

ヒト Glioma 細胞株における GFAP 発現の検討

新潟大学脳研究所神経病理学教室（主任：熊西敏郎教授）

西山 明子

Studies on GFAP expression in human glioma cell lines

Akiko NISHIYAMA

Department of Neuropathology, Brain Research Institute, Niigata University

GFAP expression in human glioma cell lines was studied using a cloned cDNA probe to human GFAP. GFAP mRNA was detected in 5 out of the 10 human glioma cell lines examined. Different levels of GFAP mRNA was found to be expressed in 4 clonal cell lines derived from the same tumor. The difference in the amount of GFAP mRNA seemed to be correlated with the difference in the levels of GFAP present in these cell lines. Southern blot analysis of these cell lines revealed the presence of the GFAP gene in all of these cell lines regardless of GFAP expression. These results demonstrate the presence of glioma clonal cell lines with different levels of GFAP expression, regulated primarily at the transcriptional level.

Key words: glial fibrillary acidic protein, glioma, cell lines, cDNA
GFAP, グリオーム, 細胞株, cDNA.

略 語

GFAP=glial fibrillary acidic protein

mRNA=messenger RNA

1×SSC=0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate

1×Denhardt's solution=0.02% bovine serum albumin, 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone

SDS-PAGE=sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

PBS=phosphate buffered saline

HRP=horseradish peroxidase

IgG=immunoglobulin G

SDS=sodium dodecyl sulfate

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) は中間径 filament の一種である glial filament の構成蛋白であり, astroglia あるいはその類縁細胞に高い特異性をもって検出される¹⁾. Astroglia の正常及び病的状態, あるいは in vivo 又は in vitro の条件下, における GFAP に関しては既に多くの知見が得られている. 個体の発生過程にみられる astroglia²⁾³⁾, experimental allergic encephalitis やその他の病的状態に伴って出現する反応性 glia 細胞⁴⁾, また種々の glioma 組織とその構成細胞³⁾⁵⁾, などにおける GFAP について解析されてきた. 培養下においても細胞の増殖段階あるいは分化誘導と GFAP との関係が正常 glia の primary culture 又は glioma 株を用いて検索されてきた⁴⁾⁶⁾. これらの研究を通して得られた知見はいずれも細胞の状態によって

Reprint requests to: Akiko Nishiyama,
Department of Neuropathology Brain
Research Institute, Niigata University,
Niigata, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町 1-757
新潟大学脳研究所神経病理学部門

西山 明子

GFAP 発現が種々であることを示唆するものである。しかし実際には GFAP の発現とその調節機構の詳細についてはなお不明である。この点を明らかにすることは正常及び病的 astroglia の特性を知る上で必要不可欠である。本研究ではまず種々のヒト glioma 細胞株における GFAP mRNA と遺伝子をヒト GFAP に対する cDNA を probe として用いて検索し、GFAP 量と合わせ検討した結果、GFAP 発現量の異なるクローン株の存在を見出したので報告する。

材料と方法

1. ヒト GFAP cDNA probe

本研究に用いたヒト GFAP に対する cDNA probe は我々が λ gt-11 ヒト脳 cDNA library (Clontech 社) より immunoscreening によって cloning したものを pUC118 に subcloning したものであり、311bp の nucleotides から成る。その塩基配列がマウス GFAP cDNA の coding region の配列⁷⁾と高い homology を有すること、また正常ヒト脳由来 RNA を用いた Northern blot 及びヒト genomic DNA の Southern blot 解析の結果より本 probe は GFAP の配列に特異的に hybridize するものであることが判明した⁸⁾。以下の実験にはこの insert を random primer 法⁹⁾により ^{32}P ラベルし、比活性 $2 - 6 \times 10^8$ cpm/ μg のものを probe として用いた。

2. 細胞

U-251 MG はヒト malignant glioma より株化された GFAP 陽性株であり²³⁾、吉田純博士 (名古屋大学) より分与された。他のヒト glioma 細胞株は本研究所で株化されたものであり、そのうち5株 (Onda 7¹⁰⁾, Onda 8¹⁰⁾, Onda 9¹⁰⁾, Onda 10¹⁰⁾, N8039) は別個の glioma 由来であり、4株は同一腫瘍 (Onda 11¹⁰⁾¹¹⁾) から得られたクローン株 (CL1, 2, 3, 4) である。非 glioma 株としてヒト choriocarcinoma (Wst) 株およびヒト neuroblastoma (Goto) 株を用いた。

細胞は10%牛胎子血清 (Gibco) 加 Eagle's minimal essential medium 中にて培養し、confluency 達成後2日目に細胞数を算定した上で採取し、RNA, DNA, 及び蛋白の抽出を行った。

