

Cockayne 症候群細胞への正常細胞 DNA の transfection

田 中 亀 代 次
(大阪大学医学部第四内科)

岡 田 善 雄
(大阪大学細胞工学センター)

1) 研 究 計 画

Cockayne 症候群 (CS) は、低身長、進行性知能障害、視神経萎縮、網膜色素変性、特異な老人様顔貌、日光過敏症などの症状を示す、常染色体性劣性遺伝疾患である。患者由来の皮膚線維芽細胞 (CS 細胞) は、紫外線 (UV) に高感受性を示す。しかし、UV による DNA 障害 (主に pyrimidine dimer) の除去修復過程、すなわち、incision から DNA ligation, さらに、chromatin の高次構造の回復過程において、正常細胞との差は見い出されておらず、CS の異常は不明である。われわれは、正常細胞 DNA を CS 細胞に transfer し、CS 細胞が UV 抵抗性を獲得するか否かを調べた。

2) 研 究 成 果

DNA transfer の recipient としては、DNA の取り込みがよく、しかも cloning efficiency の高い細胞が必要であり、まず、CS 細胞の SV40 による line 化を試みた。後述するように、われわれが見い出した遺伝的相補性 B 群に属する GM1629 (CS1BE) CS 細胞に、SV40 を m.o.i. 50~100 で infection し、約 3 週間後に foci が認められた。foci が認められる 10 cm plastic dish 内の細胞を 5~10 対 1 の splitting ratio で、3 % fetal calf serum (FCS) を含む Dulbecco modified MEM (DME) 中で subculture を続けた。約 8 ヶ月後、dish 内の大半の細胞は死滅しかけたが、非常に分裂の盛んな基盤の目状の colony が出現した。この dish を 1 回 subculture するだけで、この細胞が大半を占めた。5 % FCS・DME 中で cellular cloning を行い、分裂の盛んな clone を選び、GM1629SV と名付け、以後の実験に用いた (図 1 参照)。1) まず、GM1629SV は図 2 に示したように、正常細胞に比して UV 高感受性を示した。2) 一般に、UV 照射を受けた細胞は、その DNA 複製合成が著明に抑制を受ける。しかし、正常細胞では、5 時間後くらいより DNA 複製合成は回復してくる。それに対して、CS 細胞や色素性乾皮症細胞 (XP 細胞) では、UV 照射を受けると、回復は認められず、細胞は死滅してしまう。XP 細胞は、除去修復の第 1 段階 (incision) に異常をもつこと

