

研 究 報 告 書
令和5年度：A課題

令和7年4月25日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 金沢大学新学術創成研究機構

住 所 石川県金沢市宝町13-1

研究者氏名 西山 正章

(研究課題)

天然変性タンパク質によるクロマチン制御と発がん機構の解明

令和6年3月18日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

要 旨

クロマチンリモデラーは、ヌクレオソームのアクセシビリティを調節することにより、転写などの細胞機能に不可欠である。生物学的凝縮はこれらの過程を制御しているが、クロマチンリモデラーの凝縮機構への寄与はまだ十分に理解されていない。ここでは、がんでしばしば標的とされるクロマチンリモデラーである CHD の E132I フレームシフト変異の役割を調べた。この変異は CHD の C 末端を切断し、がん原性トランスクリプトームをもたらす、腫瘍形成を促進する。これは、CHD のコンデンセートを形成するのに重要な天然変性領域 (IDR) が失われたためである。これらの凝縮体は、H3K4me3 で修飾されたヌクレオソームと RNA の存在によって促進され、遺伝子発現を制御する活性プロモーターに導かれる。さらに、CHD コンデンセートには長鎖ノンコーディング RNA とヒストン修飾タンパク質が含まれており、エピジェネティック制御における CHD コンデンセートの重要な役割が明らかになった。これらの構成因子のうち、MLL 変異は様々ながんにおいて CHD 変異と頻繁に共起することから、がんの発生において共通の経路が存在することが示唆される。これらの知見は、クロマチンリモデラーの凝縮が、様々な細胞過程や腫瘍抑制における制御ハブとして重要であることを強調している。

緒 言

生体分子凝縮体は、液-液相分離のようなプロセスあるいはそれに代わるメカニズムを通じて、ゲノム上の異なる場所で特定のタンパク質間相互作用を促進する。核小体、前骨髄球性白血病核小体、バラスペックルなど、さまざまな核凝縮体はゲノム機能において重要な役割を果たしている。コアクチベーターや転写因子によって形成されるコンデンセートは、特殊な区画として機能し、転写機構を組織化して集中させ、細胞の同一性を確立・維持する。クロマチン結合タンパク質、ヒストン修飾ヌクレオソーム、RNA がコンデンセートの形成に寄与することは知られているが、このプロセスにおけるクロマチンリモデラーの役割はまだ十分に理解されていない。

クロマチンダイナミクスはゲノム DNA へのアクセスを制御し、細胞運命決定時の遺伝子転写を含む様々な核内プロセスに極めて重要である。クロマチンリモデラーは、ヌクレオソーム内のヒストンと DNA の結合を変化させることにより、クロマチンの再編成を制御している。クロマチンリモデラーの CHD ファミリーのメンバーであるクロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 (CHD) は、活性化された遺伝子プロモーターヘリクルートされ、遺伝子転写を制御し、そこでクロマチンをほぐしたり開いたりし、転写の開始と伸長時に RNA ポリメラーゼ II の活性をサポートする。CHD 遺伝子の機能不全や変異は、がんや神経発達障害に関連している。特に、CHD の機能喪失は前立腺がん症例の約 8-18% で観察され、細胞状況特異的に遺伝子発現に広範な変化を引き起こしている。しかしながら、CHD の異常がどのようなメカニズムでがんの発生に関与しているのか、正確なメカニズムは不明である。

ここでわれわれは、がんに頻繁に見られる CHD の E132I フレームシフト (fs) 変異が、その C 末端の天然変性領域 (IDR) を欠いた切断型タンパク質を生成することを示した。切断された CHD はその凝縮特性を失い、その結果、転写におけるがん原性障害と腫瘍形成を引き起こす。近接ビオチン化によって、CHD 凝縮のインタラクトームが、新生 RNA、長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA)、ヒストン修飾タンパク質から構成されていることが明らかになり、エピジェネティックな過程への多面的な関与が明らかになった。混合系白血病 (MLL) のヒストンリジンメチルトランスフェラーゼは、CHD コンデンセートに関連しており、CHD と頻繁に共突然変異していたことから、腫瘍形成における両者の協力関係が示唆された。

方法および結果

1. E132I fs 変異は C 末端 IDR 切断 CHD をコードする

CHD は前立腺がんでは頻繁に欠失するが、他のがんでは CHD コード領域の点突然変異によって不活性化することが多い。中でも E132I fs 変異 ($CHD^{E132I fs}$) は、Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースにおいて、多様ながん種や細胞株で最も頻繁に報告されている。この変異は、前立腺がんと大腸がんの細胞株 (22Rv1 と GP5d) では単発性で、野生型 (WT) 対立遺伝子が保持されている。サン

ガー配列決定により、 CHD^{WT} と $CHD^{E1321fs}$ の両方の転写産物の存在が確認された。 $CHD^{E1321fs}$ 変異はフレームシフトを引き起こし、それによって停止コドンが導入され、1342-1710 残基が欠失した。変異タンパク質の発現を調べるため、CRISPR を介したノックイン戦略を利用して、変異部位に黄色蛍光タンパク質である *Venus* 配列を挿入した。その結果、 $CHD^{E1321fs}$ -*Venus* と CHD^{WT} -*Venus* の発現レベルは同等であり、変異タンパク質は mRNA の崩壊を回避できることが示唆された。

PONDR (Predictor of Natural Disordered Regions) ツールを用いた解析から、CHD の切断された C 末端領域と N 末端領域は IDR であると予測された。われわれは、リコンビナント CHD タンパク質の 1 分子ライブイメージングが可能な高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて、それぞれの IDR を直接可視化し、これらの予測を検証した。CHD の N 末端領域と C 末端領域の両方が、ひも状の形成、不規則なブラウン運動、安定な折り畳みドメインの欠如といった典型的な IDR の特徴を示した。さらに、特定のドメインが欠失した CHD 変異体タンパク質を用いた HS-AFM 実験によって、各ドメインの割り当てが支持された。

2. CHD は C 末端の IDR を介して凝縮体を形成する

CHD がその IDR を介して凝縮するかどうかを調べるために、*in vitro* 液滴アッセイを行った。 CHD^{WT} は、蛍光タグの有無にかかわらず、球状の液体凝縮体を形成した。これらの凝縮体の形成は、タンパク質濃度が高いほど促進され、塩濃度が高いと抑制されるか消失した。 CHD^{WT} と IDR 欠失変異体 (ΔN , ΔC , ΔNC) を用いた液滴アッセイでは、N 末端と C 末端の両方の IDR が凝縮体形成を促進し、C 末端の IDR がより重要であることが明らかになった。*In vitro* ヌクレオソームスライディングアッセイでは、どちらの IDR も CHD のヌクレオソームスライディング活性に必須ではないことが示された。

in vitro の知見と同様に、外因性 CHD^{WT} と変異体の細胞内発現から、CHD の核凝縮には N 末端と C 末端の両方の IDR が必要であり、C 末端の IDR がより重要な役割を果たしていることが明らかになった。この凝縮は、機能が不明なヘリックス C 末端 (CHCT) ドメインではなく、IDR に依存している。CHCT ドメインを欠損した変異体でも凝縮を示した。内在性の CHD^{WT} が細胞内で凝縮するかどうかを調べるため、HeLa 細胞で *CHD* 遺伝子座の C 末端に *Venus* を遺伝子ノックインした。 CHD^{WT} -*Venus* タンパク質は小さな核凝縮体を形成し、一部の細胞ではより大きな核凝縮体も形成した。他の核タンパク質で観察されたように、CHD は熱ショックにตอบสนองして大きな核小体凝縮体を形成し、それが数時間かけて徐々に消失することが観察された。熱ショックは固体状の凝縮体を誘導することが知られているので、光脱失後蛍光回復法 (FRAP) を用いて、ネイティブおよび熱ショック条件下で形成された CHD^{WT} -*Venus* 凝縮体の動態を評価した。ネイティブ CHD 凝縮体は数秒以内に急速に回復したが、ヒートショック誘発 CHD 凝縮体は数分間蛍光が回復しなかった。これらの観察から、本来の CHD 凝縮体と熱ショックで誘導された CHD 凝縮体は、それぞれ異なる生化学的性質をもち、異なる機能を果たしている可能性が示された。

$CHD^{E1321fs}$ タンパク質変異体に対する特異的抗体がないため、免疫染色による内在性 $CHD^{E1321fs}$ の凝縮パターンを調べることはできなかった。その代わりに、 $CHD^{E1321fs}$ -*Venus* または CHD^{WT} -*Venus* をノックインした HeLa 細胞の蛍光パターンを評価した。 $CHD^{E1321fs}$ -*Venus* は、 CHD^{WT} -*Venus* のより凝縮したパターンに比べ、より均一な核分布を示し、外因性タンパク質実験と一致した。

3. H3K4me3 ヌクレオソームと RNA が CHD の凝縮を刺激する

ヒストンマークは相分離を促進することにより、染色体のコンパートメント化を引き起こす可能性がある。IDR の機能的関連性を調べるため、H3K4me3 で修飾されたヌクレオソームが CHD の凝縮を誘導するかどうかを調べた。CHD は H3K4me3 に特異的に結合するからである。DNA、ヌクレオソーム、H3K4me3、H3K27ac、H3K9me3 修飾ヌクレオソームを CHD に対して滴定し、ドロップレットアッセイを行った。その結果、H3K4me3 ヌクレオソームは CHD 凝縮体の数とサイズを有意に増加させたが、他のヌクレオソームはほとんど影響を及ぼさなかった。H3K9me3 修飾ヌクレオソームによる CHD 凝縮のわずかな増加は、クロモドメインと H3K9me3 との潜在的な相互作用に起因すると考えられる。

最近の研究で、活性プロモーターに存在する新生 RNA が転写凝縮体の形成を制御することが示されている。CHD が遺伝子プロモーターで転写に関与していることから、われわれは *EF1 α* mRNA を CHD に対して滴定することで、RNA が CHD の凝縮を促進するかどうかを調べた。液滴アッセイにより、RNA は CHD の凝縮を促進するだけでなく、凝縮体にも取り込まれることが明らかになった。高分解能 AFM 解析によると、CHD 凝縮体は、中央の突起が変動する薄い円盤状の構造を形成してい

た。一方、RNA が存在すると、高さ 50-100 nm の球状の凝縮体が形成された。

細胞内の CHD 凝縮における H3K4me3 ヌクレオソームと RNA の役割を探るため、HeLa 細胞を RNA ポリメラーゼ II 阻害剤とメチル基転移酵素阻害剤で処理した。RNA ポリメラーゼ II 阻害剤である α -Amanitin は、CHD タンパク質レベルに変化を与えることなく、核における CHD の凝縮を減少させた。RNA ポリメラーゼ I および II 阻害剤であるアクチノマイシン D は、H3K4me3 と CHD タンパク質レベルの顕著な減少を伴って、細胞内 RNA レベルを有意に減少させ、CHD の凝縮を抑制した。メチル基転移酵素阻害剤であるシネブンギンは、H3K4 におけるトリメチル化レベルを低下させ、CHD の凝縮を減少させた。これらの結果を総合すると、RNA と H3K4me3 で修飾されたヌクレオソームは、細胞内で CHD 凝縮体を促進し、安定化させることが示唆される。

4. IDR は CHD を腫瘍抑制因子のプロモーターにリクルートするのに必要である

CHD は、転写共役機構を介して転写開始点 (TSS) や遺伝子内・遺伝子間エンハンサー様部位にリクルートされる。われわれは、CHD^{WT} または CHD^{ANC} を再導入した CHD ノックアウト mCAT-HeLa 細胞を用いて ChIP-seq 解析を行うことにより、CHD の凝縮がそのゲノム分布にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、CHD^{WT} は、以前の報告と一致して、活性のあるプロモーターに主に局在していた。一方、CHD^{ANC} の TSS への結合は減少したが、遺伝子間領域やイントロン領域などの非コード領域との結合は増強した。特に、CHD^{ANC} は、TP53 やサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 1B (CDKN1B) のようながん抑制遺伝子のプロモーターでの結合が減少し、mRNA 発現の減少につながった。

CHD^{WT} または CHD^{ANC} mCAT-HeLa 細胞におけるヌクレオソーム遊離領域を同定するために、ATAC-seq を行った。その結果、CHD^{ANC} 細胞では、CHD^{WT} 細胞と比較して、オープンなクロマチンピークが 5,083 個、クローズドなクロマチンピークが 2,455 個多かった。Genomic Regions Enrichment of Annotation Tool (GREAT) 解析により、CHD^{ANC} のクローズドクロマチンはアポトーシス経路と関連し、オープンクロマチンは代謝経路と関連していることが示された。このことは、CHD^{ANC} が細胞増殖に好影響を与える可能性を示唆している。しかしながら、ゲノム全体のプロモーターのクロマチンアクセシビリティに有意な差は観察されなかった。むしろ、CHD^{WT} または CHD^{ANC} の先の ChIP-seq 解析で明らかになった結合部位は、個々の遺伝子におけるクロマチンアクセシビリティと正の相関を示した。

CDKN1B プロモーターにおける CHD^{ANC} のリクルートメントの減少に促されて、CHD^{WT} または切断型変異体 (CHD^{AN}、CHD^{AC}、CHD^{ANC}) を再導入した CHD ノックアウト mCAT-HeLa 細胞を用いて、細胞増殖に対する IDR 欠失の影響を評価した。CHD ノックアウト細胞は、非標的シングルガイド RNA (sgNTC) で処理したコントロールと比較して増殖が増加した。CHD^{WT} または CHD^{AN} のいずれかを回復させると増殖は正常化した。CHD^{AC} および CHD^{ANC} のそれは正常化しなかったことから、CHD の C 末端 IDR が増殖抑制に重要であることが示された。遺伝子セット濃縮解析 (GSEA) は、CHD ノックアウト細胞では p53 経路がダウンレギュレートされ、CHD^{ANC} ではアップレギュレートされず、CHD^{WT} の回復によってのみアップレギュレートされることを示した。このことは、CHD^{ANC} ではなく CHD^{WT} が細胞増殖を抑制した理由を部分的に説明している。

CHD のクロモドメインは、活性プロモーターにおける H3K4me2/3 への結合を担っているが、われわれの ChIP-seq の結果は、IDR も活性プロモーターとの相互作用に必須であることを示している。生化学的メカニズムをより深く理解するために、CHD^{WT} と CHD^{ANC} を用いてヌクレオソーム結合アッセイを行った。興味深いことに、CHD^{ANC} は CHD^{WT} よりも有意に強いヌクレオソーム結合を示し、CHD の IDR がヌクレオソームに対する親和性を負に制御していることが示唆された。CHD はヘリカーゼ/ATP ドメインを通してヌクレオソームに結合することが知られている。これと一致して、このヘリカーゼ/ATP ドメインを欠損した CHD 変異体はヌクレオソームに結合できず、大きな核凝縮体を形成した。これらの結果は、IDR が CHD のヌクレオソームに対する親和性を低下させ、クロモドメインを介して H3K4me2/3 修飾ヌクレオソームや活性型プロモーターへの選択的結合を高めていることを示唆している。対照的に、CHD^{ANC} のヌクレオソームに対する高い親和性は、H3K4me2/3 修飾に対する選択性の低下やミスターゲッティングを引き起こし、遺伝子間領域やイントロン領域への CHD の取り込みを説明する可能性がある。

5. C 末端 IDR は腫瘍抑制に必須である

腫瘍形成に対する C 末端切断の影響を調べるため、CRISPR-Cas9 システムを用いて 22Rv1 細胞でエクソン 29 をスキップさせ (Δ ex29) (22Rv1 ^{Δ ex29/ Δ ex29})、CHD の 1342-1671 領域を回復させた。この

復元により、赤色蛍光タンパク質である CHD^{Δex29}-mScarlet を発現する HeLa 細胞で示されるように、WT のような凝縮特性が回復した。これらの細胞をヌードマウスに皮下移植し、非標的シングルガイド RNA で処理した対照株 (22Rv1^{WT/fs}) と比較することにより、腫瘍原性を評価した。22Rv1^{Δex29/Δex29} 細胞は、22Rv1^{WT/fs} 細胞と比較して腫瘍形成が有意に減少した。免疫組織化学的に、22Rv1^{Δex29/Δex29} 腫瘍は、22Rv1^{WT/fs} 腫瘍と比較して、増殖が低く、EMT 関連タンパク質 (ITGA5、TWIST1/2、SNAI2) が少ないことが示された。

CHD^{E1321fs} によるトランスクリプトーム変化を調べるため、22Rv1^{Δex29/Δex29} 細胞と 22Rv1^{WT/fs} 細胞で RNA-seq を行った。示差的発現遺伝子 (DEG) 解析の結果、22Rv1^{Δex29/Δex29} 細胞では、22Rv1^{WT/fs} 細胞と比較して、432 個の遺伝子発現が上昇し、592 個の遺伝子発現が低下した。パスウェイ解析と GSEA により、22Rv1^{Δex29/Δex29} 細胞では p53 経路成分 (*BAX*, *DDB*) と腫瘍抑制因子 (*CDH17*, *CDKN1A*) の発現が増加し、細胞増殖 (*MYC*, *AR*, *EGFR*, *FGFR1*, *IGF1*, *IGF1R*, *IRS2*) と EMT (*SNAI2*, *IGFBP*, *WNT5A*) に関連する遺伝子の発現が減少していることが強調された。*SP1* と *TP53* 関連転写因子も 22Rv1^{Δex29/Δex29} 細胞で高値を示した。これらの変化は *in vivo* の結果と一致しており、22Rv1^{Δex29/Δex29} 細胞における増殖の低下、G1 停止、およびコラーゲンマトリックス透過性の低下と関連していた。

エクソン 29 の欠失により、39 個のアミノ酸が失われ、そのうち 28 個は DNA 結合ドメインに属する。CHD^{WT} と CHD^{Δex29} が同様の機能を示すかどうかを明らかにするために、CHD ノックアウト 22Rv1 細胞の増殖と遺伝子発現に対する CHD^{WT} と CHD^{Δex29} の再導入効果を比較した。どちらの変異体も同様に細胞増殖を阻害し、*CDKN1A*, *CDKN1B*, *BAX* をアップレギュレートした。これらの結果から、DNA 結合ドメインの部分欠損は、これらの細胞の結果に大きな影響を与えないことが示唆される。これらのデータを総合すると、CHD^{E1321fs} はがん化遺伝子の発現を促進し、細胞の増殖と浸潤を促進することが示唆される。

6. CHD 凝縮体は新生 RNA や lncRNA と相互作用する

CHD 凝縮体の機能を理解するために、その組成を解析した。HeLa 細胞で抗 CHD 抗体を用いて抗体ベースの *in situ* ビオチン化を行ったところ、抗 CHD サンプルでは IgG コントロールに比べて 4 倍以上濃縮された 6,763 個の RNA が同定された。これらの RNA のうち、72.5% はタンパク質をコードするものであり、69.1% は ChIP-Atlas から得られた CHD 標的遺伝子に対応した。これらの結果は、CHD 凝縮体が転写活性部位や新生 RNA の近くにあることを示している。

CHD に近接した RNA の約 24.7% は lncRNA であったが、コード RNA とは異なり、CHD 標的遺伝子はほとんどなかった。LncSEA2.0 を用いた GSEA では、これらの lncRNA の 36% が、RNA 免疫沈降法によって CHD と相互作用することが以前に示されていた。さらに、CHD 近位 lncRNA の 38.3% は RNA ポリメラーゼ II サブユニット A (POLR2A) と相互作用することができ、活性転写部位におけるクロマチンリモデリングにおける CHD の役割を裏付けている。さらに、14.8-38.5% の CHD 近位 lncRNA は、活性マークと抑制マークの両方を含む多様なヒストン修飾と相互作用していた。がん生物学との関連では、いくつかの CHD 近位 lncRNA はマイクロ RNA やアンドロゲン受容体 (AR) mRNA と関連しており、それぞれ遺伝子抑制や前立腺がんに関与している可能性がある。さらに、ある種の lncRNA は、転移、EMT、細胞増殖、p53 経路のようながんに関連するプロセスに関連していた。これらの所見は、lncRNA と CHD 凝縮体との機能的相互作用の可能性を示唆している。

7. IDR 依存的なヒストン修飾タンパク質との相互作用

IDR 依存的に CHD と相互作用するタンパク質を同定するために、CHD^{WT}/CHD^{ΔNC}-Venus で修復した HeLa 細胞、およびコントロールの HeLa 細胞で、抗 GFP 抗体を用いた *in situ* ビオチン化を行った。対照細胞と比較して、CHD^{WT} および CHD^{ΔNC} 修復細胞では、それぞれ 132 および 137 のタンパク質が有意に濃縮された。これらのうち、48 個のタンパク質が CHD^{WT} によって特異的に濃縮され、CHD^{ΔNC} では濃縮されなかった。STRING を用いた解析から、これらのタンパク質は、遺伝子活性化因子 (ASH2L、EP400) と抑制因子 (SUZ12、EHMT1、SDS3、GATAD2A) の両方を含む、ヒストン修飾と染色体構成に関与していることが示された。

ChIP-Atlas 解析により、CHD、ASH2L、SUZ12 の標的遺伝子に有意な重複があることが示された。内在性の ASH2L と SUZ12 を免疫蛍光染色すると、CHD の核凝縮体と部分的に共局在していることが明らかになった。CHD ノックアウト mCAT-HeLa 細胞では、外因性に発現した CHD^{WT} は、CHD^{ΔNC} と比較して SUZ12 との共局在の程度が大きかった。同様に、CHD と SUZ12 間の近接ライゲーションアッセイ (PLA) シグナルは、CHD^{ΔNC} よりも CHD^{WT} の方が有意に強かった。これらの結果は、IDR を介した CHD の凝縮において、CHD と SUZ12 が機能的に相互作用している可能性を示唆して

いる。

ASH2L は、ヒストンメチルトランスフェラーゼの MLL ファミリー (MLL1-4、または KMT2A-D) の中心的な構成要素である。MLL は白血病や固形がんを含む分岐した悪性腫瘍で頻繁に標的とされ、MLL4/KMT2D は核内凝縮体を形成することから、われわれは発がんにおける CHD と MLL 複合体の機能的なつながりの可能性を仮定した。TCGA データセットの解析から、KMT 変異と CHD 変異の顕著な併発パターンが明らかになった。特に、CHD 変異、特に CHD^{E1321fs} を有するがんでは、一般的ながん集団と比較して KMT 変異の頻度が高かった。CHD 変異の有無にかかわらず、p53 変異頻度に有意差は認められなかった。逆に、CHD 変異は、p53 変異のあるがんやがん集団全体と比較して、KMT 変異のあるがんにより一般的であった。これらのデータは、腫瘍抑制因子としての CHD と MLL の役割において、機能的な補償の可能性を示唆している。

