

細胞周期とチェックポイント

目次

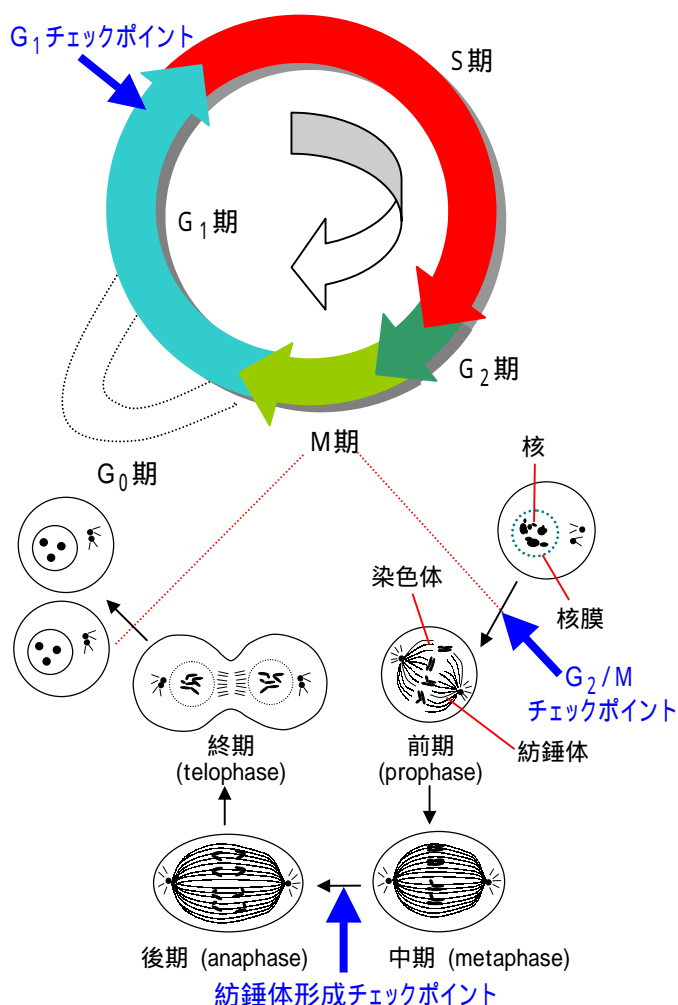
細胞周期研究の流れ

サイクリン-CDK 複合体群とその阻害剤

細胞周期の制御(チェックポイント)

真核生物の DNA 複製開始制御機構

チェックポイントの監視



我々の体の中の細胞の大部分は、組織の損傷などで細胞の再生が必要な場合を除いて、細胞分裂をしていない。しかしながら、ある限られた細胞は一定の頻度で増殖する。このような細胞を“細胞周期にある”という。

細胞周期には4つの決まった順番の期が存在する。これらをG₁期、S期、G₂期、M期と呼ぶ。

細胞周期の進行は3つのチェックポイント(check points)で監視されている。

G₁チェックポイント:

栄養や増殖因子が存在するか?

DNAの修復は完了したか?

G₂/Mチェックポイント:

染色体DNAが分配が可能か?

DNA複製は完了したか?

DNA損傷の修復は完了したか?

分裂中期または紡錘体形成チェックポイント:

紡錘体の形成は完了したか?

これらのチェックポイントでは2種のタンパク質 [タンパク質リン酸化酵素(サイクリン依存性キナーゼ, CDK)とサイクリン]から成る複合体が中心的役割を果たす。

CDK(cyclin-dependent kinase): 34 kDa, Ser/Thr キナーゼ [触媒サブユニットに相当]。数種ある。

サイクリン(Cyclin): 50~60 kDaのタンパク質 [調節サブユニットに相当]。多くの分子種が知られている。

細胞周期研究の流れ

- 細胞周期の異なる期にある細胞の融合実験(Rao & Johnson, 1970年)
 - M期が最も優位であった **M期誘導因子**の存在を示唆。
 - 次にS期が優位。S期が終了しないとG₂/M期に入らず **S期終了のモニター機構**の存在を示唆。
 - M期を経ないと再びS期に入らず **DNA再複製の禁止現象**。
- 卵成熟促進因子(maturation-promoting factor: MPF)の発見(増井や金谷, 1970年代)

