

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21229006

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Dissection of mRNA degradation pathways and anomalies associated with targeted disruption of CCR4-NOT deadenylase complex

研究代表者

山本 雅 (YAMAMOTO, TADASHI)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・教授

研究者番号：40134621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 162,600,000円、(間接経費) 48,780,000円

研究成果の概要(和文)：高等生物mRNA代謝に関わるCCR4-NOT複合体について、それを構成する9種のタンパク質を個々に欠損するマウスを作成した。それらが、胚発生、肝・脂肪組織形成、免疫機能、エネルギー代謝などの異常を引き起こすことを見いだして、CCR4-NOT欠損マウスがヒト疾患の病態モデルマウスとなると示唆した。また、mRNA分解のメカニズムを、CCR4-NOT複合体構成成分の構造やmRNAとの会合様式を解析することで追求し、標的mRNAの3'UTR配列にCCR4-NOT複合体の調節成分が会合し、その結果活性成分によりmRNAの脱アデニル化が進み、当該mRNA分解が進むことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We have studied the physiological roles of the CCR4-NOT deadenylase complex by generating mouse lines in which each gene encoding individual subunit of the CCR4-NOT complex is disrupted. Mice thus produced were analyzed pathologically and anatomically, and we so far found that those mice were either embryonic lethal or abnormal in tissue development or showed loss of regulation in immune system and/or energy metabolism. We, therefore, assumed that CCR4-NOT deficient mouse lines could be models of human diseases. We also analyzed the molecular mechanisms by which the CCR4-NOT complex recognizes and degrades poly(A) tail of its target mRNAs. We solved the crystal structures of oligo(dA)-interacting enzymatic subunits CNOT6L and CNOT7. We also found the enzymatic subunits can target poly(A) tail of specific mRNAs through their interaction with regulatory subunits such as CNOT1 and CNOT3 that can recognize specific sequences present at 3'UTR regions of particular mRNAs.

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：mRNA代謝 mRNA分解 遺伝子欠損マウス 疾患モデル CCR4-NOT複合体 脱アデニル化反応 3'UTR poly(A)配列

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、外来刺激に应答した 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、外来刺激に应答した mRNA 分解の基本的なメカニズムを、Tob と CCR4-NOT の会合の意義を追求しながら確立する。

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て CCR4-NOT 遺伝子改変マウスの作成と解析を進める。また CCR4-NOT 複合体作用の解析は、生化学、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、総合的に進める。

4. 研究成果

CCR4-NOT 複合体構成蛋白質の発現解析

CCR4-NOT を構成するサブユニットそれぞれについて、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や胚死の原因は異なっており、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 マウスと以下の Cre マウスの掛け合わせを進めた。albuminCre マウスの掛け合わせで、CNOT3 を肝臓特異的に欠損させ、瘡せで背体毛の脱毛という表現形を認めている。また肝臓の発生遅延が認められた。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。心臓肥大などが認められたが死因は不明である。AdipoQCre マウスとの掛け合わせでは脂肪萎縮症様の症状を持つマウスを得た。また体温調節異常が認められた。その他に、LckCre や Nkx2.1Cre マウスとの交配から免疫系や肺での異常を持つマウスを得ている。

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。また、肝臓特異的 CNOT3^{-/-} マウス肝では、胎児性 mRNA (AFP mRNA, IGF2 mRNA 等) の発現が生後一月後にも見られた。脂肪組織特異的 CNOT3^{-/-} マウス脂肪組織では、SREBP mRNA や UCP1 mRNA が白色脂肪組織で亢進していた。更に、高脂肪食誘導性肥満に抵抗性を示す CNOT6L ノル欠損マウスで、FGF2 (adipokine) mRNA の発現が亢進し、またその半減期が上昇していることを見いだした。

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) と会合の様子を共結晶解析から明らかにした。一方、マイクロアレイ解析、Rip-ChIP 解析、免疫共沈、またパイ

オインフォマティクスにより、CCR4-NOT 複合体が標的 mRNA の代謝を制御する分子機構を追求し、FGF21(adipokine) mRNA の 3' UTR 領域に CNOT6L が会合することを見いだした。その会合は、CCR4-NOT 複合体中の CNOT1 と CNOT6L mRNA 3' UTR 中の AU-rich 配列に結合する TTP(Tristetraprolin)との相互作用を介することを示すデータを予備的に得ている。また、IGF2 mRNA の 3' UTR に CNOT3 が IMP2 タンパク質を介して会合していることを見いだしている。

以上、CCR4-NOT 複合体成分の機能不全がマウス個体に様々な異常を引き起こすことを見いだして来ており、CCR4-NOT 欠損マウスがヒト疾患の病態モデルマウスとなる可能性を指摘できた。また、CCR4-NOT の作用機構の解析から哺乳類での mRNA 分解制御を統一的に理解する上で重要な知見が得られた。

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 19 件)

1. Watanabe, C. Morita, M. Yamamoto T. (13 名11番目) Stability of mRNA influences steoporotic bone mass via CNOT3, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol.111, 2692-2697, 2014, DOI:10.1073/pnas.1316932111, 査読有
2. Hoshina, N. Tanimura, Yamamoto T. (17 名17番目) Protocadherin 17 regulates presynaptic assembly in topographic corticobasal ganglia circuits. Neuron, Vol.78,839-854, 2013, DOI:10.1016/j.neuron.2013, 査読有
3. Yanagida S, Taniue K, Yamamoto T. (9 名7番目) ASBEL, an ANA/BTG3 antisense transcript required for tumorigenicity of ovarian carcinoma. Sci Rep. Vol.3, 1305, 2013, DOI:10.1038/srep01305, 査読有
4. Kohda K, Kakegawa W, Yamamoto T. (6名4番目) The 2 glutamate receptors gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci USA, Vol.110, E948-957, 2013, DOI:10.1073/pnas.1218380110, 査読有
5. Sekino-Suzuki N, Yuyama K, Yamamoto T. (10名7番目) Involvement of gangliosides in the process of Cbp/PAG phosphorylation by Lyn in developing cerebellar growth cones. J Neurochem, Vol.124, 514-522, 2013, DOI:10.1111/jnc.12040, 査読有
6. Yoshikawa S, Kukimoto-Niino M, Yamamoto T. (20名19番目) Structural basis for the altered drug sensitivities of non-small cell lung cancer-associated mutants of human epidermal growth factor receptor. Oncogene, Vol.32, 27-38, 2013, DOI:10.1038/onc.2012.21, 査読有
7. Takeshita K, Tezuka T, Yamamoto T. (9 名8番目) Structural flexibility regulates phosphopeptide-binding activity of the tyrosine kinase binding domain of Cbl-c. J Biochem, Vol.152, 487-495, 2012, DOI:10.1093/jb/mvs085, 査読有
8. Suzuki T, Tsuzuku J, Yamamoto T. (11 名11番目) Inhibition of DNA Damage-induced Apoptosis through Cdc7-mediated Stabilization of Tob. J Biol Chem, Vol.287, 40256-40265, 2012, DOI:10.1074/jbc.M112.353805, 査読有
9. Takahashi A, Morita M, Yamamoto T. (5 名5番目) Tob2 Inhibits Peroxisome Proliferator-Activated Receptor 2 expression by sequestering Smads and C/EBP during adipocyte differentiation. Mol and Cell Biol, Vol.32, 5067-5077, 2012, DOI:10.1128/MCB.00610-12, 査読有
10. Unezaki S, Sasaki A, Yamamoto T. (12 名9番目) Involvement of Tyr1472 phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit in postherpetic neuralgia in model mice, Mol Pain, Vol.8, 59 (1-13), 2012, DOI:10.1186/1744-8069-8-59, 査読有
11. Ozaki Y, Matsui H, Yamamoto T. (12名9番目) Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation, Mol Cell, Vol.47, 694-706, 2012, DOI:10.1016/j.molcel.2012, 査読有
12. Ohi K, Hashimoto R, Yamamoto T. (13 名11番目) The p250GAP gene is associated with risk for schizophrenia and schizotypal personality traits. PLoS ONE, Vol.7, e35696, 2012, DOI:10.1371/journal.pone.0035696, 査読有
13. Delawary M, Tezuka T, Yamamoto T. (9 名8番目) NMDAR2B tyrosine phosphorylation is involved in thermal nociception. Neurosci Lett, Vol.516, 270-273, 2012, DOI:10.1016/j.neulet.2012.04.007, 査読有
14. Morita M, Oike Y, Yamamoto T. (10 名10番目) Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3+/- mice. EMBO J, Vol.30, 4678-4691, 2011, DOI: 10.1038/emboj.2011.320, 査読有
15. Fabian MR, Cieplak MK, Yamamoto T. (11 名11番目) Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3+/- mice. EMBO J, Vol.30, 4678-4691, 2011, DOI: 10.1038/emboj.2011.320, 査読有

- 名 8 番目) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat Struct and Mol Biol*, Vol.18, 1211-1217, 2011, DOI: 10.1038/nsmb.2149, 査読有
16. Wang H, Morita M, Yang X, Yamamoto T (12 名 11 番目) Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J* Vol.29, 2566-2576, 2010, DOI:10.1038/emboj.2010.152, 査読有
 17. Bartlam M, Yamamoto T. The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein & Cell* Vol.1, 443-452, 2010, DOI:10.1007/s13238-010-0060-8, 査読有
 18. Horiuchi M, Takeuchi K, Yamamoto T (10 名 9 番目) Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *J Biol Chem*, Vol.284, 13244-13255, 2009, DOI:10.1074/jbc.M809250200, 査読有
 19. Suzuki T, Tsuzuku J, Yamamoto T (5 名 5 番目) Proteasome-mediated degradation of Tob is pivotal for triggering UV-induced apoptosis. *Oncogene*, Vol.28, 401-411, 2009, DOI:10.1038/onc.2008.387, 査読有
- [学会発表](計 30 件)
1. 高橋明格、山本雅ら、CCR4-NOT 複合体の肥満における機能解析、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 26 日、愛媛ひめぎんホール
 2. 山本雅、Physiology of deadenylation: Analysis of phenotypes and gene expression profiles in mice with altered deadenylation、国際システムズバイオロジー学会、2013 年 9 月 2 日、コペンハーゲン
 3. 山本雅、Regulation of cell growth and death by Tob protein. DSK ミニシンポジウム: Perspectives in Cancer Biology, 2013 年 10 月 1 日、京都大学大学院メディカルイノベーションセンター
 4. 高橋明格、山本雅ら、CCR4-NOT 複合体による肥満症制御機構の解明、2013 年 10 月 11 日、東京国際フォーラム
 5. 山本雅、ErbB ファミリー研究の黎明期、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド
 6. 鈴木亨、山本雅ら、Importance of CCR4-NOT complex-mediated mRNA degradation in liver development. 第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド
 7. 呉羽拓、山本雅ら、Alteration of T cell development and functions in mice with T cell-specific CNOT3 deletion. 第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド
 8. 白井陽太郎、山本雅ら、肺癌における CNOT3 の機能解析、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド
 9. 高橋明格、山本雅ら、肥満症発症における CCR4-NOT 脱アデニル化酵素活性サブユニットの重要性、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド
 10. 星名実幸、山本雅ら、ストレス応答における CCR4-NOT 複合体のリン酸化の解析、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド
 11. 李雪、山本雅ら、脂肪組織の発達と機能における CNOT3 の役割、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド
 12. 森田斉弘、山本雅ら、CCR4-NOT 複合体と RNA 結合因子による、肝臓における代謝機構の解析、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド
 13. 井上毅、山本雅ら、B 細胞分化における CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体サブユニット CNOT3 の機能解析、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド
 14. 高橋明格、山本雅ら、脱アデニル酵素 CCR4-NOT 複合体による肥満症制御、第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11 日、ホテルグランヴィア京都
 15. 高橋明格、山本雅ら、The Role of the CCR4-NOT Deadenylase Complex in Obesity. 第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場
 16. Morita M, Yamamoto T, et al. A Critical Role for Deadenylase-mediated mRNA Degradation in Metabolism and Obesity. 第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場
 17. 高橋明格、山本雅ら、Involvement of CCR4-NOT deadenylase complex in the regulation of energy metabolism. 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場
 18. 山本雅、Cell signaling in the brain. 19th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. 2012 年 8 月 23 日、ソウル、韓国
 19. 大杉美穂、山本雅ら、Localization of Kif8A/kinesin-8 depends on its tail domain and microtubule stability. International symposium "Cell Division", 2011 年 6 月 30 日、箱根
 20. 鈴木亨、山本雅ら、CDC7-dependent inhibition of Tob degradation main-

- tains cell survival after DNA damage. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋
21. 山本雅、The CCR4-NOT complex, a deadenylase that controls decay for specific sets of mRNAs in a context-dependent manner. 東大フォーラム2011、2011年10月20日、リヨン、フランス
 22. 鈴木亨、山本雅ら、Competition of Cdc7/Tob with Cul4-DDB1-Cdt2 E3 complex in DNA damage-induced apoptosis. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日、パシフィコ横浜
 23. Tokai-Nishiizumi N, Yamamoto T, et al Tropomyosin 4, actin binding protein, contributes to the proper spindle orientation during mitosis and meiosis. The 2011 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2011年12月5日、Denver, Co, USA
 24. Takahashi A, Yamamoto T, et al. Tob2 inhibits adipocyte differentiation. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日、パシフィコ横浜
 25. 森田斉弘、山本雅ら A critical role of deadenylase-mediated mRNA degradation in energy metabolism. 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010年7月16日、岐阜
 26. 伊藤健太郎、山本雅ら CNOT1 and CNOT2 are essential for maintaining the structural integrity and deadenylase activity of the CCR4-NOT complex. The 17th East Asia Joint and 9th Cross-Strait Symposium on Biomedical Research. 2010年7月1日、Gis NTU Convention Center Taipei, Taiwan
 27. Zang Y, Yamamoto T, et al. CNOT7 deficiency affects protein association and activities of murine Ccr4-Not deadenylase complex, leading to abnormal spermatogenesis. 第33回日本分子生物学会、2010年12月7日、神戸
 28. 山本雅、Role of CCR4-NOT deadenylase complex in spermatogenesis and energy metabolism. KSMBMB Annual International conference 2009年10月29日、ソウル、韓国
 29. 小川晋一、山本雅ら、Anti-proliferative protein Tob is relevant to RNA metabolism and facilitates the interaction between P-body and stress granule. 第32回日本分子生物学会、2009年12月11日、パシフィコ横浜
 30. 森田斉弘、山本雅ら、Critical involvement of deadenylase-mediated mRNA degradation in energy metabolism. 第32回日本分子生物学会、2009年12月11日、パシフィコ横浜

〔図書〕(計 1 件)

Yamamoto T, et al. "ErbB2/HER2, its contribution to basic cancer biology and development of molecular targeted therapy", *In Breast Cancer*, pp139-170, eds, Gunduz M & Gunduz E, INTECH Croatia, 2011

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅 (Yamamoto, Tadashi)

沖縄科学技術大学院大学 細胞シグナルユニット 教授

研究者番号：40134621