

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570209

研究課題名（和文） 線虫初期胚の紡錘体形成に関わる2つの微小管制御経路の解析

研究課題名（英文） Analysis for the two distinct pathways to form mitotic spindles in *C. elegans* embryos

研究代表者

戸谷 美夏 (TOYA MIKA)

独立行政法人理化学研究所・高次構造形成研究グループ・研究員

研究者番号：80455360

研究成果の概要（和文）：

微小管の形成起点として働く分子として、 γ チューブリンが広く知られているが、線虫初期胚の紡錘体形成時には、 γ チューブリン(TBG-1)に依存しない、オーロラキナーゼ A (AIR-1) が担う微小管形成経路が存在する。本研究において、AIR-1 は、そのキナーゼ活性が分裂期に重要な役割を果たすことに加えて、キナーゼ不活性型としても、紡錘体形成時に重要な役割を果たしている可能性を示した。機能的な紡錘体の形成には、中心体における γ チューブリン複合体と AIR-1 キナーゼ活性、微小管上で働くキナーゼ不活性型 AIR-1 とが協調して働く必要があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The evolutionarily conserved γ -tubulin is the main microtubule nucleator. *C. elegans* embryos have another, γ -tubulin-independent, microtubule assembly mechanism that requires Aurora A kinase (AIR-1). This study showed that AIR-1 stabilizes the spindle microtubules in a kinase-independent manner in addition to its kinase-dependent role at centrosomes. The kinase-independent AIR-1 was crucial in the assembly of chromatin-stimulated microtubules while γ -tubulin complex was dispensable for the process. The results obtained suggested that the roles of a γ -tubulin complex, a kinase-dependent AIR-1, and a kinase-independent AIR-1 necessary to be coordinated to assemble functional mitotic spindles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：紡錘体形成、微小管制御、オーロラキナーゼ A、 γ チューブリン、線虫初期胚、ライブイメーシング、RNAi

1. 研究開始当初の背景

微小管は、細胞内で細胞周期にしたがって整然と再編成され、分裂期には、紡錘体を形成して、染色体の分配到重要な役割を果たしている。紡錘体形成時の微小管制御に関わる因子や、その分子機構については、主に、*in vitro* の実験や培養細胞を用いた解析により研究が進められている。しかしながら、生きた個体内での紡錘体形成時の微小管制御の分子機構や、紡錘体形成の時間的空間的制御については、未だ多くのことが明らかにされていない。生きた個体内で、紡錘体形成時の微小管制御機構について調べる実験を行うのに最適なモデル生物として、線虫 *C. elegans* が挙げられる。*C. elegans* は、発生を通じて卵殻および細胞が透明であり、生きた個体内で、個々の細胞や蛍光標識したタンパク質の挙動を観察することが容易である。また、全ゲノム配列情報の利用が可能であり、遺伝子導入による遺伝子操作や RNAi による個体レベルでの遺伝子機能破壊を比較的簡便に行うことができる。

線虫初期胚には、紡錘体形成に関わる2つの微小管制御経路が存在する (Motegi et al., 2006 Dev Cell 10, 509-502)。 γ チューブリンは、一般に、微小管の形成起点となることが知られているが、線虫初期胚の細胞分裂では、 γ チューブリン (TBG-1) とは別に、オーロラキナーゼ A (AIR-1) が関与する微小管形成機構が存在し、機能的な紡錘体を形成するためには、それら2つの独立した微小管形成経路が必要であることが示されている。しかしながら、TBG-1 依存的微小管・AIR-1 依存的微小管の形成機序の違いや、AIR-1 が関わる紡錘体微小管制御の分子機構については、明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、時間的・空間的分解能の高い細胞生物学的アプローチが可能となる線虫初期胚を用い、紡錘体形成における微小管の制御機構の理解を深めることを目指した。具体的には、線虫初期胚における TBG-1・AIR-1 の2つの微小管経路の差異を明らかにするとともに、AIR-1 が関わる紡錘体微小管制御の分子機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ライブイメージングによる微小管形成機序の解析: TBG-1 と AIR-1 の機能を RNAi によって同時に破壊すると、微小管の形成が完全に抑制されるが、TBG-1, AIR-1 それぞれの機能を単独で破壊した場合には、どちらの

