAGE により解析した (図 2). pKX10 の場合, 3つのバンドが同定された. このうちもっとも大きい 27Kd のバンドは, β -ラクタマーゼ (*bla*) によるもので, pBR328 の *bla* 遺伝子産物のバンドと一致する. 17Kd のバンドは, X 遺伝子産物の分子量がそのアミノ酸配列から 15,195 と推測されることから, X 蛋白によるものと考えられる. また, 11Kd のバンドは, C 遺伝子の N 末端由来の蛋白であろうと推測される. 発現ベクター-pKK223-3 では, *bla* 蛋白の 27Kd のバンドのみであることから, pKX10 の付加的な 2本のバンドは, 新たに挿入 WHV 配列由来であることもこの裏付けとなる. pKX6 の場合, 17Kd のバンドは認められず, このことから, Shine-Dalgarno 配列から ATG コドンまでの間が, 6bp では短かすぎ, 10bp が適当であることが明らかとなった.

III. pKX10 由来変異プラスミドの作製と発現蛋白の解析

pKX10 により産生された 17Kd, 11Kd の 2つ蛋白が X 蛋白及び C 抗原 N 末端部分由来蛋白であることを確認するために, pKX10 内の WHV 断片内にフレームシフト変異及び欠損変異を導入し, 産生蛋白の変化を解析した.

まず, pKX10 の Nco I 部位を開裂し, 基質存在下 Klenow fragment により repair した後, T₄ リガーゼにより閉環し, フレームシフト・プラスミド pKX10-N を作製した (図 3). X 遺伝子は, 1503 位の ATG コド

ンから翻訳が開始され, 1926 位の TAA コドンにより翻訳が終結する. しかし, 1741位の Nco I 部位に+1のフレームシフトを導入すると, 1802 位に新たに TAA コドンが出現してここで翻訳が停止する. そのため, 産生される蛋白は約 30%短くなり, また, メチオニンコドンも 4 から 1 へと減少するため, 放射性標識量も大幅に減少することが予想される. pKX10-N マキシセル法により蛋白発現後, SDS-PAGE で解析したところ (図 4), 予想通り 17Kd のバンドが消失した.

次に, pKX10 の Hin d III 部位を開裂し, repair 後閉環し pKX10-H を制作した (図 3). このプラスミドは, pKX10 に比べ Hin d III 部位が+1のフレームシフトを起こしているため, pKX10-N と同様な機構で, C 遺伝子とベクターとの結合部位のフレームのずれにより, 11Kd のバンドが消失するはずである. 図 4 に見られるように, 予想通り 11Kd のバンドが消失し, より低分子域に新たにバンドが生成した. なお, このレー

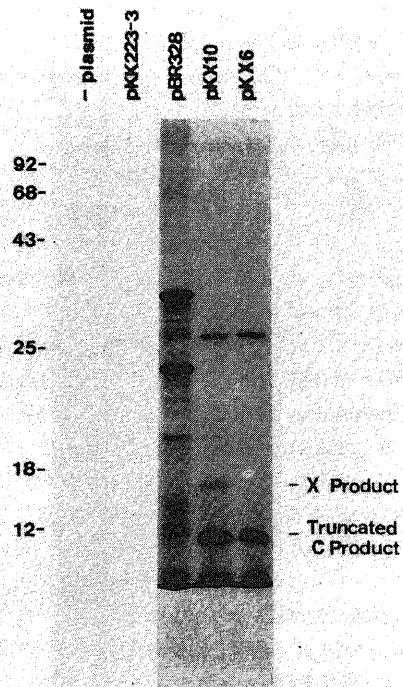


Fig. 2. SDS-PAGE of expression plasmid-coded proteins in maxi-cells. Twenty μ l of cell lysate are applied to each lane and electrophoresed in 15% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. As shown in lane "pKX10", two bands were detected due to the insertion of the WHV DNA fragment. The numbers (Kd) on the left indicate the position of size marker proteins.

ンで、17Kd バンドが pKX10 ののものにも比べややブロードになっているが、この理由は不明である。さらに、pKX10 を Bam HI, Nco I で開環し、repair 後開環して pKX10-BN を作製した (図 3)。このプラスミドは、*lac* プロモーター領域全てを欠損しているため、もし 17Kd と 11Kd の蛋白が WHV 断片を含む同一の mRNA から、ポリシストロニックな機構で産生されているならば、この pKX10-BN では、両者ともに消失するはずである。図 4 に示す通り、予想通りの結果が得られた。

以上の結果から、17Kd のバンドは X 遺伝子産物、11Kd は C 抗原 N 末端由来蛋白であり、両者は同一の mRNA からポリシストロニックな機構により産生されることが明らかとなった。

IV. 標識 X 蛋白を用いた血清中抗 X 抗体の検索

WHV がウッドチャックに感染後、実際に X 蛋白が産生しているとすれば、血清中に抗 X 抗体が検出される可能性がある。マキシセル法により標識 X 蛋白を産生後、大腸菌を溶菌し、WHs 抗原陽性、WHs 抗体陽性または、正常のウッドチャック血清を加え免疫沈澱し、Protein A Sepharose を用いて抗原抗体複合体を回収した。なお、対照群として pKK223-3 形質転換大

