

Structural Properties of Repetitive Sequences
Near an Integration Site of Woodchuck Hepatitis
Virus(WHV) DNA in an Established Cell Line
Derived from a Woodchuck Primary
Hepatocellular Carcinoma

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	http://hdl.handle.net/2297/7943

ウッドチャック肝細胞癌由来培養細胞株 (WH 257GE 10) 中に組み込まれたウッドチャック肝炎ウイルス (WHV) DNA 近傍の反復配列について

金沢大学内科学第一講座 (主任: 服部 信教授)

青 山 庄

(昭和62年3月2日受付)

ヒト肝細胞癌 (肝癌) の DNA 中に、高頻度に、ヒト B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) DNA の組み込みが証明される事実は、HBV ゲノムの組み込みと発がんとの関連を示唆するものと考えられている。HBV に類似したウイルス群 (ヘパドナウイルス, hepadnaviridae) に属し、最も発がん性が高いウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hepatitis virus, WHV) による肝癌発生機構の解析は、HBV によるヒト肝癌発生の解析の格好のモデル系と考えられている。今回、WHV 感染ウッドチャック肝癌由来の樹立培養細胞株中の WHV 組み込み部位 (region A) の DNA の構造解析によって、WHV のエンハンサー領域を含む組み込まれた WHV DNA 近傍に宿主の 2 種類の反復配列が存在することが明らかになった。このうち、WHV DNA の上流に位置する反復配列は、AC 反復であり、一方、下流に位置する反復配列は、従来記載されている反復配列とは相同性がない配列であった。このため、ブラークハイブリダイゼーションを用いた分子クローニング法にて、正常ウッドチャック遺伝子ライブラリーからこの反復配列とホモロジーを持つ DNA を単離し、その一次構造を解析した。その結果、得られた新しい反復配列ファミリーの特徴は以下であった。1) このファミリーに属する反復配列は、約 450 塩基対のサイズであり、正常ウッドチャックの 1 倍体当たり 10^4 個近く存在すると考えられる。2) この反復配列の中央部分には、DNA 置換・挿入が高率にみられる領域があり、region A では、この領域に AT 反復が存在する。3) この反復配列と類似の反復配列が、ヒト、マウス、サケ、回虫等の真核多細胞生物 DNA に広く存在するが、酵母 DNA には存在しない。4) このファミリーの反復配列は、既知の short interspersed repetitive sequence (SINE) と長いホモロジーを有せず、新たな SINE と考えられた。従って、組み込まれた WHV DNA は、その両側に、プリン・ピリミジン繰り返しを持つ特徴的な構造をとっていることが明らかになった。これらの反復配列が、WHV DNA の組み込み部位の機能的、ならびに構造的な特徴に何らかの役割を果している可能性が示唆された。又、肝癌発生の際のヘパドナウイルス DNA 挿入の役割との関係で、これらの構造が、何らかの意味を有している可能性が示唆された。

Key words repetitive sequence, woodchuck hepatitis virus, hepatocellular carcinoma

ヒト B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus, HBV) 感染とヒト肝細胞癌 (肝癌) は、疫学的に密接な関連を有することが知られている¹⁾。ヒト肝癌の発生機構における HBV の役割を解明する目的で、慢性肝炎、肝

硬変、および肝癌の組織から DNA を抽出し、HBV DNA の細胞内での存在様式を検討する研究がすすめられてきた。ヒト肝癌の染色体 DNA に HBV DNA が高率に組み込まれているとする報告がなされ、HBV

Abbreviations: bp, base pairs; DHBV, Duck hepatitis B virus; E-coli, Escherichia coli; GSHV, Ground squirrel hepatitis virus; HBV, Hepatitis B virus; kb, kilobase pairs; LINE, Long interspersed repetitive sequence; m.o.i., multiplicity of infection; PEG, Polyethylene

DNA の組み込みが肝癌の発生に何らか重要な役割を果たしていること示唆されている²⁾⁻⁶⁾。

一方、肝癌の発生メカニズムを探る一助として、動物実験モデル系の確立が急がれてきた。しかし、HBV の宿主が、ヒト、チンパンジーとテナガザルに限られているため、動物実験系として HBV 類似のウイルスとその宿主を用いた研究が有力な手段となることが期待されている⁷⁾。

1980 年代後半から、HBV 類似のウイルスが各種の動物より単離され、肝特異的な DNA 型ウイルス、ヘパドナウイルス (hepadnaviridae) として分類されるに至り、HBV、ウッドチャック肝炎ウイルス (woodchuck hepatitis virus, WHV)、地リス肝炎ウイルス (ground squirrel hepatitis virus, GSHV)、アヒル B 型肝炎ウイルス (duck hepatitis B virus, DHBV) が、現在までにヘパドナウイルスに分類されている⁸⁾。これらのウイルスは、HBV と極めて類似した粒子構造、ゲノム構造を有し、肝炎を惹起することが知られている。その中でも WHV は、ウイルス感染後比較的短期間に極めて高率に肝癌を惹起することが明らかとなり、ヘパドナウイルス中で最も高い発癌性を持つと考えられ⁹⁾、HBV による肝癌の格好の実験モデル系として研究に利用され始めた。

著者らは、ウッドチャック肝癌試料 DNA 中の WHV DNA の存在様式を検討し、宿主 DNA への WHV DNA の組み込みが高頻度に観察されることを報告した⁹⁾。そして、小林¹⁰⁾、鶴浦ら¹¹⁾により樹立されたウッドチャック肝癌由来の移植固形癌、および、樹立培養細胞株 WH257 GE10 において組み込まれた WHV DNA が安定に維持されていることを明らかにし、組み込まれている WHV DNA とその近傍の構造解析をサザン・ハイブリダイゼーション法により検討し、3 箇所の組み込み部位の存在を報告した⁹⁾。そのうち、分子クローニング法で 1 次構造を解析した組み込み部位を含む A 領域には、WHV ゲノムのエンハンサー配列部位を含み¹²⁾、又、近傍の宿主 DNA に反復配列の存在を認めた。

組み込み部位近傍の宿主 DNA 構造の解析は、ウイルスゲノム組み込み過程の理解と組み込まれたウイルス DNA の発がんへの関与を検討する上で重要と考え、近傍の宿主 DNA の反復配列の解析をおこなったところ、A 領域の WHV DNA の上流および下流に、2 種類の反復配列が存在し、後者は、今までに報告されているどの反復配列にも属さない新しい反復配列で

あることを示唆する結果を得たので、その特徴に関し、若干の考察を加えて報告する。

I. 材料および方法

I. 細胞試料と DNA の抽出

ウッドチャック肝癌由来の樹立細胞株 WH257 GE10 は、鶴浦らの方法に従って、継代および培養した¹¹⁾。WHV 表面抗原 (woodchuck hepatitis virus surface antigen, WHs Ag) 陰性ウッドチャックより全身麻酔下で正常肝組織を摘出し、DNA を抽出した後、WHV DNA が染色体外にも、又、組み込み型としても存在していないことを確認し、正常肝 DNA として以後実験に用いた。ヒト DNA は、剖検正常肝組織より精製した。仔牛胸腺 DNA およびサケ精子 DNA は、Boehringer・Mannheim (西ドイツ) の市販の標品を用いた。酵母 DNA は、*Saccharomyces cerevisiae* X2180 株細胞から精製した。

細胞からの DNA の抽出は、5 倍量のサルコシル緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 2% Na-サルコシル) に懸濁し溶解させ、等量の有機混合液 (フェノール:クロロホルム=1:1) を加え振盪混合後、水層部分を抽出し、エタノール沈澱の後にサルコシル緩衝液に溶解し、RNase A (100 μg/ml) (Boehringer・Mannheim, 西ドイツ) 処理を 37°C, 1 時間おこない、次いで、プロナーゼ E (2 mg/ml) (科研製薬) 処理を 37°C, 4~5 時間おこない、再び有機混合液による抽出を数回繰り返し、水層部分より DNA をエタノール沈澱にて精製した。DNA 標品の平均サイズは、アガロース電気泳動にて確認したところ約 50~100 キロ塩基対 (kilobase pairs, kb) であった。

肝組織からの DNA の抽出は、冷凍保存した試料を解凍後、小切片とし、5 倍量のサルコシル緩衝液にて懸濁してホモゲナイズした後、細胞から同様の方法にて DNA を調整した。

II. 遺伝子ライブラリー

Lambda Charon 4A をベクターとした WH257 GE10 の遺伝子ライブラリー、および、ウッドチャック正常肝の遺伝子ライブラリーは、金子ら⁹⁾が調整したものをを用いた。ウッドチャック正常肝の M 13 mp 11 ファージ DNA をベクターとした遺伝子ライブラリーは、正常肝 DNA の Hind III 完全消化試料と牛・腸アルカリフォスファターゼ (宝酒造) 処理により 5' 端のリン酸基を除去した Hind III 消化 M 13 mp 11 DNA とを

T4 リガーゼ (宝酒造) により結合させ、カルシウム処理大腸菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) JM105 にトランスフェクション法にて導入して得た¹³⁾。

III. ファージクローンからの DNA の調整

ラムダファージからの DNA の調整は、単離したブラークのファージを *E. coli* LE392 株に感染させ、それを 10 mM MgCl₂ 添加 Lederberg Broth (LBmg) 寒天プレートに重層法にて confluent となるようにまき、ブラーク形成後 2~3 ml の SM 液 (50 mM Tris·HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05%ゼラチン) 添加によりファージを溶出させ、クロロホルムを加えファージストックを調整した。大量培養は、0.4% マルトースを含む LBmg 培地で対数増殖期中期に増殖した LE392 に、感染多重度 (multiplicity of infection, m.o.i.) 0.1~0.07 でファージを感染させ、その後 50 倍希釈し 37°C, 8~10 時間振盪培養した。培養液にクロロホルムを少量加えた後、DNase (10 µg/ml) (宝酒造) RNase A (10 µg/ml) 処理をおこない、上清を遠心にて分取し、10% polyethylen-glycol 6000 (PEG6000) と 1 M NaCl によりファージ粒子を沈澱分取し、CsCl 勾配遠心にてファージ分画を分取精製した。その後、RNase A (10 µg/ml)、プロテイナーゼ K (100 µg/ml) により、37°C, 30 分処理後、有機溶媒混合液にて DNA 抽出をおこなった。

M13 ファージ DNA の調整は、クローン化したファージを m.o.i. 0.1 で ×2YT 培地 (0.16% トルプトン, 0.1% 酵母エキス, 0.05% NaCl, pH 7.5) で対数増殖期中期に増殖した *E. coli* JM105 株に感染させ、37°C, 5 時間振盪後、遠心にて菌体と分離した培養液よりファージを PEG6000 と NaCl にて沈澱させ、遠心にて分取した。ファージから単鎖 DNA をフェノール抽出にて精製した。2 重鎖環状 DNA は、感染した JM105 を上記の方法で 5 時間培養後、クロラムフェニコール (18 µg/ml) を添加し、更に 1 時間培養後、菌体を分取し、リゾチーム処理により溶菌させ、フェノール抽出、CsCl-エチジウム・プロマイドによる密度平衡遠心にて選択分取した。

IV. In site ハイブリダイゼーション

サザン・ハイブリダイゼーションは¹⁴⁾、genomic DNA の場合は、10~20 µg の DNA 試料を、クローニングしたウイルスまたはプラスミド DNA の場合は、約 0.5~1.0 µg を、0.5 µg/ml のエチジウム・プロマイドを含む 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 (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) を 30 分おこない、次いで、中和処理 (0.5 M Tris·HCl (pH 7.0), 1.5 M

NaCl) 処理をおこない、diffusion transfer 法にて、ニトロセルロース膜 (Schleicher & schüll, 西ドイツ) に移行させ、80°C, 2 時間処理した。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液 (0.6 M NaCl, 60 mM Tris·HCl (pH 7.6), ×5 Denhardt's 液 (0.1% 牛血清アルブミン, 0.1% ポリビニールピロリドン, 0.1% フィコール), 2 mM EDTA, 0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS, 100 µg/ml 変性サケ精子 DNA) 中で 65°C, 1 時間以上おこなった。プレハイブリダイゼーション液を除去後、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 24 時間以上おこなった。フィルターの洗浄は、過剰の 1 次洗浄液 (0.3 M NaCl, 60 mM Tris·HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA, 0.5% SDS) により、65°C, 30 分処理を 2 回繰り返し、その後、2 次洗浄液 (3 mM Tris·HCl (pH 8.0), 2 mM EDTA) で室温にて 30 分、2 回洗浄をおこなった。フィルターは、-80°C で X 線フィルム (Kodak, N. Y., 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 3~4 日間おこなった。

ブラークハイブリダイゼーションは、寒天プレートにニトロセルロース膜に接着させ、ブラークをレブリカシ、フィルターをアルカリで処理、中和処理をおこない、以後、サザン・ハイブリダイゼーションの場合と同様に、ハイブリダイゼーションをおこなった。反復配列のファミリーのクローニングは、上記の条件では単離不可能であったので、ハイブリダイゼーションの条件の stringency を下げる目的で、40% ホルムアミド存在下で 42°C でおこなった。その他は、条件は同一とした。

プローブの作製のために、A 領域を含むラムダクローン GE-L8 から各 DNA 断片を pBR322 ベクターにサブクローニングして組み換えプラスミドを作った。CsCl-エチジウム・プロマイドで精製した DNA 標本をプローブ調整に用いた。標識プローブの調整は、³²P-dCTP を標識基質として、ニック・トランスレーション法にておこなった¹⁵⁾。プローブの比活性は、約 1~3 × 10⁸ cpm/µg DNA とした。プレハイブリダイゼーション液中のプローブの濃度は、約 10 µg/ml とした。

V. DNA 1 次構造の決定

ラムダファージクローンは、精製 DNA を各種制限酵素で消化して、制限酵素地図を作成すると共に、サザン・ハイブリダイゼーションにて反復配列を有する DNA 断片を同定し、低融点アガロースゲルによる電気泳動で分画した。その後、バンド部分を切り出し、