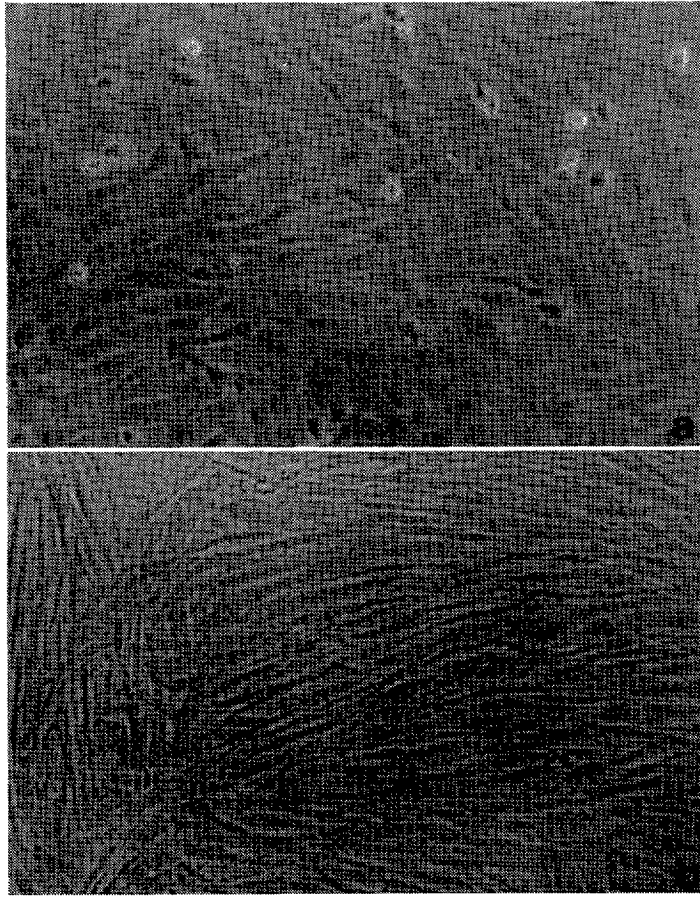


図1 a. GM1629SV b. 初代培養の GM1629

が知られ、CS 細胞も XP 細胞同様、除去修復過程に異常をもつのではないかと考える根拠になっている。正常細胞および GM1629SV を 12 J/m^2 UV 照射し、0, 2, 5, 12, 24 時間後に、 $0.3 \mu\text{Ci/ml}$ の $[^3\text{H}]$ thymidine を含む培養液でパルスラベルし、autoradiography によって DNA 複製合成を調べた。図 3 に示すように、正常細胞では 5 時間後くらいより回復が認められ、12 時間後には、UV 照射をしない細胞の約 80%，24 時間後には約 150% まで回復したのに対し、GM1629SV では、DNA 複製合成は抑制を受けたままであり、回復は全く認められなかった。3) 上述のように、UV 照射後の DNA 複製合成は、autoradiography で、細胞 1 個 1 個で判定できるので、われわれはこれを指標に、CS 遺伝的相補性群が存在するか否かを調べた。すなわち、2 つの別家系の CS 細胞を等量混ぜ、HVJ (センダイウイルス) で融合させ、18 時間後に 12 J/m^2 UV 照射した。さらに、12 時間後、 $0.3 \mu\text{Ci/ml}$ $[^3\text{H}]$ thymidine のパルスラベルを行い、DNA 複製合成の回復が認められるか否かを調べた。その結果、ある組み合わせでは、ほぼ正常レベルまで UV 照射後の DNA 複製合成の回復が認められ、CS に遺伝的相

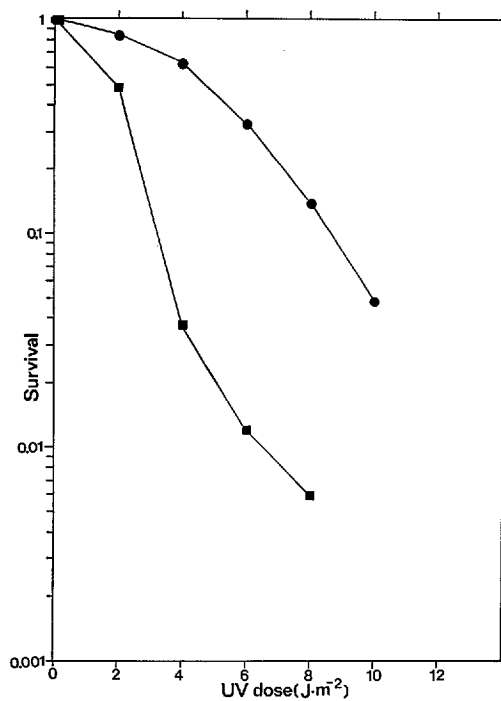


図2 GM1629SV の UV 高感受性

- 正常ヒト細胞 (NHKK)
- GM1629SV

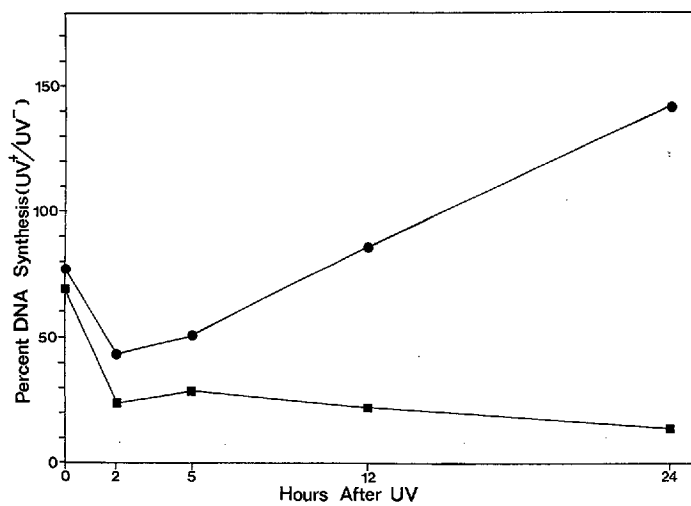


図3 GM1629SV の UV 照射後の DNA 複製合成

- 正常ヒト細胞 (NHKK)
- GM1629SV

表1 Genetic complementation groups in Cockayne syndrome

Group	Cell Strain
A	GM1856 (CS3BE) GM2965
B	GM1428 (CS7SE) GM1629 (CS1BE) GM1098 (CS2BE)
C	CS4BE (XP11BE)

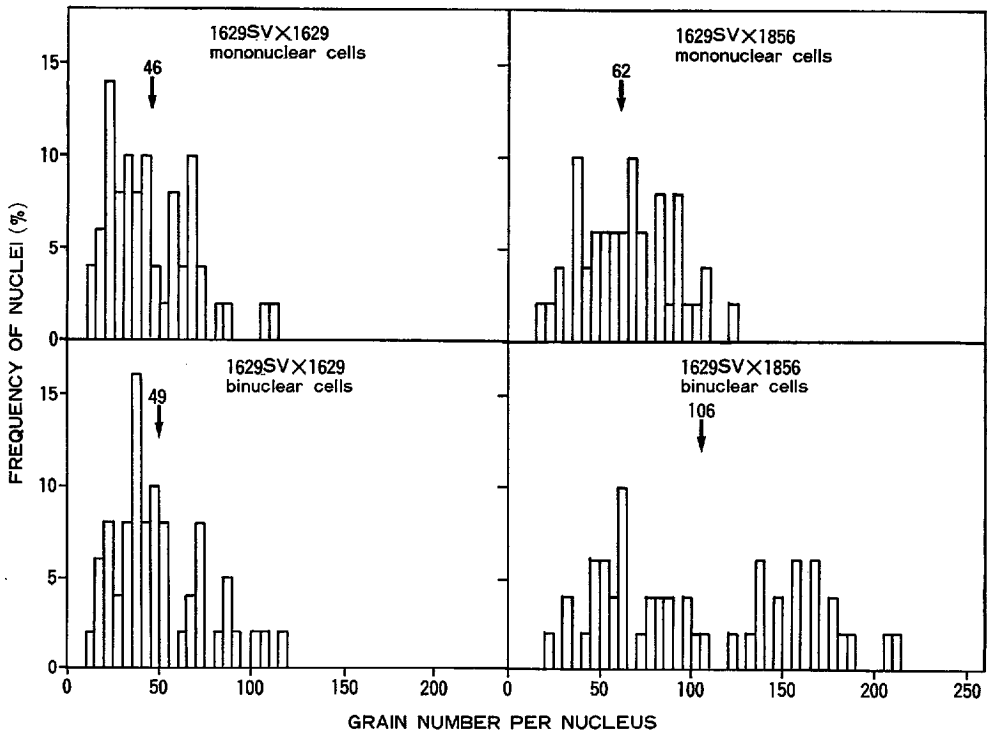


図4 GM1629SV の遺伝的相補性テスト

矢印で示した数字は、1核あたりの平均銀粒子数

補性群の存在することがわかり、現在、少なくとも3つの群が知られている(表1)。C群のCS4BEは、B群XPも合併している。われわれがline化したGM1629SVが、親細胞と同じB群であることを確かめるため、GM1629SVとGM1856(A群CS細胞)、および、GM1629SVとGM1629(B群CS細胞)間で遺伝的相補性テストを行った。融合18時間後12 J/m² UV照射し、さらに12時間後、0.3 μ Ci/ml [³H] thymidine のパルスラベルを行い、autoradiographyによって細胞核上の銀粒子数を数え、DNA複製合成を定量した。図4に示すよ

うに, GM1629SV と GM1856 の融合では, 2 核細胞のなかに, 親細胞の GM1629SV や GM1856 には認められないような, 高いレベルの DNA 複製合成を示す細胞が認められたが, GM1629SV と GM1629 の融合では, 2 核細胞のなかにも親細胞以上の DNA 複製合成を示す細胞はなく, これらの事実は, GM1629SV が, やはり, B 群に属する CS 細胞であることを示している。

ついで, この GM1629SV に, 正常細胞 DNA を transfer し, UV 抵抗性を獲得するか否かを調べた。donor DNA としては, まず, ヒト胎児肝 DNA を Alu I と Hae III で partial digestion し, Eco RI linker をつけた後, Charon 4A に組み込んだヒト DNA library (Harvard Univ. T. Maniatis) を用いた。さらに, pSV₂gpt との co-transfer を行い, DNA を取り込んだ細胞をまず selection した後, UV 抵抗性を調べた。pSV₂gpt 5~10 μ g と Charon 4A ヒト DNA library 5~10 μ g を, 10 cm の plastic dish 中の 1×10^6 個の GM1629SV 細胞に, CaPO₄ 法で co-transfection した。約12時間後, 15 (wt/vol)% glycerol で30秒間処理し, 4~5 日間通常培養液で培養した後, 10 μ g/ml mycophenolic acid, 2 μ g/ml aminopterin, 250 μ g/ml Xanthine, 10 μ g/ml thymidine, 15 μ g/ml hypoxanthine を含む 5 % FCS DME で Eco gpt gene の transformants を selection した。mycophenolic acid 抵抗性

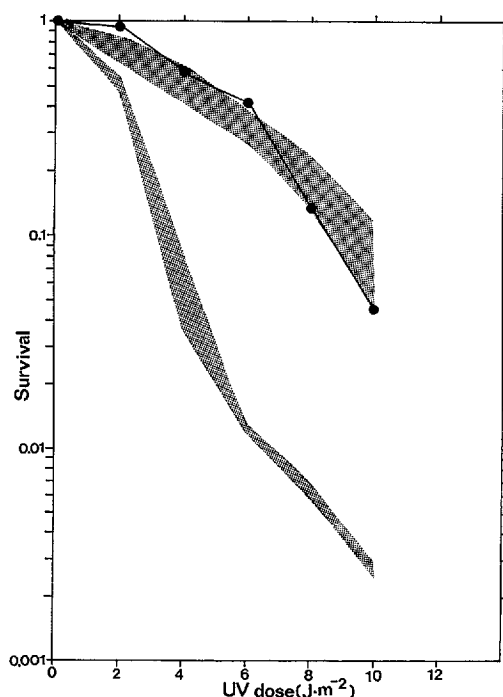


図5 K224 の UV 生存率曲線

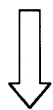
影の領域は, 正常細胞および GM1629SV の生存率曲線範囲を示す。

● K224

clone の出現頻度は、上記 transfection で、約 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個に 1 個の割合であった。約 6~14 日間上記選択培養液で培養後、 $3 \sim 10 \text{ J/m}^2$ UV 照射し、UV 抵抗性を示す clone を selection した。約 2 万個の Eco gpt の transformants のなかから、正常細胞とほぼ同じ UV 感受性を示した K224 clone が得られた (図 5)。

3) 研 究 考 察

K224 の DNA を抽出し、Charon 4A arm を probe に Southern blotting を行い、K224 に Charon 4A arm が integrate されているかどうか検索中である。integrate されていれば、K224DNA を pSV₂gpt とともに、GM1629SV に再び co-transfection を行い、同様にして、UV 抵抗性の GM1629SV を selection する。その GM1629SV DNA に再び Charon 4A arm が認められれば、cosmid library (pSV₂gpt, pBR327 の replication origin, Ampr, 2つの cos sites をもつ cosmid (基生研, 石浦正寛) で、その Bam HI site に、Sau 3A で partial digestion した 40 Kb のヒト DNA を integrate する) を作製し、Charon 4A arm を probe に、colony hybridization で、“CS gene” の cloning が可能である。もし、K224 に Charon 4A arm が認められなければ、K224 は、GM1629SV の revertant か、Charon 4A arm 部分が deletion した可能性があり、いずれにしても、CS gene の cloning は困難になる。DNA library は、その DNA fragment size が小さいことより、UV 抵抗性 clone を得る確率が低くなる危険性がある。われわれは同時に、マウス胎児線維芽細胞の high molecular weight DNA を、やはり pSV₂ gpt と GM1629SV に co-transfection している。UV 抵抗性の GM1629SV が得られれば、マウスの repeat sequence である B1 (東大・生化・木南凌) を probe に、マウスの CS 相補性遺伝子を追跡でき、ひいては CS gene も cloning が可能である。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



1)研究計画

Cockayne 症候群(CS)は,低身長,進行性知能障害,視神経萎縮,網膜色素変性,特異な老人様顔貌,日光過敏症などの症状を示す,常染色体性劣性遺伝疾患である。患者由来の皮膚線維芽細胞(CS 細胞)は,紫外線(UV)に高感受性を示す。しかし,UV による DNA 障害(主に pyrimidine dimer)の除去修復過程,すなわち,incision から DNA ligation,さらに,chromatin の高次構造の回復過程において,正常細胞との差は見い出されておらず,CS の異常は不明である。われわれは,正常細胞 DNA を CS 細胞に transfer し,CS 細胞が UV 抵抗性を獲得するか否かを調べた。