

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15038

研究課題名(和文) 胎児発育不全の予防を目指したユビキチン転移酵素CNOT4の生理機能の解明研究

研究課題名(英文) Dissecting the physiological roles of CNOT4 ubiquitin ligase for prevention of fetal growth restriction.

研究代表者

山口 智和 (Yamaguchi, Tomokazu)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30749940

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)：ユビキチン転移酵素CNOT4の哺乳類組織における生理的役割を解明するため研究を行った。CNOT4変異マウスは胎児期の発育不全と出生後の高い致死率を示すが、集合キメラにより野生型胎盤で発育したマウスも発育不全であることから、発育不全は胎盤形成とは独立した要因であることがわかった。詳細な解析を行うため、CNOT4 floxedマウスを作成し、単離したMEFにCNOT4の欠損を誘導したところ、有意な細胞増殖速度の低下と細胞死の増加を認めた。また、CNOT4の発現を抑制したHEK293TのRNA-seq解析により、CNOT4が胚の器官形成に寄与するmRNA群の発現を正に制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ユビキチン転移酵素であるCNOT4の哺乳類組織における役割を報告した例はいまだない。本研究では、変異型CNOT4を発現するマウスは胎児期の発育不全と出生後の高い致死率を示すことから、胎児の発育にCNOT4が必須の役割を果たすことがわかり、培養細胞においてはCNOT4が発現しない条件下では発生に必要な種々の遺伝子の発現が有意に低下してしまうことが明らかとなった。以上の発見は、胚発生期におけるユビキチン化修飾と遺伝子発現制御との連携に焦点を当てた新たなパラダイムの構築に繋がり、将来的には胎児発育不全やそれに付随する種々の疾病の解明と新たな治療技法の確立のための重要な基礎情報になると期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the molecular functions of CNOT4 ubiquitin ligase to dissect its physiological roles in mammalian tissues. Although CNOT4 RING mutant mice show prenatal growth retardation and high postnatal lethality, mutant embryo developed with wild type placenta made by aggregation chimaera also showed developmental deficiency, indicating that occurrence of those phenotypes were independent of placental formation. For further analysis, we generated CNOT4 floxed mice and depleted CNOT4 in MEFs. As a result, significant decrease of cell proliferation rate and increased cell death CNOT4-depleted MEFs were observed. In addition, RNA-seq analysis of CNOT4 knockdown HEK293T cells suggested that CNOT4 positively regulate mRNA expression that contribute to embryonic organ development.

研究分野：分子生物学

キーワード：CNOT4 胚発生 ユビキチン転移酵素 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CCR4-NOT 複合体関連タンパク質である CNOT4 はユビキチン転移酵素としてプロテアソーム分解系を介して細胞内タンパク質の品質制御に寄与することが酵母を用いた先行研究で報告されている。一方で、哺乳類組織における生理的意義、役割は未だ不明であった。申請者による予備的な解析により、1) CNOT4 遺伝子欠損マウス (*Cnot4*^{-/-}) は受精後およそ 10.5 日で胎生致死となること、2) ユビキチン転移活性に必須である RING ドメインの変異マウス (*Cnot4*^{L16A/L16A}) 胎児は野生型に比べ胎内での発育が未熟であり、出生後高い致死率を示すこと、3) CNOT4 をノックダウンした HEK293T 細胞は、細胞増殖能の顕著な低下を引き起こすことを明らかにしていた。以上の結果から、CNOT4 が個体発生時における組織・細胞の機能において何らかの重要な生理的役割を担っていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、個体発生時における CNOT4 の生理的役割を解明することを目的とし、1) 胚発生期の組織における CNOT4 の役割、2) 培養細胞における CNOT4 の生理的役割、3) CNOT4 が制御する遺伝子発現の分子機序、を明らかにすることを主軸に研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) *Cnot4*^{L16A/L16A} マウスは胎内での発育遅滞を認めしたが、これが胎盤の形成障害に起因するものかを検討するため、野生型の正常胚から作製したテトラプロイド胚 (4 倍体胚) と *Cnot4*^{L16A/L16A} 由来のディプロイド胚 (2 倍体胚) との凝集胚を作製し (アグリゲーション法)、仮親の子宮に移植し、個体発生を観察した。また、組織特異的な CNOT4 遺伝子欠損の表現型を解析するため、CRISPR/Cas9 ゲノム編集により CNOT4 floxed マウスを作製した。

