



Defective repair of monoclonal antibody-recognizing (6-4) photoproducts in xeroderma pigmentosum group A and D, but a slightly retarded repair in a xeroderma pigmentosum...

平本, 猛聡

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1989-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0851

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000851>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	平 本 猛 聡 (広島県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第 647号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成元年3月31日
学位論文題目	Defective Repair of Monoclonal Antibody – Recognizing (6 – 4) Photoproducts in Xeroderma Pigmentosum Group A and D, but a Slightly Retarded Repair in a Xeroderma Pigmentosum Variant (色素性乾皮症におけるモノクローナル抗体認識 (6 – 4) photoproductの修復解析: A, D群の修復欠損及びバリエ ントの修復遅延)
審査委員	主査 教授 三 島 豊 教授 田 中 千賀子 教授 藤 原 美 定

論文内容の要旨

序 文

色素性乾皮症(以下XP)は、光線過敏と日光裸露部の高発癌性を特徴とする比較的稀な遺伝性疾患である。XP細胞は、紫外線あるいは科学的に誘発されたDNA損傷に対する修復能が欠損しており、現在、9つの相補性群とバリエントとに分類されている。一般にそれら相補性群間に於ける、DNA損傷修復の程度と、紫外線照射後のコロニー形成能で見る紫外線感受性の程度とは、割合よく相関している。

ところで、254nmの紫外線は、シクロブタン型ピリミジンダイマー(以下シクロブタンダイマー)を主とする様々なDNA損傷を生成するが、突然変異誘発性の高い(6 – 4) photoproductも30%程度生成される。最近、Cleaverらは、紫外線致死感受性が正常で、シクロブタンダイマーは修復しないが(6 – 4) photoproductを正常に修復するというXP12RO(A群)のリバートントを報告した。この事実は、(6 – 4) photoproductが、紫外線の致死並びに突然変異誘発に於ける主たる要因である事を示唆している。Mitchellらは、(6 – 4) photoproductを認識するポリクローナル抗体を用い、XP – A, C, D群では、シクロブタンダイマーだけでなく、(6 – 4) photoproductの修復能も欠損している事を示した。また、Francis and Reganは、XPバリエント細胞においては、313nmで誘発されるシクロブタンダイマーでないDNA損傷の修復欠損が、紫外線高感受性に関与している事を示唆したが、一方で、Mitchellらは、前述のポリクローナル抗体を用い、XPバリエント細胞では、(6 – 4) photoproduct修復能は欠損していない事を報告している。最近、

森らは (6-4) photoproduct を特異的に認識するモノクローナル抗体を確立した。今回我々は、このモノクローナル抗体を用い、免疫酵素抗体法 (以下 ELISA) により、XP-A, D, バリエント並びに正常ヒト線維芽細胞からの DNA に於ける、254 nm 紫外線に誘発された (6-4) photoproduct の修復を調べた。

方 法

1. 細胞並びに培養

正常ヒト、XP35 KO (A群), XP43 KO (D群), XP52 KO (バリエント, XP3KOバリエントの兄) の線維芽細胞を使用した。いずれも、5~15継代のものを用い、10% FCS、2mM L-glutamine 含有 Eagle's MEM で維持し、マイコプラズマ感染のないものを使用した。

2. 不定期 DNA 合成 (UDS) の解析

細胞を 6cm dish (Falcon 3002) 中のカバースリップ上にまき、2日間培養した後、PBS で洗浄し、254nm 紫外線を $10\text{ J}/\text{m}^2$ 照射した。その後直ちに 370 kBq ($10\text{ }\mu\text{Ci}$) /ml の $[\text{Me-}^3\text{H}]$ チミジンで 3~24時間培養後、アセトン・エタノール (1:3) で固定、Sakura NR-M2 液でオートラジオグラフィーを行なった (4°C 暗所で 5日間)。その後、現像固定、ギムザ染色し、核上顆粒数を 100個以上の細胞で数え、平均値を取った。