TE緩衝液 (25 mM Tris · HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) を加え, 65°C で融解後, フェノール抽出をおこない DNA 断片を精製し, M 13 mp 10 または M 13 mp 11 のポリリンカー部分に挿入した。これらの M13 クローンの精製単鎖 DNA をダイデオキシチエンターミネーション法による DNA 塩基配列決定法に用いた¹⁶⁾。ダイデオキシ法には, 塩基配列決定用のキット (Amersham, U.S.A.) を利用し, キットのプロトコールに従って ³²P-dATP (比活性 >400 Ci/m mole) を標識基質として反応をおこなった。

成 績

1. WH257 GE10 細胞の WHV DNA 組み込みを含む A 領域の反復配列

金子, 児玉らにより既にクローニングされ, 1次構

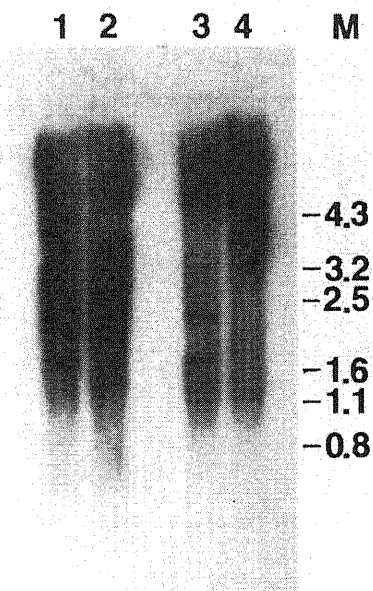


Fig. 1. Southern hybridization analysis of genomic DNA digests of woodchuck liver with the Hind III 2.1 kb fragment as the probe.

Ten to 20 μ g of digested DNA of normal woodchuck liver (lanes 3 and 4) or WH257 GE10 (lanes 1 and 2) was applied to each lane, and electrophoresed in a 1.0% horizontal agarose gel. The Hind III 2.1 kb fragment from the purified DNA of a plasmid was used as the probe. Conditions of Southern transfer and hybridization were described in Materials and Method. Lanes 1 and 3, EcoRI digests; lanes 2 and 4, Hind III digests. The positions of size marker DNAs (M) were shown in kb.

造が決定された A 領域の 2.1 kb Hind III断片内に約 800 塩基対 (base pairs, bp) の WHV DNA が存在し, これは, WHV ゲノムの S 遺伝子の C 端から X 遺伝子の中央部までを含んでいる。WHV DNA をプローブとしてサザン・ハイブリダイゼーションをおこなうと, A 領域の 2.1 kb Hind III断片に相当する 2.1 kb のバンドが Hind III消化で得られるが, この 2.1 kb の DNA をプローブとして WH257 GE10 およびウッドチャック正常肝 DNA のサザン・ハイブリダイゼーションをおこなうとスメア状のバンドが得られる (図 1)。このことは, 2.1 kb 断片の WHV DNA の近傍に反復配列が存在することを示唆する。この存在を検討するために, 他の方法によってこれを確かめた。すなわち, 細胞の全 DNA をプローブとして用いて genomic サザン・ハイブリダイゼーションをおこなうことにより, コピー数の多い反復配列断片が効率よくハイブリダイゼーション反応をおこない強いシグナルを与えることを利用し, GE-L8 DNA を EcoRI および Hind III で消化後, 正常ウッドチャック DNA をニック・トランスレーションにて標識しプローブを作製し

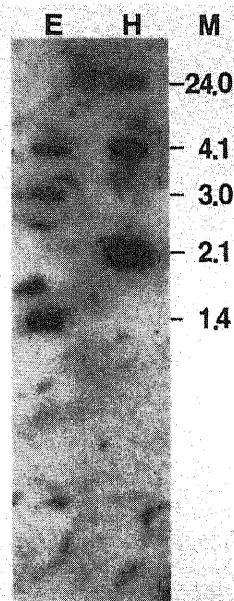


Fig. 2. Repetitive sequences in region A detected by woodchuck DNA as the probe.

EcoRI digest (E) or Hind III digest (H) of GE-L8 DNA was electrophoresed as in Fig. 1. Southern hybridization was carried out using normal woodchuck liver DNA as the probe. The positions of size marker DNAs (M) were shown in kb.

てサザン・ハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、EcoRI 消化では、1.4 kb, 3.0 kb と 4.0 kb に、Hind III 消化では、2.1 kb, 4.1 kb と 24 kb にバンドを認め、特に、EcoRI では、1.4 kb に、Hind III では、2.1 kb に強いバンドを認めた (図 2)。

そこで、2.1 kb 断片の亜領域をサブクローニングしてプローブとして用いて genomic サザン・ハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、WHV DNA の上流 (S 遺伝子のフレームの 5' 側) の Hind III-ClaI 0.3 kb をプローブとして用いても、下流 (X 遺伝子の 3' 側) の EcoRI-Hind III 0.75 kb を用いても、genomic サザン・ハイブリダイゼーションでスメア状のバンドを得た (図 3)。この結果は、WHV DNA の近接した両側に宿主側の反復配列が存在することを示してい

る。

II. 下流の反復配列にホモロジーをもつ DNA のクローニング

DNA 1 次構造の比較では、上流の Hind III-ClaI 0.3 kb の部分には、既に浜田らによって報告されている TG 反復に属すると考えられる 15 回の AC 反復が存在するが¹⁷⁾、下流部分の配列には、既知の反復配列と類似の配列は見いだされなかった。上流と下流の反復配列が同一単位のものか否か、および、下流の反復配列に属する他の配列がどのような構造を取っているかを検討するために、正常ウッドチャックの遺伝子ライブラリーから、下流の EcoRI-Hind III 0.75 kb をプローブとして、これにホモロジーを持つクローンの単離を試みた。しかし、通常の stringent な条件のハイブリダ

