

審査の結果の要旨

氏名 丹羽 隆 善

本研究は家族性乳癌の一因とされている **BRCA2** と新たに相互作用するタンパク質を探索し、このタンパク質複合体を解析することにより、**BRCA2** の新規機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. **HeLa S3** 細胞溶解液を調製し、グリセロール密度勾配法を用いて分画した。本来、分子量約 **380k** の **BRCA2** が検出される分画より大きい分子量のタンパク質が検出される分画を **SDS-PAGE** に展開し、ゲルから切り出す事により **BRCA2** と複合体を形成している候補タンパク質を精製し、**MALDI TOF/TOF** 質量分析法を用いてタンパク質を同定した。その結果、**BRCA2** と新たに相互作用する蛋白質として **plectin** が同定された。
2. 同定された **plectin** と **BRCA2** の内在性タンパク質間結合は、子宮頸癌由来細胞株である **HeLa** 細胞、および野生型の **BRCA2** を持つ事が確認されている乳癌由来細胞株である **MCF7** 細胞において、免疫共沈降法によって検討した。また、**plectin** は C 末端側に **ankyrin repeat** と高い相同性を示す 6 つの繰り返し配列を持ち、タンパク質相互作用に重要な役割をもっていると推測された。**plectin** の **BRCA2** 結合領域を明らかにするため、この領域の一部をクローニングし、**GST** 融合タンパク質 (**GST-PLEC M1**、**GST-PLEC M-C**) を精製し、**GST pull down** 法を用いて検討した。その結果、いずれの領域も **BRCA2** との相互作用に関与することが明らかになった。
3. 先行研究によって、**plectin** は細胞骨格を架橋し、核膜構成タンパク質とも相互作用すること、**BRCA2** は主に核内に局在するが、**S** 期から **M** 期前期までは中心体にも局在することが知られている。そこで、今回新たに見出した **BRCA2-plectin** 複合体が、中心体局在制御に関与するかについて検討を行う事とした。**plectin** は細胞骨格を架橋する作用を持つタンパク質であるが、**CDK 1** によってリン酸化されると、その架橋作用を喪失する性質を持つ。ホモジナイザーによって細胞膜を破断し、核、中心体、**plectin** を含む分画を作製し、**CDK 1** を反応させることで中

心体局在に変化が観察されるかについて検討した。その結果、CDK 1 による plectin リン酸化によって中心体局在が変化し、核縁からの距離が相対的に長い細胞が高頻度に観察されることが分かった。

4. BRCA2 と plectin の相互作用に PLEC M1 領域が重要な役割を担っていることが、GST-pull down 法によって明らかになっていたため、この領域が *in vitro* あるいは *in vivo* において BRCA2-plectin 相互作用を阻害するかについて検討を行った。その結果、*in vitro* においても、*in vivo* においても PLEC M1 によって BRCA2-plectin 相互作用は阻害される事が明らかになった。また、細胞内においては、PLEC M1 を導入する事によって、中心体の局在に変化が生じ、核縁からの距離が相対的に長い細胞が高頻度に観察されることが明らかになった。また、同時に、核の形態異常が見られる細胞も高頻度に観察されることが明らかになった。
5. BRCA2 あるいは plectin の発現抑制によって中心体局在変化が観察されるかについて検討を行った。それぞれの siRNA を作製し、タンパク質の発現抑制を行ったところ、BRCA2、plectin のいずれにおいても中心体局在変化が観察され、同時に、核形態異常をもつ細胞も高頻度に観察されることが明らかになった。
6. これらの実験結果より、BRCA2 は plectin と相互作用し、中心体局在制御において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

以上、本論文は BRCA2 と相互作用するタンパク質である plectin を新たに同定し、その機能解析により BRCA2-plectin 複合体が、細胞分裂において非常に重要な役割を担っている中心体の局在制御に関与している事を明らかにした。これまで、中心体における BRCA2 の機能は全く未知であった。本論文は BRCA2 の新規機能、そして、発癌過程において重要であると考えられているゲノム不安定性と中心体局在制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。