

{別紙 2}

審査の結果の要旨

氏名 小島 志保子

本研究では、概日リズム形成において重要な役割を演じると考えられている mouse *Period1* (*mPer1*) 遺伝子の 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。その結果、下記の結果を得ている。

- I. 一般的に転写後調節を制御するシグナルは主に転写物の 3' 非翻訳領域(3' UTRs)に存在する事が知られているために、まず、*mPer1* 3'UTR を単離した。*mPer1* 3'UTR は human *Per1* 3'UTR と高い相同性(78.0%)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。*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 量はほぼ同量の RNA を発現していたにも関わらず、*mPer1* 3'UTR を持つレポーター遺伝子の luciferase 活性は、対照レポーター遺伝子の約 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かつ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. 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、両レポーターの発現する転写・翻訳産物量を比較した。その結果、*mLark* の共発現によって *mPer1* 3'UTR を有するレポーター遺伝子の luciferase 発現レベルは約 5 倍に増加し

たにも関わらず、その転写物量はほぼ同量であった。さらに、NIH3T3細胞に mLark を強制発現させ、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、内在性 Per1 タンパク質量は著しく増加したが、mPer1 mRNA 量は影響を受けなかった。これらの結果は mLark が転写後に 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 とが直接相互作用するかを RNA ゲルシフトアッセイによって観察した。その結果、mLark は mPer1 3'UTR の 559-589 nt の領域と特異的に結合することが明らかとなった。さらに、免疫沈降-RT-PCR 法を用いて解析を行ったところ、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。さらに、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。

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 には翻訳抑制に必要な十分な領域(322-517 nt)と、転写後翻訳活性化領域(559-589 nt)が存在することが明らかになった。おそらく、翻訳抑制領域と相互作用する未知の分子と翻訳活性化領域に相互作用する mLark とのバランスによって mPer1 mRNA 及びタンパク質発現リズム位相差が形成されているのではないかと考えられる。

以上、本論文によって 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。また、Per1 だけでなく Lark も転写後制御を受けていることから、本研究は概日リズム形成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関与していることを示したものであり、概日リズム形成の分子機構の解明に重要な貢献を為すと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。