

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06975

研究課題名(和文) 膵細胞でのグルコース応答性インスリン分泌における転写後調節の分子機構の解析

研究課題名(英文) Post-transcriptional regulation in glucose-induced insulin secretion by the CCR4-NOT deadenylase complex in mouse pancreatic beta cells

研究代表者

柳谷 朗子 (Yanagiya, Akiko)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：30608138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン生合成に必要なCCR4-NOT複合体を介した転写後制御を解明する為に、CCR4-NOT複合体の脱アデニル化活性を示す構成分子であるCnot7欠損膵島を用いて実験を行った。Cnot7欠損膵島においてグルコース応答性インスリン分泌が低下した。RNAシーケンス解析とプロテオーム解析により、インスリン分子内のジスルフィド結合を行う酸化還元酵素であるPRDX4のmRNAと蛋白質発現量の両方が低下することを明らかにし、Prdx4 mRNAにCCR4-NOT複合体を導入するRNA結合蛋白質を同定した。本研究はインスリン生合成におけるCCR4-NOT複合体を介した転写後制御の分子機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、CCR4-NOT複合体を介した転写後制御がインスリン生合成において重要な役割を担うことを明らかにした。Cnot7欠損またはCnot8欠損マウスは異なる表現型を示すが、CCR4-NOT複合体の脱アデニル化活性を持つ構成分子であるCNOT7とCNOT8はアミノ酸配列の相同性から、機能的に相補的に働くと考えられていた。本研究によりCNOT7とCNOT8が異なるRNA結合蛋白質を介して、CCR4-NOT複合体を特異的なmRNAに導入し、mRNA分解を行うという分子機構を明らかにした。本研究は、転写後制御を標的としたインスリン生合成や分泌が低下している糖尿病に対する新規治療法の開発に役立つ。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic islets isolated from Cnot7-knockout (KO) mice lacking CNOT7, which is a component possessing deadenylase activity of the CCR4-NOT complex, were used to reveal the role of the post-transcriptional regulation by the CCR4-NOT complex in glucose-induced insulin secretion in pancreatic cells. Intriguingly, glucose-induced insulin secretion is reduced in Cnot7-KO pancreatic cells. To investigate the contribution of the CCR4-NOT complex in mRNA stability in pancreatic islets, transcriptome and proteome analyses were conducted by RNA-seq and mass spectrometry, which revealed that a peroxiredoxin called PRDX4, which is important for the formation of disulfide bonds inside insulin, is reduced at both mRNA and protein levels. Furthermore, RNA-binding protein that recruits the CCR4-NOT complex to Prdx4 mRNA was identified. Our study sheds light on the post-transcriptional regulation by the CCR4-NOT complex needed for insulin biosynthesis and subsequent insulin secretion.

研究分野：転写後制御

キーワード：転写後制御 mRNA分解 脱アデニル化 CCR4-NOT複合体 インスリン生合成 膵細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新規 mRNA 合成を必要としない、mRNA 分解や翻訳制御といった転写後調節は食後の血糖値上昇などの細胞内外の環境変化に迅速に応答して、時間的・空間的・可逆的に必要に応じた遺伝子発現を可能とする遺伝子発現機構である。血糖値上昇に応答して、膵β細胞からインスリン分泌が速やかに開始され、血糖値が低下することで血糖値の恒常性維持が維持される。グルコース応答性インスリン分泌に必要な遺伝子発現機構において、外部刺激に迅速に応答できる転写後調節が機能する可能性が考えられた。特に、mRNA 安定性を制御する CCR4-NOT 複合体による転写後制御のグルコース応答性インスリン分泌における機能が、本研究開始当初は明らかでなかった。CCR4-NOT 複合体は mRNA の 3' 末端に存在するポリ A 鎖の短縮 (脱アデニル化) により mRNA 分解を開始する。ポリ A 鎖の伸長または短縮により、mRNA の安定性や翻訳効率を制御されるが、その膵β細胞における役割は未解明であった。本研究は、血糖値の恒常性維持に必要な膵β細胞のグルコース応答性インスリン分泌における mRNA のポリ A 鎖の短縮・延長といった転写後調節の重要性を、mRNA 発現量・安定性、蛋白質発現量と翻訳効率という観点から多面的に解析する点で独創的であった。また、ポリ A 鎖の長さの制御破綻が招く糖尿病の発症メカニズムに迫ることで、転写後調節の疾患への関連性を提示する点で大変有意義な研究であると考えられた。さらに臨床への応用だけでなく、RNA の基礎研究においても本研究により、ポリ A 鎖の長さによる mRNA 分解機構の制御や翻訳制御の新規概念を確立することができると思われた。肥満症の発症機序として、ポリ A 鎖の長さや mRNA 分解系といった転写後調節に着目した研究は研究開始当初にほとんど存在しないことから本研究は独創的であり、新規作用機序をもつ糖尿病治療薬の創製に繋がると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、血糖値を降下させるインスリンを産生する膵β細胞のグルコース応答性インスリン分泌において機能する転写後制御の役割を明らかにすることを目的とした。転写後調節の一つである mRNA 分解において重要な役割を担う CCR4-NOT 複合体の構成分子であり脱アデニル化活性を持つ CNOT7 を欠損させた、*Cnot7* 欠損マウスはインスリン分泌不全を示すことから、グルコース応答性インスリン分泌における転写後調節の重要性が示唆された。インスリン分泌に必要な転写後調節の解明は、インスリン分泌低下を伴う糖尿病に対する新規治療法の開発に役立つことから、その分子機構の解明を目的とした。具体的には、以下の点の解明を目的とした。

1. グルコース応答性インスリン分泌における CCR4-NOT 複合体を介した転写後制御の解析
CCR4-NOT 複合体は mRNA の 3' 末端に存在するポリ A 鎖の短縮 (脱アデニル化) により mRNA 分解を開始する。本研究は、mRNA のポリ A 鎖の長さに依存する転写後調節の破綻によって引き起こされる膵β細胞でのインスリン分泌不全の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。CCR4-NOT 複合体の構成分子の脱アデニル化活性を持つ、CNOT7 を欠損させた *Cnot7* 欠損マウスから膵島を単離して、そのグルコース応答性インスリン分泌における機能を解析し、CCR4-NOT 複合体の膵β細胞における役割の解明を目的とした。
2. 膵β細胞におけるインスリン生合成と分泌を制御する CCR4-NOT 複合体を介した mRNA 分解の分子機構の解析
CCR4-NOT 複合体は、それに結合する RNA 結合蛋白質により特異的な mRNA に導入され、mRNA 分解を行う。本研究は、インスリン分泌不全を示す *Cnot7* 欠損膵島における、CCR4-NOT 複合体を介した mRNA 分解に必要な、RNA 結合蛋白質の同定を目的とした。また、CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化活性を持つ構成分子である CNOT7 と CNOT8 はそのアミノ酸配列の相同性から相補的な生理学的機能を持つと考えられていたが、*Cnot7* 欠損マウスは生存するが、*Cnot8* 欠損マウスは胎生致死であるなど異なる表現型を示すことから、CNOT7 と CNOT8 がそれぞれ異なる分子機構で mRNA 分解を行う可能性が考えられた。本研究は、インスリン生合成に必要な CNOT7 または CNOT8 を介した mRNA 分解の分子機構の解明を目的とした。

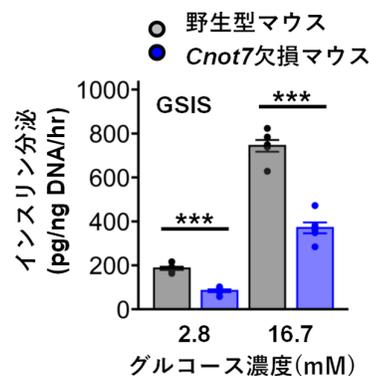
3. 研究の方法

1. *Cnot7* 欠損膵島のグルコース応答性インスリン分泌を解析する為に、*Cnot7* 欠損マウスから膵島を単離し、膵島を低または高グルコース処理を行って、膵β細胞からのインスリン分泌量をインスリン ELISA で定量した。*Cnot7* 欠損マウスの代謝を解析する為に、グルコース負荷試験とインスリン負荷試験を行った。*Cnot7* 欠損膵β細胞におけるインスリン含有量を解析する為に、*Cnot7* 欠損マウスの膵臓切片、インスリン抗体とグルカゴン抗体を用いて免疫組織染色を行った。

