細胞分裂期において分裂期キナーゼが制御する染色体動態

栗原 大輔^{1,2}

¹ 名古屋大学大学院理学研究科 〒464-8602 愛知県名古屋市中千種区不老町

² JST ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト 〒464-8602 愛知県名古屋市中千種区不老町

要旨：細胞周期の中でも細胞分裂期はダイナミックな染色体動態を伴う過程であり、その動態の美しさは古くから研究者たちを魅了している。安定した遺伝情報の継承のために必須な染色体動態は、様々な分子が関わる精巧なメカニズムによって制御されている。染色体分配に失敗すると直接異数染色体につながり、遺伝情報のバランスに狂いが生じ、細胞死やガン化を引き起こすため、動物の研究では医薬の分野も含めて精力的に研究が行われているが、植物ではほとんど明らかになっていない。著者らはこれまで、シロイヌナズナ、タバコを用いて染色体動態を制御する分裂期キナーゼ、オーロラキナーゼの同定および機能解析を進めることによって、植物における染色体動態制御機構を明らかにすることを進めてきた。本稿では、近年次第に明らかになりつつある染色体動態の制御機構とともに、植物における染色体動態研究の現状と展望を解説する。

Mitotic kinases regulate chromosome dynamics during mitosis

Daisuke Kurihara^{1,2}

¹ Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan

² Higashiyama Live-Holonics Project, ERATO, JST, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602, Japan

Summary: During mitosis, chromosomes show dynamic movements. The orchestration of chromosome dynamics mediated by various molecules is required for stable transmission of genetic information. The failure of chromosome separation directly induces aneuploidy with imbalance of genetic information. Because aneuploidy, an abnormal number of chromosomes, and chromosome instability is found in most solid tumors, the mechanisms of chromosome dynamics are well studied in animals, specifically as therapeutic target. However, it remains to be unclear the mechanisms of chromosome dynamics with mitotic kinases in plants. The authors identified and analyzed Aurora kinases as mitotic kinases, which regulate chromosome dynamics during mitosis, in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. In this review, I summarize the recent finding of the regulatory mechanisms of chromosome dynamics in animals and in plants, and discuss future perspectives.

Key words: cell division, chromosome dynamics, mitotic kinase, histone phosphorylation

はじめに

細胞分裂は、1つの細胞から2つの娘細胞へと遺伝情報を均等に分配するという、生命の根幹をなす過程である。もし遺伝情報が正確に、あるいは均等に分配されないまま細胞分裂してしまうと、その娘細胞において遺伝情報のバランスに狂いが生じ、細胞死あるいはガン化につながるなど、生命維持に深刻な結果を招く。遺伝情報を正確かつ均等に分配するために、高等真核生物のゲノムDNAは、細胞分裂期に中期染色体という高度に凝縮した高次構造をとる。細胞分裂期はダイナミックな染色体運動を伴う過程であり、その異常は直接異数染色体や細胞死へと繋がるため、厳密に制御されなければならない。この制御に関わるタンパク質として、分裂期キナーゼが挙げられる。分裂期キナー

ゼによる染色体動態の制御について、動物においては詳細な分子メカニズムが明らかになりつつあるが、植物においてはほとんど未知のままである。本稿では、細胞分裂期における染色体動態について、動物における知見を紹介した後に、植物における現状について紹介したい。

細胞分裂期における染色体動態制御

細胞分裂期は、S期に複製された2組の姉妹染色体を、2つの娘細胞に正確に均等分配する過程である。細胞分裂期に入ると、まず前期において染色体の凝縮が始まる。そして核膜崩壊後、前中期において、染色体は動原体で微小管と結合する。この紡錘体微小管によって染色体は赤道面上へと移動し、中期におい

て、すべての染色体の赤道面上への整列が完了した後、後期において、姉妹染色分体が両極へ分配される。この過程において重要なことは、すべての染色体が適切に紡錘体微小管と結合し、そして赤道面上に整列することである。これを達成するための機構が監視機構であるM期チェックポイント、すなわちスピンドルチェックポイントである (Musacchio and Salmon 2007)。スピンドルチェックポイントが監視しているのは次の2点である。1つは、動原体と紡錘体微小管が相互作用しているか。もう1点は、両極から紡錘体微小管によって動原体が引っ張られることによる張力が発生しているかである。前中期において、染色体はまず片方の動原体が片方の極の紡錘体微小管によって捕らえられる。この状態を“モノテリック結合”といい、一方向性結合であるという (図1A)。そしてもう片方の動原体が、反対の極の紡錘体微小管に捕らえられ、二方向性結合となることによって、染色体は赤道面上へと移動する (図1A)。しかしながら、動原体と紡錘体微小管との結合はランダムに起きており、必ずしも二方向性結合とならず、しばしば異常な動原体-微小管結合を生じる。異常な動原体-微小管結合には、両方の動原体が片方の極の紡錘体微小管と結合する“シンテリック結合”と、片方の動原体に両極の紡錘体微小管と結合する“メロテリック結合”の2種類が存在する (図1B)。この異常な動原体-微小管結合は一方向性結合であるため、動原体と紡錘体微小管との相互作用を監視するチェックポイントは解除するが、張力を監視するチェックポイントは解除できない。このような、張力を監視するチェックポイントに関わるタンパク質として、動物においてAurora Bキナーゼが挙げられる (Carmena et al. 2009)。Aurora Bキナーゼは姉妹染色分体間のセントロメア周辺領域 (インナーセントロメア) に局在し、動原体に局在するタンパク質をリン酸化することによって、動原体-微小管結合を不安定化させている。しかしながら、二方向性結合となり動原体間で張力が発生すると、動原体局在タンパク質とAurora Bキナーゼとの物理的距離が離れることによって、動原体-微小管結合が安定化され、チェックポイントが解除される (図1C)。近年、このチェックポイントは動原体が伸展することによって解除されるともある (Uchida et al. 2009)。

図1 分裂前中期・中期における動原体-微小管結合様式と染色体動態

(A) 分裂前中期・中期における染色体整列。モノテリック結合では極方向に染色体は移動するが、二方向性結合になると赤道面へ移動する。(B) 染色体整列における異常な動原体-微小管結合。シンテリック結合では極方向に染色体は移動し、メロテリック結合では移動しない。(C) Aurora Bキナーゼによる異常な動原体-微小管結合の校正。一方向性結合では動原体間に張力が働いていないため、Aurora Bキナーゼが動原体局在タンパク質をリン酸化し、動原体-微小管結合を解除するが、二方向性結合となり動原体間に張力がかけると、動原体間の距離が離れ、Aurora Bキナーゼが動原体局在タンパク質をリン酸化できなくなり、動原体-微小管結合が安定化する。

植物におけるオーロラキナーゼ

このようにオーロラキナーゼは染色体動態に重要な役割を担っているが、植物ではどのようになっているの

であろうか。著者らはこれまで植物におけるオーロラキナーゼを同定し、その分裂期の染色体動態における機能について解析してきたので紹介したい。

オーロラキナーゼは、酵母からヒトまで高度に保存されたセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞分裂期開始から細胞質分裂までの様々な過程において重要な役割を担っている分裂期キナーゼである。動物のオーロラキナーゼは、中心体や紡錘体極の制御、微小管の安定性に関与するAurora A、染色体の凝縮、分離、動原体-微小管結合、細胞質分裂を制御するAurora B、そして主に精巢で発現しAurora Bを相補しうるAurora Cが存在する。植物においてもオーロラキナーゼは保存されており、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* には3つのオーロラキナーゼ [*AtAUR1*, *AtAUR2*, *AtAUR3* (*Arabidopsis thaliana* Aurora kinase)] が存在する (Demidov et al. 2005, Kawabe et al. 2005)。AtAUR1とAtAUR2はキナーゼドメインにおいて95%の相同性を示し、AtAUR3とは65%の相同性を示す。オーロラキナーゼの一つの特徴として、ヌクレオソームを構成するヒストンH3 Ser10をリン酸化 (H3S10ph) することが挙げられるが、AtAURは *in vitro* において3種類ともヒストンH3 Ser10のリン酸化能を有していた。またタバコ培養細胞BY-2においてGFP融合タンパク質を用いてイメージング解析した結果、分裂期においてAtAUR1とAtAUR2は紡錘体微小管に、AtAUR3は動原体に局在しており、植物細胞においてもオーロラキナーゼは細胞分裂期に重要な役割を担っていると考えられた (Demidov et al. 2005, Kawabe et al. 2005)。

