

細胞周期 M 期開始における  
リン酸化 ATF7 の役割

2015 年

千葉大学大学院 医学薬学府 先端生命科学専攻  
分子細胞生物学研究室

長谷川 仁美

# 目次

序論・目的 .....	2
結果 .....	3
総括 .....	10
材料・方法.....	14
図.....	18
参考文献.....	20
主論文目録.....	25
謝辞.....	26

## 序論・目的

Activating transcription factor (ATF)は activator protein-1 に属する転写因子である(1)。ATF ファミリーは ATF1、ATF2、ATF3、ATF4、ATF5、ATF6、ATF7 で構成され、その中でも ATF2 と ATF7 は相同性の高い配列を持ち、様々な組織で発現している事が知られている(2-6)。ATF はアミノ末端側に Activation domain、カルボキシ末端側に DNA-binding domain を持っている。ATF2 と ATF7 のアミノ酸相同性を調べたところ、これらのドメインにおいて 82%の相同性を持つ事がわかった。ATF2 は転写活性を示す事で細胞増殖等に関わる事が知られているが、そのシグナルとして細胞外ストレス刺激によるものがある(図 1)。浸透圧ストレスや UV 刺激によって細胞がストレスを受けると、Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase (JNK)、p38、ERK が活性化し、ATF2 の Thr-69/Thr-71 をリン酸化する事が知られている。ATF2 の Thr-69/Thr-71 がリン酸化された事により、ATF2 はホモダイマー又は c-jun などとヘテロダイマーを形成し、DNA の cAMP response element(CRE)と呼ばれる部位に結合する。CRE に結合した事により転写活性が上昇する為、ATF は CRE-binding protein とも呼ばれる。また、TPA 刺激下で活性化された PKC により ATF2 の Ser-121 がリン酸化されると、その後 Thr-69/Thr-71 のリン酸化が引き起こされ、転写活性を示す報告もある(7)。ATF7 に関しては、ストレス刺激後に活性化した p38 により Thr-51/Thr-53 がリン酸化される事が知られている(8)。また ATF2 は転写活性非依存的な機能として、ミトコンドリアの外膜へ局在する事で細胞をアポトーシスに導く機能や(9)、DNA ダメージ反応の際に、ATM(ataxia-telangiectasia-mutated)により Ser-490/Ser-498 がリン酸化される事により DNA 修復に関わる事(10, 11)が知られている。しかし、ATF7 に関しては ATF2 ほど研究成果がなく、ATF7 が転写活性非依存的な機能を持つかどうかは明らかになっていない。また、これまでの ATF2 と ATF7 に関する研究では G1/S 期における機能解析が中心となっており、G2/M 期に着目された研究結果の報告がほとんどなかった。そこで本研究では、特に G2/M 期に着目し、ATF2 と ATF7 が細胞周期進行に関与するかどうか解析を行なった。

## 結果

### ATF2 と ATF7 のノックダウンによる細胞増殖・細胞周期への影響

ヒト ATF2 とヒト ATF7 にはそれぞれ、13 又は 6 つの transcript variant がある。ATF2 と ATF7 が細胞周期進行においてどのような役割を持つのかを解析する為に、ノックダウンの実験を行なった。そこで、ノックダウンで用いる shRNA のターゲットとなる配列を検討し、shATF2 は coding sequence で 13 種類の transcript variant を全てターゲットとする配列を選択し、shATF7 は coding sequence (CDS) をターゲットとするものと、3'-untranslated region (3'UTR) 領域をターゲットとするものを用意した。2 種類の shATF7 とも、transcript variant 2 と 3 をターゲットとするが、ターゲット配列が CDS にある shATF7 では、ATF7 ncRNA となる transcript variant 6 をもノックダウンしてしまう可能性が考えられた(発表論文: Fig. S1A)。また、shRNA を組み込むベクターとして、EBNA-1、OriP をコードしている、エピゾーマルベクターの pEBMulti ベクターを選択した。エピゾーマルベクターは宿主細胞の染色体に組み込まれることなく、分裂した娘細胞に受け継がれていくベクターであり、DNA 障害が起きにくいと言われている。また、neomycin 耐性遺伝子も組み込まれているので、neomycin 誘導体である G418 を用いて薬剤選択を行なう事により、pEBMulti-shRNA エピゾーマルベクターが遺伝子導入された細胞のみを集める事ができるシステムとなる。まず、HeLa S3 細胞にこれらのベクターをトランスフェクションし、薬剤選択を 1 日後から始め、トランスフェクション 3.5 日~6 日目までの細胞を回収し、薬剤選択にかかる時間を検討した。その結果、5 日目以降から安定的に、内在的に発現している ATF2 と ATF7 がそれぞれノックダウンされた細胞を集められる事がわかった(発表論文: Fig.1.A-B, Fig.S1B-C)。そこで、ATF2 と ATF7 のノックダウンを行ない細胞増殖へ影響があるかどうか解析を行なった。その結果、ATF2、ATF7 それぞれのノックダウン細胞において細胞増殖が抑制される事がわかった(発表論文: Fig.1.C)。また、ノックダウン細胞を回収し cell viability について解析する為に Facs を用いて subG1 phase の割合を調べたところ、ATF7 のノックダウンにより subG1 phase の割合が上昇した。この結果から、ATF7 をノックダウンするとアポトーシスする細胞が増えた事が考えられる為、ATF7 が G1/S 期において DNA ダメージ反応に関わる可能性が考えられた(発表論文: Fig.1D)。さらに、ATF2 よりも ATF7 をノックダウンした細胞の方において

著しい細胞増殖抑制効果が見られた事から、ATF2 よりも ATF7 の方が細胞増殖に寄与が大きい事が考えられた。また、Western Blotting の実験から、ATF7 をノックダウンすると ATF2 のタンパク質量が減少する結果が得られた(発表論文: Fig.1B, Fig.S1B-E)。shATF7 がターゲットとする配列に ATF2 の配列は含まれない為、off target 効果によるものではなく、ATF2 の蛋白質量は ATF7 に依存しているものと考えられる。

DNA 障害でアポトーシスする細胞が増える事により細胞増殖は抑制され得るが、細胞周期が遅れることによっても細胞増殖は抑制される。そこで、ノックダウン細胞を用いて細胞周期を解析する為に、細胞周期の同調を行なった。HeLa S3 細胞の細胞周期 1 サイクルを 24 時間とすると、G1 期の時間が 11 時間と長い。細胞を同調せずに実験に使用すると半分程度の細胞が G1 期であり、他の phase の特徴が見られない事が示唆される。そこで Double thymidine block (DTB)と言われる方法を用いて細胞同調を行なった。チミジンは DNA 合成を阻害する事で細胞を S 期初期に同調する事ができる試薬として広く用いられている。ただしチミジンは一度、24 時間処理しただけでは同調率が 20%と低い為、一度チミジンを除去し細胞周期を再開させ S 期を抜けた時期からさらにもう一度チミジンを処理する事で同調率を 90%程度に上げる事ができる。また、ATF2 や ATF7 のノックダウン細胞はトランスフェクション後 5 日目以降から安定的に集める事ができる結果が得られたが(発表論文: Fig.1.A-B, Fig.S1B-C)、5 日目以降から 2 日以上かけて DTB を行なう時に ATF7 のノックダウン効果である細胞増殖抑制効果が表れる事が考えられる。細胞増殖抑制により、細胞周期の同調が行なわれにくくなり同調率が著しく低下する事が予測される為、薬剤選択によりノックダウン細胞を集めながら、同調を行なうプロトコルを組み立てた(発表論文: Fig. 1E)。そこで DTB により細胞を S 期初期に同調し、チミジンを除いて細胞周期を再開させ 10、11、12 時間後の細胞を回収し Facs を用いて細胞周期進行の様子を解析した。ここで 10 時間後の細胞から 12 時間後の細胞にかけての G1 期の割合の変化に着目したところ、コントロールの細胞や ATF2 をノックダウンした細胞では 20%ほど G1 期の割合が上昇した。しかし、ATF7 をノックダウンした細胞では、G1 期の割合にあまり変化が見られなかった。この事により、ATF7 をノックダウンすると G2/M 期を抜けて G1 期に戻ってきた細胞の割合が減少するという事がわかった(発表論文: Fig. 1E)。また、リリース 10 時間後の細胞において、ターゲット配列が CDS である shATF7 を使用した細胞では G1/S 期の細胞が多く、3'UTR 領域にターゲットを持つ shATF7 では G1/S 期の細胞がほとんどなかった。ATF7 の transcript variant6 である ATF7 ncRNA をノックダウンするか否か

でこの違いが出ている事が考えられる為、ATF7 ncRNA が G1/S 期の進行に関与する可能性が考えられた。ただし、二種の shATF7 で同じように G2/M 期から G1 期に戻った細胞の割合が少ない為、ATF7 が G2/M 期の細胞周期進行に重要である事がわかった。さらに、ATF7 をノックダウンする事により M 期に進行した細胞の割合が少なかった事から(発表論文 : Fig. S1F)、ATF7 が M 期の開始に重要である可能性が考えられた。

## M 期における ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化

ATF2 と ATF7 はスレオニンのリン酸化が起こる事により機能を発揮する事が知られている(8, 12)。リン酸化が起きるスレオニン付近の配列では、ATF2 と ATF7 が全く同じ配列を持っており、ATF2 Thr-69/Thr-71 に対応するのは ATF7 Thr-51/Thr-53 という事がわかる(発表論文 : Fig. 3A)。抗リン酸化 Thr-69/71 抗体を用いる事により、リン酸化された ATF2 Thr-69/Thr-71 と ATF7 Thr-51/Thr-53 の両方を認識する事ができ、また抗 ATF2[N96]抗体により ATF2 と ATF7 の両方を認識する事が知られている(13)。これらの抗体を用いて、細胞周期のどの時期に、内在性の ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化が起きているのかを解析する為に、細胞を S 期、G2 期、M 期に同調し WB を行なった。抗リン酸化 Thr-69/71 抗体を用いた結果、M 期においてバンドが見られた。また、抗 ATF2[N96]抗体が検出したバンドを見ると、M 期の細胞でバンドが上にシフトしており泳動度の遅延が見られた(発表論文 : Fig. 2A)。特に細胞外ストレスと言われる刺激を加えていない事からも、細胞周期依存的に M 期において ATF2 Thr-69/Thr-71 と ATF7 Thr-51/Thr-53 がリン酸化される事がわかった。そこで次に、どのようなキナーゼが M 期において ATF2 と ATF7 のリン酸化に関わるのかを解析した。M 期で重要だとされている Cdk1、Aurora A、Aurora B、Polo-like kinase 1 それぞれの阻害剤を分裂期に同調した細胞に添加し WB を行なった。M 期に入る前から阻害剤を添加すると M 期に進行しなくなる可能性がある為、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いて M 期中期に細胞を同調したまま阻害剤を添加する方法で実験を行なった。興味深い事に、Cdk1 の阻害剤である RO-3306 を入れる事により M 期で見られる ATF2 Thr-69/Thr-71 と ATF7 Thr-51/Thr-53 のリン酸化は著しく減少する事がわかった(発表論文 : Fig. 2B, C)。これらのスレオニンを含むアミノ酸配列を解析したところ、Cdk1 によってリン酸化されるアミノ酸配列である Cdk1 コンセンサスシーケンス (S/T\*-P-x-K/R)と一致する事がわかった。さらに、間期の細胞においては、ATF2 と ATF7 が MAP キナーゼや PKC によりリン酸化される事が知られている為(7, 8, 12)、それら

のキナーゼによる制御があるかどうかを調べる為に、同様の実験を行なった。しかしながら、p38、JNK、ERK の阻害剤では ATF2 Thr-69/Thr-71 と ATF7 Thr-51/Thr-53 の M 期リン酸化は減少しなかった。また、PKC の阻害剤である Gö6976 を処理した時にはスレオニンのリン酸は減少せず、抗リン酸化 Thr-69/71 抗体で認識されるバンドが下にシフトした(発表論文 : Fig. 2D)。これらの結果から、M 期においては、MAP キナーゼや PKC ではなく、Cdk1 によって ATF2 Thr-69/Thr-71 と ATF7 Thr-51/Thr-53 のリン酸化が起こる事が唆された。さらに、Cdk による関与がある事を示すために、ATF2 野生型プラスミド(ATF2-wt)、ATF7 野生型プラスミド(ATF7-wt)、スレオニンをアラニンに置換しリン酸化されないようにした ATF2 T69A/T71A 変異体(ATF2-TA)、ATF7 T51A/T53A 変異体(ATF7-TA)を作製した。ATF2-wt 又は ATF7-wt と共に Cdk1 又は Cyclin B のプラスミドを cotransfection してもスレオニンのリン酸化は上昇しなかった。しかし、Cdk1 と Cyclin B を ATF2-wt 又は ATF7-wt と triple transfection し、M 期様の状態を作り出した場合に、スレオニンのリン酸化が上昇する事がわかった(発表論文 : Fig. 3B, C)。ATF2-TA 又は ATF7-TA プラスミドを用いて同様の実験を行なってもリン酸化は上昇しなかった(発表論文 : Fig. 3D, E)。これらの結果から、Cdk1 と Cyclin B の複合体が ATF2 Thr-69/Thr-71 と ATF7 Thr-51/Thr-53 のリン酸化を担う事がわかった。

## M 期で見られる ATF2 と ATF7 のリン酸化が起こる時期と局在

ATF2 と ATF7 が複合体を形成しているかどうかを解析するために、細胞に内在的に発現している ATF2 又は ATF7 を免疫沈降し、それぞれの特異抗体で Western blotting (WB)を行なった。その結果 ATF2 と ATF7 が互いに共免疫沈降された事から、ATF2 と ATF7 が複合体を形成する可能性が考えられた(発表論文 : Fig. 4A、図 2)。加えて、非同調の細胞と M 期に同調した細胞を用意し、抗リン酸化 Thr-69/71 抗体により免疫沈降を行なったところ、M 期同調細胞において ATF2 と ATF7 のバンドが検出された事から、M 期において ATF2 と ATF7 の両方がリン酸化されている事が強く示された(発表論文 : Fig. 4A)。次に、抗リン酸化 Thr-69/71 抗体と抗 Cdk1 抗体又は抗 Cyclin B 抗体を用いて、内在性のスレオニンリン酸化と Cdk1/Cyclin B の共染色を行なった。その結果、M 期の細胞において、ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化と Cdk1/Cyclin B が共局在を示す事がわかった(発表論文 : Fig. 4B, 4C)。また、ATF2/ATF7 の局在とリン酸化された ATF2 と ATF7 の局在を比較する為に、抗 ATF2[N96]抗体と抗リン酸化 Thr-69/71 抗体、抗リン酸化ヒストン H3 Ser-10 抗体を用いて共染色を行なった。抗