(2) CNOT4 が制御するの細胞機能を明らかにするために、*Cnot4*^{flax/flax}; CAG-Cre/*Esr1*^{Tg/+} マウス同士の交配後、受精後 13.5 日の胎児から MEF を単離した。タモキシフェンの添加により CNOT4 の欠損を誘導した後に、細胞の増殖速度をカウントによって推定するとともに、細胞死の割合について FACS を用いて検出を行った。

(3) siRNA の細胞導入により CNOT4 のノックダウンを行った HEK293T 細胞について RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現の変動を解析した。発現低下が顕著なものについては qPCR 方により確認を行うとともに、ActinomycinD 処理により mRNA 安定性を解析した。また、HEK293T 細胞に過剰発現させた CNOT4 の RNA 免疫沈降解析により、これら遺伝子を CNOT4 が直接的に制御しているのかの検討を行った。

4. 研究成果

(1) CNOT4 変異マウスの胚発生: 野生型の 4 倍体胚と *Cnot4*^{L16A/L16A} の 2 倍体胚との凝集胚を作製し、仮親の子宮に移植し、個体発生させた。この場合、胎盤は野生型 4 倍体胚に由来するものであるにもかかわらず、*Cnot4*^{L16A/L16A} マウスの個体発生率は依然として低く (部分的な胎生致死)、通常発生と同様の発生遅延を認めた (図 1)。この結果から、CNOT4 RING 変異マウスの成長抑制は胎盤形成とは独立した要因であることがわかった。

(2) CNOT4 floxed マウスの作製: CRISPR/Cas9 ゲノム編集により CNOT4 floxed マウスを作製した。開始コドンを含む Exon2 の上流、及び Exon3 下流のイントロン領域を標的とする gRNA を設計し、loxP 配列を含む ssODN、Cas9 Nuclease と共にマウス受精卵に顕微注入後、個体化を行った。得られた *Cnot4*^{flax/flax} マウスを *Cre*^{Tg/+} マウスに交配後、産子マウス組織における CNOT4 の消失をウェスタンブロットにて検出した (図 2)。

(3) CNOT4 欠損 MEF の表現型解析: 受精後 *Cnot4*^{flax/flax}; CAG-Cre/*Esr1*^{Tg/+} 胎児から MEF を単離した。タモキシフェン添加により CNOT4 の欠損を誘導したところ、添加後 2 日で細胞増殖の低下を認めた (図 3)。さらに、FACS 解析の結果、CNOT4 の欠損により細胞死 (PI 染色) 陽性細胞の

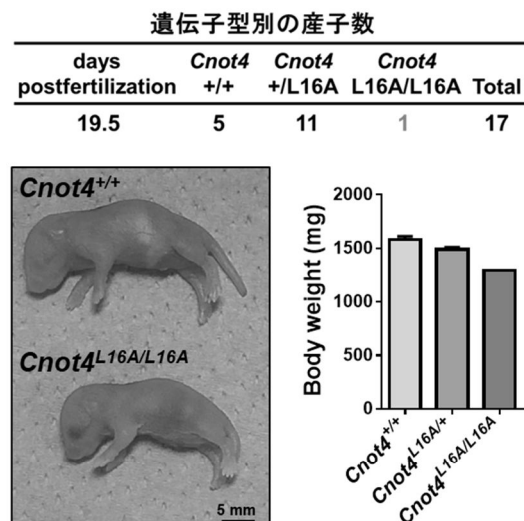


図1: アグリゲーション法により生まれた *Cnot4* RING 変異マウスの表現型

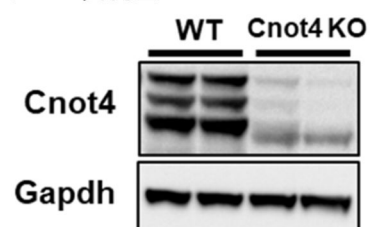


図2: 組織特異的 CNOT4 欠損マウスのウェスタンブロット

有意な増加を認めた。この結果から、CNOT4 が細胞の増殖や細胞死抑制に必須の役割を果たしていることがわかった(図 3)。

(4) CNOT4 ノックダウンによる遺伝子発現変化：siRNA により CNOT4 のノックダウンを行った HEK293T 細胞について RNA-seq 解析を行った。有意な発現変動を示した 600 遺伝子のうち発現減少遺伝子が 450 個を占め、GO 解析の結果、その多くが embryonic organ development を含む複数の発生関連の遺伝子であることがわかった(図 4)。このことから、CNOT4 は胚発生に寄与する mRNA 発現を正に制御することで、正常な胚の器官形成に寄与している可能性が示唆された。

