正常細胞では細胞分裂のたびに染色体末端のテロメアは不完全な複製のために短縮し，このテロメア末端複製問題が細胞の老化と深く関与していることが知られている．一方で，テロメア長の維持を担う酵素であるテロメラーゼは90%以上のがん細胞で高発現し，末端複製問題を回避することでがん細胞の不死化に関与していると考えられている．ヒトテロメラーゼは，触媒サブユニットである hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase) と，鋳型 RNA である hTERC (Human Telomerase RNA component) を必要最小ユニットとし，hTERT の RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ (RNA-dependent DNA polymerase; 逆転写酵素) 活性によりテロメア末端にテロメア配列を付加することが知られて

テロメラーゼ：テロメア伸長反応と新たな機能

木下圭太，毎田佳子，増富健吉

独立行政法人国立がん研究センター研究所

いる (図1)．このようにテロメア伸長をつかさどる逆転写酵素であるテロメラーゼの研究の歴史を振り返ると，RNA 研究と切り離すことができない．RNA を内在する複合体であるテロメラーゼの逆転写酵素としての特徴は RNA により規定，制御されていることがわかる．今回は RNA 結合複合体としてのテロメラーゼがどのようにして同定されたか，また近年のテロメラーゼ研究の新たな流れについて紹介する．

Telomere terminal transferase から reverse transcriptase へ

テロメラーゼは1985年 Greider と Blackburn により，原生動物において初めて発見された酵素であり，当

図1 ■ hTERT の機能と hTERT 結合 RNA

テロメラーゼ機能をもつ hTERT は TERC と結合することによりテロメア構造維持に寄与する。近年、hTERT がテロメア構造維持作用を介して iPS 細胞の誘導に関与することや、成体の組織幹細胞の機能維持、さらに RMRP と結合することにより従来の機能とは異なる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を示すことが明らかになっている。

初は telomere terminal transferase と記載され、染色体末端のテロメアに「terminal transferase」活性を利用して DNA を付加していく酵素と考えられていた⁽¹⁾。1989 年に Morin により HeLa 細胞内にヒトで初めてテロメラーゼ複合体が発見された際にも、依然として「the human telomere terminal transferase enzyme」として報告されている⁽²⁾。すなわち、テロメラーゼは template independent terminal transferase 活性により染色体末端にテロメア DNA を付加すると考えられていた。しかし、この活性が RNase 処理により消失するという実験結果から、テロメラーゼ本体は RNA を内在する ribonucleoprotein ではないかとの仮説のもと、テロメラーゼを構成する RNA のクローニング競争が繰り広げられた。1989 年に同じく Greider と Blackburn により原生動物のテロメラーゼ複合体に内在する RNA コンポーネントが同定され⁽³⁾、この発見により、テロメラーゼは RNA を内在する ribonucleoprotein 複合体であり、テロメアの伸長は内在する RNA を鋳型として染色体末端に相補的 DNA を付加する RNA 依存性 DNA ポリメラーゼ活性によるものであるという考えの基盤が形成された。その後、原生動物から哺乳動物まで、種を超えて保存されているテロメラーゼ複合体に内在する RNA コンポーネントが次々と同定され、TERC と命名された。これにより、テロメアを維持するテロメラーゼは、内在する RNA を鋳型として DNA を付加するテロメラーゼ逆転写酵素として種を超えて保存されているという仮説が立てられた。

Reverse transcriptase 触媒サブユニットの同定

続いて、クローニング競争の標的となったのは、テロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットである。テロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットとして、酵母では Est2 が知られていたこと、またテロメラーゼは種を超えて保存されているとの仮説から、Est2 のホモログとして、データベースを駆使したコンピュータ解析によりその遺伝子探索が行なわれた。その結果、1997 年 Cech⁽⁴⁾ と Weinberg⁽⁵⁾ のグループが、それぞれ独立に、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素の触媒サブユニットのクローニングに成功した。当時、それぞれのグループが報告した触媒サブユニット (hTERT: Cech のグループ, hEst2: Weinberg のグループ) は、予想通り逆転写酵素としてのモチーフを有するレトロウイルス逆転写酵素などと近縁の酵素であることが明らかとなった (現在、これらは human telomerase reverse transcriptase (hTERT) として名称が統一されている)。このようにして、テロメラーゼは内在する RNA を鋳型として DNA を付加する RNA dependent DNA polymerase (逆転写酵素) であることが明らかとなった (図 1)。

