

博士論文

CCR4-NOT 複合体による
脱アデニル化反応の生化学的解析

東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカルゲノム専攻
RNA 機能研究分野

新沼 翔

目次

第一章 序論.....	3
1-1 前文.....	3
1-2 真核生物における mRNA の分解.....	4
1-3 恒常的な脱アデニル化.....	6
1-4 積極的な脱アデニル化.....	7
1-5 CCR4-NOT 複合体.....	9
1-6 CCR4-NOT 複合体における脱アデニル化酵素.....	11
1-7 図.....	12
第二章 CCR4 と CAF1 によるポリ(A)下流配列の除去.....	16
2-1 目的.....	16
2-2 結果.....	17
1. ショウジョウバエ S2 細胞において miRISC はポリ(A)鎖の下流にある A ではない配列を除くことができる.....	17
2. 細胞抽出液における脱アデニル化活性はポリ(A)下流配列の長さ とその上流のポリ(A)鎖の長さに影響を受ける.....	18
3. ポリ(A)下流配列をもつ RNA においても CCR4-NOT 複合体が 脱アデニル化している.....	19
4. CCR4 と CAF1 の精製.....	20
5. CCR4 と CAF1 はそれぞれ独立にポリ(A)下流配列を除く活性をもつ...21	
6. 精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーの活性はポリ(A)下流配列の長さ とその上流のポリ(A)鎖の長さに影響を受ける.....	22
7. CCR4 と CAF1 はエキソヌクレアーゼ活性でポリ(A)下流配列を除く...23	
2-3 考察.....	24
1. CCR4 と CAF1 のアデニン認識機構.....	24
2. CCR4 と CAF1 の上流配列の認識.....	26
3. CCR4 と CAF1 のポリ(A)下流配列除去活性の生物学的意義.....	27
2-4 図.....	29
2-5 材料と方法.....	41

第三章	CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化における ATP の必要性.....	47
3-1	目的.....	47
3-2	結果.....	48
1.	ショウジョウバエ S2 細胞抽出液において ATP は AMP に変換される...48	
2.	AMP の除去は miRNA 依存的な脱アデニル化を活性化させるのに十分である.....	50
3.	AMP の除去は Smaug 依存的な脱アデニル化を活性化させるのに十分である.....	51
3-3	考察.....	52
1.	脱アデニル化以外の段階における ATP の必要性.....	52
2.	ATP 除去の影響.....	53
3-4	図.....	54
3-5	材料と方法.....	59
第四章	総合考察.....	61
4-1	本研究の結論.....	61
4-2	CCR4 と CAF1 の使い分け.....	62
4-3	PAN2-PAN3 複合体と CCR4-NOT 複合体の関係.....	64
4-4	脱アデニル化と PABP との関係.....	65
4-5	mRNA 分解研究の行方.....	67
4-6	総括.....	68
4-7	図.....	69
	謝辞.....	73
	引用文献.....	74

第一章

序論

1. 前文

「RNA の分解」は、すべての細胞において起こる普遍的な現象である。細胞は RNA を常に作り、そして常に分解することにより、その恒常性を維持している。さらに、ウイルスなどに由来する外部から侵入した RNA や、エラーをもつ RNA を分解することで、細胞の生存を脅かす要因を迅速に除去する (1, 2)。また、RNA の分解は時にダイナミックな細胞内情報の変化を引き起こすことにより、細胞分裂、分化、発生など複雑かつ高度な生命現象の達成を可能にしている (3-5)。このように、RNA 分解は多岐に渡る生命現象において極めて重要な役割を果たしているにも関わらず、RNA を作る反応である転写に比べ、その重要性は長らく見過ごされてきた。

RNA の分解は生物により、また RNA 種により多種多様な機構で達成される (6, 7)。本研究が対象としている真核生物の messenger RNA (mRNA) の分解は、ほとんどの mRNA において、3'末端にあるアデノシンが連続した配列、ポリ(A)鎖の分解から始まる。典型的に、ポリ(A)鎖が短くなると 5'末端からキャップ構造が外され、5'末端から 3'末端方向に分解が進んでいく (7, 8)。本研究は、生命現象を理解する上で転写と並び重要な RNA 分解のうち、真核生物の mRNA 分解の開始反応であるポリ(A)鎖の分解と、それを担う酵素について、より詳細に理解することを目的とする。

2. 真核生物における mRNA の分解

真核生物の mRNA の分解は、主にポリ(A)鎖の分解反応である「脱アデニル化」から始まる (図 1-1)。脱アデニル化は mRNA 分解の律速段階であり、PAN2-PAN3 複合体がある程度ポリ(A)鎖を短くした後、代わって CCR4-NOT 複合体が残るポリ(A)鎖を短くするという二段階反応であると考えられている (9, 10)。典型的に、脱アデニル化されたポリ(A)鎖には Lsm1-7/Pat 複合体が結合するか、末端ウリジリル転移酵素 (TUTase) によって U が付加される (7, 11)。Lsm1-7/Pat 複合体それ自体が短いポリ(A)鎖を好む性質をもつという報告があることに加え (12)、3'末端あるいはその近傍のポリ(U)を好むという報告もあり (12, 13)、TUTase は短くなったポリ(A)鎖に U を付加することで Lsm1-7/Pat 複合体を呼び込みやすくしていると考えられている (14)。Lsm1-7/Pat 複合体が 3'末端に結合すると、Pat を介して脱キャップ活性化因子や脱キャップ酵素である Dcp2 が誘導され、5'末端にあるキャップ構造が除かれる (15)。5'末端のキャップ構造が除かれると、脱キャップ複合体中の 5'-3'エキソリボヌクレアーゼである Xrn1 によって mRNA は分解される (16)。

脱アデニル化は古くから 5'末端からの分解だけでなく、エキソソームによる 3'末端からの分解を誘導する場合もあることが知られている (17, 18)。さらに最近、3'-5'エキソリボヌクレアーゼである Dis3L2 がエキソソーム非依存的に 3'末端にあるポリ(U)を認識して mRNA を分解するという報告が相次いでなされた (19, 20)。しかし試験管内において、Lsm1-7/Pat 複合体が 3'末端にあるポリ(U)に結合すると 3'末端からの分解は阻害されるという報告や (13)、ポリ(U)が Lsm1-7/Pat 複合体もしくは Dis3L2 のどちらかに有利に働くのかは不明とする議論もある (14)。また、植物においても 3'末端にあるポリ(U)は 3'末端からの分解を阻害すると報告されている (21)。

重要なことに、脱キャップ複合体とエキソソームでは局在が異なる。脱キャップ複合体は主に P-body とよばれる顆粒構造に局在している (22, 23)。P-body は RNA とタンパク質の複合体であることが知られており、CCR4-NOT 複合体や PAN2-PAN3 複合体を含む mRNA 分解に必要な因子が集中していることから、mRNA 分解の場であると考えられている (22-24)。一方で、エキソソームは核にもっとも多く局在し、細胞質にも観察されるが P-body には局在しない (23, 25)。このように、脱キャップ複合体とエキソソームでは住み分けが存在す

る一方で、Dis3L2 は P-body に局在する(19, 20)。Dis3L2 は脱キャップ複合体やエキソソームと独立して働くこともあるが (26–29)、脱キャップ複合体との協調的な作用があるのではないかと報告されている (19, 20)。このことから Dis3L2 は、Lsm1-7/Pat 複合体が結合していない U が付加された mRNA を 3' 末端側から分解することで、5' 末端からの分解を助けていると考えられている (7)。

3. 恒常的な脱アデニル化

mRNA は恒常的に脱アデニル化を受けている。恒常的な脱アデニル化にはポリ(A)結合タンパク質である PABP が重要である (図 1-2 A)。PABP は PAN2-PAN3 複合体および CCR4-NOT 複合体と相互作用する (30, 31)。PAN2-PAN3 複合体では PAN3 が PABP の C 末端領域への結合に必要な PAM2 モチーフをもつ (32-35)。一方、CCR4-NOT 複合体の構成因子は PAM2 モチーフをもたないが、複合体の構成因子である脱アデニル化酵素 CAF1 と結合するタンパク質 Tob が PAM2 モチーフをもっており、Tob を介して CCR4-NOT 複合体は PABP と相互作用している (32, 36)。さらに、翻訳終結因子 eRF3 も PAM2 モチーフをもっており、脱アデニル化複合体が結合する PABP の C 末端領域の同じ場所に結合する (32)。PABP の C 末端をめぐり、脱アデニル化複合体と eRF3 は競合しているが、翻訳の終結により eRF3 が PABP から解離すると、脱アデニル化複合体が PABP と相互作用できるようになり、脱アデニル化が進行すると考えられている(32)。

4. 積極的な脱アデニル化

(1) microRNA による脱アデニル化

mRNA は恒常的に脱アデニル化を受けている一方で、RNA 結合因子により特定の mRNA の脱アデニル化を積極的に促進することもできる (8, 37, 38) (図 1-2 B,C)。本研究では脱アデニル化を解析するためのモデルとして microRNA (miRNA) をもちいた。

miRNA はゲノムにコードされた~22 塩基長の小分子 RNA の一種である (39)。典型的に、RNA ポリメラーゼ II によって長い RNA (pri-miRNA) として転写されたあと、Drosha によってヘアピン RNA (pre-miRNA) が切り出され、Dicer によってプロセシングされて miRNA/miRNA*二本鎖 RNA ができる (39) (図 1-3)。

miRNA は単体では機能できず、Argonaute (Ago)ファミリータンパク質に取り込まれ、RNA-induced silencing complex (RISC)を形成することで機能を発揮する (39-41)。より具体的には、プロセシングされてできた miRNA/miRNA*二本鎖 RNA は ATP 依存的な Hsc70/Hsp90 シャペロン複合体による反応により Argonaute (Ago) ファミリータンパク質に取り込まれる (42, 43)。取り込まれた miRNA/miRNA*二本鎖 RNA は、ATP 非依存的な Ago の構造変化によって miRNA*鎖が剥がされて (44)、結果として Ago に miRNA が残る (図 1-3)。Ago は取り込んだ miRNA の配列を参照し、それと相補的な配列をもつ標的 mRNA と結合して翻訳抑制と脱アデニル化を引き起こす (40, 41, 45) (図 1-2 B)。

本研究でもちいたショウジョウバエにおいて、miRNA は Ago1 に取り込まれる (46-48)。Ago1 は GW182 と結合し (49, 50)、さらに GW182 は PAN2-PAN3 複合体と CCR4-NOT 複合体に結合することで脱アデニル化を引き起こす (51-53) (図 1-2 B)。miRNA による脱アデニル化は主に CCR4-NOT 複合体によって引き起こされ、PAN2-PAN3 複合体の機能は限定的であると考えられている (49, 51, 54, 55)。

(2) Smaug による脱アデニル化

本研究では miRNA の他に、脱アデニル化反応のモデルとして Smaug をもちいた。Smaug はショウジョウバエ胚の発生に必須の因子であり、胚の前後軸を決定する Nanos タンパク質の濃度勾配形成に関与し、さらに母親由来の mRNA

をもちいた初期発生が完了した後に、母親由来の mRNA のおよそ 3 分の 2 を急速に分解誘導する (56, 57)。Smaug は sterile alpha mating (SAM) ドメインをもちいて Smaug recognition element (SRE) とよばれるステムループ配列に結合する (58, 59)。Smaug は CCR4-NOT 複合体を誘導することで mRNA の脱アデニル化を引き起こし (60) (図 1-2 C)、また Cup や Ago1 と結合することにより翻訳抑制を引き起こす (61, 62)。

5. CCR4-NOT 複合体

CCR4-NOT 複合体は真核生物において広く保存されており、多くの構成因子からなる巨大複合体である (図 1-4)。古くから CCR4-NOT 複合体は出芽酵母における核内転写調節因子として研究されていたが (63, 64)、細胞質の mRNA 分解に重要な役割をもつこと (9, 65) や、CCR4-NOT 複合体が主に細胞質に局在することが明らかになると (65, 66)、CCR4-NOT 複合体の細胞質における機能が注目されていった。現在では真核生物における mRNA 分解は、CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化によって主に誘導されると考えられている (67)。

本研究でもちいたショウジョウバエにおいて、CCR4-NOT 複合体は NOT1、NOT2、NOT3、CCR4、CAF1 (=POP2)、NOT9 (=CAF40)、NOT10、NOT11 (=C2orf29) の 8 種類の構成因子から成る (67) (図 1-4)。NOT1 は CCR4-NOT 複合体の足場タンパク質であり L 字型をしている (68)。NOT1 上の因子結合サイトのうち、最も C 末端側に NOT2 と NOT3 が結合している (67, 69)。また NOT2 と NOT3 はそれぞれの C 末端どうしで結合している (70)。NOT2 や NOT3 は出芽酵母をもちいた研究により転写や RNA 校正、mRNA の核外排出への関与が報告されていたが、細胞質における機能はよくわかっていなかった (69)。ショウジョウバエの細胞をもちいた先行研究では、NOT2 もしくは NOT3 をノックダウンすると、NOT1 タンパク質の量が顕著に減少し、それにより脱アデニル化が遅れることが報告されている (71)。また最近、出芽酵母において NOT2 と NOT3 (および NOT5: 出芽酵母における NOT3 のパラログ) は、脱アデニル化の下流反応、脱キャップを促進すると報告された (72)。

ショウジョウバエの NOT1 において、NOT2 および NOT3 結合サイトよりも N 末端側に NOT9 の結合サイトがある (67)。NOT9 の機能は、マウスにおける c-Myb 遺伝子の転写抑制因子として働く以外の報告はなかったが (73)、最近 miRNA 経路で働く GW182 と NOT1 との結合を補助しているという報告が 2 つのグループからなされた (74, 75)。

NOT1 の L 字の角にあたる領域に脱アデニル化酵素 CAF1 が結合している (67)。もう一つの脱アデニル化酵素 CCR4 は NOT1 には直接結合せず、CCR4 がもつロイシンリッチリピート (LRR) ドメインと CAF1 との結合を介して複合体上に存在する (76)。本研究の第二章はこれら脱アデニル化酵素の活性の解析であり、これらの酵素については別途後述する。

最も N 末端側には、ヒトとショウジョウバエ細胞において比較的最近同定された因子、NOT10 と NOT11 が結合している (70, 77)。出芽酵母において、NOT10 と NOT11 のホモログは今のところ明らかになっていない (67)。NOT11 は NOT1 と直接結合できるが、その結合は弱く、NOT10 によって結合が促進される (70)。NOT10 および NOT11 の機能は全く分かっておらず、NOT11 は DUF2363 ドメインという機能未知の構造を取るが、NOT10 は既知の構造を取らない (70)。また NOT10 や NOT11 をノックダウンしても脱アデニル化に影響はない (77)。

6. CCR4-NOT 複合体における脱アデニル化酵素

(1) CCR4

CCR4 は EEP スーパーファミリーに属する、アデニンに対し強い選択性をもつ Mg^{2+} 依存的 3'-5' エキソリボヌクレアーゼである (78–81)。典型的に、CCR4 は N 末端側に CAF1 との結合に必要なロイシンリッチリピート (LRR) ドメインと、C 末端側にヌクレアーゼドメインをもつ (31)。真核生物に広く保存されており、出芽酵母、線虫、ショウジョウバエでは 1 種類、哺乳類では 2 種類 (CNOT6 および CNOT6L) の CCR4 が存在する (65, 82, 83)。例外として、トリパノソーマは CCR4-NOT 複合体上に CCR4 をもたない (84)。また、植物は CCR4 を 2 つもつが CAF1 との結合に必要な LRR ドメインがなく、CCR4-NOT 複合体とは独立して働くと考えられてきた (83, 85)。しかし最近、イネにおいて新たな CCR4 と CAF1 との相互作用様式が発見された (86)。イネにおいては LRR ドメインの代わりに Mynd 様ドメインが存在し、CAF1 との結合プラットフォームを提供している (86)。もしかすると植物の CCR4 はこの新規結合様式をもちいて CAF1 と結合し、CCR4-NOT 複合体として機能しているのかもしれない。

(2) CAF1

CAF1 は DEDD ファミリーに属する、 Mg^{2+} 依存的 3'-5' エキソリボヌクレアーゼである (87)。DEDD は活性部位を構成するアスパラギン酸 (D) とグルタミン酸 (E) を表しており、真核生物の CAF1 において広く保存されているが、出芽酵母の CAF1 のみ保存されていない (88)。出芽酵母の CAF1 は試験管内においては活性を保持しているが、アデニンへの選択性はほとんど失われており (88, 89)、活性部位へ変異を導入した出芽酵母で異常が見られないことから (90)、出芽酵母では CCR4 を複合体へつなぎとめる役割に留まると考えられている。

一方、出芽酵母以外の真核生物における CAF1 はアデニンへの強い選択性をもつ (81, 90–92)。CAF1 は分裂酵母、トリパノソーマ、線虫 (CCF-1)、ショウジョウバエでは 1 つ、哺乳類では 2 つ (CNOT7 および CNOT8) 存在する (82, 84, 88)。また、植物では種によって異なり、シロイヌナズナでは 11 個の CAF1 がある (93)。出芽酵母では上述のように CCR4 が脱アデニル化に重要であるが、ショウジョウバエではむしろ CAF1 が強く働いていると報告されている (94)。

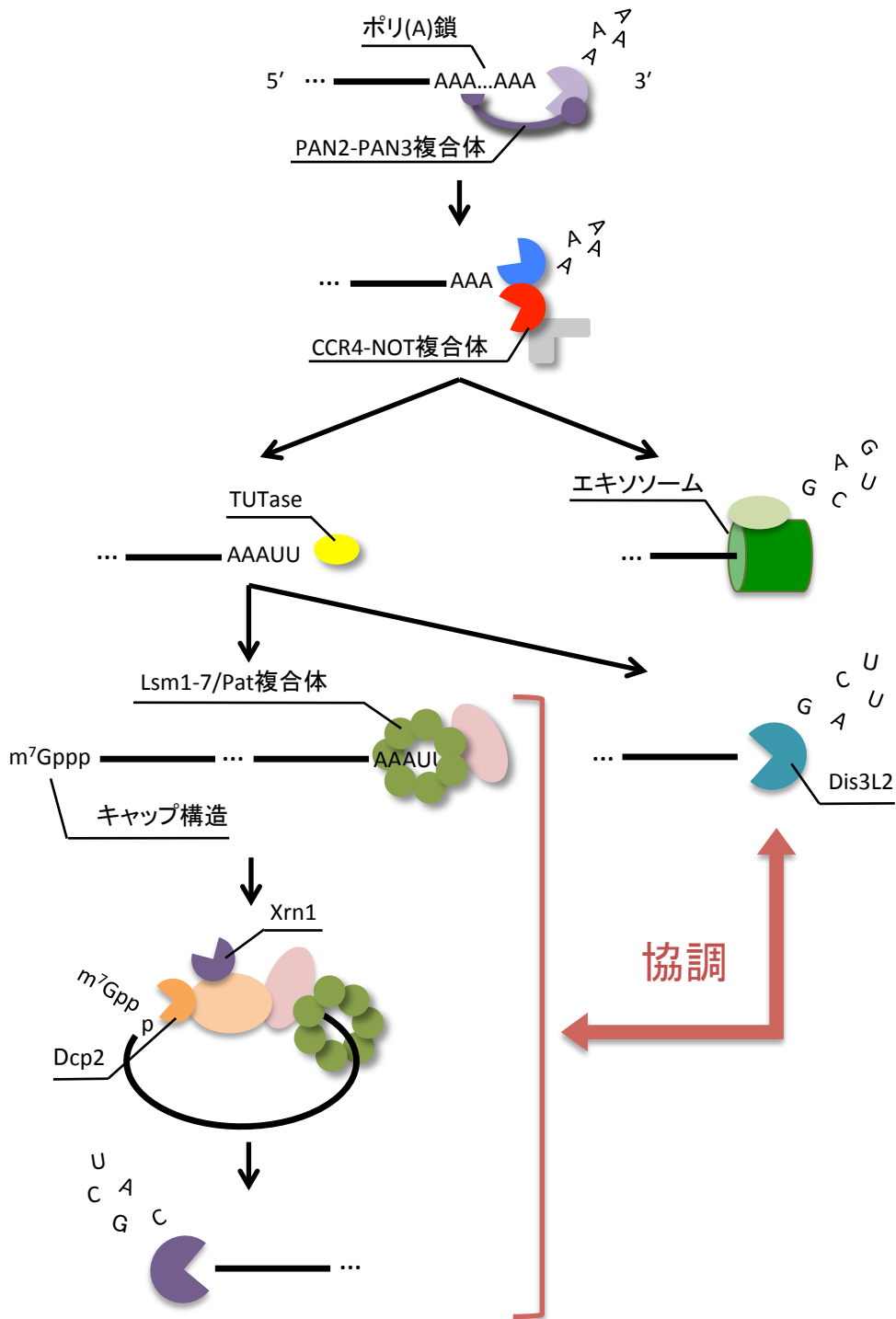


図1-1. 典型的な真核生物のmRNAの分解機構

真核生物のmRNAの分解は、主に脱アデニル化から始まる。脱アデニル化はPAN2-PAN3複合体とCCR4-NOT複合体によって行われる。脱アデニル化されたmRNAは3'末端からエキソソームによって分解されるか、TUTaseにより3'末端にUが付加される。Uが付加されたmRNAはDis3L2により3'末端から分解されるか、3'末端にLsm1-7/Pat複合体が結合する。Lsm1-7/Pat複合体は5'末端にあるキャップ構造を外すための複合体を誘導し、その複合体中のDcp2が脱キャップを行う。脱キャップされたmRNAは5'末端からXrn1によって分解される。

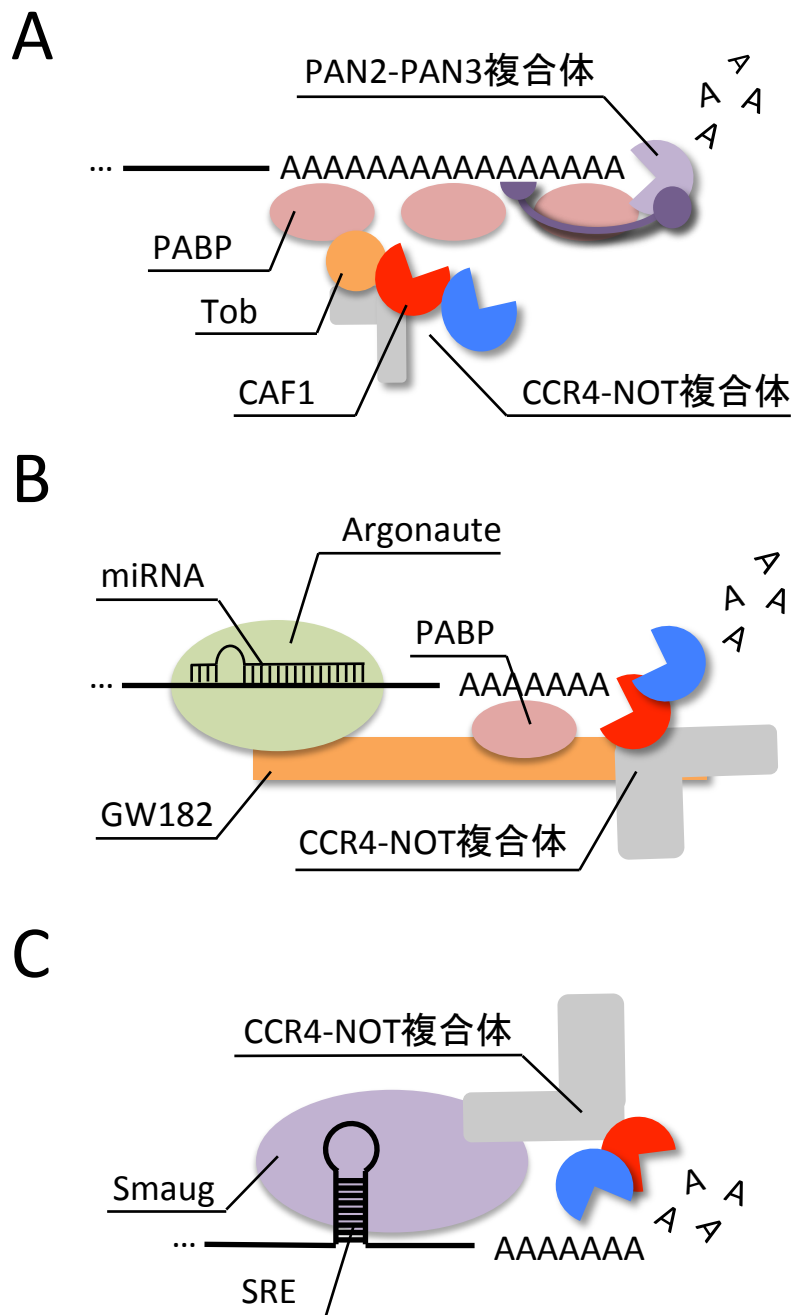


図1-2. さまざまな脱アデニル化誘導機構

- (A) PABPによる恒常的な脱アデニル化の誘導機構
- (B) miRNAによる脱アデニル化の誘導機構
- (C) Smaugによる脱アデニル化の誘導機構

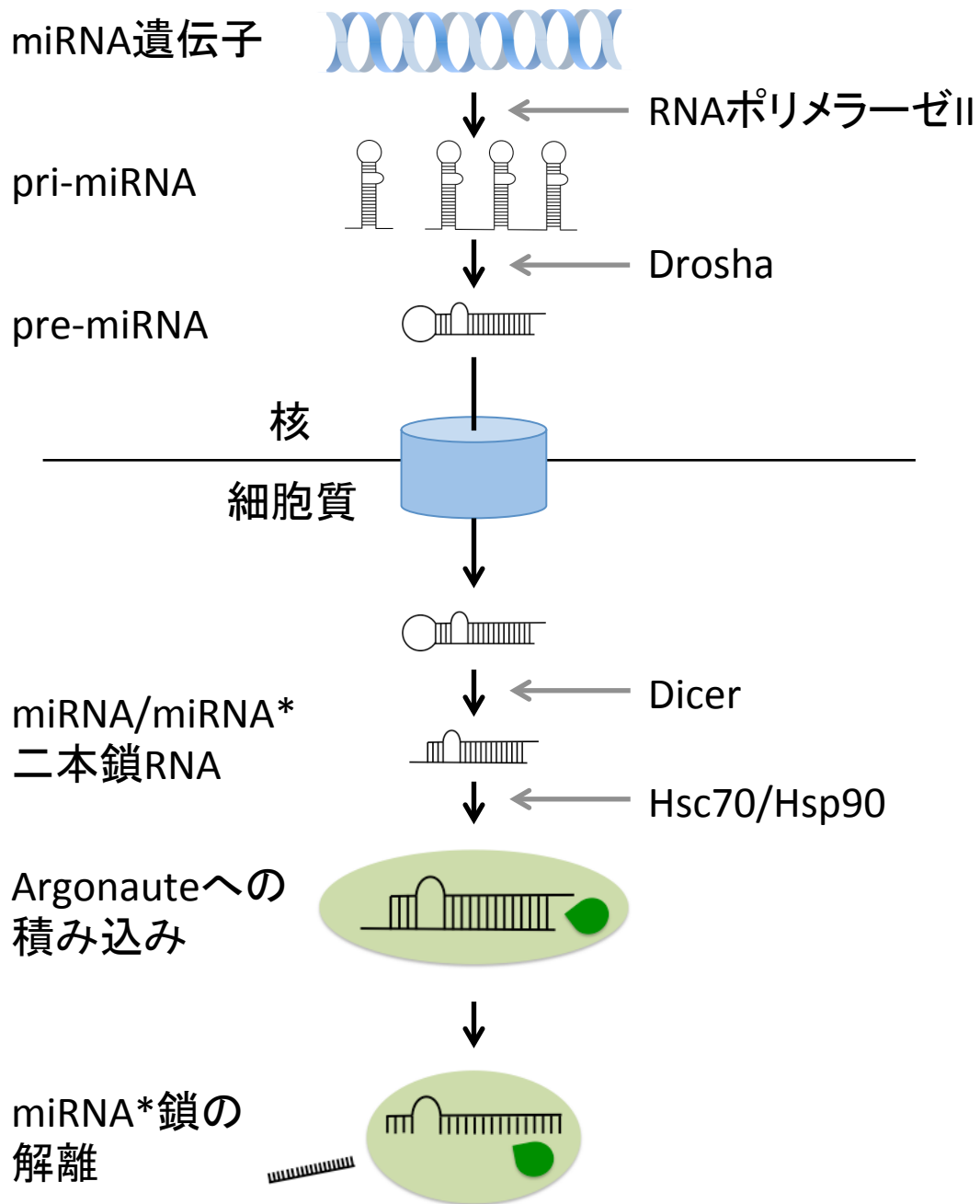


図1-3. miRNAの生合成と機能できるようになるまで
 microRNA (miRNA) はゲノムにコードされており、pri-miRNAとして転写されたあと、Droshaによってpre-miRNAに切り出される。pre-miRNAは細胞質へ運ばれたあと、DicerによってプロセシングされてmiRNA/miRNA*二本鎖RNAができる。miRNA/miRNA*二本鎖RNAは、ATP依存的なHsc70/Hsp90シャペロン複合体の反応によりArgonaute (Ago) に取り込まれる。miRNA/miRNA*二本鎖RNAはAgoの構造変化によって剥がされることでmiRNA*鎖が解離し、結果としてmiRNAがAgoに残る。AgoはmiRNAの配列を参照し、それと相補的な配列をもつmRNAと結合して翻訳抑制と脱アデニル化を引き起こす。

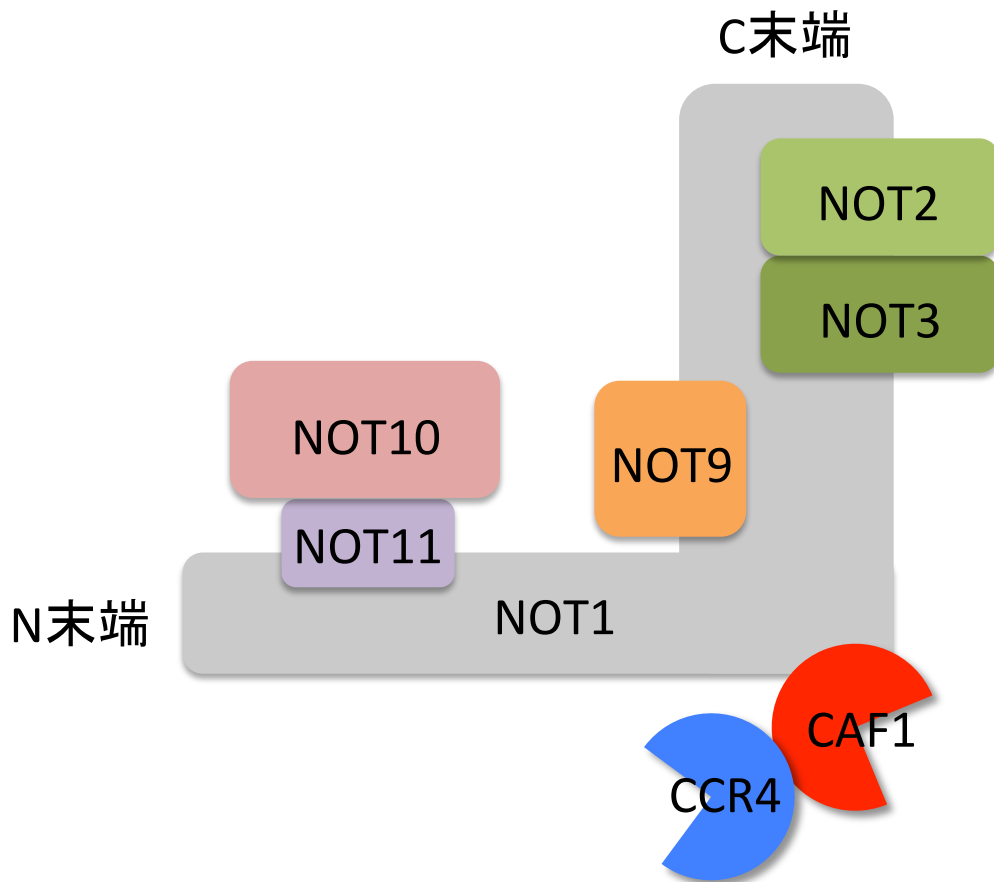


図1-4. ショウジョウバエのCCR4-NOT複合体

ショウジョウバエにおいて、CCR4-NOT複合体はNOT1、NOT2、NOT3、CCR4、CAF1、NOT9、NOT10、NOT11の8種類の構成因子から成る。

第二章

CCR4 と CAF1 によるポリ(A)下流配列の除去

目的

当研究室の先行研究において、miRNA 依存的にポリ(A)鎖の下流にある A 以外の配列が除かれる現象がショウジョウバエ細胞において発見された。さらにポリ(A)鎖の下流配列が除かれるためには、上流にあるポリ(A)鎖が重要である可能性が見出された。miRNA による脱アデニル化は CCR4-NOT 複合体が主に引き起こすことから (49, 51, 54, 55)、CCR4-NOT 複合体における脱アデニル化酵素である CCR4 もしくは CAF1 が、上流のポリ(A)鎖を認識して A 以外の配列を除くという未知の活性をもつ可能性が示唆された。第一章で述べたように、CCR4 と CAF1 はアデニンに強い選択性をもつことがわかっていた。しかしその一方で、精製した CCR4 や CAF1 では A 以外の配列を除く場合があることも報告されていた (79, 80, 89–91)。これらの報告は「CCR4 や CAF1 はどのように分解すべき配列を決定するのか」という問いに対し重要な示唆を含むが、CCR4 や CAF1 が A 以外の配列をどのように除くのかは長らく明らかにされてこなかった。第二章の目的は、ポリ(A)鎖の下流配列は CCR4 や CAF1 によって除かれるのか、除くとすればどのように除くのかを示すことである。

結果

ショウジョウバエ S2 細胞において miRISC はポリ(A)鎖の下流にある A ではない配列を除くことができる

当研究室の先行研究において、miRNA による抑制のうち翻訳抑制のみの効果を調べるために、レポーターRNA のポリ(A)鎖の下流にアデニン以外の配列から成る短い RNA 配列（以下、ポリ(A)下流配列）を付加することで脱アデニル化を止める試みがなされた。miRNA によって誘導される脱アデニル化酵素 CCR4 と CAF1 はアデニンに強い選択性をもつ 3'→5'エキソリボヌクレアーゼであると報告されていたため、ポリ(A)下流配列は除かれないと予想された。実際、114 塩基のポリ(A)鎖と 40 塩基のポリ(A)下流配列をもつレポーターRNA では脱アデニル化は起こらなかった (95)。しかしその実験の過程で、より短いポリ(A)下流配列では脱アデニル化を止めることができないことが明らかにされた。

初めに、ショウジョウバエ S2 細胞において、短いポリ(A)下流配列が miRNA 依存的に除かれるという先行研究の結果を確認した。先行研究では、細胞において意図した 3'末端をもつ RNA を発現させるため、自発的に切断がおこるハンマーヘッドリボザイム (HhR) をポリ(A)下流配列の下流に導入していた (95)。この例に倣い、Renilla luciferase (Rluc) の ORF と、S2 細胞では発現していない miRNA である let-7 に対応する標的配列 8 個に加え (96)、3'末端が 50 塩基のポリ(A)鎖となる RNA と、ポリ(A)鎖に加えて 10 塩基のポリ(C)となる RNA をそれぞれ S2 細胞で発現させた (図 2-1 A)。

これらの RNA は S2 細胞において安定であったが、let-7 の前駆体である pri-let-7 を発現させるとどちらも発現が顕著に低下した (図 2-1 B, Mock)。発現の低下が RNA の分解によることを調べるため、脱アデニル化後に働く脱キャップ酵素 Dcp2 をノックダウンした。すると pri-let-7 を発現させたときに脱アデニル化された RNA が蓄積していた (図 2-1 B, dcp2[RNAi])。このように、miRNA は S2 細胞において、ポリ(A)下流配列を除いてレポーターRNA を脱アデニル化することができる。

細胞抽出液における脱アデニル化活性はポリ(A)下流配列の長さとその上流のポリ(A)鎖の長さに影響を受ける

ポリ(A)下流配列が除かれる反応をより詳細に解析するために、S2 細胞抽出液を用いて脱アデニル化反応を観察した。先行研究において、Ago1 を過剰発現させた S2 細胞抽出液に二本鎖 miRNA を入れ、Ago1 に miRNA をプログラムさせたあとに miRNA に対応する標的配列をもつ RNA を添加し、反応後泳動展開することで脱アデニル化を観察できる系が報告されていた (95)。

細胞抽出液でもポリ(A)下流配列が除かれるのかを確かめるため、*let-7* に対応する 4 個の標的配列に加え、20 塩基のポリ(A)鎖をもつ RNA と、ポリ(A)鎖の下流に 5 塩基のポリ(C)をもつ RNA を試験管内転写により作製した (図 2-2 A)。これらの RNA を、*let-7* をプログラムした抽出液に添加して脱アデニル化を観察したところ、ポリ(A)鎖のみの RNA に比べて効率は低下するものの、ポリ(A)下流配列をもつ RNA でも脱アデニル化は進行した (図 2-2 B,C)。

先行研究から S2 細胞において、ポリ(A)下流配列が十分に長いと脱アデニル化は止まることが報告されていたので (95)、抽出液中でもポリ(A)下流配列が長くなるほど脱アデニル化の効率が低下するのかを調べた。10 塩基のポリ(C)をポリ(A)下流配列としてもつ RNA を、*let-7* をプログラムした抽出液に添加したところ、5 塩基のポリ(C)をもつ RNA よりも脱アデニル化効率は低下した (図 2-2 A-C)。この結果は、ポリ(A)下流配列が長くなるほど脱アデニル化効率は低下していくことを示している。

ポリ(A)下流配列の上流にあるポリ(A)鎖は脱アデニル化に影響を与えるのかを調べるため、ポリ(A)鎖の下流のポリ(C)を 10 塩基に固定し、ポリ(A)鎖を 20 塩基から 60 塩基にした RNA を作製した (図 2-2 A)。興味深いことに、上流のポリ(A)鎖が 20 塩基の RNA よりも 60 塩基の RNA の方が脱アデニル化効率は高かった (図 2-2 B,C)。

この結果はポリ(A)鎖が長くなったためではなく、RNA の全長が長くなったために脱アデニル化が促進された可能性も考えられる。そこで全長は同じだが、上流のポリ(A)鎖が 20 塩基である RNA と 60 塩基である RNA を作製した (図 2-2 A)。ポリ(A)鎖が 20 塩基の RNA よりも 60 塩基の RNA の方が、効率よく脱アデニル化された (図 2-2 D,E)。この結果は RNA の全長ではなく、上流のポリ(A)鎖の長さが脱アデニル化に影響を与えていることを示している。

ポリ(A)下流配列をもつ RNA においても CCR4-NOT 複合体が脱アデニル化している

miRNA による脱アデニル化は、主として CCR4-NOT 複合体が引き起こしていることが知られている (49, 51, 54, 55)。ポリ(A)下流配列をもつ RNA においても CCR4-NOT 複合体が脱アデニル化するのかを調べるために、CCR4-NOT 複合体上の脱アデニル化酵素である CCR4 と CAF1 を S2 細胞においてノックダウンした (図 2-3 A)。CAF1 をノックダウンした S2 細胞の抽出液では、*Mini-let-7A₂₀* は脱アデニル化されなかった (図 2-3 B)。一方、CCR4 のノックダウンによる *Mini-let-7A₂₀* における脱アデニル化への影響は限定的であった (図 2-3 C,D)。これらの結果は、CCR4-NOT 複合体の構造上、CAF1 が CCR4 と複合体の足場タンパク質である NOT1 とを繋いでいるために、CAF1 をなくすと CCR4 も複合体から離れるが、CCR4 をなくしても CAF1 は機能できる、という知見とよく一致している (66)。重要なことに、CAF1 のノックダウンでも CCR4 のノックダウンでもポリ(A)下流配列をもつ RNA の脱アデニル化が遅れた (図 2-3 B-D)。これらの結果は CCR4-NOT 複合体がポリ(A)下流配列をもつ RNA においても脱アデニル化していることを示唆している。

CCR4 と CAF1 の精製

CCR4-NOT 複合体がポリ(A)下流配列を直接除いているのかを調べるためには、ポリ(A)下流配列が精製した CCR4 と CAF1 により除かれることを示せば良い。しかしショウジョウバエの CCR4 と CAF1 を単離した報告はなかった。そこで CCR4 と CAF1 の精製条件を検討することにした。

まず、CCR4 と CAF1 を発現させる生物として大腸菌 (BL21 株) を選択し、ベクターとして、低温で発現誘導を行う pCold シリーズを選択した。C 末端に 6 個の His タグが付くよう CCR4 と CAF1 をそれぞれクローニングし、大腸菌に発現させて精製した。この方法で CAF1 は精製に成功したが、CCR4 は発現こそしたものの不溶化した。CCR4 の N 末端に 6 個の His タグあるいは 1 個の SBP タグをつけて精製を試みたが、やはり不溶化した。

先行研究において、大腸菌で発現させたヒトの全長 CNOT6L (hCcr4b) は精製できないという報告があった (80)。CNOT6L のヌクレアーゼドメインのみであれば大腸菌で発現させても精製できることから、不溶化の原因は CCR4 のもつ CAF1 との結合ドメイン、LRR ドメインであると考えられる。タンパク質の結合領域は一般に疎水性なので、CAF1 との結合領域が露出していることが、CCR4 が不溶化する原因ではないかと考えた。そこで pETDuet に CCR4 と CAF1 をクローニングし、大腸菌内で 2 つを同時に発現させた。しかし CCR4/CAF1 ヘテロダイマーは不溶化した。

大腸菌では LRR ドメインを適切に折りたたむことができない可能性があったので、バキュロウイルスをもちいて昆虫細胞である Sf9 細胞に CCR4 と CAF1 を発現させることにした。pFastBac Dual に CCR4 と CAF1 をクローニングし、Sf9 細胞で 2 つを同時に発現させた。すると CCR4/CAF1 ヘテロダイマーは可溶化したので、ニッケルビーズカラム、陽イオンカラム、陰イオンカラムの順に精製した (図 2-4)。最終的に、野生型と活性変異体を組み合わせた 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを作製した (図 2-5 A)。

CCR4 と CAF1 はそれぞれ独立にポリ(A)下流配列を除く活性をもつ

CCR4-NOT 複合体がポリ(A)下流配列を直接除いているのかを調べるために、miRNA に対するターゲット配列をもたないレポーターRNA を作製し、精製した 4 種類の CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを作用させた (図 2-5 A,B)。すると両方が活性をもたない場合を除いて、ポリ(A)鎖のみをもつレポーターRNA は脱アデニル化された (図 2-5 C)。続いてポリ(A)下流配列をもつ RNA (noC-A₂₀C₅) に対して CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを作用させたところ、どちらかが活性をもてば脱アデニル化は起こることがわかった (図 2-5 D)。また、ポリ(A)下流配列として 5 塩基の C ではなく、ランダムな 10 塩基の配列 (UUUGUCUGAC) をもつレポーターRNA でも脱アデニル化は起こった (図 2-5 E)。これらの結果は、CCR4 と CAF1 の両方が独立に A 以外の配列を除く活性をもつことを示している。

そこで 30 塩基のポリ(A)、(U)、(G)、(C)RNA に対して 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを作用させ、CCR4 および CAF1 の塩基嗜好性を調べた。かつての報告通り、CCR4 と CAF1 は A に対する強い嗜好性をもっていた (図 2-6 A-D)。一方で noC-A₂₀C₅ では除かれていた C は、30 塩基のポリ(C)RNA では一塩基も除かれなかった (図 2-6 A-D)。また、ポリ(U)においてシグナル強度の低下が見られたが、CCR4 と CAF1 の両方が活性をもたないときにも低下していることから、非特異的な分解であると考えられる (図 2-6 A-D)。これらの結果は、CCR4 と CAF1 が A 以外の配列を除く際には、上流のポリ(A)鎖が必要であることを示している。

精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーの活性はポリ(A)下流配列の長さとその上流のポリ(A)鎖の長さに影響を受ける

続いて、細胞抽出液で観察された、ポリ(A)下流配列の長さ、その上流のポリ(A)鎖の長さが脱アデニル化活性に影響を与える現象が、精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーにおいても観察されるかを調べた。この実験のために、異なる長さのポリ(A)下流配列およびその上流のポリ(A)鎖をもつレポーターRNA を準備した (図 2-5 B)。これらのレポーターRNA に対して精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを作用させたところ、細胞抽出液をもちいたときと同様に、ポリ(A)下流配列が長いほど活性は阻害され、上流のポリ(A)鎖が長いほど活性は促進された (図 2-7 A,B)。また、この結果はやはり RNA の全長による効果ではなかった (図 2-7 C,D)。さらにこれらの傾向は、CCR4 と CAF1 のどちらかが活性をもつ場合でも同様に観察された (図 2-7 A-D)。これらの結果は、CCR4 と CAF1 は独立にポリ(A)下流配列を除く活性をもち、その活性はポリ(A)下流配列の長さとその上流のポリ(A)鎖の長さのバランスに依存していることを示している。

CCR4 と CAF1 はエキソヌクラーゼ活性でポリ(A)下流配列を除く

ショウジョウバエの CCR4 と CAF1 は A に強い嗜好性をもつ 3'-5' エキソリボヌクラーゼであると報告されている (66)。それでは CCR4 と CAF1 はどのようにポリ(A)下流配列を除くのだろうか? エンドヌクラーゼ活性かエキソヌクラーゼ活性かを明らかにするため、ポリ(A)下流配列を放射性ラベルし、分解産物を解析した。より具体的には、ポリ(A)鎖の上流は C を含まず、ポリ(A)下流配列が「CGGGG」となるよう転写テンプレートを設計し、放射性リン原子をもつ CTP を用いて試験管内転写することで、レポーターRNA 中のただ一つの C を放射性標識した。また、コントロールとして 20 塩基のポリ(A)鎖の代わりに U と G からなる配列をもつ RNA (noC-UG₂₀C₁G₄) を用意した (図 2-8 A)。もし CCR4 や CAF1 がエンドヌクラーゼ活性でポリ(A)下流配列を除くならば、分解産物として断片が検出されることが予想される。一方、エキソヌクラーゼ活性で除くならば CMP が検出される。結果として、これらのレポーターRNA に精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを作用させると、一塩基の分解産物が生じた (図 2-8 B)。noC-A₂₀C₁G₄ でみられる分解産物のシグナルは、CCR4 と CAF1 の両方が活性をもたない場合や、上流配列がポリ(A)ではなく U と G からなる RNA におけるシグナルよりも顕著に強かった (図 2-8 B)。この結果は、分解産物のシグナルが CCR4 と CAF1 のポリ(A)下流配列分解活性に依存していることを示している。さらに薄層クロマトグラフィーで一塩基の分解産物が CMP であることを確かめた (図 2-8 C)。これらの結果は、CCR4 と CAF1 はエキソヌクラーゼ活性によってポリ(A)下流配列を除くことを示している。

考察

本研究により、CCR4 と CAF1 にはポリ(A)配列が上流にあるときにのみ、A 以外の配列を除く活性があることが示された。そしてこの活性は、上流のポリ(A)配列が長いほど促進され、ポリ(A)下流配列が長いほど抑制される性質があることもわかった。また、CCR4 と CAF1 はどちらもエキソヌクレアーゼ活性で A 以外の配列を除く。これらの結果は、CCR4 と CAF1 の両方が 3'末端から離れた位置にあるポリ(A)配列を認識し、続いて 3'末端の A 以外の配列をエキソヌクレアーゼ活性で除くことを示唆している (図 2-9)。

CCR4 と CAF1 のアデニン認識機構

先行研究における結晶構造解析の結果から、CAF1 と CCR4 の活性部位はアデニンを認識することができることと報告されている (80, 97) (図 2-10 A,B)。分裂酵母の Pop2p (CAF1 のホモログ) では Ser122 がアデニンの 3 位にある窒素原子と水素結合を形成し、さらに Leu125 の側鎖がプリン環の位置を安定化していると考えられている (97) (図 2-10 A)。一方で、ヒトの CNOT6L (hCcr4b) の活性部位では、アデニンのプリン環が Phe484 と Pro36 の環に挟まれるように認識されている。そして、アデニンの 6 位の窒素原子が Asn412 のカルボニル基と相互作用している (80) (図 2-10 B)。

しかし本研究の結果は、上流にポリ(A)配列があれば A 以外の塩基をもつ RNA を分解できることを示している。上記の先行研究では、CCR4 および CAF1 の活性部位とアデニンとの相互作用はそれぞれ 1 ヶ所しかなく、A 以外の配列が活性部位に入る余地がある (図 2-10 A,B)。実際に、CMP が CNOT6L の活性部位に入り込んだ結晶構造が最近報告された (98) (図 2-10 C,D)。この報告によると、CMP と CNOT6L の活性部位との位置関係は、AMP のそれとほとんど同じであった。この結果は、A 以外の塩基をもつ RNA でも、一度活性部位に認識されると切断される可能性を示唆している。一方で、CMP は AMP よりも CNOT6L および CNOT7 (hCaf1) の阻害剤として弱く、AMP の 1/3~1/10 ほどの強さであることから (98)、CMP は AMP よりも脱アデニル化酵素に認識されにくいと考えられる。塩基を認識する段階で A 以外をはじく機構の存在は、CCR4 や CAF1 が A を好む理由の一端を担っている。しかし一方で、AMP 以外もある程

度は結合することを考えると、CCR4 や CAF1 がアデニンに対して特異的ともいえる強い選択性をもつ理由は未だ説明できていない。CCR4 や CAF1 による塩基の選択性は、3'末端と活性部位の関係性だけでは完結しない、より複雑な機構によって決められている可能性がある。

CCR4 と CAF1 の上流配列の認識

CCR4 と CAF1 はポリ(C)配列を全く削れない一方で、ポリ(A)配列の下流のポリ(C)配列は除くことができる。この結果は、CCR4 と CAF1 が A 以外の配列を除く際に、上流のポリ(A)配列を認識していることを示唆している。しかし、CCR4 と CAF1 がどのように上流ポリ(A)配列を認識しているのか、その手がかりは現時点でそう多くはない。先行研究において、CNOT6L の活性部位に AMP が入った結晶構造を得る過程で、活性部位とは別の位置に AMP が存在する結晶構造が得られた (80) (図 2-11)。この結果は、活性部位とは別の位置にも A を認識する領域が存在する可能性を彷彿とさせるが、一方で結晶化過程のアーティファクトである可能性も否定できない。もう一つの可能性として、CCR4 あるいは CAF1 が A 以外の配列の除去を何度も試すうちに、偶発的に上流のポリ(A)配列が活性部位のアデニン認識サイトに入り込み、A 以外の配列の除去が起こる、という仮説が挙げられる。しかし CMP と CNOT6L の結晶構造を見る限り、シチジンは活性部位のアデニンが認識される場所を占拠しており (98)、3'末端の塩基以外の塩基が相互作用する余地はないと思われる (図 2-10 C,D)。

このように、3'末端より上流の配列が認識されるメカニズムは不明である一方で、ポリ(A)配列に限らず、上流の配列が CCR4 や CAF1 による脱アデニル化に影響を与えているという報告は本研究だけではない (38, 99)。精製した出芽酵母の CCR4 による脱アデニル化は、標的 RNA のポリ(A)鎖の長さを固定し、その上流の A 以外の配列を短くすると、顕著に遅れることが報告されている (99)。RNA の全長が脱アデニル化に重要である可能性もあるが、いずれにせよ CCR4 による脱アデニル化が 3'末端で完結する反応ではないことを示した初めての報告であった。さらに最近、CCR4-NOT 複合体を試験管内で再構成した研究の中で、ポリ(A)鎖より上流の配列が脱アデニル化に影響を与えると指摘された (38)。ポリ(A)鎖の上流で二次構造を組む RNA では、同じ長さの組まない RNA よりも脱アデニル化が遅れることが報告された。さらに、ポリ(A)鎖よりも上流の配列に相補的なオリゴ DNA を添加すると、オリゴ DNA を添加しないときに比べて脱アデニル化が顕著に遅れた (38)。これらの結果は、上流のポリ(A)配列を認識するという本研究の仮説を強く支持する一方で、CCR4 や CAF1 には明らかな RNA 結合モチーフは存在せず、なぜ 3'末端より上流の配列が脱アデニル化に影響を与えるのかについては今後の解析が待たれる。

CCR4 と CAF1 のポリ(A)下流配列除去活性の生物学的意義

本研究は CCR4 と CAF1 にポリ(A)鎖の下流にある A 以外の配列を除く活性があることを示したが、その生物学的な意義とはなんだろうか？

ポリ(A)下流配列は出芽酵母、植物、ヒトの内在 mRNA で見つかっており、mRNA の安定性に関わっている (21, 100, 101) (図 2-12 A)。ヒトの細胞において、最も高頻度で見られるポリ(A)下流配列は U であり、25 塩基以下のポリ(A)鎖をもつ mRNA に多い傾向がある (101)。ある mRNA 種における U をもつ頻度と、その mRNA 種における半減期との間には緩やかに負の相関があり、mRNA 分解のシグナルとして機能していることが示唆される (101)。ヒトにおいて、ポリ(A)配列の下流の U は TUT4 もしくは TUT7 によって付加されるが、TUT4/7 は長いポリ(A)鎖よりも短いポリ(A)鎖を好むことがわかっている (14)。対照的に、G は 40 塩基以上のポリ(A)鎖をもつ mRNA に多い傾向があり、mRNA における半減期と正の相関がある (101)。今のところ、mRNA のポリ(A)鎖の下流に G を付加する酵素は同定されていない。

CCR4 や CAF1 のポリ(A)下流配列の除去活性は、こうした内在のポリ(A)下流配列を除くことで mRNA の安定性を制御しているのかもしれない。本研究ではこの仮説の検証を試みた。CCR4 や CAF1 が内在 mRNA においてもポリ(A)下流配列を除いていることを示すためには、CCR4 と CAF1 をなくしたときに、通常よりも内在の mRNA におけるポリ(A)下流配列が伸長、あるいは高頻度に出現することを示せばよいと考えた。予備実験として、CAF1 ノックダウン (CAF1 がないと CCR4 は NOT1 と結合できない) と Mock の total RNA を用意し、ポリ(A)鎖の下流にアダプター配列を付加した。特定の mRNA とアダプター配列に対するプライマーで PCR した後、PCR 産物をクローニングしてポリ(A)鎖側から配列を解析することで、ポリ(A)下流配列を検出しようと試みた (図 2-12 B)。モデル mRNA として、発現量が多いことで知られる EF2b を選択した。まず、Mock よりも CAF1 ノックダウンでポリ(A)鎖が確かに伸長した集団が見られたことを確認した (図 2-12 C)。今のところショウジョウバエでは内在 mRNA のポリ(A)下流配列は報告されていないが、この実験でポリ(A)鎖の下流の U および G を発見した (図 2-12 D)。しかし、CAF1 ノックダウンにおいてポリ(A)下流配列の頻度および長さは、Mock に比べてむしろ減っていた (図 2-12 D)。データのサンプル数が少ないので確かなことは言えないが、CAF1 ノ

ックダウンによって mRNA 全体のポリ(A)鎖が伸びた結果、短いポリ(A)鎖で付加されやすい U が付加されにくくなり、その結果ポリ(A)下流配列が少なくなった可能性が考えられる。この結果を受けて、ポリ(A)下流配列を網羅的に調べることも検討したが、CAF1 ノックダウンによるポリ(A)鎖長の伸長の影響が排除できず、ポリ(A)下流配列除去活性の影響のみを切り分けて解析することができないことから実施しなかった。

そのほかに考えられる CCR4 や CAF1 のポリ(A)下流配列除去活性の意義は、ポリ(A)鎖内に紛れた A 以外の配列によって脱アデニル化が停止してしまうのを防ぐ働きや、3'UTR 内にあるポリ A 伸長反応に必要な配列「AAUAAA」を CCR4 や CAF1 が認識して除くことで、再アデニル化を防ぐ働きがあることも考えられる。CCR4 や CAF1 のポリ(A)下流配列除去活性の生物学的な意義について、今後明らかになっていくことを期待する。

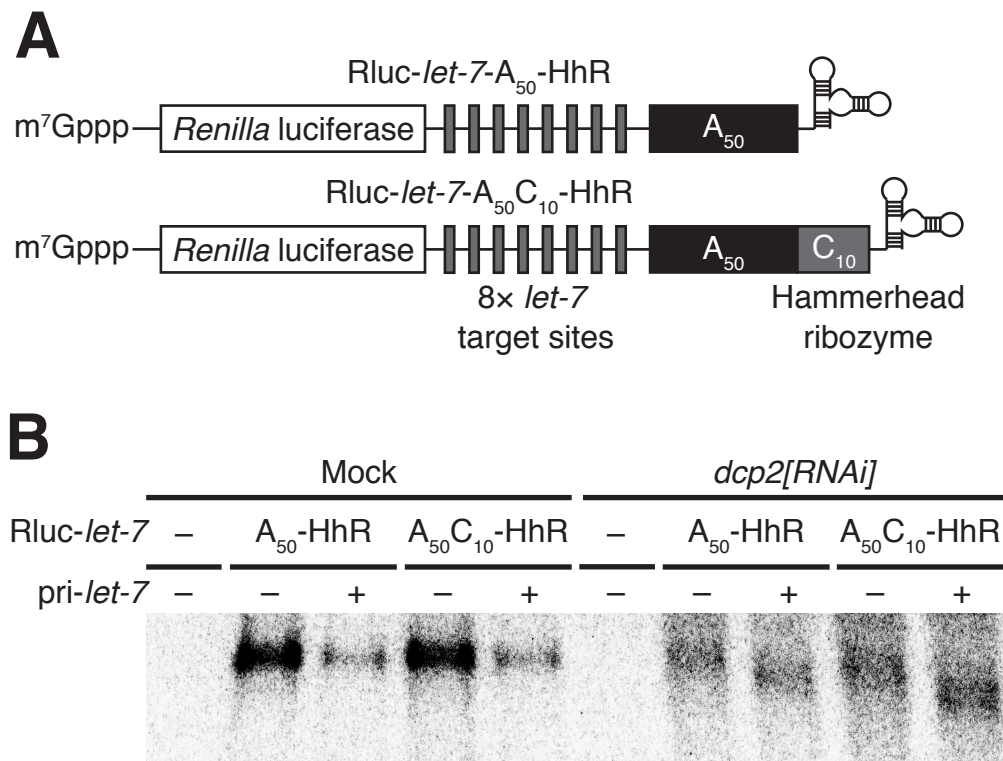


図 2-1. miRNA は S2 細胞において A ではない配列の除去を誘導できる

(A) Rluc-*let-7*-A₅₀-HhR と Rluc-*let-7*-A₅₀C₁₀-HhR の模式図。これらのレポーター RNA は Renilla luciferase (Rluc) の ORF、8 個の *let-7* に対応する標的配列、そしてハンマーヘッドリボザイム (HhR) をもつ。塩基に示された下付き文字はその配列の長さを表す。

(B) A に示したレポーター RNA のノザンブロットの結果。レポーター RNA は GFP ノックダウン下では *pri-let-7* を発現させると分解されるが、Dcp2 ノックダウン下では *pri-let-7* を発現させると脱アデニル化された RNA が検出された。

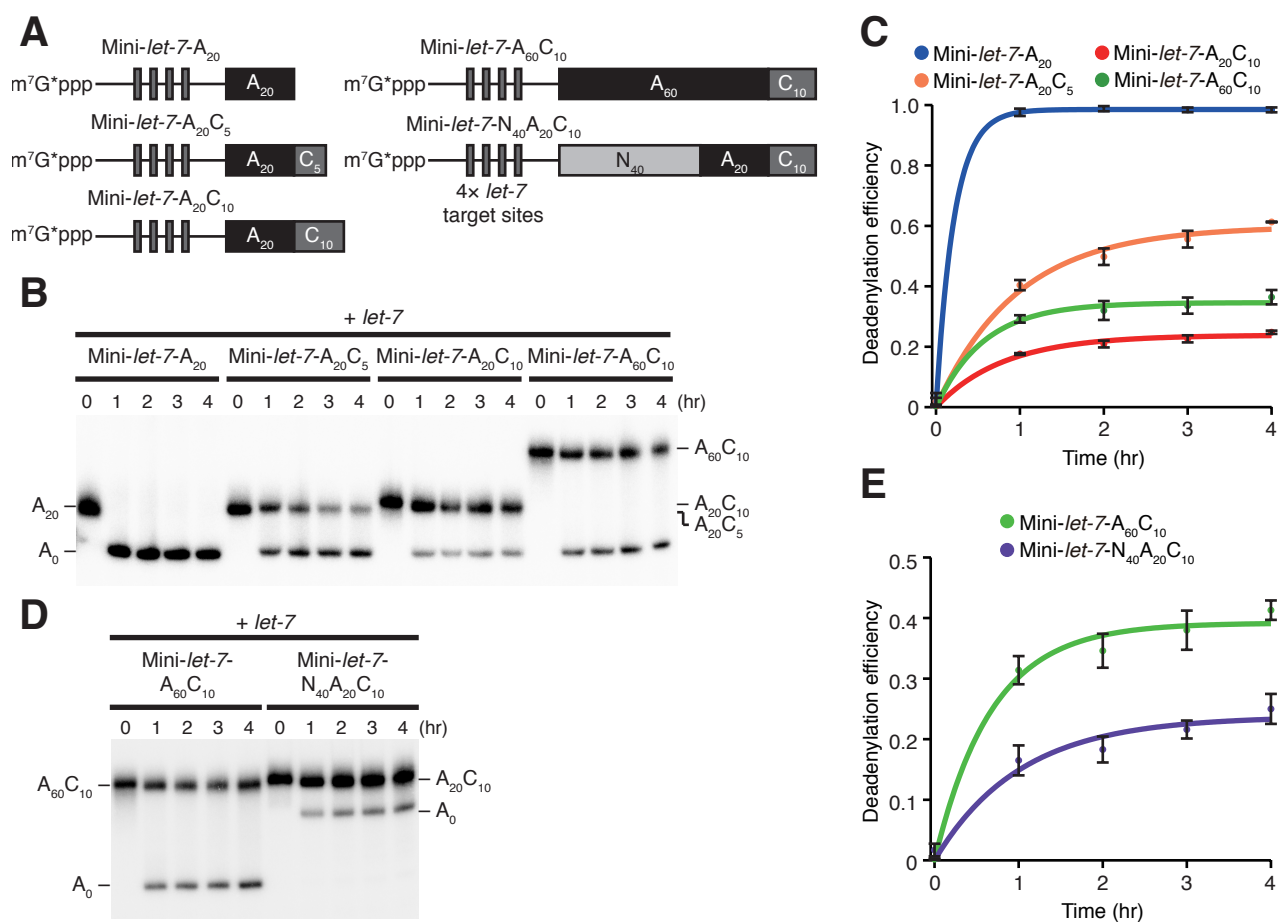


図 2-2. 細胞抽出液における脱アデニル化活性はポリ (A) 下流配列の長さとその上流のポリ (A) 鎖の長さに影響を受ける

(A) Mini-let-7 レポーター RNA シリーズの模式図。これらのレポーター RNA は 4 個の *let-7* に対応する標的配列をもち、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP をもちいてキャップされた。塩基に示された下付き文字はその配列の長さを表す。アスタリスクは放射性標識を表す。

(B) Ago1 を過剰発現させた S2 細胞抽出液における Mini-let-7 レポーター RNA の脱アデニル化解析

(C) B におけるバンドのシグナル強度を定量した。A₀ におけるシグナル強度を全体のシグナル強度で割り、その値をプロットした。Mini-let-7-A₂₀ は効率よく脱アデニル化を受けるが、ポリ (A) 下流配列が長くなると脱アデニル化の効率は低下していく。しかし上流のポリ (A) 鎖が長くなると脱アデニル化効率は改善した。グラフは平均と標準偏差を表す (n=3)。

(D) Ago1 を過剰発現させた S2 細胞抽出液における Mini-let-7-A₆₀C₁₀ と Mini-let-7-N₄₀A₂₀C₁₀ の脱アデニル化解析

(E) D におけるバンドのシグナル強度を定量した。A₀ におけるシグナル強度を全体のシグナル強度で割り、その値をプロットした。Mini-let-7-A₆₀C₁₀ は Mini-let-7-N₄₀A₂₀C₁₀ よりも効率よく脱アデニル化を受けた。グラフは平均と標準偏差を表す (n=3)。

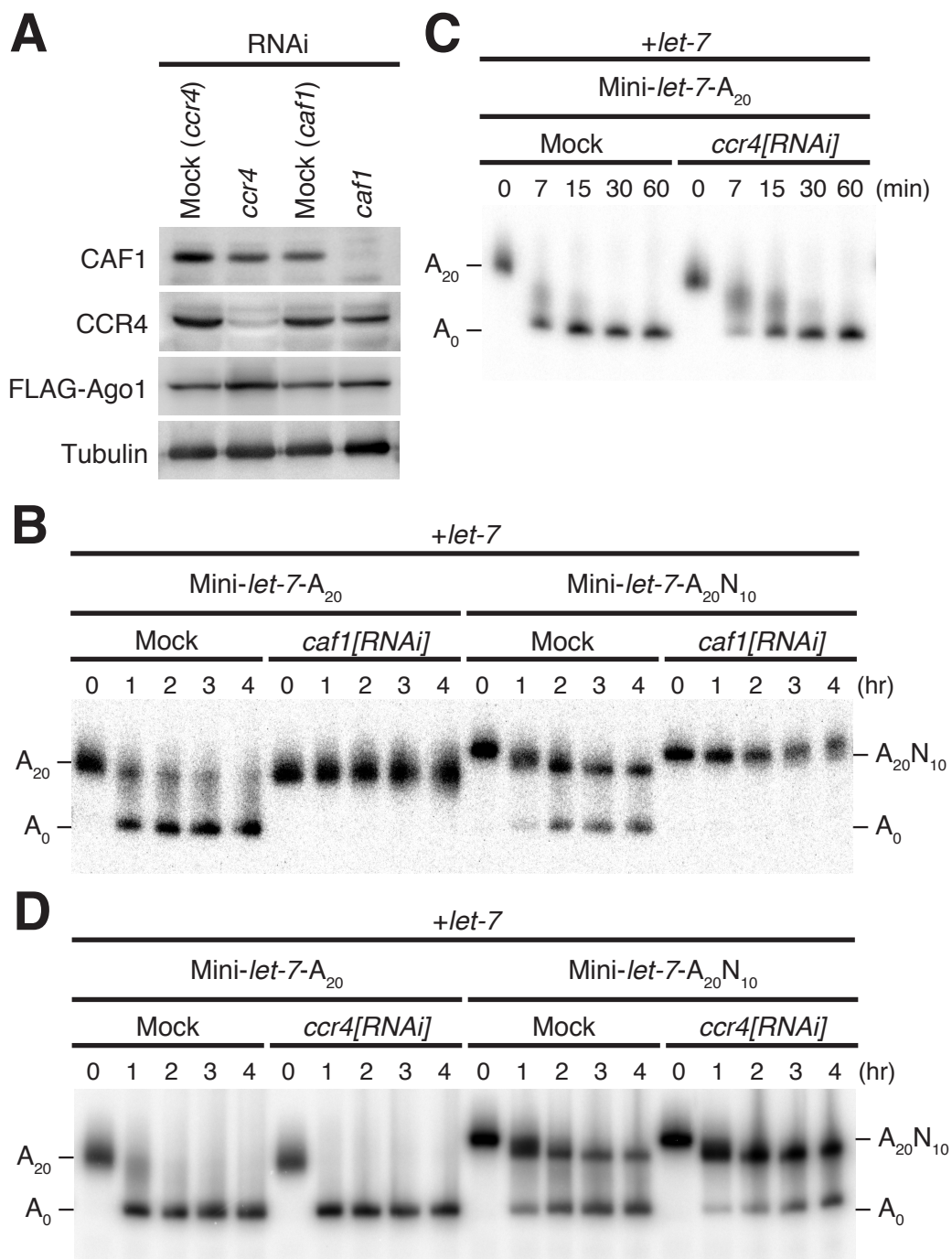


図 2-3. CCR4-NOT 複合体はポリ (A) 下流配列をもつ RNA を脱アデニル化する

(A) ウェスタンブロットの結果。S2 細胞において、CCR4 と CAF1 はそれぞれに対応する二本鎖 RNA の添加により発現量が顕著に低下する。

(B) CAF1 をノックダウンした S2 細胞抽出液を用いた脱アデニル化解析。Mock では Mini-*let-7-A*₂₀ と Mini-*let-7-A*₂₀N₁₀ の両方で脱アデニル化が起こるのに対し、CAF1 ノックダウンでは脱アデニル化は起こらなかった。

(C, D) CCR4 をノックダウンした S2 細胞抽出液を用いた脱アデニル化解析。Mock と比べ、CCR4 をノックダウンすると脱アデニル化がわずかに遅れる。

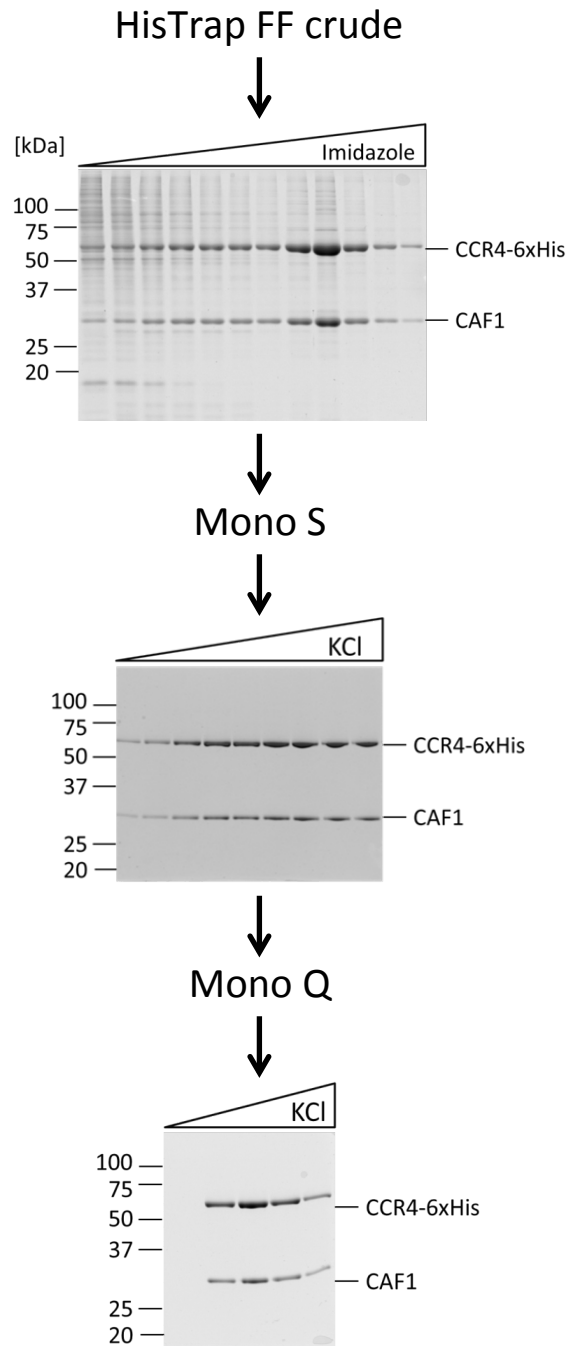


図2-4. ショウジョウバエCCR4/CAF1 ヘテロダイマーの精製

pFastBac DualにショウジョウバエのCCR4とCAF1をクローニングし、Sf9細胞にトランスフェクションした。ウイルス増幅を行ったあと、Sf9細胞に感染させ、CCR4/CAF1ヘテロダイマーを発現させた。発現を確認後、抽出液を作製し、ニッケルビーズカラム (HisTrap FF Crude)、陽イオンカラム (MonoS)、陰イオンカラム (MonoQ)の順に精製した。精製したCCR4/CAF1ヘテロダイマーはNAP-5カラムで1xlysisバッファー + 10% グリセロール + 1 mM DTTに置換された。

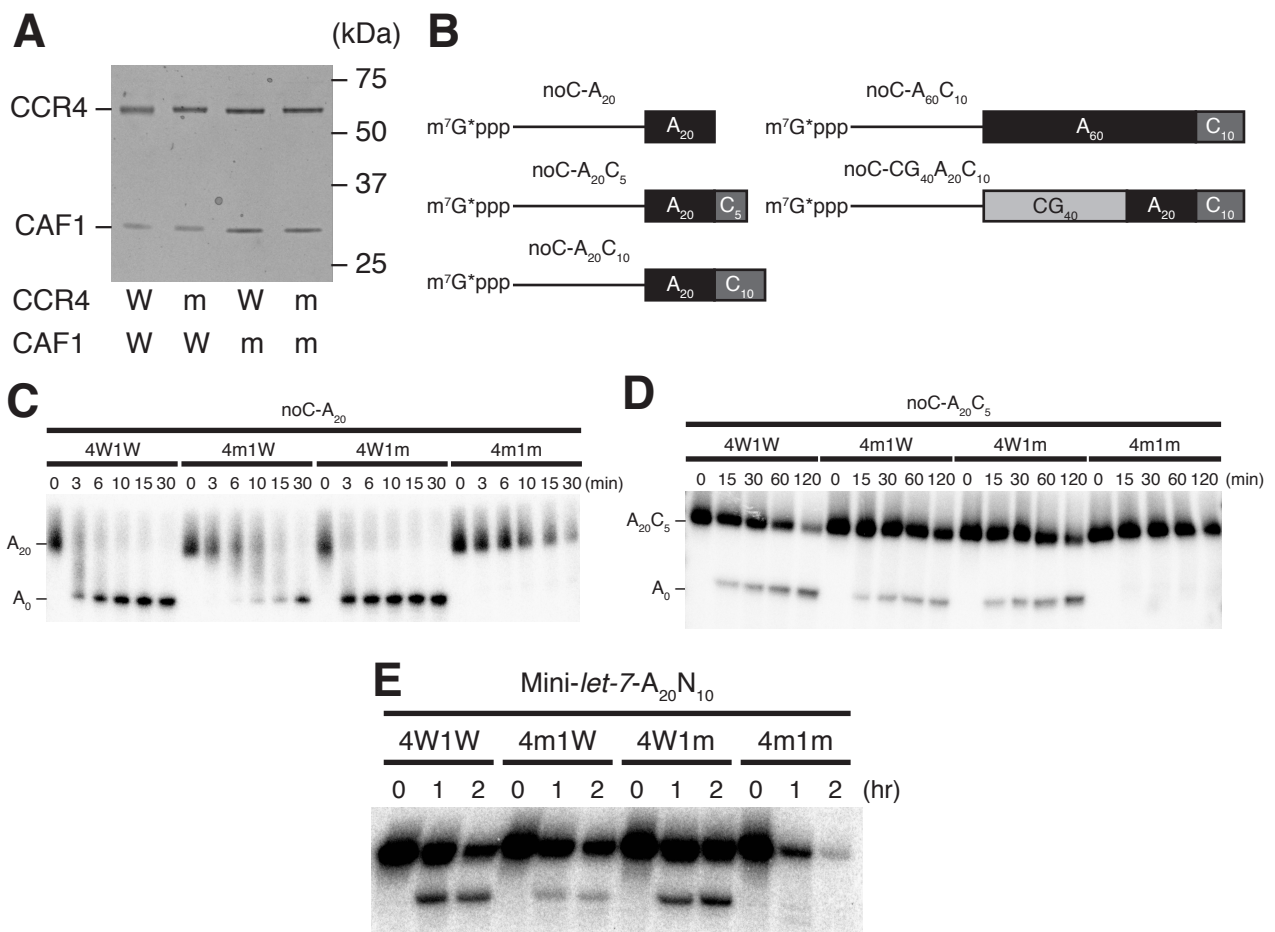


図 2-5. CCR4 と CAF1 はポリ (A) 下流配列を除く活性をもつ

(A) 4 種類の精製したショウジョウバエ CCR4/CAF1 ヘテロダイマーの SDS-PAGE およびクマシー染色。左から CCR4 と CAF1 の両方が野生型、CCR4 のみが活性変異体、CAF1 のみが活性変異体、両方が活性変異体のヘテロダイマー。(W) 野生型、(m) 活性変異体。

(B) noC レポーター RNA シリーズの模式図。これらのレポーター RNA は [α -³²P] GTP をもちいてキャップされた。塩基に示された下付き文字はその配列の長さを表す。アスタリスクは放射性標識を表す。

(C) 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーをもちいた noC-A₂₀ の脱アデニル化解析。noC-A₂₀ は両方が活性をもたない場合を除いて脱アデニル化された。(4W1W) CCR4 と CAF1 が野生型 (4m1W) CCR4 が活性変異体、CAF1 が野生型 (4W1m) CCR4 が野生型、CAF1 が活性変異体 (4m1m) CCR4 と CAF1 が活性変異体。

(D) 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーをもちいた noC-A₂₀C₅ の脱アデニル化解析。CCR4 と CAF1 は noC-A₂₀C₅ を脱アデニル化することができた。

(E) 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーをもちいた Mini-let-7-A₂₀N₅ の脱アデニル化解析。CCR4 と CAF1 は 4 種類の塩基を含むポリ (A) 下流配列をもつレポーター RNA を脱アデニル化することができた。

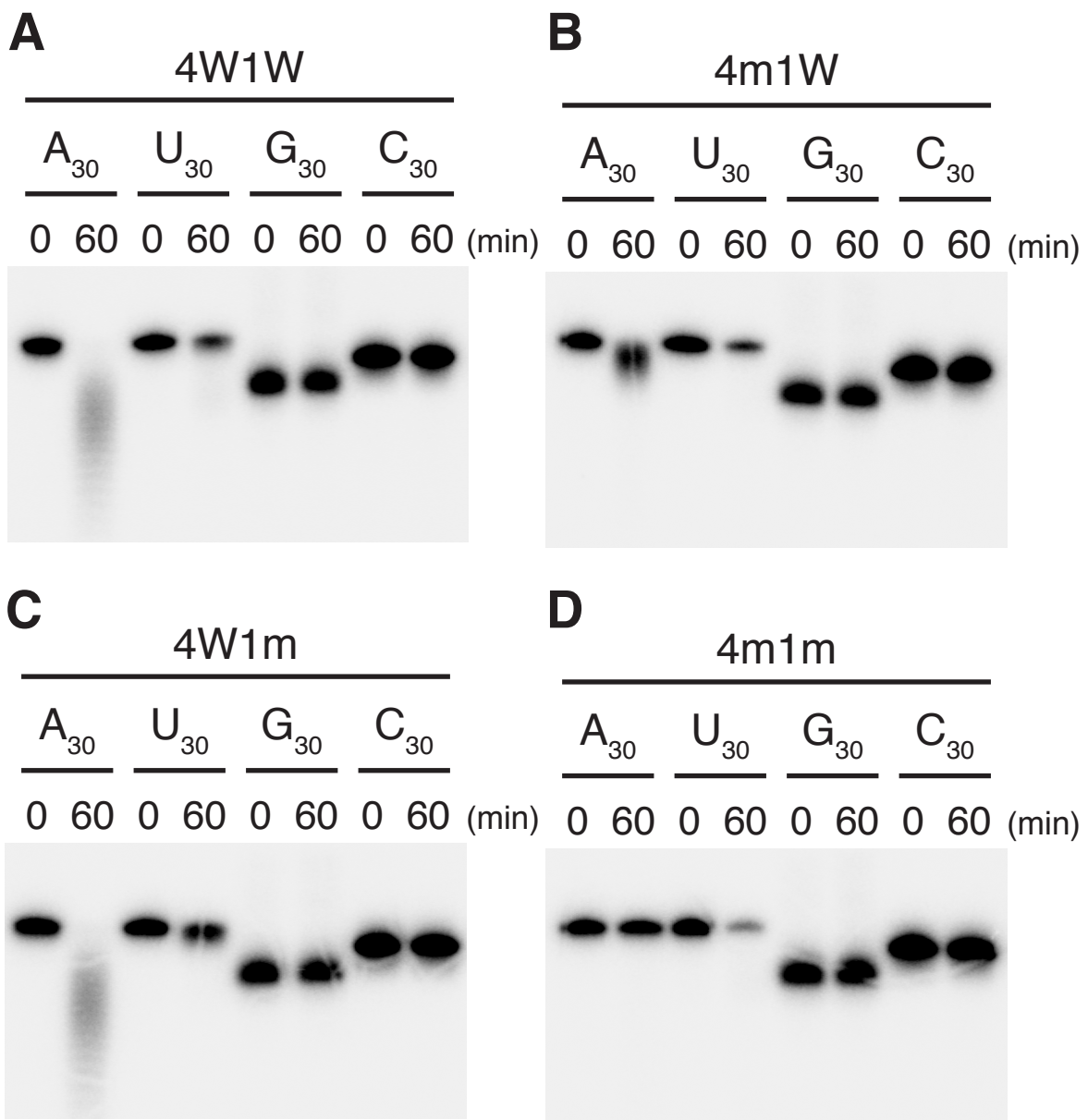


図 2-6. CCR4 と CAF1 は A に嗜好性をもつ

(A) 4W1W (B) 4m1W (C) 4W1m (D) 4m1m の CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを 30 塩基のポリ (A)、(U)、(G)、(C)RNA に作用させた。CCR4 と CAF1 の両方がポリ (A)RNA を基質として好む。ポリ (U) は 4m1m を含むすべてのタイプの CCR4/CAF1 ヘテロダイマーにより分解されているように見えるが、これはおそらく非特異的なヌクレアーゼのコンタミネーションと思われる。

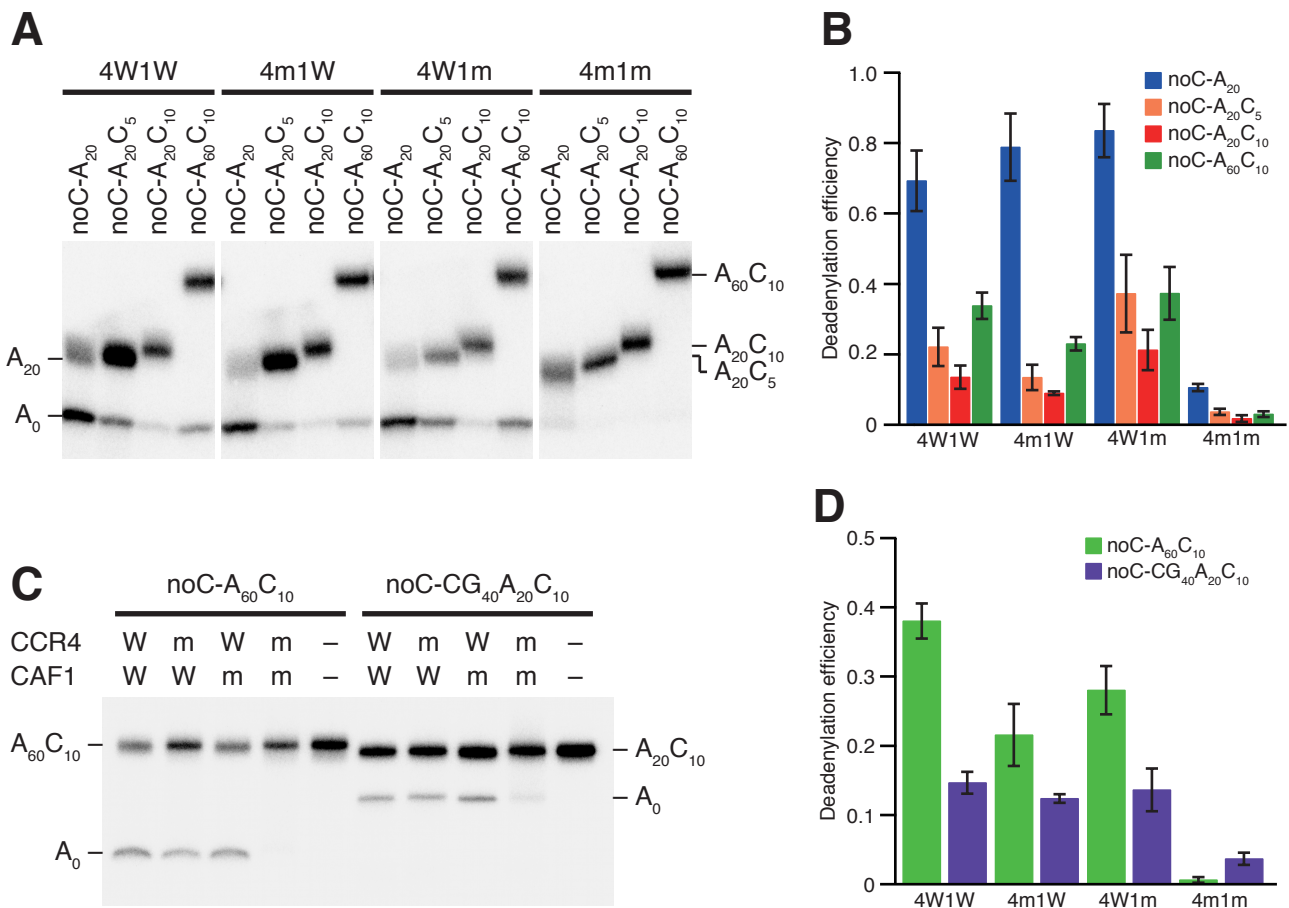


図 2-7. CCR4 と CAF1 の活性はポリ (A) 下流配列の長さとその上流のポリ (A) 鎖の長さに影響を受ける

(A) noC レポーター RNA に 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを 2 時間反応させたときの脱アデニル化

(B) A におけるバンドのシグナル強度を定量した。A₀ におけるシグナル強度を全体のシグナル強度で割り、その値をプロットした。図 2-2 C と同様に、noC-A₂₀ は効率よく脱アデニル化を受けるが、ポリ (A) 下流配列が長くなると脱アデニル化の効率は低下していく。しかし上流のポリ (A) 鎖が長くなると脱アデニル化効率は改善した。グラフは平均と標準偏差を表す (n=3)。

(C) noC-A₆₀C₁₀ と noC-CG₄₀A₂₀C₁₀ に 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを 2 時間反応させたときの脱アデニル化

(D) C におけるバンドのシグナル強度を定量した。A₀ におけるシグナル強度を全体のシグナル強度で割り、その値をプロットした。図 2-2 E と同様に、noC-A₆₀C₁₀ は noC-CG₄₀A₂₀C₁₀ よりも効率よく脱アデニル化を受けた。グラフは平均と標準偏差を表す (n=3)。

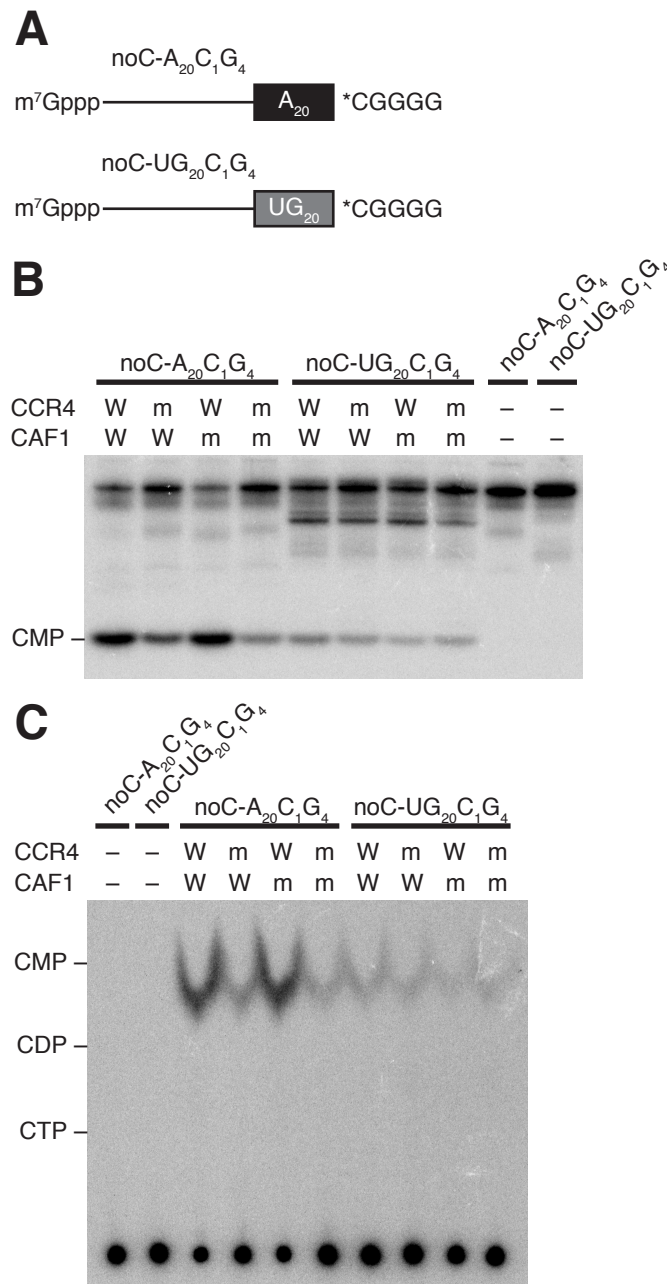


図 2-8. CCR4 と CAF1 はエキソヌクレアーゼ活性で
 ポリ (A) 下流配列を除く

(A) noC-A₂₀C₁G₄ と noC-UG₂₀C₁G₄ の模式図。これらのレポーター RNA はポリ (A) 下流配列の一カ所以外に C をもたないので、[α-³²P] CTP を含む NTP をもちいて試験管内転写をすると、ポリ (A) 下流配列内のただ一つの C を放射性標識できる。

(B) noC-A₂₀C₁G₄ と noC-UG₂₀C₁G₄ に 4 種類の精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーを 2 時間反応させたときの脱アデニル化。CCR4 と CAF1 はどちらのレポーター RNA でも CMP を放出するが、活性をもつ CCR4/CAF1 ヘテロダイマーと noC-A₂₀C₁G₄ の組み合わせで検出されるシグナルの方が、活性のない CCR4/CAF1 ヘテロダイマーや noC-UG₂₀C₁G₄ で検出されるシグナルよりも強いため、このシグナルは CCR4 や CAF1 の活性依存的に強くなることを示している。

(C) B のサンプルの薄層クロマトグラフィーの結果。

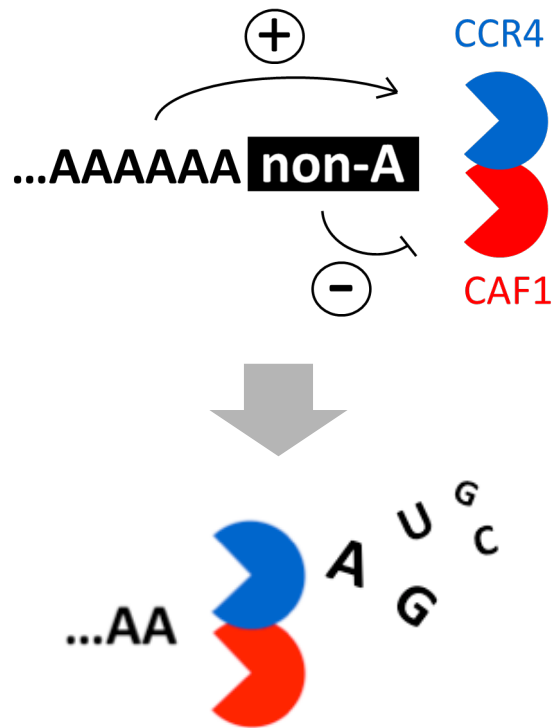


図2-9. 第二章の結論

CCR4とCAF1はポリ(A)鎖下流のA以外の配列を除く活性をそれぞれ独立にもつ。その活性はポリ(A)下流配列が長いほど阻害され、上流のポリ(A)鎖が長いほど促進される。CCR4とCAF1はどちらもエキソヌクレアーゼ活性によってポリ(A)下流配列を除く。

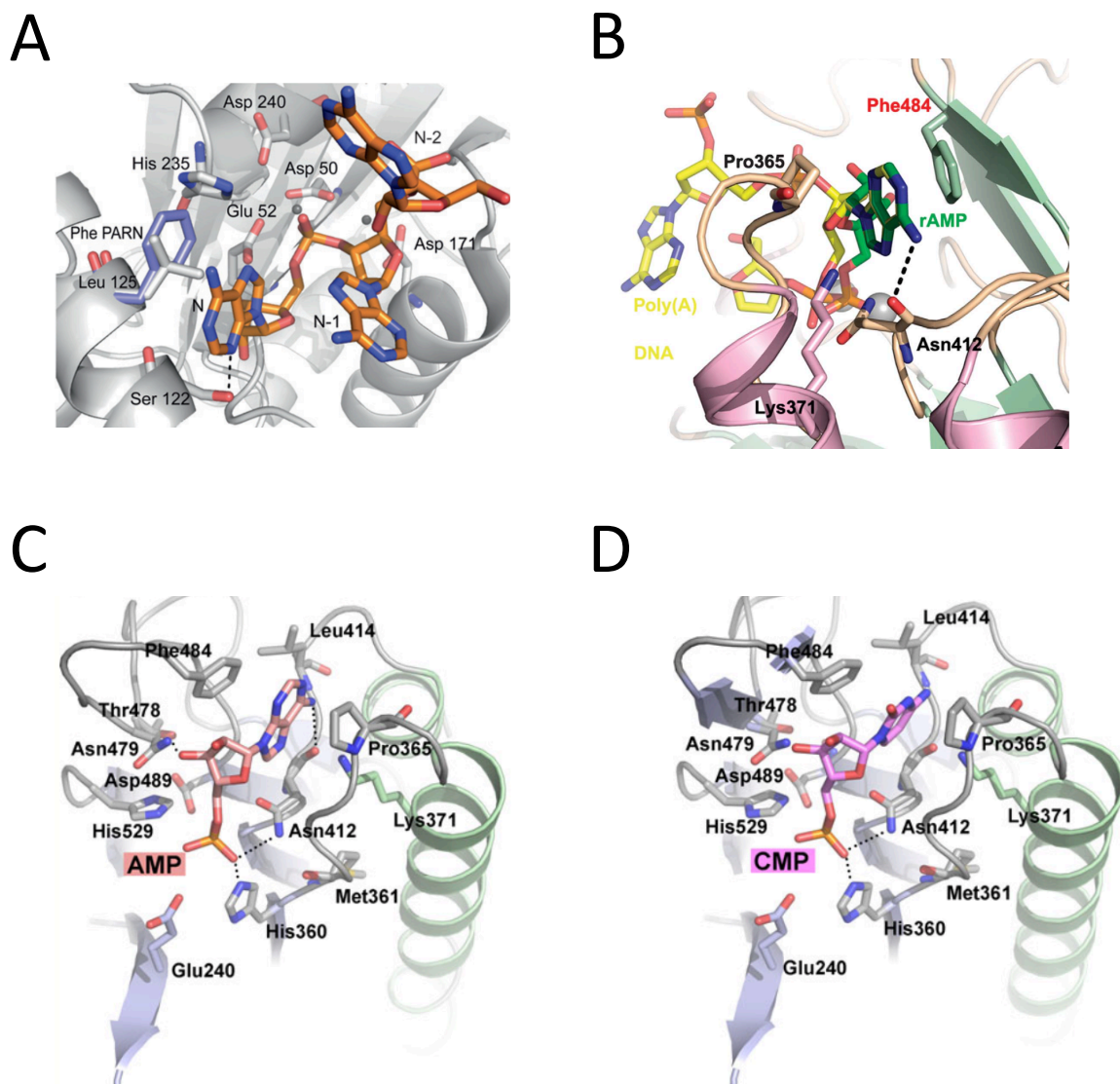


図2-10. CAF1およびCCR4の基質認識

(A) 分裂酵母のPop2p (CAF1のホモログ) における活性部位とポリ(A)RNAの構造 (図は97より引用)

(B) ヒトのCNOT6L (CCR4のホモログ) における活性部位とAMPの構造 (図は80より引用)

(C-D)ヒトのCNOT6Lの活性部位とAMP (C) およびCMP (D) の構造。活性部位におけるCMPの位置は、AMPとほとんど同じである。(図は98より引用)

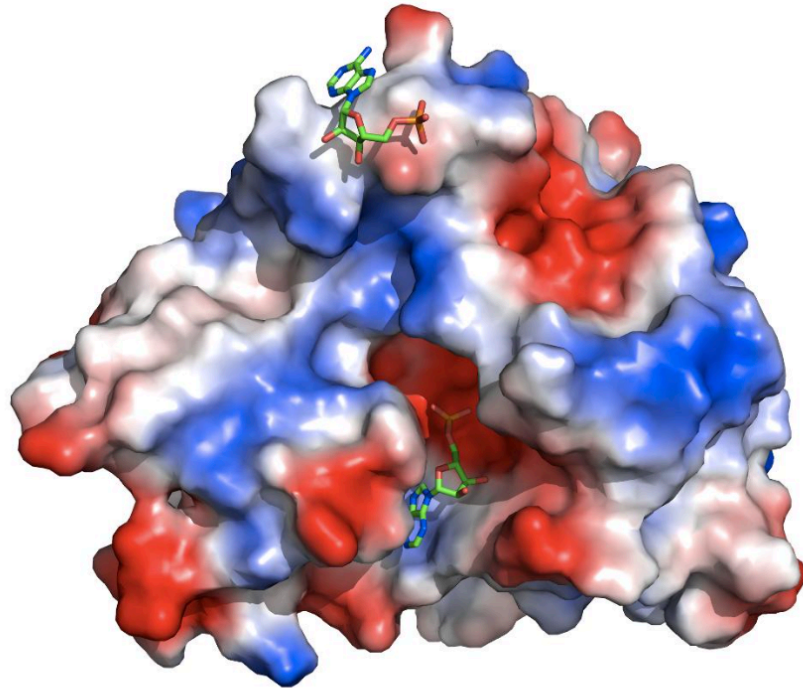


図2-11. ヒトのCNOT6Lの全体像とAMPの結合の位置関係
図の中央下の大きな凹みの中に見えるAMPは、活性部位に結合したAMPである。一方、図の中央上にもAMPが検出された。もしかすると上流のポリ(A)鎖は、中央上のAMPが検出された場所で認識されているかもしれない。しかし、中央上のAMPは、結晶を得る過程で生じたアーティファクトの可能性もある。(図は80より引用)

