

解説

細胞周期における後戻りのメカニズム

小長谷 有美

Key words : 細胞周期, G1/S チェックポイント, ライブセルイメージング

細胞は主に G1 期において細胞増殖シグナルを感じし, S 期へと進行するか G1 期にとどまるかの選択を行っている。そして G1/S 期の進行は, サイクリン依存性キナーゼ 2 (CDK2)-Rb-E2F のシグナル伝達経路によって制御される。CDK2-Rb-E2F はポジティブフィードバック回路を形成するため, Rb-E2F はオン/オフスイッチとして働き, 一度 E2F が活性化されると S 期への進行が決定すると考えられてきた。しかし, 今回ライブセルイメージングなどを用いて筆者が行った研究¹⁾から, G1 期において分子的中間状態が存在し, 細胞は可逆的に G1/S 期の進行を後戻りできることが明らかになった。

I E2F の中間的な活性化状態

まず, G1/S 期の進行を制御する CDK2 活性と E2F 活性の時間変化を調べるため, E2F の分子活性を測定する蛍光レポーターを作製し (図 1A), CDK2 のレポーター²⁾と共にヒト乳腺上皮細胞株 MCF-10A へ導入した。なお, 細胞周期を知るために Fucci (CA)³⁾の Cdt1 を, 各細胞のトラッキングのために核マーカーとして H2B を併せて導入した (図 1B)。この細胞株のライブセルイメージングを行った結果, S 期に進行した細胞において, CDK2 活性と E2F 活性は揺らぎながら数時間~数十時間かけてゆっくりと増加することがわかった

(図 1C)。更に, S 期に進行せず G1 期にとどまった細胞のなかには, E2F がほとんど活性化されなかった細胞のほかに, 一度 E2F が中間程度にまで活性化されたものの, 最終的には基底状態まで不活性化される細胞が含まれることが明らかになった (図 1D)。また, 細胞増殖因子 EGF の濃度低下や CDK4/6 活性の抑制によって, このような可逆的かつ中間的な E2F 活性化状態を示す細胞の割合が増加することが明らかになった (図 1E)。この結果は, 細胞増殖シグナルの強弱に応じて E2F 活性の動態が変化することを示している。

II Rb の部分的なリン酸化

次に, 中間的な E2F の活性化がどのようにして惹起されるのか調べるため, E2F の抑制因子である Rb に注目した。Rb は CDK によってリン酸化されるセリン・スレオニン残基を 15 個持つ。そして Rb は, 低リン酸化状態 (リン酸化が全く入っていない un-phosphorylation と, 確率的に 1 つだけリン酸化が入った mono-phosphorylation⁴⁾) で活性化され, 高リン酸化状態 (15 個のセリン・スレオニン残基に最大限リン酸化が入った hyper-phosphorylation) で不活性化されることが広く知られている。また, Rb-E2F 複合体の立体構造を調べた先行研究^{5,6)}により, Rb-E2F 複合体には 2 つの結合領域があり, それぞれ異なる Rb アミノ

The mechanism underlying cell cycle reversal

Konagaya Yumi: 理化学研究所生命機能科学研究センター定量的細胞運命決定研究チーム (〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町 2-2-3)

0370-9531/12/¥500/論文/JCOPY

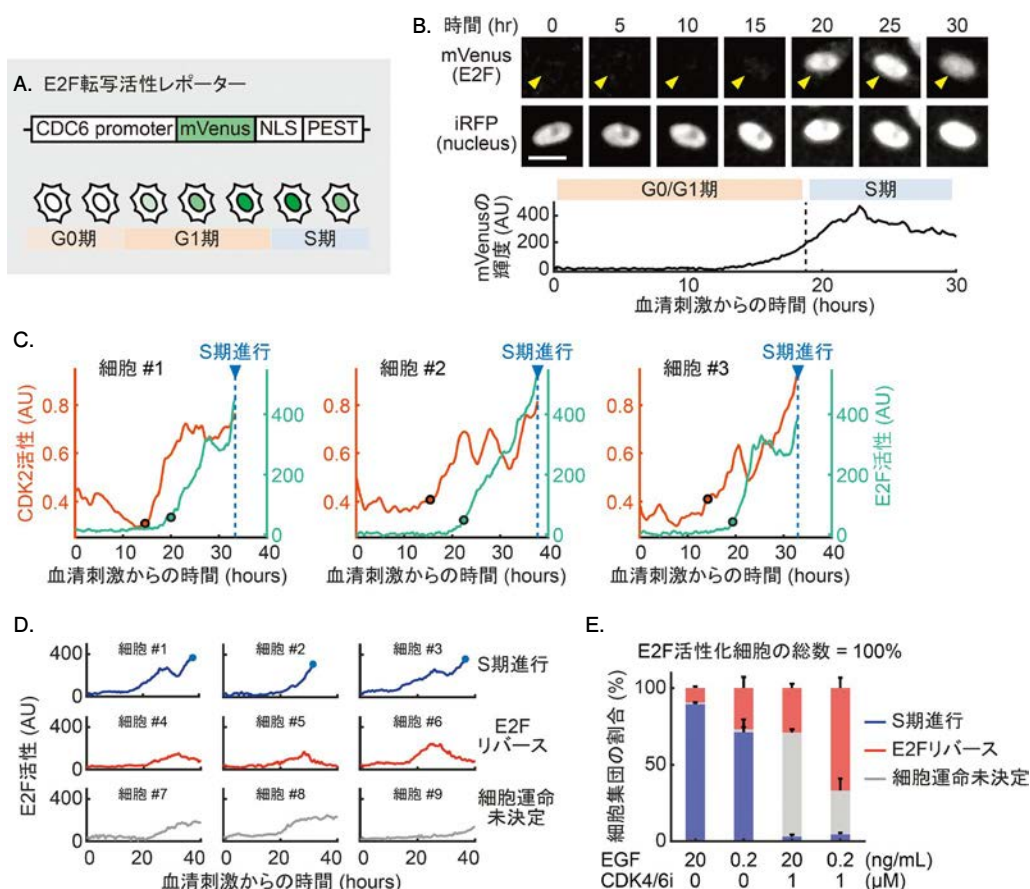


図1 細胞周期制御因子の1細胞レベルでの時間変化と細胞ごとのばらつき

A. E2F 転写活性レポーターの構造

B. E2F レポーターを発現する MCF-10A 細胞 (上) とレポーター輝度の時間変化の定量化グラフ (下)

C. MCF-10A 細胞における, CDK2 活性と E2F 活性の1細胞レベルでの時間変化

D. S 期に進行した細胞 (上), 可逆的に E2F が活性化された細胞 (中), 細胞周期の進行が決定していない細胞 (下) における E2F 活性の時間変化

E. 可逆的かつ中間的な E2F 活性化状態を示す細胞の割合

残基のリン酸化によって Rb と E2F が解離することが知られている。したがって, Rb における特定のセリン・スレオニン残基のリン酸化によって, Rb と E2F の解離が段階的に起こる可能性を考えた。この仮説が正しいとすれば, Rb のリン酸化も段階的に起こると予想される。そこで, Rb のリン酸化が段階的に起こるのかどうかを調べるため, iterative indirect immunofluorescence imaging (多重間接免疫蛍光染色法)⁷⁾を用いて Rb の各セリン・スレオニン残基におけるリン酸化の程度を1細胞レベルで調べた。すると, Rb の C 末端の残基は, 対照として用いた S807/S811 と等量ずつリン酸化されることがわかった。一方で,

Rb の中心領域にある残基, なかでも T373 は特に顕著に, S807/S811 よりも多くリン酸化されていることが明らかになった (図 2A)。また, リン酸化 Rb の時間変化を調べたところ, T373 が他の残基より先にリン酸化されることが確認された (図 2B)。これらの結果は Rb が段階的にリン酸化され, 低リン酸化状態から T373 のリン酸化を伴う部分的リン酸化状態を経て, 高リン酸化状態へと達することを示唆している (図 2C)。

Ⅲ Rb のリン酸化と E2F 活性の関係

Rb は段階的なリン酸化を受けることが明らかになった。では, Rb のリン酸化と E2F 活性との

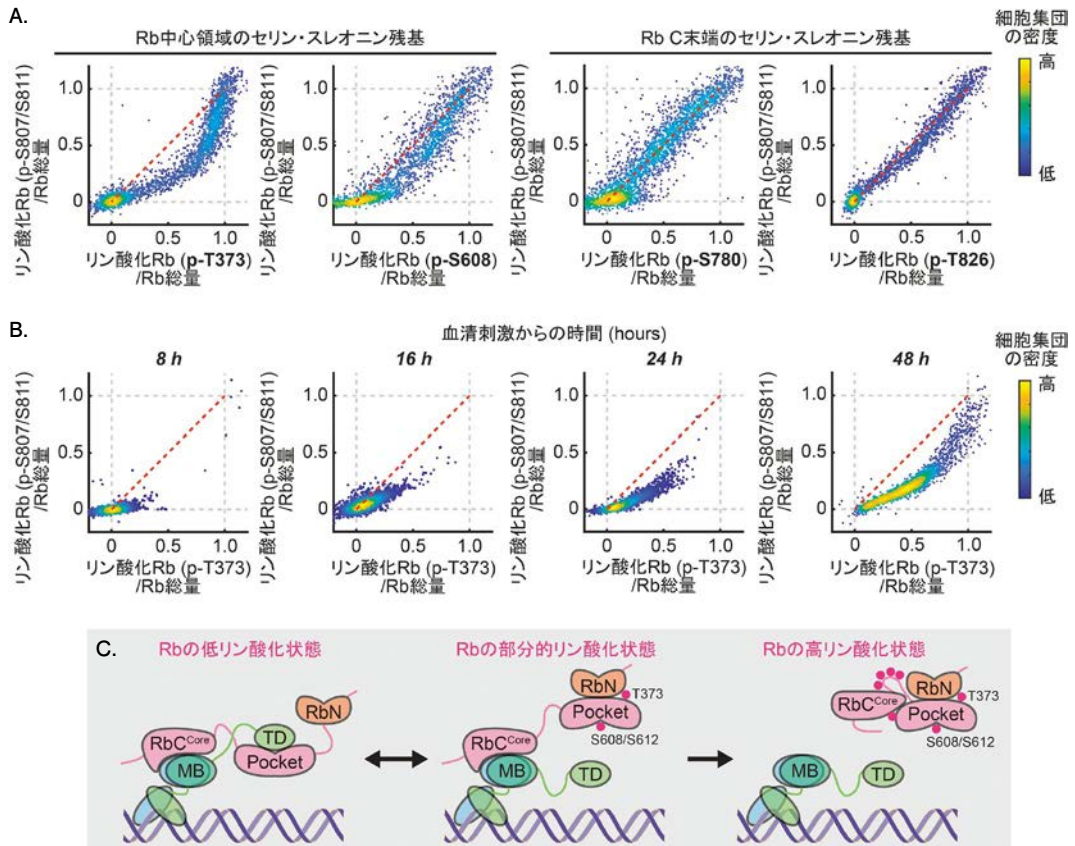


図 2 Rb の段階的なリン酸化

- A. Rb の各セリン・スレオニン残基におけるリン酸化の程度
 B. Rb の T373 と S807/S811 におけるリン酸化の時間変化
 C. Rb の段階的なリン酸化のモデル

関係はどうなっているのだろうか。Rb の各セリン・スレオニン残基におけるリン酸化と E2F 活性の関係を 1 細胞レベルで調べるために、まずはライブイメージングにより E2F 活性を測定し、そのサンプルを固定後、免疫蛍光染色法により Rb のリン酸化程度を測定した。その結果、Rb の C 末端の残基のリン酸化は、E2F が中程度以上に活性化されるまで低いままであるのに対し、Rb の中心領域にある残基のリン酸化は、中間的な E2F の活性化と共に徐々に上昇することがわかった (図 3A)。つまり、中間的な E2F 活性は Rb の中心領域の残基におけるリン酸化と正に相関する。また、CDK4/6 阻害剤を含む培地に CDK2 阻害剤を加えて CDK2 の活性を抑制すると、Rb の中心領域の残基におけるリン酸化と中間的な E2F 活性はともに抑制された。したがって、CDK4/6 活性

を阻害した条件下では、CDK2 の活性化が Rb の部分的なリン酸化と E2F の中間的な活性化を引き起こすと言える。

更に、Rb の中心領域の残基におけるリン酸化と中間的な E2F 活性の間に、相関関係だけでなく因果関係はあるのかを調べるために、Rb の変異体を用いた。具体的には、Rb-WT (野生型) および Rb- Δ CDK (CDK が標的とするセリン・スレオニン残基をすべてアラニンに置換した変異体) のほかに、Rb-WT-3A (Rb-WT をバックボーンに、Rb の中心領域にある 3 残基をアラニンに置換した変異体) と Rb- Δ CDK-3D (Rb- Δ CDK をバックボーンに、Rb の中心領域にある 3 残基をアスパラギン酸に置換した変異体) を用意した (図 3B)。そして内在性の Rb をノックダウンし、代わりに Rb の変異体を発現させて中間的な E2F

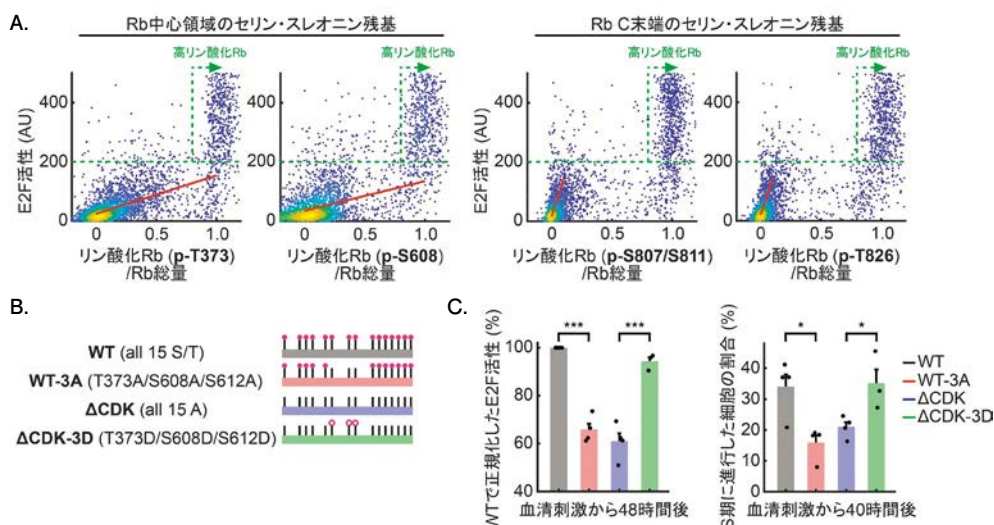


図 3 Rb の部分的リン酸化による E2F の中間的活性化

- A. Rb のリン酸化と E2F 活性の相関関係
 B. Rb の中心領域のセリン・スレオニン残基におけるリン酸化に対する変異体
 C. Rb のリン酸化と E2F 活性の因果関係

活性がどのように変化するかを調べた。まず、Rb-WT-3A を発現させた細胞において、E2F 活性は Rb-ΔCDK 発現細胞と同程度に抑制された。反対に Rb-ΔCDK-3D を発現させた細胞における E2F 活性は、Rb-ΔCDK 発現細胞よりも増加し、Rb-WT 発現細胞と同程度まで回復した (図 3C 左)。以上の結果より、Rb の中心領域の残基におけるリン酸化は中間的な E2F 活性を惹起するのに必要十分であると言える。また、これらの Rb 変異体を発現する細胞を用いて細胞周期の進行程度を調べたところ、G0 期から S 期に進行した細胞の割合は E2F 活性レベルと同様の傾向を示した (図 3C 右)。すなわち、Rb の中心領域の残基におけるリン酸化が、G1 期から S 期への進行を制御していることが示された。

