

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2008

課題番号：19689010

研究課題名（和文） 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

研究課題名（英文） Identification of novel RNA associate with human telomerase reverse transcriptase involving in stem cell maintenance

研究代表者

増富 健吉 (MASUTOMI KENKICHI)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・がん性幹細胞研究プロジェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号：20450570

研究成果の概要：

染色体末端に存在するテロメアの構造維持に重要なテロメラーゼ逆転写酵素（telomerase reverse transcriptase: TERT）の新規機能の生理的意義とりわけ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ることから、TERT が TERC 以外の RNA 結合パートナーとともに、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の実験仮説のもと、TERT に結合する RNA の網羅的解析を行った。その結果、新規同定した RNA はこれまで、hTERT と安定な結合をするとされてきた RNA である TERC と類縁の small nucleolar RNA (snoRNA) に分類される RNase mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP)であった。新規に同定した RMRP と TERT 複合体が、幹細胞やがん幹細胞機能維持において重要な役割を担うことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 10,300,000 | 3,090,000 | 13,390,000 |
| 2008 年度 | 9,500,000  | 2,850,000 | 12,350,000 |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 19,800,000 | 5,940,000 | 25,740,000 |

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

TERT 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だ。

マウス TERT (mTERT) ノックアウトマウス (DePinho lab/ Dana-Farber Cancer Institute との共同研究) およびゼブラフィッシュ TERT (zTERT) ノックダウンの系 (Kishi lab/ Dana-Farber Cancer Institute との共同研究) で汎血球減少がみられること、およびいずれも幹細胞レベルの機能不全によるものであることを見出していた。これらの汎血球減少はテロメア長の短縮化とは無関係に起こり、また、この表現型は mTERT ノックアウトマウスでは見られないことなどから、以下の可能性が強く示唆されていた。

- (1) TERT が幹細胞の機能維持に直接的に関わる。
- (2) TERT の幹細胞機能維持には TERC を必要としない。
- (3) TERT の幹細胞機能維持はテロメア機能維持とは独立した機能と考えられる。

このような背景から、TERT 新規機能の生理的意義とりわけ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た。つまり、TERT が TERC 以外の結合パートナーとともに、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るようになっていた。

## 2. 研究の目的

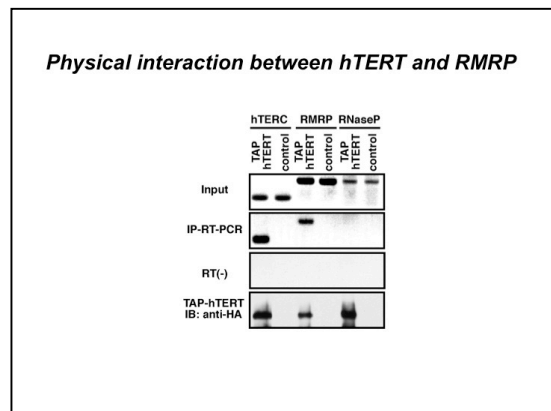
本研究計画では、テロメラーゼ触媒活性サブユニットであるテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の新規結合パートナーを同定しその新規複合体の機能および生理学的意義を検討することを目的とした。TERT が逆転写酵素活性を有する RNA 結合タンパク質であることから、機能構造体形成の新規結合パートナーの候補として TERC 以外の RNA の存在の可能性を考えることに概念的に無理はない。TERT をテロメアに特化した逆転写酵素としてではなく、RNA 結合機能構造体として大きくとらえ、新規結合 RNA の存在を立証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒトテロメラーゼ RNA 因子 (hTERTC) 以外の hTERT 結合 RNA 因子の同定に以下の方法を用いた。N 末端を FLAG ペプチド及び HA ペプチドで標識した hTERT をレトロウイルスにて安定的に導入した HeLa 細胞株を樹立し、FLAG-HA-hTERT の発現を確認した上で、FLAG 抗体および HA 抗体による段階的免疫沈降 ( tandem affinity peptide purification :TAP 法) にて、hTERT 複合体を効率的に回収した。この方法でえられた条件で hTERT 複合体を回収し網羅的に RNA の塩基配列を同定した。

## 4. 研究成果

テロメラーゼ逆転写酵素に結合する新規 RNA を同定することに成功した。新規同定した RNA はこれまで、hTERT と安定な結合をするとされてきた RNA である TERC と類縁の small nuclear RNA (snoRNA) に分類される RNase mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP) であった。hTERT と RMRP の物理的相互作用を確認した (図 1

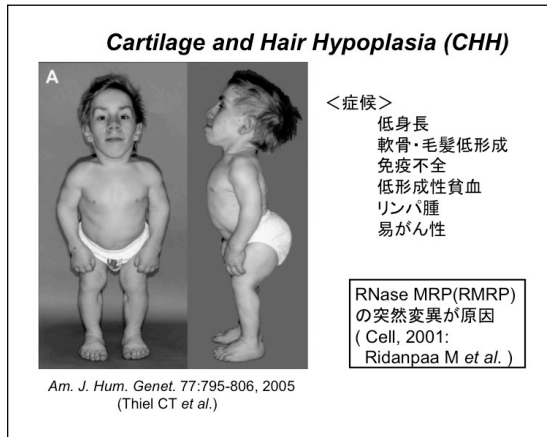


参照)。

RMRP は小人症、毛髪軟骨低形成を主症候とする遺伝性疾患である Cartilage Hair Hypoplasia (CHH) の原因遺伝子であることが知られている。その他にも、免疫不全、リンパ腫の発生、易がん性などの多様な症候を呈することが知られている。特記すべきは、本疾患の主症候が、末梢血幹細胞移植により著明に改善することから、本疾患の病態の本態は RMRP 遺伝子異常に伴う間葉系幹細胞の

異常であることが示唆されている。

これらのことから、新規に同定した RMRP と TERT 複合体が、幹細胞やがん幹細胞機能維持において重要な役割を担うことが示唆された。(図参照)



#### 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5件)

- ①. Possemato R, Timmons JC, Bauerlein EL, Wada N, Baldwin A, Masutomi K, Hahn WC  
Effects of Inhibition of POT1 on Telomere Length and Senescence in Diploid Human Cells  
*Mol Cancer Res* 2008; 6:1582-1593  
(査読有)
- ②. Imamura S, Uchiyama J, Koshimizu E, Hanai J, Raftopoulou C, Murphey RD, Bayliss PE, Imai Y, Burns CE, Masutomi K, Gagos S, Zon LI, Roberts TM, Kishi S  
A Non-Canonical Function of Zebrafish Telomerase Reverse Transcriptase is Required for The Differentiation and Survival of Embryonic Hematopoietic Cells  
*PLoS ONE* 2008; 3: e3364 (査読有)
- ③. 古内美穂, 増富健吉  
テロメラーゼと癌 -テロメラーゼの新たな機能  
*実験医学* 26(10):169(1627)-172(1630), 2008 (査読無)
- ④. 鳴海兼太, 増富健吉, 貴志周司  
幹細胞の老化-癌発生との関連  
*G. I. Research* 15(4):50(310)-54(314), 2007 (査読無)

- ⑤. 毎田佳子, 増富健吉  
機能性 RNA と発がん細胞  
*細胞* 39(12):12(501)-15(504), 2007  
(査読無)

[学会発表] (計9件)

- ①. 増富健吉  
テロメラーゼとがん幹細胞  
第21回広島大学・広島がんセミナー学術講演会  
広島大学医学部広仁会館  
2009年3月13日(招待口演)
- ②. 増富健吉  
テロメラーゼの新規機能と幹細胞  
第8回日本再生医療学会総会  
東京国際フォーラム  
2009年3月5日-6日(口頭発表)
- ③. 増富健吉  
Novel function of telomerase reverse transcriptase (TERT)  
BMB2008  
神戸ポートアイランド  
2008年12月9日-12日(口頭発表)
- ④. 増富健吉  
テロメラーゼの新規機能について  
第1回 SYMPHONY  
都市センターホテル  
2008年9月20日-21日(口頭発表)
- ⑤. 増富健吉  
テロメラーゼの新規機能と細胞老化  
慶応義塾大学 眼科学教室  
2008年7月17日(招待口演)
- ⑥. 増富健吉  
テロメラーゼの新規機能とがん幹細胞: Novel function of telomerase and cancer stem cell  
千葉県がんセンター  
2008年1月16日(招待口演)
- ⑦. 増富健吉  
テロメラーゼの新規機能とがん幹細胞  
東京大学医科学研究所  
2007年12月6日(招待口演)
- ⑧. 増富健吉  
クロマチン構造維持における TERT  
BMB2007  
パシフィコ横浜・ヨコハマグランド  
インターコンチネンタルホテル  
2007年12月11日-15日(口頭発表)

⑨. Masutomi K

Telomerase and Cancer Stem Cells  
The 11<sup>th</sup> German-Japan Cancer  
Workshop  
Kyoto Garden Palace Hotel, Kyoto  
Nov 29 - Dec 1, 2007 (招待口頭発表)

[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、毎田佳子、William C Hahn  
林崎良英、Timo Lassmann

権利者: 国立がんセンター、Dana-Farber  
Cancer Institute、理化学研究所

種類: 特許権

番号: US61/188,743

出願年月日: 2008年8月12日

国内外の別: 米国仮出願

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増富 健吉 (MASUTOMI KENKICHI)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床  
開発センター)・がん性幹細胞研究プロジ  
ェクト・プロジェクトリーダー

研究者番号: 20450570