HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Cellular basis underlying the intolerance to haploidy in vertebrates [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	矢口, 完
Description	担当：理学部図書室
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14392号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82017
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kan_Yaguchi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士(生命科学)　氏 名 矢口 完

学 位 論 文 題 名

Cellular basis underlying the intolerance to haploidy in vertebrates
(脊椎動物における一倍体細胞の性質)

背景

大半の脊椎動物は細胞あたりのゲノムコピーを二セットに維持する二倍体である。一方で、ゲノムコピーを一つしか持たない一倍体細胞は成熟した配偶子に限定されており、自然界において一倍体の脊椎動物個体は報告されていない(Wutz, 2014)。一倍体個体は親世代と同一の遺伝的背景を保持することが可能であることから、実験における個体差均質化に有用であり、また、遺伝学における強力なツールであるため、単為発生による一倍体胚の形成が試されてきた(Hertwig, 1911; Purdom, 1968)。しかしながら、これら人為的に形成された一倍体脊椎動物は多面的な形態形成異常および胚性致死を示し、繁殖することが不可能である。単為発生以外でも、腫瘍形成過程における染色体喪失によって一倍体細胞が形成されるが、これら病理的に形成された一倍体細胞は著しいゲノム不安定性を示し、数週間で容易に二倍体化する。このことから、脊椎動物は一倍体に対して細胞レベルで不寛容であり、倍数性が二倍体から逸脱することによって細胞プロセスに致命的な影響が生じている可能性が示唆される。この脊椎動物の性質は、一倍体でも安定に繁殖が可能な昆虫、酵母、植物などとは極めて対照的であることから、脊椎動物固有の細胞プロセスに倍数性が関与していることが示唆される。しかしながら、脊椎動物における一倍体不寛容性の仕組みは全く明らかでない。本研究では、(1)一倍体脊椎動物胚における細胞形質異常、(2)倍数性の違いによる遺伝子発現変化、(3)一倍体細胞におけるゲノム不安定化因子を明らかにすることを目的とし、一倍体不寛容性の仕組みに関する知見を得ることで、脊椎動物において倍数性が持つ生理学的意義を理解することを目指した。

方法

一、二倍体ゼブラフィッシュ胚はそれぞれ紫外線照射によって不活性化した精子もしくは正常な精子と正常卵を受精させることによって作製し、それらを比較検証した。ゼブラフィッシュ胚中の細胞内小器官および細胞死マーカーは蛍光抗体間接法により可視化し、その後、共焦点レーザー顕微鏡で撮像、解析を行った。また、ヒト白血病由来一倍体細胞 HAP1 株から、自発的に二倍体化した細胞集団から cell sorting によって一、二倍体細胞それぞれを濃縮し、それらを直接比較した。転写産物は次世代シーケンサーによる RNA seq によって、各タンパク質量はウエスタンブロッティングによって定量比較した。また、一倍体細胞の倍数性不安定性因子を調べるために、薬剤処理したヒト一倍体細胞の核相変化を FACS 解析によって長期間追跡した。

結果

(1) 一倍体ゼブラフィッシュ胚における中心体喪失に伴う細胞死

申請者のごく最近の発見により、約 20%のヒト一倍体 HAP1 細胞において脊椎動物細胞の細胞分裂を司る細胞内小器官である中心体の数が減少していることが明らかになった(Yaguchi et al., 2018)。中心体は植物や酵母には存在しない細胞内小器官であることから、一倍体脊椎動物の発生機構との関与が予想される。そこで、一、二倍体ゼブラフィッシュ胚の中心体を比較解析したところ、二倍体胚と比較して一倍体胚の中心体数が減少しており、紡錘体形態異常が引き起こされていた。このことから幅広い脊椎動物種において、一倍体であることによって中心体数が減少することがわかった。中心体喪失は細胞分裂遅延を生じさせ、最終的に細胞死を誘導することから一倍体胚において細胞運命が劇的に変化していることが予想される。そこで、分裂期細胞の割合を比較したところ、一倍体胚における分裂細胞の割合が有意に増加しており、著しい分裂遅延が惹起されていることが示唆された。さらに、一倍体胚特異的に細胞死の頻度が上昇していることを突き止めた。細胞死の異常増加は発生過程における器官形成能を著しく低下させることから、中心体喪失に伴う細胞死は一倍体胚の多面的な形態異常の主要因である可能性が示唆された。

(2)倍数性の違いによる Cyclin D 発現量の変化

一倍体細胞は種々のガン形成過程で形成され予後不良を引き起こすが、一倍体細胞における遺伝子発現の変化に関する知見は非常に乏しい。そこで、一、二倍体 HAP1 細胞を RNA seq 解析によって比較したところ、細胞周期制御因子 Cyclin D の発現量が一倍体細胞で低下していることが見いだされた。さらに、Cyclin D と複合体を形成する cdk4/6 を阻害したところ、一倍体細胞選択的に細胞増殖が抑制されることが見いだされた。これらの知見は、倍数性変化のバイオマーカー開発および倍数性変化に伴う疾患の治療戦略開発に大きく貢献することが期待される。

(3)小胞体ストレス不寛容性による一倍体不安定化

約 0.5%の頻度で一倍体細胞は中心体喪失に伴う分裂異常によって二倍体化するが、この低頻度の細胞の二倍体化では短期間で全細胞集団が二倍体化することは不可能であることから、中心体非依存的な二倍体化の要因が示唆される(Yaguchi et al., 2018)。近年、酵母でも小胞体ストレス応答の中枢的機能を果たす分子シャペロン転写因子 *HAC1* の欠損株は一倍体状態を保てず、二倍体化することが報告された(Lee et al., 2003)。そこで、小胞体ストレスの脊椎動物一倍体細胞に対する影響を調べるために糖鎖修飾阻害剤 tunicamycin の低濃度処理によって慢性的な小胞体ストレスを誘導したところ、一倍体 HAP1 細胞の二倍体化が加速された。一方、化学的分子シャペロンの処理によって、逆に一倍体が安定化され、二倍体化が遅延することを突き止めた。これらの結果から、人為的に誘導した小胞体ストレスのみでなく、基底状態の小胞体ストレスもまた一倍体不安定化を促進している可能性が示唆された。一、二倍体細胞の生存性および相対的増殖率を比較したところ、Tunicamycin により一倍体選択的にアポトーシスおよび細胞増殖抑制が誘発されたことから、一倍体細胞は二倍体細胞と比較して小胞体ストレスに対する許容性が低く、それにより小胞体ストレスによって一倍体細胞の相対的増殖能が低下することが二倍体化の主要因であることが考えられる。

結論

本研究結果から、多面的な細胞異常が脊椎動物の一倍体不寛容性および不安定性に寄与することが示唆された。これらの知見は、これまで不明瞭であった倍数性が変化する生理学的意義を多角的に理解することに大きく貢献する。