

特 集 Ⅱ

アデノウイルス癌遺伝子の機能と細胞の温熱感受性

豊 島 宗 厚

日本歯科大学新潟歯学部内科

キーワード：アデノウイルス，癌遺伝子，トランスフォーメーション，アポトーシス，温熱療法

はじめに

これまでの多くの研究業績が示すように、腫瘍学において DNA 腫瘍ウイルスを用いた研究がきわめて重要な位置を示していることは間違いのない事実である。しかしながら、その研究の発展の歴史を辿れば、このウイルスはただ単に癌を発生させる簡便な道具としての存在にとどまらず、分子生物学あるいは細胞生物学上の重要な知識の発見に寄与していることが理解できる。今日、ウイルスとその宿主である真核細胞の細胞性因子との相互作用の解明が精力的に行われているが、これにより細胞性因子の本来の機能が明らかになるものと期待される。こうした細胞性因子の解明の中で特に近年進展のめざましいものに、細胞の DNA 複製、転写の調節に関する領域があるが、これらの領域は細胞の増殖と癌化、細胞死の機構に密接な関連をもち、医学的にも高い関心のもたれている分野である。

温熱療法が癌の治療の一つとして登場して以来、温熱の効果を細胞あるいは分子のレベルで明らかにしようとする動きが多くの研究施設で起こったが、なかでも最も強い関心は、はたして癌細胞が正常の細胞に較べて高い温熱感受性を示すかどうか

かという点にあった。臨床材料として得たヒト癌細胞の検討¹⁾²⁾³⁾、動物由来の実験腫瘍細胞を用いた解析⁴⁾⁵⁾などにより、概ね癌細胞の温熱感受性が高い可能性が示唆された。しかし、より厳密に癌化に伴う温熱感受性の変化を把握するには、実験的に発癌させた腫瘍細胞系を用いなければならない。この観点から、ポリオーマウイルス、SV40 などの DNA 腫瘍ウイルスによる癌細胞（トランスフォーム細胞）が温熱感受性の解析に用いられた⁶⁾⁷⁾⁸⁾。この動きは、癌遺伝子の発見以後は癌遺伝子を導入した細胞を用いた研究へと発展し、今日に至っている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。今後は、癌遺伝子または癌抑制遺伝子の機能と温熱感受性の関係が論じられるようになるものと思われるが、それは細胞性因子との関係を明らかにすることなくしては為し得ないことであろう。

こうした流れのなかで、アデノウイルスは明確な癌遺伝子を有し、その機能が細胞性因子と関連づけて理解されてきている DNA ウイルスであり、癌化と温熱感受性の変化について解析する上で大変重要なデータを提供してくれるものと期待される。この総説では、アデノウイルス癌遺伝子の構造と機能について解説し、それらの細胞性因子との関係を明らかにするとともに、筆者の研究結果の一端を紹介しながら、細胞の温熱感受性を決定する要因について論究したい。

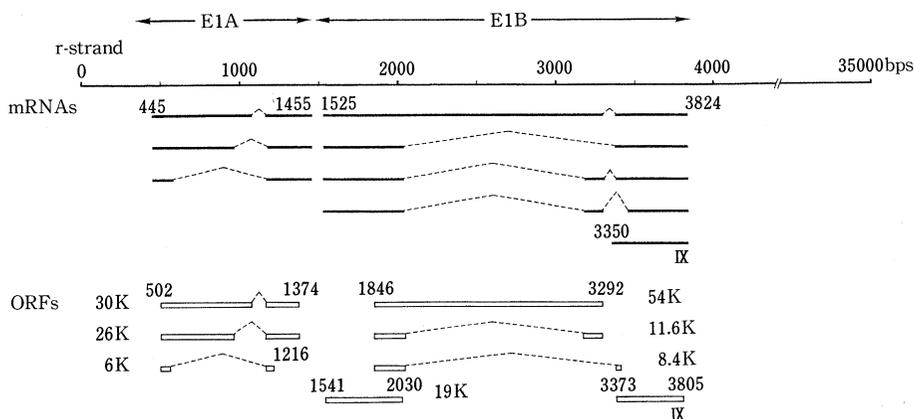
1994年12月21日受付（依頼原稿）

I. アデノウイルス癌遺伝子の構造と機能

アデノウイルスには宿主を異にする 80 以上の血清型が存在する。ヒトアデノウイルスには 41 の血清型があり、遺伝子 DNA の相同性をもとに A-F の亜群に分類されている。このうち A 群は強発癌性、B 群は弱発癌性であり、他の群は 9 型 (D 群) を除き発癌性は認められない。しかし、F 群を除いたすべてにげっ歯類由来の培養細胞をトランスフォームする活性が見られる¹²⁾¹³⁾。遺伝子は、約 35,000bp (分子量 2.3×10^7) の 2 本鎖線状 DNA で、ゲノム構造は詳細に解析され¹⁴⁾、初期、移行期、後期遺伝子として計 14 領域が同定されている¹²⁾。初期遺伝子は template strand としての r 鎖に E1A, E1B, EL, E3 の 4 領域が、l 鎖に E2A, E2B, E4 の 3 領域が存在している¹⁴⁾。各領域は細胞由来の RNA ポリメラーゼ II により転写され、複数のスプライス構造を異にする mRNA および蛋白質をコードする¹⁴⁾¹⁵⁾。

アデノウイルスの癌遺伝子の同定は、変異ウイルスおよびウイルス DNA 断片を用いたトランス

フェクション実験により行われた¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。その結果、癌遺伝子は r 鎖の左端に位置する E1A, E1B 遺伝子と決定された (Figure 1)。これらの領域からは細胞のトランスフォーメーションに密接に関係する複数の蛋白質が合成される¹⁵⁾¹⁶⁾。すなわち、E1A 遺伝子からは沈降係数 13S, 12S, 9S の 3 種類の mRNA が転写され、13S からは 53k, 44k の蛋白質が、12S からは分子量 47k, 35k, 9S からは 28k の蛋白質がそれぞれ合成される。一方、E1B 遺伝子からは、22S, 13S の mRNA により各々 54k, 15-19k の蛋白質が合成される (Table 1)。各蛋白質には、Table 2 に示すように多彩な機能があることが知られているが、E1A 領域に関しては、13S, 12S mRNA のコードする蛋白質が重要で、これらは細胞の DNA 合成を誘導し²⁰⁾、トランスフォーメーションに必須の機能を有している²¹⁾²²⁾。13S のコードする 53k, 44k の蛋白質はおもに細胞核に存在するリン酸化蛋白質で、細胞に永久増殖能を与えて不死化する機能を有している。この際、トランスフォーム細胞は形態学的な変化とともに活発な増殖能を示すが、軟寒天中でのコロニー形成能や動物における造腫瘍能がきわめて



The transcripts are represented below the scale of r "template" strand, of which continuous lines indicates the segments of rightward transcripts in mature RNAs and interrupted carets denote spliced sites of RNA. The open reading frames (ORFs) and estimated (not measured) molecular weights of the products are also stated beneath

Figure 1 Gene map of E1A and E1B regions of adenovirus type 12.

Table 1 The products of adenovirus early region 1A and 1B

Region	Coordinates (map units)	Transcripts	Proteins	
			estimated MW	measured MW
E1A	1.3-4.6	r, 13S	30k	53k, 44k
		r, 12S	26k	47k, 35k
		r, 9S	6k	28k
E1B	4.6-11.2	r, 22S	54k	54k
		r, 13S	11.6k	15-19k

Table 2 The functions of adenovirus E1A and E1B genes.

Proteins	mRNA	Localization	functions
E1A 53k/44k	13S	nucleus	cell immortalization (incomplete transformation) transactivation adenovirus early genes (E1B, E2, E3, E4): essential for virus replication cellular genes (HSP, β -tubulin) transduced genes transcriptional suppression cellular class I MHC gene transduced enhancer genes
E1A 47k/35k	12S	nucleus	essential for complete transformation dispensable for virus replication
E1B 15-19k	13S 22S	nuclear & cytoplasmic membrane	essential for complete transformation cellular & viral DNA stabilization enhancement of efficiency of virus replication
E1B 53-54k	22S	nucleus & cytoplasm	initiation of transformation enhancement of tumorigenicity essential for virus replication binding to p53

低いなど、不完全なトランスフォーメーションしか示さない²¹⁾²²⁾。しかし、これに E1B またはヒト癌遺伝子の機能が加わると完全なトランスフォーメーションが起こる²³⁾。53k, 44k 蛋白質は他の遺伝子の転写を促進または抑制して調節する機能があり、実際 E1B, E2A, E2B, E3, E4 の転写に必要で、ウイルスの増殖に必須の働きをしている²³⁾。また、癌抑制遺伝子 *p53* や細胞の β -チューブリン、熱ショック蛋白質などの遺伝子の転写も促進する²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。47k, 35k 蛋白質も核に局在するリン酸化蛋白質で、不死化された細胞を悪性化するがウイルスの増殖には必須とされていない²¹⁾。

E1B 22S mRNA からは 53-54k および 15-19k 蛋白質が、13S mRNA からは 15-19k および 8-12k 蛋白質が翻訳され得るが、実際に検出されるのは 8-12k を除いた 3 種である。15-19k 蛋白質

は核膜、細胞質膜に局在し、細胞の完全なトランスフォーメーションに不可欠である²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾。それ自身ではトランスフォーム活性を持たないが、E1A 遺伝子産物の機能と協調して完全なトランスフォーメーションを引き起こす。また、後に述べるように DNA が核酸分解酵素によって分解されるのを防ぎ、細胞ならびにウイルス DNA の安定化に寄与する²⁸⁾。一方、53-54k 蛋白質は細胞のトランスフォーメーションの開始およびウイルスの増殖に必要な蛋白質である²⁹⁾³⁰⁾。これは細胞性蛋白質の一つである p53 と結合し、その機能を阻害しているものと考えられている¹⁵⁾³¹⁾。

II. アデノウイルス癌遺伝子の機能と細胞性蛋白質

現在、アデノウイルス癌遺伝子と細胞性因子と

の相互関係が、細胞増殖と癌化、細胞死といった細胞にとって重要な現象と関係づけて精力的に解析されつつある。この章では、これまで得られた知見のうち細胞増殖と癌化の観点から、アデノウイルス癌遺伝子産物の細胞性因子との関係につき記述する。

1. E1A 遺伝子と細胞の癌化

アデノウイルス遺伝子の左端約 4.5% に位置する E1A 遺伝子は 13S, 12S の mRNA に転写され、その第 1 エキソンは細胞の癌化に必須であることが示された³²⁾。第 1 エキソンにはウイルス株間でよく保存されている領域 CR1, CR2, CR3 が存在し、それらの変異株を用いた検討により、CR1 は細胞の DNA 合成の誘導、細胞の不死化とトランスフォーメーション、転写制御に関わり、CR2 は不死化およびトランスフォーメーション、CR3 は転写の活性化に関係していることが明らかとなった³³⁾³⁴⁾。

こうした機能に対応して、各 CR 領域は細胞増殖と密接に関連した細胞性蛋白質と結合することが明らかになってきた。まず、網膜芽細胞腫で見いだされた癌抑制遺伝子 *RB* の産物、pRb (p105) と E1A 蛋白質が複合体を形成している事が明らかとなり³⁵⁾、E1A 側の結合部位が CR1 および CR2 と同定された³⁴⁾。しかも、pRb は同じ DNA 腫瘍ウイルスの一つである SV40 の T 抗原とも同様の部位で結合することから³⁶⁾、E1A による癌化機構において pRb が重要な役割をもっていると考えられた。pRb は細胞性転写因子 E2F と複合体を形成し、G1 後期から S 期における自身のリン酸化により E2F を解離、解離した E2F により細胞の DNA 合成が促進されるものと考えられている³⁷⁾³⁸⁾。現在 E1A の機能として、その CR2 領域で、pRb に結合、CR1 領域の働きにより E2F を解離し、その結果として細胞増殖を進めると考えられている³⁹⁾。これは、細胞周期における CyclinD/cdk4 複合体による E2F 解離の機構に類似した作用機作である。

E2F の制御には様々な細胞性因子が関係して

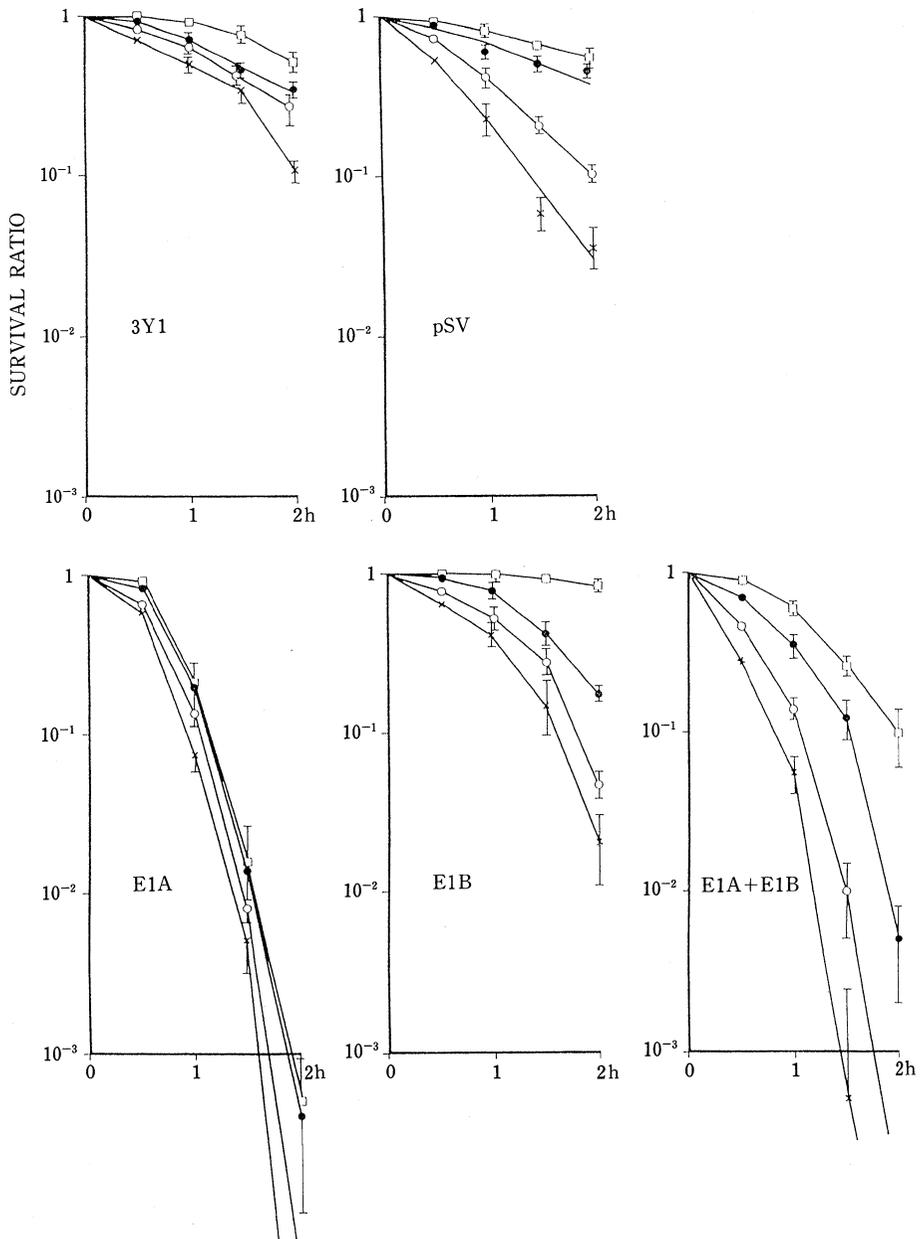
いるが、p107 も S 期において CyclinD/cdk4 または CyclinA/cdk2 と複合体を形成して E2F に結合し、細胞増殖や DNA 合成に必要な遺伝子群の転写の調節を行っていると考えられる³⁸⁾。CR1 および CR2 は、この p107 と結合して E2F を解離し、細胞の増殖を促進している可能性がある⁴⁰⁾。また G0/G1 期において E2F 転写活性を抑制する因子としての p130 蛋白質は、p107 と約 50% のアミノ酸のホモロジーを有する *RB* 遺伝子ファミリーの一員とみなされているが、p130 も CR1 および CR2 と結合することが知られている⁴¹⁾。以上のように、CR1 および CR2 は複数の *RB* 癌抑制遺伝子ファミリーの蛋白質と結合し、細胞増殖を促進、細胞を癌化させているものと考えられる。

これとは別に、p300 蛋白質は CR1 とのみ結合し、その結果 G2/M 期の制御がとれて有糸分裂が促進されるが、これにより pRb/E2F とは異なる経路での E1A による癌化機構が存在することが示唆された³⁴⁾⁴²⁾⁴³⁾。

なお 13S mRNA にのみ存在する CR3 には、Zn フィンガーモチーフがあり、TBP (TATA box binding protein)、転写因子 ATF などとの結合性を有しているが、トランスフォーメーションとの関係は明らかでない。

2. E1B 遺伝子と癌化細胞の安定化

E1B 遺伝子には、前述のようにそれ自体に細胞を癌化する機能は認められないが、E1A により不死化 (不完全トランスフォーメーション) された細胞を完全なトランスフォーメーションへと導く機能がある。この機能の解明の端緒は、アデノウイルス感染系でのプラーク形成に関する変異株の解析にあった。TAKEMORI らは、感染後の細胞障害性変異株 *cytotoxic mutant* の変異遺伝子 *cyt* が、E1B 19k 蛋白質をコードすることを報告した⁴⁴⁾⁴⁵⁾。この *cyt* 変異株は細胞障害性が強く、細胞 DNA の崩壊を伴い、トランスフォーメーションの効率が低いことが明らかになった²⁸⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾。さらに、この細胞 DNA の不安定性は E1A 遺伝



The transformed cells were obtained by transduction of pSV2Neo plasmid containing E1A or E1B genes, cloned and characterized. Each cell lines were heated at 42.5°C □, 43.0°C ●, 43.5°C ○, 44.0°C ×, and examined by colony formation assay.

Figure 2 Heat-survival curves of the transformed cell lines.

子 CR1 領域の 22~86 アミノ酸残基の機能によってもたらされたものである事がわかったが、E1B 19k 蛋白質がこれを抑制しているものと考えられた⁴⁹⁾。また、DNA の崩壊は宿主細胞に限らず、感染したウイルス DNA にも認められ⁵⁰⁾、ウイルスが効率のよい増殖を果たすために必要な機能と思われた。

一方、E1B 54k 蛋白質にも癌化細胞の腫瘍原性を高める機能があり⁴⁷⁾、19k 蛋白質と同様の機能を有する可能性が示されているが、この点に関しては癌抑制遺伝子 p53 との関係で研究が進められている。そもそも p53 蛋白質は、SV40 の T 抗原と結合している細胞性蛋白質として発見されたが⁵¹⁾、まもなくアデノウイルスの腫瘍抗原と結合していることが報告された。すなわち、E1B 54k が細胞性蛋白質である p53 と会合し、その複合体がトランスフォーム細胞の細胞質内に局在していることが判明した⁵²⁾⁵³⁾。p53 蛋白質の機能がトランスフォーメーションの抑制である事が明らかになり⁵⁴⁾、E1B 54k 蛋白質の機能が、p53 の活性を阻害することによる癌化の促進にあると考えられた⁵⁵⁾。現在のところ、p53 は、cdk 活性を阻害し細胞増殖を抑制する分子量 21k の蛋白質 p21 (Cip1) の転写を活性化していることがわかっている⁵⁶⁾。さらに補足すれば、p53 は SV40 DNA の複製開始点付近の配列、TGCCT の反復配列、および GGACATGCC のパリンδροーム配列に見られるような特異的塩基配列⁵⁷⁾を認識、あるいは HTLV-I の LTR の enhancer 配列を認識して結合し⁵⁸⁾、転写を活性化する。また、p53 は後に述べるように、アポトーシス誘導蛋白質としても知られているが、同時に E1A により誘導されるアポトーシスを促進し、これを E1B 19k および 54k が抑制するという関係も大変興味深い⁵⁹⁾。

Ⅲ. アデノウイルス・トランスフォーム細胞の温熱感受性

以上述べたように、E1A, E1B 遺伝子は様々な

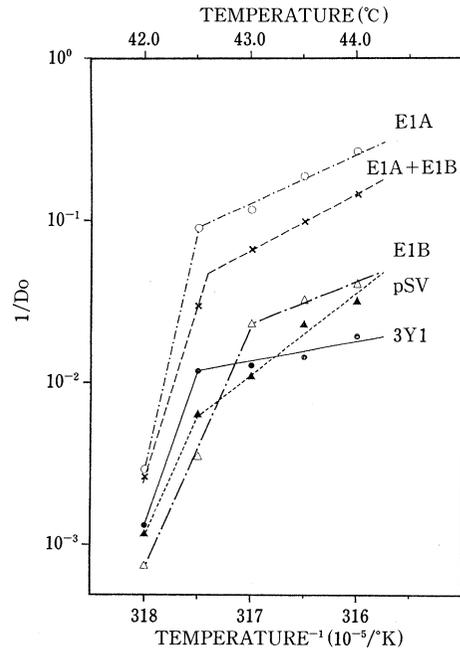


Figure 3 Arrhenius plots of the transformed cells.

細胞性因子と関係し合いながら細胞を癌化させることが明らかとなったが、それでは、こうした癌化過程にともない細胞の温熱感受性はどの様に变化するのであろうか。

筆者らは、E1A (nt. 12-1596) および E1B (nt. 1536-3858) を pSV2Neo ベクターにクローニングし、Fischer 系ラット由来の線維芽細胞 3Y1 に導入、得られたトランスフォーム細胞の温熱感受性を測定した。その結果、Figure 2 のように E1A が最も感受性が高く、ついで E1A + E1B, E1B, 3Y1 の順に高い感受性が認められた。さらにアレニウス解析^{60) 61)}を行うと、Figure 3 のように E1A を導入した細胞 (E1A, E1A + E1B) では、42.5°C 以上の加温域においてより高い不活化エネルギーが作用していることが示された。このことから、E1A 導入細胞では、E1A の発現により癌化と同時に温熱に対する細胞反応にも質的な変化が生じていることが示唆された。さらに興味深いことに、E1A 単独でトランスフォームした細胞

胞に較べ、E1B を共に導入した細胞ではその温熱感受性が低下し、E1B が細胞の抵抗性を高める機能を有していることを推測させた⁶²⁾。続いて、E1A のCR1 領域に変異をもつトランスフォーム細胞の温熱感受性を調べたところ、感受性の有意の低下を認めるとともに、アレニウス解析でも不活化エネルギーは低下しており、E1A による感受性の増大が CR1 に依存していることが明らかとなった⁶³⁾。

E1A 導入細胞と非導入細胞の間の温熱感受性の相違は、形態学的にも明らかな対比を示した。E1A 導入細胞では加温早期から核染色質の凝縮、断片化、細胞質の断片化が認められたのに対し、非導入細胞では同様の形態変化を示すものの、その出現が遅れていた。さらに核酸電気泳動を行うと、E1A 単独導入細胞では著明な DNA の断片化が確認され、温熱による細胞死はアポトーシスによるものと考えられた。しかしながら、E1A と共に E1B を導入した細胞ではこのような変化が少なく、E1B がアポトーシスを抑制、細胞に温熱抵抗性を与えたものと推測された⁶²⁾。

このように、アデノウイルス癌遺伝子のうち、癌化第1段階に機能する E1A 遺伝子の発現により細胞の温熱感受性が高まり、その機序として E1A がアポトーシスを誘導している可能性が示された。さらに、この温熱感受性の変化に対して E1B は抑制的に機能したが、この機能はアポトーシスを抑制することにより発揮されているものと思われ、アデノウイルス・トランスフォーム細胞に対する温熱の殺細胞効果と細胞のアポトーシスには密接な関係があることが示唆された。

IV. アデノウイルス癌遺伝子の発現とアポトーシス

アポトーシスは、個々の細胞単位で起こる一連のプログラム化された細胞死で、細胞の遊離 (接合性の喪失)、染色質の凝縮・断裂とそれを包み込む細胞膜により形成される細胞自体の断片化

(apoptotic body の形成)、隣接する細胞による細胞断片の貪食・崩壊といった形態学的な特徴を有する⁶⁴⁾。生化学的には、染色体 DNA の internucleosomal nucleolysis による断片化が認められる⁶⁵⁾。

アポトーシスの誘導には様々な因子が関与することが知られており、TNF、抗 Fas 抗体、抗癌剤、放射線、熱ショックなどがあげられる。温熱によるアポトーシス誘導は、CHO 細胞、ヒト T 細胞、腫瘍細胞などを用いた研究により現象として認められているが、その詳細な機構にはなお不明な部分が多い^{66)~72)}。

アポトーシスの誘導・促進あるいは抑制に関わるアポトーシス関連遺伝子についての研究は近年急速に進展し、線虫類 *Caenorhabditis elegans* の遺伝子 *ced*, *nuc-1* の他、*p53*, *c-myc*, *bcl-2*, E1A, E1B の各遺伝子について解析がすすめられているところである⁷³⁾。

1. E1A 遺伝子のアポトーシス誘導能

E1A 遺伝子を導入した細胞での細胞 DNA、ウイルス DNA の断片化については、ある程度 *cyt* 変異株を用いた実験で間接的に示されていた⁴⁶⁾⁵⁰⁾。その後、E1A 導入細胞において TNF 誘導性のアポトーシスが増感されること⁷⁴⁾⁷⁵⁾、これには E1A の CR1, CR2 が必須と考えられることが明らかとなった⁷⁵⁾。続いて、E1A 遺伝子トランスフォーム細胞におけるアポトーシスの誘導についての報告がなされた⁵⁹⁾⁷⁶⁾。それによると、E1A によるアポトーシスの誘導には p53 蛋白質の機能が重要で、これには E1A による p53 遺伝子の転写活性化²⁴⁾あるいは p53 蛋白質の安定化⁷⁶⁾が関係している可能性がある。

既に多くの総説に見られるように、p53 蛋白質はアポトーシスの過程で重要な役割を担っているが⁷⁸⁾⁷⁹⁾⁸⁰⁾、一般に細胞 DNA に障害が生じた際、p53 蛋白質の有する G1 check point 機能によりアポトーシスが誘導されると推測されている。従って p53 蛋白質を欠損した細胞では、放射線感受性も著明に低下する⁸¹⁾。その機構の詳細は不明で

あるが、最近の報告によれば、IL-1 β 変換酵素 (ICE) の活性化を通じて核酸分解酵素の局在や活性に影響を与えている可能性が示された⁸²⁾。しかし、一方では p53 の関与しないアポトーシスも存在することから^{81) 83)}、他の機構の存在も念頭におく必要がある。

2. E1B 遺伝子によるアポトーシスの抑制

既に述べたように、E1B 遺伝子は、その変異遺伝子による解析結果より、ウイルス及び細胞の DNA がアポトーシスにより崩壊することを防いでいる^{28) 44) 45) 46) 50)}。さらに、TNF、抗 Fas 抗体、抗癌剤などにより誘導されるアポトーシスを抑制する機能をも有している^{84) 85) 86)}。これらはいずれも E1B 19k 蛋白質の機能とみなされているが、特にそのアミノ酸残基 50-51, 90-96, 123-124 が重要と考えられている⁸⁶⁾。トランスフォーム細胞においても、E1B 19k 蛋白質は E1A によって誘導されるアポトーシスを抑制し、安定した増殖能を与えている^{59) 76)}。トランスフォーメーションの効率とアポトーシスの抑制効果との密接な関係は、E1B 19k 蛋白質のアミノ酸配列上、この2つの機能が同じ部位に位置することからも明らかである⁸⁶⁾。この機能部位は、株間でよく保存され、Bcl-2 との間に類似性がみられている⁷³⁾。おそらく E1B 19k は p53 に対し、その機能を間接的に抑制しているのではないかと思われるが、その詳細はわかっていない⁵⁹⁾。最近、E1B 19k と相互作用する細胞性因子の cDNA がクローニングされたとの情報があり、今後の解析が待たれる。

これに対して、E1B 54k 蛋白質にもアポトーシス抑制機能がみられる。E1B 54k は、そのほぼ中央部で p53 と結合し⁵⁵⁾、p53 を分解するかまたはその転写活性を阻害し、アポトーシスを抑制していると考えられる^{55) 59)}。

さらに、アポトーシス誘導および抑制に関する、E1A と E1B 19k との関係は、ヒトの癌遺伝子 *c-myc*, *bcl-2* との関係によく似ている^{87) 88)}。この点は、ヒト癌における温熱感受性を検討していく上

で関心のもたれるところである。

お わ り に

アデノウイルス癌遺伝子と細胞の温熱感受性に関する現在までの知見について述べた。この総説では、アデノウイルス・トランスフォーム細胞における熱ショック蛋白質についてはほとんど触れなかったが、E1A 遺伝子による HSP70 の合成の誘導が認められたこと²⁶⁾や、p53 蛋白質と HSC70 および HSP70 との複合体形成が確認されたことなどが報告されている^{89) - 92)}。従って、今後 E1A, E1B 蛋白質との間の何らかの関係が明らかになってくる可能性がある点を付け加えておきたい。

本研究の一部は、文部省科学研究費 (課題番号 05151059, 06282120) の補助を受け行われた。ここに記し、謝意を表します。

文 献

- 1) Cavalier, R., Ciocatto, E. C., Giovanella, B. C., et al.: Selective heat sensitivity of cancer cells, Biochemical and clinical studies. *Cancer*. 20: 1351-1381, 1967.
- 2) Giovanella, B. C., Stehlin, J. S., Morgan, A. C.: Selective lethal effect of supranormal temperatures on human neoplastic cells. *Cancer Research*. 36: 3944-3950, 1976.
- 3) Okumura, H., Udagawa, Y., Yamada, K., et al.: Effect of temperature on the proliferation and viability of normal and malignant human cells in culture. *Proc. Japan Acad.* 55 (B): 135-140, 1979.
- 4) Giovanella, B. C., Morgan, A. C., Stehlin, J. S., et al.: Selective lethal effect of supranormal temperatures on mouse sarcoma cells. *Cancer Research*. 33: 2568-2578, 1973.
- 5) Symonds, R. P., Wheldon, T. E., Clarke, B., et al.: A comparison of the response to hyperthermia of murine haemopoietic stem cells (CFU-S) and L1210 leukemia cells: Enhanced killing of leukemic cells in presence of normal marrow cells. *Br. J. Cancer*. 44: 682-691, 1981.
- 6) Ossovski, L., Sachs, L.: Temperature sensitivity of polyoma virus, induction of cellular DNA synthesis, and multiplication of transformed cells at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 58: 1938-1943, 1967.
- 7) Kachani, Z. F. C., Sabin A. B.: Reproductive capacity

- and viability at higher temperatures of various transformed hamster cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* 43: 469-480, 1969.
- 8) Kase, K., Hahn, G. M.: Differential heat response of normal and transformed human cells in tissue culture. *Nature.* 255: 228-230, 1975.
 - 9) Raaphorst, G. P., Spiro, I. J., Azzam, E. I., et al.: Normal cells and malignant cells transformed with the HRas oncogene have the same heat sensitivity in culture. *Int. J. Hyperthermia.* 3: 209-216, 1987.
 - 10) Li, G. C., Ling, C. C., Endlich, B., et al.: Thermal response of oncogene-transfected rat cells. *Cancer Research.* 50: 4515-4521, 1990.
 - 11) Suzuki, K., Watanabe, M., Miyoshi, J.: Differences in effects of oncogenes on resistance to γ rays, ultraviolet light, and heat shock. *Radiation Research.* 129: 157-162, 1992.
 - 12) Tooze, J.: *Molecular biology of tumor viruses*, 2nd ed. Part 2, DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Lab., New York 1981.
 - 13) 藤永 恵 : がん遺伝子の分子生物学, 5. アデノウイルスのがん遺伝子. 1985, 講談社, 東京.
 - 14) Van Ormondt, H., Galibert, F.: Nucleotide sequences of adenovirus DNAs. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110: 73-142, 1984.
 - 15) Levine, A. J.: The adenovirus early proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110: 143-167, 1984.
 - 16) Shenk, T., Williams, J.: Genetic analysis of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110: 1-39, 1984.
 - 17) Yano, S., Ojima, S., Fujinaga, K., et al.: Transformation of a rat cell line by an adenovirus type 12 DNA fragment. *Virology.* 82: 214-220, 1977.
 - 18) Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H., et al.: Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA. *Virology.* 82: 462-471, 1977.
 - 19) Shiroki, K., Shimojo, H., Sawada, Y., et al.: Incomplete transformation of rat cells by a small fragment of adenovirus 12 DNA. *Virology.* 95: 127-136, 1979.
 - 20) Stabel, S., Argos, P., Philipson, L.: The release of growth arrest by microinjection of adenovirus E1A DNA. *EMBO J.* 4: 2329-2336, 1985.
 - 21) Hurwitz, D. R., Chinnadurai, G.: Evidence that a second tumor antigen coded by adenovirus early gene region E1a is required for efficient cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 163-167, 1985.
 - 22) Moran, E., Grodzicker, T., Roberts, R. J., et al.: Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J. Virology.* 57: 765-775, 1986.
 - 23) Kuppaswamy, M. N., Chinnadurai, G.: Relationship between the transforming and transcriptional regulatory functions of adenovirus 2 E1a oncogene. *Virology.* 159: 31-38, 1987.
 - 24) Braithwaite, A., Nelson, C., Skulimowski, A., et al.: Transactivation of the p53 oncogene by E1a gene products. *Virology.* 177: 595-605, 1990.
 - 25) Stein, R., Ziff, E. B.: HeLa cell β -tubulin gene transcription is stimulated by adenovirus 5 in parallel with viral early genes by an E1a-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2792-2801, 1984.
 - 26) Nevins, J. R.: Induction of the synthesis of a 70,000 dalton mammalian heat shock protein by the adenovirus E1A gene product. *Cell.* 29: 913-919, 1982.
 - 27) White, E., Blose, S. H., Stillman, B. W.: Nuclear envelope localization of an adenovirus tumor antigen maintains the integrity of cellular DNA. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2865-2875, 1984.
 - 28) White, E., Grodzicker, T., Stillman, B. W.: Mutations in the gene encoding the adenovirus early region 1B 19,000-molecular-weight tumor antigen cause the degradation of chromosomal DNA. *J. Virology.* 52: 410-419, 1984.
 - 29) Fukui, Y., Shiroki, K., Saito, I., et al.: Characterization of a host range mutant of human adenovirus 12 defective in early region 1B. *J. Virology.* 50: 132-136, 1984.
 - 30) Shiroki, K., Ohshima, K., Fukui, Y., et al.: The adenovirus type 12 early-region 1B 58,000-Mr gene product is required for viral DNA synthesis and for initiation of cell transformation. *J. Virology.* 57: 792-801, 1986.
 - 31) Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J., et al.: Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54kd cellular protein in transformed cells. *Cell.* 28: 387-394, 1982.
 - 32) Murphy, M., Opalka, B., Sajczkowski, R., et al.: Definition of a region required for transformation in E1a of adenovirus 12. *Virology.* 159: 49-56, 1987.
 - 33) Moran, B., Zerler, B.: Interactions between cell growth-regulating domains in the products of the adenovirus E1A oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1756-1764, 1988.
 - 34) Whyte, P., Williamson, N. M., Harlow, E.: Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell.* 56: 67-75, 1989.
 - 35) Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M. et al.: Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature.* 334: 124-129, 1988.

- 36) Hu, Q., Dyson, N., Harlow, E.: The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J.* 9: 1147-1155, 1990.
- 37) Buchkovich, K., Duffy, L. A., Harlow, E.: The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell.* 58: 1097-1105, 1989.
- 38) Sherr, C. J.: Mammalian G₁ cyclins. *Cell.* 73: 1059-1065, 1993.
- 39) Ikeda, M., Nevins, J. R.: Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7029-7035, 1993.
- 40) Nevins, J. R.: E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science.* 258: 424-429, 1992.
- 41) Li, Y., Graham, C., Lacy, S., et al.: The adenovirus E1A-associated 130-kD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclins A and E. *Genes & Dev.* 7: 2366-2377, 1993.
- 42) Howe, J. A., Bayley, S. T.: Effects of Ad5 E1A mutant viruses on the cell cycle in relation to the binding of cellular proteins including the retinoblastoma protein and cyclin A. *Virology.* 186: 15-24, 1992.
- 43) Shepherd, S. E., Howe, J. A., Mymryk, J. S., et al.: Induction of the cell cycle in baby rat kidney cells by adenovirus type 5 E1A in the absence of E1B and a possible influence of p53. *J. Virology.* 67: 2944-2949, 1993.
- 44) Takemori, N., Riggs, J. L., Aldrich, C.: Genetic studies with tumorigenic adenoviruses. 1. Isolation of cytotoxic (*cyt*) mutants of adenovirus type 12. *Virology.* 36: 575-586, 1968.
- 45) Takemori, N., Cladaras, C., Bhat, B., et al.: *cyt* gene of adenoviruses 2 and 5 is an oncogene for transforming function in early region E1B and encodes the E1B 19,000-molecular-weight polypeptide. *J. Virology.* 52: 793-805, 1984.
- 46) Ezoe, H., Lai Fatt, R. B., Mak, S.: Degradation of intracellular DNA in KB cells infected with *cyt* mutants of human adenovirus type 12. *J. Virology.* 40: 20-27, 1981.
- 47) Bernardis, R., Schrier, P. I., Bos, J. L., et al.: Role of adenovirus types 5 and 12 early region 1b tumor antigens in oncogenic transformation. *Virology.* 127: 45-53, 1983.
- 48) Chinnadurai, G.: Adenovirus 2 *lp*⁺ locus codes for a 19 kd tumor antigen that plays an essential role in cell transformation. *Cell.* 33: 759-766, 1983.
- 49) White, E., Cipriani, R., Sabbatini, P., et al.: Adenovirus E1B 19-kilodalton protein overcomes the cytotoxicity of E1A proteins. *J. Virology.* 65: 2968-2978, 1991.
- 50) Pilder, S., Logan, J., Shenk, T.: Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1B 21,000-molecular-weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA. *J. Virology.* 52: 664-671, 1984.
- 51) Lane, D. P., Crawford, L. V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 278: 261-263, 1979.
- 52) Zantema, A., Franssen, J. A. M., Davis-Olivier, A., et al.: Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology.* 142: 44-58, 1985.
- 53) Zantema, A., Schrier, P. I., Davis-Olivier, A., et al.: Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3084-3091, 1985.
- 54) Finlay, C. A., Hinds, P. W., Levine, A. J.: The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 57: 1083-1093, 1989.
- 55) Yew, P. R., Berk, A. J.: Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature.* 357: 82-85, 1992.
- 56) Marx, J.: How p53 suppresses cell growth. *Science.* 262: 1644-1645, 1993.
- 57) El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., et al.: Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics.* 1: 45-49, 1992.
- 58) Aoyama, N., Nagase, T., Sawazaki, T., et al.: Overlap of the p53-responsive element and cAMP-responsive element in the enhancer of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 5403-5407, 1992.
- 59) Debbas, M., White, E.: Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes & Dev.* 7: 546-554, 1993.
- 60) Dewey, W. C., Hopwood, L. E., Sapareto, S. A. et al.: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology.* 123: 463-474, 1977.
- 61) Bauer, K. D., Henle, K. J.: Arrhenius analysis of heat survival curves from normal and thermotolerant CHO cells. *Radiat. Res.* 78: 251-263, 1979.
- 62) Toshima, M., Aikawa, K., Soga, K., et al.: Increased thermosensitivity of rat fibroblasts transformed with E1A and E1B oncogenes of adenovirus type 12. submitted.
- 63) Toshima, M., in preparation.

- 64) Keer, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26: 239-257, 1972.
- 65) Wyllie, A. H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284: 555-556, 1980.
- 66) Allen, D. J., Harmon, B. V.: The morphological categorization of cell death induced by mild hyperthermia and comparison with death induced by ionizing radiation and cytotoxic drugs. *Scanning Electron Microsc.* 3: 1121-1133, 1986.
- 67) Iliakis, G. E., Pantelias, G. E.: Effects of hyperthermia on chromatin condensation and nucleoli disintegration as visualized by induction of premature chromosome condensation in interphase mammalian cells. *Cancer Research.* 49: 1254-1260, 1989.
- 68) Harmon, B. V., Corder, A. M., Collins, R. J., et al.: Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 °C heat in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int. J. Radiat. Biol.* 58: 845-858, 1990.
- 69) Sellins, K. S., Cohen, J. J.: Hyperthermia induces apoptosis in thymocytes. *Radiat. Res.* 126: 88-95, 1991.
- 70) Takano, Y. S., Harmon, B. V., Kerr, J. F. R.: Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. *J. Pathol.* 163: 329-336, 1991.
- 71) Mosser, D. D., Martin, L. H.: Induced thermotolerance to apoptosis in a human T lymphocyte cell line. *J. Cell. Physiol.* 151: 561-570, 1992.
- 72) Tomasovic, S. P., Vasey, T. A., Story M. D., et al.: Cytotoxic manifestations of the interaction between hyperthermia and TNF: DNA fragmentation. *Int. J. Hyperthermia.* 10: 247-262, 1994.
- 73) White, E.: Death-defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes & Dev.* 7: 2277-2284, 1993.
- 74) Chen, M-J., Holskin, B., Strickler, J., et al.: Induction by *E1A* oncogene expression of cellular susceptibility to lysis by TNF. *Nature.* 330: 581-583, 1987.
- 75) Tsuji, Y., Ninomiya-Tsuji, J., Torti, S. V., et al.: Augmentation by IL-1 α of tumor necrosis factor- α cytotoxicity in cells transfected with adenovirus E1A. *J. Immunol.* 150: 1897-1907, 1993.
- 76) Rao, L., Debbas, M., Sabbatini, P., et al.: The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7742-7746, 1992.
- 77) Lowe, S. W., Ruley, H. E.: Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes & Dev.* 7: 535-545, 1993.
- 78) Lane, D. P.: A death in the life of p53. *Nature.* 362: 786, 1993.
- 79) Lane, D. P.: p53, guardian of the genome. *Nature.* 358: 15-16, 1992.
- 80) Hartwell, L.: Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell.* 71: 543-546, 1992.
- 81) Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., et al.: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature.* 362: 847-849, 1993.
- 82) Vaux, D. L., Haeccker, G., Strasser, A.: An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 76: 777-779, 1994.
- 83) Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., et al.: Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature.* 362: 849-852, 1993.
- 84) Hashimoto, S., Ishii, A., Yonehara, S.: The E1B oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody. *Int. Immunol.* 3: 343-351, 1991.
- 85) Gooding, L. R., Aquino, L., Duerksen-Hughes, P. J., et al.: The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytotoxicity of human cells but not of mouse cells. *J. Virol.* 65: 3083-3094, 1991.
- 86) Subramanian, T., Tarodi, B., Govindarajan, R., et al.: Mutational analysis of the transforming and apoptosis suppression activities of the adenovirus E1B 175R protein. *Gene.* 124: 173-181, 1993.
- 87) Shi, Y., Glynn, J. M., Guilbert, L. J., et al.: Role for *c-myc* in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science.* 257: 212-214, 1992.
- 88) Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A., et al.: Apoptotic cell death induced by *c-myc* is inhibited by *bcl-2*. *Nature.* 359: 552-554, 1992.
- 89) Pinhasi-Kimhi, O., Michalovitz, D., Ben-Zeev, A., et al.: Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins. *Nature.* 320: 182-185, 1986.
- 90) Hinds, P. W., Finlay, C. A., Frey, A. B., et al.: Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-*ras*-transformed cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2863-2869, 1987.
- 91) Sturzbecher, H.-W., Chumakov, P., Welch, W. J., et

al.: Mutant p53 proteins bind hsp72/73 cellular heat shock-related proteins in SV40-transformed monkey cells. *Oncogene*. 1: 201-211, 1987.

92) Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T.-H., et al.: Acti-

vating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.* 8: 531-539, 1988.

Relationship between the Functions of Adenovirus E1A and E1B Oncogenes and the Thermosensitivity of Their Transformed Cells

Muneatsu Toshima

Department of Internal Medicine, School of Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

Summary:

A considerable study has been carried out to substantiate the selective killing effect of heat on neoplastic versus normal cells, and generally revealed higher thermosensitivity of the former obtained from human or animal tumors. Recently, the neoplastic cells experimentally induced by chemicals, ionizing radiation, tumorigenic viruses or oncogenes has become available and important for the strict analysis. Among tumorigenic viruses, adenovirus is well known to transform rodent cells, whose genome is a linear duplex DNA molecule encoding for 20-30 polypeptides. Oncogenes of adenovirus are identified as E1A and E1B, which are tandemly located on the left end of the template r-strand. The 53k/44k proteins translated from 13S mRNA of E1A immortalize embryonic cells to accomplish the first step of transformation. E1B encodes for the 15-19k and 53-54k proteins which stabilize cellular and viral DNA to be essential for the complete transformation. Very interestingly, the thermosensitivity of adenovirus transformed cells was coincident with E1A expression and on the contrary E1B gene exerted inhibitory effect on the cell death by heat. Moreover, heat-treated E1A cell represented the immediate chromosomal change and the internucleosomal nucleolysis compatible for programmed cell death (apoptosis), while the transformed cells with E1B or E1A + E1B showed the delayed morphological change and the less amount of degraded DNA. Consequently, E1A plays an important role either in cell transformation (immortalization) and in enhancement of thermosensitivity. As it has been evident that E1A interacts some cellular proteins intimately concerned with cell replication, such as pRb (p105), p107, p130 and p300, E1A may function to endow the cells with thermal instability via these proteins.

Key words: Adenovirus, Oncogene, Transformation, Apoptosis, Hyperthermia