

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16050

研究課題名(和文) Cdk-サイクリンによるG1/Sチェックポイントの閾値決定機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism underlying G1/S checkpoint threshold by CDK-Cyclin

研究代表者

後藤 祐平 (Goto, Yuhei)

基礎生物学研究所・定量生物学研究部門・助教

研究者番号：50814620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は外界や自身の状況を感じ、増殖するか否かを決定している。外部情報の連続的な(アナログな)刺激が、細胞周期を停止するか否かといった二値的情報(デジタル)に変換されるための閾値決定機構は明らかではない。本研究では細胞周期の主要制御因子であるCDKの動態を1細胞レベルで観察し、定量的な閾値決定機構の解明を目指した。その過程でCDKの活性を生細胞で測定可能なCDK活性センサーおよび、CDK活性の光操作ツールを開発した。本研究を通じて、分裂酵母の細胞周期は様々なインプットをCDK活性に統合し、特定の因子の発現量ではなく最終的なCDK活性が実質的な閾値決定を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞周期の研究の多くは、生化学によるスナップショット、かつ細胞集団の平均的な挙動しか観測してこなかった。また、細胞周期は個々の細胞で独立しているために、薬剤などを用いて細胞周期を同調する必要があった。本研究で開発したCDK活性センサーを用いると、1細胞でのCDKの活性を経時的に、薬剤による同調無しに追うことが可能となり、細胞周期中でのCDK活性動態を高時間分解能で追うことが可能となる。また、細胞周期への擾動も光遺伝学を用いることにより、顕微鏡観察下で任意のタイミングで操作することが可能となった。これらの技術をさらに応用し生体内での細胞周期制御が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic cells sense the environmental and their own situation to decide whether or not to proliferate. Cell cycle checkpoints are used to arrest the cell cycle according to the situations. However, it remains elusive how these checkpoints convert continuous (analog) external stimuli into binary (digital) information. In this study, we aimed to elucidate the quantitative threshold mechanism by observing the dynamics of CDK, a master regulator of the cell cycle, at the single-cell level. We succeeded in developing a novel CDK activity sensor that can measure CDK activity in living cells. We also succeeded in artificially manipulation of the cell cycle checkpoint by directly perturbing CDKs through optogenetics. Throughout this study, it is suggested that the fission yeast cell cycle integrates various inputs into CDK activity and that the final CDK activity, rather than the expression level of a particular factor, is responsible for the substantial threshold determination.

研究分野：細胞生物学

キーワード：定量イメージング CDK サイクリン 分裂酵母 光遺伝学 PhyB Cry2 FRET

1. 研究開始当初の背景

厳密な細胞周期制御は、すべての真核生物が増殖する過程で必須であり、その破綻は細胞死や細胞のがん化の原因となる。G1/S 期チェックポイントは細胞内外の環境と細胞周期進行を結びつける仕組みである。哺乳類培養細胞では、増殖因子の有無や内在性の DNA ダメージによって G1 期に停止する。また、分裂酵母では培地中の窒素源の枯渇により、G1 期の時間が長くなり、最終的に細胞周期が停止する。G1/S 期チェックポイントによる G1 期への停止は、細胞の生存、成長、分化などに必須であり、また、細胞のがん化を抑える役目ももつ。

細胞周期エンジンである CDK-サイクリン複合体は、細胞内外の情報の下流でサイクリンの分解、転写や p21 などの CDK inhibitor により活性が制御されるを受ける。G1/S 期チェックポイントを超えるか否かは CDK-サイクリン複合体の活性に依存していると考えられているが、どの CDK-サイクリン複合体がどれくらい必要なのかという閾値の決定機構は未だ明らかになっていない。なぜなら、これまで、細胞周期関連因子の解析は遺伝学的な解析、もしくは生化学的な実験を主体としており、常に動的である細胞周期因子の厳密な定量的解析は不完全であった。また、外界からの刺激に対する応答や、内在性のストレスは個々の細胞で不均一であり、そのアウトプットである細胞運命の分岐も細胞ごとに不均一であると考えられる。細胞集団を取り扱う生化学的な解析ではこれらの不均一性を取り扱うのに適しておらず、個々の細胞が G1/S 期チェックポイントを超えるための閾値がどのように決定されているかはわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母およびヒト培養細胞を用いて 1 細胞イメージングにより細胞周期依存的な CDK-サイクリン複合体の濃度や解離定数を取得することを最初の目的とした。細胞周期依存的なサイクリンや CDK の蛍光強度および蛍光相関分光法 (FCS) によるタンパク質絶対量の測定、蛍光相互相関分光法 (FCCS) による CDK、サイクリン、CDK inhibitor 間の相互作用の測定を行い、それらの測定データと数理モデルをもとに、細胞周期のシステム特性を考察することで、進化的に保存された G1/S 期チェックポイント閾値決定の分子機構を明らかにすることを最終的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) 分裂酵母の内在性 CDK-サイクリン複合体の 1 細胞定量イメージング