IV Rb が部分的にリン酸化されるメカニズム

Rb の中心領域にあるセリン・スレオニン残基は、なぜ他の残基に比べて優先的にリン酸化されるのだろうか。特定の残基における優先的なリン酸化の原因としては、その残基に対する、キナーゼによる優先的なリン酸化反応、もしくはホスファターゼによる非優先的な脱リン酸化反応が考

えられる。筆者らの行った検討の結果、今回明らかになった Rb の段階的なリン酸化は、主に後者の可能性、つまり脱リン酸化反応速度の違いによるものと結論づけられた。手がかりとなったのは、各残基における脱リン酸化速度を測定するという至ってシンプルな実験だった。G1 期の細胞に対し、阻害剤を用いて CDK4/6 と CDK2 によるリン酸化を止め、ホスファターゼによる脱リン酸化の時間変化を追ったところ、Rb の中心領域の残基は C 末端の残基より遅い速度で脱リン酸化されることがわかった (図 4A)。なお、このときの Rb 総量に変化はみられなかった (図 4B)。Rb 中心領域の T373 では、C 末端の S807/S811 に比べて脱リン酸化が遅いという観察結果は、G1 期だけでなく分裂期においても一貫して観察された (図 4C, D)。また、これらの実測値を入力した Rb リン酸化・脱リン酸化の数理モデルを用いることで、T373 における脱リン酸化反応の遅さにより、T373 における優先的なリン酸化の大部分を説明できることが明らかになった。

V Rb のクロマチンへの結合

最後に、Rb の部分的なリン酸化によって転写因子である E2F が中間的な程度にまで活性化さ

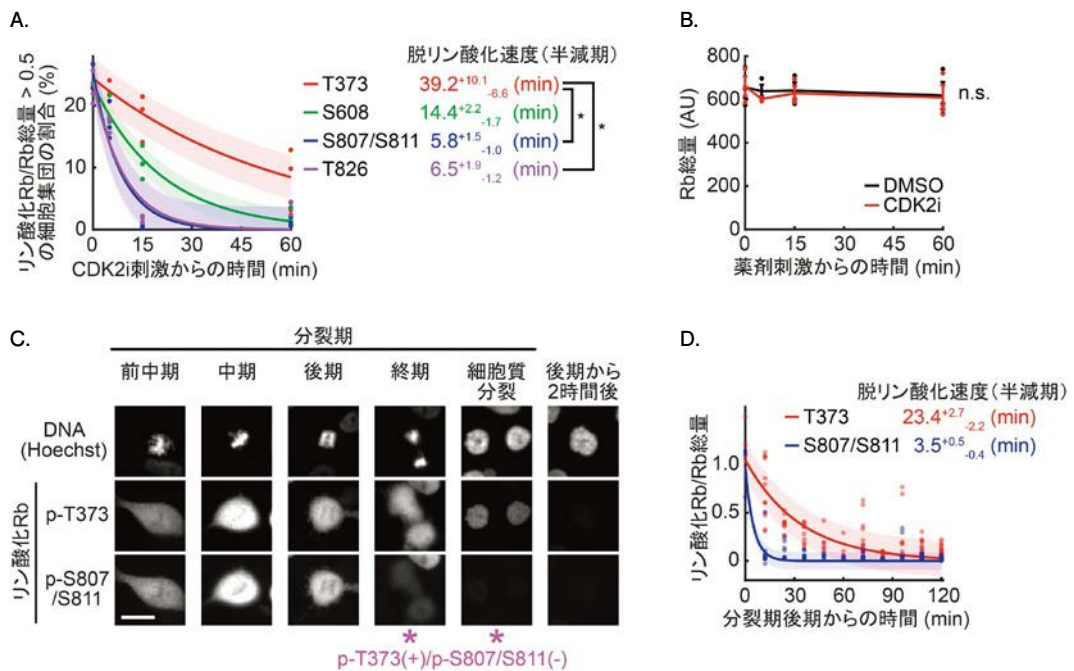


図 4 脱リン酸化速度の違いによる, T373 における優先的なリン酸化

- A. Rb の各セリン・スレオニン残基における脱リン酸化速度
 B. CDK 活性を抑制したときの Rb 総量の変化
 C. Rb の T373 と S807/S811 が脱リン酸化される分裂期の MCF-10A 細胞
 D. 分裂期における Rb の T373 と S807/S811 の脱リン酸化速度

れるしくみを調べた。前述のように, Rb が活性化されているとき, Rb と E2F は主に 2 つの異なる領域を介して相互作用し, クロマチンに結合している。Rb の中心領域の残基が C 末端の残基より先にリン酸化されるのならば, 2 つある Rb-E2F 結合のうちの片方は解離し, 他方は結合したまま Rb-E2F がクロマチンに結合するという仮説が考えられる (図 2C)。この仮説を検証するため, クロマチンから遊離しているタンパク質をあらかじめ取り除き, クロマチンに強く結合しているタンパク質を検出する方法 (pre-extraction) を用いて, 各リン酸化 Rb のクロマチンへの結合を調べた。その結果, Rb の C 末端にある S807/S811 や T826 がリン酸化された Rb はクロマチン結合分画がほとんど検出されなかったのに対し, Rb の中心領域にある T373 がリン酸化された Rb はクロマチンに結合している分画が検出された (図 5A)。また, リン酸化された Rb と E2F 活性の関係を調べたところ, T373 リン酸化 Rb がクロマチンに結

合している細胞では, E2F は中間的な程度まで活性化されていた (図 5B)。一方で, E2F が十分に高い細胞では, T373 リン酸化 Rb も S807/S811 リン酸化 Rb もクロマチン結合分画はほとんど検出されなかった。つまり, 以下のような段階的 E2F 活性化モデルが考えられる。まず, Rb が低リン酸化状態にあるときは Rb-E2F はクロマチンに強く結合しており E2F の活性は抑制されている。次に, Rb が部分的にリン酸化されると, Rb の一部の結合領域は E2F から遊離するが, 別の結合領域を介して Rb-E2F がクロマチンに弱く結合し, E2F が中間的な程度まで活性化される。最後に Rb が高リン酸化状態に達すると, Rb は完全にクロマチン上の E2F から遊離して, E2F が最大限に活性化される。

おわりに

筆者らは今回, E2F の転写活性を測定する蛍光レポーターを作製し, 大規模な画像データから,

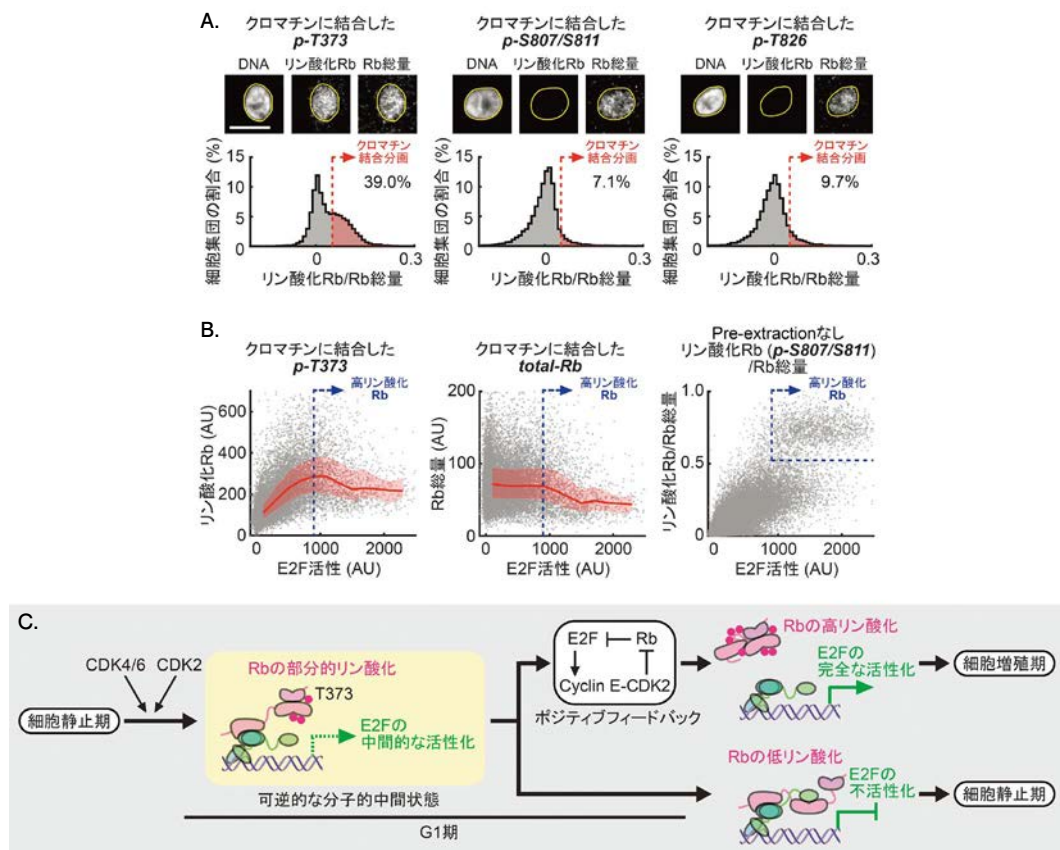


図 5 部分的にリン酸化された Rb のクロマチン結合

- A. リン酸化 Rb のクロマチン結合能
 B. クロマチンに結合した T373 リン酸化 Rb と E2F 活性の関係
 C. G1 期における可逆的な分子の中間状態のモデル

それぞれの細胞は多様な E2F 活性のダイナミクスを示すことを明らかにした。そして驚くべきことに、高い程度まで E2F が活性化された細胞集団は S 期に進行するが、細胞のなかには中程度まで E2F が活性化されたのちしばらくして不活性化され、G1 期を逆戻りする集団が存在することを発見した。このような E2F の中間的な活性化は、E2F の抑制因子である Rb の部分的リン酸化によって生み出される。すなわち、G1 期において可逆的な分子の中間状態が存在し、細胞はその期間に細胞内外のシグナルを感知・統合し、G1 期から S 期に進行するか、G1 期にとどまるかの選択を行っているのである (図 5C)。先行研究において、E2F の活性化は G1/S 期の進行だけでなく、DNA 損傷の修復や細胞の分化を制御することが報告されている⁸⁾。今回の研究で明らかに

なった Rb の部分的リン酸化による E2F の中間的な活性化が生体内でどのような機能を持つのかについては、今後の研究課題である。

●文 献

- 1) Konagaya Y, Rosenthal D, Ratnayake N et al : *Nature*. **631** : 424-431, 2024
- 2) Spencer SL, Cappell SD, Tsai FC et al : *Cell*. **155** : 369-383, 2013
- 3) Sakaue-Sawano A, Yo M, Komatsu N et al : *Mol Cell*. **68** : 626-640, 2017
- 4) Narasimha AM, Kaulich M, Shapiro GS et al : *Elife*. **3** : e02872, 2014
- 5) Lee C, Chang JH, Lee HS, Cho Y : *Genes Dev*. **16** : 3199-3212, 2002
- 6) Rubin SM, Gall AL, Zheng N, Pavletich NP : *Cell*. **123** : 1093-1106, 2005
- 7) Gut G, Herrmann MD, Pelkmans L : *Science*. **361** : eaar7042, 2018
- 8) Cam H, Dynlacht BD : *Cancer Cell*. **3** : 311-316, 2003