

2024 年度年次報告書
生命現象と機能性物質
2024 年度採択研究代表者

青木 一成

京都大学 医生物学研究所
助教

転写ネットワークを介したステムネス制御機構

研究成果の概要

がん細胞では、ゲノム DNA に異常が蓄積することで幹細胞に類似した転写ネットワークが形成され、その結果、がん細胞はステムネスを獲得して無限増殖する。転写ネットワークを構成する転写因子は次々と明らかにされているが、その包括的な理解は未だ十分ではない。本研究計画の目的は、ステムネス制御因子のひとつである cBAF 複合体を足掛かりに、cBAF 複合体と協調してステムネスを制御している遺伝子を網羅的に同定可能な新規機能的スクリーニング系を構築し、同定した因子がステムネスを制御する分子メカニズムを解明することである。

今回実施する新規スクリーニング系では、通常の培養条件下と cBAF 阻害薬を添加した条件下で並行して CRISPR スクリーニングを行い、cBAF 阻害薬含有培地で遺伝子破壊による増殖抑制効果が増強する遺伝子を探索する。そのために必要な種々の条件検討を行った。

まず、スクリーニングに使用する細胞株を選定した。これまでの実験結果および過去の文献を参考に、ステムネス制御に cBAF が関与している細胞株を選び、実際に、cBAF 阻害薬を使用すると選択細胞株のステムネスが損なわれることを確認した。引き続いて、レンチウイルスを用いて Cas9-GFP を安定発現させた。シングルセルソーティングを行い、複数のクローンを取得した。gRNA を形質導入し、目的遺伝子の欠損が高効率に得られるクローンを選択した。

次に、スクリーニングで用いる cBAF 阻害薬の濃度を決定した。予備的に、cBAF 複合体と協調して増殖を制御する遺伝子を効率よく抽出できる cBAF 阻害薬の濃度を検討した結果、細胞の増殖速度を 50%抑制するような濃度が最適であった。そこで、スクリーニングで使用する細胞株を種々の濃度の cBAF 阻害薬で培養し、細胞数を経時的に測定することで、細胞増殖速度を 50%抑制するような濃度、すなわちスクリーニングに採用すべき cBAF 阻害薬の濃度を決定した。