

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293050

研究課題名(和文)心機能調節におけるCCR4-NOTデアデニレースの作用機構と創薬への応用

研究課題名(英文) Mechanistic insight into CCR4-NOT deadenylase-mediated heart function control and its potential application for therapeutics

研究代表者

久場 敬司 (Kuba, Keiji)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10451915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：心機能調節におけるCCR4-NOTデアデニレースを介したRNA分解ならびに核酸制御に関して研究を行った。CCR4-NOTのデアデニレース活性(RNA分解活性)によりアデニン核酸レベルが変化することを明らかにした。CCR4-NOTによるbulk mRNAのpoly(A)鎖短縮、核酸レベルの変動を感知するセンサー分子としてオートファジー分子を同定した。さらに、CCR4-NOTによるアデニン核酸レベルの調節がエネルギー感知シグナルを制御する分子機構が存在することを解明した。最後に、疾患治療へのRNA分解制御の応用を目指して、CCR4-NOTデアデニレースの阻害剤の化合物スクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the mechanisms how CCR4-NOT deadenylase regulates mRNA decay and nucleotide metabolism in controlling heart functions. mRNA decay by CCR4-NOT complex was revealed to alter adenine nucleotide levels in the heart. In addition, bulk mRNA poly(A) shortening and alteration of nucleotide levels were sensed by an autophagy molecule, which is crucial for cardiomyocyte survival. Furthermore, CCR4-NOT-mediated adenine nucleotide regulation was also shown to affect energy-sensing signaling pathway. Both pathways are likely important for CCR4-NOT-mediated heart function control. Finally, we conducted chemical compound screening for CCR4-NOT deadenylase inhibitors.

研究分野：循環薬理学

キーワード：CCR4-NOT heart failure deadenylase CNOT3

1. 研究開始当初の背景

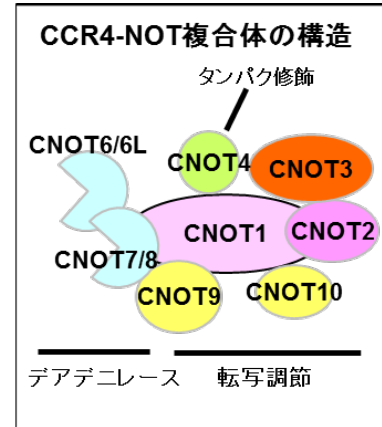
高血圧、動脈硬化、虚血性心疾患などによる心不全病態の発現において、転写、エピゲノムによる遺伝子発現の調節について多くの研究成果が蓄積されている一方で、mRNA加工、核外移行、翻訳、分解など転写後のmRNA制御が、心不全病態で果たす役割、意義には不明な点が多い。CCR4-NOT複合体は、酵母で見出された10個のNOTファミリー分子(CNOT1~10)からなる分子量1MDaの巨大な蛋白質複合体であり、酵母においてはグローバルな転写調節因子として考えられていた。細胞レベルの解析から、CCR4-NOT複合体は、その構成因子の中に転写調節因子(CNOT1, CNOT2, CNOT3)とmRNAデアデニレース(mRNA poly-AからのmRNA分解)(CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8)を持つ。CCR4-NOT複合体は、その構成因子と会合する因子との相互作用を介して、核内のmRNA転写、mRNAの核外移行、mRNAから蛋白への翻訳、非コードRNAによる遺伝子サイレンシング、mRNA分解・安定性制御など様々なRNA代謝過程をコントロールし、mRNA代謝の多様な階層で複雑な遺伝子発現調節に関与する。

ショウジョウバエのRNAiスクリーニングによりCCR4-NOTが新たな心機能の調節因子として見出され、マウスの心臓においてもCNOT3が心臓の収縮力や心電図のQT時間制御に重要な役割を担うことが明らかにされていた(Cell 2010)。CNOT3ヘテロ欠損マウスの心機能低下が、ヒストン修飾の状態と相関し、HDAC阻害剤でレスキューされたことから、エピジェネティックな制御にCNOT3が関与していることが考えられた。また、ヒトGWASにおいて、申請者は、ヒトCNOT1, CNOT3の遺伝子多型が心電図QT時間の長さを規定することを明らかにした(Nat Genet. 2009; Cell 2010)。一方で、それまでの研究から心臓特異的CNOT3欠損マウスは、心筋細胞の異常により拡張型心筋症の病態を示し心不全で死亡することがわかり、CCR4-NOTのデアデニレース活性が心筋細胞の機能維持に重要であることが示唆されていた。さらに本研究ではCCR4-NOTのデアデニレース活性により産生されるアデノシンリン酸(AMP)が、心筋細胞の代謝制御系に何らかの影響をおよぼすという予備データを取得していた。したがって、CCR4-NOTデアデニレースの作用機構は、遺伝子の発現調節を担うだけでなく、核酸代謝やエネルギー代謝といった多様な細胞機能とリンクしていることが示唆されたことから本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

心機能調節におけるCCR4-NOTデアデニレースの制御機構、作用機構をシグナル伝達、タンパク、mRNAのレベルで解明することを研究目的とし、さらにデアデニレース阻害剤

の探索を試みることによりmRNA代謝制御の創薬への応用を目指した。



3. 研究の方法

1) CCR4-NOTの各構成因子によるmRNA制御機構の解析: poly(A)鎖長ごとの分画あるいは直接的なpoly(A)シーケンスの解析のため、total RNAの3'末端をdATP[α -32P]でラベルし、非poly(A)配列を分解した後に電気泳動で展開し、bulk poly(A)の長さを測定した。

2) CCR4-NOTによる核酸代謝制御機構の解析: CE-TOF/MSによる細胞内代謝物のメタボローム解析により、CNOT3遺伝子欠損マウスあるいは他のCCR4-NOT構成因子の遺伝子欠損マウスの心臓組織について、細胞内の核酸を含む多様な代謝物のレベルを網羅的に測定した。Cnot3欠損細胞、Cnot3欠損マウスの心臓組織などについて、マイクロアレイならびにRNA-seqによる遺伝子発現解析を行い、発現変動遺伝子のリストから*in silico*遺伝子ネットワーク解析を行った。さらに、ネットワーク解析から同定された核酸代謝のセンサー分子のsiRNAノックダウンなどにより、CCR4-NOT構成因子の遺伝子欠損細胞に対するレスキュー効果の検討、生化学的な分子間相互作用、シグナル伝達機構などの分子レベルの解析を行った。

3) 新規CCR4-NOT関連因子の遺伝子欠損マウスの作製: 心不全や心臓のストレス負荷で発現する機能未知のmRNA制御因子についてCRISPR/Cas9ゲノム編集により遺伝子欠損マウスを作製した。

4) RNA代謝因子の阻害剤・活性化剤の探索: 近年明らかになったCNOT6Lの結晶構造をもとに、*in silico*でCNOT6Lの活性中心やCNOT1結合部位などのポケットに対する約50万個の化合物のライブラリーの結合をシミュレーションすることにより、阻害剤・活性化剤の候補物質をスクリーニングした。得られた候補化合物について、実験的に組み換えCNOT6L蛋白を用いた*in vitro*アッセイ系でCNOT6Lのデアデニレース活性に対する効果を検証した。

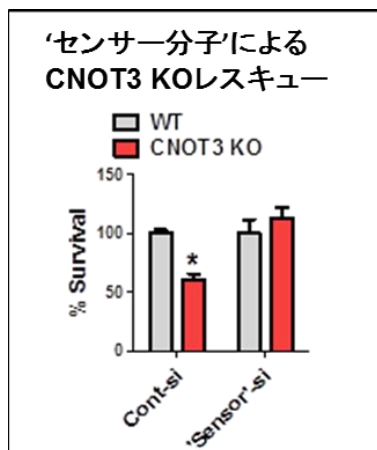
4. 研究成果

1) CCR4-NOT 構成因子の遺伝子欠損マウスにおける核酸代謝動態の解析:

・bulk poly(A)の長さの測定: poly(A)鎖長ごとの分画あるいは直接的な poly(A)シーケンスの解析のため、total RNA の 3'末端を dATP, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ でラベルし、非 poly(A)配列を分解した後に電気泳動で展開したところ、CCR4-NOT 欠損により bulk poly(A)が伸長することを確認でき、poly(A)鎖長ごとの RNA 分画の準備を整えることができた。

・核酸代謝センサー分子の機能解析: CNOT3 遺伝子欠損マウスにおける核酸代謝の変化を感知するセンサー分子について、ネットワーク解析からオートファジー分子が候補であることが分かった。この分子に対する siRNA ノックダウンは CNOT3 欠損による細胞死を部分的に抑制することが分かった。

・CCR4-NOT によるオートファジー分子制御機構の解析: 心臓特異的な Cnot3 欠損マウスの心不全死の原因のひとつとしてオートファジー分子によるオートファジー非依存的な細胞死が重要であり、その細胞死のメカニズムとしてネクローシスとアポトーシスの両方がおきていることが分かった。オートファジー分子がこれらの細胞死に寄与する分子の転写制御にかかわることが ChIP 解析から明らかになった。さらに、CCR4-NOT はオートファジー分子 mRNA の安定性制御、翻訳制御を介して遺伝子発現を調節することが分かった。



2) CCR4-NOT の各構成因子による mRNA 制御機構の解析:

・RNA 免疫沈降シーケンスの検討: CNOT3 抗体を用いた RNA 免疫沈降を行い、CNOT3 欠損マウスの心臓組織の発現解析との相関を調べた。その結果、CNOT3 欠損により mRNA が安定化し発現レベルが上昇する遺伝子と CNOT3 抗体で沈降される遺伝子に明らかな相関は見られなかった。デアデニレースによる poly(A)の短縮が mRNA 不安定化、分解と必ずしも同義ではないことが考えられた。また、CCR4-NOT と RNA の直接的な結合を検討するために、共同研究ベースで PAR-CLIP の予備検討を開始した。

・CCR4-NOT 複合体による RNA 制御機構の

解析: PAR-CLIP の手法により、CNOT1 が直接 RNA を認識し結合する可能性を検討したが、明らかに CNOT1 と直接結合する RNA は認められなかったことから、CNOT1 と会合する RNA 結合蛋白からのアプローチが重要であると結論づけられた。

・内因性 Cnot1 蛋白と会合する RNA 認識分子の探索: CCR4-NOT 複合体による RNA 制御機構を解明するため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集による Cnot1 の Flag タグ付加を行い、内因性の Cnot1 蛋白のプルダウン、質量分析による結合蛋白の解析を行った結果、RNA 認識蛋白群を同定することができた。これらの RNA 認識蛋白について PAR-CLIP の予備検討を行った。

・デアデニレース欠損マウスの心不全病態モデルでの解析: CCR4-NOT の deadenylase サブユニット 4 個全ての遺伝子欠損マウスについて、心不全モデルで機能解析を行った結果、いずれの deadenylase 欠損マウスにおいても心機能低下と心肥大をきたした。つまり、deadenylase サブユニットがそれぞれに特異的な標的遺伝子、RNA 結合タンパクを介して poly(A)鎖長、遺伝子発現を制御するというよりも、deadenylase 欠損による量的な酵素活性の低下により心臓の表現型がもたらされたことが考えられた。さらに RNAseq による遺伝子発現解析を行ったところ、サブユニット間の標的 RNA や機能の類似性などが見出された。

3) 新規 CCR4-NOT 関連因子の遺伝子欠損マウスの作製:

CCR4-NOT 複合体内のデアデニレース酵素 (CNOT6/6L/7/8) 以外にも、生理機能が不明なデアデニレース遺伝子について、CRISPR/Cas9 ゲノム編集により 2 系統の遺伝子変異 ES 細胞を作製し、個体化を進めた。また、CCR4-NOT 関連の蛋白修飾因子についても conditional 遺伝子改変マウスの作製を進めた。また、CCR4-NOT 関連の蛋白修飾因子について機能欠失型のノックインマウスを作製した。

4) CCR4-NOT デアデニレース阻害剤の候補物質のスクリーニング: *in silico* でのデアデニレース因子の活性中心に結合する化合物のスクリーニングを行い、得られた候補物質について *in vitro* でのデアデニレース蛋白を用いたアッセイでのスクリーニングを行ったところ候補阻害物質を得ることができた。しかしながら、活性中心への候補阻害物質の特異的結合を確認することができなかった。

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 10 件)

