テクニカルノート

─細胞周期インディケータ Fucci ─細胞周期を多角的に理解する─

阪上-沢野 朝子^{*1,*2)}, 宮脇 敦史^{*1,*2)} (*¹⁾JST ERATO 宮脇生命時空間情報プロジェクト,

*²理化学研究所脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チーム)

細胞の分裂(増殖)は細胞周期に従って進行する。細胞 周期は、分裂がおこる M (Mitosis) 期、DNA 複製がおこ る S (Synthesis) 期, それぞれの間をつなぐ G_1 期, G_2 期 からなる. 元々、細胞周期の進行の自律的メカニズムを分 子レベルで解明する研究が盛んであったが,近年は、組 織・器官・個体におけるさまざまな外的要因によって細胞 周期が調節される仕組みにも関心がむけられている. とこ ろが,多細胞生物の発生や再生における形態形成,幹細胞 の維持や分化、がん(癌)の浸潤・転移など、さまざまな 生命現象のなかで細胞周期の進行がどのような時空間パ ターンで展開するのかについてはまだ不明な点が多い.細 胞が S 期にあることを時空間的に調べるために、従来は、 ブロモデオキシウリジン (BrdU) や,トリチウムチミジ ン([³H]-thymidine)を一定期間取り込ませて DNA の複製 を検出する方法がとられてきた、しかし、シグナル検出の ために細胞を固定する必要があり,また取り込ませる方法 によって結果が変わるという問題があった.近年では蛍光 イメージング技術の進歩とあいまって、様々なライブイ メージング手法が登場している1~8).

ユビキチンオシレイター

細胞周期進行の自律的メカニズムは、多くの分子が参加 する分子ネットワークの制御の下で、「細胞周期エンジン」 がはたらくことで成立している⁹. 我々は、細胞周期の特 定の時期に蓄積する二つのタンパク質分子、Cdt1 と Geminin に着目した(図1A)⁶. Cdt1 は、G₁期に蓄積しS/G₂/ M期には存在しない、一方 Geminin は、DNA 複製から細

胞分裂に至る $S/G_{P}/M$ 期に蓄積し G_{P} 期には存在しない. このような細胞周期に則した特定タンパク質の量の調節 は、ユビキチン-プロテアソーム系による選択的なタンパ ク質分解反応によって達成されている^{10,11)}.常に合成され ながら、機能すべきでない時期になると、ユビキチンの付 加を経てプロテアソームで分解されるのである. Cdt1と Geminin のタンパク質の量に関しては、これらにユビキチ ンを付加するE3リガーゼであるSKP1-CUL1-F-boxprotein (SCF) 複合体と anaphase-promoting complex/cyclosome (APC) 複合体の活性が、直接的あるいは間接的 にお互いに抑制しあいながら振動する(ユビキチンオシレ イター)ことで調節されている^{10,11)}. そこで, Cdt1 と Geminin の分解に関わる領域を選び出し、それぞれに異なる色 の蛍光タンパク質を結合し、G₁期またはS/G₂/M期に蛍 光を発するプローブ Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator)の開発に臨んだ⁶.

Fucci の開発戦略

Cdt1には赤色の蛍光タンパク質を,またGemininには 緑色の蛍光タンパク質をそれぞれ結合させた.具体的に は、ヒトCdt1(全長546アミノ酸)の調節領域をコードす る部位(機能領域を除く)に、mKO2(monomeric Kusabira Orange2)をコードする遺伝子を連結した.同様に、ヒト Geminin(全長209アミノ酸)の調節領域をコードする部 位(機能領域を除く)に、mAG(monomeric Azami Green) をコードする遺伝子を連結した.多くのコンストラクトを 作製し、それらを細胞に発現し、プローブの性能およびプ ローブ導入による細胞周期の異常の有無を詳細に検討し た⁶⁾.