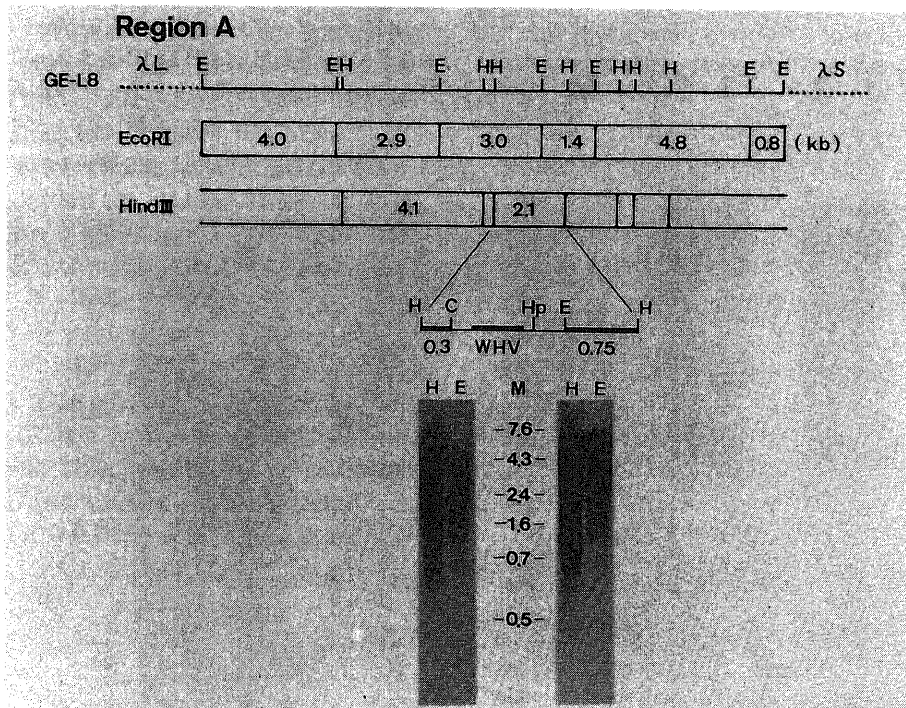


Fig. 3. Southern hybridization analysis of genomic digests of normal woodchuck liver with subfragments flanked to the integrated WHV DNA in region A. Genomic Southern hybridization (the bottom) was carried out as in Fig. 1. DNAs applied were EcoRI digests (E) or Hind III digests (H) of normal woodchuck liver DNA. The Hind III 2.1 kb fragment having the WHV DNA was digested with ClaI or EcoRI and the Hind III-ClaI 0.3 kb or the EcoRI-Hind III 0.75 kb subfragment was purified respectively. Plasmid DNA harboring the 0.3 kb (the left two lanes) or that with the 0.75 kb subfragment (the right two lanes) was used as the probe for hybridization. The positions of size marker DNAs (M) were shown in kb. The restriction map of region A is shown in the upper side according to the description of Kaneko et al⁹⁾. The restriction map of the Hind III 2.1 kb fragment is shown in the middle. Restriction enzyme cleavage sites: H, Hind III; E, EcoRI; C, ClaI; Hp, Hpa II.

イゼーションでは、ホモロジーを持つクローンの単離に成功しなかった。次いで、ハイブリダイゼーションを40%ホルムアミド存在下で42°Cとrelaxさせた条件にして、0.75 kbにホモロジーを持つクローンの単離を正常ウッドチャック肝DNAの遺伝子ライブラリーから試みた。その結果、約 $5 \sim 10 \times 10^2$ 個のプラーク当たり、1個の割合でホモロジーを持つクローンが単離された。また、M 13 pm 11のHind III消化の断片を挿入した遺伝子ライブラリーからは、約 10^4 個に1個の割合でクローニングされた。後者のクローニングで得られた3個のクローンは、制限酵素地図で同一断片であると判断された。得られたクローンからDNAを単離し、EcoRIおよびHind III消化をおこない制限酵素地図を作製するとともに、サザン・ハイブリダイゼーションのためにニトロセルロース膜にDNAを移行させた。

サザン・ハイブリダイゼーションのプロープとして

下流のEcoRI-Hind III 0.75 kbを用いたところ、遺伝子ライブラリーから得た4個のクローン中の2個であるNW-LR2クローンは、EcoRI 2.4 kb断片だけに、NW-LR5では、EcoRI-6.8 kb断片だけにプロープとホモロジーを持つ配列が存在することが示された(図4)。その他のクローンでは、EcoRI消化にて高分子領域に、又、EcoRI+Hind III消化にて複数のバンドが0.75 kbプロープとホモロジーを持ったので、今回は、塩基配列決定のためのサブクローニングはおこなわなかった。データは省略したが、M13ライブラリーのNW-MR1では、Hind III 1.0 kb断片にプロープとホモロジーを持つ配列が存在することが示された。NW-LR2, LR5, およびMRIを含むバンドは、上流のHind III-ClaI 0.3 kbをプロープとした時に、ホモロジーを持つバンドを検出できなかった(データ省略)。これらの結果は、A領域に見いだされた両側の反復配列が、それぞれ独立した反復配列に属することを示唆

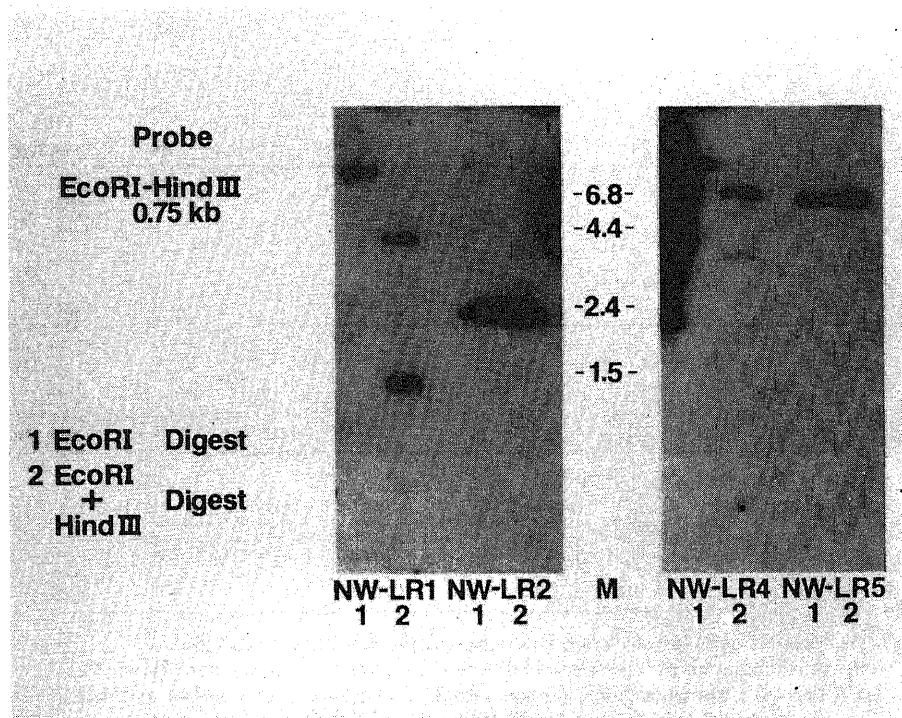


Fig. 4. Southern hybridization analysis of cloned DNAs with the 0.75 kb fragment as a probe.

Cloned DNAs, NW-LR1, NW-LR2, NW-LR4 and NW-LR5 were isolated from normal woodchuck genomic library of λ Charon 4A. Lane 1 of each DNA corresponds to EcoRI digest, lane 2 to EcoRI and Hind III double digest. The EcoRI-Hind III 0.75 kb fragment was used as the probe. The positions of size marker DNAs (M) were shown in kb.

