

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19127

研究課題名(和文) B細胞におけるCCR4-NOT複合体による標的mRNA分解機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of CCR4-NOT complex-mediated target mRNA degradation in B cells

研究代表者

井上 毅 (Inoue, Takeshi)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：80466838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究において、mRNAのポリA鎖分解酵素であるCCR4-NOT複合体のCNOT3サブユニット欠損マウスは、B細胞初期分化に著明な異常を呈することを発見した。本研究ではその分子機構の詳細を解析したところ、CCR4-NOT複合体はがん抑制遺伝子p53のmRNA分解を介した細胞死制御と、免疫グロブリン重鎖のV-DJ遺伝子再構成を独立に制御することで、B細胞初期分化に必須の機能を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The CCR4-NOT deadenylase complex plays crucial roles in mRNA decay and translational repression induced by poly(A) tail shortening. We have previously found a severe impairment of early B cell development in mice lacking CNOT3 subunit of this complex. Here, we analyzed the underlying molecular mechanisms, and our data suggested that the CCR4-NOT complex regulates B cell differentiation by controlling Igh rearrangement and destabilizing p53 mRNA.

研究分野：免疫学、分子生物学

キーワード：B細胞分化 CCR4-NOT複合体 mRNA分解 免疫グロブリン遺伝子再構成

1. 研究開始当初の背景

生物は、mRNA の転写制御と転写後制御による遺伝子発現制御プログラムによって巧妙で複雑な機能・形態を獲得している。特に免疫細胞においては、TNF や IL-6 といった炎症調節などに重要なサイトカインをコードする遺伝子群は、3' -UTR (非翻訳領域) を介して mRNA 分解レベルで精緻な調節を受けることが知られており、その分解系の破綻は自己免疫疾患などを引き起こすことから、近年 mRNA の分解制御が生体恒常性維持および高次生理機能発現において果たしている役割に注目が集まっている。

mRNA の 3' 末端に存在するポリ (A) 鎖は、ポリ (A) 結合タンパク質群と協調して翻訳の効率化、および mRNA の分解制御において重要な役割を果たしており、mRNA 分解の第一段階であるポリ (A) 鎖の分解過程 (脱アデニル化) は、一般に mRNA 分解経路全体の律速段階と考えられている。CCR4-NOT 複合体は哺乳類細胞における主要な脱アデニル化酵素であるが、哺乳類動物生体内における CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化の生理機能及び分子的制御メカニズムの解析については十分な研究がなされていなかったことから、先行研究 (若手研究 (B) “CCR4-NOT mRNA 分解酵素複合体による B 細胞分化制御機構の解明” 2013 年 4 月~2015 年 3 月) において、哺乳類生体内における CCR4-NOT 複合体の生理機能と、mRNA 分解の分子メカニズムの解明を進めてきた。その中で CCR4-NOT 複合体の構成因子の一つ CNOT3 の B 細胞特異的欠損マウスを作製したところ、このマウスは骨髄プロ B 細胞からプレ B 細胞への分化過程が著しく阻害されており、CNOT3 が B 細胞分化に必須に役割を担っていることを発見した。

さらにその分子メカニズムを解明すべく、トランスクリプトーム解析および種々の生化学的解析を行ったところ、プロ B 細胞において p53 mRNA が CCR4-NOT 複合体によるポリ (A) 鎖分解の直接的標的であることが示唆されており、*Cnot3* 欠損プロ B 細胞において p53 経路が活性化しアポトーシスが亢進していることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

Cnot3 および *p53* 遺伝子の二重欠損マウスを作製したところ、アポトーシスの亢進は解除されプロ B 細胞からプレ B 細胞への分化が部分的に回復したことから、プロ B 細胞における *p53* mRNA のポリ (A) 分解を介した転写後制御が、プレ B 細胞への分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。いっぽうで、*p53* 遺伝子との二重欠損では未熟 B 細胞以降の分化は回復しなかったことから、B 細胞初期分化に必要な他の未知の標的遺伝子 (群) が存在すると考えられる。また、*p53* mRNA の分解については、分解を司る mRNA *cis* 領域、CCR4-NOT 複合体をリクルートする *trans* 因子の分子的実体及びその制御機構は

全く不明であり、詳細な分子生物学的解析が必要とされている。そこで本研究ではマウス B 細胞における CCR4-NOT 複合体による標的 mRNA 分解の分子メカニズムの解析と、B 細胞初期分化制御機構の解明を目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

Cnot3 および *p53* 遺伝子の二重欠損マウスを詳細に解析し、*Cnot3* 単独欠損で見られたプロ B からプレ B 細胞への分化が部分的に回復するものの、未熟 B 細胞以降の分化が全く回復しない原因を、*p53* 以外の標的遺伝子を同定することで明らかにする。

4. 研究成果

(1) CNOT3 は免疫グロブリン重鎖遺伝子 (IgH) の V-DJ 遺伝子再構成に必要なものである

まず *Cnot3* および *p53* 遺伝子の二重欠損プロ B 細胞のゲノム DNA を解析したところ、IgH 遺伝子の V-DJ 再構成が阻害されていることが分かった (図 1)。

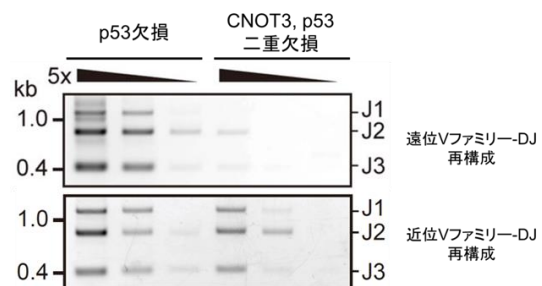


図 1. *Cnot3* 欠損プロ B 細胞における IgH V-DJ 遺伝子再構成の異常
Cnot3 単独欠損、および *Cnot3* *p53* 二重欠損プロ B 細胞のゲノム DNA の PCR 解析より、IgH の遠位 V ファミリー/DJ 遺伝子の再構成が著しく阻害されていることが分かった。

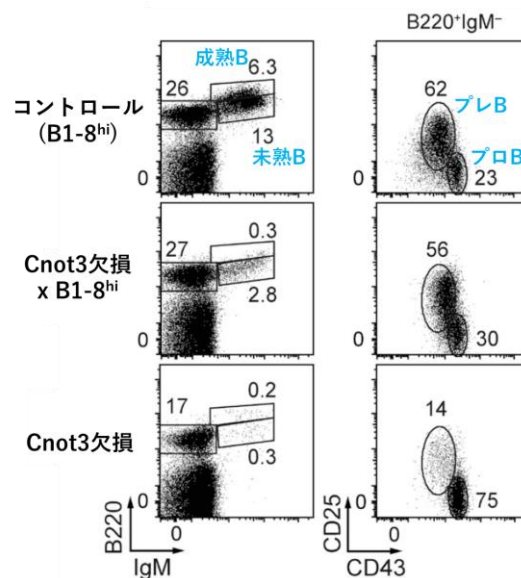


図 2. Cnot3 欠損 x B1-8^{hi} KI マウス骨髄における B 細胞初期分化

Cnot3 欠損 x B1-8^{hi} KI マウスでは、未熟 B 細胞までの分化が部分的に回復したことから、IgH V-DJ 遺伝子再構成異常が Cnot3 欠損マウスの B 細胞分化異常の主な原因の一つであることが分かった。

そこで、NP ハプテン特異的 IgH 遺伝子のノックインマウス (B1-8^{hi} KI) を Cnot3 欠損マウスと交配し、IgH V-DJ 遺伝子再構成の過程をスキップさせたところ、このマウスは未熟 B 細胞までの分化が回復した (図 2)。

このことから、Cnot3 および p53 遺伝子の二重欠損マウスで未熟 B 細胞以降への分化が回復しなかった原因は、CNOT3 が p53 を介した細胞死の制御とは独立に、プロ B 細胞における IgH の V-DJ 遺伝子再構成にも関与しているためと考えられる。

(2) CNOT3 欠損プロ B 細胞では遠位 V 遺伝子座と DJ 遺伝子座の距離が長くなっている

野生型のプロ B 細胞では遺伝子再構成の際にゲノムの遠位 (distal) V 遺伝子座と D、J 遺伝子座が空間的に近づくこと (locus contraction) により効率的な再構成が可能になっていると考えられている。そこで 3D-DNA FISH 法を用いて IgH の遠位 V 遺伝子座と DJ 遺伝子座を蛍光染色し顕微鏡観察したところ、CNOT3 欠損プロ B 細胞では V-DJ 遺伝子座間の距離が長くなっており (図 3)、遠位 V-DJ 遺伝子再構成が損なわれているという結果に関連していると考えられる。

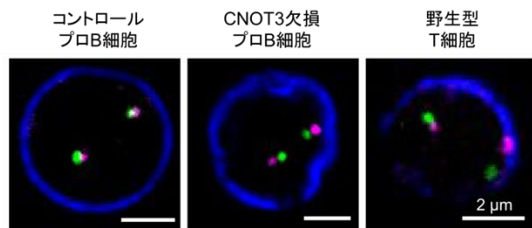


図 3. コントロール プロ B 細胞、CNOT3 欠損プロ B 細胞、野生型 T 細胞の共焦点顕微鏡写真

核膜を青、IgH の遠位 V 遺伝子座をマゼンタ、DJ 遺伝子座を緑で染色している。CNOT3 欠損細胞では、緑とマゼンタのプロープ間の距離が長くなっており、IgH V-DJ 遺伝子再構成の起こらない T 細胞により近いゲノム構造をとっていたことから、Cnot3 欠損では locus contraction に異常があることが分かった。

(3) CNOT3 欠損プロ B 細胞では IgH 遠位 V 遺伝子の germline transcript (GLT) の転写が阻害されている

詳細な分子機序は不明であるが、野生型プロ B 細胞において、IgH 遺伝子座の locus contraction と V-DJ 遺伝子再構成に先んじて様々なノンコーディング RNA (IgH GLT) が発現することが知られている。そこで CNOT3 欠損プロ B 細胞におけるノンコーディング RNA の発現を調べたところ、一部がまったく転写されていないことを見出した (図 4)。CCR-NOT 複合体は mRNA の脱アデニル化とは異なる機構、おそらくノンコーディング RNA の転写制御においても重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

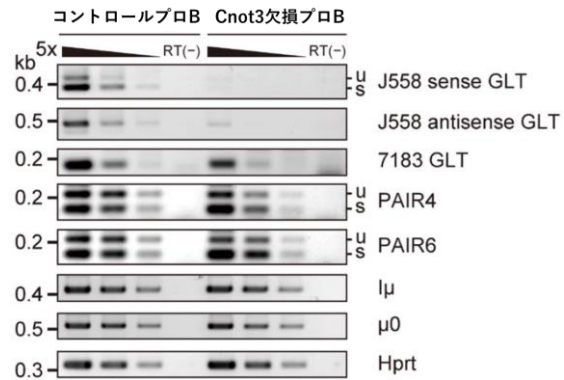


図 4. コントロール プロ B 細胞、Cnot3 欠損プロ B 細胞におけるノンコーディング RNA の発現

RT-PCR 法によりプロ B 細胞における各種ノンコーディング RNA の発現を調べたところ、Cnot3 欠損細胞では IgH locus contraction に関わっていると思われるいくつかの IgH GLT の転写が著しく阻害されていた。

(4) Cnot3 欠損、p53 欠損、B1-8^{hi} KI 三重変異マウスの解析

Cnot3 欠損、p53 欠損、B1-8^{hi} KI 三重変異マウスを作製、解析したところ、骨髄における B 細胞分化は概ね回復したものの、末梢 (脾臓) における T1 細胞から T2 細胞への分化に異常が認められた。このことは、Cnot3 は末梢における B 細胞成熟過程においても重要な役割を果たしていることを示唆しており、T1 細胞における標的遺伝子の同定やその発現制御機構の詳細解明が今後の課題である。

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 5 件)

1. Masato Ogura, Takeshi Inoue, Junko Yamaki, Miwako K. Homma, Tomohiro Kurosaki, Yoshimi Homma. Mitochondrial reactive oxygen species

suppress humoral immune response through reduction of CD19 expression in B cells in mice. *European Journal of Immunology*, 2017, 47:406-418, DOI:10.1002/eji.201646342, 査読有

2. Ryo Shinnakasu, Takeshi Inoue, Kohei Kometani, Saya Moriyama, Yu Adachi, Manabu Nakayama, Yoshimasa Takahashi, Hidehiro Fukuyama, Takaharu Okada, Tomohiro Kurosaki. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. *Nature Immunology*, 2016, 17:861-869, DOI:10.1038/ni.3460, 査読有
3. 井上 毅, RNA 分解酵素複合体 CCR4-NOT による B 細胞分化制御, 臨床免疫・アレルギー科, 2015, 64:585-589, <http://www.kahyo.com/item/M201512-64>、査読無
4. Yu Adachi, Taishi Onodera, Yuki Yamada, Rina Daio, Makoto Tsuiji, Takeshi Inoue, Kazuo Kobayashi, Tomohiro Kurosaki, Manabu Ato, Yoshimasa Takahashi. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape. *Journal of Experimental Medicine*, 2015, 212:1709-1723, DOI:10.1084/jem.20142284, 査読有
5. Takeshi Inoue, Masahiro Morita, Atsushi Hijikata, Yoko Fukuda-Yuzawa, Shungo Adachi, Kyoichi Isono, Tomokatsu Ikawa, Hiroshi Kawamoto, Haruhiko Koseki, Tohru Natsume, Taro Fukao, Osamu Ohara, Tadashi Yamamoto, Tomohiro Kurosaki. CNOT3 contributes to early B cell development by controlling Igh rearrangement and p53 mRNA stability. *Journal of Experimental Medicine*, 2015, 212:1465-1479, DOI:10.1084/jem.20150384, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 井上 毅, 胚中心 B 細胞における FOXO1 転写因子の機能解析、第 8 回シグナルネットワーク研究会、2016 年 5 月 28 日、大阪大学
2. 井上 毅, B 細胞における CNOT3 の機能解析、第 4 回 CCR4-NOT 研究会、2016 年 2 月 12 日、秋田 秋田温泉さとみ

6. 研究組織
- (1) 研究代表者

井上 毅 (INOUE Takeshi)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号 : 80466838

- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
なし