- CCR4-NOT 複合体の構成分子で脱アデニル化活性を持つ CNOT7 を欠損させた、インスリン分泌不全を示す *Cnot7* 欠損膵島を単離して、その発現変動遺伝子を RNA シークエンス解析とプロテオーム解析により網羅的に解析した。また、RNA シークエンス解析とプロテオーム解析によって同定された発現変動遺伝子の mRNA 発現量と蛋白質発現量を qPCR 法とウェスタンブロット法によりそれぞれ確認した。さらに、発現変動遺伝子の mRNA のポリ A 鎖の長さを PAT 法により解析した。
- RNA シークエンス解析とプロテオーム解析により、*Cnot7* 欠損膵島において mRNA 発現量と蛋白質発現量の両方が阻害されている遺伝子を同定し、その発現変動遺伝子の mRNA の安定性を検討した。具体的には、*Cnot7* 欠損膵島を単離した培養液に、転写阻害剤であるアクチノマイシン D を処理後、経時的に膵島を回収して Total RNA を抽出した。その Total RNA を用いて、発現変動 mRNA の安定性を qPCR により解析した。さらに、転写制御の影響の可能性を除外する為に、pre-mRNA に対する qPCR を行い、pre-mRNA 発現量を解析した。
- CCR4-NOT 複合体と協調して発現変動遺伝子の mRNA 分解を行う RNA 結合蛋白質の同定を試みた。RNA 結合蛋白質は mRNA 上の特定の塩基配列に結合することから、発現変動 mRNA の塩基配列情報から、それに結合すると予測される RNA 結合蛋白質を検索した。この RNA 結合蛋白質のリコンビナント蛋白質を作製し、標的 mRNA の標的塩基配列との直接結合をゲルシフトアッセイ (EMSA: electrophoretic mobility shift assay) により解析した。さらに、この RNA 結合蛋白質の CCR4-NOT 複合体の構成分子との相互作用を免疫沈降法により解析した。
- CCR4-NOT 複合体によって mRNA 分解される遺伝子を *Cnot7* 欠損 MIN6 細胞において過剰発現させて、この遺伝子のインスリン合成における機能を解析した。

4. 研究成果

- Cnot7* 欠損膵β細胞においてグルコース応答性インスリン分泌が低下することを明らかにした (図①)。また、グルコース負荷試験とインスリン負荷試験を行い、*Cnot7* 欠損マウスはインスリン感受性が少し亢進している一方、インスリン分泌が低下していることを明らかにした。*Cnot7* 欠損マウスの膵臓切片を用いた免疫組織染色により、*Cnot7* 欠損膵β細胞においてインスリン含有量が減少していることを明らかにした。



図① *Cnot7*欠損膵β細胞におけるインスリン分泌の低下

- Cnot7* 欠損マウスから単離した膵島を用いて、RNA シークエンス解析を行ったところ、酸化還元反応を制御する遺伝子群の発現が低下していることが明らかになった。さらにプロテオーム解析によりそれらの蛋白質発現量を比較解析した。その結果、酸化還元酵素である PRDX4 の mRNA と蛋白質発現量の両方が低下していることを明らかにした。インスリン合成におけるインスリン蛋白質のフォールディングの初期段階において、インスリン分子内のジスルフィド結合の形成が重要である。この酸化還元酵素 PRDX4 はインスリンのジスルフィド結合において機能することから、*Prdx4* mRNA の CCR4-NOT 複合体を介した mRNA 分解がインスリン合成において機能していることが示唆された。さらに、*Cnot7* 欠損膵島では、CNOT7 の減少に伴って、そのパラログである CNOT8 の蛋白質量が増大することをウェスタンブロット法により明らかにした。以上の結果から、*Prdx4* mRNA は CNOT7 ではなく、CNOT8 を介して mRNA 分解されている可能性が示唆された。
- Cnot7* 欠損膵島において、*Prdx4* mRNA の mRNA 安定性が低下していることを明らかにした (図②)。また、PAT 法により、*Cnot7* 欠損膵島において、*Prdx4* mRNA のポリ A 鎖が短縮していることを示した。*Cnot7* 欠損膵島においては、CNOT7 蛋白質発現量が低下しているので、

