

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14482

研究課題名（和文）TERTリン酸化機構とRdRP活性制御の分子基盤の解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism to dictate RdRP activity of TERT

研究代表者

増富 健吉（Masutomi, Kenkichi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：20450570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、網羅的にタンパク質量分析解析を行い、TERTのリン酸化部位を同定した。

さらに、これらのリン酸化ペプチドを抗原として、リン酸化部位特異的抗体の作製を試み、独自にリン酸化hTERT抗体を作製した。この抗体を用いて、RdRP活性に関わるリン酸化部位を決定した。さらに、既知のキナーゼ阻害剤ライブラリーやsiRNAを導入し、幾つかの候補となるキナーゼを同定した。

研究成果の概要（英文）：TERT has two distinct polymerase activities. One is reverse transcriptase activity and another is RNA dependent RNA polymerase activity. We identified several phosphorylation sites of hTERT by mass spectrometry analysis. We generated polyclonal antibodies against phospho-specific hTERT. Using the antibodies, we identified a phosphorylation site specifically dictates for RdRP activity. Moreover, we found several candidates of upstream kinase by using kinase inhibitors and siRNAs against kinases.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：テロメラーゼ TERT リン酸化 RNA依存性RNAポリメラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase: 以下 TERT) の意義は、S 期特異的に合成される逆転写酵素複合体によるテロメア長維持にあると考えられてきたが、我々のグループは、TERT がテロメア構造維持以外の生理機能を持つこと (*Cell* 2003, Masutomi *et al.*, *PNAS* 2005, Masutomi *et al.*)、および、逆転写酵素活性以外に RNA dependent RNA Polymerase (RdRP) 活性を有することを報告し (*Nature* 2009, Maida *et al.*)、さらには、M 期特異的に合成される TERT-RdRP 活性によるヘテロクロマチン状態の制御に関わることを報告してきた (*PNAS* 2011, Okamoto *et al.*, *MCB* 2014, Maida *et al.*)。また、M 期にセントロメア、紡錘糸および midbody (*MCB* 2014, Maida *et al.*) に存在することも見出してきた。

TERT が、S 期特異的に合成される逆転写酵素複合体とは異なる複合体により、細胞周期の異なる時期 (M 期) に、異なる酵素活性 (RdRP 活性) でテロメアとは異なる染色体ヘテロクロマチン領域 (セントロメア領域など) を制御していることに注目し、「M 期特異的に形成される TERT-RdRP 活性を保證する TERT リン酸化の分子基盤解明」を目指し研究を開始した。

## 2. 研究の目的

ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase: TERT) が M 期特異的に RNA dependent RNA polymerase (RdRP) 活性を保證すること、TERT が M 期にセントロメア、紡錘糸および midbody に局在することに注目し、「M 期特異的 TERT リン酸化機構と RdRP 活性制御の分子基盤」の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. M 期特異的 hTERT リン酸化部位の同定

リン酸化部位の同定のために、M 期に同調した細胞 (HeLa 細胞、293T 細胞など) を用いて網羅的にタンパク質質量分析解析 (MASC 解析) により TERT 由来リン酸化ペプチドの同定を試みた。全細胞抽出液を用いた解析では、T 独自開発した抗 TERT 抗体を用いて (*MCB* 2014, Maida *et al.*) 免疫沈降法にて hTERT タンパク質を濃縮し MASC 解析に供した。リン酸化ペプチドが同定されたので、これらのリン酸化ペプチドを抗原として、リン酸化部位特異的抗体の作製をした。

### 2. リン酸化に関わるキナーゼの同定

既知のキナーゼ阻害剤ライブラリーやキナーゼに対する siRNA を用いて、M 期特異的 hTERT リン酸化に関わるキナーゼの候補の検討を行った。

## 4. 研究成果

本研究により、網羅的にタンパク質質量分析解析を行い、TERT のリン酸化部位を同定した。さらに、これらのリン酸化ペプチドを抗原として、リン酸化部位特異的抗体の作製を試み、独自にリン酸化 hTERT 抗体を作製した。この抗体を用いて、RdRP 活性に関わるリン酸化部位を決定した。さらに、既知のキナーゼ阻害剤ライブラリーや siRNA を導入し、幾つかの候補となるキナーゼを同定した。

## 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 4件)

1. Maida Y, Yasukawa M, Masutomi K  
De novo RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase activity of TERT  
*Mol Cell Biol* 2016; 36: 1248-1259

[学会発表](計 10件)

1. Maida Y\*, Sakurai M\*, Shiromoto Y\*, Yasukawa M, Ghilotti M, Ariyoshi K, Nishikura K, Masutomi K (\*Equal contribution)

“A novel interaction of TERT with RNA editing”  
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting  
“Telomere and Telomerase” Cold Spring Harbor, NY  
May 2-6, 2017 (ポスター発表)

2. 毎田佳子、安川麻美、Marco Ghilotti、増富健吉  
TERT-RdRP活性検出法の非アイソトープ化の試み  
第39回日本分子生物学会年会  
パシフィコ横浜  
2016年11月30日-12月2日

3. 増富健吉  
hTERTの新規機能を標的とした抗がん戦略とその臨床応用  
第75回日本癌学会総会  
パシフィコ横浜  
2016年10月6日-8日 (招待講演)

4. Masutomi K  
“Targeting TERT-RdRP in HCC”  
The 12<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference in Kanazawa

Sep 22-23, 2016 (招待講演)

5. Maida Y, Yasukawa M, Ghilotti M, Masutomi K  
“Establishment of non-RI system for detecting RdRP activity of human TERT”  
The 21st Annual Meeting of the RNA Society  
Kyoto  
June 28 -July 02, 2016

6. Maida Y, Yasukawa M, Kato T, Masutomi K  
TERT protein levels correlate with RdRP activity but not with telomerase activity  
第74回日本癌学会総会  
名古屋国際会議場  
2015年10月8日-10日 (口頭発表)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

増富 健吉 ( MASUTOMI, kenichi )  
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長  
研究者番号：20450570

( )

研究者番号：

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )