

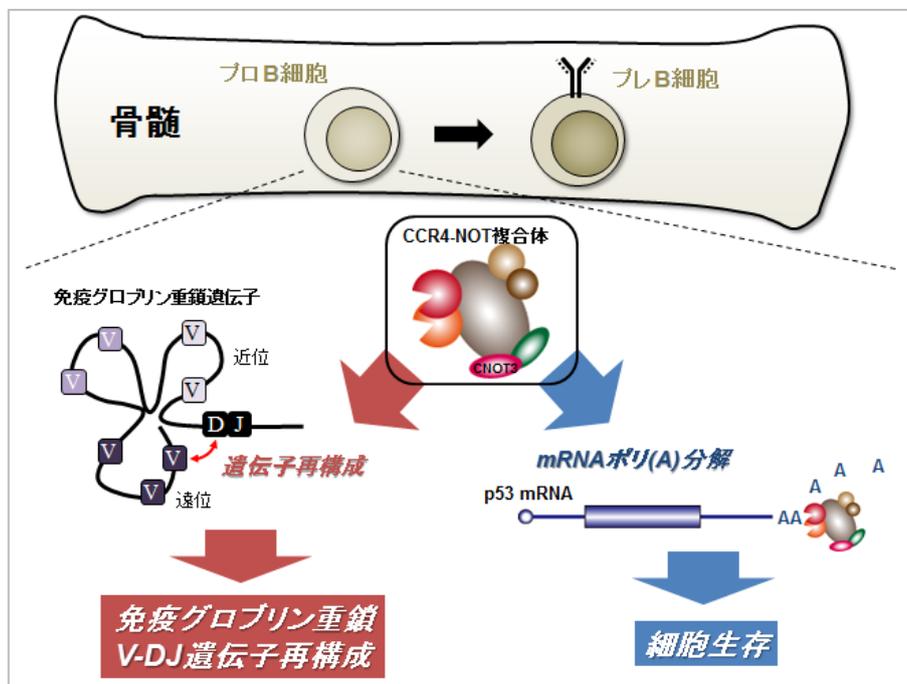
B 細胞分化を司る新しい遺伝子発現制御機構を解明

-RNA 分解酵素複合体 CCR4-NOT による B 細胞分化制御-

キーワード: B 細胞分化, CCR4-NOT 複合体, CNOT3, mRNA ポリ(A)分解, p53, 免疫グロブリン遺伝子再構成

<概要>

大阪大学免疫学フロンティア研究センターの井上毅助教、黒崎知博教授、沖縄科学技術大学院大学の山本雅教授らの研究グループは、RNA 分解酵素である CCR4-NOT タンパク質複合体が、がん抑制遺伝子 p53 の mRNA 分解や免疫グロブリン遺伝子再構成に関与し、B 細胞分化に必須の機能を担っていることを解明しました。



<掲載論文・雑誌>

Takeshi Inoue, Masahiro Morita, Atsushi Hijikata, Yoko Fukuda-Yuzawa, Shungo Adachi, Kyoichi Isono, Tomokatsu Ikawa, Hiroshi Kawamoto, Haruhiko Koseki, Tohru Natsume, Taro Fukao, Osamu Ohara, Tadashi Yamamoto, and Tomohiro Kurosaki

"CNOT3 contributes to early B cell development by controlling *Igh* rearrangement and *p53* mRNA stability"

The Journal of Experimental Medicine

2015年8月4日(火) オンライン掲載(米国東部8月3日)

<研究の背景>

生物は、mRNA の転写制御と転写後制御による遺伝子発現制御プログラムによって巧妙で複雑な機能・形態を獲得しています。mRNAの3'末端に存在するポリ(A)鎖は、ポリ(A)結合タンパク質群と協調して翻訳の効率化、およびmRNAの分解制御において重要な役割を果たしており、ポリ(A)鎖の分解過程は、mRNA分解経路全体における重要な反応段階です。CCR4-NOT 複合体は主要なポリ(A)分解酵素の一つとして知られており、研究グループはマウス B 細胞分化をモデルとしてこの複合体が哺乳類動物生体内において果たしている生理機能と、mRNA分解の分子メカニズムの解明に挑みました。

<研究の手法と成果>

本研究では、CCR4-NOT 複合体の構成因子の一つ CNOT3 の B 細胞特異的欠損マウスを解析したところ、このマウスは骨髄プロ B 細胞からプレ B 細胞への分化に著明な異常を呈し、CNOT3 が B 細胞分化に必須の機能を担っていることが明らかになりました。また、CNOT3 欠損プロ B 細胞では、がん抑制遺伝子 p53 の mRNA 分解異常に伴う細胞死が亢進しており、p53 の mRNA レベルでの転写後制御が細胞の生存に重要であることを生体内で明らかにしました。さらに、CNOT3 欠損プロ B 細胞では、免疫グロブリン重鎖遺伝子の V-DJ 遺伝子再構成に異常が認められ、CCR4-NOT 複合体が免疫グロブリン遺伝子再構成にも関与していることが分かりました。