破壊株でも、野生型では観察されない単極の紡錘体が形成されることがわかっている。このように、TBG-1, AIR-1 それぞれの制御によって形成される微小管は、その動態が異なるにもかかわらず、固定しようの免疫染色像からは同様の表現型として観察される。このため、TBG-1, AIR-1 それぞれの破壊株が形成する微小管について、高速・高分解能ライブイメージングと RNAi を応用した詳細な解析をおこなうことで、TBG-1 と AIR-1 による微小管制御の差異を明らかにした。

申請者がすでに作製を行っていた、線虫初期胚で効果的な多色蛍光ライブイメージングを可能とするためのベクターシステムを用いて、初期胚における微小管・中心体・染色体の動態を同時に観察できる、蛍光融合タンパク質マーカーを発現する線虫株を作製した。標識するマーカー因子として、 β チューブリン (微小管構成因子)・ γ チューブリン (中心体構成因子)・ヒストン (染色体構成因子) を用い、 β チューブリン:mCherry, γ チューブリン:mCherry, ヒストン:mCherry の多重標識株を作製した。

作製した蛍光融合タンパク質マーカー株を用いて、TBG-1, AIR-1 の RNAi を行い、ライブイメージングで表現型の解析を行った。

(2) 抗リン酸化 AIR-1 抗体を用いた解析: *in vitro* の系で明らかにされたオーロラキナーゼ A の活性化部位を認識する抗リン酸化ペプチド抗体を参考に (Ohashi et al., 2006 Oncogene 25, 7691-7702)、AIR-1 において、相当するリン酸化部位を認識する、抗リン酸化 AIR-1 抗体を作製した。キナーゼ活性化 AIR-1 の検出に用いた。

(3) 変異遺伝子導入株の作製と RNAi を組み合わせた分子機能の解析: 線虫初期胚で、変異タンパク質の機能が解析できる実験系 (Ozlu et al., 2005 Dev Cell 9, 237-248) を導入し、AIR-1 のキナーゼ活性が紡錘体微小管形成に与える影響を調べた。この系においては、目的タンパク質の特定のアミノ酸に変異を導入する際に、タンパク質のそれ以外の領域の使用コドンと同時に変更することで、ゲノム上の野生型遺伝子に対する RNAi では認識されない、RNAi 耐性遺伝子を作製する。この変異型かつ RNAi 耐性型 AIR-1 遺伝子を発現する線虫株を作製し、RNAi で野生型 AIR-1 の機能のみを破壊すれば、変異 AIR-1 が微小管形成に与える影響を調べることが可能となる。*in vitro* の系で明らかにされたオーロラキナーゼ A の活性化部位 (Ohashi et al., 2006 Oncogene 25, 7691-7702) に相当する変異を AIR-1 に導入して、キナーゼ不活

性型 AIR-1 発現株 : GFP-AIR-1^RT201A および GFP-AIR-1^K73R を作製した。

4. 研究成果

本研究から、以下のことが明らかになった。

(1) AIR-1 は、TBG-1 とは独立に、中心体に依存しない微小管形成に関わる。

ライブイメージングと、RNAi (*spd-5(RNAi)*): 中心体をもつ微小管形成能を破壊するように働く) を組み合わせた解析から、分裂期染色体の周辺から起こる微小管形成には、AIR-1 が必須であり、TBG-1 は必要ではないことがわかった。この時、AIR-1 は凝集した染色体に一過的に局在する様子が観察された。

(2) キナーゼ不活性型 AIR-1 が、微小管上に局在し、中心体に依存しない微小管形成に寄与している。

作製した抗リン酸化 AIR-1 抗体は、中心体のみ局在し、中心体に加えて AIR-1 が局在することが知られている微小管上にはシグナルがみられなかった。さらに、AIR-1 タンパク質としてキナーゼ不活性型 AIR-1 のみを発現する線虫株では、TBG-1 とは独立に、中心体に依存しない微小管が形成され、この時、不活性型 AIR-1 は微小管に局在するという結果を得た。これらの結果から、AIR-1 は、リン酸化活性をもつ活性型として中心体で機能することに加えて、リン酸化活性をもたない不活性型 AIR-1 として微小管上に局在し、TBG-1 とは独立に、中心体に依存しない微小管形成に関与する可能性が示唆された。