高輝度緑色蛍光タンパク質である mNeonGreen を恒常発現性のプロモーター下流で発現させた細胞株 (リファレンス細胞株) を樹立し、細胞中の mNeonGreen 濃度を FCS および定量ウェスタンブロットングで測定する。分裂酵母の細胞周期関連因子に対して、内在性遺伝子の C 末端に mNeonGreen をタグ付けした株を樹立し、リファレンス株と同時に観察することで、蛍光強度の比較から細胞周期関連因子のタンパク質量の絶対定量を行う。観察には分裂酵母に新鮮な培地を供給しつつ、分裂した古い細胞を捨てていく微小流体デバイスを使用し、低窒素源条件下で増殖中の細胞でのシグナル強度の変動を計測する。分裂酵母は単一の CDK/cdc2 と 4 つのサイクリ

ン/cdc13, cig1, cig2, puc1、CDK inhibitor/ rum1、APC/C-Cdh1/ ste9 が G1/S チェックポイントの制御因子候補であり、これらのタンパク質量の絶対定量を行う。また、それぞれの変異体による G1/S 期チェックポイントと他のタンパク質量への影響を調べ、G1/S 期チェックポイントの閾値決定因子を見出す。

(2) 蛍光相互相関分光法 (FCCS) による内在性細胞周期制御因子の相互作用測定

サイクリンに緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen、Cdk に赤色蛍光タンパク質である mCherry2 をタグ付けする。それらを発現する細胞を用いて、共焦点顕微鏡でレーザー光が作る微小な領域 (数 fL) 中での蛍光の揺らぎを測定する。この蛍光の揺らぎから、自己相関関数および相互相関関数を求める。自己相関関数および相互相関関数の y 軸切片 $G(0)$ から、それぞれ Cdk、サイクリンの濃度および Cdk-サイクリン複合体の濃度を算出し、Cdk-サイクリンの相互作用を測定する。同様に、CDK inhibitor である Rum1 と CDK との相互作用も測定し、Rum1 が G1/S チェックポイントで CDK 活性の閾値を制御する機構を調べる。

(3) ヒト培養細胞の内在性遺伝子への蛍光タンパク質タグと絶対量計測

非がんヒト乳腺上皮細胞 MCF-10A に CRISPR/Cas9 法および MMEJ (Micro-homology Mediated End Joining) を用いたノックインにより、内在性タンパク質の C 末端を蛍光タンパク質標識する。CDK2/4/6、サイクリン D/E/A および G1/S チェックポイント制御に関わる CDK inhibitor p21、APC/C-Cdh1, Rb, E2F を標的にし、細胞周期を通じたタンパク質量の変化、およびタンパク質複合体の変化を FCS、FCCS を用いて測定する。

単純化された分裂酵母での細胞周期モデルと比較することで、真核生物共通の細胞周期制御機構の解明と、ヒトにおいて特異的に進化した制御機構の発見を目指す。

(4) CDK 活性センサーと光遺伝学による細胞周期操作法の開発

CDK のリン酸化酵素活性は細胞周期制御因子の最終的なアウトプットとなるために、直接その活性を見ることは重要であるが、1 細胞で CDK 活性を測定できるセンサーはまだない。そこで FRET を利用したセンサーを開発する。CDK によるリン酸化基質配列とリン酸化ペプチド結合ドメインを持つ FRET センサー骨格を用いてスクリーニングを行い最適な CDK センサーを開発する。開発した CDK センサーを用いて CDK 活性と細胞周期制御因子のダイナミクスを同時計測する。

また、CDK 活性を光遺伝学により制御することで細胞周期に人為的に摂動を与え、その際の細胞周期因子の量と CDK 活性のダイナミクスを測定することで、細胞周期システムの堅牢性などを検証する。光誘導二量体化システムや光誘導性構造変化により、内在性の CDK の局在や活性を光操作できるツールを開発する。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母の細胞周期制御因子 20 種類の内在性遺伝子に緑色蛍光タンパク質 mNeonGreen をノックインした株を作製した。まず、栄養豊富な条件でそれぞれの株の細胞周期での発現量のダイナミクスを比較した。微小流体デバイスを用いて複数細胞を経時的に観察することが可能となったために、CDK 複合体タンパク質量の量比やサイクリン間の量比変動の違いを定量的に比較することに成功した。これらの量変動のデータは細胞周期モデルを記述するうえで重要なデータセットとなることが期待される。

(2) 次にこれらの発現量情報に加えて相互作用の情報を得るために FCCS の実験系を構築した。予備的なデータではあるが CDK とサイクリンの相互作用を FCCS により確認することができた。ほぼすべてのサイクリンは CDK と複合体を形成しており、細胞周期を通じて CDK の方がサイクリンより発現量が高いために、合成されたサイクリンは全量が速やかに複合体形成に使用されることが示唆された。

(3) HeLa 細胞への内在性遺伝子ノックイン手法を確立した。HeLa 細胞内在性の Cdk1 に mNeonGreen をノックインして FCS により発現量を調べたところ分裂酵母の CDK より一桁濃度が低いことが分かった。そこで次に、細胞周期制御が正常な非ガン化細胞である MCF10A を用いてノックイン細胞株を作製したところ、作製効率が低く研究期間内に終了できる見込みが立たなかったために実験を中断し分裂酵母実験に注力した。

(4) CDK のリン酸化酵素活性を測定するための FRET センサーを新規開発した。赤色蛍光タンパク質による内在性遺伝子の可視化と組み合わせることで、細胞周期因子の量変化と CDK 活性の相関をシングルセルで得ることに成功した。その結果、CDK の活性は単純にサイクリンの量増加のみでは説明できず、他の調節因子による活性制御も通常の細胞周期において重要な役割を果たしていることが明らかになった。

また、細胞周期に動的に摂動を加えるための光遺伝学ツールを開発した。分裂酵母 CDK は核内で機能するが、光誘導性二量体化を用いて内在性の CDK を核外へとトラップすることで CDK 活性を強制的に低下させることに成功した。また、逆に内在性の CDK を光により凝集させることで活性を上昇させることにも成功した。これらのツールにより CDK 活性に直接摂動を与えることが可能となった。

本研究を通じて、分裂酵母の細胞周期は様々なインプットを CDK 活性に統合し、特定の因子の発現量ではなく最終的な CDK 活性が実質的な閾値決定を担っていることが示唆された。また、CDK 活性の直接測定や CDK 活性への摂動を通して、分裂酵母細胞は CDK の活性調節をロバストにすることで細胞周期の堅牢性を作り出していることが示唆された。今回取得できた定量データを用いた細胞周期の定量シミュレーションや、哺乳類細胞をはじめとする他生物の細胞周期定量データとの比較などのさらなる解析によって、種間で保存された細胞周期制御機構や進化による適応機構などが明らかになると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uda Youichi, Miura Haruko, Goto Yuhei, Yamamoto Kei, Mii Yusuke, Kondo Yohei, Takada Shinji, Aoki Kazuhiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Improvement of Phycocyanobilin Synthesis for Genetically Encoded Phytochrome-Based Optogenetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2896 ~ 2906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c00477	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 Akira T Komatsubara, Yuhei Goto, Yohei Kondo, Michiyuki Matsuda, Kazuhiro Aoki	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 Sakai Keiichiro, Kondo Yohei, Fujioka Hiroyoshi, Kamiya Mako, Aoki Kazuhiro, Goto Yuhei	4. 巻 134
2. 論文標題 Near-infrared imaging in fission yeast using a genetically encoded phycocyanobilin biosynthesis system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259315	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuhei Goto
2. 発表標題 Development of optogenetic tools to manipulate cell cycle checkpoints
3. 学会等名 Optogenetics Australia workshop 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhiro Aoki, Komatsubara Akira, Yuhei Goto, Yohei Kondo
2. 発表標題 Live-cell quantification of endogenous protein interactions by genome editing technique and fluorescence cross-correlation spectroscopy
3. 学会等名 第71回細胞生物学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuhei Goto, Akira T. Komatsubara, Yohei Kondo, Michiyuki Matsuda, and Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Single-cell quantification of the concentrations and dissociation constants of endogenous proteins
3. 学会等名 8th Annual Winter q-bio conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuhei Goto, Gembu Maryu, Akira T. Komatsubara, Michiyuki Matsuda, and Kazuhiro Aoki
2. 発表標題 Live-Cell Imaging and Optogenetics Reveals AND Gate Role of ERK and Akt in G1/S transition
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuhei Goto, 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 第2回 基礎生物学研究所ゲノム編集所内セミナー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

基礎生物学研究所プレスリリース
<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2019/04/26.html>

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