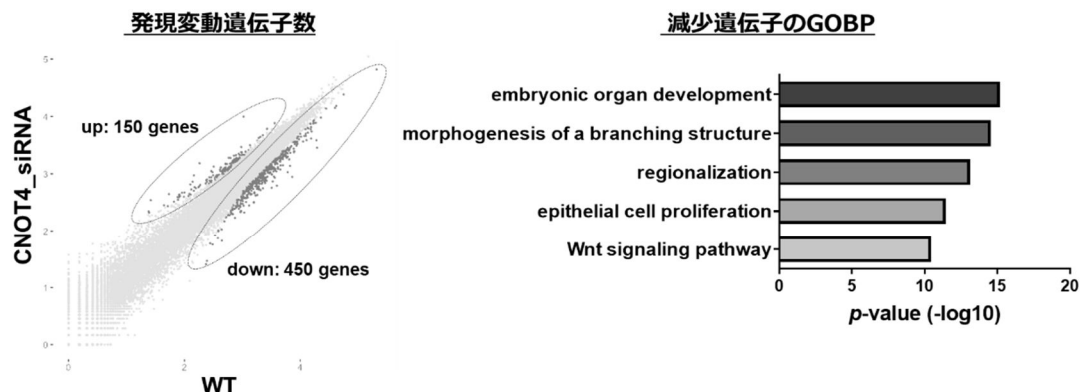


図4: CNOT4をノックダウンしたHEK293T細胞のRNA-seq解析

(5) CNOT4 による mRNA 制御の解析：HEK293T 細胞における CNOT4 遺伝子の発現抑制は胚発生関連遺伝子の発現を減少させることが、RNAseq 解析により明らかとなった。CNOT4 タンパク質を過剰発現させた HEK293T 細胞にて、CNOT4 に結合する mRNA を RNA 免疫沈降(RIP)により解析した結果、その中でも細胞増殖や細胞周期の制御に重要な geneX, geneY mRNA が CNOT4 に強固に結合していることがわかった。さらに、CNOT4 の RNA 認識ドメイン欠損体ではこれらの mRNA への結合が消失し、siRNA を用いた CNOT4 の発現抑制は geneX mRNA の発現量と安定性を有意に低下させたことから、CNOT4 は geneX mRNA に結合し安定的に発現を維持することで細胞増殖や胚の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

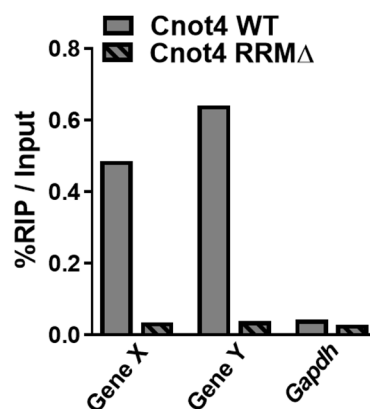


図5: RIP-qPCRによるCNOT4結合mRNAの解析

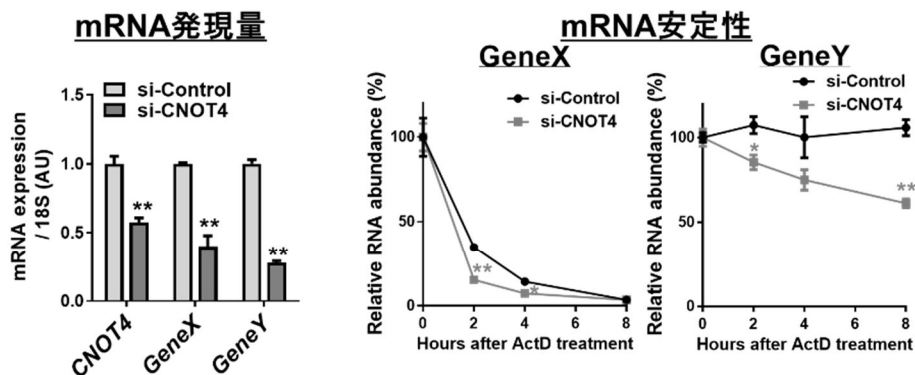


図6: CNOT4をノックダウンしたHEK293T細胞の mRNA発現およびmRNA安定性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 T. Minato, S. Nirasawa, T. Sato, T. Yamaguchi, M. Hoshizaki, T. Inagaki, K. Nakahara, T. Yoshihashi, R. Ozawa, S. Yokota, M. Natsui, S. Koyota, T. Yoshiya, K. Yoshizawa-Kumagaye, S. Motoyama, T. Gotoh, Y. Nakaoka, J. M. Penninger, H. Watanabe, Y. Imai, S. Takahashi, K. Kuba	4. 巻 11
2. 論文標題 B38-CAP is a bacteria-derived ACE2-like enzyme that suppresses hypertension and cardiac dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14867-z	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 Takahashi Akinori, Takaoka Shohei, Kobori Shungo, Yamaguchi Tomokazu, Ferwati Sara, Kuba Keiji, Yamamoto Tadashi, Suzuki Toru	4. 巻 20
2. 論文標題 The CCR4-NOT Deadenylation Complex Maintains Adipocyte Identity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5274 ~ 5274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20215274	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 Koizumi Yukio, Fukushima Jun, Kobayashi Yayoi, Kadowaki Ayumi, Natsui Miyuki, Yamaguchi Tomokazu, Imai Yumiko, Sugiyama Toshihiro, Kuba Keiji	4. 巻 20
2. 論文標題 Genome Scale CRISPR/Cas9 Screening Reveals Squalene Epoxidase as a Susceptibility Factor for Cytotoxicity of Malformin A1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201800769	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 Kuba Keiji, Sato Teruki, Imai Yumiko, Yamaguchi Tomokazu	4. 巻 111
2. 論文標題 Apelin and Elabela/Toddler; double ligands for APJ/Apelin receptor in heart development, physiology, and pathology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 62~70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.peptides.2018.04.011	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12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山口智和、佐藤輝紀、湊隆文、安健博、星崎みどり、渡邊博之、今井由美子、山本雅、久場敬司
2. 発表標題 圧負荷心不全におけるCNOT6L脱アデニル化因子の抗線維化作用の解明
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口智和、佐藤輝紀、中岡慎治、久場敬司
2. 発表標題 心不全病態モデルマウスにおけるmRNA poly(A)制御、翻訳制御の生理機能の解明
3. 学会等名 2019年度「先進ゲノム支援」拡大班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomokazu Yamaguchi, Teruki Sato, Takafumi Minato, Jianbo An, Midori Hoshizaki, Hiroyuki Watanabe, Yumiko Imai, Tadashi Yamamoto, Keiji Kuba
2. 発表標題 Protective roles of CNOT6L deadenylase in pressure overload-induced cardiac remodeling
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智和、佐藤輝紀、湊隆文、安健博、星崎みどり、渡邊博之、今井由美子、山本雅、久場敬司
2. 発表標題 CCR4-NOT脱アデニル化因子による心臓リモデリング抑制作用の解析
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智和、佐藤輝紀、夏井美幸、星崎みどり、山本雅、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 肥満組織におけるCNOT4ユビキチンリガーゼの生理機能解析
3. 学会等名 第92回生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智和
2. 発表標題 細胞増殖制御におけるユビキチン転移酵素CNOT4の機能解析
3. 学会等名 第7回CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 CCR4-NOT 複合体によるAtg7 依存性細胞死の阻害と心臓の恒常性維持
3. 学会等名 第83回 日本生化学会 東北支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 CNOT4ユビキチンリガーゼによるRNA制御機構の解析
3. 学会等名 第6回CCR4NOT研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 Atg7依存性細胞死を阻害するCCR4-NOT脱アデニル化酵素 複合体の心機能制御機構の解明
3. 学会等名 第20回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 CCR4-NOT脱アデニル化酵素複合体による心機能制御機構の解明
3. 学会等名 第69回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 CCR4-NOT脱アデニル化酵素複合体によるAtg7依存性細胞死の阻害と心機能改善作用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口智和、鈴木享、佐藤輝紀、高橋明格、山本雅、今井由美子、久場敬司
2. 発表標題 細胞恒常性維持におけるCCR4-NOT複合体を介した mRNA制御メカニズムの包括的解析
3. 学会等名 2018年度「先進ゲノム支援」拡大班会
4. 発表年 2018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