

5) 色素性乾皮症A群の分子遺伝学的解析

大阪大学細胞工学センター (主任: 岡田善雄教授)

里方 一郎・田中亀代次

Molecular Basis of Group A Xeroderma Pigmentosum

Ichiro SATOKATA and Kiyoji TANAKA

*Institute for Molecular and Cellular Biology, Osaka University**(Director: Prof. Yoshio OKADA)*

The molecular basis of group A xeroderma pigmentosum (XP) was studied and 3 mutations of the XP group A complementing gene (XPAC) were identified. One was a G→C transversion at the 3' splice acceptor site of intron 3, which caused aberrant RNA splicing resulting in loss of enzyme activity of the XPAC protein. This transversion creates a new cleavage site for the restriction nuclease AlwN I. Analysis of AlwN I restriction fragment length polymorphism (RFLP) showed a high frequency of this mutation in Japanese patients with group A XP: 16 of 21 unrelated Japanese patients were homozygous and 4 were heterozygous for this mutation. The second mutation was a nucleotide transition altering the Arg-228 codon (CGA) to a nonsense codon (TGA). Of 21 unrelated Japanese group A XP patients examined, one was a homozygote for this mutation and 3 were compound heterozygotes for this mutation and for the splicing mutation of intron 3. The third mutation was a nucleotide transversion altering the Tyr-116 codon (TAT) to a nonsense codon (TAA). Of the Japanese patients, 2 had this mutant allele. The latter two mutations create new cleavage sites for the restriction nucleases Hph I and Mse I, respectively. Our data indicate that almost all Japanese cases of group A XP are caused by one or more of these 3 mutations. Therefore, by RFLP analysis of PCR-amplified DNA sequences using the 3 restriction enzymes described above, rapid and reliable diagnosis of group A XP can be achieved in almost all Japanese subjects including prenatal cases and carriers.

Key words: xeroderma pigmentosum, XPAC gene, DNA polymorphism
色素性乾皮症, XPAC 遺伝子, DNA 多型

Reprint requests to: Ichiro SATOKATA,
Institute for Molecular and Cellular
Biology, Osaka University, 1-3,
Yamada-oka, Suita, Osaka 565, JAPAN.

別刷請求先: 〒565 吹田市山田丘1-3
大阪大学細胞工学センター
里方 一郎

緒 言

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¹⁾。病因として、損傷した DNA の修復機構の欠陥が考えられている²⁾。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。A~H 群については、DNA の除去修復機構の異常が指摘されている³⁾。variant については、複製後修復に欠陥があるとされている³⁾。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ている。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⁴⁾。このマウスの XPAC 遺伝子をプローベにして、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⁵⁾。ヒトの XPAC 遺伝子は、273 個のアミノ酸をコードしており、2 つのポリ A 付加シグナルを有する。また、この遺伝子は、zinc finger motif を有しており、この遺伝子の産物である XPAC 蛋白は、DNA 結合タンパクであることが推測された。さらに、ヒトの XPAC cDNA をプローベにして、全長約 25 kb、6 個のエクソンよりなるヒトのゲノム XPAC 遺伝子をクローニングした⁶⁾。今回、私たちは、日本人 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、その変異を明らかにし、さらに、日本人 XP A 群の DNA 診断法を開発した⁷⁾⁸⁾ ので報告する。

方法ならびに結果

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 をプローベにして、ノーザンブロットを行った (Fig. 1)。いずれの患者細胞の XPAC mRNA も正常対照に比べて小さく、量的には減少していた。これらの患者細胞の中で、XP2OS 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 をプローベにして、XP2OS の XPAC 遺伝子をクローニングした。5' フランキング領域およびフランキングイントロンを含む第 1 から第 6 エクソン領域のシーケンス解析の結果、第 3 イントロン・アク

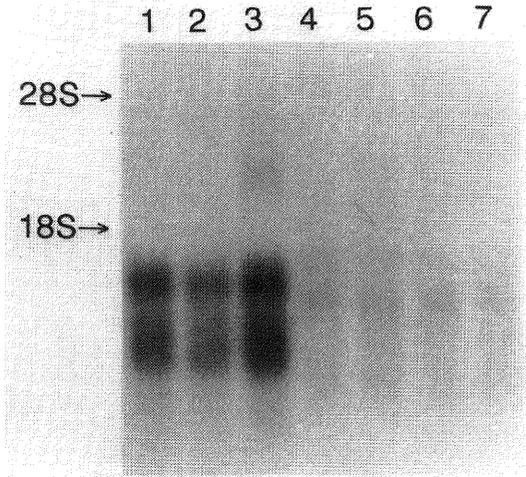


Fig. 1 Northern blot analysis of poly(A)⁺ RNA (10 μg each) from patients with group A XP (lane 4-7) and normal controls (lane 1-3) with the Pst I-Rsa I fragment of the human XPAC cDNA as a probe. Lane: 1, WI38VA 13; 2, GM130; 3, GM131; 4, XP2OS; 5, XP78TO; 6, XP84TO; 7, XP96TO. Two bands in normal controls are due to alternative polyadenylations. The XPAC mRNAs of group A XP cells were smaller than that of normal controls and amounts were markedly reduced.

セプターの AG→AC に点突然変異していることが判明した (Fig. 2)。この変異により、制限酵素 AlwN I の認識部位が第 4 エクソン内に新たに生じた。Polymerase Chain Reaction (PCR) によりフランキングイントロンを含んだ第 4 エクソン領域を増幅し、AlwN I による Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) を調べたところ、XP2OS は、この変異について homozygote であることが判明した (Fig. 3)。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、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 エクソンの最初の 2 塩基 (AG) のみが欠損しているタイプ (XPAC def I RNA) と第 3 エクソン全体および第 4 エクソンの最初の 2 塩基が欠損しているタイプ (XPAC def II RNA) の 2 種が主に存在していることが判明した (Fig. 4)。XPAC def I mRNA では、フレームシフトをきたし、第 4 エクソ

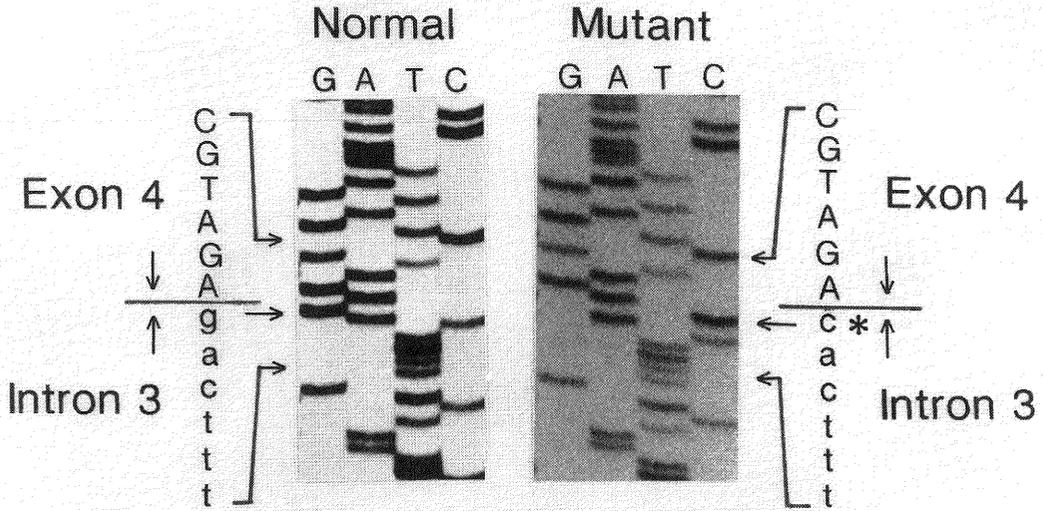
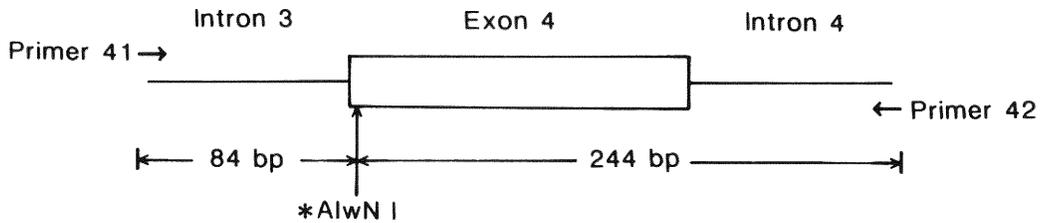


Fig. 2 DNA sequence analysis of the 3' splice acceptor site of intron 3. This comparison of the normal and mutant (XP2OS) sequences at the intron/exon border shows a single base substitution (asterisk) in the mutant.

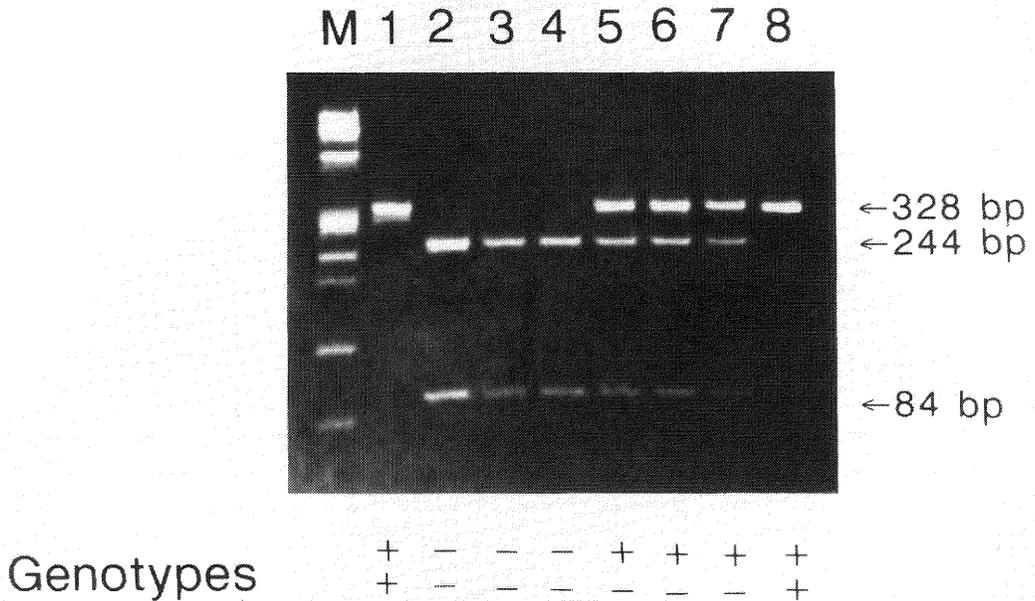
ン内に終止コドンを生じる。この結果により、XP2OS細胞では、RNA スプライシング異常が生じていることが示された。このスプライシング変異の頻度を知るため、XP A 群 34 例（日本人 21 例，白人 11 例，黒人 2 例），他の XP 群 8 例，正常対照 4 例について PCR による AlwN I RFLP を調べた（Table 1）。その結果，血縁関係のない日本人 21 例中，16 例（76%）が homozygote，4 例（19%）が heterozygote であり，日本人 XP A 群患者では，極めて高率にこの変異が認められることが判明した。この変異は，他の人種の XP A 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と考えられた。さらに，この変異について homozygote である患者 XP84TO 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（Fig. 5）。

次に，このスプライシング変異について heterozygote である患者（XP75TO，XP27OS，XP67TO）および，この変異を全く有さない患者（XP39OS）について，変異を調べた。ノーザンプロットでは，XP39OS では，正常対照とほぼ同量の正常サイズの mRNA が認められた。XP75TO，XP27OS，XP67TO では，mRNA

の量は減少し，小さなサイズの mRNA が認められた（Fig. 6）。XP39OS は，皮膚症状および神経症状が軽微であり，非典型的 A 群として報告されている⁹⁾¹⁰⁾。XP39OS 細胞から cDNA ライブラリーを作製し，ヒト XPAC cDNA をプローブにして，XP39OS の XPAC cDNA をクローニングした。得られたクローン 6 個についてシーケンス解析を行ったところ，いずれのクローンも，コドン 228 の Arg (CGA) が，終止コドン (TGA) に変異していることが判明した（Fig. 7）。この変異により，制限酵素 Hph I の認識部位が第 6 エクソン内に新たに生じた。PCR により第 6 エクソン領域を増幅し，Hph I による RFLP を調べたところ，XP39OS は，この変異について homozygote，母親は，保因者であることが判明した（Fig. 8）。XP75TO，XP27OS，XP67TO については，PCR により，5' フランキング領域およびフランキングイントロンを含む第 1 から第 6 エクソン領域を増幅し，シーケンス解析を行った。その結果，XP75TO と XP27OS は，第 3 イントロンのスプライシング変異とコドン 228 のナンセンス変異よりなる compound heterozygote であることが判明した。PCR による Hph I RFLP を日本人 XP A 群患者 21 例について調べたが，XP3KR も，同様の変異よりなる compound heterozygote であることが判明した。XP67TO



a



b

Fig. 3-a) Diagram of the positions of PCR primers and the location of the new AlwN I site (asterisk) generated by the nucleotide transversion.

b) AlwN I RFLP analysis of amplified DNAs. Aliquots of PCR products were digested with AlwN I and then analyzed on 8% acrylamide gel. Lane: 1, WI38VA13; 2, XP2OS; 3, XP84TO; 4, XP10OS; 5, XP67TO; 6, XP75TO; 7, XP27OS; 8, XP12BE. The marker lane (M) contains a Hae III-digest of ϕ X174 DNA. The genotypes of AlwN I RFLP are shown under the photograph; a plus sign denotes the presence of the 328bp band, and a minus sign the presence of the 244bp and 84bp bands.