ATF2[N96]抗体は ATF2 と ATF7 の両方を認識する抗体であるが、間期の細胞においては核内で染色像が観察された。さらに分裂期の細胞を詳しく観察すると、前期から後期にかけて細胞質に局在が見られ、終期になると染色体上に局在していた。抗リン酸化 Thr-69/71 抗体で染色した結果では、前期から後期にかけて強い蛍光強度を示す事がわかった(発表論文: Fig. 4D、図 3)。また、ヒストン H3 Ser-10 は M 期進行に重要だとされる Aurora キナーゼによってリン酸化される事が知られている。また、そのリン酸化は分裂期の前期から後期にかけて見られるので、抗リン酸化ヒストン H3 Ser-10 抗体は M 期のマーカーとしてよく用いられている。前述の結果にもあるが、M 期の細胞に Cdk1 の阻害剤である RO-3306 を処理するとスレオニンのリン酸化が減少する。しかし Aurora キナーゼの活性阻害剤である ZM447439 を処理してもスレオニンのリン酸化は減少していなかった(発表論文: Fig. 4F)。また染色結果から、分裂期前期の細胞においてスレオニンのリン酸化が上昇していてもヒストン H3 Ser-10 のリン酸化が全く見られない細胞が存在していた為、ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化はヒストン H3 Ser-10 のリン酸化より少し早い時期から起こる事が推測された(発表論文: Fig. 4E)。ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化は Aurora キナーゼ活性の影響を受けない事が考えられる。さらに、リン酸化 ATF2/ATF7 と cyclin B との関係を深く示すために、metaphase-anaphase transition の実験を行なった。スピンドルチェックポイントを誘発させる Monastrol という試薬で細胞を分裂中期に同調し、そこに ZM447439 を加える事により slippage を起こさせ、無理やり分裂後期に細胞周期を進める系を用いた。その結果、Cyclin B の分解と共に ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化が減少していく結果が得られた(発表論文: Fig. 4G)。

これらの結果から、ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化は M 期開始の早い時期から後期にかけて起きている事がわかった。

## G2/M 期進行におけるリン酸化 ATF2 と ATF7 の役割

M 期でのスレオニンのリン酸化は ATF2 と ATF7 の両方で見られていたが、ノックダウンの実験から、ATF2 よりも ATF7 の方が、細胞増殖や細胞周期への寄与が大きい事が考えられる(発表論文: Fig:1C-E, Fig: S1F)。そこで、G2/M 期における ATF7 の役割を解析する事に着目した。細胞周期進行過程において、M 期でみられる ATF7 のリン酸化がどのような機能を持っているのかを解析する為に、ATF7-wt と ATF7-TA それぞれの誘導発現細胞株を作製した。テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン

(Dox)を処理する事で、目的の蛋白質を誘導発現するシステムである。作製した細胞株を用いて WB を行なったところ、Dox 誘導により ATF7-wt 又は ATF7-TA をそれぞれ同じように発現できる事がわかった。また、ATF7-wt を誘導発現した際には、内在性のスレオニンより高いリン酸化シグナルが見られた(発表論文 : Fig. 5A, Fig. S3A-B)。そこで、Dox を添加し ATF7-wt 又は ATF7-TA を発現させ細胞内局在を観察した。免疫染色の結果、両者とも間期の細胞では核内に局在が見られ、M 期の前期から後期にかけては細胞質に広がった局在を示し、終期においては染色体上に局在していた(発表論文 : Fig. 5B)。その為、M 期における ATF7 Thr-51/Thr-53 のリン酸化は ATF7 の局在に影響を与えない事がわかった。

次に、M 期で見られる ATF7 のリン酸化が細胞周期進行に関与するかどうかを解析する為に、DTB で ATF7-wt 又は ATF7-TA 誘導発現細胞を同調し、チミジンを除いて細胞周期を再開させ、その後の細胞周期進行の様子を Facs で解析した。Dox はチミジンを除く時に添加した。PI を用いて DNA のピークを解析し、抗ヒストン H3 Ser-10 抗体で細胞を染色し、染色された細胞を M 期細胞として割合を算出した。親株の細胞ではチミジンを除いて 10.5 時間後における M 期の割合が 19%であり、11.5 時間後では、G2/M 期を抜けて G1 期に戻った細胞が 24%で 12.5 時間後の細胞では G1 期の割合が 62%であった。ATF7-wt を誘導発現した細胞では親株と同じように細胞周期が進行していく様子がみられた。しかし、ATF7-TA を誘導発現した細胞株を 3 種類作製し解析したところ、10.5 時間後の細胞における M 期の割合が 2~11%で、11.5 時間後の G1 期の割合が 9~14%、12.5 時間後の G1 期の割合は 16~37%であった(発表論文 : Fig. 5C, Fig. S3C-D, S4)。さらに、G2/M 期の移行に ATF7 のリン酸化が関わるかどうかを詳細に解析する為、RO-3306 を用いて late G2 期に細胞を同調し、細胞周期を再開させ M 期へ進行させた。Dox は RO-3306 のリリースを行なう 5 時間前から添加し、ATF7-wt 又は ATF7-TA を誘導発現させた。その結果、ATF7-TA を発現すると G2 期から M 期に移行する細胞の割合が減少していた為、M 期開始が遅延する事がわかった(発表論文: Fig. 5D)。また、内在性の ATF7 が存在している事から、ATF7-TA がドミナントネガティブ体として働いたと考えられる。これらの結果より、ATF7 のリン酸化が G2/M 期の進行に重要である事が示唆された。

### **ATF7 のリン酸化による Aurora シグナリングへの影響**

ATF7-TA を発現させる事により G2/M 期の移行が遅延したが、なぜ遅延が起きるの

かを明らかにできていない。M 期における ATF7 のリン酸化の役割を詳細に解析する為に、ノックダウンレスキューの実験を行なう事を計画した。しかし、ATF7 をノックダウンすると細胞増殖抑制効果が表れてしまい(発表論文 : Fig. 1C, E, Fig. S1F)、細胞周期の解析が正しくできなくなる事が推測された。その為、内在性の ATF7 をノックダウンするより前から、Dox を添加し ATF7-wt 又は ATF7-TA を発現させ、DTB による方法又はチミジンと RO-3306 を用いた同調を行なうプロトコルを組み立てた(発表論文 : Fig. 6A)。3'UTR 領域をターゲットとする shATF7 を細胞に Transfection すると主に G2/M 期の進行に影響が見られた事から(発表論文 : Fig. 1E)、3'UTR 領域をターゲットとする shATF7 を選択した。また、WB によりノックダウンレスキューが行なえている事を確認した(発表論文 : Fig. 6B)。ATF7 をノックダウンした時に見られる分裂後の娘細胞への影響を解析する為に、DTB を用いて細胞同調を行ない、チミジンリリース 12 時間後の細胞において、G2/M 期を抜けて G1 期に戻ってきた細胞の割合を Facs を用いて解析した。その結果、ATF7 をノックダウンした事により減少した G1 期の割合が ATF7-wt を発現させる事により回復し、ATF7-TA の発現では回復できなかった(発表論文 : Fig. 6C, S5E)。さらに、ATF7 をノックダウンした事により細胞の全体数が減少し、subG1 phase の細胞が増えるが、それらの現象が ATF7-wt の発現によりレスキューされ、ATF7-TA ではレスキューできない結果も得られた(発表論文 : Fig. S5C-D)。これらの結果により、ATF7 のリン酸化が cell viability や細胞周期の進行に重要である事が示された。

次に、ATF7 をノックダウンする事により M 期への進行が妨げられるのかを解析するために、チミジンと RO-3306 を用いた同調を行ない RO-3306 を除いた 40 分後の細胞を回収し、ATF7 と同時にリン酸化ヒストン H3 Ser-10 の共染色を行なった。ATF7 をノックダウンした細胞ではリン酸化ヒストン H3 Ser-10 の染色像はほとんど見られなかった(発表論文 : Fig. 6D)。Aurora キナーゼがヒストン H3 Ser-10 のリン酸化を行なう事から、ATF7 のリン酸化が Aurora キナーゼの活性に影響するかどうかを WB で検討した。Aurora キナーゼの活性指標として抗リン酸化 Aurora 抗体を用いたところ、ATF7 をノックダウンする事により Aurora キナーゼのリン酸化が減少し、ATF7-TA ではなく ATF7-wt を発現させる事により Aurora キナーゼのリン酸化が回復した(発表論文 : Fig. 6E)。これらの結果から、G2/M 期の移行の時期に、ATF7 のリン酸化は重要であり、Aurora キナーゼの活性にも影響する事がわかった。

## 総括

本研究において、ATF2 と ATF7 が Cdk1-cyclin B 複合体の新規の基質である事が明らかとなった。また M 期前期の中でも早い時期から後期にかけて、ATF2 の Thr-69/Thr-71 と ATF7 の Thr-51/Thr-53 がリン酸化される事がわかった。ATF2 と ATF7 は同じように M 期でリン酸化され、ATF2 と ATF7 のそれぞれのノックダウンにより細胞増殖や細胞周期進行に影響が出ていたが、ATF2 と比較し ATF7 のノックダウンによる効果の方が高かった。また、M 期でリン酸化されないようにした ATF7-TA 変異体を発現する事により、内在性の ATF7 が存在しているにも関わらず、G2/M 期の進行が遅延した。さらに、ATF7 のノックダウンレスキューの実験より、Cdk1-cyclin B の複合体によりリン酸化された ATF7 が Aurora キナーゼの活性に影響し M 期開始に関わる事が示唆された。G2/M 期において、ATF7 と ATF2 は G1/S 期とは違った機能を持つ事が考えられる(発表論文: Fig. 7)。

これまで、G1/S 期においてストレス刺激があった時に、アミノ末端側にある Activation ドメイン内に存在する ATF2 の Thr-69/Thr-71 又は ATF7 の Thr-51/Thr-53 がリン酸化される事が転写活性に重要であるという報告があった(8, 9, 12, 14-17)。しかし、G2/M 期における ATF2 と ATF7 の役割を解析した報告はほとんどなかった。興味深い事に、human ATF2 と human ATF7 はアミノ末端側にある Activation domain とカルボキシ末端側にある DNA-binding domain で相同性が高い(発表論文: Fig. 3A, Fig. S6A)。ATF2 はそれらの domain どうして分子内結合があり、不活性化体になっているが、分子内結合がはずれる事により、ダイマーを形成し転写活性を示す(18)。また、アデノウイルス E1A、HTLV-1、HMG1、c-jun などが ATF2 の DNA-binding domain に結合する事と、ストレスで活性化する MAP キナーゼにより ATF2 のスレオニンがリン酸化を受け、DNA-binding domain が活性化する事が協調的に起こり、ATF2 は活性化される(18-24)。G2/M 期開始においては Cdk1/Cyclin B 複合体が M 期開始に重要であり、また late G2 期から M 期の後期まで Cdk1/Cyclin B 複合体は活性化し様々な基質をリン酸化する事が良く知られている(25, 26)。本研究で、Cdk1/cyclin B 複合体によりリン酸化された human ATF2 と human ATF7 のスレオニン残基は MAP キナーゼによりリン酸化を受けるスレオニン残基と同じであるため、M 期で見られるリン酸化も ATF2 や ATF7 の活性化に重要なものであると考えられる。また、免疫染色の結果より、

M期の細胞において染色体上に ATF2 と ATF7 のスレオニンリン酸化は見られなかった(発表論文: Fig. 4D-E)。これらの事を合わせて考えると、ATF2 と ATF7 が、G1/S期における転写因子としての機能とは別に、M期における染色体以外の細胞質や nucleocytoplasm に存在するたんぱく質に結合し M期開始や M期進行に関与している事が考えられる。

ATF2 と ATF7 は M期において同じように Cdk1/cyclin B 複合体によりリン酸化されていた(発表論文: Fig. 2, 3, 4A)。しかしながら、human ATF7 をノックダウンした事により見られた細胞増殖抑制と細胞周期進行遅延は human ATF2 のノックダウンより効果が著しかった(発表論文: Fig. 1C-E, Fig. S1F)。ATF2 と ATF7 のアミノ酸配列を比較したときに、中央の部分とカルボキシ末端側では相同性が低いので、この事によりノックダウン効果に違いが見られるのではないかと考えられる。また、ATF2 と ATF7 をダブルノックダウンし M期に入った細胞の数を計測すると、それぞれのノックダウンよりも著しい M期進行抑制が見られた(発表論文: Fig. S1F)。よって、M期進行において ATF2 と ATF7 が相乗的な効果を示すことが示唆された。Human ATF2 と human ATF7 はそれぞれに 13 種、6 種類の transcript variant がある事が知られている。本研究で用いた shATF2 は human ATF2 全ての transcript variant をノックダウンできるものであり、shATF7 に関しては 3'UTR 領域にターゲット配列があるものでは transcript variant 2 と 3 をノックダウンし、CDS 領域にターゲット配列があるものでは transcript variant 2 と 3 に加えて transcriptvariant 6 もノックダウンする可能性が考えられた。shATF7 (CDS)では部分的に G1 期でのアレストが引き起こされていたが M期から G1 期にかけての進行抑制は 2 種類の shATF7 と同じように起こっていた(発表論文: Fig. 1B, Fig. S1)。また、ATF7-TA 変異体を誘導発現するとドミナントネガティブ効果が表れ、G2/M期の進行が抑制されていた。ゆえに、ATF2 というよりはむしろ、human ATF7 のたんぱく質のリン酸化が M期から G1 期への進行に重要であることがわかる。

ATF7 の DNA-binding ドメインを欠損させたマウスは生存し、成長過程においても特に深刻な病気や変化は引き起こされないという報告がある(2, 13)。しかし、DNA-binding domain を欠損させた ATF2 のノックアウトマウスでは、生まれてすぐ死に至る報告がある(27)。またアミノ末端側のスレオニンをアラニンに置換した TA 変異体をノックインしたマウスでも短命であり(2)、さらに ATF2 と ATF7 のダブルノックアウトマウスではさらに影響が大きく、胎児期の 11.5 日~12.5 日で死に至り生まれ

る事がない(2)。よって、mouse ATF2 と mouse ATF7 は胎児期の発生等に重要な役割を担っている事がわかる。また、ATF2 と ATF7 の両方の機能をなくしたノックアウトマウスの胎児期肝細胞は culture を始めて 2~3 日後から増殖抑制が起こりアポトーシスする細胞も増えるが、7 日ほどまで少しずつ増殖している結果も併せて報告されている(2)。これらの結果より、mouse ATF7 は human ATF7 ほどの細胞増殖効果を持っていない事が考えられた。Human ATF7 は 6 種類の transcript variant があるが、mouse ATF7 は transcript variant が報告されておらず、human ATF7 と mouse ATF7 のアミノ酸配列を比較するとカルボキシ末端側で長さが違う事がわかった(発表論文：Fig. S6B)。transcript variant やアミノ酸配列の長さの違いによりヒトとマウスとで ATF7 の機能が違うのではないかと考えている。また、ATF7 のノックダウン細胞株を作製する事ができなかった為、エピゾーマルベクターに shRNA を組み込み、薬剤選択を行なう事で短期間にノックダウンされた細胞を集められる系を組み立てた(発表論文：Fig. 1A, E, 6A)。その為、本論文でのノックダウンの系を用いる事により、シングルセルクローンによる特異性としての表現型は表れていないと示唆される。

ATF2 や ATF7 はホモダイマー又は c-jun などの他の AP-1 ファミリーとダイマーを形成する事が知られている(9, 28)。実際、本研究においても非同調の細胞、M 期の細胞の両方で ATF2 と ATF7 が共免疫沈降した結果が得られた。In vitro の系で ATF2 と ATF7 が結合している事も報告されている(29)。また、MAP キナーゼによりアミノ末端側のスレオニンがリン酸化される事によりユビキチン化や分解が制御されている事が知られている(30, 31)。さらに本研究においては、ATF7 をノックダウンする事により ATF2 のたんぱく質量に影響が見られ、またその逆として ATF2 をノックダウンしても ATF7 のたんぱく質量に若干の影響があった(発表論文：Fig. 1B, 6B, Fig. S1B-E)。詳細な解析は行っていないが、ATF2 と ATF7 がダイマーになる事により、それぞれの安定性に影響している事も考えられた。

興味深い事に、本研究において、M 期で見られる ATF7 のリン酸化が Aurora キナーゼの活性に関与している事が示唆されるデータが得られている(発表論文：Fig. 6E, Fig. S5F-G)。Aurora キナーゼファミリーは Aurora A, B C の 3 つで構成されている。特に Aurora A は oncogene として様々ながん細胞に発現し、セントロソームの成熟過程で機能を発揮し、G2/M 期の進行に重要なキナーゼである事が知られている(32)。また、Aurora A が機能しないと M 期開始の遅延が起こる事や、アポトーシスが引き起こされる報告もある(33-35)。よって、ATF7 をノックダウンした事により Aurora キナーゼの

活性が減少し(発表論文 : Fig. 6)、subG1 phase の細胞の割合が上昇し(発表論文 : Fig. 1D)、G2/M 期のアレストが起こった(発表論文 : Fig. 1C, Fig. S1F)という可能性が考えられる。Cdk1 の活性が抑制されると Aurora A キナーゼの活性も抑制されるが、Cdk1 は直接 Aurora A をリン酸化しないと言われている(36)。また、ヒストン H3 Ser-10 は活性化した Aurora B によりリン酸化される事が知られている(37-40)。本研究では活性化した Cdk1 により ATF7 のリン酸化がヒストン H3 Ser-10 のリン酸化に先行して起こる結果が得られている事から(発表論文 : Fig. 4E, F)、ATF7 のリン酸化が Aurora キナーゼの上流に位置し、Aurora キナーゼの活性や安定性に寄与しているのではないかと考えられる。加えて、ATF7 のリン酸化を介した M 期の進行にプロテアソームの抑制が影響するかどうかを調べる為に、ATF7-wt 又は ATF7-TA 誘導発現細胞株にプロテアソーム阻害剤である MG132 を処理し、細胞周期進行の様子を Facs で解析した。その結果、MG132 存在下で、ATF7-TA が引き起こす M 期開始の遅延がさらに増大した(発表論文 : Fig. S5H)。MG132 は M 期開始や M 期の終わりにおいて複雑な仕組みで進行を抑制する(41, 42)。よって M 期開始においてプロテアソーム活性依存的に、ATF7 のリン酸化が Aurora シグナリングを促進する事が示唆された。ATF7 と活性化された Aurora キナーゼ、又はその基質である INCENP や TPX2 等との間に関連があるかどうかを解析する事により、ATF7 のリン酸化がどのように Aurora キナーゼの活性に関与するのか、詳細なメカニズムを解明できるのではないかと考えられる。

## 材料・方法

### プラスミド

- pEGFP-C1-ATF2-wt (wild-type)
- pEGFP-C1-ATF2-TA (T69A/T71A)  
pcDNA3/FLAG-ATF2-wt 又は pcDNA3/FLAG-ATF2-TA (7)から ATF2-wt 又は ATF2-TA を切り出し pEGFP-C1 (Clontech) ベクターに組み込んだ。
- pcDNA4/TO/puro vector  
pcDNA4/TO vector から Zeocin-resistant gene を抜き、pPUR vector (BD Biosciences Clontech) より切り出した puromycin-resistant gene を組み込んだ。
- pcDNA4/TO/puro/ATF7-wt  
pCR4-TOPO-human ATF7 (Open Biosystems)より ATF7 を取り出し、HindIII-Xho I サイトで pcDNA4/TO/puro vector に組み込んだ。
- pcDNA4/TO/puro/ATF7-TA  
pcDNA4/TO/puro/ATF7-wt の Thr-51/Thr-53 に site-directed mutagenesis で Ala-51/Ala-53 に置換した。
- pCMX-Cyclin B1(R42A)-GFP (provided by J. Pines) (43)
- pUHD-P1-Flag-Cdc2(AF) (provided by R. Y. C. Poon) (44, 45)

### 同調試薬・阻害剤

Thymidine (DNA 合成阻害; Sigma)、RO-3306 (Cdk1 阻害; Calbiochem)、SB202190 (p38 阻害; Calbiochem)、SP600125 (JNK 阻害; Biomol international)、U0126 (MEK 阻害; Calbiochem)、Gö6976 (PKC 阻害; Calbiochem)、MG132 (プロテアソーム阻害; Peptide Institute, Inc.)、ZM447439 (Aurora B 阻害; JS Research Chemicals Trading)、MLN 8237 (Aurora A 阻害; Selleck Chemicals)、monastrol (キネシン阻害; Enzo Sciences)。

### 抗体

Phospho-ATF2[pT71] (リン酸化 ATF2 Thr-69/Thr-71 とリン酸化 ATF7 Thr-51/Thr-53 の両方を認識する) (#9221; Cell Signaling Technology)、ATF2[N-96] (ATF2 と ATF7

の両方を認識する) (sc-6233; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、ATF2[SS16] (ATF2 を特異的に認識する) (A4086; Sigma-Aldrich)、ATF7 (ATF7 を特異的に認識する) (SAB2500131 と HPA003384; Sima-Aldrich)、cyclin A (clone CY-A1, C4710; Sigma-Aldrich)、cyclin B1 (#4135; Cell Signaling Technology)、phospho-CDK1[p34] (sc-574; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、CDK1[p34] (sc-574; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、phospho-Aurora A/B/C (clone D13A11; Cell Signaling Technology)、Aurora A (IAK1, clone 4; BD Bioscience)、Aurora B (AIM-1, clone 6; BD Bioscience)、phospho-histone H3 Ser-10 (clone 6G3, #9706S; Cell Signaling Technology)、 $\alpha$ -tubulin (clone MCA78G; Serotec)、actin (clone C4, MAB1501; Millipore)。また、WB の二次抗体として、Horseradish peroxidase (HRP)-F(ab')<sub>2</sub> を、免疫蛍光染色の二次抗体として、Alexa Fluor 488-、Alexa Fluor 546-、Alexa Fluor 647-labeled IgG (Invitrogen)を使用した。

#### 細胞と遺伝子導入、細胞株作製

HeLa S3 細胞 (Japanese Collection of Research Bioresources, Osaka)、テトラサイクリンリプレッサー (TR)-発現 HeLa S3 細胞 (HeLa S3/TR, clone A3f5) (46, 47)、作製した ATF7-wt 又は ATF7-TA 誘導発現細胞株(HeLa S3/TR/ATF7-wt 又は HeLa S3/TR/ATF7-TA)は 1% fetal bovine serum (FBS)と 4% bovine serum を含む Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)で培養した。一過性の遺伝子導入は、linear polyethylenimine (25kDa; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) (48)を用いた。ATF7-wt 又は ATF7-TA のテトラサイクリン誘導型の細胞株を作製する為に、HeLa S3/TR 細胞に pcDNA4/TO/puro/ATF7-wt 又は pcDNA4/TO/puro/ATF7-TA を発現させ、350 ng/ml puromycin で薬剤選択を行なった。テトラサイクリン誘導体である Doxycycline (Dox)を 1  $\mu$ g/ml の濃度で添加する事により誘導発現を行なった。

#### RNA 干渉

shRNA を用いて ATF7 又は ATF2 のノックダウンを行なった。ATF7 の 3'UTR に含まれる配列である [5'-GCTAGATTTGATGACATATTA-3'] (Sigma MISSION shRNA library)と ATF7 の CDS に含まれる配列である [5'-GTCACATTACTACGCAATG-3']、さらに ATF2 の 13 種類の transcript variants の全てに含まれる配列である [5'-GAAGAAGTGGGTTTGTTTA-3']のオリゴヌクレオチドを用意した。それらをまず

pENTR4-H1vector (provided by Hiroyuki Miyoshi)に組み込んだ。次に EBNA-1 をコードするエピゾーマルベクターである pEBMulti vector (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)から CAG プロモーターを除去し、pENTR4-H1-shATF2 又は pENTR4-H1-shATF7 由来の H1-shATF2 又は H1-shATF7 を pEBMulti vector に組み込んだ。HeLa S3/TR 細胞、HeLa S3/TR/ATF7-wt 又は HeLa S3/TR/ATF7-TA 誘導発現細胞株に pEBMulti-shATF2 又は pEBMulti-shATF7 を一過性に発現させ、600 µg/ml G418 で薬剤選択を行いノックダウンされた細胞を回収した。pEBMulti vector の一過性発現を行わなかった HeLa S3 細胞は、600 µg/ml G418 で 5 日間処理する事により全て死滅した。

### フローサイトメトリー

細胞をトリプシン処理により回収し、4% paraformaldehyde (PFA)を 1 時間処理する事により細胞を固定し、70%エタノールを用いて-30 度で透過処理を行った(47, 49)。その後、0.1%サポニンと 3% bovine serum albumin (BSA)を含んだ phosphate-buffered saline (PBS)により室温で抽出を行なった。0.1% Tween 20 を含む PBS で細胞を洗い、一次抗体として anti-phospho histone H3 Ser-10 を一時間反応させ、その後二次抗体として Alexa Fluor 647-labeled IgG を一時間処理した。また、100 µg/ml RNaseA と 50 µg/ml PI を 37 度で 30 分処理する事により、DNA を染色した。1 サンプルにつき 5000 細胞以上用意し、Guava easyCyte (Millipore)フローサイトメトリーの 488-nm blue レーザーと 640-nm red レーザーを用いた。Guava easy Cyte で取得したデータは Flowing Software version 2.5.0 (Perttu Terho, Centre for Biotechnology, Turku, Finland)で解析した。

### 細胞同調

HeLa S3 細胞は HeLa 細胞の亜種で細胞同調性に優れ、細胞周期解析に適した細胞である(47, 48, 50-52)。HeLa S3 細胞に 4 mM チミジンを 24 時間処理する事で S 期初期に同調し、PBS で洗った後、チミジンを含まないメEDIUMで 11 時間インキュベートした。そこで mitotic shake-off を行ない回収した細胞を M 期の細胞とした。さらに他の方法として、4 mM チミジンを 24 時間処理し、PBS で洗いチミジンを含まないメEDIUMで 9 時間培養後、さらに 4 mM チミジンを 15 時間処理する事で S 期初期の同調を行なった。その後 PBS で細胞を洗い細胞周期を進ませ、メEDIUMで 10 時間 (G2

期)~12 時間(M 期)培養し細胞を回収した。また、G2/M 期の移行を詳しく見る為に、4 mM チミジンを 24 時間処理し、PBS で細胞を洗った後、チミジンを含まないメEDIUM で 5 時間細胞をインキュベートし、その後 9  $\mu$ M RO-3306 を 10 時間処理し、細胞を late G2 期に同調した。そこで  $Ca^{2+}$  と  $Mg^{2+}$ を含んだ PBS (+)で細胞を洗い、RO-3306 を含まないメEDIUM で 10~40 分インキュベートする事で M 期の細胞を回収した。

### 免疫染色

細胞を 4% PFA 室温で 15 分処理した後、100%メタノールを-30 度で 10 分処理し固定を行なった。その後 0.1%サポニンと 3%BSA を含む PBS を 30 分室温で処理した。一次抗体と二次抗体をそれぞれ 1 時間ずつ反応させた後、200  $\mu$ g/ml RNaseA と 20  $\mu$ g/ml PI を 30 分ずつ処理し DNA を染色した(53-55)。Fluoview FV500 confocal laser scanning microscope (Olympus, Tokyo)を用いて蛍光染色と微分干渉の画像を取得した。

### ウエスタンブロッティング

細胞のライセートは、SDS-PAGE sample buffer に溶かし、電気泳動を行ない、polyvinylidene difluoride membrane (Millipore)に転写した。分子量マーカーとして Prestained XL-Ladder Broad (Apro Science, Japan)を用いた。一次抗体を室温で 1 時間、又は 4 度で over night 反応させた後、二次抗体を室温で一時間処理した。様々な一次抗体を同じ membrane で反応させる場合には、0.1%  $NaN_3$ 又はストリッピングバッファーで抗体を剥がし、次のプロットを行なった。ECL (Amersham Biosciences)で Immunodetection を行なった(45, 46, 50, 56-59)。また、結果は ChemiDoc XRSPlus analyzer (Bio-Rad)で解析した。

### 免疫沈降

細胞を 1% TritonX-100 lysis buffer (1% TritonX-100、10 mM HEPES, pH7.8、5% glycerol、5 mM EDTA、50 mM NaF、20 mM  $\beta$ -glycerophosphate、50  $\mu$ g/ml aprotinin、100  $\mu$ M leupeptin、25  $\mu$ M pepstatin、10 mM  $Na_3VO_4$ 、1 mM PMSF)で溶かし、一次抗体を付加した protein G beads で免疫沈降を行なった。

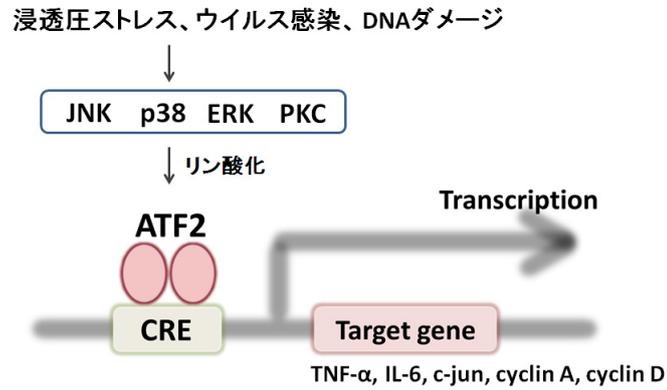


図1 ストレス応答における ATF2 の転写活性化

細胞外ストレスにより JNK などのキナーゼが活性化すると ATF2 はダイマーを形成し、転写活性が上昇する。

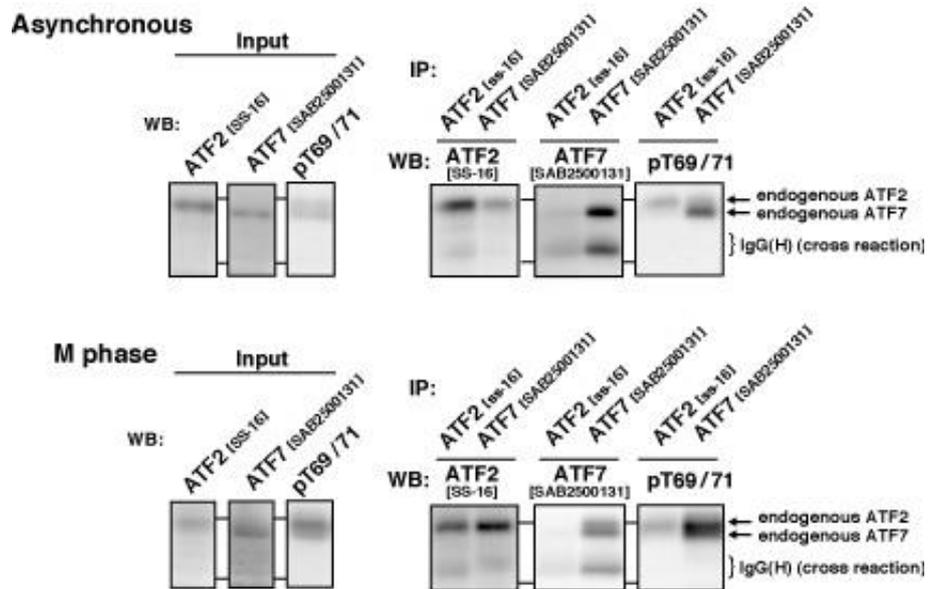


図2 ATF2 と ATF7 の interaction と M 期のリン酸化

非同調(Asynchronous)、M 期の両方において ATF2 と ATF7 が interaction する可能性がある。また、M 期において ATF2 と ATF7 の両方にリン酸化が見られる。

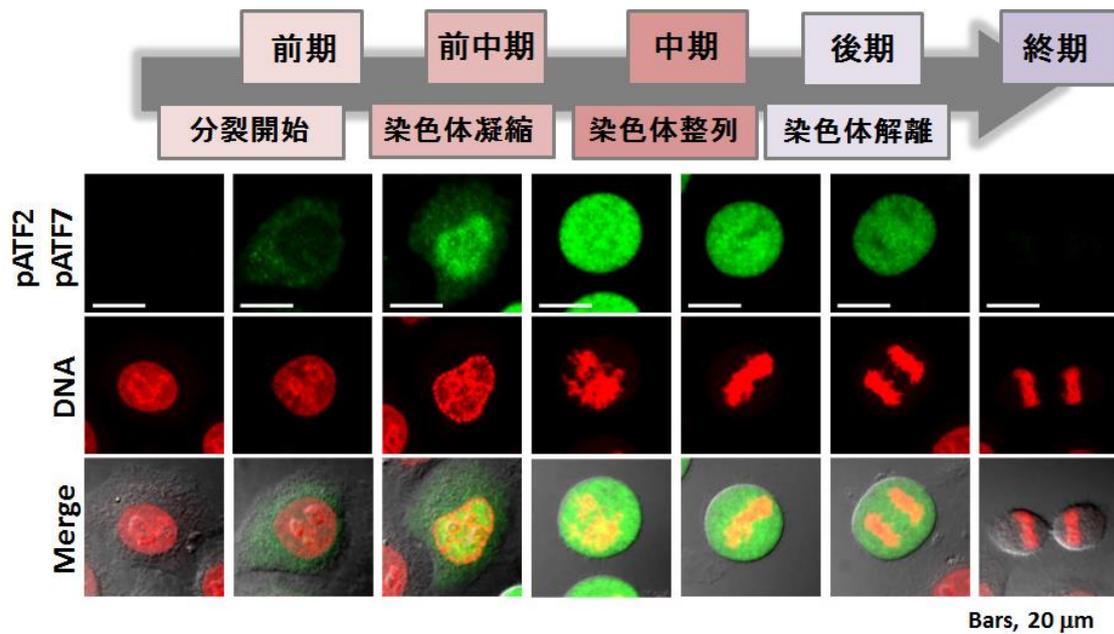


図3 M期における ATF2 と ATF7 のリン酸化の局在

M 期の前期から後期にかけて ATF2 と ATF7 のリン酸化が上昇し、主に細胞質に局在が見られた。

## 参考文献

- (1) Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 859-868, 2003.
- (2) Breitwieser W, Lyons S, Flenniken AM, Ashton G, Bruder G, et al. Feedback regulation of p38 activity via ATF2 is essential for survival of embryonic liver cells. *Genes Dev* 21: 2069-2082, 2007.
- (3) Diring J, Camuzeaux B, Donzeau M, Vigneron M, Rosa-Calatrava M, et al. A cytoplasmic negative regulator isoform of ATF7 impairs ATF7 and ATF2 phosphorylation and transcriptional activity. *PLoS ONE* 6: e23351, 2011
- (4) Walczynski J, Lyons S, Jones N, Breitwieser W. Sensitisation of c-MYC-induced B-lymphoma cells to apoptosis by ATF2. *Oncogene* 33: 1027-1036, 2014.
- (5) Takeda J, Maekawa T, Sudo T, Seino Y, Imura H, et al. Expression of the CRE-BP1 transcriptional regulator binding to the cyclic AMP response element in central nervous system, regenerating liver, and human tumors. *Oncogene* 6: 1009-1014, 1991.
- (6) Goetz J, Chatton B, Mattei MG, Kedinger C. Structure and expression of the ATF $\alpha$  gene. *J Biol Chem* 271: 29589-29598, 1996.
- (7) Yamasaki T, Takahashi A, Pan J, Yamaguchi N, Yokoyama KK. Phosphorylation of activation transcription factor-2 (ATF-2) at serine 121 by protein kinase C controls c-Jun-mediated activation of transcription. *J Biol Chem* 284: 8567-8581, 2009.
- (8) Camuzeaux B, Diring J, Hamard PJ, Oulad-Abdelghani M, Donzeau M, et al. p38 $\beta$ -mediated phosphorylation and sumoylation of ATF7 are mutually exclusive. *J Mol Biol* 384: 980-991, 2008.
- (9) Lau E, Kluger H, Varsano T, Lee K, Scheffler I, et al. PKC $\epsilon$  promotes oncogenic functions of ATF2 in the nucleus while blocking its apoptotic function at mitochondria. *Cell* 148: 543-555, 2012.
- (10) Bhoumik A, Takahashi S, Breitweiser W, Shiloh Y, Jones N, et al. ATM-dependent phosphorylation of ATF2 is required for the DNA damage response. *Mol Cell* 18: 577-587, 2005.
- (11) Bhoumik A, Lopez-Bergami P, Ronai Z. ATF2 on the double – activating transcription factor and DNA damage response protein. *Pigment Cell Res* 20: 498-506, 2007.
- (12) Ouwens DM, de Ruiter ND, van der Zon GC, Carter AP, Schouten J, et al.

Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through RalGDS-Src-p38. *EMBO J* 21: 3782-3793, 2002.

- (13) Maekawa T, Kim S, Nakai D, Makino C, Takagi T, et al. Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J* 29: 196-208, 2010.
- (14) Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ. Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267: 389-393, 1995.
- (15) van Dam H, Wilhelm D, Herr I, Steffen A, Herrlich P, et al. ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J* 14: 1798-1811, 1995.
- (16) Livingstone C, Patel G, Jones N. ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J* 14: 1785-1797, 1995.
- (17) Morton S, Davis RJ, Cohen P. Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS Lett* 572: 177-183, 2004.
- (18) Li XY, Green MR. Intramolecular inhibition of activating transcription factor-2 function by its DNA-binding domain. *Genes Dev* 10: 517-527, 1996.
- (19) Benbrook DM, Jones NC. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* 5: 295-302, 1990.
- (20) Chatton B, Bocco JL, Gaire M, Hauss C, Reimund B, et al. Transcriptional activation by the adenovirus larger E1a product is mediated by members of the cellular transcription factor ATF family which can directly associate with E1a. *Mol Cell Biol* 13: 561-570, 1993.
- (21) Kawasaki H, Song J, Eckner R, Ugai H, Chiu R, et al. p300 and ATF-2 are components of the DRF complex, which regulates retinoic acid- and E1A-mediated transcription of the c-jun gene in F9 cells. *Genes Dev* 12: 233-245, 1998.
- (22) de Graeve F, Bahr A, Sabapathy KT, Hauss C, Wagner EF, et al. Role of the ATFa/JNK2 complex in Jun activation. *Oncogene* 18: 3491-3500, 1999.
- (23) Jin C, Ugai H, Song J, Murata T, Nili F, et al. Identification of mouse Jun dimerization protein 2 as a novel repressor of ATF-2. *FEBS Lett* 489: 34-41, 2001.
- (24) Hamard PJ, Dalbies-Tran R, Hauss C, Davidson I, Kedinger C, et al. A functional interaction between ATF7 and TAF12 that is modulated by TAF4.

- Oncogene 24: 3472-3483, 2005.
- (25) Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 21-32, 2001.
  - (26) Pines J, Rieder CL. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat Cell Biol* 3: E3-E6, 2001.
  - (27) Maekawa T, Bernier F, Sato M, Nomura S, Singh M, et al. Mouse ATF-2 null mutants display features of a severe type of meconium aspiration syndrome. *J Biol Chem* 274: 17813-17819, 1999.
  - (28) Lau E, Ronai Z. ATF2 – at the crossroad of nuclear and cytosolic functions. *J Cell Sci* 125: 1-10, 2012.
  - (29) Newman JRS, Keating AE. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science* 300: 2097-2101, 2003.
  - (30) Fuchs SY, Ronai Z. Ubiquitination and degradation of ATF2 are dimerization dependent. *Mol Cell Biol* 19: 3289-3298, 1999.
  - (31) Fuchs SY, Tappin I, Ronai Z. Stability of the ATF2 transcription factor is regulated by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 275: 12560-12564, 2000.
  - (32) Barr AR, Gergely F. Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci* 120: 2987-2996, 2007.
  - (33) Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, et al. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem* 278: 51786-51795, 2003.
  - (34) Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, et al. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114: 585-598, 2003.
  - (35) de Castro IP, de Cárcer G, Montoya G, Malumbres M. Emerging cancer therapeutic opportunities by inhibiting mitotic kinases. *Curr Opin Pharmacol* 8: 375-383, 2008.
  - (36) Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, et al. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* 7: 1173-1182, 2002.
  - (37) Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102: 279-291, 2000.
  - (38) Giet R, Glover DM. Drosophila Aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensing recruitment during chromosome

- condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol* 152: 669-682, 2001.
- (39) Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, et al. Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian aurora kinases. *Mol Cell Biol* 22: 874-885, 2002.
- (40) Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 798-812, 2007.
- (41) Acquaviva C, Pines J. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J Cell Sci* 119: 2401-2404, 2006.
- (42) Bassermann F, Eichner R, Pagano M. The ubiquitin proteasome system-implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta* 1843: 150-162, 2014.
- (43) Clute P, Pines J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat Cell Biol* 1: 82-87, 1999.
- (44) Chow JPH, Siu WY, Ho HTB, Ma KHT, Ho CC, et al. Differential contribution of inhibitory phosphorylation of CDC2 and CDK2 for unperturbed cell cycle control and DNA integrity checkpoints. *J Biol Chem* 278: 40815-40828, 2003.
- (45) Kuga T, Nakayama Y, Hoshino M, Higashiyama Y, Obata Y, et al. Differential mitotic activation of endogenous c-Src, c-Yes, and Lyn in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys* 466: 116-124, 2007.
- (46) Aoyama K, Yuki R, Horiike Y, Kubota S, Yamaguchi N, et al. Formation of long and winding nuclear F-actin bundles by nuclear c-Abl tyrosine kinase. *Exp Cell Res* 319: 3251-3268, 2013.
- (47) Nakayama Y, Matsui Y, Takeda Y, Okamoto M, Abe K, et al. c-Src but not Fyn promotes proper spindle orientation in early prometaphase. *J Biol Chem* 287: 24905-24915, 2012.
- (48) Fukumoto Y, Obata Y, Ishibashi K, Tamura N, Kikuchi I, et al. Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology* 62: 73-82, 2010.
- (49) Kubota S, Fukumoto Y, Ishibashi K, Soeda S, Kubota S, et al. Activation of the pre-replication complex is blocked by mimosine through reactive oxygen species-activated Ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein without DNA damage. *J Biol Chem* 289: 5730-5746, 2014.
- (50) Knehr M, Poppe M, Enulescu M, Eickelbaum W, Stoehr M, et al. A critical appraisal of synchronization methods applied to achieve maximal enrichment of HeLa cells in specific cell cycle phases. *Exp Cell Res* 217: 546-553, 1995.

- (51) Kasahara K, Nakayama Y, Nakazato Y, Ikeda K, Kuga T, et al. Src signaling regulates completion of abscission in cytokinesis through ERK/MAPK activation at the midbody. *J Biol Chem* 282: 5327-5339, 2007.
- (52) Matsui Y, Nakayama Y, Okamoto M, Fukumoto Y, Yamaguchi N. Enrichment of cell populations in metaphase, anaphase, and telophase by synchronization using nocodazole and blebbistatin: a novel method suitable for examining dynamic changes in proteins during mitotic progression. *Eur J Cell Biol* 91: 413-419, 2012.
- (53) Takahashi A, Obata Y, Fukumoto Y, Nakayama Y, Kasahara K, et al. Nuclear localization of Src-family tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. *Exp Cell Res* 315: 1117-1141, 2009.
- (54) Pan J, Nakade K, Huang YC, Zhu ZW, Masuzaki S, et al. Suppression of cell-cycle progression by Jun dimerization protein-2 (JDP2) involves downregulation of cyclin-A2. *Oncogene* 29: 6245-6256, 2010.
- (55) Tanigawa S, Lee CH, Lin CS, Ku CC, Hasegawa H, et al. Jun dimerization protein 2 is a critical component of the Nrf2/MafK complex regulating the response to ROS homeostasis. *Cell Death Dis* 4: e921, 2013.
- (56) Kasahara K, Nakayama Y, Ikeda K, Fukushima Y, Matsuda D, et al. Trafficking of Lyn through the Golgi caveolin involves the charged residues on  $\alpha$ E and  $\alpha$ I helices in the kinase domain. *J Cell Biol* 165: 641-652, 2014.
- (57) Sato I, Obata Y, Kasahara K, Nakayama Y, Fukumoto Y, et al. Differential trafficking of Src, Lyn, Yes and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain. *J Cell Sci* 122: 965-975, 2009.
- (58) Ishibashi K, Fukumoto Y, Hasegawa H, Abe K, Kubota S, et al. Nuclear ErbB4 signaling through H3K9me3 is antagonized by EGFR-activated c-Src. *J Cell Sci* 126: 625-637, 2013.
- (59) Kubota S, Fukumoto Y, Aoyama K, Ishibashi K, Yuki R, et al. Phosphorylation of KRAB-associated protein 1 (KAP1) at Tyr-449, Tyr-458, and Tyr-517 by nuclear tyrosine kinases inhibits the association of KAP1 and heterochromatin protein 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) with heterochromatin. *J Biol Chem* 288: 17871-17883, 2013.

## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

**Hasegawa, H.**, Ishibashi, K., Kubota, S.-i., Yamaguchi, C., Yuki, R., Nakajo, H., Eckner, R., Yamaguchi, N.-t., Yokoyama, K.K., and Yamaguchi, N. Cdk1-mediated phosphorylation of human ATF7 at Thr-51 and Thr-53 promotes cell-cycle progression into M phase. PLoS One, 9: e116048, 2014.

本文中では「発表論文」として引用した。

本学位の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学大学院	(薬学研究院)	薬学博士	村山俊彦
副査	千葉大学大学院	(薬学研究院)	薬学博士	伊藤素行
副査	千葉大学大学院	(医学研究院)	医学博士	岩間厚志

## 謝辞

本研究に際し、終始的確で丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学研究室 山口直人教授に深く感謝いたします。様々な面から御協力を賜り、共同研究をさせていただいた、横山和尚教授（高雄醫學大學）に心から御礼申し上げます。また、論文発表や学会発表に際し多くの助言を下さいました、元准教授 中山祐治先生（現京都薬科大学教授）、講師 福本泰典先生、助教 山口憲孝先生に感謝いたします。

ご多忙の中、本学位の審査をしてくださった村山俊彦教授、伊藤素行教授、岩間厚志教授に心から御礼申し上げます。

先生方からご指導いただいたことを深く心に刻み、今後の研究で活かせられるよう努力して参ります。

また、研究を進めるにあたり、分子細胞生物学研究室の方々からは沢山のアドバイスを承りました。皆様と同じ研究室で過ごし、励ましあいながらも、深夜早朝問わず研究に没頭した日々は、かけがえのないもので御座います。心よりお礼申し上げます。

最後に、これまで学生生活を支え続けてくれた家族に感謝いたします。