

## 審査の結果の要旨

氏名 堀内 恵子

本論文は、WTAP ノックダウン細胞において、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することを明らかにした。WTAP のノックダウンを行った HUVEC では、G2/M 期の細胞の割合が顕著に増加しており、また細胞増殖が停止しており G2 アレスト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 アレストは HUVEC に特異的な現象ではないと考えられた。

Cyclin A2 mRNA 量の低下は、転写活性による制御ではなく、mRNA の安定性を介した制御であることがプロモーターアッセイおよび安定性アッセイにより明らかとなった。WTAP を介した cyclin A2 mRNA の安定性に関わる領域が Cyclin A2 mRNA 3' UTR の 9 塩基にあることを欠失コンストラクトを用いた安定性アッセイにより明らかとなった。WTAP 蛋白質の発現量は細胞周期により変化し、G1 期で少なく、G2/M 期で最大になることから Cyclin A2 の発現量と同調しており、cyclin A2 mRNA の安定性を維持することで cyclin A2 の発現量を調節するのに必要であることを示唆した。さらに、アデノウイルスにより Cyclin A2 を発現させると、WTAP のノックダウンによる G2 アレストが軽減されることから、Cyclin A2 は WTAP のターゲットであり、WTAP のノックダウンで Cyclin A2 の発現量が低下することにより G2 アレストが起こることが確認された。

Wtap ノックアウトマウスを用いた解析では、新生児で Wtap<sup>-/-</sup>マウスは得られなかったことから、WTAP が発生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。胎生期の解析により、Wtap<sup>-/-</sup>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 を示すことが明らかになった。E6.5 胚で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<sup>-/-</sup>であることがわかった。また、Wtap<sup>-/-</sup>の E8.5、E9.5 胚は Wtap<sup>-/-</sup>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。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で大変類似していると考えられた。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。

本研究は、WTAP が Cyclin A2 mRNA 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 移行に必要なであることを、哺乳類細胞およびマウス個体レベルにおいて明らかにしたものである。

よって本論文は博士(学術)の学位請求論文として合格と認められる。