

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890047

研究課題名（和文）

mRNA のポリ A 鎖分解酵素による新規生体エネルギー恒常性維持機構の解析

研究課題名（英文）

Regulation of energy homeostasis by mRNA deadenylase complex in the liver

研究代表者

森田 斉弘 (Masahiro Morita)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：50549475

研究成果の概要（和文）：

欧米先進各国では肥満とそれに基づくメタボリックシンドローム患者の増加が深刻な社会問題となっており、生活習慣病発症の分子メカニズムの解明が期待されている。本研究では mRNA 分解酵素の一つである CCR4-NOT ポリ A 分解酵素複合体がエネルギー恒常性の維持に関与しており、代謝酵素の mRNA を制御していることを明らかにすることを目的としている。本研究では、①CCR4-NOT 複合体の遺伝子欠損マウスの解析により、ポリ A 分解酵素が栄養状態に応じてその活性を変化させ代謝を制御、②エネルギー恒常性の維持に重要な遺伝子である Pdk4 と Igfbp1 の mRNA が CCR4-NOT 複合体の標的遺伝子であることを証明、③RNA-immunoprecipitation Microarray により CCR4-NOT 複合体に結合している mRNA の同定、④構造解析によりポリ A 分解活性中心である CNOT6L、CNOT7 の触媒メカニズムを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Obesity is a life-threatening factor and is often associated with dysregulation of gene expression. The molecular mechanism underlying the development of obesity is largely unknown. In this research project, we showed that CCR4-NOT deadenylase complex plays a key role in energy metabolism. We also identified target mRNAs of CCR4-NOT complex in the liver. Furthermore, we solved the structure of CNOT6L and CNOT7 protein. These findings may be useful to understand the mechanism of the development of obesity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医化学一般

キーワード：遺伝子、発現制御、Deadenylation、マイクロアレイ、糖尿病、脂質代謝、

1. 研究開始当初の背景

欧米先進各国では、脂肪分摂取量の増大などによる摂取エネルギー量の過剰と運動不

足などによる消費エネルギー量の低下から、エネルギー過剰蓄積の状態、つまり肥満とそ

れに基づくメタボリックシンドローム患者の増加が深刻な社会問題となっている。肥満症からインスリン抵抗性・糖尿病・高脂血症・高血圧を基盤として発症する動脈硬化症は、日本でも癌と並んで主要な死因であり、医療福祉の点からも医療経済の点からも国民の関心事・重要課題となっていることは言うまでもない。これを踏まえて近年、生体エネルギー代謝の恒常性維持機構についての研究は飛躍的な進歩を遂げており、その機構がある程度明らかとなってきている。しかし、各種の遺伝子欠損マウスの結果を始めとして今わかっている機構だけでは説明のつかない現象が次々と報告されており、エネルギー恒常性維持機構についてはまだまだ知られていないことが非常に多いと考えられる。更にエネルギー恒常性維持に関わる研究は、基礎研究であると同時に研究発展が実際に急増している患者に対する福音となりうる可能性を秘めており、その発展が期待されている。

2. 研究の目的

近年の研究により、エネルギー恒常性維持には様々な転写因子や転写共役因子が深く関与していることが明らかとなってきた。しかしながら適切に mRNA の発現量を制御するためには、転写による発現誘導だけでなく mRNA 分解による制御が同様に重要であるということはいふまでもなく、さらに mRNA 分解と肥満の関連を示すような研究は報告されていなかった。mRNA に関与する遺伝子は酵母における解析により多数同定されており、鍵となる因子が明らかとなりつつある。一般的な mRNA の分解経路ではポリ(A)鎖分解が律速段階であり、そのポリ(A)鎖分解を担う酵素として CCR4-NOT 複合体が同定されている。当研究室における CCR4-NOT 複合体構成因子の遺伝子ノックアウトマウスや細胞にお

けるノックダウンの解析により、CCR4-NOT 複合体の構成因子は癌化や細胞周期といった細胞増殖の制御や、骨形成・精子形成といった細胞分化に関わっていることが明らかとなった。本研究では、mRNA 分解の律速段階であるポリ A 分解を制御する CCR4-NOT 複合体が、代謝酵素の mRNA 分解を制御していることを明らかにし、CCR4-NOT 複合体がエネルギー恒常性の維持に重要な遺伝子であることを明らかにすることを目的としている。これまでに CCR4-NOT 複合体の構成因子である CNOT3 と CNOT6L の遺伝子欠損マウスが抗肥満の表現型を示すことを明らかにしてきた。今後はより詳細に表現型を解析し、その表現型に基づいた新たな分子メカニズムを明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) CCR4-NOT 複合体構成因子の遺伝子欠損マウスにおける生体エネルギー代謝

これまでに、CNOT3 遺伝子ヘテロ欠損マウスと CNOT6L 遺伝子欠損マウスが抗肥満の表現型を示すことを明らかにしてきた。生理機能に基づいた分子メカニズムを明らかにするために、より詳細にマウスの表現型を明らかにすることを試みた。高脂肪食負荷した遺伝子欠損マウスを用いて、グルコース耐久性テスト及びインスリン耐久性テストを行い、また血糖値・血清中のトリグリセロール、FFA、コレステロール量を測定する。また様々な代謝測定を行い、摂餌量、酸素消費量、運動量、体温を測定し、エネルギーバランスを調べる。

(2) CCR4-NOT 複合体によるエネルギー恒常性維持に関わる標的 mRNA 同定

マイクロアレイによる解析を用いて標的候補の遺伝子の同定を試みる。CNOT3 や CNOT6L 遺伝子欠損マウスではポリ A 分解活性が減弱していると考えられ、標的 mRNA の発現量は上昇していると考えられる。マイクロアレイ

解析を用いて、遺伝子欠損マウスにおいて発現上昇している mRNA を同定した。CNOT3 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいて発現上昇している標的 mRNA のポリ(A)鎖の長さが上昇しているものを探索する。実験法としては、RNaseH アッセイを用いる。多数の標的候補 mRNA に対してこの実験を行うことにより、CCR4-NOT 複合体はすべての mRNA を標的としているのか、ある特定の mRNA だけを認識して標的としているのかを知ることができ、mRNA 分解の一般性を明らかにできる。

(3) CCR4-NOT 複合体に標的 mRNA の認識機構の解析

CNOT3 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいてエネルギー代謝異常の表現型が顕著にみられることから、この複合体はある程度基質特異性を保持していると考えている。mRNA は細胞内において mRNA 単体だけでは存在しておらず、RNA 結合蛋白や microRNA (miRNA) などと結合し高次構造をとっていると考えられている。そのような RNA 結合蛋白や miRNA が標的 mRNA を認識し、CCR4-NOT 複合体へリクルートすることによって基質特異性が生まれているというモデルを考えている。このことを証明するために、CCR4-NOT 複合体に会合している mRNA と miRNA の探索を試みた。実験方法としては、これまでに作製した抗 CNOT6L 抗体を用いて複合体を組織から精製し、会合している mRNA と miRNA を単離しマイクロアレイにて同定する (RNA-immunoprecipitation microarray (RIP-CHIP))。その後、実際に CCR4-NOT 複合体と mRNA や miRNA が結合しているかを確認し解析を進めていく。また標的 mRNA の認識領域を調べる実験としてレポーターアッセイがある。miRNA の多くは mRNA の 3' UTR 領域に結合している。よって標的遺伝子の 3' UTR をクローニングしルシフェラー

ゼレポーター mRNA の 3' 側に結合させて、ルシフェラーゼの発現量を調べることにより認識部位を同定することができる。

4. 研究成果

(1) CCR4-NOT 複合体構成因子の遺伝子欠損マウスにおける生体エネルギー代謝

これまでに作製した CNOT3 遺伝子ヘテロ欠損マウスと CNOT6L 遺伝子欠損マウスの詳細な解析を行った。どちらの遺伝子欠損マウスも抗肥満の表現型をしめし、特に肝臓における脂質代謝の亢進が見られた。またグルコース耐久性テストにより、糖代謝が亢進しており、また酸素消費量が亢進していることも明らかにすることができた。これらの詳細なマウスの解析をもとに、生理機能に基づいた分子メカニズムを明らかにすることを試みた。

図1,高脂肪食負荷後のマウ

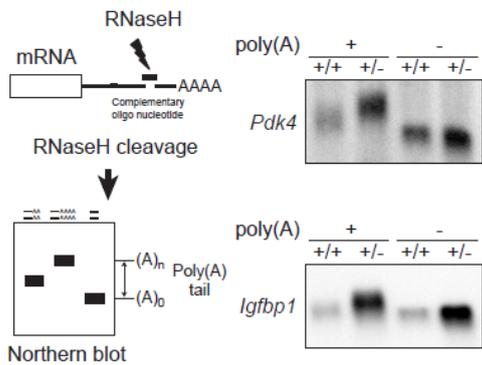


(2) CCR4-NOT 複合体によるエネルギー恒常性維持に関わる標的 mRNA 同定

マイクロアレイによる解析により標的候補の遺伝子の同定を試み、実際にヘテロマウスにおいて発現上昇している遺伝子を同定することができた。確認できた候補遺伝子から、

CNOT3 遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいてポリ(A)鎖の長さが上昇しているものを探索した結果、Pdk4 と Igfbp1 mRNA のポリ A の長さが CNOT3 遺伝子ヘテロ欠損マウスで上昇していることが確認できた。しかしながら Gapdh mRNA のポリ A の長さには変化が見られなかった。CCR4-NOT 複合体はすべての mRNA を標的としているわけではなく、影響を与えやすい

図2, 内在性 mRNA のポリ A 鎖長の比較
mRNA があることが明らかとなった。



(3) CCR4-NOT 複合体に標的 mRNA の認識機構の解析

これまでに作製した特異性の高い抗 CNOT6L 抗体を用いて複合体を組織から精製し、会合している mRNA と miRNA の同定を行った (RNA-immunoprecipitation assay)。その結果、CCR4-NOT 複合体に結合している約 750 個の mRNA と 15 個の miRNA を同定した。この 750 個の mRNA の内やく 200 個は代謝に関わる遺伝子であり、CNOT6L 遺伝子欠損マウスの抗肥満の表現型を説明できる遺伝子が多く含まれていた。データベースを用いた解析により、CNOT6L に結合している mRNA と miRNA には相補する配列を持つものが多くあることがわかった。特異 miR-122 は脂質代謝に関わることが知られており、miR-122 とその標的 mRNA が CNOT6L に結合していることを明らかにした。標的 mRNA の 3' UTR をクローニングして、ルシフェラーゼレポーターのベクターに挿

入した。これらのコンストラクションを用いることによって、RIP-CHIP により同定した mRNA が実際に miR-122 を介して、CCR4-NOT 複合体によって制御していることが明らかになった。以上の結果により、CCR4-NOT ポリ A 分解酵素複合体がエネルギーバランスの維持機構を制御しており、実際に代謝酵素の mRNA を直接制御していることが明らかになることができた。本研究では、mRNA 分解酵素が代謝制御に関わるというこれまでに知られていない新たな制御メカニズムを明らかにすることができた。この研究結果は肥満や糖尿病といった疾患への創薬に結び付く可能性があり、臨床応用の役立つことが期待される。

図3, RIP-CHIP による結合 mRNA と miRNA の同定

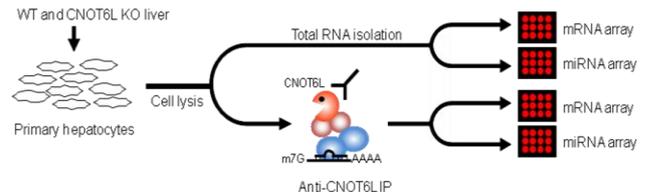
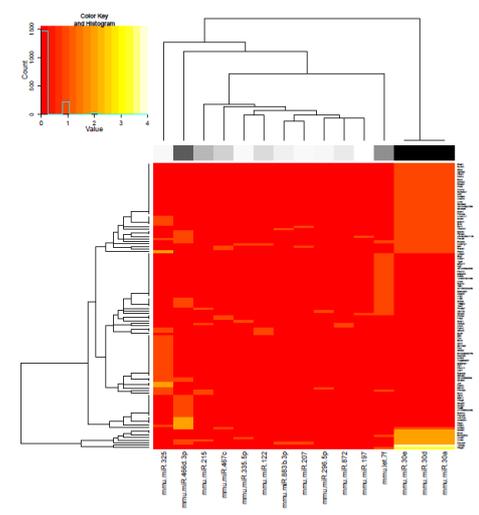


図 8, 同定した mRNA と miRNA の相補性



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 3 件) (すべて査読あり)
1: Kentaro Ito, Takeshi Inoue, Kazumasa

Yokoyama, **Masahiro Morita**, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto, CNOT2 depletion disrupts and inhibits the CCR4-NOT deadenylase complex and induces apoptotic cell death., **Genes to Cells**, 16, 368-379 (2011)

2: Hui Wang, **Masahiro Morita**, Xiuna Yang, Toru Suzuki, Wen Yang, Jiao Wang, Kentaro Ito, Quan Wang, Cong Zhao, Mark Bartlam, Tadashi Yamamoto, Zihao Rao, Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity., **EMBO Journal**, 29, 2566-2576 (2010)

3: **Masahiro Morita**, Kentaro Ito, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto, Involvement of the CCR4-NOT Deadenylase Complex in the Control of Cell Growth. **Systems Biology**, 229-237 (2009)

[学会発表] (計 6 件)

1: Yan ZHANG, **Masahiro Morita**, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto
CNOT7 deficiency affects protein association and activities of murine Ccr4-Not deadenylase complex, leading to abnormal spermatogenesis
第 33 回 日本分子生物学会 年会、第 83 回 日本生化学会 大会 合同大会
2010 年 12 月 9 日

2: 高橋 明格, **森田 齊弘**, 鈴木 亨, 山本 雅
Involvement of Tob2 in adipocyte differentiation
第 33 回 日本分子生物学会 年会、第 83 回 日本生化学会 大会 合同大会
2010 年 12 月 9 日

3: Chiho Watanabe, **Masahiro Morita**, Yoichi Ezura, Tetsuya Nakamoto, Tadayoshi Hayata, Hiroaki Hemmi, Takuya

Notomi, Keiji Moriyama, Tadashi Yamamoto, Masaki Noda

Cnot3, a Novel Critical Regulator of a mRNA Stability, is Involved in the Maintenance of the Bone Mass and the Bone Structure in Senile Osteoporosis Model

The American Society for Bone and Mineral Research 2010 Annual Meeting
Toronto, 2010 年 10 月 18 日

4: **Masahiro Morita**, Yuichi Oike, Tadashi Yamamoto

A critical role of deadenylase-mediated mRNA degradation in energy metabolism.
第 42 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会
岐阜, 2010 年 7 月 16 日

5: **Masahiro Morita**, Yuichi Oike, Takeshi Nagashima, Toru Suzuki, Mariko Hatakeyama, Tadashi Yamamoto

Critical involvement of deadenylase-mediated mRNA degradation in energy metabolism.

第 32 回日本分子生物学会年会
横浜, 2009 年 12 月 11 日

6: Kentaro Ito, **Masahiro Morita**, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto

CNOT1 and CNOT2 are essential for maintaining the structural integrity and the deadenylase activity of the CCR4-NOT complex

第 32 回日本分子生物学会年会
横浜, 2009 年 12 月 11 日

6: Shinichi Ogawa, **Masahiro Morita**, Tsuyoshi Inoue, Toru Suzuki, Tadashi Yamamoto

Anti-proliferative protein Tob is relevant to RNA metabolism and facilitates the interaction between

P-body and stress granule.

〔図書〕（計 0 件）

〔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

森田 齊弘 (Masahiro Morita)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：50549475

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし