

## 論文内容の要旨

### 論文題目：mRNA 分解酵素複合体 CCR4-NOT の作用機構 及び生理学的機能の解明

(Analysis of the structural organization and physiological importance of the CCR4-NOT deadenylase complex)

伊藤 健太郎

生物は遺伝子の発現量を制御することにより、細胞の機能発現・ストレス応答・恒常性の維持・発生・分化など様々な生物学的プロセスを実行している。多様な遺伝子発現制御機構の中でも mRNA 分解経路は新しい遺伝子発現調節機構として昨今、その生物学的重要性が議論されている。

真核生物の mRNA は転写後、5'末端にキャップ構造、3'末端にポリ(A)尾部構造が付加される。この2つの末端構造にそれぞれ翻訳開始因子やポリ(A)結合タンパク質が動員され、これらのタンパク質間相互作用により mRNA は環状化される。mRNA の環状化はポリソーム形成を促し翻訳を活性化するだけでなく、mRNA 自身をエクソヌクラーゼによる分解から守っている。このことはポリ(A)尾部構造が mRNA の安定性を規定している

ことを示唆しており、真核生物の mRNA 分解はポリ(A)尾部の短縮（脱アデニル化）から開始される(図 1)。脱アデニル化を受けた mRNA は環状構造を維持できず、Processing body(P-body)にて DCP1/2 による脱キャップ反応と XRN1 エクソヌクラーゼによる 5'末端からの不可逆的な分解を受ける。

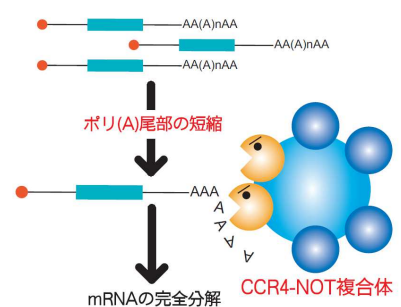


図 1：mRNA 分解経路

CCR4-NOT 複合体は酵母からヒトまで進化的に高度に保存された巨大なタンパク質複合体で、近年 mRNA の脱アデニル化を担う分子として同定された。CCR4-NOT 複合体は細胞内で 2.0 MDa と 1.2 MDa の 2 形態をとり、両形態には少なくとも 9 個のサブユニット(CNOT1-CNOT3, CNOT6/6L, CNOT7-CNOT10)が存在する。このうち、CNOT6/6L, CNOT7/8 は mRNA の脱アデニル化活性を有することが報告されており、この活性が CCR4-NOT 複合体の主要な機能であると考えられている。しかしながら、機能未知のサブユニットも多く存在し、CCR4-NOT 複合体の形成機構や活性調節機構について明らかにされていない。そこで本研究は CCR4-NOT 複合体サブユニット CNOT1, CNOT2 ならびに CNOT9 の機能解析を通じて、当該複合体の形成機構や生理学的重要性に迫ることを目的とした。

## 1. CNOT1 及び CNOT2 の複合体形成への寄与

CNOT1 及び CNOT2 の生理学的功能を解析する目的で、short interfering RNA を用いて培養細胞中の両サブユニットの発現を抑制した時に細胞に現れる影響を検討した。その結果、CNOT1, CNOT2 の発現抑制により、細胞にカスパーゼ依存的なアポトーシスが誘導された。酵母を用いた先行研究から、Not1p は CCR4-NOT 複合体の足場タンパク質であり、Not2p は酵母特異的サブユニット Not5p を複合体に留め置く役割を担うとされている。そこで、それぞれの発現抑制細胞中の CCR4-NOT 複合体の形成状態について詳細な検討を試みた。CNOT1 発現抑制細胞中の CCR4-NOT 複合体サブユニットの発現をイムノブロットによって検討したところ、CNOT2, 6L, 7, 9 の発現がコントロール細胞に比べて大幅に低下していることを見出した。一方、CNOT2 発現抑制細胞では当該複合体サブユニットの発現低下は観察されなかった。そこで、CNOT2 発現抑制細胞中の CCR4-NOT 複合体の形成状態をゲル濾過クロマトグラフィーにより解析した。コントロール細胞において当該複合体サブユニットは 2.0 MDa 付近の画分に存在していたが、CNOT2 発現抑制細胞ではそれらが 1.2 MDa 付近の画分に顕著に現れた。このことから、CNOT2 は当該複合体の安定性に寄与していることが分かった。

次に、CNOT2 の発現抑制に因る CCR4-NOT 複合体の不安定化が脱アデニル化活性に影響を与えるかを、試験管内再構成系における脱アデニル化活性測定実験で検証した。その結果、CNOT2 発現抑制細胞より精製した CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化活性はコントロール細胞から精製したものに比べて顕著に減弱していることを見出した(図 2)。さらに、CNOT2 発現抑制による複合体活性の低下が細胞内 mRNA 分解へ影響を及ぼすかを検討すべく、P-body の挙動を観察した。コントロール細胞では一細胞あたり 10 個ほど観察された P-body が、CNOT2 発現抑制細胞では顕著に減少していた。このことから、CNOT2 は 2.0 MDa CCR4-NOT 複合体を安定に保つこと

で脱アデニル化活性を保障していることが示唆された。

細胞内の mRNA は、ポリソームを形成し翻訳を活発に行う状態と P-body において分解を受ける状態の平衡関係にあることが報告されている。これを踏まえると、CNOT2 発現抑制細胞で観察された P-body の減少は当該細胞内における mRNA の蓄積と翻訳の活性化を意味していると思われる。そこで、CNOT2 発現抑制細胞中のタンパク質量を測定することで、上記の仮説を検討した。その結果、単位細胞数あたりのタンパク質量は CNOT2 の発現抑制によってコントロール細胞の 2 倍近くまで増加することが分かった。興味深いことに、CNOT2 発現抑制で誘導されたアポトーシスは翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドの添加によって抑圧されること、CNOT2 発現抑制細胞において小胞体ストレス依存的アポトーシス時に働くカスパーゼ 4 の活性化と転写因子 *CHOP/GADD153* の発現誘導をそれぞれ見出した(図 3)。これらの結果から、CNOT2 の発現抑制により細胞に小胞体ストレス依存的アポトーシスが誘導されることが示唆された。また本研究から、CCR4-NOT 複合体は細胞内 mRNA の翻訳—分解バランスを司る重要な因子であり、当該複合体の機能欠損は細胞の生存に大きな影響を与えることが示唆された(図 4)。

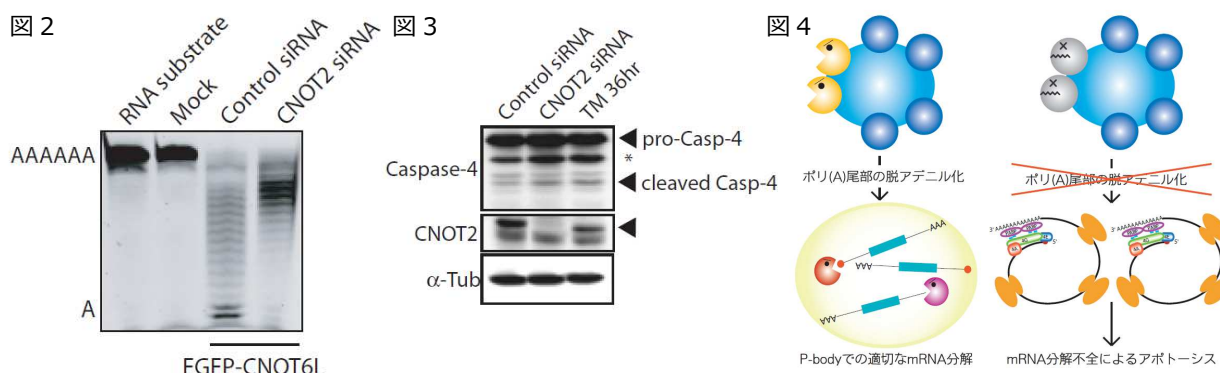


図 2:試験管内再構成系における脱アデニル化活性測定実験。各細胞より精製した CCR4-NOT 複合体を poly (A)RNA と反応させた。図 3: カスパーゼ 4 のイムノブロット。CNOT2 発現抑制細胞で切断型カスパーゼ 4 が増加している。図 4: CCR4-NOT 複合体の機能欠損が引き起こす mRNA 分解不全の概念図

## 2. CNOT9 の CCR4-NOT 複合体活性への役割と胎児内血管網形成への関与

CCR4-NOT 複合体サブユニット CNOT9 は、これまでの研究から細胞の分化に関与することが示唆されてきているが、その生理学的意義や CCR4-NOT 複合体サブユニットとしての役割については明らかにされていない。最初に、マウスの組織における CNOT9 タンパク質の発現様式をイムノブロットで検討した。その結果、CNOT9 は多くの組織で発現が観察され、特に精巣、脾臓、胸腺などで高い発現を示した。CNOT9 の生理学的機能を解析する目的で、*Cnot9* 遺伝子欠損マ

ウスを作製した。*Cnot9* 遺伝子ホモ欠損(*Cnot9*<sup>-/-</sup>)マウスは胎生 9.5 日目あたりで成長遅滞を呈し、胎生 11.5 日目あたりで致死となった。また *Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚は青白く、卵黄嚢に血管が走行していない外見をしていた(図 5)。そこで、当該遺伝子欠損マウスの胚性致死の原因を血管形成異常の面から検討することにした。

*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚の血管網形成について、血管内皮細胞マーカーである PECAM(Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)の全胚免疫染色によって検討した。その結果、*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚の卵黄嚢にも血管網が存在していることが分かったが、野生型胚の卵黄嚢では階層性のある血管網が構築されているのに対し、*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚の卵黄嚢では原始血管叢様の構造を呈していた(図 6)。また、胚体内の血管網形成の指標である体節間を走行する血管の張り出しを評価したところ、野生型に比べ *Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚では張り出しが弱いことを見出した。さらに OP-9 細胞共培養実験において、*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚の卵黄嚢より回収した細胞から形成された血管内皮細胞コロニーの数・大きさは共に野生型に比べ顕著に減少していた。以上の結果から、*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚では血管網の成熟・発達過程の異常により胚性致死を呈することが示唆された。

*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚で観察された血管網形成異常を引き起こす分子機構を解析する目的で、マイクロアレイから得られる網羅的遺伝子発現プロファイルを *Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚と野生型胚間で比較した。その結果、*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚の *Jag1* や *Cxcr4* などの血管形成関連遺伝子の発現に野生型胚との顕著な相違を見出した。興味深いことに、試験管内再構成系において CNOT9 タンパク質は脱アデニル化触媒サブユニットである CNOT7 の活性を抑制した。

以上のことから、CNOT9 は CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化活性を制御することで血管形成関連遺伝子群の安定性を規定していることが示唆された。

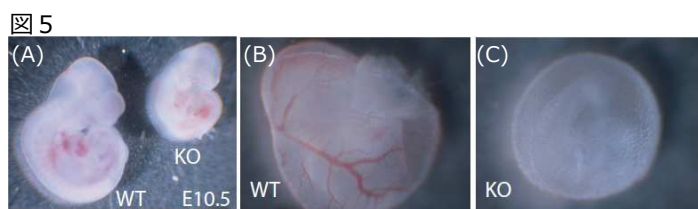


図5: *Cnot9* 遺伝子欠損マウス。(A) 胎生 10.5 日目の *Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚と同腹の野生型。 *Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚のほうが野生型に比べて小さいことがわかる。(B, C) 胎生 10.5 日目の *Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚と同腹の野生型の卵黄嚢。野生型には血管が観察されるが、*Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚には見られない。

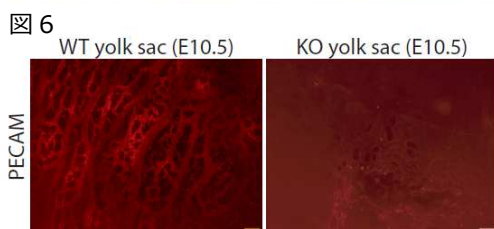


図6: 抗 PECAM 抗体による胎生 10.5 日胚の卵黄嚢の免疫染色。野生型に見られるような階層性のある血管網が *Cnot9*<sup>-/-</sup> 胚には見られない。