Table 1 AlwN I Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in 42 patients with XP and 4 normal controls

Subjects	Genotype *	Subjects	Genotype *
Normal controls		Group A XP	
WI38VA13	+ / +	Caucasian	
HeLa	+ / +	GM82	+ / +
GM130	+ / +	GM544B	+ / +
GM131	+ / +	GM710A	+ / +
Group A XP		GM1630	+ / +
Japanese		GM2009	+ / +
XP2OS	- / -	GM2062	+ / +
XP6TO	- / -	GM2990	+ / +
XP7TO	- / -	GM2994	+ / +
XP31TO	- / -	XP12RO	+ / +
XP32TO	- / -	XP12BE	+ / +
XP35TO	- / -	XP8LO	+ / +
XP54TO	- / -	Black	
XP78TO	- / -	GM2090	+ / +
XP84TO	- / -	GM2033	+ / +
XP87TO	- / -	Group B XP	
XP96TO	- / -	GM2252	+ / +
XP3OS	- / -	Group C XP	
XP10OS	- / -	GM2246	+ / +
XP15OS	- / -	Group D XP	
XP35OS	- / -	GM2486	+ / +
XPEMB-1	- / -	Group E XP	
XP67TO	+ / -	XP24KO	+ / +
XP75TO	+ / -	Group F XP	
XP27OS	+ / -	XP2YO	+ / +
XP3KR	+ / -	Group G XP	
XP39OS	+ / +	XP3BR	+ / +
		Group H XP	
		GM3248	+ / +
		Variant XP	
		XP2SA	+ / +

* A plus sign denotes the presence of a 5.2 kb AlwN I RFLP band, and a minus sign the presence of a 0.7 kb AlwN I RFLP band.

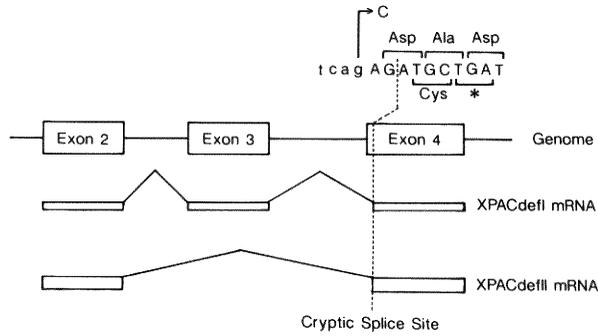


Fig. 4 Processing of mutant transcripts. A part of the XPAC gene is shown, with exons represented by open boxes and introns by thin lines. The two different mRNAs produced by the mutant gene are shown below; exons are shown as open boxes, with splices indicated by carets. The nucleotide sequences of the 3' splice acceptor site of intron 3 are shown at the top of the figure. The location of the mutation is shown by an arrow, and that of the 3' cryptic splice site by a vertical dashed line. The abnormal splicing results in a frameshift and a new stop codon (asterisk) in XPACdefI mRNA.

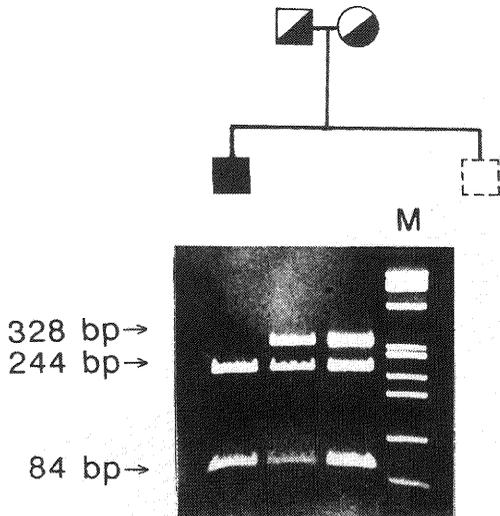


Fig. 5 Pedigree of XP84TO analyzed by AlwNI polymorphism in amplified DNAs. The marker lane (M) contains a HaeIII-digest of ϕ X174 DNA.

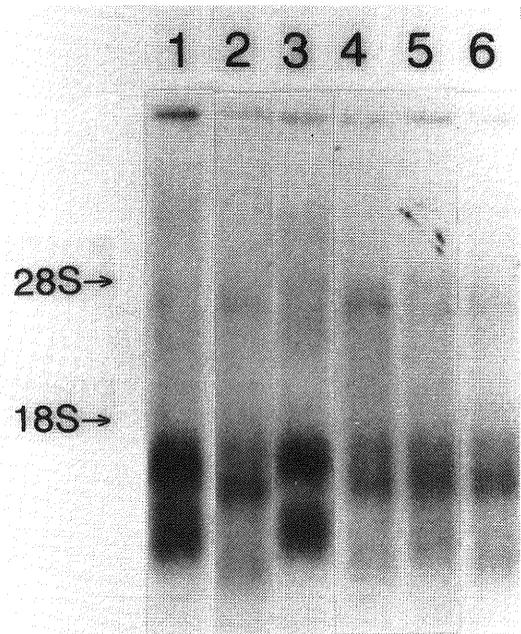


Fig. 6 Northern blot analysis of poly(A)⁺ RNA (10 μ g each) from group A XP patients (lane 2-6) and a normal control (lane 1) with the Pst I-Rsa I fragment of the human XPAC cDNA as a probe. Lane: 1, WI38 VA13; 2, XP2OS; 3, XP39OS; 4, XP27OS; 5, XP75TO; 6, XP67TO.

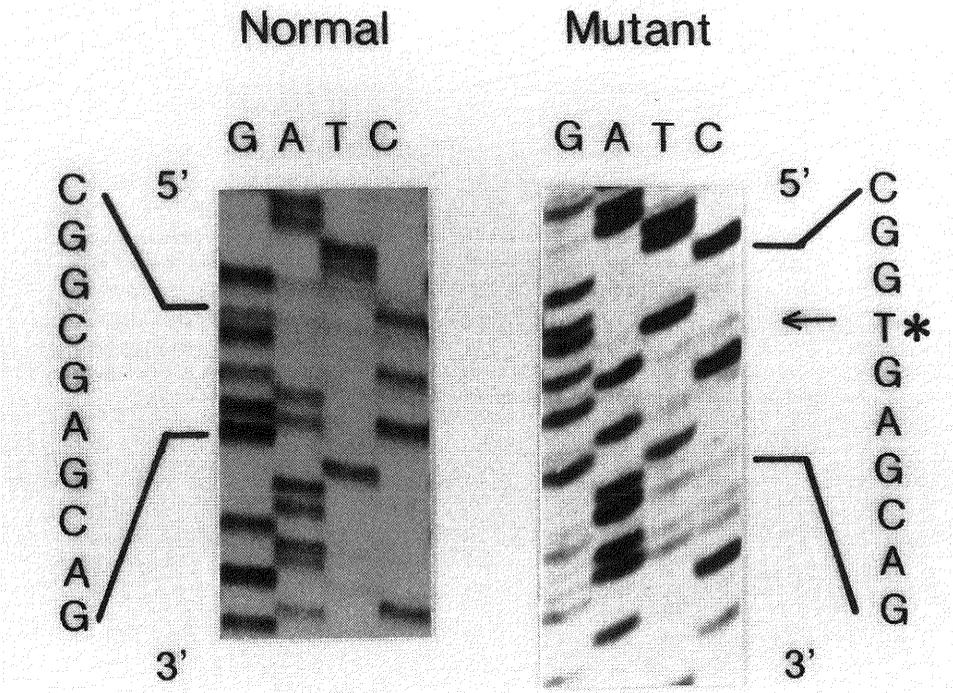
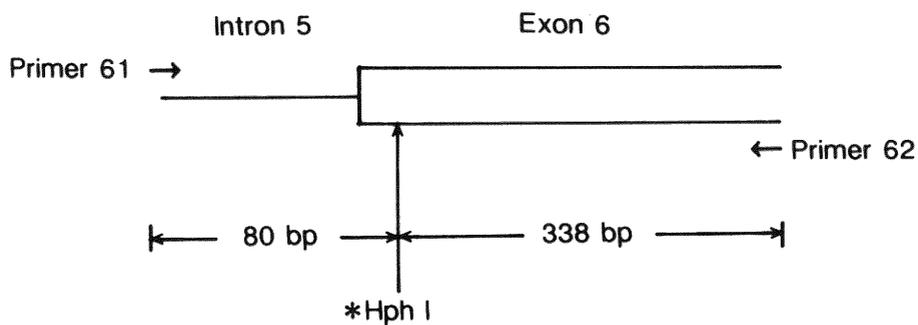
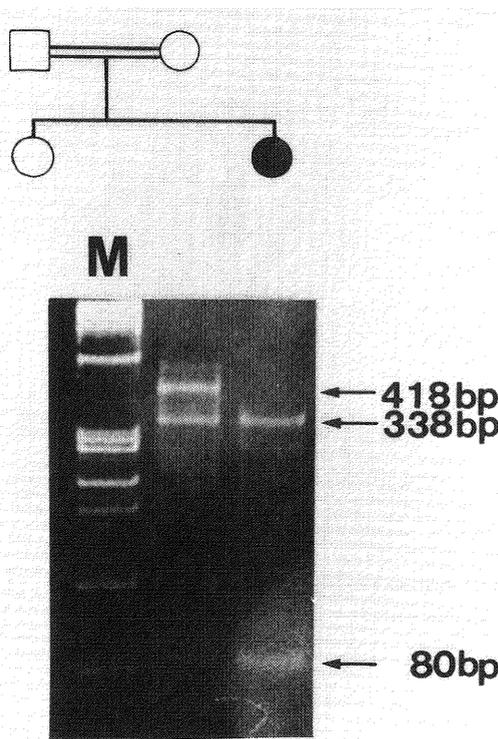


