真核生物の細胞周期を理解する － 生物学的かつ実験的な概要

Understanding the Eukaryotic Cell Cycle – a Biological and Experimental Overview

Review C0001J

Mini Review

Cancer

真核生物の細胞周期は、細胞の複製を行う進化的に保存された過程です。それは厳密に制御されており、3 つの主要なチェックポイント G1、G2/M、および紡錘体（M）が含まれます。これらのチェックポイントは、細胞周期各段階の順序、忠実性および完全性が確認されます。 例えば、G2/M チェックポイントは、DNA 損傷を検出し、細胞分裂前に修復を行います。細胞周期の過程における不備は、しばしばがんのような疾患をもたらします。 従って、この極めて重要なライフサイクルは、がんの予後および診断と同様に、細胞の健康を評価するために日常的に使用されています。このミニレビューでは、細胞増殖を評価するための一般的な分子を含む、真核生物の細胞周期の概要を提供します。

目次

1.真核生物における細胞周期の概要

1.1 真核生物の細胞周期

1.2 細胞周期制御

1.3 真核生物における DNA 複製

1.4 主要な細胞増殖バイオマーカー

2. DNA 複製および細胞周期の動態を評価するための技術

2.1 DNA 複製の評価

2.2 DNA 含量の定量化

2.3 サイクリンおよび Cdk の発現の測定

2.4 細胞増殖マーカーの検出

2.5 まとめと今後の展望

1. 真核生物における細胞周期の概要

19 世紀の早い時期から、科学者たちは細胞周期を徹底的に調べてきました。この間、彼らは新しい細胞が既存の細胞に由来することを発見しました（Nurse et al. 1998）。しかしながら、細胞分裂に関与する正確なプロセスは、ほとんど知られていませんでした。この時の科学的関心は、種間でプロセスがどのように異なっているかを調べることでした。

過去 60 年間に、原核生物および真核生物の細胞分裂に関与する分子機構に関する重要な発見および洞察がありました。これらの研究は、真核生物の細胞周期が原核生物よりもはるかに複雑であることを実証していました。DNA 複製および細胞分裂は原核生物、真核生物の両方で起こりますが、プロセスは著しく異なっています。主な違いは、これらの生物が DNA をどのように複製するかにあります。典型的な真核細胞は原核細胞よりも 25 倍多くの DNA を有するので、原

核細胞の分裂は真核生物の細胞周期で観察される染色体への DNA 凝縮が含まれません。もう一つの大きな違いは、DNA 複製が起こる過程にあります。原核生物は比較的短い細胞周期で DNA を連続的に複製しますが、真核細胞は細胞周期の S 期にのみで DNA を複製します（詳細は 1.2 節を参照）。このミニレビューでは、特に、DNA 複製、細胞周期制御、細胞分裂の重要なバイオマーカーに重点を置いた真核生物細胞周期の複雑さについて記載します。

1.1 真核生物の細胞周期

高度に制御された細胞周期は、中間期（G1 期、S 期、および G2 期）および有糸分裂期（M 期）と呼ばれる段階に分けられる（図 1）。

Gap 1（G1）期において、細胞は成長し、分裂に必要なエネルギーを獲得する。染色体を除く細胞成分は、この段階で複製される。合成（S）期では、DNA 複製が起こって遺伝物質を複製し、各染色体は 2 つの姉妹染色分体を形成する。

Gap 2（G2）期では、細胞は、有糸分裂に必要な細胞質成分を集める代謝変化を誘導することによって分裂する準備をする。 M 期の間に核分裂が起こり、最終的に細胞は分裂して 2 つの同一の娘細胞を形成する。核、細胞質、および原形質膜の分割によって 2 つの娘細胞を作製する物理的プロセスは、サイトキネシス（cytokinesis;ギリシャ語で kyto または kytos はコンテナ、体、容器を意味し、kinesis は動きを意味します）と呼ばれる。サイトキネシスの終わりに、各新しい細胞は、親細胞と完全に相補的 DNA から構成されます（Kapinas et al. 2013）。

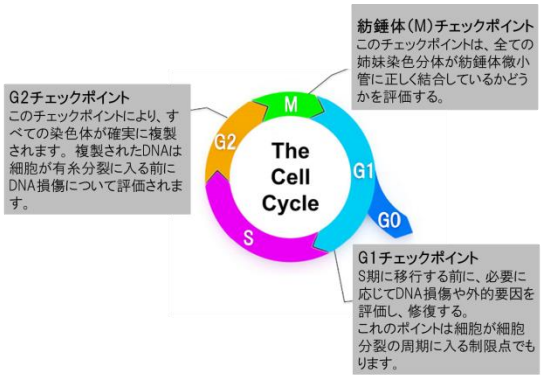

図 1. 真核生物の細胞周期の概要
細胞分裂の間、集団で細胞周期と呼ばれる一連の過程を通過する。正常細胞が細胞分裂の各過程を確実に移行するために、細胞周期は異なる項目を確認する G1、G2、紡錘体（M）の 3 つの主要なチェックポイントがあります。

