

<研究の背景>

ユーイング肉腫は、小児や10代の若年性の骨及び軟部組織に発生する腫瘍であり、悪性度が高く、転移頻度も共に高い。がん化の原因として、染色体の相互転座による転写活性化部位を持つ EWS 遺伝子と DNA 結合部位を持つ FLI1 遺伝子のキメラがん遺伝子 EWS-FLI1 が 85%以上の症例で検出される。EWS-FLI1 は GGAA 繰返し配列と結合することで、特定の遺伝子の転写制御するメカニズムが近年明らかになり、がん遺伝子による転写活性化機構については解明が進んでいる。しかし、有効な抗癌治療法は開発されていないのが現状である。

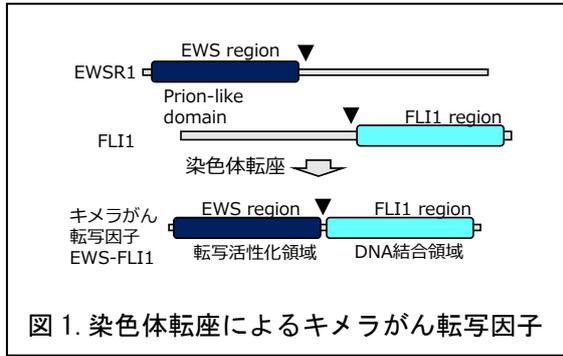


図 1. 染色体転座によるキメラがん転写因子

転写因子を標的とした分子標的薬の開発は困難であり、EWS-FLI1 と相互作用する分子に着目した間接的な標的薬として、Parp1 阻害剤やスーパーエンハンサーに対する BET 阻害剤 (Brenner JC *et al.* 2012, Jacques C *et al.* 2015)が開発されている。直接がん遺伝子を阻害する分子標的薬よりも、相互作用するタンパク

質の機能を抑制することで抗腫瘍効果を期待する研究が進んでいる。申請者は、タンパク質相互作用を網羅的に同定する方法として、BioID 法 (Roux KJ *et al.* 2012)に着目し、EWS-FLI1、EWS-ERG、EWS-E1AF、3種類のキメラがん転写因子に共通するタンパク質を同定している。それらの中から、AHDC1 という機能未知遺伝子に着目し、AHDC1 が EWS-FLI1 の転写活性や細胞増殖に関与していることを明らかにしている(論文投稿準備中)(図2)。

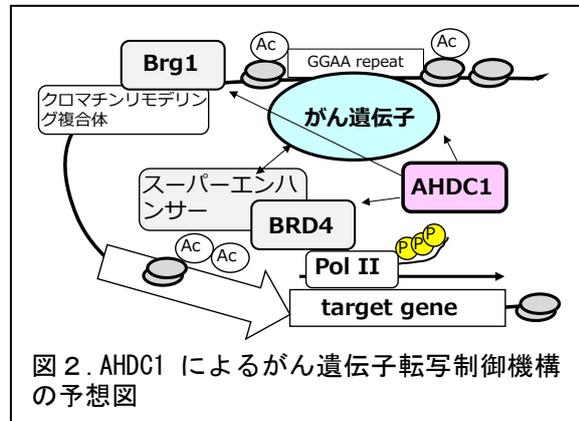


図 2. AHDC1 によるがん遺伝子転写制御機構の予想図

<研究の目的>

AHDC1 は一部 DNA polymerase と同源性がある領域が存在する。しかし、全体の構造は alphafold による構造予測においても disordered となっているために、明確な機能ドメインが不明である。よって、現在のところ AHDC1 の分子機能からがん遺伝子の転写活性制御機構が推定できない。現在得ている結果では、AHDC1 は BRD4 はがん遺伝子と相互作用を形成するスーパーエンハンサーBRD4 と共局在することから、AHDC1 もスーパーエンハンサーの一部であることが予想される(論文投稿準備中)。スーパーエンハンサーは、ユーイング肉腫を含めてがん遺伝子が形質転換をおこす原因の一つであることが分かっており、AHDC1 がスーパーエンハンサーの一部であることが解明できれば、他のがんの分

