

## 論文内容の要旨

申請者氏名 Le Phuong Hang

(CAG)<sub>n</sub> に代表されるトリプレットリピート (3ヌクレオチドリピート、TNR) は遺伝的不安定性を示し、ヒトの各種神経変性疾患では、それらの原因遺伝子の DNA 配列中に存在する TNR のコピー数が以上に増加することが発症の原因となっている。親から子に遺伝情報が伝達される過程で TNR のコピー数変動 (減少と増加) が生じることは明らかになっているが、神経変性疾患発症の際の極端なコピー数の増加も含めて、TNR コピー数の変動の分子機構はほとんど解明されていない。しかし、*in vitro* の研究において TNR が不完全なヘアピンや 4 重鎖構造などを形成することや、これらの異常な DNA 構造が DNA ポリメラーゼによる DNA 鎖伸長反応が阻害されることから、TNR のコピー数変動には DNA 複製が関与する可能性が示唆されている。そこで、申請者は TNR の遺伝的不安定性と DNA 複製の関係を明らかにすることを目的として、ハンチントン舞踏病の原因遺伝子である huntingtin (*HTT*) 遺伝子に由来する CAG/CTG リピートを含む DNA 上での複製フォークの進行を調べることを計画した。

まず、大腸菌 *oriC* プラスミド DNA 複製系を利用して、健常者およびハンチントン病発症者の CAG/CTG リピートのコピー数を持つ *HTT* 遺伝子由来の DNA 断片をクローン化した *oriC-terB* プラスミドを鋳型 DNA として *in vitro* 複製系での複製フォークの進行を詳細に解析した。その結果、以前の報告とは異なり、発症者レベルの大きなコピー数を持つ CAG/CTG リピートでも複製フォークの進行が顕著に停止しないことが分かった。一方、予想外のこととして、*HTT* 遺伝子の CAG/CTG リピートの下流に存在する 33 bp の DNA 領域が複製フォークの進行を妨げることが判明した。この 33 bp の DNA は (CCG/CGG)<sub>7</sub> の TNR を含んでおり、dFR と命名して、方向性が異なる dFR-I と dFR-II についての詳細な生化学的解析を行った。その結果、以下のことが明らかになった。1) CCG リピートがリーディング鎖合成の鋳型となる dFR-II が強力な DNA 鎖伸長の阻害を示した。2) この DNA 鎖伸長阻害は大腸菌、出芽酵母、ヒトの複製型 DNA ポリメラーゼに対して検出されたが、特に真核生物のリーディング鎖合成に働く DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  が最も強く阻害された。3) DNA の高次構造を取り除く単鎖 DNA 結合タンパク質が存在しても、dFR-II による DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  の鎖伸長阻害は解消されなかった。以上のことから、*HTT* 遺伝子の CAG/CTG リピート自体は複製フォークの進行に影響を及ぼさないが、CAG/CTG リピートの下流に存在する短い CCG/CGG リピートが DNA 合成の方向に依存して DNA 鎖伸長を強く阻害し、複製フォークの一時的な停止を引き起こすことを結論した。複製フォーク進行阻害は二本鎖 DNA 切断を誘発する可能性が考えられることから、そのことが引き金となって CAG/CTG リピート内での異所的な組換えが生じ、異常なレベルの遺伝的不安定性を引き起こすモデルを提唱した。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Le Phuong Hang

遺伝情報は世代を超えて伝達される際に、突然変異や染色体再編などによりある低い頻度で変化する。この遺伝的変化はゲノム全体で同じ頻度で生じるのではなく、DNA配列や染色体構造などにより変化し易さが大きく異なる。特に遺伝的変化が生じやすいDNA領域には様々な種類の繰り返し配列が存在することが知られており、種内での遺伝的多型を生み出す原因となるだけでなく、遺伝病発症の原因となる場合も知られている。ヒトの神経変性疾患の原因遺伝子に存在するトリプレットリピート(TNR)は、その代表的な繰り返し配列であり、強い遺伝的不安定性を示す。健常者でもTNRのコピー数は個人により異なるほどの多型性を示すが、発症者ではTNRのコピー数が異常なレベルに増加する。このようなTNRの遺伝的不安定性の分子機構については、神経変性疾患の発症メカニズムの解明や、発症の予防の観点から医学上の重要な課題であるため、世界中で活発な研究が行われてきた。しかしながら、TNRがDNA鎖伸長の際に高頻度でスリッページを起こしやすいことが示されている以外には、未だに不明な点が多い。

本論文では、TNRの遺伝的不安定性とDNA複製の関係を明らかにすることを目的として、精製した複製タンパク質群からDNA複製フォークを試験管内で再構成することができる大腸菌 *oriC* プラスミドDNA複製系を用いて、ヒトハンチントン舞踏病の原因遺伝子 *HTT* に存在する(CAG/CTG)<sub>18-123</sub> のTNRを含むDNA配列での複製フォークの進行を詳細に解析している。その結果、TNR自体は複製フォークの進行にほとんど影響を及ぼさないが、TNRの近接した下流に複製フォークの進行を阻害する配列が存在することを明らかにしている。さらに、この複製阻害配列の実体は(CCG/CGG)<sub>7</sub> のTNRであることを突き止め、詳細な生化学的解析から鋳型にCCG配列が含まれる時にのみDNAポリメラーゼのDNA鎖伸長反応を強く阻害することを発見している。また、様々な複製型DNAポリメラーゼを用いた解析を行い、真核生物のリーディング鎖合成を担うDNAポリメラーゼ $\epsilon$ が特に強いDNA鎖伸長阻害を示すことから、TNRの遺伝的不安定性を説明する新たなモデルも提唱している。

以上のように、本論文はヒトの神経変性疾患の原因遺伝子に共通して見られるTNRの遺伝的不安定性の分子機構におけるDNA複製の役割を明らかにする過程で、DNA鎖伸長反応を強く阻害する新規の短いTNRを発見したものであり、DNAポリメラーゼを介した遺伝的不安定性の誘発という新しい概念を提唱したものと言える。DNA構造やDNAポリメラーゼの作用機構の理解などの学術上、さらには神経変性疾患の予防・治療などの応用上の点で貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。