生殖の場合には､卵子および精子細胞を産生するために減数分裂として知られる別の特殊な細胞分裂過程が必要である。この過程は、減数分裂 I と減数分裂 II に分けられ、減数分裂 I は生殖細胞に特有であり、減数分裂 II は有糸分裂に類似しています。
しかし、有糸分裂とは対照的に、減数分裂に関与する分子および調節機構はあまり理解されていません（Ohkura 2015）。

ある条件下では、細胞は細胞周期を出て、Gap 0（G0）期と呼ばれる休止状態に入ることができる。しかしながら、この過程は可逆的であり、G0 細胞は適切に刺激されると、G1 期に戻り、増殖および分裂を再開することができる。

1.2 細胞周期制御

細胞周期の各段階は厳密に制御されており、G1 期終了付近、G2 / M 移行時、および有糸分裂(M

期)の中期(metaphase)の終わり近く（紡錘体（M）チェックポイント）にチェックポイントがあります。これらのチェックポイントは、分裂した娘細胞が、正確な染色体数を持ち、完全な親細胞の複製であり、突然変異がないことを保証する監視機構である（図 1)。G1 チェックポイントの間、細胞周期を進行するのに必要な細胞状態が評価される。適切な細胞サイズであり、十分なエネルギーを有し、DNA 損傷がない場合、細胞は一般に G1 チェックポイントを通過することができる。G2 チェックポイントの主な機能は、すべての染色体の複製が完全であり、突然変異または未修復の DNA 損傷の混入がないことを確認することです。さらに、このチェックポイント中に、適切な細胞サイズおよびタンパク質保存量も評価される。紡錘体/ M 期チェックポイントでは、全ての姉妹染色分体が紡錘体微小管に正しく付着し、各細胞が正しい数の染色体を有することを保証する。

これらのチェックポイントで、細胞が各要件を満たしていない場合には、細胞周期の進行が停止します。これは識別された好ましくない条件に対処するために必要です。例えば、検出された DNA 損傷は、ゲノムの安定性を維持する上での重要な役割を持つために、「ゲノムの守護者(guardian of the genome)」と呼ばれている p53 転写因子の活性化につながる（Lane 1992)。p53 の主な機能は、G1 期または G2 / M 期の細胞周期停止を誘導し、DNA 修復を開始することです。それにより P53R2 のような DNA 修復遺伝子の遺伝子発現を活性化します(Tanaka et al. 2000)。p53 は、DNA 損傷を修復できない場合には、BAX などのアポトーシス遺伝子の発現を誘導することによって、最終手段としてアポトーシスを誘導することができます(Zilfou and Lowe 2009)。突然変異した DNA を有する細胞の細胞周期の進行を防ぐために重要な役割を果たすので、p53 は腫瘍抑制因子とみなされている（Zilfou and Lowe 2009)。その結果、いくつかのがんにおいて p53 は一般的に変異しているか、または存在しないことが報告されている（Hussain and Harris 1998)。

しかしながら、真核生物における細胞周期の主要制御因子は、サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼ（Cdks：Cyclin-dependent Kinases）（Murray 2004）からなるヘテロ二量体酵素複合体である。サイクリンの発現は、細胞周期の異なる段階で増加または減少し、それらは調節する細胞周期期に基づいて群に分けられる（図 2)（Murray 2004)。しかしながら、ほとんどの場合、Cdk の濃度は比較的一定のままである。 各 Cdk サブユニットは異なるサイクリンと会合することができ、関連するサイクリンは、どのタンパク質基質が Cdk-サイクリン複合体によってリン酸化されるかを決定する（Lodish et al. 2000)。 さらに、サイクリンが結合しない限り、Cdks はキナーゼ活性を有さない。 サイクリンの結合に加えて、複合体の活性化には、Cdk サブユニットの活性化ループにおける重要な残基のリン酸化も必要である（Harper and Elledge 1998、Hochegger et al. 2008)。

活性化されたサイクリン-Cdk 複合体を阻害するためのいくつかのメカニズムが同定されている。

これらは、Cdk1 におけるチロシン 15 およびトレオニン 14 などの重要な残基の阻害的リン酸化、ユビキチンを介した特異的タンパク質分解によるサイクリンサブユニットの分解、またはサイクリン D-Cdk4 複合体の場合は p16 のような特異的阻害タンパク質との会合があげられる（Hochegger et al. 2008、Kellogg 2003、Peters 2006、Serrano et al. 1993）。

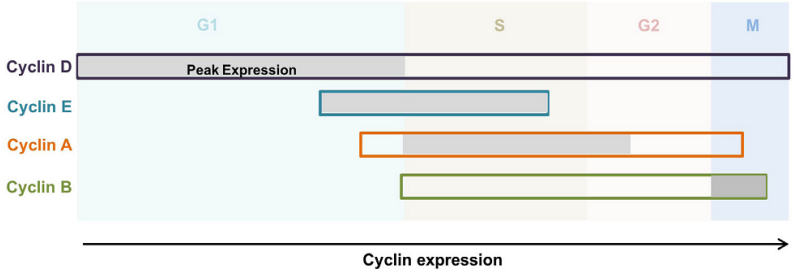

図 2. 細胞周期を通したサイクリンの発現 (Lodish et al. 2000)
サイクリンは細胞周期の様々な局面で発現が異なり、細胞周期の制御において異なる役割を担っている。図では、各サイクリンが発現する細胞周期の段階を示している。灰色の斜線部分は、それぞれのサイクリンの発現のピークを示す。

細胞周期制御の古典的モデルは、D 型サイクリンと Cdk4 または Cdk6 が G1 期初期の事象を調節することが示されている（Nurse 2000）。次いで、サイクリン E-Cdk2 複合体が S 期を開始し、サイクリン A-Cdk2 またはサイクリン A-Cdk1 複合体は S 期の完了を制御する。続いて、サイクリン B-Cdk1 複合体が有糸分裂を司る（表 1）。細胞周期の各相間の移行は、Cdks によって触媒されるタンパク質リン酸化によって媒介される。それに対して、ホスファターゼによるリン酸残基の除去もまた、細胞周期の進行にとって重要である。例えば、いくつかのホスファターゼは有糸分裂の制御に関与している（Chen et al. 2007）。 タンパク質ホスファターゼ-2A1（PP2A1）は、有糸分裂期の基質に対する主なホスファターゼ活性を仲介する（Sola et al. 1991）。 PP2A は細胞が有糸分裂に入ると不活性化されるが、有糸分裂サイクリン(Mitotic cyclins)のタンパク質分解後に再活性化される（Sola et al. 1991）。

10 年前、真核生物の細胞周期制御について最小閾値モデルと呼ばれるの改訂モデルが提案された（Hochegger et al. 2008）。このモデルでは、サイクリン A に結合した Cdk1 または Cdk2 のいずれかが間期の全段階を制御するのに十分あり、一方、サイクリン B-Cdk-1 複合体は有糸分裂への移行に必要であると規定している（Hochegger et al. 2008）。また、間期および有糸分裂 Cdk の違いは、必ずしも相互作用する特定のサイクリンと関係があるわけではないことも仮定されている。しかし、これは局在性と、間期よりも有糸分裂の方が活動閾値が高いためである（Hochegger et al. 2008）。

ノックアウトマウスは、このモデルを支持するデータを提供し、特定の Cdks とサイクリンの欠失は体細胞における細胞周期の破壊につながらないことを示した (Berthet and Kaldis 2007, Hochegger et al. 2008, Malumbres and Barbacid 2005)。例えば、Cdk2、Cdk4、および Cdk6 を欠損したマウスの胚は、依然として細胞周期が機能している（Santamaria et al. 2007）。しかし、古

典的な見解によれば、これらのマウスの細胞はG1期を超えて進行することはできないはずです。（Hochegger et al. 2008）。このことは、Cdk1-サイクリンAのような少数の複合体のみが細胞周期の進行に必要であることを示唆している。最小閾値モデルは、酵母を用いた他の研究や数理モデル実験によっても支持されている（Coudreuse and Nurse 2010、Gérardet et al. 2015）。しかし、この提案されたモデルを確認するためには、Cdk欠失の影響の違いを説明するような、さらなる研究が必要である。Hochegger ら（2008）によると、これは Cdk-サイクリン複合体のまだ知られていないキナーゼ非依存的な機能による可能性がある。

表1. サイクリン – 細胞周期の主要制御要因

	Cdk の結合相手のサイクリン	細胞周期における発現のピーク	細胞周期における役割
サイクリンD	Cdk および Cdk6 と優先的に結合する。Cdk1 および Cdk2 とも結合可能	G1	サイクリン D1 は、G0 から G1 への移行に必要である。Cdk4 と複合体を形成し、レチノブラストーマタンパク質を活性化する。サイクリン E の発現を上昇させる。
サイクリンE	Cdk2 と優先的に結合する。Cdk1 にも結合する。	G1/S	サイクリン E-Cdk2 複合体は S 期開始に必要である
サイクリンA	Cdk2 と優先的に結合する。Cdk1 にも結合する。	S/G2	サイクリン A は、Cdk1 や Cdk2 とともに、S 期完了と融資分裂期への移行を制御している。
サイクリンB	Cdk1 と優先的に結合する。Cdk2 とも結合することができる	M	サイクリン B1 および B2 は、M 期において Cdk1 と相互作用して M 期／成熟促進因子（MPF）を形成し、有糸分裂紡錘体の組み立てを促進するプロセスを制御し、最終的に細胞分裂を促進させている

Hochegger et al. (2008).　Cdk：cyclin-dependent kinase;サイクリン依存キナーゼ.

1.3 真核生物における DNA 複製

DNA 複製は、明らかに S 期に起こる細胞周期の不可欠な部分である。このプロセスは、細胞分裂に先立って絶妙な精度で行わなければならない（Alberts et al. 2002）。

DNA 複製は、ヘリカーゼ酵素ファミリーの一員による DNA 二重らせんの巻き戻しから始まる（図3、ステップ1）。ヘリカーゼは、ヌクレオチド塩基対間の水素結合を切断することによって DNA を巻き戻す。一本鎖 DNA 結合タンパク質は、巻き戻された DNA を安定化させ、鎖が再結合しないようにして、新しい DNA 鎖の合成が起こる Y 字型複製フォークを作製する（図3、ステップ2）。

複製フォークにおいて、分離された DNA 鎖は、相補的なヌクレオチドの挿入をガイドして新しい DNA を形成する鋳型として働く。例えば、鋳型鎖上のシトシン(C)ヌクレオチドは、新しい鎖上にグアニン(G)の挿入を誘導する。同様に、アデニン(A)ヌクレオチドはチミン(T)の挿入を誘導する。

相補的ヌクレオチドの添加前に、プライマーはテンプレート鎖に RNA プライマーを付加し、遊離の 3'OH 基を残して新しい鎖の合成を開始する。次いで、DNA ポリメラーゼ ε は鋳型鎖に結合し、ヌクレオチドを遊離 3'末端に付加することにより RNA プライマーを伸長させる（図3、ステップ3）。

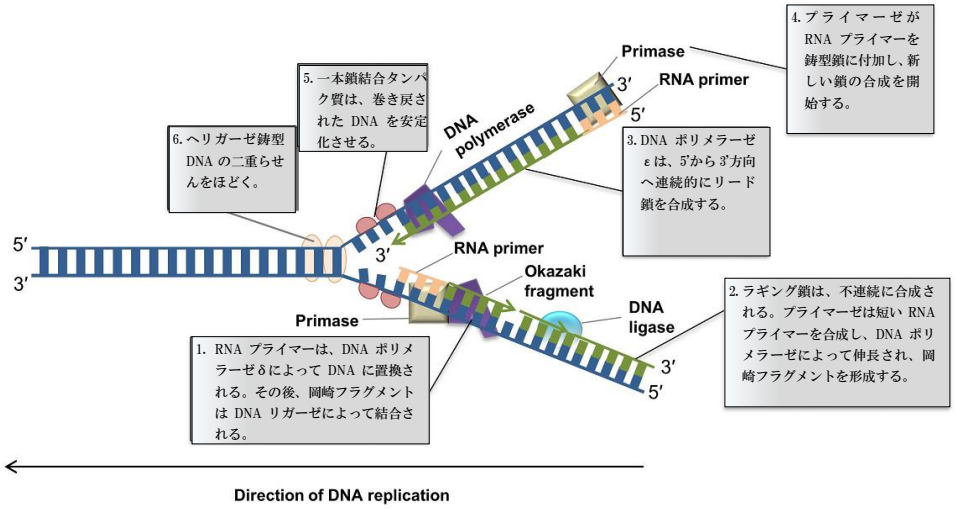

図 3　DNA 複製の概要 (Alberts et al. 2002)
細胞が分裂する前に、DNA を複製する必要があります。この図は、真核生物の DNA 複製フォークと、新しい相補的な DNA 鎖の生成に関わるステップを示したものです。
真核生物の DNA 複製フォークと、新しい相補的な DNA 鎖の生成に関与するステップを示したものである。

DNA ポリメラーゼは、5 'から 3'の方向でのみ機能する（DNA 方向については図 3 参照）。その結果、1 つの新しい DNA 鎖（リーディング鎖と呼ばれる）のみが連続的に合成され得る。
もう一方の鎖の合成（ラギング鎖と呼ばれる）は、より複雑なプロセスを必要とする（図 3、ステップ 5 および 6）。

3 'から 5'へのラギング鎖を作製するために、いくつかの RNA プライマーは、岡崎フラグメントと呼ばれる断片（図 3、ステップ 5）において 5 'から 3'方向の DNA ポリメラーゼによって不連続に伸長される。リーディング鎖の合成と同様に、プライマーは RNA プライマーを導入してさらなる伸長を開始する。 RNase は RNA プライマーを除去し、別の DNA ポリメラーゼ（DNA ポリメラーゼ δ）が岡崎フラグメント間のギャップを埋める。次いで、DNA リガーゼ I は、リーディング鎖およびラギング鎖の両方でニックを埋めて、新たに合成された DNA 分子を完成させる（図 3、ステップ 6）。

DNA 複製プロセスの完了時に、活発に分割する親細胞の各娘細胞は、1 つの古い鎖および 1 つの新しい鎖を含む新しい DNA 二重らせんを継承する。

1.4 主要な細胞増殖マーカー

Ki-67、増殖細胞核抗原（PCNA: proliferation cell nuclear antigen）およびミニ染色体維持タンパク質 2（MCM2: mini-chromosome maintenance protein 2）は、サイクリンおよび Cdks（1.2 節に記載）に加えて、細胞増殖および増殖を調節するための重要なタンパク質でもある。

Ki-67 は、細胞周期の全段階（G1 期、S 期、G2 期、M 期）に存在するが、休止期細胞（G0 期）には存在しない核タンパク質である（Gerdes et al. 1984）。そのタンパク質発現は、G1 期および初期 S 期の間に低く、そして有糸分裂の間に徐々に最大に達する（Li et al. 2014）。有糸分裂の間、Ki-67 は染色体の表面上に特異的に発現され、主にクロマチン凝縮に関与する（Cuylen et al. 2016、van Dierendonck et al. 1989）。Ki-67 過剰発現は、乳房および肺のがんを含む多くのがんのタイプで報告されており、これは患者の生存率の低下に関連している（Pollack et al. 2004、Shiba et al. 2000、Stuart-Harris et al. 2008）。その結果、Ki-67 は、乳がんなどの特定の種類のがんの予後予測マーカーとして臨床で使用されています（Li et al. 2014）。しかし、がんの臨床バイオマーカーとして、その有用性および臨床的意義は、実験室間および観察者間の変動性を示す矛盾する研究によって挑戦されている（Albarracin and Dhamne 2014）。

PCNA は必須の進化的に保存されたタンパク質である。マウスで PCNA をノックアウトすると胚性致死が生じるという事実が強調している（Hu and Xiong 2006、Roa et al. 2008、Strzalka and Ziemienowicz 2011）。このタンパク質の最初に判明した役割は、PCNA が DNA ポリメラーゼδの補助タンパク質として DNA 合成に関与することが明らかにされた（Bravo et al 1987）。その後、PCNA の機能についての理解が深まり、このタンパク質が DNA 修復、クロマチンリモデリング、染色体分離、細胞周期進行など、様々な細胞内プロセスに関与していることが報告されている（Strzalka and Ziemienowicz 2011）。PCNA はこれらの役割から、「ゲノムのリングマスター(Ringmaster)」と呼ばれている（Paunesku et al. 2001）。PCNA はまた、p53 との相互作用を通して細胞の運命に影響を与える。PCNA 遺伝子は p53 によって誘導され、PCNA が高発現しているときには DNA 修復をもたらす。腫瘍抑制因子がない場合。PCNA は DNA 複製を誘導することができる。PCNA の発現が低いか、あるいはない場合は、アポトーシスに至る（Paunesku et al. 2001）。したがって、PCNA は、その発現が細胞運命を決定づける重要なタンパク質である（Paunesku et al. 2001）。 PCNA は、G1 および S 期後期に主に発現し、G2 および M 期における発現を減少させ、G0 期および G1 期初期では低いかまたは存在しない（Kurki et al。1986）。複製および DNA 修復におけるその役割のために、PCNA は、子宮頸がんおよび神経膠腫を含む多くのがんにおける細胞増殖のマーカーと考えられている（Lv et al. 2016）。

MCM2 は、MCM2-MCM7 からなる MCM タンパク質ファミリーの 6 つのメンバーのうちの 1 つである。これらのタンパク質は、G1 期において複製前複合体（pre-RC）を形成することにより、DNA 複製の開始において重要な役割を果たす（Maiorano et al. 2006）。この複合体は、鋳型 DNA 鎖の巻き戻しをも刺激するため、その後の S 期における DNA 複製に重要である（Maiorano et al.2006, Labib et al.2000）。他の MCM ファミリーメンバーと比較して、MCM2 は細胞周期を通して明らかに発現される。MCM3-MCM7 タンパク質は化学量論的量で発現されず、異なる制御を受けている（Todorov et al. 1998）。例えば、MCM7 は、MCM2 と比較して増殖細胞よりも休止細胞に多く存在する（Tsuruga et al. 1997）。

MCM2 は G1 期初期に高発現し、S 期、G2 期、M 期には中程度に発現し、G0 期には発現しない(Maiorano et al. 2006)。さらに、MCM2 は明瞭な細胞内局在パターンを示し、細胞周期において測定することができる。細胞周期を通じて核内に発現しているが、G1 期にはクロマチンに強く結合している（Todorov et al 1995)。その後、S 期で変位し、G2 期と M 期では結合しないままである(Todorov et al. 1995)。したがって、MCM2 の局在と発現パターンは、理想的な増殖マーカーとなる。また、腎臓がんや神経膠腫などのがんの診断・予後判定マーカーとしても用いられている (Giaginis et al. 2010, Todorov et al. 1998)

表 2. は、がんにおけるこれらの主要な増殖バイオマーカーの細胞周期発現、機能、診断上の利用法をまとめたものである。
表 2. 主要な細胞増殖のバイオメーカーまとめ。

細胞増殖 バイオマーカー	細胞周期中の発現	機能	がん診断への応用
Ki-67	G0:発現していない G1:低発現 S:発現が少ない G2:発現量が増加 M:最大発現	主に有糸分裂時のクロマチン凝縮に関与する	乳がん、肺がんなどのがんの予後予測マーカーとして使用されている 実験室間、観察者間のばらつきがあり、臨床的な有用性に限界がある
MCM2	G0:発現していない G1:G1 初期に高発現 S:中程度の発現 G2:中程度の発現 M:中程度の発現	DNA 複製を開始するための複製前複合体の一部を形成する鋳型 DNA の巻き戻しに関与する	腎臓がんや神経膠腫など、さまざまながんの診断・予後バイオマーカーとして使用されています。
PCNA	G0:低発現または非発現 G1:G1 後期に高発現 S:高発現 G2:発現が低下 M:発現が低下	DNA の複製に関与する および修復、クロマチン クロマチン再構築、染色体分離 染色体分離、細胞周期の進行に関与	子宮頸がん、神経膠腫を含むいくつかのがん種における細胞増殖のマーカー。

MCM2:mini-chromosome maintenance protein 2（ミニ染色体維持タンパク質 2)、PCNA:proliferation cell nuclear antigen（増殖細胞核抗原）

2. DNA 複製および細胞周期の動態を評価するための分子技術

細胞周期とそれに関与する主要なタンパク質に関する現在の理解は、細胞周期プロセスおよび細胞増殖を定量化し評価するための多くの手法の開発につながっています。これらの技術は、がんおよび細胞生物学の研究に日常的に利用されています。 細胞分裂を評価するために最も一般的に使用されている方法を以下に紹介します。

2.1 DNA 複製の評価

新しく合成された DNA を測定することは、増殖中の細胞を検出する最も一般的な方法であり、また、個々の細胞周期段階を評価することもできます。従来の方法では、特定のヌクレオチドの代わりに DNA に取り込まれる化学化合物を利用していました。特に、DNA 複製の際に新たに合成された DNA に取り込まれるチミジンアナログがよく使われています。従来、DNA 合成の測定には、5'-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）が用いられてきた。取り込まれた BrdU は、チミジンとの交差反応性が少ない特異抗体を用いて検出される（Magaud et al.1989)。BrdU の取り込みは、新たに合成された DNA を正確に検出することができますが、生体試料に遺伝的・分子的な悪影響を及ぼすことが報告されています（Anda et al.2014, Lehner et al.2011)。したがって、BrdU を利用する実験では、適切な対照を含める必要があります。DNA 複製の測定によく利用される他のチミジンアナログには、5'-クロロ-2'-デオキシウリジン（CIdU)、5'-ヨード-2'-デオキシウリジン（IdU）および 5'-エチニル-2'-デオキシウリジン（EdU）(Salic and Mitchison 2008,

Tuttle et al.2010）などがあります。

2.2 DNA 量の定量化

細胞内の DNA の量は、化学量論的に DNA に結合する蛍光色素を用いて定量することができ、検出される色素の量は、細胞中に存在する DNA の量に正比例します。従って、これらの色素は、DNA に生じる変化に基づいて、細胞周期の様々な段階を識別するのに適しています。例えば、細胞周期の S 期にある細胞は、G1 期にある細胞よりも多くの DNA を持つことになる。同様に、G2 期の細胞は G1 期の細胞よりも DNA 量が 2 倍多いため、蛍光測定値も高くなる。一般的な全 DNA 結合色素には、ヨウ化プロピジウム（PI）、4',6'-ジアミノ-2-フェニルインドール（DAPI）、7-アミノアクチノマイシン-D（7-AAD）などが使われます。これらの色素の蛍光強度は、一般にフローサイトメトリーによって測定される。 これらの色素は膜が保持された生細胞には入ることができないため、DNA に効果的に色素を結合させるためには、細胞サンプルを透過処理する必要がある。さらに、これらの色素は RNA とも結合するため、DNA 量のみを測定するためには、色素添加前に RNase 処理が必要である。