<詳しい解説>

本研究では、CCR4-NOT 複合体の構成因子の一つ CNOT3 に着目し、B 細胞特異的 CNOT3 欠損マウスを作製、解析しました。B 細胞は造血幹細胞から発生し、プロ B 細胞、プレ B 細胞、未熟 B 細胞を経て、成熟 B 細胞へと分化しますが、このマウスでは、骨髄プロ B 細胞からプレ B 細胞への分化に著明な異常を呈し、未熟 B 細胞以降の B 細胞はほとんど存在しないことが分かり、CNOT3 が B 細胞初期分化において必須の機能を担っていることが明らかになりました(図 1)。

次に研究グループは CNOT3 欠損マウスにおける B 細胞分化異常の原因を明らかにするため、CNOT3 欠損プロ B 細胞に発現している mRNA を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、CNOT3 欠損に伴い発現が変動している遺伝子を探索しました。CNOT3 欠損プロ B 細胞ではアポトーシスによる細胞死が亢進していること、また発現変動遺伝子群の中で、がん抑制遺伝子 p53 およびその標的遺伝子群の発現上昇が見られたことから、p53 mRNA が CCR4-NOT 複合体によるポリ(A)分解の標的になっているか検討を行いました。CNOT3 欠損細胞では、p53 mRNA はポリ(A)鎖が伸長して安定化しており(図 2)、野生型プロ B 細胞において CCR4-NOT 複合体と p53 mRNA の結合が認められたことから、CNOT3 欠損プロ B 細胞ではポリ(A)分解異常に伴って p53 mRNA が安定化し、p53 経路を活性化させて細胞死が亢進している可能性が示唆されました。事実、CNOT3 と p53 の二重欠損マウスを作製、解析したところ、CNOT3 単独欠損による細胞死の亢進は解消され、プレ B 細胞数の部分的な回復が認められました(図 1B)。これらのことは、B 細胞の初期分化過程において、p53 の mRNA レベルでの転写後制御が細胞の生存を維持する上で重要な役割を果たしていることを示しています。細胞の生死を制御する

重要な因子である p53 は、リン酸化、ユビキチン化をはじめとする様々な翻訳後修飾を受け、タンパク質レベルで極めて多様かつ緻密に制御されていることは広く知られていますが、本研究はタンパク質レベルだけでなく p53 の mRNA レベルでの分解制御の重要性を生体内で示したものであり、これらの知見が p53 遺伝子を対象とした新しいがんの治療法の開発につながることも期待されます。

一方、CNOT3 欠損マウスの解析から p53 の活性化では説明できない CNOT3 の機能として、免疫グロブリン遺伝子重鎖の再構成の制御が明らかになりました。免疫グロブリン重鎖可変領域のエキソンは、骨髄の初期 B 細胞において V、D および J 遺伝子断片から組み立てられる(「再構成」される)ことで特異的で多様な抗体レパートリーが確保されています。CNOT3 欠損プロ B 細胞では V 遺伝子から DJ 遺伝子への遺伝子再構成がうまく行われておらず(図 3)、これも CNOT3 欠損マウスにおける B 細胞分化異常の原因の一つであることが分かりました。野生型のプロ B 細胞では遺伝子再構成の際に遠位(distal) V 遺伝子座と D、J 遺伝子座が空間的に近づくこと(locus contraction)により効率的な再構成が可能になっていることが知られていますが、CNOT3 欠損プロ B 細胞では V-DJ 遺伝子座間の距離が長くなっていたことから(図 4)、CNOT3 はこの過程にも関与していることが示唆されました。

<図の説明>

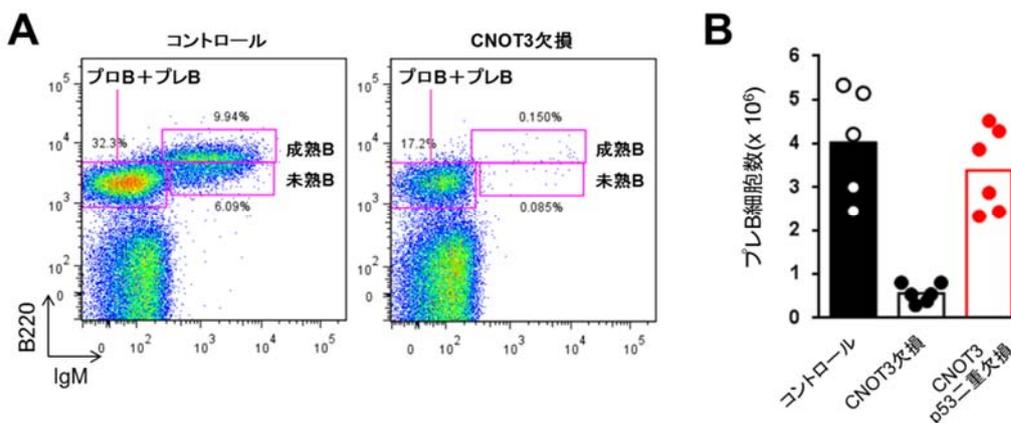


図 1 CNOT3 は B 細胞初期分化に必須である

(A) 野生型(コントロール)および B 細胞特異的 CNOT3 欠損マウス(CNOT3 欠損)の骨髄細胞の解析。CNOT3 欠損マウスではプレ B 細胞が顕著に減少し、未熟 B および成熟 B 細胞はほとんど存在しない。(B) CNOT3 と p53 遺伝子の二重欠損マウスでは CNOT3 単独欠損で見られたプレ B 細胞の減少が部分的に回復した。

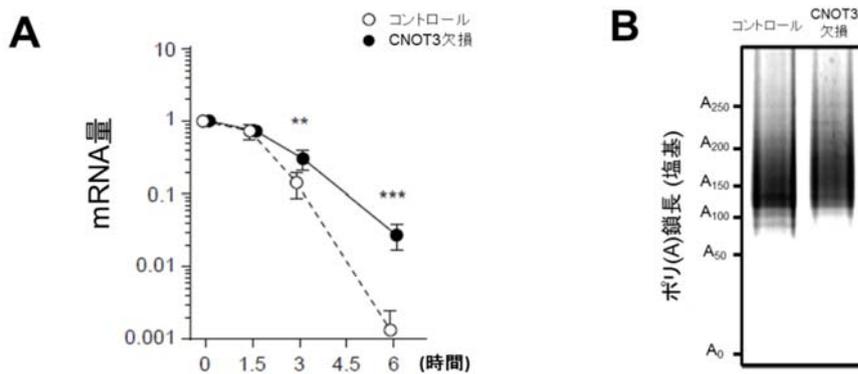


図 2 p53 mRNA は CCR4-NOT 複合体によるポリ(A)分解の標的である

(A) コントロールおよび CNOT3 欠損プロ B 細胞における p53 mRNA の安定性の解析。転写阻害剤 Actinomycin D を用いて p53 mRNA の半減期を測定した。(B) コントロールおよび CNOT3 欠損プロ B 細胞における p53 mRNA のポリ(A)鎖長の解析。

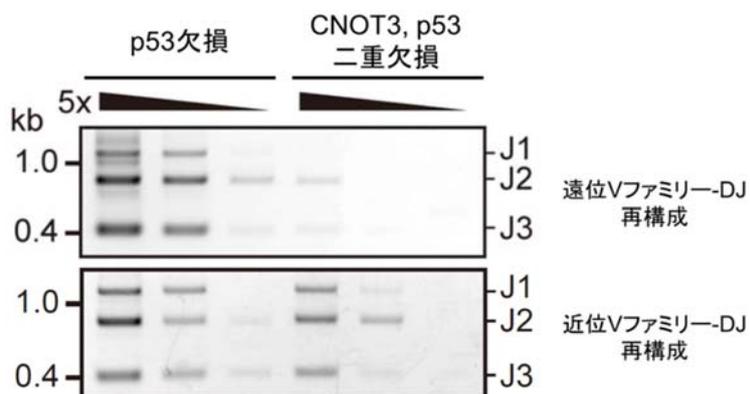


図 3 CNOT3 は免疫グロブリン重鎖遺伝子の V-DJ 遺伝子再構成に必要である

コントロール細胞(p53 単独欠損)および CNOT3、p53 二重欠損プロ B 細胞のゲノム DNA の解析。二重欠損細胞ではコントロール細胞と比較して遠位 V 遺伝子ファミリーから DJ 遺伝子への遺伝子再構成に異常が認められた。

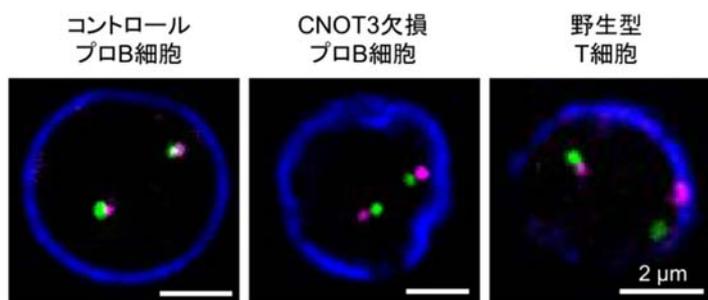


図 4 CNOT3 欠損プロ B 細胞では遠位 V 遺伝子座と DJ 遺伝子座の距離が長くなっている

コントロール プロ B 細胞、CNOT3 欠損プロ B 細胞、野生型 T 細胞の顕微鏡写真。核膜を青、免疫グロブリン重鎖の遠位 V 遺伝子座をマゼンタ、DJ 遺伝子座を緑で染色している。CNOT3 欠損細胞では、緑とマゼンタのプロープ間の距離が長くなっており、locus contraction に異常が認められた。