

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18965

研究課題名(和文) CCR4-NOT複合体に関連するユビキチン転移酵素の生理機能の解析

研究課題名(英文) Physiological analyses of CCR4-NOT complex related ubiquitin ligase

研究代表者

山口 智和 (Yamaguchi, Tomokazu)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30749940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CCR4-NOT複合体関連ユビキチン転移酵素であるCNOT4の生理的役割を明らかにすることを目的とし以下の検討を行った。CNOT4遺伝子欠損マウス、CNOT4機能欠失マウスについて表現型を調べた結果、発生異常、心機能の低下といった特徴を観察した。また、培養細胞においてCNOT4発現抑制時の表現型を調べた結果、細胞増殖能の低下や細胞面積の退縮を認めた。以上の表現型を引き起こす分子機序を明らかにするため、CNOT4に結合するタンパク質、及びRNAの網羅的な探索を行った結果、CNOT4に結合するタンパク質の多くがRNA結合タンパク質であることがわかり、その標的候補となるRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：To characterize the physiological roles of CNOT4, the CCR4-NOT complex related ubiquitin ligase, we performed the functional analyses of CNOT4 as follows. CNOT4 deficient mice or Cnot4 mutant mice showed the phenotypes of embryonic death, high perinatal mortality, dwarf, and impaired heart functions. Analyses of CNOT4 depleted or CNOT4 mutated cells showed impaired cell proliferation and reduction of cell area. To elucidate the molecular mechanisms regulated with CNOT4, we performed the global analyses of CNOT4 interacting proteins or mRNAs. Mass spectrometry analyses of CNOT4-interacting proteins indicated that the CNOT4 is likely to bind to RNA binding proteins (RBPs). Moreover, several mRNAs are detected as candidates for target of CNOT4-RBP complex.

研究分野：分子生物学

キーワード：CCR4-NOT複合体 ユビキチン転移酵素 CNOT4 発生 細胞増殖 心機能

## 1. 研究開始当初の背景

CCR4-NOT 複合体は、酵母から哺乳類まで高度に保存された分子であるが、複数のコア分子 (CNOT1, CNOT2, CNOT3) 機能性分子 (CNOT4, CNOT6, CNOT7 など) の会合により形成される巨大なタンパク質複合体であり、核内外で数々のタンパク質群 (TOB, UBC4/5 など) と連携することで、転写調節、mRNA 代謝、翻訳制御をはじめとする細胞内遺伝子発現機構をグローバルに制御する重要な因子として知られている。申請者が所属する研究室では、ショウジョウバエにおいて大規模な *in vivo* RNAi 心不全スクリーニングが行われており、心機能調節に関与する遺伝子のうち CCR4-NOT 複合体の関連因子が多数同定されている (Kuba K, et al. Cell 2010)。その中でユビキチン転移酵素としての機能を有する CNOT4 は、ユビキチン結合酵素である UBC4/5 と連携し、UBC4/5 が輸送するユビキチンを基質タンパク質へと転移させる役割を担うとされている (図 1)。これによりプロテアソーム分解系を介した細胞内タンパク質の厳密な品質制御に重要な役割を果たしていると考えられているがその制御機構の詳細は不明のままである。また、現在蓄積しつつある CNOT4 に関する報告は酵母や培養細胞レベルでの解析結果がほとんどであり、生体組織中における生理的役割は未だ不明な点が多い。そこで本研究では CNOT4 の哺乳類組織における生理的役割を明らかにすることを目的とし研究を遂行した。

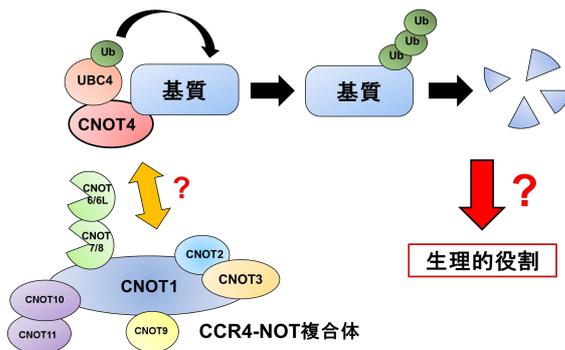


図1 CNOT4が制御するユビキチン-プロテアソーム分解系

## 2. 研究の目的

CNOT4 の生理的役割、及び CNOT4 が制御する分子メカニズムを明らかにするために、本研究では以下の目的を設定した。

(1) CNOT4 遺伝子欠損マウス、及び CNOT4 RING ドメイン変異マウス胎児における表現型の解析：CNOT4 の生理的役割を明らかにするために、申請者の研究室では既に CNOT4 遺伝子欠損マウスの作製に成功していた。CNOT4 遺伝子をヘテロ欠損するマウス同士を交配させ、新生児における遺伝子型を決定した結果、CNOT4 遺伝子をホモ欠損した個体は存在しなかった。このことから、CNOT4 遺伝子を完全に欠損した個体は胎生致死であることが考えられた。そこで、CNOT4 遺伝子ホモ欠損マ

ウスが胚発生期のどの段階で死亡するか、また組織学的な異常が見られるか観察を行った。また、この発生異常に CNOT4 によるユビキチン化の作用が関与するのかを明らかにするために、CNOT4 のユビキチン転移反応に必須のドメインである RING フィンガードメインに特異的に変異を導入したノックインマウスを作出し、表現型の観察を行った。

(2) CNOT4 遺伝子欠損マウスの心機能解析：ショウジョウバエにおいて行われた大規模な *in vivo* RNAi 心不全スクリーニングにより、CNOT4 及び CNOT4 との相互作用が知られている UBC4 が心機能調節に関与する遺伝子としてすでに同定されていた (Kuba K, et al. Cell 2010)。そこで、心機能における CNOT4 の関与を明らかにするために、CNOT4 遺伝子ヘテロ欠損マウスについて心エコーによる *in vivo* 解析を行った。

(3) CNOT4 発現抑制下における培養細胞の表現型解析：CNOT4 遺伝子欠損マウス組織で観察される表現型の原因を細胞レベルで理解するために、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いた CNOT4 遺伝子欠損の導入、もしくは CNOT4 siRNA を培養細胞に導入することにより、CNOT4 発現抑制下における細胞増殖能や細胞形態について解析を行った。また、CNOT4 の RING フィンガードメイン変異マウスよりマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を単離し同様の観察を行った。

(4) CNOT4 が標的とするユビキチン化タンパク質の探索：ユビキチン転移酵素としての機能を有する CNOT4 は、ユビキチン結合酵素である UBC4/5 と連携し、UBC4/5 が輸送するユビキチンを基質タンパク質へと転移させる役割を担う。そこで、CNOT4 の標的となる基質タンパク質を明らかにするために、CNOT4 に FLAG タグを付加した発現ベクターを作出し、強制発現後の HEK293T 細胞について FLAG 抗体を用いた免疫沈降及び共沈タンパク質の質量分析を行い、CNOT4 に結合するタンパク質の網羅的な探索を行った。

(5) CNOT4 結合 RNA の探索：(4) の CNOT4 が標的とするユビキチン化タンパク質の網羅的な探索により、CNOT4 に結合するタンパク質の多くが RNA 結合タンパク質であることが明らかとなった。そこで、CNOT4-会合タンパク質複合体による RNA 制御機構の全容を明らかにするために、CNOT4 に Halo タグを付加した発現ベクターを HEK293T 細胞に導入し、PAR-CLIP 法により CNOT4 と共沈した RNA の解析を行った。

## 3. 研究の方法

【2】に記載した研究目的を達成するために、以下の方法に従い研究を遂行した。

(1) CNOT4 遺伝子欠損マウス、及び CNOT4 RING ドメイン変異マウス胎児における表現型の解析：申請者の研究室ですでに作出されていた CNOT4 遺伝子ヘテロ欠損マウス (*Cnot4<sup>+/−</sup>*) 同士を交配させ、腔栓確認後 (E0.5) から 10

日以降の妊娠マウスを開腹し、胎児を摘出した。PCRにより遺伝子型を決定しCNOT4遺伝子ホモ欠損マウス(*Cnot4*<sup>-/-</sup>)の生存を確認するとともに、*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウス胎児のHE染色切片を作製し組織の観察を行った。また、CNOT4によるユビキチン化の関与の有無を明らかにするために、CRISPR/Cas9によるノックイン技術を用いて、ユビキチン転移反応に必須のドメインであるRINGフィンガードメインに変異を導入したノックインマウスを作成した。このRING変異ヘテロ遺伝子マウス同士を交配させ、膣栓確認、胎児の摘出、遺伝子型の決定、HE染色切片の作製によりRING変異ホモ遺伝子マウスの生存、組織学的な特徴について観察を行った。

(2) CNOT4遺伝子欠損マウスの心機能解析：心臓機能とCNOT4との関連を明らかにするために、高齢の*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウスについて心エコーによるin vivo解析を行い、加齢に伴う心収縮力の評価を行った。心機能の評価後、心臓を摘出し重量を測定することで肥大の有無を確認した。また、心不全マウスモデルを作製し、同様の観察を行った。

(3) CNOT4発現抑制下における培養細胞の表現型解析：HEK293T細胞、及びA549細胞にCNOT4-siRNAを導入し、CNOT4遺伝子発現抑制下における細胞増殖能、及び細胞形態の観察を行った。また、CRISPR/Cas9ゲノム編集を用いてES細胞におけるCNOT4遺伝子の欠損を誘導し、細胞増殖能を調べた。さらに、(1)で得られたE13.5のRING変異ホモ遺伝子マウスよりMEFを単離し野生型MEFとの増殖能を比較した。また、同MEFよりRNAを抽出し、RT-qPCR法により、CNOT4ユビキチン転移活性の欠損により生じる遺伝子発現変動について解析を行った。

(4) CNOT4が標的とするユビキチン化タンパク質の探索：CNOT4に結合しユビキチン化の基質となるタンパク質を同定するために、CNOT4にFLAGタグを付加した発現ベクターを作成し、HEK293T細胞へ導入し培養した。その後、細胞ライセートよりFLAG抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈タンパク質の質量分析を行うことで、CNOT4に結合するタンパク質の網羅的な探索を行った。

(5) CNOT4結合RNAの探索：CNOT4-RNA結合タンパク質複合体によるRNA制御を明らかにするために、同複合体に結合するRNAをPAR-CLIP法により解析した。CNOT4にHaloタグを付加した発現ベクターを作成し、HEK293T細胞へ導入し培養した。その後、細胞ライセートよりHalo抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈したRNAを次世代シーケンス(Illumina, HiSeq2000)にて解析することで、CNOT4に結合するRNAの網羅的な探索を行った。

#### 4. 研究成果

CNOT4の生理的役割を明らかにする目的で【3】に記載した方法に基づき研究を遂行した結果以下の成果を得た。

(1) CNOT4遺伝子欠損マウス、及びCNOT4RINGドメイン変異マウス胎児における表現型の解析：CNOT4遺伝子を完全に欠損した*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウス胎児の発生段階における生存率を調べた結果、*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウスは受精後10日程で致死になることがわかった。また、胎児のHE染色像を観察した結果、*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウスは野生型個体に比べ明らかに体格が小さく、脳をはじめ、心臓、肝臓といった各組織が非常に未成熟な状態にあることがわかった。このことから、CNOT4は個体の初期発生段階において器官形成や細胞増殖の制御等に重要な役割を担っていると考えられた。一方で、CNOT4RING変異ホモ遺伝子マウスは出生後の生存が確認された。このことから、少なくとも受精後から10日までの発生初期においてはユビキチン化修飾に非依しないCNOT4による制御機構が正常な胚発生に大きく寄与していると考えられる。一方で、CNOT4RINGドメイン変異マウス胎児の組織を観察した結果、RING変異ホモ遺伝子マウス胎児は野生型に比べ体格が小さく、腸管の発達が未熟であるといった外見的特徴を示した。また、出生前後の胚重量も野生型に比べ小さく、出生後RING変異ホモ遺伝子マウス新生児は高い死亡率を示した。以上のことから、CNOT4によるユビキチン化作用も胚発生後期における正常な器官形成に重要な役割を担っていることが考えられる。今後、*Cnot4*<sup>-/-</sup>胎児、及び出生直前のRING変異ホモ遺伝子マウス胎児についてRNAseqを行い、CNOT4機能不全による遺伝子発現変動を明らかにすることで、胚発生におけるCNOT4の生理的機能について明らかにできると考える。

(2) CNOT4遺伝子欠損マウスの心機能解析：心臓機能とCNOT4との関連を明らかにするために、高齢の*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウスについて心エコーによるin vivo解析を行い、心機能の評価を行った。その結果、*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウスは加齢に伴う心収縮力の低下が野生型マウスに比べより顕著であることを確認した。一方で、野生型に比べ顕著な心臓の肥大は確認できなかった。遺伝子ヘテロ欠損では現れる表現型が弱い可能性が考えられたため、心臓における表現型の差をよりはっきりとさせるために、心不全マウスモデルにおいて、さらなる心機能の評価を行った。その結果、*Cnot4*<sup>-/-</sup>マウスは野生型マウスに比べ心収縮能の低下、及び心肥大を認めた。以上の結果から、CNOT4が心機能の恒常性維持に何らかの生理的役割を果たしていることが示唆された。今後、この生理機能にユビキチン転移反応が関与しているのかを明らかにするとともに、CNOT4の機能低下に起因した心臓機能の障害に至る分子機序を明らかにすることで、心不全発症メカニズムの新たな知見が得られる

のではないかと期待している。

(3) CNOT4 発現抑制下における培養細胞の表現型解析: CNOT4 遺伝子の欠損により細胞の生理機能に異常が生じるかを確認するため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用い ES 細胞に CNOT4 遺伝子欠損を誘導し、細胞増殖能を確認した。しかしながら、*Cnot4*<sup>-/-</sup> ES 細胞は野生型細胞と比べ増殖速度に差は見られず、Hanging drop 法による胚様体形成や心筋細胞分化においても異常は見られなかった。このことから CNOT4 は少なくとも幹細胞における増殖・分化には関与していない可能性が考えられた。そこで、CNOT4 siRNA 導入後の培養細胞について細胞増殖速度、及び細胞面積について調べたところ、いずれもコントロール処理の細胞に比べ減少することを確認した。また、全長、及び CNOT4 RING 変異タンパク質を発現するベクターを作出し、強制発現後の細胞形質について調べたところ、全長タンパク質の強制発現で細胞面積が増加した一方、CNOT4 RING 変異タンパク質を強制発現した細胞では有意に細胞面積が減少していた。また、RING 変異ホモ遺伝子マウス胎児より MEF を単離し細胞増殖能を調べた結果、RING 変異ホモ遺伝子 MEF は野生型の MEF に比べ細胞増殖に遅延が認められた。以上の結果から、CNOT4 によるユビキチン修飾は体細胞における細胞増殖能や細胞体積の制御に重要な機能を果たしている可能性が示唆された。このような細胞の生理機能異常の原因を確かめるとともに、ロックアウトマウスにみられる表現型との関連性を明らかにすることが今後の課題の一つである。

