ヒトB型肝炎ウイルス及びウッドチャック肝炎ウイルスのPreC-C及びC遺伝子のHeLa細胞における発現

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: 下田, 敦
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8013

金沢大学十全医学会雑誌　第97巻　第1号　179－190（1988）

ヒトB型肝炎ウイルス及びウッドチャック肝炎ウイルスのPreC-C及びC遺伝子のHeLa細胞における発現

金沢大学内科学第一講座（主任：服部　信教授）
下　田　　敦

（昭和63年1月27日受付）

ヘパドナウイルスのプレコア含有C遺伝子（PreC-C）は，2種のポリペプタイドすなわちPreC-CとCとをコードし，これらはウイルスの生活環において異なった役割を持っていると考えられる．今回，著者は個別にこの2つのペプタイドが安定に発現する動物培養細胞系を作製した．ウッドチャック肝炎ウイルス（WHV2）および，ヒトB型肝炎ウイルス（HBVadr）ゲノムのPreC-CまたはC遺伝子を，*Eco gpt*選択可能な発現ベクターpMSGのマウス乳癌ウイルス（MMTV）LTRの下流のポリリンカー部位に挿入した．これらのプラスミドDNAをリン酸カルシウムとの共沈澱法により，HeLa細胞にトランスフェクトした．GPT耐性株数は単位DNA量当り同程度であり，その出現頻度はPreC含有の有無に関係なく，またWHV, HBVの別に関係なくほぼ一定であって，PreC-CやCの発現が，HeLa細胞に対して細胞障害を与えることを示すに至らなかった．DNAとRNAはグアニジン・イソチオシアネイト法を用いて抽出し分析した．WHV PreC-C 6株，WHV C 5株，HBV PreC-C 3株，HBV C 5株についてDNAの組み込み様式をサザンブロッティングにより検討し，導入したプラスミドDNAのタンデムな組み込みが認められた．ノーザンブロッティングにより比較検討したところ，PreC-C及びCの各クローンごとに発現量に大きな差が認められた．また，デキサメサゾン添加により全mRNA量は約10倍の増加を示した．HBV PreC-Cを持つクローンにおいて，Slマッピングを行なったところ，転写はMMTV LTRのプロモーターを用いて行われていることが確認された．免疫組織学的染色法により，コア蛋白の存在を確認した．1次抗体としてマウス抗HBc IgG，2次抗体としてビオチン化抗マウスIgGを用いさらに，アルカリフォスファターゼ基質により赤色に発色させた．HBV PreC-C遺伝子が組み込まれた細胞株では，コア蛋白が細胞質にび漫性に存在する傾向が認められ，一方，HBV C遺伝子が組み込まれた細胞株では，コア蛋白は核に存在する傾向が認められた．同様な傾向がWHV DNA含有株でも認められた．

Key words　hepadna virus, HBV, WHV, core antigen, e antigen

血中HBe抗原はヒトB型肝炎の感染性のマーカーあるいはB型慢性肝炎の活動性のマーカーと言われ，ヒトB型肝炎ウイルス（hepatitis B virus, HBV）産生状態を知る有力な手がかりである[1]．この可溶性蛋白はコア粒子中にも証明され，HBc抗原の蛋白分解処理によって出現することが解明された[2]．これによりHBV構成蛋白に関する抗原抗体系はS抗原抗体系及びC-e抗原抗体系として系統だった理解が可能となった．S遺伝子と同様にC蛋白遺伝子にもPreC配列が存在することがDNA配列から読み取れ，さらにPreC-C蛋白の確認が最近行なわれるとともに，PreC-CとCが異なった挙動を示すことが示唆された[3]．HBV産生時におけるHBc及びHBe抗原の生成機構と局在と分泌機構の解明は肝炎の病像を理解する上からも重要な課題であり，PreCの機能解明が急がれた．今回，著者はPreC-CとCの発現系を動物細胞系で構

Abbreviations: [α-^{32}P] dCTP, deoxycytidine 5'-[α-^{32}P] triphosphate; HBV, hepatitis B virus; LTR, long terminal repeat; MMTV, murine mammary tumor virus; PBS, phosphate-buffered saline; SDS, sodium laurylsulfate; SV 40, simian virus 40; WHV, woodchuck hepatitis virus.

成し，その発現の調節を可能としたので報告する．

材料および方法

I．使用菌株およびプラスミド

1．使用菌株

大腸菌 HB101 株をプラスミドの形質転換宿主として用い，各種形質転換株より，プラスミドの調製を行なった．

2．プラスミド

pMSG は図 1 に示すように MMTV の LTR, SV40 の初期スプライス領域，同ポリアデニレーション領域，同初期プロモーター領域，および大腸菌 gpt 遺伝子を含んでいる．MMTV の LTR 内にホルモン受容体があり，グルココルチコイドにより MMTV の LTR の下流の遺伝子発現が誘導される．

II．試 薬 類

特に会社名の記載のない各種制限酵素は宝酒造株式会社の製品を，アガロースは宝酒造株式会社の製品を，低融点アガロースは FMC コーポレーション（U.S.A.）のシープラークアガロースを用いた．ニックトランスレーションキットはベーリンガー・マンハイム山之内株式会社，マルチプライム DNA ラベリングシステム（コード RPN.1601）および［α-^{32}P］dCTP（>3000 Ci/mmol）はいずれもアマシャム・ジャパン株式会社から購入した．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株式会社の製品を用いた．

III．プラスミド DNA の調整及び形質転換

1．プラスミド DNA の調整

プラスミド DNA は大腸菌 HB101 株から Birnboim-Doly の方法[4]に従って抽出した．

2．形質転換

プラスミド DNA 及び組み換え体 DNA は塩化カルシウム法[5]に従って大腸菌 HB101 株に導入した．

IV．培養細胞及び発現誘導

HeLa 細胞は非働化（56°C，30 分）10%牛胎児血清（BOCKNEK ラボラトリーズ，カナダ）含有イーグル MEM 培地（日水製薬株式会社）で培養した．この培地には，さらに L-グルタミン（最終濃度；0.03%），7 % 炭酸水素ナトリウム（最終濃度；0.15%）（大塚製薬株式会社），硫酸カナマイシン（最終濃度；0.05 mg/ml）（山之内製薬株式会社）を添加した．

MMTV LTR による発現誘導の条件は，トランスフェクト後 24 時間でデキサメサゾン（SIGMA ケミカルカンパニー，U.S.A.）1 μM 添加後 16 時間以上処理した[6]．