子メカニズムの解明にもつながる。また、AHDC1 は、発達遅延、低血圧、知的障害、発作を特徴とする Xia-Gibbs syndrome の原因遺伝子であるので、AHDC1 の分子機能を明らかにすることができれば、疾患解明の手助けにもなりうる。本研究課題では、AHDC1 の分子実態の全体像を明らかにし、ユーイング肉腫でのがん遺伝子の転写活性制御機構の役割の解明を目指す。

〈研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか〉

ユーイング肉腫での AHDC1 の関与する分子実態を明らかにするためには、どのような分子が介在し AHDC1 の機能を維持、制御しているのかを知る必要がある。本申請課題では、オミックス技術を使い、以下の計画で AHDC1 の機能を明らかにする(図3)。

(計画1) : miniTurboID 法による AHDC1 複合体の同定

同定する AHDC1 の相互作用分子から AHDC1 の機能を推定する。

(計画2) : AHDC1 による遺伝子制御機構の解析

AHDC1 発現抑制時に変化する遺伝子の pathway 解析から AHDC1 の機能に関与する機能を明らかにする。

(計画3) : 間葉系幹細胞を用いたユーイング肉腫の再現、AHDC1 複合体の役割の解明

ユーイング肉腫に形質転換する過程で AHDC1 及びその機能複合体が機能する役割を明らかにする。

本計画により、AHDC1 と相互作用する分子及び関連する複合体の機能および遺伝子制御機構を明らかにし、ユーイング肉腫の形質転換機構への関与について解明する。

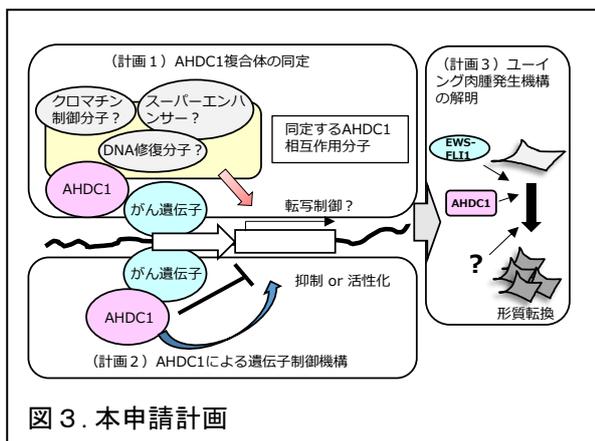


図3. 本申請計画

〈本年度の研究計画〉

(計画1) : miniTurboID 法による AHDC1 複合体の同定

〔目的〕 AHDC1 はその酵素活性、作用する複合体などが全くの未知のため、ターゲットとなるような機能が推定できない。AHDC1 と複合体を形成するタンパク質を AHDC1 側から探索し、同定する既知の複合体から機能を推定する(図4)。

〔方法〕 AHDC1 複合体の同定を BioID タグの分子進化版である miniTurboID 法で行う (Branon TC et al. 2018)。miniTurboID タグを AHDC1 の N 末及び C 末端側へ融合し、piggybac system でゲノムへ導入する。遺伝子発現は tet-on system で発現させ、ビオチンを培地へ添加後、AHDC1 隣接タンパク質をビオチン化する。ビオチン化タンパク質を Streptavidin で回収・精製し、共同研究者

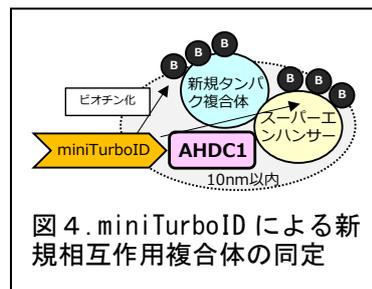


図4. miniTurboID による新規相互作用複合体の同定

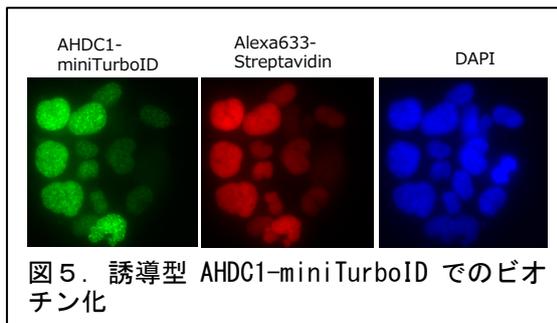


図5. 誘導型 AHDC1-miniTurboID でのビオチン化

の荒木令江(熊本大学)に質量分析装置で解析する。miniTurboID は AHDC1 の N 末端および C 末端に融合させ、融合する位置による同定されるタンパク質を網羅するようにする。すでに、一部の株は作製済みで、ビオチン添加で核内のタンパク質のビオチン化が生じることを確認している(図5)。Xia-Gibbs syndrome では、フレームシフト変異によるタンパク質合成欠損だけでなく、一アミノ酸変異の AHDC1 変異も存在する。患者由来の AHDC1 変異は AHDC1 の何らかの機能を欠失していると予想されるので、一アミノ酸変異 AHDC1(D607N)(G792R)も解析を行う。野生型、変異型の相互作用タンパク質を同定することで、AHDC1 の機能を推定し、相互作用試験などの検討を行う。

### 〔計画 2〕: AHDC1 による遺伝子制御機構の解析

〔目的〕 AHDC1 の発現抑制は、EWS-FLI1 タンパク量の低下及びターゲット遺伝子発現量の低下を起こすことから、AHDC1 ががん遺伝子の転写制御機構の一端を担っている可能性がある。そこで、AHDC1 を発現低下させた後、RNAseq で変化する遺伝子を網羅的に探索する。

〔方法〕 AHDC1 siRNA あるいは FLI1 siRNA を A673 細胞へ導入し、次世代 DNA シークエンサーで発現量を定量する。両遺伝子で共通して発現が低下する遺伝子を抽出し、共通のメカニズムの解明を行う(図6)。

共通遺伝子の抽出後、過剰発現または発現抑制による mRNA の定量 PCR 及びウエスタンブロッティングによる解析を行い、がん遺伝子の転写制御機構との関連を調べる。

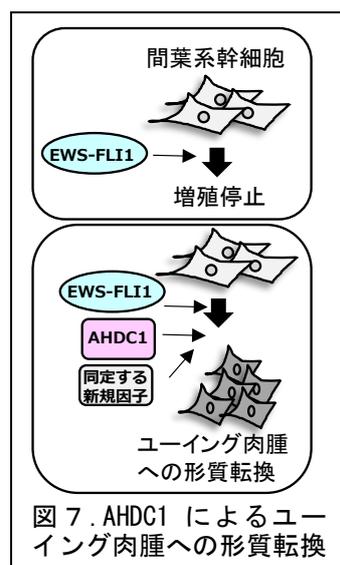
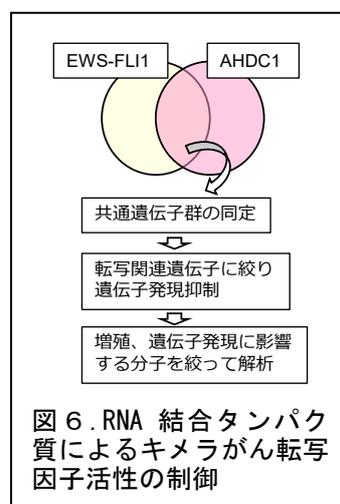
### 〔計画 3〕: 間葉系幹細胞を用いたユーイング肉腫の再現、AHDC1

#### 複合体の役割の解明

〔目的〕 ユーイング肉腫細胞の起源細胞が胎児期のマウスの関節表面組織であることが近年示された (Tanaka M. et al. 2015) が、ヒトでの再現実験は行われていない。本研究課題の AHDC1 及び同定する因子が、ユーイング肉腫発生のイニシエーターである可能性を検証するために、間葉系幹細胞での構築を試みる(図7)。

〔方法〕 間葉系幹細胞でキメラがん転写因子を発現させても形態はユーイング肉腫様になるが増殖停止が起こることが報告されている。本研究課題の AHDC1 及び(計画 1 及び 2) で同定する新規分子を同時に間葉系幹細胞へ導入し、レンチ-tet-on システムでがん遺伝子を発現させ、ユーイング肉腫への形質転換が起こるかどうかを調べる。うまくいかなかった場合、ヒト iPS 細胞から軟骨組織へ誘導し、軟骨表面細胞及び内部の細胞でキメラがん転写因子を発現させ、ユーイング肉腫への形質転換効率を調べ、AHDC1 及び同定する因子がユーイング肉腫発生前に寄与するのかどうかを解析する。

#### 〈これまでの実績〉



### ①新型コロナウイルス抗体検査での(2020～2022)

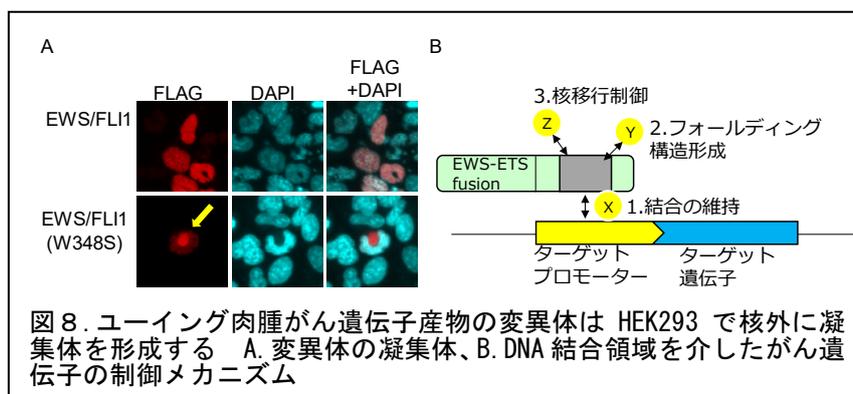
(研究内容) 2020年の新型コロナウイルス発生に伴い、北海道地域全体の新型コロナウイルス感染に対する地域への貢献のため、札幌市及びオーソ・クリニカル・ダイアグノスティックスとも共同体制を構築し、1000例以上の抗体検査を実施した。

(得られた成果) 北海道地域の病院、介護施設、飲食店、本学教職員・学生の安全に寄与した。解析結果の一部を論文として報告した (Takao Kitagawa, Yasuhiro Kuramitsu, Kouji Nakagawa, Tohru Ohta, Kozo Akino, Masahiro Asaka, Masanobu Kobayashi, Antibody response to BNT162b2 mRNA vaccine in healthcare workers and residents in a long-term care facility. Geriatrics & gerontology international 22(2) 179-181 2022、Takao Kitagawa, Masanobu Kobayashi, Tohru Ohta, Masaru Terasaki, Yoko Tsukamoto, Rie Takai, Reika Ishizumi, Osamu Uehara, Koji Nakagawa, Kozo Akino, Masahiro Asaka, Yasuhiro Kuramitsu, Nine Cases of SARS-CoV-2-PCR-positive Samples Showed No Increase of Antibodies Against SARS-CoV-2. IN VIVO 35(5) 2947-2949 2021)。

### ②酵母でのユーイング肉腫がん遺伝子の解析(2011～2015)

(研究内容) 小児がんの一種であるユーイング肉腫は予後不良のがんであり、染色体の転座により生じる融合遺伝子が異常な転写因子となる。しかし、希少ながんであり研究が進んでいないため、出芽酵母を使い癌遺伝子の解析をした。

(得られた成果) EWS-ETS がん転写因子を酵母で遺伝学的に解析し、最も重要な領域は DNA 結合ドメインであることを明らかにした。さらに HEK293 細胞において一部の変異体を発現させると、核外で巨大な凝集体を形成することから、DNA 結合ドメインに相互作用するタンパクが安定性や核移行を制御し、がん転写因子の機能を制御する可能性を示すことができた (Kitagawa T\*, Okita H, Baron B, Tokuda K, Nakamura M, Wang Y, Akada J, Hoshida H, Akada R, Kuramitsu Y, Nakamura K. Mutant screening for oncogenes of Ewing's sarcoma using yeast. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 6737-6744, 2015. 図8)。



