

# 研究報告書(公開)

## 「RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとそのクロマチン構造維持機構」

研究期間：平成 19 年 10 月～平成 23 年 3 月

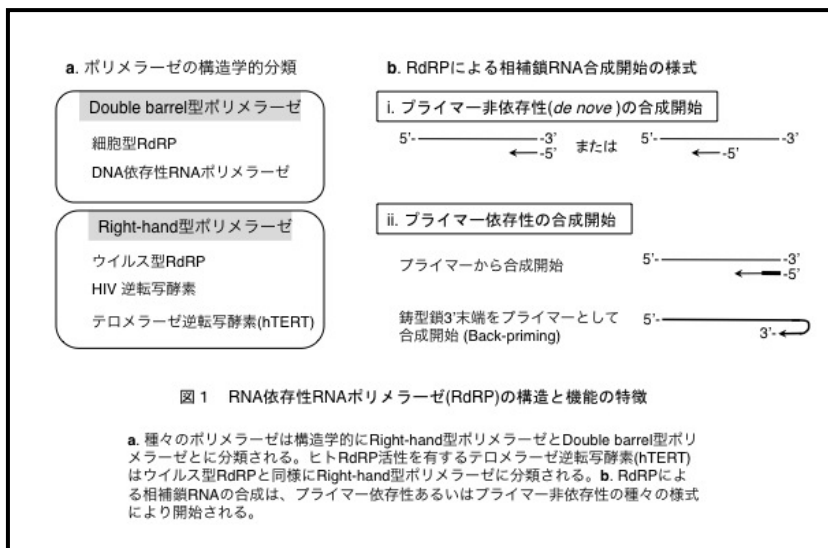
研究者：増富 健吉

### 1. 研究のねらい

RNA 干渉は、2 本鎖 RNA が特定の遺伝子の発現を抑制する現象で、ウイルス感染に対する防御機構など生体内のさまざまな局面で重要な役割を担っている。1990 年代に、植物で 2 本鎖 RNA を合成する酵素「RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp)」が発見されて以来、真核生物などでも存在することが報告されていたが、ヒトなどのほ乳動物での存在は確かではなく、分子生物学における長年の謎のひとつとなっていた。RdRp は、RNA により介在されるゲノム構造維持機構の中でその根幹を担う重要な酵素と認識されてきたが、哺乳動物においても RdRp と機能的な相同性を有する分子の存在は予想こそされているが、依然としてその立証はされていなかった。本研究では、ヒトにおける RdRp の同定とその生物学的意義の解明を目指した。

