The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Studies of in vivo mutations in rpsL transgene in UVB-irradiated epidermis of XPA-deficient mice
Author(s)	村井, 浩明
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41766
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、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	村　井　浩　明（むら い ひろ あき）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　15261　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学　位　論　文　名	Studies of in vivo mutations in rpsL transgene in UVB-irradiated epidermis of XPA-deficient mice （紫外線照射されたXPA欠損マウスの表皮におけるrpsL遺伝子のin vivo突然変異の研究）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　西宗　義武 （副査） 教　授　花岡　文雄　　教　授　田中亀代次

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum : XP）は、日光過敏症、皮膚癌高頻度発生、精神神経症状を臨床的特徴とし、ヌクレオチド除去修復機構（nucleotide excision repair : NER）に異常を持つ常染色体劣性の遺伝病である。我々は、A群XP（XPA）の分子病態を解析する目的で、XPA遺伝子をノックアウトしたマウス（XPAマウス）を作成した。XPAマウスは患者と同様に、低線量の紫外線照射により高頻度に皮膚癌を発症した。本研究では、XPAマウスにおける紫外線皮膚発癌の分子機構解明の一端として、rpsLトランスジェニックマウスの系を用いて紫外線照射後のXPAマウス皮膚表皮におけるin vivo突然変異の解析を行うことを目的とした。

【方法】

1．rpsLトランスジェニックマウス

rpsLトランスジェニックマウスは、全てのマウス体細胞に生じる突然変異を検出するために、大腸菌のリボソーム小サブユニット蛋白質群の一つをコードしているrpsL遺伝子を含み、カナマイシン耐性（Km^R）遺伝子を持つシャトルプラスミドpML4をタンデムに導入したトランスジェニックマウスである。野生型rpsL遺伝子を持つpML4はストレプトマイシン感受性を大腸菌に与えるのに対し、rpsL遺伝子に突然変異が生じていると宿主大腸菌はストレプトマイシン抵抗性のままとなる。この原理により、rpsL遺伝子の突然変異はストレプトマイシン抵抗性の大腸菌コロニーとして簡便かつ鋭敏に検出できる。

2．XPA／rpsLマウス皮膚表皮における紫外線誘発突然変異の測定

rpsLトランスジェニックマウスとXPAマウスを交配し、rpsL遺伝子を持ったXPA（＋／＋）、XPA（＋／－）およびXPA（－／－）マウスをそれぞれ10、12および12匹得た。各遺伝子型のマウスを2群に分け、毛を剃った背部の皮膚へそれぞれ150J／㎡または900J／㎡のUVBを照射した。照射されなかった腹部の皮膚を非照射コントロールとした。抽出した表皮DNAをBanIIで切断し、T4 DNA ligaseで自己環状化し、大腸菌へ導入した後、Kmプレートおよび Km／Smのプレートで培養した。この2種類のプレートに現れるコロニー数の比から、マウス個体の皮膚表皮に蓄積された突然変異度を算定した。そして、これらのSm耐性となったコロニーよりpML4を抽出し、rpsL遺伝子における突然変異をシークエンスによって調べた。

【成績】

1）非照射表皮から得られた突然変異率は各遺伝子型で差はなく、1.8 $\times 10^{-5}$ 程度であった。2）150J／㎡照射の場合、XPA（－／－）の照射表皮の突然変異率は有意に上昇（2.8倍）したが、XPA（＋／＋）およびXPA（＋／－）の突然変異率は非照射表皮と差がなかった。900J／㎡照射の場合はすべての遺伝子型マウスで照射表皮の突然変異率は非照射群と比べ有意に上昇したが、各遺伝子型マウス間で差はなかった。3）Sm耐性の大腸菌コロニーに含まれるrpsL遺伝子をシークエンスした結果、非照射表皮からのrpsL遺伝子の突然変異のスペクトラムは各遺伝子型マウス間で明らかな差はなかった。照射表皮では両線量とも非照射皮膚に較べて、G：C－>A：Tトランジションが増加した。150J／㎡照射群において、紫外線による特徴的な突然変異であるCC－>TTタンデム変異はXPA（－／－）マウスのみに認められた。900J／㎡照射群の場合、XPA（＋／＋）およびXPA（＋／－）マウスではCC－>TT変異の頻度は2％であったが、XPA（－／－）では18％に認められた。4）すべての遺伝子型マウスの照射皮膚の突然変異において、明らかなホットスポットが認められた。特に、cytocine194でG：C －>A：Tトランジションが高頻度に認められた。

【総括】

1）紫外線照射された皮膚上皮におけるin vivo突然変異を調べるため、rpsL遺伝子をタンデムに350コピーもつXPA（－／－）、（＋／＋）、（＋／－）マウスを作成した。

2）低線量（150J／㎡）のUVB照射により、XPA（－／－）マウスはXPA（＋／＋）、（＋／－）マウスより高頻度にrpsL遺伝子の突然変異を起こした。

3）高線量（900J／㎡）のUVB照射により、全ての遺伝子型マウスにおいて突然変異が同程度に上昇した。おそらく、XPA（－／－）マウス表皮では高線量（900J／㎡）のUVB照射により表皮の細胞死が起こり、突然変異の誘発と細胞死が平衡状態になったためと考えられる。

4）紫外線誘発突然変異に特異的であり、NER欠損細胞やXP患者の皮膚癌において高頻度に認められるCC－>TTタンデム変異がXPA（－／－）マウス表皮で特異的に認められた。

5）XPA／rpsLマウスは、種々の発癌物質による突然変異誘発におけるNERの役割を解析する上で有用なマウスであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum;XP）は日光紫外線による高頻度皮膚発癌を臨床的特徴とする遺伝疾患であり、ヌクレオチド除去修復能（nucleotide excision repair;NER）に異常を持つ。XPの分子病態を解析するため、A群色素性乾皮症（XPA）遺伝子をノックアウトしたマウス（XPAマウス）が作成され、XPAマウスは、A群XP患者と同様に、低線量の紫外線照射によって高頻度に皮膚癌が発症することが知られている。本研究では、XPAマウスにおける紫外線誘発皮膚発癌の分子機構解明の一端として、rpsLトランスジェニックマウスの系を用いて、紫外線照射後のXPAマウス表皮におけるrpsL遺伝子のin vivo突然変異の解析を行った。その結果、低線量（150J／㎡）の紫外線照射によって、XPAホモ型マウスは、ヘテロ型および野生型マウスに比べ、高頻度にrpsL遺伝子の突然変異を起こした。さらに、紫外線誘発突然変異に特異的であり、NER欠損細胞やXP患者の皮膚癌において高頻度に認められるCC→TTタンデム変異がXPAホモ型のマウス表皮で高頻度に認められた。これらの結果は、XPマウスにおける紫外線誘発皮膚発癌過程において、紫外線DNA損傷による突然変異の高頻度蓄積が重要な発癌要因であることを示唆すると共に、XPA／rpsLマウスが、種々の発癌物質による突然変異誘発におけるNERの役割を解析する上で有用なマウスであることを示したものであり、学位の授与に値する研究と考えられる。