1. Rodríguez-Gil A, Ritter O, Saul VV, Wilhelm J, Yang CY, Grosschedl R, Imai Y, Kuba K, Kracht M, *Schmitz ML. The CCR4-NOT complex contributes to repression of Major Histocompatibility Complex class II transcription. *Scientific Reports*, in press. (査読有り)
 2. Sato T, Sato C, Kadowaki A, Watanabe H, Ho L, Ishida J, Yamaguchi T, Kimura A, Fukamizu A, Penninger JM, Reversade B, Ito H, *Kuba K. (*責任著者) ELABELA – APJ axis protects from pressure overload heart failure and Angiotensin II-induced cardiac damage. *Cardiovascular Research*, in press. (査読有り)
 3. Yang CY, Ramamoorthy S, Boller S, Rosenbaum M, Rodríguez Gil A, Mittler G, Imai Y, Kuba K, Grosschedl R. Interaction of CCR4-NOT with EBF1 regulates gene-specific transcription and mRNA stability in B lymphopoiesis. *Genes & Development*. 30: 2310-2324, 2016. (査読有り)
 4. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, Kuba K, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T. *JCI Insight*. 2: e89462, 2017. (査読有り)
 5. Koizumi Y, Nagai K, Hasumi K, Kuba K, Sugiyama T. Structure-activity relationship of cyclic pentapeptide malformins as fibrinolysis enhancers. *Bioorg Med Chem Lett*. 26:5267-5271, 2016. (査読有り)
 6. Tanaka KI, Tamura F, Sugizaki T, Kawahara M, Kuba K, Imai Y, Mizushima T. Evaluation of Lecithinized Superoxide Dismutase for Prevention of Acute Respiratory Distress Syndrome in Animal Models. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2016 Sep 26. [Epub ahead of print] (査読有り)
 7. Sun Y, Guo F, Zou Z, Li C, Hong X, Zhao Y, Wang C, Wang H, Liu H, Yang P, Han Z, Liu K, Kuba K, Song B, Gao J, Mo Z, Li D, Li B, Li Q, Zhong N, Wang C, Penninger JM, Jiang C. Cationic nanoparticles directly bind angiotensin-converting enzyme 2 and induce acute lung injury in mice. *Part Fibre Toxicol*. 12, 4, 2015. (査読有り)
 8. Sato T, Watanabe H, Kimura A, Ito H, Imai Y, Kuba K. Apelin-APJ axis inhibits Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis via up-regulation of ACE2. The 79th Annual Scientific Meeting of JCS. Supplement to *Circulation Journal* 79: 210, 2015. (査読有り)
 9. Demetz E, Schroll A, Auer K, Heim C, Patsch JR, Eller P, Theurl M, Theurl I, Theurl M, Seifert M, Lener D, Stanzl U, Haschka D, Asshoff M, Dichtl S, Nairz M, Huber E, Stadlinger M, Moschen AR, Li X, Pallweber P, Scharnagl H, Stojakovic T, März W, Kleber ME, Garlaschelli K, Uboldi P, Catapano AL, Stellaard F, Rudling M, Kuba K, Imai Y, Arita M, Schuetz JD, Pramstaller PP, Tietge UJ, Trauner M, Norata GD, Claudel T, Hicks AA, Weiss G, Tancevski I. The arachidonic acid metabolome serves as a conserved regulator of cholesterol metabolism. *Cell Metabolism*. 20: 787-798, 2014. (査読有り)
 10. Sato T, Kuba K, Watanabe H, Kimura A, Ito H, Imai Y. Apelin positively regulates Angiotensin Converting Enzyme 2(ACE2) in failing hearts. The 78th Annual Scientific Meeting of JCS, Supplement to *Circulation Journal* 78: 470, 2014. (査読有り)
- 〔学会発表〕(計 17 件)
- Keiji Kuba, CCR4-NOT complex controls adenine nucleotide metabolism and energy sensing in cardiac homeostasis. The 89th JBS meeting symposium, 26th September 2016, Sendai, Japan.
- Teruki Sato, Tomokazu Yamaguchi, Hiroyuki Watanabe, Ayumi Kadowaki, Chitose Sato, Hiroshi Ito, Ymiko Imai, Keiji Kuba (2016) Dissecting the functional role of A Novel APJ ligand, ELABELA, in heart failure. 第 89 回 日本薬理学会年会、2016 年 3 月、横浜 (英語、口頭発表)
- Tomokazu Yamaguchi, Takashi Suzuki, Teruki Sato, Miyuki Natsui, Ayumi Kadowaki, Chitose Sato, Yukio Koizumi, Akinori Takahashi, Tadashi Yamamoto, Yumiko Imai, Keiji Kuba (2016) Analysis for the role of CCR4-NOT complex in regulation of adenine nucleotide metabolism in the hearts. 第 89 回 日本薬理学会年会、2016 年 3 月、横浜 (英語、口頭発表)
- 小泉幸央、山口智和、門脇歩美、夏井美幸、

佐藤チトセ、今井由美子、久場敬司： Cnot3 による ES 細胞の細胞周期制御機構の解析、第 89 回 日本生化学会大会、2016 年 9 月、仙台（ポスター発表）

山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、夏井美幸、門脇歩美、佐藤チトセ、小泉幸央、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司：CCR4-NOT 複合体によるアデニン核酸代謝制御の分子機構の解析、第 89 回 日本生化学会大会、2016 年 9 月、仙台（ポスター発表）

佐藤輝紀、山口智和、渡邊博之、門脇歩美、佐藤チトセ、伊藤宏、今井由美子、久場敬司：心不全病態における新規 APJ リガンド ELABELA の機能的意義の解明、第 26 回 日本循環薬理学会、2016 年 12 月、松本（口頭発表）

山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、夏井美幸、門脇歩美、佐藤チトセ、小泉幸央、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司：心臓の mRNA poly(A)分解とエネルギー感知シグナルの相互作用機構の解明、第 26 回 日本循環薬理学会、2016 年 12 月、松本（口頭発表）

Kuba, K. Signaling network to maintain cardiac homeostasis in failing hearts. The 4th Hsien Wu and Ray Wu Symposia “Proteins, Genes and Diseases”, August 2015, Beijing, China.（招待講演）

山口智和、門脇歩美、小泉幸央、夏井美幸、佐藤チトセ、今井由美子、久場敬司：Dissecting the role of CCR4-NOT associated ubiquitin converting enzyme in controlling heart functions. 第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 3 月、名古屋（ポスター発表）

小泉幸央、山口智和、久場敬司：A crucial role of CNOT3 in stem cell proliferation and early embryonic development. 第 88 回 日本薬理学会年会、2015 年 3 月、名古屋（口頭発表）

Kuba, K. Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) links Apelin and angiotensin systems in controlling heart function. 第 120 回 日本解剖学会・第 92 回 日本生理学会合同大会 シンポジウム アンジオテンシンによる循環構造・機能調節研究の最前線、2015 年 3 月、神戸（口頭発表）

久場敬司：mRNA 分解制御を介した心臓の恒常性維持、第 1 回 J-ISCP 学術集会（国際心血管薬物療法学会日本部会）医学・薬学ジョイントシンポジウム 心不全の分子病態と薬物治療、2015 年 6 月、京都（口頭発表）

山口智和、鈴木 享、佐藤輝紀、夏井美幸、門脇歩美、佐藤チトセ、小泉幸央、高橋明格、山本 雅、今井由美子、久場敬司（2015）CCR4-NOT 複合体によるアデニン核酸制御機構の解析、第 17 回日本 RNA 学会、2015 年 7 月、札幌（口頭発表）

久場敬司：RNA 分解制御による心臓エネルギー恒常性維持の分子機構、BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会合同大会）、2015 年 12 月、神戸（口頭発表）

久場敬司：酵母からヒトまで保存された CCR4-NOT 複合体による心機能制御メカニズム、第 24 回 日本循環薬理学会 シンポジウム、2014 年 12 月、山形（口頭発表）

久場敬司：CCR4-NOT deadenylase complex links mRNA metabolism to energy sensing in cardiac homeostasis、第 31 回 国際心臓研究学会（ISHR）日本部会、2014 年 11 月、名古屋（口頭発表）

久場敬司：Dissecting the mechanisms for regulation of cardiac energy metabolism by CCR4-NOT complex、第 16 回 日本 RNA 学会年会、2014 年 7 月、名古屋（口頭発表）

〔図書〕(計 1 件)

久場敬司 ACE2 の多彩な生理機能 . Angiotensin Research 12, 12-17, 2015.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久場敬司 (Keiji Kuba)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10451915