

## CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体による Atg7 依存性細胞死抑制と心機能維持\*

山口 智和, 久場 敬司

秋田大学医学系研究科 分子機能学・代謝機能学講座

(平成 31 年 4 月 26 日掲載決定)

### The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function

Tomokazu Yamaguchi and Keiji Kuba

*Department of Biochemistry and Metabolic Science, Akita University Graduate School of Medicine*

**Key words :** CCR4-NOT complex, deadenylation, Cnot3, Atg7, Heart failure

#### はじめに

心不全は、欧米をはじめとする先進国の多くで長年にわたり死因の第 1 位を占めており、日本においても癌に次いで、死因の第 2 位になっており、今後も心不全患者は世界規模で増加の一途を辿ることが予想されている。心不全の病態では、心肥大や線維化など心臓のリモデリング過程を経て、収縮不全に陥るが、心不全の発症に至るまでの病態メカニズムやそれを制御する分子機序についてはいまだ不明な点が多いのが現状である。

心不全の発症に至る分子メカニズムの理解のために、以前に我々の研究室では、ショウジョウバエにおける大規模な *in vivo* RNAi 心不全スクリーニングを行い、心機能調節に関与する新規の遺伝子を多数同定した<sup>1)</sup>。その中で見出されたのが、CCR4-NOT タンパク質複合体を構成する一群のタンパク質である。

細胞内における遺伝子発現調節において mRNA 分解を介した mRNA の量的、質的な制御は重要なプロ

セスである。mRNA 分解の第一段階は、mRNA のポリアデニル化 [ポリ (A)] 鎖の短縮および除去、すなわち脱アデニル化と呼ばれる過程により開始されるが、CCR4-NOT (carbon catabolite repression 4-negative on TATA-less) 複合体は中心的な足場タンパク質である CNOT1 への結合を介して、RNA 結合タンパク質 (RBPs) や RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) による mRNA のリクルート、二つの脱アデニル化酵素 (CNOT6/6L と CNOT7/8) によるポリ (A) 鎖の分解を制御することで、細胞内における mRNA の発現量、安定性(分解量)、及び翻訳を調整している<sup>2,3)</sup>。我々は以前、複合体の足場タンパク質の一つである CNOT3 がショウジョウバエとマウスにおいて心機能の制御に働くことを報告し、ヒトにおいては CNOT1 及び CNOT3 遺伝子における一塩基多型と QT 間隔の延長に相関性を見出した<sup>1)</sup>。以上のことから、CCR4-NOT 複合体による mRNA の遺伝子発現調節が心臓の恒常性維持に重要な役割を果たすことが考えられる一方、その詳細な分子機構や mRNA 脱アデニル化制御の心臓における生理的意義、役割は不明である。

本研究で我々は心臓における CCR4-NOT 複合体の標的 mRNA として、種々のオートファジー関連タンパク質をコードする mRNA を見出した。オートファジーはリソソームを介して細胞質内のタンパク質や細胞内小器官を分解し、エネルギー産生に必要なアミノ

Correspondence : Tomokazu Yamaguchi  
Department of Biochemistry and Metabolic Science,  
Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1  
Hondo, Akita 010-8543, Japan  
Tel : 81-18-884-6075  
Fax : 81-18-884-6443  
E-mail : yamaguchit@med.akita-u.ac.jp

\*平成 31 年 2 月 20 日秋田医学会学術奨励賞記念講演

酸や脂肪酸を供給するための、エネルギー恒常性維持機構の一つとして知られている<sup>4,5)</sup>。オートファジーは心臓においては、圧負荷や虚血傷害などによるストレス応答に有益な作用を担うことが報告されている一方<sup>6,7)</sup>、過剰なオートファジーの活性化を伴った細胞死がいくつかの心臓病態で報告されている<sup>8,9)</sup>。オートファジーの主要調節因子である Atg7 は、基質である Atg8 (LC3) をリン脂質であるホスファチジルエタノールアミンに、Atg12 を Atg5 への共有結合を触媒することでオートファゴソーム形成に重要な役割を担うユビキチン活性化酵素として知られている<sup>10)</sup>。一方で、オートファジーに独立した働きとして、p53 による転写制御の調節因子としての機能も報告されている<sup>11)</sup>。本研究にて、我々は心臓における CCR4-NOT 複合体の欠損によって生じる Atg7 の mRNA 脱アデニル化不全と、それに起因する心筋細胞死を伴った心不全の発症メカニズムについて報告する<sup>12)</sup>。

### 1. 心臓における CCR4-NOT 複合体の欠損は心筋細胞死を伴った致死的心不全を生じる

本研究では、まず心臓における CCR4-NOT 複合体の生理的な役割を明らかにするため、CCR4-NOT 複合体の主要な足場タンパク質である Cnot3 の遺伝子発現を心臓にて欠失させた遺伝子ノックアウト (Cnot3 mKO) マウスを作出し、遺伝子欠損下における心臓の機能評価を行った。Cnot3 mKO マウスは出生後およそ 3 週間後で死亡し始め、30 日以内にすべてのマウスが死亡することがわかった。また、死亡直前の心臓を観察したところ、Cnot3 を欠失した心臓では、心臓の肥大、収縮力の低下、及び QT 延長を伴う致死的心不全を生じていることがわかった (図 1)。また、CCR4-NOT 複合体の中心的な足場タンパク質である Cnot1 を心臓にて欠失させた遺伝子ノックアウト (Cnot1 mKO) マウスを作出し同様の評価を行ったところ、Cnot1 mKO マウスは生後 10 日から 15 日までにすべて死亡し、その心臓も Cnot3 mKO マウス心臓と同様の心不全病態を認めた。以上のことから、CCR4-NOT 複合体は心臓の恒常性維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

### 2. CCR4-NOT 複合体は心臓においてオートファジー mRNA の脱アデニル化を介したタンパク質発現を制御する

Cnot3 を欠損した心臓について HE 染色像を観察したところ、多数の空胞変性を伴うネクロシス様の心筋細胞死を認めた。また、電子顕微鏡での観察を行ったところ、ミトコンドリアの配列異常、細胞質成分の溶解に加えてオートファジー様の液胞の蓄積を伴ったネクロシスと思われる心筋細胞死を観察した (図 2)。以上の結果から、心臓における Cnot3 の欠損によりオートファジーの変化による細胞死が疑われたため、Cnot3 を欠損した心臓におけるオートファジー関連因子の分子動態を調べた。Cnot3 mKO マウスの心臓における各種オートファジー関連タンパク質の発現量を野生型マウスの心臓と比較したところ、栄養条件に関わらず、Cnot3 を欠損した心臓では Ulk1, Pik3c3, Atg7, p62 タンパク質の発現が上昇していた (図 3)。siRNA を用いて Cnot3 や脱アデニル化酵素の発現を抑制した心筋細胞にて、オートファジー因子をコードする mRNA の発現動態を解析したところ、mRNA ポリ

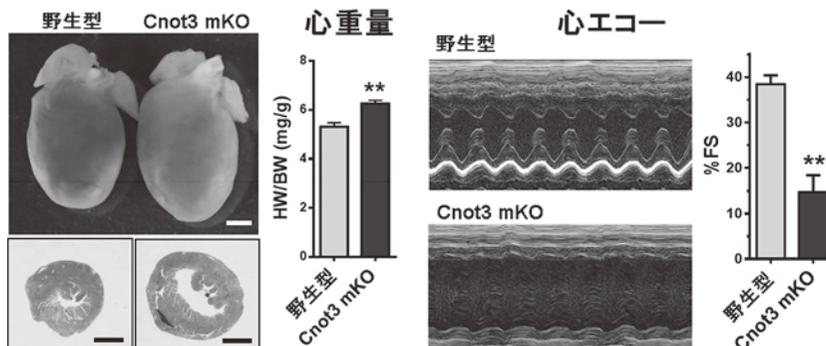


図 1. Cnot3 遺伝子欠損 (Cnot3 mKO) マウスにおける心不全病態。(文献 12 より引用、一部改変)

