

2008年2月8日

独立行政法人 理化学研究所  
独立行政法人科学技術振興機構

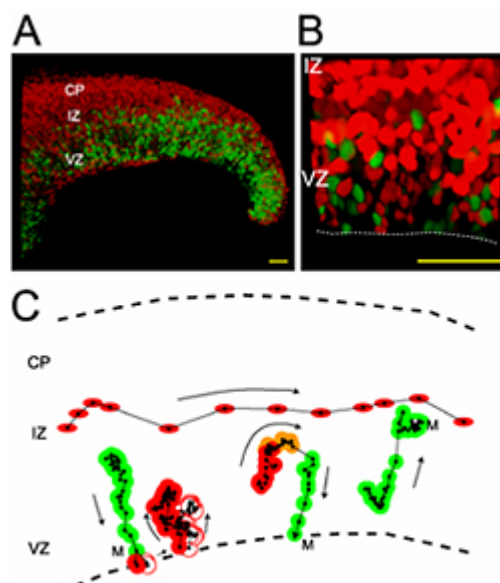
## DNA複製や細胞分裂の様子をリアルタイムで観察する新技術

- 生物発生のメカニズム解明やがんの診療・治療薬開発に新たな道 -

細胞は、細胞分裂を繰り返して増殖します。発生や再生の過程では、分裂と分化との制御が見事に絡み合って組織、器官、個体を形作り、機能を獲得していきます。生命を維持するために、この細胞分裂は繰り返されていきます。この整然とした細胞分裂は、世代を越えて、ひたすら普遍的に継続されてきた生命現象の源とも言えます。

細胞分裂の周期は、細胞周期と呼ばれます。例えば細胞周期の制御に異常をきたし、無制限に分裂を繰り返すような状態が「がん」です。これまで、発生・再生時の細胞活動の様子や、がんの浸潤・転移など、さまざまな生命現象の根本である細胞周期の実態を生きたままりアルタイムで観察する方法がありませんでした。

理研脳科学総合研究センター細胞機能探索技術開発チームは、科学技術振興機構、東京都臨床医学総合研究所、癌研究会癌研究所らと共同で、生物個体内で進行する細胞周期をリアルタイムで可視化する蛍光イメージング技術の開発に世界で初めて成功しました。赤と緑の2色の蛍光タンパク質を、細胞周期の特定の時期に存在する2種類のタンパク質に結合させ、細胞周期の進行における休止期（G1期）と、DNA複製の時期とを、区別して蛍光させる（ラベルする）ことを実現しました。この技術を利用し、マウスに移植したがんの浸潤・転移や神経細胞の分化、移動の様子を観察することにも成功し、生物発生の形態形成、がん化などのメカニズムに関して新たな知見がもたらされることが期待されます。



Fucci-トランスジェニックマウスの  
脳原基におけるタイムラプスイメージング

2008年2月8日

独立行政法人 理化学研究所  
独立行政法人科学技術振興機構

## DNA 複製や細胞分裂の様子をリアルタイムで観察する新技術

- 生物発生のメカニズム解明やがんの診療・治療薬開発に新たな道 -

### ◇ポイント◇

- ・蛍光タンパク質を用いて、細胞周期をリアルタイムで可視化するイメージング技術
- ・がん細胞の浸潤や転移、神経細胞の分化、移動などの時空間パターンの観察に成功
- ・胚性幹細胞、人工多能性幹細胞などを用いる再生医療に寄与する可能性

独立行政法人理化学研究所（野依良治 理事長）及び独立行政法人科学技術振興機構（JST）（北澤宏一 理事長）は、東京都臨床医学総合研究所（田中啓二 所長代行）と共同で、生物個体内で進行する細胞周期をリアルタイムに可視化する蛍光イメージング技術の開発に成功しました。本技術を用いることにより、細胞周期の進行に伴って起こるDNA複製と分裂という基本的な生命現象のタイミングを蛍光色の変化で捉えることができます。理研脳科学総合研究センター（甘利俊一センター長）細胞機能探索技術開発チームの宮脇敦史チームリーダー及びJST戦略的創造研究推進事業ERATO宮脇生命時空間情報プロジェクト（研究総括 宮脇敦史）の阪上（沢野）朝子研究員らと、東京都臨床医学総合研究所ゲノム動態プロジェクト、癌研究会癌研究所生化学部、理研脳科学総合研究センター細胞培養技術開発チームとの共同研究による成果です。

細胞は、分裂を繰り返して増殖します。この細胞分裂の周期を細胞周期と呼びます。一周期が進む過程で細胞のDNAは複製され、それを二分するように細胞分裂が起こります。例えば生物の発生や再生においては、増殖と分化とが見事に絡み合っており、組織、器官、そして個体が形成されていきます。そうした制御が破綻して細胞の増殖が盛んになると、がん（癌）になります。細胞周期に基づく細胞増殖の状況を個体のレベルで調べることが重要であることはわかっていましたが、細胞周期の進行を逐次、観察（モニター）することを可能にするイメージング技術はありませんでした。

今回の新しい技術は、細胞周期の特定の時期に存在する2種類のタンパク質を選び、それぞれ色が異なる蛍光タンパク質で標識（ラベル）したプローブを作製することで実現しました。このプローブを導入すると、分裂後からDNA複製前の時期にある細胞の核は赤色の蛍光を、DNA複製から分裂前の時期にある細胞の核は緑色の蛍光を発するようになります。この技術を利用して、マウスに移植したがん細胞の浸潤・転移や、マウスの胚で起こる神経細胞の分化、移動などにおける細胞周期進行の時空間パターンを観察することに成功しました。

この技術を活用することにより、生物発生の形態形成、創傷治癒、がん化などのメカニズムに関して新たな知見がもたらされることが期待されます。また、がんの治療評価や診断法開発、さらには移植後の胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）の増殖をモニタリングする技術の開発に役立つことが予想されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『Cell』（2月8日号）に掲載されます。

## 1. 背景

細胞の分裂（増殖）は、細胞周期と呼ばれるサイクルにしたがって進行します（図 1）。細胞周期は、分裂が起こるM（Mitosis）期と、DNAの複製が起こるS（Synthesis）期、それぞれの間をつなぐG1（Gap1）期、G2（Gap2）期からなります。周期は、G1→S→G2→M→G1→・・・の順に進み、G1期とG2期には、それぞれS期とM期に入るための準備と点検が行われます。近年、生命の根幹をなす細胞周期の進行の自律的メカニズムが、分子レベルでどんどん解明されてきました。また、組織、器官、個体において、細胞はさまざまな外的要因の影響を受けて細胞周期の進行を調節していることが明らかになっています。一方、発生や再生における形態形成、がん（癌）の浸潤や転移など、さまざまな現象の中で細胞周期の進行がどのような時空間パターンを示すのかについてはほとんどわかっていません。従来の研究では、細胞が増殖モードに入ったことを調べるために、プロモデオキシウリジン<sup>\*1</sup>という物質を取り込ませてDNAの複製を検出する方法が行われてきました。しかし、この方法では、抗体染色のために細胞を固定する必要があり、生きた状態での観察が行えません。細胞周期の進行をリアルタイムに可視化する技術の開発が切望されていました。

## 2. 研究手法と成果

細胞は、多くのタンパク質分子が参加するネットワーク制御のもと、細胞周期を規則正しく進行させています。研究グループは、細胞周期の特定の時期にのみ存在するCdt1<sup>\*2</sup>とGeminin<sup>\*3</sup>という2つのタンパク質に着目しました。細胞周期の中で両タンパク質の量は、ダイナミックにかつ正確に調節されています。Cdt1は、分裂を終えた細胞がDNA複製の準備をするG1期にもっとも増加し、S/G2/M期には存在しません。逆にGemininは、DNA複製から細胞分裂に至るS/G2/M期に増加し、G1期には存在しません。このような細胞周期に則した特定のタンパク質の量の調節は、ユビキチン-プロテアソーム系<sup>\*4</sup>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ます。細胞周期の特定の時期に機能すべきタンパク質は、常に合成されながら、機能すべきでない時期になるとすみやかに分解されます。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2種類の蛍光タンパク質を結合させG1期及びS/G2/M期に蛍光を発するようなプローブを作製し、Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator : 「フーチ」と発音) と命名しました（図 2）。

### (1) Fucci の開発戦略

Fucciの開発に当たり、Cdt1には赤色の蛍光を発するmKO2<sup>\*5</sup>という蛍光タンパク質を、またGemininには緑色の蛍光を発するmAG<sup>\*6</sup>という蛍光タンパク質をそれぞれ結合させました。具体的には、Cdt1（全長 546 アミノ酸）の、機能領域を除く調節領域をコードする遺伝子に、mKO2をコードする遺伝子を組み込みました。同様に、Geminin（全長 209 アミノ酸）の、機能領域を除く調節領域をコードする遺伝子に、mAGをコードする遺伝子を組み込みました。そもそも、プローブには細胞が持つ本来の機能を阻害しないように働くことが求められます。プローブが分子スパイと呼ばれる所以です。研究グループは、何種類ものプローブを作製し、それらの性能および細胞が受ける影響を詳細に検討しました。長時間の観察には、インキュベーター顕微鏡<sup>\*7</sup>を用いました。

その結果、Cdt1に関しては、アミノ酸番号で30番から120番までの領域にmKO2を繋いだもの(mKO2-hCdt1(30/120))が、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を繋いだもの(mAG-hGem(1/110))が、プローブとして最も適していることを見いだしました(図2)。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と同じパターンで出現、消失することになります。