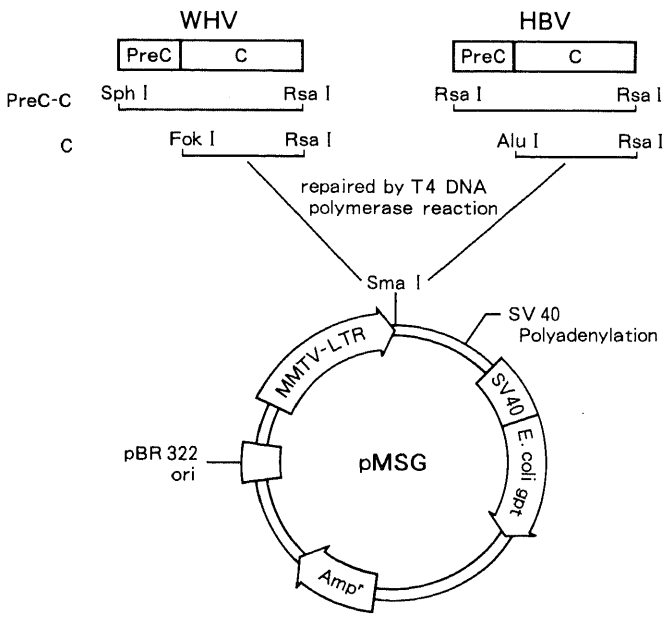

Fig. 1. Plasmid DNA construction.
PreC-C or C region fragment of cloned WHV2 or HBVadr was inserted into the polylinker site downstream to MMTV LTR of pMSG plasmid having *Ecogpt* gene as the selective marker.

V．組み換えDNAの作成及び培養細胞への導入

1．組み換えDNAの作成

1）pMSGベクター

発現ベクターpMSGのMMTV LTR下流のポリリンカー部位を制限酵素Sma Iで消化し，フェノール・クロロホルム抽出，エタノール沈澱後CIP処理（仔牛小腸由来アルカリ性フォスファターゼ0.25 U/DNA μg, 37°C 2時間)(ベーリンガー・マンハイム，西ドイツ)した．非活性化は25 mM EDTA, 0.5% SDS, 65°C 1時間で行ない，フェノール・クロロホルムによる有機溶媒抽出をさらに3回繰り返した．

2）ウッドチャック肝炎ウイルス（woodchuck hepatitis virus, WHV）PreC-Cの作成

WHV2ゲノムを縦列配列（tandem）に持つプラスミドpSVNWより制限酵素Eco RIを用いて3.3 kbpのDNA断片を単離した．さらにこれより図1左に示すように，プレコア含有C遺伝子（1931－2584）を含むDNA断片を単離するためにSph I，Rsa Iを用いて二重消化し，Sph I（1912)-Rsa I（2595)から成るPreC-C断片を得た．T4 DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を利用して，Sph I（1912）の付着末端を平滑化し発現ベクターpMSGのMMTV LTR下流のSma I部位に順方向に挿入し，WHV PreC-Cを作成した．

3）WHV Cの作成

同様に3.3 kbpのEco RI断片よりC遺伝子（2021－2584）を含むDNA断片を単離するためにFok I消化し，200 bpのFok I断片（2006－2206)を4％ポリアクリルアミドゲルにて分離回収した．このFok I断片（2006－2206）をCIP処理したうえで，Hind III消化し184 bpのFok I（2006)-Hind III（2190）断片を得た．また一方3.3 kbpのEco RI断片をHind IIIとRsa Iを用いて二重消化し405 bpのHind III（2190)-Rsa I（2595)断片を分離回収した．これらの二つの断片をT4 DNAリガーゼを用いてHind III末端で結合させた．この時Rsa I末端での再結合を防ぐために，再度制限酵素Rsa Iで消化した．CIP処理したFok I（2006）末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼで再び燐酸化し，Klenowフラグメントにて Fok Iの付着末端を平滑化し，発現ベクターpMSGのMMTV LTR下流のSma I部位に順方向に挿入し，WHV Cを作成した．

4）HBV PreC-Cの作成

HBVadrゲノムを持つプラスミドpBHB4より制限酵素Bam HIを用いて3.2 kbpのDNA断片を単離した．さらにこれより図1右に示すように，プレコア含有C遺伝子（1696－2324）を含むDNA断片を単離するためにRsa Iを用いて消化し，Rsa I（1642)-Rsa I（2377)から成るPreC-C断片を得た．これを発現ベクターpMSGのMMTV LTR下流のSma I部位に順方向に挿入し，HBV PreC-Cを作成した．

5）HBV Cの作成

同様に3.2 kbpのBam HI断片よりC遺伝子（1773－2324)を含むDNA断片を単離するために，4）で得たRsa I（1642)-Rsa I（2377）断片をAlu Iで部分消化し，630 bpのAlu I（1747)-Rsa I（2377）断片を4％ポリアクリルアミドゲルにて分離回収した．この断片を発現ベクターpMSGのMMTV LTR下流のSma I部位に順方向に挿入し，HBV Cを作成した．

6）培養細胞への導入

これらのプラスミドDNAを燐酸カルシウムとの共沈澱法[7]により10～30％コンフルエントのHeLa細胞にトランスフェクトした．プラスミドDNA量は直径10 cmディシュ当り10 μgとした．24から48時間後HAT培地[8]にてGPT選択をかけ，約3週間後にGPT耐性トランスフォーマントを単離した．HAT培地は，前述の10％牛胎児血清含有MEM培地に50×HAT溶液（Flowラボラトリーズ，英国)，アミノプテリン（2 μg/ml)，ミコフェノール酸（25 μg/ml)（SIGMAケミカルカンパニー，U.S.A.)，グリシン（10 μg/ml）及びキサンチン（250 μg/ml, pH 10.5）を加えて作製した．そのほかに培養細胞株として，WH257GE10[9]，PLC/PRF/5[10]，Hep-G2[11]，HuH-7[12]を用いた．

VI．サザン及びノーザン・ハイブリダイゼイション

RNA及びDNAは，グアニジン・イソチオシアネイト法[13]を用いて同時に抽出した．

1．サザン・ハイブリダイゼイション

サザン・ハイブリダイゼイション[14]は，培養細胞より抽出した場合は，10 μgのDNA試料を，プラスミドDNAの場合は，約0.5～1.0 μgを，0.5 μg/mlのエチジウム・ブロマイドを含む1.0％アガロースの水平ゲルにのせ電気泳動にて分画した．泳動結果を撮影後，アルカリ処理（1.5 M塩化ナトリウム，0.5 M水酸化ナトリウム)を30分行ない次いで中和処理（1.5 M塩化ナトリウム，0.5 M Tris-HCl pH 7.2，1 mMエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム)を30分行ない，毛細管現象によりナイロン膜Hybond-N（アマシャム・ジャパン株式会社)にブロットし，DNAの吸着面を下にして5分間紫外線照射した．プレハイブリダイゼーションは，プレハイブリダイゼーション溶液（0.9 M塩化ナトリウム，90 mMクエン酸三ナトリウム，0.1％牛血清アルブミン（生化学工業株式会社)，0.1％フィ

コール（SIGMA ケミカルカンパニー, U.S.A.), 0.1%ポリビニルピロリドン（SIGMA ケミカルカンパニー, U.S.A.), 0.5%ドデシル硫酸ナトリウム（半井化学薬品株式会社), 100 μg/ml 変性サケ精子 DNA (SIGMA ケミカルカンパニー, U.S.A.) 中で 65°C, 1 時間以上行なった. プレハイブリダイゼーション溶液を除去後, プローブ DNA を含む新たなプレハイブリダイゼーション溶液を加え, 65°C でハイブリダイゼーションを 16 時間以上行なった. Hybond-N フィルターの洗浄は, 洗浄溶液（0.3 M 塩化ナトリウム, 30 mM クエン酸三ナトリウム, 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム）により, 65°C, 30 分処理を 2 回繰り返した. フィルターは, −80°C で X 線フィルム X-Omat AR (Kodak, U.S.A.) に密着させ, 増感スクリーンを使いオートラジオグラフィーを 1 〜 2 日間行なった.

標識プローブの調整は, [α-^{32}P]dCTP（>3000 Ci/mmol）を標識基質としてニック・トランスレーション法[15]（比活性 1 〜 3 ×10^8 cpm/μg DNA）あるいはマルチプライム DNA ラベリングシステム[16]（比活性 1.8×10^9 cpm/μg DNA) にて行なった. ハイブリダイゼーション液中のプローブの濃度は, 前者では 10 ng/ml, 後者では 2.5 ng/ml とした. DNA の変性には 500 W 電子レンジで 5 分を要した.

2. ノーザン・ハイブリダイゼイション

ノーザン・ハイブリダイゼイション[17]は, 培養細胞より抽出した 10 μg の RNA 試料を, 変性ゲルシステムを用いて行なった. RNA 溶液には 50%ホルムアミド, 6 %ホルムアルデヒド, 20 mM 3-N-モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS), 5 mM 酢酸ナトリウム pH 7.0 及び 1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを加え, 65°C で 5 分間加熱した後, 氷中で急冷した. RNA は, 6 %ホルムアルデヒド, 20 mM 3-N-モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS), 5 mM 酢酸ナトリウム pH 7.0 及び 1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む 1.2%アガロースの水平ゲルにのせ電気泳動にて分画した. 泳動結果はエチジウム・ブロマイド 0.25 μg/ml, 0.07% β-メルカプトエタノール含有水溶液にて 12 時間染色後撮影した. RNA は毛細管現象によりニトロセルロース膜 BA 85 (Schleicher & Schuell, 西ドイツ) にブロットした後, 80°C, 2 時間処理にて固定した. プレハイブリダイゼーションは, プレハイブリダイゼーション溶液（50%ホルムアミド, 0.75 M 塩化ナトリウム, 75 mM クエン酸三ナトリウム, 0.1%牛血清アルブミン, 0.1%フィコール, 0.1%ポリビニルピロリドン, 50 mM 燐酸ナトリウム pH 6.5, 250 μg/ml 変性サケ精子 DNA 中で 42°C, 2 時間行なった. プレハイブリダイゼーション溶液を除去後, プローブ DNA を含むハイブリダイゼーション溶液（50%ホルムアミド, 0.75 M 塩化ナトリウム, 75 mM クエン酸三ナトリウム, 0.02%牛血清アルブミン, 0.02%フィコール, 0.02%ポリビニルピロリドン, 20 mM 燐酸ナトリウム pH 6.5, 10%デキストラン硫酸ナトリウム, 100 μg/ml 変性サケ精子 DNA を加え, 42°C でハイブリダイゼーションを 16 時間以上行なった. ニトロセルロースフィルターの洗浄は, 洗浄溶液（0.3 M 塩化ナトリウム, 30 mM クエン酸三ナトリウム, 0.1%ドデシル硫酸ナトリウム）により, 42°C, 30 分処理を 2 回繰り返した. フィルターは, −80°C で X 線フイルム X-Omat AR (Kodak, U.S.A.) に密着させ, 増感スクリーンを使いオートラジオグラフィーを 2 〜 3 日間行なった.

標識プローブの調整は, [α-^{32}P]dCTP（>3000 Ci/mmol）を標識基質として, ニック・トランスレーション法（比活性 1 〜 3 ×10^8 cpm/μg DNA）あるいはマルチプライム DNA ラベリングシステム（比活性 1.8×10^9 cpm/μg DNA) にて行なった. ハイブリダイゼーション液中のプローブの濃度は, 前者では 10 ng/ml 後者では 2.5 ng/ml とした.

VII. S1 マッピング

プラスミド DNA HBV PreC-C を Hind III 消化し, 有機溶媒抽出, エタノール沈澱した後, さらに Bgl II 消化し, 0.8%低融点アガロースを使用して 1667 bp のバンドを分画し, 透析膜チューブ（三光純薬株式会社）を用いて DNA を回収した. この 1667 bp の Hind III-Bgl II 断片を CIP 処理（仔牛小腸由来アルカリ性フォスファターゼ 0.2 U/DNA μg 37°C 30 分）し, 非活性化は 10 mM EDTA, 65°C 5 分で行ない, フェノール・クロロホルムによる有機溶媒抽出をさらに 3 回繰り返した. 次に, [γ-^{32}P] ATP（>4000 Ci/mmol）及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて 5' 末端をラベルした後, Cla I 消化し, 4 %ポリアクリルアミドで分画し, Cla I-Bgl II 断片 1340 bp の Bgl II 5' 末端をラベルしたものをプローブ DNA として回収した（図 4）. 回収は透析膜チューブを使用し, エタノール沈澱時にハイブリダイゼーションすべき RNA, HBV PreC-C 2 を 100 μg 加えた. ハイブリダイゼーションには 0.6 ml のミクロスピッツ（三光純薬株式会社）を使用した. ハイブリダイゼーション溶液（80%ホルムアミド, 0.4 M 塩化ナトリウム, 40 mM ピペラジン-N, N'-ビス 2-エタンスルホン酸 pH 6.4, 1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムクエン酸三ナトリウム）中で 80°C 5 分加熱し, その後 52°C で 16 時間以上処理し, 37°C まで自然冷却した. これに S1 緩衝液（30 mM 酢酸ナトリウム, pH 4.6, 0.3 M 塩化ナトリウム, 3

mM 硫酸亜鉛，10 μg/ml 牛胸腺変性 DNA 及び Sl ヌクレアーゼ 100 単位を加え，37°C 2 時間処理した．これをエタノール沈澱後 5 %ポリアクリルアミドゲル (8 M 尿素含有) にのせ，1000 V 4 時間電気泳動した．