(1) 細胞周期依存的蛍光シグナル

G₁期および S/G₂/M 期特異的なプローブを検討するために,候補となるコンストラクトを発現する細胞のタイム ラプスイメージングを行った.検討の結果,Cdt1に関し

Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cellcycle progression

Asako Sakaue-Sawano^{*1, *2)} and Atsushi Miyawaki^{*1, *2)} (^{*1)}Miyawaki Life Function and Dynamics Project, ERATO, JST and ^{*2)}Lab for Cell Function Dynamics, Brain Science Institute, RIKEN, 2–1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351–0198, Japan)

60

時間

70

テクニカルノート



図1 細胞周期と Fucci

(A) Fucci の構造 Fucci は G₁ 期特異的プローブと S/G₂/M 期特異的プローブによ り構成される. G₁期特異的プ ローブは,赤色蛍光タンパク (mKO2, mCherry) 12 Cdt1 (30-120) を連結している. S/G₂/M 期特異的プローブは,緑色蛍光 タンパク質 (mAG, mVenus) に Geminin (1-110) を連結してい る. *S/G₂/M 期特異的プローブ は,緑色以外の蛍光タンパク質 (mCherry, AmCyan) でも開発 に成功している.青色部分は Cy motif (amino acids 68-70), ピンク色部分は destruction box,

そして黒色部分は nuclear localization signal.

(B) Fucci/Fucci2が描出する細 胞周期

Fucci/Fucci2はG₁期にある細胞 の核を赤色に、S/G₂/M期にあ る細胞の核を緑色に、G₁/S遷移 期にある細胞の核を黄色に、 G₀/postmitotic期にある細胞の核 を強赤色(Red^{nigh})に描出す る^{6,7,13,14}.

(C)理想的Fucciプローブ
 Fucci性能向上の目標.G。を含む全ての周期を連続的に異なる
 色で描出することを可能とする.



時間



 $\boxtimes 2$ G₁ arrest/G₀/postmitotic phase

(A)-(D) NMuMG/Fucci2 細胞を用いたタイムラプスイメージング. contact inhibition に至る 過程のイメージングからのスナップショット(A)と,矢印で示す細胞のFucci 蛍光強度のト ラッキングデータ(B). serum starvation 条件下(0.5% 血清)でのイメージングからのスナッ プショット(C)と,矢印で示す細胞のFucci 蛍光強度のトラッキングデータ(D).(E,F) Fucci (G₁-Red) #596とFucci (S/G₂/M-Green) #504とのダブルトランスジェニックマウスの胎 生11.5日,13.5日の全身矢状断切片の蛍光画像.共焦点蛍光顕微鏡によりRed,Green それ ぞれの蛍光画像をタイリングモードで取得し,画像解析を行った.20倍対物レンズ,それぞ れ108(縦12列横9列)枚(E),294(縦21列横14列)枚(F)の画像から全体像を作成した.*F の肝臓の緑シグナルは自家蛍光である.

49



図3 Fucci発現細胞を用いた抗がん剤評価実験

NMuMG/Fucci2, HeLa/Fucci2 細胞を etoposide で処理した際の細胞反応3種類の概要. (A) G₂ arrest, もしくは低濃度のため細胞周期が影響を受けない. (B) 正常な M 期を完了することが出来ずに nuclear mis-segregation を示す. (C) M 期 に進行するが, cytokinesis が起こらず, endoreplication へと進む. (D) NMuMG/Fucci2 を様々な濃度の etoposide で処理し, タイムラプスイメージングを行い, 48 時間後の画像より, 3種類の反応および細胞死に至ったそれぞれの細胞数をカウントしグラフ化した.

ては、アミノ酸番号で30番から120番までの領域に mKO2 をつないだもの [mKO2-hCdt1(30/120)] (Fucci; G₁-Red), また Geminin に関しては、アミノ酸番号で1番か ら 110 番までの領域に mAG をつないだもの「mAG-hGem (1/110)] (Fucci; S/G₂/M-Green) がプローブとして最も 適していることを見出した(図 1A). これらのプローブは、 それぞれ内在性の Cdt1, Geminin と調節領域を共有するた め、細胞内に導入されると、Cdt1、Geminin と同じ時間的 パターンで核内で出現と消失を繰り返すことになる. mKO2-hCdt1 (30/120) と mAG-hGem (1/110) を HeLa 細胞 に恒常的に発現させ(HeLa/Fucci)、タイムラプスイメー ジングで観察したところ、細胞の核の色が細胞周期の進行 に応じて、赤→黄→緑→(分裂)→赤→と交互に変化する ことが確認できた. 生きた状態で, G₁期にある細胞の核 を赤色に, S/G₂/M 期にある細胞の核を緑色に, G₁/S 遷移 期にある細胞の核を黄色にハイライトすることができた $(\boxtimes 1B)^{6}$.

(2) インキュベーター顕微鏡

そもそもプローブには、細胞がもつ本来の機能を阻害し ないで働くことが求められる^{1.2)}. Fucci 導入によって、細 胞周期の制御が変わってしまうことがあってはならない. Cdt1 や Geminin の全長は勿論のこと、機能領域を含むコ ンストラクトが細胞周期に劇的な影響を与えることを経験 してきた. このような評価を行う上で、我々は長時間蛍光 タイムラプスイメージングを採用した. 哺乳類細胞の細胞 周期が一巡するのを十分にカバーするには、およそ 24 時 間以上の観察が必要となる. 長時間にわたって安定した培 養環境を維持するために、CO² 濃度 (pH), 温度, 湿度な どのコントロールがきわめて正確に制御できるインキュ ベータ顕微鏡を使用した⁶.

(3) レンチウイルス

レンチウイルスは、非分裂細胞にも感染してゲノムへの 組込みをおこすので、あらゆる細胞に外来遺伝子を導入す ることが可能なシステムである¹²⁾. プラスミドによる一過 性のトランスフェクションを行った細胞は、分裂を繰り返 すたびにプラスミド量が減少していくため、数回の分裂を 経て発現が見られなくなる. それに対して、レンチウイル スによるトランスダクションの場合は、ゲノムヘインテグ レーションされるため、一度導入してしまえば恒常的な発 現が期待できる. 導入効率も高く、Fucciの2種類の遺伝 子を同時に導入したり、初代培養細胞などでプローブを発 現させるような実験には有用なツールである.

(4) イメージング技術と画像解析技術

様々な色の蛍光タンパク質が分子生物学で活用されるようになって久しく,多色イメージングの活躍によって,複数の生命現象を同時に観察することが可能となってきた^{1,2)}.しかし多色イメージングにはそれなりのノウハウがある.用いる蛍光タンパク質それぞれのスペクトル特性を知ることが必須であり,それらに合致する光学システムを 吟味・選択していくことが重要である.たとえば,spectrum manager (http://rikenbocc.brain.riken.jp/SpectrumMan ager.html)を活用されることをすすめる.適正なイメージ ングデータを元に情報を読み解き,各生命現象の包括的理 解を図ることが重要である¹³.

(5) Fucci の性能向上をめざして

現在,さまざまな次世代 Fucciの開発に取り組んでい る. すでに GFP や YFP を用いて作製されている種々の細 胞機能プローブと同時に細胞周期を観察するためには, Fucciの多色化が必須である. そこで、G 期特異的なプ ローブとして、さくら色 (mCherry), S/G₂/M 期特異的な プローブとして、さくら色 (mCherry)、黄緑色 (mVenus)、 シアン色 (AmCyan) などを作製した^{7,13,14)}. ところで、オ リジナル Fucci は核局在タイプであり、細胞1個1個を同 定する場合には都合がよいが、注目する細胞の種類や分化 状態に関する情報は与えてくれない.そこで S/G₂/M 期特 異的に細胞全体に局在を示す Fucciを作製した⁷.この Fucci プローブを用いると、S/G2 期にある細胞のシルエッ トを描出することが出来る.しかしながら、より強く切望 されているのは図 1C に示すような G1, S, G2, M 期のみ ならず、G₀/postmitotic 期を含むすべての周期を異なる色 で見分けることが出来る Fucci である.こうした理想的 Fucciを目標に現在も開発が進行中である.

G₁ arrest/G₀/postmitotic phase

Fucci 発表後,様々な研究者からのフィードバックをも とに Fucci 技術の操作原理について理解を進めてきた¹³⁾. たとえば Fucci;G₁-Red は,G₁期にくわえ,G₁ arrest/G₀/ postmitotic 期においても細胞の核を赤色にハイライトする が,これらの時期では,G₁-Red をユビキチン化して分解 に導く系が OFF のまま赤色が蓄積し続ける結果,強赤色 (Red^{high})として表現できることがわかった(図1B).そこ で第2世代 Fucci (Fucci2;mCherry-hCdt1(30/120)と mVenus-hGem(1/110))を恒常的に発現する細胞 NMuMG/ Fucci2を作製し,培養条件下でG₁ arrest/G₀/postmitotic phase を誘導する二つの実験を行った¹³⁾. NMuMG 細胞は 接触阻止 (contact inhibition) 制御がかかる細胞であり,

テクニカルノート

その過程をタイムラプスイメージングしたところ,過密状 態になった全ての細胞で増殖が停止し,Fucciは強赤色 (Red^{high})を示した(図2A).代表的な細胞のFucci蛍光強 度をグラフ化すると(図2B),分裂を繰り返している時の 赤強度に比べ,増殖停止した時の赤強度が高いことがわか る.次にNMuMG/Fucci2を血清飢餓(serum starvation)条 件下でタイムラプスイメージングすると(図2C,D),細 胞は密になる前に増殖を停止するが,やはりFucciの赤強 度が上昇していく(Red^{high})様子が観察された.Fucciは contact inhibitionや serum starvationにより惹起されるG₁ arrest/G₀/postmitotic phaseと総称される時期を,赤色蛍光タ ンパク質が蓄積し続ける時期=強赤色(Red^{high})として描 出する.

