

高発癌性遺伝疾患における欠損因子に関する研究

Protein factors defective in cancer-prone hereditary diseases

代表研究者	熊本大学医学部教授 Prof., School of Medicine, Kumamoto Univ. Masaru YAMIZUMI	山 泉 克
協同研究者	熊本大学医学部助手 Assist., School of Medicine, Kumamoto Univ. Tatsuo SUGANO	菅 野 辰 生
	熊本大学医学部研究生 Research Fellow, School of Medicine, Kumamoto Univ. Hiroshi ASAHINA	朝 比 奈 宏

Xeroderma pigmentosum (XP) is an autosomal recessive disease and patients afflicted with this disease show a photo-sensitivity and often develop various type of skin cancer. Cells isolated from these patients have increased sensitivity to ultraviolet irradiation and there are defects in repair processes of UV-induced DNA damage. In cell hybridization experiments, at least eight genetic complementation groups (A-H) were identified, thus, at least eight gene products are assumed to be involved in repair of UV-induced DNA damage in human cells. UV-irradiated cells of every complementation group recover a normal level of unscheduled DNA synthesis (UDS) after introduction of endonuclease of T4 phage, an endonuclease which nicks specifically at pyrimidine dimers. Loss of endonuclease-sensitive sites (ESS) in DNA recovered from UV-irradiated XP-cells is severely defective, as compared to normal cells. These results suggest that XP cells have defects at either the incision or preincision step of the excision repair process. However, little is known of how UV-induced DNA damage is repaired in human cells and how the XP gene products function in this process as factors required for this process have not been purified.

We report here the first identification and characterization of protein factors which are defective in XP cells of group A and group C. A protein factor which corrects the defect of group A of XP cells was detected in cell extracts prepared from various species. The activity of this factor was measured by restoration of UDS in UV-irradiated XP-A cells after microinjection. Native molecular mass of this factor in calf thymus extract was estimated to be 80 kDa, by gel-filtration, and 25 kDa by glycerol gradient. The activity was, however, recovered at 43 kDa after renaturation from SDS-PAGE gels. In parallel, the isoelectric point was 7.5 after renaturation from IEF gels. These values were obtained with a partially purified sample. This factor was then identified by two-dimensional gel electrophoresis, using a sample highly purified from SDS-PAGE gels. Purified protein stimulated UDS specifically in group A of XP cells and endowed a normal level of UV-resistance to XP-A cells. These XP-A cells also showed a normal level of UDS after treatment with either 4HAQO or psoralen plus UV-A.

A protein factor which is defective in XP-C cells was detected in nuclear extracts prepared from various species. This factor was very stable in nuclei of XP-C cells with no detectable decrease in its activity for at least 48 hr. Native molecular mass of this factor was estimated to be 600 kDa, by gel-filtration, and 180 kDa by glycerol gradient. The 600 kDa fraction obtained by gel-filtration stimulated UDS only in XP-C cells.

研究目的

色素性乾皮症 (*Xeroderma pigmentosum*, 以下 XP) は皮膚癌を高発する常染色体性劣性の遺伝疾患である。患者由来の培養細胞は紫外線に対し高い感受性を示す。またこれらの細胞では、紫外線照射により DNA 上に形成されるピリミジン 2 量体の除去がほとんど認められない。したがって XP における病因は DNA 除去修復反応での初期段階における欠損によるものであることが示唆されてきた。一方 XP には現在 8 群 (A 群~H 群。これまで 9 群あると言われていたが、9 番目の I 群は実は C 群の混入であることが最近判明し、8 群と訂正された) の遺伝的相補性群が見つかっており、ヒト細胞における DNA 除去修復には少なくとも 8 つの因子が関与していることが考えられている。これらの XP 細胞欠損因子の機能を明らかにすることは、単にヒト細胞における DNA 修復機構の解明にとどまらず、ヒトにおける発癌と DNA 修復との関係を明らかにするための新しい糸口ともなり、今後解決すべき重要な研究課題の一つだと考えられる。

本研究は上記遺伝的相補性群のうち、臨床症状が重篤でしかも発症頻度の高い A 群および C 群 XP 細胞における欠損因子を精製し、それらの機能を解析しようとするものである。

研究経過と成果

1) 正常細胞抽出液中に検出される各種 XP 細胞欠損因子の細胞内分布、分子量および細胞内安定性

HeLa 細胞抽出液を顕微鏡下で微小ガラス針を使って XP 細胞に注入し、紫外線照射した後 ³H-チミジンを取り込ませ、オートラジオグラフィで不定期 DNA 合成 (unscheduled DNA synthesis; UDS) を調べることにより、各種 XP 細胞欠損因子の活性を検出することができる。この方法により、我々はすでに A 群 XP 細胞欠損因子 (XP-A cell complementing factor; XP-ACF) の未変性状態での分子量が 160 kDa 及び 90 kDa であることを明らかにした。今回 HeLa 細胞中に見いだされる他の XP 細胞欠損因子が核内に存在するのがあるいは細胞質中に存在するのかを明らかに

表 1. XP 細胞欠損因子の細胞内分布

Location	Complementation group							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Cytoplasm	+	-	-	+	-	+	-	-
Nucleus	+	+	+	+	+	+	+	+

するため、低張液処理により膨張させた後ホモジェナイズして細胞を壊し、遠心により、上清の細胞質画分と沈査の核画分に分け、各々より抽出液を調整した。各々の抽出液を 8 群の XP 細胞に注入して不定期 DNA 合成量の変化を調べた。表 1 に示すように、A, D, F 群 XP 細胞欠損因子は核及び細胞質に検出されるのに対し、その他の群の XP 細胞欠損因子は核にのみ検出された。後述するように大部分の XP 細胞欠損因子は細胞質で合成された後、数時間で核内へ移行すると思われることから、細胞質中にも活性の見いだされる A, D, F 群 XP 細胞欠損因子の合成量はこれ以外の欠損因子より多いことが考えられる。しかしながらもう一つの可能性としては、これら 3 群の欠損因子は核との結合が弱く、細胞質抽出液を調整している間に核より漏出したとも考えられる。現在のところ真相は不明である。

HeLa 細胞抽出液を特定の XP 細胞に継時的に注入した後、紫外線照射して不定期 DNA 量の変化を調べることにより、その XP 細胞に対応する欠損因子の細胞内安定性を調べることができる。8 群の XP 細胞のうち 5 群 (A, B, C, D, F) について調べることができた。それらの結果まとめたのが図 1 である。5 群のうちもっとも早く分解してゆくのが A 群 XP 細胞欠損因子で、その半減期は約 16 時間である。その他の群の欠損因子の中では C 群欠損因子が非常に安定で約 2 日の間、活性の減少が観察されなかった。B, D, F 群欠損因子はこれらの中間の安定性を示した。いずれにせよ、少なくとも今回調べることでできた 5 群の XP 細胞欠損因子は、細胞内では相当安定であり、このことは、タンパク合成阻害剤により、新規のタンパク合成を抑えても少なくとも 24 時間は正常細胞において不定期 DNA 合成量に変化しない

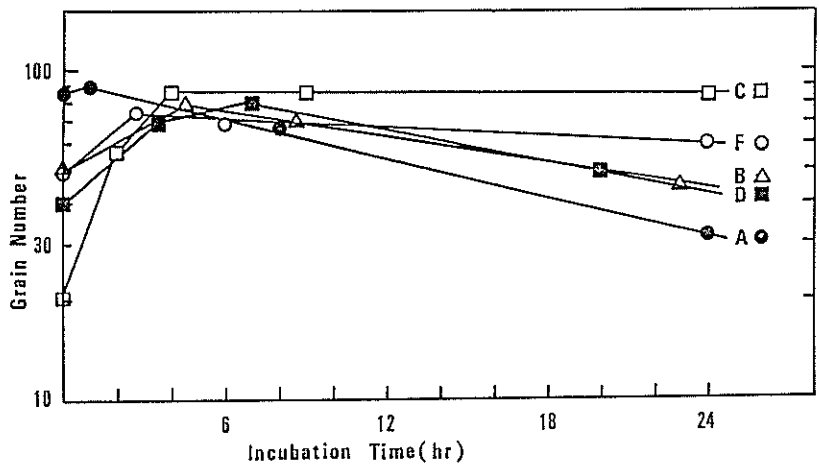


図1. 各種 XP 細胞欠損因子の細胞内での安全性.

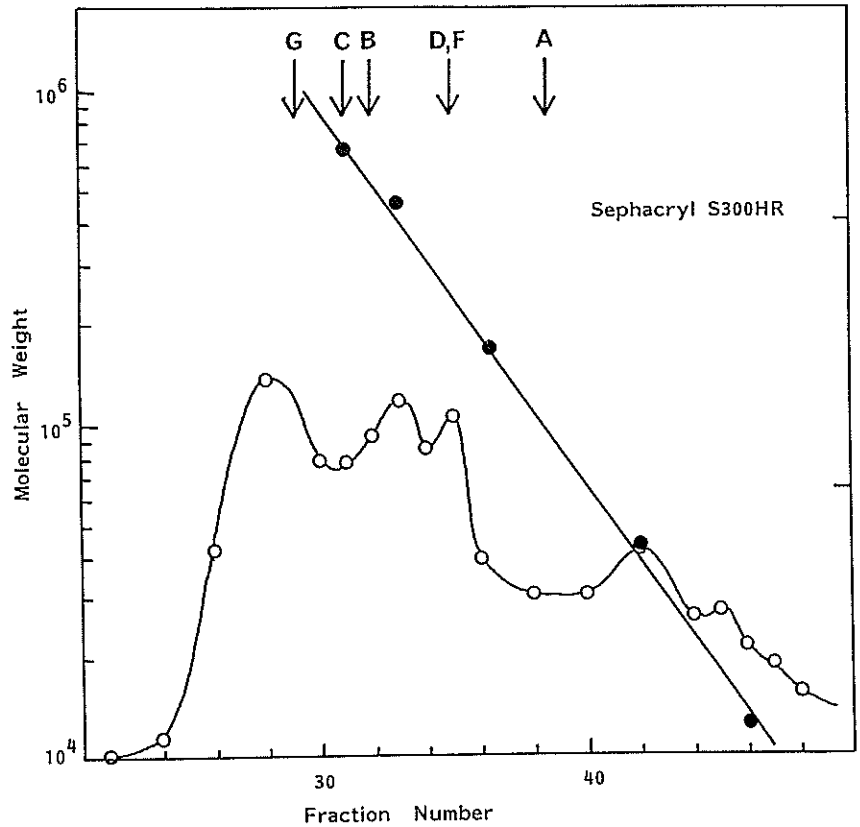


図2. HeLa 細胞抽出液中に含まれる各種 XP 細胞欠損因子のゲルろ過による分子量.
 (○): A280 で測定したタンパク量, (●): マーカートンパクの位置から推定される分子量直線.

表 2. A 群 XP 細胞欠損因子 (XP-ACF) のまとめ

Purification step	Vol (ml)	Protein (A_{280})	Activity	End-point
Crude extract	800	13	+	1
Step 1 Bio-Rex 70	30	8	+	6
Step 2 Ammonium sulfate	14	4	+	ND
Step 3 DE 52	9	2.7	+	ND
Step 4 ss-DNA agarose	2	0.5	+	100
Step 5 SDS-PAGE	0.01	ND	+	ND

XP-ACF の活性 (activity) は UDS 量より -, +, #, ## の 4 段階で示す。また各精製段階標品を段階希釈して (+) 活性を示す最大希釈率も同時に End-point で示す。ND: not determined.

