

研 究 報 告 書

「RNA 分解による生体恒常性維持機構の解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研 究 者: 久場 敬司

1. 研究のねらい

CCR4-NOT 蛋白複合体は酵母から保存された分子量 1 MDa の巨大な遺伝子発現調節因子であるが、複合体の構成因子や会合分子により、転写調節、RNA 分解、蛋白修飾など幅広い機能をもつ。とりわけ CCR4-NOT の RNA 分解作用は、翻訳終結、RNA の運命制御、miRNA などによる RNA 代謝制御において重要な役割を担うことが示唆されていた。本研究者はショウジョウバエの *in vivo* 心不全スクリーニングから CCR4-NOT 複合体を新規の心機能調節因子として単離し、その構成因子の CNOT3 がマウス、ヒトでの心機能の恒常性維持に不可欠な役割を担うことを明らかにした (*Cell* 2010)。さらにマウス *Cnot3* が肝臓におけるエネルギー恒常性の維持を制御することや T 細胞性急性リンパ性白血病においてヒト CNOT3 の遺伝子変異／欠失が重要であることが報告されたが、CCR4-NOT 複合体による生体の恒常性の維持機構やその破綻による病態の形成メカニズムについては、未だ不明な点が多かった (*EMBO J.* 2011, *Nat Genet.* 2013)。本研究者は複数の CCR4-NOT 構成因子の遺伝子改変マウスの作製、機能解析ならびに遺伝子ネットワークの解析から、複合体の RNA 分解作用が心機能の恒常性維持に重要であることを示唆する予備的な知見を得ていた。本研究では、CCR4-NOT 複合体の RNA 分解作用を介したシステム間相互作用による生体の恒常性維持の役割、意義を明らかにすることを目的として研究を行った。さらに、CCR4-NOT 複合体の機能破綻が心不全、感染症、癌などの疾患を発症するメカニズムを解明し、それに基づいた新しい治療薬の開発を目指すことを第二の目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、CCR4-NOT 複合体を介した RNA 分解と生体システムとの機能関連、相互作用に関する研究項目に特に焦点を当てて研究を進めた。具体的な研究成果としては、まず心機能調節において CCR4-NOT 複合体の RNA 分解活性によるオートファジー分子 Atg7 依存性の細胞死の制御機構ならびに心機能調節機構を明らかにした。次に、CCR4-NOT 複合体が bulk mRNA の poly(A)鎖短縮、RNA 分解の実行因子として働くことによりエネルギー感知シグナルを制御するという分子機構が存在することを解明した。合わせて、心不全病態における RNA 分解の役割、意義についても解析を進めた。さらに CCR4-NOT による poly(A)鎖短縮の RNA 認識などの分子機構の解明を目指して CNOT4 ユビキチンリガーゼの分子機能の解析を行った。また、RNA 代謝との観点から共通項があることから、coding RNA と non-coding RNA の 2 機能性分子である ELABELA 遺伝子についての解析も合わせて進めた。最後に、疾患治療への RNA 分解制御の応用を目指した研究項目として、CCR4-NOT 構成因子 CNOT6L deadenylase の阻害剤を *in silico* ならびに wet で化合物スクリーニングを行った。研究成果全

体としては、RNA 分解と生体システムとの機能連関についてこれまでに予想できなかった生体恒常性維持機構の実体をとらえることに成功した。

(2) 詳細

①CCR4-NOT 複合体によるオートファジー分子 Atg7 の p53 転写調節制御機構の解明

心臓特異的な CCR4-NOT 複合体の欠損マウスとして、心臓特異的な Cnot1 欠損あるいは Cnot3 欠損マウスを樹立して解析したところ、CCR4-NOT 欠損により著しい心収縮力低下、QT 時間の延長の表現型を示し、心不全により死亡することが分かった。これらのマウスの心組織の電顕解析から心筋細胞がネクロシスならびにオートファジー空胞形成の像を呈して細胞死をきたすことが分かった。オートファジー分子の発現制御を調べたところ、CCR4-NOT 複合体は Atg7 を始めとする一部のオートファジー遺伝子 mRNA の poly(A)短縮、翻訳抑制により発現レベルを制御することが分かった。CCR4-NOT 欠損による心筋細胞死の分子機構をさらに検索したところ、Atg7 は本来のオートファジー空胞形成で果たす分子機能とは異なる p53 の転写活性を亢進するという別の分子機能を介して細胞死を誘導することが分かった。実際、Atg7 欠損あるいは Atg5 欠損と CCR4-NOT 欠損との二重欠損マウスを作製すると、Atg7 特異的に心不全が改善された。さらに、Cnot3 欠損の心臓において、Atg7 依存的な細胞死関連遺伝子の発現上昇が認められた。したがって、CCR4-NOT 複合体による RNA 分解は、Atg7 による細胞死誘導を制御し、心筋細胞の生存、心機能制御に寄与することが分かり、RNA 分解とオートファジー分子との新しい相互作用のメカニズムが解明された(論文投稿中)。

②bulk RNA の poly(A)分解によるエネルギー感知シグナル制御機構の解明

CCR4-NOT 複合体は、酵母や線虫において多くの mRNA の poly(A)鎖短縮、RNA 分解の実行因子として働くことが知られていたが、高等生物においては不明であった。Cnot1 欠損あるいは Cnot3 欠損マウスの心臓の遺伝子発現解析の結果、CCR4-NOT 欠損により数千におよぶ遺伝子の発現量が上昇していた。そこで、mRNA の poly(A)鎖の 3' 末端を ³²P ラベルし、RNase 処理することにより、bulk mRNA poly(A)鎖の長さ、分布を調べたところ、CCR4-NOT 欠損の心臓では延長した poly(A)鎖(およそ 100~300nt)を持つ mRNA が蓄積し、poly(A)鎖のアデニン含量が増加していることがわかった。一方で、心筋組織のアデニン核酸量を質量分析で測定したところ、CCR4-NOT 欠損によりアデノシンリン酸(AMP)のレベルが低下していた。そこで、細胞内エネルギーセンサーとして AMP によって活性化される AMPK のリン酸化状態を調べたところ、CCR4-NOT 欠損により AMPK のリン酸化レベルは有意に低下していた。一方で、AMP の結合した AMPK をリン酸化することで知られる上流の LKB1 について調べたところ、CCR4-NOT 欠損の心臓において LKB1 の発現レベルや活性化状態に変化は見られなかった。さらに、AMPK の活性化状態の機能的意義について評価するため、AMPK アゴニスト(AICAR, A769662)を CNOT3 欠損マウスに投与したところ、いずれの AMPK アゴニストも CCR4-NOT 欠損による心機能低下を改善した。したがって、CCR4-NOT 複合体による bulk mRNA の脱アデニル化反応は、non-genomic なアデニン核酸の代謝制御ならびにエネルギー感知シグナルの制御に寄与することが分かった。さらに、横行大動脈縮窄術(TAC)による心

不全モデルのマウスにおいて、心機能が低下する非代償期において Cnot3 発現の低下を認め、これと相関して AMP レベルが有意に低下することを見出したことから、心不全の進行に AMP レベルの低下が重要であることが示唆された(論文投稿準備中)。

