The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	リン酸化したClathrin heavy chain (CHC) は扁平上皮癌の増殖に重要な働きを担う
Author(s)	薮野, 佑介
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69488
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

リン酸化した Clathrin heavy chain (CHC) は扁平上皮癌の増殖に重要な働きを担う

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻　顎顔面口腔外科

（口腔外科学第一教室）

薮野佑介

緒言

GAK (cyclin G associated Kinase) は Cyclin G と結合するセリン/スレオニンキナーゼである。GAK は分子量が約 170kDa のタンパク質で、N 末端にセリン/スレオニンキナーゼドメインを持ち、C 末端には Auxilin との相同領域を持っている (1) 。Auxilin は脳細胞特異的に発現し、受容体依存性エンドサイトーシスに関与しているタンパク質であり、Hsc70 タンパク質をクラスリン被覆小胞に集積してきてクラスリンを解離させることが明らかになっている (2) 。Auxilin は脳でしか発現していないが、この受容体依存性エンドサイトーシスは生体内のどの部分においても見られる現象である。そこで脳以外では別の似たタンパクが行っているのではないかと考えられており、そのひとつの候補として Auxilin と相同領域を持つ GAK がその役割を担っているのではないかと報告されている (3) 。実際、ラットの肝臓、牛の精巣において Auxilin ではなく GAK の発現を認め、また Hsc70 によるクラスリンの解離を認めている。このことは脳細胞以外においては GAK が Auxilin の代わりに機能していることを示唆している。

一方、癌やパーキンソン病などの疾患においても GAK の関連が示唆されている (4,5,6) 。また、複数の癌細胞株で GAK の過剰発現が認められ、特に骨肉腫に関する研究では、癌細胞の増殖や予後との関係性が報告されている (5) 。さらに前立腺癌に

おいて、悪性度の指標の 1 つであるグリソンスコアが高い患者検体において、GAK が高発現していると報告されており、癌の悪性度と GAK の正の相関関係が注目されている (6) 。したがって、GAK が将来的に癌治療において有効な分子標的薬となる可能性が期待される。

GAK はクラスリン被覆小胞の構成因子である Clathrin heavy chain (CHC) と結合し、細胞質と核で異なる結合様式を有することが、見出された (7) 。CHC は前述の受容体依存性エンドサイトーシスに関わるタンパク質としてよく知られており (8) 、3 つの CHC 分子が C 末端で非共有結合し、それらに Clathrin light chain (CLC) が強固に結合して小胞を形成する (9-12) 。そして近年、膜輸送以外の機能として有糸分裂時に紡錘体形成に重要な役割を果たしていることが報告された (13) 。さらに、CHC 分子は 3 次元電子顕微鏡で、微小管同士が結合し、ネットワークを形成することが報告されている (14) 。しかし、GAK をノックダウンすると CHC の極性が変化することに加え（7)、染色体周辺の微小管伸長が著しく抑制されることから (15) 、GAK は CHC と協同し有糸分裂時の紡錘体形成を調整することが示唆されている。また、GAK は、CHC と結合するが、エンドサイトーシスのみを調製するわけではなく (16) 、分裂時に中心体の成熟や染色体の集合に関与している (7) 。そして、GAK の減少により、中心体の不安定性を引き起こし、染色体の構造異常が起こり、中期で停止することが報告されている (7,15) 。これらの表現型は CHC 発現が減少した細胞ではさらに

顕著であった (17) 。実際、GAK は様々な癌細胞で修飾、過剰発現しており (18) 、これらの結果は細胞周期において GAK の制御が細胞増殖の調節に重要であることを示唆するが、分子機構については未知のままである。

Polo-like kinase 1 (PLK1)は、有糸分裂の開始、修正、完成に関与する中心体に発現するキナーゼである。その働きは、中心体の成熟、紡錘体の集合、微小管と動原体の結合において重要な役割を担い、ゲノムの安定に関与している (19,20,21) 。多くの PLK1 の基質は DNA 複製や中心体の制御、G2/M 期移行、動原体の原動力、紡錘体の集合のチェックポイント、姉妹染色体結合、分裂の終了、細胞質分裂など細胞周期進行の様々な面で関与している (22,23) 。PLK1 もまたアポトーシスやチェックポイントを含めた DNA 損傷反応を調整し(23,24) 、PLK1 の異所発現で、染色体の異数性や有糸分裂の欠損し、腫瘍形成が起こることから、PLK1 の発現は強く調整されていることが報告されている (22) 。実際、PLK1 は様々なヒトの癌で過剰発現しており、予後との相関が報告されている (25,26) 。そのため、PLK1 キナーゼ活性を阻害することが、癌治療に応用されることが期待されている (27) 。

PLK1 はその分子機構として中心体において Kizuna（Kiz）の T379 をリン酸化し、リン酸化した Kiz は紡錘体の柱の維持に不可欠である (28) 。

本研究では *In vitro* において GAK が CHC の T606 をリン酸化し、リン酸化した CHC (CHC-pT606) が細胞や腫瘍の発育に必要であることを示した。また、蛍光免疫染色分析にて CHC-pT606 シグナルが間期において核および中心体で、局在したが、非リン酸化 CHC はほとんどが細胞質に局在しており。M 期においては、中心体の CHC-pT606 シグナル星状体の周囲で非リン酸化 CHC と共局在を認めず、紡錘体で強く発現していることを見出した。また、siRNA を用いて GAK をノックダウンさせると、中期で細胞分裂の停止を起こし、CHC-pT606 の異常な局在を認め、免疫沈降にて Kiz と GAK、CHC、PLK1 との関連を示した。このことから、M 期にて、GAK、CHC-pT606、PLK1、Kiz は複合体を形成し、中心体で共局在をし、細胞増殖に重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。

さらに、当科にて舌扁平上皮癌と診断された切除検体を用い、本研究で作製した抗体で組織免疫染色を行い、扁平上皮癌の新規腫瘍マーカーとしての有用性を検討した。

材料と方法

<u>抗体</u>

抗体は以下のものを使用した。

モノクロナール抗体 ： GAK9-13 (野島らにより作成され、提供された) ,γ-tubulin (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA),α-tubulin (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA),

PLK1 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA), Clathrin Heavy Chain (BD, New Jersey, USA), Ki67 (DAKO, Glostrup, Denmark), Cyclin B1 (Santa Cruz Biotechnology,Texas, USA)

ポリクロナール抗体：CHC-pT606(Gene script, New Jersey, USA に依頼した)、Kizuna-pT379 (Gene script, New Jersey, USA に依頼した)、GAK-Y412 (野島らにより作成され、提供された)

以上の 1 次抗体の他に、WB における 2 次抗体として Anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling, Massachusetts, USA) または Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody (Cell signaling, Massachusetts, USA) を使用した。また、ローディングコントロールとして、GAPDH-direcT (MBL, Nagoya, JAPAN) と α-tubulin を使用した。蛍光免疫染色においては、2 次抗体として、Alexa Flour488,594 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) を使用した。化学免疫染色においては Anti-mouse IgG

biotinylated(DAKO, Glostrup, Denmark) 、Anti-rabbit IgG(biotinylated(DAKO, Glostrup, Denmark)を使用した。

GST 融合タンパク質の精製

pGEX6p(+AscⅠ)vector に GST-CHC および CHC 変異体をコードする遺伝子配列(GeneScript で合成)をサブクローニング(AscⅠ/NotⅠ)した。このプラスミドをコンピテントセルの BL2/RIL 株に遺伝子導入を行い、LB 寒天培地上にコロニーを得た。前培養としてアンピシリン(終濃度 50μg/ml)を含む 3ml の LB 液体培地に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。本培養として、アンピシリンを含む LB 培地 200ml に植菌し、37℃で OD 値が 0.5~0.8 に至るまで振とう培養を行った。氷上で菌液を十分に冷やした後、IPTG(終濃度 0.1mM)を添加し、20℃で 20 時間培養を行うことで GST 融合タンパクの発現を誘導した。Sonication Buffer として、PBS(-)に終濃度 1 mM NaF、1mM Na_3VO_4、1mM Benzamidine、100μg/ml PMSF、1μg/mg Aprotinin、1μg/mg leupeptin、1μg/mg pepstatin A、1% Triton X-100 を加え、遠心分離で得た菌体を懸濁した。超音波処理(ソニケーション)により菌体を粉砕し、遠心後の上清に 50 % Glutation Sepharose 4B in beads(アマシャムファルマシア社, Uppsala, Konungariket Sverige)を加え、4℃で一晩転倒混和した。セファロースを回収後、還元型グルタチオ

ン (nacalai tesque, Kyoto, JAPAN)で GST 融合タンパク質を解離させ、溶出を行った。オープンチップカラム(SARSTEDT, Nordrhein-Westfalen, Germany) にセファロースを充填後、PBS(-)で Wash し、Elution Buffer で溶出した。Elution Buffer 1(50mM Tris-HCl (pH8.0) , 10mM reduced glutathione) をカラムに 500μl 加え 10 分間静置した。この溶出液を〔E1〕として回収した。同様に Elution Buffer 1 を 500μl 加え溶出を 2 回行い、〔E2〕〔E3〕として順に回収した。Elution Buffer 2(150mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM reduced glutathione)、Elution Buffer 3(150mM Tris-HCl (pH8.0) , 50mM reduced glutathione、0.5M NaCl)も同様に 3 回ずつ溶出液を回収し、それぞれ〔E4〕〔E5〕〔E6〕〔E7〕〔E8〕〔E9〕とした。また、ここまでの作業で溶出が認められないタンパク質には、Elution Buffer 4(225mM Tris-HCl (pH8.8), 50mM reduced glutathione、0.5M NaCl)での溶出を試みた。溶出した GST 融合タンパク質にグリセロール(終濃度 50%)を加え、一部を 4x sample buffer に加え、7 分間ボイルを行い、泳動サンプルを作製した。SDS-PAGE 後、ゲルを CBB 染色液に浸透させ 15 分間染色を行い、脱色液をゲルに一晩浸透させ脱色させ、BSA 濃度で精製されたタンパク質量を見積もった。

In vitro kinase assay

In vitro kinase assay(Hot)は GST 融合 CHC 断片タンパク質を基質とし、GST 融合 GAK をキナーゼとして行った。Kinase buffer は、10 mM HEPES pH 7.5、50 mM NaCl、10 mM $MgCl_2$、5 mM $MnCl_2$、1 mM DTT、5 mM NaF、50 mM β-glycerophosphate を組成とした。5 μM ATP に 10 μCi(γ-^{32}P)ATP(PerkinElmer、NEG502A)を加え、キナーゼと基質を 30℃で 30 分間反応させた後、4x sample buffer に加え、7 分間ボイルを行った。ボイルしたサンプルはプレキャストゲル(nacalai tesque, Kyoto, JAPAN)を用いて電気泳動し(30 mA / gel,50 min)、Simply Blue™Safe Stain(Invitrogen, Thermo Fisher, Massachusetts, USA)で 30 分染色した後、純水で脱色した。^{32}P の検出は Bass Mac および X 線フィルムを用いて行った。

細胞培養

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa S3、ヒト舌癌細胞株 SAS は、10 % Fetal Bovine Surum 含有 Dulbcco's modified Eagle's medium (DMEM)(Sigma-Aldrich , St.Louis, USA)で培養した。培養培地には、Penicilin- Stereptomycin Mixed Solution (Nacalai tasque, Kyoto, JAPAN) に終濃度 1 %となるように添加した。HeLa S3/ Tet_Advanced 細胞には 0.8 mg/ml G418 二硫酸塩溶液 (Nacalai tesque, Kyoto, JAPAN) 、0.2 mg/μg の

Hygromycin B (Clontech) を添加した培地を使用した。培養には、ディッシュ (IWAKI, Tokyo, JAPAN) を使用し、37 °C, 5% CO_2 条件下で行った。細胞の継代には、PBS (-) 溶液 (DS ファーマ, OSAKA, JAPAN)、0.02 %-EDTA solution (nacalai tesque, Kyoto, JAPAN)、0.25 %-Trypsin Solution (nacalai tesque, Kyoto, JAPAN) を使用した。細胞懸濁液を遠心分離する場合は、室温、1000 rpm, 5 min の条件で遠心機を使用した。細胞の保存は保存液として CELLBANKER® 2 (日本全薬工業 Fukushima, JAPAN) とセラムチューブ (住友ベークライト, Tokyo, JAPAN) を使用して-80 °C で保存した。

細胞への形質導入

細胞を 6cm ディッシュにまき、60 % コンフルエントの状態でリポフェクション法による形質導入を行った。導入する plasmid を 4 μg 相当、Opti-MEM (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 500 μl、Plus Reagent (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 16 μl を混合調製し、室温で 15 分間反応させた。その後、別途調製した Lipofectamine (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 24μl、Opti-MEM500μl 混合液との混合液を調整し、さらに 15 分間反応させた。形質導入させる細胞は、PBS (-)、Opti-MEM で洗浄し、4 mL Opti-MEM を加え、Mixture を滴下した後で 37 °C、5 % CO_2 インキュベータ

ーで培養を行った。培養 3 時間後、20 % FBS を含む DMEM を等量加えた。リポフェクション 24 時間後に 10% FBS を含む培養培地に交換し、その後の実験を行った。

HeLa S3 Tet-on 誘導性安定発現細胞株の樹立

pTRET3-6Myc vector は 6Myc タグ (BamHI-HindIII-ClaI-6Myc-AscI-EcoRV-NotI-SalI) を含んだマルチクローニングサイトを pTRE-Tight Vector (Clontech, California, USA) の BamHI and SalI サイトに挿入して設計した。HeLa S3/Tet-On 細胞に CHC または空ベクターを含む pTRET-6Myc プラスミドと Linear Hygromycin Marker (Clontech, California, USA) を Lipofectamine と PLUS Reagent を用いて導入した。プラスミドが導入された細胞を限外希釈と Hygromycin (0.2 mg/ml) を含む培地で培養することで選択、単離した。安定発現細胞株を終濃度 1 μg/ml の doxycycline 有無の培地での発現チェックを行うことによって樹立した。

フローサイトメトリー

解析に用いる細胞のディッシュの培地を 15 ml チューブ に回収し、PBS (-) で洗浄した後、Trypsin-EDTA 処理によって細胞を剥離させ、遠心して洗浄したあと、そのペレットを 300 μl の PBS (-) で懸濁した。そこに、700 μl の氷冷 100 % エタノール

を添加して転倒混和し、一晩以上 -20 °C で固定した (終濃度 70 %)。PBS (-) でエタノールを洗浄して除いた後、490 µl の PBS (-) で懸濁して 10 µl の 10 mg/ml RNase を添加した。30 分間室温で静置したあと、25 µl の PI (ヨウ化プロピジウム)、(SIGMA,Kanagawa, JAPAN) を加えて、遮光下でさらに 10 分間反応させた。ナイロンメッシュに通した後、DNA 量や細胞の大きさを FACS Calibur (BD, New Jersey, USA) で測定、 CellQuest software (BD, New Jersey, USA) を用いて解析を行った。各 2000 個の細胞で 3 回ずつ実験を行った。

増殖曲線測定

ディッシュの培地を吸引し、PBS (-) で洗浄した後、Trypsin-EDTA 処理によって細胞を剥離させ、15 ml チューブに移し、遠心して回収した。上清吸引後、5 ml の液体培地を加え、懸濁した。懸濁した液体培地 10 µl とトリパンブルー10 µl と混和し、セルカウント用のプレートに 10 µl 混和液を挿入し、The Countess™ (Thermo Fisher, Massachusetts, USA)にプレートを挿入し、細胞数を測定した。6 well plate に 2.0×10^{5} ずつ細胞を加えて、37℃で培養を行った。細胞が定着した時点を day 0 とし、day 1 から day 4 まで Trypsin-EDTA 処理を行った後、細胞数を測定した。

マウス皮下腫瘍モデル実験

ヌードマウス (BALB/c-nu/nu, SLC) にソムノペンチル (共立製薬, Tokyo, JAPAN) を生理食塩水 (大塚製薬, Tokyo, JAPAN) で 10 倍希釈し、30 ゲージの針 (TERUMO, Tokyo, JAPAN)、1 ml の注射用シリンジ (TERUMO, Tokyo, JAPAN) を用い、腹腔内投与を行った。麻酔が十分に奏功しているのを確認したのち、マウスの皮下に 細胞数が 5.0×10^{6} cells /50 μl となるように調製を行った DMEM を 50 μl 投与を 27 ゲージの注射針 (TERUMO, Tokyo, JAPAN)、1 ml の注射用シリンジ (TERUMO, Tokyo, JAPAN) を使用した。接種 1 日後に生存していることを確認し、2 日目から doxycycline ((80 μg/g ×マウスの体重約 20 g）分を生理食塩水で希釈、計 100 μl) を週 2 回腹腔内投与した。また、doxycycline 投与時に腫瘍径(長径×短径×厚み)を測定した。

siRNA の細胞導入

細胞を 6cm ディシュ、6-well plate にまき、30 % confluent の状態でリポフェクション法による形質導入を行った。Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher, Massachusetts, USA) 10 μl (6-well plate では 5 μM)と Opti-MEM 500μl (6-well plate では 250μM)と混合調製し、室温で 5 分反応させた。5 分後、別途調製した 20 μM の siRNA を 10 μl

(6-well plate では 5 μM)、Opti-MEM 混合液との Mixture を調整し、さらに 20 分間反応させた。siRNA を導入させる細胞は、PBS (-)、Opti-MEM で洗浄し、4 mL Opti-MEM(6-well plate では 2 ml)を加え、Mixture を滴下した後で 37 °C、5 % CO_2 インキュベーターで培養を行った。培養 6 時間後、培地交換を行い、48 時間後に固定や回収を行った。

細胞の溶解

ディッシュの培地を吸引し、PBS (-) で洗浄した後、Trypsin-EDTA 処理によって細胞を剥離させ、遠心して洗浄して回収した。沈殿させた細胞を TNE250 Lysis buffer (10 mM Tris HCl pH8.0、250 mM NaCl、0.25 % Nonidet P-40、1 mM EDTA、20 μM Benzamidine) + inhibitor (1mM PMSF、1 μg/mg Aprotinin、10 μg/mg leupeptin、1 μg/mg pepstatin A、1 mM NaF、1 mM Na_3VO_4、10 mM β-glycerophosphate、1mM DTT、100ng/ml Okadaic acid) を添加し、Buffer で細胞をピペッティングした後、4℃で 30 分間転倒混和させ、細胞抽出液を得た後、4℃、15000rpm 30 分間遠心し、上清を回収した。上清は終濃度 20%になるように Cold Glycerol と混合させ、4℃で 30 分間転倒混和した。この細胞抽出液のタンパク濃度は Bradford 法により定量を行い、決定した。細胞抽出液はすべて 4x sample buffer (0.4 M Tris-HCl pH 6.8、8 % SDS

（Sodium dodecyl sulfate）、20 % glycerol、10 % β-mercaptoethanol、0.2 % bromophenol blue) を加え、7 分間ボイルを行った。

ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE には 8%、10 %あるいは 15 %アクリルアミドゲルを使用した。SDS-PAGE のゲルは、40%アクリルアミド/ビス混合液〔37.5:1〕(nacalai tesque, Kyoto, JAPAN)、1.5M Tris-HCl(pH8.8)、1 M Tris-HCl(pH6.8)、10% SDS、10% ペルオキソ二硫酸アンモニウム (APS : ammonium persulfate) 、10% TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) を混合することで、適切な濃度のものを作製した。調製したサンプルをゲルにアプライし、電気泳動後 (95 min,40 mA/枚) 、セミドライ式のブロッティング装置によって PVDF メンブレン (Milipore, USA, Immobilon-P, 0.45 μm) に転写した。ブロッキングと抗体反応は TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.05 % Tween 20) + 5 % Skim milk もしくは 5 % BSA を使用した。ブロッキングは室温で 1 時間、1 次抗体は室温で 3 時間、4℃で一晩反応させた。2 次抗体は室温で 1 時間半反応させた。メンブレンの洗浄には TBST を使用した。発光には Western Lighting Plus-ECL (PerkinElmer Life Science, Massachusetts, USA) と Western

Lighting ECL-Pro (PerkinElmer Life Science, Massachusetts, USA) を使用し、X 線フィルムに感光した。

抗体のクオリティチェック

非リン酸化ペプチド、リン酸化ペプチドを共に滅菌水に溶解し、10 ng、100 ng、500ng 相当を Immobion membrane 上にスポットした。このメンブレンをウエスタンブロッティングのブロッキング以降のプロトコールに従い、抗体反応に用いて、シグナルの検出を行った。また、免疫染色の前に抗体の 5 倍量の非リン酸化ペプチド、リン酸化ペプチドを抗体とそれぞれ混和させ、室温に 1 時間静置させたのち、免疫染色のプロトコールに乗っ取って抗体反応に用いて、発色させた。

免疫沈降

タンパク濃度が 2 mg/ml となるように細胞抽出液を Binding Buffer (TNE250+inhibitor) で希釈した。Binding Buffer で予備洗浄した Protein G slurry beads を 50% ProteinG slurry beads/TNE250 or 50% Protein A/TNE250 となるように調整した。細胞抽出液に 50% Protein G 溶液を 30 μl 加え、4℃で 1 時間転倒混和した。その後、4℃、8000 rpm で 2 分間遠心し、上清を別のチューブに移した。上清に抗体を 2 μg 加え、さらに

4℃で 2 時間転倒混和した。さらに 50% Protein G 溶液を 30 μl 加え、再び 4℃で 2 時間転倒混和した。4℃、8000rpm で 2 分間遠心したのち、上清を除き、Binding Buffer(TNE250+inhibitor)で 5 回 wash したのち、2x sample buffer を 30 μl 加え、7 分間ボイルを行い、泳動用サンプルとした。

蛍光免疫染色

1well ずつにカバーガラスを入れた 6 well plate に細胞を撒き、培養し、カバーガラスに細胞を接着させた。細胞の固定は 2 ml/well の 4%ホルムアルデヒド含有 PBS(-)、0.1%Triton-X-100 含有 PBS(-)、0.05% Tween20+0.05%NaN_3 含有 PBS(-)を順に 10 分間ずつ低温静置で作用させ、細胞を固定した。その後、5% FBS in TBST でブロッキングをした。一次抗体をブロッキング液で希釈し、室温で 3 時間または 4℃で一晩反応させ、TBST で 5 分間の wash を 3 回行った。二次抗体は Alexa Fluor 488-anti-mouse IgG と Alexa Fluor 594-anti-rabbit IgG を使用した。TBST で 5 分間の wash を 3 回繰り返し、10 mg/ml Hoechst 33258 in DMSO (Sigma, St Louis, USA) を TBST で 250 倍希釈し。5 分間 DNA 染色を行った。TBST で 3 回 wash したのち、slowFade Antifade kit solutionA を用い、封入した。また、観察には共焦点走査顕微鏡 (FLUOVIEW FV 10i, OLYMPUS)を使用した。

舌癌臨床検体の組織免疫染色

大阪大学歯学部附属病院　第一口腔外科で治療を行い、研究の同意が得られている患者の検体のパラフィンブロックを使用した(H28-E6)。パラフィン切片を脱パラフィン、親水化してから、0.01 M クエン酸バッファー (pH 7.0) で圧力鍋(pascal S2800, DAKO,Glostrup, Denmark)にて 125℃ 30 秒、90℃ 10 秒にて抗原賦活化処理を行った。Blocking には Protein Block Serum-Free Ready to Use (DAKO, Glostrup, Denmark) を使用した。抗体希釈液には 0.1% BSA + 0.1 % Tween 20 + PBS (-) をした。LSAB 法にて、染色を行い、1 次抗体の濃度は CHC-pT606 が 1/200, negative control である rabbit IgG 1/500、Ki67　1/100 で行った。また、二次抗体には Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulines / Biotinylated (DAKO, Glostrup, Denmark) を、内因性ペルオキシダーゼの除去には 150 ml メタノール+ 3.5 ml H_2O_2 (WAKO, OSAKA, JAPAN) を使用し、Streptavidin/HRP (DAKO, Glostrup, Denmark) を使用した。発色には、DaKo REAL ™ の DAB + CHROMOGEN (×50)(DAKO, Glostrup, Denmark) と SUBSTRATE BUFFER(DAKO, Glostrup, Denmark) を混合したものを使用し、核対比染色にはマイヤーヘマトキシリン溶液 (Wako, Osaka, JAPAN)、封入には PARAmount-N (ファルマ, Tokyo, JAPAN) を使用した。また、洗浄には TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5,150 mM NaCl)、 脱パラフィン、透徹処理には

Hemo-De (ファルマ, Tokyo, JAPAN) を、親水化、脱水に 100 % エタノールを使用した。

統計

Microsoft Excel 2013 software (Microsoft)にて Student's t-test から有意差を求めた。また、*In vitro*、*in vivo* ともに標準誤差(SEM)で求めた。*P* values が<0.01 (**) and <0.05 (*)で統計学的有意差を表した。

結果

GAK は *in vitro* において CHC の T606 をリン酸化する

本実験はまず CHC が GAK によるリン酸化の基質となっているのかを検証した。まず、CHC をドメインごとに 5 つの部分に分け (29) 、GST タグを付加した欠失変異体を作製した（Fig.1A）。大腸菌から精製したこれらの CHC 変異体を基質、GAK をキナーゼとして *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、CHC 2nd (324-808aa)でリン酸化が確認された（Fig.1B）。詳細なリン酸化部位を決定するため、CHC 2nd をさらに５つに分け、同様に *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、CHC 2nd-3 でリン酸化が確認された（Fig.1C）。CHC 2nd-3 には 7 つの Ser(S)/Thr(T)があるが、GAK は T を優先的にリン酸化することがわかっており、CHC 2nd-3 の T を A に置換した変異体を作成し、*in vitro* キナーゼアッセイを行った（Fig.1D）。その結果、1792-1959bp の領域がリン酸化され、A に置換した変異体のうち CHC-pT606A のみリン酸化が確認できなかった。これらの結果より、GAK の新規基質として CHC を同定し、GAK は CHC の T606 をリン酸化することが明らかとなった（Fig.1E）。

GAK による CHC のリン酸化は *in vitro* において細胞増殖を早める

HeLa S3 Tet-on 誘導性安定発現細胞株の樹立し（CHC-WT,CHC-T606A,CHC-T606D）、安定発現細胞株を終濃度 1 μg/ml の doxycycline 有無の培地での発現チェックを行った (Fig.2A)。

GAK による CHC のリン酸化が細胞周期、細胞増殖スピードにも影響があるかどうか調べるため、樹立した細胞株を用い、細胞増殖を検証した。結果は、CHC-WT、CHC-T606D は CHC-T606A やコントロールの vector と比較し、有意に増殖速度の上昇を認めた (Fig.2B)。

In vivo においても CHC のリン酸化は細胞増殖を早める

5 週齢のヌードマウスに、増殖曲線で有意差があった CHC-WT と CHC-T606A の 2 つの細胞株を移植し、観察を行ったところ、*in vitro* 同様に CHC-WT のほうが、腫瘍径が大きくなり、*in vivo* においてもその増殖速度の差を確認できた (Fig.2C,D)。

GAK は CHC の T606 をリン酸化する

CHC-T606 のリン酸化 (CHC-pT606) を特異的に認識する抗体を作製し、ドットブロッティングにて抗体の品質をチェックしたところ、作製した抗体は CHC のリン酸化ペプチドのみ特異的に認識した (Fig.3A)。CHC-pT606 の細胞内局在を調べるため、HeLa　S3 細胞を anti-CHC-pT606 抗体で蛍光免疫染色を行い、共焦点走査顕微鏡で観察を行った。そして、peptide competition を行い、リン酸化した CHC-T606 を認識、染色していることを確認した (Fig.3B)。

CHC-pT606 は M 期において中心体に局在する

CHC-pT606 の詳細な局在を調べるために中心体のマーカーである γ-tubulin と共染色を行った (Fig.3C)。その結果、CHC-pT606 は γ-tubulin と共局在していることが観察されたため、M 期において CHC-pT606 は中心体に局在することが確認された。CHC-pT606 は間期では核に弱く発現し、細胞質ではほとんど発現を確認できないが、M 期前期から γ-tubulin と同時期に発現し、その局在は細胞質だけでなく、中心体に局在した。

次に anti-CHC-pT606 抗体と anti-CHC 抗体の共染色を行ったところ(Fig.3D)、CHC-pT606 は間期において核内に染色を認める一方で、非リン酸化 CHC はほとんどが細胞質で染色を認めた。また前期では、CHC-pT606 が細胞膜に粒状に、染色体の周囲のドット状に局在を認めた。この CHC-pT606 の粒状の局在は様々な場所で認められたが、細胞質内の CHC の局在とは別の部位であった。また、M 期全体においても、CHC の紡錘体での発現した部位と CHC-pT606 の発現部位は異なっていた。

この CHC-pT606 の細胞質全体の発現は前期に強く始まり、中期から後期にかけて増強し、終期には徐々に消失した。一方、中心体での発現は終始ほとんど変化がなかった。また、中期において CHC-pT606 が発現している中心体の部位を拡大して観察すると、CHC は紡錘体で発現してはいるが、CHC-pT606 との共局在を認めなかった(Fig.3E)。

さらに anti-CHC-pT606 抗体と anti-PLK 抗体を共染色すると、中心体において CHC-pT606 は PLK1 とも共局在していることを確認した(Fig.3F)。

GAK をノックダウンさせる CHC-pT606 の異常な局在が起こる

次に GAK と CHC-pT606 の分子機構を調べるため、siRNA を用いて GAK をノックダウンさせる実験を行った。蛍光免疫染色では、GAK をノックダウンさせると細胞が中

期で停止した (Fig.4A)。M 期の細胞数は GAK ノックダウンさせたものが多く(Fig. 4B)、染色体や紡錘体に異常をきたしている細胞を認めた (矢印 Fig.4A)。

次に、ウエスタンブロッティングにてタンパク発現について検証した。GAK のタンパク発現レベルの明らかな減少を確認した (黒矢印 Fig.4C) 。また、CHC タンパク発現量自体はあまり変化なかったが (緑矢じり Fig.4C) 、CHC-pT606 のタンパク発現量は減少していた (黒矢印 Fig.4C) 。

また、full-length CHC-pT606 とその分解産物は siGAK を使用させると発現量が低下したが、siCHC で CHC をノックダウンさせても、CHC-pT606 の発現量は減少しなかった (Fig.4D) 。このウエスタンブロッティングからも HeLa S3 細胞においてごく少量の CHC-T606 が GAK によりリン酸化していることが示唆された。

次に、M 期の前後に必要なタンパクである cyclin B1 の発現は siGAK または siCHC を使用すると、siGL2 と比較し、上昇した (Fig.4E) 。

M 期において中心体で GAK、CHC-pT606, PLK1, Kiz の 4 つのタンパクは共局在する。

GAK と PLK1 が関連しているかどうかを確認するため、免疫沈降（co-immunoprecipitation (Co-IP) assays）を行い、GAK と PLK1 はそれぞれ関連があるこ

とを確認した(Fig.5A)。Sato らの報告 (30) で GAK と CHC が直接関連していることを報告されており、PLK1 のリン酸化のターゲットの Kiz と GAK、CHC、PLK1 が関連をもつかを調べるため、Flag-Kiz と Myc-PLK1, Myc-GAK, Myc-CHC の３つを用い、それぞれ免疫沈降を行った (Fig.5B) 。これらの結果により GAK,CHC,PLK1 と Kiz は複合体を形成することがわかった。これらは中心体で共局在することから、中心体において GAK、CHC-pT606, PLK1, Kiz 複合体を形成することが示唆された。

GAK による CHC のリン酸化は中心体の位置や Kizuna のリン酸化に影響しない

Kiz が GAK や CHC と結合することが分かったため、GAK による CHC のリン酸化が Kiz にどのような影響を与えているかを、CHC リン酸化安定株を用い、蛍光免疫染色で検証した (Fig.6) 。γ-tubulin と共染色することにより、中心体の数や位置の異常は認めないことが確認された。PLK1 によりリン酸化された Kiz（Kiz-pT379）は CHC のリン酸化は影響せず、中心体に局在していた。そのため、CHC のリン酸化は Kiz のリン酸化には直接関与していないことが示された。

ヒト舌扁平上皮細胞株 SAS においても CHC-pT606 は発現している

HeLa S3 細胞で、CHC-pT606 は間期では核内に、M 期においては細胞質や中心体に発現することが本研究でわかっている (Fig.3) 。口腔顎顔面領域でも多い舌扁平上皮癌でも同様に発現しているかどうかを調べるため、ヒト舌扁平上皮細胞株 SAS を用い、蛍光免疫染色を行った。結果は HeLa S3 細胞と同様に間期では核、中期では細胞質全体、中心体での発現を確認した（Fig.7A）。また、anti-CHC 抗体や anti-PLK1 抗体とも共染色を行い、こちらも HeLa S3 細胞と同様の局在を示す結果となった（Fig.7B,C）。

ヒト舌癌組織において、CHC-pT606 が過剰発現している

CHC-pT606 が M 期において中心体に発現し増殖速度に影響することが分かったため、悪性腫瘍において過剰発現していることを疑い、当科にて手術を行い、扁平上皮癌の診断を得た組織検体を用いて anti-CHC-pT606 抗体にて組織化学免疫染色を行った。すると、癌細胞の核で染色されたが、Stage 分類や分化度で差は認められなかった (Fig.8A,B,C) 。peptide competition を行い、核の染色が CHC-pT606 特異的であることを確認した (Fig.8D) 。

また、dysplasia についても検証した。H,E 染色を示す(Fig.9B)。anti-CHC-pT606 抗体を用いて染色すると癌細胞だけでなく、異型性細胞でも核で染色された。また、安全

域にある正常と思われる上皮細胞では基底細胞に一部認めるのみで染色の割合は明らかに低くなった (Fig.9B) 。また、c-Src によりリン酸化された GAK（GAK-pY412）(31) や GAK でも組織化学免疫染色を行ったところ、GAK-pY412 は CHC-pT606 と同様に核で染色を認め、正常な上皮細胞では染色を認めなかった(Fig.9C)。GAK は severe dysplasia と診断された異形成細胞の基底層でのみ発現を確認され、正常な上皮細胞、mild dysplasia と診断された細胞では明らかな染色は認めなかった (Fig.9D)。

考察

CHC はクラスリン被覆小胞を形成し、エンドサイトーシスに関与する分子としてよく研究が進められているが (32) 、CHC の他の機能として有糸分裂時の紡錘体形成の際に微小管の安定化に寄与する報告がある (*33*) 。また、GAK と CHC は核および細胞質で結合することが既に知られており (34) 、ヒトの癌細胞において、Clathrin と GAK の膜輸送と有糸分裂の機能は独立していると報告されている (31,35) 。ヒト以外では、線虫胚において Clathrin はアクトミオシンの表層の緊張を促進することにより、中心体の局在に深く関与されていることが報告されており (36) 、ツメガエルにおいて、CHC は特にリン酸化した TACC3 に関連し、紡錘体の左右対称、染色体調整のため、紡錘体極にリクルートとも報告されている (37) 。そして、CHC-pT606 と GAK は M 期に入り、膜輸送が行われなくなると (35,38) 、染色体から中心体に移動することがわかった (Fig. 4) , (30) 。このことから、GAK_CHC-pT606 複合体が有糸分裂において重要な役割を担っていることが示唆される。このような報告から GAK は CHC の機能を果たす上で重要な因子であり、CHC はキナーゼである GAK のリン酸化の影響を受けて機能調節されていることが考えられた。本研究で GAK をノックダウンさせることで、GAK は CHC-pT606 のタンパクキナーゼとして、重要なことを確認された(Fig. 4)。また、GAK や CHC をノックダウンさせると、cyclin B1 の発現が上昇したが、それは siGAK や siCHC による中期における細胞停止の 2 次的な影響と推測さ

れた。CHC の発現量の低下は、直接 CHC-pT606 の発現量に関与していると考えられるが、本研究でのウエスタンブロッティングからは実証はできなかった(Fig. 4D)。

GAK は c-Src により Y412 と Y1149 でリン酸化され、リン酸化によるバンドシフトは主に M 期に起き、別の機能を示した (31) 。GAK-pY412/pY1149 の発現は間期では核内で発現し、前期で染色体に移動、中期には中心体に,後期には微小管に蓄積する (31) 。この動きは CHC-pT606 の発現と類似している(Fig. 3)。また、GAK は前立腺癌切除検体でその発現を確認された (29) 。骨肉腫細胞株:U2OS でも同様に報告された (5) 。今後このような GAK と CHC の新たの機能が、癌の診断、治療の標的になることが期待される。本研究で作製した anti-CHC-pT606 抗体も新規腫瘍マーカーとして有用であると考え、今後症例数を増やし、検討する予定である。

Kiz は２極の紡錘体構造に不可欠で、中心体周辺物質の安定に関与している。中心体周辺物質は、有糸分裂の微小管の核形成の主な領域であり、有糸分裂の染色体の分離にきわめて重要な働きを担っている (28,39)。Kiz-T379 は中心体において PLK1 のリン酸化基質で (28) 、PLK1 を阻害すると中心体の断片化する(40)。GAK、CHC、Kiz は複合体を形成し (Fig. 6)、GAK, CHC-pT606, PLK1, Kiz, Kiz-pT379 は M 期にて中心体で共局在する(Fig. 4, 7) (6) 。

これらの結果を元に、GAK_CHC-pT606_PLK1_Kiz-pT379 複合体が有糸分裂に重要な働きを担っていると仮説を立てた。GAK は主に Clathrin 依存性膜輸送で働いているが、もう一つの機能として、正常な細胞では GAK は活性化され、CHC-T606 をリン酸化し、さらに PLK1 による Kiz-pT379 を調整し、有糸分裂の進行に関与している。しかし、癌細胞では GAK は過剰発現し (18) 、活性化する。これにより、CHC-T606 の過剰なリン酸化が起き、Kiz-pT379 のリン酸化にも影響を与えて、癌細胞の過剰増殖を起こしていると推測された。逆に、GAK がノックダウンされた細胞では、CHC-T606 はリン酸化されず、CHC_PLK1_Kiz 複合体の制御が阻害され、中期での細胞停止が起こると考えられる。実際、以前の報告で、骨肉腫細胞において、GAK は真のゲフィニチブの標的と考えられ、ゲフィニチブとルテリオンを投与すると、骨肉腫、前立腺癌細胞で効率よくアポトーシスを誘導した (5,18) 。また、GAK を標的とし、腎細胞癌の増殖を阻害する miR-206 は腎細胞癌の治療のターゲットになり得ると報告されたり(41) 、ウイルス感染の有望な治療薬 (42) やパーキンソン病の治療薬としても期待され、今後の研究が期待されている。

本研究において、舌扁平上皮癌の組織検体において CHC-T606 が過剰にリン酸化されていることを示された。現在、舌扁平上皮癌の診断には H,E 染色が用いられ、組織化学免疫染色として Ki-67 を始めとする様々な抗体で行われている (43) が、悪性診断

としての指標とまで言われているものは少ない。本研究で用いた抗体がその一助になることを期待し、研究を進めていきたい。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えていただき、終始御懇切なるご指導を賜りました、大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病院病態制御講座(口腔外科第一教室)古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の礎を気づかれ、研究の立案並びに進行に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学微生物病研究所分子遺伝研究分野　野島博教授、藪田紀一准教授ならびに同研究室の皆様に心よりお礼申し上げます。また、本研究に当たり、多大なご協力を頂いた内橋俊大先生を始めとする大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病院病態制御講座(口腔外科第一教室)の教室員の皆様に厚くお礼申し上げます。

図の説明

Figure 1: GAK は *in vitro* において CHC をリン酸化する。

（A） 模式図は本研究で用いた CHC 欠失変異体を示す。CHC は Edeling *et al.* (2006) を参考に５つの断片部位を作成した。

（B）（C）（D）大腸菌から精製した GST-CHC 変異体を基質として用いた in vitro kinase assay の結果。矢印は SimplyBlue によって染色された各基質を示し、矢尻はオートラジオグラフィーによって検出された基質に取り込まれた ^{32}P-γATP を示す。CHC-T606A のみリン酸化されないことから、GAK は CHC-T606 をリン酸化することが分かった。

Figure 2: GAK による CHC のリン酸化の細胞増殖の検討

（A） HeLa S3 Tet-on 誘導性安定発現細胞株の樹立し（CHC-WT,CHC-T606A,CHC-T606D）、ウエスタンブロッティングによる CHC の発現チェック。

（B） HeLa S3 Tet-on 誘導性安定発現細胞株の growth curve を示す。CHC-WT、CHC-T606D は CHC-T606A、vector と比較し、有意に増殖速度の上昇を認めた。

（C） CHC-WT,CHC-T606A のマウス皮下腫瘍モデル実験。CHC-WT の腫瘍径は

CHC-T606A と比較し、有意に増大傾向にあった。

（D） マウス皮下腫瘍の Day19,27,33 の写真。

Figure 3:HeLa S3 細胞における CHC-pT606 の細胞内局在の検討

（A） anti-CHC-pT606 抗体のクオリティチェックの結果。Immonblion membrane に抗原である非リン酸化ペプチドとリン酸化ペプチドを図中に記されている量をブロットした。

（B） 非リン酸化ペプチドとリン酸化ペプチドを抗体の 5 倍量を抗体と反応させた後に行った免疫蛍光染色。anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-α-tubulin 抗体（緑）を使用。スケールバーの長さは 10μm を表す。

（C） anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-γ-tubulin 抗体（緑）で免疫蛍光染色、および Hoechst 33258（DNA：青）で染色された免疫蛍光染色図。スケールバーの長さは 10μm を表す。

（D） anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-CHC 抗体（緑）で免疫蛍光染色、および Hoechst 33258（DNA：青）で染色された免疫蛍光染色図。スケールバーの長さは 10μm を表す。

（E） (C)の中期における中心体付近の拡大図を示す。矢印は中心体の位置を示す。

（F） anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-PLK1 抗体（緑）で免疫蛍光染色、および Hoechst 33258（DNA：青）で染色された免疫蛍光染色図。スケールバーの長さは 10μm を表す。

Figure 4:GAK をノックダウンさせた際の CHC-pT606 のタンパク発現の検討

（A） siRNA によりノックダウンさせた免疫蛍光染色。anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-γ-tubulin 抗体（緑）および Hoechst 33258（DNA：青）で染色した。矢じりは中心体の位置、数の異常を示している。スケールバーの長さは 10μm を表す。

（B） siGAK によりノックダウンさせた細胞の細胞数カウント、間期、M 期の割合を示す。それぞれ 200 個を 3 回行った。

（C） siRNA によりノックダウンさせた後のウエスタンブロッティングを示す。*は非特異的なバンドを表している。siGAK により GAK がノックダウンされていることを赤矢印に示している。

（D）（E）siRNA（siGAK,siCHC）によりノックダウンさせた後のウエスタンブロッティングを示す。

Figure 5:GAK,CHC の分子機構の検討

（A） i) Flag-GAK,Myc-vector または Myc-PLK1 を細胞導入させた HEK-293T 細胞の anti-Myc 抗体にて免疫沈降(IP)し、ウエスタンブロッティングを行った。抗体は右に示す。

ii) Flag-GAK または Flag-vector または Myc-PLK1 を細胞導入させた HEK-293T 細胞の anti-Flag 抗体にて免疫沈降(IP)し、ウエスタンブロッティングを行った。抗体は右に示す。

（B） Flag-Kiz と Myc-GAK または Myc-CHC、Myc-PLK1 を細胞導入させた HEK-293T 細胞の anti-Flag 抗体にて免疫沈降(IP)し、ウエスタンブロッティングを行った。一次抗体に anti-Myc 抗体を使用した。

Figure 6: HeLa S3 Tet-on 誘導性安定発現細胞株の Kiz および中心体の局在の検討

HeLa S3 Tet-on 誘導性安定発現細胞株を anti-Kiz-pT379 抗体（赤）、anti-γ-tubulin 抗体（緑）で免疫蛍光染色、Hoechst 33258（DNA：青）で染色された免疫蛍光染色図（中期）。

Figure 7: ヒト舌扁平上皮細胞株 **SAS** における **CHC-pT606** の細胞内局在の検討

（A）　ヒト舌扁平上皮細胞株 SAS に anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-γ-tubulin 抗体（緑）で免疫蛍光染色、および Hoechst 33258（DNA：青）で染色された免疫蛍光染色図。スケールバーの長さは 10μm を表す。

（B）　ヒト舌扁平上皮細胞株 SAS に anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-CHC 抗体（緑）で免疫蛍光染色、および Hoechst 33258（DNA：青）で染色された免疫蛍光染色図。スケールバーの長さは 10μm を表す。

（C）　ヒト舌扁平上皮細胞株 SAS に anti-CHC-pT606 抗体（赤）、anti-PLK1 抗体（緑）で免疫蛍光染色、および Hoechst 33258（DNA：青）で染色された免疫蛍光染色図。スケールバーの長さは 10μm 表す。

Figure 8: 舌扁平上皮癌の組織化学免疫染色

（A）（B）（C）扁平上皮癌の診断を得た舌癌組織の組織化学免疫染色。使用抗体は左から rabbit IgG、anti-Ki67 抗体、anti-CHC-pT606 抗体を使用した。右は HE 染色を示している。スケールバーの長さは強拡大 200μm、弱拡大 50μm を表す。

(D) 非リン酸化ペプチドとリン酸化ペプチドを抗体の 5 倍量を抗体と反応させた後に行った組織化学免疫染色。リン酸化ペプチドと反応させると核の染色が消失している。

Figure 9: 舌白板症の組織化学免疫染色

（A）（B）（C）（D）舌白板症の HE 染色 (A) 、anti-CHC-pT606 抗体 (B) 、anti-GAK-412 抗体 (C)、anti-GAK 抗体 (D) を示す。severe displasia、mild displasia、切除断端を拡大し、下段に示す。スケールバーの長さは強拡大 500μm、弱拡大 50μm を表す。

Figure 10: CHC の分子機構の模式図

（A）間期では CHC はクラスリン被覆小胞の構成因子としてエンドサイトーシスに関与している。細胞内の小胞を GAK は小胞を解離させている。また、M 期では紡錘体に CHC は発現しており、中心体において GAK_CHC-pT606_PLK1_Kiz-pT379 複合体を形成し、細胞分裂に寄与している。

（B）GAK がノックダウンすると、GAK が CHC-T606 をリン酸化しなくなる。

また、GAK をノックダウンさせると PLK1 の発現量も低下する（7）。そのため、GAK_CHC-pT606_PLK1_Kiz-pT379 複合体は PLK1 の分子機構の報告中心体の成熟や微小管の伸長に関与していると考えられる。

参考文献

1)Kanaoka Y, Kimura SH, Okazaki I, Ikeda M, Nojima H. GAK: a cyclin G associated kinase contains a tensin/auxilin-like domain. *FEBS Lett.* 402,73-80.(1997)

2)Lemmon SK. Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr Biol*. 11,R49-52(2001).

3)Horne MC, Donaldson KL, Goolsby GL, Tran D, Mulheisen M, Hell JW, Wahl AF. Cyclin G2 is up-regulated during growth inhibition and B cell antigen receptor-mediated cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 272, 12650-61(1997)

4）International Parkinson Disease Genomics Consortium, Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin UM, Saad M, Simón-Sánchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjörnsdóttir S, Stefánsson K, Martinez M, Hardy J, Heutink P, Brice A, Gasser T, Singleton AB, Wood NW. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. Lancet. 377(9766):641-9(2011).

5)Susa M, Choy E, Liu X, Schwab J, Hornicek FJ, Mankin H, Duan Z. Cyclin G-associated kinase is necessary for osteosarcoma cell proliferation and receptor trafficking. *Mol Cancer Ther*. 9(12),3342-50(2010)

6)Ray MR, Wafa LA, Cheng H, Snoek R, Fazli L, Gleave M, Rennie PS. Cyclin G-associated kinase: a novel androgen receptor-interacting transcriptional coactivator that is overexpressed in hormone refractory prostate cancer. *Int J Cancer*. 118,1108-19(2006).

7)Shimizu H, Nagamori I, Yabuta N, Nojima H. GAK, a regulator of clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression.*J Cell Sci.* 122,3145-52(2009)

8)Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73,1255-9(1976)

9)Ungewickell E, Branton D. Assembly units of clathrin coats. *Nature*. 289:420-2.(1981)

10)Kirchhausen T, Harrison SC. Protein organization in clathrin trimers. *Cell.* 23,755-61(1981)

11)Näthke IS, Heuser J, Lupas A, Stock J, Turck CW, Brodsky FM. Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub. *Cell*. 68:899-910(1992)

12)Winkler FK, Stanley KK. Clathrin heavy chain, light chain interactions. *EMBO J,*2,1393-400(1983).

13)Royle SJ, Bright NA, Lagnado L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature*. 434,1152-7(2005)

14)Nixon FM, Gutiérrez-Caballero C, Hood FE, Booth DG, Prior IA, Royle SJ. The mesh is a network of microtubule connectors that stabilizes individual kinetochore fibers of the mitotic spindle. Elife. 4(2015)

15) Tanenbaum ME, Vallenius T, Geers EF, Greene L, Mäkelä TP, Medema RH. Cyclin G-associated kinase promotes microtubule outgrowth from chromosomes during spindle assembly. Chromosoma. 119 415-24(2010).

16) Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. Cold Spring Harb Perspect Biol. 6(5):a016725. (2014)

17)Royle SJ, Bright NA, Lagnado L. Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. Nature. 434(7037):1152-7(2005).

18) Sakurai MA, Ozaki Y, Okuzaki D, Naito Y, Sasakura T, Okamoto A, Tabara H, Inoue T, Hagiyama M, Ito A, Yabuta N, Nojima H. Gefitinib and luteolin cause growth arrest of human prostate cancer PC-3 cells via inhibition of cyclin G-associated kinase and induction of miR-630. PLoS One. 9(6):e100124(2014).

19)Schmucker S, Sumara I. Molecular dynamics of PLK1 during mitosis. Mol Cell Oncol. 1(2):e954507(2014)

20)Archambault V, Lépine G, Kachaner D. Understanding the Polo Kinase machine. Oncogene. 34(37):4799-807(2015).

21)Combes G, Alharbi I, Braga LG, Elowe S. Playing polo during mitosis: PLK1 takes the lead. Oncogene. 36(34):4819-4827 (2017)

22)Liu J, Zhang C. The equilibrium of ubiquitination and deubiquitination at PLK1 regulates sister chromatid separation. Cell Mol Life Sci. 74(12):2127-2134(2017).

23)Kumar S, Sharma AR, Sharma G, Chakraborty C, Kim J. PLK-1: Angel or devil for cell cycle progression. Biochim Biophys Acta. 1865(2):190-203(2016).

24)Reinhardt HC, Yaffe MB. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. Nat Rev Mol Cell Biol. 14(9):563-80(2013).

25)Liu Z, Sun Q, Wang X. PLK1, A Potential Target for Cancer Therapy. Transl Oncol. Feb;10(1):22-32(2017).

26)Yunfeng Z, Zhibin W, Dapeng L, Meng W, Guodong X, Peili W, Xin S, Hong R, Shou-Ching T, Ning D. Augmented expression of polo-like kinase 1 indicates poor clinical outcome for breast patients: a systematic review and meta-analysis. Oncotarget. 8:57723-57732(2017)

27)Gutteridge RE, Ndiaye MA, Liu X, Ahmad N. Plk1 Inhibitors in Cancer Therapy: From Laboratory to Clinics. Mol Cancer Ther.15(7):1427-35(2016)

28)Oshimori N, Ohsugi M, Yamamoto T. The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. Nat Cell Biol.Oct;8(10):1095-101(2006)

29)Edeling MA, Smith C, Owen D. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. Nat Rev Mol Cell Bio l7,32-44(2006)

30) Sato J, Shimizu H, Kasama T, Yabuta N, Nojima H. GAK, a regulator of clathrin mediated membrane trafficking, localizes not only in the cytoplasm but also in the nucleus. Genes Cells.14,627-41(2009)

31）Fukushima K, Wang M, Naito Y, Uchihashi T, Kato Y, Mukai S, Yabuta N, Nojima H, GAK is phosphorylated by c-Src and translocated from the centrosome to chromatin at the end of telophase. Cell Cycle. 16(5):415-427(2017).

32)Pearse BM. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73,1255-9(1976)

33)Royle SJ. The role of clathrin in mitotic spindle organisation. J Cell Sci. 125,19-28(2012)

34) Beilina A, Rudenko IN, Kaganovich A, Civiero L, Chau H, Kalia SK, Kalia LV, Lobbestael E, Chia R, Ndukwe K, Ding J, Nalls MA; International Parkinson's Disease Genomics Consortium.; North American Brain Expression Consortium.,

Olszewski M, Hauser DN, Kumaran R, Lozano AM, Baekelandt V, Greene LE, Taymans JM, Greggio E, Cookson MR. Unbiased screen for interactors of leucine-rich repeat kinase 2 supports a common pathway for sporadic and familial Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111,2626-31(2014).

35) Blixt MK, Royle SJ. Clathrin heavy chain gene fusions expressed in human cancers: analysis of cellular functions. Traffic.12(6):754-61(2011)

36) Spiró Z, Thyagarajan K, De Simone A, Träger S, Afshar K, Gönczy P. Clathrin regulates centrosome positioning by promoting acto-myosin cortical tension in C. elegans embryos. Development.141(13):2712-23(2014)

37) Fu W, Tao W, Zheng P, Fu J, Bian M, Jiang Q, Clarke PR, Zhang C. Clathrin recruits phosphorylated TACC3 to spindle poles for bipolar spindle assembly and chromosome alignment. J Cell Sci.123(Pt 21):3645-51(2010)

38) Schweitzer JK, Burke EE, Goodson HV, D'Souza-Schorey C. Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis. J Biol Chem. 280(50):41628-35(2005)

39) Oshimori N, Li X, Ohsugi M, Yamamoto T. Cep72 regulates the localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation. EMBO J.28(14):2066-76(2009).

40) Yuan K, Huang Y, Yao X. Illumination of mitotic orchestra during cell division: a Polo view. Cell Signal.23(1):1-5(2011).

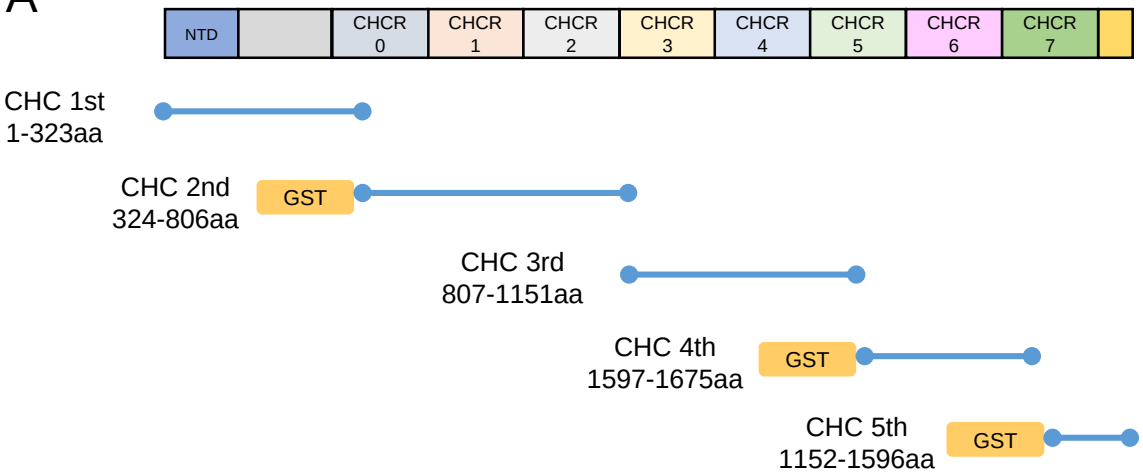
41) Wei C, Wang S, Ye ZQ, Chen ZQ. miR-206 inhibits renal cell cancer growth by targeting GAK. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.36(6):852-858. (2016)

42) Bekerman E, Neveu G, Shulla A, Brannan J, Pu SY, Wang S, Xiao F, Barouch-Bentov R, Bakken RR, Mateo R, Govero J, Nagamine CM, Diamond MS, De Jonghe S, Herdewijn P, Dye JM, Randall G, Einav S. Anticancer kinase inhibitors impair intracellular viral trafficking and exert broad-spectrum antiviral effects. J Clin Invest. 127(4):1338-1352(2017)

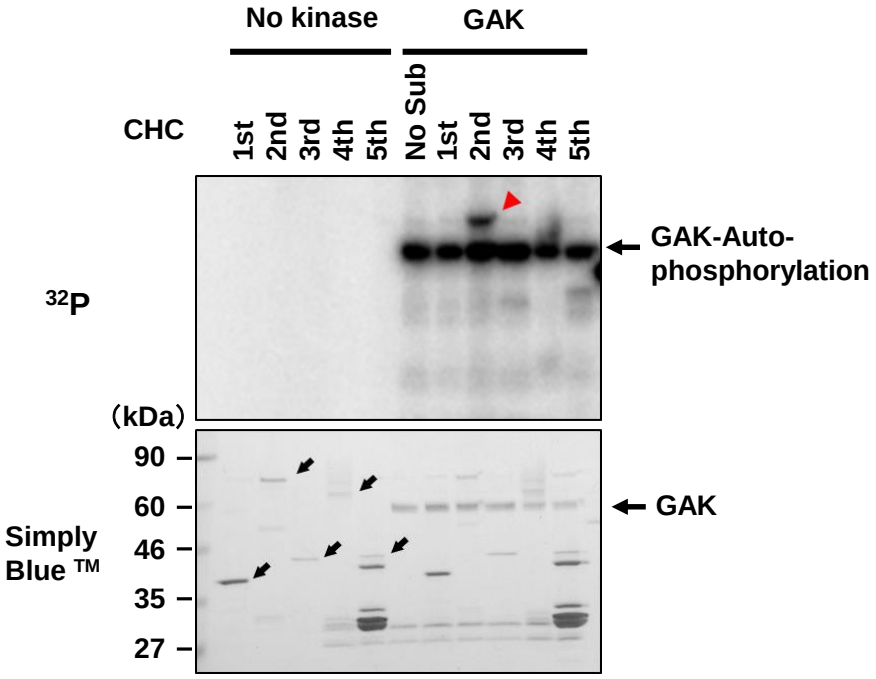
43) Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, Coletta RD, Läärä E, Leivo I, Salo T. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J of Cancer* 117, 856–866 (2017)

Figure 1.

A


NTD
CHCR 0
CHCR 1
CHCR 2
CHCR 3
CHCR 4
CHCR 5
CHCR 6
CHCR 7
CHC 1st
1-323aa
CHC 2nd
324-806aa
GST
CHC 3rd
807-1151aa
CHC 4th
1597-1675aa
GST
CHC 5th
1152-1596aa
GST

B


No kinase
GAK
CHC
1st
2nd
3rd
4th
5th
No Sub
1st
2nd
3rd
4th
5th
32P
GAK-Auto-
phosphorylation
(kDa)
90
60
46
35
27
Simply
Blue ™
GAK

C

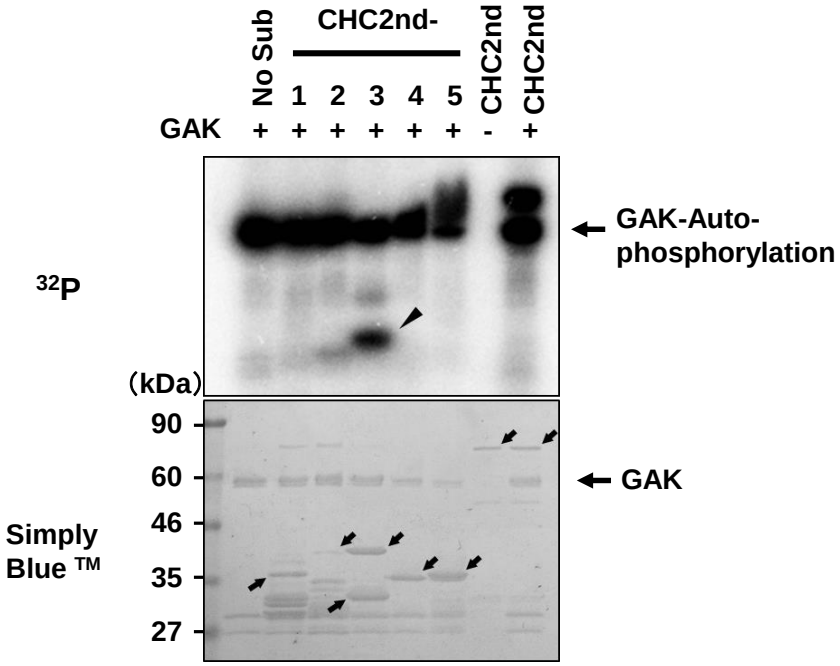
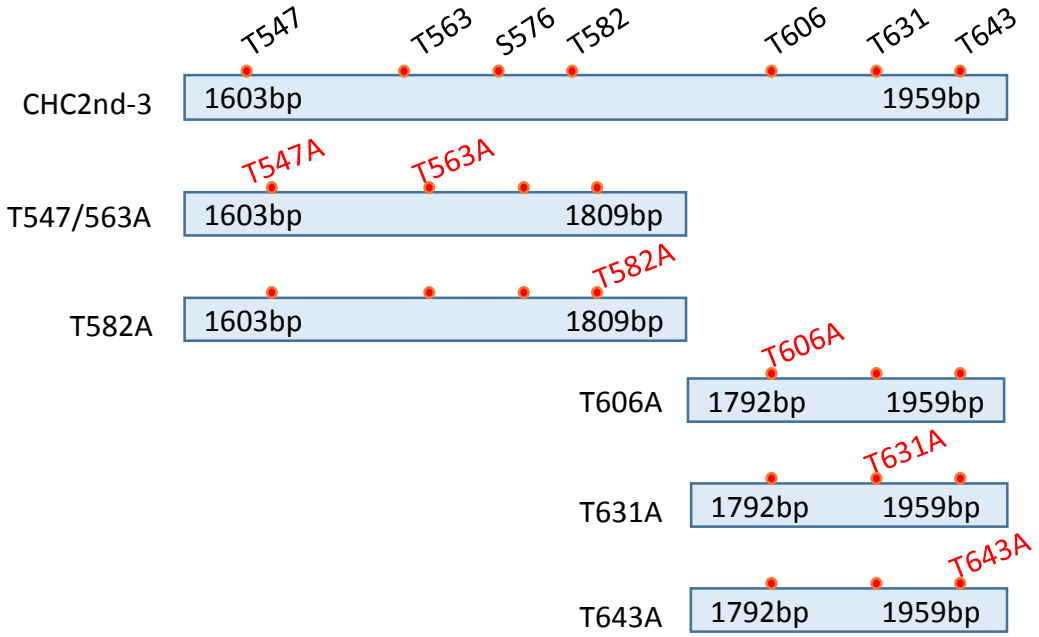

CHC2nd-
No Sub
1
2
3
4
5
CHC2nd
CHC2nd
GAK
+
+
+
+
+
+
-
+
32P
GAK-Auto-
phosphorylation
(kDa)
90
60
46
35
27
Simply
Blue ™
GAK

Figure 1.

D


T547
T563
S576
T582
T606
T631
T643
CHC2nd-3
1603bp
1959bp
T547A
T563A
T547/563A
1603bp
1809bp
T582A
T582A
1603bp
1809bp
T606A
T606A
1792bp
1959bp
T631A
T631A
1792bp
1959bp
T643A
T643A
1792bp
1959bp

E

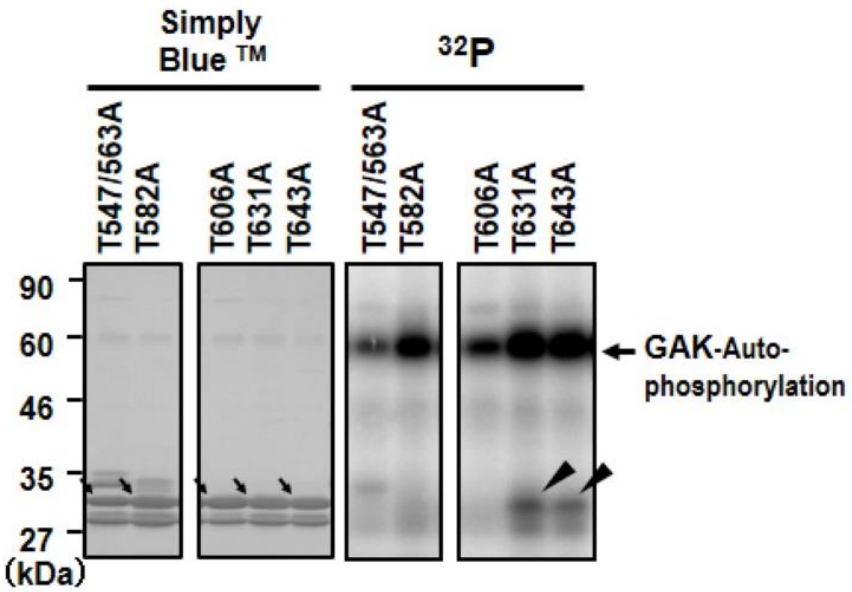
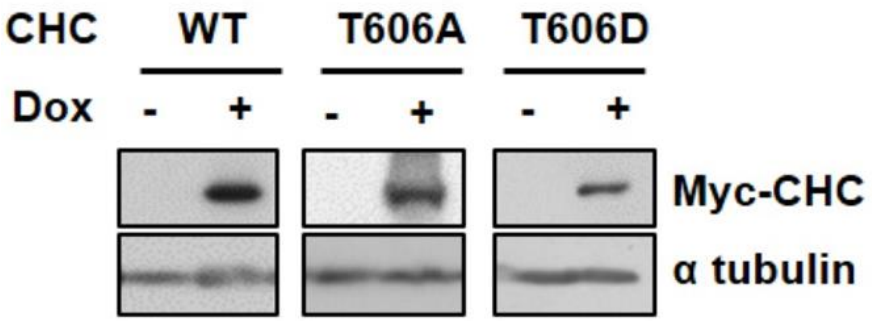
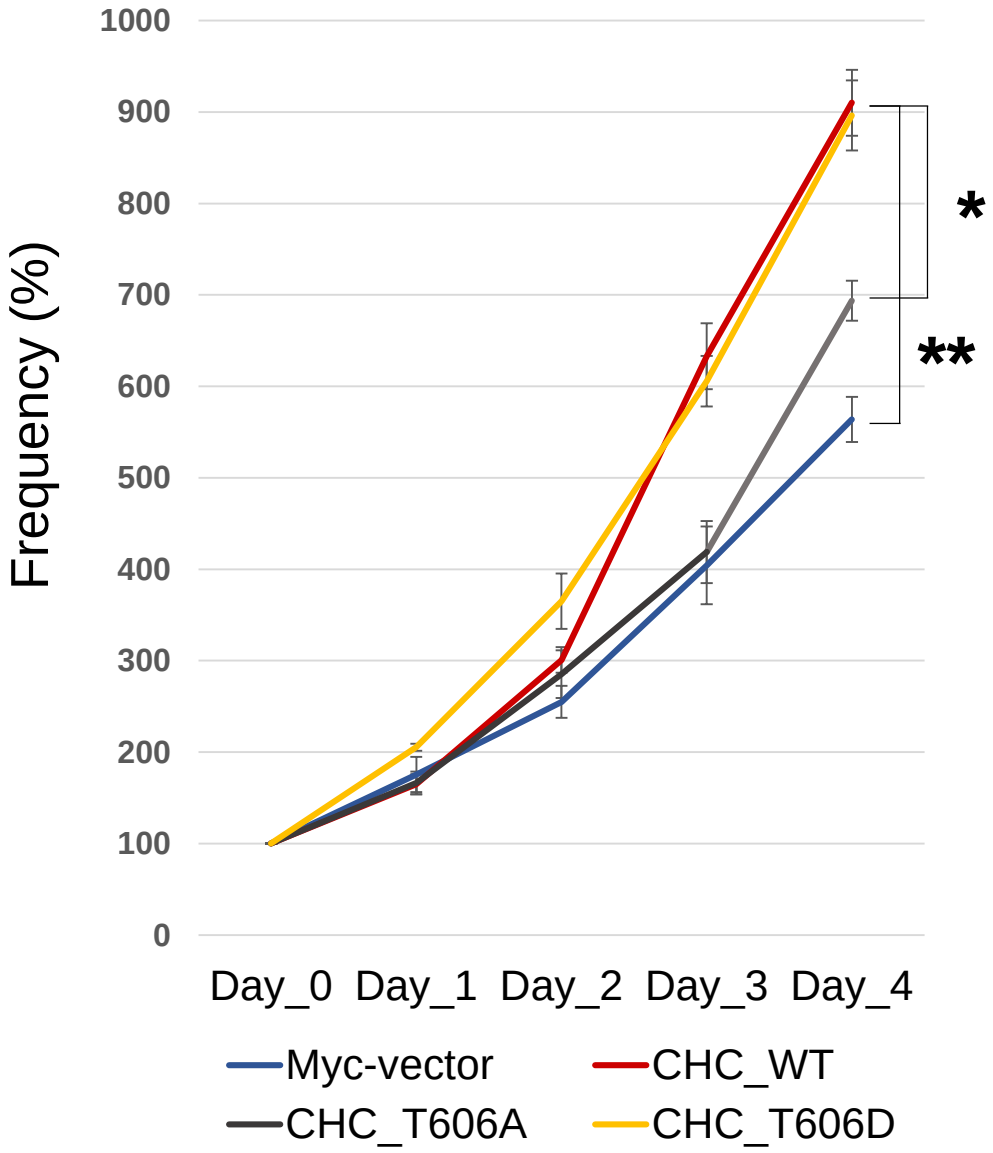

Simply Blue ™
32P
T547/563A
T582A
T606A
T631A
T643A
T547/563A
T582A
T606A
T631A
T643A
90
60
46
35
27
(kDa)
GAK-Auto-phosphorylation

Figure 2.

A



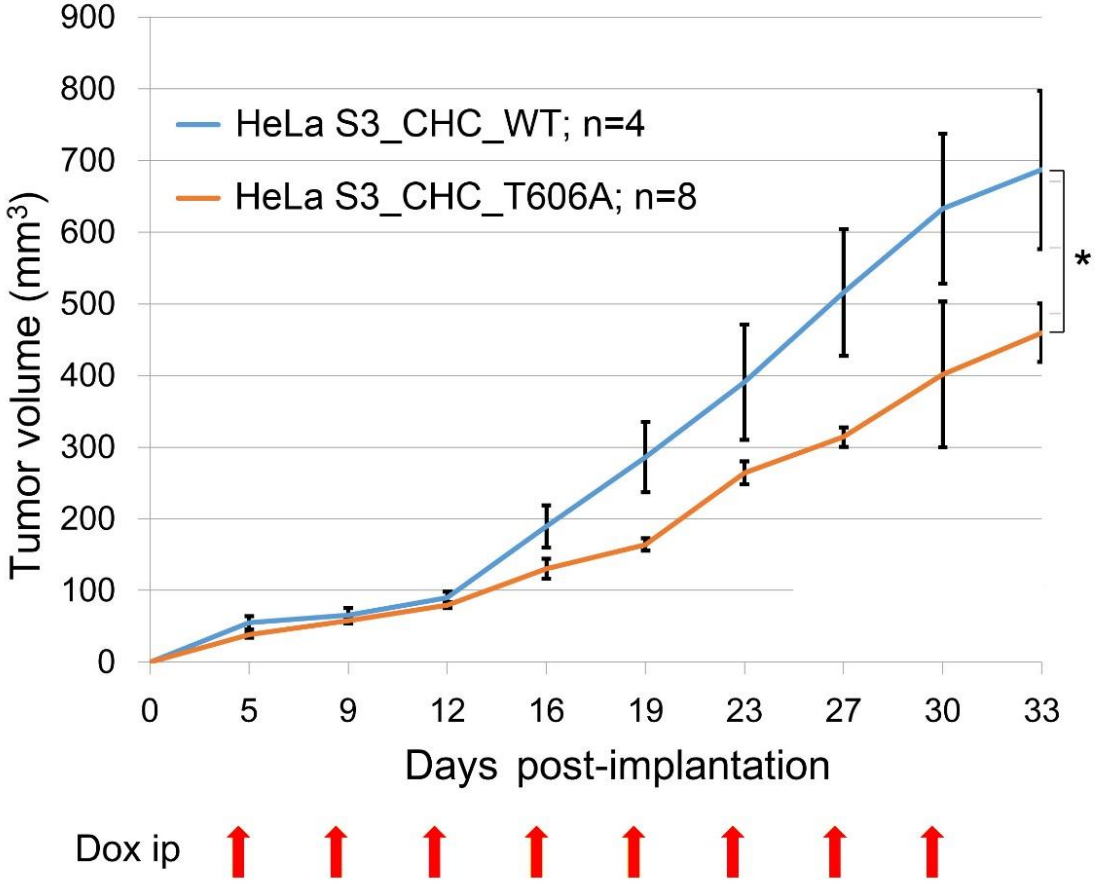
B



*$P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Figure 2.

C

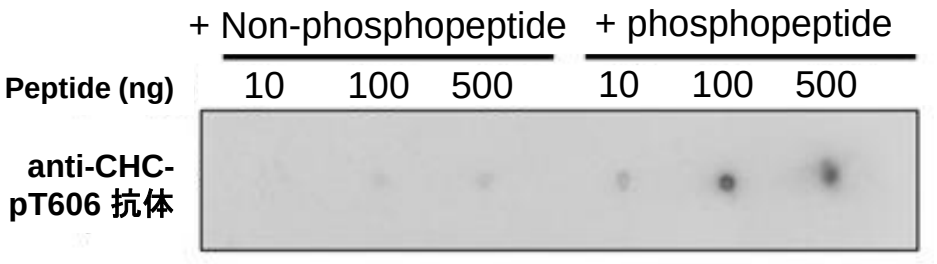


*$P < 0.05$

D

Figure 3.

A


+ Non-phosphopeptide
+ phosphopeptide
Peptide (ng)
10
100
500
10
100
500
anti-CHC-pT606 抗体

B

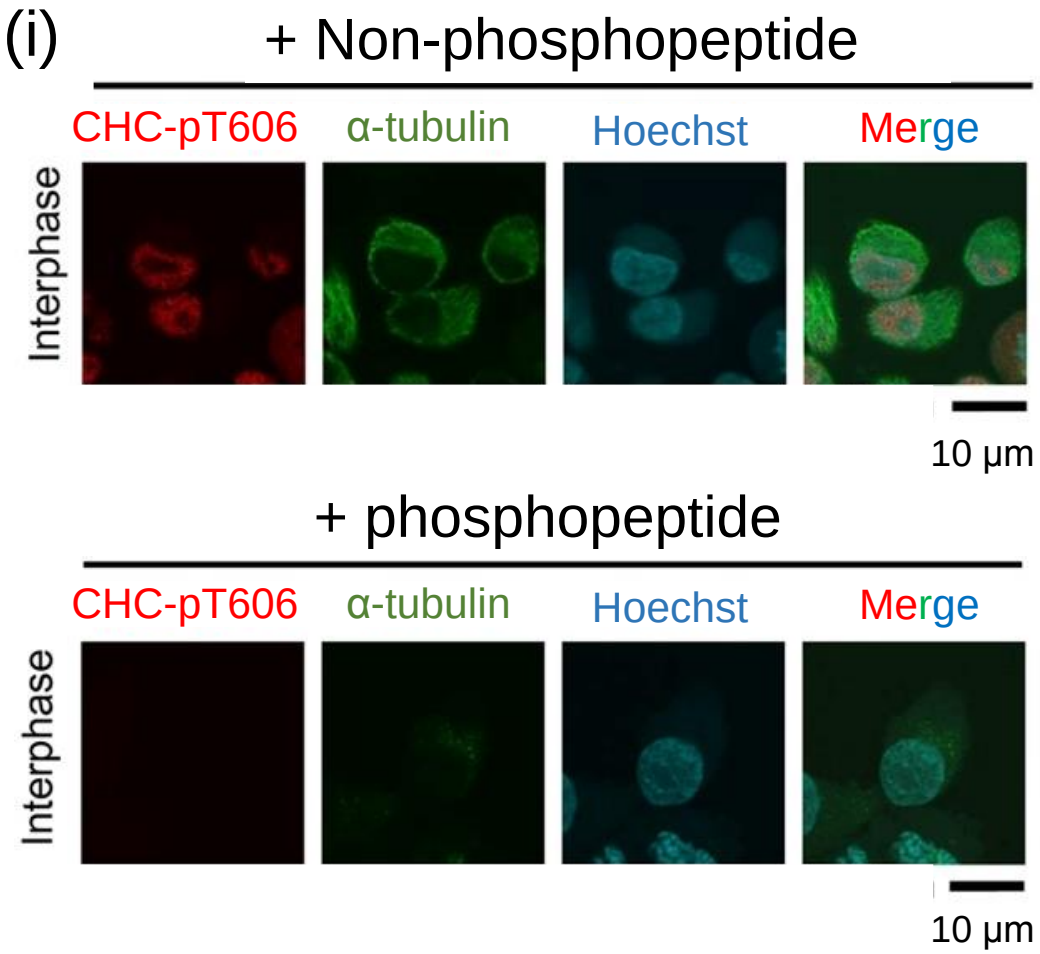

(i)
+ Non-phosphopeptide
CHC-pT606
α-tubulin
Hoechst
Merge
Interphase
10 μm
+ phosphopeptide
CHC-pT606
α-tubulin
Hoechst
Merge
Interphase
10 μm

Figure 3.

C

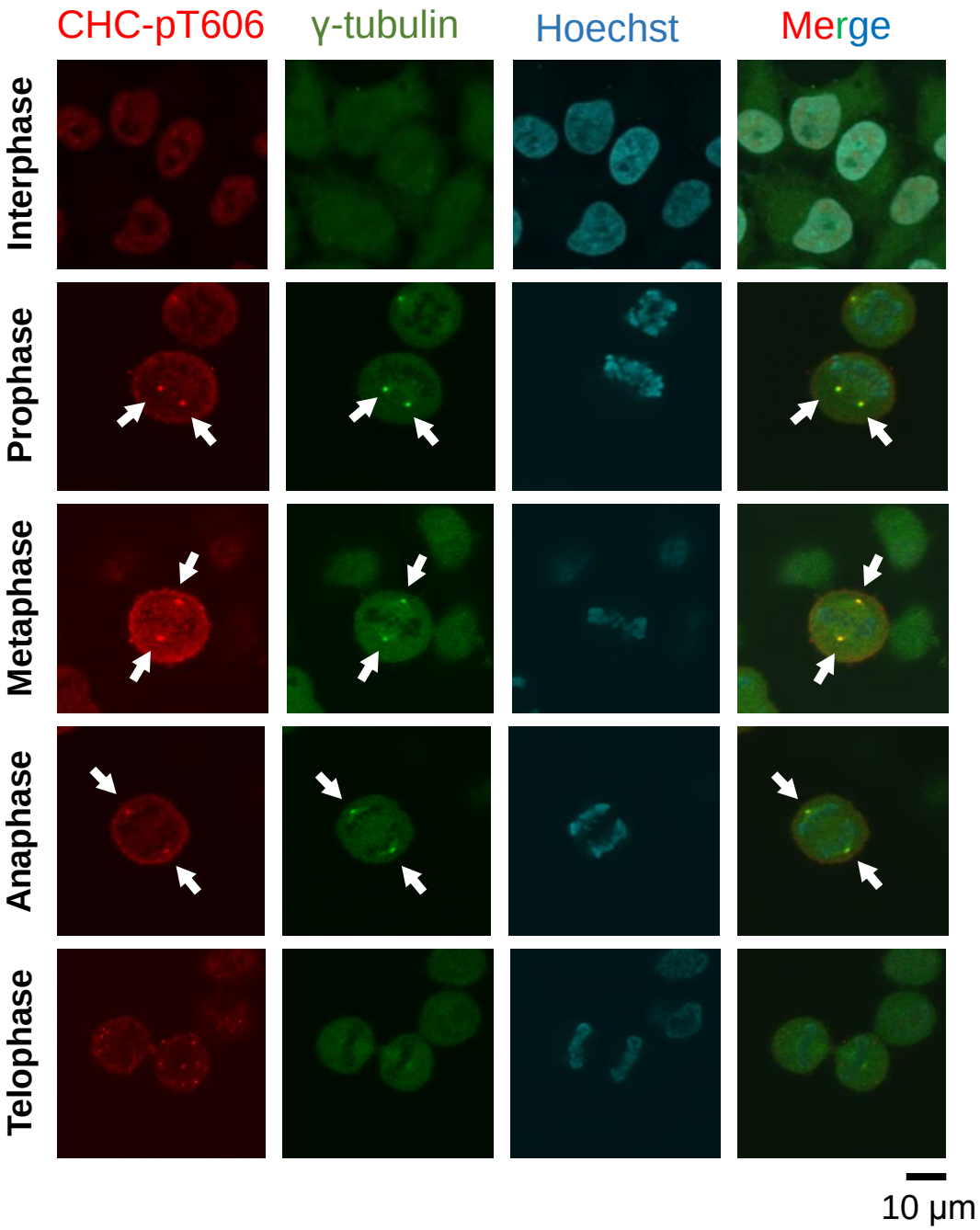
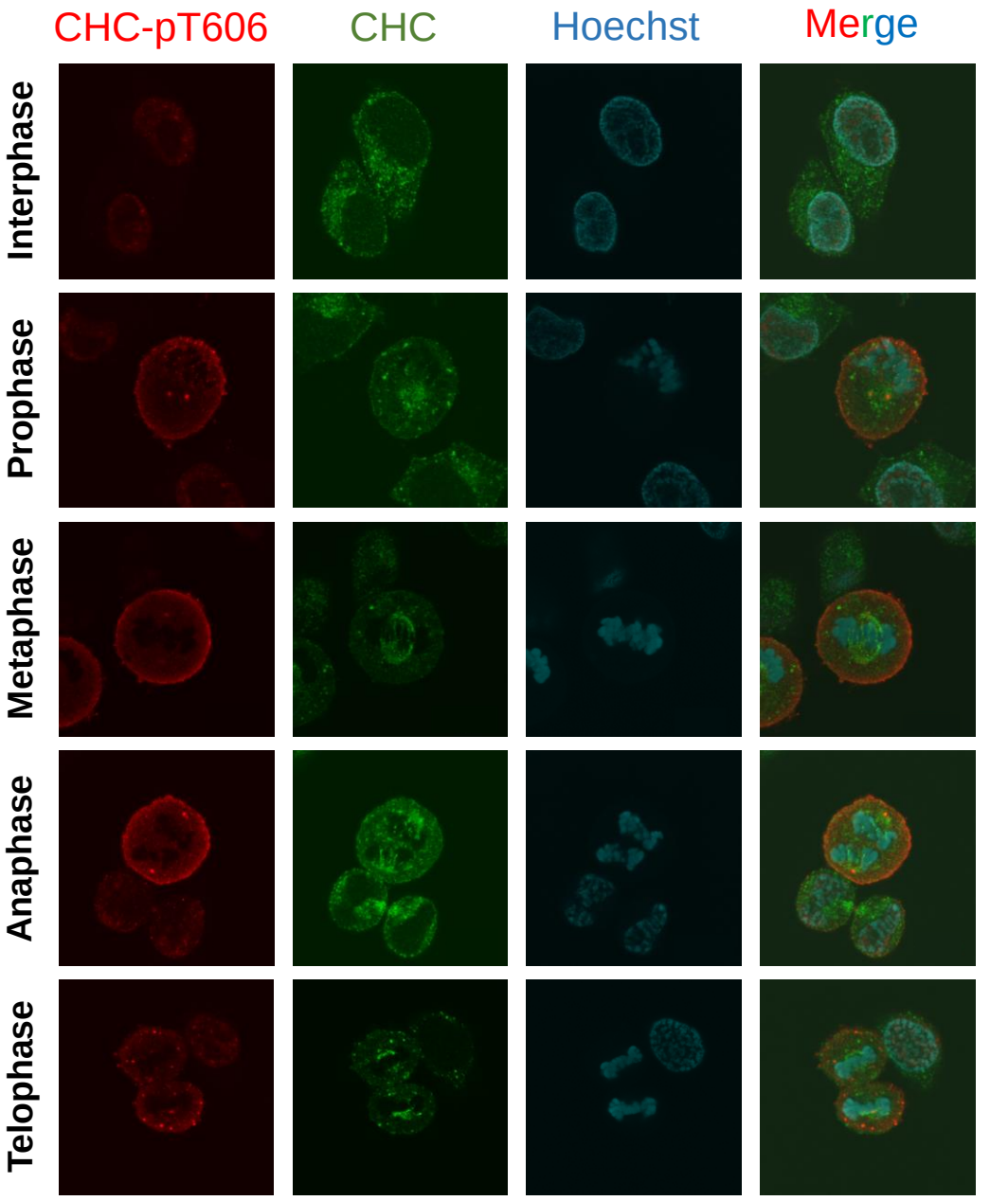

CHC-pT606
γ-tubulin
Hoechst
Merge
Interphase
Prophase
Metaphase
Anaphase
Telophase
10 μm

Figure 3.

D


CHC-pT606
CHC
Hoechst
Merge
Interphase
Prophase
Metaphase
Anaphase
Telophase
10 µm

E

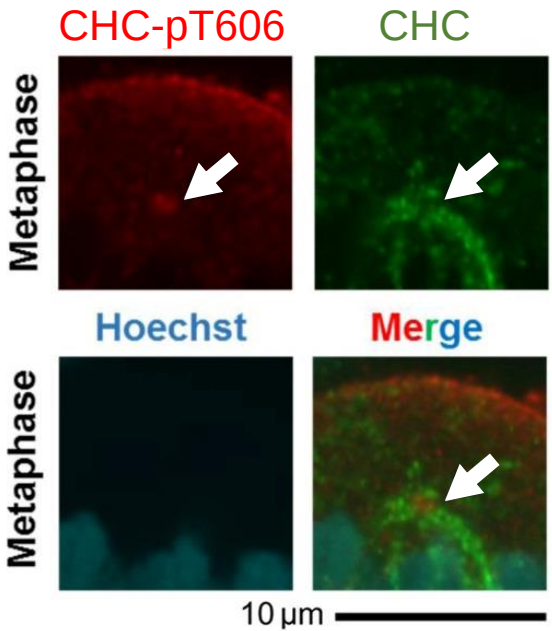

CHC-pT606
CHC
Metaphase
Hoechst
Merge
Metaphase
10 µm

Figure 3.

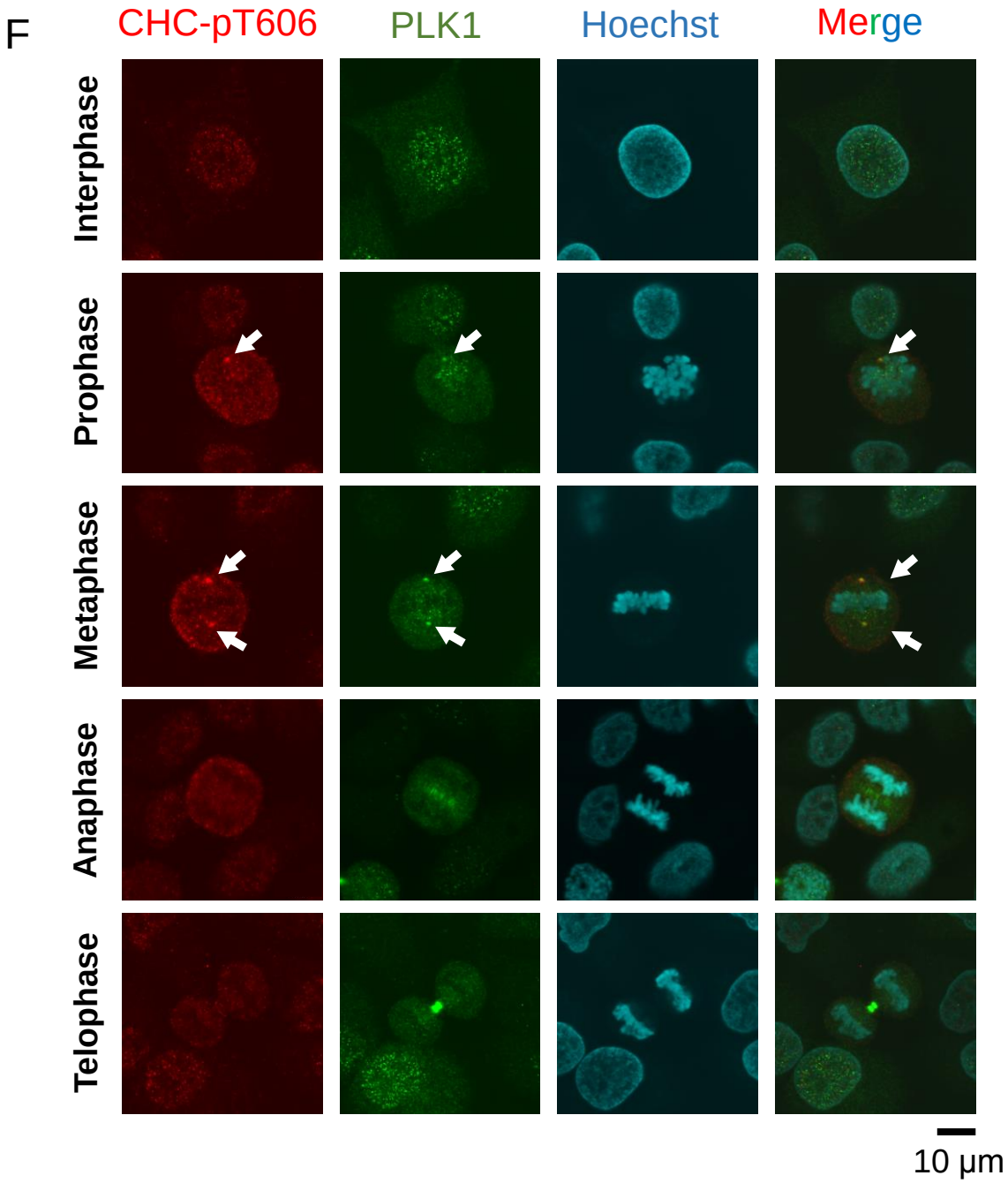
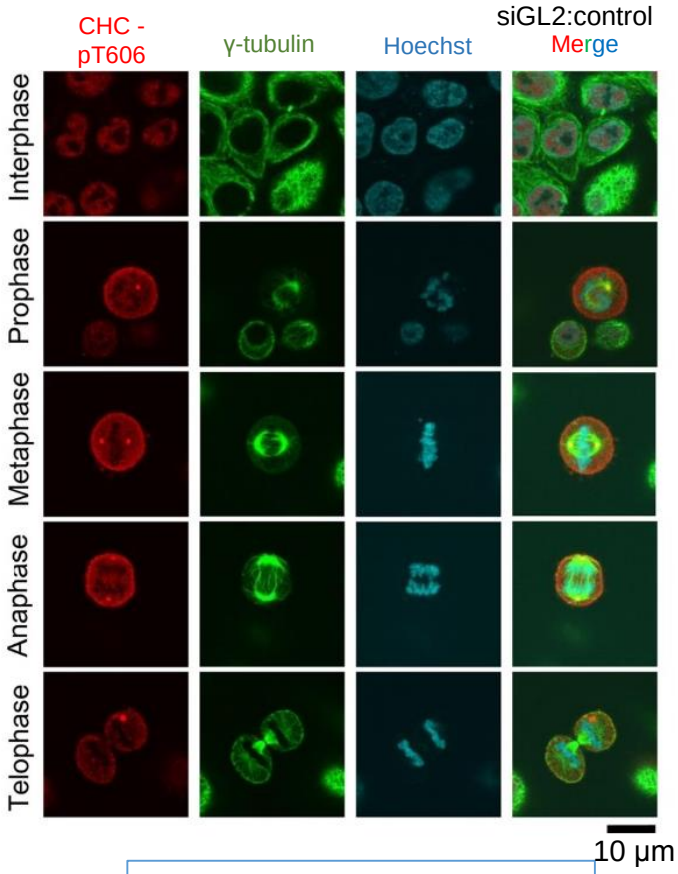

F
CHC-pT606
PLK1
Hoechst
Merge
Interphase
Prophase
Metaphase
Anaphase
Telophase
10 μm

Figure 4.

A

i) HeLa S3, no KD(siGL2)



ii) HeLa S3, GAKKD(siGAK)

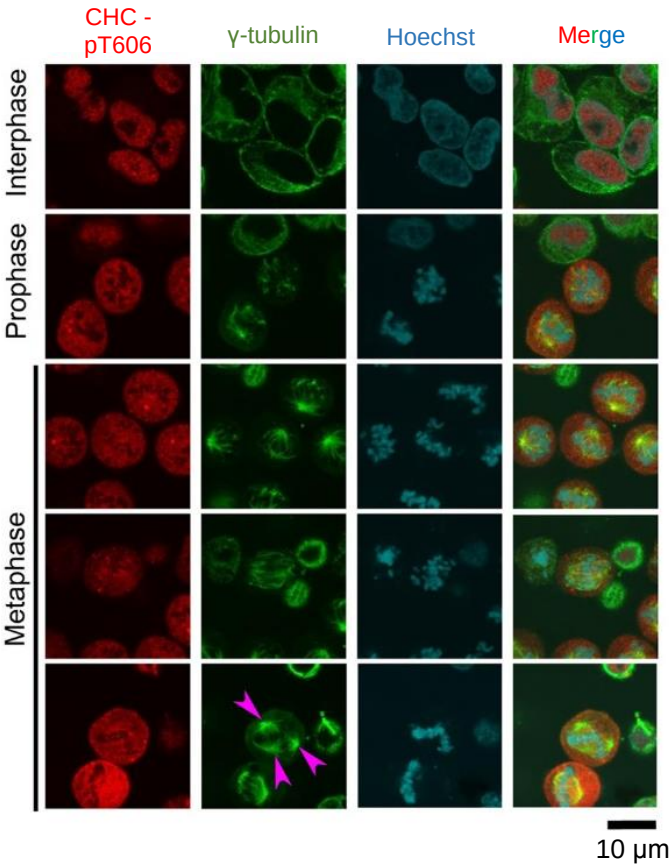
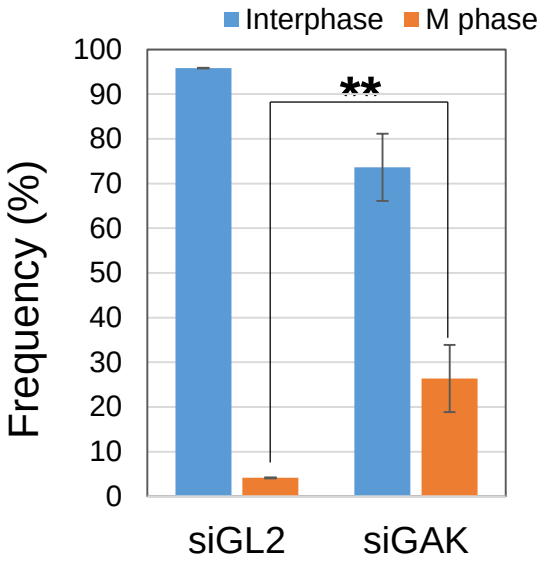


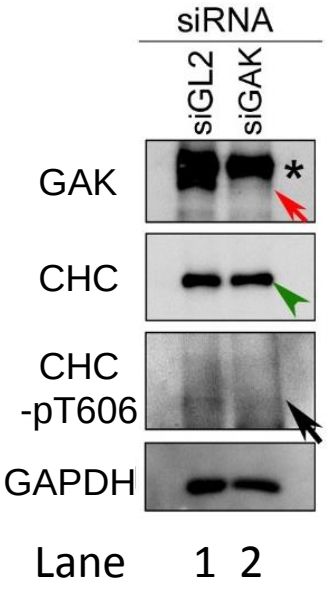
Figure 4.

B

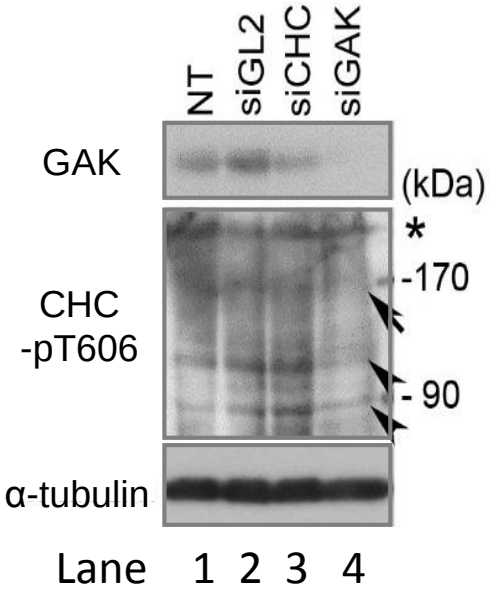


** $P < 0.01$

C



D



E

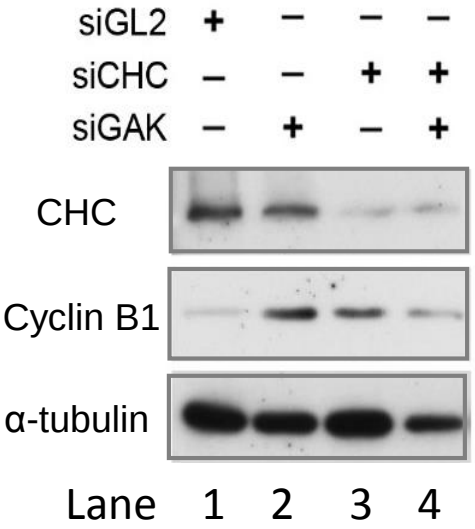
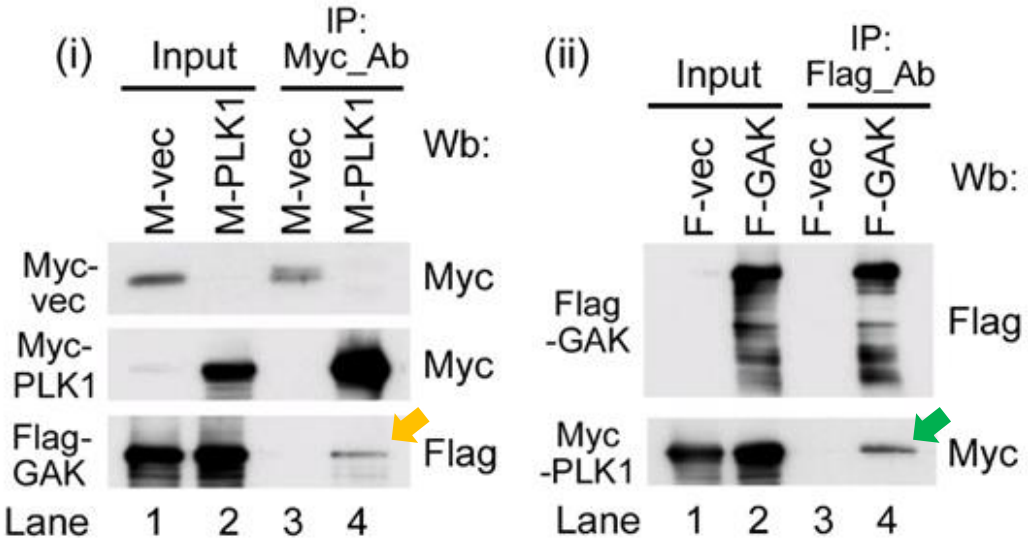


Figure 5.

A


(i)
Input
IP: Myc_Ab
M-vec
M-PLK1
M-vec
M-PLK1
Wb:
Myc-vec
Myc
Myc-PLK1
Myc
Flag-GAK
Flag
Lane 1 2 3 4
(ii)
Input
IP: Flag_Ab
F-vec
F-GAK
F-vec
F-GAK
Wb:
Flag -GAK
Flag
Myc -PLK1
Myc
Lane 1 2 3 4

B

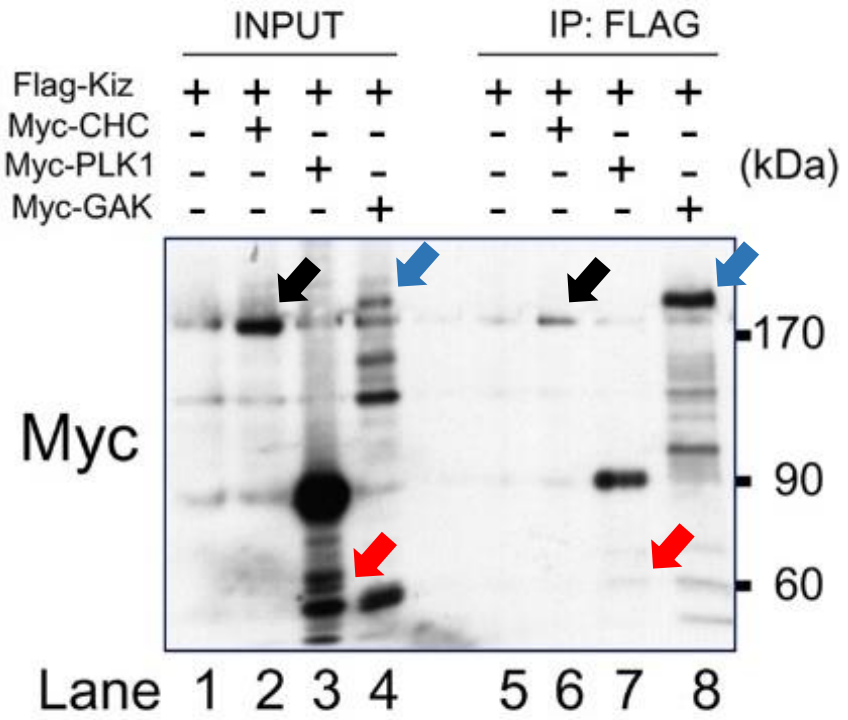

INPUT
IP: FLAG
Flag-Kiz + + + + + + + +
Myc-CHC - + - - - + - -
Myc-PLK1 - - + - - - + -
Myc-GAK - - - + - - - +
(kDa)
Myc
170
90
60
Lane 1 2 3 4 5 6 7 8

Figure 6.

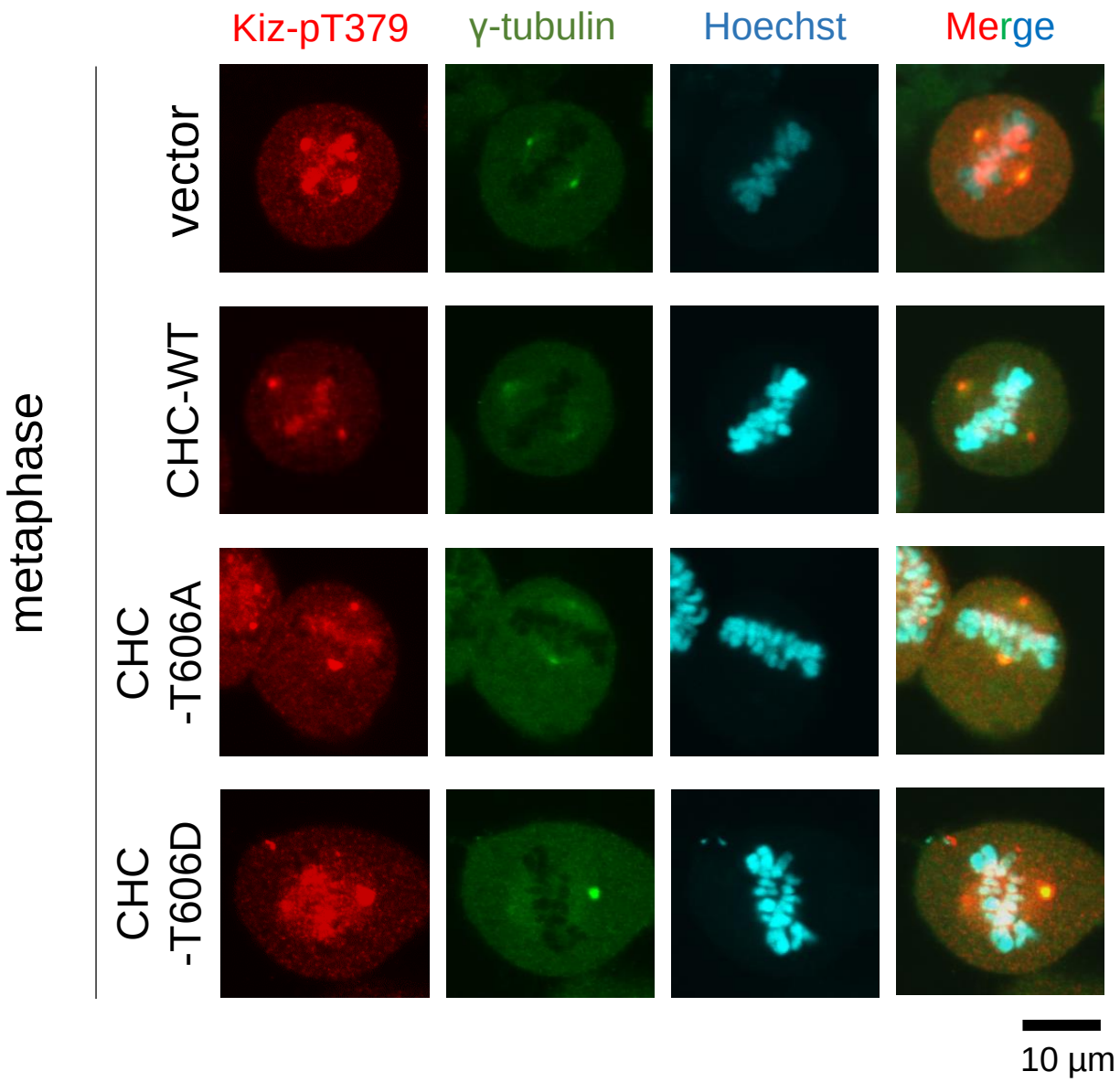
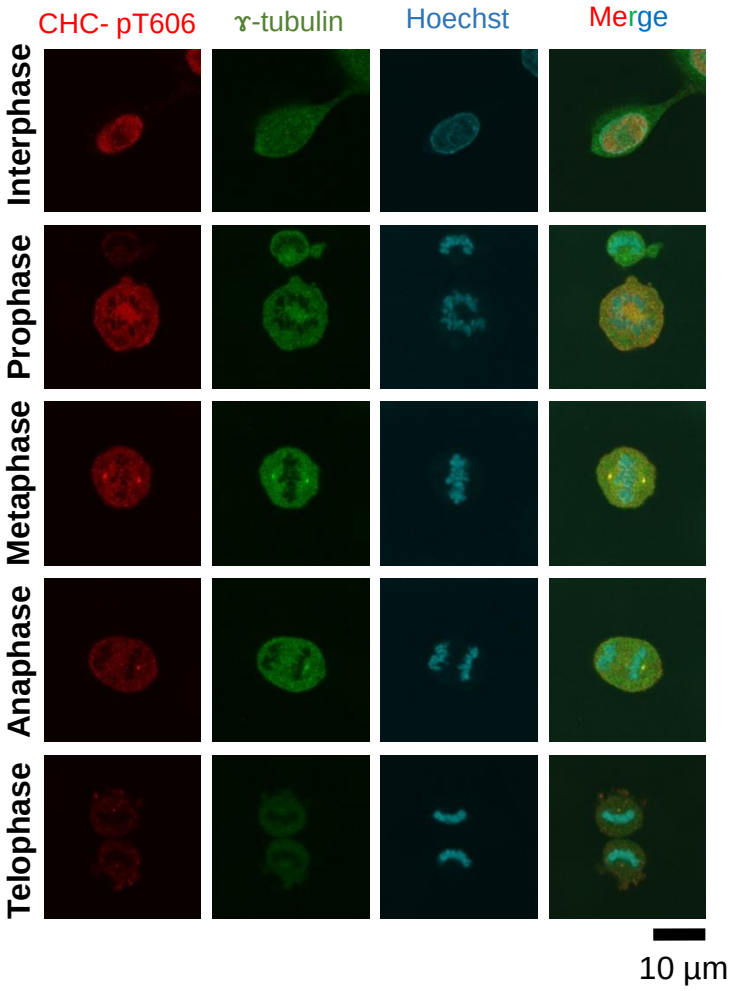

Kiz-pT379
γ-tubulin
Hoechst
Merge
metaphase
vector
CHC-WT
CHC
-T606A
CHC
-T606D
10 μm

Figure 7.

A

cell:SAS



B

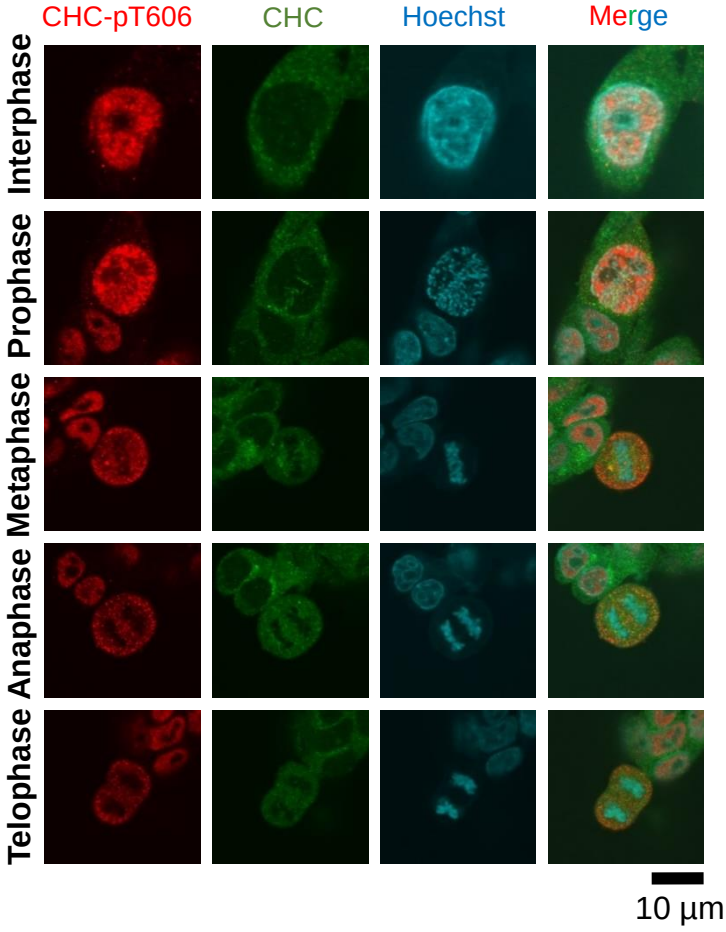


Figure 7.

C

cell:SAS

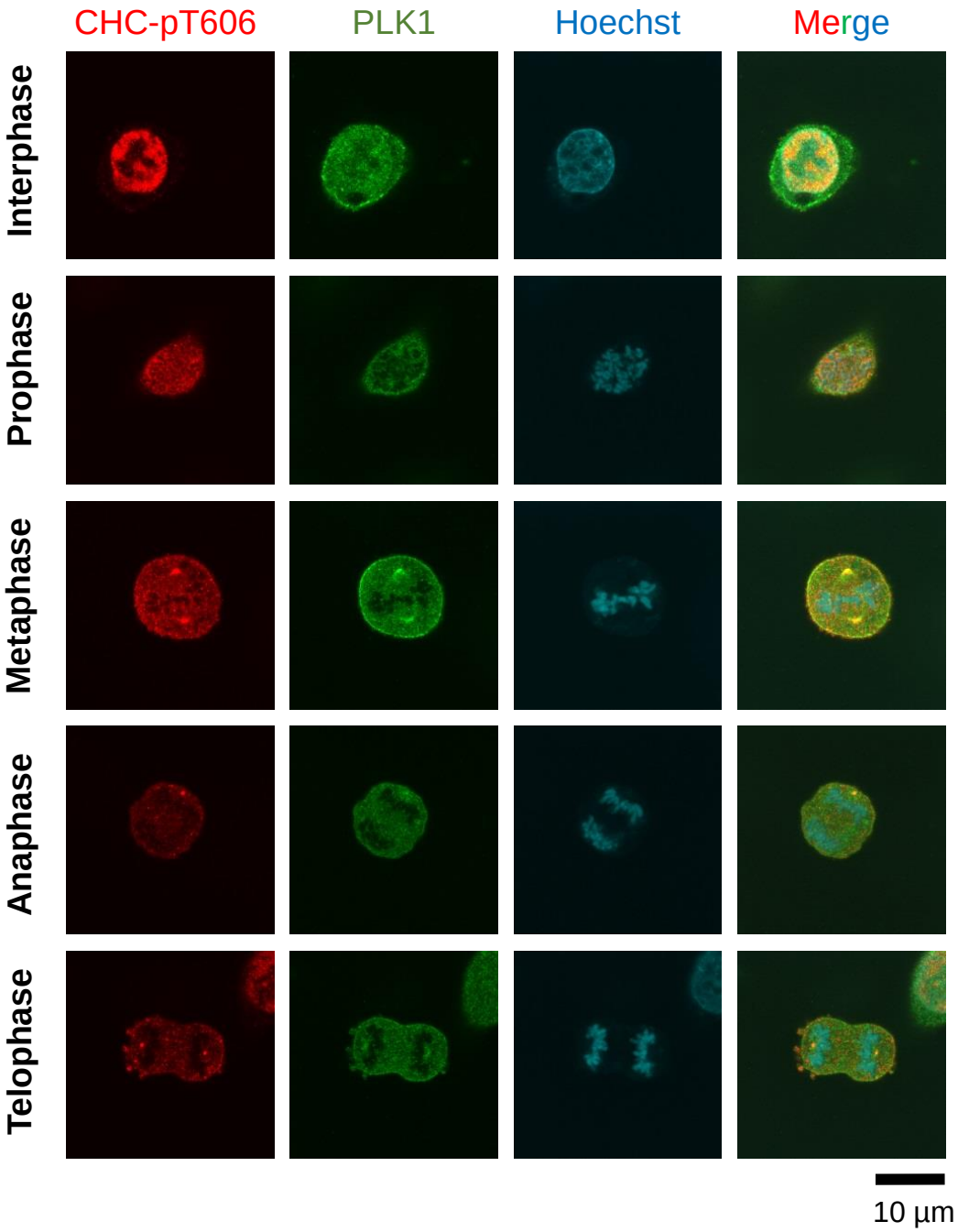
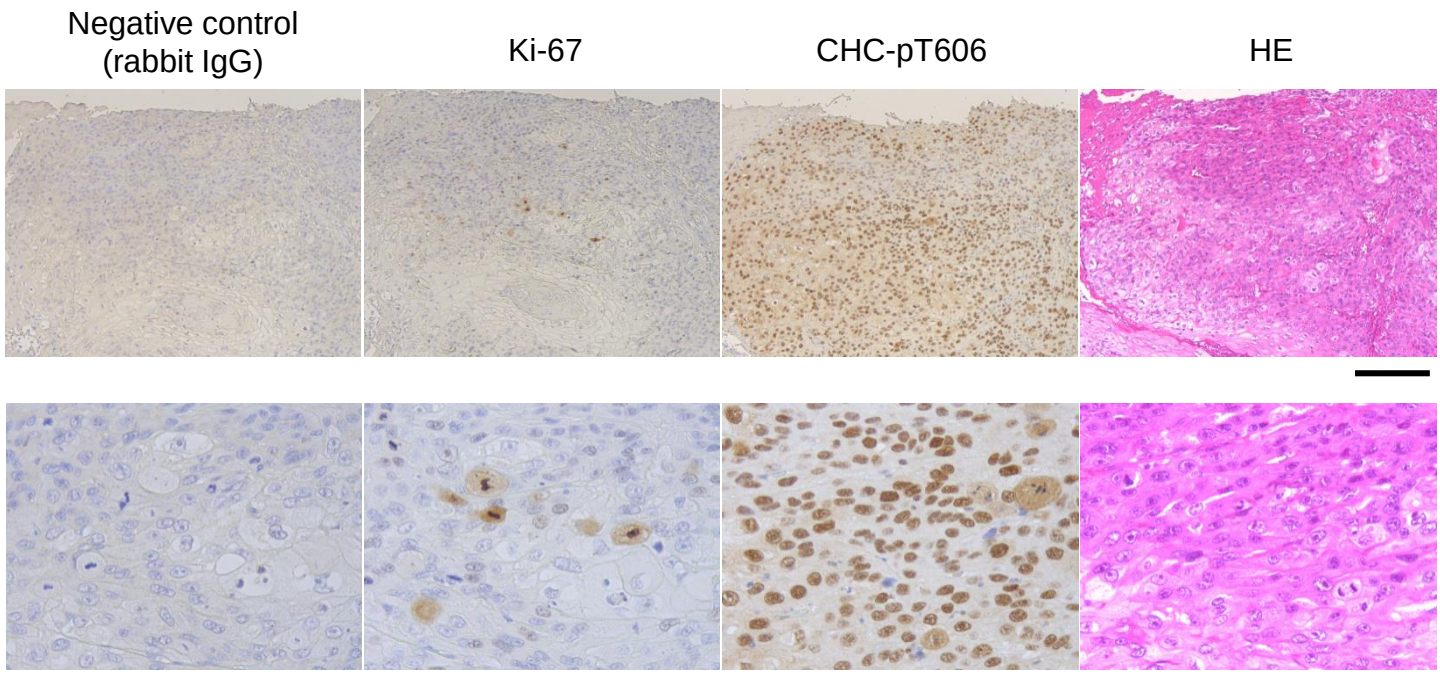


Figure 8.

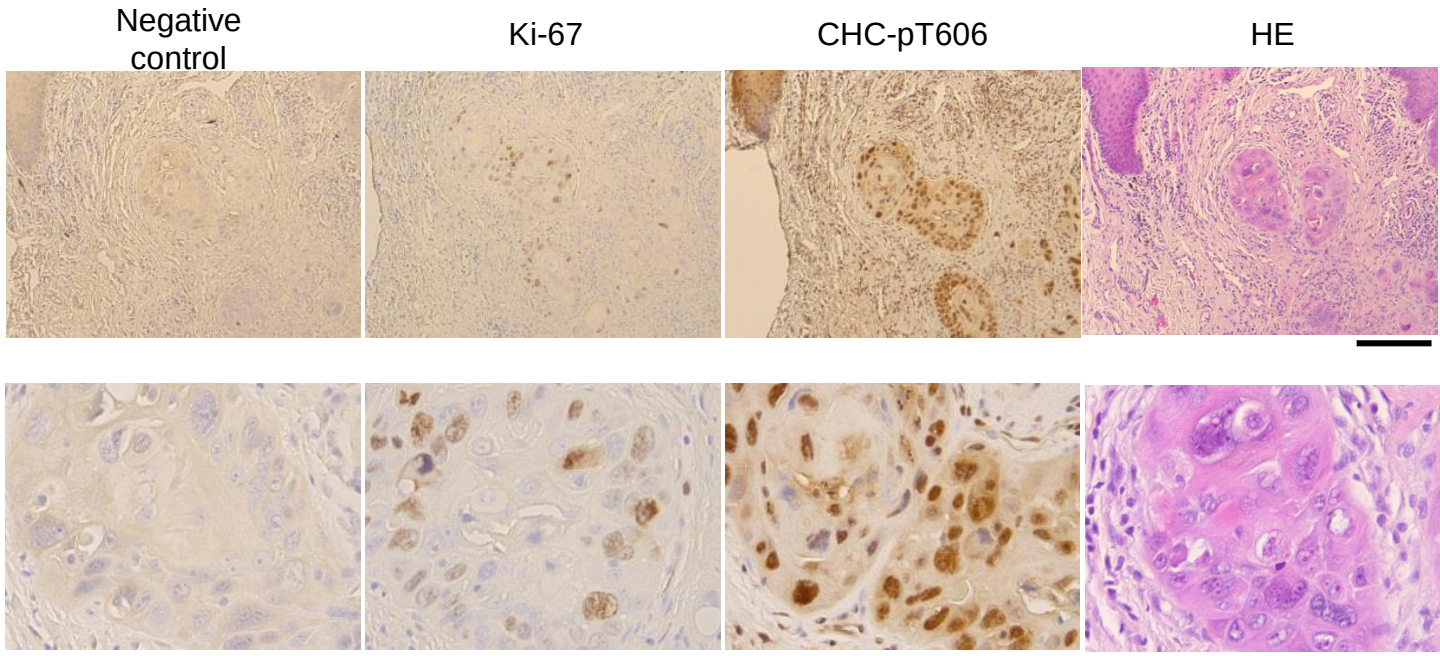
A

症例1：舌癌（SCC）
分化度：高分化　Stage Ⅰ



B

症例2：舌癌（SCC）
分化度：中等度
StageⅣ



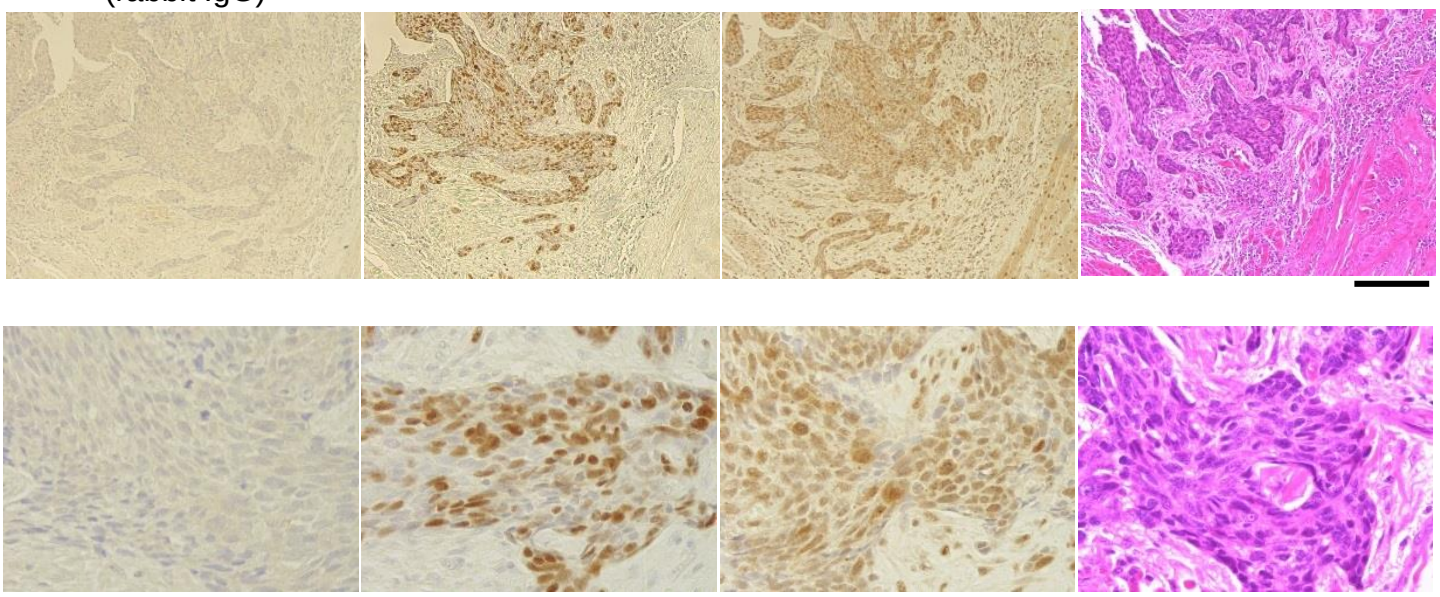
200 μm　50 μm

Figure 8.

C

症例3：舌癌（SCC）
分化度：低分化　Stage Ⅱ

Negative control (rabbit IgG) | Ki-67 | CHC-pT606 | HE

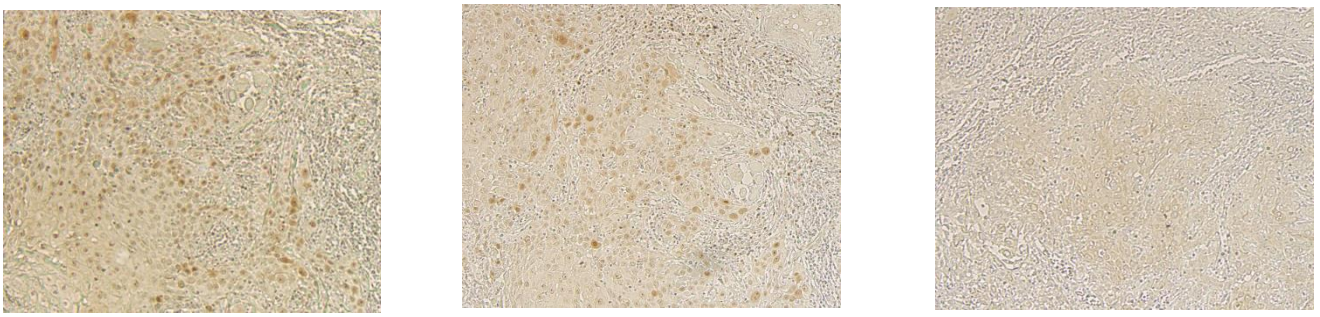


200 µm　50 µm

D

CHC-pT606 peptide competition

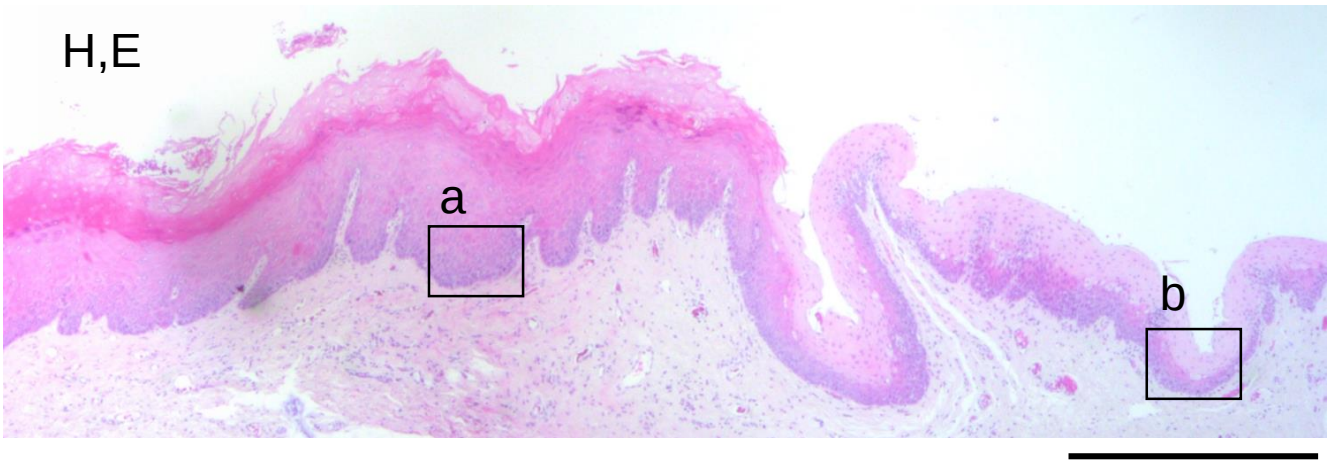
no peptide | Non phospho peptide | phospho peptide



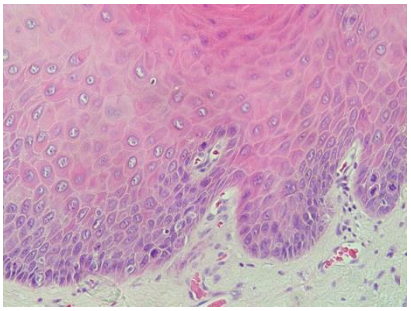
200 µm

Figure 9.

A

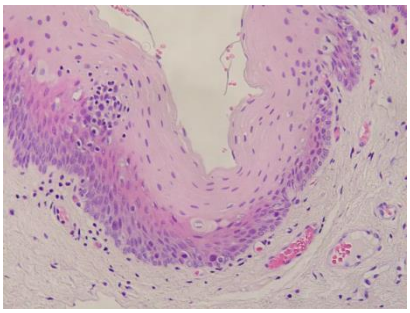


a

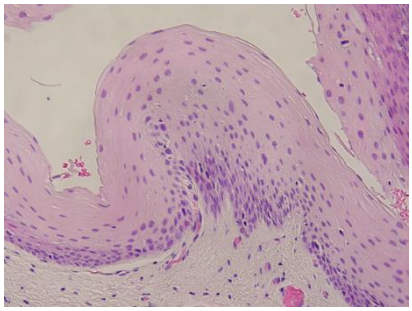


moderate dysplasia

b



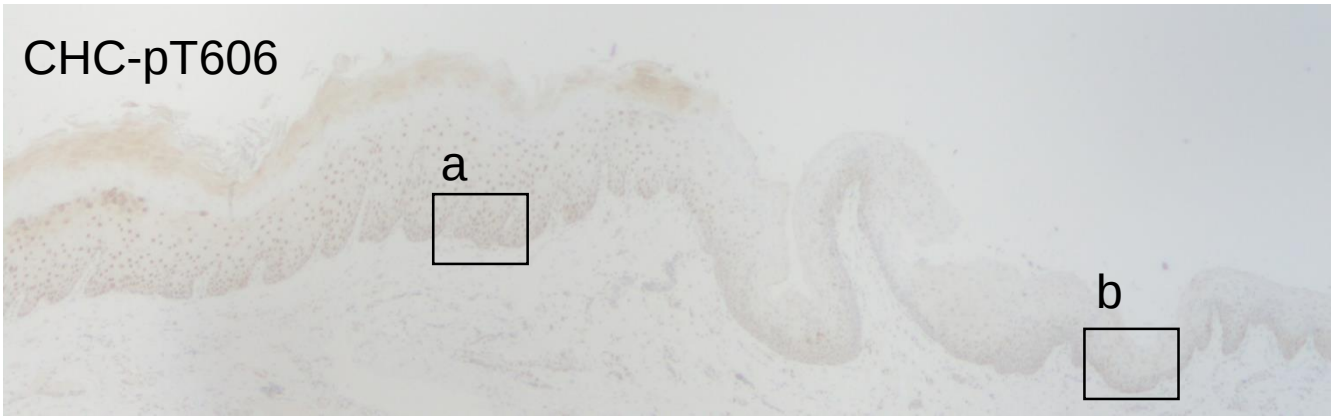
mild dysplasia



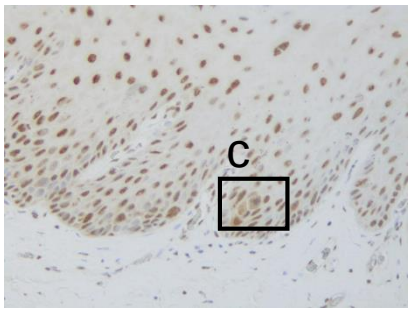
切除断端

500 μm 50 μm

B

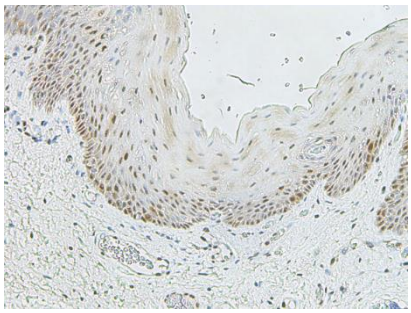


a

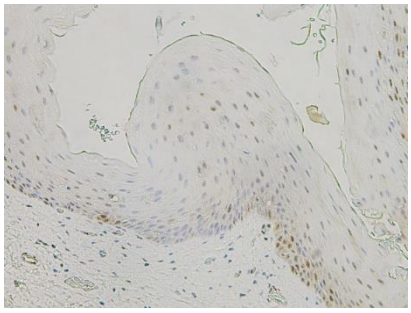


moderate dysplasia

b

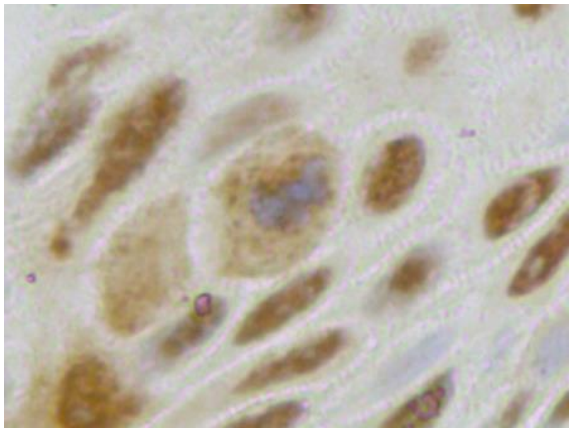


mild dysplasia



切除断端

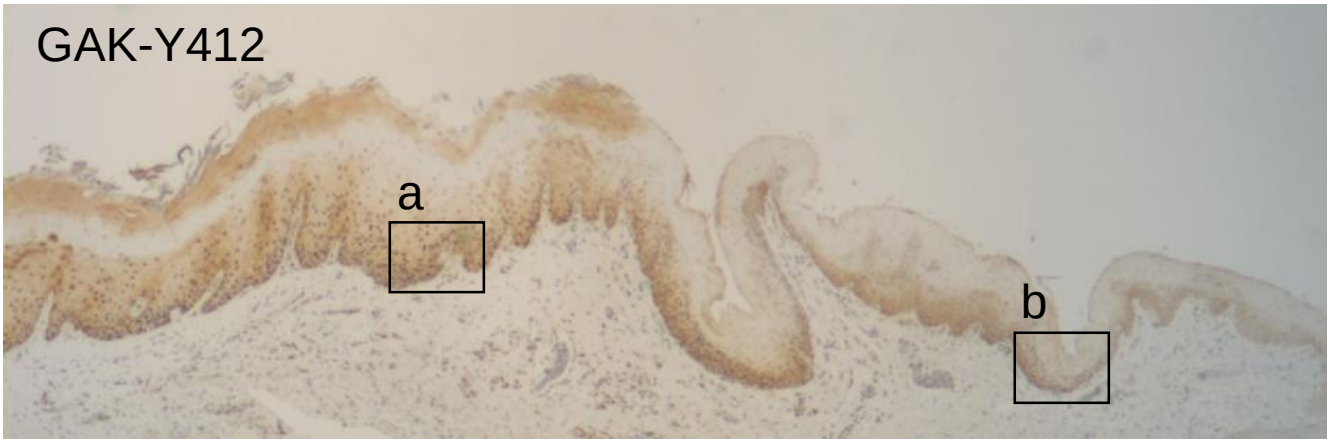
c 拡大図



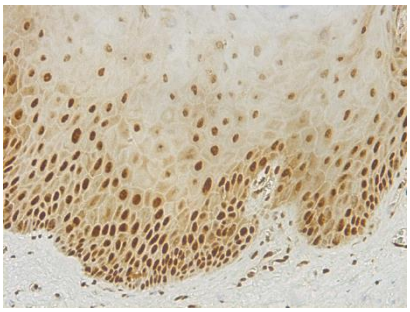
500 µm 50 µm

Figure 9.

C

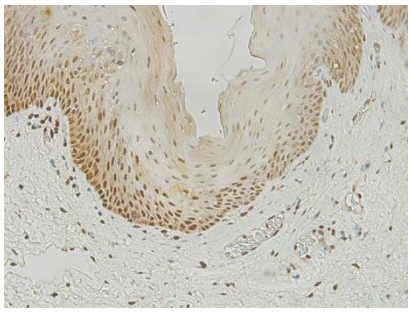


a

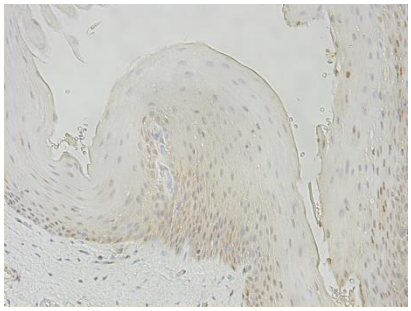


moderate dysplasia

b

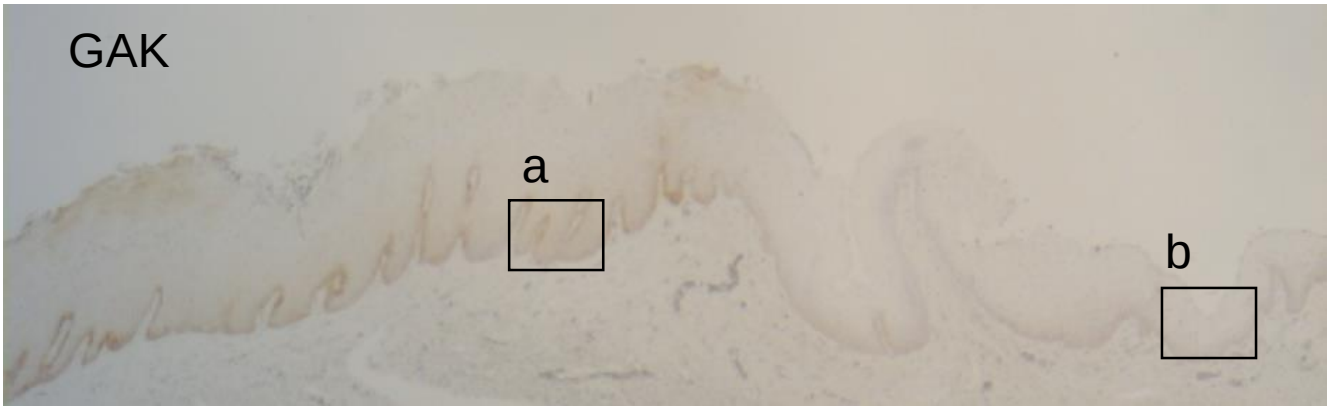


mild dysplasia

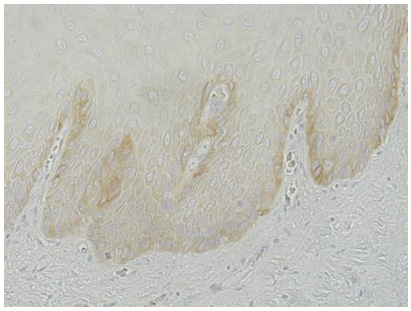


切除断端

D

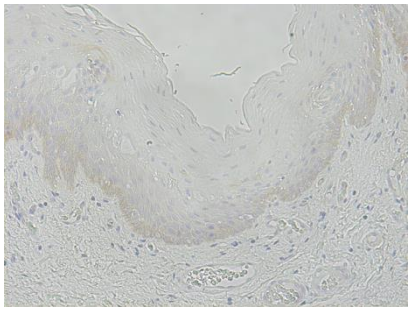


a

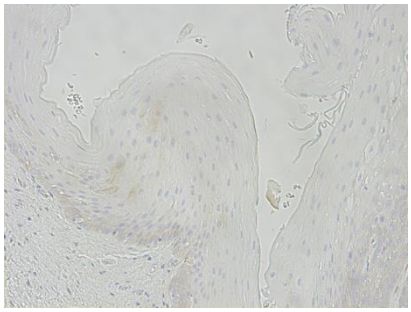


moderate dysplasia

b



mild dysplasia

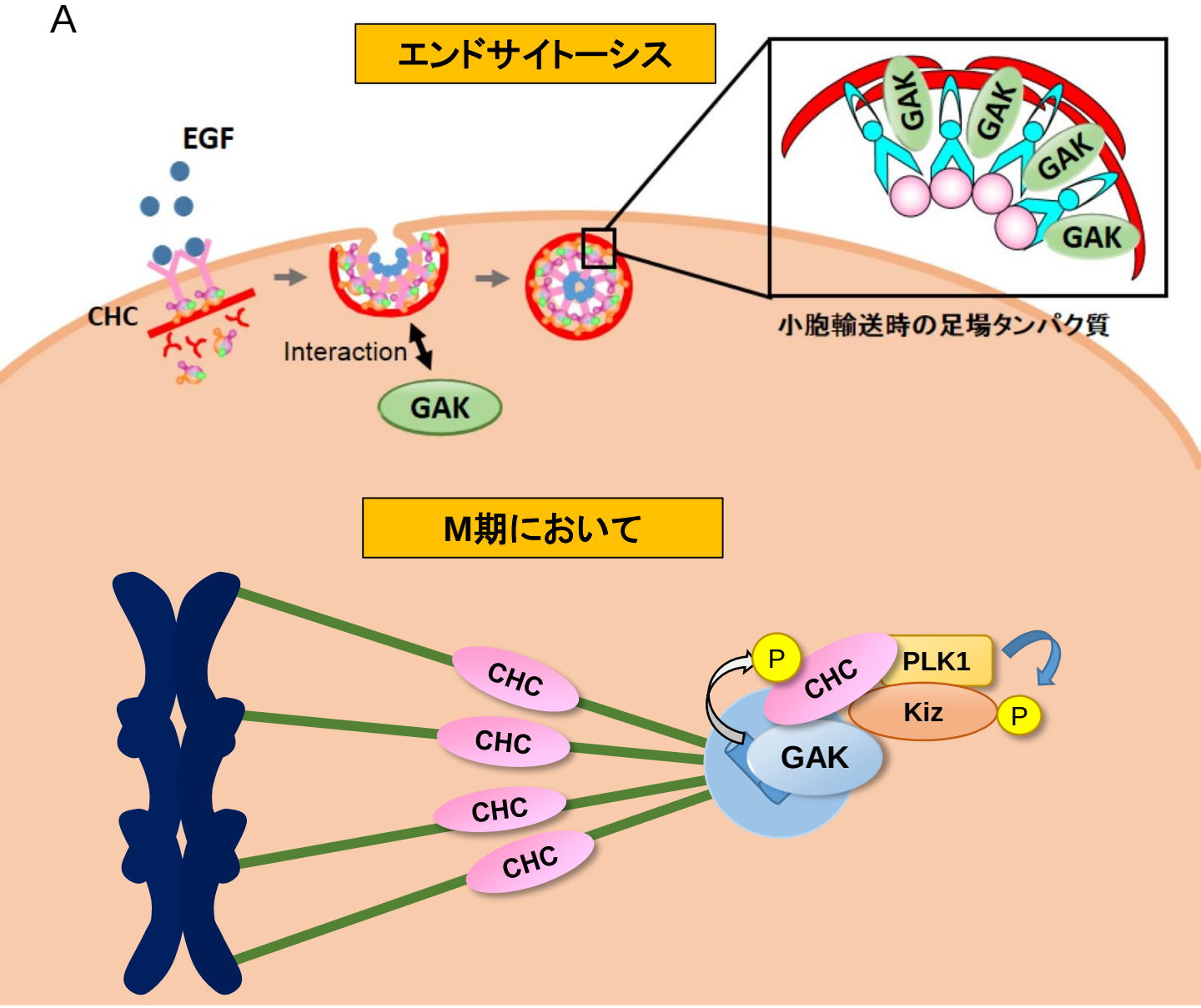


切除断端

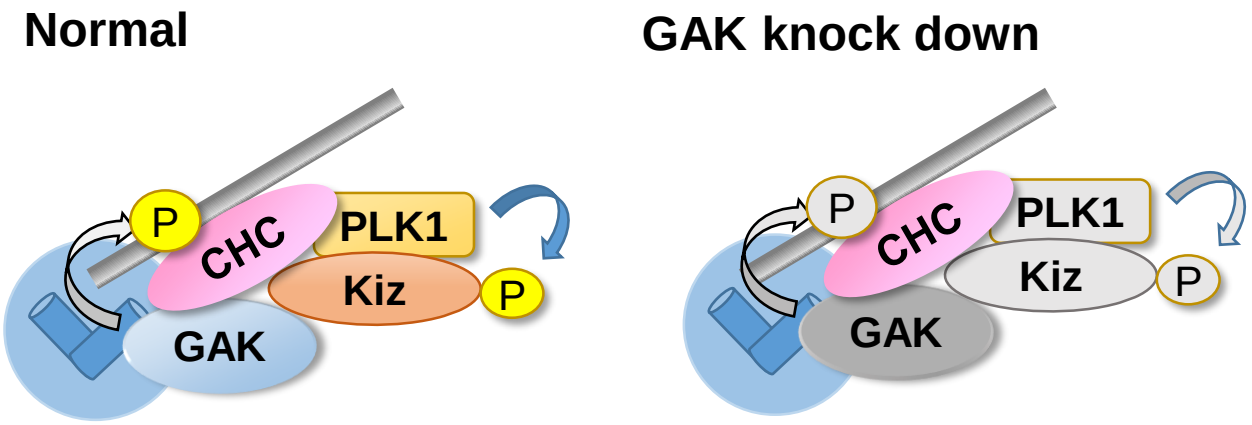
500 μm 50 μm

Figure 10.

A


エンドサイトーシス
EGF
CHC
Interaction
GAK
GAK
GAK
GAK
GAK
小胞輸送時の足場タンパク質
M期において
CHC
CHC
CHC
CHC
P
CHC
PLK1
Kiz
P
GAK

B


Normal
P
CHC
PLK1
Kiz
P
GAK
GAK knock down
P
CHC
PLK1
Kiz
P
GAK