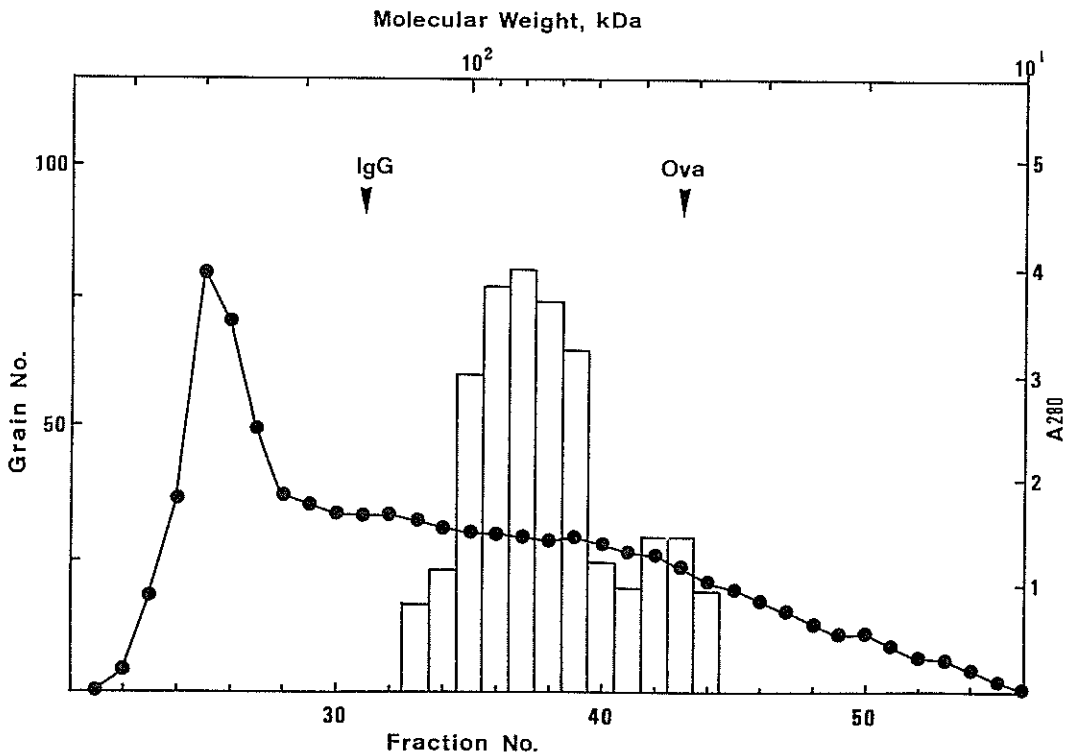


図 3. ゲルろ過 (Sephadex G 200) による A 群 XP 細胞欠損因子の分子量。
(●): A_{280} で測定したタンパク量。

という Gautschi らの観察 [*Exp. Cell Res.*, 76, 87-94 (1973)] を裏づけるものと思われる。

HeLa 細胞抽出液をゲルろ過し、各分画をそれぞれの XP 細胞に注入して不定期 DNA 量を調べることにより、未変性状態での XP 細胞欠損因子の分子量を決定することができる。今までのところ 8 群中 6 群の欠損因子 (A, B, C, D, F, G) の大き

さを知ることができた。図 2 はこれらの結果をまとめたもので、D, F 群欠損因子が共に 240 kDa である以外は 100 kDa から 1,000 kDa の間の別々の分画に活性が検出される。このゲルろ過は 0.6 M KCl 存在下で行われているため、断言はできないが、これらの DNA 修復因子は平常時には核内ではばらばらの状態で存在しているが、紫外線

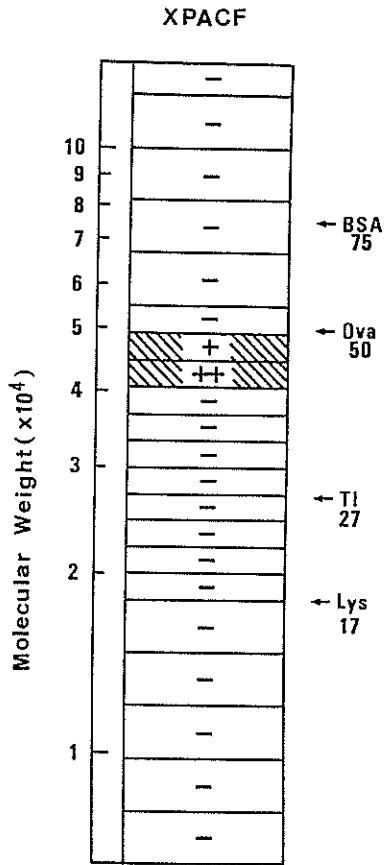


図4. SDS-PAGE ゲルからの活性回復法で決定された A 群 XP 細胞欠損因子の分子量。

照射により DNA 上に損傷が生じると、一定の順序に従ってこれらの因子が損傷 DNA 上で会合し、複合体を形成して何らかの酵素活性が出るモデルを我々は想定している。

(2) A 群 XP 細胞欠損因子の同定

A 群 XP 細胞欠損因子 (XP-ACF) の活性はいろいろな動物種由来の組織抽出液中に検出される。我々が調べた中ではアフリカツメガエル卵が、進化的にヒトと最も隔った動物であった。後でわかったことであるが XP-ACF は細胞成分としては minor component であり、その分離・同定にはかなりの量の組織が必要であることが予想された。以下の精製には比較的活性の高い抽出液が得られることから、仔牛胸腺を出発材料として