すると考えられる。

III. 下流の反復配列とホモロジーを持つ DNA の塩基配列とこのファミリーの共通配列

サザン・ハイブリダイゼーションによって 0.75 kb プローブとホモロジーを持つ DNA 断片を pBR328 にサブクローニングして細かな制限酵素地図を作製の後 (図 5), プローブとホモロジーのある小断片部分の塩基配列決定を M13 ファージ DNA を用いたダイデオキシ法によっておこなった。0.75 kb と共通配列部分を含む塩基配列を図 6 に示した。この結果は、塩基配列決定をしたクローン間でみられる共通配列部分は約 450 bp であり、その中央部分には、DNA 挿入が高率にみられる領域があり、その高い diversion を有する部分に相当して、A 領域では 28 回の AT 反復が存在する。このことは、A 領域の AT 反復は、0.45 kb 反復配列ファミリーの共通配列ではなく、特異的な配列

であることを示している。これらの相互間の塩基置換率は約 25% であった。また、コンピューター解析によるホモロジー検索では、既知の反復配列と長いホモロジーを持つ領域は見いだされなかった。

IV. 他の生物種の DNA 中に 0.45 kb 反復配列に類似した配列の存在する可能性

今回明らかとなった 0.45 kb 反復配列ファミリーが、ウッドチャックに特異的な配列であるか否かを調べるために、各種の生物由来の DNA 試料を用いて genomic サザン・ハイブリダイゼーションをおこない、プローブとして 0.75 kb 断片を用いた。結果 (図 7) は、同類に属するマウスのみならず、ヒト、サケ、更には、回虫の DNA 中にもスメア状のバンドを認めた。このことは、今回、ウッドチャックに見いだされた 0.45 kb 反復配列ファミリーとホモロジーを持つ類似の反復配列が、これらの広い多細胞生物種に共通

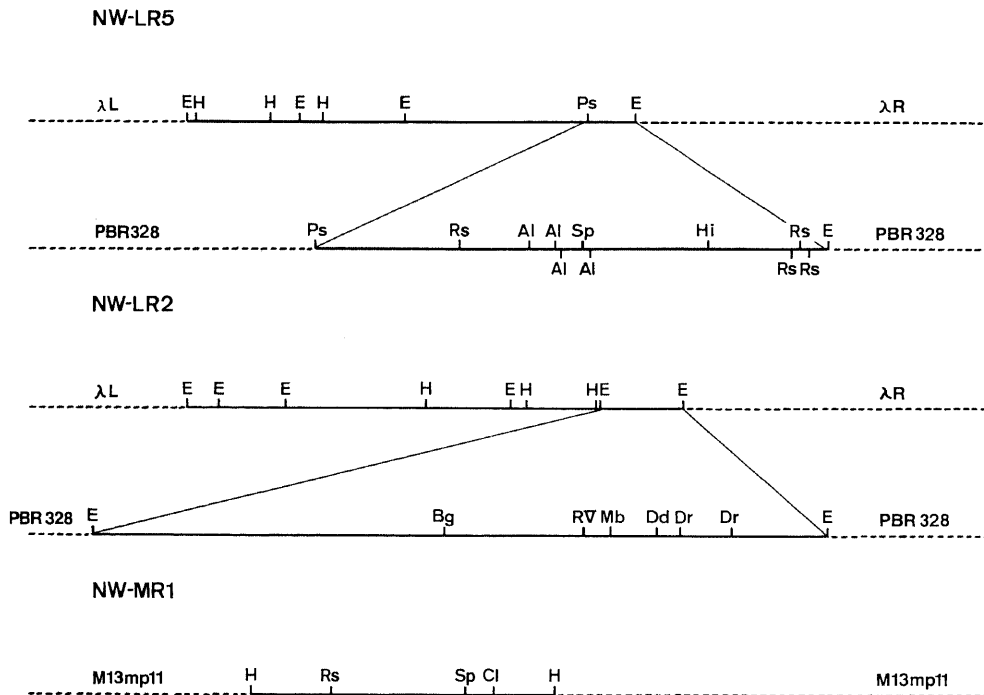


Fig. 5. Restriction maps of cloned DNAs having the repetitive sequences.

The restriction maps of three cloned DNA used for DNA sequencing were shown. Cloned DNA derived from woodchuck genome into λ of charon 4A were shown as thick lines. The relative position of the two EcoRI fragments of NW-LR2 near to the left arm (λ L) are tentative. Subcloned fragments inserted into pBR328 vector were shown in the case of NW-LR2 and NW-LR5 in an enlarged scale. M13 clones for DNA sequencing were constructed according to the fine mapping of the subfragment as shown in the Figure. In the case of NW-MR1, DNA sequencing was carried out directly at first, then subcloning was done according to the sequencing results.

Restriction enzyme cleavage sites: E, EcoRI; H, Hind III; Ps, PstI; Rs, RsaI; Al, AluI; Sp, SphI; Bg, Bgl II; RV, EcoRV; Dd, DdeI; Dr, DraI; Mb, MboI; Cl, ClaI.

して存在することが明らかとなった。しかし、真核単細胞生物に属する酵母では、類似の配列を検出することはできなかった。

考 察

HBV は、ヒトに感染し、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変等の様々な病態を生み出すのみならず、肝癌の発症に深く関連することが疫学的研究によって示唆されている。しかし、HBV の発がんにおける役割は、分子機構としていまだ明らかでない。近年、遺伝子工学的手法を駆使した研究が可能となり、クローニングされた HBV ゲノムを用いて各種肝疾患試料中の HBV の存在状態を明らかにすることが可能となった。その結果、HBV 関連マーカーが陽性の肝癌の約 75~100% 近くに HBV DNA の組み込みを認めることが報告され、肝癌発生に HBV DNA の組み込みが何らかの役割を

果していることが示唆されてきた。しかし、組み込まれているウイルス DNA は、いずれもゲノムの 1 部分であり、ウイルスの特定遺伝子が無傷でがん細胞に維持されているとは考えられない。また、ウイルスゲノム中のがん遺伝子に相当する遺伝子がコードされている事実はない。サザン・ハイブリダイゼーション等で検討された結果から、宿主染色体上の組み込み部分が少数に限定していることを示唆する結果はなく、むしろ、組み込み部位はまちまちの傾向にある。これらの事実は、ウイルスの転写制御シグナルが宿主 DNA に挿入されたことによるがん化を想定する場合にも、少数の標的部位への単純なウイルスゲノムの組み込みでは説明が困難である。また、組み込み部位近傍の宿主の DNA 構造の再配列、再編成を伴う例が多く、HBV ゲノムの組み込みと発がんとの関連説明は容易ではない。

