



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterizing the cell division machinery in human somatic tetraploid cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	山本, 隆博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第15775号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92494
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Yamamoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 山本隆博

学位論文題名

Characterizing the cell division machinery in human somatic tetraploid cells
(四倍体ヒト体細胞における細胞分裂装置の性質)

全ゲノム倍加(whole genome duplication; WGD)は種の進化、個体の発生そして細胞のガン化といった様々なスケールの生命現象で起こることが知られ、細胞の特性を劇的に変化させることでこれらのイベントを駆動するキープロセスである。WGD によって形成される多倍体細胞の特徴は様々な細胞構成物の倍加に伴い細胞内環境が劇的に変化することである。近年ゲノム解析や薬剤スクリーニングにより、多倍体細胞は細胞分裂制御因子への依存性が高まっていることが明らかになりつつあるが、具体的に分裂制御メカニズムがどのように変容するかはよくわかっていない。そこで本研究ではヒト体細胞の二倍体と四倍体の比較系を樹立し、分裂期中心体と細胞質分裂の様式の解析を通じて四倍体における分裂装置の特性を明らかにすることを目的とした。

・ 倍数性依存的な中心体タンパク質集積亢進メカニズム

はじめに比較系樹立のため細胞質分裂阻害によってヒト大腸がん由来 HCT116 細胞の安定四倍体株を作成した。免疫抗体染色で可視化した分裂期中心体の輝度を定量したところ、四倍体では分裂期中心体タンパク質の集積が二倍体と比べ優位に増加していることがわかった。また微小管伸長端マーカーEB3-GFP を安定発現する細胞株を用いた生細胞イメージングにより、単位時間あたりに分裂期中心体から形成される星状体微小管の数も四倍体で優位に増加していることが明らかになった。次に倍数性依存的な中心体タンパク質の集積亢進がより早期におこっている可能性を検証するため、全ゲノム倍加直後の分裂期を観察した。全ゲノム倍加直後の細胞は四個の中心体を有するが、余剰中心体の影響を排除するため中心体複製阻害剤を併用し余剰中心体を持たない状態を誘導した。その結果、全ゲノム倍加直後においても分裂期中心体タンパク質の集積が二倍体と比べ優位に増加していることがわかった。これにより中心体タンパク質の集積亢進は四倍体化直後に、中心体足場あたりのタンパク質プール量の増加により生じることが明らかになった。さらに具体的な責任因子を特定するため、線虫初期胚における先行研究をもとに CEP192 の量が四倍体の中心体集積亢進を規定している可能性に着目した。そこで遺伝子編集とオーキシンドグロン法によるタンパク質分解系を用いて、四倍体細胞で二倍体細胞並みの発現量を誘導する系を樹立した(CEP192 半減系)。本系を用いた分裂期の中心体集積および微小管形成能の評価により CEP192 の遺伝子コピー数変化が倍数性依存的な中心体タンパク質集積亢進の要因であることが明らかになった。

・ 中心体タンパク質集積亢進にともなう多倍体細胞の脆弱性

得られた知見をもとに倍数性依存的な中心体タンパク質集積の亢進の負の側面に着目した。E3 ユビキチンリガーゼ TRIM37 は中心体タンパク質の分解制御により中心体恒常性を司っていることが知られている。そこで HCT116 四倍体細胞において TRIM37 を RNAi で発現抑制し、分裂期を観察したところ、二倍体に比べて四倍体細胞では多極紡錘体形成が顕著に増加していることがわかった。また微小管マーカーEGFP- α -tubulin と染色体マーカーH2B-mCherry を安定発現する細胞株の生細胞イメージングにより、TRIM37 発現抑制によって四倍体細胞では多極性の染色体分離が顕著に増加することがあきらかになった。さらにフローサイトメーターによる解析で TRIM37 発現抑制により四倍体細胞の DNA 量が減少していたことから、TRIM37 の機能が四倍体細胞のゲノム安定性の維持に必要であることが示唆された。次に四倍体細胞で多極紡錘体形成が増加した原因に着

目した。中心体因子 Centrobilin の凝集体が余剰な紡錘体極形成に寄与するという既報の結果と一致して、TRIM37 発現抑制下の二倍体と四倍体における免疫抗体染色により、大部分の細胞で Centrobilin の凝集体が観察された。四倍体では TRIM37 発現抑制にともなう Centrobilin 凝集体の頻度は二倍体に対して微増にとどまったのに対し、凝集体が多極紡錘体形成に寄与する頻度が顕著に高くなっていることがわかった。そこで四倍体における多極紡錘体の増加に CEP192 の量が寄与している可能性を検証するため、TRIM37 発現抑制下で先の CEP192 半減系を用いて分裂期紡錘体を観察した。その結果、CEP192 半減により四倍体の多極紡錘体の頻度が二倍体と同等のレベルまで抑制された。また Centrobilin 凝集体の頻度は CEP192 半減により微減にとどまったのに対し、多極紡錘体形成に寄与する Centrobilin 凝集体の頻度は大幅に低下した。以上の結果から四倍体では倍数性依存的な CEP192 の量的増加により TRIM37 発現抑制下の多極紡錘体形成が促進されることが明らかになった。さらに実験的に得られた TRIM37 機能への依存性と CEP192 の量的関係の一般性について公開がんデータベース the Cancer Dependency Map (DepMap)を用いて評価した。CEP192 はその遺伝子コピー数が TRIM37 への依存性と最もよく相関する因子であり、他のガン細胞株における TRIM37 への依存性と CEP192 の量的関係の一般性を裏付ける結果となった。

・ 四倍体の細胞質分裂における細胞形状異常

HCT116 の安定四倍体株における生細胞イメージングにより、細胞質分裂過程において大きな突起形成を伴う細胞形状異常が観察された。この突起形成は細胞質分裂過程で細胞極近傍に一時的に見られる典型的なブルブとは異なり、巨大な突起が長時間にわたって形成され、細胞極だけでなく赤道面近傍にも出現した。この突起形成は収縮溝の陥入が完了すると起こらなくなることから、四倍体細胞は収縮溝形成過程における細胞形状制御に脆弱性をかかえていることが示唆された。なお複数の HCT116 安定四倍体株における観察から、この細胞質分裂にともなう細胞形状の異常が共通して観察された一方で HAP1 安定四倍体細胞では観察されなかった。この形状異常の原因を探るため、免疫抗体染色により細胞骨格タンパク質の細胞内局在を可視化した。中央紡錘体や細胞皮質の RhoA および Anillin の異所的な局在が細胞形状の不安定性を伴うことが知られているが、観察によりこれらはいずれも細胞中央に局在しており、細胞質分裂中の形状異常には寄与していないことが明らかになった。一方で細胞質分裂中の細胞形状を制御する myosin II の局在解析により四倍体では収縮溝の形成時期に細胞極近傍における集積量が二倍体と比べて有意に増加することがわかった。myosin II の局在と活性は調節軽鎖 (RLC) のリン酸化を通じて正の制御を受けるため、ウエスタンブロッティングにより RLC のリン酸化レベルを評価した。しかし、細胞質分裂期を濃縮した四倍体において RLC のリン酸化は二倍体と比べて上昇していなかった。そこで細胞質分裂中の RLC リン酸化を担う Rho キナーゼ/ROCK 阻害剤である Y27632 により myosin II の活性を抑制したところ、四倍体の細胞質分裂中における突起形成が顕著に抑制され、二倍体と同等の滑らかな細胞形状になった。これらの結果から myosin II の調節不全が四倍体状態における細胞形状不安定の主な原因であることが示唆された。

本研究は分裂期の中心体と細胞質分裂の解析を通じて、四倍体細胞における具体的な分裂制御システムの変容を定義し、付随する潜在的な脆弱性とその分子メカニズムを明らかにした。これらの発見は全ゲノム倍加に伴う様々な生命現象の理解に資する基礎生物学上重要な知見であり、多倍体関連疾患の新しいバイオマーカーや治療法の開発に寄与するものである。