

# SV40 小型腫瘍抗原遺伝子のクローン化 と抗原の精製

岡山大学医学部癌源研究施設生化学部門（指導：小田琢三教授）

池 田 正 五

（昭和60年3月8日受稿）

**Key word :** SV40 t 抗原,  
遺伝子のクローン化,  
発現ベクター,  
ウエスタン・ブロッティング

## 結 言

SV40 (simian virus 40) はサルを自然宿主とする最も代表的な小型 DNA 腫瘍ウイルスで、その初期遺伝子にコードされる大型腫瘍抗原 (T 抗原) と小型腫瘍抗原 (t 抗原) が発癌に関与している<sup>1)</sup>。T 抗原は分子量 81,000~100,000 (94,000) の蛋白質であり、許容細胞中では細胞 DNA 合成の誘導や SV40 DNA の複製と初期および後期遺伝子の制御を行い、形質転換細胞中では形質転換の確立・維持や細胞 DNA 合成の誘導を行っている<sup>1)</sup>。生化学的性質としては、DNA 結合力<sup>2,3)</sup>や ATP アーゼ活性<sup>4,5)</sup>をもつこと、また細胞性 53K 蛋白質と結合していること<sup>6)</sup>が報告されている。t 抗原は分子量 17,000~22,000 (20,000) の蛋白質であり、ウイルスの増殖にはあまり関与していない<sup>7)</sup>。t 抗原単独では形質転換しないが、その欠変異株では宿主細胞により異なるが完全な形質転換を起こすことができない<sup>7~11)</sup>。また細胞性蛋白質 (56K, 32K) と結合していること<sup>12)</sup>や細胞内のアクチンケープルの切断を引き起こす<sup>13)</sup>という報告もある。しかし、動物細胞内の t 抗原は T 抗原よりさらに微量で精製のためには大量の材料を必要とすることや、t 抗原の抗原性が一部 T 抗原と共通するので両抗原の区別のためには煩雑な操作を必要とするなどの理由で、動物細胞からの t 抗原の分離・精製は困難である。従って T 抗原と比

較して t 抗原の生化学的性質の解析はいまだ十分なされていない。

本研究では、SV40 による発癌の分子機構研究の一環として<sup>14~19)</sup>、t 抗原の生化学的性質を調べるため、発現ベクターを用いた組換え DNA 技術による t 抗原遺伝子のクローン化と大腸菌内での t 抗原の生産、さらに t 抗原の分離・精製を試みた。

## 材 料 と 方 法

### 1. 大腸菌とプラスミド

大腸菌 HB101 株をプラスミド DNA の大量調製のために用いた。大腸菌 DH1 株を遺伝子発現のために用いた。

SV40 (776株) DNA は Bethesda Research Laboratories, Inc. より購入し、pBR 322 の BamHI 部位にクローン化し用いた。このプラスミドを pSVBam とした。発現プラスミドベクターとして pUC8<sup>20)</sup>を用いた。

### 2. t 抗原遺伝子のクローン化

制限酵素 (BamHI, Pvu II, Hind III と Taq I), 大腸菌アルカリホスファターゼ (BAP) と T4 DNA リガーゼは宝酒造株式会社より購入した。すべての酵素反応はそれぞれの至適条件下で行った。

図 1 に示すように t 抗原遺伝子をクローン化した。精製した pSVBamDNA を BamHI, Pvu II と Hind III で連続して切断し、0.8% 低融点ア

ガロースゲル (Low Gel Temperature, Bio-Rad) で 0.089M Tris, 0.089M ホウ酸, 0.002 M EDTA を緩衝液として電気泳動<sup>21)</sup>した。0.5  $\mu$ g/ml エチジウムブロミドで DNA 断片を染色後, SV40 Hind III 断片 [1169塩基対(bp)] の断片をアガロースごと切り出した。このアガロースを 65°C で 5 分間加熱して融解させ, 37°C に保温した。これに Hind III による切断と BAP による脱リン酸化を行った pUC8 DNA を加え, さらに T4 DNA リガーゼを作用させた。反応後, 組換え DNA 分子で大腸菌 DH1 株の形質転換を行い<sup>22)</sup>, アンピシリン耐性のコロニーを選択した。それらのコロニーから Holmes と Quigley の方法<sup>23)</sup>でプラスミド DNA を調製し, Taq I による切断とアガロースゲル電気泳動による分析を行った。図 1 に示す方向で t 抗原遺伝子が挿入されているクロンを選び pSVt とした。

3. 蛋白質の電気泳動と t 抗原の免疫学的検出  
pUC8 または pSVt をもった大腸菌 DH1 株を 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地<sup>21)</sup> で 600nm における吸光度が 1.0 になるまで培養した。0.5ml の培養液から菌体を集め, 50  $\mu$ l の 4% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 0.125 M Tris-HCl (pH6.8), 0.5M ショ糖, 0.7M 2-メルカプトエタノール, 0.025% ブロムフェノールブルーに溶解した。沸騰水中で 3 分間熱処理した後, 14% の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)<sup>24)</sup> で蛋白質を分離した。蛋白質染色を行う場合はクマシーブリリアントブルー (CBB)-R250 で染色した。免疫学的分析を行う場合は分離した蛋白質をニトロセルロース膜 (TM-2, 0.45  $\mu$ m, 東洋科学産業株式会社) 上へウエスタン・ブロッティングした<sup>25)</sup>。ブロッティングはトランスブロット装置 (Bio-Rad) を用い, 12.5mM Tris, 96mM グリシン中で 50V, 4°C で 3 時間行った。ブロッティング後, ニトロセルロース膜を 1% 牛血清アルブミン (BSA) を含む 10mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl (TBS) の中に移し, 室温で 30 分間振盪した。次に SV40 誘発担癌ハムスター血清を 1:30 に希釈したものと 37°C で 1 時間反応させた。血清はあらかじめ以下に示す前処理を行

い用いた。pUC8 をもった大腸菌 DH1 株を 600 nm における吸光度が 1.0 になるまで培養し, 遠心分離で集めた菌体を培養液の 1/10 量の TBS に懸濁した。超音波処理 (15秒, 10回) で菌体を破壊後, 血清を 1:30 になるように加え, 4°C で 5 時間反応させた。不溶物を遠心分離で除いた上清を前処理血清として用いた。血清と反応後, ニトロセルロース膜を 0.05% Tween 20 を含んだ TBS で 10 分間 3 回洗浄した。次に西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ハムスター IgG や抗体 (Cappel Laboratories, Inc.) の 1% BSA/TBS 希釈液 (1:500) と 37°C で 30 分間反応させた。0.05% Tween 20/TBS で 10 分間 3 回洗浄した後, 0.5mg/ml 4-クロル-1-ナフトール, 0.165% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む TBS でペルオキシダーゼ反応を行った。反応の停止は水洗により行った。

#### 4. 雑種 t 抗原の抽出と精製

pSVt をもった大腸菌 DH1 株を 100ml の 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む LB 培地で 600nm における吸光度が 1.0 になるまで培養し菌体を集めた。2.5ml の 1% NP-40 を含む緩衝液 A (10 mM Tris-HCl, pH8.4, 100mM NaCl, 5 mM EDTA, 2.5mM フッ化フェニルメチルスルホニル, 20mM 2-メルカプトエタノール) に懸濁後超音波処理 (15秒, 5 回) を行った。20,000g で 30 分間遠心し上清を抽出液とした。次に遠心の沈殿を 2.5ml の 2M 尿素を含む緩衝液 A に懸濁し同上の処理を行い抽出液を得た。さらにそれぞれ 4M, 6M, 8M, 10M 尿素を含む緩衝液 A で同上の操作を段階的に繰り返し, それぞれの尿素濃度における抽出液を得た。

6M 尿素による抽出液 0.5ml を 14% の SDS-PAGE で分離し, CBB-R250 で染色した。脱色後カミソリで雑種 t 抗原のバンドを切り出した。ゲルからの蛋白質の抽出はおよそ次田の方法<sup>26)</sup>に従った。切り出したゲルを細かく切り刻み 1 ml の 70% ギ酸を加え 1 時間室温で振盪し蛋白質を抽出した。3 回の抽出操作を行い, 集めた抽出液を真空濃縮乾固した。改めて 50  $\mu$ l の 70% ギ酸に溶解し, 70% ギ酸で平衡化した Bio-Gel P-2 (Bio-Rad) のカラム (0.6 $\times$ 7cm) でゲル濾過して蛋白質分画を集め, 濃縮乾固して

精製雑種 t 抗原とした。

## 5. デンシトメトリー

デンシトメトリーは島津 2 波長クロマトスキャナー CS-930 で行った。

## 結 果

### 1. t 抗原遺伝子のクローン化

t 抗原を大腸菌で発現させることを目的として t 抗原遺伝子のクローン化を行った(図 1)。

ベクターとして用いた pUC8 はアンピシリン耐性遺伝子と大腸菌のラクトース・オペロン (*lac*) のプロモーターとオペレーターと  $\beta$ -ガラクトシダーゼの遺伝子をもっている。さらに  $\beta$ -ガラクトシダーゼの遺伝子内に Multiple cloning

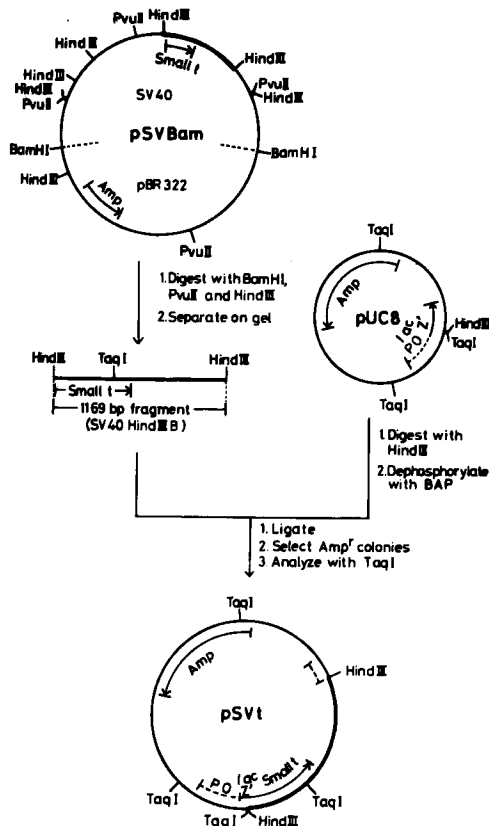


図 1. t 抗原遺伝子のクローン化方法の模式図

DNA の調製や組換え体の構成方法は本文中に記載した。図の DNA 上の制限酵素名はその酵素の切断部位を示す。Amp はアンピシリン耐性遺伝子、small t は t 抗原遺伝子、*lac P, O* と *Z'* はそれぞれラクトース・オペロンのプロモーター、オペレーターと  $\beta$ -ガラクトシダーゼの遺伝子を示す。

ing sites (MCS) と呼ばれるいくつかの特徴的な制限酵素切断部位をもっている<sup>20)</sup>。従って遺伝子の読み枠を変えることなく MCS 中に目的の遺伝子を挿入すれば、*lac* プロモーターを利用した挿入遺伝子の発現を行うことができる<sup>27)</sup>。

t 抗原遺伝子は T 抗原や多くの真核性物の遺伝子と異なり介在配列により分断されていない<sup>28)</sup>。また SV40 DNA の Hind III による切断によって t 抗原の全遺伝子を含んだ DNA 断片 (SV40 Hind III B 断片) を得ることができ、しかもその断片は t 抗原のアミノ基末端をコードするコドンの上流にわずか 12bp をもつにすぎない。さらに、pUC8 の MCS 中の Hind III 部位に SV40 Hind III B 断片を連結した場合、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子と t 抗原遺伝子の転写方向が同じになるように連結すると、両遺伝子の読み枠は一致することが両者の塩基配列の観察によりわかった。従って上記のような DNA 組換え体を得れば、t 抗原遺伝子が発現すると考えられる。その場合、図 2 に示すような DNA 塩基配列が生じ、またそれは上部に示すような t 抗原に 18 個のアミノ酸が結合した雑種蛋白質をコードすることが推測される。

以上の構想より、材料と方法に示した DNA 組換え実験を行い、t 抗原遺伝子をクローン化したプラスミド、pSVt を得た。図 3 に pUC8 と pSVt の Hind III と Taq I による切断断片のアガロースゲル電気泳動像を示した。

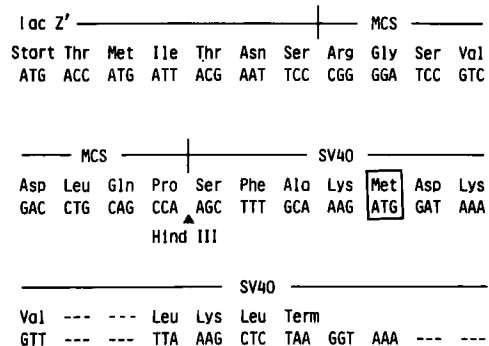


図 2. 予想される pSVt の DNA 塩基配列と雑種 t 抗原蛋白質のアミノ酸配列。

枠で囲んだ ATG と Met は完全な t 抗原のアミノ基末端のコドンとアミノ酸を示す。

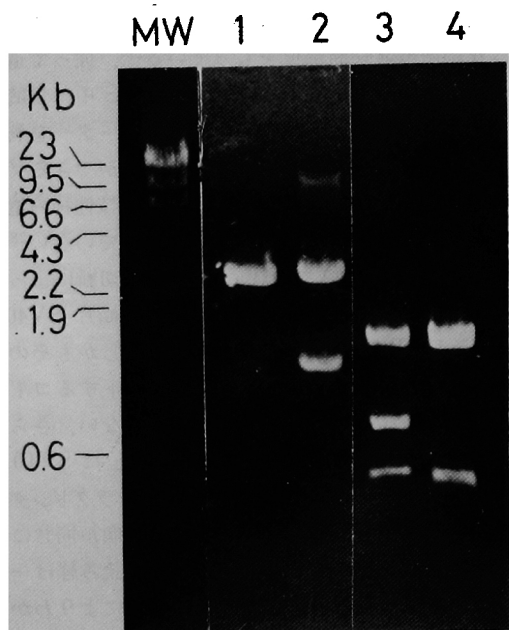


図3. pUC8 と pSVt の制限酵素による切断.

電気泳動は0.8%アガロースゲル (Low-mr, Bio-Rad) で0.089M Tris, 0.089M ホウ酸, 0.002M EDTAを緩衝液として行った<sup>15)</sup>. 染色は0.5  $\mu$ g/ml エチジウムブロミドで行った. MWは分子量マーカーを示す. 1はpUC8をHind IIIで, 2はpSVtをHind IIIで, 3はpUC8をTaq Iで, 4はpSVtをTaq Iでそれぞれ切断したものを示す.

Hind III切断では2.75KbのpUC8と1.17Kbの挿入断片のバンドが見える. Taq I切断でpUC8は1.45Kb, 0.79Kb, 0.51Kbの3本のバンド, pSVtは1.53Kb, 1.45Kbと0.51Kb, 0.45Kbのバンドがそれぞれ重なって2本のバンドのように見える.

## 2. t 抗原遺伝子の大腸菌内での発現

pSVtのt抗原遺伝子の発現をSDS-PAGEで調べた(図4-1, 2). pUC8をもつ大腸菌と比べてpSVtをもつ大腸菌に分子量22,000の蛋白質が余分に存在することがわかった. 完全なt抗原の分子量はSDS-PAGEで17,000~22,000(20,000)である. 従ってpSVtをもつ大腸菌で発現した分子量22,000の蛋白質はpSVtにコードされているt抗原の雑種蛋白質であると考えられる. この蛋白質はデンストメトリーにより全蛋白質の約6%を占めていることがわかった.

分子量22,000の蛋白質がt抗原の雑種蛋白質であることを確認するために, ウェスタン・ブ

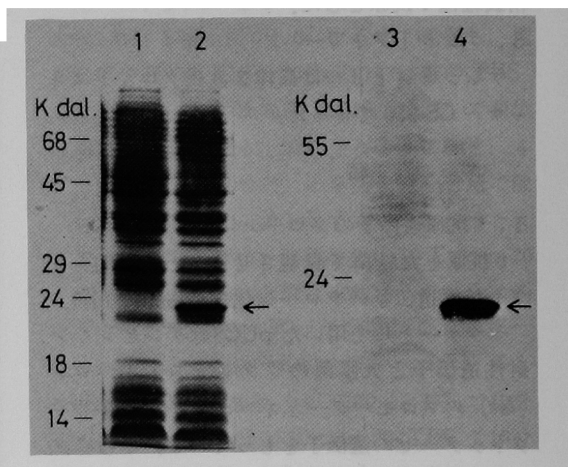


図4. 雑種t抗原の大腸菌内での発現.

1, 2はCBB-R250による蛋白染色を, 3, 4は免疫学的染色を行ったものを示す. また1, 3はpUC8をもつ大腸菌DH1株の, 2, 4はpSVtをもつ大腸菌DH1株の抽出液を示す. 矢印は雑種t抗原のバンドを示す.

ロットニングと酵素抗体法で免疫学的に調べた(図4-3, 4). 分子量22,000の蛋白質がSV40誘発担癌ハムスター血清と特異的に反応した. 従って分子量22,000の蛋白質がt抗原の雑種蛋白質であり, 18個のアミノ酸が余分に結合しているにもかかわらず同じt抗原性を保持していることがわかった.

さらに, データーは示さなかったが, ラクトース・オペロンの強力な転写誘導物質であるイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) の添加により分子量22,000の蛋白質が1.5~2倍増加することがわかった. t抗原遺伝子はlacプロモーターの下流に連結されているので, IPTGで誘導される分子量22,000の蛋白質はt抗原遺伝子からの産物であることが裏付けされた.

## 3. 大腸菌で生産された雑種t抗原の精製

大腸菌で生産された雑種t抗原を, 1% NP-40と2M, 4M, 6M, 8M, 10M尿素により材料と方法で示したように段階的に抽出した(図5). 1% NP-40では抽出されず, 2M尿素で抽出され始め, 6M尿素で最も多く抽出された. デンシトメーターで測定すると, 2M, 4M, 6M, 8M, 10M尿素抽出液中の回収率はそれぞれ8.8, 10, 31, 19, 11%であり純度は3.3, 4.4, 12, 16, 13%であった.

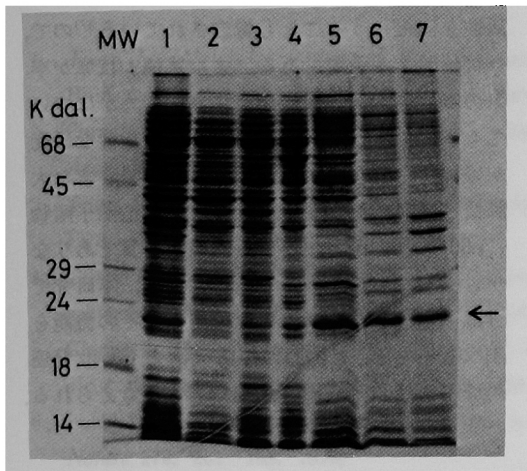


図5. 大腸菌からの雑種 t 抗原の抽出。

MW は分子量マーカーを示す。1 は 4% SDS による全抽出液、2 は 1% NP-40; 3~7 は順に 2M, 4M, 6M, 8M, 10M 尿素による抽出液を示す。1 は 0.67 ml, 2~7 は 2 ml の培養液から回収した大腸菌からの抽出液に相当する量を試料として電気泳動した。矢印は雑種 t 抗原のバンドを示す。

最も回収率の高い 6M 尿素抽出液から雑種 t 抗原の精製を試みた。6M 尿素、20mM 2-メルカプトエタノール存在下での Sepharose CL-6B (Pharmacia) と DEAE-Sephacel (Pharmacia)、さらに 6M 塩酸グアニジン、0.1M 2-メルカプトエタノール存在下での Sepharose CL-6B によるクロマトグラフィーをそれぞれ試みたが、それらの条件下でも大部分の雑種 t 抗原は会合状態にあるため単一のピークは得られなかった。しかし SDS-PAGE では単量体として挙動することより、SDS-PAGE で分離したバンドから雑種 t 抗原を抽出、精製した(図6-1,2)。雑種 t 抗原が単一の蛋白質として精製されていることがわかった(図6-2)。精製蛋白質の抗原性をウエスタン・ブロッティングと酵素抗体法で調べた(図6-3,4)。蛋白質量と酵素抗体法による染色の強さの比は、抽出液と精製標品ではあまり変化しなかった。すなわち、精製過程において抗原性の低下が起っていないことが示された。

#### 考 察

SV40t 抗原の大腸菌内での発現は、大腸菌の *lac* プロモーターを利用して Roberts ら<sup>29)</sup> と

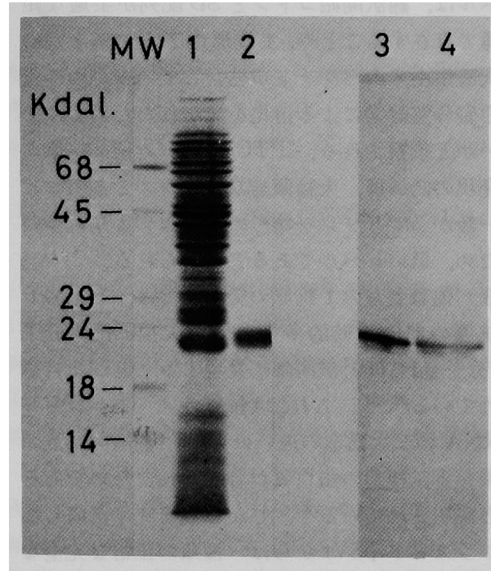


図6. 雑種 t 抗原の精製。

MW は分子量マーカーを示す。1,2 は CBB-R250 による蛋白質染色を、3,4 は免疫学的染色を行ったものを示す。また1,3は6M尿素抽出液を、2,4は精製標品を示す。

Thummel ら<sup>30)</sup>が、 $\lambda$ ファージの *P<sub>L</sub>* プロモーターを利用して Derom ら<sup>31)</sup>が、また大腸菌の *trp* (トリプトファン・オペロン)と *lac* プロモーターを利用して Bikel ら<sup>32)</sup>がすでに行っているが、本研究は次に述べる点で有用であると考えられる。

1) 組換え遺伝子を大腸菌に導入して発現させる場合は、効率のよいプロモーターや Shine-Dalgarno (SD) 配列と遺伝子を適当な距離で連結させる必要がある<sup>33)</sup>。本研究では pUC8 の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子内に t 抗原遺伝子を組込んだため、*lac* プロモーターや SD 配列と組込む遺伝子との距離を考慮する必要がなくなる。従って、発現する t 抗原は雑種蛋白質であるが、発現プラスミドの構成を容易に行うことができた。

2) 本研究における雑種 t 抗原の発現量は、大腸菌の全蛋白質の約 6% であり、他著者らの t 抗原の発現例<sup>29-32)</sup>と比較して高いレベルであった。大腸菌当たりおよそ 500,000 分子の雑種 t 抗原が発現されたことになる。この高い発現レ

ベルは、翻訳開始コドンとSD配列が至適な距離で存在することや、t抗原のアミノ基末端に大腸菌由来のペプチドが結合しているために蛋白質分解酵素による消化を免がれたためではないかと推察される。IPTGによる雑種t抗原の発現の誘導は、大腸菌当りのプラスミドのコピー数がlacリプレッサーの分子数<sup>34)</sup>よりも多いため、低いレベルであると考えられる。

3) 他著者らのt抗原の発現例では、本来のt抗原の他に比較的多量に短い欠損t抗原分子(分子量14,000)が同時に発現することが報告されている<sup>30-32)</sup>。これはt抗原のメッセンジャーRNAの二次構造の違いにより、翻訳開始点の異なる二種類の蛋白質が合成されたためであると説明されている<sup>35)</sup>。しかし本研究で構成したプラスミドpSVtからは一種類の正常な完全なt抗原蛋白質のみが発現した。

発現した雑種t抗原は分子量22,000であり、図2に示すようにβ-ガラクトシダーゼのアミノ基末端のアミノ酸を6個、MCSの配列から8個、SV40 Hind III B断片の非翻訳領域から4個、合計18個のアミノ酸をアミノ基末端に余分にもっている。従ってこの雑種t抗原は192個のアミノ酸より成る。この雑種蛋白質はt抗原性を保持していたので、精製を試みた。雑種t抗原は完全なt抗原と同じく<sup>32)</sup>、NP-40で抽出されず、尿素で抽出された。段階的な抽出操作で純度が2~3倍上昇した。しかし尿素や塩酸グアニジンのような蛋白質変性剤と還元剤である2-メルカプトエタノールの存在下においても雑種t抗原分子の多くが会合状態にあった。完全なt抗原の場合にも同様なことが報告されている<sup>30,32,36)</sup>。従って一般的なクロマトグラフィーでt抗原を精製するためには、t抗原を単量体化させる溶媒について検討を行う必要がある。本研究ではSDS-PAGEのゲルから直接抽出し精製した。70%ギ酸による抽出は回収率も良く、また蛋白質とSDSの分離が可能である<sup>26)</sup>。精製した雑種t抗原は単一であり、また抗原性も保持していた。

本研究で精製した雑種t抗原がどのような生化学的および生物学的活性を有するかについては将来の研究に待たなければならないが、SDS-

PAGEのゲルから抽出した酵素蛋白質が酵素活性を回復しうることも報告されている<sup>37)</sup>ので、今後検討する予定である。また雑種t抗原が本来のt抗原と同じ機能を有するかどうかについても未知であるが、T抗原について重要な研究が雑種蛋白質を用いて行われること<sup>3,4)</sup>、また大腸菌で発現したレトロウイルスの癌遺伝子産物(p60<sup>src</sup><sup>38)</sup>、p21<sup>ras</sup><sup>39)</sup>)も雑種蛋白質でありながら機能を有していることなどより、本研究で分離・精製した雑種t抗原を用いてその機能を調べることは、t抗原の作用機構とSV40発癌の分子機構の研究に有意義であると考えられる。

## 結 語

1. SV40t抗原を精製するために、t抗原遺伝子を発現ベクターを用いて大腸菌でクローン化した。
2. t抗原は大腸菌内で分子量22,000の雑種蛋白質として発現した。発現量は比較的多量で全大腸菌蛋白質の約6%であった。
3. ウェスタン・ブロッティングと酵素抗体法で、雑種t抗原が抗原性を保持していることを証明した。
4. 雑種t抗原を尿素で大腸菌から抽出し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離して、ゲルから抽出・精製した。精製標品も同様に抗原性を保持していた。
5. 精製した雑種t抗原は完全なt抗原蛋白質(174アミノ酸)のアミノ基末端に短い異種ペプチド(18アミノ酸)が結合した分子量約22,000(192アミノ酸)の不溶性蛋白質である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始、御指導と御校閲を賜りました恩師、小田琢三教授に深く感謝の意を捧げます。さらに、実験遂行にあたり、終始快く御協力下さいました研究室の皆様から心から御礼申し上げます。

## 文 献

1. Tooze, J.: *Molecular Biology of Tumor Viruses*, second edition, *DNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York, 1980.
2. Carroll, R.B., Hager, L. and Dulbecco, R.: Simian virus 40 T antigen binds to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 3754—3757, 1974.
3. Tjian, R.: The binding site on SV40 DNA for a T antigen-related protein. *Cell* **13**, 165—179, 1978.
4. Tjian, R. and Robbins, A.: Enzymatic activities associated with a purified simian virus 40 T antigen-related protein. *Proc. Natl. Sci. USA* **76**, 610—614, 1979.
5. Giacherio, D. and Hager, L.P.: A poly(dT)-stimulated ATPase activity associated with simian virus 40 large T antigen. *J. Biol. Chem.* **254**, 8113—8116, 1979.
6. Lane, D.P. and Crawford, L.V.: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261—263, 1979.
7. Sleight, M.J., Topp, W.C., Hanich, R. and Sambrook, J.F.: Mutants of SV40 with an altered small t protein are reduced in their ability to transform cells. *Cell* **14**, 79—88, 1978.
8. Martin, R.G., Setlow, V.P., Chepelinsky, A.B., Seif, R., Lewis, A.M., Jr., Scher, C.D., Stiles, C.D. and Avila, J.: Roles of the T antigen in transformation by SV40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 311—324, 1979.
9. Frisque, R.J., Rifkin, D.B. and Topp, W.C.: Requirement for the large T and small T proteins of SV40 in the maintenance of the transformed state. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 325—331, 1979.
10. Seif, R. and Martin, R.G.: Simian virus 40 small t antigen is not required for the maintenance of transformation but may act as a promoter (cocarcinogen) during establishment of transformation in resting rat cells. *J. Virol.* **32**, 979—988, 1979.
11. Rubin, H., Figge, J., Bladon, M.T., Chen, L.B., Ellman, M., Bikel, I., Farrell, M. and Livingston, D.M.: Role of small t antigen in the acute transforming activity of SV40. *Cell* **30**, 469—480, 1982.
12. Rundell, K., Hearing, P. and Yang, Y.C.: SV40 17K protein is associated with two cellular proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 211—214, 1979.
13. Graessman, A., Graessman, M., Tjian, R. and Topp, W.C.: Simian virus 40 small t protein is required for loss of actin cable network in rat cells. *J. Virol.* **33**, 1182—1191, 1980.
14. 小田琢三: SV40 クロマチンの構造と機能. *生物物理*, **20**, 45—55, 1980.
15. Hidaka, H., Misumi, H. and Oda, T.: Transcription of reconstituted simian virus 40 nucleoprotein complexes. *J. Virol.* **34**, 675—683, 1980.
16. Oda, T.: Molecular cytochemistry of the replication and transcription of chromatin. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 154—158, 1983.
17. Tsutsui, K., Watanabe, S., Katagiri, M. and Oda, T.: Identification of proteins interacting with newly replicated DNA in SV40-infected cells by UV-induced DNA-protein cross-linking. *Nucleic Acids Res.* **11**, 4793—4807, 1983.
18. Oda, T., Watanabe, S., Maki, Y., Iwamoto, H. and Hanakawa, S.: DNA replication of simian virus 40 chromatin in digitonin-treated and saponin-treated permeable cells. *Biochem. Internatl.* **9**, 763—769, 1984.

19. Ikeda, S., Hatsushika, M., Shigehara, T., Watanabe, S., Omura, S., Tsutsui, K. and Oda, T.: Partial purification of simian virus 40 large T antigen by immunoaffinity chromatography and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Med. Okayama* **38**, 341—347, 1984.
20. Messing, J. and Vieira, J.: A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digested restriction fragments. *Gene* **19**, 269—276, 1982.
21. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.
22. Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557—580, 1983.
23. Holmes, D.S. and Quigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal. Biochem.* **144**, 193—194, 1981.
24. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680—685, 1970.
25. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350—4354, 1979.
26. 次田 皓：不溶性タンパク質の一次構造研究のための二、三の新しい試み，蛋白質・核酸・酵素，**27**，1486—1501，1982.
27. Helfman, D.M., Feramisco, J.R., Fiddes, J.C., Thomas, G.P. and Hughes, S.H.: Identification of clones that encode chicken tropomyosin by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 31—35, 1983.
28. Fiers, W., Contreras, R., Haegman, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G. and Ysebaert, M.: Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* **273**, 113—120, 1978.
29. Roberts, T.M., Bikel, I., Yocum, R.R., Livingston, D.M. and Ptashne, M.: Synthesis of simian virus 40 t antigen in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5596—5600, 1979.
30. Thummel, C.S., Burgess, T.L. and Tjian, R.: Properties of simian virus 40 small t antigen overproduced in bacteria. *J. Virol.* **37**, 683—697, 1981.
31. Derom, C., Gheysen, D. and Fiers, W.: High-level synthesis in *Escherichia coli* of the SV40 small-t antigen under control of the bacteriophage lambda  $P_L$  promoter. *Gene* **17**, 45—54, 1982.
32. Bikel, I., Roberts, T.M., Bladon, M.T., Green, R., Amann, E. and Livingston, D.M.: Purification of biologically active simian virus 40 small tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 906—910, 1983.
33. 今井俊輔，今本文男：細胞内に導入された組換え遺伝子の発現，蛋白質・核酸・酵素，**28**，1480—1499，1983.
34. Gilbert, W. and Müller-Hill, B.: Isolation of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**, 1891—1898, 1966.
35. Gheysen, D., Iserentant, D., Derom, C. and Fiers, W.: Systematic alternation of the nucleotide sequence preceding the translation initiation codon and the effects on the bacterial expression of the cloned SV40 small-t antigen gene. *Gene* **17**, 55—63, 1982.
36. Tegtmeyer, P., Spillman, T. and Schuetz, F.R.: Purification and characterization of the SV40 F-gene protein. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **44**, 159—164, 1979.
37. Hager, D.A. and Burgess, R.R.: Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

- gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzyme activity: result with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal. Biochem.* 109, 76—86, 1980.
38. Gilmer, T.M. and Erikson, R.L.: Rous sarcoma virus transforming protein, p60<sup>src</sup>, expressed in *E. coli*, functions as a protein kinase. *Nature* 294, 771—773, 1981.
39. Stein, R.B., Robinson, P.S. and Scolnick, E.M.: Photoaffinity labeling with GTP of viral p21 ras protein expressed in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 50, 343—351, 1984.

**Molecular cloning of the SV40 small t antigen gene  
and purification of the antigen**

**Shogo IKEDA**

**Department of Biochemistry, Cancer Institute, Okayama University Medical School**

**(Director: Prof. T. Oda)**

The simian virus 40 (SV40) DNA fragment encoding small t antigen was cloned with expression vector pUC8 for the purification of small t-antigen. Small t antigen produced in *Escherichia coli* was a hybrid protein of 22,000 daltons which comprised about 6% of the total protein. Hybrid small t antigen maintained antigenic activity which was examined by Western-blotting and enzyme-linked immunoassay. Hybrid small t antigen was extracted from *E. coli* with urea and purified from a small t-antigen band in SDS-polyacrylamide gel. The purified antigen maintained antigenic activity.