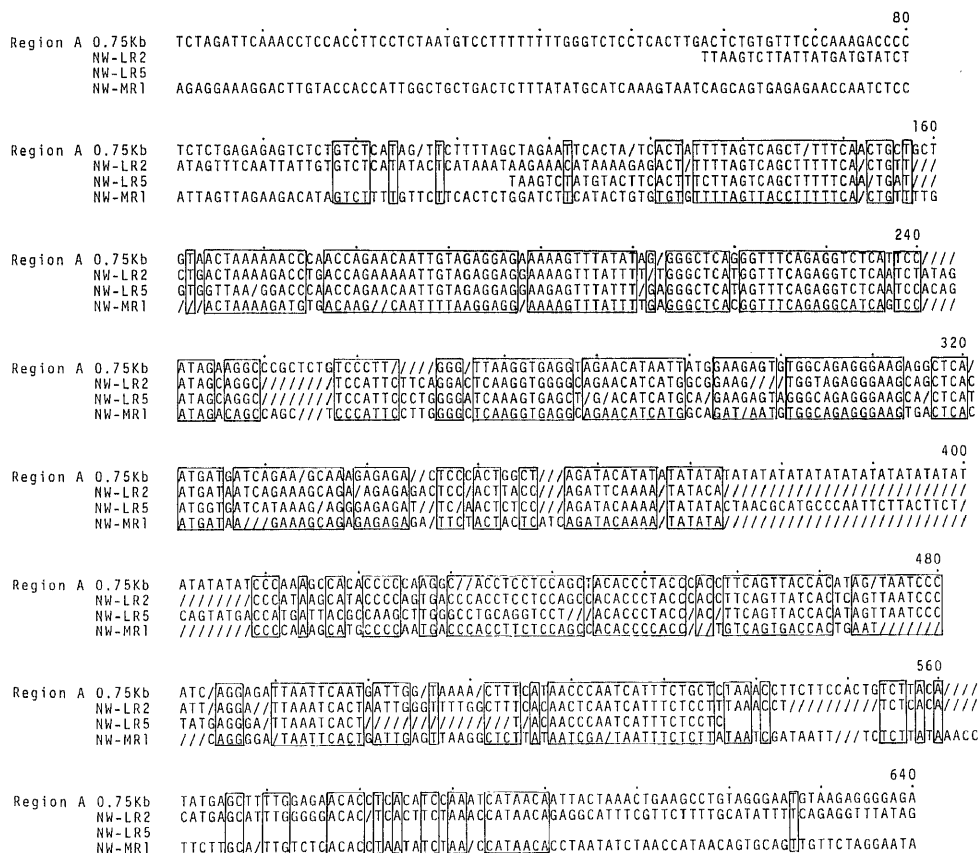


Fig. 6. The sequence analysis of fragments from cloned DNAs, NW-LR2, NW-LR5 and NW-MR1 having homology to 0.75 kb fragment.

The sequences of fragments from cloned DNAs, NW-LR2, NW-LR5 and NW-MR1 homologous to 0.75 kb fragment were shown. Bases in boxes are conserved among three or four fragments.

HBVの肝癌関与を検討する上で有力な研究方向の1つは、動物モデル系を用いた研究である。特に、HBV類似のウイルス群（ヘパドナウイルス）が発見されて以来、ウイルスのゲノム構造の比較から、ヘパドナウ

イルスが進行的に共通の祖先を持ち、また、HBVと類似の病原性を示すことが明らかとなった¹⁸⁾。そして、ヘパドナウイルスに属するHBV、WHV、GSHV、DHBVの中で、WHVが最も発がん性が強いことが示

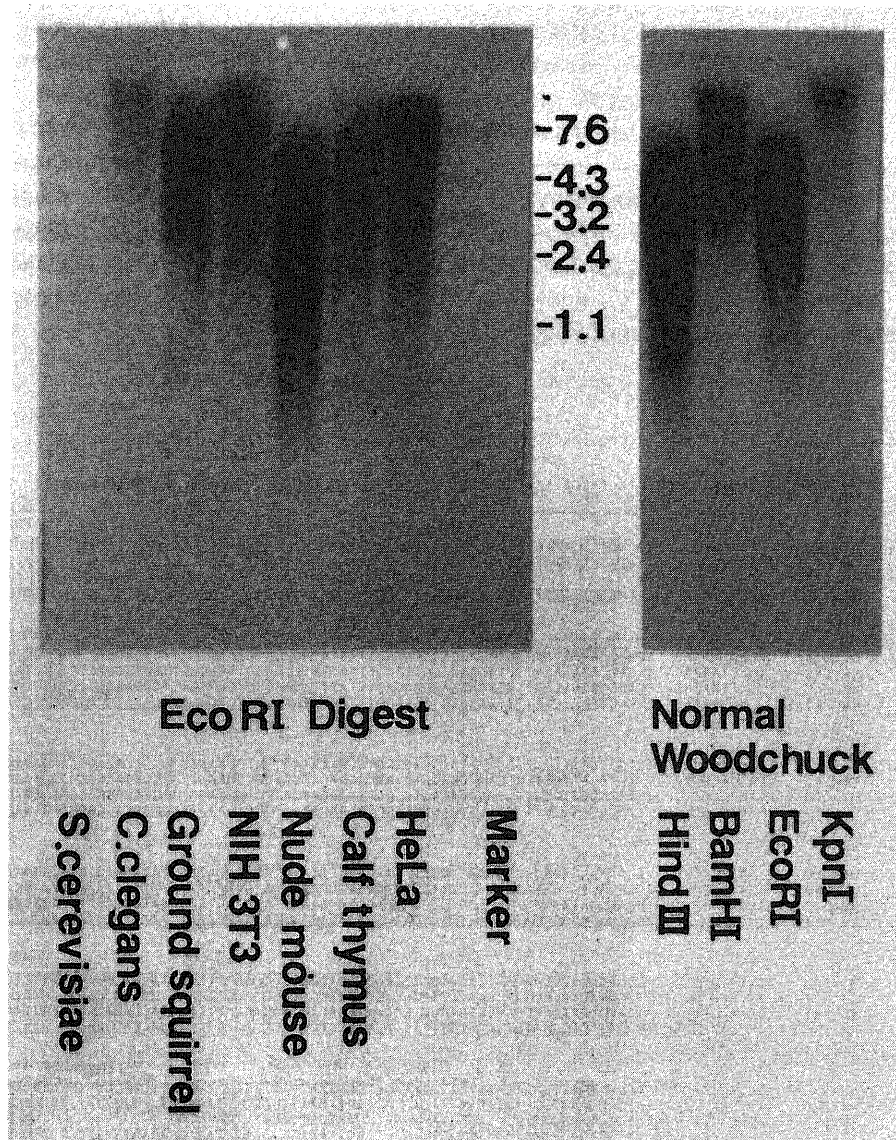


Fig. 7. Southern hybridization analysis of DNA samples of various sources with EcoRI-Hind III 0.75 kb as the probe.

The result in the right is Southern hybridization of normal woodchuck DNA after various restriction enzyme digestion. No discrete band is detected in each lane. The result in the left is a Southern hybridization of EcoRI digests of various DNA samples. In each lane, 10 to 20 μ g of DNA samples was applied. The isolated EcoRI-Hind III 0.75 kb was used as the probe. Hybridizations were carried out in the presence of 40% formamide at 42°C as described in Materials and Methods. The numbers (kb) on the middle indicate the position of size marker DNAs.

され、ウッドチャックの場合、肝硬変という病態を経由せず感染後2〜3年という比較的短期間に肝癌が発症することが知られている⁹⁾。これらの点から、ウッドチャックとWHVの系は、ヒト肝癌とHBVの関連を検討する上で有力な系として用いられている。

著者らは、ウッドチャック肝癌由来移植固形癌とそれを出発材料とした樹立細胞培養株WH257 GE10におけるWHV DNAの存在様式を検討し、これらの細胞集団の継代過程で、3箇所WHV DNAの組み込み部位が安定に維持されていることが示された⁹⁾。その中のA領域には、WHVゲノムのS遺伝子のC端からX遺伝子の中央部までが再編成なく組み込まれていて、従って、WHVのエンハンサー領域が存在する。また、A領域のWHV DNAの近傍の宿主DNA配列に、特徴的なプリン・ピリミジンの繰り返し構造がみられ、A領域の形成には宿主側の再編成の存在が示唆されている。このため、WHV DNAの近傍に存在する宿主の反復配列の配置と構造の解析が、A領域の形成およびWH257 GE10細胞中でのこの領域の遺伝的活性を知る一助となることを期待して構造解析をおこなった。

この結果は、以下の通りであった。1) A領域の組み込まれたWHV DNAの近傍の両側に宿主側の反復配列が存在し、この両側の配列は、WHV DNA組み込みによって分断された1つの反復配列と考えるより、それぞれ独立した2つの反復配列がWHV DNAに近接して存在すると推定される。2) 下流に存在する反復配列は、約450 bpのサイズの反復配列のファミリーに属する。3) 下流の反復配列部分の中央に見いだされる28回のAT反復は、0.45 kbの反復配列に属する他の配列には見いだされず、A領域の反復配列に特異的な配列と考えられた。従って、A領域では、WHV DNAの上流にTG反復配列に属する15回のAC繰り返し¹⁷⁾と、下流の約0.45 kbファミリーに属する配列の中央部にAT繰り返しが存在する特徴的な構造となっている。これらのプリン・ピリミジン繰り返し配列は、DNAの局所構造をZ型に転換させる可能性が指摘されていて¹⁹⁾、TG反復に関しては、エンハンサー活性が存在することが浜田らにより報告されている²⁰⁾。事実、金子らは、A領域に存在するAC反復を含む亜領域および0.45 kb反復配列を含む亜領域にエンハンサー活性があるとの結果を得ている(未発表)。また、最近では、HBVの組み込み近傍にmini-satellite反復配列が存在することが示唆され、組み込み部位の形成、特に宿主側の再編成に関連する可能性が示唆されている²¹⁾。このような点から、今回明らかになったWHV DNAの両側の反復配列が、A領域の形成の転

写制御の面から何らかの役割を果している可能性がある。

今回構造的な特徴を明らかにしたウッドチャックに存在する0.45 kb反復配列ファミリーは、1倍体当たり約10⁴個存在する反復配列と考えられ、クローニングされた反復配列がtandemに並ぶことなく、近傍にユニーク配列が存在することから、interspersed repetitive sequenceと考えられる。現在までに、このようなサイズのSINEで最もよく知られているのはAlu配列であり²²⁾、その他にもB2²³⁾、O²⁴⁾、R²⁵⁾、ID²⁶⁾²⁷⁾、Sau 3A²⁸⁾、等のSINEがあり、また、プリン・ピリミジン繰り返しに属するTG、CA等も知られている¹⁷⁾。コンピュータプログラムを用いたホモロジー検索では、これらの配列と今回解析した0.45 kbファミリーの間では長いホモロジーを検出できず、最も長いホモロジーでも25塩基対に22のマッチであり、0.45 kbに及ぶ相同性は検出できなかった。また、long interspersed repetitive sequence (LINE)の一部である可能性についてもKpnI²⁹⁾およびMIF-1ファミリー³⁰⁾とのホモロジーを検討したが、長いホモロジー配列は検出できなかった。これらの結果、今回明らかにした0.45 kbファミリーは、今までに報告されていない新たなSINEであると考えられる。興味深いことに、0.45 kbファミリーに類似の反復配列が、今回検討した全ての真核多細胞生物DNA試料にgenomic サザン・ハイブリダイゼーションレベルで検出されたが、真核単細胞生物である酵母DNAには検出されなかった。今後、植物細胞DNA等の検討が必要とはいえ0.45 kbファミリーが、多細胞生物に共通して広く存在するSINEである可能性が高く、その機能の解析が必要である。特に、この配列がWHV DNAの組み込み部位の近傍に見いだされたことは、このSINEが、DNA組み換えを起こし易い部位(recombinogenic site)として機能している可能性がある。また、Roglerらによれば、HBV DNAが染色体の切断を受け易い部位(fragile site)に頻度高く組み込まれうる可能性が指摘されており³¹⁾、0.45 kbとfragile siteとの関連も今後の課題である。

最近、反復配列の多くのものが、逆転写の過程を経て染色体の他の部位に移動することが指摘され、retrotransposonの提唱もある。このような可能性は、SINE、LINEがmovable elementとして機能することを暗示しており、ヘパドナウイルスがRNAを経由する特異な複製過程を持つこととの関連を含め興味深い課題と思われる。今後、ヘパドナウイルスDNAの組み込みとそれに伴う宿主DNAの再編成を解析する上で、他の生物種、特に、ヒトに存在する0.45 kb類似の

反復配列の解析が必要と考える。

結 論

ウッドチャック肝癌由来樹立培養細胞株中の WHV DNA が組み込まれている A 領域の WHV DNA 近傍の反復配列の特徴について解析した。

1. WHV DNA が組み込まれている A 領域の近傍に約 450 bp の反復配列が存在した。

2. この 450 bp の反復配列は、正常ウッドチャック DNA の 1 倍体当り約 10^4 存在すると推定され、SINE に属すると考えられ、しかも、既知の AluI, B2, R, O, Sau 3A, ID, 等の SINE とは異なる新しい反復配列であった。

3. この反復配列と類似の反復配列が、ヒト、マウス、サケ、回虫、等の広い多細胞生物の DNA 中に存在すると推定された。

4. A 領域の WHV DNA を狭んで、AC 反復配列と今回解析した約 450 bp の反復配列が存在し、並びに、A 領域のこの反復配列にのみ AT 繰り返しが存在した。従って、A 領域は、2 つのプリン・ピリミジン繰り返しがあり、組み込まれた WHV DNA の近傍両側に存在する特徴的な構造をとっている。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった、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、大阪大学医学部遺伝子講座吉川寛教授、金沢大学がん研究所生物物理部村上清史助教授に心から感謝いたします。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原田文夫教授に深謝いたします。また、御協力をいただいた第 1 内科第 2 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いたします。

尚、本論文の要旨は、第 22 回日本肝臓学会総会（昭和 61 年度、甲府）に発表した。

文 献

- 1) Beasley, R., Hwang, L. Y. & Lin, C. C.: Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet*, **2**, 1129-1132 (1981).
- 2) Shafritz, D. A., Shouval, D. & Sherman, H. I.: Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cell in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, **305**, 1067-1073 (1981).
- 3) Koshy, R., Maupas, P. H. & Müller, R.: Detection of hepatitis virus-specific DNA in the genome of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis tissues. *J. Gen. Virol.*, **57**, 95-102

(1981).

