

Polo-like kinase1 は vimentin のリン酸化を介して
分裂期において初期エンドソームの
膜融合を阻害する

井川 敬介

目次

要旨	・ ・ ・ 1～2
第一章 序論	・ ・ ・ 3～9
第二章 材料と方法	・ ・ ・ 10～15
第三章 結果	・ ・ ・ 16～37
第四章 考察	・ ・ ・ 38～41
参考文献	・ ・ ・ 42～50
謝辞	・ ・ ・ 51

要旨

メンブレントラフィック(小胞輸送)は、様々な分子を細胞内の目的の場所へと的確に輸送する機構である。この機構は、分裂期において大きく変化する。特に、初期エンドソームは、分裂期において小胞同士の膜融合が阻害されることが古くから報告されている。しかし、その分子機構や生理的機能は未だに解明されていない。本研究では、分裂期の主要な制御因子である Polo-like kinase1(Plk1)が、この現象を制御する可能性について検討を行った。私は、siRNA や特異的阻害剤を用いて Plk1 を阻害すると、分裂期において初期エンドソームの膜融合が抑制されず、その結果、初期エンドソームが肥大化する現象を発見した。さらに、初期エンドソーム分画に存在する Plk1 の基質をリン酸化プロテオーム解析により探索をした結果、中間径フィラメントである vimentin の 459 番目のセリンが Plk1 によってリン酸化されることがわかった。vimentin をノックダウンすると、分裂期における初期エンドソームの膜融合抑制が起こらなかった。この現象は siRNA 耐性のマウス 野生型 vimentin (vimentin-WT)や 459 番目のセリンをグルタミン酸に置換した擬リン酸化型変異体 vimentin (vimentin-S459E)の発現によってレスキューされたが、459 番目のセリンをアラニンに置換した非リン酸化型変異体 vimentin (vimentin-S459A)ではレスキューされなかった。このことから、Plk1 は分裂期において、vimentin 459 番目のセリンをリン酸化し、初期エンドソームの膜融合を抑制することが示された。次に、この Plk1-vimentin による膜融合の抑制機構が分裂期後期における小胞輸送に関与する可能性について、 β 1-integrin 小胞の輸送に着目して検討を行った。integrin は細胞-基質間接着を担う膜貫通型レセプターであり、分裂期後期においては、Rab21 依存的な小胞輸送により細胞分裂溝へと輸送され、細胞質分裂を促進することが報告されている。vimentin をノックダウンした結果、細胞分裂溝への β 1-integrin の局在が減弱し、多核化した細胞の割合が上昇した。この現象も、vimentin-WT や vimentin-S459E の発現でレスキューされたが、vimentin-S459A ではレスキューされなかった。このことから、vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化が Rab21 依存的な分裂溝への β 1-integrin 小胞の輸送および細胞質分裂の促進に必要であることが示めされた。以上の結果から、Plk1 は分裂期において vimentin459 番目

のセリンをリン酸化することによりエンドソームの膜融合を阻害し、この阻害機構が分裂期後期における integrin の輸送を制御することがわかった。

第一章 序論

メンブレントラフィックは、細胞内の様々な物質を、脂質膜小胞を用いて適材適所へと輸送する真核細胞特有のシステムである。メンブレントラフィックには、大別すると細胞内の物質を細胞外へと運び出す経路と細胞外の物質を細胞内へと取り込む経路の二つの経路が存在する(図 1、白矢印、灰色矢印)。細胞内から細胞外へと運び出す経路はエクソサイトーシスと呼ばれ、小胞体やゴルジ体から直接細胞膜へと小胞を輸送する分泌経路や、細胞外から細胞内へと取り込まれた分子を細胞膜へと送り返すリサイクリング経路が存在する(図 1、白矢印)。細胞外の物質を細胞内へと取り込む経路はエンドサイトーシスと呼ばれ、細胞膜上に存在するレセプターや細胞外に存在する栄養成分、細菌などを細胞内へと取り込む(図 1、灰色矢印)。取り込まれたレセプターや物質は、初期エンドソームにおいて分解されるものと(図 1、黒矢印)、細胞膜へとリサイクルされるものに仕分けされ、それぞれの経路へと適切に輸送される (Gruenberg, 2001; Zerial and McBride, 2001)。初期エンドソームは、様々な分子が積み荷として乗った小胞と生体膜融合することにより、その分子を受け取る。この膜融合のシステムは、small GTPase である Rab5 やそのエフェクターである early endosomal antigen 1(EEA1)、vacuolar protein sorting 34(Vps34)、そして生体膜融合の直接の制御因子である soluble

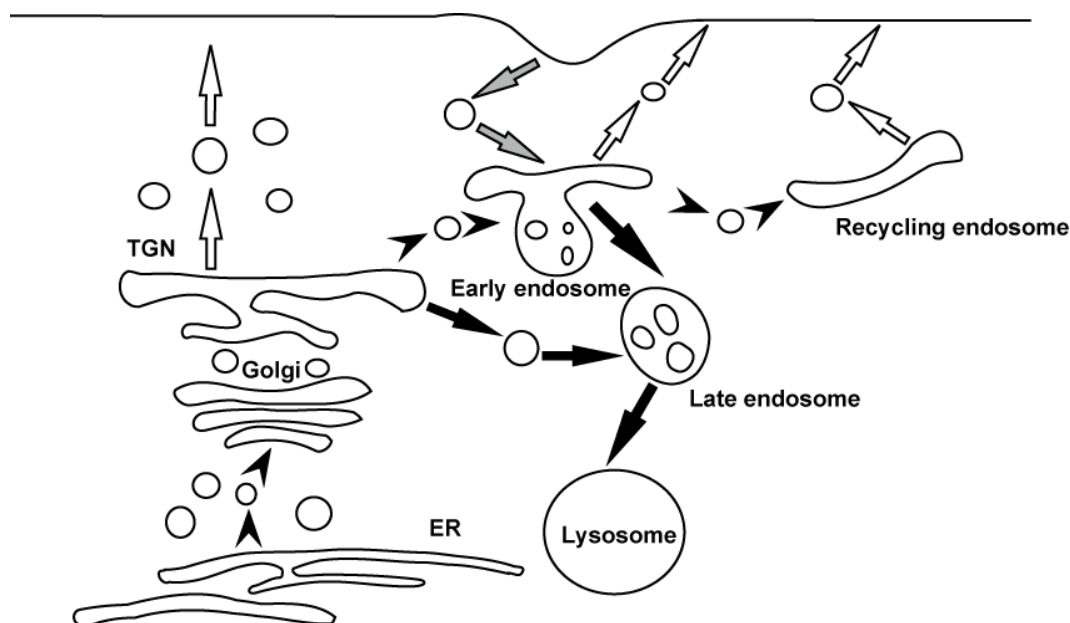


図 1. メンブレントラフィックの輸送経路

灰色矢印：細胞外から細胞内への取り込みの経路 白矢印：細胞内から細胞外への輸送経路 黒矢印：分解経路

N-ethylmaleimid-sensitive factor attachment protein receptor(SNARE)などによって制御される(Gruenberg, 2001; Zerial and McBride, 2001)。

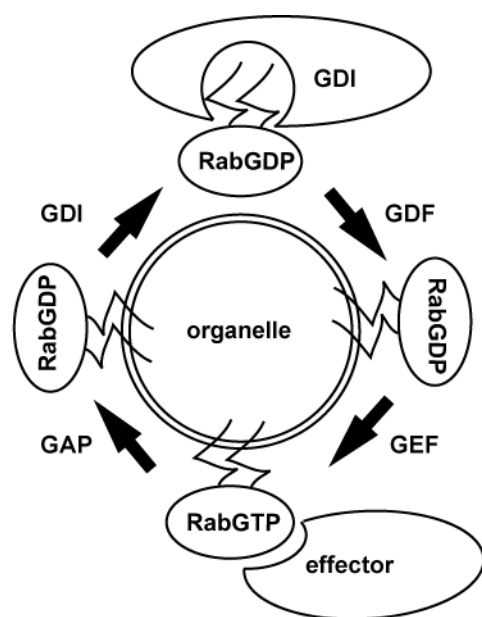


図 2 Rab の活性化サイクル

Rab は細胞質において GDI によってプレニル基を隠されることで細胞質中に存在する。GDI が GDF によって置換されると、オルガネラ上に局在し、GEF によって活性化される。この活性化した Rab にエフェクターが結合し、様々な機能を果たす。役割を果たした Rab は GAP によって不活性化され、再び GDI と結合し、細胞質中へと戻っていく。GDI:GDP dissociation inhibitor GDF:GDI displacement factor GEF:guanine nucleotide exchange factor GAP:GTPase-activating protein

Rab は Ras-like GTPase superfamily に属する small G タンパク質であり、60 以上の種類があることから、真核生物に保存されたメンブレントラフィックに関与するタンパク質の中で、最も大きなファミリーを構成すると考えられる(Pfeffer, 2001; Stenmark and Olkkonen, 2001; Zerial and McBride, 2001; Brighthouse et al, 2010)。また、Rab は GTP 結合型(活性型)と GDP 結合型(不活性型)の変換を繰り返すことで活性を切り替える分子スイッチであり、活性型のものがエフェクターとなる分子との結合を介して、輸送を制御する(Pfeffer, 2001; Stenmark and Olkkonen, 2001; Zerial and McBride, 2001; Brighthouse et al, 2010)。Rab の活性の切り替えは、guanine nucleotide exchange factor(GEF)と GTPase-activating protein(GAP)が制御する。GEF は Rab を GDP 結合型から GTP 結合型へと変換することで Rab の活

性化を誘導し、逆に GAP は Rab の GTPase 活性を促進することで、GTP 結合型から GDP 結合型への変換を誘導して、Rab を不活性化する。この Rab の活性化サイクルは、オルガネラの膜との結合に密接に関係している。不活性型の Rab-GDP は細胞質において GDP dissociation inhibitor(GDI)によりプレニル基が覆い隠されることで、膜への結合が阻害されている。この GDI が GDI displacement factor(GDF)によって置換されると、Rab-GDP はオルガネラの膜への結合が可能となる。膜に結合した Rab-GDP は GEF によって活性型の Rab-GTP に変換される。その後、GAP によって不活性化され、再び GDI と結合することで細胞質へと戻る(Grosshans et al, 2006)(図 2)。

初期エンドソームの膜融合には Rab5 が重要であることが知られている(Gruenberg, 2001; Zerial and McBride, 2001)。Rab5 は、初期エンドソーム上で GEF によって活性型 Rab5 に変換されると、エフェクターである EEA1 や Vps34/p150 複合体と結合する(Gruenberg, 2001; Zerial and McBride, 2001; Grosshans et al, 2006)。Vps34 は、class III phosphatidylinositol-3 kinase(PI3K)に属するリン脂質キナーゼであり、p150 や Beclin-1 と複合体を形成し、オートファゴソームの形成や初期エンドソームの膜融合に関与することが知られている(Simonsen and Tooze, 2009)。初期エンドソームの膜融合を制御する場合には、Vps34 は p150 と複合体を形成することで活性型 Rab5 と結合し、周辺の膜脂質をリン酸化し phosphatidylinositol-3 phosphate(PI3P)の脂質領域を作り出す(Simonsen and Tooze, 2009; Grosshans et al, 2006)。EEA1 は、分子内に PI3P との結合ドメインである FYVE ドメインと、活性型 Rab5 との結合領域を持ち、これらのドメインを介して、初期エンドソーム上に局在する(Simonsen et al, 1998; Grosshans et al, 2006)。初期エンドソーム上の EEA1 は別のエンドソーム上に局在する EEA1 とダイマーを形成することで、二つのエンドソームを繋ぐ役割を持つ(Christoforidis et al, 1999)。そして、このエンドソームが連結している部分に SNARE が動員され、二つのエンドソームの間で膜融合が起こる(McBride et al, 1999; Simonsen et al, 1998; Simonsen et al, 1999)(図 3)。SNARE は、様々なオル

