

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860358

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Regulation of early B cell development by the CCR4-NOT deadenylase complex

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

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)：哺乳類動物の発生・分化には遺伝子の転写制御のみならず、mRNA分解による転写後制御も重要な役割を果たしていると考えられる。mRNAのポリA鎖分解酵素の一つCCR4-NOT複合体の生理機能を明らかにするため、複合体のCNOT3サブユニットのB細胞特異的欠損マウスを作製したところ、著明なB細胞初期分化異常を呈し、CNOT3がB細胞分化に必須の役割を担っていることを明らかにした。さらに初期B細胞における複合体の生理的標的基質遺伝子の一部の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Post-transcriptional gene regulation is a key regulatory mechanism underlying mammalian cell differentiation and development. To elucidate physiological functions of the CCR4-NOT deadenylase complex, we analyzed the function of CNOT3 subunit of this complex using B cell development as a model system. We generated B-cell specific Cnot3-deficient mice and found that CNOT3 has an essential role for early B cell development. Furthermore, we identified a physiological target mRNA of this complex in early B cells.

研究分野：免疫学

キーワード：B細胞分化 CCR4-NOT複合体 mRNA分解

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。従来の研究では、遺伝子発現の第一段階である転写調節、すなわち mRNA 合成開始の時空間的制御に焦点が当てられ、転写後制御機構、中でも mRNA 分解過程については十分な解明がなされて来なかった。これは主として mRNA 分解を司る cis 領域および trans 因子の分子の実体及びその制御機構の解明が不十分であることに起因すると考えられる。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 複合体は酵母で発見された脱アデニル化酵素であり、哺乳類細胞においても主要な脱アデニル化酵素であることが示唆されているが、CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化の分子機構解析については酵母やショウジョウバエにおける研究が主であり、哺乳類動物生体内における生理機能及び分子メカニズムの解析についてはほとんど研究がなされていない。

2. 研究の目的

B 細胞は、各細胞サブセットの表面マーカー、シグナル伝達経路、転写プログラムなどの研究の蓄積により、詳細に各分化段階が定義されている上に、マウス遺伝学を始めとする様々な解析手法や実験系が確立されており、極めて優れた細胞分化モデルを提供している。そこで本研究では、マウス B 細胞分化系をモデルとして、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を解明することを目的とする。

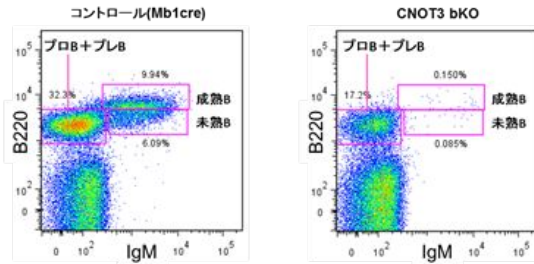
3. 研究の方法

CCR4-NOT 複合体は複数のサブユニットより形成されているため、複合体において脱アデニル化酵素活性を調節していると考えられている CNOT3 サブユニットに注目した。CNOT3 ノックアウトマウス(*Cnot3*^{-/-})は耐性致死であることから、CNOT3 を B 細胞分化初期に特異的に欠損するコンディショナルノックアウトマウス(*Cnot3*^{lox/flox} *Mb1*^{cre/+}マウス、以下 CNOT3 bKO マウス)を作製し、その解析を行う。さらにその表現型の分子メカニズムを解明するため、トランスクリプトーム解析等を用いて標的 mRNA を探索し、その表現型への寄与を検討する。また、CCR4-NOT 複合体によるこれら標的 mRNA の認識機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) CNOT3 は B 細胞初期分化に必須である

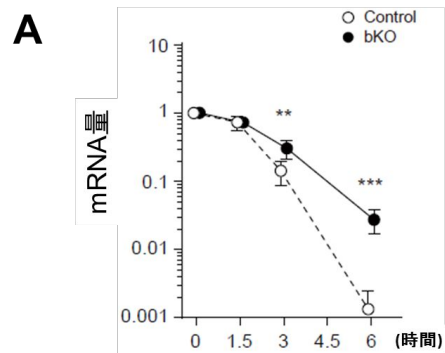
bKO マウスの脾臓および骨髄の B 細胞を解析したところ、脾臓には成熟 B 細胞がほとんど認められず、骨髄においてプロ B 細胞からプレ B 細胞ステージにかけて著しい分化異常をきたし、未熟 B 細胞ステージ以降の B 細胞がほとんど存在しないことが分かった(図 1)。このことから、CNOT3 はプロ B からプレ B における分化ステップにおいて必須の役割を担っていることが示された。



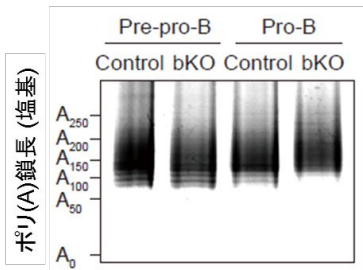
(図 1) CNOT3 欠損に伴う B 細胞分化異常
CNOT3 bKO マウスは骨髄プロ B ~ プレ B 細胞にかけて著しい分化異常をきたし、未熟 B 細胞以降の B 細胞はほとんど存在しない。

(2) CNOT3 欠損プロ B 細胞における p53 経路の活性化

CNOT3 bKO マウスおよびコントロールマウスのプロ B 細胞のトランスクリプトームを RNA-seq を用いて網羅的に解析した。CNOT3 欠損に伴う発現変動遺伝子群のパスウェイ解析を行ったところ、p53 経路の活性化が示唆された。実際、bKO プロ B 細胞において、p53 や Puma, Bax, p21 といった p53 の標的遺伝子の発現上昇が認められ、アポトーシスが亢進していた。そこで、次に p53 mRNA が CCR4-NOT 複合体によるポリ(A)分解の標的になっているかを検討した。p53 mRNA は bKO プロ B 細胞で半減期が上昇して安定化しており、ポリ(A)鎖も伸長していることが明らかになった(図 2)。また、生化学的解析より、p53 mRNA はプロ B 細胞において CCR4-NOT 複合体と結合することが明らかになった。これらのことから、p53 mRNA がプロ B 細胞における CCR4-NOT 複合体によるポリ(A)分解標的遺伝子であることが示唆された。



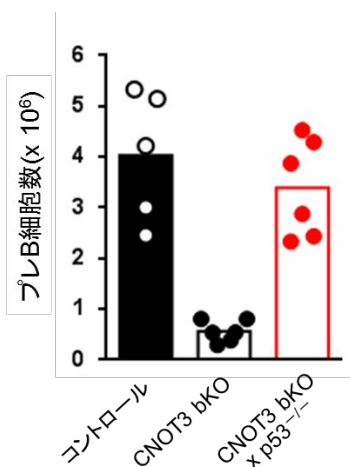
B



(図2) p53 mRNA は CCR4-NOT 複合体によるポリ(A)分解標的遺伝子である
 (A) プロ B 細胞を転写阻害剤 Actinomycin D で処理し、p53 mRNA の半減期を測定したところ、bKO プロ B 細胞で p53 mRNA は安定化していることが分かった。
 (B) p53 mRNA のポリ(A)鎖長を LM-PAT アッセイで測定したところ、bKO プロ B 細胞において p53 はポリ(A)鎖が伸長していることが分かった。

(3) p53 mRNA の転写後制御は B 細胞初期分化に重要である

プロ B 細胞における CCR4-NOT 複合体による p53 mRNA のポリ(A)分解の生理的意義を検討するため、CNOT3 と p53 の二重欠損マウス (*Cnot3^{flx/flx} Mb1^{cre/+} × p53^{-/-}*) を作製した。重要なことに、このマウスでは bKO マウスで見られたアポトーシスの亢進が解除され、プロ B からプレ B 細胞への分化が部分的に回復した(図3)。すなわち、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になった。



(図3) CNOT3 と p53 二重欠損マウスの B 細胞初期分化
 bKO マウスにおけるプレ B 細胞への分化異常は p53 遺伝子を欠損させることで部分的に回復する。

本研究では、哺乳類動物個体内における細胞分化という高次生理機能と結びつける形で mRNA 分解の時空間制御機構の洞察を行い、マウス B 細胞をモデルとして、ポリ(A)分解による転写後制御が細胞分化において極めて重要な役割を担っていることを明らかにした。また、細胞の生死を制御する重要な因子であるがん抑制遺伝子 p53 は、リン酸化、ユビキチン化をはじめとする様々な翻訳後修飾を受け、タンパク質レベルで極めて多様かつ緻密に制御されていることは広く知られている一方、mRNA レベルでの転写後制御については十分な知見が得られていない。本研究は、生体内における p53 の新規発現制御相を提出するという点においても重要な知見をもたらすものと考えられる。

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)

[学会発表](計7件)

1. Takeshi Inoue, Tadashi Yamamoto, Tomohiro Kurosaki. Regulation of early B cell development by the CCR4-NOT mRNA deadenylase complex. Keystone Symposia, 2015年3月24日、Banff、Canada

2. 井上 毅、B 細胞における CNOT3 の機能解析、第3回 CCR4-NOT 研究会、2015年3月13日、東北大学

3. 井上 毅、B 細胞分化・活性化における CNOT3 の機能解析、第2回 CCR4-NOT 研究会、2014年6月27日、沖縄科学技術大学院大学

4. Takeshi Inoue, Tadashi Yamamoto, Tomohiro Kurosaki. Essential role of CNOT3 subunit of the CCR4-NOT deadenylase complex during B cell development. 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月12日、幕張メッセ

5. 井上 毅、森田 斉弘、足達 俊吾、夏目 徹、深尾 太郎、小原 収、山本 雅、黒崎 知博、B 細胞分化における CCR4-NOT 脱アデニル化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年會、2013年12月3日、神戸 ポートアイランド

6. 井上毅、黒崎知博、B 細胞分化における CNOT3 の機能解析、第5回シグナルネットワーク研究会、2013年8月30日、北海道大学

7. 井上毅、B 細胞初期分化における Cnot3 の機能解析、第1回 CCR4-NOT 研究会、2013年8月9日、秋田 ホテルグランド天空

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