

GY1 細胞 DNA におけるヒトアデノウイルス発癌遺伝子の組み込み構造

工藤 伸一

札幌医科大学がん研究所分子生物学部門 (主任 藤永 蕙 教授)

Analysis of Integrated Viral DNA and Flanking Cellular DNA Sequences in a Rat Cell Line GY1, Transformed by Ad12 *Hind* III Fragment-G

Shin-ichi KUDO

Department of Molecular Biology, Cancer Research Institute, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. K. Fujinaga)

The nucleotide sequences around the junction sites between the viral transforming gene and cellular DNA in a transformed cell line GY1 were determined. This cell line had been established from a rat cell line 3Y1 by transformation with the adenovirus type 12 DNA fragment (*Hind* III-G, nucleotide 1 to 2322) encompassing the entire E1A region and the E1B 19 kd (kilodaltons) protein coding region. This particular cell line contains more than one hundred viral copies per haploid genome. Sequence analysis of four independent viral integrates revealed the following features.

- 1) Viral DNAs were integrated at multiple different sites of cellular chromosomal DNA.
- 2) Various levels of deletions occurred at both ends of the transfected viral DNA fragment.
- 3) There was no internal base change such as deletion, insertion or substitution in the viral integrates so far examined.
- 4) No common and no highly specific sequences existed around the viral-cellular junctions.
- 5) Simple and repeated sequences were often found in cellular sequences adjacent to the left ends of viral DNAs.
- 6) Except for the short patch type homologies there was no extensive homology between deleted viral sequences and flanking cellular sequences.
- 7) Possible palindrome structures could be constructed around the viral-cellular junctions as well as parental viral regions corresponding to the junction sites in all of the cases investigated.

(Received November 14, 1985 and accepted December 2, 1985)

Key words: Adenovirus transforming gene, Transformed cell, Integration sites, Nucleotide sequence

1 緒 言

ヒトアデノウイルスは約 35,000 塩基対よりなる線状二本鎖 DNA をゲノムとして持ち、ヒトでは主に結膜炎や小児の呼吸器疾患を起こすが、げっ歯動物由来の培養細胞に導入した場合にはトランスホメーションを誘発することができる。このトランスホメーションに関与する遺伝子はウイルスゲノムの左端約 10% までに位置し、初期遺伝子領域 E1 に含まれている¹⁾。アデノウイルスによる発癌過程にはウイルス発癌遺伝子が

細胞染色体 DNA と組み換えを起こして宿主ゲノム中に組み込まれて存続することが必要とされる。外来遺伝子としてのアデノウイルス DNA がどのような機構で組み込まれるかという点に関しては、現在のところ明らかにされていないが、いくつかのトランスホメーション細胞株を用いて組み込み構造の解析がなされている²⁻⁹⁾。ウイルス DNA と細胞 DNA の組み換え領域には、両者の配列に部分的に相同性が認められる場合^{3,4,5,9)} や二次構造を組める配列が認められる場合^{3,9)} があり、また隣接する細胞側の配列に 10 塩基対ほどの直列反復配列が存

の方法¹⁷⁾によりクローン化 DNA の調整を行なった。

2.3 塩基配列の決定

塩基配列の決定は Maxam-Gilbert 法¹⁸⁾に準拠して行なった。クローン化 DNA を切断点地図をもとに適当な制限酵素で消化し、ウイルス DNA-細胞 DNA 結合部位を含む DNA 断片をアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルで分離し、精製した。ウシ腸アルカリホスファターゼで処理して 5' 末端に残るリン酸基を除去した後、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下、T4 polynucleotide kinase で 5' 末端の標識を行なった。次に一端のみが標識された DNA 断片にするため、内部に切断箇所を持つ制限酵素で消化してポリアクリルアミドゲルで分離し、精製した。この標識 DNA 材料を 4 つに分け、それぞれ塩基特異的な化学分解(A+G, G, T+C, C)を行ない、塩基配列解析用ゲル (7M 尿素を含む濃度 20%, 8%, または 6%ポリアクリルアミドゲル, 厚さ 0.3 mm) にのせ、1,500~2,000 V で電気泳動を行なった。ゲルを 10%メタノール-10%酢酸に浸した後、ろ紙に移して乾燥してから X 線フィルムを重ねてオートラジオグラフィーを行なった。

2.4 トランスホーム活性の検出

リン酸カルシウム法¹⁹⁾によってクローン化 DNA を 3Y1 細胞に導入し、約 30 日後のフォーカス形成の有無でトランスホーム活性を判定した。

2.5 コンピューター解析

ウイルス DNA-細胞 DNA 結合領域の塩基配列及びウイルス DNA 上の組み込み部位となっている領域の塩基配列について、その二次構造をコンピューター解析した。探索は、100 塩基以内の配列で形成されるパインドローム構造で、ヘアピンループが 50 塩基以内、内部ループ及び突出ループがそれぞれ 3 塩基以内という条件のもとで行なった。探索プログラムは北海道大学理学部の飯田陽一博士により作成されたものを使用させて頂いた。

3 実験成績

3.1 組み換え領域の塩基配列決定

本実験では、GY1 細胞内よりクローニングにより分離した組み込みウイルス DNA をもつ 4 つのクローン、pGYAd212, 312, 377, 381 について解析を行なった。これらのクローン化 DNA は、Southern blot 解析からウイルス DNA 領域が導入に用いた DNA 断片内部のそれぞれ異なった範囲までが存在すること、また制限酵素切断点パターンが隣接細胞 DNA 側でまったく異なること (Fig. 1) から細胞染色体 DNA 上の異なる組み込

み領域に由来するものと考えられる。塩基配列の決定は切断点地図 (Fig. 1) をもとにウイルス DNA-細胞 DNA 結合部位を含む DNA 断片を切り出して 5' 末端を標識した後、Fig. 1 の矢印に示す方向に Maxam-Gilbert 法¹⁸⁾により行なった。3 クローン pGYAd212, 312, 381 においては両側のウイルス DNA-細胞 DNA 結合部位の塩基配列を決定した。クローン pGYAd377 で

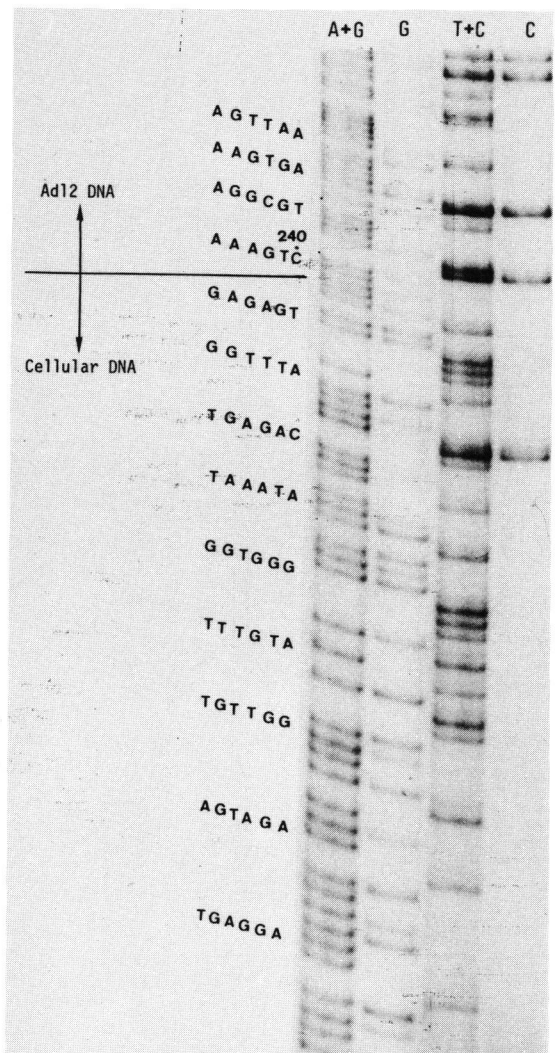


Fig. 2 Sequencing data through the left viral-cellular junction in pGYAd312. The *AccI* fragment carrying the left viral-cellular junction was labeled at 5' ends, and then cleaved with *PvuII* and separated by 5% polyacrylamide gel. The junction fragment extracted was sequenced from the cellular DNA into the viral DNA according to the method of Maxam and Gilbert (1980). The sequencing result is summarized in Fig. 3.

は左側の結合部位は配列決定したが、右側の結合部位は近傍に末端標識に使用できる適当な制限酵素切断点がないために配列決定を行っていない。トランスフェクションに用いた Ad12 *Hind* III-G 断片(2322 塩基対)については塩基配列がすでに明らかにされている²⁰⁻²²⁾ため、ウイルス DNA 側配列は得られた塩基配列データをこのウイルス本来の配列と比較することで同定した。Fig. 2 は pGYAd312 での左側のウイルス DNA-細胞 DNA 結合部位における塩基配列のオートラジオグラフィである。

3.2 組み込まれたウイルス DNA の塩基配列

ウイルス DNA の組み込みは、Ad12 *Hind* III-G 断片内のそれぞれ異なった部位で起きていて、両端は種々の程度に欠損していた。塩基配列の決定により、明らかとなった組み込みウイルス DNA 領域は次のとおりである。pGYAd212 では塩基 183 番目より 2,145 番目までの領域、pGYAd312 では塩基 240 番目より 1,942 番目までの領域、pGYAd381 では塩基 53 番目より 1,949 番目までの領域が組み込まれていた (Fig. 3)。また pGYAd 377 では塩基 260 番目よりウイルス DNA 配列が開始していた (Fig. 3)。E1A の転写開始に必要な 5' 上流のプロモーター配列は塩基 276 番目から始まる^{20,29)}ので、ここで解析したクローンにおいてはこの配列は保持されていた。Ad12 *Hind* III-G 断片は E1B19kd 蛋白コード領域を含むが、このコード領域のポリ A 付加シグナルまでを持つのは pGYAd212 のみで、pGYAd312 と pGAd381 はコード領域の途中までを含んでいた。pGYAd377 の場合、右側のウイルス DNA-細胞 DNA 結合部位の配列決定を行っていないのでウイルス DNA の右端の正確な位置は明らかでないが、Southern blot 解析から E1A 全領域は含んでいることが明らかとなっている。組み込まれたウイルス DNA の制限酵素による切断点パターンは、本来のウイルス DNA のパターンと同一であり (Fig. 1)、塩基配列の決定を行なった範囲内ではウイルス DNA 側に塩基の欠損、置換あるいは挿入がみられなかったことから、組み込まれたウイルス DNA 内部における顕著な塩基の変異はなかったと推定される。ここで組み込まれたウイルス DNA 中の E1A 領域が実際に機能するかどうかを確かめるため、ラット細胞株 3Y1 に対して各クローンのトランスフェクション実験をおこなった。その結果、4クローン全部にトランスホーム活性がみられ E1A 領域が十分機能し得ることが確認された(データは未掲載)。ウイルス DNA の組み込みは、本来のウイルス DNA 配列上の異なる箇所

れないため、ウイルス DNA 側における組み込みの hot spot は存在しなかった。また欠損したウイルス DNA 領域をクローン間で比較しても、欠損に関与すると考えられる共通した配列は認められなかった。

3.3 隣接する細胞 DNA の塩基配列

結合部位におけるウイルス DNA とそれに隣接する細胞 DNA の塩基配列を、Fig. 3 に示す。ウイルス DNA の組み込みが細胞 DNA 上の特定塩基配列を目印に起こる可能性に関して、隣接する細胞 DNA 間の塩基配列の比較を行なったが、特に共通した塩基配列はみられなく、標的部位は見いだされなかった。レトロウイルスによる組み込みの場合、その組み換え領域には 4-6 塩基対よりなる隣接細胞 DNA の複製個所が存在する²⁴⁾が、ここで解析した限りではそのような配列様式はみられなかった。欠損したウイルス DNA 配列とそれに置き換わった隣接細胞 DNA 配列の比較では、部分的に相同性がみられる場合があったが、広範囲に相同性がみられるものはなかった。このため、こうした領域が互いに塩基対をなして相互作用し、組み込みに機能した可能性は少ないと考えられる。細胞 DNA 側での特徴的な点として、ウイルス DNA の左端に隣接する細胞 DNA 配列に単純な繰り返しからなる配列が存在した。pGYAd381 では組み換え部位のごく近傍で TCC 配列が 5 回連続し、pGYAd212 でも TCC 配列が組み換え部位から 51 塩基内に 8 回繰り返されていた。pGYAd377 ではアデニンが 8 塩基連続したあとチミンが 24 塩基連続した配列が存在し、特異な配列構造をなしていた。

3.4 コンピューター解析によるパンドローム構造

ウイルス DNA-細胞 DNA 結合部位周囲の塩基配列、及び本来のウイルス DNA 上での組み込み部位周囲の塩基配列について、実験方法に記した条件でコンピューター解析を行ない二次構造の探索を行なった。各々のウイルス DNA-細胞 DNA 結合領域には、Fig. 4 に示すようなパンドローム構造を組むことができた。これらのパンドローム構造は、その大きさや形がそれぞれ異なっていた。ウイルス DNA-細胞 DNA 結合部位は、パンドローム構造内のヘアピンループに位置するものと、幹領域に位置するものとがあり、構造内の同じ領域には位置していなかった。一方、本来のウイルス DNA 上の各々の組み込み領域には、Fig. 5 に示すようなパンドローム構造を組むことができた。これらのパンドローム構造においても、その大きさや形がそれぞれ異なり、組み込み部位はパンドローム構造内の同じ領域に位置していなかった。

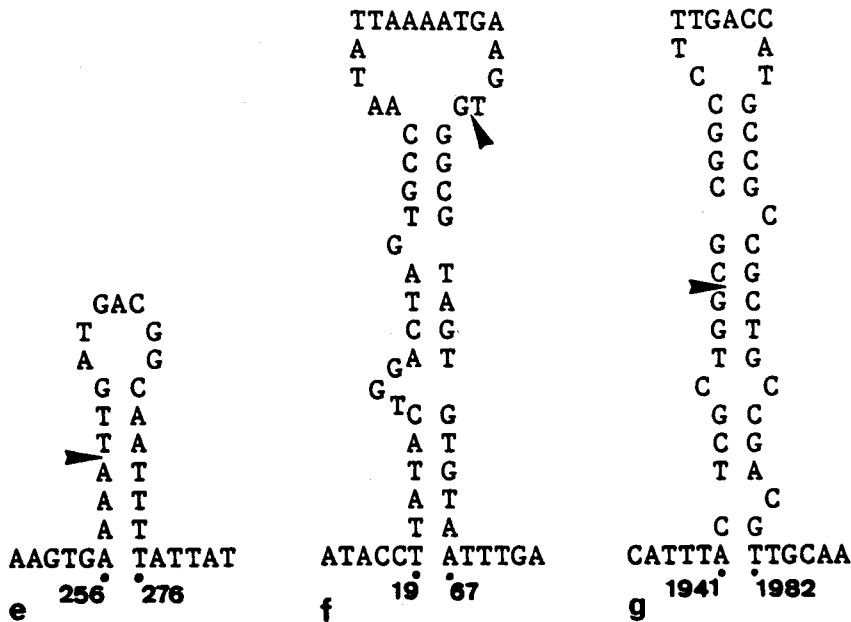
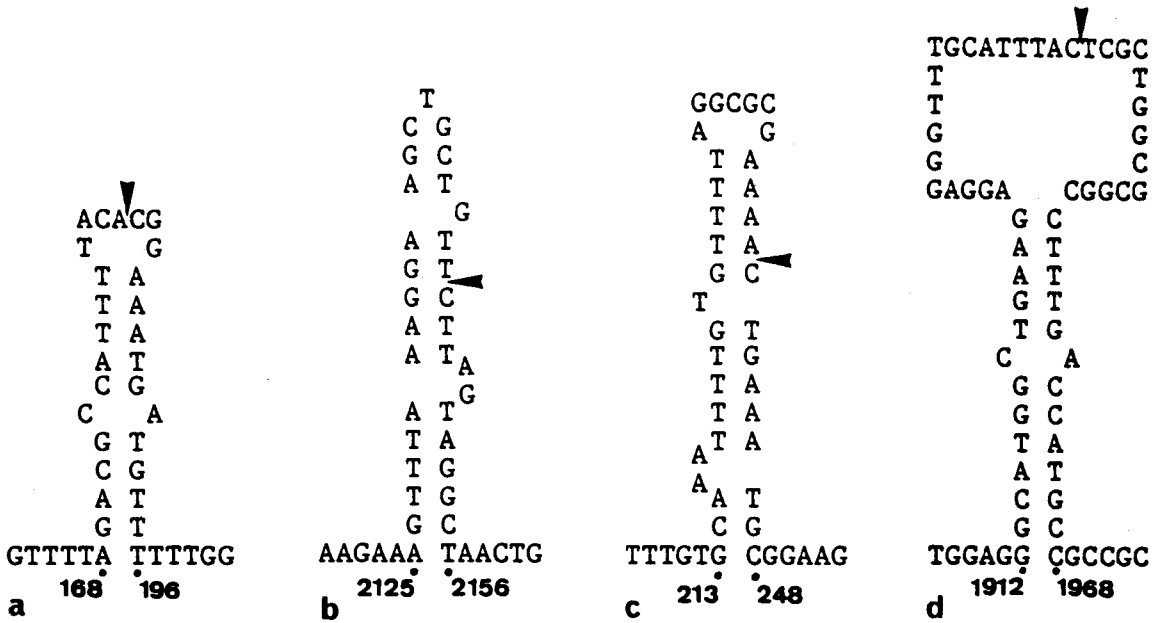


Fig. 5 Possible palindrome structures constructed at the regions of parental viral DNAs encompassing (a) the left and (b) the right in pGYAd212, (c) the left and (d) the right in pGYAd312, (e) the left in pGYAd377, (f) the left and (g) the right in pGYAd381, insertion sites. Arrowheads indicate the insertion sites.

4 考 察

高等真核生物に外来遺伝子を導入して、その発現や機能を調べることは、分子生物学及び細胞生物学上きわめて有効な手法であり、今日、リン酸カルシウム法¹⁹⁾、リボソーム融合法²⁵⁾、プロトプラスト融合法²⁶⁾、マイクロインジェクション法²⁷⁾などの導入法が開発されている。一般にこうした方法で導入された遺伝子は、細胞内で染色体に組み込まれない状態でもその形質発現が一時的に起きている(Transient expression)。しかし、安定した形質発現を持続するためには、さらに染色体 DNA 中に組み込まれて存続することが必要とされる²⁸⁾。本論文では、外来遺伝子の組み込み機構を理解するための実験系として、アデノウイルス発癌遺伝子をリン酸カルシウム法で導入して得られたトランスホーム細胞を対象に、ウイルス DNA の組み込み構造を解析した。ラット細胞株 GY1 にはハプロイドあたり 100 コピー以上のウイルス DNA が存在し、Southern blot 法による解析からは組み込んだ後に一部のウイルス DNA が遺伝子増幅を起こしたことが示唆されている¹²⁾。ここでは、染色体 DNA 上の別々の箇所へ組み込まれた 4 つのウイルス DNA について、組み換え領域の塩基配列を決定し、その解析を行なった。細胞 DNA 内におけるウイルス DNA は、導入した Ad12 *Hind* III-G 断片(2322 塩基対)内のそれぞれ異なった箇所へ組み込まれていて、両端部を種々の程度に欠損したかたちで存在した。E1A 領域は解析したウイルス DNA すべてに含まれていたが、E1B 19 kd 蛋白コード領域は一つのウイルス DNA だけで保持されていた。これらのコード領域が、細胞内で実際に転写されていて、発癌に関与したかどうかは明らかでないが、3Y1 細胞に対するトランスフェクション実験ではトランスホーム活性が認められ、どの組み込みでも E1A 機能は保たれていることが判明した。アデノウイルス⁸⁾や SV40²⁹⁾では、組み込まれたウイルス DNA に大きな欠損を生じている場合があるが、ここでは組み込みウイルス DNA の切断点パターンに変化がみられないこと、また塩基配列を決定した範囲で塩基の欠損、置換あるいは挿入がみられないことから、ウイルス DNA 内部での顕著な欠損は起きなかったと推定される。組み換え領域では、ウイルス DNA 側、及び細胞 DNA 側配列それぞれで共通した塩基配列はみられなく、特定の塩基配列が組み換えの認識部位とはなっていない。細胞 DNA 側での興味ある特徴としては、一方鎖が単純な塩基単位の繰り返しからなる配列が、ウイルス DNA の左端に隣接する配列にみられる傾向があっ

