

**Involvement of Long Interspersed  
Nucleotide Element-1 Retrotransposition in  
intractable diseases**

(難治疾患における Long Interspersed  
Nucleotide Element-1 レトロトランスポジ  
ションの関与)

2011

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

奥 平 准 之

## 目 的:

Long Interspersed Nucleotide Element-1 (LINE-1 以下 L1) はヒトゲノムの 17 %を占めるレトロエレメントであり、正常細胞で 3-30 回の出生に 1 回の頻度でゲノム内を動き得る (retro-transposition 以下 RTP)。これまでに血友病や筋ジストロフィーをはじめとした伴性劣性遺伝形質を示す疾患、大腸癌や乳癌組織中で大腸癌抑制遺伝子である APC や癌遺伝子である Myc 遺伝子内に L1 が挿入されていることなどが報告されている。最近では、2008 年に L1 の動きと自己免疫疾患に関する新しい知見が報告された。L1-RTP 誘導に関しては、X 線照射による DNA 二重鎖切断によって誘導される報告はあるが、その他の L1-RTP 誘導因子やシグナル経路について詳細な報告はない。今回私は、L1-RTP を誘導する刺激やその L1-RTP 機序について詳細な解析をすることで、L1 の生命機能に果たす役割について考察した。

## 対象と方法:

L1-RTP を解析する対象としては、6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole (FICZ) というトリプトファンが紫外線照射によって産生される化合物と、7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)/12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による発癌モデルを用いた。L1-RTP の解析には、培養細胞株および L1-RTP を解析するレポーター遺伝子を導入した L1 トランスジェニックマウス (L1-Tg) を作製して用いた。

## 結 果:

### FICZ による L1-RTP 誘導機序の解析

FICZ は Picomole レベルという低濃度でも L1-RTP を誘導し、その頻度は  $10^{-4}$  から  $10^{-5}$  程度である事が示唆された。FICZ は aryl hydrocarbon receptor (AhR) リガンド物質であり、CYP1A1 などの遺伝子発現制御は AhR 依存的であるが、L1-RTP は AhR 依存的ではなく AhR 核輸送蛋白質 1 (ARNT1) 依存的に誘導することが示唆された。また、FICZ は mitogen-activated protein kinase (MAPK) と cAMP-responsive element-binding protein (CREB) 依存的に L1-RTP を誘導することが示唆された。さらに、FICZ は L1-encoded open reading frame-1 (ORF1) と ARNT1 を相互作用させ、L1-RTP 誘導時には MAPK 依存的に ORF1 をクロマチンにリクルートさせた。FICZ の L1-RTP 誘導機序はこれまで報告された X 線照射とは異なる機序で誘導されていることも示唆された。L1-Tg に FICZ を投与すると胸腺と脾臓で L1-RTP 誘導が認められた。また、FICZ を投与した L1-Tg において、自己免疫疾患発症に関与する Th17 細胞の転写因子 RoR  $\gamma$  の発現と L1-RTP を誘導した共染細胞数が増加した。

### DMBA/TPA 発癌モデル実験と L1-RTP

L1-Tg に DMBA/TPA を塗布して皮膚癌を形成させ、腫瘍を解析すると 15 個の腫瘍中 13 個で L1-RTP が誘導された。免疫組織化学解析においても、腫瘍マーカーの phosphorylated signal transducer and activator of transcription (p-Stat3) と L1-RTP の指標が共局在していた。DMBA の L1-RTP は AhR、ARNT1 依存的であるが、TPA は AhR、ARNT1 依存的ではないことが示唆された。TPA の L1-RTP は epidermal growth factor receptor (EGFR) と extracellular signal-regulated kinase (ERK) 依存的に L1-RTP を誘導した。

## 考 察：

これまで疾病発症の原因に関して遺伝背景が着目されてきたが、本研究によって環境因子により誘発される L1-RTP が様々な病態に関連する可能性が示唆された。bHLH/PAS ファミリー転写調節因子群の AhR あるいは ARNT1 に依存する L1-RTP は、発癌物質や生体内低分子化合物からの刺激によってゲノム再編機構を誘導し、生命活動に影響していることが示唆された。また、L1-RTP 誘導が自己免疫疾患発症と関連のある T 細胞分化に関与する可能性や、腫瘍形成の一端を担うことが明らかとなり疾患との関連性が示唆された。また、これらの L1-RTP 誘導化合物は、AhR あるいは ARNT1 に依存的な結果であったことから、L1 の挿入部位に化合物特有の指向性がある可能性が示唆された。今後 L1 挿入部位の解析を行い、L1-RTP が生命現象に与える影響について議論を深めたい。

## 結 論：

本研究で L1-RTP 誘導機序は DNA 二重鎖切断によって誘導されるだけでなく、様々な環境因子によって誘導されることを明らかにした。また、化合物によってその L1-RTP 誘導機序は異なるシグナル経路を必要とすることが示唆された。環境因子による L1 のゲノム再編機構は、難治疾患発症の一因になる可能性が示唆された。

## 目 次

1. 実験背景および目的	4
1-1. ヒトゲノムには機能的な内在性レトロエレメントが多く存在する	4
1-2. L1-RTP の分子機序	5
1-3. L1 と疾病との関連性	6
1-4. 研究目的	7
1-5. 疾病発症における環境因子の関与	9
2. 対象と方法	11
2-1. 培養細胞	11
2-2. 化学物質と抗体	11
2-3. L1-RTP の検出法	12
2-4. 各 siRNA の機能評価法	13
2-5. <i>ARNT1</i> と <i>CREB</i> の siRNA resistant プラスミド構築法	14
2-6. Constitutive active CREB ( <i>CREB</i> <sup>Y134F</sup> ) cDNA の作製	15
2-7. siRNA resistant ベクターのトランスフェクションバックの方法	16
2-8. ORF1-TAP ベクターの作製法とクロマチンリクルート解析方法	16
2-9. <i>ARNT1</i> と ORF1 の分子間相互作用の解析法	17
2-10. RT-PCR による <i>CYP1A1</i> の検出法	17
2-11. 定量 RT-PCR による L1 mRNA の検出法	18
2-12. L1 トランスジェニックマウス (L1-Tg) 作製法	19
2-13. L1-Tg の transgene コピー数の解析	20

2-14. DMBA/TPA 2 段階発癌誘導実験の方法 .....	20
2-15. 免疫組織化学染色法 .....	20
2-16. 統計解析 .....	21
 3. 結果 .....	 22
3-1. FICZ は L1-RTP を誘導した .....	22
3-2. FICZ の L1-RTP 誘導機序 .....	22
3-3. ORF1 は L1-RTP 誘導時にクロマチンにリクルートされた .....	26
3-4. FICZ はマウスの胸腺、脾臓で L1-RTP を誘導した .....	27
3-5. 非遺伝毒性物質 TPA は ERK 依存的に L1-RTP を誘導した .....	27
3-6. 遺伝毒性物質の DMBA は AhR と ARNT1 依存的に L1-RTP を誘導した .....	28
3-7. L1-Tg マウスに形成させた腫瘍は L1-RTP が誘導されていた .....	28
3-8. TPA 標的遺伝子に L1 の挿入はなかった .....	30
3-9. 発癌作用のある化合物は AhR 依存的に L1-RTP を誘導した .....	30
 4. 考察 .....	 31
4-1. FICZ、DMBA、TPA の L1-RTP 誘導機序について .....	31
4-2. bHLH/PAS ファミリーと L1-RTP について .....	31
4-3. 自己免疫疾患と L1 について .....	32
4-4. 発癌と L1 について .....	33
4-5. 環境因子とレトロエレメントにより誘発される生命現象について .....	34

5. 謝辞	.....	36
6. 図表の説明	.....	37
7. 参考文献	.....	52
8. 図表	.....	65

## 1. 実験背景および目的

### 1-1. ヒトゲノムには機能的な内在性エレメントが多く存在する

これまでの生命科学研究は、主として蛋白質をコードする遺伝子とその機能解析が行われてきた。2001 年にヒトゲノムの全配列が発表され、興味深いことが明確になった[1]。即ち、ヒトゲノム全配列中の蛋白質をコードする領域は約 1 %にすぎず、「動き回り得る遺伝子」(TP 遺伝子：トランスポゾン) が半分近くを構成している事が明らかになった[1]。ヒト TP 遺伝子では全ゲノムの約 45 %を占め、マウス TP 遺伝子 (39 %) よりも多い [1-3]。中でも 1 細胞中に約 52 万コピー (全ゲノムの約 17 %) 存在する Long Interspersed Nucleotide Element-1 (LINE-1 以下 L1) は特徴的で[1, 4]、その内の 80-100 コピーは正常細胞中で 3-30 回の出生に 1 回の頻度でゲノム内を動き得る (retro-transposition 以下 RTP) [5]。L1 のゲノムへの挿入によりゲノム構造や細胞内遺伝子発現様式は変化し[6]、出現した新しい形質はゲノム内に保存され次世代に伝播される。最近では L1-RTP が胎生期の神経幹細胞の分化多様性に必要なこと[7-9]、成体マウスでは環境変化によって脳組織で L1-RTP が誘導されることが報告された[10]。さらに、ヒト正常組織での L1 は精巣や胎盤の一部の細胞で発現していることが報告された[11]。これらは、L1 が哺乳類の高次生命機能の発達に重要な役割を果たすことを幹細胞および体細胞で示唆する報告である。

また、ヒトの L1 は全長に近い形で 650 万年前から良く保存されてきたが、同じ哺乳類のチンパンジーの L1 は極端に短く、様々なグレードに分岐してきた[12]。即ち、チンパンジーでは、L1 が排除される傾向にあるのに対してヒトでは良く保存されてきた。さらに L1 は転移することで、L1 配列間での組換えにより遺伝子構造の変化が生じることから生物進化の促進因子として報告された[13]。このような様々な観点から L1-RTP



について生物進化の駆動力となって機能している可能性が指摘されており、ヒト L1 が私たちの生体内でも機能性を保持して生命現象に深く関与している[13]。

## 1-2. L1-RTP の分子機序

図 1 に L1 の構造を示した。L1 は全長約 6 kB からなり、約 900 塩基の 5' 側プロモーター領域 (UTR: untranslated region) と 2 つの蛋白質をコードする ORF1 および ORF2 (ORF: open reading frame)、及び約 200 塩基の 3' 非翻訳領域に加えてポリ A 付加シグナル配列領域を含む[14-17]。L1 は自身の mRNA を転写、逆転写し、ゲノム上に挿入するコピー&ペーストで L1-RTP を成立させる。L1 は自身の 5' UTR 上の RNA pol II プロモーターより転写され、ORF1、ORF2 が翻訳される。合成された L1 蛋白質は自身の RNA と複合体 (RNP) を形成し、核内へと移行する。次に、ORF2 のエンドヌクレアーゼ活性によってゲノム上の 3'-A/TTTT-5' 配列部位が切断される。L1 mRNA 上の polyA テールが切断部位の polyT ストレッチにアニールし、ORF2 の逆転写が開始される。最後に、2<sup>nd</sup> スtrand が合成されゲノムに挿入されると L1-RTP は完了する[17, 18]。この様な L1-RTP の機構は、Target primed reverse-transcription (TPRT) と呼ばれ、カイコのレトロトランスポジションについて明らかにされていた (図 2) [19, 20]。しかし、L1 の転写後調節機構については明確な報告はない。

L1-RTP は DNA 二重鎖切断 (DNA double strand break 以下 DSB)、金属イオンによる酸化ストレスや L1-5' UTR の脱メチル化で誘導されることが知られている[21-24]。特に、放射線 (γ 線) は L1-RTP を誘導する代表的な誘導因子であるが、DNA 損傷誘導のエトポシド、シスプラチン、カンプトテシンでは顕著な L1-RTP は誘導されない[22]。放射線による L1-RTP 誘導機序については Ataxia telangiectasia mutated (ATM) とい

う DSB 応答において中心的な役割を果たす因子に依存して L1-RTP が誘導されることが報告された[21]。また、Ramos KS らは、環境汚染物質の benzo(a)pyrene (B[a]p) が DNA 損傷によって L1-RTP を誘導することを報告したが[25]、どのような機序で DNA 損傷が誘導され L1-RTP を誘導したのかは明らかにされていない。内在性の L1 は、高度にメチル化修飾を受けており、発現は抑制された状態にあることも報告された[26-28]。胎生期の神経幹細胞では、未分化マーカーの Sox2 や DNA メチル化因子の MeCP2 の発現が低下すると L1 が転移されやすくなることが報告された[7, 8]。このように、様々な因子やメチル化修飾によって L1-RTP は誘導されるが、そのシグナル機序について明確な報告はない。L1-RTP が生じるとゲノム構造変化が誘導され近傍遺伝子の発現に影響し突然変異が生じるが、その仕組みに関する報告はない[29-31]。本研究では特に体細胞における L1-RTP シグナル機序に着目し、ヒトの生命現象における L1-RTP と環境要因によって誘発される L1-RTP の役割を明らかにした。

### 1-3. L1 と疾病との関連性

L1 は血友病 A の原因遺伝子である血液凝固第Ⅷ因子に L1 の転移が認められたことで発見されたレトロエレメントである[32]。血友病以外の先天性異常疾患として、筋ジストロフィーをはじめとした伴性劣性遺伝形質を示す疾患に L1-RTP が関与していることが報告された[33]。また、大腸癌や乳癌組織中で大腸癌抑制遺伝子である APC や癌遺伝子である Myc 遺伝子内に L1 が挿入されていることも報告された（表 1）[34, 35]。発癌との関連では、腫瘍細胞の L1 の 5' UTR が脱メチル化状態になっていることや L1 の発現を抑制すると腫瘍細胞の増殖や分化能が低下することが知られていた[36]。最近では、ゲノム中の反復配列の一種であるサテライト DNA を過剰発現すると L1 の発現も上

昇し、上皮癌形成との相関性があることが報告された[37]。このように、発癌過程で L1 が転移することや L1-RTP が発癌に関与することを示唆する報告がある。

一方、2008 年に L1 の動きと自己免疫疾患に関する新しい知見が報告された[38]。正常細胞には内在性レトロエレメントに由来した DNA を処理する作用が存在し、これが破綻すると ssDNA などの余剰の核酸によって I 型インターフェロンの産生と細胞傷害が誘導され、自己免疫疾患の発症誘因となる可能性が考えられる。自己免疫疾患発症には Th17 という CD4 陽性細胞から転写因子 RoR $\gamma$  や IL-6、TGF- $\beta$  などによって分化誘導される T 細胞サブセットが重要な役割を果たすことが知られている[39, 40]。実際、自己免疫疾患患者では、Th17 が患部に集積されることが報告されている[41]。また Th17 を分化誘導する化合物として 6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole (FICZ) が知られている[42, 43]。このように、L1-RTP が種々の疾病発症に関与している可能性が示唆されているが、その L1 が転移する分子機序に関しての報告はない。特に、生活環境における環境因子がどのように L1-RTP 誘導に関与するかは全く明らかになっていない。

#### 1-4. 研究目的

このように L1-RTP が誘導される機序や L1 の転移メカニズムに関しては殆ど明らかにされていない。私は、特に発癌や自己免疫疾患と L1 の関連性について興味を持ち以下の実験を行った。L1 が発癌ステップのどの段階に影響を与えているのか、自己免疫発症と低分子化合物の L1-RTP 誘導との関連性について考察した。

##### a. 発癌における L1-RTP の関与

癌研究で良く解析されてきた実験発癌である 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DM-BA) /12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 誘発モデルがある[44]。DMBA は

Ha-ras のコドン 61 (A→T) に変異を誘導する[45]。TPA を繰り返しマウスの皮膚に塗ると epidermal growth factor receptor (EGFR) 、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 、signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) という因子が活性化することが知られている[46-49]。また、マウスの遺伝的背景に着目すると、DBA/2 マウスは TPA に感受性の高い系統だが、C57BL/6 は感受性の低い系統であることが知られている[50-54]。しかし、TPA がどのような機序で細胞の形質転換を誘導し細胞の癌化を促進させるのか報告はない。本研究では L1 の transgene を導入した L1 トランスジェニックマウス (L1-Tg) を作製して、L1-Tg に腫瘍を形成させ腫瘍組織における L1-RTP 誘導の有無を解析する。

#### b. FICZ の L1-RTP 誘導機序

FICZ は basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim (bHLH/PAS) の転写因子に含まれる芳香族炭化水素受容体 (AhR) のリガンド物質である[55-59]。FICZ はトリプトファンが紫外線照射を受けて生成される化合物であり、これまでにヒト尿中から検出された報告がある[60]。FICZ は AhR 依存的に薬物代謝酵素の CYP1A1 の mRNA を発現することが知られている[61]。一方、FICZ が AhR 依存的に Th17 という自己免疫疾患に関わる T 細胞サブセット産生に関与し、炎症反応を誘導するという報告がある[42, 43]。このように、FICZ は生体内で産生される可能性があり、また疾病発症に関与することが示唆される。そこで、本研究では FICZ の L1-RTP 誘導能に関して培養細胞系を用いて詳細に解析し、L1 が転移するシグナル機序を明らかにする。

#### c. bHLH/PAS ファミリー蛋白質と L1-RTP

DMBA、TPA、FICZ の実験の結果、bHLH/PAS ファミリー分子を介して、L1-RTP が誘導されることが示唆された。bHLH/PAS ファミリーはバクテリアからヒトまで生物界で広

く存在し、生理学や発生上重要な過程において様々な機能をもつことが知られている[56]。例えば、環境汚染物質ダイオキシン(TCDD: 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)によって活性化される AhR は AhR 核輸送因子 (ARNT1) とヘテロダイマー (AhR complex; AHRC) を形成する[62]。ARNT1 の核移行シグナルに依存して AHRC は xenobiotic response element (XRE) に結合し、CYP1A1 の mRNA を発現することが知られている[60]。AhR/ARNT1 以外の bHLH/PAS タンパクファミリーとして、発癌による低酸素状態に関与することが知られている Hypoxia inducible factor (HIF)、神経発達に関わる Single-minded (SIM)、日概リズムに関わる clock が知られている[56]。特に ARNT1 は AhR ばかりでなく、HIF や SIM とヘテロ二量体を形成し、肝機能や酸素状態の調節、神経発達に影響し、自身の核移行シグナル (NLS) によって様々な因子を核に移行させ、遺伝子発現制御を行う[63]。このように bHLH/PAS タンパクファミリーは様々な生命現象に関わっている。本研究では DMBA、TPA、FICZ に関する L1-RTP 誘導機序について bHLH/PAS ファミリーの AhR と ARNT1 に着目して実験を進める。L1 と bHLH/PAS ファミリーは共に、多機能な生命現象に関わっている。AhR と ARNT1 は様々な環境因子やウイルスを認識する核内レセプターであり[62]、環境因子によって誘導される L1-RTP と密接に関連する可能性がある。私はトランスポゾンという現象が私たちの生命現象に果たす役割や正常体細胞における自己免疫疾患発症と発癌への影響について明らかにしたい。

#### 1-5. 疾病の発症における環境因子の関与

本研究では、自己免疫疾患発症と発癌メカニズムについて L1 と bHLH/PAS ファミリー蛋白質を中心に議論を進める。疾病は遺伝背景と環境要因によって誘発されるが、環境因子の役割は殆どが不明である。L1 の転移と疾病発症の関連性を明らかにすることが

本研究における重要な点である。L1 が転移する機構を明らかにすることで、ゲノム再編機構の仕組みや環境因子のターゲット遺伝子を明らかにする。ヒトゲノムが環境因子によって再編され、その再編が遺伝背景に影響しながら疾病発症に関与することを全く新しい視点から病態を理解するために、L1-RTP の検出システムとその機序を明らかにすることは意義深い。将来的には、生物進化と L1 および bHLH/PAS ファミリーの機能的連関について解析を行いたい。具体的には、ヒトの L1 だけでなくマウスや zebrafish 等の L1-RTP 機序の解析を行うことで生物種ごとの L1 の役割を明らかにし、L1 本来の機能を明確にしたい。

## 2. 対象と方法

### 2-1. 培養細胞

HuH-7 (a human hepatocellular carcinoma cell line)、HeLa (a cervical carcinoma cell line)、HEK293T (a human cell line derived from fetal kidney with exogenous expression of SV40 T antigen)、MCF-7 (human breast adenocarcinoma cell line) は 10 % 牛胎児血清 (FCS) (Sigma, St, Louis, MO, USA) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 濃度で培養した。それぞれの細胞の遺伝子導入率は、細胞に EGFP 発現ベクターをトランスフェクションし 48 時間後に FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて解析した。その結果、HuH-7, HeLa, HEK293T, MCF-7 はそれぞれ 70 %, 30 %, 80 %, 30 % であった。

### 2-2. 化学物質と抗体

FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole, Enzo Life Sciences. Inc, NY, USA)、DMBA (12-dimethylbenz[*a*]anthracene, Sigma)、TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, Sigma)、SP600125 (Sigma) [64]、SB202190 (Sigma) [65]、PD, 98, 059 (Sigma) [66]、CL387, 785 (Sigma) [67]、プロテアーゼ阻害剤 (Roche, Basel Schweiz)、リン酸化阻害剤 (Merck, Darmstadt, Germany) を使用した。細胞培養に使用した薬剤は G418 (Sigma)、Hygromycin (Sigma)、Puromycin (Sigma)、Zeocin (Invitrogen) である。それぞれの培養細胞で薬剤効果を検討後使用した。抗体は、aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、AhR nuclear translocator-1 (ARNT1)、ARNT2 (Santa Cruz Biotechnology)、 $\beta$ -tubulin (Thermo Scientific, CA, USA)、 $\gamma$

H2AX (リン酸化抗体) (Millipore, MA, USA)、H2AX (Millipore)、cAMP response element binding protein (CREB)、p-CREB (リン酸化抗体)、CCAAT-enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP- $\beta$ )、p-C/EBP- $\beta$  (リン酸化抗体)、c-Jun, p-c-Jun (リン酸化抗体)、p38、p-p38 (リン酸化抗体)、Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)、p-Stat3 (リン酸化抗体) (Cell Signaling Technology, MA, USA)、ERK、p-ERK (リン酸化抗体)、JNK、p-JNK (リン酸化抗体) (Santa Cruz Biotechnology)、FLAG (Sigma)、EGFP (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)、EGFP (Abcam Cambridge, Cambridge, the United Kingdom)、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Trevigen, MD, USA) を一次抗体として用いた。マウス、ウサギ、ヤギ IgG、の HRP 標識したものを二次抗体に使用した。

### 2-3. L1-RTP の検出法

pCEP4/L1mneoI/ColE1 (pL1-Neo<sup>R</sup>) のレポーター遺伝子を Nicolas Gilbert 氏 (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA) から供与いただき、L1-RTP を検出するコロニーアッセイに用いた[68]。pL1-Neo<sup>R</sup> は L1-RTP が生じるとネオマイシン耐性の細胞集団を形成する。同じく L1-RTP を検出する pEF06R のレポーター遺伝子を Luning Prak 氏 (University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, PA, USA) から供与していただいた[22]。pEF06R は L1-RTP が誘導される際に EGFP が発現するシステムである。pEF06R による L1-RTP 検出法には *EGFP* の exon 領域にプライマーを設計することにより PCR で高感度に検出するシステムを確立させた(図 3)。まず、L1-RTP が誘導された領域を特異的に検出するために、*Pst*I で処理した DNA を PCR 増幅した。PCR プライマーは 5' < ACTGGGTGCTCAGGTAGTGGTT > 3' と 5' < GAAGAACGGCATCAAG-



-GTGAA<3'を用いた。PCR増幅には Ex Taq (TAKARA, Shiga, Japan) を用いて、94 °C15 分で処理した後に、94 °C30 秒、68 °C15 秒を 28-32 のサイクル数で増幅した。インターナルコントロールとして  $\beta$ -actin の PCR 増幅を行った。プライマーは 5' <TGAACCCC-  
-AAGGCCAACCGC<3 and 5' <TTGTGCTGGGTGCCAGGGCA<3' を用いた。PCR 反応は、94 °C5 分で処理した後に、94 °C30 秒、62 °C30 秒、72 °C1 分を 20 サイクル行った。PCR 産生物は、アガロースゲルで泳動し、SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Basel, Schweiz) で染色したものを FX-PRO PLUS (BIO-RAD) 用いて検出した。Relative intensity は EGFP と  $\beta$ -actin のシグナル強度を算出した。

#### 2-4. 各 siRNA の機能評価法

各 siRNA は Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) に合成していただいた。3 つの配列をそれぞれの遺伝子について用意し、ウェスタンブロットを用いて siRNA のノックダウン効果を評価した。siRNA 配列の詳細は表 2 に示した。細胞は HuH-7 と MCF-7 を用いた。siRNA 導入試薬は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) と oligofectamine (Invitrogen) を用いた。導入方法は、各 siRNA を 16 pM-50 nM を 100  $\mu$ l の Opti-MEM (Invitrogen) に入れたものと、90  $\mu$ l の Opti-MEM と 10  $\mu$ l の Lipofectamine 2000 を混合したものを siRNA と混ぜ合わせそれを 10 cm プレートに添加した。添加後 4 時間で培養液を変えた。添加後 1-6 日で細胞を回収し細胞溶解液を作製した。回収した細胞を PBS(-) で 1 度洗い、その細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.6)、150 mM NaCl、0.1 % SDS、0.5 % デオキシコール酸ナトリウム、1 % Nonidet P-40、プロテアーゼ阻害剤) と混ぜた。その後、Bioruptor (UCD-250; Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いて sonication (12 分 30 秒 (10 秒 on, 20 秒 off) , (high level 250 W)) を 4°C で行い、

