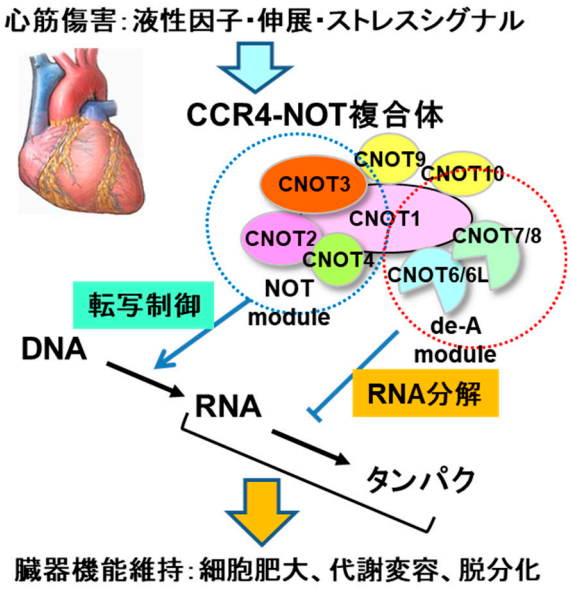
36　RNA poly(A)制御による心機能調節の分子機構解明	久場　敬司

【目的】循環器疾患は先進国における死因のトップにあり疾患発症のメカニズムの解明が急務の課題である。心不全のシグナル伝達における転写、エピゲノムなど mRNA 合成の制御機構について多くの知見が蓄積されてきた一方で、mRNA 分解など代謝制御の解析は未だ十分とはいえない。私達は、これまでに CCR4-NOT 複合体を新規の心機能調節因子として単離し（Neely et al, 2010）、さらに Cnot3 の標的 mRNA として Atg7 を見出し、Cnot3 が Atg7 mRNA の poly(A)鎖分解、翻訳抑制を介して p53 誘導性の心筋細胞死を阻止することを明らかにした（Yamaguchi et al, 2018）。本研究では CCR4-NOT 複合体を介したグローバルな RNA 制御の分子メカニズムを明らかにすること、ならびにマウス心不全モデルにおける CCR4-NOT の deadenylase 因子の生理機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】薬剤誘導性に CCR4-NOT を欠損させる細胞モデルで各種シーケンス解析により、mRNA 発現量、Cnot1 結合強度、転写効率、poly(A)鎖長の変化を包括的に解析した。また、マウス心不全モデルにおける deadenylase 因子の機能、役割について遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。

【結果】CCR4-NOT 複合体内の NOT module と deadenylase module では機能の異なる遺伝子の発現調節に寄与することが分かった。遺伝子毎の poly(A)鎖長の解析から、mRNA 分解のみならず転写に対しても CCR4-NOT が寄与することが分かったことから、CCR4-NOT が遺伝子発現の buffering 作用をもたらすことが考えられた。また、deadenylase 因子が心不全の代償期に心機能維持に重要であることが分かった。さらに、deadenylase 因子の標的 mRNA の 1 つが心不全における線維化の防御に重要であることを解明した。今後、さらに心不全組織における細胞内の制御機構ならびに細胞間の相互作用を介したメカニズムを解明していく予定である。

RNA poly(A)制御因子 CCR4-NOT による転写、翻訳、mRNA 分解の制御



36. RNA poly(A)制御による心機能調節の分子機構解明

久場　敬司

秋田大学 大学院医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座

Key words：心不全，CCR4-NOT，poly(A)

緒　言

循環器疾患は先進国における死因のトップにあり疾患発症のメカニズムの解明が急務の課題である。心不全のシグナル伝達における転写、エピゲノムなど mRNA 合成の制御機構について多くの知見が蓄積されてきた一方で、mRNA 分解など代謝制御の解析は未だ十分とはいえない。mRNA の安定化、翻訳などの制御には、3’末端に付加されたポリアデニン鎖（poly(A)）の長さの調節が不可欠な役割を担うが、その RNA poly(A)の長さをゲノム配列から予測することは今のところ不可能である。従来 poly(A)の長さは、転写後に規則性無しに一様に短くなると考えられてきたが、最近、網羅的な遺伝子毎の poly(A)シーケンス（TAIL-seq）が可能となってきたが、poly(A)が心不全ストレスに応答して制御される機構はほとんど不明である。

CCR4-NOT 複合体は、酵母から保存された 8 個の NOT ファミリー分子からなる蛋白質複合体であり、近年、ヒトにおいても多様な生理機能をもつことが報告され始めている。CCR4-NOT 複合体は、足場の scaffold 部分である NOT module（CNOT1、CNOT2、CNOT3）と RNA poly(A)鎖の分解活性をもつ deadenylase module（de-A module：CNOT6、CNOT6L、CNOT7、CNOT8）を持つ。CCR4-NOT 複合体は、その構成因子と会合する因子を介して転写や poly(A)鎖分解などの RNA 制御による遺伝子発現調節に寄与する。近年、肝臓や脂肪組織における CNOT3 や CNOT7 のエネルギー恒常性の維持の役割［1，2］、B 細胞の分化における役割［3］あるいはヒトの強直性脊椎炎、網膜色素変性症、T 細胞性急性リンパ性白血病における CNOT3 の遺伝子変異/多型が病態発症、進行に関与していることが報告され［4～6］、CCR4-NOT の疾患感受性、疾患病態の発現における重要性が強く示唆されている。私達は、これまでに CCR4-NOT 複合体を新規の心機能調節因子として単離し、当初の CCR4-NOT 複合体の構成因子 Cnot3 のヘテロ欠損マウスを用いた解析ではエピジェネティク調節を介した転写誘導に寄与することが示唆された［7］。さらに最近、筋肉組織に特異的な *Cnot3* 欠損マウスの心不全死のメカニズム解析において、新たに Cnot3 の標的 mRNA として Atg7 を見出し、Cnot3 が Atg7 mRNA に結合し、poly(A)鎖分解、翻訳抑制を介して p53 誘導性の心筋細胞死を阻止することを明らかにした［8］。

本研究では CCR4-NOT 複合体を介した RNA 制御の詳細な分子メカニズムを明らかにするために、タモキシフェン誘導性に NOT module（Cnot1）あるいは de-A module（Cnot7、Cnot8）を欠損させる線維芽細胞株（MEF）を新たに樹立し、RNA-seq、Cnot1 RIP-seq、4SU-seq、TAIL-seq により［9］、それぞれ mRNA 発現量、Cnot1 結合強度、転写効率、poly(A)鎖長の module 欠損による変化を包括的に解析した。その結果、CCR4-NOT では、NOT module が転写関連遺伝子の転写を正に調節する一方で、de-A module は核酸・エネルギー代謝、翻訳制御因子の mRNA 発現を正に調節し、さらにリボソーム合成、細胞死の mRNA を不安定化させ負に調節することが分かった。CCR4-NOT は NOT module と de-A module を介した遺伝子発現の buffering 作用をもたらすと考えられた。

方　法

1. CCR4-NOT 欠損細胞株の樹立と RNA 網羅解析

Cnot1$^{f/f}$;*CAG-MCM*^{Tg}マウス、*Cnot3*$^{f/f}$;*CAG-MCM*^{Tg}マウスあるいは *Cnot7* $^{+/-}$;*Cnot8*$^{f/f}$;*CAG-MCM*^{Tg}マウスの交配により、タモキシフェン誘導性にそれぞれ *Cnot1*、*Cnot3* あるいは *Cnot7*、*8* を欠損させる線維芽細胞（MEF）を樹立した。これらの細胞の培地中にタモキシフェンを添加することにより、*Cnot1* 欠損、*Cnot3* あるいは *Cnot7*、*8* 二重欠損が誘導されることを Western Blot で確認した。いずれの細胞も遺伝子欠損により、最終的に増殖抑制、細胞死をきたしたことから、細胞死の変化がみられないタモキシフェン添加後 24 時間の細胞を実験に用いた。RNA-seq 解析は、細胞から RNA を抽出し、Illumina Tru-seq キットによりライブラリーを調製し、Hiseq4000 でシーケンスを行った。得られたシーケンスデータを DEseq2 で解析し、scatter plot、Gene ontology などの解析を行った。TAIL-seq 解析は、total RNA を RNase T で部分分解後、各種 linker oligo を用いて、TAIL-seq ライブラリーを作製し、MiSeq でシーケンスを行った。

2. マウス心不全モデルにおける *de-A* 遺伝子の機能解析

TAC 心不全モデルについては、*de-A* 遺伝子欠損マウスあるいは野生型マウスに対し、麻酔下に横行大動脈の腕頭動脈と総頸動脈の間を外科的結紮により 27G の太さに絞扼し、左心室に圧負荷を誘導した。野生型マウスでは、TAC 誘導後の発現変化について継時的に心臓組織をサンプリングし、Western Blot により de-A 蛋白の発現を検討した。また、*de-A* 遺伝子欠損マウスの心臓における遺伝子発現解析は、TAC 後 2 週間の心臓組織から RNA を抽出して、RNA-seq 解析を行った。また、線維化遺伝子の発現解析については、qRT-PCR により行った。マウスの心機能測定は、Vevo770 を用いて心エコーを行った。

結果および考察

1. CCR4-NOT 欠損細胞株の樹立と遺伝子発現解析

CCR4-NOT 複合体の分子機能は、複合体の足場部分である NOT module と poly(A)分解活性を担う deadenylase module（de-A module）に分けられる。NOT module と de-A module の機能を調べるために、*Cnot1* 欠損により NOT module を欠失させる一方で、*Cnot7*、*8* 二重欠損により de-A module を欠失させた（図 1a）。これらの細胞の培地中にタモキシフェンを添加し、24 時間後に Cnot1 欠損あるいは Cnot7、8 二重欠損が誘導されることを確認した（図 1b）。*Cnot1* 欠損あるいは *Cnot7*、*8* 二重欠損の細胞から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行い、scatter plot、Gene ontology 解析を行った（図 1c）。さらに、*Cnot1* 欠損と *Cnot7*、*8* 二重欠損での共通変動遺伝子を抽出し、NOT module と de-A module のそれぞれによる制御バイアスのかかった遺伝群の抽出を試みた。その結果、NOT module 欠損（Cnot1 欠損）によりリボソーム合成の遺伝子群の発現が上昇し、転写制御関連の遺伝子群の発現が顕著に低下していた。また、*de-A module* 欠損（*Cnot7*、*8* 二重欠損）では、クロマチン制御、細胞周期、ユビキチン化の遺伝子群の発現上昇が顕著である一方で、ATP 核酸代謝や酸化還元の遺伝子群の発現低下を認めた。したがって、CCR4-NOT では、NOT module が転写関連遺伝子の転写を正に調節する一方で、de-A module は ATP 核酸代謝、翻訳制御因子の mRNA 発現を正に調節し、クロマチン制御、細胞周期の遺伝子群を負に調節することが分かった。さらに、NOT module と de-A module が共通して制御する遺伝子群としては、リボソーム合成の mRNA 発現を負に調節し、ATP 核酸代謝、翻訳制御因子の mRNA 発現を正に調節することが分かった。グローバルな mRNA 分解・合成の制御に CCR4-NOT 複合体が寄与するとされていたが、遺伝子機能でも標的 mRNA がある程度絞り込めることが分かった。

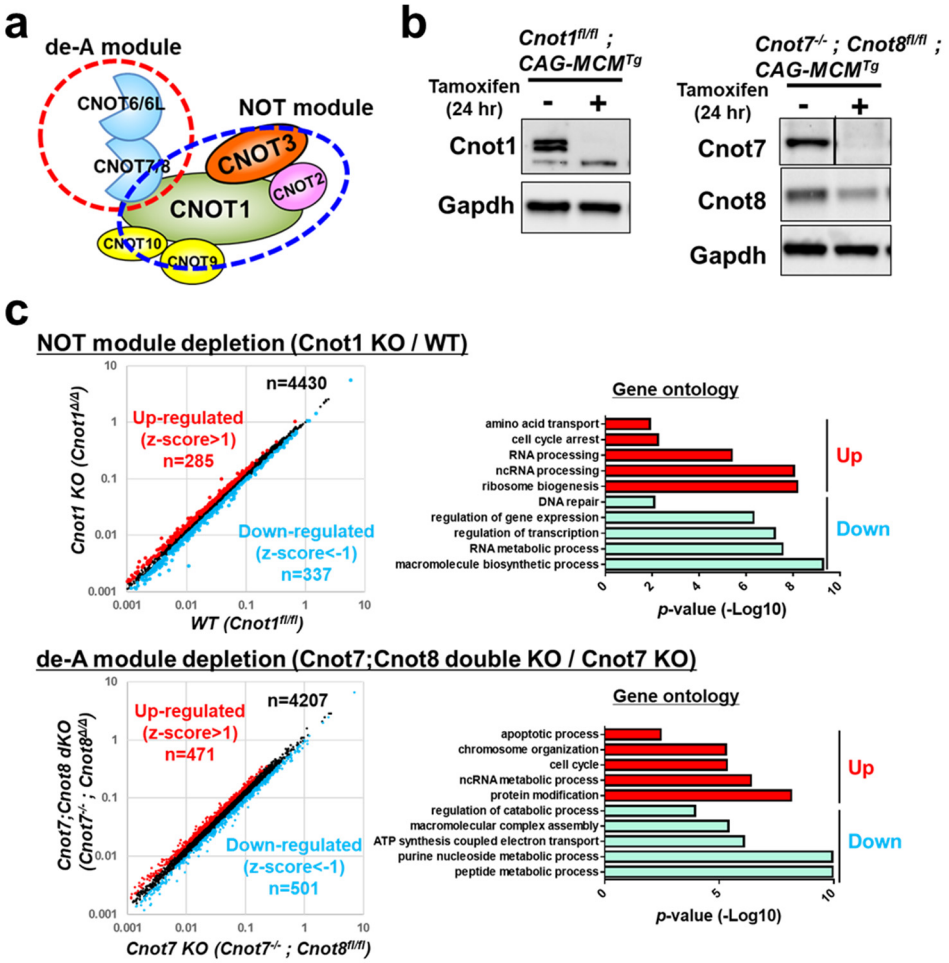


図 1. CCR4-NOT 欠損細胞の遺伝子発現解析

a）CCR4-NOT 複合体における NOT module（Cnot1/2/3）と deadenylase（de-A）module（Cnot6/6L/7/8）。

b）CCR4-NOT 構成因子の各種欠損マウスより単離、樹立した線維芽細胞：タモキシフェン添加により *Cnot1* 欠損あるいは *Cnot7*、*8* 二重欠損を誘導し、Western Blot により確認した。

c）NOT module 欠失細胞あるいは de-A module 欠失細胞の RNA-seq 解析。

2. CCR4-NOT 欠損による poly(A)鎖長の変動解析ならびに RNA 制御との相関解析

前述の *Cnot1* 欠損細胞、*Cnot7*、*8* 二重欠損細胞に加え、新たに樹立した *Cnot3* 欠損細胞を用いて、TAIL-seq 解析を行った。*Cnot1* 欠損、*Cnot7*、*8* 二重欠損、*Cnot3* 欠損のいずれにおいても、グローバルな poly(A) length は 100 nt 以上の長さの poly(A)鎖が増加する傾向を示した（図 2a 左）。CCR4-NOT 欠損による poly(A)鎖の長さ毎の変化率を見ると、*Cnot1* 欠損では 150 nt 以上の長さの poly(A)の fraction が増加しているのに対し、*Cnot7*、*8* 二重欠損では 80～170 nt の長さのものが増加していた（図 2a 右）。一方、Cnot3 欠損では poly(A)鎖の伸長はごくわずかであった（図 2a 右）。また、scatter plot においても同様の変化が確認できた（図 2b）。さらに、転写効率の網羅解析や Cnot1 RIP seq 解析との相関解析を行うことにより、興味深い予備的な知見を得ることができたのでさらに解析を進めている（図 2c）。

Cnot1 欠損と *Cnot7*、*8* 二重欠損で poly(A)鎖の伸長が異なる理由としては次のようなことが考えられた。まず、Pan2/Pan3 という活性が弱い deadenylase が CCR4-NOT 複合体と会合することが知られており、Cnot1 と結合していることが考えられる。次に、CCR4-NOT 複合体が deadenylation の実行因子であるのに対し、Pan2/Pan3 複合体は deadenylation 開始に重要であることから、*Cnot1* 欠損は NOT module 欠失により、CCR4-NOT 複合体のみならず会合する Pan2/Pan3 複合体も機能不全に陥っていることが考えられた。

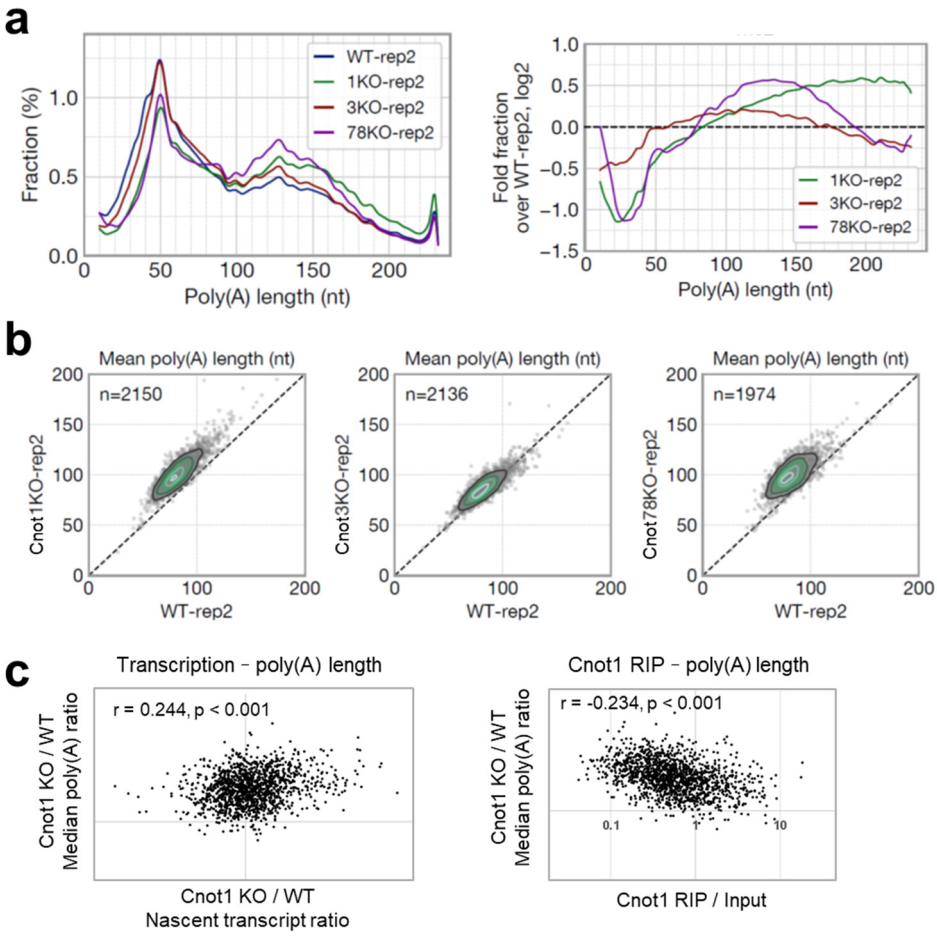


図 2. CCR4-NOT 欠損細胞（MEF）の poly(A)鎖の長さの測定と転写制御、RNA 結合との相関

a）TAIL-seq 解析におけるグローバルな poly(A)鎖の長さの変化（WT：野生型、1KO：Cnot1 KO、3KO：Cnot3 KO、78KO：Cnot7、Cnot8 dKO. Duplicate で行ったうちの rep2 を提示）。

b）TAIL-seq 解析における mean poly(A) length の scatter plot。

c）*Cnot1* 欠損による poly(A) length の変動比と新生 RNA（転写活性）の変動比との相関（左側）なら *Cnot1* 欠損による poly(A) length の変動比と Cnot1 結合度 （Cnot1 RIP/Input）との相関（右側）。

3. マウス心不全モデルにおける *de-A* 遺伝子の機能解析

心不全における *de-A* 遺伝子の発現を調べたところ、圧負荷手術 1 週間から 8 週間の経時的変化において、野生型マウスの心臓で de-A の発現が上昇していた（図 3a）。*de-A* 遺伝子欠損（de-A KO）マウスは圧負荷手術 2 週間で心機能が低下し（図 3b）、心体重比も野生型マウスに比較して上昇していた（図 3c）。*de-A* 遺伝子欠損マウスの心臓を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、Factor-X（FX）遺伝子の上昇が認められたため、de-A、FX double KO マウスを作製した。TAC 手術を行ったところ、de-A、FX double KO マウスにおいて心機能が改善していた（図 3d、e）。さらに、線維化遺伝子の Col8a1 mRNA の発現上昇も抑制された（図 3f）。つまり、心不全病態において、de-A による FX の遺伝子発現制御機構が心機能調節に重要であることが分かった。

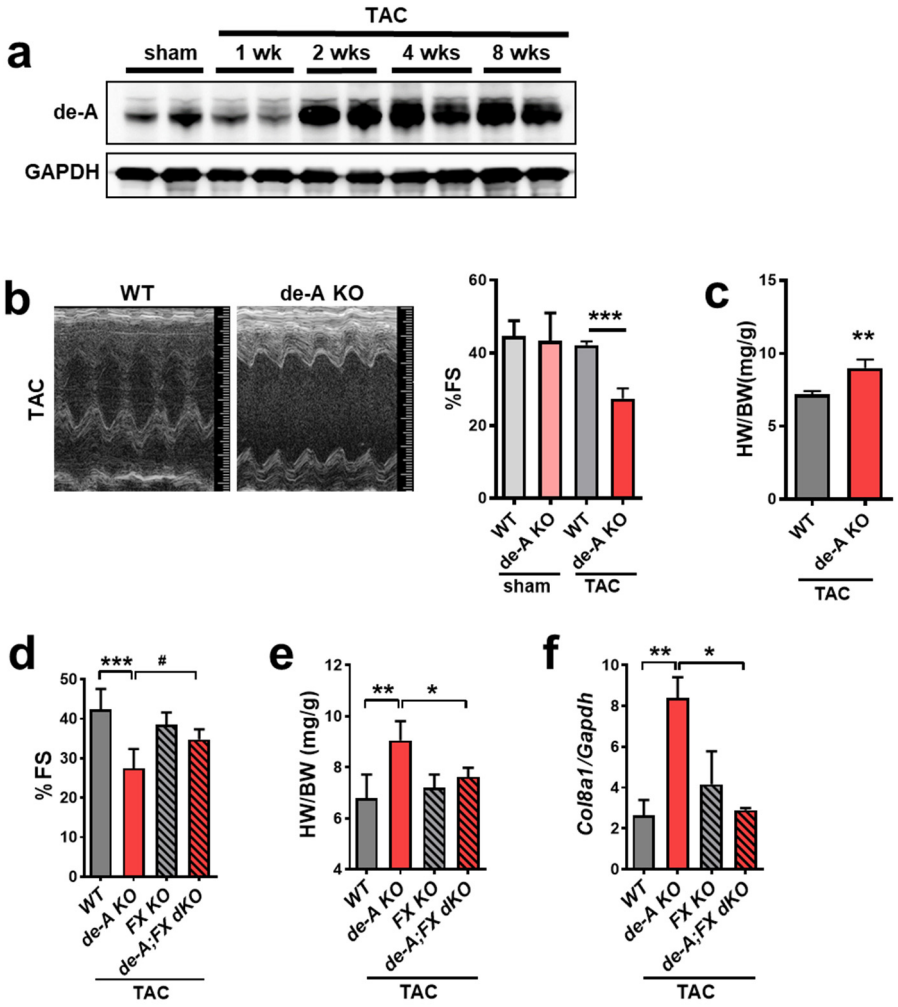


図 3. TAC 圧負荷心不全モデルにおける *de-A* 遺伝子の機能解析

a) TAC（大動脈縮窄手術）による圧負荷導入後の心臓における de-A 蛋白の発現変化。

b、c）*de-A* 欠損マウス（de-A KO）の TAC 術後 2 週間の心機能（b）と心体重比（c）。

d～f）de-A：Factor-X 二重欠損マウス（de-A：FX dKO）の TAC 術後 2 週間の心機能（d）、心体重比（e）、線維化遺伝子（Col8a1 mRNA）の発現変化（f）。

（n＝4～6、Mann–Whitney U test による検定結果を示す。 #P＜0.1、*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001）

本研究において解析した単一の *de-A* 遺伝子は多くの mRNA 発現制御に関与しており、心不全病態におけるその一つが Factor-X であると考えられた。Factor-X は負荷時に発現が上昇することで心臓リモデリングを促進する因子として知られているが、心不全の代償期において de-A がその発現制御に重要であると考えられる。今後、細胞内の制御機構ならびに細胞間の相互作用を介したメカニズムを解明していく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、秋田大学の山口智和助教、佐藤輝紀助教、沖縄科学技術大学院大学（OIST）の山本雅教授、東京大学の鈴木穣教授、北海道大学の中岡慎治講師ならびにソウル大学の Narry Kim 教授である。

文 献

1) Morita M, Oike Y, Nagashima T, Kadomatsu T, Tabata M, Suzuki T, Nakamura T, Yoshida N, Okada M, Yamamoto T. Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3+/- mice. EMBO J. 2011 Sep 6;30(22):4678-91. doi: 10.1038/emboj.2011.320. PMID: 21897366

2) Takahashi A, Adachi S, Morita M, Tokumasu M, Natsume T, Suzuki T, Yamamoto T. Post-transcriptional Stabilization of Ucp1 mRNA Protects Mice from Diet-Induced Obesity. Cell Rep. 2015 Dec 29;13(12):2756-67. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.056. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26711342

3) Yang CY, Ramamoorthy S, Boller S, Rosenbaum M, Rodriguez Gil A, Mittler G, Imai Y, Kuba K, Grosschedl R. Interaction of CCR4-NOT with EBF1 regulates gene-specific transcription and mRNA stability in B lymphopoiesis. Genes Dev. 2016 Oct 15;30(20):2310-2324. Epub 2016 Nov 2. PMID: 27807034

4) Díaz-Peña R, Aransay AM, Suárez-Álvarez B, Bruges-Armas J, Rodríguez-Ezpeleta N, Regueiro M, Pimentel-Santos FM, Mulero J, Sánchez A, Collantes E, Queiro R, Ballina J, Alves H, López-Larrea C. A high density SNP genotyping approach within the 19q13 chromosome region identifies an association of a CNOT3 polymorphism with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 2012 May;71(5):714-7. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200661. Epub 2012 Jan 31. PMID: 22294640

5) Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS, Rivolta C. CNOT3 is a modifier of PRPF31 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance. PLoS Genet. 2012;8(11):e1003040. doi: 10.1371/journal.pgen.1003040. Epub 2012 Nov 8. PMID: 23144630

6) De Keersmaecker K, Atak ZK, Li N, Vicente C, Patchett S, Girardi T, Gianfelici V, Geerdens E, Clappier E, Porcu M, Lahortiga I, Lucà R, Yan J, Hulselmans G, Vranckx H, Vandepoel R, Sweron B, Jacobs K, Mentens N, Wlodarska I, Cauwelier B, Cloos J, Soulier J, Uyttebroeck A, Bagni C, Hassan BA, Vandenberghe P, Johnson AW, Aerts S, Cools J. Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet. 2013 Feb;45(2):186-90. doi: 10.1038/ng.2508. Epub 2012 Dec 23. PMID: 23263491

7) Neely GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmén L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NN, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Koglgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks AA, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM. A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. Cell 2010 Apr 2;141(1):142-53. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.023.

8) Yamaguchi T, Suzuki T, Sato T, Takahashi A, Watanabe H, Kadowaki A, Natsui M, Inagaki H, Arakawa S, Nakaoka S, Koizumi Y, Seki S, Adachi S, Fukao A, Fujiwara T, Natsume T, Kimura A, Komatsu M, Shimizu S, Ito H, Suzuki Y, Penninger JM, Yamamoto T, Imai Y, Kuba K. The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function. Sci Signal 2018 Feb 6;11(516). pii: eaan3638. doi: 10.1126/scisignal.aan3638. PMID: 29438013

9) Lim J, Lee M, Son A, Chang H, Kim VN. mTAIL-seq reveals dynamic poly(A) tail regulation in oocyte-to-embryo development. Genes Dev. 2016 Jul 15;30(14):1671-82. doi: 10.1101/gad.284802.116. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27445395