この様な作業を経て作製したFucciを、増殖を繰り返すHeLa細胞に恒常的に発現させ、タイムラプスイメージング<sup>\*8</sup>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→緑→赤→と交互に変化することが確認できました(図3)。すなわち、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標識することができたのです。

## (2) Fucci を用いた実験例

研究グループは、Fucci をマウス個体に応用する実験(以下2例)を行い、この蛍光プローブの威力を示しました。

① Fucciを恒常的に発現する腫瘍細胞の塊をヌードマウスの乳腺(皮下)組織に移植し、経時的に観察する実験を行いました。良性の腫瘍細胞を用いたところ、移植細胞は組織の中で増殖を止め、それらの移植した腫瘍塊は、赤色を呈していました(図4A-C)。これはG1期、つまり休止状態に落ち着いたことを示します。一方、悪性の腫瘍細胞を用いたところ、移植細胞は組織の中で増殖を続け、その移植した腫瘍塊は、G1期の赤色の蛍光とS/G2/M期の緑色の蛍光とが混在する色(黄色)になりました(図4D-F)。そうして、移植細胞が血管新生を誘導し、血行性<sup>\*9</sup>に伝播する様子を観察することができました(図4G、H)。浸潤・転移を観察する手法として同様の悪性腫瘍細胞を皮膚静脈に注入したところ、血管壁をすり抜けて組織内へ侵入する瞬間や、さらには組織内で増殖する様子を観察することができました(図5)。いずれも、生きた個体の中で腫瘍細胞の細胞周期の進行をモニタすることに成功した世界で初めての成果です。このように、個体レベルで、腫瘍の悪性度の判定や腫瘍の浸潤、転移における増殖形態をリアルタイムで観察することが可能になりました。

② Fucciを恒常的に発現するトランスジェニックマウスを作製しました。マウス頭部を観察すると、すべての細胞の核が、緑色または赤色の蛍光を発しています。胎仔(13日目)の頭部切片像を観察しました(図6)。増殖の盛んな部分、例えば脳原基の脳室側、つまり神経前駆細胞<sup>\*10</sup>の細胞体がひしめく部分では、細胞周期が盛んに繰り返されるため、緑色と赤色のシグナルが混在しています。一方、増殖が終了した部分、例えば脳原基の脳膜側、つまり分化・成熟した神経細胞が蓄積する部分では、赤色のシグナルが支配的になっています。さらに、こうした神経系発達に伴う細胞周期の進行をリアルタイムに観察することに成功しました。脳原基をスライス状に切り出して培養し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いてタイムラプスイメージングを行ったところ、脳室面で分裂した神経前駆細胞が脳室から遠ざかりながらG1期

からS期に進むこと、その後また脳室に近づきながらS/G2期を経てM期に入ることが、実際の動画の中で確かめられました（図7）。

### 3. 今後の期待

Fucci 技術は、以下のような分野で使われることが予想されます。学術分野および産業分野の両方で普及させることを狙い、材料となる蛍光タンパク質は純国産のものを使っています。

- ① 細胞の増殖と分化との間にある協調的制御に関して、明快な理解を得ることができます。今回、開発した Fucci は、哺乳類動物の細胞に適用されるバージョンですが、他の動物種や植物に適用可能なバージョンの作製も進行中です。さまざまな生物種でトランスジェニック個体が作製されることにより、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得られることが期待されます。
- 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ります。がんや再生は、細胞増殖に関わる現象です。がん細胞や移植細胞の増殖を細胞の浸潤・転移や分化などと関連させて評価する系が構築できます。
- ③ 創薬分野で、細胞増殖に関わる薬のスクリーニング用に活躍する技術となります。例えば、細胞分裂だけでなく DNA 複製をモニタすることで、より副作用の少ない抗がん剤の開発が期待できます。

（問い合わせ先）

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム

チームリーダー 宮脇 敦史（みやわき あつし）

Fax : 048-467-5924

脳科学研究推進部 嶋田 庸嗣（しまだ ようじ）

Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造事業本部

研究プロジェクト推進部 小林 正（こばやし ただし）

Tel : 03-3512-3528 / Fax : 03-3222-2068

（報道担当）

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

## <補足説明>

### ※1 ブロモデオキシウリジン

ブロモデオキシウリジン (BrdU) は、チミジン誘導物質であり、DNA 複製期の細胞核にチミジンの代わりに取り込まれる。細胞や組織を固定後、抗 BrdU 抗体を用いて DNA 複製、すなわち S 期に突入した細胞を検出する。

### ※2 Cdt1

Cdc10 dependent transcript 1 の略。DNA 複製のライセンス化制御因子。真核細胞のゲノムは複数の染色体から構成されており、複数の複製開始点が存在している。それら複数の開始点すべてから、1 回の細胞周期で 1 回のみ複製が起こるように厳密に制御しているシステムが“ライセンス化”である。Cdt1 は、G1 期において複製開始点に局在しており、複製のライセンス化に非常に重要な役割を担っている。G1 期に発現量が高く、それ以外の時期にはユビキチン-プロテアソーム系により分解されている。

