

東京農業大学

博士論文

cyclin A-CDK の活性亢進が誘導する  
細胞周期制御機構の解析

令和2年度 修了

農学研究科バイオサイエンス専攻

赤池 康範

令和2年度

cyclin A-CDKの活性亢進が誘導する  
細胞周期制御機構の解析

バイオサイエンス専攻

赤池 康範

# cyclin A-CDK の活性亢進が誘導する 細胞周期制御機構の解析

東京農業大学大学院農学研究科

バイオサイエンス専攻

令和2年度 博士課程修了

赤池 康範

指導教授 千葉櫻 拓

# 目次

序章	1
本研究に至る研究背景	8
第1章 ヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進が及ぼす	
細胞周期への影響の解析	15
1-1 ヒト細胞株における CycA $\Delta$ 80 が及ぼす	
細胞周期への影響の解析	
第1節 序	
第2節 結果	
第3節 考察	
1-2 擬似的 3-KO ヒト細胞における CycA $\Delta$ 80 の影響	26
第1節 序	
第2節 結果	
第3節 考察	

## 第2章 ヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進による

### G2/M 期停滞誘導機構の解明 31

#### 2-1 E1A の CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞の促進機構の解析

##### 第1節 序

##### 第2節 結果

##### 第3節 考察

#### 2-2 細胞周期チェックポイントによる

### G2/M 期停滞誘導機構の解析 40

##### 第1節 序

##### 第2節 結果

##### 第3節 考察

## 第3章 E1A による CycA-CDK2 活性促進機構の解 49

##### 第1節 序

##### 第2節 結果

##### 第3節 考察

総合討論	60
材料	72
実験手法	77
参考文献	84
謝辞	90

## 序章

細胞増殖は生命において根源的な事象であり、細胞内で起きる多くの事象は最終的に細胞増殖に関与している。細胞増殖は主に「複製」と「分裂」のサイクルが必要であり、我々ヒトを含む動物細胞においても共通している。動物細胞の細胞増殖は G1 (Gap1) 期→S (Synthesis) 期→G2 (Gap2) 期→M (Mitosis) 期という4つの Phase からなる一方通行のサイクルであり、細胞周期と呼ばれている。細胞周期を進行させると同時に、周期性をもたらしているのが cyclin- cyclin 依存性キナーゼ (CDK) 複合体である。cyclin と CDK には複数の種類が存在し、細胞周期の各時期において発現している cyclin とそれによって活性化される CDK が決まっており、この cyclin の時期特異的発現が細胞周期に周期性をもたらしている<sup>1-3</sup>。

哺乳動物の細胞周期制御に関連する主要な cyclin-CDK 複合体は cyclin D (CycD) -CDK4/6, cyclin E (CycE) -CDK2, cyclin A (CycA) -CDK2/1, cyclin B (CycB) -CDK1 であり、CycD-CDK4/6 は G1 期、CycE-CDK2 は G1/S 期、CycB-CDK1 は G2/M 期と機能する時期が明確に分かれている。

CycA と CycB は M 期前中期から後期にかけて分解シグナル配列である破壊ボックス (destruction box: D-box) のポリユビキチン化依存的なプロテアソームによる分解制御を受けている<sup>4,5</sup>。この分解制御の生理的意義として、CycB の分解制御は細胞分裂にとって必須な制御である一方で、CycA の分解制御の生理的意義は不明であった。そこで、我々の研究グループは哺乳動物細胞における CycA の分解制御の重要性について研究を進めてきた。

## 本研究に関連する因子・制御機構

- cyclin-cyclin dependent kinase (CDK) の活性制御

cyclin-CDK 複合体は細胞周期進行を担う主な因子<sup>1-3</sup>であり、CDK 活性は 3つの機構により制御されている。一つ目は cyclin の分解制御である。CDK は cyclin と複合体を形成することで機能する。Anaphase-promoting complex (APC) は E3 ユビキチンリガーゼの 1つであり、CycA と CycB が持つ分解シグナル配列である D-box を認識し、ポリユビキチン化することで cyclin のプロテアソーム分解を誘導する<sup>4,5</sup>。しかし、CDK 活性は cyclin との結合のみで制御されているわけではない。二つ目は CDK 内のチロシン・スレオニンのリン酸化である。CDK のリン酸化による制御は 2 パターン存在する。CDK2 は Wee1 により 15 番目のチロシンをリン酸化されることで CDK 活性が抑制され、cdc25A により脱リン酸化されることで抑制が解除される。逆に CDK-activating kinase (CAK) により 160 番目のスレオニンをリン酸化されることで CDK2 は活性化する<sup>6</sup>。三つ目が CDK inhibitor (CKI) の結合である。哺乳動物細胞の主な CKI として p21 と p27 が知られている。CKI は主に G1 期で cyclin-CDK 複合体と結合することで CDK 活性を抑制し、S 期移行を抑制する<sup>7,8</sup> (Fig. 0-1)。

- CycA-CDK2 の細胞周期における制御

CycA は CDK1、CDK2 と複合体を形成する<sup>9</sup>。CycA は G1/S 遷移期から M 期の前中期まで機能するが、その後 APC による D-box を介したポリユビキチン化に依存してプロテアソームにより分解される<sup>5</sup>。また、G1 期においては CKI の結合により CycA-CDK 複合体の活性は抑制されており、細胞周期を通じて厳密な制御を受けている<sup>10</sup>。そのため CycA の異常な安定化や発現は染色体の整列や分裂期後期の開始を遅らせることでゲノム不安定化を誘導する<sup>5,11</sup>。一方で、CDK2 活性は ATR-Chk1 経路を介した細胞周期チェックポイントを誘導することも知られている<sup>12</sup>。CDK2 による Chk1 活性化は cdc25A の活性抑制を介して CDK1 の抑制的リン酸化を維持することで細胞周期を停止させる。そのため細胞周期チェックポイント制御にも CDK2 は深くかかわっている (Fig. 0-2)。



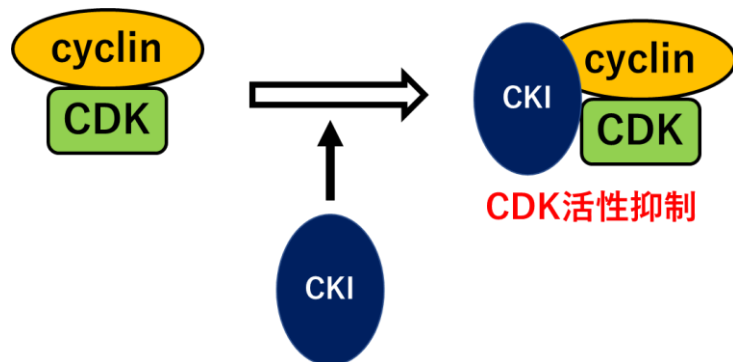
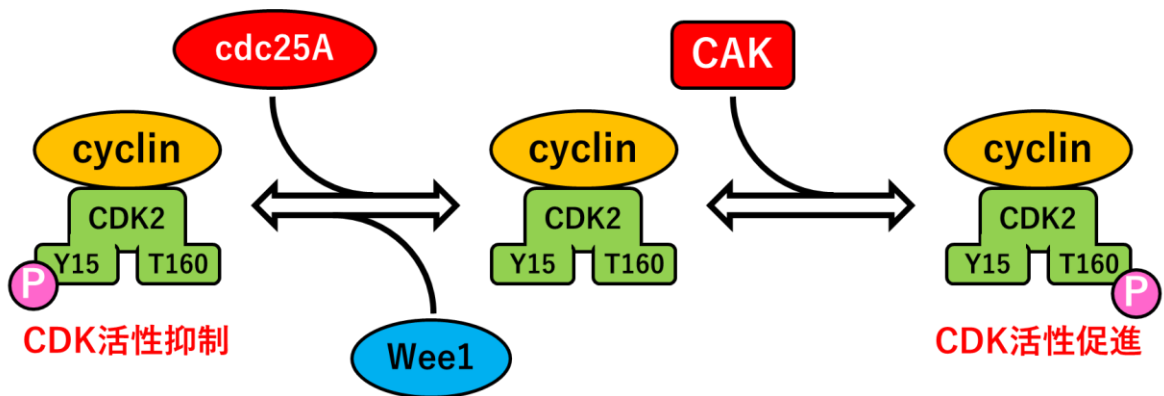
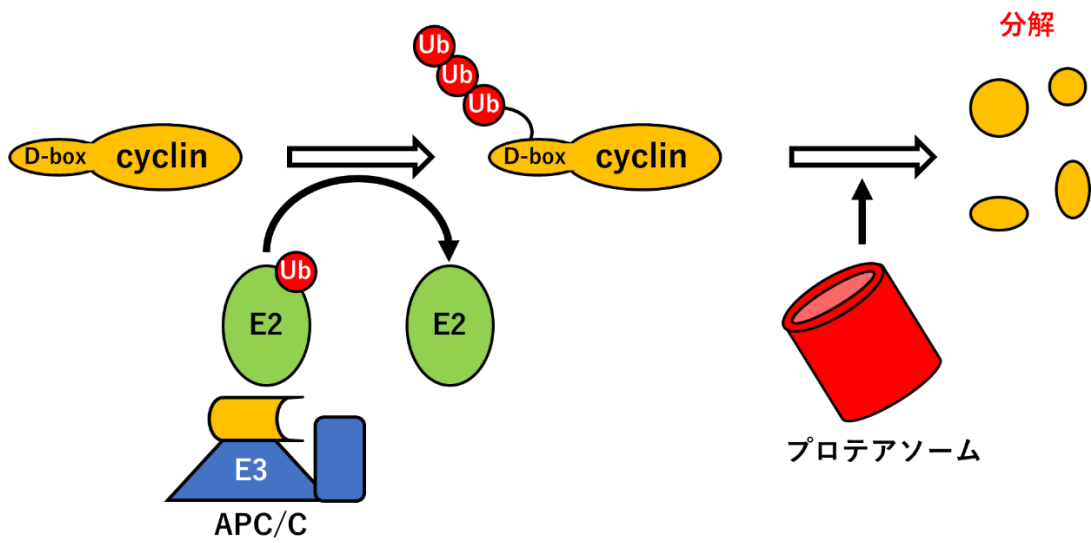


Fig. 0-1 cyclin-CDK の活性制御

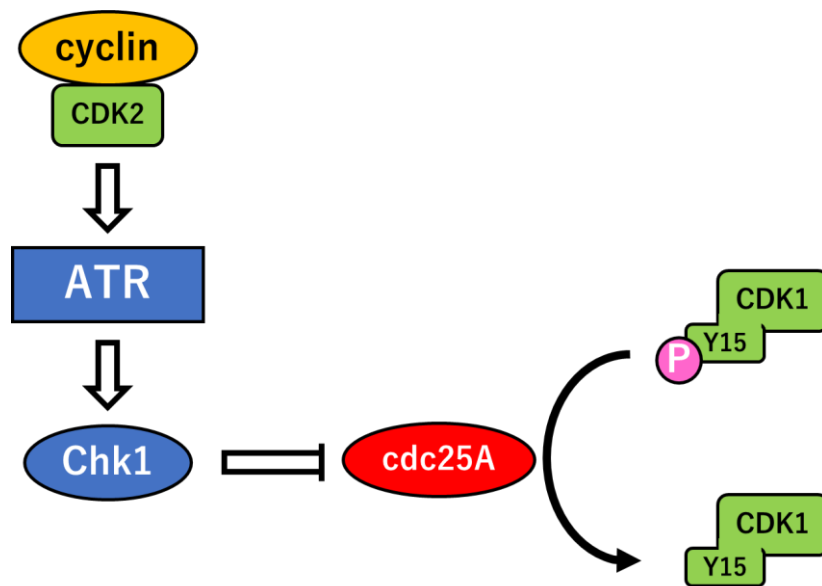
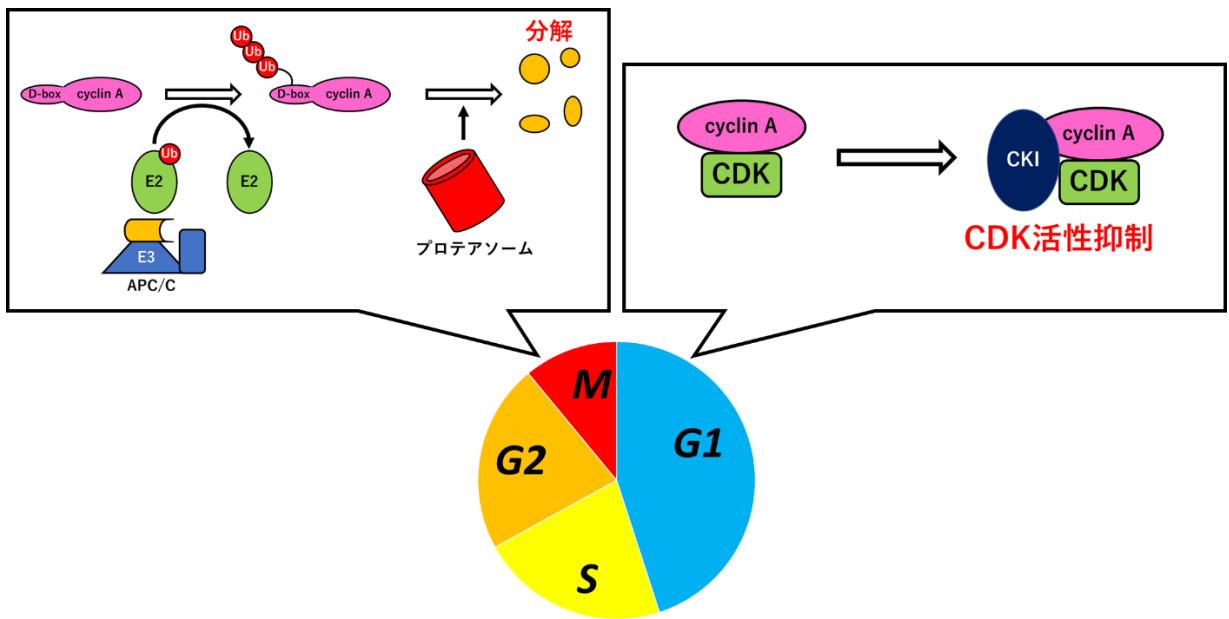


Fig. 0-2 CycA-CDK2 の細胞周期における制御

- アデノウイルスタンパク質 E1A による細胞周期制御の破綻

E1A はアデノウイルスが感染後初期に発現し、他のウイルスタンパク質発現に関与する<sup>13</sup>。E1A は 5 つのスプライシングバリエントを持つ<sup>14</sup>。また、E1A には血清型間で保存された領域である CR (conserved region) ドメインが 4 種類 (CR1, CR2, CR3, CR4) 存在しており<sup>15</sup>、スプライシングバリエント間で保持する CR ドメインの組み合わせが異なる。E1A はがん抑制因子として知られる pRb と結合することで、pRb を転写因子 E2F から引き離し、pRb の細胞周期制御を破綻させることからがん原タンパク質としても知られている (Fig. 0-3)<sup>16,17</sup>。CR2 の LxCxE モチーフにおいて pRb と結合するが、この LxCxE モチーフはヒトパピローマウイルスの E7 や SV40 ウイルスの large T 抗原にも保存されている<sup>18</sup>。しかしながら、E1A による E2F からの pRb の解離は CR1 も関与している報告がある<sup>19,20</sup>。また、E1A による細胞周期制御の破綻は pRb との結合によるものだけではない。CKI の p27 や CKI 同様 CDK 活性を抑える INK4 ファミリーの p16 による細胞周期停止を LxCxE モチーフ非依存的に解除すること<sup>21</sup> や複製関連因子の発現を誘導することで、S 期移行や複製フォークの速度を促進することも報告されている<sup>22</sup>。

- E1A と CycA の複合体形成

E1A は Rb-like family の 1 つである p107 と CycA-CDK2 と複合体を形成することが報告されている<sup>23</sup>。p107-CycA-CDK2 との複合体は pRb との複合体とは独立しており、CR1 と CR2 が p107 との結合に重要であることが知られている<sup>20</sup>。しかし、E1A-p107-CycA-CDK2 複合体の機能や生理的役割については未だに不明である。

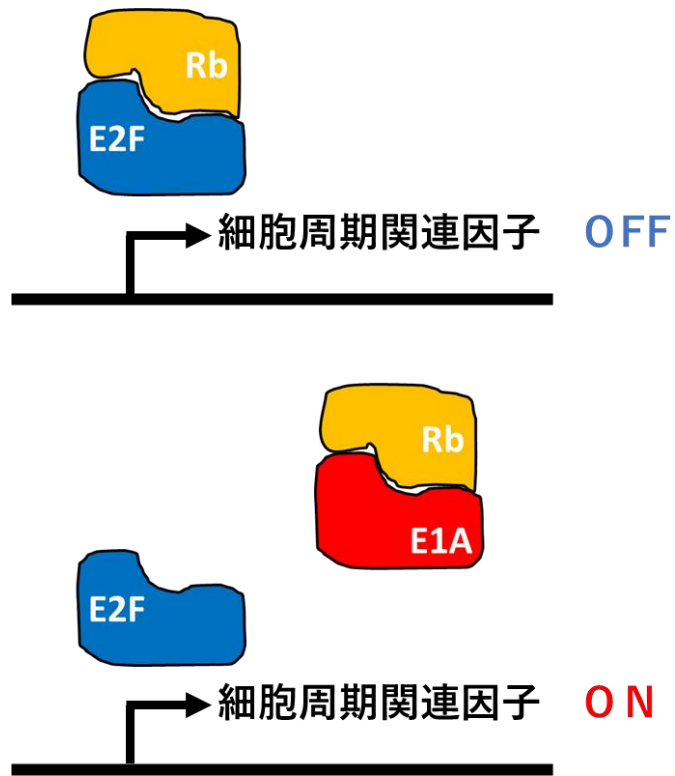


Fig. 0-3 E1A による Rb の E2F 不活性化の阻害

- 細胞老化におけるヒト・マウス細胞間の違い

動物細胞は細胞増殖を長期的に繰り返すと細胞増殖の限界を迎え、細胞老化を起こすことが Hayflick らにより提唱されている (Fig. 0-4)<sup>24,25</sup>。ヒト細胞では約 50 回程度の細胞分裂後、細胞老化が誘導される。一方で、マウス細胞においても細胞分裂回数の限界と細胞老化は存在するが、細胞老化誘導後に、その制御を脱して細胞増殖を続ける不死化細胞の出現が確認されている<sup>26</sup>。このことからヒト・マウス細胞間には、細胞周期制御における厳密性の違いが存在することが考えられる。

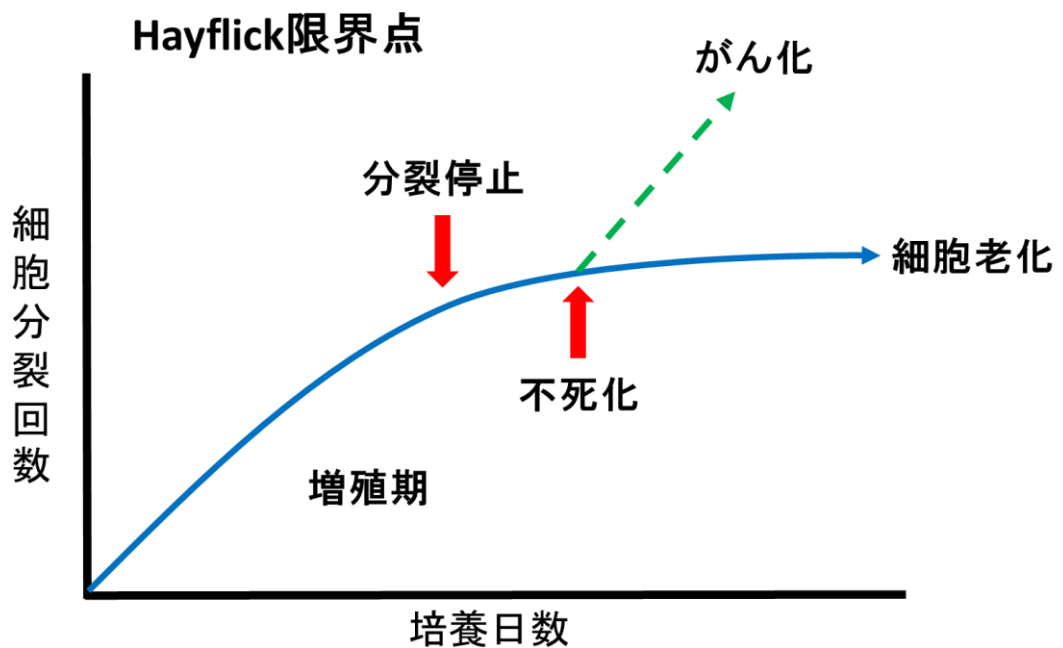


Fig. 0-4 Hayflick 限界点

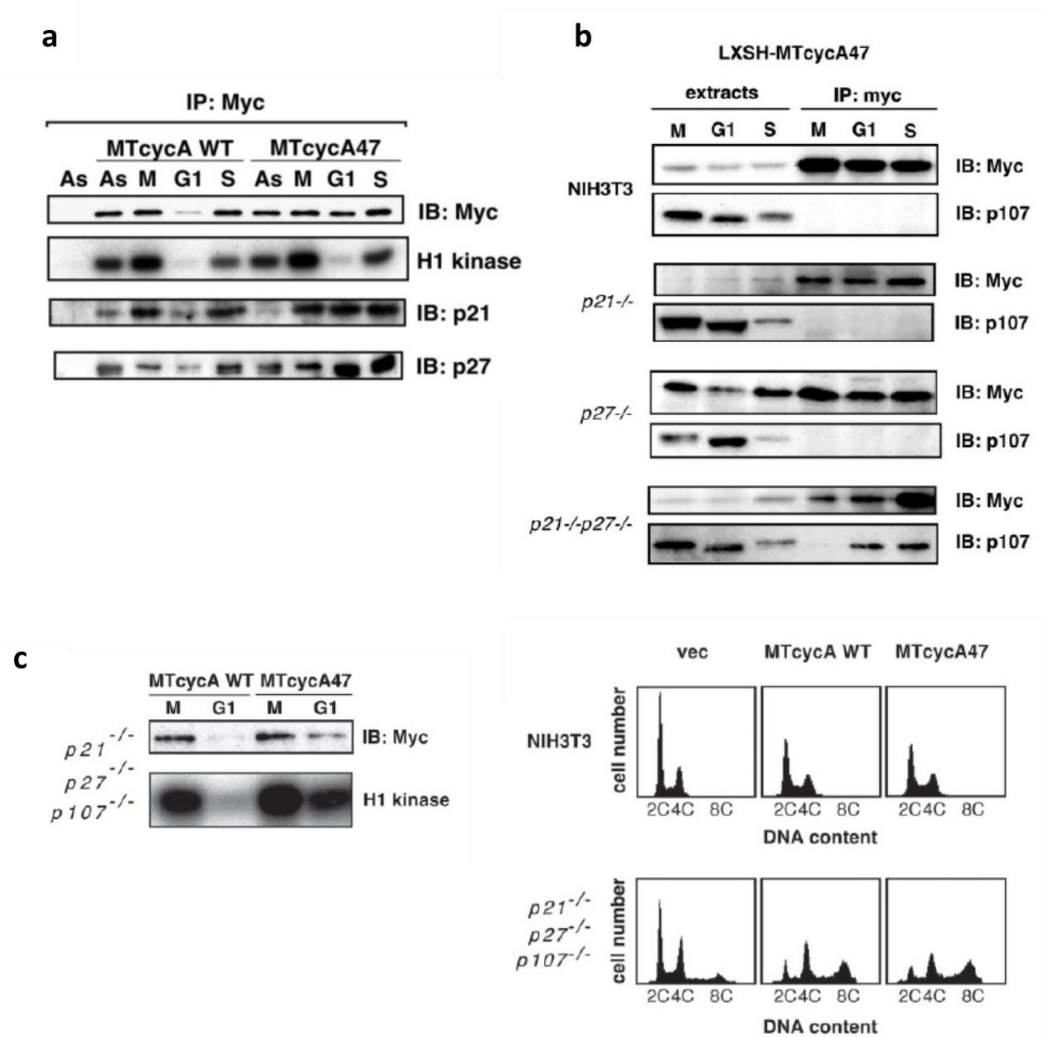
## 本研究に至る研究背景

- M-G1 期における CycA-CDK 活性化による染色体倍数化<sup>27</sup>

CycA の分解制御の重要性を解析するため、哺乳類 CycA D-box 内の保存性が高い3つのアミノ酸をアラニン置換し、プロテアソーム分解に抵抗性を持つ CycA (CycA47) を用いたところ、G1 期での CycA 発現は保たれる一方で、CDK 活性は抑制されたままであることが見出された。原因として、CKI である p21、p27 と pRb-like family の1つである p107 のいずれかが CDK と結合していることが示された。そこで、p21、p27、p107 を三重欠損させた 3-KO 細胞を用いたところ、G1 期において CycA47-CDK の活性が検出された。本来 M-G1 期では抑制されている CycA-CDK 活性の細胞周期への影響を flow cytometry (FACS) により解析したところ染色体の倍数化を誘導することが示された (Fig. 0-5)<sup>27</sup>。

- M-G1 期における CycA-CDK 活性化による染色体倍数化誘導機構<sup>28</sup>

CycA-CDK 活性制御の重要性を解明するため、M-G1 期における CycA-CDK 活性化の染色体倍数化の詳しい誘導機構の解析が行われた。ここでは D-box を含む N 末端側 80 アミノ酸を欠損させ、CycA47 よりも安定性の高い CycA $\Delta$ 80 を用いて解析を行っている<sup>5,29</sup>。まず染色体倍数化が誘導される細胞周期時期の特定を細胞周期進行阻害薬剤により行った。S 期進行阻害薬剤である hydroxyurea (HU) と M 期進行阻害薬剤である nocodazole (Noc) を用いて 3-KO 細胞において細胞周期進行阻害およびその解除を行い、CycA $\Delta$ 80 による染色体倍数化の誘導を確認したところ、どちらの薬剤添加においても染色体倍数化が誘導されなかった一方で、両薬剤による進行阻害を解除した場合に倍数化が誘導された (Fig. 0-6)。この結果から染色体倍数化は M 期中期以降に誘導されることが推測された。そこで、タイムラプス観察により細胞分裂を継時的に観察したところ、CycA $\Delta$ 80 を発現している細胞において細胞分裂のスキップが確認された (Fig. 0-7)。さらに中心体数の確認を免疫蛍光染色により観察したところ、中心体数の異常が確認された (Fig. 0-8)。また、薬剤による S 期進行阻害では中心体数異常が確認されなかった一方で、M 期進行阻害では中心体数の異常が誘導されていた (Fig. 0-8)。以上のことから M-G1 期における CycA-CDK 活性化、つまり CycA-CDK 活性制御破綻による染色体倍数化は、S 期における中心体過剰複製とそれに伴う細胞分裂のスキップにより誘導されていることが示唆された (Fig. 0-9)<sup>28</sup>。