た。単純な繰り返し配列は、他のアデノウイルス³⁾や SV40²⁹⁻³¹⁾による組み込み領域にもみることができ、真核細胞 DNA にはこうした繰り返し配列が、染色体 DNA 上に非常に多く散在していることが報告されている³²⁾。たとえば、一方鎖が 23 個のアデニン塩基のみからなるポリ A 配列は、ウサギゲノム中に 18,000 塩基ごとの割合で存在している³³⁾。また TCC 配列の繰り返しのようにピリミジン塩基だけからなる配列は、その長さが 20~200 塩基のものが多数散在していて、200 塩基程度のものでマウスゲノム中では、平均 6~8 キロ塩基ごとの割合で存在していることが知られている³⁴⁾。そのため、その他の単純な繰り返し配列についても考え合わせると、ウイルス DNA の組み込みがこうした配列の近傍で起こる確率はかなり高いと考えられる。しかしまた、SV40 の組み込みの場合^{30,31)}でみられた TG からなる隣接細胞 DNA の繰り返し配列では、左巻の Z 型 DNA を形成することが可能な配列として知られるプリン、ピリミジンの交互配列³⁵⁾であることから、高次構造上ゲノム内部に組み込まれやすい環境をつくっている可能性が考えられている³¹⁾。ここでみられた配列についても、塩基構成の不均等さからそうしたゲノム構造を形成しているかもしれない。また注目すべき配列として、ウイルス DNA-細胞 DNA 結合領域、及びウイルス DNA 上の組み込み部位周囲の配列には、パルンドローム構造が組める 2 回転対称配列が認められた。パルンドローム構造が実際に作られるかどうかは明らかではないが、2 回転対称配列が蛋白の結合部位となっている場合が、heat shock gene³⁶⁾やニワトリの lysozyme gene³⁷⁾で知られており、組み込みに際して蛋白との相互作用を考える上で興味もたれる。

5 結 語

Ad12 *Hind* III-G 断片でトランスホームしたラット細胞株 GY1 中のウイルス DNA と細胞 DNA 組み換え領域における塩基配列の解析から、次のことが明らかになった。

- 1) ウイルス DNA の組み込みは、細胞染色体 DNA 上の複数箇所で行われていた。
- 2) ウイルス DNA は、導入した DNA 断片のそれぞれ異なった部位で細胞 DNA と結合し、両端部を種々の程度に欠損して存在した。
- 3) 組み込まれたウイルス DNA には、解析した範囲で塩基の欠損、挿入、あるいは置換といった内部変異はみられなかった。
- 4) 組み換え領域には、ウイルス DNA 側、及び細胞

DNA 側それぞれに共通した特定の塩基配列は存在しなかった。

5) ウイルス DNA の左端に隣接する細胞 DNA 上には、単純な繰り返しからなる配列がみられる傾向があった。

6) 欠損したウイルス DNA 側配列と隣接する細胞 DNA 側配列との間には、断片的に相同性がみられるのみで、広範囲にわたる相同性は存在しなかった。

7) ウイルス DNA-細胞 DNA 結合領域、及び本来のウイルス DNA 配列上の組み込み部位に相当する領域には、パリンδροーム構造を組める塩基配列がみられた。

稿を終えるにあたり、終始御指導頂いた藤永蕙教授に深謝いたします。また、本研究に御指導、御協力頂いた京都大学化学研究所の高浪満教授、相崎弘幸博士、北海道大学理学部の飯田陽一博士、並びに、札幌医科大学分子生物学教室の方々々に感謝の意を表します。

尚、本研究の一部は文部省科学研究助成金（藤永）により行なわれた。

文 献

- 藤永 蕙： アデノウイルス一序にかえて一。蛋白質・核酸・酵素 **27**, 2415-2419 (1982).
- Sambrook, J., Greene, R., Stringer, J., Mitchison, T., Hu, S. L. and Botchan, M.: Analysis of the sites of integration of viral DNA sequences in rat cells transformed by adenovirus 2 or SV40. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **44**, 569-584 (1979).
- Deuring, R., Winterhoff, U., Tamanoi, F., Stabel, S. and Doerfler, W.: Site of linkage between adenovirus type 12 and cell DNAs in hamster tumor line CLAC3. Nature (London) **293**, 81-84 (1981).
- Gahlmann, R., Leisten, R., Vardimon, L. and Doerfler, W.: Patch homologies and the integration of adenovirus DNA in mammalian cells. EMBO J. **1**, 1101-1104 (1982).
- Stabel, S. and Doerfler, W.: Nucleotide sequence at the site of junction between adenovirus type 12 DNA and repetitive hamster cell DNA in transformed cell line CLAC1. Nucleic Acids Res. **10**, 8007-8023 (1982).
- Visser, L., Reemst, A. C. M. B., van Mansfeld, A. D. M. and Rozijn, T. H.: Nucleotide sequence analysis of the linked left and right hand terminal regions of adenovirus type 5 DNA present in the transformed rat cell line 5RK 20. Nucleic Acids Res. **10**, 2189-2198 (1982).
- Westin, G., Visser, L., Zabielski, J., van Mansfeld, A. D. M., Pettersson, U. and Rozijn, T. H.: Sequence organization of a viral DNA insertion present in the adenovirus-type-5-transformed hamster line BHK 268-C31. Gene **17**, 263-270 (1982).
- Gahlmann, R. and Doerfler, W.: Integration of viral DNA into the genome of the adenovirus type 2-transformed hamster cell line HE5 without loss or alternation of cellular nucleotides. Nucleic Acids Res. **11**, 7347-7361 (1983).
- Schulz, M. and Doerfler, W.: Deletion of cellular DNA at site of viral DNA insertion in the adenovirus type 12-induced mouse tumor CBA-12-1-T. Nucleic Acids Res. **12**, 4959-4976 (1984).
- Shiroki, K., Handa, H., Shimojo, H., Yano, S., Ojima, S. and Fujinaga, K.: Establishment and characterization of rat cell lines transformed by restriction endonuclease fragments of adenovirus 12 DNA. Virology **82**, 462-471 (1977).
- Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**, 503-517 (1975).
- Sawada, Y., Ojima, S., Shimojo, H., Shiroki, K. and Fujinaga, K.: Transforming DNA sequences in rat cells transformed by DNA fragments of highly oncogenic human adenovirus type 12. J. Virol. **32**, 379-385 (1979).
- Fujinaga, K., Sawada, Y. and Sekikawa, K.: Three different classes of human adenovirus transforming DNA sequences; highly oncogenic subgroup A, weakly oncogenic subgroup B and subgroup C specific transforming DNA sequences. Virology **93**, 578-581 (1979).
- Fujinaga, K., Sawada, Y. and Uemizu, Y.: A rapid screening for the specific DNA sequence: analysis of the transforming DNA segments in adenovirus transformed cells. Gann **70**, 239-243 (1979).
- Leder, P., Tiemeier, D. and Enquist, L.: EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms: The λ gtWES system. Science (Washington, D. C.) **196**, 175-177 (1977).
- Benton, W. D. and Davis, R. W.: Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaque *in situ*. Science (Washington, D. C.) **196**, 180-182 (1977).
- Tanaka, T. and Weisblum, B.: Construction of

- a colicin E1-R factor composite plasmid *in vitro*: Means for amplification of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **121**, 354-361 (1975).
18. Maxam, A. and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65**, 499-560 (1980).
 19. van der Eb, A. J. and Graham, F. L.: Assay of transforming activity of tumor virus DNA. *Methods Enzymol.* **65**, 826-839 (1980).
 20. Sugisaki, H., Sugimoto, K., Takanami, M., Shiroki, K., Saito, I., Shimojo, H., Sawada, Y., Uemizu, Y., Uesugi, S. and Fujinaga, K.: Structure and gene organization in the transforming *Hind* III-G fragment of Ad12. *Cell* **20**, 777-786 (1980).
 21. Kimura, T., Sawada, Y., Shinagawa, M., Shimizu, Y., Shiroki, K., Shimojo, H., Sugisaki, H., Takanami, M., Uemizu, Y. and Fujinaga, K.: Nucleotide sequence of the transforming early region E1b of adenovirus type 12 DNA: Structure and gene organization, and comparison with those of adenovirus type 5 DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 6571-6589 (1981).
 22. Bos, J. L., Polder, L. J., Bernards, R., Schrier, P. I., van den Elsen, P. J., van der Eb, A. J. and van Olmondt, H.: The 2.2 kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens starting at different AUG triplets. *Cell* **27**, 121-131 (1981).
 23. Sawada, Y. and Fujinaga, K.: Mapping of adenovirus 12 mRNAs transcribed from the transforming region. *J. Virol.* **36**, 639-651 (1980).
 24. Majors, J. E. and Varmus, H. E.: Nucleotide sequences at host-proviral junctions for mouse mammary tumor virus. *Nature (London)* **289**, 253-258 (1981).
 25. Gregoriadis, G.: Tailoring liposome structure. *Nature (London)* **283**, 814-815 (1980).
 26. Schaffner, W.: Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2163-2167 (1980).
 27. Graessmann, A., Graessmann, M. and Mueller, C.: Microinjection of early SV40 DNA fragments and antigen. *Methods Enzymol.* **65**, 816-825 (1980).
 28. 長田嘉穂, 大石道夫: 細胞への DNA 導入. 蛋白質・核酸・酵素 **28**, 1569-1581 (1983).
 29. Maruyama, K. and Oda, K.: Two types of deletion within integrated viral sequences mediate reversion of Simian Virus 40-transformed mouse cells. *J. Virol.* **49**, 479-489 (1984).
 30. Stringer, J. R.: DNA sequence homology and chromosomal deletion at a site of SV40 DNA integration. *Nature(London)* **296**, 363-366 (1982).
 31. Bullock, P., Forrester, W. and Botchan, M.: DNA sequence studies of Simian Virus 40 chromosomal excision and integration in rat cells. *J. Mol. Biol.* **174**, 55-84 (1984).
 32. Tautz, D. and Renz, M.: Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res.* **12**, 4127-4138 (1984).
 33. Flavell, R. A., van den Berg, F. M. and Grosveld, G. C.: Isolation and characterization of the oligo (dA-dT) clusters and their flanking DNA segments in the rabbit genome. *J. Mol. Biol.* **115**, 715-741 (1977).
 34. Straus, N. A. and Birnboim, H. C.: Polypyrimidine sequences found in eukaryotic DNA have been conserved during evolution. *Biochim. Biophys. Acta* **454**, 419-428 (1976).
 35. Wang, A. H.-J., Quigley, G. J., Kolpak, F. J., Crawford, J. L., Boom, J. H., Marel, G. and Rich, A.: Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature (London)* **282**, 680-686 (1979).
 36. Wu, C.: Activating protein factor binds *in vitro* to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature (London)* **311**, 81-84 (1984).
 37. Borgmeyer, U., Nowock, J. and Sippel, A. E.: The TGGCA-binding protein: a eukaryotic nuclear protein recognizing a symmetrical sequence on double-stranded linear DNA. *Nucleic Acids Res.* **12**, 4295-4311 (1984).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学がん研究所分子生物学部門 藤永 憲

ERRATA

THE SAPPORO MEDICAL JOURNAL Vol. 55, No. 1, February 1986

please make corrections from 1) to 3) with errata

Errors —————> Corrections

- 1) p. 59 : the 8th line from top in left column
Fig. 2 —> Fig. 2³⁸⁾
- 2) p. 59 : the 3rd line from bottom in left column
omit the sentence within the parenthesis
- 3) p. 64 : after the reference 37
 38. Kudo, S., Sugisaki, M., Takanami, M., Yamashita, T., Ishino, M., Shimizu, Y., Iida, Y. and Fujinaga, K. : Structure of viral DNA in a rat cell line, GY1, transformed by Ad12 *Hind*III fragment-G. *Virology* **148** in press (1986).