

論文の内容の要旨

論文題目 CCR4-NOT複合体による脱アデニル化反応の生化学的解析

氏名 新沼 翔

真核生物におけるほとんどの mRNA は 3'末端にポリ(A)鎖を持つ。細胞質における mRNA の主要な分解経路はポリ(A)鎖の分解反応である「脱アデニル化」から始まる。脱アデニル化を引き起こす因子を mRNA 上に誘導する方法はいくつか知られているが、その内の一つに microRNA(miRNA)がある。miRNA は約 22 塩基長の内在小分子 RNA であり、Argonaute(Ago)タンパク質に取り込まれる。Ago は miRNA の配列を参照することで適切な RNA にエフェクター因子を誘導する。本研究で用いたショウジョウバエにおいて miRNA は Ago1 に取り込まれ、翻訳抑制と脱アデニル化という 2 種類の転写後制御を引き起こす。この脱アデニル化は主に CCR4-NOT 複合体によって引き起こされる。CCR4-NOT 複合体は真核生物において広く保存され、多くの構成因子からなる巨大複合体である。それらの構成因子のうち、脱アデニル化活性を持つ酵素は CCR4 と CAF1 の 2 つである(図 1)。

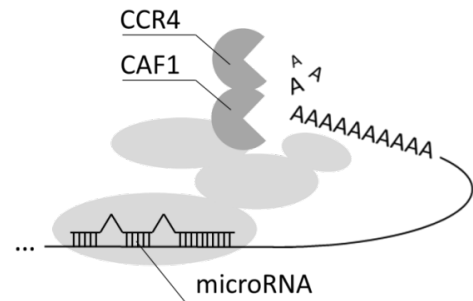


図 1 : miRNA による脱アデニル化

本研究はmiRNA経路をモデルとしてCCR4-NOT複合体の脱アデニル化反応を生化学的に解析し、その作用機序を理解することを目的とする。

(1) 脱アデニル化酵素CCR4とCAF1はポリ(A)下流配列を除く活性を持つ

当研究室の先行研究において、miRNA による翻訳抑制の効果のみを調べるために、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持つ 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、レポーターRNA が十分に長いポリ(A)下流配列を持つ場合には、脱アデニル化は完全に止まることがわかった。ところが、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わかった。さらなる解析から、ポリ(A)下流配列が長いほど脱アデニル化の効率は減少するが、その上流のポリ(A)配列が長いほど脱アデニル化効率は回復することがわかった。これらの結果から、miRNA 経路には「ポリ(A)配列の下流にある A 以外の配列を除く」という未知の活性を持つ因子が存在する可能性が示唆された。

ポリ(A)下流配列を持つRNAにおいてもCCR4-NOT複合体が脱アデニル化しているのかを検証するため、ショウジョウバエS2細胞においてCAF1のノックダウンを行った。CCR4はCAF1を介してCCR4-NOT複合体上に存在するため、CAF1が失われるとCCR4も複合体上に誘導されなくなり、結果として脱アデニル化は起こらなくなると予想された。確かに、CAF1をノックダウンした細胞抽出液中ではポリ(A)鎖を持つレポーターRNAにおいて脱アデニル化は起こらなかったが、ポリ(A)下流配列を持つレポーターRNAにおいても同様に脱アデニル化は起こらなかった。この結果はポリ(A)下流配列を持つRNAにおいてもCCR4-NOT複合体が脱アデニル化していることを示している。

次にCCR4あるいはCAF1がポリ(A)下流配列を除く活性を持つ可能性を検証するため、野生型あるいは活性変異体を組み合わせた4種類のCCR4/CAF1ヘテロダイマーを精製した。4種類のCCR4/CAF1ヘテロダイマーをポリ(A)下流配列を持つレポーターRNAに作用させたところ、両方が活性変異体である場合を除いて脱アデニル化は進行した(図2)。この結果はCCR4とCAF1の両方にポリ(A)下流配列を除く活性があることを示している。さらにポリ(A)下流配列を放射性標識したレポーターRNAに対してCCR4/CAF1ヘテロダイマーを作用させたところ、一塩基の分解産物が生じることがわかった。この結果はCCR4とCAF1はエキソヌクレアーゼ活性でポリ(A)下流配列を除くことを示している。

続いて、4種類のCCR4/CAF1ヘテロダイマーを用いてポリ(A)下流配列と、その上流のポリ(A)配列が活性に与える影響を調べた。その結果、ポリ(A)下流配列を伸ばすほど脱アデニル化効率は低下し、上流のポリ(A)配列を伸ばすほど脱アデニル化効率が回復するという、細胞抽出液において見られた性質をCCR4とCAF1の両方が持つことがわかった。これらの結果はCCR4とCAF1がポリ(A)下流配列を除く際には、上流のポリ(A)配列を認識することが重要であることを示唆している。

本研究の結果は「CCR4とCAF1の基質認識機構」と「内在ポリ(A)下流配列の除去機構」に一定の理解をもたらす。CCR4とCAF1の基質認識機構について、先行研究では活性部位の近くにある立体構造がアデニンを選択すると説明している。しかし本研究の結果は、CCR4とCAF1が3'末端から離れた位置にあるポリ(A)配列を認識することを示唆する。CCR4とCAF1は活性部位近くの立体構造だけでなく、より複雑な基質選択機構を用いて除くべき配列を決めていることが想定される。

近年、一部の内在mRNAにポリ(A)下流配列が付加されていることが発見された。ポリ(A)下流配列として1塩基のUを持つmRNAの半減期は短い傾向があり、1塩基のGを持つmRNAの半減期は長い傾向があることがわかった。もしかするとCCR4やCAF1のポリ(A)下流配列を除く活性は、内在ポリ(A)下流配列を除くことでmRNAの半減期を制御する働きがあるのかもしれない。

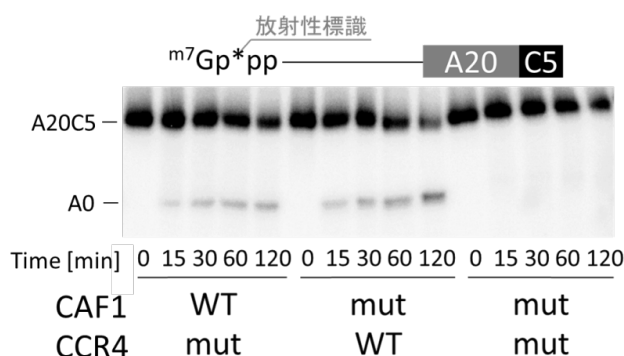


図 2: CCR4 と CAF1 はポリ(A)下流配列を除いて脱アデニル化を行う

(2) CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化反応にATPは必要ではない

古くから miRNA 経路は ATP 依存的であることが知られている。特に、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。一方、当研究室の先行研究において、miRNA を Ago1 に取り込ませたあとに 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観察された。この結果から、標的の脱アデニル化を引き起こす段階もまた ATP 依存的であるとされた。しかし精製した CCR4 や CAF1 は ATP を必要とせず、なぜ miRNA による脱アデニル化に ATP が要求されるのかは不明である。本研究では 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が目的である。

miRNA による反応を細胞抽出液で観察する際には、ATP 濃度を一定に保つ目的で ADP を ATP に変換する酵素クレアチンキナーゼ(CK)とその基質クレアチンリン酸(CP)が添加される。一方で ATP を反応系から除く場合は、ヘキソキナーゼ(HK)が ATP を用いてグルコース(Glc)をリン酸化し、ADP を放出する反応を利用するため、CK+CP の代わりに HK+Glc が添加される。

先行研究の結果を確認するために ATP 存在下で miRNA を Ago1 に取り込ませたあと、CK+CP もしくは HK+Glc を細胞抽出液に添加して脱アデニル化を観察した。確かに、CK+CP を添加すると脱アデニル化が起こるのに対して、HK+Glc を添加すると脱アデニル化は顕著に遅れた。しかしこの実験の過程で、何も添加しない場合においても脱アデニル化は顕著に遅れることがわかった。このことは、ATP を積極的に除く操作の有無に関わらず細胞抽出液では脱アデニル化は起こりにくく、CK+CP の添加によって脱アデニル化が促進されることを意味する。

これらの反応系における ATP の挙動を調べるため、放射性標識された ATP を細胞抽出液に添加し、ATP の変化を経時的に調べた。その結果、HK+Glc を添加した場合および何も添加しない場合において ATP は AMP に変換されていた。一方、CK+CP を添加すると AMP は ATP に戻されることがわかった。これらの結果は、CK+CP による

ADP から ATP への変換反応が細胞抽出液の平衡を変えることで ATP 濃度を一定に保ち、脱アデニル化を促進することを示している。

では ATP の増加と AMP の減少のどちらが脱アデニル化に重要なのだろうか。この疑問に答えるために、AMP を加水分解する酵素 5'ヌクレオチダーゼが脱アデニル化を促進するかを検証した。その結果、AMP を加水分解すると、ATP が増加していないにも関わらず、脱アデニル化は促進されることがわかった。この結果は、細胞抽出液中では AMP が脱アデニル化を阻害しており、ATP の存在に関わらず、AMP さえ除けば脱アデニル化が進行することを示している。さらに精製した酵素を用いた実験から、AMP は濃度依存的に CCR4 と CAF1 の活性を阻害するという結果が得られた。この結果は細胞抽出液中で AMP が脱アデニル化を阻害しているという解釈を支持している。

本研究では miRNA が脱アデニル化を引き起こす段階において、ATP は必要ないことを明らかにした。この結果は miRNA 経路だけでなく Smaug 経路においても当てはまる。Smaug はショウジョウバエの胚発生に必要な因子であり、標的 RNA と結合して CCR4-NOT 複合体を誘導し、脱アデニル化を引き起こす。先行研究から Smaug による脱アデニル化においても ATP が必要とされてきたが、本研究の結果を踏まえて再解析したところ、Smaug による脱アデニル化においても ATP は必要なく、AMP が脱アデニル化を阻害していた。本研究で得られた結果は Smaug 経路のモデルを書き換えたように、他の経路のモデルにも再考を迫るかもしれない。