

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	化学物質及び薬物誘発性ストレスが引き起こす LINE1 レトロトランスポジションの活性化
Title(English)	
著者(和文)	寺崎奈都子
Author(English)	Terasaki Natsuko
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9402号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:梶川 正樹,岩崎 博史,太田 啓之,駒田 雅之,相澤 康則
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9402号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成 25 年度博士論文

化学物質及び薬物誘発性ストレスが引き起こす  
LINE1 レトロトランスポジションの活性化

東京工業大学大学院  
生命理工学研究科  
生体システム専攻  
漏田 奈都子

指導教官 梶川 正樹 講師

# 目次

1. 第一章 序論.....	4
1.1 転移因子.....	4
1.2 LINE .....	4
1.3 LINE のレトロトランスポジション機構.....	5
1.4 生体内における L1 レトロトランスポジションと疾患.....	6
1.5 LINE レトロトランスポジションとストレス.....	7
1.6 目的.....	7
2. 第二章 材料と方法.....	9
2.1 プラスミドベクターの作製.....	9
2.2 細胞培養.....	10
2.3 被験物質.....	11
2.4 デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子試験.....	11
2.5 レトロトランスポジション検出実験.....	11
2.6 レトロトランスポジション確認のための PCR .....	12
2.7 細胞生存率.....	13
2.8 統計解析.....	13
3. 第三章 結果.....	14
3.1 L1 レポーター遺伝子試験による L1 プロモーター活性の評価.....	14
3.2 遺伝毒性物質の L1 プロモーター活性への影響.....	14
3.3 細胞ストレス誘発物質の L1 プロモーター活性への影響.....	15
3.4 薬剤の L1 プロモーター活性への影響.....	16
3.5 HeLa 細胞における化合物の L1 プロモーター活性への影響.....	16
3.6 化合物スクリーニングのための高スループットなデュアル分泌型ルシフェラーゼ レトロトランスポジション検出系.....	17

3.7	L1 レトロトランスポジションに影響を与える化合物の探索.....	21
4.	第四章 考察.....	23
4.1	化合物による L1 の転写及びレトロトランスポジションの活性化.....	23
4.2	<i>in vitro</i> 実験系におけるレトロトランスポジション活性化の検出力.....	23
4.3	<i>in vitro</i> で認められたレトロトランスポジション活性化の <i>in vivo</i> での影響について .....	24
4.4	<i>in vitro</i> レトロトランスポジション検出系における DNA メチル化、ヒストン修飾 を介した影響の評価.....	25
4.5	遺伝毒性と細胞ストレスによる L1 転写及びレトロトランスポジションの活性化....	25
4.6	市販薬による L1 転写及びレトロトランスポジションの活性化.....	27
4.7	化学物質や薬が L1 以外のレトロトランスポジションを誘発する可能性.....	27
4.8	薬や化学物質によるレトロトランスポジション誘発のリスク評価.....	28
5.	第五章 まとめ.....	29
	謝辞.....	31
	参考文献.....	32
	表.....	41
	図.....	60
	本研究に関する発表.....	73

## 1. 第一章 序論

### 1.1 転移因子

多くの高等真核生物のゲノム中には、転移因子と呼ばれる、進化の過程でゲノムに挿入された動く DNA 断片が多数存在している。転移因子は、DNA が切り出されて転移するトランスポゾンと、RNA を介して転移増幅するレトロトランスポゾンに分類される。さらにレトロトランスポゾンは、両端に長い同方向の末端反復配列 (long terminal repeat、LTR) を含む LTR 型レトロトランスポゾンと、LTR を含まない non-LTR 型レトロトランスポゾンに分類される。non-LTR 型レトロトランスポゾンには、自身にコードされている転移に必要なタンパク質により自律的に転移する長鎖散在性反復配列 (long interspersed element、LINE) や LINE にコードされているタンパク質によって非自律的に転移する短い散在性反復配列 (short interspersed element、SINE) などが含まれる。

ゲノムサイズとタンパク質をコードしている遺伝子数に相関はないが、ゲノムサイズと転移因子の割合には相関があり、ゲノムサイズが大きいほど転移因子の割合も大きい (表 1; (Kazazian, 2011a))。また、各種転移因子の割合は生物種によって異なる (表 2; (Kazazian, 2011a))。真核生物ゲノムは重複、欠失、転座、逆位、エキソンシャッフリング、遺伝子交換などの多くの過程を経て進化してきた。その中で転移因子は、転移による増幅や、転移因子同士の誤対合や不等交差により引き起こされるゲノムの重複や欠失によって、真核生物ゲノムの進化や複雑さに大きな影響を及ぼしてきたと考えられている (Goodier and Kazazian, 2008; Kazazian, 2004)。

### 1.2 LINE

ヒトゲノムにおいては LINE がゲノム全体のおよそ 21% (約 85 万コピー)、SINE が全体のおよそ 13% (約 150 万コピー) もの領域を占める (図 1; (Lander et al., 2001))。LINE は自身から転写された RNA の逆転写反応を介してコピー&ペースト方式で増幅すると考えられており、この RNA を介した増幅機構はレトロトランスポジションと呼ばれる (図 2; (Weiner et al., 1986))。

ヒトの LINE の中で最も多い LINE1 (L1) はヒトゲノムの 17%を占めている (図 1; (Lander et al., 2001))。その多くは変異や切断によりレトロトランスポジション能を失っているが、現在でも 80~100 コピーの L1 がレトロトランスポジション活性を有していると考えられている (Beck et al., 2010; Brouha et al., 2003)。また、ヒトゲノムにおいて L1 の挿入部位及び配列には個人差があることが知られており、ゲノム多型を生み出している (Beck et al., 2010; Ewing and Kazazian, 2011; Huang et al., 2010; Seleme et al., 2006)。

LINE は約 4~7kbp の長い散在性の反復配列であり、5'非翻訳領域 (5' untranslated region、5'UTR)、2つのタンパク質コード領域 (open reading frames、ORF) である ORF1、ORF2、及びポリ A シグナルを含む 3'非翻訳領域 (3' untranslated region、3'UTR) から構成されている (図 3; (Dombroski et al., 1991; Scott et al., 1987))。ORF1 と ORF2 には LINE の自律的なレトロトランスポジションに必要なタンパク質がコードされている (Moran et al., 1996)。3' UTR にはレトロトランスポジションの際に LINE タンパク質によって認識される配列が含まれる。SINE の 3' UTR にも同じ認識配列が存在しており、SINE は LINE のタンパク質を利用して転移増幅する (Dewannieux et al., 2003; Kajikawa and Okada, 2002)。また、ヒト L1 が宿主遺伝子の転写産物のレトロトランスポジションをおこしてレトロ偽遺伝子を生み出すことも知られている (Esnault et al., 2000)。

### 1.3 LINE のレトロトランスポジション機構

LINE は target-primed reverse transcription (TPRT) という機構によってレトロトランスポジションをおこす (図 3; (Cost et al., 2002; Luan et al., 1993))。まず、LINE は 5' UTR 内に存在する RNA ポリメラーゼ II 依存性の内在性プロモーターにより転写される。次に、LINE の ORF2 にコードされているエンドヌクレアーゼ (Feng et al., 1996) が宿主ゲノム DNA のターゲット部位の 1 本鎖にニックを入れ、LINE の ORF2 にコードされている逆転写酵素 (Mathias et al., 1991) が自身の RNA の 3' 末端領域を認識し、ニックにより生成した 3' 水酸基をプライマーにして逆転写反応をおこし、cDNA が合成される (Luan and Eickbush, 1995)。その後、宿主の DNA 修復機構によって LINE はゲノム DNA に挿入され、レトロトランスポジショ

ンは完了する (Suzuki et al., 2009)。ORF1 は RNA 結合タンパク質をコードしており、転写された LINE の RNA が核外へ移動してタンパク質を合成した後、自身の RNA と大きな RNA-タンパク質複合体 (ribonucleoprotein particle; RNP) を形成し、ゲノムへの挿入のため核内へ移行するのに必要であると考えられている (Doucet et al., 2010; Kulpa and Moran, 2005; Shi et al., 2007)。

## 1.4 生体内における L1 レトロトランスポジションと疾患

ヒトゲノムの中で最も数の多い LINE は L1 であり、前述の通り 80~100 コピーのヒト L1 は生体内でレトロトランスポジションをおこすことが可能だと考えられる配列を有している (Beck et al., 2010; Brouha et al., 2003)。レトロトランスポジション活性のあるヒト L1 は宿主ゲノムに挿入することができるため、L1 は内在性の変異原である。実際、ヒトで L1 のレトロトランスポジションによる遺伝子変異が原因の疾患が多数報告されている (Belancio et al., 2009; Chen et al., 2005; Hancks and Kazazian, 2012)。例えば、血友病 A (第 VIII 因子欠損症) 患者の第 VIII 因子遺伝子 (Dombroski et al., 1991; Kazazian et al., 1988)、筋ジストロフィー患者のジストロフィン遺伝子 (Holmes et al., 1994)、ピルビン酸脱水素酵素複合体欠損症患者のピルビン酸脱水素酵素 X 遺伝子 (Mine et al., 2007) に L1 の挿入が認められている。第 VIII 因子遺伝子、ジストロフィン遺伝子に挿入された L1 はそれぞれ L1.2、LRE2 であり、レトロトランスポジション活性があることも確認されていることより (Moran et al., 1996)、レトロトランスポジション活性のある L1 が新規にレトロトランスポジションをおこしてこれら遺伝子に挿入され、遺伝子が機能しなくなることが原因で疾患になったと考えられる。これらの L1 挿入は、生殖細胞もしくは発生初期におけるレトロトランスポジションによるものと考えられる。

近年、癌細胞のような体細胞においても L1 レトロトランスポジションが報告されている (Belancio et al., 2010; Kazazian, 2011b; Lee et al., 2012; Muotri et al., 2005; Solyom et al., 2012)。腫瘍細胞中の癌抑制遺伝子の内部に L1 が挿入され、それが原因で癌化が促進している可能性も示されている (Iskow et al., 2010; Lee et al., 2012)。

このようにヒトの生体内では現在においても L1 のレトロトランスポジションがおこっており、生殖細胞や発生初期に機能遺伝子に L1 が挿入されることで遺伝子疾患や胎児奇形になる可能性が、また、体細胞でのレトロトランスポジションにより、細胞が癌化する可能性がある。

## 1.5 LINE レトロトランスポジションとストレス

これまで、様々なストレスによりヒト L1 の転写及びレトロトランスポジションが誘導されることが報告されている。例えば、培養細胞を用いた実験において、benzo[a]pyrene、UV 照射 (Stribinskis and Ramos, 2006; Teneng et al., 2007)、 $\gamma$  線照射 (Farkash et al., 2006)、X 線照射 (Banaz-Yasar et al., 2012) のような DNA 損傷をおこすストレスや、 $H_2O_2$  による酸化ストレス (Giorgi et al., 2011)、その他にも、重金属 (Kale et al., 2005)、6-formylindolo[3,2-b]carbazole (Okudaira et al., 2010) によるヒト L1 の転写またはレトロトランスポジションの活性化が報告されている。ヒト L1 のトランスジェニックマウスで、運動ストレス (Muotri et al., 2009) によるヒト L1 のレトロトランスポジション活性化も報告されている。また、その他のレトロトランスポゾンについても、熱ショックのような物理的刺激によるヒト Alu、マウス B1、B2 の転写活性化 (Liu et al., 1995)、遺伝毒性物質である etoposide によるマウス B2 の転写活性化 (Hagan and Rudin, 2007)、 $\gamma$  線照射による酵母 Ty1 (Sacerdot et al., 2005)、ショウジョウバエ I 因子 (Bregliano et al., 1995) のレトロトランスポジション活性化など、様々な動物種でストレスによるレトロトランスポゾンの転写やレトロトランスポジションの誘導が報告されている (Wilkins, 2010)。また、ヒト L1 の ORF1 タンパク質が、ヒートショックや酸化ストレス、低酸素などのストレス条件で誘導される細胞質内のストレス顆粒中に局在していることから、ストレスのレトロトランスポジションへの関与が示唆されている (Goodier et al., 2007)。

## 1.6 目的

上述の通り、ヒト L1 は現在でもレトロトランスポジション活性を保持している内因性的の変異原であり、疾患の原因にもなり得る。さらに、その L1 のレトロトランスポジションは

いくつかのストレスによって誘導されることが報告されている。したがって、化学物質や薬が生体に曝露され、そのストレスによって生殖細胞や体細胞で L1 のレトロトランスポジションが誘導されて、機能遺伝子に L1 が挿入されると、遺伝子疾患、胎児奇形、癌などにつながる可能性が考えられる。しかし、どのような化合物が L1 のレトロトランスポジションに影響を与えるのか幅広く調べられた例がなく不明な点も多いため、現時点では化学物質や薬の安全性評価において、レトロトランスポジションを誘導するリスクは考慮されていない。

そこで、本研究では、どのような化合物によるストレスが L1 の活性化を誘導するのかを調べるため、ヒト L1 の転写及びレトロトランスポジションを誘導する化合物の探索を行った。まず、遺伝毒性物質、細胞ストレス誘発物質、市販薬を含む 95 化合物で、ヒト由来 HepG2 細胞を用いたレポーター遺伝子試験を行い、L1 転写への影響について評価した。次に、ヒト由来 HeLa 細胞を用いた L1 レトロトランスポジション検出実験を行い、化合物の L1 レトロトランスポジションへの影響を評価した。レトロトランスポジションを高スループットで評価するため、分泌型ルシフェラーゼであるガウシアルシフェラーゼ (Gaussia luciferase、GLuc) をレポーターとした新規のレトロトランスポジション検出系を用いて、26 化合物を評価した。本実験において、化合物曝露によって L1 の転写やレトロトランスポジションが誘導されるならば、その化合物は生体内においても L1 レトロトランスポジションを活性化し、ゲノムに変異をもたらす可能性がある。

## 2. 第二章 材料と方法

### 2.1 プラスミドベクターの作製

強いレトロトランスポジション活性を保持しているヒト L1 の一種である L1.3 (Sassaman et al., 1997) の 5' UTR 領域を pCEP4/L1.3mneoI<sub>400</sub>/ColE1 (Gilbert et al., 2002) を鋳型に PCR を用いて増幅した後、pGL4.11 (Promega) のホタルルシフェラーゼ (firefly luciferase) 遺伝子の 5' 上流にクローニングし pGL4.11-L1.3 5' UTR を作製した。pGL4.11-L1.3 5' UTR の作製手順を以下に示す。pCEP4/L1.3mneoI<sub>400</sub>/ColE1 (Gilbert et al., 2002) を鋳型に、*Xho*I 制限酵素切断部位を含むフォワードプライマー

(5'-ATGCCTCGAGGGGGGAGGAGCCAAGATGGCCG-3') と *Hind*III 制限酵素切断部位を含むリバースプライマー (5'-GCATAAGCTTCTTTGTGGTTTTATCTACTTTTGGTCTTTG-3') を用いて PCR を行い、L1.3 の 5' UTR を増幅した。この PCR 産物を *Xho*I と *Hind*III で切断し、*Xho*I と *Hind*III で切断した pGL4.11 にクローニングし、pGL4.11-L1.3 5' UTR と名付けた。この pGL4.11-L1.3 5' UTR を用いて、L1 のプロモーター活性を評価した。

ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (HSV-TK) プロモーター及びその下流にウミシイタケルシフェラーゼ (*Renilla luciferase*) 遺伝子を含む pGL4.74 (Promega) をレポーター遺伝子試験の内部標準ベクターとして用いた。

以下に示す、99-PUR-RPS-*mGLucI* 及び 99-PUR-JM111-*mGLucI* はジョーンズホプキンス大学 John L. Goodier 博士により譲渡されたものである。99-PUR-RPS-*mGLucI* は、ヒト L1 の一種で強いレトロトランスポジション活性を保持している L1<sub>RP</sub> (Kimberland et al., 1999) の 3' UTR 内部に *mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットが挿入された配列を、ピュエロマイシン耐性遺伝子を含む 99PUR ベクター (Kimberland et al., 1999; Ostertag et al., 2000) にクローニングしたものである (Terasaki et al., 2013)。*mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットは、GLuc 遺伝子の 5' 上流に EF-1 $\alpha$ /eIFg ハイブリッドプロモーターを、下流にチミジンキナーゼ (TK) のポリ A シグナルを含み、GLuc 遺伝子の内部には 134 bp のミニイントロンが GLuc に対してアンチセンスに挿入されている。99-PUR-RPS-*mGLucI* を用いたレトロトランスポジションの検出原理を以下に示す。GLuc 遺伝子内部にはイントロンが挿

入されているため、プラスミドから GLuc 遺伝子が発現することはない。まず、LI 5'UTR 内部の RNA polymerase II プロモーターによって、LI 及び *mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットが転写され、続いて GLuc 遺伝子内にあるイントロンがスプライシングを受ける。次に、LI の ORF から翻訳された LINE の転移に必要なタンパク質がこの転写産物の 3' 末端領域を認識し、TPRT の機構に従ってレトロトランスポジションがおこると、イントロンの除かれた GLuc 遺伝子がゲノム中に生成される。ここで初めて GLuc 遺伝子が発現可能となる。発現した GLuc は培地中に分泌されるため、培地中の発光量を測定することで、レトロトランスポジションを検出することができる。

99-PUR-JM111-*mGLucI* は 99-PUR-RPS-*mGLucI* の JM111 変異体である。JM111 変異体は LI<sub>RP</sub> の ORF1 に 2 つのミスセンス変異を有しており、そのためにレトロトランスポジション活性を失っている (Moran et al., 1996)。99-PUR-JM111-*mGLucI* は、レトロトランスポジション検出実験における GLuc 遺伝子の発現がレトロトランスポジションによるものであることを確認するために使用された。

pSV40-CLuc (New England BioLabs) は SV40 プロモーターによって恒常的にシュプリジナルシフェラーゼ (Cypridina luciferase, CLuc) を発現するベクターである (Nakajima et al., 2004)。pSV40-CLuc は、レトロトランスポジション検出実験の内部標準ベクターとして使用された。

全てのプラスミド DNA は Plasmid Maxi kit (Qiagen) を用いて精製された。

## 2.2 細胞培養

ヒト肝癌細胞由来 HepG2 細胞 (ATCC) は 1 mM ピルビン酸ナトリウム、1%非必須アミノ酸、2 mM L-グルタミン、10%ウシ胎児血清 (Life Technologies, Inc.) を添加した最少必須培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa 細胞 (ATCC) は 10%ウシ胎児血清 (Life Technologies, Inc.) を添加した、ダルベッコ改変イーグル培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。継代には T75 または T225 フラスコを用い、約 80%コンフルエントで 0.25%トリプシン/0.02% EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich) を使用して継代した。

## 2.3 被験物質

被験物質は主に、Sigma-Aldrich、和光純薬工業、EMD Millipore より購入した。被験物質は、ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide、DMSO) に溶解して $-20^{\circ}\text{C}$  に保管し、使用直前に培地を用いて 1000 分の 1 倍または 200 分の 1 倍に希釈した。

