



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

イヌの乳腺腫瘍関連遺伝子 Brca2  
の機能解析に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 落合, 和彦 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2220">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2220</a>

氏名(本籍)	落合和彦(福島県)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第166号		
学位授与年月日	平成17年3月14日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岩手大学		
学位論文題目	イヌの乳腺腫瘍関連遺伝子 <i>Brca2</i> の機能解析に関する研究		
審査委員	主査	岩手大学 教授	橋爪一善
	副査	帯広畜産大学 教授	鈴木宏志
	副査	岩手大学 教授	谷口和之
	副査	東京農工大学 教授	山根義久
	副査	岐阜大学 教授	丸尾幸嗣

## 論文の内容の要旨

イヌは乳腺腫瘍に罹患しやすく、雌イヌが発症する腫瘍のうち約40%と見積もられ、ヒトの発症率の約3倍であり、小動物疾病治療の大きな課題である。ヒトでは遺伝性乳癌の原因遺伝子として、*BRCA1*、*BRCA2* がクローニングされ、その機能に関する研究が展開されている。*BRCA1* 及び *BRCA2* タンパク質は、減数分裂期の相同組換えやDNAの2本鎖切断修復に関わる *RAD51* タンパク質と結合し、損傷修復機能を調節することが知られている。*BRCA2* の変異は *BRCA1* に比べ乳癌発症の特異性が高いため、イヌにおける遺伝性乳腺腫瘍の発症機構解明の有力な分子であると考えられる。

本研究では、*Brca2* と *Rad51* の相互作用を中心にして、イヌ乳腺腫瘍発症機構の解明を試みた。

第一章では、イヌの *Brca2* と *Rad51* をクローニングし、その構造と発現を解析した。イヌの *Brca2* 及び *Rad51* は、それぞれ約11kb および1.5kb のcDNA、3471個及び339個のアミノ酸をコードしていた。これらのアミノ酸配列を既報のヒト及びマウスの配列と比較すると *Rad51* の種間相同性が非常に高い(平均約99%)のに対して *Brca2* の相同性は低かった(平均約63%)。

第二章では、イヌ *Brca2* と *Rad51* の結合をツーハイブリッド法によって検討した。*Brca2* は、BRC repeats とC末端の両方で *Rad51* と結合した。C末端での結合はマウスでしか証明されておらず、本研究の成果が第2の例である。また、8個のBRC repeats には結合が強い repeat (1, 2, 4) と弱い repeat (3, 5, 6, 7, 8) が存在し、BRC repeats

を1個ずつ削った変異体ではその長さにより結合の強さが異なった。

第三章では、Rad51 と repeat の結合性をイヌとヒトの BRC repeat4 で比較したところ、イヌのものがより強く結合した。BRC repeat4 の配列を一部イヌ型からヒト型に置換すると Rad51 との結合が弱くなり、ヒト型からイヌ型にすると強くなった。中でもヒト BRC repeat4 の 1532 番目の Valine をイヌ型の Isoleucine に置換すると結合が約 5 倍強くなった。また、X 線照射によって DNA 損傷を誘導した COS-7 細胞での Rad51 の focus 形成は、ヒト型 BRC repeat4 よりもイヌ型変異導入体により強く阻害された。加えて、イヌの Brca2 C 末端も Rad51 の focus 形成を阻害した。

第四章では、BRC repeats の塩基配列を解析し、変異および多型を検索した。その結果、BRC repeat3 に存在する K1455R の多型を発見したが、この変異はタンパク質の翻訳が途中で停止する欠失変異ではなかった。

以上のように、イヌでも Brca2 が Rad51 を介して DNA の相同組換え修復に関与することが示され、イヌ Brca2 と Rad51 の結合能の変化および BRC repeats のアミノ酸置換または変異が、DNA 相同組換え修復調節のゆらぎをもたらす要因であることが初めて明らかとなった。今後、この制御機構の解明は DNA 損傷修復の乱れによるイヌ乳腺腫瘍発症の真因特定に大きな展望を開くと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、イヌに好発する乳腺腫瘍の発症要因に関わる乳腺腫瘍関連遺伝子である *Brca2* の機能を明らかにすることを目的とし、イヌ *Brca2* 及び *Rad51* 遺伝子のクローニング、両遺伝子産物の結合様式の解析、並びに BRC repeats の多型を解析することを試みたもので、以下の新知見を得ている。

1) これまで明らかでなかったイヌ *Brca2* 及び *Rad51* 遺伝子をクローニングし、それぞれ約 11kb、1.5kb の cDNA 及び 3471 個、339 個のアミノ酸から構成されること、ヒト、マウスのアミノ酸配列と *Brca2* は約 63%、*Rad51* は約 99% の相同性であることを明らかにした。2) *Brca2* と *Rad51* の結合を検討し、*Brca2* は、BRC repeats と C 末端の両方で *Rad51* と結合すること、8 個の BRC repeats (BRC1-8) の結合能には差があり、特に BRC4 が強いことを発見した。3) repeats と *Rad51* の結合能をアミノ酸置換した変異導入体を用いて検証し、ヒト型の配列に比較してイヌ型の変異導入体が *Rad51* と強く結合すること、中でもヒト型 BRC4 の 1532 番目の Valine をイヌ型の Isoleucine に置換した変異体の結合力が約 5 倍となることを明らかにした。また、*Rad51* focus 形成抑制の検討から、イヌ型変異導入 BRC4 と内在性 *Rad51* との結合作用が強いこと、加えて、イヌ *Brca2* C 末端も内在性 *Rad51* と強く結合することを確認した。4) BRC repeats の解析から BRC repeat3 にイヌ特異的な K1455R の多型を発見し、この多型配列は *Rad51* とより強く結合することを明らかにした。

本研究で得られた成果は、イヌでは *Brca2* と *Rad51* の結合能の変化及び BRC repeats のアミノ酸置換あるいは変異が、DNA 相同組換え修復調節に変化をもたらす要因であることを初めて立証するものであり、*Brca2* が変異すると DNA 損傷の修復に破綻を招き、遺伝子を不安定化することからイヌの乳腺腫瘍を進行させる可能性を示唆した。今後、この制御機構の解明は DNA 損傷修復の乱れによるイヌ乳腺腫瘍発症の真因特定や発症抑制、治療薬の開発などに貢献すると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Cloning and sequencing full length of canine Brca2 and Rad51 cDNA  
著 者 名 : Ochiai, K., Morimatsu, M., Tomizawa, N. and Syuto, B.  
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 63 (10) : 1103-1108, 2001
  
- 2) 題 目 : Brca2 C-terminus interacts with Rad51 and contributes to nuclear focus formation in double-strand break repair of DNA  
著 者 名 : Ochiai, K., Morimatsu, M., Yoshikawa, Y., Syuto, B. and Hashizume, K.  
学術雑誌名 : Biomedical Research  
巻・号・頁・発行年 : 25 (6) : 269-275, 2004

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Properties of the tumor suppressor gene Brca2 in the cat  
著 者 名 : Oonuma, T., Morimatsu, M., Ochiai, K. and Syuto, B.  
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 65 (10) : 1123-1126, 2003
  
- 2) 題 目 : Association of the nucleocapsid protein of the Seoul and Hantaan hantaviruses with small ubiquitin-like modifier-1-related molecules  
著 者 名 : Lee, B.H., Yoshimatsu, K., Maeda, A., Ochiai, K., Morimatsu, M., Araki, K., Ogino, M., Morikawa, S. and Arikawa, J.  
学術雑誌名 : Virus Research  
巻・号・頁・発行年 : 98 (1) : 83-91, 2003
  
- 3) 題 目 : cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period  
著 者 名 : Ushizawa, K., Herath, C. B., Kaneyama, K., Shiojima, S., Hirasawa, A., Takahashi, T., Imai, K., Ochiai, K., Tokunaga, T., Tsunoda, Y., Tsujimoto, G., and Hashizume, K.  
学術雑誌名 : Reproductive Biology and Endocrinology  
巻・号・頁・発行年 : 2 : 77, 2004