

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660089

研究課題名(和文)細胞核サイズの制御機構

研究課題名(英文)Study on nuclear size control

研究代表者

久米 一規 (Kume, Kazunori)

広島大学・先端物質科学研究科・助教

研究者番号：80452613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：核は、膜で覆われたオルガネラで、DNAの安定な維持に重要である。核の機能に重要な核サイズは、細胞サイズと比例関係にあり、核と細胞の体積比(ratio between nuclear and cellular volume、以下N/C ratio)は一定に保たれている。しかし、その制御機構については不明な点が多い。私たちは、真核細胞の核サイズ制御機構の理解を目指し、分裂酵母を用い、N/C ratio異常変異体の解析を行った。その結果、核サイズの制御には、核と細胞質間の輸送と脂質代謝が重要であることを明らかにした。がん細胞は肥大化した核を持つことから、本研究成果は細胞がん化の理解に貢献しうる。

研究成果の概要(英文)：Nucleus is one of membrane-bound organelles and important for maintenance of genome DNA in eukaryotic cells. Nuclear size, required for nuclear function, is proportional to cell size, resulting in a constant ratio between nuclear and cellular volumes (N/C ratio). However, how this is achieved remains elusive. To understand molecular mechanisms of nuclear size control in eukaryotic cells, we studied N/C ratio mutants using fission yeast, a model organism of eukaryotic cell. We found that properly regulated nucleocytoplasmic transport and membrane growth are critical for appropriate nuclear size control in growing cells. This finding may contribute to understanding a cause of cancer, because cancer cells have enlarged nucleus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞核サイズ オルガネラ構造 細胞増殖 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の特徴である膜で覆われたオルガネラ(細胞小器官)は、細胞増殖時に細胞サイズに比例して変化し、適切な大きさに維持されている。しかしながら、細胞がいかにして自身のオルガネラサイズを決定し、適切な大きさに制御しているのかは、生物学において、未だに解明されていない重要な課題である。

細胞にとって重要なオルガネラの一つである細胞核(以下、核)は、ほとんどの真核細胞においてただ一つ存在し、形が球形をとることから、膜に覆われたオルガネラのサイズ変化やオルガネラサイズのホメオスタシスについて研究する上で、優れたモデルである。核サイズについての最初の知見は、1903年に報告され、異なる様々な細胞種において、核サイズは細胞サイズと比例関係にあり、核と細胞の体積比(ratio of nuclear and cellular volumes、以下 N/C ratio)は、一定の値をとることが提唱された。しかしながら、その制御の実態は不明である。また、多くのがん細胞が肥大化した核を持つことから、核サイズと細胞がん化との関連性が示唆されており、核サイズ制御機構の解明は、細胞がん化を理解する上で極めて重要であると考えられる。

近年、出芽酵母と分裂酵母を用いて、核サイズについての詳細な研究が行われた。その結果は、以下の通りである(Jorgensen et al, Mol. Biol. Cell, 2007, Neumann and Nurse, J. Cell Biol., 2007)。

- 1) 酵母の N/C ratio は一定の値をとる。
- 2) 分裂酵母の N/C ratio は、細胞周期を通して一定であり、ほぼ 0.08 をとる。
- 3) 細胞の DNA 含量の変化は、N/C ratio に影響を与えない。
- 4) 核サイズは、核を取り巻く周辺の空間の大きさによって変化する(核周辺のスペースが少ないと核サイズは小さくなり、スペースが大きいと核サイズは大きくなる)。

このように、増殖する細胞において、核サイズを規定するために、N/C ratio は重要であり、その特徴が明らかとなりつつある。しかし、何が N/C ratio を決定し、核サイズを

適切な大きさに保っているのか?(核サイズの決定機構)そして、細胞はいかにして N/C ratio を制御しているのか?(核サイズ制御機構)など、核サイズについては未だ不明な点が多い。

研究代表者は、真核細胞の普遍的な核サイズ制御機構を理解するために、日本学術振興会海外特別研究員として、分裂酵母を用いた核サイズ研究を展開している Paul Nurse 博士の研究室に滞在し、核サイズ研究に取り組んできた。具体的には、核サイズ制御に関わる遺伝子を同定するために、分裂酵母の非必須遺伝子破壊株ライブラリー(約 3,000 株)を用い、N/C ratio が異常になる変異体を網羅的にスクリーニングし、N/C ratio 異常変異体を複数選抜した。

2. 研究の目的

真核細胞の核サイズ制御機構の全体像を解明し、核サイズ制御の分子機構を明らかにすることを目的とする。

増殖する細胞において、何が N/C ratio を決定し、細胞の核サイズを適切な大きさに保っているのか?(N/C ratio の決定機構とは?)また、増殖する細胞の核サイズ制御の分子機構については不明である。そこで、N/C ratio に注目し、分子遺伝学が駆使できる分裂酵母を用いて、核サイズ制御に関わる因子を明らかにする。そして、その解析を通して、核サイズ制御に重要な遺伝子間ネットワークを解明する。さらに、核サイズ制御機構を分子レベルでの理解を目指す。

3. 研究の方法

この目的を達成するため、以下の研究計画に従い、研究を行う。

- (1) 核サイズ制御に重要な因子の同定
- (2) 核サイズ制御機構の全体像の解明(核サイズ制御に関わる遺伝子群が形成する遺伝子間ネットワークを明らかにする。)
- (3) 核サイズ制御の分子機構の解明

研究方法は、研究代表者がこれまでに選抜した N/C ratio 異常変異体(14 株)の原因遺伝子がどのように核サイズに影響を及ぼす

のかについて、N/C ratio の異常が顕著な変異体から順次解析（特に、N/C ratio が増加する変異体の解析）を行い、核サイズ制御に関わる因子や細胞内プロセスを同定する。次に、選抜した遺伝子について、核サイズ制御における関係を調べ、核サイズ制御機構の全体像を明らかにする。そして、核サイズ制御の分子機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 核サイズ制御に重要な因子の同定

選抜した N/C ratio 異常変異体（解析に用いたのは N/C ratio が増加する変異体）の原因遺伝子について、それ自身が N/C ratio に影響を及ぼすのかを調べた。当該遺伝子それぞれの過剰発現プラスミドを構築し、それぞれの遺伝子の過剰発現による野生株の N/C ratio への影響を調べた。その結果、いずれの遺伝子の過剰発現株においても、野生株が示す N/C ratio に顕著な変化は見られなかった。つまり、当該遺伝子は、それ自身が N/C ratio の決定因子ではなく、当該遺伝子に関わる細胞内プロセスが N/C ratio の制御に関連することが示唆された。

次に、N/C ratio に直接影響を及ぼす細胞内プロセスを明らかにするため、選抜した変異体が示す N/C ratio の異常が、N/C ratio 制御の破綻によるものであるかを検証した。N/C ratio の制御は、細胞が伸長し細胞サイズが変化する細胞周期間期に行われていることが示唆されている（Neumann and Nurse, J. Cell Biol., 2007）。そこで、選抜した 14 株の変異株について、細胞周期間期に停止させ、細胞サイズを増加させてもなお異常な N/C ratio を示すかを調べた。その結果、14 株中 8 株で異常な N/C ratio を示した。一方で、6 株が示す異常な N/C ratio は回復した。以上のことから、8 株は N/C ratio の制御が破綻していることが予想された。

8 株の変異株の原因遺伝子を機能分類したところ、2 遺伝子が mRNA の核外輸送に、2 遺伝子が脂質代謝に、残りの 4 遺伝子は、タンパク質分解、RNA プロセッシング、転写制御に分類できた。興味深いことに、mRNA の核外輸送の 2 遺伝子、脂質代謝の 2 遺伝子

は、それぞれのプロセスにおいて、遺伝子産物が複合体を形成し、同経路で機能することが報告されていた。そこで、それぞれの細胞内プロセスと核サイズ制御との関係を明らかにするためにこれらの変異株の解析を進めた。

また、選抜した遺伝子と関連する必須遺伝子についても、遺伝子変異により N/C ratio が異常となる変異体を探索し、複数の変異体が同定できたことから、核サイズ制御には、上記の細胞内プロセスが関わるのが強く示唆された。

(2) 核サイズ制御機構の全体像の解明

脂質代謝の 2 遺伝子は、ホスファチジン酸ホスファターゼの活性化に重要であり、遺伝子欠損株は、ホスファチジン酸が増加することから、野生株と比べ、脂質代謝が異常であることが予想される。実際、変異株では、小胞体膜が肥大化し、核膜の肥大化も観察された。そこで、核サイズ増加の原因が、脂質代謝の異常によるものかを検証するため、脂肪酸合成（小胞体膜や核膜の構成に重要）ができない変異株と N/C ratio 異常変異体との二重変異体を構築し、N/C ratio を測定した。その結果、二重変異体では核の肥大化が抑えられ、N/C ratio は野生株とほぼ同じであった。以上より、異常な脂質代謝による核膜の異常供給が核の肥大化を誘発し、N/C ratio の異常をとることがわかった。

