

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14727

研究課題名（和文）細胞核の構造的特性を理解するためのin vitro再構築系の開発

研究課題名（英文）in vitro reconstruction system for understanding nuclear structural property

研究代表者

原 裕貴（Hara, Yuki）

山口大学・大学院創成科学研究科 ・講師

研究者番号：80767913

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：「核の構造的特性」の理解を本研究の目的とし、核内の特徴量に着目した核のサイズの増大速度の制御機構に関する解析を進めた。その結果、核内DNA量に合わせて核のサイズを制御する機構の存在を示唆する実験的証拠を得ることに成功した。この実験結果を中心として研究論文にまとめ、論文を投稿した（査読中）。さらに、生物種横断的に核サイズのデータを比較解析することで、高等真核生物種のみが保存する核ラミナ構造により、核サイズが核内DNA量依存的に制御される新規仮説を提案した。この核サイズデータの種間比較解析による結果は、研究論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示した核内のDNA量やクロマチン構造により核サイズを制御する新規機構は、既存研究で主眼が置かれていた核構成タンパク質の量による核サイズ制御機構とは異なる観点から解析を進めることで、初めて提案するに至った。クロマチン構造は核内の機能である転写やDNA複製と密接に関連するため、本研究成果は核サイズと核内機能の双方向的な結びつきを強く示唆するものであり、当該細胞生物学領域での大きなインパクトを有する。

研究成果の概要（英文）：For the sake of understanding structural properties in a nucleus, we analyzed mechanisms for controlling the nuclear size by focusing on intranuclear components and physical properties of chromatin. As a result, we proposed a novel mechanism for DNA-amount-dependent nuclear-size-scaling. Furthermore, through comparison of nuclear size across the Tree of life including eukaryotes and prokaryotes, we suggested the DNA-amount-dependent nuclear-size-scaling is only conserved within multicellular eukaryotes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞核 クロマチン構造 核サイズ サイズ生物学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞核は、細胞質から DNA を物理的に隔離する役割だけでなく、DNA の機能をも制御する。核のサイズは発生過程や細胞の種類によって大きく異なるため、核のサイズは細胞の性質に合わせて適切に制御される必要がある。この核のサイズを制御する分子機構に関しては、特に無細胞再構築系を用いた研究により、その理解が飛躍的に進展した。約 30 年前に開発されたアフリカツメガエルの卵抽出液を用いた無細胞再構築系では、未受精卵から抽出した細胞質に単離した精子クロマチンを加え培養することで、*in vitro* の条件下で核の再構築が可能である。これまでの申請者らが蓄積した分子機構の知見を基に、核の材料の供給能力や核の周囲の物理的環境を人為的に操作すれば、理論上、この無細胞再構築系において核のサイズを思いのままに操作することが可能である。しかし、開発されて以来約 30 年が経過した現在でも、無細胞再構築系を用いて以下の 2 つの核の特徴を再現できていない。

- (1) **細胞自体のサイズを超える巨大な核**：従来の無細胞再構築系では、直径約 40 μm の核の再構築が可能であるが、卵母細胞で見られる巨大な核 (直径約 400 μm) を再構築できていない。
- (2) **人工 DNA 材料からの機能的な核の構築**：精子クロマチンの代わりに DNA 結合マイクロビーズを用いると、その周囲に核膜の構造を構築することはできるが、構築された構造のサイズを全く増大させることが出来ない。

2. 研究の目的

本研究課題では、(1) 巨大な核、(2) 人工的な DNA 材料から機能的な核を *in vitro* の条件下で再構築するのに必要な細胞内環境を探索する。さらに、得られた結果を基に、機能的な核を構築するための構造体としての核の特性の理解を試みる。このような構造的特性の観点や核内部構造物の影響を加味することで、実際の細胞内環境の核の構成能力を評価し、核の構築機構の理解を深める。

3. 研究の方法

(1) 巨大な核を再構成する実験条件の探索

核の可視化・標識法を改善・検討することで、核内外で生じる様々なイベント (例：DNA 複製、核の変形) と核のサイズの増大速度との関係性を理解する。さらに、培養環境や卵抽出過程、さらに核の構成材料の供給能力に着目し、核増大速度を上昇させる実験条件を探索する。

(2) DNA ビーズ核からの核再構成と核構造の解析

従来の DNA ビーズ作製法を参考に、DNA 量や結合させる DNA の物理的性質を改良することで、*in vitro* 条件で再構成される核の増大速度の改善を試みる。さらに、再構成した核の構造を解析することで、DNA の物理特性と核構造の相互関係の理解を試みる。

4. 研究成果

(1) 核内クロマチン構造依存的に核サイズを制御する機構の提唱

従来型のアフリカツメガエル卵細胞質抽出液を用いて核を *in vitro* 再構築系する際に、核形成初期の DNA 複製時に核サイズ増大速度が高いことを実感していた。そこで、DNA 複製のような DNA 量の増加が核サイズ増大制御に与える影響を実験的に検証した。核内 DNA の物理量を様々な手法で操作すると、核サイズの増大速度や核の最大サイズが DNA 量に正の相関を示す実験的証拠を得た (次頁・図 1)。さらに、DNA 量だけでなく、核内のクロマチン構造 (クロマチンの凝縮度) が核サイズの増大速度制御に影響を与える実験的証拠も得た。全ての結果を統合し、核内の DNA・クロマチンの物理特性

が核サイズを制御する新規の制御機構を提案した (Heijo, Hara, et al., *SneakPeek2.0* (2019) preprint)。

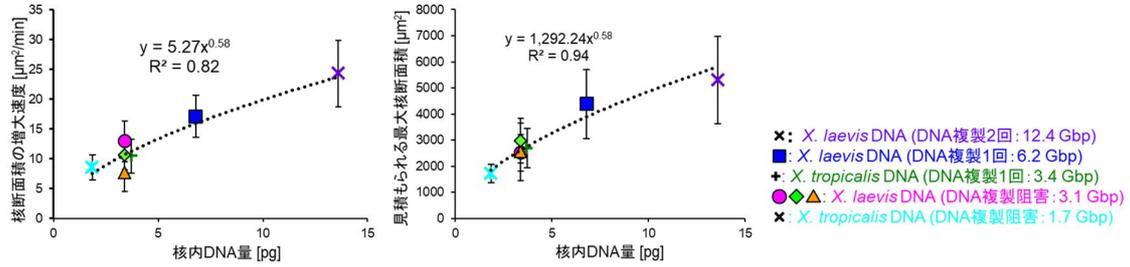


図1：核内DNA量と核サイズの増大速度と最大サイズの関係。両者間には強い相関がみられる。

(2) 核 DNA 量依存性な核サイズ制御機構の比較解析

(1) で検出した核内 DNA 量と核サイズの相関関係が真核生物種間での保存性を検証するために、真核生物種だけでなく核様体を有する原核生物を含めた多様な生物種間で核サイズの比較解析を行った。その結果、核サイズと細胞サイズの相関関係は、原核生物の核様体を含め、全ての生物種間で保存されている一方で、核サイズと DNA 量の相関関係は高等真核生物（多細胞真核生物）のみで保存されていることを明らかにした。この比較により、核内 DNA の高次構造の形成にも関与する核ラミナの構造が高等真核生物でのみ保持され、核ラミナの構造的剛性や核ラミナとクロマチンの相互作用により、核サイズ制御を可能にする新規仮説を導いた (図 2 : Hara, *Journal of Cell Science*, (2020) in press)。

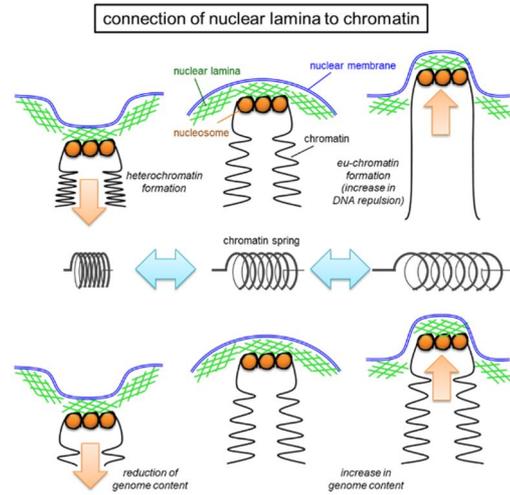


図2：高等真核生物内での核ラミナの働き。核ラミナとの結合により、クロマチンが有するバネ様の力が、核膜へと伝わり核サイズ制御に関与する。

(3) DNA ビーズ核再構成条件の検討

DNA 結合ビーズを調製し、アフリカツメガエル卵抽出液による核の *in vitro* 無細胞再構築系を用い、DNA 結合ビーズからの核の再構成に成功した。この再構成した核には、核膜孔複合体が再構成され、核内タンパク質輸送が生じていることも確認できた。その一方で、現状の実験条件では、アフリカツメガエル卵抽出液中で DNA ビーズ核のサイズを増大させることは出来なかった。今後も引き続きビーズに結合させる DNA 構造の改変を試み、核サイズが増大する実験条件の探索を継続する。

(4) 卵黄顆粒による核サイズ増大速度制御に与える影響の解析

様々な細胞内オルガネラに着目し、核サイズ制御に与える影響を解析した。その結果、アフリカツメガエル胚の動物極側に多数含まれる卵黄顆粒が、核サイズ増大を抑制する方向に働くことを明らかにした (図 3)。核近傍に集積する卵黄顆粒は、核へと脂質膜の供給する小胞体を核近傍へと集積することの物理的障害となり、脂質供給低下を介した核サイズ増大速度の低下に繋がる新規細胞内現象を解明した (現在論文作成中)。

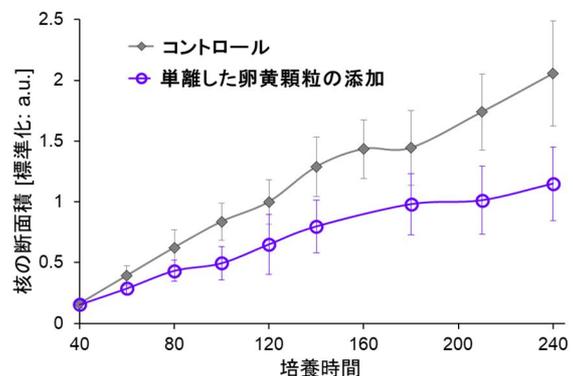


図3：単離した卵黄顆粒を添加することで、核サイズ増大速度が低下する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 原裕貴	4. 巻 36(13)
2. 論文標題 細胞のサイズを感知し、核のサイズは制御される 核サイズのスケーリング	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2174-2180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 原 裕貴	4. 巻 56(5)
2. 論文標題 ダイニンに依存した核膜成分の集積による細胞核の大きさ制御	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 275-277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.56.275	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 Yuki Hara, Kenta Adachi, Shunsuke Kagohashi, Kazuo Yamagata, Hideyuki Tanabe, Shinji Kikuchi, Sei-Ichi Okumura, Akatsuki Kimura	4. 巻 19
2. 論文標題 Scaling relationship between intra-nuclear DNA density and chromosomal condensation in metazoan and plant	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Chromosome Science	6. 最初と最後の頁 43-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11352/scr.19.43	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 Heijo Hiroko, Shimogama Sora, Nakano Shuichi, Miyata Anna, Iwao Yasuhiro, Hara Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA Content Contributes to Nuclear Size Control in <i>Xenopus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 SSRN Electronic Journal	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） 10.2139/ssrn.3461734	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 -

1. 著者名 Yuki Hara	4. 巻 -
2. 論文標題 Specialization of nuclear membrane in eukaryotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	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) 10.1242/jcs.241869	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 Iwao Yasuhiro, Kimoto Chihiro, Fujimoto Ayaka, Suda Asuka, Hara Yuki	4. 巻 87
2. 論文標題 Physiological polyspermy: Selection of a sperm nucleus for the development of diploid genomes in amphibians	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 358 ~ 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23235	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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 細胞核サイズのスケールリング
3. 学会等名 サイズ生物学ワークショップ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Hara
2. 発表標題 DNA-content-dependent nuclear size control in Xenopus.
3. 学会等名 第36回染色体ワークショップ/第17回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 細胞核のサイズ制御
3. 学会等名 第2回 IoLシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 Nuclear size scaling with cell size and DNA content in Xenopus
3. 学会等名 56th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 核内DNA量に依存した核のサイズ制御
3. 学会等名 HiHA&HIRAKU 若手研究者 Workshop (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Hara
2. 発表標題 Nuclear size scaling with DNA content in Xenopus
3. 学会等名 17th international Xenopus Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 オルガネラのサイズは細胞内病態のバイオマーカーとなりうるか
3. 学会等名 がんの増殖抑制 公開講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平城 裕子, 原 裕貴
2. 発表標題 アフリカツメガエルにおけるDNA量依存的な核サイズ制御機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原 裕貴, 平城 裕子
2. 発表標題 ツメガエル核-細胞質雑種における細胞内構造サイズ制御の不適合性
3. 学会等名 第88回日本動物学会大会(富山)（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuki Hara
2. 発表標題 Size scaling of the cell nucleus
3. 学会等名 5th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 細胞内空間の制約による細胞核の大きさ制御機構
3. 学会等名 第8回定量生物学の会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 ダイニン・微小管による膜の成分の供給が核の大きさの増大速度を制御する
3. 学会等名 第68回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Heijo Hiroko, Yuki Hara
2. 発表標題 DNA-content-dependent nuclear expansion in <i>Xenopus laevis</i>
3. 学会等名 5th International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuki Hara
2. 発表標題 Positioning of the nucleus inside the cell regulates the nuclear expansion by changing dynein-based accumulation of membranes
3. 学会等名 12th International Congress of Cell biology（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 無細胞再構築系を用いた細胞核のIn vitro再構築とその応用
3. 学会等名 第八回光塾
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 細胞内構造体のスケーリングに関する進化細胞生物学的解析
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 アフリカツメガエルにおいてDNAが核のサイズ決定に影響を与える
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 裕貴
2. 発表標題 サイズ細胞生物学：細胞は核のサイズをどのようにデザインするか？
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0 (招待講演)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----