

マウスゲノム DNA 導入による 色素性乾皮症細胞の機能回復

研究協力者 岡 田 善 雄
田 中 亀 代 次
(大阪大学細胞工学センター)

I. 目 的

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum ; XP) は、常染色体性劣性遺伝形式によって発症するヒト遺伝病で、患者は日光露出部の皮膚に色素沈着や萎縮をきたし、皮膚癌が高発する。患者の皮膚線維芽細胞 (XP 細胞) は、紫外線 (ultraviolet-light ; UV) に高感受性を示し、UV 照射によって生じた DNA 障害の除去修復能に異常をもつことが知られている。さらに XP には A ~ I 群と variant の合計10の遺伝的相補性群の存在することも知られている。われわれは XP 細胞が欠損している遺伝子のクローニングを目的として、正常マウスゲノム DNA を CaPO_4 法で XP 細胞に遺伝子移入し、UV 抵抗性を示し DNA 修復能を回復する XP 細胞を選択した。

II. 方法および結果

遺伝的相補性 A 群に属し、SV40 で株化した XP 細胞 (XP20SSV) を遺伝子移入の recipient に使った。donor DNA として、妊娠14日目の ICR 系胎児マウスをすりつぶしフェノールで抽出したゲノム DNA と pSV₂ gpt を使用した。これらの DNA を CaPO_4 法で XP 20SSV 細胞に co-transfection し、まず pSV₂ gpt 形質転換 XP 細胞を、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mycophenolic acid 存在下で選択した。これらの pSV₂ gpt 形質転換 XP 細胞の多く (数10%) は、同時にマウスゲノム DNA も取り込んでいると考えられ、次に、4 J/m^2 の UV 照射を 2 ~ 3 回行い、UV 抵抗性を示し、DNA 修復能に関しても形質転換した XP 細胞を選択した。約16万個の pSV₂ gpt 形質転換細胞のうち、2 個の XP 細胞が UV 抵抗性を示した。これら 2 個の XP 細胞の UV 生存曲線は、XP20SSV 細胞と、SV40 で株化した正常ヒト細胞 WI38VA13 との中間型を示した (図1)。次いで、これら UV 抵抗性を獲得した XP 細胞の30 J/m^2 UV 照射後の不定期 DNA 合成を調べたが、やはり、XP20SSV と WI38VA13 の中間の値を示した。UV 抵抗性を獲得した XP 細胞にマウス遺伝子が取り込まれていることを確認するため、UV 抵抗性 XP 細胞より DNA を抽出し、EcoRI で切断、ゲル電気泳動後、マウス特異的繰り返し配列である B1 (4~8 \times 10⁴ コピー/ハプロイド) を probe に Southern blotting を行った。マウスゲノムを移入しない XP20SSV には B1 で hybridize する

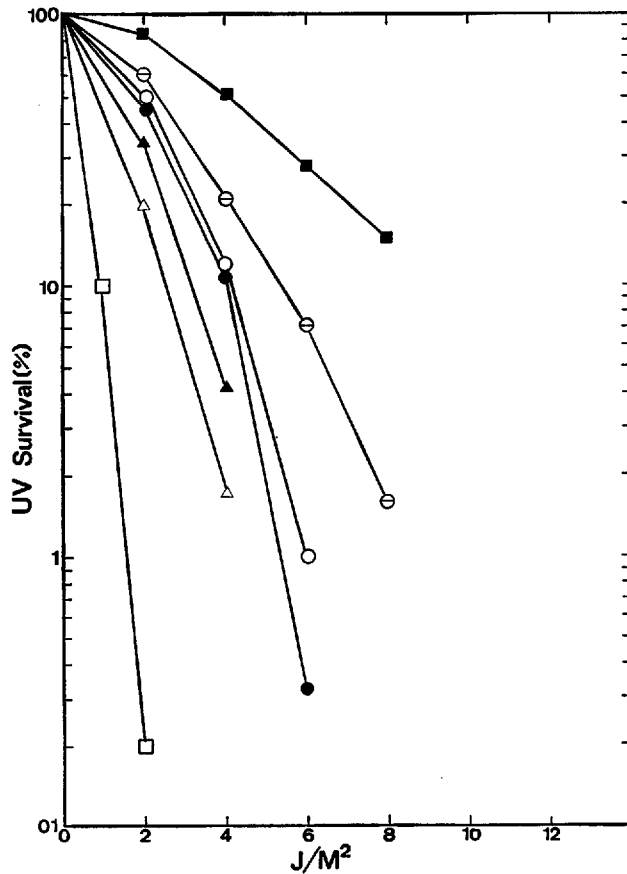


図1 UV 抵抗性 XP 細胞の生存率曲線

■: WI38VA13

□: XP2 OSSV

○, ●, ▲, △: UV 抵抗性 XP 細胞およびそのクローン

DNA が全く認められなかったが、二つの UV 抵抗性 XP 細胞にはいずれにも B1 で hybridize する DNA fragments が認められ、両者に共通する size の fragments も認められた (図2と3)。もう一つのマウス特異的繰り返し配列である M₂ を probe に同じく Southern blotting を行ったが、一方の UV 抵抗性 XP 細胞には M₂ と hybridize する DNA は認められなかった (図4)。

次いで、これら UV 抵抗性 XP 細胞よりゲノム DNA を抽出し、pSV₂ gpt とともに XP 20SSV 細胞に Co-transfection を行っている (second transfection)。約9万個の pSV₂ gpt 形質転換 XP 細胞を得ているが、そのいずれもが UV 高感受性のままであった。

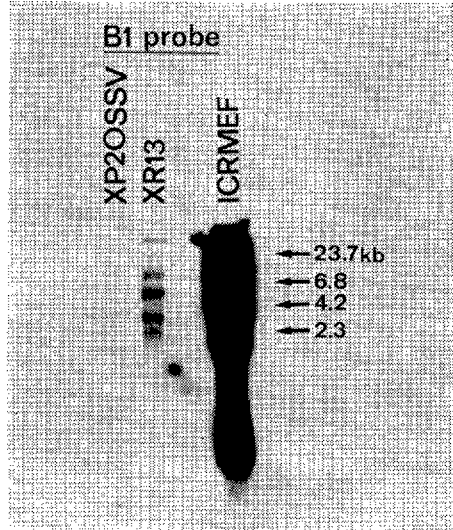


図2 UV 抵抗性XP 細胞中のマウス遺伝子
マウス胎児細胞 (ICRMEF), 親 XP 細胞
(XP2OSSV), UV 抵抗性 XP 細胞 (XR13)
の DNA を EcoRI で切断, B1 を probe
に Southern blot したもの。XR13 にマウ
ス遺伝子が認められる。

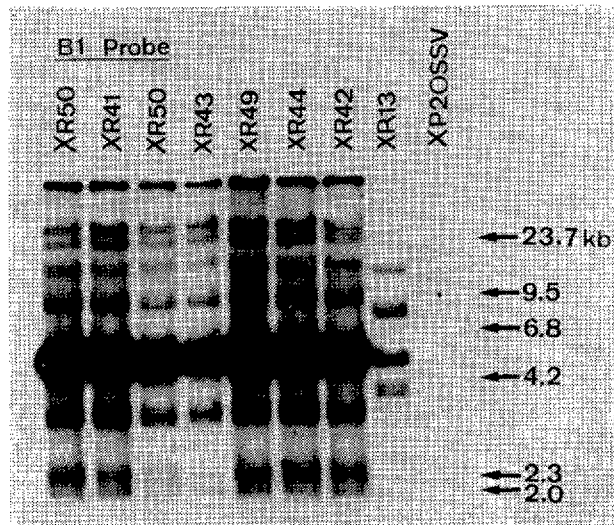


図3 UV 抵抗性 XP 細胞中のマウス遺伝子
UV 抵抗性 XP 細胞 (XR 42, 44, 49, 43, 50, 41, 51は
1つのクローン由来; XR13) をEcoRI で切断, B1 を probe
に Southern blot したもの。

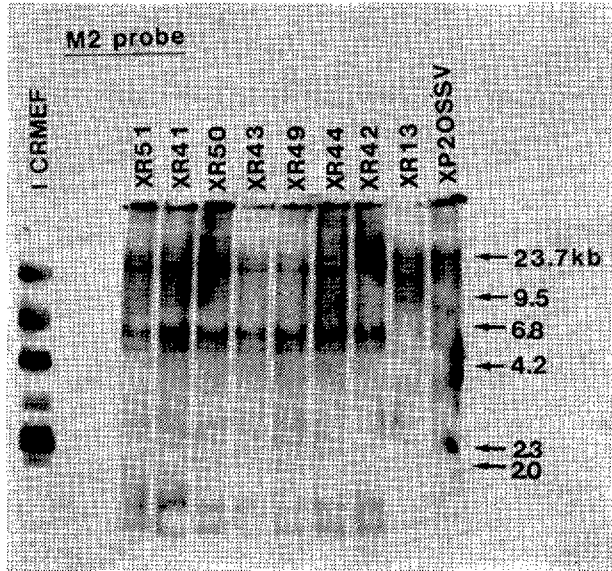


図4 M2 を probe にした Southern blotting
 一方の UV 抵抗性 XP 細胞 (XR 42, 44, 49, 43, 50, 41, 51) には M2 と hybridize するマウス遺伝子が認められるが、もう一方の UV 抵抗性 XP 細胞には M2 sequence は認められない。

III. 考察と展望

正常マウスゲノム DNA を遺伝子移入することによって得られた UV 抵抗性 XP 細胞は、いずれもその UV 生存率曲線、不定期 DNA 合成とも、正常細胞と親 XP20SSV 細胞の中間型を示した。正常細胞レベルまで回得しなかった理由は不明であるが、一方の allele のみが移入されていること、移入された遺伝子の位置が正常細胞の位置と異なること、マウスの遺伝子をヒト細胞に移入したこと、などが考えられる。

もし second transfection によって、UV 抵抗性の XP 細胞が得られ、その細胞にマウス遺伝子が認められれば、この XP 細胞より DNA library を作成し、B1 を probe に plaque hybridization, colony hybridization で、XP に相補的なマウス遺伝子ひいてはヒトの XP 遺伝子をクローニングできると考えている。



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. 目的

色素性乾皮症(xeroderma pigmentosum;XP)は,常染色体性劣性遺伝形式によって発症するヒト遺伝病で,患者は日光露出部の皮膚に色素沈着や萎縮をきたし,皮膚癌が高発する。患者の皮膚線維芽細胞(XP 細胞)は,紫外線(ultraviolet-light;UV)に高感受性を示し,UV 照射によって生じた DNA 障害の除去修復能に異常をもつことが知られている。さらに XP には A~I 群と variant の合計 10 の遺伝的相補性群の存在することも知られている。われわれは XP 細胞が欠損している遺伝子のクローニングを目的として,正常マウスゲノム DNA を CaP04 法で XP 細胞に遺伝子移入し,UV 抵抗性を示し DNA 修復能を回復する XP 細胞を選択した。