講座

遺伝子工学実験講座

XIII. 動物細胞のベクター系および動物細胞への遺伝子導入法 (2)[†]西森克彦^{††}, 大石道夫

東京大学応用微生物研究所

113 東京都文京区弥生1-1-1

Key Words : mammalian cell, vector, gene transfer, dominant selection marker

2. 動物細胞への遺伝子導入

2・1 動物細胞への遺伝子導入法について

動物細胞への遺伝子導入法の開発と改良は、大腸菌を利用した遺伝子 DNA のクローニング技術およびその組換え技術の発展と相まって進み、がんや細胞分化、あるいは免疫機構などにおけるさまざまな遺伝子の発現制御を明らかにする上での有力な手段となった。また有用物質生産、あるいは新しい細胞、生物の育種といった観点からも重要な技術といえよう。

動物細胞への遺伝子導入法には前述した各種の形質導入用ウイルスベクターの細胞への感染を利用した、いわば生物学的といえる方法と、それ以外の物理化学的ともいえるより人工的な方法の二つに大別できると思われるが、この章では後者についてのみ述べたい。

さて、このいわば物理化学的というべき方法もさらに化学的な方法と物理的、あるいは機械的ともいうべき方法の二つに分類できる。前者の化学的な方法としては、代表的なリン酸カルシウム法がまず挙げられる^{82), 83)}。これはリン酸カルシウムの沈殿をキャリアとして DNA の細胞内への取込みを図るものであるが、リン酸カルシウム沈殿の細胞への取込みは細胞の

貪食能によっているといわれ、貪食能の乏しいと考えられるリンパ球系細胞などに対しては概して適用が困難である。一方、DNA だけではなく染色体や組換え DNA を持つスフェア等をそのまま用いて細胞に導入できる等の利点をも持つ。また負に帯電した細胞膜に対し DEAE-dextran⁸⁴⁾, polybrene⁸⁵⁾, poly-L-ornithine⁸⁶⁾ 等のポリカチオンを用いてポリアニオンである DNA の吸着を図り、その取込みを促す方法もある。これらに対し、機械的な方法としては顕微鏡下マイクロマニピュレータを用い、細胞核中に直接ガラス微小管を差し込み DNA を導入する microinjection 法^{87), 88)}、電気パルスにより細胞膜を穿孔し DNA を流入させる electroporation^{89) - 91)}、機械的ダメージによる方法⁹²⁾ などがある。また両者の中間的な方法ともいえるのが人工的な vesicle を作製し、これに DNA を封入してこれと細胞の融合により DNA の導入を図るリポソーム法^{93), 94), 109)}、そしてプラスミド DNA を持つ大腸菌をプロトプラストとしてこれと細胞の融合により DNA を導入する protoplast-fusion^{95), 96)} 法であろう。このようにさまざまな方法が考案、改良されており、これを細胞の種類や目的、そして実験者の技術レベル等に応じて使い分けて行かねばならない。今後ともこれらの方法の改良が重ねられていくものと思われるがここではまず、transient expression と stable transformant の違いについて述べた後、各遺伝子導入法の概略と特徴等について述べていきたい。

2・1・1 一時的発現 (transient expression) と安定的形質転換株 (stable transformant)

ここでは本題に入る前に細胞へ導入された DNA のたどる変化について簡単に述べたい。まずさまざまな

[†] Introduction to the Experiments of Genetic Engineering. XIII. Vector-systems and gene transfer techniques for mammalian cells (2). Katsuhiko NISHIMORI and Michio OISHI: Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113.

^{††} 現所属：東北大学農学部農芸化学科 980 仙台市提通雨宮町1-1。

方法で細胞内へ DNA が導入される場合の一時的な効率、高いもので全細胞の10-50%にも及ぶとされる。細胞内へ導入された DNA の一部は核へ移行し、染色体に組み込まれないまま転写、翻訳により形質発現する。このような一時的な形質発現を transient expression と呼び、遺伝子 DNA の5'側上流等に存在することの多いエンハンサーに対する細胞側の制御などは、大部分がこの状態でもほぼ共通に働くものと考えられている。事実エンハンサー、プロモータをめぐる研究の多くは遺伝子導入後1-2日以内に発現をみるこの transient expression の系を利用して行われている。このような状態の DNA は、ウイルス由来の複製開始点を持つものなどを除けば宿主細胞の染色体が複製し、細胞が分裂する間に希釈、分解されてしまう。しかしこうした DNA のごく一部は宿主染色体中に組み込まれ、染色体とともに複製されていくようになる。このような状態に至った細胞を stable transformant と呼ぶ。Stable transformant の利点は導入された DNA の状態がより本来の姿に近いと考えられることであるが、一方導入株の取得に時間のかかること、また導入遺伝子の染色体 DNA への挿入位置が random で⁹⁷⁾、しかも挿入位置近傍の影響を受けるため導入遺伝子の活性が促進されたり、抑制されたりすることがある点などの問題点もある。こうした点についてもより大きな領域ごと染色体中へ導入する⁹⁸⁾、あるいは本来の遺伝子等との相長的組換えにより染色体中の特定の位置へ遺伝子を導入する⁹⁹⁾、等の方法が考案、改良されつつある。