(4) CNOT4 が標的とするユビキチン化タンパク質の探索: CNOT4 に FLAG タグを付加した発現ベクターを作出し、強制発現後の HEK293T 細胞について FLAG 抗体を用いた免疫沈降及び共沈タンパク質の質量分析を行い、CNOT4 に結合するタンパク質の網羅的な探索を行った。その結果、CNOT4 に結合するタンパク質の多くが RNA 結合タンパク質であることが明らかとなった。また、その中で RNase 処理下の免疫沈降においても CNOT4 と結合していることが確認された RNA 結合タンパク質 X (RBP X) について、ウェスタンブロットでも結合を確認したところ、CNOT4 と RBP X の共沈が確認できた。また、RBP X による制御が報告されている遺伝子の発現を、CNOT4-siRNA 処理、もしくは CNOT4 発現ベクターを導入した HEK293T 細胞について調べた結果、これらの遺伝子発現と CNOT4 タンパク質の発現動態に相関がみられた。以上のことから CNOT4 が RBP X の制御を介し mRNA の発現制御を行っている可能性が考えられる。今後これら mRNA 制御とユビキチン化修飾との関連性等を明らかにし、CNOT4 による遺伝子発現制御機構の全容を明らかにする必要がある。

(5) CNOT4 結合 RNA の探索: CNOT4-RNA 結合タンパク質複合体による RNA 制御を明らかに

するために、同複合体に結合する RNA を PAR-CLIP 法により解析した。その結果、CNOT4-RBP X と結合していると思われる mRNA を複数同定した。この中でも特に強く結合していると思われる 6 遺伝子について、CNOT4 RING ドメイン変異マウス胎児 MEF における遺伝子発現量を調べた結果、このうちの 3 遺伝子に有意な増加が認められた。このことから CNOT4 によるユビキチン化が mRNA の転写制御や分解に関与している可能性が示唆された。今後は、RBP X のユビキチン化動態と同定された mRNA 発現との関連性について調べるとともに、CNOT4 による遺伝子発現調節が胚発生や心機能維持にどのような生理的役割を担っているのかを明らかにする必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Sato T, Sato C, Kadowaki A, Watanabe H, Ho L, Ishida J, Yamaguchi T, Kimura A, Fukamizu A, Penninger JM, Reversade B, Ito H, Imai Y, Kuba K, ELABELA-APJ axis protects from pressure overload heart failure and angiotensin II-induced cardiac damage. *Cardiovasc Res.*, 査読有, 1;113(7), 2017, 760-769.  
DOI: 10.1093/cvr/cvx061.

[学会発表](計 7 件)

山口 智和 他、*Cnot4* 遺伝子欠損マウスにおける発達障害と肥満抑制についての解析、第 5 回 CCR4-NOT 研究会、2017 年 2 月 5 日、沖縄科学技術大学院大学(沖縄県・国頭郡)

山口 智和 他、CCR4-NOT 複合体が制御する心臓のアデニン核酸代謝制御機構の解析、第 26 回日本循環薬理学会、2016 年 12 月 2 日、信州大学医学部付属病院(長野県・松本市)

山口 智和 他、CCR4-NOT 複合体が制御するアデニン核酸代謝制御機構の解析、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 26 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

山口 智和 他、CCR4-NOT 複合体による心臓のアデニン核酸代謝制御機構の解析、第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

山口 智和 他、ユビキチン転移酵素 *Cnot4* 遺伝子のハプロ不全による抗肥満作用の解析、第 4 回 CCR4-NOT 研究会、2016 年 2 月 16 日、秋田温泉さとみ(秋田県・秋田市)

山口 智和 他、CNOT3 を介した心臓のアデニン核酸代謝制御機構の解析、第 66 回の本薬理学会北部会、2015 年 9 月 18 日、富山国際会議場(富山県・富山市)

山口 智和 他、CCR4-NOT 複合体によるアデニン核酸代謝制御機構の解析、第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月 15 日、ホテルライフオーソ札幌(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山口 智和(Yamaguchi Tomokazu)  
秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30749940

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )