

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07394

研究課題名（和文）脳神経系における新規の遺伝子発現制御機構とその破綻による障害・疾患

研究課題名（英文）Novel gene expression regulatory system in the brain and its dysregulation in disorder/disease

研究代表者

松浦 憲（Matsuura, Ken）

沖縄科学技術大学院大学・神経回路ユニット・技術員

研究者番号：10625742

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：CCR4-NOT（CNOT）複合体は転写後遺伝子サイレンシングにおいて主要な役割を果たし、mRNAの分解と翻訳抑制の二つの重要な働きを持つ。しかし、脳神経系におけるCNOT複合体の役割はほとんどわかっていなかった。本研究では、CNOT複合体の構成因子が前脳神経細胞で特異的に欠損したマウス系統を複数用い、遺伝子発現のオミックス（包括的）解析や行動実験を行った。その結果、これらのマウスは多動や学習障害などを示し、更にCNOT複合体が神経細胞におけるタンパク質品質管理にて役割を果たしている事が示唆された。これらの結果は、遺伝子発現制御機構の破綻がもたらす疾患の病因解明に役立つことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、タンパク質翻訳の増大による神経ネットワークの過剰な興奮が自閉症に繋がる事が提唱されており、CNOT3が自閉症リスク遺伝子候補として同定された。更に、CNOT9の新規突然変異を持つ患者は発達・知的障害やてんかんを起こすことが報告されるなど、次々とCNOT変異疾患が明らかになっている。本研究の成果は、これまで分かっていなかったCNOT複合体の脳神経系における役割を、様々なCNOT変異マウスを用いる事により、どのような遺伝子変動があるか、どのような行動異常を呈するかなどを解明しており、脳神経系におけるCNOT複合体の遺伝子発現制御機構の破綻による障害および疾患の理解に寄与する事が期待される。

研究成果の概要（英文）：The CCR4-NOT (CNOT) complex plays a major role in post-transcriptional gene silencing and has two important functions: mRNA degradation and translation inhibition. However, little was known about the role of the CNOT complex in the nervous system. In this study, we conducted omics analyses of gene expression and some behavioral experiments using multiple mouse strains in which the different components of the CNOT complex were deficient in forebrain neurons. These mice exhibited behavioral abnormalities such as hyperactivity and learning disabilities. The omics analyses suggested that the CNOT complex may play a role in protein quality control in neurons. These results are expected to help elucidate the pathogenesis of diseases caused by disruption of gene expression control mechanisms.

研究分野：神経科学

キーワード：CCR4-NOT

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) CNOT 複合体による遺伝子抑制機構

CNOT 複合体の構成タンパク質は進化的に保存されていて、核内での転写制御から細胞質での翻訳制御にいたるまで、遺伝子発現制御において、様々な役割を果たしている事が知られている (*Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 337-344, 2008; *WIREs RNA* 7, 438-454, 2016)。特に、細胞質では転写後遺伝子サイレンシングにおいて主要な役割を果たし、デアデニレース活性による mRNA のポリ A 鎖の分解と、デアデニレース活性非依存的な翻訳抑制の、二つの重要な働きを持つ。デアデニレース活性による mRNA の分解に繋がる CNOT 複合体の役割は比較的是っきりしているが (*Mol Cell* 70, 1081-1088, 2018; *Mol Cell* 70, 1089-1100, 2018) 翻訳抑制に関しては、マイクロ RNA-RISC 複合体依存的、および非依存的なもの両方に参与している事が報告されており、まだ機構的に分からない事も多い (*Mol Cell* 54, 737-750, 2014; *Mol Cell* 54, 751-765, 2014)。