MPFはカエルやヒトの卵成熟を誘導する因子として見出されたが、真核細胞のM期に普遍的に存在することがわかった **M期促進因子(M-phase promoting factor)**と再命名された。
- 酵母の細胞周期制御に関する遺伝学の研究(Hartwellら, 1970年代)

cdc 変異株*の研究から、出芽酵母の *CDC28* 遺伝子、分裂酵母の *cdc2* 遺伝子が同定された。
cdc2 のヒトホモログの単離・同定(Nurseら, 1987年) **Cdc2 (CDK1)は全真核細胞に共通の酵素!**

*cell division cycle の略。
- サイクリンの発見(Hunt & Ruderman, 1980年代)

海産無脊椎動物卵の細胞周期の進行に応じて周期的に変動するタンパク質(サイクリン)を発見
 サイクリンA, Bと命名された。これらはM期の終わりに消失する。

1986年にcDNAがクローニングされた。そのmRNAをカエル卵に注入すると卵の成熟が誘起された。

5. MPFの単離(Lohka & Maller, 1988年)

カエル卵の精製MPF: 34kDaと46kDaの複合体で、Ser/Thrキナーゼ活性をもつ。

分裂酵母ではCdc2とCdc13(酵母のサイクリンB)の複合体。MPFの実体はCdc2とサイクリンBの複合体。

サイクリン-CDK複合体群とその阻害剤

Cdc2(CDK1)とサイクリンA, Bが発見されたが、細胞周期はこれらだけで制御されるのか?後に多くのCDKとサイクリンが発見され、細胞周期の各段階は、異なるCDK-サイクリン複合体で制御されていることが明らかとなった。また、細胞周期を制御する第3の分子、CDK阻害因子(CDKインヒビター)が発見され、細胞周期の制御は極めて複雑な機構であることが分かった。さらに、細胞周期では、サイクリンの合成だけでなく、プロテアソームによる分解が重要な役割を果たしている。

1. サイクリンファミリー

M期はCdc2(CDK2)とサイクリンB[Mサイクリン]複合体で制御されることが分かったが、G₁期はどのように制御されているのか? **G₁サイクリン** C, D, E, F, G, H, I, Tの発見へ。

現在、哺乳類では約20種のサイクリンが見つまっている。

A1, A2, B1, B2, C, D1, D2, D3, E1, E2, F, G1, G2, H, I, K, T1, T2a, T2b

サイクリンT-CDK9はRNAポリメラーゼのC端ドメイン(CTD)をホリン酸化し、転写を促進する。

2. CDKファミリー

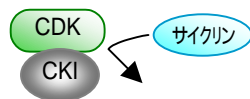
酵母の遺伝子 *cdc2* (CDC28)は1種のみ。高等真核生物ではCdc2と似た遺伝子が9種ある。

3. CDK阻害因子

酵母のtwo-hybrid法を用いた研究から、サイクリン-CDK複合体に結合し、活性を阻害するタンパク質群 **CDK阻害因子** (CDK inhibitor, CKI)が発見された(1990年代半ば)。これらは次の2つのファミリーに分類される。いずれも、G₁チェックポイントに關与する。

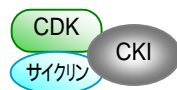
Ink4ファミリー: p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d}

アンキリンリピートが存在。サイクリンD-CDK4, 6を阻害する。サイクリンと拮抗することで、CDKの作用を抑制する。



Cip/Kipファミリー: p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}

CDK結合領域が存在。サイクリンE-CDK2複合体に結合し、CDK活性を阻害する。p21^{Cip1}はPCNA結合領域をもち、また、老化細胞の増殖停止にも關与する。



4. 細胞周期の制御とサイクリン-CDK

G₁期の通過: サイクリンD-CDK4

S期の開始: サイクリンE-CDK2

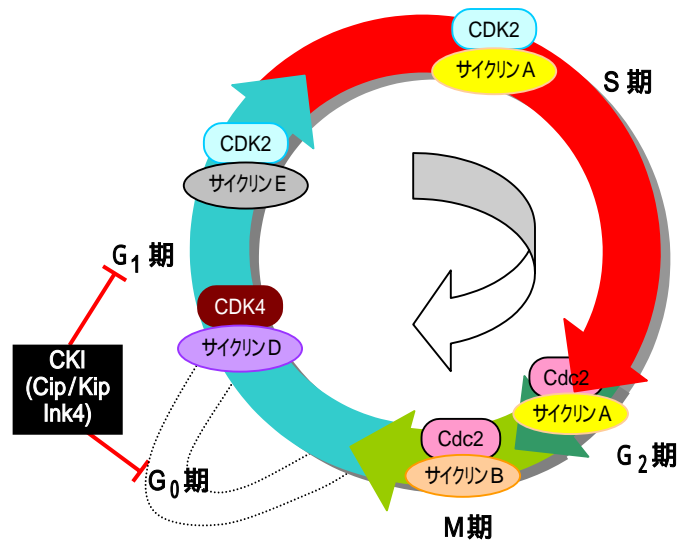
S期の通過: サイクリンA-CDK2

G₂期の通過: サイクリンA-CDK1(Cdc2)

M期の開始: サイクリンB-CDK1(Cdc2)

また、種々のサイクリン-CDKの活性化にサイクリンH-CDK7複合体(CAKなど)が必要。

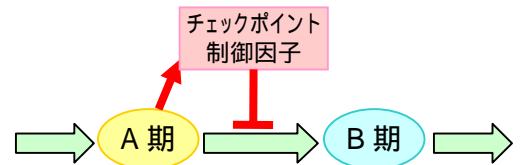
CDKがエンジン、サイクリンはアクセル、CKIはブレーキ。



細胞周期の制御(チェックポイント)

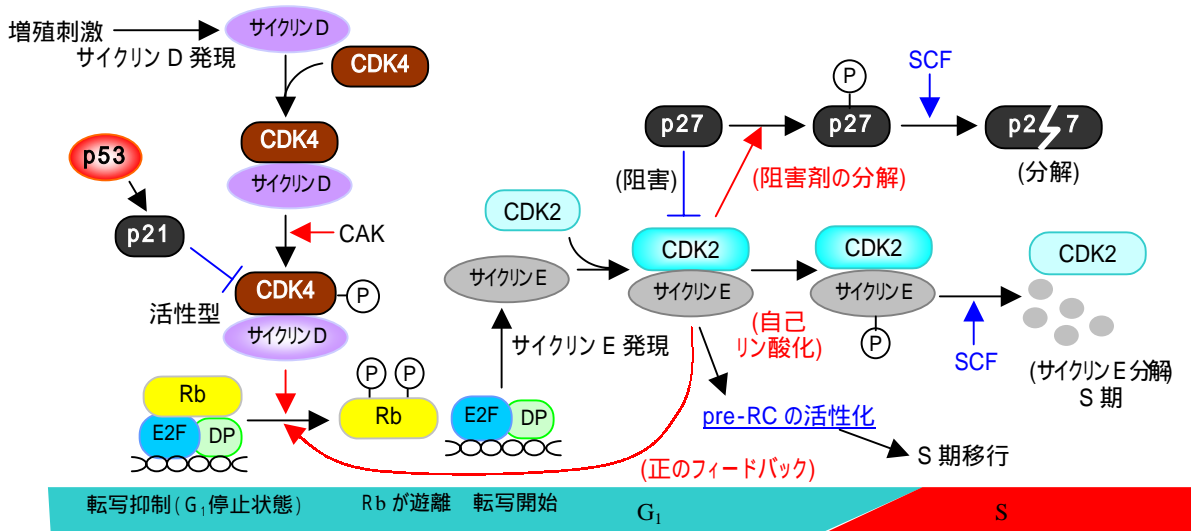
チェックポイントの概念(Hartwell, 1989年):

「細胞周期では、後のイベントの開始は前のイベントの完了を待って実施される。前のイベントが終了するまでは、後のイベントには負のフィードバックがかかる。」



1. G₁ から S 期への移行の制御 (G₁ チェックポイントの分子機構)

G₁ 期の通過と S 期への移行はサイクリン D-CDK4 とサイクリン E-CDK2 複合体が制御している。増殖刺激によりサイクリン D が合成され、CDK4 と結合する。複合体は CAK によりリン酸化され活性化され、次いで Rb タンパク質をリン酸化する。Rb がリン酸化されると結合している転写因子 E2F が離れ、サイクリン E などの S 期進行や DNA 複製に必要な遺伝子群の発現が誘導される。サイクリン E は CDK2 に結合して Rb をさらに活性化して自らの発現を亢進するとともに、p27^{Kip1} (CKI の 1 つ) をリン酸化してその分解を促進する。これらにより、S 期への進行が実現する。幾つかの段階で、CKI は S 期への移行を抑制する。S 期に入るとサイクリン E はユビキチン-プロテアソーム系*で分解される。



