

研究題目 VIKING 法による高効率ゲノム編集を利用したパイオニア因子に関する LLPS 関連因子のスクリーニング

研究組織

研究代表者：横山 敦（東北大学大学院医学系研究科）

共同研究者：沢津橋 俊（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

核内受容体をはじめとする転写因子はそれぞれコンセンサス配列と呼ばれる特異的な DNA 配列に結合するが、実際の染色体上での転写因子の結合サイト数はゲノム配列からのコンピューター予想と比較して圧倒的に少ないことが知られている。これは転写因子が染色体上に結合する際に、そのクロマチン環境に影響を受けるためと解釈されている。このクロマチン環境を転写因子が結合できるように整える機能を持ったタンパク質の一群は“パイオニア因子”と呼ばれ、転写因子による時空間特異的な遺伝に発現制御を規定していると考えられる。核内受容体アンドロゲン受容体（AR）は前立腺での過剰活性化が前立腺癌増悪と関連していることがよく知られているが、骨格筋における AR の組織特異的制御のメカニズムについてはほとんど知られていない。このことはサルコペニアの治療法開発のために重要な知見となると考えられる。

本研究では、沢津橋博士との共同研究において骨格筋細胞の AR パイオニア因子取得のために、まず複合体精製・同定技術により細胞内での相互作用因子を網羅的に同定する。そして、得られた候補因子群について、それぞれ沢津橋博士の開発した VIKING 法による高効率ゲノム編集によりノックアウト細胞ライブラリーを樹立し、アンドロゲン応答能および沢津橋博士が評価系を有している OptoDroplet 法による LLPS 形成能を網羅的に評価する。以上の実験から、本研究題目ではパイオニア因子の LLPS 形成に関与する因子を同定することを目的とす

る。

[1-2] 研究の方法・経過

マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を用いて、アンドロゲン受容体の安定発現株を樹立した。この C2C12-AR 細胞を筋管細胞へと分化させ、アンドロゲンであるジヒドロテストステロン（DHT）への応答能があることをまず qPCR と ChIP アッセイにて確認を行った。

続いて、分化させた C2C12-AR 細胞を材料に、AR に結合する因子を RIME 法を用いて網羅的に精製・同定した。その結果 472 の結合候補因子を同定することに成功した。これらの中から、パイオニア因子の可能性がある DNA 結合性転写因子を探索すると、19 因子の候補を抽出することができた。これらの因子群に関して、それぞれ VIKING 法を利用したゲノム編集により遺伝子欠損 C2C12-AR 細胞株を樹立しており、アンドロゲン応答能の評価を進めている。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

これまでほとんど明らかになっていなかった、骨格筋細胞における AR のパイオニア因子の候補を得ることができた。また、これらに加えて骨格筋細胞における AR の転写共役因子候補群も得ることができた。これらは全て新規の知見となる。

今後、これらの候補因子の中から、骨格筋特異的な AR 標的遺伝子の制御に重要な因子を絞り込んでいくことで、核内受容体の組織特異的な転写制御の詳細な分子メカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発

展性

本年度の研究期間では、得られた候補因子群それぞれに対する遺伝子欠損細胞株を全て樹立するには至らなかったが、本研究課題を継続することで目的のパイオニア因子の同定へと至ることが可能と考えている。

また、今回の共同研究から得られた候補因子群のなかには IDR を有し相分離に関与する可能性のある因子も複数取得することができた。これらについては、今後沢津橋博士が行っている OptoDroplet 法により相分離能の有無の評価を行い、LLPS に関与するパイオニア因子の同定へと繋げていきたい。上述のように、VIKING 法や OptoDroplet 法について連携して研究することで本研究計画がより進展する可能性を大きくすることができ、非常に有意義な共同研究であった。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

- 1) ESS2 controls prostate cancer progression through recruitment of chromodomain helicase DNA binding protein 1.

Takahashi S, Takada I, Hashimoto K, Yokoyama A, Nakagawa T, Makishima M, Kume H.
Sci Rep. 2023 Jul 31;13(1):12355.

- 2) ステロイドホルモン研究における組織学的アプローチ

鈴木貴, 山崎有人, 岩渕英里奈, 横山敦, 高木清司, 三木康宏
組織細胞化学 2023 (日本組織細胞化学会)、197-206、(2023)

- 3) 新たなアンドロゲン受容体制御因子を求めて

横山敦、瀬瀬拓海、菅原明
日本アンドロロジー学会ニュースレター、No. 26、(2023)

[3-2]学会発表

なし

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後に関しては、取得された因子群のなかから骨格筋細胞における AR のパイオニア因子の同定することを最優先に考えている。そのためは、候補因子群のゲノム編集により遺伝子欠損細胞株の樹立を引き続き継続し、アンドロゲン応答の評価することで絞り込みを行うことが必要であると考えられる。

また、IDR を有する遺伝子に関しては、OptDroplet 法による相分離能の評価へと進めていく。