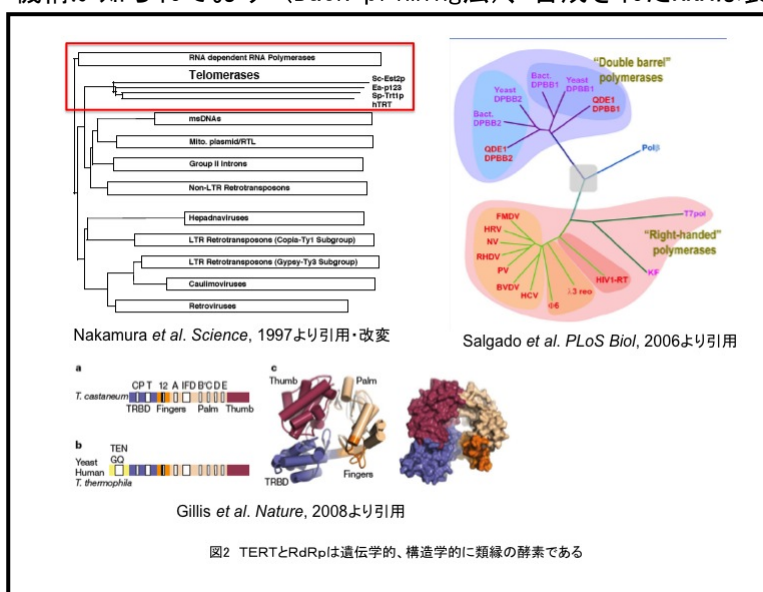
### 2. 研究成果

RNA サイレンシングは 20 塩基から 30 塩基長の小さな RNA に介在される遺伝子発現制御機構である。1998 年に線虫で RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) が発見されて以来、small interfering RNA (siRNA)、microRNA (miRNA) など RNA サイレンシングに関与する種々の RNA が報告され、それぞれの生体内での発現や機能、技術応用に関する研究が精力的に進められている。RNA サイレンシングに関与する小さな RNA の代表的な合成経路には、長鎖 2 本鎖 RNA やヘアピン型 RNA からの切断による合成があり、ヒトでも RNaseIII 型酵素である Dicer が miRNA の前駆体であるヘアピン型の pre-miRNA を切断することが知られている。植物や分裂酵母、アカパンカビ、線虫などのモデル生物では 1 本鎖 RNA を鋳型に 2 本鎖 RNA を合成する酵素である RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase; RdRP) の存在が知られており、細胞内での長鎖 2 本鎖 RNA の合成および長鎖 2 本鎖 RNA の切断による内在性 siRNA の合成経路が存在する。しかしながら、ヒトを始めとする哺乳類の RdRP はこれまでその存在が立証されていなかった。今回、ヒトにおける RdRP の存在を証明し、RdRP による内在性 siRNA の合成経路の一部を明らかにした。

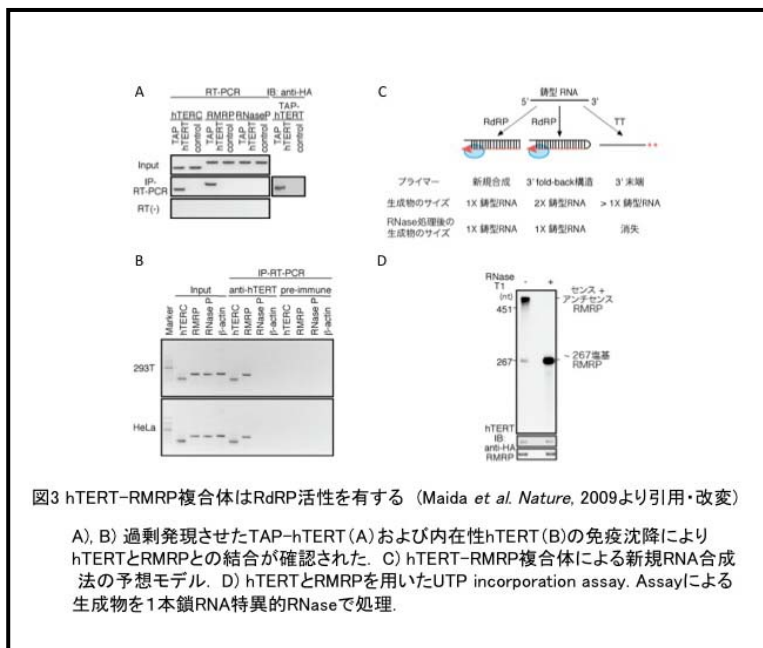


現在までに知られているRdRPは構造的類似性に基づいてウイルス型RdRPと細胞型RdRPの2つの型に分類される(図1a)。ポリオウイルス、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルス(HCV)などのRNAウイルスが持つウイルス型RdRPは、レトロウイルスのRNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)とともにpalm and fingers structure(手

