

氏 名 原 裕 貴

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1350 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 A Study on Cell-size Dependency of Spindle Elongation  
and Chromosome Condensation in *Caenorhabditis*  
*elegans* Embryo

論文審査委員 主 査 教授 仁木 宏典  
教授 荒木 弘之  
教授 小原 雄治  
特任准教授 五島 剛太（名古屋大学）  
教授 佐々木 裕之（九州大学）

Cell size is one of the critical parameters controlling the size of intracellular structures. The size of intracellular structures must change according to cell size, which varies among cell types and developmental stages. A well-known example is the constant nuclear-to-cytoplasmic ratio (N/C ratio). Although researchers have long observed that the sizes of intracellular structures correlate with cell size, systematic quantification of the correlation has been conducted for few structures. In addition, the mechanisms underlying cell size-dependency remain largely unclear. Here, I quantified relationships between cell size and two intracellular processes—spindle elongation [CHAPTER I] and chromosome condensation [CHAPTER II]. I used *Caenorhabditis elegans* early embryos as a model organism. On the basis of measurements in wild-type and gene-knockdown embryos, I explored mechanisms for controlling the two processes in a cell-size-dependent manner.

In CHAPTER I, I focused on the relationship between spindle elongation and cell size. During anaphase, the mitotic spindle elongates and delivers the centrosomes and sister chromatids near to the centers of nascent daughter cells. First, I measured the dynamics of spindle elongation quantitatively in cells of various sizes, revealing that the extent and speed of spindle elongation correlated well with cell size throughout early embryogenesis. To explore the mechanism underlying the cell-size-dependent spindle elongation, I investigated the effect of G $\alpha$ -dependent force pulling astral microtubules toward the cortex by using RNAi knockdown of G $\alpha$  proteins and their regulators. In these RNAi embryos, spindles failed to fully elongate and that the speed of spindle elongation was almost constant regardless of cell size, suggesting that the G $\alpha$ -dependent cortical pulling force is involved in the cell-size-dependent spindle elongation. This result further suggested that spindle elongation is controlled by two qualitatively distinct mechanisms—G $\alpha$ -dependent and G $\alpha$ -independent mechanisms. Next, I developed two distinct models in order to explain each G $\alpha$ -dependent and -independent mechanisms and tried to evaluate whether these models reproduce *in vivo* cell size-dependency of spindle elongation by using computer simulation. A force generator-limited model, is based on the cortical pulling force generated by limited number of force generators, reproduced characteristics of the G $\alpha$ -dependent mechanism. A constant pulling model, is controlled by constant force regardless of the cell size, reproduced the characteristics of the G $\alpha$ -independent mechanism. Simulation analyses revealed that a combination of the two models—constant-pulling model and force-generator-limited model enables mitotic spindle to elongate in a cell-size-dependent manner. Finally, to obtain insight into the regulatory mechanism to set the elongated spindle length to about the half of the cell length, I characterized the properties of my proposed model using simulation analysis. As a result, my proposed model also explains how the set length of spindles is achieved *in vivo*.

In CHAPTER II, I investigated the mechanisms underlying variation in the size of

condensed chromosomes in metaphase. Chromosome condensation is an important process for transmitting genetic information to daughter cells. Although genome length is basically constant in each organism, the condensed chromosome size appears to be different in different cells, for example, during embryogenesis. However, the mechanism regulating the size of a condensed chromosome has remained a mystery. In the present study, I systematically quantified the sizes of condensed chromosomes at each cell stage during embryogenesis. This measurement revealed that condensed chromosome size is not constant at each cell stage. To further analyze the variation in chromosome size, I manipulated some intracellular parameters, such as cell size, nuclear size, and DNA content by genetic perturbations. The results of manipulations indicated that the sizes of condensed chromosomes are not determined solely by the developmental stage. In addition, the size of the nucleus or the amount of DNA possessed therein, rather than cell size, was predicted to affect directly the condensed chromosome size. Based on the effect of nuclear size and DNA content, I suggest that the physical constraint of the nucleus is a critical determinant of condensed chromosome size. Finally, I propose a model for control of condensed chromosome size to consider the physical constraint of the nucleus. In my proposed model named nuclear-size-dependent looping model, properties of DNA loop formed in nucleus affects the condensed chromosome size in metaphase.

This is a first report to quantify a cell-size-dependent spindle elongation and nuclear-size-dependent chromosome condensation during early embryogenesis. I proposed possible mechanisms for controlling these two intracellular processes.

## 博士論文の審査結果の要旨

生物の基本単位である細胞の大きさは生物毎にまちまちである。真核細胞では、同じ個体であっても発生・分化に応じて、細胞の大きさが著しく変化する。細胞の大きさの変化により、細胞内の様々な現象が影響を受けるが、中でも染色体の分配過程への影響は大きい。特に発生初期の著しい細胞サイズの変動時には、大きな細胞では長い距離、小さな細胞では短い距離で染色体を適切に分配させなければならない。このためには、染色体分配装置である紡錘体の伸長が細胞のサイズに応じて調整されることが重要である。原裕貴君は紡錘体の伸長を制御するメカニズムに関して研究を行ない、細胞サイズそのものが紡錘体の伸長を制御する仕組みを明らかにし、さらに細胞サイズが分裂期の染色体のサイズを規定していることを見だし博士学位論文として報告した。

線虫 *C.elegans* は初期発生に伴い様々な大きさの細胞を生じ、また生きたまま内部の状態を経時的に観察できるため紡錘体伸長の距離と速度を細胞サイズと共に測定するのに適した材料である。GFP標識 $\gamma$ チューブリンで中心体を視覚化して紡錘体の位置を、またGFP標識ヒストンH2Bで染色体を視覚化して染色体の位置を測定し、発生初期の細胞で紡錘体伸長の計測を定量的に行なった。その結果、紡錘体伸長の距離と速度が細胞サイズと比例関係にあることを見いだした。また、星状糸による紡錘体の引っ張り力の発生に関与する  $G\alpha$  因子とその調節因子の働きをRNAi法によりそれぞれ阻害し、紡錘体伸長の距離と速度を測定したところ、紡錘体伸長に影響を見だし、さらにその伸長速度が細胞サイズによらずほぼ一定になることを見いだした。この結果から、紡錘体伸長には  $G\alpha$  因子に依存する様式と依存しない様式の2つがあると結論した。さらに、定量的に測定した値を元に紡錘体伸長の数理モデル化を行い、計算機によるシミュレーション実験から紡錘体伸長に関して Force-generator-limited モデルと Constant-pulling モデルが適用できることを示した。それぞれのモデルは、 $G\alpha$  因子に依存する様式と依存しない様式によく対応する。また、これらモデルより、細胞サイズや紡錘体のサイズの情報を取り込んで、紡錘体がどのように伸長しているのかをうまく説明できた。

定量的な解析法により紡錘体サイズと細胞サイズの間にある制御関係の解明に成功したことから、次に分裂中期の染色体のサイズの決定機構について研究を行なった。初期胚の各ステージから中期染色体を単離し、個々の染色体のサイズを測定した。その結果、染色体のサイズは細胞のステージにより異なっていることを見だし、染色体のサイズもまた細胞のサイズと相関していると結論した。さらに *ran-3* 遺伝子の阻害により核が小さくなると染色体のサイズが縮小する傾向にあることや、DNA量が半減し一倍体として初期発生を続ける細胞では、染色体のサイズが増大する傾向にあることを明らかにしている。これらの結果から、核内におけるDNA量と中期染色体のサイズに因果関係があるものと考察した。作業仮説として、間期核において染色体が核膜表層で形成するループ構造の数が、中期染色体のサイズを決めるモデルを提唱し、今後の染色体のサイズの決定機構の研究における方向性を示している。

以上のように、本申請論文の内容は細胞生物学的な観察を定量的に解析し、細胞のサイズの変動に応じて分裂装置のサイズがどのように制御されているのか明らかにし、また中期染色体のサイズの決定機構の解明に迫る独創的な研究成果といえ、科学的に高く評価で

きる。特に、細胞のサイズに依存した紡錘体のサイズの制御に関する研究成果は、筆頭著者として国際誌に発表している。以上の理由から、原裕貴君の学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。