**Fig. 0-5** *p21*, *p27*, *p107* 三重欠損細胞における *CycA47* の影響<sup>27</sup>

(a) *p21*, *p27* と *CycA47* の結合解析

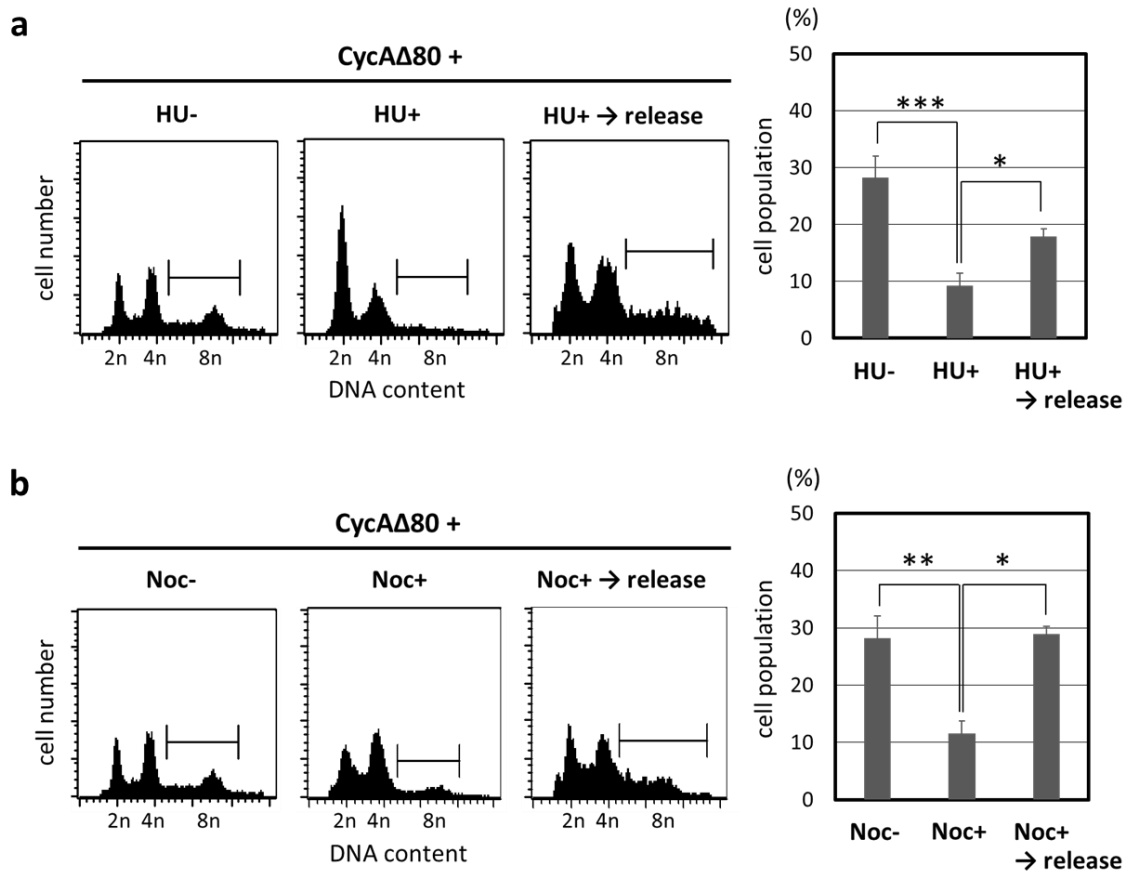
NIH3T3 の *CycA47* 安定発現細胞株において、非同期条件と Noc による細胞同調後、M 期細胞は Noc block、G1 期細胞は Noc release 120 min 後、S 期細胞は 16 h 後として細胞回収。myc-tag 抗体による免疫沈降により *CycA* と CKI の結合を検証。

(b) *p21*, *p27* 二重欠損細胞における *CycA47* と *p107* の結合解析

(a)と同様の細胞同調条件において細胞回収を行い、*p107* との結合を検証。

(c) *p21*, *p27*, *p107* 三重欠損細胞における *CycA47*-CDK の活性測定と FACS 解析

活性測定用サンプルにおいては(a)と同様の細胞同調条件により細胞回収を行い、Histone H1 キナーゼ活性測定により CDK 活性を解析。FACS 解析用サンプルは細胞同調を行わず細胞回収している。



**Fig. 0-6 染色体倍数化誘導の細胞周期特異性**<sup>28</sup>

(a) Hydroxyurea (HU) による S 期同調時の染色体倍数化誘導

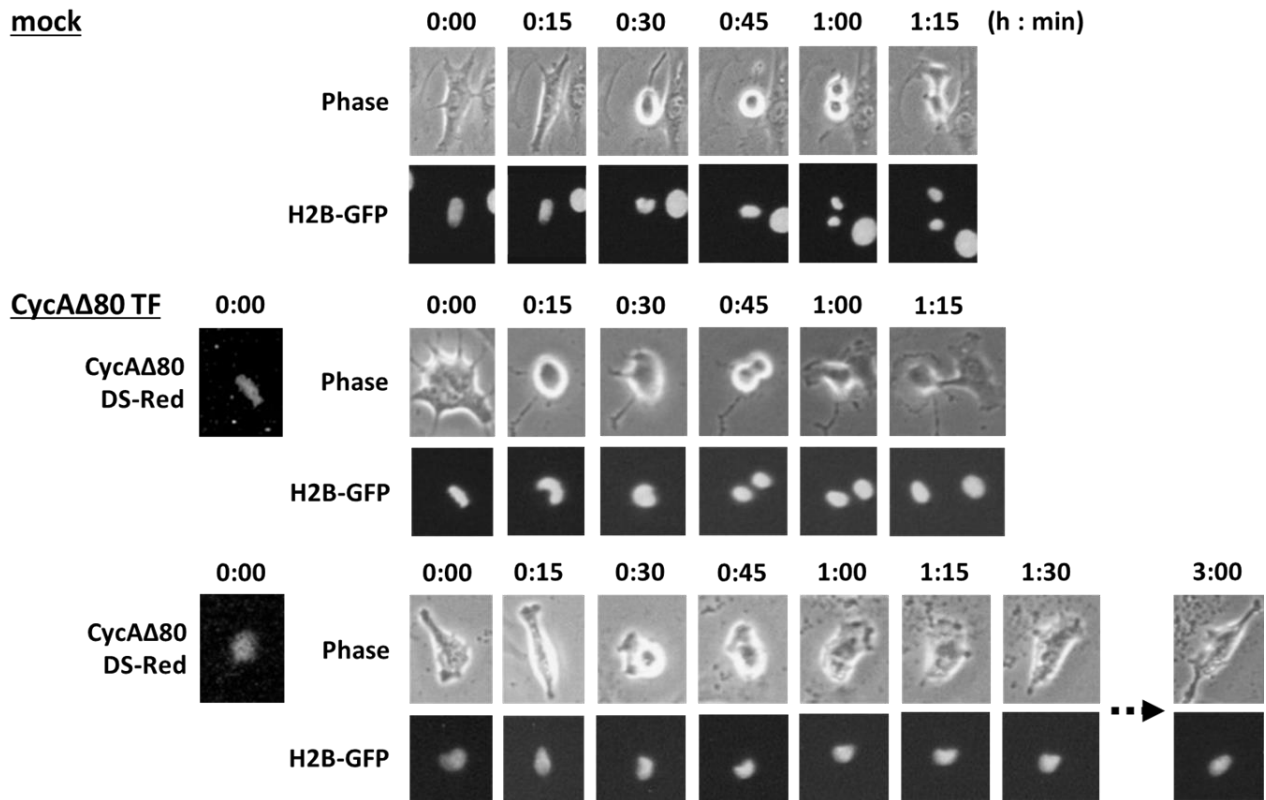
3-KO 細胞に pCS mtCycA  $\Delta$  80 と pCMV CD20 を共トランスフェクションし、CD20 を認識する FITC 抗体により発せられる FITC の蛍光強度を TF 効率の高さとし、蛍光強度が閾値よりも高い細胞を外来性 CycA がトランスフェクションされた細胞として解析した。HU+は添加 28 h 後に細胞回収。release は HU 除去 28 h 後に細胞回収。

(b) Nocodazole (Noc) による M 期同調時の染色体倍数化誘導

3-KO 細胞に pCS mtCycA  $\Delta$  80 と pCMV CD20 を共トランスフェクションし、CD20 を認識する FITC 抗体により発せられる FITC の蛍光強度を TF 効率の高さとし、蛍光強度が閾値よりも高い細胞を外来性 CycA がトランスフェクションされた細胞として解析した。Noc+は添加 24 h 後に細胞回収。release は Noc 除去 16 h 後に細胞回収。

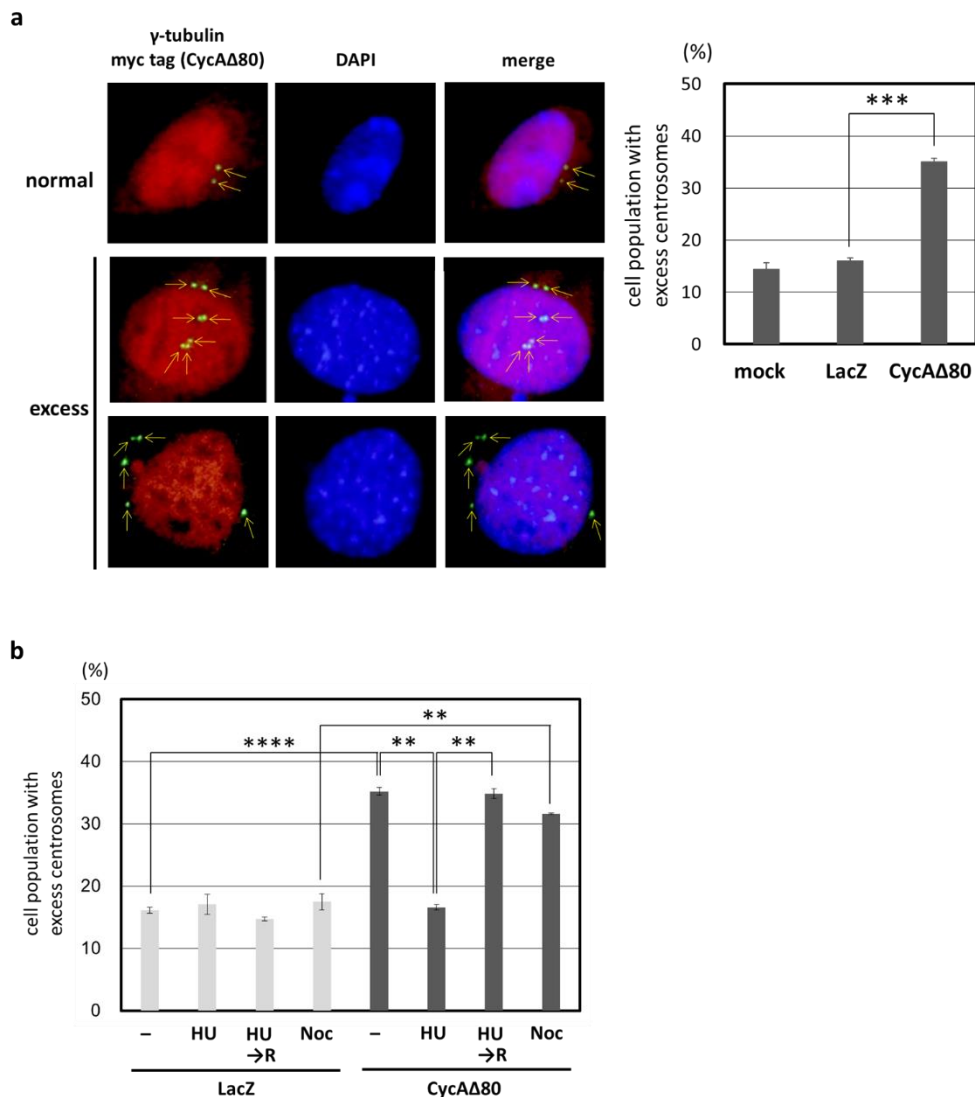
\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$





**Fig. 0-7 CycAΔ80 発現細胞のタイムラプスによる細胞分裂の継時的観察<sup>28</sup>**

3-KO 細胞に pCS (mock) もしくは pCS CycA Δ 80 DS-red と共に H2B-GFP を発現するプラスミドを共トランスフェクションし、15 min 間隔でタイムラプス観察を行っている。



**Fig. 0-8 CycA $\Delta$ 80 による中心体数異常の誘導<sup>28</sup>**

(a) 免疫蛍光染色による中心体数の比較

3-KO 細胞に pCSMT (mock)、pCSMT lacZ、pCSmtCycA  $\Delta$  80 をトランスフェクションし、myc-tag 抗体(赤)と  $\gamma$ -tubulin 抗体(緑)により免疫蛍光染色を行い、mtCycA  $\Delta$  80 発現細胞における中心体数を解析した。

(b) 細胞周期同調薬剤による細胞周期同調時の中心体数の比較

HU+は添加 26 h 後、HU release は除去 26 h 後、Noc+は添加 24 h 後に(a)同様に免疫蛍光染色を行っている。

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

# プロテアソーム

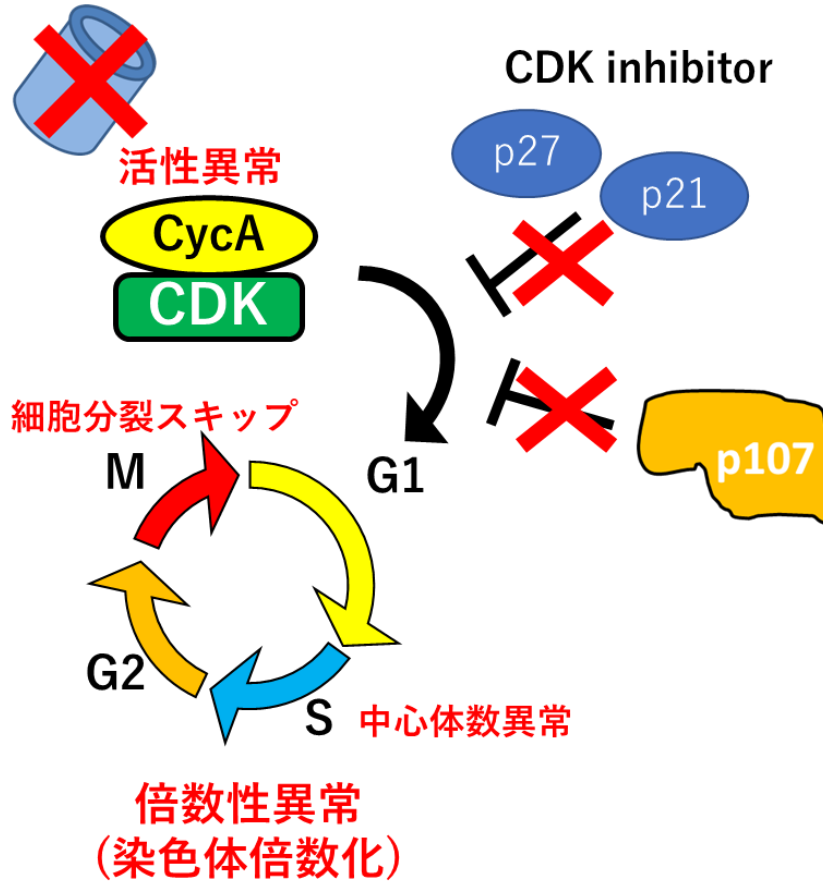


Fig. 0-9 CycA-CDK 活性亢進による染色体倍数化誘導モデル

## 本研究の目的

今までの研究により、M-G1 期における CycA タンパク質分解の阻害と CDK 阻害因子の欠損による CycA-CDK 活性制御破綻は、中心体数異常による細胞分裂スキップにより染色体倍数化を引き起こすことが示唆され、CycA-CDK 活性制御は細胞周期の恒常性維持にとって非常に重要であることが考えられる。しかし、以上の研究で用いた 3-KO 細胞はマウス由来の細胞であり、マウス細胞は老化に対する細胞周期制御の厳密性を欠いていることが知られている。このことから、CycA-CDK 活性制御破綻による染色体倍数化は、マウス細胞特異的な現象である可能性が考えられ、CycA-CDK 活性制御の普遍的な生理的意義を解明するためには、ヒト細胞での解析は不可欠である。そこで本研究では、ヒト細胞における CycA-CDK 活性制御破綻が及ぼす細胞周期への影響を解析することで、CycA-CDK 活性制御の生理的意義の理解を深めることを目的とした。

## 第1章 ヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進が及ぼす細胞周期への影響の解析

### 1-1 ヒト細胞株における CycA $\Delta$ 80 が及ぼす細胞周期への影響の解析<sup>30</sup>

#### 第1節 序

ヒト細胞での CycA-CDK 活性制御破綻による細胞周期への影響を解析するにあたって、いくつかのヒト細胞株において CycA $\Delta$ 80 を発現させた際の FACS 解析による細胞周期への影響、Histone H1 を用いた CDK 活性測定、Western 解析による CKI (p21, p27, p107) の発現量について細胞株間比較を行った。さらに、CycA-CDK 活性亢進による影響の CDK 活性依存性を CycA 及び CDK2 変異体を用いて検証した。

- (1) ヒト細胞における CycA $\Delta$ 80 の影響
- (2) Histone H1 を用いたヒト細胞株間の CDK 活性比較
- (3) ヒト細胞株間の CKI (p21, p27, p107) の発現量比較
- (4) CDK 活性依存性の検証

## 第2節 結果

### (1) ヒト細胞における CycA $\Delta$ 80 の影響

アデノウイルスゲノムが導入されたトランスフォーム細胞株である HEK293、がん細胞株である MDAH041, U-2 OS, HT1080, Saos-2、正常細胞株である WI-38 について CycA 野生型 (WT)・ $\Delta$ 80 をそれぞれ発現させた。CycAWT においては U-2 OS, MDAH041, Saos-2 において G1 期細胞の減少と S 期細胞の蓄積がみられ、過去の報告と一致している<sup>10,31</sup>。一方で、CycA $\Delta$ 80 を発現させた際には HEK293 と MDAH041 において CycAWT を発現させた時とは異なり G2/M 期停滞が誘導された (Fig. 1-1)。また、他の細胞種では CycAWT を発現させた時と同じプロファイルを示した。

### (2) Histone H1 を用いたヒト細胞株間の CDK 活性比較

(1) により CycA $\Delta$ 80 の影響を検証した 6 種のヒト細胞株における CycAWT-CDK・CycA $\Delta$ 80-CDK 間の活性比較を行った。活性測定は大量の細胞数を必要とするため、細胞培養の際に多く細胞数を得られない Saos-2, WI-38 での活性比較は行えなかった。外来性 CycA には Myc-tag が付与されているため Myc-tag 抗体により免疫沈降及び Histone H1 kinase 活性測定を行った。G2/M 期停滞が誘導される細胞 HEK293, MDAH041 では誘導されない細胞 U-2 OS, HT1080 に比べ CycA $\Delta$ 80-CDK の活性が CycAWT-CDK よりも亢進していることが示唆された (Fig. 1-2)。

### (3) ヒト細胞株間の CKI (p21,p27,p107) の発現量比較

CycA $\Delta$ 80 により G2/M 期停滞を誘導される細胞において CycA $\Delta$ 80-CDK の活性が CycAWT-CDK よりも亢進していることから細胞株間で CDK 活性を制御する CKI の発現レベルの違いが関与していると考え、(1) で用いた細胞株の CKI (p21,p27,p107) の発現レベルの比較を行った。CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞が誘導されない細胞では誘導される細胞に比べ p21, p27 どちらかの発現レベルが高かった。また、p107 の発現レベルは正常細胞である WI-38 を除いて、どの細胞株でもほとんど変化なかった (Fig. 1-3)。以上のことから G2/M 期停滞は p21,p27 両 CKI の発現レベルの低下により CycA-CDK 活性亢進がされ、G2/M 期停滞が誘導されたと考えられる。

#### (4) CDK 活性依存性の検証

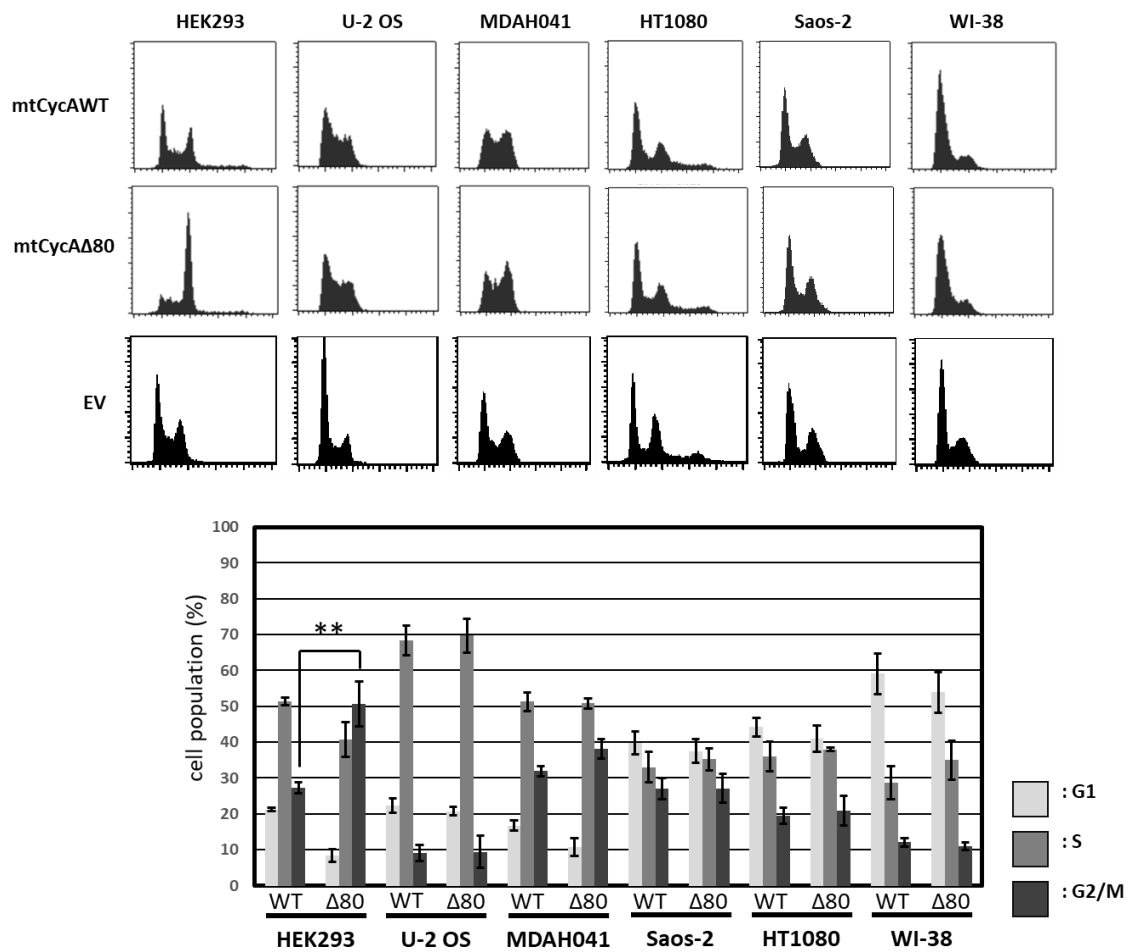
以上の結果より p21, p27 の発現レベルが低いヒト細胞において CycA $\Delta$ 80 の発現により CycA-CDK 活性が亢進することで G2/M 期停滞が誘導されることが示唆されたが、CycA-CDK 活性亢進が G2/M 期停滞誘導の原因であるかを検証する必要がある。そのため以下 2 つの変異体を用いて検証を行った。また、以下の検証は CycA $\Delta$ 80 の発現により特に強く G2/M 期停滞誘導及び CDK2 活性亢進を示した HEK293 により進めることとした。

##### (a) CDK2 非結合 CycA 変異体<sup>32</sup>

CDK 結合領域の 211 番目のアルギニンをアラニン置換した CycA は CDK 結合能を欠損する (Fig. 1-4)。CycAWT, CycA $\Delta$ 80, CycA $\Delta$ 80 R211A それぞれを DNA 量別にトランスフェクションしたところ、CycA $\Delta$ 80 では DNA 量依存的に G2/M 期停滞が強く誘導される一方で、CycAWT, CycA $\Delta$ 80 R211A では G2/M 期停滞誘導の増強がみられなかった (Fig. 1-5)。

##### (b) CDK2 非活性型 (ドミナントネガティブ: dn) 変異体<sup>33</sup>

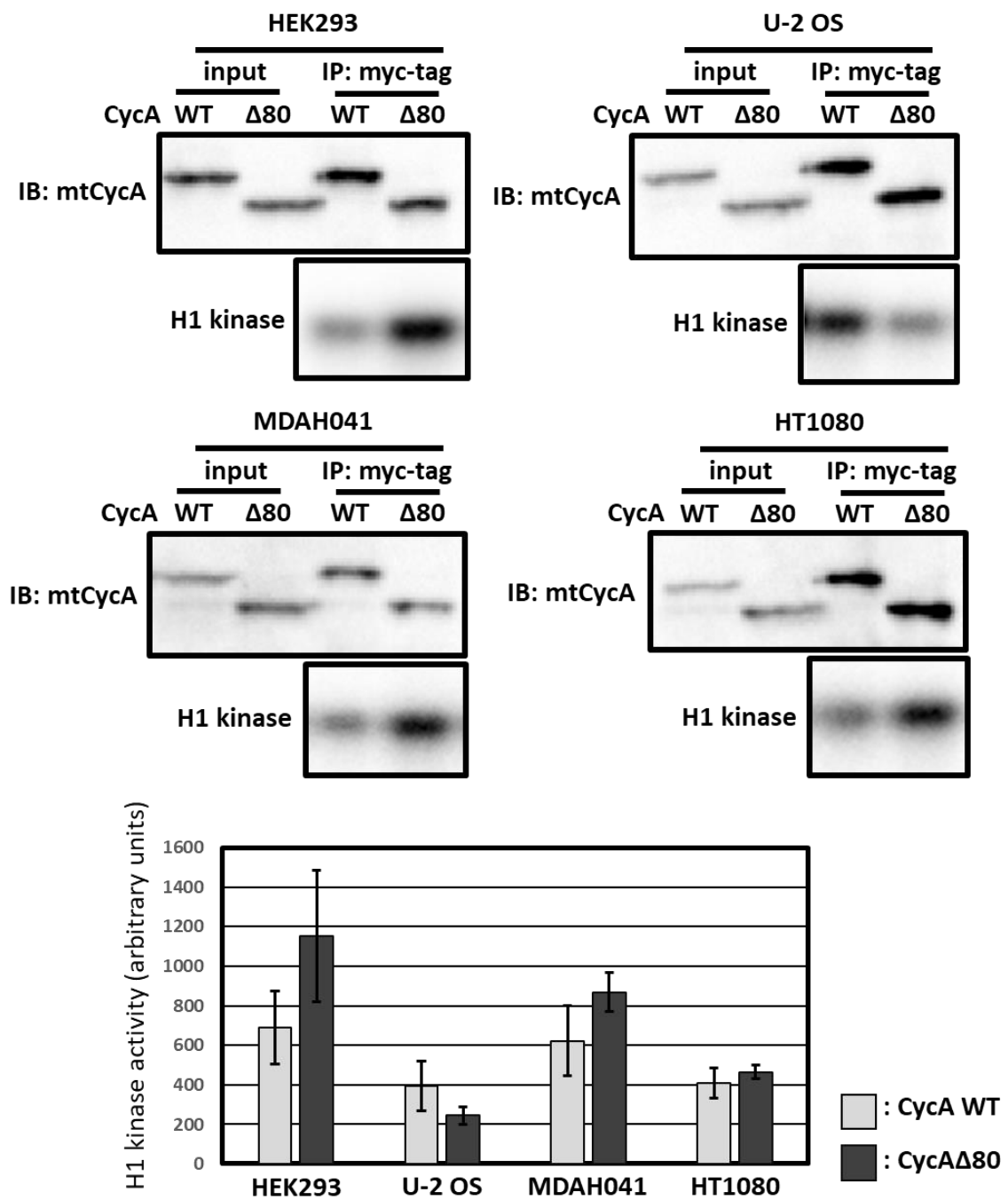
CDK2 dn 変異体は活性中心に変異を持ち、キナーゼとしての活性を持たない変異体のことである。CDK2WT, CDK2dn それぞれを CycA $\Delta$ 80 共にトランスフェクションしたところ、CDK2WT では CDK2 の DNA 量に関係なく G2/M 期停滞を誘導する一方で、CDK2dn 変異体では CDK2 の DNA 量依存的に G2/M 期停滞が解除された (Fig. 1-6)。