Fucci トランスジェニックマウス

pCAGGS ベクターを用いて Fucci を発現するトランス ジェニックマウスを作製した⁶⁾. すべての細胞の核が,赤 色または緑色の蛍光を発すると期待できる.G₁-Redのマ ウスが16ライン,S/G₂/M-Greenのマウスが8ライン得ら れ、それぞれから全身性の発現が見られるラインを選別し \mathcal{E} (Fucci (G₁-Red) # 596 \mathcal{E} Fucci (S/G₂/M-Green) # 504). それぞれのラインは、個体発生、出生、成長、生殖、寿命 において正常個体と変わりなく、Fucci プローブがこれら 生命活動に影響を与えないことを示している。#596と# 504 をかけ合わせ、両方のシグナルを有する胎仔(胎生 11.5日,13.5日)の全身切片像(矢状断)を観察すると (図 2E, F), 増殖の盛んな部分, 脳原基の脳室側, 神経前 駆細胞の細胞体がひしめく部分(矢頭)では、細胞周期が 盛んに繰り返されるため、赤色と緑色のシグナルが混在し ている¹³⁾.一方,増殖が終了した部分,たとえば脳原基の 脳膜側、細胞分裂を止めて神経に分化・成熟した細胞が蓄 積する部分(矢印)では、赤色のシグナルが支配的(強赤 色 (Red^{high})) になっており, G₀/postmitotic phase にあると 考えられる.図 2E と図 2F を比較すると、F において圧倒 的に強赤色 (Red^{high}) の領域が広く, 増殖から分化への移 行を視覚的にも理解できる.

薬剤効果のスクリーニング

NMuMG/Fucci2, HeLa/Fucci2 細胞を用いて,古典的な 抗がん剤であるエトポシド (etoposide) で処理した際の細 胞の反応を解析した¹⁴⁾. etoposide は,DNA topoisomerase II 酵素の阻害剤として知られており,この薬で処理した細 胞は,主にG²期で細胞周期が停止し (G² arrest),いずれ 細胞死に至ると考えられている.解析には,以下の三つの 方法を用いた.まず,核染色を施した細胞群に対して,

- FACS を使い,核 DNA 量および細胞周期(Fucci)の 情報を解析する.対象とする細胞の数が多く統計的 なポピュレーション解析が可能.
- CELAVIEW (high content analysis 装置)を使い,画 像データを元に,個々の細胞について核 DNA 量お よび細胞周期 (Fucci)の情報を照合させながら解析 する.

一方, 生細胞を材料にして,

(3) タイムラプスイメージングにより,高精細の画像 データを元に,個々の細胞について細胞周期(Fucci) に関する情報を経時的に解析する.

結果, HeLa/Fucci2 細胞は,低濃度から高濃度の etoposide に対し G_2 arrest を示すことがわかった.一方, 意外にも NMuMG/Fucci2 細胞は etoposide 濃度に対して多 様な反応を示した(図3).低濃度の etoposide は G_2 arrest を引き起こすのに対し,中濃度の etoposide は,細胞核の 分断化現象 (nuclear mis-segregation)を引き起こした.さ らに,高濃度の etoposide は,細胞分裂をスキップして核 DNA 量を指数関数的に増やす特異な細胞周期進行 (endoreplication)を誘起した.タイムラプスイメージングに よって,高濃度 etoposide 暴露の後に, G_2 arrest から endoreplication サイクルに移行する瞬間を捉えることにも成 功した¹⁴⁾.

上記のような核分断化現象(nuclear mis-segregation)や 核 DNA 量増大化現象(endoreplication)を詳細に解析する ためには,(2) CELAVIEW および(3) タイムラプスイメー ジングによる解析が必須であると思われる.従来の薬剤応 答の評価実験は,(1) FACS のみに頼ることが多く,ある 時間一点における細胞集団のデータを扱っている.我々 は,たとえ遺伝的背景が同じでも1個1個の細胞が状況に 応じて多様な応答を示すことを明らかにしており,現行の 薬剤効果評価に対して注意喚起を促したいと思う¹⁴.

