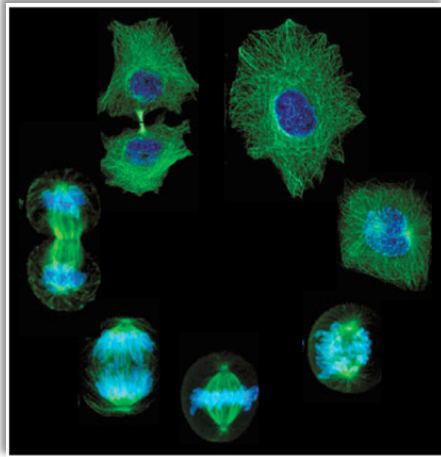


基礎細胞学III

後期水曜1限 E131

- 方針
 - 自分が担当分(5/15)の単位は原則的には出します。
- 出席
 - フルネームで名簿に署名すること。
 - 代筆不可。
 - 遅刻は入室時間を記入すること(自己申告)。
- 小テスト(11/4 担当の最終回)
 - 基礎、実験原理が中心、準備不要。
 - 人の解答を絶対写さないこと。
 - 自分の言葉で書くこと。



基礎細胞学III

後期水曜1限 E131

http://25.media.tumblr.com/tumblr_lcn6tfAey11qezvqko1_500.jpg

細胞周期

杉山伸 10/7, 10/14, 10/21

細胞分裂

杉山伸 10/28, 11/4

細胞死

荒木聡彦

遺伝

松本邦弘

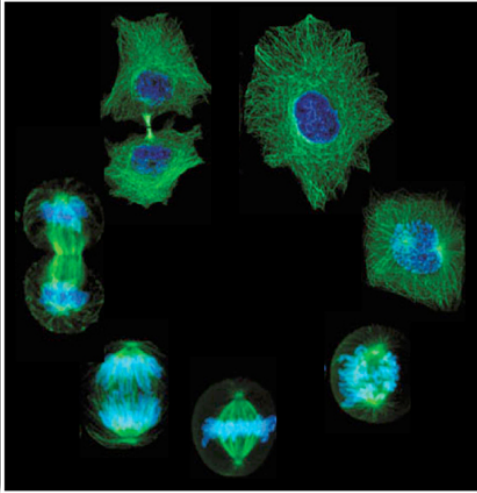
がん

松本邦弘

杉山伸 発生成長制御学グループ講師 E207 内線5039

ssugiyama@bio.nagoya-u.ac.jp

教えること



- 細胞周期とその制御因子の発見 10/7
 - 細胞周期の制御機構 10/14
- S期の制御とM期開始の制御 10/21
 - 有糸分裂のメカニックス 10/28
- 細胞周期の特殊例 11/4 (小テスト)

教えないこと

- 原核生物の細胞周期は取り上げない
 - 減数分裂は取り上げない
 - DNA複製は取り上げない

図の出典



教科書

Essential 細胞生物学 原書第3版 (Bruce Alberts他著、中村桂子・松原謙一監訳、南江堂、2011年)

細胞の分子生物学 第5版 (Bruce Alberts他著、中村桂子・松原謙一監訳、Newton Press、2010年)

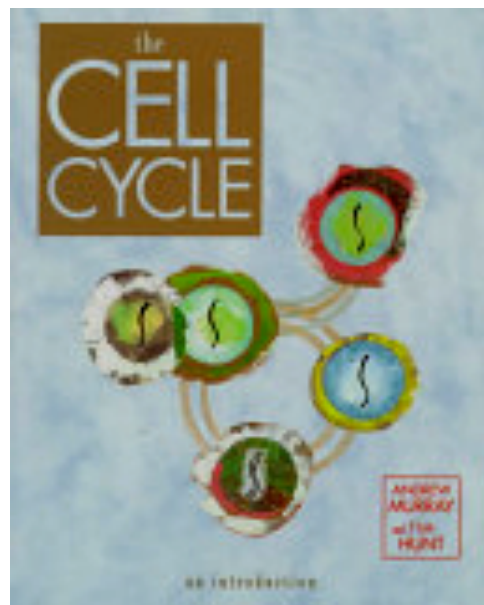
The Cell Cycle an Introduction. Andrew Murray and Tim Hunt. Oxford Univ. Press 1993

ECB

Wikipedia



WIKIPEDIA



MBoC



高価だけど、レフェランス本としては必要。

本日：細胞周期と その制御因子の発見

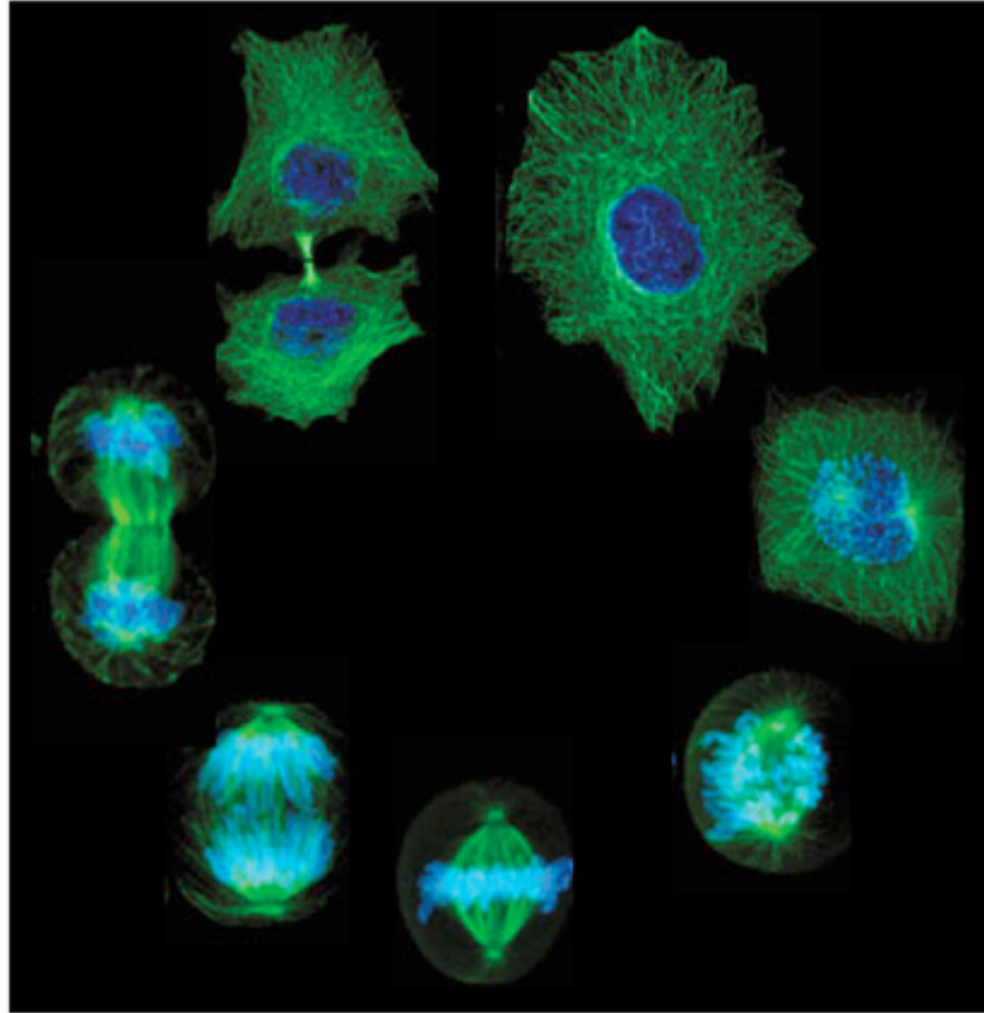
コンセプト

- 1 細胞周期とは何か?
- 2 細胞周期の理解の重要性。
- 3 細胞周期制御機構の存在を明瞭にした実験。
- 4 細胞周期制御因子の発見

キーワード

G1期、S期、G2期、M期、間期、
Cyclin、MPF、Cdk、温度感受性変異

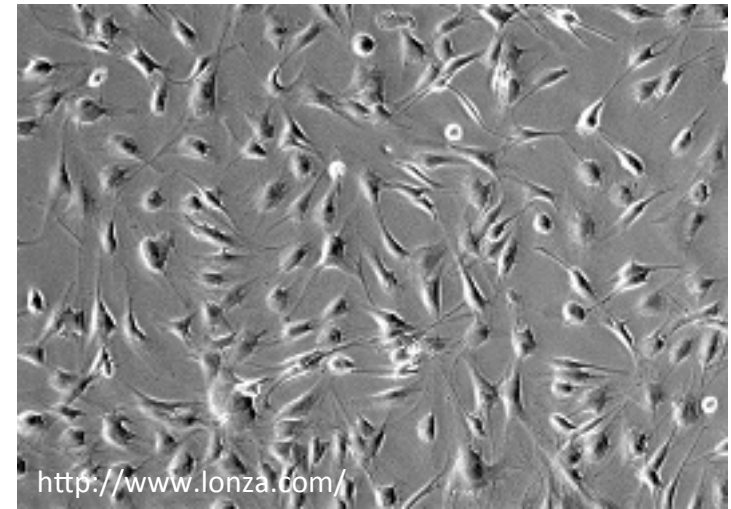
細胞周期とは？



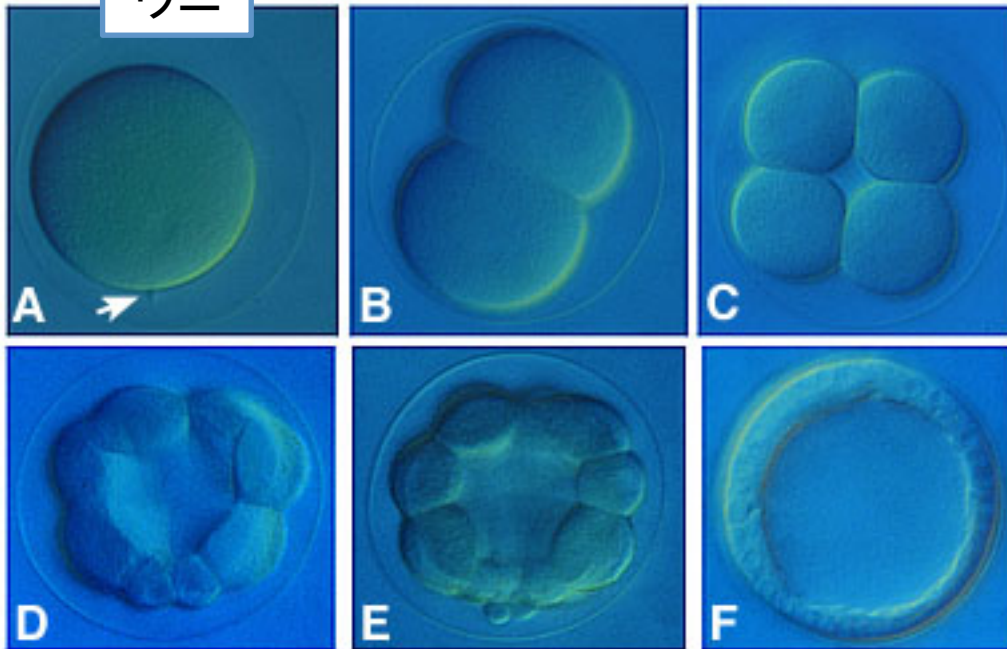
http://25.media.tumblr.com/tumblr_lcn6tfAey11qezvqko1_500.jpg

細胞周期って何？ What is the cell cycle ?

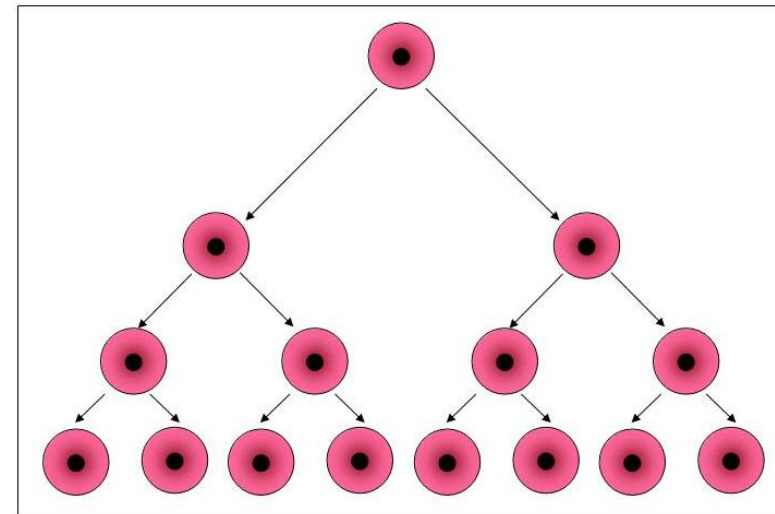
培養細胞



ウニ



http://worms.zoology.wisc.edu/urchins/SUcleavage_montage.jpg



<http://geneticsuite.net/files/Cell%20multiplication.jpg>

どんな細胞も分裂を繰り返して増える

細胞周期の長さ

	Cell Type	Cell-Cycle Times
カエル卵割	Early frog embryo cells	30 minutes
酵母	Yeast cells	1.5–3 hours
小腸上皮	Intestinal epithelial cells	~12 hours
繊維芽細胞	Mammalian fibroblasts in culture	~20 hours
肝細胞	Human liver cells	~1 year

一般的に:



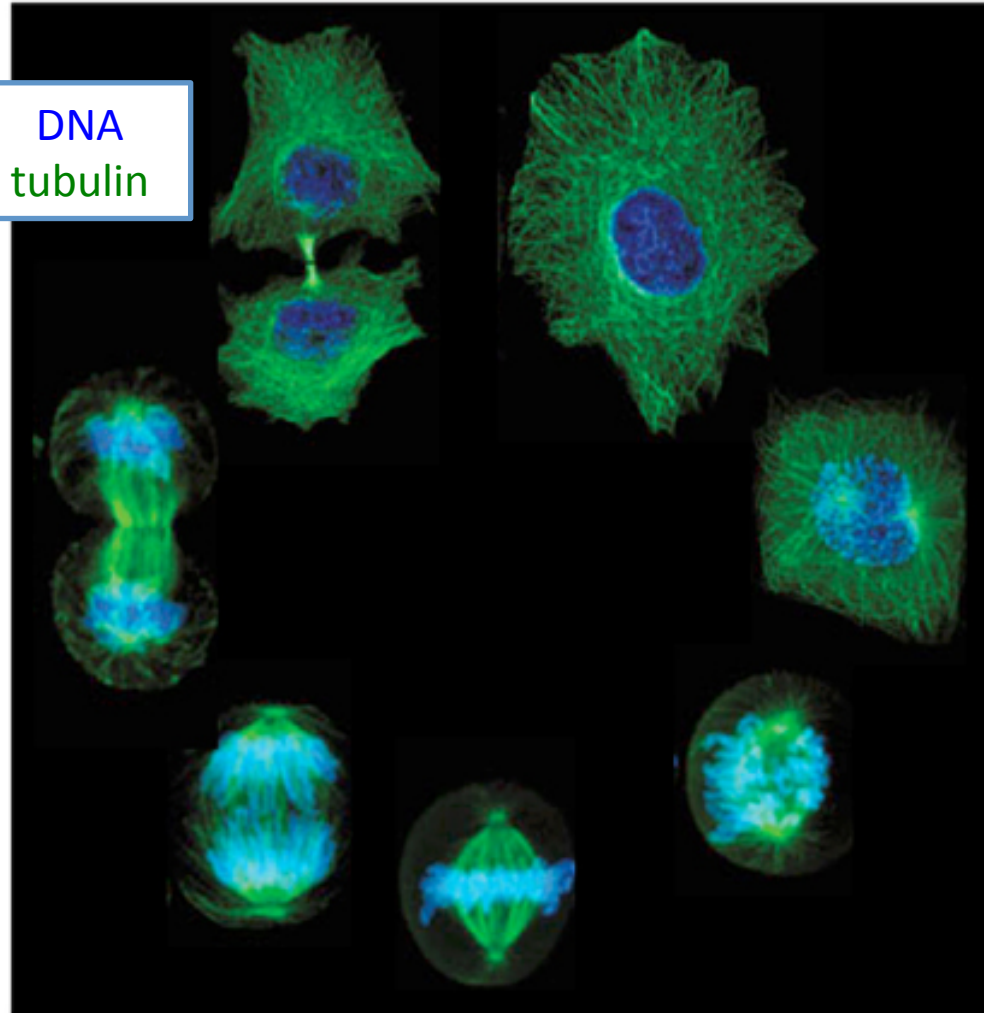
細胞周期で特徴的なのは有糸分裂

(Mitosis)

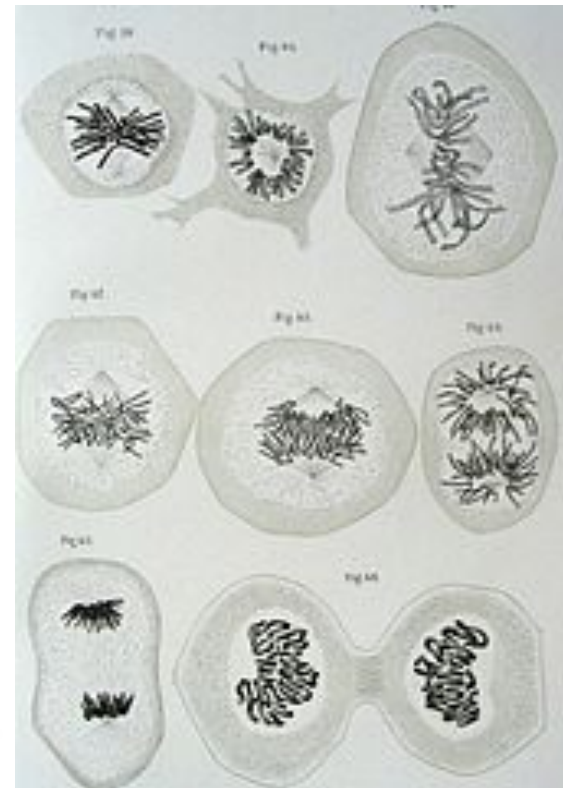


https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fe/Walther_flemming.gif

ドイツのWalther Flemmingが
1882年に記載



http://25.media.tumblr.com/tumblr_lcn6tfAey11qezvqko1_500.jpg

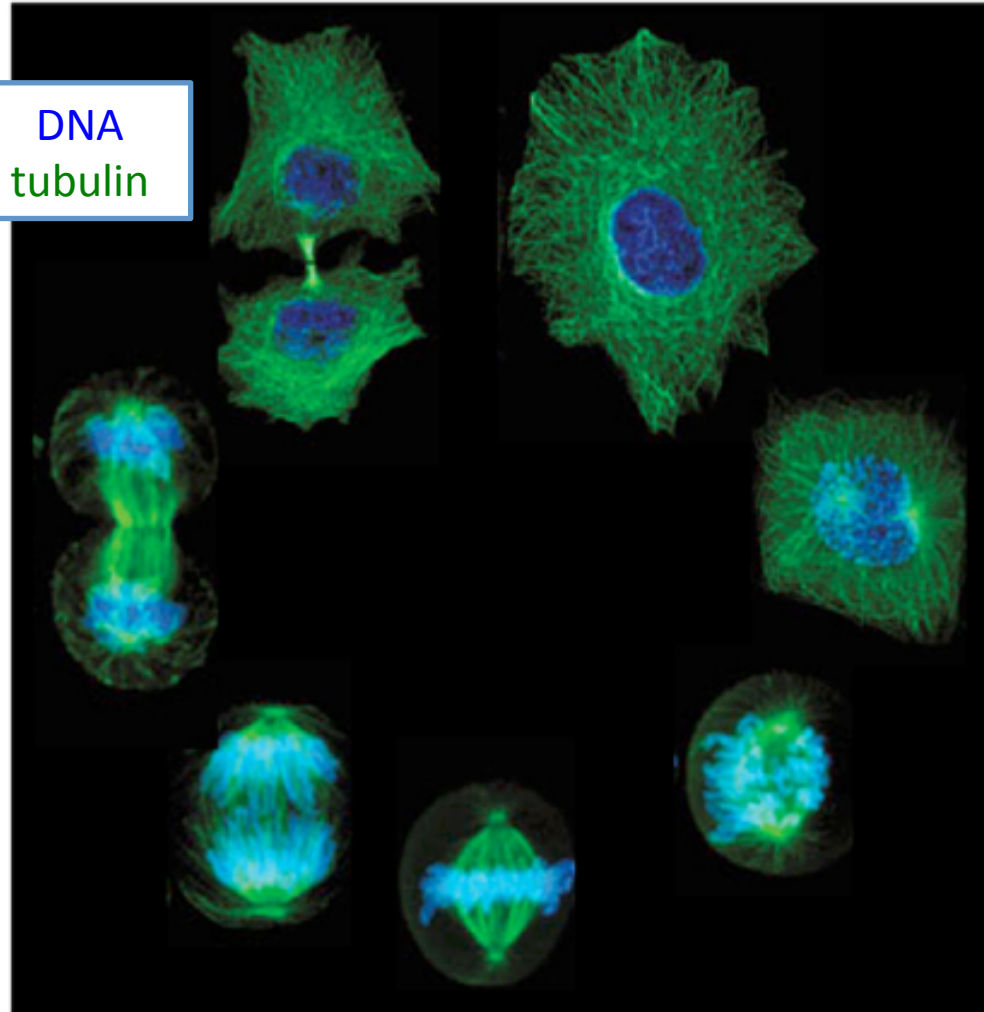


<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6d/Zellsubstanz-Kern-Kerntheilung.jpg>

メンデルの法則が有名になってなかったなので、染色体の分配の遺伝的意義には気付いていなかった。

細胞周期で特徴的なのは有糸分裂

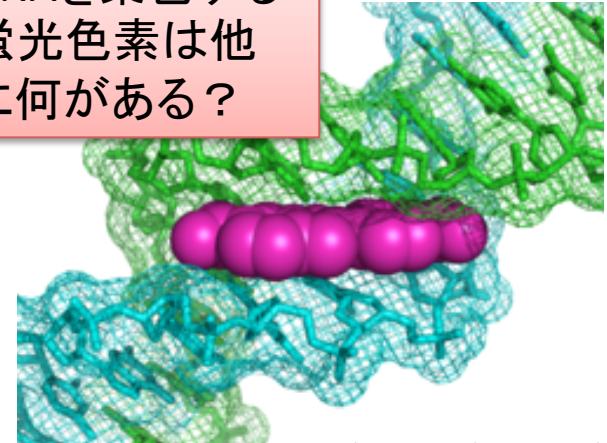
(Mitosis)



DNA
tubulin

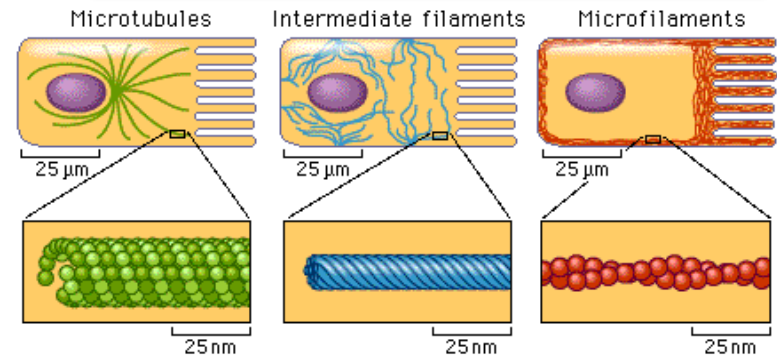
http://25.media.tumblr.com/tumblr_lcn6tfAey11qezvqko1_500.jpg

DNAを染色する
蛍光色素は他
に何がある？



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/14/1D30_DNA_DAPI.png

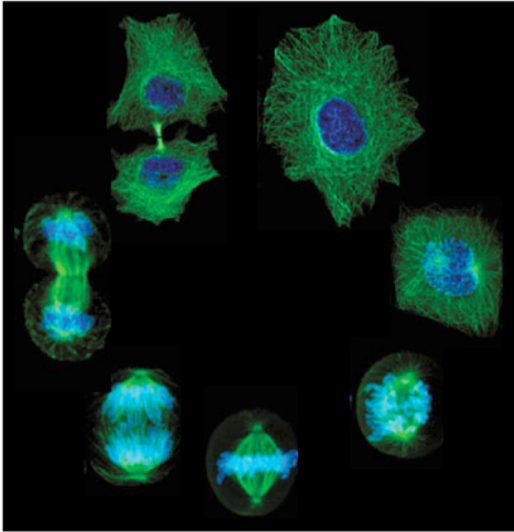
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole: DNA二重螺旋の小溝に結合する蛍光色素



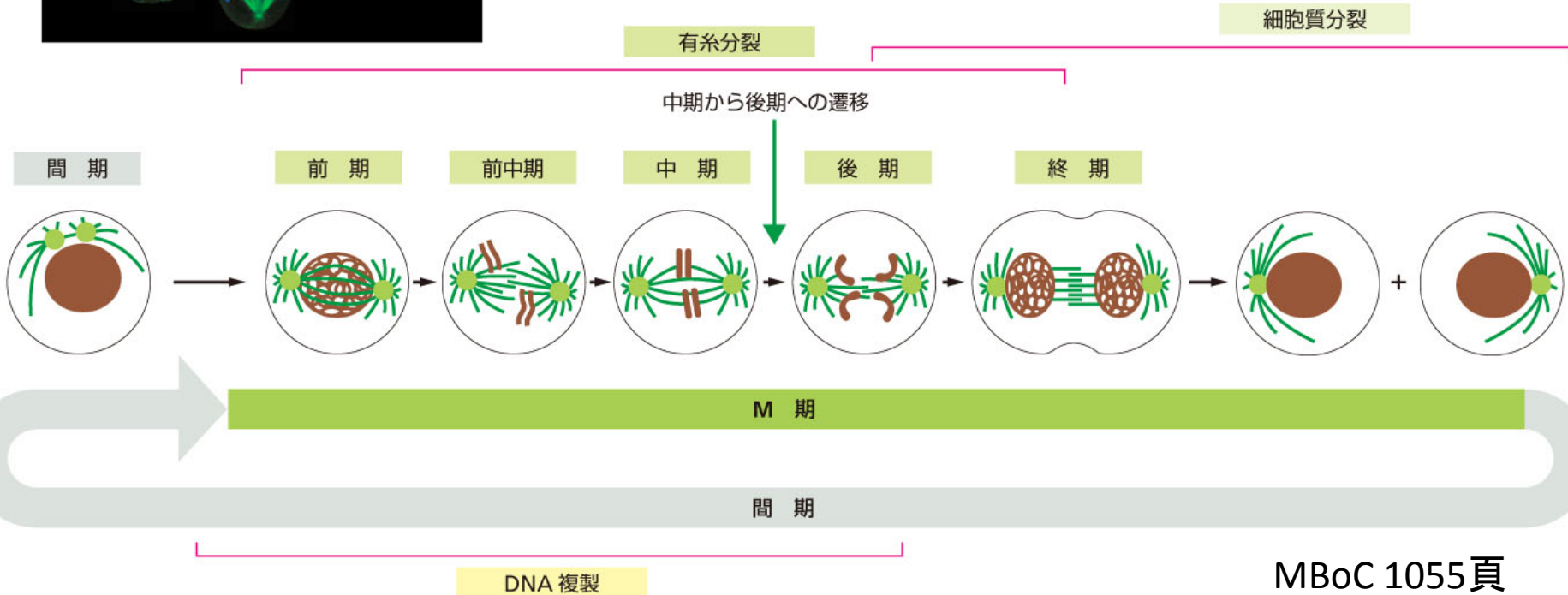
チューブリン(微小管
蛋白質)
GFPか抗体で検出

http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/cells/images/Cytoskel.gif

細胞周期には見かけ上は2つの時期がある

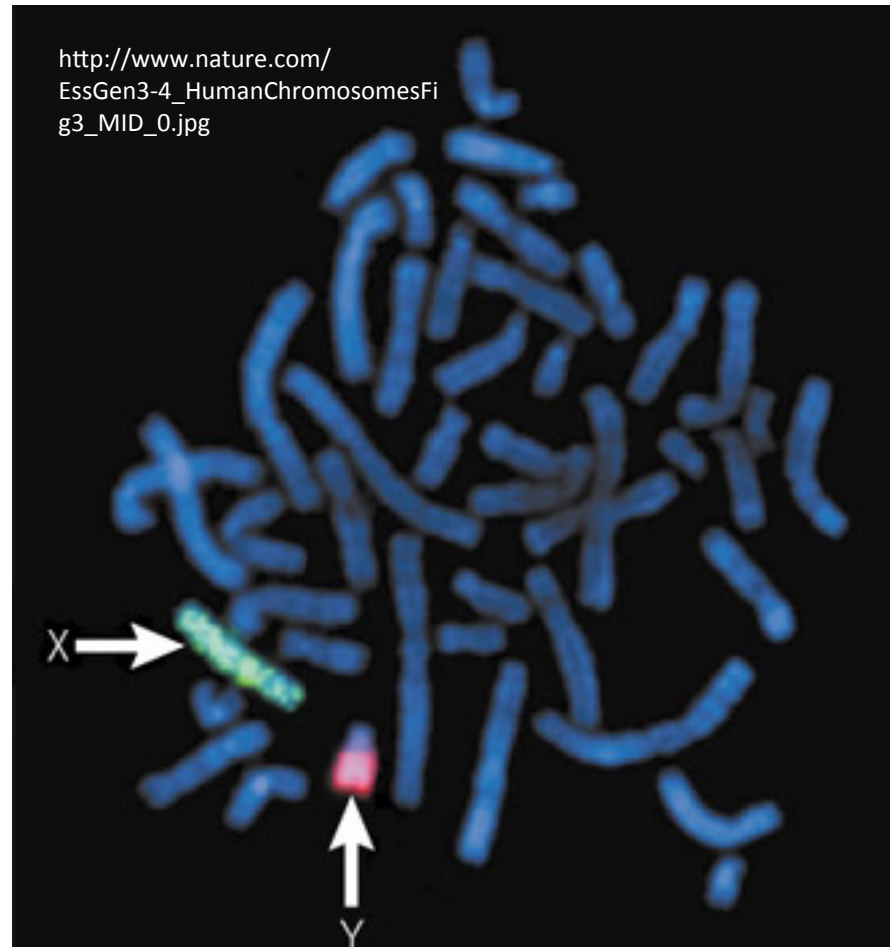


M期/Mitotic phase (分裂期)
間期/Interphase (分裂の間)



間期に遺伝子の複製がおこる:s期

細胞周期では毎回すべての染色体のコピーが作られ
2つの細胞に正確に分配される。

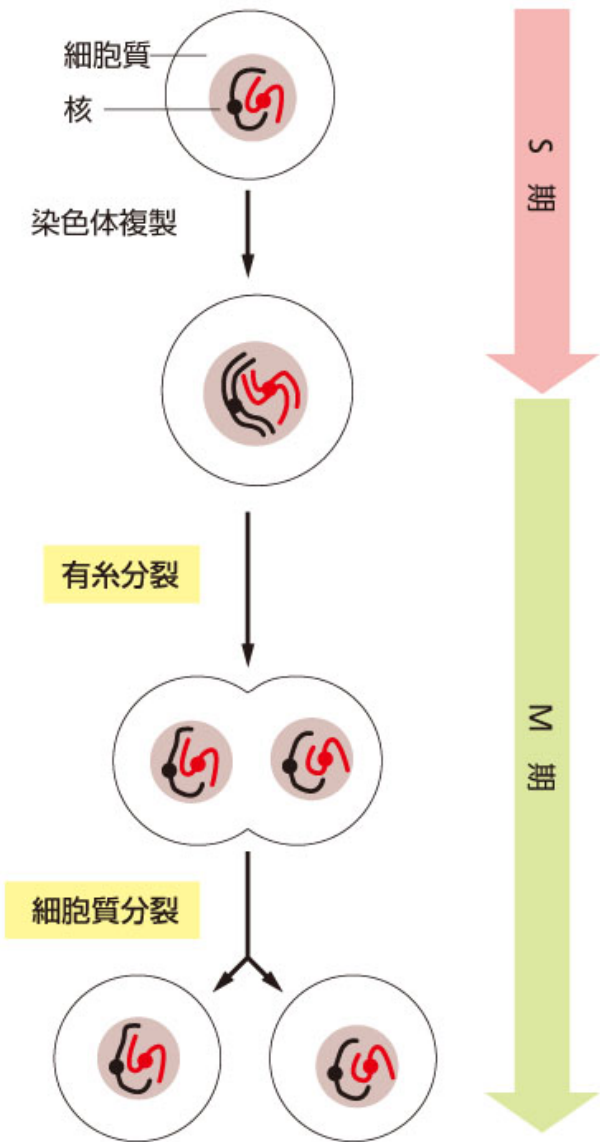


例外は？

細胞周期は遺伝情報を増やして
分ける機構として捉えることができる

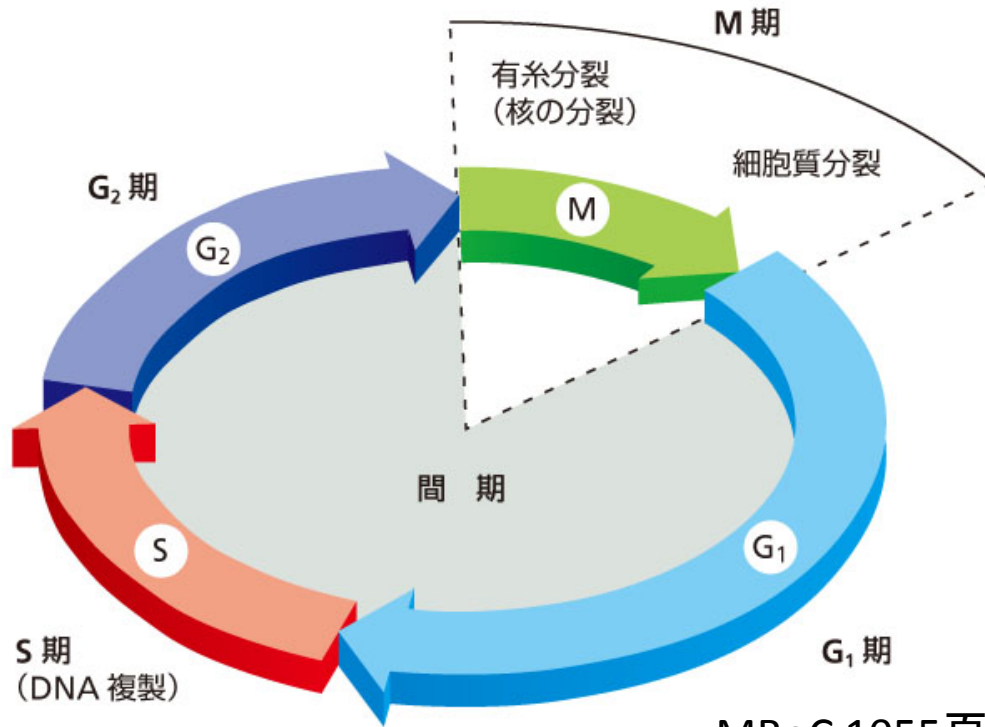
今日の重要概念 1

S期とM期に注目した細胞周期



MBoC 1054頁

でも実際はS期とM期の間には2つの間隔(Gap)がある



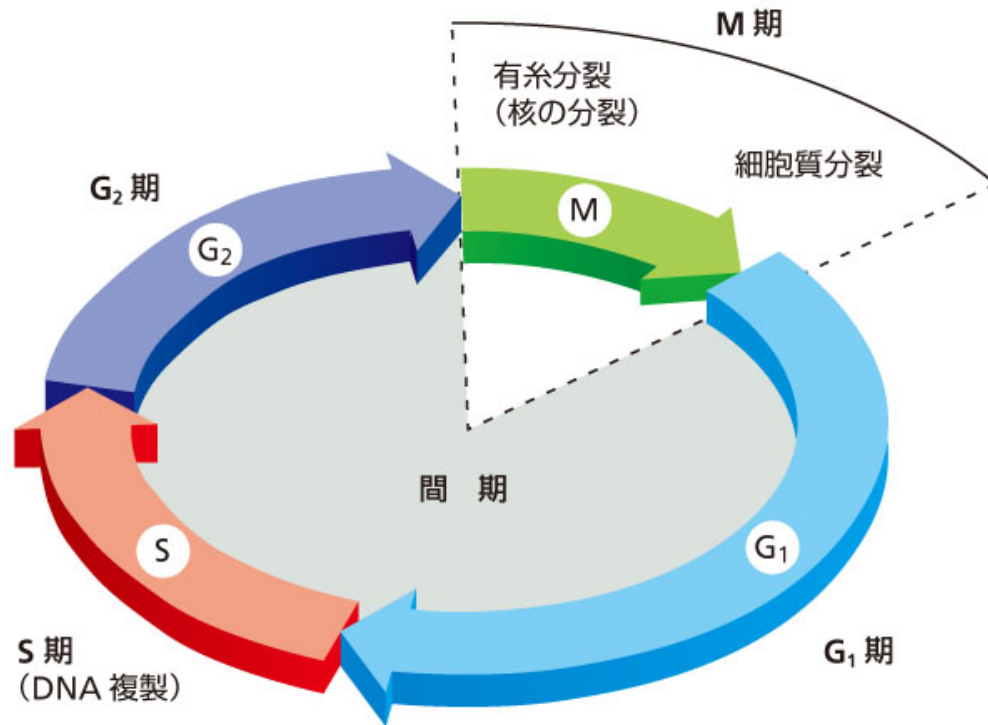
MBoC Fig17-04

MBoC 1055頁

細胞周期には4つの時期がある

G₁、S、G₂、M

(細胞周期制御に注目すると明瞭)



MBoC Fig17-04

MBoC 1055頁

細胞周期の4つの時期のうちわけ

G₁(G₀)期 Gap1 phase : 休止または細胞成長、細胞周期のスタート

S期 Synthesis phase: DNA合成期

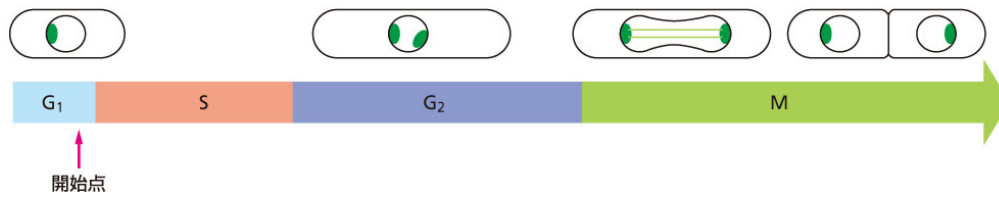
G₂期 Gap2 phase : 細胞成長 (ない細胞もある)

M期 分裂期 Mitotic phase : 有糸分裂+細胞質分裂

間期

M期

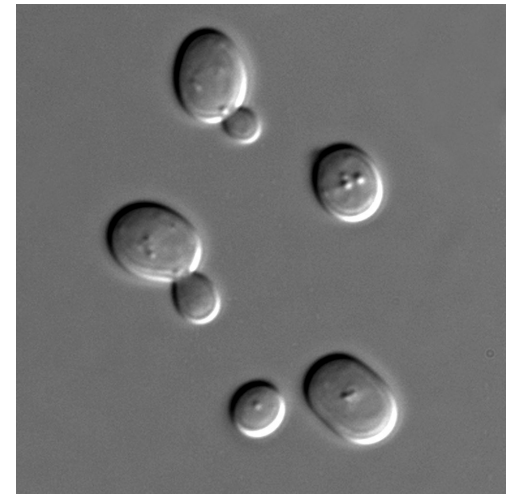
(A) 分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)



(B) 出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)



単細胞生物も多細胞生物も
真核生物は細胞周期の機構
が進化的に保存されている。



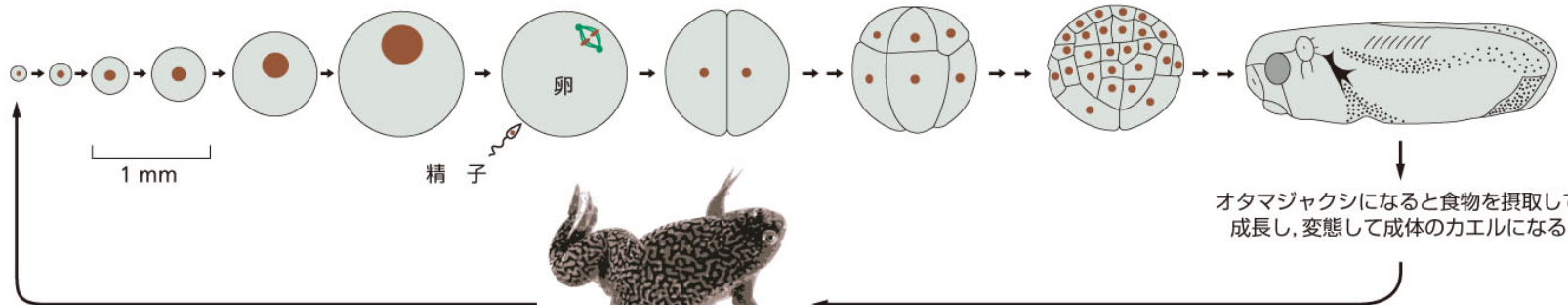
MBoC 1056頁

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d9/S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg

卵母細胞は分裂せずに容積が増大
(月単位で進行)

受精

受精卵は全体の容積が増大せずに分割
(時間単位で進行)



オタマジャクシになると食物を摂取して
成長し、変態して成体のカエルになる

MBoC 1058頁

個体発生では細胞周期が厳密
に制御されている。

細胞分裂と細胞分化の関係

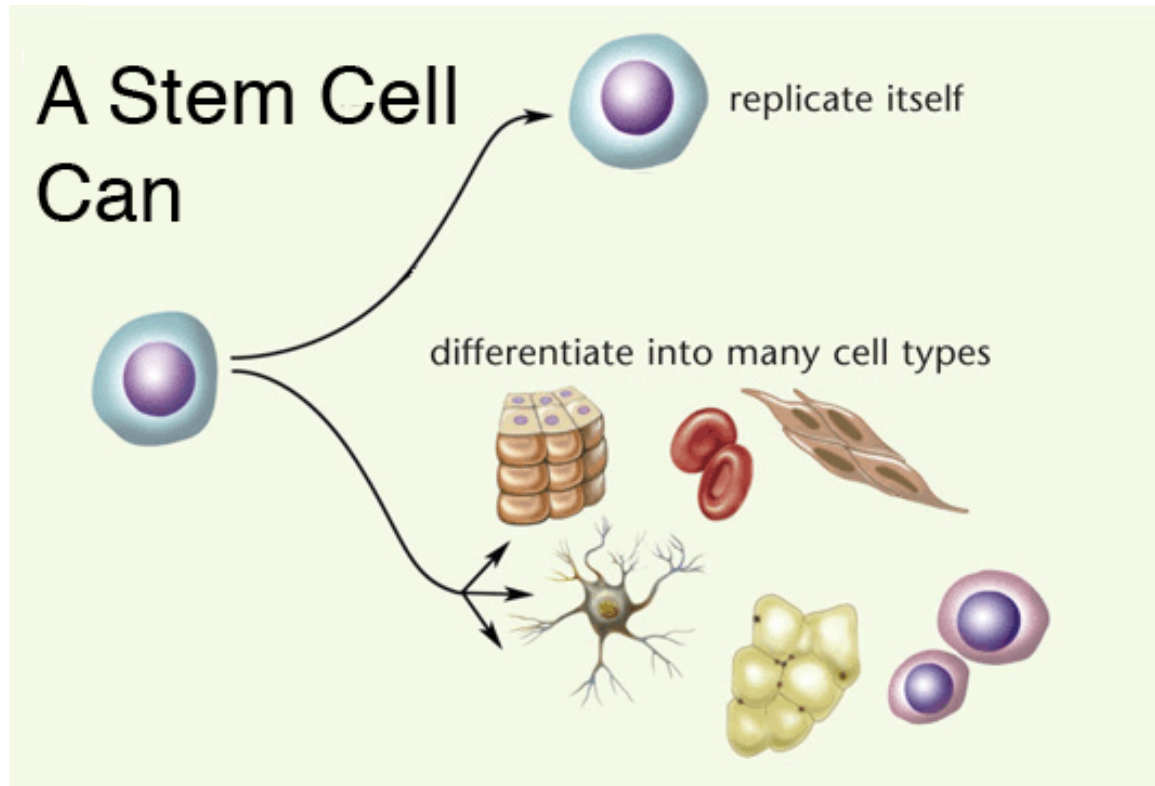
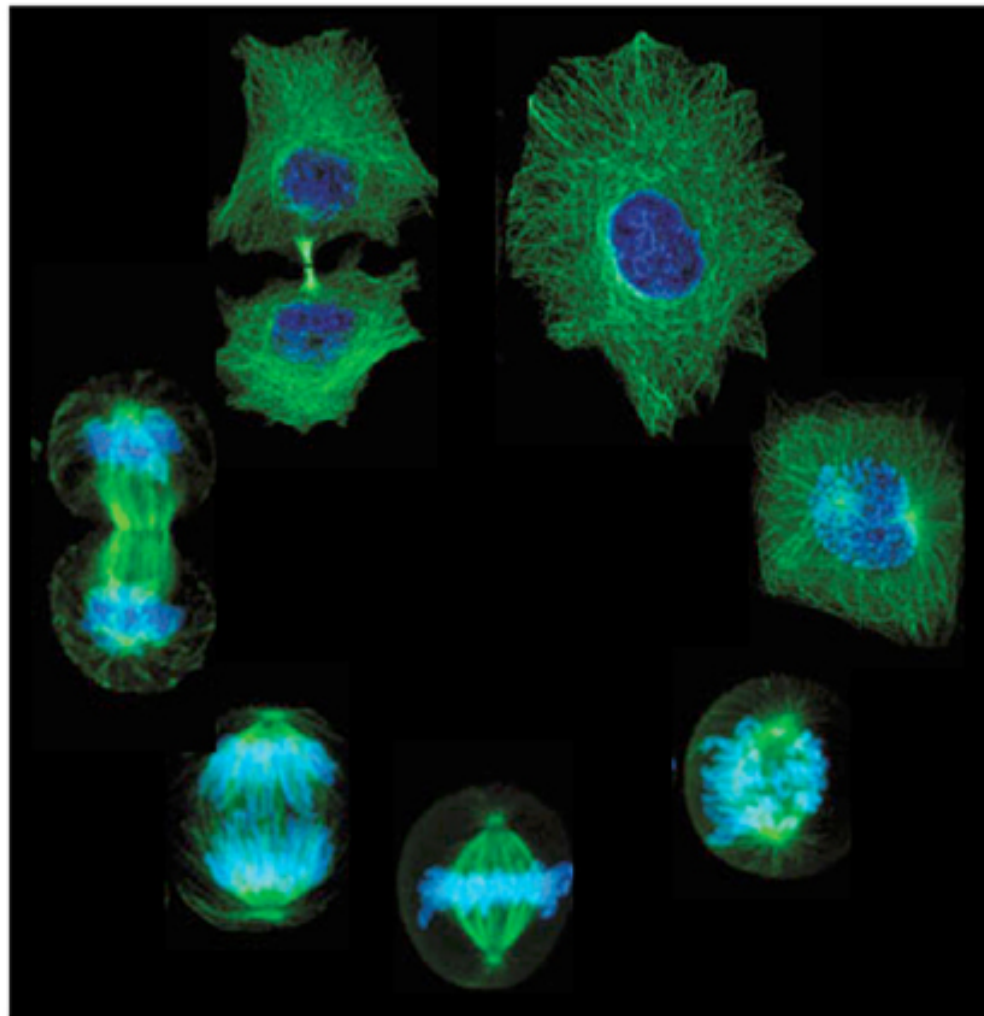


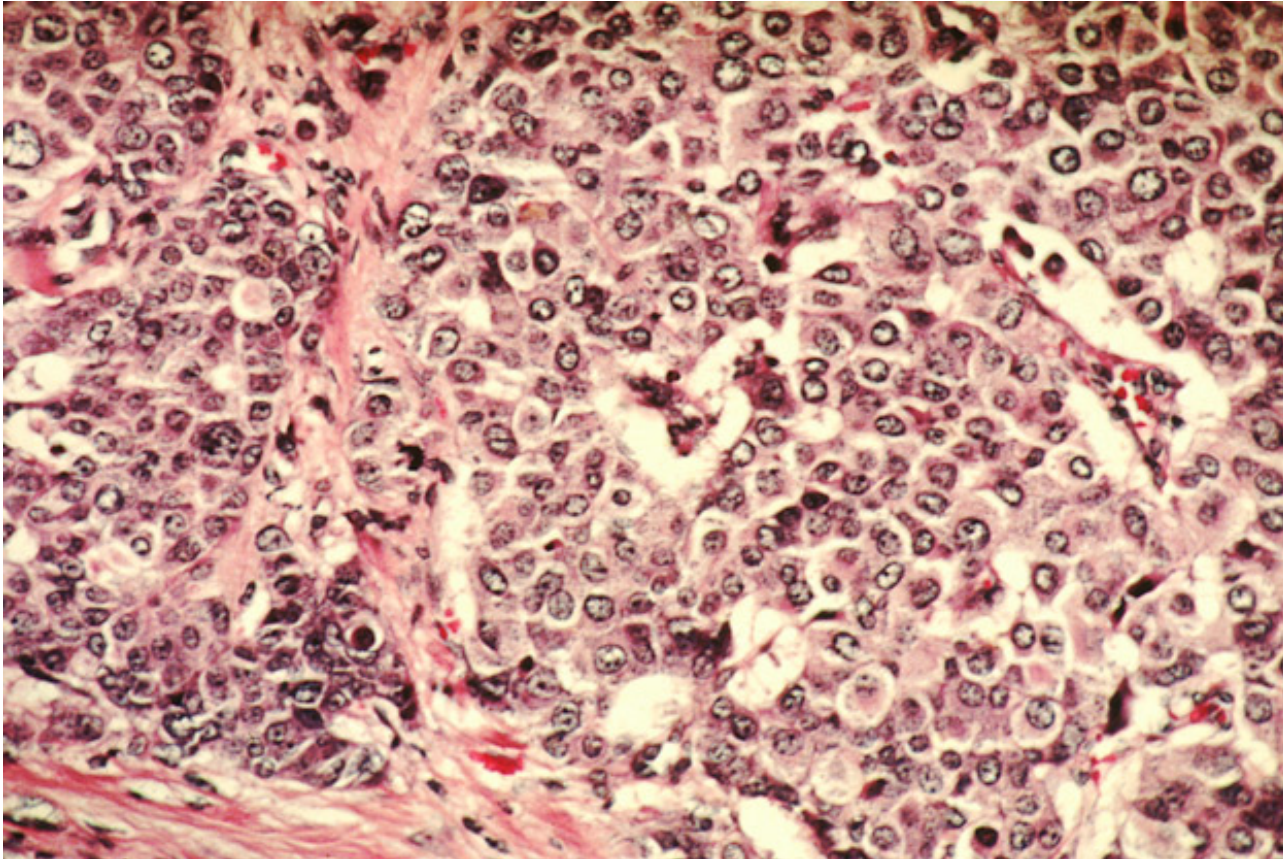
Image prepared by Catherine Twomey for the National Academies, *Understanding Stem Cells: An Overview of the Science and Issues from the National Academies*, www.nationalacademies.org/stemcells.

未分化：分裂盛ん ↔ 分化：分裂低下（停止）

細胞周期研究の重要性



細胞周期制御が破綻したらどうなる？



<http://www.nature.com/principles/ebooks/principles-of-biology-104015/9523064>

例えば：乳癌 Breast Cancer

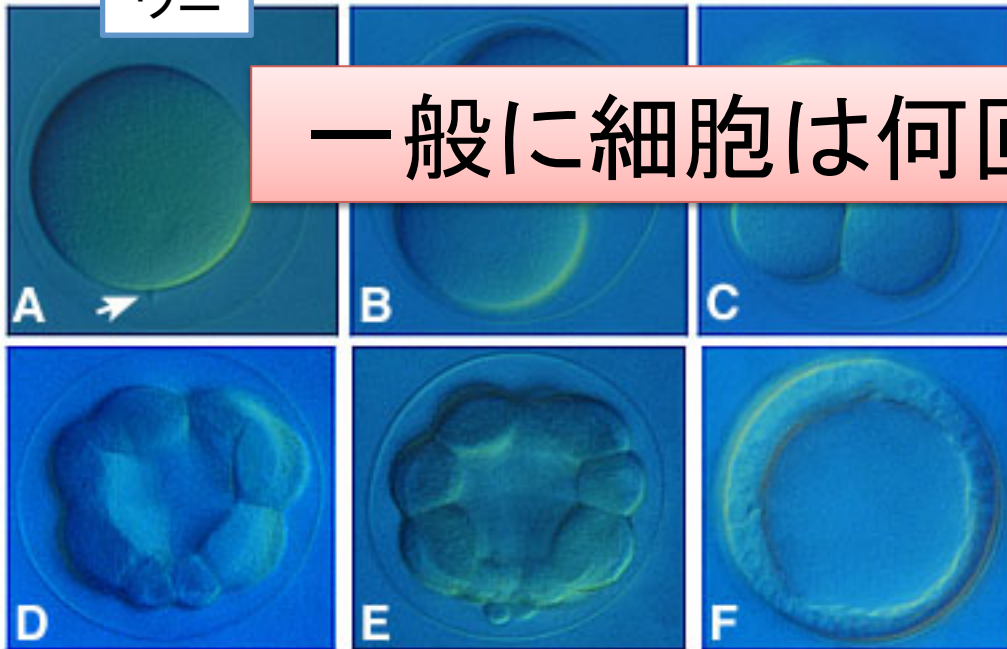
今日の重要概念 3

細胞周期 Cell cycle

培養細胞

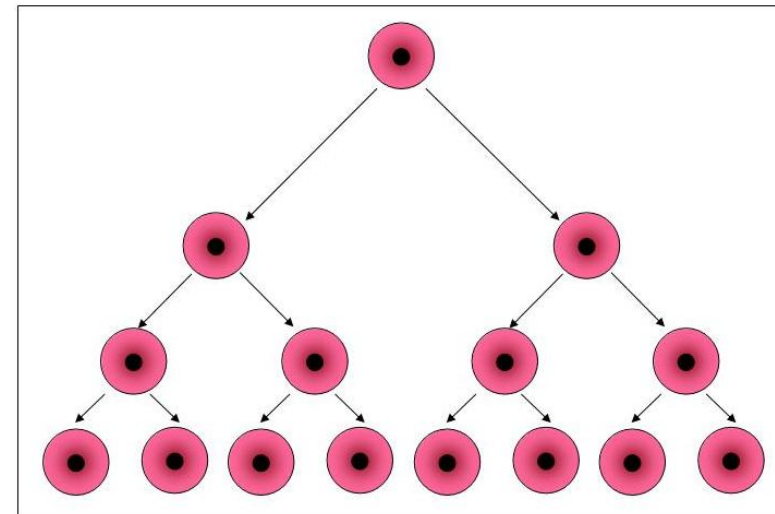


ウニ



一般に細胞は何回分裂する？

http://worms.zoology.wisc.edu/urchins/SUcleavage_montage.jpg



<http://geneticsuite.net/files/Cell%20multiplication.jpg>

どんな細胞も分裂を繰り返して増える

THE SERIAL CULTIVATION OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS¹

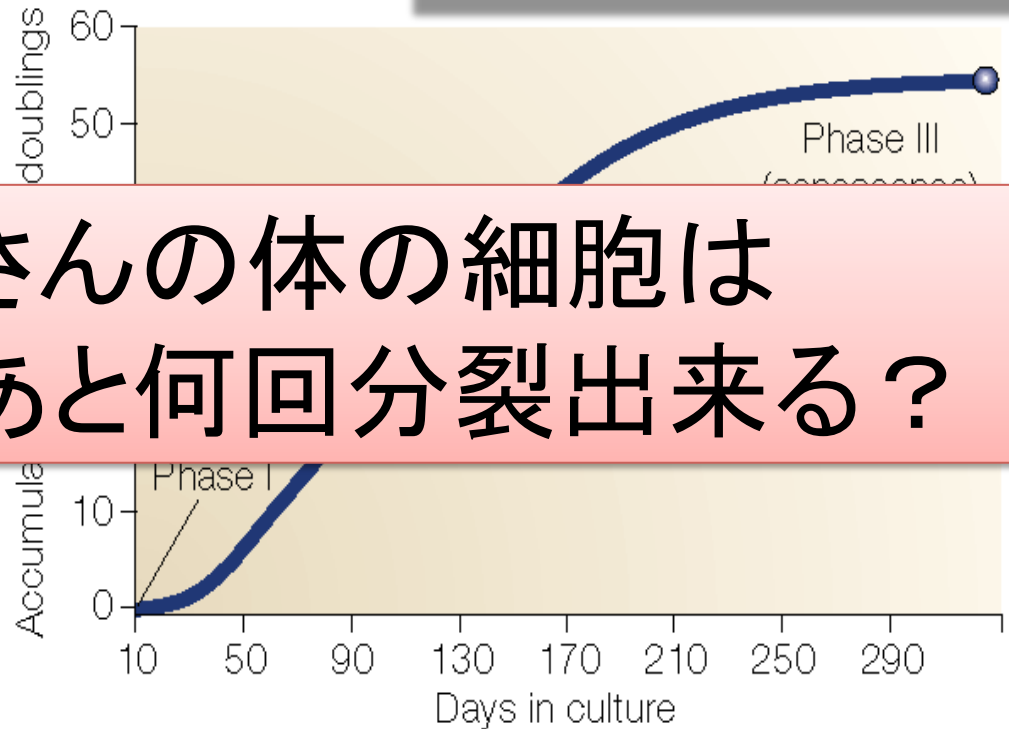
L. HAYFLICK and P. S. MOORHEAD

Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, Pa., U.S.A.

Received May 15, 1961

Hayflick limit (1965)

Hayflick限界



みなさんの体の細胞は平均してあと何回分裂出来る？

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

http://images.the-scientist.com/content/figures/images/yr1997/may/may_art/hayflick.jpg

知っている？

ヒト培養細胞は50回ほどで分裂停止。
個々の細胞にも寿命がある？
分裂停止=寿命？

人間の体の細胞数は？

60兆個？

(10^{13-14} = おおよそ 2^{46})

平均分裂回数 47回

回数の余裕はあと数回？



Hayflick limit (1965)

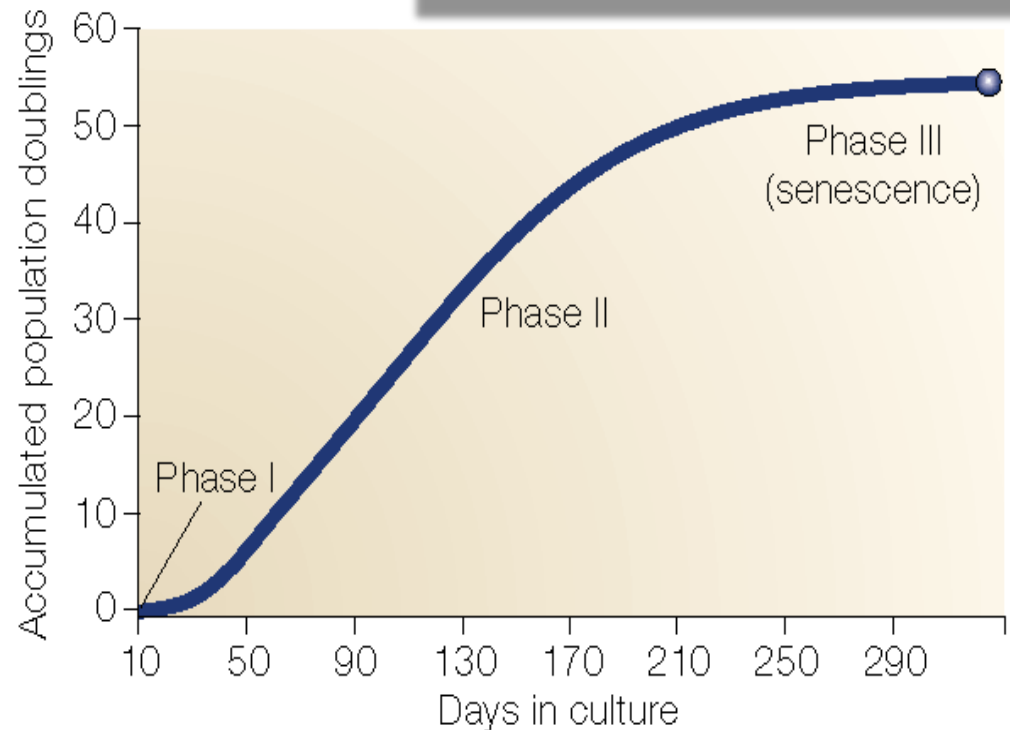
Hayflick限界

THE SERIAL CULTIVATION OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS¹

L. HAYFLICK and P. S. MOORHEAD

Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, Pa., U.S.A.

Received May 15, 1961



http://images.the-scientist.com/content/figures/images/yr1997/may/may_art/hayflick.jpg

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

ヒト培養細胞は50回ほどで分裂停止。

個々の細胞にも寿命がある？

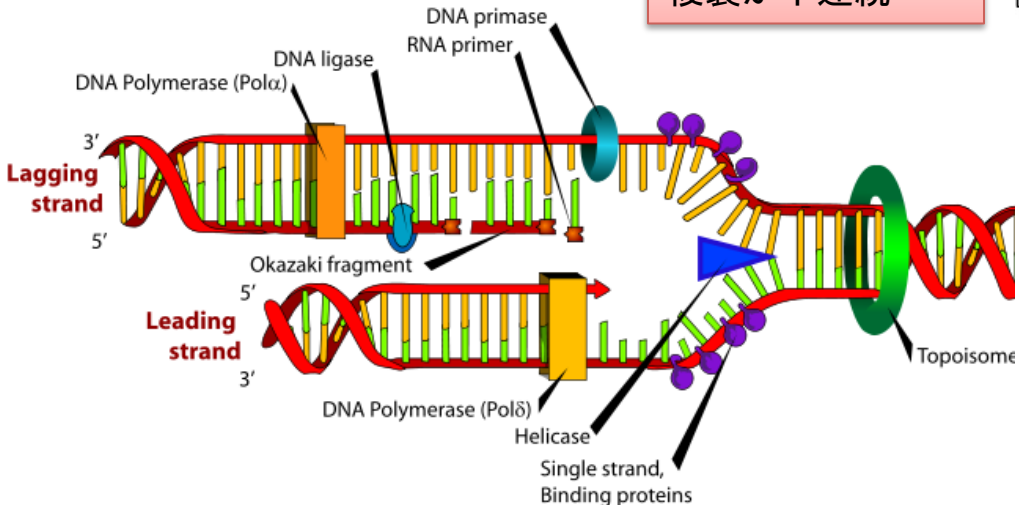
分裂停止=寿命？

どうして50回で分裂は停止するのか？

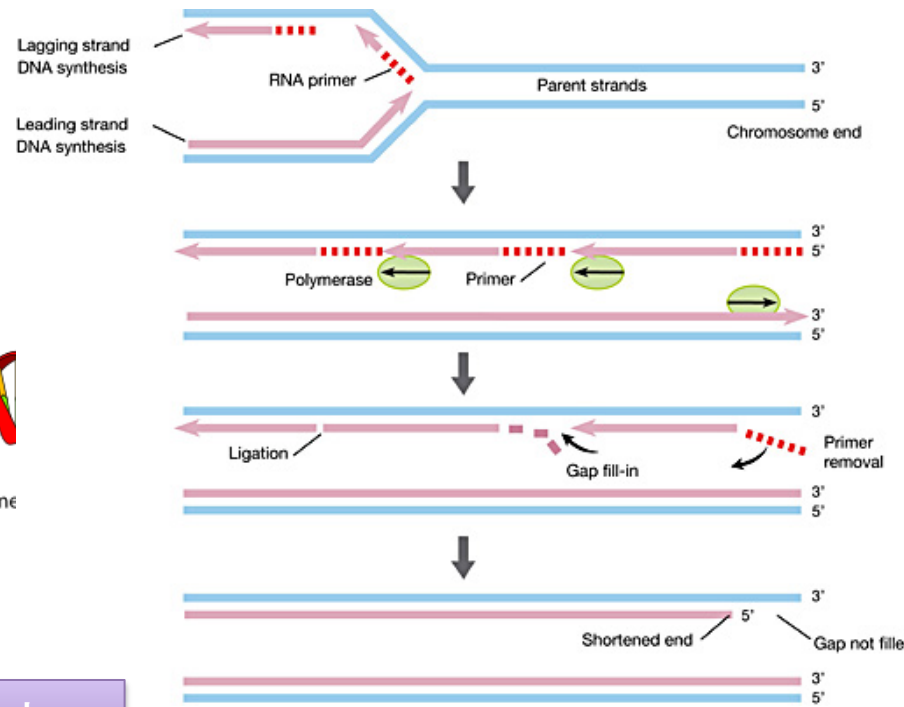
DNA複製の機構を 考えると....

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8f/DNA_replication_en.svg

片方のDNA鎖では複製が不連続



染色体の末端で片鎖の複製が不完全



<http://telomereinformation.com/images/imgNoblePrizeFig1.jpg>

“End Replication Problem”

DNA複製の度に染色体が短くなる!



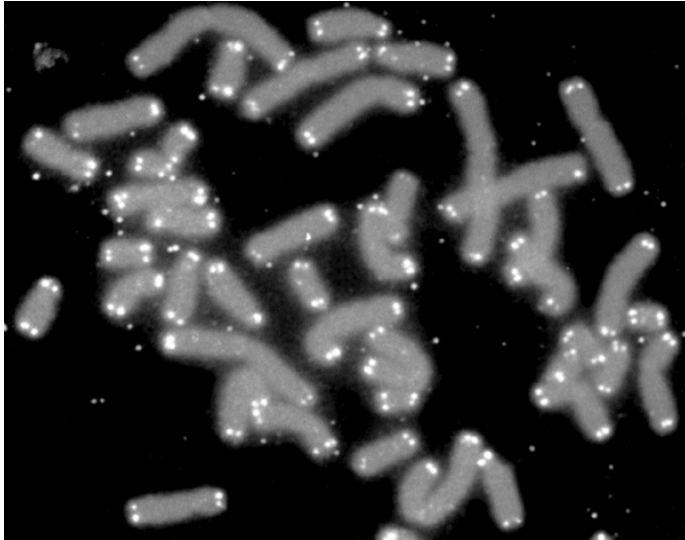
「岡崎フラグメント」
(100-200塩基)

Reiji and Tsuneko Okazaki

The telomere theory

老化のテロメア仮説

年齢とともに
テロメアが短く

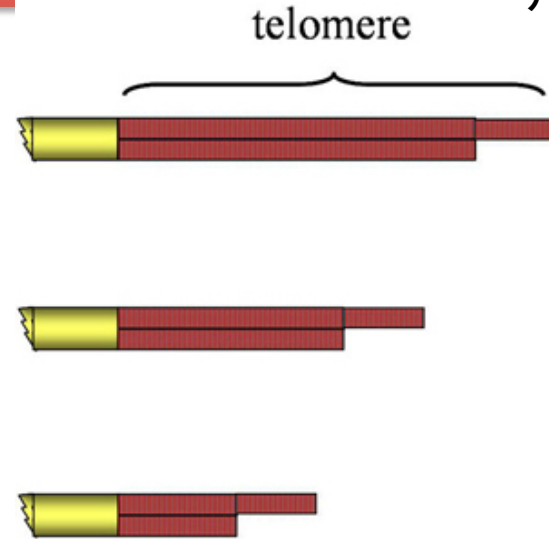


https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4a/Telomere_caps.gif

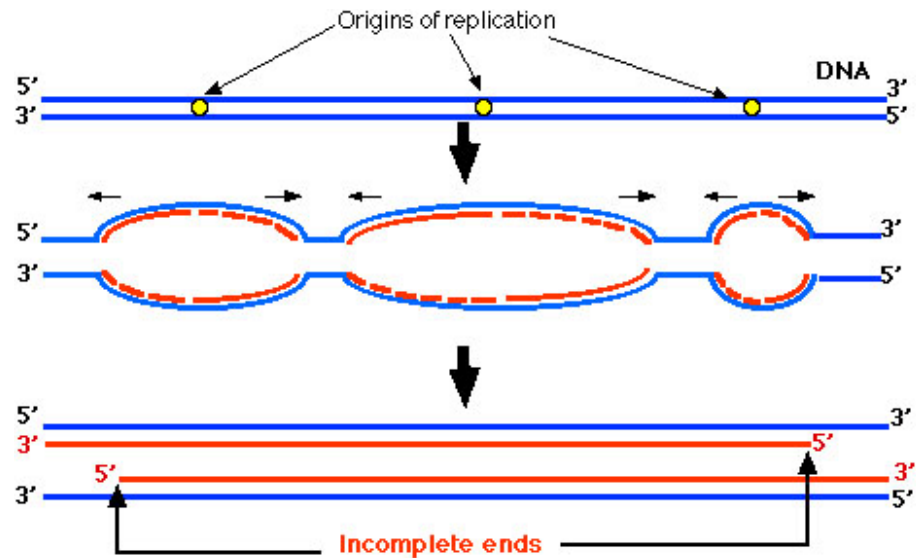
テロメア: 染色体末端の構造

染色体は複製の度、短くなる.

今日の重要概念 4



http://bioenv.gu.se/digitalAssets/1311/1311740_bpop_telomeres_picture3.jpg



<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/T/telomere3.gif>

Hayflick limit (1965)

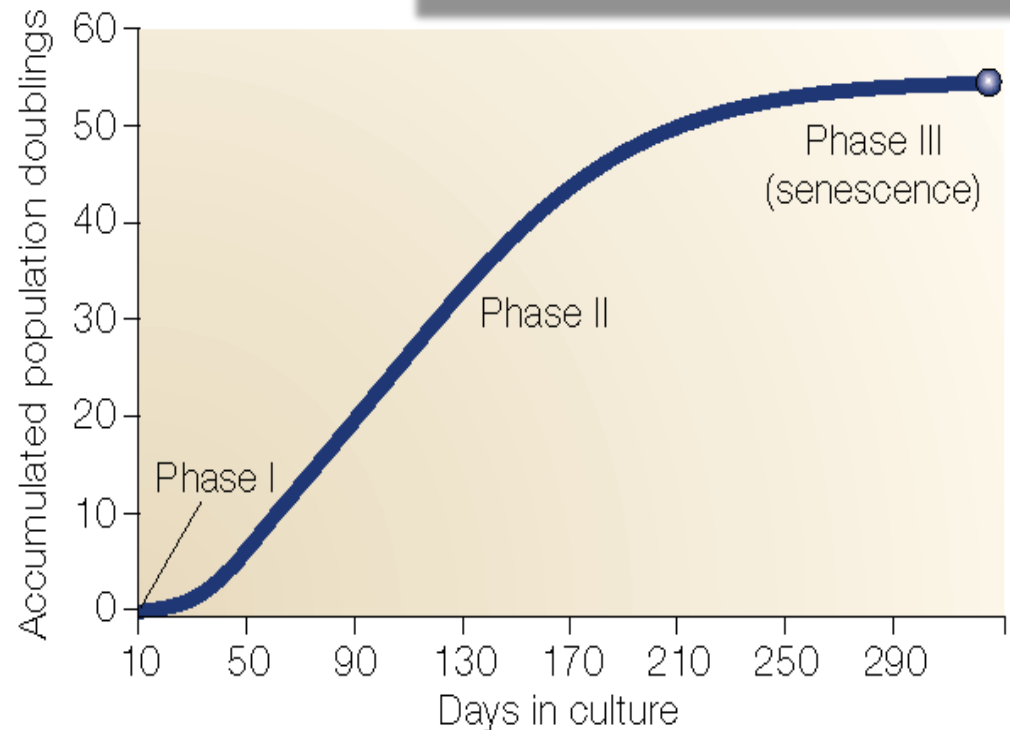
Hayflick限界

THE SERIAL CULTIVATION OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS¹

L. HAYFLICK and P. S. MOORHEAD

Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, Pa., U.S.A.

Received May 15, 1961



http://images.the-scientist.com/content/figures/images/yr1997/may/may_art/hayflick.jpg

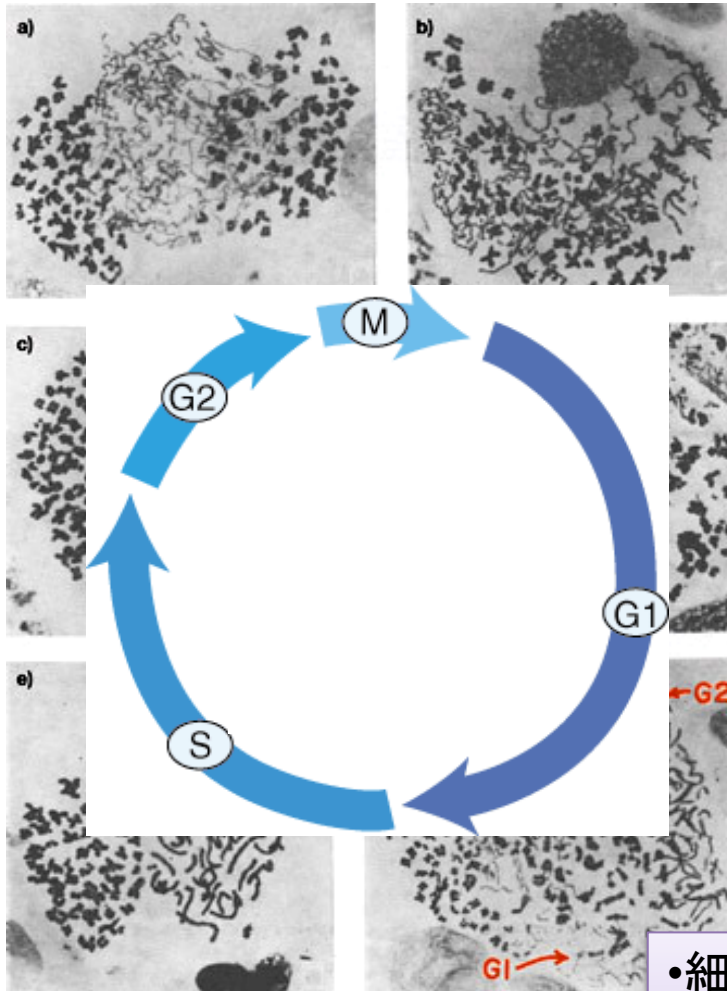
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

ヒト培養細胞は50回ほどで分裂停止。
個々の細胞にも寿命がある？
分裂停止=寿命？

どうして50回で分裂は停止するのか： テロメア仮説(染色体を安定させる末端(テロメア)が無くなる)

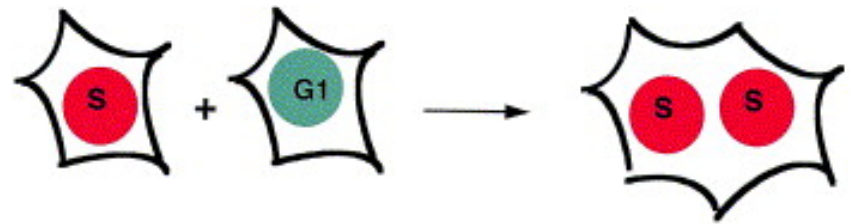
ここから別の話し...

細胞周期研究の先駆的な実験

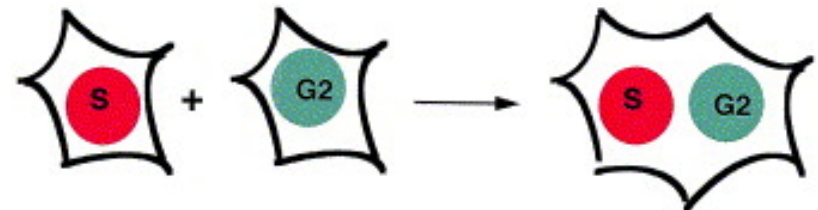


周期の異なる細胞を融合させると、細胞質中の因子が核に作用して位相を変更させる場合もあれば変更しない場合もある。

<http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S0304419X97000334-gr1.jpg>



法則性ある？



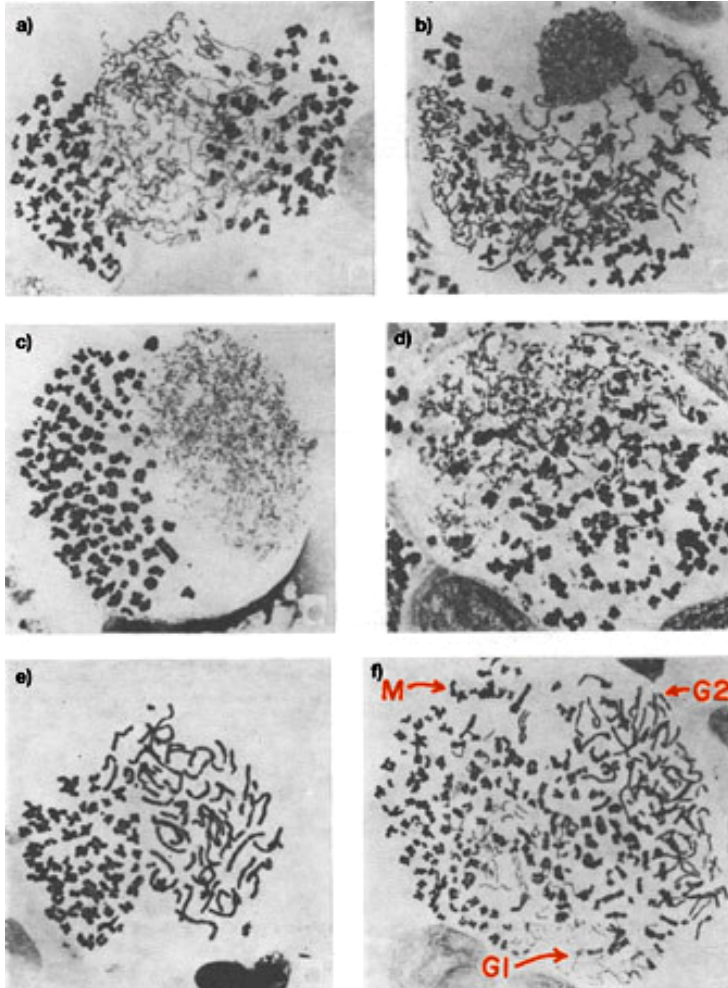
Johnson, R.T. & Rao, P.N., Mammalian Cell Fusion: Induction of Premature Chromosome Condensation in Interphase Nuclei.

Nature 226, 717-722 (1970)

- 細胞質中の核に作用する制御因子の存在が示唆
- S期の細胞質はG1期の核をS期に進める。
- G2期の細胞質はS期の核をG2期に進められない。

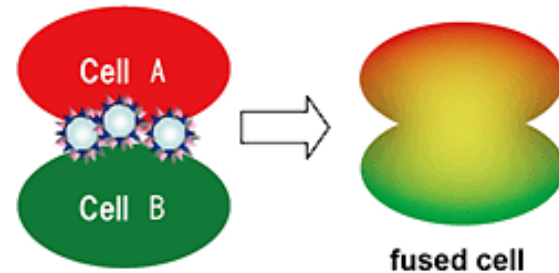
細胞周期研究の先駆的な実験

周期の異なる細胞を融合させると、細胞質中の因子が核に作用して位相を変更させる場合もあれば変更しない場合もある。



細胞融合

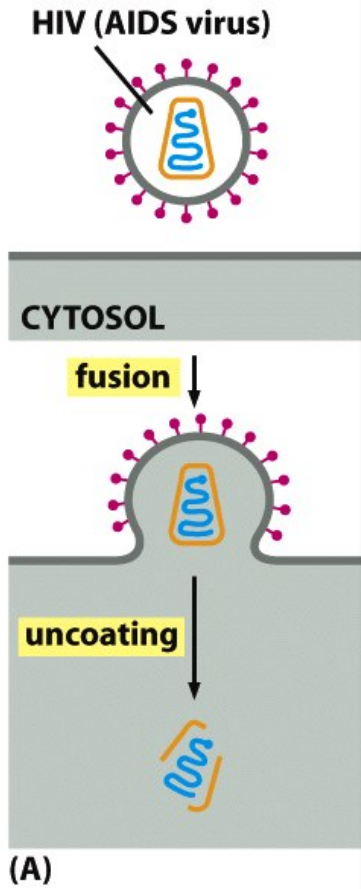
http://www.cosmobio.co.jp/export_e/products/cells/products_ISK_20070518/CF_02.gif



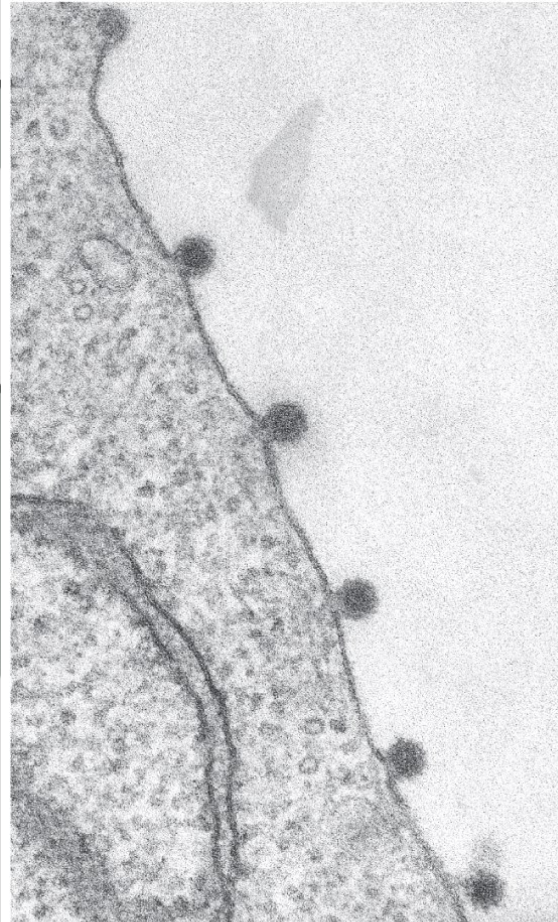
ウイルスやPEG(polyethylene glycol)で処理すると融合が誘導される。一部のウイルスはそもそも細胞融合で感染。PEGの作用機構は不明。

Johnson, R.T. & Rao, P.N., Mammalian Cell Fusion: Induction of Premature Chromosome Condensation in Interphase Nuclei. *Nature* 226, 717–722 (1970)

ウイルスはどうやって 細胞融合を引き起こす？

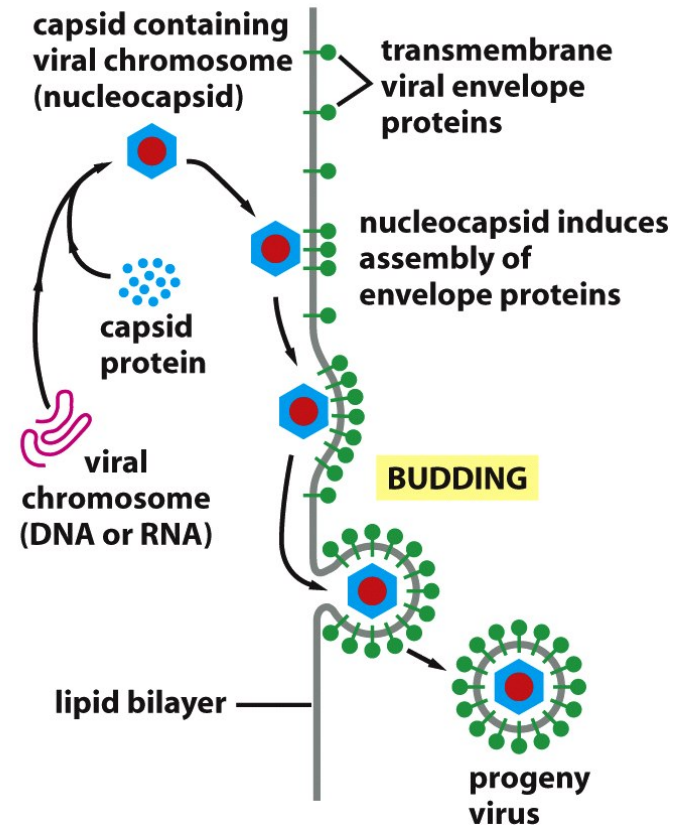


MBoC 1506頁



(A)

100 nm



(B)

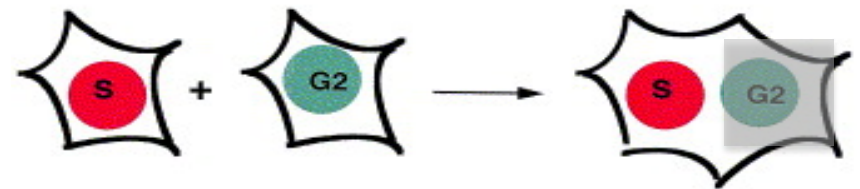
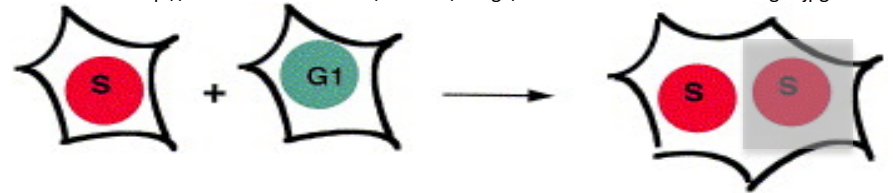
MBoC 1497頁

細胞周期研究の先駆的な実験

- A. **S期**の細胞と**G1期**の細胞を融合させるとG1期の核でDNA複製が誘導される。
- B. しかし、**S期**の細胞と**G2期**の細胞を融合させるとG2期の核で2回目のDNA複製は誘導されない。
- C. **S期**の細胞と**G2期**の細胞を融合させるとG2期の核の**M期**への進行が阻害される。

現象を整理しよう

<http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S0304419X97000334-gr1.jpg>



G1 → S → G2 → M → G1



M

Johnson, R.T. & Rao, P.N., Mammalian Cell Fusion: Induction of Premature Chromosome Condensation in Interphase Nuclei. *Nature* 226, 717–722 (1970)

細胞周期研究の先駆的な実験

- (i) S期の細胞にはG1期の細胞のDNA複製を誘導する細胞質因子がある。

Licensing Factor

- (ii) G1期の細胞はDNA複製ができるけど、G2期の細胞はDNA複製ができない。

再複製防止機構

- (iii) S期の細胞にはG2期の細胞のM期への進行を防ぐ細胞質因子がある。

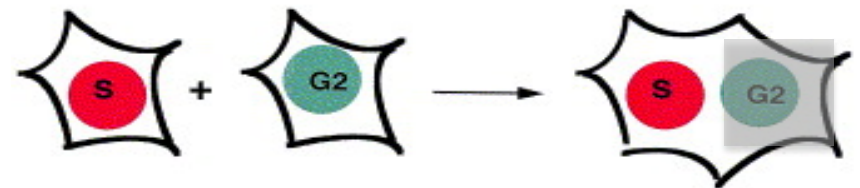
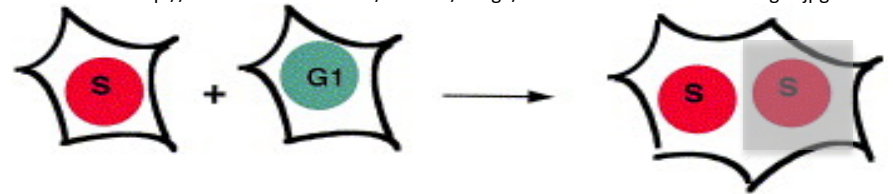
Check Point機構

- (iv) G2期の細胞はM期を経るとDNA複製が誘導可能になる。

リセット機構

わかったことを整理しよう

<http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S0304419X97000334-gr1.jpg>



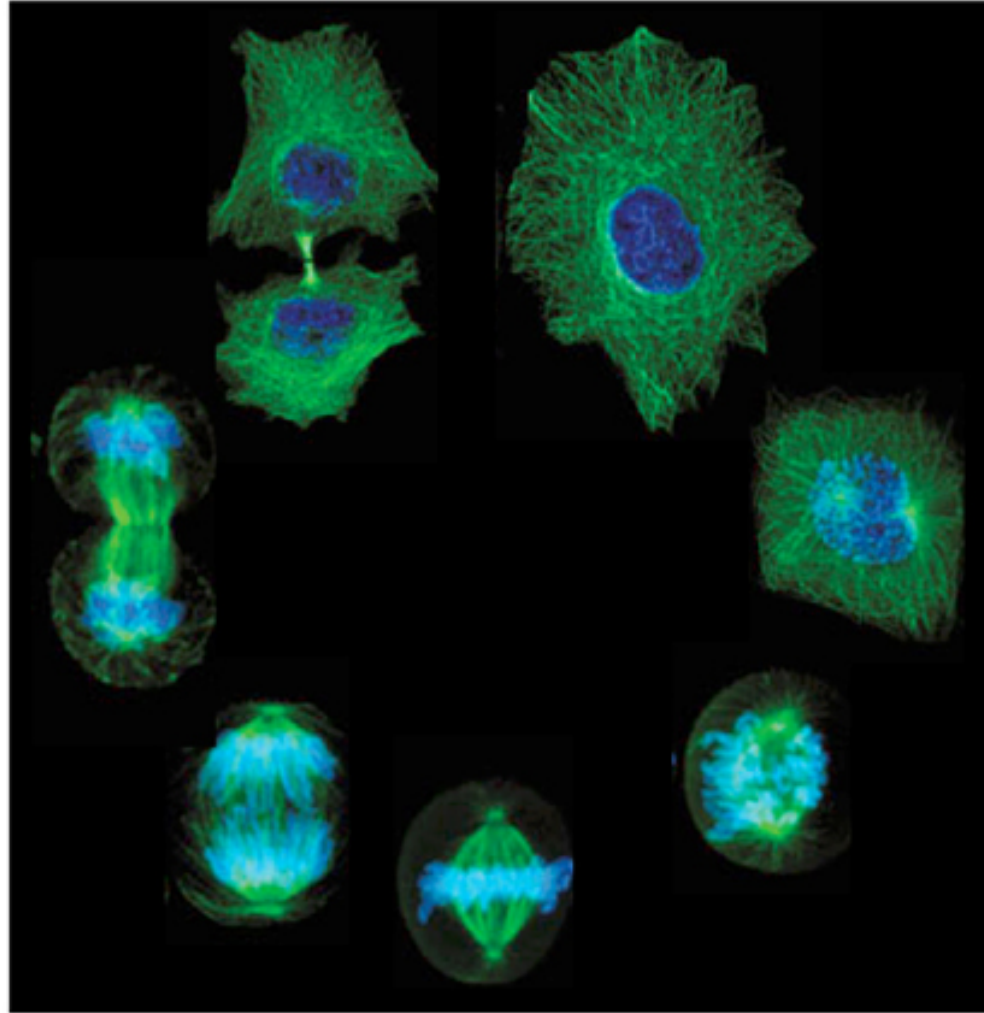
来週以降解説



M

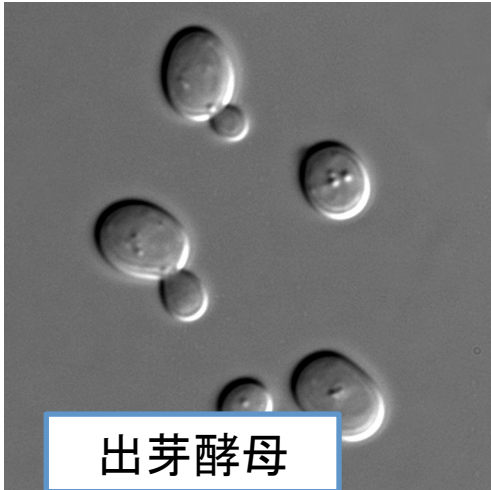
Johnson, R.T. & Rao, P.N., Mammalian Cell Fusion: Induction of Premature Chromosome Condensation in Interphase Nuclei. *Nature* 226, 717-722 (1970)

細胞周期の研究手法



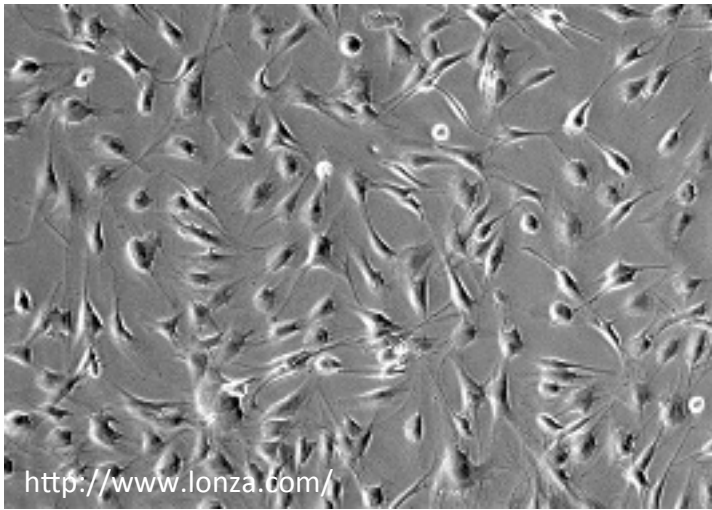
Cyclin と Cdk の発見

細胞周期の研究には様々な実験材料が使われる



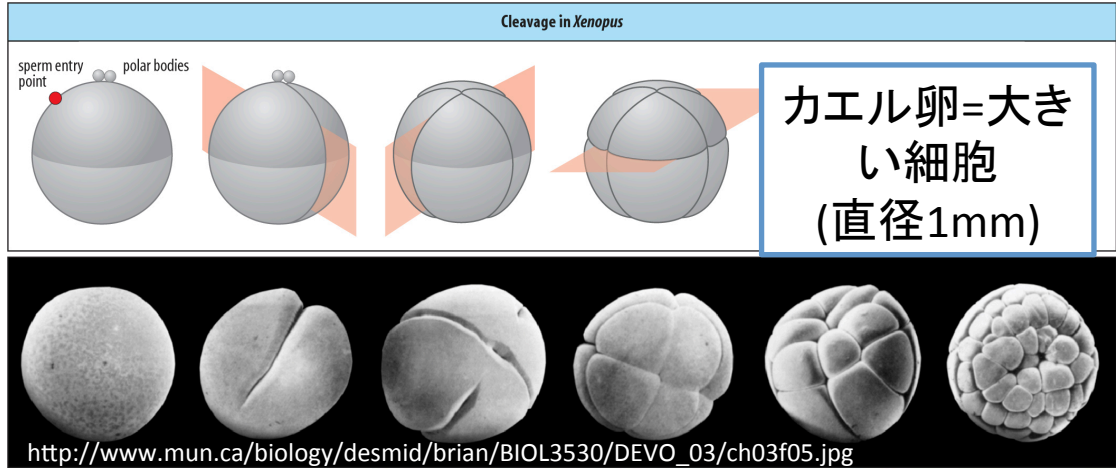
出芽酵母

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d9/S_cerevisiae_under_DIC_microscopy.jpg



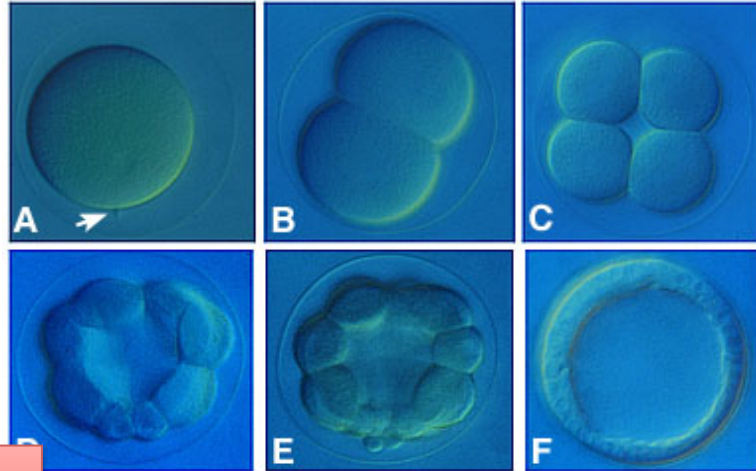
<http://www.lonza.com/>

培養細胞



カエル卵=大きい細胞
(直径1mm)

http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f05.jpg

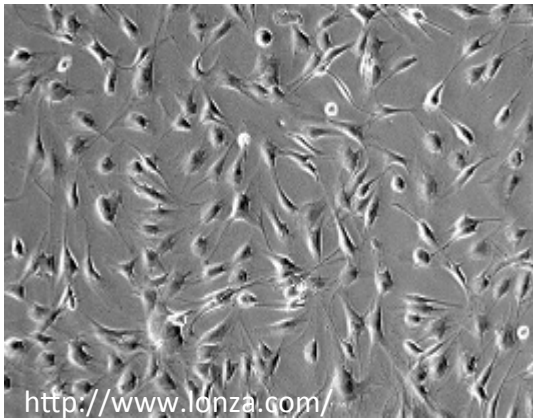
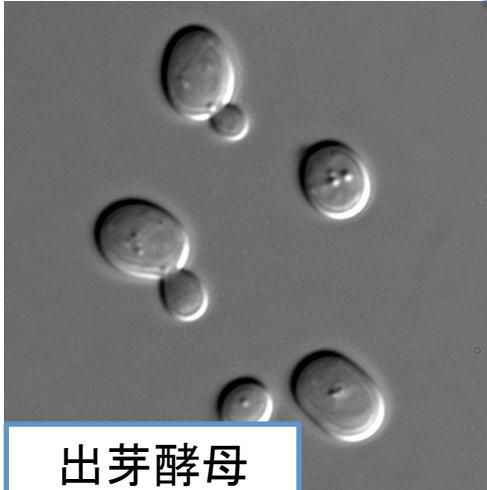


細胞周期が同調した細胞が得られる材料が適している。

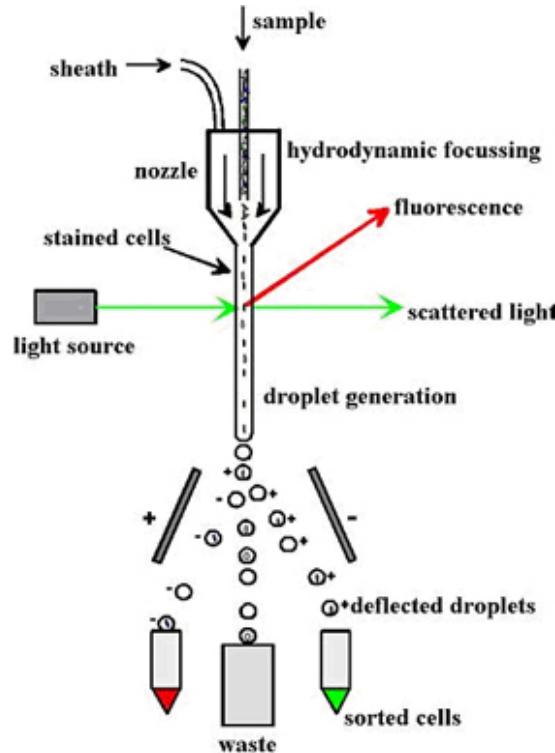
http://worms.zoology.wisc.edu/urchins/SUcleavage_montage.jpg

ウニ

フローサイトメーターで見た細胞周期

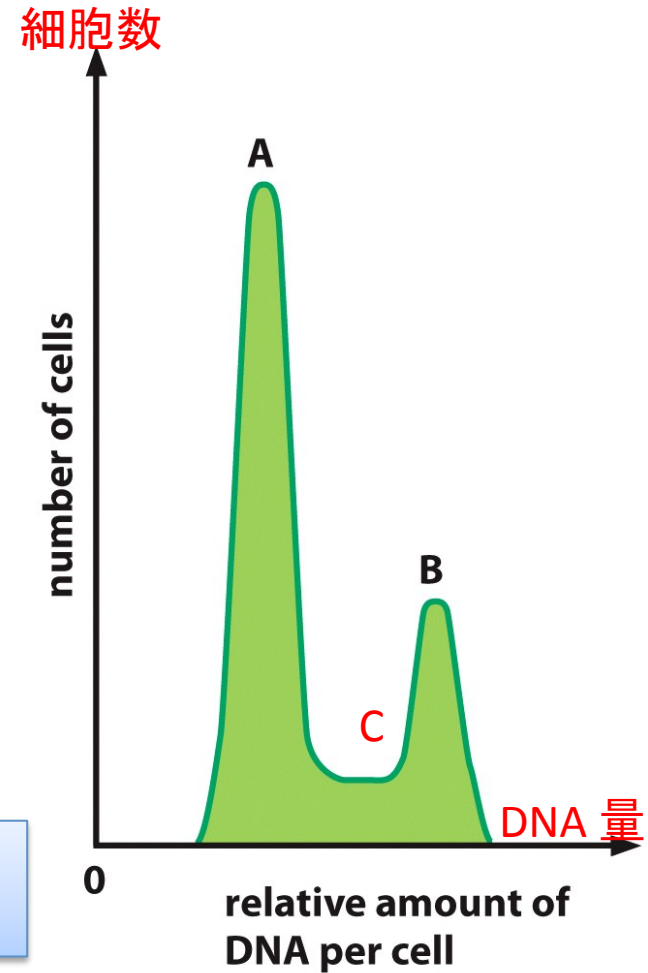


培養細胞



<http://www.abcam.com/ps/CMS/Images/Flow-Cytometry-how%20it%20works-Diagram.jpg>

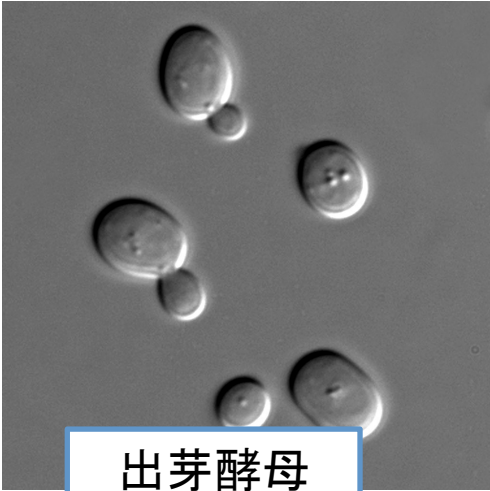
フローサイトメトリー/Cell Sorterの原理



Question 18-2 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

周期の揃ってない細胞を分別することが可能

細胞周期の研究には様々な実験材料が使われる



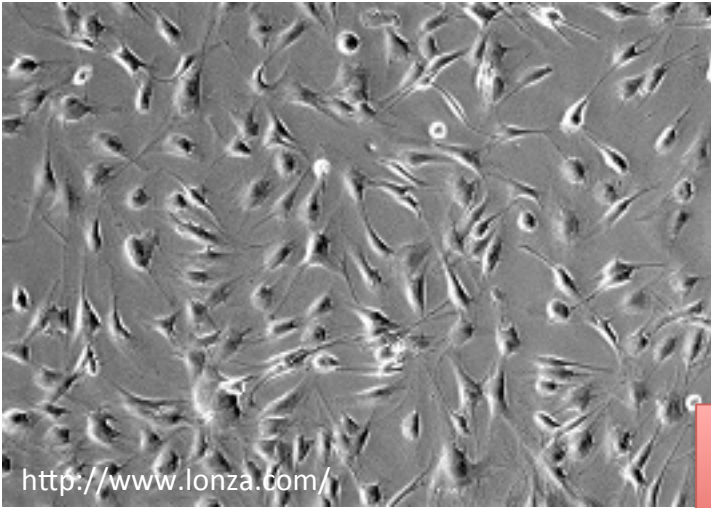
出芽酵母

Cleavage in *Xenopus*

sperm entry point polar bodies

カエル卵=大きい細胞 (直径1mm)

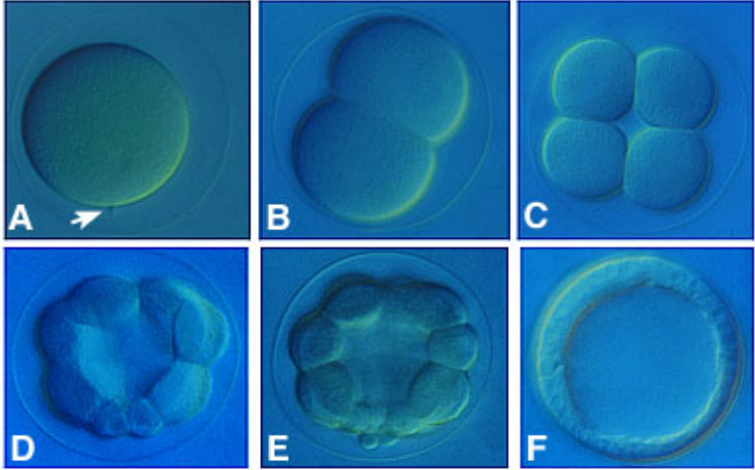
http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f05.jpg



<http://www.lonza.com/>

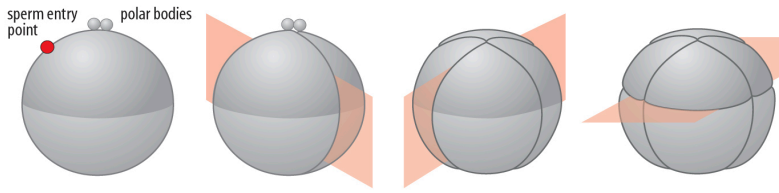
培養細胞

細胞周期が同調した細胞が得られる材料が適している。



SUcleavage_montage.jpg
http://worms.zoology.wisc.edu/urchins/SUcleavage_montage.jpg

ウニ

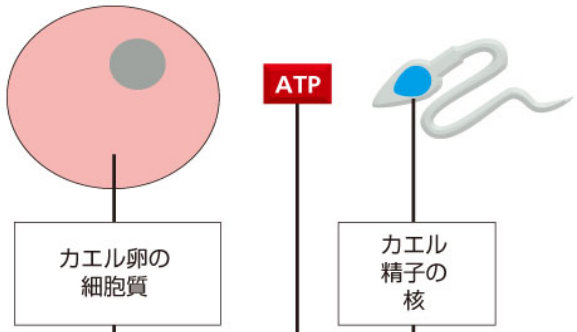


カエル卵=大きい細胞
(直径1mm)

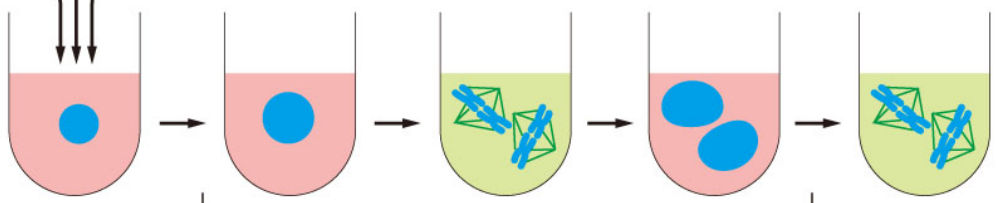


http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f05.jpg

アフリカツメガエル卵は細胞周期が同調する巨大細胞



カエル卵細胞質をつかって in vitro (試験管内) で細胞周期を再現することが可能。



無細胞系の有糸分裂周期：40~60分



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/83/Xenopus_laevis_1.jpg

生化学的な解析(精製実験など)に適している。

Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes¹

YOSHIO MASUI² AND CLEMENT L. MARKERT
Department of Biology, Yale University, New Haven, Connecticut 06520

ABSTRACT Fully grown oocytes of the frog (*Rana pipiens*) undergo cytoplasmic and nuclear maturation when treated with progesterone after the follicular envelopes have been removed. The mechanism of this maturation was investigated by injection of cytoplasm from progesterone-treated oocytes at various stages of maturation into fully grown but immature oocytes. The injected cytoplasm becomes effective in inducing maturation by 12 hours after progesterone administration, reaches a maximum effectiveness around 20 hours, and then declines after the donor oocytes complete maturation. However, even cytoplasm from early embryos retains some capacity to induce oocyte maturation. The frequency with which maturation is induced is proportional to the volume of the injected cytoplasm. Progesterone itself is not directly responsible for the maturation-producing effect of injected cytoplasm since injected progesterone does not promote maturation. However, externally applied progesterone does induce the completion of the first meiotic division, presumably by releasing a cytoplasmic "maturation promoting factor." The production of this cytoplasmic factor was not affected by removal of the nucleus.

After completion of the first meiotic division, oocytes cease further development at the metaphase of the second meiotic division, where they remain until fertilized or activated to develop. Cytoplasm from such secondary oocytes when injected into one of the blastomeres at the two-cell stage of development suppresses mitosis as well as cleavage. Mitosis is usually arrested at metaphase. No such inhibition was brought about by injection of cytoplasm from cleaving blastomeres. Thus, the arrest of mitosis and cleavage can be attributed to a specific "cytostatic factor" in the cytoplasm of the secondary oocyte. Activation of donor secondary oocytes by insemination or pricking with a glass needle soon destroys the cytostatic factor. Likewise, addition of cortical cytoplasm to endoplasm from the secondary oocyte rapidly destroys the cytostatic capacity. This result implies that cortical material is involved in the process of removing the cytostatic factor at the time of normal activation or fertilization. Enucleation of oocytes demonstrated that production and removal of the cytostatic factor is independent of the nucleus.

Cytoplasmic control of nuclear activities during the mitotic cell cycle has been investigated by nuclear transplantation in amphibian eggs (Graham, '66; Graham et al., '66; Gurdon and Woodland, '68) and in protozoans (DeTerra, '60, '67; Goldstein and Prescott, '67) and by cell fusion in avian and mammalian cells (Harris, '67). The activity of a nucleus transferred into a cell at different stages of mitotic activity tends to conform to the state of the host cell. This nuclear behavior suggests a predominant role for the cytoplasm in regulating the mitotic activity of the nucleus.

A few observations also indicate that the cytoplasm may control the meiotic as well as the mitotic behavior of the nucleus. For example, the nuclei of spermatocytes and spermatids are synchronized in development, perhaps by means of the syncytial cytoplasmic bridges that link these cells (Fawcett, '61). Another example is provided by the behavior of sperm nuclei introduced into immature oocytes of sea urchins (Brachet, '22) and amphibians by precocious insemination

¹ This research was supported by NSF grant GB-5440X.

² Present Address: Department of Zoology, University of Toronto, Toronto 5, Ontario, Canada.



http://www.brh.co.jp/s_library/j_site/scientistweb/no25/img/face.jpg

1971年

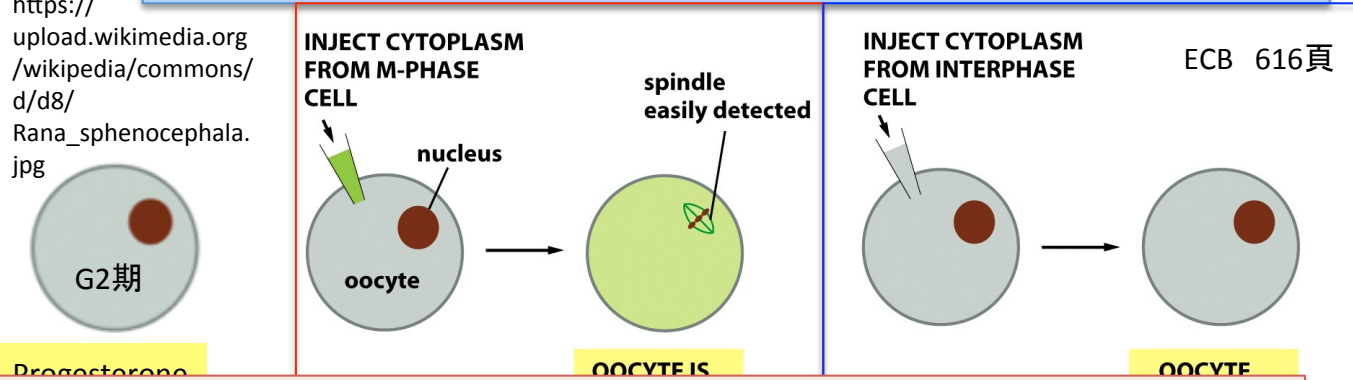


Rana pipiens
ヒョウガエル/
Common Frog

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d8/Rana_sphenocephala.jpg

MPF(Maturation Promoting Factor)の発見

1971年



皆さんが知っている中でこれと似た実験は何？

Figure 18-7 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

- 卵巣から抽出した未成熟卵をプロゲステロン(黄体ホルモン)処理すると、減数分裂途中まで細胞周期が進行して停止。
- M期の受精卵の細胞質を微量注射すると有糸分裂(減数分裂)が誘導される。
- 間期の受精卵の細胞質を注射しても効果無し

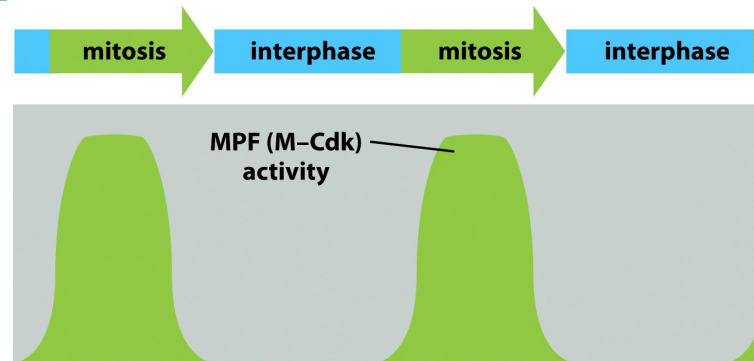


Figure 18-8 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

細胞周期に依存した活性

卵成熟の減数分裂に限らず、一般に有糸分裂を誘導させることが判明

精製が試みられた(当然)

http://www.brh.co.jp/s_library/j_site/scientistweb/no25/img/face.jpg



Yoshio Masui 増井 禎夫
京大出身

1971当時Yale大学

後にToronto大学(カナダ) ECB 616頁

Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes ¹

YOSHIO MASUI ² AND CLEMENT L. MARKERT
Department of Biology, Yale University, New Haven, Connecticut 06520

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 85, pp. 3009-3013, May 1988
Cell Biology

Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events

(cell cycle/mitosis/protein phosphorylation)

MANFRED J. LOHKA*, MARIANNE K. HAYES†, AND JAMES L. MALLER

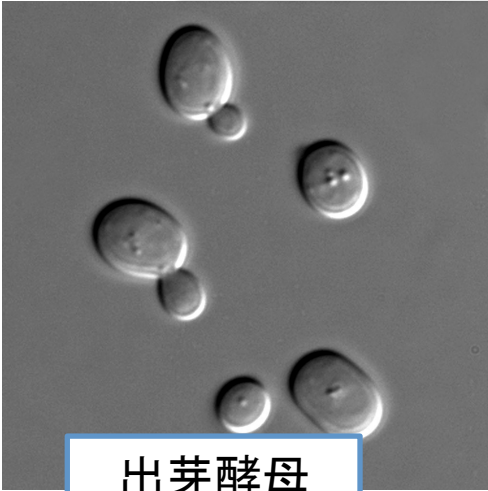
Department of Pharmacology, University of Colorado School of Medicine, Denver, CO 80262

Communicated by Raymond L. Erikson, December 22, 1987 (received for review October 10, 1987)

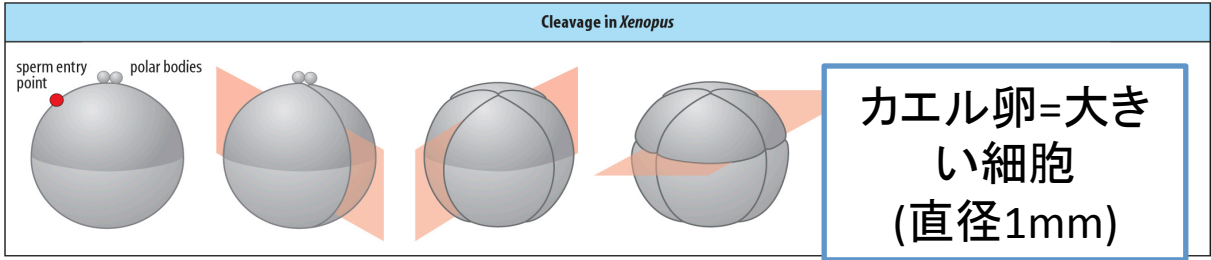
- MPFの発見は1971年。
- その精製は1988年（別の研究グループ）。
- その間に他の材料での研究が進展。

では、MPFはなんだったのか？

細胞周期の研究には様々な実験材料が使われる



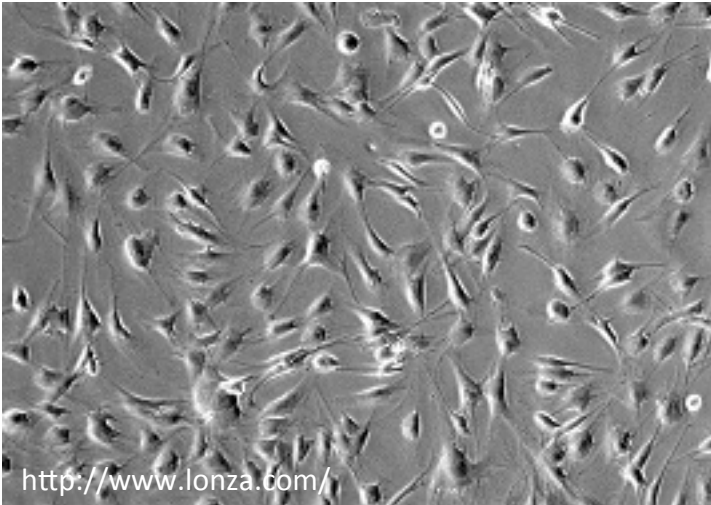
出芽酵母



カエル卵=大きい細胞
(直径1mm)



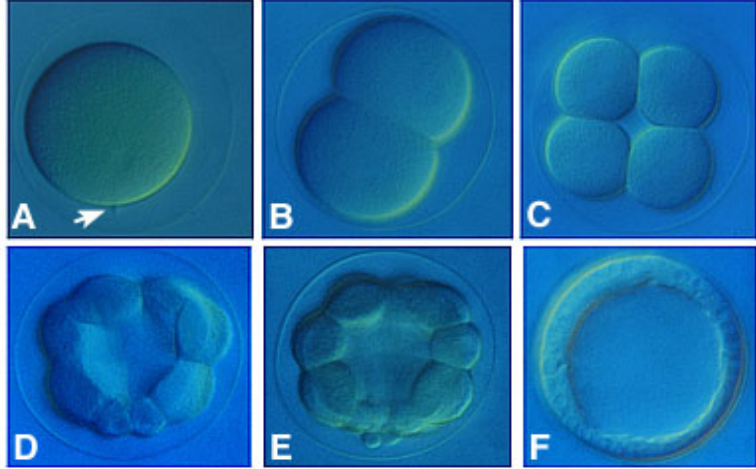
http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f05.jpg



<http://www.lonza.com/>

培養細胞

細胞周期が同調した細胞が得られる材料が適している。



http://worms.zoology.wisc.edu/urchins/SUcleavage_montage.jpg

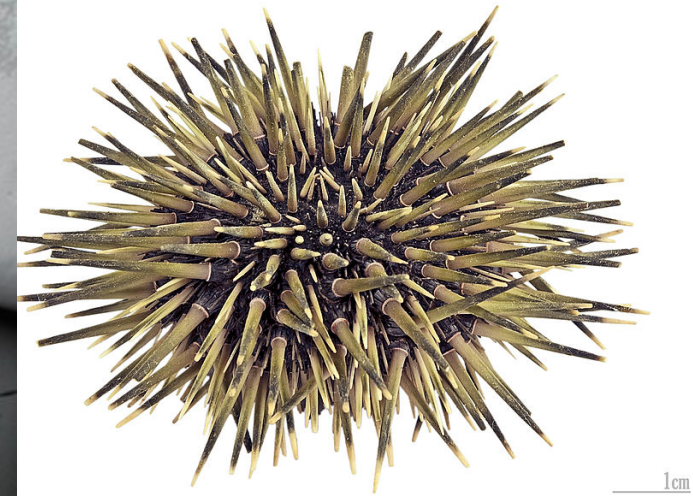
ウニ



KCl処理

http://www2s.biglobe.ne.jp/~nkazu/jugyou/image/uni_jusei/Resized800/s-DSCN0920.jpg

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Echinometra_mathaei_MHNT_Philippines.jpg

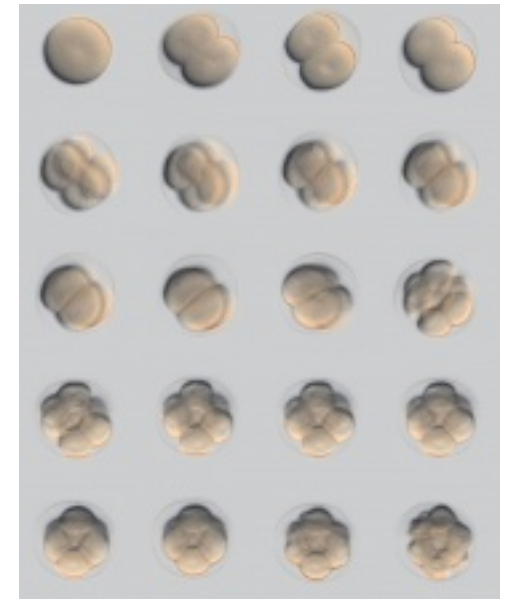


1cm

同調した細胞が簡単に得られる



https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/48/Sea_urchin_eggs.jpg



https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/images/b/b6/Sea_Urchin_early_embryo_cleavage_pattern.jpg

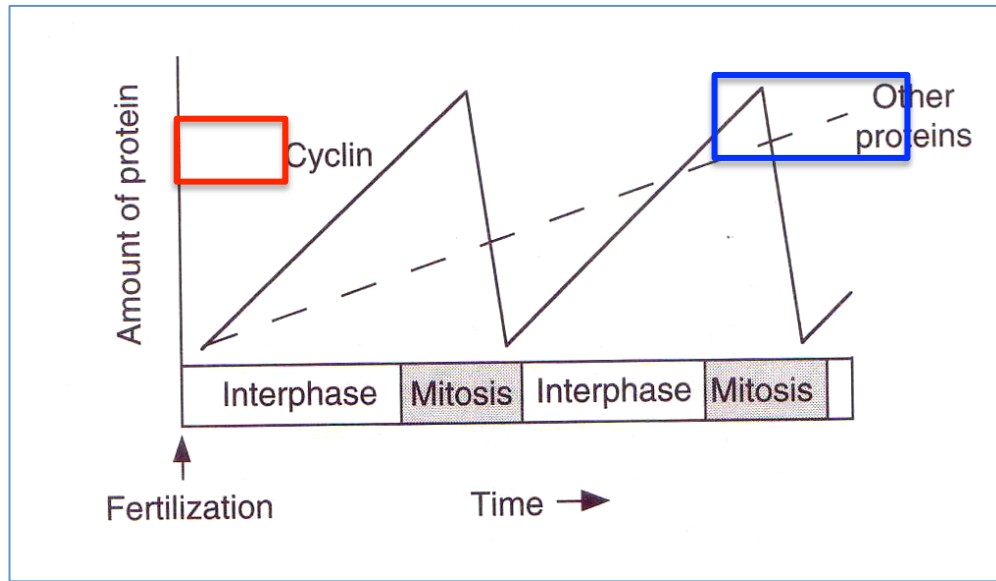


Tim Hunt



Wood's Hole 海洋学研究所

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Marine_Biological_Laboratory%2C_Woods_Hole_by_Pam_Wilmot.jpg



ウニで受精後に新規合成される蛋白質を調べたら、**一般の蛋白質**が徐々に増加するのに対し、細胞周期に依存して劇的に増減する蛋白質があった(**Cyclin**)。1983年

The Cell Cycle an Introduction 25頁

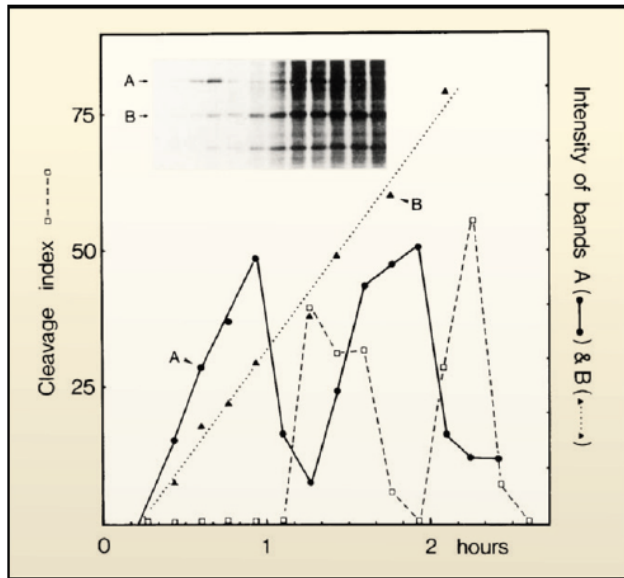
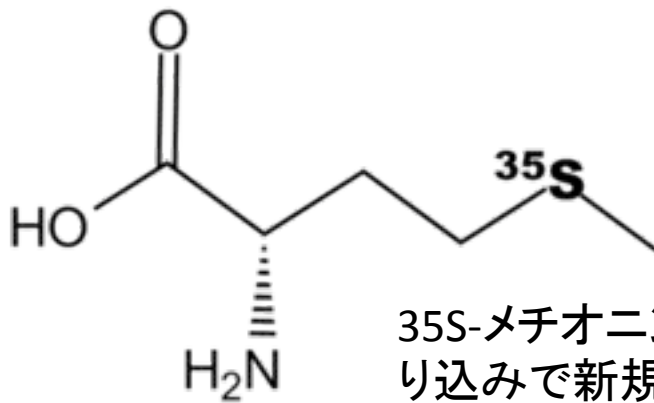
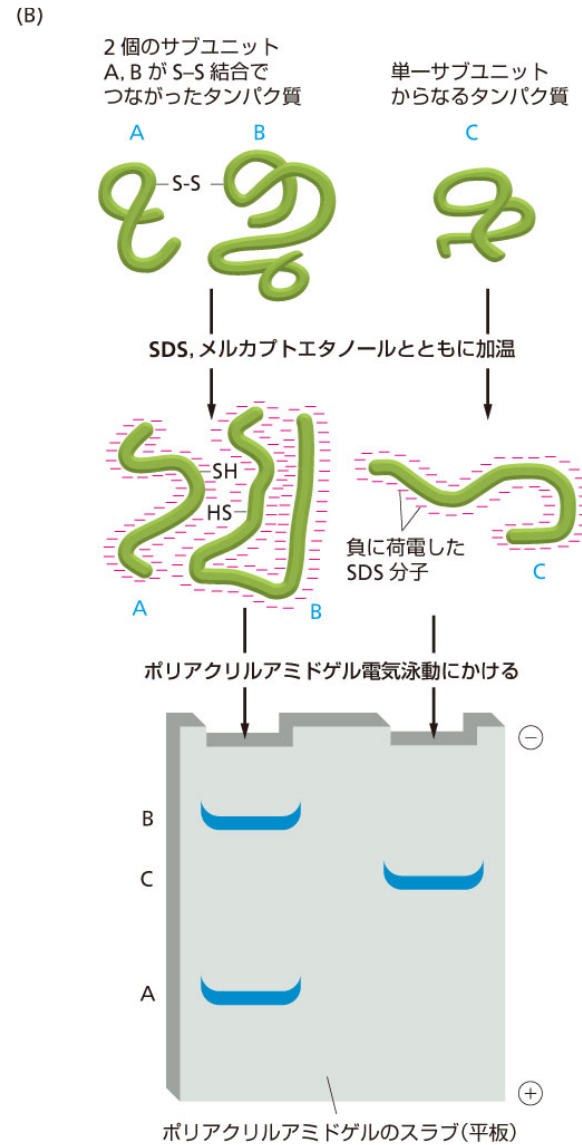
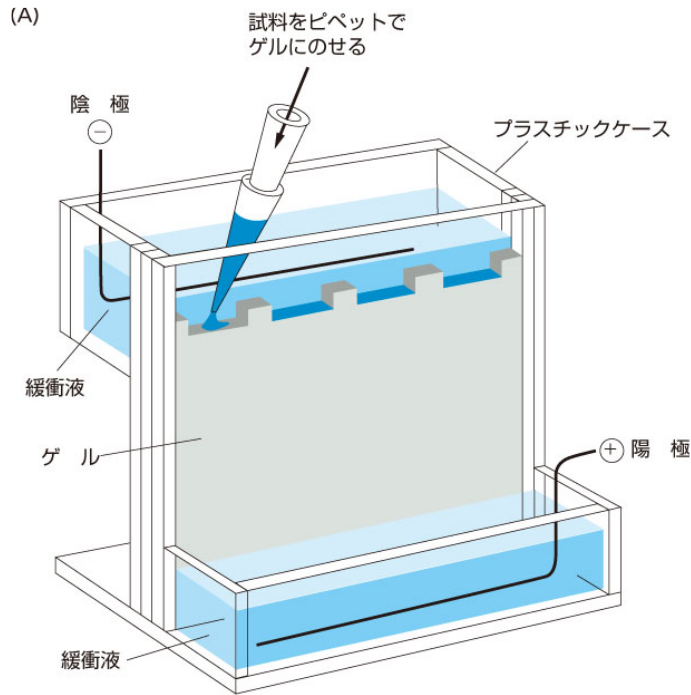


Figure 1. A Simple Experiment

[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(08\)00888-X](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(08)00888-X)

方法:放射性標識したアミノ酸を添加して蛋白質に取り込ませる事で新規合成された蛋白質を検出可能にし、ゲル電気泳動での分子量で識別。

SDS-PAGEで蛋白質を分子量に応じて展開



35S-メチオニンの取り込みで新規合成の蛋白質だけが放射性標識される。



Tim Hunt



Wood's Hole
海洋学研究所

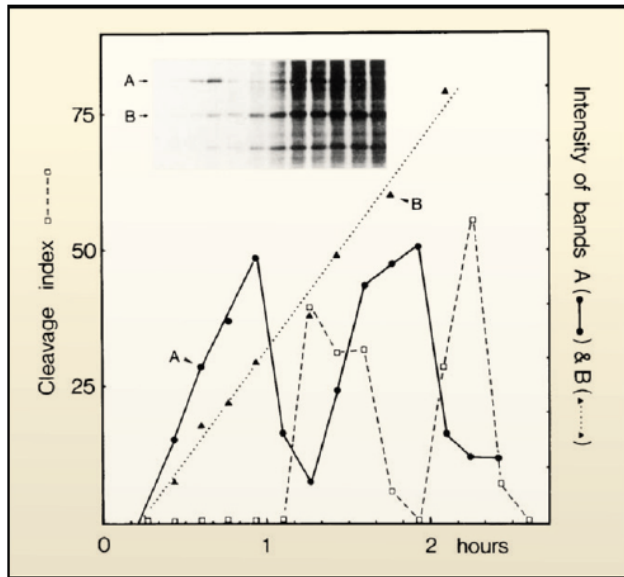
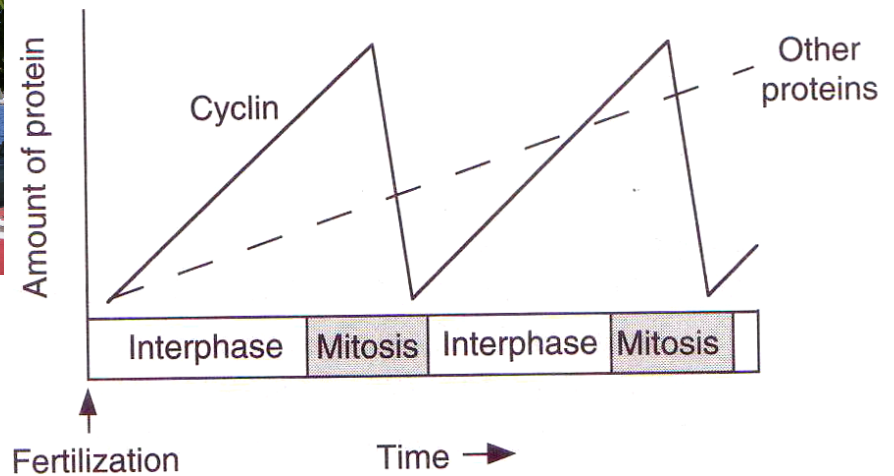


Figure 1. A Simple Experiment

[http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674\(08\)00888-X](http://www.cell.com/cell/abstract/S0092-8674(08)00888-X)

方法:放射性標識したアミノ酸を添加して蛋白質に取り込ませる事で新規合成された蛋白質を検出可能にし、ゲル電気泳動での分子量で識別。

ウニで受精後に新規合成される蛋白質を調べたら、一般の蛋白質が徐々に増加するのに対し、細胞周期に依存して劇的に増減する蛋白質があった(Cyclin)。1983年

Cell, Vol. 33, 389-396, June 1983, Copyright © 1983 by MIT

Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division

Tom Evans,* Eric T. Rosenthal,†
Jim Youngblom,‡ Dan Distel,§ and
Tim Hunt[¶]
Marine Biological Laboratory
Woods Hole, Massachusetts 02543



2001 生理医学賞

どうしてサイクリンと命名されたのか？

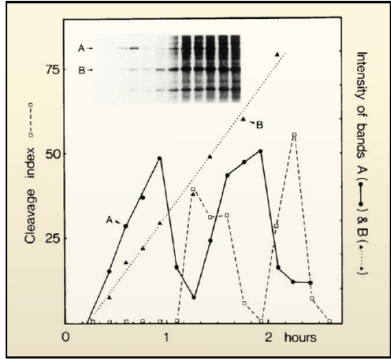
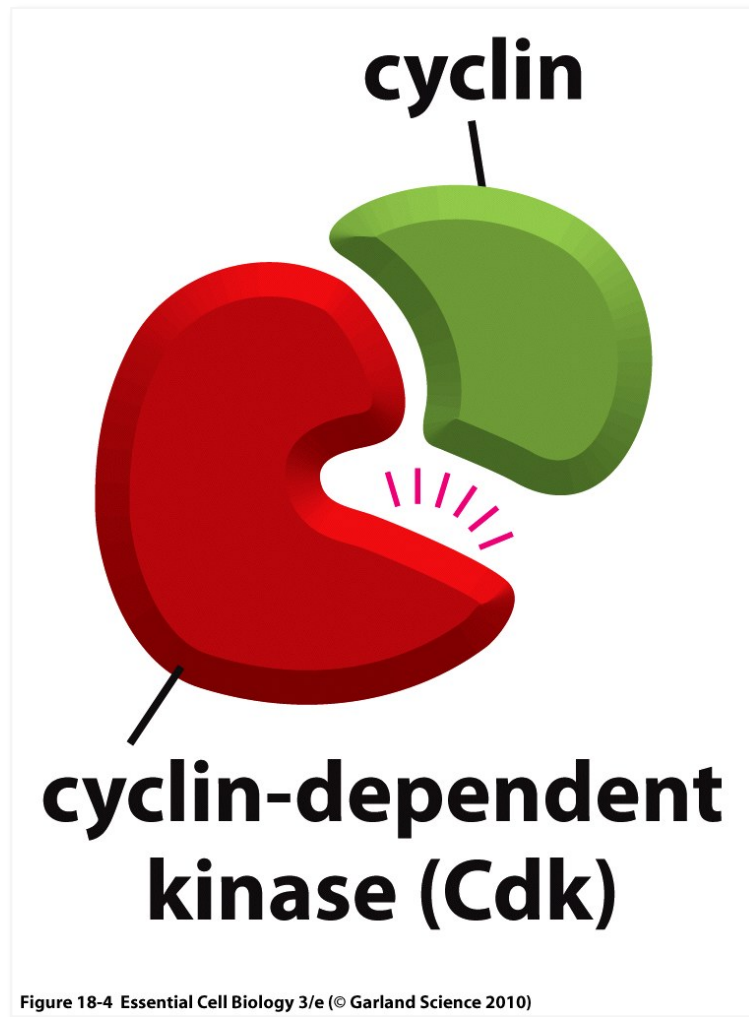


Figure 1. A Simple Experiment

"By the way the name cyclin, which I coined, was really a joke, it's because I like **cycling** so much at the time but they did come and go in the cell..."

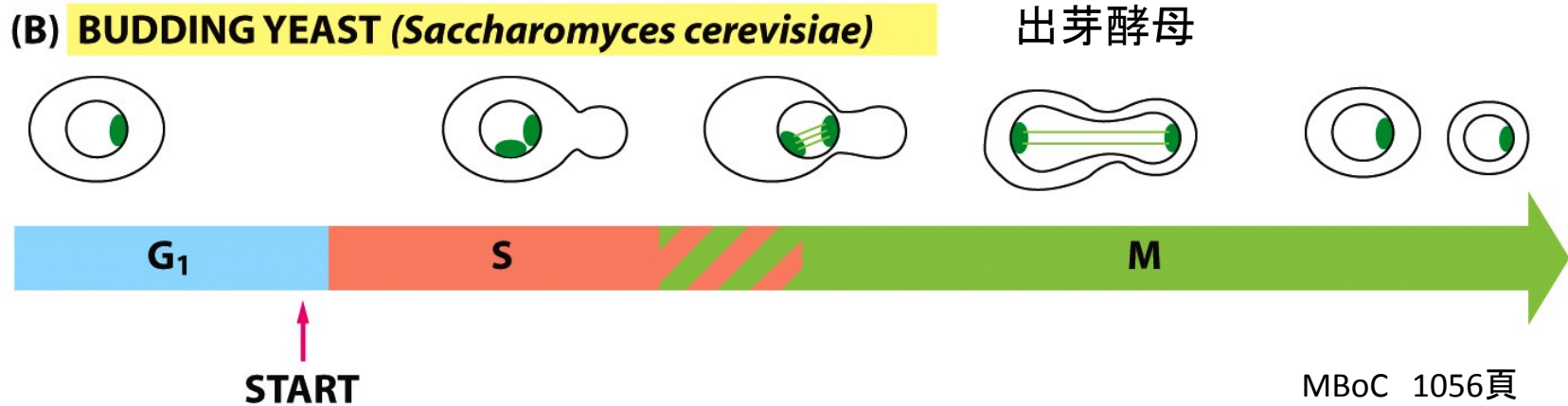
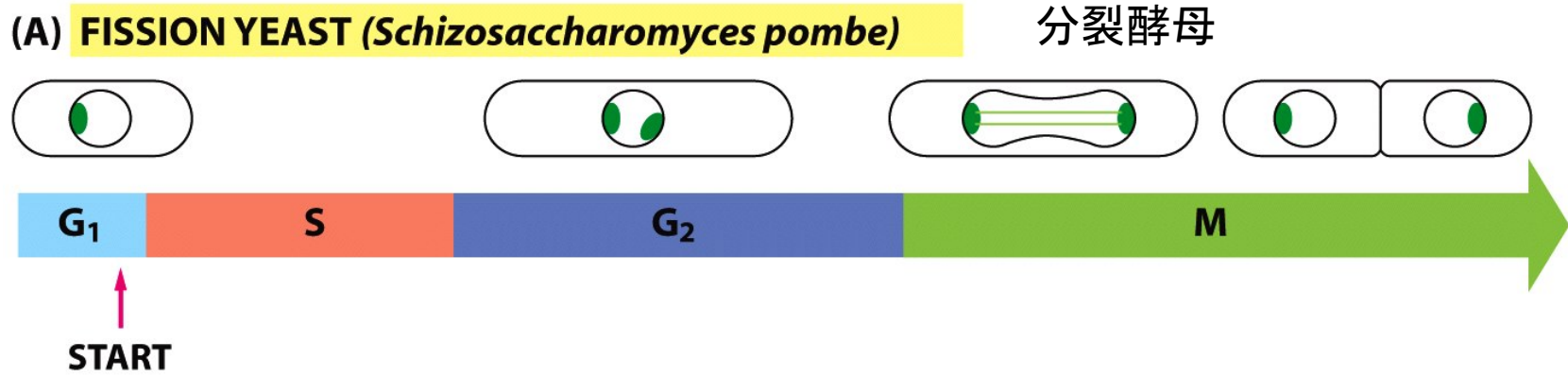


サイクリンは酵母で同定された Cdk1 に結合して制御



ECB 614頁

どうやってCdk は発見されたのか？

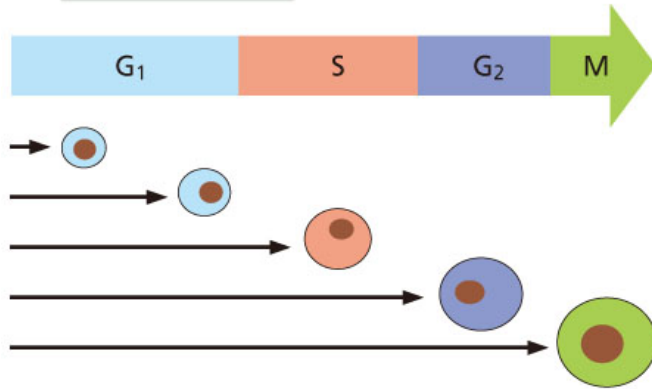


MBoC 1056頁

The size and shape of yeast indicate the phase of cell cycle
 酵母では細胞のサイズと形から細胞周期の位相がわかる。
 (possible with live cells/活きた細胞で可能)

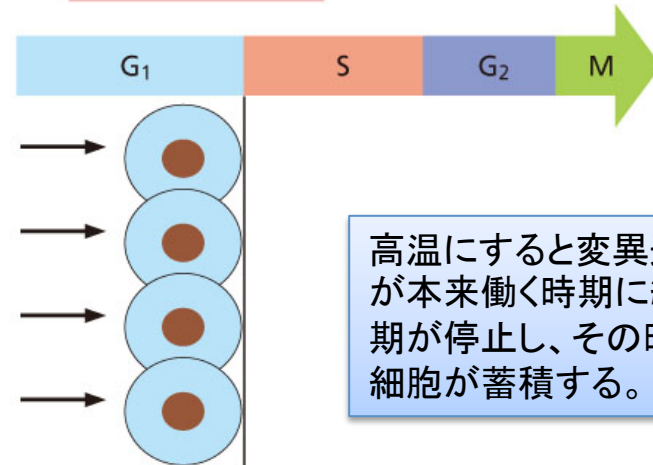
温度感受性変異という便利なもの(出芽酵母など)

(A) 許容温度(低温)



常温ではいろんな周期の細胞がある。

(B) 非許容温度(高温)

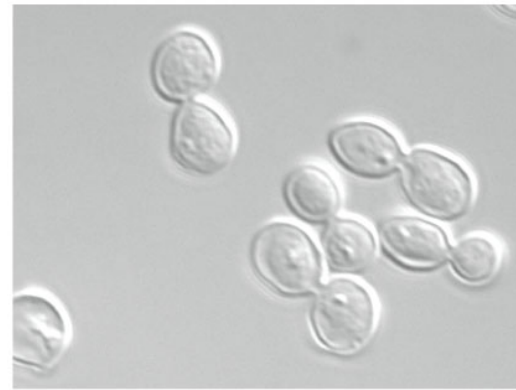


高温にすると変異遺伝子が本来働く時期に細胞周期が停止し、その時期の細胞が蓄積する。

MBoC 1057頁



(A)



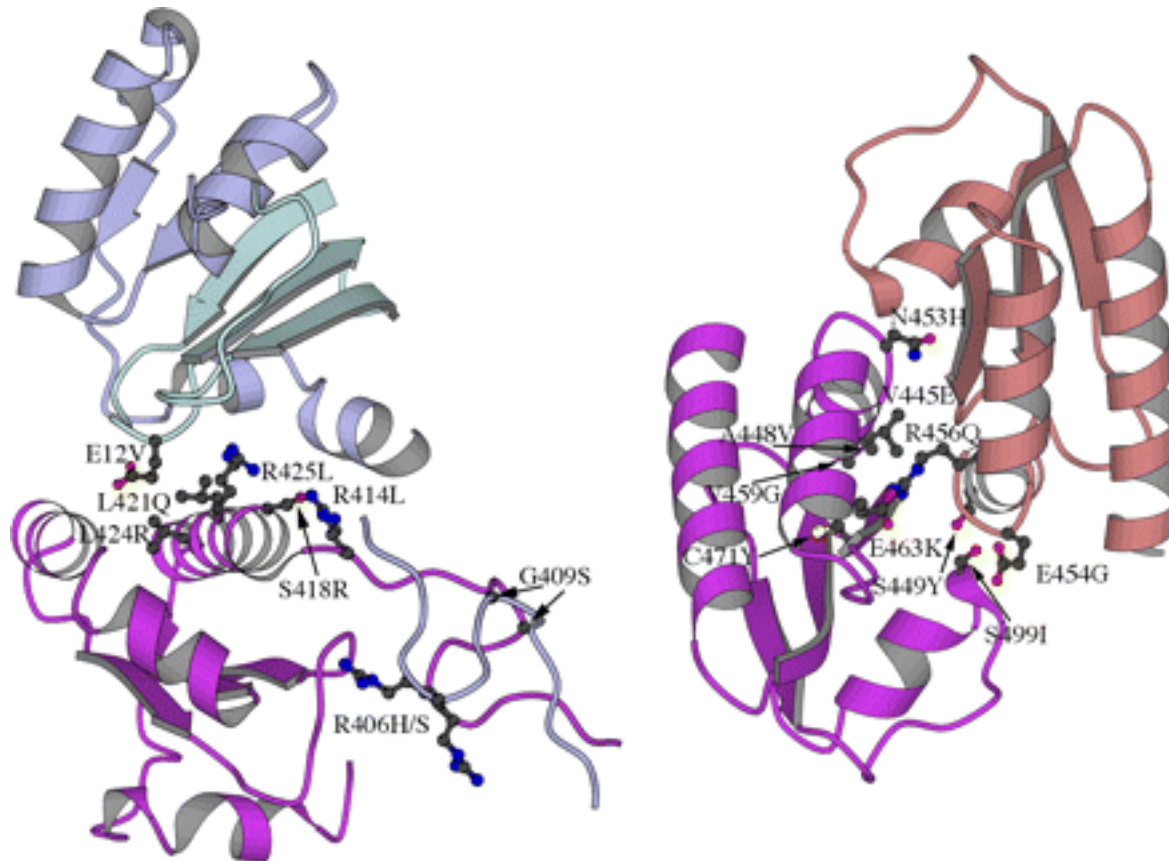
(B)

20 μm

低温に戻せば細胞周期は一斉に再開する。

温度制御で細胞周期を同調させられる。

温度感受性変異 (Temperature-sensitive mutations)の起きる原理



<http://jb.asm.org/content/193/23/6639/F3.large.jpg>

- 蛋白質は高次構造が機能に重要

- 高次構造は高温ほど不安定になる

- 高次構造維持に重要なアミノ酸の置換変異が起こると高温感受性になり易い

- 低温感受性よりも高温感受性変異が得やすい

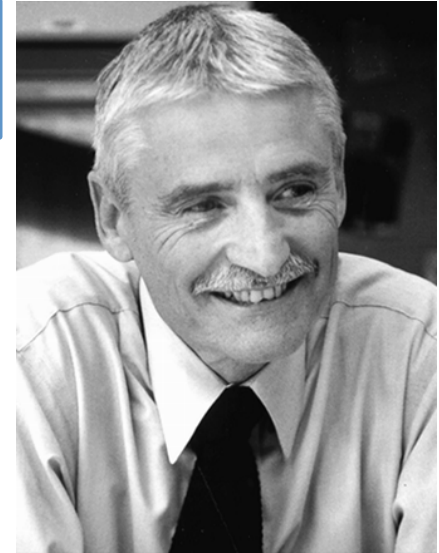
例: サルモネラ菌のRNaseEの温度感受性変異の変異箇所は同一蛋白質内の異なる領域が接触している箇所

今日の重要概念 4

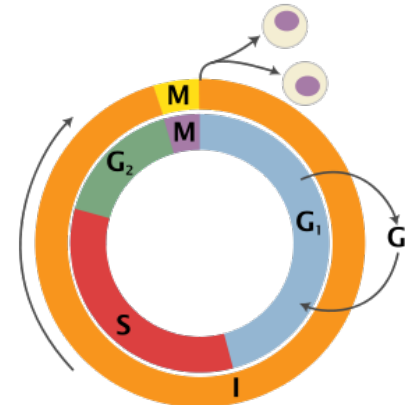
出芽酵母温度感受性変異を使って沢山の細胞周期制御遺伝子を同定

<http://images.the-scientist.com/content/figures/images/yr2003/apr21/hartwell.jpg>

温度感受性の細胞周期突然変異を探す



米国: Lee Hartwell

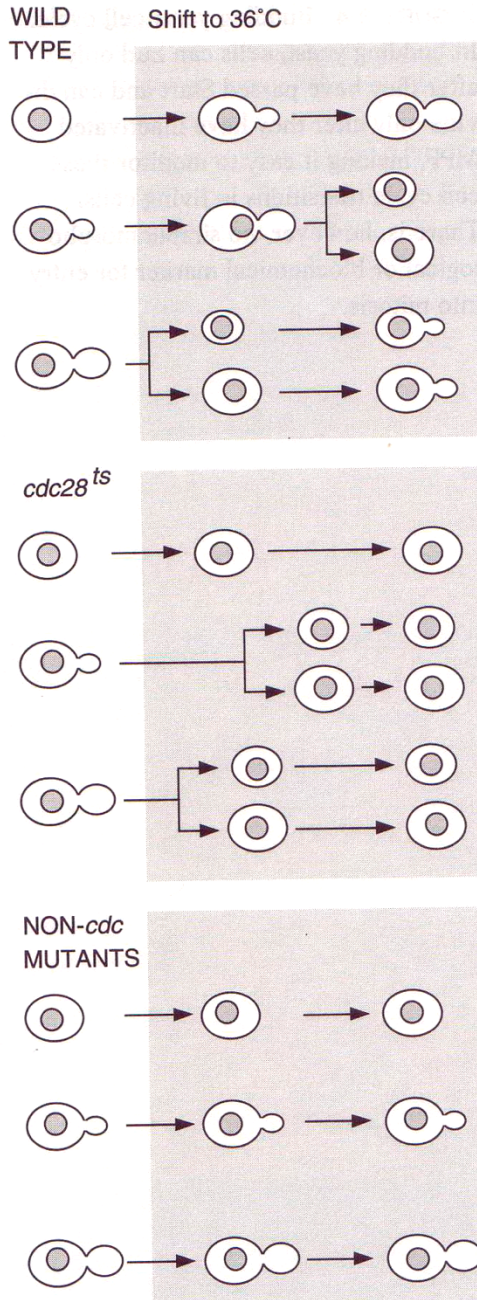


https://en.wikipedia.org/wiki/Cell_cycle

酵母ではこの種の変異をCdc(Cell division cycle)変異と呼び、32遺伝子座が知られている。



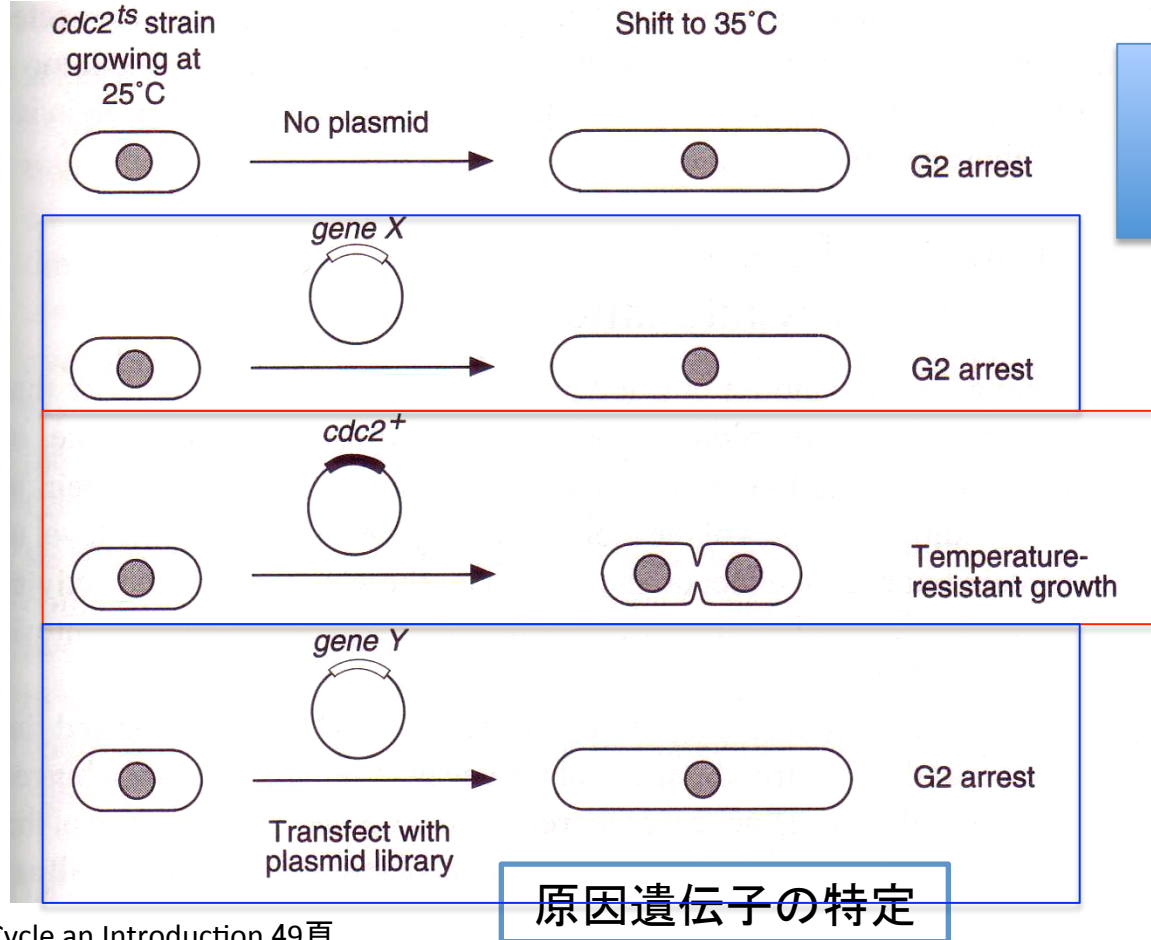
2001 生理医学賞



野生型は温度を30°Cから36°Cにしても細胞周期は進行する。

細胞周期の特定の時期に働く遺伝子の温度感受性変異は細胞周期の特定の時期に止る。
(図ではG1, cdc28)

一般の(細胞周期性でない)温度感受性変異は細胞周期のいろんな時期に止る。

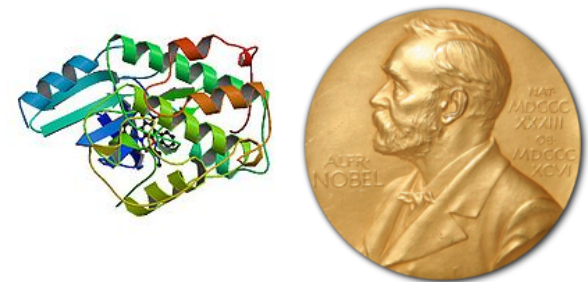


酵母の温度感受性変異を使って一番重要な細胞周期制御遺伝子を同定



イギリス: Paul Nurse

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Paul_Nurse_portrait.jpg



2001 生理医学賞

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/PBB_Protein_CDK2_image.jpg

The Cell Cycle an Introduction 49頁

- いろんな遺伝子を導入し、
- 高温での生育を救済するものを特定する。
- 得られた中で *cdc2* が最も有名。
別名 **Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1)**
- 出芽酵母 *cdc28* 遺伝子で分裂酵母 *cdc2* 変異を救済でした。
出芽酵母 *cdc28* = 分裂酵母 *cdc2*: 進化的に保存。
後にヒト Cdk1 も同定。



Yoshio Masui 増井 禎夫

MPF(Maturation Promoting Factor)

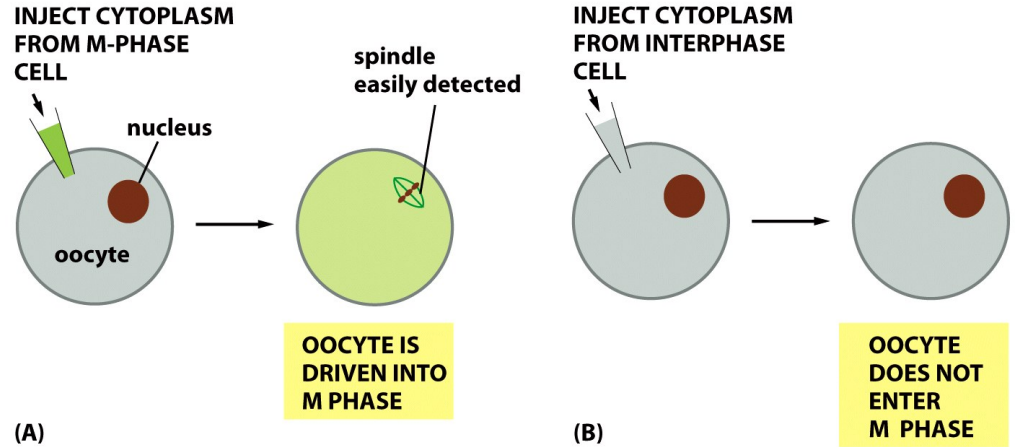


Figure 18-7 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

MPFの実体は
Cdkとサイクリンの
複合体だった!

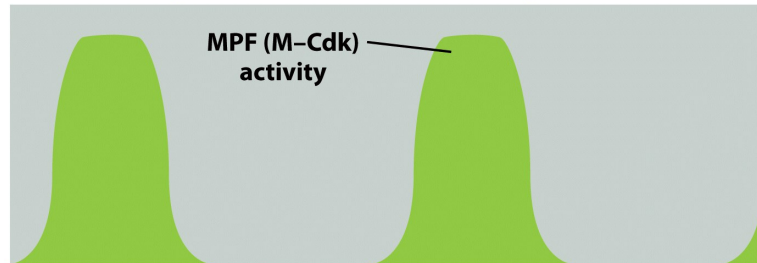
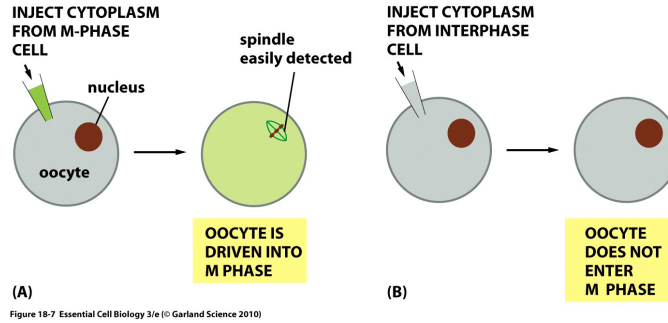
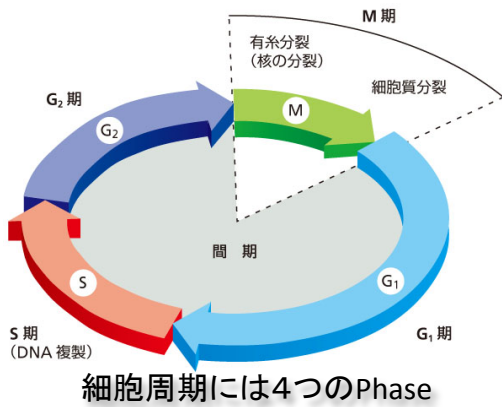
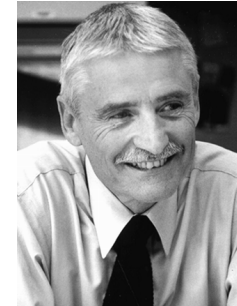
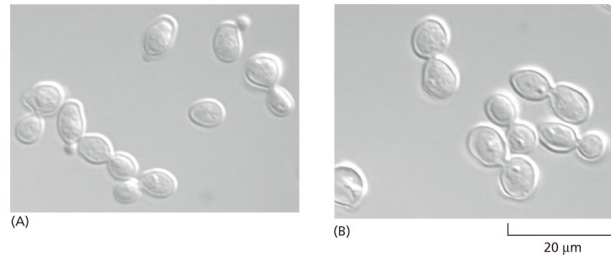
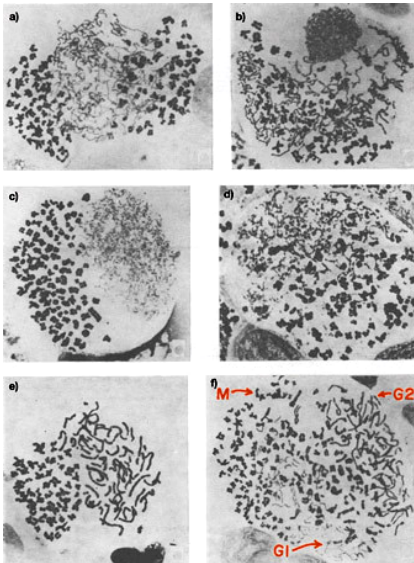


Figure 18-8 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

今週のまとめ



カエル卵からMPF
(実験発生学)



酵母からCdk
(遺伝学)

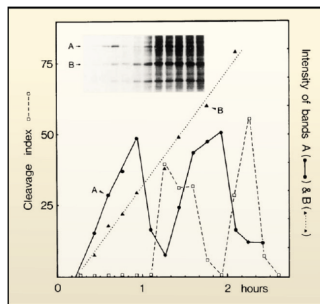


Figure 1. A Simple Experiment



ウニからサイクリン
(生化学)

細胞融合実験から制御因子の存在
(細胞学)

G1期、S期、G2期、M期、間期、サイクリン、MPF、Cdk



本日：細胞周期と その制御因子の発見

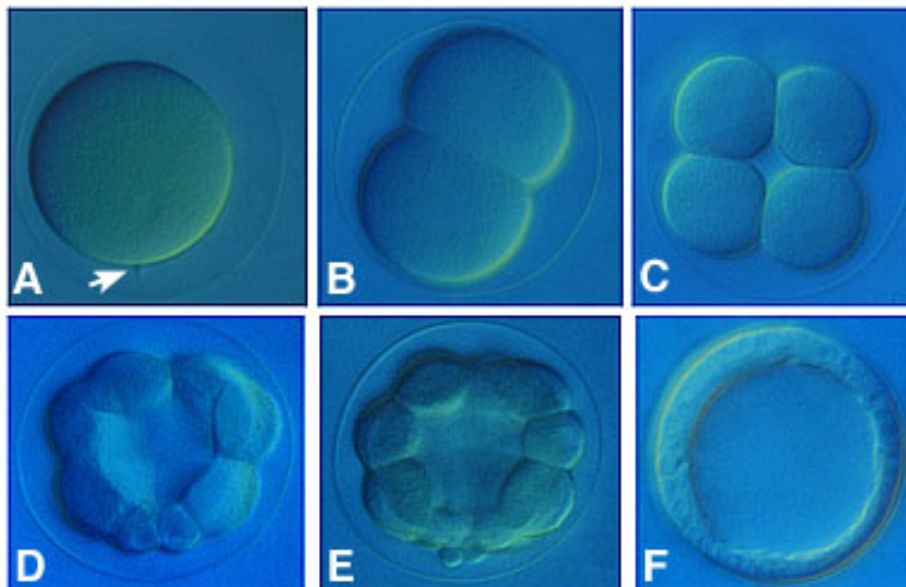
- 1 細胞周期とは何か？
- 2 細胞周期の理解の重要性。
- 3 細胞周期制御機構の存在を明瞭にした実験。
- 4 細胞周期制御因子の発見

キーワード

G1期、S期、G2期、M期、間期、
Cyclin、MPF、Cdk、温度感受性変異

- 細胞周期は遺伝情報の複製と分配が中心
 - 癌は細胞周期制御の異常
 - 細胞増殖と細胞分化の関係
 - Hayflick限界とテロメア仮説
 - 温度感受性変異の仕組み

質問は？



身につけて欲しいこと

最低限の知識(専門用語)

研究法の論理の理解