

京都大学	博士（薬学）	氏名	伊藤 翔
論文題目	Studies on Circadian Clock RNA Methylation and Micturition Rhythm		

(論文内容の要旨)

The circadian clock is composed of clock genes interlocked in transcriptional/post-translational feedback loops (TTFLs) regulating their own expression. The discovery of the basic molecular mechanism of TTFLs at 1984 won the 2017 Nobel Prize in Physiology of Medicine. In the decades since this discovery, most research on TTFLs has focused primarily on two spatially and temporally separated processes: “transcription” and “(post)translation”. Yet, how these two processes are connected via RNA level regulation has been poorly understood. Our laboratory found that RNA methylation is necessary for the proper function of the circadian clock, and that when RNA methylation is inhibited, the period length of the circadian clock becomes longer. However, the molecular mechanism underlying this phenomenon is not fully elucidated.

At the physiological level, the oscillations of the core clock genes generated by TTFLs are output as changes in locomotor activity, body temperature, metabolisms, etc. in a cycle of about 24 hours. Historically, recording methods of locomotor activity rhythm and body temperature rhythm have led to great advances in the study of circadian physiology. In addition, the development of the metabolic cage made it possible to measure energy consumption rhythm. However, methods for recording renal excretion and reabsorption rhythms are not well established and new methods with high accuracy are awaiting development.

**In Chapter 1**, the relationship between the circadian clock and RNA methylation was investigated at the molecular level. Particularly, I focused on studying N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A), known as the most prevalent internal base modification of mRNA for mammals. I found that the transcripts of a key circadian clock component, Casein kinase 1 delta (*Csnk1d*), possess an m<sup>6</sup>A modification in the 3'-untranslated region (3'-UTR). Reduced expression of the m<sup>6</sup>A writer enzyme *Mettl3* led to the upregulation of *Csnk1d* protein expression, suggesting that the m<sup>6</sup>A modification negatively regulates *Csnk1d* translation. To test the importance of m<sup>6</sup>A of *Csnk1d* in vivo, I generated mutant mice with a deletion in m<sup>6</sup>A locus of *Csnk1d*. The result of locomotor activity measurement demonstrates that the m<sup>6</sup>A locus is required for the proper oscillation of the circadian clock. Furthermore, I show that two *Csnk1d* alternative splicing isoforms, *Csnk1d1* and *Csnk1d2* which have not

been characterized so far, exhibit mutually antagonistic functions in the regulation of the circadian clock.

**In Chapter 2**, I invest my effort to the development of a new system for measuring the circadian rhythm of renal excretion and reabsorption. More specifically, I revised a previously established method, automated Voided Stain on Paper (aVSOP). This improved method allows simultaneous measurement of animal behavior and micturition rhythms, which could not be done so far. Using this system, I monitored simultaneously the locomotor rhythm and micturition rhythm under an experimental jet-lag condition, where the circadian clock function is temporarily impaired.

(論文審査の結果の要旨)

生体リズムは、時計遺伝子の転写/翻訳振動が個体の活動レベルにまで反映する極めてユニークな系である。DNAから転写されたRNAは細胞内で種々のプロセッシングを受ける。体内時計の振動には、遺伝子の転写・翻訳後制御のみならず、RNAの化学修飾、特にアデニン塩基のメチル化(m<sup>6</sup>A修飾)の重要性が示されてきた。しかし、生体リズム形成を担うRNAに関して、メチル化の具体的な標的やその作用機序が明らかにされていない。個体レベルにおいて概日時計は、運動、体温、代謝、ホルモン分泌など種々の生理活動リズムを制御する。しかし生理活動の計測において、腎排泄・再吸収リズムを記録する方法が十分には確立されておらず、精度の高い新しい方法の開発が待たれていた。伊藤 翔氏は本論文の第一章において、体内時計に必須の時計タンパク質キナーゼCK1DがRNAのメチル化による遺伝子発現制御を受けることを明らかにし、第二章でマウスの排尿リズムと行動リズムを同時測定するためのシステム開発に成功した。第一章ではとくに、m<sup>6</sup>A修飾がCK1D mRNAの3'非翻訳領域に起き、翻訳をネガティブに制御すること、CK1Dには機能の異なる2つのアイソフォームがあること、そしてm<sup>6</sup>A修飾部位の変異マウスが概日リズム異常を示すことを明らかにした。また第二章では排尿を検出するための濾紙を一定速度で自動的に巻き取る装置(aV SOP)と行動リズム計測系の併用により、排尿と行動の同時測定を行い、時差環境下でマウスの排尿と行動リズムの位相関係を明らかにした。これらの成果は、RNAのメチル化を介した新たな生体リズム調節機構の解明、ならびに、腎排泄機能に着目した新たな生体リズム観測系の利用を報告するものであり、体内時計の基礎生理学的機構の解明において重要な知見をもたらしたといえる。よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として価値あるものと認める。また、2021年2月19日に、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降