Ⅷ．免疫組織染色法

HeLa 細胞は 12 穴ガラス板（ボクスイ・ブラウン株式会社）上で培養した．PBS を用い室温で 10 分間 2 回洗浄後，3.5%ホルムアミド（室温，20 分間）で固定した．その後 PBS（室温で 10 分間 2 回）洗浄し，ブロッキング血清含有 PBS-S で 37°C，30 分間処理後 1 次抗体として 100 倍 PBS-S 希釈のマウス抗ヒト C 抗原体（ミドリ十字）[18]を用い，37°C，1 時間処理した．PBS-S で室温，30 分間洗浄し，2 次抗体としてビオチン化抗マウス IgG 抗体（フナコシ薬品株式会社）を用い 37°C，1 時間反応させ，PBS-S で室温，10 分間洗浄後，アビジン DH（フナコシ薬品株式会社）及びビオチン化アルカリホスファターゼ H（フナコシ薬品株式会社）混合物と 37°C，1 時間反応させ，PBS-S で室温，10 分間洗浄後，アルカリホスファターゼ基質（0.1 M Tris-HCl pH 8.2 に溶解）により赤色に発色させた．

成　　績

Ⅰ．GPT 耐性トランスフォーマント

HeLa 細胞に WHV PreC-C, WHV C, HBV PreC-C, HBV C をトランスフェクト後 HAT 培地にて GPT 選択をかけ，約 3 週間後に GPT 耐性トランスフォーマントを単離した．それらの GPT 耐性株の出現頻度は PreC 含有の有無に関係なく，また WHV,

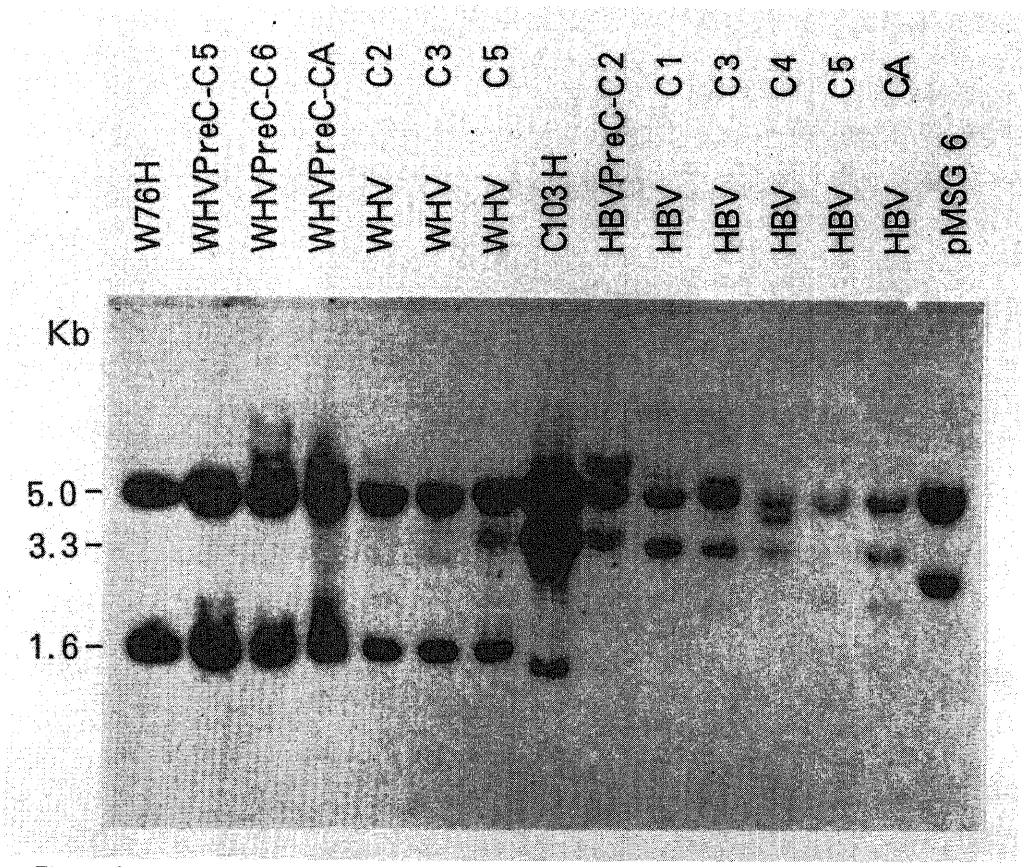

Fig. 2. Southern blotting in clones having PreC-C or C. From isolated clones, DNA and RNA were purified by the guanidine isothiocyanate method and analyzed. Clones with WHV PreC-C: WHV PreC-C5, WHV PreC-C6, WHV PreC-CA; clones with WHV C: WHV C2, WHV C3, WHV C5; a clone with HBV PreC-C: HBV PreC-C2; clones with HBV C: HBV C1, HBV C3, HBV C4, HBV C5, HBV CA. Size markers, W76H and C103H, are Hind Ⅲ-digested plasmid DNAs which were used for transfection, and pMSG 6 is GPT+ clone DNA having pMSG vector.

HBV の別に関係なくほぼ一定で，直径 10 cm ディシュ（10 μg DNA）当り約 100 コロニーであった．WHV PreC-C, WHV C, HBV PreC-C, HBV C の各クローンをそれぞれ 6 株（No. 1，2，5，6，7，A），5 株（No. 1，2，3，5，6），3 株（No. 1，2，3），5 株（No. 1，3，4，5，A）分離し以下の実験に使用した．そのほかに培養細胞株として，WH257GE10, PLC/PRF/5, Hep-G2, HuH-7 を用いたが検討した条件下では GPT 耐性株は得られなかった．

II．サザンブロッティング

得られた GPT 耐性株を単離継代培養し WHV PreC-C 6 株，WHV C 5 株，HBV PreC-C 3 株，HBV C 5 株について，DNA の組み込み様式をサザンブロッティングにより検討した（図 2）．RNA 及び DNA は，グアニジン・イソチオシアネイト法を用いて同時に抽出した．抽出した DNA 10 μg を制限酵素 Hind III で消化し，トランスフェクトした DNA をプローブとしてサザンブロッティングを行い，GPT 耐性株中の DNA の組み込み様式を検討した．W76H 及び C103H はサイズマーカーで，トランスフェクトしたプラスミド DNA の Hind III 消化を示す．pMSG 6 は発現ベクターのみによる GPT 耐性株 DNA の Hind III 消化である．WHV 群の 1.6 kbp と 5.0 kbp, HBV 群の 3.3 kbp と 5.0 kbp のバンドは，導入したプラスミド DNA の Hind III 断片と同一サイズであり，縦列組み込み（tandem）が示唆された．それ以外のバンドは宿主 DNA との連結部位及びリアレンジメントによるものと推測された．また，コピー数にも差を認めた．