Prdx4 mRNA のポリ A 鎖の短縮は、他の脱アデニル化活性を持つ構成分子である CNOT8 によって行われることが示唆された。

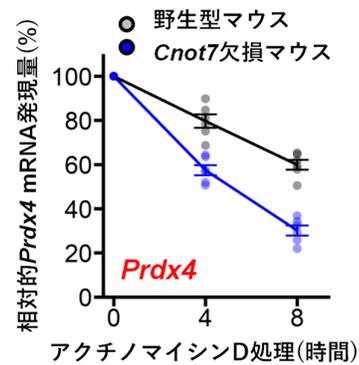
4. *Prdx4* mRNA に CCR4-NOT 複合体を導入する RNA 結合蛋白質を同定する為に、*Prdx4* mRNA の塩基配列上に存在する RNA 結合蛋白質に対する結合部位モチーフ検索を行った。その結果、*Prdx4* mRNA に結合すると予測される RNA 結合蛋白質を同定した。この RNA 結合蛋白質のリコンビナント蛋白質を作製し、*Prdx4* の結合 RNA 配列を用いてゲルシフトアッセイを行い、この RNA 結合蛋白質が *Prdx4* mRNA と直接結合することを明らかにした。

5. CCR4-NOT 複合体の構成分子の内、脱アデニル化活性のある CNOT7 または CNOT8 とこの RNA 結合蛋白質との相互作用を解析する為に、HEK293T 細胞にこの RNA 結合蛋白質と CCR4-NOT 複合体の構成分子を過剰発現させ、免疫沈降を行った。その結果、この RNA 結合蛋白質は CNOT8 を含む CCR4-NOT 複合体と相互作用するのに対して、CNOT7 を含む CCR4-NOT 複合体とは結合しないことを明らかにした。

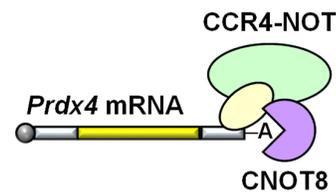
6. AlphaFold 2 による蛋白質の立体構造予測により、CNOT7 と CNOT8 の C 末端に構造的差異が存在することが予測された。すなわち、CNOT7 の C 末端が天然変性領域なのに対して、CNOT8 の C 末端には、 α ヘリックス構造の存在が予測された。この CNOT7 と CNOT8 の C 末端における立体構造の違いが、CNOT7 または CNOT8 に結合する異なる RNA 結合蛋白質を決定している可能性を解析する為に、CNOT7 と CNOT8 の C 末端欠損体と、それぞれの C 末端を CNOT7 と CNOT8 で入れ替えた変異体を HEK293T 細胞に過剰発現させて、この RNA 結合蛋白質との相互作用を免疫沈降法により解析した。その結果、この RNA 結合蛋白質が CNOT8 の C 末端で結合することを明らかにした (図③)。

7. *Cnot7* 欠損 MIN6 細胞において *Cnot7* 欠損膵島と同様に CNOT7 発現量低下に伴う CNOT8 蛋白質発現量の増加をウエスタンブロット法により確認した。*Cnot7* 欠損 MIN6 細胞に PRDX4 を過剰発現させたところ、インスリン生成が改善することをインスリン抗体を用いたウエスタンブロット法により明らかにした。

以上の研究成果を統合的にまとめてインスリン生成に重要な CCR4-NOT 複合体を介した転写後制御の分子機構を解明することができた。本研究の研究成果は論文としてまとめて科学雑誌に投稿し、査読者から良い評価を得ることができた。本研究をまとめた論文は国際科学雑誌において現在リバイス中であり、論文発表に向けて精査中である。



