

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03253

研究課題名（和文）オルガネラ間サイズネットワーク機構の実験的検証

研究課題名（英文）Evaluation of size network among intracellular organelles

研究代表者

原 裕貴（Hara, Yuki）

山口大学・大学院創成科学研究科 ・准教授

研究者番号：80767913

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）：本研究では、核のサイズと細胞内オルガネラである小胞体や細胞内顆粒、および細胞内分子のサイズや量との関係性を検証することを目的とした。さらに、摂動実験を通して、このサイズの関係性を制御する機構についての理解を進めた。

その結果、発生分化の過程や細胞サイズに合わせて変化する核周囲の小胞体のサイズや構造に合わせて、核のサイズ成長速度を変化させる仕組みの存在を示す実験的証拠を得ることに成功した。これら研究成果は3報の研究論文にまとめ論文発表し、加えて一部成果は論文作成中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体サイズと核サイズが、発生分化の過程で、相互に関連しながら変化することは古くから指摘されていたが、小胞体のサイズや構造を人工的に操作する本研究の手法を用いることで初めて、核サイズと小胞体構造との関係性を明確に示すことに成功した。また、種横断的な比較研究に発展させることで、この小胞体と核のサイズの相関関係が、特定の生物種だけではなく、真核生物種に保存された特徴であることを示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：The main focus of this research project is to understand the mechanisms of how the nuclear size is controlled by sensing the sizes and numbers of other organelles including endoplasmic reticulum, intracellular granules, and molecules. As a consequence, we obtained some novel relationships that the nuclear size changes together with the size and structure of the endoplasmic reticulum surrounding the nucleus and intracellular environments. Furthermore, we have reported the experimental results and proposed mechanisms as three research papers.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ サイズ 核 小胞体 線虫 分裂酵母 ツメガエル

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内には、共通して脂質二重膜で囲まれた構造をもつオルガネラが多種類存在し、外部環境に合わせ適切な細胞機能を発揮するために、オルガネラそれぞれの機能とそれに密接に関連するサイズを調節している。実際に、細胞周期や多細胞生物の発生・分化の過程で、オルガネラのサイズは劇的に変化する。例えば、一般的に核やミトコンドリアは間期の際にサイズを継続的に増大し、分裂期に移ると核は崩壊し、ミトコンドリアは断片化することでサイズを減少させる。また、多細胞生物では発生の進行に伴い、核の体積が大きく変化する。癌化や老化など機能異常が見られる細胞では、核が劇的に肥大化することが知られており、真核生物の細胞が内外の環境に合わせ細胞機能を順応させるためには、オルガネラのサイズの制御が重要となる。

そして、細胞内のオルガネラは単独でサイズを変化させるのではなく、複数のオルガネラが連動し、それらサイズを変動させることが推察される。実際に、核と小胞体はそれぞれを構成する脂質二重膜が物理的に繋がっており、小胞体から核へと膜を供給する仕組みが存在する。さらに小胞体はゴルジ体やリソソームなど複数オルガネラの形成に関与することを鑑みると、細胞内では複数オルガネラによるネットワークが形成されることが示唆される。そこで、細胞空間内の有限量の脂質膜を適切な比率で各オルガネラに分配し、それらサイズを決定する新規仮説「サイズネットワーク機構」を導いた。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞周期や発生過程での複数オルガネラのサイズ変化を定量し、サイズ変化の際のオルガネラ間ネットワークの有無の検証とその決定因子を解明する。

## 3. 研究の方法

[A: オルガネラサイズ定量法の確立]

オルガネラの中でも主要な、核、ミトコンドリア、小胞体、リソソーム、ゴルジ体に焦点を絞り、オルガネラの可視化法を検討した。観察には、個体が透明なため観察が容易であり、発生分化の過程を短時間で追跡可能な線虫 *Caenorhabditis elegans* 初期胚、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*, *in vitro* での細胞内オルガネラの再構成が可能な2種のツメガエル *Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis* の卵細胞を対象とした。その後、各オルガネラのサイズを測定し、核サイズと協調的に変化するオルガネラを探索した。

[B: 核サイズを中心としたサイズネットワーク機構の検証と決定因子の解明]

分裂酵母や線虫、アフリカツメガエルにおいて、Aで特定したオルガネラのサイズや、そのオルガネラ独自の構造に摂動を与え、核サイズの変化の程度を検証した。摂動実験には、関連遺伝子に対するRNAiや変異体作製、人工構造物を用いた物理的制約の付与を駆使した。これにより、オルガネラのサイズや構造の定量的な変化と核サイズ変化との関係性を特定すると共に、その関係性の背後に潜む遺伝子の特定を行った。

## 4. 研究成果

(1) 核周囲の小胞体サイズに合わせた核サイズ制御機構と種間保存性の解明

ネットイツメガエルの卵細胞質抽出液を用いた核の *in vitro* 再構成実験の際に、マイクロデバイスを駆使し、核周囲の細胞質空間を物理的に限定すると、間期核のサイズ増大速度が通常よりも低下する特徴を明らかにした(図1)。さらに、この空間は小胞体構造で満たされており、核のサイズが周囲に構築される小胞体構造のサイズに合わせて制御される機構の存在を示すことが出来た。この小胞体サイズ依存性は、姉妹種のアフリカツメガエルでも保存され

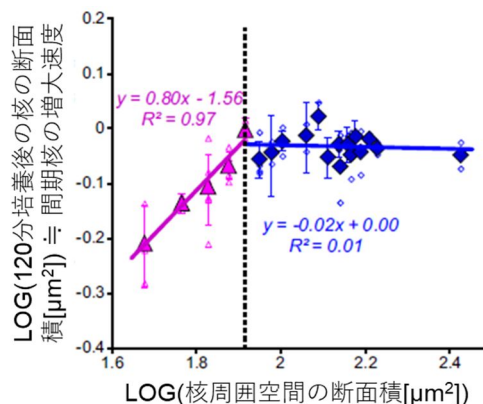


図1. 核周囲空間の限定による間期核サイズ増大速度への影響

ているが、核サイズに影響を与える小胞体構造のサイズには種間での違いがあることも示した（以上の結果を報告；Heijo, Hara et al, *Dev. Growth Differ.*, (2022)）。さらに、線虫初期胚において、核の形態に關与する遺伝子の RNAi を行なうと、小胞体サイズと核サイズのバランスが変化する特徴も見出している。これは核-小胞体間の脂質膜分配のバランスが存在し、核の形態変化により、そのバランスが変化したことが推察される（以上内容について現在投稿論文準備中）。

#### (2) 小胞体構造に合わせた核サイズ制御機構と種間保存性の解明

アフリカツメガエルの卵細胞質抽出液を用いた核の *in vitro* 再構成実験の際に、細胞質内に微細な人工構造物を添加すると、構造物が核周囲の小胞体構造の中に取り込まれ、小胞体構造が一部破損し、さらに核サイズの増大速度が低下する特徴を明らかにした（図 2：以上の結果を報告；Shimogama, Hara et al, *Dev. Biol.*, (2022)）。同様に線虫初期胚における特定遺伝子の RNAi による小胞体構造の破壊や、分裂酵母における遺伝子変異体を介した小胞体構造の変化により、間期核のサイズ増大速度が同時に低下する特徴が見出されており、小胞体構造による核サイズ制御機構は真核生物種に保存された機構であることが推察される（現在投稿論文準備中）。

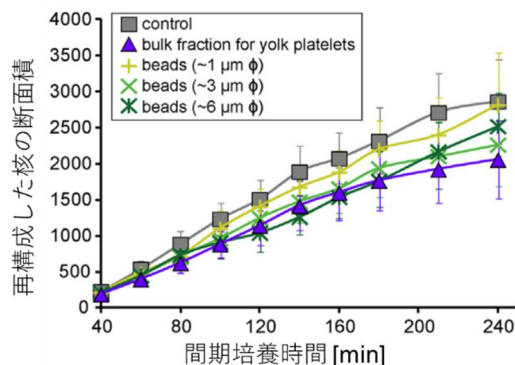


図2. 核再構成時に人工構造物（直径1, 3, 6 μmのビーズ、卵黄顆粒）を添加した条件での核サイズ増大ダイナミクス変化

#### (3) 真核生物種間での核サイズの比較解析

複数種のカエルから赤血球を単離し、核サイズと細胞サイズを測定し、さらに既知の文献情報から抽出した他生物種の赤血球の核サイズデータを統合し、生物種横断的な核サイズと細胞サイズの比較解析を行なった。その結果、特定分類群の赤血球では、核サイズは細胞サイズだけでなく、核内の DNA 量とも正の相関関係を示すことが示唆された（図 3：Niide, Hara et al, *Front. Cell Dev. Biol.*, (2022)）。この成果も統合すると、このような種間の核サイズ制御の背後には、細胞内の核に与える多様な「力」が存在し、それら複数の力の核サイズ決定への貢献度が生物種により異なる、新たな制御システムの存在が示唆された（Hara, *Curr. Opin. Cell Biol.*, (2023)）。

