

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19510057  
 研究課題名（和文） 家族性乳癌原因因子BRCA2に結合するPALB2の、相同組換えにおける機能の解析  
 研究課題名（英文） Analysis of function of PALB2, which binds to BRCA2 (breast cancer susceptibility gene product 2), in homologous recombination.  
 研究代表者 山添 光芳 (YAMAZOE MITSUYOSHI)  
 和歌山県立医科大学医学部・准教授  
 研究者番号：00284745

## 研究成果の概要：

家族性乳癌原因因子 BRCA2 と、その N 末端領域に結合する因子 PALB2 の遺伝学的相互作用を、脊椎動物細胞で容易に遺伝子破壊を行うことができるニワトリ B リンパ球 DT40 細胞を用いて解析した。PALB2 の相同組換えにおける機能は、いずれも BRCA2 の持つ機能の一部に含まれていた。このことから PALB2 遺伝子は BRCA2 遺伝子の下で、BRCA2 と同じ相同組換え経路で働いていると結論した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：相同 DNA 組換え、DNA 修復、家族性乳癌、BRCA2、PALB2、DT40 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体 DNA が被る損傷の中で、最も重篤なものは、DNA の二本鎖切断である。相同 DNA 組換え修復は、放射線による DNA 二本鎖切断を修復するのみならず、ゲノム DNA の複製を滞りなく遂行するために必須の機構である。

(2) 相同 DNA 組換え修復において最初の重要な段階は、RAD51 蛋白が DNA 損傷部位に集合することである。家族性乳癌原因因子 BRCA2 は RAD51 蛋白の集合を促進して、相同 DNA 組換え修復に関与している。

(3) BRCA2 蛋白の C 末端側領域は、RAD51 蛋白結合部位を初めとして、重要な機能ドメインが知られていたが、N 末端側領域については、細胞内での機能は不明であった。

(4) 我々は、この領域に種を超えてアミノ酸配列が保存されているドメインを発見した。ニワトリ B リンパ球細胞株 DT40 を使って実際にこのドメインを欠失した変異細胞は、BRCA2 の C 末端領域を欠失した細胞と非常によく似た性質を示した。

(5) ハーバード大学の Livingston 博士のグループが、生化学的手法により BRCA2 の N 末端に結合する蛋白 PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2) を同定し、PALB2 遺伝子をノックダウンすると、相同 DNA 組換え組換え能が低下することを報告した。また PALB2 が結合する BRCA2 の領域は、我々が同定した N 末端側保存領域と重複していた。つまり BRCA2 の N 末端側保存領域の機能の一つは、PALB2 との相互作用によるものであることが予想された。

## 2. 研究の目的

(1) 相同 DNA 組換えにおける PALB2 の機能を、ニワトリ DT40 細胞のノックアウト細胞を用いて、遺伝学的手法で明らかにする。

(2) PALB2 との相互作用を含め、BRCA2 の N 末端保存領域の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) PALB2 cDNA のクローニング  
DT40 細胞の cDNA から、ニワトリ PALB2 の cDNA 断片が単離できた。これをもとに、cDNA の 5'末端、3'末端をそれぞれ 5'RACE、3'RACE 法を用いて単離し、全長の PALB2 cDNA を明らかにする。

(2) PALB2 破壊細胞の樹立  
異なる種の PALB2 蛋白の間で、アミノ酸配列の保存度が高いエクソン 3 の途中に、薬剤選択マーカーを導入したノックアウト用プラスミドを構築する。これを DT40 細胞に導入して、PALB2 破壊細胞を作製する。

(3) PALB2 と BRCA2 遺伝子の二重変異株作製

(4) PALB2 破壊細胞、PALB2/BRCA2 二重破壊細胞の表現型解析

- ①各種 DNA 損傷に対する感受性
- ②染色体分析
- ③遺伝子標的組換え効率の測定
- ④ScNeo カセットによる相同組換え能の評価
- ⑤チェックポイント
- ⑥RAD51 蛋白などの相同 DNA 組換えに関与する蛋白の、DNA 損傷後の核内局在

(5) PALB2 のポリクローナル抗体の作製  
作製した抗体を用いて、相同 DNA 組換えに関与する他の遺伝子欠損細胞における PALB2 の局在を解析する。

## 4. 研究成果

(1) ニワトリ PALB2 cDNA の同定  
先にクローニングしたニワトリ PALB2 cDNA の断片を元に RACE 法を行っていた最中に、NCBI のデータベースに全長のニワトリ cDNA 配列が報告された (accession # XM\_414873)。ヒトとニワトリ PALB2 蛋白は、ほぼ同じ大きさで、C 末端半分に高い相同性を持つ領域があった。

(2) PALB2 破壊細胞の樹立  
図 1 に示したように、ニワトリ PALB2 の C 末端が欠失するような破壊細胞を樹立することができた。すなわち、PALB2 遺伝子は DT40 細胞の増殖に必須ではなかった。

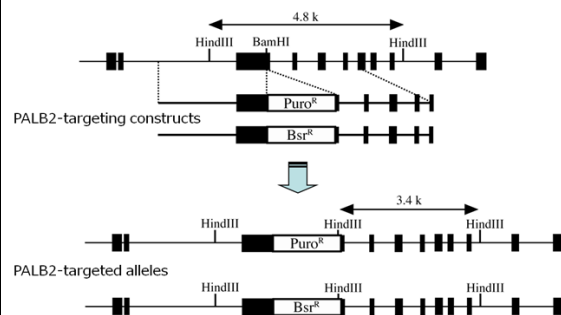


図 1. PALB2 遺伝子の破壊

(3) PALB2・BRCA2 の二重破壊細胞の樹立  
2つの BRCA2 対立遺伝子の一方を完全ナルに、もう一方を Cre recombinase-loxP のシステムによって条件的に破壊できるような DT40 細胞を利用した (図 2)。

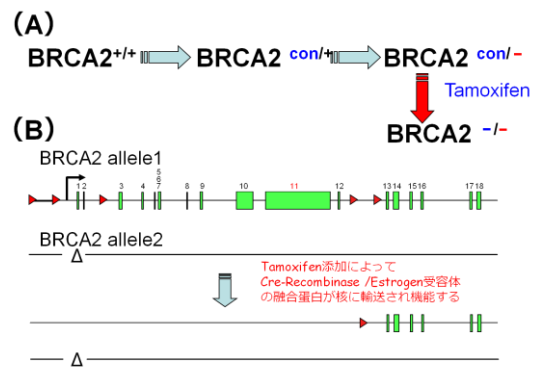


図 2. BRCA2 遺伝子を条件破壊する仕組み

この細胞を出発材料として、PALB2 遺伝子の両 allele を破壊した。その後で、培養液にタモキシフェンを添加し、再クローニングすることによって PALB2・BRCA2 の二重遺伝子破壊細胞を樹立することができた (図 3)。



図3. BRCA2・PALB2遺伝子の二重破壊株の作製

(4) PALB2 破壊細胞、PALB2・BRCA2 二重破壊細胞の表現型解析

①増殖速度

増殖の早い順に、野生型（倍加時間 8 時間）>PALB2 破壊株（同 10.6 時間）>BRCA2 破壊株（同 11.7 時間）=PALB2・BRCA2 二重破壊株であった（図4）。

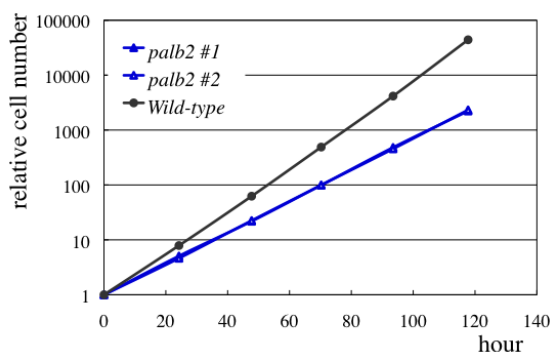


図4.PALB2遺伝子破壊細胞の増殖曲線

②DNA 二本鎖切断を起こす薬剤であるシスプラチンやカンプトテシンに対する感受性

PALB2 破壊細胞は、シスプラチンやカンプトテシンに対して、野生型細胞より高い感受性を示したが、BRCA2 破壊細胞ほど高い感受性ではなかった（図5，6）。

また PALB2・BRCA2 二重破壊細胞はこれらの薬剤に対して、BRCA2 破壊細胞と全く同じ高感受性を示した。

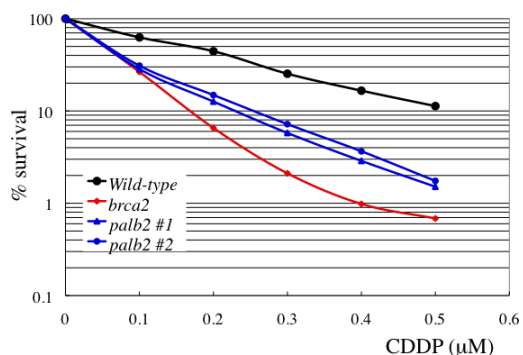


図5.PALB2遺伝子破壊細胞のシスプラチン感受性

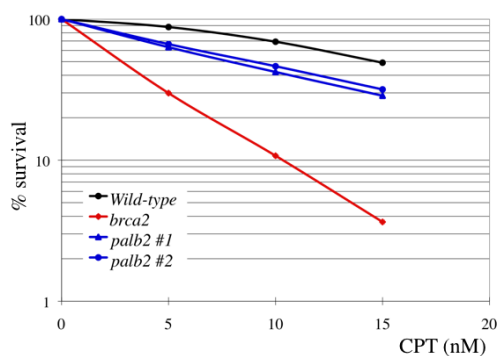


図6.PALB2遺伝子破壊細胞のカンプトテシン感受性

③DNA 損傷後の RAD51 蛋白の細胞内局在 細胞に電離放射線を照射して染色体 DNA に二本鎖切断を導入すると、野生型細胞では核内に RAD51 蛋白の集合が複数の焦点として確認できる（図7A）。BRCA2 破壊細胞では、放射線照射後いくら時間をおいても RAD51 焦点が観察できない（図7C）。PALB2 破壊細胞では、照射後 6 時間経つと、野生型と比較すると焦点の数、強さともに劣るが、一部の細胞で RAD51 蛋白の焦点が観察できた（図7B）。PALB2・BRCA2 二重破壊株では、BRCA2 破壊細胞と同様に、RAD51 蛋白の焦点は全く認められなかった。

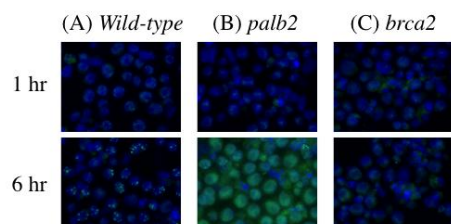


図7.電離放射線(8Gy)照射後の核内Rad51焦点

④染色体分析

外からの DNA 損傷が無い増殖状態で発生する spontaneous な染色体異常を調べた。異常が少ない細胞から、野生型細胞（100 個の細胞あたり異常が～0 個）<PALB2 遺伝子破壊細胞（同～8 個）<BRCA2 遺伝子破壊細胞 = PALB2・BRCA2 二重破壊細胞（同 14～18 個）であった。これは①の増殖速度によく対応しており、増殖速度の遅い原因は染色体異常によるものであると推察できた。

(5) PALB2 と BRCA2 遺伝子の epistasis BRCA2 遺伝子破壊細胞の表現型は、いずれも PALB2 遺伝子破壊細胞より強く表れており、両遺伝子の二重破壊細胞は、BRCA2 遺伝子破壊細胞と同じ表現型を示している。以上より、PALB2 遺伝子は BRCA2 遺伝子の下で、BRCA2 と同じ経路で働いていると結論づけた。

また PALB2 遺伝子破壊細胞は、BRCA2 遺伝子の N 末端領域を欠失した細胞と表現型が似ており、BRCA2 の N 末端側保存領域の機能のほとんどは、PALB2 との相互作用であると結論した。

(6) 今後の展望 (PALB2 と FANC-C 遺伝子の二重破壊細胞の作製)

PALB2 遺伝子は、染色体不安定性を示す遺伝疾患である Fanconi 貧血の原因遺伝子の一つ、FANC-N 遺伝子と同一であることが、当該研究期間中に報告された (Nat Genet 39, 159-161, 2007; Nat Genet 39, 162-164, 2007)。そこで FANC 因子経路を介した DNA 修復における PALB2 の役割を明らかにするために、FANC-C 破壊細胞で PALB2 遺伝子の破壊を試みているが、現時点では両遺伝子の二重破壊細胞はまだ樹立できていない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Chen, N., Zinchenko, AA., Yoshikawa, Y., Araki, S., Adachi, S., Yamazoe, M., Hiraga, S. and Yoshikawa, K.  
ATP-induced shrinkage of DNA with MukB protein and the MukBEF complex of Escherichia coli. J Bacteriol. 190, 3731-3737 (2008) 査読有り
2. Ridpath, JR., Nakamura, A., Tano, K., Luke, AM., Sonoda, E., Arakawa, H., Buerstedde, JM., Gillespie, DA., Sale, JE., Yamazoe, M., Bishop, DK., Takata, M., Takeda, S., Watanabe, M., Swenberg, JA. and Nakamura, J.  
Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma level of formaldehyde. Cancer Res. 67, 11117-11122 (2007) 査読有り
3. Martin, RW., Orelli, BJ., Yamazoe, M., Minn, AJ., Takeda, S. and Bishop, DK. RAD51 up-regulation bypasses BRCA1 function and is a common

feature of BRCA1-deficient breast tumors. Cancer Res. 67, 9658-9665 (2007) 査読有り

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山添 光芳 (YAMAZOE MITSUYOSHI)  
和歌山県立医科大学医学部・准教授  
研究者番号 : 00284745

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者