2.1.2 リン酸カルシウム法

van der Eb らが初めて報告した⁸²⁾このリン酸カルシウム法は特別な器具等を必要とせず、他の方法に比べても比較的簡単な方法であることから、動物細胞へ DNA を導入する基本的な方法となっている。そして現在に至るまで多くの改良が加えられており、細胞の透過性を上げ DNA の取込み効率を上げるために glycerol shock¹²³⁾や DMSO shock¹⁰⁰⁾を行ったり、ryosome の働きを一時的に抑えるクロロキシン¹⁰¹⁾により細胞を処理するなどの工夫がされている。また Okayama らはバッファ系の改良と DNA の細胞への取込みのさいの環境の変更などを行うことにより、stable transformant を得る率が著しく上昇すると報告した。彼らの報告によれば、DEAE-dextran 法など遺伝子の transient expression を目的とした方法により細胞へ DNA を導入すると、全細胞のうち最高50%程度にまで DNA が導入されていると考えられるにもかかわらず、その後染

色体へ DNA が組み込まれ stable transformant の得られる効率は全細胞の0.001-1%にしか過ぎないが、この改良したリン酸カルシウム法を用いれば、多数の上皮性および繊維芽由来の培養細胞で10-50%もの効率で stable transformant を取得することができるという¹⁴⁾。彼らの方法の特徴は、① DNA の高度な精製、②従来の HEPES バッファの替わりに BES バッファ系を用い、pH 条件を細かな沈殿がゆっくり生成する最適の条件に合わせる、③リン酸カルシウム-DNA 複合体の取込みは35℃、3% CO₂ 濃度で行う、④ベクター中の neo^r 遺伝子上流に残存していたバクテリア由来のプロモータ配列と不要な ATG コドンを削除する、といった従来のリン酸カルシウム法の改良点にある。

2.1.3 ポリカチオンを用いる方法

リン酸カルシウム法による DNA 導入が行えない浮遊系の細胞などに対し、古くから行われていた DEAE dextran 法⁸⁴⁾、そして他に polybrene⁸⁵⁾、poly-L-ornithine⁸⁶⁾を使う方法などが報告されている。いずれもポリカチオンであるこれらの合成高分子により、負に帯電した細胞とポリアニオンである DNA の仲だちをして細胞内への DNA の導入を図ろうというものである。ポリカチオンによる DNA の胞内への導入効率は glycerol、DMSO、PEG などで細胞を処理することでさらに上昇させることができる。ただし、これらの方法では stable transformant の得られる効率は必ずしも高くはないと報告されている。

2.1.4 マイクロインジェクション法

動物細胞への DNA 導入法としては最も直接的な機械的導入法である。この方法は一般的には接着系の細胞に対し有効であるが、poly-lysine などを利用して細胞をシャーレの底面に接着させたり、機械的に細胞を微小管で吸引固定するなどの方法により浮遊系細胞にも適用でき、導入効率も非常に良い。また細胞内へ注入する DNA の量を調節できるなどの利点も多い。さらに簡単な方法としては、DNA を含む溶液中で微小管により細胞に穴をあけることにより DNA の導入を図るブリッキング法と呼ばれる方法もある。一方、注入のための装置が高価であり、機械の操作にも熟練を要すること、扱える細胞の数に限度があることなどの難点もある。ただし、こうした問題も装置の改良、自動化等により改善されつつあり、とくに受精卵への遺伝子導入による transgenic 動物の作製にはこのマイクロインジェクション法が良く使われている。

またブリッキング法と似た方法として、レーザー光により細胞膜に微小な穴をあけることで DNA の導入

を図る方法も開発されている¹⁰²⁾が一般的にはなっていない。

2・1・5 電気穿孔法 (Electroporation 法)

