

mRNA のポリ A 鎖を介した転写後制御

鈴木悠也, 荒江星拓, 千葉由佳子

北海道大学大学院 生命科学院

〒060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目

北海道大学理学部 5 号館

Yuya Suzuki, Tomohiro Arae and Yukako Chiba

Poly(A)-dependent Post-transcriptional Regulations

Keywords: deadenylation, mRNA decay, Poly(A), Post-transcriptional Regulation

Graduate School of Life Science, Hokkaido University

Sapporo, Hokkaido, 060-0810 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8b8.00118

1. はじめに

遺伝子発現の厳密な制御は、細胞のホメオスタシスの維持や、細胞内および細胞外の環境変化に適応するために重要である。セントラルドグマという分子生物学の基本原理に示されるように、遺伝情報は基本的に DNA, mRNA, タンパク質の順に伝達される。各段階における発現調節が最終的なタンパク質量を決定するのに重要である一方で、遺伝子発現制御に関する多くの研究は転写制御に焦点が当てられており、転写後調節とりわけ mRNA 分解による発現制御の研究例はあまり多くない。しかしながら近年、mRNA の安定化や翻訳効率の調節による遺伝子発現制御の重要性が次々と明らかとなっており、見落としてはならない重要な制御段階であると言える。本総説は mRNA の 3'末端に付加されるポリ A 鎖に焦点を当て、ポリ A 鎖を介した遺伝子発現制御を中心としたポリ A 鎖の役割について、ここ数年植物の分野で明らかになった事柄を紹介する。

2. ポリ A 鎖の役割

真核生物では、核内で転写により合成された pre-mRNA が 5'キャップ構造の付加、スプラ

イシング, 3'末端へのポリ A 鎖の付加というプロセッシングを受け, 成熟 mRNA となり核外へ搬出される。主に個別の遺伝子における解析から, mRNA のポリ A 鎖長は遺伝子ごとに異なり, ポリ A 鎖は mRNA の安定性や翻訳効率に影響を与えるということが示された (Preiss et al., 1998; Tucker et al., 2001)。一方で, これまではゲノムワイドなポリ A 鎖長の同定が技術的に困難であったため, こうした mRNA の安定性や翻訳効率におけるポリ A 鎖長の重要性は個別の遺伝子での議論に留まっていた。しかし, ここ数年の間に polyadenylation state array (PASTA), TAIL-seq, poly(A)-tail length profiling by sequencing (PAL-seq) などの, ポリ A 鎖長を網羅的に推測・同定する手法が確立され, ポリ A 鎖長と遺伝子発現制御の関わりについてゲノムワイドなレベルでの議論がなされ始めている (Beilharz & Preiss, 2007; Subtelny et al., 2014; Chang et al., 2014)。さらに, これらのポリ A 鎖長のゲノムワイドな解析によって, mRNA 全体のポリ A 鎖長の分布は生物種によって大きく異なり, ポリ A 鎖の平均長は酵母で約 30 塩基, 哺乳類で約 82 塩基, そして植物で約 58 塩基であることが示された (Subtelny et al., 2014)。ここでは, 酵母, 哺乳類, 植物における知見を基に, ポリ A 鎖の役割について概説する。

2-1. ポリ A 鎖と翻訳

mRNA のポリ A 鎖の役割として翻訳効率の制御が挙げられる。mRNA は 5'末端のキャップ構造に結合する因子である eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) と, ポリ A 鎖に結合するタンパク質である Poly(A) binding protein (Pab1p) が eIF4G を介して相互作用することによって環状構造を取る (Tarun & Sachs, 1996)。この環状構造により, 翻訳終結後に一度 mRNA から解離したリボソームが再び mRNA の 5'末端にリクルートされやすくなり, 翻訳効率が上昇すると考えられる (Hong et al., 2017)。また, 同じ mRNA でも長いポリ A 鎖を持つものは高い翻訳効率を示すことから, 翻訳効率の制御におけるポリ A 鎖長の重要性が示された (Preiss et al., 1998)。しかしながらこれまで, 個々の遺伝子におけるポリ A 鎖長と翻訳効率に関する研究の多くは, 主にアフリカツメガエルなどの卵母細胞という極めて特殊な細胞を用いて行われており, さらにこれらのゲノムワイドな相関については長い間解明されていなかった。近年, 酵母を用いたポリ A 鎖長の網羅的な同定手法の確立により, ポリ A 鎖長と mRNA 上のリボソームの密度に正の相関が示された (Beilharz & Preiss, 2007; Lackner et al., 2007)。このことは酵母において, 長いポリ A 鎖を持つ mRNA は翻訳効率が高い傾向があることを示している。一方で PAL-seq とリボソームプロファイリングによる解析から, ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルでは胚発生初期にあたる胞胚期までの細胞でポリ A 鎖長と翻訳効率に正の相関が見られるのに対し, その後の原腸胚の細胞ではこの相関が喪失することが示された (Subtelny et al., 2014)。これらのことから, ポリ A 鎖による翻訳効率の制御はある特定の時期や特定の細胞において機能すると考えられている。植物ではこのようなゲノムワイドなポリ A 鎖長と翻訳効率に関する解析が未だ行われておらず, 今後の解析が期待される。

2-2. ポリ A 鎖と mRNA の安定性

mRNA のポリ A 鎖のもうひとつの役割として多く議論されているのが、ポリ A 鎖と mRNA の安定性との関わりである。

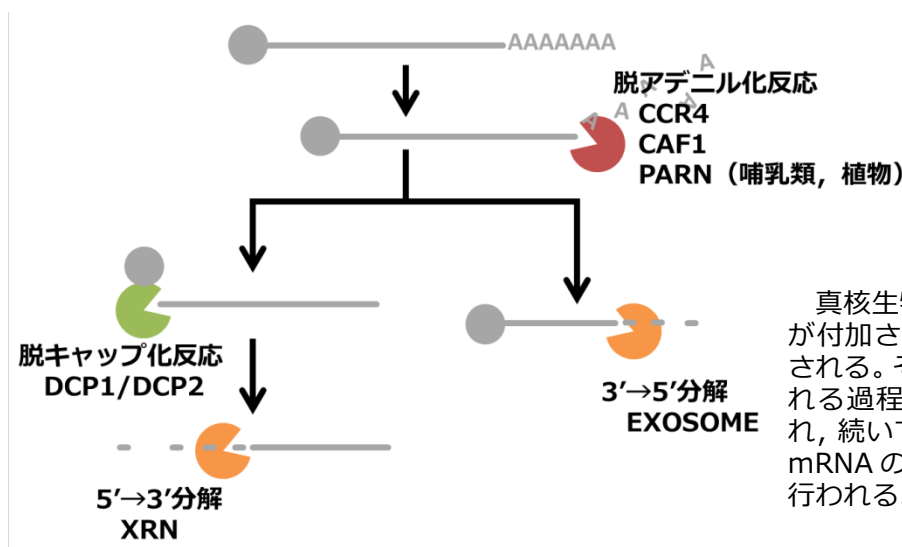


図 1 真核生物における mRNA 分解の概略

真核生物における mRNA 分解経路は広く保存されており、脱アデニル化酵素によるポリ A 鎖の除去が最初の段階であり、律速段階であると考えられている。ポリ A 鎖が取り除かれた mRNA は続いて脱キャップ酵素である Decapping 1 (DCP1)/DCP2 複合体によりキャップ構造が取り除かれる (Beelman et al., 1996; Xu et al., 2006)。その後、mRNA は 5' 末端から Exoribonuclease (XRN) によって分解されるか、3' 末端から EXOSOME による分解を受ける (図 1, Larimer & Stevens, 1990; Souret et al., 2004; Mitchell et al., 1997; Chekanova et al., 2007)。

