

京都大学	博士（医学）	氏 名	AL ABO Muthana
論文題目	Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex (相同 DNA 組換え因子 BRCA2 の 2 つのドメインの機能解析)		
(論文内容の要旨)			
【背景と目的】BRCA2 は相同組換えに関与する多数の因子のうちの一つである。相同組換えは、DNA 二重鎖切断の修復に関与し、カンプトテシン、シスプラチン、poly[ADP ribose]polymerase 阻害剤などの抗がん剤で生じた損傷を修復する。BRCA2 は 3418 アミノ酸をコードする巨大分子であり、各ドメインの機能解析は遅れている。そこで、BRCA2 の各ドメインのなかでも、(i)DNA 損傷部位結合タンパクである BRCA1-PALB2 と複合体を形成することに関与する N 末端ドメインと、(ii)BRCA2 が DNA に直接結合するために必要な DNA 結合ドメインに着目し、各ドメインの機能を解析した。 【方法】遺伝子破壊効率の非常に高いニワトリ B リンパ球細胞株 DT40 を用いて、各ドメインを欠損させるノックインミュータント (<i>BRCA2^{ΔN}</i>、<i>BRCA2^{ΔDBD}</i>、<i>BRCA2^{ΔN+DBD}</i>) を作製し、上記抗がん治療薬に対する感受性を調べた。また、DNA 損傷部位への BRCA2 の集積の効率を調べるために、各ドメイン欠損細胞の内在性 BRCA2 を GFP で標識し、可視化した。 【結果】抗がん治療薬に対する感受性は、<i>BRCA2^{ΔN}</i>変異細胞、及び <i>BRCA2^{ΔDBD}</i>変異細胞ともに、BRCA2 ヌル欠損細胞に比べて、かなり軽度であった。それに比べて、上記(i)、(ii)のドメインが両方欠失した <i>BRCA2^{ΔN+DBD}</i>変異細胞は、BRCA2 ヌル欠損細胞と同程度に重篤な表現型を示した。このことは、N 末端領域と DNA 結合部位が、BRCA2 が相同組換えを促進するときに互いに似た機能を遂行していることを示している。また、同時に N 末端ドメインと DNA 結合ドメインが、BRCA2 が相同組換えを促進するために必須であることも示している。 続いて、各ドメイン欠損細胞の BRCA2 における DNA 損傷部位への集積を、蛍光顕微鏡で観察した。BRCA2^{ΔN}と <i>BRCA2^{ΔDBD}</i>では、かなり BRCA2 タンパクの集積がかなり低下し、<i>BRCA2^{ΔN+DBD}</i> では、集積が全く観察できなくなった。このことは、BRCA1-PALB2-BRCA2 複合体の形成と、BRCA2 の DNA 結合部位の両方が、BRCA2 の DNA 損傷部位への効率的な集積に必須であることを示している。 【考察】本研究で、N 末端ドメインを DNA 結合ドメインの機能が似ていることを示した。さらにその似た機能とは、BRCA2 の、DNA 損傷部位への集合であることを示した。本研究は、がん治療に以下のように貢献できる。現在、がん患者検体中に含まれる変異を、高感度で迅速に解析できるようになった。本研究成果から、N 末端ドメインもしくは DNA 結合ドメインに変異が見つかった場合、その変異が抗がん治療効果に与える影響を評価できるようになった。また、同様の変異が健常者の遺伝子診断で見つかった場合、その変異が発がんに与える効果も評価できるようになった。			

(論文審査の結果の要旨) BRCA2は相同組換え因子一つである。相同組換えはDNA二重鎖切断の修復に関与し、カンプトテシン、シスプラチン、poly[ADP ribose]polymerase 阻害剤などの抗がん剤で生じた損傷を修復する。BRCA2は3418アミノ酸をコードする巨大分子であり、各ドメインの機能解析は遅れている。そこで、BRCA2の各ドメインのなかでも、(i)DNA損傷部位結合タンパクであるBRCA1-PALB2と複合体を形成することに関与するN末端ドメインと(ii)BRCA2がDNAに直接結合するために必要なDNA結合ドメインに着目し、その機能を、ニワトリBリンパ球細胞株DT40を用いて解析した。 抗がん治療薬に対する感受性は、BRCA2^{ΔN}変異細胞及びBRCA2^{ΔDBD}変異細胞ともに、BRCA2ヌル欠損細胞に比べてかなり軽度であった。それに比べて上記(i)、(ii)のドメインが両方欠失したBRCA2^{ΔN+DBD}変異細胞は、BRCA2ヌル欠損細胞と同程度に重篤な表現型を示した。このことは、N末端領域とDNA結合部位が、BRCA2が相同組換えを促進する時に似た機能を遂行していることを示している。さらに解析を進めた結果、この似た機能とは、BRCA2がDNA損傷部分に結合する機能であることが解析できた。 以上の研究は家族性腫瘍の発生機構の解明に貢献し、その診断・治療方法の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成26年1月30日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日以降			