

学位論文

Doctor's Thesis

Aurora-A キナーゼによるセントロメア蛋白 CENP-A リン酸化の動原体機能に
おける役割

(Role of Aurora-A dependent phosphorylation of CENP-A in kinetochore
function)

國徳 尚子

Naoko Kunitoku

指導教官

熊本大学大学院医学研究科脳神経外科学

生塩 之敬 教授

熊本大学大学院医学研究科腫瘍医学

佐谷 秀行 教授

2003 年 3 月

学位論文

Doctor's Thesis

論文題目名: Aurora-A キナーゼによるセントロメア蛋白 CENP-A
リン酸化の動原体機能における役割
(Role of Aurora-A dependent phosphorylation of CENP-A
in kinetochore function)

著者名 : 國徳 尚子

Naoko Kunitoku

指導教官 脳神経外科学担当教授 生塩 之敬 教授
腫瘍医学担当教授 佐谷 秀行 教授

審査員名 : 1) 器官制御分野担当教授 中尾 光善 教授
2) 分子遺伝学担当教授 森 正敬 教授
3) 組織制御分野担当教授 山泉 克 教授
4) 免疫識別学担当教授 西村 泰治 教授

2003年3月

| | |
|---|----|
| 1 要旨 | 4 |
| 2 発表論文リスト | 7 |
| 3 謝辞 | 8 |
| 4 略語一覧 | 9 |
| 5 研究の背景と目的 | 10 |
| 5-1 Aurora/Ipl1-related キナーゼファミリー | 10 |
| 5-2 染色体分離と動原体機能 | 12 |
| 5-3 スピンドル・アセンブリー・チェックポイント | 13 |
| 5-4 セントロメア蛋白 CENP-A | 13 |
| 5-5 本研究の目的 | 15 |
| 6 実験方法 | 16 |
| 6-1 siRNA | 16 |
| 6-2 ツーハイブリッドスクリーン | 16 |
| 6-3 細胞培養とトランスフェクション | 16 |
| 6-4 プラスミド | 17 |
| 6-5 リコンビナント蛋白 | 17 |
| 6-6 抗体の作製 | 18 |
| 6-7 Binding assays | 18 |
| 6-8 in vitro kinase assay | 19 |
| 6-9 免疫染色および Image 定量 | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 6-10 タイム・ラプス イメージング..... | 20 |
| 7 実験結果 | 21 |
| 7-1 Aurora-A および Aurora-B の染色体配列における役割 | 21 |
| 7-2 セントロメア蛋白 CENP-A は Aurora-A と結合する | 22 |
| 7-3 Aurora-A は CENP-A の 7 番目のセリンをリン酸化する..... | 23 |
| 7-4 CENP-A のリン酸化の時期的調節と Aurora-A の時期的空間的調節..... | 24 |
| 7-5 細胞内において CENP-A のリン酸化は Aurora-A と Aurora-B により連続的に行われる | 25 |
| 7-6 CENP-A がリン酸化されない細胞は分裂期異常を引き起こす | 26 |
| 7-7 CENP-A のリン酸化は Aurora-B が分裂期において動原体間に正しく集積するために必要である | 28 |
| 8 考察..... | 30 |
| 8-1 二つの Aurora キナーゼは共に CENP-A の セリン 7 のリン酸化に必要である。 | 30 |
| 8-2 CENP-A のリン酸化は Aurora-B の局在を制御する | 30 |
| 8-3 分裂期における CENP-A リン酸化の意義 | 32 |
| 8-4 Aurora キナーゼと動原体機能..... | 32 |
| 9. 結語..... | 34 |
| 10. 参考文献 | 35 |

1 要旨

ヒト細胞における分裂期の進行には、多数の蛋白質のリン酸化反応が関与していると考えられており、それらをリン酸化する一群のセリン スレオニン キナーゼの役割がきわめて重要であることが酵母やショウジョウバエを用いた解析によって明らかになってきている。これらのキナーゼは総称して分裂期キナーゼ (mitotic kinase) と呼ばれ、Cdc2、Polo-like、NimA-related、aurora/Ipl1-related、warts キナーゼなどが含まれ、酵母からヒトに至るまでその構造は高度に保存されている。aurora/Ipl1-related キナーゼは、ヒトにおいては Aurora-A、-B、-C の 3 つのホモログが存在し、それらが分裂期の開始や進行に重要な機能を営んでいることが解明されてきている。Aurora-A と Aurora-B はほとんどのすべての細胞種に発現しているが、その局在や発現の時期などは微妙に違いがあり、分裂期における機能も異なっていると予想されている。最近 Aurora-B は分裂中期における染色体の配列に関与することが報告されたが、私達は Aurora-A もまたヒト細胞において染色体配列に関与することを見いだした。今回私達は Aurora-A の染色体配列制御の分子背景を明らかにし、その機能が Aurora-B とどのように分担されているかを見いだすことを目的として研究を行った。まず酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、Aurora-A 結合蛋白としてセントロメア領域特異的なコアヒストンである CENP-A を同定した。また、今まで Aurora-B によるリン酸化部位として知られていた CENP-A の 7 番目のセリンを Aurora-A もまたリン酸化することを見いだした。RNA 干渉法を用いて Aurora-A 及び Aurora-B の発現を特異的に抑制することにより、CENP-A のリン酸化は最初 Aurora-A によって行われ、この CENP-A のリン酸化によって Aurora-B が動原体間に集積することが出来るようになり、その結果 Aurora-B によって CENP-A のリン酸化が維持されていることを示唆する所見を得た。また、CENP-A の 7 番目のセリンをアラニンに置き換えた変異体を発現した細胞では、Aurora-A 発現を抑制した細胞同様、分裂期において動原体と紡錘糸との結合が障害され、染色体の配列異常を来たした。これらのことより、Aurora-A による CENP-A のリン酸化は、分裂期における機能的な動原体の形成に不可欠であり、染色

体を均等に分配するために必要な染色体配列を制御するための重要なステップ
であると考えられた。

Abstract

Evidence is accumulating that various evolutionarily conserved serine/threonine kinases play a central role in the regulation of mitotic events. These kinases, known as mitotic kinases, include Cdc2, Polo-like, NimA-related, aurora/Ipl1-related and warts kinases.

The Aurora (Ipl1)-related kinases are universal regulators of mitosis. We now show that Aurora-A, in addition to Aurora-B, regulates kinetochore function in human cells. A two-hybrid screen identified the kinetochore component CENP-A as a protein that interacts with Aurora-A. Aurora-A phosphorylated CENP-A in vitro on serine-7, a residue also known to be targeted by Aurora-B. Depletion of Aurora-A or Aurora-B by RNA interference revealed that CENP-A is initially phosphorylated in prophase in a manner dependent on Aurora-A, and that this reaction appears to be required for the subsequent Aurora-B-dependent phosphorylation of CENP-A as well as for the restriction of Aurora-B to the inner centromere in prometaphase. Prevention of CENP-A phosphorylation also led to chromosome misalignment during mitosis as a result of a defect in kinetochore attachment to microtubules. Our observations suggest that phosphorylation of CENP-A on serine-7 by Aurora-A in prophase is essential for kinetochore function.

2 発表論文リスト

- 1) Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., Hirota, T. ; CENP-A Phosphorylation by Aurora-A in Prophase Is Required for Enrichment of Aurora-B at Inner Centromeres and for Kinetochore Function. *Developmental Cell* 5: 853-864, 2003

- 2) Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K. and Saya, H. : Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells *Cell* 114: 585-598, 2003

- 3) Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, Sasayama T, Kuninaka S, Mimori T, Tamaki N, Kimura M, Okano Y and Saya H : Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes to Cells* 7: 1173-1182, 2002

3 謝辞

本研究を行うにあたり御指導、御支援くださいました熊本大学大学院医学研究科脳神経外科学講座 生塩 之敬 教授、同腫瘍医学講座 佐谷 秀行 教授、ならびに両教室の皆様に深く感謝致します。とくに直接御指導頂きました丸本朋稔 先生ならびに 広田 亨 先生に心より感謝致します。また、研究を遂行するにあたり、名古屋大学 依田欣也博士より抗 CENP-A 抗体を、Fox Chase Cancer Center T. J. Yen 博士より抗 BubR1 抗体および抗 CENP-E 抗体を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。また、有用な議論を頂いた Research Institute of Molecular Pathology J.-M. Peters 博士 S. Hauf 博士、California 大学 D. O. Morgan 博士、北海道大学 岩永 敏彦博士ら多くの先生方に厚く御礼申し上げます。

4 略語一覧

Ab: antibody

ATP: adenosine triphosphate

CDK: cyclin-dependent kinase

cDNA: complementary DNA

DAPI: 4'6-diamidino-2-phenylindole

DIC: differential interference contrast

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol bis (beta-aminoethylether)-N,N,N9,N9-tetraacetic acid

FITC: fluorescein isothiocyanate

GFP: green fluorescent protein

GST: glutathione s-transferase

IP: immunoprecipitation

PAGE: polyacrylamide electrophoresis

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PI: propidium iodide

SDS: sodium dodecyl sulfate

SiRNA: short interference RNA

Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

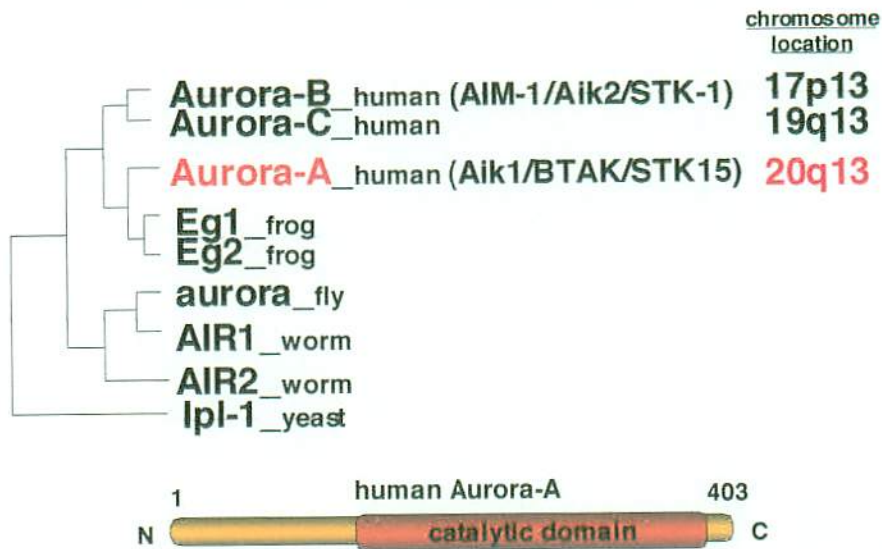
5 研究の背景と目的

5-1 Aurora/Ipl1-relatedキナーゼファミリー

ヒト細胞において分裂期の開始及び進行には Cdc2-cyclinB キナーゼの活性化が必要であることが分かっているが、分裂期は染色体凝集、中心体成熟、中心体分離、核膜崩壊、染色体配列、染色体分離、細胞質分裂といった複雑なイベントが連続的に進行し、たった一つのキナーゼによってそれらが制御されているとは考えがたい。最近これらのイベントの遂行には、進化的に保存された様々なセリン スレオニン キナーゼが関与していることが酵母やショウジョウバエの遺伝学的手法を用いた解析から明らかとなり、それらのキナーゼが Cdc2-cyclinB と協調して働いていることが見出されている。これらのキナーゼは分裂期キナーゼ (mitotic kinase) と呼ばれ、Polo-like、NimA-related、aurora/Ipl1-related、warts キナーゼなどが含まれる。Aurora/Ipl1-related キナーゼファミリーは酵母からヒトまで高度に保存されている分裂期キナーゼで、様々な分裂期のイベントに必須であることが知られている(Bischoff and Plowman, 1999; Nigg, 2001)。最初に酵母において同定された Ipl1 は、染色体数の増加を来す変異株の原因遺伝子として見つかった(Chan and Botstein, 1993)。Ipl1 変異体では、分裂期に姉妹染色分体が正しく分配されず、高頻度で同じ娘細胞に受け継がれることが示されている。また Ipl1 変異体では、DNA 複製はほぼ正常に進み紡錘体はほぼ正常に形成されるが、in vitro の動原体-微小管結合のアッセイでこの結合の ATP への感受性が低下することが示され、これらの事実より、Ipl1 キナーゼは何らかの形で動原体の機能を制御しているのではないかと提唱された(Biggins et al., 1999)。更に Ipl1 は、張力のかかっていない動原体と紡錘系の不適切な結合をキャンセルし、次に正しい結合が生じる機会を作るために必須の役割を担っていることが示された (Tanaka et al., 2002)。

出芽酵母においては、そのホモログは一つ (Ipl1) しかないが、ヒトにおいては3つのホモログが同定されており、Aurora-A、Aurora-B、Aurora-C と呼ばれている(Nigg, 2001)。

Aurora/Ipl1-related kinase family



ヒトの Aurora-A と Aurora-B は非常に相同性が高く、そのカルボキシル末端側である触媒部位においては 71%の相同性である一方、アミノ末端側の非触媒部位はその長さも違い、相同性も低くなっている。Aurora-C は精巣において形成期の精子細胞に発現し、構造的には極めて Aurora-B に近いことから、減数分裂に関与する特異的な機能を持つことが予想されるが、その機能はよくわかっていない。また Aurora-A と Aurora-B の局在はそれぞれ微妙に異なり、Aurora-A が中心体および中心体近傍の紡錘糸上に局在しているのに対し、Aurora-B は細胞分裂前期より細胞分裂中期までは二つの動原体間であるインナーセントロメアに局在し、細胞質分裂期には中央体/ミッドボディーに局在することから、これら 2 つのホモログは機能的に区別されると考えられる。

Ipl1 のホモログである Aurora キナーゼは、ヒト細胞内において酵母の Ipl1 と同様に染色体の分配に重要な働きを担うと予想することができる。Aurora キナーゼファミリーのうち Aurora-A (Katayama et al., 2001; Marumoto et al., 2003)

と Aurora-B (Kallio et al., 2002; Murata-Hori and Wang, 2002a)はどちらも染色体の配列に必要であることが、抗体導入の実験やキナーゼ活性を持たないドミナントネガティブ蛋白の発現実験により示唆されている。Aurora-B に関しては、酵素阻害剤や siRNA を用いたノックダウンにより、酵母の Ipl1 と同様に、不適切な紡錘体—動原体間の結合を解離させるために必要であることが分かってきた (Hauf et al., 2003)。しかし、Aurora-A がどのような分子背景で染色体配列や分配に機能しているかについては明らかではない。

5-2 染色体分離と動原体機能

細胞はその遺伝情報を正確に二つの娘細胞に分け与えるため、正確に複製と分裂を遂行しなくてはならない。細胞分裂期において、姉妹染色体を正確に分配することは、染色体の安定性を維持する上で、非常に重要である。正確な染色体の分配を行うためには、分配に先立って分裂中期において全ての姉妹染色体が赤道面上に正確に整列する必要がある。動原体は、特異的な DNA 配列を含むセントロメアと、そこに集積する蛋白質からなる大きな複合体であるが、分裂期において染色体が紡錘系と結合する場を形成し、また染色体が移動するための動力を形成することにより、染色体が赤道面上に整列するために重要な役割を担っている。更に、動原体はスピンドル・アセンブリー・チェックポイント(後述)と呼ばれるチェックポイントシグナルを生み出す場にもなっている (Rieder and Salmon, 1998; Shah and Cleveland, 2000)。動原体蛋白質には、細胞周期を通じて常にセントロメア領域に存在するものと (Earnshaw and Rothfield, 1985)、紡錘系結合モーター蛋白やチェックポイント蛋白等のように分裂期のみリクルートされてくるものが存在する (Rieder and Salmon, 1998; Shah and Cleveland, 2000; Hoyt, 2001)。この動原体蛋白のリクルートは、分裂前期に起こることが分かってきている (Jablonski et al., 1998; Hoffman et al., 2001)。しかし、どのようなメカニズムによって動原体蛋白がリクルートされ、染色体配列や分配のための機能的な動原体を作り出しているのかは、現在のところわかっていない。

5-3 スピンドル・アセンブリー・チェックポイント

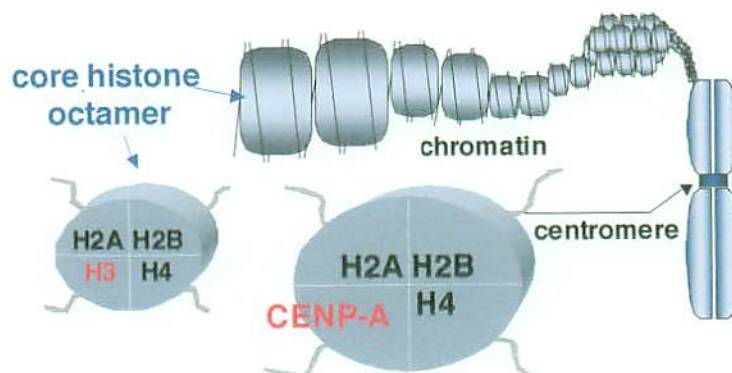
細胞は各細胞周期において、ゲノムの複製や、染色体その他の構造物を娘細胞へ正確に分配することを必要とされる。これを監視する機構として、チェックポイントとよばれるシステムが存在する。チェックポイントの概念は、Hartwell らにより出芽酵母の研究により提唱された (Hartwell and Weinert, 1989)。チェックポイントとは、「細胞周期が進行するのに必要な個々の事象が正常に完了することが次に起こる事象の開始の必要条件になっている場合に、これら2つの事象をつなぐ別の独立した制御機構」と定義される。言い換えると、次の独立した段階に入る前にその段階が完了しているかどうかを監視するシステムである。具体的には DNA に損傷が生じた場合や、分裂期紡錘体の形成不全があった場合などの様々な細胞ストレスなどによってチェックポイントが作動し、細胞周期が停止する。DNA 損傷などの異常の修復が完了すると、細胞は再び細胞周期を進行させるが、修復できなかった場合や損傷が大きい場合は、細胞死が誘導される。スピンドル・アセンブリー・チェックポイントとは、分裂中期においてすべての染色体が赤道面上に整列するまで分裂後期の開始を起こさないようにするためのチェックポイントである。従って、DNA 損傷チェックポイント等と異なり、分裂期毎に必ず作用する生理的なチェックポイントであり、その経路が障害されると premature anaphase が生じ、染色体数異常を来すこととなる。このチェックポイントを担う経路としては、紡錘糸が動原体に結合することによって解除されると考えられる mad2 依存性経路と、姉妹染色体において紡錘糸が双極性に正しく結合し、姉妹染色体間に張力が正しく生じることによって解除されると考えられる BubR1 依存性経路があると考えられている(Shah and Cleveland, 2000; Hoyt, 2001)。

5-4 セントロメア蛋白 CENP-A

DNA は通常ヒストン H2A, H2B, H3, H4 各二分子ずつのオクタマーからなるヌクレオソームに糸を巻き付けたような状態で存在するが、CENP-A はセン

トロメア領域に特異的なヌクレオソームを形成するヒストン H3 と考えられている(Sullivan et al., 1994; Yoda et al., 2000)。

CENP-A: centromere specific core histone



CENP-A は細胞周期を通じてセントロメアに存在しており、酵母・線虫・ショウジョウバエ・マウス・ヒト等の様々な種において、機能的な動原体の形成に必須な蛋白として知られている(Howman et al., 2000; Blower and Karpen, 2001; Oegema et al., 2001; Goshima et al., 2003)。CENP-A が欠損すると、CENP-C・CENP-I・CENP-H といった他の様々な動原体蛋白の動原体への集積が障害され、その結果動原体の機能が損なわれる。動原体は分裂期において染色体が紡錘糸と結合する場を形成し、また染色体が移動するための動力を形成することにより、染色体が赤道面上に整列するために重要な役割を担っており、更に、スピンドル・アセンブリー・チェックポイントシグナルを生み出すのに必須である。この機能が障害されると、分裂中期において染色体は紡錘糸と結合できないために赤道面へ整列することができず、更にスピンドル・アセンブリー・チェックポイントが障害されている為、細胞は整列できていない染色体が存在するにも関わらず、染色体分離異常を伴ったまま分裂してしまふ(Cleveland et al., 2003)。このように、CENP-A は動原体の形成とその機能に必須であると考

えられる。

5-5 本研究の目的

上述したように、Aurora キナーゼは様々な分裂期のイベントに必須の蛋白質であり、ヒト細胞内においても酵母同様に染色体の分配に重要な働きを担うと予想することができる。しかし、Aurora-A がヒトの細胞で染色体分配においてどのような機能を持っているかについての詳細な報告はない。この Aurora-A を欠いたヒト細胞においてその表現型を解析すること、また Aurora-A の会合分子を同定し機能解析を行うことによって、その生理的役割を明らかにすることを目的とした。

6 実験方法

6-1 siRNA

ヒト Aurora-A の siRNA のためのシーケンスは、過去に siRNA が成功している報告のある (Kufer et al., 2002)、725-743 ヌクレオチドに相当する 5-AUGCCCUGUCUUACUGUCA-3 を、ヒト Aurora-B の siRNA のためのシーケンスは 168-186 ヌクレオチドに相当する 5-GGUGAUGGAGAAUAGCAGU-3 を、コントロール siRNA としては、luciferase (GL-2) をターゲットとする二重鎖 RNA を使用した。21 ヌクレオチドからなる RNA-DNA キメラ (日本バイオサービス) をアニーリングして二重鎖にした後、oligofectamine (Life Technologies 社) にて細胞に導入した。

6-2 ツーハイブリッドスクリーン

酵母のストレインは L40 を用いた。PBTM116HA-KM/Aurora-A(1-129) を導入し、Aurora-A(1-129) の発現を確認した後、pGAD-GH プラスミドに HeLa の cDNA を組み込んだライブラリー (Clontech) を導入した。ヒスチジンを欠いた培地にて一次スクリーニングを行い、更に二次スクリーニングとして行った β -ガラクトシダーゼアッセイ陽性のクローンより、pGAD-GH のプラスミドを回収し、シーケンスにてその遺伝子を同定した。

6-3 細胞培養とトランスフェクション

すべての培養細胞は DMEM/F-12 培地 (GIBCO BRL 社) に最終濃度 10% の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, BIOWITTAKER 社) を加えたもので、37 度の 5% CO₂ 培養器にて継代培養した。HEK293T 細胞のトランスフェクションには Lipofectamine (Invitrogen 社) を用いた。GFP-tagged CENP-A の安定発現 HeLa 細胞株の作製には、Fu gene (Roche 社) を用いてトランスフェクションを行い、800

μg/ml の G418 (Gibco BRL)を含む培養液で培養し、クローンを単離した。各クローン細胞は蛍光顕微鏡を用いてその導入蛋白の局在を検討され、全ての細胞が均一に導入蛋白を発現しており、更に内在性の CENP-A と同様な動原体のドット状の局在を示すクローンのみを使用した。

6-4 プラスミド

HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを鋳型とし、polymerase chain reaction (PCR)にて増幅した DNA フラグメントを、pEGFP-C1 および Flag-tag を組み込んだ pcDNA3 ベクター(Invitrogen 社) に組み込んだ。全ての PCR 産物は PyroBest DNA polymerase (Takara) を用いて増幅し、cDNA の配列をシーケンスにて確認した。

GST 結合、あるいはヒスチジンでタグされた大腸菌産生蛋白の作製には、PCR 産物を pGEX4T-1 ベクター (Amersham pharmacia biotech 社) あるいは、pRSET ベクター (Invitrogen 社) にそれぞれ組み込んだ。GST 結合、あるいはヒスチジンでタグされた Sf9 昆虫細胞産生蛋白の作製には、PCR 産物を pFastBac ベクター(Gibco BRL 社)に組み込んだ。

6-5 リコンビナント蛋白

CENP-A のトランケーションミュータントを組み込んだ pGEX4T-1 ベクターあるいは Aurora-A を組み込んだ pRSET ベクターを大腸菌 (BL21-S1) に導入し、0.1 mM の isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside または 0.3M の NaCl を含んだ LB 液体培地にて 25° C の温度で 20 時間培養した。その後大腸菌を 0.5% NP-40 detergent, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25% sucrose, 5mM MgCl₂, 5 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, leupeptin (1 μg/ml), pepstatin A (0.7 μg/ml), aprotinin (5 μg/ml)を含むバッファーにて溶解した。細胞抽出液は、グルタチオンアガロースビーズ (Sigma 社)あるいはタロンメタルレジン (Clontech 社)にて精製し、5 mM glutathione または 100 mM imidazole を含む溶出バッファーにてそれぞれ溶出した。リコンビナント蛋白を組みこんだバキュウロウイルスは Bac-

to-Bac baculovirus expression system (Gibco-BRL 社)を使用して作製した。His₆-tagged Aurora-A あるいは GST-Aurora-A あるいは GST-CENP-A (全長あるいは Δ41-60 ミュータント)を組み込んだバキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞は 48 時間培養した後 1% CHAPS, 10 mM Hepes-NaOH (pH 7.7), 150 mM NaCl, 100nM okadaic acid, 20 mM β-glycerophosphate, 5 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, leupeptin (1 μg/ml), pepstatin A (0.7 μg/ml), aprotinin (5 μg/ml) を含むバッファーにて溶解し、大腸菌産生蛋白と同様に精製した。

6-6 抗体の作製

CENP-A の 7 番目のリン酸化セリンに対するポリクローナル抗体は、7 番目のセリンをリン酸化フォームにして合成した、ヒト CENP-A の N 端の 1-13 アミノ酸のリン酸化合成ペプチド [MGPRRRS(PO₃H₂)RKPEAP] (S7P) (ペプチド研究所) を抗原として使用した。ラビット (ニュージーランド ホワイト) に 2 週間に一度のスケジュールで免疫を行い、3 ヶ月後に全採血した。全採血にて得られた抗血清は、非リン酸化型合成ペプチドとリン酸化型合成ペプチドを連続的に用いて精製した。

6-7 Binding assays

400nMのGST融合蛋白と400nMのHis-Aurora-Aをon iceにて0.25mlのバッファー(50 mM HEPES NaOH (pH 7.2), 15 mM NaCl, 0.05% Triton X-100, 5% glycerol, 2 mM dithiothreitol, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) 内で1時間インキュベートした後、0.015mlのglutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia)を加え4度にて1時間攪拌しながらインキュベートした。Beadsを5回洗った後、beadsに結合している蛋白をウエスタンブロッティングに用いた。

免疫沈降には、anti-Flag 抗体をアガロース beads に結合させてある M2-beads (Sigma) あるいは anti-GFP 抗体(3E6; Wako)を protein A-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech)に共有結合させたものを用いた。細胞を NP-40 溶解液 (0.5%

NP-40, 50 mM Tris, pH 7.4, 500mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, 1 mM DTT, 100nM okadaic acid, 20 mM β-glycerophosphate, 5 mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, leupeptin (1 μg/ml), pepstatin A (0.7 μg/ml), aprotinin (5 μg/ml)) にて溶解した。この細胞抽出液を 14,000 g で 20 分間遠心後、上清を M2 beads または GFP beads に加えて 4 度にて 2 時間攪拌しながらインキュベートした。Beads を 5 回洗った後、beads に結合している蛋白をウエスタンブロッティングに用いた。

6-8 in vitro kinase assay

バキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞より精製した GST-Aurora-A もしくは His-tagged Aurora-A を用いてリン酸化反応をおこなった。リン酸化反応は 10 μM のコールド ATP (Sigma 社) 、 10 μCi の γ-[³²P]ATP (3,000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia 社)、および様々なトランケーションミュータント CENP-A を含む 30 μl の 反応系にて 30 °C で 10-30 分間行った。反応は SDS サンプルバッファーを加えた後、95 °C で 5 分間煮沸して終了させた。これらのサンプルを 15%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動したのち、オートラジオグラフィを行った。基質のラジオアクティビティは BAS2000 Bioimager (Fujifilm) にて測定した。

6-9 免疫染色および Image 定量

HeLa 細胞を 35-mm petri dish 内にて培養し、0.1 M のリン酸バッファー (pH 7.4) にて溶解した 4% paraformaldehyde を用いて 20 分間室温にて固定した。0.5% Triton X-100 / PBS にて 15 分間室温にて permeabilize し、5% bovine serum albumin / PBS にて室温で 60 分間ブロッキングを行った。一次抗体を室温にて 一晚反応させた後、二次抗体は FITC または Texas Red または Rhodamine を結合させた抗ウサギあるいは抗マウス抗体 (Biosource or Molecular Probes) を室温にて 60 分反応させた。クロマチンは、Toto3 iodide (Molecular Probes) または DAPI または PI にて染色した。染色した細胞は、共焦点顕微鏡 (FV300, Olympus) または

蛍光顕微鏡(BX51, Olympus)にて観察した。動原体上あるいは染色体上の蛍光強度の定量には、一定条件下にて撮った画像上の固定円の範囲内の蛍光強度を Image-J software を用いて計測した。

6-10 タイム・ラプス イメージング

HeLa 細胞を ΔT ディッシュ (Bioprocess) で培養した。観察前に最終濃度 10%の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, BOWITTAKER 社) を加えた pH 7.2 の Leibovitz's CO₂-independent medium (L-15) 培養液 (Sigma 社) に入れ換え、乾燥を防ぐため培養液の表面はミネラルオイルで完全に覆った。 ΔT ディッシュは、 ΔT Culture Dish System (Bioprocess 社) にて 37 °C に維持した。画像は SenSys-1401E CCD カメラ (Roper Scientific 社) をオリンパス IX70 顕微鏡 (Olympus 社) に装着して取得した。DIC 像を 10x UPlan Apo 対物レンズ (Olympus 社) を用いて取得した。カメラ、シャッター及びフィルターは MetaMorph 画像取得ソフト (Universal Imaging 社) を用いて制御した。画像は、100 ms の露出時間で 5 分毎に取得した。また、焦点のあった画像を取得するため、それぞれの画像を取得する際には、3 枚ずつ Z 軸方向に焦点を変えて取得した。

7 実験結果

7-1 Aurora-AおよびAurora-Bの染色体配列における役割

まず始めに Aurora キナーゼの染色体配列における役割を検討するために、siRNA 法を用いたノックダウンを行ったところ、Aurora-A の siRNA によって Aurora-A の発現が、Aurora-B の siRNA によって Aurora-B の発現が効率よく抑えられていた(Figure 1A)。Aurora-A と Aurora-B はそのキナーゼドメインの相溶性が非常に高いため、Aurora-A の RNAi によって Aurora-B の発現が、また Aurora-B の RNAi によって Aurora-A の発現が影響されないかどうかを検討したところ、それぞれの蛋白発現量はウエスタンブロットにおいても(Figure 1A)、また一細胞レベルにおいても影響がなかった(Figure 1B)。更に、Aurora-A のノックダウンによって Aurora-B の活性が影響を受けたり、Aurora-B のノックダウンによって Aurora-A の活性が影響を受けたりする可能性がないかどうかを検討するために、それぞれのノックダウン細胞において、他方の活性を検討した。Aurora-A の活性化の指標として、Aurora-A の活性化ループ内にあり、活性化状態においてリン酸化されることが知られているスレオニン 288 のリン酸化状態を(Walter et al., 2000)、また Aurora-B の活性化の指標として、Aurora-B の基質であるヒストン H3 のリン酸化状態を(Adams et al., 2001; Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003)それぞれ検討したところ、Aurora-A のノックダウン細胞において Aurora-B の活性の指標であるヒストン H3 のリン酸化は影響されず、また Aurora-B のノックダウンによって Aurora-A のスレオニン 288 のリン酸化状態は影響されなかった(Figure 1C)。これらにより、Aurora-A および Aurora-B の siRNA はそれぞれ他方の蛋白量や活性化には影響を与えないことが確認された。

これらの細胞において分裂期を観察した。紡錘糸を染色してみると、Aurora-A および Aurora-B の RNAi どちらにおいても双極性紡錘体は形成されていた。Aurora-B のノックダウン細胞において過去に報告されているものと同様に(Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003) 染色体の配列異常が認められたのみならず、Aurora-A のノックダウン細胞においても、高頻度に赤道面上に整列していない染色体が見られた(Figures 2A and 2B)。この結果より、Aurora キナ

ーゼファミリーのうち、過去に報告のある Aurora-B のみならず、Aurora-A もまた染色体配列に重要な役割を担っていると考えられた。

7-2 セントロメア蛋白CENP-AはAurora-Aと結合する

Aurora-A キナーゼの染色体配列における分子背景を明らかにするために HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを使用して酵母のツーハイブリッド法を行いその会合分子を検索した。Aurora-A と Aurora-B はそのキナーゼドメインの相同性が非常に高いため、Aurora-A の全長のうち、キナーゼドメインを含まず相同性の低い 1-129 アミノ酸の部分を bait として用いた。2.4 × 10⁷ 個のプラスミド導入酵母細胞のうち、135 個の陽性クローンを得た。更に二次スクリーニングを行って擬陽性を除外して得た 10 個のクローンのシーケンスを行ったところ、2 個が独立した全長の CENP-A の cDNA であった(Figure 3A)。次に、Aurora-A が酵母内と同様にヒト細胞内でも会合するかどうかを免疫沈降法により検討した。Flag タグをつけた全長の Aurora-A と GFP タグをつけた全長の CENP-A を HEK293T 細胞に共に発現させ、Flag タグおよび GFP タグに対する抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、Aurora-A に共沈して CENP-A が認められ、また、CENP-A に共沈して Aurora-A が認められた(Figure 3B)。このことより、ヒト細胞内においても、この二つの分子が会合していることが確認された。次にその結合部位を同定するために、様々な CENP-A のトランケーションミュータントを GST 融合蛋白として作成した(Figure 4A)。大腸菌内で発現させた GST-CENP-A と His-Aurora-A を用いて *in vitro* binding assay を行ったところ、CENP-A の 31-70 アミノ酸の部分のみが Aurora-A と結合した(Figure 4B)。1-40 アミノ酸および 61-100 アミノ酸の部分が全く結合しなかったことより、その結合部位を 41-60 アミノ酸と同定し、その部分のみを欠いたデリーションミュータントを作成した。このミュータントが Aurora-A と結合できなくなったことより、CENP-A はその 41-60 アミノ酸の部分で Aurora-A と結合することが分かった(Figure 4C)。

7-3 Aurora-AはCENP-Aの7番目のセリンをリン酸化する

CENP-A が Aurora-A と強く結合することより、CENP-A が Aurora-A によりリン酸化されるのではないかと考えられた。バキュロウイルスにより作成した活性のある Aurora-A をリン酸化酵素として用い、全長の CENP-A を基質として *In vitro* kinase assay を行ったところ、CENP-A は Aurora-A によって強くリン酸化された(Figure 5A)。次にそのリン酸化部位を同定するために先程と同様のトランケーションミュータントを用いて kinase assay を行ったところ、1-40 アミノ酸の部分と 91-140 アミノ酸の部分にリン酸化が認められた(Figure 5B)。ヒストンは、そのアミノ端のテイル部分に様々な修飾を受けることによりクロマチン構造の調節に関わることが知られているため、テイル部分の 1-40 アミノ酸に焦点を絞った。31-70 アミノ酸の部分が全くリン酸化されなかったことより、1-30 アミノ酸のなかにリン酸化部位が存在すると考えられた。この部位を更に 1-14 アミノ酸と 13-30 アミノ酸の二つに分けて kinase assay を行ったところ、1-14 アミノ酸のみがリン酸化された(Figure 5D)。この部位にはリン酸化部位の候補としては7番目のセリンのみしか存在していないため(Figure 5C)、この部位をアラニンに置換した変異体を作成したところ、この変異体は全くリン酸化されなかった(Figure 5D)。これらの結果より、CENP-A の7番目のセリンが Aurora-A によるリン酸化部位であることが分かった。

ここで、CENP-A はその 41-60 アミノ酸の部分で Aurora-A と結合し、それとは離れた7番目のセリンが Aurora-A によるリン酸化部位であることより、この二つの分子が結合することが、効率のよいリン酸化反応に必要なのではないかと考えられた。そこで、結合能とリン酸化効率の関係を明らかにする為に、Aurora-A との結合部位を欠いたデリーションミュータントを基質として用い、kinase assay を行った。Aurora-A との結合部位を欠いた CENP-A は、全長の CENP-A と比べて明らかにリン酸化効率が低下していた(Figures 6A and 6B)。このことより、効率良いリン酸化反応には両者の結合が必要であることが分かり、CENP-A は細胞内においても Aurora-A の生理的な基質であると予想された。

7-4 CENP-Aのリン酸化の時期的調節とAurora-Aの時期的空間的調節

次に私達は Aurora-A によってリン酸化をうける CENP-A セリン 7 のリン酸化の時期的調節を検討する為に、リン酸化セリン 7 を特異的に認識するウサギポリクローナル抗体を作成した。抗原として CENP-A の 1-13 アミノ酸のうちセリン 7 がリン酸化されているリン酸化合成ペプチドを用い、作成した抗体を S7P 抗体と名付けた。この抗体は、ウエスタンブロッティング法にて非リン酸化型の CENP-A は認識せず(Figure 7A)、また過去の報告通り(Zeitlin et al 2001a)、分裂期の細胞抽出液中の内在性 CENP-A のみを認識し間期の細胞抽出液中の内在性 CENP-A は認識しなかった(Figure 7B)。この抗体を用いて細胞染色を行ったところ、セントロメアを認識する CREST 血清の染色と完全に一致したドット状の染色が認められた(Figure 7C)。この抗体を、抗原として用いたリン酸化ペプチドとインキュベートした後に細胞染色に用いるとこの染色は完全に失われたが、非リン酸化ペプチドとインキュベートした後に細胞染色に用いても染色は失われなかったことより、細胞染色においてもリン酸化 CENP-A を特異的に認識していると考えられた(Figure 7D)。この抗体を用いて CENP-A のリン酸化状態を詳細に検討したところ、間期の細胞にはリン酸化は認められず、染色体凝集の始まる分裂前期より始まり、分裂中期まで持続し、分裂後期に急速に減少することが分かった(Figure 8A)。

一方 Aurora-A は G2-M 期に活性化されることが知られており、分裂期には中心体と紡錘系上に存在することが知られているが(reviewed in Nigg, 2001)、分裂前期におけるその局在ははっきりと知られていない。今回私達は G2 期から分裂前期におけるその局在を詳細に検討した。細胞染色の結果、Aurora-A は分裂期が始まる以前の G2 期において、既に中心体および細胞質に淡く認められ始め、分裂前期においては中心体に存在するほかに染色体凝集の進行に伴って核内に集積することが分かった(Figure 8B panels a-c)。さらに、活性化型 Aurora-A を認識するスレオニン 288 に対するリン酸化抗体で染色したところ、この核内に移行した Aurora-A は活性化型であることが分かった(Figure 8B

panel d)。また核膜成分であるラミンと共に染色することにより、この移行はラミンが存在する時期である核膜崩壊以前に既に起こっていることが分かった。

この、分裂前期における活性化型 Aurora-A の核内移行は CENP-A のリン酸化が生じる時期と一致しており、このことよりも CENP-A が Aurora-A の生理的な基質であることが強く示唆された。

7-5 細胞内においてCENP-Aのリン酸化はAurora-AとAurora-Bにより連続的に行われる

CENP-A が Aurora-A の生理的な基質であるかどうかを検討するために、siRNA によるノックダウン法を用いて、CENP-A のリン酸化状態を検討した。今回私達は CENP-A のリン酸化酵素として Aurora-A を同定したが、そのホモログである Aurora-B もまた CENP-A のリン酸化酵素であるという報告が過去になされている(Zeitlin et al., 2001b)。そこで Aurora-A と Aurora-B が CENP-A のリン酸化酵素として、細胞内でどのように使い分けられているのかを明らかにするために、Aurora-A および Aurora-B ノックダウン細胞における CENP-A のリン酸化状態を検討した。

コントロール siRNA を導入した細胞では、先程と同様に分裂前期の初期から CENP-A のリン酸化が認められ始め、分裂前中期まで徐々に増強した。Aurora-A のノックダウン細胞においては、分裂前期の初期から分裂中期に至るまで CENP-A のリン酸化は低く抑えられていた。それに対し、Aurora-B のノックダウン細胞では、分裂前期の初期における CENP-A のリン酸化はコントロールと同等に見られたが、分裂前期の後期以降はそのリン酸化が認められなくなった(Figures 9A and 9B)。これらの結果より、CENP-A のリン酸化は、その開始を Aurora-A が行い、Aurora-B はリン酸化状態の維持に働くということが分かった。更に、Aurora-A による CENP-A のリン酸化の開始が無ければ、Aurora-B は CENP-A のリン酸化を行うことが出来ないということも示唆された。

次に CENP-A のリン酸化状態によって、CENP-A と Aurora-A および CENP-A と Aurora-B との結合能に変化が生じるかどうかを検討した。CENP-A のセリン

7をグルタミン酸に置換し、リン酸化状態を mimic した CENP-A S7E を作成し、Aurora-A または Aurora-B と野生型 CENP-A、CENP-A S7A、CENP-A S7E をそれぞれ導入した細胞抽出液を用いて免疫沈降を行った。Aurora-B は CENP-A のセリン 7 のリン酸化状態に関わらずに結合したのに対し、Aurora-A は野生型 CENP-A と CENP-A S7A には結合したが CENP-A S7E とは結合しなかった (Figure 9C)。この結果は、Aurora-A は CENP-A をリン酸化する間のみ一過性に CENP-A と結合するのに対し、Aurora-B はそのリン酸化を保つために Aurora-A よりも長い間結合し続けることが必要であるという考えを支持するものと考えられた。

7-6 CENP-A がリン酸化されない細胞は分裂期異常を引き起こす

次に私達は、分裂期における CENP-A のリン酸化の意義について検討するために、GFP-tag をつけた野生型 CENP-A および Aurora キナーゼによってリン酸化される 7 番目のセリンをアラニンに置換した非リン酸化型の変異型 CENP-A の安定発現株を HeLa 細胞において樹立した。野生型 CENP-A および非リン酸化型の変異型 CENP-A はどちらも内在性の CENP-A と同様にセントロメア領域に特異的に局在した (Figure 10A)。これらの細胞を CENP-A のセリン 7 に対するリン酸化抗体を用いて染色したところ、非リン酸化型を発現した細胞では CENP-A のリン酸化が見られず、変異型 CENP-A は内在性 CENP-A に対してドミナント・ネガティブに働くと考えられた (Figures 10A and 10B)。これらの細胞の分裂期をタイム・ラプス顕微鏡を用いて経時的に観察した。CENP-A S7A を発現した細胞では、分裂前中期と思われるラウンドアップした状態で分裂期が延長していた (Figure 11A)。それぞれの細胞株において、ひとつひとつの細胞について分裂期の長さを測定したところ、コントロール細胞及び野生型 CENP-A 発現細胞では殆どの細胞が 60 分以内に分裂期を通過したのに対し、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞では、複数クローンにおいて同様に分裂期の長さが著明に延長していた (Figure 11B)。CENP-A のリン酸化には

Aurora-A が必要であるため、Aurora-A のノックダウン細胞でも同様に分裂期の延長が見られるかどうかを検討したところ、コントロール siRNA 細胞では殆どの細胞が 60 分以内に分裂期を通過したのに対し、Aurora-A のノックダウン細胞では同様に分裂期の長さが著明に延長していた(Figure 11C)

次にこの分裂期の延長の原因を検討する為に免疫細胞染色を行った。紡錘系と共に染色したところ、野生型 CENP-A 発現細胞では分裂中期において染色体が赤道面上に綺麗に整列したのに対し、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞では中心体の外側に位置する染色体を有する細胞が観察され、染色体配列に異常が生じていると考えられた(Figures 12A and 12B)。配列異常を来した染色体は紡錘体極の近傍に位置しており、動原体と紡錘体極とが双極性に結合できていないものと考えられた。

細胞には、すべての動原体に紡錘系が正しく結合するまで分裂後期の開始を起こさないようにするためのスピンドル・アセンブリー・チェックポイントが存在する(Shah and Cleveland, 2000; Hoyt, 2001)。このチェックポイントの重要因子であり、紡錘系が結合していない動原体や、結合していてもきちんと張力がかかっていない動原体に存在することが知られている mad2 ・ BubR1 ・ CENP-E の局在を検討したところ、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞内の配列異常を来した染色体の動原体には mad2 ・ BubR1 ・ CENP-E が局在していた(Figure 12C)。CENP-A のリン酸化には Aurora-A が必要であるため、Aurora-A のノックダウン細胞でも同様の異常を来すかどうかを検討したところ、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞と同様に分裂期の延長・染色体配列異常・チェックポイント因子の動原体への局在を認めることが出来た(Figure 12D)。このことより、CENP-A のリン酸化が障害されると、動原体と紡錘系との正しい結合が障害され、スピンドル・アセンブリー・チェックポイントにより分裂期の延長を来すということが明らかになった。言い換えると、CENP-A のリン酸化は、紡錘系と結合するための機能的な動原体の形成に必要であるということが分かった。

7-7 CENP-Aのリン酸化はAurora-Bが分裂期において動原体間に正しく集積するために必要である

Aurora-B は G2 期においてはクロマチン結合蛋白としてクロマチン上に瀰漫性に存在しているが、分裂前期において CENP-A がリン酸化され始めるときに一致してインナーセントロメアと呼ばれる二つの動原体の間に集積し始めることが知られている(Zeitlin et al., 2001b; Cleveland et al., 2003)。また、siRNA を用いた Aurora キナーゼのノックダウンの実験より、Aurora-A による CENP-A のリン酸化の開始がおこらないと、その後の Aurora-B によるリン酸化の維持も障害されるということが今回見いだされている(Figure 9)。これらの結果より、Aurora-B の動原体間への局在には CENP-A のリン酸化が必要なのではないかとこの仮説が考えられた。そこでこの可能性を検討するために、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞における Aurora-B の局在を観察したところ、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞では、Aurora-B は二つの動原体の間のみでなく染色体腕上にも存在していた(Figures 13A and 13B)。細胞染色にてその蛍光強度を測定したところ、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞では染色体腕上の Aurora-B の蛍光強度が明らかに増加しているのと共に、動原体間の Aurora-B の蛍光強度は減少していた(Figure 13D)。これらの結果より、CENP-A のリン酸化が障害された細胞における Aurora-B の局在異常は、染色体腕からの Aurora-B の解離が障害されることにより効率よく動原体間に局在することが出来なくなったためと考えられた。更に Aurora-A のノックダウン細胞において Aurora-B の局在を検討したところ、やはり非リン酸化型 CENP-A 発現細胞と同様に Aurora-B の局在異常が認められ(Figures 13C and 13D)、分裂前期の初期における Aurora-A による CENP-A のリン酸化は、Aurora-B が正確に動原体間に局在するために必要であると考えられた。

これらの結果より、分裂前期の初期において Aurora-A が CENP-A のセリン7をリン酸化すると、そのリン酸化を契機に Aurora-B が動原体間に正常に局在することができるようになり、そうして局在した Aurora-B が分裂前期の後期から分裂中期にかけて CENP-A のリン酸化を維持しているというモデルが考え

られた(Figure 14)。

8 考察

8-1 二つのAuroraキナーゼは共にCENP-Aのセリン7のリン酸化に必要である。

Aurora-A と Aurora-B はその相同性が非常に高いにも関わらず、その局在や基質、役割はそれぞれ異なったものと考えられている。今回の私達の結果は、両キナーゼが同一の基質 (CENP-A) のリン酸化に関与していることを示す、初めてのデータである。これまで、CENP-A は Aurora-B の基質であると考えられてきたが、今回私達は、Aurora-B だけでなく、Aurora-A もまた CENP-A のキナーゼであることを見いだした。この所見を証明する実験的根拠として、以下の4つが挙げられる。(1) Aurora-A は CENP-A と結合し、CENP-A は *in vitro* kinase assay において Aurora-A によりリン酸化され、また効率のよいリン酸化には両者の結合が重要であった。(2) CENP-A のリン酸化が始まる分裂前期において、活性化型 Aurora-A が核内に移行することが観察された。(3) siRNA の実験より、分裂前期における CENP-A のリン酸化には Aurora-A が必須であることが分かった。(4) siRNA により Aurora-A を抑制した細胞と、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞の表現型は酷似しており、双方共に染色体配列の不全を認めた。この様に、Aurora-A は CENP-A のリン酸化酵素であるということが明らかとなった。

一方、今まで Aurora-B は *in vitro* において CENP-A をリン酸化することが報告されていたが、細胞内においてもリン酸化に関与しているかどうかについては検討されていなかった。今回、siRNA により Aurora-B をノックダウンすることにより、Aurora-B は細胞内において、特に prometaphase の CENP-A のリン酸化に必要であることが分かった。つまり、Aurora-A と Aurora-B はともに CENP-A のリン酸化酵素であるということが分かった。

8-2 CENP-Aのリン酸化はAurora-Bの局在を制御する

非リン酸化型 CENP-A 発現細胞および Aurora-A ノックダウン細胞の両者において、Aurora-B は通常の分裂期の局在であるインナーセントロメア領域に限局することなく、染色体腕全体に存在することが観察された。これは、CENP-A

の7番目のセリンのリン酸化が Aurora-B のインナーセントロメア領域への正確な局在に必要であるということを示している。逆に、Aurora-B の分裂期早期におけるインナーセントロメアへの局在は、それ以後に CENP-A のリン酸化を維持するために必要であると考えられた。

では、セントロメアにしか存在しない CENP-A のリン酸化が、どのようなメカニズムによって染色体腕上の Aurora-B の局在を制御することが出来るのであろうか。その答えは依然明確ではないが、一つの可能性として、CENP-A のリン酸化が、セントロメアばかりでなく染色体腕全体の構造に影響を及ぼすということが考えられる。CENP-A のリン酸化が生じる分裂前期は、クロマチンの凝集や、染色体腕の間のコヘージンの染色体からの解離による染色体腕の分離といった、著しい染色体構造変化が生じる時期でもあるため、Aurora-B の局在異常はセントロメアの構造に直接影響されているのではなく、染色体腕の構造変化によって生じているのかもしれない。今回私達は分裂中期の細胞のクロマチン・スプレッドを作成し、蛍光顕微鏡にて染色体の構造変化を観察しようと試みたが、染色体の凝集や染色体腕の分離には、明らかな異常を見いだすには至らなかった。しかし、様々な免疫染色や電子顕微鏡を用いた観察を行うことにより、CENP-A のリン酸化の欠損に伴う染色体腕の微妙な構造変化を将来見いだすことが出来るかもしれない。別の可能性としては、リン酸化 CENP-A を含んだセントロメアが Aurora-B に修飾を行うことによって、その局在を染色体全体からインナーセントロメアのみ制限しているのかもしれない。Aurora-B は分裂前期から分裂中期にかけてインナーセントロメアに存在しているが、この Aurora-B はフォトブリーチングの実験により、静的に存在しているのではなく細胞質内のプールに存在する分子と動的に入れ替わっているということが分かってきている(Murata-Hori and Wang, 2002b)。この turnover モデルは、Aurora-B 側の修飾による局在異常という可能性を支持するものであると思われる。

今回、CENP-A のリン酸化を阻害した際に見られた染色体腕上に残存した Aurora-B がキナーゼ活性を持っているのか、また動原体間に存在している Aurora-B の蛍光強度は若干減少していたがその機能は保たれているのかに関し

での検討はできなかった。最近、Aurora-A のスレオニン 288 に相当する Aurora-B の活性化ループ内のスレオニンのリン酸化が、Aurora-B の活性化の指標となることが分かってきている。この部分に対するリン酸化抗体を用いて、局在異常を来している Aurora-B の活性化状態を検討する必要があると思われる。

8-3 分裂期におけるCENP-Aリン酸化の意義

今回私達は、CENP-A のリン酸化が動原体と紡錘系との結合に必要であることを見いだした。CENP-A のリン酸化が生じる分裂前期は、様々な動原体蛋白が動原体に集まってくる時期と一致している(Jablonski et al., 1998; Hoffman et al., 2001)。CENP-A 蛋白そのものは様々な種において、細胞周期を通してセントロメアに存在する動原体蛋白のリクルートに必須であることが分かっている(Howman et al., 2000; Blower and Karpen, 2001; Oegema et al., 2001; Goshima et al., 2003)。分裂前期におこる CENP-A のリン酸化が、動原体と紡錘系との結合に不可欠な分裂期特異的動原体蛋白の動原体へのリクルートに必須であるという可能性は十分に考えられる。一方、CENP-A のリン酸化は Mad2, BubR1, CENP-E といったスピンドル・アセンブリー・チェックポイント蛋白の動原体への局在には必要ではないことが分かった。実際 CENP-A のリン酸化が障害された細胞では、スピンドル・アセンブリー・チェックポイントによって分裂期が延長していた。CENP-A のセリン 7 のリン酸化依存的に動原体へリクルートされてくる動原体蛋白の同定が、動原体機能の分子背景を検討していくための今後の課題となると思われる。

8-4 Auroraキナーゼと動原体機能

Aurora-B は酵母の Ipl1 と同様に、ヒト細胞において、動原体と紡錘系の張力のかかっていない不適切な結合をキャンセルし、次に正しい結合が生じる機会を作るために必須の役割を担っており(Hauf et al., 2003)、この役割が損なわれると染色体の配列異常が認められる。その為、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞や Aurora-A を欠いた細胞において見られる染色体の配列異常には、Aurora-B

の局在異常に起因するものである可能性は否定できない。しかし、分裂前期において Aurora-A によってなされる CENP-A のリン酸化は、紡錘系との結合が可能となる機能的な動原体の形成に必要であると考えられ、非リン酸化型 CENP-A 発現細胞や Aurora-A を欠いた細胞においては、そもそも紡錘系と動原体の結合が生じなくなっている。このため、動原体と紡錘系との不適切な結合をキャンセルするという Aurora-B の機能が、これらの細胞において保たれているのか障害されているのかについては検討不可能であった。しかし、Aurora-B を欠いた細胞では、不適切ではあるものの紡錘系と動原体の結合は認められていることより(Hauf et al., 2003)、Aurora-A は少なくとも Aurora-B の機能とは独立した、紡錘系との結合能の獲得という動原体の機能に必須であると言えることが出来る。今回、Aurora キナーゼによる動原体機能の制御機構に CENP-A のリン酸化が関与していることが明らかになったが、今後 CENP-A のセリン 7 のリン酸化依存的に動原体へリクルートされてくる動原体蛋白の同定が、この二つの Aurora キナーゼによる動原体機能の制御機構を更に詳細に分子レベルで検討していく為に必須であると考えられ、今後の課題である。

9. 結語

本研究において、ヒト細胞では2つの Aurora キナーゼが、CENP-A のリン酸化を連続的に行っていること、そしてこの CENP-A のリン酸化が紡錘系と結合することが出来る機能的な動原体の形成に必須であるということが分かった。酵母では1つのホモログしか存在しない Aurora キナーゼファミリーが進化の過程でその役割を二つのキナーゼに分離してより詳細な動原体の機能制御を担っていること、Aurora-A が Aurora-B の局在を制御することによって、二つの Aurora キナーゼの時間空間的制御がなされていることは非常に興味深い。この CENP-A のリン酸化が障害されることによって、どの様な分子背景により紡錘体との結合不全が生じるのかは現時点では全く解明されておらず、今後の課題である。

10. 参考文献

- Adams, R.R., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2001). Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol.* 11, 49–54.
- Biggins, S., Severin, F.F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A.A., and Murray, A.W. (1999). The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev.* 13, 532–544.
- Bischoff, J.R., and Plowman, G.D. (1999). The Aurora/Ipl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 9, 454–459.
- Blower, M.D., and Karpen, G.H. (2001). The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nature Cell Biol.* 3, 730–739.
- Chan, C.S., and Botstein, D. (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* 135, 677–691.
- Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263–271.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* 112, 407–421.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* 161, 267–280.
- Earnshaw, W.C., and Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91, 313–321.
- Goshima, G., Kiyomitsu, T., Yoda, K., and Yanagida, M. (2003). Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J. Cell Biol.* 160, 25–39.
- Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van

Meel, J., Rieder, C.L., and Peters, J.M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 161, 281–294.

Hartwell, L. H. and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585-598.

Hoffman, D.B., Pearson, C.G., Yen, T.J., Howell, B.J., and Salmon, E.D. (2001). Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores. *Mol. Biol. Cell* 12, 1995–2009.

Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1148–1153.

Hoyt, M.A. (2001). A new view of the spindle checkpoint. *J. Cell Biol.* 154, 909–911.

Jablonski, S.A., Chan, G.K., Cooke, C.A., Earnshaw, W.C., and Yen, T.J. (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* 107, 386–396.

Kallio, M.J., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J. (2002). Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Curr. Biol.* 12, 900–905.

Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M., and Sen, S. (2001). Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 276, 46219–46224.

Kufer, T.A., Sillje, H.H., Korner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., and Nigg, E.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J. Cell Biol.* 158, 617–623.

Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., and Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* in-press

Murata-Hori, M., and Wang, Y. (2002a). The kinase activity of Aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis. *Curr. Biol.* 12, 894–899.

Murata-Hori, M., and Wang, Y. L. (2002b). Both midzone and astral microtubules are involved in the delivery of cytokinesis signals: insights from the mobility of aurora B. *J. Cell Biol.* 159, 45-53.

Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 21–32.

Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 153, 1209–1226.

Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* 8, 310–318.

Shah, J.V., and Cleveland, D.W. (2000). Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* 103, 997–1000.

Shelby, R.D., Monier, K., Sullivan, K. F. (2000). Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J. Cell Biol.* 151, 1113-1118.

Sullivan, K. F., Hechenberger, M., and Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol.* 127, 581-592.

Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J., and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* 108, 317–329.

Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., and Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation.

Oncogene 19, 4906–4916.

Yoda, K., Ando, S., Morishita, S., Houmura, K., Hashimoto, K., Takeyasu, K., and Okazaki, T. (2000). Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7266-7271.

Zeitlin, S.G., Barber, C.M., Allis, C.D., Sullivan, K.F., and Sullivan, K. (2001a). Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M. *J. Cell Sci.* 114, 653–661.

Zeitlin, S.G., Shelby, R.D., and Sullivan, K.F. (2001b). CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* 155, 1147–1157.

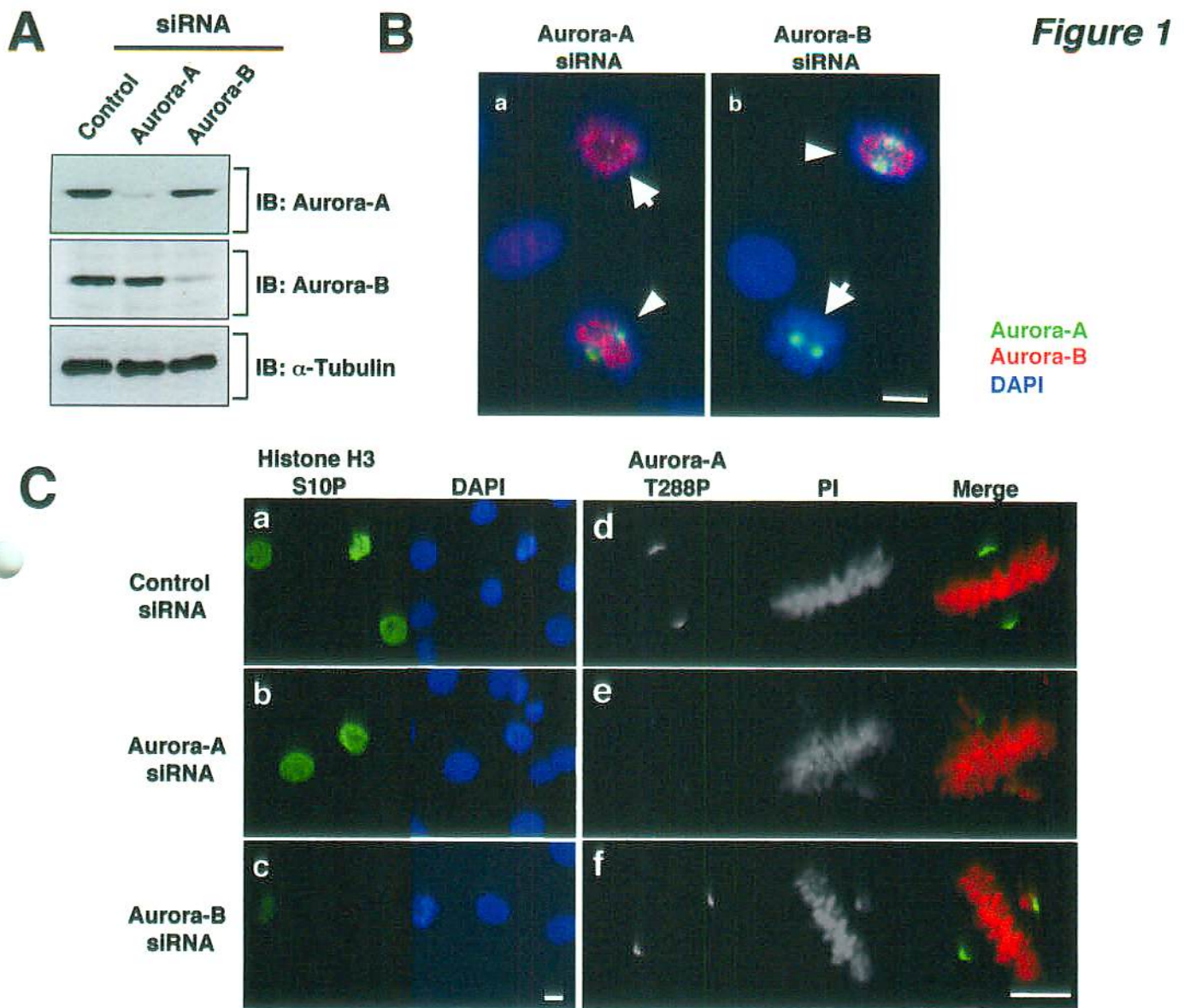


Figure 1. Depletion of Aurora-A and Aurora-B by siRNA

(A) Depletion of Aurora-A and Aurora-B by RNAi in HeLa cells. Cells were transfected with control, Aurora-A, or Aurora-B siRNAs in the interval between the two thymidine blocks of the double thymidine block protocol for cell synchronization. Cell lysates were prepared 7.5 h after release of the cells from the G_1 -S boundary and were subjected to immunoblot analysis (IB) with antibodies to Aurora-A, to Aurora-B, or to α -tubulin (control), as indicated.

(B) Effect of depletion of one Aurora kinase on the expression of the other. HeLa cells transfected with Aurora-A (panel a) or Aurora-B (panel b) siRNAs as in (A) were fixed 10 h after release from the G_1 -S boundary and subjected both to staining with DAPI (blue) and to indirect immunofluorescence analysis with antibodies to Aurora-A (FITC, green) and to Aurora-B (Texas Red, red). Arrows indicate cells in which the abundance of the targeted protein was substantially reduced. Arrowheads indicate cells in which the siRNA was ineffective (6.5 and 3.6% of cells for cultures transfected with Aurora-A or Aurora-B siRNAs, respectively). Bar, 10 μ m.

(C) Independent activation of Aurora-A and Aurora-B. HeLa cells transfected with control (panels a and d), Aurora-A (panels b and e), or Aurora-B (panels c and f) siRNAs were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies specific for histone H3 phosphorylated on Ser¹⁰ or for Aurora-A phosphorylated on Thr²⁸⁸ (FITC), and their DNA was visualized with DAPI or with propidium iodide (PI), as indicated. Bars, 10 μ m.

Figure 2

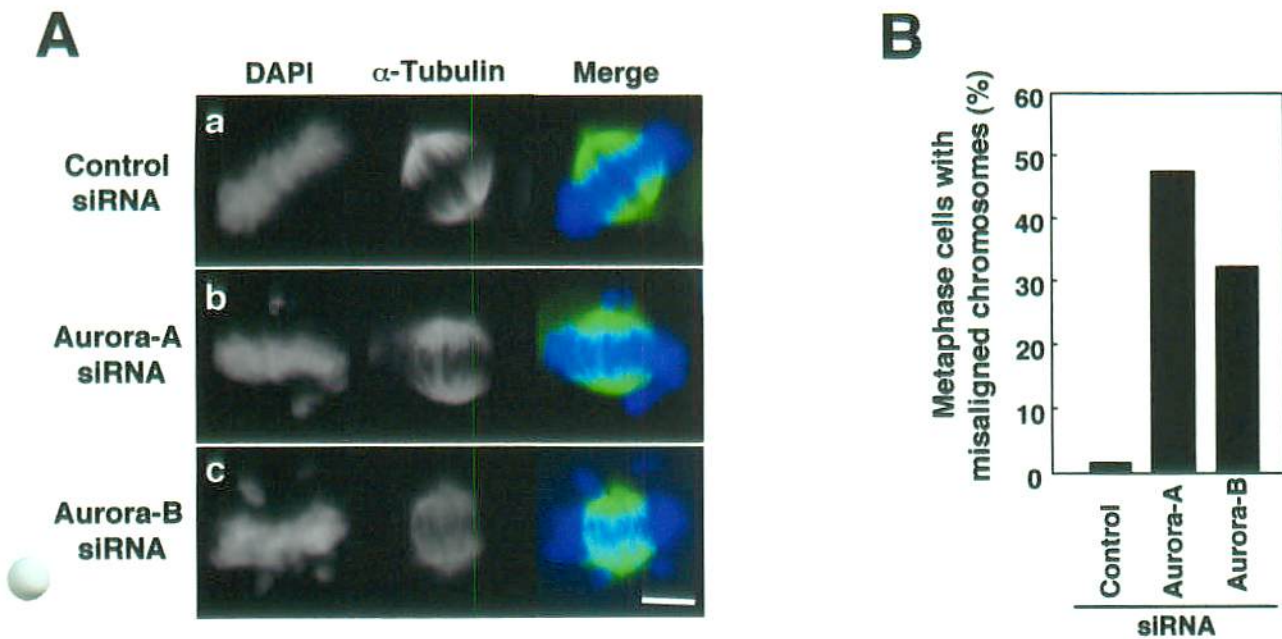


Figure 2. Roles of Aurora-A and Aurora-B in Chromosome Alignment

(A) Defect in chromosome alignment in cells depleted of Aurora-A or of Aurora-B. HeLa cells transfected with control (panels a), Aurora-A (panels b), or Aurora-B (panels c) siRNAs as in (Figure 1A) were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies to α -tubulin (FITC, green) and to staining with DAPI (blue) 8.5 h after release from the G₁-S boundary. Representative images of metaphase cells with aligned chromosomes (panels a) or with misaligned chromosomes (panels b and c) are shown. Bar, 10 μ m.

(B) Incidence of chromosome misalignment in HeLa cell cultures transfected with control, Aurora-A, or Aurora-B siRNAs. About 100 metaphase cells were scored for chromosome misalignment. Cells in metaphase were identified on the basis of a bipolar spindle configuration and of the presence of most condensed chromosomes at the metaphase plate.

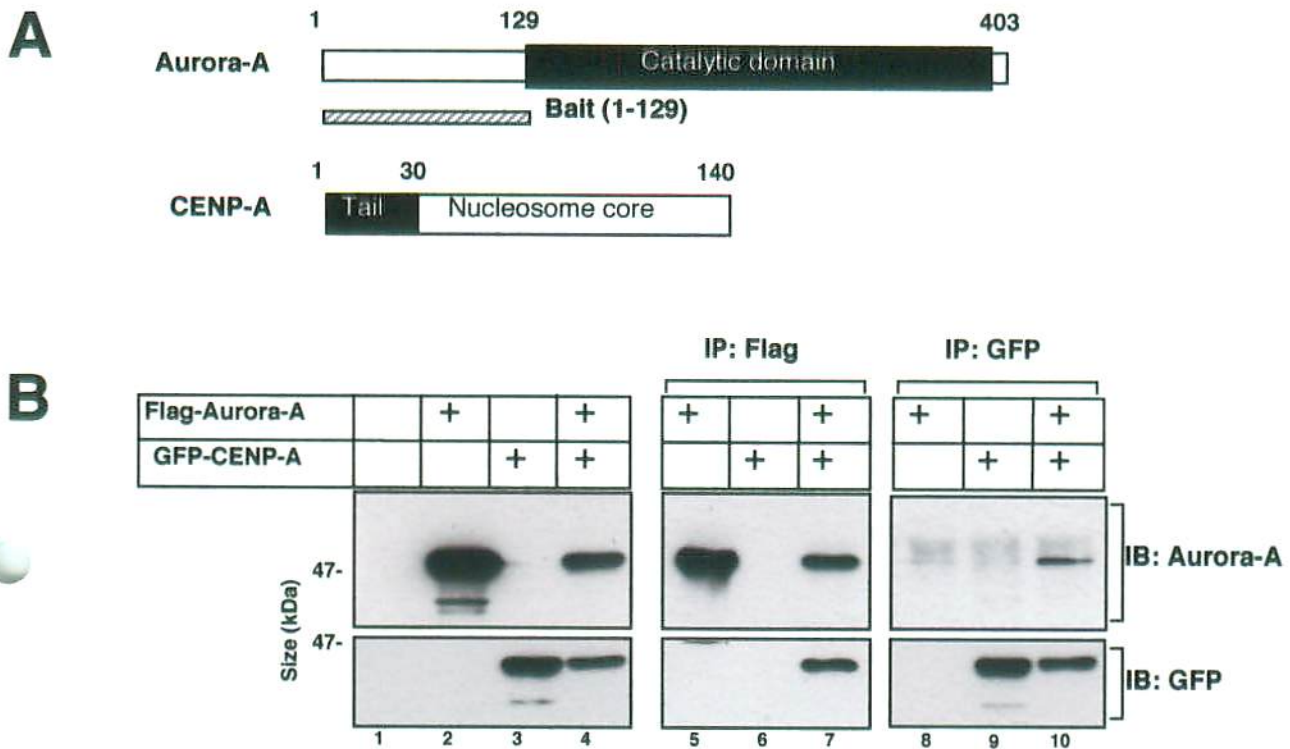


Figure 3. Identification of CENP-A as an Aurora-A–Binding Protein

(A) Domain organization of human Aurora-A and human CENP-A. The hatched bar below the Aurora-A structure represents the portion of the protein used as the bait for a two-hybrid screen.

(B) Interaction of CENP-A and Aurora-A in HEK293T cells. Lysates of cells expressing Flag–Aurora-A, GFP–CENP-A, or both proteins were subjected to immunoblot analysis with antibodies to Aurora-A or to GFP, as indicated (lanes 1–4). The same cell lysates were also subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Flag (lanes 5–7) or with anti-GFP (lanes 8–10), and the resulting precipitates were subjected to immunoblot analysis with antibodies to Aurora-A or to GFP.

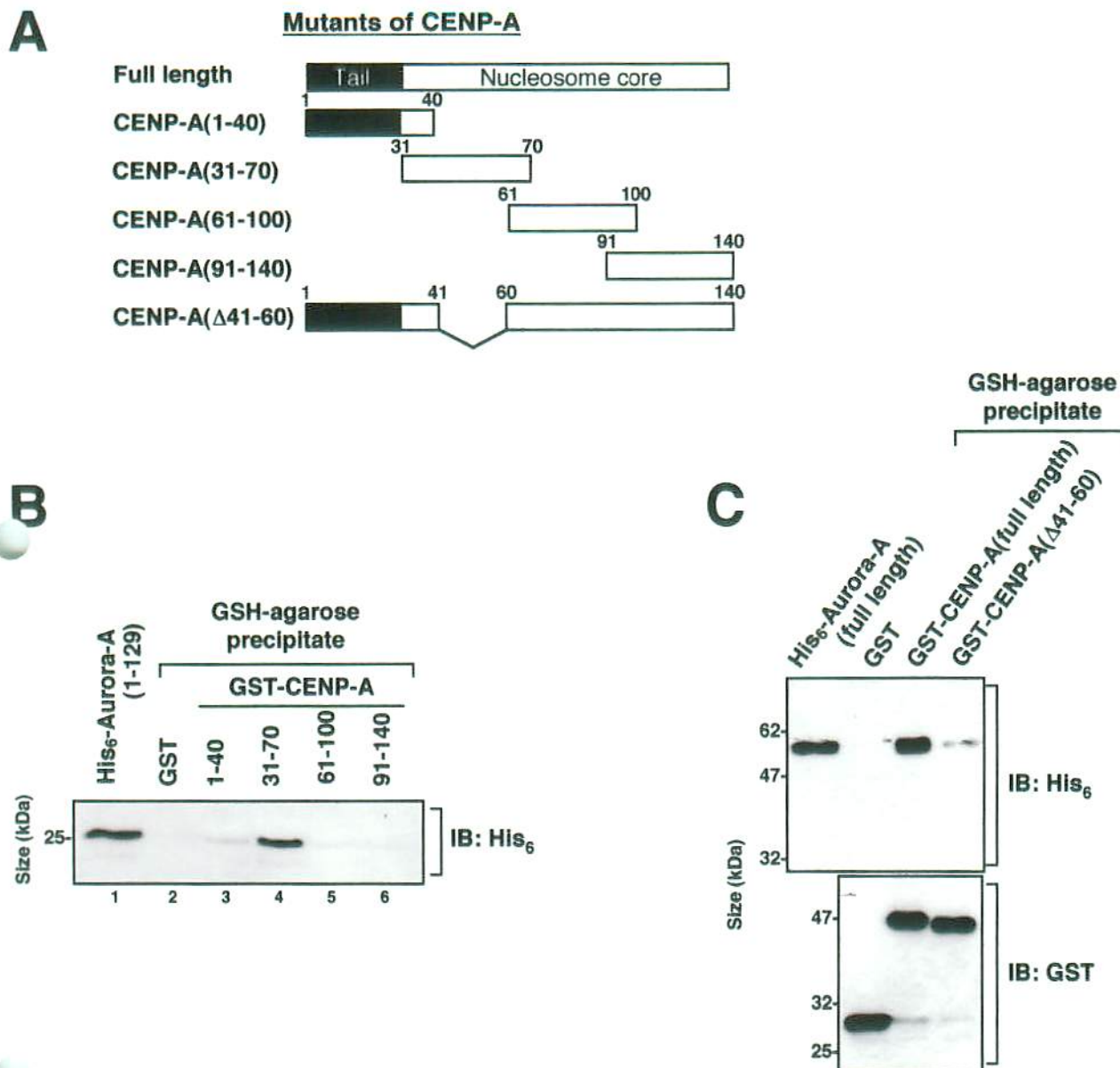


Figure 4. Binding Domain of CENP-A to Aurora-A

(A) Deletion mutants of human CENP-A.

(B) In vitro binding assay with a recombinant fragment of Aurora-A and CENP-A deletion mutants. Purified GST-CENP-A fusion proteins (400 nM), or GST as a control, were incubated with purified His₆-tagged Aurora-A(1-129) (400 nM) and then precipitated with glutathione-agarose beads. Bead-bound proteins were subjected to immunoblot analysis with antibodies to the His₆ tag. The input of His₆-Aurora-A(1-129) into the binding reaction is shown in lane 1.

(C) Requirement for amino acids 41 to 60 of CENP-A in the binding of CENP-A to Aurora-A. GST-CENP-A(full length) or GST-CENP-A(Δ41-60) purified from baculovirus-infected Sf9 cells was incubated with purified His₆-tagged full-length Aurora-A and then precipitated with glutathione-agarose beads. Bead-bound proteins were subjected to immunoblot analysis with antibodies to the His₆ tag or to GST.

Figure 6

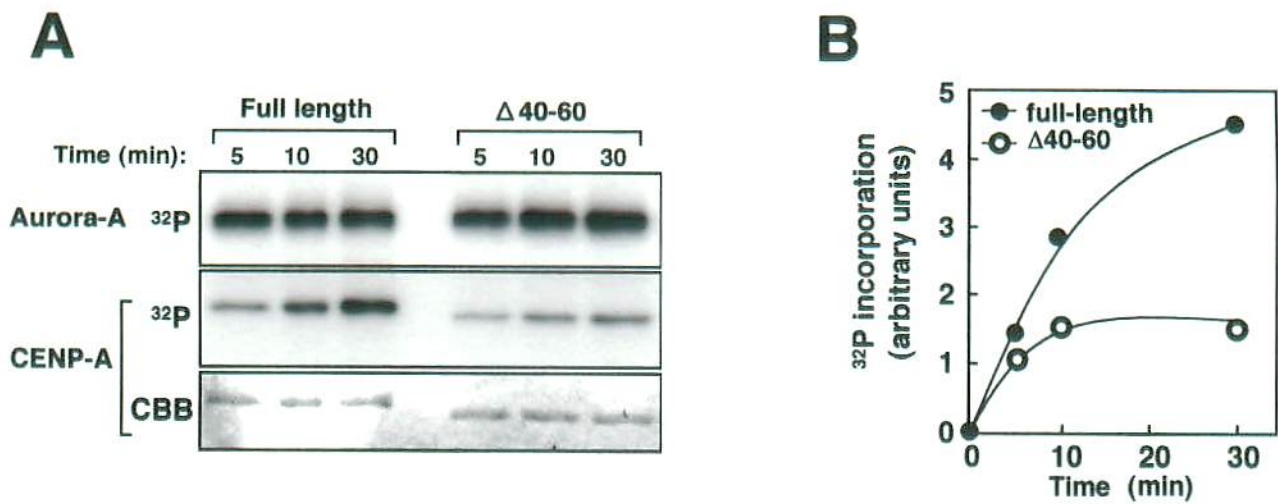


Figure 6. Effect of the Interaction of CENP-A with Aurora-A on CENP-A phosphorylation (A) Phosphorylation of a binding-incompetent mutant of CENP-A by Aurora-A. Purified GST-CENP-A(full length) or GST-CENP-A(Δ 41-60) was incubated for the indicated times with purified His₆-tagged wild-type Aurora-A in the presence of [γ -³²P]ATP. The reaction mixtures were then analyzed as in (A). (B) The radioactivity associated with the phosphorylated GST-CENP-A proteins in (E) was quantified by densitometric scanning.

Figure 7

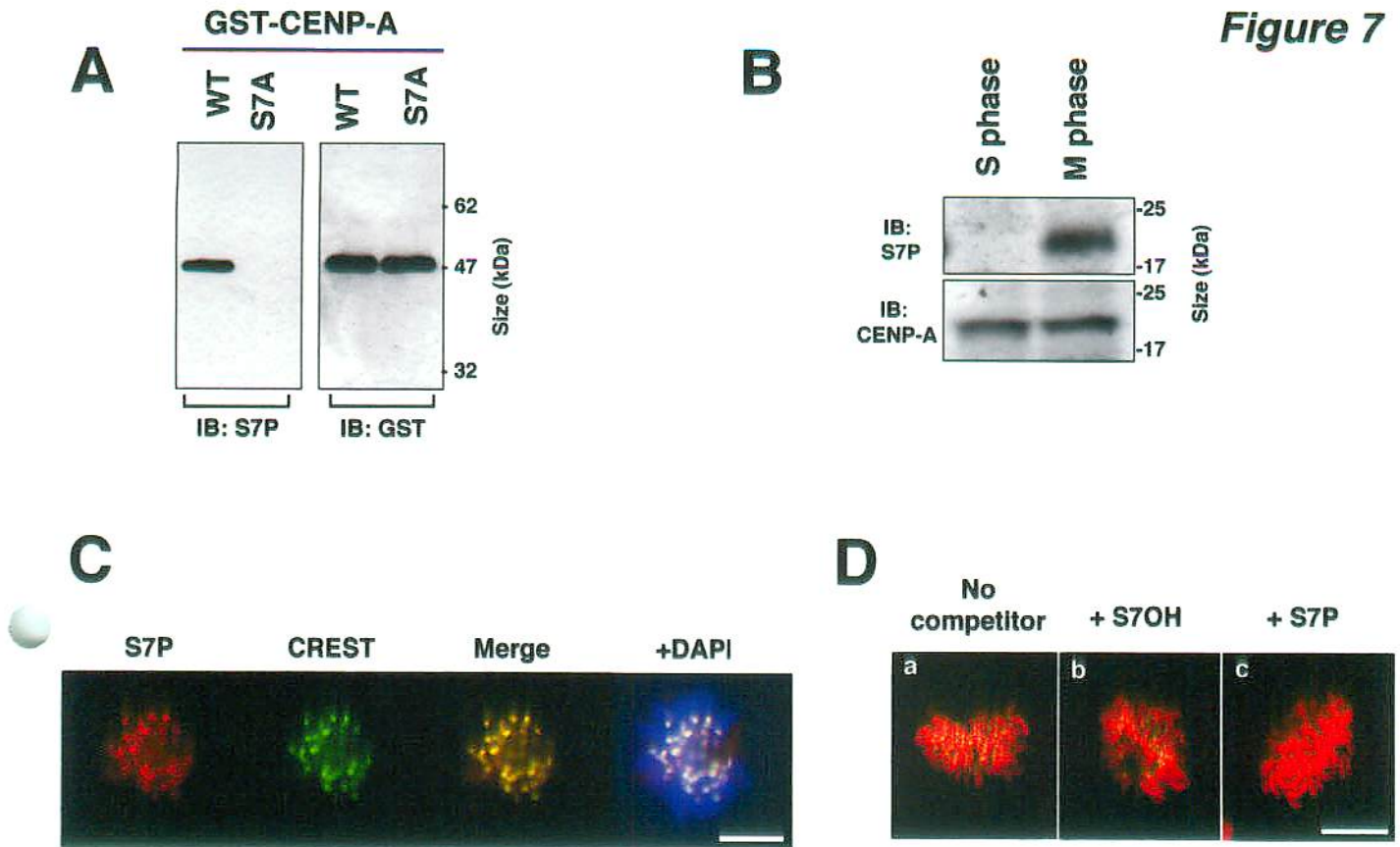


Figure 7. Specificity of S7P antibodies

(A) Specificity of S7P antibodies for CENP-A phosphorylated on Ser⁷. GST fusion proteins containing wild-type CENP-A or the S7A mutant were incubated with His₆-tagged Aurora-A in the presence of 10 μM ATP for 30 min. The reaction mixtures were then subjected to immunoblot analysis with the S7P antibodies or with anti-GST, as indicated.

(B) Detection of endogenous CENP-A with the S7P antibodies. Lysates of HeLa cells in S or M phase were subjected to immunoblot analysis with the S7P antibodies or with a mouse monoclonal antibody to CENP-A, which detects both phosphorylated and nonphosphorylated forms of the protein.

(C) The S7P antibodies recognize kinetochores. HeLa cells were subjected to immunofluorescence analysis with the S7P antibodies (Rhodamine, red) and with antiserum to CREST (FITC, green). DNA was visualized with DAPI (blue). Bar, 10 μm.

(D) Effects of preincubation of the S7P antibodies with the S7P peptide antigen or the S7OH peptide on the pattern of immunostaining. The S7P antibodies were preincubated for 30 min either with the S7P peptide antigen [MGPRRRS(PO₃H₂)RKPEAP] (panel c) or the corresponding nonphosphorylated peptide S7OH (panel b), each at a concentration of 10 μg/ml, or without competing peptide (panel a). The antibodies were then used to stain HeLa cells (FITC, green). DNA was stained with propidium iodide (red). Bar, 10 μm.

Figure 8

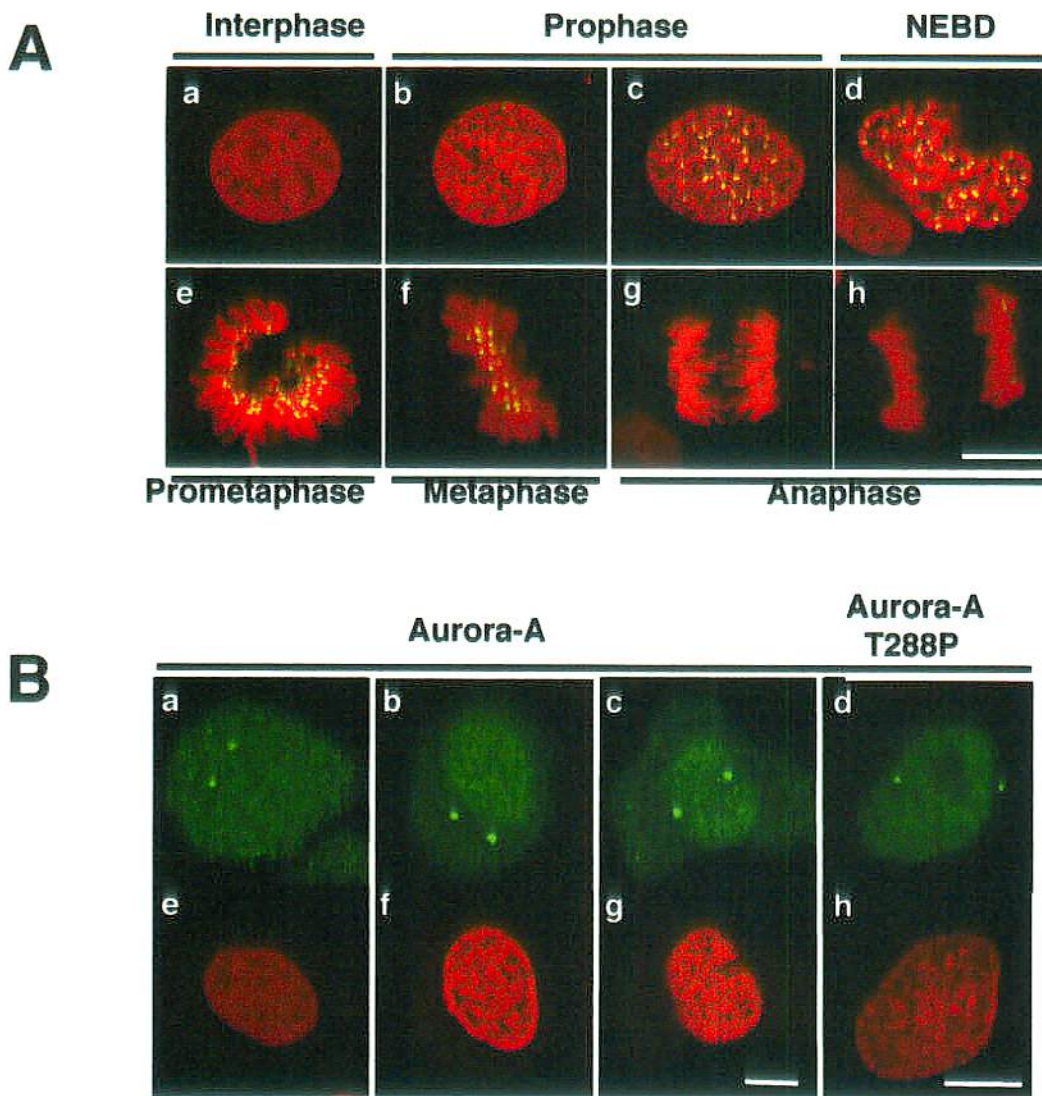


Figure 8. CENP-A Phosphorylation on Ser⁷ During Early Mitosis

(A) Distribution of Ser⁷-phosphorylated CENP-A during the cell cycle. Exponentially growing HeLa cells were subjected to staining with propidium iodide (red) and to immunofluorescence analysis with S7P antibodies that had been preincubated with the S7OH peptide (FITC, green). Representative cells in interphase (panel a), in early prophase (panel b), in late prophase (panel c), during nuclear envelope breakdown (NEBD) (panel d), in prometaphase (panel e), in metaphase (panel f), and in anaphase (panels g and h) are shown. Bar, 10 μ m.

(B) Nuclear localization of Aurora-A during prophase. Exponentially growing HeLa cells were subjected to immunofluorescence staining with antibodies to Aurora-A, and representative prophase cells are shown in a temporal order of chromatin condensation (FITC, green) (panels a-c) or with antibodies specific for Aurora-A phosphorylated on Thr²⁸⁸ (FITC, green) (panel d). DNA was visualized with propidium iodide (red) (panels e-h). Bars, 10 μ m.

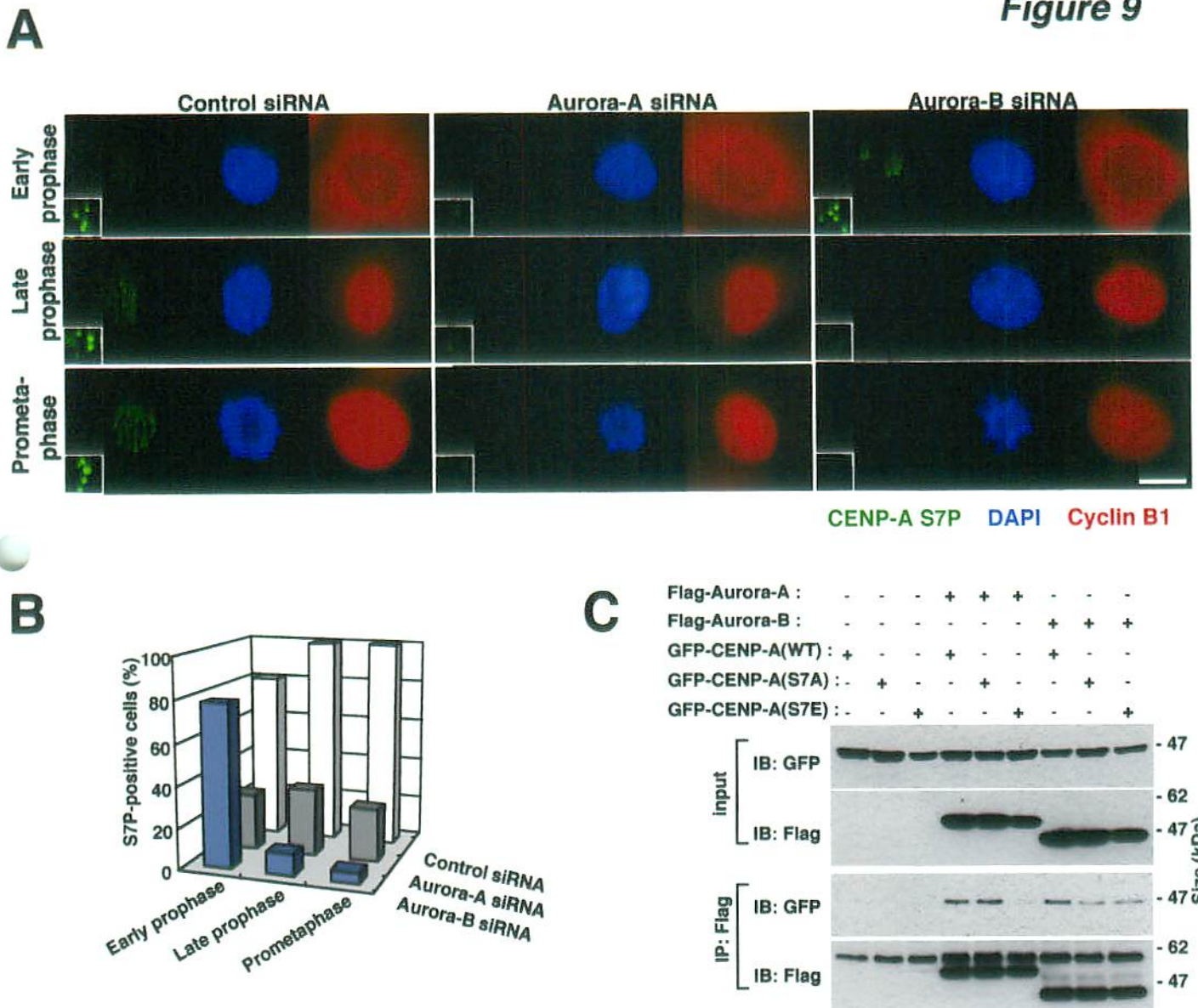


Figure 9. Requirement for Two Aurora Kinases in the Phosphorylation of CENP-A on Ser⁷

(A) Immunofluorescence analysis of CENP-A phosphorylation in Aurora-A or Aurora-B downregulated cells. Synchronized HeLa cells were transfected with siRNAs as in Figure 1A and subjected to immunofluorescence analysis 8.5 h after the release from G₁-S block. The cells were stained with the S7P antibodies (FITC, green), with anti-cyclin B1 (Texas Red), and with DAPI (blue). They were staged on the basis of chromosome condensation and cyclin B1 localization. Representative images of cells in each of these three phases are shown. Bar, 10 μ m. Insets present higher-magnification images of S7P staining.

(B) Effect of Aurora-A or Aurora-B deficiency on the percentage of cells positive for S7P staining in early mitosis. Cells treated as in (A) were stained with the S7P antibodies as well as with either anti-Aurora-A or anti-Aurora-B to exclude those in which RNAi was not effective. Fifty to 100 cells in each of the three phases of the cell cycle examined, classified based on chromatin appearance, were then scored for S7P staining.

(C) Effect of Modification of Ser⁷ of CENP-A on the Interaction Between CENP-A and Aurora-A or Aurora-B HEK293T cells were transfected with vectors for the indicated combinations of Flag-tagged Aurora-A or Aurora-B and GFP-CENP-A (wild type or S7A or S7E mutants). Cell lysates were subjected to immunoblot analysis with antibodies to GFP or to Flag (input). They were also subjected to immunoprecipitation with antibodies to Flag, and the resulting precipitates were subjected to immunoblot analysis with antibodies to GFP or to Flag, as indicated.

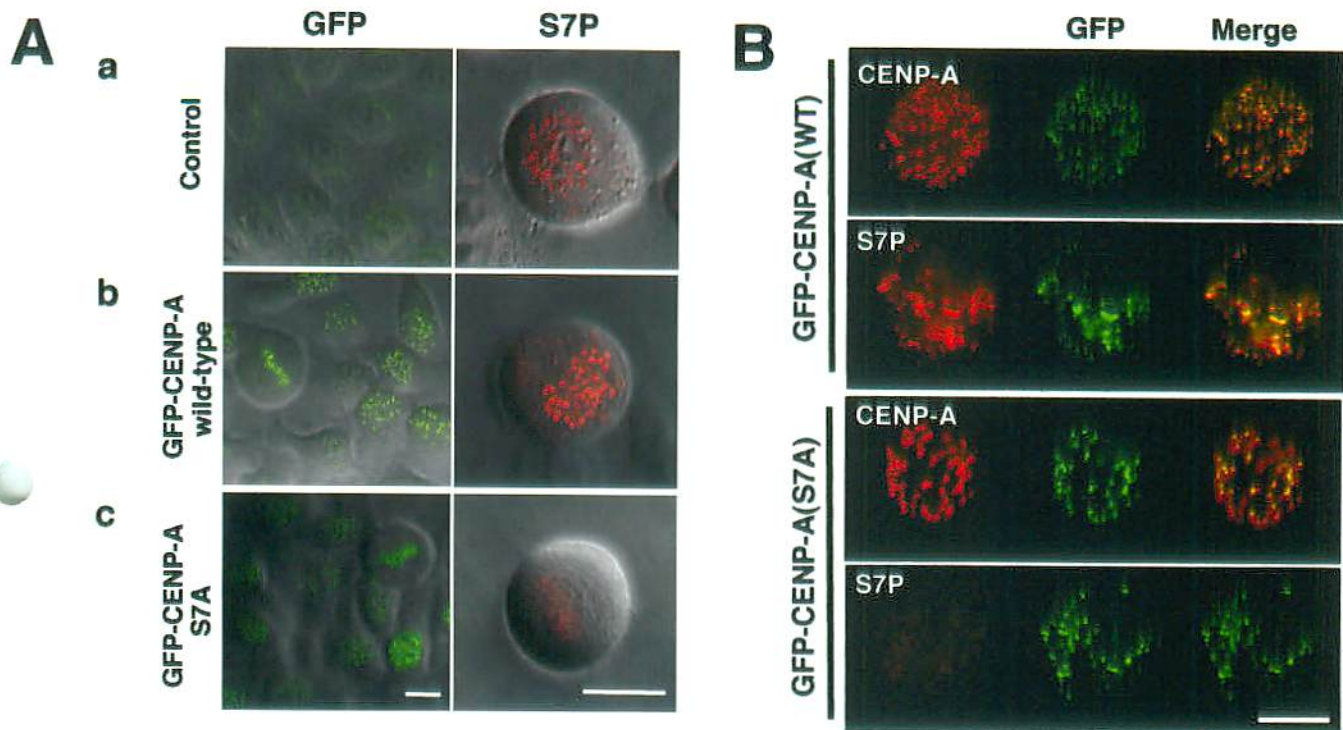


Figure 10. Establishment of cells stably expressing GFP-CENP-A

(A) Establishment of HeLa cells stably expressing GFP-CENP-A. HeLa cells were transfected with a plasmid encoding GFP-tagged wild-type CENP-A (panels b) or the mutant CENP-A(S7A) (panels c), or with the corresponding empty vector (panels a). Left panels show GFP fluorescence (green) merged with DIC images. Right panels show indirect immunofluorescence staining with the S7P antibodies (Rhodamine, red). Bars, 10 μ m.

(B) Inhibition of the phosphorylation of endogenous CENP-A on Ser⁷ by expression of CENP-A(S7A). HeLa cells stably expressing GFP-tagged wild-type CENP-A or CENP-A(S7A) were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies to CENP-A or with the S7P antibodies (Texas Red, red). GFP fluorescence is shown in green. Bar, 10 μ m.

Figure 11

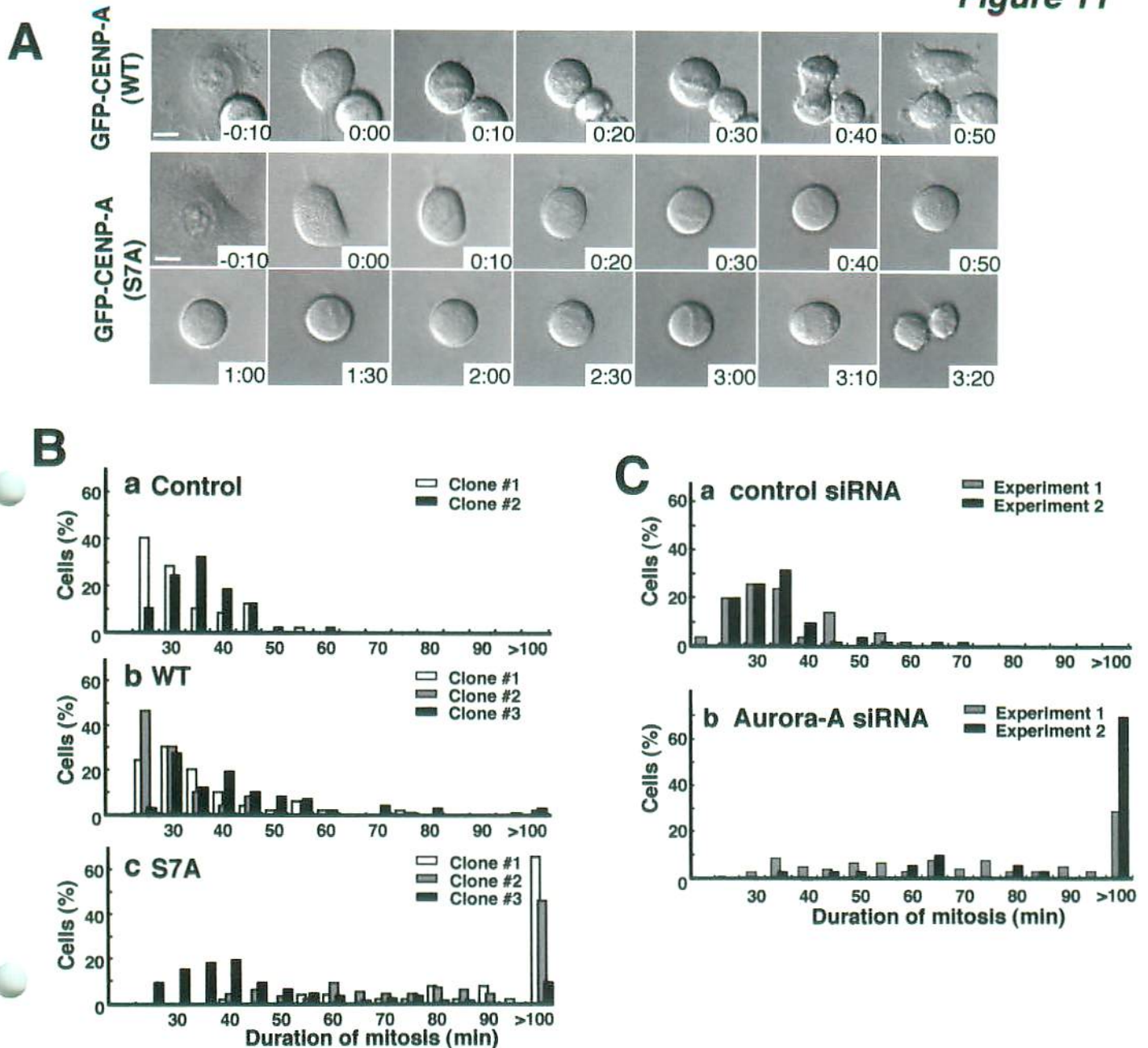


Figure 11. Prolonged mitosis in cells expressing CENP-A(S7A)

(A) Time-lapse DIC microscopy of mitotic cells expressing GFP-tagged wild-type CENP-A or CENP-A(S7A). Times are indicated in hours:minutes, with the time of nuclear envelope breakdown set to zero. Bars, 10 μ m.

(B) Prolonged mitosis in cells expressing CENP-A(S7A). The duration of mitosis from breakdown of the nuclear envelope (onset of prometaphase) to cytokinesis was measured by time-lapse microscopy. Two, three, and three independent clones of cells stably transfected with empty vector (panel a) or with the vectors for GFP-tagged wild-type CENP-A (panel b) or GFP-CENP-A(S7A) (panel c), respectively, were analyzed. About 100 cells were scored for each experiment.

(C) Prolonged mitosis in cells depleted of Aurora-A. Cells transfected with control (panel a) or Aurora-A (panel b) siRNAs as in Figure 1A were analyzed for mitotic duration as in (D). Data are shown for two independent experiments.

Figure 12

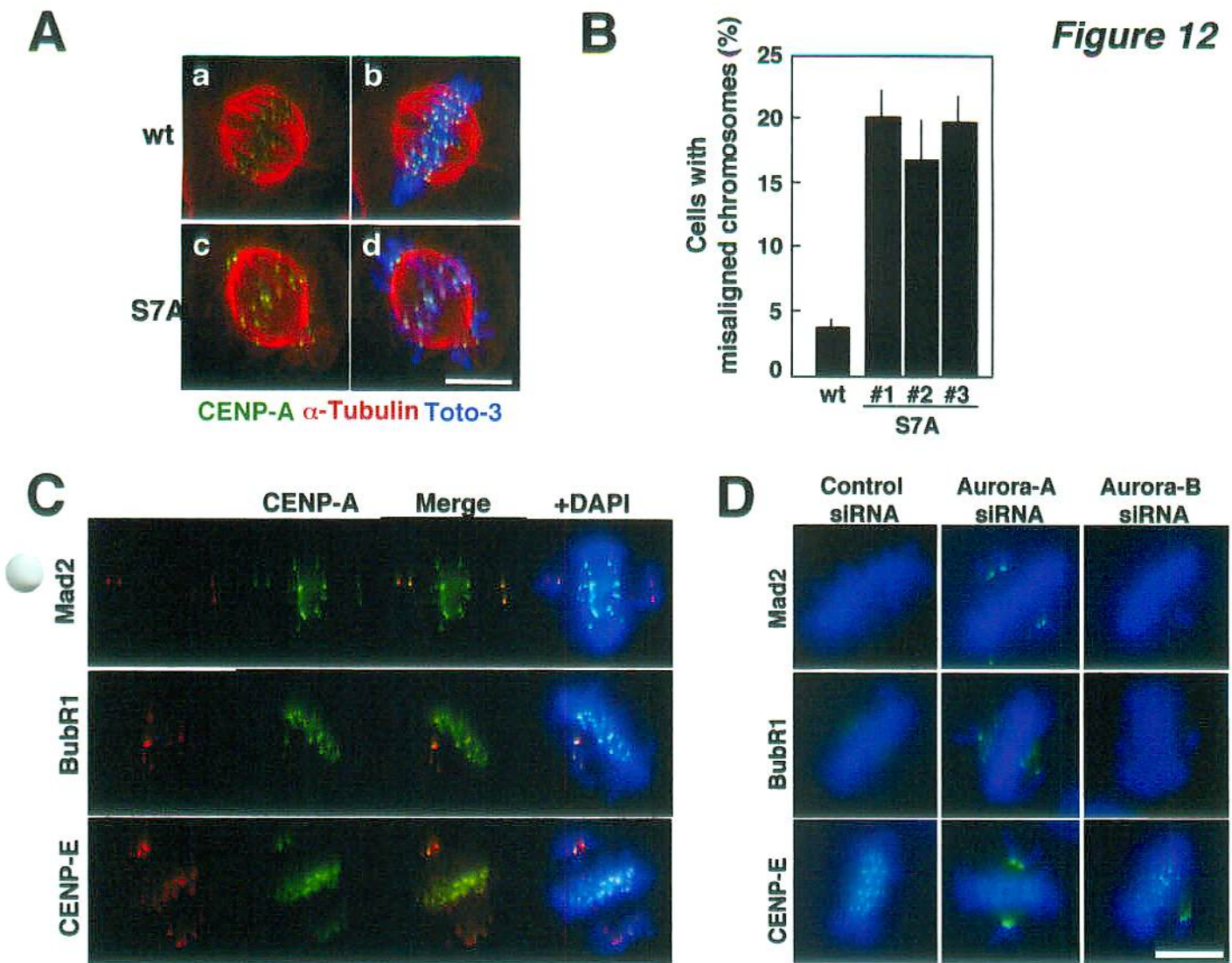


Figure 12. Defective Kinetochore Function in Cells in Which CENP-A Phosphorylation Is Blocked

(A) Defect in chromosome alignment in cells expressing CENP-A(S7A). HeLa cells stably expressing GFP-tagged wild-type CENP-A (panels a and b) or CENP-A(S7A) (panels c and d) were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies to α -tubulin (Texas Red). GFP fluorescence is shown in green. DNA was also visualized with Toto-3 iodide (blue) (panels b and d). Bar, 10 μ m.

(B) Incidence of chromosome misalignment. About 100 metaphase cells expressing GFP-tagged wild-type CENP-A or CENP-A(S7A) were scored for chromosome misalignment. Three independent clones of cells expressing the S7A mutant were analyzed. Data are means \pm SD of values from three different experiments.

(C) Association of checkpoint proteins with the kinetochores of misaligned chromosomes. Cells expressing GFP-CENP-A(S7A) were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies to Mad2 (upper panels), to BubR1 (middle panels), or to CENP-E (lower panels) and with Rhodamine-labeled secondary antibodies (red). GFP fluorescence is shown in green and DNA was visualized with DAPI (blue). Bar, 10 μ m.

(D) Recruitment of checkpoint proteins to the kinetochores of misaligned chromosomes in cells depleted of Aurora-A or Aurora-B. HeLa cells were transfected with control, Aurora-A, or Aurora-B siRNAs and subjected to immunofluorescence analysis with antibodies to Mad2, to BubR1, or to CENP-E (FITC, green), as indicated. DNA was visualized with DAPI (blue). Bar, 10 μ m.

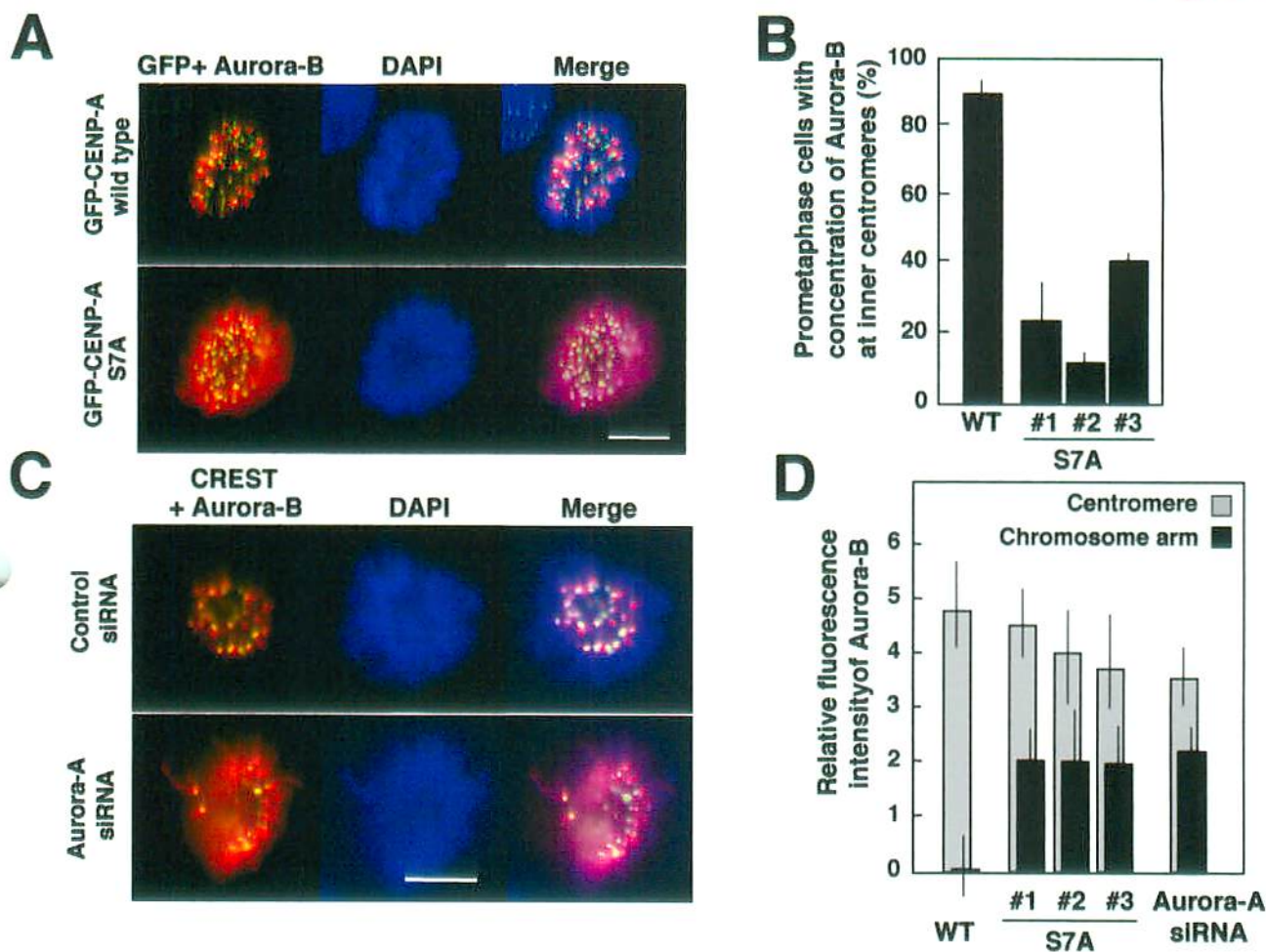


Figure 13. Phosphorylation of CENP-A on Ser⁷ Is Required for Concentration of Aurora-B at Inner Centromeres

(A) Failure of Aurora-B to concentrate at inner centromeres in cells expressing CENP-A(S7A). HeLa cells stably expressing GFP-tagged wild-type CENP-A (upper panels) or CENP-A(S7A) (lower panels) were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies to Aurora-B (Texas Red, red). DNA was visualized with DAPI (blue). Representative images of prometaphase cells are shown. Bar, 10 μ m. Similar results were obtained with cells that stably express a Myc-CENP-A(S7A) (data not shown).

(B) Quantitation of cells showing concentration of Aurora-B at the inner centromere. Prometaphase cells (~100) expressing GFP-tagged wild-type CENP-A or CENP-A(S7A) (three different lines) were scored for the concentration of Aurora-B at the inner centromere as detected in (A). Data are means \pm SD of values from three independent experiments.

(C) Effect of Aurora-A reduction on Aurora-B distribution in prometaphase cells. HeLa cells transfected with control (upper panels) or Aurora-A (lower panels) siRNAs were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies to Aurora-B (Texas Red, red) and antiserum to CREST (FITC, green). DNA was visualized with DAPI (blue). Bar, 10 μ m.

(D) Fluorescence intensity of Aurora-B immunoreactivity at centromeres and on chromosome arms in prometaphase HeLa cells either expressing GFP-tagged wild-type CENP-A or CENP-A(S7A) or depleted of Aurora-A by RNAi. The centromere was defined as region between the paired dot-like signals of CENP-A or CREST antigen. The distal portions of chromosome arms were indicated by DAPI staining. All images were collected with the same imaging settings. The intensities of Aurora-B fluorescence were measured and were corrected for background fluorescence. Data are means \pm SD of values from 50 cells examined.

Figure 14

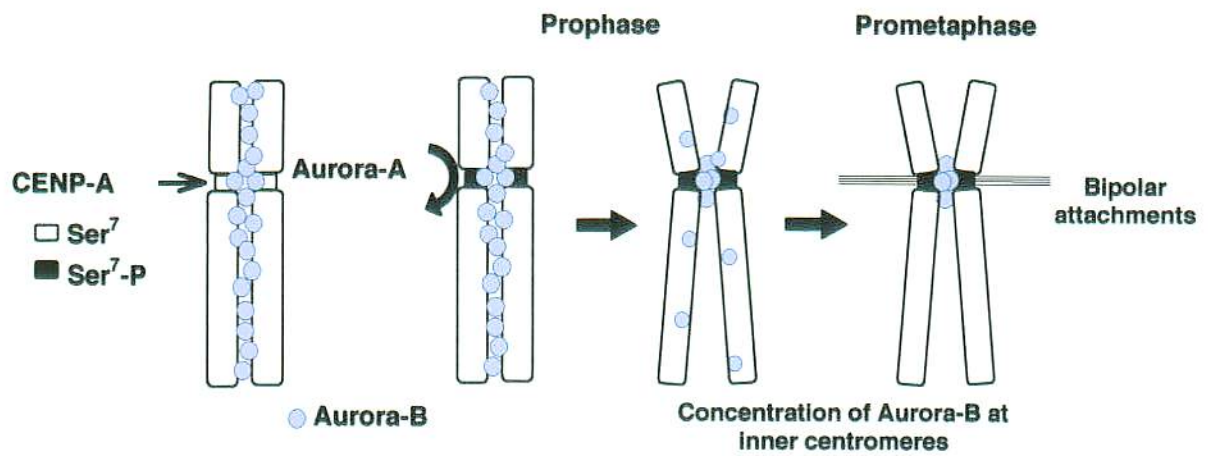


Figure 14. Model for the regulation of CENP-A phosphorylation on Ser⁷ by Aurora-A and Aurora-B and its role in mitosis.