

## ヘテロクロマチンタンパク質によるAurora Bキナーゼ複合体の局在と活性化のメカニズム

Aurora Bキナーゼは、細胞周期の分裂期に活性化し、INCENP (Inner Centromere Protein), Survivin, Borealin/Dasraなどのタンパク質とクロモソームパッセンジャー複合体 (Chromosome Passenger Complex; CPC) を形成する<sup>1)</sup>。CPCは、その名前が示すように、分裂期をとおしてダイナミックに局在が変遷するという性質を持ち、分裂期の前期には染色体腕部全体に分布し、前中期から中期にかけてインナーセントロメア、後期にスピンドルミッドゾーン、終期にミッドボディに局在する。この局在の変遷に伴うAurora Bキナーゼの活性は、染色体の成熟、動原体と微小管との正確な結合、さらに細胞質分裂といった、分裂期の様々なイベントとその制御に極めて重要な役割を果たす<sup>1)</sup>。これまでに、Aurora Bキナーゼの活性化には、INCENPとの結合状態による構造変化やAurora Bキナーゼの局所濃度が関与することが示されてきた<sup>2,3)</sup>。しかしながら、Aurora BキナーゼがCPCとして分裂期の進行とともに局在を変えながら、その時々、所々でキナーゼとしての活性化の制御が如何に行われているのかについて、分子的な視点でのメカニズムの理解は未だに乏しい。

われわれは、ヒト細胞のHP1 (Heterochromatin Protein 1) の機能解析をとおしてヘテロクロマチンが如何に染色体機能に関与しているのかについて研究を行っている。その過程で、プロテオミクス解析により見いだしたHP1の新規結合タンパク質POGZ (Pogo transposable element-derived protein with zinc finger domain) が、分裂期前期の染色体腕部におけるAurora Bキナーゼの活性と局在を制御していることが明らかとなった<sup>4)</sup>。

POGZは、155 kDaの比較的大きなタンパク質であり、ジンクフィンガークラスターとセントロメアタンパク質CENP-B (Centromere Protein B) と似たDNA結合ドメインおよびDDEドメインから成り、細胞周期を通してヘテロクロマチンに局在し、分裂期においても染色体腕部に局在する (図1<sup>4)</sup>)。POGZは直接HP1と結合するが、特筆すべきは、POGZとHP1との結合様式が特異であることであつた。HP1は2量体化によって形成される疎水面を介して、PxVxL (P=プロリン, V=バリン, L=ロイシン, x=任意のアミノ酸) 配列モチーフ (PxVxLモチーフ) を

持つ様々なタンパク質と結合することが知られている<sup>5)</sup>。われわれのプロテオミクス解析により82種類のHP1結合タンパク質のうち79種類は、自身が持つPxVxLモチーフにより直接的にHP1と結合するか、PxVxLタンパク質に結合することにより間接的にHP1と結合していることがわかつた<sup>4)</sup>。一方、POGZは他のHP1結合タンパク質とは異なり、機能的なPxVxLモチーフを持たず、ジンクフィンガーとよく似たHPZ (HP1-binding zinc-finger-like motif) を介してHP1と結合していることが判明した (図1<sup>4)</sup>)。

RNA干渉法を用いてPOGZをノックダウンすると、スピンドルチェックポイント機構が働かず、時期尚早な分裂期後期への進行が観察され、さらに前中期に、通常セントロメア付近に局在するINCENP, Aurora BキナーゼなどのCPC構成因子が、染色体腕部全体に広がって局在した (図2A, B<sup>4)</sup>)。また、POGZのノックダウンによるHP1の局在への影響について調べてみた。通常、HP1は、間期ではメチル化されたヒストンH3の9番目のリジン (H3K9) を認識してクロマチンに局在し、分裂期に入るとH3K9の隣の10番目のセリン (H3S10) がAurora Bキナーゼによりリン酸化されることにより、ほとんどのHP1は染色体から解離することが知られている<sup>6,7)</sup>。POGZをノックダウンすると、間期のHP1の局在には影響は及ぼさないが、興味深いことに、分裂期でのHP1の染色体からの解離が見られず、染色体腕部全体に留まることがわかつた<sup>4)</sup>。これらのことから、POGZのノックダウンによりAurora Bキナーゼの活性化が起こっていないことが推測された。実際に、POGZをノックダウンした細胞では、Aurora Bキナーゼの基質である分裂期染色体上でのH3S10, H3S28のリン酸化、さらには、Aurora Bキナーゼ自身の活性化状態を示す自己リン酸化も見られず、Aurora Bキナーゼの活性が顕著に低下していることがわかつた<sup>4)</sup>。これらのPOGZをノックダウンしたときの様々な表現型は、HPZを含む60アミノ酸のペプチドを発現させるだけで相補できたことから、分裂期前期にPOGZがHPZを介してHP1と相互作用することがAurora Bキナーゼの活性化と局在制御に必須であることがわかつた<sup>4)</sup>。また、HPZの性質を詳細に調べたところ、HPZはPxVxLタンパク質と競合的にHP1と結合し、PxVxLタンパク質をHP1から解離させるとともに、HP1とクロマチンとの結合を不安定化することを見いだした<sup>4)</sup>。間期において、HP1は秒単位でクロマチンとの結合と解離を繰り返していることが報告されているが<sup>8)</sup>、これはPOGZが持つHPZと他のHP1結合タンパク質が持つPxVxL配列との競合的なHP1への結合と解離

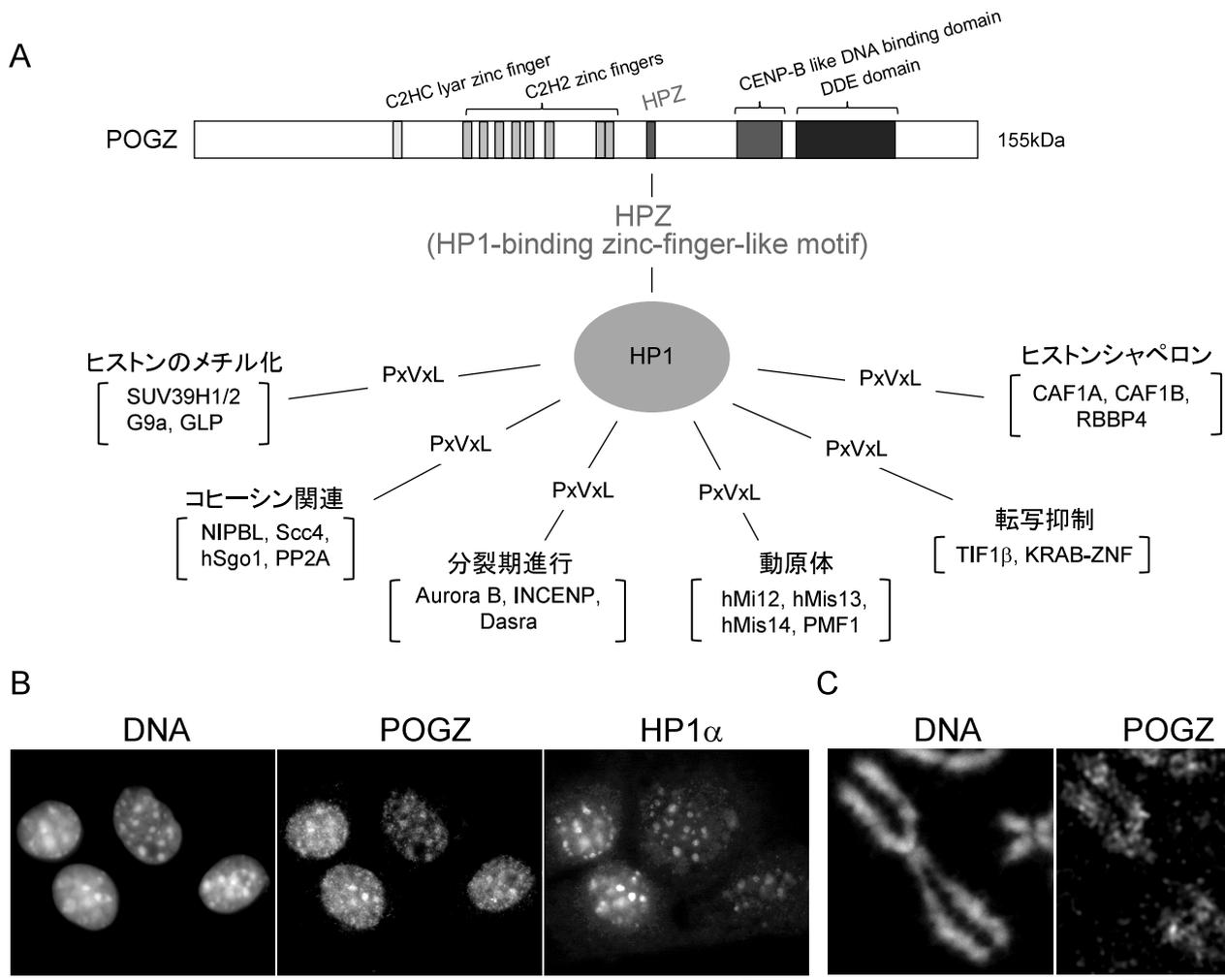


図1 POGZの性質

A. プロテオミクスにより同定されたHP1結合タンパク質POGZはジンクフィンゲークラスタ、HPZドメイン、CENP-B様DNA結合ドメイン、DDEドメインからなる155 kDaのタンパク質である。POGZはジンクフィンゲールによく似たHPZ (HP1-binding zinc-finger-like motif) (HP1 binding zinc finger like motif) を介してHP1と結合する。一方、HP1結合タンパク質は、自身が持つPxVxLモチーフを介してHP1と結合する。

B. POGZの局在

マウス Swiss 3T3細胞について、DNAをHoechst (左図)、POGZを特異的なPOGZ抗体 (中図)、HP1αを特異的なHP1α抗体 (右図) で染色した。POGZは核全体に存在するが、特に、DNAとHP1αが濃く染まるヘテロクロマチン領域に局在した。スケールバーは10 μm。

C. 分裂期染色体でのPOGZの局在

ヒトHeLa細胞の分裂期染色体。DNAをHoechst、POGZを特異的なPOGZ抗体で染色した。スケールバーは10 μm。

が一因かもしれない。それでは、分裂期前期には、どのようにしてPOGZはAurora Bキナーゼの局在と活性化に働きかけているのだろうか。Aurora Bキナーゼは直接HP1には結合しないが、同じCPCの構成因子であるINCENPがPxVxLモチーフによりHP1と直接結合する<sup>4)</sup>。したがって、分裂期前期において、Aurora BキナーゼはCPC

の構成因子として間接的にHP1と結合し染色体腕部に局在していると考えられる。したがって、POGZはHPZモチーフを介してINCENPと競合的にHP1と結合することによりCPCの染色体腕部からの解離を促すものと考えられる。しかしながら、他のHP1結合タンパク質とは異なり、ひとたびCPCがHP1から解離すると、CPCに構造的

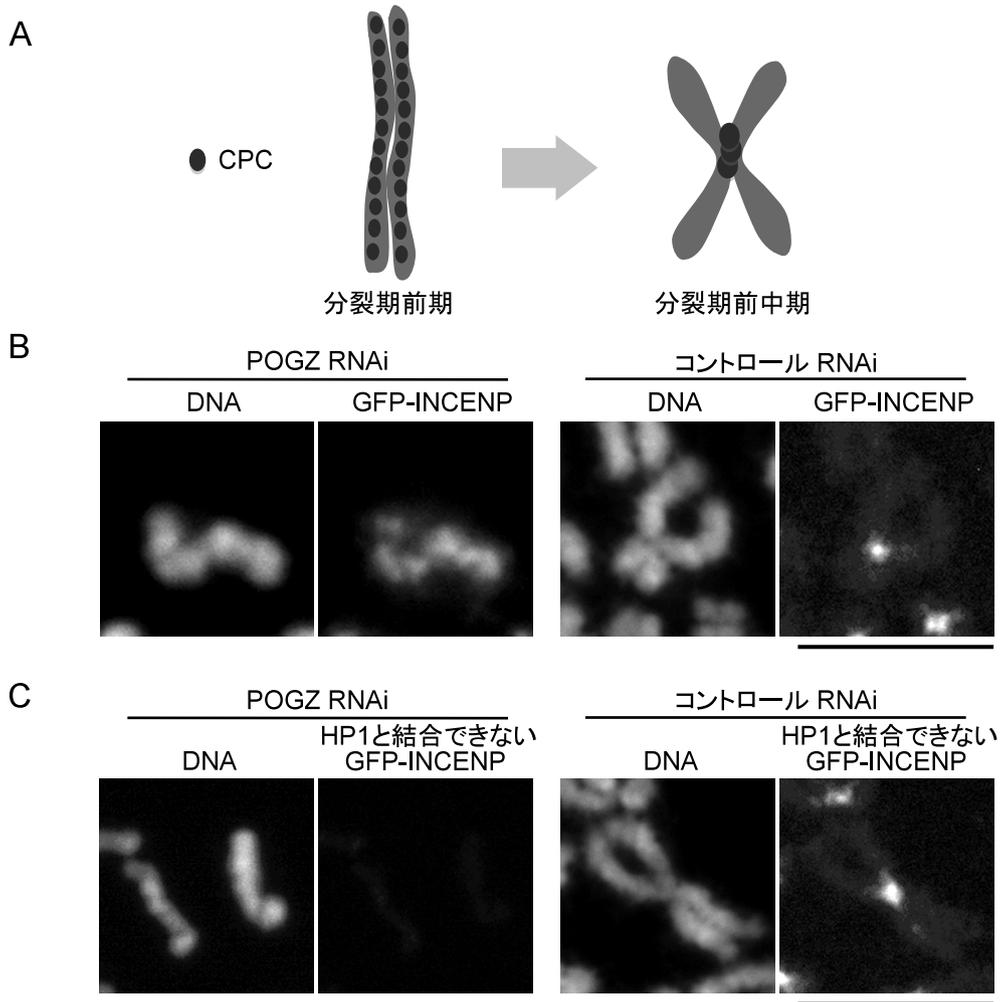


図2 POGZの阻害によるCPCの異常

A. 分裂期の前期から前中期にかけてのCPCの局在の模式図

B. GFP-INCENPを安定に発現するHeLa細胞に対して、RNA干渉法を用いてPOGZをノックダウンし、GFP-INCENPの分裂期染色体上での局在を観察した(左図)。GFP-INCENPは染色体腕部全体に広がって観察され、分裂期前期様の局在を示した。また姉妹染色分体間接着が脆弱になっていた。コントロールRNAiでは(右図)、GFP-INCENPは分裂期前中期染色体上でインナーセントロメアに局在した。スケールバーは10 μm。

C. PxVxLモチーフに変異を導入し、HP1と結合できないGFP-INCENPを安定に発現するHeLa細胞に対して、RNA干渉法を用いてPOGZをノックダウンし、HP1と結合できないGFP-INCENPの分裂期染色体上での局在を観察した。POGZ RNAiでは(左図)、HP1と結合できないGFP-INCENPは染色体上に観察されなかった。コントロールRNAiでは(右図)、HP1と結合できないGFP-INCENPは分裂前中期染色体上でインナーセントロメアに局在した。CPCはHP1依存的に染色体腕部に局在し、インナーセントロメア局在はHP1に依存しないことが示された。スケールバーは10 μm。

な変化が生じ、Aurora Bキナーゼの活性化が起こり<sup>2)</sup>、HP1がH3K9から解離することによりオープンになったH3S10をリン酸化するものと考えられる(図3)。H3S10がリン酸化されると、HP1は再びクロマチンに結合すること

ができないので、HP1、CPCともに染色体腕部から遊離すると考えられる。

このように、POGZのHPZを介したHP1へのCPCとの競合的な結合が、分裂期前期のAurora Bキナーゼの活性

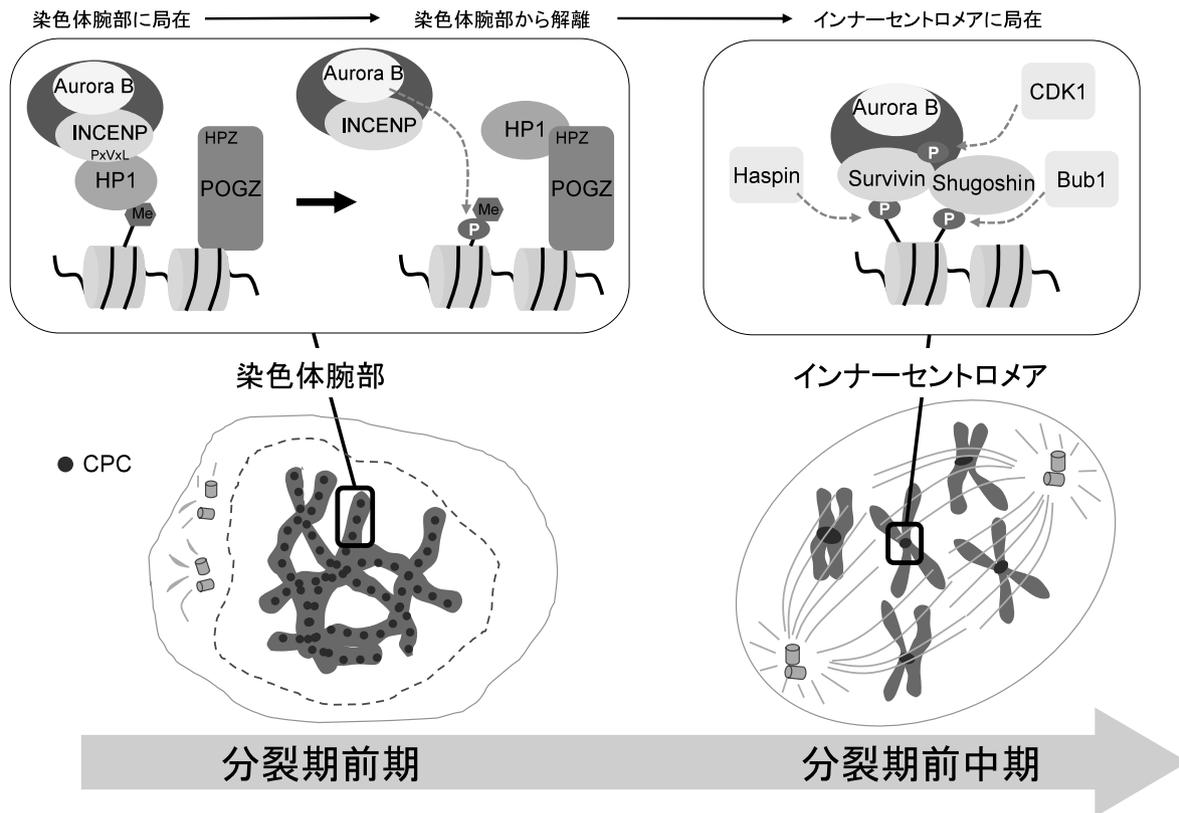


図3 分裂期前期, 前中期における Aurora B キナーゼの活性化と局在メカニズムのモデル

分裂期前期において, Aurora B キナーゼは CPC として間接的に HP1 と結合し, 染色体腕部に局在する. POGZ の HPZ を介した HP1 との結合により, CPC は HP1 から解離し, Aurora B キナーゼが活性化する (左図). 分裂前中期において, Shugoshin と CPC 構成因子である Survivin によって CPC はインナーセントロメアに局在する (右図). 詳しくは本文参照のこと.

化と CPC の腕部からの解離というダイナミックな局在変化の引き金となっていることが想定された. したがって, HP1 は, さまざまな因子をクロマチン上にリクルートして機能する場を提供する存在と考えられてきたが, それだけではなく, POGZ などの因子とともに働くことにより, HP1 結合因子の活性や局在を制御し得るといふ, より能動的な機能を有することが明らかとなった<sup>4)</sup>.

Aurora B キナーゼを含む CPC は, 分裂期前期に POGZ が HP1 に結合することにより染色体腕部から解離した後, 前中期になるとインナーセントロメアへと局在するようになる<sup>1)</sup>. われわれの解析では, PxVxL モチーフに変異を導入した HP1 と結合できない INCENP は, 染色体腕部に局在することはできないが, インナーセントロメアに局在することができた (図 2, C<sup>4)</sup>, 野澤・小布施, 未発表). このことは, CPC の HP1 との結合能は染色体腕部への局在には必要であるがインナーセントロメアへの局在には必要

ないことを示すとともに, CPC は必ずしも染色体腕部への局在を経なくてもインナーセントロメアに局在していることを示している. POGZ を阻害すると PxVxL モチーフに変異を導入した INCENP はインナーセントロメアにすら局在できなくなることから, インナーセントロメアへの局在の前提条件として染色体腕部における Aurora B キナーゼの活性化のステップが必要であることが示唆された (図 2, C<sup>4)</sup>, 野澤・小布施, 未発表). これらのことから, CPC の複雑な局在変化を行うために, Aurora B キナーゼ自身の活性化による分裂期染色体の環境変化が大きく関わっていることが想像される.

それでは, 分裂期前中期のインナーセントロメアへの CPC の局在にはどのような分子が関与しているのだろうか? このことに関して, ごく最近, いくつかのグループから相次いで報告があり, 大きく分けると二つの経路が存在することが明らかとなってきた. 一つの経路はセント

ロメアにおいて姉妹染色体分体の接着を保護する機能を持つことが知られている Shugoshin タンパク質が、分裂期前中期のインナーセントロメアにおける CPC の足場として働くというものである<sup>9,10</sup>。すなわち、Shugoshin は動原体に局在する Bub1 キナーゼによるヒストン H2A の 121 番目のセリン (H2S121) のリン酸化を認識してセントロメアのクロマチンに局在し<sup>9</sup>、その Shugoshin に Cdk1 キナーゼによりリン酸化された CPC が結合するというものである<sup>10</sup>。もう一つの経路は、姉妹染色体分体の接着を直接行っているコヒーシン複合体そのものが CPC の局在を規定しているというものである。コヒーシンはインナーセントロメアに濃縮されていることが知られているが、コヒーシン複合体の構成因子として知られる Pds5 と Haspin キナーゼが相互作用し<sup>13</sup>、Haspin キナーゼはインナーセントロメア領域のヒストン H3 の 3 番目のスレオニン (H3T3) をリン酸化する。CPC の構成因子である Survivin がこのリン酸化された H3T3 を認識して直接結合するというものである<sup>11,12</sup>。これら二つの経路が存在することから、分裂期前中期の CPC インナーセントロメア局在に関しては、Bub1 キナーゼと Haspin キナーゼ、二つのキナーゼの活性が重なった領域に CPC が局在するというモデルが提唱されている (図 3<sup>13</sup>)。これらの分裂期前中期における CPC や Aurora B キナーゼ局在化機構が、正確な微小管との結合やコヒーシンによる姉妹染色体分体の接着に如何に関わっているのか興味深い。

Aurora B キナーゼは分裂期進行に必須な役割をしているのみならず、多くのがん細胞において高発現が認められ、また、その高発現は予後の不良と関連していることから、抗がん剤としての分子標的として有望視されている<sup>14</sup>。我々が報告した分裂期前期の局在と活性化の機構と、最近報告された分裂期前中期の局在機構の発見は、分裂期進行制御の理解のみならず、創薬の分子標的としての理解を促し、その有効性、選択性の向上に寄与することで

あろう。

- 1) Ruchaud, S., Carmena, M., & Earnshaw, W.C. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 798–812.
- 2) Sessa, F., Mapelli, M., Ciferri, C., Tarricone, C., Areces, L.B., Schneider, T.R., Stukenberg, P.T., & Musacchio, A. (2005) *Mol. Cell*, **18**, 379–391.
- 3) Kelly, A.E., Sampath, S.C., Maniar, T.A., Woo, E.M., Chait, B.T., & Funabiki, H. (2007) *Dev. Cell*, **12**, 31–43.
- 4) Nozawa, R.S., Nagao, K., Masuda, H.T., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., & Obuse, C. (2010) *Nat. Cell Biol.*, **12**, 719–727.
- 5) Smothers, J.F. & Henikoff, S. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 27–30.
- 6) Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., & Jenuwein, T. (2001) *Nature*, **410**, 116–120.
- 7) Hirota, T., Lipp, J.J., Toh, B.H., & Peters, J.M. (2005) *Nature*, **438**, 1176–1180.
- 8) Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B., & Misteli, T. (2003) *Science*, **299**, 721–725.
- 9) Kawashima, S.A., Yamagishi, Y., Honda, T., Ishiguro, K., & Watanabe, Y. (2010) *Science*, **327**, 172–177.
- 10) Tsukahara, T., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2010) *Nature*, **467**, 719–723.
- 11) Kelly, A.E., Ghenoiu, C., Xue, J.Z., Zierhut, C., Kimura, H., & Funabiki, H. (2010) *Science*, **330**, 235–239.
- 12) Wang, F., Dai, J., Daum, J.R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P.T., Gorbisky, G.J., & Higgins, J.M. (2010) *Science*, **330**, 231–235.
- 13) Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., & Watanabe, Y. (2010) *Science*, **330**, 239–243.
- 14) Taylor, S. & Peters, J.M. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 77–84.

野澤 竜介, 小布施 力史  
(北海道大学大学院先端生命科学研究院  
分子細胞生物学研究室)

Regulation of localization and activation of Aurora B kinase by heterochromatin proteins

Ryu-Suke Nozawa and Chikashi Obuse (Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Kita-21, Nishi-11, Sapporo 001-0021, Japan)