3. 紫外線照射並びに DNA 抽出

細胞を 10cm dish (Falcon 3003) に 10^6 /dish の割合でまき、2日間培養した後、PBS で 2回洗浄後 254nm 紫外線を照射した。紫外線照射量と (6-4) photoproduct 生成量との関係を見る為に $0\sim 40\text{ J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射した。また、(6-4) photoproduct の経時的修復を見る時の紫外線照射量は $40\text{ J}/\text{m}^2$ とした。照射後も直ちにあるいは修復時間を培養した後、1% SDS-STE を 1ml 滴下し細胞を融解させ回収した。Proteinase K で消化後、フェノール・クロロホルムで抽出、エタノール沈澱させた。更に沈澱物を TE buffer で溶解し、RNase で処理後、フェノール・クロロホルムで抽出、エタノール沈澱により DNA を抽出、最終的に DNA 濃度が $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ になる様 10mM PBS で溶解した。紫外線非照射細胞からの DNA をコントロールとして用意した。

4. 64M-1 モノクローナル抗体並びに ELISA

最近、森らが確立した (6-4) photoproduct を特異的に認識する 64M-1 モノクローナル抗体を使用した。ELISA は下記の如く行なった。96穴プレートに、1% 硫酸プロタミンを被覆させ、254nm 紫外線を $2\text{ KJ}/\text{m}^2$ 照射した 2本鎖 DNA を標準抗原として、 $50\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で固着させた。非特異的結合部位は、1% NCS で阻害した。64M-1 モノクローナル抗体 0.1ml と、1本鎖にしたサンプル DNA $2\text{ }\mu\text{g}$ とを加え反応させ、PBS で数回洗浄後、二次抗体としてヒツジ抗マウス IgG を用い、o-フェニレンジアミンで 490nm の吸収 (A_{490}) を分光測光で計測した。標準抗原に対する 64M-1 結合の阻害百分率 (Percent inhibition) は、下記の式で計算した。

Percent inhibition =

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

結果と考察

XP35KO (A群) と XP43KO (D群) の紫外線高感受性は、平均致死線量 (D_0) で見ると、各々 0.35, 0.7 J/m² で、これらは正常細胞 ($D_0 = 5.0$ J/m²) の各々 15, 7 倍高感受性である。ところで、これを T4 エンドヌクレアーゼ感受性部位 (以下 ESS, シクロブタンダイマーの存在を示す) の減少で見ると、XP-A, D 群細胞は各々、照射 24 時間後 0, 10% (正常 100%) である。また UDS で見ると、3 時間ラベルで XP34KO (A群) で 2%, XP43KO (D群) で 40% である。継続的 UDS で見ても XP43KO は、正常の 40% である。XP-D 群がこの様に、重篤な修復欠損を持ちながら高い UDS 値を示す理由は、障害部位に nick は生じるが障害そのものは除去できないか、あるいは、シクロブタンダイマー以外の障害を優先的に修復する可能性が残されているものの詳細は定かでない。

最近、Cleaver らは、XP-A 群のリバートントを用いて、シクロブタンダイマーに比べ、(6-4) photoproductの方が、より致死効果並びに突然変異誘発性が高い事を示した。この 2 種類の DNA 障害の差異は、pZ189 プラスミドにおいても、大腸菌の photolyase を用いて示されている。photolyase により 90% のシクロブタンダイマーが除かれると、プラスミドの致死が 75% までに、突然変異誘発性が 80% までに減少する。これらの事実は、シクロブタンダイマーと (6-4) photoproduct の、染色体上の障害ならびにプラスミド上の障害の差異を示唆している。これらの点をふまえて、ヒト細胞における、(6-4) photoproduct の生成並びに修復を調べた。

まず第 1 に、正常ヒト、XP35KO (A群)、XP43KO (D群)、XP52KO (バリエント) 細胞において、(6-4) photoproduct 量が紫外線照射量に比例する事を ELISA で確認した。254 nm 紫外線 0~40 J/m² の範囲で両者は比例している。40 J/m² 照射での Percent inhibition は、29.1 ± 3.1 % であった。

次に、照射量を 40 J/m² に固定して、64M-1 モノクローナル抗体が認識する (6-4) photoproduct の修復を見た。64M-1 抗体結合部位は、正常細胞では、照射 6, 12, 24 時間後に、80, 90, 95% 消失している。ところが、XP35KO (A群) 細胞では、照射 24 時間後も全く消失しておらず、XP43KO (D群) 細胞では、照射 24 時間後で 10% 消失しているに過ぎない。これらの結果は、Mitchell らのポリクローナル抗体による結果と一致している。XP-A, D 群は、シクロブタンダイマーと共に (6-4) photoproduct の修復能も欠損しており、これが、光線過敏、高発癌性の原因の 1 つと考えられるが、XP-D 群に関しては、その高 UDS 値との関係は不明である。

XP52KO バリエント細胞は ESS の減少及びシクロブタンダイマー除去は正常であるが、軽度紫外線高感受性である (正常の $D_0 = 5.0$ J/m² に対し、XP バリエントの $D_0 = 4.4$ J/m²)。更に、カフェインを加えた紫外線照射後の致死効果も正常より高い。Mitchell らは XP バリエントは (6-4) photoproduct を正常に除去するデータを示しているが、我々の結果は、XP52KO 細胞で、約 20% 除去が遅れる事を示している。この事が、紫外線に軽度高感受性である事の原因かもしれない。

以上より、XP-A, D 群は、シクロブタンダイマー並びに 64M-1 抗体が認識する (6-4) photoproduct の両方を修復できない。また、XP バリエントは、(6-4) photoproduct の修復

が軽度遅延している。

論文審査の結果の要旨

1962年のSetlowらの、「紫外線による大腸菌死滅の主因はチミンダイマー型DNA障害である。」という報告以来、紫外線誘発DNA損傷研究は、チミンダイマーを中心として進められてきた。ヒト細胞においても、1968年、Cleaverは、紫外線高感受性ヒト突然変異である色素性乾皮症(XP)由来の線維芽細胞が、紫外線誘発DNA損傷を修復できない事を明らかにし、この事実には、チミンダイマーの除去修復に必須のエンドヌクレアーゼの欠損が、関連している事を示唆した。

ところが、1982年、BrashとHaseltineが、大腸菌においてはチミンダイマーよりも(6-4) photoproductsの方が、よりpoint mutationを誘起しやすいという現象を報告して以来、(6-4) photoproductsが注目を集める様になった。しかるに、ヒト細胞における(6-4) photoproductsの修復に関する研究としては、わずかにMitchellらのポリクローナル抗体を用いたXP細胞の経時的観察の報告があるのみである。

我々は、そこで(6-4) photoproductsを認識するモノクローナル抗体を用いて、XP-A群、D群、バリエントにおける、(6-4) photoproductsの修復をELISA法で定量した。その結果、(6-4) photoproductsの修復能力は、XP-A群においては、ほぼ完全に欠損、XP-D群では、24時間後、正常の約10%であり、XP-バリエントでは、正常に比べ、軽度修復が遅延している事が判明した。XP-A、D群に関する結果は、Mitchellらの報告を支持するものであるが、XP-バリエントに関する結果は、XP-バリエントでは、(6-4) photoproductsの修復能力は欠損しないとするMitchellらの報告とは一致しない。

ヒト細胞における、モノクローナル抗体を用いた、(6-4) photoproductsの修復動態に関する報告は、過去になく本報によるXP-バリエントにおける(6-4) photoproductsの修復遅延の所見は、新しい知見であり、博士号を授与するに価する研究である事を認める。