



Title	Characterization of a splicing mutation in group A xeroderma pigmentosum
Author(s)	里方, 一郎
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37200
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	里 方 一 郎
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9 6 5 9 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 26 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	Characterization of a splicing mutation in group A xeroderma pigmentosum (色素性乾皮症A群におけるスプライシング変異の分子遺伝学的解析)
論文審査委員	(主査) 教 授 岡田 善雄 (副査) 教 授 岡田伸太郎 教 授 岡山 博人

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

色素性乾皮症 xeroderma pigmentosum (XP) は、常染色体性劣性遺伝病で、紫外線に高感受性で、小児期早期より種々の皮膚症状をきたし、高率に皮膚癌を合併する、神経症状を伴うものは、de Sanctis-Cacchione 症候群と呼ばれている。病因として、DNA修復機構の欠陥が考えられている。ヒトのDNA修復機構については、現在ほとんど不明であり、本疾患は、ヒトのDNA修復機構解明の糸口になるものとして注目されている。現在までにA~H群の遺伝的相補性群と variant の合計9群が認められている。XP A群は、XPの中で最も臨床症状が重篤で、日本人XP患者の約半数を占める。私たちは、先に、XP A群細胞を特異的に相補するマウスのゲノムDNA修復遺伝子のクローニングに成功し、この遺伝子を Xeroderma Pigmentosum Group A Complementing (XPAC) Gene と命名した。このマウスのXPAC遺伝子を probe にして、ヒトおよびマウスのXPAC cDNAをクローニングし、その構造を明らかにした。さらに、ヒトのXPAC cDNAを probe にして、全長約25kb、6個の exon よりなるヒトのゲノムXPAC遺伝子をクローニングした。本研究では、XP A群患者のXPAC遺伝子について分子遺伝学的解析を行い、その異変を明らかにし、さらに、日本人XP A群のDNA診断法を示した。

(方法ならびに成績)

典型的な臨床症状を示す日本人XP A群患者細胞についてヒトXPAC cDNAを probe にして、northern blot を行った。いずれの患者細胞のXPAC mRNAも正常対照に比して小さく、量的には著明に減少していた。これらの患者細胞の中で、XP 2 OS細胞について、XPAC遺伝子のシーケン

ス解析を行った。XP2OS細胞のゲノムDNAライブラリーを作製し、ヒトXPAC cDNAをprobeにして、XP2OS細胞のXPAC遺伝子をクローニングした。5' flanking 領域及び flanking intron を含む第1から第6 exon のシーケンス解析の結果、第3 intron splice acceptor site のAGがACに点突然変異していることが判明した。この変異により、制限酵素 AlwN I の認識部位が第4 exon 内に新たに生じた。ヒトXPAC cDNAをprobeにして、AlwN I によるXP2OS細胞のSouthern blotを行ったところ、XP2OSは、この変異についてホモ接合体であることが判明した。この変異により、XP2OS細胞にRNAスプライシング異常が生じていることを示すために、PCRを用いてXP2OS細胞のXPAC cDNAを増幅し、そのシーケンス解析を行った。その結果、第4 exon の最初の2塩基が欠損しているタイプの2種のXPAC mRNAが主に存在していることが判明した。この結果より、XP2OS細胞では、第4 exon の最初の2塩基が cryptic splice site として利用されていると考えられ、この変異により、RNAスプライシング異常が生じ、発症に至るものと考えられた。さらに、この変異により、実際に細胞が紫外線感受性になることを示すため、XP2OS細胞に正常XPAC遺伝子およびこの変異を有するXPAC遺伝子を transfection した。その結果、正常XPAC遺伝子を transfection したXP2OS細胞は、紫外線抵抗性になったが、変異XPAC遺伝子を transfection したXP2OS細胞は、紫外線感受性のままであった。この結果は、この変異により細胞が紫外線感受性になることを示しており、この変異によりXPが発症することをさらに強く支持するものと考えられた。

このスプライシング変異の頻度を明らかにするためXP A群34例（日本人21例、白人11例、黒人2例）、他のXP群8例、正常対照4例について、Southern blot による AlwN I RFLP を調べた。その結果、血縁関係のない日本人21例中、16例（76%）がホモ接合体、4例（19%）がヘテロ接合体であり、日本人XP A群患者では、極めて高率にこの変異が認められることが判明した。この変異は、他の人種のXP A群、他のXP群および正常対照では認められなかった。したがって、この変異は、racial divergence 後に生じたものであることが考えられた。PCRにより、この変異を含んだ第4 exon 領域を増幅し、この領域の AlwN I RFLP を同様の対象について調べたが、同じ結果を得た。また、この変異についてホモ接合体である患者の家系について、PCRによる AlwN I RFLP を調べたが、両親ともに保因者であることが判明し、本症が常染色体性劣性遺伝形式で発症することが分子レベルで示された。

（総 括）

XP A群患者のXPAC遺伝子について分子遺伝学的解析を行った。その結果、第3 intron splice acceptor site のAGがACに点突然変異していた。この変異により、RNAスプライシングに異常をきたし、発症に至ると考えられた。このスプライシング変異は血縁関係のない日本人XP A群患者21例中20例（95%）に認められた。PCRによる AlwN I RFLP 法は、出生前診断を含めた日本人XP A群のDNA診断に非常に有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、色素性乾皮症A群の分子遺伝学的解析を行ったものである。その結果、日本人患者の大部分が、XPAC遺伝子の第3イントロン・アクセプターの点突然変異により発症することが明らかにされた。この結果は、XPAC遺伝子が、色素性乾皮症A群の原因遺伝子であることを強く支持するものとなった。

色素性乾皮症A群の病因を、遺伝子レベルで明らかにした最初の仕事であり、本疾患の出生前診断を含めたDNA診断法を初めて開発した点で、本研究は、博士論文に値するものである。