## 2.4 デュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子試験

HepG2 細胞 ( $0.33 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{l}$ /ウェル) または HeLa 細胞 ( $0.5 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{l}$ /ウェル) を 96 ウェルプレートに播種し、24 時間培養後、1 ウェルあたり 30 ng pGL4.11-L1.3 5' UTR 及び 30 ng pGL4.74 を、0.18  $\mu\text{l}$  FuGENE6 試薬 (Roche) を用いて共トランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に被験物質を曝露し、6 時間または 24 時間後に、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いてホタル及びウミシイタケルシフェラーゼの発光を Multilabel Counter 1420 ARVO (PerkinElmer) で測定した。

1 濃度あたり 2 または 4 ウェルで曝露を行った。化合物の L1 プロモーター活性への影響を解析するため、内部標準であるウミシイタケルシフェラーゼ発光値に対するホタルルシフェラーゼ発光値の比 (ホタルルシフェラーゼ/ウミシイタケルシフェラーゼ) を計算した後、DMSO 処理対照群に対する被検物質処理群の割合 (%) を計算し、化合物曝露によるプロモーター活性の変化率とした。被検物質曝露時のウミホタルルシフェラーゼの発光値が、DMSO 処理対照群の 50% 未満または 200% より大きい場合、その濃度のデータは不採用とした。

## 2.5 レトロトランスポジション検出実験

レトロトランスポジションに影響を与える化合物をスクリーニングするため、HeLa 細胞 ( $0.5 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{l}$ /ウェル) を 96 ウェルプレートに播種した。24 時間培養後、100 ng 99-PUR-RPS-*mGLucI* または 99-PUR-JM111-*mGLucI* と 2 ng pSV40-CLuc を 0.3  $\mu\text{l}$ /ウェル FuGENE6 試薬を用いて共トランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に、1  $\mu\text{g/ml}$  ピューロマイシン及び被検物質を含有する培地に交換した。プレート間、実験

間の値を正規化するため、各プレートに DMSO 無処理細胞を置いた。2 日間培養後に、被検物質のみ含有する培地に交換し、さらに 3 日間培養した。最後に、20  $\mu$ l の培養上清を 2 回採取し、GLuc または CLuc の発光量をそれぞれ BioLux Gaussia luciferase assay kit (New England BioLabs) または BioLux Cypridina luciferase assay kit (New England BioLabs) を用いて Multilabel Counter 1420 ARVO (PerkinElmer) で測定した。1 濃度あたり 4 ウェルで化合物を曝露し、独立した実験を 4 回または 6 回繰り返した。

化合物の L1 レトロトランスポジションへの影響を解析するため、まず、内部標準である CLuc に対する GLuc の比 (GLuc/CLuc) を計算した後、各プレートに設置した DMSO 無処理細胞の値で補正した。次に、DMSO 処理対照群に対する被検物質処理群の割合 (%) を計算し、化合物曝露によるレトロトランスポジション活性の変化率とした。

培養上清中の発光値を測定後、残った細胞で後述の方法により細胞生存率を測定した。細胞生存率が 80%未満の場合、その濃度のデータは不採用とし、レトロトランスポジション活性へ与える影響の評価は行わなかった。

## 2.6 レトロトランスポジション確認のための PCR

前述の通り、99-PUR-RPS-*mGLucI* からレトロトランスポジションがおこると、イントロンを含まない GLuc 遺伝子がゲノム中に生成される。そこで、*mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットのイントロンを挟むプライマーを用いて PCR を行い、L1 のレトロトランスポジションを確認した。HeLa 細胞に 99-PUR-RPS-*mGLucI* をトランスフェクション後 4 日目に細胞を採取し DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。イントロンを挟んで設計したフォワードプライマー (5'-CTTTCCGGGCATTGGCTTCC-3') 及びリバースプライマー (5'-CAAGCCCACCGAGAACAACG-3') を用いて PCR を行った。プラスミド由来の PCR 産物はイントロンを含む 282 bp である。プラスミドからの転写産物がスプライシングを受けてレトロトランスポジションによりゲノムに挿入された場合、ゲノム DNA から増幅される PCR 産物は、イントロンを含まない 149 bp である。抽出した DNA にはゲノム DNA とプラスミド DNA が混在しており、プラスミド由来の PCR 産物も生成される。そこで、

プラスミド由来の PCR 産物が増幅されないように、99-PUR-RPS-*mGLucI* に含まれるイントロン内部を切断する *BanI* または *BspT107I* で抽出した DNA を切断した後に、PCR を行った。

## 2.7 細胞生存率

細胞内 ATP 量を Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて測定し、細胞生存率を算出した。発光量は Multilabel Counter 1420 ARVO (PerkinElmer) を用いて測定した。DMSO 処理対照群の発光量に対する被験物質処理群の発光量の割合 (%) を細胞生存率とした。1 濃度あたり 4 ウェルで化合物を曝露し、独立した実験を 4 回または 6 回繰り返した。

## 2.8 統計解析

対照群と被験物質処理群 1 濃度の 2 群間比較には Student の *t* 検定を、対照群と 2 濃度以上の被験物質処理群の比較は Dunnett の多重比較検定を用いて統計解析を行った。統計解析ソフトは SAS 9.1.3 software (SAS Institute Inc.) を使用し、*p* 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判断した。

### 3. 第三章 結果

#### 3.1 L1 レポーター遺伝子試験による L1 プロモーター活性の評価

化学物質や薬の曝露によりレトロトランスポジションが活性化されると、遺伝子変異による遺伝子疾患、胎児奇形や癌の可能性が高まることが懸念される。これまでに、遺伝毒性などのストレスによる L1 の転写やレトロトランスポジションの活性化が報告されているが、どのような作用機序の化合物が L1 を活性化するか幅広く調べられた例はない。そこで、日常生活で曝露され得る化合物を含む、細胞ストレス誘発物質、遺伝毒性物質、臨床で使用されている医薬品を幅広く選択し、95 化合物の L1 プロモーター活性への影響を評価した。

まず、強いレトロトランスポジション活性を保持しているヒト L1.3 (Sassaman et al., 1997) の 5' UTR をホタルルシフェラーゼの上流にクローニングし、pGL4.11-L1.3 5' UTR を作製した。高スループットに評価できるように、96 ウェルプレートを用いる実験系を構築した。96 ウェルプレートに播種したヒト肝癌由来 HepG2 細胞に、pGL4.11-L1.3 5' UTR と、HSV-TK プロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を有する pGL4.74 を共トランスフェクションし、24 時間後に被験物質の媒体である DMSO を曝露した結果、曝露から 6 時間及び 24 時間後の両方で、L1 プロモーター活性を示すホタルルシフェラーゼの顕著な発現が確認された (図 4)。内部標準であるウミシイタケルシフェラーゼの発現も明確に検出された (図 4)。これらの結果より、本実験系を用いて、化合物の 6 時間及び 24 時間曝露による L1 プロモーター活性への影響を評価できることが確認された。本研究では、95 化合物の 6 時間及び 24 時間曝露による L1 プロモーター活性への影響をスクリーニングした。全 95 化合物の L1 プロモーター活性評価結果を表 6 に示した。

#### 3.2 遺伝毒性物質の L1 プロモーター活性への影響

DNA アルキル化、DNA クロスリンク、DNA トポイソメラーゼ阻害など、様々な作用機序の遺伝毒性物質 21 化合物の評価を行った (表 3)。その結果、benzo[a]pyrene、camptothecin、cytochalasin D、merbarone、vinblastine の 5 化合物は、6 または 24 時間曝露で、L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上 ( $p < 0.05$ ) 上昇させた。(表 3、図 5)。この 5 化合物については以

下で説明する。

DNA インターカレーターである benzo[a]pyrene がマウスの L1 プロモーター活性を上昇させることは既に報告されているが (Teneng et al., 2007) 、本研究でも同様に benzo[a]pyrene は 24 時間曝露で L1 プロモーター活性を約 1.5 倍まで濃度依存的に上昇させた。DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤である camptothecin は、L1 レトロトランスポジションに影響を与えないことが報告されているが (Farkash et al., 2006) 、本研究では 24 時間曝露で L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた。DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤である merbarone は 6 時間及び 24 時間曝露で、50  $\mu$ M まで濃度依存的に、L1 プロモーター活性を約 2 倍まで上昇させた。対照的に、同じ DNA トポイソメラーゼ II 阻害作用を持つ etoposide は、L1 プロモーター活性には影響を与えなかった。細胞骨格を阻害するアクチン重合阻害剤 cytochalasin D 及び微小管重合阻害剤 vinblastine は、最高濃度の 24 時間曝露で L1 プロモーター活性をそれぞれ 3 倍及び 2 倍まで上昇させた (図 5) 。vinblastine は臨床で抗癌剤として使用されている。

### 3.3 細胞ストレス誘発物質の L1 プロモーター活性への影響

次に、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、小胞体ストレスなど、細胞の機能へストレスを与える 27 化合物について L1 プロモーター活性への影響を評価した (表 4) 。その結果、cyclosporin A、diethyl malate、etomoxir、exo 1 の 6 時間または 24 時間曝露により、L1 プロモーター活性が 1.5 倍以上 ( $p < 0.05$ ) 上昇した (表 4、図 6) 。この 4 化合物について以下で説明する。

cyclosporin A は臨床では臓器移植の際に免疫抑制剤として使用されており、ミトコンドリア膜透過を阻害することが知られているが (Broekemeier et al., 1989) 、30  $\mu$ M の 24 時間曝露により L1 プロモーター活性を約 2 倍上昇させた。グルタチオンを枯渇させ、酸化ストレスを誘発する diethyl malate (Bizzozero et al., 2006) は、375、750  $\mu$ M の 6 時間曝露により L1 プロモーター活性を濃度依存的に 1.5 倍以上まで上昇させた。脂肪酸  $\beta$  酸化阻害作用によりミトコンドリア障害を誘発する etomoxir (Gerondaes et al., 1988) は 500  $\mu$ M の 6 時間曝露により

L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上 ( $p < 0.05$ ) 上昇させた。小胞体-ゴルジ体輸送阻害剤である exo1 (Feng et al., 2003) は 50  $\mu\text{M}$  及び 100  $\mu\text{M}$  の 24 時間曝露により L1 プロモーター活性を 2 倍以上上昇させた (図 6)。

### 3.4 薬剤の L1 プロモーター活性への影響

薬剤の L1 プロモーター活性への影響を評価するため、44 個の市販薬を含む 47 化合物を用いてレポーター遺伝子試験を行った。市販薬は、高脂血症治療薬、高コレステロール治療薬、抗菌薬、解熱鎮痛薬、抗ヒスタミン薬、降圧剤、利尿剤など、様々な薬理作用を持つ化合物を選択した (表 5)。その結果、市販薬である bezafibrate、diflunisal、fenofibrate、flufenamic acid、salicylamide、sulindac の 6 化合物が、6 時間または 24 時間曝露で L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上 ( $p < 0.05$ ) 上昇させた (表 5、図 7)。L1 プロモーターを活性化した市販薬の薬理作用としては、高脂血症治療薬である PPAR $\alpha$  アゴニスト及びシクロオキシゲナーゼ (Cyclooxygenase、COX) 阻害作用で解熱鎮痛薬として使用されている非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs、NSAIDs) に偏っている傾向があった。PPAR アゴニストでは bezafibrate、fenofibrate が、NSAIDs では diflunisal、flufenamic acid、salicylamide、sulindac が L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた (表 5)。

### 3.5 HeLa 細胞における化合物の L1 プロモーター活性への影響

レトロトランスポジションを評価するのに広く使われている HeLa 細胞を用いて化合物のレトロトランスポジションへの影響を評価するため、HeLa 細胞においても HepG2 細胞と同様に化合物曝露による L1 プロモーター活性への影響が捉えられるかを確認した。まず、L1 の 5' UTR の下流にホタルルシフェラーゼを有する pGL4.11-L1.3 5' UTR と、HSV-TK プロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を有する pGL4.74 を HeLa 細胞に共トランスフェクションしたところ、HepG2 細胞と同様に、6 時間及び 24 時間後の両方で顕著なホタルルシフェラーゼの発現が確認され、L1 プロモーター活性が明確に検出された (図 8)。また、内部標準として用いるウミシイタケルシフェラーゼの発現も明確に検出された。次に、HepG2 細胞で L1 のプロモーター活性を上昇させた benzo[a]pyrene、merbarone を HeLa

細胞に曝露した結果、両化合物ともに、HeLa 細胞においても L1 プロモーター活性を上昇させた (図 9)。この結果より、HeLa 細胞でも HepG2 と同様に化合物による L1 プロモーター活性の変化が捉えられることが示唆されたため、HeLa 細胞を用いたレトロトランスポジション検出系において、HepG2 で認められた L1 プロモーター活性への影響も含めて化合物の L1 レトロトランスポジションへの影響を評価できると考えた。

### 3.6 化合物スクリーニングのための高スループットなデュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系

化合物曝露による L1 のレトロトランスポジション活性への影響を評価するため、ジョージホプキンス大学 John L. Goodier 博士によって新規に開発された分泌型ガウシアルルシフェラーゼ (Gaussia luciferase, GLuc) をレポーター遺伝子とした *mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットを用い、HeLa 細胞で高スループットにレトロトランスポジションへの影響を評価した。

一般的に、LINE のレトロトランスポジションの検出には、レポーター遺伝子及びスプライソソームに依存するイントロンを利用する方法が用いられている。*mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットには、GLuc 遺伝子の内部に GLuc 遺伝子に対してアンチセンスにミニイントロンが挿入されている。GLuc 遺伝子内部にはイントロンが挿入されているため、プラスミドから GLuc 遺伝子が発現することはない。また、GLuc 遺伝子上流には活性の強い EF-1 $\alpha$ /eIF4g プロモーター配列が、下流には HSV-TK ポリ A シグナル配列が含まれる (図 10A)。この *mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットは、L1<sub>RP</sub> の 3' 非翻訳領域に GLuc 遺伝子が L1<sub>RP</sub> に対してアンチセンスになるように挿入されている。L1<sub>RP</sub> は *in vitro* でのレトロトランスポジション活性が最も強い L1 の 1 つであり (Kimberland et al., 1999)、Transcribed-Active (Ta) サブファミリーに属している (Skowronski et al., 1988)。*mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットを含む L1<sub>RP</sub> を、ピューロマイシン耐性遺伝子の搭載された、染色体外で自律して増幅するエピソーマルベクターにクローニングしたものが 99-PUR-RPS-*mGLucI* である。

99-PUR-RPS-*mGLucI* を用いてレトロトランスポジションが検出される原理を以下に示す。

まず、L1<sub>RP</sub>の5' UTRにある内部プロモーターによって *mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットを含むキメラ L1 が転写され、続いて GLuc 遺伝子内にあるミニイントロンがスプライシングを受ける。次に L1<sub>RP</sub> の ORF から翻訳されたタンパク質がこの転写産物の3'末端領域を認識し、RNA は逆転写され、cDNA がゲノムに挿入されると、イントロンの除かれた GLuc 遺伝子がゲノム中に生成される。ここで初めて GLuc 遺伝子が発現可能となる。

GLuc は海洋性カイアシ類の一種である *Gaussia princeps* 由来の 20 kDa のルシフェラーゼで、基質であるセレンテラジンを酸化することによって 480 nm の発光を生じる。この基質はウミシイタケルシフェラーゼの発光基質と同じものである (Verhaegent and Christopoulos, 2002)。レトロトランスポジション検出のためのレポーターとして、GLuc は他のルシフェラーゼに比べて非常に有利な特徴を有している。遺伝子配列を最適化した GLuc はホタルルシフェラーゼやウミシイタケルシフェラーゼより 1000 倍以上も発光強度が強く、培地中での半減期は約 6 日であり非常に安定である (Tannous et al., 2005)。また、L1 はゲノムに挿入する際そのほとんどが 5'側の途中で切断されるため、レポーター遺伝子配列が長い場合、レトロトランスポジションがおこっても、レポーター遺伝子の途中までしかゲノムに挿入されず、レポーター遺伝子が発現できない。その結果、レトロトランスポジション頻度を低く見積もる可能性がある。936 bp のウミシイタケルシフェラーゼや 1653 bp のホタルルシフェラーゼと比較して GLuc は 558 bp で短いため、GLuc をレポーター遺伝子として用いることで、レトロトランスポジションによりレポーター遺伝子の全長配列がゲノムに挿入する頻度が増加し、より正確なレトロトランスポジション頻度を示すことができると考えられる。さらに、GLuc は分泌型のルシフェラーゼであり、90% 以上の GLuc は培地中に分泌されるため、培地を採取することでレトロトランスポジションを簡便に測定できる。また、ホタルルシフェラーゼやウミシイタケルシフェラーゼのように発光測定のために細胞を破壊する必要がない。したがって、GLuc をレポーター遺伝子として用いることにより、1 ウェルから多時点での経時的なレトロトランスポジション検出が可能になり、さらに、レトロトランスポジションを測定した後の細胞は細胞生存率測定など、他の実験に使用することができる。96 ウェルプレートのように小さいスケールで様々な濃度の被験物質を一度に

高スループットでスクリーニングすることも可能である。

本研究では、トランスフェクション効率や化合物曝露による細胞数増減を補正するため、内部標準として pSV40-CLuc を使用した。pSV40-CLuc は海洋性貝虫類の一種である *Cypridina noctiluca* 由来のシュプリジナルシフェラーゼ (*Cypridina luciferase*, CLuc) を発現する (Nakajima et al., 2004)。GLuc はセレンテラジンを基質として反応するが、CLuc は、シュプリジナルシフェリンを基質とするため、培地中の GLuc と CLuc は交差することなく、明確に区別して発光を検出することができる。CLuc も GLuc と同様に、古くからレポーター遺伝子として使用されているホタルシフェラーゼと比較して約 1000 倍程度の非常に強い発光強度を示す。

このデュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系を用いてレトロトランスポジションが検出できることを検証するため、99-PUR-RPS-*mGLucI* または 99-PUR-JM111-*mGLucI* を pSV40-CLuc と同時に HeLa 細胞に共トランスフェクションし、6 日後に GLuc と CLuc の発光を測定した。野生型 L1 を含む 99-PUR-RPS-*mGLucI* のトランスフェクションにより、GLuc の強い発光が検出された (図 10B)。一方、L1 の ORF1 変異体 JM111 を含む 99-PUR-JM111-*mGLucI* をトランスフェクションした場合、レトロトランスポジション活性を示す GLuc の発光はほとんど検出されなかった (図 10B)。この結果は、他のレポーター遺伝子を用いたレトロトランスポジション検出系での結果と一致した (Moran et al., 1996; Ostertag et al., 2000; Xie et al., 2011)。99-PUR-RPS-*mGLucI* または 99-PUR-JM111-*mGLucI* のどちらを共トランスフェクションした場合においても、内部標準である CLuc の強い発光が検出された (図 10B)。GLuc の発光値を CLuc の発光値で補正した結果を図 10C に示す。

GLuc の発現がレトロトランスポジションによるものであることを確認するため、HeLa 細胞に 99-PUR-RPS-*mGLucI* をトランスフェクション後 6 日目にゲノム DNA を抽出し、*mGLucI* 内部のミニイントロンを挟むプライマーを用いて PCR を行った (図 10D)。プラスミド由来の PCR 産物はイントロンを含む 282 bp である。レトロトランスポジションがおこり、プラスミドからの転写産物がスプライシングを受けた後にゲノムに挿入された場合、