16,000 gで10分遠心後、上清を細胞溶解液とした。蛋白質定量は、BCA protein assay reagent kit (Thermo Scientific)を用い、定量後にウエスタンブロット (Western blotting 以下 WB)を行った。検出は2次抗体にペルオキシダーゼ標識したものをを用い、発色試薬はECL plus western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, USA)を用いた。

## 2-5. ARNT1 と CREB の siRNA resistant プラスミドの構築法

ARNT1 と CREB の cDNA はそれぞれ Oliver Hankinson 氏 (Jonsson Comprehensive Cancer Center, University of California, Los Angeles, CA, USA) [69] と Kumiko Saeki 氏 (National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan) [70] から供与していただいた。それぞれの cDNA を pcDNA3.1 Zeo に組み込み、cDNA の 5' 末端に *NheI*-Kozak sequence ATG-3×Flag-*XbaI* (pFlagZeo) となるように設計した。まず、ARNT1 の siRNA resistant cDNA (pSiR-ARNT1) の作製のために、ARNT1-F/*XbaI* primer (5'-AAATCTAGAA-TGGCGGCGACTACTGC-3') と ARNT1-R/*BamHI* primer (5'-AAGGATCCCTATTCTGAAAAGGGGGGAAAC-3') を用いて PCR 増幅した。*XbaI*-*BamHI* で DNA を処理し、これを pFlagZeo (pFlag-ARNT1) に組み込んだ。また、ARNT1 の cDNA の *KpnI* フラグメント 5'-tcagcagtcttccatgagaatgtgtatgggctcaaggagatcgtttatttgccgaatgaggtgtggcagtagctctgtggacc cGgtCtcCgtCaaCaggc-3' (sense 鎖のみ表記) は ARNT1 の siRNA-1 のターゲットサイトであり、これを pBluescriptII/KS+ vector (pKSII, Stratagene, CA, USA) にサブクローニングした (pKSII/ARNT1/*KpnI*)。pKSII/ARNT1/*KpnI* の *BbsI* と *BlpI* のサイトに挿入し、最後にこれを pFlag-ARNT1 に組み込んだ。

siRNA-resistant CREB の cDNA (pSiR-CREB) の作製には、まず、pFlagZeo の *XbaI*-*BamHI*

サイトに同じ制限酵素で切り出した *CREB* cDNA を組み込んだ (pFlag-*CREB*)。さらに、(5'-gcagtggacagtatatattgccattacccagggaggagcaatacagctCgcCaaTaaCggtac-3' sense 鎖のみ表記) を pFlag-*CREB* の *XcmI* と *KpnI* サイトにいれ、pSiR-*CREB* とした。いずれの発現ベクターも制限酵素マップと DNA シークエンスで構築したプラスミドができていることを確認した。

## 2-6. Constitutive active *CREB* (*CREB*<sup>Y134F</sup>) cDNA の作製

Constitutive active *CREB* は *CREB* の 134 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換することで作製する (p*CREB*<sup>Y134F</sup>)。作製法は、pFlag-*CREB* をテンプレートに QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いる。まず、*DpnI* でプラスミドを処理し、Pfu Turbo DNA polymerase を用いて 5'-gaggccttcctTcaggaaaattttgaatgactta-tcttctg-3' と 5'-cagaagataagtcattcaaaattttcctgAaggaaggcctc-3' で PCR 増幅した後、PCR 産物をバクテリアにレスキューさせた。Positive clone の 134 番目のコドンが tAc のかわりに tTc になっていることをシークエンスで確認した。この p*CREB*<sup>Y134F</sup> が機能していることをルシフェラーゼアッセイで確認した。pGL3 enhancer (pCRE-luc; Promega, WI, USA) に cAMP-responsive element (CRE) の 5'-CTCGGGGGCGCCTCCTTGGC-TGACGTCAGAGAGAGAGC-3' を組み込みレポータープラスミドとした。HuH-7 細胞に pCRE-luc を導入し、*Renilla reniformis* luciferase (Promega) を添加して解析した。Positive コントロールとしてヒトの TNF- $\alpha$  (R&D Systems, MN, USA) 40 ng/ml を 48 時間作用させた。ルシフェラーゼ活性は *Renilla reniformis* luciferase で標準化した。

## 2-7. siRNA resistant ベクターのトランスフェクションバックの方法

pL1-Neo<sup>R</sup> あるいは pEF06R を導入してから 3 日目に siRNA を導入し、その次の日に pSiR-*ARNT1* あるいは pSiR-*CREB* を Lipofectamine 2000 で導入してから 24 時間後に細胞を再度プレートにまいた。コロニーアッセイは FICZ を 2 日間作用させた後に G418 (800  $\mu$ g/ml) 選択を開始した。

## 2-8. ORF1-TAP ベクターの作製法とクロマチンリクルート解析方法

ORF1-TAP (tandem affinity purification) の TAP tag cDNA[71] は pZome-1-C の *BamHI-EcoRI* サイトから切り出し、pcDNA3.1 Zeo (pcDNA/TAP) の同様のサイトに組み込んだ。次に、コドン適合化した Human ORF1 は pBudORF1<sub>syn</sub>[72] をテンプレートに *KpnI-BamHI* を含んだプライマーで PCR 増幅し、同様のサイトで pcDNA/TAP に組み込んだ (ORF1-TAP)。コントロールベクターの EGFP-TAP は、pBOSH2BGFP-N1[73] から *KpnI-BglIII* サイトで増幅し、これを pcDNA/TAP の *KpnI-BamHI* サイトに挿入した。2 つのプラスミドは制限酵素マッピングとシーケンスにより確認した。ORF1-TAP および EGFP-TAP を HuH-7 にトランスフェクションしてから 2 日後に細胞を回収し、Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Scientific) を用いてクロマチン分画を解析した。クロマチン分画を抽出する際に、核不溶性画分を 10 mM PIPES (pH 6.5)、1 mM EDTA、300 mM NaCl の緩衝液で 3 回洗った。その後、300 U micrococcal nuclease (Thermo Scientific) で 37°C 30 分間処理し、16,000×g で 10 分間遠心後の上清をクロマチン分画とした。TAP-tag は horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA) で検出した。クロマチン分画のコントロールには H2AX を用いた。

## 2-9. ARNT1 と ORF1 の分子間相互作用の解析法

ORF1-EGFP 発現ベクターを作製法は、pBOSH2BGFP-N1 の EGFP cDNA を *Bam*HI-*Not*I サイトを含むプライマーで PCR 増幅し、同様のサイトで pcDNA3.1Zeo に組み込んだ (pcDNA/EGFP)。次に、コドン適合化した ORF1 を pcDNA/EGFP の *Kpn*I-*Bam*HI サイトに組み込んだ (ORF1-EGFP)。コントロールベクターの Flag-streptag-EGFP (pFS-EGFP) の作製法は streptag のアミノ酸配列 (-WSHPQFEK-WSHPQFEK-M-) を pFlag-CMV2 (Sigma) に入った後に、EGFP cDNA を挿入した。2 つのプラスミドは制限酵素マッピングとシーケンスにより確認した。HuH-7 細胞に pFS-EGFP あるいは pORF1-EGFP を導入後、FICZ 10 nM あるいは 0.001 % DMSO を 24 時間作用させてから細胞を回収した。細胞は免疫沈降 (IP: Immunoprecipitation) buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、0.5 % NP-40、and 10 % glycerol) で 30 分間氷中に置き、Bioruptor (UCD-250; Cosmo Bio) を用いて sonication (12 分 30 秒 (10 秒 on、20 秒 off) , (high level 250 W) ) を 4°C で行い、さらに氷中で 30 分間置き、16,000 g で 10 分遠心後、上清を細胞溶解液とした。IP には細胞溶解液を 500  $\mu$ g 用い、抗体は  $\alpha$  ARNT1 と  $\alpha$  EGFP を 4  $\mu$ g 用いた。この免疫複合体を protein G beads (GE Healthcare) で回収した。Input は IP に使用した 10 分の 1 量の蛋白質を用いた。

## 2-10. RT-PCR による CYP1A1 の検出法

HuH-7 細胞に FICZ を 10 nM で 6 時間作用させた後に細胞を回収して RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて回収した。RNA 抽出過程において、ゲノム DNA を完全に除去するために RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いてゲノム DNA を除去した。RNA の逆転写反応には RNA 350 ng を用い、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied

Biosystems)を用いた。合成した cDNA を Ex Taq を用いて、94 °C で 15 分変性後、94 °C 15 秒、60 °C 25 秒、72 °C 30 秒を 20 サイクル行い増幅した。Human CYP1A1 の検出プライマーは 5'-TAGACACTGATCTGGCTGCAG-3' と 5'-GGGAAGGCTCCATCAGCATC-3' を用いた。

## 2-11. 定量 RT-PCR による L1 mRNA 検出法

RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて回収した。RNA 抽出過程において、ゲノム DNA を完全に除去するために RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いてゲノム DNA を除去した。cDNA の合成には、random hexamers あるいは oligo-dt を用い、また逆転写反応には Omniscript RT Kit (Qiagen) を用いた。DNA 増幅には、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を使い、検出器は 700 Sequence Detection system (Applied Biosystems) を使用した。全てのデータは  $\beta$ -actin で標準化した。使用した各プライマーを以下に示した。内在性 ORF2 の mRNA 検出プライマーは、L1-EGFP+5653F (5'-CCAAATGTCCAACAATGA-TAGACTG-3') L1-EGFP+5762R (5'-CCATGTCCCTACAAAGGATATGAAC-3')、mRNA EGFP プライマーは L1-EGFP+6342F (5'-TAGTGGTTGTCGGGCAGCAG-3') / L1-EGFP+7351R (TTCAAGATCCGCC-ACAACATC-3') あるいは L1-EGFP+7222F (5'-TGGAAGCTGGGTGTGTAGTTATCTG-3') / L1-EGFP+7365R (5'-GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATC-3') を用いた。pEF06R の 3' CMV プロモーター領域のプライマーは L1-EGFP+8245F (5'-TGGCATATGATACACTTGATGTACTGC-3') / L1-EGFP+8349R (5'-TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG-3') を用いた。 $\beta$ -actin のプライマーは、h-ACTB-F (5'-GAGTACTTGCCTCAGGAGGA-3') / h-ACTB-R (5'-CATTGCCGACAGGATGCA-3') を使用した。サンプルは N=3 で行い、mRNA は  $\beta$ -actin で補正した。次に、pEF06R では antisense の mRNA が産生され、L1 の mRNA レベルの測定感度が悪いので、pEF06R の 3' 側の CMV を削ったプラスミド (pEF06R  $\Delta$  3' CMV) を作製した。pEF06R の *Bam*HI で処理

すると pEF06R の 5'UTR から polyA 領域まで切り出した。これを pBSII ベクターの *BamHI* サイトに pEF06R の *BamHI* フラグメントを組み込み、さらに *HindIII* で処理すると 3' CMV 領域が切り出せその後にセルフライゲーションし pL1-EGFP Δ3' CMV を作製した。最後に、*NotI*-*ApaI* で pBSII に入った pL1-EGFP Δ3' CMV を切り出し、pcDNA3.1 Hygro の同様のサイトに組み込み 5' UTR の上流に CMV プロモーターが付いた発現ベクターを作製した。

## 2-12. L1 トランスジェニックマウス (L1-Tg) 作製法

*NotI*-*ApaI* サイトで切り出せる pEF06R の DNA フラグメント (図 4) を BDF1 (♀) × C57BL/6N (♂) マウスの前核受精卵 (日本 SLC, Hamamatsu, Japan) にマイクロインジェクションで打ち込んだ[74]。Transgene の有無は 5' -CATTGGGCTGGAGTAGATT-3' と 5' -AAGGAGGACGGCAACAT-3' のプライマーセットによる PCR 増幅で確認した。得られたファウンダーマウス (F1) は C57BL/6Ncr (日本 SLC) と交配させた。17 系統の独立したトランスジェニックマウスが得られ、生育段階で自然発生的に L1-RTP が誘導されずに、X 線照射で L1-RTP が誘導される系統を選別するためにスクリーニングを行った[22]。スクリーニング法は各系統の F1 マウスのマウス胎児線維芽細胞 (MEF: Mouse Embryonic Fibroblast) で初代培養を行い、4.5 Gy の X 線照射後 6 日間培養した後に L1-RTP の PCR 解析を行った。解析の結果、#66 や #24 の系統は自然発生的に強く L1-RTP が誘導されており、また #58 や #74 は MEF の段階で L1-RTP は誘導されていないが X 線照射を行っても L1-RTP は誘導されなかった (data not shown)。このスクリーニングの結果から MEF の段階で L1-RTP が誘導されずに X 線照射で L1-RTP が誘導された 4 つの系統 (#4, #67, #53, #84) がとれた。この 4 系統の中から #4 と #67 の系統で L1-Tg の実験を行った。

### 2-13. L1-Tg の transgene コピー数の解析法

解析方法はサザンブロットと定量-PCR を用いて測定した (図 4、表 2)。定量-PCR 法は以下のプライマーセットを作製 (5'-TACAGGGTTCATGGTGGCAAGA-3' と 5'-GGGCACAAGC-TGGAGTACAACCTA-3') した。標準化に用いた遺伝子は、Zfat 遺伝子でマウスのゲノムに 1 コピー含まれている [75]。Zfat のプライマーは 5'-TGCCAAATGCATTACCATCC-3' と 5'-CAAAGCTGAGTTCCTTCTGG-3' を用いた。使用した機器と試薬は、7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems)、FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) と EGFP プライマーを用いた。全てのデータは Zfat 遺伝子で標準化し、#4 と #67 系統 L1-Tg のコピー数を測定した。

### 2-14. DMBA/TPA2 段階発癌誘導実験の方法

L1-Tg マウスの体毛を剃り、皮膚にアセトンで希釈した 400 nmol の DMBA 200  $\mu$ l を皮膚に塗った。7 日後にアセトンで希釈した 17 nmol の TPA 200  $\mu$ l を皮膚に塗り、DMBA を塗った以降、週 2 回 TPA を皮膚に塗る作業を継続して行った [44]。これを 36 週続けると腫瘍が形成されはじめた。その腫瘍からゲノム DNA あるいは組織固定を行い L1-RTP の解析を行った。

### 2-15. 免疫組織化学染色法

組織固定には Zamboni 固定液 (0.1 M pH7.4 リン酸緩衝液、4 %パラホルムアルデヒド、0.2 %ピクリン酸) を用いた。固定した組織から OCT compound で凍結ブロックを作製し、クライオスタット (Leica Wetzlar, Germany) で 5  $\mu$ m の凍結切片を作製した。その切片を PBS で 10 分間洗浄後、20 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl、0.03 % Triton



X-100 (TBS-T)で 5 % 牛アルブミン (BSA : Bovine serum albumin) 溶液を作製し室温で 1 時間ブロッキングした。次に 1 % BSA で希釈した EGFP 抗体 (1 : 10000 rat monoclonal) と p-Stat3 抗体 (1:10000 rabbit polyclonal) を 4℃で 2 日間反応させる。2 日後、TBS-T で 10 分 3 回洗浄後に 1 % BSA で希釈した Alexa Fluor 555 (rabbit) (Invitrogen) と Alexa Fluor 488 (rat) (Invitrogen) を 4℃で 24 時間反応させた。細胞の核染色には Hoechst 33258 (Invitrogen) (1:10000, 終濃度: 0.36  $\mu$  M) を室温で 1 時間反応させ染色した。染色した切片の検鏡には蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX50、Tokyo、Japan) を用いた。

## 2-16. 統計解析

有意差検定にはノンパラメトリック法の Mann-Whitney 解析を用いた。 $P < 0.05$  で有意差有りとした。

## 結 果

### 3-1. FICZ は L1-RTP を誘導した

従来から L1-RTP の解析に用いられているコロニーアッセイで、FICZ の L1-RTP 誘導能を評価した。実験に用いたプラスミド pL1-Neo<sup>R</sup> および実験スケジュールは図 5A に示した。その結果、HuH-7 および HeLa 細胞を用いた実験により 100、10、1 nM FICZ (図 5B、列 3-5, 8-10;  $P < 0.02$ ) を作用させると L1-RTP は誘導された。同濃度における FICZ の細胞毒性がないことは (図 5C) に示した。また、PCR 解析でも FICZ の L1-RTP 誘導の有無を確認した。プラスミドは pEF06R を使用し、プラスミドマップは (図 3) に示した。EGFP のエクソン領域にプライマーを設計し、PCR 反応を行う前に制限酵素 *PstI* 処理をすることで、L1-RTP が誘導されたときに 140 bp のバンドが特異的に増幅するようにした。(図 6A) には L1-RTP を誘導した細胞からゲノム DNA を抽出し、*PstI* 処理しないものと処理したものを PCR 増幅したときの泳動パターンを示した。インターナルコントロールには  $\beta$ -actin を用いた。pEF06R を用いたときの実験スケジュールを (図 6B) に示した。pEF06R による PCR 解析も HuH-7 と HeLa 細胞を用いて行い、FICZ は 10 nM で 1、2、4、6 日とタイムコースをとって L1-RTP 誘導能を解析した。その結果、1 日以内に FICZ は L1-RTP を誘導することが示唆された (図 6C)。また、FICZ の L1-RTP を誘導する頻度は  $10^{-4}$  から  $10^{-5}$  であることが示唆された (図 6D)。さらに、PCR 解析から FICZ は Pico mole レベル (3 pM) でも L1-RTP を誘導した (図 6E)。

### 3-2. FICZ の L1-RTP 誘導機序

FICZ は AhR のリガンドとして知られている化合物である [55-59]。そこで、培養細胞を用いて AhR の阻害剤または siRNA でノックダウンしたときに FICZ の L1-RTP が抑制さ

れるのか否か解析した。AhR の阻害剤には、3'-methoxy-4'-nitroflavone (MNF)を用いた[76]。pEF06R を導入した HuH-7 細胞に、10  $\mu$  M MNF で 30 分間処理した後に FICZ を添加しても L1-RTP は抑制されなかった(図 7A)。MNF の効果は RT-PCR を用いて、FICZ によって誘導される CYP1A1 の mRNA レベルが抑制されたことから、使用した MNF は機能していた(図 7B)。次に、10 nM AhR の siRNA を用いて FICZ の L1-RTP 誘導能を評価した。まず、AhR の 3 つの siRNA が機能するか否か WB で評価した。1, 2, 3いずれの AhR siRNA も、HuH-7 の AhR のタンパクレベルを 20 %以下に抑えた(図 8A, B)。1 と 3 の AhR siRNA 10 nM を用いて pL1-Neo<sup>R</sup>のコロニーアッセイを行ったところ、どちらも FICZ の L1-RTP を抑制しなかった(図 8C)。次に、50 nM の AhR siRNA が少なくとも 3 日間は機能することを確認し(図 8D)、その後に同様のコロニーアッセイを行っても AhR の siRNA では FICZ の L1-RTP は抑制できなかった(図 8E)。また、pEF06R の PCR 解析の結果から、50 nM AhR siRNA を用いて、AhR をノックダウンさせたときの FICZ の L1-RTP 誘導能を解析したところ 10, 1, 0.1 nM の FICZ の L1-RTP はいずれも抑制されなかった(図 8F)。AhR siRNA が確かに機能することを CYP1A1 の RT-PCR で解析した結果、AhR の siRNA で CYP1A1 の mRNA は抑制された(図 8G)。

次に AhR と核内でヘテロダイマーを形成する ARNT1 に着目し実験を行った。まず、ARNT1 の 2 つの異なる配列である siRNA を WB で解析したところ、20 %以下にタンパクレベルを抑制することを確認した(図 9A, B)。その 2 つの siRNA を用いてコロニーアッセイをした結果、FICZ の L1-RTP を抑制した(図 9C)。さらに、pEF06R を用いて PCR 解析をした結果、FICZ の L1-RTP を抑制した(図 9D)。ARNT1 の siRNA が確かに機能することを CYP1A1 の RT-PCR で確認した(図 9E)。FICZ の L1-RTP 誘導機序に ARNT1 が必要であることを強く示唆するために、ARNT1 の siRNA resistant 発現ベクターを作製した。ARNT1

の siRNA を導入した細胞に、ARNT1 をトランスフェクションバックしその発現を WB で確認した(図 9F) [69]。この発現ベクターを用いてコロニーアッセイをした結果、siRNA を導入した細胞では FICZ の L1-RTP は抑制され、且つ siRNA resistant を導入した細胞では FICZ の L1-RTP 誘導能は回復した(図 9G)。したがって、FICZ の L1-RTP は ARNT1 依存的であることが示唆された。さらに、AhR リプレッサー遺伝子で AhR の CYP1A1 誘導の抑制因子として知られている AhRR[77]と、ARNT1 と相同性の高い AhR との相互作用は ARNT1 と比較して減弱する ARNT2[78]について、siRNA を用いて FICZ の L1-RTP 誘導との関連性について検討した。その結果、AhRR と ARNT2 は FICZ の L1-RTP には関与しないことが示唆された(図 10A-C)。

次に、AhR のリガンド物質が MAPK を活性化することが知られているので[79]、FICZ が MAPK 下流の転写因子をリン酸化するか否か WB で解析した。その結果、FICZ は CREB のリン酸化は誘導するが、C/EBP  $\beta$ 、c-Jun はリン酸化しなかった(図 11A)。FICZ の CREB リン酸化は ARNT1 をノックダウンした細胞では抑制された(図 11B)。この結果から、FICZ の CREB リン酸化は ARNT1 依存的であることが示唆された。FICZ が MAPK を活性化することから、MAPK の p38 経路の阻害剤である SB202190[65]と JNK 経路の阻害剤である SP600125[64]で前処理した細胞で FICZ の L1-RTP が抑制されるか否か評価した。その結果、コロニーアッセイおよび PCR 解析から両方の阻害剤で L1-RTP が抑制された(図 11C, D)。また、FICZ が CREB をリン酸化することから、CREB をノックダウンしたときに L1-RTP が抑制されるか評価した。まず、3 つの CREB siRNA の評価を WB で解析した結果、1 と 2 の CREB siRNA の配列で 50 %以下にタンパクレベルを抑えることができた(図 11E, F)。1 と 2 の siRNA を用いて FICZ の L1-RTP を解析したところ、コロニーアッセイおよび PCR 解析から FICZ の L1-RTP は抑制された(図 11G, H)。FICZ の L1-RTP に CREB が必要であ

ることを強く示唆するために、CREB の siRNA resistant 発現ベクターを作製した。CREB の siRNA を導入した細胞に、CREB をトランスフェクションバックしその発現を WB で確認した(図 12A) [51]。この発現ベクターを用いてコロニーアッセイを行ったところ、siRNA を導入した細胞では FICZ の L1-RTP は抑制され、且つ siRNA resistant を導入した細胞では FICZ の L1-RTP 誘導能は回復した(図 12B)。したがって、FICZ の L1-RTP は CREB 依存的であることが示唆された。また、CREB の Constitutive active form を作製し、CREB のリン酸化状態を模倣した状態で L1-RTP が誘導されるか否か検討した。その結果、CREB Constitutive active form を細胞に導入しただけではコロニーアッセイと PCR 解析の結果から L1-RTP は誘導されなかった(図 12C-F)。

また、ARNT1 のターゲット配列である XRE 配列がヒト L1 の 5' UTR 上およびマウスにも存在するので[80, 81]、FICZ の L1-RTP は L1 の mRNA の発現上昇と関係しているのか定量 RT-PCR で解析を行った(図 13A, B)。その結果、FICZ によって L1 の CMV 領域の mRNA レベルは増減しないことが示唆された。さらに MAPK の阻害剤や各 siRNA も、L1 の CMV 領域の mRNA レベルに影響しないことを確認した(図 13A, B)。また FICZ は、未熟な L1 の転写産物や ORF2 の mRNA (図 14)、L1 の ORF1/ORF2 のタンパクレベルにも影響しないことを確かめた(図 15A-E)。これらの結果は、FICZ の L1-RTP 誘導には ARNT1 の機能がとても重要であることを示唆した。

L1-RTP は、DSB、金属イオンによる酸化ストレスや、L1-5' UTR の脱メチル化で誘導されることが知られていた[21-24]。今回 FICZ の L1-RTP 誘導機序を解析した結果、少なくとも DSB による L1-RTP 誘導とは異なる機序であることが示唆された。まず、FICZ と X 線照射による L1-RTP は、誘導にかかる日数が異なることが上げられた。実験の結果、FICZ は 1-2 日で L1-RTP が誘導されるが、X 線照射には 12 日間も L1-RTP 誘導まで

に必要とした (図 16A) [22]。さらに、MAPK の阻害剤で FICZ の L1-RTP 誘導能は完全に抑制されるが、X 線照射の L1-RTP は抑制されなかった (図 16B)。また、環境汚染物質である TCDD は、DSB マーカーの H2AX のリン酸化 (H2AX リン酸化 serine 139) を誘導するが (図 16C) [82]、L1-RTP は誘導しなかった (図 16D)。使用した TCDD の活性は、CYP1A1 の mRNA レベルが上昇することを確認した (図 16E)。以上の結果から、FICZ の L1-RTP 誘導は DSB とは異なるシグナル経路で誘導されていることが示唆された。