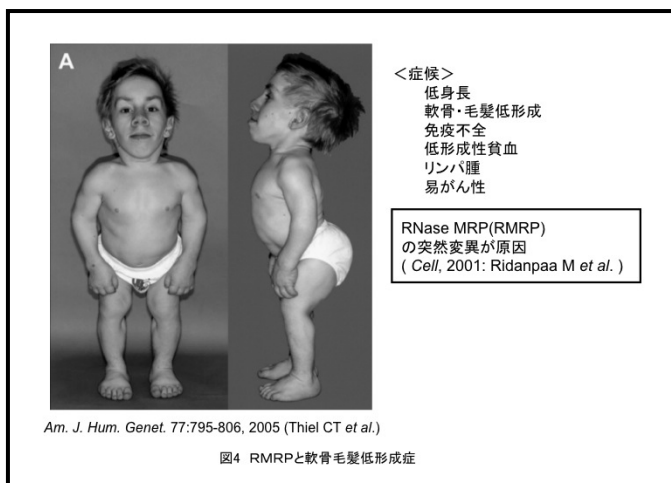
のひらと指の構造)を有するRight-hand型ポリメラーゼに分類される。後述のヒトRdRPもRight-hand型ポリメラーゼに属している。一方、植物、分裂酵母、アカパンカビ、線虫などのモデル生物が持つ細胞型RdRPはDouble barrel型ポリメラーゼに分類され、これら2つの型のRdRPは異なる祖先から進化したものと考えられている。RdRPが相補鎖RNAを合成する方法には、プライマー要求性に基づいて2つのタイプがある<sup>2)</sup>(図1b)。一つはプライマーを必要としない方法で、プライマー非依存性 (*de novo*) の合成開始と言われる。モデル生物の細胞型RdRPによる内在性siRNA(とりわけ2次性siRNA)の合成には、この方法を用いる例が報告されている<sup>2) -4)</sup>。一方、プライマーを必要とする方法はプライマー依存性の合成開始と言われる。Right-hand型ポリメラーゼに属するウイルスやヒトのRdRPは、プライマー依存性の相補鎖合成が可能である<sup>5)</sup>。この例として、インフルエンザウイルスは宿主mRNAから切断された5'キャップ構造を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして自己のゲノムを転写する。また、HCVやデングウイルス、西ナイル熱ウイルスのRdRPでは、鋳型RNA 3'末端の折り返し構造を利用した合成開始機構が知られており(Back-priming法)、合成されたRNAは長いヘアピン構造となる。



テロメア逆転写酵素であるテロメラーゼの活性は、テロメラーゼの触媒サブユニットであるhTERT(human telomerase reverse transcriptase)と、テロメラーゼの構成RNAであるhTERC(human telomerase RNA component)により保証される。hTERTの本態はhTERCの塩基配列を鋳型として染色体末端にテロメアDNAを付加するテロメア特異的RNA依存性DNAポリメラーゼ(逆転写酵素)として広く知られているが、TERTは遺伝系統学的にウイルスのRdRPと近縁にあり、構造学的にもウイルスのRdRPと同じRight-hand型ポリメラーゼに分類される(図2)。我々はTERTがTERC以外のRNAとともにテロメラーゼとは異なるポリメラーゼ活性を示すのではないかと考え、TERTに結合する新規RNAの検索を行った。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 (図 3A)。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 (図 3B)。RMRPは267塩基のnon-coding RNAであり、



著明な低身長を呈し種々の症候を発症する軟骨毛髪低形成の原因遺伝子として知られている (図 4)。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<sup>32</sup>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 (図 3D)。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<sup>32</sup>P-UTPの取り込みは認められなかった。これまでに報告されてきたRNA依存性RNAポリメラーゼを有するウイルスでの詳細な検討をヒントに、hTERT-RMRP複合体によるRNA鎖の合成方法として、①RdRP活性による *de novo* の相補鎖RNA合成、②RdRP活性による鋳型RNAの3' fold-back構造を利用した相補鎖RNA合成、③terminal transferase活性による鋳型RNA 3' 端への塩基付加の3つのモードが考えられた (図 3C)。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 (図 3D)、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。以上の結果はすなわち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 (図 5A)。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。