DNA を含む溶液中に細胞を懸濁し高電圧パルスを与えることにより, DNA, 蛋白等の生体高分子を細胞内に導入することが可能である。これは電圧パルスにより細胞膜に一時的に微小な穴が穿孔されるためである。Kinoshita, Jr. らは赤血球の膜に電気穿孔する条件の検討を行ったが, その後 Zimmerman らはこの電圧パルスによる穿孔条件を交流電圧付加によって生ずる細胞の dielectrophoresis 現象と組み合わせ, 新しい細胞の電気融合法として発表した⁹⁹⁾。その後高分子物質の導入のための電気穿孔法の条件検討が進み, Potter らはヒトやマウスのリンパ系細胞へ pSV 7-neo-gpt プラスミドの導入を¹⁰³⁾, また Toneguzzo らもヒトやマウスのリンパ系細胞に pSV 2 cat プラスミドの導入を試み, 浮遊系細胞への有効性を実証した¹²⁴⁾。また Chu らは HeLa, CV-1, NIH-3 T 3, XP 12 RO, 1 MR-90, VA 13 など多種の細胞への DNA 導入条件を広く検討し報告している¹⁰⁴⁾。彼らは stable な transformant も 0.5% の効率で取得できたという。電気パルスの印加装置 (図16) としてはコンデンサの放電による減衰波パルスを用いる形式と, より高価な専門的器械を必要とするが, 適切なパルス印加条件が可能となる矩形波パルス方式に大別される。前者の装置は手作りも可能であるが, 後者は高価である難点がある。いずれにしろこの電気穿孔法の利点はリン酸カルシウム法が効果の

ない細胞に対しても他の機械的, 物理的方法と同様に応用が可能であり, また細胞を処理するチャンバの工夫により, 多量の細胞に DNA をほとんど同時に導入することも可能なことなどで, 現在多種の機器が開発, 市販されるに至っている。実際の導入については目的とする細胞と使用する機器ごとに細かな条件設定が必要であるが, これらについては前述の英文文献^{99), 103), 104), 105)}, および邦文文献^{106)–108)}を参照されたい。

2・1・6 プロトプラストフュージョン法

大腸菌中のプラスミド DNA を精製することなく細胞と菌体の融合により細胞中へ導入しようというもので, 初め Schaffner⁹⁵⁾らにより報告され, その後 Sandri-Goldin らにより条件の改良が行われた⁹⁶⁾。リン酸カルシウム法の適用できない培養細胞, とくにリンパ系の細胞や植物細胞への遺伝子導入法として効果を挙げた。方法を概略するとつぎのようになる。目的の遺伝子を含むプラスミドを持つ大腸菌を培養し, クロラムフェニコール添加により copy 数の増幅をした後, 高張液中でリゾチーム, EDTA による処理を行いプロトプラストとする。これと浮遊細胞を $\sim 10^4$ protoplasts/cell の割合で混ぜ (接着性の細胞はトリプシン等ではがしてから使用する), 遠心後上清を除いた後 50% 程度の PEG-1000 溶液をかけ, 短時間処理して融合を開始させた後 PEG 溶液を取り除く。そして gentamicin 等の抗性物質を含む培養液中で 1–2 日 expression time をとった後, 選択培地にてクローンの取得を待つこととなる。Sandri-Goldin らは LTK⁺ 細胞の場合で 1–2 %

図 16 電気穿孔法による細胞へのDNAの導入

典型的な電気穿孔法による DNA の細胞への導入装置を示した。チャンバはプラスチックのディスプレイ用キューベット, 電極はステンレス製等が使い良い。パルス発生器より発生したパルスはオシロスコープによりその波形や持続時間などの条件を検討できる。

の細胞にDNAの取込みが見られ、また、0.2%程度の割合で stable transformant を取得できたとしている⁹⁶⁾。筆者の経験ではリン酸カルシウム法の適用が難しい MEL 細胞やリンパ系細胞へも DNA 導入が可能であるなど効果的な方法と思われるが、一方、操作に時間と熟練を要し、また多数の試料を同時に処理することが難しいこと、大腸菌中での ori を持たない DNA の導入が不可能なこと、大腸菌の strain や細胞の種類により微妙に条件を変える必要があるなどの難点をも持つものと思われる。Seed らは cos cell と protoplast fusion 法を活用して効果的な遺伝子のクローニング物を報告しており¹⁷⁾、場合によっては非常に有効な方法と思われるが、一方、その適用ケースの一部は今後電気穿孔法により代替されていくものと考えられる。

2.1.7 その他の方法

リポゾーム法^{93), 94), 109)}はDNAのみならず生体高分子を細胞中に導入する方法として注目された方法である。しかし、初期のリポゾーム法はリポゾーム調製の難しさ等に比し期待したほどの効果を与えることはできなかった。その後、精製したフォスファチジルセリンを用いる方法⁹⁴⁾や、合成リビドを用いる方法¹⁰⁹⁾などの改良により、細胞によってはリン酸カルシウムや DEAE-dextran 法の 5 - 100 倍以上もの効率で DNA を導入することも可能になったと報告されている。リポゾーム法の利点は細胞や目的によりリポゾームの大きさや、vesicle 中に入る DNA の量等を自由に変えることができ、またリポゾーム中には DNA に限らず RNA 蛋白質、ウイルス粒子など広範囲の生体高分子を封入することができることなどである。より品質の良いリポゾーム生成用のリビドが利用可能になれば有力な DNA の細胞への導入手段となり得ると思われる。またリポゾームの代わりに赤血球ゴーストを用いる方法もある。

この他にも、細胞をシャーレより機械的にはぎとったり、細胞に超音波処理をすることで DNA の導入が図れる⁹²⁾との報告などもあるが、いずれも一般化するには至っていない。

2.2 動物細胞への遺伝子導入における優性選択マーカー

各種のベクターを用いて動物培養細胞に遺伝子を導入する場合、大腸菌への plasmid 導入と同様な薬物耐性の選択マーカー遺伝子をとともに導入すると、遺伝子導入株の取得は容易となる。マーカー遺伝子を目的遺伝子と連結して導入する方法では、薬剤により選択さ

れた株中に目的遺伝子が導入されている確率が高いが、一方目的遺伝子がマーカー遺伝子を制御しているエンハンサー/プロモータの影響を受けることが考えられるので、とくに目的遺伝子の細胞内での制御を観察したい時には、cotransfection 法¹¹⁰⁾が適している。

選択には、旧来より行われてきた核酸合成系酵素欠損株を宿主とし、これを相補する遺伝子をマーカーとする方法、すなわち、TK⁻株に対し HSV の tk 遺伝子¹¹¹⁾を使う等の方法と、最近良く利用されるようになった *Eco-gpt*^{112), 113)}、G418耐性^{114), 115)}、hygromycin 耐性⁴³⁾等の優性選択マーカーを利用する方法に分かれる。

2.2.1 tk 遺伝子

TK(thymidine kinase)欠損株は核酸の *de novo* 合成の阻害剤であるアミノプテリン存在下では生育できないが、HSV tk 遺伝子¹¹¹⁾を導入すれば hypoxanthine, thymidine 存在下で生育できるので、TK⁻変異株を宿主に、HSV tk 遺伝子を選択マーカーとして使用し得る。しかし、TK⁻変異を持つ培養細胞の種類は少なく、とくに初代細胞などへの応用ができないなど汎用性に欠け、動物細胞における優性選択マーカーの系の確立が期待されることとなった。

2.2.2 *Eco-gpt*

Eco-gpt は大腸菌よりクローニングされたキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPR) 遺伝子のことである。Mulligan and Berg らは SV 40 由来の発現ベクターにこの *Eco-gpt* をつないだ pSV 2 gpt (図17) を動物細胞内に導入すると、IMP → XMP 変換の阻害剤であるミコフェノール酸存在下でも生育できるようになることを報告した^{112), 113)}。

2.2.3 G418(neo)耐性遺伝子

バクテリアのトランスポゾン 5 (*Tn5*) 中にコードされているアミノグリコシドフォスフォトランスフェラーゼ (*neo* 遺伝子) は、大腸菌等ではカナマイシン、ネオマイシン耐性を現わす。Colbere-Garapin らはこの *neo* (G 418^r) 遺伝子を HSV tk 遺伝子プロモータ下流につなぎ pAG シリーズベクターを¹¹⁴⁾、また Southern and Berg らはこれを SV 40 由来の発現ベクター pSV 2 につなぎ pSV 2 neo (図17) ベクター¹¹⁵⁾を作製し、それぞれ動物細胞に導入した。そしてこれらの薬剤耐性遺伝子は、動物細胞中でも発現し、動物細胞の蛋白質合成阻害作用のあるカナマイシン類縁抗生物質である G 418 に対する耐性を示すことが確認された。この *neo^r* (G 418^r) 遺伝子は使い易い動物細胞用の優性選択マーカーとしてマウス、サル、ヒト等の多くの培養細胞への遺伝子導入の示標として応用されている。使用濃度

図 17 *gpt*および*neo*の優性選択マーカー遺伝子を持つベクター^{112),115)}
 ■, pBR 322 由来; ▨, 選択マーカー遺伝子(*gpt*または*neo*); ▤, SV 40 由来の配列。矢印はマーカー遺伝子の転写の向きを示す

が細胞により 200 μ g - 1 mg/ml とやや高濃度で使う必要がある点と, 日本国内での購入価が割高である問題点はあるが, 使用し易い選択マーカー遺伝子である。

2・2・4 Hygromycin 耐性遺伝子

アミノグリコシド系の抗生物質である hygromycin B は, とくに B-リンパ系の細胞には G 418 に比べ 10 倍ほど毒性が強い。Sugden らはこの点に注目し, 従来かなりの高濃度でないと毒性を示すことのできなかった G 418 の代わりに hygromycin B/*hph* 遺伝子の組合せによる新しい優性選択マーカーの系を報告した⁴³⁾。*hph* は *neo*^r と同様バクテリアに由来する hygromycin B phosphotransferase をコードする遺伝子であるが, 彼らはこれを HSV の *tk* 遺伝子プロモータに接続し, EBV 由来の染色体外プラスミドベクターのマーカー遺伝子として B-リンパ系の細胞への遺伝子導入に応用した。

2・2・5 *dhfr* 遺伝子

核酸の *de novo* 合成の重要な酵素であるジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)は葉酸アナログのメソトレキシエート(methotrexate: MTX)により強い阻害を受ける。しかし, 細胞を弱い MTX 濃度中で生育させ, 徐々にその濃度を上昇させると *dhfr* 遺伝子の増幅により MTX 耐性の細胞が得られることが知られていた¹¹⁶⁾。Subramani らはこのマウス DHFR cDNA を SV 40 由来の発現ベクターに連結し CHO *DHFR*⁻ 細胞に導入すると *dhfr*⁻ を complement するため, glycine, hypoxanthine, thymidine を欠いた選択培地で生育することを¹¹⁷⁾, そして Casser らは外部より細胞へ導入されたマウス DHFR cDNA も MTX により増幅させることのできることを見出した¹¹⁸⁾。さらに Simonsen らは MTX に対する親和性の著しく低下した変異 DHFR cDNA を用いることにより, *DHFR*-変異のない CHO

細胞やマウス L 細胞でもこの DHER cDNA による MTX 耐性という形質で優性選択マーカーとして利用できることを見出した¹¹⁹⁾。この変異 *dhfr* 遺伝子でも MTX 濃度の段階的上昇により増幅するので, この *dhfr* 遺伝子に他の目的遺伝子を連結し細胞に導入, 遺伝子増幅をかけることにより目的遺伝子も同時に増幅することが可能である。

この *dhfr*/MTX による選択, 遺伝子増幅の系により SV 40 t 抗原¹²⁰⁾, インターフェロン¹²¹⁾, B 型肝炎表面抗原¹²²⁾などの増産が報告されている。

文 献

- 1) Mulligan, R.C., Howard, B.H. and Berg, P.: *Nature*, **277**, 108-114 (1979)
- 2) Hamer, D.H. and Leder, P.: *ibid.*, **281**, 35-40 (1979)
- 3) Moriarty, A.M., Hoyer, B.H., Shih, J.W.-K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2606-2610 (1981)
- 4) Pavlakis, G.N., Hizuka, N., Gorden, P. et al.: *ibid.*, **78**, 7398-7402 (1981)
- 5) Gruss, P. and Khoury, G.: *ibid.*, **78**, 133-137 (1981)
- 6) Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. and Maniatis, T.: *Cell*, **27**, 279-288 (1981)
- 7) Gluzman, Y., *ibid.*, **23**, 175-182 (1981)
- 8) Gething, M.-J. and Sambrook, J.: *Nature*, **293**, 620-625 (1981)
- 9) Gray, P.W., and Goeddel, D.V.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5842-5846 (1983)
- 10) Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T et al.: *Nature*, **302**, 305-310 (1983)

- 11) Rio, D.C., Clark, S.G. and Tjian, R.: *Science*, **227**, 23-28 (1985)
- 12) Gerard, R.D. and Gluzman, Y.: *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3231-3240 (1985)
- 13) Okayama, H. and Berg, P.: *ibid.*, **2**, 161-170 (1982)
- 14) Chen, C. and Okayama, H.: *ibid.*, **7**, 2745-2752 (1987)
- 15) Yokota, T., Lee, F., Rennick, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1070-1074 (1984)
- 16) Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T. et al.: *ibid.*, **83**, 2061-2065 (1986)
- 17) Seed, B. and Aruffo, A.: *ibid.*, **84**, 3365-3369 (1987)
- 18) Seed, B. and Aruffo, A.: *EMBO J.*, **6**, 3313-3316 (1987)
- 19) Aruffo, A. and Seed, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8573-8577 (1987)
- 20) Lowy, D.R., Dvoretzky, I., Shober, R. et al.: *Nature*, **287**, 72-74 (1980)
- 21) Law, M.-F., Lowy, D.R., Dvoretzky, I. and Howley, P.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2727-2731 (1981)
- 22) Sarver, N., Gruss, P., Law, M.-F. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 486-496 (1981)
- 23) Karin, M., Cathala, G. and Nguyen-Huu, M. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4040-4044 (1983)
- 24) Pavlakis, G.N. and Hamer, D.H.: *ibid.*, **80**, 397-401 (1983)
- 25) Zinn, K., Mellon, P., Ptashne, M. and Maniatis, T.: *ibid.*, **79**, 4897-4901 (1982)
- 26) Fukunaga, R., Sokawa, Y. and Nagata, S.: *ibid.*, **81**, 5086-5090 (1984)
- 27) Meneguzzi, G., Binetruy, B., Grisoni, M. and Cuzin, F.: *EMBO J.*, **3**, 365-371 (1984)
- 28) Matthias, P.D., Bernard, H.U., Scott, A. et al.: *ibid.*, **9**, 1487-1483 (1983)
- 29) Lusky, M. and Botchan, M.R.: *Cell*, **36**, 391-401 (1984)
- 30) Berg, L.J., Singh, K. and Botchan, M.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 859-869 (1986)
- 31) Lacey, M., Alpert, S. and Hanahan, D.: *Nature*, **322**, 609-612 (1986)
- 32) Elbrecht, T., DeMayo, F.J., Tsai, M.-J. and O'malley, B.W.: *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1276-1279 (1987)
- 33) Kusano, T., Uehara, H., Saito, H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 1789-1793 (1987)
- 34) Saito, H., Uehara, H., Kusano, T. and Oishi, M.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 8815-8829 (1987)
- 35) Nishimori, K., Fujiwara, J., Kouda, T. and Oishi, M.: *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2097-2104 (1988)
- 36) Nishimori, K., Kouda, T., Segawa, K. and Oishi, M.: in submitted.
- 37) 相沢慎一, 他: 投稿準備中
- 38) Milanesi, G., Barbanti-Brodano, G., Negrini, M. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1551-1560 (1984)
- 39) Yates, J.L., Warren, N., Reisman, D. and Sugden, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3806-3810 (1984)
- 40) Reisman, D.R., Yates, J. and Sugden, B.: *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 1822-1832 (1985)
- 41) Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B.: *Nature*, **313**, 812-815 (1985)
- 42) Margolskee, R., Kavathas, P. and Berg, P.: *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 2837-2847 (1988)
- 43) Sugden, B., Marsh, K. and Yates, J.: *ibid.*, **5**, 410-413 (1985)
- 44) Okayama, H. and Berg, P.: *ibid.*, **3**, 280-289 (1983)
- 45) Mann, R., Mulligan, R. and Baltimore, D.: *Cell*, **33**, 153-159 (1983)
- 46) Miller, A.D., Law, M.-F. and Verma, I.M.: *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 431-437 (1985)
- 47) Tabin, C.J., Hoffmann, J.W., Shin, C.-H. et al.: "The utilization of a retrovirus as a eukaryotic vector for transmitting cloned DNA sequences.: in Eukaryotic Viral Vector" (ed. Gluzman, Y.), pp. 123-126, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)
- 48) Shimotoono, K. and Temin, H.M.: *Cell*, **26**, 67-77 (1981)
- 49) Wei, C.-M., Gibson, M., Spear, P.G. and Scolnic, E.M.: *J. Virol.*, **39**, 935-944 (1981)
- 50) Cepko, C.L., Roberts, B.E. and Mulligan, R.C.: *Cell*, **37**, 1053-1062 (1984)

- 51) Cone, R.D. and Mulligan, R.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6349-6353 (1984)
- 52) Miller, A.D., Trauber, D.R. and Buttimore, C.: *Somat. Cell Molec. Genet.*, **12**, 175-183 (1986)
- 53) Miller, A.D. and Buttimore, C.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2895-2902 (1986)
- 54) Markowitz, D., Goff, S.: and Bank, A.: *J. Virol.*, **62**, 1120-1124 (1988)
- 55) Keller, G., Paige, C., Gilboa, E. and Wanger, E.F.: *Nature*, **318**, 149-154 (1985)
- 56) Hock, R.A. and Miller, A.D.: *ibid.*, **320**, 275-277 (1986)
- 57) Magli, M. C., Dick, J.E., Huszar, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 789-793 (1987)
- 58) Ledly, F.D., Darlington, G.J., Tahn, T. and Woo, S.L.C.: *ibid.*, **84**, 5335-5339 (1987)
- 59) Wilson, J.M., Jefferson, D.M., Chowhury, J. R. et al.: *ibid.*, **85**, 3014-3018 (1988)
- 60) der Putten, H., Botteri, F.M., Miller, A.D. et al.: *ibid.*, **82**, 6148-6152 (1985)
- 61) Stewart, C.L., Schuetze, S., Vanek, M. and Wagner, E.F.: *EMBO J.*, **6**, 383-388 (1987)
- 62) Cone, R.D., Weber-Benarous, A., Baorto, D. and Mulligan, R.C.: *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 887-897 (1987)
- 63) Spaete, R.R. and Frenkel, N.: *Cell*, **30**, 295-304 (1982)
- 64) Palella, T.D., Slvean, L.J., Schroll, C.T. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 457-460 (1988)
- 65) Green, M.R., Treisman, R. and Maniatis, T.: *Cell*, **35**, 137-148 (1983)
- 66) Gayner, R.B., Hillman, D. and Berk, A.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1193-1197 (1984)
- 67) Powell, J., Berkner, K., Lebo, R. and Adamson, J.: *ibid.*, **83**, 6465-6469 (1986)
- 68) Davis, A.R., Kostek, B., Mason, B.B. et al.: *ibid.*, **82**, 7560-7564 (1985)
- 69) Davidson, D. and Hassel, J.A.: *J. Virol.*, **61**, 1226-1239 (1987)
- 70) Berkner, K., Schaffhausen, B. S., Roberts, T.M. and Sharp, P.A.: *ibid.*, **61**, 1213-1220 (1987)
- 71) Yamada, M., Lewis, J.A. and Grodzicker, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3567-3571 (1985)
- 72) Mansour, S.L., Grodzicker, T. and Tjian, R.: *ibid.*, **82**, 1359-1363 (1985)
- 73) Logan, J. and Shenk, T.: *ibid.*, **81**, 3566-3659 (1984)
- 74) Massie, B., Gluzman, Y. and Hassel, J.A.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2872-2883 (1986)
- 75) Karlsson, S., Van Doren, K., Schweiger, S. G. et al.: *EMBO J.*, **5**, 2377-2385 (1986)
- 76) Smith, G.E., Frasher, M.J. and Summers, M.D.: *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2156-2165 (1983)
- 77) Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M. et al.: *Nature*, **315**, 592-594 (1985)
- 78) Jeang, K., Giam, C., Nerenberg, M. and Khoury, G.: *J. Virol.*, **61**, 708-713 (1987)
- 79) Mackett, M., Smith, G.L. and Moss, B.: *ibid.*, **49**, 857-864 (1984)
- 80) Smith, G.L., Mackett, M. and Moss, B.: *Nature*, **302**, 490-495 (1983)
- 81) Smith, G.L., Murrphy, B.R. and Moss, B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7155-7159 (1983)
- 82) Graham, F.L. and van der Eb, A.J.: *Virology*, **52**, 456-467 (1973)
- 83) Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1373-1376 (1979)
- 84) McCutchan, J.H. and Pagano, J.S.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **41**, 351-357 (1968)
- 85) Kawai, S. and Nishizawa, K.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1172-1174 (1984)
- 86) Bond, V.C. and Wold, B.: *ibid.*, **7**, 2286-2293 (1987)
- 87) Diacumakos, E.G. (Ed. by Perscott, D.M.): "Methods in Cell Biology", Vol. 7, pp. 287-311, Academic Press, New York, N.Y. (1973)
- 88) Cappechi, M.R.: *Cell*, **22**, 479-488 (1980)
- 89) Zimmermann, U. and Scheurich, P.: *Planta*, **151**, 26-32 (1981)
- 90) Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. and Hofschneider, P.H.: *EMBO J.*, **1**, 841-845 (1982)
- 91) Tur-Kaspa, R., Teicher, L., Levine, B.J. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 716-718 (1986)

- 92) Fechheimer, M., Boylan, J.F., Parker, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 8463-8467 (1987)
- 93) Fraley, R., Subramani, S., Berg, P. and Papahadjopoulos, P.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 10431-10435 (1980)
- 94) Itani, T., Ariga, H., Yamaguchi, N. et al.: *Gene*, **56**, 267-276 (1987)
- 95) Schaffner, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2163-2167 (1980)
- 96) Sandri-Goldin, R.M., Goldin, A.L., Levine, M. and Glorio-so, J.C.: *Moll. Cell. Biol.*, **1**, 743-752 (1981)
- 97) Folger, K.R., Wong, E. A., Wahl, G. M. and Capecchi, M.R.: *ibid.*, **2**, 1372-1387 (1982)
- 98) Grosveld, F., van Assendelft, G.B., Greaves, D.R. and Kollias, G.: *Cell*, **51**, 975-985 (1987)
- 99) Thomas, K.R., Folger, K.R. and Capecchi, M.R.: *ibid.*, **44**, 419-428 (1986)
- 100) Sussman, D.J. and Milman, G.: *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1641-1643 (1984)
- 101) Luthman, H. and Magnusson, G.: *Nucl. Acids Res.*, **11**, 1295-1307 (1983)
- 102) Kurata, S., Tsukakoshi, M., Kasuya, T. and Ikawa, Y.: *Exp. Cell Res.*, **162**, 372-378 (1986)
- 103) Potter, H., Weir, L. and Leder, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7161-7165 (1984)
- 104) Chu, G., Hayakawa, H. and Berg, P.: *Nucl. Acids Res.*, **15**, 1311-1326 (1987)
- 105) Andreason, G.L. and Evans, G.A.: *BioTech.*, **6**, 650-660 (1988)
- 106) 葛西道夫, 稲葉浩子: 蛋白質・核酸・酵素, **31**, 1591-1603 (1986)
- 107) 稲葉浩子, 葛西道夫, 佐藤弘毅: 同上, **32**, 10-21 (1987)
- 108) 高山慎一郎, 米田悦啓, 金田安史, 内田 驍: 細胞工学, **6**, 771-780 (1987)
- 109) Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413-7417 (1987)
- 110) Wigler, M., Sweet, R., Sim, G.K. et al.: *Cell*, **16**, 777-785 (1979)
- 111) Colbere-Garapin, F., Chousterman, S., Horodniceanu, F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3755-3759 (1979)
- 112) Mulligan, R.C. and Berg, P.: *Science*, **209**, 1422-1427 (1980)
- 113) Mulligan, R.C. and Berg, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2072-2076 (1981)
- 114) Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P. and Garapin, A.-C.: *J. Mol. Biol.*, **150**, 1-14 (1981)
- 115) Southern, P.J. and Berg, P.: *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 327-341 (1982)
- 116) Schimke, R.T. (Schimke, R.T. ed.): Summary. in "Gene Amplification," pp. 317-333, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982)
- 117) Subramani, S., Mulligan, R. and Berg, P.: *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 854-864 (1981)
- 118) Casser, C.S., Simonsen, C.C., Schilling, J.W. and Schimke, R.T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6522-6526 (1982)
- 119) Simonsen, C.C. and Levinson, A.D.: *ibid.*, **80**, 2495-2499 (1983)
- 120) Kaufman, R.J. and Sharp, P.A.: *J. Mol. Biol.*, **159**, 601-621 (1982)
- 121) McCormick, F., Trahey, M., Innis, M., Dieckmann, B. and Ringold, G.: *Cell. Biol.*, **4**, 166-172 (1984)
- 122) Michel, M.-L., Sobczak, E., Malpiece, Y. et al.: *Bio/Technology*, **3**, 561-566 (1985)
- 123) Frost, E. and Williams, J.: *Virology*, **91**, 39-50 (1978)
- 124) Toneguzzo, F., Hayday, A.C. and Keating, A.: *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 703-706 (1986)