

研究課題名：「細胞周期への定量生物学的アプローチ：Cyclin と CDK の定量から細胞周期システムを理解する」

大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 基礎生物学研究所/
 総合研究大学院大学 基礎生物学専攻 五年一貫博士課程 2年（助成時）
 同上 五年一貫博士課程 3年（現在）
 向井 正哉

研究背景: 多細胞生物にとって、細胞増殖の制御は組織の発生や恒常性・腫瘍抑制に必須である。細胞が増殖するか否かは、細胞周期(図1)が G1 期と S 期の境目である「G1-S 期チェックポイント」を通過するかどうかで決まる。その中心的因子は Retinoblastoma protein (RB) と呼ばれ、G1-S 期チェックポイントの通過にブレーキをかける役割を持つ(図2)。細胞が増殖シグナルを受容すると、細胞増殖のマスター因子である ERK が活性化され、増加した Cyclin D-CDK 4/6 複合体が RB をリン酸化してブレーキを解除する。細胞増殖を促進・抑制する様々なシグナルはこの G1-S 期チェックポイントの分子機構に伝達されるため、RB のリン酸化や Cyclin D-CDK4/6 複合体の量的な変化は細胞増殖を理解する上で重要視されてきた。

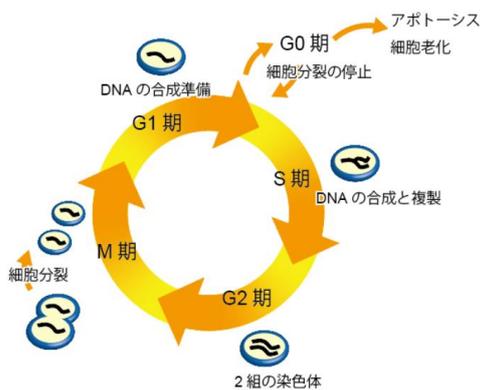


図1：細胞周期の概念図。細胞が分裂する際には、DNA 合成期（S 期）、分裂期（M 期）、間期（G1・G2 期）という 4 つのステージを経る。

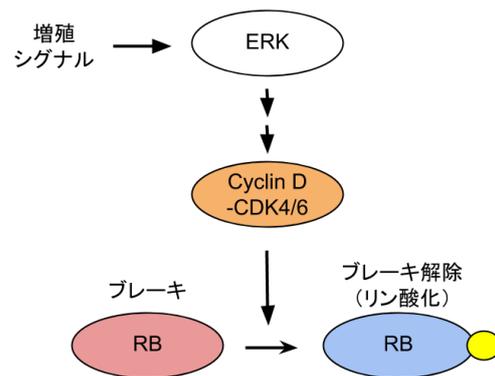


図2：細胞周期の「G1-S チェックポイント」の制御機構。Cyclin D-CDK4/6 複合体が RB をリン酸化する事でブレーキが解除され、細胞が増殖する。

上流にある ERK の活性を生細胞で可視化した近年の研究では、増殖シグナルを受けた ERK の活性は単純な上昇ではなく時々刻々とした変動をみせ、上昇と下降を一定以上の頻度で繰り返す事が増殖の促進に必要である事が示唆されている[Albeck, 2013; Aoki, 2013]。そのため、細胞増殖の制御機構を理解する上で、ERK の時間的な変動に合わせて下流でいつ・どの程度 Cyclin D-CDK4/6 複合体が増加し、RB がリン酸化されてブレーキが解除されるか、という情報は必須である。ところが、従来それらの変動は細胞集団を特定の時点ですりつぶして生化学的に解析する事で観測しており、十分な時間分解能と定量性を得る事が出来なかった。なぜなら、実験室で同じ条件下にある細胞集団においても ERK の活性や G1-S チェックポイントの通過状態は細胞間でばらついており、集団の平均的な情報を観測した場合にそれが隠されてしまうからである。

研究内容: 本研究課題では CyclinD-CDK4/6 複合体とリン酸化された RB の量を1細胞ごとに生きたまま経時的に観測する事をねらいとし、以下 2 つの小課題を提案した。

- ① Cyclin DとCDK4/6の絶対濃度・Cyclin D-CDK4/6間の解離定数の測定による複合体の定量
 ② RBのリン酸化を生きた細胞で可視化する蛍光プローブの開発
 このうち小課題②において、G1-SチェックポイントのブレーキであるRBのリン酸化状態を世界で初めて生きた細胞で可視化する事に成功した。

研究成果:

新規 FRET バイオセンサーの作製と RB のリン酸化の可視化に成功

RB のリン酸化を生きた細胞で可視化するにあたって、リン酸化に伴う RB 特異的な構造変化の検出を試みた。タンパク質である RB は2つのドメイン (RbNドメインと Pocketドメイン)を持ち、リン酸化に伴いこれらのドメインが引き合って構造が変化する[Burke, 2014]。そこで2つの蛍光タンパク質をRBに融合し、蛍光タンパク質間の距離に依存して蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)が起きる設計にする事で、輝度の変化からRBの構造変化を検出するアイデアをとった。ヒトRBのN末端とC末端に蛍光タンパク質であるYFPとCFPの遺伝子配列をそれぞれ融合し、RBの構造変化を可視化するFRETバイオセンサーを開発した(図3A)。

このFRETバイオセンサーが、RBの既知のリン酸化ダイナミクスを検出可能かどうかを検証した。細胞が分裂するM期において、リン酸化されたRBが減少する事が知られている[Ludlow, 1993]。ヒトがん細胞株 HeLa 細胞のM期をRB FRET バイオセンサーで観測したところ、CFP・YFPの輝度の比(YFP/CFP; 以下、FRET比)が低下した(図3BC)。FRET比の低下はCFP・YFPの距離が離れた事を意味しており、リン酸化の減少に伴ってRB内の2つのドメインが離れた事をRB FRET バイオセンサーが反映した事が示唆される。

RBのリン酸化状態を低下させる阻害剤やリン酸化されないRB変異体を用いた実験から、RB FRET バイオセンサーのFRET比がRBのリン酸化に伴う構造変化を反映する事が強く示唆された。これはG1-Sチェックポイントの中心的因子RBのリン酸化状態を生細胞で可視化した世界初の例であると考えられる。

さらに、ヒト正常細胞株 MCF-10A 細胞をRB FRET バイオセンサーで調べたところ、同一細胞集団の中でM期におけるRBリン酸化が「減少する/しない」という2つの集団に分けられる現象を新規に発見した(図3C)。これまでは同一細胞集団ではM期におけるRBのリン酸化の変動は一律だと考えられていたが、生きたまま1細胞ごとに観測した事で正常細胞 MCF-10A では不均一である事実が明らかとなった。細胞増殖の未知の制御機構を示唆する発見だと考えており、現在論文執筆中である。

今後の展望:今回発見された正常細胞のM期におけるRBリン酸化減少の不均一性は、組織における細胞種の比率の制御や、がん細胞の薬剤応答性を理解する上で重要な機構の存在を示唆している。今後はRB FRET バイオセンサーと薬剤・光刺激を組み合わせる事で外部シグナルとRBリン酸化の関係性を明確に出来ると思う。また小課題①と組み合わせる事でRBリン酸化の反応速度定数を求め、定量的な数理シミュレーションを可能にするという方向性も検討している。

注:本稿の図1は labchem-wako.fujifilm.com より借用した。

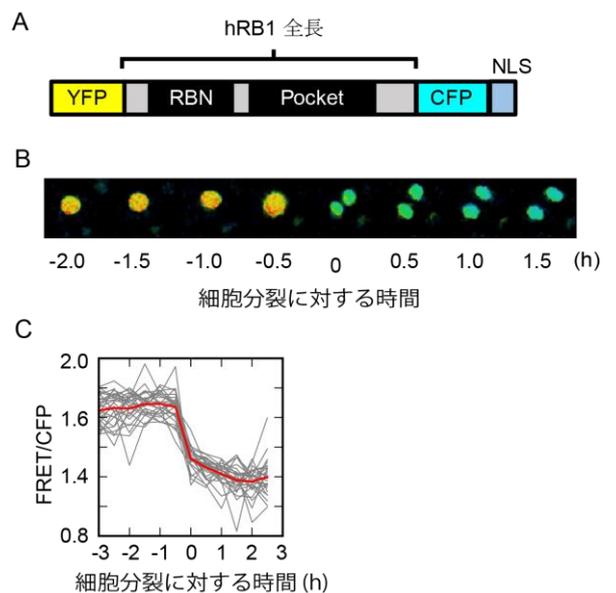


図3: (A) RB FRET バイオセンサーを発現する DNA コンストラクトの模式図。hRB1=ヒトRB。(B、C) HeLa 細胞のM期(分裂期)におけるFRET比の低下。(B)は細胞核におけるFRET比の擬似カラー表示。(C)は細胞分裂に対する時間とFRET比の変動。