細胞内局在が明らかになる一方、細胞内におけるオーロラキナーゼの実際の機能は不明であった。タギンラインを用いた突然変異体解析を行おうとしたが、AtAUR3がノックアウトしているラインが得られなかった。これはAtAUR3が細胞分裂に重要なタンパク質であり、ノックアウトすると致死になってしまうためではないかと考えられた。そこで抗ガン剤として注目されていたAuroraキナーゼ阻害剤であるヘスペラジンを用いて、解析を行った (Kurihara et al. 2006)。ヘスペラジンはAuroraキナーゼのATP結合部位に結合しリン酸化能を阻害するATP拮抗阻害剤であり、動物細胞では効いていたが、植物においてもAuroraキナーゼを阻害するかどうかは分からなかった。まず植物においてAuroraキナーゼを阻害するか確かめるために、タバコ培養細胞BY-2に添

加し、ヒストンH3のリン酸化を免疫染色で調べたところ、H3S10phの免疫染色シグナルが減少したことより、ヘスペラジンは植物においてもAuroraキナーゼを阻害することが分かった (図2A, B)。ヘスペラジンによるオーロラキナーゼ阻害により、分裂中期において染色体は赤道面上に整列したが、分裂後期において姉妹染色分体の分離が遅れた遅延染色体が、また間期において微小核と呼ばれる小さい核が多く観察された (図2C, D)。

図2 タバコBY-2細胞におけるオーロラキナーゼ阻害の影響 (A, B) 分裂前中期における抗H3S10ph抗体 (赤) を用いた免疫染色。DNAをDAPIで染色した (水色)。コントロール細胞 (A) ではセントロメア周辺領域にドット状のシグナルが観察されるが、ヘスペラジン処理細胞 (B) ではシグナルは顕著に減少している。(C, D) オーロラキナーゼ阻害による染色体分離異常。分裂後期においては赤道面上に遅延染色体 (C, 矢印) が、間期においては通常の核よりも小さい微小核 (D, 矢印) が観察された。スケールバーは10 μ m。

さらに細胞分裂・染色体動態といったダイナミックな現象におけるオーロラキナーゼの機能を解析するために、蛍光タンパク質を用いたライブセルイメージングを行うことによって動的な情報を得ることを試みた。まず動原体をRFPおよび微小管をGFPによって可視化したタバコ培養BY-2細胞を確立した。ヘスペラジン処理した形質転換BY-2細胞を用いてライブセルイメージング解析した結果、動原体が赤道面上へ整列する時間がコントロールと比べて約2倍長くなった。また動原体の挙動を追跡したところ、染色体は両極間を行ったり来たりしながら赤道面上へ整列していくが、ヘスペラジン処

理細胞においては振動の速度が遅くなることが明らかになった。また細胞分裂後期において、片方の動原体は正常に極に移動するが、もう一方は赤道面上に取り残され、遅れて移動するという動態と、両方の動原体ともに赤道面上へ取り残され遅れて極へ移動するという2種類の遅延染色体動態が1つの細胞で同時に観察された。赤道面上に取り残された片方の動原体は両極方向へ伸展していたことより、この動原体では両極の紡錘体微小管が結合しているメロテリック結合が起こっていると考えられる。このことは染色体整列時に観察された振動速度低下の原因とも説明できる。すなわち、メロテリック結合状態の動原体は赤道面方向への力がないために、この染色体では全体として赤道面方向への力が弱くなったため、振動速度が低下したと考えられる(図3A)。また両方の動原体が赤道面上で取り残されていた後者においては、ある程度の距離、両方の動原体は離れていたことより、姉妹染色分体間の接着の解離が阻害されていることが考えられる(図3B)。このようにオーロラキナーゼ阻害剤を用いたライブセルイメージング解析により、植物においてオーロラキナーゼは異常な動原体-微小管結合の校正と姉妹染色分体間の接着の解離を担うことによって、分裂前中期・中期における染色体整列および分裂後期における姉妹染色分体の分離といった染色体動態を制御していることが示唆された

(Kurihara et al. 2008)。

シロイヌナズナにおいても、ヘスペラジン処理により分裂期のH3S10phが減少すること、そして遅延染色体が観察されている(Demidov et al. 2009)。このようにオーロラキナーゼを阻害することにより、染色体の不均衡分配が起こることから、植物においてオーロラキナーゼが染色体動態に深く関わっていることが明らかとなった。これまでは培養細胞を用いて解析を行ってきたが、植物体におけるオーロラキナーゼの役割はどのようなだろうか。シロイヌナズナにおいて、*AtAUR1*、*AtAUR2*、*AtAUR3*ともに根や花芽、花といった分裂活性の高い組織で発現している(Demidov et al. 2005)。また単離した胚を用いてヘスペラジン処理しライブセルイメージング解析した結果、染色体整列が完了する前に分配が始まり分裂期が終わってしまう異常が観察された(栗原ら、未発表)ことより、シロイヌナズナ植物体でもオーロラキナーゼは分裂期において染色体動態を制御していることが考えられる。興味深いことに、*AtAUR2*にはキナーゼドメインの一部をコードする第4エクソンが欠失したスプライシングバリエーション(*AtAUR2S*)が存在する(Kurihara et al. 2007)。精製*AtAUR2S*は*in vitro*においてH3S10のリン酸化能は失っていたが、H3への結合能は有していた。*AtAUR2S*は葉、茎といった分裂活性の低い組織で発現しており、GFP融合タンパク質は*AtAUR2*と同じ

図3 BY-2細胞におけるオーロラキナーゼ阻害による遅延染色体形成モデル

BY-2細胞におけるオーロラキナーゼ阻害の染色体分離異常には、メロテリック結合により片方の染色体のみが極への移動が遅延し遅延染色体となる経路(A)と接着の解離阻害により両方の染色体ともに遅延染色体となる経路(B)が考えられる。

細胞内局在を示したことから、AtAUR2SはAtAUR2のコンペティターとして働き、細胞分裂しないようにしているというメカニズムが示唆された(Kurihara et al. 2007). このようにオーロラキナーゼの染色体動態制御機構を解析することによって、植物における細胞分裂、器官形成メカニズムが明らかにされると期待される。

分裂期キナーゼによるヒストンH3リン酸化

変わってこの章では、分裂期キナーゼによって引き起こされるヒストンリン酸化について紹介したい。細胞分裂期はダイナミックな染色体運動を伴う過程であり、そのため高等真核生物のゲノムDNAは、細胞分裂期中期染色体という高度に凝縮した高次構造をとる。例えば、ヒトでは2 mの長さに達するDNAが直径10 μm程度の核内に収納されるが、そのような緻密な染色体構造が形成されるメカニズムは未だ不明である。DNAは、ヒストンH2A, H2B, H3, H4の4種類のヒストンタンパク質からなるヒストンコアに巻き付いたヌクレオソーム構造をとっている。これらヒストンタンパク質のN末端はきちんとした立体構造をとらない直鎖上のヒストンテールと呼ばれ、このヒストンテール部分がリン酸化、アセチル化、メチル化などさまざまな翻訳後修飾を受けることによってヌクレオソーム構造を変え、遺伝子発現などがエピジェネティックに制御されることが知られている(Kouzarides 2007)。ヒストン修飾の中でも、H3S10phは酵母からヒトまで真核生物間で広く保存された細胞分裂期特異的な修飾であり、リン酸化のタイミングが染色体凝縮と強い相関を示すことより、古くから染色体構造を制御する翻訳後修飾として注目されてきた(Bradbury et al. 1973, Marks et al. 1973, Gurley et al. 1975)。ヒトにおいては、G2期後半からセントロメア周辺領域で始まり、細胞分裂期にはいと染色体周縁領域に広がり、後期から減少し始め、終期になると消失する(Goto et al. 2002)。テトラヒメナのH3S10をアラニンに置換した変異体では、染色体凝縮と分離に異常が見られ(Wei et al. 1999)、またショウジョウバエにおいてRNAiによってAurora BキナーゼをノックダウンするとH3S10phは消失し、染色体凝縮が阻害される(Adams et al. 2001)。しかしながら、出芽酵母のアラニン変異体では染色体凝縮は正常に起こり(Hsu et al. 2000)、Aurora Bキナーゼを免疫除去したアフリカツメガエル卵抽出液で染色体を形成させると、H3S10phは消失するが、染色体凝縮

に異常は見られない(MacCallum et al. 2002)など、染色体凝縮におけるH3S10phの役割については、生物種によって結果が違っており、未だ統一した見解は得られていない。

それでは植物におけるヒストンリン酸化はどのようなであろうか。興味深いことに、分裂期特異的なヒストンH3のリン酸化という現象自体は保存されているが、染色体上におけるリン酸化パターンには大きな違いが見られる。シロイヌナズナやタバコBY-2細胞では、染色体凝縮が始まる前期においてセントロメア周辺領域で始まり、免疫染色像ではドット状のシグナルとして観察される(図2A)。そして、後期において姉妹染色分体が分離すると、染色分体全体に広がりながら消失する。3章で述べたように、ヘスペラジンによってオーロラキナーゼを阻害するとH3S10phは顕著に減少する(図2B)。シロイヌナズナ、BY-2細胞ともに遅延染色体は観察されるが、染色体凝縮といった染色体構造には異常は見られなかった(Kurihara et al. 2006, Demidov et al. 2009)ことより、植物においてH3S10phは染色体凝縮に重要ではないといえる(図2B)。

