

論文の内容の要旨

論文題目: Positive and negative regulation of *Period1* expression at post-transcriptional stage

和訳: 哺乳類時計遺伝子 *Period1* の 3' 非翻訳領域を介した転写後調節機構の解析

指導教官 徳永 勝士 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月 入学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名 小島 志保子

生物には約 24 時間を周期とする概日リズムが存在し、光などの外部刺激によって同調する。哺乳類においては、視床下部に存在する視交叉上核(SCN)がリズム発振機能を司っていることが知られている。

マウス SCN において、時計遺伝子 *Period1*(*Per1*)の mRNA 及びタンパク質発現は明暗及び恒暗条件下において自律的な日周振動を示し、この振動は肝臓・肺・骨格筋などの末梢組織でも維持されることが明らかになっている。*Per1* 欠損変異動物及び *Per1* 過剰発現変異動物の解析より、*Per1* 発現の日周振動は概日リズム形成に重要な役割を果たすと考えられている。*Per1* 発現リズムは転写レベルで一義的に規定され、実際、転写因子である Clock-Bmal1 ヘテロダイマーによる活性化、Cry1、Cry2 による抑制により形成されることが知られている。

一方、*Per1* タンパク質の発現は mRNA と比較して約 4-6 時間遅れた位相で振動する。このことは *Per1* 発現日周リズムに転写後制御が機能していることを示す。ショウジョウバエの時計遺伝子 *Period* の mRNA 及びタンパク質発現リズムにも脳内で約 5 時間の位相差が観察される。この位相差は *Period* の発現リズムの維持に重要であることが提唱されているものの、その形成機構について詳細な解析は為されていない。また、孵化リズムを制御する RNA 結合タンパク質として dLark が知られている。dLark は、転写日周リズムを示さないものの、翻訳産物発現は、明期に高く暗期に低い明確な発現リズムが観察される。現在、dLark の RNA 結合配列や標的 mRNA、またその分子機能は全く明らかにされていない。

一般的に転写後調節は、mRNA の選択的スプライシングや安定性、そしてタンパク質の翻訳効率や局在を制御し、発生や細胞極性の形成に重要な役割を果たす。これらを制御するシグナルは主に転写物の 3' 非翻訳領域(3' UTRs)に存在する。そして、転写後調節にはこれらのシグナルと制御分子（多くは RNA 結合タンパク質）との相互作用が必要である。

本研究では、マウス *Per1* (*mPer1*) の mRNA 及びタンパク質発現リズム位相差の有する意義とその形成機構を解明するために、*mPer1* の転写後調節機構について解析を行った。luciferase と *mPer1* 3'UTR を融合したリポーター遺伝子を用いて解析し、その結果 *mPer1* 3'UTR 内に翻訳抑制領域を見出した。さらに、マウス Lark (*mLark*) が *mPer1* 遺伝子発現を正に転写後制御する事を見いだした。そして、*mLark* が概日リズム形成に果たす機能を *mPer1::luc* 遺伝子を導入したトランスジェニック動物の SCN 培養系を用いて解析した。

I. Structural and functional analysis of 3' untranslated region of mouse *Period1* mRNA

mPer1 の転写後調節機構を明らかにするために、まず、*mPer1* 3'UTR を単離した。全 *mPer1* 3'UTR は 601 nt で、ヒト *Per1* 3'UTR とは 78.0% と高い相同性を示し、両者とも特に典型的な poly(A) 付加配列を持たなかった。この *mPer1* 3'UTR 中には転写後調節に重要だと考えられている二つの RNA モチーフが存在した。一つは mRNA の崩壊に寄与する AU-rich element (ARE) であり、もう一つは mRNA の安定性や翻訳効率などを制御する differentiation control element (DICE) である。*mPer1* 3'UTR を機能を解析するために、*mPer1* 3'UTR もしくは SV40 poly(A)

signal を luciferase 遺伝子の下流に挿入したレポーター遺伝子 [*luc::mPer1* 3'UTR, *luc::SV40 poly(A)*] を構築し、NIH3T3 細胞中で両レポーターの発現する転写・翻訳産物量を比較した。両レポーター遺伝子の RNA 量を定量的 RT-PCR 法を用いて測定したところ、ほぼ同量の RNA を発現していた。しかし、*luc::mPer1* 3'UTR が発現する luciferase 活性は、*luc::SV40 poly(A)* が示すその約 20% にとどまった。この結果より *mPer1* mRNA の 3'UTR には翻訳抑制領域が存在していることが判明した。この翻訳抑制領域をさらに詳しく決定するために、種々の *mPer1* 3'UTR 欠失変異体を作製し、その luciferase 活性を測定した。その結果、*mPer1* 3'UTR の 322-517 nt の領域がこの翻訳抑制活性に必要な十分であることが示された。この領域には ARE が含まれているが、ARE 点変異レポーター遺伝子を用いた実験により、この翻訳抑制に ARE は機能していないことが明らかになった。

II. Post-transcriptional activation of mouse *Period1* expression by an RNA-binding protein, mLark

mPer1 の転写及び翻訳リズム間位相差の形成には、I で明らかにした負の制御だけでなく、正の制御も必要であると考えられる。そこで、概日リズム形成に機能するとされるショウジョウバエ *dlark* のマウス相同遺伝子 *mLark* の *mPer1* 発現に与える機能を解析した。まず、上述の二つのレポーターと *mLark* を NIH3T3 細胞に共発現させ、その luciferase 活性を測定した。その結果、*mLark* の共発現によって *luc::mPer1* 3'UTR のみ、luciferase 発現レベルが約 5 倍に増加した。また、この luciferase 活性の上昇は *mLark* の発現ベクターの濃度に依存していた。一方、*mLark* 共発現下でのレポーターの転写物量は、*mLark* 共発現の有無に関わらずほぼ同量であった。さらに、*mLark* が内在性の *mPer1* 遺伝子に対しても同様の作用を及ぼすかを明らかにするため、NIH3T3 細胞に *mLark* の発現ベクターを導入し、内在性 *mPer1* の mRNA 量、*mPer1* タンパク量を測定した。*mLark* の強制発現に依存して、NIH3T3 細胞ではほとんど検出出来なかった内在性 *Per1* タンパク質の著しい発現が認められた。この時、*mLark* 強制発現によって *mPer1* mRNA 量は影響を受けなかった。これらの結果は *mPer1* 3'UTR へ *mLark* が相互作用することによって、転写後に *mPer1* 遺伝子の発現を活性化していることを示唆している。そこで、*mLark* と *mPer1* 3'UTR との相互作用領域を決定するために RNA ゲルシフトアッセイを行った。その結果、*mLark* は *mPer1* 3'UTR の

559-589 nt の領域と特異的に結合し、この結合は反応液中の mLark の濃度に依存していた。またこの結合は、抗 Lark 抗体もしくは大過剰量の RNA(559-589nt) によって阻害されたが、抗 c-Myc 抗体もしくは大過剰量の RNA(342-372nt)では阻害されなかった。さらに、細胞内でもこの結合が維持されているかを明らかにするため、抗 Lark 抗体を用いて免疫沈降-RT-PCR 法を行った。その結果、mLark は NIH3T3 細胞内でも *mPer1* mRNA と相互作用していることが明らかになった。これらの結果を総合すると、mLark は *mPer1* 3'UTR の 559-589 nt を介して相互作用し、転写後調節によって *mPer1* の発現を活性化すると考えられる。さらに興味深いことに、恒暗条件で飼育したマウス SCN において mLark タンパク質の発現には CT12-16 にピークをもつ自律的な振動が見られた。これは、*mPer1* タンパク質が示す発現ピークと一致する。しかし、*mLark* mRNA の発現には日周リズムは見られなかった。即ち、mLark 自身も概日リズムに支配された転写後調節を受けている事が明らかになった。これらの結果は、*mPer1* タンパク質の発現リズム形成には mLark と *mPer1* 3'UTR との相互作用による翻訳活性化が必要であることを示している。

以上、本研究では *mPer1* 3'UTR の構造を明らかにし、その機能を解析した。その結果、*mPer1* 3'UTR には、正及び負の転写後調節に必要な配列を含んでいることを明らかにした。一つは翻訳抑制に必要な十分な 322-517 nt の領域で、もう一つは転写後翻訳活性化領域として機能する 559-589 nt の領域であった。また、この 559-589 nt と直接相互作用し、翻訳を活性化する分子として mLark を同定した。

本研究より、*mPer1* タンパク質発現リズムが *mPer1* 3'UTR を介した正及び負の転写後調節によって形成されることが示された。さらに、正の制御に機能する mLark 自身も概日リズムにより支配された転写後調節を受けることから、概日リズム形成の分子機構には、転写レベルの制御だけではなく、転写後制御の重層的なネットワークも機能していると考えられる。