### (2) RNA 顆粒における遺伝子発現制御異常と神経・精神疾患

近年の研究では、酵母やある種の哺乳類細胞では直ちに翻訳されない mRNA はマイクロ RNA や様々な RNA 結合タンパク質とストレス顆粒や P ボディと呼ばれる凝集構造体を形成し、条件が整うまで保存あるいは分解されることが明らかになってきている。CNOT 複合体は少なくとも分解を担う P ボディの構成要素であることが分かっている。一方、神経細胞において、神経ネットワークの連結部位であるシナプスは細胞体直径の数十～百倍以上もの長さを持つ樹状突起上で形成されているため、シナプス周囲へ予め輸送・準備された mRNA や RNA 結合タンパク質などから成る RNA 顆粒が存在する。シナプス活動に応じた速やかな局地的遺伝子発現制御が個々のシナプス強度の変化と維持に必要で、シナプス可塑性の基盤となっているとされる (*Neuron* 51, 685-690, 2006)。さらに、RNA 顆粒における遺伝子発現制御異常は、脆弱性 X 症候群や前頭側頭認知症、筋萎縮性側索硬化症など様々な神経・精神疾患の原因になっていると考えられている (*Trends Neurosci* 33, 173-182, 2010; *Trends Mol Med* 22, 769-783, 2016)。神経細胞の RNA 顆粒は輸送粒子やストレス顆粒様、P ボディ様のものなど複数の種類が報告されているが、その構成因子や機能についてはまだ分かっていないことが多く、重要な研究分野となっている (*RNA Biol* 11, 1019-1030, 2014)。

## 2. 研究の目的

CNOT 複合体の研究は主に酵母で先行し、その後ヒトを始めとした哺乳類細胞株でも同様の研究が進み、基本的な機能やメカニズムの解明が多くの研究によってなされてきた。しかし、多くの研究は細胞培養下の条件において人工的なレポーター遺伝子を使用したものや、過剰発現、不完全な機能阻害の利用など、必ずしも生理的な状況は反映しておらず、生体内でも完全に同様なものは疑問が残る。また、種および細胞の種類はもちろん、個々の遺伝子によっても相互作用因子などが異なることが予想され、より細やかな、更に生理的な状況も反映した実験系が将来的なトランスレーショナル医療を見据える上でも必須である。

我々の研究グループは、早くから CNOT 複合体の哺乳類細胞における役割に着目し、特にその生理的機能についての研究でこの分野をリードしてきた。特筆すべきは、哺乳類細胞における全 10 種類の CNOT 複合体構成タンパク質 (サブユニット) の全てについて、それぞれの全身 KO マウスを作製し、さらには Flox マウスも作製したことにより、自由に望みの組織特異的欠損マウスを作製・利用可能な環境を作り上げたということである。CNOT 複合体の解析を、哺乳類個体レベルで十分に進めているのは世界的に見ても当研究グループだけである。これまで主に CNOT1, 3, 7 を中心に、精子形成、骨形成、脂肪細胞や肝細胞での代謝制御、心臓機能の維持など、多くの重要な働きを明らかにしてきた (*Nat Genet* 36, 528-533, 2004; *EMBO J* 29, 2566-2576, 2010; *EMBO J* 30, 4678-4691, 2011; *PNAS* 111, 2692-2697, 2014; *Cell Rep* 13, 2756-2767, 2015; *Sci Signal* 11, 516, 2018)。しかし、脳神経系研究は手付かずの状況であり、他のサブユニットの生理的機能も不明であった。本研究は、脳神経系における CNOT 複合体の遺伝子発現制御における役割を作用機序やターゲット遺伝子の同定、生理的機能にいたるまで明らかにし、遺伝子発現制御機構の破綻による障害および疾患の理解に寄与する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、複数の全身あるいは前脳神経細胞特異的な CNOT サブユニット KO マウスを用い、RNA-seq 解析やクロスリンク共免疫沈降-LC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析、さらにはパスウェイ解析などバイオインフォマティクス手法を用い、CNOT サブユニットが欠損している時の神経細胞の包括的な遺伝子発現変動および相互作用因子を同定した。また、これら CNOT サブユニット KO マウスを用い、種々の行動実験を行い、CNOT 複合体の神経系における生理的な役割を検証した。

#### 4. 研究成果

我々は、全 10 種類の CNOT サブユニットについて、まず全身欠損マウスを作製した。その結果、CNOT6, 6L, 7 を除く全てで胎生致死となった(6 と 6L, 7 と 8 はそれぞれ paralog で複合体中、相互に排他的である)。そこで我々は、主要サブユニットの CNOT1-3 と翻訳抑制と関係している CNOT9 の前脳神経細胞特異的 (*CamK2a-cre*) KO マウスを作製したが、CNOT1-3KO では生後間もなく死亡した。しかし、CNOT9 KO は成体まで外見上異常なく成長できる事が分かった。この結果は、CNOT1-3 は正常な脳形成に必須で有る一方、CNOT9 は CNOT 複合体の中で特定の機能のみを担うことを示唆した。本研究では、CNOT 複合体の成体での神経系における役割を明らかにするため、デアデニレース活性を持つ CNOT6, 6L のシングルおよびダブル KO マウスと CNOT9 の前脳特異的 KO マウスで解析を進めた。

まず、KO 脳組織をコントロールとした免疫染色解析で CNOT 複合体は神経細胞に特異的な発現を示した。これは、普遍的な機能を持つと考えられている CNOT の分布としては予想外で、従来の概念を変える結果であった。デアデニレース活性を担う 4 つのサブユニット CNOT6, 6L, 7, 8 の内、CNOT7/8 は主に裸のポリ A 鎖を分解し、一方 CNOT6/6L は主に PABP が結合したポリ A 鎖を分解し、PABP を解離させる。PABP は mRNA を安定化して翻訳を促進すると考えられており、実際に発現量の多いある一群の mRNA (リボソームタンパク質や翻訳因子等) 上に特異的に多く結合している (*Genome Biol* 16, 10, 2015)。よって、CNOT6/6L の機能が阻害された場合、発現量の多い一群の遺伝子が安定化・増産される可能性が考えられた。実際、CNOT6/6L ダブル KO および CNOT9KO 前脳では発現量の高い mRNA ほど高い割合で有意に発現が上昇しており、これらはリボソームタンパク質や翻訳因子などを含む。トランスクリプトームおよびプロテオーム解析では、CNOT9KO 前脳で、タンパク質合成経路、小胞体ストレス・UPR (Unfolded Protein Response) 経路、ATP 生成経路、炎症・免疫応答経路の有意な増大が観測された。CNOT6/6L ダブル KO 前脳でも、程度は下がるが似た傾向を示した。以上の結果は、KO 前脳では CNOT 複合体の何らかの遺伝子発現制御不全により、タンパク質の過剰な合成が起こり、神経細胞にストレスが掛かっている事を示唆しており、CNOT 複合体の生理的な機能やターゲットを解析する上で、これまではなかった非常に有用な材料になる事がわかった。

次に、これら遺伝子発現変化が起こるメカニズムに迫るために、CNOT1,2,3,9 特異的抗体でクロスリンク共免疫沈降-LC-MS/MS 解析を行い、脳組織で CNOT 複合体結合因子を同定した。これらは、翻訳因子、RNA 結合タンパク質、シャペロンタンパク質、およびユビキチンプロテアソームシステム(UPS)因子などだった。更に、CNOT9KO 脳組織を用いて、CNOT9 依存的結合因子を同定した。これらの結果は、神経細胞におけるタンパク質品質管理における CNOT 複合体の CNOT9 依存的な関与を示唆した。最後に、CNOT 複合体の神経系における生理的な機能を検討するために、種々の行動実験を行った。その結果 CNOT9 KO では、多動、不安軽減、学習障害などが見られた(図 1)。CNOT6/6L ダブル KO マウスでも一部で同じ表現系が観察された。

今後は、分子機構の更なる解析などにより、CNOT 複合体の神経系における作用機序やその破綻がもたらす障害が明らかにされる事が期待される。本研究で得られた内容については第 42 回日本分子生物学会年会で発表しており、また現在学術論文を投稿準備中である。尚、本研究の omics 解析を進める過程で、使用した *CamK2a-Cre* 発現マウス (*CamiCre*) において、本来発現し