テロメラーゼと iPS 細胞の誘導、幹細胞の維持

このような変遷でテロメア伸長酵素としてのヒトテロメラーゼ研究が進められてきたが、近年、テロメラーゼ研究の新たな流れが報告されるようになってきた。これまでもテロメラーゼにテロメア構造維持機構以外の機能が存在する可能性を示唆する報告はあったが⁽⁶⁾、中でも、前述したテロメラーゼ複合体の触媒サブユニットである TERT が iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell; 人工多能性幹細胞) の誘導や幹細胞の機能維持に関わるのではないかという報告が相次いだ⁽⁷⁻⁹⁾ (図 1)。

2009 年 Marion らは、マウスの体細胞から作製した iPS 細胞において、TERT の誘導とともにテロメア伸長が起こり、それが多能性の獲得と相関することを見いだした⁽⁷⁾。マウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) に Oct-3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子を導入することにより誘導した iPS 細胞、または c-Myc を除いた 3 因子を導入することにより誘導した iPS 細胞ではともにテロメラーゼの再活性化が見られ、iPS 作製の由来となった MEF よりもテロメア長が伸長していることが確認された。しかし、この iPS 細胞のテロメア長は、由来となった MEF のテロメア長よりは長いものの、遺伝的に同じ性質を有すると考えられている胚性幹 (ES) 細胞と比べると短いこと

が確認された。ところが、非常に興味深いことに、この iPS 細胞を培養し続けると ES 細胞とほぼ同等のテロメア長をもつようになることが確認されている。このことは、テロメア伸長反応の大部分はリプログラミング後に起こるということを強く示唆するものであり、iPS 細胞の未分化状態維持にテロメラーゼが関与していることが示唆される。

また彼らは、iPS 細胞の誘導にテロメラーゼ活性が必須であることを、テロメラーゼ活性に不可欠な RNA コンポーネントである TERC をノックアウトしたマウスを用いて解析した。まず、テロメア長が十分である第 1 世代の $Terc^{-/-}$ マウス由来の MEF から iPS 細胞を作製したところ、野生型 MEF を用いた場合と同等の効率で iPS 細胞が誘導できることを確認した。しかし、この第 1 世代 $Terc^{-/-}$ マウス由来の iPS 細胞ではテロメア伸長が見られなかったことから、iPS 細胞誘導後のテロメア伸長反応はテロメラーゼによるものだと推測することができる。さらに、前述のように第 1 世代の $Terc^{-/-}$ マウス由来の MEF から iPS 細胞を誘導することができた一方で、第 2・3 世代の $Terc^{-/-}$ マウス由来の MEF から iPS 細胞誘導を試みたが、その誘導効率は劇的に減少することが確認された。これらの結果は、テロメラーゼ活性のない MEF におけるテロメア短小化が iPS 細胞の誘導を抑制する原因であることを示唆している。しかし、iPS 細胞誘導効率が低い第 2 世代の $Terc^{-/-}$ マウスと $Terc^{-/+}$ マウスを掛け合わせた第 3 世代 $Terc^{-/+}$ マウス由来の MEF では iPS 細胞誘導効率は回復することが確認され、iPS 細胞の誘導効率はテロメラーゼ活性に依存することが強く示唆されている。

また、2005 年 Sarin らは、マウステロメラーゼの触媒サブユニットである mTERT を毛嚢のバルジ領域幹細胞に特異的に発現させることで、著しい体毛の成長を示すことを見いだした⁽⁹⁾。毛嚢は成長期 (anagen)、退行期 (catagen)、休止期 (telogen) を経て、バルジ領域幹細胞へのシグナル刺激によって休止期から成長期へと移行し体毛が合成される。TERT はこの休止期のバルジ領域幹細胞で機能し、毛嚢を速やかに成長期へと移行させ、体毛の顕著な成長をひき起こす。この現象にはテロメラーゼ活性に不可欠な TERC の存在が必要でないことから、TERT のテロメラーゼ活性以外の新規機能、とりわけ幹細胞機能維持における TERT の重要性が示された。さらに同じグループは、この体毛の顕著な成長が、TERT とクロマチンリモデリング複合体の構成因子である BRG1 による Wnt/ β -catenin/Myc シグナル伝達経路の活性化によるものであることを明らかにした^(10,11)。こ

