

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15550

研究課題名（和文）テロメラーゼ逆転写酵素による遺伝子発現制御が標的とする新規遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of genes regulated by human telomerase reverse transcriptase

研究代表者

町谷 充洋（Machitani, Mistuhiro）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90759523

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、発がんにおけるnon-coding RNA (ncRNA) の影響が明らかにされてきたが、ncRNAの発現機構や生理学的意義は未解明な部分が多い。申請者のグループは、テロメラーゼ逆転写酵素hTERTがRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) 活性を示し、アンチセンスRNAを合成することで、腫瘍形成を促進することを明らかにしてきた。本研究では、RdRP活性による発がん促進機構を解明するために、がん細胞においてhTERTに結合するRNAの解析を実施した。その結果、hTERTのRdRP活性は、TERRAが形成するR-loop構造を解消し、ゲノム安定性に寄与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テロメア伸長に関わるテロメラーゼ逆転写酵素hTERTは、多くのがんで発現が上昇しており、発がんに関与するため、重要な抗がん戦略の分子標的として研究されてきたが、未だにhTERTを標的とした治療法の開発には至っていない。本研究において、hTERTのRdRP活性が、TERRAが形成するR-loop構造を解消し、がんの生存に寄与することを明らかにした。本研究成果は、hTERTに着目したがん治療研究を進める大きな一歩になるに違いない。

研究成果の概要（英文）：Although recent studies have revealed that non-coding RNAs (ncRNAs) are involved in tumorigenesis, the physiological significance of ncRNAs remains unknown. We have demonstrated that the telomerase reverse transcriptase hTERT exhibits RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) activity and promotes tumorigenesis. In this study, we analyzed RNAs binding to hTERT in cancer cells to examine the involvement of RdRP activity in tumorigenesis. In these analyses, we found that the RdRP activity of hTERT dissolves R-loop structure formed by TERRA, which contributes to genome stability.

研究分野：分子生物学

キーワード：テロメラーゼ逆転写酵素hTERT RNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRP) TERRA R-loop

1. 研究開始当初の背景

近年の大規模なトランスクリプトーム解析により、哺乳類細胞において、遺伝子をコードしない ncRNA が数多く発現していることが示された。そして、多くの ncRNA が、遺伝子の反対鎖からアンチセンス RNA として発現していることが明らかになった。一部のアンチセンス RNA に関しては詳細な解析が進められているが、哺乳類細胞が発現するほとんどのアンチセンス RNA に関しては、どのような細胞で、いつ、どのように転写され、どのような機能を有するか全く明らかになっていない。

一方で、植物などでは、細胞中の RNA を鋳型として、アンチセンス RNA を合成する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) の存在が古くから知られている。例えば、ウイルスに感染した植物細胞は、ウイルス RNA に対するアンチセンス RNA が RdRP によって合成され、標的であるウイルス RNA を分解する。このように、植物細胞で RdRP はウイルス RNA を標的とし分解するが、哺乳類細胞における RdRP の標的 RNA に関しては全く明らかになっていない。このような背景のもと、申請者のグループは、テロメラーゼの触媒サブユニットである hTERT が RdRP 活性を有することを見出し (Maida *et al. Nature* 2009)、がんにおける hTERT-RdRP 活性の生理学的意義を明らかにしてきた (Maida *et al. Mol Cell Biol* 2014, Maida *et al Mol Cell Biol* 2016)。さらに最近の解析で、細胞周期特異的にリン酸化された TERT が、その RdRP 活性によって、がん抑制遺伝子に対するアンチセンス RNA を合成し、その発現を制御することで、腫瘍形成を促進していることを明らかにした (Yasukawa *et al. Nat Commun* 2020)。しかしながら、現在のところ、同定された RdRP 標的遺伝子の種類は限定的で、RdRP による RNA の合成が発がんにつながるメカニズムの全容解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、申請者のグループが独自に開発した hTERT を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた RIP-seq (RNA-immunoprecipitation sequencing) によって、がん細胞において hTERT に結合する RNA を網羅的に解析し、hTERT の RdRP 活性が合成する RNA、ならびに、RdRP 活性によって発現制御される遺伝子の同定を試みる。さらに、hTERT と標的遺伝子の発現制御が、がんに与える影響を明らかにし、「hTERT の RdRP 活性による遺伝子発現制御を介した発がんメカニズム」の全容解明を目指す。本研究成果は、RdRP 活性による腫瘍形成メカニズムの解明にもつながり、新たな抗がん戦略の創出に寄与することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 抗 hTERT 抗体を用いた RIP-seq

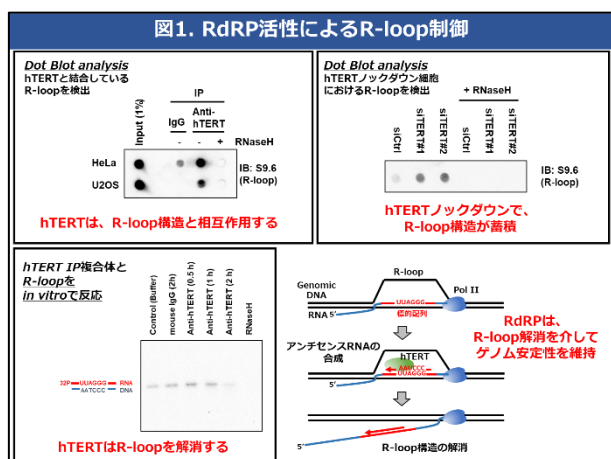
抗 hTERT 抗体を用いた RIP-seq を実施することで、hTERT が結合している RNA を解析し、RdRP 活性で合成される RNA の同定を試みた。まず、免疫沈降後の hTERT に結合した RNA を精製し、次世代シーケンサー解析によって、網羅的に結合 RNA を解析した。

(2) RdRP 変異細胞株を用いた RNA-seq

これまでの解析で、hTERT は RdRP 活性を介して、標的遺伝子の発現を制御することを明らかにしている。そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて、hTERT の RdRP 活性を欠失させた変異細胞株を作製した。野生型細胞株、及び、RdRP 変異細胞株から精製した Total RNA を用いて、RNA-seq による遺伝子発現解析を行い、RdRP 変異細胞で発現変動している遺伝子を抽出した。これら(1)(2)の解析を組み合わせることで、RdRP が標的とする遺伝子を解析した。

(3) 標的 RNA に対する RdRP 活性の生理学的意義の解析

上述した網羅的解析で得られた候補遺伝子が RdRP 標的遺伝子であることを分子生物学的手法や生化学的手法で実験的に解析した。さらに、RdRP による標的 RNA の制御が発がんにつながるかを検証した。

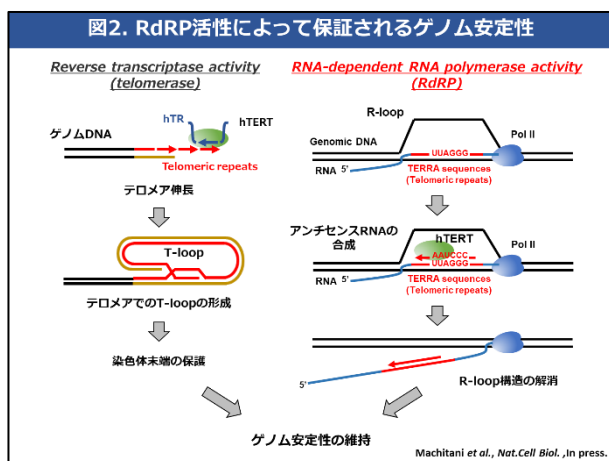


4. 研究成果

RdRP 活性による遺伝子発現制御メカニズムを解析するために、hTERT 結合 RNA の解析を実施した。これまでの研究で、hTERT が核スペckルに局在することが明らかになったため、生化学的な核スペckル構造体の精製条件を検討した。得られた条件にて、核スペckル構造体を生化学的に精製したところ、核スペckル精製画分に hTERT が濃縮されていることが確かめた。さらに、核スペckル画分から免疫沈降にて精製した hTERT が、RdRP 活性を示すことを明らかにした。このように、核スペckル構造体に含まれる hTERT の生化学

的な精製に成功したので、核スペックルで hTERT に結合する RNA の網羅的な解析 (RIP-seq) を実施した。その結果、hTERT が、テロメアリピート配列を有する RNA である TERRA RNA と結合していることが明らかになった (図 1)。近年、TERRA RNA は R-loop 構造を形成していることが報告されていることから、hTERT の RdRP 活性と R-loop の関係を解析したところ、hTERT が R-loop 構造に結合し、R-loop 構造に含まれる RNA に対してアンチセンス RNA を合成することで、R-loop 解消に働くことを見出した (図 1)。R-loop の蓄積は DNA 損傷につながるということが知られているが、実際に、hTERT を阻害した条件で、R-loop 構造の増加と DNA 損傷マーカーの増加が見られた。以上の結果から、hTERT は、その RdRP 活性を介して、R-loop を制御し、ゲノム安定性に寄与していることが示された。

RdRP 活性の生理学的意義を、さらに明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により、肉腫細胞株である U2OS 細胞での hTERT 遺伝子改変を試みた。作製した細胞から得られたゲノム DNA のシーケンス解析を実施し、hTERT の遺伝子改変を確認した。さらに、作製した hTERT 遺伝子改変細胞において、hTERT の発現阻害により、RdRP 活性が顕著に抑制されていることが示された。すなわち、RdRP 活性を欠損した hTERT 遺伝子改変細胞の取得に成功した。hTERT の RdRP 活性が遺伝子発現に与える影響を解析するために、hTERT 遺伝子改変細胞と野生型細胞の遺伝子発現を RNA-seq によって解析した。発現変動した遺伝子のクラスタリングを行い、各クラスターに含まれる遺伝子の特徴を GO 解析にて調べたところ、hTERT 遺伝子改変細胞において、DNA 複製や細胞周期に関わる遺伝子の発現減少が見られた。また、hTERT 遺伝子改変細胞において、TERRA RNA の発現上昇が認められた。さらに、RdRP 活性の阻害が、腫瘍の増殖に影響を与えるか解析した。作製した hTERT 遺伝子改変細胞は、野生型 U2OS 細胞と比較して、*in vitro* での培養で、細胞増殖速度の低下が見られた。そこで、マウス皮下腫瘍モデルを用いて、その造腫瘍能を比較した。その結果、hTERT の遺伝子改変で、皮下腫瘍の増殖が顕著に阻害されることが明らかになった。すなわち、hTERT の RdRP 活性が造腫瘍能に関わることが明らかになった。



以上、本研究において、hTERT の RdRP 活性は、TERRA が形成する R-loop 構造を解消し、ゲノム安定性に寄与することが明らかになった (図 2)。また、hTERT 遺伝子改変細胞の取得に成功し、hTERT の RdRP 活性の阻害が腫瘍形成を阻害すること、すなわち、RdRP 阻害ががん治療標的と成り得ることを示した (Machitani *et al.* *Nat Cell Biol.* In press)。本研究成果は、hTERT を標的とした全く新しい治療法の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Machitani M, Nomura A, Yamashita T, Yasukawa M, Ueki S, Fujita K, Ueno T, Yamashita A, Tanzawa Y, Watanabe M, Taniguchi T, Saitoh N, Kaneko S, Kato Y, Mano H, Masutomi K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Maintenance of R-loop structures by phosphorylated hTERT preserves genome integrity.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-024-01427-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Machitani M, Nomura A, Masutomi K.
2. 発表標題 Phase separation sequesters p-hTERT with the RdRP activity into subnuclear structures.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nomura A, Machitani M, Masutomi K.
2. 発表標題 hTERT contributes to proliferation of telomerase negative ALT cells through RNA-dependent RNA polymerase activity.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Machitani M, Nomura A, Yamashita T, Ueno T, Yamashita A, Taniguchi T, Kaneko S, Kato Y, Mano H, Masutomi K.
2. 発表標題 Maintenance of R-loop structures by phosphorylated hTERT to preserve genome integrity.
3. 学会等名 CSHL Meeting-Telomeres & Telomeras- (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Machitani M, Nomura A, Yamashita T, Yamashita A, Saitoh N, Masutomi K.
2. 発表標題 R-loop regulation by RNA-dependent RNA polymerase activity of hTERT.
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Machitani M, Nomura A, Yamashita T, Ueno T, Yamashita A, Taniguchi T, Saitoh N, Kaneko S, Kato Y, Mano H, Masutomi K.
2. 発表標題 Synthetic lethality by inhibition of RNA dependent RNA polymerase activity and the Fanconi anemia/BRCA pathway.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Machitani M, Nomura A, Yamashita T, Yamashita A, Saitoh N, Masutomi K.
2. 発表標題 Maintenance of genome integrity by RNA-dependent RNA polymerase activity of hTERT.
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------