脱アデニル化酵素は複数種類存在し、酵素活性ドメインの構造から大きく分けて Asp-Glu-Asp-Asp (DEDD) と Exonuclease-endonuclease-phosphatase (EEP) のふたつのファミリーに分類される。酵母における主要な脱アデニル化酵素は EEP ファミリーに含まれる Carbon catabolite repressor 4 (Ccr4p) であり、DEDD ファミリーに含まれる Ccr4 associate factor 1 (Caf1p) と相互作用することにより巨大なタンパク質複合体である Ccr4-Negative on TATA (Not) 複合体を形成している。哺乳類と植物は Ccr4p と Caf1p のホモログに加えて、Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) とよばれる脱アデニル化酵素を持つ。酵母と哺乳類では Poly(A) nuclease 2 (Pan2p)/Pan3p 複合体も脱アデニル化酵素として働き、CCR4-NOT 複合体と協調してポリ A 鎖分解を行っている (Yamashita et al., 2005)。

酵母の *ccr4* 変異株では代表的な mRNA のポリ A 鎖が長くなっており、かつその半減期が長くなる (Tucker et al., 2001)。また、ポリ A 鎖に結合するタンパク質である Pab1p が CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化反応を阻害する (Tucker et al., 2002)。これらのことは、酵母においてポリ A 鎖が mRNA の安定化に重要であることを示している。ゲノムワイドな解析からは、ポリ A 鎖長と半減期の相関関係を見出すことができる。マウスの培養細胞である NIH 3T3 を用いた解析では、mRNA のポリ A 鎖長と半減期に正の相関が見られた (Chang et al., 2014)。一方で、酵母、哺乳類の培養細胞および植物を用いた解析では、ポリ A 鎖長と半減期

にはっきりとした相関は見られず、弱い負の相関が示された (Beilharz & Preiss, 2007; Subtelny et al., 2014; Kappel et al., 2015)。この違いが実験系の違いによるものである可能性もあるが、mRNA のポリ A 鎖長と半減期の関係については、今後さらなる解析が必要であると思われる。

3. 植物の脱アデニル化酵素

mRNA のポリ A 鎖は核内でポリ A ポリメラーゼによって付加される。その後細胞質内で脱アデニル化酵素によるポリ A 鎖の除去を介した mRNA 分解が促進されることで、適切な遺伝子発現の調節を可能にしていると考えられる。植物は代表的な脱アデニル化酵素として CCR4, CAF1, PARN の 3 種類の脱アデニル化酵素を持つ。植物の脱アデニル化酵素の研究例は酵母や哺乳類に比べるとはるかに少ないが、2004 年の AtPARN の解析を皮切りに、少しずつではあるが着実に研究が進んでいる。ここではポリ A 鎖長を制御する脱アデニル化酵素に焦点を当て、植物での脱アデニル化反応の生理的な意義について概説する。

3-1. CCR4

植物における CCR4 はシロイヌナズナとイネで見つかっている。シロイヌナズナの CCR4 (AtCCR4) は酵母 Ccr4p のホモログとして単離された (Dupressoir et al., 2001)。AtCCR4 はシロイヌナズナで 7 つの遺伝子からなるファミリーを形成し、中でも AtCCR4a および AtCCR4b が酵母 Ccr4p と最も高い相同性を示す。atccr4a/4b 二重変異株を用いた逆遺伝学的解析から、AtCCR4a/4b がデンプン代謝に関わっていることが明らかとなった。atccr4a/4b 二重変異株ではデンプンの構成要素のひとつであるアミロースの量が増加しており、さらに、アミロース合成酵素をコードする *Granule-bound starch synthase 1 (GBSSI)* mRNA のポリ A 鎖長が長くなっていた。このことから、AtCCR4a/4b によって決まる GBSSI のポリ A 鎖長は、アミロースの量の制御に重要であることがわかった (Suzuki et al., 2015)。mRNA 分解に関わる多くの酵素は細胞質内で Processing body (P-body) と呼ばれる顆粒状の凝集体を形成している (Xu et al., 2006; Iwasaki et al., 2007; Zheng et al., 2008)。AtCCR4a/4b も同様に P-body に局在しており、蛍光蛋白質再構成法 (bimolecular fluorescence complementation) による解析から、AtCCR4a/4b は AtDCP1/2, AtXRN4 といった他の mRNA 分解酵素と P-body において相互作用することが示された (Suzuki et al., 2015)。OsCCR4a および OsCCR4b はイネにおける酵母 Ccr4p のホモログであり、これらもまた P-body に局在する。さらに、OsCCR4a/4b は *in vitro* でポリ A 鎖の分解活性を示した (Chou et al., 2017)。EEP ファミリーに含まれる脱アデニル化酵素は、CCR4, Nocturnin, PDE12, Angel の 4 つのサブグループに分類され、AtCCR4a/4b, OsCCR4a/4b はともに CCR4 グループに属する (Dupressoir et al., 2001; Chou et al., 2017)。AtHesperin (AtHESP) は哺乳類の Nocturnin のシロイヌナズナにおけるホモログであり、*in vitro* でポリ A 鎖特異的な分解活性が示された (Delis et al., 2016)。

3-2. CAF1

植物における CAF1 はシロイヌナズナ、イネ、トウガラシで見つかっている。トウガラシの *CAF1 (CaCAF1)* は病原菌の感染によって発現が誘導され、CaCAF1 を過剰発現させた形質転換トマトは強い病害抵抗性を示した (Lee et al., 2004; Sarowar et al., 2007)。また、その形

質転換トマトでは病害抵抗性遺伝子である *Pathogenesis-related gene 1 (PR1)* および *PR6* の発現が恒常的に増加していた (Sarowar et al., 2007)。シロイヌナズナでは、*AtCAF1* は 11 個の遺伝子からなるファミリーを形成している。*AtCAF1a* と *AtCAF1b* もまた病原菌の感染によって発現誘導が起こり、さらにストレス応答関連の植物ホルモンの添加や傷害などによっても発現が誘導される (Liang et al., 2009)。*AtCAF1a* は *CaCAF1* と同様に、過剰発現させることで植物体に強い病害抵抗性をもたらし、その過剰発現株でも *PR1* および *PR2* の遺伝子発現が増加していた。また、*AtCAF1a/b* は *in vitro* でポリ A 鎖の分解活性を示し、*AtCAF1a/b* 共通の標的 mRNA としてジャスモン酸誘導性遺伝子である *Vegetative storage protein 1 (VSP1)* やストレス関連遺伝子である *Chitinase B (CHIB)*, *Lipoxygenase 2 (LOX2)*, さらに *AtCAF1b* の特異的な標的 mRNA として *Phosphatidyl-inositol 4-kinase (PI4Kg3)* が同定された (Liang et al., 2009; Walley et al., 2010)。これらのことから、CAF1 は特定の mRNA のポリ A 鎖長の調節を介して、病原体感染などの生物的ストレス応答に関わっていると考えられる。イネにおける CAF1 のホモログである *OsCAF1b* に関しては、その発現がアブシジン酸 (ABA) や傷害応答で誘導されること、さらに *AtXRN4* との共局在解析から P-body に局在することが示された (Chou et al., 2014)。

3-3. PARN

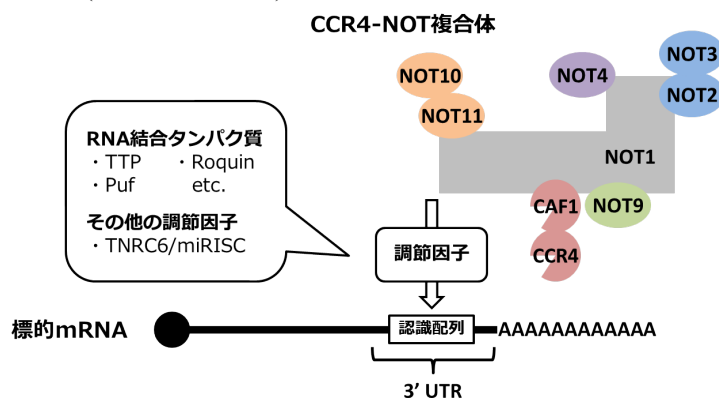
PARN は酵母, ショウジョウバエには存在しない脱アデニル化酵素であり, 植物においてはシロイヌナズナでヒト PARN のホモログである *AtPARN* が単離された。*AtPARN* はその機能欠損変異株が胚発生致死になることから, 生育に必須の脱アデニル化酵素であると言える (Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004)。また, *AtPARN* の漏出突然変異株は, 内生の ABA 量が増加するために外生の ABA に対して高感受性となる表現型を示した (Nishimura et al., 2005)。興味深いことに, *AtPARN* がミトコンドリアに局在する脱アデニル化酵素であることが示され, ポリ A ポリメラーゼと協調したミトコンドリア mRNA のポリ A 鎖長の制御機構が明らかとなった (Hirayama et al., 2013)。このことから, 核や細胞質だけでなく, ミトコンドリアなどの細胞小器官においても脱アデニル化反応が重要な役割をもつことが示された。

4. 複合体と複合体による mRNA の認識

真核生物に広く保存された主要な脱アデニル化酵素のうち, *CCR4* および *CAF1* は *CCR4-NOT* 複合体という巨大なタンパク質複合体を形成している。また, これらの脱アデニル化酵素は標的 mRNA を認識するために必要な RNA 結合ドメインを持たない。そのため標的 mRNA の認識には *CCR4-NOT* 複合体と, mRNA の 3'UTR に存在する塩基配列や二次構造を認識する RNA 結合タンパク質などの調節因子との相互作用が必要であることが, 酵母や哺乳類の研究で示された。ここでは *CCR4-NOT* 複合体と標的 mRNA 認識機構の概要, そして植物における研究例を簡単に紹介する。

4-1. CCR4-NOT 複合体

CCR4-NOT 複合体は、NOT1 を足場タンパク質として CCR4/CAF1, NOT2/3/5, NOT4, NOT9, NOT10/11 などが結合する巨大なタンパク質複合体である (図 2)。酵母や哺乳類では、複合体の足場タンパク質である NOT1 を欠失させると致死の表現型を示すことから、CCR4-NOT 複合体が生命活動の維持に必須であることが理解できる (Collart, 2003; Shirai et al., 2014)。酵母の CCR4-NOT 複合体は Ccr4p/Caf1p による脱アデニル化反応の制御だけでなく、他のサブユニットによる転写やタンパク質分解の制御など、遺伝子発現の様々な段階の制御に関わっている。酵母 CCR4-NOT 複合体のサブユニットである Not4p は E3 ユビキチンリガーゼであり、翻訳中のリボソームが mRNA 上で停止すること (翻訳アレスト) により誘導されるタンパク質分解への関与が示唆されている (Mulder et al., 2007; Dimitrova et al., 2009; Inada & Makino, 2014)。翻訳アレストは mRNA からのリボソームの解離を引き起こす。このことが引き金となり、Not4p による翻訳が途中で終了した不完全なタンパク質の分解促進や、その鋳型となっている mRNA の分解が起こる。また、Not2/3/5 は RNA ポリメラーゼ II のサブユニットである Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 17 (Med17p) と相互作用し、転写制御に関与する (Lee et al., 1998)。



真核生物に広く保存された脱アデニル化酵素複合体 CCR4-NOT は、足場である NOT1 タンパク質に CCR4/CAF1 や他の NOT タンパク質が結合したタンパク質複合体である。脱アデニル化酵素である CCR4/CAF1 は標的 mRNA を認識する RNA 結合ドメインを持たず、特異的な標的 mRNA の認識は RNA 結合タンパク質などの調節因子が CCR4-NOT 複合体と相互作用することによって行われている。

図 2 ヒト CCR4-NOT 複合体による調節因子を介した標的 mRNA 認識の概略

植物においても CCR4-NOT 複合体のコアサブユニットは保存されており、イネで OsCCR4 と OsNOT1 が OsCAF1 を介して相互作用し複合体を形成することが示された (Chou et al., 2017)。しかしながら、植物の CCR4-NOT 複合体の全容は未解明で、各サブユニットのホモログに関する研究例もまだ少ない。酵母 Not2p のシロイヌナズナにおけるホモログである AtNOT2a/b は、Dicer-like 1 (DCL1) や SERRATE (SE) など、miRNA の成熟に関わるタンパク質と核で相互作用する (Wang et al., 2013)。また AtNOT2a/b の機能欠損変異株は致死の表現型を示し、プロモーター領域への T-DNA の挿入及び RNAi によって AtNOT2a/b の発現が低下している植物体でも葉の形態異常や花成の遅延を示し、miRNA を含む多くの遺伝子の転写が抑制される。ゆえに CCR4-NOT 複合体は植物においても遺伝子発現制御の根幹にかかわる重要な複合体として機能していると考えられる。

4-2. 標的 mRNA 認識

酵母や動物では先に述べた CCR4-NOT 複合体のコアサブユニットに加えて、標的 mRNA の

認識に働く調節因子が複合体と相互作用し、標的 mRNA の分解や翻訳抑制を行う。このような標的 mRNA の認識に働く RNA 結合タンパク質として Tristetraprolin (TTP), Pumilio/FBF (Puf), Mmi1, Roquin, Bicaudal C, Smaug などがある。哺乳類で保存されている TTP は, AU-rich elements (AREs) と呼ばれる配列を認識することで CCR4-NOT 複合体を標的 mRNA にリクルートし, Tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのサイトカインやがん原遺伝子の発現を抑制する (Lykke-Andersen & Wagner, 2005; Fabian et al., 2013)。酵母の Puf ファミリーに属する Puf4p と Mpt5p は, 接合型転換を制御する *HO endonuclease* mRNA の発現を負に制御する。Puf4p と Mpt5p はそれぞれが *HO* mRNA の 3'UTR 上に存在する 9-10 塩基の配列を認識し, *HO* mRNA の分解や翻訳抑制を行う (Hook et al., 2007)。また, RNA 結合タンパク質の他にも標的 mRNA の認識に機能する調節因子として miRNA が報告されている。哺乳類の Trinucleotide repeat-containing gene 6 (TNRC6) は miRNA 誘導性サイレンシング複合体 (miRISC) と CCR4-NOT 複合体に相互作用することで, miRNA に相補的な配列を持つ標的 mRNA のポリ A 鎖分解を促進する (Fabian et al., 2012)。

このように酵母や動物では CCR4-NOT 複合体を介した標的 mRNA の制御機構の詳細が徐々に明らかとなってきた。しかしながら, TTP や TNRC6 などの他の真核生物で報告されてきた調節因子の多くは植物では保存されていない。このことから植物は動物や酵母とは異なる独自の標的 mRNA 認識機構を持つ可能性がある。植物では AtCCR4 や AtCAF1 の標的 mRNA として, *GBSSI*, *VSP1*, *CHIB*, *LOX2*, *PI4K γ 3* が明らかとなっているが, これらの認識に関わる調節因子については未解明である (Suzuki et al., 2015; Liang et al., 2009; Walley et al., 2010)。今後これらの標的 mRNA の制御機構を明らかにするためには, 植物における CCR4-NOT 複合体の全貌を解明する必要がある。

5. おわりに

ポリ A 鎖長の網羅的な同定手法の確立や, 個々の脱アデニル化酵素の研究により, mRNA のポリ A 鎖の遺伝子発現制御における役割について, 少しずつではあるが確実に知見が蓄積されてきた。特に, 植物においては脱アデニル化酵素のホモログが数多く存在し, さらに個々の脱アデニル化酵素の変異株が異なる表現型を示すことから, 酵素ごとに特異的な標的 mRNA を持つと考えられる。一方で, 脱アデニル化酵素の標的 mRNA の認識機構については, この分野の研究が進んでいる酵母, 哺乳類においても例が少なく, 植物では未だ報告例がない。脱アデニル化酵素の変異株を用いてゲノムワイドにポリ A 鎖長を検出することができれば, 脱アデニル化酵素の標的 mRNA を網羅的に同定し, さらには認識に関わるシス配列の解明へとつながり得る。また, 植物においてポリ A 鎖長を介した転写後制御を行うことの生理的な意義が明らかとなれば, この分野の研究を大きく進展させることになるであろう。

6. 謝辞

本特集を企画し, 執筆の機会を与えてくださった濱田 隆宏氏, 栗原 志夫氏に感謝します。

7. 引用文献

- Beelman, C.A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrandeur, T.E., Hatfield, L., Fortner, D.M. & Parker, R. 1996. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature*, 15: 642-646.
- Beilharz, T.H. & Preiss, T. 2007. Widespread use of poly(A) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome. *RNA*, 13: 982-997.
- Chang, H., Lim, J., Ha, M. & Kim, V.N. 2014. TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol. Cell*, 53: 1044-1052.
- Chekanova, J.A., Gregory, B.D., Reverdatto, S.V., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., Alonso, J., Brukhin, V., Grossniklaus, U., Ecker, J.R. & Belostotsky, D.A. 2007. Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the Arabidopsis transcriptome. *Cell*, 131: 1340-1353.
- Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., van Erp, H. & Green, P.J. 2004. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis. *Gene*, 328: 95-102.
- Chou, W.L., Huang, L.F., Fang, J.C., Yeh, C.H., Hong, C.Y., Wu, S.J. & Lu, C.A. 2014. Divergence of the expression and subcellular localization of CCR4-associated factor 1 (CAF1) deadenylase proteins in *Oryza sativa*. *Plant Mol. Biol.*, 85: 443-458.
- Chou, W.L., Chung, Y.L., Fang, J.C., & Lu, C.A. 2017. Novel interaction between CCR4 and CAF1 in rice CCR4–NOT deadenylase complex. *Plant Mol. Biol.*, 93: 79–96.
- Collart, M. A. 2003. Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene*, 313: 1–16.
- Delis, C., Krokida, A., Tomatsidou, A., Tsikou, D., Beta, R.A., Tsioumpekou, M., Moustaka, J., Stravodimos, G., Leonidas, D.D., Balatsos, N.A. & Papadopoulou, K.K. 2016. AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants. *RNA Biol.*, 13: 68-82.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. 2009. Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 284: 10343–10352.
- Dupressoir, A., Morel, A.P., Barbot, W., Loireau, M.P., Corbo, L. & Heidmann, T. 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.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F. & Sonenberg, N. 2012. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4–NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19: 1211–1217.

- Fabian, M.R., Frank, F., Rouya, C., Siddiqui, N., Lai, W.S., Karetnikov, A., Blackshear, P.J., Nagar, B. & Sonenberg, N. 2013. Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20: 735–739.
- Hirayama, T., Matsuura, T., Ushiyama, S., Narusaka, M., Kurihara, Y., Yasuda, M., Ohtani, M., Seki, M., Demura, T., Nakashita, H., Narusaka, Y. & Hayashi, S. 2013. A poly(A)-specific ribonuclease directly regulates the poly(A) status of mitochondrial mRNA in Arabidopsis. *Nat. Commun.*, 4: 2247.
- Hong, K.Y., Lee, S.H., Gu, S., Kim, E., An, S., Kwon, J., Lee, J.B. & Jang, S.K. 2017. The bent conformation of poly(A)-binding protein induced by RNA-binding is required for its translational activation function. *RNA Biol.*, doi: 10.1080/15476286.2017.1280224. [Epub ahead of print]
- Hook, B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., & Wickens, M. 2007. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.*, 282: 15430–15438.
- Inada, T. & Makino, S. 2014. Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation. *Front Genet.*, 5: 1–7.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H. & Watanabe, Y. 2007. Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett.*, 581: 2455-2459.
- Kappel, C., Trost, G., Czesnick, H., Ramming, A., Kolbe, B., Vi, S.L., Bispo, C., Becker, J.D., de Moor, C. & Lenhard, M. 2015. Genome-Wide Analysis of PAPS1-Dependent Polyadenylation Identifies Novel Roles for Functionally Specialized Poly(A) Polymerases in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.*, 25; 11 :e1005474.
- Lackner, D.H., Beilharz, T.H., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert, F., Preiss, T. & Bahler, J. 2007. A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol. Cell*, 26: 145-155.
- Larimer, F.W. & Stevens, A. 1990. Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'----3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene*, 95: 85-90.
- Lee, S., Kim, S.Y., Chung, E., Joung, Y.H., Pai, H.S., Hur, C.G. & Choi, D. 2004. EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Funct. Integr. Genomics.*, 4: 196-205.
- Lee, T.I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E G., Gadbois, E.L., & Young, R.A. 1998. Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 4455–4462
- Liang, W., Li, C., Liu, F., Jiang, H., Li, S., Sun, J., Wu, X. & Li, C. 2009. The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res.* 19: 307-316

- Lykke-Andersen, J., & Wagner, E. 2005. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.*, 19: 351–361.
- Mitchell, P., Petflaski, E., Chevchenko, A., Mann, M. & Tollervey, D. 1997. The exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' → 5' exoribonuclease activities. *Cell*, 91: 457-466.
- Mulder, K.M., Inagaki A., Cameroni E., Mousson F., Winkler G.S., De Virgilio C., Collart M.A. & Timmers H.T. 2007. Modulation of Ubc4p/Ubc5p-mediated stress responses by the RING-finger-dependent ubiquitin-protein ligase Not4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, 1: 181-192.
- Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K. & Hirayama, T. 2005. Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 44: 972-984.
- Preiss, T., Muckenthaler, M. & Hentze, M.W. 1998. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control. *RNA*, 4: 1321-1331.
- Reverdatto, S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A. & Belostotsky, D.A. 2004. mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA*, 10: 1200-1214.
- Sarowar, S., Oh, H.W., Cho, H.S., Baek, K.H., Seong, E.S., Joung, Y.H., Choi, G.J., Lee, S. & Choi, D. 2007. *Capsicum annuum* CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J.*, 51: 792-802.
- Shirai, Y.T., Suzuki, T., Morita, M., Takahashi, A., & Yamamoto, T. 2014. Multifunctional roles of the mammalian CCR4-NOT complex in physiological phenomena. *Front Genet*, 5: 1–11.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. & Green, P.J. 2004. AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell*, 15: 173-83.
- Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H. & Bartel, D.P. 2014. Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*, 508: 66-71.
- Suzuki, Y., Arae, T., Green, P.J., 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: 863–874.
- Tarun, S.Z. Jr & Sachs, A.B. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.*, 15: 7168-7177.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L. & Parker, R. 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104: 377-386.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhrad, D. & Parker, R. 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 21: 1427-36.

- Walley, J.W., Kelley, D.R., Nestorova, G., Hirschberg, D.L., & Dehesh, K. 2010. Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. *Plant Physiol.*, 152: 866–875.
- Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X. & Cao, X. 2013. NOT2 Proteins Promote Polymerase II-Dependent Transcription and Interact with Multiple MicroRNA Biogenesis Factors in Arabidopsis. *Plant Cell*. 25: 715–727.
- Xu, J., Yang, J.Y., Niu, Q.W. & Chua, N.H. 2006. Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell*. 18: 3386-3398.
- Yamashita, A., Chang, T.C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.Y. & Shyu, A.B. 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12: 1054-1063.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.Y., Zhu, W., He, X. & Shyu, A.B. 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 182: 89-101.