

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860761

研究課題名(和文)ポリ(A)鎖分解酵素CCR4-NOT複合体によるmRNA分解を介した肥満症制御

研究課題名(英文)The CCR4-NOT deadenylase complex regulates obesity via mRNA decay

研究代表者

高橋 明格(Takahashi, Akinori)

沖縄科学技術大学院大学・その他の研究科・研究員

研究者番号：90637589

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)：肥満は多くの生活習慣病の危険因子であり、詳細なメカニズムの解明が新規治療法の創成に必須である。申請者はmRNA分解を担う真核生物の主要poly(A)鎖分解酵素 CCR4-NOT複合体の酵素活性サブユニット CNOT8 の肝臓特異的欠損マウスモデルを用いて、肥満発症の新規分子機序の解明を目指した。この結果、CNOT8がEgfr mRNAの発現を抑制し肥満発症に寄与することを示した。さらに、CNOT8はEgfr mRNAを脱アデニル化非依存的に転写後制御することが示唆された。本研究の更なる遂行により、肥満発症の新規分子メカニズムと転写後遺伝子発現調節機構の新たなモデルを提唱できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a risk factor of various lifestyle diseases. Understanding of detail molecular mechanisms underlying obesity is required for invention of novel therapeutic approaches. The CCR4-NOT complex is a major eukaryotic deadenylase, and CNOT8 is one of the enzymatic subunits. The CCR4-NOT complex is implicated in obesity. To investigate molecular mechanism, we used liver-specific CNOT8 knockout mice model. We found that CNOT8 negatively regulates Egfr expression and contributes to obesity. Interestingly, CNOT8 regulates Egfr mRNA via deadenylation-independent post-transcriptional mechanism. Our study will provide a novel molecular mechanism of obesity and a new in vivo model of deadenylation-independent post-transcriptional regulation.

研究分野：Molecular biology

キーワード：Obesity The CCR4-NOT complex mRNA decay

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満は体内に過剰に脂肪が蓄積された状態と定義され、糖尿病・高血圧・高脂肪血症・心疾患等の多くの生活習慣病の危険因子である。肥満症の新規治療法の創製には、詳細なメカニズムの解明が必須である。肥満症の分子機序としては、転写因子による制御の報告が多くなされている。例えば、脂肪細胞分化の必須因子である PPAR γ は脂肪蓄積を促進する遺伝子の発現誘導を介して肥満の進行に關与する。一方で、近年の研究により、mRNA 分解を始めとする転写後調節と肥満との関連性が明らかになりつつある。転写後調節による肥満症の制御機構の詳細なメカニズムを解明することで、新規作用点をもつ治療薬や治療法の創製に繋がると考えられる。

(2) 転写後調節は、転写された mRNA の発現量制御機構であり、mRNA の 5' 末端のキャップ構造のデキャッピングや 3' 末端の poly(A) 鎖の脱アデニル化に引き続いて誘導される mRNA 分解がその中核を担う。CCR4-NOT 複合体は真核生物の主要な脱アデニル化酵素であり、poly(A) 鎖の短縮を介して、mRNA を不安定化し、mRNA 分解を導く。CCR4-NOT 複合体は細胞増殖、エネルギー代謝、精子形成、骨形成等、様々な生命現象に重要な役割を果たし、生体の恒常性維持の根幹を担う。CCR4-NOT 複合体は少なくとも 11 のサブユニット (CNOT1-3, 6L, 6-11) からなる。このうち、CNOT1 は各サブユニットをつなぎとめる巨大な足場タンパクであり、CNOT6/6L/7/8 は酵素活性サブユニットである。CNOT1-3 は酵素活性制御に關与することが報告されている。

(3) これまでの研究により、CCR4-NOT 複合体がエネルギー代謝関連遺伝子の発現を制御し、肥満発症に關与することが報告されている。CCR4-NOT 複合体のサブユニットの一つである Cnot3 の全身ヘテロ欠損マウスは通常食負荷条件下ですでに痩せ型であり、高脂肪食負荷により誘導される肥満にも抵抗性を示す。Cnot3 は CCR4-NOT 複合体の酵素活性制御を介して、poly(A) 鎖長の調節し、肝臓におけるエネルギー関連遺伝子の発現制御に關与していた。しかし、肥満において、CCR4-NOT 複合体がどの臓器で主にその進行に寄与するか、並びに、脱アデニル化酵素活性の寄与、さらには遺伝子発現調節の詳細なメカニズムは未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、肥満進行時において、CCR4-NOT 複合体の働きが重要な臓器を見出し、その酵素活性の重要性も明らかにすることで、CCR4-NOT 複合体による肥満症制御の詳細な分子メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) CCR4-NOT 複合体の酵素活性サブユニットである CNOT8 の条件特異的欠損マウスを作成し、肝臓特異的に Cre を発現する Albumin-Cre マウスと交配することにより、肝臓特異的 CNOT8 欠損マウスを作成した。本マウスに高脂肪食を負荷した後、体重変動、インスリン・グルコース投与に対する反応性を調べることにより、CNOT8 の肝臓における肥満への寄与を検討した。

