The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Large expansion of CTG•CAG repeats is exacerbated by MutSβ in human cells
Author(s)	仲谷, 利栄
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69412
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）

仲谷　利栄

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	望月秀樹
	副　査	大阪大学教授	河原行郎
	副　査	大阪大学教授	池内淳

論文審査の結果の要旨

トリプレットリピート病の症状進行の原因となるリピート伸長機構に関連する分子はこれまで様々なmodelで報告されているが、未だ一定の見解は得られていない。特にin vitroにおいて数百～数千リピートに及ぶ大幅な伸長・短縮を表現したhuman cell modelを用いた各転写因子の役割を検証する報告はこれまでなされていなかった。今回の論文では、800のCTG・CAGリピートを持つヒト細胞モデル（HT1080-800R）を用いて、リピート不安定性に関与する因子をそれぞれsiRNAにより抑制し、リピート長の変動をsmall pool PCR法にて解析することでこのメカニズムの鍵となる因子を同定した。すなわちMutSβのようなDNA修復因子が大幅なリピート伸長と短縮に重要な役割を果たしていることがわかり、それらはトリプレットリピート病の治療標的となりうると考えられた。この功績は学位論文に値する。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	仲谷　利栄
論文題名 Title	Large expansion of CTG·CAG repeats is exacerbated by MutSβ in human cells （ヒト細胞においてCTG·CAG反復の大幅伸長はMutSβにより悪化する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

筋強直性ジストロフィーなどに代表されるトリプレットリピート病（TRED）は、３塩基繰り返し配列の異常伸長が原因とされている。TREDは世代を経るごとにまた年齢とともに伸長する傾向（リピート不安定性）があり、リピートが長いほど重症となる。これまでの研究によりリピート不安定性にはDNA修復蛋白の関与が示唆されているが、その詳細な機構はいまだ解明されていない。我々は、以前(Nakamori et al.2011)樹立した800のCTG・CAGリピートを持つヒト細胞モデル（HT1080-800R）を用いて、リピート不安定性に関与する因子をそれぞれsiRNAにより抑制し、リピート長の変動をsmall pool PCR法にて解析することで、リピート不安定性の鍵となる因子を探索した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

HT1080-800R細胞において、各DNA修復因子をsiRNAによりknockdownした。1ヶ月後にそれぞれの転写因子が<27%以下にknockdownされていることを定量的RT-PCRで確認した。次にknockdown後のリピート数の解析を行った。MutSβのheterodimerを形成し、ミスマッチ修復に機能する因子であるMSH2とMSH3をknockdownすると大幅なリピート伸長が抑制された。一方で、MSH2とMutSαのheterodimerを形成するMSH6をknockdownすると200リピートを超える大幅な伸長が促進され、代償的にMSH3とMutSβの増加を伴った。さらMSH6をknockdownした際にMutSβが過剰に形成されていることを免疫沈降で確認した。MSH2とMSH6、MSH3とMSH6をそれぞれ同時にknockdownすると、リピート不安定性はともにMSH6 knockdown単独と比較して減少していた。このことからMSH6 knockdownによる代償性のMutSβ増加を抑制することでリピート不安定性が減少することが判明した。次にMSH6 knockdownによってCTG repeatに増加したMutSβが導入されているかどうかをクロマチン免疫沈降を用いて調べた。MSH2,MSH3ともにMSH6 knockdown時にコントロールと比較してよりCTGリピートの下流に結合していることが判明した。

さらに一重鎖DNA修復に関連するTOP1,TDP1を同時にknockdownすると大幅なリピート数の短縮が認められた。

またDNA:RNAハイブリッド形成とTC-DNR(転写と共役したヌクレオチド除去修復)に影響するRNA:DNA helicaseであるsenataxinをknockdownすると両方向へのリピート不安定性が増悪した。

〔総　括(Conclusion)〕

上記結果よりMutSβのようなDNA修復因子が大幅なリピート伸長と短縮に重要な役割を果たしていることが判明し、それらはトリプレットリピート病の治療標的となりうると考えられた。