

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19244

研究課題名（和文）中心体複製チェックポイントの人工合成による安定一倍体細胞の樹立

研究課題名（英文）Establishment of stable somatic haploid cells through engineering of centrosome duplication "checkpoint"

研究代表者

上原 亮太（Uehara, Ryota）

北海道大学・先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：20580020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では中心体喪失による動物一倍体細胞のゲノム不安定性を i) 中心体複製不全を解消する新しい分子回路の設計と、ii) 中心体不在のまま安定な分裂増殖が可能な遺伝的背景の構築の二つのアプローチにより、一倍体状態を安定化することを試みた。i) については人工回路構成遺伝子の構造の検討、最適化を行い、内性の中心体制御系との干渉を最小化した人工遺伝子の作出に至っており、今後、その機能評価を進める。ii) については、中心体非存在下に分裂制御に関わる遺伝子制御系構成因子の、一倍体状態特有の量的不足を突き止め、その人為的補強によって、中心体喪失下で1か月以上一倍体状態を保持できる安定な細胞株の樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全遺伝子を1コピー保有する一倍体細胞は、遺伝子機能改変が容易で、遺伝学や細胞工学ツールとして高い利便性をもつ。しかし、動物一倍体は著しいゲノム不安定性で短期間に二倍体化することが汎用性の妨げている。本研究では、二つの独立したアプローチのうちの一つにより高い安定性をもつ一倍体ヒト細胞の樹立に成功した。この過程で、一倍体不安定性の原因となる具体的な遺伝子群を特定した点に高い学術的意義がある。また、本研究で確立した一倍体安定化法は、多くの動物種の一倍体制御に適用可能と考えられ、安定一倍体技術の発達を通して、生命工学および農水産資源開発の分野に波及性が期待できる点に社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to resolve the genomic instability of animal haploid cells caused by chronic centrosome loss using two approaches: i) designing a new molecular circuit to resolve centrosome replication defects and ii) establishing a genetic background that allows stable mitotic control in the absence of a centrosome. Regarding i), we examined and optimized the structure of the artificial circuit component genes and produced synthetic genes that minimize interference with the endogenous centrosome regulatory system. We will evaluate their functions in the future. For ii), we found haploidy-linked insufficiency in gene products for acentrosomal mitotic control. By the replenishment of these factors, we succeeded in establishing a stable haploid cell line that could maintain their haploid state for more than one month in continuous culture.

研究分野：細胞生物学

キーワード：倍数性 中心体 一倍体

1. 研究開始当初の背景

通常動物の体細胞(体をつくる細胞)は父方母方由来のゲノムを一つずつ保有する二倍体状態を基本として、安定な分裂増殖を行う。一方、配偶子細胞は生殖系譜の二倍体細胞が減数分裂により一倍体になったもので、通常は分裂増殖を行わない。ところが、単為発生(受精を経ずに配偶子から個体形成が開始する現象)や、がん形成における染色体数異常などのイレギュラーなプロセスで、一倍体状態で分裂増殖を行う体細胞が形成される¹。一倍体細胞は全遺伝子を1コピーのみ保有する状態であるため、遺伝子機能改変を容易に行える利点がある。このため、天然で一倍体状態をとる酵母などでは、この一倍体を利用した遺伝学、細胞工学が盛んに行われてきた。ゲノム編集技術の興隆に伴って、動物の一倍体細胞も、このような生物工学的ツールとして高い利便性に注目が寄せられている²。しかし、多くの動物種で、一倍体細胞が著しいゲノム不安定性を示し、数日から数週間の培養で二倍体化してしまい、これが動物一倍体細胞の汎用性を制限する問題となってきた。動物で一倍体状態に特有のゲノム不安定性が生じる原因は長年不明であった。本研究の代表者は、最近、ヒトがん細胞およびマウス初期胚細胞を材料とした研究によって、このゲノム不安定性が、一倍体状態で特異的に生じる慢性的な中心体複製の遅延による分裂制御不全によって生じていることを発見した³。中心体の遅延に合わせて薬理的に細胞周期の進行を遅らせると、中心体複製が解消し、一倍体がゲノム安定性を取り戻すことが分かった⁴。このことから中心体異常を克服することで安定一倍体を樹立できることが示唆された。しかし、上述の薬理的手法は、細胞周期阻害剤を数時間ごとに投与・除去するサイクルを毎日、数週間にわたり実施する必要があるため、汎用性が低い。このような背景で、遺伝子工学的な操作によって一倍体特有の中心体不全にまつわる不安定性を克服することで、汎用性の高い一倍体細胞を樹立することが望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、動物一倍体細胞に特有に生じる慢性的な中心体複製不全に起因する細胞分裂不安定性を遺伝子工学的な操作によって克服することを目指した。これによって、長期間安定に一倍体状態を保持できる、汎用性の高い一倍体細胞株を樹立するとともに、この実験検証によって動物の一倍体不安定性に通底する分子的な原理を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、二つの相補的な研究方法で一倍体特有の分裂制御不安定性の克服を図った。

(1) 中心体複製をモニターする「チェックポイント」の人工合成による一倍体安定化

細胞周期制御において、染色体複製の進行遅延は、複製チェックポイント機構によりモニターされることで、その解消が試みられる。一方、中心体複製には、知られる限りそのような監視機構が働かないため、複製遅延が見過ごされたまま漸次的な中心体喪失が起こる。そこで、中心体複製の進行をモニターしてその遅延に応じて細胞周期進行を調整する人工回路を作製することを試みた。代表者自身の先行研究から、一倍体細胞における中心体複製の遅延は、中心体複製開始反応のマスターレギュレーターである plk4 キナーゼの細胞内機能部位への集積の遅延を伴って生じることを見出していた³。そこで、plk4 の集積・活性に依存して制御される下流因子の制御状態を反映して、人工的なシグナル伝達系を on/off 制御できる人工遺伝子回路の設計を試みた。チェックポイント回路は、plk4 活性をモニターするセンサー部分と、その情報をもとに細胞周期進行を制御するアクチュエータ部分から構成されることを想定し、まずセンサー部分の開発を行った。

具体的には、plk4 の活性に依存して相互作用性が変化する中心体タンパク質の STIL および SAS6⁵ の相互作用ドメインに、それぞれ分割した TEV プロテアーゼ⁶ を融合した人工遺伝子を作製し、plk4 の活性依存的に特異アミノ酸配列切断活性を付与する回路の構成を試みた。

(2) 中心体要求性のバイパスによる安定一倍体細胞株の樹立

中心体は多くの動物種細胞の分裂制御に関与する一方、マウス卵割胚のように中心体のない状態で双極性の分裂を行う細胞もあり、ヒト体細胞においても中心体を人為的に喪失した細胞で中心体非依存的な紡錘体形成経路が機能して、分裂が完了しうることが明らかにされてきた。特に、ユビキチンリガーゼの TRIM37 は中心体非依存的な紡錘体形成に関わるタンパク質群の量や集合の制御を介して、中心体非依存的な紡錘体形成能を負に調整する機能をもつことが近年明らかにされた⁷。この知見に基づき、TRIM37 をノックアウトして中心体非依存的な紡錘体形成を促進した遺伝的背景の一倍体 HAP1 を作出して、その染色体安定性への影響の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) 中心体複製をモニターする「チェックポイント」の人工合成による一倍体安定化

上述の plk4 下流因子について、中心体局在および両者相互作用に關するドメインを含む遺伝子断片に分断型 TEV プロテアーゼを半分ずつ融合した人工遺伝子を作製し、ヒト培養細胞株（まず機能解析のために中心体追跡の容易な HeLa 細胞を用いた）にトランスフェクションしたところ、内在性の plk4 制御経路との干渉による中心体複製不全が起こり、安定発現細胞株が形成されなかった。そこで、人工遺伝子のトランケート長、タグ配置などを変化させた人工遺伝子候補をさらに作製し、中心体複製への作用を指標として毒性の低いものを選別した。この結果、内在性の中心体制御への干渉性の低い人工遺伝子の作製に成功し、その安定発現細胞株を得た。今後はこの人工遺伝子を用いて、中心体進行に応じた TEV 活性変化をモニターし、中心体複製センサーとしての機能評価を行い、人工回路の開発を進める。

なお、本研究を推進する過程で、後述する(2)のアプローチにより当初の予想を上回る顕著な一倍体の安定化を実現できる兆候を得たことから、(2)による安定化の確証と原理の探求により重点を置いて研究を展開した。

(2) 中心体要求性のバイパスによる安定一倍体細胞株の樹立

TRIM37 をロックアウトした HAP1 一倍体および二倍体細胞を作成し、中心体複製を plk4 の阻害により人為的に阻害して中心体喪失を起こした際の、双極紡錘体形成および染色体安定性への影響を間接蛍光抗体法およびフローサイトメトリー法で解析した。この結果、二倍体細胞では TRIM37 のロックアウトによって分裂制御および染色体安定性への中心体要求性がほぼ完全にバイパスされ、中心体喪失条件下でも、双極性の紡錘体が高い頻度で形成され、安定な分裂増殖により二倍体状態が保持された。一方、一倍体細胞では、TRIM37 KO 背景においても、中心体要求性が解消されず、plk4 阻害下では紡錘体が著しく単極化し、頻繁な分裂制御不全により数日の培養によってほぼすべての細胞が二倍体化を起こすことが分かった。この結果から、一倍体状態では、中心体の複製制御系に加えて、中心体非依存性の分裂制御経路にも脆弱性が生じていることが明らかとなった。この原因を探るため、蛍光イメージングで plk4 阻害下の TRIM37KO 一倍体および二倍体細胞の紡錘体構造やタンパク質集積を比較解析したところ、前者では後者に比べ、紡錘体極形成に關するタンパク質 cep192 の紡錘体極への集積が減弱化していることを発見した。興味深いことに、plk4 阻害下の TRIM37KO 一倍体細胞に外来性の cep192-EGFP を導入して発現量を補強したところ、二倍体コントロールと同様のレベルにまで紡錘体の双極性と染色体安定性が回復することが分かった。また、この cep192 を補強した TRIM37KO 一倍体細胞は、長期連続培養において一倍体状態の安定性が顕著に向上し、一か月の培養を経ても一倍体状態を保持できることが明らかになった(図1)。このように本研究により、一倍体のもつ中心体非依存性経路の脆弱性が明らかになり、その脆弱性の分子基盤を特定した。さらに遺伝子操作によってこの脆弱性を補強することで、一倍体特有の不安定性を克服可能であることが分かった。

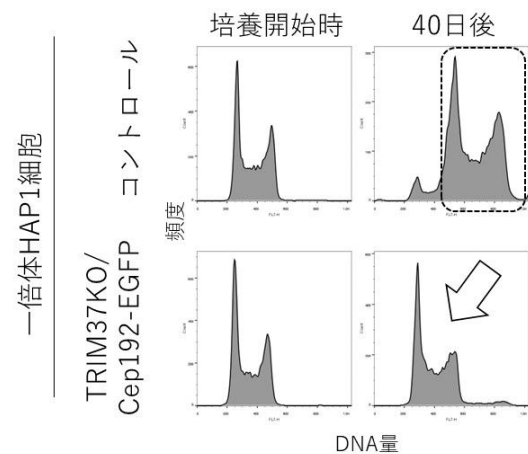


図1. 一倍体細胞の安定化

コントロール一倍体細胞株は40日間の培養でほぼ完全に二倍体化したのに対し、上述の遺伝子操作を施した株ではほぼもとの一倍体状態が保持された。

引用文献

- Wutz, Haploid animal cells. *Development* 2014 141:1423-1426
- Liu and Li, Advances in haploid embryonic stem cell research. *Biol Reprod.* 2022 107:250-260
- Yaguchi, et al., Uncoordinated centrosome cycle underlies the instability of non-diploid somatic cells in mammals. *J Cell Biol.* 2018 217: 2463-2483
- Yoshizawa, et al., Uncoupling of DNA replication and centrosome duplication cycles is a primary cause of haploid instability in mammalian somatic cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020 8:721
- Ohta, et al., Direct interaction of plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nat Commun.* 2014 5:5267
- Wehr et al., Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat Methods* 2006 3: 985-993

Meitinger et al., TRIM37 controls cancer-specific vulnerability to PLK4 inhibition.
Nature 2020 585: 440-446

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kamasaki Tomoko, Uehara Ryota, Fujita Yasuyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Ultrastructural Characteristics of Finger-Like Membrane Protrusions in Cell Competition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfac017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizawa Koya, Matsura Akira, Shimada Masaya, Ishida Ishihara Sumire, Sato Fuyu, Yamamoto Takahiro, Yaguchi Kan, Kawamoto Eiji, Kuroda Taruho, Matsuo Kazuya, Tamaoki Nobuyuki, Sakai Ryuichi, Shimada Yasuhito, Mishra Mithilesh, Uehara Ryota	4. 巻 -
2. 論文標題 Tetraploidy linked sensitization to CENP E inhibition in human cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.13379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yaguchi Kan, Saito Daiki, Menon Triveni, Matsura Akira, Mizutani Takeomi, Kotani Tomoya, Nair Sreelaja, Uehara Ryota	4. 巻 -
2. 論文標題 Centrosome Loss And Cell Proliferation Defects Underlie Developmental Failure In Haploid Zebrafish Larvae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.05.12.491746	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上原亮太
2. 発表標題 動物生活環を特徴づける“倍数性・中心体リンク”
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上原亮太
2. 発表標題 染色体倍加に伴う中心体の量的変化の作用
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上原亮太
2. 発表標題 染色体倍加に伴う中心体活性亢進の原理と意義
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関