

論文の内容の要旨

論文題目 核内因子 WTAP (Wilms tumor 1-associating protein) の機能解析

氏名 堀内 恵子

WTAP (Wilms tumor 1-associating protein) は、当研究室においてヒト血管内皮細胞 HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) cDNA ライブラリーを用いた酵母 Two-Hybrid スクリーニング法により、GATA2 の Zn フィンガードメインに相互作用する因子として同定され、同じく Zn フィンガー蛋白質である Wilms tumor 1 と結合する蛋白質として報告されている。WTAP はショウジョウバエの *female-lethal-2-D (fl(2)D)* 遺伝子のヒトホモログであり、FL(2)D は *Sex-lethal* 遺伝子および *transformer* 遺伝子の pre-mRNA のスプライシング制御に関わることが示されている。また近年、プロテオーム解析から WTAP はスプライソソーム関連蛋白質として単離されている。以上のことから、WTAP は splicing に関与しているのではないかと考えられているが、その生理的機能は明らかとなっていない。本研究では、WTAP の生理的機能を解明することを目的とし、HUVEC を用いた *in vitro* およびノックアウトマウスを用いた *in vivo* の系で解析を行った。

WTAP ノックダウン細胞を用いた WTAP の機能解析

WTAP に特異的な配列の siRNA (short interfering RNA) を HUVEC にトランスフェクションすることにより、WTAP mRNA および蛋白質発現を有意に下げる RNAi (RNA interference) の系を得た。この細胞から RNA を回収し、Affimetrix 社 Human Genome U133 Plus 2.0 アレイを用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、Cyclin A、CDC20、Cyclin B など細胞周期の G2/M 期に関連する遺伝子発現が顕著に減少した。サイクリンは細胞周期の主な調節因子であるが、Cyclin A、B が顕著に抑制されており、G1 サイクリンである Cyclin D、E の発現レベルは変わらなかった。

以上の結果から、WTAP の RNAi が細胞周期に何らかの影響を及ぼしていると考え

られた。そこでFACS解析により細胞周期のプロファイルを調べたところ、WTAPのノックダウンを行ったHUVECでは、コントロールと比べてG2/M期の細胞の割合が8.3%から21%へ顕著に増加していることが分かった。また細胞数を比較すると、WTAPのノックダウンにより細胞増殖が停止しておりG2 arrestが起こっていると考えられた。この作用は初代培養細胞であるヒト線維芽細胞においても観察され、WTAPのノックダウンによるG2 arrestがHUVECに特異的な現象ではないと考えられた。

WTAPのノックダウンによるG2 arrestのメカニズムを解析するにあたって、DNAマイクロアレイ解析で最も発現が低下したCyclin A2に注目した。Cyclin A2は、細胞周期のS期から発現し始め、G2/M期で最高レベルに達し、分裂中期の直前に速やかに分解される。S期の進行、G2/Mの移行に必要である。Cyclin Aの除去によりG2 arrestが起こることがショウジョウバエ胚や哺乳類体細胞で報告されている。そこでWTAPのノックダウンによりCyclin A2の発現が減少し、その結果G2 arrestが起こるといふ仮説を立て、Cyclin A2 mRNAの発現調節機構について解析した。

WTAPを介したCyclin A2 mRNA発現の調節が、転写活性による制御なのか、あるいはmRNAの安定性を介した制御なのかを解析した。まず、Cyclin A2のプロモーターおよび上流調節領域を挿入したルシフェラーゼベクターを用いたプロモーターアッセイを行い、転写活性による制御に関して検討した。その結果、WTAPのRNAiとコントロールで転写活性に顕著な違いは認められなかった。

次に、アクチノマイシンDを用いたアッセイにより、mRNAの安定性を介した制御について検討した。WTAPのsiRNAで処理した細胞にアクチノマイシンDを添加して転写を阻害し、その後、時間を追ってRNAを回収した。リアルタイムPCR法によりCyclin A2 mRNA量を調べてmRNAの崩壊速度を求めることで安定性を評価した。その結果、WTAPのRNAiによりmRNAの半減期が3時間から42分に短くなり、安定性が下がることがわかった。mRNA安定性制御の機構の一つとして、3' UTRを介した制御が知られている。そこでCyclin A2の3' UTR部分をluciferaseのコード領域直下に挿入したプラスミドを用いてキメラルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、3' UTRの1~244base部分のキメラルシフェラーゼを用いた場合、WTAPのRNAiによりコントロールの半分程度までルシフェラーゼ活性が落ちた。すなわち、Cyclin A2 mRNA 3' UTRの領域がWTAPによるmRNAの安定性に関わっていることが示唆された。

Wtap ノックアウトマウスを用いた解析

レキシコン社において遺伝子トラップ法により作出されたノックアウトマウスを用いて解析した。ベクターが挿入された部分のPCRによりgenotypingの系を作成し、新生児のgenotypingを行ったところ、新生児でWtap^{-/-}マウスは認められなかった。したがって、Wtap ノックアウトマウスは胎生致死であり、WTAPが発生の過程において重要な役割を担っていることが示唆された。そこでWtapヘテロマウス同士を掛け合わせ

て胎生期の胚の解析を行った。

卵黄囊 DNA を用いて genotyping を行い E8.5 (Embryonic day 8.5) 胚の解析を行った。Wtap $-/-$ 胚は、E8.5 ですでに野生型胚、ヘテロ胚と比べて大きさが5分の1程度と大変小さく、神経ひだ、心臓、体節などの胚構造が認められないという異常な phenotype を示したので、さらに初期のステージである E6.5 に遡って組織学的な解析を行った。E6.5 胚は原腸陥入が始まる時期であり、胚性および胚外性の内胚葉、外胚葉で構成されている。異常な形態を示した個体は同腹の正常胚に比べて小さく、また、組織学的には細胞数が少なく、外胚葉と内胚葉からなる特徴的な胚の層構造が認められず、胚盤胞様の形態を呈した。抗 WTAP 抗体を用いた免疫染色の結果、E6.5 で異常な phenotype を示した個体では WTAP が染まらず、Wtap $-/-$ であることがわかった。また、Wtap $-/-$ の E8.5、E9.5 胚は Wtap $-/-$ の E6.5 胚の構造と類似していたことから、E6.5 より発生が止まっていると考えられた。

一方、Cyclin A2 ノックアウトマウスは E6.5 で発生が止まり胎生致死であると報告されており、phenotype が Wtap ノックアウトマウスのものと大変類似している。細胞周期解析における WTAP の RNAi の結果を合わせて考えると、Wtap ノックアウトマウスでは Cyclin A2 の発現量が低下することで、Cyclin A2 ノックアウトマウスと同様の phenotype を示すと考えられた。

細胞周期における WTAP 発現量

WTAP が G2 サイクリン、M 期関連遺伝子の発現に関与していることが示唆されたため、細胞周期における WTAP の発現量について検索した。Serum starvation により HUVEC を G1 期に停止させ、その後まき直すと同時に増殖因子含有メEDIUMに換えることにより細胞周期を同調させた。その結果、WTAP の発現量は G1 期で少なく、S、G2/M 期で上昇することがわかった。Cyclin A2 は G1 期には発現していないが、S 期に発現し、G2/M 期でピークを迎えており、WTAP の発現パターンと同調していた。この発現パターンは Cyclin A2 mRNA の安定性を維持する WTAP の機能を支持するものであると考えられた。

以上の研究結果より、WTAP は 3' UTR を介して Cyclin A2 mRNA の安定性を調節し、細胞周期における G2/M 移行に必要であることが、哺乳類細胞およびマウス個体レベルにおいて明らかとなった。