

CCR4-NOT デアデニレース欠損に伴う病態解析と新たな 遺伝子発現制御機構

Dissection of mRNA degradation pathways and anomalies associated with targeted disruption of CCR4-NOT deadenylase complex

山本 雅 (YANAMOTO TADASHI)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・教授



研究の概要：遺伝子発現を転写後に調節する mRNA 分解制御機構が注目されている。本研究では、mRNA 分解制御の重要なステップを担う CCR4-NOT deadenylase 複合体について、その構成成分の一つ一つを改変したマウスラインを作成し病態との関連を探る。また、その解析情報に基づき、CCR4-NOT 複合体と RNA 結合蛋白質や microRNA 等との相互作用を解析し、deadenylase 複合体が標的 mRNA 種を認識し分解に導く新たな仕組みを明らかにする。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：分子

1. 研究開始当初の背景

近年になって mRNA 分解系による遺伝子発現制御の重要性が認識されてきた。また、microRNA の関与の元での mRNA 分解調節による遺伝子発現制御が脚光を浴びようになってきた。しかしながら、外来刺激に応答した mRNA 分解調節機構には不明点が多かった。我々は増殖抑制性蛋白質で EGF 受容体刺激後にリン酸化される Tob が、mRNA 代謝制御に関わる poly(A) binding protein や CCR4-NOT deadenylase 複合体と会合することを見出していた。CCR4-NOT については主に酵母で解析が進み、哺乳類での生理学的重要性は分かっていなかった。

2. 研究の目的

有核細胞 mRNA 分解制御の重要なステップを担う CCR4-NOT 複合体についてその構成因子の遺伝子を改変したマウスを作成する。それらの異常、病態を解析し CCR4-NOT の生理学的意義を明らかにする。また、外来刺激に応答した mRNA 分解の基本的なメカニズムを確立する。

3. 研究の方法

CCR4-NOT 複合体の生理的意義を確立する為に発生工学の手法を用いる。また CCR4-NOT

複合体作用の解析には、分子細胞生物学、バイオインフォマティクス、構造生物学の手法を用いる。

4. これまでの成果

CCR4-NOT 複合体構成蛋白質の発現解析

マウスでの臓器特異的、時期特異的発現を調べた結果、量的にも質的にも臓器発現パターンは各サブユニットでばらつきがあり、形成される CCR4-NOT 複合体は一様ではないことが示唆された。また CNOT3 の肝臓での発現が絶食させると減少し、再度摂食すると回復することがわかり、CNOT3 が栄養条件のセンサーとなっていることが示唆された。

欠損マウスの異常／病態解析

deadenylase 活性を持つ CNOT6, 6L, 7 サブユニットを欠損させたマウスは、精子形成不全であったり抗肥満傾向にあったりするものの、見かけ上正常に成長する。CNOT8 サブユニットは deadenylase 活性を示すが欠損させた場合胚性致死となるので、他の deadenylase サブユニットでは代替できない特別な機能を有していると考えられた。他の酵素活性を持たないサブユニットは欠損させると胚性致死であった。複合体の deadenylase 活性に、これらサブユニットが構造上あるいは機能上必須であると考えら

れる。ただ、胚性致死であっても個々の、マウスで胚発生に異常を生じる時期は異なっており、個々のサブユニットが特徴的な役割を果たしていることが示唆された。

Conditional KOマウスの作成と解析

成体での機能を探るために、conditional KOマウスラインを作成した。これまでに、CNOT3lox マウスと albuminCre マウスの掛け合わせで、CNOT3 を肝臓特異的に欠損させ、瘠せで背体毛の脱毛という表現形を認めている。また AP2Cre マウスとの掛け合わせでは、胚発生は順調で出生前後に死亡した。

遺伝子発現解析

ヌルあるいはconditional欠損マウスで異常あるいは病態を示す原因はmRNA分解の遅延に基づくと推測されるので、表現形を示す組織と対応する野生型との間でmRNA発現をmicroarrayで比較しgene ontology解析した。例として、CNOT3^{+/-} マウス肝臓でエネルギー代謝や成長に関わるPdk4 mRNA やIgfbp1 mRNAが発現亢進していることを見いだした。これらmRNAの3'側では、CNOT3 欠乏状態でpoly(A)が分解されにくいことも示した。

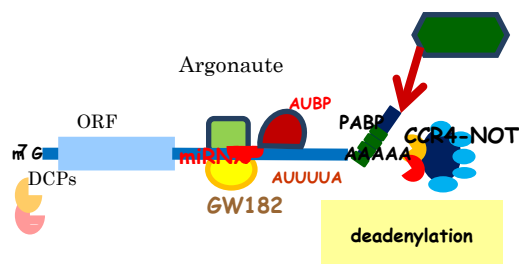
分子機構の解析

miRNA 標的 mRNA 上にリクルートするArgonaute/GW182 複合体のうちのGW182 がCNOT1 と会合することをpull-down 法等で示した。また、CNOT6L とCNOT7 deadenylase それぞれが oligo(dA) と会合する様子を共結晶解析から明らかにした。

5. 今後の計画

(1) CCR4-NOTヌル欠損、conditional欠損マウスの病態解析を進め、その生理学上の重要な役割を明らかしつつ、原因不明の病態の理解に貢献するよう努める。

(2) 上記病態を引き起こす直接の原因mRNA種をバイオインフォマティクスを駆使して焙りだし、それらmRNAのCCR4-NOTによる分解の分子機構を構造生物学的手法を取り込みながら解析し、下図モデルを確立する。



(3) CCR4-NOTと癌や肥満等に由来する成人病との関わりを探る。

6. これまでの発表論文 (受賞等も含む)

1. Morita M, Oike Y, Nagashima T, Kadomatsu T, Tabata M, Suzuki T, Nakamura T, Yoshida N, Okada M, and Yamamoto T, Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3^{+/-} mice. EMBO J, 30, 4678-4691, 2011

2. Fabian MR, Cieplak MK, Frank F, Morita M, Green J, Srikumar T, Nagar B, Yamamoto T, Raught B, Duchaine TF and Sonenberg N. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. Nat Struct and Mol Biol, 18, 1211-1217, 2011

3. Wang H, Morita M, Yang X, Suzuki T, Yang W, Wang J, Ito K, Wang Q, Zhao C, Bartlam M, Yamamoto T and Rao Z. Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. EMBO J 29: 2566-2576, 2010

4. Bartlam M, Yamamoto T. The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. Protein & Cell 1: 443-452, 2010

5. Horiuchi M, Takeuchi K, Noda N, Muroya N, Suzuki T, Nakamura T, Kawamura-Tsuzuku J, Takahashi T, Yamamoto T and Inagaki F, Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. J Biol Chem 284:13244-13255, 2009

6. Suzuki T, Tsuzuku J, Kawakami K, Miyasaka T and Yamamoto T. Proteasome-mediated degradation of Tob is pivotal for triggering UV-induced apoptosis. Oncogene 28:401-411.2009

ホームページ等

<http://groups.oist.jp/csu/unit-introduction>