Fig. 7 Nucleotide sequences of the alleles of the XPAC cDNA and gene of XP39OS (mutant) and WI38VA13 (normal), respectively. The left part of the figure shows the corresponding portion of the normal exon 6 sequence and the right part shows the mutation-containing region in exon 6 of the patient's XPAC cDNA. The arrow indicates the position of a C to T transition.



a



b

Fig. 8-a) Diagram of the positions of the PCR primers for Hph I RFLP analysis and the location of the new Hph I site (asterisk) generated by the nucleotide transition.

b) Pedigree of XP390S analyzed by Hph I RFLP in amplified DNAs. The marker lane (M) contains a Hae III-digest of ϕ X174 DNA.

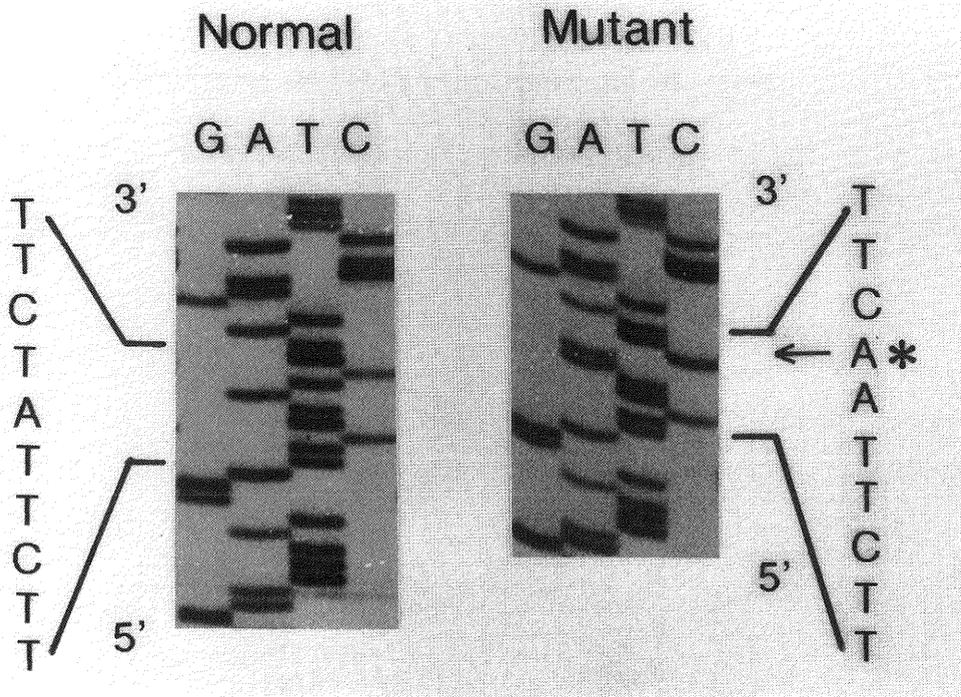


Fig. 9 Nucleotide sequences of the alleles of the XPAC gene of XP 67TO (mutant) and WI38VA13 (normal). The left part of the figure shows the corresponding portion of the normal exon 3 sequence and the right part shows the mutation-containing region in exon 3 of the patient's XPAC gene. The arrow indicates the position of a T to A transversion.

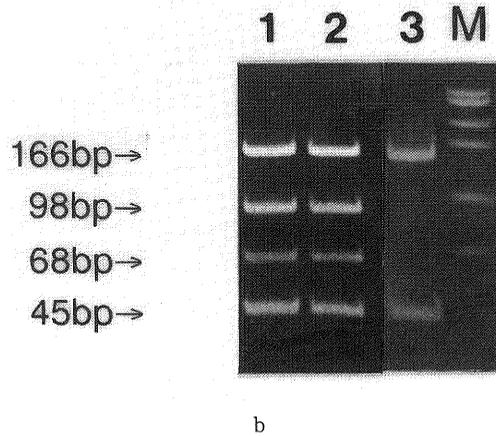
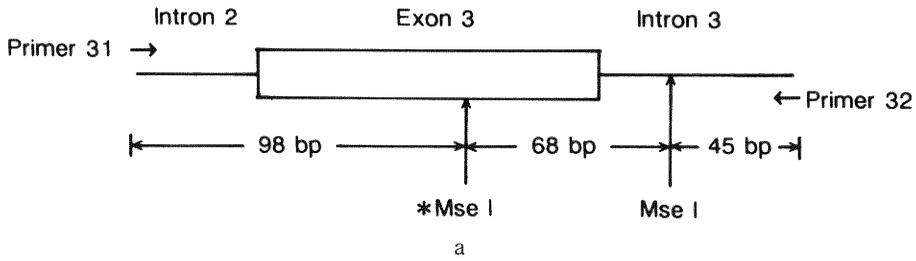


Fig. 10-a) Diagram of the position of the PCR primers for Mse I RFLP analysis and the location of the new Mse I site (asterisk) generated by the nucleotide transversion.
 b) Mse I RFLP analysis of amplified DNAs. Lanes: 1, XP67TO; 2, XP78TO; 3, WI38VA13. The marker lane (M) contains a Hae III-digest of ϕ X174 DNA.