図② *Cnot7* 欠損膵島における *Prdx4* mRNA 安定性の低下



図③ CNOT8 を含んだ CCR4-NOT 複合体による *Prdx4* mRNA の分解

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Mostafa D, Yanagiya A, Georgiadou E, Wu Y, Stylianides T, Rutter GA, Suzuki T*, Yamamoto T*	4. 巻 476
2. 論文標題 Loss of -cell identity and diabetic phenotype in mice caused by disruption of CNOT3-dependent mRNA deadenylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications biology.	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01201-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi A, Suzuki T, Soeda S, Takaoka S, Kobori S, Yamaguchi T, Mohamed H, Yanagiya A, Abe T, Shigeta M, Furuta Y, Kuba K, and Yamamoto T	4. 巻 3
2. 論文標題 The CCR4-NOT complex maintains liver homeostasis through mRNA deadenylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life science alliance.	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.201900494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mostafa D, Takahashi A, Yanagiya A, Yamaguchi T, Abe T, Kureha T, Kuba K, Kanegae Y, Furuta Y, Yamamoto T*, Suzuki T*.	4. 巻 17(3)
2. 論文標題 Essential functions of the CNOT7/8 catalytic subunits of the CCR4-NOT complex in mRNA regulation and cell viability.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA biology.	6. 最初と最後の頁 403-416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476286.2019.1709747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Akinori, Suzuki Toru, Soeda Shou, Takaoka Shohei, Kobori Shungo, Yamaguchi Tomokazu, Mohamed Haytham Mohamed Aly, Yanagiya Akiko, Abe Takaya, Shigeta Mayo, Furuta Yasuhide, Kuba Keiji, Yamamoto Tadashi	4. 巻 3
2. 論文標題 The CCR4-NOT complex maintains liver homeostasis through mRNA deadenylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 1~19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.201900494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mostafa Dina, Takahashi Akinori, Yanagiya Akiko, Yamaguchi Tomokazu, Abe Takaya, Kureha Taku, Kuba Keiji, Kanegae Yumi, Furuta Yasuhide, Yamamoto Tadashi, Suzuki Toru	4. 巻 17
2. 論文標題 Essential functions of the CNOT7/8 catalytic subunits of the CCR4-NOT complex in mRNA regulation and cell viability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 403 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15476286.2019.1709747	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Patrick Stoney, Akiko Yanagiya, Saori Nishijima, Tadashi Yamamoto	4. 巻 15;434(9)
2. 論文標題 CNOT7 outcompetes its paralog CNOT8 for integration into the CCR4-NOT complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 167523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2022.167523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shohei Takaoka, Akiko Yanagiya*, Haytham Mohamed Aly Mohamed, Rei Higa, Takaya Abe, Ken-Ichi Inoue, Akinori Takahashi, Patrick Stoney, Tadashi Yamamoto	4. 巻 24(10)
2. 論文標題 Neuronal XRN1 is required for maintenance of whole-body metabolic homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Akiko Yanagiya
2. 発表標題 Translational control by poly(A)-binding protein in glucose-stimulated insulin biosynthesis in diabetes
3. 学会等名 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiko Yanagiya, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation to maintain redox homeostasis in insulin biosynthesis by the Ccr4-Not deadenylase complex in mouse pancreatic β -cells
3. 学会等名 8th RNA Stability Conference: mRNA Turnover Mechanisms, Regulation and their Implication in Infectious and Age-Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Yanagiya, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation maintains redox homeostasis in insulin biosynthesis by the Ccr4-Not deadenylase complex
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Yanagiya, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation in insulin biosynthesis by the Ccr4-Not deadenylase complex in mouse pancreatic β cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳谷朗子
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation in glucose-stimulated insulin biosynthesis by the Ccr4-Not deadenylase complex in mouse pancreatic islets
3. 学会等名 RNA 2018, The 23rd Annual Meeting of the RNA Society, Berkeley, California, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳谷朗子
2. 発表標題 Post-transcriptional regulation in insulin biosynthesis by the Ccr4-Not deadenylase complex in mouse pancreatic islets
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会、大阪、日本
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Tara, Akiko Yanagiya, Dina Mostafa, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 mRNA turnover mediated by RNA modification to maintain pancreatic cell homeostasis
3. 学会等名 The RNA frontier meeting, Okinawa, Japan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Tara, Akiko Yanagiya, Dina Mostafa, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 The postr-transcriptional regulation by the CCR4-NOT complex is essential for pancreatic cell function
3. 学会等名 The 8th CCR4-NOT Meeting, Ito, Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Yanagiya, Yuki Tara, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Translational control is a potential therapeutic target to cure a variety of diseases: Translational control of m6A-methylated mRNAs to maintain pancreatic cell homeostasis
3. 学会等名 The 44th the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Yanagiya, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 膵 細胞の恒常性維持に重要なCCR4-NOT複合体を介したmRNA分解制御の解析
3. 学会等名 The 11th Signaling network meeting, Osaka, Japan (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳谷朗子
2. 発表標題 膵 細胞におけるインスリン 生合成に必須な転写後制御の解析
3. 学会等名 東北大学薬学研究科遺伝子制御薬学分野 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------