



# 太陽光によるDNA損傷と修復 : (6-4) photoproducts の生物学的意義 (助成研究報告)

市橋, 正光  
松永, 司  
平本, 猛聡  
藤原, 美定

---

**(Citation)**

神戸大学医学部神緑会学術誌, 6:92-95

**(Issue Date)**

1990-06

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(JaLCD0I)**

<https://doi.org/10.24546/81007152>

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007152>



## 太陽光による DNA 損傷と修復

### —(6-4) photoproducts の生物学的意義—

神戸大学医学部皮膚科 市橋正光

金沢大学薬学部放射薬品化学 松永司

県立淡路病院皮膚科 平本猛聡

神戸大学医学部放射線基礎医学 藤原美定

#### はじめに

色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum, XP) は人口40,000~200,000人に1人発症する稀な光線過敏性皮膚疾患で日光曝露皮膚に皮膚癌が好発する<sup>1,2)</sup>。XP細胞は紫外線 (ultra violet, UV) や化学変異源によりDNAに生じる損傷の修復に異常がある<sup>3,4)</sup>。

XPは現在、除去修復能が低下ないしは欠損しているA~Hの8相補群とシクロブタン型2量体の除去修復が正常なバリエーションに分類される<sup>5,6,7)</sup>。XP細胞のUV致死感受性をコロニー法でみると、DNA修復活性とよく相関している<sup>8)</sup>。

254nm UV照射でDNAに種々の損傷が生じるが、その中でもシクロブタン型2量体が主である<sup>9)</sup>。近年、注目を集めている(6-4)光生成物は全DNA損傷の30%程度であるが、高い突然変異性をもっている<sup>10)</sup>。1987年Cleaverら<sup>11)</sup>は興味あるXPA群(XP12 RO)を報告している。即ち、正常UV致死感受性と正常な染色体DNA突然変異率を示すXP12 RO revertant細胞は、(6-4)光生成物を正常に修復できるが、シクロブタン型2量体を修復できないことを示し、(6-4)光生成物修復とシクロブタン型2量体とその修復能の意義を問い直している。彼らの報告によれば(6-4)光生成物がUVによる細胞致死や突然変異発生前に重要な役割りを演じていることを示唆している。また、Mitchellら<sup>12)</sup>は(6-4)光生成物に対する polyclonal抗体を用いて、XPA、C、及びD群細胞はシクロブタン型2量体の修復欠損に加えて(6-4)光生成物に対する修復がほとんどないことを示し、同時に正常ヒト細胞では(6-4)光生成物修復はUV照射後4時間で約75%が修了し、そのカイネテックスはシクロブタン型2量体より速いことをも証明している。FrancisとRegan<sup>13)</sup>はXPバリエーションのUV感受性は313nmUVに

過敏な非シクロブタン型2量体の修復欠損のためとの考えを示唆している。一方、Mitchellら<sup>14)</sup>は polyclonal抗体を用いてXPバリエーション細胞は(6-4)光生成物の修復は正常であると報告している。

最近Moriら<sup>15)</sup>は、チミン・チミン及びチミン・シトシン配列の(6-4)光生成物を認識するがシクロブタン型2量体とは結合しない単クローン抗体を得ている。我々は、Moriらの抗体を用い、正常ヒト皮膚XPA、XPDとバリエーションの線維芽細胞に254nmUVを照射し、経時的に(6-4)光生成物修復をELISA法で追求した。

#### 材料と方法

##### 1. 細胞と培養

XP35KO (A群)、XP43KO (D群)<sup>16)</sup>、XP52KO (バリエーション) および正常ヒト線維芽細胞を用いた。これらの培養細胞は5~15継代のものであった。継代および実験には、10%胎児牛血清含有Eagles MEM培養液を用いた。なお、いずれの細胞もマイコプラズマ非感染であった。