については、codon 116 の Tyr (TAT) が、終止コドン (TAA) に変異していた (Fig. 9)。この変異により、制限酵素 Mse I の認識部位が第3エクソン内に新たに生じた。PCR による Mse I RFLP を日本人 XP A 群患者21例について調べたところ、XP67TO は、この変異と第3イントロンのスプライシング変異よりなる compound heterozygote, XP78TO は、この変異について heterozygote, 第3イントロンのスプライシング変異については homozygote であることが判明した (Fig. 10)。

考 按

血縁関係のない日本人 XP A 群患者21例の XPAC 遺伝子について、分子遺伝学的解析を行った。その結果、3種類の点突然変異が認められた。1番目は、第3イントロン・アクセプターのスプライシング変異で、この変異により、RNA スプライシングに異常をきたし、XPAC mRNA は、著明に減少し、酵素活性を有さない XPAC 蛋白が産生されることが考えられた。2番目は、コドン 228 のナンセンス変異で、このため、C末端側の

46個のアミノ酸が欠損した XPAC 蛋白が産生されることが予測された。この変異について homozygote である患者 XP39OS は、臨床症状、特に神経症状が極めて軽微であることより、この変異により産生される XPAC 蛋白は、多少なりとも機能を残存していると考えられた。スプライシング変異とコドン 228 のナンセンス変異の compound heterozygote である患者の臨床症状は、典型的 XP A 群よりも軽く、XP39OS よりも重い。XP A 群にみられるこのような臨床症状の heterogeneity は、XPAC 遺伝子における変異の違いを反映しているものと考えられた。3番目の変異は、コドン 116 のナンセンス変異で、この変異により C 末端側の 158 個のアミノ酸が欠損した XPAC 蛋白がつけられることが予測された。この変異について homozygote である患者は、今回の検討では認められなかったが、スプライシング変異とこの変異の compound heterozygote である XP67 TO が重篤な臨床症状を示すことより、この変異により産生される XPAC 蛋白は、活性を失っているものと考えられた。

今回の検討では、第3イントロンのスプライシング変異は、日本人 XP A 群患者の95%、コドン 228 のナンセンス変異は19%、コドン 116 のナンセンス変異は10%に認められた。これらの変異は、他の人種には認められなかったことより、racial divergence 後に生じたものと考えられた。日本人のルーツの1つとして中国および朝鮮半島が考えられているが、これらの国々では、XP A 群患者は非常に少ない。XPAC 遺伝子に変異をもつ日本人のルーツは、中国および朝鮮民族以外に求めなければならないのかもしれない。あるいは、これら3つの変異の歴史は比較的浅いものなのかもしれない。今回の検討で、日本人の XP A 群のほとんど全てが、3種類の変異の組合せで生じていることが考えられた。したがって、PCR を用いた AlwN I, Hph I および Mse I RFLP 法は、今後、出生前診断を含めた日本人の XP A 群の DNA 診断法として非常に有用となるものと思われる。

稿を終えるにあたり、発表の機会を与えて下さった新潟大学小児科 堺 薫教授に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) de Sanctis, C. and A. Cacchione: L' idiozia xerodermica. Riv. Sper. Freniatr., 56: 269~292, 1932.
- 2) Cleaver, J.E.: Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. Nature, 218: 652~656, 1968.
- 3) Friedberg, E.C.: DNA Repair. Freeman, New York. 505~525 pp., 1984.
- 4) Tanaka, K., Satokata, I., Ogita, Z., Uchida, T. and Okada, Y.: Molecular cloning of a mouse DNA repair gene that complements the defect of group-A xeroderma pigmentosum. Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 5512~5516, 1989.
- 5) Tanaka, K., Miura, N., Satokata, I., Miyamoto, I., Yoshida, M.C., Sato, Y., Kondo, S., Yasui, A., Okayama, H. and Okada, Y.: Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and a zinc-finger domain. Nature, 348: 73~76, 1990.
- 6) Satokata, I., Tanaka, K., Iwai, K. and Okada, Y.: Genomic characterization of the human DNA repair gene XPAC. Nucleic Acid Res. In submission.
- 7) Satokata, I., Tanaka, K., Miura, N., Miyamoto, I., Sato, Y., Kondo, S. and Okada, Y.: Characterization of a splicing mutation in group A xeroderma pigmentosum. Proc. Natl. Acad. Sci. In press. 1990.
- 8) Satokata, I., Tanaka, K., Miura, N., Narita, M., Mimaki, T., Satoh, Y., Kondo, S. and Okada, Y.: Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. J. Clin. Invest. In submission.
- 9) Mimaki, T., Ito, N., Abe, J., Tagawa, T., Sato, K., Yabuuchi, H. and Takebe, H.: Neurological manifestations in xeroderma pigmentosum. Ann. Neurol., 20: 70~75, 1985.
- 10) Sato, K., Watatani, M., Ikenaga, M., Kozuka, T., Kitano, Y., Yoshikawa, K., Mimaki, T., Abe, J. and Sugita, T.: Sensitivity to UV radiation of fibroblasts from a Japanese group A xeroderma pigmentosum patient with mild neurological abnormalities. Br. J. Dermatol., 116: 101~108, 1987.

司会 ありがとうございます。MHC 抗原の疾患関連性の中で疾病発症に関する遺伝子部位の解析を行った

成績の発表ですが、質問はございますか。

松本 Hetero の両親から hetero の mutation をもった子供が発症していますね。両親はどうなっているのでしょうか。両親も患者ですか。

里方 両親は患者ではありません。

松本 ということは、この mutation を hetero に持っている人の中にも発症する人としていない人がいるということになりますね。

里方 Exon 3 の mutation は hetero ですが、もう一つの mutation は、第3 intron の splicing mutation ですから、今お話した三つの mutation があるのですが、必ず、この組合せが今まで調べた日本人では認められます。

松本 ですから hetero といっても、異常に関しては必ず、homo になっている訳ですね。

里方 そうです。

西村 両親は hetero でなのに患者では homo になって発症していますね。患者で初めて mutation が出現したのでしょうか。

里方 実は、このもう一つの exon 3 に mutation を有する XP67TO という患者さんは、今お話しましたように、第3 intron の acceptor site の mutation と、この第3 exon の nonsense mutation を持っており、mutation として二つ持っているわけです。XP67TO の第3 intron の acceptor site の splicing mutation については自然に起こっているということが、親子関係を調べてわかりました。

西村 両親にはなかったわけですね。

里方 ありませんでした。

西村 両親というか、夫の paternity については大丈夫でしょうか。

里方 それは VNTR などを調べ、親子関係はまず間違いないということを確認しています。さらに調べたところ、第3 intron の acceptor site の mutation が自然に生ずることの他に、第3 exon の nonsense mutation が、自然に起こる症例も持っています。遺伝によって伝えられるもの以外に日本人では、この mutation がかなり自然に生じているということです。

西村 mutation は germ line ではなく、somatic cell に生じたという意味ですか。

里方 その点は難しいですが、組織を変えて検討を行っています。といってもヒトですので fibroblast と血液ですが、その結果は全く同じ mutation が認められています。ですから、mutation の生じた時期は割と早い時期ではないかと思えます。

西村 この遺伝子の mRNA はどの細胞にも普遍的に出ているのでしょうか。

里方 はい。胎児も含めヒトで調べましたが、脳で一番多く出ているようでした。この疾患特にA群では、神経症状が必発ですし、小頭症なども見られます。私達はヒトでは全くわかっていない DNA repair に着目し、それを解明する糸口になるのではないかとということで、この疾患は遺伝子を調べたわけです。DNA repair はヒトの脳の発生に重要な働きをしているのではないかとということで、検討していこうという計画です。

西村 それから、cloning の方法ですけれども、これは、mutation を rescue するような遺伝子を取られたのでしょうか。

里方 そうです。

西村 この gene product は最終的にはどういう遺伝子の傷を見分けるのでしょうか。

里方 XP のこの相補性群は DNA repair の中でも、early step の段階に関与していることがいままでの実験で示されています。それから、XP のB群、世界に一例しか存在しない XP ですが、その遺伝子も得られましたので、それらを利用して、ヒトの DNA 修復機構を解明していけるのではないかと考えています。

西村 ありがとうございます。

司会 他に、御意見はございますか。どうも、先生ありがとうございます。以上で本日のシンポジウムのすべてを終えたわけですが、残念ながら、少し時間を超過したようです。MHC 抗原、HLA による免疫応答の解析と分子遺伝学的解析を中心に御討議をいただきましたが、大変有意義なシンポジウムであったと思います。また、お集まりいただいた諸先生方にはディスカッションに参加していただきましてありがとうございました。