The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	マウスXPV遺伝子の単離とジーンターゲティング
Author(s)	山田, 亜夕美
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42282
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

【17】

氏　　名	山　田　亜夕美（やまだ　あゆみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16164　号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬学専攻
学　位　論　文　名	**マウス *XPV* 遺伝子の単離とジーンターゲティング**
論文審査委員	（主査） 教　授　花岡　文雄 （副査） 教　授　馬場　明道　　教　授　西宗　義武　　教　授　岡部　勝

論文内容の要旨

色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum；XP）は、日光過敏を主症状とする高発癌性の常染色体性劣性遺伝病であり、AからG群（XP－A～G）とバリアント群（XP－V）の8相補性群に分類されている。XP－A～G群では、紫外線によりDNA上に生じる損傷を修復するヌクレオチド除去修復機構（nucleotide excision repair；NER）が欠損しており、一方、XP－V群では、NERは正常であるが、紫外線照射後の複製に異常が見られている。我々は、このXP－V群の原因遺伝子産物（XPV）を生化学的手法を用いて単離同定し、XPVが紫外線により生じるシクロブタン型ピリミジン二量体（cyclobutane pyrimidine dimer；CPD）を乗り越えて複製する新規DNAポリメラーゼη（polη）であることを明らかにした。これまでに大腸菌や酵母を用いた遺伝学的な解析から、損傷を乗り越える複製機構（translesion synthesis；TLS）には、損傷を乗り越える際に、損傷の相補鎖に誤った塩基を取り込み変異を誘発する経路と、正しい塩基を取り込み変異を起こさない経路の2経路あることが明らかにされていた。Polηは、チミン二量体であるCPDに対してアデニン塩基を重合することから、変異を起さない経路に関与するDNAポリメラーゼであると考えられる。また、他のグループの解析から、ヒトの変異誘発に関わると予想される損傷乗り越えDNAポリメラーゼも単離され、ヒトにも二つのTLS経路が存在することが示唆されている。XP－V群患者では、変異を起さない経路を欠損するために、変異誘発経路が機能し、その結果、皮膚癌を発症すると推測される。しかしながら、哺乳類細胞内において、2つのTLS経路がどのように制御され、そして発癌に寄与しているのか、現在のところ明らかではない。私は本研究において、*XPV*遺伝子の個体における役割を解明し、さらに損傷乗り越え複製と発癌との関わりを明らかにすることを目的として次のことを行なった。まず、マウス*XPV* cDNA（*mXPV*）を単離し、その解析を行った。さらに、*mXPV*遺伝子破壊のためのターゲティングベクターを構築し、*XPV*遺伝子欠損マウスの作出を試みた。

マウスcDNAライブラリーよりヒト*XPV* cDNAをプローブとしてスクリーニングを行い、マウス*XPV*ホモログを単離し、その配列を決定した。*mXPV* cDNAは694アミノ酸のタンパク質をコードし、推定されるアミノ酸配列はヒトXPVタンパク質（hXPV）と80.3%の同一性を示した。単離したcDNAより昆虫細胞発現系を用いて組換えタンパク質を作成した。mXPV組換えタンパク質は、hXPVと同様にCPD損傷を乗り越えるDNAポリメラーゼ活性を有しており、単離したマウスXPVホモログが、マウスDNAポリメラーゼηであることが確認された。次に、mXPVタンパク質をXP－V群患者由来の細胞抽出液に加えて、無細胞損傷乗り越え複製反応を行なったところ、

mXPV タンパク質は、hXPV と同様に XP－V 群において欠損する損傷乗り越え複製を相補する活性を示した。さらに、ヒト及びマウス *XPV* cDNA を XP－V 群細胞に導入することにより、XP－V 群細胞の紫外線感受性を回復させることを明らかにした。これらの結果より、mXPV は、hXPV と全く同様の機能を持つことが示され、マウスの細胞内においても機能していると予想された。また、ノザンブロットによりマウス組織における *mXPV* の発現を検討したところ、精巣、胸腺、肝臓及び皮膚といった増殖能を持つ細胞において比較的高い発現が見られた。さらに、紫外線による発現誘導は見られなかったが、S 期誘導に伴った mRNA 量の増加が見られた。これらの結果、pol η である mXPV は、細胞増殖による発現制御を受け、DNA 複製に関わっている可能性が示唆された。

