

色素性乾皮症遺伝子クローニングに関する研究

研究協力者 岡 田 善 雄

共同研究者 田 中 亀 代 次

松 原 謙 一

林 崎 良 英

(大阪大学細胞工学センター)

目 的

色素性乾皮症 (XP) は、常染色体劣性遺伝疾患で、患者は日光に過敏性を示し、日光露出部に高頻度に皮膚癌を発症する。XP 患者由来の皮膚線維芽細胞 (XP 細胞) は、紫外線 (UV) に高感受性を示し (図 1)、UV による DNA 障害の除去修復能に異常を示す (図 2)。以前、われわれは、バクテリオファージ T₄ の UV 特異的エンドヌクレアーゼを XP 細胞に注

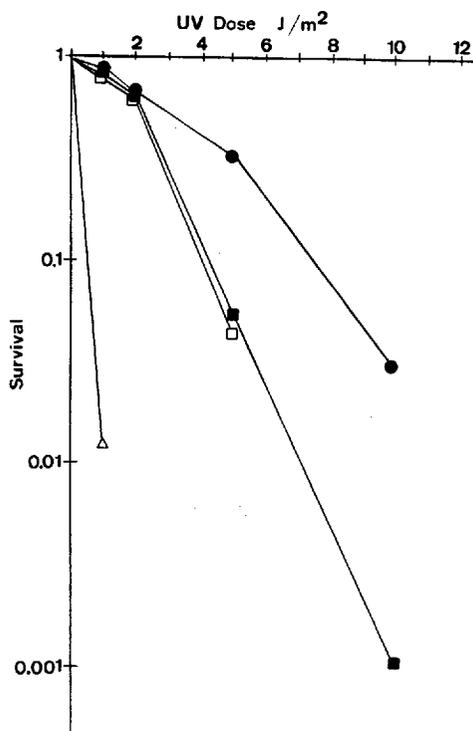


図 1 UV 照射後のコロニー形成能

● : 正常ヒト細胞 (WI38VA13), △ : XP20SSV,
■ : XR13, □ : XR49

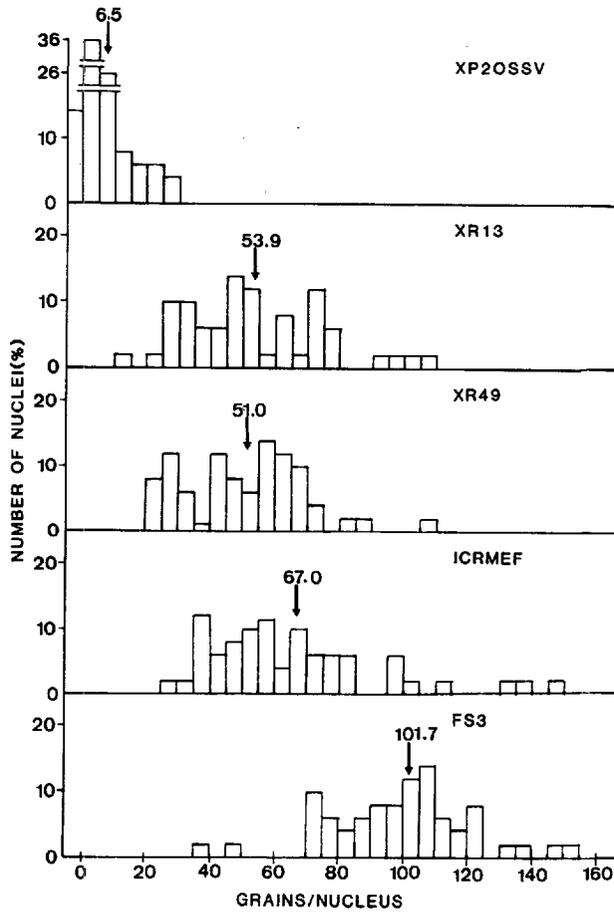


図2 UV照射(30J/m²)後の不定期DNA合成
 横軸：核あたりの銀粒子数(不定期DNA合成量)
 縦軸：横軸にあらわした不定期DNA量を示す核の頻度(%)
 FS3：正常ヒト皮膚線維芽細胞
 ICRMEF：ICRマウス14日目胎児線維芽細胞

入し、XP細胞の除去修復能が回復することを見出し、XP細胞が除去修復の第一ステップに異常をもつことを示唆した。しかし、その遺伝子レベルでの異常は全く不明であり、しかもXPには10個の遺伝的相補性群の存在も知られている。XP(相補性A群)細胞の欠損している遺伝子クローニングを目的として、正常細胞ゲノムDNAをXP細胞にDNAトランスフェクションし、UV抵抗性に形質転換したXP細胞を選別し、さらに、この形質転換遺伝子をファージ等に“rescue”しようとした。

方 法

供与DNAとして、ICRマウス14日目胎児の高分子量(約200Kbp)ゲノムDNAと、pSV₂gpt(大腸菌キサンチン-グアニン-フォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を

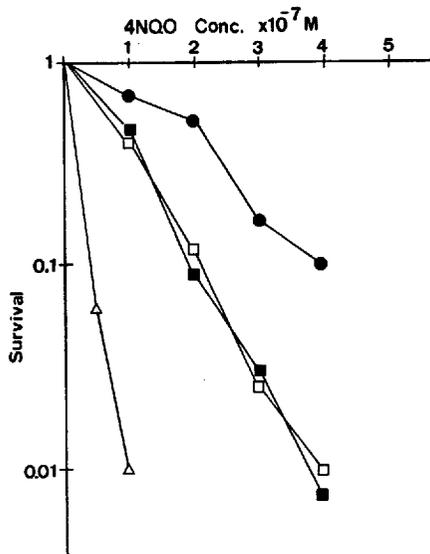


図3 4NQO 処理後のコロニー形成能
 図中の印は図1に同じ。

真核細胞中で発現できるようにした、優性選択可能なプラスミッド)を使用した。受容 XP 細胞として、相補性 A 群に属し、SV40 で株化した、XP2 OSSV 細胞を用いた。DNA トランフェクションは、 1×10^6 個/10 cm ディッシュの XP2OSSV 細胞あたり、 $5 \mu\text{g}$ の pSV₂gpt と $20 \mu\text{g}$ のマウスゲノム DNA を用い、CaPO₄ 法で行った。Southern ブロッキングは、 $10 \times \text{SSC}$ でニトロセルロースフィルターを用いて行い、DNA ハイブリダイゼーションは、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times \text{Denhardt}$ 液、 50 mM NaPO_4 (pH6.9)、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 $50\% \text{ フォルムアミド}$ 中で 42°C で行なった。ブランクハイブリダイゼーションは、NEN の Colony/Plaque Screen から Pall の Biodyne を用いて、それぞれ指示された条件下で行った。

結 果

XP2OSSV 細胞に、pSV₂ gpt とマウスゲノム DNA をトランスフェクションし、まず、pSV₂ gpt 形質転換 XP細胞を $10 \mu\text{g/ml}$ マイコフェノール酸存在下で選別した。ついで、UV を $3 \sim 4 \text{ J/m}^2$ 数回照射し、UV 低抗性にも形質転換した XP 細胞を顕微鏡下で選別した。約 16 万個の pSV₂ gpt 形質転換 XP 細胞より、2 個の UV 抵抗性 XP 細胞を得た (XP13, XR49 と命名した)。これら 2 個の XP 細胞の UV 照射後、4NQO 処理後のコロニー形成能は、正常ヒト細胞と親 XP2OSSV 細胞の中間を示した (図 1, 3)。UV 照射 (30 J/m^2) 後の不定期 DNA 合成も、中間型を示し (図 2)、UV 抵抗性の獲得は、除去修復能回復によることが示唆された。MIF, Bam5, R, B1 の 4 つのマウス繰り返し配列 (p. 7014. 京大山岸氏) をプローブに Southern プロットで調べたところ、これら 2 つの UV 抵抗性 XP 細胞中にマウス遺伝子が確かに取り込まれていることが明らかになった (図 4)。ついで、XR13 のゲノ

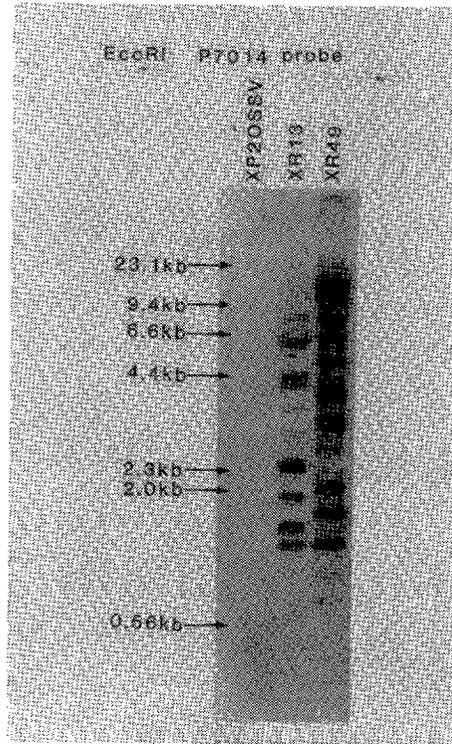


図4 EcoRI 切断 DNA の p7014 プローブによる Southern プロット
 マーカー DNA は Hind III 切断 スフェージ DNA

ム DNA と pSV₂ gpt を再び XP2OSSV 細胞にトランスフェクションし、pSV₂ gpt 形質転換 XP 細胞の UV 感受性を調べた。約20万個の pSV₂ gpt 形質転換細胞は全て UV 高感受性のままであった。XP49 ゲノム DNA と pSV₂ gpt も XP2OSSV にトランスフェクションした。約30万個の pSV₂ gpt 形質転換 XP 細胞のスクリーニングで1個 UV 抵抗性の XP 細胞を得た (XR II 130 と命名)。その UV 照射後のコロニー形成能は、XR49, XR13 と完全に一致した (図5)。p7014 をプローブに Southern プロットを行ったところ、XR II 130 にはマウス遺伝子が取捨選択されて存在することが明らかになった (図6)。ついで、XR II 130 のゲノム DNA を BamHI で切断し、2~10 Kb の長さのものを蔗糖密度勾配遠心で精製し、L47 フェージの BamHI 切断アームとつなぎ、XR II 130 の DNA ライブラリーを作製した。p7014 をプローブに、プラークハイブリダイゼーションを行い、図6-b にみられた、3.5 Kb と 9 Kb の BamHI DNA フラグメントを含むと考えられるフェージをクローニングした (図7, 8)。

考 察

クローニングした3.5 Kb と 9 Kb フラグメントは、XP2OSSV の DNA 修復能を回復させ

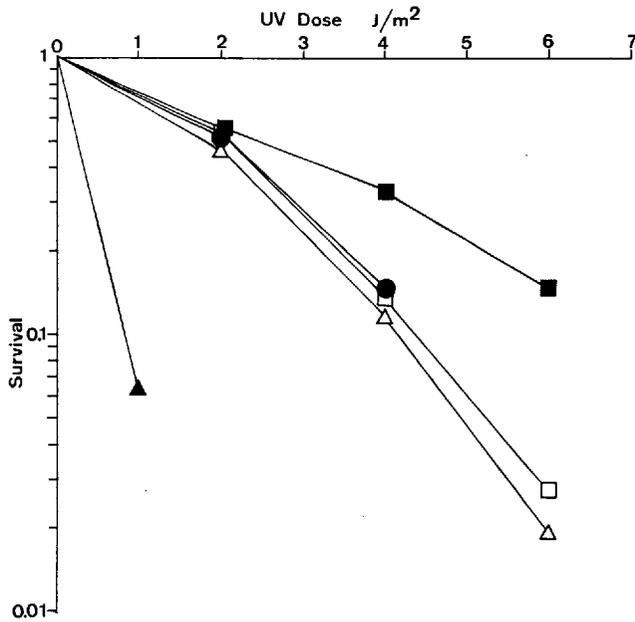
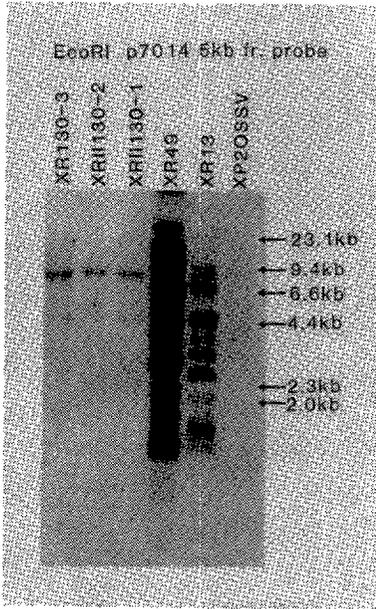


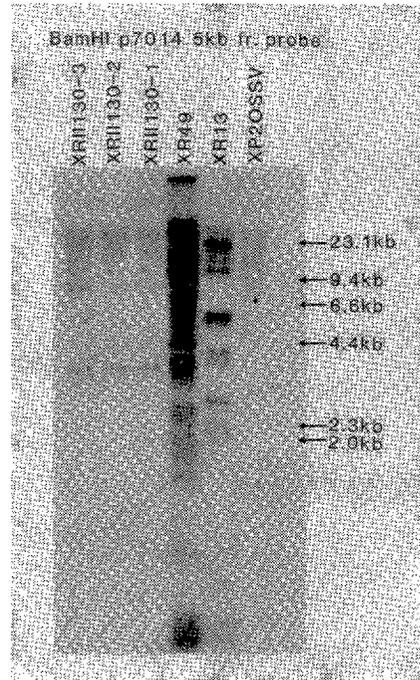
図5 UV 照射後のコロニー形成能

■ : WI38VA13 ▲ : XP20SSV □ : XR13
 △ : XR49 ● : XR II 130

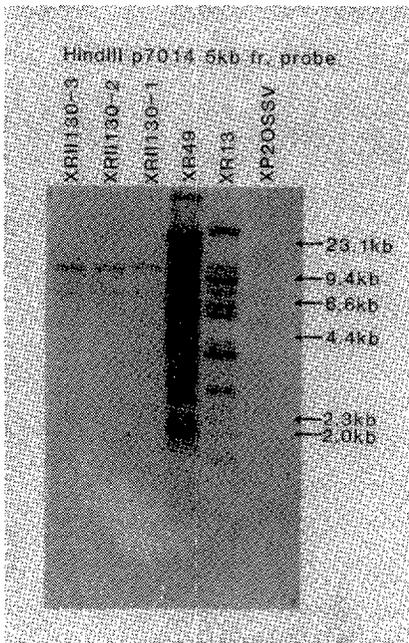
る遺伝子に強く関連していると考えられる。今後 XR II 130 DNA の Sau3A 部分切断ライブラリーをコスミッドで作製し、上記 3.5 Kb と 9 Kb フラグメントをプローブに、機能性の DNA 修復遺伝子をクローニングしたいと考えている。また、このマウス遺伝子をプローブにしてヒト DNA ライブラリーより、ヒトの DNA 修復遺伝子もクローニングしていきたいと考えている。



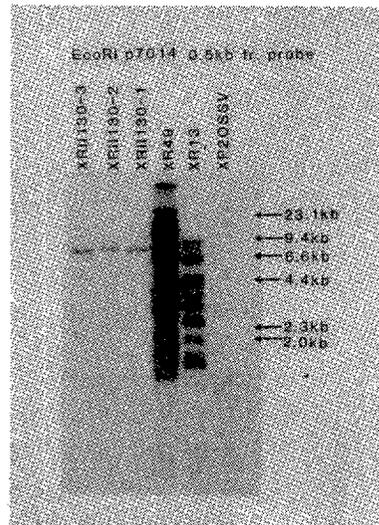
a



b



c



d

図6 Eco RI (a), Bam HI (b), Hind III (c) 切断 DNA の p 7014プローブによる Southern プロットニング

(d) : Bam 5のみをプローブにしたプロットニング Eco RI 切断

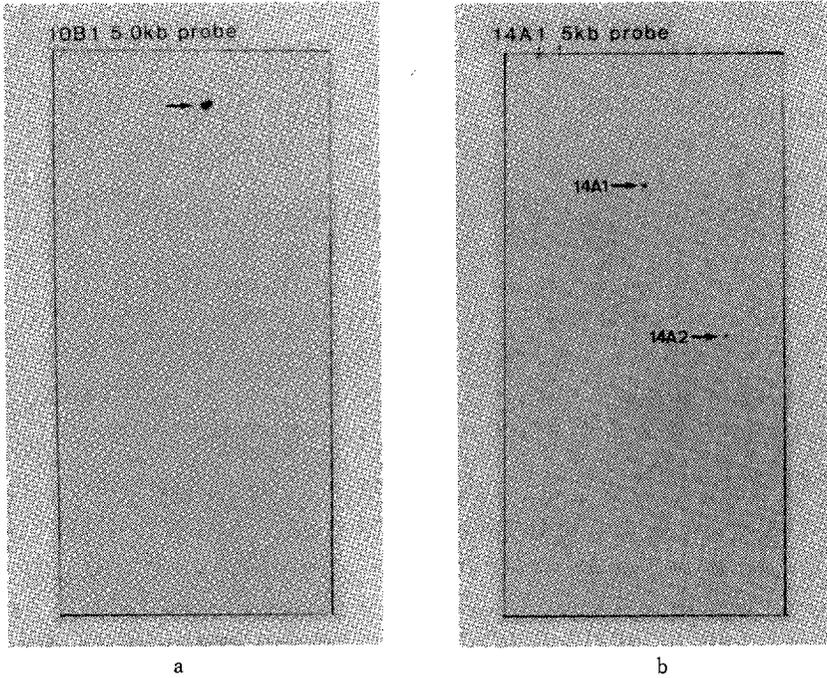


図7 XR II130 Bam HI 切断 DNA ライブラリーの p 7014 プローブによるブランクハイブリダイゼーション
 a : クローン 10B1 (四角で囲んだ中に 1.5×10^8 pfu のファージが存在する。)
 b : クローン 14A1, 14A2

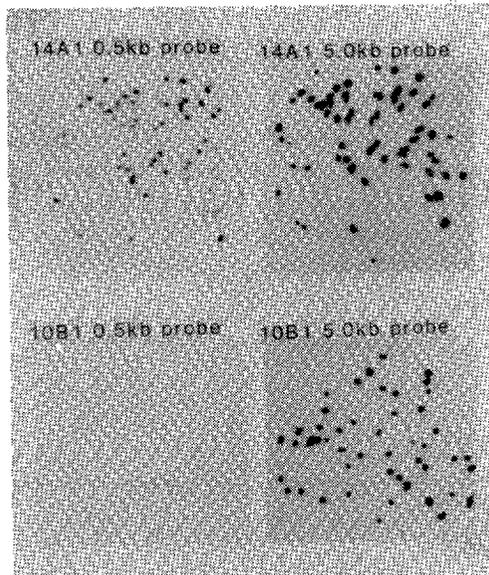
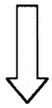


図8 10B1, 14A1 の p7014(5kb ; MIF, Bam 5, R B1 フェミリー) と Bam 5 フェミリー(0.5 kb) のみのプローブによるブランクハイブリダイゼーション
 14A1 は p7014 と Bam 5 の両方でハイブリダイズした。10B1 は p7014 でハイブリダイズするが, Bam 5 ではしない。10B1 が 9kb, 14A1 が 3.5kb の Bam HI フラグメントに対応することが期待される。



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



目的

色素性乾皮症(XP)は、常染色体劣性遺伝疾患で、患者は日光に過敏性を示し、日光露出部に高頻度に皮膚癌を発症する。XP患者由来の皮膚線維芽細胞(XP細胞)は、紫外線(UV)に高感受性を示し、UVによるDNA障害の除去修復能に異常を示す。以前、われわれは、バクテリオファージT4のUV特異的エンドヌクレアーゼをXP細胞に注入し、XP細胞の除去修復能が回復することを見い出し、XP細胞が除去修復の第一ステップに異常をもつことを示唆した。しかし、その遺伝子レベルでの異常は全く不明であり、しかもXPには10個の遺伝的相補性群の存在も知られている。XP(相補性A群)細胞の欠損している遺伝子クローニングを目的として、正常細胞ゲノムDNAをXP細胞にDNAトランスフェクションし、UV抵抗性に形質転換したXP細胞を選別し、さらに、この形質転換遺伝子をファージ等に"rescue"しようとした。