Fucci 技術の今後の展開

今後, Fucci 技術が進展することで,以下のような展開・応用の可能性が期待される.

(1) 個体発生における"細胞の増殖と分化との間にある 協調的制御"に関して,新しい理解をえることができる. 種々の生物種でトランスジェニック個体が作製されること で^{6.15,16},様々な細胞周期を4次元で理解する試みが可能と なり,細胞周期の進行をつかさどる動的メカニズムに関し て包括的な新知見がえられることが期待される.

(2) 医療分野における前臨床的実験(実験動物を用いる 実験)で活躍する技術となる.がんや再生は,細胞増殖が 関わる現象である.がん細胞や, iPS 細胞などの移殖細胞

テクニカルノート

の増殖を、細胞の浸潤・転移や分化など動態と関連させて 評価する系が構築できる.

(3) 創薬分野で細胞増殖に関わる薬のスクリーニング, バリデーションに活躍する技術となる.たとえば,細胞分 裂だけでなく DNA 複製,さらに G₁ 期, G₂ 期を別個にモ ニタすることで,新しい抗がん剤の開発が期待できる.

(4) Fucciファミリーは今後も機能拡張を続けていく.新 しいFucciのシアン色,黄緑色やさくら色は,世界中に普 及している緑色蛍光タンパク質や赤色蛍光タンパク質のシ グナルと区別することができる.Fucciと別の蛍光機能プ ローブとの組み合わせによる多角的蛍光イメージングを展 開できる.

謝辞

本研究は、都立臨床研・正井久雄先生、癌研・今村健志 先生、羽生亜紀先生、名古屋大学・宮田卓樹先生、筑波大 学・笹倉靖徳先生、小椋陽介氏、筑波理研・三好浩之先 生、理研 BSI・小川正晴先生および研究室の皆さん、RRC (Research Resource Center), BOCC (理研 BSI-オリンパス 連携センター)、および宮脇ラボメンバーとの共同により 行っています.この場を借りて深謝いたします.

- 1) Tsien, R.Y. (2009) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 48(31), 5612–5626.
- 2) Miyawaki, A. (2011) Annu. Rev. Biochem., 7(80), 357-373.
- 3) Leonhardt, H., Rahn, H.P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer,

T., Zink, D., & Cardoso, M.C. (2000) J. Cell Biol., 17(149), 271–280.

- Thomas, N., Kenrick, M., Giesler, T., Kiser, G., Tinkler, H., & Stubbs, S. (2005) Cell Cycle, 4(1), 191–195.
- Easwaran, H.P., Leonhardt, H., & Cardoso, M.C. (2005) Cell Cycle, 4(3), 453–455.
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., & Miyawaki, A. (2008) *Cell*, **132**, 487–498.
- Sakaue-Sawano, A., Ohtawa, K., Hama, H., Kawano, M., Ogawa, M., & Miyawaki, A. (2008) *Chem. Biol.*, 15, 1243– 1248.
- Hahn, A.T., Jones, J.T., & Meyer, T. (2009) Cell Cycle, 8 (7), 1044–1052.
- Nurse, P., Masui, Y., & Hartwell, L. (1998) Nat. Med., 4, 1103–1106.
- 10) Ang, X.L. & Harper, J.W. (2004) Science's STKE., 242, pe31.
- Nakayama, K.I. & Nakayama, K. (2006) Nat. Rev. Cancer, 6, 369–381.
- Miyoshi, H., Blömer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., & Verma, I.M. (1998) J. Virol., 72, 8150–8157.
- Sakaue-Sawano, A. & Atsushi, M. (2011) Imaging in Developmental Biology. pp. 331–340, CSH Press.
- 14) Sakaue-Sawano, A., Kobayashi, T., Ohtawa, K., & Miyawaki,
 A. (2011) *BMC Cell Biol.*, 13, 12:2.
- 15) Sugiyama, M., Sakaue-Sawano, A., Iimura, T., Fukami, K., Kitaguchi, T., Kawakami, K., Okamoto, H., Higashijima, S., & Miyawaki, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 106(49), 20812–20817.
- 16) Ogura, Y., Sakaue-Sawano, A., Nakagawa, M., Satoh, N., Miyawaki, A., & Sasakura, Y. (2011) *Development*, 138(3), 577– 587.