##### 2. UV照射後の不定期DNA合成の経時変化

細胞をFalcon 3003シャーレ内にシリコンで固定した11×32mmカバーガラス上に蒔き2日間培養した。細胞を燐酸緩衝液(PBS)で2度洗滌後、254nmUVを10J/m<sup>2</sup>で照射し、370KBq (10 μCi) /mlの<sup>3</sup>H-チミジン [specific activity : 1702GBq (46Ci) mmol, Amersham] 含有培養液で3~24時間 (hydroxyurea 不含) インキュベートした。その後カバーガラス上の細胞をカルノア液で固定し、次いでサクラNR-M2液状フィルムを用いてオートラジオグラフィを行った。なお、フィルム処理細胞は冷暗所(4℃)で5日間感光させた。現像後、ギムザ染色し、細

胞核上の小顆粒を100個の細胞につき求め、平均値を各細胞群の不定期 DNA 合成能とし、UV 照射直後に3時間ラベルしたものを初期 UDS とした。

3. UV 照射と DNA 単離

1 × 10<sup>6</sup>個細胞を Falcon 3003、直径10cmシャーレに蒔いて2日間培養した。細胞をPBSで2度洗滌後254nmUVを照射した。初めに、UV量と(6-4)光生成物量の相関を求めるため、0~40J/m<sup>2</sup>UVを照射した。また、UV照射後、時間経過と修復の関連を求める実験ではUV量を40J/m<sup>2</sup>とした。

UV照射後、あるいは照射後24時間までの一定時間、インクベート後、シャーレに1.0% SDS-STE (100mM NaCl, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH8.0) を1ml加え、細胞を溶解させ回収した。Lysate を200 μg/mlのプロテイナーゼK (Merck社) で30°C 16時間処理した。エタノールで沈澱させ、乾燥後 TE 緩衝液 (1 mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH7.5) に溶解し、50 μg/ml pancreatic RNaseで37°C、1時間処理した。上記精製DNAをサンプルとし、10mM PBS (pH 7.4) に100 μg/mlの濃度に溶解した。UV非照射細胞より抽出したDNAを対照に用いた。

4. ELISA 法による (6-4) 光生成物の定量

64M-1 単クローン抗体を用いて以下のELISA法を行った。1% protamine sulfate で polyvinyl chloride 製平底96Well プレートに coating し、次いで、254nmUV を 2KJ/m<sup>2</sup>照射した牛胸腺の2重鎖DNA 50ng を PBS (pH 7.4) 50 μl に溶かして標準抗原とし、37°C で20時間インクベートし、結合させた。次にWellに64M-1抗体0.1mlとUV照射または非照射の正常、XPA、Dおよびバリエーション細胞の単鎖DNAを2 μg (過剰条件) を加えた後、PBSでよく洗い、goatの抗マウスIgG/peroxidase 複合体0.1mlを37°Cで90分反応させ、次いで0.04% phenylenediamine、0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/20mM クエン酸緩衝液で30分間処理した。各サンプルの490nm吸光度を測定し、64M-1抗体が、標準抗原に結合する率がサンプルDNAによりどの程度競合阻害を受けるかを求めた。

percent inhibition =

$$\left( 1 - \frac{A_{490} \text{ with inhibitor DNA}}{A_{490} \text{ without inhibitor DNA}} \right) \times 100$$

5. UV 生残曲線と T<sub>4</sub>エンドヌクレアーゼ感受性部位<sup>17)</sup>

対数増殖期細胞に254nmUVを照射した後、37°C、CO<sub>2</sub>インクベーターで10~14日間培養し、生じたコロニーを数え、生存曲線を得た。

結果と考按

XP35KO (A群) XP43KO (D群) の平均致死線量 (D<sub>0</sub> 値) は各々0.35J/m<sup>2</sup>と0.7J/m<sup>2</sup>で正常に比べ15倍と7倍致死感受性が高い (Table 1)。XPA と D の致死感受性の差異はUV照射 (10J/m<sup>2</sup>) 24時間後の T<sub>4</sub> エンドヌクレアーゼ感受性部位 (ESS) 消失が各々0%と10%と異っていることとよく相関する。一般にXPD細胞は通常20~50%の初期UDSを示す。XP43

Table. 1 正常人およびXP患者細胞のUV感受性

	UDS <sup>a</sup>	Early-time UV-survival parameters <sup>b</sup>		% ESS loss	Loss of 64M-1 binding sites at	
		n	D (J/m <sup>2</sup> )		6h	24h
Normal	100	1.5	5.00	100	80	> 95
XP35KO (A)	2	1.0	0.35	0	0	0
XP43KO (D)	40	1.0	0.70	10	5	10
XP52KO (Variant)	100	1.0	4.40	100	50~60	> 95

- a) Autoradiographic UDS after a 3 h [<sup>3</sup>H] thymidine labeling following 10 J/m<sup>2</sup>, relative to control.
- b) See reference (16)
- c) Disappearance of T<sub>4</sub> endonuclease V-susceptible sites 24 h after 10 J/m<sup>2</sup>, relative to control.
- d) From Fig. 1.

KOの初期UDSは~40%と他のXPDと同様であるが、24時間までのESSは10%と低い。このようにXPD群細胞では初期UDSが高いが、24時間後の除去修復が低い。その理由はよくわからないが、損傷DNAにnickが入るが切り出せないか、あるいは2量体以外のDNA損傷が正常なためかなどが考えられる。

Cleaverら<sup>11)</sup>はXPAのリバートメントを用いて(6-4)光生成物はシクロブタン型2量体に比べ、致死感受性や突然変異により深く関与していることを示している。また、Escherichia coliを用いた実験ではシクロブタン型2量体を90%除去するとpZ189 plasmidのUV killingを75%、突然変異を80%減らすとの報告もある<sup>10)</sup>。これらの結果は染色体DNAとplasmid DNAの(6-4)光生成物とシクロブタン型2量体損傷は生物学的効果においても異った役割を演じていることを示唆している。

これらの背景のもと、我々はヒト細胞でUV照射後の(6-4)光生成物とその修復の動態を追求した。

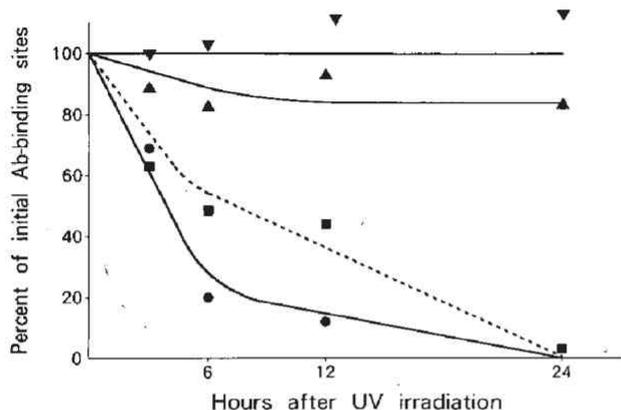


Fig. 1 抗(6-4)光生成物単クローン抗体を用いた修復動態。

40J/m<sup>2</sup> UV 照射直後の抗体結合能を100%とし、経時的に結合能の減少をELISA法で定量

(●) 正常人; (▼) XP35 KO (A);

(▲) XP43 KO (D); (■) XP52 KO (V)

はじめに、我々は正常ヒト、XP35KO (A) XP43KO (D) および XP52KO (バリエント) 細胞の UV 量依存性 (6-4) 光生成物の生成を単クローン抗体を用いて ELISA 法で測定した。細胞を 254nm UV で 40J/m<sup>2</sup> 照射し (6-4) 光生成物の除去の kinetics を求めた (Fig. 1)。抗体結合部位は、正常細胞では照射後、0、12と24時間後で各々80、90と95%と速やかに除去された。しかしながら、XP35 KO (A) 細胞では24時間の結合部位の減少はなく、XP43 KO (D) 細胞は、24時間後にわずか10%の減少(修復)を示したのみであった。これらの結果は Mitchell らが (6-4) 光生成物に対する多クローナル抗体を用いて求めた結果と一致している。XPA と D は (6-4) 光生成物とシクロブタン型 2 量体の両損傷を修復できないために高 UV 致死感受性であり、突然変異および発癌を生じやすいと考えられる。しかし、XPD 細胞では両 2 量体を 10% しか除去できないのに、初期 UDS が 20~50% とかなり高いことの説明がつかない。

XP52KO (バリエント) 細胞は ESS やシクロブタン型 2 量体修復は正常であるが、正常ヒトに比べ、UV 致死にやや感受性があり、またカフェイン添加で致死が増大する<sup>18)</sup>。Mitchell らは XP バリエントは正常に (6-4) 光生成物を修復すると報告している。しかし、図 1 に示した如く我々の単クローン抗体を用いた assay では UV 照射 6~12 時間後でわずかながら正常細胞より低い修復であることを示している。