### 3-3. ORF1 は L1-RTP 誘導時にクロマチンにリクルートされた

近年、Goodier らにより、通常 L1 の ORF1 は細胞の小胞体に局在しており、ストレス刺激によって、クロマチンにリクルートされることが報告された[83]。このことから、FICZ の L1-RTP 誘導時には ORF1 がクロマチンにリクルートされることが仮定される。この仮説を明らかにするために、まず、L1 の ORF1 の発現ベクターを作製した。ORF1 の C 末端には TAP タグをつけて FICZ による ORF1 のクロマチンリクルート能を解析した。コントロールベクターとして EGFP に TAP タグをつけた発現ベクターを用意した。細胞分画を行って、細胞質、核可溶性画分、クロマチン画分を抽出した (図 17A)。細胞質のコントロールとして GAPDH、クロマチン画分のコントロールには H2AX を用いた (図 17A)。FICZ を添加して 24 時間後に細胞を回収したところ、クロマチン画分で FICZ 添加による ORF1 タンパク量の増加が認められた (図 17B)。また、FICZ によるクロマチンの ORF1 タンパクの増加は SB202190 で抑制されたことから、ORF1 のクロマチンリクルートは MAPK 依存的であることが示唆された (図 17C)。次に、ORF1 と ARNT1 の相互作用について解析した。まず、ORF1 の C 末端に EGFP をつけた発現ベクターを作製した。コントロールベクターとして、Flag-streptag をつけた EGFP を用意した。それぞれを細

胞に導入し、24 時間後に FICZ を添加して 24 時間後に細胞を回収し免疫沈降を行って解析した。その結果、FICZ を添加することによって、ORF1 と ARNT1 の相互作用が認められた(図 17D)。

### 3-4. FICZ はマウスの胸腺、脾臓で L1-RTP を誘導した

In vivo での FICZ と L1 の関連性を解析するために、Human L1 transgene を導入した L1-Tg を作製した(図 18)。L1-Tg は background が少なく、L1-RTP 誘導因子の X 線照射で L1-RTP が誘導される系統を作る必要があった。そこで 17 系統ファウンダーマウスの MEF を調製して X 線照射 (4.5Gy) を行い、L1-RTP 誘導能を解析した。その結果、4 系統が X 線照射で L1-RTP 誘導され且つバックグラウンドが少ない系統であった。特に L1-RTP 誘導能が強い #4 と #67 を実験に用いた(図 18A)。 $\#4$  と  $\#67$  の L1-Tg マウスに FICZ を投与すると、免疫システムに重要な組織である胸腺、脾臓で L1-RTP が誘導されていた(図 19)。さらに、胸腺の免疫染色を行ったところ、FICZ を投与したマウスで RoR $\gamma$  と L1-RTP の指標である EGFP の共染している細胞が増加していた(図 20A-C)。

### 3-5. 非遺伝毒性物質 TPA は ERK 依存的に L1-RTP を誘導した

PCR 解析及びコロニーアッセイを用いて、TPA が L1-RTP を  $10^{-4}$  から  $10^{-5}$  の頻度で誘導することが示唆された(図 21A, B)。使用した TPA の濃度では細胞毒性がないことを確認した(data not shown)。また、TPA が ERK をリン酸化することを WB で確認し(図 21C)、ERK の阻害剤である PD98,059 で L1-RTP が抑制されることを PCR 解析及びコロニーアッセイで確認した(図 21D, E)。また、TPA は L1 の mRNA には影響を与えない事を定量 RT-PCR によって確認した (data not shown)。

### 3-6. 遺伝毒性物質の DMBA は AhR と ARNT1 依存的に L1-RTP を誘導した

私は様々な化合物の L1-RTP 誘導能について、AhR/ARNT1 複合体に着目した研究を行ってきた。まず、DMBA は TPA と同様に L1-RTP を誘導することをコロニーアッセイにより確認した(図 22A)。DMBA について、AhR と ARNT1 をそれぞれ siRNA でノックダウンした細胞で L1-RTP 誘導能を解析したところ、L1-RTP は抑制された(図 22B)。また、TPA についても同様の実験を行ったが、TPA は AhR および ARNT1 をノックダウンしても L1-RTP は誘導された(図 22C)。また、DMBA は ERK, JNK, p38 の阻害剤を用いても L1-RTP は抑制することはできなかった(図 22D)。癌細胞の増殖や浸潤に関与する EGFR 受容体の阻害剤 CL387, 785 で処理した細胞で L1-RTP 解析を行うと、TPA の L1-RTP は抑制されたが、DMBA の L1-RTP は抑制されなかった(図 22E)。また、DMBA は L1 の mRNA には影響を与えない事を定量 RT-PCR によって確認した (data not shown)。実験に用いた 10 nM、1 nM DMBA の濃度では細胞毒性がないことを確認した (data not shown)。

### 3-7. L1-Tg マウスに形成させた腫瘍は L1-RTP が誘導されていた

In vivo で腫瘍形成と L1 の関連性を解析するために、L1-Tg マウスに DMBA/TPA 発癌モデルを用いた。実験は図 23A のプロトコール通りに行い、7 匹のマウスを用いて 15 個の腫瘍解析をした。その結果を表 4 に示した。15 個の腫瘍のうち 13 個で L1-RTP が誘導され(図 23B)、7 個の腫瘍の H&E (Hematoxylin&Eosin) 染色を行い、病理学的解析をしたところ、3 個が乳頭腫、3 個が角化棘細胞腫、1 個が慢性皮膚炎であった(図 24A)。以上の結果を統計学的に解析したところ、有意に腫瘍部位で L1-RTP が誘導されていることが示唆された (表 4)。

また、腫瘍部位には H-ras の point mutation (A61T) が誘導されることが知られて



いる[45]。シーケンス解析の結果、15 個の腫瘍のうち 11 個で H-ras の変異が認められ、さらに 9 個が L1-RTP も誘導されていた腫瘍であった（表 5）。次に、実際の腫瘍組織で L1-RTP が誘導されていることを EGFP 抗体による免疫組織化学染色で解析した。腫瘍マーカーには Stat3 のリン酸化抗体を用いた。#4 と #67 の L1-Tg マウスの 2 つの腫瘍組織を解析した結果、EGFP と Stat3 のリン酸化は共染していることが明らかになり、腫瘍組織で L1-RTP が誘導されていることが組織学的にも示唆された(図 24B)。また、DMBA/TPA で皮膚に表れた黒色斑点 (Nevi) を 8 個解析したところ 1 つで L1-RTP が誘導されていたが、残り 7 個は L1-RTP が誘導されていなかった(図 24C)。

腫瘍組織の結果と H-ras 変異の結果を踏まえて、Stat3 のリン酸化と H-ras の変異がそれぞれ L1-RTP 誘導能に関与するのか検討した。まず、Stat3 の Constitutive active form の発現ベクターを用意し[84]解析を行ったが、Stat3 を模倣的にリン酸化しただけでは L1-RTP は誘導されなかった（図 25A, B）。また、Ha-ras の発現ベクター[85]を細胞に導入して Stat3 のリン酸化を解析した。その結果、Stat3 のリン酸化は誘導されず（図 25C）、L1-RTP が細胞の形質転換時に誘導されるものではないことが示唆された。以上の結果から、L1-RTP は Stat3 活性化よりも上流のイベントであることが示唆された。

また、細胞を用いた実験から DMBA を前処理した細胞に、その後に pEF06R を導入し、解析すると L1-RTP は誘導されなかった(図 26A)。L1-Tg を用いた実験で皮膚に 1 回だけ DMBA を塗った組織では L1-RTP は誘導されず、TPA を週 2 回塗った皮膚では L1-RTP は誘導された(図 26B)。このことから、マウス腫瘍形成には TPA の L1-RTP が重要な役割を担うことが示唆された。

### 3-8. TPA 標的遺伝子に L1 の挿入はなかった

最近、DMBA/TPA の発癌モデルで、S-transferase  $\alpha 4$  (*Gsta4*) 遺伝子が TPA のターゲット遺伝子であることが報告された[86]。*Gsta4* は第 9 染色体上に位置することが、TPA によるマウスの系統別の腫瘍形成に関する論文より報告されていた[87]。特に、DMBA/TPA 誘導による腫瘍形成には *Gsta4* の重要性が言われている。これらの見解は、TPA による L1-RTP 誘導には *Gsta4* がターゲットになっている可能性が示唆された。しかし、PCR 解析の結果、腫瘍から抽出したゲノム DNA では *Gsta4* 遺伝子の変異は認められなかった (図 27)。

### 3-9. 発癌作用のある化合物は AhR 依存的に L1-RTP を誘導した

遺伝毒性を発揮する発癌物質 3-methylcholanthrene (3-MC) [88]や(B[a]P) [89]、加熱食品中に存在する発癌物質である 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP) や 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) [90, 91]、HIV-1 のアクセサリ蛋白質の Vpr[65]の L1-RTP 誘導能とその機序について解析した。その結果、これらの化合物およびリコンビナント蛋白質は AhR 依存的に L1-RTP を誘導した (図 28 に結果の一部を示した)。また、これらの 4 つの化合物とリコンビナント蛋白質はいずれも MAPK を活性化し、MAPK の p38 経路の阻害剤である SB202190[65]と JNK 経路の阻害剤である SP600125[64]で L1-RTP が抑制された (data not shown)。

## 4. 考 察

### 4-1. FICZ、DMBA、TPA の L1-RTP 誘導機序について

本研究では、L1 とヒトの生命現象がどのように関連しているのかヒトの生体内で産生される可能性があり、発癌性が認められていない化合物 FICZ と遺伝毒性物質 DMBA、非遺伝毒性物質 TPA の発癌メカニズムについて研究を行った。また、環境汚染物質や発癌物質の L1-RTP 誘導能とそのメカニズムについても研究を行った。様々な化合物や蛋白質の L1-RTP 誘導能を解析し、特に作用機構がわかっていない化合物で自己免疫疾患に関連のある FICZ と発癌作用のある DMBA、TPA に着目した。これら 3 つの化合物を詳細に解析することで、疾病発症における環境因子と L1 の機能的連関について考察した。

まず FICZ の L1-RTP は AhR 非依存的で ARNT1 依存的、DMBA は AhR、ARNT1 依存的、TPA は AhR、ARNT1 どちらも関与しなかった。FICZ の L1-RTP には MAPK および CREB のリン酸化が必要だが、CREB の constitutive active form を細胞に導入しただけでは L1-RTP は誘導されないことから (図 12C-F)、FICZ の L1-RTP には ARNT1 の機能と MAPK の両方が必要であることが示唆された。FICZ と TPA の解析結果から、ともに MAPK の活性化を必要とするが、MAPK のみを活性化しても L1-RTP は誘導されず、その上流の AhR や ARNT1、TPA は EGFR 受容体と相互に作用することで L1-RTP が誘導されることが示唆された。FICZ の L1-RTP 誘導機序については、FICZ を作用させることで ORF1 と ARNT1 が相互作用することから、ARNT1 の重要性が示唆された。

### 4-2. bHLH/PAS ファミリーと L1-RTP について

本研究では、生命現象に深く関わる bHLH/PAS タンパクファミリーと L1 が密接に関わっていることが FICZ、DMBA、TPA の実験から示唆された。FICZ の実験では、ARNT1 と相

相互作用する因子として新たに L1 構成蛋白のうちの 1 つである ORF1 を見出した。bHLH/PAS タンパクファミリーの ARNT1 は AhR、HIF や SIM などの因子と結合し様々な生命現象に関与することが知られている[63]。今回の解析結果から、FICZ によって ARNT1 が L1 構成蛋白の ORF1 と相互作用し、クロマチンにリクルートされることで疾病発症や生命現象に関わる遺伝子発現に影響を与える可能性が考えられた。また、L1-RTP 誘導は化合物によって異なる宿主側の因子を必要とすることが示唆された。したがって、L1 の挿入箇所には、指向性があり bHLH/PAS タンパクファミリーの担う役割に依存する可能性が考えられた。特に、ARNT1 依存的に L1-RTP を誘導する FICZ は、XRE 配列付近の特定の箇所に挿入されるかもしれない。今後、次世代シーケンサー等を用いて、化合物ごとに L1 の転移箇所を解析することが、L1 による疾患発症機序と生命現象への影響を解明するために重要である。

#### 4-3. 自己免疫疾患と L1 について

ヒト体内で産生される可能性のある FICZ は、自己免疫疾患発症に関わる Th17 細胞の分化に関与することが報告された[42, 43]。Th17 分化誘導に転写因子の RoR $\gamma$ 、IL-6、TGF- $\beta$  が関わる事が知られていた[39, 40]。今回の研究によって、FICZ が胸腺で L1-RTP を誘導することで、Th17 の分化誘導に関わる遺伝子発現に影響しているかもしれない。実際、これまでの研究によって L1 が神経幹細胞の分化の多様性に関わる事が報告され[7-9]、L1 が細胞分化に影響する報告もある。また、L1 のような内在性レトロエレメントが細胞内で分解されないと、インターフェロンが誘導され自己免疫疾患発症に繋がることも報告された[38]。一方で、実験室等の蛍光灯で組織培養に用いる培養液を 24 時間照射すると、8 pM の FICZ が産生される報告がある[59]。ヒト体内にはトリプトファ

ンが  $70\ \mu\text{M}$  存在するので[92]、蛍光灯のもとで作業をし続けると、 $\mu\text{M}$  オーダーの FICZ が体内で産生される可能性が示唆される。実験の結果から、 $\text{pM}$  オーダーで FICZ は L1-RTP を誘導することから (図 6E)、ヒト体内でも FICZ による L1-RTP は誘導されることが推察される。今後、L1 の機能を抑制したときに、FICZ による Th17 誘導の有無を解析し、L1 と自己免疫疾患発症の関連性を解析することが疾患との関連性を把握するために重要である。また、実際の自己免疫患者血清中の FICZ の検出や患者血清の L1-RTP 誘導能を解析し、FICZ を対象とした新規の自己免疫疾患治療法や検査法の確立が可能になるのではないかと考えている。

#### 4-4. 発癌と L1 について

DMBA/TPA による発癌実験の結果、腫瘍形成に L1-RTP が関与することが示唆された。これまで L1 が腫瘍組織のゲノムに挿入されているという報告はあるが[4, 30, 93]、L1 がどのようなシグナルで転移したのか詳細な報告はない。今回の研究結果は、L1-RTP が腫瘍形成の promotion step に関わる可能性を示唆した。作製した L1-Tg の MEF は L1-RTP が誘導されていないが、L1-RTP 誘導刺激を加えると RTP が誘導される系統を使用した。免疫組織化学染色の結果、腫瘍組織では L1-RTP による EGFP 陽性像と、腫瘍マーカーの Stat3 のリン酸化抗体陽性像が共局在していた。重要なこととして、正常細胞における Ha-ras 遺伝子の活性化は ATM 依存的に細胞の growth arrest を誘導する[94, 95]。正常細胞の腫瘍細胞への形質転換には遺伝的変化が必要である。ATM 依存的なシグナルの活性化 (DSB シグナル) は、腫瘍化よりも細胞の老化現象で誘導され、癌化には DSB シグナルの解除が必要であることが報告された[94, 95]。実験の結果、DMBA をマウスの皮膚に 1 回塗布しただけでは L1-RTP は誘導されず、TPA による 2 回塗布によ

って L1-RTP は誘導されたことから (図 26B)、TPA による L1-RTP 誘導が DMBA によって生じた DSB シグナル解除に関与して癌化を進行させている可能性が示唆された。

また、様々な発癌物質を解析した結果、全て AhR 依存的に L1-RTP を誘導した (図 28)。しかし、発癌作用の報告のない AhR のリガンド物質である FICZ は、AhR 依存的には L1-RTP を誘導しなかった。B[a]P による皮膚癌は損傷を受けていない AhR 遺伝子が必要であることが報告されていることから [89]、L1-RTP を誘導する発癌物質は bHLH/PAS ファミリー転写調節因子の AhR が重要な役割をしていることが示唆された。内在性レトロエレメントのトランスポゾンが癌形成とも密接に関与することが今回の研究結果から考察され、癌の治療や病態メカニズムの解明に新たな切り口を提唱した。

#### 4-5. 環境因子とレトロエレメントにより誘発される生命現象について

これまで疾病発症の原因に関して遺伝背景が着目されてきたが、本研究の結果から環境因子によって誘発される L1-RTP が、様々な疾患に関連する可能性が示唆された。AhR あるいは ARNT1 に依存する L1-RTP の誘導は、bHLH/PAS ファミリー転写調節因子が様々な環境因子からの刺激を L1 によるゲノム再編機構を使って、環境に適応するための手段にしている可能性がある。図 29 に各 L1-RTP 誘導物質の転移機構についてまとめた。化合物ごとに異なる宿主側の因子を使用して、L1-RTP を誘導することが明らかになった。

bHLH/PAS ファミリー転写調節因子はバクテリアからヒトまで広く存在し [56]、L1 もまた *Candida albicans* から zebrafish、ヒトまで広く保存されている [96, 97]。FICZ は、アフリカツメガエルの細胞株や zebrafish の胚まで作用することが報告されている [98, 99]。本研究では、L1-RTP 誘導が外的因子によって体細胞で起こることおよびその

機序を明らかにし、また bHLH/PAS ファミリー転写調節因子と L1 が密に連携して様々な生命現象に関与することを明らかにした。L1 は疾患発症ばかりでなく、近年では神経幹細胞の多能性獲得や環境変化に伴う脳組織での L1-RTP 誘導の研究が盛んに行われている。L1 のゲノム再編機構は、ヒトが高度な生命機能を獲得するために保存されてきたのかもしれない。ヒトのような L1 を全長に近い形で保存してきた生物が高度な生命機能を獲得し、ゲノム再編機構をうまく用いながら進化してきたことが考えられる。今後、L1 が疾病発症を誘導するときの挿入箇所と脳神経機能を発達させるときの挿入箇所を比較することで、本来の内在性レトロエレメントの機能解明に繋がると考えられる。

## 5. 謝辞

本研究を行うにあたり御指導、御鞭撻、また生活面でも援助していただきました国立国際医療研究センター研究所難治性疾患研究部 石坂幸人部長に深く感謝します。

また、研究者としての心得や研究の御助言をしていただいた筑波大学連携大学院人間総合科学研究科 狩野繁之教授（国立国際医療研究センター研究所熱帯医学・マラリア研究部 部長）に深く御礼申し上げます。

遺伝子組み換えマウスの作製のご協力をいただいた国立国際医療研究センター研究所感染症制御研究部 岡村匡史室長ならびにヒト型動物開発研究室の皆様には感謝致します。博士課程での研究生活において終始様々な御助言をいただきました国立国際医療研究センター研究所難治性疾患研究部 志村まり室長ならびに研究室の皆様方に感謝致します。

また、博士 3、4 年と奨学金の援助をいただきました東京生化学研究会に感謝致します。

最後に、体調や生活面で援助いただきました家族に深く感謝致します。



## 6. 図表の説明

表 1 : L1 の挿入によって発症が報告されている疾患一覧

表 2 : 実験に用いた各 siRNA 配列一覧

表 3 : L1-Tg の transgene copy 数の結果

表 4 : DMBA/TPA モデルで形成させた腫瘍と黒色斑点の L1-RTP 解析一覧

表 5 : DMBA/TPA モデルで形成させた腫瘍の L1-RTP と H-ras 変異解析一覧

図 1 : L1 の構造概略図

図 2 : L1 のゲノム転移機構模式図

図 3 : L1-RTP の PCR 解析法

EGFP のイントロンを挟む形でプライマーを設計することで L1-RTP が誘導された時には 140 bp のバンドが検出される実験系を作製した。実際、L1-RTP を誘導した細胞を FACS Aria (Becton Dickinson) で sorting し 細胞からそれぞれ DNA を抽出し PCR を行くと EGFP 陽性細胞集団の DNA で 140 bp のバンドが検出された。

図 4 : L1-Tg に用いた transgene のマップと transgene copy 数を解析した結果

上図には L1-Tg に用いた transgene のマップおよびサザンブロットの解析概要を示した。下図は transgene copy 数を解析したサザンブロットの結果を示した（詳細は表 3 を参照）。

図 5 : L1-Neo<sup>R</sup> の解析法を用いた FICZ の L1-RTP 誘導能

(A) L1-Neo<sup>R</sup> のプラスミドマップと解析プロトコールを示した。(B) HuH-7 と HeLa 細胞を用いたコロニーアッセイの結果を示した。U : 未処理の細胞 (列 1、6)。D : dimethyl sulfoxide (DMSO) (列 2、7) F : FICZ は 100 nM、10 nM、1nM (F、列 3-5 と 8-10) コロニー数は (C) の FICZ に対する細胞生存率で標準化した。\* は有意差検定を行った結果  $P < 0.02$  の列を示した。染色したプレートは HuH-7 が列 2、4、HeLa が列 7、9 を示した。

図 6 : pEF06R を用いた解析法と FICZ の L1-RTP 誘導能

(A) イントロンにある制限酵素サイト *PstI* でゲノム DNA を処理することで 140 bp のバンドを特異的に増幅した結果を示した。列 1 が未処理、列 2 が *PstI* 処理したサンプルを示した。(B) pEF06R を用いた解析法のプロトコールを示した。(C) HuH-7 と HeLa 細胞を用いた PCR 解析の結果を示した。1、2、4、6 日のタイムコースを示した。バンド強度 (RI) は  $\beta$ -actin で標準化した値を示した。U は未処理。D は DMSO 0.001 %。F は FICZ 10 nM を示した。(D) FICZ の L1-RTP 頻度の結果を示した。細胞は HuH-7 を用いた。標準サンプルは 1 コピーの EGFP が入った細胞を用意し、EGFP が  $10^5$  から  $10^0$  までの細胞を EGFP 陰性の細胞を合計  $10^6$  個になるよ

うに混ぜたサンプルから DNA を抽出したものを使用した。U は未処理。D は DMSO 0.001 %。F は FICZ 10 nM を示した。(E) Pico mole レベルの FICZ は L1-RTP を誘導した。HuH-7 細胞に pEF06R を導入し、FICZ を 2 日間反応させた。N は未処理、D は DMSO、FICZ の希釈系列は列 3-6 で 80、16、3、0.6 pM を示した。

図 7 : AhR 阻害剤では FICZ の L1-RTP を抑制しない

(A) 細胞は 10  $\mu$ M の MNF で 30 分間前処理 (列 4-6) してから新しい培養液に 10 nM の FICZ を添加し翌日に DNA を回収して解析した。MNF のコントロールは DMSO 0.001 %を用いた。U は未処理 (列 1、4)。D は DMSO 0.001 % (列 2、5)。F は FICZ 10 nM (列 3、6) を示した。(B) MNF が FICZ 誘導による CYP1A1 の mRNA レベルを抑制することを示した。細胞は 10  $\mu$ M の MNF で 30 分間前処理 (列 4-6) してから新しい培養液に 10 nM の FICZ を添加し 6 時間後に RNA を回収した。解析は RT-PCR 法を用いた。MNF のコントロールは DMSO 0.001 %を用いた。U は未処理 (列 1、4)。D は DMSO 0.001 % (列 2、5)。F は FICZ 10 nM (列 3、6) を示した。

図 8: AhR は FICZ の L1-RTP には影響しない

(A) AhR の siRNA の機能評価。3 つの siRNA の配列の機能評価を濃度勾配ごとに評価した。HuH-7 に siRNA を導入してから 2 日後に細胞を回収した。濃度は 50 nM、10 nM、2 nM、400 pM、80 pM、16 pM (列 1-6)、C はコントロール siRNA、U は未処理の細胞を示した。RE はコントロール siRNA のバンド強度を 100 %としたときと比較した各 AhR siRNA のバンド強度の比較から求めたものを示した (5 % 9 % 14 %、19 %、18 %、38%、列 1-6)。実験は矢印の 10 nM の siRNA で実験を行った。

(B) AhR 各配列 1-3 の siRNA 10 nM の結果を示した。RE の算出した結果、配列 1 は 11 %、配列 2 は 19 %、配列 3 は 14 %で、実験には配列 1 と 3 を使用した。(C) AhR の siRNA は FICZ の L1-RTP を抑制しない。コロニーアッセイを行った結果を以下に示した。コントロール siRNA は列 1-3 と列 7-9、AhR siRNA は列 4-6 と列 10-12。細胞は HuH-7 を用いて、未処理の細胞は列 1、4、7、9、0.001 % DMSO は列 2、5、8、11、10 nM FICZ は列 3、6、9、12 を示した。(D) AhR siRNA のノックダウン効果。50 nM の配列 1 の AhR siRNA を用いて、1、3、6 日までの siRNA のノックダウン効果を検定した。U : 未処理の細胞、cont. : コントロール siRNA を示した。RE は列 5-7 でそれぞれ 13 %、16 %、40 %であった。(E) AhR siRNA の効果を上げても FICZ の L1-RTP は抑制されない。コロニーアッセイした結果を示した。列 1-3 は 50 nM コントロール siRNA、列 4-6 は 50 nM AhR siRNA 配列 1 を示した。HuH-7 細胞を用いて未処理は列 1、4、0.001 % DMSO は列 2、5、10 nM FICZ は列 3、6 を示した。(F) 低い濃度の FICZ の L1-RTP も AhR siRNA は抑制しない。列 5-8 は 50 nM コントロール siRNA、列 9-12 は 50 nM AhR siRNA 配列 1 を示した。10 nM FICZ は列 2、6、10、1 nM FICZ は列 3、7、11、0.1 nM FICZ は列 4、8、12 で 2 日間反応させた。PCR 解析で 140 bp のバンドを増幅させた。(G) AhR siRNA は CYP1A1 の mRNA を抑制した。RT-PCR は 10 nM のコントロール siRNA (列 4-6) と 10 nM AhR siRNA 配列 1 (列 7-9) を導入して 2 日後に 10 nM の FICZ を 6 時間反応させた。

図 9: ARNT1 は FICZ の L1-RTP に必要である

(A) ARNT1 の siRNA の機能評価。2 つの siRNA の配列の機能評価を濃度勾配ごとに評価した。HuH-7 に siRNA を導入してから 2 日後に細胞を回収した。濃度は 50 nM、

10 nM、2 nM、400 pM、80 pM、16 pM (列 1-6)、C はコントロール siRNA、U は未処理の細胞を示した。RE はコントロール siRNA のバンド強度を 100 %としたときと比較した各 AhR siRNA のバンド強度の比較から求めたものを示した (6 %、7 %、9 %、19 %、22 %、20%、列 1-6)。実験は矢印の 10 nM の siRNA で実験を行った。

(B) ARNT1 各配列 1、2 の siRNA 10 nM の結果を示した。RE の結果配列 1 は 12 % 配列 2 は 4 %であった。(C) ARNT1 の siRNA は FICZ の L1-RTP を抑制した。コロニーアッセイを行った結果を示した。コントロール siRNA は列 1-3 と列 7-9、ARNT1 siRNA は列 4-6 と列 10-12。細胞は HuH-7 を用いて、未処理の細胞は列 1、4、7、9、0.001 % DMSO は列 2、5、8、11、10 nM FICZ は列 3、6、9、12 を示した。(D) PCR 解析において FICZ の L1-RTP は ARNT1 の siRNA で抑制した。配列 1、2 を混合して 10 nM の濃度でノックダウンを行った。列 4-6 は 10 nM コントロール siRNA、列 7-9 は 10 nM ARNT1 siRNA の結果を示した。(E) ARNT1 siRNA は CYP1A1 の mRNA を抑制した。RT-PCR は 10 nM のコントロール siRNA (列 4-6) と 10 nM AhR siRNA 配列 1 (列 7-9) を導入して 2 日後に 10 nM の FICZ を 6 時間反応させた。(F) pSi<sup>R</sup>-ARNT1 の発現確認の結果を示した。HuH-7 細胞に 10 nM コントロール siRNA (列 1、2)、10 nM ARNT1 siRNA (列 3、4) に導入した。翌日にコントロールベクター (C、列 1、3) あるいは pSi<sup>R</sup>-ARNT1 (R、列 2、4) に導入した。蛋白質の発現確認は 2 回目のトランスフェクションから 2 日後に解析した。(G) pSi<sup>R</sup>-ARNT1 は siRNA によって抑制された L1-RTP を回復させた。HuH-7 細胞に siRNA を導入してから、翌日にコントロールベクター (列 4-6) あるいは pSi<sup>R</sup>-ARNT1 (列 7-9) をトランスフェクションした。翌日から 10 nM FICZ を 2 日間反応させた後に、G418 で選択を開始した。有意差検定の結果、列 6 と 9 で  $P < 0.02$  であった。C はコントロールベクター、

D は 0.001 % DMSO、F は 10 nM FICZ、R は pSi<sup>R</sup>-ARNT1、U は未処理を示した。

図 10 : AhRR と ARNT2 は FICZ の L1-RTP に影響を与えない

(A) AhRR の siRNA を機能評価した。50 nM の siRNA を用いて RE 列 4 は 43 %、列 5 は 14 %、列 6 は 3 %であった。細胞は HuH-7 を用い、トランスフェクション後 2 日で解析した。(B) ARNT2 の siRNA を機能評価した。50 nM の siRNA を用いて RE 列 3 は 6 %であった。細胞は HuH-7 を用い、トランスフェクション後 2 日で解析した。(C) AhRR と ARNT2 の siRNA の FICZ が L1-RTP を誘導する効果について検定した。

図 11 : FICZ の L1-RTP は MAPK と CREB に依存する

(A) FICZ によって CREB がリン酸化された。細胞は HuH-7 細胞を用いて、未処理 (U、列 1)、0.001 % DMSO (D、列 2) 10 nM FICZ (F、列 3)、positive コントロールとして 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた (H、列 4)。(B) FICZ による CREB のリン酸化は ARNT1 siRNA で抑制された。コントロール siRNA を列 1-3、ARNT1 siRNA を列 4-6 に導入した。(C、D) MAPK の阻害剤は L1-RTP を抑制した。SB202190 (p38 阻害剤、1 μM) と SP600125 (JNK 阻害剤、100 μM) を 10 nM FICZ を添加する 30 分前に処理した。(E) CREB の siRNA の機能評価。3 つの siRNA の配列の機能評価を濃度勾配ごとに評価した。HuH-7 に siRNA を導入してから 2 日後に細胞を回収した。濃度は 50 nM、10 nM、2 nM、400 pM、80 pM、16 pM (列 1-6)、C はコントロール siRNA、U は未処理の細胞を示した。RE はコントロール siRNA のバンド強度を 100 %としたときと比較した各 CREB siRNA のバンド強度の比較から求めたものを示した (34 %、37 %、

21 %、29 %、60 %、29%、列 1-6)。実験は矢印の 10 nM の siRNA で実験を行った。

(F) CREB 各配列 1-3 の siRNA 10 nM の結果を示した。RE の結果配列 1 は 48 %、配列 2 は 28 %であった。配列 3 は効果がなかった。(G) CREB の siRNA は FICZ の L1-RTP を抑制した。コロニーアッセイを行った結果を以下に示した。コントロール siRNA は列 1-3 と列 7-9、CREB siRNA は列 4-6 と列 10-12。細胞は HuH-7 を用いて、未処理の細胞は列 1、4、7、9、0.001 % DMSO は列 2、5、8、11、10 nM FICZ は列 3、6、9、12 を示す。(H) PCR 解析において FICZ の L1-RTP は CREB の siRNA で抑制された。配列 1、2 を混合して 10 nM の濃度でノックダウンを行った。列 4-6 は 10 nM コントロール siRNA、列 7-9 は 10 nM CREB siRNA の結果を示した。

図 12 : FICZ の L1-RTP は CREB を必要とする

(A) pSi<sup>R</sup>-CREB の発現確認を行った。HuH-7 細胞に 10 nM コントロール siRNA (列 1、2)、10 nM CREB siRNA (列 3、4) に導入した。翌日にコントロールベクター (C、列 1、3) あるいは pSi<sup>R</sup>-CREB (R、列 2、4) を導入した。蛋白質の発現確認は 2 回目のトランスフェクションから 2 日後に解析した。(G) pSi<sup>R</sup>-CREB は siRNA によって抑制された L1-RTP を回復させた。HuH-7 細胞に siRNA を導入してから、翌日にコントロールベクター (列 4-6) あるいは pSi<sup>R</sup>-CREB (列 7-9) をトランスフェクションした。翌日から 10 nM FICZ を 2 日間反応させた後に、G418 で選択を開始した。有意差検定の結果、列 6 と 9 で  $P < 0.02$  であった。C はコントロールベクター、D は 0.001 % DMSO、F は 10 nM FICZ、R は pSi<sup>R</sup>-CREB、U は未処理を示した。(C) constitutively active CREB (pCREB<sup>Y134F</sup>) の発現確認。HuH-7 細胞にコントロールベクター (C、列 1)、pCREB<sup>Y134F</sup> (Y134F、列 2)、pCREB<sup>WT</sup> (WT、列 3)

を導入して FLAG 抗体で検出した。(D)  $pCREB^{Y134F}$  によってプロモーター活性が増加した。cAMP-responsive element (CRE) を挿入した (pCRE-Luc) を作製しルシフェラーゼアッセイを行った。pCRE-Luc とともに  $pCREB^{WT}$  あるいは  $pCREB^{Y134F}$  (列 3、4) を導入した。Positive コントロールにはヒト TNF- $\alpha$  (R&D Systems) を用いた。ルシフェラーゼ活性の値はコトランスフェクションした phRL-SV40 (Promega) で補正した。(D、E)  $pCREB^{Y134F}$  を導入しただけでは L1-RTP は誘導されない。実験はプロトコール通りに行った。U は未処理、D は 0.001 % DMSO、F は 10 nM FICZ、V はコントロールベクター、WT は  $pCREB^{WT}$ 、Y134F は  $pCREB^{Y134F}$  を示した。

図 13 : FICZ、MAPK 阻害剤、siRNA の L1 mRNA に影響しない

(A、B) L1 mRNA の定量 RT-PCR で解析を行った。プライマーを CMV 領域に設計した。U は未処理、D は DMSO、F は FICZ、SB は SB202190、SP は SP600125、siRNA 3 種類 7 は AhR、8 は ARNT1、9 は CREB を示した。

図 14 : FICZ は L1 mRNA には影響しない

逆向きの CMV プロモーターを欠失させたプラスミドを用いて、L1 mRNA の解析を定量 RT-PCR で行った。プライマーを EGFP-precursor 部位、EGFP-mature 部位、ORF2 部位に設計し解析した。U は未処理、D は 0.001 % DMSO、F は 10 nM FICZ を示した。

図 15 : FICZ は L1 の ORF1 と ORF2 のタンパクレベルに影響しない

(A) ORF1 抗体の機能評価。うさぎ宿主のポリクローナル抗体を作製した。免疫したペプチド (MGKKQNRKTGNSKTQSAC) を免疫増強剤とともに免疫し、得られた血清を



精製し用いた。HuH-7 細胞に ORF1-EGFP を導入し、得られた細胞溶解液を EGFP 抗体で IP を行った。IP 後に WB を行い ORF1 抗体が機能することを確認した（列 2 は Input、列 4 は IP したものの矢印が ORF1 を示し、arrow head は IgG heavy chain を示した）(B) FICZ は ORF1 のタンパクレベルに影響しない。HuH-7 細胞に pEF06R を導入し、FICZ を 100、10、1 nM と 2 日間反応させ、細胞溶解液を回収した。(C) ORF2 抗体の機能評価。HEK293T 細胞に Flag-tagged ORF2 を導入した。ORF2 はコードン適合化した pBudORF2 (Astrid M. Roy-Engel, Tulane University Health Sciences Center から供与) を用いた。3×Flag タグは ORF2 の 3' 側に挿入した。細胞の溶解液はプラスミド導入してから 2 日後に回収したもので調製し、Flag 抗体 (M2) (Sigma) で IP を行い、ORF2 抗体 (John Goodier, University of Pennsylvania School of Medicine から供与) で WB を行った。(D) FICZ は ORF2 のタンパクレベルに影響しない。(B) と同様に行い、ORF2 抗体で WB を行った。(E) FICZ は ARNT1 のタンパクレベルに影響しない。HuH-7 細胞に pFlag-Streptag-EGFP (FS) (列 1, 2) あるいは pORF1-EGFP (ORF1) (列 3, 4) を導入した。D は 0.001 % DMSO、F は 10 nM FICZ を示した。

図 16 : FICZ の L1-RTP は DNA 二重鎖切断とは異なるシグナル機序で誘導される

(A) X 線照射によって誘導される L1-RTP は 12 日間を要した。細胞は HuH-7 を用いた。U は未処理、D は DMSO、X は X 線照射 (4.5 Gy) を照射したものを示した。

(B) X 線照射の L1-RTP は MAPK に依存しない。列 6 は 6 日間で、列 1-5、7-9 は 12 日間で回収した DNA を解析した結果を示した。DMSO 列 2 は 0.001 %、列 3 は 0.1 % を示した。(C) TCDD は  $\gamma$ H2AX を誘導した。U は未処理、X は X 線照射 (4.5 Gy)、D

は 0.1 % DMSO、列 4-8 は 10 nM の TCDD を 0.5、1、3、6、9 時間反応させた細胞を解析した結果を示した。H2AX は loading コントロールを示した。(D) TCDD は L1-RTP を誘導しない。コロニーアッセイの結果を示した。U は未処理、D は 0.001 % DMSO、T は TCDD を示し列 3-8 は 100、10、1、0.1、0.01、0.001  $\mu$ M を示し、F は 10 nM FICZ を示した。DMSO、TCDD、FICZ は 2 日間反応させた後に G418 選択を行った。(E) TCDD は CYP1A1 の mRNA を誘導した。HuH-7 細胞を用いて、10  $\mu$ M TCDD の機能を評価した。U は未処理、D は 0.1 % DMSO、列 3-5 は 10  $\mu$ M の TCDD を 3、6、9 時間反応させた後に RNA を回収し RT-PCR を行った。

図 17 : FICZ は MAPK 依存的に ORF1 をクロマチンにリクルートさせた

(A) ORF1 は定常状態でクロマチンに局在した。HuH-7 細胞に ORF1-TAP (列 1-3) と EGFP-TAP (列 4-6) をそれぞれ導入して 2 日後に細胞分画を行った。細胞質 (Cyt、lane1、4)、核可溶性画分 (Sol、列 2、5)、クロマチン画分 (Chr、列 3、6) を示した。GAPDH は細胞質マーカー、H2AX はクロマチンマーカーを示した。ORF1 のクロマチン画分は列 3 に示した。(B) FICZ で ORF1 はクロマチンにリクルートした。A と同様の実験を行った結果を示した。クロマチン画分は 10 nM FICZ を 24 時間作用させた。列 1、3 は 0.001 % DMSO、列 2、4 は 10 nM FICZ を示した。Chr-ORF1 は ORF1 のクロマチン画分を示した。Cyt-ORF1 は ORF1 の細胞質画分を示した。(C) ORF1 のクロマチンリクルートは MAPK の阻害剤で抑制された。1  $\mu$ M SB202190 は 10 nM FICZ を添加する 30 分前に添加した。U は未処理 (列 1、4)、D は 0.001 % DMSO (列 2、5)、F は 10 nM FICZ (列 3、6) を示した。Chr-ORF1 は ORF1 のクロマチン画分を示した。Cyt-ORF1 は ORF1 の細胞質画分を示した。(D) FICZ の作用で ARNT1 と

ORF1 が相互作用した。HuH-7 細胞に pFlag-Streptag-EGFP (FS) (列 1-4) と pORF1-EGFP (ORF1) を導入した。24 時間後に 0.001 % DMSO (D、列 1、2、5、6) あるいは 10 nM FICZ (F、列 3、4、7、8) を 24 時間反応させた後に IP および WB (IP/WB) を行った。αA は ARNT1 抗体、αE は EGFP 抗体、IN は Input、Be は Beads 画分を示した。

図 18 : L1-Tg マウスのスクリーニング結果

L1-Tg マウスに用いた transgene の概略図を示した。ファウンダーマウス 17 系統を作製し、MEF を作製して X 線照射 (4.5 Gy) を行い、L1-RTP 誘導能を解析した結果を示した。列 1 は transgene 陰性の細胞で未処理、列 2 は transgene 陰性の細胞で X 線照射、列 3、4、7、8 は transgene 陽性の細胞で未処理、列 5、6、9、10 は transgene 陽性の細胞で X 線照射した細胞を示した。U は未処理、X は X 線照射したサンプルを示した。G1、G2 は同腹子の胎児から作製した MEF のグループ番号を示した。

図 19 : L1-Tg に FICZ を投与すると胸腺、脾臓で L1-RTP が誘導された

L1-Tg (#4) マウスに FICZ を血中濃度で 10 nM になるよう 1 日おきに 3 回腹腔内投与し、各組織から DNA を抽出した。D は DMSO、F は FICZ、I は ITE (AhR のリガンド物質) を示した。Thy は胸腺、Sp は脾臓、Ly はリンパ組織、BM は骨髄を示した。

図 20 : FICZ 投与により L1-RTP と RoR $\gamma$  の共局在した細胞が増加する

L1-Tg (#4) マウスに FICZ を血中濃度で 10 nM になるよう 1 日おきに 3 回腹腔内投与し、灌流固定後に凍結ブロックを作製した。(A) と (B) とともに酵素抗体法に

よる免疫染色した結果を示した。(A) FICZ 投与マウス胸腺の連続切片写真を示した。RoR $\gamma$  抗体は赤色、L1-RTP の指標である EGFP は青色で示した。検鏡倍率は 400 倍で Bar は 20  $\mu$ m 示した。(B) DMSO と FICZ を投与したマウスの胸腺の免疫染色像を示した。RoR $\gamma$  と EGFP を共染し、arrow head で示した箇所が共局在した細胞を示した。検鏡倍率は 100 倍で Bar は 20  $\mu$ m 示す。(C) 免疫染色した胸腺の RoR $\gamma$  と EGFP の共局在している細胞数をカウントした結果を示した。

図 21 : TPA は ERK 依存的に L1-RTP を誘導した

(A) コロニーアッセイのプロトコールを示した。TPA (10, 100, 200 nM) は  $1 \times 10^5$  個の pL1-Neo<sup>R</sup> を導入した細胞に添加し、800  $\mu$ g/ml G418 で薬剤選択を行った。写真のコロニー D は DMSO、T は 200 nM TPA を示した。U は未処理の細胞を示した。

(B) PCR 解析で TPA は L1-RTP を誘導した。RI は  $\beta$ -actin で標準化したバンド強度の値を示した。Mr はマーカ、U は未処理 (列 1)、D は DMSO (列 2)、列 3-9 は 200、100、10、1、0.1、0.01、0.001 nM TPA を示した。TPA は 48 時間作用させた。

(C) TPA は MAPK に関わる因子をリン酸化した。細胞は 200 nM TPA および 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 30 分反応させたものをサンプルとした。U は未処理、D は DMSO、T は 200 nM TPA、H は 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を示した。(D、E) TPA の L1-RTP は ERK 依存的であった。(D) は PCR 解析、(E) はコロニーアッセイを示した。PD98,058、SB202190、SP600125 はそれぞれ 20、1、100  $\mu$ M で使用し、30 分前に細胞に前処理した。TPA は 200 nM で使用した。

図 22 : DMBA は培養細胞で L1-RTP を誘導した

(A) DMBA は 1 nM と 10 nM でコロニーアッセイを行った。T は 200 nM TPA を示した。写真 D は DMSO、M は 10 nM DMBA、T は 200 nM TPA を示した。実験は図 14 A のプロトコールと同じように行った。(B) DMBA は AhR と ARNT1 依存的に L1-RTP を誘導した。実験は異なる配列の siRNA で 2 回行った。DMBA は 10 nM を用いた。(C) TPA の L1-RTP には AhR と ARNT1 は依存しない。各 siRNA は 10 nM を用いた。TPA は 200 nM、DMBA は 10 nM を用いた。各 siRNA は 10 nM を用いた。(D) TPA と DMBA は異なるシグナル経路で L1-RTP を誘導した。PD98, 058、SB202190、SP600125 はそれぞれ 20、1、100  $\mu$  M で使用し、30 分前に細胞に前処理した。TPA は 200 nM、DMBA は 10 nM で使用した。(E) TPA は EGFR 依存的に L1-RTP を誘導した。CL387, 785 (100 nM) を 200 nM TPA と 10 nM DMBA を添加する 60 分前に処理し、コロニーアッセイを行った。

図 23 : DMBA/TPA モデルを L1-Tg に用いると腫瘍組織で L1-RTP が誘導された

(A) DMBA/TPA を用いて腫瘍形成を行ったプロトコールを示した。写真の arrow head は腫瘍を示し、矢印は黒色斑点 (Nevi) を示した。(B) 腫瘍組織では L1-RTP を誘導するが、正常組織および尾部では L1-RTP は誘導されていない。N は正常組織、C は尾部、T は腫瘍を示した。No. 1、3、5、6 は#4 の腫瘍、No. 2、4、7、8 は#67 の腫瘍を示した。

図 24 : 免疫組織化学染色で L1-RTP は腫瘍マーカー p-Stat3 と共局在した

(A) H&E 染色したマウス腫瘍写真示した。上の写真は#4 (No. 1) の乳頭腫、下

の写真は#67 (No. 2) の角化棘細胞腫を示した。Bar は 50  $\mu$ M を示した。(B) L1-RTP は腫瘍組織で誘導されていた。免疫組織化学染色を EGFP 抗体 (緑色) と p-Stat3 抗体 (赤色) で行った。結果は No. 1 は乳頭腫で#4、No. 2 は角化棘細胞腫で#67 を示した。一番左の列は 2 次抗体のみを使用した結果を示した。青色は核染色 (Hoechst) を示した。Bar は 20  $\mu$ M を示した。(C) 黒色斑点での L1-RTP 誘導能を示した。N は正常組織で列 1、8、11、14、M は黒色斑点で列 2、3、4、5、6、9、12、15、T は腫瘍で列 7、10、13、16 を示した。

図 25 : Constitutive activated form の Stat3 では L1-RTP は誘導されない

(A) Stat3 発現ベクターの発現確認を行った。列 1 はコントロールベクター (V)、列 2 は野生型 Stat3 (W)、列 3 は Constitutive activated form の Stat3 (C) を示した。(B) Constitutive activated form の Stat3 の L1-RTP を誘導しない。列 1-4 は HuH-7 細胞、列 5-8 は MCF-7 細胞の結果を示した。列 1, 5 はコントロールベクター (V) を示した。列 2, 6 は野生型 Stat3 (W)、列 3, 7 は Constitutive activated form の Stat3 (C)、列 4, 8 は HIV-1 のアクセサリ遺伝子の Vpr 発現ベクター (Vpr) を示した (Vpr は positive コントロール)。(C) H-ras を一過性に発現させても Stat3 のリン酸化は誘導されない。細胞は MEF (C57BL6 マウス由来) を用い、V はコントロールベクター、R は H-ras (codon 12) 活性型ベクター (Fukamachi K at Nagoya City University Graduate School of Medical Science and Medical School から供与)、V-H はコントロールベクターを導入後、1 mM  $H_2O_2$  を 30 分反応させた positive コントロールを示した。

図 26 : L1-RTP はマウス皮膚で TPA でのみ誘導され、DMBA は誘導しない

(A) DMBA を前処理した細胞では L1-RTP は誘導されない。実験はプロトコールに従い行った。HuH-7 細胞に DMBA を 1 nM で 7 日間反応させた後に、pL1-Neo<sup>R</sup>を導入しコロニーアッセイを行った。Positive コントロールとして pL1-Neo<sup>R</sup>を導入した後に DMBA を 1 nM 反応させたものを使用した。(B) L1-Tg マウスの正常皮膚では TPA を塗ったときのみ L1-RTP を誘導した。実験はプロトコールに従って行った。マウス皮膚に塗った濃度を以下に示した。DMBA は 400 nmol を 200  $\mu$ l のアセトンで塗り、TPA は 17 nmol を 200  $\mu$ l のアセトンで塗った。D は DMSO、M は DMBA、T は TPA を示した。

図 27 : DMBA/TPA モデルで形成させた腫瘍から抽出したゲノム DNA の Gsta4 遺伝子

には異常な transposable 遺伝子の挿入はなかった

上の図は実験の概略を示した。4 つのプライマーセットを構築して解析を行った。列 1-3 は#67 の腫瘍、列 4 は#4 の腫瘍、列 5 は#67 の正常組織、列 6 は#4 の正常組織、列 7 は negative コントロール、列 8 はコントロールマウスの DNA を示した。

図 28 : 遺伝毒性物質の L1-RTP 誘導には AhR が必要である

(A) は 3-MC、(B)は B[a]p の L1-RTP を示した。HuH-7 細胞に pEF06R を導入後、AhR siRNA をトランスフェクションして 1  $\mu$ M 3-MC と 3  $\mu$ M B[a]p を添加し解析をした。

図 29 : L1-RTP 誘導物質は異なるシグナル機序で L1-RTP を誘導した

## 7. 参考文献

1. Lander ES, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**: 860–921.
2. Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 14572–9.
3. Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 2004; **303**: 1626–32.
4. Goodier JL, Kazazian HH Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 2008; **135**: 23–35.
5. Brouha B, et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5280–5.
6. Han JS, Szak ST, Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 2004; **429**: 268–74.
7. Muotri AR, et al. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*; 2005; **435**: 903–10.
8. Muotri AR, et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 2010; **468**: 443–6.
9. Coufal NG, et al. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 2009; **460**: 1127–31.



10. Muotri AR, Zhao C, Marchetto MC, Gage FH. Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus* 2009; **19**: 1002-7.
11. Ergün S, et al. Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J Biol Chem* 2004; **279**: 27753-63.
12. Lee J, et al. Different evolutionary fates of recently integrated human and chimpanzee LINE-1 retrotransposons. *Gene* 2007; **390**: 18-27.
13. Seleme MC, et al. Extensive individual variation in L1 retrotransposition capability contributes to human genetic diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 6611-6.
14. Babushok DV, Kazazian HH Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat* 2007; **28**: 527-39.
15. Martin SJ. The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. *J Biomed Biotechnol* 2006; 45621.
16. Doucet AJ, et al. Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS Genet* 2010; **6**: e1001150.
17. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 1996; **87**: 905-16.
18. Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* 2002; **21**: 5899-910.