用いた。精製の後半で単鎖 DNA-アガロース (ss-DNA agarose) カラムを用いるが、この時大量の核のタンパクが混入していれば、XP-ACF との分離が困難となるため、遠心で核を落とした上清を 5 段階の過程で精製した。全過程をまとめたのが表 2 である。精製過程で興味深いことは、XP-ACF は同一条件下で (イオン強度, pH) 陽イオン交換体 (Bio-Rex 70) にも陰イオン交換体 (DEAE-cellulose) にも結合することで分子上不均等な荷電の分布が予想される。第 4 段階 (ss-DNA) で少なくとも 2,500 倍は精製されたことになる。この精製段階で活性の濃縮化がなされ、次のステップである変性ゲルからの活性の回収が可能となった。

ウシ組織由来の XP-ACF の分子量を種々の方法を用いて調べて見たところ、たいへん奇妙な結果が得られた。Sephadex G200 を用いて未変性状態での分子量は約 8 kDa であった (図 3)。ところが、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、ゲルを細断し、各ゲル断片より変性タンパクを溶出させた後、アセトンで SDS を除去して回復 (renaturation) させると図 4 に示すように活性は 43 kDa 相当部分に認められた。最初我々はゲルろ過で認められる 80 kDa のタンパクは、SDS-PAGE の結果得られた 43 kDa タンパクの 2 量体もしくは、他のタンパクとの会合体と考えた。しかし、同一標品をグリセロールの密度勾配遠心 (10~30%) にかけてみたところ、XP-ACF 活性は分子量 25 kDa 相当部分から検出された (図 5)。これらの結果がどのような理由によるのかはわからないが、我々は今のところ次のように考えている。恐らく XP-ACF は球状タンパクでなくしかも分子上の荷電分布が不均等がと思われる。このようなタンパクはゲルとの相互作用の結果、ゲルろ過では早く流れ見掛け上分子量としては大きな値が得られるのに対して、SDS-PAGE 及びグリセロール密度勾配遠心では移動が遅くなり、見掛け上分子量は SDS-PAGE では大きめ、グリセロール密度勾配では小さめの値となる可能性が十分ある。したがって XP-ACF の真の分子量は 25 kDa~43 kDa の間ではないか

と考えられる。

次に XP-ACF の等電点 (pI) を決める実験を

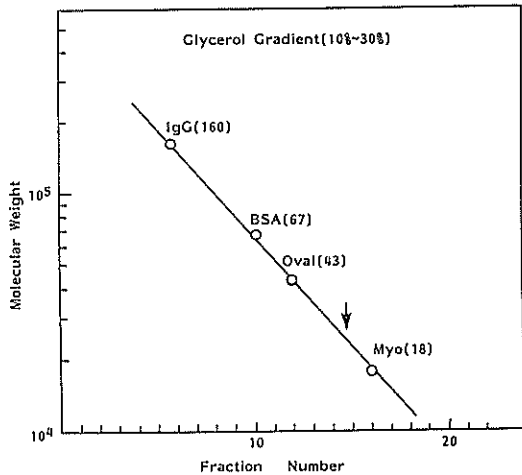


図5. グリセロール密度勾配遠心で得られるA群XP細胞欠損因子の分子量。(○): マーカータンパクの位置。矢印はA群XP細胞欠損因子の位置を示す。

行った。この実験では、ディスク型の泳動装置を使って、変性条件下(8.5 M Urea, 2%NP-40)で泳動を行った後、ゲルより変性タンパクを溶出させ、透析により変性剤を除去して活性の回復を計った。図6に示すように、XP-ACFの活性はpH7.5付近のゲル断片からのみ検出された。

XP-ACFタンパクを同定するため、精製の各段階で、活性の強弱と一致するタンパクバンドがSDS-PAGEで見つからないかどうか調べて見たが、不成功に終わった。幸いにも、SDS-PAGEゲルからの活性の回復実験より、XP-ACFの分子量が43 kDaであることがわかったので、精製の後半の段階で得られた標品(ss-DNA アガロース)を10~30%のグリセロール密度勾配遠心にかけ分画した。各分画のXP-ACF活性とSDS-PAGEによるタンパクパターンを対応させて見たところ、minor componentではあるが、43 kDaのタンパクが認められた。またss-DNAアガロース標品をSDS-PAGEで見ると43 kDa付近にはタン

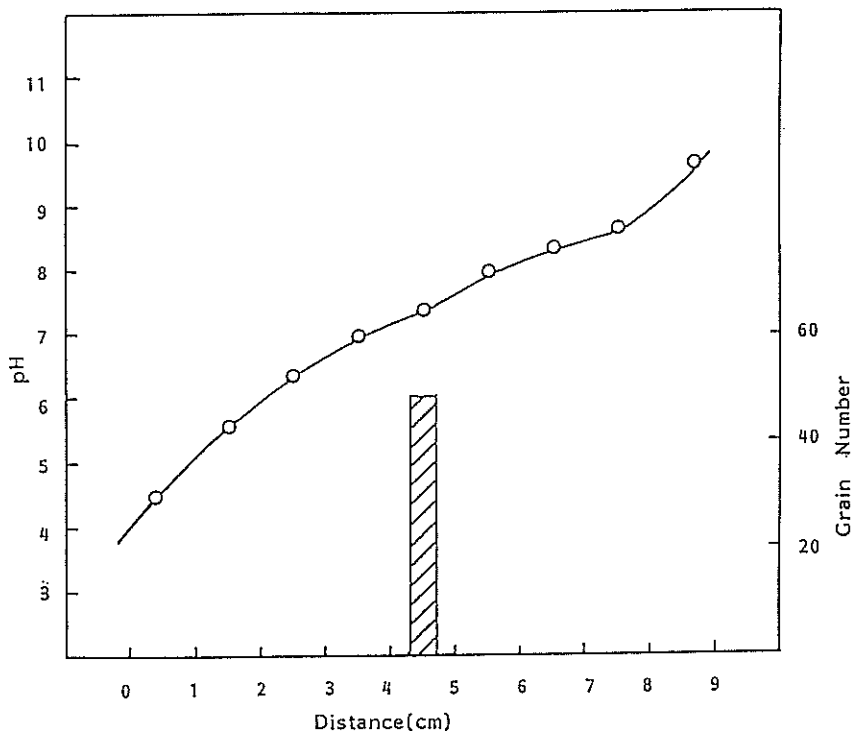


図6. A群XP細胞欠損因子の等電点。

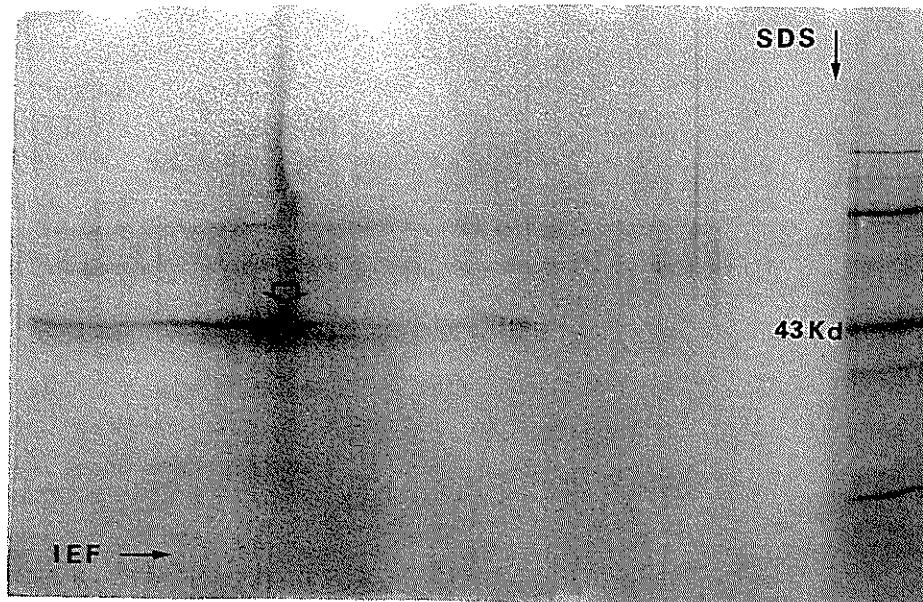


図7. A群XP細胞欠損因子の2次元電気泳動による同定. 矢印で示す.

表3. 精製したA群XP細胞欠損因子の作用特異性

Cell	Complementation group	UDS	
		Step 4	Step 5
XP27OS	A	+	+
CRL1199	B	-	-
GM3176	C	-	-
GM0435	D	-	-
GM2415	E	-	-
XP2YO	F	-	-
GM3021A	G	-	-
GM3248	H	-	-

バンドが少ないことがわかったので、ゲルから溶出させて得られたXP-ACF標品はこの段階で非常にきれいになっていることが予想される。我々はすでにこのタンパクの等電点を決定していたので、ゲルから溶出して得られたタンパクをさらに2次元電気泳動にかけてみたところ、予想される分子量ならびに等電点をもつmain spotを検出することができた(図7)。XP-ACFの精製はこれまで大変困難だと考えられてきたが、ここに

表4. A群XP細胞欠損因子(XP-ACF)注入によるUV以外のDNA損傷修復能の回復

Cell	Injection of XP-ACF	Grain number	
		4HAQO	TMP
XP27OS	(-)	2	1
	(+)	97	31
NSF	(-)	105	27

TMP: Trimethyl psoralen, NSF: 正常ヒト細胞, (+), (-)は injectionの有無を示す.

示したような独自の方法により、最終的な同定に成功することができた。

HaLa細胞由来のXP-ACFの分子量はゲルろ過によりこれまで160 kDa及び90 kDaであることをすでに明らかにしてきたが、今回さらにウシ由来のXP-ACFの分子量決定に用いたと同様な手法でSDS-PAGEゲルからの活性の回復実験を試みた。ヒトXP-ACFもSDS-PAGE上では43 kDaのタンパクであることもわかった。XP-ACF活性が各種の動物細胞抽出液中にも検出されることを考え合わせると本タンパクが、進化の過程で保存されてきた重要なタンパクであること

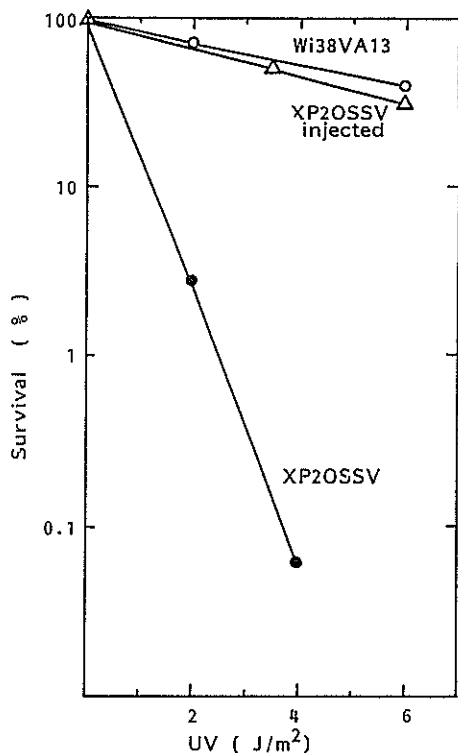


図8. 精製したA群XP細胞欠損因子をA群XP細胞に注入した場合に見られる紫外線抵抗性。XP2OSSV: SV40でトランスフォームしたA群XP細胞。Wi38VA13: SV40でトランスフォームした正常細胞。

が考えられる。

我々が精製してきたタンパクが、特異的な働きをもっているかどうかを調べるため、他のB群～H群XP細胞に注入してUDS量の変化を見てみたが、表3に示すように本タンパクはA群XP細胞でのみUDS量を高める働きのあることがわかり、特異的であることを証明することができた。

以上のようにXP-ACFはA群XP細胞において紫外線照射後のUDS量を正常レベルに戻すことができるのであるが、これらのA群XP細胞は紫外線に対し抵抗性になっているのであろうか。図8に示すように、少なくとも6J/m²までの紫外線に対してはほぼ正常細胞レベルの生存率を示した。

XP細胞は紫外線のみならず、紫外線様のDNA障害作用をもつと言われる4NQOやソラレンといった化学物質による損傷の修復にも欠陥をもつことが示されている。そこで我々の精製したXP-ACFをA群XP細胞に注入し、これらの細胞を上記化学物質で処理した後不定期DNA合成量の変化を調べて見たところ、表4に示すように正常細胞レベルのUDSが認められた。

(3) C群XP群細胞欠損因子の精製

C群XP群細胞欠損因子の精製はマウス腹水癌細胞の核抽出液を出発材料として行った。本因子は単離核を生理的食塩水で洗浄しても遊離してこないことから核内の構造物、恐らくDNAと強く結合して存在していると推定される。DNA-セルロースカラムに結合させた後の溶出条件を調べてみると2本鎖DNAよりも単鎖DNAに強く結合する性質のあることがわかった。すでに述べたように本因子はいったん合成された後核内に入ると大変安定で、少なくとも2日間は活性の減少が検出されなかった。本因子の推定分子量はゲルろ過では600kDa、グリセロール密度勾配遠心では180kDaであった。A群XP細胞欠損因子の場合と同様本因子も線維状タンパクである可能性が考えられる。

(4) A群XP細胞欠損因子の機能について

本因子の機能に関してはDNA結合能のあること以外に今のところ所見はない。ただ最近Cleaverらにより、XP-A細胞から紫外線抵抗性を示す復帰変異細胞が分離され、この細胞でのDNA損傷の修復を調べたところ、6-4光産物と呼ばれるタイプの損傷は修復されているのに、ピリミジン2量体の修復は検出されないことが明らかになった[Mol. Cell. Biol., 7, 3353~3357 (1987)]。このことから、XP-ACFが何らかの形でDNA損傷部位の認識にかかわっていることが示唆される。そこで我々はピリミジン2量体を分子内に1個だけもった75塩基よりなる2本鎖DNAを合成し、これを基質として精製したXP-ACFを加えgel-retardation法により、ピリミジン2量体に対する結合能の有無を調べてみたが、結合能は検出されなかった。

今後の課題

ヒト細胞における紫外線による DNA 損傷の修復機構ならびに発癌機構を解明するための第一歩として、A 群・C 群 XP 細胞の欠損因子の精製を開始し、A 群欠損因子については今回初めて精製することに成功した。本因子は細胞当りに含まれる分子数が少なく、精製は大変困難であったが、幸いにも本因子の活性が変性状態から回復されることが可能であることがわかり、その分子量およびに等電点を初期精製段階の標品を用いてまず決定し、次に部分精製した標品を用いて、2 次元電気泳動でタンパクポットを決定するという新しい手法の開発・導入で可能となった。

今後他の XP 細胞欠損因子を含め、これら複数の因子が DNA 損傷修復の過程でいかなる役割を果たしているのかの解析を進めなければならないが、そのためには何より無細胞系での DNA 修復反応の再構成がなされなければならないと考える。このため我々はすでにピリミジオン 2 量体を 1 個だけ分子内に有する 75 塩基の 2 本鎖 DNA を作り、これを基質として無細胞系での反応系を開発しつつある。この系を用いて A 群 XP 細胞欠損因子にはピリミジオン 2 量体との結合性が検出されないことが今回明らかにされたが、今後の研究の発展が期待される。

研究発表

- 1) T. Sugano, T. Uchida and M. Yamaizumi: Identification of a specific protein factor defective in group A *Xeroderma pigmentosum*, submitted to *J. Biol. Chem.*
- 2) M. Yamaizumi, T. Sugano, H. Asahina and T. Uchida: A stable nuclear protein with a high molecular weight corrects a defect in DNA repair of *Xeroderma pigmentosum* cells of complementation group C. submitted to *Mut. Res.*
- 3) 菅野辰生, 朝比奈 宏, 山泉 克: 色素性乾皮症 A 群欠損因子の精製, 第 32 回日本放射線影響学会 (平成元年 8 月, 北九州).
- 4) 山泉 克, 菅野辰生, 朝比奈 宏, 高崎芳成: 紫外線による DNA 損傷の修復合成における polymerase δ の関与, 第 32 回日本放射線影響学会 (平成元年 8 月, 北九州).
- 5) 山泉 克: ヒト細胞における紫外線による DNA 損傷の修復因子, 第 48 回日本癌学会ワークショップ (平成元年 9 月, 名古屋).
- 6) M. Yamaizumi: Protein factors involved in DNA repair of ultraviolet-induced damage in human cells, 日仏がん研究協力計画第 4 回ワークショップ (平成元年 11 月, 京都).
- 7) 山泉 克, 菅野辰生: A 群色素性乾皮症細胞に欠損する特異的タンパク因子の同定, 第 49 回日本癌学会 (平成 2 年 7 月, 札幌).
- 8) 山泉 克: 紫外線高感受性遺伝疾患発症の分子機構, 第 14 回阿蘇シンポジウム (平成 2 年 8 月, 熊本).