### ③タンパク質生産向上させるターミネーター配列とそのトランス因子の同定(2011~2017)

**(研究内容)**株式会社豊田中央研究所との共同研究で出芽酵母のタンパク質高生産に関わる *DIT1* 遺伝子のターミネーターを同定しており、そのトランス因子を同定するために出芽酵母全遺伝子の過剰発現ライブラリーを使って探索した。

**(得られた成果)**高活性ターミネーターである *DIT1* 遺伝子の

ターミネーターは、polyA 結合タンパク質である *PAP1* と RNA 結合タンパク質 *NAB6* がトランス因子であることが分かり、その結合モチーフを同定することに成功した (Ito Y+, Kitagawa T+, Yamanishi M, Katahira S, Izawa S, Irie K, Furutani-Seiki M, Matsuyama T. Enhancement of protein production via the strong *DIT1* terminator and two RNA-binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, Scientific Reports, 6, 36997, 2016. 図9)。この研究で特許申請を1件行った。

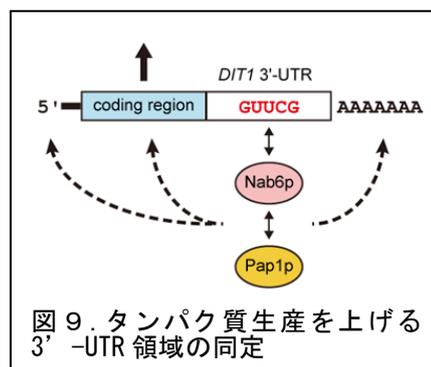


図9. タンパク質生産を上げる3'-UTR領域の同定

### ④セルロースを炭素源としたバイオエタノール生産の基礎研究(2007~2010)

**(研究内容)**バイオエタノール生産用の実用酵母の開発を行った。酵母のみでセルロースを分解するセルラーゼ分解酵素生産とエタノール生産を同時に行う consolidated bioprocessing を実現するために、酵母でのタンパク質分泌能力を向上させるための遺伝子の同定を行った。また、

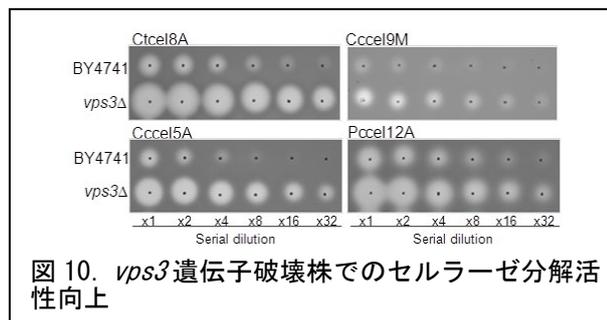


図10. *vps3* 遺伝子破壊株でのセルラーゼ分解活性向上

また、実用に耐える耐熱性酵母として *Issatchenkia orientalis* に対する遺伝子導入法の開発及びセルラーゼ生産を可能とした。

**(得られた成果)**55 種の新規外来タンパク質分泌抑制遺伝子の同定及び多重遺伝子破壊株の作製によってエンドグルカナーゼ活性を4倍以上上げることができた (Kitagawa T\*, Kohda K, Tokuhiko K, Hoshida H, Akada R, Takahashi H, Imaeda T. Identification of genes that enhance cellulase protein production in yeast. Journal of Biotechnology 151, 194-203, 2010. 図9)。また、耐熱性酵母での遺伝子導入系の確立をし、高温でのセルロース分解によるエタノール生産に成功した (Kitagawa T\*+, Tokuhiko K+, Sugiyama H, Kohda K, Isono N, Hisamatsu M, Takahashi H, Imaeda T. Construction of a beta-glucosidase expression system using the multistress-tolerant yeast *Issatchenkia orientalis*. Applied Microbiology and Biotechnology 87, 1841-1853, 2010. 図10)。これらの研究で3件の特許申請を行った。