19. Luan DD, Eickbush TH. Downstream 28S gene sequences on the RNA template affect the choice of primer and the accuracy of initiation by the R2 reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 4726-34.
20. Christensen SM, Eickbush TH. R2 target-primed reverse transcription: ordered cleavage and polymerization steps by protein subunits asymmetrically bound to the target DNA. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 6617-28.
21. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol* 2006; **357**: 1383-93.
22. Farkash EA, Kao GD, Horman SR, Prak ET. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acid Res* 2006; **34**: 1196-204.
23. Kale SP, Moore L, Deininger PL, Roy-Engel AM. Heavy metals stimulate human LINE-1 retrotransposition. *Int J Environ Res Public Health* 2005; **2**: 14-23.
24. Yu F, Zingler N, Schumann G, Strätling WH. Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**: 4493-501.
25. Teneng I, Stribinskis V, Ramos KS. Context-specific regulation of LINE-1. *Genes Cells* 2007; **12**: 1101-10.
26. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997; **13**: 335-40.

27. Hutnick LK, Huang X, Loo TC, Ma Z, Fan G. Repression of retrotransposal elements in mouse embryonic stem cells is primarily mediated by a DNA methylation-independent mechanism. *J Biol Chem* 2010; **285** : 21082-91.
28. Garcia-Perez JL, et al. Epigenetic silencing of engineered L1 retrotransposition events in human embryonic carcinoma cells. *Nature* 2010; **466** : 769-73.
29. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 2009; **10** : 691-703.
30. Symer DE, et al. Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell* 2002; **110** : 327-38.
31. Moran JV, DeBerardinis RJ, Kazazian HH Jr. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science* 1999; **283** : 1530-4.
32. Kazazian HH Jr, et al. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 1988; **332** : 164-6.
33. Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Férec C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Hum Genet* 2005; **117** : 411-27.

34. Morse B, Rotherg PG, Sourg VJ, Spandorfer JM, Astrin SM. Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature* 1988; **333**: 87-90.
35. Miki Y, et al. Disruption of the APC gene by a retrotransposable insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res* 1992; **52**: 643-5.
36. Oricchio E, et al. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene* 2007; **26**: 4226-33.
37. Ting DT, et al. Aberrant overexpression of satellite repeats in pancreatic and other epithelial cancers. *Science* 2011; **331**: 593-6.
38. Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, Medzhitov R. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 2008; **134**: 587-98.
39. Pepper M, Jenkins MK. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol* 2011; **12**:467-71.
40. Morrison PJ, Ballantyne SJ, Kullberg MC. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology* 2011; **133**: 397-408.
41. Chen DY, et al. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis Res Ther* 2011; **13**: R126.
42. Quintana FJ, et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the

- aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008; **453**: 65-71.
43. Veldhoen M, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008; **453**: 106-9.
44. Balmain A, Ramsden M, Bowden GT, Smith J. Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature* 1984; **307**: 658-60.
45. Nelson MA, Futscher BW, Kinsella T, Wymer J, Bowden GT. Detection of mutant Ha-ras genes in chemically initiated mouse skin epidermis before the development of benign tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 6398-402.
46. Chun KS, Kim SH, Song YS, Surh YJ. Celecoxib inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of AP-1 and p38 MAP kinase in mouse skin. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 713-22.
47. Casanova ML, et al. A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2002; **62**: 3402-7.
48. Bourcier C, et al. p44 mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1)-dependent signaling contributes to epithelial skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2006; **66**: 2700-7.
49. Chan KS, et al. Epidermal growth factor receptor-mediated activation of Stat3 during multistage skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2004; **64**: 2382-9.

50. Naito M, Chenicek KJ, Naito Y, DiGiovanni J. Susceptibility to phorbol ester skin tumor promotion in (C57BL/6 x DBA/2) F1 mice is inherited as an incomplete dominant trait: evidence for multi-locus involvement. *Carcinogenesis* 1988; **9**: 639-45.
51. Reiners JJ Jr, Nesnow S, Slaga TJ. Murine susceptibility to two-stage skin carcinogenesis is influenced by the agent used for promotion. *Carcinogenesis* 1984; **5**: 301-7.
52. Angel JM, Beltrán L, Minda K, Rupp T, DiGiovanni J. Association of a murine chromosome 9 locus (Psl1) with susceptibility to mouse skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Mol Carcinog* 1997; **20**: 162-7.
53. Feith DJ, et al. Mouse skin chemical carcinogenesis is inhibited by antizyme in promotion-sensitive and promotion-resistant genetic backgrounds. *Mol Carcinog* 2007; **46**: 453-65.
54. Angel JM, Caballero M, DiGiovanni J. Identification of novel genetic loci contributing to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate skin tumor promotion susceptibility in DBA/2 and C57BL/6 mice. *Cancer Res* 2003; **63**: 2747-51.
55. Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 2002; **141**: 131-60.
56. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 189-204.

57. Denison M S, Nagy S R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; **43**: 309-34.
58. Rannug A, et al. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J Biol Chem* 1987; **262**: 15422-7.
59. Oeberg M, Bergander L, Håkansson H, Rannug U, Rannug A. Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicol Sci* 2005; **85**: 935-43.
60. Eguchi H, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocation/hypoxia-inducible factor 1b is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem* 1997; **272**: 17640-7.
61. Wincent E, et al. The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem* 2009; **284**: 2690-6.
62. Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008; **18**: 207-50.
63. Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 1998;

- 273**: 2895–904.
64. Bennett BL, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 13681–6.
65. Hoshino S, et al. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol* 2010; **87**: 1133–43
66. Engedal N, Blomhoff HK. Combined action of ERK and NF kappa B mediates the protective effect of phorbol ester on Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 10934–41.
67. Kobayashi S, Shimamura T, Monti S et al. Transcriptional profiling identifies cyclin D1 as a critical downstream effector of mutant epidermal growth factor receptor signaling. *Cancer Res* 2006; **66**: 11389–98.
68. Gilbert N, Lutz S, Morrish TA, Moran JV. Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 7780–95.
69. Hoffman EC et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991; **252**: 954–8.
70. Saeki K , Saeki K , Yuo A . Distinct involvement of cAMP-response element-dependent transcriptions in functional and morphological maturation during retinoid-mediated human myeloid differentiation. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 673–81.



71. Rigaut G, et al. A genetic protein purification method for protein complex characterization and protease exploration. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 1030-2.
72. Wallace N, Wagstaff BJ, Deininger PL, Roy-Engel AM. LINE-1 ORF-1 protein enhances Alu SINE retrotransposition. 2008 *Gene*; **419**: 1-6.
73. Kanda T, Sullivan KF, Wahl GM. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. 1998 *Curret Biol*; **8**: 377-85.
74. Okamura T, et al. Bilateral congenital cataracts result from a gain-of-function mutation in the gene for aquaporin-0 in mice. *GENOMICS* 2003; **81**: 361-8.
75. Tsunoda T, et al. Immune-related zinc finger gene ZFAT is an essential transcriptional regulator for hematopoietic differentiation in blood islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 14199-204.
76. Fitsche E, et al. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmic target for ultraviolet B radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 8851-6.
77. Baba T, et al. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem* 2001; **276**: 33101-10.
78. Dougherty EJ, Pollenz RS. Analysis of Ah receptor-ARNT and Ah receptor-ARNT2 complexes in vitro and in cell culture. *Toxicol Sci* 2008; **103**: 191-206.
79. Kwon MJ, Jeong KS, Choi EJ, Lee BH. 2,3,7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced activation of mitogen-activated protein kinase signaling

- pathway in Jurkat T cells. *Pharmacol Toxicol* 2003; **93**: 186-90.
80. Stribinskis V, Ramos KS. Activation of human long interspersed nucleotide element 1 retrotransposition by benzo[*a*]pyrene, an ubiquitous environmental carcinogen. *Cancer Res* 2006; **66**: 2616-20.
81. Roman AC, Benitez DA, Carvajal-Gonzalez JM, Fernandez-Salguero PM. Genome-wide B1 retrotransposon binds the transcription factors dioxin receptor and slug and regulates gene expression *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 1632-7.
82. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5858-68.
83. Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH Jr. LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 6469-83.
84. Shen Y, Devgan G, Darnell Jr, JE, Bromberg JF. Constitutively activated stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated stat1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 1543-8.
85. Gough DJ, Corlett A, Schlensinger K, Wegrzyn J, Larner AC, Levy DE. Mitochondrial stat3 supports ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 2009; **324**: 1713-6.

86. Abel EL, et al. Evidence that Gsta4 modifies susceptibility to skin tumor development in mice and humans. *J Natl Cancer Inst* 2010; **102**: 1663-75.
87. Angel JM, Caballero M, DiGiovanni J. Confirmation of the mapping of a 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate promotion susceptibility locus, Psl1, to distal mouse chromosome 9. *Mol Carcinog* 2001; **32**: 169-75.
88. Kaminsky LS, Fasco MJ. Small intestinal cytochromes P450. *Crit Rev Toxicol* 1991; **21**: 407-22.
89. Shimizu Y, et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 779-82.
90. Rohrmann S, Hermann S, Linseisen J. Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study. *Am J Clin Nutr* 2009; **89**: 1418-24.
91. Sinha R, et al. Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. *Cancer Res* 2005; **65**: 8034-41.
92. Suzuki Y et al. Increased serum kynurenine/tryptophan ratio correlates with disease progression in lung cancer. *Lung Cancer* 2010; **67**: 361-5.
93. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell* 2002; **110**: 315-25.
94. Bartkova J, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 2006; **444**: 633-7.

95. Di Micco R, et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 2006; **444**: 638-42.
96. Furano AV, Duvernell DD, Boissinot S. L1 (LINE-1) retrotransposon diversity differs dramatically between mammals and fish. *Trends Genet* 2004; **20**: 9-14.
97. Dong C, Poulter RT, Han JS. LINE-like retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2009; **18**: 301-311.
98. Laub LB, Jones BD, Powell WH. Responsiveness of a *Xenopus laevis* cell line to the aryl hydrocarbon receptor ligands 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Chem Biol Interact* 2010; **183**: 202-211.
99. Jönsson ME et al. The tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) binds multiple AHRs and induces multiple CYP1 genes via AHR2 in zebrafish. *Chem Biol Interact* 2009; **181**:447-54.

# 表1

## Elements

LINE-1

## 疾患

血友病-A

血友病-B

$\beta$ -サラセミア

慢性肉芽腫症

筋ジストロフィー

拡張性心筋症

色素性網膜症

大腸癌

乳癌

## 標的遺伝子

FVIII遺伝子

FIX遺伝子

$\beta$ -globin遺伝子

Cyt-b遺伝子

DMD遺伝子

DMD遺伝子

RP-2 遺伝子

APC遺伝子

C-myc遺伝子

# 表 2

Genes			Nucleotide sequences (-5'<<3'-)
<i>AhR</i>	-1	Se	GCAUGAUAGUUUCCGGCUTT
		AS	AGCCGGAAAACUAUCAUGCCA
	-2	Se	GGCUCUUUCAAGAUAGUAATT
		AS	UUACUAUCUUGAAAGAGCCCT
	-3	Se	CGGAUGAAAUCCUGACGUATT
		AS	UACGUCAGGAUUUCAUCCGTT
<i>ARNT1</i>	-1	Se	GGCGUAUCCUGGAUCUAAATT
		AS	UUUAGA UCCAGGAUACGCCCT
	-2	Se	CAGUUUCUGUGAAUAGGCUTT
		AS	AGCCUAUUCACAGAAACUGGG
<i>CREB</i>	-1	Se	GCUGGCUAACAAUGGUACCTT
		AS	GGUACCAUUGUUAGCCAGCTG
	-2	Se	CCAAUCCCUUGAGUUUAUUTT
		AS	AUAUAACUCAAGGGAUUGGTT
	-3	Se	GGUGGAAAAUGGACUGGCUTT
		AS	AGCCAGUCCAUUUUCCACCTT
<i>AhRR</i>	-1	Se	GGGACGAUAUUUUAUGCAUTT
		AS	AUGCAUAAAAUAUCGUCCCTT
	-2	Se	CCCAAUUACUCAGCAGGAATT
		AS	UCCUGCUGAGUAAUUGGGTT
	-3	Se	GGAUGCACCUGAAAACAGATT
		AS	UCUGUUUUCAGGUGCAUCCTG
<i>ARNT2</i>	-1	Se	CCAGAGAGAUGGAUUGUCATT
		AS	UGACAAUCCAUCUCUCUGGTG
	-2	Se	CUAUAACAUCGAAGACUUUTT
		AS	AAAGUCUUCGAUGUUAUAGTT
	-3	Se	CACUGUACAGGAUACAUCATT
		AS	AAAGUCUUCGAUGUUAUAGTT

# 表3

Transgenic Lines	Number of Copies by Southern Blot Analysis	Number of Copies by qPCR Assay	
	Copies Number(n) <sup>†</sup>	Copies Number(n) <sup>†</sup>	SD <sup>‡</sup>
#4	~ 10	12(4)	1.03
#67	~ 20	22(4)	0.14

~, approximately

<sup>†</sup>Total number of transgenic mice analyzed in different lines by Southern blot analysis and genomic qPCR assay.

<sup>‡</sup>Standard deviation of copy number determined by among mice of the same transgenic line.

Primers			
Target Gene	Primers	Sequence	Length
EGFP	Forward	5'- TACAGGGTTCATGGTGGCAAGA -3'	329 bp
	Reverse	5'- GGGCACAAGCTGGAGTACAACATA -3'	
Zfat	Forward	5'- TGCCAAATGCATTACCATCC -3'	200 bp
	Reverse	5'- CAAAGCTGAGTTCCTTCTGG -3'	

# 表 4

Mouse lines	Tumors	Normal skin tissues	Nevi
#4	4/4 <sup>†</sup>	0/6	0/1
#67	9/11	0/14	1/7
Total	13/15 (87 %) <sup>‡</sup>	0/20	1 (13 %)

<sup>†</sup> Positive numbers / examined

<sup>‡</sup> Number (%).  $P < 0.001$ , p-value was based on Fisher's exact test. OR (95 % CI) was 46.

有効数字は 2 桁とした。



# 表 5

Mouse lines	Tumors				Nevi		
	No	L1-RTP	<i>Ha-ras</i> <sup>†</sup>	L1 <sup>‡</sup> / <i>Ha-ras</i>	No	L1	H-ras
#4	4	4	3	3	1	0	0
#67	11	9	8	6	7	1	0
Total	15	13 (87 %)	11 (73 %)	9 (60 %)	8	1 (12 %)	0

† From A to T at the first letter of codon 61 of *Ha-ras*

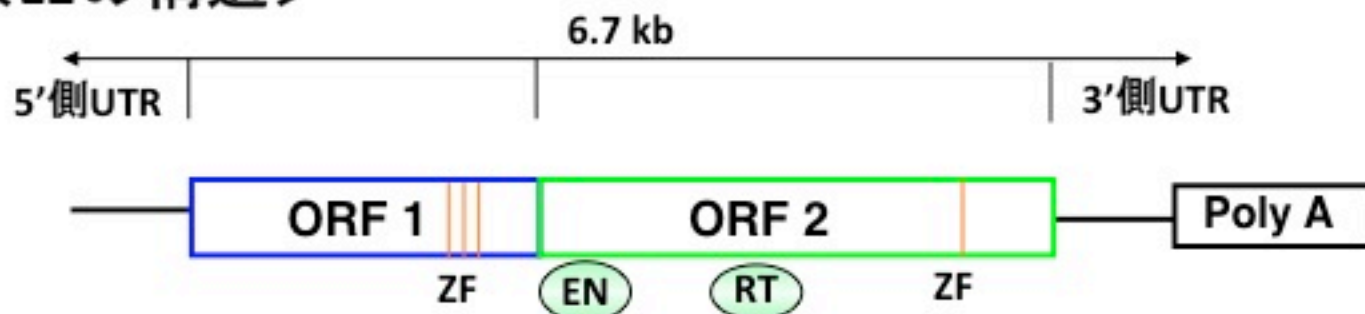
‡ L1-RTP

有効数字は 2 桁とした。

# 図 1

## ●LINE-1 (Long Interspersed Nucleotide Element-1: L1)

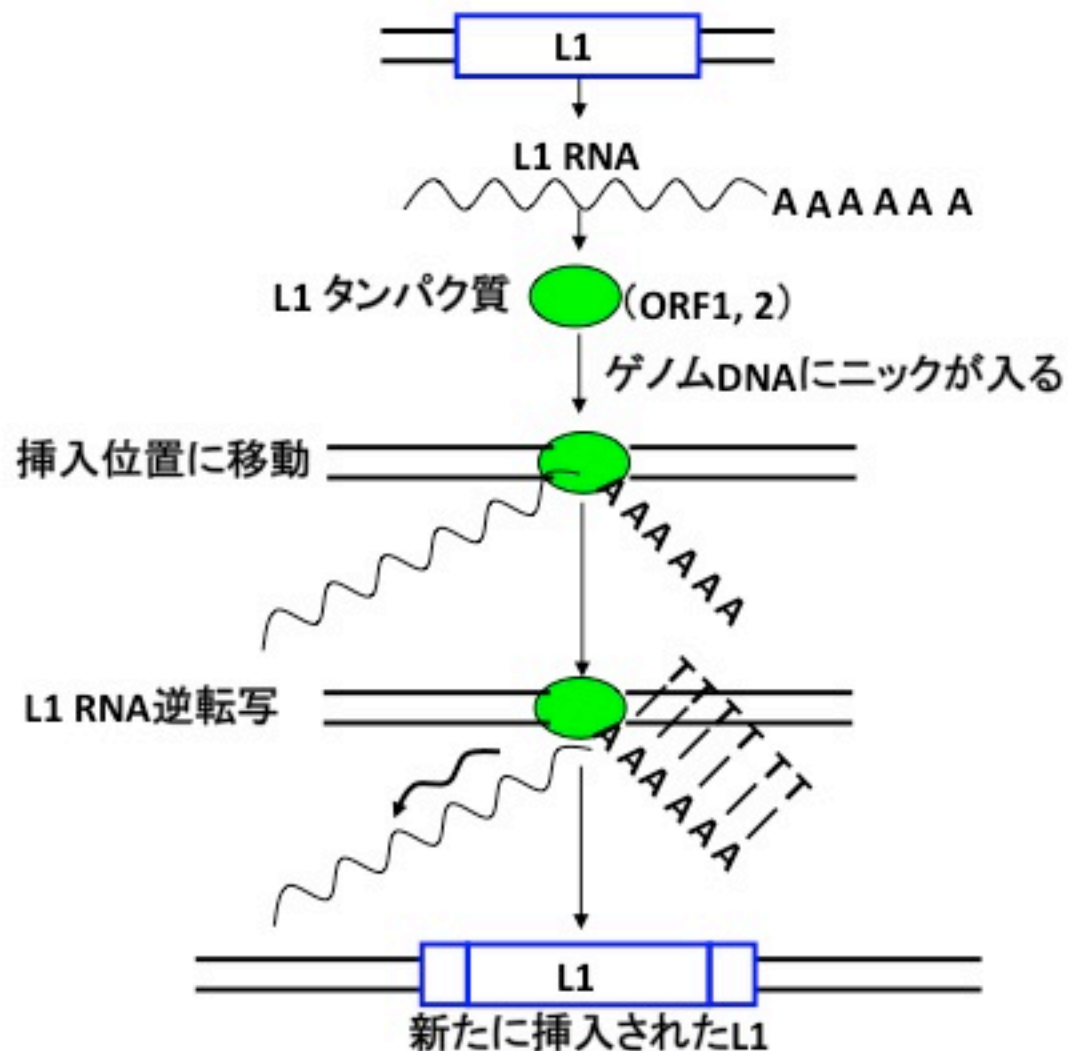
### <L1の構造>



(ZF : ジンクフィンガー様構造. EN : エンドヌクレアーゼ, RT : 逆転写酵素)

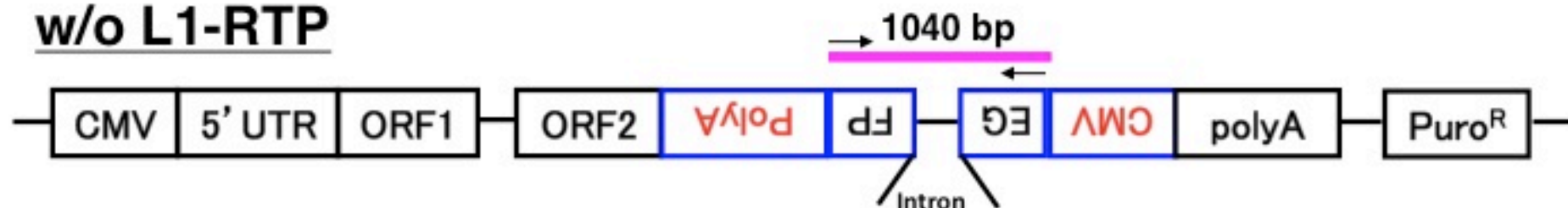
## 図2

### ●TPRT (target-DNA primed reverse transcription)

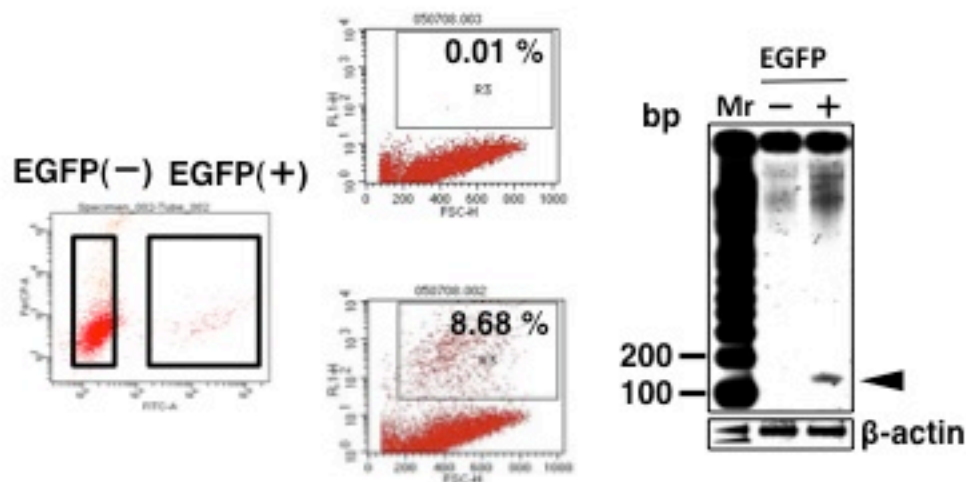


# 図3

w/o L1-RTP

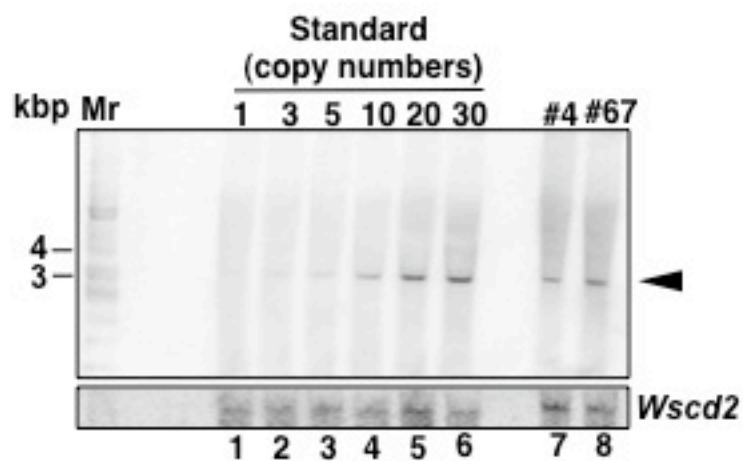
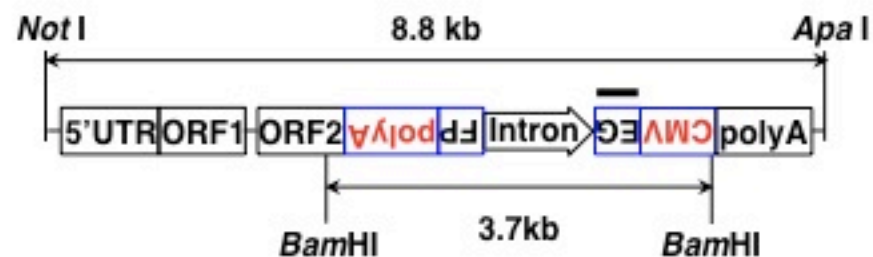


with L1-RTP

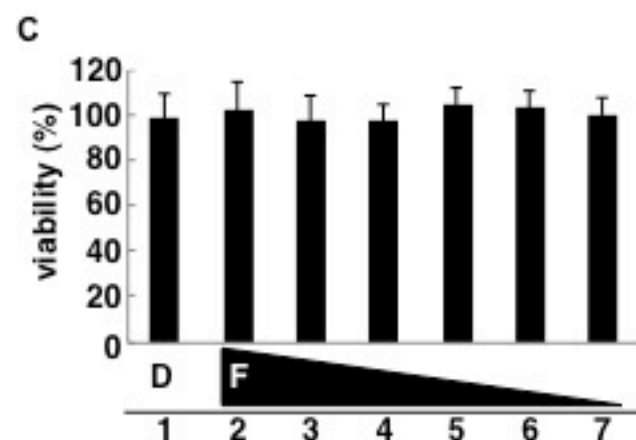
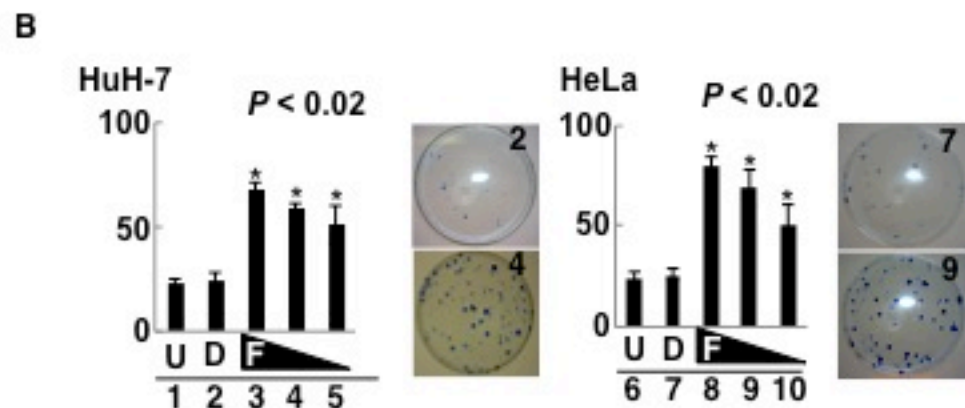
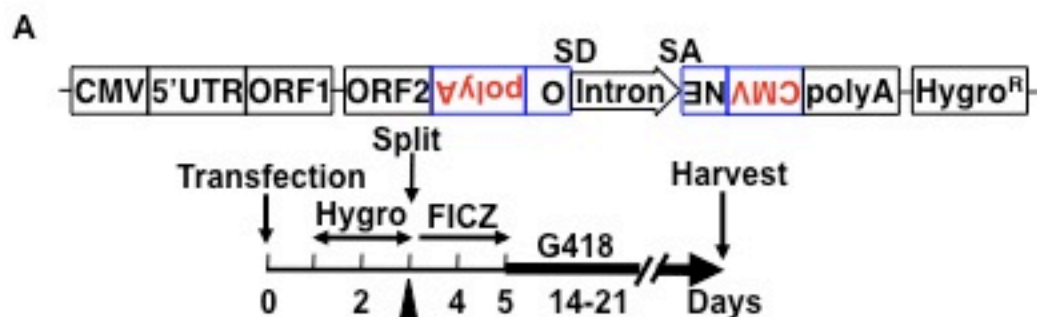