腸菌ライセートを用いた場合、特異的な蛋白の沈澱は認められなかった (結果示さず)。WHs 抗原又は WHs 抗体陽性の血清のうち 5 例で、抗 X 抗体との複合体形成により X 蛋白が回収され、17Kd の位置にバンドが検出された (図 5 レーン 2, 3, 4)。同時に、WHc 抗体により回収されたと考えられる 11Kd のバンドも 6 例で認められた。大腸菌ライセートでは、27Kd, 17Kd, 11Kd など多数のバンドが検出される (図 5 レーン 1) が、血清との免疫沈澱により回収されるのは 17Kd, 11Kd のみであり、しかも両者の回収量比が血清により異なることから、この免疫沈澱は特異的なものであると考えられる。また、HBe 抗原陽性、HBs 抗原陽性、及び正常のヒト血清を用いて、同様な免疫沈澱反応を行った (図 5)。その結果、HB 血清マーカー陽性のもので、3 例中 2 例に於て 17Kd のバンドが検出され、正常血清では何れも 17Kd のバンドを認めなかった。このことは、X 蛋白と C 蛋白には、WHV と HBV の間で各々共通抗原性があることを示唆する。

次に、WHV 関連血清マーカーの発現と抗 X 抗体の検出結果の関係を表 1 にまとめた。このうち上から 5 例は、剖検により肝細胞癌を認めた個体のものである。

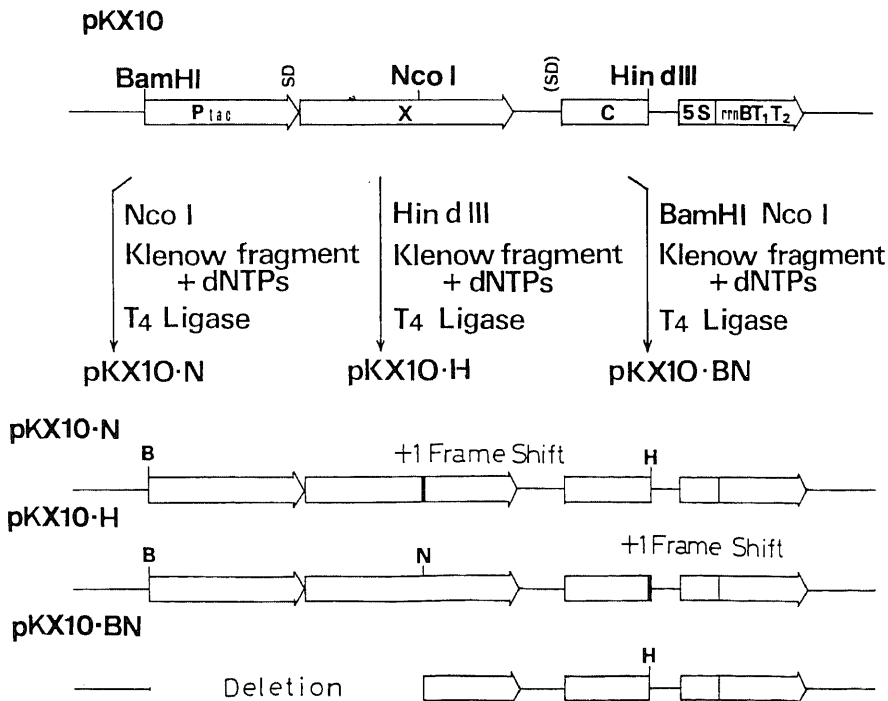


Fig. 3. Construction of frame-shifted plasmids, pKX10-N and pKX10-H, and deletion plasmid, pKX10-BN. The starting material was plasmid pKX10. The frame-shifted sites are indicated as the vertical thick-lines.

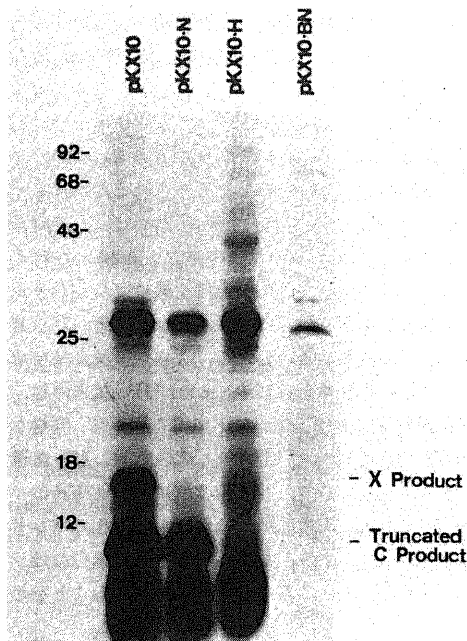


Fig. 4. SDS-PAGE of proteins produced in maxi-cells harboring frame-shifted or deletion plasmids. Samples were electrophoresed as Fig. 2. 17Kd or 11Kd band was disappeared by the frame-shifting at the Nco I or the Hin d III site, respectively. From this result, 17kd and 11kd proteins were deduced to X protein and truncated C protein, respectively.

S抗原陽性のもものでは8例中4例, S抗体陽性のもものでは2例中1例に於てX抗体を検出した。この中で, 肝細胞癌を発症した個体については5例中4例で抗X抗体を検出した。また, C抗体とX抗体の関連性については, C抗体陽性5例中4例でX抗体を, 逆にX抗体陽性5例中4例でC抗体を検出した。一方, WHV関連マーカー全て陰性のもものでは, 全例で抗X抗体は検出されなかった。WHV関連マーカー陽性の血清が, WHV感染後の関連抗原抗体系の変動過程の, どの位置にあるのかが不明なので, これ以上の詳細な解析はできないが, 以上の結果からX遺伝子産物がWHV感染ウッドチュックに於て, 産生されていることが明らかになった。

大腸菌X蛋白産生系はこのように, ウッドチュック血清の免疫化学的検索を可能にしたが, X蛋白の蛋白化学的, 酵素化学的の性質を解明するには, さらに高収率でよりX-特異的な産生系が必要となる。そこで次に, SP6-*in vitro* 転写系・ウサギ網状赤血球ライセート *in vitro* 翻訳系を用いたX蛋白の産生を試みた。

V. SP6依存性発現プラスミドの構成

X遺伝子を受細胞蛋白発現系により産生させるための発現プラスミド pSPX-1, pSPX-2 は, SP6プロモーターをもつ発現ベクター-pSP65のポリリンカー部に WHV₂ のX領域全てを含むDNA断片を挿入することにより構成した。SP6 RNAポリメラー

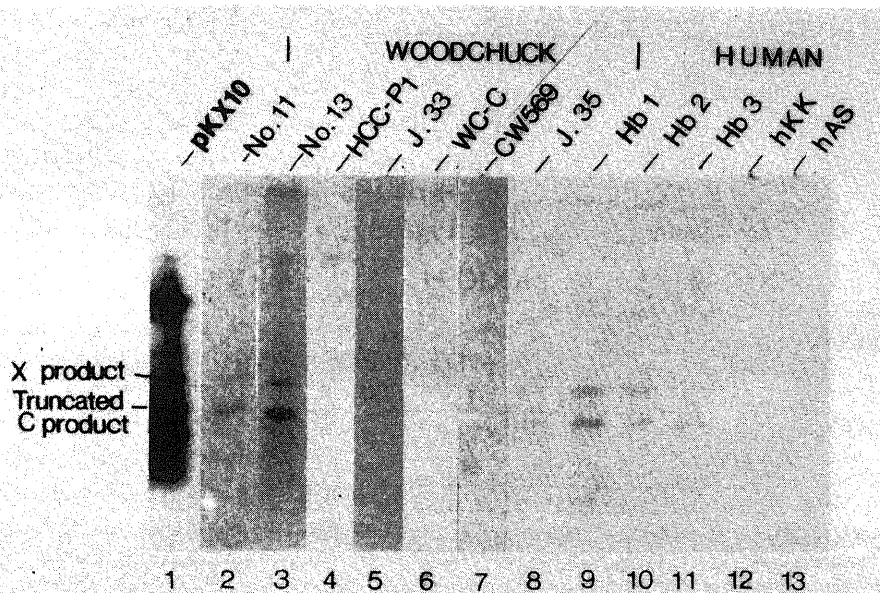


Fig. 5. Detection of anti-X antibody by immunoprecipitation using ³⁵S-methionine labeled maxi-cell lysates. Twenty μ l of sample was applied to each lane and electrophoresed in 15% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The position of X protein and truncated C protein are indicated on the left.

ぜは, SP6 プロモーターを選択的に認識して転写を行う, SP6 プロモーター下流に X 領域を挿入することにより, SP6 RNA ポリメラーゼを用いて単一な X-mRNA を高収率で得, これをウサギ網状赤血球ライセート無細胞蛋白合成系を用いて翻訳させることにより, X 蛋白が産生されると考えられた。

図 6 に pSPX-1, pSPX-2 の作製手順を示す。まず, WHV₂ DNA を, Nco I 部分消化, Hin d III 消化し, X 領域全てを含む 668bp 断片を得, これを repair した。これとは別に, WHV₂ DNA を Alu I 消化し X 領域を含む 508bp 断片を得た。これら 2 つの断片を各々 Sma I 消化 pMSG プラスミドに挿入し, MMTV LTR プロモーターに対し X 領域が順方向に挿入されているクローンを選択した。これを Nhe I, Sal I にて消化, X 領域を含む断片を回収後, 予め Xba I · Sal I 消化しておいた pSP65 に T₄ リガーゼにより挿入, 閉環した。これにより, SP6 プロモーター下流に X 領域が順方向に挿入された発現プラスミド pSPX-1, pSPX-2 を各々得た。

VI. 無細胞 X 蛋白発現系の反応条件の検討

pSPX-1 を用い *in vitro* 転写系及び翻訳系の反応条

件を検討した (図 7)。pSPX-1 を Hin d III 消化により開環し, 鋳型とした, ³²P-UTP を標識基質とし, 反応の基質濃度依存性を調べたところ (図 7-a), 0.5 mM が最適となり, X-RNA のみの単一の mRNA の産生が認められた。5'-cap 構造の有無は転写に影響を与えなかった。

つぎに翻訳反応の経時変化をみたところ (図 7-b), 反応開始後少なくとも 75 分間は, 反応は時間に比例して進行し, 5'-cap 構造の有無は翻訳反応に対しても影響を与えなかった。よって, 以後は mRNA に 5'-cap 構造を入れないこととした。

ウサギ網状赤血球ライセート翻訳系では, 蛋白の産生効率率は K⁺, Mg²⁺ 及び mRNA 濃度に大きく依存していることが知られている。この系ではライセート濃度が 40% (v/v) 以上でなければ効率良い翻訳が得られないことを考慮して, 三者の濃度依存性を検討したところ (図 7-c, d, e) [K⁺]=85mM, [Mg²⁺]=1.5mM, [X-mRNA]=0.017 μg/ml が最適濃度であることが明らかとなった。最適条件において産生された X 蛋白は, SDS-PAGE で事実上単一のバンドを与えた (図 8)。この系での ³⁵S-メチオニンの X 蛋白へのとりこ

Table 1. Detection of anti-X antibody in sera from woodchucks

Woodchuck	sAg	sAb	cAb	xAb
No. 5	+	-	+	+
No. 11	+	-	+	+
No. 13	+	-	+	+
W47	+	-	±	+
WC-HCC-P ₁	+	-	+	±
A-5-99	+	-	-	±
CW569	+	-	-	-
A-4-73	+	-	-	-
J33	-	+	±	±
J34	-	+	+	+
No. 21	-	-	-	-
J22	-	-	-	-
WC-Lar	-	-	-	-
WC-A	-	-	-	-
WC-F	-	-	-	-
P2	-	-	-	-

sAg, sAb, and cAb were detected by HBsAg-RIA, HBsAb-RIA and maxi-cell lysate immunoprecipitation method, respectively. Detection method of xAb was referred to "Materials and Methods". No. 5, No. 11, No. 13, W47 and WC-HCC-P₁ were individuals carrying hepatocellular carcinoma. +, positive; ±, pseudopositive; -, negative.

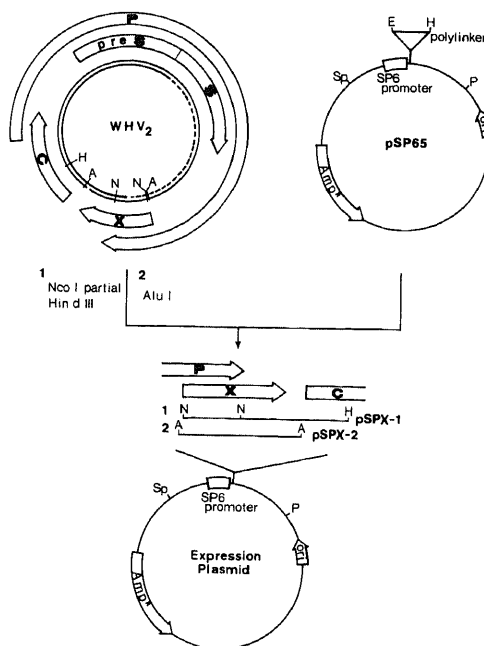


Fig. 6. Outline of the major steps in the construction of SP6-directed expression plasmid, pSPX-1 and pSPX-2. The actual starting material of WHV₂ is pWH81, which is indicated in Fig. 1. Further details are in "Results". H, Hin d III; A, Alu I; N, Nco I; E, Eco RI; Sp, Sph I and P, Pvu II.

み量は、大腸菌産生系に比べ標識基質当りニケタ以上上昇した。このように、無細胞 X 蛋白発現系により、予想通り高収率で選択的な X 蛋白の産生が可能となり、X 蛋白のさらに詳細な解析が可能となった。なお、pSPX-2 でも同様な結果が得られた。

VII. 無細胞発現系により産生された標識 X 蛋白を用いた血清中抗 X 抗体の検出

無細胞発現系産生 ^{35}S -メチオニン標識 X 蛋白を用いて、大腸菌産生系の標識蛋白と同様な方法にて、ウッドチャック血清中の抗 X 抗体の検出を試みた (図 9)。なお、対照群として WHV-C 遺伝子を pSP65 に

挿入し、無細胞発現系により産生させた C 抗原を用いた反応も同時に行った。

無細胞発現系産生 X 蛋白を用いた場合、大腸菌産生 X 蛋白を用いた場合に比べ (図 5 レーン 2, 3 と図 9), より少量の標識化合物の使用により、はるかに明瞭なバンドを与えた。WHV 非感染血清では、X 蛋白のバンドは検出されなかった (結果示さず)。なお、図 9 の全てのレーンで、クマジブリリアントブルーで染色される IgG の H 鎖と L 鎖に一致する領域に、2 つのバンドが認められるが、これは非特異的な沈澱によるものである。

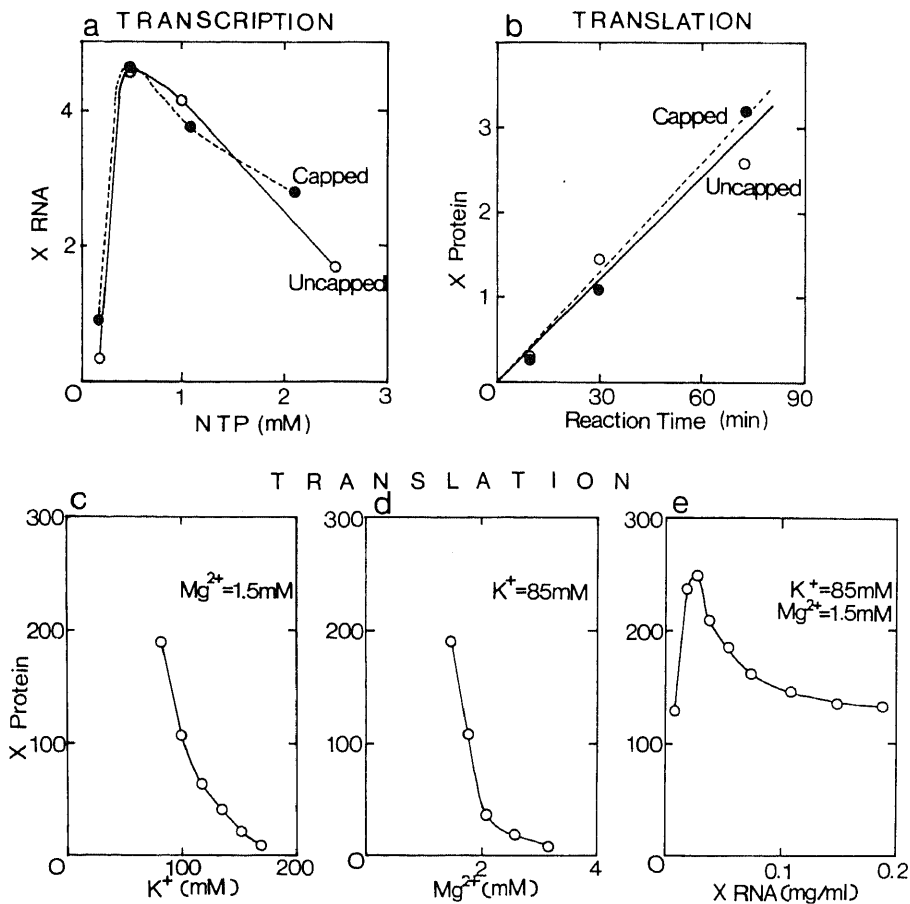


Fig. 7. Effect of concentration of reaction components on *in vitro* transcription and *in vitro* translation.

(a) Effect of concentration of nucleotide triphosphates on *in vitro* transcription. The results were plotted against NTPs concentrations. Vertical axis is indicated in an arbitrary scale. \circ , in the absence of capping analogue; \bullet , in the presence of capping analogue. (b) Time course of *in vitro* translation. Vertical axis is indicated in optimal scale. \circ and \bullet are same to (a). (c)-(e) Effect of concentration of K^+ , Mg^{2+} , and X-mRNA on *in vitro* translation. Production of X-mRNA or X protein during transcription or translation were measured by a densitometer after radioautography.

このように、検出感度の向上に伴って、血清中の抗 X 抗体レベルの定量的な比較も可能と考えられる。

考 察

HBV がヒトに感染後、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変を発症させ、さらには肝細胞癌の発症と密接な関連性を有していることは、疫学的に明らかとなっている¹⁾。しかしながら、HBV の感染が肝癌の発症に於て第一義的役割を持つのかそれとも副次的役割しか持っていないかは、分子生物学的レベルにおいては何ら明らかにされていない。HBV はこれまでの研究からがん遺伝子を持っていないことが明らかとなっており²⁾、がん遺伝子の宿主 DNA への挿入による発癌の可能性は明確に否定される。それゆえ、HBV と肝癌発生の関連性を解明するには、それ以外の機構をへた発癌の可能性を検討する必要がある、その端緒となるのは、HBV ウイルスゲノムの塩基配列およびコードされる遺伝子産物のもつ基本的性質の記載であるとする。

HBV の共通の祖先から進化した同族のウイルス群

(ヘパドナウイルス)が存在しており、群内のウイルスは宿主を異にするのに加え、病理学的性質にも顕著な差異を有することが知られている。ヘパドナウイルスに属する HBV, WHV, GSHV, DHBV (duck hepatitis B virus) のなかでは、WHV は HBV よりも強い発癌性を有し²¹⁾⁹⁾、宿主ウッドチャックは、感染後 2~3 年で肝硬変を経ずに肝癌を発症することが知られている。一方、GSHV は、WHV と極めて近縁のウイルスであるにもかかわらず、弱い発癌性を有するにすぎない⁴⁾²⁰⁾。筆者らは先に、ヘパドナウイルス 4 種 9 クロンの塩基配列、アミノ酸配列を定量的に比較し、ウイルスにコードされる 4 つの遺伝子の進化速度が各々異なり、X 遺伝子の進化速度が最も速いことを明らかにした³⁾。また、X 遺伝子の進化速度が、HBV 亜型間とリス肝炎ウイルス (WHV, GSHV) 間で異なる傾向があることを見いだした³⁾。X 遺伝子は非常に速い進化速度を持ちながらも、ORF のゲノム上での相対的位置、分子量、蛋白の一次構造の基本的特性などはよく保存されており、このことは X 遺伝子がウイルスの感染、複製あるいは肝疾患の発症過程の中で何らかの重要な性質を保持していることの反映であろうと考えた。こうしたことから、HBV と肝癌の関連性を解明する上で、この“未知の遺伝子”の性質の解明は重要であると考えられる。筆者らは、そのための第一段階として、X 遺伝子産物の *in vitro* での発現系の開発を試みた。出発 DNA は、先述のような理由のためヒト肝癌と HBV の関連を調べる有力な系とされるウツ

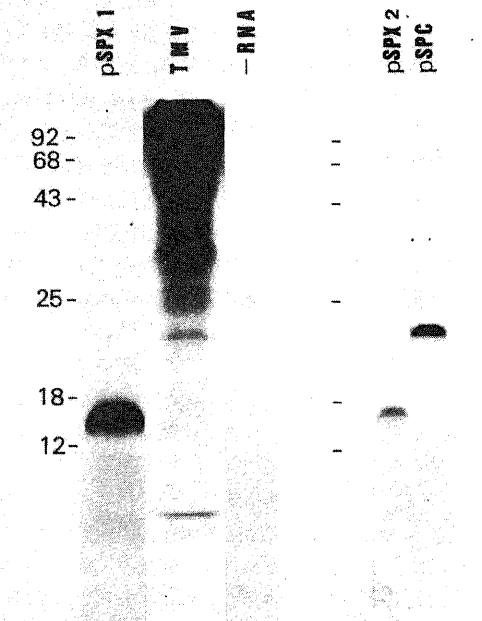


Fig. 8. Production of X protein by *in vitro* translation with the cell-free expression system using rabbit reticulocyte lysates. Two μ l of reaction mixtures were applied to each lanes and electrophoresed in 15% (w/v) SDS-polyacrylamide gel. The numbers (Kd) on the left indicate the position of size marker proteins. Shown is an autoradiogram of proteins translated *in vitro*.

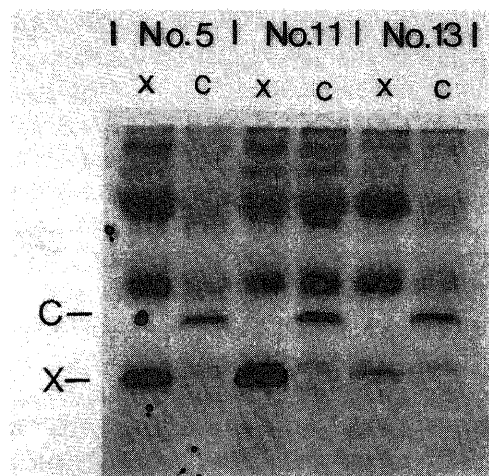


Fig. 9. Detection of anti-X antibody by immunoprecipitation using ³⁵S-methionine labeled X protein synthesized by the cell-free expression system. Further details are in "Materials and Methods".

ドチャック-WHV系からWHV DNAを用いた。

大腸菌発現プラスミドは、発現ベクター内の *tac* プロモーターの直下流にWHV X遺伝子本来の翻訳開始ATGコドンがくるように構築し、non-fusedのfull lengthのX遺伝子産生を発現させるようにした。これまで報告されたX蛋白産生系は、ほとんどが大腸菌蛋白などとの融合蛋白(fused protein)であり、X蛋白のN末端部分を欠き、その代わりに大腸菌 β -ガラクトシダーゼ¹⁴⁾、アンスラニル酸シンターゼ¹⁵⁾、ompF蛋白²¹⁾あるいはSV40 VP2蛋白⁷⁾などのN末端を有している。このように蛋白のN末端部分を別の蛋白で置換した場合、蛋白内の各領域を持つ抗原的性質は保持されるとしても、蛋白が、「分子」として保持している性質が変化してしまう可能性が考えられる。これは特に“未知の蛋白”の性質の記載においては特に注意すべきと考えられる。しかし、non-fusedでfull lengthの蛋白の場合、この危険性は回避される。

X蛋白産生はまず *lac i^q* 宿主を用い、IPTG添加により脱抑制(derepress)させることにより行ったが、十分な産生は得られなかった。Kayらも *lac Z*-HBx融合蛋白の産生を同様な系で行っているが²⁰⁾、lambda cI遺伝子の系で報告されているような高レベルの発現²²⁾には成功していない。この原因としては、i) X遺伝子と大腸菌のコドン使用頻度分布が大幅に違うため有効な翻訳ができない、ii) 産生されたX蛋白が大腸菌の内在性プロテアーゼ活性による分解されてしまうことが考えられる。X遺伝子と大腸菌コドン使用頻度分布(Ogasawara私信)の比較を行ったところ、X遺伝子内に頻繁に出現するアミノ酸コドンの使用頻度が、大腸菌では低いなどの結果が得られたが、現在のところ定量的比較を行う指標を持っていないため、この可能性は肯定も否定もできなかった。後者については、*lon⁻* 変異株を用いてX蛋白を産生させたが、発現量が増加しなかったので否定された。Chisakaら¹⁹⁾は、 Δ *rpoH* 株でHBxのN末端9アミノ酸を大腸菌 *trpE* 蛋白のN末端で置換した融合蛋白を用いておりこれらの差異が筆者らの結果との違いの原因となっていることが考えられる。

宿主を *recA. uvrA* 株とし、マキシセル法を用いたところX蛋白の産生が確認された。この方法は、コピー数の多いプラスミドにコードされる蛋白の産生に有効である。マキシセル法により産生された標識X蛋白を用いて、ウッドチャックおよびヒト血清中の抗X抗体の検索を行ったところ、両者で抗X抗体が検出された。HBVとWHVでは、X蛋白の配列がかなり違うにもかかわらず、このような交叉反応性がみとめられることは、各々のX蛋白の抗原的性質に有意な類似

性があることを示唆する。筆者らは先に、WHVとHBVのX蛋白のアミノ酸配列およびハイドロパシー・プロットを比較し、両者共、蛋白中央部とN末端部分に強い疎水性の領域を認めるなど、いくつかの構造の類似性を見いだしたが(結果示さず)、このこととも一致する。ウッドチャックでの抗X抗体検索の結果を、他の血清中WHVマーカーと比較すると、S抗原陽性では8例中4例で、S抗体陽性2例中1例で、また担癌個体(全例S抗原陽性)では5例中4例において、X抗原産生の履歴を認めた。WHV感染後の血清マーカー遷移のどの段階で採血したのが不明のため、詳細な検討ができないが、Moriartyら⁷⁾、Kayら⁸⁾、Meyersら¹⁴⁾が、HBVに感染したヒト血相中の抗HBx抗体を検索した結果と比較すると、全体としてのX抗体陽性血清率は、ウッドチャックのほうが高い値を示した。また、担癌個体の陽性率は、Moriartyらの肝細胞癌患者の値(72.7%)とよく似た値であった。このことは、肝炎ウイルス感染者が肝癌まで移行する率がウッドチャックのほうがヒトより高いことと、何らかの関連性がある可能性を示唆する。また、担癌個体または患者での陽性率がよく似た値を示すことは、発癌過程でのX蛋白の寄与が二つのウイルスで似ていることの反映なのかもしれない。しかしながら、MoriartyらがX蛋白の一部に対応する合成ペプチドに対して調製した抗血清を用いて、HBV感染患者血清から検出した28Kdの蛋白は、他の研究者によっては全く検出されないなど、批判的な見解も存在するため、さらに検討を進める必要がある。

他のHBマーカーとHBxとの関連は、抗X抗体と抗HB_e抗体に緩やかな相関があり他のマーカーとはあまり相関がないという報告¹⁴⁾や、X抗体の発現はC抗体の発現と相関しているという報告²³⁾など相反する報告があり、現在のところ一致した見解はない。筆者らの結果では、C抗体とX抗体の発現は相互に80%の確率で重複が認められ、後者との類似性を示した。

マキシセル法により産生したX蛋白により以上のようにいくつかの興味ある知見が得られたが、その産生量はX蛋白の蛋白化学的・酵素化学的性質の解析のためには少なすぎ、また紫外線照射量のズレにより宿主蛋白の産生量の上昇がみられる時があり、操作が煩雑などの欠点があった。本研究の後半で検討したSP6-ウサギ網状赤血球ライセート系を用いた *in vitro* 産生系は、これらの欠点の多くを克服した。これまで、大腸菌産生X蛋白で行った免疫学的解析を *in vitro* 産生蛋白で反復し、より高感度で良好な結果を得ている。

最近、X蛋白の細胞内局在や蛋白としての機能に関する知見が得られつつあり¹⁵⁾²⁴⁾、またX遺伝子とがん

遺伝子の機能関連性を示唆する報告もではじめている。今後、X 遺伝子産生の蛋白としての基本的性質の記載は、より重要になると思われ、*in vitro* 産生系を用いた X 蛋白の研究はこの面で有効性を発揮すると思われる。

結 論

WHV の X 遺伝子を、*in vitro* 産生系により発現させ、生成した X 蛋白を用いて免疫学的方法により、WHV 感染ウッドチャック血清中に抗 X 抗体を検出し、以下の結論を得た。

1. WHV の X 遺伝子全てを含む DNA 断片を大腸菌発現ベクター-pKK223-3 に挿入し、発現プラスミド pKX10 を作製した。

2. pKX10 にコードされる蛋白をマキシセル法により発現させ、挿入 DNA 断片特異的な 17Kd, 11Kd の二種の蛋白を同定した。フレームシフト変異、欠損変異を pKX10 内に導入することにより 17Kd は X 蛋白、11Kd は C 抗原 N 末端部分由来の融合蛋白であることを明らかにした。

3. 生成した ³⁵S-メチオニン標識 X 蛋白を含むマキシセル溶出液を用いた免疫沈澱により、WHV 感染ウッドチャック血清より抗 X 抗体を検出した。

4. X 蛋白発現効率の向上と操作の簡便化のため、SP6-依存性発現プラスミド pSPX-1 及び pSPX-2 を作製した。

5. pSPX-1 を SP6 RNA ポリメラーゼで転写後、ウサギ網状赤血球ライセートにより無細胞的に翻訳させ、X 蛋白を高収率でしかも簡便に産生させた。産生した X 蛋白により、抗 X 抗体を大腸菌産生系に比べ高感度で検出した。pSPX-2 でも同様な結果を得た。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、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大阪大学医学部遺伝学講座吉川寛教授、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いたします。併せて、本研究の遂行に際し、多大の御指導、御協力を賜りました金沢大学がん研究所生物物理部門の諸先生方に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第 60 回日本生化学会大会 (1987 年度、金沢) で発表した。

文 献

1) Beasley, R., Hwang, L. Y. & Lin, C. C.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet*, 2, 1129-1132 (1981).
 2) Summers, J., Smolec, J. M. & Snyder, R.: A

virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 4533-4537 (1978).

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

4) Marion, P. L., Oshiro, L. S. & Regnery, D. C.: A virus in beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of human. *Proc. Natl. Acad. USA.*, 77, 2941-2945 (1980).

5) Mason, W. S., Seal, G. & Summers, J.: Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.*, 36, 829-836 (1980).

6) Tiollais, P., Pourcel, C. & Dejian, A.: The hepatitis B virus. *Nature*, 317, 489-495 (1985).

7) Moriarty, A. M., Alexander, H. & Lernaer, R. A.: Antibodies to peptides detect new hepatitis B antigen: Serological correlation with hepatocellular carcinoma. *Science*, 227, 429-432 (1985).

8) Kay, A., Mandart, E. & Trepo, C.: The HBV HBx gene expressed in *E. coli* is recognized by sera from hepatitis patients. *EMBO J.*, 4, 1287-1292 (1985).

9) deBoer, H. A., Comstock, L. J. & Vasser, M.: The *lac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 21-25 (1983).

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

11) Schwyzer, M.: Early proteins of oncogenic DNA viruses. *INSERM, France*, 63-68 (1977).

12) Bonner, W. M. & Laskey, R. A.: A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.*, 46, 83-88 (1974).

13) Shimoda, A., Kuroki, K. & Unoura, M.: Expression of preC-C and C of human hepatitis B virus and woodchuck hepatitis virus in HeLa cells. 1987 Meeting on hepatitis B virus, Cold Spring Harbor, NY., p24.

14) Meyers, M. L., Trepo, L. V. & Nath, N.: Hepatitis B virus peptide X: Expression in *Escherichia coli* and identification of specific antibodies in sera from hepatitis B virus-infected

humans. *J. Virol.*, **57**, 101-109 (1986).

15) Chisaka, O., Araki, K. & Ochiya, T. : Purification of hepatitis B virus X gene product synthesized in *Escherichia coli* and its detection in a human hepatoblastoma cell line producing hepatitis B virus. (in press to *Gene*).

16) Brosius, J., Dull, T. & Sleeter, D. D. : Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **148**, 107-127 (1981).

17) Ishii, S., Kuroki, K. & Sugino, Y. : Purification and characterization of the N gene product of bacteriophage lambda. *Gene*, **10**, 291-300 (1980).

18) Sancar, A., Hack, A. M. & Rupp, W. D. : Simple method for identification of plasmid-coded proteins. *J. Bacteriol.*, **137**, 692-693 (1981).

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

20) Marion, P. L., Van Davelaar M. J. & Knight, S. S. : Hepatocellular carcinoma in ground squirrels persistently infected with ground

squirrel hepatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 4543-4546 (1986).

21) Elfassi, E., Heseltine, W. A. & Dienstag, J. L. : Detection of hepatitis B virus X product using an open reading frame *Escherichia coli* expression vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 2219-2222 (1986).

22) Amman, E., Brosius, J. & Ptashne, M. : Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, **25**, 167-178 (1983).

23) Vitritski, L., Meyers, M. L. & Sninski, J. J. : Immunofluorescent studies of hepadna X gene products expression in liver of man, woodchuck and duck : Evidence for crossreactivity and correlation with replication. 1986 Meeting on hepatitis B virus, Cold Spring Harbor, NY., p78.

24) Siddiqui, A., Jameel, S. & Mapoles, J. : Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 2513-2517 (1987).

Expression of X Gene Product of Woodchuck Hepatitis Virus in *Escherichia coli* and *In Vitro* System Kazuya Kodama, Division of Biophysics, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 246—259 (1988)

Key words : woodchuck hepatitis virus, X protein, expression vector, immunoprecipitation

Abstract

All members of viruses in hepadnaviridae which includes human hepatitis B virus (HBV), have well conserved structure of virus genomes. Among the 4 open reading frames (ORFs) in the genomes, X ORF is unknown in its functions and localization. Sequence comparisons and circumstantial evidence have been accumulating to suggest that X gene product has some important functions for pathological processes related to the HBV infection. Basic approaches of expression or production of X protein are important to understand the biological function of X gene. With this aim, I succeeded in establishing expression systems of X protein of woodchuck hepatitis virus (WHV), which has been known as the most oncogenic one among hepadnaviridae. An expression plasmid, pKX-10, was constructed by insertion of WHV X ORF in the downstream of *tac* promoter and the ribosome-binding sequence of an expression vector, pKK223-3, in *E. coli*. Plasmid coded proteins were expressed by the maxi-cell method. The two bands, 17Kd and 11Kd, were detected by the SDS-PAGE due to the insertion of the DNA. From the products analysis of frame-shifted and deletion plasmids derived from pKX-10, it was concluded that 17Kd protein is X gene product and 11Kd protein is the protein containing the N-terminal region of C gene. The presence of anti-X-antibodies in sera from WHV-infected woodchucks could be

detected by the immunoprecipitation method using ^{35}S -methionine labeled lysates, although it was not detected in those from WHV-uninfected woodchucks. *In vitro* transcription-translation system was applied to obtain X protein in a larger amount and higher specific activity. The SP6-directed expression plasmids, pSPX-1 and pSPX-2, were constructed and transcribed *in vitro* by SP6 RNA polymerase. X protein was specifically produced from these in translation system *in vitro* by rabbit reticulocyte lysates. Immunochemical analysis using the *in vitro* product gave higher sensitivity than that using the expression system in *E. coli*.