続いて、*XPV* 遺伝子欠損マウスを作出するために、*mXPV* 遺伝子のゲノム DNA を単離し、その構造を決定した。*mXPV* 遺伝子は終止コドンまでが11のエキソンに分断され、翻訳開始コドンは第 2 エキソンに存在していた。この構造を基に、pol η の機能を完全に欠失した変異マウスを得るために、エキソン 2 ～ 8 を含む領域をネオマイシン耐性遺伝子発現カセットで置換したターゲティングベクターを構築した。ES 細胞のスクリーニングにより得られた相同組換え体より 2 クローンを胚盤胞に導入し、キメラマウスを作出した。そのうち 1 クローン由来のキメラマウスより *mXPV* 変異アリルの生殖系列への伝播を確認し、*XPV* ヘテロ接合型マウスを得た。さらにヘテロ接合体マウス同士の交配より、*mXPV* ホモ変異体の作出を試みた結果、ホモ変異体は 1 匹も得られず、マウスにおいて *XPV* 遺伝子のヌル変異体は耐性致死になる可能性が示唆された。

マウスにおいて、*XPV* 遺伝子の欠損が耐性致死となった結果は、XP－V 患者の存在を考えると非常に予想外のものであった。今後、耐性致死となった原因が、XPV の損傷乗り越え複製に起因するものなのか、それとも未知の機能に基づくものなのか解析を進め、ヒトでは XP－V 患者が存在し、*XPV* は必須遺伝子ではないにも関わらず、マウスにおいては必須となる理由を明らかにしたいと考えている。そして、マウスを用いたこのような解析から得た知見より、損傷乗り越え複製 DNA ポリメラーゼの分子レベルでの解析にフィードバックできるようになると大いに期待される。

論文審査の結果の要旨

DNA 上に生じた損傷は、DNA 複製時において DNA 複製装置の進行を阻害することが知られている。細胞内では、損傷による複製の阻害を組換え反応や、損傷を乗り越える複製反応（translesion synthesis；TLS）により回避していると考えられている。このような反応は総称して「複製後修復」と呼ばれ、これまで大腸菌や酵母を用いた遺伝学的な解析が主であった。当研究室では、ヒト高発がん性遺伝的疾患である色素性乾皮症バリアント群患者由来細胞の TLS 欠損を相補するタンパク質を単離し、それが損傷を乗り越えて複製する新規 DNA ポリメラーゼであることを見い出し、その遺伝子クローニングに成功した。

著者は、この XPV ポリメラーゼの生体内での機能および他の修復系との関係を調べることを目的として実験を行い、次のことを明らかにした。

1）ヒト *XPV*（*hXPV*）cDNA をプローブとして、マウス cDNA ライブラリーより *mXPV* の完全長 ORF を単離し、その塩基配列を決定した。マウス XPV タンパク質は、ヒト XPV タンパク質と全体で80.3%の同一性を示した。

2）組換え mXPV タンパク質は、ヒト XPV タンパク質と同様に、紫外線により生じるメインな損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマーを乗り越えて複製できる DNA ポリメラーゼ活性を有していた。

3）*mXPV* cDNA もヒト *XPV* cDNA も XP－V 群細胞に形質転換したときに、そのカフェイン存在下での紫外線感受性を相補した。

4）*mXPV* は調べたマウス組織において、少なくとも mRNA レベルで普遍的に発現していた。特に精巣、肝臓、皮膚、胸腺など、増殖している細胞を多く含む組織において高い発現が見られた。

5）細胞周期に同調させた細胞における *mXPV* の発現を調べたところ、DNA 合成の上昇に伴って発現の上昇が見られ、XPV ポリメラーゼが細胞増殖時に機能している可能性を示唆した。

6）*XPV* 遺伝子の欠損したマウスを作出するために、*XPV* 遺伝子の真ん中をネオマイシン耐性遺伝子で置換したター

ゲッティングベクターを構築し、ES細胞に導入した。キメラマウスを作成し、野生型マウスとの交配により、ノックアウトした*XPV*遺伝子アリルの生殖細胞系列への伝播を確認した。続いてヘテロ接合型マウス同士の交配によりホモ変異マウスの作出を試みたが、現時点ではホモ変異体は得られておらず、マウスにおいては*XPV*遺伝子のヌル変異体は胎生致死である可能性が示唆された。

以上のように、本論文はヒトのDNA損傷乗り越え複製機構や発がん機構の研究に対して、有用な知見を明らかにしており、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいものと考える。