従って XP バリエント細胞の UV 致死感受性がごく軽度なのは (6-4) 光生成物修復が少し欠けているためとも考えられる。しかし、XP バリエントの UV 致

死における (6-4) 光生成物修復の関与は、今後より多数のバリエント細胞を用いた研究で明らかになると考えられる。

## 文 献

1. Kraemer KH, Slor H: Xeroderma pigmentosum. Clin Dermatol 3 : 33-69, 1985.
2. Fujiwara Y, Matsumoto A, Ichihashi M, Satoh Y: Heritable disorders of DNA repair: Xeroderma pigmentosum and Fanconi's anemia. Curr Probl Dermatol 17 : 182-198, 1987.
3. Cleaver JE: Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. Nature 218 : 652-656, 1968.
4. Zelle B, Bootsma D: Repair DNA damage after exposure to 4-nitroquinoline-1-oxide in heterodikaryons derived from xeroderma pigmentosum cells. Mutat Res 70 : 373-381, 1980.
5. Fischer E, Keijzer W, Thielman HW, Popanda O, Bohnert E, Edler L, Jung EG, Bootsma D: A ninth complementation group in xeroderma pigmentosum, XP I. Mutat Res 145 : 217-225, 1985.
6. Cleaver JE: Xeroderma pigmentosum: Variants with normal DNA repair and normal sensitivity to ultraviolet light. J Invest Dermatol 58 : 124-128, 1972.
7. Bootsma D, Keijzer W, Jung EG, Böhner E: Xeroderma pigmentosum complementation group XP-I withdrawn. Mutat Res 218 : 149-151, 1989.
8. Kreamer KH, Andrews AD, Barrett SF, Robbins JH: Colony-forming ability of ultraviolet-irradiated xeroderma pigmentosum fibroblasts from different DNA repair complementation groups. Biochim Biophys Acta 442 : 147-153, 1976.
9. Lippke JA, Gordon LK, Brash DE, Haseltine WA: Distribution of UV-induced damage in a defined sequence of human DNA: Detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. Proc Natl Acad Sci USA 78 : 3388-3392, 1981.
10. Protic-Sabljić M, Tuteja N, Munson PT, Hauser J, Kreamer KH, Dixon K: UV light-induced cyclobutane pyrimidine dimers are mutagenic in mammalian cells. Mol Cell Biol 6 : 3349-3356, 1986.
11. Cleaver JE, Cortes F, Lutze LH, Morgan WF, Player AN, Mitchell DL: Unique DNA repair prop-

- erties of a xeroderma pigmentosum revertant. *Mol Cell Biol* 9 : 3357, 1987.
12. Mitchell DL, Haipek CA, Clarkson JM: (6-4) photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat Res* 143 : 109-112, 1985.
  13. Francis AA, Regan JD: Detection and repair of a UV-induced photosensitive lesion in the DNA of human cells. *Mutat Res* 165 : 151-157, 1986.
  14. Mitchell DL, Haipek CA, Clarkson JM: Xeroderma pigmentosum variant cells are not defective in the repair of (6-4) photoproducts. *Int J Radiat Biol* 52 : 201-206, 1986.
  15. Mori T, Matsunaga T, Hirose T, Nikaido O: Establishment of a monoclonal antibody recognizing ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Mutat Res* 194 : 263-270, 1988.
  16. Ichihashi M, Yamamura K, Hiramoto T, Fujiwara Y: No apparent neurologic defect in a patient with xeroderma pigmentosum complementation group D. *Arch Dermatol* 124 : 256-260, 1988.
  17. Fujiwara Y, Ichihashi M, Kano Y, Goto K, Shimizu K: A new human photosensitive subject with a defect in the recovery of DNA synthesis after ultraviolet-light irradiation. *J Invest Dermatol* 77 : 256-263, 1981.
  18. Ichihashi M, Fujiwara Y: Clinical and photobiological characteristics of Japanese xeroderma pigmentosum variant. *Br J Dermatol* 105 : 1-12, 1981.