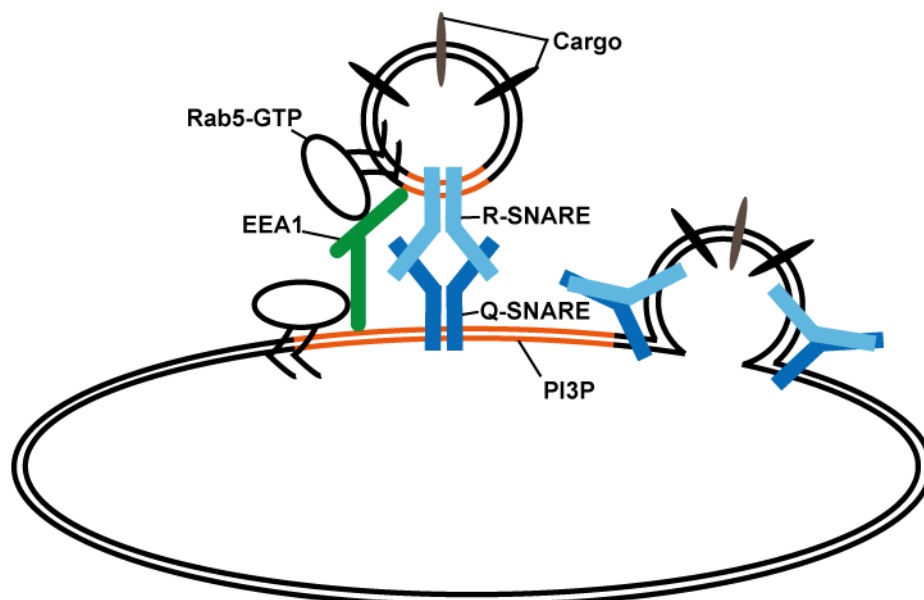


図 3 初期エンドソームの膜融合の仕組み
Rab5-GTP によって PI3P 領域が作り出され、EEA1 が結合する。EEA1 はダイマーを形成することで小胞を連結させ、SNARE を誘導する。SNARE は R-SNARE と Q-SNARE が結合することにより、小胞同士の距離を短縮し、膜融合を促進する。

ガネラ上に存在する膜タンパク質であり、Qa-、Qb-、Qc-SNARE と R-SNARE サブファミリーに分類される。Qa-、Qb-、Qc-SNARE が複合体を形成することにより Q-SNARE となり、この Q-SNARE が融合する相手方の小胞上に存在する R-SNARE と結合し、小胞同士を近接させることで膜融合を起こす。膜融合後の Q-SNARE と R-SNARE の複合体は、alpha-soluble NSF attachment proteins(α -SNAP) や N-ethylmaleimide-sensitive factor(NSF)によって再び Q-SNARE と R-SNARE に分離され、次の膜融合に備える(Jahn and Scheller, 2006)。初期エンドソームの膜融合に関わる SNARE ファミリーとしては、Q-SNARE である syntaxin-13、syntaxin-16、VTI1a、syntaxin-6 や、R-SNARE である VAMP4 が報告されている(Jahn and Scheller, 2006)。

このような初期エンドソームの膜融合システムは、主に間期の細胞での研究から提唱された概念である。一方、細胞分裂期(M 期)においては、この膜融合システムが阻害されることが知られている。まず、カエル卵抽出液を利用した *in vitro* 膜融合系を用いた研究により、M 期に機能するキナーゼである cyclin-dependent kinase 1(Cdk1)が、エンドソームの膜融合阻害に必要であることが報告された(Tuomikoski et al, 1989)。その後、培養細胞を用いた研究により、Rab5 の GAP である RN-Tre が、Cdk1 によってリン酸化され、M 期においてその活性が上昇するという報告がなされた(Lanzetti et al, 2007)。このことから、M 期におけるエンドソームの膜融合阻害は、Cdk1 を介して Rab5 の GAP が活性化することにより、Rab5 が不活性化されることで起こる現象である可能性が示唆された。また、Rab5 のエフェクターについても、M 期において挙動が変化すると報告がある。EEA1 は、活性型 Rab5 や PI3P への結合性により、細胞質と初期エンドソーム上を行き来するという局在の変化を見せる。M 期においては、EEA1 の初期エンドソームへの結合と離脱というサイクルが間期に比べて速くなることが報告されている(Bergeland et al, 2008)。これは、EEA1 の初期エンドソーム膜上への滞在時間が短くなることで、エンドソーム同士を繋ぐ役割を果たせなくなり、その結果、膜融合が抑制されている可能性を示唆している。さらに、Vps34 についても、Cdk1 によってリン酸化されることで、その活性が抑制されると報告が存在する(Furuya et al, 2010)。Vps34 は、初期エンドソームの膜上に PI3P を産生することで、EEA1 が初期エンドソームへと結合する足場を作る。このことから、Vps34 の活性抑制も EEA1 の M 期における挙動の変化に関与している可能性がある。しかしながら、これ

らの培養細胞を用いた報告は、M 期における初期エンドソームの膜融合阻害に関与することを示唆はしているが、実際に必要であることを示す具体的な証拠は提示しておらず、その詳細な分子機構や、M 期のどのイベントの制御に関与するかについては不明であった。

細胞分裂期では、染色体の凝縮、核膜崩壊に始まり、細胞質分裂による 2 つの娘細胞の形成に至るま

で、複雑な細胞内現象が規則正しく行われなければならない。これらの規則正しい進行のためには、そ

れぞれのステップを進行させる因子が秩序正しく合成、活性化されることが必要である。さらに活性化された因子がその役割を終えるときには、分解などにより迅速に不活性化されることが必要である。このような、M 期における多様な因子の活性化や不活性化には、M 期特異的な多様なキナーゼが関わる。Polo-like kinase 1(Plk1)は Plk ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、G2 期の終わりから M 期にかけてタンパク質量、キナーゼ活性共に最大になる(Golsteyn et al, 1995; Lane and Nigg, 1996; Archambault and Glover, 2009)。Plk1 は N 末端側にキナーゼドメインを、C 末端側に polo-box ドメイン(PBD)と呼ばれる領域を持つ(Elia et al, 2003a; Elia et al, 2003b; Archambault and Glover, 2009; Park et al, 2010)(図 4)。PBD は、二つの polo-box(PB)モチーフにより構成されるリン酸化結合ドメインであり、PB1 と PB2 がリン酸化アミノ酸残基を挟み込むように認識してリン酸化タンパク質に結合する (Park et al, 2010) (図 4)。PBD 結合コンセンサス配列として、S-pS/pT-P/X が同定されており、この配列は Cdk1 のリン酸化サイトと一致している(Elia et al, 2003a; Elia et al, 2003b)。そのため、Plk1 は主に Cdk1 によってリン酸化された分子を基質として認識し、リン酸化する (Elia et al, 2003a; Elia et al, 2003b)。Plk1 は M 期において数多くの基質を持ち、そのリン酸化によって M 期の現象を広範囲にわたって制御する(Archambault and Glover, 2009; Park et al, 2010; Bruinsma et al, 2012)。その制御は、中心体の成熟や分離(Lane and Nigg, 1996; Feng et al, 1999; Yarm, 2002; Casenghi et al, 2003; van et al, 2004; Sumara et al, 2004; Casenghi et al, 2005; Rapley et al, 2005)、ゴルジ体の断片化(Lin et al, 2000; Sutterlin et al, 2001)、染色体の整列と分離(Sumara et al, 2002; Gimenez-Abian et al, 2004; Hornig and Uhlmann, 2004; Hauf et al, 2005; Matsumura et al, 2007)、細胞質分裂(Lee et al, 1995; Mundt et al, 1997; Seong et al, 2002; Zhou et al, 2003; Neef et al, 2003; Yamaguchi et al, 2005; Niiya et al, 2006; Bastos

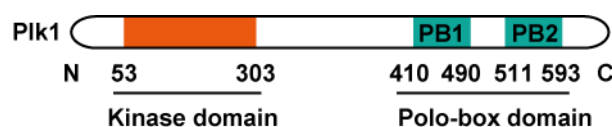


図 4 ヒト Plk1 のドメイン構造
Plk1 は N 末端側にキナーゼドメインを持ち、C 末端側に polo-box ドメインを持つ。Polo-box ドメインには二つの polo box(PB) モチーフが存在している。

and Barr, 2010)などにわたる。Plk1 による細胞質分裂の制御には vimentin や centrosomal protein 55(Cep55)のリン酸化が重要であることが報告されている(Yamaguchi et al, 2005; Bastos and Barr, 2010)。vimentin は線維芽細胞や血管内皮細胞など多くの種類の細胞に存在する中間径フィラメントであり、様々なキナーゼによってリン酸化を受けることで重合反応が制御される(Yamaguchi et al, 2005; Ivaska et al, 2005; Izawa and Inagaki, 2006)。この重合反応の制御によって、vimentin は多種多様な現象に関係しており、例えば、integrin のリサイクリング機構などメンブレントラフィックに関わることなどが報告されている(Ivaska et al, 2005)。また、M 期においては、Plk1 によって 83 番目のセリンがリン酸化されることで脱重合反応がおこり、この反応が細胞質分裂の制御に必要であることが知られている(Yamaguchi et al, 2005)。Plk1 の Cep55 リン酸化による細胞質分裂の制御においては、Cep55 のリン酸化が endosomal sorting complexes required for transport(ESCRT)複合体を含む小胞の輸送を制御することで、細胞質分裂を正常に完了させることが言及されている(Bastos and Barr, 2010)。小胞輸送による細胞質分裂の制御機構については数多くの報告が存在し、リサイクリング経路の輸送に関わる Rab11 などが、細胞膜を変形させる因子を細胞分裂溝へ輸送する現象 (Fielding et al, 2005)や、Rab21 が integrin を含んだ小胞を分裂溝へと輸送し、細胞質分裂を促進することも報告されている(Pellinen et al, 2008)。これらの報告は、M 期におけるメンブレントラフィックの制御が細胞質分裂と深い関わりを持ち、その制御を Plk1 が担っている可能性を示している。しかしながら、初期エンドソームの膜融合阻害の観点から Plk1 と細胞質分裂の関連について検討を行った報告はこれまで存在しない。

本研究では、Plk1 が M 期における初期エンドソームの膜融合阻害を促進している可能性を考え検討を行った。その結果、siRNA や特異的阻害剤を用いて Plk1 を阻害すると、M 期において初期エンドソームの膜融合が抑制されず、その結果、初期エンドソームが肥大化することが分かった。次に、初期エンドソーム分画に存在する Plk1 の基質をリン酸化プロテオーム解析により探索をした結果、中間径フィラメントである vimentin の 459 番目のセリンが Plk1 によってリン酸化されること、また、このリン酸化依存的に初期エンドソームの膜融合が抑制されることもが明らかとなった。さらに、この Plk1-vimentin による膜融合の抑制機構が、Rab21 依存的な細胞分裂溝への integrin 小胞の輸送と細胞

質分裂の促進に必要であることが示めされた。

第二章 材料と方法

1. 細胞培養及び細胞周期の同調

HeLa細胞は10% Fetal Bovine Serumを含むDMEM培地で37°C、5%二酸化炭素存在下で培養した。細胞周期の同調にはダブルチミジンブロック法を用いた。まず、対数増殖期の細胞を、2 mM のチミジンで17時間処理を行いS期に同調させた後に、細胞を新鮮な培地で二度洗浄してリリースした。リリースから8時間後に、再び2mMのチミジンで15時間の処理を行い、細胞をG₁/S期の境界に停止させ、再び細胞を新鮮な培地で二度洗浄してリリースした。リリースから10~12時間後を、細胞がM期のピークとして観察を行った。M期に細胞を停止させる場合には、二度目のリリース後8~11時間でMG132 (Wako)(最終濃度 50 µM)またはnocodazole (Sigma)(最終濃度 150 ng/ml)を培地中に添加した。また、Plk1を阻害する場合には、リリース後8~10時間後にBI2536 (Axon Medchem)(最終濃度 100 nM または 1 µM)を培地中に添加した。

2. In cell vesicle fusion アッセイ

チミジン、MG132 (Wako)(最終濃度 50µM)の添加によってS期又はM期に停止させたHeLa細胞に、Alexa647-EGF (Invitrogen)を37°Cで5分間取り込ませた。その後、acid wash buffer (200 mM NaCl、50 mM MES、pH 5.0)を用いて、4°Cで5分間処理し細胞を洗浄した。さらにAlexa555-EGF (Invitrogen)を37°Cで5分間取り込ませた後に、新鮮な培地で洗浄し、37°Cで5分間培養した。この細胞を3.7%ホルマリンで固定し、Zスタック画像を取得後、画像処理、解析ソフトであるMeta Morph (Molecular Device)を用いて3Dデコンボリューションにかけた。Alexa647-EGFとAlexa555-EGFの画像から、Image Jによって二色がマージしている領域を定義し、その定義された領域の体積をMeta Morph (Molecular Device)によって測定した。ライブイメージングにおいては、M期に停止させたHeLa細胞に、上記と同様の方法でAlexa555-EGF (Invitrogen)とAlexa488-EGF (Invitrogen)を取り込ませ、新鮮

な培地で洗浄後すぐに観察を行った。この時のタイムラプス観察には CV1000 共焦点顕微鏡 (YOKOGAWA)を用い、37°C、5%二酸化炭素条件下で、1 秒間隔で 15 分間撮影を行った。

3. siRNA

Plk1 と vimentin の siRNA は以下のように設計し、日本バイオサービスで作製した。

- Plk1-1 sense:5'-ggttttcgattgctcccagtt-3'
- Plk1-1 antisense:5'-ctgggagcaatcgaaaacctt-3'
- Plk1-2 sense:5'-gggcggctttgccaagtgcctt-3'
- Plk1-2 antisense:5'-gcacttggaagccgcctt-3'
- vimentin sense:5'-gggaaactaatctggattcctt-3'
- vimentin antisense:5'-gaatccagattagtttcctt-3'

α -SNAP と NSF の siRNA は Dharmacon より購入した(siGENOME SMARTpool)。アニーリングした siRNA は、Oligofectamin (Invitrogen)と混合し HeLa 細胞と共に 4 時間培養することで、細胞に導入された。siRNA 導入後の細胞は、ダブルチミジンプロックによって同調させた。

4. プラスミドコンストラクト及びトランスフェクション

His または GFP タグ付きのマウス Plk 野生型(mPlk1 WT)及びマウス Plk1 キナーゼ失活型(mPlk1 KD)は以前の論文で使用されたものを用いた(Matsumura et al, 2007)。GFP タグ付きのマウス Rab5A(GFP-Rab5A)、Rab5A 活性型(GFP-Rab5CA)、Rab21(GFP-Rab21)は東北大学大学院生命科学研究科の福田光則教授に分与頂いた(Tsuboi and Fukuda, 2006; Ishida et al, 2012)。またマウス vimentin の cDNA は愛知ガンセンター研究所の稲垣昌樹教授に分与いただき、それを PCR 法により増幅後、pEGFP-N ベクターへとクローニングして、GFP タグ付きのマウス vimentin 野生型(GFP-vimentin WT)を作成した。vimentin の 459 番目のセリンをアラニンに置換した非リン酸化型変異体(GFP-vimentin

S459A)と、グルタミン酸に置換したリン酸化型変異体(GFP-vimentin S459E)は、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いて作成した。GFP-2×FYVE は HeLa 細胞の cDNA から PCR 法により増幅後、pEGFP-C ベクターへとクローニングした。プラスミドのトランスフェクションにおいては、Lipofectamin Plus (Invitrogen)を用いた。一度目のリリース後の HeLa 細胞に Lipofectamin Plus (Invitrogen)と混合したプラスミドを添加し、30 分培養後、新鮮な培地で二度洗浄した。その後二度目のチミジンを添加した。Plk1 の siRNA と GFP-mPlk1 を細胞に導入する場合には、GFP-mPlk1 を細胞に導入後、一度目のチミジンを添加し、そのリリース後に siRNA を導入した。

5. ウェスタンブロッティング

HeLa 細胞を Lysis buffer (20 mM Tris[pH 7.4]、50 mM NaCl、10 mM β -glycerophosphate、1.5 mM $MgCl_2$ 、2 mM EGTA、20 mM NaF、2 mM dithiothreitol、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1 mM Na_3VO_4 、2 μ g/ml aprotinin、0.5%Triton X-100)で溶解し、15 分間 4°C で攪拌後、20,000 g で 15 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に 4×SDS sample buffer を添加し、サンプル処理後、SDS-PAGE で展開した。展開したゲルを、セミドライトランスファーにより PVDF メンブレンへと転写し、抗 Plk1 抗体 (Invitrogen)、抗 EEA1 抗体(BD Transduction Laboratories)、抗 α -tubulin 抗体(Sigma)、抗 α -SNAP 抗体 (Abcam)、抗 NSF 抗体(Calbiochem)、抗 vimentin 抗体(Santa Cruz)を用いてウェスタンブロッティングした。

6. 初期エンドソーム分画

10cm シャーレで培養した HeLa 細胞を、ダブルチミジンプロックによって G1/S 期に同調させた。二度目のチミジンからリリース後、MG132 (Wako)(最終濃度 50 μ M)または nocodazole (Sigma)(最終濃度 150 ng/ml)で M 期に停止させ、15ml チューブに回収した。回収した細胞を homogenization buffer (250 mM sucrose、3mM imidazole、pH7.4)で洗浄し、1.5ml のプロテアーゼ阻害剤(10 μ g/ml aprotinin、

1 μ g/ml pepstatin、1 μ g/ml antipain)と 0.5 mM EDTA を含んだ homogenization buffer に溶解後、細胞を破碎した。細胞の破碎物を 800 g で 10 分間遠心し、上清を postnuclear supernatants (PNS)として回収した。PNS は 40%の sucrose 溶液として調製し、その上に 3 mM imidazole を含み、pH 7.4 に調製した 35% sucrose、25% sucrose、6.5% sucrose 溶液をのせて、SW41Ti ローター(Beckman)で 32,000rpm で 90 分間遠心した。35%と 25% sucrose 溶液の間の層を初期エンドソーム分画として回収した。

7. キナーゼアッセイ

リコンビナントの His タグ付きヒト Plk1 WT (His-Plk1 WT)は、Sigma より購入したものを使用した。His タグ付き mPlk1 KD (His-Plk1 KD)は *Escherichia coli* に発現させ、Probond™ Resin (Invitrogen) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。リコンビナントのマウス vimentin は、愛知ガンセンター研究所の稲垣昌樹教授に分与頂き、透析 buffer (10 mM Tris[pH 8.8]、2 mM EGTA、50 mM 2-mercaptoethanol、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)によって透析したものを用いた。初期エンドソーム分画のリン酸化反応では、His-Plk1 WT 又は His-Plk1 KD を 50 μ M ATP、15 mM MgCl₂ と共に初期エンドソーム分画と混合し、3 μ Ci の [γ -³²P]ATP 存在下で 30°C で 20 分間反応させ、サンプル処理後、SDS-PAGE で展開してオートラジオグラフィーで検出した。vimentin のリン酸化反応では、His-Plk WT 又は His-Plk1 KD を 50 μ M ATP、15 mM MgCl₂ と共に vimentin と混合し、3 μ Ci の [γ -³²P]ATP 存在下で 25°C で 1 時間反応させた。

8. リン酸化プロテオーム解析

リン酸化プロテオーム解析は、京都大学薬学研究科の石濱泰教授との共同研究により行った。M 期に停止させた HeLa 細胞から回収した初期エンドソーム分画を脱リン酸化し、His-Plk1 WT または His-Plk1 KD で 30°C で 20 分間反応させた。これらの初期エンドソーム分画をトリプシンによってペプチド化し、¹³CD₂O 又は ¹²CH₂O でそれぞれ標識した。その後、titanium dioxide (TiO₂)を用いたリン

酸化濃縮処理を行い、nano-scale liquid chromatography-tandem mass spectrometry(nanoLC-MS/MS)により解析を行った(Hsu et al, 2003; Sugiyama et al, 2007)。

9. 細胞染色と画像解析

native collagen (Atelo Cell)でコーティングしたカバーガラス上に HeLa 細胞をまき、3.7%ホルマリンで固定し、0.2% TritonX-100 を含む PBS で 5 分間透過処理した。その後、3%BSA を含む PBS に希釈した一次抗体で 4°C で一晩静置し、3%BSA を含む PBS に希釈した二次抗体で、室温で 1 時間反応させ、Mowiol にマウントした。作成したサンプルは Olympus IX81-ZDC microscope 及び Meta Morph (Molecular Device)で解析した。一次抗体は、抗 EEA1 抗体(BD Transduction Laboratories)、抗 CIMPR 抗体(Thermo Scientific)、二次抗体は、AlexaFluor 488 又は AlexaFluor 546-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes)を用いた。EEA1 及び CIMPR の体積は、Z スタック 0.3 μ m 間隔で撮影した Z スタック画像を Meta Morph (Molecular Device)内でデコンボリューションにかけ、3D 構築することで測定した。 β 1-integrin の観察においては、HeLa 細胞の培地中に、Zenon AlexaFluor 546 Mouse IgG Labeling kit (Molecular Probes)で標識した抗 β 1-integrin 抗体(P5D2)(Abcam)を添加し、37°C で 30 分間培養した。その後、培地で洗浄し、上記と同様の方法で固定した。 β 1-integrin の蛍光強度解析においては、Z スタック画像中で細胞分裂溝での蛍光強度が最も高い画像を選択し、その画像の分裂溝領域内の平均の蛍光強度を求めた。ヒートマップは、この画像を Image J で加工することで得た。

10. β 1-integrin のタイムラプス観察

各 siRNA を導入した HeLa 細胞を、ダブルチミジンブロックによって同調した。このとき、一度目のリリース後に、2-well coverglass chamber (IWAKI)にまきなおし、二度目のチミジンを添加した。二度目のチミジンからリリース後、Zenon AlexaFluor 546 Mouse IgG Labeling kit(Molecular Probes)で標識した抗 β 1-integrin 抗体(P5D2)(Abcam)を培地中に添加し、37°C で 30 分間培養した。培地で洗浄後、

20 mM Hepes (pH 7.2) を培地中に添加し、37°C 条件下で、Olympus IX81-ZDC microscope 及び Meta Morph (Molecular Device) を用いて、40 秒間隔で 2 時間タイムラプス画像を得た。

11. 活性型 Rab5 GST-pull down アッセイ

GFP-Rab5A を発現した HeLa 細胞を M 期に同調させ、Lysis buffer (50mM Tris[pH7.5]、10mM MgCl₂、300mM NaCl、1mM dithiothreitol、0.5μg/ml leupeptin、2μg/ml aprotinin、10μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride、2% IGEPAL) で溶解し、20,000g で 5 分間遠心した。上清に、GST (20μg) 又は、GST-Rab5 binding domain (R5BD)(20μg) のリコンビナントタンパク質を添加し、30 分間混合した。この混合溶液に glutathione sepharose beads (GE healthcare) を加え、さらに 30 分間混合し、wash buffer (25mM Tris[pH7.5]、30mM MgCl₂、40mM NaCl、1mM dithiothreitol、0.5μg/ml leupeptin、2μg/ml aprotinin、10μg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride) で 3 回洗浄して、ビーズ洗浄物をサンプル処理した。このサンプルを抗 GFP 抗体によってウエスタンブロッティングし、活性化した Rab5 を検出した。

第三章 結果

1. Plk1 は M 期において初期エンドソームの膜融合を抑制する

Plk1 が、M 期において初期エンドソームの膜融合を抑制している可能性を検討するため、まず siRNA によって Plk1 をノックダウンした M 期前、中期の HeLa 細胞を、初期エンドソームのマーカーである抗 EEA1 抗体で染色し、観察した。その結果、Plk1 をノックダウンすると初期エンドソームが肥大化する様子が観察された(図 5、A、B)。この時、EEA1 のタンパク質量については変化がなかったことから(図 5、A; 下段)、EEA1 のタンパク質量の増加に伴う EEA1 シグナルの増強によって観察された現象ではないことが確認された。次に、この肥大化する現象の定量化を試みた。抗 EEA1 抗体で染色した HeLa 細胞の Z スタック画像を、デコンボリューションにかけ、3D 構築してその体積を求めた。その結果、観察結果と同様に、Plk1 をノックダウンすると、初期エンドソームの体積が有意に増加する事が、Plk1 に対する 2 種類の siRNA で示された(図 6、A、B)。さらに、Plk1 をノックダウンした HeLa 細胞に、GFP タグ付きの siRNA 耐性マウス野生型 Plk1 (GFP-mPlk1 WT) を発

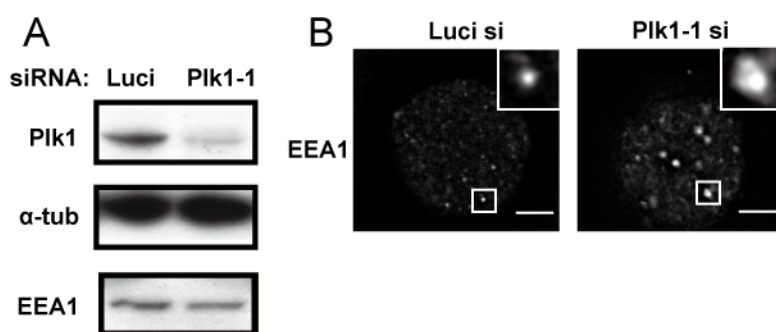


図 5 Plk1 のノックダウンによって初期エンドソームが肥大化する。
(A) HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、M 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開して、抗 Plk1 抗体、抗 α -tub 抗体、抗 EEA1 抗体でウェスタンブロッティングした。
(B) (A) の実験で、siRNA を導入した HeLa 細胞を抗 EEA1 抗体で染色し、画像を取得した。スケールバーは 5 μ m を示している。

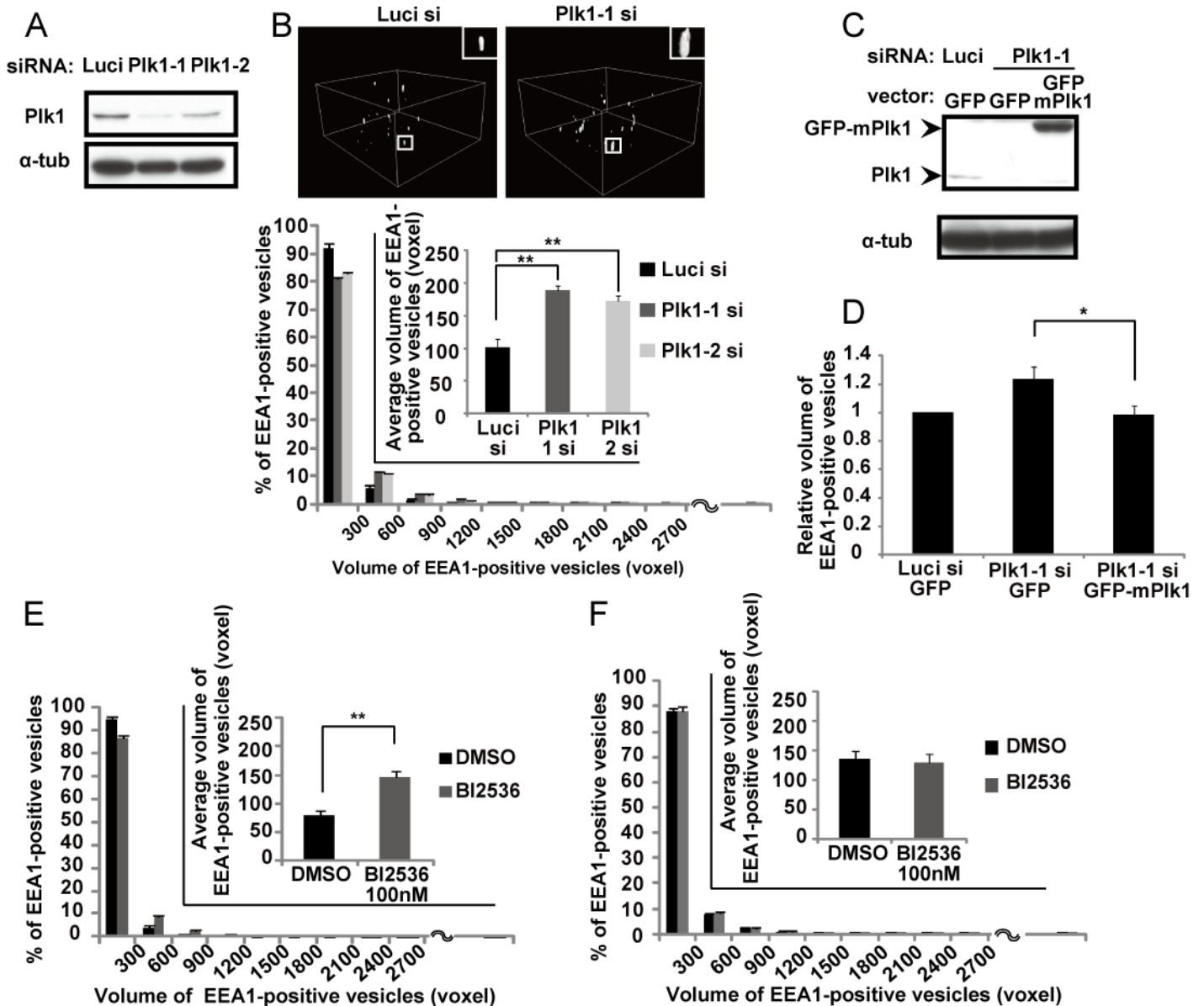


図 6 初期エンドソームの大きさの定量化

(A) HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、M 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開し、抗 Plk1 抗体、抗 α -tub 抗体でウェスタンブロッティングした。

(B) (A) の実験で、siRNA を導入した HeLa 細胞を抗 EEA1 抗体で染色し、画像を取得した。その後立体的に画像を構築し、初期エンドソームの体積を計測した。1 voxel は、 $0.00027\mu\text{m}^3$ である。さらにダネット多重比較検定を行った。** $P < 0.01$

(C) siRNA を導入した HeLa 細胞に表記のベクターをトランスフェクションし、M 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開し、抗 Plk1 抗体、抗 α -tub 抗体でウェスタンブロッティングした。

(D) (C) の細胞を M 期に同調後、抗 EEA1 抗体で染色した。その細胞の Z スタック画像を取得して立体的に画像を構築し、初期エンドソームの体積を計測して、体積の比率を算出した。さらに t 検定を行った。* $P < 0.05$

(E) BI2536 で処理した HeLa 細胞を M 期に同調後、抗 EEA1 抗体で染色した。その細胞の Z スタック画像を取得して立体的に画像を構築し、初期エンドソームの体積を計測した。さらに t 検定を行った。* $P < 0.05$

(F) BI2536 で処理した HeLa 細胞を S 期に同調後、抗 EEA1 抗体で染色した。その細胞の Z スタック画像を取得して立体的に画像を構築し、初期エンドソームの体積を計測した。

現すると、Plk1 RNAi による初期エンドソームの肥大化が抑制されることがわかった(図 6、C、D)。このことから、この現象は Plk1 siRNA のオフターゲットによる現象ではないことが確認された。Plk1 特異的な阻害剤である BI2536 で処理した場合でも M 期において初期エンドソームが肥大化したことから(図 6、E、F)、この現象は M 期前、中期において Plk1 が抑制された場合に起こる現象であることが示された。初期エンドソーム以外の小胞についても同様の現象が起こるかどうかについて検討するために、Plk1 をノックダウンした HeLa 細胞を後期エンドソームのマーカーである CIMPR の抗体で染色したところ、EEA1 のような肥大化は観察されなかった(図 7、A、B)。以上の結果から、Plk1 は M 期前、中期において初期エンドソーム特異的に、その大きさを制御している事が分かった。

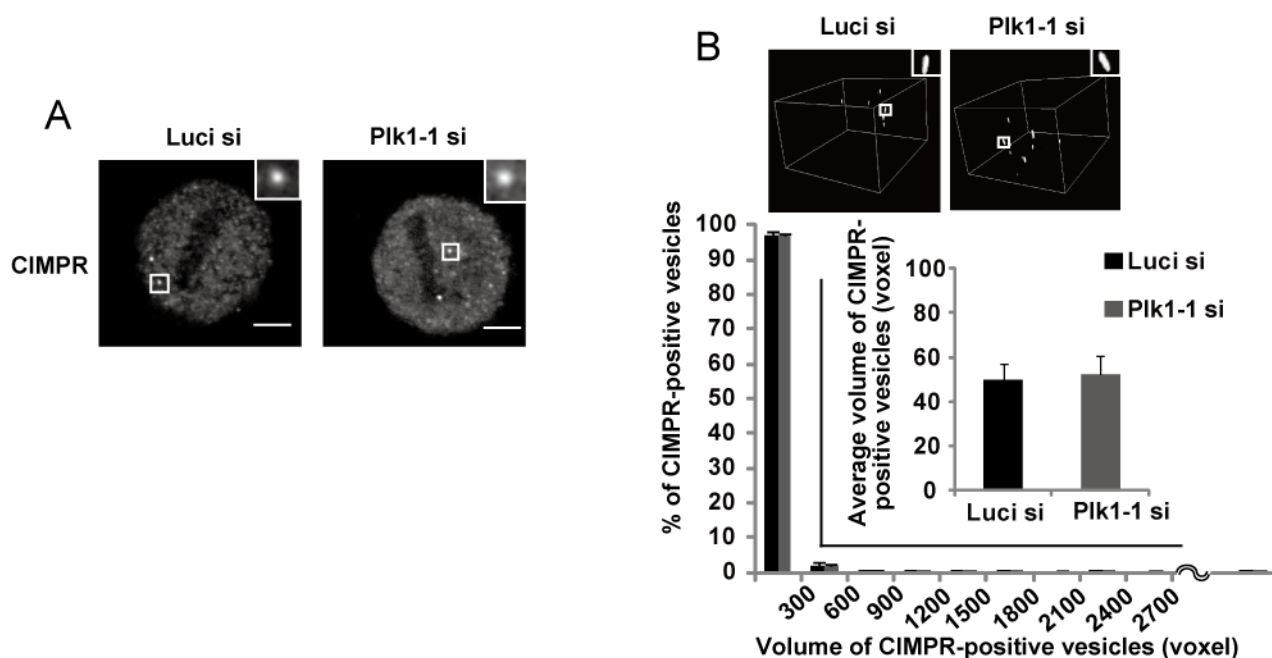


図 7 後期エンドソームの大きさは Plk1 の阻害によって変化しない

(A) HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、M 期に同調させ抗 CIMPR 抗体で染色し、画像を取得した。スケールバーは 5 μ m を示している。

(B) (A) の実験で、取得した画像を後立体的に構築し、後期エンドソームの体積を計測した。

初期エンドソームの大きさは、主に初期エンドソーム同士の膜融合によって制御されることが知られている(Roberts et al, 2000)。そこで次に、Plk1 が M 期において初期エンドソームの膜融合を抑制している可能性を検討するため、細胞内で初期エンドソームの膜融合を定量的に解析する実験手法を立ち上げた。まず、HeLa 細胞に Alexa647-EGF を取り込ませた後に、acid wash buffer を用いて 4 $^{\circ}$ C で 5 分間処理し細胞表面に残った Alexa647-EGF を洗浄した。さらに Alexa555-EGF を 37 $^{\circ}$ C で 5 分間取り込ませた後に、新鮮な培地で洗浄し、37 $^{\circ}$ C で 5 分間培養した。この細胞の画像から 2 色がマ

ージしている領域を抽出後、3D 構築して体積を算出し、初期エンドソームの膜融合の度合いとして測定した(図 8、A)。この手法では、細胞に取り込まれた EGF が初期エンドソーム内で EGF レセプターから外れ、エンドソーム内に拡散することが重要である。また、EGF はエンドサイトーシスされるとまず初期エンドソームに輸送され、その後、後期エンドソーム、リソソームへと輸送され、分解される (Sorkin and Goh, 2008)。そのため、この手法の所要時間中(15~30 分)に、EGF が初期エンドソームに存在しているかについて、まず確認を行った。GFP タグの付いたマウスの活性型 Rab5 (GFP-Rab5CA)を発現した HeLa 細胞に、Alexa555-EGF を 30 分間取り込ませて、その挙動を観察した。活性型 Rab5 は初期エンドソームを肥大化させるため、初期エンドソーム内における EGF の挙動観察に適している。その結果、EGF は活性型 Rab5 で肥大化した初期エンドソーム内に一様に拡散して存在していた(図 8、B; 右側拡大図)。また、EGF が 30 分間の培養の間に初期エンドソームに局在することも確認できた(図 8、B)。この結果から、この手法によって、初期エンドソームの膜融合を解析し得ることが示唆された。さらに、 α -SNAP と NSF を RNAi により HeLa 細胞でノックダウンし、本手法によって小胞膜融合低下が検出できるかを確認した。その結果、S 期に同調させた HeLa 細胞に、Alexa647-EGF と Alexa555-EGF を順次取り込ませたところ、コントロールの細胞では 2 色がより良くマージしており、初期エンドソームの膜融合が起こっている様子が観察された(図 8、C、D; Luci 画像、ヒストグラム)のに対し、 α -SNAP と NSF をノックダウンした細胞では、2 色のエンドソームが隣り合っているがマージしない様子が観察された(図 8、C、D; α -SNAP si, NSF si 画像、ヒストグラム)。これは、 α -SNAP と NSF をノックダウンすると初期エンドソーム近接させるシステムには影響しないが、膜融合が阻害されていることを示唆している。さらに、 α -SNAP と NSF をノックダウンした細胞では、コントロールの細胞に比べてマージの度合いが減少し、マージしている領域の体積が 200voxel 以下であることがわかった(図 8、D; ヒストグラム)。この値は、初期エンドソーム同士が近接することによって検出されるマージの値と考えられる。以上の結果から、この手法によって、初期エンドソームの膜融合は定量的に解析できると結論付け、体積が 200voxel より上の値のものを膜融合が起こった初期エンドソームであると定義した。

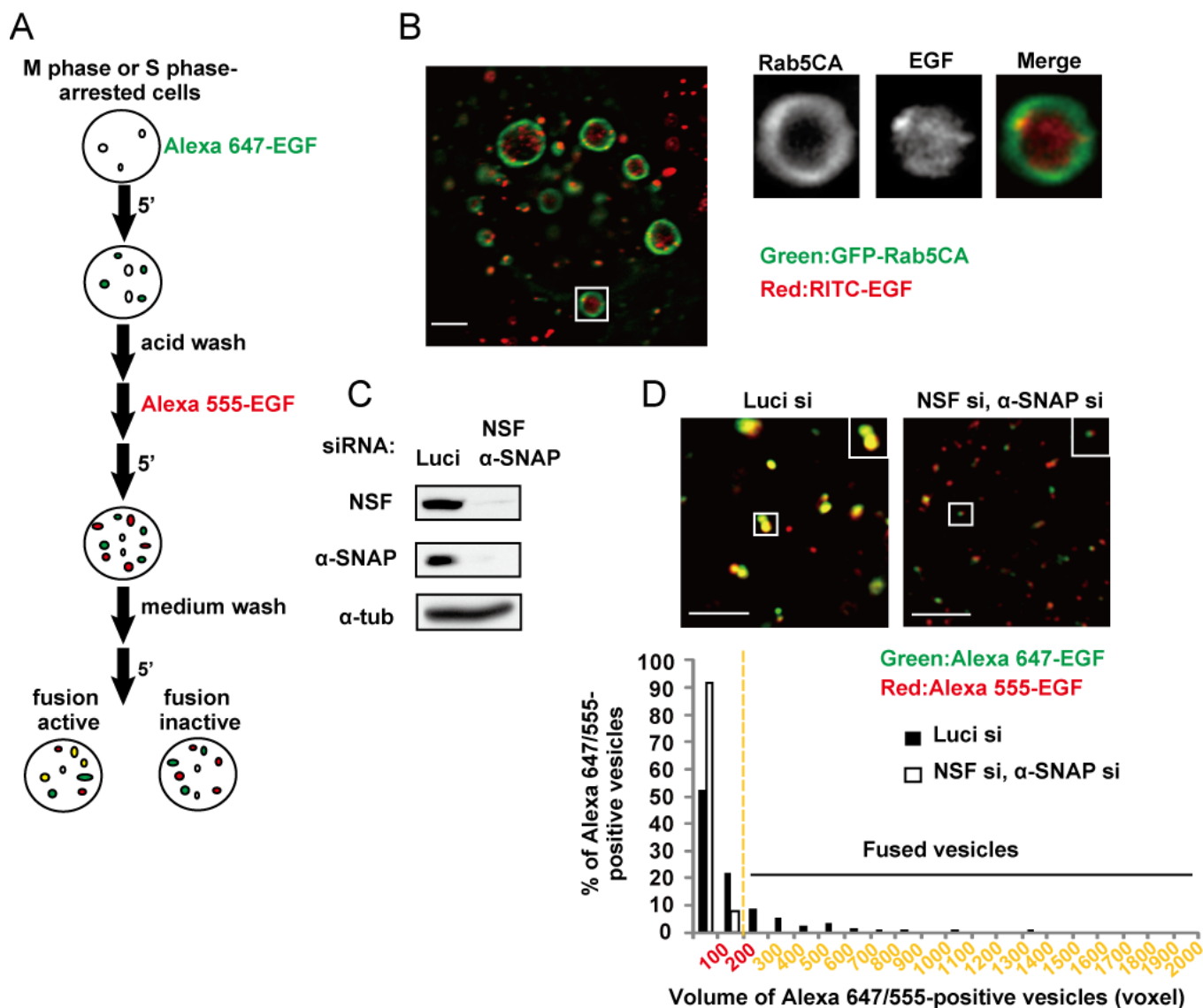


図 8 初期エンドソームの膜融合の定量化

(A)in cell fusion アッセイのモデル図を示した。

(B)GFP-Rab5CA をトランスフェクションした HeLa 細胞に、RITC-EGF を 30 分間取り込ませた後に固定し、画像を取得した。スケールバーは 5 μ m を示している。

(C)HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、S 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開し、抗 NSF 抗体、抗 α -SNAP 抗体、抗 α -tub 抗体でウエスタンブロッティングした。

(D)(C) の細胞を S 期に同調後、Alexa647-EGF と Alexa555-EGF を取り込ませて固定した。その細胞の Z スタック画像を取得してマージした部分を定義後、立体的に画像を構築して、その体積を定量化した。200 voxel より体積の大きいものを膜融合を起こしたエンドソームとした。スケールバーは 5 μ m を示している。

そこで、この手法を用いて、Plk1 をノックダウンした M 期中期の HeLa 細胞における初期エンドソームの膜融合について解析を行った。その結果、コントロールの細胞では 2 色の EGF が連結している様子が多く観察された(図 9、A; Luci 画像、ヒストグラム)。これは α -SNAP と NSF をノックダウンした細胞で観察されたものの良く似ており、M 期中期においては初期エンドソームの接合は起こるが、膜融合は阻害されている事を示している。それに対して、Plk1 をノックダウンした場合に

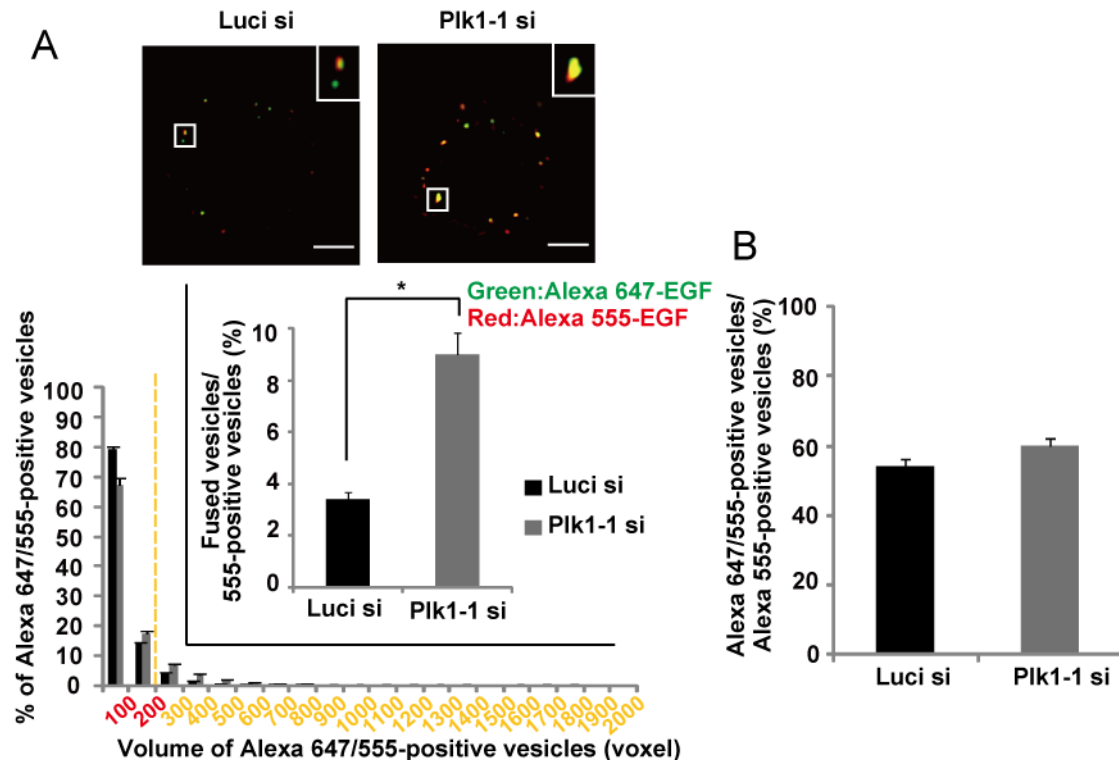


図 9 Plk1 のノックダウンによって M 期の初期エンドソームの膜融合が促進される
 (A)HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、M 期に同調させ、Alexa647-EGF と Alexa555-EGF を取り込ませて固定した。その細胞の Z スタック画像を取得してマージした部分を定義後、立体的に画像を構築して、その体積を定量化した。その体積の値をもとに膜融合したエンドソームの割合をもとめた。その割合について t 検定を行った。*P<0.05 スケールバーは 5 μ m を示している。
 (B)(A) で検出された Alexa647-EGF と Alexa555-EGF のシグナルをもとに、二色のエンドソームが出会う割合を求めた。

は、2 色がより良くマージし、初期エンドソームの膜融合がコントロールの細胞に比べて促進されている様子が観察された(図 9、A; Plk1-1 si 画像、ヒストグラム)。検出された全ての Alexa555-EGF のうち、膜融合したと定義できるものが何割存在するのかを求めて、初期エンドソームの膜融合の頻度について検討したところ、Plk1 をノックダウンした場合に有意に増加していた(図 9、A; ヒストグラム上段)。また、全ての Alexa555-EGF の内、Alexa647-EGF とマージしているものが何割存在するかを求めることによって、初期エンドソーム同士の接合の頻度を検討したところ、Plk1 をノックダウンした場合でも変化はなかった(図 9、B)。以上の結果から、Plk1 は初期エンドソーム接合の頻度には影響しないが、膜融合を阻害することが示された。さらに、Alexa488-EGF と Alexa555-EGF を細胞に取り込ませて、タイムラプス観察によって膜融合について検討を行った。その結果、コントロールの細胞では、2 色の EGF が隣り合った状態で観察されるが、時間が経過してもマージの度合いが増加することはなかった(図 10、上段)。これに対し、Plk1 をノックダウンした細胞では、時間

の経過とともにマージの度合いが増加し、初期エンドソームが融合している様子も観察された(図 6; 下段)。以上の結果から、Plk1 は M 期において初期エンドソームの膜融合を阻害している事が示された。

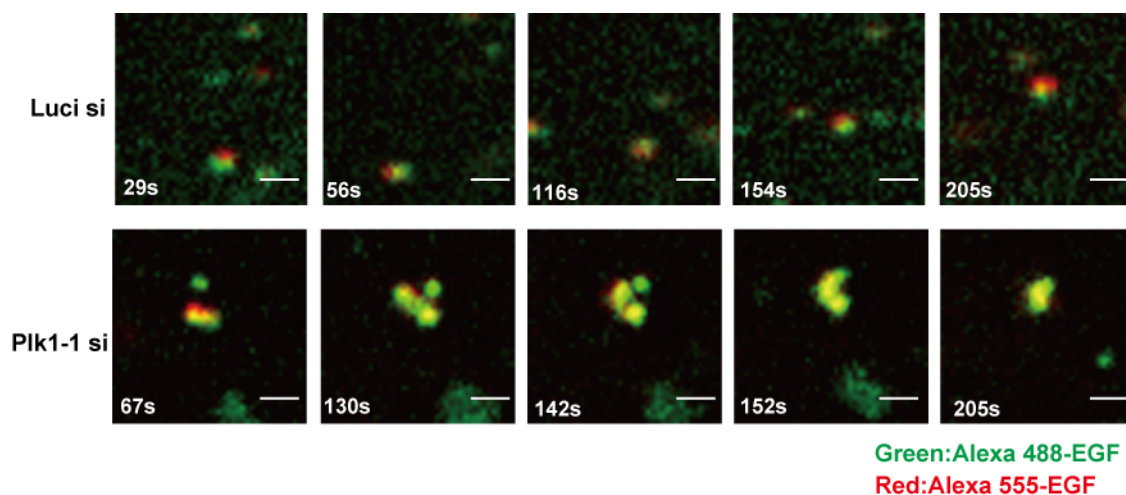


図 10 Plk1 は M 期において初期エンドソームの膜融合を阻害している
HeLa 細胞に siRNA を導入後、M 期に同調させ、Alexa555-EGF と Alexa647-EGF を取り込ませて 1 秒間隔でタイムラプス観察を行った。スケールバーは 1μm を示している。

2. Plk1 による M 期の膜融合阻害機構は Rab5 や Vps34 の活性には依存しない

初期エンドソームの膜融合は Rab5 の活性や、そのエフェクターによって制御される (Gruenberg, 2001; Zerial and McBride, 2001)。Rab5 の GAP である RN-Tre は M 期において活性化されることが報告されており、その活性化に伴って Rab5 が不活性型へと変化し、膜融合が抑制される可能性が考えられる (Lanzetti et al, 2007)。また、Rab5 のエフェクターである Vps34 も、M 期において不活性化されることが報告されており、この不活性化によって初期エンドソーム上の PI3P が減少し、膜融合が抑制されている可能性がある (Furuya et al, 2010)。そこで、Plk1 が Rab5 や Vps34 の活性を制御する可能性を考えた。まず M 期における Rab5



図 11 Plk1 は Rab5 の活性には影響しない
M 期に同調させた GFP-Rab5A を発現した HeLa 細胞を溶解し、リコンビナントの GST(20μg) 又は、GST-Rab5 binding domain(R5BD)(20μg) と 30 分間混合した。この混合溶液に glutathione sepharose beads を加え、さらに 30 分間混合し、洗浄して、サンプル処理した。このサンプルを抗 GFP 抗体によってウエスタンブロッティングし活性化した Rab5 を検出した。

の活性について、活性型 Rab5 の結合ドメインである Rabaptin5 の Rab5 binding domain(R5BD)を用いた GST-pull down アッセイによって検討を行った。その結果、Plk1 をノックダウンした場合でも Rab5 の活性は変化しなかった(図 11)。このことから、Plk1 は M 期における、Rab5 の活性制御には関与しないことが示唆された。次に、Vps34 の活性について、GFP タグ付きの EEA1 の FYVE ドメイン (GFP-2×FYVE)を細胞に発現させて検討を行った。その結果、間期では初期エンドソーム上に GFP-2×FYVE が局在しているが、M 期においてはその局在が無くなることがわかった(図 12、A; DMSO、B; DMSO)。この傾向は Vps34 の阻害剤である wortmannin で細胞を処理した場合と同様であることから、M 期において Vps34 の活性が減衰している事が示唆される(図 12、A; DMSO、B; wortmannin 100nM)。M 期の細胞を BI2536 で処理した場合にも、コントロールの細胞と同様に GFP-2×FYVE の初期エンドソームへの局在は認められなかった(図 12、A; BI 1 μ M)。この結果から、Plk1 は M 期における Vps34 の不活性化にも関与しない事が示唆された。

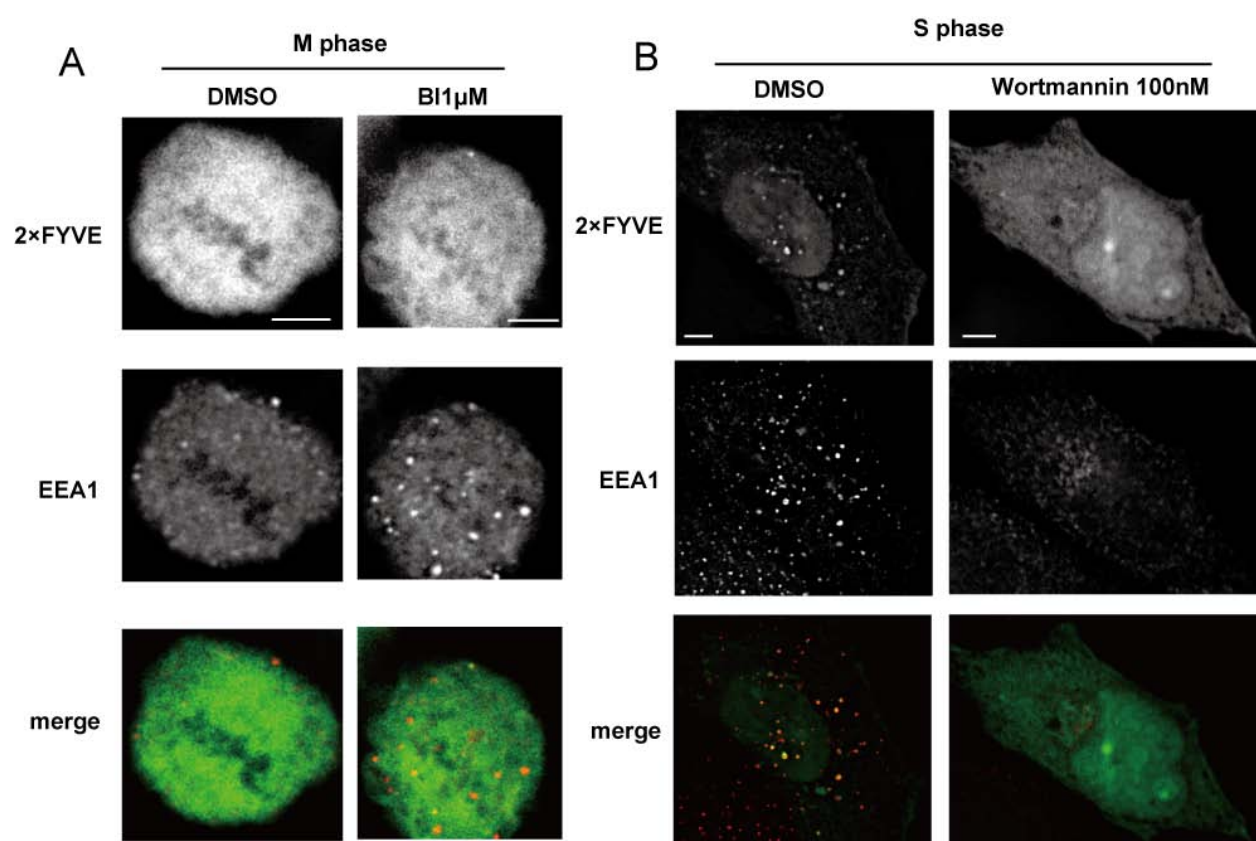


図 12 Plk1 は Vps34 の活性には影響しない

(A)GFP-2×FYVE を導入した HeLa 細胞を BI2536 処理と共に M 期に同調させて固定し、抗 EEA1 抗体で染色した。その後、画像を取得した。

(B)GFP-2×FYVE を導入した HeLa 細胞を S 期に同調させて wortmannin で処理後固定し、抗 EEA1 抗体で染色した。その後、画像を取得した。

スケールバーは 5 μ m を示している。

3. Plk1 は M 期において vimentin の 459 番目のセリンをリン酸化する

上記の結果から、Plk1 は Rab5 や Vps34 非依存的な未知の分子機構により、M 期の膜融合を阻害すると考えられる。そこで、この機構における Plk1 の基質の同定を試みた。Plk1 は、M 期において多くの基質をリン酸化することが知られている (Archambault and Glover, 2009; Park et al, 2010; Bruinsma et al, 2012)。そのため、M 期の細胞抽出液から、エンドソーム膜融合阻害に貢献する Plk1 の基質を探索することは困難である。そこで私は、初期エンドソームの膜融合を制御する因子はその膜上に存在すると予想し、M 期中期に停止させた HeLa 細胞から初期エンドソームを分画し、その中から基質探索する方法を考えた(図 13、A)。はじめに、Plk1 がリン酸化し得るタンパク質が初期エンドソーム分画に存在するのを確認するために、初期エンドソーム分画とリコンビナント His-Plk1 WT 又は His-Plk1 KD タンパク質とを混合し *in vitro* キナーゼアッセイによってリン酸化の有無を検討した。その結果、His-Plk1 WT を加えた場合にリン酸化されるタンパク質バンドが検出された(図 13、B)。そこで、京都大学薬学研究科の石濱教授との共同研究により、エンドソーム分画に

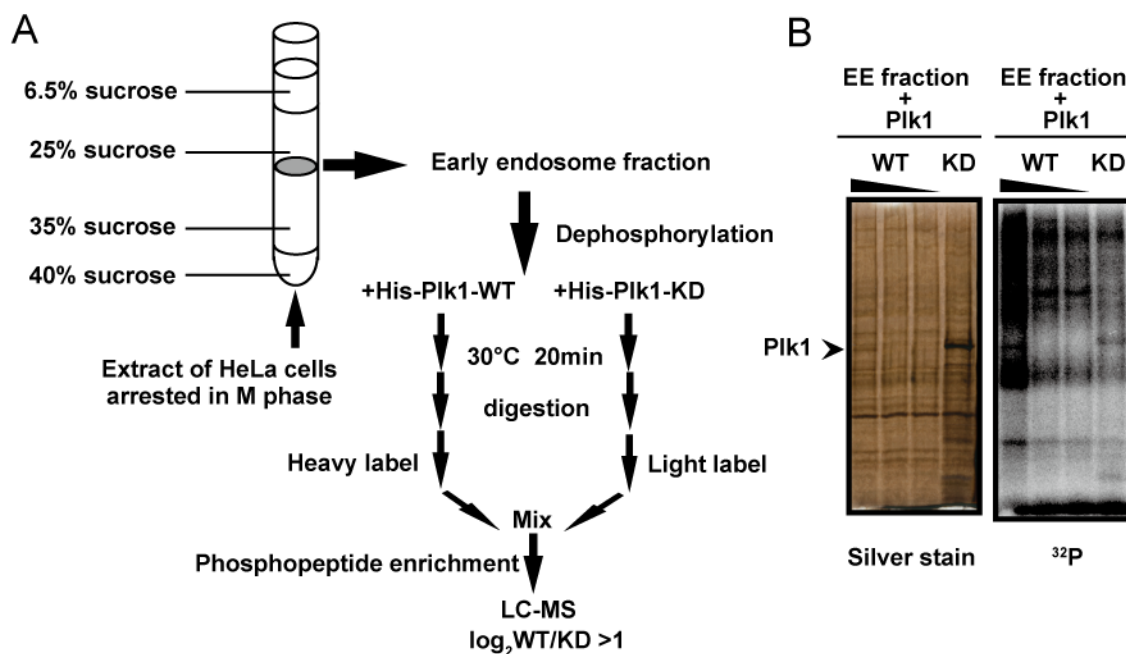


図 13 初期エンドソーム分画を用いたリン酸化プロテオーム解析

(A) 初期エンドソームを分画からリン酸化プロテオーム解析までの流れをモデル図として示した。

(B) 初期エンドソーム分画を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行い、サンプル処理によって反応停止後、SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィーで検出した。His-Plk1 WT は 0.05、0.01、0.005 μg 、His-Plk1 KD は 0.3 μg 使用した。

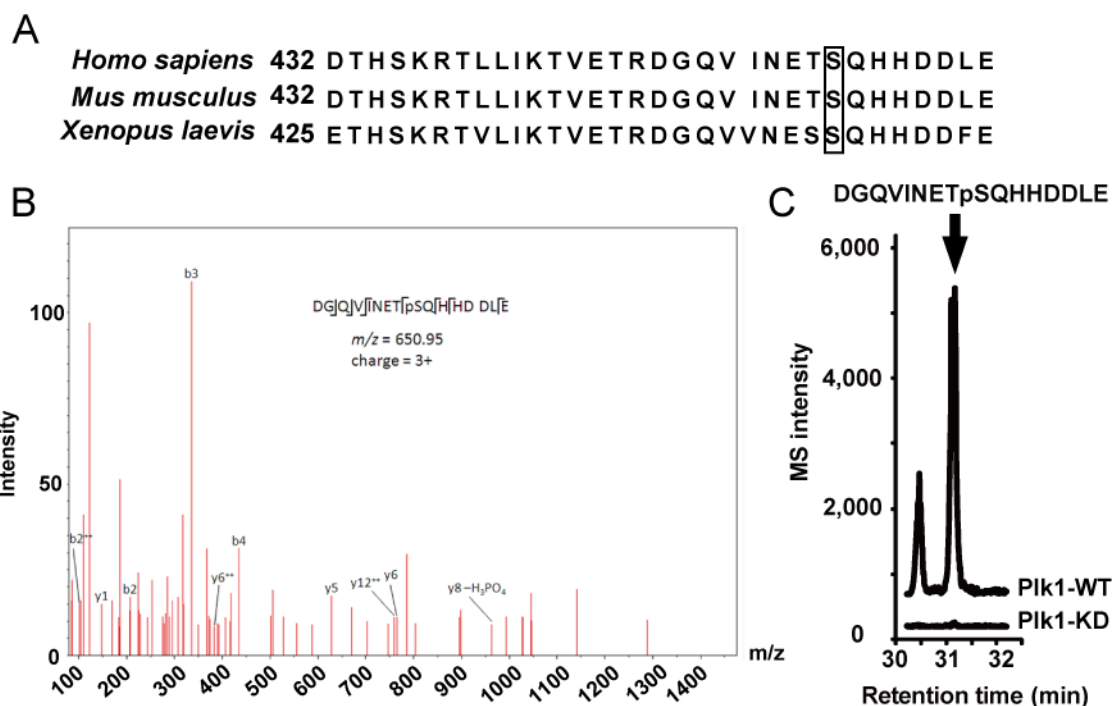


図 14 Plk1 によって vimentin の 459 番目のセリンがリン酸化される
 (A)vimentin の C 末端側の配列を示した。四角で囲ったセリンが 459 番目のセリンである。
 (B) リン酸化プロテオーム解析によって得られた annotated MS/MS spectra を示している。
 (C)annotated MS/MS spectra から抽出した **DGQVINETpSQHHDDLE** の ion current chromatogram を示している。

表 1. リン酸化プロテオーム解析によって同定されたリン酸化サイト

AccNum	Protein name	phospho-site	sequence
1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	S148	EEAEN S LVAYK
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	S325	LSITGTYDLK S VLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHK
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	S405	S PLFMGKVVNPTQK
ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1	S239	S YELPDGQVITIGNER
ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	S36	GILAADE S TGSIK
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	S189	GDR S EDFGVNEDLADSDAR
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	T169	DITSDTSGDFRNALLSLAK
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	S182	DITSDTSGDFRNALL S LAK
ANXA1_HUMAN	Annexin A1	T141	RVFQKY T K
DCD_HUMAN	Dermcidin	S93	AVGGLGKLKGADEDE S VGKGAVHDVKDVLDS
DCD_HUMAN	Dermcidin	S108	AVGGLGKLKGADEDE S VGKGAVHDVKDVLDS
EF1A2_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 2	S445	K S GGAGKVTK
EF1A2_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 2	T452	KSGGAGK V TK
ENPL_HUMAN	Endoplasmic	S64	EEEAQLDGLNAS S QIR
ERO1A_HUMAN	ERO1-like protein alpha	S143	LGAVDE S LSEETQK
ERO1A_HUMAN	ERO1-like protein alpha	S145	LGAVDE S LSEETQK
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	S241	VPTANV S VVDLTCR
G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	T246	VPTANV S VVDLTCR
GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein	T85	NQLT S NPENTVFDAKR
GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein	T91	NQLT S NPENTVFDAKR
HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta	S391	GVVSEDLP S LNIS
HSPB1_HUMAN	Heat shock protein beta-1	S82	QL S SGVSEIR
IMA2_HUMAN	Importin subunit alpha-2	S88	GIN S SNVENQLQATQAAR
K1C13_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 13	S427	MIGFPSSAGSV S PR
K1C13_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 13	S7	LQ S SSASYGGGFGGGSCQLGGGR
K1C13_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 13	S453	T SDVRRP
NUCL_HUMAN	Nucleolin	T76	VAVAT P AK
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	T437	MDATANDVPSPYEV R
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	T31	SDVLEL T DDNFESR
PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3	S209	P SHLTNKFEDK
PEX19_HUMAN	Peroxisomal biogenesis factor 19	S147	NATDLQNS S MSEELTK
PEX19_HUMAN	Peroxisomal biogenesis factor 19	S149	NATDLQNS S MSEELTK
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E	S89	SNVGASGDHDD S AMKTLR
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E	Y940	S YELPDGQVITIGNER
POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E	T93	T LRNKMKGK
RIC1_HUMAN	Protein RIC1 homolog	T960	QHATLLFN T ALEQGGK
RIC1_HUMAN	Protein RIC1 homolog	T965	QHATLLFN T ALEQGGK
RIC1_HUMAN	Protein RIC1 homolog	T64	S STQFGSYK
SRPR_HUMAN	Signal recognition particle receptor subunit alpha	S297	GTGSGGQLDLDC S SDDEGAQNSTKPSATK
VIME_HUMAN	Vimentin	S459	DGQVINET S QHHDDLE

赤字はリン酸化ペプチドを表している。

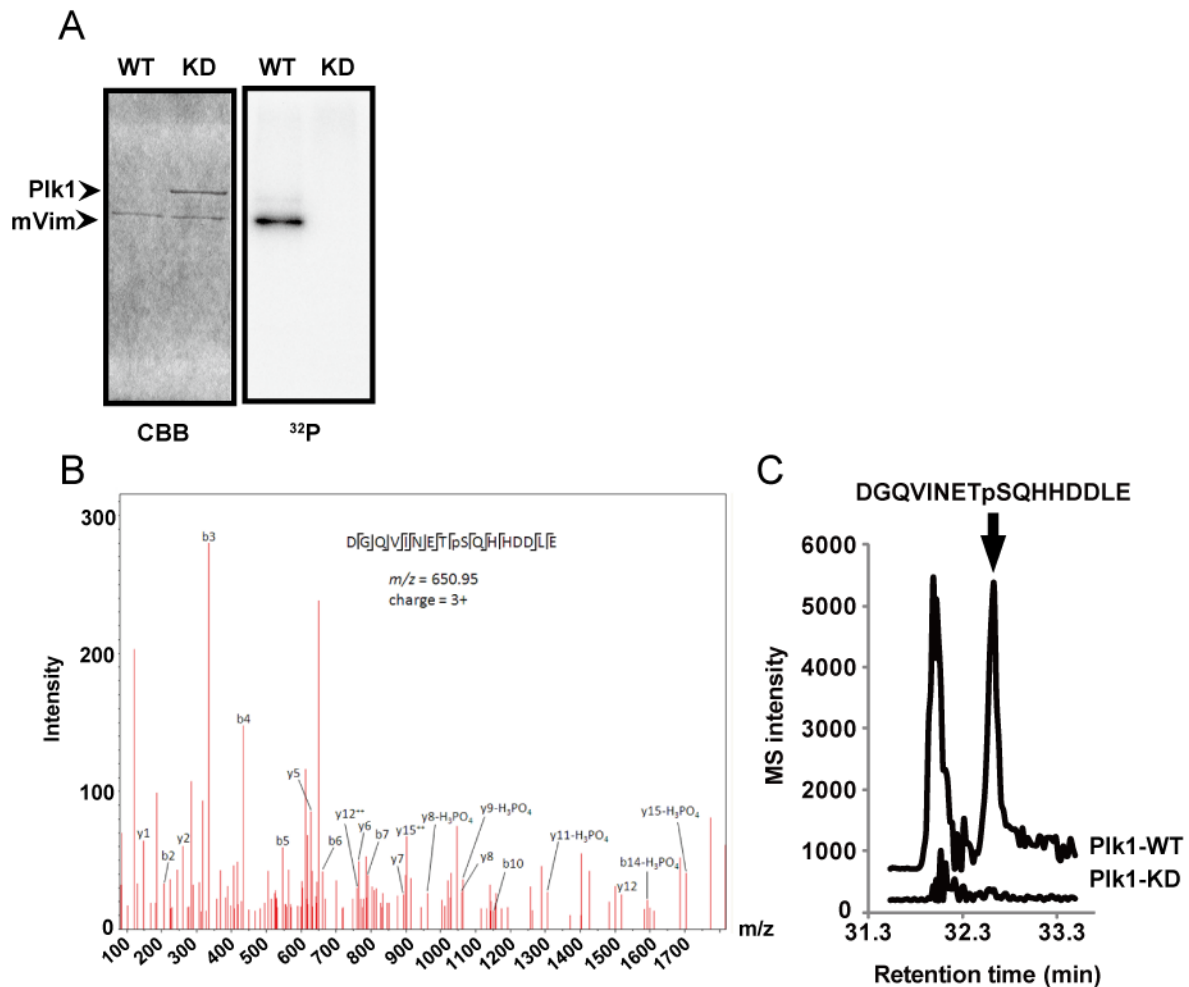


図 15 *in vitro* においても Plk1 によって vimentin の 459 番目のセリンがリン酸化される
(A) リコンビナントのマウス vimentin を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行い、サンプル処理によって反応停止後、SDS-PAGE で展開し、オートラジオグラフィーで検出した。His-Plk1 WT は 0.05、0.01、0.005 μ g、His-Plk1 KD は 0.3 μ g、vimentin は 1.5 μ g 使用した。
(B)(A) のサンプルをリン酸化プロテオーム解析した結果得られた annotated MS/MS spectra を示している。
(C)(B) の annotated MS/MS spectra から抽出した DGQVINETpSQHHDDLE の ion current chromatogram を示している。

