

## 論文内容の要旨

mRNA ポリ(A)分解酵素複合体の構成因子である CNOT3 の機能解析:

エネルギー恒常性維持への関与

CNOT3, the component of the mRNA deadenylase complex, maintains the energy homeostasis

森田 齊弘

mRNA 分解は、mRNA の発現量や翻訳効率を決定する重要な制御機構の一つである。mRNA 分解は 200mer ほどの長さのある 3' ポリ(A)鎖の分解(デアデニレーション)によって引き起こされ、その後のmRNA の完全な分解には2つの経路があると考えられている。一方の経路では、ポリ(A)鎖が分解されたmRNA は、Dcp1 と Dcp2 を含むデキャッピング複合体によって 5' Cap が分解され、その後 Xrn1 を含む 5'  $\rightarrow$ 3' エクソヌクレアーゼ複合体によって完全に分解される。もう一方の経路では、ポリ(A)鎖が分解されたmRNA は、3'  $\rightarrow$ 5' エクソヌクレアーゼを含むエクソソーム複合体によって完全に分解される。どちらの経路においても、デアデニレーションは決定的な段階であり、mRNA の発現量を規定していると考えられる。

デアデニレーションの解析は、主に出芽酵母を用いた系で進んでおり、これまでに 2 つのデアデニレースコンプレックスが同定されている。1つは、活性サブユニットである Pan2 と補助ユニットである Pan3 からなる、Pan2-Pan3 複合体である。酵母 Pan2 はデアデニレーションの初期段階に関与しているとされ、約 200mer からなるポリ(A)鎖を 75mer まで分解している。もう1つは、活性サブユニットである Ccr4 と、補助ユニットである Not1, Not2, Not3, Not4, Not5, Caf1, Caf40, Caf130 からなる、CCR4-NOT 複合体である。酵母 Ccr4 は、非発酵性の代謝遺伝子の発現を制御している遺伝子とし

て同定され、いくつかの転写因子と相互作用することから、転写に関与していると考えられていた。しかしながら、近年の生化学的解析により、酵母 Ccr4 はエクソヌクレアーゼ III ファミリーに属しており、デアデニレース活性を持つことが明らかとなった。酵母 Ccr4 の欠失変異体において、mRNA のポリ(A)鎖が長くなっていることが観察された。さらにショウジョウバエの研究によっても、Ccr4 は特定のmRNA のデアデニレーションを制御しており、その結果として Ccr4 欠失変異体では胎生致死やメスの不妊が引き起こされることが解った。これらのことから、CCR4-NOT 複合体は、デアデニレース活性を介して、様々な生命現象に関与していると考えられる。しかしながら、高等生物における CCR4-NOT デアデニレース複合体の機能については、ほとんど知られていない。

そこで本研究では、高等生物における CCR4-NOT デアデニレース複合体の機能を明らかにすることを目的とした。まず、活性中心である Ccr4 のヒトホモログを同定し、相互作用因子として CCR4-NOT 複合体構成因子を同定した。さらに、遺伝子欠損マウスを作製することにより、個体における機能を解明することにした。本研究では、特にエネルギー恒常性維持に関わる因子として CNOT3 を同定し、CNOT3 遺伝子欠損マウスの解析について述べる。

CNOT6 と CNOT6L は、ヒトにおける酵母 Ccr4 のホモログであり、N 末端のロイシンリッチリピート (LRR) と C 末端のデアデニレースドメインから構成されている。CNOT6 と CNOT6L は酵母から高度に保存されていた。CNOT6L に結合するタンパク質を同定するために、タグを付加した CNOT6L を HEK293T 細胞に過剰発現させ、タグにより免疫沈降後、質量分析器により同定した。その免疫沈降したタンパク質を質量分析器によって同定した結果、CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT8, CNOT9, KIAA1741, AAH02928 を同定した(図 1A)。CNOT6 を過剰発現させた HEK293T 細胞からも、同様の結果が得られた。さらに細胞内における内在性の CNOT6L と CNOT1, CNOT3, CNOT7, CNOT9 との相互作用を調べたところ、すべてのタンパク質が相互作用していた。これらの結果より、哺乳類細胞においても CCR4-NOT 複合体の存在が示唆された。次に、細胞内における CCR4-NOT 複合体

の局在を調べた。過去の報告では、CCR4-NOT 複合体は、核における転写制御と、細胞質におけるデアデニレーションとの2つの機能が示されていた。NIH3T3 細胞に GFP タグを付加した CNOT6L を過剰発現させたところ、CNOT6L は細胞質中に強く発現した。また NIH3T3 細胞の溶解物を回収し、核画分と細胞質画分に分画したところ、CNOT3, CNOT6L, CNOT7 は細胞質画分での発現が確認された。さらに、酵母 Ccr4 の活性に重要なアミノ酸が、CNOT6 と CNOT6L に保存されていることから、CNOT6 と CNOT6L のデアデニレーズ活性を確認した。In vitro デアデニレーズアッセイを行った結果、CNOT6 と CNOT6L はデアデニレーズ活性を保持していることを明らかにした。以上の結果より、哺乳類においても CCR4-NOT デアデニレーズ複合体が高度に保存されていることが明らかとなった。

このことは、高等生物においても CCR4-NOT 複合体は、デアデニレーズ活性を介して、様々な生命現象に関与していることが推測される。以上のことを明らかにするために、CCR4-NOT 複合体の構成因子の遺伝子欠損マウスを作製した。

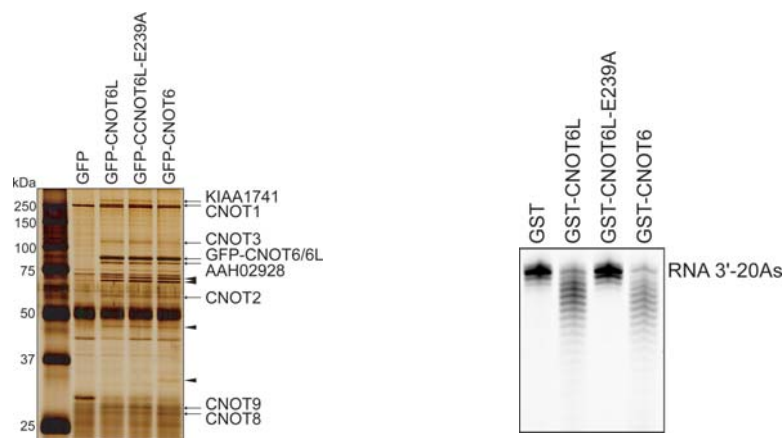


図1A.CCR4-NOT 複合体の精製 B.CCR4-NOT 複合体のデアデニレーズ活性

生物は、摂食により獲得したエネルギーを基礎代謝・運動・体温調節によって消費しており、このエネルギー恒常性は厳密に維持されている。近年、エネルギー恒常性の維持に関わる因子として、eIF4E-BP や S6K 等の翻訳制御因子が見出された。mRNA は、5' cap 構造と 3' ポリ(A)鎖が相互作用しており、その環状化は mRNA の翻訳効率と安定性に重要であると考えられている。よってポリ(A)鎖の調節因子によるエネルギー恒常性維持への関与が示唆されるが、これまでにそのような報

告はない。

我々は、CCR4-NOT デアデニレース複合体の構成因子である CNOT3 の遺伝子欠損マウスを複製し、CNOT3<sup>+/-</sup>マウスが痩せの表現型を示すことを明らかにした。野生型に比べて、ヘテロ型は体重が減少し、脂肪組織が縮小していた。それに伴い、CNOT3<sup>+/-</sup>マウスはインスリン感受性が亢進していた。これらの結果は、CNOT3<sup>+/-</sup>マウスにおいてエネルギー消費がエネルギー摂取を上回っていると考えられ、実際に CNOT3<sup>+/-</sup>マウスでは基礎代謝が亢進していた。

一方で、酵母での機能解析により CNOT3 はポリ(A)分解酵素複合体の一因子であることが知られている。マウス脂肪組織においても CNOT3 はその他の複合体構成因子と結合しており、CNOT3 が個体のエネルギー状態により発現変動していることをつきとめた。また、CNOT3 の発現量が CCR4-NOT 複合体のデアデニレース活性を調節していることを明らかにした。これらのことから、CNOT3 は栄養状態により発現を変動させ、ポリ(A)分解活性を制御していると考えられる。この制御機構が減弱した CNOT3<sup>+/-</sup>マウスにおいて高脂肪食負荷による肥満を誘発したところ、野生型は顕著な肥満を呈したが、ヘテロ型は肥満を呈さなかった。我々は、mRNA 分解制御因子が栄養状態によって発現量を変化させ、エネルギー恒常性を制御しているという、新たな機構を提唱する。

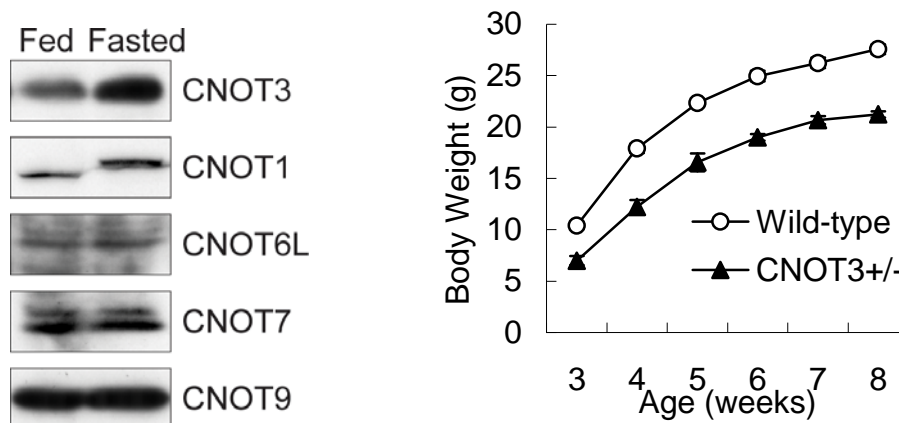


図2 A. CNOT3 の発現変化 B. CNOT3<sup>+/-</sup>マウスの体重変化