ゲノム DNA 由来の PCR 産物は、イントロンを含まない 149 bp である。PCR の結果、プラスミド DNA 由来のイントロンを含む 282 bp の PCR 産物とレトロトランスポジションがおこったことを示す、イントロンを含まない 149 bp の PCR 産物が検出された。これは、抽出した DNA にゲノム DNA とプラスミド DNA が混在していることを示している。PCR を行う前に、細胞から抽出された DNA を、*mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットのミニイントロン内部を切断する *BanI* または *BspT107I* で処理し、プラスミド由来の 282 bp の PCR 産物の生成を防ぐことで、レトロトランスポジションを示す 149 bp の PCR 産物が明確に増加した。一方、L1 の ORF1 変異体を含む 99-PUR-JM111-*mGLucI* をトランスフェクションした場合には、149 bp の PCR 産物は検出されなかった。これらの結果より、本検出系を用いて、レトロトランスポジションが検出できることが示された。

レトロトランスポジションに影響を与える化合物を探索するための、高スループットのデュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系の手順を図 11A に示す。まず、HeLa 細胞を 96 ウェルプレートに播種した後、99-PUR-RPS-*mGLucI* と pSV40-CLuc を共トランスフェクションし、トランスフェクションから 24 時間後にピューロマイシンと化合物を同時に曝露した。ピューロマイシン処理を行うことにより、99-PUR-RPS-*mGLucI* の導入された細胞を選択することができる。2 日間培養後、ピューロマイシンを含まない培地を用いて化合物のみを曝露し、さらに 3 日間培養した。最後に、培地中の GLuc と CLuc の発光及び細胞中の ATP 量を測定した。レトロトランスポジションにより発現する GLuc と内部標準である CLuc の発光量はレトロトランスポジションの評価に、細胞中 ATP 量は細胞生存率の評価に使用した。化合物無処理群に対する化合物曝露群の ATP 量を細胞生存率とし、細胞生存率が 80%以上の時にのみ化合物の L1 レトロトランスポジションへの影響を評価した。

まず、逆転写酵素阻害剤である azidothymidine (AZT) を用いて、本実験系で化合物のレトロトランスポジションへの影響を評価できることを確認した。AZT は逆転写反応において、cDNA 鎖の伸長反応中に取り込まれることにより、逆転写を阻害する。AZT が逆転写を介する L1 レトロトランスポジションを阻害することは、ネオマイシン遺伝子をレポーターと

したレトロトランスポジション検出系で示されている (Dai et al., 2011)。本実験系において 5 または 10  $\mu\text{M}$  の AZT を曝露した結果、既報と同様に、L1 レトロトランスポジション頻度は対照群の 20%以下に顕著に抑制された (図 11B)。同時に細胞生存率を測定した結果、5 または 10  $\mu\text{M}$  の AZT 曝露による細胞毒性は認められなかった (図 11C)。

このように、本検出系を用いることで、96 ウェルプレートで高スループットに感度良くレトロトランスポジションを検出することが可能であり、さらに、レトロトランスポジションの検出のために細胞を破壊する必要がないため、残った細胞を用いて細胞生存率測定も可能である。本研究ではこの特性を生かし、培地と細胞よりそれぞれ L1 レトロトランスポジション活性と細胞生存率を測定し、化合物によるレトロトランスポジションへの影響を評価した。

### 3.7 L1 レトロトランスポジションに影響を与える化合物の探索

新規に構築したデュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系を用いて、レポーター遺伝子試験で L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた 15 化合物を含む 26 化合物の L1 レトロトランスポジションへの影響を評価した。

これら 26 化合物の評価を行った結果、L1 レトロトランスポジション頻度を濃度依存的に 20%以上 ( $p < 0.05$ ) 上昇させた化合物は、etomoxir、salicylamide、WY-14643 の 3 化合物であった (図 12)。この 3 化合物について以下に説明する。etomoxir は脂肪酸  $\beta$  酸化阻害によりミトコンドリア機能障害を誘発する化合物である。etomoxir は 50  $\mu\text{M}$  の曝露により L1 レトロトランスポジション頻度を 0.6%上昇させた ( $p < 0.001$ ; 図 12)。etomoxir は 50-500  $\mu\text{M}$  の曝露により、濃度依存的に約 2 倍まで L1 プロモーター活性の上昇が認められていた (図 6)。解熱鎮痛薬として市販されている salicylamide は L1 レトロトランスポジション頻度を、50、100  $\mu\text{M}$  の曝露により濃度依存的に 23.1%まで上昇させた ( $p < 0.001$ ; 図 12)。より高濃度の 1250  $\mu\text{M}$  の曝露により L1 プロモーター活性は約 1.5 倍まで上昇した (図 7)。PPAR $\alpha$  アゴニストである WY-14643 は L1 プロモーター活性を上昇させなかったが (表 5)、10、50  $\mu\text{M}$  の曝露により L1 レトロトランスポジション頻度を濃度依存的に 28.5%まで上昇させた

( $p < 0.001$ ; 図 12)。全化合物の L1 レトロトランスポジション評価結果と細胞生存率を表 7 に示した。

## 4. 第四章 考察

### 4.1 化合物による L1 の転写及びレトロトランスポジションの活性化

95 化合物の L1 のプロモーター活性への影響をレポーター遺伝子試験で評価した結果、8 化合物の市販薬を含む 15 化合物で 6 時間または 24 時間曝露により、L1 プロモーター活性が 1.5 倍以上に有意に増加した (表 3-5、図 5-7)。次に、L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた 15 化合物を含む 26 化合物を用いて L1 レトロトランスポジションへ与える影響を評価したところ、レトロトランスポジション頻度を濃度依存的に 20%以上まで上昇させた化合物数は 3 化合物であった (図 12)。プロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた化合物 15 化合物のうち、レトロトランスポジション頻度を 1.2 倍以上濃度依存的に上昇させた化合物は 2 化合物であり (表 7)、転写を活性化させた化合物が必ずしもレトロトランスポジションを活性化させる結果ではなかった。この原因としては以下の 2 点が考えられる。1 つ目は化合物曝露濃度の違いである。プロモーター活性は化合物曝露後 24 時間で評価したが、レトロトランスポジションは 5 日間曝露後に細胞毒性が 80%以下の濃度で評価を行ったため、プロモーター活性を評価した濃度よりもレトロトランスポジションを評価した濃度の方が低いものが多い。2 つ目の原因として、転写後にレトロトランスポジションが抑制されている可能性が考えられる。これについては 4.5 で考察する。

L1 プロモーター活性を評価するためのレポーター遺伝子試験及び L1 レトロトランスポジション検出実験では、細胞毒性や細胞増殖作用による細胞数への影響やトランスフェクション効率を補正するために、内部標準ベクターとして異なる発光を発現するベクターを使用した。特に、レトロトランスポジション実験は、全条件で細胞生存率を測定することで、細胞毒性や細胞増殖による影響のない濃度で評価を行った。本研究で認められた化合物曝露による L1 プロモーター活性及びレトロトランスポジション活性への影響の程度は大きくはないが、これらの変化は統計的に有意差があり、意味のある変化であると考えられる。

### 4.2 *in vitro* 実験系におけるレトロトランスポジション活性化の検

## 出力

遺伝毒性物質である DNA インターカレーター *benzo[a]pyrene* は、マウス L1 の転写を 2 倍程度 (Teneng et al., 2007) 、ヒト L1 のレトロトランスポジション (Stribinskis and Ramos, 2006) を 10 倍程度活性化することが報告されている。本研究では、*benzo[a]pyrene* により L1 転写は 1.5 倍程度増加したが、L1 レトロトランスポジション頻度の上昇は認められなかった。この原因は、レトロトランスポジション検出実験の条件が先行研究と異なる点にあると推察される。本研究では一過性のトランスフェクションを行い、曝露時間は 5 日間という短期間でレトロトランスポジションへの影響を評価したが、一方、先行研究では途中に継代を挟んで 14 日間の曝露を行っていた。本研究では、曝露時間の短い条件で化合物の評価を行ったため、レトロトランスポジション活性化のポテンシャルを検出できていない化合物が含まれているかもしれない。

### 4.3 *in vitro* で認められたレトロトランスポジション活性化の *in vivo* での影響について

本研究でレトロトランスポジション検出実験に使用した L1<sub>RP</sub> は活性のあるヒト L1 の中でも、*in vitro* の実験系において非常に強い活性を保持しているものである (Kimberland et al., 1999) 。化合物によるレトロトランスポジション誘導作用が小さい場合、L1<sub>RP</sub> 自身の非常に強いレトロトランスポジション活性に隠れてしまい、本実験系においてレトロトランスポジションの活性化を検出できていない可能性が考えられる。また、*in vivo* における L1<sub>RP</sub> のレトロトランスポジション活性が小さい場合、本研究で *in vitro* で軽微にレトロトランスポジションを活性化させた化合物が、*in vivo* ではより大きな影響を及ぼすかもしれない。L1<sub>RP</sub> は *in vitro* では強いレトロトランスポジション活性を保持していることが確認されているが、生体内でどの程度の活性があるかは不明である。さらに、ヒトゲノム中にはレトロトランスポジション活性を保持している L1 が 80~100 コピー存在すると考えられているが (Beck et al., 2010; Brouha et al., 2003) 、実際これらの L1 が生体内でどの程度活性を保持しているのか不明である。現時点では化合物が生体内でどの種類の L1 を活性化するのか、また、そ

の変動がそれぞれの程度なのかを計り知ることはできない。

#### 4.4 *in vitro* レトロトランスポジション検出系における DNA メチル化、ヒストン修飾を介した影響の評価

L1 の転写は DNA メチル化により制御を受けている。本研究におけるレトロトランスポジション検出系は、細胞の染色体外で自律して増幅するエピソーマルベクターを一過性にトランスフェクションして評価する実験系であり、エピソーマルベクター上のプロモーターはメチル化されないため (Jenke et al., 2004)、L1 のメチル化への影響を含めた評価はできていないと考えられる。L1 の転写は DNA メチル化によって抑制されているため、脱メチル化によって L1 のレトロトランスポジション頻度は上昇する (Bourc'his and Bestor, 2004; Muotri et al., 2010; Yoder et al., 1997)。したがって、*in vivo* で DNA メチル化を低下させる化合物では、*in vitro* よりも *in vivo* でのレトロトランスポジション活性化の程度が大きくなる可能性が考えられる。

また、L1 の転写はヒストン修飾にも制御されており、ヒストン脱アセチル化により転写が抑制され、ヒストンアセチル化により転写が上昇すると考えられている (Garcia-Perez et al., 2010)。DNA メチル化やヒストンアセチル化のようなエピゲノムへの影響も含めて評価するためには、安定発現株を用いた実験系で評価を行う必要がある。

#### 4.5 遺伝毒性と細胞ストレスによる L1 転写及びレトロトランスポジションの活性化

DNA 損傷をおこす UV 照射 (Teneng et al., 2007)、X 線 (Banaz-Yasar et al., 2012)、ガンマ線 (Farkash et al., 2006)、遺伝毒性物質 (Farkash and Luning Prak, 2006; Teneng et al., 2007) によって L1 の転写またはレトロトランスポジションが活性化されることが知られている。本研究においては、benzo[a]pyrene、camptothecin、cytochalasin D、merbarone、vinblastine の 5 個の遺伝毒性物質が L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた (図 5)。

遺伝毒性物質が L1 レトロトランスポジションを活性化させる要因としては以下の 2 つが考えられている。遺伝毒性物質により DNA が切断されると、L1 は自身のエンドヌクレア

一ゼを介することなくレトロトランスポジションを誘導できる (Morrish et al., 2007; Morrish et al., 2002)。また、遺伝毒性物質が SRY ファミリー (Tchenio et al., 2000)、YY1 (Becker et al., 1993)、RUNX3 (Yang et al., 2003)、p53 (Harris et al., 2009) のような L1 5' UTR に結合する転写因子を活性化することで L1 の転写が誘導されると考えられている。

DNA 損傷をおこす遺伝毒性物質は一般的に p53 を活性化することが知られている (Lukas et al., 2004; Nelson and Kastan, 1994)。実際、本研究で L1 プロモーター活性を増加させた benzo[a]pyrene (Pei et al., 1999)、camptothecin (Nelson and Kastan, 1994)、cytochalasin D (Rubtsova et al., 1998) は p53 の発現を上昇させることが報告されている。しかし、本研究で評価した DNA 損傷をおこす遺伝毒性物質の中には L1 の転写を活性化させなかったものもあったため、p53 の活性化だけでは L1 の転写は活性化されない可能性が考えられた。

細胞へのストレスによるレトロトランスポジションの誘導に関しては、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化ストレスが L1 レトロトランスポジションを活性化させるという報告がある (Giorgi et al., 2011)。本研究で用いた酸化ストレス誘発化合物では diethyl malate が L1 プロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた (表 3)。さらに本研究では、ミトコンドリア機能障害作用を持つ cyclosporin A、etomoxir、小胞体ストレスを誘導する exo1 が L1 のプロモーター活性を 1.5 倍以上に上昇させた (表 7)。このうち、レトロトランスポジション頻度を濃度依存的に 1.2 倍以上上昇させたのは etomoxir のみであった。

L1 の RNA、ORF1 タンパク質及び ORF2 タンパク質は、ヒートショック、酸化ストレス、低酸素などのストレス条件下で形成される細胞質のストレス顆粒中に局在しており、L1 レトロトランスポジションとストレスの関与が示唆されている (Goodier et al., 2010; Goodier et al., 2007)。このストレス顆粒ではストレス応答として eIF4 の機能低下により翻訳が抑制されると考えられている (Anderson and Kedersha, 2009)。また、レトロトランスポジションを抑制する ApoBEC3G (Kinomoto et al., 2007) 及び MOV10 (Goodier et al., 2012) はストレス顆粒にも局在すると報告されている (Gallois-Montbrun et al., 2007)。本研究において、転写を活性化させた化合物のうちレトロトランスポジション頻度を上昇させたものが少なかったのは、転写後にストレス顆粒において翻訳抑制等によりレトロトランスポジションが抑

制されたためかもしれない。

#### 4.6 市販薬による L1 転写及びレトロトランスポジシンの活性化

本研究では、これまでほとんど報告のなかった市販薬についても L1 プロモーター活性及びレトロトランスポジション活性への影響を広く評価した。その結果、salicylamide が、L1 レトロトランスポジション頻度を軽微ではあるが 1.2 倍以上まで濃度依存的に上昇させた (図 12)。また、bezafibrate、diflunisal、fenofibrate、flufenamic acid、salicylamide、sulindac は L1 のプロモーター活性を 1.5 倍以上上昇させた。L1 の転写を活性化させたこれらの市販薬は、高脂血症治療薬である PPAR $\alpha$  アゴニスト及び解熱鎮痛薬として使用されている COX 阻害剤である NSAIDs に偏っている傾向にあった。salicylamide は 1250  $\mu$ M の曝露により *in vitro* の L1 転写を、50–100  $\mu$ M の曝露により *in vitro* のレトロトランスポジション頻度を上昇させた (図 7、12)。臨床での salicylamide の最大有効血中濃度は 24.8  $\mu$ M であり (Abdel-Rahman et al., 1991)、本研究で L1 レトロトランスポジションが認められた濃度の方が臨床最大有効血中濃度よりも高いが、薬物代謝能の個人差や組織への移行等で、salicylamide の生体内濃度が *in vitro* で影響が認められた濃度に達する可能性があるかもしれない。化合物の生体内での L1 レトロトランスポジシンの活性化を評価する方法としては、ヒト L1 トランスジェニックマウスを使用する方法がある。最近の研究で、7,12-dimethylbenz[a]anthracene 及び 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate を投与したヒト L1 トランスジェニックマウスの皮膚癌組織中でヒト L1 のレトロトランスポジションが検出されている (Okudaira et al., 2011)。将来的には、本研究で *in vitro* のレトロトランスポジション頻度を上昇させた化合物についても、*in vivo* で同様の変化があるかを検証していく必要がある。

#### 4.7 化学物質や薬が L1 以外のレトロトランスポジションを誘発する可能性

ヒトゲノム中の SINE である Alu 及び SINE-VNTR-Alu (SVA) は、レトロトランスポジションに必要なタンパク質を自身にコードしておらず、L1 のタンパク質を利用してトランス

にレトロトランスポジションをおこす (Dewannieux et al., 2003; Hancks et al., 2011; Kajikawa and Okada, 2002)。Alu、SVA もレトロトランスポジション活性を保持するレトロトランスポゾンであり、Alu や SVA のレトロトランスポジションが原因の疾患も多数報告されている (Deininger and Batzer, 1999; Ostertag et al., 2003; Takasu et al., 2007)。したがって、本研究において L1 プロモーター活性を誘導した化合物が L1 のタンパク質の発現を上昇させることにより、L1 だけでなく Alu や SVA のレトロトランスポジションも誘導することで、疾患を引き起こす可能性が考えられる。化合物が L1 以外のレトロトランスポゾンに与える影響についても今後評価していくべきである。

#### 4.8 薬や化学物質によるレトロトランスポジション誘発のリスク評価

L1 のレトロトランスポジションに起因する疾患がこれまでに多数報告されており (Beck et al., 2011; Chen et al., 2005; Hancks and Kazazian, 2012)、また、ストレスによる L1 の転写やレトロトランスポジションの活性化についても近年研究が進められているが、創薬の過程で行う安全性評価において、レトロトランスポジション活性化のリスクは未だ考慮されていない。本研究において、95 化合物中 15 化合物が L1 転写を 1.5 倍以上有意に上昇させ、26 化合物中 3 化合物がレトロトランスポジションを 20%以上まで濃度依存的に有意に誘導した。薬の服用などによる化合物の積極的な曝露、環境中の化合物の受動曝露のいずれにおいても、このような化合物が生体内に曝露された場合、化合物誘発性ストレスが原因となり、生体内でレトロトランスポジションが誘導される可能性がある。これは、レトロトランスポジションが活性化されることにより、機能遺伝子内に L1 が挿入されて疾患になるという重篤なリスクが増加することを意味している。ゲノム変異は元に戻すことができない最も重大な副作用であるため、薬や化学物質の安全性評価において、レトロトランスポジションの活性化のリスクを考慮していく必要があるのではないかと考える。

## 5. 第五章 まとめ

長鎖散在性反復配列である LINE1 (L1) はヒトゲノムの 17%を占めており、ヒトゲノム中の 80~100 コピーの L1 はレトロトランスポジション活性を保持していると考えられている。L1 はレトロトランスポジションにより、自身のコピーをゲノム中の新しい座位に挿入するため、結果的にゲノム変異をもたらすことになる。したがって、レトロトランスポジション活性を有する L1 は内在性の変異原であり、実際、L1 の挿入による遺伝子変異が原因の疾患が多数報告されている。また、遺伝毒性、酸化ストレスなどのストレスにより、L1 の転写やレトロトランスポジションが活性化されることも知られている。化学物質や薬によって生体内で L1 レトロトランスポジションが活性化され、機能遺伝子に L1 が挿入されると、遺伝子疾患、胎児奇形、癌などにつながる可能性が考えられるが、どのような化合物が L1 のレトロトランスポジションに影響を与えるのか幅広く調べられた報告はない。

そこで、本研究では、様々な作用を持つ化合物を用いてヒト L1 の転写及びレトロトランスポジションを誘導する化合物の探索を行った。まず、HepG2 細胞におけるレポーター遺伝子試験を用いて、ヒト L1 の転写を活性化させる化合物をスクリーニングした。遺伝毒性物質、細胞ストレス誘発物質、市販薬を含む 95 化合物について評価を行った結果、15 化合物の 6 時間または 24 時間曝露によって、L1 プロモーター活性が 1.5 倍以上 ( $p < 0.05$ ) 上昇した。それらの化合物は主に、遺伝毒性物質、高脂血症薬である PPAR $\alpha$  アゴニスト、COX 阻害作用を持つ非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) に属するものであり、遺伝毒性物質では benzo[a]pyrene、camptothecin、cytochalasin D、merbarone、vinblastine が、PPAR $\alpha$  アゴニストでは bezafibrate、fenofibrate が、非ステロイド性抗炎症薬では diflunisal、flufenamic acid、salicylamide、sulindac が L1 プロモーター活性を誘導した。

次に、これらの化合物の L1 レトロトランスポジションへの影響を評価するため、分泌型ガウシアルシフェラーゼをレポーター遺伝子とする *mGLuc1* レトロトランスポジション検出カセットを用いた、新規の高スループットなデュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系を構築した。その結果、etomoxir、WY-14643、salicylamide の 3 化合物が有意に L1 レトロトランスポジション頻度を上昇させた。これらの結果は、化学物質や

薬剤誘発性のストレスによって、レトロトランスポジションが活性化され、ゲノム変異をもたらす可能性があることを示唆している。したがって、薬や化学物質の安全性評価において、化合物により誘発される L1 レトロトランスポジション活性化のリスクを考慮していく必要があるのではないかと考える。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、研究全般にわたる多大なご支援とご指導を賜りました本学元教授、現名誉教授の岡田典弘先生に深く感謝いたします。学部4年生から13年という長い間、研究に対する姿勢から、研究内容、論文の執筆まで終始有用な助言を賜りましたことに心より深く感謝いたします。また、共同研究、国際学会での発表等、第一線の研究者と議論する機会を与えて頂きましたことに、厚く御礼申し上げます。

研究の進め方、実験の組み立て方、課題解決方法、論文のまとめ方等、公私にわたり研究に関する細やかなご指導や議論を賜りました梶川正樹講師に心より感謝いたします。

本研究でレトロトランスポジション検出に用いた *99-PUR-RPS-mGLucI* 及び *99-PUR-JM111-mGLucI* は、ジョンズホプキンス大学 John L. Goodier 博士により作製されたものです。このプラスミドを使用した化合物評価系の構築及び投稿論文作成において、有用なご助言を頂きました John L. Goodier 博士、Haig H. Kazazian 教授に深く感謝いたします。

研究に関する有益な議論やご助言を頂きました、岡田・梶川研究室の皆さま及び先輩方に心より御礼申し上げます。

最後に、これまでの長い研究生生活を暖かく見守り、陰から支えてくれた家族に心から感謝いたします。

## 参考文献

- Abdel-Rahman, M.S., Reddi, A.S., Curro, F.A., Turkall, R.M., Kadry, A.M., and Hansrote, J.A. (1991). Bioavailability of aspirin and salicylamide following oral co-administration in human volunteers. *Canadian journal of physiology and pharmacology* *69*, 1436-1442.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 430-436.
- Banaz-Yasar, F., Gedik, N., Karahan, S., Diaz-Carballo, D., Bongartz, B.M., and Ergun, S. (2012). LINE-1 Retrotransposition Events Regulate Gene Expression After X-Ray Irradiation. *DNA and cell biology*.
- Beck, C.R., Collier, P., Macfarlane, C., Malig, M., Kidd, J.M., Eichler, E.E., Badge, R.M., and Moran, J.V. (2010). LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* *141*, 1159-1170.
- Beck, C.R., Garcia-Perez, J.L., Badge, R.M., and Moran, J.V. (2011). LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annual review of genomics and human genetics* *12*, 187-215.
- Becker, K.G., Swergold, G.D., Ozato, K., and Thayer, R.E. (1993). Binding of the ubiquitous nuclear transcription factor YY1 to a cis regulatory sequence in the human LINE-1 transposable element. *Human molecular genetics* *2*, 1697-1702.
- Belancio, V.P., Deininger, P.L., and Roy-Engel, A.M. (2009). LINE dancing in the human genome: transposable elements and disease. *Genome medicine* *1*, 97.
- Belancio, V.P., Roy-Engel, A.M., Pochampally, R.R., and Deininger, P. (2010). Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. *Nucleic acids research* *38*, 3909-3922.
- Bizzozero, O.A., Ziegler, J.L., De Jesus, G., and Bolognani, F. (2006). Acute depletion of reduced glutathione causes extensive carbonylation of rat brain proteins. *Journal of neuroscience research* *83*, 656-667.
- Bourc'his, D., and Bestor, T.H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* *431*, 96-99.
- Bregliano, J.C., Laurencon, A., and Degroote, F. (1995). Evidence for an inducible repair-recombination

system in the female germ line of *Drosophila melanogaster*. I. Induction by inhibitors of nucleotide synthesis and by gamma rays. *Genetics* *141*, 571-578.

Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E., and Pfeiffer, D.R. (1989). Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* *264*, 7826-7830.

Brouha, B., Schustak, J., Badge, R.M., Lutz-Prigge, S., Farley, A.H., Moran, J.V., and Kazazian, H.H., Jr. (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 5280-5285.

Chen, J.M., Stenson, P.D., Cooper, D.N., and Ferec, C. (2005). A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Human genetics* *117*, 411-427.

Cost, G.J., Feng, Q., Jacquier, A., and Boeke, J.D. (2002). Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *The EMBO journal* *21*, 5899-5910.

Dai, L., Huang, Q., and Boeke, J.D. (2011). Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Ty1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition. *BMC biochemistry* *12*, 18.

Deininger, P.L., and Batzer, M.A. (1999). Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* *67*, 183-193.

Dewannieux, M., Esnault, C., and Heidmann, T. (2003). LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature genetics* *35*, 41-48.

Dombroski, B.A., Mathias, S.L., Nanthakumar, E., Scott, A.F., and Kazazian, H.H., Jr. (1991). Isolation of an active human transposable element. *Science* *254*, 1805-1808.

Doucet, A.J., Hulme, A.E., Sahinovic, E., Kulpa, D.A., Moldovan, J.B., Koper, H.C., Athanikar, J.N., Hasnaoui, M., Bucheton, A., Moran, J.V., *et al.* (2010). Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS Genet* *6*, e1001150.

Esnault, C., Maestre, J., and Heidmann, T. (2000). Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature genetics* *24*, 363-367.

Ewing, A.D., and Kazazian, H.H., Jr. (2011). Whole-genome resequencing allows detection of many rare

LINE-1 insertion alleles in humans. *Genome Res* 21, 985-990.

Farkash, E.A., Kao, G.D., Horman, S.R., and Prak, E.T. (2006). Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic acids research* 34, 1196-1204.

Farkash, E.A., and Luning Prak, E.T. (2006). DNA damage and L1 retrotransposition. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2006, 37285.

Feng, Q., Moran, J.V., Kazazian, H.H., Jr., and Boeke, J.D. (1996). Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 87, 905-916.

Feng, Y., Yu, S., Lasell, T.K., Jadhav, A.P., Macia, E., Chardin, P., Melancon, P., Roth, M., Mitchison, T., and Kirchhausen, T. (2003). Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6469-6474.

Gallois-Montbrun, S., Kramer, B., Swanson, C.M., Byers, H., Lynham, S., Ward, M., and Malim, M.H. (2007). Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *Journal of virology* 81, 2165-2178.

Garcia-Perez, J.L., Morell, M., Scheys, J.O., Kulpa, D.A., Morell, S., Carter, C.C., Hammer, G.D., Collins, K.L., O'Shea, K.S., Menendez, P., *et al.* (2010). Epigenetic silencing of engineered L1 retrotransposition events in human embryonic carcinoma cells. *Nature* 466, 769-773.

Gerondaes, P., Alberti, K.G., and Agius, L. (1988). Interactions of inhibitors of carnitine palmitoyltransferase I and fibrates in cultured hepatocytes. *The Biochemical journal* 253, 169-173.

Gilbert, N., Lutz-Prigge, S., and Moran, J.V. (2002). Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell* 110, 315-325.

Giorgi, G., Marcantonio, P., and Del Re, B. (2011). LINE-1 retrotransposition in human neuroblastoma cells is affected by oxidative stress. *Cell and tissue research* 346, 383-391.

Goodier, J.L., Cheung, L.E., and Kazazian, H.H., Jr. (2012). MOV10 RNA helicase is a potent inhibitor of retrotransposition in cells. *PLoS Genet* 8, e1002941.

Goodier, J.L., and Kazazian, H.H., Jr. (2008). Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation

of parasites. *Cell* 135, 23-35.

Goodier, J.L., Mandal, P.K., Zhang, L., and Kazazian, H.H., Jr. (2010). Discrete subcellular partitioning of human retrotransposon RNAs despite a common mechanism of genome insertion. *Human molecular genetics* 19, 1712-1725.

Goodier, J.L., Zhang, L., Vetter, M.R., and Kazazian, H.H., Jr. (2007). LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Molecular and cellular biology* 27, 6469-6483.

Hagan, C.R., and Rudin, C.M. (2007). DNA cleavage and Trp53 differentially affect SINE transcription. *Genes, chromosomes & cancer* 46, 248-260.

Hancks, D.C., Goodier, J.L., Mandal, P.K., Cheung, L.E., and Kazazian, H.H., Jr. (2011). Retrotransposition of marked SVA elements by human L1s in cultured cells. *Human molecular genetics* 20, 3386-3400.

Hancks, D.C., and Kazazian, H.H. (2012). Active human retrotransposons: variation and disease. *Curr Opin Genet Dev* 22, 191-203.

Harris, C.R., Dewan, A., Zupnick, A., Normart, R., Gabriel, A., Prives, C., Levine, A.J., and Hoh, J. (2009). p53 responsive elements in human retrotransposons. *Oncogene* 28, 3857-3865.

Holmes, S.E., Dombroski, B.A., Krebs, C.M., Boehm, C.D., and Kazazian, H.H., Jr. (1994). A new retrotransposable human L1 element from the LRE2 locus on chromosome 1q produces a chimaeric insertion. *Nature genetics* 7, 143-148.

Huang, C.R., Schneider, A.M., Lu, Y., Niranjana, T., Shen, P., Robinson, M.A., Steranka, J.P., Valle, D., Civin, C.I., Wang, T., *et al.* (2010). Mobile interspersed repeats are major structural variants in the human genome. *Cell* 141, 1171-1182.

Iskow, R.C., McCabe, M.T., Mills, R.E., Torene, S., Pittard, W.S., Neuwald, A.F., Van Meir, E.G., Vertino, P.M., and Devine, S.E. (2010). Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* 141, 1253-1261.

Jenke, A.C., Scinteie, M.F., Stehle, I.M., and Lipps, H.J. (2004). Expression of a transgene encoded on a

non-viral episomal vector is not subject to epigenetic silencing by cytosine methylation. *Molecular biology reports* 31, 85-90.

Kajikawa, M., and Okada, N. (2002). LINEs mobilize SINEs in the eel through a shared 3' sequence. *Cell* 111, 433-444.

Kale, S.P., Moore, L., Deininger, P.L., and Roy-Engel, A.M. (2005). Heavy metals stimulate human LINE-1 retrotransposition. *International journal of environmental research and public health* 2, 14-23.

Kazazian, H.H. (2011a). *Mobile DNA : finding treasure in junk* (Upper Saddle River, New Jersey: FT Press).

Kazazian, H.H., Jr. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303, 1626-1632.

Kazazian, H.H., Jr. (2011b). Mobile DNA transposition in somatic cells. *BMC biology* 9, 62.

Kazazian, H.H., Jr., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A.F., Phillips, D.G., and Antonarakis, S.E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 332, 164-166.

Kimberland, M.L., Divoky, V., Prchal, J., Schwahn, U., Berger, W., and Kazazian, H.H., Jr. (1999). Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells. *Human molecular genetics* 8, 1557-1560.

Kinomoto, M., Kanno, T., Shimura, M., Ishizaka, Y., Kojima, A., Kurata, T., Sata, T., and Tokunaga, K. (2007). All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic acids research* 35, 2955-2964.

Kulpa, D.A., and Moran, J.V. (2005). Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Human molecular genetics* 14, 3237-3248.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Lee, E., Iskow, R., Yang, L., Gokcumen, O., Haseley, P., Luquette, L.J., 3rd, Lohr, J.G., Harris, C.C., Ding, L., Wilson, R.K., *et al.* (2012). Landscape of Somatic Retrotransposition in Human Cancers. *Science*.

Liu, W.M., Chu, W.M., Choudary, P.V., and Schmid, C.W. (1995). Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucleic acids research* 23, 1758-1765.

Luan, D.D., and Eickbush, T.H. (1995). RNA template requirements for target DNA-primed reverse transcription by the R2 retrotransposable element. *Molecular and cellular biology* 15, 3882-3891.

Luan, D.D., Korman, M.H., Jakubczak, J.L., and Eickbush, T.H. (1993). Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 72, 595-605.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA repair* 3, 997-1007.

Mathias, S.L., Scott, A.F., Kazazian, H.H., Jr., Boeke, J.D., and Gabriel, A. (1991). Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254, 1808-1810.

Mine, M., Chen, J.M., Brivet, M., Desguerre, I., Marchant, D., de Lonlay, P., Bernard, A., Ferec, C., Abitbol, M., Ricquier, D., *et al.* (2007). A large genomic deletion in the PDHX gene caused by the retrotranspositional insertion of a full-length LINE-1 element. *Human mutation* 28, 137-142.

Moran, J.V., Holmes, S.E., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Boeke, J.D., and Kazazian, H.H., Jr. (1996). High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87, 917-927.

Morrish, T.A., Garcia-Perez, J.L., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., Sekiguchi, J., and Moran, J.V. (2007). Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* 446, 208-212.

Morrish, T.A., Gilbert, N., Myers, J.S., Vincent, B.J., Stamato, T.D., Taccioli, G.E., Batzer, M.A., and Moran, J.V. (2002). DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nature genetics* 31, 159-165.

Muotri, A.R., Chu, V.T., Marchetto, M.C., Deng, W., Moran, J.V., and Gage, F.H. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435, 903-910.

Muotri, A.R., Marchetto, M.C., Coufal, N.G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K., and Gage, F.H. (2010). L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468, 443-446.

Muotri, A.R., Zhao, C., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2009). Environmental influence on L1

retrotransposons in the adult hippocampus. *Hippocampus* *19*, 1002-1007.

Nakajima, Y., Kobayashi, K., Yamagishi, K., Enomoto, T., and Ohmiya, Y. (2004). cDNA cloning and characterization of a secreted luciferase from the luminous Japanese ostracod, *Cypridina noctiluca*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* *68*, 565-570.

Nelson, W.G., and Kastan, M.B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Molecular and cellular biology* *14*, 1815-1823.

Okudaira, N., Goto, M., Yanobu-Takanashi, R., Tamura, M., An, A., Abe, Y., Kano, S., Hagiwara, S., Ishizaka, Y., and Okamura, T. (2011). Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in skin tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer science* *102*, 2000-2006.

Okudaira, N., Iijima, K., Koyama, T., Minemoto, Y., Kano, S., Mimori, A., and Ishizaka, Y. (2010). Induction of long interspersed nucleotide element-1 (L1) retrotransposition by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), a tryptophan photoproduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 18487-18492.

Ostertag, E.M., Goodier, J.L., Zhang, Y., and Kazazian, H.H., Jr. (2003). SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *American journal of human genetics* *73*, 1444-1451.

Ostertag, E.M., Prak, E.T., DeBerardinis, R.J., Moran, J.V., and Kazazian, H.H., Jr. (2000). Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic acids research* *28*, 1418-1423.

Pei, X.H., Nakanishi, Y., Takayama, K., Bai, F., and Hara, N. (1999). Benzo[a]pyrene activates the human p53 gene through induction of nuclear factor kappaB activity. *The Journal of biological chemistry* *274*, 35240-35246.

Rubtsova, S.N., Kondratov, R.V., Kopnin, P.B., Chumakov, P.M., Kopnin, B.P., and Vasiliev, J.M. (1998). Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS letters* *430*, 353-357.

Sacerdot, C., Mercier, G., Todeschini, A.L., Dutreix, M., Springer, M., and Lesage, P. (2005). Impact of

ionizing radiation on the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae* Ty1 retrotransposon. *Yeast* 22, 441-455.

Sassaman, D.M., Dombroski, B.A., Moran, J.V., Kimberland, M.L., Naas, T.P., DeBerardinis, R.J., Gabriel, A., Swergold, G.D., and Kazazian, H.H., Jr. (1997). Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nature genetics* 16, 37-43.

Scott, A.F., Schmeckpeper, B.J., Abdelrazik, M., Comey, C.T., O'Hara, B., Rossiter, J.P., Cooley, T., Heath, P., Smith, K.D., and Margolet, L. (1987). Origin of the human L1 elements: proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics* 1, 113-125.

Seleme, M.C., Vetter, M.R., Cordaux, R., Bastone, L., Batzer, M.A., and Kazazian, H.H., Jr. (2006). Extensive individual variation in L1 retrotransposition capability contributes to human genetic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6611-6616.

Shi, X., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2007). Cell divisions are required for L1 retrotransposition. *Molecular and cellular biology* 27, 1264-1270.

Skowronski, J., Fanning, T.G., and Singer, M.F. (1988). Unit-length line-1 transcripts in human teratocarcinoma cells. *Molecular and cellular biology* 8, 1385-1397.

Solyom, S., Ewing, A.D., Rahrmann, E.P., Doucet, T., Nelson, H.H., Burns, M.B., Harris, R.S., Sigmon, D.F., Casella, A., Erlanger, B., *et al.* (2012). Extensive somatic L1 retrotransposition in colorectal tumors. *Genome Res* 22, 2328-2338.

Stribinskis, V., and Ramos, K.S. (2006). Activation of human long interspersed nuclear element 1 retrotransposition by benzo(a)pyrene, an ubiquitous environmental carcinogen. *Cancer research* 66, 2616-2620.

Suzuki, J., Yamaguchi, K., Kajikawa, M., Ichianagi, K., Adachi, N., Koyama, H., Takeda, S., and Okada, N. (2009). Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genet* 5, e1000461.

Takasu, M., Hayashi, R., Maruya, E., Ota, M., Imura, K., Kougo, K., Kobayashi, C., Saji, H., Ishikawa, Y., Asai, T., *et al.* (2007). Deletion of entire HLA-A gene accompanied by an insertion of a retrotransposon. *Tissue antigens* 70, 144-150.

Tannous, B.A., Kim, D.E., Fernandez, J.L., Weissleder, R., and Breakefield, X.O. (2005). Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and in vivo. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *11*, 435-443.

Tchenio, T., Casella, J.F., and Heidmann, T. (2000). Members of the SRY family regulate the human LINE retrotransposons. *Nucleic acids research* *28*, 411-415.

Teneng, I., Stribinskis, V., and Ramos, K.S. (2007). Context-specific regulation of LINE-1. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* *12*, 1101-1110.

Terasaki, N., Goodier, J.L., Cheung, L.E., Wang, Y.J., Kajikawa, M., Kazazian, H.H., Jr., and Okada, N. (2013). In vitro screening for compounds that enhance human L1 mobilization. *PloS one* *8*, e74629.