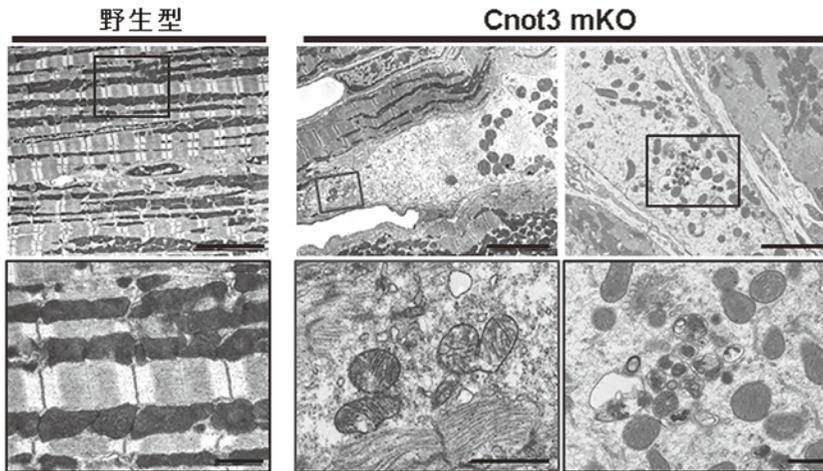


図2. 野生型および Cnot3 mKO マウス心臓組織の電子顕微鏡観察像。(文献 12 より引用, 一部改変)

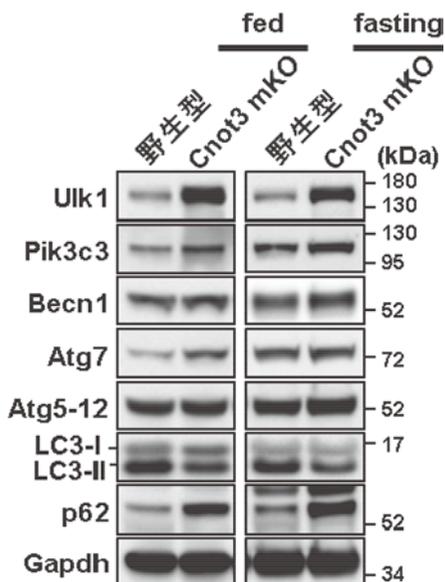


図3. 心臓におけるオートファジー関連タンパク質の発現上昇。(文献 12 より引用, 一部改変)

(A) 鎖の伸長, 及び mRNA の安定化 (分解の抑制) を確認した (図 4)。以上の結果は, CCR4-NOT 複合体が数種のオートファジー関連 mRNA ポリ (A) 鎖の脱アデニル化を介して, タンパク質発現を制御していることを示している。心臓における抗 Cnot3 抗体を用いた RNA 免疫沈降及び RNA-seq (RIP-seq) の解析により, この中でも特に *Atg7* mRNA が Cnot3 に強固に

結合していることが明らかとなった (図 5)。

### 3. 心臓における *Atg7* の欠損は CCR4-NOT 複合体の欠損による心不全病態の進行を緩和する

CCR4-NOT の欠損により生じる心不全が, オートファジー関連因子の発現増加に起因したものなのかを明らかにするために, 心臓における Cnot3 の欠損に加え, *Atg7* も欠損した (Cnot3; *Atg7* dmKO) マウスの心機能評価を行った。Cnot3 mKO マウスはすべて 4 週までに死亡してしまうが, Cnot3; *Atg7* dmKO マウスはその生存が 7 週までに延長することがわかった。また, 心機能についても, *Atg7* の欠損は Cnot3 mKO マウスに見られる心臓肥大, 収縮力の低下, 及び QT 延長などの心不全病態を部分的に回復させ (図 6), 組織像における心筋細胞死を抑制していることがわかった。また, Cnot3 欠損同様に Cnot1 の欠損により生じる心不全病態も *Atg7* との二重欠損により回復することがわかった。興味深いことに, *Atg7* と同様にオートファゴソーム形成に必須である *Atg5* を心臓で欠損させた Cnot3; *Atg5* dmKO マウスでは Cnot3 欠損による心不全病態の改善は認められなかった。したがって, CCR4-NOT 複合体を欠損した心臓における心筋細胞死は *Atg7* の働きに強く依存しているが, オートファジーによる分子機序とは独立したものによる可能性が考えられた。

(24)

CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体による Atg7 依存性細胞死抑制と心機能維持

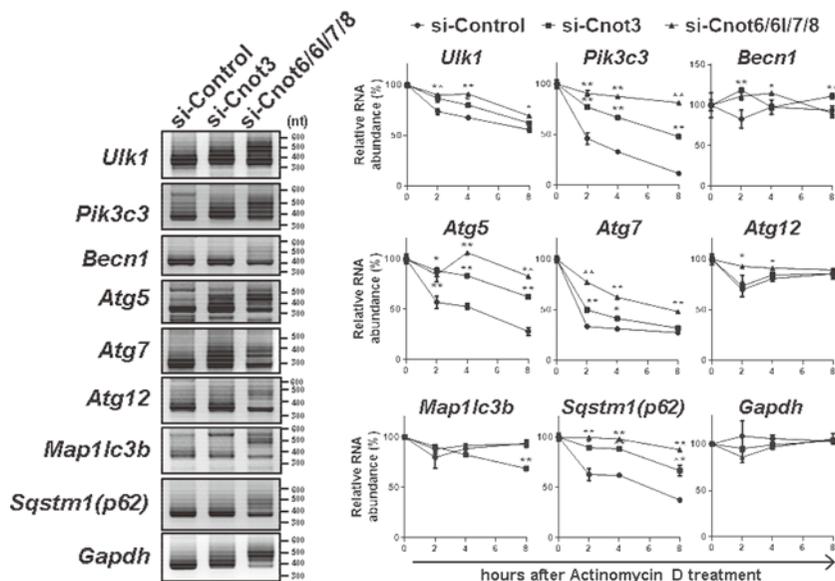


図4. 心筋細胞におけるオートファジー関連 mRNA ポリ (A) 尾部の長さ (左), 及び mRNA の安定性 (右). (文献 12 より引用, 一部改変)

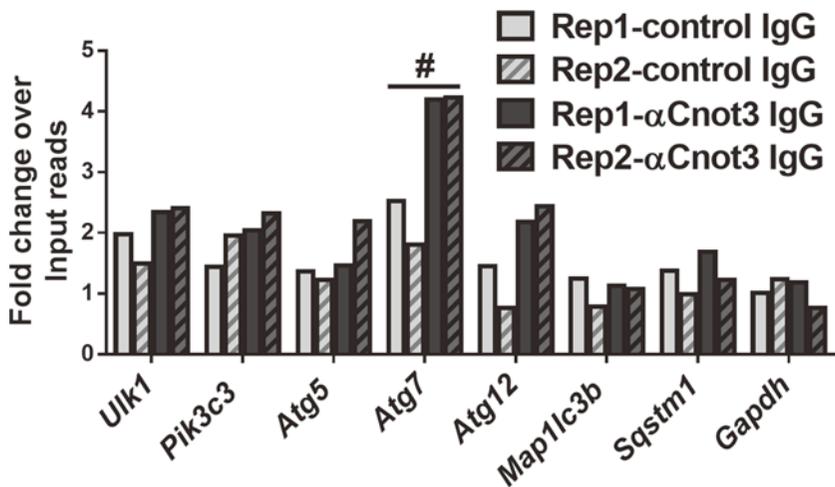


図5. 抗 Cnot3 抗体による心臓の RNA 免疫沈降 (RIP). 2 回の RIP-seq の結果を示す. (文献 12 より引用, 一部改変)

#### 4. Cnot3 を欠損した心筋細胞では核内 Atg7 が p53 による転写活性を亢進し細胞死関連遺伝子の発現を上昇させる

線維芽細胞や HCT116 細胞においては, 飢餓環境でのストレス応答として, Atg7 が核内へと移行し,

p53 が介する p21 遺伝子発現を増強することで細胞周期を制御していることが報告されている<sup>11)</sup>. また, がん細胞や B 細胞などでは CCR4-NOT 複合体の欠損は p53 の発現を上昇させることが報告されており<sup>13,14)</sup>, 実際に Cnot3 を欠損させた心臓においては p53 タンパク質の発現が著しく上昇していた (図 7). また, 抗

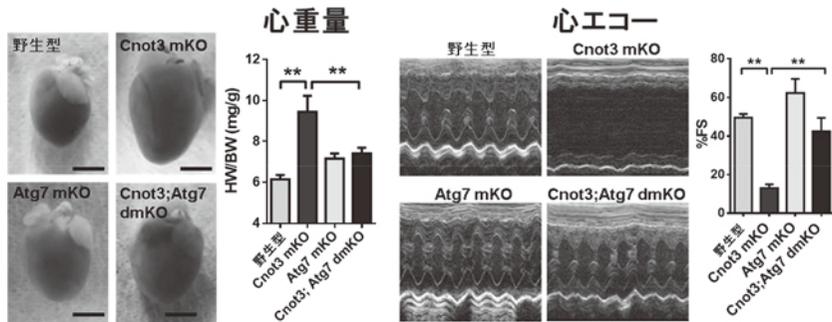


図6. Atg7 遺伝子欠損 (Atg7 mKO) による Cnot3 mKO マウスの心不全病態の回復. (文献 12 より引用, 一部改変)

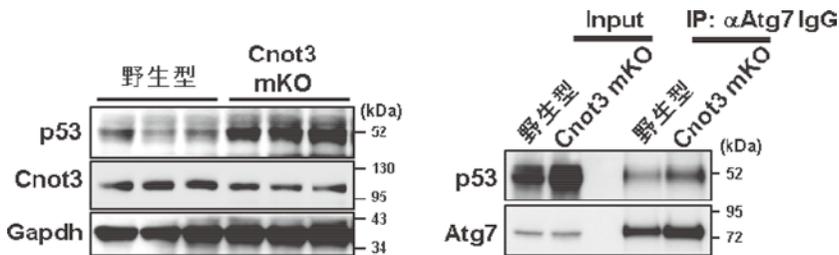


図7. 心臓における p53 タンパク質の発現 (左), 及び抗 Atg7 抗体による免疫沈降 (右). (文献 12 より引用, 一部改変)

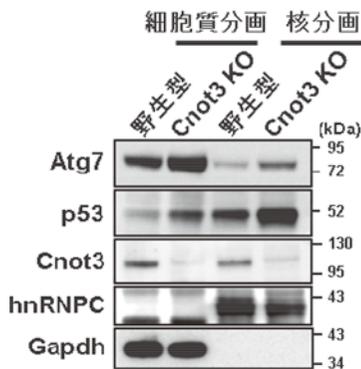


図8. 線維芽細胞分画サンプル中の Atg7 と p53 タンパク質. (文献 12 より引用, 一部改変)

Atg7 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ, Cnot3 を欠損させた心臓においては p53-Atg7 の結合が強化されていることがわかった (図7). そこで, Cnot3 を欠損した線維芽細胞における Atg7 タンパク質と p53 タンパク質の局在を調べたところ, 通常細胞質内のみ存在している Atg7 タンパク質の一部が核内へと移行

しているとともに, p53 タンパク質の核内における発現量が増加していることがわかった (図8). そこで, 心臓において p53 が標的とする細胞死関連因子の mRNA 発現量を調べたところ, Cnot3 の欠損により *Puma*, *Ripk3* mRNA の発現が Atg7 依存的に上昇していることがわかり (図9), Atg7 が p53 依存的に *Puma*, *Ripk3* のプロモーター領域に結合することを明らかにした (図10). また, Cnot3 を欠損することにより生じる心筋細胞死は siRNA を用いた Atg7 及び p53 の発現抑制により減少していた (図11). 以上の結果から CCR4-NOT 複合体の欠損により生じる心筋細胞死は, Atg7 と p53 の異常な活性化により *Puma*, *Ripk3* 等の細胞死促進因子をコードする遺伝子の転写発現を誘導することに起因していることが明らかとなった.

### さいごに

本研究では Cnot3 を欠損した心臓は, 心筋細胞死の亢進により, 心肥大, 心収縮率の低下, QT 延長を伴

(26)

CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体による Atg7 依存性細胞死抑制と心機能維持

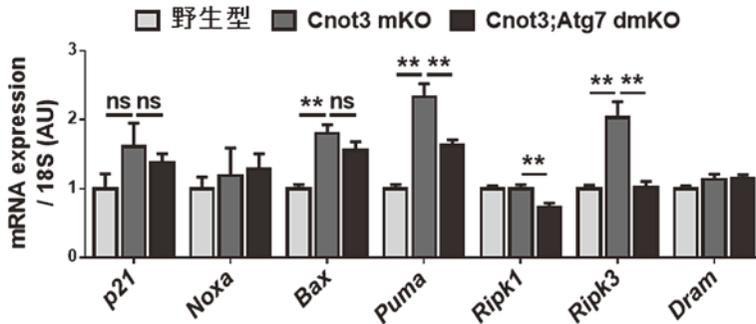


図9. 心臓における p53 標的遺伝子の mRNA 発現. (文献 12 より引用, 一部改変)

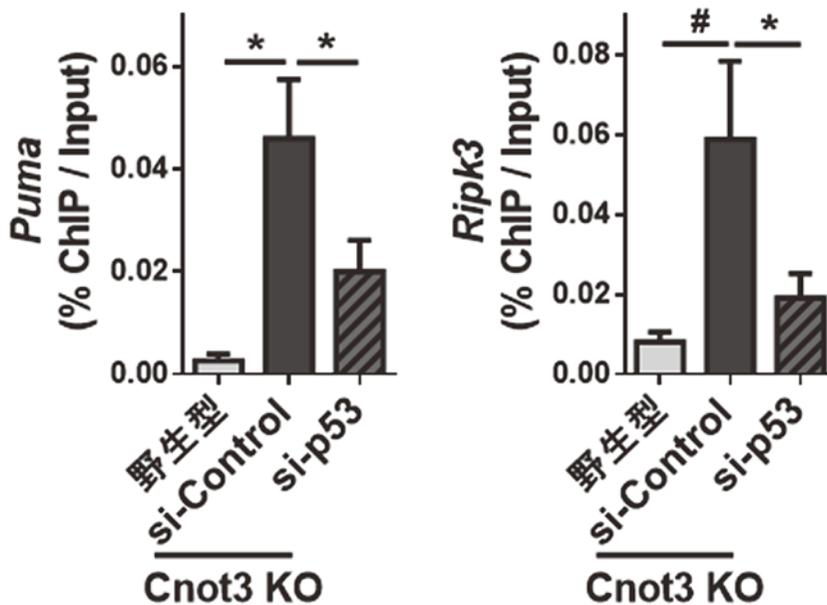


図10. 抗 Atg7 抗体による線維芽細胞のクロマチン免疫沈降 (ChIP). (文献 12 より引用, 一部改変)

う重篤な心不全を発症することを明らかにした. このような心臓において, 脱アデニル化作用の不全は, 主要なオートファジー制御因子である Atg7 タンパク質の発現量を増加させていることがわかり, Atg7 の欠損は Cnot3 欠損により生じる心不全の進行を遅延させたことから, 心不全病態の悪化に Atg7 が強く関与していることが示された. また, Cnot3 を欠損した細胞では Atg7 と p53 のタンパク質発現量の増加, 両タンパク質の結合の強化, 核内への移行, 及び *Puma* と *Ripk3* のプロモーター領域への蓄積を観察し, オートファジーとは独立した Atg7 依存的な細胞死誘導の分

子機序を明らかにした. 一方で, Atg7, p53 タンパク質による転写活性制御の詳細な分子メカニズムは依然として明らかにできていない. 今回の Cnot3 抗体を用いた RNA 免疫沈降の解析では, Cnot3 に結合する mRNA として Atg7 を含む 1,000 個以上の遺伝子を同定しており, 遺伝子オントロジー解析の結果, 転写制御やメチル化制御に関与する遺伝子が多くを占めていることがわかった. これらのことから, CCR4-NOT 複合体は mRNA 分解と連動して, mRNA 合成 (転写) を制御している可能性を示唆しており, 細胞内 mRNA の発現量調節機構の詳細について明らかにす

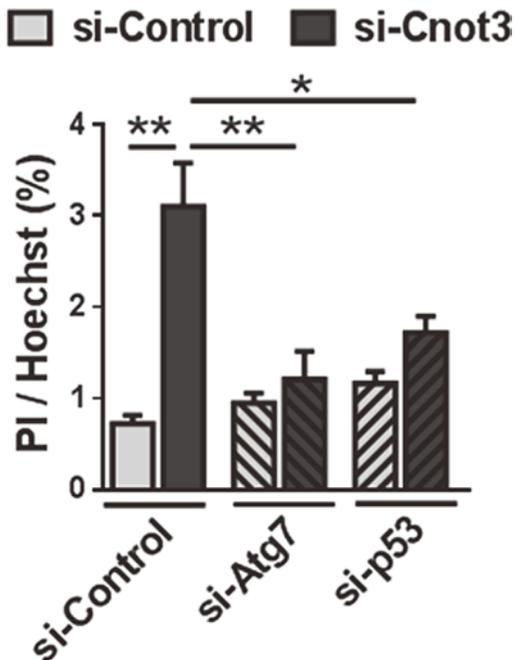


図11. PI染色による培養心筋細胞の死細胞の定量。  
(文献12より引用, 一部改変)

ることが今後の重要な課題の一つと考えている。また、本研究にてCCR4-NOT複合体が心臓においてAtg7を含むオートファジー関連mRNAの脱アデニル化を介し、タンパク質発現量を調節していることを明らかにしたが、CCR4-NOT複合体がどのようにしてこれらmRNA種を選別しているかは非常に興味深い問題といえる。おそらく、これらのmRNAを特異的に認識し、脱アデニル化酵素に提示を行うRNA結合タンパク質との相互作用が示唆されるが、今後その存在を明らかにすることで、心臓におけるmRNA分解の詳細を説明できると考えている。本研究により得られた知見は、オートファジータンパク質の活性やRNA分解を標的とした、既存の循環器病にない心不全の診断・治療法の開発に貢献できるものと期待している。

#### 参考文献

- 1) Neely, G.G., Kuba, K., Cammarato, A., *et al.* (2010) A global in vivo *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*, **141**, 142-153.
- 2) Collart, M.A. and Panasenko, O.O. (2012) The Ccr4-Not complex. *Gene*, **492**, 42-53.
- 3) Wahle, E. and Winkler, G.S. (2013) RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4-Not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1829**, 561-570.
- 4) Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B. and Kroemer, G. (2014) Metabolic control of autophagy. *Cell*, **159**, 1263-1276.
- 5) Mizushima, N. and Komatsu, M. (2011) Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, **147**, 728-741.
- 6) Lavandro, S., Chiong, M., Rothermel, B.A. and Hill, J.A. (2015) Autophagy in cardiovascular biology. *J. Clin. Invest.*, **125**, 55-64.
- 7) Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., *et al.* (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.*, **13**, 619-624.
- 8) Kroemer, G. and Levine, B. (2008) Autophagic cell death: The story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 1004-1010.
- 9) Zhu, H., Tannous, P., Johnstone, J.L., Kong, Y., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Le, V., Levine, B., Rothermel, B.A. and Hill, J.A. (2007) Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J. Clin. Invest.*, **117**, 1782-1793.
- 10) Noda, N.N., Satoo, K., Fujioka, Y., Kumeta, H., Ogora, K., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y. and Inagaki, F. (2011) Structural basis of Atg8 activation by a homodimeric E1, Atg7. *Mol. Cell*, **44**, 462-475.
- 11) Lee, I.H., Kawai, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I.I., Bishop, A.J., Motoyama, N., Cao, L. and Finkel, T. (2012) Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress. *Science*, **336**, 225-228.
- 12) Yamaguchi, T., Suzuki, T., Sato, T., *et al.* (2018) The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function. *Sci. Signal.*, **11**, eaan3638.
- 13) 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.

(28) CCR4-NOT 脱アデニル化酵素複合体による Atg7 依存性細胞死抑制と心機能維持

- 14) Inoue, T., Morita, M., Hijikata, A., *et al.* (2015) CNOT3 contributes to early B cell development by controlling Igh rearrangement and p53 mRNA stability. *J. Exp. Med.*, **212**, 1465-1479.
- 15) Bhuiyan, M.S., Pattison, J.S., Osinska, H., James, J., Gulick, J., McLendon, P.M., Hill, J.A., Sadoshima, J. and Robbins, J. (2013) Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy. *J. Clin. Invest.*, **123**, 5284-5297.