れら一連の報告は、TERT がテロメア構造維持機能とは別に幹細胞機能制御に直接的に関わっていることを示した重要な報告といえる。同様の発見は同時期に他のグループからも報告されているが、一方はこの機能にテロメラーゼの RNA コンポーネントである TERC が必要であると主張し⁽⁸⁾、別のグループは幹細胞機能維持には TERC は必要なく、従来から知られるテロメラーゼ複合体の機能とは独立した機能であると主張している⁽⁹⁾。この点は非常に重要な問題であるが、現時点では明確な答えは出ていない (図 1)。また、mTERT ノックアウトマウスと mTERC ノックアウトマウスで同じ表現型が認められることから⁽¹²⁾、はたして TERT が TERC と独立した機能を本当に有するかどうかなお多くの議論があり、今後も引き続き解析が必要である。

このような背景のもと、近年 TERT の新規機能を制御する新たなパートナーの存在が示唆されている⁽¹³⁾。最近では、Fu らが TERT 複合体の精製を行ない、従来同定されていなかったタンパク質分子群を複体内に同定し注目されている⁽¹⁴⁾。これらのタンパク質群の中には、幹細胞機能維持に関わることが示唆される分子と近縁のタンパク質なども存在し、これらの生物学的な意義の解析は非常に興味深い。さらに TERC にかわり TERT と結合し得る RNA の同定の試みは、RNA を制御する TERT の新たな機能の発見につながった⁽¹⁵⁾。

■ テロメラーゼである TERT の新規機能の発見：RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして機能する hTERT

近年、RNA は遺伝子発現を多様なメカニズムで制御することが明らかとなってきた。その中核となる分子が二本鎖 RNA である。RNA サイレncing は 20~30 塩基長の小さな RNA による遺伝子発現抑制機構であるが、RNA サイレncing を起こす代表的な分子に siRNA (small interfering RNA) があり、内因性の siRNA は長鎖二本鎖 RNA の切断によって合成される^(16,17)。一本鎖 RNA を鋳型に二本鎖 RNA を合成する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RNA-dependent RNA polymerase: RdRP) は内因性 siRNA の合成に関わる重要な分子として植物や線虫、分裂酵母などのモデル生物での発現が知られていたが、哺乳類では RdRP の存在は立証されていなかった。TERT の新規機能について検討を行っていた筆者らは、TERT が系統遺伝学的⁽⁴⁾ および構造学的⁽¹⁸⁾ に RNA ウイルスの RdRP と近縁にあることに注目し、hTERT が RdRP として機能するのではないかと推測して解析を行なった。

まず、hTERC に代わる新規 hTERT 結合 RNA を検

図2 ■ hTERT-RMRP 複合体は RdRP 活性を有する (文献 15 より転載・改変)

過剰発現させた hTERT (A) および内源性 hTERT (B) の免疫沈降により hTERT と RMRP との結合が確認された. (C) hTERT を用いた *in vitro* RdRP assay によって 267 塩基の RMRP (センス鎖) から合成された長鎖ヘアピン型 RNA (矢印). 合成ヘアピン型 RNA は RMRP のセンス配列とアンチセンス配列をともに含み, RMRP の約 2 倍の長さを持つ.

索し, RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease) を同定した (図 2-A, B). RMRP は 267 塩基の snoRNA (small nucleolar RNA) に分類される non-coding RNA であり, 低身長を主症候とする遺伝子性疾患である軟骨毛髪低形成 (Cartilage and Hair Hypoplasia) の原因遺伝子であることが報告されている⁽¹⁹⁾. hTERT と RMRP との複合体の RNA 合成能について *in vitro* の解析を行なったところ, この複合体は長鎖 RNA の合成が可能であることがわかった (図 2-C). そこで hTERT と RMRP により合成される長鎖 RNA について詳細に検討した結果, hTERT は RMRP (センス鎖) を鋳型として RMRP の相捕鎖 (アンチセンス鎖) を合成し, 合成された RNA は長いヘアピン型の二本鎖 RNA であることがわかった. つまり, hTERT は一本鎖 RNA を鋳型に二本鎖 RNA を合成する RdRP 活性を有することが証明されたのである.

次に, 細胞内における hTERT の RdRP として機能について検討を行なった. hTERT と RMRP をともに発現している細胞から抽出した RNA を用いて行なったノーザンブロッティングにより, 細胞内にも RMRP のセンス鎖 + アンチセンス鎖からなる長鎖ヘアピン型 RNA の存在が確認された (図 3-A). さらに, RMRP のアンチセンス鎖合成は, hTERT の発現のある細胞でのみ認められることがわかった. これらより, hTERT は細胞内でも RdRP 活性により RMRP のアンチセンス鎖を合成していることが示唆された.

さらに, hTERT がもつ RdRP 活性の生物学的意義を考える上で, 興味深い現象が見つかった. ウイルスベクターを用いて RMRP の過剰発現を試みたところ, hTERT の発現のある細胞でのみ RMRP の細胞内総発現量が減少したのである (図 3-B). さらに, hTERT の発現のない細胞に hTERT を導入すると RMRP の発現は減り, 逆に hTERT を発現している細胞でその発現を抑制すると RMRP 発現量が増加した. これらの結果は, hTERT が RMRP に対し転写後抑制をかけている可能性を示唆していた. 前述のように, RNA サイレncing の主体は長い二本鎖 RNA から切り出された 20~30 塩基長の短い二本鎖 RNA である. そこで, hTERT の RdRP 活性によって合成された RMRP 由来の長鎖ヘアピン型 RNA も機能性の短い二本鎖 RNA へと切断されているのではないかと考え検討したところ, 細胞内に RMRP に由来する 22 塩基の短い二本鎖 RNA が存在することを突き止めた (図 3-C). この短い二本鎖 RNA は長鎖二本鎖 RNA を切断する Dicer に依存して発現しており, RNA サイレncing を起こす際に結合する AGO 2 タンパク質とともに存在していることが確かめられた. 以上の結果, テロメラー逆転写酵素として知られた hTERT はテロメラーとは異なる RdRP 活性を有し, 長鎖ヘアピン型 RNA の合成とそれに引き続く内因性 siRNA の合成を介して RNA サイレncing に関与することが立証されたのである (図 3-D).

図3 ■hTERT の RdRP 活性と RNA サイレncing (文献 15 より転載・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) hTERT が仲介する RNA サイレncing のモデル。 hTERT は RdRP 活性により RMRP の相補鎖を合成。 合成されたヘアピン型二本鎖 RNA を Dicer が切断。 切り出された内在性 siRNA は hAGO2 に取り込まれ、 相補的な配列をもつ RNA の発現を抑制

おわりに

テロメラーゼとしての hTERT はこれまでも分子標的医療や再生医療分野などで臨床応用に向けた様々な研究がなされてきたが、テロメラーゼが新たな機能を有するとすれば、多くの新知見が得られるはずである。今回、hTERT の新規機能として RdRP 活性を見いだしたことにより、癌細胞内での選択的な siRNA 合成技術や RNA の増幅技術など新たなアイデアが創出される可能性がある。

(おわり)

文献

- 1) C. W. Greider & E. H. Blackburn : *Cell*, **43**, 405 (1985).
- 2) G. B. Morin : *Cell*, **59**, 521 (1989).

- 3) C. W. Greider & E. H. Blackburn : *Nature*, **337**, 331 (1989).
- 4) T. M. Nakamura *et al.* : *Science*, **277**, 955 (1997).
- 5) M. Meyerson *et al.* : *Cell*, **90**, 785 (1997).
- 6) S. A. Stewart *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12606 (2002).
- 7) R. M. Marion *et al.* : *Cell Stem Cell*, **4**, 141 (2009).
- 8) I. Flores *et al.* : *Science*, **309**, 1253 (2005).
- 9) K. Y. Sarin *et al.* : *Nature*, **436**, 1048 (2005).
- 10) J. Choi *et al.* : *PLoS Genet*, **4**, e10 (2008).
- 11) J. I. Park *et al.* : *Nature*, **460**, 66 (2009).
- 12) X. Yuan *et al.* : *Genes Cells*, **4**, 563 (1999).
- 13) E. H. Blackburn : *Nature*, **436**, 922 (2005).
- 14) D. Fu & K. Collins : *Mol. Cell*, **28**, 773 (2007).
- 15) Y. Maida *et al.* : *Nature*, **461**, 230 (2009).
- 16) K. Okamura *et al.* : *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**, 673 (2008).
- 17) H. Siomi *et al.* : *Nature*, **457**, 396 (2009).
- 18) A. Gillis *et al.* : *Nature*, **455**, 633 (2008).
- 19) M. Ridanpaa *et al.* : *Cell*, **104**, 195 (2001).