

# 論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 健太郎

本論文は mRNA 分解の最初の反応である脱アデニル化を担う mRNA 分解酵素複合体 CCR4-NOT について、培養細胞及び遺伝子改変マウスを用いた解析を通じて、当該複合体の形成機構や生体における機能の解明を試みたものである。本論文は二章から構成されており、内容を要約すると以下のようになる。

第一章では、CCR4-NOT 複合体サブユニット CNOT2 について、当該複合体の形成及び脱アデニル化活性に対する機能解析について述べられている。まず、論文提出者は、培養細胞に siRNA を導入し当該サブユニットの発現を抑制した。CNOT2 発現抑制細胞溶解物を用いた免疫沈降実験、GST プルダウンアッセイ及びゲルろ過クロマトグラフィーを用いた解析から、CNOT2 は CNOT3 と直接結合すること、CNOT2 の発現抑制によって 2.0 MDa CCR4-NOT 複合体は 1.2 MDa と 0.5 MDa の 2 つに分かれることを見出した。これらの解析から、CNOT2 は 2.0 MDa CCR4-NOT 複合体を形作る役割を担うことが示唆された。

CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化活性に対する CNOT2 の機能を検討する為、論文提出者は培養細胞から当該複合体を免疫沈降により精製し、試験管内再構成系において脱アデニル化活性を測定した。その結果、コントロール細胞から精製した CCR4-NOT 複合体に比べ、CNOT2 発現抑制細胞から精製した複合体の脱アデニル化活性が低下していることが分かった。さらに、細胞内 mRNA 分解の場である P-body の免疫染色実験から、CNOT2 発現抑制細胞中の P-body の数がコントロール細胞に比べ有意に減少していることを見出した。これらのことから、CNOT2 は CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化活性の制御に関わるサブユニットであることが示唆された。

論文提出者はさらに、CNOT2 の発現抑制が細胞に与える影響について解析し、CNOT2 発現抑制細胞において、①アポトーシス誘導②タンパク質の過剰生産③小胞体ストレス依存的アポトーシス経路に関与する Caspase-4 の活性化と CHOP の転写量増加を見出した。

以上の解析結果から、CNOT2 は 2.0 MDa CCR4-NOT 複合体の構造を維持することで当該複合体が持つ脱アデニル化活性を保障する機能を有することが示唆された。また、当研究は脱アデニル化不全に伴って細胞死が誘導されること、さらにはその制御機構の一端を示したものであり、非常に興味深いものと言えよう。

第二章では、論文提出者が作製した CCR4-NOT 複合体サブユニット *Cnot9* 遺伝子欠損マウスの表現型解析について述べられている。当該遺伝子ホモ欠損マウスは胎児内血管網形成不全により胎生 12.5 日目で致死となった。さらに、OP-9 細胞共培養系を用いた血管内皮細胞への分化誘導実験から、野生型胚に比べ *Cnot9* 遺伝子ホモ欠損胚由来の細胞の分化能や血管網形成能が減弱していることを見出した。

CNOT9 によって制御される mRNA を探索すべく論文提出者は、マイクロアレイ解析によって得られた野生型胚と *Cnot9* 遺伝子ホモ欠損胚の遺伝子発現プロファイルを比較した。その結果、当該遺伝子ホモ欠損胚において、血管網形成関連遺伝子群の顕著な発現変動を見出した。これらの遺伝子群の中から、CNOT9 の標的 mRNA を探索すべく、3' UTR における AU rich element の有無や Gene Ontology 解析に基づいて候補遺伝子を抽出し、定量的 RT-PCR により発現変動の再現性を確認した。その結果、*Cxcr4* や *Jag1* などの遺伝子について有意に再現性を確認することが出来た。

CNOT9 の CCR4-NOT 複合体脱アデニル化活性への寄与を検討する為、脱アデニル化触媒サブユニット CNOT7 と CNOT9 タンパク質を精製し、試験管内再構成系において脱アデニル化活性を測定した。その結果、CNOT7 の活性は CNOT9 の添加により抑制されることを見出した。このことから、CNOT9 は CNOT7 の脱アデニル化活性に対して負に働きうることを示唆した。

以上の解析結果から、CCR4-NOT 複合体は CNOT9 を介して血管網形成関連遺伝子 mRNA 群の安定性を調節することによって適正な胎児内血管網形成を実現していると考えられる。当研究は血管網形

成過程において mRNA 分解レベルでの制御という新たな側面を提唱するものとして大変意義深いと考える。

なお、本論文第一章は井上 毅 博士、横山 一剛 博士、森田 斉弘 博士、鈴木 亨 博士、山本 雅 博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。