

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21278

研究課題名（和文）核サイズの人為的操作法の開発

研究課題名（英文）Development of artificial manipulation methods for nuclear size

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物において核のサイズは厳密に制御されており、核と細胞の体積比は一定に維持されている。核サイズ制御の破綻は、がん細胞や老化細胞で散見される異常であることから、核サイズ制御機構の解明は、細胞のがん化や老化の理解につながることを期待される。本研究は、分裂酵母を真核生物のモデルとして用いて、核サイズの人為的操作法の確立を目指した。核サイズ制御に関わる細胞内プロセスに注目して、それらの活性を微調整し組み合わせることにより、核サイズを安定的に変化させる方法を見出した。当該方法により、核サイズを変化させた細胞の表現型解析を行い、核サイズの変化は、その他のオルガネラ構造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

核サイズ異常と細胞のがん化や老化の因果関係については不明であり、核サイズ制御の重要性についてはこれまでに詳細な解析がなされておらず、不明な点が多いのが現状であった。しかし本研究結果により、核サイズを段階的に変化させることで、細胞や核の機能についての詳細な解析が可能となる。核サイズを変化させるために修飾を加えた細胞内プロセスは、酵母からヒトまで高度に保存されたプロセスであることから、本技術は酵母のみならず普遍的なものとして利用可能である。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotes, nuclear size is strictly regulated and the nucleus-to-cell volume ratio is maintained at a constant level. Since perturbed nuclear size is observed in cancer cells and senescent cells, elucidation of the nuclear size control mechanism is expected to lead to an understanding of cell canceration and senescence. In this study, using fission yeast as a model of eukaryotic cells, we aimed to establish a method for artificial manipulation of nuclear size. We focused on intracellular processes involved in nuclear size control and found a method to stably change nuclear size by fine-tuning and combining their activities. Phenotypic analysis of cells in which nuclear size was changed by using the method revealed that the change in nuclear size affects other organelle structures.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核サイズ 分裂酵母 核と細胞質間の物質輸送 脂質代謝 膜輸送 分子遺伝学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ほとんどの真核細胞の核サイズは厳密に制御され、核と細胞の体積比 (N/C ratio) がほぼ一定に維持されている。この普遍的現象が最初に報告されて 100 年以上が経過しているが、その制御の実体は不明な点が多く、生物学における大きな謎の一つである。また、N/C ratio を一定に保つことの生理学的意義についても不明であるが、その理解のヒントとなることとして、がん細胞や老化細胞が示す核サイズの異常が挙げられる。つまり、核サイズ制御の破綻は、細胞のがん化や老化と密接に関係していることが示唆されており、重要な研究課題といえる。

N/C ratio に注目した核サイズ研究は、分裂酵母を用いた研究 (Neumann and Nurse, J Cell Biol 2007) により、大きく進展し、核サイズ制御の特徴がわかってきた。しかし、N/C ratio の制御に関わる因子は不明であったため、研究代表者らは、分裂酵母を用いた N/C ratio 異常変異体の網羅的スクリーニングを世界に先駆けて実施した。そして、当該変異体の選抜に成功した (Kume et al, PLoS Genet 2017)。さらに、選抜変異体の解析から、N/C ratio の制御に関わる 3 つの細胞内プロセス (核と細胞質間の物質輸送、脂質代謝、核と小胞体間の膜輸送) を特定し、核サイズ制御の新規モデルを提唱した (Kume et al, Nat Commun 2019)。興味深いことに、遺伝学的アプローチにより、各プロセスの活性状態を変化 (機能欠損もしくは機能強化) させて組み合わせたところ、正常細胞の示す N/C ratio = 0.08 から、大小それぞれの値へと大きく変化させられることがわかった。以上の結果は、上記の 3 プロセスを調節して組み合わせることで、N/C ratio を人為的に変化させる技術へと展開する可能性を示唆するものであった。

2. 研究の目的

これらの背景を受けて、本研究では、核サイズ制御の生理学的意義の解明を念頭に、N/C ratio の人為的操作法の確立を目指した。さらに、確立した方法を用い、N/C ratio の変動が細胞内構造、細胞増殖等に与える影響を調べることにより、核サイズ制御の生理学的意義の検証を目的とした。

3. 研究の方法

分裂酵母の N/C ratio は細胞周期を通して 0.08 で維持されている。N/C ratio の人為的操作法を確立するために、これまでに研究代表者が明らかにした N/C ratio に影響を及ぼす上記 3 つの細胞内プロセスの活性状態を調節することにより、N/C ratio を極大値および極小値まで段階的に変化させる方法を探索した。さらに、核サイズ制御機構の生理学的意義を検証するために、N/C ratio を段階的に変化させる方法を用いて、N/C ratio を改変した細胞の表現型解析を行なった。

(1) N/C ratio の人為的操作法の開発

(1-1) N/C ratio を極大値まで段階的に増加させる条件の探索

N/C ratio を基準値である 0.08 から極大値まで上昇させるためには、上記の 3 つのプロセスのそれぞれの活性状態を調節し、組み合わせることで可能となると考えた。活性状態の調節のために、プロセスに関わる遺伝子の過剰発現や変異体もしくはプロセスに対して阻

害効果を示す薬剤等を用いて、N/C ratio を段階的に増加させる条件の探索を行なった。

(1-2) N/C ratio を最小値まで段階的に減少させる条件の探索

N/C ratio を 0.08 から極小値まで減少させるためには、上記の 3 つのプロセスについて、(1) の逆の活性状態に調節して、組み合わせることにより可能になると考えた。活性状態の調節には(1) で用いた方法と同じようなアプローチにより、N/C ratio を最小値まで段階的に減少させる条件の探索を行なった。

(2) N/C ratio 改変細胞の表現型の解析

上記(1)の方法により、N/C ratio を段階的に改変した N/C ratio 改変細胞を用いて、表現型解析を行なった。具体的には、核以外の膜型オルガネラを含む細胞内構造の定量的解析、細胞増殖や各種ストレス感受性のアッセイを行なった。

4. 研究成果

(1) N/C ratio の人為的操作法の開発

(1-1) N/C ratio を極大値まで段階的に増加させる条件の探索

上記 3 つの細胞内プロセスについて、核外輸送の阻害と脂質代謝異常(膜の成分となる構造脂質の増加を誘発)を組み合わせた結果、N/C ratio は正常細胞が示す 0.08 から、約 0.12 まで約 50%増加した(それぞれのプロセスが破綻した細胞の N/C ratio は 0.11 と 0.95)。さらに、阻害剤の濃度を変化させて、各プロセスが破綻した状態をより悪化させて組み合わせたところ、N/C ratio は 0.16 まで上昇した。さらに、核と小胞体間の膜輸送に関わる因子(膜輸送の阻害因子)を取り除いたところ、N/C ratio は、0.2 まで上昇した。このように 3 つのプロセスの活性調節により、N/C ratio を 0.12、0.16、0.2 まで段階的に変化させる組み合わせを発見した。しかし、0.16 をこえて N/C ratio が高くなると N/C ratio の値のばらつきが大きくなり、安定した N/C ratio を示す条件を発見するにはいたらなかった。

(1-2) N/C ratio を最小値まで段階的に減少させる条件の探索

(1-1)とは逆で、核外輸送を活性化し、脂質代謝異常(構造脂質の減少を誘発)を組み合わせた結果、N/C ratio が 0.06 まで約 25%減少した。さらに、核と小胞体間の膜輸送の阻害因子を活性化させたところ、N/C ratio が 0.04 まで減少した。以上の結果より、上記 3 つのプロセスの組み合わせにより、N/C ratio が 0.08 から、0.06、0.04 まで段階的に変化させる組み合わせを発見した。

(2) N/C ratio 改変細胞の表現型の解析

上記(1-1)と(1-2)の条件を用いて N/C ratio を改変した細胞の表現型解析を行なった。細胞増殖について調べたところ、N/C ratio が 50%をこえて増加する、もしくは、25%をこえて減少した場合、細胞の増殖が顕著に悪化することがわかった。タイムラプス観察により、細胞の増殖過程を調べた結果、N/C ratio の逸脱は分裂期での染色体分配異常を誘発していることがわかった。また、核以外の膜型オルガネラについて調べたところ、ミトコンドリアの構造異常を示すことがわかった。今後は、核サイズの変化と染色体分配およびミトコンドリア機能との関係を明らかにしていきたい。

本研究で注目した細胞内プロセスは進化上保存されていることから、分裂酵母の解析から見出した核サイズの人為的操作法は、高等生物での研究に展開可能であり、核サイズ制御機構の生理学的意義を理解するための基礎的知見としての貢献が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 藤本堯玄、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 386、392
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 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 藤本堯玄、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7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

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 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 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 2023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 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増加変異体の解析
3. 学会等名 第38回 YEAST WORKSHOP
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------