(3) AIR-1 とともに微小管制御に関わる TPXL-1 は、キナーゼ不活性型 AIR-1 の微小管上への局在に必要である。

オーロラキナーゼ A のキナーゼ活性化因子であり、中心体に依存しない分裂期染色体近傍からの微小管形成に必須な因子として、TPX2 が種を超えて広く同定されている。TPX2 の線虫ホモログである TPXL-1 は、*in vitro* で AIR-1 を活性化することが知られている (Ozlu et al., 2005 Dev Cell 9, 237-248)。しかしながら、*tpxl-1(RNAi)* の胚で中心体に局在することが知られていた AIR-1 は、抗リン酸化 AIR-1 抗体により認識されたことから、*in vivo* では、TPXL-1 は、AIR-1 を活性化する働きをもたないことが示唆された。この時、AIR-1 の微小管上への局在が見られなくなったことから、TPXL-1 は、キナーゼ不活性型 AIR-1 を微小管上に局在させる働きをもつと考えられる。

本研究から、AIR-1 は、そのキナーゼ活性が分裂期に重要な役割を果たすことに加え

て、キナーゼ不活性型としても、紡錘体形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。キナーゼ活性型 AIR-1 は、中心体に局在して紡錘体の二極性を保つ。キナーゼ不活性型 AIR-1 は、凝集した染色体と、TPXL-1 を介した微小管上への局在により、染色体近傍での微小管形成、および、微小管の安定化に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Toya, M., Terasawa, M., Nagata, K., Iida, Y. and Sugimoto, A. A kinase-independent role for Aurora A in the assembly of mitotic spindle microtubules in *Caenorhabditis elegans* embryos. **Nat. Cell Biol.** 13, 708-715 (2011), 査読有
- ② Terasawa, M., Toya, M., Motegi, F., Mana, M., Nakamura, K. and Sugimoto, A. *Caenorhabditis elegans* ortholog of the p24/p22 subunit, DNC-3, is essential for the formation of the dynactin complex by bridging DNC-1/p150(Glued) and DNC-2/dynamitin. **Genes Cells**, 15, 1145-1157(2010), 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 戸谷美夏、杉本亜砂子 Contribution of the kinase-inactive-form of Aurora A kinase to the assembly of mitotic spindles in *C. elegans* embryos 第 33 回日本分子生物学会年会 2010/12/10. 神戸
- ② Toya, M., Sugimoto, A. Coordination of two microtubule assembly mechanisms in the formation of mitotic spindles in *C. elegans* embryos. 4th East Asia *C. elegans* Meeting 2010/7/13. Tokyo
- ③ Toya, M., Sugimoto, A. Coordination of two microtubule assembly mechanisms in the formation of mitotic spindles in *C. elegans* embryos. EMBO conference Series Microtubules. 2010/6/4. Heidelberg, Germany
- ④ 戸谷美夏、杉本亜砂子 Coordination of two microtubule assembly mechanisms in the formation of mitotic spindles in *C. elegans* embryos 第 62 回日本細胞生物学会大会 2010/5/19. 大阪

- ⑤ 戸谷美夏、杉本亜砂子 Coordination of two distinct pathways to form mitotic spindle microtubules in *C. elegans* embryos. 第32回日本分子生物学会年会 2009/12/10. 横浜
- ⑥ 戸谷美夏、杉本亜砂子 紡錘体形成に関わる2つの微小管経路 第61回日本細胞生物学会大会 2009/6/4. 名古屋

[図書] (計 2 件)

- ① Toya, M., Iida, Y. and Sugimoto, A. Academic Press Methods in Cell Biology, Microtubules *in vivo*: Chapter 19, Imaging of mitotic spindle dynamics in *Caenorhabditis elegans* embryos. 2010, 359-372.
- ② Sato, M., Toya, M. and Toda. T. Humana Press (Springer) Methods in Molecular Biology 545 Mitosis: Visualization of fluorescence-Tagged proteins in fission yeast: The analysis mitotic spindle dynamics using GFP-tubulin under the native promoter. 2009, 185-204.

[その他]

http://www.cdb.riken.jp/jp/04_news/articles/11/110710_aurora.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸谷 美夏 (TOYA MIKA)

独立行政法人理化学研究所・高次構造形成研究グループ・研究員

研究者番号：80455360

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし