



ある ECT2 は、細胞質分裂時に中央体において RhoA と共局在し、RhoA を強く活性化する。しかし、逆に RhoA を不活性化するメカニズムは明らかになっていなかった。セリンスレオニン型のキナーゼである Aurora B も、細胞質分裂時に中央体に局在することが知られており、変異体を用いた解析から細胞質分裂に関与していることが明らかになっていたが、その分子メカニズムは不明であった。

マウス白血病細胞株である M1 細胞は、インターロイキン 6 刺激によりマクロファージ様細胞に分化する細胞である。MgcRacGAP は、この細胞にアンチセンスで発現させたときにインターロイキン 6 による分化誘導に抵抗性を示すことを指標に、当研究室においてクローニングされた。また、ヒト白血病細胞株である HL60 細胞にセンスで発現すると、マクロファージ様細胞への分化が観察された。その後の解析から、MgcRacGAP は間期にはおもに核内、細胞質分裂時には中央体に局在すること、および、GAP 活性を持たない MgcRacGAP の変異体を細胞に導入すると、細胞質分裂が阻害され、多核化してしまう等の結果より、この分子の GAP 活性が細胞質分裂に必須であることが明らかとなった。哺乳類の細胞において、中央体に局在することが知られている GAP は MgcRacGAP だけであるが、大腸菌で精製した MgcRacGAP は、Rhoファミリーのメンバーである Rac1, Cdc42 に対しては活性を持つが、RhoA に対しては活性を持たず、細胞質分裂時の RhoA 不活性化の機構は不明であった。

RhoA 不活性化の機構を考えるうえで、MgcRacGAP に RhoGAP 活性がある方が理解しやすい。しかし、大腸菌で精製した MgcRacGAP は RhoGAP 活性を持たない。そこで、MgcRacGAP は中央体において何らかの修飾を受け、それにより RhoA に対する GAP 活性が誘導されるのではないかと考えた。ヒト子宮頸部癌細胞株である HeLa 細胞から中央体を精製し、ウェスタンブロットしたところ、通常 MgcRacGAP の分子量より高い位置にバンドが検出され、脱リン酸化酵素を作用させると通常的位置に戻った。また、細胞培養液中に放射性のリンを加えて培養し、中央体の MgcRacGAP を免疫沈降したところ、放射活性のある MgcRacGAP が検出されたため、リン酸化によりバンドがシフト

していることが明らかとなった。

MgcRacGAP が中央体においてリン酸化されていることから、中央体に局在することが知られている Aurora B に注目した。まず手始めに、Aurora B と MgcRacGAP が複合体を形成するかを HeLa 細胞を用いた免疫沈降法で調べた。同期した HeLa 細胞では、細胞質分裂を行っている細胞が最も多くなるときに一致して、Aurora B と MgcRacGAP は複合体を形成した。また、精製タンパク質同士も結合することから、この 2 者の結合は直接的であることが示された。さらに、免疫染色法を用いて調べたところ、細胞質分裂の最終段階で 2 者の共局在が観察された。

Aurora B と MgcRacGAP が直接結合することは明らかになったが、では実際に Aurora B が MgcRacGAP をリン酸化するのかどうかの解析を行った。試験管内で、放射性リンの取り込み実験を行うと、確かに Aurora B は MgcRacGAP をリン酸化していた。MgcRacGAP はおもに 4 つの領域からなっており、そのうちの 3 つの領域が Aurora B によりリン酸化を受けていた。GAP 活性をもつ領域（GAP 領域）もリン酸化されており、このことから、リン酸化により GAP 活性に何らかの変化があるのではないかと考えた。そこで、試験管内で Aurora B によりリン酸化を受けた GAP 領域と、リン酸化を受けていない GAP 領域で RhoA に対する活性を測定した。すると、リン酸化により RhoA に対する GAP 活性が認められた。

リン酸化アミノ酸解析により、Aurora B によりリン酸化を受けるのはほぼセリン残基のみであることが明らかとなった。GAP 領域には 7 カ所セリン残基があるが、どのセリン残基がリン酸化されているかを試験管内で調べたところ、387 番目 (S387) と 410 番目 (S410) のリン酸化が認められた。次に、この 2 カ所のセリン残基を、リン酸化セリンを模倣するアスパラギン酸残基に置換した変異体をそれぞれ (S387D, S410D) 作製し、GAP 活性を測定すると、S410D では野生型と変わらないのに対し、S387D においては RhoA に対する GAP 活性が認められた。しかし、逆に Rac1, Cdc42 に対する GAP 活性は完全に消失していた。

次に、S387 に注目し、このセリンのリン酸化を特異的に認識する抗リン酸化抗体を作製した。この抗体で HeLa 細胞を免疫染色したところ、中央体において強い染色像が確認された。リン酸化能を失った Aurora B の不活性化型変異体を細胞に導入し、この抗体を用いて免疫染色した結果、中央体での染色は観察されなかった。よって、MgcRacGAP の中央体における S387 のリン酸化において中心的な役割を果たすのは Aurora B であると考えられる。また、MgcRacGAP と RhoA, Rac1, Cdc42 の細胞分裂時における共局在を調べたところ、分裂中期および後期では Rac1 との共局在が観察された。細胞質分裂時には、RhoA と中央体においてリング状の構造をとり、おそらく収縮環上で共局在していることが確認されたが、Rac1, Cdc42 との局在は異なっていた。これらの結果より、中央体において Aurora B によりリン酸化を受けた MgcRacGAP が RhoA に対する GAP となるということが、試験管内でも、生体内においても確からしいと考えられた。

最後に、S387 にリン酸化を受けないようアラニン残基に置換した変異体 S387A を細胞に導入したところ、著明な細胞質分裂の阻害が観察された。一方、S387D では細胞質分裂阻害は確認できなかった。このことは、S387 がリン酸化されること、つまり MgcRacGAP が RhoA に対する GAP 活性を持つことが、細胞質分裂に必須であることを強く示唆している。