

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790349

研究課題名（和文）

4次元イメージングによるテロメラーゼ関連蛋白質および機能性RNAの動態解析

研究課題名（英文）

Image analysis of proteins and functional RNA related to telomerase

研究代表者

大岡静衣（OHKA SEII）

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：80313097

研究成果の概要（和文）：

がん幹細胞機能維持分子群（human telomerase reverse transcriptase (hTERT)、BRG1、Nucleostemin (NS)）は、細胞分裂期に重要な構造体に局在し、細胞分裂期の細胞分裂進行に寄与することを示唆した。抗 hTERT mAb は、細胞内のがん幹細胞機能維持分子群を細胞分裂期に重要な構造体以外の場所に局在させることにより、細胞分裂期に重要な構造体に局在するがん幹細胞機能維持分子群を減少させ、細胞分裂期の細胞分裂進行を阻害している可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

A novel complex consists of human telomerase (hTERT), Nucleostemin (NS) and BRG1 is important for the maintenance of tumor initiating cells (Okamoto N., et al., PNAS, 2011). We found that Heterochromatin protein 1 (HP1), which are related to the heterochromatin formation, co-localize with the molecules on the important structure during the mitotic phase. These results suggest that hTERT, NS, BRG1 and HP1 collaborate to form and maintain heterochromatin and imply the molecular link between tumor initiating cell maintenance and heterochromatin formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：テロメラーゼ、細胞分裂期、がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

がん性幹細胞あるいは ES 細胞などの分裂が盛んな幹細胞ではテロメラーゼの発現が高いことが予想され、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) が幹細胞機能維持に重要な役割を果たしていると考えられている。TERT は、Telomerase RNA component (TERC) を鋳型にテロメアを合成するテロメア特異的 RNA 依存性 DNA ポリメラーゼとして知られていた。Maida らは、TERT が non-coding RNA (ncRNA) の一種である RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease (RMRP) に直接相互作用することで、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 活性を発揮することを明らかにした (1)。さらに、TERT は RNA 代謝に深く関わっていることなどから、TERT や関連蛋白質は機能性 RNA と関与することでがん性幹細胞の機能制御に関わっていることが推察される。そこで、TERT に関連する蛋白質や機能性 RNA に焦点を絞ることとした。

がん性幹細胞特異的な蛋白質の機能を TERT 関連の現象から解明するため、TERT と同様の RdRp 活性を持つ酵母 Rdp1 が関与するヘテロクロマチンに着目した。ヘテロクロマチンとは、凝縮した構造を持ち、転写が起こりにくく mRNA や機能性 RNA が作られにくくなっている構造のことを指し、正常な遺伝子発現制御に必須である。また、細胞分裂時に紡錘糸が結合するセントロメアなどにはヘテロクロマチンが存在し、正常な染色体分配にも重要である。このように、ヘテロクロマチン構造の異常は、染色体レベルの異常を引き起こすだけでなく、個々の遺伝子の発現パターンを変化させ、発がん過程、悪性化等へ寄与することが示唆されている。酵母で、ヘテロクロマチン形成・維持に中心的な役割を果たす RNA-directed RNA polymerase complex ( RDRC ) や RNA-induced transcriptional gene silencing (RITS) 複合体が明らかにされている。これらの酵母複

合体に含まれる蛋白質 Swi6 のヒトホモログ heterochromatin protein 1 (HP1) は、ヒト BRG1 との相互作用が報告されている (2)。また、上記酵母複合体に含まれる Argonaute (Ago) のヒトホモログ AGO は、ヒト Nucleostemin (NS) と相互作用する。そしてヒト NS は、ヒト BRG1、ヒト TERT と相互作用することを岡本らが確認した (3)。以上の結果から、がん幹細胞機能維持分子群 (hTERT、BRG1、NS) と HP1、AGO を含む複合体がヒトでも存在し、上記酵母複合体と同様にヘテロクロマチン形成・維持に中心的な役割を果たす可能性があると考えた。

また、機能性 RNA と相互作用する TERT や AGO ががん幹細胞機能維持分子群に含まれていることから、機能性 RNA が細胞分裂に関与する可能性がある。変異 RMRP は、TERT との相互作用による RdRp 活性非依存的に骨幹端軟骨異形成症を引き起こすとの報告もあることから、RMRP 自体が担う未知の機能が存在する可能性もある。

最終的には、細胞分裂の観点から幹細胞特異性・機能制御機構やがん悪性化機構の解明ならびに骨幹端軟骨異形成症などの疾患の発症機構解明に繋がれると考えた。

## 参考文献

1. 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.
2. Nielsen AL, Sanchez C, Ichinose H, Cerviño M, Lerouge T, Chambon P, Losson R. Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha. *EMBO J*. 2002, 21:5797-5806.

3. Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, Shibata T, Ligon KL, Fukami K, Hahn WC, Masutomi K. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20;108(51):20388-20393.

## 2. 研究の目的

テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) や関連蛋白質は、機能性 RNA と関与することでがん性幹細胞の機能制御に関わっていると考えられる。我々は、正常な遺伝子発現制御や染色体分配に必須なヘテロクロマチンの維持に関連すると考えられる、TERT を含む蛋白質群が、細胞分裂時に重要な構造体に共局在していることを見出した。そこで、上記蛋白質群および関連機能性 RNA の細胞周期、特に細胞分裂時における時空間解析を行い、それらの細胞周期における機能を主にイメージングの観点から解明する。そして、幹細胞特異性・機能制御機構やがん悪性化機構の解明に繋げる。

## 3. 研究の方法

がん幹細胞機能維持分子群それぞれとコントロールとして GFP のノックダウンを、shRNA 発現レトロウイルスベクターを用いて行った。ノックダウン時の各がん幹細胞機能維持分子群を免疫細胞染色し、標的蛋白質のノックダウンを確認すると同時に、その他の分子群の局在を、主に細胞分裂期について確認した。また、細胞分裂期にある細胞の割合を計測し、コントロール細胞の細胞分裂期にある細胞の割合と比較した。

がん幹細胞機能維持因子のひとつである hTERT に対するマウスモノクローナル抗体 (mAb) クローンから免疫細胞染色に適応したクローンを第一段階選抜し、さらに他の用

途にも適応するクローンを選抜することで、適切な抗体を作製した。この抗 hTERT mAb およびコントロール抗体を Ab-DeliverIn (OZ Biosciences) を用いて生細胞に導入した。免疫細胞染色後、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP2, Leica Microsystems) で局在観察を行った。また、細胞分裂期細胞の割合を計測し比較した。

細胞分裂期における HP1 と各がん幹細胞機能維持分子群との共局在を、免疫細胞染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

我々は、がん幹細胞機能維持分子群それぞれのノックダウンにより細胞分裂期細胞数が増加することを見いだした。したがって、がん幹細胞機能維持分子群は、細胞分裂期に重要な構造体に局在し、細胞分裂期の細胞分裂進行に寄与することを示唆した。

がん幹細胞機能維持因子のひとつである hTERT に対するマウスモノクローナル抗体 (mAb) を作製した。この抗 hTERT mAb を生細胞に導入したところ、抗 hTERT mAb ががん幹細胞機能維持分子群を細胞分裂期に重要な構造体以外の場所にトラップしている像が免疫細胞染色により観察された。そして、抗 hTERT mAb 導入細胞では細胞分裂期細胞数が増加した。以上の結果より、抗 hTERT mAb は、細胞内のがん幹細胞機能維持分子群を細胞分裂期に重要な構造体以外の場所に局在させることにより、細胞分裂期に重要な構造体に局在するがん幹細胞機能維持分子群を減少させ、細胞分裂期の細胞分裂進行を阻害している可能性が示唆された。

細胞分裂期に HP1 とがん幹細胞機能維持分子群が細胞分裂期に重要な構造体に共局在することを明らかにした。このことは、がん幹細胞機能維持分子群と HP1 は協調してがん幹細胞機能維持やヘテロクロマチン形成

に寄与している可能性を示唆している。

なし

## 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)

[学会発表] (計3件)

1. 木下圭太、大岡静衣、岡本奈緒子、安川麻実、増富健吉 Link between heterochromatin maintenance and tumor initiating cell by human telomerase reverse transcriptase (hTERT). 第71回日本癌学会学術総会 2012年09月19日～2012年09月21日 北海道

2. 大岡静衣、岡本奈緒子、木下圭太、安川麻実、増富健吉 Tumor initiating cell maintenance and heterochromatin establishment during mitotic phase 第34回分子生物学会年会 2011年12月13日～16日 神奈川

3. 大岡静衣 がん幹細胞機能維持に関わる分子群のイメージング解析 第4回NanoBio若手ソーシャルネットワークワーキングシンポジウム 2011年6月3日～4日 北海道

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大岡 静衣 (OHKA SEI)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員  
研究者番号: 80313097

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者