

博士論文

CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体を介した  
mRNA 分解と翻訳との共役制御機構の解析

友廣 拓生

# 目次

## 第1章 序論

1-1. はじめに	4
1-2. 真核生物における翻訳開始段階と mRNA の安定性	5
1-3. 脱アデニル化酵素	
1-3-1. CCR4-NOT 複合体	7
1-3-2. Pan2-Pan3 複合体	12
1-3-3. PARN	12
1-4. シス配列とトランス作用因子	
1-4-1. microRNA (miRNA)	13
1-4-2. ARE (AU-rich element) 結合タンパク質	15
1-4-3. BTG/Tob family タンパク質	16
1-5. 本研究の概要	17

## 第2章 材料と方法

2-1. 試薬類	18
2-2. プラスミド	18
2-3. 培養細胞の取り扱い	20
2-4. 培養細胞への遺伝子導入	20
2-5. FLAG-affinity beads を利用した HEK293T 細胞からの FLAG-Ago2 抽出	20
2-6. <i>in vitro</i> 転写によるレポーター-mRNA の合成	21
2-7. miRISC を利用した <i>in vitro</i> 脱アデニル化解析系	21
2-8. 組換えタンパク質の精製	22
2-9. ZFP36L1 を利用した <i>in vitro</i> 脱アデニル化解析系	22
2-10. Northern Blotting 法	22
2-11. 共免疫沈降法	23
2-12. Western Blotting 法に使用した抗体と希釈率	23
2-13. CRISPR-Cas9 system によるノックアウト細胞の作成	24

### 第3章 結果

3-1. 脱アデニル化酵素 CNOT7, CNOT8 による poly(A)鎖分解	25
3-1-1. miRNA 依存的な脱アデニル化の試験管内再構成	26
3-1-2. <i>CNOT7</i> , <i>CNOT8</i> 遺伝子をノックアウトした HEK293T 細胞抽出液の脱アデニル化活性	33
3-1-3. CNOT7-CNOT6/6L ヘテロダイマーの形成が脱アデニル化活性に重要である	36
3-1-4. miRNA 依存的な翻訳抑制への CNOT7 と CNOT8 の寄与	39
3-1-5. ZFP36L1 を介した脱アデニル化においても CNOT7-NOT 複合体が重要である	41
3-2. CCR4-NOT 複合体の構成	43
3-2-1. 共免疫沈降法による CCR4-NOT 複合体の構成因子の検出	43
3-2-2. ゲルろ過クロマトグラフィーによる CCR4-NOT 複合体の構成因子の検出	46
3-2-3. CNOT7 の発現により複合体中の CNOT6 は増加する	48

### 第4章 総合考察

4-1. CCR4-NOT 複合体における CNOT7 と CNOT8 の役割	50
4-2. CNOT7/8 による mRNA 分解制御と PABP の関係	54
4-3. 翻訳と共役した mRNA 安定性制御における本研究の位置付け	57
4-4. 本研究の総括	58

謝辞	60
----	----

参考文献	62
------	----

# 第1章

## 序論

### 1-1. はじめに

細胞および個体が正常に維持され機能するには、特定の遺伝子がそれぞれ適切な時期・場所で適切な量だけ発現する必要がある。近年、免疫応答や分化・発生等の高次生命現象に伴い発現量が変化する遺伝子の多くが、特に転写後の RNA レベルで時間・空間的に制御されていることが明らかになり、遺伝子発現を制御するための新たな階層として mRNA 安定性制御の重要性が認識されつつある。このような転写後の制御において mRNA の 3'末端に存在する poly(A)鎖を介した制御機構が非常に重要であることがよく知られている。poly(A)鎖の分解、すなわち脱アデニル化は一般的な mRNA 分解の起点であるため、poly(A)鎖長の調整機構は mRNA の安定性に大きく寄与している。また、poly(A)鎖には、PABP (poly(A)-binding protein) が複数結合しており、5'cap 上の翻訳開始複合体と相互作用することで mRNA を環状化し、翻訳効率を制御していると考えられている。したがって、poly(A)鎖長の調整は mRNA の安定性と翻訳効率を制御するための重要なチェックポイントのひとつであり、複数の脱アデニル化酵素が協調的に働くことで遺伝子発現が正負に制御されている。本研究は、脱アデニル化酵素複合体の酵素サブユニットの役割について生化学的に解析し、mRNA の安定性と翻訳効率を協調的に制御しているメカニズムの詳細を理解することを目的とした。

本章では、まず一般的な mRNA の翻訳が開始される過程と、その後で分解される過程の概要について述べる。次に RNA レベルでの遺伝子発現制御に関わる mRNA 分解酵素と mRNA のシス配列を認識するトランス作用因子の代表例の紹介を行い、最後に本研究の概要について述べる。

## 1-2. 真核生物における翻訳開始段階と mRNA の安定性

真核生物の mRNA は一般的に 5'末端に cap 構造 ( $m^7Gppp$ ) を、3'末端にはアデノシンが連続した配列である poly(A)鎖を持つ。この 5'cap 構造と poly(A)鎖は、翻訳効率と mRNA の安定性の両方を制御するために機能する様々な RNA 結合タンパク質のプラットフォームとして機能している。

翻訳の開始に際しては、eIF4E が 5'cap 構造に結合し、その後 eIF4G が eIF4E に結合し、poly(A)結合タンパク質 (PABP) と相互作用して mRNA の環状化を促進する (1-6)。このループ構造は翻訳効率を高めるとともに、mRNA の安定性を向上させることが知られている (7)。同時に、eIF4G はまた、DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼである eIF4A と相互作用する (8)。eIF4E、4G、および 4A からなる複合体は、eIF4F 複合体と呼ばれ、協調的に働くことで効率よくリボソーム小サブユニットを mRNA 上にリクルートし、翻訳を開始させる (図 1)。翻訳開始複合体が mRNA 上に形成された後に、リボソームが mRNA 上にリクルートされタンパク質合成が開始されるまでの過程は、翻訳反応全体の律速段階であるため (9)、「翻訳開始複合体の形成」や「mRNA の環状化」を阻害もしくは促進することで翻訳効率を調整することができる。

典型的な mRNA の分解過程は、poly(A)鎖の分解、「脱アデニル化」から始まる。脱アデニル化は mRNA 分解の律速段階であり、また poly(A)が分解されることでループ構造が崩れると翻訳効率も低下するため、脱アデニル化は mRNA の安定性を介してタンパク

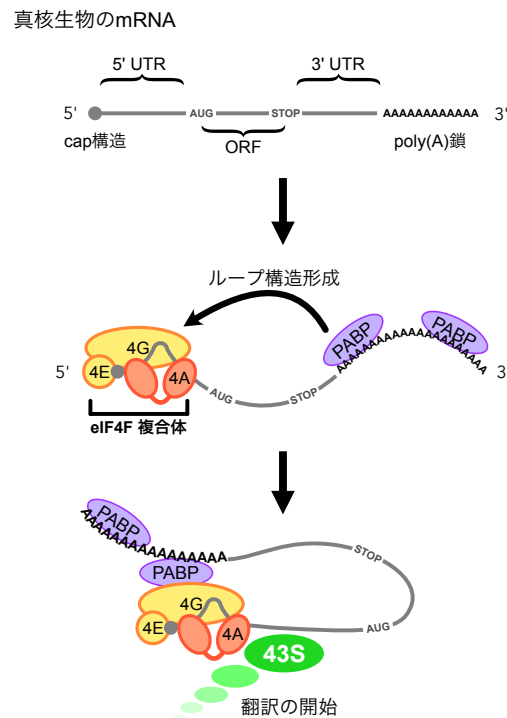


図1. 真核生物の翻訳開始段階

A. 真核生物の mRNA は、5'末端に cap 構造、3'末端には poly(A)鎖を持つ。  
B, C. eIF4E が cap 構造に結合し、その後 eIF4G が eIF4E に結合し、poly(A)結合タンパク質 (PABP) と相互作用してループ構造形成する。この構造によって mRNA の安定性と翻訳効率が向上する。eIF4G はまた、DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼである eIF4A と相互作用し、eIF4F 複合体を形成することで効率よくリボソームを mRNA 上にリクルートし、翻訳を開始させる。

質合成を制御するためのステップとして非常に効率が良い。哺乳動物細胞の安定な mRNA は一般的に 200 から 250 塩基ほどの poly(A)鎖を持ち、一般的に 2 段階の反応を経て完全に脱アデニル化されると考えられている (10, 11) (図 2)。1 段階目は、約 110 塩基まで分解する開始のステップであり、Pan2-Pan3 複合体 (後述) と呼ばれる脱アデニル化酵素が行う。そしてその後、CCR4-NOT 複合体 (後述) と呼ばれる脱アデニル化酵素が完全に脱アデニル化を完了する。脱アデニル化が完了すると、mRNA はエキソソームによ

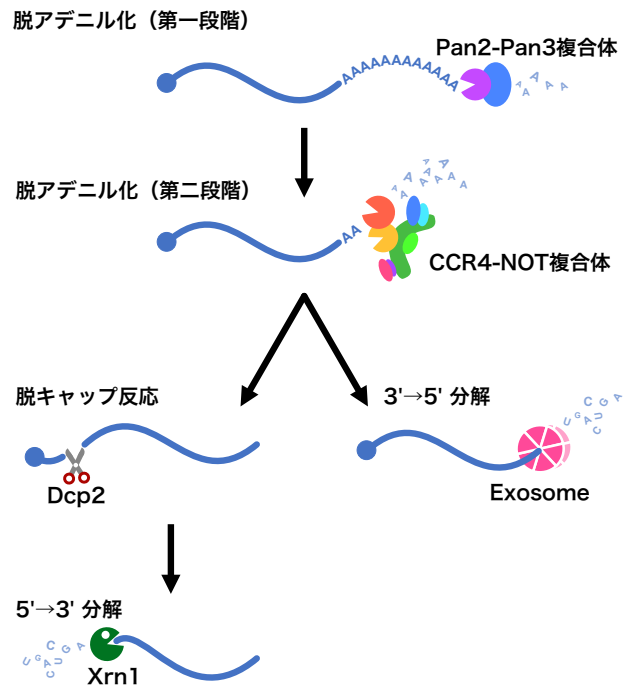


図2. 脱アデニル化とそれに続く mRNA の分解の主な経路

脱アデニル化は、Pan2-Pan3による第一段階とCCR4-NOT複合体による第二段階に分けられる。脱アデニル化された mRNA はその後、Dcp2によって脱キャップされ、速やかにXrn1によって5'→3'方向に分解されるか、Exosome複合体によって3'→5'方向に分解される。

って 3'→5'方向に分解されるか、もしくは脱キャップ反応を経て、その後に速やかに Xrn1 によって 5'→3'方向に分解される (12-15) (図 2)。

このように mRNA の翻訳制御と安定性制御のいずれにも poly(A)鎖が重要であることが明らかになっており、細胞環境に応じて特定の mRNA の poly(A)鎖長を調整することで遺伝子発現を厳密に制御している。このような制御を実現するために、真核生物には多様な脱アデニル化酵素が存在し、mRNA 上のシス配列とそれを読み取るトランス作用因子の組み合わせによって脱アデニル化酵素が使い分けられ、mRNA の安定性と翻訳効率が調整されている。一方で、脱アデニル化酵素複合体の種類・機能は多岐に渡り非常に複雑であるうえ、脱アデニル化酵素のなかには一見機能が重複していて役割が明らかになっていないものもあり、脱アデニル化酵素の使い分けが mRNA の安定性の制御にどのように寄与しているのかについては未だ不明な点が多い。次の章では現時点で明らかにされている脱アデニル化酵素複合体の機能や特性について解説する。

### 1-3. 脱アデニル化酵素

脱アデニル化酵素は複数存在が知られ、それぞれ異なる酵素特性、結合パートナー、および細胞内局在によって固有の細胞内機能を有している。高等真核生物（主に哺乳動物）における代表的なものについて紹介する。

#### 1-3-1. CCR4-NOT 複合体

CCR4-NOT 複合体 (The carbon catabolite repression 4-negative on TATA-less complex) は、出芽酵母で核内転写制御因子としてはじめて同定され、mRNA の脱アデニル化やタンパク質修飾を含む様々な機能を持つことが明らかにされてきた。その後、ヒトを含む哺乳動物細胞においても保存されていることが明らかになり、今では脱アデニル化酵素としては最も一般的かつ主要なものであると考えられている。哺乳動物細胞における CCR4-NOT 複合体は、CNOT1 を中心に、そこに少なくとも CNOT2、CNOT3、CNOT6 (もしくは CNOT6L)、CNOT7 (もしくは CNOT8)、CNOT10、CNOT11 等が結合し構成されている (表 1、図 3)。各サブユニットについてこれまでに明らかになっている役割や特徴を以下に述べる。

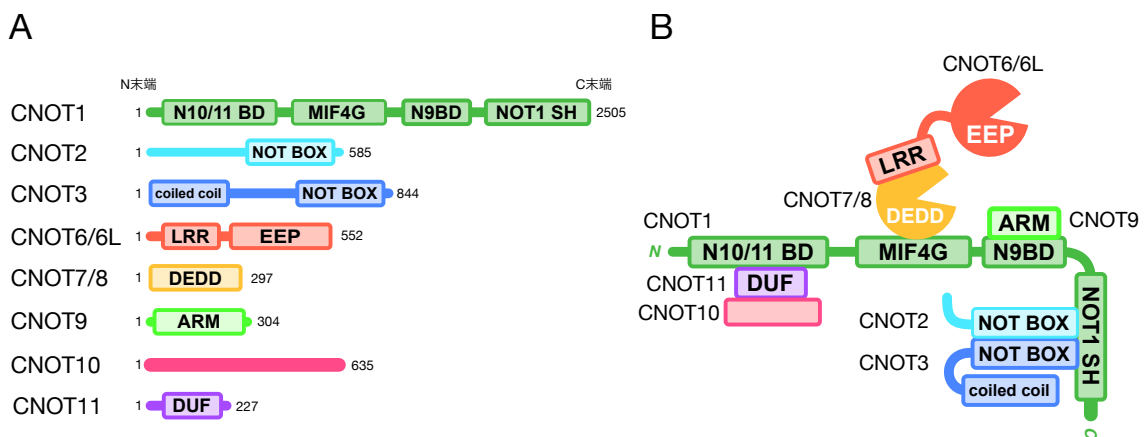


図3. CCR4-NOT複合体の構造

- A. CCR4-NOT複合体の各サブユニットのドメインを模式的に表した。
- B. CCR4-NOT複合体の各サブユニットが実際に結合している状態を模式的に表した。

Name of subunit	Yeast ortholog(s)	Human ortholog(s)
NOT1	Not1	CNOT1
NOT2	Not2	CNOT2
NOT3	Not3	CNOT3
CCR4	Ccr4	CNOT6 (=CCR4a), CNOT6L (=CCR4b)
CAF1	Caf1	CNOT7 (=CAF1a), CNOT8 (=CAF1b, POP2)
CAF40	Caf40	CNOT9 (=CAF40, Rcd1)
NOT10	-	CNOT10
NOT11	-	CNOT11

表 1. 主な CCR4-NOT 複合体のサブユニットの種類と名称

① CNOT1

CCR4-NOT 複合体の中心となる、最も分子量の大きな L 字型のサブユニットである。CNOT1 は、それ自身は酵素としての活性を持たず、他のサブユニットの足場、複合体の骨格として機能する。CNOT1 のアミノ酸配列は、はだまかに N 末端領域、中間領域、C 末端領域の 3 つの主要な領域に分けることができる (30)。N 末端領域には CNOT10 や CNOT11 が結合し (30, 31)、C 末端領域には CNOT2 や CNOT3 が結合できることが明らかになっている (30, 32, 33)。中間領域には MIF4G (middle domain of eukaryotic initiation factor 4G) と呼ばれるドメインが存在し、このドメインをかいして Caf1 (CNOT7/8) と結合している (30, 34)。MIF4G は CCR4-NOT 複合体のサブユニットだけでなく、脱キャップ反応の補酵素や翻訳抑制因子として知られている RNA helicase DDX6 とも結合できるため、CNOT1 は脱アデニル化だけでなく脱キャップ反応や翻訳制御にも関与していると考えられている (35-37)。また、MIF4G 以外の中間領域には CNOT9 が結合している (35, 36)。

② CNOT2, CNOT3

CNOT2 と CNOT3 はどちらも C 末端に NOT-box と呼ばれるドメインを保持するサブユニットであり、CNOT1 の N 末端領域に結合する。また、CNOT2 と CNOT3 はそれぞれの C 末端で互いに結合することも知られている (30, 32, 33)。CNOT2 と

CNOT3 は酵素活性を持っていないが、CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化活性を正に制御する因子として知られている。例えば、ショウジョウバエ S2 細胞では、NOT2 や NOT3 (ヒトでは CNOT2、CNOT3) を RNAi によってノックダウンすると mRNA の poly(A)鎖の長さに影響を与え、またその際に NOT1 (ヒトでは CNOT1) の量が著しく減少していることが知られている(38)。近年マウスを用いた研究においても、心筋細胞の CNOT3 遺伝子を後天的にノックアウトすると、CNOT1 の量が減少し、CNOT1 遺伝子のノックアウトと同様にオートファゴソームの形成が促進され心筋細胞死を誘発することが証明された (39)。したがって、CNOT2 および CNOT3 は CNOT1 を中心とする CCR4-NOT 複合体の形成、安定性に寄与しており、結果的に脱アデニル化を促進すると考えられている。

### ③ CNOT6, CNOT6L

出芽酵母の CCR4-NOT 複合体には2つの脱アデニル化酵素サブユニットがあり、その1つが CCR4 である (40)。脱アデニル化酵素は、活性部位に保存されたエキソヌクレアーゼ配列モチーフによって主に EEP (Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase) スーパーファミリーと DEDD スーパーファミリーのいずれかに分類され、CCR4 は Nocturinin、ANGEL らとともに EEP スーパーファミリーに属している(41)。ヒトの細胞には CCR4 のオーソログとして CNOT6 と CNOT6L の2種類の脱アデニル化酵素が主に存在し、相互排他的に CCR4-NOT 複合体中に存在している。CNOT6/6L は、N 末端の LRR (leucine-rich repeat) ドメインと C 末端の脱アデニル化酵素活性ドメインという2つの特徴的なドメインを高度に保存している (41)。酵母を利用した two hybrid 解析によって、CNOT6/6L は直接 CNOT1 には結合せず、LRR ドメインを介して CNOT7/8 と結合することで複合体中に組み込まれていることが明らかになっている (42)。ヒト乳がん MCF7 細胞を用いた実験によって、CNOT6 と CNOT6L は機能の大部分が重複していて、複合体中に相互排他的に存在することから、互いに代償的に働くことができることが明らかにされている。一方で、マウスにおいて CNOT6L は全身の様々な組織にユビキタスに発現しているが、CNOT6 は精巣、卵巣、胸腺、脾臓など特定の組織に特に高度に発現して

いる (43)。またマイクロアレイ解析によると、CNOT6LのノックダウンはCNOT6のノックダウンよりも比較的 mRNA レベルに影響を与えやすい (43) ほか、CNOT6L はマウス線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) の Cdkn1b mRNA を制御することで細胞増殖に影響していることが示されている (44)。これらの報告から CNOT6 と CNOT6L は、異なる役割を担っていることが明らかになりつつあるが、そのメカニズムや詳細を知るには更なる研究が必要である。