*サイクリン-CDK 複合体の活性は、サイクリンや CKI の分解によっても調節される。この分解はプロテアソームによるユビキチン依存性のものである。G₁/S 期サイクリンや p27^{Kip1} の分解に関わる E3 は SCF(Skp1-Cul1-F-box タンパク質から成る複合体)である。F-box タンパク質が標的を認識する。

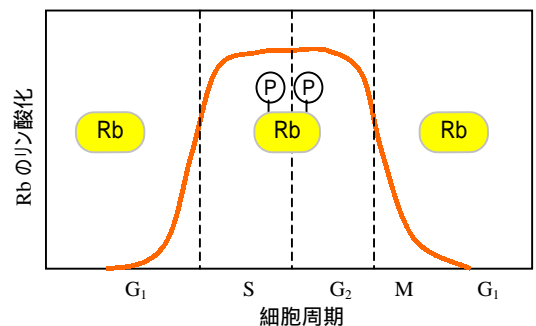
Rb タンパク質とは

網膜芽細胞腫(retinoblastoma)の原因遺伝子 RB 産物である。ヒト Rb は 928 残基から成り (110 kDa)、遺伝子 (200 kb) は 27 エクソンから成る。ガン抑制遺伝子の 1 つである。

細胞周期の G₁ 期にはリン酸化されていないが、S 期になる直前で多数のリン酸化を受ける。細胞内では転写因子 E2F 1~3 を結合し、その働きを抑えている。Rb がリン酸化されると不活性型になり、E2F が遊離する。E2F は S 期の初期遺伝子群を活性化する。

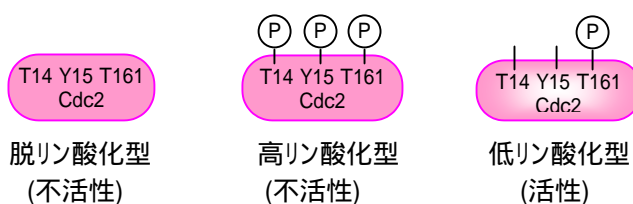
E2F は転写因子

ロイシンジッパー構造をもち、TTTCGCGC に結合する転写因子。DP1/2 とヘテロ二量体を形成して存在する。E2F-1~6 がある。



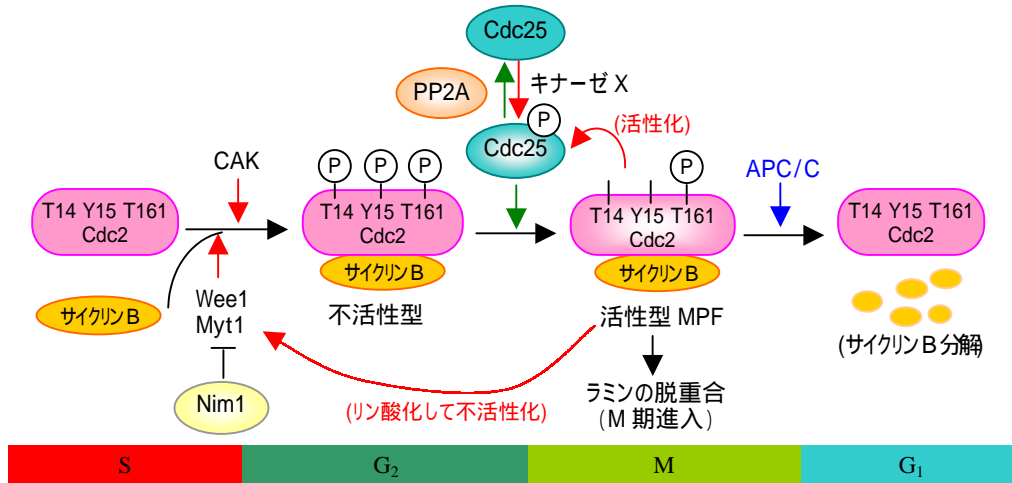
2. M 期への移行の制御 (G₂/M チェックポイントの分子機構)

M 期の開始は上で述べた MPF (Cdc2 とサイクリン B の複合体) によって制御されている。Cdc2(CDK1) のキナーゼ活性は、Thr14, Tyr15, Thr161 のリン酸化の状態によって調節される。すなわち、Thr161 だけがリン酸化されている状態が活性型で、3 つの残基が全てリン酸化または脱リン酸化された状態は不活性である。



サイクリン B が S 期で合成され Cdc2 と複合体 (MPF) を形成する。このとき Cdc2 は脱リン酸化型なので、MPF は不活性である。G₂ 期に入ると、Cdc2 は 3 種のキナーゼでリン酸化される (Myt1 が Thr14 をリン酸化、Wee1 が Tyr15 をリン酸化、CAK が Thr161 をリン酸化する)。この高リン酸化型 Cdc2 も不活性である。サイクリン B-Cdc2 複合体は G₂ 期には主として細胞質に存在し、G₂ 期終了時に核に移行する。

次に、タンパク質チロシンホスファターゼ Cdc25 (ヒトでは 25A, 25B, 25C がある) が Cdc2 の Thr14, Tyr15 を脱リン酸化すると、複合体は活性型 MPF に変換され、これが Cdc25C をさらに活性化する一方で、Myt1 と Wee1 をリン酸化して不活性型に変えて再び不活性化されるのを防ぐ。MPF は核膜の裏打ちタンパク質ラミンをリン酸化して脱重合させ、核膜の崩壊を導く。これにより、細胞周期は M 期へ進行する。Cdc25 の活性はタンパク質ホスファターゼ PP2A によって、調節される。



M 期サイクリンの分解

M 期サイクリンを分解して M 期脱出に関わる E3 は APC/C (anaphase-promoting complex あるいは cyclosome) と呼ばれる。タンパク質 (Ser/Thr) 脱リン酸化酵素 (protein phosphatases, PP)

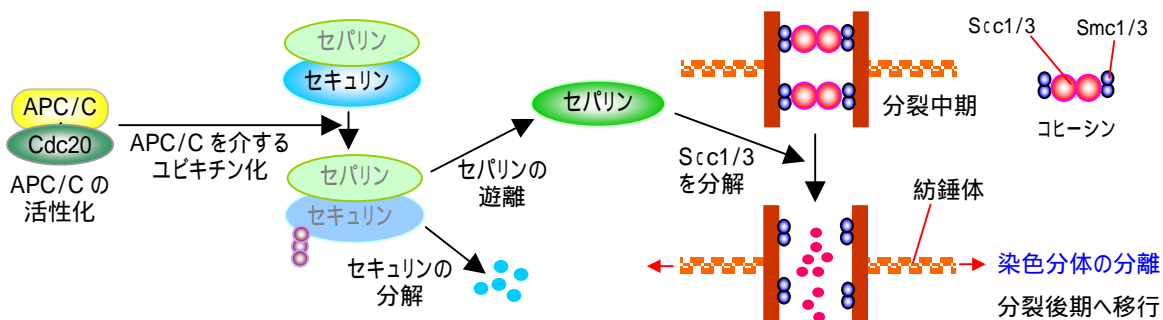
PP1, PP2A, PP2B, PP2C が知られている。PP2A はヘテロ二量体または三量体。α, β の 2 つのイソフォームがある。二量体は触媒サブユニット C と調節サブユニット A から成り、三量体ではこれに B ファミリータンパク質である B (PR55), B' (B56), B'' (PR72) が結合。B ファミリーには α, β, γ の 3 つのイソフォームや多くのスプライス異性体がある。

3. 紡錘体形成チェックポイント

【染色体の分離機構】

細胞分裂中期までは、姉妹染色分体はコヒーシンによって架橋され合着 (cohesion) している。コヒーシン (cohesin) は、染色分体にアンカーする Smc1/Smc3 と、その間を架橋する Scc1/Scc3 から成っている。

一方、セパリン (separin) にはセキュリン (securin) が結合してその機能が抑制されている。染色体の分離は、先ずセキュリンが Cdc20 依存的に APC/C を介してユビキチン化され、プロテアソームで分解されることで開始される。セキュリンの分解で遊離したセパリンが、コヒーシンの成分である Scc1/3 を分解する。この結果、染色体の分離が起こる。



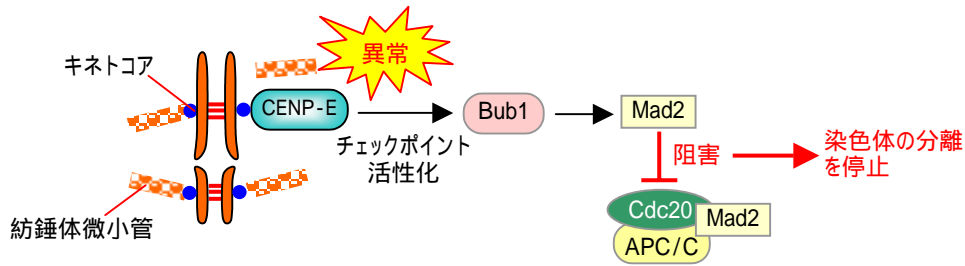
【紡錘体形成チェックポイントの発動】

細胞分裂中期において、姉妹染色分体が紡錘体赤道面に並列していないなどの異常があるとセンサーが認識し、チェックポイント機構が発動される。

異常の例：染色体セントロメア上のキネトコアへの紡錘体微小管の結合不完全。

姉妹染色体の両側にある微小管の間の張力の不均衡。

キネトコアのキネシン様タンパク質 CENP-E がセンサーとして働き、この異常を Bub1 がキネトコア上で Mad2 に伝達。活性化 Mad2 は Cdc20 に結合し、その APC/C 活性化能を抑制。その結果、セキュリンのタンパク質分解が抑制され、染色体の分離が妨げられる。その結果、合着が保たれ、分裂中期がそのまま維持され、染色体の異常な分配を阻止。

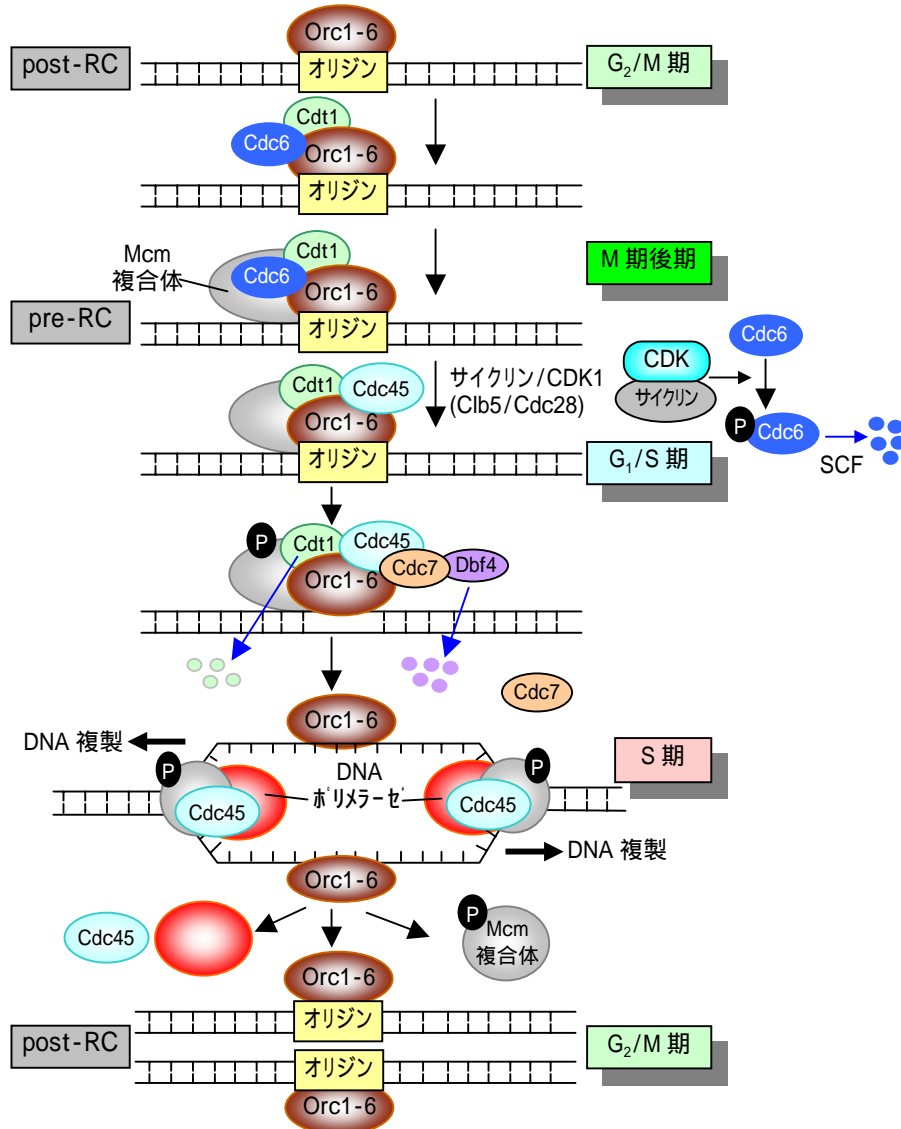


真核生物の DNA 複製開始制御機構

真核生物では数十 kb に 1 ヶ所くらいの割合で存在する数万ヶ所の複製開始点(オリジン)から複製が開始される。複製開始に必要な 6 種のタンパク質(Orc-1 ~ 6)がオリジンに結合している。これを **post-RC** (post-replicative complex という)。

M 期後期に Cdc6 が結合し、さらに、6 種の Mcm (minichromosome maintenance) タンパク質 (Mcm2 ~ 7) から成る Mcm 複合体が Orc-1 ~ 6 に結合する。M 期後期でのこの状態を **pre-RC** という。

G₁ 期に入ると、サイクリン-CDK1 によって Cdc6 がリン酸化され、ユビキチン依存性プロテアソーム系で分解される。これが S 期移行のシグナルとなる。これに Cdc7/Dbf4 キナーゼ複合体が取り込まれ、Mcm 複合体をリン酸化し、Mcm4, 6, 7 のもつヘリカーゼ活性を刺激する。さらに Cdc45 が結合し、これが第 2 のシグナルとなって、DNA ホリメラーゼをリクルートして S 期が開始される。DNA 複製が開始されると、Cdc7/Dbf4 キナーゼ複合体は Dbf4 をリン酸化して、Orc-1 ~ 6 から離れる。複製が終わると Mcm 複合体が DNA から解離し post-RC の状態に戻る。細胞周期で S 期に 1 回だけ DNA 複製が起きるのは、**pre-RC 状態が M 期後期で 1 回だけ起こる**ためである。



出芽酵母の複製開始モデル

Orc1-6: ORC 複合体 (Orc1: Cde18 と相互作用, Orc2: Cdc2 でリン酸化), Cdc6: ATPase/GTPase, Mcm 複合体: Mcm4/6/7 はヘリカーゼ, Cdc7: Ser/Thr キナーゼ (Dbf4 と複合体形成), Dbf4: Cdc7 と結合, Cdc45: DNA ホリメラーゼの DNA への結合を仲介。

チェックポイントの監視

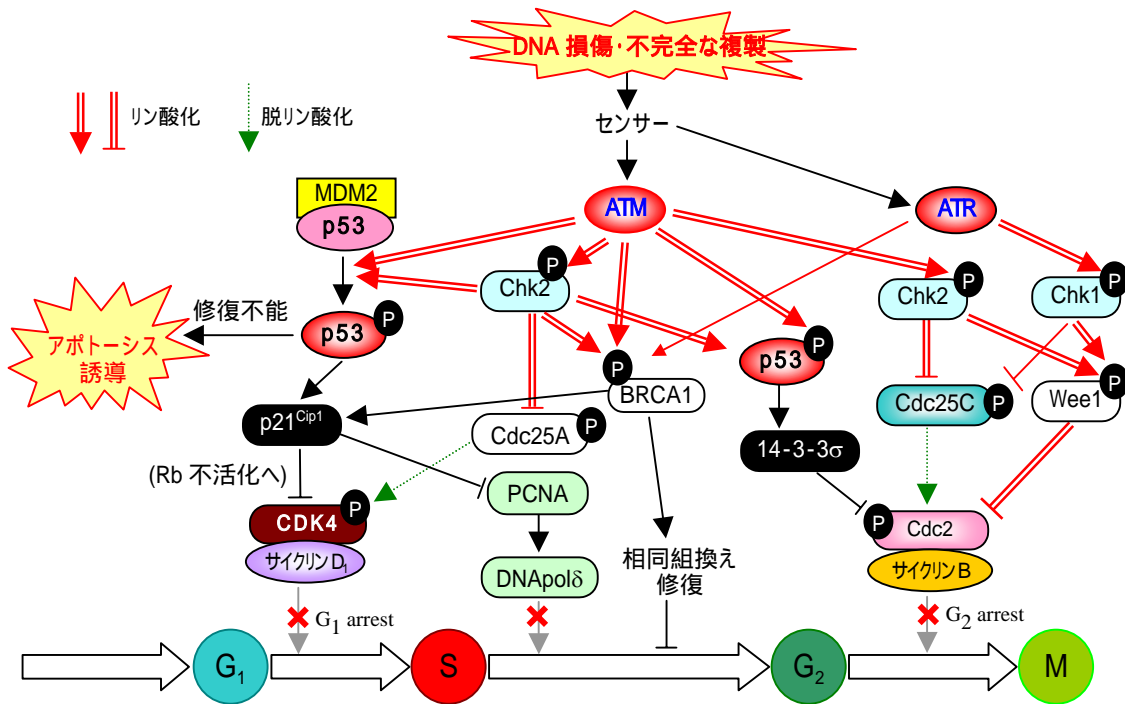
1. DNA 損傷・複製阻害チェックポイント

紫外線・線照射などによる DNA 損傷や、ヒドロキシウレアやアフィディコリンなどによる DNA 複製の阻害がある場合、細胞周期は停止する。このような異常はセンサーによって感知され、PI3 キナーゼドメインをもつ核のヒト ATM や ATR などのタンパク質キナーゼの活性化を引き起こす。ATM や ATR は、別のタンパク質キナーゼである Chk1 や Chk2 を直接リン酸化してそれらの活性を亢進する。その後のシグナル伝達過程は細胞周期に依存する。

G₁ 期の場合： ATM が活性化されると p53 の Ser15 が ATM や Chk2 でリン酸化され、MDM2 (p53 のユビキチン依存性分解に関わる E3) が p53 から離れ、p53 が安定化する。p53 は転写因子なので、p21^{Cip1} の転写を誘起し、p21^{Cip1} を合成する。これがサイクリン E-CDK2 を阻害して S 期移行を抑制する。DNA 損傷がひどい場合、p53 は細胞のアポトーシスを誘導する。

S 期の場合： 同様に出現した p21^{Cip1} が PCNA (DNA 複製におけるクランプ) に結合して DNA ポリメラーゼ 活性化能を抑制し、DNA 複製が停止する。また、BRCA1 のリン酸化を介した相同組換え修復が惹起される。

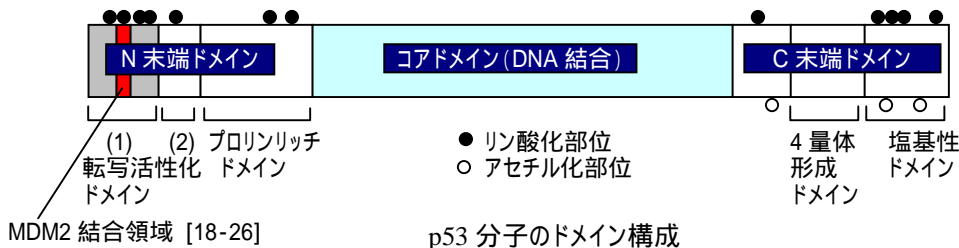
G₂ 期の場合： ATR や ATM が Chk1 や Chk2 を活性化する。これらが Cdc25C の Ser216 をリン酸化して、その脱リン酸化活性を阻害する。あるいは、Cdc25 を核から排除する。結果として、サイクリン B-Cdc2 の活性化ができなくなる。一方、Chk1/2 は Wee1 をリン酸化して活性を亢進し、サイクリン B-Cdc2 の活性化が抑制される。また、p53 は 14-3-3σ を誘導し、これが Cdc25C の Ser216 に結合して Cdc25C の核からの排出を誘起し、細胞周期を G₂ 期で停止させる。



p53 ---ゲノムの管理人(guardian of the genome)---

p53 は、SV40 ラージ T 抗原に結合するタンパク質として同定された (Lane, Levine, 1979 年)。当初はガン遺伝子産物と考えられたが、後に、ガン抑制遺伝子と分かった (1988-1989 年)。ヒトのガンの約 50% で、p53 に変異・失活が見られる。CDK 阻害剤 p21^{Waf1} を誘導することから、p53 は転写因子の 1 つであることが分かった (Vogelstein, 1993 年)。p53 は G₁/S および G₂ チェックポイントに深く関与する他に、アポトーシスを誘導する能力や、M 期では染色体の分配に主要な役割を果たす中心体の数を決定する制御因子の 1 つでもある。

p53 遺伝子はヒト染色体 17p13 に、マウスでは第 11 染色体にあり、11 個のエクソンから成る。酵母にはないがショウジョウバエにはある。ヒト、マウス p53 はそれぞれ 393, 390 残基から成り、3 つのドメインで構成される。



通常、p53 は 4 量体で存在し、細胞内に少量しか存在しない。これは、MDM2 (p53 の分解を促進する E3) が結合して分解が促進されているためである。そのため、半減期約 20 分である。ATM や ATR で Ser15 がリン酸化されたり、p19^{ARF} が MDM2 に結合してその活性を阻害すると、p53 は MDM2 から離れて安定化・活性化する。