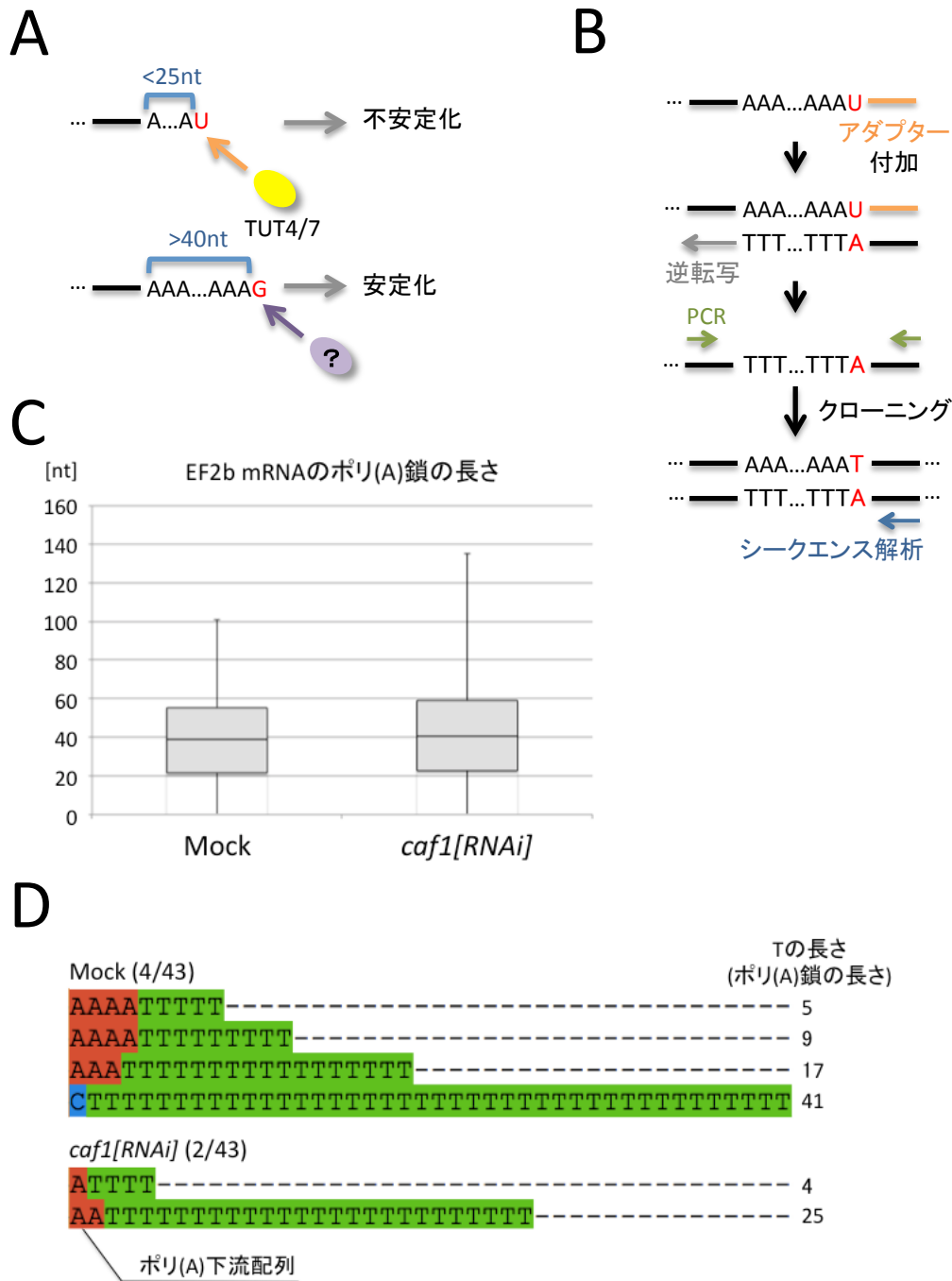


図2-12. 内在mRNAのポリ(A)下流配列の解析

(A) ヒトの内在mRNAにおけるポリ(A)下流配列の先行研究の結果 (14, 101)
 (B) ショウジョウバエの内在mRNAにおけるポリ(A)下流配列検出の手順
 (C) EF2b mRNAのポリ(A)鎖の長さの分布。縦線の下限は最小値、上限は最大値、箱の下限は第一四分位数、中間線は中央値、上限は第三四分位数を示す。Mockの中央値は39、caf1[RNAi]の中央値は41.5 (n=43)。
 (D) 検出されたEF2b mRNAのポリ(A)下流配列。結果は相補鎖の配列を5'-3'方向に示している。Mockおよびcaf1[RNAi]の横の数字は(ポリ(A)下流配列を含むサンプル数/全サンプル数)を表す。

材料と方法

プラスミドの作製

pAWS

pASW (102) を 5'-GTGAGCTCCGCCACCATGGACGAGAAGACCACC-3' と 5'-TCACGTGGACCGGTGGCCGGAGGGCTCCCG-3' で PCR した増幅産物と、pAFW を 5'-CACCGGTCCACGTGACGT-3' と 5'-GGTGGCGGAGCTCACCA-3' で PCR して線形にした増幅産物を、InfusionHD (Takara) をもちいて結合した。

pAWS-Rluc-let-7-A₅₀-HhR, *pAWS-Rluc-let-7-A₅₀C₁₀-HhR*

pUC57-Rluc-let-7-A₁₁₄ (95) から 5'-CACCATGGCTTCCAAGGTGTACGAC-3' と 5'-CCTGTTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACCGGAAAACACATCCGGTGACAGGTTTCTAAATGAGTCTTCGGACCT-3' もしくは 5'-CCTGTTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACCGGAAAACACATCCGGTGACAGGGGGGGGGGGGTTTGGCAGCGGCCGCGTCGAC-3' で PCR した。PCR 産物を pENTR/D-TOPO (Invitrogen) にクローニングし、LR クロナーゼ (Invitrogen) をもちいて pAWS に挿入した。

pFastBac Dual-CAF1-CCR4-6×His

CAF1 はショウジョウバエ S2 細胞 cDNA から 5'-GAAGCGCGCGG AATTATGAAATGGACAATGCCCTC-3' と 5'-GATTCGAAAGCGGCCTCATG AAGCGCTGTTTCGT-3' をもちいて PCR した。CCR4 は 5'-TGCATCAGCTGCT AGCTAATGATGATGATGATGCATC-3' と 5'-CACCCGGGATCTCGAAT GAAAGGCAATCATTATAAAAATGTCTC-3' をもちいて PCR した。pFastBac Dual (Invitrogen) を EcoRI と NotI で切断して CAF1 の PCR 断片を、XhoI と NheI で切断して CCR4 の PCR 断片を挿入した。

ターゲット RNA の作製

Mini-let-7-A₂₀, *Mini-let-7-A₂₀N₁₀*

psiCHECK2-*let-7* 4× (103) を5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGGCAGTA ATTCTAGGCGATCG-3' と5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCCTTAAGCG GCCCCCGCG-3'もしくは5'-GTCAGACAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCG CCTTAAGCGGCCCCCGCG-3'でPCRした。PCR産物をT7-Scribe Standard RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) をもちいて転写し、UREAゲルで泳動展開して切り出し精製した。その後、ScriptCap m7G Capping System (CELLSCRIPT) と[α-³²P] GTP (PerkinElmer) をもちいて放射性標識し、再度UREAゲルで泳動展開して切り出し精製した。

Mini-let-7-A₂₀C₅, *Mini-let-7-A₂₀C₁₀*, *Mini-let-7-A₆₀C₁₀*, *Mini-let-7-N₄₀A₂₀C₁₀*

psiCHECK2-*let-7* 4× (103) を5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGGCAGTA ATTCTAGGCGATCG-3' と5'-GGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCGGCC AGCGGCCG-3'もしくは5'-GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC GGCCAGCGGCCG-3'もしくは5'-GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTGC CGCCAGC GGCCG-3'もしくは5'-GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACCA ACACACAGATGTAATGAAA-3'でPCRした。PCR産物をT7-Scribe Standard RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) をもちいて転写し、UREAゲルで泳動展開して切り出し精製した。その後、ScriptCap m7G Capping System (CELLSCRIPT) と[α-³²P] GTP (PerkinElmer) をもちいて放射性標識し、再度UREAゲルで泳動展開して切り出し精製した。

noC-A₂₀, *noC-A₂₀C₅*, *noC-A₂₀C₁₀*, *noC-A₆₀C₁₀*, *noC-CG₄₀A₂₀C₁₀*

5'-GGTGAGAGTGAGTAGTGTAGTATTGGTAGTTGTATTAGAGTGAGGTT GTGGTTTGTGGGT-3'を、5'-CGTAATACGACTCACTATAGGTGAGAGTGA GTAGTGTAGTATTGG-3' と5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCCACAAAC CACAACCTC-3'もしくは5'-GGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCCACA AACCAACCTC-3'もしくは5'-GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTACCCACAAACCAACCTC-3'もしくは5'-GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTT

TTTA
CCCACAAACCACAACCTC-3'もしくは5'-GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTCCCGCGGGCCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCG
GACCCACAAACCACAACCTC-3'でPCRした。PCR産物をT7-Scribe Standard
RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) をもちいて転写し、UREAゲルで泳動展開して
切り出し精製した。その後、ScriptCap m7G Capping System (CELLSCRIPT)
と[α -³²P] GTP (PerkinElmer) をもちいて放射性標識し、再度UREAゲルで泳動
展開して切り出し精製した。

noC-A₂₀C₁G₄, noC-UG₂₀C₁G₄

5' -GGTGAGAGTGAGTAGTGTAGTATTGGTAGTTGTATTAGAGTGAGGTT
GTGGTTTGTGGGT-3'を5' -CGTAATACGACTCACTATAGGTGAGAGTGAG
TAGTGTAGTATTGG-3' と5'-CCCCGCCCACCAACAACAACAACCACCC
ACAAACCACAACCTC-3'もしくは5' -CCCCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA
CCCACAAACCACAACCTC-3' でPCRした (下線は2'-O-メチル化ヌクレオチ
ドを表す)。その後、[α -³²P] CTP (PerkinElmer) 存在下でMAXIscript T7 *In*
Vitro Transcription Kit (Ambion) により転写した。UREAゲルで泳動展開して
切り出し精製した。

ノザンプロット

S2細胞からトータルRNAをTRI Reagent (Molecular Research Center) をもち
いて抽出した。GFPノックダウンS2細胞由来のトータルRNAは2 μ g、Dcp2ノ
ックダウンS2細胞由来のトータルRNAは10 μ gを1.3%ホルムアルデヒドアガロー
スゲルで泳動展開し、Hybond-N⁺ メンブレン (GE Healthcare) に転写した。
検出のためのRNAプローブ5' -UGAGGUAGAUCUUGUAUAGU-3'は、T4ポ
リヌクレオチドキナーゼ (Takara) と[γ -³²P] ATP (PerkinElmer) をもちいて
放射性標識され、Perfecthyb Plus (Sigma) とトータルRNAが転写されたメン
ブレンとともに50°Cでインキュベートされた。

RNA干渉のための二本鎖RNAの作製

GFP、Dcp2、CAF1、CCR4のORFに対応する二本鎖RNA (dsRNA) を先行研
究に従って作製した (66, 104, 105)。両方向にT7プロモーターをもつPCR産物

をT7-Scribe Standard RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) で転写し、スピンドウンして上清を回収した。上清をエタノール沈殿してペレットを水に溶かしたあと、酢酸アンモニウム沈殿してペレットを水に溶かして使用した。

RNA干渉とトランスフェクション

Dcp2ノックダウンは先行研究と同様に行った (105)。 1.0×10^6 cells/ml、2 mlのS2細胞に2 μ gのpASW-pri-let-7 (102) と2 μ gのpAWS-Rluc-let-7-A₅₀-HhRもしくはpAWS-Rluc-let-7-A₅₀C₁₀-HhRをX-tremeGENE HP (Roche) をもちいてトランスフェクションした。プラスミド添加と同じタイミングで各dsRNAを30 μ g添加して3日間培養した。CAF1ノックダウンは 1.0×10^6 cells/ml、10 mlのS2細胞に20 μ gのdsRNAを添加して1日培養した。その後、10 μ gのpAFW-Ago1をX-tremeGENE HP (Roche) をもちいてトランスフェクションし、3日培養した。CCR4ノックダウンは 1.0×10^6 cells/ml、10 mlのS2細胞に100 μ gのdsRNAを添加した。3日後、100 μ gのdsRNAを再度添加し1日培養した。その後細胞を10cmディッシュ5枚に分けて各10 mlとし、pAFW-Ago1をCAF1ノックダウンのときと同様にトランスフェクションした。S2細胞からの抽出液は先行研究のように作製した (102)。

ウェスタンブロット

FLAG抗体 (1:5000; Sigma)、CAF1抗体 (1:5000 (66))、CCR4抗体 (1:5000 (66))、Tubulin抗体 (1:1000; Sigma) を一次抗体として使用した。Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) により化学発光させ、LAS-3000 (Fujifilm Life Sciences) で撮影した。

変異導入

pFastBac Dual-CAF1-CCR4-6 \times Hisを5'- CACTATGTGGCCATGGCCACCGC GTTTCCAGGCGTGGTA-3' と5' -TACCACGCCTGGAAACGCGGTGGCCAT GGCCACATAGTG-3'でPCRすることでCAF1にD53AとD55A変異を導入した。また、5' -CTGCTGCTGTGCGGTGCCTTCGCCTCGCTACCCGATTCA-3' と5' -TGAATCGGGTAGCGAGGCGAAGGCACCGCACAGCAGCAG-3'でPCRすることでCCR4にD411AとN413A変異を導入した。

タンパク質精製

CCR4/CAF1ヘテロダイマーはBac-to-Bac バキュロウイルス発現システム (Invitrogen) をもちいてSf9細胞に発現させた。ヘテロダイマーはHis-trap FF crude カラム (20-400 mM imidazole)、Mono Sカラム、Mono Qカラム (それぞれ20-1000 mM KCl) (GE Healthcare) をもちいて段階的にアフィニティークロマトグラフィー精製した。精製後、NAP-5 (GE Healthcare) をもちいて10% glycerolと1 mM DTTの入った1× lysisバッファーに置換した。

試験管内脱アデニル化解析

40× reaction mix (ATP、ATP再生系、GTP、RNase阻害剤を含む)、lysisバッファー (30 mM HEPES-KOH (pH 7.4)、100 mM KOAc、2 mM Mg(OAc)₂)、2× proteinase Kバッファー、ホルムアミド泳動染色液は先行研究に従った (106)。S2細胞抽出液における脱アデニル化解析は先行研究に従った (107)。精製CCR4/CAF1ヘテロダイマーをもちいた脱アデニル化反応は典型的に、6 µlの1.5 µM 精製CCR4/CAF1ヘテロダイマー、3 µlの5× lysisバッファー、1.5 µlの10 mM DTT、0.3 µlの40 U/µl RNasin plus (Promega)、2 µlの~5 nM target RNA、2.2 µlの水を25°Cでインキュベートした。30塩基のポリ(N)RNAに対する脱アデニル化反応においては脱リン酸化酵素阻害剤として最終濃度10 mMのNa₃VO₄を添加した。タイムコースの各時点で、サンプルから2.8 µlずつ回収し、等量のホルムアミド泳動染色液を添加した。サンプルを5、6、18%のUREAゲルに2.8 µlアプライして泳動展開し、PhosphoImager (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare) で解析した。

薄層クロマトグラフィー

ポリエチレンイミン-セルロースプレート (MACHEREY-NAGEL) を水で2時間泳動した。プレートを乾かし、2 µlのホルムアミド泳動染色液入りサンプルをプレートに滴下した。プレートを乾かし、450 mM硫酸アンモニウムで1時間泳動した。プレートを乾かした後、PhosphoImager (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare)で解析した。

内在mRNAのポリ(A)下流配列の解析

final 5 μ Mのアダプター配列5'-pCTGACTGACTGACTGACTGATGGAATTCTCGGGTGCCAAGGC[AmC7]-3'をMth RNA ligase (NEB) を20 μ l系で5'アデニル化した。その後、total RNA 1 μ gに対して5'アデニル化したアダプター溶液を3 μ l使い、T4 RNA ligase, truncated KQ (NEB) をもちいて20 μ l系で結合した。アダプターの配列と相補的な配列5'-GCCTTGGCACCCGAGAATTCCATCAGTCAGTCAGTCAGTCAG-3'を添加して、SuperScriptIII RTase (Invitrogen) をもちいて20 μ l系で逆転写した。付属のRNaseHを1 μ l加えて37°C20分反応させた。cDNAを1/50に希釈し、EF2b内の配列5'-CGGTATCGATAAGCTGTGCAGCTGGCTGAGCGG-3'とアダプターに対する相補的な配列を含む5'-ATTCGATATCAAGCTGGACTAACTGCCTGATTGACCCTAGCTGCCTTGGCACCCGAGAATTCCA-3'でPCRした。PCR産物をHindIIIカットしたpBluescriptII SK(+)にInfusionHD (Takara) をもちいて結合した。その後、コロニーPCRを10 μ l系で行い、反応液を1/20希釈して5'-GGACTAACTGCCTGATTGAC-3'のプライマーで配列解析を依頼した (Eurofins)。結果はClustal2で解析した。

第三章

CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化における ATP の必要性

目的

古くから microRNA (miRNA) 経路は ATP 依存的であることが知られている。特に、Argonaute (Ago) が miRNA を取り込む段階には ATP 依存的シャペロンが必要であることが示されている (42, 43)。また、ATP 存在下で miRNA を Ago1 に取り込ませたあとに反応系から ATP を除くと、miRNA による脱アデニル化が顕著に遅れるという現象が報告されていた (103)。この結果から、miRNA が Ago1 と機能的複合体を作る段階だけではなく、その下流で標的の脱アデニル化を引き起こす段階もまた ATP 依存的であると考えられている。また miRNA 経路だけでなく Smaug 経路においても同様に、ATP 除去によって脱アデニル化が遅れることが報告されていた (108)。これらの経路では CCR4-NOT 複合体が主に脱アデニル化を引き起こすが、精製された CCR4 や CAF1 による脱アデニル化反応そのものは ATP を必要とせず (38, 81, 109)、なぜ miRNA や Smaug が誘導する脱アデニル化に ATP が要求されるのかは不明である。第三章の目的は、miRNA や Smaug が誘導する脱アデニル化に ATP は本当に必要なのか、必要ならばその理由を明らかにすることである。

結果

ショウジョウバエ S2 細胞抽出液において ATP は AMP に変換される

miRNA 依存的な脱アデニル化には ATP が必要であると報告されている (103)。この結論は、クレアチンキナーゼ (CK) がクレアチンリン酸 (CP) をもちいて ADP を ATP に変換する反応 (図 3-1 A) により、抽出液中の ATP 濃度が一定に保たれている条件下ではポリ(A)鎖は迅速に短くなるのに対し、ヘキソキナーゼ (HK) が ATP 依存的にグルコース (Glc) をリン酸化する反応 (図 3-1 B) をもちいて抽出液中から ATP を除くと脱アデニル化が顕著に遅れる、という結果を根拠としている。そこでまず、miRNA 依存的な脱アデニル化を観察することのできる、FLAG-Ago1 を過剰発現させたショウジョウバエ S2 細胞から抽出液を作製し、ATP を除去すると脱アデニル化が顕著に遅れるという先行研究の結果を確認することにした。

Ago が miRNA を取り込む段階には ATP が必要なので (42, 110)、final 1 mM の ATP とともに Ago1 を過剰発現させた S2 細胞抽出液と *let-7/let-7** 二本鎖 RNA をインキュベートし、Ago1 に *let-7* を取り込ませた。その後 *let-7* と部分的に相補的な配列をもつポリ(A)鎖付き標的 RNA とともに、CK + CP もしくは HK + Glc を添加した(図 3-1 C)。先行研究の結果と同様に、CK + CP により ATP が再生される条件下において脱アデニル化は強く起こったが、HK + Glc で ATP を除去した条件下において脱アデニル化は強く阻害された (図 3-1 D)。しかし重要なことに、CK + CP も HK + Glc も添加しない場合においても脱アデニル化は阻害された (図 3-1 D)。この結果は、S2 細胞抽出液そのものが ATP を消費している可能性を示している。

S2 細胞抽出液における ATP の消費を観察するために、final 1 mM の ATP に加えて[α - 32 P] ATP を添加し、経時的にサンプルを回収して薄層クロマトグラフィで展開した (図 3-1 E)。その結果、HK + Glc を加えなくても、*let-7* を取り込ませるための 30 分インキュベーションの間に ATP はほぼ完全に AMP に変換されており、その後 60 分間の脱アデニル化反応中 AMP 濃度は一定に保たれていた。対照的に、CK + CP を添加すると AMP は即座に ATP に変換され、脱アデニル化反応中は ATP 濃度が一定に保たれていた。CK + CP は ADP を ATP に変換する酵素であることを考えると、細胞抽出液内の AMP、ADP、ATP

間の平衡を、CK + CP による反応が ATP 側へとシフトさせることで AMP が ATP に変換されたと思われる。このように、ATP の濃度は脱アデニル化の効率とよく相関している。

AMP の除去は miRNA 依存的な脱アデニル化を活性化させるのに十分である

ここまでの結果は一見、これまで提唱されてきた「miRNA 依存的な脱アデニル化には ATP が必要である」という仮説と一致している。しかし、S2 細胞抽出液において ATP は AMP に変換されることを考えると、ATP の不足した結果ではなく、AMP が蓄積した結果 miRNA 依存的な脱アデニル化が阻害された可能性がある。AMP は脱アデニル化により産生される物質であり、理論的には効果的な脱アデニル化阻害剤として働くと考えられる。たしかに精製された CCR4/CAF1 ヘテロダイマー (miRNA 依存的な脱アデニル化における脱アデニル化酵素) は ATP には全く阻害されないが、ADP により弱く、AMP により強く阻害される (図 3-2 A-C)。また AMP による強い阻害効果は、精製されたヒトの CNOT6L (hCcr4b) や CNOT7 (hCAF1) においても報告されている (98)。

もし miRNA による脱アデニル化が AMP によって阻害されているならば、AMP を除けば活性が回復すると考えられる。この仮説を検証するために、モノヌクレオチド (例: AMP) をヌクレオシド (例: アデノシン) とリン酸に加水分解する酵素である 5'-ヌクレオチダーゼ (5'-NT) を、AMP を細胞抽出液から除くためにもちいた (図 3-3 A,B)。図 3-3 C に示すように、CK + CP の代わりに 5'-NT を添加すると、添加後 45 分の時点から脱アデニル化が顕著に促進されているのが観察された (図 3-3 C)。薄層クロマトグラフィーによって ATP の消費を観察してみると、5'-NT が徐々に AMP を分解し、リン酸が産生されている様子が観察された (図 3-3 D)。そして AMP の分解速度と miRNA 依存的な脱アデニル化の促進はよく相関していた (図 3-3 C,D)。さらに、標的 RNA を添加する前に 5'-NT を添加してあらかじめ AMP を除いておくと、脱アデニル化はより早い段階で起こることがわかった (図 3-4 A-C)。これらの結果は S2 細胞抽出液において、ATP 依存的に一度 RISC を形成させてしまえば、AMP を除くだけで miRNA 依存的な脱アデニル化が進行することを示している。

AMP の除去は Smaug 依存的な脱アデニル化を活性化させるのに十分である

Smaug は RNA 結合タンパク質であり、ショウジョウバエ初期胚において nanos などの特定の母性 mRNA の翻訳抑制や分解を引き起こす (5)。Smaug は標的 mRNA の Smaug 認識配列 (SRE) に結合し、CCR4-NOT 複合体を誘導する (5)。miRNA 依存的脱アデニル化と同様に、Smaug 依存的脱アデニル化においてもまた ATP が必要であるとされている (108)。Smaug 依存的な脱アデニル化に ATP が必要なのかを再調査するため、SRE を含む nanos の 3'UTR をもった標的レポーターRNA と、Smaug 依存的脱アデニル化を観察できる、Smaug を過剰発現させた S2 細胞由来の抽出液を作製した (図 3-5 A)。先行研究と同様に、CK + CP を添加して ATP 濃度を一定に保つと Smaug 依存的脱アデニル化が起こるが、HK + Glc により ATP を除去すると脱アデニル化は顕著に阻害された (図 3-5 B,C)。重要なことに、FLAG-Smaug を過剰発現させた細胞抽出液でも HK + Glc なしで ATP は AMP に変換され、さらに 5'-NT により AMP を除去すると脱アデニル化は促進された (図 3-5 C,D)。このように、miRNA 依存的脱アデニル化と同様、Smaug 依存的脱アデニル化においても AMP が脱アデニル化を阻害しており、ATP は必要ないことがわかった。

考察

これまで miRNA や Smaug が誘導する脱アデニル化には ATP が必要であると考えられてきた。この結論は、CK + CP によって ATP 濃度を維持すると脱アデニル化は強く起こる一方で、HK + Glc によって ATP を除くと脱アデニル化は止まるという結果から導かれた (103, 108)。しかし、HK + Glc を添加しなくても、ショウジョウバエ S2 細胞抽出液は ATP を、脱アデニル化に対する強力な阻害剤である AMP に分解する性質があった。重要なことに、5'-NT をもちいて ATP を増やすことなく AMP を除くと、脱アデニル化は起こることがわかった。この結果は、miRNA や Smaug が誘導する脱アデニル化には ATP が必要ではないことを意味する。

脱アデニル化以外の段階における ATP の必要性

第三章のデータは、miRNA に誘導される脱アデニル化の最終段階に ATP は必要ないことを示すものであるが、この反応に先立って起こる RISC の形成には ATP の加水分解が必要であることが知られている (110, 111)。より具体的には、miRNA/miRNA*二本鎖 RNA が Ago タンパク質に取り込まれる際に、ATP 依存的な Hsc70/Hsp90 シャペロン複合体による反応が必要である (42, 43)。一方で、miRNA*鎖の解離に ATP は必要ない (110, 111)。しかし、Ago に GW182 や CCR4-NOT 複合体、翻訳抑制因子が誘導される過程で ATP が必要かどうかは定かではない。実際、Smaug が翻訳抑制複合体を形成する過程は ATP によって促進されることが報告されている (112)。本研究は脱アデニル化そのものに ATP は必要ないことを示し、既存のモデルに再考を求めるものではあるが、miRNA や Smaug による標的抑制機構における未解析の段階において ATP が必要とされる可能性を否定するものではない。

ATP 除去の影響

HK + Gle は ATP 除去のための方法として広く使われている (113–115)。さらに様々な化学物質やストレス条件が ATP の消費促進や ATP 合成阻害によって、細胞内で急激な ATP 消失を引き起こすことが知られている (116, 117)。ATP 消失の細胞に対する影響は、いくつかの場面において、ATP がなくなったためではなく、AMP が増加したことで AMP 活性化型タンパク質キナーゼ (AMPK) や AMP 脱アミノ化酵素 (AMPD) が働くことに関係している (116, 118)。本研究の結果は、ATP を除去したときに起こる結果の原因は、本当に ATP が失われたことなのかを、他の研究領域でも再度確認する必要があることを意味している。

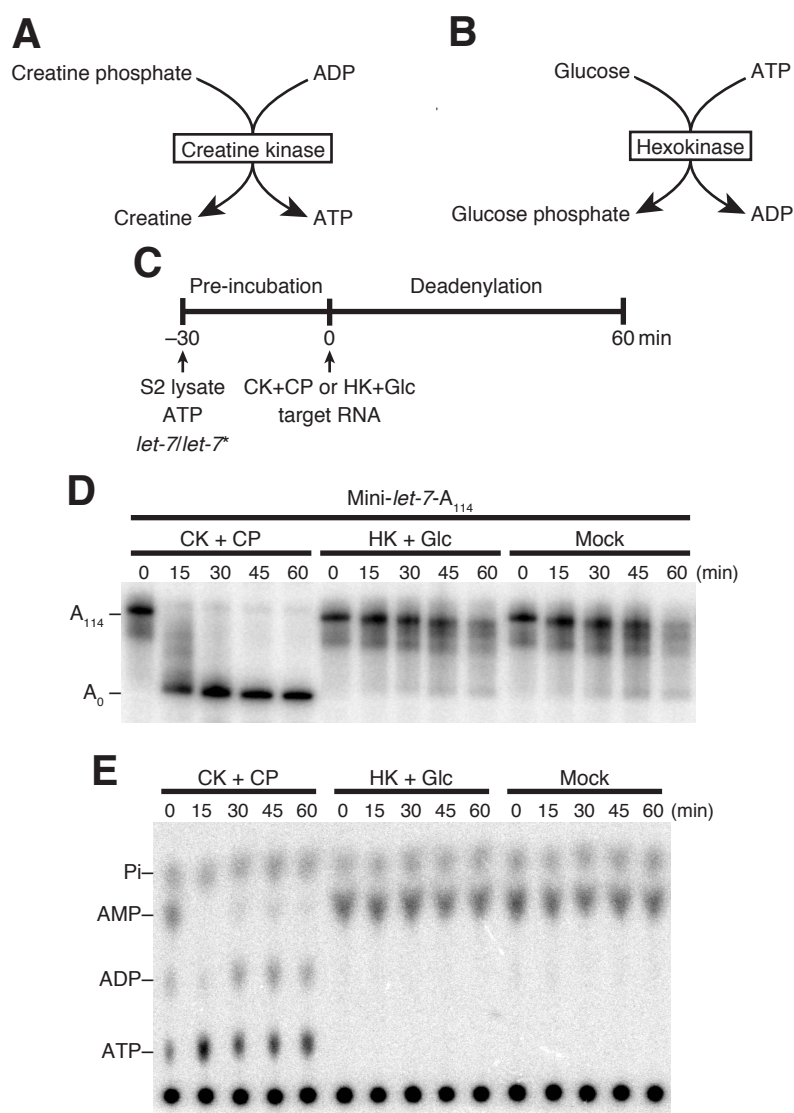


図 3-1. S2 細胞抽出液における miRNA 依存的脱アデニル化と ATP 消費

(A) クレアチンキナーゼ (CK) によって触媒される反応

(B) ヘキソキナーゼ (HK) によって触媒される反応

(C) D と E の実験条件の図。はじめに FLAG-Ago1 を過剰発現させた S2 細胞抽出液に *let-7/let-7** 二本鎖 RNA と 40x reaction mix (最終的に約 1 mM となる濃度の ATP 含む)、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を添加し、30 分間インキュベーションして RISC を形成させた。続いてキャップ構造を放射性標識した標的 RNA、Mini-8x*let-7-A*₁₁₄ とともに CK + CP、HK + Glc もしくは Mock として水をサンプルに添加して 60 分間インキュベーションした。脱アデニル化と ATP 消費の解析に必要なサンプルは同一サンプルから回収した。

(D) miRNA 依存的な脱アデニル化の解析。CK + CP において脱アデニル化は強く起こるが、HK + Glc や Mock では起こらない。

(E) 薄層クロマトグラフィーをもちいた ATP 消費の解析。HK + Glc 添加においてだけでなく、Mock においてさえも ATP は AMP に変換される。一方、CK + CP 添加において AMP は ATP に変換され、その後 ATP 濃度が一定に保たれる。

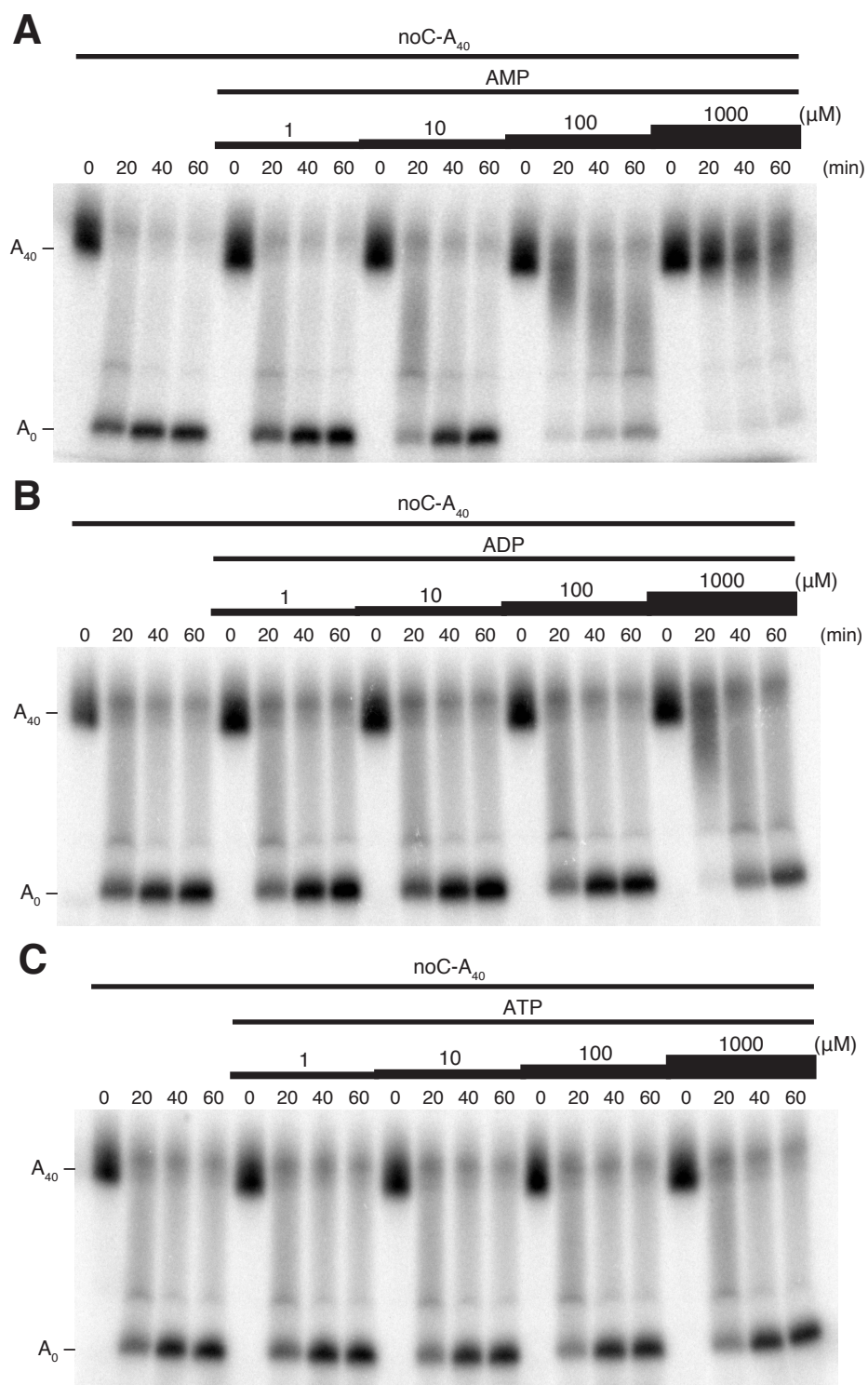


図 3-2. AMP は精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーの活性を強く阻害する

(A) AMP、(B) ADP、(C) ATP を、濃度を変えて添加したときの精製 CCR4/CAF1 ヘテロダイマーによる脱アデニル化。ATP は脱アデニル化を阻害しない一方で、ADP は弱く、AMP は強く脱アデニル化を阻害する。

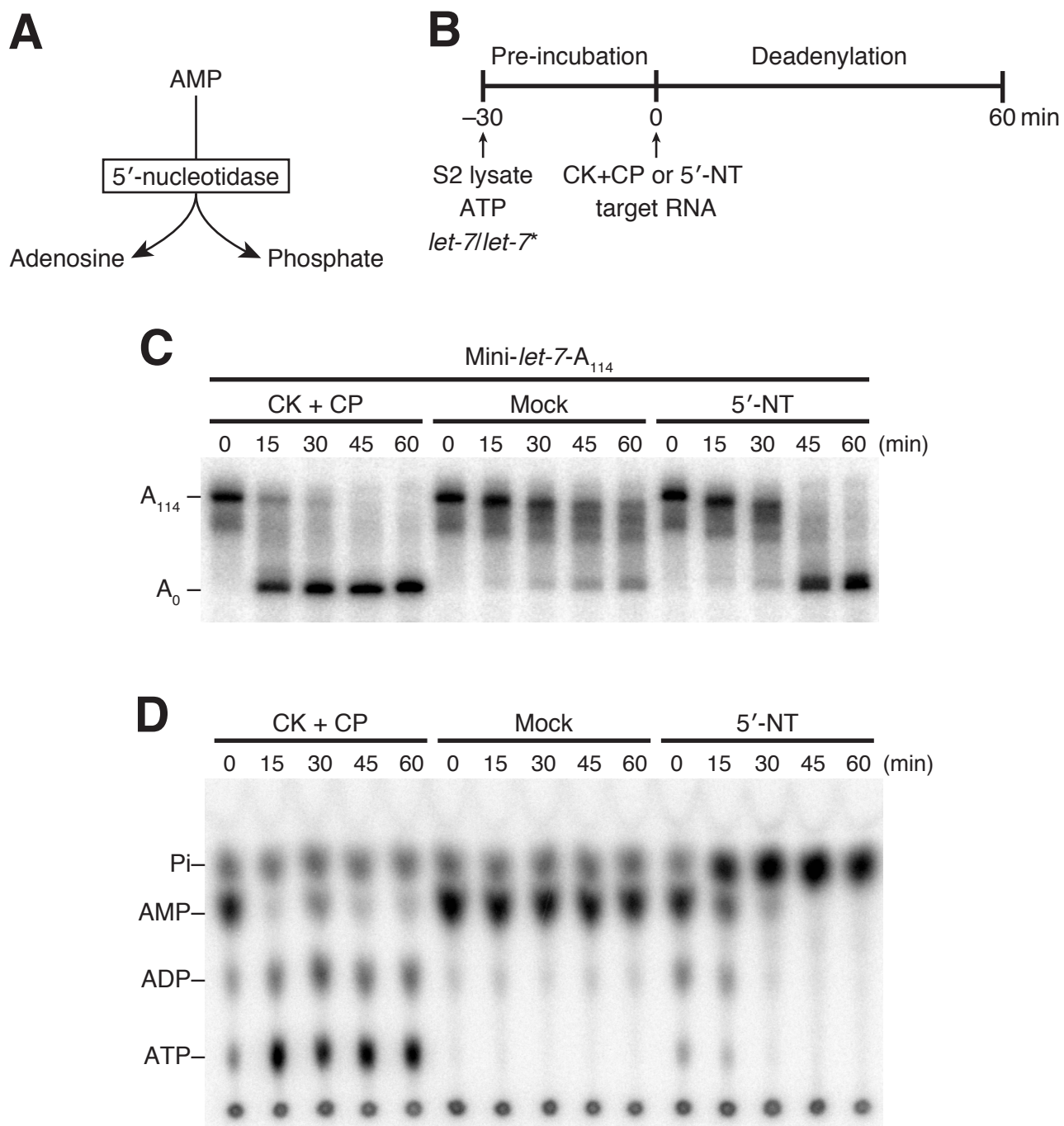


図 3-3. AMP の除去は miRNA 依存的脱アデニル化を活性化させるのに十分である

(A) 5'-ヌクレオチダーゼ (5'-NT) によって触媒される反応

(B) C と D の実験条件の図。5'-NT をもちいた点以外は図 3-1 C と同様に実験を行った。

(C) miRNA 依存的な脱アデニル化の解析。5'-NT 添加後 45 分で脱アデニル化が顕著に促進されている。

(D) 薄層クロマトグラフィーをもちいた ATP 消費の解析。5'-NT は AMP を徐々にアデノシンとリン酸に分解している。AMP の分解速度と脱アデニル化の速度はよく関連している。

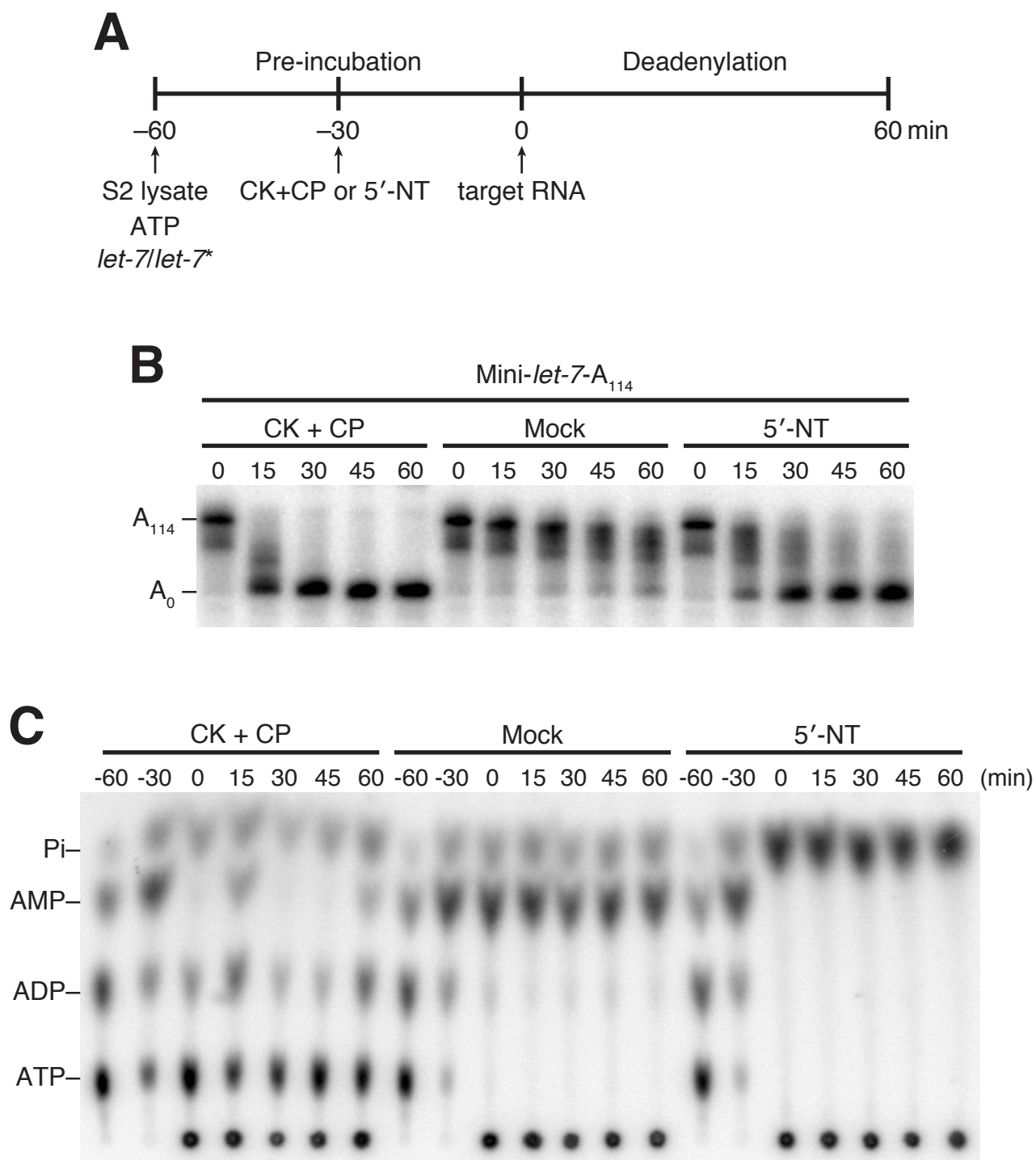


図 3-4. AMP をあらかじめ除去すると miRNA 依存的
脱アデニル化はより早く促進される

(A) B と C の実験条件の図。30 分間の RISC 形成反応のあと、5'-NT を添加してさらに 30 分間インキュベートすることで、標的 RNA の添加に先んじて AMP を除去した。

(B) 前もって AMP を除くと図 3-3 C に比べて脱アデニル化がより早い段階で促進されている。

(C) 薄層クロマトグラフィーをもちいた ATP 消費の解析。標的 RNA を添加する時点で AMP は 5'-NT によって完全に分解されている。

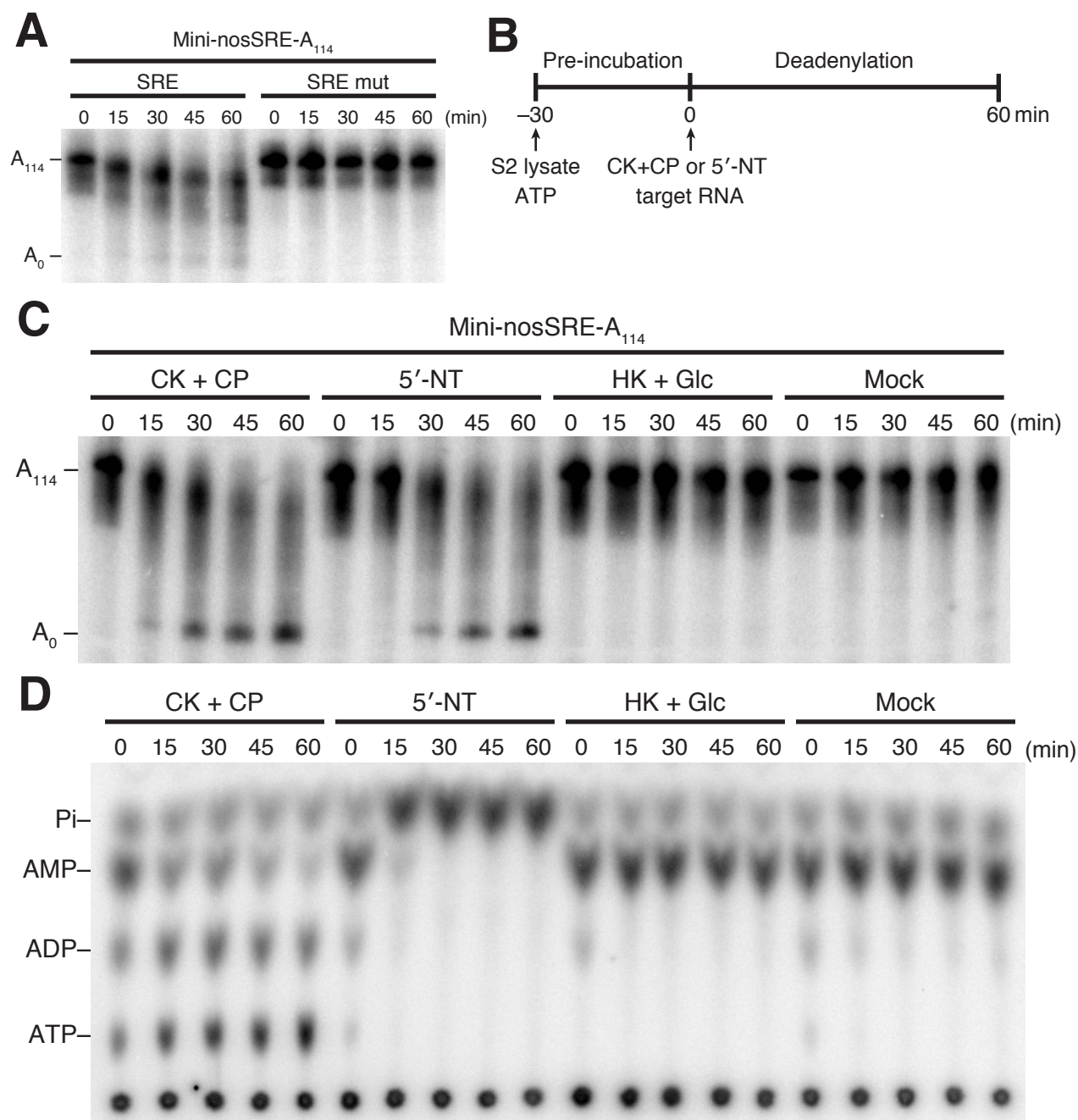


図 3-5. AMP の除去は Smaug 依存的脱アデニル化を
活性化させるのに十分である

(A) C と D の実験条件の図。FLAG-Smaug を過剰発現させた S2 細胞抽出液をもちいたこと、標的 RNA として Mini-nosSRE-A₁₁₄ をもちいたこと、そして *let-7/let-7** 二本鎖 RNA を添加しなかったこと以外は図 3-1 C や図 3-3 B と同様に実験を行った。

(B) 変異 SRE をもつ RNA では Smaug 依存的な脱アデニル化は起こらない。

(C) Smaug 依存的な脱アデニル化の解析。miRNA のときと同様に、Smaug においても CK + CP あるいは 5'-NT 添加で脱アデニル化は起こるが、HK + Glc や Mock では起こらない。

(D) 薄層クロマトグラフィーをもちいた ATP 消費の解析。HK + Glc や Mock では AMP が蓄積するが、CK + CP や 5'-NT では AMP の蓄積は起こらない。

材料と方法

共通試薬

S2 細胞抽出液、lysis バッファー (30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 100 mM KOAc and 2 mM Mg(OAc)₂), 2× proteinase K バッファー、ホルムアミド泳動染色液は先行研究に従った (106, 107)。40× reaction mix (106) には GFP とアミノ酸を入れずに実験を行った。

プラスミドの作製

pUC57-Mini-nosSRE-A₁₁₄, *pUC57-Mini-nosSREmut-A₁₁₄*

pUC57-Mini-nosSRE-A₁₁₄ は 5'-TAGGCGATCGCTCGAAGAGGGCGAATCCAGCTCTGGAGCAGAGGCTCTGGCAGCTTTTGCAGCGTTTATATAACATGAAATATATATACGCATTCCGATCAAA-3' と 5'-AGGCGGCCAGCGGCCTCTAAATCTCTTTAAAATCGAACGCGCCAGGCGCTATTTAAACGTTACTATCTATCTATCTGGTTAACCCAGCTTTGATCGGAATGCG-3' をアニール後 PCR した。Infusion HD (Takara) をもちいて PCR 産物と XhoI と NotI で切断した *pUC57* を結合した。*pUC57-Mini-nosSREmut-A₁₁₄* は *pUC57-Mini-nosSRE-A₁₁₄* と同様に作製した。5'-TAGGCGATCGCTCGAAGAGGGCGAATCCAGCTCTGGAGCAGAGGCTCTCGCAGCTTTTGCAGCGTTTATATAACATGAAATATATATACGCATTCCGATCAAA-3' と 5'-AGGCGGCCAGCGGCCTCTAAATCTCTTTAAAATCGAACGCGGAGGCGCTATTTAAACGTTACTATCTATCTATCTGGTTAACCCAGCTTTGATCGGAATGCG-3' をアニール後 PCR した。これらの DNA 配列は (108) に従った。

ターゲット RNA の作製

Mini-let-7-A₁₁₄, *Mini-nosSRE-A₁₁₄*, *Mini-nosSREmut-A₁₁₄*

Mini-let-7-A₁₁₄, *Mini-nosSRE-A₁₁₄*, *Mini-nosSREmut-A₁₁₄* はそれぞれ *pUC57-Mini-let-7-A₁₁₄*, *pUC57-Mini-nosSRE-A₁₁₄*, *pUC57-Mini-nosSREmut-A₁₁₄* から T7-Scribe Standard RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) をもちいて転写された。その後 UREA ゲルで泳動展開して切り出し精製し、ScriptCap m7G Capping System (CELLSCRIPT) と [α -³²P] GTP (PerkinElmer) をもちいて放射性標識して再度 UREA ゲルで泳動展開して切り出し精製した。

noC-A40

5'-GGTGAGAGTGAGTAGTGTAGTATTGGTAGTTGTATTAGAGTGAGGTT
GTGGTTTGTGGGT-3'を 5'-CGTAATACGACTCACTATAGGTGAGAGTG
GTAGTGTAGTATTGG-3'と 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTACCCACAAACCACAACCTC-3'をもちいて PCR した。PCR 産物
を T7-Scribe Standard RNA IVT Kit (CELLSCRIPT) をもちいて転写し、
UREA ゲルで泳動展開して切り出し精製した。その後、ScriptCap m7G Capping
System (CELLSCRIPT) と [α -³²P] GTP (PerkinElmer) をもちいて放射性標識
し、再度 UREA ゲルで泳動展開して切り出し精製した。

脱アデニル化解析と ATP 消費解析

S2 細胞抽出液における脱アデニル化解析は先行研究に修正を加えて行った (107)。典型的に、7.5 μ l の FLAG-Ago1 もしくは FLAG-Smaug を過剰発現した S2 細胞抽出液、4.5 μ l の 40 \times reaction mix (クレアチンキナーゼとクレアチンリン酸を含まない)、1.5 μ l の 500 nM *let-7/let-7**二本鎖 RNA (Smaug の場合は lysis バッファーを使用)、2 μ l の [α -³²P] ATP (PerkinElmer) を混ぜて 25 °C でインキュベーションした。続いて、2 μ l の 0.35 U/ μ l クレアチンキナーゼ (Millipore) と 300 mM Sodium creatine phosphate dibasic tetrahydrate (Sigma) の混合溶液、もしくは 1 μ l の 2 U/ μ l ヘキソキナーゼ (Sigma) と 2 μ l の 200 mM グルコース、もしくは 2 μ l の 100 ng/ μ l 5'-ヌクレオチダーゼ (human CD73; R&D Systems) を対応するサンプルに添加し、25°Cでインキュベーションした。同時、もしくは30分インキュベーション後、1.5 μ l の~5 nM 5'キャップ放射性標識ターゲット RNA を添加し、最終量が 20 μ l となるように水で調整した。25°Cでタイムコースをとり、各時点で脱アデニル化解析用に 2.8 μ l と ATP 消費解析用に 1 μ l のサンプルを回収した。脱アデニル化解析は先行研究と同様に行った (107)。ATP 消費解析用サンプルは 4 μ l のホルムアミド泳動染色液が添加され、95°Cで 3 分インキュベーションした後すぐに氷上においた。2 μ l のサンプルをポリエチレンイミン-セルロースプレートに滴下し、薄層クロマトグラフィーを前章のように行った (81)。

第四章

総合考察

1. 本研究の結論

本研究の目的は、CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化反応を、miRNA 経路をモデルとして生化学的に解析することで、より詳細に理解することであった。本研究の結論を図 4-1 に示す。第二章では「CCR4 や CAF1 はどのように分解すべき配列を決定しているのか」という問いに対し、「CCR4 や CAF1 は 3' 末端の A もしくは 3' 末端より上流のポリ(A)鎖を認識した場合に、3' 末端の配列を分解する」という結論を与えた。第二章の結論は、CCR4 や CAF1 は標的 RNA の 3' 末端だけで完結しない、より複雑な基質認識機構をもちいて分解すべき配列を決定していることを意味している。さらに第三章では、これまで ATP が必要と考えられてきた CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化には、実は ATP は必要ないことを示した。第三章の結論は、CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化のモデルを書き換えただけでなく、他の研究領域における酵素をもちいて ATP を除去した研究結果にも再考を迫るものである。

重要なことに、主に A を選択して分解するという脱アデニル化反応は一見複雑に見えるが、分解すべき配列の選択や脱アデニル化反応そのものには ATP の助けを必要とせず、CCR4 と CAF1 が自身の性質により脱アデニル化を成し遂げる。しかし、脱アデニル化の反応自体は CCR4 や CAF1 のみで完結している一方で、細胞内の脱アデニル化は CCR4、CAF1、および多くの周辺因子が協調することで達成されている。第四章では CCR4、CAF1、および周辺因子との関係性について考察する。

2. CCR4 と CAF1 の使い分け

CCR4-NOT 複合体は脱アデニル化酵素として CCR4 と CAF1 の 2 つをもつが、なぜ同じ活性をもつ酵素を 2 つも持っているのだろうか? CAF1 をなくすと CCR4 も複合体からなくなるという構造上の問題から、CCR4 のみを残して CAF1 をなくすという実験は、現時点では困難である。その一方で、CCR4 をなくして CAF1 を残すという実験は可能である。CCR4 をノックダウンした S2 細胞あるいは CCR4 ノックアウトショウジョウバエをもちいた研究では、CCR4 をなくしても mRNA 全体のポリ(A)鎖の長さは、一部伸長している集団があるものの、野生型とほとんど変わらないことが示された (66)。この結果は、多くの mRNA においては CAF1 が残っていれば十分脱アデニル化は進むことを示している。その一方で、CCR4 のノックアウトショウジョウバエでは、卵形成や初期発生に異常をきたす個体が一定数存在することが報告されている (119, 120)。また、nanos や cyclin といった、発生や細胞分裂制御に重要な因子をコードする mRNA のポリ(A)鎖が伸長して安定化してしまうことが、異常を引き起こす原因であると考えられている (119, 120)。これらの報告は、CAF1 の活性だけでは不十分であり、CCR4 の活性が必要である場面があることを示している。

ショウジョウバエにおいて、CAF1 の活性変異体を過剰発現することで、内在の CAF1 の機能を阻害すると、Hsp70 をコードする mRNA の脱アデニル化は顕著に遅れる。一方で、CCR4 の活性変異体を過剰発現しても、脱アデニル化に影響はなかった (94)。この結果から、ショウジョウバエの脱アデニル化は、主に CAF1 によって引き起こされているとされている。しかし、本研究の第二章で精製した CCR4/CAF1 ヘテロダイマーの活性の強さは、1M4W>1W4W>1W4M の順であり、CAF1 の活性は CCR4 の活性より弱かった (図 2-5 C)。この結果は一見、CAF1 が主に脱アデニル化を引き起こすとする過去の結果と矛盾している。

この矛盾には 2 つの説明が考えられる。第一に、分裂酵母の CCR4-NOT 複合体を試験管内で再構成した最近の研究において、CAF1 と CCR4 の活性に強さの違いはほとんどないことが示された (38)。さらに、ヌクレアーゼモジュールだけのときよりも、CCR4-NOT 複合体のときのほうが脱アデニル化の効率が良かった (38)。生物種による違いの可能性はあるものの、もしかするとショウジ

ヨウバエの CAF1 は NOT1 との結合により活性が促進されるのかもしれない。第二に、先行研究の活性変異体を過剰発現する実験について、CAF1 の活性変異体を過剰発現しても内在の CCR4 の数には限りがあるので、CCR4 と結合していない CAF1 の活性変異体をもつ CCR4-NOT 複合体の集団が増えた結果、脱アデニル化が阻害された可能性が考えられる。いずれにしても CCR4 もしくは CAF1 による脱アデニル化が使い分けられているのか、また、なぜ CCR4 が必要な状況が生まれるのか、現時点では明らかになっていない。

3. PAN2-PAN3 複合体と CCR4-NOT 複合体の関係

細胞における脱アデニル化は、PAN2-PAN3 複合体と CCR4-NOT 複合体の二段階反応である (9, 10)。しかし二段階反応がどのようにして達成されるのかは不明である。PAN2-PAN3 複合体と CCR4-NOT 複合体の顕著な違いとして一つ挙げられるのは PABP によって阻害されるかどうかである。CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化は PABP によって阻害される (65)。一方で、古くから PAN2-PAN3 複合体による第一段階の脱アデニル化は PABP によって促進されることが知られており、PAN2-PAN3 複合体の活性に PABP が必要であると考えられてきた(121-123)。

最近、PABP と PAN2-PAN3 複合体の関係性について、結晶構造解析と生化学的手法をもちいた興味深い報告が相次いでなされた (33-35)。これら一連の報告は、PABP は確かに PAN2-PAN3 複合体の脱アデニル化を促進するが、必要ではないことを示した。この結果から、PABP は PAN2-PAN3 複合体をポリ(A)鎖に誘導することで、その活性を促進していると解釈された。さらに、PAN2 が RNase 活性をもっていることは知られていたが、PAN2 単独のときよりも PAN3 に結合したほうが劇的に速く脱アデニル化でき、さらに A が残り 25 塩基くらいになると分解速度が低下することもわかった。また、PAN3 がもつ CCCH ジンクフィンガーが上流のポリ(A)を好んで結合することも明らかになった。これらの結果をまとめると、PABP は PAN2-PAN3 複合体をポリ(A)鎖に誘導することで脱アデニル化を促進し、PAN2-PAN3 複合体自体がポリ(A)鎖を認識して脱アデニル化を行う。ポリ(A)鎖が残り 25 塩基くらいのところで CCCH ジンクフィンガードメインが上流のポリ(A)配列を認識できなくなり、PAN2-PAN3 複合体による脱アデニル化が終わるというモデルが提唱されている (34)。もしかすると PAN2-PAN3 複合体は PABP が結合していても、PAN3 のアームが PABP を超えて上流のポリ(A)鎖を認識することで、PABP に PAN2 が衝突する直前までは脱アデニル化できるのかもしれない。

PAN2-PAN3 複合体による第一段階の反応は、PAN2-PAN3 複合体自体の性質によって起こると考えられる一方で、CCR4-NOT 複合体への引き渡しがどのように起こるのかはよくわかっていない。もしかすると PABP がポリ(A)鎖に結合している場合は PAN2-PAN3 複合体、PABP がポリ(A)鎖を離れると CCR4-NOT 複合体、という使い分けが存在するのかもしれない (図 4-2)。

4. 脱アデニル化と PABP との関係

脱アデニル化に関する研究において「PABP は脱アデニル化に先立って除かれるのか、それとも脱アデニル化こそが PABP を除くための反応なのか」議論が分かれている (8, 24, 30, 122)。細胞質においてポリ(A)鎖に結合している PABP は、3'末端を分解から保護する役割と、5'末端に結合している翻訳開始因子と結合して翻訳を促進する役割がある (124, 125)。ポリ(A)鎖はすでに PABP によって占拠されているにもかかわらず、どのようにポリ(A)鎖の分解反応である脱アデニル化が起こるのかはよくわかっていない。前述のように、CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化は PABP によって阻害される (65)。本研究において、当初は ATP が PABP を除くことで CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化を促進する可能性を想定していた。しかし第三章の結果から、ATP はそもそも必要ないという結論が導かれ、PABP があるにも関わらず、なぜ CCR4-NOT 複合体は脱アデニル化を引き起こすことができるのか、という疑問の手がかりは得られなかった。

CCR4-NOT 複合体と PABP との関係を考えることは、本研究で示した「CCR4 と CAF1 が上流ポリ(A)鎖を認識する」ということが、PABP によって A が覆い隠されているにも関わらず起こるのか、という疑問に対しても重要である。先行研究において、PABP は P-body に局在していないことが示されている (24, 126)。この結果は重要であるものの、P-body 形成前に CCR4-NOT 複合体がポリ(A)鎖を除いた結果 PABP が P-body に存在しないのか、P-body 形成前に PABP が何らかの方法で除かれた結果、CCR4-NOT 複合体は P-body においてポリ(A)鎖を除くことができるのか、については切り分けることができない。

PABP は脱アデニル化に先立って除かれるのだろうか?それとも脱アデニル化が PABP を除くのだろうか?先行研究では、CCR4-NOT 複合体の mRNA への誘導が PABP の解離を引き起こすと報告されている (127)。しかし CCR4-NOT 複合体に結合する因子のうち、どの因子が、どのように PABP を除くのかは不明である。PABP の解離を報告した論文の中では、翻訳抑制に続いて PABP の解離が起こるのではないかと予想している (127)。miRNA をもちいた先行研究においては確かに、翻訳抑制は脱アデニル化に先んじて起こることが報告されている (128–135)。さらに、miRNA によって誘導される GW182 依存的な翻訳抑制においても CCR4-NOT 複合体が必要であることが知られており (52, 70,

127, 136)、この抑制には DDX6 が必要であることが示された (74, 75, 137)。DDX6 は ATP 依存的ヘリカーゼとして知られ、CCR4-NOT 複合体の足場タンパク質である NOT1 と結合する (74, 75, 137)。DDX6 には 4E-T というタンパク質が結合しており、4E-T は翻訳開始段階を阻害することが知られているが、GW182 依存的な翻訳抑制においてその役割は部分的であることから(138)、おそらく DDX6 自身も CCR4-NOT 複合体依存的な翻訳抑制において働いているだろうと推測される。DDX6 が実際どのように機能するのか、その詳細は未だ明らかになっていないが、翻訳伸長を阻害することと、脱キャップ反応を促進するという役割が知られている (45)。最近、アフリカツメガエルの DDX6 ホモログ、Xp54 が関係する翻訳抑制は、翻訳開始複合体、特にその内の eIF4G, eIF4A, eIF4B のどれか (あるいは複数) を阻害していることが報告された (139)。植物の精製 PABP をもちいた研究では、PABP は翻訳開始因子である eIF4G や eIF4B との相互作用により、ポリ(A)鎖への結合親和性が 10 倍ほど上がるということが報告されている (140)。もしかすると CCR4-NOT 複合体に結合している DDX6 をはじめとした翻訳抑制因子群によって、PABP と翻訳開始因子の間の相互作用が阻害されると、PABP のポリ(A)鎖への親和性が下がって自発的にポリ(A)鎖から解離しやすくなるのかもしれない (図 4-3)。もしそうならば、PABP がポリ(A)鎖から離れた際に、CCR4-NOT 複合体がポリ(A)鎖を分解することで PABP の再結合を阻止し、結果として PABP は P-body に存在しなくなると考えられる。また、3'末端より上流の配列を CCR4 や CAF1 が認識しておくことで、脱アデニル化の最中に、上流のポリ(A)配列に PABP が結合するのを阻止しているのかもしれない。

5. mRNA 分解研究の行方

前項において、翻訳開始の抑制に依存した PABP の解離が、脱アデニル化の開始に重要である可能性を指摘した。ここで重要なのは、翻訳と脱アデニル化、さらに mRNA の分解が密接な関係にある可能性があるという点である。最近、細胞内における各 tRNA の量 (供給) と、それに対応するコドンの出現頻度 (需要) のバランスが mRNA の安定性を決めていることが立て続けに報告された (141–143)。より具体的には、需要より供給が多い tRNA に対応するコドン (optimal codon) を多くもつ mRNA は安定であり、逆に供給より需要が多い tRNA に対応するコドン (non-optimal codon) を多くもつ mRNA は不安定である傾向が示された。さらに、non-optimal codon を多くもつ mRNA では翻訳効率が低く、さらにリボソームの進行が遅いことがわかった (141)。このことから、供給が少ない tRNA は、供給が多い tRNA よりも対応するコドンへの結合に時間がかかり、その結果リボソームの進行が遅れると考えられている (141)。リボソームの進行が遅れるとなぜ mRNA は不安定化するのか、その分子メカニズムは不明であるが、non-optimal codon による真核生物の mRNA 不安定化は CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化に依存していることや、Dhh1p (出芽酵母における DDX6 のホモログ) が non-optimal codon で停滞したリボソームの認識に重要であると報告されている (141, 142, 144)。

これまでの考察を踏まえて翻訳と mRNA の分解との関係を考えると、図 4-4 に示すような、翻訳が活発な mRNA は安定化され、翻訳が活発ではない mRNA は不安定化される機構が存在するのではないかと予想する。しかしながら、翻訳と mRNA 分解の関係に関する研究は始まったばかりであり、今後さらなる証拠の積み重ねが必要である。一つの方向性として、脱アデニル化や mRNA 分解に関する研究は、翻訳との関係がフォーカスされる形で進展していくことが予想される。

6. 総括

第四章では CCR4、CAF1、および周辺因子について考察し、脱アデニル化や mRNA 分解機構における謎の一例を挙げた。これらの謎は、一分子イメージングによるタンパク質と RNA の動態観察や RNA-seq による網羅的解析、CRISPR-Cas9 システムに代表されるゲノム編集ツールといった強力な手法と生化学を組み合わせることで解決できるかもしれない。CCR4 や CAF1 の使い分けについては、CRISPR-Cas9 システムで活性変異型の遺伝子にそれぞれ置換した細胞を用意し、各 mRNA のポリ(A)鎖の長さの変化を網羅的に調べれば、CCR4 もしくは CAF1 依存的な脱アデニル化がポリ(A)鎖の短縮に必要な mRNA 集団を同定できると考えられる。もしかすると、同定した mRNA 集団を比較することで、mRNA の配列や構造に、今まで見えていなかった CCR4 や CAF1 の嗜好性が明らかになるかもしれない。さらに、一分子イメージングをもちいれば、翻訳開始複合体や PABP が mRNA 上に滞在する時間を見積もることができると考えられる。この系をもちいて、翻訳開始が通常のとくと抑制されているときの比較や、リボソームの進行速度が速いときと遅いときの比較によって、翻訳開始複合体や PABP が mRNA 上に滞在する時間の変化を検出することができると思われる。それにより、翻訳状態と mRNA の分解がリンクしていることを裏付ける証拠が得られるかもしれない。本研究では生化学をもちいて CCR4-NOT 複合体の脱アデニル化を調べたが、今後は生化学だけでなく、幅広い実験手法を取り入れることが知見を広げるために必要である。このような今後の研究に、本研究の結果が役立ち、新たな知見につながることを願う。そして mRNA 分解や遺伝子制御のより詳細な理解、生命現象のメカニズム解明、ひいては医療の進歩に本研究が少しでも貢献できれば幸いである。

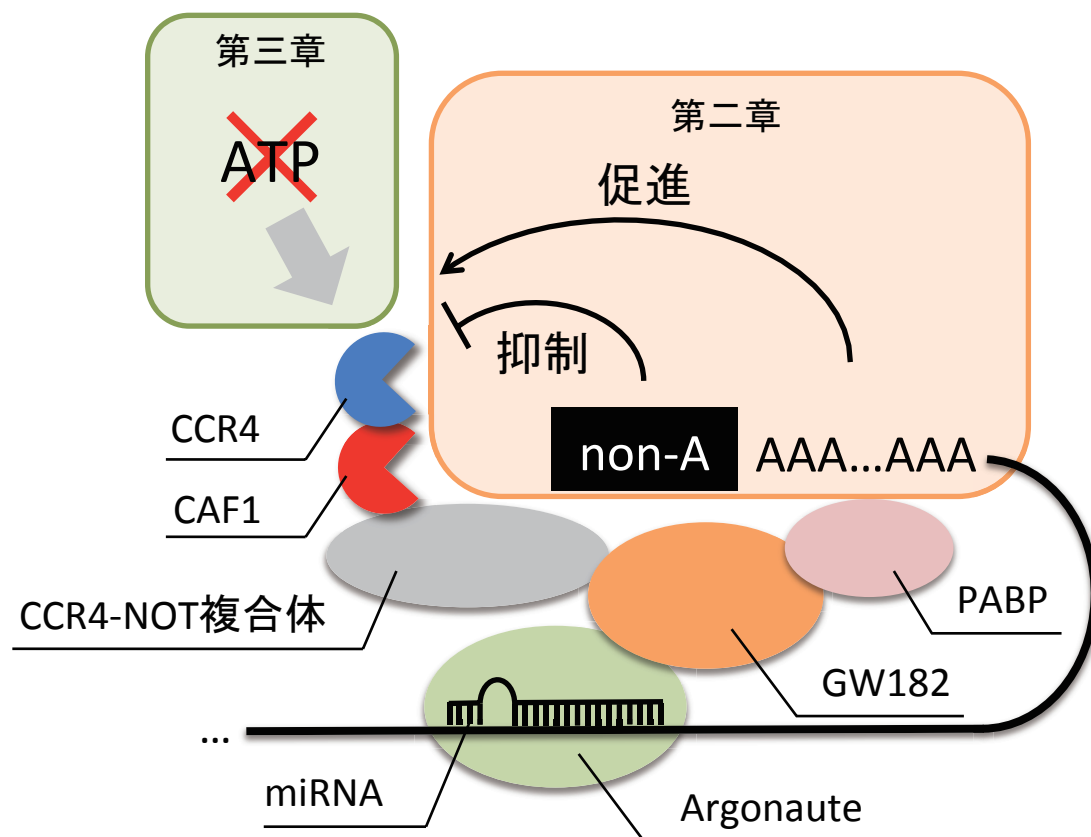


図4-1. 本研究が明らかにしたこと

miRNA経路をモデルとした生化学的解析により、第二章で明らかになったことをオレンジで、第三章で明らかになったことを緑で囲った。第二章ではCCR4-NOT複合体はポリ(A)下流配列と、その上流のポリ(A)鎖の長さのバランスによってRNAを分解することを明らかにした。第三章ではCCR4-NOT複合体による脱アデニル化にはATPが必要ないことを明らかにした。

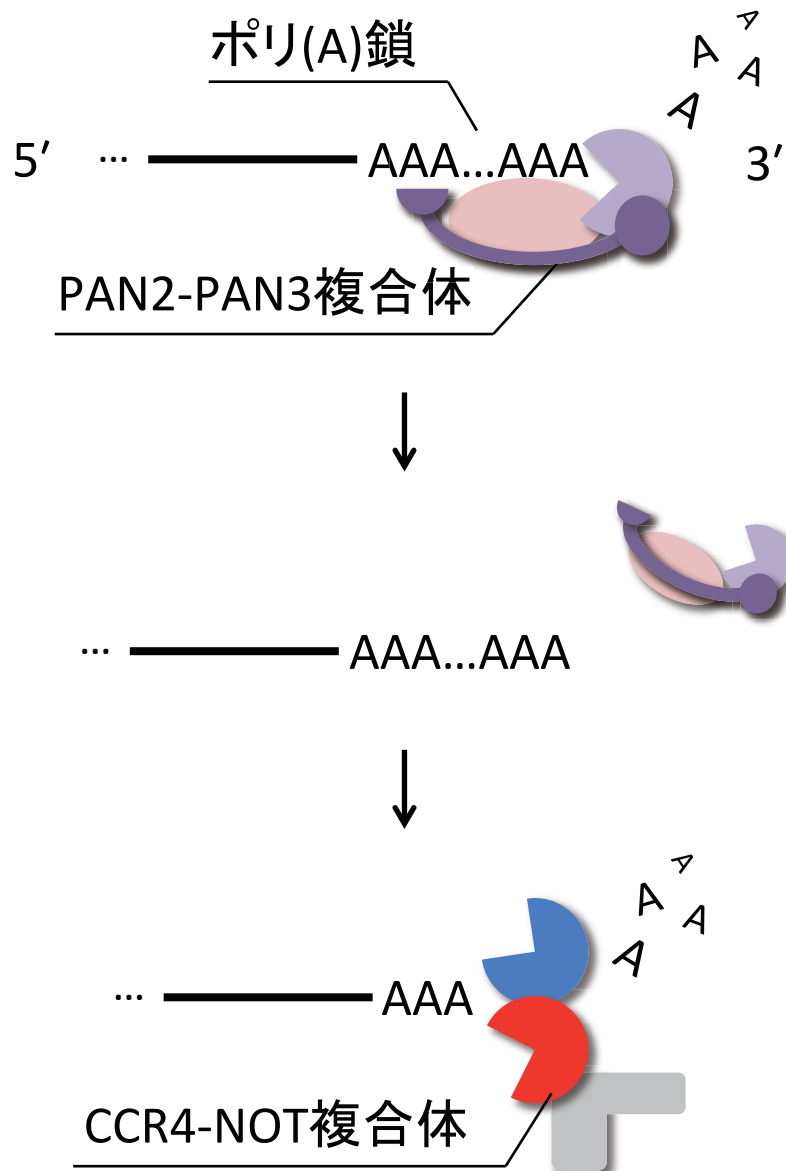


図4-2. PAN2-PAN3複合体とCCR4-NOT複合体による二段階脱アデニル化のモデル図

PAN2-PAN3複合体とCCR4-NOT複合体による脱アデニル化における推測をまとめたモデル図。PAN2-PAN3複合体からCCR4-NOT複合体による脱アデニル化の切り替えは、PABPがポリ(A)鎖に結合しているかどうかによって依存するのではないかと考えた。

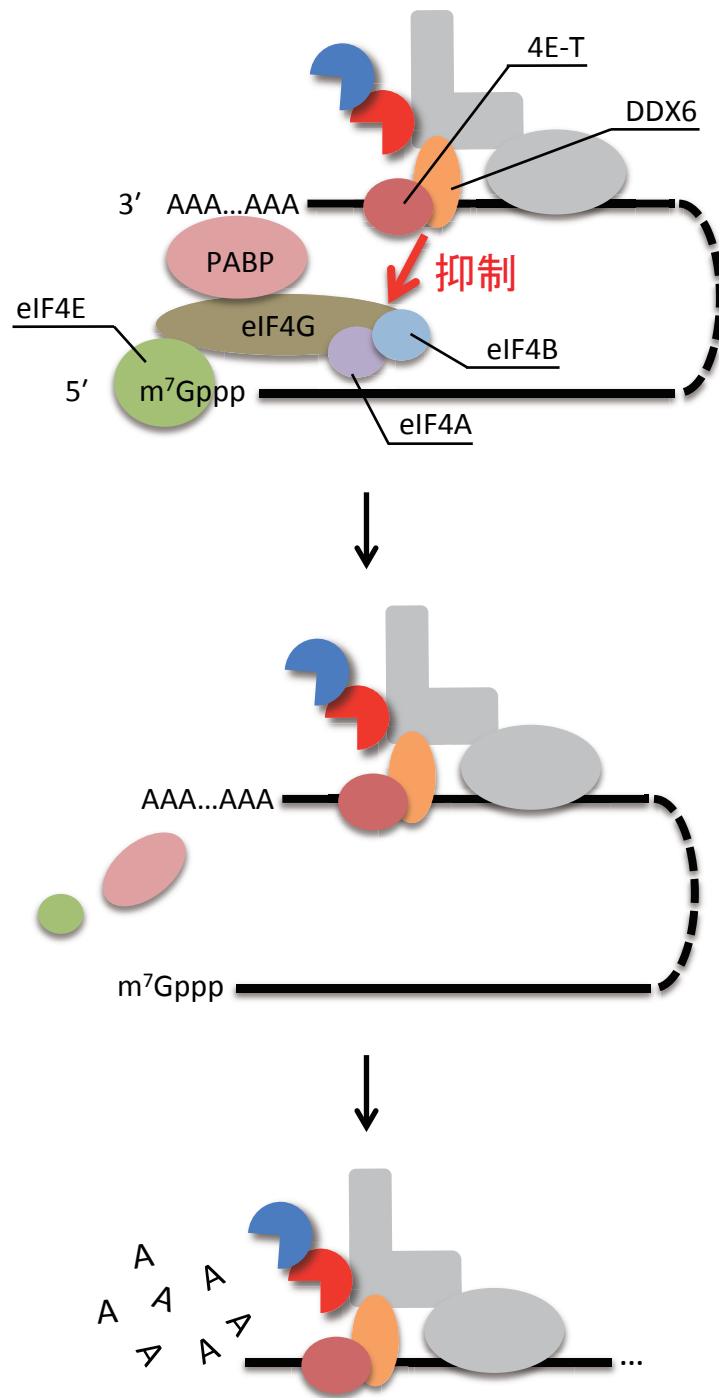


図4-3. CCR4-NOT複合体が脱アデニル化に至るまでのモデル図

脱アデニル化に至るまでの推測をまとめたモデル図。CCR4-NOT複合体に存在するDDX6や4E-Tを始めとする因子によって翻訳開始因子が抑制されると、翻訳開始複合体が不安定化する。翻訳開始複合体が不安定化すると、PABPのポリ(A)鎖への親和性が下がって解離しやすくなり、脱アデニル化酵素がアクセスしやすくなることで脱アデニル化が進行するのではないかと考えた。

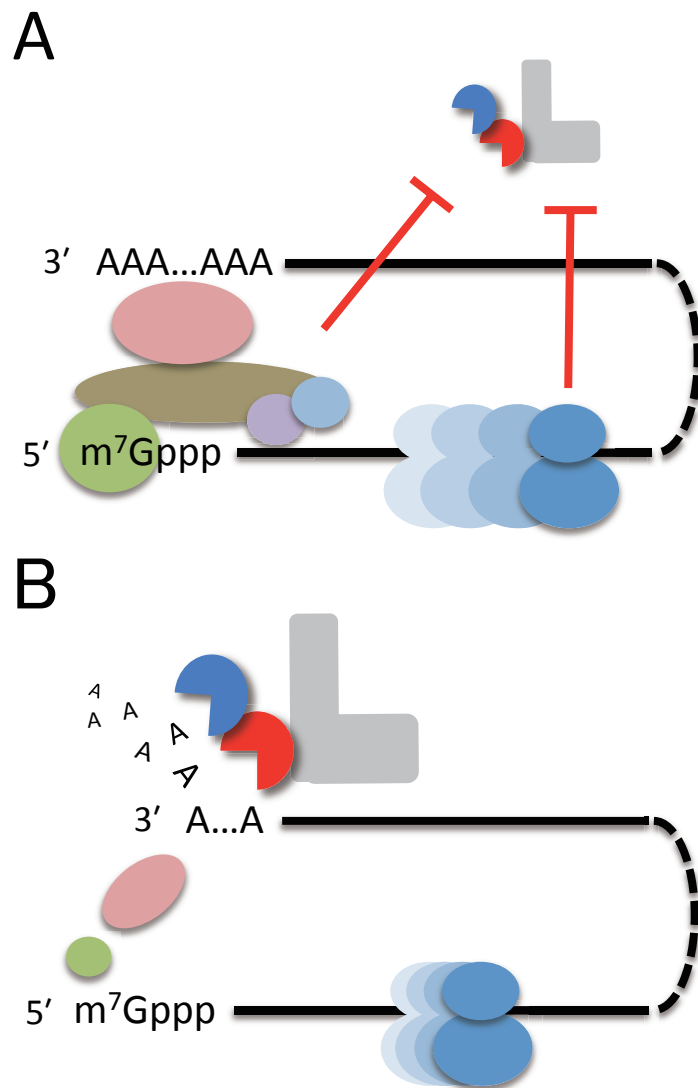


図4-4. 翻訳状態とmRNAの安定性は
リンクしている可能性がある

- (A) 翻訳開始因子がmRNA上に存在していたり、リボソームの進行が速いmRNAでは脱アデニル化は起こりにくいことを表したモデル図
- (B) 翻訳開始因子がmRNAから解離していたり、リボソームの進行が遅いmRNAでは脱アデニル化は起こりやすいことを表したモデル図

謝辞

本研究を進めるにあたり、どんなに忙しいときでもディスカッションに時間を割いてくださり、その都度、懇切丁寧なご指導や多くの貴重なアドバイスを賜りました泊幸秀教授に深く深く感謝申し上げます。

本研究を始めるにあたり、懇切丁寧に、わかりやすく実験を指導してくださり、また多くの貴重なアドバイスを賜りました深谷雄志博士に深謝致します。

本研究において、バキュロウイルス発現系の実験指導は Juan Guillermo Betancur 博士、タンパク質精製の実験指導は佐々木浩博士、pAWS の構築は岩崎信太郎博士、pUC57-Mini-nosSRE-A₁₁₄およびpUC57-Mini-nosSREmut-A₁₁₄の構築は深谷雄志博士により行われました。感謝申し上げます。

本研究を進める上で、泊研究室のメンバーから、日々多大なるご支援、ご指導、アドバイスを頂きました。感謝申し上げます。

ポリ(A)鎖をクローニングする上でのアドバイスを頂きました深尾亜喜良博士と藤原俊伸教授、CCR4 抗体と CAF1 抗体を頂きました Claudia Temme 博士と Elmar Wahle 教授に感謝申し上げます。

本研究は日本学術振興会によるご支援を頂きました (研究課題/領域番号 14J08195)。感謝申し上げます。

最後に、研究生活を支えてくれた両親と江頭純佳さんに心から感謝致します。

引用文献

1. Hirose T, Mishima Y, Tomari Y (2014) Elements and machinery of non-coding RNAs: toward their taxonomy. *EMBO Rep* 15(5):489–507.
2. Shoemaker CJ, Green R (2012) Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol* 19(6):594–601.
3. Miller MA, Olivas WM (2011) Roles of Puf proteins in mRNA degradation and translation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(4):471–492.
4. Mazzoni C, Falcone C (2011) mRNA stability and control of cell proliferation. *Biochem Soc Trans* 39(5):1461–1465.
5. Laver JD, Marsolais AJ, Smibert CA, Lipshitz HD (2015) Regulation and Function of Maternal Gene Products During the Maternal-to-Zygotic Transition in *Drosophila*. *Curr Top Dev Biol* 113:43–84.
6. Braun KA, Young ET (2014) Coupling mRNA synthesis and decay. *Mol Cell Biol* 34(22):4078–4087.
7. Łabno A, Tomecki R, Dziembowski A (2016) Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1863(12):3125–3147.
8. Chen CY, Shyu AB (2011) Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:167–183.
9. 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.
10. Yamashita A *et al.* (2005) Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12:1054–1063.
11. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2):113–126.
12. Chowdhury A, Mukhopadhyay J, Tharun S (2007) The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA* 13(7):998–1016.
13. Song MG, Kiledjian M (2007) 3' Terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping. *RNA* 13(12):2356–2365.
14. Lim J *et al.* (2014) Uridylation by TUT4 and TUT7 marks mRNA for degradation. *Cell* 159(6):1365–1376.

15. Nissan T, Rajyaguru P, She M, Song H, Parker R (2010) Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Mol Cell* 39(5):773–783.
16. Braun JE *et al.* (2012) A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat Struct Mol Biol* 19(12):1324–1331.
17. Beelman CA, Parker R (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81(2):179–183.
18. Anderson JS, Parker RP (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* 17(5):1497–1506.
19. Malecki M *et al.* (2013) The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *EMBO J* 32(13):1842–1854.
20. Lubas M *et al.* (2013) Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. *EMBO J* 32(13):1855–1868.
21. Sement FM *et al.* (2013) Uridylation prevents 3' trimming of oligoadenylated mRNAs. *Nucleic Acids Res* 41(14):7115–7127.
22. Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25(5):635–646.
23. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E (2007) P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 27(11):3970–3981.
24. Zheng D *et al.* (2008) Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* 182(1):89–101.
25. Chlebowski A, Lubas M, Jensen TH, Dziembowski A (2013) RNA decay machines: the exosome. *Biochim Biophys Acta* 1829(6-7):552–560.
26. Chang HM, Triboulet R, Thornton JE, Gregory RI (2013) A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3L2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* 497(7448):244–248.
27. Ustianenko D *et al.* (2013) Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylated precursors of let-7 miRNAs. *RNA* 19(12):1632–1638.
28. Faehnle CR, Walleshauser J, Joshua-Tor L (2014) Mechanism of Dis3L2 substrate recognition in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* 514(7521):252–256.

29. Thomas MP *et al.* (2015) Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. *Cell Rep* 11(7):1079–1089.
30. Goldstrohm AC, Wickens M (2008) Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4):337–344.
31. Wahle E, Winkler GS (2013) RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim Biophys Acta* 1829(6-7):561–570.
32. 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.
33. Schäfer IB, Rode M, Bonneau F, Schüssler S, Conti E (2014) The structure of the Pan2-Pan3 core complex reveals cross-talk between deadenylase and pseudokinase. *Nat Struct Mol Biol* 21(7):591–598.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Du H *et al.* (2016) YTHDF2 destabilizes m(6)A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4-NOT deadenylase complex. *Nat Commun* 7:12626.
38. Stowell JA *et al.* (2016) Reconstitution of Targeted Deadenylation by the Ccr4-Not Complex and the YTH Domain Protein Mmi1. *Cell Rep* 17(8):1978–1989.
39. Kobayashi H, Tomari Y (2016) RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta* 1859(1):71–81.
40. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2):215–233.
41. Iwakawa HO, Tomari Y (2015) The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol* 25(11):651–665.

42. Iwasaki S *et al.* (2010) Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 39(2):292–299.
43. Iwasaki S *et al.* (2015) Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature* 521(7553):533–536.
44. Kwak PB, Tomari Y (2012) The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19(2):145–151.
45. Jonas S, Izaurralde E (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16(7):421–433.
46. Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev* 18(14):1655–1666.
47. Förstemann K, Horwich MD, Wee L, Tomari Y, Zamore PD (2007) *Drosophila* microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. *Cell* 130(2):287–297.
48. Tomari Y, Du T, Zamore PD (2007) Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130(2):299–308.
49. 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(14):1885–1898.
50. Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 15(4):346–353.
51. Braun JE, Huntzinger E, Fauser M, Izaurralde E (2011) GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylase complexes to miRNA targets. *Mol Cell* 44(1):120–133.
52. Chekulaeva M *et al.* (2011) miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs. *Nat Struct Mol Biol* 18(11):1218–1226.
53. Fabian MR *et al.* (2011) miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat Struct Mol Biol* 18(11):1211–1217.

54. Chen CY, Zheng D, Xia Z, Shyu AB (2009) Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol* 16(11):1160–1166.
55. Piao X, Zhang X, Wu L, Belasco JG (2010) CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol* 30(6):1486–1494.
56. Smibert CA, Wilson JE, Kerr K, Macdonald PM (1996) Smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo. *Genes Dev* 10(20):2600–2609.
57. Tadros W *et al.* (2007) SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in Drosophila and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev Cell* 12(1):143–155.
58. Aviv T *et al.* (2003) The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nat Struct Biol* 10(8):614–621.
59. Green JB, Gardner CD, Wharton RP, Aggarwal AK (2003) RNA recognition via the SAM domain of Smaug. *Mol Cell* 11(6):1537–1548.
60. Semotok JL *et al.* (2005) Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early Drosophila embryo. *Curr Biol* 15(4):284–294.
61. Nelson MR, Leidal AM, Smibert CA (2004) Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J* 23(1):150–159.
62. Pinder BD, Smibert CA (2013) microRNA-independent recruitment of Argonaute 1 to nanos mRNA through the Smaug RNA-binding protein. *EMBO Rep* 14(1):80–86.
63. Collart MA (2003) Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene* 313:1–16.
64. Collart MA, Panasenko OO (2012) The Ccr4--not complex. *Gene* 492(1):42–53.
65. Tucker M, Staples RR, Valencia-Sanchez MA, Muhlrad D, Parker R (2002) Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21(6):1427–1436.

66. Temme C, Zaessinger S, Meyer S, Simonelig M, Wahle E (2004) A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J* 23(14):2862–2871.
67. Temme C, Simonelig M, Wahle E (2014) Deadenylation of mRNA by the CCR4-NOT complex in *Drosophila*: molecular and developmental aspects. *Front Genet* 5:143.
68. Nasertorabi F, Batisse C, Diepholz M, Suck D, Böttcher B (2011) Insights into the structure of the CCR4-NOT complex by electron microscopy. *FEBS Lett* 585(14):2182–2186.
69. Collart MA, Panasenko OO, Nikolaev SI (2013) The Not3/5 subunit of the Ccr4-Not complex: a central regulator of gene expression that integrates signals between the cytoplasm and the nucleus in eukaryotic cells. *Cell Signal* 25(4):743–751.
70. Bawankar P, Loh B, Wohlbold L, Schmidt S, 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(2):228–244.
71. Boland A *et al.* (2013) Structure and assembly of the NOT module of the human CCR4-NOT complex. *Nat Struct Mol Biol* 20(11):1289–1297.
72. Alhusaini N, Collier J (2016) The deadenylase components Not2p, Not3p, and Not5p promote mRNA decapping. *RNA* 22(5):709–721.
73. Haas M, Siegert M, Schürmann A, Sodeik B, Wolfes H (2004) c-Myb protein interacts with Rcd-1, a component of the CCR4 transcription mediator complex. *Biochemistry* 43(25):8152–8159.
74. 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.
75. 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.
76. Basquin J *et al.* (2012) Architecture of the nuclease module of the yeast Ccr4-not complex: the Not1-Caf1-Ccr4 interaction. *Mol Cell* 48(2):207–218.
77. Mauxion F, Prève B, Séraphin B (2013) C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex. *RNA Biol* 10(2):267–276.

78. Dlakić M (2000) Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases. *Trends Biochem Sci* 25(6):272–273.
79. Chen J, Chiang YC, Denis CL (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J* 21(6):1414–1426.
80. Wang H *et al.* (2010) Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *EMBO J* 29(15):2566–2576.
81. Niinuma S, Fukaya T, Tomari Y (2016) CCR4 and CAF1 deadenylases have an intrinsic activity to remove the post-poly(A) sequence. *RNA* 22(10):1550–1559.
82. Nousch M, Techritz N, Hampel D, Millonigg S, Eckmann CR (2013) The Ccr4-Not deadenylase complex constitutes the main poly(A) removal activity in *C. elegans*. *J Cell Sci* 126(Pt 18):4274–4285.
83. Dupressoir A *et al.* (2001) Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics* 2:9.
84. 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.
85. Suzuki Y, Arae T, Green PJ, Yamaguchi J, Chiba Y (2015) AtCCR4a and AtCCR4b are Involved in Determining the Poly(A) Length of Granule-bound starch synthase 1 Transcript and Modulating Sucrose and Starch Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 56(5):863–874.
86. Chou WL, Chung YL, Fang JC, Lu CA (2016) Novel interaction between CCR4 and CAF1 in rice CCR4-NOT deadenylase complex. *Plant Mol Biol*
87. Zuo Y, Deutscher MP (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res* 29(5):1017–1026.
88. Daugeron MC, Mauxion F, Séraphin B (2001) The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res* 29(12):2448–2455.
89. Thore S, Mauxion F, Séraphin B, Suck D (2003) X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO Rep* 4(12):1150–1155.
90. Viswanathan P, Ohn T, Chiang YC, Chen J, Denis CL (2004) Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but in yeast the

- deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *J Biol Chem* 279(23):23988–23995.
91. Bianchin C, Mauxion F, Sentis S, Séraphin B, Corbo L (2005) Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA* 11(4):487–494.
 92. Jonstrup AT, Andersen KR, Van LB, Brodersen DE (2007) The 1.4-Å crystal structure of the *S. pombe* Pop2p deadenylase subunit unveils the configuration of an active enzyme. *Nucleic Acids Res* 35(9):3153–3164.
 93. Walley JW, Kelley DR, Nestorova G, Hirschberg DL, Dehesh K (2010) Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. *Plant Physiol* 152(2):866–875.
 94. Temme C *et al.* (2010) Subunits of the *Drosophila* CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA* 16(7):1356–1370.
 95. Fukaya T, Tomari Y (2011) PABP is not essential for microRNA-mediated translational repression and deadenylation in vitro. *EMBO J* 30(24):4998–5009.
 96. Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V (2002) The expression of the *let-7* small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 244(1):170–179.
 97. Andersen KR, Jonstrup AT, Van LB, Brodersen DE (2009) The activity and selectivity of fission yeast Pop2p are affected by a high affinity for Zn²⁺ and Mn²⁺ in the active site. *RNA* 15(5):850–861.
 98. Zhang Q *et al.* (2016) Structural basis for inhibition of the deadenylase activity of human CNOT6L. *FEBS Lett* 590(8):1270–1279.
 99. Viswanathan P, Chen J, Chiang YC, Denis CL (2003) Identification of multiple RNA features that influence CCR4 deadenylation activity. *J Biol Chem* 278(17):14949–14955.
 100. Rissland OS, Norbury CJ (2009) Decapping is preceded by 3' uridylation in a novel pathway of bulk mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 16(6):616–623.
 101. Chang H, Lim J, Ha M, Kim VN (2014) TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell* 53(6):1044–1052.
 102. Fukaya T, Tomari Y (2012) MicroRNAs mediate gene silencing via multiple different pathways in *drosophila*. *Mol Cell* 48(6):825–836.
 103. Iwasaki S, Kawamata T, Tomari Y (2009) *Drosophila* argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression. *Mol Cell* 34(1):58–67.

104. Förstemann K *et al.* (2005) Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires Loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biol* 3(7):e236.
105. Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11:1640–1647.
106. Haley B, Tang G, Zamore PD (2003) In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* 30(4):330–336.
107. Fukaya T, Iwakawa HO, Tomari Y (2014) MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in *Drosophila*. *Mol Cell* 56(1):67–78.
108. Jeske M, Meyer S, Temme C, Freudenreich D, Wahle E (2006) Rapid ATP-dependent deadenylation of nanos mRNA in a cell-free system from *Drosophila* embryos. *J Biol Chem* 281(35):25124–25133.
109. Maryati M, Airhihen B, Winkler GS (2015) The enzyme activities of Caf1 and Ccr4 are both required for deadenylation by the human Ccr4-Not nuclease module. *Biochem J* 469(1):169–176.
110. Kawamata T, Seitz H, Tomari Y (2009) Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 16(9):953–960.
111. Yoda M *et al.* (2010) ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 17(1):17–23.
112. Jeske M, Moritz B, Anders A, Wahle E (2011) Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels. *EMBO J* 30(1):90–103.
113. Wang W *et al.* (2010) ATP-independent CFTR channel gating and allosteric modulation by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(8):3888–3893.
114. Chivasa S, Slabas AR (2012) Plant extracellular ATP signalling: new insight from proteomics. *Mol Biosyst* 8(2):445–452.
115. Sugi H *et al.* (2015) Electron microscopic recording of myosin head power stroke in hydrated myosin filaments. *Sci Rep* 5:15700.
116. Hawley SA *et al.* (2010) Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab* 11(6):554–565.

117. Ishimoto T *et al.* (2012) Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(11):4320–4325.
118. Johnson RJ *et al.* (2013) Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes* 62(10):3307–3315.
119. Morris JZ, Hong A, Lilly MA, Lehmann R (2005) twin, a CCR4 homolog, regulates cyclin poly(A) tail length to permit *Drosophila* oogenesis. *Development* 132(6):1165–1174.
120. Zaessinger S, Busseau I, Simonelig M (2006) Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development* 133(22):4573–4583.
121. Sachs AB, Deardorff JA (1992) Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70(6):961–973.
122. Lowell JE, Rudner DZ, Sachs AB (1992) 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev* 6(11):2088–2099.
123. Uchida N, Hoshino S, Katada T (2004) Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 279(2):1383–1391.
124. Goss DJ, Kleiman FE (2013) Poly(A) binding proteins: are they all created equal. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4(2):167–179.
125. Eliseeva IA, Lyabin DN, Ovchinnikov LP (2013) Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)* 78(13):1377–1391.
126. Kedersha N *et al.* (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169(6):871–884.
127. 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.
128. Pillai RS *et al.* (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 309(5740):1573–1576.
129. Mathonnet G *et al.* (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* 317(5845):1764–1767.

130. Fabian MR *et al.* (2009) Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell* 35(6):868–880.
131. Zdanowicz A *et al.* (2009) Drosophila miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell* 35(6):881–888.
132. Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ (2012) Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science* 336(6078):233–237.
133. Béthune J, Artus-Revel CG, Filipowicz W (2012) Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep* 13(8):716–723.
134. Djuranovic S, Nahvi A, Green R (2012) miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science* 336(6078):237–240.
135. Moretti F, Kaiser C, Zdanowicz-Specht A, Hentze MW (2012) PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nat Struct Mol Biol* 19(6):603–608.
136. Cooke A, Prigge A, Wickens M (2010) Translational repression by deadenylases. *J Biol Chem* 285(37):28506–28513.
137. Rouya C *et al.* (2014) Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1. *RNA* 20(9):1398–1409.
138. Kamenska A *et al.* (2014) Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Res* 42(5):3298–3313.
139. Waghray S, Williams C, Coon JJ, Wickens M (2015) Xenopus CAF1 requires NOT1-mediated interaction with 4E-T to repress translation in vivo. *RNA* 21(7):1335–1345.
140. Le H *et al.* (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* 272(26):16247–16255.
141. Presnyak V *et al.* (2015) Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160(6):1111–1124.
142. Mishima Y, Tomari Y (2016) Codon Usage and 3' UTR Length Determine Maternal mRNA Stability in Zebrafish. *Mol Cell* 61(6):874–885.

143. Boël G *et al.* (2016) Codon influence on protein expression in *E. coli* correlates with mRNA levels. *Nature* 529(7586):358–363.
144. Radhakrishnan A *et al.* (2016) The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell* 167(1):122–132.e9.