

## 細胞分裂期における二つの微小管形成機構の時空間的制御メカニズム

Spatio-temporal Regulation of Two Mechanisms of Microtubule Assembly in Mitosis

代表研究者 東北大学 杉本 亜砂子 Tohoku University Asako SUGIMOTO

Aurora A kinase is one of the key regulators of mitotic events including mitotic entry, centrosome maturation and spindle bipolarity. We previously found that *C. elegans* Aurora A (AIR-1) is responsible for the assembly of  $\gamma$ -tubulin-independent microtubules in early embryos; however, the mechanism by which AIR-1 contributes to microtubule assembly during mitosis has been unclear. Here we show by live imaging and RNAi-based modulation of gene activity that AIR-1 has a crucial role in the assembly of chromatin-stimulated microtubules that is independent of the  $\gamma$ -tubulin complex. Surprisingly, the kinase activity of AIR-1 is dispensable for this process. Although the kinase-inactive form of AIR-1 was detected along the microtubules as well as on centrosomes, the kinase-active form of AIR-1 was restricted to centrosomes. Thus we propose that AIR-1 has a kinase-dependent role at centrosomes and a kinase-independent role for stabilizing spindle microtubules and that coordination of these two roles is crucial for the assembly of mitotic spindles.

### はじめに

微小管は細胞周期にしたがってダイナミックな制御を受け、細胞分裂期になると特殊な微小管構造である紡錘体を形成する。分裂期における主要な微小管形成中心 (MTOC) は中心体であり、中心体から形成される微小管が増加することが紡錘体形成に大きな役割を果たす。一方、凝縮した染色体も微小管形成能を持つことがアフリカツメガエル卵

抽出液を用いた実験などから明らかになっており、特に、中心体の存在しない細胞（たとえば卵細胞の減数分裂）では染色体依存的な微小管形成が紡錘体構築に重要だと考えられている。このように紡錘体微小管には複数の「形成中心（あるいは形成場）」が存在することに加えて、機能的にも3種類の微小管サブグループ（染色体分離を行う「動原体微小管」、紡錘体のポジショニングに重要な「星状体微小管」、紡錘体の二極性を維持する「重複域微小管」）に分類される。すなわち、正常な機能を果たす紡錘体を形成するためには、1) 細胞内の複数の「場」における微小管形成能の制御、2) 異なる機能を果たす微小管サブグループの形成、3) 微小管サブグループの集合体としての紡錘体構築、という多面的な制御が併行して行われる必要がある。

これまで微小管形成の分子メカニズムについては主に*in vitro*系の実験で詳細な解析が進められてきたが、細胞内で紡錘体が構築される際に微小管形成がどのような時空間的制御を受けているかについては不明な点が多く残っている。その理由として、生きた細胞内で中心体や染色体の微小管形成能を操作しながら紡錘体形成過程を観察できる実験系が限られていたことが挙げられる。本研究では、申請者らが確立してきた線虫胚における高分解能ライブイメージング技術と遺伝子機能操作技術を活用し、紡錘体構築における微小管形成の時空間的制御の統合的な理解をめざす。

## 研究目的

これまでに申請者らは、線虫初期胚において、従来から知られていた $\gamma$ -チューブリン (TBG-1)依存的な微小管に加えて、新たに、Aurora Aキナーゼ(AIR-1)を必要とする $\gamma$ -チューブリン非依存的微小管が存在することを発見し (Motegi, et al., *Dev Cell*, 2006)、その解析をすすめてきた。(以下、 $\gamma$ -チューブリン依存的微小管を「TBG-1微小管」、Aurora A依存的(かつ $\gamma$ -チューブリン非依存的)微小管を「AIR-1微小管」と呼ぶ。)本研究では、われわれが見いだしたAIR-1微小管の形成機構を明らかにするとともに、TBG-1微小管とAIR-1微小管が協調して紡錘体を構築するための時間的・空間的制御機構を解明することをめざす。

## 研究結果と考察

### I. 紡錘体形成における TBG-1 微小管と AIR-1 微小管の寄与の時間的变化

ライブイメージングと RNAi による遺伝子機能破壊解析を組み合わせ、紡錘体形成

に TBG-1 微小管と AIR-1 微小管がどのように寄与しているかを解析した。線虫胚において *air-1* 遺伝子と *tbg-1* 遺伝子の発現を RNAi によって抑制し、紡錘体形成期における微小管の変化を観察した。その結果、*tbg-1(RNAi)*胚 (AIR-1 微小管のみが存在) では染色体凝縮に伴って微小管の数や長さが増加したのに対し、*air-(RNAi)*胚 (TBG-1 微小管のみが存在) の微小管は数や長さがほぼ一定であった。この結果は、TBG-1 と AIR-1 が異なる様式で紡錘体形成に関与していることを示唆している。

## II. AIR-1 は染色体依存的微小管形成に必須である

中心体が微小管形成の中心として機能することは良く知られているが、他の生物種では、凝縮した染色体も微小管形成を誘導することが示されている。上述の実験から AIR-1 微小管が染色体凝縮期に数や長さの増加を示したことから、AIR-1 が染色体依存的微小管形成に寄与しているのではないかと推測した。この可能性を検証するために以下の実験を行った。

線虫野生型胚においては、中心体が主要な微小管形成中心であるため、染色体依存的微小管を可視化することが困難である。そこで、中心体成熟に必要な *spd-5* 遺伝子を RNAi によって機能阻害することにより中心体依存的微小管形成を阻害し、染色体依存的微小管のみを観察できる条件を構築した。この条件下でさらに *tbg-1* を抑制しても染色体依存的微小管が形成されたのに対して、*air-1* を抑制した胚では微小管の数が減少し、長さも短くなっていることがわかった。また、AIR-1 は凝縮した染色体周辺に局在するが、TBG-1 は染色体周辺には観察されなかった。以上の結果から、染色体依存的微小管形成 (あるいは安定化) には AIR-1 は必須だが TBG-1 は必要ないことが明らかとなった。

## III. AIR-1 はキナーゼ活性非依存的に微小管形成に寄与する

AIR-1/Aurora A は自己リン酸化されることによって、リン酸化酵素 (キナーゼ) 活性を獲得することが知られている。そこで、リン酸化された活性型 AIR-1 のみを認識する抗体を作成し、AIR-1 の局在をさらに詳しく調べた。その結果、興味深いことに、リン酸化 AIR-1 (すなわち活性型 AIR-1) は中心体の中心部のみで局在し、凝縮した染色体付近には局在しないことが明らかになった。このことは、AIR-1 の染色体依存的微小管形成能はキナーゼ活性によるものではない可能性を示唆している。この可能性を検証す

るために、キナーゼ活性を欠損した AIR-1 を線虫胚で発現させてその影響を調べたところ、染色体依存的微小管の形成には AIR-1 のキナーゼ活性は不要であることが明らかになった。また、AIR-1 の微小管上への局在にも影響は見られなかった。一方、AIR-1 の機能の1つとして以前から知られていた中心体成熟(中心体周辺物質の中心体へのリクルート)には、キナーゼ活性は必須であった。これらの結果から、活性型 AIR-1 は中心体成熟に、不活性型 AIR-1 は微小管形成(あるいは安定化)に寄与していることが示された。これら2つの状態の AIR-1 タンパク質はいずれも紡錘体形成に必要であり、そのバランスが紡錘体の形成とその挙動に重要であると推測される。

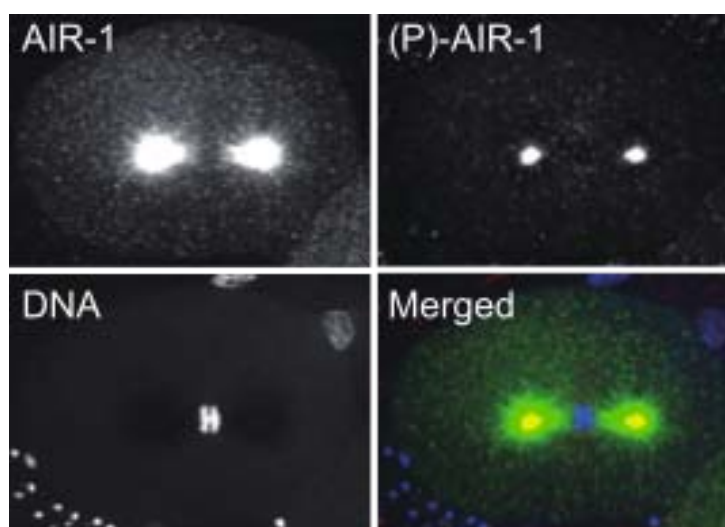


Figure 1. Localization of activated AIR-1 kinase in one-cell *C. elegans* embryos. (Top left) AIR-1 protein is localized to centrosomes and proximal microtubules. (Top right) phosphorylated AIR-1 (=kinase-active AIR-1) is localized to the center of centrosomes. (Bottom, left) DNA. (Bottom right) merged image.

## まとめ

本研究により、AIR-1/Aurora A タンパク質はキナーゼ活性非依存的に微小管形成に寄与していることが明らかとなった。その作用機序は現時点では不明だが、活性型 AIR-1 と不活性型 AIR-1 はそれぞれ異なるタンパク質と相互作用することによって異なる局在や機能を示すことが推測される。今後、それぞれの型の AIR-1 に結合するタンパク質を同定することなどによって、AIR-1 が多彩な機能を果たすメカニズムの解明を行なっていく予定である。Aurora A は多くの癌細胞で過剰発現されていることが知られている

が、癌との関連については不明な点が多く残されている。本研究で明らかになった AIR-1/Aurora A の新規機能および作用機構が哺乳動物細胞においても保存されているか否かも今後調べていきたいと考えている。

これまで、キナーゼをはじめとする酵素タンパク質の機能は酵素活性を介していることが前提として考えられてきたが、非活性型酵素が担っている機能についても今後着目していく必要があると思われる。

## 研究発表

### 口頭発表

Mika Toya, Masahiro Terasawa, Asako Sugimoto: A kinase-independent role of Aurora A in the assembly of mitotic spindle microtubules, (Oral presentation), 18th International *C. elegans* Meeting, June 2011, Los Angeles, U.S.A.

Mika Toya, Masahiro Terasawa, Asako Sugimoto: A Kinase-independent Role of Aurora A in the Assembly of Mitotic Spindle Microtubules in *C. elegans* Embryos (Poster presentation), Exploring the Logic of the Cell Cycle, September 2011, Montpellier, France

Mika Toya, Masahiro Terasawa, Asako Sugimoto:, A Kinase-independent Role of Aurora A in the Assembly of Mitotic Spindle Microtubules in *C. elegans* Embryos (Poster presentation), Centrosomes & Spindle Pole Bodies, October 2011, Barcelona, Spain

杉本亜砂子 : Centrosomal and non-centrosomal microtubule assembly in *C. elegans* mitosis (シンポジウム) 日本分子生物学会第 34 回年会、2011 年 12 月、横浜

### 誌上発表

Toya, M., Terasawa, M., Nagata, K., Iida, Y., and Sugimoto, A. (2011) A kinase-independent role for Aurora A in the assembly of mitotic spindle microtubules in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat Cell Biol* **13**, 710-716.