

## 審査の結果の要旨

氏名 平池 春子

本研究は新規乳癌抑制候補遺伝子として染色体 8p21 領域から同定された DBC1 (deleted in breast cancer 1)の生物学的意義について検索し、この DBC1 が乳癌抑制遺伝子 BRCA1 や BRCA1 依存性 SIRT1 に対する影響に関して解析し、下記の結果を得ている。

### 1. DBC1 は細胞内において BRCA1 と複合体を形成する

DBC1 が HeLa 細胞内で BRCA1 と内在性複合体を形成するか否かを検討したが、DBC1 と BRCA1 は特異的に共免疫沈降するので DBC1 と BRCA1 は複合体を形成していることが判明した。また 293T 細胞に DBC1 および BRCA1 (野生型および変異型) の発現ベクターをリポフェクション法でトランスフェクションしたのち、anti-FLAG M2 agarose にて免疫沈降を行ったが、DBC1 と BRCA1 (野生型および変異型) は特異的に共免疫沈降するので DBC1 と BRCA1 (野生型および変異型) は複合体を形成していることが判明した。

### 2. DBC1 と BRCT の結合領域の同定~in vitro および in vivo における DBC1 と BRCT の結合

DBC1 と BRCT が直接結合するかどうかを検討するため GST pull down assay が行われたが、DBC1 と野生型および変異型 BRCT は直接的に結合することが判明した。DBC1 の BRCT との結合領域の同定のため、DBC1 の deletion mutant を用いて GST pull down assay が行われたが、DBC1 のアミノ酸末端 (DBC1 N: 1-230 アミノ酸) が BRCT との結合領域であることが判明した。Mammalian two-hybrid assay を用いたところ、VP16-DBC1 N は GAL4-BRCT の活性を正に調節したことから GST pull down assay の結果が確認された。一方 VP16-DBC1 N は GAL4-BRCT の活性を抑制した。

### 3. DBC1 と BRCA1 の MCF-7 細胞内における共存および動態変化

DBC1 と BRCA1 の細胞内における共存について、共焦点顕微鏡を用いて観察した。定常状態では核内において DBC1 と BRCA1 は共存した。細胞に紫外線を照射して細胞死を誘導したが、核の形態より細胞死を起こしていると考えられる細胞の細胞質において、両者が共存していることが確認された。

#### 4. DBC1 の BRCA1 に対する転写活性抑制効果

DBC1 が BRCT の転写活性化能に与える影響を検討した。DBC1 を GAL4-BRCT と同時に 293T 細胞に発現させたところ、BRCT のルシフェラーゼ活性は DBC1 発現により半減し、特異的抑制効果を示した。DBC1 N 発現ベクターは、この抑制効果をもたらさなかった。BRCA1 は SIRT1 promoter を持つルシフェラーゼベクターの活性を上げることが知られているが、DBC1 はこの増強効果を抑制した。従って BRCA1 依存性 SIRT1 発現増強作用を DBC1 は抑制することが示された。ChIP assay により、SIRT1 promoter 1354-1902 の領域に DBC1、BRCA1、SIRT1 の三者が存在することが判明した。

#### 5. DBC1 の乳癌生検組織における発現

乳癌生検組織における DBC1 の発現を、駒込病院乳癌症例について免疫組織化学染色法にて検討し、乳癌予後規定因子との関連を調べた。DBC1 および SIRT1 の発現量を点数化して評価したところ、DBC1 発現と乳癌の核異形度が正の相関を示すことが明らかとなった。一方 DBC1 発現、SIRT1 発現と HER2 の発現は逆相関することがわかり、乳癌の予後規定因子と関連がある可能性が示唆された。

以上、本論文は新規乳癌抑制候補遺伝子である DBC1 は BRCT の野生型、変異体いずれにも結合し得ること、また転写抑制因子として作用することから、BRCT の変異体に転写活性化能が消失している原因の一つではないかと考えられること、抗老化分子 SIRT1 には、p53 の脱アセチル化に対し拮抗しているのみならず、SIRT1 発現レベルでも拮抗していること、結果として、抗腫瘍ないし造腫瘍的に作用しうることは、発癌機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位授与に値するものと考えられる。