**Fig. 1-1** ヒト細胞株における *CycAΔ80* の影響<sup>30</sup>

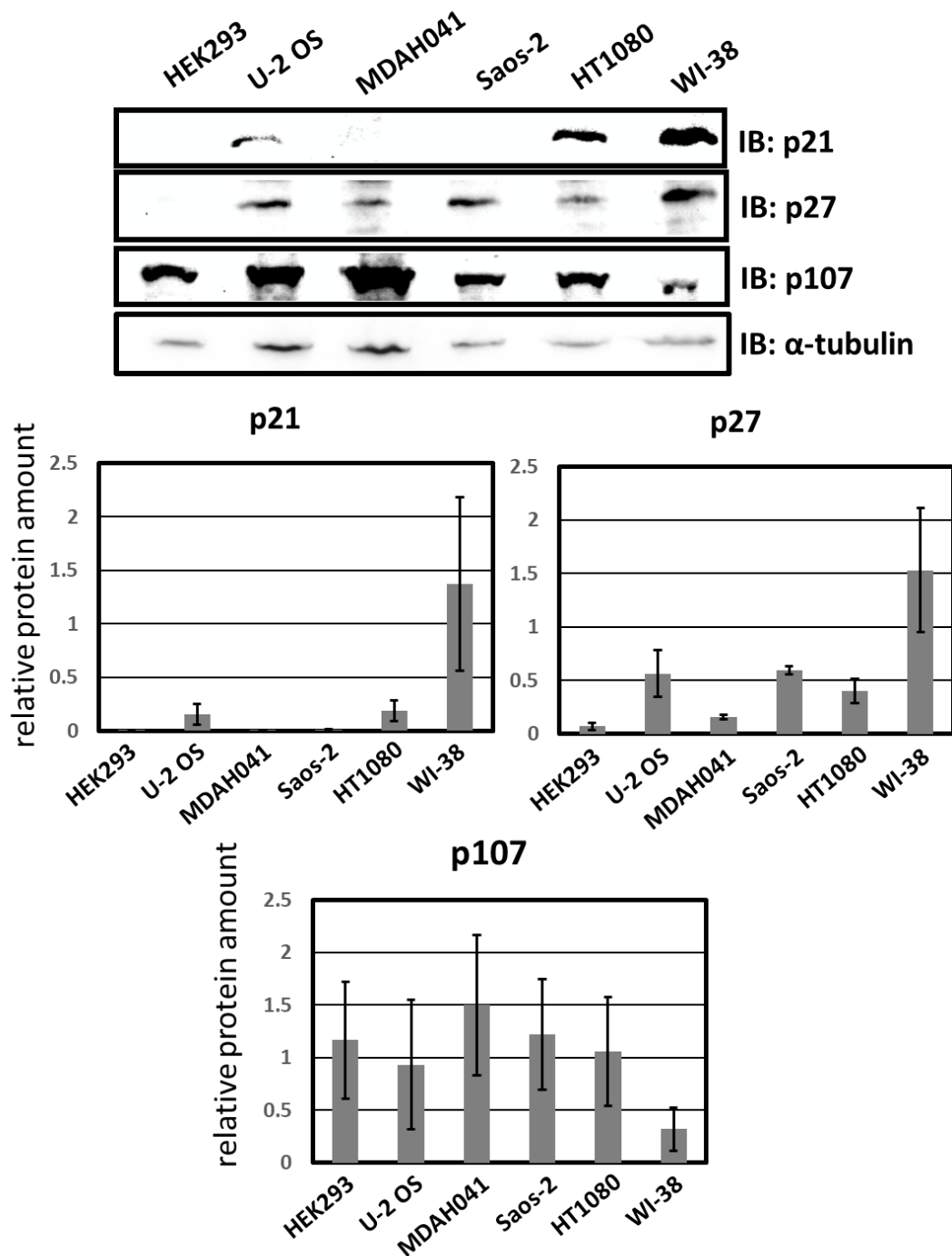
各細胞株に 10 μg の pCSMT EV, pCS myc-tag cyclin A (mtCycA) WT もしくは mtCycAΔ80 と 1 μg の pEGFP-C1 を共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\*  $p < 0.01$





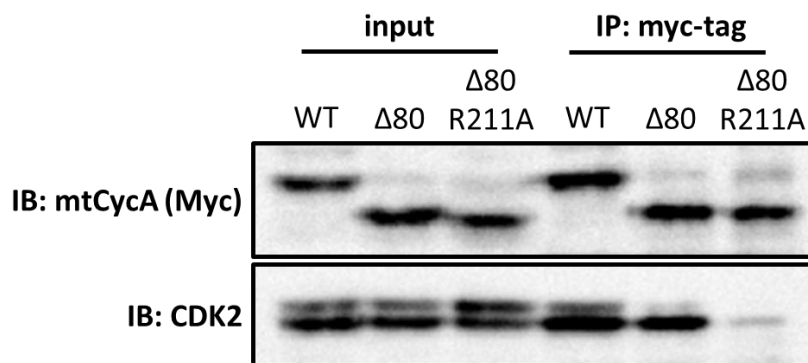
**Fig. 1-2 Histone H1 を用いたヒト細胞株間の CDK 活性比較<sup>30</sup>**

各細胞株に 10  $\mu$ g の pCS mtCycAWT もしくは mtCycA $\Delta$ 80 をトランスフェクションした細胞の CDK 活性測定を行った。免疫沈降で用いた抗体は myc-tag 抗体であり、外来性 CycA と結合している CDK の活性を測定している。下図は H1 kinase 活性値のグラフ。



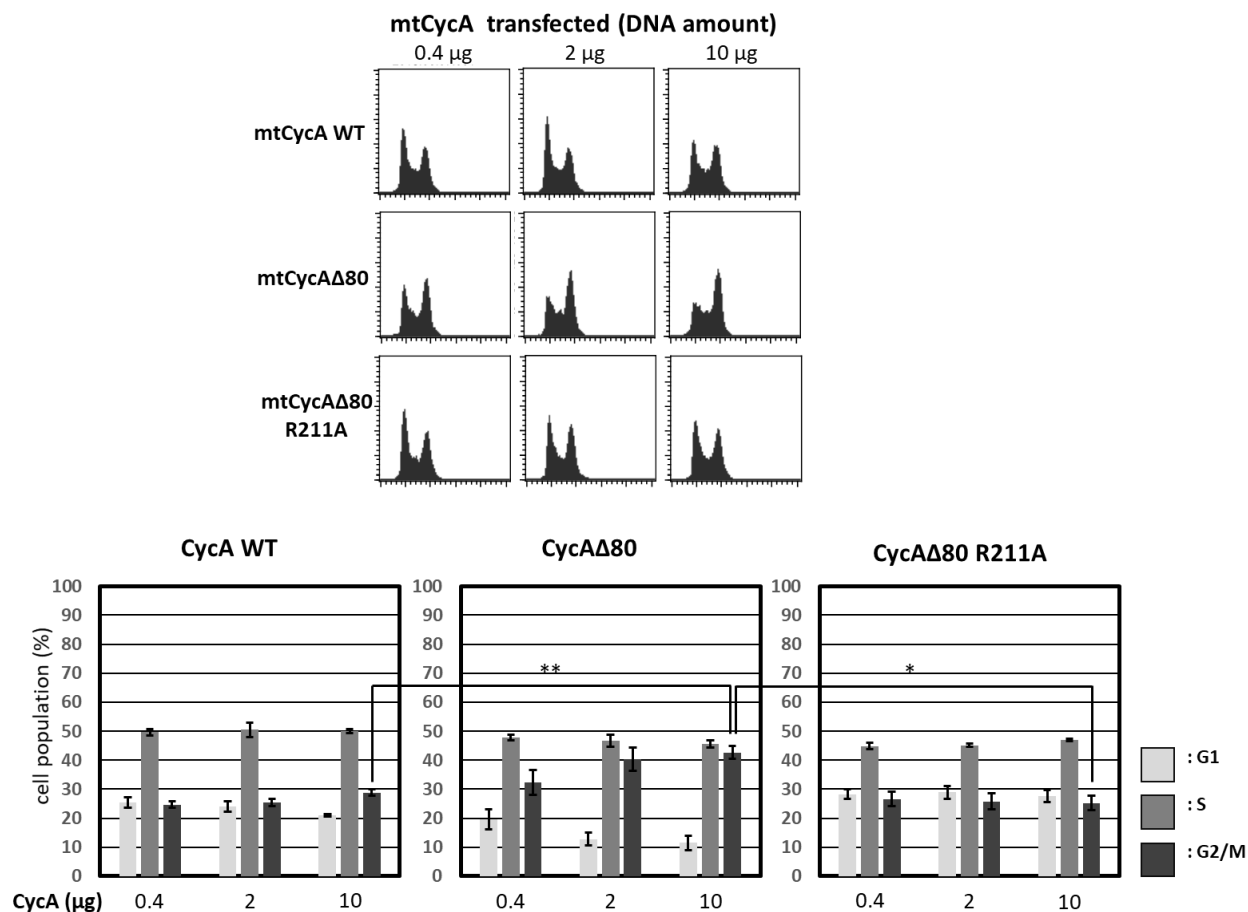
**Fig. 1-3** ヒト細胞株の CKI の発現量比較<sup>30</sup>

各細胞株の CKI 発現量を Western 解析により比較した。 $\alpha$ -tubulin を internal control としたときの相対値をそれぞれグラフに示した。



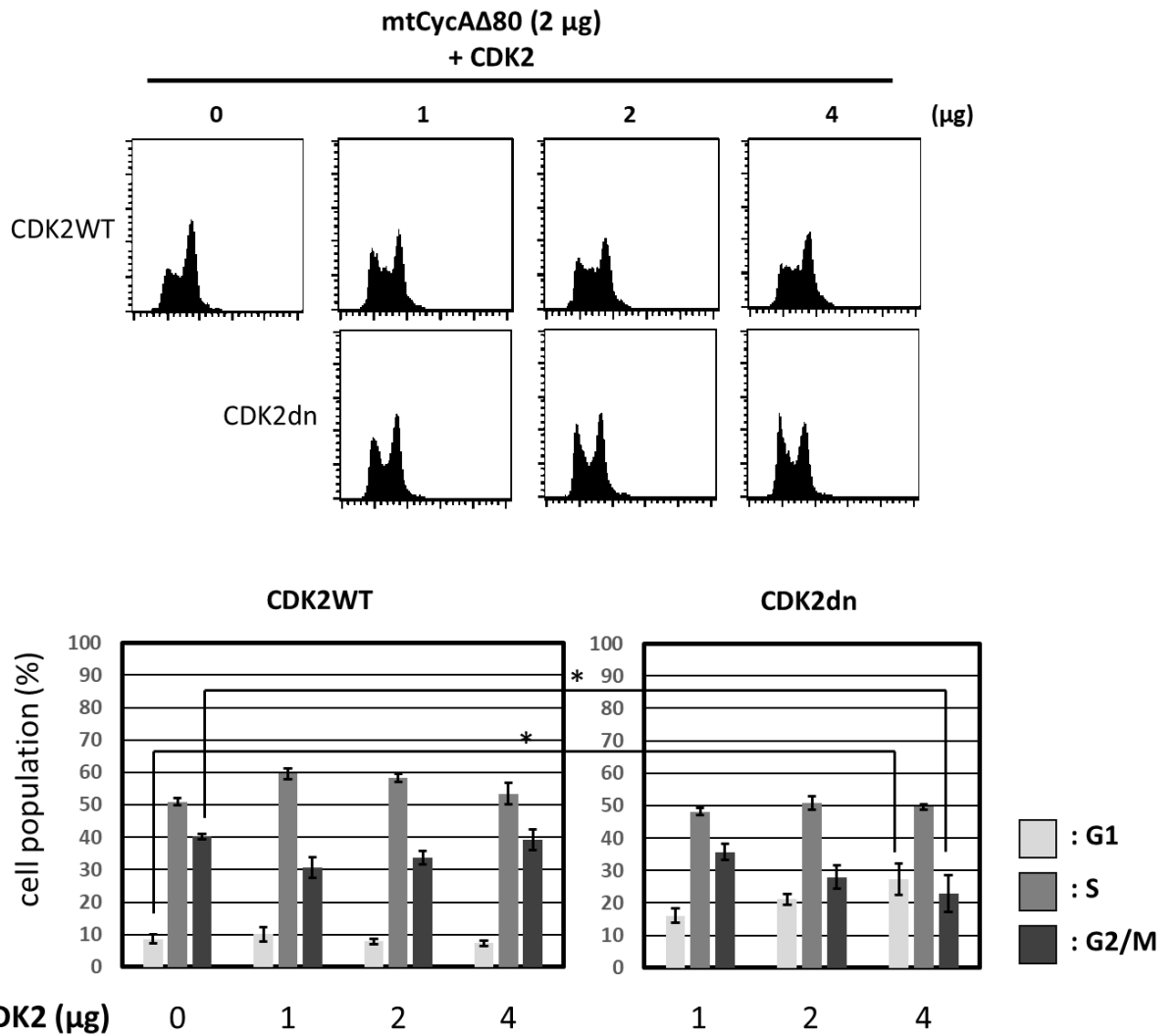
**Fig. 1-4 CDK2 非結合 CycA 変異体の CDK2 結合性<sup>30</sup>**

HEK293 に pCS mtCycAWT、mtCycA $\Delta 80$ 、mtCycA $\Delta 80$  R211A それぞれを 10  $\mu$ g トランスフェクションし、myc-tag 抗体による免疫沈降と Western 解析により CDK2 との結合を確認した。



**Fig. 1-5 CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導の CDK 活性依存性①<sup>30</sup>**

HEK293 に 1  $\mu$ g の pEGFP-C1 とともに pCS mtCycAWT、mtCycA $\Delta$ 80、mtCycA $\Delta$ 80 R211A それぞれを 0.4  $\mu$ g、2  $\mu$ g、10  $\mu$ g の濃度別で共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$

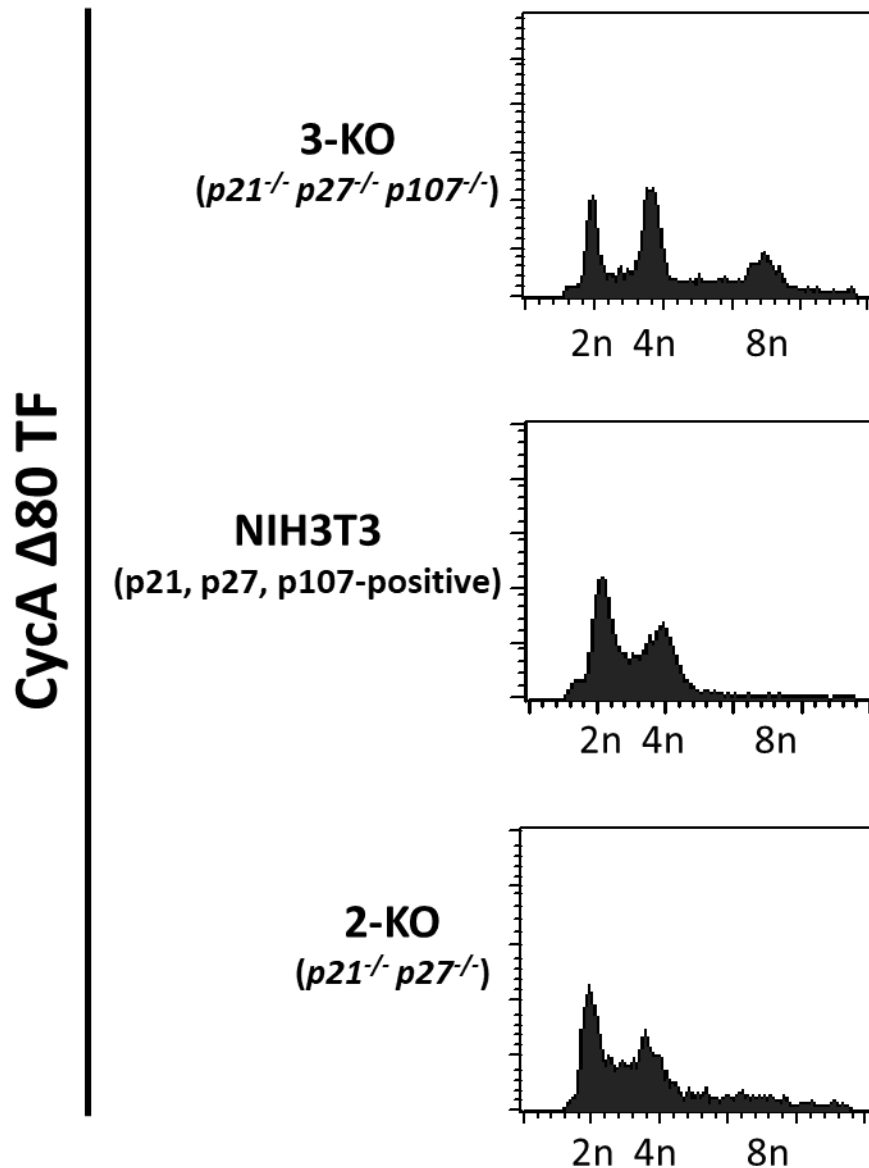


**Fig. 1-6 CycAΔ80 による G2/M 期停滞誘導の CDK 活性依存性<sup>②30</sup>**

HEK293 に 2 μg の pCS mtCycAΔ80 とともに pCSHA CDK2WT、CDK2dn それぞれを 1 μg、2 μg、4 μg の濃度別で共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*  $p < 0.05$

### 第3節 考察

ヒト細胞における CycA-CDK 活性制御破綻が及ぼす細胞周期への影響の解析として、HEK293, MDAH041, U-2 OS, HT1080, Saos-2, WI-38 での CycA  $\Delta$  80 の影響を検証した。CycA  $\Delta$  80 発現により、HEK293 と MDAH041 において CycAWT 発現ではみられない G2/M 期停滞が誘導された。両細胞株では他の細胞株に比べ p21 と p27 の両発現レベルが低いことが Western 解析により示され、U-2 OS, HT1080 に比べ CycA $\Delta$ 80-CDK の活性が CycAWT-CDK よりも亢進していることも Histone H1 キナーゼ活性測定により示唆された。これらの結果から、細胞内の CDK inhibitor の発現レベルが低い細胞においてはプロテアソーム分解を受けない CycA  $\Delta$  80 の発現により CycA-CDK 活性が亢進することを確認した。また、CycA-CDK 活性亢進が G2/M 期停滞誘導の原因であるかを、CDK2 非結合 CycA 変異体および CDK2 非活性型変異体を用いて検証したところ、どちらの変異体においても G2/M 期停滞の誘導が抑制されたことから、CycA-CDK 活性亢進が G2/M 期停滞誘導の原因であることが示唆された。以上の結果から、ヒト細胞において CycA-CDK 活性制御破綻である CycA-CDK 活性亢進により G2/M 期停滞が誘導されることを示した。しかしながら、p21 と p27 欠損マウス細胞 (p21<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> MEFs) においては CycA  $\Delta$  80 の発現による G2/M 期停滞は誘導されないことが示されており (Fig. 1-7)<sup>28</sup>、細胞種間で CycA  $\Delta$  80 発現の影響に違いがあると考えられる。



**Fig. 1-7 3-KO, 2-KO MEFs と NIH3T3 における CycA  $\Delta$ 80 発現の影響<sup>28</sup>**

pCS mtCycA  $\Delta$ 80 15  $\mu$ g と CD20 発現プラスミド 5  $\mu$ g を共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。anti-CD20-FITC により FITC の蛍光が確認された細胞を pCS mtCycA  $\Delta$ 80 がトランスフェクションされた細胞として解析している。

## 1-2 擬似的 3-KO ヒト細胞における CycA $\Delta$ 80 の影響

### 第1節 序

1-1 より p21 と p27 の低発現ヒト細胞株において、CycA $\Delta$ 80 の発現により CycA-CDK 活性が亢進し G2/M 期停滞を誘導することが示唆された。しかしながら、マウス細胞株 3-KO 細胞における CycA-CDK 活性制御の解析では、p21 と p27 に加えて p107 も CycA-CDK と結合することで、M-G1 期における CycA-CDK 活性化を抑えることが示されている。ヒト細胞ではプロテアソーム分解を受けない CycA $\Delta$ 80 と、CDK 活性を抑える CKI である p21 と p27 の発現低下のみで CycA-CDK 活性の異常と細胞周期への影響が確認できたが、p107 を欠損することで、より強い細胞周期への影響(染色体倍数化など)につながることを予測される。そこで、p21 と p27 の低発現ヒト細胞株において CRISPR-Cas9 システムでの p107 のノックアウトによる擬似的な 3-KO ヒト細胞を作製し、CycA $\Delta$ 80 による細胞周期への影響を解析した。

(Akaike Y, Chibazakura T. 未発表データ)

(1) HEK293 における p107 欠損細胞の作製と CycA $\Delta$ 80 による影響

(2) MDAH041 における p107 欠損細胞の作製と CycA $\Delta$ 80 による影響



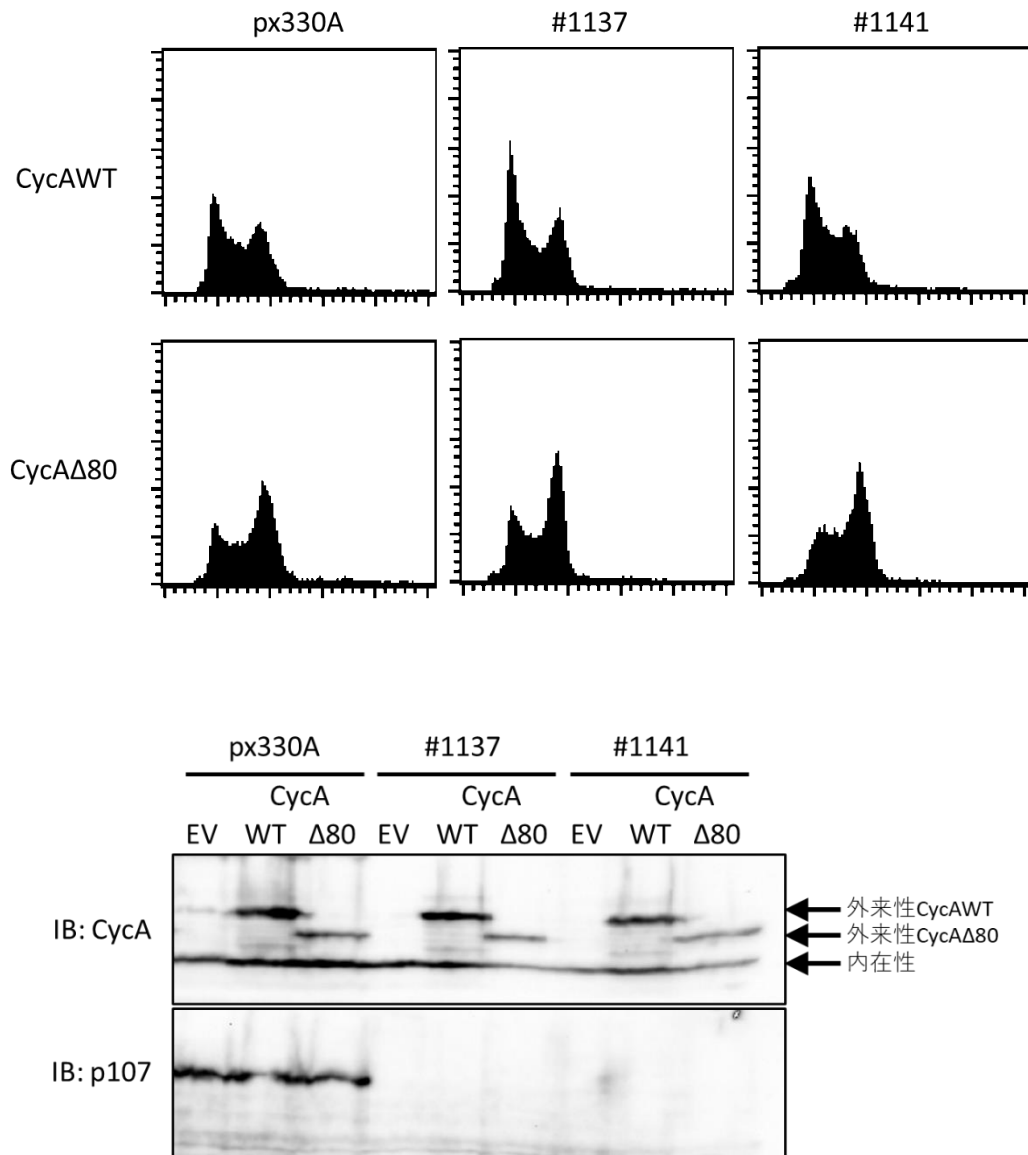
## 第2節 結果

### (1) HEK293 における p107 欠損細胞の作製と CycA $\Delta$ 80 による影響

CRISPR-Cas9 system により p107 欠損細胞の作製を行った。Western 解析により p107 の欠損を確認と、CycAWT と CycA $\Delta$ 80 発現による細胞周期への影響を FACS 解析により解析した。取得した p107 欠損細胞である #1137 と #1141 においても、control である px330A と同様に CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞が誘導された (Fig. 2-1, Akaike Y, Chibazakura T. 未発表データ)。

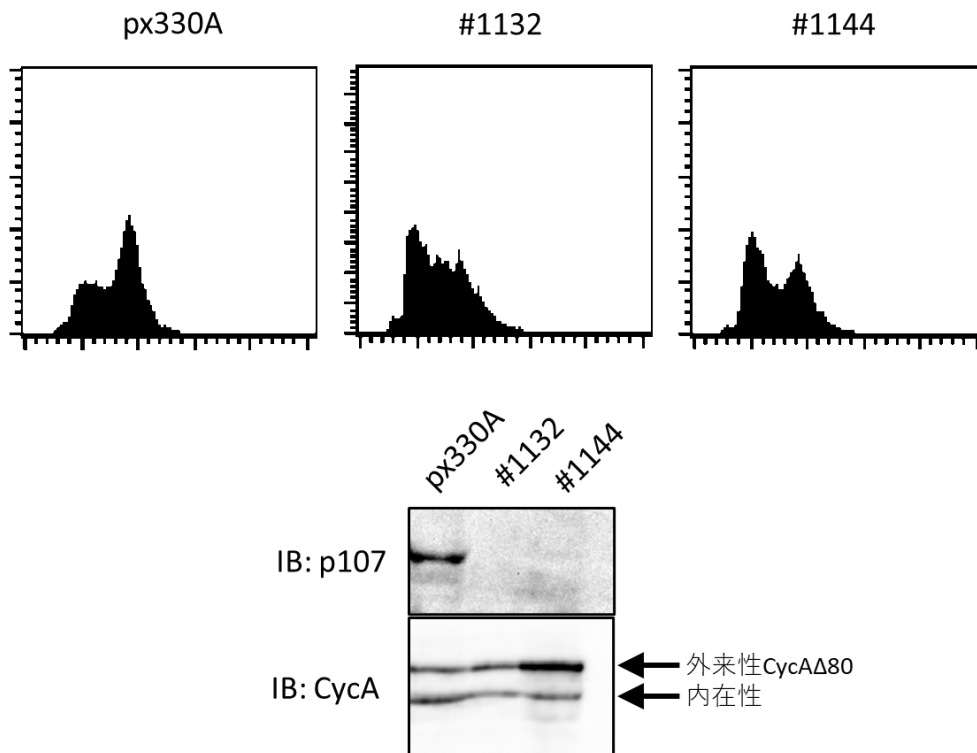
### (2) MDAH041 における p107 欠損細胞の作製と CycA $\Delta$ 80 による影響

CRISPR-Cas9 system により HEK293 同様 p107 欠損細胞の作製を行った。Western 解析により p107 の欠損を確認と、CycA $\Delta$ 80 発現による細胞周期への影響を FACS 解析により解析した。取得した p107 欠損細胞である #1132 と #1144 では、control である px330A とは異なり CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞が誘導されなかった (Fig. 2-2, Akaike Y, Chibazakura T. 未発表データ)。



**Fig. 2-1 HEK293 p107 欠損細胞における CycAΔ80 の影響**

各細胞株に 10  $\mu$ g の pCS mtCycAWT もしくは mtCycAΔ80 と 1  $\mu$ g の pEGFP-C1 を共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。下図は Western 解析による発現確認。(Akaike Y, Chibazakura T. 未発表データ)



**Fig. 2-2 MDAH041 p107 欠損細胞における CycAΔ80 の影響**

各細胞株に 10 μg の pCS mtCycAΔ80 と 1 μg の pEGFP-C1 を共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。下図は Western 解析による発現確認。(Akaike Y, Chibazakura T. 未発表データ)

### 第3節 考察

マウス細胞株 3-KO 細胞における CycA-CDK 活性制御の解析では p21 と p27 だけでなく p107 も CycA-CDK 活性化を抑えていたことから、ヒト細胞においても p107 を欠損することで、より強い細胞周期への影響が誘導されるのかを、p21 と p27 の低発現ヒト細胞株の p107 のノックアウトによる擬似的な 3-KO ヒト細胞により解析した。各擬似的な 3-KO ヒト細胞の結果から、由来する細胞株によって CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞への影響に違いはあるものの、マウス由来の 3-KO 細胞でみられた染色体倍数化が誘導されることはなかった。以上の結果より、p21 と p27 の低発現及び p107 の欠損による擬似的ヒト 3-KO 細胞においては、CycA $\Delta$ 80 による CycA-CDK 活性亢進条件下であっても細胞分裂スキップによる染色体倍数化は誘導されないと示唆された。

## 第2章 ヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞誘導機構の解明

### 2-1 E1A の CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞の促進機構の解析<sup>30</sup>

#### 第1節 序

ヒト細胞において、CycA $\Delta$ 80 による CycA-CDK 活性亢進は 3-KO 細胞における染色体倍数化を誘導せず、G2/M 期停滞を誘導することが示されたが、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導の分子メカニズムについては未だ明らかでない。そこで、ヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞誘導機構の解明に向けて研究を進めることとした。

CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞誘導機構の解明にあたって、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞が誘導された細胞株 HEK293 と MDAH041 において、G2/M 期停滞誘導強度に違いがあることを見出した (MDAH041 では HEK293 ほどの G2/M 期停滞が誘導されない)。両者の細胞の違いとして HEK293 はアデノウイルス DNA がゲノム DNA 内に導入されており、アデノウイルス由来のタンパク質である E1A が発現していることが挙げられる。そこで、E1A の CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導への関与について解析を進めることで、CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞誘導機構の解明への足掛かりとした。

- (1) HEK293 における E1A ノックダウンによる G2/M 期停滞誘導への影響
- (2) HEK293 における E1A ノックダウンによる内在性 CDK2 活性への影響
- (3) MDAH041 における E1A 共発現による G2/M 期停滞誘導への影響
- (4) MDAH041 における E1A 共発現による CycA-CDK 複合体形成への影響
- (5) MDAH041 における E1A 共発現による内在性 CDK2 活性への影響

## 第2節 結果

### (1) HEK293 における E1A ノックダウンによる G2/M 期停滞誘導への影響

siDirect により設計した E1A ノックダウン用 siRNA を CycA $\Delta$ 80 とともに XtremeGENE transfection reagent によりトランスフェクションし、FACS 解析により G2/M 期停滞誘導への影響を解析したところ、E1A siRNA 濃度依存的に CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞の抑制がみられた (Fig. 3-1)。

### (2) HEK293 における E1A ノックダウンによる内在性 CDK2 活性への影響

(1) の条件における細胞内 CDK2 活性を、CDK2 抗体による免疫沈降及び Histone H1 kinase 活性測定を行った。E1A siRNA 濃度依存的に Histone H1 の CDK2 によるリン酸化が抑制され、CDK2 活性の低下がみられた。さらに、CDK2 に結合する CycA $\Delta$ 80 量が低下したことから、E1A のノックダウンにより CycA-CDK2 複合体形成が抑制されていることが示唆された (Fig. 3-2)。

### (3) MDAH041 における E1A 共発現による G2/M 期停滞誘導への影響

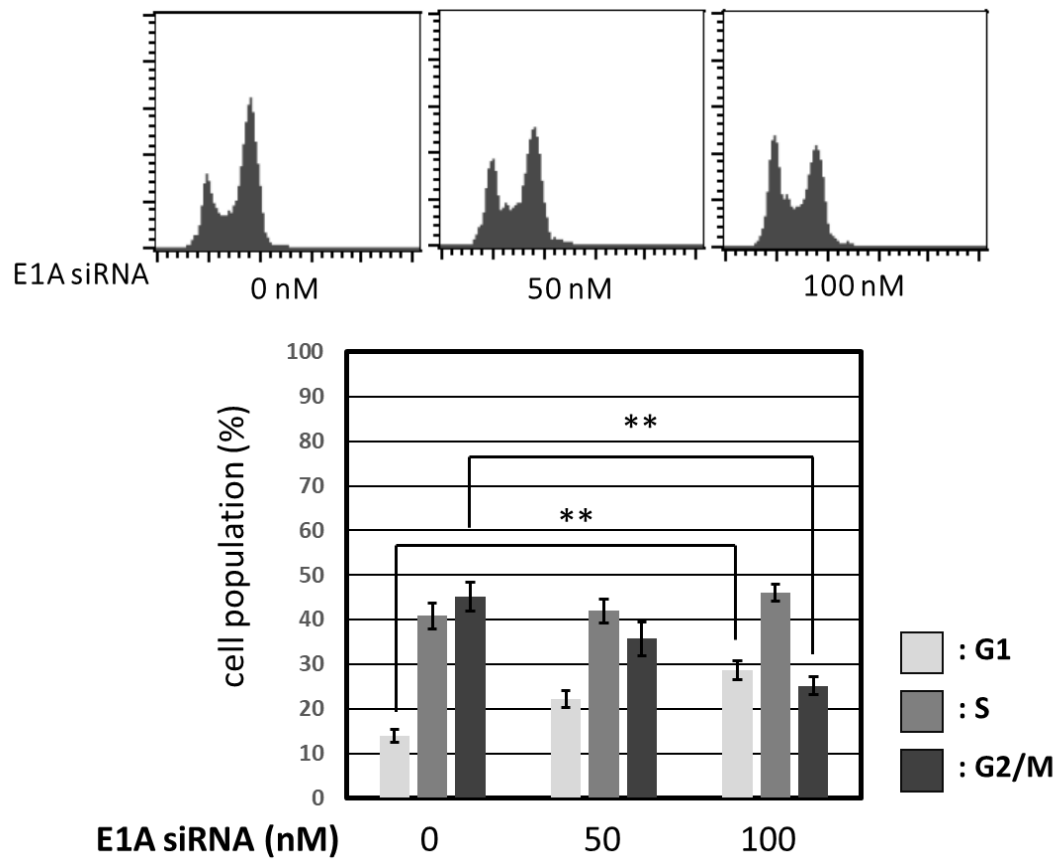
CycA $\Delta$ 80 と共に E1A を発現させ、FACS 解析により CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導への影響を解析したところ、E1A を共トランスフェクションした細胞において G2/M 期停滞が促進された (Fig. 3-3)。

### (4) MDAH041 における E1A 共発現による CycA-CDK 複合体形成への影響

HEK293 における E1A ノックダウンにより CycA-CDK2 複合体形成の抑制が示唆されたため、E1A の共発現による CycA-CDK2 複合体形成への影響を Myc-tag 抗体による免疫沈降により検証した。E1A 共発現により外来性 CycA に結合する CDK2 量の増加がみられたことから、E1A により CycA-CDK2 複合体形成が促進されていることが示唆された (Fig. 3-4)。

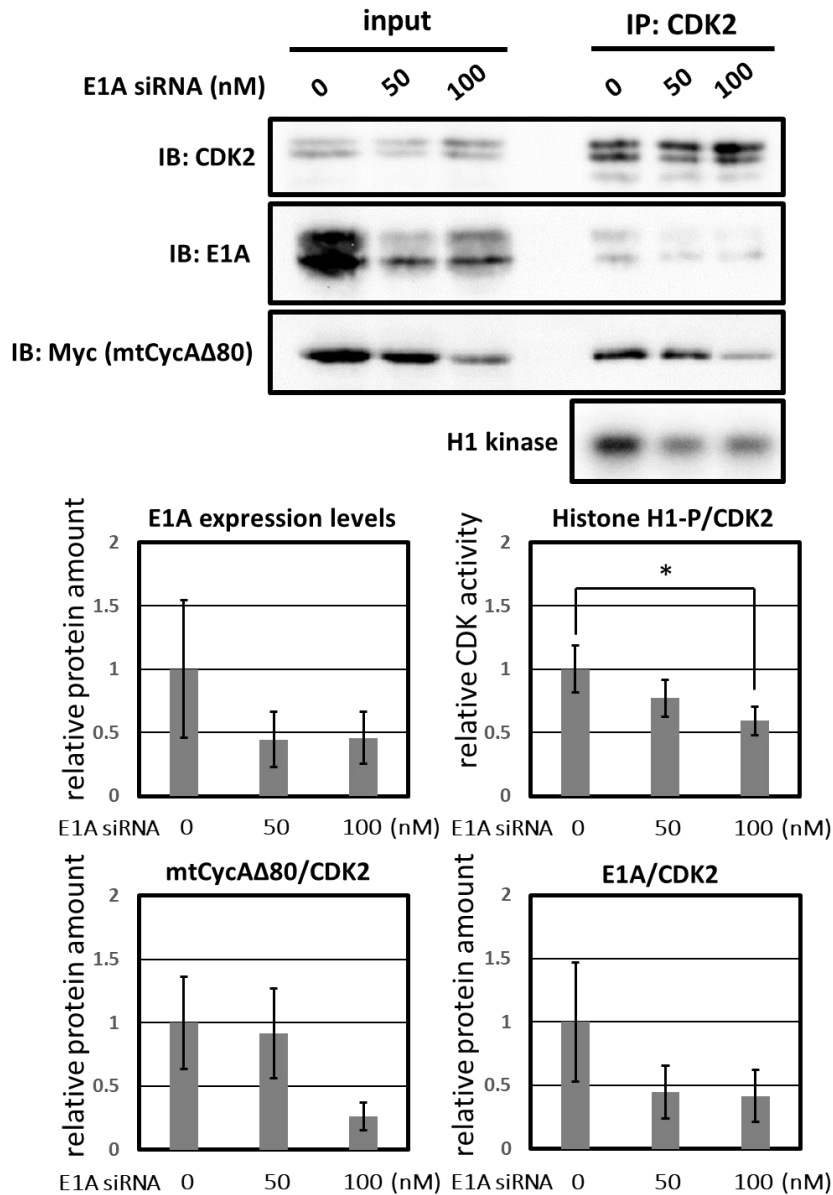
### (5) MDAH041 における E1A 共発現による内在性 CDK2 活性への影響

(3) の条件における細胞内 CDK2 活性を CDK2 抗体による免疫沈降及び Histone H1 kinase 活性測定を行った。E1A 依存的に Histone H1 の CDK2 によるリン酸化が増加し、CDK2 活性の促進がみられた。さらに、(4) の結果と同様に CDK2 に結合する CycA $\Delta$ 80 量が増加したことから、E1A により CycA-CDK2 複合体形成が促進されていることが示唆された。また、一方で CycA と同様に CDK2 と複合体形成をする cyclin E の結合性には変化なかった (Fig. 3-5)。また、CycA  $\Delta$  80 と同様の条件で cyclin E と E1A の共発現による細胞周期の影響を FACS 解析により解析したところ E1A 共発現時でも細胞周期への影響は見られなかった (Fig. 3-6)。



**Fig. 3-1 HEK293 における E1A ノックダウンによる G2/M 期停滞誘導への影響<sup>30</sup>**

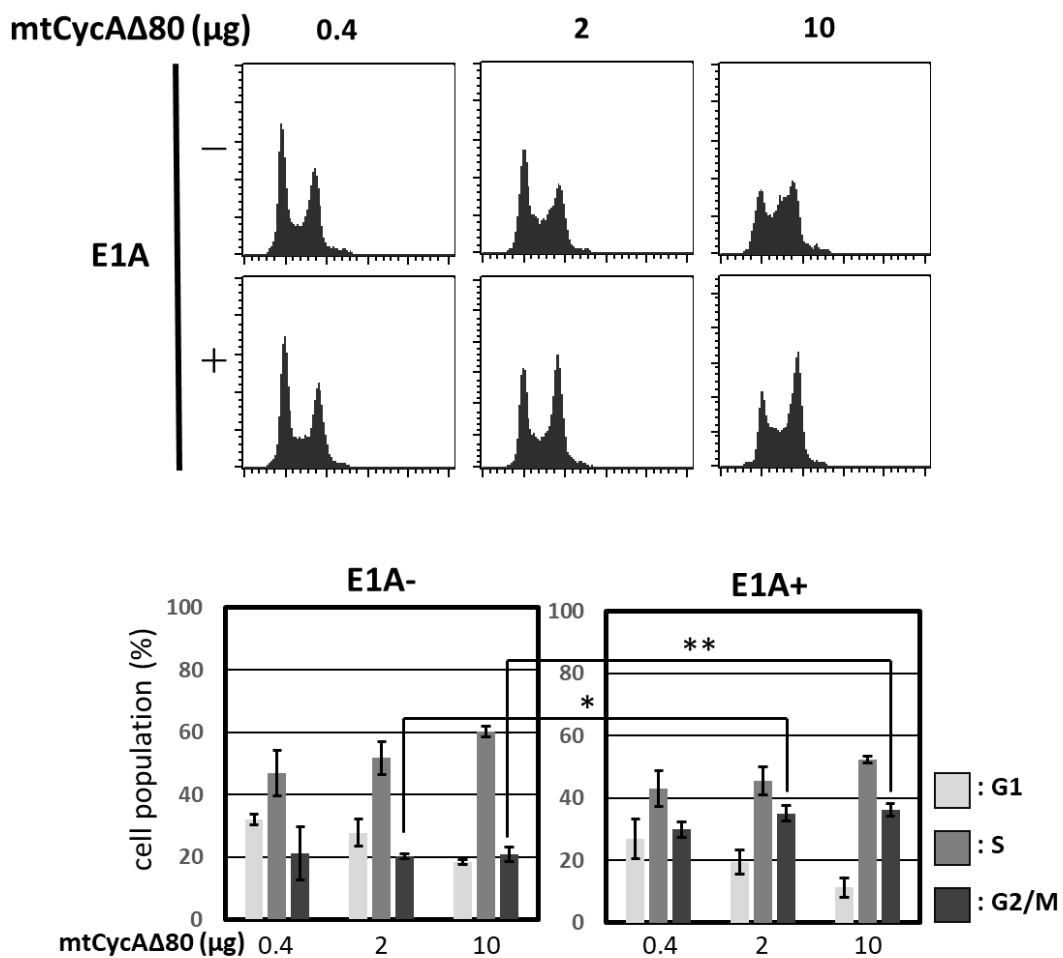
HEK293 に 2  $\mu$ g の pCS mtCycA $\Delta$ 80、1  $\mu$ g の pEGFP-C1 とともに E1A ノックダウン用 siRNA を終濃度 0 nM、50 nM、100 nM になるように共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\*  $p < 0.01$



**Fig. 3-2 HEK293 における E1A ノックダウンによる内在性 CDK2 活性への影響**<sup>30</sup>

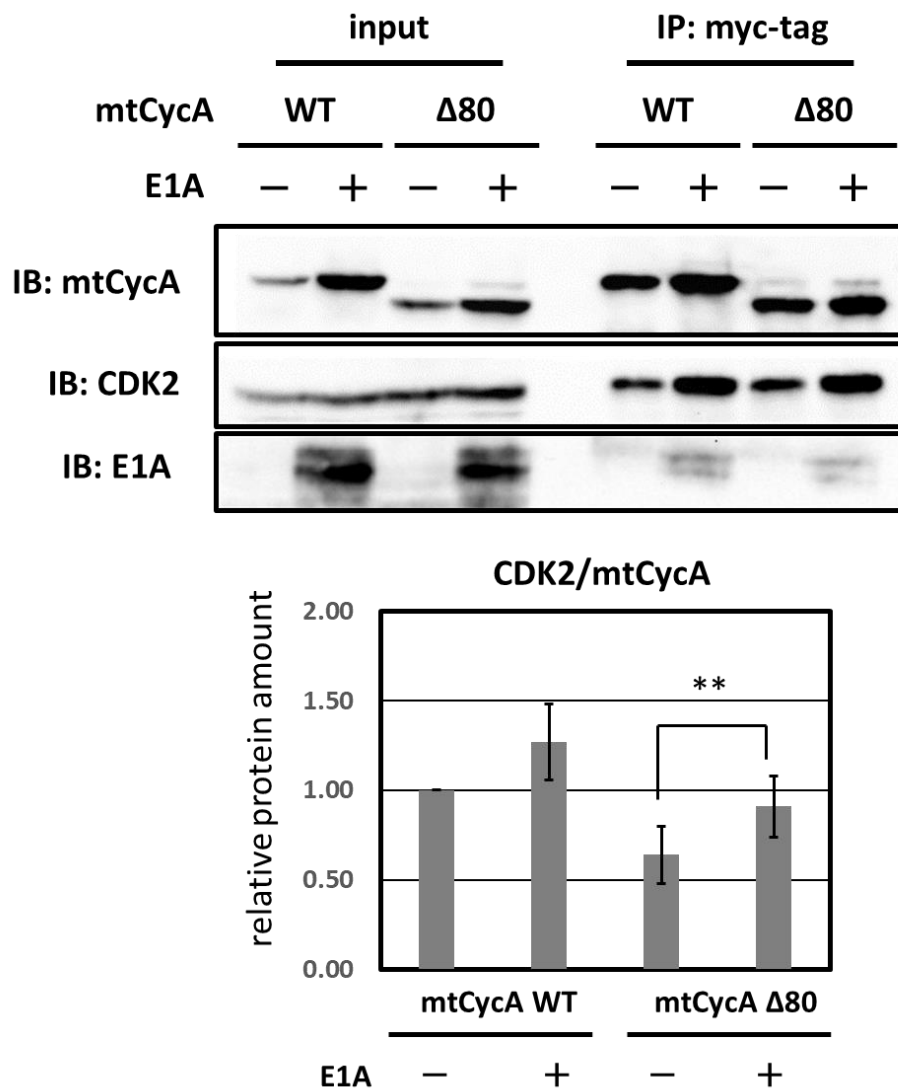
HEK293 に 2  $\mu$ g の pCS mtCycA $\Delta$ 80 とともに E1A ノックダウン用 siRNA を終濃度 0 nM、50 nM、100 nM になるように共トランスフェクションした。その細胞のライセートを用いて CDK2 抗体による免疫沈降及び Histone H1 kinase 活性測定を行った。左上のグラフは E1A のノックダウン効率を示す。右上のグラフは内在性 CDK2 の活性値を示す。左下のグラフは外来性 mtCycA と CDK2 の結合量を示す。右下のグラフは E1A と CDK2 の結合量を示す。全てのグラフは E1A siRNA 0 nM = 1 とした時の相対値で示す。\*  $p < 0.05$





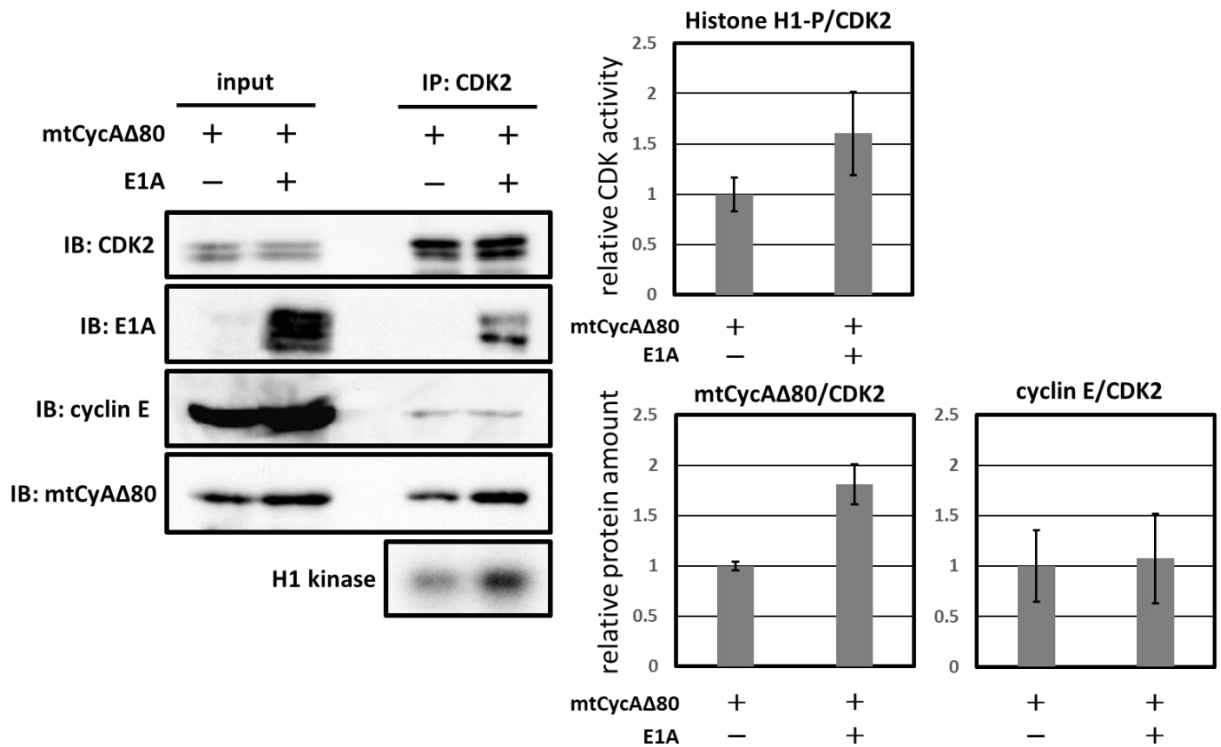
**Fig. 3-3 MDAH041 における E1A 共発現による G2/M 期停滞誘導への影響<sup>30</sup>**

MDAH041 に 0.4 μg、2 μg、10 μg の pCS mtCycAΔ80、1 μg の pEGFP-C1 とともに 5 μg の pE1A を共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。pE1A を共トランスフェクションしていない細胞には 5 μg の pCS2+を代わりに共トランスフェクションしている。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$



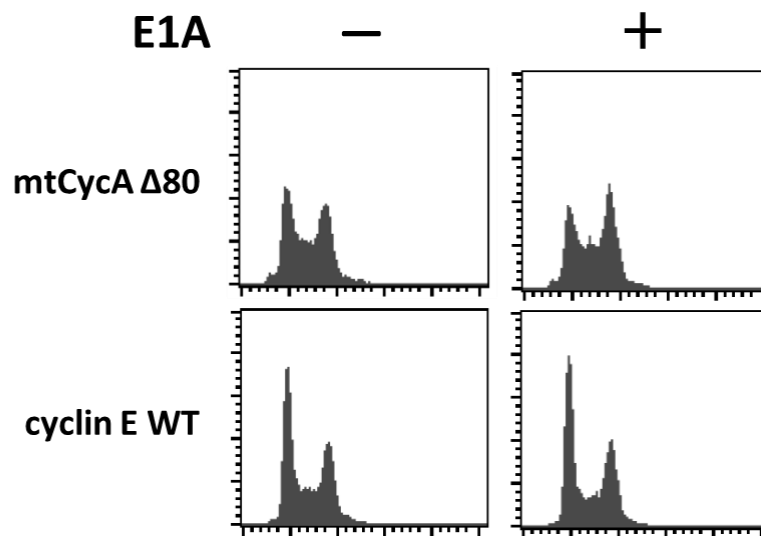
**Fig. 3-4 MDAH041 における E1A 共発現による CycA-CDK 複合体形成への影響<sup>30</sup>**

MDAH041 に 10 μg の pCS mtCycAWT もしくは mtCycAΔ80 とともに 5 μg の pE1A を共トランスフェクションした。pE1A を共トランスフェクションしていない細胞には 5 μg の pCS2+を代わりに共トランスフェクションしている。その細胞のライセートを用いて myc-tag 抗体による免疫沈降を行い、外来性 CycA と CDK2 の複合体量を比較した。下図のグラフは mtCycAWT・E1A- =1 としたときの相対値を示す。\*\*  $p < 0.01$



**Fig. 3-5 MDAH041 における E1A 共発現による内在性 CDK2 活性への影響<sup>30</sup>**

MDAH041 に 10 μg の pCS mtCycAΔ80 とともに 5 μg の pE1A を共トランスフェクションした。pE1A を共トランスフェクションしていない細胞には 5 μg の pCS2+を代わりに共トランスフェクションしている。その細胞のライセートを用いて CDK2 抗体による免疫沈降及び Histone H1 kinase 活性測定を行った。左上のグラフは内在性 CDK2 の活性値を示す。左下のグラフは外来性 mtCycAΔ80 と CDK2 の結合量を示す。右下のグラフは内在性 cyclin E と CDK2 の結合量を示す。全てのグラフは E1A- =1 とした時の相対値で示す。



**Fig. 3-6 cyclin E の E1A 共発現による細胞周期への影響<sup>30</sup>**

MDAH041 に 10  $\mu\text{g}$  の pCS mtCycA  $\Delta$  80 もしくは mtcyclin E とともに 1  $\mu\text{g}$  の pEGFP-C1 と 5  $\mu\text{g}$  の pE1A を共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。pE1A を共トランスフェクションしていない細胞には 5  $\mu\text{g}$  の pCS2+を代わりに共トランスフェクションしている。

### 第3節 考察

HEK293 と MDAH041 における CycA  $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導強度の違いの原因として、HEK293 においてアデノウイルスタンパク質 E1A の発現が考えられた。そこで、E1A の CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導への関与について HEK293 での E1A ノックダウン条件下と、MDAH041 での E1A 共発現条件下における FACS 解析及び Histone H1 キナーゼ活性測定による比較解析を行った。HEK293 において E1A siRNA 濃度依存的に CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞の抑制がみられ、Histone H1 キナーゼ活性測定による CycA-CDK2 複合体量及び CDK2 活性も低下していた。また一方で、MDAH041 において E1A 共発現により G2/M 期停滞誘導の促進と、CycA-CDK2 複合体量及び CDK2 活性の促進が示唆された。以上の結果から、E1A は CycA-CDK2 複合体形成の促進によるより強い CycA-CDK 活性亢進を誘導することで、G2/M 期停滞誘導を促進することが示唆された。また、cyclin E は CycA 同様に CDK2 と複合体を形成する cyclin であり、E1A と結合する因子として知られている<sup>34</sup>が、今回の解析では E1A 共発現条件下において CDK2 との結合性は変化せず細胞周期への影響も見られなかった。このことから MDAH041 内では E1A の cyclin-CDK2 結合特異性に違いがあることが考えられる。

## 2-2 細胞周期チェックポイントによる G2/M 期停滞誘導機構の解析<sup>30</sup>

### 第1節 序

過去の論文で「CDK2 は p53 非依存的な G2/M 期チェックポイント制御に必要である」という報告がされている<sup>12</sup>。今回の CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導も、第三章で示した E1A による CycA-CDK2 活性亢進により G2/M 期停滞が促進する結果を踏まえると、CDK2 活性亢進により ATR-Chk1 経路が活性化し、G2/M 期停滞が誘導されているのではないかと考えた。そこで、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導と ATR-Chk1 経路の関係性について解析を進めた。

- (1) ATR-Chk1 経路特異的阻害剤を用いた CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞への影響
- (2) 細胞同調による停滞時期の特定
- (3) CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導時の CDK1 抑制的リン酸化レベルの比較
- (4) CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導における CDK1 抑制的リン酸化の依存性

## 第2節 結果

### (1) ATR-Chk1 経路特異的阻害剤を用いた CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導への影響

CycA $\Delta$ 80 および E1A を発現させ、ATR の阻害剤である Caffeine、Chk1 の阻害剤である MK8776 と UCN-01、Chk2 の阻害剤である PV1019 で処理し、FACS 解析を行った。FACS 解析の結果 Caffeine、MK8776、UCN-01 において CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞の抑制がみられた。また、PV1019 においては CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞の抑制は見られなかった。このことから CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導には ATR-Chk1 経路が関与しており、Chk2 は関与していないことが示唆された (Fig. 4-1)。

### (2) 細胞周期同調による停滞誘導時期の特定

細胞周期同調を用いて CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞の詳細な停滞誘導時期を特定することで Chk1 の作用時期を特定した。CycA $\Delta$ 80 および E1A をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、リン酸カルシウム除去の refeed 時に Nocodazole (Noc) を添加し、24 時間後に Noc を除去する。Noc 除去 8 時間後に細胞を回収する。Noc は微小管形成を阻害するため細胞周期は前中期で停止するため、もし前中期以前で Chk1 が作用していれば Noc 除去前にのみ MK8776 を添加しても G2/M 期停滞は誘導されない。もし前中期以降で Chk1 が作用していれば Noc 除去以降に MK8776 を添加しないと G2/M 期停滞は解除されない。Fig. 4-2 に示したタイムコースで CycA $\Delta$ 80 と E1A を発現した細胞を処理し、FACS 解析を行った。結果として Noc 除去前にのみ MK8776 を添加した細胞でも G2/M 期停滞は誘導されておらず、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞は ATR-Chk1 経路を介して前中期以前に誘導されていることが示唆された。

### (3) CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導時の CDK1 抑制的リン酸化レベルの比較

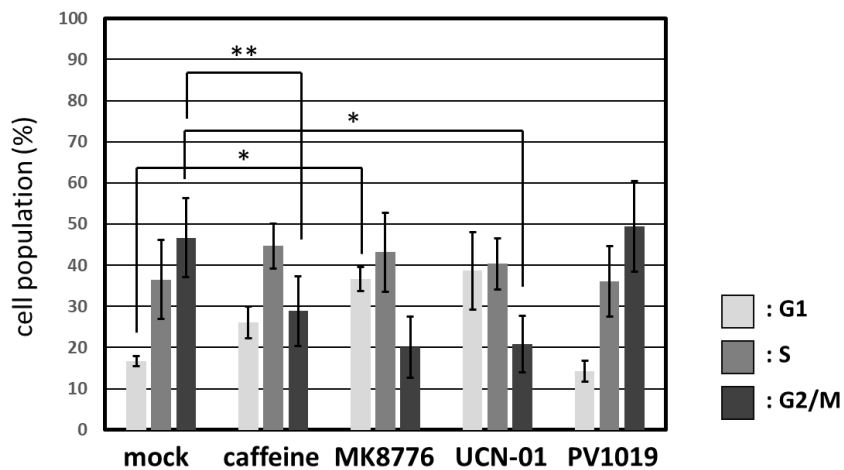
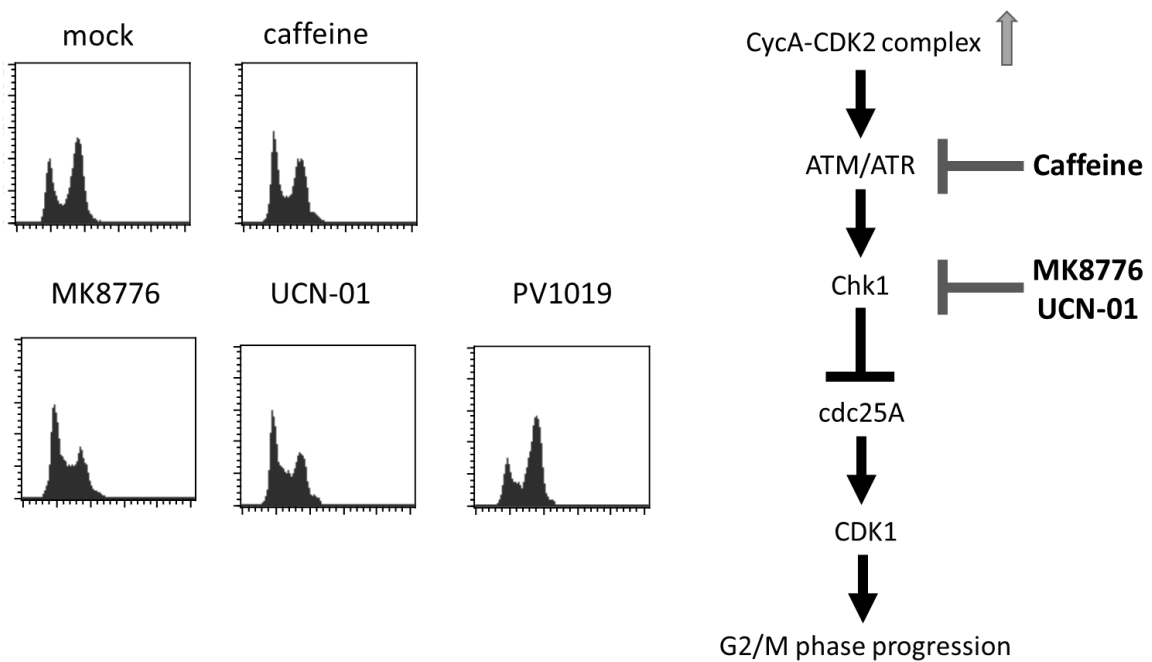
CDK2 による G2/M 期停滞は、ATR-Chk1 経路が CDK1 抑制的リン酸化を除去する cdc25A の活性を抑制することで誘導されることも報告されている。そこで、CycA $\Delta$ 80 および E1A を発現した際の CDK1 抑制的リン酸化レベルを比較した。CDK1 抑制的リン酸化は Y15 のリン酸化(pY15)が指標となる。まず、E1A 共発現の有無による CDK1 抑制的リン酸化レベルの比較を行ったところ、E1A を共発現させた細胞において CDK1-pY15 の量の増加がみられた (Fig. 4-3)。また、CycA $\Delta$ 80 と E1A を共発現させた細胞に Chk1 阻害剤 (MK8776) を添加したところ、CDK1-pY15 の量の減少がみられ (Fig. 4-4)、CycA $\Delta$ 80 および E1A を発現させることで CDK1 抑制的リン酸化が誘導され

ていることが示唆された。

(4) CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導における CDK1 抑制的リン酸化の依存性

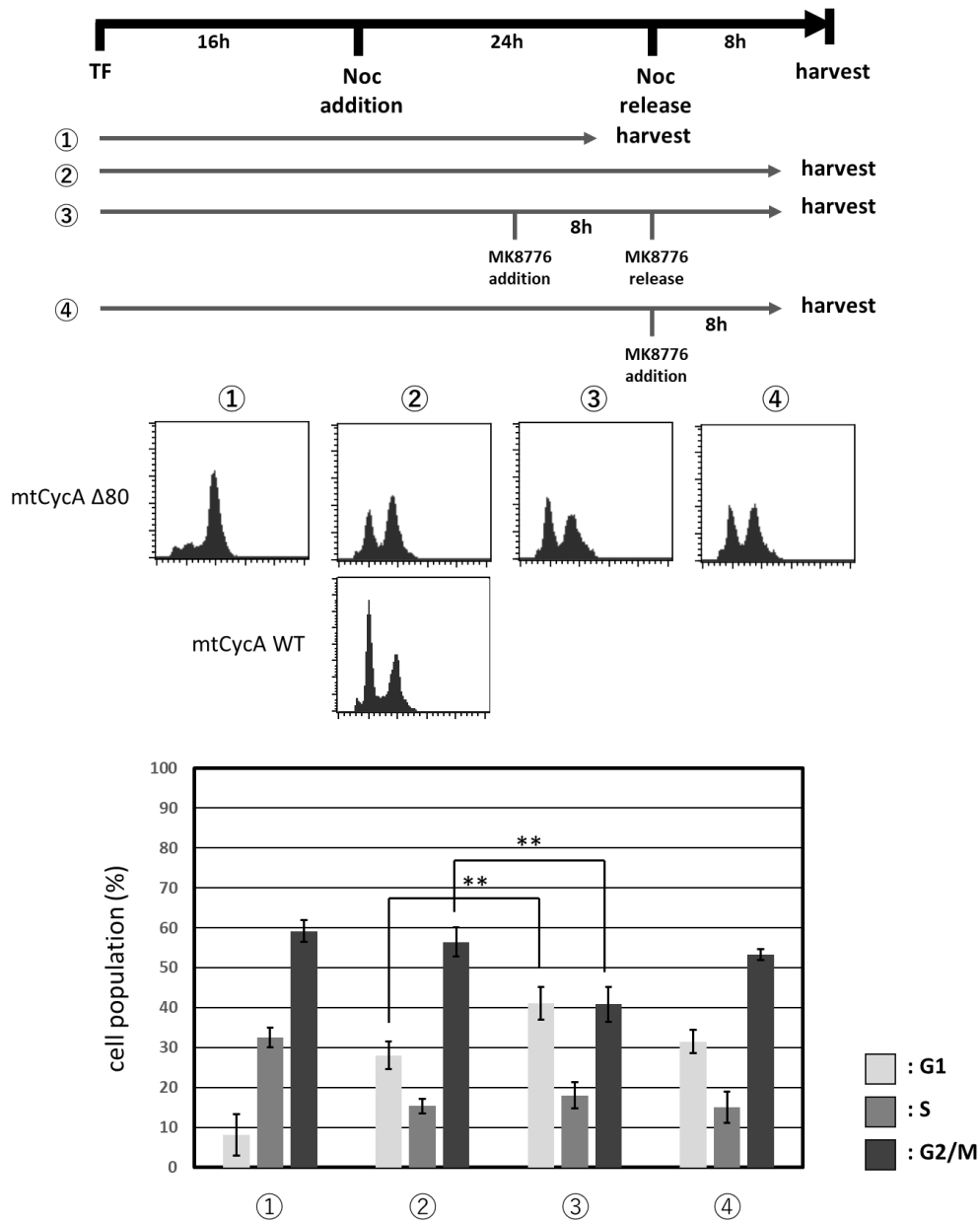
(3) において CDK1 抑制的リン酸化が誘導されていることが示唆されたが、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導が CDK1 抑制的リン酸化に起因しているのかは不明である。そこで、CDK1 抑制的リン酸化を受けない変異体 (CDK1AF)<sup>35</sup> と *cdc25A* を用いて CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導と CDK1 抑制的リン酸化の関係性について検証した。CycA $\Delta$ 80 および E1A とともに CDK1WT、CDK1AF、*cdc25A* をそれぞれ共発現させ、FACS 解析を行った。結果として、CDK1AF と *cdc25A* を発現させたときに G2/M 期停滞の抑制がみられた (Fig. 4-5)。以上の結果より、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞は、ATR-Chk1 経路を介した *cdc25A* の活性抑制により CDK1 活性が抑制されることで誘導させることが示唆された。





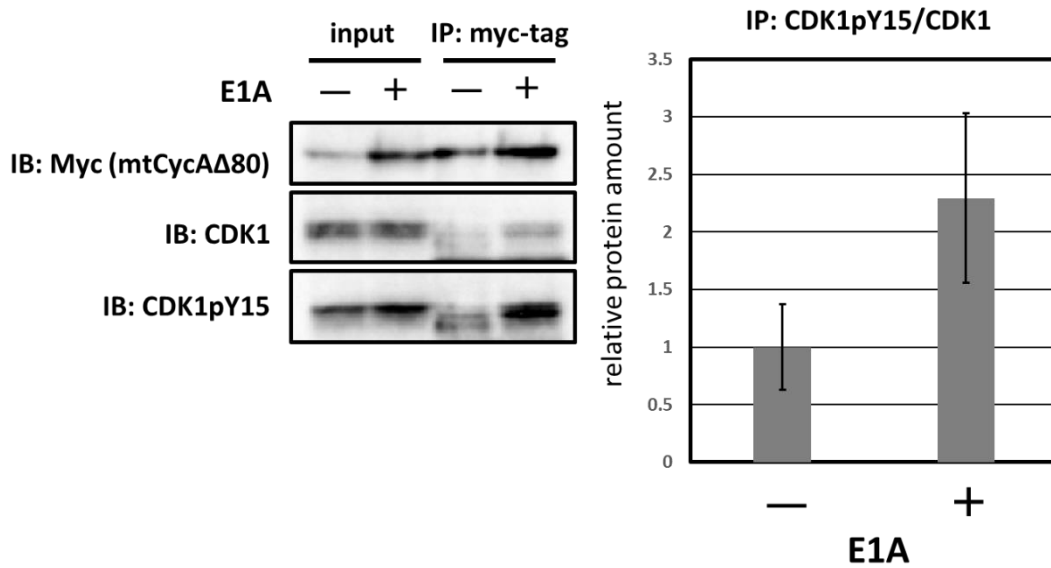
**Fig. 4-1 ATR-Chk1 経路特異的阻害剤を用いた CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導への影響<sup>30</sup>**

10  $\mu$ g の pCS mtCycA $\Delta$ 80、5  $\mu$ g の pE1A、1  $\mu$ g の pEGFP-C1 を共トランスフェクションした MDAH041 に ATM/ATR 阻害剤の caffeine、Chk1 阻害剤 MK8776、UCN-01、Chk2 阻害剤 PV1019 をそれぞれ 24 時間添加し、FACS 解析を行った。終濃度は 4 mM caffeine、1  $\mu$ M MK8776、50 nM UCN-01、300 nM PV1019 とした。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$



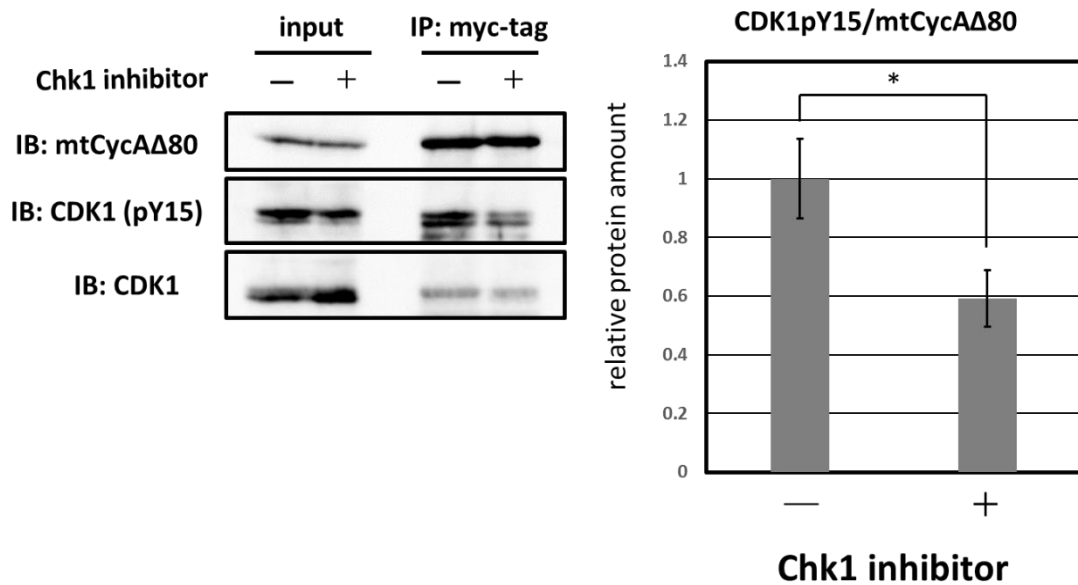
**Fig. 4-2** 細胞同調による停滞時期の特定<sup>30</sup>

10  $\mu\text{g}$  の pCS mtCycA $\Delta$ 80、5  $\mu\text{g}$  の pE1A、1  $\mu\text{g}$  の pEGFP-C1 を共トランスフェクションした MDAH041 にノコダゾール (Noc) をトランスフェクションから 16 時間後に終濃度 0.1  $\mu\text{M}$  で 24 時間添加し、細胞回収したものを①とした。同条件で Noc 添加 24 時間後に Noc 除去 8 時間後に細胞回収したものを②とした。Noc 除去の 8 時間前に MK8776 を終濃度 1  $\mu\text{M}$  を添加し、Noc, MK8776 同時除去 8 時間後に細胞回収したものを③とした。Noc 除去と同時に MK8776 を終濃度 1  $\mu\text{M}$  を添加し、8 時間後に細胞回収したものを④とした。以上の FACS 解析を行った。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\*  $p < 0.01$



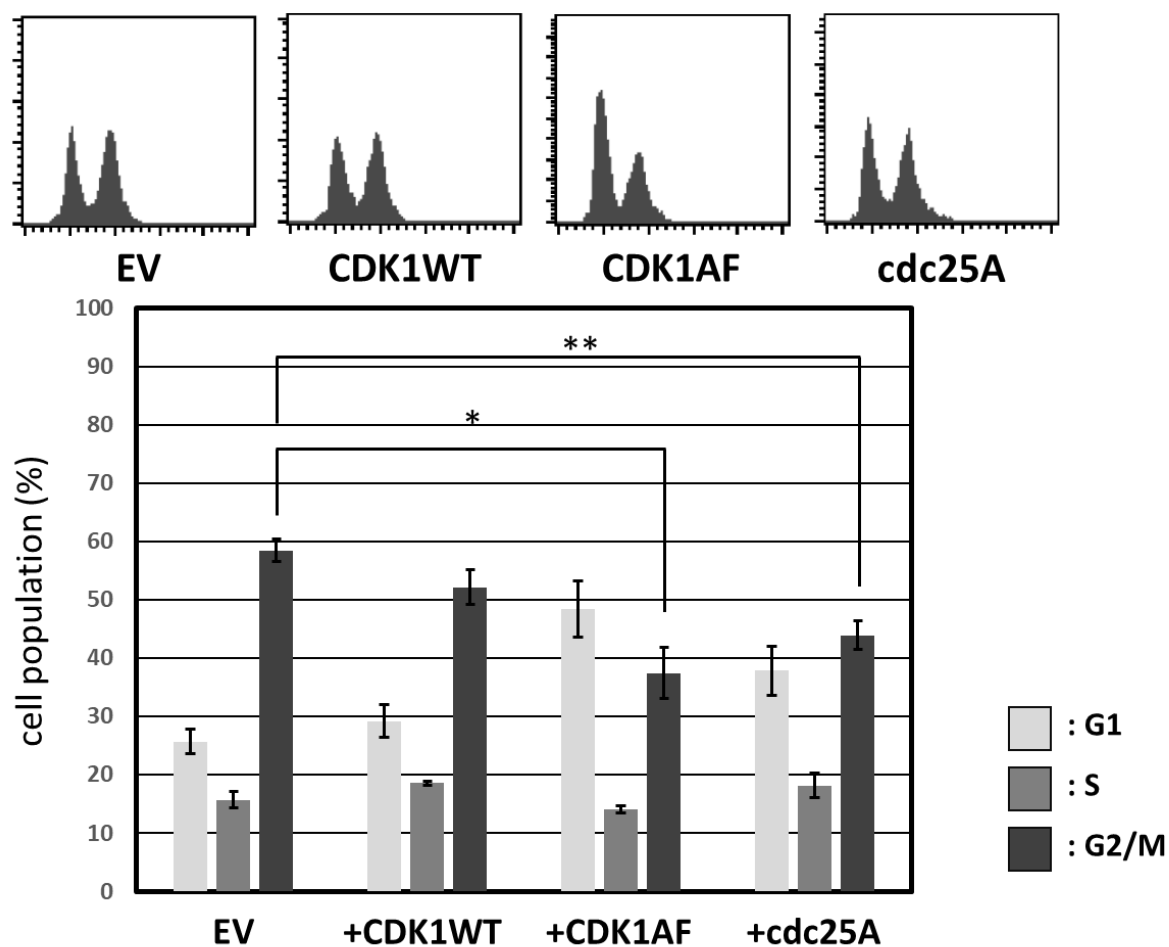
**Fig. 4-3** CycAΔ80 による G2/M 期停滞誘導時の CDK1 抑制的リン酸化レベルの比較①<sup>30</sup>

MDAH041 に 10 μg の pCS mtCycAΔ80 とともに 5 μg の pE1A を共トランスフェクションした。pE1A を共トランスフェクションしていない細胞には 5 μg の pCS2+を代わりに共トランスフェクションしている。その細胞のライセートを用いて、myc-tag 抗体による免疫沈降及び Western 解析により CDK1pY15 の量を比較した。グラフは E1A- =1 としたときの相対値で示す。



**Fig. 4-4** CycAΔ80 による G2/M 期停滞誘導時の CDK1 抑制的リン酸化レベルの比較②<sup>30</sup>

10 μg の pCSMT mtCycAΔ80 とともに 5 μg の pE1A を共トランスフェクションした MDAH041 に、Chk1 inhibitor である MK8776 を終濃度 1 μM で添加した。その細胞のライセートを用いて myc-tag 抗体による免疫沈降及び Western 解析により CDK1pY15 の量を比較した。グラフは Chk1 inhibitor - =1 としたときの相対値で示す。\*  $p < 0.05$



**Fig. 4-5** CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導における CDK1 抑制的リン酸化の依存性<sup>30</sup>

MDAH041 に 10  $\mu$ g の pCSMT mtCycA $\Delta$ 80、5  $\mu$ g の pE1A とともに pCSHA CDK1WT、CDK1AF、cdc25A それぞれを共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周

### 第3節 考察

CycA $\Delta$ 80によるG2/M期停滞誘導とATR-Chk1経路の関係性について解析を進めた結果、ATR-Chk1経路特異的阻害剤添加によるFACS解析により、CycA $\Delta$ 80によるG2/M期停滞誘導にはATR-Chk1経路が関与していること、さらにNocによるM期同調とMK8776添加タイミングの組み合わせによりCycA $\Delta$ 80によるG2/M期停滞がATR-Chk1経路を介して前中期以前に誘導されていることが示唆された。また、CDK1の抑制的リン酸化レベルの比較とCDK1AF及びcdc25Aの共発現によるFACS解析により、CycA $\Delta$ 80によるCycA-CDK活性亢進がATR-Chk1経路を活性化することで、CDK1の抑制的リン酸化を解除するcdc25Aのホスファターゼ活性の不活化によりG2/M期停滞が誘導されていることが示唆された。本研究では解析していないが、CDK2がATR-Chk1経路を活性化する原因はATRと結合することでDNA損傷部位へATRをリクルートするATRIPをCDK2がリン酸化することが挙げられ<sup>12,36,37</sup>、本研究のCycA-CDK活性亢進がATR-Chk1経路活性化に間接的ではなく直接関与していることが考えられる。また、本来CycAが分解制御を受ける分裂期前中期よりも早い時期に、分解制御を受けないCycA $\Delta$ 80によるCycA-CDK活性制御破綻が細胞周期チェックポイントを活性化し細胞周期進行を抑えることは、細胞周期制御破綻自体が異常な細胞増殖を抑えるシステムとして非常に無駄がなく理にかなった機構であると言える。

### 第3章 E1AによるCycA-CDK2活性促進機構の解析<sup>38</sup>

#### 第1節 序

2-1よりE1AがCycA-CDK2活性化を促進することを示した。しかしながら、E1Aが細胞周期制御に関与する研究は、pRbの解離を介したE2Fの活性化や転写活性化因子(E4F、ATFなど)と結合することで転写活性化能を促進する<sup>39,40</sup>といった報告が多く、CDK活性との関連性は報告されていなかった。また、本研究のCycA-CDK活性亢進の細胞周期への影響を議論するにあたって、CycA-CDK活性亢進の原因経路となりうる現象の解明は非常に重要であると考ええる。そこで、本章ではE1AのCycA-CDK活性化促進機構をE1Aの機能ドメインであるCRドメインに注目し、CRドメインを選択的に保持するスプライシングバリエントを用いて、各CRドメインの機能解析よりE1Aの詳細なCDK2活性化促進機構について解析することにした。また、E1Aはp107やp130を介してCycA-CDK2と複合体を形成することから、E1AのCDK2活性化促進機構におけるp107、p130の依存性についても解析することとした。

- (1) E1A スプライシングバリエントの取得
- (2) E1A バリエントのCycA $\Delta$ 80によるG2/M期停滞誘導への影響
- (3) E1A バリエントのCDK2結合性比較とp107依存性
- (4) E1A バリエントのCDK2活性促進能の比較

## 第2節 結果

### (1) E1A スプライシングバリエントの取得

E1A のスプライシングバリエントを単離するために、アデノウイルスゲノムが染色体に導入されている細胞株として知られる HEK293 の cDNA よりクローニングを行った。取得したスプライシングバリエントのシーケンス結果と報告されているスプライシングバリエントの配列を比較し、取得した E1A スプライシングバリエントを特定した。取得した E1A スプライシングバリエントは 13S (保持する CR ドメイン: CR1, CR2, CR3, CR4)、12S (CR1, CR2, CR4)、10S (CR2, CR4)、9S (CR4) であった (Fig. 5-1a)。それぞれの E1A スプライシングバリエントを MDAH041 にて発現させ、Western 解析を行ったところ、13S、12S、10S の発現は確認できたものの 9S は発現が確認できなかった (Fig. 5-1b)。そのため以降の解析は 13S、12S、10S を用いて解析を行うこととする。

### (2) E1A バリエントの CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導への影響

2-1 より E1A は CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導を促進することが示唆されている。そこで、各 E1A スプライシングバリエントにおいても、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導促進能の有無を確認した。CycA $\Delta$ 80 と共に各 E1A スプライシングバリエントを発現させ、FACS 解析により CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導への影響を解析したところ、13S において最も強い G2/M 期停滞誘導促進能が確認された (Fig. 5-2a)。さらに 12S は EV (E1A-) と同様の DNA プロファイルを示す一方で、10S は G1 期細胞の割合が増加していた。10S の影響を詳しく解析するために 10S のみ発現させた際の FACS 解析を行ったところ、強い G1 期停滞が確認された (Fig. 5-2b)。また、CycA $\Delta$ 80 との共発現時と比較すると、10S の G1 期停滞が CycA $\Delta$ 80 の共発現により抑制されていることが示された。

### (3) E1A バリエントの CDK2 結合性比較と p107 依存性

E1A は Rb-like ファミリーである p107 や p130 を介して CycA-CDK2 複合体を形成しており、E1A の CR2 は p107 との結合に関与する領域として知られている<sup>34</sup>。しかし、今回取得した E1A スプライシングバリエントはすべて CR2 を保持している。そこで、CR2 変異体を用いて E1A の CDK2 活性促進能の p170、p130 の依存性を解析することにした。まず、本研究を通して使用している細胞株 MDAH041 における p107 と p130 の発現量を、他の細胞株 (HEK293、NIH3T3) と比較した。Western 解析の結果から p107 の発現量は 3 細胞株で大きな差はない一方で、p130 の発現量は MDAH041 において低いことが示され

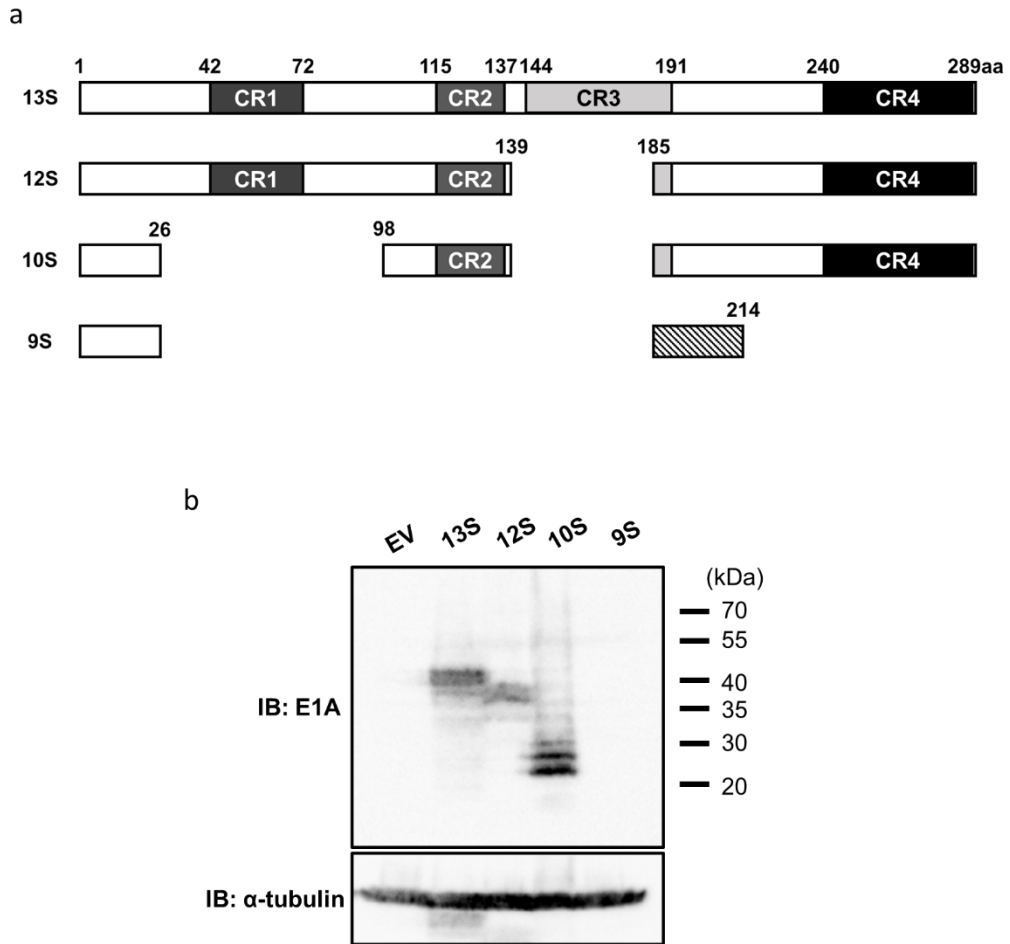


た (Fig. 5-3a)。これより、MDAH041 においては p107 が主に E1A と結合していると考えられ、今後の解析は p107 の依存性について CR2 変異体の解析を進めた。CR2 変異体は p107 や pRb との結合能を欠損することが報告されている dl1108 を使用した<sup>41</sup>。まず、dl1108 の p107 結合能を MDAH041 において 13S と比較したところ dl1108 は 13S に比べ半分以下の結合性を示した (Fig. 5-3b)。p107 との結合能を欠損しているとまではいかないが、p107 の依存性を比較する上では問題ないと判断し解析を進めることにした。次に E1A スプライシングバリエントの比較時と同様 dl1108 においても、CycAΔ80 による G2/M 期停滞誘導促進能について FACS 解析により確認した。Fig. 5-3c より dl1108 は 13S よりも弱い G2/M 期停滞誘導促進能であったことが示された。次に、CDK2 との結合性について共免疫沈降法により比較した。CDK2 との結合性については、すべての E1A スプライシングバリエントと比較している。E1A 抗体による共免疫沈降と Western 解析の結果、dl1108 は 13S に比べ CDK2 との結合性が低いことが示された (Fig. 5-3d)。このことから CR2 は E1A の CDK2 との結合性に参与していることが示唆された。さらに、10S においても、13S と 12S に比べ CDK2 との結合性が低いことが示された。10S は CR2 と CR4 のみを保持しており CR1 と CR3 は持たない。また、CR3 を保持する 13S と保持しない 12S では、CDK2 との結合性に大きな差は確認できないことから CR1 もまた CDK2 との結合に参与していることが考えられる。

#### (4) E1A バリエントの CDK2 活性化促進能の比較

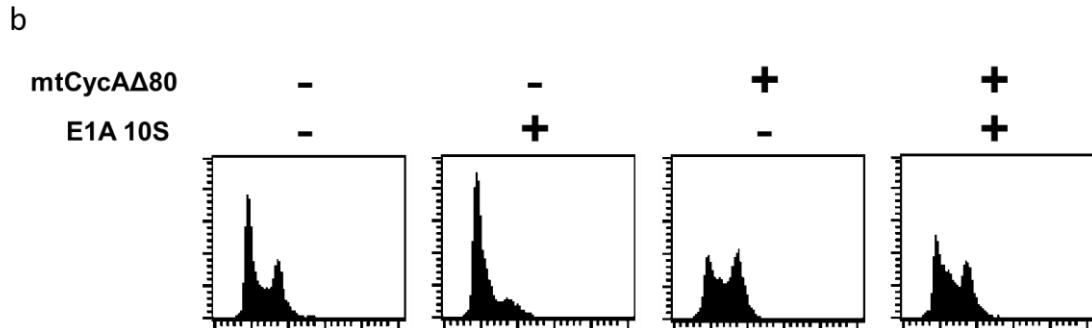
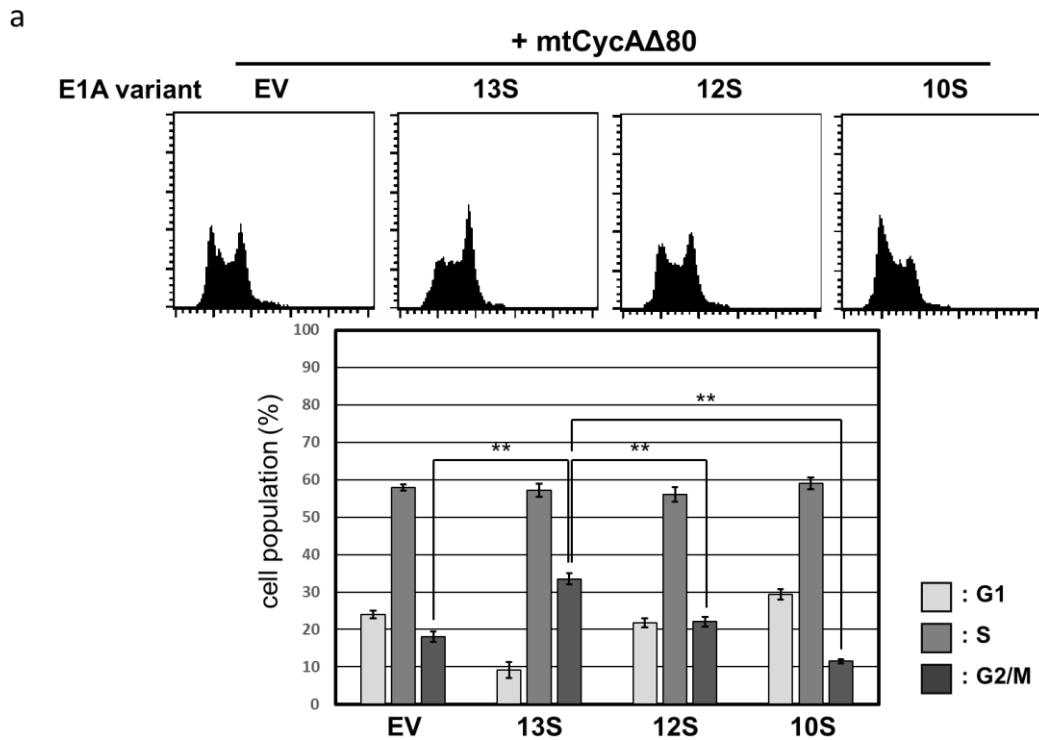
E1A の CDK2 活性化促進能について (3) 同様 E1A 抗体による共免疫沈降と Histone H1 キナーゼ活性測定により、各 E1A スプライシングバリエントおよび dl1108 間で比較した。13S において他の E1A と比べ E1A に結合する CDK2 の活性が最も高かった (Fig. 5-3d histone H1-P/E1A)。10S と dl1108 においては、CDK2 との結合性も低いことから CDK2 結合性の違いが 13S との CDK2 活性の差につながっていると考えられる。しかしながら、12S においては 13S と CDK2 との結合性の違いは確認できない。また、CDK2 当たりの Histone H1 リン酸化量、つまり CDK2 比活性も 12S は 13S に比べ低い (Fig. 5-3d histone H1-P/CDK2) ことから、13S は CDK2 結合性とは独立した CDK2 活性化促進能を持つことが考えられる。しかし、この結果は 12S が CDK2 活性を抑制しているようにも解釈できる。そこで、CDK2 抗体による共免疫沈降と Histone H1 キナーゼ活性測定により内在性 CDK2 活性を比較した。結果として、12S を共発現した細胞の CDK2 比活性は EV (E1A-) 共発現の細胞と同程度の CDK2 比活性を示す一方で、13S 共発現時の CDK2 比活性は EV に比べ上昇した (Fig. 5-3e)。以上のことから 12S が CDK2 活性を抑制しているのではなく、

13S が CDK2 活性を促進していることが示唆された。



**Fig. 5-1 E1A スプライシングバリエントの取得**<sup>38</sup>

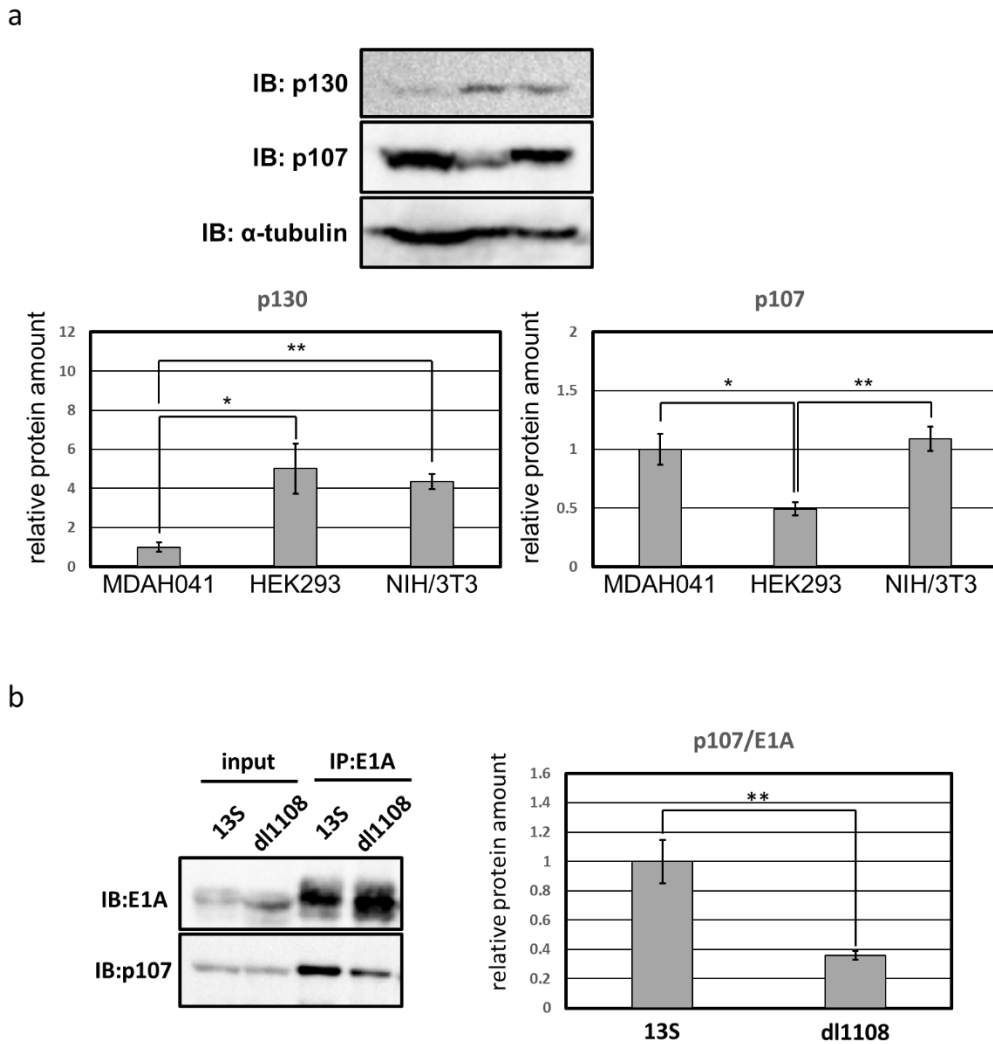
- (a) 各 E1A スプライシングバリエントの配列概略図  
 (b) 各 E1A スプライシングバリエントの発現確認



**Fig. 5-2** 各 E1A スプライシングバリエントの CycAΔ80 による G2/M 期停滞誘導促進能<sup>38</sup>

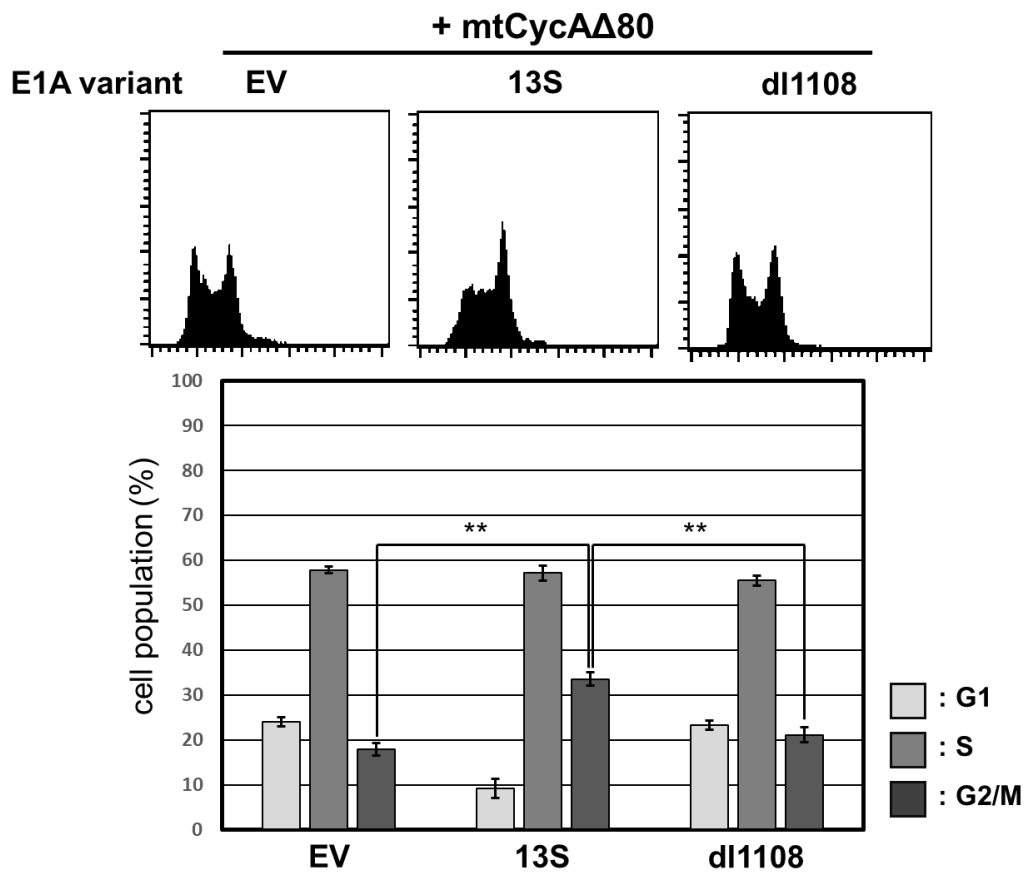
(a) MDAH041 に 10 μg の pCS mtCycAΔ80、1 μg の pEGFP-C1 とともに 5 μg の各 E1A スプライシングバリエントを共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。pE1A を共トランスフェクションしていない細胞には 5 μg の pCS2+ を代わりに共トランスフェクションしている。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\*  $p < 0.01$

(b) MDAH041 に 1 μg の pEGFP-C1 とともに 10 μg の pCS mtCycAΔ80 と 5 μg の pCS E1A10S の図示してある組み合わせでトランスフェクションし、FACS 解析を行った。



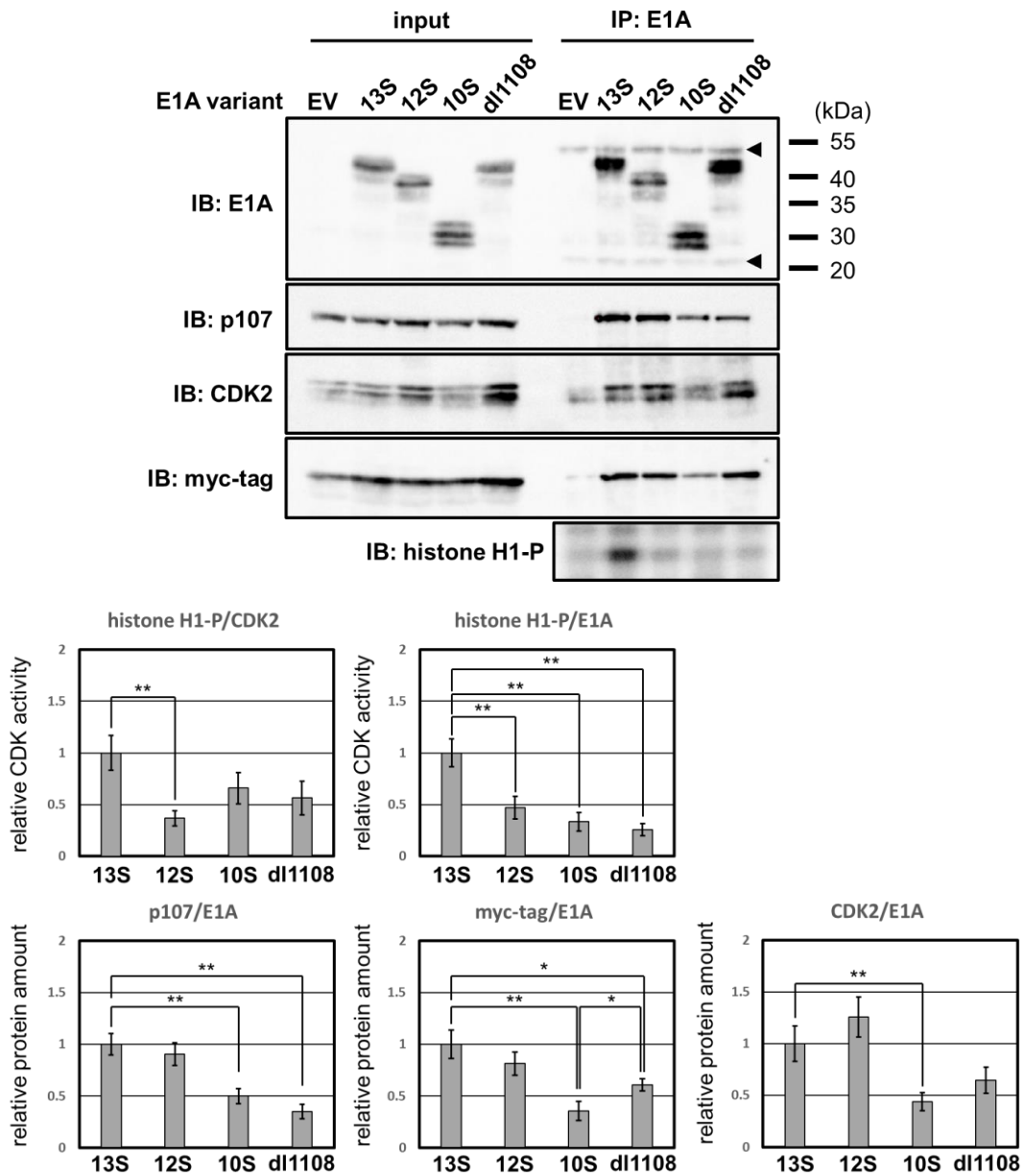
**Fig. 5-3 MDAH041 における Rb-like ファミリーの発現と CR2 変異体 dl1108 の p107 結合性**<sup>38</sup>

- (a) Western 解析による MDAH041、HEK293、NIH3T3 間の Rb-like ファミリーの発現量比較。Internal control として  $\alpha$ -tubulin で補正。下図のグラフは MDAH041 = 1 としたときの各細胞株の相対値。\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$
- (b) MDAH041 に 10  $\mu$ g の pCS mtCycA $\Delta$ 80 とともに 5  $\mu$ g の pCS E1A13S もしくは pCS E1A dl1108 を共トランスフェクションした。その細胞ライセートを用いた E1A 抗体による共免疫沈降と Western 解析による 13S と dl1108 との E1A-p107 結合性比較。右図のグラフは 13S = 1 とした時の E1A 当たりの p107 結合相対量。\*\*  $p < 0.01$



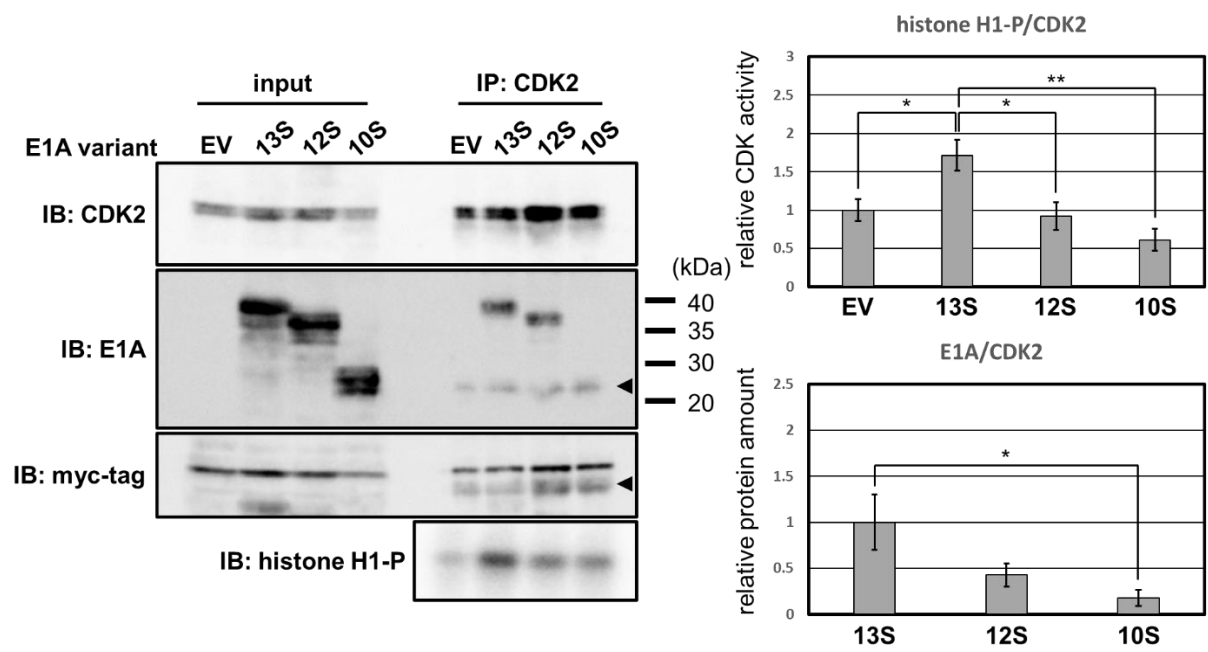
**Fig. 5-3c dl1108 の CycAΔ80 による G2/M 期停滞誘導促進能<sup>38</sup>**

MDAH041 に 10 μg の pCS mtCycAΔ80、1 μg の pEGFP-C1 とともに 5 μg の pCS E1A13S もしくは pCS E1A dl1108 を共トランスフェクションし、FACS 解析を行った。pE1A を共トランスフェクションしていない細胞には 5 μg の pCS2+を代わりに共トランスフェクションしている。下図のグラフは各 FACS 解析結果の細胞周期別の割合を示す。\*\* p < 0.01



**Fig. 5-3d** 各 E1A バリエント及び dl1108 の CDK2 結合性と Histone H1 キナーゼ活性測定<sup>38</sup>

MDAH041 に 10  $\mu$ g の pCS mtCycA $\Delta$ 80 とともに 5  $\mu$ g の各 E1A スプライシングバリエントもしくは dl1108 を共トランスフェクションした。その細胞ライセートを用いた E1A 抗体による共免疫沈降と Histone H1 キナーゼ活性測定。下図のグラフは 13S =1 とした時の相対量。上段が CDK2 (左) と E1A (右) 当たりの Histone H1 リン酸化量を示す。下段が E1A 当たりの p107 (左)、mtCycA (中央)、CDK2 (右) 結合量を示す。\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$



**Fig. 5-3e** 各 E1A バリエントの CDK2 結合性と Histone H1 キナーゼ活性測定 (CDK2IP ver.)<sup>38</sup>

MDAH041 に 10  $\mu$ g の pCS mtCycA $\Delta$ 80 とともに 5  $\mu$ g の各 E1A スプライシング バリエントを共トランスフェクションした。その細胞ライセートを用いた CDK2 抗体による共免疫沈降と Histone H1 キナーゼ活性測定。右図のグラフは 13S = 1 とした時の相対量。上段が CDK2 当たりの Histone H1 リン酸化量を示す。下段が CDK2 当たりの E1A 結合量を示す。\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$



### 第3節 考察

E1A の CycA-CDK 活性化促進機構を、CR ドメインを選択的に保持するスプライシングバリエントを用いて、各 CR ドメインの機能解析より E1A の詳細な CDK2 活性化促進機構について解析した。E1A スプライシングバリエントの単離により、4 種類のスプライシングバリエントを取得できたが、9S については Western 解析により発現が確認できなかった。原因として、9S はスプライシングによるフレームシフトにより翻訳の読み枠がずれてしまい、E1A 抗体での検出ができなかったことが考えられる。そのため、13S、12S、10S で解析を進めた。E1A による CycA  $\Delta$  80 の G2/M 期停滞誘導促進能は、FACS 解析により 13S が最も強い G2/M 期停滞誘導促進能を持つことが示された。また、10S においては G1 期停滞が確認され、その G1 期停滞は 10S 単体でも誘導されることが示唆された。しかし、本来 E1A は pRb と結合することで pRb の E2F 活性抑制を解除することが知られており、逆に細胞周期進行の阻害を誘導する機能は非常に興味深い現象ではあるが詳細な原因は不明である。E1A の CycA-CDK 活性化促進における p107 の依存性の検証として用いた CR2 変異体 dl1108 と各スプライシングバリエントの比較については、E1A 抗体による共免疫沈降と Histone H1 キナーゼ活性測定及び Western 解析により CR1 と CR2 が p107 及び CDK2 との結合に重要であること、また 10S と dl1108 共発現での E1A に結合する CDK2 の活性も低下していたことから、E1A と CDK2 との結合には p107 の結合が重要であることが考えられる。さらに、13S と 12S の E1A 抗体による共免疫沈降と Histone H1 キナーゼ活性測定の比較により 13S が CDK2 との結合性に関わらず 12S に比べて CDK2 活性を促進していることが示され、13S のみが保持する CR3 は CDK2 結合性とは独立した CDK2 活性化促進能を持つ、つまり質的な CDK2 活性化促進能を有していることが考えられる。

## 総合討論

### 第1章～第2章 ヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞誘導機構の解析

ヒト細胞における CycA-CDK 活性制御破綻が及ぼす細胞周期への影響の解析として HEK293, MDAH041, U-2 OS, HT1080, Saos-2, WI-38 での CycA $\Delta$ 80 の影響を検証した。CycA $\Delta$ 80 発現により HEK293 と MDAH041 において CycAWT 発現ではみられない G2/M 期停滞が誘導された。両細胞株では他の細胞株に比べ p21 と p27 の両発現レベルが低いこと、非誘導細胞株に比べ CycA $\Delta$ 80-CDK の活性が CycAWT-CDK よりも亢進していることが示され、これらの結果から細胞内の CDK inhibitor の発現レベルが低い細胞において、プロテアソーム分解を受けない CycA $\Delta$ 80 の発現により CycA-CDK 活性亢進することで G2/M 期停滞が誘導されることを見出した。

また、マウス由来 3-KO 細胞との比較として擬似的ヒト 3-KO 細胞における CycA $\Delta$ 80 の影響を確認したが、マウス由来 3-KO 細胞でみられた染色体倍數化は誘導されなかった。このことから生物種間で CycA-CDK 活性亢進の影響に違いがあると考えられる。この違いが何に起因するのかは未だ不明であるが、可能性としてマウス由来 3-KO 細胞で確認されている中心体数の異常が挙げられる。本研究で G2/M 期停滞が誘導される HEK293 において CycA $\Delta$ 80 発現時の細胞極の数を確認したところ多極化することではなく、CycA-CDK 活性亢進による中心体数異常は誘導されないことが考えられる (Fig. D-1)。CycA は中心体局在する因子としても知られている<sup>42</sup>が、中心体数制御においては Cdc6 や Mcm5, Orc1 の中心体局在を誘導し、中心体複製を抑制する報告<sup>43,44</sup>がある一方で、CycA が Mps1 の中心体局在を安定化させ、中心体過剰複製を促進することも報告<sup>45</sup>されており、ヒト・マウス間でのこれらの制御機構自体の違いやそれぞれの関係性の違いは不明である。また、分裂期に中心体成熟や紡錘体形成などに関与する Plk1 高発現マウス細胞において、中心体数の異常と細胞周期チェックポイントの迂回により異数体化するという報告<sup>46</sup>もあり、中心体制御は細胞周期制御の破綻に大きく関わっていると考えられる。そのためヒト・マウス細胞間の中心体関連因子等の比較解析をすることで、生物種間の CycA-CDK 活性亢進に対する細胞応答機構の違いの原因が明らかになると考える。

さらに、ヒト 3-KO 細胞作製の元にした細胞株によって CycA $\Delta$ 80 による細胞周期への影響に control との違い (HEK293 では control 同様 G2/M 期停滞が誘導されたが、MDAH041 由来の 3-KO 細胞では誘導されなかった) を確認した。この違いは Fig. 5-3a で示した p130 の発現レベルに由来すると考えられる。HEK293 では p107 欠損条件下であっても p130 が p107 の機能を補っている一方で、

MDAH041 では p130 の発現が元々少なく p107 欠損を相補できないため G2/M 期停滞が誘導されなかったのではないかと考えられる。しかし、もし p107 の欠損で G2/M 期停滞が誘導されないのであれば、p107 は CycA-CDK 活性を亢進する機能を持つことになる。これはマウス由来 3-KO 細胞での p107 の CDK 活性阻害能とは逆の機能をヒト細胞では持つことになり、p107 の機能にも生物種間で違いがあると考えられる。これは p21 と p27 欠損マウス細胞 (p21<sup>-/-</sup> p27<sup>-/-</sup> MEFs) においては CycA $\Delta$ 80 の発現による G2/M 期停滞は誘導されないこととも一致する (Fig. 1-7)<sup>27</sup>。

ヒト細胞において CycA $\Delta$ 80 による CycA-CDK 活性亢進は、3-KO 細胞における染色体倍数化を誘導せず G2/M 期停滞を誘導することが示されたが、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導の分子メカニズムについては未だ明らかでない。そこで、ヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞誘導機構の解明に向けて研究を進めた。まず、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞が誘導された細胞株 HEK293 と MDAH041 において、G2/M 期停滞誘導強度に違いがあることを見出し、HEK293 はアデノウイルス由来のタンパク質である E1A が発現していることから、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞と E1A の関係性を解析し、CycA-CDK 活性亢進による G2/M 期停滞誘導機構の解明の足掛かりとした。E1A により G2/M 期停滞誘導の促進と CycA-CDK2 複合体量及び CDK2 活性の促進を確認したことから、E1A は CycA-CDK2 複合体形成の促進によるより強い CycA-CDK 活性亢進を誘導することで、G2/M 期停滞誘導を促進することが示唆された。さらに、興味深いことに E1A は 26S プロテアソームを阻害することが報告されており<sup>47</sup>、本研究においても E1A 発現レベルにより mtCycA の発現が変動している (Fig. 3-2, 4 input: mtCycA) ことが確認できることから、E1A による 26S プロテアソーム阻害が CycA の安定性に関与していることが考えられる。しかしながら、E1A 共発現による CycA-CDK2 複合体量も増加している (Fig. 3-4, 5) ことから、E1A は CycA の安定性だけでなく CycA-CDK2 複合体形成の促進にも関与していることを示唆できる。

E1A による CycA-CDK2 活性亢進により G2/M 期停滞が促進する結果を踏まえると、CDK2 活性が ATR-Chk1 経路を活性化し、G2/M 期停滞を誘導する過去の報告と一致する<sup>12</sup>。そこで、CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導と ATR-Chk1 経路の関係性について、ATR-Chk1 経路特異的阻害剤や ATR-Chk1 経路下流に位置する cdc25A や抑制的リン酸化 (pY15) を受けない CDK1 変異型 CDK1AF を用いて解析を進めた。ATR-Chk1 経路特異的阻害剤添加による FACS 解析により CycA $\Delta$ 80 による G2/M 期停滞誘導には ATR-Chk1 経路が関与していること、CDK1AF 及び cdc25A の共発現による FACS 解析により CycA $\Delta$ 80 による CycA-CDK 活性亢進が ATR-Chk1 経路を活性化することで、CDK1 の抑制的リン

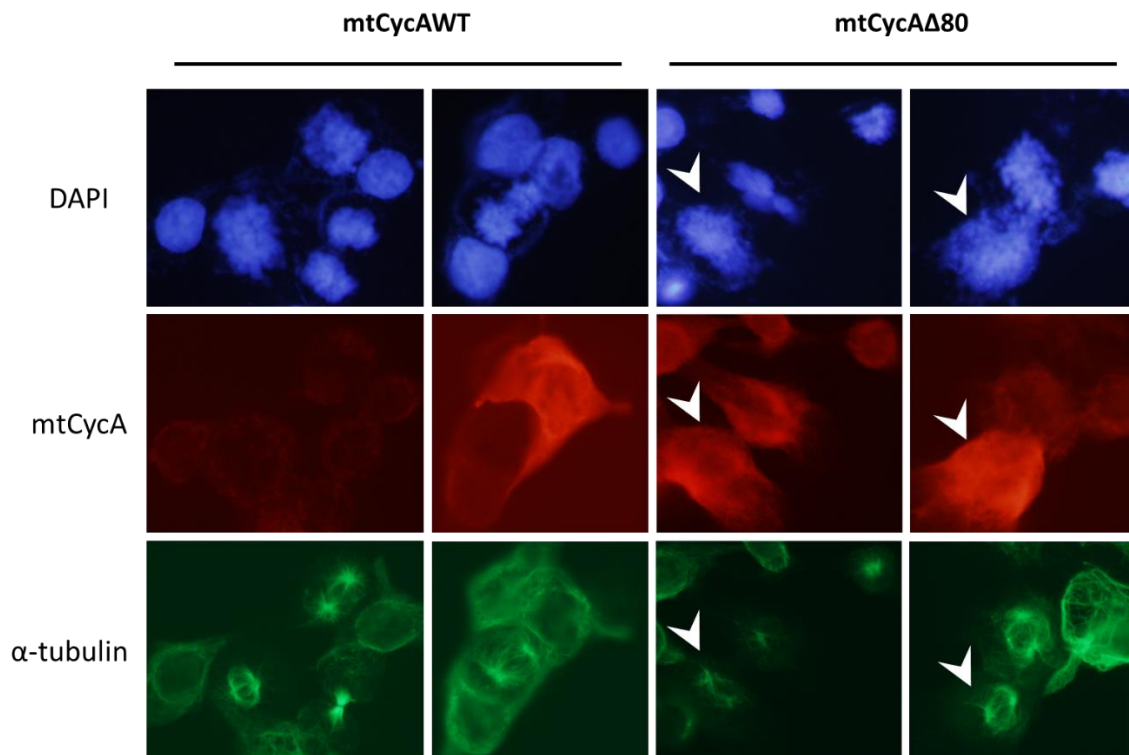
酸化を解除する *cdc25A* のホスファターゼ活性の不活化により G2/M 期停滞が誘導されていることが示唆された。また、*Chk1* は *cdc25A* と *cyclin-CDK* の結合を阻害することが知られており<sup>48</sup>、本研究で確認された *CDK1* の抑制的リン酸化の増加に *cdc25A* と *cyclin-CDK* の結合性も関与しているかもしれない。一方で、*CDK2* 欠損細胞で G2/M 期チェックポイントが DNA 損傷により誘導され、むしろ *CDK2* の不活性化が G2/M 期チェックポイントに必要であるという報告もある<sup>49</sup>。その論文では *CKI* である *p21* が *CDK1* 活性を抑制することで G2/M 期停滞が誘導される経路が示されている。しかしながら、本研究では *p21* 発現レベルが低下している細胞株での解析であり、*p21* 発現下での誘導経路とは異なる経路であると考えられる。また、*MDAH041* において *CycA-CDK* 活性亢進誘導時の DNA 損傷を  $\gamma$ -H2AX のリン酸化を指標として確認したところ、DNA 損傷は確認できなかった (Fig. D-2)。このことから本研究と *CDK2* 欠損細胞における G2/M 期チェックポイントの誘導経路は異なる経路であることが考えられる。

### 第3章 E1A による *CycA-CDK* 活性化促進機構の解析

本研究より見出された E1A による *CycA-CDK* 活性化促進能は、E1A の機能としては今まで報告されていなかった。また、本研究の *CycA-CDK* 活性亢進の細胞周期への影響を議論するにあたって、*CycA-CDK* 活性亢進の原因経路となりうる現象の解明は非常に重要であると考え、E1A の *CycA-CDK* 活性化促進機構を E1A スプライシングバリエントを用いた各 CR ドメインの機能解析より E1A の詳細な *CDK2* 活性化促進機構について解析した。単離したスプライシングバリエント 13S、12S、10S による *CycA $\Delta$ 80* の G2/M 期停滞誘導促進能を FACS 解析により確認したところ、13S が最も強い G2/M 期停滞誘導促進能を示した。さらに、各スプライシングバリエントの *CDK2* 活性化促進能を比較したところ、13S において他の E1A と比べ E1A に結合する *CDK2* の活性が最も高かった。この結果は G2/M 期停滞誘導促進能の結果と一致する。また、単離したスプライシングバリエントはすべて CR2 を保持しており、CR2 は *p107* との結合に関与する領域として知られている<sup>34</sup>。そこで、E1A の *CycA-CDK* 活性化促進における *p107* の依存性の検証として CR2 変異体 *dl1108* と各スプライシングバリエントの比較解析を行った。*dl1108* と 10S において 13S と 12S に比べ *CDK2* 及び *p107* との結合性の低下が示され、CR1 と CR2 が *p107* 及び *CDK2* との結合に重要であることが示唆された。また、10S 及び *dl1108* 共発現での E1A に結合する *CDK2* の活性も低下していたことから、E1A と *CDK2* との結合には *p107* の結合が重要であることが考えられる。E1A は *p107* と *CycA-CDK2* 複合体と 4 者複合体を形成することが既に知られている<sup>23</sup> ことから、今回の E1A の *CDK2* 結合性が *p107* の結合に依存することは容易に想像できる。

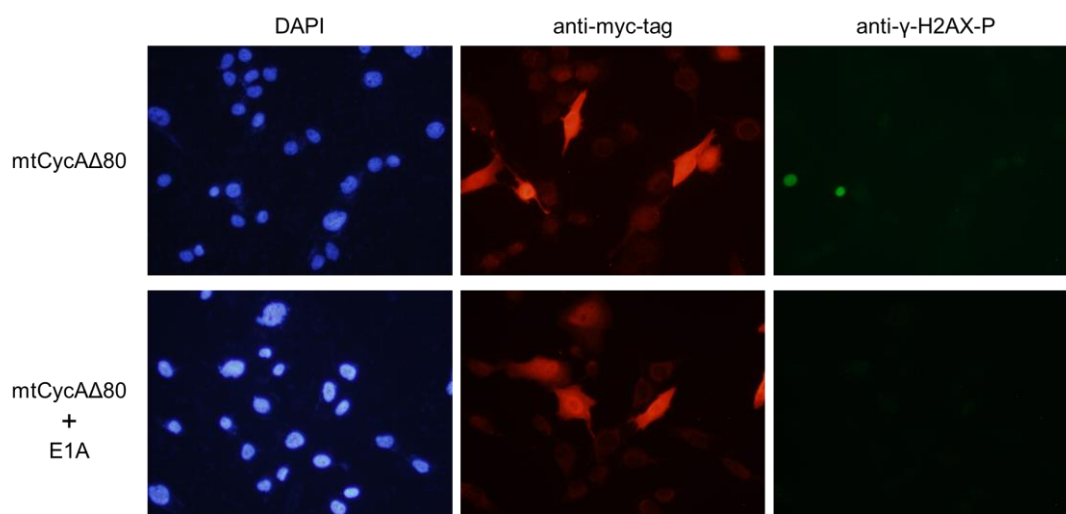
さらに、13S と 12S の CDK2 活性と結合性の比較により 13S が CDK2 との結合性に関わらず 12S に比べて CDK2 活性を促進していることが示され、13S のみが保持する CR3 は CDK2 結合性ではない質的な CDK2 活性化促進能を有していることが示唆された。CR3 は zinc finger motif を持ち、転写活性化因子と結合することで転写活性化能を促進すること<sup>39,40</sup>は報告されているが、細胞周期制御を直接行う因子を質的に制御する機能は本研究が初めて見出した。CR3 は 3 つのサブドメイン: zinc finger motif を含む N-terminal 領域 (139-179aa)、C-terminal 領域 (183-188aa)、補助領域と呼ばれる<sup>50</sup>CR3 を C 末端側に少し超えた配列も含む AR1 領域 (189-200aa)<sup>15</sup> を持ち、N-terminal 領域と C-terminal 領域が独立的に転写活性化因子の活性に関与していることが知られている<sup>51</sup>。これら 3 つのサブドメインの CDK2 活性への影響の解析は、E1A の CDK2 活性化促進能機構の理解につながると考えられる。また、スプライシングバリエーションの比較解析から各バリエーションの機能の違いについても明らかとなった (Table D-1)。13S においては、元々知られている E2F の活性を抑制する pRb の不活性化能だけでなく、CDK2 の活性化促進能を持つと示唆される一方で、CR3 を保持しない 12S は CDK2 活性化促進能を持たないため pRb の不活性化能だけを持つと考えられる。10S においては pRb と E2F の解離に必要な CR1 も保持しないため pRb 不活性化能も持たないことが考えられる (Fig. D-3)<sup>20</sup>。また、10S は G1 期停滞を誘導する (Fig. 5-2b) ことが示されており、pRb との結合は CR2 を保持しているため可能であることから、10S は pRb と E2F の結合を逆に強固にしていることが予測される。

最後に、E1A の細胞周期制御に対する機能として、本研究から新規な側面が明らかとなった。今までは E2F の活性を抑制する pRb の不活性化により、細胞増殖を促進する正の制御能を持つことが知られていたが、本研究で見出した E1A の CDK2 活性化促進能は、最終的な細胞応答として細胞周期チェックポイントの活性化により細胞周期停滞を誘導することが示され、E1A の細胞周期制御としては負の制御能を持つことを示す重要な知見であると考えられる (Fig. D-4)。



**Fig. D-1 HEK293** における CycA-CDK 活性亢進による多極化への影響

免疫蛍光染色により mtCycAWT と mtCycA Δ 80 を発現させた細胞の細胞極の観察。使用抗体は anti-myc-tag polyclonal (MBL) 1:200 と anti-α-tubulin monoclonal (GeneTex) 1:100。矢印は mtCycA Δ 80 が発現と細胞極が確認できる細胞を示す。  
(Akaike Y, Chibazakura T. 未発表データ)



**Fig. D-2 MDAH041 における CycA-CDK 活性亢進の DNA 損傷誘導**

免疫蛍光染色により mtCycA  $\Delta$  80 と mtCycA  $\Delta$  80 及び E1A を発現させた細胞の DNA 損傷時に誘導される  $\gamma$ -H2AX のリン酸化の観察。使用抗体は anti-myc-tag polyclonal (MBL) 1:200 と anti- $\gamma$ -H2AX-P monoclonal (SIGMA) 1:200。

(Akaike Y, Chibazakura T. 未発表データ)

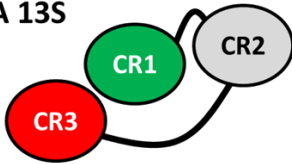
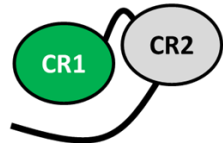
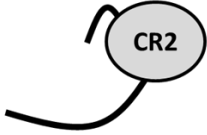
	pRb 不活性化能	CDK2活性化促進能
<b>E1A 13S</b> 	+	+
<b>E1A 12S</b> 	+	—
<b>E1A 10S</b> 	— むしろE2Fとの結合を促進？	—

Table D-1 E1A スプライシングバリエントの機能まとめ



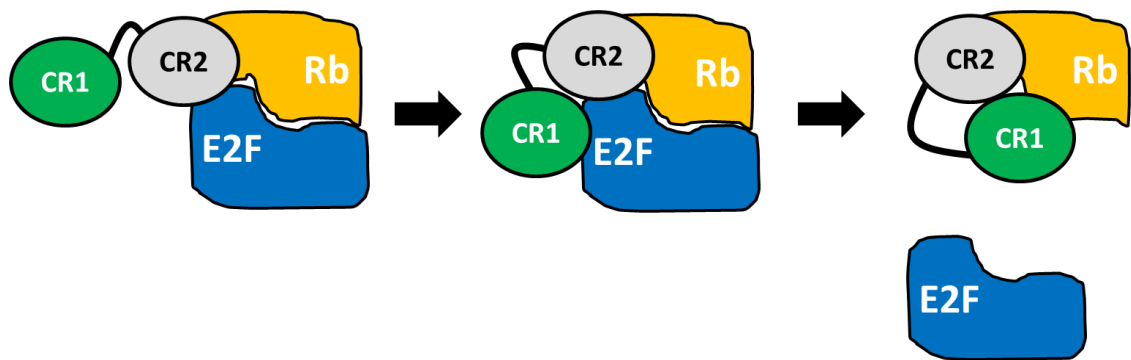


Fig. D-3 E1A による pRb-E2F 結合の解離プロセス

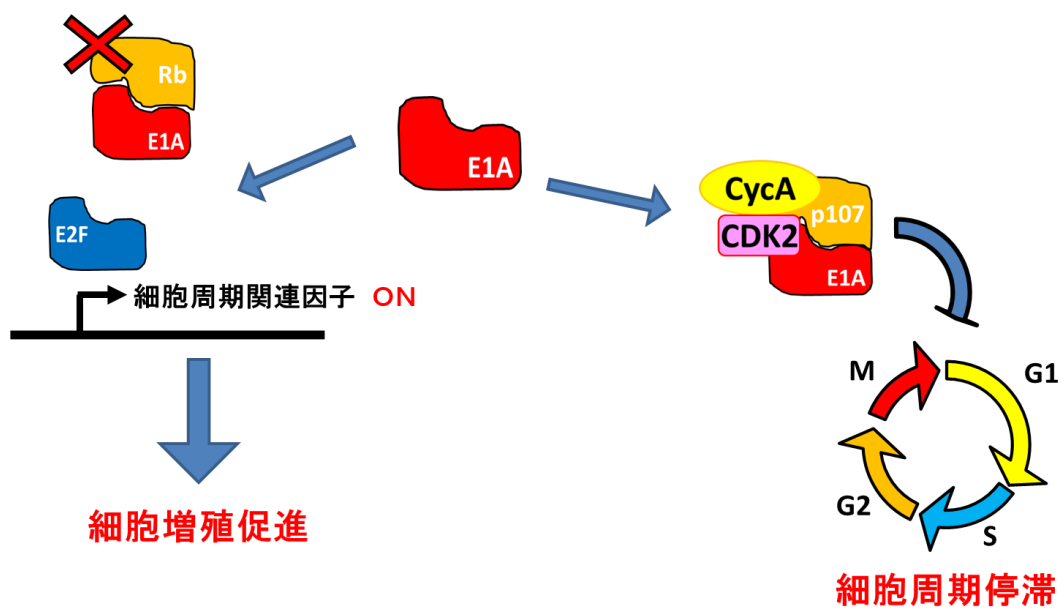


Fig. D-4 E1A による細胞周期制御

## 総括

本研究によりヒト細胞における CycA-CDK 活性亢進による CycA-CDK 活性制御破綻の細胞周期への影響として、細胞周期チェックポイント ATR-Chk1 経路の活性化による細胞周期停滞が誘導されることが明らかとなった。本研究に至る研究背景として、マウス由来 3-KO 細胞における CycA-CDK 活性亢進による染色体倍数化においても細胞周期停滞として細胞分裂の阻害が誘導されている。しかし、細胞分裂阻害時の表現型としてヒト細胞では細胞周期進行が停滞するに対し、マウス細胞では分裂をスキップして次の G1 期に進行する細胞周期停止制御の厳密性の違いが考えられる (Fig. D-5)。この違いの原因として中心体数制御を挙げたが、マウス細胞では細胞老化を脱して不死化細胞となる細胞の出現頻度が高く<sup>26</sup>、ヒト細胞では形質転換などが誘導されない限り不死化細胞は出現しないことが知られている。このことからヒト・マウス細胞間の細胞周期制御の厳密性の違いが示唆されており、本研究により明らかとなった CycA-CDK 活性制御破綻による影響の違いにおいても、ヒト・マウス細胞間の細胞周期制御の厳密性の違いを示す重要な知見であると考えられる。

また、M 期進行阻害剤 Noc と細胞周期チェックポイント阻害剤の併用実験により、本来 CycA が分解制御を受ける分裂期前中期よりも早い時期に、分解制御を受けない CycA $\Delta$ 80 による CycA-CDK 活性制御破綻が、細胞周期チェックポイントを活性化し細胞周期進行を抑えることが示唆され、細胞周期制御破綻自体が異常な細胞増殖を抑える防御システムの存在が明らかとなったことから、ヒト細胞にとって前中期以降の CycA の発現は、非常に不都合な現象であり CycA-CDK 活性制御の重要性を示していると考えられる (Fig. D-6)。さらに、本研究で初めて見出された E1A による CycA-CDK 活性化促進能が、本研究においては最終的に細胞周期チェックポイントの活性化に繋がることは、がんウイルスタンパク質であり細胞周期制御を破綻させる E1A の機能とは矛盾するように考えられる。しかし一方で、E1A は増殖シグナル経路を阻害することでがん抑制因子となることが報告されており、その機能はマウスを用いた *in vivo* 実験でも確認されている<sup>52-54</sup>。このことから本研究でみられた E1A の細胞周期チェックポイント活性化への関与は E1A のがん抑制機能の 1 つかも知れない。しかし、E1A による CycA-CDK 活性化促進能がアデノウイルスのウイルス産生やウイルス感染した細胞内での影響、他のアデノウイルスタンパク質との関係性については更なる解析が必要である。また、スプライシングバリエントの機能の違いも見出されたことから、E1A の CycA-CDK 活性化促進能や E1A が複数のスプライシングバリエントを持つことがアデノウイルスにとって、どのような意義を持つのか、今後さらに研究を進める価値があると考えられる。

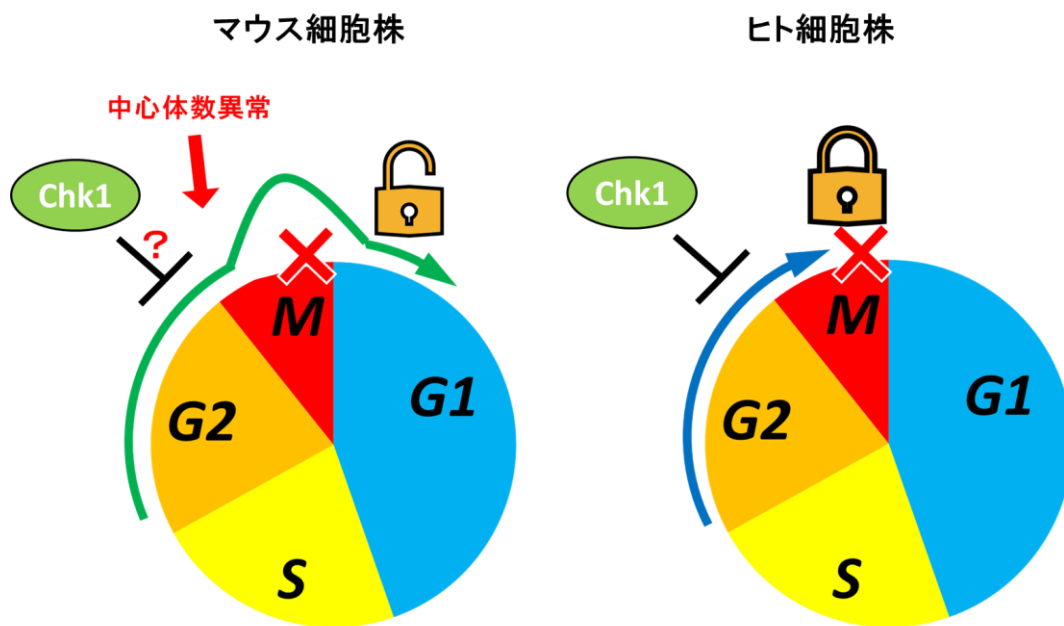


Fig. D-5 ヒト・マウス細胞間の細胞周期制御の厳密性の違い

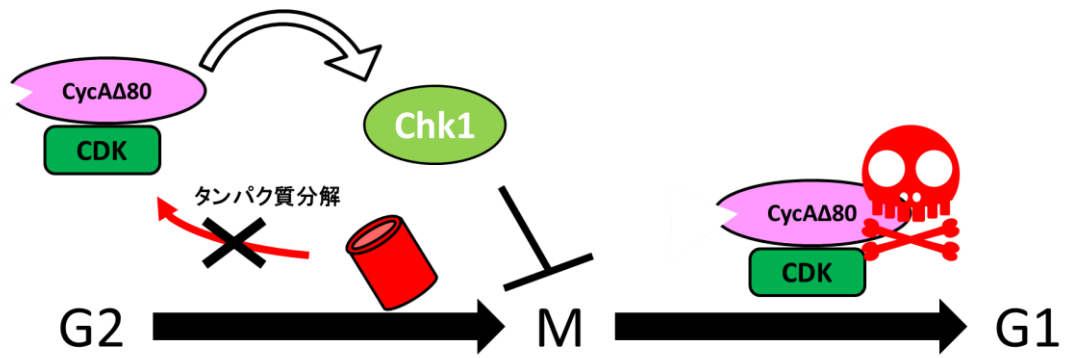


Fig. D-6 CycA-CDK 活性制御破綻が誘導する細胞周期停滞

## 材料

- 使用細胞

HEK293 (ヒト胎児腎細胞由来アデノウイルス形質転換株)

U-2 OS (ヒト骨肉腫由来)

MDAH041 (ヒト線維芽肉腫由来)

HT1080 (ヒト線維芽肉腫由来)

Saos2 (ヒト骨肉腫由来)

WI-38 (ヒト胎児肺由来線維芽細胞)

- 使用プラスミド

pCS mtCycAWT

pCS mtCycA  $\Delta$  80

pCS mtCycA  $\Delta$  80 R211A

pCS mtcyclin E

pCS2+

pCSMT

pCSHA CDK2WT

pCSHA CDK2dn (dn: dominant negative) (別府大学 大坪素秋教授より分与)

pCSHA CDK1WT

pCSHA CDK1AF (別府大学 大坪素秋教授より分与)

pCSHA cdc25A

pCSHA

pE1A

pCS E1A13S

pCS E1A12S

pCS E1A10S

pCS E1A9S

pCS E1A dl1108 ( $\Delta$  124-127aa)

pEGFP-C1

px330 (CRISPR-Cas9 system 用 plasmid)

px330 p107#114

px330 p107#113

- 使用抗体

western blotting

- Anti-myc-tag monoclonal PL-14 (MBL)
- Anti-p21 polyclonal C-19 (Santa Cruz)
- Anti-p27 polyclonal C-19 (Santa Cruz)
- Anti-p107 polyclonal C-18 (Santa Cruz)
- Anti-p130 monoclonal D-10 (Santa Cruz)
- Anti- $\alpha$ -tubulin monoclonal (GeneTex)
- Anti-cyclin A polyclonal<sup>55</sup>
- Anti-CDK2 polyclonal M2 (Santa Cruz)
- Anti-CDK1 monoclonal (BD)
- Anti-CDK1 Y15-phosphorylated (pY15) (Abcam)
- Anti-E1A monoclonal M58 (Santa Cruz)
- Anti-cyclin E (Santa Cruz)

免疫沈降 & Histone H1 キナーゼ活性測定

- Anti-myc-tag monoclonal PL-14 (MBL) 希釈倍率 1:200
- Anti-CDK2 polyclonal (Merck Millipore) 希釈倍率 1:100
- Anti-E1A monoclonal M58 (Santa Cruz) 希釈倍率 1:200

- 細胞進行・細胞周期チェックポイント阻害薬剤

Nocodazole (SIGMA)

Caffeine (SIGMA)

MK8776 (Selleckchem)

UCN-01 (SIGMA)

PV1019 (Calbiochem)

● 動物細胞用培地&試薬

DME 培地 (DMEM)

Dulbecco's Modified Eagles Medium (SIGMA)  
10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Valley Biomedical)  
1% Penicillin-Streptomycin-Glutamine (PSG) (Gibco)  
0.2% Fungizone (Gibco)

PBS

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco) 9.6 g  
dH<sub>2</sub>O 1 L

1×Trypsin

Trypsin-EDTA (Gibco) 5 ml  
PBS 45 ml

● Transfection (リン酸カルシウム法)用試薬

2×HEPES

NaCl 1.6 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.024 g  
HEPES 6.5 g  
(pH 7.0 に調整 NaOH)  
dH<sub>2</sub>O up 100 ml



● Immunoprecipitation 用試薬

10×TBS

2 M Tris-HCl (pH7.5) 12.5 ml (500 mM)  
5 M NaCl 15 ml (1.5 M)  
dH<sub>2</sub>O 22.5 ml

RIPA complete

4×RIPA 10 ml  
50% Glycerol 8 ml  
1 M NaF 2 ml (500 mM)  
0.1 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 400 μl (1 mM)  
1 M DDT 40 μl (1 mM)  
10 mg/ml Leupeptin/H<sub>2</sub>O 40 μl (10 μg/μl)  
10mg/ml Aprotinin/H<sub>2</sub>O 40 μl (10 μg/μl)  
10mg/ml PepastainA/DMSO 40 μl (10 μg/μl)  
0.1 M PSMF/DMSO 400 μl (1 mM)  
H<sub>2</sub>O 19.04 ml

4×RIPA

2 M Tris-HCl (pH7.5) 5 ml (200 mM)  
10% NP-40 10 ml (2%)  
※NonidetP-40 は販売中止なので Igepal-CA 630 (SIGMA-ALDRICH)を代替品として使用  
5 M NaCl 6 ml (600 mM)  
0.5 M EDTA 2 ml (20mM)  
dH<sub>2</sub>O 27 ml

1×RIPA-

4×RIPA 10 ml  
1 M DTT 40 μl (1 mM)  
1 M NaF 2 ml (500 mM)  
dH<sub>2</sub>O 27.96 ml

- H1 kinase 測定用試薬

10×H1 kinase buffer

100  $\mu$ l 2 M Tris (pH 7.4)     200 mM  
75  $\mu$ l 1 M MgCl<sub>2</sub>     75 mM  
10  $\mu$ l 1 M DTT     10 mM ※使用時に添加  
815  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

H1 kinase reaction mix

5  $\mu$ l 10×H1 kinase buffer  
5  $\mu$ l 0.3 mM ATP  
1  $\mu$ l 1 mg/ml Histone H1  
購入時期から必要量を計算 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP ※RI センターにて入れる  
Up to 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

- p107 ノックアウト用 CRISPR ターゲット配列

CRISPR direct (<http://crispr.dbcls.jp/>)

ATUM (<https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/results>)

上記の2つの検索サイトにより候補配列を以下のように決定した。

113: 5' -AATATCTCCGTCCGGTCAGT -3'  
114: 5' -AAATATCTCCGTCCGGT CAG -3'

- E1A ノックダウン用 siRNA 配列

siDirect (<http://sidirect2.nai.jp/>) により設計。

5'AUAAU CUAACAC AAACUCCUC 3'  
5'GGAGUUUGUGUUAGAUUAUGU 3'

## 実験手法

- リン酸カルシウム法 (P100 培養ディッシュの系)<sup>56</sup>

DNA とリン酸カルシウムの共沈殿物を形成させエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込ませる方法。安価で特別な機器が必要なく、遺伝子が多コピーで取り込まれるという特徴がある。

トランスフェクション (TF) の 4 h 前に 8 ml の DMEM で Refeed する

↓

ファルコンチューブに DNA Mixture を作製する

DNA	X $\mu$ l
2 M CaCl <sub>2</sub>	62 $\mu$ l
<u>+ MilliQ</u>	<u>up to 500 <math>\mu</math>l</u>

↓

2×HEPES 500  $\mu$ l を一滴ずつ DNA Mixture へ滴下する

↓

細胞へ一滴ずつまんべんなく滴下する

↓

滴下後は素早くインキュベーターへ細胞をしまう

↓

16 h から 18 h 後に DMEM で Refeed し、その後は実験に合った処理をする。

● リポフェクション法 (P100 培養ディッシュの系)

TF の 4~8 h 前に 4 ml/dish で refeed

① X-treamGENE siRNA Transfection Reagent(Roche)

+ Opti-MEM (Gibco) (PSG/Fungizone/FBS-free)

② siRNA/Plasmid + Opti-MEM (Gibco) (PSG/Fungizone/FBS-free)

①+② ピペッティング

↓

20 min R. T. dark

↓

培養細胞に TF

- 100 mm dish の場合、①を 200  $\mu$ l, ②を 200  $\mu$ l で合わせて 400  $\mu$ l とし添加した。
- 培養条件によって異なるが TF 24 h 以降に回収を行う。
- X-treme の量は核酸(RNA+DNA)の量(ng)の 5 倍量( $\mu$ l)入れ、入れる核酸の量は予備実験より入れる量を決めた。
- negative siRNA を入れるときも X-treme を添加した。

● 免疫沈降法 (Immunoprecipitation; IP) <sup>29</sup>

・ RIPA 回収

細胞を回収

↓

遠心 4°C 900 rpm 5min

↓

PBS 1~4 ml で懸濁し、細胞数をカウントする

↓

遠心 4°C 900 rpm 5min

↓

上清を捨て、1×TBS 1 ml に溶かす (エッペン一本あたり 1 ml) →エッペン

↓

遠心 4°C 7500 rpm 1 min

↓

RIPA complete で  $1.0 \times 10^4$  cells/ $\mu$ l となるよう懸濁する

↓

on ice 30 min

↓

-80°C保存

・ 免疫沈降

遠心 4°C 15000 rpm 1 min

↓

上清を必要量新しいエッペンへ移す

↓

RIPA complete で 400  $\mu$ l に fill up し、Protein G を 60  $\mu$ l 加える(pre-clear)  
4°C rotator にセットして 4°C で 30 min 回転させる

↓

遠心 4°C 15000 rpm 1 min

上清を新しいエッペンに入れ、抗体を加え、氷上で 1 h インキュベート  
このとき input 用として上清を少量別にとっておく

↓

Protein G 60  $\mu$ l を加え、4°C rotator にセットして 4°C で 30 min 回転させる

↓

遠心 4°C 15000 rpm 1 min

↓

上精をアスピレート後 1×RIPA 300  $\mu$ l を加え(ピペッティングしない)、  
遠心 4°C 15000 rpm 1 min

↓×3

ビーズを吸わないようにアスピレート

↓

2×sample Buffer 15  $\mu$ l を加える

↓

100°Cで 5 min インキュベーション

↓

**SDS-Western**

(その日中にやらなければ-30°C保存)

● H1 kinase 活性測定

目的因子を認識する抗体で IP

ただし、抗体反応後の protein G は倍量入れる(2 つに分けるときの誤差を少なくするため)

また、wash は RIPA complete×1 , 1×H1 kinase buffer×3 とし、最後の wash のとき 2 つに分ける

↓

片方は通常の Western

もう片方は RI へ

↓(以下 RI の工程)

H1 kinase reaction mix 20 µl/sample

↓

30 min 37°C add 15 µl 4×SB boil 5 min

↓

SDS-PAGE

↓

Lower ゲル濾紙に貼り付け、ラップで包む。

↓

ゲルをイメージングプレートと共にカセットに挟み感光

↓

BAS-2500 (FUJI FILM) を用いてパソコンにデータを取り込み放射線の線量を数値化する。

● FACS sample 回収

DMEM を吸引除去し、PBS 2 ml で wash

↓

1×Trypsin 1 ml を加え 37°C 5 min インキュベート

↓

DME 2 ml×2 でコーニングチューブへ回収する(ここから先は氷上)

↓

900 rpm 4°C 5 min 遠心

↓

上清を捨て PBS 1 ml を加え、同じ条件で再び遠心

↓

上清を捨て PBS 0.5 ml を加え、vortex しながら 90% エタノールを 4.5 ml 滴下

↓

4°C 30 min~(over night 推奨)

↓

PI 染色へ

● PI 染色

エタノール固定した細胞を 900 rpm 4°C 5 min 遠心

↓

上清を慎重に捨てる(細胞がとても剥がれ易い)

↓

PBS 2 ml で wash し 900 rpm 4°C 5 min 遠心

↓

上清を捨て、PI/RNase 400  $\mu$ l を添加し 37°C 30 min 遮光で静置

↓

FACS 解析へ



- p107 欠損細胞のクローン取得

p107 の CRISPR ターゲット配列を導入した CRISPR plasmid をリポフェクション法により TF したのち、48 時間後に低密度(顕微鏡の視野に 1 cell しか目視できないくらい)にまき直す。コロニーの形成が確認できたのちにピッキング法によりコロニーを単離することで、クローンを取得した。

## 参考文献

1. Murray AW, Kirschner MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* (1989) 339:275–80.
2. Afshari CA, Barrett JC. Cell Cycle Controls: Potential Targets for Chemical Carcinogens? *Environ Health Perspect* (1993) 101:9.
3. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* (1990) 344:503–8.
4. King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* (80-. ). (1996) 274:1652–9.
5. Elzen N Den, Pines J. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *J Cell Biol* (2001) 153:121–35.
6. Morgan DO. Principles of CDK regulation. *Nature* (1995) 374:131–4.
7. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* (1995) 6:387–400.
8. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massagué J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* (1994) 78:59–66.
9. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* (1992) 11:961–71.
10. Resnitzky D, Hengst L, Reed SI. Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* (2015) 15:4347–52.
11. Kabeche L, Compton DA. Cyclin A regulates kinetochore microtubules to promote faithful chromosome segregation. *Nature* (2013) 502:110–3.

12. Chung JH, Bunz F. Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control. *PLoS Genet* (2010) 6: e1000863.
13. Nevins JR, Ginsberg HS, Blanchard J-M, Wilson MC, Darnell JE. Regulation of the Primary Expression of the Early Adenovirus Transcription Units. *J Virol* (1979) 32:727–33.
14. Stephens C, Harlow E. Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. *EMBO J* (1987) 6:2027–35.
15. Pelka P, Ablack JNG, Fonseca GJ, Yousef AF, Mymryk JS. Intrinsic Structural Disorder in Adenovirus E1A: a Viral Molecular Hub Linking Multiple Diverse Processes. *J Virol* (2008) 82:7252–63.
16. Whyte P, Buchkovich KJ, Horowitz JM, Friend SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* (1988) 334:124–9.
17. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* (1995) 81:323–30.
18. DeCaprio JA. How the Rb tumor suppressor structure and function was revealed by the study of Adenovirus and SV40. *Virology* (2009) 384:274–84.
19. Ikeda MA, Nevins JR. Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol Cell Biol* (1993) 13:7029–35.
20. Fattaey AR, Harlow E, Helin K. Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F-protein complexes. *Mol Cell Biol* (1993) 13:7267–77.
21. Alevizopoulos K, Sanchez B, Amati B. Conserved region 2 of adenovirus E1A has a function distinct from pRb binding required to prevent cell cycle arrest by p16INK4a or p27Kip1. *Oncogene* (2000) 19:2067–74.

22. Singhal G, Leo E, Setty SKG, Pommier Y, Thimmapaya B. Adenovirus E1A Oncogene Induces Rereplication of Cellular DNA and Alters DNA Replication Dynamics. *J Virol* (2013) 87:8767–78.
23. Faha B, Ewen M, Tsai L, Livingston D, Harlow E. Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science* (80- ) (1992) 255:87–90.
24. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* (1961) 25:585–621.
25. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* (1965) 37:614–36.
26. Todaro GJ, Green H. QUANTITATIVE STUDIES OF THE GROWTH OF MOUSE EMBRYO CELLS IN CULTURE AND THEIR DEVELOPMENT INTO ESTABLISHED LINES. *J Cell Biol* (1963) 17:299–313.
27. Chibazakura T, McGrew SG, Cooper JA, Yoshikawa H, Roberts JM. Regulation of cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27, and p107. *Proc Natl Acad Sci* (2004) 101:4465–70.
28. Niwa T, Akaike Y, Watanabe K, Chibazakura T. Hyperactivation of cyclin A-CDK induces centrosome overduplication and chromosome tetraploidization in mouse cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press.
29. Geley S, Kramer E, Gieffers C, Gannon J, Peters J-M, Hunt T. Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome-Dependent Proteolysis of Human Cyclin a Starts at the Beginning of Mitosis and Is Not Subject to the Spindle Assembly Checkpoint. *J Cell Biol* (2001) 153:137–48.
30. Akaike Y, Chibazakura T. Aberrant activation of cyclin A-CDK induces G2/M-phase checkpoint in human cells. *Cell Cycle* (2020) 19:84–96.

31. Chibazakura T, Kamachi K, Ohara M, Tane S, Yoshikawa H, Roberts JM. Cyclin A Promotes S-Phase Entry via Interaction with the Replication Licensing Factor Mcm7. *Mol Cell Biol* (2010) 31:248–55.
32. Kobayashi H, Stewart E, Poon R, Adamczewski JP, Gannon J, Hunt T. Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell* (1992) 3:1279-1294.
33. van den Heuvel S, Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* (80- ) (1993) 262:2050–4.
34. Faha B, Harlow E, Lees E. The adenovirus E1A-associated kinase consists of cyclin E-p33cdk2 and cyclin A-p33cdk2. *J Virol* (1993) 67:2456–65.
35. Sprenger F, Yakubovich N, O’Farrell PH. S-phase function of Drosophila cyclin A and its downregulation in G1 phase. *Curr Biol* (1997) 7:488–99.
36. Myers JS, Zhao R, Xu X, Ham A-JL, Cortez D. Cyclin-Dependent Kinase 2–Dependent Phosphorylation of ATRIP Regulates the G 2 -M Checkpoint Response to DNA Damage. *Cancer Res* (2007) 67:6685–90.
37. Ball HL, Myers JS, Cortez D. ATRIP Binding to Replication Protein A-Single-stranded DNA Promotes ATR–ATRIP Localization but Is Dispensable for Chk1 Phosphorylation. *Mol Biol Cell* (2005) 16:2372–81.
38. Akaike Y, Nakane Y, Chibazakura T. Analysis of E1A domains involved in the enhancement of CDK2 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2021) 548:98-103.
39. Chatton B, Bocco JL, Gaire M, Hauss C, Reimund B, Goetz J, Kedinger C. 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* (1993) 13:561–70.

40. Raychaudhuri P, Rooney R, Nevins JR. Identification of an E1A-inducible cellular factor that interacts with regulatory sequences within the adenovirus E4 promoter. *EMBO J* (1987) 6:4073–81.
41. Egan C, Jelsma TN, Howe JA, Bayley ST, Ferguson B, Branton PE. Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol Cell Biol* (1988) 8:3955–9.
42. Pascreau G, Eckerdt F, Churchill MEA, Maller JL. Discovery of a distinct domain in cyclin A sufficient for centrosomal localization independently of Cdk binding. *Proc Natl Acad Sci* (2010) 107:2932–7.
43. Xu X, Huang S, Zhang B, Huang F, Chi W, Fu J, Wang G, Li S, Jiang Q, Zhang C. DNA replication licensing factor Cdc6 and Plk4 kinase antagonistically regulate centrosome duplication via Sas-6. *Nat Commun* (2017) 8:15164.
44. Ferguson RL, Pascreau G, Maller JL. The cyclin A centrosomal localization sequence recruits MCM5 and Orc1 to regulate centrosome reduplication. *J Cell Sci* (2010) 123:2743–9.
45. Kasbek C, Yang C-H, Yusof AM, Chapman HM, Winey M, Fisk HA. Preventing the Degradation of Mps1 at Centrosomes Is Sufficient to Cause Centrosome Reduplication in Human Cells. *Mol Biol Cell* (2007) 18:4457–69.
46. Gheghiani L, Wang L, Zhang Y, Moore XTR, Zhang J, Smith SC, Tian Y, Wang L, Turner K, Jackson-Cook CK, et al. PLK1 induces chromosomal instability and overrides cell cycle checkpoints to drive tumorigenesis. *Cancer Res* (2020) 1377, 2020.
47. Turnell AS. Regulation of the 26S proteasome by adenovirus E1A. *EMBO J* (2002) 19:4759–73.
48. Uto K, Inoue D, Shimuta K, Nakajo N, Sagata N. Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *EMBO J* (2004) 23:3386–96.

49. Bačević K, Lossaint G, Achour TN, Georget V, Fisher D, Dulić V. Cdk2 strengthens the intra-S checkpoint and counteracts cell cycle exit induced by DNA damage. *Sci Rep* (2017) 7:13429.
50. Bondesson M, Svensson C, Linder S, Akusjärvi G. The carboxy-terminal exon of the adenovirus E1A protein is required for E4F-dependent transcription activation. *EMBO J* (1992) 11:3347–54.
51. Webster LC, Ricciardi RP. trans-dominant mutants of E1A provide genetic evidence that the zinc finger of the trans-activating domain binds a transcription factor. *Mol Cell Biol* (1991) 11:4287–96.
52. Flinterman M, Gäken J, Farzaneh F, Tavassoli M. E1A-mediated suppression of EGFR expression and induction of apoptosis in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Oncogene* (2003) 22:1965–77.
53. Callejas-Valera JL, Guinea-Viniegra J, Ramírez-Castillejo C, Recio JA, Galan-Moya E, Martinez N, Rojas JM, Cajal SR y, Sánchez-Prieto R. E1a Gene Expression Blocks the ERK1/2 Signaling Pathway by Promoting Nuclear Localization and MKP Up-regulation. *J Biol Chem* (2008) 283:13450–8.
54. Cimas FJ, Callejas-Valera JL, García-Olmo DC, Hernández-Losa J, Melgar-Rojas P, Ruiz-Hidalgo MJ, Pascual-Serra R, Ortega-Muelas M, Roche O, Marcos P, et al. E1a is an exogenous in vivo tumour suppressor. *Cancer Lett* (2017) 399:74–81.
55. Marraccino RL, Firpo EJ, Roberts JM. Activation of the p34 CDC2 protein kinase at the start of S phase in the human cell cycle. *Mol Biol Cell* (1992) 3:389–401.
56. Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* (1996) 10:1979–90.

## 謝辞

8年間という長い期間、私の研究だけでなく進路や就職活動においても多くの助言をしてくださり、様々な場面で助けていただきました千葉櫻拓教授、本当にありがとうございました。また、私の研究に対して厳しい指摘と素晴らしいご討論をご一緒にしてくださった吉川博文教授、朝井計教授、渡辺智准教授、本当にありがとうございました。

東京農業大学総合研究所の大学院博士後期課程研究支援制度から3年間にわたり、研究費の支援をしていただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

私の研究にご協力してくださった森菜摘、佐藤大輔、渡辺開智、二瓶拓人、中根祐樹、鈴木里奈、渡辺駿、渡部美香、諸氏には心から感謝申し上げます。

同期の方々には、私と共に日々、お互いの研究に対する激しい議論と楽しい酒盛りにお付き合いしていただきありがとうございました。これからも末永くお付き合いください。

生活面において多大なるご援助をしていただきました両親には、心から感謝申し上げます。また、多くのご心配をおかけしました。今後もしもご苦勞をおかけするかもしれませんが、精一杯頑張りたいと思います。