Cell : HEK293T

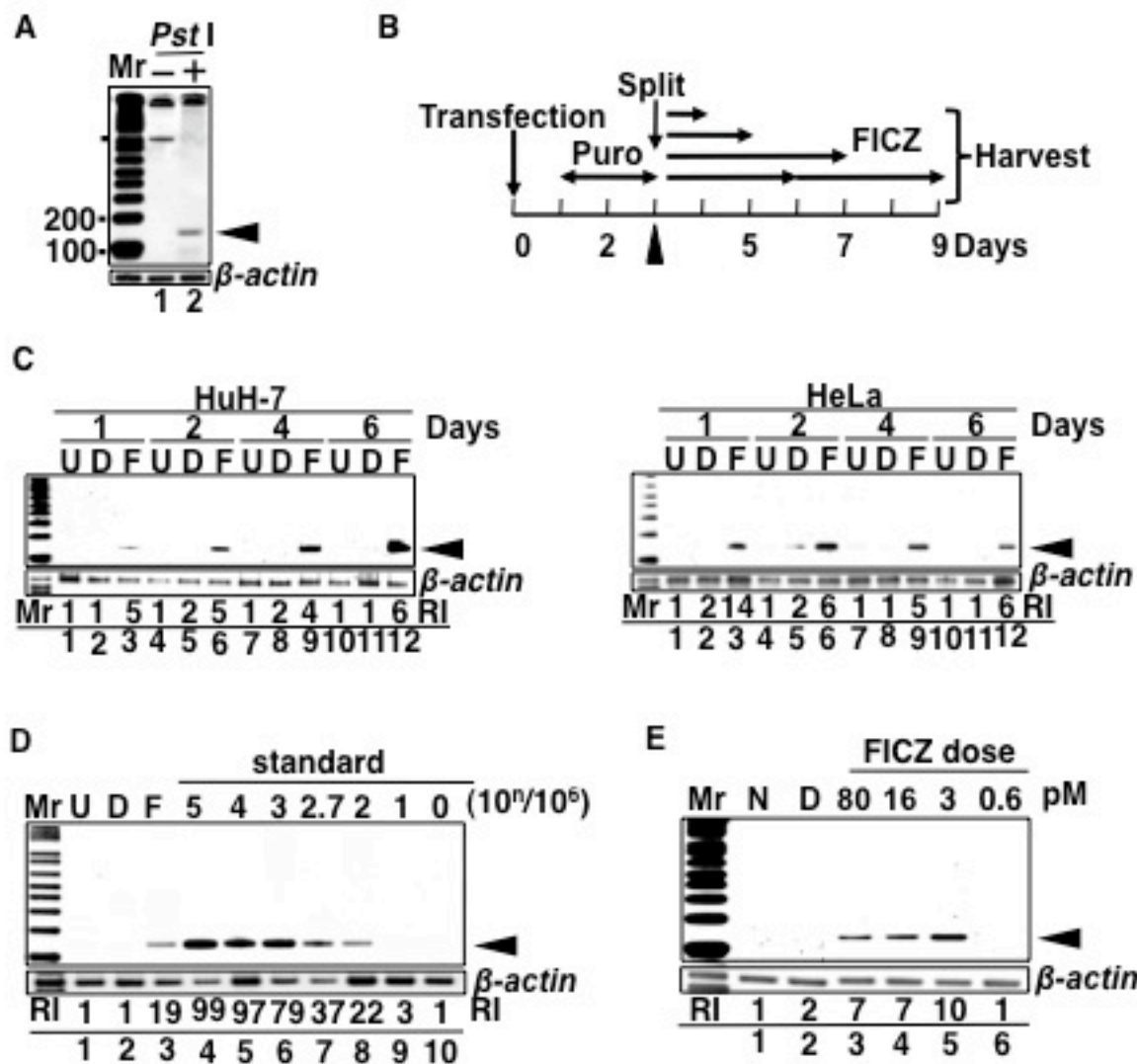
# 图4



# 图5



# 图6

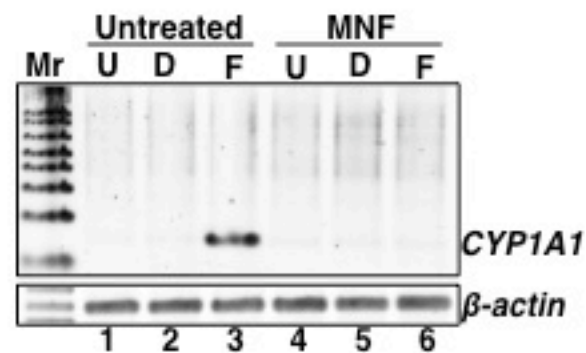


# 图7

A

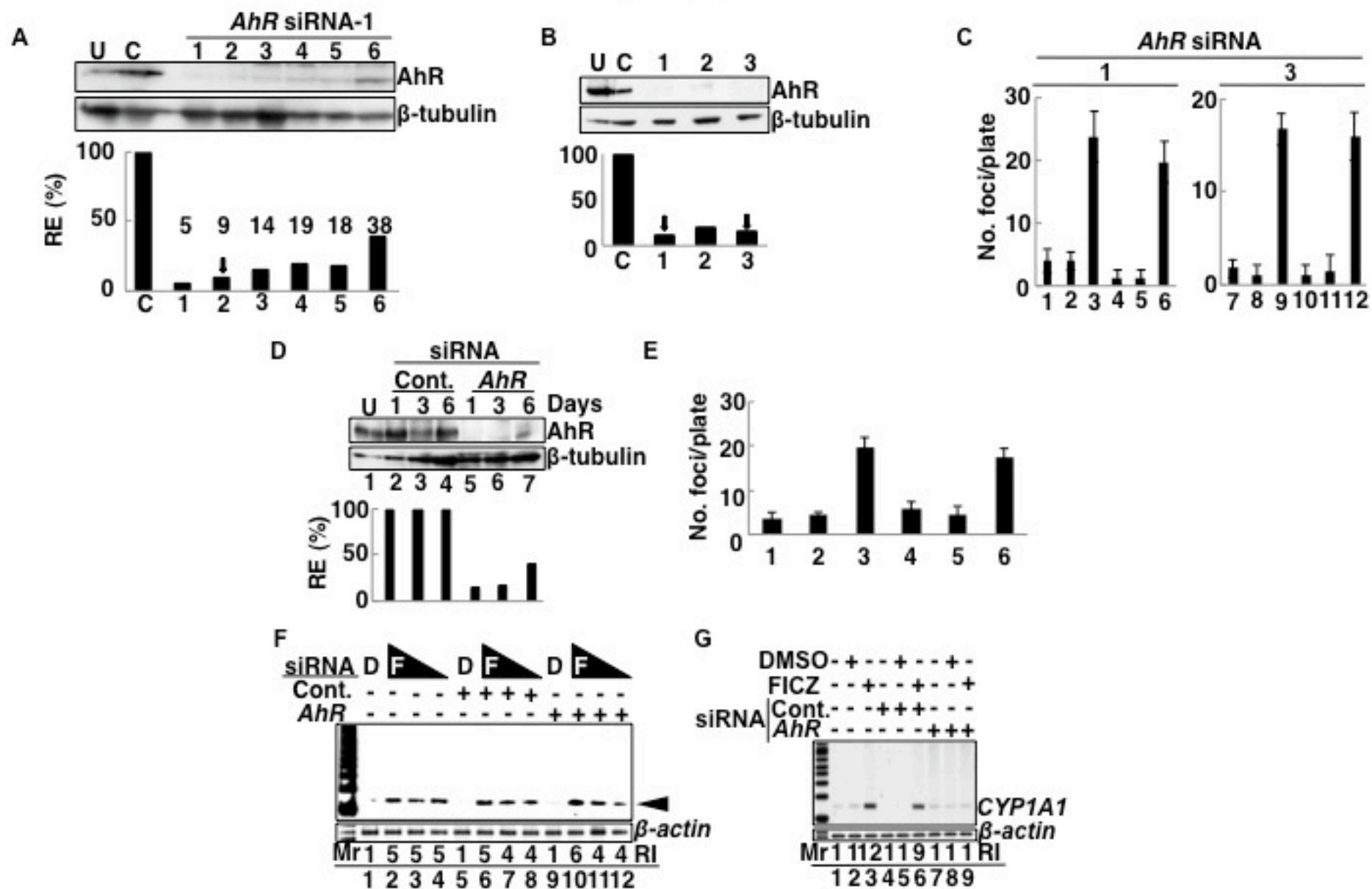


B

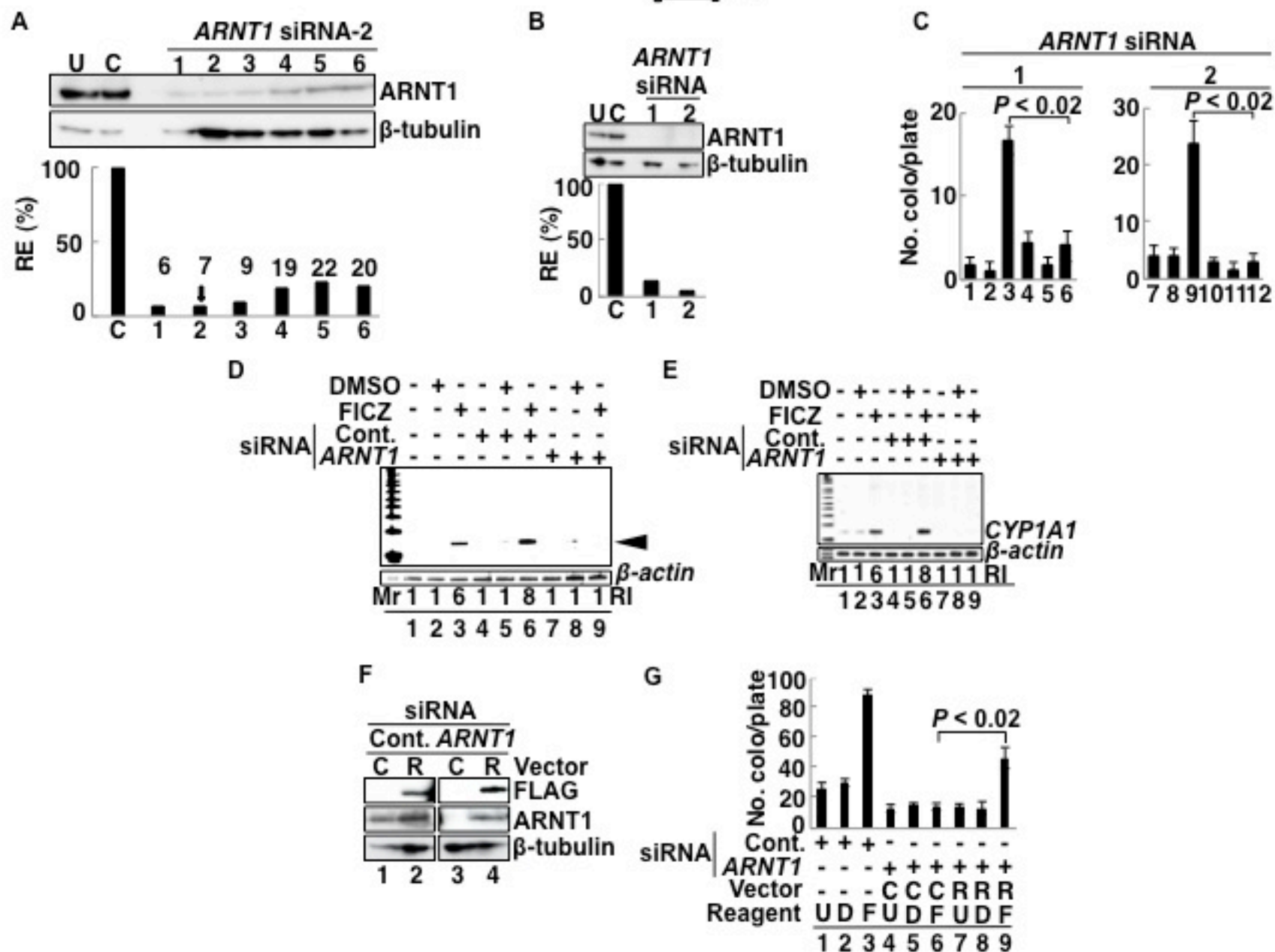




# 图8

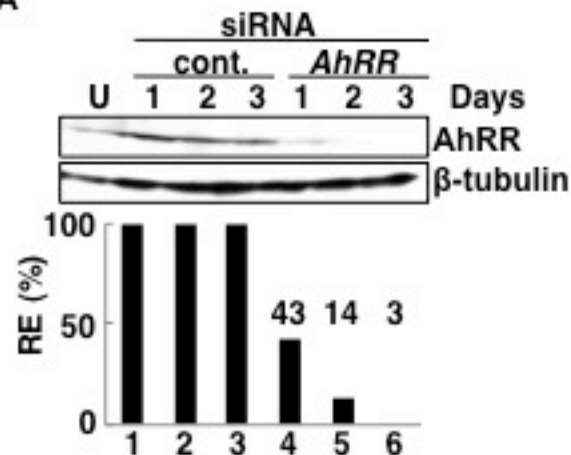


# 图9

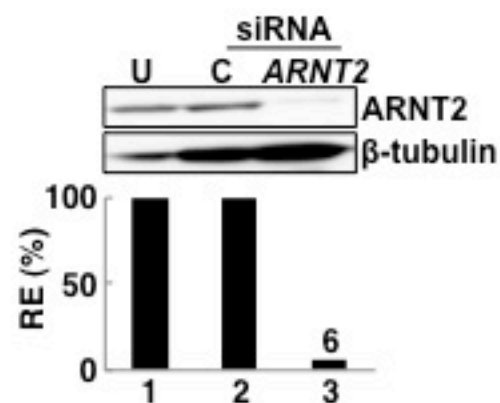


# 图10

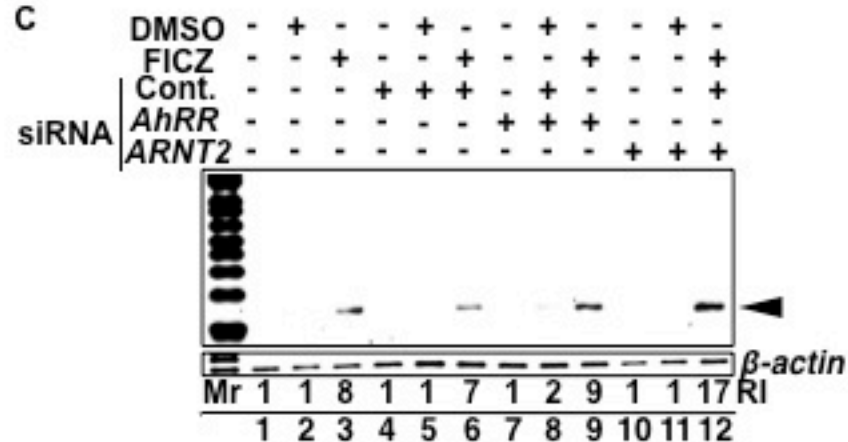
A



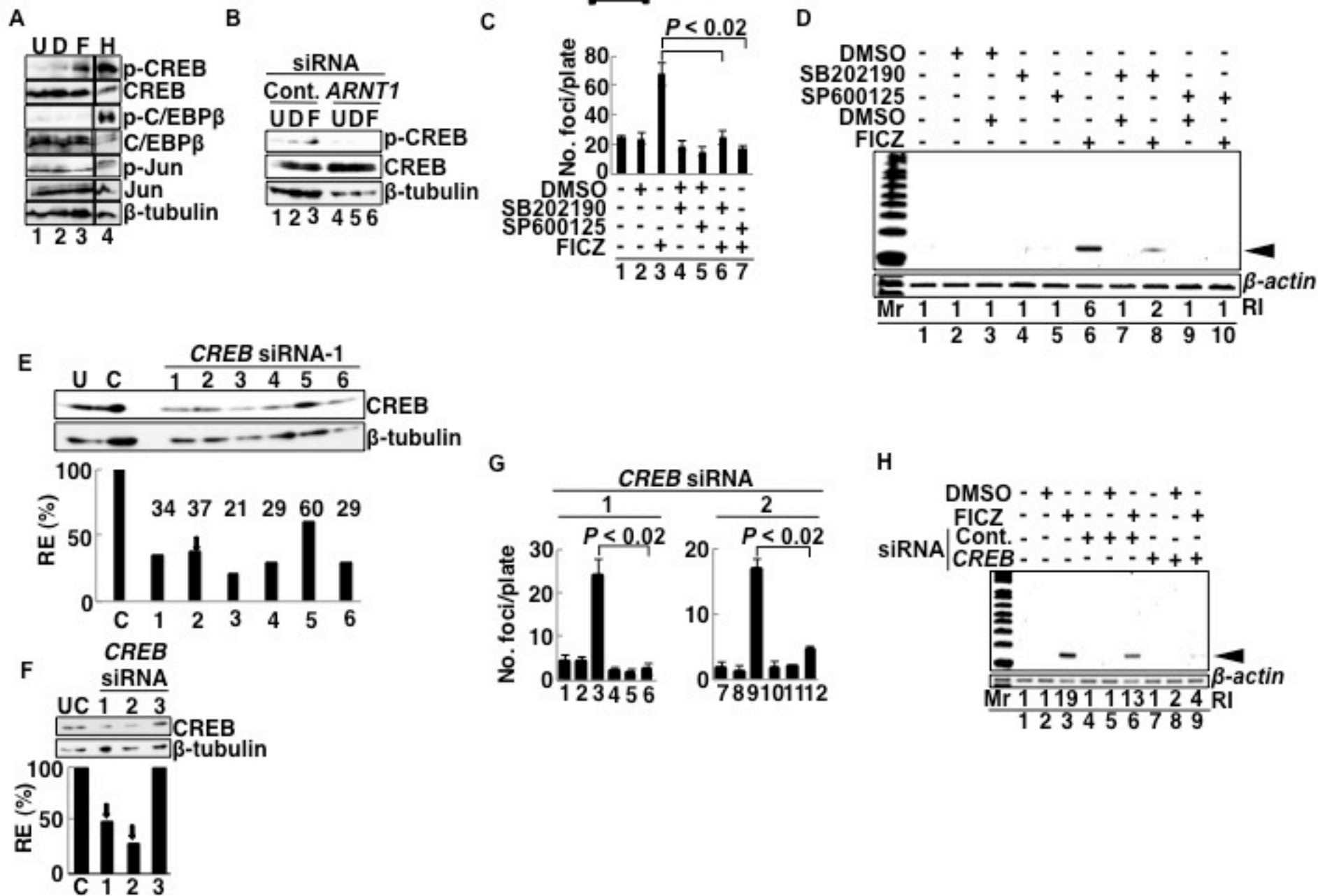
B



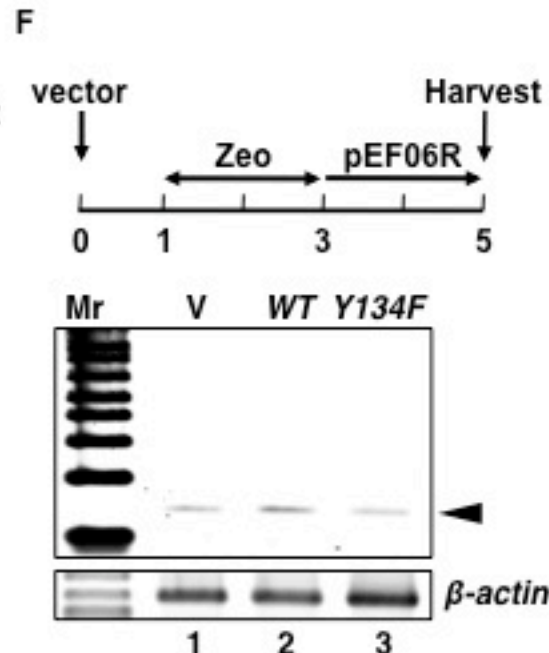
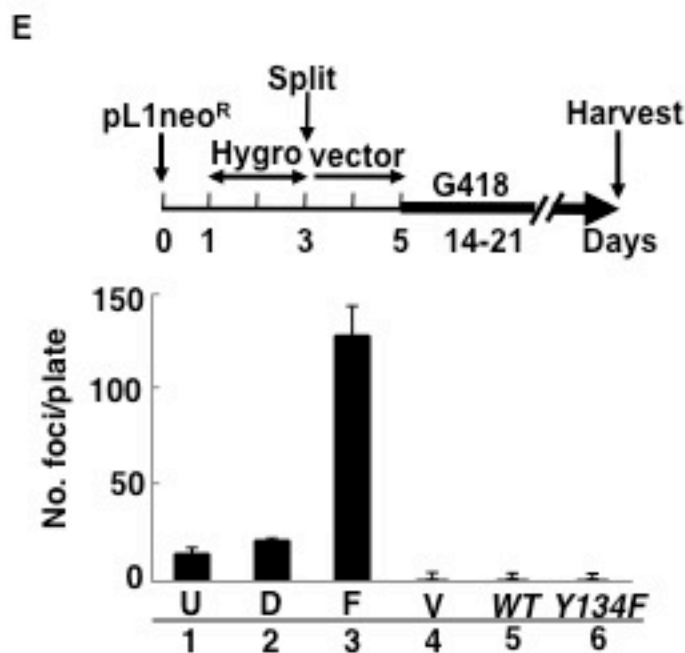
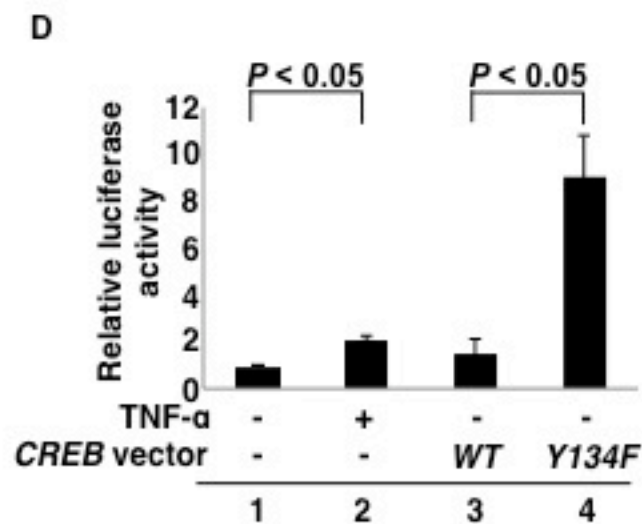
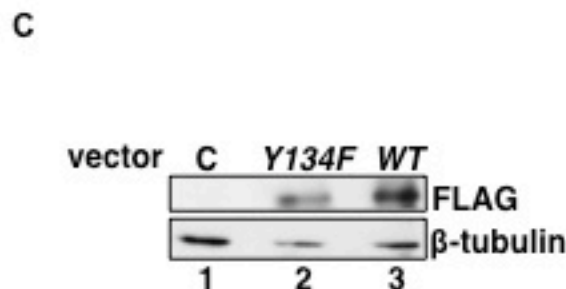
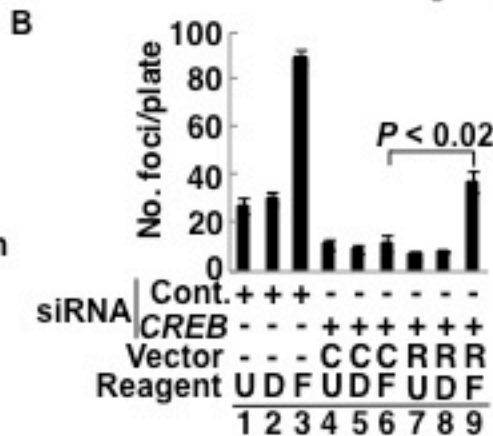
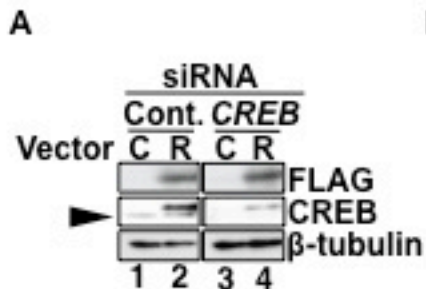
C



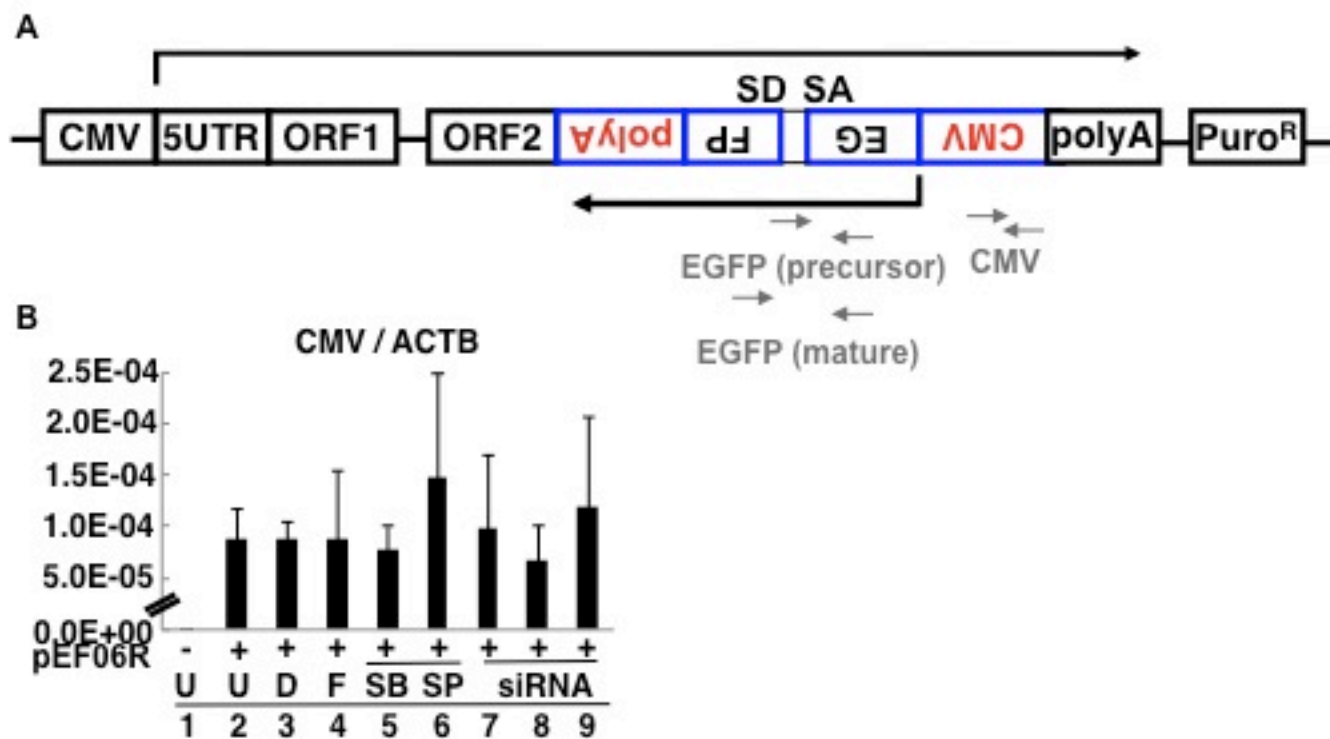
# 图 11



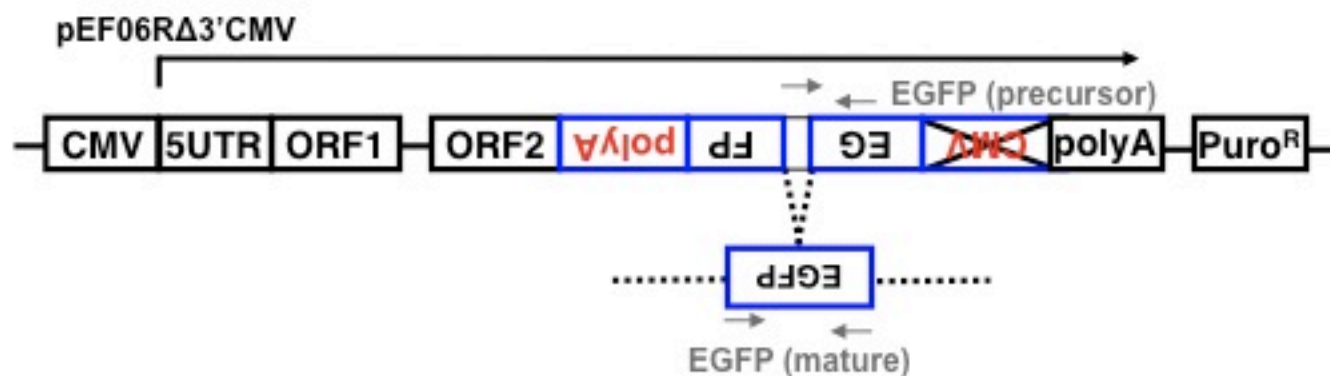
# 图12



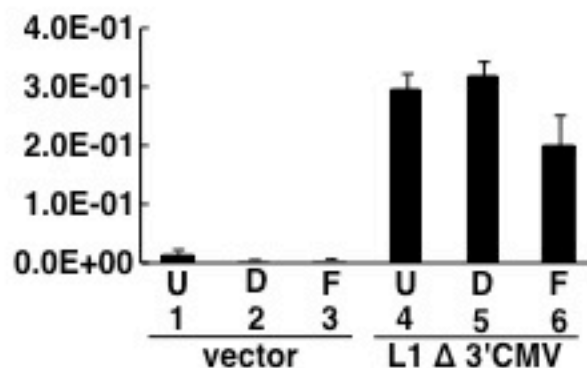
# 图13



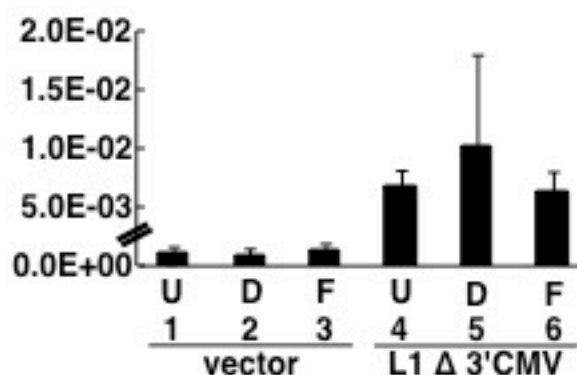
# 图14



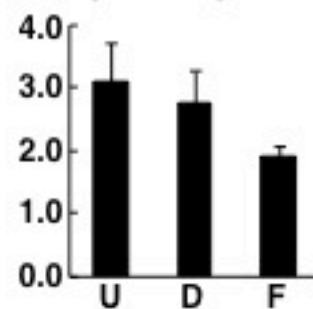
EGFP-precursor/ ACTB



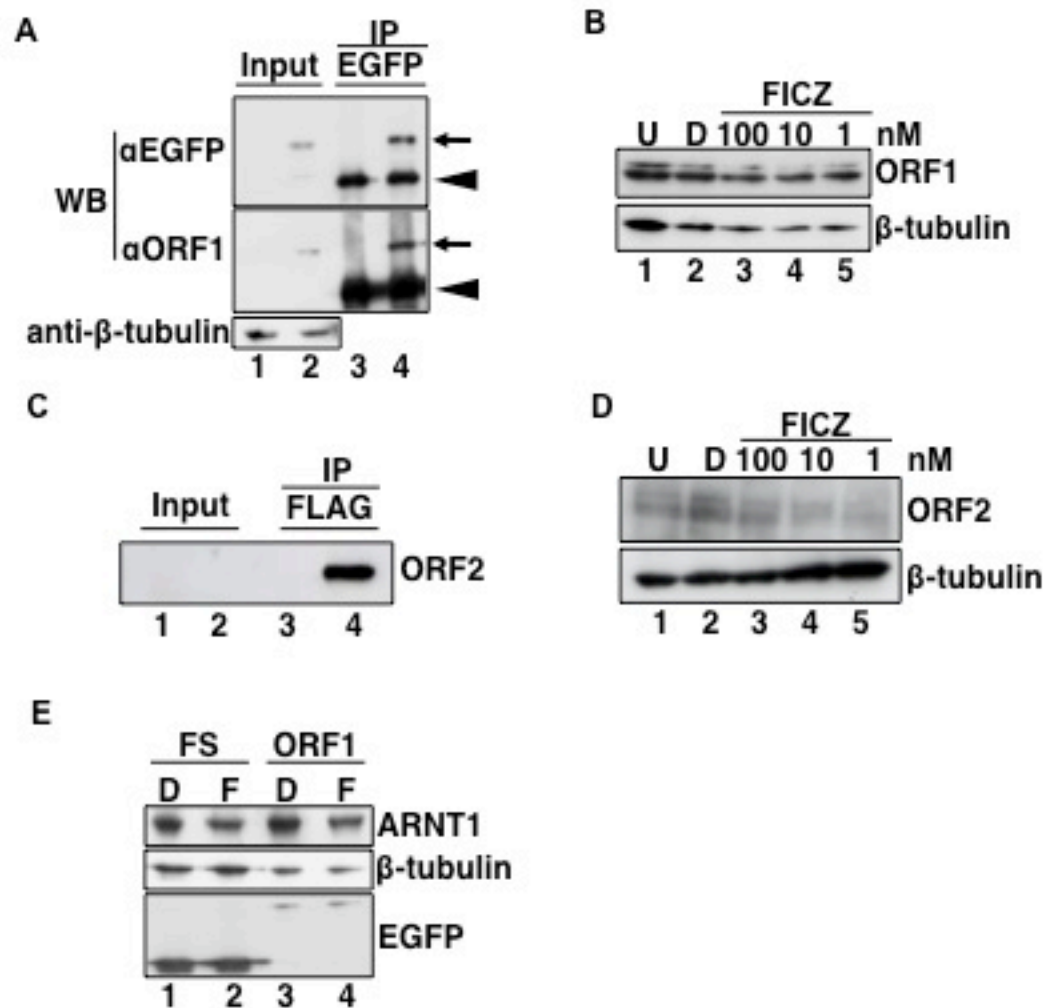
EGFP-mature/ ACTB



ORF2/ ACTB

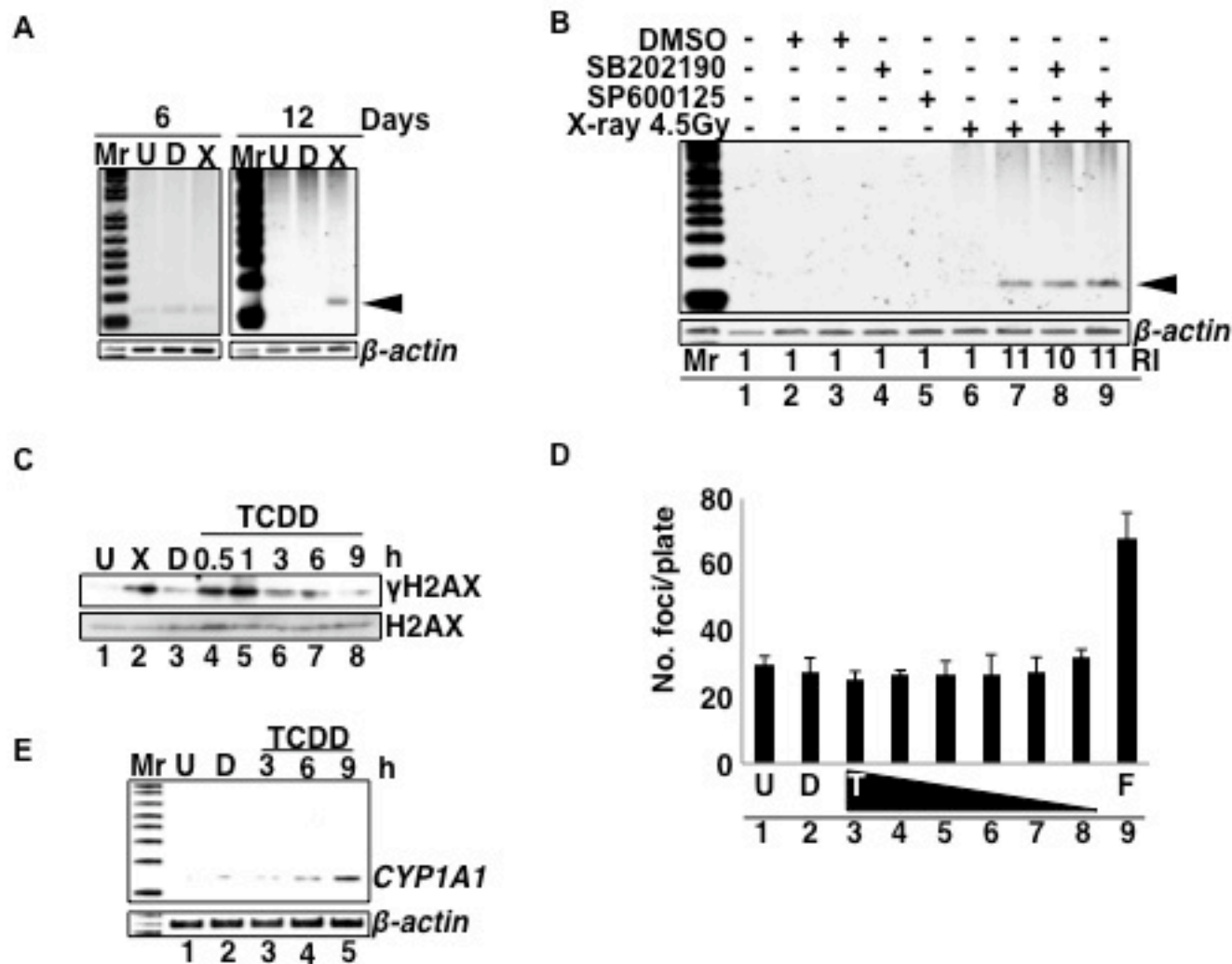


# 图15

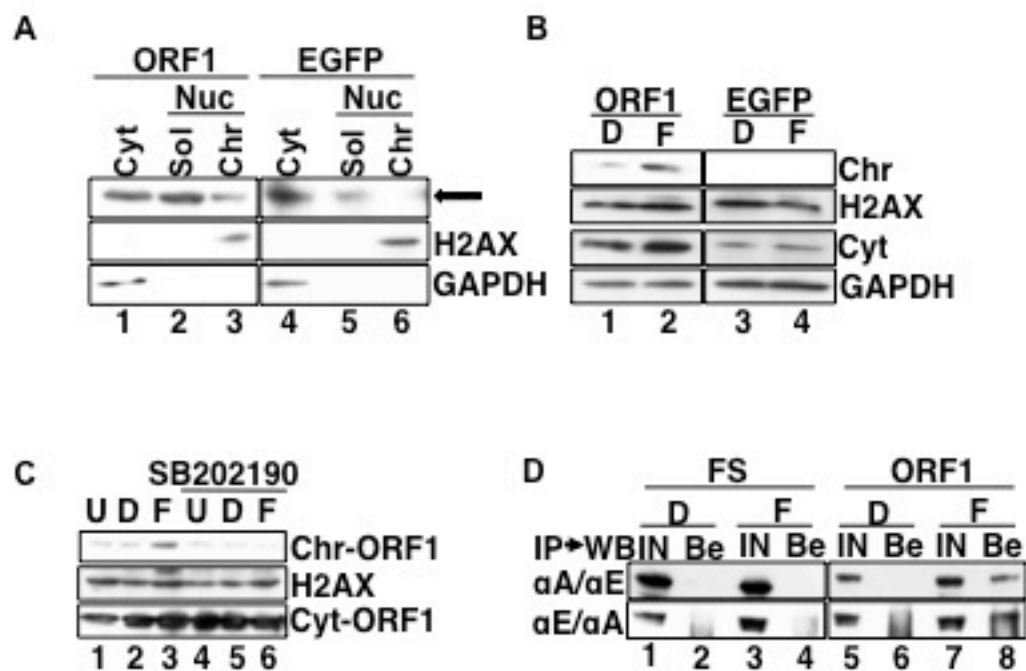




# 图16



# 图17



# 図18

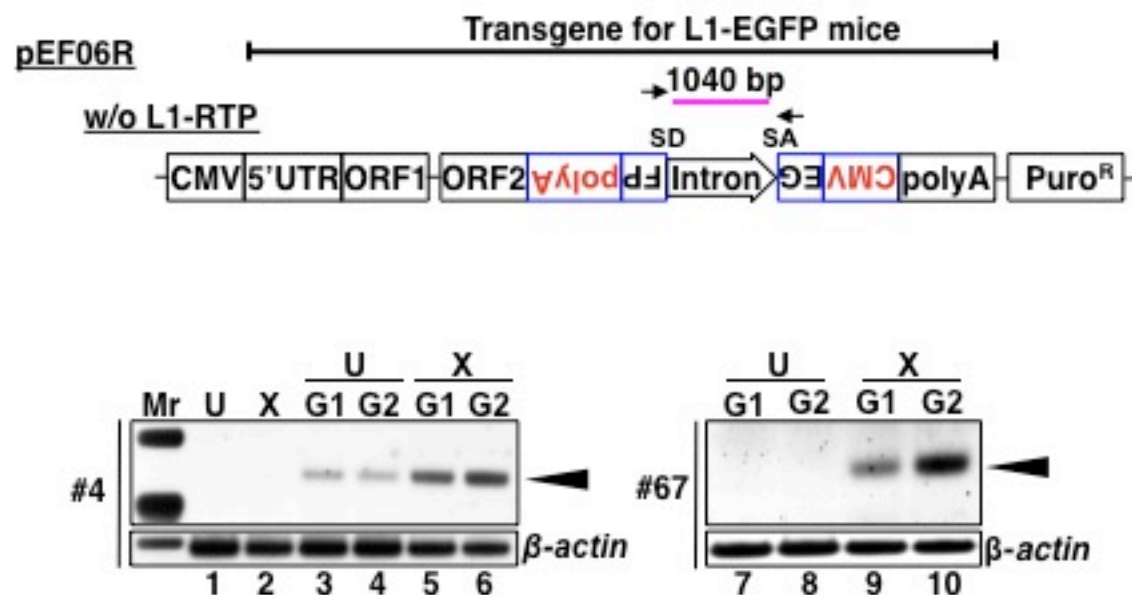
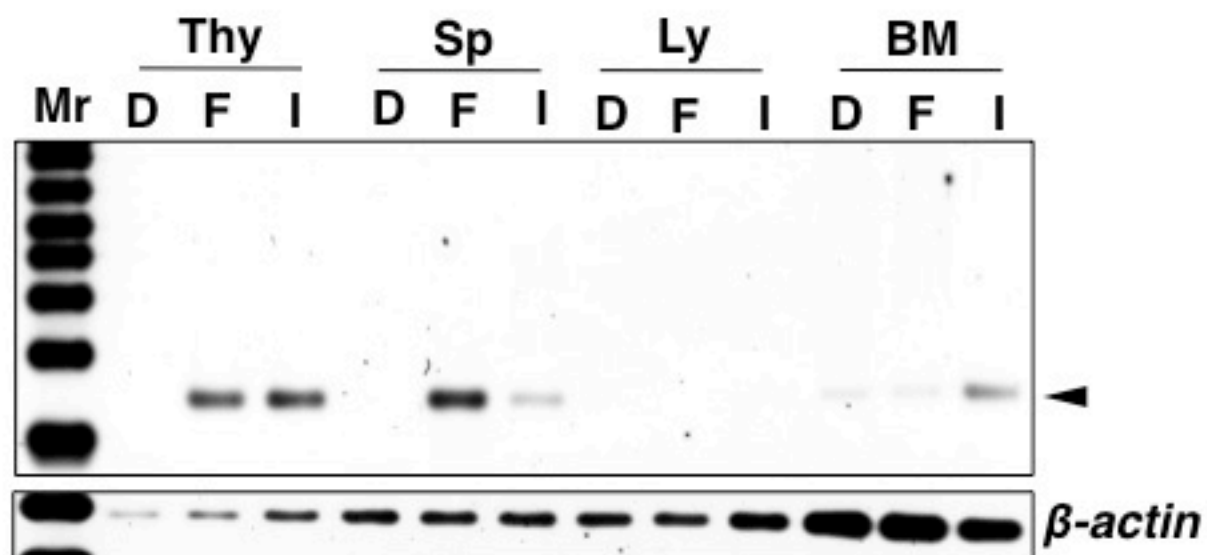
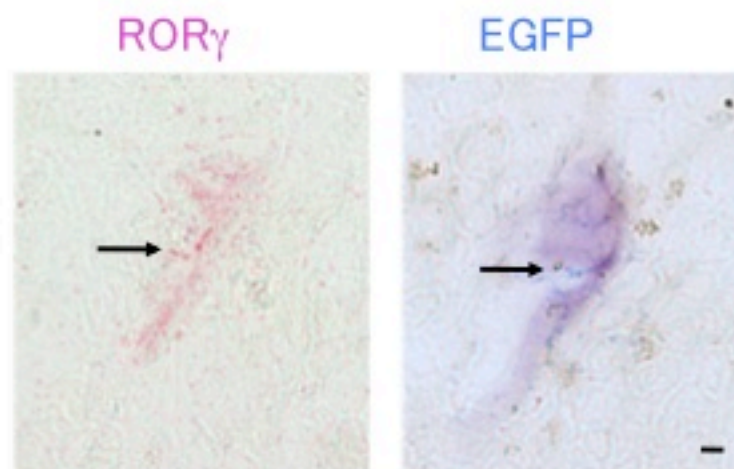


图19

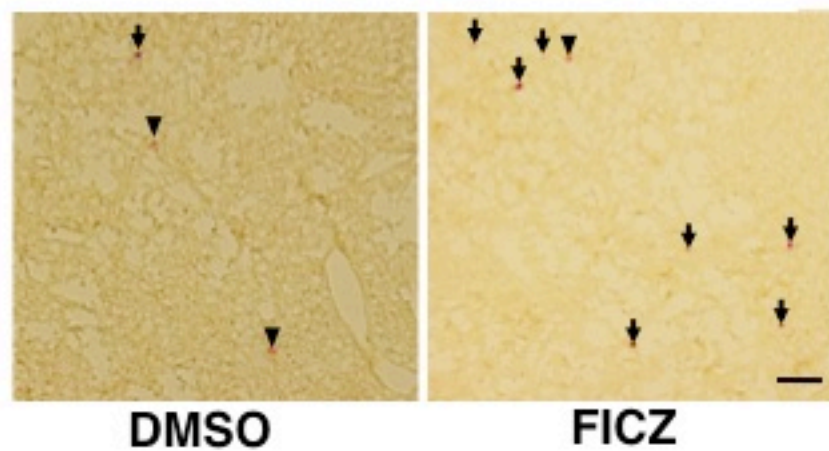


# 図20

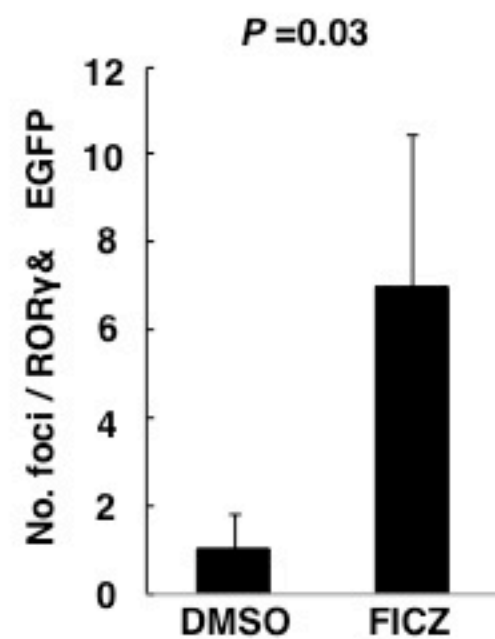
A



B

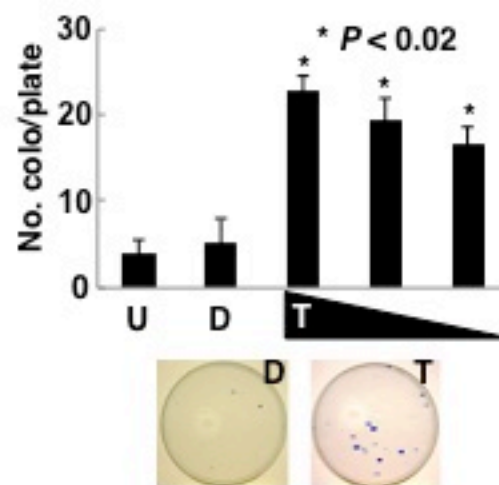


C

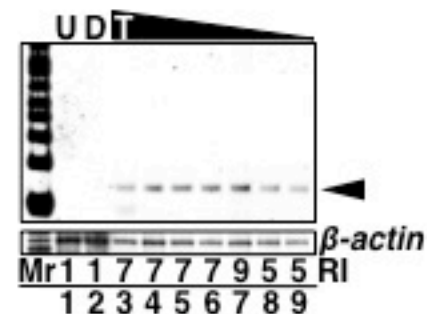


# 图21

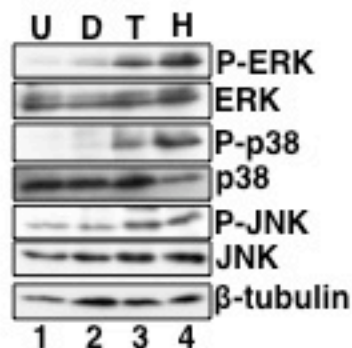
A



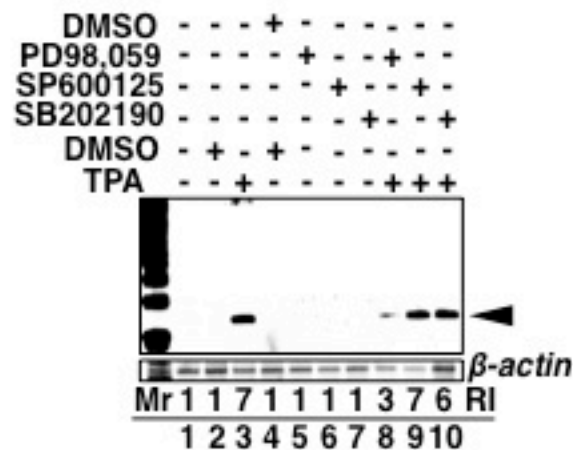
B



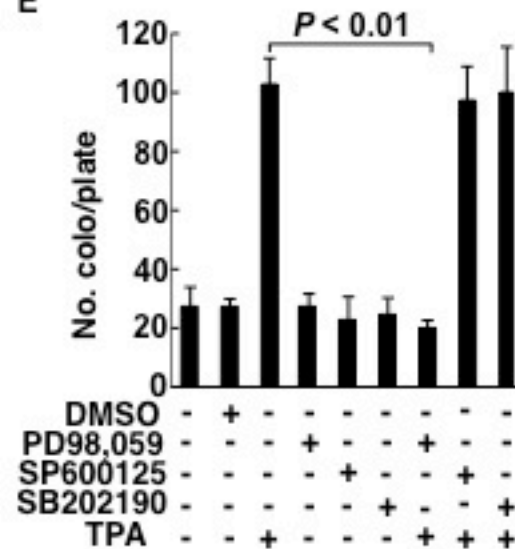
C



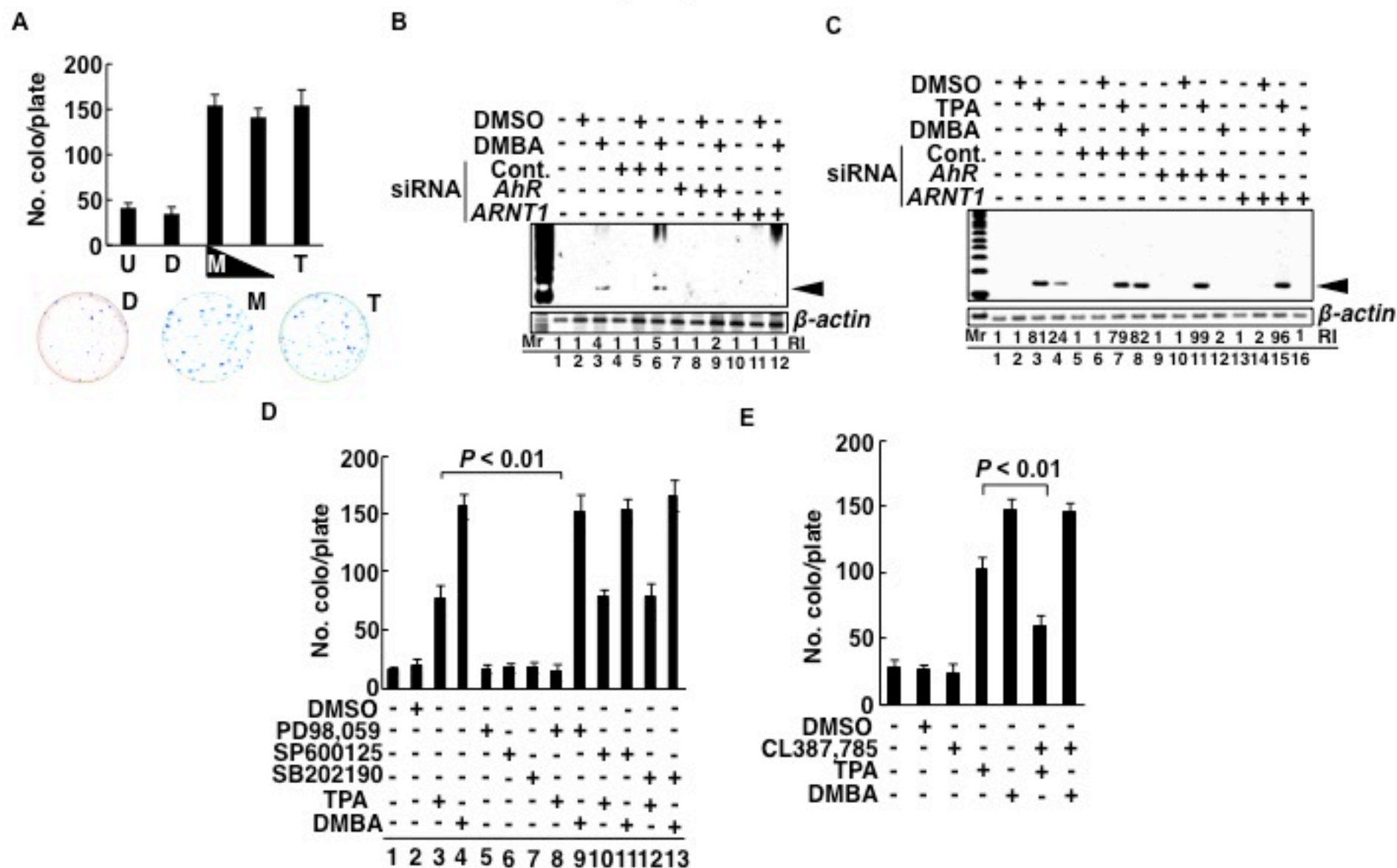
D



E

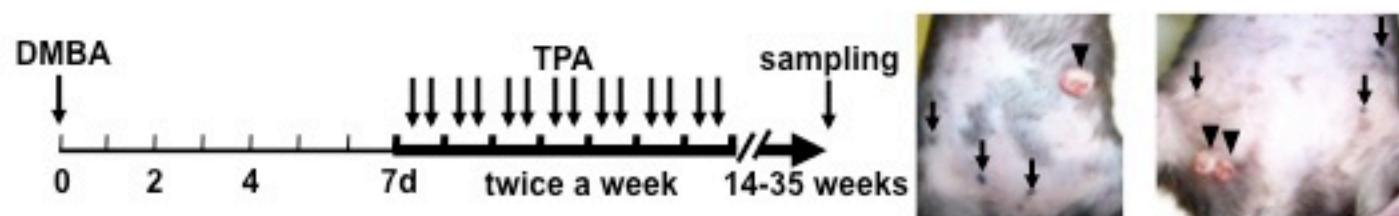


# 图22

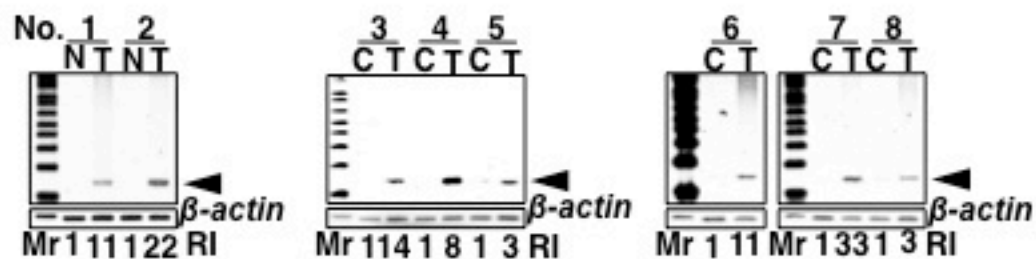


# 図23

A



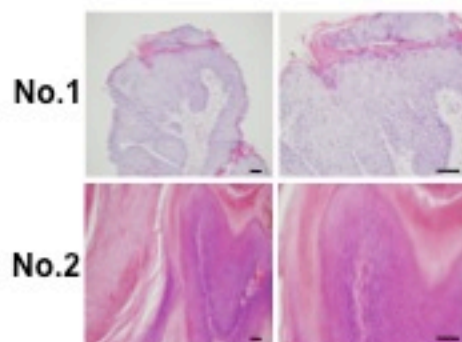
B



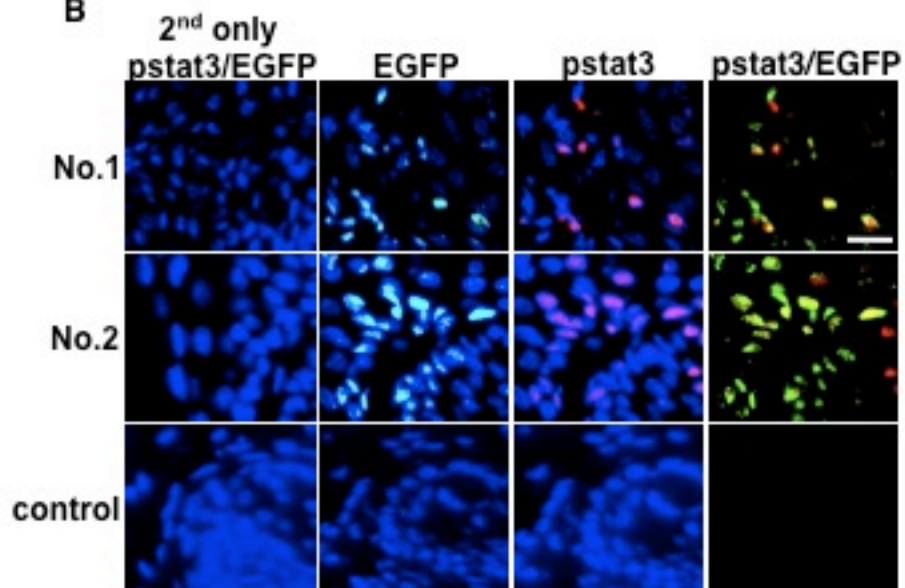


**图24**

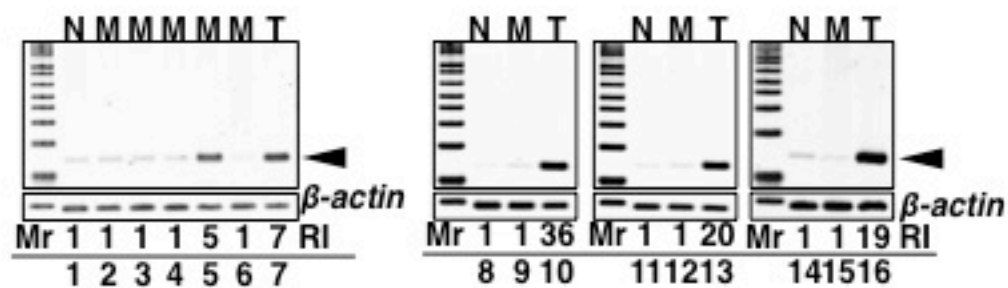
**A**



**B**

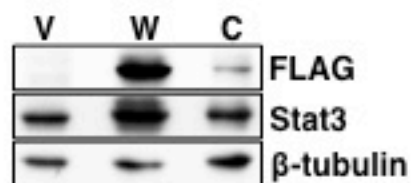


**C**

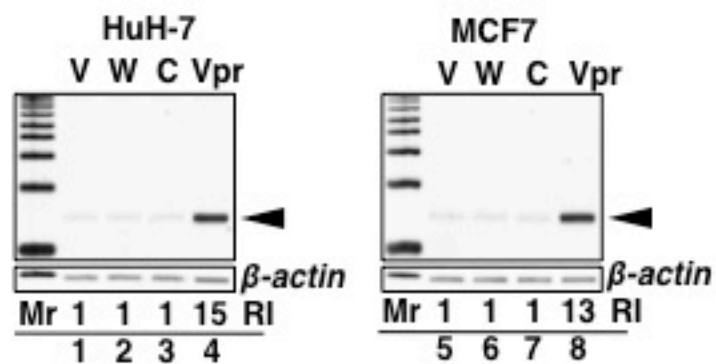
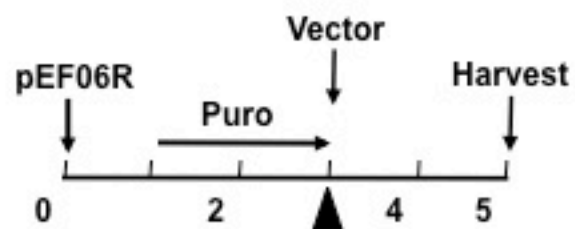


# 图25

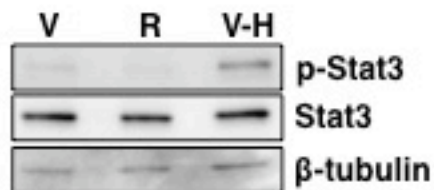
A



B



C



# 图26

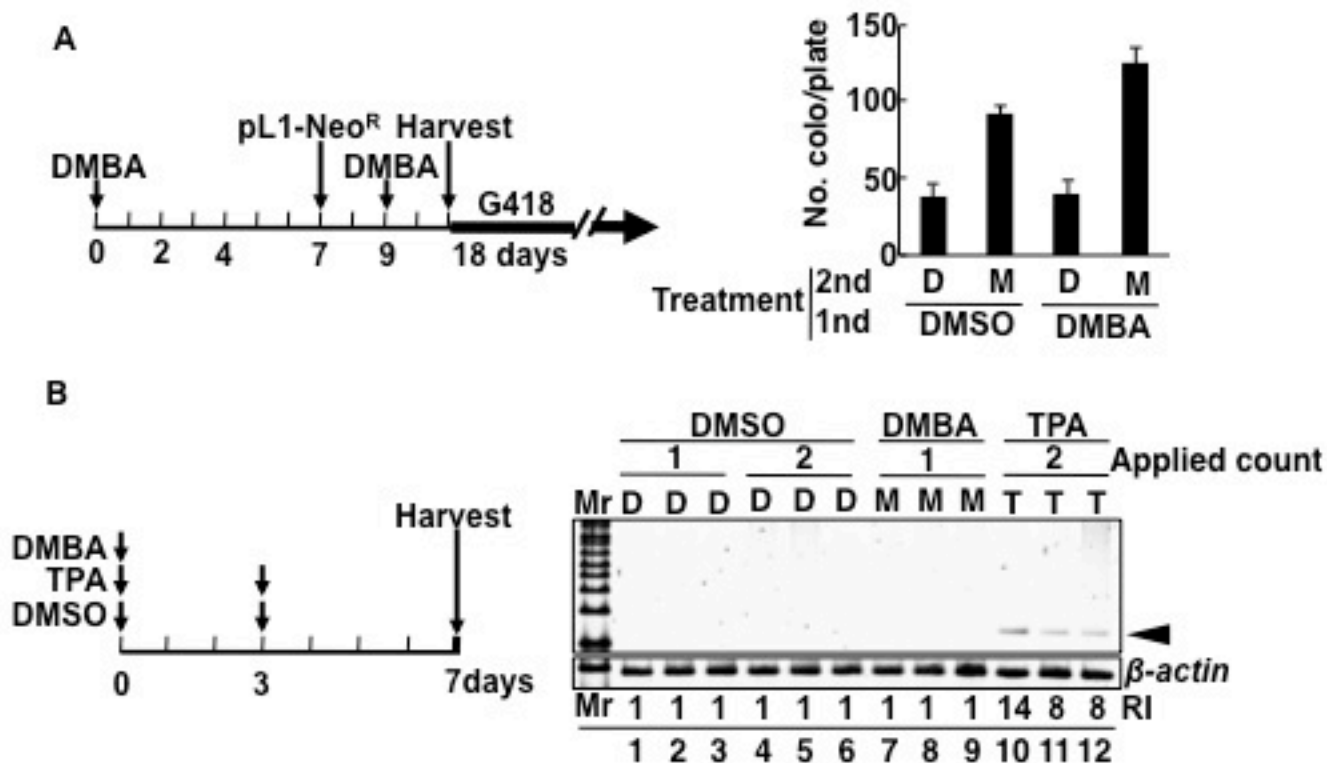
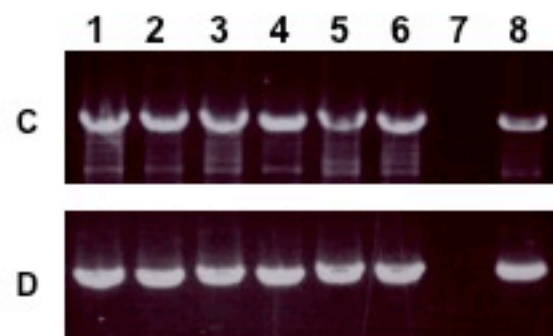
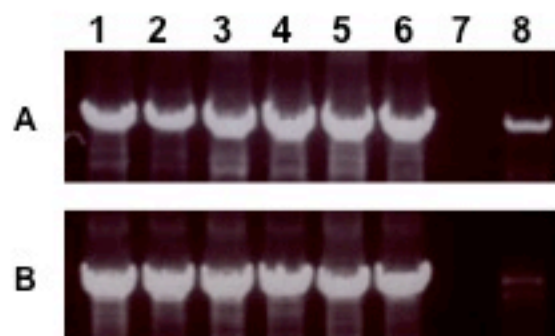
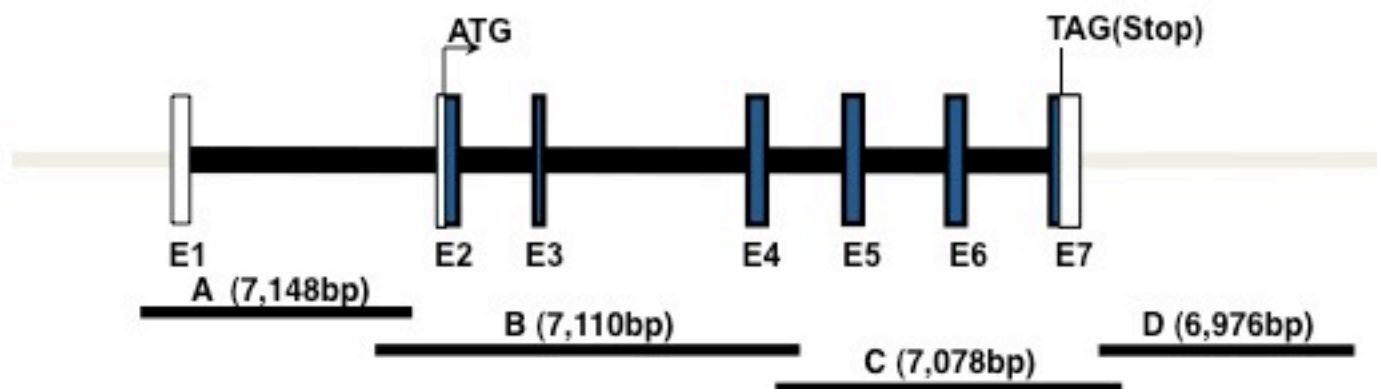


图27



# 図28

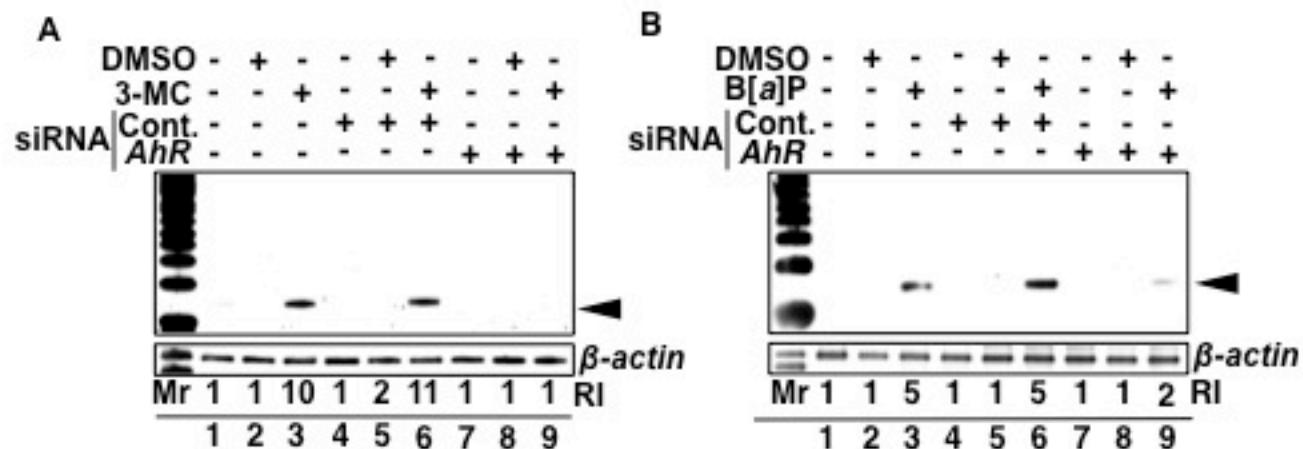
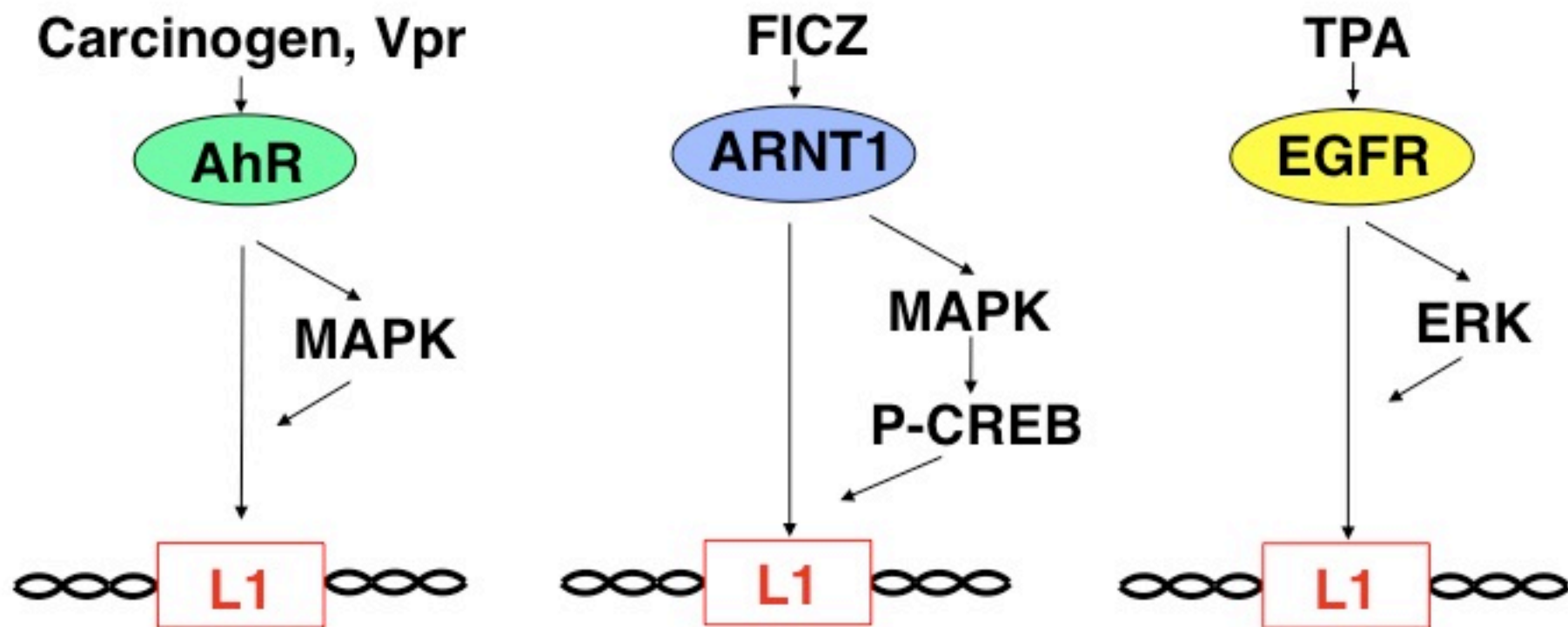


図29



環境に適応するためにL1の転移箇所も誘導物質によって異なる可能性がある

参考論文については学術雑誌掲載論文から構成されていますが、著作権者(出版社、学会等)の許諾を得ていないため、筑波大学では電子化・公開しておりません。

なお、リンク先 があるものについては電子ジャーナルとして出版社から公開されています。契約している場合は全文を読むことができます。詳しくは下記のリンク先をご覧ください。

1. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1001252107>
2. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02060.x>