3. RNA 分析

培養細胞約 1×10^7 ないし 1×10^8 個及び正常ヒト脳組織約 1g より Chirgwin らの方法¹²⁾によって total RNA 分画を調製し、必要に応じて oligo (dT) cellulose column (Collaborative Research 社) を用いて poly (A)⁺

RNA に分画した。Northern blot 解析には total RNA 20 μg または poly (A)⁺ RNA 2.5 μg を 2.2M formaldehyde 含有1.3% agarose gel 電気泳動後、nitrocellulose filter (Schleicher and Schuell, BA 85) に転写した。Hybridization は Thomas らの方法¹³⁾に従って行った。すなわち42℃ 8時間以上 hybridization buffer にて prehybridization を行った後に、 ^{32}P ラベル cDNA を probe として (3×10^6 cpm/ml) hybridization buffer (50% formamide, 5 \times SSC, 1 \times Denhardt 液, 20mM sodium phosphate pH 6.5, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denatured herring sperm DNA) にて42℃ 15-20時間 hybridization を行った。洗浄は 0.2 \times SSC, 68℃にて行い、autoradiography はX線フィルムを用い、-80℃にて1-6日間行った。RNA dot blot 分析には段階希釈した total RNA を nitrocellulose filter に spot し、上と同様に hybridize した。

4. DNA 分析

培養ヒト glioma 細胞約 1×10^7 個より Blin and Stafford の方法¹⁴⁾によって高分子 DNA を調製した。DNA を制限酵素 (宝酒造社) Hind III 又は PstI で切断後、その 6 μg を 0.7% agarose gel 電気泳動し、nitrocellulose filter に転写¹⁵⁾後上記同様に hybridize した。Hybridization 後の洗浄は0.2 \times SSC, 0.1% SDS 50℃とし、-80℃にて1-5日間 autoradiography を行った。

5. 蛋白分析

培養細胞約 1×10^7 個から Bigbee らの方法¹⁶⁾により 1% SDS 可溶性分画を調製し、その 20, 4, 及び 0.8 μg ずつを用いた。蛋白定量は Lowry の方法¹⁷⁾に従った。Laemmli らの方法¹⁸⁾により10% acrylamide gel を用いて SDS-PAGE 後、Towbin らの方法¹⁹⁾により nitrocellulose filter に転写し、ウサギ抗ウシ GFAP 抗体 (Dako 社) を用いて間接法にて免疫染色した。免疫染色は次の方法の通りに行った。すなわち10%ヤギ血清 (PBS 希釈) で1時間前処理後、1次反応は抗 GFAP 抗体 (1:40希釈) を用いて1時間、2次反応は HRP-標識ヤギ抗ウサギ IgG (1:30希釈) を用いて1時間行った。発色には 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride-H₂O₂ を用いた。反応はすべて室温で行った。

6. 免疫組織化学的検索

スライドガラス (Miles Scientific 社) 上に単層培養した細胞を 4% paraformaldehyde で30分固定し、PBS 洗浄後30分の ethanol 処理し、0.3% H₂O₂-methanol

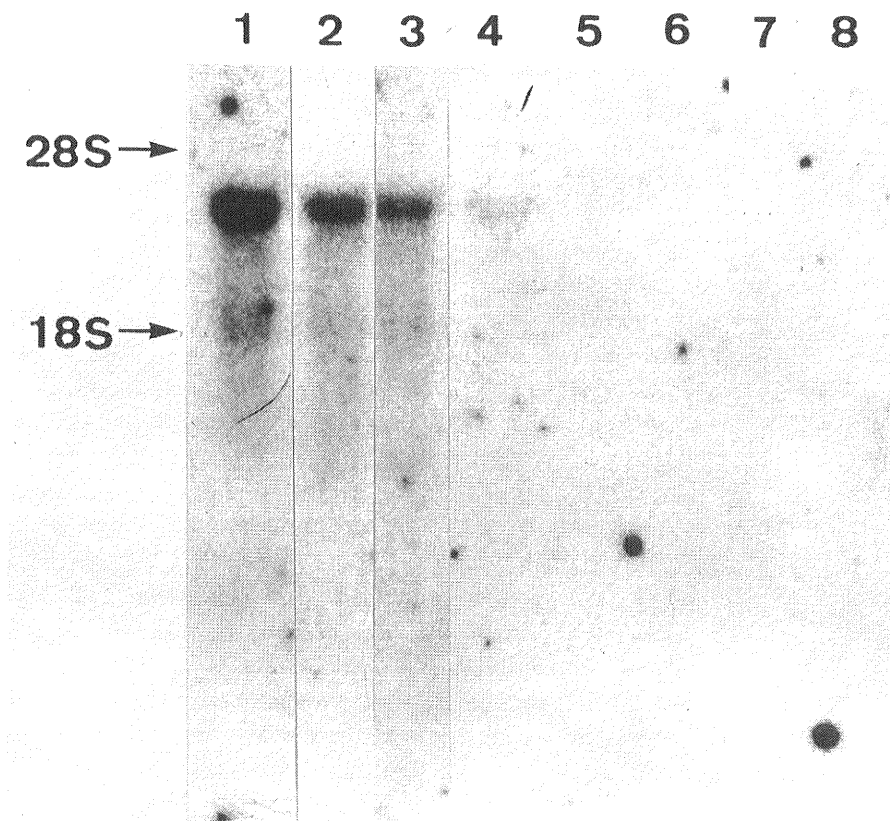
1時間及び正常ヤギ血清1時間の前処理を行った。1次反応は抗 GFAP 抗体 (10%正常ヤギ血清にて1:40又は1:400希釈) を用いて1時間、2次反応は HRP-標識ヤギ抗ウサギ IgG (正常ヤギ血清にて1:30希釈) を用いて1時間行った。Control には1次抗体の代わりに正常ウサギ血清を用いた。反応はすべて室温にて行った。

結 果

1. GFAP mRNA

ヒト GFAP に対する 311bp cDNA をプローブとし

てヒト glioma 10株, 非 glioma 2株, 及び正常ヒト脳組織より調製した total RNA 20 μ g の Northern blot 解析を行った。その結果 glioma 5株 (U-251 MG 株, Onda 11-CL 1, 2, 3, 4) にそれぞれ約 3.5kb のバンドが認められたが, 他の5株には hybridize するバンドは認められなかった (Fig. 1a)。また正常ヒト脳由来 RNA にも同様の約 3.5kb のバンドを認めた (Fig. 1b)。非 glioma 株にはバンドは認められなかった (Fig. 1c)。GFAP mRNA 陽性 glioma 5株間にはそのバンドの濃度に差が認められた。すなわち, U-251, CL1, 及び CL2 に最も強く, CL3 に中等度に, そして CL4



a. Human glioma cells.

Lanes contained 20 μ g of total RNA from: 1, Onda 11-CL 1; 2, Onda 11-CL 2; 3, Onda 11-CL 3; 4, Onda 11-CL 4; 5, Onda 10; 6, Onda 9; 7, Onda 7; 8, Onda 8.

Fig. 1 Detection of GFAP transcript in various cell lines and tissue.

The RNAs were electrophoresed, blotted, and hybridized with the 311 bp cDNA probe as described in the text. Autoradiographic exposure was for 6 days at -80°C . Ribosomal RNA was used as size marker.

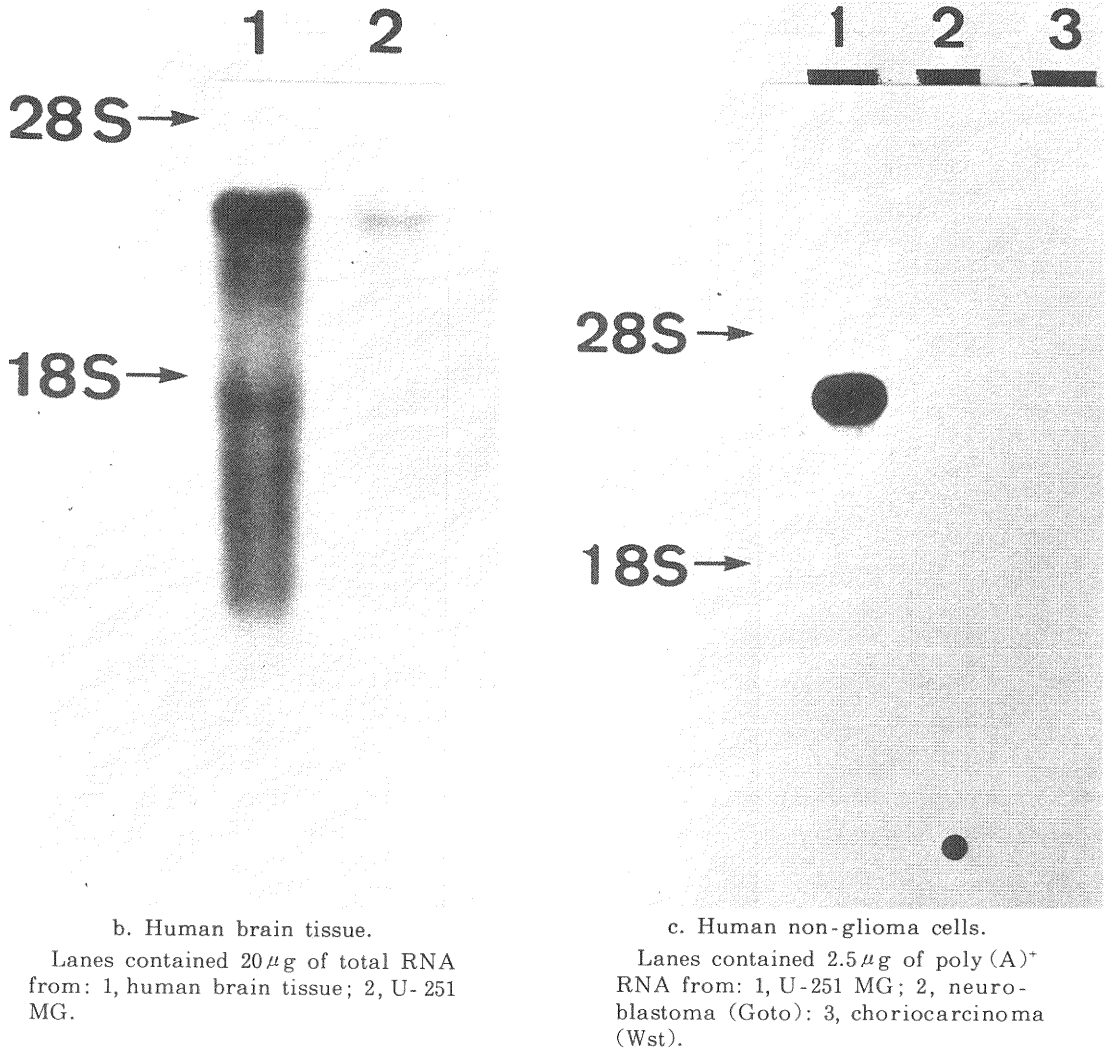


Fig. 1

には非常に弱く GFAP mRNA が認められた。これらの GFAP mRNA 陽性株における GFAP mRNA の発現量をさらに詳細に検討するために、これらの細胞より調製した total RNA を用いて RNA dot blot 法にて定量的解析を行った。その結果、U-251、CL1、及び CL2 のシグナルが最も強く、CL3 のシグナルの強さは CL1 の約 1/5 であり、CL4 の強さは CL1 の 1/5 と 1/25 の間であった (Fig. 2)。これらの細胞株間には RNA 採取時の細胞数及び得られた総 RNA 量に顕著な差はなかった。従って、ここにみられた hybridization signal の強さの相違はそれぞれの細胞株における真の GFAP mRNA 含有量の相違を反映していると考えられた。

2. GFAP 遺伝子

Fig. 3 には GFAP mRNA 陽性及び陰性 glioma より抽出した高分子 DNA の Southern blot hybridization の結果を示した。図に示した 6 例の glioma 株 (U-251, Onda 11-CL1, 2, 3, 4, Onda 7) 全例に Hind III 消化では約 23kb のバンド 1 本が、また Pst I 消化では 3.8kb と 2.1kb の 2 本のバンドが認められた。図に含めなかったが他の GFAP mRNA 陰性株由来 DNA についても同様の結果が得られ、これらのバンドのパターンはヒト胎盤由来 DNA のそれと同様であった。また、細胞株間には著明なバンドの濃度の差はなかった。従って、GFAP mRNA 発現の有無に拘らず、検索した glioma

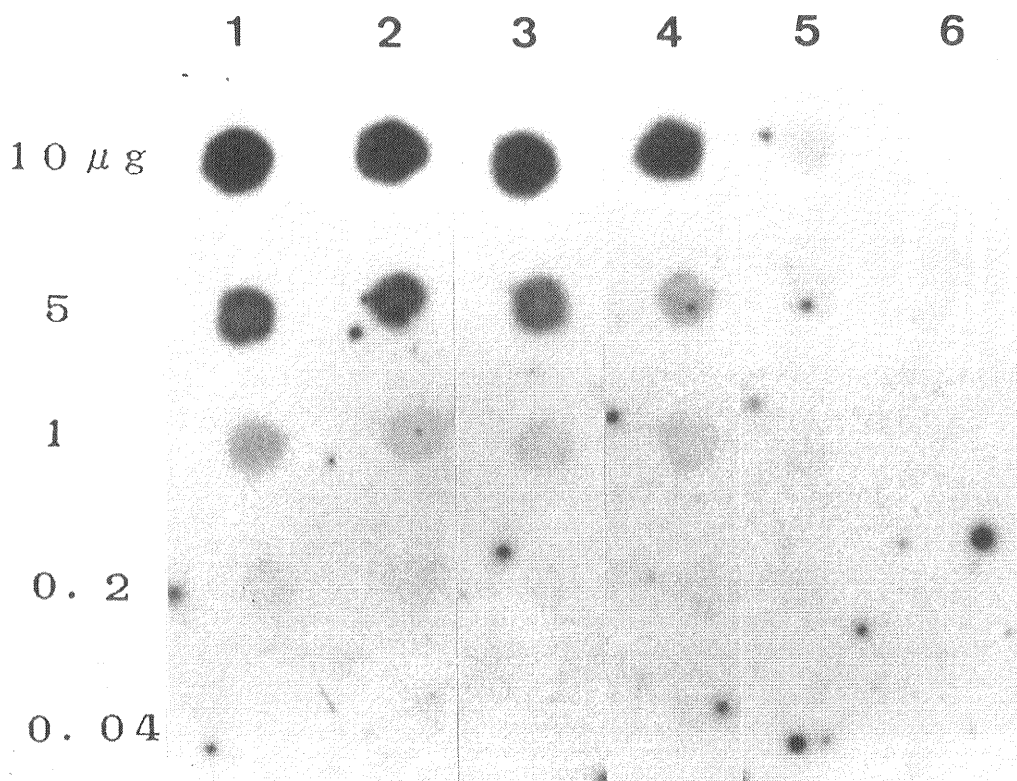


Fig. 2 Differential expression of GFAP mRNA in different glioma cell lines.

Each column contained the indicated amount of total RNA from: 1, U-251 MG; 2, Onda 11-CL1; 3, Onda 11-CL2; 4, Onda 11-CL3; 5, Onda 11-CL4; 6, Onda 7.

3 μ l of RNA were spotted onto nitrocellulose filter and hybridized as described in the text using the 311bp cDNA as the probe. Autoradiographic exposure was for 5 days at -80°C .

株の genome にはこの GFAP cDNA と hybridize する遺伝子が同様に存在することが示唆された。

3. GFAP

ヒト glioma より抽出した 1% SDS 可溶性分画を用いた半定量的 Western blot 解析の結果を Fig. 4 に示した。GFAP mRNA 陽性 5 株にはそれぞれ約 50kb のバンドを認めたが、他の glioma 5 例には認められなかった。細胞株間のバンドの濃度を比較すると、U-251 及び CL1 のバンドの濃度がほぼ同様で最も強く、蛋白 0.8 μ g まで検出可能であったのに対して、CL2 は CL1 よりやや弱く、CL3 は CL1 の約 1/5 であり、CL4 は CL1 の 1/5 から 1/25 の間であった。蛋白採取時の細胞数より細胞当たりの総蛋白量は細胞株間ではほぼ同様であった。従ってこの差はこれらの細胞株間の GFAP 量の差を反映するものと考えられ、GFAP mRNA 量の

差にはば対応するものであった。

4. 免疫組織化学

スライドガラスの上に単層培養した細胞を抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的に検索した結果、U-251, CL1, 2, 及び 3 には細胞質及び細胞突起に微細線維状の陽性染色を認めた (図省略)。ほとんどの細胞が陽性であり、個々の細胞間における染色強度に差はなかった。CL4 の染色性は他の陽性 4 株に比べて弱かったが、この場合も個々の細胞における染色態度の相違は認められなかった。従って、これらの細胞株間にみられた GFAP の発現量の差異は各株の個々の細胞における GFAP 発現量の差によるものと考えられた。

考 察

ヒト glioma 細胞株について既に多くの報告がある

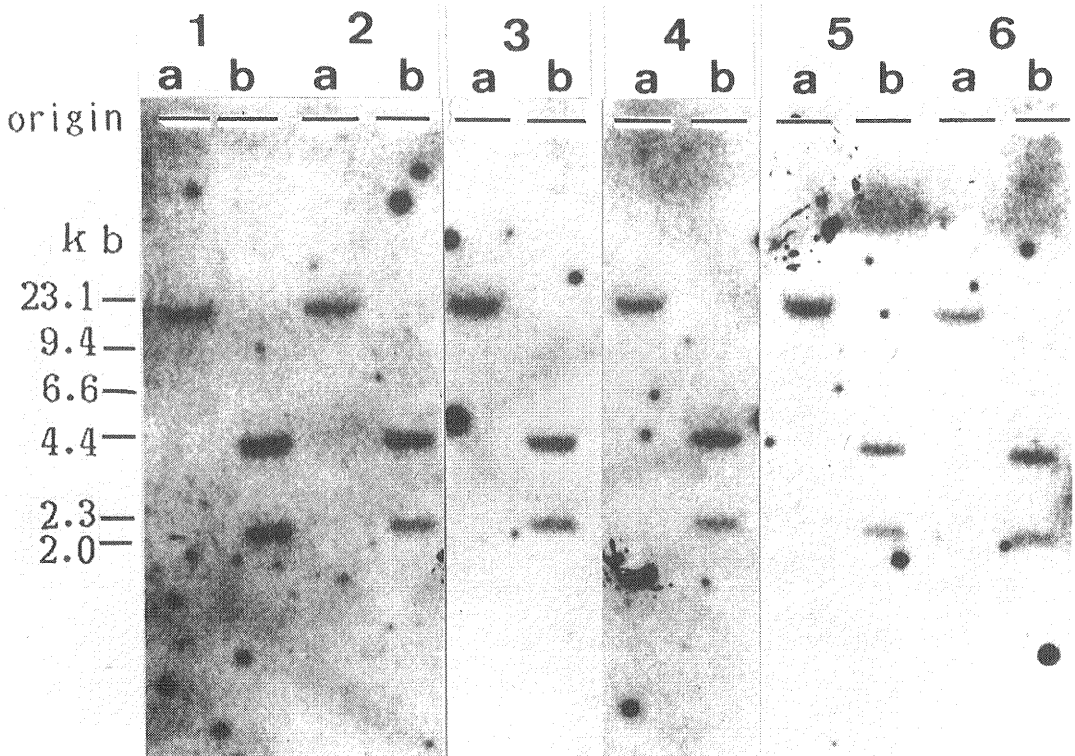


Fig. 3 Southern blot analysis of human glioma cells.

6 μ g of genomic DNA from: 1, U-251 MG; 2, Onda 11-CL1; 3, Onda 11-CL2; 4, Onda 11-CL3; 5, Onda 11-CL4; 6, Onda 7 were digested with a, HindIII; or b, Pst I.

DNAs were electrophoresed and hybridized as described in the text using the 311bp cDNA probe. The X-ray film was exposed for 5 days at -80°C . The size marker was λ DNA digested with Hind III.

が、GFAP 陽性 glioma 株はまだ少ない²⁰⁾²¹⁾。また細胞株における GFAP 発現に関する詳細も不明である。今回我々はクローニングして得られたヒト GFAP に対する cDNA および抗 GFAP 抗体を用いて主に本研究所で樹立されたヒト glioma 10株における GFAP の発現について検索した。その結果、5株に GFAP mRNA と蛋白が検出された。これらの内4株は同一腫瘍より得られたクローン株であり、1例は U-251 MG 株であった。Northern 解析の結果これらの5株すべてに約 3.5kb のバンドが認められたが、それぞれの濃度には差がみられた。この差を定量的に調べるために RNA dot blot 分析を行ったところ、U-251, CL1 及び CL2 に最も強くシグナルが認められ CL3 は CL1 の約 1/5、また CL4 は CL1 の 1/5 から 1/25の強さであった。蛋白に関して抗 GFAP 抗体を用いて半定量的 Western blot 解析を行った結果、GFAP mRNA 陽性5例に約 50kd

のバンドがみられ、その濃度の差は GFAP mRNA 量の差にはほぼ相関していたが、他の glioma 株にはバンドは検出されなかった。これらの株化細胞間には細胞採取時の細胞数、RNA、及び蛋白収量に顕著な差が認められなかった。従ってこれらの株間には真に mRNA 及び蛋白の両者における GFAP の発現に差があることが示唆された。免疫組織化学的検索の結果、これらの細胞株における GFAP 発現量の差は GFAP 発現量の異なる細胞が一つの株の中に混在しているためではなく、各株の個々の細胞における GFAP 発現量が異なっているためであることが判明した。そしてこのような細胞株間における GFAP 量の差は主に細胞中に存在する GFAP mRNA 量の差によることがわかった。この GFAP mRNA 量の相違は GFAP 遺伝子からの転写段階の調節によるかあるいは RNA の turnover の差によるものであらうと考えられる。今後核抽出物を用いた転写実験や mRNA

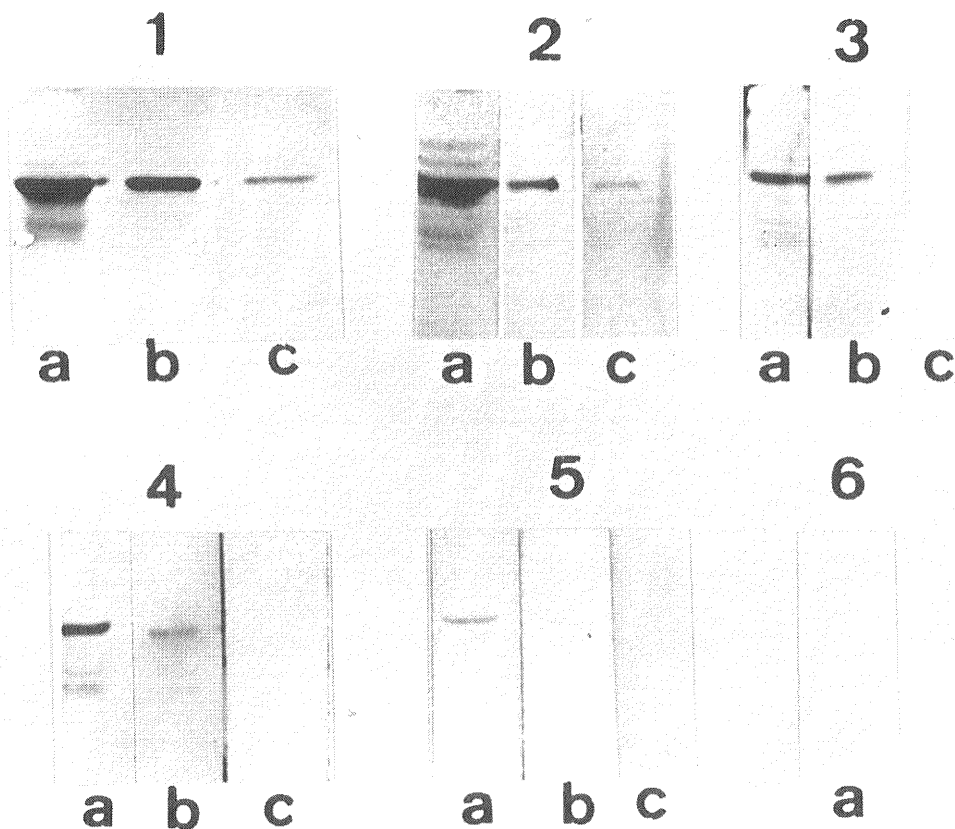


Fig. 4 Semiquantitative Western blot analysis of GFAP in human glioma cells.

a, 20 μ g; b, 4 μ g; and c, 0.8 μ g of 1% SDS-soluble protein from: 1, U-251; 2, Onda 11-CL1; 3, Onda 11-CL2; 4, Onda 11-CL3; 5, Onda 11-CL4; 6, Onda 7 were electrophoresed and blotted as described in the text and the filters were immunostained with antibody to bovine GFAP.

の turnover についての検索が必要と思われる。

Dewhurst らはマウス GFAP に対する cDNA を probe として用いて2種のヒト glioma 細胞株における GFAP mRNA を検索している²²⁾。この中で彼らは細胞の単層培養の免疫組織化学染色の結果がほぼ同様である2株の GFAP mRNA 量に差があることを Northern blot 解析で示しているが、定量的な分析は行っていない。我々は RNA dot blot 法及び Western blot 法により半定量的に検索した結果、免疫組織化学で差の認められなかった2株間にも GFAP mRNA 及び蛋白量に差を認めた。ヒト glioma 株より GFAP 陽性及び陰性クローンを得たという報告はいくつかある^{23) 24) 25)}が、今回の我々の検索の結果のように、同一腫瘍より得られたクローンの中に GFAP の発現量の異なったクローンが存在するこ

とを示した報告はない。

今回検索した glioma では GFAP mRNA のサイズはすべて約 3.5kb で同一であった。これは正常ヒト脳由来 GFAP mRNA のサイズと同一であった。しかし腫瘍細胞における β -actin 遺伝子に point mutation を認めたという Leavitt ら²⁶⁾の報告や腫瘍細胞における γ -actin の point mutation に関する報告²⁷⁾などを考えると今回用いた probe では検出されなかったわずかな変化の存在の可能性は否定できない。今後さらに正常及び glioma 由来の GFAP 遺伝子についての分析が必要と思われる。

株化 glioma 細胞において、継代中に DNA 量が増加するというのを flow cytometry で示した報告がいくつかある^{20) 21) 28)}。Glioma 細胞株における GFAP

遺伝子の存在をみるために我々はこれらの細胞より抽出した高分子 DNA を用いて、Southern blot 分析を行った。その結果、今回用いた 311bp cDNA probe ではこれらの細胞由来 DNA すべてに同様のバンドを認めた。また細胞株間におけるバンドの濃度には著明な差は認められなかった。Lilienbaum ら²⁹⁾は vimentin mRNA 陰性である Burkitt 細胞にも Southern blot 法にて vimentin 遺伝子の存在を報告している。これらのことから培養細胞中にある中間径 filament 遺伝子は継代を続けても比較的保たれていることが推測される。

以上をまとめると今回ヒト GFAP に対する cDNA probe を用いてヒト glioma 細胞株における GFAP 発現について検索した結果、異なる程度の GFAP mRNA を有し、その程度が蛋白の量とはほぼ相関するクローン株の存在を確認した。Southern blot 解析の結果、GFAP 陽性及び陰性例にも genome 中には GFAP 遺伝子が存在していることがわかった。これらの GFAP mRNA 量の異なる株化細胞は今後 astroglia における GFAP 発現の調節をさらに詳細に検討していく上でのモデルとして有用と思われる。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました熊西敏郎教授に深謝いたします。また始終御指導、御協力をいただきました新潟大学脳研究所神経薬理学部門高橋康夫教授、桑野良三先生、崎村建司先生、同脳神経外科学部門鷺山和雄先生、恩田清先生および当部門の諸兄に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Eng, I.F.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28: 351~354, 1971.
- 2) Bignami, A., Dahl, D. and Rueger, D.C.: Glial fibrillary acidic protein (GFA) in normal neural cells and in pathological conditions. In *Adv. Cell Neurobiol* 1: 285~310, 1980.
- 3) Eng, L.F. and DeArmond, S.J.: Immunocytochemistry of the glial fibrillary acidic protein. *Prog Neuropathol* 5: 19~39, 1983.
- 4) Eng, L.F., Smith, M.E., de Vellis, J. and Skoff, R.P.: Recent studies of the glial fibrillary acidic protein. *Ann New York Acad Sci*: 525~537, 1985.
- 5) Osborn, M. and Weber, K.: Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 48: 372~394, 1983.
- 6) Backhovens, H., Gheuens, J. and Slegers, H.: Expression of glial fibrillary acidic protein in rat C6 glioma relates to vimentin and is independent of cell-cell contact. *J Neurochem* 49: 348~354, 1987.
- 7) Lewis, S.A., Balcarek, J.M., Krek, V., Shelanski, M. and Cowan, N.J.: Sequence of a cDNA clone encoding mouse glial fibrillary acidic protein: structural conservation of intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci* 81: 2743~2746, 1984.
- 8) Nishiyama, A., Kuwano, R., Sakimura, K. and Takahashi, Y.: ヒト GFAP の cDNA クローニング. 第29回日本神経病理学会, 1988.
- 9) Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.: *Analyt Biochem* 132: 6~13, 1983.
- 10) Onda, K., Washiyama, K., Tanaka, R. and Kumanishi, T.: 中枢神経系腫瘍の組織培養. 第2回日本組織培養学会秋季シンポジウム抄録集, p. 10, 1987.
- 11) Onda, K., Washiyama, K., Tanaka, R. and Kumanishi, T.: 中枢神経系腫瘍の組織培養— Flow cytometry によるヒトグリオーマ培養細胞の研究. *組織培養研究* 6: 43~48, 1988.
- 12) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294~5299, 1979.
- 13) Thomas, P.S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci* 77: 5201~5205, 1980.
- 14) Blin, N. and Stafford, D.W.: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acid Res* 3: 2303~2308, 1976.
- 15) Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:

- 503~517, 1975.
- 16) Bigbee, J.W., Bigner, D.D., Pegram, C., and Eng, L.F.: Study of glial fibrillary acidic protein in a human glioma cell line grown in culture and as a solid tumor. *J Neurochem* 40: 460~467, 1983.
- 17) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265~275, 1951.
- 18) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680~685, 1970.
- 19) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 76: 4350~4354, 1979.
- 20) Bigner, D.D., Bigner, S.H., Ponten, J., Westermark, B., Mahaley, Jr M.S., Rouslahti, E., Herschman, H., Eng, L.F. and Wilstrand, C.J.: Heterogeneity of genotype and phenotype characteristics of 15 permanent cell lines derived from human glioma. *J Neuropath Exp Neurol* 40: 201~229, 1981.
- 21) McComb, R.D. and Bigner, D.D.: The biology of malignant gliomas—a comprehensive survey. *Clin Neuropathol* 3: 93~106, 1984.
- 22) Dewhurst, S., Stevenson, M., McComb, R.D. and Volsky, D.J.: Expression of glial fibrillary acidic protein in human glioma cell lines as detected by molecular hybridization. *Acta Neuropathol (Berl)* 73: 383~386, 1987.
- 23) Ponten, J. and Westermark, B.: Properties of human malignant glioma cells in vitro. *Medical Biol* 56: 184~193, 1978.
- 24) Wang, E., Cairncross, J.G. and Liem, R.K.H.: Identification of glial filament protein and vimentin in the same intermediate filament system in human glioma cells. *Proc Natl Acad Sci* 81: 2102~2106, 1984.
- 25) Shimbo, Y., Yamazaki, K. and Ikuta, F.: Glial filaments in the subcutaneous tumors of mouse glioma clones differently expressing glial fibrillary acidic protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 74: 1~8, 1987.
- 26) Lin, C-S., Ng, S-Y., Gunning, P., Kedes, L. and Leavitt, J.: Identification and order of sequential mutations in β -actin genes isolated from increasingly tumorigenic human fibroblast strains. *Proc Natl Acad Sci* 82: 6995~6999, 1985.
- 27) Chou, C-C, Davis, R.C., Fuller, M.L., Slovin, J.P., Wong, A., Wright, J., Kania, S., Shaked, R., Gatti, R.A. and Salser W.A.: γ -actin: Unusual mRNA 3'-untranslated sequence conservation and amino acid substitutions that may be cancer related. *Proc Natl Acad Sci* 84: 2575~2579, 1987.
- 28) Collins, V.P.: Cultured human glial and glioma cells. *Int Rev Exp Path* 34: 135~202, 1983.
- 29) Lilienbaum, A., Legagneux, V., Portier, M-M., Dellagi, K. and Paulin, D.: Vimentin gene: expression in human lymphocytes and in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 5: 2809~2814, 1986.

(昭和63年2月25日受付)