考 察

本研究は、CHD を介した凝縮における IDR の役割を解明し、腫瘍抑制における IDR の重要性を明らかにした。CHD ファミリータンパク質における IDR の予測と、これらの領域における疾患関連変異の同定は、CHD タンパク質の多様な機能における縮重の関与を示唆した。今回の発見は、CHD がその C 末端 IDR を介して動的な凝縮体を形成していることを示すものであり、この過程はゲノム全体のターゲティング、パートナータンパク質との相互作用、遺伝子発現の制御に不可欠である。さらに、がんで再発する E1321fs 変異による C 末端 IDR の欠損が、これらの機能を破壊し、腫瘍形成に寄与することも明らかになった。

転写凝縮体の形成は、遺伝子発現を空間的・時間的に制御するために不可欠である。CHD が転写の開始と伸長に関与することはよく知られているが、転写凝縮体形成における CHD の役割はまだ不明である。われわれの *in vitro* 液滴アッセイでは、CHD の凝縮は、転写活性部位の構成要素である H3K4me3 や RNA で修飾されたヌクレオソームによって特異的に促進されることが示された。さらに、インタラクトーム解析から、CHD 凝縮体には標的遺伝子の RNA が含まれており、おそらく活性遺伝子座から新たに転写されたものであろうことが明らかになった。また、CHD 凝縮体内で RNA ポリメラーゼ II サブユニット A と相互作用する lncRNA も同定された。RNA ポリメラーゼ II とメチルトランスフェラーゼの阻害は、細胞内の CHD 凝縮に影響を与えたことから、新生 RNA と H3K4me3 ヌクレオソームが CHD の凝縮を促進していることが示唆された。全体として、これらの知見は、CHD の凝縮が転写凝縮体の重要な構成要素であることを示唆している。

IDR 依存性 CHD インタラクトームには、lncRNA やヒストン修飾タンパク質が含まれており、エピジェネティックな制御における役割を示している。このことは、CHD 変異をもつがんに見られるグローバルな遺伝子発現の変化を説明するものと考えられる。CHD、SUZ12、ASH2L の間で標的遺伝子が大きく重複していること、核凝縮体において部分的に共局在していることから、CHD は特定の遺伝子座で SUZ12 を含むリプレッサー複合体または ASH2L を含む MLL アクチベーター複合体と相互作用している可能性が示唆される。CHD のゲノムへのリクルートは、主に TSS 周辺の H3K4me3 マークによって駆動されるので、相互作用するパートナーは、特定の遺伝子座に存在する転写因子や補因子の影響を、細胞の文脈依存的に受けている可能性が高い。さらに、CHD と特定の lncRNA との共局在は、lncRNA と相互作用するこれらの転写因子や補因子によって間接的に媒介されている可能性もある。一旦共局在化すると、lncRNA は特異的な RNA 配列ではなく、その負電荷によって CHD の凝縮を促進し、核内での機能的なコンパートメント化に寄与する可能性がある。

ASH2L と CHD の標的遺伝子に顕著な重複があることから、多様ながん種におけるそれらの機能喪失を調べたところ、CHD と MLL 複合体のヒストンリジンメチル化酵素の変異がしばしば共存することがわかった。注目すべきことに、MLL4/KMT2D は、そのプリオン様ドメインを介して相分離した核凝縮体を形成し、エンハンサー凝縮体の形成を促進することが知られている。MLL 複合体の潜在的な凝縮特性と CHD 凝縮体中の ASH2L の存在を考えると、CHD と MLL 複合体は相分離において協力し、凝縮の閾値を下げる可能性があるという仮説を立てた。どちらか一方の経路が破壊されただけでは発がんには至らないかもしれないが、両方の経路に変異があると、相分離が決定的に損なわれ、がんの発生が促進される可能性がある。われわれのトランスクリプトーム解析とインタラクトーム解析によって、複数のがん関連経路と分子が同定されたが、これらの発がんプロセスを完全に理解するためには、今後の研究でさらなる機能検証を行う必要がある。