

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02915

研究課題名(和文) 進化上保存された核サイズ恒常性維持機構の全容解明とその生理学的意義の検証

研究課題名(英文) Analysis of control mechanisms of nuclear size homeostasis and their physiological significance

研究代表者

久米 一規 (Kume, Kazunori)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授

研究者番号：80452613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核の大きさは、真核生物において厳密に制御され、細胞増殖時に核と細胞の体積比は一定に維持されている(核サイズ恒常性維持機構)。しかし、核サイズ恒常性維持機構の実体や生理学的意義については不明な点が多く、生物学における大きな謎である。本研究は、進化上高度に保存された核膜タンパク質Lem2による核サイズの恒常性維持機構の全容解明、当該機構の生理学的意義の解明を目的とした。分裂酵母と線虫をモデルとして用いた解析の結果、核サイズ恒常性維持に重要なLem2を中心とした分子ネットワークを明らかにした。さらに、当該制御の破綻は脂質代謝関連遺伝子の遺伝子発現および脂質代謝に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核サイズ恒常性の破綻は、老化細胞や多種のがん細胞でみられる異常であることから、核サイズ恒常性の破綻と細胞の老化やがん化との関連性が示唆されている。本研究は、分裂酵母と線虫をモデルとして用いた解析により、進化上高度に保存された核膜タンパク質Lem2を中心とした分子ネットワークを同定し、核サイズ恒常性維持機構に重要な分子経路の一端を明らかにした。さらに、当該制御の重要性を検証し、脂質代謝との関連性を示唆する結果を得た。これらの成果は、長年生物学において謎とされている核サイズ制御機構の理解への貢献に加え、細胞の老化やがん化、関連する疾患との因果関係解明に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The size of cell nuclei is strictly regulated in eukaryotes, with the nucleus-to-cell volume ratio maintained at a constant level (nuclear size homeostasis mechanism). However, the substance and physiological significance of the nuclear size homeostasis mechanism is still unclear and is one of the great mysteries in biology. In this study, we focused on evolutionary conserved nuclear membrane protein Lem2 and revealed the molecular network involved in nuclear size homeostasis. Furthermore, we found that perturbation of nuclear size homeostasis altered gene expression of lipid metabolism genes and lipid metabolism involved in structural membranes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核サイズ 分裂酵母 線虫 核膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、ゲノム DNA を収納する核は、生命継承を担う重要な細胞小器官である。核サイズはほとんどの生物で厳密に制御され、核と細胞の体積比 (N/C ratio : ratio between nuclear volume and cell volume) がほぼ一定に保たれている。この普遍的現象が最初に報告されて 120 年以上が経過しているが、核サイズの恒常性維持機構の実体については不明な点が多く、生物学における大きな謎の一つとされている。さらに、当該制御の生理学的意義についても不明であるが、そのヒントとなる知見として、老化細胞やがん細胞が示す核サイズの恒常性の破綻があげられる。つまり、核サイズ制御の破綻と細胞の老化・がん化との関連性が示唆されており、重要な研究課題といえる。

これまでに、真核生物のモデルである分裂酵母を用いた核サイズ研究 (Neumann and Nurse, *J Cell Biol*, 2007) から、細胞増殖時の核サイズ制御の 3 つの特徴がわかってきた。それらは、分裂酵母の N/C ratio は 0.08 であること、N/C ratio = 0.08 は細胞周期を通して一定に維持されること、核に含まれる DNA 含量は N/C ratio の決定因子ではないことである。しかし、N/C ratio の決定因子や N/C ratio を維持する因子については不明であった。そこで研究代表者は、当該因子を明らかにし、核サイズ制御機構の全容を解明すべく、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリを用いて N/C ratio が異常を示す変異体の網羅的スクリーニングを実施した。そして、当該変異体を複数選抜することに成功した (Kume et al, *PLoS Genet*, 2017)。選抜した変異体の中で、核が肥大化して N/C ratio が増加する変異体の解析から、N/C ratio の恒常性維持には少なくとも 2 つの細胞内プロセス (核と細胞質間の物質輸送と脂質代謝) の適切な制御が重要であることを明らかにした。さらに、上記プロセスの下流において、N/C ratio の恒常性維持にとってキーとなる進化上高度に保存された核膜タンパク質 Lem2 を同定し、Lem2 が核膜と小胞体膜の間の膜の流入および流出を調節するバルブとして機能することをつきとめ、核サイズ制御の新規モデルを提唱した (Kume et al, *Nat Commun*, 2019)。研究代表者の分裂酵母を用いた研究を含む世界の核サイズ研究から、核サイズ制御に関わる因子の同定が進み、核サイズ (N/C ratio) の恒常性維持機構の一端が明らかとなってきたが、その詳細な分子機構、および当該機構の普遍性や生理学的意義については不明な点が多く、解明すべきことが数多く残されている。

2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母と線虫をモデルとして用いて、核サイズの恒常性維持機構の全容解明と普遍性の検証、さらには、当該機構の生理学的意義の理解を目指した。研究代表者は、分裂酵母を用いたこれまでの研究で核膜タンパク質 Lem2 が核サイズの恒常性を維持するための主要因子であることを見出していた。そこで、Lem2 に着目した解析を進めることが、核サイズの恒常性維持機構の理解につながると考え、以下の研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 核サイズ恒常性維持機構の解析

(1-1) N/C ratio 恒常性維持機構において Lem2 と機能関連する分子の探索と機能解析

分裂酵母を用いて、Lem2 と相互作用する分子の中から、Lem2 と機能関連する分子を探索した。Lem2 に GFP タグを融合した株を構築して、細胞抽出液から anti-GFP 抗体を用いた免疫沈降を実施し、Lem2 と相互作用する分子を質量分析により探索した。そして、相互作用する分子についての遺伝学的解析を進め、Lem2 と機能関連する分子を選抜し、当該分子の機能解析を行なった。

(1-2) 核サイズ恒常性維持機構の普遍性の検証

線虫の Lem-2 や Lem-2 と機能関連する遺伝子群について、プラスミドを用いて分裂酵母で発現する系を構築し、核サイズへの影響を調べた。また、線虫を用いて、核サイズ恒常性を評価する測定システムを構築した。そして、分裂酵母において核サイズ恒常性維持に関わる Lem2 を含む遺伝子群について、線虫の相同遺伝子を RNAi によりノックダウンした株を用いて、核サイズを評価した。

(2) 核サイズ恒常性維持機構の生理学的意義の解析

研究代表者がこれまでに選抜した複数の N/C ratio 異常変異体 (分裂酵母) を用いて、核サイズ恒常性の破綻が細胞内構造 (核内構造、膜型オルガネラ、非膜型オルガネラ、細胞サイズ) に与える影響を調べるために、各構造を蛍光ラベルした株もしくは蛍光プローブを用いて蛍光顕微鏡により観察を行なった。細胞内構造の異常が確認できた株について、トランスクリプトーム解析を実施し、N/C ratio の変化により遺伝子発現が変化した共通の遺伝子群を探索した。さらに、選抜した遺伝子群と核サイズ恒常性維持との機能関連性を調べるために、遺伝学的解析やストレス感受性試験を行なった。

4. 研究成果

(1) 核サイズ恒常性維持機構の解析

(1-1) 核膜タンパク質 Lem2 による核サイズ恒常性維持機構の全体像を明らかにするために、分裂酵母を用いて、Lem2 と相互作用する分子を探索した結果、約 2,000 のタンパク質のうち、コントロール株と比較して、有意なスコアを示した 93 のタンパク質を選抜できた。次に、選抜したタンパク質の機能や細胞内局在についての既存の情報をもとに、Lem2 の機能や核サイズ制御と関連する可能性のあるタンパク質に絞り込みを行なったうえで、遺伝子欠損株や過剰発現株を用いた遺伝学的解析を実施した。そして、N/C ratio の恒常性維持において Lem2 の上流および下流で機能する可能性のあるそれぞれの因子を複数特定した。さらに、複数の上流因子の中から主要経路を絞り込むために、選抜した上流因子と Lem2 とを強制的に結合させた株を構築して、Lem2 の機能(タンパク量や局在など)および核サイズに与える影響を調べた。そして Lem2 を制御する主要因子を特定した。また、Lem2 の部分欠損株を用いた解析により、上流因子による Lem2 の制御には、Lem2 の N 末端に存在する DNA 結合ドメインは必要ないことがわかった。一方、Lem2 の下流では、小胞体の構造変化や脂質代謝に関わる因子が含まれており、これらの因子の過剰発現が Lem2 の過剰発現による核サイズへの変化と同様の変化を引き起こすことがわかった。さらに、これらの下流因子は、上記の上流因子の下流で核サイズの恒常性維持に関わることがわかった。以上の結果より、核サイズの恒常性維持において、Lem2 を中心とした分子ネットワークの全体像の一端が明らかとなった。現在、上流因子による Lem2 の制御機構や Lem2 と下流分子との機能的関係についての詳細な解析を進めている。

(1-2) 分裂酵母の Lem2 による核サイズ恒常性維持機構の普遍性を検証するために、分裂酵母および線虫を用いた解析を行なった。線虫の Lem-2 や Lnp-1(分裂酵母において、Lem2 の機能を相補する小胞体膜タンパク質)を分裂酵母で発現する系を構築し、核サイズへの影響を調べた。分裂酵母において、Lem2 を高発現すると核サイズを減少させることから、この表現型を指標として、線虫の各遺伝子を高発現した細胞を用いて核サイズを測定した。その結果、Lem-2 や Lnp-1 の高発現は、分裂酵母 Lem2 や Lnp1 の高発現が示す表現型と同じ表現型を示したことから、線虫の Lem-2 と Lnp-1 は、核サイズ制御において、分裂酵母の各遺伝子と同様の機能を有することが示唆された。また、線虫において Lem-2 や Lnp-1 との機能関連性が示されている複数のタンパク質についても同様の実験を実施した。そして、複数の遺伝子について、発現量の変化に応じて核サイズが増減することがわかった。つまり、これらの遺伝子は、新規の核サイズ制御因子であることが示唆された。今後これらの遺伝子による核サイズへの影響を、線虫および分裂酵母を用いて、詳細な解析を進めていく予定である。線虫を用いた解析では、核サイズ測定システムの構築に成功し、分裂酵母において核サイズ恒常性維持に関わる遺伝子群の RNAi によりノックダウンした株を用いて、胚発生期の細胞における核サイズを評価した。そして、複数の遺伝子のノックダウンにより、核形態や核分裂の異常を示すことがわかった。今後は、分裂酵母での発現系も利用して、更なる解析を進めていく予定である。

(2) 核サイズ恒常性維持機構の生理学的意義の解析

これまでに研究代表者が選抜した分裂酵母の核サイズ異常変異体を用いて、細胞内構造を調べたところ、野生株と比較して、特に、ミトコンドリア、小胞体、脂肪滴の構造(サイズ、形態、数など)が変化した変異体を複数特定することができた。異常が確認できた変異体について、トランスクリプトーム解析を行なった結果、脂質代謝に関わる遺伝子群(構造リン脂質の代謝や貯蔵脂質の代謝に関わる遺伝子群など)の発現が大きく変化していることがわかった。次に、これらの遺伝子群の中から、主要なものについて、タンパク質レベルでの発現量を確認したところ、転写レベルでの変化と同様の変化がみられたことから、核サイズの恒常性の破綻と脂質代謝との関連性が示唆された。このことを確かめるために、発現変化を示した遺伝子群に注目して、脂質代謝の各種阻害剤や遺伝子欠損株を用いた遺伝学的解析を実施したところ、構造リン脂質の代謝に関わる遺伝子群との組み合わせにより、複数の核サイズ異常変異体が合成致死性を示すことがわかった。つまり、核サイズ恒常性の破綻による生存率の維持には構造リン脂質の合成が必要であることが示唆された。脂質代謝は核サイズ制御における核膜成長に関わることから、今後は核サイズ異常変異体でみられる脂質代謝遺伝子の発現変化が、核サイズ恒常性の破綻に起因するかを明らかにするとともに、細胞増殖における核サイズ制御と脂質代謝の関係についての詳細な解析を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kume Kazunori, Nishikawa Kenji, Furuyama Rikuto, Fujimoto Takahiro, Koyano Takayuki, Matsuyama Makoto, Mizunuma Masaki, Hirata Dai	4. 巻 14
2. 論文標題 The fission yeast NDR kinase Orb6 and its signalling pathway MOR regulate cytoplasmic microtubule organization during the cell cycle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 1, 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsob.230440	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 -
1. 著者名 Koyano Takayuki, Fujimoto Takahiro, Onishi Kaori, Matsuyama Makoto, Fukushima Masaki, Kume Kazunori	4. 巻 28
2. 論文標題 Pkd2, mutations linking to autosomal dominant polycystic kidney disease, localizes to the endoplasmic reticulum and regulates calcium signaling in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 811 ~ 820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13069	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 藤本 亮玄、久米一規	4. 巻 54
2. 論文標題 分裂酵母の核サイズ制御のしくみと核サイズ操作技術への展開	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 48, 51
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 久米一規	4. 巻 60
2. 論文標題 真核生物における核のサイズ制御の仕組み 細胞のサイズを感知して核のサイズを制御するメカニズムとは？	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 56, 60
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 藤本亮玄、久米一規	4. 巻 6
2. 論文標題 細胞サイズと連動した核サイズ制御機構と核サイズ操作技術への展開	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 56、60
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 Scotchman Elizabeth、Kume Kazunori、Navarro Francisco J.、Nurse Paul	4. 巻 134
2. 論文標題 Identification of mutants with increased variation in cell size at onset of mitosis in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1、11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.251769	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 該当する

〔学会発表〕 計38件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kazunori Kume, Paul Nurse
2. 発表標題 The formation of nuclear aggregates promotes nuclear membrane growth in fission yeast
3. 学会等名 The 11th International Fission Yeast Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takahiro Fujimoto, Kazunori Kume
2. 発表標題 Overexpression of nuclear export signal leads to nuclear expansion in fission yeast
3. 学会等名 The 11th International Fission Yeast Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Harumi Hiramatsu, Kazunori Kume
2. 発表標題 Role of endoplasmic reticulum structure and lipid synthesis in nuclear membrane growth in fission yeast
3. 学会等名 The 11th International Fission Yeast Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rikuto Furuyama, Dai Hirata, Kazunori Kume
2. 発表標題 Fission yeast morphogenesis Orb6 network (MOR) regulates the organization of cytoplasmic microtubules
3. 学会等名 The 11th International Fission Yeast Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久米一規、平松暖海、Paul Nurse
2. 発表標題 分裂酵母の核と細胞のサイズ連動性が破綻した核サイズ減少変異体の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤本亮玄、久米一規
2. 発表標題 核外輸送シグナルの過剰発現による核肥大化メカニズムの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神田颯太、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母Hsp70核内輸送因子の過剰発現による核肥大化メカニズムの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田遙、藤本亮玄、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核-細胞質間輸送因子が関わる核膜構造維持機構の解析
3. 学会等名 第40回イーストワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazunori Kume, Harumi Hiramatsu, Paul Nurse
2. 発表標題 Role of endoplasmic reticulum structure and lipid synthesis in nuclear size control
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 核と細胞サイズ運動性を制御する仕組み
3. 学会等名 サイズ生物学ワークショップ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田 遥、久米一規、藤本亮玄
2. 発表標題 分裂酵母の核-細胞質間輸送因子が関わる核膜構造維持機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 久米一規、Paul Nurse
2. 発表標題 分裂酵母の核肥大化メカニズムの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 mRNA核外輸送の破綻により引き起こされる核肥大化のメカニズムの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第55回 研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤本亮玄、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核-細胞質間輸送システムによる核サイズ制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第55回 研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高嶋宏太、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核サイズ恒常性維持に関わる脂質代謝制御メカニズムの解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第55回 研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平松暖海、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母におけるN/C ratio減少変異体ptr6の解析
3. 学会等名 第39回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 細胞サイズと連動した核サイズの恒常性維持機構
3. 学会等名 広島大学 健康長寿研究拠点 ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 普遍的な核サイズ制御機構の理解を目指して ~核と細胞のサイズ連動性が破綻した分裂酵母変異体の解析~
3. 学会等名 山口大学 ゲノム量変動生物学研究推進体・キックオフ研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 細胞機能を司る核のサイズ制御のしくみ
3. 学会等名 第23回 酵母合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 核の空間サイズを制御する仕組みとは？
3. 学会等名 第44回 分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田颯太、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核-細胞質間輸送システムによる核サイズ制御機構の解析
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本亮玄、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核-細胞質間輸送システムによる核サイズ制御機構の解析
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本堯玄、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核-細胞質間輸送システムによる核サイズ制御機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第54回 研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本堯玄、水沼正樹、久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核-細胞質間輸送システムによる核サイズ制御機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度 京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久米一規
2. 発表標題 分裂酵母の核サイズ恒常性を破綻させる核内凝集体の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第53回 研究報告会
4. 発表年 2020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
研究分担者	原 裕貴 (Hara Yuki) (80767913)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・講師 (15501)	

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			
英国	フランシスクリック研究所			