

〔原 著〕

## 酵母を用いたラットにおける癌抑制遺伝子p53の 機能的変異検出法の確立

中田 大地\*\*\*

\*北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座

\*\*北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門

\*(主任：有末 眞教授)

\*\*\*(主任：守内 哲也教授)

## Establishment of yeast functional assay for rat p53

Daichi NAKATA

\*Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido

\*\*Division of Cell Biology, Cancer Institute, Hokkaido University School of Medicine

\*(Chief : Prof. Makoto ARISUE)

\*\*\*(Chief : Prof. Tetsuya MORIUCHI)

### Abstract

Research in carcinogenesis and cancer treatment, commonly uses rats and their usefulness is well known. Alteration of the p53 tumor suppressor gene is the most common genetic defect known to occur in human tumors and it seems to play an important role in carcinogenesis. Recently, a new biological assay for human p53 using a yeast has been developed. This yeast functional assay is a simple and more sensitive method than previous methods. This study applied this yeast assay to the analysis of the rat p53 gene and estimated its usefulness. The yeast functional assay for rats could be established by a modification of the assay for humans. Thus, cotransformation of a rat p53 PCR products and pLSRP53 plasmid cut with Pst I and Stu I results in repair of the plasmid with the PCR products in vivo and constitutive expression of the full length rat p53 protein in yeast. After cultivation, yeast inserted with wild-type rat p53 forward white colonies and those inserted with mutant type rat p53 forward red colonies effectively. The ratio (white / red colonies) corresponded well with the mutant ratio of rat p53 gene (wild / mutant type). The sequence of p53 cDNA obtained from red colonies detects all clonal mutations. This incidence of mutation found out in rat p53 was higher than that of

---

第56回日本癌学会 (平成9年9月25日～9月27日), 第52回日本口腔科学会 (平成10年4月16日～4月17日)  
受付：平成11年3月30日

previous reports. These results indicate that the yeast functional assay can be applied to for the analysis of rat p53 and that this assay is highly sensitive and specific enough to estimate the genotype of rat p53.

**Key words :** Rat p53, Tumor suppressor gene, Yeast, Homologous recombination.

## 緒 言

“癌”という病は最近の分子生物学的研究技術の発展により遺伝子レベルでの解析が急速に進み、その発生や悪性化進展には複数の癌関連遺伝子の変異や発現の異常が関与することが明らかにされつつある。現在までに同定された癌関連遺伝子のうち、癌抑制遺伝子p53は口腔癌を始めとする様々な癌で最も高頻度に変異が認められており<sup>(1-3)</sup>、その変異は発癌、癌の悪性化進展および臨床的予後と深い関連のあることが報告されている<sup>(4-7)</sup>。このp53は、細胞のDNAに損傷を受けた際に発現が誘導され、p21などの標的遺伝子の転写調節領域に結合する。そして、その標的遺伝子の発現を促進させ、細胞周期を止めDNAの修復をおこさせたり、アポトーシスを誘導することなどにより細胞の癌化を抑制する<sup>(8-10)</sup>いわば「ゲノムの番人」的役割を果たしていることが知られている<sup>(11)</sup>。癌研究でよく用いられるラットでも同様なメカニズムが認められるが、その変異頻度はヒトの癌に比べ概して低いことが知られている。その原因として、種の違いによるp53の癌抑制効果の差異も考えられるが、遺伝子の解析精度が不十分なことも大きく影響していると推察されている。これまで、p53の解析方法としてSingle-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) や免疫組織学的な手法が用いられているが、これらの方法では、1) 手技が煩雑で熟練を要すること、2) 変異p53の定量的解析が不可能であること、3) 非特異的な反応により偽陽性・偽陰性が出現しやすいことなどの欠点があり<sup>(15)</sup>、動物実験の解

析系としては不十分な面も認められた。

一方、最近開発された酵母を用いたヒトp53の機能的診断法 (Yeast Functional Assay, 以下酵母アッセイ) は、細胞または組織から Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) により増幅した p53 cDNA を酵母内で遺伝子相同組み換えによりベクターに組み込み発現させ、その変異の有無をレポーター用酵母のコロニーの色 (野生型: 白色, 変異型: 赤色) の変化で判定する方法で、従来の方法の欠点を補うことが示されている<sup>(18)</sup>。

本研究ではこの酵母アッセイを実験動物に応用可能とするために、自然発癌あるいは各種化学発癌の実験系など広く癌研究にもちいられているラットにおける酵母アッセイシステムの作製を試みた。また、その特異性・感度および定量性の評価をおこなった。さらに、本法を用いて各種ラット細胞株のp53遺伝子型をならびにその変異の同定をおこない、その有用性および意義をも検討した。

## 材料および方法

### 1. 動物および組織

10週齢、雌、WKAHラットを用い(北海道大学医学部附属動物実験施設より供与)、ジエチルエーテル麻醉下にて脳、舌、心、肺、胃、肝、脾、腎、筋の各組織を摘出し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

### 2. 培養細胞株および培養条件

ラット培養細胞株は北海道大学医学部癌研究施設病理部門および同細胞制御部門で継代維持

されている22種類を56°C/30分間不活化処理した10%または30% fetal bovine serum (FBS)を含むRPMI 1640培地(ニッスイ, 東京),あるいは56°C/30分間不活化処理した7% calf bovine serum (CBS)を含むDMEM培地(ニッスイ)で37°C/5% CO<sub>2</sub>条件下で培養維持した。

### 3. RNAの抽出

培養細胞は1x10<sup>6</sup>個あたり1mlのTrizol Reagent (Gibco-BRL, 東京)で溶解し,ラット組織は100mgあたり2mlのTrizol Reagentと共にホモジナイザー(井内盛栄堂, 大阪)で破碎した。その後,酸・グアニジウムチオシアネート/フェノール/クロロホルム抽出法(AGPC法)で全RNAを抽出した。

### 4. ラットp53発現ベクター-pLSRP53の作製

#### 1) ヒトp53発現ベクターの制限酵素処理

酵母内ヒト野生型p53蛋白発現ベクターpLS72 (Swiss Institute for Experimental Cancer Research, R. D. Iggo博士より供与)を制限酵素*Hind*IIIと*Eag*Iで完全消化し, Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)により断端を脱リン酸化し, 1%低融点アガロースで電気泳動した。約1.2kbのヒトp53 cDNA断片を分離した後, 約7.4kbのプラスミド断片をWizard PCR prep kit (Promega, Madison, WI)にてアガロースから回収した。

#### 2) RT-PCR法によるラットp53 cDNAの増幅

WKAHラット肝から抽出した全RNA 3 μgを65°C/10分間加熱処理後急冷し, 200単位の逆転写酵素 (M-MLV reverse transcriptase; Stratagene, LaJolla, CA), 同添付反応液, 7.5 mM Dithiothreitol (DTT), 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPおよび0.5μMラットp53特異的プライマーP1を加え, 37°C/60分間逆転写反応(RT)を行いラットp53 cDNAを得た。このp53 cDNAを鋳型とし, PCR法によりラットp53の全コーディング領域を含む約1.2kbのcDNAを

増幅した。使用したラットp53特異的プライマーはFC1, RC1でセンスプライマーには*Hind*III, アンチセンスプライマーには*Eag*Iの制限酵素認識部位を付加した(Table 1)。PCRはRT産物 2 μlにこれらプライマー0.5uMとPfu DNAポリメラーゼ1.25単位 (Stratagene), 同添付反応液, 0.75mM dNTPを加え, GeneAmp PCR System 2400-R (Perkin Elmer, 千葉)で行った。PCR反応条件は95°C/40秒, 60°C/20秒, 78°C/60秒を35サイクルとした。PCR産物は1%アガロースゲル内電気泳動を行い確認した後, *Hind*IIIと*Eag*Iで完全に消化し, 1%低融点アガロースゲルにて電気泳動後, Wizard PCR prepでアガロースゲルから回収し精製した。

#### 3) ラットp53発現ベクターのクローニング

7.4kbのpLS72断片をCIAP処理し, これとRT-PCR法で増幅したラットp53 cDNAの*Hind*III-*Eag*I断片をT4 DNAリガーゼ (TA-KARA)を用いて連結した (Fig.2a)。この反応液を用いて大腸菌 (competent high: TOYOBO, 東京)をヒートショック法にて形質転換し, アンピシリン加L-brothプレート上で14時間選択培養した。生じた個々の大腸菌コロニーからプラスミドを回収してラットp53 cDNAが組み込まれているか否かを制限酵素 (*Pst*Iと*Stu*I)処理し, 電気泳動にて確認した。

### 5. ラット発現ベクター-pLSRP53による酵母の形質転換

#### 1) 酵母株および培地

p53レポーター用酵母には*ADE2*変異酵母株 yIG397<sup>(18)</sup> (遺伝子型: *MA Taade2-1, Leu2-3, 112 trp1-1 his3-11, 15 can1-100 ura3-1 URA3 3 xRGC::pCYC1::ADE2*) (北海道大学医学部多田光宏博士より供与)を使用した。通常, yIG397はYPDに十分量のアデニン (200μg/ml)を加えた培地YPDA++で培養した。

2) 酢酸リチウム法による酵母の形質転換  
yIG397を100mlのYPDA++で振盪培養し、50% (W/V) polyethyleneglycol 4000 (関東化学, 東京) を含む0.1M酢酸リチウム, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA溶液にて調整した。この酵母懸濁液300 $\mu$ lにp53発現プラスミドと50 $\mu$ gの超音波処理一本鎖サケ精子DNA (Stratagene) を加え, 30°C/30分保温したのち, 42°C/15分間のヒートショックを与え酵母に導入した。酵母は低アデニン (5 ug/ml) 加・ロイシン無添加選択プレート上で30°C/48時間培養し, コロニー数およびその色彩を調べた。

## 6. ラットp53の酵母アッセイ

### 1) RT-PCR

ラット正常組織ならびに各種細胞株より抽出した全RNAを鋳型とし, 前述した方法で逆転写反応を行いp53 cDNAを得た。次にこのp53 cDNAを鋳型とし, 0.5 $\mu$ Mのラットp53特異的プライマーFC2, RC2 (Table 1), Pfu DNAポリメラーゼ1.25単位 (Stratagene), 同添付反応液, 0.75mM dNTPを含むPCR反応液20 $\mu$ lを混合し, 引き続いてPCR反応: 95°C/40秒, 63°C/20秒, 78°C/60秒を35サイクル行なった。この際, PCR反応の特異性を高めるためホットスタート法を用いた。これにより約1.0kbのp53 cDNAを増幅した。

### 2) ギャップベクターの作製

pLSRP53を*Pst* I および*Stu* I で完全に消化

し, ラットp53 cDNAのコドン67からコドン344の領域を削除した線状プラスミド (ギャップベクター) を作製した。この線状プラスミドは1%低融点アガロースゲルにて電気泳動により分離し回収した後, Wizard PCR prepにて精製しCIAP処理した。これをフェノール・クロロホルム処理後, エタノール沈殿により精製した。このpLSRP53ギャップベクターは酵母アッセイ用に25ng/ $\mu$ lとなるように1xTE緩衝液に溶解した。

### 3) 酵母アッセイの原理および手技 (Fig. 2b)

培養細胞あるいは組織から増幅したp53 cDNAのPCR産物とギャップベクターを前述した酢酸リチウム法により酵母に導入すると, 酵母内では遺伝子相同組み換えによるギャップ修復が起こり, 被検p53 cDNAがプラスミドに組み込まれる。そして, ギャップ修復領域の上流にある*ADH1*プロモーターによりp53蛋白が酵母内で恒常的に発現し, ベクター上の*LEU2* 遺伝子が活性化され酵母はロイシン非要求性を獲得する。次いで, この形質転換を受けた酵母を低アデニン (5  $\mu$ g/ml) 加・ロイシン無添加選択プレート上で30°C/48時間培養し, 酵母内で野生型p53蛋白が発現すると, これが酵母染色体上に組み込んであるp53蛋白認識配列 (RGC配列) <sup>(21)</sup> に結合して下流の*ADE2* (phosphoribosyl aminoimidazole carboxylase) 遺伝子の転写を活性化し, 酵母自身がアデニンを産生して酵母コロニーは白色を呈する。一方, 変異型p53が発現するとp53蛋白認識配列に結合できない異常なp53蛋白が合成され, 下流の*ADE2* 遺伝子が転写されず, アデニン合成の中間代謝産物 (phosphoribosyl aminoimidazole) が蓄積し酵母コロニーが赤色を呈する<sup>(22)</sup>。本原理を利用し, 1プレートにつき200個以上のコロニーを数え, 赤コロニーの割合を百分率で算定し, 以下p53の機能評価を行った。

Table 1 Oligonucleotide primers used for RT-PCR and Sequencing of p53

Name	Sequence	
P1	5'-AGCCCTAAAGTC-3'	Sence
FC1	5'-GGCAAGCTTCATGGAGGATTCACAGTCG-3'	Sence
RC1	5'-ATCGGCCGAGGATGCAGAGGCTGTCACT-3'	Anti-sence
FC2	5'-CAGCGACAGGGTCACCTAAT-3'	Sence
RC2	5'-TTTATGGCGGGACGTAGACT-3'	Anti-sence
S2	5'-TTTCCCTCAATAAGCTGTTCGCCAG-3'	Sence
S4	5'-GCCCATCCTTACCATCATCACGCTG-3'	Sence
R6F2	5'-CCCGGCCTCTGACTTATCT-3'	Sence
R6R2	5'-CTGGAGTCTTCCAGCATGAT-3'	Anti-sence

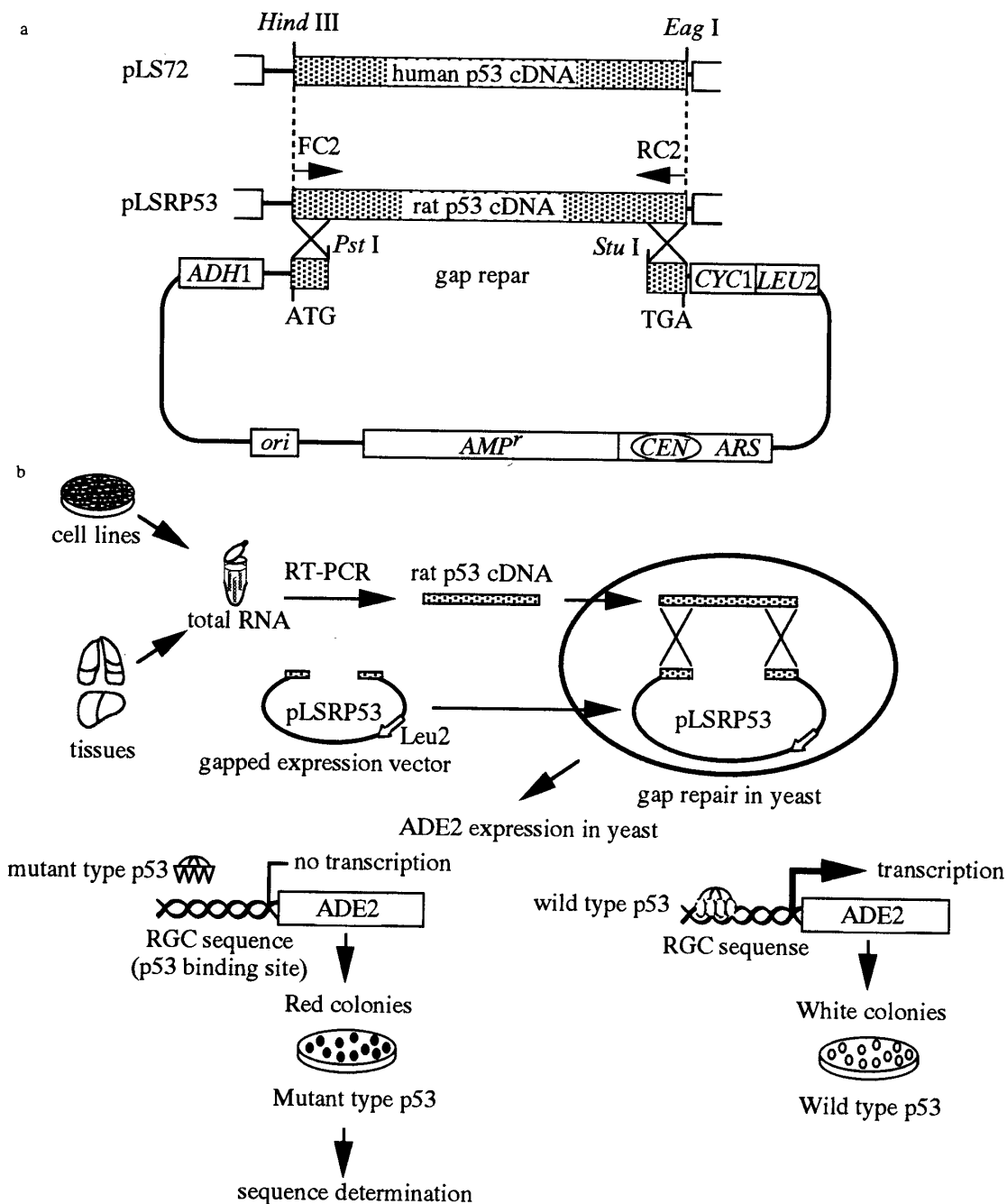


Fig.2 p53 expression vectors and outline of yeast functional assay. (a) pLS72 expresses full length p53 cDNA from the *ADH1* promoter. pLSRP53 is identical with pLS72 except human p53 cDNA. (b) When the yIG397 is transformed with a plasmid encoding wild type p53, the cells express *ADE2*, and form white colonies. Cells containing mutant p53 fail to express *ADE2*. They form red colonies. They form red colonies. Cells containing mutant p53 fail to express *ADE2*. They form red colonies. They form red colonies. Cells containing mutant p53 fail to express *ADE2*. They form red colonies.

### 7. 酵母コロニーからp53 cDNAの単離とその塩基配列の決定

プレート上に形成した酵母コロニーを1検体につき4個単離し、zymolyase 100T (生化学工業, 東京) および alkaline lysis 法 (QIAprep

plasmid kit : QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) によりプラスミドを抽出した。これを電気穿孔法 (The Electroporator II, Invitrogen, USA) により XL-1 blue 大腸菌に導入し、アンピシリン加 L-broth プレート上で14時間培養し

た。培養した大腸菌コロニーから再度 alkaline lysis法によりプラスミドを抽出した。プラスミド中のp53の塩基配列はDye Deoxy Terminator kit (Perkin-Elmer, 千葉)を用いてABI 373 Automated sequencer (Applied Biosystem, 千葉)で解析した。塩基配列決定反応にはプラスミド中のp53の全塩基配列を網羅するためFC1, S2, S4のプライマーを用いた (Table 1)。

#### 8. ラット酵母アッセイの定量性の解析

ラットの酵母アッセイにおける赤コロニーの比率がサンプル中の変異mRNAの比率を忠実に反映するかどうかを検証するため、種々の割合で野生型と変異型p53のPCR産物を混ぜ合わせ酵母アッセイを行った。これらp53のPCR産物を1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、100ng/ml臭化エチジウム溶液にて染色後、UVトランスイルミネーター (フナコシ, 東京) 上で写真撮影した。写真上のバンドの濃度をデンストメータで測定し、これをもとに野生型と変異型由来のPCR産物をそれぞれ100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50, 0:100の割合で混合した。これらのPCR産物を用いて3回ずつ酵母アッセイを行い、赤コロニーの平均値を算出した。

#### 9. ゲノムDNAの抽出とその塩基配列の決定

培養細胞 $1 \times 10^6$ 個からSepa Gene (Sanko Junyaku, 東京)を用いてゲノムDNAを抽出し、RNase ( $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (WAKO) 処理後、R6F2およびR6R2のプライマーにてゲノムDNAよりp53の第6エクソンを増幅した。また、塩基配列のプライマーはR6F2を用いて直接塩基配列決定法により決定した (Table 1)。

#### 10. 統計学的処理

Student's t testにより検定した。酵母アッセイの赤コロニーの比率とサンプル中の変異mRNAの比率の相関は回帰分析により評価した。

## 結 果

### 1. ラットp53発現ベクターpLSRP53の作成

WKAHラット肝から全RNAを抽出し、RT-PCR法でラットp53 cDNAの全コーディング領域 (約1.2kb) を増幅してcDNA断片を得た (Fig. 1)。一方、酵母内ヒトp53発現ベクターpLS72の野生型ヒトp53のcDNA部分をHind IIIとEag Iで完全消化して削除し、これにラットp53のcDNAをT4リガーゼにより組み込み、ライゲーション反応液で大腸菌を形質転換し、得られた37個のクローンよりプラスミドを回収した。これらをPst IとStu Iによる制限酵素処理を行い、ラットp53 cDNAが組み込まれているか否かを確認したところ、12クローンより得られたプラスミドでラットp53断片が確認された (data not shown)。

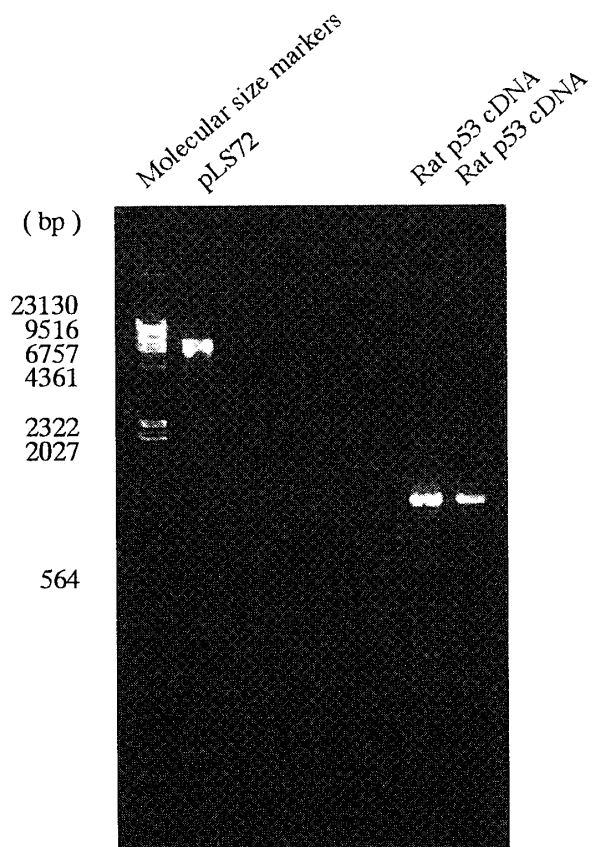


Fig.1 Detection of rat p53 mRNA expression by RT-PCR

次に得られたプラスミドが1) 酵母を効率よく形質転換するか, 2) 野生型ラットp53の発現が酵母の成育に影響を与えないか, 3) ADE2遺伝子の転写を促して白コロニーを形成するかどうかを検討するため, 12個のラットp53が組み込まれたプラスミドクローンより, 任意に選択した3つ (pLSRP53-8, -31, -34) を環状のまま酢酸リチウム法で酵母yIG397に導入した。コントロールにはpLS72 (ヒト野生型p53発現ベクター) とpLS/SAS (ヒト変異p53発現ベクター) を用いた。pLS72では全てのコロニー (1600個) が白色となり, pLS/SASでは全て赤色コロニー (784個) を形成した。pLSRP53-8, -31, -34では全て白色コロニー (それぞれ2208, 1024, 264個) が得られた (Table 2)。また, コロニーの大きさには差は認められず, pLS72で得られたものとほぼ同じ大きさを示していた。そこで, 効果的にコロニーが形成されたpLSRP53-8とpLSRP53-31のラットp53 cDNAの塩基配列を調べたところ, pLSRP53-8ではコーディング領域の塩基配列が野生型<sup>(23)</sup>と一致した。一方, pLSRP53-31では88番目の塩基がGからTに変異し, 30番目のアミノ酸がアスパラギン酸からチロシンに置換されていた (data not shown)。以上の結果より, これ以降の酵母アッセイはpLSRP53-8を用いて行った。なお, 以下これを単にpLSRP53と表記する (Fig. 2a)。

## 2. ラットp53の酵母アッセイの特異性の検討

pLSRP53を用いたラットp53の酵母アッセイの特異性を検証するため, 正常ラット肝由来のp53 cDNA (WT: 野生型コントロールサンプル) および人為的に変異を挿入したp53 cDNA (M1およびM2: 変異型コントロールサンプル) のPCR産物について酵母アッセイを行った。pLSRP53のギャップベクター25ngを単独で導入した場合は15個のコロニーが生じた。一方, WTを用いた酵母アッセイでは2382個のコロニーを形成し, そのうち赤コロニーは152個 (6.4%) であった。また, 203番目のアミノ酸のチロシンがシステインに置換された変異を持つM1では97.6%, 218番目のアミノ酸のチロシンがヒスチジンに置換されたM2では92.6%の赤コロニーが生じた (Table 3)。また, 1つの酵母 (コロニー) 内に野生型プラスミドと変異型プラスミドが同時に維持されていないかどうかを検討するため, 赤および白それぞれの酵母コロニーよりプラスミドを回収し, 大腸菌に導入後, それぞれ10個の大腸菌コロニーよりプラスミドクローンを回収し, 再び酵母アッセイを行った。この結果, 赤コロニーに由来したプラスミドクローンは全て赤コロニーを白コロニー由来のプラスミドクローンは全て白コロニーを形成するのが確かめられた (data not shown)。

**Table 2** Transformation of yeast with p53 expression vectors

Vector	No. of red colonies	No. of white colonies	% of red colonies
pLS72	0	1600	0 %
pLS / SAS	784	0	100 %
pLSRP53 - 8	0	2208	0 %
pLSRP53 - 31	0	1024	0 %
pLSRP53 - 34	0	264	0 %

pLS72 contains wild type human p53 cDNA.

pLS / SAS contains mutant human p53 cDNA (codon 336, Glu → stop).

pLSRP53 - 8, -31, -34 contain wild type rat p53 cDNA.

**Table 3** Results of yeast functional assay using pLSRP53

vector / Insert	No. of red colonies	No. of total colonies	% of red colonies
pLSRP53 / water	9	15	*
pLSRP53 / WT	152	2382	6.4 %
pLSRP53 / M1	1188	1217	97.6 %
pLSRP53 / M2	1616	1745	92.6 %

WT: RT-PCR product of wild type rat p53 cDNA from WKAH rat liver.

M1: PCR products of rat p53 cDNA with Tyr203Cys substitution.

M2: PCR products of rat p53 cDNA with Tyr218His substitution.

\*: Percent of red colonies was not evaluated because the number of colonies was less than 200.

### 3. 各正常組織におけるラットp53酵母アッセイの背景値の検討

10週齢、雌、WKAHラットから各正常組織（9臓器）を摘出し全RNAを抽出した後、RT-PCR法によりp53のcDNAを増幅し、これらについて酵母アッセイを行った。その結果、9臓器とも赤コロニーの割合は、10%以下（5.7~8.2%）であった（Table 4）。次に正常組織の検体より5.7~8.2%の赤コロニーが出現した原因を調べるため、野生型p53を発現する細胞株OWHを用いた酵母アッセイで出現した赤コロニー（6.1%）の解析を行った。赤コロニー9個からプラスミドを回収し、そのp53 cDNAの塩基配列を決定したところ、2サンプル（R1とR2）が1塩基置換、4サンプル（R6~R9）が1塩基挿入、残り3サンプル（R3~R5）が欠失を有していた（Table 5）。1塩基置換はミスセンス変異でクローンにより変異個所が異なっていた。一方、挿入変異は全てアデニン1塩基の挿入でいずれも6個のアデニンの連続する部位に認められた。クローンR3およびR4では欠失の再結合部位に共通の5塩基配列が認められた。R5では第6イントロンのアクセプターサイトの変異もしくはオルターネイティブスプライシング

Table 4 Results of rat p53 functional assay of samples from normal rat tissue

Organ	% of red colonies
brain	6.2 ± 1.8 %
tongue	6.6 ± 0.2 %
heart	7.1 ± 1.0 %
lung	6.5 ± 0.6 %
stomach	7.3 ± 1.7 %
liver	8.0 ± 0.9 %
spleen	8.2 ± 1.4 %
kidney	8.2 ± 1.6 %
muscle	5.7 ± 1.8 %

Data are mean ± SD values.

の可能性が示唆された。また、5つの白コロニーより回収したプラスミドにはp53の変異は見いだされなかった（data not shown）。

### 4. ラットp53酵母アッセイの検出感度および定量性の検定

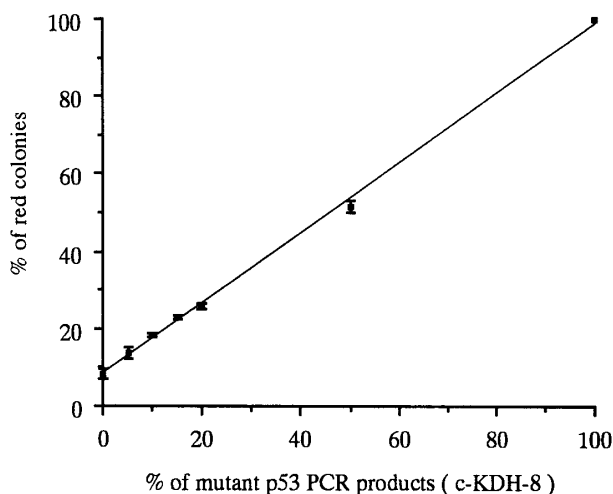
検出感度を調べるため、野生型p53を発現するc-SST-2および変異型p53を発現するc-KDH-8に由来するp53のPCR産物を種々の割合に混合して酵母アッセイを行った。変異型p53 PCR産物の割合と酵母アッセイの赤コロ

Table 5 p53 mutations in background red colonies

clone	mutation	
R1	nt 337 C to T	Gln 113 stop
R2	nt 823 T to G	Cys 275 Gly
R3	deletion of nt 146 - 236	5' - <u>GT</u> <u>CCTGC</u> cccagg.....cc <u>cctgc</u> ACCGTGG - 3'
R4	deletion of nt 208 - 935	5' - TCCTGC <u>Agca</u> cag.....ccc <u>cag</u> CAAAGA - 3'
R5	deletion of nt 777 - 833	5' - ACTCCAG tgggaa.....tggg <i>ag</i> AGACCGT - 3'
R6	1 base insertion at nt 293 - 298	AAAAAA→AAAAAAA
R7	1 base insertion at nt 865 - 870	AAAAAA→AAAAAAA
R8	1 base insertion at nt 952 - 957	AAAAAA→AAAAAAA
R9	1 base insertion at nt 952 - 957	AAAAAA→AAAAAAA

Deleted sequences shown in lower case letters.  
Homologous sequences shown underlined.  
The possible acceptor site for splicing is shown in italics.





**Fig.3** Correlation between percent of red colonies and mutant p53 cDNA contents. The bars indicate means  $\pm$  SD. Statistical analysis was carried out by simple regression.  
 $y = 8.5017 + 0.90444x$   $r^2 = 0.999$

ニーの比率は極めて高い正の相関関係を示した ( $r^2 = 0.999$ ) (Fig. 3)。また、変異型p53 PCR産物が0%, 5%, 10%, 15%, 20%含まれるサンプル間では赤コロニーの比率に有意差が認められた ( $p < 0.001$ )。

**5. ラット培養細胞株における酵母アッセイを用いたp53変異の解析**

22種類の培養細胞株(継代数の異なる同種細胞株2例を加えて24サンプル)についてp53の酵母アッセイを行い、生じた赤コロニーの比率を調べたところ、3.2~8.3%のものが13例(I群)、51.5~54.3%のものが3例(II群)、92.0~100%のものが8例(III群)となり、大きく3群に別れた。この3群の中間(10~50%, 55~90%)の比率の赤コロニーを生じたサンプル

**Table 6** Yeast functional assay of p53 in various rat cell lines

Cell line	Tumor origin	Rat strain	Carcinogen / Virus	% of red colonies	p53 status	Mutation		
						Amino acid change	Sequence change	Exon
9L	glioma	Fisher	ENU	5.1	wt			
KEG-1	glioma	WKA	ENU	7.5	wt			
C6	glioma	SD	-	8.3	wt			
c-SST-2 <sup>29)</sup>	adenocarcinoma	SHR	-	7.7	wt			
cl.4 <sup>29)</sup>	adenocarcinoma	SHR	-	6.3	wt			
ER-1 <sup>29)</sup>	adenocarcinoma	SHR	-	4.9	wt			
SPRT-1	fibrosarcoma	SHR	-	3.2	wt			
c-KMT-17-A3 <sup>30)</sup>	fibrosarcoma	WKA	MCA	5.2	wt			
c-KMT-17-A6 <sup>30)</sup>	fibrosarcoma	WKA	MCA	94.8	mt	Ser 146 Pro + 85bp del (1/4), Asp 257 Asn (1/4) **		
c-WRT-7 <sup>31)</sup>	leukemia	WKA	Rauscher virus	5.4	wt	nt 870 A del(1/4), nt 952 - 957 A ins (1/4)		
P2-a	leukemia	WKA	Rauscher virus	6.1	wt			
P2-b	leukemia	WKA	Rauscher virus	96.9	mt	Leu 286 Phe (1/3), 7bp ins (2/3) **		7
LR	leukemia	WKA	Rauscher virus	7.9	wt			
1B5	leukemia	WKA	Rauscher virus	6.6	wt			
1C5-a	leukemia	WKA	Rauscher virus	50.4	wt / mt	Leu 127 Phe (4/4)	CTC→TTC	5
1C5-b	leukemia	WKA	Rauscher virus	92.0	mt	Leu 127 Phe (4/4)	CTC→TTC	5
2A5	leukemia	WKA	Rauscher virus	100	mt	Ile 248 Leu (1/4), Tyr 217 Cys (1/4), 450 bp del (2/4) **		
1D6	leukemia	WKA	Rauscher virus	54.0	wt / mt	Arg 247 Pro (4/4)	CGG→CCG	6
OWH*	hepatoma	F1 / LEC	-	6.1	wt			
LDH	hepatoma	LEC	3'-Metyl-DAB	54.3	wt / mt	Arg 247 Pro (4/4)	CGG→CCG	6
DAB	hepatoma	LEC	3'-Metyl-DAB	96.5	mt	Tyr 218 Cys (4/4)	TAT→TGT	6
c-KDH-8 <sup>20)</sup>	hepatoma	WKA	3'-Metyl-DAB	100	mt	nt 728 G del (4/4)	GGC→G - C	6
3Y1 cl.B1-6	fibroblast	Fisher 344	-	100	mt	Lys130 Thr + Ala 136 Thr (4/4)		5
DMBA-OC1	ovarian cancer	WKA	DMBA	100	mt	His 212 Ile (4/4)	AAG→ACG + GCG→ACG CAC→ATC	6

\* : OWH, a hepatoma cell line was established from a hepatoma spontaneously developed in a backcrossed rat of F1(LEC x WKA) with an LEC rat.

\*\* : Multiple mutations.

ルは認められなかった。また、これらの中で同一細胞株で継代数が異なるものを比較したところ、P2-aがI群、P2-bがIII群に、また1C5-aおよび1C5-bがそれぞれII群とIII群に属していた (Table 6)。次に、50%以上の赤コロニーを呈したII群、III群のものについて、その原因を明らかにするために複数の赤コロニーからプラスミドを回収し塩基配列を決定した。II群のLDHと1D6では、両者ともコドン247の塩基配列がCGGからCCGに変異し、アミノ酸がアルギニンからプロリンに置換されていた。1C5-a (II群) および1C5-b (III群) ではコドン127のCTCがTTCに変異してアミノ酸がロイシンからフェニルアラニンに置換されていた。III群については1C5-b

に加えて、DABでコドン218のアミノ酸がチロシンからシステインへのミスセンス変異が認められた。3Y1cl.B1-6では、2カ所のアミノ酸(コドン130のロイシンからスレオニンとコドン136のアラニンからスレオニン)の置換が見いだされた。また、c-KDH-8では723-728番目のグアニン(G)が6個連続する箇所のでGの1塩基の欠失が見いだされた。これにより243番目以降のアミノ酸が変異し、244番目に停止コドンが出現した。DMBA-OC1では、コドン212のCAC(ヒスチジン)がATC(イソロイシン)への2塩基変異によるミスセンス変異が見いだされた (Fig. 4)。P2-bではコドン286のミスセンス変異のほか、第8エクソンと第9エクソンの間に第8イ

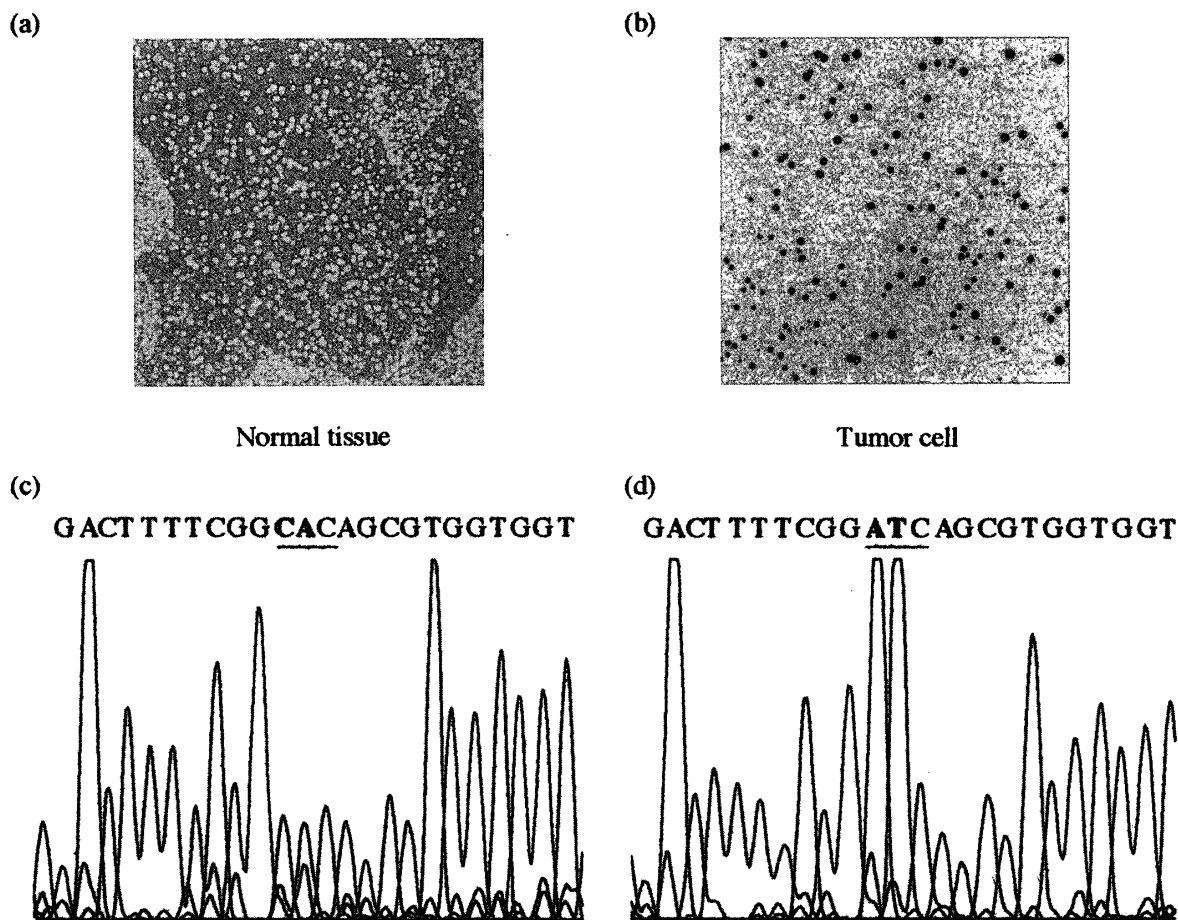


Fig.4 Representative results of the yeast functional assay for rat p53. Tongue (a) and DMBA-OC1 (b) showed 6.7% and 100% red colonies. Sequence electropherograms showing the normal in the tongue (c) and mutant in DMBA-OC1 (d).

ントロンの最初の7塩基が挿入される変異が認められた。c-KMT17-A3および2A5では、それぞれ欠失のほかに複数の変異が認められた (Table 6)。

#### 6. 赤コロニーの割合が50%前後の細胞株の遺伝子型についての検索

赤コロニーの割合が50%前後の場合、これが細胞の野生型/変異型のヘテロ接合の遺伝型にもとづくものかあるいは細胞がヘテロな集団であるためなのか明らかにするために、LDHについてp53の第6エクソンのゲノムDNAをPCRで増幅し直接塩基配列決定法により塩基配列を調べた。この結果、コドン247の2番目の塩基の位置が野生型C (シトシン) と変異型G (グアニン) の両方を示す塩基配列が検出された (data not shown)。また、限界希釈によりサブクロニング可能であった1C5-aについては、そのサブクロンの酵母アッセイを行ったところ、29サブクロン全てにおいて赤コロニーがほぼ50%の割合で出現した (Table 7)。また、これらサブクロンより5クローン (クローンM9, M12, M13, M15, M24) について赤コロニーからプラスミドを回収しそのp53変異を同定したところ、親株と同様のコドン127にミスセンス変異 (CTCロイシン→TTCフェニルアラニン) が認

められた。この細胞を更に5代、および35代にわたって継代培養した後、酵母アッセイを行った結果、赤コロニーはそれぞれ50%, 55%とほぼ等しい割合を示していた。

## 考 察

### ラットp53酵母アッセイの開発

現在まで、ラットの癌またはそれらに由来する細胞株において、多数のp53変異が見出されている。これらのラットp53変異は大部分がアミノ酸の置換を惹起する点変異であり、そのほとんど全てがいわゆる配列特異的なDNA結合ドメインをコードする部分、即ちヒトにおける変異頻度が高い部位 (コドン102~292) と同じである<sup>(12)</sup>ことが示されている。したがって、ヒトにおいて既に明らかにされているp53のDNA結合能/転写活性化能の喪失を指標とした酵母アッセイの確立はラットの腫瘍におけるp53の遺伝子診断において効率の良い方法となりうると推察され、SSCP法などの従来の方法より高感度である<sup>(13)</sup>ことより、ラットp53遺伝子の酵母アッセイの開発は意義あるものと考えられた。

本アッセイの使用にあたり、基本的な問題として以下の点が推察された。即ちyIG397をレポーター酵母として用いた場合RGC配列にラットのp53が結合しADE2を発現するかどうか、ラットp53の発現が酵母の発育などに悪影響を及ぼさないかどうか、ラットの細胞からp53のcDNAが効率よく増幅され、遺伝子相同組み換えによりプラスミドに導入発現されるかどうかである。そこで、本研究ではラットp53発現ベクターpLSRP53の3つのクローン (pLSRP53-8, -31, -34) をyIG397へ導入し酵母アッセイを行った。その結果、低アデニン培地でこれらは白コロニーを呈していた。このことはラットp53が酵母アッセイにおいて発現され、それがADE2転写を活性化する事を示した。

Table 7 Results of yeast functional assay of 1C5 subclones

sample	% of red colonies	sample	% of red colonies
1C5 - M1	48.1 %	1C5 - M17	44.3 %
1C5 - M2	45.7 %	1C5 - M18	47.6 %
1C5 - M4	51.9 %	1C5 - M19	56.2 %
1C5 - M5	49.3 %	1C5 - M20	47.9 %
1C5 - M6	51.4 %	1C5 - M21	53.2 %
1C5 - M7	47.2 %	1C5 - M22	51.4 %
1C5 - M8	50.4 %	1C5 - M23	54.7 %
1C5 - M9	44.3 %	1C5 - M24	48.7 %
1C5 - M10	46.3 %	1C5 - M25	48.5 %
1C5 - M11	48.0 %	1C5 - M26	48.6 %
1C5 - M12	51.4 %	1C5 - M27	47.6 %
1C5 - M13	50.6 %	1C5 - M28	47.4 %
1C5 - M14	48.1 %	1C5 - M29	49.4 %
1C5 - M15	48.9 %	1C5 - M30	47.7 %
1C5 - M16	44.0 %		

また、pLSRP53-8と-31においてコロニーのサイズおよび数がヒトのプラスミドpLS72の場合と同程度であったことより、ラットp53の発現がyIG397の発育などに有害ではないことと形質転換の効率がプラスミドDNA 1  $\mu$ gあたり  $1.0 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4$ 個と良好であることが示された。さらに、ギャップベクターを用いたラットp53の酵母アッセイにおいても同様な結果が得られたことよりp53のDNAが遺伝子相同組み換えによるギャップベクターに導入されp53蛋白が発現されたと考えられた。これらの結果より上記問題点を解決することが可能と推察された。

#### ラットp53酵母アッセイの特異性および背景値の検討

本アッセイ法の特異性を検定するため、正常ラット組織よりRT-PCR法で増幅したp53のcDNA断片および人為的に変異を導入したp53のcDNA断片をpLSRP53のギャッププラスミドとともに酵母に遺伝子導入して解析した。正常肝組織由来のp53 PCR産物では約6.4%の赤コロニーが出現した (data not shown)。一方、ヒトのp53変異として知られているコドン205のチロシンからシステイン(Tyr205Cys)、コドン220のチロシンからヒスチジン(Tyr220His)と同じ変異をもつラットp53 cDNA (M1: Tyr203Cys, M2: Tyr218His) ではそれぞれ97.6%, 92.6%の赤コロニーが得られた。このことはラット変異p53由来のPCR産物でもヒトの系と同様に赤コロニーを発現させる高い特異性があることを示唆した。また、野生型p53を導入した酵母アッセイ法でも少数の赤コロニーが出現し、これらは背景値と考えられた。即ち他のラット各種非癌部組織を用いた検討でも背景値赤コロニー数が5.7~8.2%の頻度で出現していた。この値は柏崎ら<sup>(24)</sup>が報告したヒトのp53の酵母アッセイ法における背景値 (2.9~10%) に比べ平均するとやや高い値を示していた。そ

の原因として、ギャップベクター自体の再結合、ラットp53のRT-PCRの際の変異の挿入、変性したRNAに由来する短縮したPCR産物の合成 (鋳型スイッチ) などが考えられた。そこで、まずpLSRP53のギャップベクターのみを導入したところ赤コロニーが9個と白コロニーが6個出現した (Table 3)。塩基配列を解析したところ、赤コロニーではギャップベクター自身の再結合によるもの、また白コロニーではラットp53 cDNAの塩基配列がみられ、制限酵素で切り出したものの分離精製の際に残存した環状のpLSRP53によるものと考えられた。これらの出現頻度はp53のPCR産物を用いた酵母アッセイ法による全コロニー中の0.4~0.7%である (data not shown) と低頻度であった。次いで、赤コロニーが6.1%を呈したOWH (野生型p53発現細胞株: Table 6) の赤コロニーから回収したp53 cDNAの塩基配列を解析したところ、2つの事柄が背景値の原因として注目された。1つは大きな欠失でTable 5に示したようにR3およびR4の再結合点 (塩基配列列記の下線部に示した) に5塩基の相同の配列が認められた。これはWaridelら<sup>(25)</sup>がすでにヒトの酵母アッセイ法における問題点として注意を喚起しているようにRT-PCRの際におこりうる鋳型スイッチという現象に基づくPCRのエラーと考えられた。もう1つの変異として、1塩基挿入が9クローン中4個に認められた。これらはアデニンが6個連続する箇所 (nt293~298, nt865~870, nt952~957) にみられ、RT-PCRのエラーの他にラット細胞内でのDNA複製の際の挿入変異およびRNAに転写される際の挿入変異<sup>(26)</sup>である可能性が推察された。このようなアデニンが6個連続する配列はヒトのp53には存在せず、ヒト酵母アッセイのアーチファクトとしても報告されておらず、このアデニン挿入変異はラット特有の現象もしくはそれに伴うアーチファクトと考えられた。また、本研究の背景値の2.7%を

占めたことより、これがヒトより背景値が増加する主因である可能性が示唆された。

#### ラットp53酵母アッセイ法の定量性

酵母アッセイの信頼性は、p53発現ベクターが1コピーで酵母内に維持されることに依存している。このためにpLSRP53はCEN/ARSユニットを含むベクターpRS315をもとに構築した。実際、このことを確かめるため赤コロニーおよび白コロニーからそれぞれ10個のクローンをプラスミドを回収し、大腸菌を形質転換させた。1個の大腸菌には1個のプラスミドしか入らないことが証明されているため、大腸菌から回収したプラスミドで再び酵母の形質転換を行った。その結果、赤コロニーから得られたプラスミドからは全て赤コロニーが、白コロニーから得られたプラスミドからは全て白コロニーが形成された (data not shown)。この実験から赤コロニーは変異p53クローンのみを、また白コロニーは野生型p53クローンのみを保持していることが証明された。さらに野生型と変異型のp53 PCR産物と様々な比率で混合して酵母アッセイ法を行った結果、変異型p53 PCR産物の割合と赤コロニーの比率との間に非常に高い正の相関関係が得られた。このことは本アッセイに定量性があることを強く示し、同時に、1つの酵母に1種類のベクターしか維持されていないことを示したと考えられた。

#### 酵母アッセイによる細胞株ゲノムp53の検討

ラットの培養細胞株を用いて酵母アッセイを行った結果、これらを赤コロニーが10%以下のI群、50%前後のII群、100%近いIII群と3つに分類することができた。I群は赤コロニーがおおむね背景値レベルで野生型p53を発現する群と考えられた。II群は50%~55%の赤コロニーが出現した。この原因を明らかにするために限界希釈法によりサブクローンを単離することのできた1C5-aについて、その29サブクローンについて酵母アッセイを行ったところ、各サブク

ローンにおいて赤コロニーは全て50%前後であった。この結果は、1C5-aが野生型p53をもつ細胞と変異型p53をもつ細胞が混在しているために50%程度の赤コロニーを呈したのではなく、同一細胞内で野生型と変異型のp53遺伝子が存在している均一な細胞集団となっていることを示した。また、この実験結果は細胞株においてp53の変異型および野生型の両対立遺伝子が同程度転写されていることを示しており、Ishiokaら<sup>(27)</sup>がヒトの系で指摘している様に、酵母アッセイの赤コロニーの比率がラット細胞株の遺伝子型 (genotype) を推察する上で1つの有用な指標になり得ることを示した。100%近い赤コロニーを呈したIII群8細胞株中5株 (3 Y1-cl.B1-6, DAB, 1C5-b, c-KDH-8, DMBA-OC1) でクローナルな変異が同定され、これらの細胞ではLOH (Loss of heterozygosity: ヘテロ接合性の消失) がおきていることが推察された。一方、残りのP2-b, 2A5およびc-KMT-17-A6の3例で複数の変異遺伝子が同定された。これらの細胞株で同定された欠失は、その再結合部位の配列に共通の塩基配列がなく、鋳型スイッチによるものとは考えられなかった。また、c-KMT17-A6で4クローン中2つにアデニンが6個連続する部位での挿入および欠失変異が同定された。これ以外に変異が認められなかったことより、野生型対立遺伝子をもとにした酵母アッセイにおけるラットp53特有のアーチファクトや転写時のエラーによる可能性も示唆されたが、赤コロニーが94.8%と高率で白コロニーの割合が極度に低く、野生型対立遺伝子の存在による可能性は少ないと考えられた。以上のことより、これら3株中に複数の異なったp53変異を持った細胞集団が共存している可能性が高いと推察された。今後、この点を明らかにするため、さらに検討する必要があると考えられた。

### ラット細胞株の遺伝子不安定性

今回、1C5細胞の酵母アッセイの結果より継代培養中にp53遺伝子の状態が変化することがあるのが示された。1C5細胞はもともと白血病細胞株c-WRT-7の垂株P2 (%赤コロニー: 6.1%)から限界希釈法により単離されたクローンであるがその約35代継代(1C5-a)および約100代継代(1C5-b)細胞の赤コロニーの出現頻度にそれぞれ50.4%, 92.0%と差異が観察された。1C5-aおよび1C5-bの塩基配列の解析により両方ともコドン127のロイシンからフェニルアラニンへの変異が認められたが、1C5-aにのみ野生型の塩基配列も認められ、ヘテロ接合体であることが明かにされた。このため、1C5-bでみられた赤コロニーの増加は、継代培養中に野生型対立遺伝子のLOHを生じた細胞が出現、これがヘテロ接合体の細胞に比べて速やかに増殖したためと考えられた<sup>(16,17)</sup>。この知見を再現するため、1C5-aを35代にわたり継代したが、LOHをおこした細胞は見出されなかった。このことはLOHが継代により常に起こりうるものではないことを示唆した。

### 結 語

ラットp53遺伝子の機能的変異を高感度にしても定量的に検出する酵母アッセイ法を確立した。このアッセイ法における背景値は10%以下で、検体中の変異p53 mRNAの比率が5%違えば赤コロニーの有意な差として検出可能である。また、このアッセイ法を用いることで細胞株のp53の遺伝子型を簡便に解析することができ、p53変異を指標とした様々な研究の解析手段として有用であることが示された。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導とご校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座有末眞教授、柴田敏之助教授、な

らびに本研究の機会を与えて下さいますとともに終始御指導御鞭撻を頂きました北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門守内哲也教授に感謝申し上げます。また、3Y1cl.B1-6細胞を提供して下さいました札幌医科大学医学部山下利春講師、DMBA-OC1細胞を提供して下さいました久留米大学医学部片岡明生博士に深く感謝致します。そして、本研究全般にわたり多大な御助言、御協力を頂きました北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門浜田淳一講師、外木秀文助手をはじめ、細胞制御および病理部門の教室員の皆様に心より厚く御礼申し上げます。

### 参 考 文 献

1. Somers KD, Merrick MA, Lopez ME, et al: Frequent p53 mutations in head and neck cancer., *Cancer Res*, **52**: 5997-6000, 1992.
2. Cardinali M, Kratochvil FJ, Ensley JF, et al: Functional characterization in vivo of mutant p53 molecules derived from squamous cell carcinomas of the head and neck., *Mol Carcinog*, **18**: 78-88, 1997.
3. Yeudall WA, Jakus J, Ensley JF, et al: Functional characterization of p53 molecules expressed in human squamous cell carcinomas of the head and neck., *Mol Carcinog*, **18**: 89-96, 1997.
4. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis., *Cell*, **61**: 759-767, 1990.
5. Nowell PC: Mechanisms of tumor progression., *Cancer Res*, **46**: 2203-2207, 1986.
6. Harris CC, Hollstein M: Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene., *N Engl J Med*, **329**: 1318-1327, 1993.
7. Bosari S, Viale G: The clinical significance of p53 aberrations in human tumours., *Virchows Arch*, **427**: 229-241, 1995.
8. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression., *Cell*, **75**: 817-825, 1993.
9. Miyashita T, Reed JC, et al: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene., *Cell*, **80**: 293-299, 1995.

10. Kastan MB, Zhan Q, El-Deiry WS, et al: A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia., *Cell*, **71** : 587-597, 1992.
11. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome., *Nature*, **358** : 15-16, 1992.
12. Friend S: p53: A glimpse at the puppet behind the shadow play., *Science*, **265** : 334-335, 1994.
13. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours., *Nature*, **356** : 215-221, 1992.
14. Fukuda I, Ogawa K: Detection of p53 gene mutation in rat hepatocellular carcinoma cell line by denaturing gradient gel electrophoresis., *Mol Carcinog*, **7** : 257-262, 1993.
15. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K: Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology., *J Clin Oncol*, **13** : 1009-1022, 1995.
16. Ushijima T, Makino H, Nakayasu M, et al: Presence of p53 mutations in 3Y1-B clone 1-6: A rat cell line widely used as a normal immortalized fibroblast., *Jpn J Cancer Res*, **85** : 455-458, 1994.
17. Tada M, IggoRD, Ishii N, et al: Clonality and stability of the p53 gene in human astrocytic tumor cells: Quantitative analysis of p53 gene mutations by yeast functional assay., *Int J Cancer*, **67** : 447-450, 1996.
18. Flaman JM, Frebourg T, Moreau V, et al: A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** : 3963-3967, 1995.
19. Kashiwazaki H, Tonoki H, Tada M, et al: High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay., *Oncogene*, **15** : 2667-2674, 1997.
20. Yoshida MC, Masuda R, Sasaki M: New mutation causing hereditary hepatitis in the laboratory rat., *J Hered*, **78** : 361-365, 1987.
21. Zambetti GP, Levine AJ: A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53., *FASEB*, **7** : 855-865, 1993.
22. Stotz A, Linder P: The *ADE2* gene from *Saccharomyces cerevisiae*: sequence and new vectors., *Gene*, **95** : 91-98, 1990.
23. Hulla JE, Schneider RP et al: Structure of the rat p53 tumor suppressor gene., *Nucl Acids Res*, **21** : 713-717, 1993.
24. 柏崎晴彦: Yeast functional assay法によるヒト口腔扁平上皮癌におけるp53遺伝子変異の検出感度と診断規準, *北海道医誌*, **72** : 211-224, 1997.
25. Waridel F, Estreicher A, Bron L et al: Field cancerisation and polyclonal p53 mutation in the upper aerodigestive tract., *Oncogene*, **14** : 163-169, 1997.
26. Linton MF, Raabe M, Pierotti V, et al: Reading-frame restoration by transcriptional slippage at long stretches of adenine residues in mammalian cells., *J Biol Chem*, **272** : 14127-14132, 1997.
27. Ishioka C, Frebourg T, Yan YX, et al: Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast., *Nat Genet*, **5** : 124-129, 1993.
28. Hamada J, Takeichi N, Okada F, et al: Progression of weakly malignant clone cells derived from rat mammary carcinoma by host cells reactive to plastic plates., *Jpn J Cancer Res*, **83** : 483-490, 1992.
29. Kuramitsu Y, Ohiro Y, Matsushita K, et al: The mechanism of locally enhanced production of tumor necrosis factor- $\alpha$  in tumor tissues by the administration of a new synthetic lipid A analog, ONO-4007, in hepatoma-bearing rats., *Anti-Cancer Drugs*, **8** : 886-893.
30. Fujii T, Takeichi N, Kasai M: Establishment and characterization of a differentiating myeloid cell line obtained from a rat myelomonocytic leukemia., *Cancer Res*, **43** : 1875-1879, 1983.