

機関番号：82606

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2009～2010

課題番号：21689012

研究課題名 (和文) hTERT-RMRP 複合体による幹細胞及びがん幹細胞の機能維持における役割の解析

研究課題名 (英文) Functional role of hTERT-RMRP complex in stem cells and tumor initiating cells

研究代表者

増富 健吉 (MASUTOMI KENKICHI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20450570

研究成果の概要 (和文)：

テロメラーゼ触媒活性サブユニットであるテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の新規結合パートナーを同定しその新規複合体の機能および生理学的意義を検討することを目的として「幹細胞の機能維持に重要なテロメラーゼ逆転写酵素と結合する新規 RNA の同定と解析」を研究テーマとした。本研究課題の研究過程でテロメラーゼ逆転写酵素に結合する新規 RNA として TERC と類縁の small nucleolar RNA (snRNA) に分類される RNase mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP) を同定した。さらに、TERT-RMRP により保証される RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性により RMRP は長い 2 本鎖 RNA へと合成されさらに Dicer により短い 2 本鎖 RNA に変換され siRNA として機能することを報告した (Nature 2009, Maida *et al.*)。

研究成果の概要 (英文)：

Constitutive expression of telomerase in human cells prevents the onset of senescence and crisis by maintaining telomere homeostasis. However, accumulating evidence suggests that the human telomerase catalytic subunit (hTERT) contributes to cell physiology independent of its ability to elongate telomeres. Here we show that hTERT interacts with the RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (*RMRP*), a gene that is mutated in the inherited pleiotropic syndrome Cartilage-Hair Hypoplasia. hTERT and *RMRP* form a distinct ribonucleoprotein complex that exhibits RNA dependent RNA polymerase (RdRP) activity and produces double-stranded RNAs that can be processed into small interfering RNA in a Dicer-dependent manner. These observations identify a mammalian RdRP composed of hTERT in complex with *RMRP* (Nature 2009, Maida *et al.*).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	13,600,000	4,080,000	17,680,000
2010 年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
総計	21,600,000	6,480,000	28,080,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：

キーワード：癌、幹細胞、生化学

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、テロメラーゼのテロメア構造維持以外の新規機能の報告がなされており、テロメラーゼの触媒活性サブユニット (TER T) が、テロメア構造維持以外の生理的役割を介して、幹細胞の機能維持に重要な役割を有することを強く示唆する報告が相次いでいた。このような背景を考えると、幹細胞の機能維持における TERT 発現の意義は、これまでに同定されてきたテロメラーゼ複合体とは異なる機能構造体により維持されていることが強く示唆されていた。つまり、安定な複合体を形成する既知の RNA である TERC 以外の結合パートナーとともに TERT が複合体を形成し、従来知られてきたテロメア構造維持以外の新規機能を発揮すると考えられていた。

### 2. 研究の目的

研究開始当初、テロメラーゼ逆転写酵素に結合する新規 RNA として同定されていた、RNase mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP) の機能および生理学的意義を検討することを目的として研究を開始した。

### 3. 研究の方法と 4. 研究成果

TAP (tandem affinity peptide) purification により TAP-hTERT を過剰発現させた HeLa-S3 細胞から hTERT 結合 RNA を回収し解析したところ、hTERT と結合する新規 RNA として RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) を同定した。また、内在性に発現する hTERT の免疫沈降により、HeLa 細胞および 293T 細胞内での hTERT と RMRP との物理的相互作用を確認した。まず、hTERT と RMRP による RdRP 活性の有無に関して以下の検討を行った。hTERT と RMRP、或いは hTERT と hTERC を用いて *in vitro* UTP

incorporation assay を行ったところ、hTERT-RMRP 特異的に  $^{32}\text{P}$ -UTP を取り込んだ長短 2 本のバンドが認められ、hTERT-RMRP 複合体による新規 RNA 鎖の合成が示唆された。なお、hTERT のポリメラーゼ活性に必要な 2 価金属結合モチーフに変異を入れたドミナントネガティブ型 hTERT では  $^{32}\text{P}$ -UTP の取り込みは認められなかった。UTP incorporation assay で認められる長いバンドは RMRP の約 2 倍 (約 530 塩基) の長さを有し、1 本鎖 RNA の特異的切断によって約 267 塩基に集積し、且つ、2 本鎖 RNA の特異的切断では消失することが分かった。これらの結果は、この約 530 塩基の RNA が、約 267 塩基で折り返す長いヘアピン構造を有することを示唆している。さらに UTP incorporation assay 産物に対する Northern blotting により、この RNA には RMRP のセンス配列並びにアンチセンス配列がともに含まれることが示唆された。以上の結果は hTERT-RMRP 複合体による約 530 塩基の産物が、RMRP を鋳型として hTERT のポリメラーゼ活性により RMRP (センス鎖) 3' 端からの back-priming により相補鎖が合成されたヘアピン型の RNA 産物であることを示すものであった。一方、UTP incorporation assay に見られる短い約 267 塩基の産物は 2 本鎖 RNA を特異的に切断する RNase III に耐性であったことから、すでに報告のある hTERT の terminal transferase 活性産物であることが考えられた。

hTERT が *in vitro* で RdRP 活性を示すことが証明されたが、細胞内でも同様に RdRP として機能することが立証されれば哺乳類での能動的な内在性 siRNA 合成経路の存在を示す重要な根拠となる。そこで培養細胞から抽出した total RNA を用いて、UTP incorporation assay で認められる約 530 塩

基のヘアピン型 RNA (センス+アンチセンス型 RMRP) と同様の RNA を Northern blotting により検索したところ、hTERT と RMRP をともに発現する HeLa 細胞、293T 細胞および MCF7 細胞内にセンス+アンチセンス型 RMRP の存在が確認された。また、細胞内における RMRP アンチセンス鎖の発現は hTERT 依存性であり、細胞内でも hTERT が RdRP として back-priming による RMRP の相補鎖合成に関与していることが示唆された。

センス+アンチセンス型 RMRP の細胞内での機能を考える上で、我々は興味深い現象を見出した。RMRP の過剰発現を試みたところ、hTERT を発現している細胞株では、導入したウイルス由来の RMRP の細胞内過剰発現が確認されるにも関わらず RMRP の総量が減少したのである。一方で、hTERT を過剰発現させると内在性の RMRP 発現量は減少し、逆に hTERT の発現を抑制すると RMRP 発現量は増加した。これらの現象は、hTERT 依存性に RMRP の発現量を転写後に抑制する機構が細胞内に存在することを示唆するものと考えられた。モデル生物の検討で RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは siRNA の合成に重要な役割を担うことが知られていたことより、われわれは hTERT により合成されたセンス+アンチセンス型 RMRP は Dicer による切断を受けて RNA サイレンシングに関与している可能性があると考え、RMRP に特異的な短い RNA の有無を Northern blotting により検討した。種々のプローブを用いた検討の結果、hTERT を発現する細胞株において、RMRP の 21 塩基から 40 塩基の部位に設定したプローブによりセンス鎖・アンチセンス鎖がともに検出される 22 塩基の RNA の存在が確認された。これらの RNA は 5'-monophosphate および 2', 3'-hydroxyl group の構造を有し、Dicer 依存性に合成されることから、Dicer による能動的切断産物

であると考えられた。さらに AGO タンパクの免疫沈降により、この短い RNA が hAGO2 に取り込まれていることが示唆された。以上より、hTERT が RdRP 活性によってヘアピン型の長い 2 本鎖 RNA を合成し、長い 2 本鎖 RNA から Dicer による切断を受けて形成された内在性 siRNA を介して遺伝子の転写後抑制に関与する、という新しいモデルを報告した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, Masutomi K, Hayashizaki Y.

Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER

*BMC Molecular Biology*, 2011 Feb 9;12:6 査読有

2. Maida Y, Masutomi K.

RNA-dependent RNA polymerase in RNA silencing

*Biological Chemistry* 2011; 392: 299-304 査読有

3. 木下圭太、毎田佳子、増富健吉

テロメレース：テロメア伸長反応と新たな機能

科学と生物 48(11):780-784, 2010 査読無

4. 岡本奈緒子、増富健吉

TERT, がん性幹細胞を標的としたがん治療の可能性

腫瘍内科 6(1):59-64, 2010 査読無

5. 毎田佳子、増富健吉

テロメア・テロメレースと noncoding RNA と

の新たな関わり

実験医学 増刊 28(10):1521-1527, 2010 査読無

6. 毎田佳子, 増富健吉

ヒト二本鎖 RNA 合成酵素の発見と RNA サイレンシングへの関与

細胞工学 29(4):374-375, 2010 査読無

7. 毎田佳子, 増富健吉

ヒト RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの発見と RNA サイレンシングへの関与

実験医学 28(3):439-443, 2010 「カレントトピックス」 査読無

8. Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, Kasim V, Hayashizaki Y, Hahn WC, Masutomi K.

An RNA dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA

*Nature* 2009; 461: 230-235 査読有

9. 毎田佳子, 増富健吉

RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをめぐる新たな展望

Medical Science Digest 35:571-577, 2009

2009年12月号 特集「RNAと医薬品」

査読無

10. 毎田佳子, 増富健吉

小分子 RNA と疾患

BIO Clinica 24(8):52(718)-57(723), 2009

査読無

[学会発表] (計 18 件)

1. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Possemato R, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K.

“Induction of tumor initiating cell

behavior of defined genetic composition by a complex composed of nucleostemin, hTERT and BRG1”

Keystone Symposia “Stem Cells, Cancer and Metastasis”

Keystone Resort, Keystone, Colorado

Mar 6 - 11, 2011 (ポスター発表)

2. 増富健吉 (招待講演)

がん幹細胞と放射線療法抵抗性

第 69 回日本癌学会総会

大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪

2010年9月22日~24日

3. 岡本奈緒子、安川麻美、Christine Nguyen、Kasim Vivi、深見希代子、William C.Hahn、増富健吉

hTERT、BRG1、核小体 GTP 結合タンパク質 GNL3L/NS からなる複合体は腫瘍形成能を制御する

第 69 回日本癌学会総会

大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪

2010年9月22日~24日 (口頭発表)

4. 増富健吉 (招待講演)

ヒト RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとクロマチン構造維持

第 2 回日本 RNAi 研究会 グランドプリンスホテル広島

2010年8月27日~28日

5. 増富健吉 (招待講演)

テロメレース、がん幹細胞、転移

第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会 金沢市文化ホール

2010年6月16日~17日

6. 増富健吉 (招待講演)

Human RNA dependent RNA polymerase and chromatin structure

第62回日本細胞生物学会大会  
大阪国際会議場

2010年5月19日～20日

7. Nakajima Eguchi T, Yoshida H, Taniguchi H, Masutomi K, Shimoda T, Yamada Y.

“Immunohistochemical analysis of CD133/44 expression in surgical specimens of squamous cell carcinoma of the esophagus after neoadjuvant chemotherapy”

AACR 101<sup>st</sup> Annual meeting 2010, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC

Apr 17-21, 2010 (ポスター発表)

8. Yoshida H, Nakajima Eguchi T, Taniguchi H, Horita Y, Masutomi K, Shimoda T, Yamada Y.

“Evaluation of CD133/44 expression level in resected gastric cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy”

AACR 101<sup>st</sup> Annual meeting 2010, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC

Apr 17-21, 2010 (ポスター発表)

9. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Possemato R, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K.

“A complex of hTERT, Brg1 and the nucleolar GTP-binding proteins GNL3L and nucleostemin regulates tumor initiating cell behavior”  
Cold Spring Harbor Asia Conferences “James Watson Symposium on Cancer”

Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China

Apr 6 - 11, 2010 (口頭発表)

10. 増富健吉 (招待講演)

テロメラーゼ新規機能とがん幹細胞

第6回宮崎サイエンスキャンプ

ワールドコンベンションセンターサミット  
宮崎

2010年2月26日～28日

11. Masutomi K

“A mammalian RNA dependent RNA polymerase formed by hTERT and the RNA component of RNase MRP”

Joint Colloquium: “Current approaches and future perspectives on the human genome, transcriptome and proteome”

Nobel Forum, Karolinska Institute, Stockholm

Jan 19, 2010 (招待講演)

12. 毎田佳子、安川麻美、岡本奈緒子、Vivi Kasim、Timo Lassmann、林崎良英、増富健吉  
hTERT produces endogenous siRNA through its RNA dependent RNA polymerase activity  
第32回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜

2009年12月9日～12日 (口頭発表)

13. 岡本奈緒子、安川麻美、毎田佳子、工富知子、深見希代子、William C. Hahn、増富健吉

hTERT と核小体 GTP 結合タンパク質 NS/GNL3L による腫瘍形成能の制御

第32回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜

2009年12月9日～12日 (ポスター発表)

14. Masutomi K

“A Mammalian RNA Dependent RNA Polymerase

Formed by hTERT and the RNA Component of RNase MRP”

2010 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology “Telomere Biology and DNA Repair”

RAVC Royal Pine Resort Ashmore, Queensland, Australia

Oct 9-14, 2009 (口頭発表)

15. 岡本奈緒子、安川麻美、毎田佳子、工富知子、深見希代子、William C.Hahn、増富健吉

hTERT と核小体 GTP 結合タンパク質 GNL3L/NS は腫瘍形成能を制御する

第 6 8 回日本癌学会総会

パシフィコ横浜

2009 年 10 月 1 日～3 日 (口頭発表)

16. 毎田佳子、安川麻美、Vivi Kasim、Timo Lassmann、岡本奈緒子、林崎良英、William C.Hahn、増富健吉

hTERT は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性により内在性 siRNA の産生に関与する

第 6 8 回日本癌学会総会

パシフィコ横浜

2009 年 10 月 1 日～3 日 (口頭発表)

17. 岡本奈緒子、増富健吉

hTERT と核小体 GTP 結合タンパク質 Nucleostemin/GNL3L による腫瘍形成能の制御

第 2 回 SYMPHONY

ホテルメトロポリタンエドモンド飯田橋

2009 年 9 月 12 日～13 日

18. Masutomi K

“A mammalian RNA dependent RNA polymerase (RdRP) formed by hTERT and the RNA

component of RNase MRP”

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting

“Telomere and Telomerase”

Apr 28-May 2, 2009 (口頭発表)

[図書] (計 1 件)

Masutomi K, Hahn WC.

“Telomerases: Chemistry, Biology and Clinical Applications”

Chapter 8: Off-telomerase function of telomerase

John Wiley & Sons, in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: A mammalian RNA dependent RNA polymerase

発明者: 増富健吉 他

権利者: 国立がん研究センター 他

種類: 米国特許出願、PCT 移行

番号: US61/188, 743

出願年月日: 2008 年 8 月 12 日

移行年月日: 2009 年 7 月 6 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/p10cell/p10cell.html>