#### ④ CNOT7, CNOT8

出芽酵母の CCR4-NOT 複合体に存在する 2つの脱アデニル化酵素サブユニットのうち 1つが、多くの DNA ポリメラーゼ校正ドメインや DNA エキソヌクレアーゼなどを含む DEDD スーパーファミリーに属している CAF1 である (40, 41)。ヒトの細胞には CAF1 のオーソログとして CNOT7 と CNOT8 の 2種類の脱アデニル化酵素が主に存在し、相互排他的に CCR4-NOT 複合体中に存在している (42)。CNOT7/8 は CNOT1 の中間領域にある MIF4G ドメインに結合して複合体中に存在し (30, 34, 46)、また CNOT6/6L の LRR ドメインと結合することでこれらの酵素の足場としても機能している (42)。CNOT7 遺伝子をノックアウトしたマウスの表現系はよく研究されており、心機能障害や精子形成以上、骨量の増加などが報告されている (47, 48, 49)。一方で、CNOT8 遺伝子ノックアウトマウスについては胚性致死の形質を示すことが最近明らかになり、CNOT7 とは異なり胚発生に不可欠な因子であることが示唆されている (50)。しかしながら、ヒト乳がん MCF7 細胞を用いた研究で CNOT7 と CNOT8 をそれぞれ単独でノックダウンしても細胞中の mRNA の安定性にほとんど変化が見られず、両者を同時にノックダウンして初めて影響が見られることが報告されている (51)。したがって、CNOT7 と CNOT8 は機能的にはほとんど重複しているが、特定の条件下では異なる役割を担っていると考えられている。ただし、CNOT7 と CNOT8 はマウスの全身の細胞でユビキタスに発現しており、その発現パターンも類似している (44)。したがってこれら二つのパラログがどのようにして異なる役割を担っているのかは未だ不明である。また、CNOT7 および CNOT8 は BTG/Tob family タンパク質と直接結合できること

が知られている (13)。BTG/Tob family タンパク質は、PABP タンパク質や、Myc mRNA 等に特異的に結合する CPEB タンパク質との相互作用を介して CNOT7 および CNOT8 を mRNA 上にリクルートし脱アデニル化を促進するという報告がある (52, 53)。これらの状況で CNOT7/8 が典型的な CCR4-NOT 複合体を形成しているかは不明であり、その分子動態は今後の解析が待たれる。

#### ⑤ CNOT9

CNOT9 はさまざまなタンパク質-タンパク質間の相互作用で重要であることが明らかにされている ARM (armadillo) リピードドメインを 6 つ持ち、CNOT1 の中間領域に結合する (35, 36, 54)。自身は酵素活性を持たず、CNOT1 と結合することで、CCR4-NOT 複合体と TTP や TNRC6 (どちらも詳細は後述) といったアダプタータンパク質との相互作用を可能にし、mRNA の脱アデニル化を促進する (35, 36, 55)。

#### ⑥ CNOT10, CNOT11

CNOT10 と CNOT11 は、比較的最近同定されたサブユニットであり、酵母において CNOT10、CNOT11 に相当するサブユニットは同定されておらず、ヒトの細胞におけるこれらの機能はまだほとんど明らかになっていない (12, 31, 56)。CNOT11 は CNOT1 の N 末端領域と直接結合し、その結合は CNOT10 存在化でより安定する (30)。これまでにヒトやショウジョウバエの細胞では CNOT10、CNOT11 をノックダウンした場合でも脱アデニル化に影響がないことが明らかになっている (31)。トリパノソーマでは CNOT10 をノックダウンすると、CNOT1 の存在量が減少し、結果として脱アデニル化の効率が下がることが報告されている (57) 一方、トリパノソーマの CCR4-NOT 複合体は CCR4 が必要ない (58) など例外的な特徴を多く持つため、ヒトや他の生物とは異なるトリパノソーマ特有の現象だと考えるのが妥当かもしれない。また近年、分裂酵母における Mmi1 タンパク質、出芽酵母における Caf130 タンパク質のように、特定の配列を持つ mRNA との結合を媒介する CCR4-NOT サブユニットの存在が明らかになりつつあり (59, 60)、

CNOT10/11 も同じようにある特定の mRNA との結合を促進する因子である可能性もある。

### 1-3-2. Pan2-Pan3 複合体

CCR4-NOT 複合体と並んで、哺乳動物細胞において代表的な脱アデニル化酵素が Pan2-Pan3 複合体である。典型的な脱アデニル化反応は、約 110 塩基まで分解する第一段階とその後完全に分解する第二段階の 2 階層に別れていると考えられており、Pan2-Pan3 はその第一段階に関与していると考えられている (10, 11)。

Pan2 は CNOT7/8 と同様に DEDD スーパーファミリーに属している脱アデニル化酵素であり、 $Mg^{2+}$  依存的に poly(A)鎖を分解していく (61, 62, 63)。Pan3 は脱アデニル化酵素活性を持たず、Pan2 を標的 mRNA 上にリクルートさせるためのアダプターとして機能する (64, 65)。Pan3 は PAM2 と呼ばれる特徴的なドメインを保有し、このドメインで poly(A)鎖上の PABP の C 末端領域に結合できる (66-70)。これによって PABP の結合している比較的長い poly(A)鎖上に結合して脱アデニル化の第一段階を行うと考えられている。またこの特徴から、Pan2-Pan3 は各 mRNA に特異的なアダプタータンパク質が存在していない状態でも mRNA 上にリクルートされて脱アデニル化を起こすことができ、恒常的な脱アデニル化に寄与している可能性が示唆されている (63, 65)。PAM2 ドメインは、脱アデニル化酵素のアダプタータンパク質として機能する TNRC6 タンパク質や Tob タンパク質、翻訳終結因子のひとつである eRF3、そして PABP と poly(A)鎖の結合性を調整する Paip2 タンパク質などに保存されており (67, 71)、これらの因子と競合的に PABP と相互作用することで PABP を介した poly(A)鎖の安定化と不安定化のバランスが緻密に調整されている。

### 1-3-3. PARN (Poly(A) specific ribonuclease)

PARN は Pan2 同様 DEDD スーパーファミリーに属している脱アデニル化酵素であり、mRNA の 5'cap 構造と直接結合することができるという特徴を持つ (72, 73)。ヒト培養細胞において PARN をノックダウンしても全体的な poly(A)鎖の長さに影響を及ぼさないことから、一般的な脱アデニル化において主要な役割を担っている可能性は少な

いと考えられている (74)。一方で、近年 PARN が細胞質よりもむしろ ER (小胞体) 表面に局在していること、細胞質中の mRNA には影響を及ぼさず、ER 上で翻訳されている mRNA の poly(A)鎖の長さを調整することで翻訳効率を調整していることが報告され、CCR4-NOT や Pan2-Pan3 とは全く異なる制御に関与していると考えられている (75-78)。

#### 1-4. シス配列とトランス作用因子

一般的に CCR4-NOT 複合体は標的 mRNA に結合するのではなく、RNA 結合タンパク質や microRNA-タンパク質複合体など様々なアダプター因子との相互作用を介して、脱アデニル化を引き起こす。このようなアダプター因子はトランス作用因子と呼ばれ、標的 mRNA は各トランス作用因子に特異的に認識されるようなシス配列を主に 3' UTR に保有している。このシス配列の存在によって、mRNA の分解が誘導される場所・時間を定義することができ、トランス作用因子がシス配列を特異的に認識し働くことで、時空間的な mRNA 分解制御を可能にしている。脱アデニル化を引き起こすトランス作用因子として代表的なものについて例を挙げる。

##### 1-4-1. microRNA (miRNA)

miRNA は、細胞内在性の約 20-22 塩基からなる小さなノンコーディング RNA で、Ago (Argonaute) family タンパク質と複合体 miRISC (microRNA-induced silencing complex) を形成し、自身に相補的な配列を持つ標的 mRNA 上に結合することでその機能を発揮する (100)。動物の miRNA は、翻訳開始複合体の形成を阻害することで翻訳活性を抑制するとともに、脱アデニル化を引き起こして mRNA を分解する (16-22)。また、ショウジョウバエ細胞、ゼブラフィッシュ胚を用いた先行研究によって、

miRNAによる翻訳抑制がmRNAの不安定化に先行して起こることが示唆されている(23-27)。一方でmiRNAによる標的mRNAの脱アデニル化とそれに続く分解は、翻訳が進行していなくても起こることも明らかにされており、miRNAによる翻訳抑制とmRNA分解はそれぞれ独立したメカニズムであることも明らかにされている(28-29)。

miRISCにはTNRC6と呼ばれるアダプタータンパク質が結合し、PABPやCCR4-NOT複合体、Pan2-Pan3複合体を含む多数のタンパク質を標的mRNA上に

リクルートすることで、脱アデニル化を誘導する(101-119)(図4)。miRNAを介した脱アデニル化は、RNAiによるCCR4-NOT複合体の各構成因子のノックダウンや酵素活性およびCCR4との結合性を欠いたCAF1のドミナントネガティブ変異体の影響を強く受ける一方で、Pan2-Pan3のRNAiによるノックダウンや酵素活性を欠いたドミナントネガティブ変異体の影響をほとんど受けないことが明らかにされており、CCR4-NOT複合体を介した経路が主要なものであると考えられている(102, 104, 106, 108)。

また、miRNAは脱アデニル化とは別に、翻訳開始複体の不安定化を引き起こすことで、純粋に翻訳を抑制する経路も誘導することができるが知られている(17-22, 93, 94)。この経路では最終的に翻訳開始因子eIF4AがmRNA上から解離されることで翻訳の開始を阻害しているが、miRISCが形成されてからeIF4Aが解離されるまでのメカニズムは未だ完全に解明されていない(35-37, 93-99)。miRNAを介した翻訳抑制を引き起こす因子として有力なものにRNA helicase DDX6があげられる。DDX6はCNOT1のMIF4Gドメインに結合することができ、CNOT1のノックダウンがmiRNAを介した翻訳抑制を一部阻害することから、CCR4-NOT複合体が脱アデニル化以外の経路でタンパク質合成を制御する一例として考えられている(35-37)。また、DDX6は4E-Tとの結合を

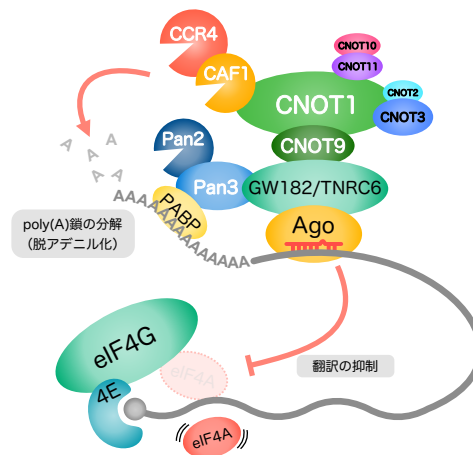


図4. microRNAを介した脱アデニル化と翻訳抑制

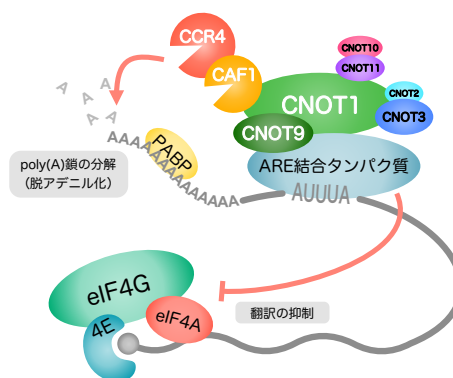
miRNAが脱アデニル化および翻訳抑制を引き起こすモデル図。miRNAはAgoタンパク質とともにmiRISCと呼ばれる複合体を形成し、アダプタータンパク質であるTNRC6との結合を介して脱アデニル化酵素群であるCCR4-NOT複合体やPan2-Pan3複合体を呼び込む。

介して 4EHP と呼ばれる eIF4E のホモログをリクルートすることも知られている。4EHP は eIF4G との結合性を持たないため、cap 上で eIF4E と競合することで翻訳を抑制するモデルも報告されている (95-99)。

#### 1-4-2. ARE (AU-rich element) 結合タンパク質

ARE は AUUUA などアデニン(A)とウリジン(U)を多く含むシス配列の総称であり、急速な分解を必要とするような mRNA に多く見られる。ARE は主に IL6 などの炎症性サイトカインや VEGF などの成長因子をコードする mRNA の 3'UTR に存在し、ヒトの全 mRNA の約 8% に含まれることが分かっている (79)。

ARE 結合タンパク質として最も代表的なものが ZFP36 (TTP)、ZFP36L1,2 (BRF1、BRF2) などが含まれる TIS11 family タンパク質である (80, 81)。これらの因子は CCR4-NOT 複合体と直接結合し、脱アデニル化を引き起こしている (82, 83) (図 5)。また近年、ZFP36 と ZFP36L1 に関して miRNA と同様に脱アデニル化非依存的な翻訳抑制能を有していることが明らかになりつつある (84, 85) (図 5)。特に ZFP36L1 は CNOT1 との結合変異体で翻訳抑制機能が阻害されることから、CCR4-NOT 複合体を介して翻訳抑制を誘導していると考えられている (85)。しかしながら、miRNA による翻訳抑制を阻害した試薬を用いても、ZFP36L1 による翻訳抑制に影響がなかったことから、CCR4-NOT 複合体を介した翻訳抑制経路は 1 通りではないことが想定され、相互作用するアダプタータンパク質の種類や周囲の環境によって、その構成因子や性質がダイナミックに変化している可能性が示唆されている。



**図5. ARE結合タンパク質を介した脱アデニル化と翻訳抑制**  
 ARE結合タンパク質が脱アデニル化および翻訳抑制を引き起こすモデル図。TIS11 familyタンパク質などのARE結合タンパク質はCCR4-NOT複合体と直接相互作用し、脱アデニル化を引き起こす。ZFP36(TTP)やZFP36L1(BRF1)などは脱アデニル化非依存的な翻訳抑制を引き起こすことが明らかにされている。

### 1-4-3. BTG/Tob family タンパク質

BTG/Tob family タンパク質は、細胞増殖を抑制する抗腫瘍タンパク質群であり、CAF1 (CNOT7) と結合することで mRNA の脱アデニル化を誘導する (13) (図 6)。CAF1 との結合は BTG/Tob family のすべてのタンパク質で保存されているが、その中でも特に Tob1/2 は C 末端に PAM2 モチーフを持ち、poly(A)鎖上の PABP と結合し、脱アデニル化酵素である CAF1 を効率的に poly(A)鎖付近へリクルートすることができる。

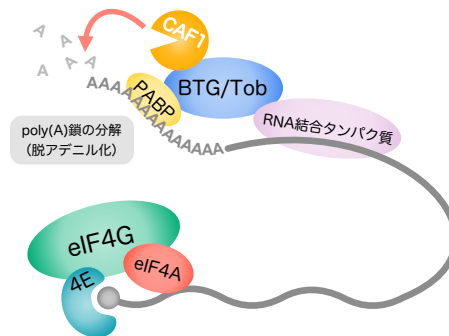


図6. BTG/Tob familyタンパク質を介した脱アデニル化

BTG/Tob family タンパク質が脱アデニル化を引き起こすモデル図。BTG/Tob familyタンパク質はCaf1 (CNOT7/CNOT8) と直接結合し脱アデニル化を引き起こすことが知られている。

## 1-5. 本研究の概要

ここまで解説してきたように、poly(A)鎖は mRNA の安定性と翻訳効率を規定する上で非常に重要な役割を担っており、多様な脱アデニル化酵素とそれらをリクルートするトランス作用因子によって緻密に制御されている。特に CCR4-NOT 複合体は多数のサブユニットで構成され、その構成因子の組み合わせによってさまざまな機能を発揮することが知られている。さらにそのサブユニットのパラログは進化に伴って増加し、機能が重複しているように見えるパラログがそれぞれ異なる細胞個性の獲得に寄与していることを示す報告が多数存在している。したがって、細胞環境に応じて CCR4-NOT 複合体の構成および特性が変化することで、mRNA の安定性・翻訳効率を動的に制御することが可能になり、時空間的な遺伝子発現制御に寄与しているのではないかと考えられる。

以上のような背景から、CCR4-NOT 複合体の酵素サブユニットのひとつである CAF1 に着目した。CAF1 は、酵母のような単細胞真核生物やハエのような節足動物では 1 種類しか発現していないのに対して、哺乳類や魚類など脊椎動物では 2 種類のパラログ (CNOT7 と CNOT8) が発現している。さらに 1-3-1 で述べたように、哺乳動物細胞においてそれぞれのパラログが生殖や発生といった高次生命現象において重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究では、CCR4-NOT 複合体の活性が CNOT7 と CNOT8 によってどのように制御されているのかを生化学的に解析し、各パラログの機能的差異とその分子メカニズムを元に、遺伝子発現の新たな制御層としての mRNA 分解制御機構を「mRNA 分解と翻訳の共役制御」という観点から考察する。

## 第 2 章

### 材料と方法

#### 2-1. 試薬類

一般の試薬類、酵素などは主に TAKARA、東洋紡、Sigma、ナカライから購入した。

#### 2-2. プラスミド

構築したプラスミドのうち、本論文を理解する上で重要なものを以下に記載する。

##### pFLAG-human CNOT7

HEK293T 細胞の cDNA と human CNOT7-F、human CNOT7-R のプライマーを用いて PCR を行い、ヒトの CNOT7 の ORF を増幅した。この断片を HindIII と BamHI で切断し、pFLAG-CMV-2 (SIGMA) の HindIII と BamHI 部位に挿入した。

##### pFLAG-human CNOT8

HEK293T 細胞の cDNA と human CNOT8-F、human CNOT8-R のプライマーを用いて PCR を行い、ヒトの CNOT8 の ORF を増幅した。この断片を SalI と BamHI で切断し、pFLAG-CMV-2 (SIGMA) の SalI と BamHI 部位に挿入した。

##### pFLAG-human CNOT7 D40A, D42A

pFLAG-human CNOT7 を鋳型に hCNOT7 D40A, E42A-F、hCNOT7 D40A, E42A-R プライマーを用いて、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (TAKARA) のプロトコールに従い、PCR 反応を行なった。その反応液に DpnI を加えて 37°C で 2 時間インキュベートしたのちに、全量が大腸菌に形質転換してクローンを得た。得られたクローンは変異が導入されているかどうかをシーケンスにより確認した。

#### pFLAG-human CNOT7 C67E, L71E

pFLAG-human CNOT7 を鋳型に hCNOT7 C67E-F、hCNOT7 C67E-R、hCNOT7 L71E-F、hCNOT7 L71E-R プライマーを用いて、PrimeSTAR® Mutagenesis Basal Kit (TAKARA) のプロトコールに従い、PCR 反応を行なった。その反応液に DpnI を加えて 37°C で 2 時間インキュベートしたのちに、全量が大腸菌に形質転換してクローンを得た。得られたクローンは変異が導入されているかどうかをシーケンスにより確認した。

#### pFLAG-human Ago2

HeLa 細胞の cDNA と human Ago2-F、human Ago2-R のプライマーを用いて PCR を行い、ヒトの Ago2 の ORF を増幅した。この断片を HindIII と BamHI で切断し、pFLAG-CMV-2 (SIGMA) の HindIII と BamHI 部位に挿入した。

#### 使用したプライマー一覧

hCNOT7-F: 5'- GGAAGTCCCCAGCGGCAACTGTAGAT-3'

hCNOT7-R: 5'-AAGGATCCTCATGACTGCTTGTTGGC-3'

hCNOT8-F: 5'-AAGTCGACCCTGCAGCACTTGTGGAG-3'

hCNOT8-R: 5'-AAGGATCCTCACTGCTGCATGTTGTT-3'

hCNOT7 D40A, E42A-F: 5'-GCTATGGCCACCGCGTTTCCAGGTGTGGTTGCA-3'

hCNOT7 D40A, E42A-R: 5'-TGGAACGCGGTGGCCATAGCAACGTAATTATA-3'

hCNOT7 C67E-F: 5'-TTGCGGGAGAATGTAGACTTGTAAAG-3'

hCNOT7 C67E-R: 5'-TACATTCTCCCGCAATAGTTGGTATTG-3'

hCNOT7 L71E-F: 5'-GTAGACGAGTTAAAGATAATTCAGCTA-3'

hCNOT7 L71E-R: 5'-CTTTAACTCGTCTACATTCTCCCGCAA-3'

hAgo2-F: 5'-AAGCTTTACTCGGGAGCCGGCCCC-3'

hAgo2-R: 5'-GGATCCTCAAGCAAAGTACATGGT-3'

### 2-3. 培養細胞の取り扱い

HEK293T 細胞

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) base

FBS (Fetal Bovine Serum) 10%

Penicillin & Streptomycin 1%

(継代法)

PBS(-)で2回洗浄した後、Trypsin-EDTA 0.05%溶液を加え、5分間37°Cで処理した。培養液を加えピペティングで細胞をはがした後、適量を新しい培地に加えた。

