

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07667

研究課題名（和文）骨髄性白血病関連非コードRNA CCDC26の機能解析と新規がん治療標的の探索

研究課題名（英文）Functional analysis of CCDC26, a noncoding RNA related to myeloid leukemia, and search of a target for treatment of tumor

研究代表者

平野 哲男（Hirano, Tetsuo）

広島大学・統合生命科学研究科（総）・助教

研究者番号：50228805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：CCDC26と相互作用するタンパク質を解析した結果、これらはVimentin（細胞骨格タンパク質）、HNRNPC（スプライシング関係RNA結合タンパク質）、CBX1（ヘテロクロマチン関連タンパク質）であることがわかり、特異的抗体を用いた免疫プロットングによってもこのことが確認された。VimentinとCCDC26RNAの特異的な結合をRNA免疫沈降法により確認した。結合に必要なRNA配列を同定するため、RNAを三つの領域に分け、Vimentinとの試験管内結合実験を行った結果、CCDC26-RNA全長のうち、428-1076領域にVimentinとの結合領域が存在することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞局在の異なる複数のタンパク質と相互作用する単独で様々な機能を有する多機能lncRNAであると考えられるが、我々が知る限り、これまでにそのようなlncRNAの概念はまだ提唱されておらず、この点で大きな学術的な意義がある。また、lncRNAによるがん関連遺伝子及びグロビタンパク質群の発現制御に関する知見は、基礎から臨床応用に至るまで、与える影響は大きい。非コードRNA CCDC26による遺伝子発現制御機構がいつそう明らかにすることにより、白血病治療及び異常ヘモグロビン症の治療戦略に役立つ可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Analysis of proteins that interact with CCDC26 revealed that these were identified as Vimentin (a cytoskeletal protein), HNRNPC (splicing-related RNA-binding protein), and CBX1 (heterochromatin-associated protein). Specific binding of Vimentin and CCDC26 RNA was confirmed by RNA immunoprecipitation. In order to identify the RNA sequence required for binding, three separate regions of CCDC26 RNA were tested for their ability to bind in vitro to Vimentin protein. As a result, the region of 428-1076 base of CCDC26-RNA is found to bind to Vimentin protein.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：非コードRNA 骨髄性白血病細胞 遺伝子発現調節 グロビン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

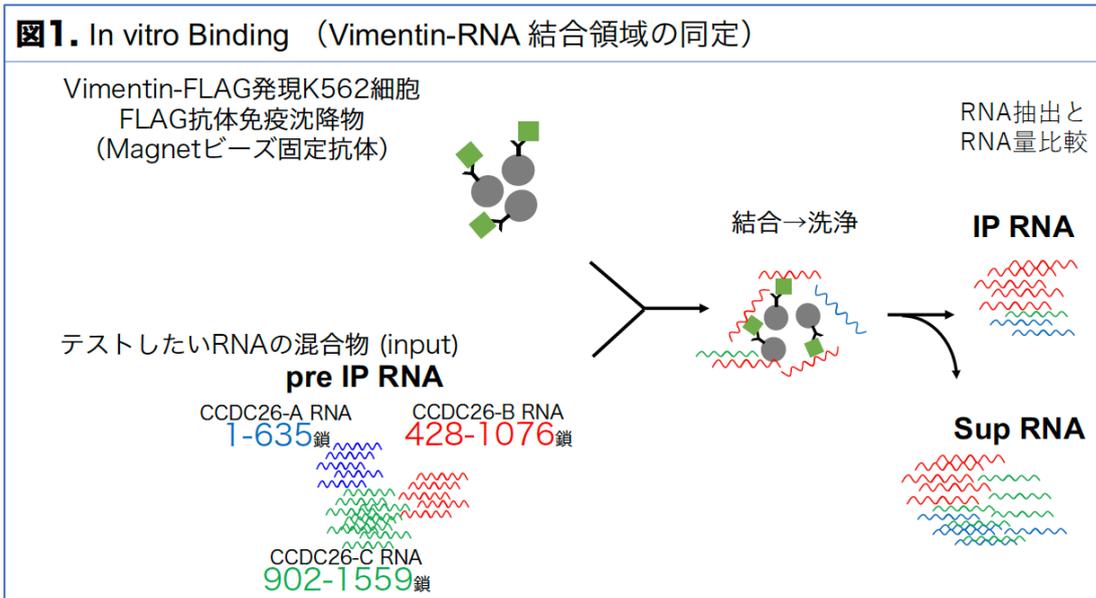
CCDC26 は小児期急性骨髄性白血病の患者群をゲノム規模で網羅的に調査した中で、コピー数変動の見られる遺伝子のトップにランクされる遺伝子である。また SNP 解析によりグリオーマ（神経膠腫）との、生検試料の解析によりすい臓がんや消化器がんとの関連も示されている。CCDC26 遺伝子の構造あるいは発現の異常が疾患と関連していることについては多くの知見が蓄積しており、CCDC26 遺伝子産物が細胞のがん化における具体的な役割を明らかにすることが必要になっている。一方、CCDC26 遺伝子は、マウスなど他の生物種との間で保存性が見られるものの、機能性のタンパク質はコードされておらず、長鎖非コード RNA (lncRNA) の一種であると考えられる。lncRNA とはアミノ酸配列をコードせず、それ自身で機能する鎖長 200 bp 以上の RNA である。

2. 研究の目的

骨髄性白血球細胞系譜において様々な作用を持つ lncRNA CCDC26 の作用機作を明らかにし、研究が遅れている lncRNA の細胞増殖や細胞分化における意義を明らかにすることを目的とする。また、lncRNA の制御を利用した難病治療の可能性について追求する。

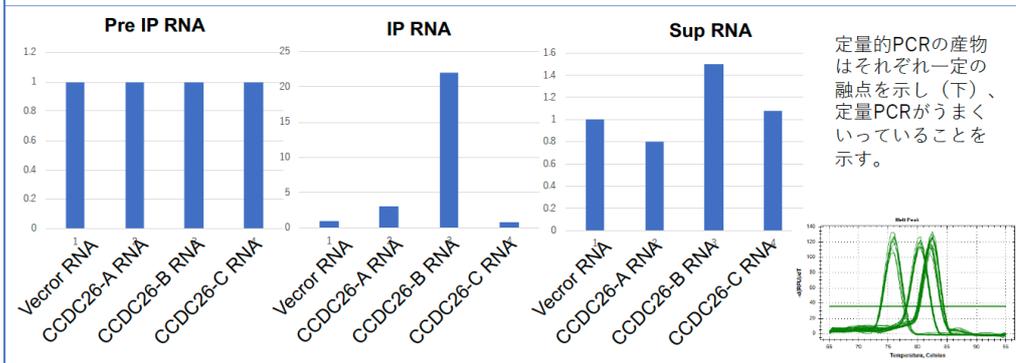
3. 研究の方法

ストレプトアビジン結合アプタマー配列をタグとして付加した目的転写物を発現ベクターに組み込み、K562 細胞に強制発現させ、UV 照射によりクロスリンクした。細胞を破砕し、ストレプトアビジンビーズによるプルダウンを行い、目的の RNA-タンパク質複合体を解析した。次に同定されたタンパク質に対する、CCDC26-RNA の配列特異性を試験管内結合実験により行った。すなわち、Vimentin と CCDC26RNA の特異的な結合を RNA 免疫沈降法により確認した。結合に必要な RNA 配列を同定するため、RNA を三つの領域に分け、Vimentin との試験管内結合実験を行った (図 1)。



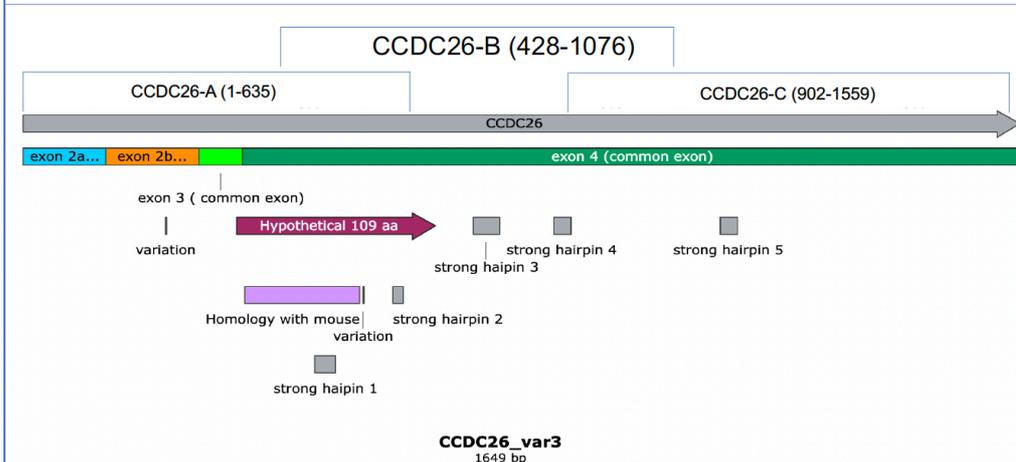
その結果、CCDC26-RNA 全長のうち、428-1076 領域に Vimentin との結合領域が存在することがわかった (図 2)。

図2. Vimentin-FLAG IP RNA



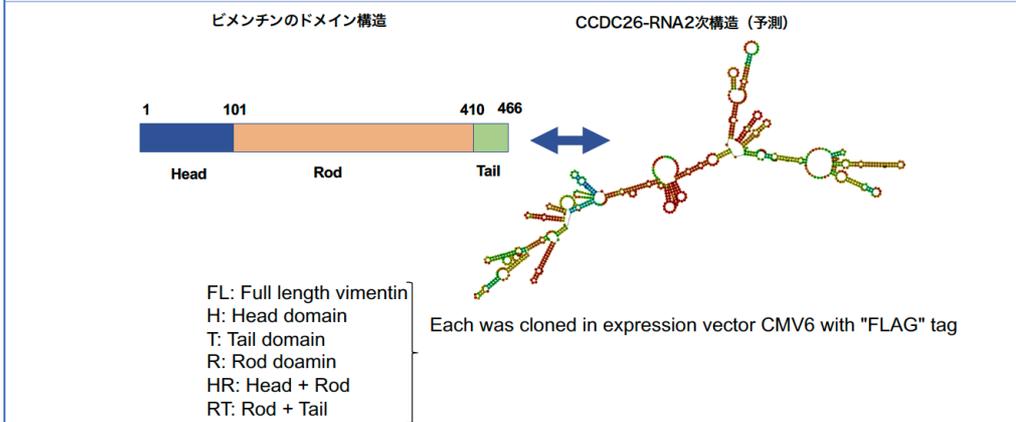
この領域は強い二次構造であるヘアピン構造を多く含み、これらの二次構造が特異的な結合に責任があることが示唆された（図3）

図3. Truncated CCDC26 RNAs



次に Vimentin 側の相互作用責任領域を同定するため、ドメイン構造を特徴的な3つのドメイン（Head、Rod、Tail）について、これらの領域を含むタンパク質を発現ベクターに組み込み、検出と結合実験のための FLAG タグを付加した（図4）。

図4. CCDC26-RNAの高次構造とタンパク質ドメイン構造の相互作用を調べる



これらのタンパク質を K562 細胞に導入し、発現させたところ、VIM-FL (Vimentin 全長)、VIM-R (Rod 部分)、VIM-HR (Tail 部分欠失)、VIM-RT (Head 部分欠失) について、強い発現が確認できた (図 5)。

VIM-T (Tail 部分のみ)、VIM-H (Head 部分のみ) については発現が確認できなかった。これらの細胞抽出液を、FLAG 抗体-Magnetic beads に結合させたところ、特異的にタンパク質が結合できていることがわかった (図 6) 各タンパク質-FLAG 抗体複合体を使い、全長 CCDC26 を試験管内で結合実験を行ったところ、特異的な結合が見られた (図 7)。

しかしながら、この条件下では、非特異的な結合も顕著に見られた (図 8)。Vimentin 各欠失変異と CCDC26 部分 RNA を用い、検討したところ、CCDC26 がどの変異とも結合するように見える結果が得られたが、Vimentin 全長タンパクと同様、CCDC26 の非特異的な結合が観察され、

この非特異的な結合を抑制する条件の検討が必要となった。非特異的な結合を抑えるため、結合反応時に無関係のタンパク質であるウシ血清アルブミンタンパク質を加えたところ、これが抑えられ、この条件が適していることがわかった (図 9)。