Verhaegent, M., and Christopoulos, T.K. (2002). Recombinant Gaussia luciferase. Overexpression, purification, and analytical application of a bioluminescent reporter for DNA hybridization. *Analytical chemistry* *74*, 4378-4385.

Weiner, A.M., Deininger, P.L., and Efstratiadis, A. (1986). Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annual review of biochemistry* *55*, 631-661.

Wilkins, A.S. (2010). The enemy within: an epigenetic role of retrotransposons in cancer initiation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *32*, 856-865.

Xie, Y., Rosser, J.M., Thompson, T.L., Boeke, J.D., and An, W. (2011). Characterization of L1 retrotransposition with high-throughput dual-luciferase assays. *Nucleic acids research* *39*, e16.

Yang, N., Zhang, L., Zhang, Y., and Kazazian, H.H., Jr. (2003). An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic acids research* *31*, 4929-4940.

Yoder, J.A., Walsh, C.P., and Bestor, T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics : TIG* *13*, 335-340.

## 表

表 1. ゲノム中の転移因子の割合とタンパク質をコードする遺伝子数

生物種	ゲノムサイズ (Mb)	タンパク質をコードする 遺伝子数 (個)	転移因子の割合 (%)
出芽酵母	12	5,773	3
キイロタマホコリカビ	34	9,000	10
線虫	100	18,400	6
シロイヌナズナ	125	25,498	14
キイロショウジョウバエ	180	13,600	15
ガンビエハマダラカ	278	13,000	16
トラフグ	400	38,000	2
イネ	400	37,544	35
ハツカネズミ	2,500	30,000	40
トウモロコシ	3,200	50,000	60
ヒト	3,000	25,000	44

(Kazazian, 2011a)

表 2. 転移因子の種類別割合

生物種	LTR 型 レトロトランスポゾン	非 LTR 型 レトロトランスポゾン	DNA トランスポゾン
出芽酵母	100	0	0
キイロタマホコリカビ	45.8	38.5	15.6
線虫	1.7	6.9	91.4
シロイヌナズナ	46	5	48.9
キイロショウジョウバエ	69.2	22.7	8.1
ヒト	18.6	75.2	6.3
イネ	56.2	3.7	40.1
トウモロコシ	95	1.7	3.3

(Kazazian, 2011a)

表 3. 遺伝毒性物質による L1 プロモーター活性の変動

作用機序	化合物名	L1 プロモーター活性	
		6 時間後	24 時間後
DNA アルキル化	Busulfan <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
	Cyclophosphamide <sup>a</sup>	N.S.	-
	Methyl methanesulfonate	N.S.	N.S.
DNA クロスリンク	Mitomycin C <sup>a</sup>	N.S.	+
DNA 結合	Actinomycin D <sup>a</sup>	N.S.	+
	Cisplatin <sup>a</sup>	+	N.S.
DNA インターカレーター	Doxorubicin <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
	Benzo[a]pyrene	+	++
DNA 代謝拮抗	Cytosine arabinoside <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
	Fluorouracil <sup>a</sup>	N.S.	-
	Methotrexate <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
	6-Thioguanine	+	N.S.
DNA トポイソメラーゼ I 阻害	Camptothecin	N.S.	++
DNA トポイソメラーゼ II 阻害	Etoposide <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
	Merbarone	++	++
核酸アナログ	Azidothymidine <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
	Ganciclovir <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
微小管重合阻害	Colchicine <sup>a</sup>	N.S.	N.S.
	Vinblastine <sup>a</sup>	N.S.	++
微小管脱重合阻害	Taxol <sup>a</sup>	N.S.	-
アクチン重合阻害	Cytochalasin D	N.S.	++

遺伝毒性物質の 6 及び 24 時間曝露による L1 プロモーター活性変動のまとめ。L1 プロモーター活性は HepG2 細胞を用いたデュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子試験で評価した。対照群に対する被検物質処理群の L1 プロモーター活性比率を算出し、1 濃度以上で L1 プロモーター活性を 1.2~1.5 倍亢進または 1.5 倍以上亢進させた化合物を、それぞれ+ または++ で示し ( $p < 0.05$ )、1 濃度以上で L1 プロモーター活性を 0.67~0.84 倍低下または 0.67 倍未満に低下させた化合物を、それぞれ-または--で示した ( $p < 0.05$ )。N.S.: 1.2 倍以上または 0.84 倍以下の変化なし。レポーター遺伝子試験の全濃度の変化率は表 6 に示した。<sup>a</sup>: 市販薬。

表 4. 細胞ストレス誘発物質による L1 プロモーター活性の変動

作用機序		化合物名	L1 プロモーター活性	
			6 時間後	24 時間後
酸化ストレス	活性酸素種産生	Carbon tetrachloride	N.S.	N.S.
		2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone	N.S.	N.D.
		Iodoacetamide	+	N.S.
		Menadione	N.S.	N.D.
		1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	N.S.	N.S.
	グルタチオン枯渇	Diethyl malate	++	N.D.
		Phorone	+	N.S.
ミトコンドリア機能障害	呼吸鎖阻害	Antimycin A	N.S.	N.S.
		3-Nitropropionic acid	N.S.	N.S.
		Oligomycin	N.S.	-
		Rotenone	N.S.	N.S.
		Thenoyltrifluoroacetone	+	N.S.
	ミトコンドリア膜透過誘導	Citrinin	N.S.	+
	ミトコンドリア膜透過阻害	Cyclosporin A <sup>a</sup>	N.S.	++
		Lonidamine	N.S.	N.S.
	β-酸化阻害	1-Cyclopropanedicarboxylic acid	N.S.	--
		Etomoxir	++	+
		4-Pentenoic acid	N.S.	N.D.
Valproic acid		N.S.	N.D.	
小胞体ストレス	カルシウムイオノファ	A23187	--	--
		Ionomycin	--	--
		Tunicamycin	--	-
	小胞体-ゴルジ輸送阻害	Brefeldin	-	N.D.
		Exo1	+	++
細胞増殖	成長因子	EGF	N.S.	-
ステロイド合成促進	アルドステロン分泌亢進	Angiotensin II	N.S.	N.S.
	cAMP 誘導	Forskolin	N.S.	--

細胞ストレス誘発物質の 6 及び 24 時間曝露による L1 プロモーター活性変動のまとめ。L1 プロモーター活性は HepG2 細胞を用いたデュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子試験で評価した。N.D.: 未評価。その他脚注は表 3 を参照。

表 5. 薬剤による L1 プロモーター活性の変動

薬理作用		化合物名	L1 プロモーター活性	
			6 時間後	24 時間後
高脂血症治療薬	PPAR $\alpha$ アゴニスト	Bezafibrate	++	+
		Clofibrate	N.S.	+
		Fenofibrate	+	++
		WY-14643 <sup>b</sup>	N.S.	-
高コレステロール治療薬	HMG-CoA 還元酵素阻害剤	Fluvastatin	N.S.	+
		Mevastatin <sup>b</sup>	N.S.	N.S.
		Pravastatin	+	N.S.
		Simvastatin	N.S.	N.S.
副腎ステロイド抑制薬 (副腎腫瘍)	ステロイド合成阻害	Aminoglutethimide	N.S.	+
		o,p'-Dichlorodiphenyldichloroethane	-	N.S.
		Metyrapone	+	+
ホルモン剤	ステロイドホルモン	Progesterone	-	-
	性ホルモン	17 $\beta$ -Estradiol	N.S.	N.S.
		Methyltestosterone	N.S.	-
	甲状腺ホルモン	Triiodothyronin	N.S.	-
抗菌剤	エルゴステロール合成阻害	Ketoconazol	-	--
		Fluconazole	N.S.	N.S.
鎮痛消炎薬	COX 阻害, 非ステロイド性抗炎症薬	Acetylsalicylic acid	+	--
		Diclofenac	N.S.	--
		Diflunisal	++	++
		Flufenamic acid	+	++
		Ibuprofen	N.S.	-
		Indometacin	-	--
		Mefenamic acid	+	N.S.
		Salicylamide	++	++
		Sulindac	++	N.D.
Zomepirac	N.S.	N.S.		
鎮痛消炎薬		Acetaminophen	N.S.	+
抗ヒスタミン剤	H1 ヒスタミン受容体アゴニスト	( $\pm$ )-Chlorpheniramine maleate salt	N.S.	N.S.
		Cyproheptadine hydrochloride	--	-
		Epinastine hydrochloride	--	N.S.
		Ketotifen fumarate salt	-	N.S.
		Promethazine hydrochloride	-	N.D.
抗ヒスタミン剤		Methapyrilene <sup>b</sup>	-	N.S.
鎮咳薬	シグマ受容体アゴニスト	( <i>S,R</i> )-Noscapine	-	--
去痰薬	アヘンアルカロイド <sup>c</sup>	Guaiacol glyceryl ether	+	+
	ムコ多糖体合成阻害	Bromhexine hydrochloride	N.S.	N.S.

表 5. 薬剤による L1 プロモーター活性の変動 (続き)

薬理作用		化合物名	L1 プロモーター活性	
			6 時間後	24 時間後
高血圧治療薬	Ca <sup>2+</sup> アンタゴニスト	Amlodipine besylate	N.S.	N.S.
		Nifedipine	N.S.	+
	アンジオテンシン II タイプ 1 受容体阻害	Losartan	N.S.	N.S.
		Telmisartan	N.S.	N.S.
アルドステロン拮抗	Spirolactone	N.S.	N.S.	
脳梗塞治療薬	抗血小板	Clopidogrel	N.S.	N.S.
		Ticlopidine	N.S.	+
	抗凝固	Warfarin	N.S.	--
利尿剤	ループ利尿薬	Furosemide	N.S.	--
	サイアザイド系利尿薬	Trichlormethiazide	N.S.	--

薬剤の 6 時間及び 24 時間曝露による L1 プロモーター活性変動のまとめ。プロモーター活性は HepG2 細胞を用いたデュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子試験で評価した。N.D.: 未評価。<sup>b</sup>: 市販されていない化合物。その他の脚注は表 3 を参照。

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
(±)-Chlorpheniramine maleate salt	0	100.0	8.8		100.0	5.9	
	50	91.1	9.6	N.S.	96.2	18.6	N.S.
	100	100.7	9.2	N.S.	86.4	8.2	N.S.
	500	84.0	3.3	*	N.D.	N.D.	N.D.
(S,R)-Noscapine	0	100.0	5.1		100.0	5.1	
	125	85.3	11.4	N.S.	40.8	2.2	***
	250	80.1	19.5	N.S.	33.3	5.6	***
	500	68.2	9.4	**	30.4	4.2	***
17 $\beta$ -Estradiol	0	100.0	15.2		100.0	1.8	
	25	100.8	6.5	N.S.	104.0	10.7	N.S.
	50	119.2	8.4	*	103.0	15.7	N.S.
	100	106.6	7.5	N.S.	101.7	15.3	N.S.
1-Cyclopropanedicarboxylic acid	0	100.0	12.2		100.0	8.6	
	500	102.8	17.5	N.S.	79.2	19.3	N.S.
	1000	113.9	7.0	N.S.	64.6	7.6	**
	2000	99.9	8.8	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone	0	100.0	2.2		N.D.	N.D.	N.D.
	15	118.8	8.7	**	N.D.	N.D.	N.D.
	30	119.0	8.1	**	N.D.	N.D.	N.D.
3-Nitropropionic acid	0	100.0	13.7		100.0	13.4	
	125	114.5	5.0	N.S.	95.1	5.4	N.S.
	250	112.2	13.8	N.S.	94.2	18.2	N.S.
	500	118.6	13.5	N.S.	80.7	10.7	N.S.
4-Pentenoic acid	0	100.0	3.7		N.D.	N.D.	N.D.
	25000	102.0	2.3	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	50000	99.1	4.5	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	100000	101.0	26.2	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
6-Thioguanine	0	100.0	3.3		100.0	12.6	
	2.5	126.5	16.1	*	98.6	12.5	N.S.
	5	108.2	17.1	N.S.	102.0	13.8	N.S.
	10	104.0	4.2	N.S.	97.3	11.1	N.S.
A23187	0	100.0	8.0		100.0	9.3	
	0.75	57.4	15.5	***	57.4	4.2	***
	1.5	52.3	8.8	***	N.D.	N.D.	N.D.
	5	54.4	4.2	***	N.D.	N.D.	N.D.
Acetaminophen	0	100.0	17.3		100.0	8.5	
	10000	116.1	11.8	N.S.	130.6	18.3	**
	20000	114.9	9.1	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Acetylsalicylic acid	0	100.0	5.1		100.0	7.9	
	1	103.0	7.2	N.S.	98.7	9.5	N.S.
	3	114.9	11.1	N.S.	88.3	11.1	N.S.
	10	107.3	3.8	N.S.	105.2	9.7	N.S.
	50	105.6	8.5	N.S.	98.2	29.3	N.S.
	100	123.4	22.6	**	N.D.	N.D.	N.D.

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
Acetylsalicylic acid	250	111.6	13.4	N.S.	104.8	8.4	N.S.
	500	113.8	14.2	N.S.	86.0	5.1	N.S.
	1000	107.0	11.8	N.S.	91.3	6.0	N.S.
	2000	95.4	8.0	N.S.	67.7	5.9	***
	3000	105.3	4.0	N.S.	53.3	2.5	***
	5000	111.3	15.2	N.S.	40.8	1.2	***
Actinomycin D	0	100.0	11.6		100.0	9.6	
	0.0025	131.6	33.6	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	0.005	111.7	12.3	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	0.01	110.2	35.7	N.S.	143.8	19.2	**
Aminoglutethimide	0	100.0	11.0		100.0	12.2	
	250	139.5	58.2	N.S.	125.6	11.1	*
	500	136.4	34.6	N.S.	101.6	15.7	N.S.
	1000	96.0	7.4	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Amlodipine besylate	0	100.0	5.0		100.0	7.4	
	0.5	93.6	11.1	N.S.	104.8	8.9	N.S.
	1	104.2	10.3	N.S.	100.9	22.3	N.S.
	2	95.7	7.8	N.S.	107.1	11.9	N.S.
	10	85.2	8.2	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Angiotensin II	0	100.0	15.2		100.0	1.8	
	250	115.1	10.8	N.S.	93.0	16.5	N.S.
	500	100.0	13.1	N.S.	95.1	10.7	N.S.
	1000	97.5	9.9	N.S.	92.6	7.8	N.S.
Antimycin A	0	100.0	17.0		100.0	8.1	
	0.075	101.5	17.3	N.S.	115.0	20.9	N.S.
	1	101.4	5.7	N.S.	109.4	8.4	N.S.
Azidothymidine	0	100.0	8.5		100.0	9.8	
	50	106.7	25.4	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	100	105.8	25.5	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	200	111.3	27.1	N.S.	104.5	12.6	N.S.
	1000	N.D.	N.D.	N.D.	109.7	7.2	N.S.
Benzo[a]pyrene	0	100.0	7.8		100.0	7.7	
	0.5	101.9	12.4	N.S.	132.4	17.2	**
	1	116.6	11.7	***	140.0	22.2	***
	3	133.4	17.7	***	187.4	37.2	***
Bezafibrate	0	100.0	6.3		100.0	4.7	
	10	115.0	12.8	*	105.4	4.7	N.S.
	100	139.9	11.4	***	132.8	12.9	***
	1000	173.9	13.8	***	N.D.	N.D.	N.D.
Brefeldin	0	100.0	8.7		N.D.	N.D.	N.D.
	0.3	82.3	7.7	*	N.D.	N.D.	N.D.
	1	70.1	4.2	***	N.D.	N.D.	N.D.
Bromhexine hydrochloride	0	100.0	11.0		100.0	1.6	
	62.5	108.1	14.4	N.S.	101.7	7.2	N.S.
	125	97.8	11.5	N.S.	98.7	11.9	N.S.

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
Busulfan	0	100.0	9.4		100.0	4.1	
	100	111.5	33.1	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	250	118.7	29.1	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	500	131.3	38.7	N.S.	122.4	38.9	N.S.
Camptothecin	0	100.0	16.0		100.0	13.0	
	0.05	110.3	16.7	N.S.	142.2	21.0	*
	0.1	98.1	16.0	N.S.	134.6	20.9	*
	0.3	102.6	21.9	N.S.	152.1	13.3	**
Carbon tetrachloride	0	100.0	6.5		100.0	3.5	
	500	99.7	5.5	N.S.	91.3	3.6	N.S.
	1000	110.5	5.9	N.S.	90.7	12.4	N.S.
	2000	108.3	8.1	N.S.	98.4	8.2	N.S.
Cisplatin	0	100.0	11.1		100.0	11.9	
	10	109.2	12.8	N.S.	98.4	13.2	N.S.
	50	116.7	22.7	N.S.	105.3	7.7	N.S.
	100	147.8	39.5	**	95.4	19.0	N.S.
Citrinin	0	100.0	8.4		100.0	6.2	
	45	100.7	12.2	N.S.	103.7	13.9	N.S.
	90	102.1	10.5	N.S.	134.3	25.4	***
Clofibrate	0	100.0	7.1		100.0	6.8	
	10	112.8	10.8	*	111.8	7.9	N.S.
	100	101.9	10.8	N.S.	100.1	9.5	N.S.
	1000	105.9	16.8	N.S.	132.3	22.9	***
Clopidogrel	0	100.0	14.0		100.0	7.0	
	10	96.7	8.6	N.S.	113.2	5.2	N.S.
	25	98.5	12.4	N.S.	113.5	13.7	N.S.
	50	92.9	6.0	N.S.	110.5	9.2	N.S.
	100	84.6	4.4	N.S.	106.5	11.5	N.S.
Colchicine	0	100.0	4.8		100.0	9.4	
	0.01	100.3	17.1	N.S.	100.2	17.9	N.S.
	0.05	99.8	4.3	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	0.1	107.9	32.5	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Cyclophosphamide	0	100.0	3.3		100.0	12.6	
	10000	96.3	14.2	N.S.	95.3	10.8	N.S.
	20000	93.6	21.9	N.S.	77.9	4.5	*
	40000	98.3	8.4	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Cyclosporin A	0	100.0	9.8		100.0	10.5	
	15	96.0	15.4	N.S.	94.8	12.3	N.S.
	30	100.9	15.8	N.S.	196.8	32.6	***
	60	100.7	10.2	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Cyproheptadine hydrochloride sesquihydrate	0	100.0	9.3		100.0	5.0	
	50	90.1	17.2	N.S.	70.2	14.1	***
	100	74.7	29.6	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	200	47.2	12.1	***	N.D.	N.D.	N.D.