### 2-4. 培養細胞への遺伝子導入

10cm 径の dish に 50-80%コンフルとなるように HEK293T 細胞を準備し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 12 $\mu$ L を Opti-MEM (Thermo Fisher) 100 $\mu$ L に加え、5分間室温でインキュベートした。そこへ、プラスミド DNA (6 $\mu$ g) を Opti-MEM (Thermo Fisher) 100 $\mu$ L に希釈したものを全量加えて、20分間室温でさらにインキュベートした。この間に細胞を PBS(-)で一回洗浄した後に培養液を 10mL 加えておき、静置していた DNA 混合液を細胞培養液に全量加えて、37°Cで24時間培養した。

### 2-5. FLAG-affinity beads を利用した HEK293T 細胞からの FLAG-Ago2 抽出

[2-4]に従って FLAG-Ago2 を過剰発現させた HEK293T 細胞を回収し、PBS(-)で洗浄した後に細胞ペレットの2倍 volume の lysis buffer (40mM HEPES-KCl [pH7.4], 100 mM potassium acetate, 1 mM magnesium acetate, 1mM DTT) で懸濁した。その後、窒素ガスで細胞を破碎し、10,000 $\times$ g で10分間遠心した。遠心後の上清 300  $\mu$ L 分と 50  $\mu$ L の Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) を wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1% Triton) 中で混ぜ、2時間4°Cで結合させた。その後、wash buffer で7回、lysis buffer で2回洗浄した後に、溶出 buffer (40 mM HEPES-KCl [pH7.4], 100 mM potassium acetate, 1 mM magnesium acetate, 750 ng/ $\mu$ L 3x FLAG Peptide) を 200 $\mu$ L 加えて4°Cで1時間溶出した。

## 2-6. *in vitro* 転写によるレポーターmRNA の合成

pBluescriptII SK(+)\_Nluc\_miR-1\_A114 (Fukao molcell 2014) を、poly(A)鎖を保護しない場合は EcoT22I、poly(A)鎖を保護する場合は HindIII で切断し、High Pure PCR clean up micro Kit (Roche) を用いて精製した。精製した DNA を鋳型に CUGA® *in vitro* Transcription Kit (ニッポンジーン) を用いて *in vitro* 転写反応した。その後、ScriptCap m<sup>7</sup>G Capping System (CELLSCRIPT) を用いて 5'末端に m<sup>7</sup>G cap を付加してから、RNeasy Mini Kit (Qiagen) によって精製した。

## 2-7. miRISC を利用した *in vitro* 脱アデニル化解析系

10cm 径の dish に 50-80%コンフルとなるように HEK293T 細胞を準備し、PBS(-)で洗浄し回収した後に細胞ペレットの 2 倍 volume の lysis buffer (40mM HEPES-KCl [pH7.4], 100 mM potassium acetate, 1 mM magnesium acetate, 1mM DTT) で懸濁した。その後、窒素ガスで細胞を破碎し、10,000×g で 10 分間遠心した。遠心後、上清を回収し、これを細胞質抽出液とした。この細胞質抽出液 (10 μL) に対して、FLAG-Ago2 (1 μg)、miR-1 duplex (5 pmol) を混合し、37°Cで 30 分間インキュベートして Ago2 タンパク質に miR-1 を取り込ませた。その後、レポーターmRNA (5ng) と Reaction buffer (ATP, ATP 再生系, GTP を含む) を加え、10-90 分間 37°Cで反応させたのちに、脱アデニル化反応液から ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出した。この total RNA (2 μg 分) に対して、oligo DNA (25 pmol) を加えて、アニーリングを行なった (67°C 5min, 37°C 10min)。この oligo DNA はレポーターmRNA の ORF 下流の配列に対する相補的な配列を持つ (5'-TTACGCCAGAATGCGTTCGCA-3')。そこへ RNase H (0.5U; TAKARA) と RNase inhibitor (Toyobo; 10 U)、RNase H buffer (20 mM HEPES-KOH [pH 7.9], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, and 1 mM DTT) を加えて、37°Cで 10 分間反応させた。反応液をエタノール沈殿し、Gel Loading Buffer II (Invitrogen) に溶かして泳動用 sample とし、Northern Blotting 法により検出した。なお、同時に翻訳活性を測定する場合は、脱アデニル化反応後、total RNA を抽出する前にルミノメーターによってルシフェラーゼ活性を測定した (Promega 社 Nano-Glo Luciferase Assay System を使用)。

## 2-8. 組換えタンパク質の精製

pMALc5X-ZFP36L1-6×His (85) を BL21 コンピテントセルに導入後、アンピシリン入り LB 寒天培地上でコロニーを選択し、Overnight Express™ Instant LB (Novagen) を用いて 37°C で 18 時間培養した。培養後、3,000 rpm で 30 分間遠心し、得られたペレットを 0.1 % Triton X-100 と protease inhibitor cocktail (nacalai) を含む phosphate buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl at pH 7.5) で懸濁し、超音波で破碎した。10000×g で 30 分遠心した後、上清を cOmplete His-Tag Purification Resin (Roche) を用いて精製した。phosphate buffer を使用すること以外はメーカーの指示書の通りに行い、500 mM imidazole を含む phosphate buffer で溶出した。さらに Amylose Resin (New England Biolabs) を用いて精製した。phosphate buffer を使用すること以外はメーカーの指示書の通りに行い、10mM Maltose を含む phosphate buffer で溶出した。溶出後、Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device (Thermo Fisher) を用いて、lysis buffer (40mM HEPES-KCl [pH7.4], 100 mM potassium acetate, 1 mM magnesium acetate) 中で一晩透析を行った。透析後のタンパク質は Lowry 法で定量後、-80°C で保存した。

## 2-9. ZFP36L1 を利用した *in vitro* 脱アデニル化解析系

MBP-ZFP36L1 (1 μg)、レポーター mRNA (5 ng) を混合し、4°C で 15 分間インキュベートしてレポーター mRNA に ZFP36L1 を結合させた。その後、2-7 と同様の方法で調整した細胞質抽出液 (10 μL) と Reaction buffer (ATP, ATP 再生系, GTP を含む) を加え、10-60 分間 37°C で反応させ、2-7 と同様に Northern Blotting 法により poly(A) 鎖長を検出した。

## 2-10. Northern Blotting 法

[2-7] で得たサンプルを変性アクリルアミドゲル (1×TBE buffer 中に 6% アクリルアミドと 8M ウレアを含む) で分離し、ナイロンメンブレン (Pall) に転写した。レポーター mRNA は、ハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド、750 mM NaCl、75 mM クエン酸三ナトリウム、2% ブロッキングリジェント (Roche)、0.1% SDS、0.1%

N-ラウロイルサルコシン、200 ng/μl yeast tRNA) 中でプローブ RNA と 60°C で 12 時間反応させた。プローブ RNA は DIG RNA ラベリングミックス (Roche) を利用して kit のプロトコールに従い調整したものを使用した。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、wash buffer A (2×SSC、0.1% SDS) で室温にて二度、wash buffer B (0.1×SSC、0.1% SDS) で 65°C にて二度洗浄した。洗浄後、1% のブロッキングリジェント (Roche) を溶かしたマレイン酸 buffer に Anti-Digoxigenin-AP (Roche) を 10000 倍希釈し、レポーター mRNA に抗体を室温で 30 分間結合させた。その後、wash buffer C (0.3% Tween 20 を溶かしたマレイン酸 buffer) で二度洗浄し、CDP Star (Roche) を反応基質として製造元の指示に従ってシグナルを検出した。

## 2-11. 共免疫沈降法

10cm 径の dish に 80% コンフルとなるように HEK293T 細胞を準備し、PBS(-) で洗浄し回収した後に TNE buffer (20mM Tris pH7.5、150mM NaCl、2mM EDTA、50mM NaF、1% NP-40) を 1mL 加えて細胞を回収し、氷上で 20 分間静置した後にボルテックスで破碎した。その後、10,000×g で 10 分間遠心し、上清を細胞抽出液とした。抗 CNOT3 抗体(参照 50)もしくは control Mouse IgG 抗体 1 μg 分を Dynabeads Protein G (Invitrogen) 10 μL にあらかじめ結合させ、そこへ細胞抽出液 500 μL を加えて、4°C で 2 時間反応させた。TNE buffer (20mM Tris pH7.5、150mM NaCl、2mM EDTA、50mM NaF、1% NP-40) で 5 回洗浄し、SDS sample buffer (50mM Tris pH6.8、2% SDS) で 70°C 10 分間溶出して SDS-PAGE sample とした。

## 2-12. Western Blotting 法に使用した抗体と希釈率

抗 FLAG ウサギポリクローナル抗体 (1:5000; Sigma)

抗 human Ago2 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; MBL)

抗 β-Actin マウスポリクローナル抗体 (1:5000; Abcam)

抗 CNOT1 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT3 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT6 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT6L マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT7 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT8 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT9 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT10 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

抗 CNOT11 マウスポリクローナル抗体 (1:2000; (参照 50))

## 2-13. CRISPR-Cas9 system によるノックアウト細胞の作成

参考文献 129 を参照し、pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene plasmid #62988) を BbsI で処理し、アニーリングした oligo DNA (リン酸化済み) とライゲーションした。gRNA の配列とオーバーハングを含む oligo DNA (センス鎖およびアンチセンス鎖) の配列は以下の通り。

得られたプラスミドを HEK293T にトランスフェクションし、24 時間後に puromycin を添加した培地 (最終濃度 1 $\mu$ g/mL) に継代した。puromycin 入りの培地で 48 時間培養した後、限界希釈法により単一クローンを取得し、培養後ストックした。得られたクローンの genome DNA の配列を確認し、目的遺伝子のノックアウトを確認した。

### human CNOT7

gRNA	Sense oligo	Antisense oligo
TTACAGGACACCGAGTTTCCAGG	CACCGTTACAGGACACCGAGTTTCC	AAACGGAAACTCGGTGTCCTGTAAC

### human CNOT8

gRNA	Sense oligo	Antisense oligo
GCCAGGTTATCTGTGAAGTGAAG	CACCGGCCAGGTTATCTGTGAAGTG	AAACCACTTCACAGATAACCTGGCC

## 第3章

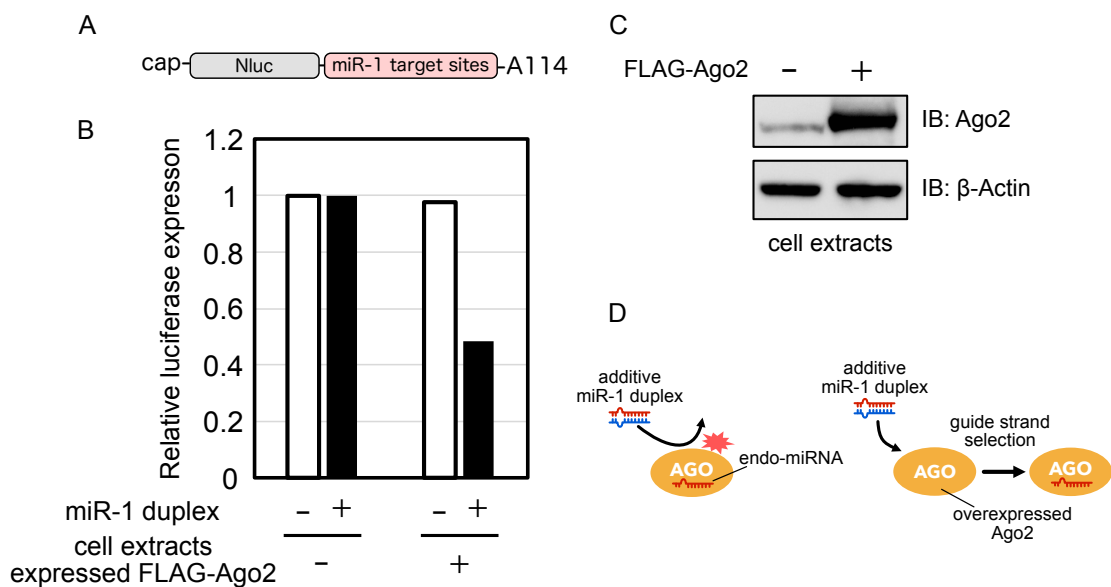
### 結果

#### 3-1. 脱アデニル化酵素 CNOT7, CNOT8 による poly(A)鎖分解

序論でも取り上げたように、哺乳動物細胞における CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化酵素 Caf1 には CNOT7 と CNOT8 という2つのパラログが存在する。これまでに CNOT7 と CNOT8 の機能に関して、大腸菌を用いて調製した組み換えタンパク質と RNA を試験管内で反応させることで、その機能が比較され、単純な脱アデニル化酵素活性には大きな違いはないと考えられている (86, 87)。また、CNOT7 と CNOT8 は全身の細胞に高レベルで発現しており、その発現パターンにも相関性がある。ヒト乳腺ガン細胞である MCF7 細胞を用いた研究で、CNOT7 および CNOT8 を RNAi によってそれぞれノックダウンしても、細胞中の mRNA の全長に有意な変化は観察されないことが報告されている (44)。一方で、近年 CNOT7 と CNOT8 をそれぞれノックアウトしたマウスの作成が試みられており、CNOT7 ノックアウトマウスが精子形成異常などのフェノタイプを示すのに対し、CNOT8 ノックアウトマウスは胎生致死となることが明らかとなった (47-50)。したがって、CNOT7 と CNOT8 は正常な個体を維持するために必要不可欠な因子であり、それぞれが脱アデニル化酵素として独立した役割を担っていると考えられるが、その分子基盤はほとんど明らかになっていなかった。CNOT7 と CNOT8 はサブユニット単体で機能するのではなく、CCR4-NOT 複合体の構成因子の一つとして RNA 結合タンパク質や miRNA-タンパク質複合体 (miRISC) に結合して巨大な分子集合体として標的 mRNA を選択的に分解していると考えられている (42)。したがって、その機能を詳細に解析するためには、高次複合体としての動態を解析できる系が必要であると考えた。そこで、HEK293T 細胞の細胞質抽出液を用いた *in vitro* 無細胞翻訳系を応用し、CCR4-NOT 複合体を介した poly(A)鎖の分解のモデルとして miRNA を介した poly(A)鎖の分解を観測できる系を構築し、CNOT7 と CNOT8 の複合体中での機能を検証した。

### 3-1-1. miRNA を介した脱アデニル化と翻訳抑制の試験管内再構成

CCR4-NOT 複合体を介した mRNA の脱アデニル化を検証するために、主に CCR4-NOT 複合体によって引き起こされていると考えられている、miRNA を介した脱アデニル化をモデルとして利用することにした (102, 104, 106, 108)。そこで、miRNA による脱アデニル化と翻訳抑制を、過去の報告を参考にして (89, 93, 94, 121, 124, 125)、*in vitro* 無細胞翻訳系を応用して生化学的に再構成した。まずは、HEK293T 細胞から得た細胞質抽出液に、代表的な miRNA のひとつである miR-1 を添加し、内在の Ago タンパク質に 37°C で取り込ませた。その後、レポーター mRNA を添加して翻訳反応を行い、luciferase 活性を測定した。レポーター mRNA には、ORF に NanoLuc (Promega) をコードする配列、3' UTR に miR-1 の標的配列を 6 個、そして 3' 末端に 114 塩基分のアデニン (A) からなる poly(A) 鎖をもつ RNA を *in vitro* で合成し、これを用いた (図 7A)。しかしながら、miR-1 存在下と非存在下でこのレポーター mRNA からの翻訳活性にほとんど変化が見られなかった (図 7B 左)。これは内在の Ago タンパク質が、すでに内在の miRNA と複合体を形成しており、試験管内で添加した miR-1 が内在の Ago タンパク質に十分に取り込まれていないことが原因では無いかと考えられたため、細胞中に Ago2 を過剰発現させることで解決を試みた。HEK293T 細胞に FLAG タグを付けた Ago2 を過剰発現させ、同様の実験を行なった結果、Ago2 を過剰発現させることで miR-1 依存的に翻訳が抑制されることが確認できた (図 7B 右)。



**図7. miR-1によるサイレンシングを観測するためにはFLAG-Ago2を過剰発現させる必要がある**

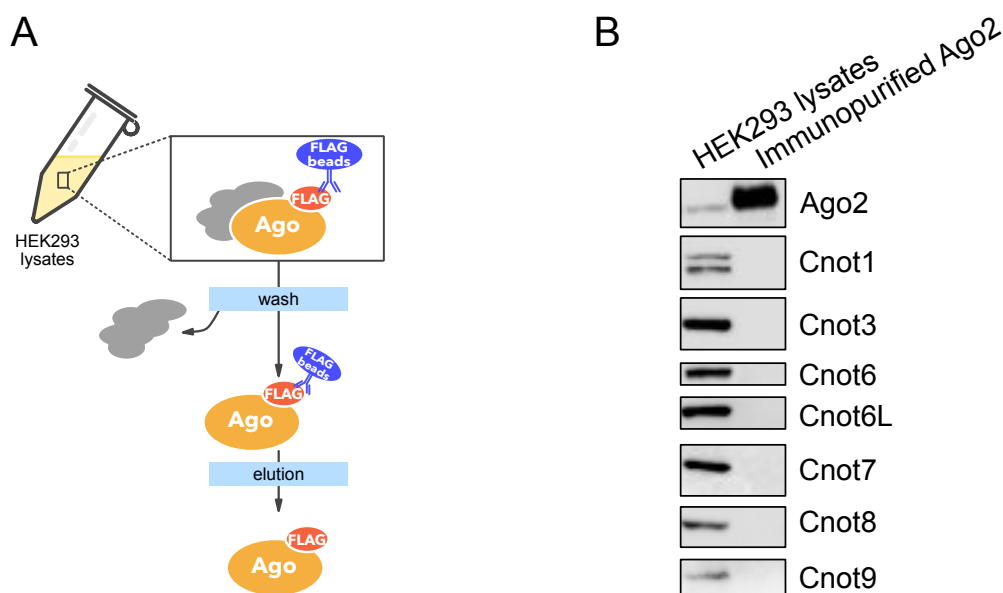
A. レポーターmRNAの模式図。このレポーターmRNAは、Nanoluc (Nluc) のORF、6個のタンデムなmiR-1標的配列、3'末端に114個のアデニンからなるpoly(A)鎖を持つ。

B. HEK293T細胞質抽出液にmiR-1を添加し、37°CでAgoタンパク質に取り込ませた後、レポーターmRNAを加え、翻訳反応を行なった。その後、測定したluciferase活性をグラフに示した。miR-1 duplexおよびFLAG-Ago2過剰発現細胞質抽出液を加えていない場合の値を1としたときの比を示している。FLAG-Ago2を過剰発現していない場合、miR-1を加えても翻訳活性に影響は見られないが、FLAG-Ago2を過剰発現した細胞質抽出液を加えると、miR-1の存在依存的に翻訳活性が低下した。

C. HEK293T細胞にFLAG-Ago2を過剰発現させ、Western Blotting法によりそれを検出した。

D. 内在のAgoタンパク質と過剰発現させたAgo2の違いを模式的に表した図。内在のAgoタンパク質はすでに内在miRNAを取り込んでいるため、miR-1を加えてもほとんど取り込まれず、内在のmiRNAを超える量のAgo2を過剰発現させることでmiR-1を取り込ませることができると考えられる。

本研究では、複数のノックアウト細胞を用いて miRNA を介した脱アデニル化・翻訳抑制を比較することを目標としているため、次に試験管内で細胞抽出液に Ago2 タンパク質のみを添加することで同様の実験が実現できないか検証した。そこで、図 7 で用いた、FLAG-Ago2 を過剰発現させた細胞質抽出液から Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (SIGMA) を用いて FLAG-Ago2 をアフィニティ精製し、抽出した FLAG-Ago2 を用いて同様の実験を行うことにした。こうして得られた Ago2 タンパク質は Western blotting 法および質量分析法によって解析し、CCR4-NOT 複合体の構成成分などが結合していないことを確認した (図 8)。



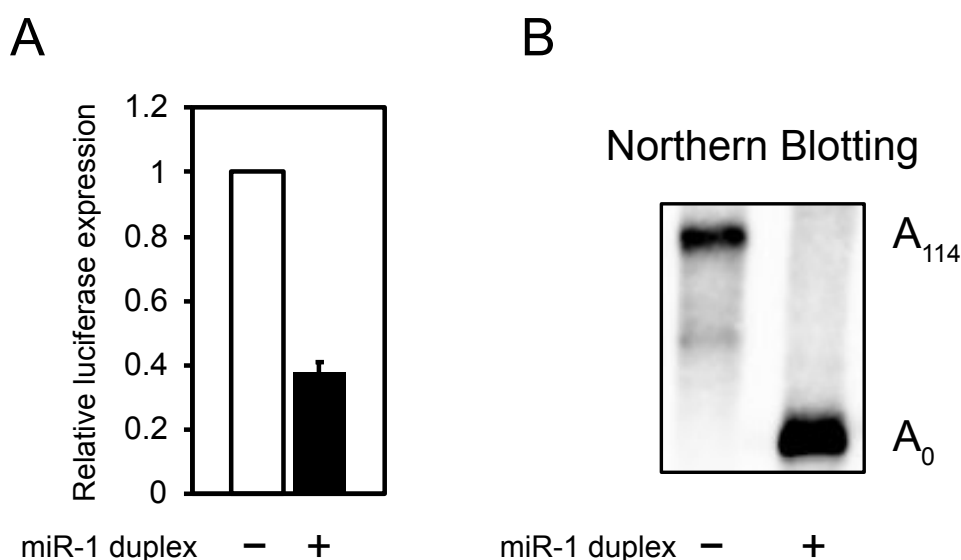
**図8. HEK293T細胞からのFLAG-Ago2のアフィニティ精製**

A. HEK293T細胞にFLAG-Ago2を過剰発現させ、その細胞質抽出液からAnti-FLAG M2 Magnetic Beadsを用いてアフィニティ精製した。

B. アフィニティ精製したAgo2タンパク質にCCR4-NOT複合体のサブユニットが含まれないことをWestern Blotting法によって確認した。

この Ago2 タンパク質を用いて、miRNA による翻訳抑制を観測することができるか検証した。HEK293T 細胞抽出液、miR-1、FLAG-Ago2 を混合し、Ago2 に miR-1 を取り込ませ、その後にレポーター mRNA を添加して翻訳反応を行った。luciferase 活性を測定した結果、miR-1 を添加した場合に翻訳が有意に抑制されている様子が観察された (図 9A)。

その反応液中から ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて total RNA を抽出し、poly(A)鎖の分解が検出できるように、ORF (Open Reading Frame) の下流に相補的な oligo DNA と RNase H を用いて断片化した。断片化した RNA は変性ゲルで電気泳動により展開し、Northern blotting 法により検出した。その結果、miR-1 の存在下で脱アデニル化が誘導され、poly(A)鎖が除かれた断片が蓄積している様子を検出することができた (図 9B)。この系を *in vitro* 脱アデニル化解析系 (図 10) とした。

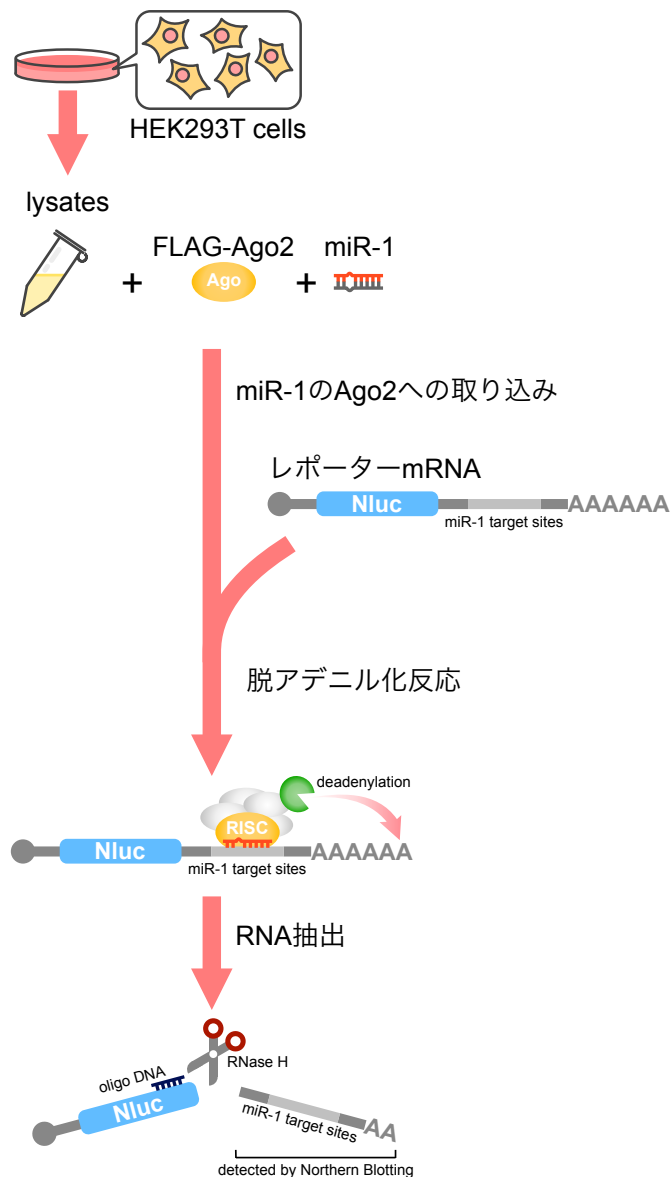


### 図9. HEK293T細胞からアフィニティ精製したFLAG-Ago2の活性

HEK293T細胞からアフィニティ精製したFLAG-Ago2が、miR-1 依存的なサイレンシングを行う活性を保持しているのかどうかを確認した。

A. HEK293T細胞抽出液、miR-1 duplex、アフィニティ精製したFLAG-Ago2を混合し、Ago2にmiR-1を取り込ませた。その後、レポーターmRNAを添加して翻訳反応を行い、miR-1 依存的に翻訳が抑制されていることを確認した。

B. 反応液中からRNAを抽出し、ORFの下流に相補的なoligo DNAとRNase Hによって断片化した。断片化したRNAは変性ゲルで電気泳動により展開し、Northern blotting法により検出した。これによりmiR-1 依存的にpoly(A)鎖が脱アデニル化されていることを確認した。



## 図10. *in vitro* 脱アデニル化解析系

HEK293T細胞抽出液、miR-1 duplex、アフィニティ精製したFLAG-Ago2を混合し、Ago2にmiR-1を取り込ませた。その後、レポーターmRNAを添加して翻訳反応を行い、反応液中からRNAを抽出した。poly(A)鎖の分解が検出できるように、ORFの下流に相補的なoligo DNAとRNase Hによって断片化した。断片化したRNAは変性ゲルで電気泳動により展開し、Northern blotting法により検出した。これにより細胞質中で翻訳と共役してmiRNA依存的に行われる脱アデニル化を試験管内で再現できるようになった。

また、翻訳開始因子が結合せずループ構造を形成していない mRNA は不安定であることが知られている (7)。したがって、本研究で用いた脱アデニル化解析系で観測された poly(A)鎖の分解が、miRISC によって呼び込まれた脱アデニル化酵素によるものではなく、miRISC によって翻訳が抑制されたことによって mRNA が不安定化されている結果である可能性は排除できない。これを確かめるため、5'末端に通常の cap 構造の代わりに ApppG (Acap) を付加したレポーター mRNA を作成した。Acap は翻訳開始因子 eIF4E によって認識されないことが知られている。実際に Acap を 5'末端に付加したレポーター mRNA を利用して翻訳状態を確認すると、通常の cap 構造を持つレポーター mRNA と比較して著しく翻訳活性が低く、また miR-1 を添加しても翻訳抑制が見られなかった (図 11A)。このレポーター mRNA の安定性を脱アデニル化解析系で確認すると、通常の cap 構造を持つレポーター mRNA と同様に miR-1 依存的に脱アデニル化が観測され、翻訳活性が著しく低い場合でも miRISC が形成されない場合は脱アデニル化が引き起こされていないことが確認できた (図 11B)。したがって、この脱アデニル化解析系では、miRISC 依存的な翻訳抑制および脱アデニル化をそれぞれ観測できると考えられる。

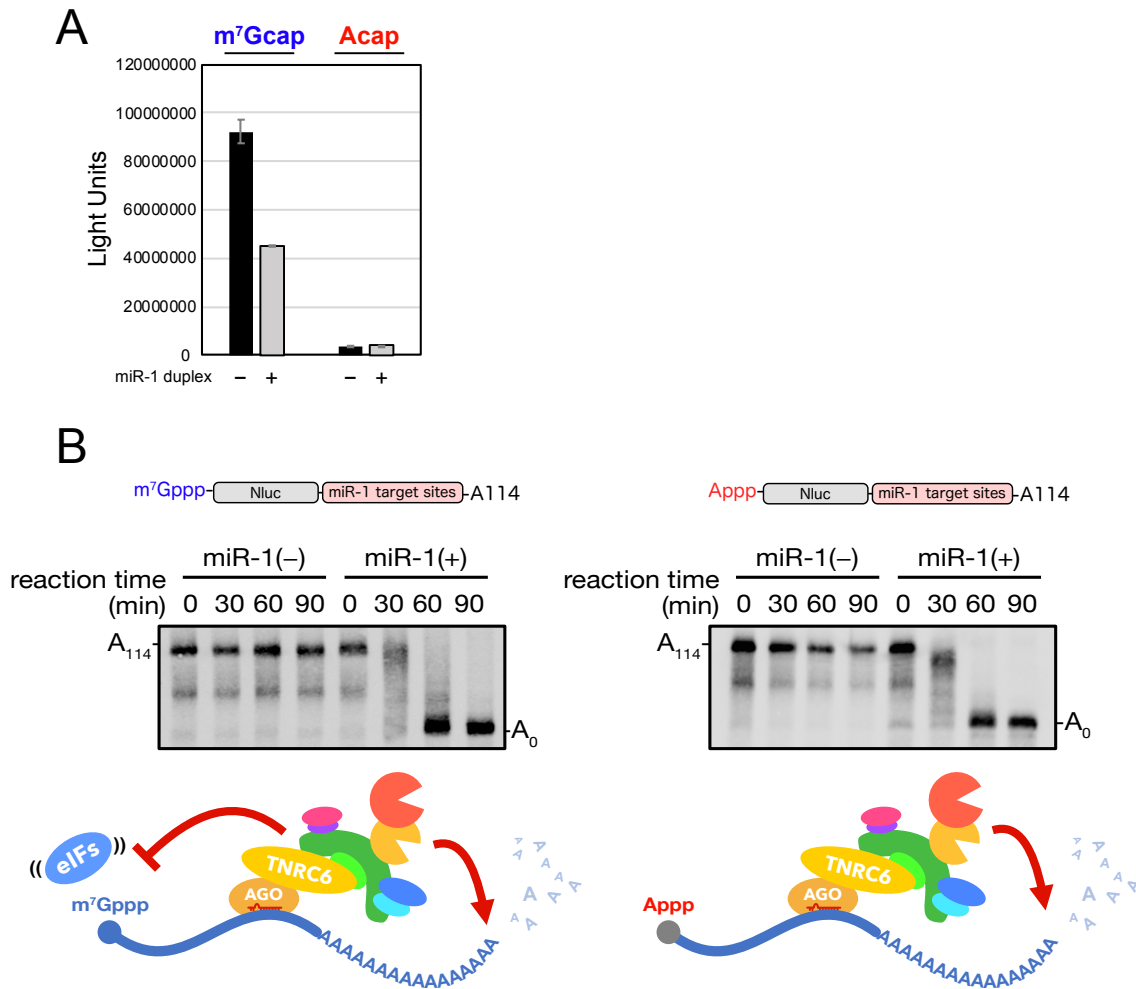


図11. 翻訳抑制が起こらない場合もmiRNAに依存して脱アデニル化が引き起こされる

A. m<sup>7</sup>GcapレポーターmRNAと比較して、AcapレポーターmRNAの翻訳効率是非常に低く、miRNAによる翻訳抑制も観測されなかった。

B. AcapレポーターmRNAを用いた場合もm<sup>7</sup>GcapレポーターmRNAと同様にmiRNAの存在に依存して脱アデニル化が観測された。

### 3-1-2. CNOT7、CNOT8 をノックアウトした HEK293T 細胞抽出液を用いた miRISC 依存的な脱アデニル化活性の検証

CNOT7 と CNOT8 が CCR4-NOT 複合体を介した脱アデニル化にどのように寄与しているのかを明らかにするため、*CNOT7* 遺伝子と *CNOT8* 遺伝子をそれぞれノックアウトした HEK293T 細胞を用いて、*in vitro* 脱アデニル化解析系で poly(A)鎖分解の効率を比較することにした。

まずはじめに、CRISPR-Cas9 システムを利用して *CNOT7* ノックアウト HEK293T 細胞と *CNOT8* ノックアウト HEK293T 細胞を作成した (図 12)。そして、このノックアウト細胞の細胞質抽出液を用い、*in vitro* 脱アデニル化解析系で poly(A)鎖分解能を比較した。その結果、コントロールの野生型 HEK293T 細胞抽出液では 60 分間反応

させた時点で脱アデニル化が完了し、完全に poly(A)鎖が分解された状態になっている (図 13A) のに対し、*CNOT7* をノックアウトした場合には脱アデニル化の効率が悪くなり、60 分間反応時点では完全に分解された mRNA はほとんど検出されず、90 分間反応後によりやく反応が完了した mRNA が検出できた (図 13B)。一方で、*CNOT8* をノックアウトした場合、コントロール細胞と同じ効率で脱アデニル化が進行し、60 分反応時点で脱アデニル化が完了した (図 13C)。

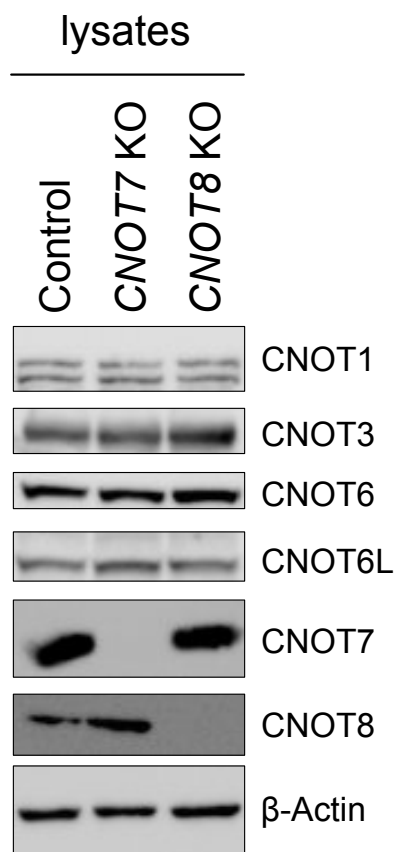
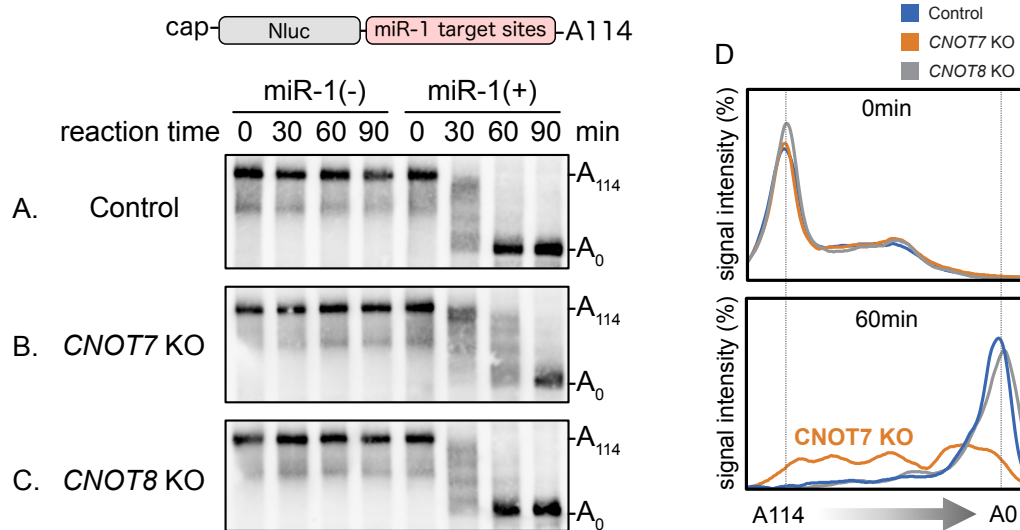


図12. *CNOT7*、*CNOT8*遺伝子ノックアウト細胞におけるCCR4-NOT複合体 CRISPR-Cas9法で*CNOT7*もしくは*CNOT8*遺伝子をノックアウトした HEK293T細胞にそれぞれ*CNOT7*、*CNOT8*が発現していないことを Western Blotting法で確認した。



**図13. CNOT7、CNOT8ノックアウト細胞抽出液の脱アデニル化活性**

CNOT7 KO細胞、CNOT8 KO細胞の細胞質抽出液を用いてin vitro 脱アデニル化評価系で脱アデニル化活性を検証した。

A. コントロールとして野生型のHEK293T細胞を用いた。60分の反応でほぼ完全に脱アデニル化が完了していることが確認できた。

B. CNOT7 KO細胞を用いた。コントロール細胞の場合と比較して脱アデニル化の速度が遅く、60分反応しても脱アデニル化が完了せず、90分後ようやく完全に分解した産物が検出され始めた。

C. CNOT8 KO細胞を用いた。コントロール細胞の場合とほとんど変化せず、60分でほぼ完全に脱アデニル化が完了した。

D. 反応前（0分）と反応開始後60分時点での、(A)、(B)、(C)それぞれのmiR-1(+ )のデータを定量化したグラフ。

次に *CNOT7* をノックアウトした細胞抽出液で観測された脱アデニル化の阻害が、*CNOT7* が欠乏したことが原因であることを確かめるために、*CNOT7* ノックアウト細胞に *CNOT7* もしくは *CNOT8* を一過的に過剰発現させ、その細胞抽出液を用いて同様の実験を行った。その結果、コントロールとして GFP を過剰発現させた細胞抽出液と比較して、*CNOT7* を過剰発現した細胞抽出液で脱アデニル化が効率的に進行していることが明らかになった (図 14A, B, D)。一方で、*CNOT8* を過剰発現した細胞抽出液では脱アデニル化は促進されず、むしろやや阻害された (図 14C, D)。したがって、miRNA によって誘導される CCR4-NOT 複合体を介した脱アデニル化において、必要不可欠であり、*CNOT8* では *CNOT7* の機能を補完できないことが明らかになった。

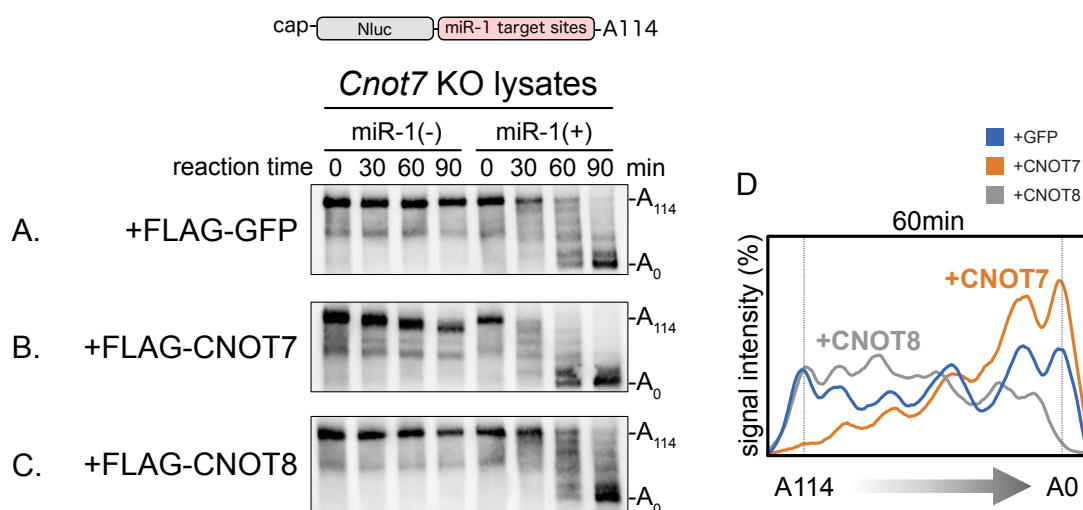
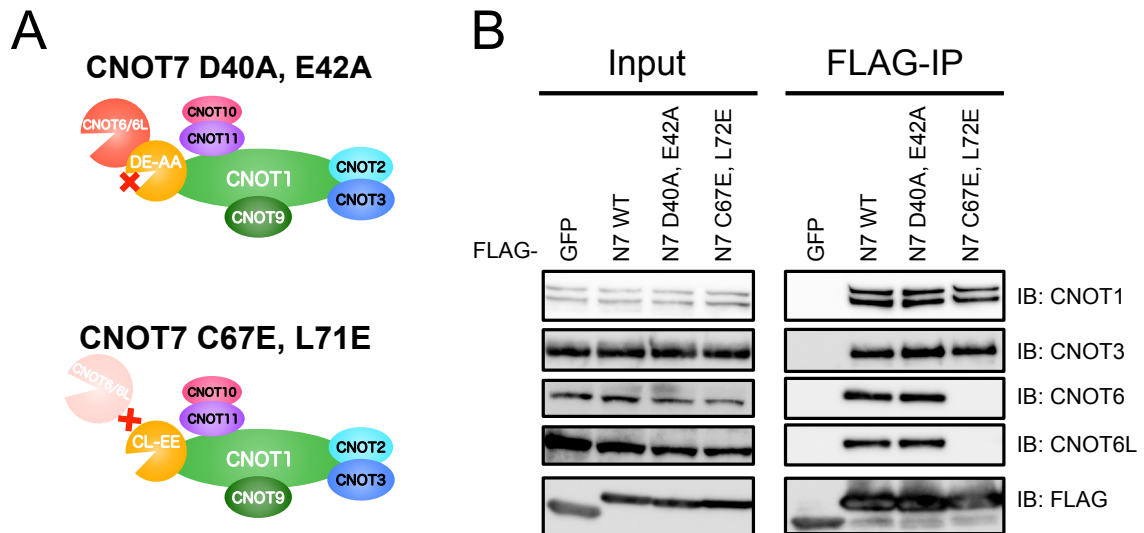


図14. *CNOT7* ノックアウト細胞抽出液の脱アデニル化活性は *CNOT7* 過剰発現で改善する

*CNOT7* KO細胞にA. FLAG-GFP (コントロール)、B. FLAG-CNOT7、C. FLAG-CNOT8をそれぞれ過剰発現させ、*in vitro* 脱アデニル化評価系で脱アデニル化活性を検証した。*CNOT7* を過剰発現させたBでは脱アデニル化の速度が改善し、30分時点で全長残っているpoly(A)がほとんどなくなり、60分時点で完全に分解されているpoly(A)鎖が増え始めていることが確認できた。

### 3-1-3. CNOT7-CNOT6/6L ヘテロダイマーの形成が脱アデニル化活性に重要である

当研究室を含む複数の研究機関のこれまでの研究で、CAF1 が効率よく脱アデニル化反応を起こすには、CCR4 とヘテロダイマーを形成することが重要であることが明らかにされている (74, 89-91)。本研究で用いた *in vitro* 脱アデニル化解析系でも CNOT7 が CNOT6/6L とヘテロダイマーを形成することが脱アデニル化に重要であるかを検証するため、CNOT7 の変異体を利用して実験を行った。具体的には CNOT7 自体の脱アデニル化活性の重要性を検証するためには脱アデニル化酵素の活性中心に変異を入れた CNOT7 (D40A, E42A) (87, 89, 92) を使用し、CNOT7-CNOT6/6L ヘテロダイマーが形成できない場合の脱アデニル化活性を検証するためには CNOT6/6L との結合部位に変異を入れた CNOT7 (C67E, L71E) (34, 92) を用いた (図 15A)。まずはこれらの CNOT7 変異体の CNOT1 および CNOT6/6L への結合性を共免疫沈降実験により確認した。FLAG タグを付加した各 CNOT7 を CNOT7 ノックアウト細胞に発現させ、anti-FLAG affinity gel によって共免疫沈降を行い、Western Blotting 法で CCR4-NOT 複合体の各サブユニットを検出した。脱アデニル化活性を欠失した CNOT7 (D40A, E42A) が CNOT1, CNOT6/6L と結合できるのに対して、CNOT6/6L との結合領域に変異を入れた CNOT7 (C67E, L71E) は CNOT1/CNOT3 とは結合できるが CNOT6/6L とは結合できないことを確認した (図 15B)。



**図15. 2種類のCNOT7変異体のCNOT1、CNOT6/6Lとの結合性**

2種類のCNOT7変異体を作成し、CNOT1、CNOT6/6L等との結合性を確認した。

A. 今回使用したCNOT7変異体。D40A, D42Aは脱アデニル化活性を欠失しており、C67E, L72EはCNOT6/6Lと結合できない。

B. FLAG-CNOT7（野生型、各変異体）を過剰発現させたHEK293T細胞を破碎して、anti-FLAG M2 beadsを用いた共免疫沈降法によって、各CNOT7と相互作用している因子を同定した。D40A, D42A変異体は野生型と同様にCNOT1/3/6/6Lのいずれも検出でき、C67E, L72E変異体はCNOT1/3のみ検出できた。

これらの変異体をそれぞれ *CNOT7* ノックアウト細胞に一過的に過剰発現させ、*in vitro* 脱アデニル化解析系を用いて、脱アデニル化活性への影響を観察した。その結果、いずれの変異体も *CNOT7* ノックアウト細胞抽出液の脱アデニル化活性を促進することはできず、むしろ阻害的に作用することが明らかとなった (図 16)。したがって、miRNA 依存的な脱アデニル化において、*CNOT7* もしくは *CNOT6/6L* のみの酵素活性では効率よく poly(A)鎖を分解することはできず、*CNOT7* と *CNOT6/6L* が相互作用し、かつ酵素活性を有している場合にのみ脱アデニル化が効率よく行われることを示すことができた。

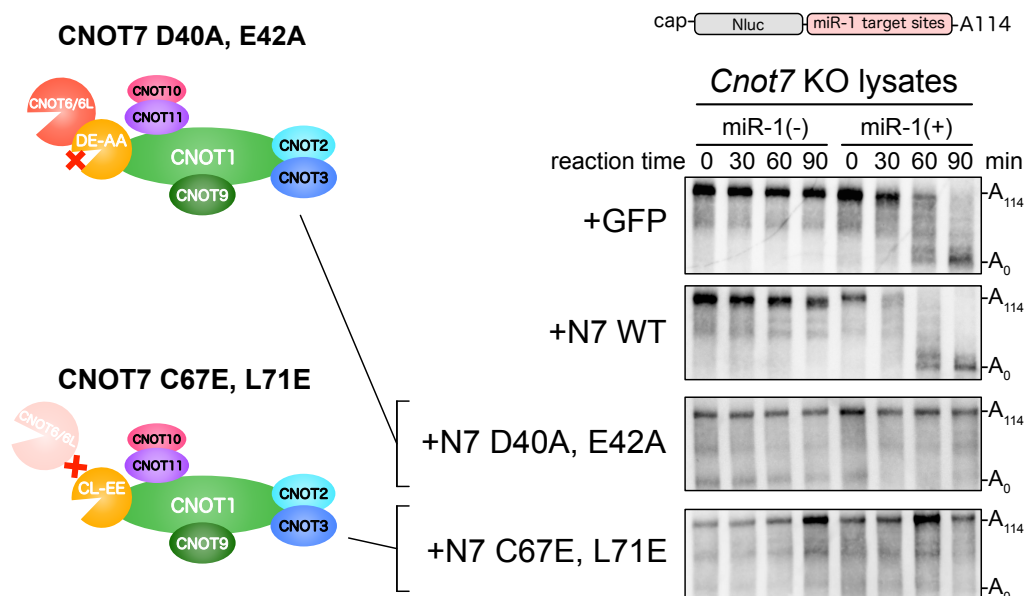


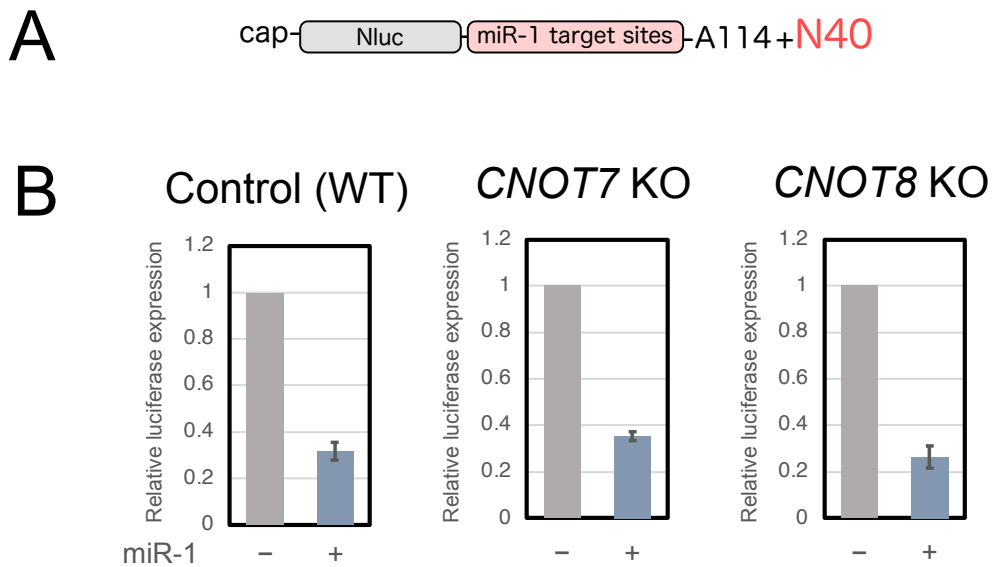
図16. *CNOT7*変異体は脱アデニル化に対して阻害的に働く

*CNOT7* KO細胞に各*CNOT7*変異体を過剰発現させて、脱アデニル化活性を検証した。野生型の*CNOT7*が脱アデニル化活性に対して促進的に影響するのに対して、*CNOT7*変異体を発現させた場合は脱アデニル化が完全に起こらなくなり、いずれも阻害的にはたらくことが明らかになった。

### 3-1-4. miRNA 依存的な翻訳抑制への CNOT7 と CNOT8 の寄与

miRNA は脱アデニル化とそれに続く mRNA 分解とは別に、翻訳開始複合体の不安定化を引き起こすことで "純粋な" 翻訳抑制を引き起こすことが知られている (17-22, 93, 94) (図 4)。miRNA が翻訳開始複合体の不安定化を引き起こすメカニズムには様々な仮説が存在する (35-37, 95-99) が、未だに翻訳開始複合体の不安定化を引き起こす因子の同定には至っていない。一方でアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた解析で、Caf1 (CNOT7 および CNOT8) が poly(A)鎖の分解に依存しない方法で翻訳を抑制することが知られている (86)。したがって miRNA によって引き起こされる翻訳抑制も、miRISC にリクルートされた CCR4-NOT 複合体中の CNOT7 もしくは CNOT8 が関与している可能性がある。また、ここまでの検証で CNOT7 が miRNA による脱アデニル化において重要であることを示したが、CNOT7 をノックアウトすることで miRNA を介した翻訳抑制が阻害されていた場合、それが原因で脱アデニル化の効率が下がっている可能性もある。そこで、CNOT7 もしくは CNOT8 をノックアウトした細胞抽出液を利用して miRNA を介した翻訳抑制を検証した。

当研究室のこれまでの研究で poly(A)鎖の下流にランダムな塩基を付加しておくことで、脱アデニル化を阻害できることが明らかになっている。そのため、脱アデニル化に依存しない純粋な翻訳抑制を観測するために、*in vitro* 脱アデニル化検証系で用いたレポーター mRNA の 3'末端にランダムな 40 塩基を付加したものを新たに合成し、脱アデニル化から保護した (図 17A)。細胞質抽出液 (コントロール、CNOT7 ノックアウト、CNOT8 ノックアウトの 3 種類) 内で精製 Ago2 に miR-1 をロードし、その後この脱アデニル化保護レポーター mRNA を加え、翻訳反応後に luciferase 活性を測定することで、脱アデニル化に依存しない純粋な翻訳抑制を検証した。その結果、CNOT7 もしくは CNOT8 をノックアウトしても miRNA 依存的な翻訳抑制に有意な差は見られなかった (図 17B)。したがって、miRNA 依存的な翻訳抑制機能への CNOT7、CNOT8 の寄与は小さいか、もしくは脱アデニル化とは異なり CNOT7 もしくは CNOT8 のどちらかが存在すれば十分であるということが明らかになった。また、CNOT7 をノックアウトした時に見られた脱アデニル化効率の低下は、翻訳抑制の効率とは独立した現象であることが明らかになった。



**図17. CNOT7、CNOT8はmiRNA依存的な翻訳抑制には関与していない。**

A. 脱アデニル化とは独立した翻訳抑制を検証するために用いたレポーターmRNAの模式図。これまで用いてきたレポーターmRNAの3'末端にランダムな40塩基を追加することで、脱アデニル化からpoly(A)鎖を保護している。

B. CNOT7 KO細胞とCNOT7 KO細胞の細胞質抽出液に、miR-1 duplexとFLAG-Ago2を添加し、37°CでAgoタンパク質に取り込ませた後、poly(A)鎖保護レポーターmRNAを加え、30分間翻訳反応を行なった。その後、測定したluciferase活性をグラフに示した。miR-1 duplexを加えていない場合の値を1としたときの比を示している。miR-1による翻訳抑制はコントロールの野生型細胞とCNOT7 KO細胞とCNOT7 KO細胞で有意な差は見られなかった (n=3)。

### 3-1-5. ARE 結合タンパク質 ZFP36L1 を介した脱アデニル化においても CNOT7-NOT 複合体が重要である

ここまでの検証では、miRISC (特に miR-1) を介した脱アデニル化への CNOT7 と CNOT8 の寄与を検証してきた。そこで次に、miRISC 以外のマシナリーでも同様の結果が得られるのかどうかを、ARE 結合タンパク質のひとつである ZFP36L1 を用いて検証した。ZFP36L1 は CNOT1 と直接相互作用することにより、CCR4-NOT 複合体を介して脱アデニル化を引き起こすことが明らかにされている (85)。まずは、大腸菌から精製した ZFP36L1 の組換えタンパク質 (図 18A) と ZFP36L1 の標的配列である IL6 mRNA の 3'UTR を付加したレポーター mRNA を用いて *in vitro* 脱アデニル化検証系を構築した (図 18B)。

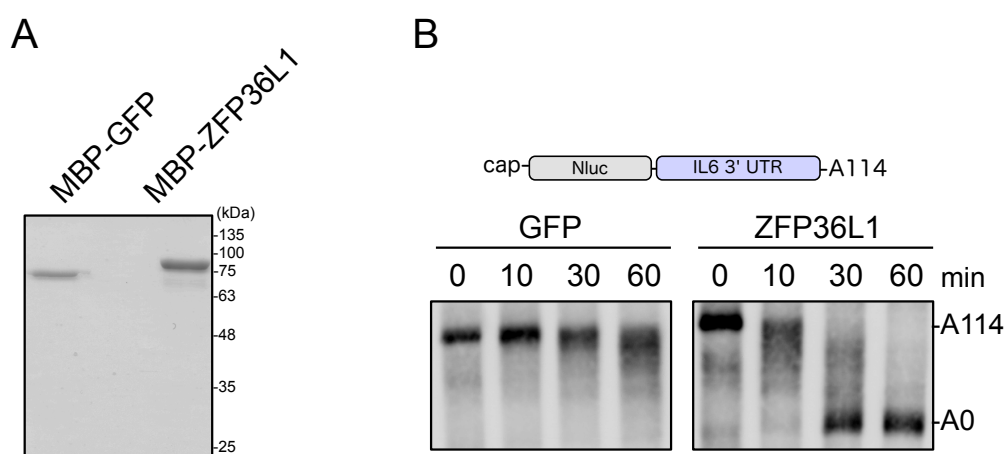
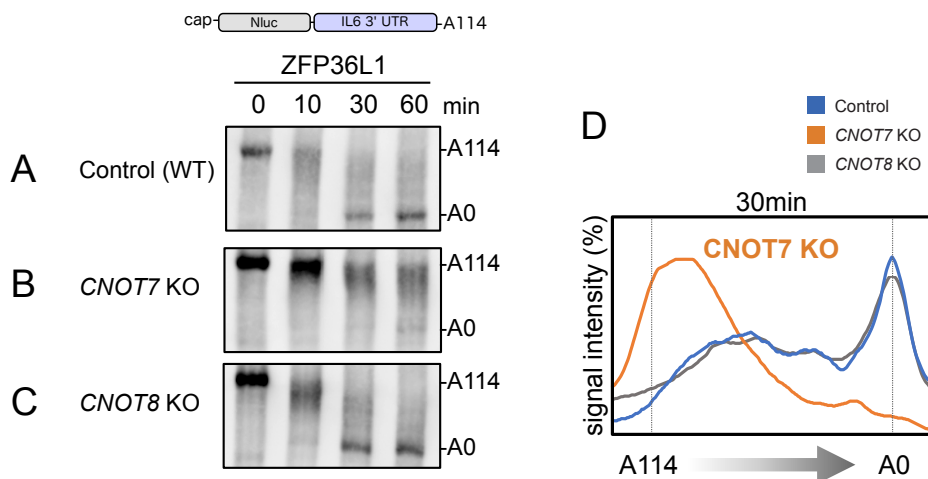


図18. ZFP36L1を介した脱アデニル化検証系

A. 大腸菌から精製したMBP-GFPとMBP-ZFP36L1のCBB染色。

B. ZFP36L1存在下でIL6 3'UTRを持つレポーターmRNAの脱アデニル化が確認できた。

この実験系を利用して CNOT7 KO 細胞抽出液と CNOT8 KO 細胞抽出液を用いた場合に ZFP36L1 を介した脱アデニル化活性に変化が見られるかどうかを検証した。その結果、miRISC の場合と同様に ZFP36L1 を介した脱アデニル化も CNOT7 をノックアウトした細胞抽出液を用いた場合にコントロールと比較して阻害されていることが明らかになった (図 19A, B)。また、こちらも miRISC の時と同様に CNOT8 のノックアウトは脱アデニル化活性にほとんど影響を及ぼさなかった (図 19C)。また、miRISC を用いた場合と比較して CNOT7 の KO によって脱アデニル化がより強く阻害されていた (図 19D)。したがって、ZFP36L1 を介した脱アデニル化も miRISC と同様に CNOT7-NOT 複合体に依存していることが明らかになった。



**図19. ZFP36L1を介した脱アデニル化にもCNOT7-NOT複合体が大きく寄与している**

CNOT7 KO細胞、CNOT8 KO細胞の細胞質抽出液を用いてZFP36L1を介した脱アデニル化活性を検証した。

- A. コントロールとして野生型のHEK293T細胞抽出液を用いた。反応開始後30分時点でほぼ完全に脱アデニル化が完了していることが確認できた。
- B. CNOT7 KO細胞抽出液を用いた。コントロールと比較して脱アデニル化の速度が遅く、60分反応しても脱アデニル化が完了しなかった。
- C. CNOT8 KO細胞抽出液を用いた。コントロール細胞の場合とほとんど変化せず、30分でほぼ完全に脱アデニル化が完了した。
- D. 反応開始後30分時点での、(A)、(B)、(C)それぞれのデータを定量化したグラフ。

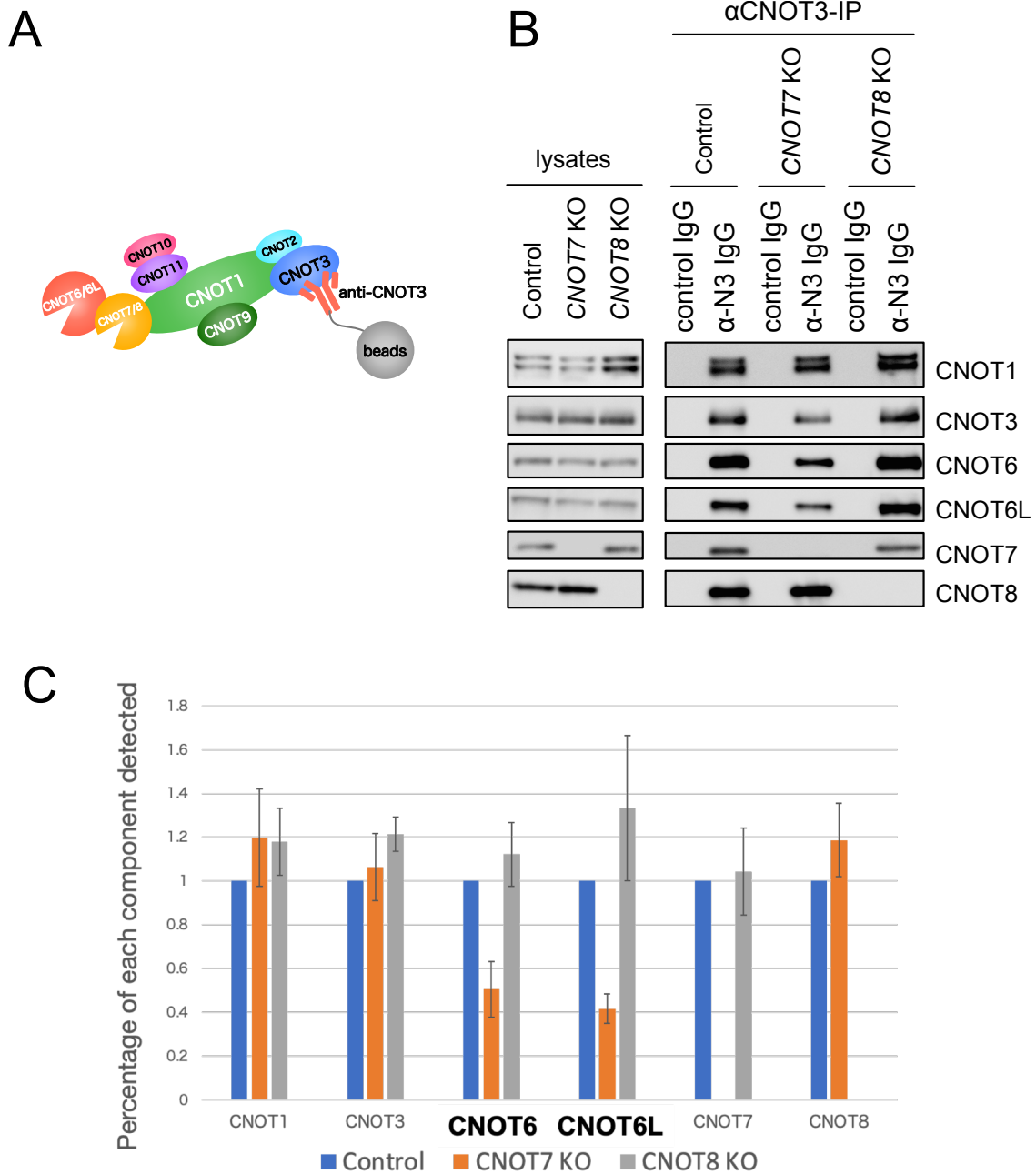
## 3-2. CCR4-NOT 複合体の構成

ここまで、miRNA を介した脱アデニル化において、ヒトの CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化酵素サブユニットである CNOT7 と CNOT8 の寄与が異なっていることを示してきた。また、CNOT7 が CNOT6/6L と機能的なヘテロダイマーを形成できる状態であることが脱アデニル化を引き起こすために重要であることを示した。これらの結果から、CNOT8 を含む複合体を介した脱アデニル化の効率が低いのは、CNOT7-NOT 複合体と CNOT8-NOT 複合体とで CNOT6/6L をはじめとする他のサブユニットとの親和性が異なることが原因ではないかと仮説を立てた。この章では CNOT7 および CNOT8 が結合している複合体の構成因子の違いや安定性を比較することで、前章のような機能的差異が見られた原因を検証することを目的とする。

### 3-2-1. 共免疫沈降法による CCR4-NOT 複合体の構成因子の検出

まずは、共免疫沈降法で CCR4-NOT 複合体を解析することを試みた。はじめに Ago タンパク質を免疫沈降法で回収し、そこに存在する CCR4-NOT 複合体を解析することを試みたが、Ago タンパク質と CCR4-NOT 複合体は非常に大きな TNRC6 タンパク質との相互作用を介して結合しており、酵素サブユニットまで検出するのは実験技術の都合上非常に難しかった。また、CCR4-NOT 複合体の中心である CNOT1 は、免疫沈降法に使用できる抗体がなく、さらにその問題が解決したとしても CNOT1-CNOT7、CNOT1-CNOT8 など機能的な複合体ではない二量体などを同時に検出してしまう可能性があったため、こちらを利用することも控えた。そこで実験技術的に解析可能でかつ、脱アデニル化酵素複合体として機能的な CCR4-NOT を回収する方法として、文献 129, 130 を参考に CNOT3 に対する抗体を用いて共免疫沈降することにした。CCR4-NOT 複合体の構成因子の中で CNOT3 は複合体全体の安定性に寄与していると考えられ、CNOT3 の欠乏は CCR4-NOT 複合体の形成不全と機能不全を引き起こすことが明らかにされている。したがって、共免疫沈降法を用いて CNOT3 と結合する因子を検出することで、機能的な CCR4-NOT 複合体の構成因子を同定することができると考えられる。この手法を用いて、

*CNOT7*および *CNOT8*をノックアウトした場合に、CCR4-NOT 複合体の安定性や構成因子に変化が生じていないか検証することにした。*CNOT7* および *CNOT8* をノックアウトした細胞とコントロールの細胞とを破碎し、その細胞抽出液を用いて抗 *CNOT3* 抗体によって免疫沈降し、CCR4-NOT 複合体の各サブユニットを検出した。その結果、*CNOT7*をノックアウトした場合に、CCR4-NOT 複合体中の *CNOT6* と *CNOT6L* の存在量が減少していることが明らかになった (図 20)。一方で *CNOT8* をノックアウトした場合、CCR4-NOT 複合体中の *CNOT6* と *CNOT6L* の存在量はコントロール細胞と差が見られなかった (図 20)。したがって、*CNOT6/6L* は *CNOT7* の存在下でより安定して複合体に結合できると考えられる。



**図20. CNOT7をノックアウトするとCNOT3-IPで検出できるCNOT6/6Lが減少する**

A. CNOT3-IPの模式図。

B. CNOT3の抗体を用いて、CNOT7 KO細胞、CNOT8 KO細胞の細胞質抽出液中のCCR4-NOT複合体のサブユニットを共免疫沈降法で検出した。

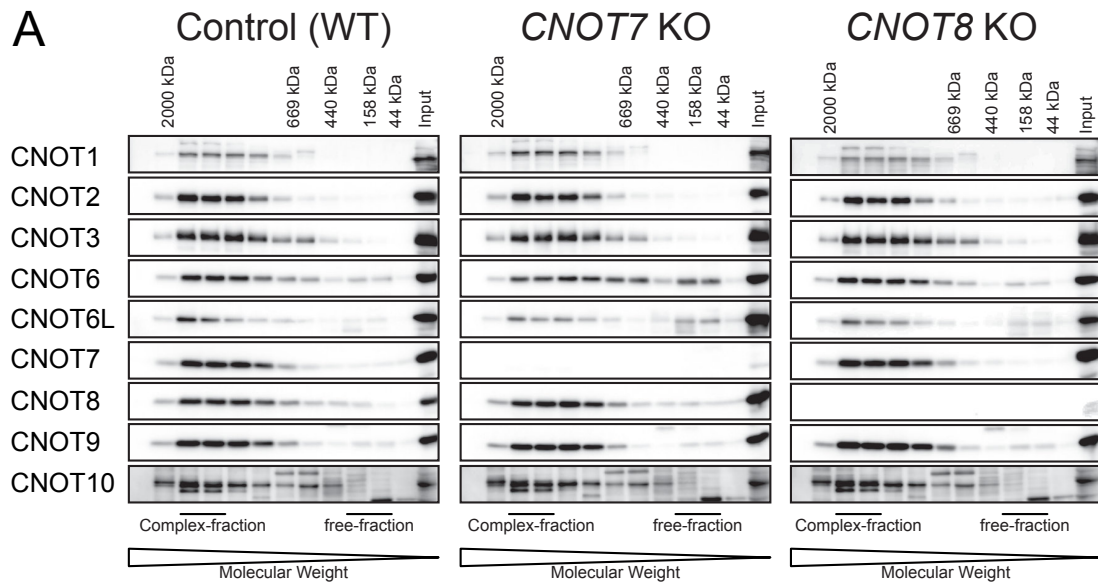
C. Bのバンド強度をそれぞれ定量し、それぞれControlの値を1として相対費を計算し、グラフにした。CNOT7 KO細胞で検出できるCNOT6/6Lが有意に減少していた。

### 3-2-3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる CCR4-NOT 複合体の構成因子の検出

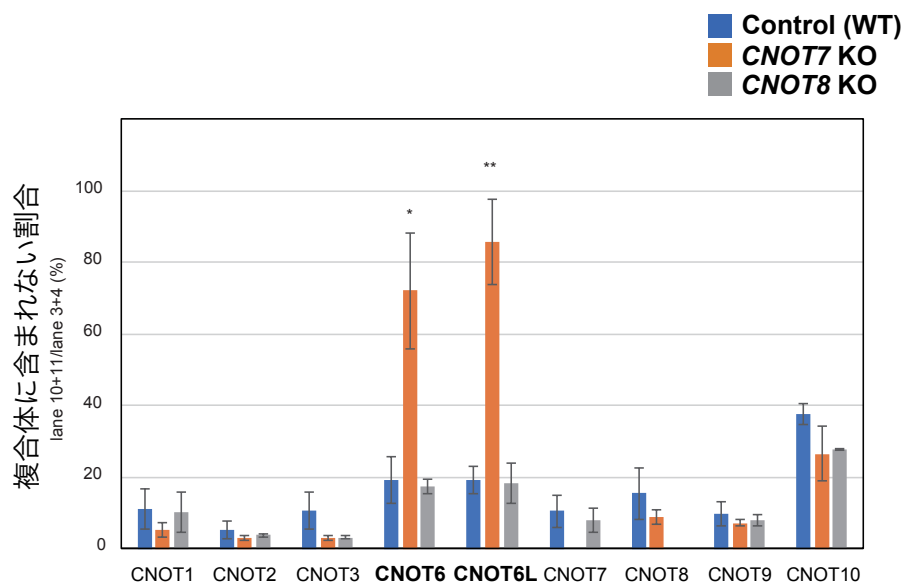
3-2-2 の共免疫沈降法で検出したのはあくまで CNOT3 を含む複合体の構成因子である。そこで複合体全体を別の手法を用いて再度確認し、*CNOT7* をノックアウトしたときに複合体中から CNOT6/6L が減少していることを確かめることにした。

そこで、文献 42 を参考にして HEK293T 細胞抽出液をゲルろ過クロマトグラフィーによって各因子の存在している複合体の分子量に基づいて展開し、それを Western blotting 法で検出することで、各構成因子の内、複合体中に存在するものと複合体に結合していないものをそれぞれ検出した (図 21A)。CCR4-NOT 複合体はおおよそ 1-2 MDa の大きさの複合体であると考えられている。実際にコントロール細胞でゲルろ過クロマトグラフィー法を用いて検証してみると、1-2MDa の分画に CCR4-NOT 複合体の構成因子のほとんどが存在していた。これと同様の実験を *CNOT7* ノックアウト細胞でも行ったところ、*CNOT7* をノックアウトした場合にのみ、40-200kDa の分子量の小さな分画に存在する CNOT6/6L の量が増加していることが確認できた。一方で、*CNOT8* ノックアウト細胞でこの実験を行ったところ、CNOT6/6L の存在する分画に大きな変化は見られなかった。

このデータをもとに、複合体になっている分画 (lane10+11) と複合体に含まれていない分画 (lane3+4) のバンド強度を定量してその比を算出した (図 21B)。その結果からも *CNOT7* をノックアウトしたときに複合体に含まれない CNOT6/6L の割合が有意に増加していることを示すことができた。また、その他の構成因子に関しては *CNOT7* をノックアウトしても有意な変化は見られなかった。したがって、この検証によっても CNOT6/6L が *CNOT7* の存在下でより安定して複合体に結合できることが示唆された。



**B**



**図21. *CNOT7*をノックアウトすると複合体に含まれない*CNOT6/6L*が増加した**

A. *CNOT7*ノックアウト細胞、*CNOT8*ノックアウト細胞の細胞質抽出液をゲルろ過クロマトグラフィーで分画し、Western BlottingでCCR4-NOT複合体の成分を検出した。1-2MDaの画分に含まれているのが、複合体を形成している成分であると考えられる。

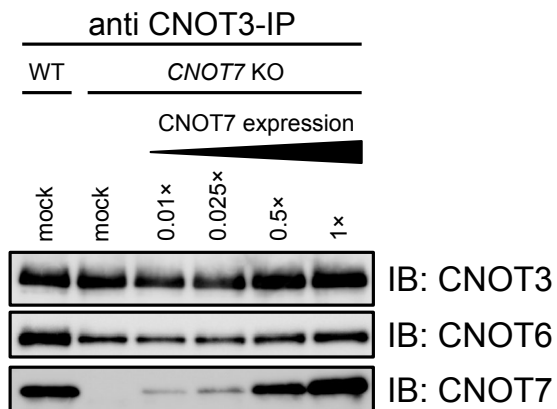
B. 複合体を形成しているlane10, 11と複合体に含まれていないlane3, 4のバンド強度の比を取り、グラフに表した。*CNOT7*をノックアウトした細胞で複合体に含まれない*CNOT6/6L*が有意に増加していた。

### 3-2-3. CNOT7 の発現により複合体中の CNOT6 は増加する

3-2-1 および 3-2-2 の検証によって、細胞質中に CNOT7 が存在しない場合、複合体中から CNOT6/6L が減少し、CCR4-NOT 複合体中に含まれない「フリー」の CNOT6/6L が増加していることを明らかにした。また 3-1-2 での *in vitro* 脱アデニル化解析系を利用した検証において、*CNOT7* ノックアウト細胞に一過的に CNOT7 を過剰発現させると、脱アデニル化活性が一部回復することを示した。そこで、*CNOT7* ノックアウト細胞に CNOT7 を一過的に過剰発現させた際に、複合体中に結合している CNOT6 の量が増加しているのかどうかを検証した。3-1-2 と同様に、*CNOT7* ノックアウト細胞に FLAG-CNOT7 を発現させ、その細胞抽出液を用いて CNOT3 の抗体を用いた共免疫沈降を行い、CNOT6 を検出した。CNOT7 の発現量に従って CNOT6 の量が増加することを確かめるために、*CNOT7* ノックアウト細胞にトランスフェクションする際のプラスミド DNA の量を 3-1-2、3-1-3 で使用した量の 0.01 倍量から 1 倍まで 4 パターン用意した。その結果、CNOT7 の発現量が増えるにつれて、複合体中の CNOT6 の量が増加していくことが明らかになった (図 22)。この結果は 3-1-2 と 3-2-1, 2 の結果とも整合性が取れるものであり、CCR4-NOT 複合体中の CNOT7-CNOT6 ヘテロダイマー形成の重要性を示し

ている。

A



B

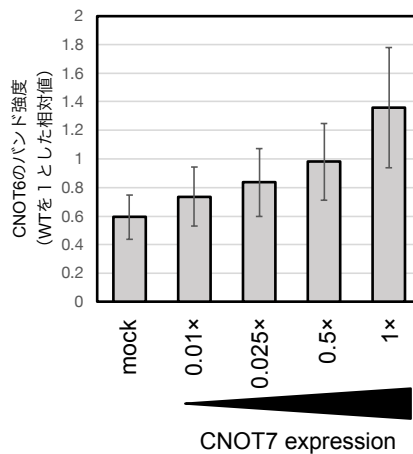


図22. *CNOT7*ノックアウト細胞に*CNOT7*の発現させると複合体中の*CNOT6*が増加した

- A. *CNOT7*ノックアウト細胞にFLAG-*CNOT7*を過剰発現させ、*CNOT3*の抗体で共免疫沈降を行い、Western Blottingで*CNOT6*を検出した。
- B. *CNOT6*のバンド強度を定量し、コントロール細胞でのデータを1としてグラフにした。*CNOT7*の発現が増加するとともに複合体中の*CNOT6*が増加していた。

## 第 4 章

### 総合考察

本研究では、miRISC および ARE 結合タンパク質 ZFP36L1 を介した脱アデニル化をモデルとして、CCR4-NOT 複合体が翻訳中の標的 mRNA 上にリクルートされ、poly(A)鎖を分解していく過程を解析してきた。この解析によって、脱アデニル化酵素として同等の機能を持つと考えられてきた CNOT7 と CNOT8 が、CCR4-NOT 複合体として機能する際には異なる挙動を示すことを明らかにした (第 3 章 3-1)。また、CNOT7, 8 をそれぞれ構成因子として持つ CCR4-NOT 複合体を比較し、それぞれの複合体でもうひとつの脱アデニル化酵素サブユニットである CNOT6/6L との関係性が異なることを示した (第 3 章 3-2)。最後にこれらの結果から考えられる CNOT7 と CNOT8 の使い分けやそれによって実現される翻訳制御と共役した mRNA の安定性制御モデルについて考察したい。

#### 4-1. CCR4-NOT 複合体における CNOT7 と CNOT8 の役割

図 13, 19 において、少なくとも miR-1 および ZFP36L1 を介した脱アデニル化に関しては、CNOT7-NOT 複合体が主要な脱アデニル化酵素として機能しており、CNOT8-NOT 複合体の寄与は CNOT7 と比較して小さいということを示した。さらに CNOT7 の各種変異体を用いた検証によって、CNOT7 が複合体中で脱アデニル化酵素として機能を発揮するためには CNOT6/6L とのヘテロダイマーを形成していることが重要であることを示した (図 16)。これまでも当研究室も含む複数の研究機関の研究で、CAF1 (CNOT7/8) と CCR4 (CNOT6/6L) が両方存在することで互いに協調して脱アデニル化を引き起こすことが、主に組換えタンパク質を用いた *in vitro* の実験によって明らかにされている (74, 89-91)。また近年、CNOT7 が PABP の結合していない poly(A)鎖、CNOT6L が PABP の結合している poly(A)鎖をそれぞれ選択的に分解することで、poly(A)鎖全体を速やかに効率よく分解していることが複数の研究機関によって証明された (74,

91)。当研究における結果はこれらの報告と整合性の取れるものであり、CNOT7-CNOT6/6L ヘテロダイマーの形成が複合体中においても、非常に重要であることを示している。また、複合体の構成を検証したことで、CNOT8 は CNOT7 と比べて CNOT6/6L と複合体を形成しにくいという結果が得られた。そこで、CNOT8-NOT 複合体は CNOT6/6L と協調的に働くことが難しく、それが原因で脱アデニル化の効率が CNOT7-NOT 複合体と比べて低下しているというモデルを提唱する (図 23)。

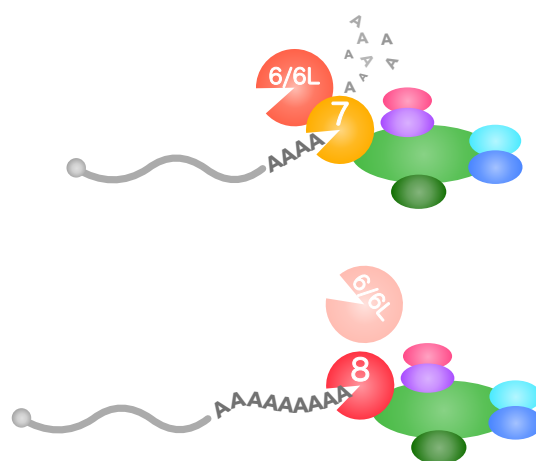


図23. 本研究で得られた結論

miRISC (miR-1 を使用) および ARE 結合タンパク質 ZFP36L1 を介した脱アデニル化において、CNOT7-NOT 複合体が重要な役割をになっていること、また、CNOT8 は CNOT7 の役割を完全には補完できないことを明らかにした。また、複合体の構成を解析することで、CNOT8 を含む複合体には CNOT6/6L が安定して存在できないことを明らかにし、それが原因で脱アデニル化の効率が低下しているモデルにたどり着いた。

一方で、本研究は CNOT7 および CNOT8 と他のサブユニットの結合性を直接的に解析しているわけではない。近年の報告では CNOT7-CNOT1 の結合は CNOT8-CNOT1 の結合と比較して強力であることが示されており (129)、CNOT7 の方が複合体により強く結合できることが脱アデニル化の活性に影響している可能性は排除できない。しかしながら、ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を見る限り、CNOT8 のほとんどが高分子量画分に存在しており、また CNOT7 の存在・非存在で複合体に含まれる割合が大きく変化することもなかった。したがって少なくとも通常の発現状態では、CNOT7 と CNOT8 のそれぞれが複合体を形成できる十分量の CNOT1 が存在しており、CNOT1 との親和性の差が複合体の形成そのものに大きな影響を及ぼすことはないと考えられる。以上の理由から、CNOT1 との親和性の差が脱アデニル化活性に及ぼす影響は限定的であると考えているが、今後の更なる検証が必要である。

また、そもそも CNOT7 および CNOT8 の発現量の差が脱アデニル化活性に反映されているという可能性はないだろうか。CNOT7 および CNOT8 はいずれも組織・細胞の種類により発現量に違いはあるが、ユビキタスに発現していることが知られている (44,

129)。本研究で用いた培養細胞の内在 CNOT7/8 の量を比較していないので、厳密に議論することは難しい。一方で、CNOT7 KO 細胞に CNOT8 をさらに発現させても脱アデニル化活性は改善せず、むしろやや阻害された (図 14)。以上を鑑みると、脱アデニル化への寄与の相違は、CNOT7 および CNOT8 の単純な量比の問題ではなく、これら 2 因子の機能・役割が異なっていると考える方が妥当である。

それでは、CNOT8-NOT 複合体が CNOT6/6L との親和性が低く脱アデニル化を効率よく誘導することができないというモデルを想定する場合、CNOT8 は mRNA の安定性を制御する上でどのような役割を担っているのだろうか。そこで、現在得られている本研究の結果およびこれまでの知見から、「CNOT7-NOT 複合体と CNOT8-NOT 複合体がトランス作用因子に競合的に結合することで脱アデニル化効率の調整を行っている」というモデルを提唱する。また、CNOT8-NOT 複合体は CNOT7-NOT 複合体と比較して CNOT6/6L との結合率は低いが、結合性は保持しているということも重要である。CNOT6/6L との相互作用を完全に排した CNOT7 変異体が脱アデニル化を強力に阻害していたのに対し、CNOT8 ではそのような効果が見られなかったことからわかるように、CNOT8-NOT 複合体は分解を全く誘導しないわけではなく、CNOT7-NOT 複合体と比較して緩やかに分解するという捉え方が最も適していると考えられる。したがって、通常の細胞状態での緩やかな mRNA 分解には CNOT8-NOT 複合体を利用し、急性の分解 (炎症性サイトカイン mRNA の分解など) を引き起こす必要がある際は CNOT7-NOT 複合体を用いている可能性も考えられる。その場合、CNOT8-NOT 複合体は、CNOT7-NOT 複合体とトランス作用因子上で競合することで、急速な分解を必要としない mRNA を保護する役割も担っているのではないかと考えられる。本研究では分解配列を持つレポーター mRNA を利用して急速に分解される過程を対象に検証したが、そのような配列を持たない mRNA が分解される過程も今後検証する必要がある。

CNOT8-NOT 複合体を選択的に利用するようなトランス作用因子が存在する可能性も考えられる。今回は CCR4-NOT 複合体を介した脱アデニル化のモデルとして miR-1 と結合した miRISC と ARE 結合タンパク質 ZFP36L1 による脱アデニル化を検証した。しかしながら、CCR4-NOT 複合体を標的 mRNA 上に呼び込み脱アデニル化を引き起こすと考えられているトランス作用因子は、序論で述べたように他にも多数報告されている。

それらのトランス作用因子が CCR4-NOT 複合体を呼び込む方法は少しずつ異なる。例えば TNRC6 や ZFP36L1 は CNOT1 および CNOT9 との結合を介して CCR4-NOT 複合体と相互作用するが、BTG/Tob family タンパク質は CNOT7 と直接結合することが知られ、CNOT6 や CNOT1 をノックダウンしても分解速度に影響がないことが示されている。このように、CCR4-NOT 複合体の形態とその機能は、CCR4-NOT 複合体を呼び込むトランス作用因子によっても影響を受けると考えられ、その詳細を明らかにするには更なる検証が必要である。当研究において作成した CNOT7/CNOT8 ノックアウト細胞を用いて、内在 mRNA の poly(A)鎖長を網羅的に解析し比較することにより、CNOT7-NOT 複合体と CNOT8-NOT 複合体が好む mRNA 上のシス配列やそれを認識するトランス作用因子を特定することが可能であると考えられる。

#### 4-2. CNOT7/8 による mRNA 分解制御と PABP の関係

CNOT7-NOT 複合体と CNOT8-NOT 複合体が、CNOT6/6L との関係性の違いによって異なる活性を有することは、mRNA の安定性を制御する上でどのような効果を生み出すのだろうか。序論や前項でも述べたように、CAF1 (CNOT7 および CNOT8) と CCR4 (CNOT6 および CNOT6L) は、poly(A)鎖上の PABP による影響が全く異なることが報告されている (74, 91)。したがって、CNOT6/6L との相互作用が弱い CNOT8-NOT 複合体は、PABP と結合している poly(A)鎖を分解する上で非常に不利であると考えられる。したがって、CNOT8-NOT 複合体が CNOT7-NOT 複合体と競合して mRNA 安定性を制御するモデルを考える上で、PABP による影響を考えることは必須であると言える。

従来、PABP は poly(A)鎖に結合することで、mRNA のループ構造を形成し翻訳効率を向上するとともに、脱アデニル化酵素から poly(A)鎖を保護することで mRNA の安定性の向上に寄与するなど、翻訳と mRNA 安定性を正に制御する因子であると考えられてきた。しかしながら最新の知見では、PABP は必ずしも脱アデニル化を阻害する因子ではなく、場合によっては脱アデニル化を促進する、poly(A)鎖長調整因子としての一面を持つことが明らかになりつつある (11, 67, 68)。例えば、細胞中から PABP を除去するとむしろ全体的な poly(A)鎖長が長くなることが *in vitro* で証明されている (26, 121, 122)。また繰り返しになるが、Pan2-Pan3 や Cnot6/6L が PABP の結合している poly(A)鎖を選択的に分解していることが明らかにされている (63, 65, 74, 91, 120)。このように PABP による mRNA 安定性の制御は非常に複雑であり、PABP は単純に poly(A)鎖を保護するために存在しているのではなく、poly(A)鎖を適切な長さに調整するために、各種脱アデニル化酵素のプラットフォームとして機能しながら脱アデニル化の促進と阻害のバランスを取っていると考えられる。

本研究の結果とこれらの報告を考慮すると、CNOT7-NOT 複合体は、2種類の脱アデニル化酵素をうまく使い分けることで PABP の存在/非存在に依存せず poly(A)鎖を分解するのに対し、CNOT8-NOT 複合体は PABP の結合している poly(A)鎖を CNOT7-NOT 複合体から保護するシステムとして機能している可能性が考えられる。CNOT6/6L との相互作用が比較的弱く、脱アデニル化活性の低い CNOT8-NOT 複合体が生体内で必須

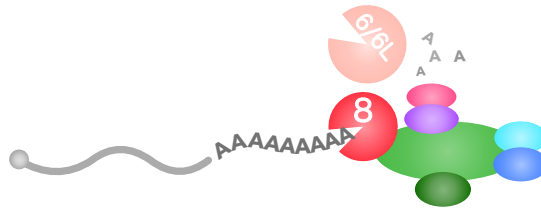
の因子であることは、PABP と poly(A)鎖の結合が mRNA の安定性を正負に調整する上で非常に重要な要素であることを強く示唆している。また、Pan2-Pan3 脱アデニル化酵素複合体は Pan3 と PABP の直接的な結合を介して poly(A)鎖上にリクルートされ、この相互作用によって比較的長い poly(A)鎖を分解すると考えられている (64-70)。このように、現在細胞質で機能していると考えられている主要な脱アデニル化酵素である CCR4-NOT 複合体と Pan2-Pan3 複合体はいずれも PABP の存在に対して異なるレスポンスを示す可能性が考えられ、複数の脱アデニル化酵素が存在する理由を解明する上で今後 PABP の重要性はより高まっていくだろう。

また、miRISC は TNRC6 との相互作用を介して poly(A)鎖から PABP を取り除くことができることが知られている (123)。この機能は当初 miRISC による翻訳抑制メカニズムの一端であると考えられていたが、その後 PABP が miRISC による翻訳抑制に不要であることが示され (121)、現在では翻訳抑制機構の中心ではないと考えられている。miRISC による PABP の解離を単なる翻訳抑制機構の一端ではなく、mRNA 分解の調整機構として位置付けることができる。miRISC によって PABP が poly(A)鎖から取り除かれることで、miRISC 以外のトランス作用因子によってリクルートされた時と比べて CNOT8-NOT 複合体を介した脱アデニル化が有利に働く可能性もある。実際に、本研究においても CNOT7 をノックアウトしたときに miRISC による脱アデニル化は完全にストップしているわけではなく、CNOT7 以外の脱アデニル化酵素によってゆっくり分解されていることが観測できている (図 13)。一方で miRISC ではなく ZFP36L1 を用いた実験結果を見ると、miRISC と比較して CNOT7 KO による影響をより強く受けていることが確認できる (図 19)。このように複数存在する脱アデニル化酵素複合体と poly(A)鎖に結合した PABP、そして RNA 結合タンパク質の 3 種類が組み合わさることで、複雑かつ緻密な制御が実現していると考えられる (図 24)。

### A. CNOT7-NOT複合体



### B. CNOT8-NOT複合体



### C. Pan2-Pan3複合体

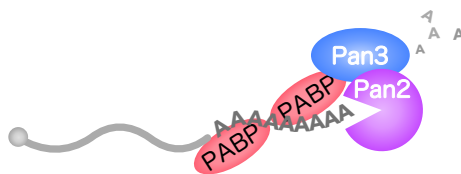


図24. 各脱アデニル化酵素複合体によって分解するpoly(A)鎖の嗜好性が異なる可能性がある

A. CNOT7-NOT複合体はPABPの存在/非存在に関係なくpoly(A)鎖を効率よく分解できる。

B. CNOT8-NOT複合体はPABPの結合しているpoly(A)鎖を分解するのが遅い。

C. Pan2-Pan3複合体はPABPと結合しながらpoly(A)鎖を分解するため、poly(A)鎖を最後まで分解することができない。

このように特徴の異なる複数の複合体を適切に使い分けることで緻密なmRNA分解制御を行なっている可能性がある。

#### 4-3. 翻訳と共役した mRNA 安定性制御における本研究の位置付け

前項までで述べてきたように、これらの複合体の活性の違いは、poly(A)鎖に結合した PABP の影響を受ける可能性が高い。PABP と poly(A)鎖との結合は、序論で述べたように mRNA の翻訳効率とも深く関係しているため、PABP の結合によって脱アデニル化酵素複合体の優位性が変化することは、mRNA 分解と翻訳効率との関係性を考える上で非常に興味深い。すなわち、CNOT8-NOT 複合体が PABP の結合している poly(A)鎖を分解できず CNOT7-NOT 複合体と競合することは、翻訳効率の高い mRNA、あるいはのちに翻訳するために分解せず維持する必要のある mRNA を保護するための機構である可能性が考えられる。

このような制御機構を考えるにあたって、精子形成時の poly(A)鎖長と翻訳活性の変化に関する報告を引用したい。精子形成の過程において、最終的に成熟した精子へと細胞分化が進行するステップで、翻訳が抑制された状態で保存されていた poly(A)の長い (約 160 塩基) mRNA がポリソーム画分へと移行し翻訳が活性化されることが知られている (126-128)。興味深いことに、この翻訳の活性化は poly(A)の短縮と連動しており、ポリソーム画分へと移行した mRNA は poly(A)鎖が約 30 塩基まで急速に分解されていることが明らかにされている。この複雑な翻訳制御機構は、poly(A)鎖が長い mRNA をその状態のまま保存しておく際には mRNA 上に CNOT8-NOT 複合体をリクルートしておき、翻訳の活性化とともに CNOT7-NOT 複合体へと入れ替わることで poly(A)鎖を短縮するというモデルを当てはめることで、そのメカニズムがうまく説明できるようになるのではないだろうか。この脱アデニル化が翻訳活性化の前提条件なのか、それとも翻訳活性化に伴って引き起こされる副産物なのかは不明であるが、CNOT7 KO マウスが精子形成不全の表現系を示すことは、この翻訳活性化メカニズムにおいてこれらの複合体による脱アデニル化が重要な役割を担っていることを示している。このように、翻訳効率と poly(A)鎖長の協調的な調整は、多様な性質を持つ脱アデニル化酵素の組み合わせによって実現されている可能性があり、本研究の結果はこのモデルを支持するものである。今後、CNOT8 が結合している mRNA と CNOT7 が結合している mRNA を、ribosome profiling 法などを利用して解析することで、これらの複合体が mRNA の翻訳状態によってどのように使い分けられ

ているのかを詳細に解析することが可能であると考えられる。

#### 4-4. 本研究の総括

最後に、本研究で明らかにした CNOT7 と CNOT8 の機能の差が mRNA 分解を介した遺伝子発現制御においてどのような意味を持つのか総括する。CCR4-NOT 複合体は多数のサブユニットで構成され、さらに進化の過程で酵素サブユニットに複数のパラログが発現するようになり、それぞれのパラログが相互排他的に複合体に結合することで mRNA 分解を緻密に制御していると考えられていた。しかしながら、これまではそれらの機能はほとんど重複していると考えられており、パラログの使い分けが遺伝子発現制御にもたらす意味やその分子基盤はほとんど明らかになっていなかった。本研究では、CNOT7-NOT 複合体と CNOT8-NOT 複合体がトランス作用因子を化した mRNA 分解において全く異なる活性を持っていることを明らかにし、その分子メカニズムについて生化学的に検証した。CNOT7 と CNOT8 が複合体中で全く異なる役割を担っていることは、CCR4-NOT 複合体の構成因子の変化が mRNA 分解制御に大きく寄与していることを意味し、進化の過程で mRNA 分解制御を介した時空間的な遺伝子発現制御の重要性がより増してきたことを示唆している。さらに、もうひとつの酵素サブユニットである CNOT6/6L との結合性が CNOT7-NOT 複合体と CNOT8-NOT 複合体で異なることは、PABP の結合率によって mRNA の安定性が制御されている可能性を示唆しており、脱アデニル化酵素複合体を中心に、mRNA の安定性と翻訳効率が包括的に制御されるモデルにつながる (図 25)。

本研究は、遺伝子発現制御における mRNA 分解の重要性を CCR4-NOT 複合体を題材にすることで検証しているが、一方で上述したモデルに関しては完全に証明できたわけではなく、複数の可能性が想定されることをここまでも述べてきた。今後さらに検証を進めるにあたって、各ノックアウト細胞を用いた内在 mRNA の poly(A)鎖長の網羅的な解析と配列の比較、さらに ribosome profiling によるそれぞれの配列ごとの翻訳効率の比較など、大規模なオミクス解析が有効であると考えられる。この研究で得られた結果が、今後の RNA 研究の進展に役立てられると幸いである。

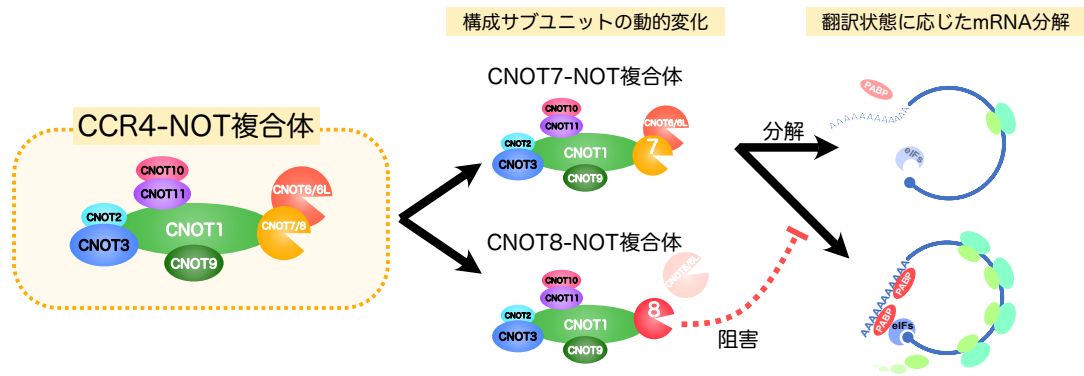


図25. CCR4-NOT複合体の構成変化による翻訳とmRNA分解の共役制御機構の想定されるモデル

## 謝辞

指導教官である泊幸秀教授には、本研究の遂行に当たって研究方針やデータの解釈、その伝え方など大変多くの助言と協力をいただきました。また、大学卒業後、進学先の決まっていなかった私に手を差し伸べていただいたことに深く感謝しています。この研究室に配属する機会が得られ、研究室の皆様と出会うことができたことは、私にとって非常に有意義であり、成長するきっかけにもなりました。深く御礼申し上げます。

近畿大学の藤原俊伸教授には学部生のころから、研究に取り組む姿勢、命題を解決するための実験の組み立て方、そして研究者としての哲学まで多様なご指導をいただきました。時に厳しいお言葉をいただくこともありましたが、困難にあたった際にはいつも全力で協力していただき、最善を尽くしていただきました。深く感謝申し上げます。

近畿大学の船上仁範准教授には、薬の知識や *in vivo* での実験の話など、私のあまり詳しくない分野の話をいつも丁寧に教えていただきました。また、非常勤薬剤師として病院にて働く際に尽力していただき、研究を続ける上で非常に助けとなりました。感謝申し上げます。

近畿大学の深尾亜喜良講師には、学部生のころから大変お世話になりました。実際に実験を行う上でのコツやうまくいかない時のアドバイスなど、たくさん助言をいただきました。実験がうまくいかない時も、楽しい話をしながら笑い飛ばしていただき、くじけずに続けてくることができました。ここに御礼申し上げます。

本研究において使用させていただいた抗CNOT抗体は、沖縄科学技術大学院大学の山本雅教授と理化学研究所の鈴木亨博士よりご供与いただきました。また、ゲルろ過クロマトグラフィーによる解析などにおいて多大なご協力をいただき、データの解釈や実験手法について貴重なご意見をいただきました。感謝申し上げます。

貞廣暁利博士には日々の実験指導から雑談、書類の作成まで様々な面で協力していただきました。研究姿勢から生活態度まで勉強になることばかりでした。大塚衆志さんと青山智彦さんは、同じように研究を行う同期として、いつも切磋琢磨し合う関係でいてくれました。有能な同期に恵まれて、私もたくさん刺激を受け成長することができました。池田大輔さんは大学卒業後、私とは異なる進路に進んでも定期的に連絡をくれ、食事に誘ってくれ、いつも気にかけてくれました。友人として心から感謝しています。

研究室内の皆さんは、いつも私のくだらない話に笑って付き合ってくれ、また苦しいときには笑わせてくれました。皆さんが毎日暖かく接してくれることで、厳しい研究生活がとても明るく楽しいものになりました。本当にありがとうございました。

最後に、浪人をした時も、就職せずに進学することを決めた時も、なかなか進学先が決まらなかった時も、いつも味方でい続けてくれ、何も言わずに助けてくれた両親、家族に心より感謝いたします。

令和4年12月5日

## 参考文献

1. Wei, C.-C., Balasta, M.L., Ren, J. and Goss, D.J. (1998) Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogues. *Biochemistry* 37, 1910–1916
2. Tarun, S.Z. and Sachs, A.B. (1995) A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev.* 9, 2997–3007
3. Pestova, T.V., Lorsch, J.R., and Hellen, C.U. (2007). The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In *Translational Control in Biology and Medicine*, M.B. Mathews, N. Sonenberg, and J.W. Hershey, eds. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 87–128.
4. Sen, N.D., Zhou, F., Harris, M.S., Ingolia, N.T. and Hinnebusch, A.G. (2016) eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5' UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 113, 10464–10472
5. Archer, S.K., Shirokikh, N.E., Hallwirth, C.V., Beilharz, T.H. and Preiss, T. (2015) Probing the closed-loop model of mRNA translation in living cells. *RNA Biol.* 12, 248–254
6. Zhang, C., Wang, X., Park, S., Chiang, Y.-c., Xi, W., Laue, T.M. et al. (2014) Only a subset of the PAB1-mRNP proteome is present in mRNA translation complexes. *Protein Sci.* 23, 1036–1049
7. Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., and Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* 2, 135–140.

8. Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913–963.
9. Aylett, C. H., and Ban, N. (2017) Eukaryotic Aspects of Translation Initiation Brought into Focus. *Philos. Trans. R. Soc., B* 372 (1716), 20160186.
10. Yamashita, A., Chang, T. C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C. Y., et al. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1054–1063.
11. Tucker M et al. (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104(3):377–386.
12. Bartlam, M., and Yamamoto, M. (2010). The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex. *Protein Cell* 25, 443–452. doi: 10.1007/s13238-010- 0060-8
13. Doidge, R., Mittal, S., Aslam, A., and Winkler, G. S. (2012). Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4-Not complex. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 896–901
14. Muhlrads, D., Decker, C.J. and Parker, R. (1995) Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2145–2156
15. Muhlrads, D., Decker, C.J. and Parker, R. (1994) Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 50→30 digestion of the transcript. *Genes Dev.* 8, 855–866

16. Anderson, J.S.J. and Parker, R. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 30 to 50 exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17, 1497–1506
17. Hendrickson, D.G., Hogan, D.J., McCullough, H.L., Myers, J.W., Herschlag, D., Ferrell, J.E. et al. (2009) Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol.* 7, e1000238
18. Iwakawa, H.-o. and Tomari, Y. (2015) The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends Cell Biol.* 25, 651–665
19. Eichhorn, S.W., Guo, H., McGeary, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D. et al. (2014) mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol. Cell* 56, 104–115
20. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. and Bartel, D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835–840
21. Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63
22. Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F.D., Gygi, S.P. and Bartel, D.P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455, 64–71
23. Bazzini, A.A., Lee, M.T. and Giraldez, A.J. (2012) Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336, 233–237

24. Djuranovic, S., Nahvi, A. and Green, R. (2012) miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336, 237–240
25. Béthune, J., Artus-Revel, C.G. and Filipowicz, W. (2012) Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep.* 13, 716–723
26. Fabian, M.R., Mathonnet, G., Sundermeier, T., Mathys, H., Zipprich, J.T., Svitkin, Y.V. et al. (2009) Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol. Cell* 35, 868–880
27. Djuranovic, S., Nahvi, A. and Green, R. (2011) A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science* 331, 550–553
28. Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M. and Izaurralde, E. (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15, 21–32
29. Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van Dongen, S., Inoue, K. et al. (2006) Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 312, 75–79
30. Bawankar, P., Loh, B., Wohlbold, L., Schmidt, S., and Izaurralde, E. (2013). NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *RNA Biol.* 10, 228–244.
31. Mauxion, F., Prève, B., and Séraphin, B. (2013). C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *RNA Biol.* 10, 267–276.

32. Zwartjes, C. G., Jayne, S., van den Berg, D. L., and Timmers, H. T. (2004). Repression of promoter activity by CNOT2, a subunit of the transcription regulatory Ccr4- not complex. *J. Biol. Chem.* 279, 10848–10854.
  
33. Boland, A., Chen, Y., Raisch, T., Jonas, S., Kuzuog˘lu-Öztürk, D., and Wohlbold, L. et al. (2013). Structure and assembly of the NOT module of the human CCR4- NOT complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1289–1297.
  
34. Basquin, J., Roudko, V. V., Rode, M., Basquin, C., Séraphin, B., and Conti, E. (2012). Architecture of the nuclease module of the yeast Ccr4-not complex: the Not1-Caf1-Ccr4 interaction. *Mol. Cell* 48, 207–218.
  
35. Chen Y et al. (2014) A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Mol Cell* 54(5):737–750.
  
36. Mathys H et al. (2014) Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Mol Cell* 54(5):751–765.
  
37. Rouya C et al. (2014) Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA* 20(9):1398–1409. Temme, C., Zhang, L., Kremmer, E., Ihling, C., Chartier, A., Sinz, A., et al. (2010). Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA* 16, 1356–1370.
  
38. Temme, C., Zhang, L., Kremmer, E., Ihling, C., Chartier, A., Sinz, A., et al. (2010). Subunits of the Drosophila CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA* 16, 1356–1370.

39. Yamaguchi T, Suzuki T, Sato T, Takahashi A, Watanabe H, Kadowaki A, Natsui M, Inagaki H, Arakawa S, Nakaoka S, et al. (2018) The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function. *Sci Signal* 11: eaan3638.
40. Collart, M. A., and Panasenko, O. O. (2012). The Ccr4-Not complex. *Gene* 492, 42–53.
41. Winkler, G. S., and Balacco, D. L. (2013). Heterogeneity and complexity within the nuclease module of the Ccr4-Not complex. *Front. Genet.* 4:296.
42. Lau, N. C., Kolkman, A., van Schaik, F. M., Mulder, K. W., Pijnappel, W. W., Heck, A. J., et al. (2009). Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem. J.* 422, 443–453.
43. Mittal, S., Aslam, A., Doidge, R., Medica, R., and Winkler, G. S. (2011). The Ccr4a (CNOT6) and Ccr4b (CNOT6L) deadenylase subunits of the human Ccr4-Not complex contribute to the prevention of cell death and senescence. *Mol. Biol. Cell* 22, 748–758.
44. Chen, C., Ito, K., Takahashi, A., Wang, G., Suzuki, T., Nakazawa, T., et al. (2011). Distinct expression patterns of the subunits of the CCR4-NOT deadenylase complex during neural development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 360–364.
45. Morita, M., Oike, Y., Nagashima, T., Kadomatsu, T., Tabata, M., Suzuki, T., et al. (2011). Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3<sup>+/-</sup> mice. *EMBO J.* 30, 4678–4691.
46. Petit, A. P., Wohlbold, L., Bawankar, P., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., et al. (2012). The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic Acids Res.* 40, 11058–11072.

47. Berthet, C., Morera, A. M., Asensio, M. J., Chauvin, M. A., Morel, A. P., Dijoud, F., et al. (2004). CCR4-associated factor CAF1 is an essential factor for spermatogenesis. *Mol. Cell Biol.* 24, 5808–5820.
48. Nakamura, T., Yao, R., Ogawa, T., Suzuki, T., Ito, C., Tsunekawa, N., et al. (2004). Oligoastheno-teratozoospermia in mice lacking *Cnot7*, a regulator of retinoid X receptor beta. *Nat. Genet.* 36, 528–533.
49. Washio-Oikawa, K., Nakamura, T., Usui, M., Yoneda, M., Ezura, Y., Ishikawa, I., et al. (2007). *Cnot7*-null mice exhibit high bone mass phenotype and modulation of BMP actions. *J. Bone Miner. Res.* 22, 1217–1223.
50. Mostafa D, Takahashi A, Yanagiya A, Yamaguchi T, Abe T, Kureha T, Kuba K, Kanegae Y, Furuta Y, Yamamoto T, et al. (2020) Essential functions of the CNOT7/8 catalytic subunits of the CCR4-NOT complex in mRNA regulation and cell viability. *RNA Biol* 17: 403–416.
51. Aslam, A., Mittal, S., Koch, F., Andrau, J. C., and Winkler, G. S. (2009). The CCR4-NOT deadenylase subunits CNOT7 and CNOT8 have overlapping roles and modulate cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* 20, 3840–3850.
52. Hosoda, N., Funakoshi, Y., Hirasawa, M., Yamagishi, R., Asano, Y., Miyagawa, R., et al. (2011). Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. *EMBO J.* 30, 1311–1323.
53. Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, Y., and Hoshino, S. (2014). Antiproliferative protein Tob directly regulates c-myc protooncogene expression through cyto-plasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene* 33, 55–64.

54. Garces, R. G., Gillon, W., and Pai, E. F. (2007). Atomic model of human Rcd-1 reveals an armadillo-like-repeat protein with in vitro nucleic acid binding properties. *Protein Sci.* 16, 176–188.
55. Bulbrook D., Brazier H., Mahajan P., Kliszczak M., Fedorov O., Marchese F.P., Aubareda A., Chalk R., Picaud S., Strain-Damerell C. et al., Tryptophan-Mediated interactions between tristetraprolin and the CNOT9 subunit are required for CCR4-NOT deadenylase complex recruitment. *J. Mol. Biol.* 2018; 430:722–736.
56. Panepinto, J. C., Heinz, E., and Traven, A. (2013). The cellular roles of Ccr4-NOT in model and pathogenic fungi-implications for fungal virulence. *Front. Genet.* 4:302.
57. Färber, V., Erben, E., Sharma, S., Stoecklin, G., and Clayton, C. (2013). Trypanosome CNOT10 is essential for the integrity of the NOT deadenylase complex and for degradation of many mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 41, 1211–1222.
58. Schwede A et al. (2008) A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells. *Nucleic Acids Res* 36(10):3374–3388.
59. Stowell JAW, et al. (2016) Reconstitution of Targeted Deadenylation by the Ccr4-Not Complex and the YTH Domain Protein Mmi1. *Cell Rep.* 2016;17(8):1978–1989.
60. Stowell J.A.W., Wagstaff J.L., Hill C.H., Yu M., McLaughlin S.H., Freund S.M.V., Passmore L.A. (2018) A low-complexity region in the YTH domain protein Mmi1 enhances RNA binding. *J. Boil. Chem.* 293:9210–9222.
61. Moser, M.J., Holley, W.R., Chatterjee, A. and Mian, I.S. (1997) The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res.* 25, 5110–5118

62. Zuo, Y. and Deutscher, M.P. (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* 29, 1017–1026
63. Lowell, J.E., Rudner, D.Z. and Sachs, A.B. (1992) 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev.* 6, 2088–2099
64. Mangus, D.A., Evans, M.C., Agrin, N.S., Smith, M., Gongidi, P. and Jacobson, A. (2004) Positive and negative regulation of poly(A) nuclease. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5521–5533
65. Uchida, N., Hoshino, S.-I. and Katada, T. (2004) Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 279, 1383–1391
66. Siddiqui, N., Mangus, D.A., Chang, T.-C., Palermino, J.-M., Shyu, A.-B. and Gehring, K. (2007) Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 282, 25067–25075
67. Funakoshi Y et al. (2007) Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev* 21(23):3135–3148.
68. Schäfer IB, Rode M, Bonneau F, Schüssler S, Conti E (2014) The structure of the Pan2-Pan3 core complex reveals crosstalk between deadenylase and pseudokinase. *Nat Struct Mol Biol* 21(7):591–598.
69. Wolf J et al. (2014) Structural basis for Pan3 binding to Pan2 and its function in mRNA recruitment and deadenylation. *EMBO J* 33(14):1514–1526.

70. Jonas S et al. (2014) An asymmetric PAN3 dimer recruits a single PAN2 exonuclease to mediate mRNA deadenylation and decay. *Nat Struct Mol Biol* 21(7):599–608.
71. Ezzeddine N et al. (2007) Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol Cell Biol* 27(22):7791–7801.
72. Yan, Y.B. *Deadenylation: Enzymes, regulation, and functional implications*. Wiley Interdiscip Rev. RNA 2014, 5, 421–443.
73. Goldstrohm, A.C.; Wickens, M. I deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008, 9, 337–344.
74. Yi H, Park J, Ha M, Lim J, Chang H, Kim VN. PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Mol Cell.* 2018;70(6):1081–8 e5.
75. Berndt, H.; Harnisch, C.; Rammelt, C.; Stohr, N.; Zirkel, A.; Dohm, J.C.; Himmelbauer, H.; Tavanez, J.P.; Huttelmaier, S.; Wahle, E. Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA* 2012, 18, 958–972.
76. Duan, T.L.; He, G.J.; Hu, L.D.; Yan, Y.B. The intrinsically disordered C-terminal domain triggers nucleolar localization and function switch of PARN in response to DNA damage. *Cells* 2019, 8, 836.

77. Anastasakis, D.; Skeparnias, I.; Shaukat, A.N.; Grafanaki, K.; Kanellou, A.; Taraviras, S.; Papachristou, D.J.; Papakyriakou, A.; Stathopoulos, C. Mammalian PNLDC1 is a novel poly(A) specific exonuclease with discrete expression during early development. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, 8908–8920.
78. Duan TL, Jiao H, He GJ, Yan YB. Translation Efficiency and Degradation of ER-Associated mRNAs Modulated by ER-Anchored poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN). *Cells.* 2020;9(1):162. Published 2020 Jan 9.
79. Bakheet, T., M. Frevel, B. R. Williams, W. Greer, and K. S. Khabar. (2001) ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res.* 29:246-54.
80. Blackshear, P. J. (2002) Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* 30:945-52.
81. Ciaï D, Cherradi N, Bailly S, Grenier E, Berra E, Pouyssegur J, Lamarre J, Feige JJ. (2004) Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene.* 2004 Nov 11;23(53):8673-80.
82. Min Gao, Carol J. Wilusz, Stuart W, Peltz and Jeffrey Wilusz. (2001) A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *The EMBO Journal* Vol. 20 No. 5 pp. 1134-1143.
83. Fabian, M.R., Frank, F., Rouya, C., Siddiqui, N., Lai, W.S., Karetnikov, A., Blackshear, P.J., Nagar, B., and Sonenberg, N. (2013) Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tris- tetraprolin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 735-739.

84. Tao, X. and Gao, G. (2015) Tristetraprolin recruits eukaryotic initiation factor 4E2 to repress translation of AU-rich element-containing mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 35, 3921-3932.
85. Otsuka H, Fukao A, Tomohiro T, et al. ARE-binding protein ZFP36L1 interacts with CNOT1 to directly repress translation via a deadenylation-independent mechanism. *Biochimie.* 2020;174:49-56.
86. Cooke A, Prigge A, Wickens M. Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem.* 2010;285(37):28506-28513.
87. Bianchin C, Mauxion F, Sentis S, Séraphin B, Corbo L. Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA.* 2005;11(4):487-494.
88. Maryati M, Airhihen B, Winkler GS. The enzyme activities of Caf1 and Ccr4 are both required for deadenylation by the human Ccr4-Not nuclease module. *Biochem J.* 2015;469(1):169-176.
89. Niinuma S, Fukaya T, Tomari Y. CCR4 and CAF1 deadenylases have an intrinsic activity to remove the post-poly(A) sequence. *RNA.* 2016;22(10):1550-1559.
90. Maryati M, Airhihen B, Winkler GS. The enzyme activities of Caf1 and Ccr4 are both required for deadenylation by the human Ccr4-Not nuclease module. *Biochem J.* 2015;469(1):169-176.
91. Webster MW, Chen YH, Stowell JAW, et al. mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. *Mol Cell.* 2018;70(6):1089-1100.e8.

92. Mishima Y, Tomari Y. Codon Usage and 3' UTR Length Determine Maternal mRNA Stability in Zebrafish. *Mol Cell*. 2016;61(6):874-885.
93. Fukaya T, Iwakawa HO, Tomari Y. MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in *Drosophila*. *Mol Cell*. 2014;56(1):67-78.
94. Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, et al. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Mol Cell*. 2014;56(1):79-89.
95. Jafarnejad SM, Chapat C, Matta-Camacho E, et al. Translational control of ERK signaling through miRNA/4EHP-directed silencing. *Elife*. 2018;7:e35034. Published 2018 Feb 7.
96. Chen S, Gao G. MicroRNAs recruit eIF4E2 to repress translation of target mRNAs. *Protein Cell*. 2017;8(10):750-761.
97. Chapat C, Jafarnejad SM, Matta-Camacho E, et al. Cap-binding protein 4EHP effects translation silencing by microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(21):5425-5430.
98. Räsch F, Weber R, Izaurralde E, Igreja C. 4E-T-bound mRNAs are stored in a silenced and deadenylated form. *Genes Dev*. 2020;34(11-12):847-860.
99. Amaya Ramirez CC, Hubbe P, Mandel N, Béthune J. 4EHP-independent repression of endogenous mRNAs by the RNA-binding protein GIGYF2. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(11):5792-5808.
100. Kawamata, T. and Tomari, Y. (2010) Making RISC. *Trends Biochem. Sci*. 35, 368–376

101. Mishima, Y. et al. (2006) Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr. Biol.* 16, 2135–2142
102. Behm-Ansmant, I. et al. (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 20, 1885–1898
103. Fabian, M.R. et al. (2011) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4–NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1211–1217
104. Braun, J.E. et al. (2011) GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol. Cell* 44, 120–133
105. Chekulaeva, M. et al. (2011) miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4–NOT through conserved W-containing motifs. *Nat. Struct.*
106. Piao, X. et al. (2010) CCR4–NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1486–1494 *Mol. Biol.* 18, 1218–1226
107. Eulalio, A. et al. (2009) Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA* 15, 21–32
108. Chen, C.Y. et al. (2009) Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat. Struct.* 50. *Mol. Biol.* 16, 1160–1166
109. Rehwinkel, J. et al. (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11, 1640–1647

110. Till, S. et al. (2007) A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 897–903
111. Takimoto, K. et al. (2009) Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression. *RNA* 15, 1078–1089
112. Lian, S.L. et al. (2009) The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing. *RNA* 15, 804–813
113. Schirle, N.T. and Macrae, I.J. (2012) The crystal structure of human Argonaute2. *Science* 336, 1037–1040
114. Lazzaretti, D. et al. (2009) The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. *RNA* 15, 1059–1066
115. Zipprich, J.T. et al. (2009) Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA* 15, 781–793
116. Chekulaeva, M. et al. (2009)
117. Multiple independent domains of dGW182 function in miRNA-mediated repression in *Drosophila*. *RNA* 15, 794–803
118. Eulalio, A. et al. (2009) A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA* 15, 1067–1077

119. Bridge KS, Shah KM, Li Y, et al. Argonaute Utilization for miRNA Silencing Is Determined by Phosphorylation-Dependent Recruitment of LIM-Domain-Containing Proteins. *Cell Rep.* 2017;20(1):173-187.
120. Sachs AB, Deardorff JA (1992) Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70(6):961–973.
121. Fukaya T, Tomari Y. PABP is not essential for microRNA-mediated translational repression and deadenylation in vitro. *EMBO J.* 2011;30(24):4998-5009. Published 2011 Nov 25.
122. Sachs AB, Davis RW. The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell.* 1989;58(5):857-867.
123. Zekri L, Kuzuoğlu-Öztürk D, Izaurralde E (2013) GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J* 32(7):1052–1065.
124. Fukaya T, Tomari Y. MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in drosophila. *Mol Cell.* 2012;48(6):825-836.
125. Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y. *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell.* 2009;34(1):58-67.
126. Mays-Hoopers LL, Bolen J, Riggs AD, Singer-Sam J. Preparation of spermatogonia, spermatocytes, and round spermatids for analysis of gene expression using fluorescence-activated cell sorting. *Biol Reprod.* 1995;53(5):1003–1011.
127. Giorgini F, Davies HG, Braun RE. Translational repression by MSY4 inhibits spermatid differentiation in mice. *Development.* 2002;129(15):3669–3679.

128. Yang J, Morales CR, Medvedev S, Schultz RM, Hecht NB. In the absence of the mouse DNA/RNA-binding protein MSY2, messenger RNA instability leads to spermatogenic arrest. *Biol Reprod.* 2007;76(1):48–54.
129. Stoney PN, Yanagiya A, Nishijima S, Yamamoto T. CNOT7 Outcompetes Its Paralog CNOT8 for Integration into The CCR4-NOT Complex. *J Mol Biol.* 2022;434(9):167523.
130. Suzuki T, Kikuguchi C, Nishijima S, et al. Postnatal liver functional maturation requires Cnot complex-mediated decay of mRNAs encoding cell cycle and immature liver genes. *Development.* 2019;146(4):dev168146. Published 2019 Feb 15.