(2) CNOT8 により制御されるエネルギー代謝関連遺伝子を同定するため、高脂肪食負荷後の肝臓特異的 CNOT8 欠損マウスの肝臓より RNA とタンパク質を抽出し、次世代シーケンサー・定量的リアルタイム PCR・ウェスタンブロットング法により遺伝子の発現変化を調べた。

(3) CNOT8 が遺伝子発現を制御する分子基盤を明らかにするために、CNOT8 欠損肝臓における mRNA の poly(A) 鎖長、CNOT8 と mRNA の結合を調べ、mRNA 分解への影響を調べた。また、mRNA の転写活性化状態も調べた。さらに、mRNA レベルとタンパク質レベルの制御を明らかにするために、肝臓抽出液からフラクションコレクターにより、ポリソームフラクション分画し、翻訳の状態を検討した。

4. 研究成果

(1) CNOT8 肝臓特異的欠損マウスにおける肥満抵抗性

野生型マウスにおいて高脂肪食負荷により誘導される体重増加は、CNOT8 肝臓特異的欠損マウスでは顕著に抑制されていた。さらに、臓器重量を調べたところ、CNOT8 肝臓特異的欠損マウスでは野生型マウスに比して、肝臓と白色脂肪組織の組織重量の減少が確認された。肥満では、インスリン・グルコース投与後の血中グルコースの末梢臓器への取り込みが悪くなっており、高血糖の原因となっている。続いて、CNOT8 肝臓特異的欠損マウスと野生型マウスにインスリンとグルコースを投与しその後の血中のグルコースレベルを調べた。この結果、CNOT8 肝臓特異的欠損マウスでは、野生型マウスに比して、インスリン感受性とグルコースの取り込み能が亢進していた。以上の結果より、肥満において、CNOT8 が肝臓で重要な役割を担うことが示唆された。

(2) CNOT8 による発現制御遺伝子の同定

CNOT8 が肥満時の肝臓で制御する遺伝子群を同定するため、野生型マウスと CNOT8 肝臓特異的欠損マウスから単離した肝臓より RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行った。この結果、CNOT8 肝臓特異的欠損マウスにおいて、インスリンシグナル制御因子を含むエネルギー代謝関連遺伝子群の発現増加と炎症制御因

子の発現減少がみられた。以上の結果は、遺伝子発現レベルからも、CNOT8 肝臓特異的欠損マウスにおける肥満耐性の表現系を支持するものである。CNOT8 肝臓特異的欠損マウスにおいて、発現が増加していたインスリンシグナル制御因子の内、Egfr はインスリンシグナルとの密接な関連性が知られているものの、個体レベルで肥満における重要性の研究が進んでいない遺伝子の一つである。肥満の新規分子機序を明らかにするため、我々はまず、Egfr に着目し、肥満時のインスリンシグナルに与える影響を調べた。CNOT8 肝臓特異的欠損マウスでは、インスリン刺激により誘導される Akt のリン酸化レベルが野生型マウスに比して高レベルであり、インスリン感受性が亢進している。しかし、CNOT8 肝臓特異的欠損マウスに Egfr のリン酸化酵素活性の阻害剤である gefitinib を投与したところ、インスリン刺激により誘導される Akt のリン酸化レベルが顕著に抑制された。以上の結果より、肝臓において、CNOT8 は Egfr の発現を抑制することで、インスリンシグナルを阻害し、肥満進行に寄与することが示唆された。

(3) CNOT8 による Egfr の発現調節機構の解明

RNA 免疫沈降実験により、コントロール IgG による免疫沈降複合体に比べて、抗 CNOT8 抗体による免疫沈降複合体の中に、Egfr mRNA が多く含まれていることから、CNOT8 が Egfr mRNA と結合することを示した。続いて、CNOT8 は脱アデニル化酵素活性を有するため、Egfr mRNA の poly(A)鎖長を調べた。しかしながら、CNOT8 欠損肝臓における Egfr mRNA の poly(A)鎖長は、野生型と同程度であった。そこで、CNOT8 が Egfr mRNA を転写前後のどちらで制御しているかを調べるため、Egfr の Pre-mRNA の発現量を調べた。Egfr の Pre-mRNA の発現量は CNOT8 欠損の影響を受けなかったことから、CNOT8 は脱アデニル化を介さない転写後調節により、Egfr mRNA の発現量を制御していることが示唆された。今後は、CNOT8 が Egfr mRNA のデキャッピングに与える影響等を調べることにより、脱アデニル化非依存的な mRNA 分解機構を検討する予定である。mRNA 分解はエンドヌクレアーゼによる内部切断、または、エクソヌクレアーゼによる 5' もしくは 3' 末端からの分解により執り行なわれる。基本的概念として、mRNA は poly(A)鎖が短縮され、5' キャップ構造が外れたのち、5' と 3' 末端の両端から分解されるが、本研究のデータは、個体内において、どちらか片側末端からの mRNA 分解が起きうる可能性を示唆している。本研究の更なる遂行は、mRNA 分解の新規概念の確立にも繋がると考えられる。

(4) CNOT8 による翻訳制御

CCR4-NOT 複合体はデキャッピング酵素複合体を翻訳開始因子が外れた mRNA の 5' 末端

にリクルートすることにより、翻訳を阻害し、5' 末端からの mRNA 分解に寄与することが示唆されている。そこで、CNOT8 欠損肝臓におけるエネルギー代謝関連遺伝子の翻訳状態を肝臓抽出液から、ポリソームフラクションをフラクションコレクターにより分画することにより調べた。この結果、一部の遺伝子で顕著なポリソームフラクションの減少がみられ、CNOT8 が翻訳に必須である可能性が示唆された。今後は、リボソームプロファイリングにより、肝臓において、CNOT8 が翻訳を制御する遺伝子を網羅的に探索し、肥満における CNOT8 による翻訳制御の重要性にアプローチする。

(5) 総括・展望

本研究では、肝臓において、肥満を制御する新規遺伝子として CNOT8 を同定した。さらに、CNOT8 が Egfr の発現を抑制することがインスリンシグナルの減弱に繋がることを明らかにした。CNOT8 は脱アデニル化非依存的な転写後調節により、Egfr mRNA の発現を抑制的に制御していた。本研究の更なる遂行により、脱アデニル化非依存的な mRNA 発現抑制機構という RNA 分野における新規概念の確立と肥満の新規発症メカニズムを提唱できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shirai, Y.T., Suzuki, T., Morita, M., **Takahashi, A.**, Yamamoto, T. (2014). Multifunctional roles of the mammalian CCR4-NOT complex in physiological phenomena. *Front. Genet.* 5, 286 doi: 10.3389/fgene.2014.00286、査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

第 14 回日本 RNA 学会年会 (ひめぎんホール、松山、2013 年 7 月 26 日~7 月 28 日) CCR4-NOT 複合体の肥満における機能解析 (口頭発表) **高橋明格**、森田斉弘、鈴木亨、山本雅

第 5 回シグナルネットワーク研究会 (北海道大学医学部フラテホール、札幌、2013 年 8 月 30 日~8 月 31 日) CCR4-NOT 標的 mRNA と肥満症制御 (口頭発表) **高橋明格**、山本雅

第 35 回日本肥満学会 (東京 2013 年 10 月 11 日-10 月 12 日) CCR4-NOT 複合体による肥満症制御機構の解明 (口頭発表) **高橋明格**、山本雅

第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3 日- 6 日) Importance of CCR4-NOT deadenylase subunits in obesity. **Akinori Takahashi**,

Masahiro Morita, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto

第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3 日 - 6 日) Importance of CCR4-NOT complex-mediated mRNA degradation in liver development. Toru Suzuki, Chisato Kikuguchi, Takeshi Nagashima, **Akinori Takahashi**, Tadashi Yamamoto

第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3 日 - 6 日) Analysis of phosphorylation of CCR4-NOT complex in response to stress. Miyuki Hoshina, Naosuke Hoshina, Toru Suzuki, **Akinori Takahashi**, Tadashi Yamamoto

第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3 日 - 6 日) 脂肪組織の発達と機能における CNOT3 の役割 李雪, 森田 斉弘, **高橋 明格**, 鈴木 亨, 山本 雅

第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド 2013 年 12 月 3 日 - 6 日) CCR4-NOT 複合体と RNA 結合因子による、肝臓における代謝制御機構の解析 森田 斉弘, Nadeem Siddiqui, Christopher Rouya, 長嶋 剛史, Ola Larsson, **高橋 明格**, Marc Fabian, 岡田 眞理子, 山本 雅, Nahum Sonenberg

第 15 回日本 RNA 学会年会 (ウインクあいち、名古屋、2014 年 7 月 23 日 - 25 日) 肝炎発症における CCR4-NOT 複合体の機能と標的 mRNA **高橋明格**、鈴木亨、山本雅

第 15 回日本 RNA 学会年会 (ウインクあいち、名古屋、2014 年 7 月 23 日 - 25 日) CCR4-NOT 複合体による心臓エネルギー代謝制御機構の解析 久場敬司、鈴木亨、佐藤輝紀、山口智和、**高橋明格**、山本雅、今井由美子

第 37 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2014 年 11 月 25 日 - 27 日) The role of the CCR4-NOT deadenylase complex in induced pluripotent stem cells. Ari Zukeran, **Akinori Takahashi**, Toru Suzuki, Shinya Ikematsu, Tadashi Yamamoto

第 37 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 2014 年 11 月 25 日 - 27 日) 外来刺激時における CCR4-NOT デアデニレース複合体のリン酸化による制御機構の解析 星名(栗國)実幸, 星名直祐, **高橋明格**, 鈴木亨, 山本雅

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<https://groups.oist.jp/csu>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 明格 (Takahashi Akinori)
沖縄科学技術大学院大学・研究員
研究者番号: 90637589

〔図書〕 (計 0 件)