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
Cytochalasin D	0	100.0	8.3		100.0	6.2	
	0.1	110.3	12.7	*	106.5	11.1	N.S.
	0.5	100.9	7.4	N.S.	127.6	8.5	***
	1	106.0	11.6	N.S.	167.2	16.0	***
	10	98.6	12.7	N.S.	295.3	19.5	***
Cytosine arabinoside	0	100.0	6.5		100.0	3.5	
	125	101.1	8.0	N.S.	106.1	3.7	N.S.
	250	95.2	5.5	N.S.	105.2	4.4	N.S.
	500	102.2	8.1	N.S.	102.8	6.2	N.S.
Diclofenac	0	100.0	12.9		100.0	6.0	
	125	109.2	7.4	N.S.	68.5	3.6	***
	250	106.6	1.6	N.S.	59.6	5.5	***
Diethyl malate	0	100.0	4.8		N.D.	N.D.	N.D.
	375	126.7	13.4	*	N.D.	N.D.	N.D.
	750	159.4	18.2	***	N.D.	N.D.	N.D.
Diflunisal	0	100.0	10.0		100.0	5.3	
	62.5	147.7	6.5	***	116.7	8.5	**
	125	136.5	12.5	**	156.3	4.7	***
	250	159.2	20.7	***	N.D.	N.D.	N.D.
Doxorubicin	0	100.0	13.9		100.0	3.8	
	0.1	N.D.	N.D.	N.D.	88.8	14.7	N.S.
	0.5	101.0	32.6	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	1	98.1	26.5	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
EGF	0 ng/mL	100.0	4.3		100.0	5.1	
	50 ng/mL	102.8	9.7	N.S.	86.6	8.9	*
	100 ng/mL	98.6	5.6	N.S.	86.2	6.6	*
	200 ng/mL	94.9	3.7	N.S.	76.1	12.6	***
Epinastine hydrochloride	0	100.0	8.2		100.0	4.5	
	100	93.6	15.2	N.S.	85.9	26.5	N.S.
	200	77.8	11.7	*	N.D.	N.D.	N.D.
	500	27.1	3.8	***	N.D.	N.D.	N.D.
Etomoxir	0	100.0	9.8		100.0	10.3	
	50	126.5	10.8	*	111.5	14.8	N.S.
	100	147.1	12.0	***	143.2	17.3	***
	500	180.9	23.4	***	N.D.	N.D.	N.D.
Etoposide	0	100.0	19.9		100.0	9.5	
	10	90.4	7.5	N.S.	95.7	4.1	N.S.
	25	100.2	30.5	N.S.	108.3	16.3	N.S.
	50	98.6	21.0	N.S.	138.1	69.9	N.S.
Exo1	0	100.0	9.6		100.0	8.8	
	10	122.6	12.4	***	134.3	10.4	*
	50	127.2	15.0	***	255.9	39.7	***
	100	120.5	22.4	***	263.3	60.7	***

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
Fenofibrate	0	100.0	6.0		100.0	5.3	
	10	117.0	9.8	*	108.1	5.3	N.S.
	50	126.1	10.7	***	127.0	10.4	**
	100	140.5	11.9	***	162.9	24.4	***
Fluconazole	0	100.0	14.9		100.0	9.1	
	1250	107.6	11.1	N.S.	99.5	7.4	N.S.
	2500	99.2	6.6	N.S.	92.7	12.8	N.S.
Flufenamic acid	0	100.0	9.4		100.0	7.5	
	62.5	129.8	7.7	**	158.0	18.9	***
	125	119.4	13.9	N.S.	119.9	19.8	N.S.
	250	129.5	21.0	**	N.D.	N.D.	N.D.
Fluorouracil	0	100.0	12.8		100.0	7.1	
	5	110.4	29.8	N.S.	106.6	17.8	N.S.
	10	108.7	21.8	N.S.	83.2	4.1	*
	20	94.5	11.4	N.S.	73.4	10.6	**
Fluvastatin	0	100.0	9.1		100.0	9.4	
	5	125.9	35.3	N.S.	133.9	32.1	*
	10	111.0	31.7	N.S.	102.0	23.1	N.S.
	20	99.4	19.4	N.S.	109.3	25.2	N.S.
Forskolin	0	100.0	10.2		100.0	5.3	
	25	88.6	4.5	N.S.	59.9	9.0	***
	50	85.9	4.0	*	59.0	6.1	***
	100	89.2	7.9	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Furosemide	0	100.0	4.0		100.0	5.9	
	100	104.2	27.9	N.S.	102.8	23.9	N.S.
	250	97.3	11.4	N.S.	96.2	8.4	N.S.
	500	96.9	5.2	N.S.	91.2	6.5	N.S.
	1000	89.1	15.5	N.S.	60.4	2.4	**
Ganciclovir	0	100.0	1.4		100.0	6.9	
	500	109.1	16.9	N.S.	98.3	6.1	N.S.
	1000	114.8	15.5	N.S.	104.4	10.7	N.S.
Guaiacol glyceryl ether	0	100.0	10.5		100.0	5.5	
	1250	123.5	7.7	N.S.	99.7	7.2	N.S.
	2500	135.9	18.8	**	112.2	19.2	N.S.
	5000	148.9	13.3	***	145.0	15.0	**
Ibuprofen	0	100.0	7.2		100.0	8.0	
	250	117.7	8.4	*	90.8	3.5	N.S.
	500	99.7	9.9	N.S.	89.6	10.2	N.S.
	1000	97.2	8.2	N.S.	74.9	7.6	***
Indometacin	0	100.0	10.9		100.0	6.6	
	250	99.1	10.0	N.S.	83.0	11.2	*
	500	92.6	13.3	N.S.	59.3	6.8	***
	1000	67.2	10.1	**	N.D.	N.D.	N.D.

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
Iodoacetamide	0	100.0	10.7		100.0	7.3	
	0.1	97.4	9.0	N.S.	103.0	11.0	N.S.
	1	101.4	13.0	N.S.	106.4	15.9	N.S.
	5	117.1	22.8	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	10	130.2	26.8	***	N.D.	N.D.	N.D.
Ionomycin	0	100.0	8.0		100.0	9.3	
	5	77.1	5.0	*	79.5	14.9	*
	10	60.0	13.8	***	58.1	10.6	***
	20	60.5	11.3	***	36.9	6.4	***
Ketoconazol	0	100.0	14.9		100.0	9.1	
	10	90.9	12.3	N.S.	82.2	15.5	N.S.
	20	83.5	10.9	N.S.	57.5	15.0	***
	40	71.4	9.3	*	37.2	4.2	***
Ketotifen fumarate salt	0	100.0	8.8		100.0	7.5	
	50	90.4	6.5	N.S.	89.9	4.6	N.S.
	100	92.3	7.8	N.S.	83.7	8.0	*
	200	80.3	4.5	**	N.D.	N.D.	N.D.
Lonidamine	0	100.0	9.6		100.0	9.6	
	50	105.2	12.3	N.S.	93.0	8.0	N.S.
	100	87.9	6.4	N.S.	105.0	9.1	N.S.
	200	99.9	25.0	N.S.	91.6	9.5	N.S.
Losartan	0	100.0	4.3		100.0	7.9	
	15.625	93.6	6.2	N.S.	92.6	10.4	N.S.
	31.25	106.3	7.8	N.S.	101.7	10.2	N.S.
	62.5	108.7	8.7	N.S.	98.6	10.8	N.S.
	125	100.7	10.3	N.S.	95.1	7.4	N.S.
Mefenamic acid	0	100.0	5.2		100.0	4.1	
	50	127.6	8.3	**	91.0	5.5	*
	500	113.1	19.0	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	1000	93.8	12.8	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Menadione	0	100.0	3.7		N.D.	N.D.	N.D.
	17.5	116.1	11.0	*	N.D.	N.D.	N.D.
Merbarone	0	100.0	7.9		100.0	9.3	
	1	111.9	11.5	N.S.	112.7	12.8	N.S.
	10	140.0	16.8	***	147.2	17.4	***
	50	171.3	27.1	***	218.9	30.5	***
	100	182.2	15.7	***	197.6	31.6	***
Methyl methanesulfonate	0	100.0	1.4		100.0	6.9	
	125	112.5	11.1	N.S.	90.8	4.2	N.S.
	250	106.7	15.1	N.S.	88.2	13.3	N.S.
	500	100.1	12.3	N.S.	83.2	4.5	*
Methapyrilene	0	100.0	13.7		100.0	13.4	
	250	97.7	2.8	N.S.	100.9	25.4	N.S.
	500	86.6	8.4	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	1000	72.8	12.0	**	N.D.	N.D.	N.D.

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
Methotrexate	0	100.0	19.9		100.0	13.8	
	10	86.8	9.6	N.S.	111.9	35.6	N.S.
	100	93.4	12.7	N.S.	107.6	48.2	N.S.
	200	93.6	12.1	N.S.	141.9	41.4	N.S.
Methyltestosterone	0	100.0	4.7		100.0	5.6	
	25	94.7	15.1	N.S.	73.9	15.0	**
	50	108.1	4.4	N.S.	74.5	13.8	**
	100	98.5	14.3	N.S.	85.3	3.9	N.S.
Metyrapone	0	100.0	7.3		100.0	8.6	
	125	121.3	7.4	**	111.2	10.7	N.S.
	250	141.9	18.5	***	121.5	11.4	*
	500	126.6	3.5	**	134.6	13.7	***
Mevastatin	0	100.0	6.7		100.0	7.1	
	1	113.6	21.7	N.S.	117.7	30.9	N.S.
	3	101.2	23.6	N.S.	104.9	11.7	N.S.
	6	123.5	43.0	N.S.	103.3	18.2	N.S.
Mitomycin C	0	100.0	10.4		100.0	4.9	
	2.5	119.3	25.0	N.S.	131.4	10.2	**
	10	96.4	10.7	N.S.	114.3	24.6	N.S.
1-Methyl-4-phenyl -1,2,3,6-tetrahydropyridine	0	100.0	18.2		100.0	11.3	
	500	115.3	10.9	N.S.	121.5	18.6	N.S.
Nifedipine	0	100.0	9.2		100.0	11.9	
	10	96.1	10.2	N.S.	103.8	8.8	N.S.
	25	98.4	2.3	N.S.	125.9	5.6	***
	50	97.2	12.2	N.S.	104.3	7.0	N.S.
	100	88.6	23.7	N.S.	91.2	2.7	N.S.
Oligomycin	0	100.0	13.5		100.0	7.9	
	0.75	89.6	5.8	N.S.	82.1	18.7	*
	1.5	82.5	14.8	N.S.	77.2	1.9	**
o,p'-Dichlorodipenyldichloroethane	0	100.0	1.6		100.0	4.6	
	50	97.3	5.0	N.S.	107.7	5.8	N.S.
	100	77.5	11.0	**	N.D.	N.D.	N.D.
Phorone	0	100.0	4.8		100.0	3.2	
	500	130.9	15.9	**	117.6	20.8	N.S.
	1000	130.7	6.7	**	118.0	22.8	N.S.
Pravastatin	0	100.0	5.1		100.0	5.1	
	2500	130.4	8.2	***	101.7	7.9	N.S.
Progesterone	0	100.0	3.1		100.0	7.9	
	25	100.7	7.1	N.S.	81.7	11.6	*
	50	90.4	15.1	N.S.	67.8	7.1	**
	100	73.7	6.7	**	N.D.	N.D.	N.D.
Promethazine hydrochloride	0	100.0	8.6		N.D.	N.D.	N.D.
	50	73.9	13.1	**	N.D.	N.D.	N.D.

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu$ M)	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	p-値	平均値	標準 偏差	p-値
Rotenone	0	100.0	11.4		100.0	9.5	
	0.075	112.8	27.6	N.S.	90.8	3.4	N.S.
	10	97.8	8.2	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	50	93.6	11.2	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Salicylamide	0	100.0	11.9		100.0	4.8	
	1250	146.3	22.1	**	174.6	15.9	***
	2500	139.3	9.1	*	N.D.	N.D.	N.D.
	5000	150.7	24.9	**	N.D.	N.D.	N.D.
Simvastatin	0	100.0	5.2		100.0	6.2	
	1	94.1	18.2	N.S.	100.4	11.5	N.S.
	3	93.1	7.7	N.S.	117.4	14.5	N.S.
	6	107.6	18.0	N.S.	107.1	15.4	N.S.
Spironolactone	0	100.0	11.0		100.0	12.2	
	1	103.9	9.8	N.S.	89.3	3.8	N.S.
	3	97.8	9.3	N.S.	100.3	8.9	N.S.
	30	88.5	9.3	N.S.	110.8	12.1	N.S.
Sulindac	0	100.0	11.8		N.D.	N.D.	N.D.
	250	218.2	44.0	**	N.D.	N.D.	N.D.
Taxol	0	100.0	3.1		100.0	3.0	
	5	104.5	16.7	N.S.	86.9	18.2	N.S.
	10	123.0	34.9	N.S.	81.9	10.9	N.S.
	20	96.8	14.1	N.S.	76.3	12.8	*
Telmisartan	0	100.0	4.0		100.0	5.9	
	1.25	103.9	11.1	N.S.	112.1	8.0	N.S.
	2.5	105.2	8.6	N.S.	113.6	9.7	N.S.
	5	115.0	3.5	N.S.	114.2	9.0	N.S.
	10	119.5	15.1	*	119.2	3.6	**
Ticlopidine	0	100.0	9.5		100.0	6.0	
	10	116.9	5.9	*	124.4	4.8	**
	25	106.6	9.2	N.S.	104.3	9.1	N.S.
	50	96.2	12.3	N.S.	112.7	22.2	N.S.
	100	97.5	12.8	N.S.	129.0	11.2	**
Trichlormethiazide	0	100.0	4.3		100.0	7.1	
	100	102.9	10.4	N.S.	66.9	13.0	***
	250	107.5	16.7	N.S.	59.6	9.6	***
	500	101.5	6.6	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
	1000	99.7	26.7	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Triiodothyronin	0	100.0	3.1		100.0	7.9	
	125	100.7	8.9	N.S.	74.1	9.1	**
	250	107.1	12.8	N.S.	72.3	6.2	**
	500	100.2	9.0	N.S.	71.7	14.1	**
Thenoyltrifluoroacetone	0	100.0	8.8		100.0	7.4	
	250	137.2	15.5	*	116.0	9.5	N.S.
	500	149.4	32.3	***	112.8	10.4	N.S.
	1000	132.8	9.6	*	109.7	33.0	N.S.

表 6. HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験結果 (続き)

化合物名	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	L1 プロモーター活性 (コントロール比 (%))					
		6 時間後			24 時間後		
		平均値	標準 偏差	<i>p</i> -値	平均値	標準 偏差	<i>p</i> -値
Tunicamycin	0 $\mu\text{g/mL}$	100.0			100.0	7.4	
	5 $\mu\text{g/mL}$	76.6	8.1	***	73.3	3.2	***
	10 $\mu\text{g/mL}$	66.6	7.3	***	84.5	10.9	*
	20 $\mu\text{g/mL}$	63.5	3.2	***	72.1	7.7	***
	40 $\mu\text{g/mL}$	N.D.	N.D.	N.D.	75.8	6.2	***
Valproic acid	0	100.0	10.6		N.D.	N.D.	N.D.
	2500	90.2	25.2	N.S.	N.D.	N.D.	N.D.
Vinblastine	0	100.0	6.3		100.0	7.2	
	0.1	92.8	14.6	N.S.	180.5	30.9	***
	1	92.1	23.2	N.S.	160.9	30.3	***
	5	94.0	11.9	N.S.	207.3	24.3	***
Warfarin	0	100.0	4.3		100.0	7.9	
	25	98.9	10.7	N.S.	85.0	5.2	N.S.
	50	89.5	11.7	N.S.	85.8	14.0	N.S.
	100	91.7	11.0	N.S.	74.2	9.4	**
	500	90.8	25.4	N.S.	64.1	6.6	***
WY-14643	0	100.0	9.2		100.0	7.8	
	200	98.9	11.1	N.S.	82.7	5.2	*
Zomepirac	0	100.0	5.3		100.0	6.8	
	500	102.2	9.6	N.S.	86.3	6.3	*

化合物の 6 及び 24 時間曝露による L1 プロモーター活性の変化率。L1 プロモーター活性は HepG2 細胞を用いたデュアルルシフェラーゼレポーター遺伝子試験で評価した。対照群に対する被検物質処理群の L1 プロモーター活性の比率を示した。Acetylsalicylic acid 以外は 1 濃度あたり 2 ウェル以上で独立した実験を少なくとも 2 回行い ( $n \geq 4$ )、Acetylsalicylic acid は 1 濃度あたり 4 ウェルで 1 回実験を行い ( $n=4$ )、それらの平均値及び標準偏差を示した。N.S.: 有意差なし, N.D.: 未評価。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ 。EGF、Tunicamycin の濃度単位は  $\mu\text{g/mL}$ 、その他の化合物濃度単位は  $\mu\text{M}$ 。

表 7. L1 レトロトランスポジション実験及び細胞毒性試験結果

化合物名	L1 プロモーター活性		濃度 (μM)	L1 レトロトランスポジション活性 (コントロール比 (%))			細胞生存率 (コントロール比 (%))	
	6h	24h		平均値	標準偏差	p-値	平均値	標準偏差
Acetylsalicylic acid	+	--	0	100.0	2.5		100.0	8.8
			100	98.3	6.1	N.S.	101.3	5.2
			1000	75.9	1.8	***	95.4	2.4
Actinomycin D	N.S.	+	0	100.0	4.7		100.0	3.7
			0.00005	103.3	3.6	N.S.	99.7	3.5
			0.0001	108.4	12.5	N.S.	101.8	5.3
Benzo[a]pyrene	+	++	0	100.0	5.9		100.0	7.7
			1	110.5	2.3	N.S.	88.3	7.7
			3	110.4	7.8	N.S.	85.3	6.6
Bezafibrate	++	+	0	100.0	2.5		100.0	8.8
			10	109.5	10.5	N.S.	103.0	4.0
			100	118.4	5.7	**	99.0	4.1
Busulfan	N.S.	N.S.	0	100.0	5.9		100.0	7.7
			5	104.6	6.1	N.S.	96.5	5.7
			10	113.0	12.1	N.S.	89.2	5.4
Camptothecin	N.S.	++	0	100.0	2.9		100.0	4.9
			0.001	99.2	3.6	N.S.	94.2	7.1
			0.005	93.0	3.3	*	85.4	3.1
Citrinin	N.S.	+	0	100.0	4.5		100.0	4.1
			5	112.9	1.2	**	101.7	6.7
			10	108.6	5.4	*	101.7	5.1
Clofibrate	N.S.	+	0	100.0	2.5		100.0	8.8
			10	100.9	9.2	N.S.	103.9	5.1
			100	108.9	7.8	N.S.	101.1	9.7
Colchicine	N.S.	N.S.	0	100.0	7.0		100.0	3.6
			0.00005	111.1	4.8	*	98.6	5.5
			0.0001	114.5	5.5	**	97.5	7.5
Cyclosporin A	N.S.	++	0	100.0	7.0		100.0	3.6
			0.05	110.8	10.6	N.S.	95.9	5.5
			0.1	120.1	9.8	*	94.9	5.6
			1	64.6	14.4	***	87.2	5.3
Cytochalasin D	N.S.	++	0	100.0	8.0		100.0	4.6
			0.001	98.9	3.7	N.S.	98.5	5.3
			0.005	100.4	5.1	N.S.	91.3	8.4
Cytosine arabinoside	N.S.	N.S.	0	100.0	5.9		100.0	7.7
			0.01	104.0	7.3	N.S.	96.7	5.9
Diethyl malate	++	N.D.	0	100.0	4.5		100.0	4.1
			10	100.1	3.9	N.S.	102.0	4.5
			50	95.0	4.4	N.S.	101.2	5.1
Diflunisal	++	++	0	100.0	2.9		100.0	4.9
			5	115.7	7.2	**	94.5	5.9
			10	113.9	3.8	**	94.9	3.0
Etomoxir	++	+	0	100.0	4.5		100.0	4.1
			10	114.4	7.5	N.S.	95.8	3.0
			50	140.6	13.1	***	95.0	3.0

表 7. L1 レトロトランスポジション実験及び細胞毒性試験結果 (続き)

化合物名	L1 プロモーター活性		濃度 (μM)	L1 レトロトランスポジション活性 (コントロール比 (%))			細胞生存率 (コントロール比 (%))	
	6h	24h		平均値	標準偏差	p-値	平均値	標準偏差
Etoposide	N.S.	N.S.	0	100.0	2.9		100.0	4.9
			0.05	103.1	3.4	N.S.	91.8	3.1
			0.1	98.4	2.5	N.S.	86.1	3.1
Exo 1	+	++	0	100.0	5.9		100.0	7.7
			1	108.3	6.4	N.S.	100.6	7.6
			5	111.9	3.4	*	92.3	6.6
			10	101.3	2.0	N.S.	87.3	6.5
Fenofibrate	+	++	0	100.0	2.5		100.0	8.8
			1	102.9	9.4	N.S.	100.4	4.0
			5	95.5	5.6	N.S.	98.7	9.5
			10	99.1	10.1	N.S.	95.4	5.0
Flufenamic acid	+	++	0	100.0	2.5		100.0	8.8
			10	100.9	3.1	N.S.	98.6	3.3
			20	100.8	6.0	N.S.	98.4	8.4
Iodoacetamide	+	N.S.	0	100.0	4.5		100.0	4.1
			0.1	96.3	6.2	N.S.	101.2	3.8
			0.5	96.0	5.6	N.S.	100.7	5.5
Merbarone	++	++	0	100.0	2.9		100.0	4.9
			5	95.9	3.6	N.S.	91.5	4.4
			10	96.0	6.6	N.S.	91.5	3.8
Metyrapone	+	+	0	100.0	5.9		100.0	3.2
			1	98.6	4.7	N.S.	101.1	3.8
			10	102.3	4.7	N.S.	103.7	2.6
			100	97.5	4.7	N.S.	101.5	3.1
Salicylamide	++	++	0	100.0	2.9		100.0	4.9
			50	114.0	6.9	**	94.4	2.0
			100	123.1	5.5	***	94.5	6.0
Sulindac	++	N.D.	0	100.0	2.9		100.0	4.9
			5	102.9	1.7	N.S.	92.7	3.0
			10	101.4	3.5	N.S.	98.6	2.2
Vinblastine	N.S.	++	0	100.0	5.9		100.0	7.7
			0.000005	109.3	6.0	N.S.	97.4	7.1
			0.00001	106.9	9.0	N.S.	96.0	4.4
WY-14643	N.S.	-	0	100.0	3.8		100.0	7.3
			10	116.4	11.1	**	101.8	4.9
			50	128.5	9.2	***	102.3	4.0

化合物曝露による L1 レトロトランスポジション活性の変化率及び細胞生存率。L1 レトロトランスポジション活性は、HeLa 細胞を用いたデュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系で評価した。L1 レトロトランスポジション活性の変化率及び細胞生存率は対照群に対する被検物質処理群の比率で示した。独立した実験を 4 回行い、それらの平均値及び標準偏差を示した。N.S.: 有意差なし。\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ 。L1 プロモーター活性の結果は表 3-5 の内容を転記した。L1 プロモーター活性に関する脚注は

表 3 を参照。

図

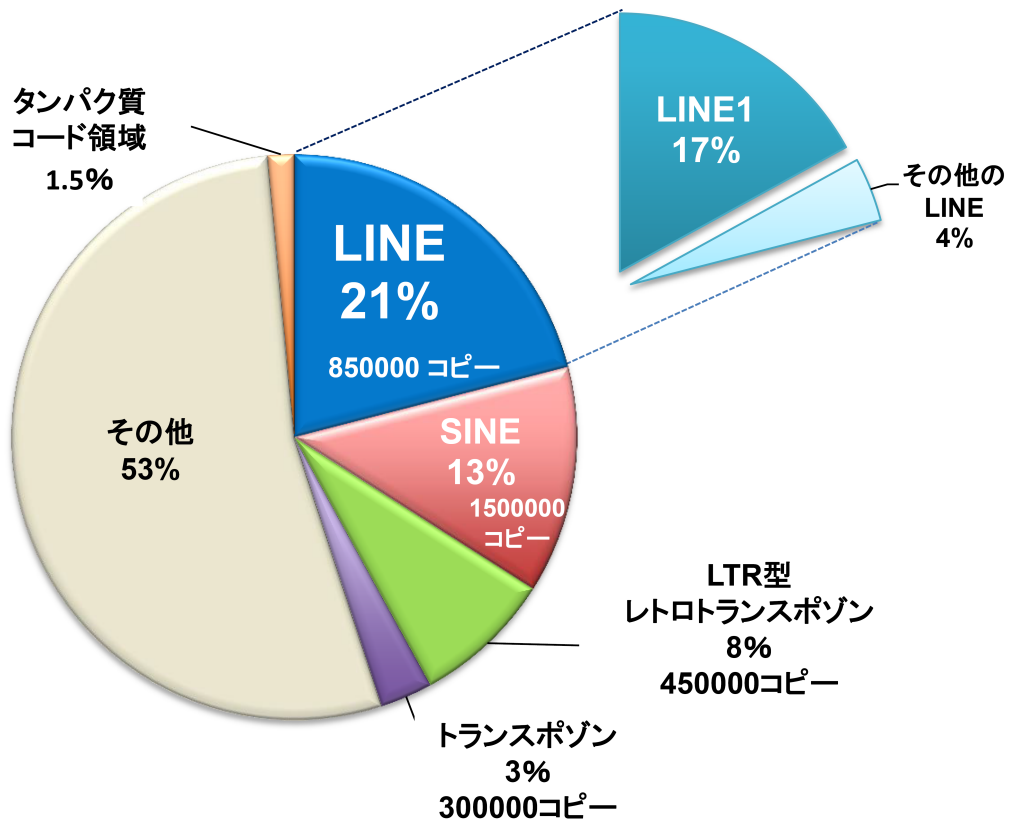


図 1. ヒトゲノム中のレトロトランスポゾンの割合

(Lander et al., 2001)

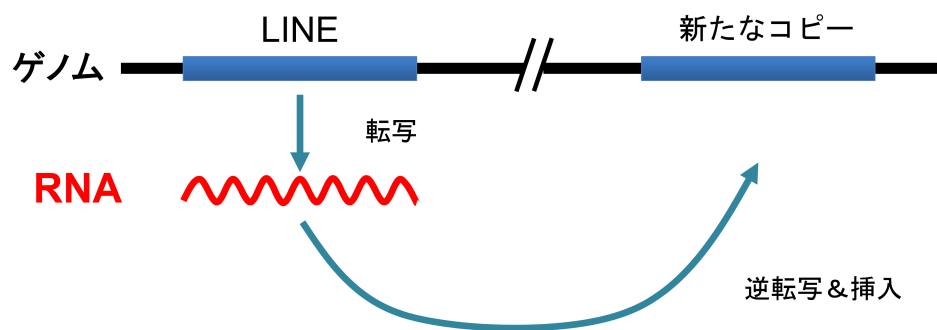


図 2. レトロトランスポジション

レトロトランスポゾン は RNA に転写された後、逆転写を介したコピー&ペースト方式で増幅する。

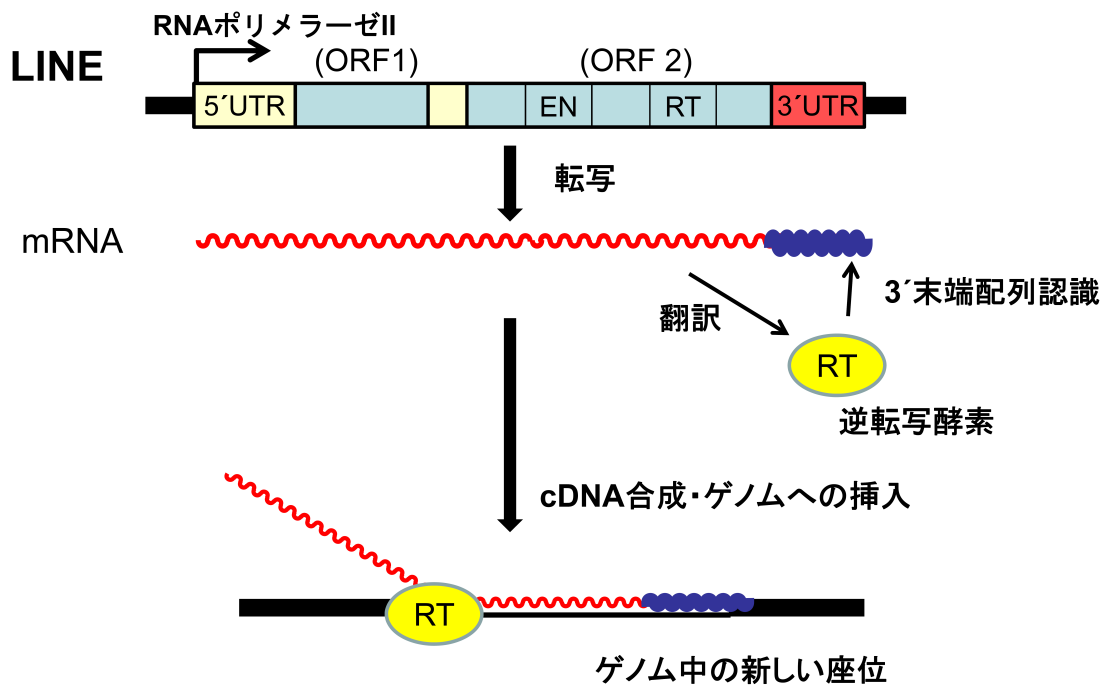


図 3. LINE の Target-Primed Reverse Transcription (TPRT) によるレトロトランスポジション機構

LINE は 5'UTR、2 つのタンパク質コード領域である ORF1、ORF2、及びポリ A シグナルを含む 3'UTR から構成される。まず、LINE は 5'UTR 内の内在性プロモーターにより転写される。次に、LINE 内部にコードされているエンドヌクレアーゼが宿主ゲノム DNA のターゲット部位の一本鎖にニックを入れ、その時に生成した 3'水酸基をプライマーにして、LINE 内部にコードされている逆転写酵素によって逆転写反応がおこり、cDNA が合成される。その後、宿主の DNA 修復機構によって LINE はゲノム DNA に挿入され、レトロトランスポジションは完了する。この LINE のレトロトランスポジション機構は Target-Primed Reverse Transcription (TPRT) と呼ばれる。

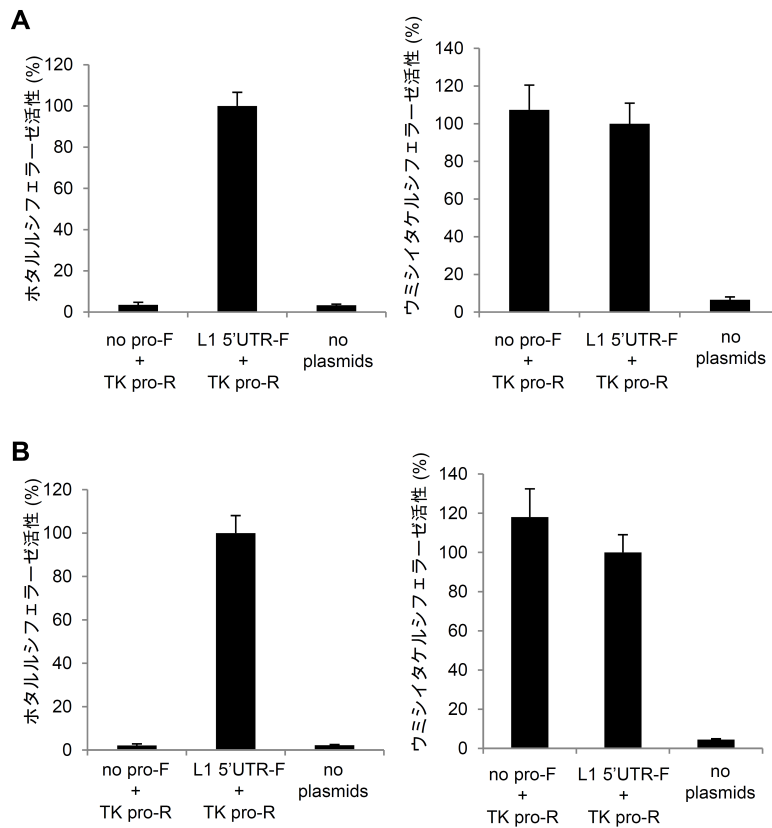


図 4. HepG2 を用いた L1 レポーター遺伝子試験におけるホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼ活性

HepG2 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験で、媒体である DMSO 曝露から 6 時間後 (A) 及び 24 時間後 (B) のホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの相対的なルシフェラーゼ活性 (左、右) を示した。pGL4.11-L1.3 5' UTR のトランスフェクションによるホタルルシフェラーゼの発現は L1 プロモーター活性を示している。TK pro-R: pGL4.74, no pro-F: pGL4.11, L1 5' UTR-F: pGL4.11-L1.3 5' UTR。

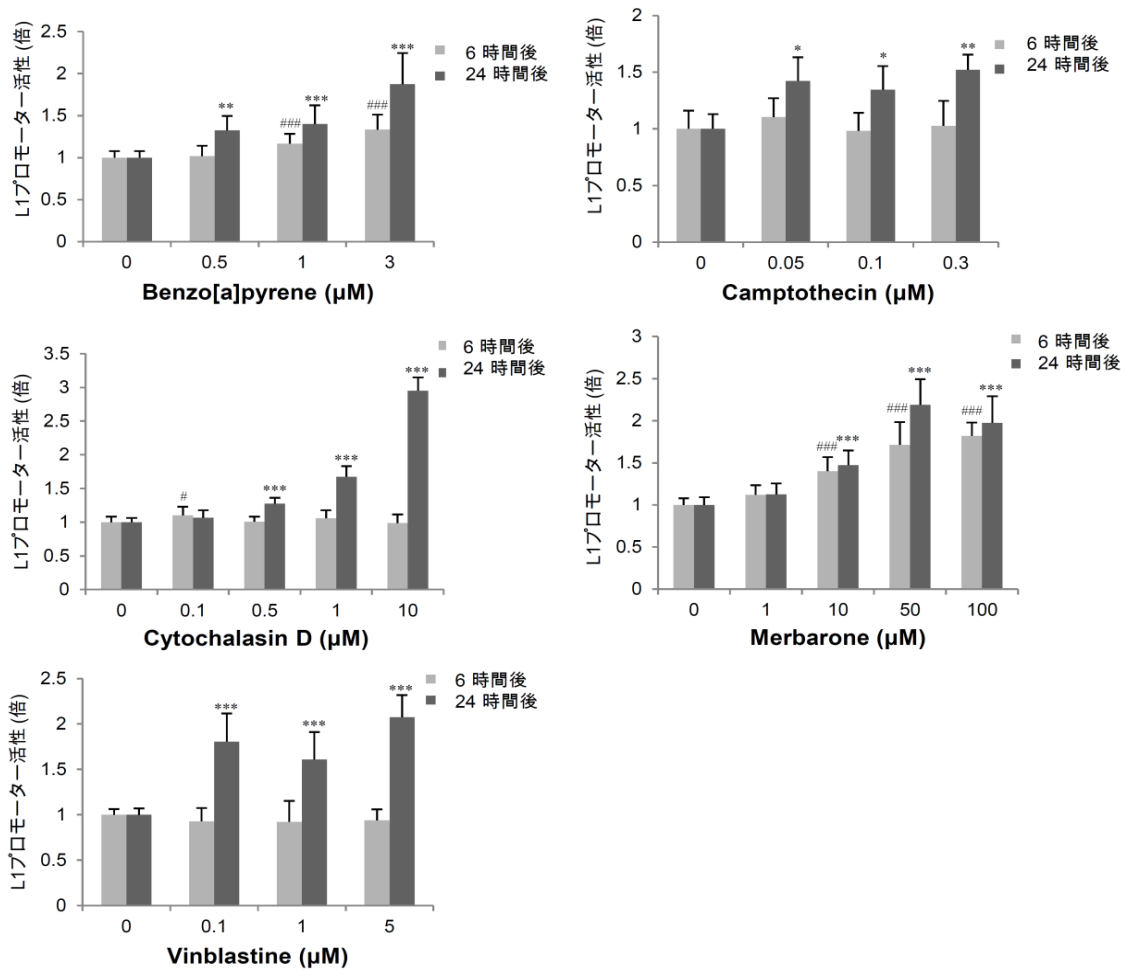


図 5. HepG2 細胞における遺伝毒性物質の L1 プロモーター活性への影響

HepG2 細胞に遺伝毒性物質を 6 時間及び 24 時間曝露した後の L1 プロモーター活性を、レポーター遺伝子試験を用いて評価した。L1 プロモーター活性を有意に 1.5 倍以上上昇させた化合物の結果を示す。対照群に対する被検物質処理群の L1 プロモーター活性比率を算出した。1 濃度あたり 2 ウェル以上で独立した実験を 2 回以上行い、それらの平均値及び標準偏差を示した ( $n \geq 4$ )。Dunnnett の多重比較検定を用いて統計解析を行い、対照群に対して有意差が検出されたものをグラフに示した (\*または#,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*または###,  $p < 0.001$ )。

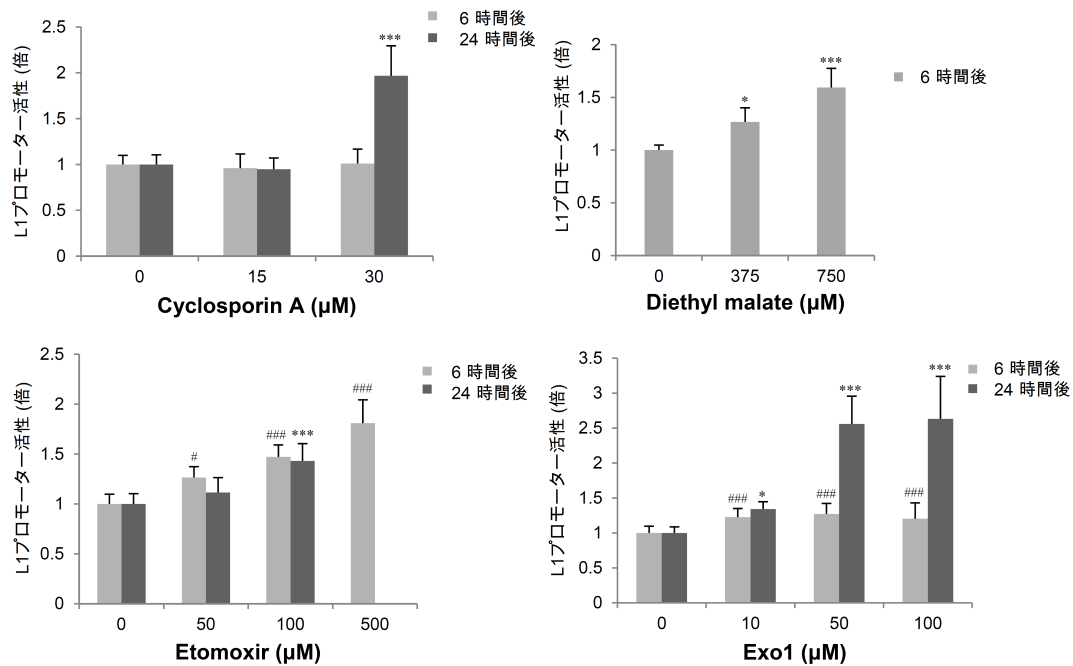


図 6. HepG2 細胞における細胞ストレス誘発物質の L1 プロモーター活性への影響

HepG2 細胞に細胞ストレス誘発物質を 6 時間及び 24 時間曝露した後の L1 プロモーター活性を、レポーター遺伝子試験を用いて評価した。L1 プロモーター活性を有意に 1.5 倍以上上昇させた化合物の結果を示す。対照群に対する被検物質処理群の L1 プロモーター活性比率を算出した。1 濃度あたり 2 ウェル以上で独立した実験を 2 回以上行い、それらの平均値及び標準偏差を示した ( $n \geq 4$ )。diethyl malate、500  $\mu\text{M}$  etomoxir は 24 時間曝露により細胞毒性が認められたため、6 時間曝露の結果のみを示した。Dunnett の多重比較検定を用いて統計解析を行い、対照群に対して有意差が検出されたものをグラフに示した (\* または #,  $p < 0.05$ ; \*\*\* または ###,  $p < 0.001$ )。

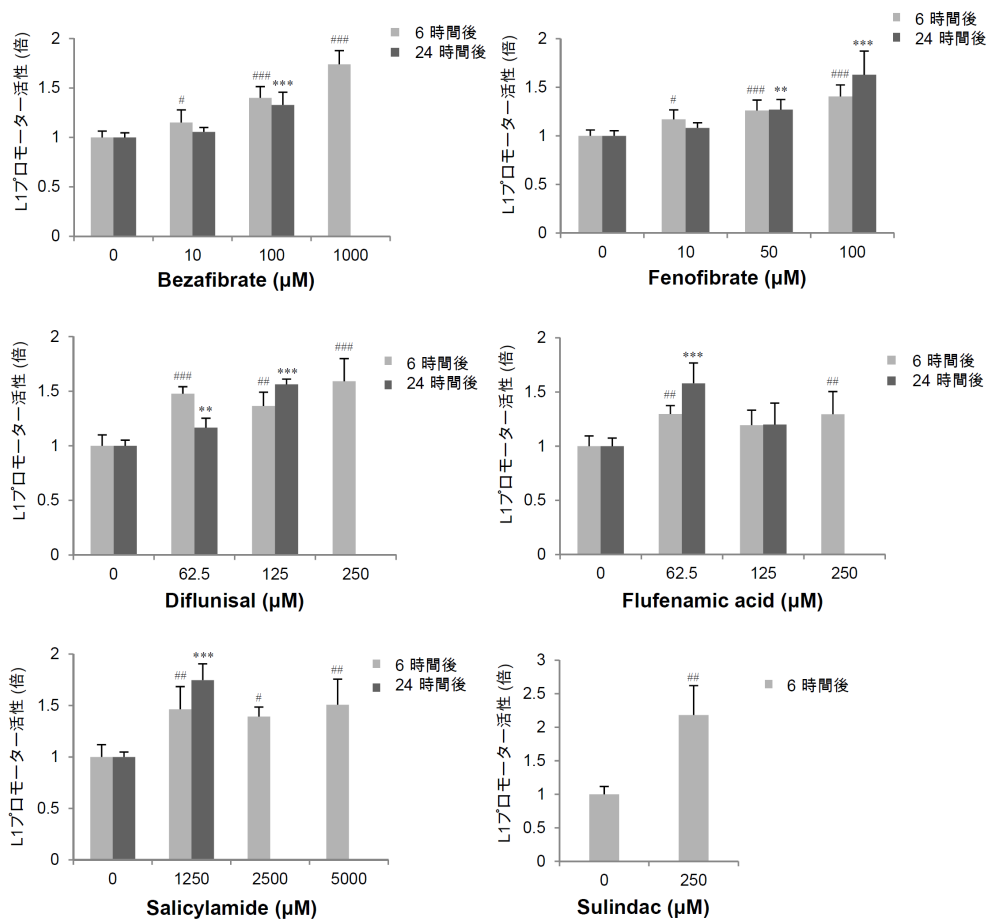


図 7. HepG2 細胞における薬剤の L1 プロモーター活性への影響

HepG2 細胞に薬剤を 6 時間及び 24 時間曝露した後の L1 プロモーター活性を、レポーター遺伝子試験を用いて評価した。L1 プロモーター活性を有意に 1.5 倍以上上昇させた化合物の結果を示す。対照群に対する被検物質処理群の L1 プロモーター活性比率を算出した。1 濃度あたり 2 ウェル以上で独立した実験を 2 回以上行い、それらの平均値及び標準偏差を示した ( $n \geq 4$ )。sulindac は 24 時間曝露により細胞毒性が認められたため、6 時間曝露の結果のみを示した。Dunnnett の多重比較検定を用いて統計解析を行い、対照群に対して有意差が検出されたものをグラフに示した (#,  $p < 0.05$ ; \*\*または##,  $p < 0.01$ ; \*\*\*または###,  $p < 0.001$ )。

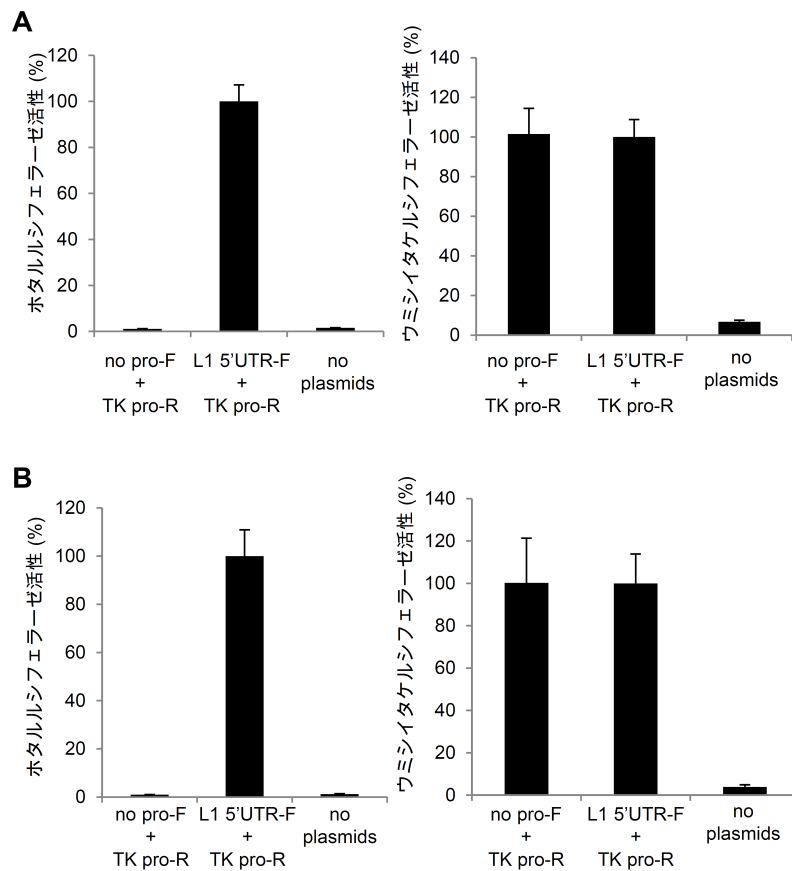


図 8. HeLa 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験におけるホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼ活性

HeLa 細胞を用いた L1 レポーター遺伝子試験で、媒体である DMSO 曝露から 6 時間後 (A) 及び 24 時間後 (B) のホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの相対的なルシフェラーゼ活性 (左、右) を示した。pGL4.11-L1.3 5' UTR のトランスフェクションによるホタルルシフェラーゼの発現は L1 プロモーター活性を示している。TK pro-R: pGL4.74, no pro-F: pGL4.11, L1 5' UTR-F: pGL4.11-L1.3 5' UTR。

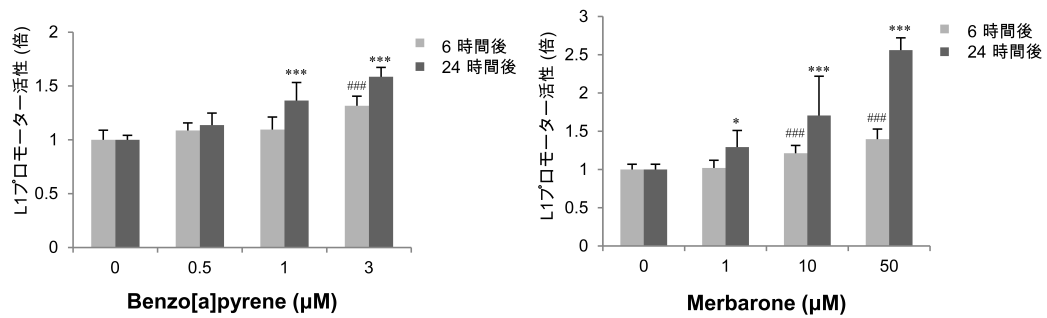


図 9. HeLa 細胞における benzo[a]pyrene、merbarone の L1 プロモーター活性への影響

HeLa 細胞に benzo[a]pyrene、merbarone を 6 時間及び 24 時間曝露した後の L1 プロモーター活性を、レポーター遺伝子試験を用いて評価した。

対照群に対する被検物質処理群の L1 プロモーター活性比率を算出した。1 濃度あたり 4 ウェルで独立した実験を 2 回行い、それらの平均値及び標準偏差を示した ( $n = 8$ )。Dunnnett の多重比較検定を用いて統計解析を行い、対照群に対して有意差が検出されたものをグラフに示した (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*または###,  $p < 0.001$ )。

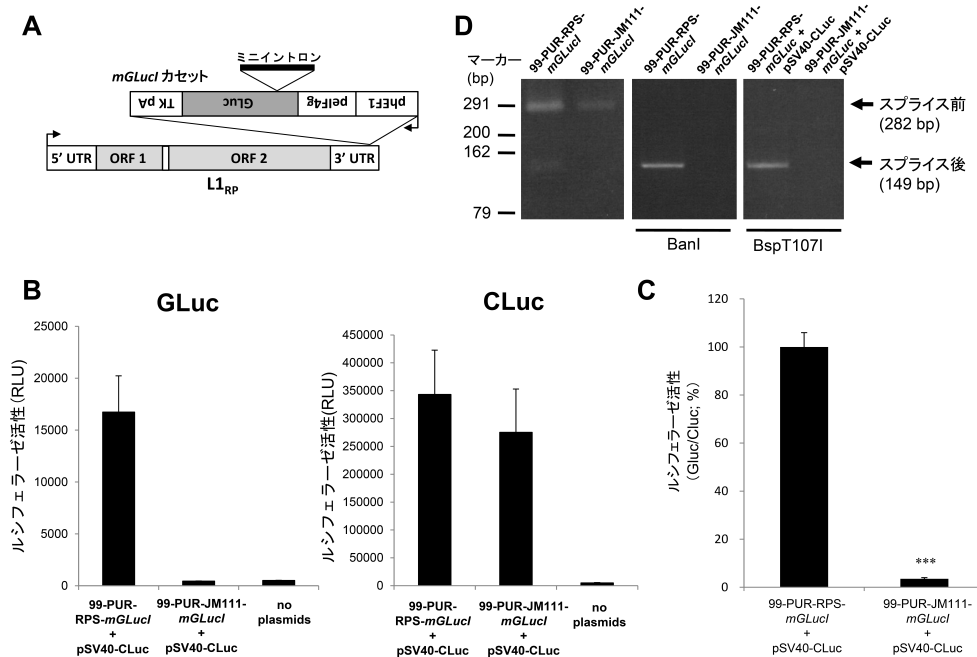
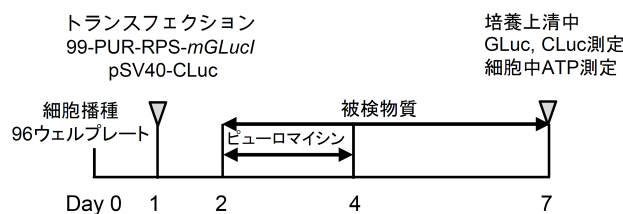


図 10. ガウシアルシフェラーゼを用いた新規のレトロトランスポジション検出系

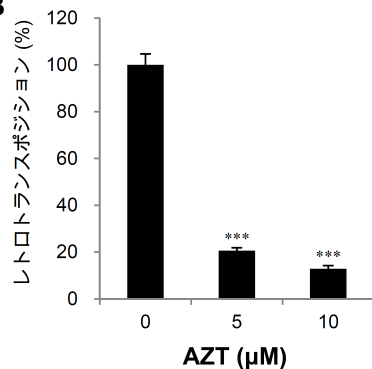
(A) ヒト *L1* に導入された *mGLucI* レトロトランスポジション検出カセット。 *mGLucI* レトロトランスポジション検出カセットは *L1<sub>RP</sub>* の 3' UTR に *L1<sub>RP</sub>* に対してアンチセンスに導入されている。 GLuc 遺伝子の中に GLuc に対してアンチセンスにミニイントロンを含む。 GLuc 遺伝子の上流には EF-1 $\alpha$ /eIF4g ハイブリッドプロモーター (phEF1/peIF4g) を、下流には TK poly(A) シグナル (TK pA) を有する。 GLuc はレトロトランスポジションがおこると発現する。(B) デュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系における GLuc と CLuc の発現。 99-PUR-RPS-*mGLucI* または *L1* ORF1 変異体を含む 99-PUR -JM111-*mGLucI* と pSV40-CLuc を共トランスフェクションしてから 6 日後の GLuc と CLuc の発光値を示した。 GLuc の発光はレトロトランスポジション活性を示している。 CLuc は内部標準として使用した。 独立した実験を 6 回行い、それらの平均値及び標準偏差を示した。 RLU: 相対発光量。(C) *L1<sub>RP</sub>* の ORF1 変異体 JM111 の *L1* レトロトランスポジション活性への影響。(B) の GLuc の発光値を CLuc の発光値で補正した。 JM111 変異体はレトロトランスポジションできないことが知られている。(D) レトロトランスポジション確認 PCR。 レトロトランスポジショ

ンがおこったことを確認するため、HeLa 細胞にプラスミドをトランスフェクション後に DNA を抽出し、GLuc 遺伝子内のイントロンを挟んだプライマーで PCR を行った。スプライシングを受けた後の 149 bp のバンドは、レトロトランスポジションがおこったことを示している。282 bp のバンドは、99-PUR-RPS-*mGLucI* または 99-PUR-JM111-*mGLucI* から増幅されたものである。プラスミド由来の 282 bp の PCR 産物の生成を防ぐため、細胞から抽出された DNA を、ミニイントロン内を切断する *BanI* または *BspT107I* で処理した後に PCR を行った。

**A**



**B**



**C**

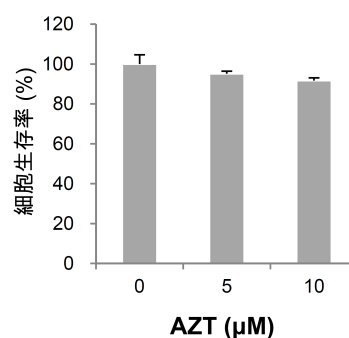


図 11. デュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系による化合物評価

(A) デュアル分泌型ルシフェラーゼレトロトランスポジション検出系による化合物評価の手順。HeLa 細胞に 99-PUR-RPS-*mGLuc1* と pSV40-CLuc を共トランスフェクションした後、被検物質とピュロマイシンを同時に 2 日間曝露した。その後、被検物質のみを 3 日間曝露し、培養上清中の GLuc と CLuc の発光量及び細胞中の ATP 量を測定した。GLuc の発現は L1 レトロトランスポジション活性を示す。CLuc の発光量は、内部標準としてデータの補正に使用した。細胞内 ATP 量を指標として細胞生存率を評価した。(B, C) 逆転写酵素阻害剤 AZT の L1 レトロトランスポジション活性 (B) 及び細胞生存率 (C) への影響。L1 レトロトランスポジション活性と細胞生存率は、対照群に対する化合物処理群の比率で示した。(B-C) 独立した実験を 4 回を行い、それらの平均値及び標準偏差を示した。Dunnett の多重比較検定を用いて統計解析を行い、対照群に対して有意差が検出されたものをグラフに示した (\*\*\*,  $p < 0.001$ )。

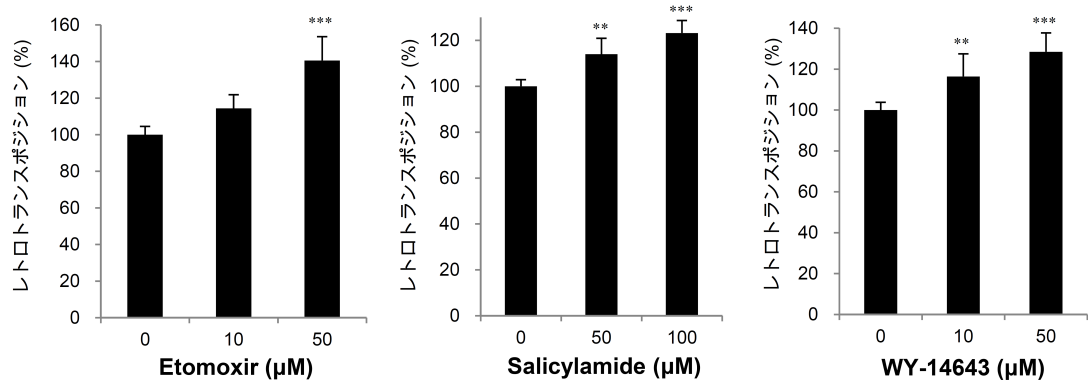


図 12. etomoxir、salicylamide、WY-14643 の L1 レトロトランスポジションへの影響

etomoxir、salicylamide、WY-14643 の 5 日間曝露による L1 レトロトランスポジション活性への影響を評価した。独立した実験を 4 回行い、それらの平均値及び標準偏差を示した。Dunnett の多重比較検定を用いて統計解析を行い、対照群に対して有意差が検出されたものをグラフに示した (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

## 本研究に関する発表

### 【査読付き論文】

Terasaki N, Goodier JL, Cheung LE, Wang YJ, Kajikawa M, Kazazian HH Jr, Okada N. (2013) *In vitro* screening for compounds that enhance human L1 mobilization. PLoS One. 8(9):e74629. doi: 10.1371/journal.pone.0074629.

### 【ポスター発表】

Natsuko Terasaki, Masaki Kajikawa, Norihiro Okada

Human LINE1 promoter activity is enhanced by chemical and drug-induced stress in HepG2 cells.

Society of Toxicology 50th Annual Meeting, 2011, Washington, D.C., USA

Natsuko Terasaki, Masaki Kajikawa, John L. Goodier, Haig H. Kazazian, Jr., Norihiro Okada

Chemical and drug induced stresses enhance transcription and mobilization of human LINE1.

FASEB summer research conferences (Mobile DNA in Mammalian Genomes), 2011, Colorado, USA

Natsuko Terasaki, Masaki Kajikawa, John L. Goodier, Haig H. Kazazian, Jr., Norihiro Okada

Chemical- and drug-induced stresses enhance transcription and mobilization of human LINE1.

63rd Fujihara seminar (A new horizon of retroposon research), 2012, Kyoto, Japan