



Title	Multiple Possible Sites of BRCA2 Interacting With DNA Repair Protein Rad51
Author(s)	片桐, 豊雅
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41284
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	かた ぎり とよ まさ 片 桐 豊 雅
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 0 1 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 4 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Multiple Possible Sites of BRCA2 Interacting With DNA Repair Protein Rad51 (BRCA2 蛋白質と DNA 修復蛋白質 Rad51 の多様な結合領域の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中村 祐輔 (副査) 教 授 辻本 賀英 教 授 田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

全乳癌症例のうち約 5-10% が遺伝的な遺伝子異常を起因として発生する家族性乳癌と考えられている。これらの家族性乳癌の原因遺伝子として BRCA1・BRCA2 遺伝子が単離されており、約 70-80% の家族性乳癌はこれらの遺伝子のいずれかの異常によることが明らかにされている。したがって、BRCA2 遺伝子産物の機能を知ることは、乳癌発生機構の解明につながるものと考えられる。本研究では、BRCA2 遺伝子産物の機能を解析するために、酵母の Two-Hybrid 法を用いて BRCA2 遺伝子産物に結合する蛋白質の単離を試みた。その結果、BRCA2 遺伝子産物は DNA 修復系に重要な役割を果たす蛋白質 Rad51 と結合することを証明するとともに、それぞれの蛋白質における結合領域の同定もあわせて行った。

(方法ならびに成績)

BRCA2 蛋白質は 380 kDa にも及ぶ巨大なタンパクであるため、BRCA2 蛋白質を 8 領域 (Region1-8) に分割して解析を行った。まず、8 領域のうち、ヒト、マウス間で 90% 以上保存されている領域を含むアミノ酸残基 639-1508 の領域を乳腺の Poly ARNA を鋳型として逆転写した cDNA を利用して合成した。その産物を酵母の転写因子である GAL4 の DNA 結合領域が組み込まれた発現ベクター pAS2-1 に蛋白が発現するようにフレームをあわせてサブクローニングして BRCA2・GAL4 DNA 結合領域融合蛋白質発現ベクターを構築した。また、BRCA2 が相互作用する蛋白質をスクリーニングするライブラリーとして、BRCA2 遺伝子が高発現している精巣 cDNA ライブラリーを使用した。BRCA2・GAL4 DNA 結合領域融合蛋白質発現ベクターおよびヒト精巣 cDNA ライブラリーを酵母 Y190 系統へ同時に形質転換して約 3×10^6 個の形質転換体をスクリーニングした結果、HIS3 および beta-galactosidase のレポーター遺伝子を活性化した 141 個のクローンを得た。陽性クローンのうち精巣の cDNA クローン単独でレポーター遺伝子を活性化しているものを除外するために、再度 Y190 系統へ形質転換して検討した結果、最終的に Two-hybrid スクリーニングの陽性として 11 クローンを同定した。次に、これらのクローンの塩基配列を決定し、それぞれについて BRAST プログラムを用いて DNA データベースに登録されている遺伝子とのホモロジー検索を行った結果、6 クローンがヒ

ト Rad51 遺伝子の一部を含んでいることが判明した。そこで、ヒト Rad51 蛋白質と BRCA2 蛋白質の in vitro における結合を確認するため、GST とスクリーニングに用いた BRCA2 領域に相当するペプチドとの融合蛋白質を作製し、それを乳癌細胞株 MCF7 のライセートに加えて混和した後、GST に吸着した蛋白を抗 Rad51 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析した。その結果、GST 単独では結合の認められない 38 kDa の Rad51 蛋白質が、GST・BRCA2 融合蛋白質とは特異的に結合することが明らかとなり、in vitro における Rad51 と BRCA2 の結合が確認された。次いで、Rad51 蛋白が BRCA2 のどの領域に結合するかを調べるために、アミノ酸残基 639-1508 の領域（領域 3）を 3A（アミノ酸残基 639-897）、3B（839-1090）、3C（1039-1266）、3D（1219-1508）の重複する 4 領域に分割して、GST とそれぞれの部分に相当するペプチドとの融合蛋白質を作製した。これらの融合蛋白質を用いて領域 3 と同様の実験を行ったところ、3B および 3C の領域の両者において Rad51 蛋白質との結合が確認された。そこで、3B および 3C の領域をさらに分割して詳細に Rad51・BRCA2 の相互作用を調べた結果、ヒト、マウス間における高度保存領域（アミノ酸残基 1002-1050）を含むアミノ酸残基 981-1071 および 1139-1266 の 2 カ所において Rad51 が結合していることが明らかとなった。

（総括）

酵母の Two-Hybrid 法を用いて BRCA2 遺伝子産物に結合する蛋白質のスクリーニングを行った結果、DNA 修復蛋白質 Rad51 を単離した。これらの蛋白質の結合は in vitro においても証明され、さらに、BRCA2 蛋白質はアミノ酸残基 981-1071（Rad51 binding Region1）および 1139-1266（Rad51 binding Region2）の 2 領域において Rad51 と結合していることを明らかにした。これらの 2 領域のうち Rad51 binding Region1 ではヒト、マウス間における高度保存領域（アミノ酸残基 1002-1050）を含んでいたが、Rad51 binding Region2 においては保存領域は含まれていなかった。Rad51 が BRCA2 の C 末端に結合しているとの報告もあることから、Rad51 と BRCA2 は複数の領域を用いて強固な複合体を形成し、DNA の修復に関与しているものと推測される。これら複合体が DNA 修復、すなわち、ゲノムの安定性を保持しており、これらに異常が起きることによりゲノムの不安定性が生じ、遺伝子の異常が起りやすくなって、癌化へとつながっていくものと考えられる。このような現象はミスマッチ修復遺伝子である MSH2, MLH1 の異常によって引き起こされる家族性非腺腫性大腸癌（HNPCC）の発症のしくみと類似している。

論文審査の結果の要旨

本研究は第二の家族性乳癌の原因遺伝子である BRCA2 遺伝子産物の機能の解析を行うことにより、乳癌発生機構の解明の手がかりを得ることを目的としている。本研究では酵母の Two-Hybrid 法を用いて BRCA2 遺伝子産物に結合する蛋白質の単離を試みた。その結果、2 本鎖 DNA 切断の組み換え修復の機能を持つ Rad51 蛋白質を単離し、これらの蛋白質の結合は in vitro においても証明された。さらにこの結合は、少なくとも 2 カ所で結合していることが判明し、Rad51 蛋白質と BRCA2 蛋白質は複数の領域を用いて強固な複合体を形成し、DNA の修復に関与しているものと推測された。

以上から本研究の内容は BRCA2 遺伝子産物の機能を明らかにし、乳癌発生機構の解明に貢献するものであり、学位授与に値するものと認められる。