mRNA の核外輸送の 2 遺伝子産物は、複合体を形成し、さらに核膜孔タンパク質の Rae1（生育に必須な遺伝子）とも複合体を形成し、mRNA の核外輸送に重要である。rae1 高温感受性変異体についても、N/C ratio を測定したところ、mRNA が核外輸送できない高温時に、N/C ratio 異常変異体同様、異常な N/C ratio を示した。次に、mRNA の核外輸送の破綻が N/C ratio の異常を示す原因を明らかにするため、rae1 変異体の解析を進めた。その結果、rae1 変異体が N/C ratio に異常を示す高温において、mRNA とタンパク質が核内に異常に蓄積していることがわかった。そこで、RNA およびタンパク質の合成をそれぞれ阻害したところ、RNA、タンパク質合成のどちらを阻害しても rae1 変異体が

示す N/C ratio の異常が顕著に抑圧された。つまり、核内に異常蓄積した mRNA とタンパク質が、核の肥大化を誘発する原因であることが示唆された。さらに、*rae1* 変異体が示す核の肥大化に脂質合成が必要かについて調べたところ、脂質合成の阻害により、*rae1* 変異体が示す N/C ratio の異常を部分的に抑圧した。また、その際、核内では、mRNA およびタンパク質が蓄積していた。つまり、脂質合成は核が肥大化する際に必要であり、脂質合成を促進する原因は、核内蓄積した mRNA およびタンパク質であることが示唆された。

これまでの結果より、核サイズ制御には、核と細胞質間の輸送と脂質代謝が重要であることが示唆された。

(3) 核サイズ制御の分子機構の解明

上記(2)より、*rae1* 変異体において、核内蓄積した mRNA およびタンパク質が核サイズの肥大化の原因であることが示唆された。そこで、核サイズ制御の分子機構解明の手がかりを得るために、*rae1* 変異体において核内蓄積した mRNA およびタンパク質の同定を試みた。その結果、*rae1* 変異体では、野生株と比較し、多くの mRNA (約 900) の増加がみられた。さらに、約 500 のタンパク質が核内に蓄積していた。以上より、*rae1* 変異体が示す N/C ratio の異常は、少数の特異的な遺伝子によるものではなく、グローバルなレベルでの核内 mRNA やタンパク質の増加が原因であることが示唆された。現在、*rae1* 変異体の解析を継続し、特に、核内蓄積と脂質合成をつなぐ遺伝子の存在を予想し、その遺伝子の探索を行っている。

がん細胞では、肥大化した核をもつことから、本研究成果は、細胞癌化の理解に貢献しうる。また、生物学の未解決な課題の解明のヒントになりうることを期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件) 査読あり

1. Kume K., Cantwell H., Neumann F.R., Jones A.W., Snijders A.P., Nurse
A systematic genomic screen implicates nucleocytoplasmic transport and membrane growth in nuclear size control.

PLoS Genet., in press (2017)

*: Corresponding author

〔学会発表〕(計6件)

1. 久米一規

「分裂酵母の核サイズ制御機構」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 17 日~3 月 20 日、京都女子大学、京都市

2. 久米一規, Helena Cantwell, Paul Nurse

「分裂酵母の核サイズ制御機構」第 49 回酵母遺伝学フォーラム、2016 年 9 月 9 日~11 日、シーサイドホテル舞子ビラ、神戸市

3. (招待講演) 久米一規

「細胞はいかにして核サイズを制御するのか?」第 3 回 NBRP 酵母シンポジウム、2015 年 9 月 24 日、奈良女子大学、奈良市

4. 久米一規, Paul Nurse

「細胞核サイズの制御に重要な遺伝子の探索」第 48 回酵母遺伝学フォーラム、2015 年 8 月 31 日~9 月 2 日、広島大学、東広島市

5. K. Kume, P. Nurse

Nuclear cytoplasmic transport is critical for nuclear size control in fission yeast. The 8th international fission yeast meeting, 21-26, June 2015, Ikuta shrine, Kobe (Japan)

6. 久米一規, Paul Nurse

「分裂酵母の細胞核サイズ制御機構に重要な遺伝子の探索」、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26 日~29 日、岡山大学、岡山市

〔図書〕(計1件)

1. K. Kume, Humana Press, Methods in Mol. Biol., Cell cycle oscillators 2016, 149-155.

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/adsm/graduate-school/bio/cellbio>

広島大学健康長寿研究拠点

<http://hiha.hiroshima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米 一規 (KUME KAZUNORI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号: 80452613

(4) 研究協力者

Paul Nurse

The Francis Crick Institute (英国)