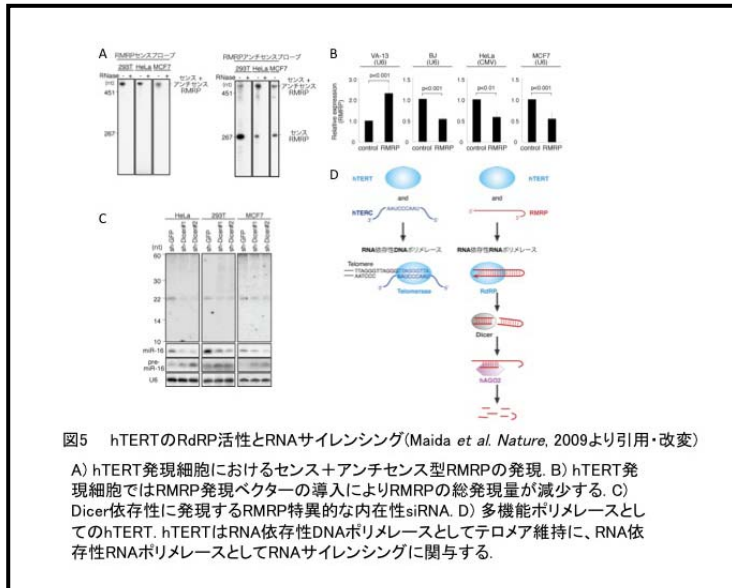


図5 hTERTのRdRp活性とRNAサイレンシング(Maida et al. Nature, 2009より引用・改変)

A) hTERT発現細胞におけるセンス+アンチセンス型RMRPの発現。B) hTERT発現細胞ではRMRP発現ベクターの導入によりRMRPの総発現量が減少する。C) Dicer依存性に発現するRMRP特異的な内在性siRNA。D) 多機能ポリメラーゼとしてのhTERT。hTERTはRNA依存性DNAポリメラーゼとしてテロメア維持に、RNA依存性RNAポリメラーゼとしてRNAサイレンシングに関与する。

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(図 5B)。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ncing 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(図 5C)。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(図 5D)。

### 3. 今後の展開

本研究成果は下記の点において重要な展望を示すもので、将来の RNA 干渉を応用したがんをはじめとする疾患治療に向けた研究に貢献することが期待される。

1. 幹細胞機能維持に重要な役割を果たす分子である RMRP の幹細胞生物学への技術応用
2. 従来から発がんの分子メカニズムに深く関わることが知られていた TERT の新たな機能を標的としたがん治療法の確立およびがん性幹細胞を標的とした治療法への応用

### 4. 自己評価

ヒトの RdRp の存在を立証するという目標は達成された。RNA により介在されるヘテロクロマチン構造維持における RdRp の役割に関する解析は引き続いての研究が必要と考えられるが、その機能に関わる分子群の同定まで(非公開の研究成果)は到達できたためほぼ当初の計画は完了したと判断できる。

### 5. 研究総括の見解

RNA 依存 RNA ポリメラーゼ(RdRP)の存在を、ヒトで証明した意義は非常に大きい。この研究では、ヒト RdRp はテロメラーゼの触媒サブユニットである hTERT であることを示した。これ

まで、モデル生物(分裂酵母、線虫など)のみで知られていた、siRNA 生成機構をヒトにも適用できるようになった。本研究では、さらに、RNA が介在するヘテロクロマチン構造の維持におけるヒト RdRP の役割を明らかにするための解析が着々と進んでおり、今後のさらに大きな発展も期待できる。

## 6. 主要な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, <u>Masutomi K</u> , Hayashizaki, Y Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER <i>BMC Molecular Biology</i> , in press online Feb. 9, 2011
2. Maida Y, <u>Masutomi K</u> RNA-dependent RNA polymerase in RNA silencing <i>Biological Chemistry</i> , in press online Feb. 7, 2011
3. Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, Kasim V, Hayashizaki Y, Hahn WC, <u>Masutomi K</u> An RNA dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA <i>Nature</i> 2009; 461: 230-235

### (2)特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 増富 健吉 他

発明の名称: A mammalian RNA dependent RNA polymerase

出 願 人: ヒューマンサイエンス振興財団 他

出 願 日: 2008/8/12 US61/188743

2009/7/6 PCT 出願

2011/2/14 米国内移行

### (3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

#### 主要な学会発表

#### 1. 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)

#### 2. 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

October 9-14, 2009 (口頭発表)

#### 3. 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”  
April 28–May 2, 2009 (口頭発表)

4. Masutomi K, Hahn WC.  
“Telomerases: Chemistry, Biology and Clinical Applications”  
Chapter 8: Off-telomerase function of telomerase  
John Wiley & Sons, in press.

受賞

第一回国立がん研究センター医学会賞金賞受賞 平成22年12月10日