2.3 サイクリンおよび Cdk の発現の測定

細胞周期の様々な段階におけるサイクリンおよび Cdks の明瞭な発現ピークを利用した細胞周期解析が可能である（図 2）。個々のサイクリンおよびそのリン酸化体の総量は、ウェスタンブロッティングや酵素免疫吸着法（ELISA）などの免疫検出法を用いて検出することができる。これらの手法と DNA 合成の評価を組み合わせることで、細胞周期の徹底的な解析が可能となります。

2.4 細胞増殖マーカーの検出

細胞増殖マーカー（Ki-67、PCNA、MCM2）の解析は、細胞周期を通じて明確に発現しているため、増殖中の細胞の同定に用いることができる（表 2）。これらのタンパク質に対する特異的な抗体により、活発に分裂している細胞（陽性発現）と静止（G0）細胞（低発現または陰性発現）を区別することができる。この増殖細胞の同定方法は、免疫組織化学を用いた腫瘍組織の病理学的分析において最も一般的である。しかし、この方法で得られた結果は、増殖率の直接的な測定ではなく、増殖している細胞の数を示しているに過ぎないことを意識することが重要である。

2.5 まとめと今後の展望

細胞周期は、細胞の複製をもたらす秩序だったプロセスである。この過程は進化的に保存されており 細胞周期の制御に欠陥があると、しばしばがんなどの病気になる（Harashima et al.）。細胞分裂が初めて観察された 1800 年代とは対照的に、このプロセスを実験的に測定する新しい技術が開発され、細胞分裂の仕組みに関する理解は大きく進展した。また、細胞増殖やがんに関与する分子マーカー（表 2）が同定され、がん治療の有望なターゲットとして検討されるようになった。例えば、Ki-67 は積極的な腫瘍増殖と予後不良に関連しているため、現在、がん治療の治療

標的として評価されています（Rahmanzadeh et al. 2010, Ricciardi et al. 2015a, Ricciardi et al. 2015b）。研究により、抗体阻害剤またはアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれかを介してKi-67を阻害すると、細胞分裂が減少することが示されており、効果的ながん治療の標的としての有用性が裏付けられています（Kausch et al. 2003、Starborg et al. 1996、Zhang et al. 2007）。

References

- Albarracin C and Dhamne S (2014). Ki67 as a biomarker of prognosis and prediction: Is it ready for use in routine pathology practice. Curr Breast Cancer Rep 6, 260-266.
- Alberts B et al. (2002). DNA replication mechanisms. In Molecular Biology of the Cell, 4th edition, (New York: Garland Science), ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26850/,accessed April 25, 2017.
- Anda S et al. (2014). Cell-cycle analyses using thymidine analogues in fission yeast. PloS One 9, e88629.
- Berthet C and Kaldis P (2007). Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. Oncogene 26, 4469-4477.
- Bravo R et al. (1987). Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. Nature 326, 515-517.
- Chen F et al. (2007). Multiple protein phosphatases are required for mitosis in Drosophila. Curr Biol 17, 293-303.
- Coudreuse D and Nurse P (2010). Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. Nature 468, 1074-1079.
- Cuylen S et al. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. Nature 535, 308-312.
- Gerdes J et al. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. J Immunol 133, 1710-1715.
- Gérard C et al. (2015). Cell cycle control by a minimal Cdk Network. PLoS Comput Biol 11, e1004056.
- Giaginis C et al. (2010). MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. Histol Histopathol 25, 351-370.
- Harashima H et al. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. Trends Cell Biol 23, 345-356.
- Harper JW and Elledge SJ (1998). The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. Genes Dev 12, 285-289.
- Hochegger H et al. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? Nat Rev Mol Cell Biol 9, 910-916.
- Hu J and Xiong Y (2006). An evolutionarily conserved function of proliferating cell nuclear antigen for Cdt1 degradation by the Cul4-Ddb1 ubiquitin ligase in response to DNA damage. J Biol Chem 281, 3753-3756.
- Hussain SP and Harris CC (1998). Molecular epidemiology of human cancer: Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. Cancer Res 58, 4023-4037.
- Kapinas K et al. (2013). The abbreviated pluripotent cell cycle. J Cell Physiol 228, 9-20.
- Kausch I et al. (2003). Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. Int J Cancer 105, 710-716.
- Kellogg DR (2003). Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. J Cell Sci 116, 4883-4890.
- Kurki P et al. (1986). Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. Exp Cell Res 166, 209-219.
- Labib K et al. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. Science 288, 1643-1647.
- Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358, 15-16.
- Lehner B et al. (2011). The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. Cell Tissue Res 345, 313-328.
- Li TL et al. (2014). Ki-67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). Mol Med Rep 11, 1566-1572.
- Lodish H et al. (2000). Overview of the cell cycle and its control. In Molecular Cell Biology, 4th edition (New York: WH Freeman & Co.), ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21466/,accessed May 2, 2017.
- Lv Q et al. (2016). Proliferating cell nuclear antigen has an association with prognosis and risks factors of cancer patients: a systematic review. Mol Neurobiol 53, 6209-6217.
- Magaud JP et al. (1989). Double immunocytochemical labeling of cell and tissue samples with monoclonal anti-bromodeoxyuridine. J Histochem Cytochem 37, 1517-1527.
- Maiorano D et al. (2006). MCM proteins and DNA replication. Curr Opin Cell Biol 18, 130-136.
- Malumbres M and Barbacid M (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem Sci 30, 630-641.
- Murray AW (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. Cell 116, 221-234.
- Nurse P et al. (1998). Understanding the cell cycle. Nat Med 4, 1103-1106.
- Nurse P (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. Cell 100, 71-78.
- Ohkura H (2015). Meiosis: an overview of key differences from mitosis. Cold Spring Harb Perspect Biol 7, pii: a015859.
- Paunesku T et al. (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. Int J Radiat Biol 77, 1007-1021.
- Peters JM (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. Nat Rev Mol Cell Biol 7, 644-656.
- Pollack A et al. (2004). Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation therapy oncology group trial 92-02. J Clin Oncol 22, 2133-2140.
- Rahmanzadeh R et al. (2010). Ki-67 as a molecular target for therapy in an in vitro 3D model for ovarian cancer. Cancer Res 70, 9234-9242.
- Ricciardi GR et al. (2015a). Androgen receptor (AR), E-Cadherin, and Ki-67 as emerging targets and novel prognostic markers in triple negative breast cancer (TNBC) patients. PLoS One 10, e0132647.

■ Ricciardi GR et al. (2015b). Correction: Androgen receptor (AR), E-Cadherin, and Ki-67 as emerging targets and novel prognostic markers in triple negative breast cancer (TNBC) patients. PLoS One 10, e0132647.
■ Roa S et al. (2008). Ubiquitylated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class switch recombination and is required for meiotic progression. Proc Natl Acad Sci USA 105, 16248-16253.
■ Salic A and Mitchison TJ (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 105, 2415-2420.
■ Santamaria D et al. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. Nature 448, 811-815.
■ Serrano M et al. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature 366, 704-707.
■ Shiba M et al. (2000). Ki-67 immunostaining and other prognostic factors including tobacco smoking in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. Cancer 89,1457-1465.
■ Sola MM et al. (1991). p34cdc2 phosphorylation sites in histone H1 are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Biochim Biophys Acta 1094, 211-216.
■ Starborg M et al. (1996). The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. J Cell Sci 109, 143-153.
■ Strzalka W and Ziemienowicz A (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. Ann Bot 107, 1127-1140.
■ Stuart-Harris R et al. (2008). Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. Breast 17, 323-334.
■ Tanaka H et al. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. Nature 404, 42-49.
■ Todorov IT et al. (1995). A human nuclear protein with sequence homology to a family of early S phase proteins is required for entry into S phase and for cell division. J Cell Sci 107, 253-265.
■ Todorov IT et al. (1998). HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker for human tumors and normal tissues. Lab Invest 78, 73-78.
■ Tsuruga H et al. (1997). Expression, nuclear localization and interactions of human MCM/P1 proteins. Biochem Biophys Res Commun 236, 118-125.
■ Tuttle AH et al. (2010). Immunofluorescent detection of two thymidine analogues (CIdU and IdU) in primary tissue. J Vis Exp 46, 2166.
■ Van Dierendonck JH et al. (1989). Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. Cancer Res 49, 2999-3006.
■ Zhang P et al. (2007). Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. J Am Chem Soc 129, 4526-4527.
■ Zilfou JT and Lowe SW (2009). Tumor suppressive functions of p53. Cold Spring Harb Perspect Biol 1, a001883.

(*)本稿は Bio-Rad Laboratories, Inc.が出版した Mini Review 「Understanding the Eukaryotic Cell Cycle – a Biological and Experimental Overview」の翻訳版です。

バイオ･ラッド ラボラトリーズ株式会社
ライフサイエンス

www.bio-rad.com

本社　〒140-0002　東京都品川区東品川 2-2-24　Tel：03-6361-7000　Fax：03-5463-8480

製品の学術的なお問い合わせは

Mail：life_ps_jp@bio-rad.com　Tel：03-6404-0331　Fax：03-6404-0334

*価格（税抜き）は 2022 年 11 月現在のもので、メーカー希望小売価格です。
*本レビューに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。
*本レビューに記載されている製品は、研究用であり、診断目的にはご利用いただけません。

Review C0001J　Z13207L 2211a