III．ノーザンブロッティング

C 遺伝子発現のデキサメサゾン添加効果の有無をノーザンブロッティングにより比較検討した．図 3 の右に示すように，デキサメサゾン 1 μM 添加 24 時間後の全 mRNA 量は，約 10 倍の増加を示し，MMTV LTR プロモーターからの転写が示唆された．図 3 左は

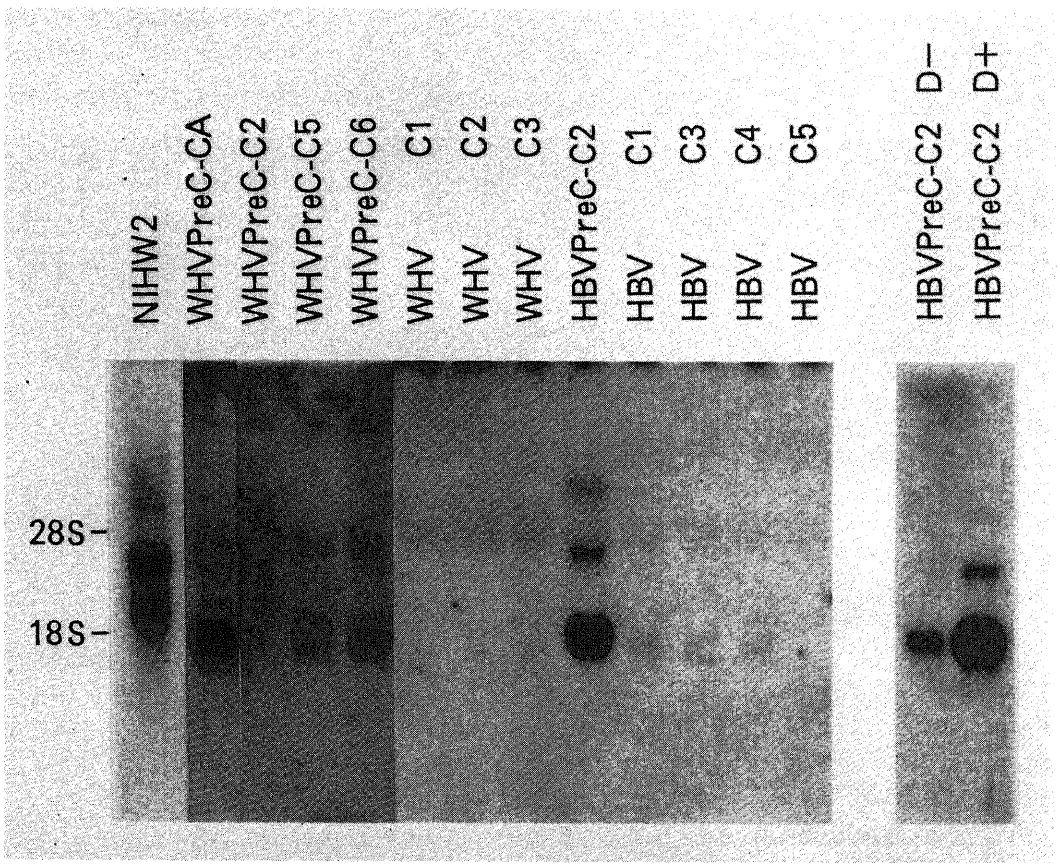

Fig. 3. Northern blotting in clones having PreC-C or C. Expression of PreC-C or C region detected by Northern blotting varied considerably among these clones. NIHW2 is size marker and positive control. In the right columns, mRNAs were prepared from cells grown in the presence (D+) or in the absence (D−) of 1 μM dexamethasone for 24 hr before harvesting

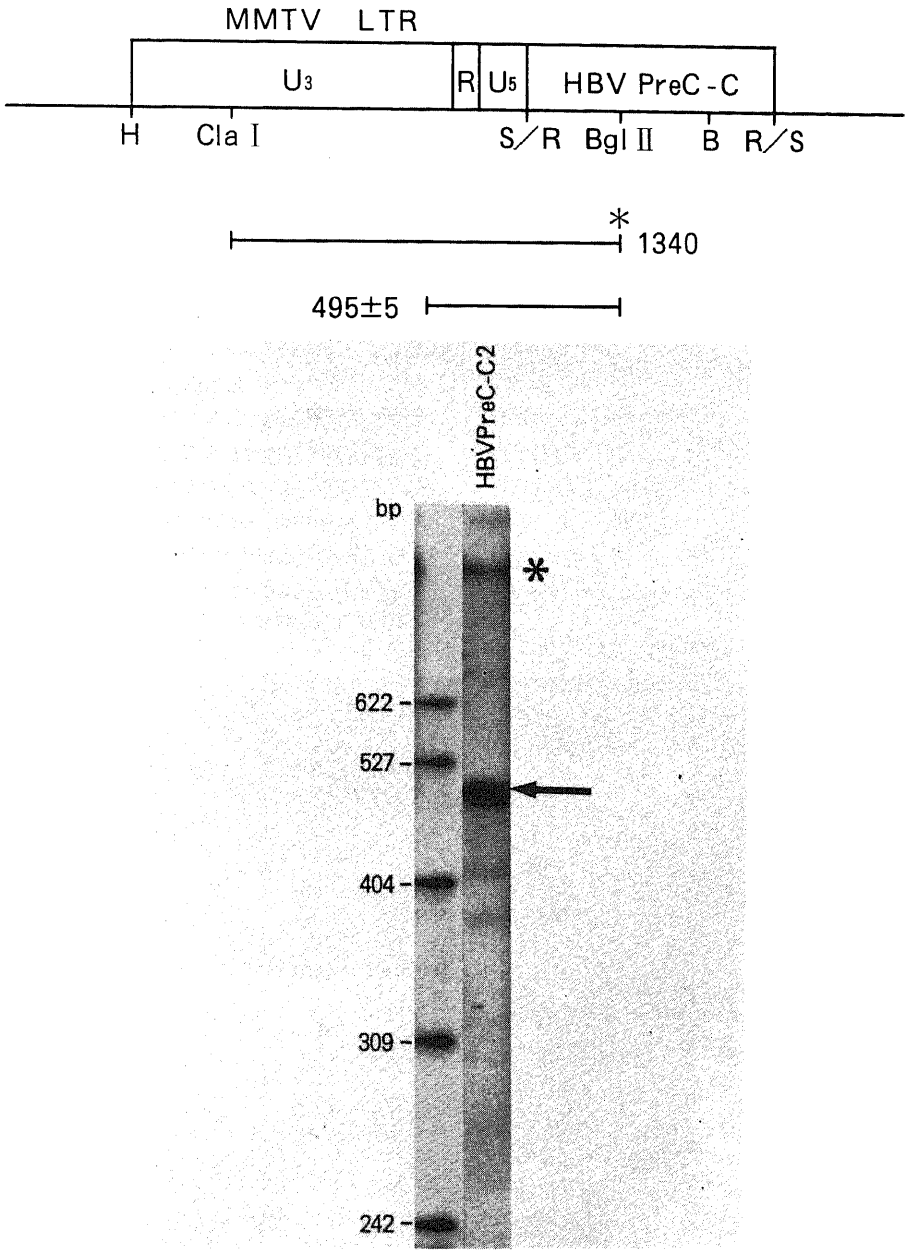

Fig. 4. Nuclease protection mapping of the 5' terminus of MMTV transcripts.
The 1.3 kb Cla I-Bgl II restriction fragment was 5' end-labeled as indicated by the star and annealed with RNA (HBV PreC-C). The hybrid was digested with Sl nuclease. Probe protected from digestion was visualized (indicated by the arrow) by autoradiography after electrophoresis on denaturing 5% sequencing gels.

単離株のデキサメサゾン添加後のノーザンブロッティングで，株ごとにPreC-C及びCの発現量に差が認められた．

Ⅳ．Sl マッピング

MMTV LTRのプロモーターよりの転写を確認するために，Cla I-Bgl II断片1340ベースのBel-II 5'末端をラベルしたものをプローブDNAとしてSlマッピングを行なった（図4）．米印はプローブDNAを示す．矢印で示される495±5ベースの断片は，Sl ヌクレアーゼで消化され得ないサイズである．MMTV LTRプロモーターによる翻訳開始部位は1332 bpのLTR領域中の1196 bp部位にある[19]．これより導入したHBV PreC-C遺伝子のmRNAに関するSlマッピングの予測計算値は491ベースであり実験値と符合する．これより発現はMMTV LTRのプロモーターを用いて行なわれていることが確認された．

Ⅴ．免疫組織学的染色法

これらの単離細胞株を用いて免疫組織学的染色法によりコア蛋白存在を確認した．1次抗体として100倍希釈のマウス抗ヒトC抗原抗体を用い，2次抗体として，アビジン・ビオチン複合体を用い，アルカリフォスファターゼ基質により赤色に発色させた（図5，6）．

図5左下のpMSG 6は，発現ベクターのみであり赤色発色を認めない．一方，図5上段の左右は，ともに赤色発色を認め，左上のPreC含有株では細胞質の発色傾向が認められた．WHV群でも同様に，図6左上のPreC含有株では細胞質の発色傾向が強く，また図6右上のPreC非含有株では，核の発色傾向が認められた．

考　　察

血中のHBe抗原はHBc抗原（ペプタイドP19）のC末端部分から34個のアミノ酸が切り取られた基本ペプタイドP15.5から成り[20]，HBV産生状態では肝細胞から血中へHBe抗原が放出され，HBV肝炎の消長と病状の特異的マーカーとして知られている．またe抗原陽性の慢性肝炎患者の肝組織中でのC抗原の局在を抗HBc抗体結合螢光抗体法で調べると，非活動性では核に局在する傾向がみられ，活動性では高率に細胞質及び細胞膜に局在する傾向がみられる[21]．これらの事実はHBc抗原とHBe抗原とは関連している

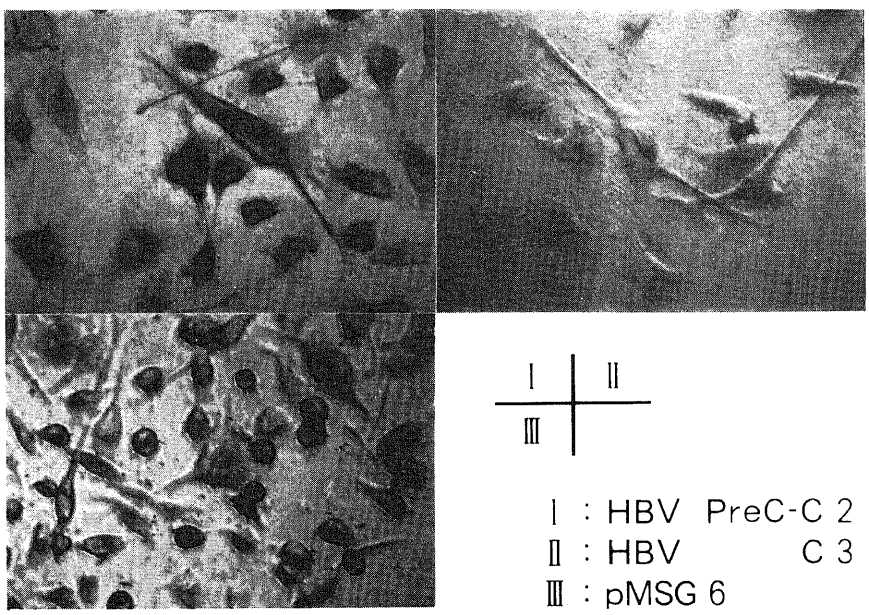

Fig. 5. Immunohistochemical staining of HeLa cells with HBV PreC-C region (Ⅰ), HBV C region (II), or pMSG (III). Existence and localization of core-related protein was examined immunohistochemically by using mouse anti-HBc IgG as the first antibody, biotinylated anti-mouse IgG as the second, and the avidin conjugated alkaline phosphatase as the third. Cells having HBV PreC-C region were stained positive in the cytoplasmic region, whereas the nuclear region was stained in cells harboring HBV C region. The original color is light red.

事を示すと同時に，HBV 産生時における HBc 及び HBe 抗原の生成機構と局在と分泌機構の解明は肝炎の病像を理解する上からも重要な課題であり，PreC の機能解明が急がれた．

本研究では，ヘパドナウイルスゲノムに共通して PreC-C 遺伝子から 2 種のポリペプチドが発現することに着目し，個別に 2 つのペプチドが発現する培養細胞系を検討した．導入した外来遺伝子の発現が細胞障害性である可能性を考慮して，本研究ではデキサメサゾン添加効果による発現の調節が可能な MMTV LTR のプロモーターによる発現ベクターを用いた．成績に示したように HeLa 細胞で PreC-C 及び C の安定な発現系を確立し，この系で転写は MMTV LTR プロモーターから開始されることが S1 マッピングにより示され，デキサメサゾン添加による転写促進効果が示された．得られた GPT 耐性株を単離継代培養し，ノーザンブロッティングにより比較検討したところ，PreC-C 及び C の各クローンごとに発現量に大きな差が認められた．いづれのクローンでも DNA の組み込み様式は縦列 (tandem) な組み込みであり，発現量の差異は縦列組み込みのコピー数とは相関していなかった．また mRNA のサイズの違いも認められなかった．これらの事実は発現量の差異がむしろ組み込まれた宿主の染色体領域の転写活性状態に依存している可能性があると思われる．

本研究の HeLa 系の GPT 選択プロトコールはデキサメサゾン非添加状態でクローン選択を行ない，PreC-C と C の挿入プラスミドと pMSG との DNA 当りの GPT 耐性クローン単離数に差異がなく，各クローンのデキサメサゾン添加後の細胞の増殖や形態に違いが認められなかった．これらの結果は PreC-C や C の発現が，HeLa 細胞に対して細胞障害を与えることを示すに至らなかった．HeLa 細胞以外に培養細胞株として肝細胞由来の WH257GE10, PLC/PRF/5, Hep-G2, HuH-7 を用いて PreC-C や C のベクターの導入と安定発現系の単離を試みたが，検討した条件下では GPT 耐性株は得られなかった．これは検討した細胞培養条件での肝細胞系の増殖が悪く GPT 選択が十分にかからなかった可能性があり，GPT 遺伝子を選択としての利用には限界があると思われ，今後他の選択マーカーの検討が必要である．肝細胞系培養細胞で PreC-C と C の発現が細胞に toxic であるか否かはさらに検討を要する点と思われる．

C 蛋白の N 端からのアミノ酸配列が 2 番目の ATG

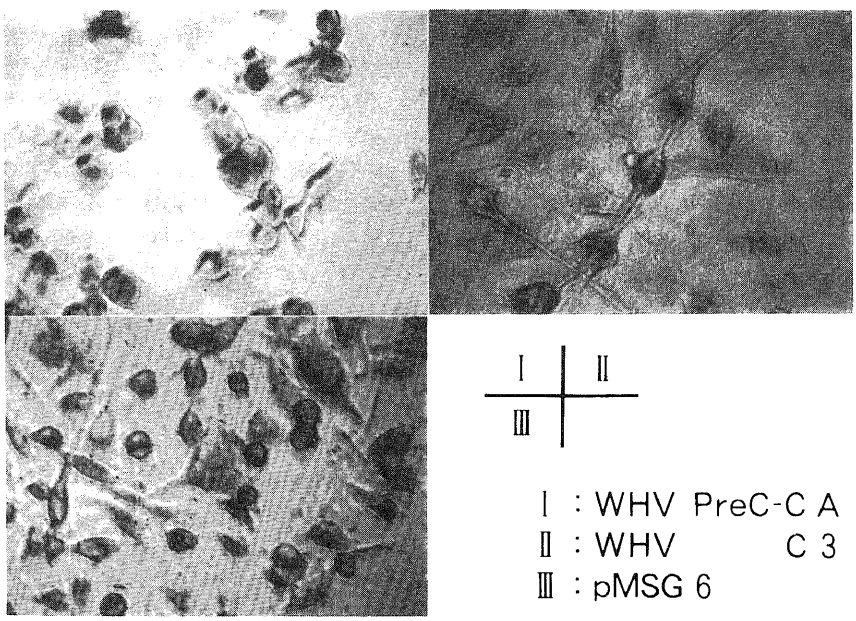

Fig. 6. Immunohistochemical staining of HeLa cells with WHV PreC-C region (I), WHV C region (II), or pMSG (III). Existence and localization of core-related protein was examined immunohistochemically by using mouse anti-HBc IgG as mentioned in Fig. 5. The same tendencies as Fig. 5 were observed in cells with WHV DNA fragment. The extent of staining was weaker than those with HBV, since mouse anti-HBc IgG was used as the first antibody.

から予想される配列と一致していることもあり，PreCのリーダー配列の意義は明らかでなかった．しかしヘパドナウイルスゲノムで常にPreC-C構造は保存され，アミノ酸配列の共通性があり，かつ膜通過シグナル配列が見いだされることによりPreC部分についての関心が高まった．Ouら[3]はPreC-C蛋白の確認と共に，PreC-C蛋白が膜通過後に開裂されe抗原が放出されることを示し，PreC-CとCが異なった挙動をとることを示唆した．彼らの系はSV40由来のベクターを利用し哺乳動物細胞として非肝細胞系のCOS7またはCHOを用いたものであり，導入した外来遺伝子の発現調節は不可能である．本研究のPreC-CとC発現に関する分別的な局在を示唆する成績は，Ouらのtransient発現系の結果と良く符合している．これらの結果はPreC-CとCが異なった生物的意義を持ちうることを強く示唆している．しかし，原核細胞[22]及び哺乳動物細胞[23]でのコア蛋白の発現には，C遺伝子のみが関与していればよく，PreC領域は必要でないことが明らかにされ，PreCの意義についてアヒル（duck）肝細胞への実験的感染系でウイルス増殖に必須でないことが最近示されている[24]．PreC領域の意義についてe抗原の役割と個体での感染系成立と免疫応答過程の検討など今後解明すべき点が残されている．

ウイルスゲノムのDNA情報の効率的な利用形態として，遺伝子が重複して翻訳の段階でフレームをずらす場合と，1つの連続したopen reading frame（ORF）の数カ所の開始コドンから各々の蛋白が形成される場合が知られている．ヘパドナウイルスのゲノムは両者を共にとっているが，PreS-SとS及びPreC-CとCでは後者である．1つのORFから複数の蛋白が翻訳される例では，最初のATGの近傍のDNA配列がKozakらの見いだした翻訳開始共通配列[22]とずれている．事実HBVやWHVのPreC-Cの最初の配列で低い翻訳開始効率が予想される．この様な機構のため，PreC-C発現系でPreC-CとCが共に生成されている可能性が高く，この点の確認は生成された蛋白種の同定が今後の課題として残された．

結　　論

1．ヘパドナウイルスのC蛋白の発現と機能を解析する目的で，PreC-CまたはC遺伝子の発現がMMTV LTRのプロモーターの支配を受けるプラスミドを作製し，HeLa細胞に導入し，WHVのPreC-C又はC遺伝子のDNAが，安定に組み込まれたGPT耐性株を6株，HBVのPreC-C又はC遺伝子が，安定に組み込まれたGPT耐性株を6株得て，それらの細胞株中でのコア遺伝子の発現を確認した．

2．免疫組織学的染色法により，C蛋白の存在が確認され，C遺伝子が組み込まれた細胞株では，コア蛋白は核に局在する傾向が見られ，PreC-C遺伝子が組み込まれた細胞株では細胞質にび漫性に存在する傾向が認められた．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，終始，御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師，服部信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，黒木和之助手，村上清史助教授に心から感謝致します．本研究に御援助下さった，金沢大学がん研究所生物物理部門，原田文夫教授に深謝致します．また，御協力をいただいた第一内科第二研究室各位，並びに，金沢大学がん研究所生物物理部門各位に深く感謝致します．

尚，本論文の要旨は，第23回日本肝臓学会総会（昭和62年度，岡山）及び，第10回日本分子生物学会年会（昭和62年度，京都）に発表した．

文　　献

1） **Okada, K.**: E antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmision of hepatitis B virus to their infants. N. Engl. J. Med., **294**, 746-749 (1976).

2） **Takahashi, K.**: Demonstration of hepatitis B e antigen in the core of Dane particles. J. Immunol., **122**, 275-279 (1979).

3） **Ou, J., Laub, O. & Rutter, W. J.**: Hepatitis B virus gene function: The precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 1578-1582 (1986).

4） **Birnboim, H. C. & Doly, J.**: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., **7**, 1513-1523 (1979).

5） **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Molecular cloning: A laboratory manual, p250-251, Cold spring harbor laboratory, New York, 1982.

6） **Ponta, H., Kennedy, N., Skroch, P., Hynes, N. E. & Groner, B.**: Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat can be dissociated from the proviral promoter and has enhancer properties. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 1020-1024 (1985).

7） **Graham, F. L. & Van der Eb, A. J.**: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. J. Virol., **52**, 456-467 (1973).

8） **Glover, D. M.**: DNA cloning volume II, lst

ed., p143-165, IRL Press, Oxford, 1985.

9) **Unoura, M., Kobayashi, K. & Fukuoka, K.**: Establishment of a cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. Hepatology, **5**, 1106-1111 (1985).

10) **Alexander, J. J., Bey, E. M., Geddes, E. W. & Lecatsas, G.**: Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. S. Afr. Med. J., **50**, 2124-2128 (1976).

11) **Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B. B.**: Controlled synthesis of HBsAg in a Differentiated human liver carcinoma-derived cell line. Nature, **282**, 615-616 (1979).

12) **Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J.**: Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Research, **42**, 3858-3863 (1982).

13) **Davis, L. G., Dibner, M. D. & Battey, J. F.**: Molecular Biology, 1st ed., p130-135, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986.

14) **Southern, E. M.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separeted by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **98**, 503-517 (1975).

15) **Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.**: Molecular cloning: A laboratory manual, p382-386, Cold spring harbor laboratory, New York, 1982.

16) **Feinberg, A. P. & Vogelstein, B.**: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem., **132**, 6-13 (1983).

17) **Perbal, B.**: A practical guide to molecular cloning, 1st ed., p311-316, John Wiley & Sons Inc., New York, 1984.

18) **Uemura, Y., Fukuyama, K., Nishida, M., Suyama, T. & Ohori, H.**: Establishment of passive hemagglutination assay (PHA) system for anti-HBc in plasma. Tohoku J. exp. Med., **149**, 11-20 (1986).

19) **Ucker, D. S., Firestone, G. L. & Yamamoto, K. R.**: Glucocorticoids and chromosomal position modulate murine mammary tumor virus transcription by affecting efficiency of promoter utilization. Mol. Cell. Biol., **3**, 551-561 (1983).

20) **Takahashi, K., Machida, A. & Funatsu, G.**: Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in serum. J. Immunol., **130**, 2903-2907 (1983).

21) **Chu, C. & Liaw, Y.**: Intrahepatic distribution of hepatitis B surface and core antigen in chronic hepatitis B virus infection. Gastroenterology, **92**, 220-225 (1987).

22) **Cohen, B. J. & Richmond, J. E.**: Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in E. coli. Nature, **296**, 677-678 (1982).

23) **Will, H., Cattaneo, R. & Pfaff, E.**: Expression of hepatitis B antigens with a simian virus 40 vector. J. Virol., **50**, 335-342 (1984).

24) **Chang, C., Enders, G., Sprengel, R., Peters, N., Varmus, H. E. & Ganem, D.**: Expression of the precore region of avian hepatitis B virus is not required for viral replication. J. Virol., **61**, 3322-3325 (1987).

25) **Kozak, M.**: Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes. Cell, **47**, 481-483 (1987).

Expression of PreC-C and C Region of Human Hepatitis B Virus and Woodchuck Hepatitis Virus in HeLa Cells

Atsushi Shimoda, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med. Soc., **97**, 179—190 (1988)

Key words : hepadna virus, HBV, WHV, core antigen, e antigen

Abstract

The PreC-C region of hepadnaviruses codes two polypeptides, PreC-C and C, having different roles on viral infection cycles. I decided to establish mammalian cell clones stably expressing each of them. PreC-C or C region fragment of cloned WHV2 or HBVadr was inserted into the polylinker site downstream to MMTV LTR of pMSG plasmid having *Ecogpt* gene as the selective marker. Constructed plasmid DNA was introduced into HeLa cells by transfection with calcium phosphate co-precipitation. Numbers of *Ecogpt* transformed colonies were in the same range per microgram donor DNA of each of 4 different constructs and the parental pMSG, suggesting that expression of PreC-C or C is not harmful for Hela cells. From isolated clones, DNA and RNA were purified by the guanidine isothiocyanate method and analyzed. Tandem integration of donor DNA was demonstrated by Southern blotting in all clones tested so far, including 6 WHV PreC-C, 5 WHV C, 3 HBV PreC-C and 5 HBV C clones. Expression of PreC-C or C region detected by Northern blotting varied considerably among these clones. The amount of the mRNA increased by 10-folds by addition of dexamethasone. The 5' end of the transcript in a clone having HBV PreC-C determined by the Sl nuclease mapping method indicates that the RNA was transcribed by the LTR promoter. Existence and localization of core-related protein was examined immunohistochemically by using mouse anti-HBc IgG as the first antibody, biotinylated anti-mouse IgG as the second, and the avidin conjugated alkaline phosphatase as the third. Cells having HBV PreC-C region were stained positive in the cytoplasmic region, whereas the nuclear region was stained in cells harboring HBV C region. The same tendencies were observed in cells with WHV DNA fragment, although the extent of staining was rather weak.