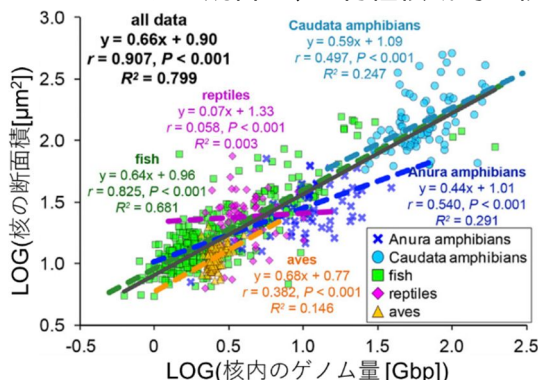


図3. 様々な真核生物種における有核赤血球の核サイズとゲノムサイズの関係

#### (4) 小胞体に依存しない細胞質分子による新規核サイズ制御機構の解明

アフリカツメガエルの卵細胞質抽出液を用いた核の *in vitro* 再構成実験の際に、細胞質の RNA を分解させると、間期核の増大速度が低下する特徴を見出した（図 4）。更なる細胞内分子の摂動実験により、RNA は小胞体の制御とは独立し、水溶性の RNA が保持するマイナス電荷が核内のクロマチン構造を変容させることで、核サイズの増大を促す新規の制御機構が示唆された。また真核細胞は、核サイズの直結する核内のクロマチン状態を最適に保つ RNA 濃度が存在することが想定される（以上の内容を現在稿論文準備中）。

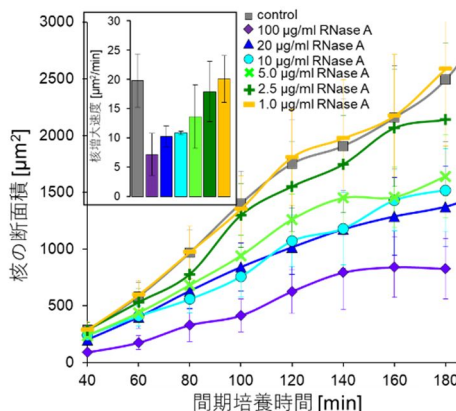


図4. 核再構成時にRNA分解酵素 (RNase A) を添加した条件での核サイズ増大ダイナミクス変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Heijo Hiroko, Merten Christoph A., Hara Yuki   | 4. 巻<br>64              |
| 2. 論文標題<br>Differential contribution of nuclear size scaling mechanisms between <i>Xenopus</i> species | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Development, Growth and Differentiation  | 6. 最初と最後の頁<br>501 ~ 507 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/dgd.12819  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>HARA Yuki  | 4. 巻<br>62              |
| 2. 論文標題<br>Intracellular Size Scaling of Cell Nucleus  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Seibutsu Butsuri   | 6. 最初と最後の頁<br>280 ~ 284 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.2142/biophys.62.280   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>原 裕貴、山本 一男   | 4. 巻<br>73              |
| 2. 論文標題<br>特集 形態形成の統合的理解 . 形態の要素をつくるしくみ 細胞とオルガネラのサイズ決定のしくみ   | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>生体の科学  | 6. 最初と最後の頁<br>287 ~ 290 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.11477/mf.2425201522   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Shimogama Sora, Iwao Yasuhiro, Hara Yuki   | 4. 巻<br>482             |
| 2. 論文標題<br>Yolk platelets impede nuclear expansion in <i>Xenopus</i> embryos                           | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Developmental Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>101 ~ 113 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ydbio.2021.12.003  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Tetsufumi Niide, Saki Asari, Kosuke Kawabata and Yuki Hara | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Specificity of nuclear size scaling in frog erythrocytes  | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Cell and Developmental Biology                | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fcell.2022.857862                | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Shimogama Sora, Iwao Yasuhiro, Hara Yuki                    | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Yolk platelets impede nuclear expansion in Xenopus embryos | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>bioRxiv   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1101/2021.01.13.426473                 | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Heijo Hiroko, Shimogama Sora, Nakano Shuichi, Miyata Anna, Iwao Yasuhiro, Hara Yuki | 4. 巻<br>31                |
| 2. 論文標題<br>DNA content contributes to nuclear size control in Xenopus laevis                  | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Biology of the Cell   | 6. 最初と最後の頁<br>2703 ~ 2717 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1091/mbc.E20-02-0113   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Hara Yuki   | 4. 巻<br>85                    |
| 2. 論文標題<br>Physical forces modulate interphase nuclear size | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Current Opinion in Cell Biology                   | 6. 最初と最後の頁<br>102253 ~ 102253 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ceb.2023.102253       | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>原裕貴                    |
| 2. 発表標題<br>適切な細胞核のサイズをどのように制御するか？ |
| 3. 学会等名<br>第45回日本分子生物学会年会（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2022年                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yuki Hara  |
| 2. 発表標題<br>DNA quantity and chromatin structure contribute to nuclear size control in <i>Xenopus laevis</i> |
| 3. 学会等名<br>日本生物物理学会第60回年会（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>原裕貴                          |
| 2. 発表標題<br>異種ツメガエル材料を組み合わせたオルガネラの無細胞再構成 |
| 3. 学会等名<br>日本動物学会第93回早稲田大会（招待講演）        |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>原裕貴                        |
| 2. 発表標題<br>アフリカツメガエルを用いた核サイズ制御        |
| 3. 学会等名<br>新学術領域・学術変革領域A合同「若手の会 2022」 |
| 4. 発表年<br>2022年                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>平城 裕子、下釜 空、中野 秀一、宮田 杏奈、岩尾 康宏、原 裕貴    |
| 2. 発表標題<br>アフリカツメガエルにおいてDNAの物理条件が核のサイズ決定に影響を与える |
| 3. 学会等名<br>第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会        |
| 4. 発表年<br>2021年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Hiroko Heijo, Shuichi Nakano, Sora Shimogama, Yasuhiro Iwao, Yuki Hara |
| 2. 発表標題<br>Genomic DNA content contributes to the nuclear size scaling            |
| 3. 学会等名<br>第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shuichi Nakano, Hiroko Heijo, Sora Shimogama, Yasuhiro Iwao, Yuki Hara |
| 2. 発表標題<br>DNA contributes to nuclear size control in <i>Xenopus laevis</i>       |
| 3. 学会等名<br>58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)         |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>原 裕貴                       |
| 2. 発表標題<br>アフリカツメガエル胚発生初期過程におけるRNAの役割 |
| 3. 学会等名<br>第4回有性生殖研究会 (招待講演)          |
| 4. 発表年<br>2024年                       |

|                                  |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>原 裕貴                  |
| 2. 発表標題<br>細胞質中で細胞核を迅速に構築する条件の探索 |
| 3. 学会等名<br>日本生体エネルギー研究会第49回討論会   |
| 4. 発表年<br>2023年                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>原 裕貴   |
| 2. 発表標題<br>Nuclear size scaling with cell size and ploidy |
| 3. 学会等名<br>第46回日本分子生物学会年会（招待講演）                           |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>原 裕貴              |
| 2. 発表標題<br>倍数性変動時の核サイズスケーリング |
| 3. 学会等名<br>倍数性研究会（招待講演）      |
| 4. 発表年<br>2023年              |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>原 裕貴              |
| 2. 発表標題<br>倍数性変動時の核サイズスケーリング |
| 3. 学会等名<br>サイズ生物学ワークショップ2023 |
| 4. 発表年<br>2023年              |



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ユサコ株式会社による海外学術雑誌掲載論文の紹介  
<https://www.usaco.co.jp/article/detail.html?itemid=1423&dispmid=610&TabModule439=3>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 木村 健二<br><br>(Kimura Kenji)<br><br>(40644505)  | 北海道大学・遺伝子病制御研究所・講師<br><br><br>(10101)    |    |
| 研究分担者 | 久米 一規<br><br>(Kume Kazunori)<br><br>(80452613) | 広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授<br><br><br>(15401) |    |

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|------------------------------|---|----|
| 研究協力者 | 大濱 三紗子<br><br>(Ohama Misako) | 山口大学・理学部・技術補佐員<br><br><br>(15501)       |    |
| 研究協力者 | 下釜 空<br><br>(Shimogama Sora) | 山口大学・大学院創成科学研究科・大学院生<br><br><br>(15501) |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)               | 備考 |
|-------|---------------------------------|-------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 正法地 達矢<br><br>(Shohoji Tatsuya) | 山口大学・大学院創成科学研究科・大学院生<br><br>(15501) |    |
| 研究協力者 | 中野 秀一<br><br>(Nakano Shuichi)   | 山口大学・大学院創成科学研究科・大学院生<br><br>(15501) |    |
| 研究協力者 | 鈴木 希望<br><br>(Suzuki Nozomi)    | 山口大学・理学部・学部生<br><br>(15501)         |    |
| 研究協力者 | 池邊 莉里香<br><br>(Ikebe Ririka)    | 山口大学・理学部・学部生<br><br>(15501)         |    |
| 研究協力者 | 佐々木 円<br><br>(Sasaki Madoka)    | 山口大学・理学部・学部生<br><br>(15501)         |    |
| 研究協力者 | 池田 瑞紀<br><br>(Ikeda Mizuki)     | 山口大学・理学部・学部生<br><br>(15501)         |    |
| 研究協力者 | 小町 彩乃<br><br>(Komachi Ayano)    | 山口大学・理学部・学部生<br><br>(15501)         |    |
| 研究協力者 | 大山 結子<br><br>(Oyama Yuiko)      | 山口大学・理学部・学部生<br><br>(15501)         |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)               | 備考 |
|-------|----------------------------|-------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 田中 祐人<br><br>(Tanaka Yuto) | 山口大学・理学部・学部生<br><br><br><br>(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 |  |  |  |
|---------|---------|--|--|--|
| スイス     | EPFL    |  |  |  |