### ※3 Geminin

DNA 複製のライセンス化阻害因子。S 期に突入し、一度複製が開始されたゲノムの複製開始地点に再びライセンス化因子が結合しないように機能することで、正常な DNA 複製の監視役をしている。S 期に発現量が増加し、複製と同時に Cdt1 と結合して、複製開始地点から Cdt1 を引きはがすことで機能阻害をされると考えられている。M 期から G1 期にかけては、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されるため、Cdt1 によるライセンス化が可能になる。

### ※4 ユビキチン-プロテアソーム系

ユビキチンは、タンパク質を分解に導く目印として作用し、プロテアソームはユビキチンで修飾されたタンパク質を選択的に破壊する細胞内装置である。タンパク質のユビキチン化には、各々のタンパク質を特異的に認識するユビキチン化酵素が働いており、細胞周期特異的に機能するものも多い。今回の研究では、G1 期に特異的に働くユビキチン化酵素である APC/C<sup>cdh1</sup>により Geminin の分解を導き、逆に S/G2/M 期に特異的に働くユビキチン化酵素である SCF<sup>skp2</sup>により Cdt1 の分解を促している。

### ※5 mKO2

monomeric Kusabira-Orange 2 の略。イシサンゴに属するヒラタクサビライシ (*Fungia concinna*) よりクローニングされた新規蛍光タンパク質。2004 年、理研脳科学総合研究センターの細胞機能探索技術開発チーム (宮脇敦史チームリーダー) およびアマルガム社により単離された。オレンジ色の蛍光を発し、pH 安定性を示す。励起極大が 551nm、蛍光極大が 565nm。

## ※6 mAG

monomeric Azami-Green の略。イシサンゴに属するアザミサンゴ (Galaxeidae coral) よりクローニングされた、緑色の蛍光を発する蛍光タンパク質。2003年、理研脳科学総合研究センターの細胞機能探索技術開発チーム (宮脇敦史チームリーダー) およびアマルガム社により単離された。励起極大が 492nm、蛍光極大が 505nm。共焦点レーザー顕微鏡に装着されている 473nm の固体レーザーにより効率よく励起され、個体の長時間イメージング観察が可能である。

## ※7 インキュベーター顕微鏡

培養細胞にとって一番環境の良いCO<sub>2</sub>インキュベーターの中で、数週間に渡る細胞の経過観察を可能にした蛍光顕微鏡。生命科学の解明、創薬研究、再生医療などの研究に用いられる。インキュベーションイメージングシステムとしてオリンパス社において製品化されており、理研脳科学総合研究センターに 2007年6月開設された「理研・BSIオリンパス連携センター」の主要機器に位置付けられている。

## ※8 タイムラプスイメージング

経時的画像記録のこと。細胞や組織を顕微鏡下において経時的に観察する。端末から顕微鏡と CCD カメラを制御することにより、経時的に画像を取得・保存していく。それらの画像を繋ぎ合わせて動画を作成すると、生きた細胞や組織の動態を“観る”ことができる。

## ※9 血行性

腫瘍塊 (がん) などが血管 (主に静脈) に入り、血液によって運ばれること。リンパ管を通じて運ばれることを、リンパ行性という。

## ※10 神経前駆細胞

神経細胞への分化能を保持した細胞。発生初期の脳原基においては多く存在しており、細胞周期も回っている。その細胞周期の“場”と“タイミング”により運命が決定されていく様が、最近のいくつかの研究により明らかになってきている。マウスの場合、胎生 13 日 (図 6、図 7) では、多くの神経前駆細胞が緑色の蛍光を発しており、細胞周期が進行しているのに対して、胎生 19 日になるとほとんどの細胞は、赤色で停止している (神経終末分化、G1/G0 休止状態。データは示していない)。

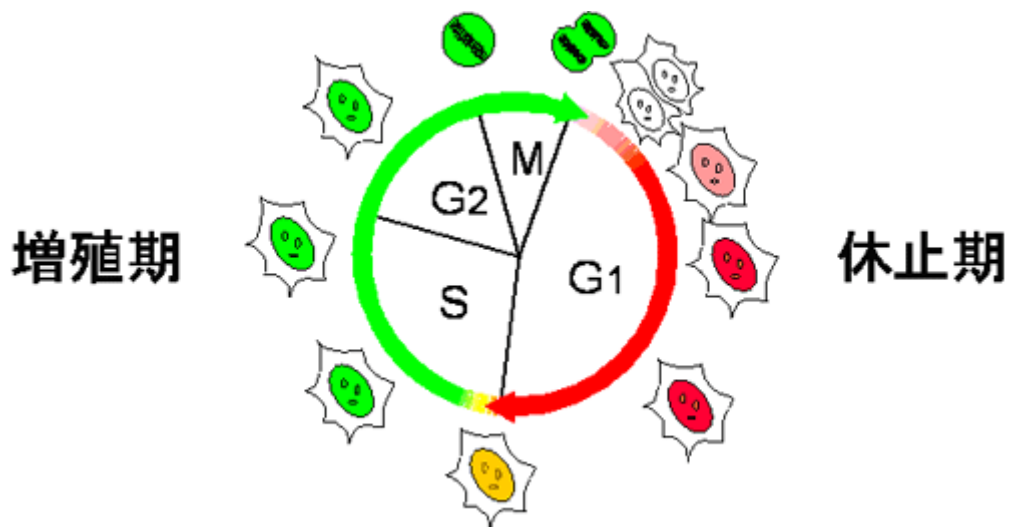


図1 細胞周期サイクル

細胞周期は分裂期 (M)、複製前休止期 (G1)、DNA 複製期 (S)、分裂前準備期 (G2) より構成されている。分裂期により 2 つになった娘細胞が、休止期 (G1) を経て、DNA 複製を行い (S 期)、遺伝情報を倍加させて再び分裂期に突入して 2 つの細胞になる。ここでは休止期 (G1) に対応したフェーズとして、S/G2/M 期を増殖期と称する。



A

localization	G1 specificity	normal cell division	
N	○	X	
N	○	X	
N	○	X	
no expression			
N+C	X		
N+C	X		
N	○	○	→ mKO2-hCdt1(30/120)
N	X		
N	X		
N	X		



B

localization	S/G2M specificity	normal cell division	
N+C	○	X	
N	○	○	
N+C	○	○	
N+C	—	X	
N	○	△	
N+C	X	X	
N	○	○	→ mAG-hGem(1/110)



図 2 Fucci (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) の開発と性能評価

A : G1 特異的なプローブ作製のためのコンストラクト(構築物)。図中の数字は Cdt1 のアミノ酸番号を示す。性能評価の結果を左側に示す。mKO2-hCdt1 (30/120) を G1 特異的プローブとして選別した。

B : S/G2/M 特異的なプローブ作製のためのコンストラクト。図中の数字は Geminin のアミノ酸番号を示す。性能評価の結果を左側に示す。mAG-hGem (1/110) を S/G2/M 期特異的プローブとして選別した。

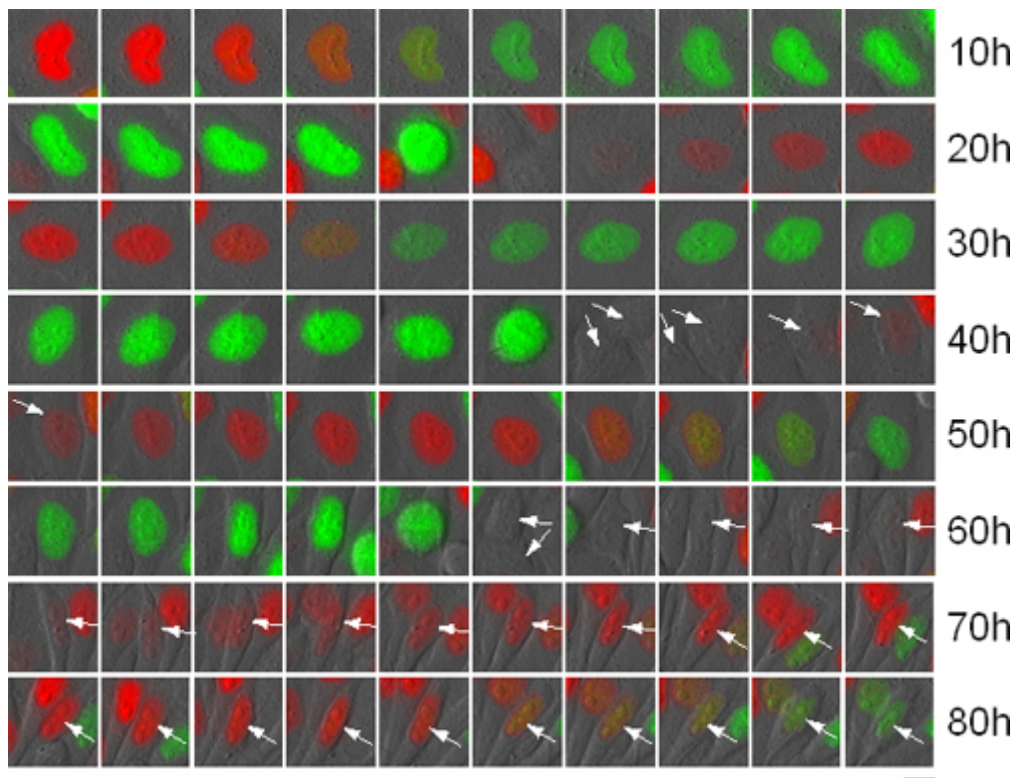


図3 Fucci の細胞周期依存性の評価

Fucci を恒常的に発現する HeLa 細胞のライブイメージングからのデータ。インキュベーター顕微鏡 (LCV100 顕微鏡/オリンパス社製) により細胞を連続 80 時間以上タイムラプスイメージングし、細胞周期の進行に合わせて Fucci の蛍光が赤→緑→赤→緑→と変化することを確認した。