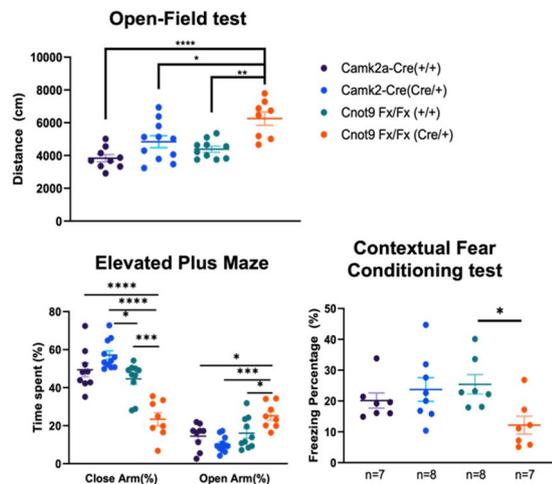


図 1 CNOT9 KO マウスの行動異常

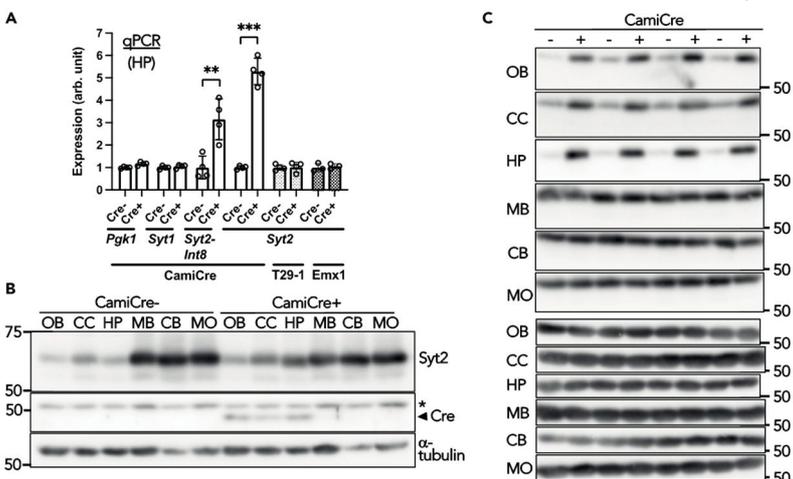


図 2 CamiCre マウス前脳における Syt2 の過剰発現

ていない synaptotagmin 2 を始めとする神経活動因子が過剰発現しており(図 2)更に多動や学習増進が見られるなど重要な欠陥が観察されたため、本研究やこの業界に与える影響の大きさを鑑み、まずこの結果を *iScience* 誌に報告した。本研究では適切なコントロールを取る事によりその影響は極力排除している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuura Ken, Mohamed Haytham M.A., Youssef Mohieldin M.M., Yoshida Yutaka, Yamamoto Tadashi	4. 巻 25
2. 論文標題 Synaptotagmin 2 is ectopically overexpressed in excitatory presynapses of a widely used CaMK -Cre mouse line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104692 ~ 104692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2022.104692	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 Matsuura K, Mohamed H, Yousef M, Yamamoto T	4. 巻 450492
2. 論文標題 Synaptotagmin 2 is ectopically overexpressed in excitatory presynapses of a widely used CaMKII -Cre mouse line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.06.30.45049	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Matsuura K, Mohamed H, Yousef M, Yamamoto T
2. 発表標題 Synaptotagmin 2 is ectopically overexpressed in excitatory presynapses of a widely used CaMK2a-Cre mouse line
3. 学会等名 The Molecular Biology Society of Japan
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuura K, Mohamed H, Yanagiya A, Ashford W, Sako H, Yamamoto T
2. 発表標題 The role of CCR4-NOT dependent post-transcriptional regulation in mammalian nervous system
3. 学会等名 日本分子生物学会, ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ken Matsuura, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 Investigation of the role of CNOT9 in mature brain
3. 学会等名 CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松浦憲、山本雅	4. 発行年 2020年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 2
3. 書名 Medical Science Digest	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------