ヒストンH3はSer10のほかに、Thr3, Thr11, Ser28でも細胞分裂期特異的にリン酸化される。ヒトにおいて、H3S28phはH3S10ph同様に染色体周縁領域全体で起こる(図4A, C, 赤; Goto et al. 2002)。H3T3phは染色体全体で起こるが、中期染色体をスライドガラスに展開して免疫染色すると、セントロメア周辺領域に限定して観察される(図4A, 緑; Dai et al. 2005)。H3T11phは細胞分裂期を通してセントロメア周辺領域で起こる(図4C, 緑; Preuss et al. 2003)。リン酸化パターンの違いからもわかるように、ヒストンH3はそれぞれ異なる分裂期キナーゼによってリン酸化されており、H3S10とH3S28はAurora Bキナーゼ(Goto et al. 2002)、H3T3はハスピンキナーゼ(Dai et al. 2005)、H3T11は*in vitro*でしか確かめられていないがDlk/ZIPキナーゼ(Preuss et al. 2003)によってリン酸化されている。植物においてもH3S28ph, H3T3ph, H3T11phは保存されているが、H3S10ph同様に動物とは異なるリン酸化パターンを示す。H3S28phはH3S10ph同様セントロメア周辺領域で起こるが、H3T3ph, H3T11phは染色体全体で起こる(図4B, D; Kurihara et al. 2006, Houben et al. 2007)。ヌクレオソームを構成しているヒストンタンパク質は生物間で高度に保存されており、ヒストンH3では、ヒトとシロイヌ

ナズナで比べると、135アミノ酸のうち4アミノ酸しか違いはない。特に翻訳後修飾をうけるヒストンテール部分は同一であり、H3リン酸化といった現象自体も保存されているながら、そのリン酸化パターンは動植物間で明確に違うことは興味深い。

図4 動物(ヒトHeLa細胞)と植物(タバコBY-2細胞)におけるヒストンH3リン酸化

(A, B) 分裂中期における抗H3S28ph抗体(赤), 抗H3T3ph抗体(緑)を用いた免疫染色。DNAをDAPIで染色した(青)。HeLa細胞ではH3S28phが染色体周縁領域に広がり、H3T3phは比較的染色体内部にシグナルが観察されるが(A), BY-2細胞ではH3S28phがセントロメア周辺領域にドット状の、H3T3phが染色体全体にシグナルが観察される(B)。(C, D) H3T11ph(緑)もHeLa細胞(C)とBY-2細胞(D)で同様のパターンの違いを示すが、H3T3phと比べてHeLa細胞においてセントロメア領域にシグナルが観察される(C)。スケールバーは10 μ m。

最近、出芽酵母、アフリカツメガエル、ヒトにおいて、ヒストンH3のリン酸化を介した分裂期キナーゼ制御の新たなカスケードが報告され注目されている(Wang et al. 2010, Kelly et al. 2010, Yamagishi et al. 2010)。2章で述べたように、Aurora Bキナーゼは動物体における張力を監視するために、インナーセントロメアに局在することが重要である。ハスピンキナーゼがまずインナーセントロメアにおいてH3T3をリン酸化する。続いて、Aurora Bキナーゼと複合体を形成しているSurvivinと呼ばれるタンパク質がそのH3T3phと結合することによって、Aurora Bキナーゼがインナーセントロメアに運ばれ、キナーゼ活性を発揮する(Wang et al. 2010, Kelly et al.

2010, Yamagishi et al. 2010)。このようにヒストンH3リン酸化は、それぞれ特異的な分裂期キナーゼによって、適切な時期、適切な場所でリン酸化されることによって、染色体構造ではなく、染色体動態を制御しているのかもしれない。

植物における分裂期キナーゼ研究の現状

ところで、リン酸化を介した種々のシグナル伝達系は細胞増殖や環境応答などに重要な役割を担っている。ヒトでは約500遺伝子がセリン・スレオニンキナーゼをコードしていると推定されているが(Manning et al. 2002)、植物においてはシロイヌナズナにおいて約1,000遺伝子(Champion et al. 2004)、イネにおいては約1,400遺伝子(Dardick et al. 2007)と、実に2倍にもおよぶキナーゼの存在が推定されている。植物において、核内で働く多くのキナーゼが報告されているが、分裂期キナーゼの報告は驚くほど少ないのが現状である(Dahan et al. 2010)。

植物分裂期キナーゼとしてよく研究されているタンパク質として、MAP (Mitogen-activated protein) キナーゼが挙げられる。MAPキナーゼ(MAPK)は、MAPKキナーゼ(MAPKK)、MAPKキナーゼキナーゼ(MAPKKK)とともにMAPKカスケードとよばれる情報伝達経路を構成しており、このMAPKカスケードは広く真核生物に保存される情報伝達経路であるが、植物においても発生、細胞増殖、ホルモン応答、ストレス応答など多岐にわたって働いている(Nakagami et al. 2005)。分裂期においては、NACK-PQR経路とよばれるMAPKカスケードが、細胞質分裂を制御することが明らかになってきている(Takahashi et al. 2004)。タバコにおいて、キネシン様タンパク質であるNACK1とNACK2がM期特異的に発現し、MAPKKKであるNPK1と結合することによってNPK1の活性とフラグモプラスト中央部への局在を制御している(Nishihama et al. 2002)。活性化されたNPK1 MAPKKKはNPK1 MAPKKをリン酸化することによって活性化し、さらにNPK1 MAPKKはNRK1 MAPKを活性化する(Soyano et al. 2003)。そしてNRK1 MAPKは微小管結合タンパク質MAP (microtubule-associated protein) であるNtMAP65-1をリン酸化することによって微小管束化活性を低下させ、微小管の重合・脱重合を促進し、フラグモプラストの拡大成長を促すことによって、細胞板形

成を制御していると考えられている (Sasabe et al. 2006). またシロイヌナズナにおいても, NACK-PQR 経路が細胞質分裂を制御していることが明らかになりつつある. *HINKEL/AtNACK1* と *STUD/TETRASPORE/AtNACK2* が *NACK1*, *NACK2* (Nishihama et al. 2002, Strompen et al. 2002, Yang et al. 2003, Tanaka et al. 2004), *ANP1*, *ANP2*, *ANP3* が MAPKKK である *NPK1* (Nishihama et al. 1997, Krysan et al. 2002), *MKK6/ANQ* が MAPKK である *NQK1* のオーソログとして同定されている (Soyano et al. 2003). さらに最近, GFP 融合 MKK6 が細胞板形成部位に局在し, *in vitro* において精製 MKK6 が MPK の 1 つである MPK4 をリン酸化すること (Takahashi et al. 2010), GFP 融合 MPK4 も細胞板形成部位に局在し, *in vitro* において精製 MPK4 は細胞質分裂に関わる MAP65-3 をリン酸化すること (Takahashi et al. 2010), そしてそれぞれの変異体解析の結果から *HINKEL/AtNACK1*, *ANPs*, *MKK6/ANQ*, *MPK4* がシロイヌナズナにおける NACK-PQR 経路を構成しており, 細胞板形成を制御していることが明らかにされつつある.

またシロイヌナズナにおいて, NIMA (never in mitosis, gene A) -related protein kinase 6 (NEK6) が, アルマジロリピートを持つキネシン様タンパク質と相互作用して働くことが明らかとなっている (Sakai et al. 2008). NEK6 の機能欠損変異体は表皮細胞の伸長方向の異常を示し, また GFP 融合 NEK6 は微小管上に局在しており, 微小管動態を制御することによって伸長方向を制御することが示唆されている (Motosé et al. 2008). NIMA キナーゼはコウジカビにおいて分裂期の開始に必須であり, またヒストン H3 Ser10 リン酸化能を有している (O'Connell et al. 2003). 動物においては, 11 種類あるうちの 4 種類の NEK が分裂期において中心体の分離, 分裂期進行, 紡錘体形成に関わっているが (O'Regan et al. 2007), シロイヌナズナ NEK6 の分裂期における機能は未だ明らかではない.

Tousled キナーゼは葉や花の発生に重要なキナーゼとして同定され (Roe et al. 1993), その後 *in vitro* においてヒストン H3 のリン酸化能を持ち, G2 期後半から M 期, そして G1 期前半でキナーゼ活性が上昇することより (Ehsan et al. 2004), 分裂期においてなんらかの役割を担っているとされたが, H3S10ph に Tousled は必要ないとの報告もあり (Wang et al. 2007), その機能は未知のままである.

おわりに

動物細胞と植物細胞の細胞分裂の様式には明確な違いが見られるが, 染色体動態を考えると今のところ大きな違いは見られていない. 細胞分裂様式の違いは, 植物は細胞壁を持つといった動物との細胞構造の違いに起因するものであるが, 遺伝情報の分配といった生命の根幹に関わる染色体動態制御機構というものは生物間で高度に保存されているのかもしれない. 本稿ではシロイヌナズナとタバコのオーロラキナーゼを紹介したが, 配列情報をもとにオーロラキナーゼを探索すると, 被子植物, 裸子植物, シダ植物, コケ植物, 緑藻, 紅藻と広く植物に保存されていることがわかる (Demidov et al. 2005). このことから, オーロラキナーゼを含む分裂期キナーゼのさらなる研究から, 生物普遍的な染色体動態制御機構が明らかにされていくことが期待される. また, 著者らはシロイヌナズナにおけるハスピンキナーゼを現在同定しており (栗原ら, 投稿中), ヒストン H3 リン酸化パターンが違いうようにオーロラキナーゼ・ハスピンキナーゼに関わる植物特有の染色体動態制御機構が見えてくるかもしれない.

謝辞

本総説は, 2010 年度植物形態学会奨励賞の受賞研究の内容を元に執筆したものである. 本総説で紹介した細胞分裂期における植物オーロラキナーゼの研究は, 日本学術振興会特別研究員として, 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻でおこなったものである. ご指導・ご支援を頂いた福井希一教授, 松永幸大准教授をはじめとした研究室の方々にこの場を借りて深く御礼申し上げたい.

引用文献

- Adams, R. R., Maiato, H., Earnshaw, W.C., and Carmena, M. (2001) Essential roles of Drosophila inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol* 153: 865-880.
- Bradbury, E. M., Inglis, R. J., Matthews, H. R., and Sarner, N. (1973) Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. Correlation with chromosome condensation. *Eur J Biochem* 33: 131-139.
- Carmena, M., Ruchaud, S., and Earnshaw, W. C. (2009) Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol*

- 21: 796-805.
- Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A., and Henry, Y. (2004) Arabidopsis kinome: after the casting. *Funct Integr Genomics* 4: 163-187.
- Dahan, J., Wendehenne, D., Ranjeva, R., Pugin, A., and Bourque, S. (2010) Nuclear protein kinases: still enigmatic components in plant cell signalling. *New Phytol* 185: 355-368.
- Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., and Higgins, J. M. (2005) The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev* 19: 472-488.
- Dardick, C., Chen, J., Richter, T., Ouyang, S., and Ronald, P. (2007) The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiol* 143: 579-586.
- Demidov, D., Hesse, S., Tewes, A., Rutten, T., Fuchs, J., Ashtiyani, R. K., Lein, S., Fischer, A., Reuter, G., and Houben, A. (2009) Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in Arabidopsis. *Plant J* 59: 221-230.
- Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F. R., and Houben, A. (2005) Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in Arabidopsis and other plants. *Plant Cell* 17: 836-848.
- Ehsan, H., Reichheld, J. P., Durfee, T., and Roe, J. L. (2004) TOSLED kinase activity oscillates during the cell cycle and interacts with chromatin regulators. *Plant Physiol* 134: 1488-1499.
- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A., and Inagaki, M. (2002) Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells* 7: 11-17.
- Gurley, L. R., Walters, R. A., and Tobey, R. A. (1975) Sequential phosphorylation of histone subfractions in the Chinese hamster cell cycle. *J Biol Chem* 250: 3936-3944.
- Houben, A., Demidov, D., Caperta, A. D., Karimi, R., Agueci, F., and Vlasenko, L. (2007) Phosphorylation of histone H3 in plants--a dynamic affair. *Biochim Biophys Acta* 1769: 308-315.
- Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., Lin, R., Smith, M. M., and Allis, C. D. (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102: 279-291.
- Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2005) Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol Biol* 58: 1-13.
- Kelly, A. E., Ghenoiu, C., Xue, J. Z., Zierhut, C., Kimura, H., and Funabiki, H. (2010) Survivin reads phosphorylated histone H3 threonine 3 to activate the mitotic kinase Aurora B. *Science* 330: 235-239.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.
- Krysan, P. J., Jester, P. J., Gottwald, J. R., and Sussman, M. R. (2002) An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* 14: 1109-1120.
- Kurihara, D., Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Fujimoto, S., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2007) Characterization of a splicing variant of plant Aurora kinase. *Plant Cell Physiol* 48: 369-374.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Kawabe, A., Fujimoto, S., Noda, M., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2006) Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J* 48: 572-580.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2008) Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol* 49: 1256-1261.
- MacCallum, D. E., Losada, A., Kobayashi, R., and Hirano, T. (2002) ISWI remodeling complexes in Xenopus egg extracts: identification as major chromosomal components that are regulated by INCENP-aurora B. *Mol Biol Cell* 13: 25-39.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- Marks, D. B., Paik, W. K., and Borun, T. W. (1973) The relationship of histone phosphorylation to deoxyribonucleic acid replication and mitosis during the HeLa S-3 cell cycle. *J Biol Chem* 248: 5660-5667.
- Motose, H., Tominaga, R., Wada, T., Sugiyama, M., and Watanabe, Y. (2008) A NIMA-related protein kinase suppresses ectopic outgrowth of epidermal cells through its kinase activity and the association with microtubules. *Plant J* 54: 829-844.
- Musacchio, A., and Salmon, E. D. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 379-393.
- Nakagami, H., Pitzschke, A., and Hirt, H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* 10: 339-346.
- Nishihama, R., Banno, H., Kawahara, E., Irie, K., and Machida, Y. (1997) Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of Arabidopsis ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKKs). *Plant J* 12: 39-48.
- Nishihama, R., Soyano, T., Ishikawa, M., Araki, S., Tanaka, H., Asada, T., Irie, K., Ito, M., Terada, M., Banno, H., Yamazaki, Y., and Machida, Y. (2002) Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109: 87-99.
- O'Connell, M. J., Krien, M. J., and Hunter, T. (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol* 13: 221-228.
- O'Regan, L., Blot, J., and Fry, A. M. (2007) Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div* 2: 25.
- Preuss, U., Landsberg, G., and Scheidtmann, K. H. (2003) Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res* 31: 878-885.
- Roe, J. L., Rivin, C. J., Sessions, R. A., Feldmann, K. A., and

- Zambryski, P. C. (1993) The *Tousled* gene in *A. thaliana* encodes a protein kinase homolog that is required for leaf and flower development. *Cell* 75: 939-950.
- Sakai, T., Honing, H., Nishioka, M., Uehara, Y., Takahashi, M., Fujisawa, N., Saji, K., Seki, M., Shinozaki, K., Jones, M. A., Smirnov, N., Okada, K., and Wasteneys, G. O. (2008) Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 53: 157-171.
- Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Sonobe, S., Igarashi, H., Itoh, T.J., Hidaka, M., and Machida, Y. (2006) Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev* 20: 1004-1014.
- Soyano, T., Nishihama, R., Morikiyo, K., Ishikawa, M., and Machida, Y. (2003) NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev* 17: 1055-1067.
- Strompen, G., El Kasmi, F., Richter, S., Lukowitz, W., Assaad, F. F., Jurgens, G., and Mayer, U. (2002) The *Arabidopsis* HINKEL gene encodes a kinesin-related protein involved in cytokinesis and is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Curr Biol* 12: 153-158.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Kosetsu, K., Sasabe, M., and Machida, Y. (2010) HINKEL kinesin, ANP MAPKKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51: 1766-1776.
- Takahashi, Y., Soyano, T., Sasabe, M., and Machida, Y. (2004) A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *J Biochem* 136: 127-132.
- Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C., and Machida, Y. (2004) The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in *Arabidopsis*. *Genes Cells* 9: 1199-1211.
- Uchida, K. S., Takagaki, K., Kumada, K., Hirayama, Y., Noda, T., and Hirota, T. (2009) Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 184: 383-390.
- Wang, F., Dai, J., Daum, J. R., Niedzialkowska, E., Banerjee, B., Stukenberg, P. T., Gorbsky, G. J., and Higgins, J. M. (2010) Histone H3 Thr-3 phosphorylation by Haspin positions Aurora B at centromeres in mitosis. *Science* 330: 231-235.
- Wang, Y., Liu, J., Xia, R., Wang, J. G., Shen, J., Cao, R., Hong, X. H., Zhu, J. K., and Gong, Z. Z. (2007) The protein kinase TOUSLED is required for maintenance of transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Rep* 8: 77-83.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. A., and Allis, C. D. (1999) Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* 97: 99-109.
- Yamagishi, Y., Honda, T., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2010) Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* 330: 239-243.
- Yang, C. Y., Spielman, M., Coles, J. P., Li, Y., Ghelani, S., Bourdon, V., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Scott, R. J., and Dickinson, H. G. (2003) TETRASPORE encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 34: 229-240.