原 著

ヒト活性化型 c-H-*ras*-1 遺伝子の細胞トランスホーミング能 に対するウイルスエンハンサーおよび c-*myc* の作用

小 山 貴 司

東京医科歯科大学歯学部第 1 口腔外科学教室（主任・指導：塩田重利教授）

東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学教室（指導：土田信夫教授）

（1990 年 9 月 28 日 受付）

Enhancement of Cellular Transforming Activities of Truncated EJ c-H-*ras*-1 with Viral Enhancers or with c-*myc*

Takashi Koyama

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry,

Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director : Prof. Shigetoshi Shioda)

Department of Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Director : Prof. Nobuo Tsuchida)

The 2.9kb Sac I fragment (EJ2.9), which lacks the previously reported promoter/enhancers of the activated human c-H-*ras*-1, was used to study the interaction with the tumor virus promoter/enhancers or with the activated c-*myc*. When EJ2.9 constructs linked to the viral promoter/enhancers or to a viral enhancer even in the antisense orientation was transfected to the mouse cells, 16-39% of the foci induced with those linked in the sense orientation were formed. Further, the transforming activity decreased dramatically when the deletion was introduced from the upstream Sac I site to the 61 bases (-61) upstream of translational initiation codon, but the deletions to -144 did not significantly change the activity.

Cotransfections with the activated c-*myc* were found also to enhance the transforming activity of EJ2.9 constructs either with or without the LTR linked in the antisense orientation. The transfected *ras* and *myc* were expressed as 1.2 and 2.5kb mRNAs, respectively, in each transformant. The *in vitro* mutagenesis suggested that the c-*myc* protein was involved in the enhancement.

These results raise the possibility that the viral enhancers activate a cryptic promoter(s) within the region between -1 and -144 of p21 initiation codon by interacting with the region between -61 and -144 and that the c-*myc* protein also activates the same or different cryptic promoter(s) within the intron 0 or noncoding region of exon I, thus leading to the enhancement of the EJ2.9 transforming activity.

I. 緒 言

癌遺伝子の研究が進み、レトロウイルス (RNA

腫瘍ウイルス) の癌遺伝子 (oncogene) が正常細胞ゲノムにある癌原遺伝子 (proto oncogene) 由来であることが解明され¹⁾, 現在までに, 異なっ

た機能をもつ20種類以上のレトロウイルスの癌遺伝子が発見されている。レトロウイルスゲノムは感染後、プロモーター／エンハンサー機能をもつ long terminal repeat (LTR) を両端に介し、プロウイルスとして宿主細胞染色体 DNA に組み込まれる²⁾。組み込まれた癌遺伝子は癌原遺伝子と基本的に同じであるが、点突然変異あるいは欠失変異をもち、イントロンがなく、5'側のLTRからウイルスの配列とともに mRNA として発現する。その結果、癌原遺伝子産物とは質的に異なったタンパク質が多量に発現され、細胞をトランスホームする²⁾。レトロウイルスの癌遺伝子と同様の変異をもった癌原遺伝子（細胞の癌遺伝子）がヒト癌細胞よりみつき³⁾、ヒト発癌においても重要な役割を果たすことが明らかとなっている。また、ヒト癌における癌原遺伝子活性化の機序として、タンパク質の質的変化をもたらす点突然変異、染色体転座および量的発現上昇をもたらす遺伝子増幅、染色体転座が報告されている⁴⁾。

レトロウイルスで見い出された癌遺伝子のうち、ヒト癌においては、*ras* (Kirsten, Harvey 肉腫ウイルスの癌遺伝子) の点突然変異と *myc* (MC 29 株骨髓球血症ウイルスの癌遺伝子) の発現増量が高頻度でみられる。*ras* 遺伝子群 (H, K および N-*ras*) の活性化は、多くの場合、コドン12, 13, 61 内における点突然変異によっておきる^{5,6)}。最初のヒト活性化型癌遺伝子として、膀胱癌 T24/EJ 株から分離された c-H-*ras*-1 (EJ 6.6) は^{3,7)}、コードしているタンパク質 p21 の N 末端から12番目のアミノ酸であるグリシンがバリンに置換するような点突然変異をエキソン 1 内で起こした結果、活性化されていた⁸⁻¹¹⁾。さらに、ヒト舌癌由来の細胞株 ZA では、13番目のコドンが点突然変異した活性化型 c-H-*ras*-1 の存在と c-*myc* 遺伝子の同時増幅が見い出された¹²⁾。

c-*myc* 遺伝子は、ヒト癌において増幅の頻度が高く癌細胞でよく発現しており⁴⁾、バーキットリンパ腫 (BL) では、染色体転座の結果、第8染色体バンド q24 の c-*myc* 遺伝子が免疫グロブリン遺伝子領域に隣接し、免疫グロブリン重鎖や軽鎖

のエンハンサーによって、その発現が高まり活性化されている²⁾。

ras と *myc* 遺伝子産物は、細胞内における産物の局在が異なり、*ras* は細胞膜の内側に、*myc* は核内にその産物が局在する²⁾。*ras* 遺伝子産物 (p21) は、GTP ase 活性をもち外界からの刺激を細胞内に伝える信号伝達に関係していると報告されている⁵⁾。一方、c-*myc* 遺伝子産物は、細胞の増殖制御に関与すると考えられており²⁾、その過剰発現により初代培養細胞に永久増殖能を与える不死化癌遺伝子である^{13,14)}。また、DNA 複製のイニシエーターとして働くと同時に、自身および他の遺伝子のエンハンサーに結合し、転写を促進・抑制する転写因子として働く DNA 結合タンパク質であると報告されている¹⁵⁾。このように、*ras* 遺伝子と c-*myc* 遺伝子の機能は異なるが、この二つの遺伝子を同時に導入すると、協同作用によりラット初代培養線維芽細胞をトランスホームできることが報告され^{13,16)}、多段階発癌の一つの実験系となっている^{17,18)}。しかし、*ras* と *myc* の協同作用の機構についてはいまだに不明な部分が多い。

レトロウイルスには前述した宿主細胞由来の癌遺伝子をもち短期間に癌を誘発するものと、癌遺伝子を欠くが一定の潜伏期間の後に癌を作るものがある²⁾。前者は、動物に接種すると早期に癌を誘発し、培養細胞をトランスホームする²⁾が、後者による癌化の機構として、宿主に感染したレトロウイルスが癌原遺伝子の下流に組み込まれ、ウイルス遺伝子の発現・転写に必要な LTR¹⁹⁾ の作用により癌原遺伝子の発現が活性化し、腫瘍が発生するというプロモーター挿入説²⁰⁾が提唱された。しかし、レトロウイルスの組み込みが癌原遺伝子の下流で同じ向きの場合でも、上流で逆向きの場合でも腫瘍が発生することから、この場合の癌原遺伝子の活性化は、近傍の遺伝子発現を活性化するレトロウイルス LTR のエンハンサーの作用がより重要であると考えられている^{19,21)}。

最初にヒト膀胱癌細胞よりクローニングされた c-H-*ras*-1 の組換え体である EJ6.6 のプロモータ

図1 ヒト活性化型 *c-H-ras-1* (EJ6.6) と EJ2.9 の構造
斜線部分は、タンパク質翻訳領域を示す。B, S, VTR は、それぞれ、BamHI, Sac I 認識部位、variable tandem repeat を示す
↗: 転写開始部位

ー／エンハンサー領域については、p21 開始コードン ATG の約 1 kb 上流に四つの転写開始部位を含むプロモーター領域がある²³⁾ (図1)。さらに、そのプロモーターを含む領域内 (0.85kb の Sac I 断片) にエンハンサー領域が見い出されている²²⁾。また、エキソン 0 とエキソン 1 の間に約 1.1kb のイントロン 0 が存在し²³⁾、*ras* p21 タンパク質はエキソン 1～4 の四つのエキソンによってコードされている。さらに、エキソン 4 の下流にある 28 bp の variable tandem repeat (VTR)²⁴⁾にもエンハンサー活性がある²⁵⁾と報告されている。一方、EJ6.6 から既知の転写開始領域とエンハンサー領域を取り除いた 2.9kb Sac I 断片 (EJ2.9) (図1) のトランスホーミング能は、herpes simplex virus type I (HSV-1) の初期遺伝子エンハンサーによってあげられることが報告されており²⁶⁾、ヒト *c-H-ras-1* にはすでに報告されているプロモーター／エンハンサー領域^{22, 23, 25～27)}の他に、イントロン 0 あるいはその下流にウイルスのエンハンサーで影響される未知の領域の存在が考えられるが、いまだ不明な点が多い。

そこで、本研究では、癌遺伝子を欠くレトロウイルス感染による発癌機構をモデルとして、既知のエンハンサー／プロモーターを除いた EJ2.9 を組み込んだ組換え体のトランスホーミング能に、HSV-1 以外のウイルスエンハンサーや *c-myc* 遺伝子がどのような影響を与えるかを検討した。

II. 実験材料および実験方法

1. 使用細胞株ならびに培養法

以下の3種類の細胞株を用いた。

1) NIH Swiss マウス 胎仔由来の樹立線維芽細胞株: NIH3T3²⁸⁾

2) Fischer ラット胎仔由来の樹立線維芽細胞株: 3Y1²⁹⁾

3) Balb/c マウス 胎仔由来の樹立線維芽細胞株: BALB3T3³⁰⁾

培養液は、ダルベッコ変法イーグル培地 (日水製薬) に10%ウシ胎仔血清 (FCS) (Cell Culture Laboratories), 4mM L-グルタミン, 10 μ g/ml ゲンタマイシン, 0.18%炭酸水素ナトリウムを添加したものを使用した。また、細胞の培養は、37℃, 5%CO₂ 下で行った。

2. 使用したプラスミドとそれらの調製法

以下のプラスミドを使用した。: pEJ6.6⁷⁾ (ヒト活性化型 *c-H-ras-1*), pMomyc³¹⁾ (活性化型 *c-myc*, 以下, Momyc), pUC8³²⁾, pUC18³²⁾, pSV2neo³³⁾

プラスミドの調製は、Molecular Cloning の方法³⁴⁾に従った。

3. 発現ベクターの作成

Moloney murine sarcoma virus³⁵⁾ (Mo-MSV) LTR をもつ pMomyc を BamH I で消化し、5.5 kb のマウス *c-myc* インサートを取り除いた後、自己結合させた発現ベクターを pMoLTRO と命

図2 活性化型 *c-myc* とその変異体の構造
B, P, Ex. は、それぞれ、BamHI, PstI 認識部位, exon を示す

名した (図2)。 myeloproliferative sarcoma virus (MPSV) をプロウイルスとしてもつ p 18-363³⁶⁾ を HindⅢ で消化し、3' 側の MPSVLTR を含む 3.1kb の HindⅢ 断片を得た。この断片を HindⅢ で消化し直鎖状にした pUC19 に結合し、自己結合した後、BglⅡ で消化し、BglⅡ 断

片を除去した後、再自己結合した発現ベクターを pMPSVLTRO と命名した (図3)。

4. ヒト活性化 *c-H-ras-1* の組換え体の作製 (図3)

以下にのべる組換え体の作製は、Molecular Cloning の方法³⁴⁾ に順じて行った。

pEJ6.6 を制限酵素 SacⅠ で消化し、転写開始

図3 ヒト活性化型 c-H-ras-1 の各組換え体の構造

制限酵素部位は、B : BamHI, E : EcoRI, H : HindIII, Bg : BglII, X : XbaI 認識部位を示す。
SS : SV40 splicing signal, L : SV40 late gene, A : polyA additional signal を示す

および VTR 領域を除いた 2.9kilobase (kb) の Sac I 断片を分取した。この DNA 断片の両末端を平滑化し、BamH I リンカーをつけ、EJ2.9と命名した(図1)。EJ2.9を、pMoLTRO, pMP-SVLTRO, もしくは simian virus 40 (SV40) の初期遺伝子の発現ベクターである pSV2・Bg³¹⁾ の下流に、それぞれのプロモーターに対し、正(S)、逆(AS)の両方向に結合したプラスミドの組換え体を作製し、おのおの pMoMSVLTREJS, pMoMSVLTREJAS, pMPSVLTREJS, pMPSVLTREJAS, pSV2EJS, pSV2EJAS と命名した。また、pUC18 ベクターのポリリンカーの BamH I 部位に EJ2.9 を導入した組換え体を作製し、lacZ プロモーターにたいして正向きのを pUCEJS,

逆向きのものを pUCEJAS と命名した。さらに、pMPSVLTRO を Hind III と Xba I で同時に消化し、MPSVLTRO のエンハンサー領域を含む 0.7 kb の断片を、pUCEJS, pUCEJAS に組み込んだものを作製し、おのおの、pMPSVLTREnEJS, pMPSVLTREnEJAS と命名した。

5. pMoMSVLTREJAS の 5' 上流域欠失変異体の作製(図4)

pMoMSVLTREJAS をエキソン1の上流約230塩基対(bp)に存在する Eco47III 部位で切断し、直鎖状のプラスミド DNA を得た。得られた直鎖状 DNA に BAL31 スクレアーゼを作用させて、両端から種々の長さに欠失させた後、Hind III リンカーを結合し、T4 DNA リガーゼを用いて自

図4 pMoMSVLTREJASの5' 上流欠失変異体の構造

己結合させ、種々の環状中間欠失変異体を作製した。その後、HindⅢで消化し、pUC 18のポリリンカー内のHindⅢ部位から中間欠失変異体のHindⅢ部位までの領域を取り除き自己結合させた。作製した欠失変異体の欠失領域については、7-DEAZA Sequencing Kit（宝酒造）を用いて dideoxy シークエンス反応³⁷⁾による塩基配列の解析から決定した。作製した各欠失変異体については、ATG コドンのAを+1、その1 bp 上流を-1として、dl-239, dl-209, dl-144, dl-61, dl-37, dl+22と命名した。これらはそれぞれ、5' 上流からdl-239は-240bp, dl-209は-210bp, dl-144は-145bp, dl-61は-62bp, dl-37は-38bp, dl+22は+21bpまで欠失したものである。なお、dl-61は、EJ2.9のEcoT14Ⅰの部位をHindⅢ部位に変え、同様に上流域を欠失させたものである。