③ユビキチンリガーゼ CNOT4 による RNA 分解制御機構の解析

CCR4-NOT 複合体による RNA 分解制御の分子機構解明を目指して、CCR4-NOT と会合する機能不明なユビキチンリガーゼ CNOT4 に着目して解析を行った。Cnot4 欠損マウスを複製、解析したところ、Cnot4 ホモ欠損マウスは胎生致死で、Cnot4 ヘテロ欠損マウスはやせの表現型を示し、高脂肪食負荷による肥満に耐性、加齢に伴う心機能低下を示した。これらの表現型は Cnot3 ヘテロ欠損マウスと似通っていた。CNOT4 は分子内に RNA 認識モチーフを持つことから、CNOT4 が RNA と直接結合するかどうかを PAR-CLIP で検討したところ、CNOT4 とは異なる蛋白ではあるが CNOT4 と安定的に結合する蛋白が RNA を認識することが分かった。CNOT4 の免疫沈降、質量分析により同定された蛋白群について検索したところ、この CNOT4 と結合する蛋白を IP, WB により同定することができた。同定された蛋白は RNA の安定性にかかわる RNA 結合蛋白であり、CNOT4 の標的候補 RNA について解析したところ、CNOT4 もこの RNA に対して安定性を増加させる方向に作用することが分かり、CNOT4 とこの RNA 結合蛋白の複合体が CCR4-NOT に対する負の調節因子として機能することが示唆された。現在、この CNOT4 の PAR-CLIP サンプルからライブラリーを調製し、次世代シーケンサーの解析を行っている。

④Elabela - APJ シグナルによる心機能制御機構の解明

ELABELA (ELA)は、non-coding RNA で機能不明な分子として看過されてきたが、近年新規の APJ/Apelin 受容体リガンドとして同定され、さらに 3' UTR 領域が核内 non-coding RNA として機能することが報告された。私達はそれまでに心機能調節において Apelin が ACE2 の陽性調節因子であることを解明してきた(*J Clin Invest* 2013)ことから、ELA の心機能調節における役割、意義について解析を行った。ELA ペプチドを横行大動脈縮窄術(TAC)による心不全モデルのマウスに投与したところ、有意に心肥大や線維化が抑制された。また、APJ KO マウスでは ELA による心保護効果を認めなかったことから、ELA は APJ 受容体依存的に心保護効果を発揮していることが分かった。ELA は Apelin とは異なり ACE2 の転写レベルへの影響は小さかったものの、FoxM1 転写因子の発現抑制を介して ACE の転写レベルを抑制することが分かった。さらに、ELA はアンジオテンシン II 投与にて誘導される心肥大や血圧の上昇も抑制した(*Cardiovasc Res*, in press)。さらに、ELA の non-coding RNA としての役割、意義を解明するために ELA KO マウスを解析したところ、心不全モデルで予想外の結果が得られたので現在さらに解析を進めている。

⑤CNOT6L deadenylase 酵素阻害剤の探索

CCR4-NOT 構成因子 CNOT6L deadenylase の阻害剤を *in silico* の計算科学でスクリーニングし候補化合物を選別する目的で、CNOT6L の活性中心のポケットに対する化合物の結合をシミュレーションするために Rigid-base docking (DOCK v6.4)と Flexible Docking (GOLD v1.3)

の2つのアルゴリズムで計算した。計算結果で上位にランク付けされた 100 個程度について化合物を入手し、大腸菌の蛋白質発現系で調製した組換え CNOT6L 蛋白を用いて実際に wet で酵素活性をスクリーニングした。その結果、#29 の化合物が *in vitro* において CNOT6L 蛋白による poly(A) RNA オリゴの分解、短鎖化を抑制し、deadenylase 酵素の阻害活性があることを見出した。しかしながら、阻害剤候補#29 の構造類自体 50 個を入手して解析を行ったもののいずれも#29 のような阻害剤活性を示さなかったため、#29 の化合物が *in silico* で予想された CNOT6L の酵素活性部位に結合している可能性は低いと考えられた。さらに、東北大学の約 6,000 個の化合物ライブラリーを用いた wet でのスクリーニングを行った。1 次スクリーニングで 1 個のヒット化合物を見出すことができたものの、2 次スクリーニングで残念ながら非特異的な阻害反応であることが分かり、結果的に阻害物質は得られなかった。

⑥骨－心臓連関による生体恒常性維持機構の解明(共同研究 FS の追加支援による)

骨－心臓連関による生体恒常性維持機構の解明することを研究目的として、篠原正浩博士との共同研究で骨細胞と心筋細胞の間のシグナル伝達分子を網羅的なレンチウイルスベクター-cDNA 発現スクリーニングにより同定することを試みた。ところが、初代培養心筋細胞へのレンチウイルスベクターによる cDNA 発現の条件検討を行ったところ、網羅的なスクリーニングを行うには導入遺伝子の発現効率が良くないため困難であることが判明した。そこで、方針転換して骨粗鬆症モデルマウス、心不全モデルマウスで、それぞれ心機能測定、骨量定量などを行い、さらに心不全、骨粗鬆症マーカーを定量することにより、骨粗鬆症、心不全とのクロストークにかかわる候補因子を探索するアプローチに変更した。その結果、まず骨粗鬆症マウスでは心不全マーカーの顕著な発現上昇、心不全マウスでは骨量の有意な減少がみられたことから、マウス疾患モデルで骨－心臓連関が存在する可能性が強く示唆された。この結果に基づき、現在それぞれの疾患モデルの遺伝子発現プロファイルを検索し、クロストークにかかわる候補因子の絞り込みを行っている。今後、骨細胞と心筋細胞の間のシグナル伝達候補分子をそれぞれの細胞に発現させるなどして機能解析を進めていく予定である。

3. 今後の展開

本研究で RNA 分解とオートファジー分子あるいはエネルギー感知シグナルとの相互作用を明らかにすることができたが、さらに踏み込んで RNA 分解とエネルギー代謝との直接的な機能連関について研究を進めていく。メタボロームにおける代謝フラックス解析など RNA 分解によって産生される核酸代謝物がエネルギー代謝にどのようにかかわっていくかを解明することで、新たな細胞エネルギー恒常性維持機構の解明につながることを期待される。さらに RNA 分解の多様な制御機構についてその分子機構を解明していくことにより、RNA にコードされる未解明の動的な遺伝情報を読み解いていきたいと考えている。本研究の成果から、分子生物学のセントラルドグマ(DNA→RNA→タンパク)にとらわれないシステム間の相互作用を介した新しい生体の恒常性の維持機構の解明につながることを期待される。

4. 評価

- (1) 自己評価
- (研究者)

研究目的の達成状況については、RNA 分解と生体システムとの機能連関による生体恒常性維持機構に関する研究項目においておおむね達成できたものと考えている。一方で、疾患病態モデルにおける検討や RNA 分解酵素阻害剤の探索では十分に達成できなかった。RNA 分解酵素阻害剤の探索では in silico 解析、wet screening など健闘したが、成果につなげることができなかった。製薬企業など専門家との連携などを積極的に行う必要があったのではないかと考えている。研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)については、地方大学医学部という学生、大学院生のマンパワーが期待できない研究環境においては、研究員ならびにさがけ研究費で雇用した研究補助員と連携して研究を推進していくことができ、ベストではないがベターな研究実施体制であったと思われる。研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)については、RNA 分解の生体恒常性維持における新たな意義付けという観点から、本研究成果は疾患病態の理解、治療法の開発において今後大きな波及効果があるものと期待している。その他領域独自の評価項目については、本研究は細胞内システムに着目した研究であったが、個体レベルでの解析も含んでおり、生体全体で俯瞰した時の細胞集団の相互作用などによる生命現象に関する研究も進められるとよかったと考えている。そういった意味では、共同研究 FS の支援で骨と心臓の臓器間相互作用の共同研究を東京医科歯科大の篠原正浩博士と進められたのは大変貴重で有意義であった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、遺伝子発現調節因子である CCR4-NOT 複合体を介した RNA 分解と生体システムとの機能連関、相互作用に焦点を当てている。CCR4-NOT 複合体の RNA 分解活性によるオートファジー分子 Atg7 依存性の細胞死の制御機構ならびに心機能調節機構についての成果は、これまでに予想できなかった生体恒常性維持機構の実体をとらえることに成功し、現在論文投稿中である。また、CCR4-NOT 複合体が bulk mRNA の poly(A)鎖から AMP を生成すること、心不全モデルマウスでの AMP 減少と CCR4-NOT 複合体の一部の CNOT3 の低下が関連していることを解明して、論文投稿準備中である。一方、さがけの本研究領域内での共同研究として、骨-心臓連環について検討したところ、骨粗鬆症マウスでは心不全マーカーの顕著な発現上昇、心不全マウスでは骨量の有意な減少がみられたことから、マウス疾患モデルで骨-心臓連環が存在する可能性が強く示唆され、クロストークにかかわる候補因子の絞り込みを行っている。このようにさがけ研究で研究の幅が広がっている。

研究予算は、研究の進展のため新たな機器購入費用、共同 FS 実施のための増額を行った。さがけ期間中に准教授から教授に昇進し、一つの研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sato T, Sato C, Kadowaki A, Watanabe H, Ho L, Ishida J, Yamaguchi T, Kimura A, Fukamizu

| |
|--|
| <p>A, Penninger JM, Reversade B, Ito H, Imai Y, <u>Kuba K</u>. ELABELA – APJ axis protects from pressure overload heart failure and Angiotensin II-induced cardiac damage. Cardiovasc Res, in press.</p> |
| <p>2. Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, <u>Kuba K</u>, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. JCI Insight. 2: e89462, 2017.</p> |
| <p>3. Yang CY, Ramamoorthy S, Boller S, Rosenbaum M, Rodriguez Gil A, Mittler G, Imai Y, <u>Kuba K</u>, Grosschedl R. Interaction of CCR4-NOT with EBF1 regulates gene-specific transcription and mRNA stability in B lymphopoiesis. Genes Dev. 30: 2310–2324, 2016.</p> |
| <p>4. Demetz E, Schroll A, Auer K, Heim C, Patsch JR, Eller P, Theurl M, Theurl I, Theurl M, Seifert M, Lener D, Stanzl U, Haschka D, Asshoff M, Dichtl S, Nairz M, Huber E, Stadlinger M, Moschen AR, Li X, Pallweber P, Scharnagl H, Stojakovic T, März W, Kleber ME, Garlaschelli K, Uboldi P, Catapano AL, Stellaard F, Rudling M, <u>Kuba K</u>, Imai Y, Arita M, Schuetz JD, Pramstaller PP, Tietge UJ, Trauner M, Norata GD, Claudel T, Hicks AA, Weiss G, Tancevski I. The arachidonic acid metabolome serves as a conserved regulator of cholesterol metabolism. Cell Metab. 20: 787–798, 2014.</p> |
| <p>5. Sato T, Suzuki T, Watanabe H, Kadowaki A, Fukamizu A, Liu PP, Kimura A, Ito H, Penninger JM, Imai Y, <u>Kuba K</u>. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. J Clin Invest. 123: 5203–5211, 2013.</p> |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

シンポジウム発表: “CCR4-NOT complex controls adenine nucleotide metabolism and energy sensing in cardiac homeostasis.” 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム 3S17 “Multiple RNA control freak CCR4-NOT protein complex revealing novel paradigm of gene expression.”(英語、研究者がオーガナイザー) 2016 年 9 月 27 日、仙台

シンポジウム発表: “Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) links Apelin and angiotensin systems in controlling heart function” 第 120 回 日本解剖学会・第 92 回 日本生理学会合同大会 シンポジウム 「アンジオテンシンによる循環構造・機能調節研究の最前線」(英語) 2015 年 3 月、神戸

シンポジウム発表: 「RNA 分解制御による心臓エネルギー恒常性維持の分子機構」BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会合同大会)ワークショップ「mRNA 分解の機能破綻がもたらす多様な疾患病態」2015 年 12 月、神戸

シンポジウム発表: “CCR4-NOT deadenylase complex links mRNA metabolism to energy

sensing in cardiac homeostasis” 第 31 回 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会、2014 年 11 月 29 日、名古屋

受賞：秋田医学会学術賞「呼吸循環器疾患の病態における分子ネットワークの同定、解析」2014 年 2 月 10 日、秋田