図5. Expression of Truncated Vimentin-FLAG in K562 Cells

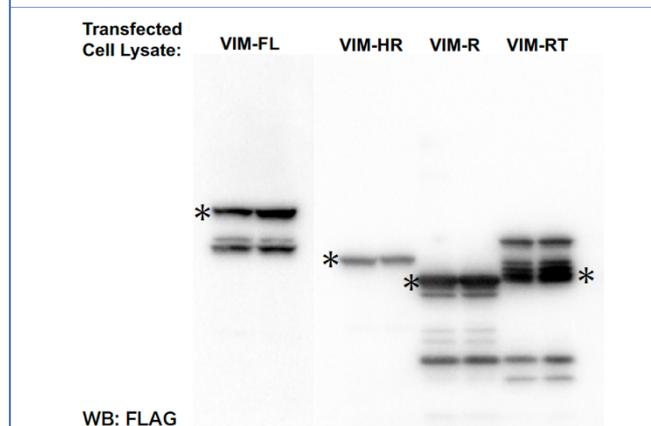


図6. FLAG-IP Truncated Vimentin Cell Lysate

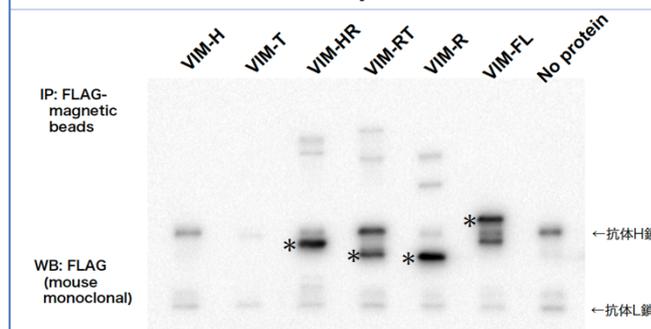


図7. Interaction between FL Vimentin and Full Length CCDC26 RNA

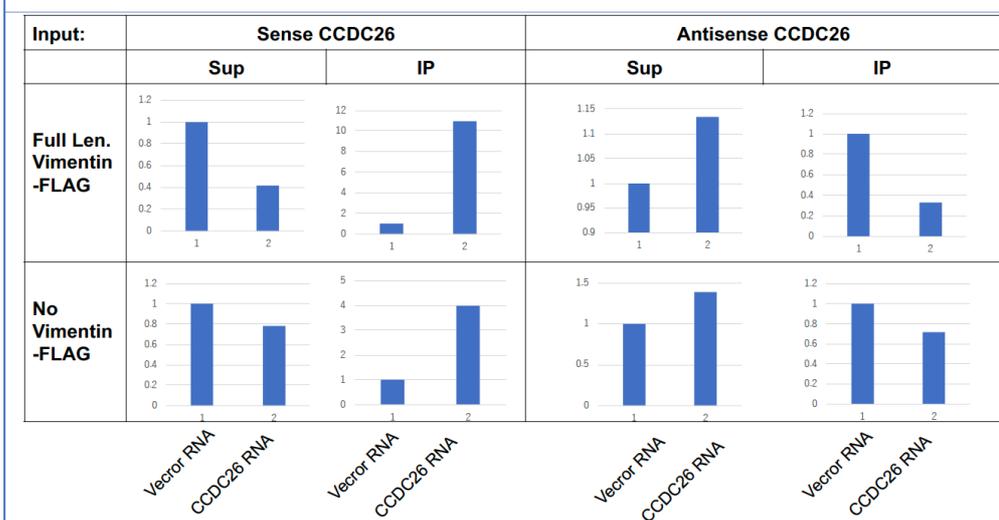


図8. Binding of Vimentin domain CCDC26 RNA Regions

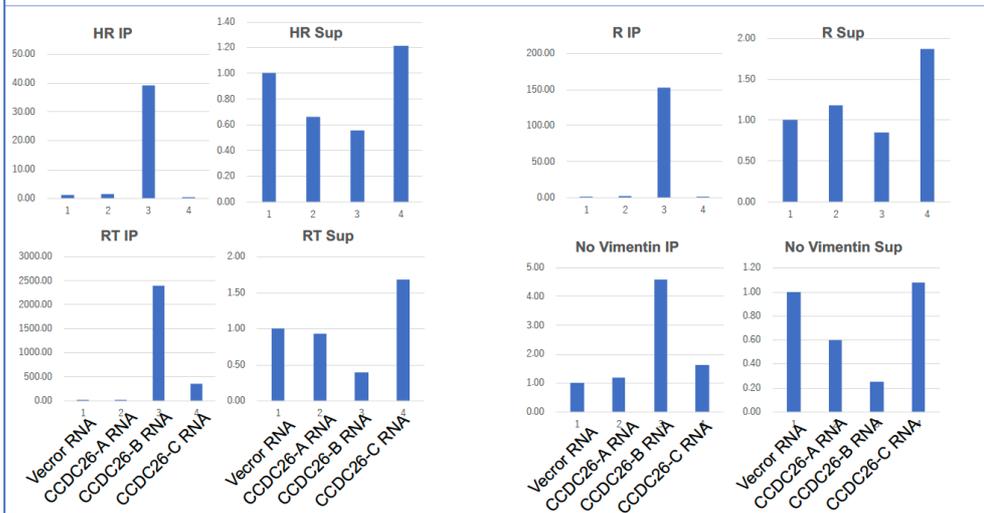
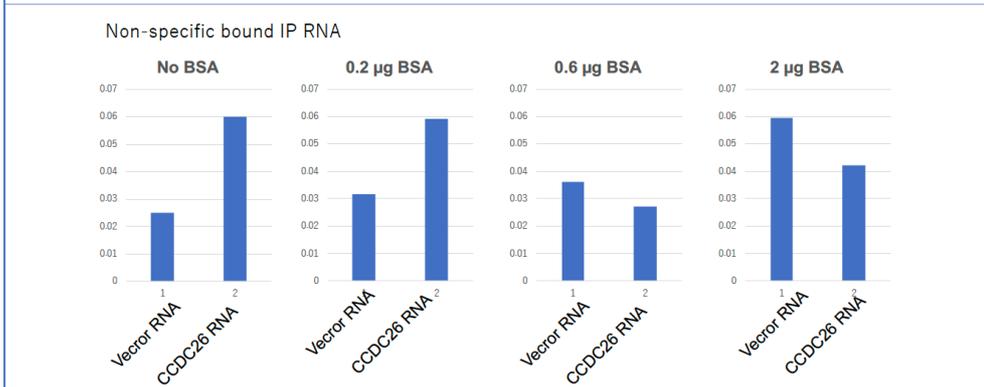


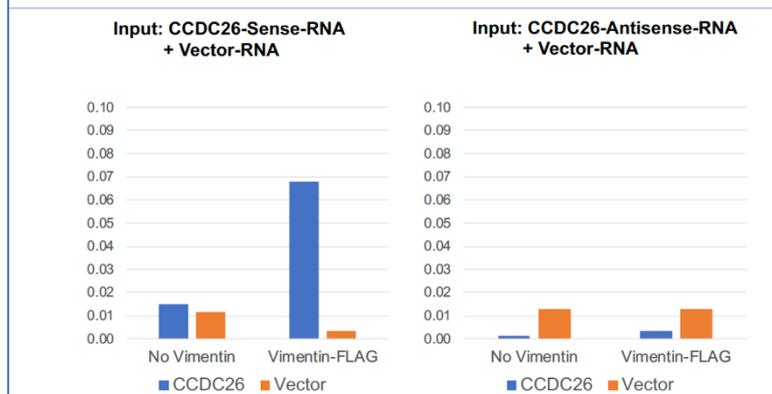
図9. Suppression of Non-specific CCDC26-Vimentin Binding with BSA



この条件下で改めて、Vimentin と CCDC26 の結合実験を行ったところ、特異的な結合だけを観察することに成功した (図 10)。

現在、特異的な結合に寄与する RNA 側およびタンパク質側の配列について、より確証性の高い結果を得た上で、発表するために準備中である。また、Vimentin 以外の CCDC26 結合タンパク質である CBX1、HNRNPC を Vimentin と同様に発現ベクターへのク

図10. RNA-IP Vimentin-FLAG/CCDC26-FL (New condition)



ローニングが完了し、同様実験を行い、これらの結果から CCDC26-RNA による細胞機能の調整機構について議論し、この成果も順次発表する。

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 1件）

1. 著者名 Hirano, T., Tsuruda, T., Tanaka, Y., Harada, H., Yamazaki, T., Ishida, A.	4. 巻 1868
2. 論文標題 Long noncoding RNA CCDC26 as a modulator of transcriptional switching between fetal and embryonic globins.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 118931
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2020.118931	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野哲男、鶴田智美、田中佑佳、原田 浩徳、山崎岳、石田敦彦
2. 発表標題 長鎖非コードRNA CCDC26の胚性、胎児性間グロビン転写切り替え調節因子としての役割
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021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
研究分担者	原田 浩徳 (Harada Hironori) (10314775)	東京薬科大学・生命科学部・教授 (32659)	
研究分担者	山崎 岳 (Yamazaki Takeshi) (30192397)	広島大学・統合生命科学研究科（総）・教授 (15401)	
研究分担者	根平 達夫 (Nehira Tatsuo) (60321692)	広島大学・統合生命科学研究科（総）・准教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	石田 敦彦 (Ishida Atsuhiko) (90212886)	広島大学・統合生命科学研究科（総）・教授 (15401)	

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