6. 活性化型 *c-myc* の変異体の作製 (図2)

Momycの制限酵素PstⅠ部位は、*myc*のイントロン1内に2箇所、エキソン2内に2箇所、また、エキソン3の下流に残っているpUC19のポリリンカー内に1箇所存在する。そこで、MomycをPstⅠで消化し、生じた断片のうち、*myc*のエキソン2の一部とエキソン3を含みpUC19のポリリンカー内のPstⅠ部位までの4.4kb断片と、

イントロン1の一部とその上流のMoMSVLTR, pUC19ベクターとそのポリリンカー内のPstⅠ部位までの4 kb断片を精製した。つぎに、4.4kb断片をMoMSVLTRに対して逆向きになるように4 kb断片に結合し、作製した組換え体をpMom-ycmut. と命名した。

7. トランスフェクション法による各プラスミドのトランスホーミング能の検索

トランスフェクションはChen, Okayamaの方法³⁸⁾に従い、リン酸カルシウム共沈法により行った。3Y1の場合、トランスフェクションの前日に対数増殖期にある各培養細胞をトリプシン処理し、 2×10^5 細胞/直径60mm 組織培養用プラスチックプレート/4 ml 培養液の密度となるようにまき、37℃、5%炭酸ガスで一夜培養した。翌日、培養液を交換した後、200 μ l の0.25M塩化カルシウム溶液中に各2 μ g または4 μ g のプラスミドDNAと全DNA量が10 μ g となるようにcalf thymus DNAを加え、室温に5分間放置した。つぎに、200 μ l の2 $\times$ BBSを加え、混合後20分間室温で放置した。放置後、混合液を一滴ずつ培地中に加えプレートを前後左右に揺らしてよく拡散させ、3%炭酸ガス濃度中、37℃で15~24時間培養した。培地を除き細胞を4 ml のPBS (phosphate buffered saline) で二度洗い、培地を4 ml

加え、5%炭酸ガス濃度、37℃でさらに一夜培養した。培養後、1枚のプレートに対し1枚の直径10cmプレートにまきなおした。その後は、3日に一度、培地を交換し同じ条件で培養した。培養2～3週間後にメタノール固定、ギムザ染色した後、出現したフォーカスの数を数えた。NIH3T3の場合は田所らの方法¹²⁾、BALB3T3の場合は土田らの方法³⁹⁾に順じた。

8. ノーザン・ブロッティング

トランスフェクションで生じた単一フォーカスをペニシリンシリンダーを用いてクローニングした後、培養し、LiCl法⁴⁰⁾に従い細胞質RNAを抽出した。超小型電気泳動システム《ミュピッド-2》(コスモ・バイオ)を用い、ホルムアルデヒド-ホルムアミド法⁴¹⁾に従い、1%アガロースゲルを用いてノーザン・ブロッティングを行った。RNAは各5μg使用した。フィルターはナイロンメンブレンフィルター(Gene Screen Plus, NEN)を、付属のプロトコールに従って使用した。また、転写後のフィルターに短波長の紫外線を5分間照射し、4,200塩基長⁴²⁾の28S ribosomal RNA(rRNA)、1,870塩基長⁴²⁾の18S rRNAの量が各レーン間にてほぼ等しいことを確認後、それらの位置を鉛筆でマークしサイズマーカーとした。DNAプローブの標識は、Random Primed DNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim)ならびに³²P-dCTPを用いて行い、5～8×10⁸ cpm/μgの比活性をもつプローブを得た。まず、pEJ6.6のインサートをプローブとしてハイブリダイゼーションを行ったのち、同じフィルターを、マウス*c-myc*プローブ(0.93kbのXba I-Sac I DNA断片)で再ハイブリダイゼーションした。

9. ウェスタンブロッティング

1) サンプルの調製

トランスフォームした3Y1の各クローンを直径10cmプレートに、コンフルエントに達するまで培養し、NEI-700 ANTI-RAS P21 WESTERN BLOT PANEL(DuPont)(以下、NEI-700)の方法に従い、細胞質の蛋白質を抽出した。trypan

blue染色により生細胞を数え、 2.0×10^5 個の生細胞/μlの割合となるように適量のNP-40 Lysis Buffer(150mM NaCl, 1.0% NP-40, 50mM Tris-HCl(pH8.0))を細胞ペレットに加え、ただちに均一になるまで攪拌した。4℃で、7,500回転にて15分間遠心し、上清を電気泳動するまで-20℃で保存した。

2) ゲルの作製および電気泳動

ラビダス・二連ミニスラブ電気泳動装置; AE-6450型(アトー)の取扱説明書およびNEI-700の方法に従った。ミニスラブゲルは、濃縮ゲルがSDSを含む4.5% polyacrylamide gel, 分離ゲルがSDSを含む12.5% polyacrylamide gelのものを作製した。電気泳動は、1レーンにつきサンプル2μlを使用した。分子量マーカーとして、Biotinylated SDS-PAGE Standards(Bio-Rad)を用いた。

3) フィルターへのブロッティング

フィルターはデュラポア(GVHP)フィルター(Millipore)を、付属のマニュアルに従い用いた。ブロッティングはポリプロット電気ブロッティングシステム(ABN)を用い、付属のマニュアルに従って189mAで20分間行った。

4) ブロッキングおよび酵素抗体反応

NEI-700のマニュアルに従って行った。一次抗体は、Ras 11 anti ras p21(pan)を1,000倍希釈したものを用いた。この抗体は、種を問わず、三つのファミリー(H-ras, K-ras, N-ras)の正常型、活性型*ras*タンパク質に反応し、また、電気泳動時の移動度の差から、双方のタンパク質を区別することができる⁴³⁾。二次抗体のhorseradish peroxidase(HRP)結合ヒツジ抗マウスIgGは、50倍希釈したものを用いた。抗体処理したフィルターを、0.1%ジアミノベンチジン、0.02%過酸化水素水の混和液に5分間つけて発色させた。

Ⅲ. 結 果

1. 各種腫瘍ウイルスのプロモーター/エンハンサーにつないだEJ2.9のトランスホーミング能
RNA腫瘍ウイルスのMPSV, MoMSVのエン

表1 各種腫瘍ウイルスのプロモーター/エンハンサーにつないだ EJ2.9 を含む
組換え体プラスミドのトランスホーミング能 (単位, F. F. U./ μ g DNA)

Plasmids	Recipient Cells			
	BALB3T3		NIH3T3	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
pMoMSVLTREJS	2.6×10^2	2.9×10^2	6.5×10^2	9.7×10^2
pMoMSVLTREJAS	7.0×10^1	5.6×10^1	1.5×10^2	8.9×10^1
pMPSVLTREJS	ND	2.9×10^2	1.3×10^3	6.5×10^2
pMPSVLTREJAS	ND	5.7×10^1	1.9×10^2	1.2×10^2
pSV2EJS	ND	ND	4.4×10^2	ND
pSV2EJAS	ND	ND	1.7×10^2	ND
pMPSVLTREnEJS	ND	ND	ND	1.3×10^2
pMPSVLTREnEJAS	ND	ND	ND	7.5×10^1
pUCEJS	<1		4	1
pUCEJAS	<1		1.0×10^1	1

ND : not done

ハンサー/プロモーターおよび DNA 腫瘍ウイルスである SV 40 の初期遺伝子のエンハンサー/プロモーターの下流に、既知のプロモーター/エンハンサー領域を除いた EJ2.9 を結合した。これらの各種組換え体プラスミドを、トランスフェクション法を用いて NIH3T3, BALB3T3 へ導入し、フォーカスアッセイを行いそれらのトランスホーミング能を調べた (表1)。その結果、いずれのウイルスプロモーター/エンハンサーを用いても、正向き (S) に結合したものを 100 とすると逆向き (AS) につないだものでも 16~39 前後のトランスホーミング能をもつことがわかった。しかし、各種腫瘍ウイルスのプロモーター/エンハンサーを結合していない EJ2.9 のみでは 0.1~1.5 であった。そこで、AS につないだ組換え体プラスミドのトランスホーミング能がウイルスのエンハンサーによって上昇したか否かを調べるため、プロモーター機能をもたずエンハンサー機能をもつ LTR の下流に EJ2.9 を正逆両方向につないだ組換え体 (pMPSVLTREnEJS, pMPSVLTREnEJAS) を作製し、トランスホーミング能を検討した。その結果、プロモーター/エンハンサーを含む LTR に EJ 2.9 を逆向きに結合したものと同程度のトランスホーミング能をもつことがわかった。

表2 各種 5' 上流域欠失変異体のトランスホーミング能

Plasmid DNAs	F. F. U. / μ g DNA
pMoMSVLTREJAS	55
dl-239	56
dl-209	63
dl-144	43
dl-61	6.0
dl-37	1.5
dl+22	0
pUCEJ	1.0
pEJ6.6	450
pUC8	0

NIH3T3 細胞を用いた duplicate assay の平均値を示す

た。

この活性の上昇に関与する EJ2.9 の領域を解析する目的で、EJ 2.9 内の構造遺伝子の 5' 上流域 (イントロン 0 とエキソン 1 の非翻訳領域) に種の欠失をもつ変異体を、pMoMSVLTREJAS より作製し、NIH3T3 細胞に導入しフォーカスアッセイを行いトランスホーミング能の変化を調べた (表2)。その結果、p 21 タンパク質翻訳開始コドン上流、-144 までは変化がみられなかった。

表3 活性化型 *c-myc* による EJ2.9 各種組換え体プラスミドのトランスホーミング能の上昇

Plasmid DNAs		F. F. U./ μ g DNA		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
pUCEJ	+Momyc	5	4	6
pUCEJ	+pUC8	0	ND	ND
pUCEJ	+pUC18	ND	0	0
pMPSVEnEJAS	+Momyc	ND	12	10
pMPSVEnEJAS	+pUC8	ND	ND	ND
pMPSVEnEJAS	+pUC18	ND	0	1
pMPSVLTREJAS	+Momyc	54	22	21
pMPSVLTREJAS	+pUC8	0	ND	ND
pMPSVLTREJAS	+pUC18	ND	0	1
pMoMSVLTREJAS	+Momyc	18.5	16	19
pMoMSVLTREJAS	+pUC8	0	ND	ND
pMoMSVLTREJAS	+pUC18	ND	0	3
pEJ6.6	+Momyc	41	33	29
pEJ6.6	+pUC8	5.5	ND	ND
pEJ6.6	+pUC18	ND	4	16
pUC8		0	ND	ND
pUC18		ND	0	0
Momyc		0	0	0

3Y1細胞を用いた3回の独立実験の結果を示す
ND: not done

が、-61の領域まで欠失させると急激にトランスホーミング能が下がることがわかった。つまり、開始コドンの上流、61～144塩基の間にトランスホーミング能に關与する領域が存在した。

2. マウス *c-myc* による EJ2.9 を含む各種プラスミド組換え体のトランスホーミング能の上昇

活性化型 *c-myc* は、*ras* と協同して初代培養細胞をトランスホームすることが知られている。そこで次に、*c-myc* が、各種 LTR およびエンハンサーに対して逆向きに結合した EJ2.9 組換え体プラスミドのトランスホーミング能を、上昇させるか否かを調べた。EJ2.9 の各組換え体と活性化型 *c-myc* (Momyc) を同時に 3Y1 細胞に導入し、フォーカスアッセイを行いそのトランスホーミング能を調べた (表3)。その結果、Momyc を同時に導入した場合、対照 (pUC8 あるいは pUC18) と

比べ、有意に上昇することがわかった。EJ2.9 でも EJ6.6 の場合でも同様であった。

得られたフォーカスの形態は、図5に示すように、正常な 3Y1 細胞と比べ、丸くきらきらとひかる形態を示した。トランスホームした細胞は、接触阻止能を失い過剰増殖し、培養に用いたプラスチックプレートからはがれやすかった。

さらに、導入された *ras* と *myc* 遺伝子の両者がトランスホーメーションに關与しているか否かを検討するため、得られたフォーカスから、それぞれ2～3個のトランスホーマントをクローニングし、mRNA の発現をノーザンブロッティング法を用いて調べた (図6)。その結果、各クローンにおいて、メジャーバンドとして、1.2kb の *ras* の mRNA と 2.5kb の *myc* の mRNA が同時に発現していることがわかった。一方、正常 3Y1 細胞では、両遺伝子の発現はみられなかったことから、検出された mRNA は、導入した *ras/myc* 遺伝子の発現によるものと考えられた。各クローンにおいて、*ras* と *myc* の発現量に相違がみられた。メジャーバンド以外のバンドは、トランスフェクションの際におきた組換えによって生じたものと考えられた。さらに、これらのクローンについて、ウェスタンブロッティング法を用いて、タンパク質レベルで *ras* の発現を検討した (図7)。その結果、発現量に差があるものの、各クローンにおいて 3Y1 で発現している正常型 p21 タンパク質以外に、それより移動度の少し遅い導入した *ras* 遺伝子がコードする活性化型 p21 が発現されていることがわかった。

次に、このトランスホーミング能の上昇が *c-myc* タンパク質によるものか否かを検討する目的で、活性化型 *c-myc* (Momyc)、*myc* タンパク質を発現できない変異体 (Momycmut.) および Momyc から *c-myc* を除いた MoLTRO を、pUC-EJAS, pMoMSVLTREJAS などとともに 3Y1 細胞に導入し、フォーカスアッセイを行った (表4)。その結果、pUCEJAS と MoLTRO との組合せで、わずかにフォーカスが出現してきたものの、活性化型 *c-myc* は、*c-myc* タンパク質を発

図5 各EJ2.9の組換え体と *myc* により，トランスホームした3Y1細胞が形成したフォーカスの位相差顕微鏡像：拡大率；×40にて撮影

図6 各 EJ2.9 の組換え体と *myc* のトランスホーマントにおける各遺伝子 RNA の発現
 1. pEJ6.6+pUC18, 2. pEJ6.6+pMomyc, 3. pUCEJAS+pMomyc
 4. pMPSVEnEJAS + pMomyc, 5. pMPSVLTREJAS+pMomyc の
 トランスホーマントのクローン 6. 3Y1 細胞

図7 各 EJ2.9 の組換え体と *myc* のトランスホーマントにおける活性化型 *ras* タンパク質の発現
 T24; EJ6.6 で発現される活性化型 p21 と同じ *ras* タンパク質を発現するヒト膀胱癌細胞株

現できない変異体に比べ, EJ 2.9 のトランスホーミング能を約 3 倍上昇させた。一方, *c-myc* タンパク質を発現できない Momycmut. では上昇がみられず, 対照として用いた MoLTRO, pUC18 と同レベルであった。pMoMSVLTREJAS, pEJ

6.6 を用いた場合でも, 同様の結果であった。したがって, *c-myc* タンパク質が, EJ 2.9 のトランスホーミング能の上昇に関与していると考えられた。

次に, *c-myc* タンパク質によるトランスホー

表4 活性化型 *c-myc* との cotransfection による, EJ2.9 のトランスホーミング能の上昇における *myc* タンパク質の関与

Plasmid DNAs		the number of Foci/Plate 3Y1 Cells
pUCEJAS	+ pUC18	0
pUCEJAS	+ Momyc	7
pUCEJAS	+ Momycmut.	1
pUCEJAS	+ MoLTRO	2
pMoMSVLTREJAS	+ pUC18	13
pMoMSVLTREJAS	+ Momyc	36
pMoMSVLTREJAS	+ Momycmut.	12
pMoMSVLTREJAS	+ MoLTRO	12
pEJ6.6	+ pUC18	15
pEJ6.6	+ Momyc	48
pEJ6.6	+ Momycmut.	15
pEJ6.6	+ MoLTRO	15
pUC18	+ pUC18	0
pUC18	+ Momyc	0
pUC18	+ Momycmut.	0
pUC18	+ MoLTRO	0

表5 活性化型 *c-myc* による各種 5' 上流域欠失変異体のトランスホーミング能

Plasmid DNAs	3Y1 Cells			
	With myc		alone	
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
pUCEJ	ND	1	ND	0
pMoMSVLTREJAS	22	9.5	0.5	2.0
dl-239	21	10.5	1.0	1.0
dl-209	18	10	1.8	1.0
dl-144	13	3.5	0.5	0.5
dl-61	2.3	2.5	0	0.5
dl-37	ND	2.0	0	0
dl+22	0	0	0	0
pEJ6.6	69	26.5	14.5	5.5
pUC8	0	ND	0	ND
pUC18	ND	0	ND	0

単位: F. F. U./ μ g DNA (duplicate assay.)
ND; not done

ミング活性の上昇に関与する EJ2.9 の領域を解析するため, 前述の EJ2.9 の 5' 上流域の欠失変異体を, Momycあるいは対照の pUC18とともに,

3Y1細胞に導入しフォーカスアッセイを行い, トランスホーミング能の変化を調べた(表5)。その結果, 全体としてトランスホーミング能は上昇するものの, 開始コドンの上流, -209まではトランスホーミング能に著明な変化はみられず, -61まで欠失させるとトランスホーミング能は低下した。この結果は, 表2の結果とほぼ一致した。

IV. 考 察

本研究では, ヒト *c-H-ras-1* 遺伝子の本来の転写開始領域を除いたため, トランスホーミング能をほとんどもたない EJ2.9 のトランスホーミング能をウイルスエンハンサーやマウス *c-myc* が上昇させることを示した。

1. 各種腫瘍ウイルスのプロモーター/エンハンサーにつないだ EJ2.9 を含む組換え体プラスミドのトランスホーミング能について

EJ2.9を, 各種腫瘍ウイルスのプロモーター/エンハンサーの下流に正逆両方向につないだ場合, EJ2.9のトランスホーミング能が上昇した。また, エンハンサーのみの場合でも, EJ2.9のトランス

ホーミング能が同様に上昇した。このことは、HSV-1 の初期遺伝子エンハンサーによる EJ2.9 のトランスホーミング能の上昇の報告²⁶⁾と一致する。エンハンサーは、位置、方向に無関係にプロモーターからの転写を活性化することから、EJ2.9 のトランスホーミング能の上昇に、エンハンサーが関与していると考えられる。

癌遺伝子を欠くトリ白血病ウイルス LTR のエンハンサー挿入による癌原遺伝子の活性化の場合^{21, 44~51)} は、*c-myc* が本来もっているプロモーターが活性化されている。これに対して、本研究で用いた EJ2.9 は、本来のプロモーター領域が除かれている。よって、EJ2.9 のイントロン 0 もしくは ATG の上流の非翻訳エクソン 1 内に、正常では働かないプロモーターが存在すると考えられ、そこからの転写をウイルスエンハンサーが活性化していると考えられる。このような例は、バーキットリンパ腫 (BL) で、染色体転座の結果、本来のプロモーター領域が欠失した *c-myc* の転写が、

イントロン 1 内の正常では働かないプロモーターから始まる例が報告されている²⁾。また、Brown らは、ウイルス感染によって、*H-ras* のイントロン 0 から転写が始まる可能性を報告している⁵²⁾。さらに、本研究で、EJ2.9 の上流域欠失変異株を用いたフォーカスアッセイの実験から、*ras* タンパク質翻訳開始コドン ATG の上流、-144 から -61 の間でトランスホーミング能が急激に減少することが明らかとなり、この領域に、ウイルスエンハンサーで影響されるトランスホーミング能に関係した転写開始あるいは調節領域があると考えられる。EJ2.9 のイントロン 0 もしくは非翻訳エクソン 1 内に存在する正常では働かない転写開始部位が、ウイルスエンハンサーによって活性化され、転写が開始しているかどうかは、S1 mapping と primer extension によって調べる必要がある。

最近、ヒト *c-H-ras-1* には、エンハンサー機能をもつ VTR 領域²⁵⁾と同様、イントロン 0 に

図 8 EJ2.9 のエクソン 1 の一部とその上流イントロン 0 の塩基配列；欠失変異体の欠失領域と転写因子の結合配列を示した。転写因子結合配列中の点線部分は、各転写因子の consensus sequence とは異なる塩基を示す

も繰り返し配列, GGGCCT があり (図 8), その繰り返しの数に個体差があること, さらに, この二つの繰り返し配列には互いに相関性があることが報告されている⁵³⁾。後者の配列は, 本研究における -144 ~ -61 の間にあることから, 今後, この領域の配列が, ヒト癌における *c-H-ras-1* 遺伝子の発現にどのような役割を果たすか興味もたれる。

2. *c-myc* 遺伝子による EJ2.9 を含む各種組換え体のトランスホーミング能の上昇について

癌原遺伝子のなかで, *c-myc* 遺伝子は, 多くのヒト癌細胞で増幅の頻度が高く, 高発現している⁴⁾。そこで, 本研究においては, ウイルス LTR にマウス *c-myc* を正向きにつなぎ, 強制発現させた活性化状態で用いることにより, *ras* が活性化し, かつ *c-myc* が高発現しているヒト癌細胞を想定した。各 EJ2.9 組換え体のトランスホーミング能は, *c-myc* タンパク質により上昇した。さらに, 活性化型 *c-myc* (Momyc) およびその変異体による EJ2.9 のトランスホーミング能の上昇を調べた実験から, *c-myc* タンパク質がこの上昇に関与していると考えられる。一方, ノーザン・ブロッティング法による解析の結果から, それらの各クローンでは, 対照として用いた pEJ6.6 の場合と同様に, 同じ 1.2 kb の mRNA を発現していた。また, EJ2.9 の上流側にあるベクターのポリリンカー内で 2 箇所切断し, 直鎖状にした EJ2.9 の組換え体を用いて, Momyc との同時導入によるフォーカスアッセイを行った結果, 環状の組換え体を用いた場合と同じ結果であった (未発表)。したがって, *c-myc* タンパク質が, 各 EJ2.9 組換え体のトランスホーミング能の上昇に関与し, さらに, 各 EJ2.9 組換え体の転写が, ベクター内から始まり RNA スプライシングを受けているのではなく, EJ2.9 のイントロン 0 もしくは非翻訳エキソン 1 領域から開始している可能性が考えられる。しかし, 転写開始点については, 前述と同様, S1 mapping と primer extension による解析が必要である。

EJ2.9 のトランスホーミング能をあげる, *c-*

myc タンパク質の機構として, 以下の三つの可能性が考えられる。

第 1 は, *c-myc* タンパク質が, ウイルスエンハンサーの機能の上昇と EJ2.9 の上流域に, 同時に作用する可能性である。第 2 は, そのどちらかに作用する可能性である。本研究からは, *c-myc* タンパク質がウイルスエンハンサーに関与していることは否定できない。しかしながら, ウイルスエンハンサーをもたない EJ2.9 のみのトランスホーミング能も *c-myc* によって活性化がみられる (表 3) ことから, 少なくとも, EJ2.9 の上流域には, *c-myc* タンパク質が作用する領域が存在すると考えられる。事実, Kaddurah-Daouk らは, マウス *c-myc* タンパク質が, ヒト heat shock protein 70 (hsp70) 遺伝子のプロモーターからの転写を, トランスに活性化していることを報告している⁵⁴⁾。また, 有賀らは, *c-myc* タンパク質は, 特異的な TCTCTTA 配列を認識する DNA 結合タンパク質であり, *c-myc* 遺伝子自身および他の遺伝子のエンハンサーに結合し, その転写を促進・抑制する転写因子として働くことを報告している¹⁵⁾。以上のことから, *c-myc* タンパク質は, 遺伝子発現を調節する転写因子と考えられている^{15, 55)}。EJ 2.9 内のイントロン 0 と非翻訳エキソン 1 領域を調べてみると (図 8), dl-239 の 14bp 上流に, *c-myc* タンパク質が結合する塩基配列と 1 bp 違いの TAAGAGC 配列が存在し, また, 2 bp 違いの配列が 6 箇所存在し, EJ2.9 のイントロン 0 に *c-myc* タンパク質が結合する配列と相同性の高い配列が有意に多いことがわかった。したがって, *c-myc* タンパク質がこの領域に直接作用している可能性がある。一方, EJ2.9 のイントロン 0 および非翻訳エキソン 1 領域内に, 図 8 に示すように AP2 をはじめ 4 種類の転写因子⁵⁶⁾が結合する可能性のある配列が集中していることから, これらの転写因子の発現および機能が *c-myc* タンパク質によって上昇する⁵⁵⁾ことにより, EJ2.9 の転写を活性化している可能性も考えられる。*c-myc* タンパク質や転写因子が EJ2.9 の上記の領域に結合するか否かは, さらに, DNase I フ

ットプリント法やゲルシフトアッセイ法によって調べる必要がある。

第3は、*c-myc* タンパク質のもつ転写活性化以外の機能が、EJ2.9のトランスホーミング能に関与している可能性である。*c-myc* タンパク質は、細胞DNA複製のイニシエーターとして働き¹⁵⁾、また、*c-myc*の発現と細胞増殖能に相関がみられるという報告がある¹⁸⁾。しかし、*ras* タンパク質にこのような機能、発現と増殖との相関はないと考えられている。さらに、*ras*と異なり、一般的に、活性化型*c-myc*はトランスホーミング能をもたないとされているが、条件によっては、すでに細胞株となっている3Y1細胞をトランスホームすることが報告されている⁵⁷⁾。よって、メカニズムは不明であるが、3Y1細胞において潜在的にトランスホーミング能をもつ*c-myc*タンパク質とEJ2.9タンパク質が、初代培養細胞の癌化における*ras/myc*の協同作用と同様の機構で協同作用することにより、EJ2.9のトランスホーミング能が上昇している可能性も考えられる。

3. ヒト癌と本研究との関わりについて

レトロウイルスゲノムが感染した細胞の染色体DNAに組み込まれる場合、挿入される染色体上に特定の位置はないとされており²⁾、ヒト癌では、動物レトロウイルスの場合にみられたように、レトロウイルスLTRのプロモーターやエンハンサーの挿入変異によって、*cis*の作用による癌原遺伝子の活性化が起きている例^{44~51)}は、いまだ報告がない。しかし、ヒト癌細胞においては、転座などによる染色体異常が広範に検出されている。事実、バーキットリンパ腫においては、転座の結果により、他の遺伝子のエンハンサーの近傍に*c-myc*が位置することにより、*c-myc*の正常では働かないイントロンに存在するプロモーターが活性化され、機能するようになることが知られている²⁾。本研究では、ウイルスエンハンサーによる*H-ras*の活性化を示したが、ヒト癌で、同様の現象が起きているか否かを探ることが今後の課題である。

Fieldらは、頭頸部領域の扁平上皮癌(SCC)

では*H-ras*と*c-myc*の発現が、正常組織に比べて、有意に高いことを報告している⁵⁸⁾。ヒト舌SCC由来のZAでも*c-H-ras-1*の点突然変異による活性化と*c-myc*の増幅が同時にみられている¹²⁾。*ras*・*myc*両方の活性化は、この他、ヒト前骨髄性白血病細胞株であるHL60⁵⁹⁾、ヒト肺巨細胞癌のLu-65⁶⁰⁾においても報告されており、ヒト癌における*ras*と*myc*の多段階発癌における関与が示唆される。*ras*と*myc*の細胞癌化における協同作用機構はいまだ不明であるが、本研究における、本来の転写開始領域をもっていないEJ2.9のトランスホーミング能が*c-myc*によってあげられるという知見は、*ras/myc*協同作用ばかりでなく、ヒト細胞における多段階発癌過程機構解明の一助につながると考えられる。

V. 結 語

癌遺伝子を欠くレトロウイルス感染による発癌および*ras*が活性化し、かつ*c-myc*が高発現しているヒト癌細胞をモデルとして、既知の転写開始調節領域を除いたヒト活性化型*c-H-ras-1*のトランスホーミング能に、ウイルスエンハンサーや*c-myc*遺伝子がどのような影響を与えるか検討した。

すでに同定されたEJ6.6のプロモーターおよびエンハンサー領域を除き、タンパク質をコードするエキソンをすべてもつ2.9kb Sac I断片(EJ2.9)を、各種腫瘍ウイルスのエンハンサー/プロモーター、もしくは、エンハンサー機能のみをもつLTRの下流に正、逆の両方向に結合した組換え体を作製した。それらをリン酸カルシウム共沈法を用いて、培養細胞に導入し、フォーカスアッセイによりトランスホーミング能を調べた。

その結果、EJ2.9を、LTRあるいはエンハンサー機能のみをもつLTRに逆方向につないだ組換え体でも、正向きにつないだ場合の16~39%のトランスホーミング能をもつことが明らかとなった。さらに、LTRに逆向きにつないだEJ2.9の5'上流側の欠失変異体を用いた解析の結果、EJ2.9のトランスホーミング能は、*ras*タンパク

質翻訳開始コドン(ATG)の上流, -144~-61の領域において急激に減少することが明らかとなった。一方, cotransfection の実験から, 活性化型 *c-myc* は, EJ2.9 のトランスホーミング能をLTRの有無に関わらず有意に増大させた。出現したトランスホーマントでは *ras* と *myc* 遺伝子が, それぞれ1.2kb と2.5kb の mRNA として発現されており, *myc* タンパク質の変異体の解析からこの増大には *myc* タンパク質が関与することが判明した。

以上の結果より, ウイルスエンハンサーが p21 タンパク質の翻訳開始点の上流, -61~-144 の領域に作用し, -1~-144 の間にある正常では機能しないプロモーターを活性化し, また, *myc* タンパク質はイントロン0かエキソン1の非翻訳領域にあるプロモーターを活性化し, EJ2.9 のトランスホーミング能を上昇させる可能性が示唆された。得られた知見について, ヒト発癌機構と関係づけて考察した。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 懇切なるご指導, ご校閲を賜りました本学第1口腔外科学教室塩田重利教授に謹んで感謝の意を表するとともに, 終始, 直接懇切丁寧なご教授とご校閲を賜りました本学口腔細菌学教室土田信夫教授に深甚なる感謝を申し述べます。また, 直接, 懇切なるご指導, ご助言を賜りました本学口腔細菌学教室池田正明助手に深く感謝いたしますとともに, 貴重なご助言をいただきました同文部技官入谷昭夫氏に厚くお礼申し上げます。さらに, 終始暖かいご支援をいただきました, 第1口腔外科学教室, 口腔細菌学教室の皆様は心より感謝いたします。

なお, 本研究の一部は, 昭和63年度, 平成2年度文部省科学研究補助金, 一般研究(C) (課題番号63570929, 02670888) の援助を受けた。

本論文の要旨の一部は, THE MOLECULAR BASIS OF CELL GROWTH REGULATION, (1989年5月, MALLORCA) において発表した。

文 献

1) Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M. and

- Vogt, P. K. : DNA related to the transforming genes of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260 : 170-173, 1976.
- 2) Weiss, R., Teich, N., Varmus, H. and Coffin, J. : RNA tumor viruses 2/Supplements and Appendixes. New York, 1985, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- 3) Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C. and Weinberg, R. A. : Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297 : 474-478, 1982.
- 4) Bishop, J. M. : The molecular genetics of cancer. *Science* 235 : 305-311, 1987.
- 5) Barbacid, M. : *ras* genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56 : 779-827, 1987.
- 6) Bos, J. L. : *ras* oncogenes in human cancer : A review. *Cancer Res.* 49 : 4682-4689, 1989.
- 7) Shih, C. and Weinberg, R. A. : Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29 : 161-169, 1982.
- 8) Tabin, C. J., Bradley, S. M., Bargmann, C. I., Weinberg, R. A., Papageorge, A. G., Scolnick, E. M., Dhar, R., Lowy, D. R. and Chang, E. H. : Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300 : 143-149, 1982.
- 9) Reddy, E. P., Reynolds, R. K., Santos, E. and Barbacid, M. : A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300 : 149-152, 1982.
- 10) Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H. and Goeddel, D. V. : Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature* 302 : 33-37, 1983.
- 11) Reddy, E. P. : Nucleotide sequence analysis of the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Science* 220 : 1061-1063, 1983.
- 12) Tadokoro, K., Ueda, M., Ohshima, T., Fujita, K., Rikimaru, K., Takahashi, N., Enomoto, S. and Tsuchida, N. : Activation of oncogenes in human oral cancer cells : a novel codon 13 mutation of c-H-ras-1 and amplification of c-*erbB*-1 and c-*myc*. *Oncogene* 4 : 499-505, 1989.
- 13) Weinberg, R. A. : The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 230 : 770-776, 1985.
- 14) Mougneau, E., Lemieux, L., Rassoulzadegan, M. and Cuzin, F. : Biological activities of v-*myc* and rearranged c-*myc* oncogenes in rat fibroblast cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 5758-5762, 1984.
- 15) Ariga, H., Imamura, Y. and Iguchi-Ariga, S. :

- DNA replication origin and transcriptional enhancer in *c-myc* gene share the *c-myc* protein binding sequences. *EMBO J.* 8 : 4273-4279, 1989.
- 16) Land, H., Parada, L. F. and Weinberg, R. A. : Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304 : 596-602, 1983.
 - 17) Weinberg, R. A. : Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49 : 3713-3721, 1989.
 - 18) Alt, F. W., Harlow, F. and Ziff, E. : Current Communications in Mol. Biol. : Nuclear oncogenes. New York, 1987, Cold Spring Harbor Lab. Press, 186-192.
 - 19) 佐久間貞俊, 土田信夫 : レトロウイルス LTR の構造と発癌. 代謝 21 : 53-64, 1984.
 - 20) Hayward, W. S., Neel, B. G. and Arstrin, S. M. : Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis. *Nature* 290 : 475-480, 1981.
 - 21) Payne, G. S., Bishop, J. M. and Varmus, H. E. : Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature* 295 : 209-214, 1982.
 - 22) Spandidos, D. A. and Riggio, M. : Promoter and enhancer like activity at the 5' end of normal and T24 Ha-*ras*1 genes. *FEBS Letters* 203 : 169-174, 1986.
 - 23) Ishii, S., Merlino, G. T. and Pastan, I. : Promoter region of the human *ras* proto-oncogene : similarity to the EGF receptor proto-oncogene promoter. *Science* 230 : 1378-1381, 1985.
 - 24) Krontiris, T. G., Dimartino, N. A., Colb, M. and Parkinson, D. R. : Unique allelic restriction fragments of the human Ha-*ras* locus in leukocyte and tumour DNAs of cancer patients. *Nature* 313 : 369-374, 1985.
 - 25) Spandidos, D. A. and Holmes, L. : Transcriptional enhancer activity in the variable tandem repeat DNA sequence downstream of the human Ha-*ras*1 gene. *FEBS Letters* 218 : 41-46, 1987.
 - 26) Puga, A., Marquez, J. G., Brayton, P. R., Cantin, E. M., Long, L. K., Barbacid, M. and Notkins, A. L. : The immediate-early enhancer element of Herpes simplex virus type 1 can replace a regulatory region of the c-Ha-*ras*1 oncogene required for transformation. *J. Virol.* 54 : 879-881, 1985.
 - 27) Sekiya, T., Fushimi, M., Hori, H., Hirohashi, S., Nishimura, S. and Sugimura, T. : Molecular cloning and the total nucleotide sequence of the human c-Ha-*ras*-1 gene activated in a melanoma from a Japanese patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 4771-4775, 1984.
 - 28) Todaro, G. and Green, H. : Quantitative studies on the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell. Biol.* 17 : 299, 1963.
 - 29) Kimura, G., Itagaki, A. and Summers, J. : Rat cell line 3Y1 and its virogenic polyoma- and SV40-transformed derivatives. *Int. J. Cancer* 15 : 694, 1975.
 - 30) Aaronson, S. A. and Todaro, G. J. : Development of 3T3-like lines from Balb/c mouse embryo cultures : transformation susceptibility to SV40. *J. Cell Physiol.* 72 : 141-148, 1968.
 - 31) Ikeda, M. and Tsuchida, N. : *myc* genes linked to viral promoters can collaborate with a transformation-deficient simian virus 40 early gene mutant to transform established rat cells. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann).* 78 : 428-431, 1987.
 - 32) Vieira, J. and Messing, J. : The pUC plasmid, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19 : 259-268, 1982.
 - 33) Southern, P. J. and Berg, P. : Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial *lgene* under control of the SV40 early gene promoter. *J. Mol. Appl. Gen.* 1 : 327-341, 1982.
 - 34) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning, 2nd edition. New York, 1989, Cold Spring Harbor Lab. Press.
 - 35) Moloney, J. B. : A virus-induced rhabdomyosarcoma of mice. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 22 : 139-142, 1966.
 - 36) Kollek, R., Stoking, C., Joffe, F. S. and Ostertag, W. : Molecular cloning and characterization of a leukemia-inducing myeloproliferative sarcoma virus and two of its temperature-sensitive mutants. *J. Virol.* 50 : 717-724, 1984.
 - 37) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 5463-5467, 1977.
 - 38) Chen, C. and Okayama, H. : High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 2745-2752, 1987.
 - 39) Tsuchida, N., Ryder, T. and Ohtsubo, E. : Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science* 217 : 937-939, 1982.
 - 40) Conlon, R. A., Tufaro, F. and Brandhorst, B. P. : Post-transcriptional restriction of gene

- expression in sea urchin interspecies hybrid embryos. *Genes&Develop.* 1 : 337-346, 1987.
- 41) Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. and Boedtker, H. : RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.* 16 : 4743-4751, 1977.
- 42) 村松正実, 編著 : 遺伝子発現と転写因子. 東京, 1989. 羊土社, 184-189.
- 43) Carney, W. P., DeLellis, R. A., Wolfe, H., Cooper, G. and Rabin, H. : A biochemical analysis of carcinoma cells using a panel of monoclonal antibodies to normal and activated *ras* proteins. *Proc. 78th AACR.* 28 : 397, 1987.
- 44) Nusse, R. and Varmus, H. E. : Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31 : 99-109, 1982.
- 45) Peters, G., Brookes, S., Smith, R. and Dickson, C. : Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus : evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors. *Cell* 33 : 369-377, 1983.
- 46) Tsichlis, P. N., Strauss, P. G. and Hu, L. F. : A common region for proviral DNA integration in MoMuLV-induced rat thymic lymphomas. *Nature* 302 : 445-449, 1983.
- 47) Lemay, G. and Jolicoeur, P. : Rearrangement of a DNA sequence homologous to a cell-virus junction fragment in several Moloney murine leukemia virus-induced rat thymomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 38-42, 1984.
- 48) Cuypers, H. T., Selten, G., Quint, W., Zijlstra, M., Maandag, E. R., Boelens, W., Wezenbeek, P. V., Melief, C. and Berns, A. : Murine leukemia virus-induced T-cell lymphomagenesis: integration of proviruses in a distinct chromosomal region. *Cell* 37 : 141-150, 1984.
- 49) Silver, J. and Kozak, C. : Common Proviral integration region on mouse chromosome 7 in lymphomas and myelogenous leukemias induced by Friend murine leukemia virus. *J. Virol.* 57 : 526-533, 1986.
- 50) Sola, B., Simon, D., Mattei, M. G., Fichelson, S., Borderaux, D., Tambourin, P. T., Guent, J. L. and Gisselbrecht, S. : *Fim-1*, *Fim-2/c-fms*, and *Fim-3*, three common integration sites of Friend murine leukemia virus in myeloblastic leukemias, map to mouse chromosomes 13, 18, and 3, respectively. *J. Virol.* 62 : 3973-3978, 1988.
- 51) Poirier, Y., Kozak, C. and Jolicoeur, P. : Identification of a common helper provirus integration site in Abelson murine leukemia virus-induced lymphoma DNA. *J. Virol* 62 : 3985-3992, 1988.
- 52) Brown, K., Bailleul, B., Ramsden, M., Fee, F., Krumlauf, R. and Balmain, A. : Isolation and characterization of the 5' flanking region of the mouse c-Harvey-*ras* gene. *Mol. Carcinog.* 1 : 161-170, 1988.
- 53) Iwahara, H., Orita, M., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. : A new RFLP in intron 1 of the human c-H-*ras* 1 gene and its close relationship with the variable tandem repeats in the region 3' to the gene. *Oncogene* 5 : 1049-1053, 1990.
- 54) Kaddurah-Daouk, R., Greene, J. M., Baidwin, A. S. and Kingston, R. E. : Activation and repression of mammalian gene expression by the c-*myc* protein. *Genes & Develop.* 1 : 347-357, 1987.
- 55) Collum, R. G. and Alt, F. W. : Are *myc* proteins transcription factors? *Cancer Cells* 2 : 69-75, 1990.
- 56) Jones, N. C., Rigby, P. W. J. and Ziff, E. B. : Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription : lessons from studies on DNA tumor viruses. *Genes & Develop.* 2 : 267-281, 1988.
- 57) Shiroki, K., Segawa, K., Koita, Y. and Shibuya, M. : Neoplastic transformation of rat 3Y1 cells by a transcriptionally activated human c-*myc* gene and stabilization of p53 cellular tumor antigen in the transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 4379-4386, 1986.
- 58) Field, J. K. and Spandidos, D. A. : Expression of oncogenes in human tumours with special reference to the head and neck region. *Oral Pathol.* 7 : 97-105, 1987.
- 59) Murray, M. J., Cunningham, J. M., Parada, L. F., Dautry, F., Lebowitz, P. and Weinberg, R. A. : The HL-60 transforming sequence : a *ras* oncogene coexisting with altered *myc* genes in hematopoietic tumors. *Cell* 33 : 749-757, 1983.
- 60) Taya, Y., Hosogai, K., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Tsuchiya, R., Tsuchida, N., Fushimi, M., Sekiya, T. and Nishimura, S. : A novel combination of K-*ras* and *myc* amplification accompanied by point mutational activation of K-*ras* in a human lung cancer. *EMBO J.* 3 : 2943-2946, 1984.