様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ５ 月 ２７ 日現在

機関番号：８２６７５
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｈ０２４４４

研究課題名（和文）ERKシグナルによるG1-S期チェックポイントの閾値決定機構の定量的な理解

研究課題名（英文）Quantitative understanding of the mechanism of G1-S phase checkpoint regulated by ERK signal

研究代表者

青木　一洋（AOKI, Kazuhiro）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・教授

研究者番号：８０５１１４２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,500,000円

研究成果の概要（和文）：　細胞が分裂するかしないかを決定する細胞周期は生命にとって必要不可欠なメカニズムである。本研究では、細胞増殖因子の下流で活性化するERKとAktの活性を生細胞イメージングにより１細胞レベルで可視化し、それぞれの動態の細胞周期に及ぼす影響を解析した。その結果、①AktはERKと同様に確率的に活性化する発火現象を示すこと、②ERKとAktの活性に強い相関があるが、S期においてERKとAktの活性が相関しない部分があること、③Akt活性はS期/G2期の短縮に必要であること、④ERKとAktの両方の活性がないと細胞質分裂を伴わない細胞周期進行であるendocyclingが起きること、などが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
細胞の分裂、増殖は胚発生や再生といった生理的なプロセスと悪性腫瘍の増殖といった病理的な側面で起こる現象であり、細胞分裂を制御する細胞周期の理解は極めて重要である。本研究では、ERKとAktというどちらも多くの悪性腫瘍細胞で活性化が認められるシグナル伝達分子の細胞周期の役割を生細胞イメージングによってアプローチした研究であり、これまで知られていない結果を得ることができた。特に、Aktの細胞周期における役割のいくつかを今回の研究で明らかにすることができたことは今後の悪性腫瘍の治療戦略を考えるうえで重要になってくるものと考える。

研究成果の概要（英文）：The cell cycle, which determines whether cells divide or not, is an essential mechanism for living organisms. In this study, the activities of ERK and Akt, which are activated downstream of growth factors, were visualized at the single cell level by live-cell imaging, and the effects of their dynamics on the cell cycle were analyzed. We found that, (1) Akt shows a stochastic activation patterns similar to ERK, (2) there is a strong correlation between the activities of ERK and Akt, but there is a difference between them especially in the S phase, and (3) Akt activity is necessary for S/G2 progression, and (4) endocycling, which is a cell cycle progression without cytokinesis, occurs by inhibiting both ERK and Akt.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ERK　Akt　光遺伝学　細胞周期　チェックポイント

※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

細胞分裂はすべての生命の発達と機能の発現にとって必須の現象である。真核生物の細胞分裂における一連の過程は細胞周期と呼ばれ、細胞周期は細胞の構成成分を倍加する S 期、倍加した構成要素を２つの娘細胞に分配する M 期、M 期から S 期の間を G1 期、S 期から M 期への間を G2 期と定義されている（図１）。細胞周期にとって重要な制御因子はサイクリン（Cyclin）とサイクリン依存性キナーゼ（CDK）である。Cyclin は細胞周期依存的に細胞内に蓄積し、CDK と結合して標的となる基質をリン酸化することで細胞周期の進行を促す。

真核細胞は、細胞外の栄養状態といった外環境だけでなく、その細胞自身の細胞周期や DNA ダメージといった細胞内の内部状態を認識し、適切なタイミングで細胞周期を進行する。このような細胞周期の制御は、チェックポイントと呼ばれる機構が特定の時期に機能することで達成される。とくに外部の栄養状態などを認識し、細胞周期を進めるかどうかを決定する G1-S 期チェックポイントは重要である。なぜなら、これに関わる分子の多くが癌遺伝子、もしくは癌抑制遺伝子であり、ヒトの腫瘍新生に密接に関連していることからである。G1-S 期チェックポイントの分子機構としては、以下の３ステップで構成されている。

(1) 成長因子によって ERK や Akt が活性化し、サイクリン D（Cyclin D）の発現が上昇する。
(2) Cyclin D はサイクリン依存性キナーゼ（CDK4/6）と結合し、RB をリン酸化する。
(3) リン酸化された RB は転写因子である E2F と解離し、フリーになった E2F が S 期進行に必要な遺伝子発現を促進する

細胞周期に関するこれらの知見はすでに教科書にも記されており、多くの研究者の見解が一致するところである。しかし、実際には細胞周期制御に関する定量的でかつ動的な情報が欠落している。研究代表者が細胞増殖過程における ERK 活性を FRET バイオセンサーで可視化したところ、確率的に ERK が活性化していることを以前に見出している（Aoki K, Mol Cell, 2013）。興味深いことに、この確率的な ERK 活性化の発火頻度と細胞増殖速度には強い相関があった。しかしこのようなダイナミックに変動する ERK 活性がどのようにして離散的で不可逆な G1-S 期チェックポイントを誘導するのかは不明であった。

２．研究の目的

上述の状況を鑑み、本研究では「ERK シグナルによる G1-S 期チェックポイントの閾値決定機構の定量的な理解」を目的とし研究を進めた。

３．研究の方法

ヒト乳腺上皮由来細胞 MCF-10A 細胞に、ERK と Akt のレポーターと細胞周期レポーターの同時タイムラプスイメージングを行った。これにより、ERK、Akt 活性のダイナミクスと細胞周期の状態を 1 細胞レベルで定量化を行った（図１）。

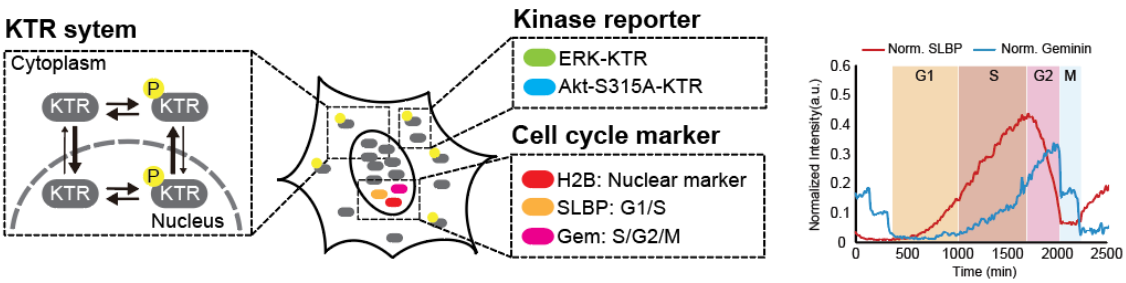

図１：ERK、Akt 活性と細胞周期の同時タイムラプス観察

さらに阻害剤を用いて、どの細胞周期で ERK、Akt のどちらか、または両方の活性を抑制すると細胞周期がどこで止まるのかをイメージングによって検討した。また光遺伝学の手法を用いて、ERK、Akt を青色光によって活性化する手法を開発し、光によって細胞周期進行が制御できるかを検討した。

４．研究成果

MCF-10A 細胞に ERK、Akt のレポーターである ERK-KTR、Akt-KTR と細胞周期のレポーターである SLBP、Geminin を導入し、数日間にわたるタイムラプスイメージングを行った。このイメージングによって得られた大量の画像データから ERK と Akt、細胞周期の情報を抽出するための画像解析プログラムを作製した。その結果、Akt は ERK と同様に確率的に活性化する発火現象を示すこと、また ERK と Akt の活性に強い相関があるが、S 期において ERK と Akt の活性が相関しない部分があることが分かった（図２）。これは S 期において Akt もしくは ERK が何らかの役割を担っているのではないかということを示唆する結果であった。

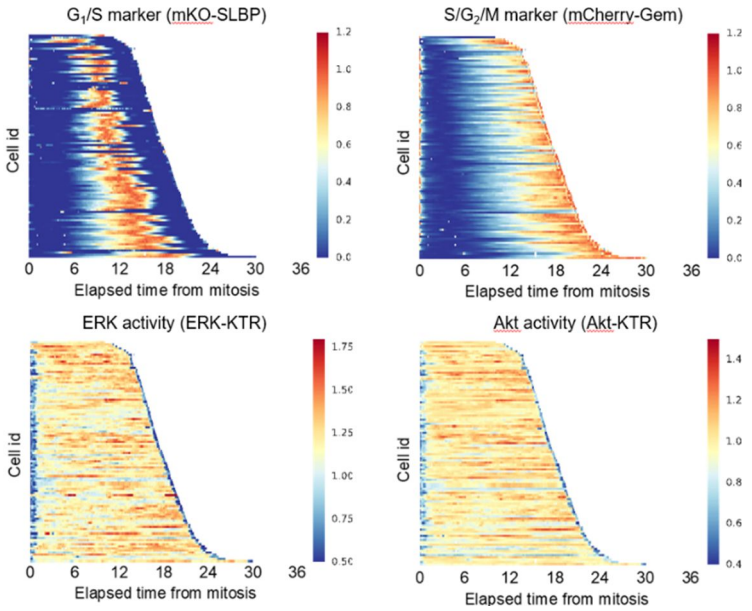

図２：ERK、Akt 活性と細胞周期の定量化

ERK の上流の MEK を阻害すると、どの細胞周期に存在していても最終的には G1 期で停止することが分かった。また Akt の上流の PI3K 阻害剤や Akt 阻害剤で細胞を処理すると、G1 期の細胞は G1 期に停止し、S/G2 期の細胞は S/G2 期に維持され、最終的には M 期を経ずに G1 期にもどる endocycling と呼ばれる現象が起きることが分かった。また、S/G2 期の細胞を ERK と Akt を両方阻害剤で抑制すると、より強く endocycling することが明らかになった。これらの結果から、ERK 経路は G1/S 期進行に、Akt 経路は G1/S 期進行と S/G2/M 期の進行のどちらにも関与しうるということが示唆された。

最後に、光遺伝学により ERK と Akt をそれぞれ別々に活性化できる系を開発し、ERK と Akt を細胞周期進行における役割を解析した。青色光によって ERK、Akt を活性化できる系を MCF-10A 細胞に導入し、様々な光強度の条件で細胞を培養したときの細胞周期への影響を検討した。その結果、血清飢餓条件で培養し G1 期に停止させた細胞が、ERK と Akt の両方を光で活性化させると、G1/S 期の進行が非常に効率よく引き起こされることが分かった（図３）。またこの G1/S 期進行は CDK 阻害因子である p21 を介していることも確認している。

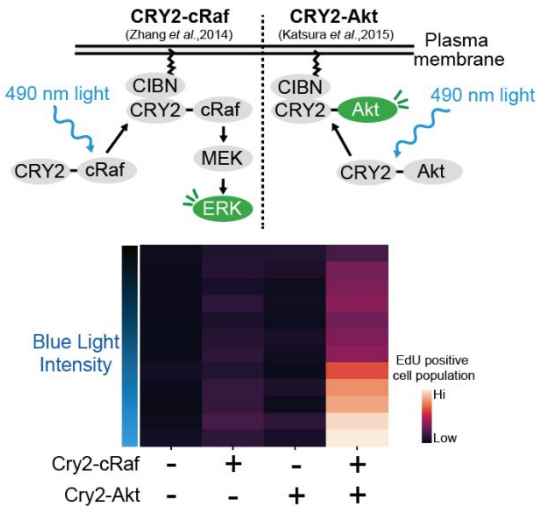

図３：光遺伝学による ERK、Akt の活性化と細胞周期の進行

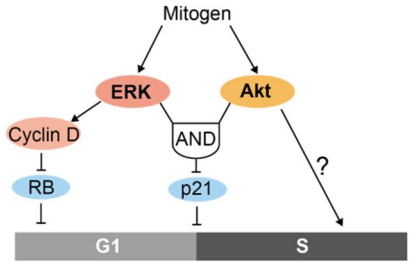

図４：本研究のまとめ

これらの解析から、ERK と Akt は協調して G1 期から S 期への進行を制御していること、さらに Akt は ERK とは独立して S 期/G2 期の進行を制御していることが明らかになった。Akt 経路を阻害すると endocycling が誘導されることから、G2/M 期チェックポイントに Akt が関与している可能性を示唆していた。現在、これらのことを検証している。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計7件（うち査読付論文　7件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　4件）

１．著者名 Nakamura Akinobu、Oki Choji、Kato Kenya、Fujinuma Satoko、Maryu Gembu、Kuwata Keiko、Yoshii Tatsuyuki、Matsuda Michiyuki、Aoki Kazuhiro、Tsukiji Shinya	４．巻 15
２．論文標題 Engineering Orthogonal, Plasma Membrane-Specific SLIPT Systems for Multiplexed Chemical Control of Signaling Pathways in Living Single Cells	５．発行年 2020年
３．雑誌名 ACS Chemical Biology	６．最初と最後の頁 1004-1015
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acschembio.0c00024	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 Yagi Hirokazu、Yagi-Utsumi Maho、Honda Rena、Ohta Yusaku、Saito Taiki、Nishio Miho、Ninagawa Satoshi、Suzuki Kousuke、Anzai Takahiro、Kamiya Yukiko、Aoki Kazuhiro、Nakanishi Mahito、Satoh Tadashi、Kato Koichi	４．巻 11
２．論文標題 Improved secretion of glycoproteins using an N-glycan-restricted passport sequence tag recognized by cargo receptor	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Nature Communications	６．最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-15192-1	査読の有無 有
オープンアクセス 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 －

１．著者名 Komatsubara Akira T.、Goto Yuhei、Kondo Yohei、Matsuda Michiyuki、Aoki Kazuhiro	４．巻 294
２．論文標題 Single-cell quantification of the concentrations and dissociation constants of endogenous proteins	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	６．最初と最後の頁 6062～6072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.007685	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 Komatsubara Akira T.、Goto Yuhei、Kondo Yohei、Matsuda Michiyuki、Aoki Kazuhiro	４．巻 294
２．論文標題 Single-cell quantification of the concentrations and dissociation constants of endogenous proteins	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	６．最初と最後の頁 6062～6072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.007685	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 Miura Haruko、Kondo Yohei、Matsuda Michiyuki、Aoki Kazuhiro	4．巻 24
2．論文標題 Cell-to-Cell Heterogeneity in p38-Mediated Cross-Inhibition of JNK Causes Stochastic Cell Death	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Cell Reports	6．最初と最後の頁 2658～2668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2018.08.020	査読の有無 有
オープンアクセス 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 －

1．著者名 Muta Yu、Fujita Yoshihisa、Sumiyama Kenta、Sakurai Atsuro、Taketo M. Mark、Chiba Tsutomu、Seno Hiroshi、Aoki Kazuhiro、Matsuda Michiyuki、Imajo Masamichi	4．巻 9
2．論文標題 Composite regulation of ERK activity dynamics underlying tumour-specific traits in the intestine	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Nature Communications	6．最初と最後の頁 2174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-04527-8	査読の有無 有
オープンアクセス 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 －

1．著者名 Maryu Gembu、Miura Haruko、Uda Youichi、Komatsubara Akira T.、Matsuda Michiyuki、Aoki Kazuhiro	4．巻 43
2．論文標題 Live-cell Imaging with Genetically Encoded Protein Kinase Activity Reporters	5．発行年 2018年
3．雑誌名 Cell Structure and Function	6．最初と最後の頁 61～74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.18003	査読の有無 有
オープンアクセス 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 －

〔学会発表〕　計11件（うち招待講演　11件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 Kazuhiro Aoki
2．発表標題 Live-cell quantification of the concentration and dissociation constant of endogenous proteins by a combination of CRISPR/Cas9 genome editing and FCS/FCCS.
3．学会等名 Interface between Immunology & Quantitative Biology（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2019年

１．発表者名
青木一洋

２．発表標題
細胞内シグナル伝達系の 可視化、定量化、光操作

３．学会等名
大阪大学蛋白質研究所セミナー がん研究の新機軸（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
青木一洋

２．発表標題
生細胞イメージングによる細胞内シグナル伝達系の可視化、定量化、操作

３．学会等名
第9回光科学異分野横断萌芽研究会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
青木一洋

２．発表標題
生細胞イメージングによるJNK活性の細胞間不均一性と確率的な細胞死の可視化

３．学会等名
第92回日本生化学会大会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
青木一洋

２．発表標題
遺伝子技術と生細胞イメージングによる内在性分子濃度と解離定数の定量化

３．学会等名
第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Kazuhiro Aoki

２．発表標題
Visualization and manipulation of cell signaling

３．学会等名
The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium Imaging and Quantitative Biology（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
青木一洋

２．発表標題
イメージングによる細胞内シグナル伝達の定量化と操作

３．学会等名
第42回日本分子生物学会年会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
青木 一洋

２．発表標題
細胞内シグナル伝達系の可視化と光操作

３．学会等名
第18回日本蛋白質科学会年会（招待講演）

４．発表年
2018年

１．発表者名
青木 一洋

２．発表標題
実験と数理モデルによる

３．学会等名
第15回 生物数学の理論とその応用 -次世代の数理科学への展開-（招待講演）

４．発表年
2018年

１．発表者名 青木 一洋
２．発表標題 細胞間のERK活性伝搬による細胞集団運動の制御と光操作
３．学会等名 細胞を創る研究会11.0（招待講演）
４．発表年 2018年

１．発表者名 青木 一洋
２．発表標題 細胞集団運動と非平衡輸送現象の接点
３．学会等名 定量生物学の会第9回年会（招待講演）
４．発表年 2019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