Fucci-  
良性腫瘍細胞

Fucci-  
悪性腫瘍細胞

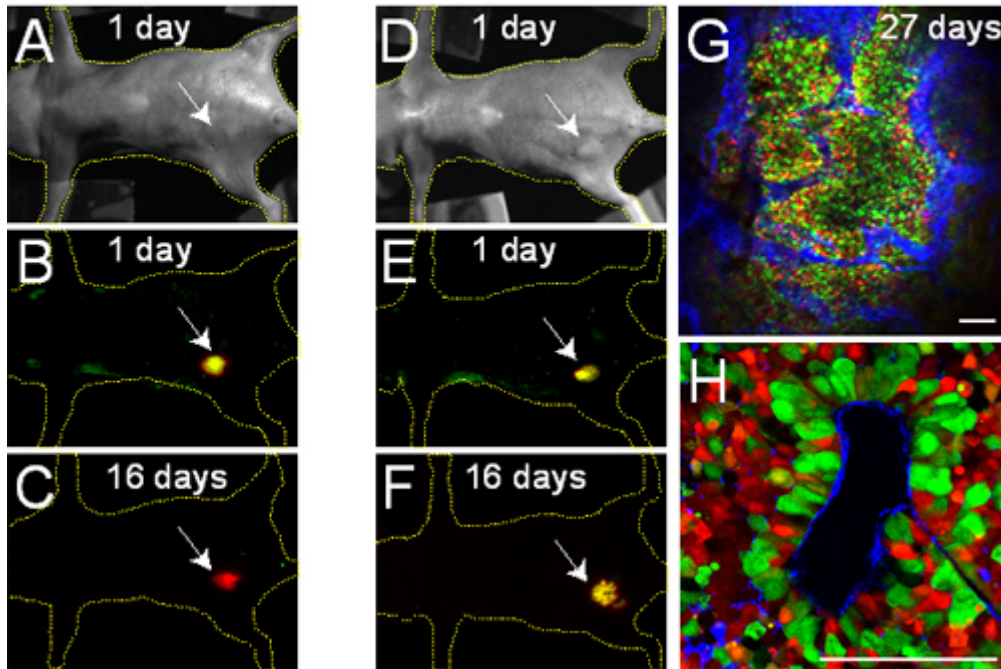


図4 Fucci 発現細胞のヌードマウス移植実験

A-C : Fucci を恒常的に発現する良性腫瘍細胞 (NMuMG 細胞) をヌードマウスの乳腺皮下に移植し (A)、Fucci の蛍光を 1 日後 (B) 16 日後 (C) に麻酔下で観察したもの。

D-H : Fucci を恒常的に発現する悪性腫瘍細胞 (HeLa 細胞) をヌードマウスの乳腺皮下に移植し (D)、Fucci の蛍光を 1 日後 (E)、16 日後 (F) に麻酔下で観察したもの。G は、27 日後に血管を可視化する Angiosense-IVM750 を用いて、血管と増殖腫瘍細胞を同時に観察した。H は、G の腫瘍を切片にし、抗 CD31 抗体で血管壁を免疫染色し、周囲の増殖腫瘍細胞と同時に観察した。

\*ヌードマウス : 先天的に無毛で胸腺が欠損しているマウス。ヌードマウスは胸腺が欠如しているため、細胞性免疫が機能しない。そのため拒絶反応が起こらないので移植実験に多用されている。

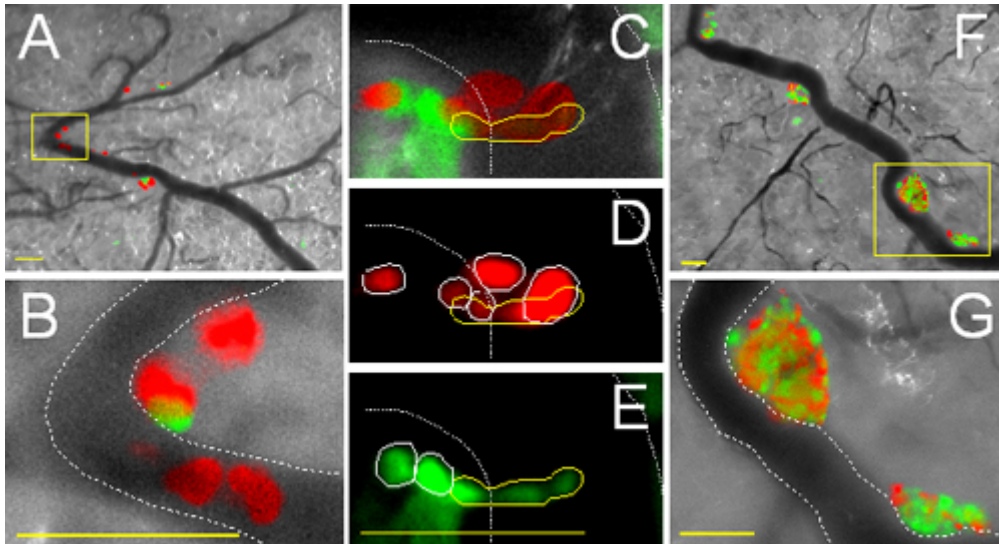


図5 Fucci 発現細胞のヌードマウス浸潤・転移実験

Fucci を恒常的に発現する悪性腫瘍細胞（HeLa 細胞）をヌードマウス血管内腔に移植した 4 日後のイメージング画像。

A-B : 血管内壁に留まり浸潤・転移の段階に入った細胞。ほとんどの細胞が赤色（G1 期）であった。

C-E : まさに浸潤・転移をしている瞬間の細胞。血管壁の隙間を通り抜けるために、核は非常に細長く、断片化したような形になっている。

F-G : 転移先での増殖像。増殖は非常に盛んで、緑色が優勢に観察できた。

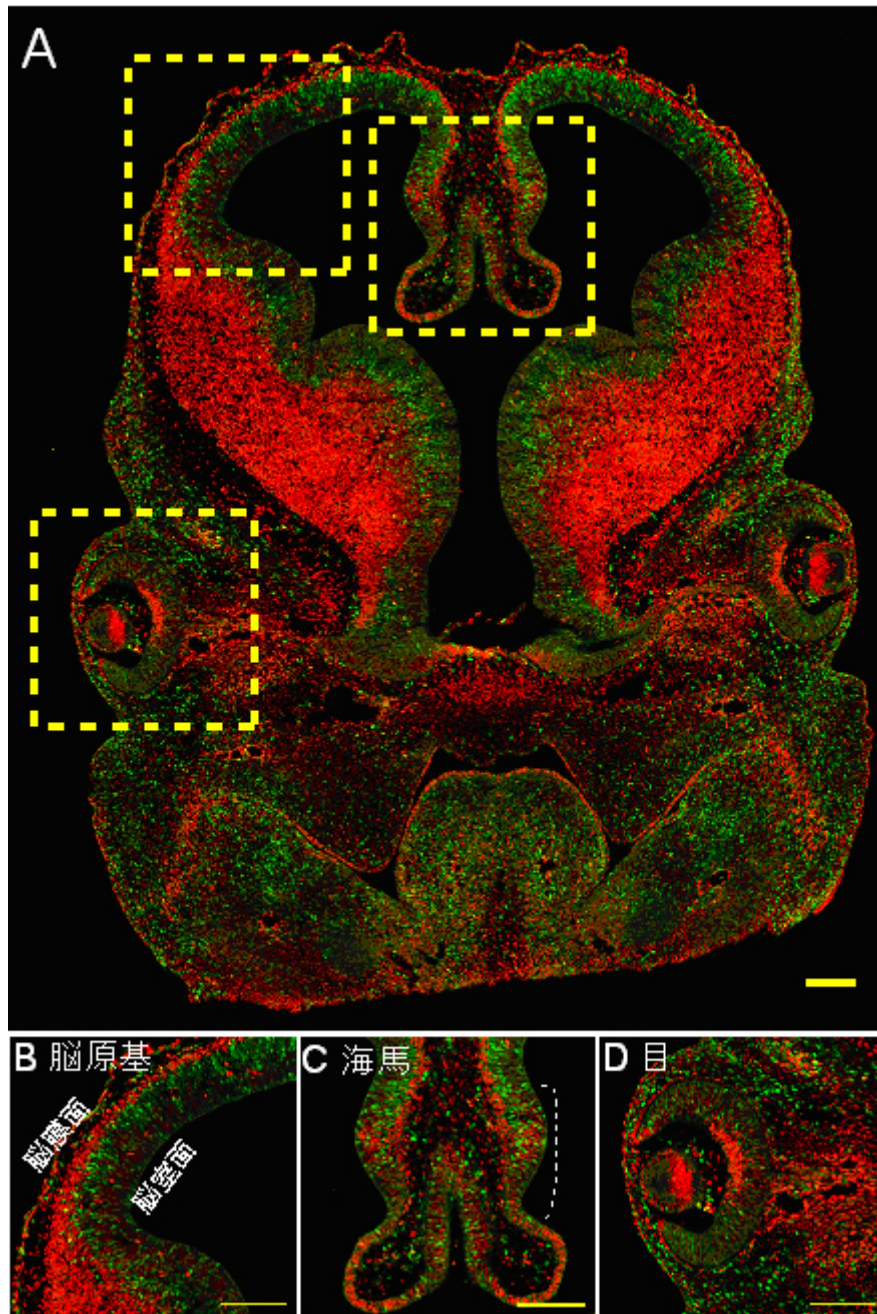


図6 Fucci-トランスジェニックマウス

胎生13日目の頭部切片の画像。共焦点蛍光顕微鏡によりタイリング画像を取得し、画像解析を行なった。

\*タイリング画像：顕微鏡で取得できる画像の範囲には限りがあり、頭部全体の画像を取得するためには、50から100枚の画像を連続で取得し、画像解析ソフトでタイルを貼り合わせるように組み合わせ、1枚の画像に仕立てる。

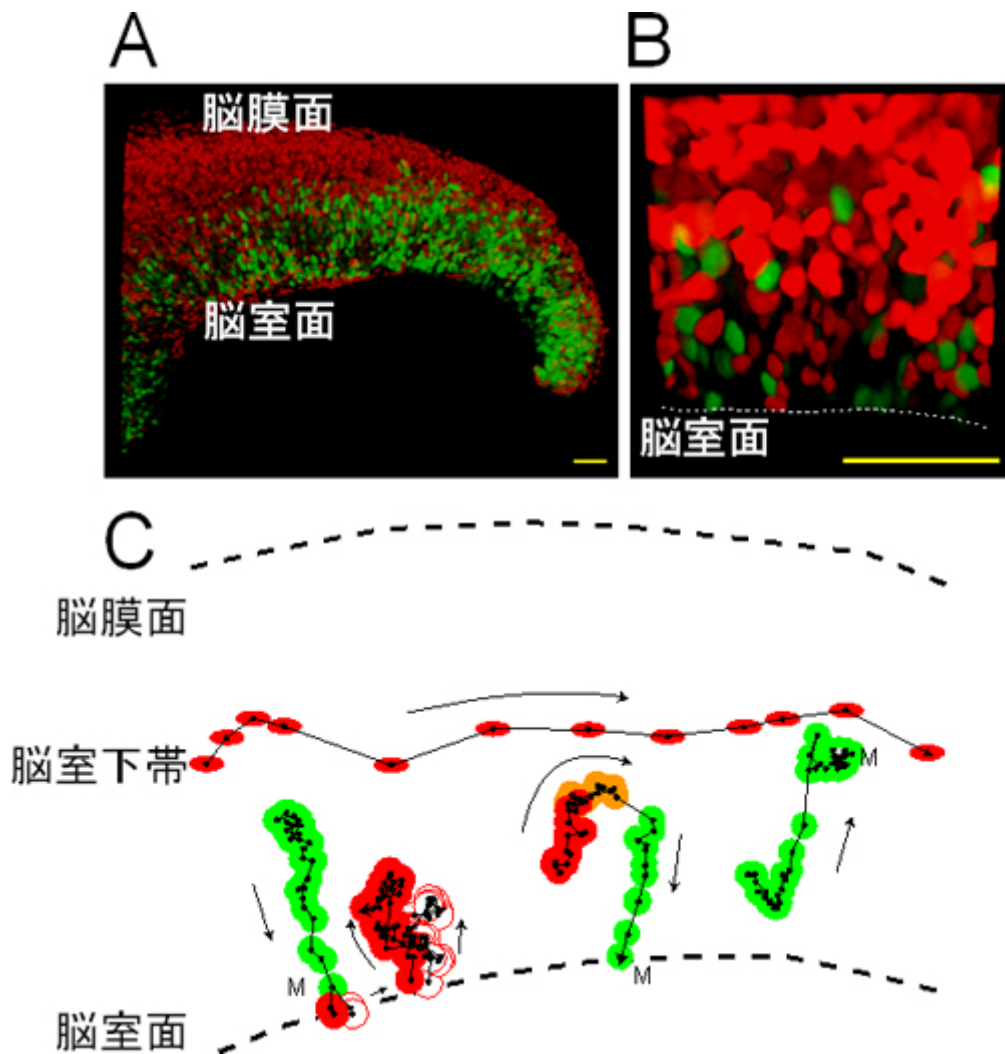


図7 Fucci-トランスジェニックマウスの脳原基におけるタイムラプスイメージング

Fucci-トランスジェニックマウスから脳原基をスライスカルチャーし (A,B)、共焦点レーザー走査微鏡 (FV1000 /オリンパス社製) により多点、XYZT タイムラプスイメージングを行った。いくつかの細胞の動きをトレースし、細胞周期の情報とともにCに示した。