- 4) Brechot, C., Pourcel, C. & Hadchouel, M.: State of hepatitis B virus DNA in liver diseases. *Hepatology*, **2**, 27-34 (1982).
- 5) Chen, D. S., Hoyer, B. H. & Nelson, J.: Detection and properties of hepatitis B virus DNA in liver tissues from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **2**, 42-46 (1982).
- 6) Hino, O., Kitagawa, T. & Koike, K.: Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatology*, **4**, 90-95 (1984).
- 7) Summers, J.: Three recently derived animal virus models for human hepatitis B virus. *Hepatology*, **1**, 179-183 (1981).
- 8) Summers, J., Smolec, J. M. & Snyder, R.: A virus similar to hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4533-4537 (1978).
- 9) Kaneko, S., Ohshima, T. & Murakami, S.: Stable integration of woodchuck hepatitis virus DNA in transplanted tumors and established tissue culture cells derived from a woodchuck primary hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, **46**, 3608-3613 (1986).
- 10) Kobayashi, K., Fukuoka, K. & Matsushita, F.: Transplantation of woodchuck hepatocellular carcinoma nude mice. *Hepatology*, **3**, 663-666 (1983).
- 11) Unoura, M., Kobayashi, K. & Fukuoka, K.: Establishment of a cell line from a woodchuck hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **5**, 1106-1111 (1985).
- 12) Kaneko, S., Kodama, K. & Murakami, S.: A small part of woodchuck hepatitis virus genome corresponding to the enhancer region is integrated in a hepatoma cell line of woodchuck. *J. Virol.* (1987), in press.
- 13) Messing, J. & Vieira, J.: A new pair of M13 vectors for selecting either strand of double-digest restriction fragments. *Gene*, **19**, 269-276 (1982).
- 14) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 15) Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.: Molecular cloning: A laboratory manual, 383-386. Cold spring harbor laboratory, New York, 1982.
- 16) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **74**, 5463-5467 (1977).
- 17) **Hamada, H., Petrino, M. G. & Kakunaga, T.**: Characterization of genomic poly (dT-dG)•poly (dC-dA) sequences: structure, organization and conformation. *Mol. and Cel. Biol.*, **4**, 2610-2621 (1984).
- 18) **Kodama, K., Ogasawara, N. & Yoshikawa, H.**: Nucleotide sequence of a cloned woodchuck hepatitis virus genome: evolutionary relationship between hepadnaviruses. *J. Virol.*, **56**, 978-986 (1985).
- 19) **Hamada, H., Petrino, M. G. & Kakunaga, T.**: A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6465-6469 (1982).
- 20) **Hamada, H., Seidman, M. & Howard, B. H.**: Enhanced gene expression by the poly (dT-dG) • poly (dC-dA) sequence. *Mol. and Cel. Biol.*, **4**, 2622-2630 (1984).
- 21) **Berger, I. & Shaul, Y.**: Integration of hepatitis B viruses: Analysis of unoccupied sites. Abstracts of papers presented at the 1986 meeting on molecular biology of hepatitis B viruses, 47, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1981.
- 22) **Jagadeeswaran, P., Forget, B. G. & Weissman, S. M.**: Short interspersed repetitive DNA elements in eukaryotes: transposal DNA elements generated by reverse transcription of RNA pol III transcripts? *Cell*, **26**, 141-143 (1981).
- 23) **Kramerov, D. A., Grigoryan, A. A. & Pyskov, A. P.**: Long double-stranded sequences (dsRNA-B) of nuclear pre-mRNA consist of a few highly abundant classes of sequences: evidence from DNA cloning experiments. *Nucl. Acids Res.*, **6**, 697-713 (1979).
- 24) **Sun, L., Paulson, K. E. & Schmid, C. W.**: Non-Alu family interspersed repeats in human DNA and their transcriptional activity. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 2669-2690 (1984).
- 25) **Gebhard, W., Meitlinger, T. & Hocht, J.**: A new family of interspersed repetitive DNA sequences in the mouse genome. *J. Mol. Biol.*, **157**, 453-471 (1982).
- 26) **Milner, R. J., Bloom, F. E. & Lai, C.**: Brain-specific genes have identifier sequences in their introns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 713-717 (1984).
- 27) **Sutcliffe, J. G., Milner, R. J. & Bloom, F. E.**: Common 82-nucleotide sequence unique to brain RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 4942-4946 (1982).
- 28) **Kiyama, R., Matsui, H. & Oishi, M.**: A repetitive DNA family (Sau 3A family) in human chromosomes: Extrachromosomal DNA and DNA polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4665-4669 (1986).
- 29) **Shafit-Zagardo, B., Maio, J. J. & Brown, F. L.**: Kpn I families of long, interspersed repetitive DNAs in human and other primate genomes. *Nucl. Acids Res.*, **10**, 3175-3193 (1982).
- 30) **Brown, D. M. & Dover, G.**: Organization and evolutionary progress of a dispersed repetitive family of sequences in widely separated rodent genomes. *J. Mol. Biol.*, **150**, 441-452 (1981).
- 31) **Rogler, C. E., Sherman, M. & Su, C. Y.**: Deletion in chromosome 11p associated with a hepatitis B integration site in hepatocellular carcinoma. *Science*, **230**, 319-322 (1985).

Structural Properties of Repetitive Sequences Near an Integration Site of Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) DNA in an Established Cell Line Derived from a Woodchuck Primary Hepatocellular Carcinoma Shou Aoyama, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 426—438 (1987)

Key words : repetitive sequence, woodchuck hepatitis virus, hepatocellular carcinoma

Abstract

High frequency of integration of human hepatitis B virus (HBV) DNA into host DNA in hepatocellular carcinomas (HCC) has been regarded as suggesting an essential role of HBV DNA integration on the generation of HCC. Woodchuck hepatitis virus (WHV), one of the members of hepadnaviridae, is most oncogenic among hepadnaviruses and thus WHV and woodchuck have been regarded to be one of the most suitable experimental model systems to understand the oncogenic mechanism of viral induced HCC. Two repetitive sequences of host DNA were discovered in the course of analyses of a cloned region of WHV DNA integration site, region A, which has been stably maintained during passages of an established cell line derived from a HCC of a WHV infected woodchuck. The two repetitive sequences surrounded the integrated WHV subgenome having the viral enhancer region; an AC repeat in upstream to the WHV DNA and a repetitive sequence in downstream to the WHV DNA. Since the latter has no homology to reported repetitive sequences, cloning of DNA having homology to the downstream region was carried out from genomic libraries of normal woodchuck liver DNA by plaque hybridization. By comparisons of DNA sequences of cloned regions homologous to the downstream sequence of region A, a long sequence was found to be conserved. The properties of the repetitive sequence family are summarized as follows. 1) The size of the repetitive sequence is around 0.45 kb, and its copy number is around 10^4 per haploid genome of woodchuck. 2) There is a highly divergent part in the middle of the conserved sequence, where the long poly AT repeat was inserted in the sequence of region A. 3) Homologous sequences were detected in a wide variety of multicellular eukaryotic DNA, including human, mouse, nematoda, but were not detected in yeast DNA. 4) This family of repetitive sequences could be categorized as a new SINE since no long homology was detected between repetitive sequences reported previously. The WHV DNA sequence, therefore, is surrounded two repetitive sequences each of which has a long purine-pyrimidine alternate. Such structure might afford structural and functional characteristics around the integration site of the WHV DNA. The meaning of such structural properties is discussed in relation to roles of hepadnaviral DNA integration on the generation of HCC.