存在する Plk1 の基質をリン酸化プロテオーム解析により探索した。M 期中期に停止させた細胞から得た初期エンドソーム分画を脱リン酸化処理し、His-Plk1 WT 又は His-Plk1 KD と混合しリン酸化反応させた。そのサンプルを、トリプシン処理によってペプチド化し、¹³CD₂O(heavy label:Plk1 WT と反応させたサンプルを標識)又は ¹²CH₂O(light label:Plk1 KD と反応させたサンプルを標識)でそれぞれ標識し、混合した。その混合したサンプルを titanium dioxide(TiO₂) を用いてリン酸化濃縮処理を行い、nano-scale liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS)により解析を行った。その結果、40 個のリン酸化サイトを同定した(表 1)。私は、同定されたリン酸化サイトのうち、vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化に着目した。このセリンのリン酸化 MS シグナルは、Plk1 WT と初期エンドソーム分画を反応させた場合には検出されたが、Plk1 KD と反応させた場合には検出されな

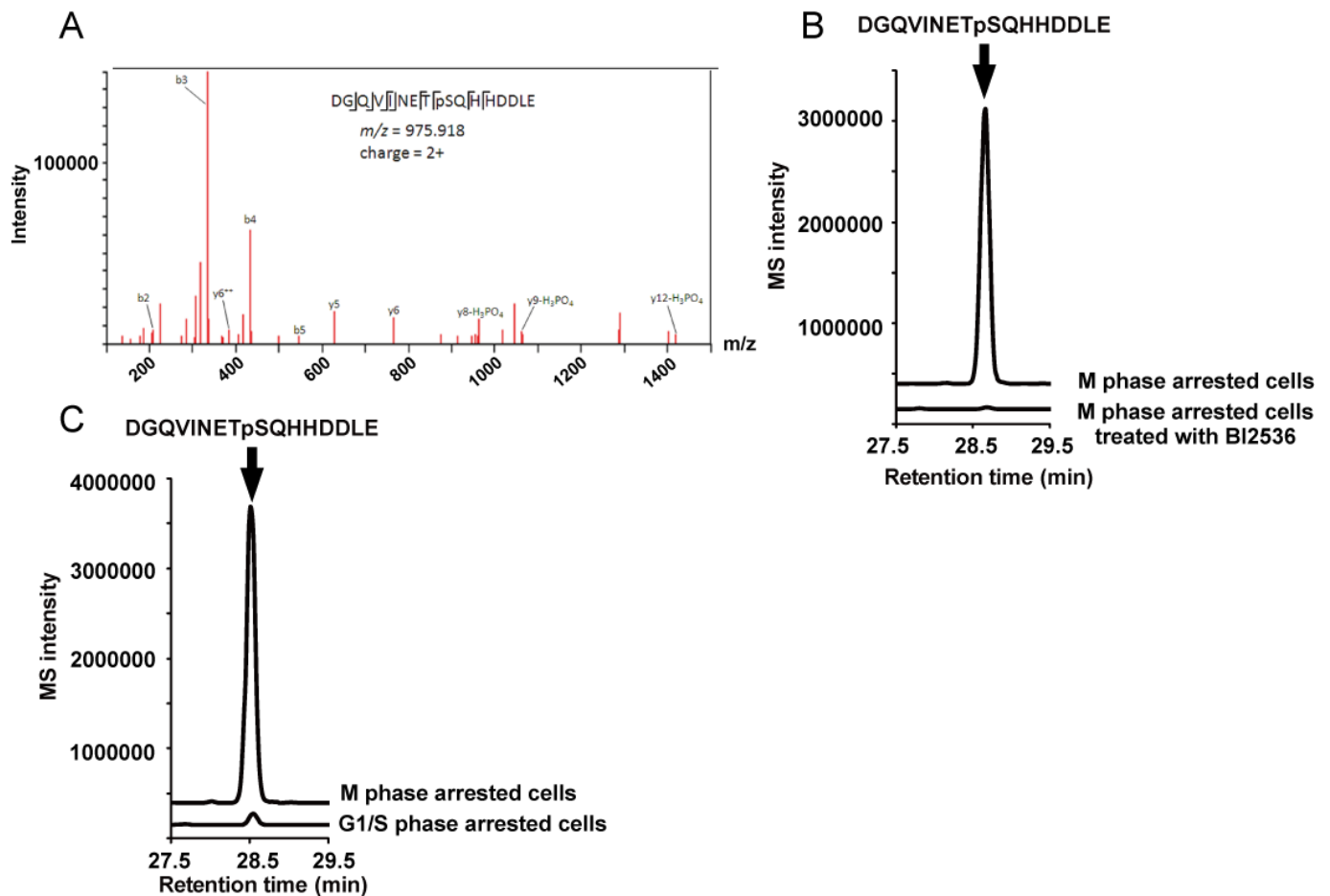


図 16 M 期の細胞内で vimentin の 459 番目のセリンは Plk1 にリン酸化される
(A)M 期の細胞をリン酸化プロテオーム解析した結果得られた annotated MS/MS spectra を示している。
(B)(A) の annotated MS/MS spectra から抽出した DGQVINETpSQHHDDLE の ion current chromatogram を示している。
(C)S 期の細胞と M 期の細胞から得られた DGQVINETpSQHHDDLE の ion current chromatogram を示している。

かった(図 14、B、C)。また、このセリン残基と周辺のアミノ酸配列はヒト、マウス、カエル間で良く保存されていた(図 14、A)。さらに、このサイトは M 期特異的にリン酸化されることが報告されていた(Dephoure et al, 2008)。そこで、Plk1 が vimentin の 459 番目のセリンをリン酸化する可能性について *in vitro* キナーゼアッセイにより検討した。その結果、His-Plk1 はリコンビナントの vimentin をリン酸化し、そのリン酸化サイトの一つが 459 番目のセリンであることが分かった(図 15、A、B、C)。次に、Plk1 が M 期の細胞内で、vimentin の 459 番目のセリンをリン酸化するかを検討した。nocodazole 処理によって M 期に停止させた HeLa 細胞と、M 期に停止させて Plk1 の阻害剤である BI2536 で処理した M 期の HeLa 細胞の細胞抽出液を用いてリン酸化ペプチド MS 解析を行った。その結果、コントロールの M 期の細胞では vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化が検出されたが、BI2536 を処理した細胞では検出されなかった(図 16、A、B)。さらに、M 期に停止させた細胞と G1/S 期で停止させた細胞を比較した結果、M 期では vimentin の 459 番目のセリンがリン酸化されていた

が、G1/S 期ではリン酸化は認められなかった(図 16、C)。以上の結果から、Plk1 は M 期において vimentin の 459 番目のセリンをリン酸化することが示された。

4. 459 番目のセリンのリン酸化は vimentin のフィラメント形成や局在には影響しない

vimentin は様々なキナーゼにリン酸化され、その重合反応が制御されることが知られている (Yamaguchi et al, 2005; Ivaska et al, 2005; Izawa and Inagaki, 2006)。Plk1 は vimentin の 83 番目のセリンをリン酸化し、脱重合を促進させることが報告されている(Yamaguchi et al, 2005)。そこで、Plk1 によ

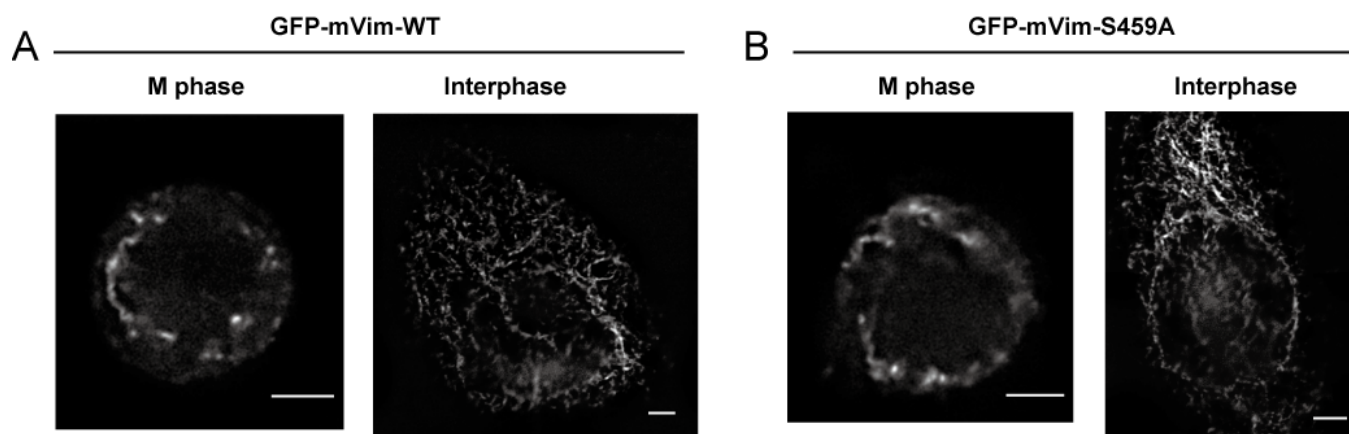


図 17 vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化は vimentin の重合反応には影響しない
(A)HeLa 細胞に GFP-mVim WT をトランスフェクション後、M 期又は S 期に同調させ固定し、画像を取得した。
(B)HeLa 細胞に GFP-mVim S459A をトランスフェクション後、M 期又は S 期に同調させ固定し、画像を取得した。
スケールバーは 5μm を示している。

る vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化がその重合反応を制御する可能性について検討した。まず、GFP-mVim WT 又は、GFP-mVim S459A を HeLa 細胞に発現させ、S 期と M 期における局在について観察した。その結果、S 期、M 期ともに、GFP-mVim WT と GFP-mVim S459A の間で局在の変化は認められなかった。S 期においては、細胞全体にフィラメント状の vimentin が広がっている様子が観察され、M 期においては、S 期に比べてフィラメント状の vimentin が減少し、細胞質中に局在する様子が観察された(図 17、A、B)。さらに、初期エンドソーム上に存在する vimentin について、初期エンドソーム分画後のサンプルをウエスタンブロッティングすることで検討を行った。その結果、GFP-mVim WT、GFP-mVim S459A 共に初期エンドソーム分画に局在していた(図 18、A、B)。これらの結果から、vimentin の 459 番目のリン酸化は vimentin の重合反応や初期エンドソーム分画へ

の局在には影響しないことが示唆された。

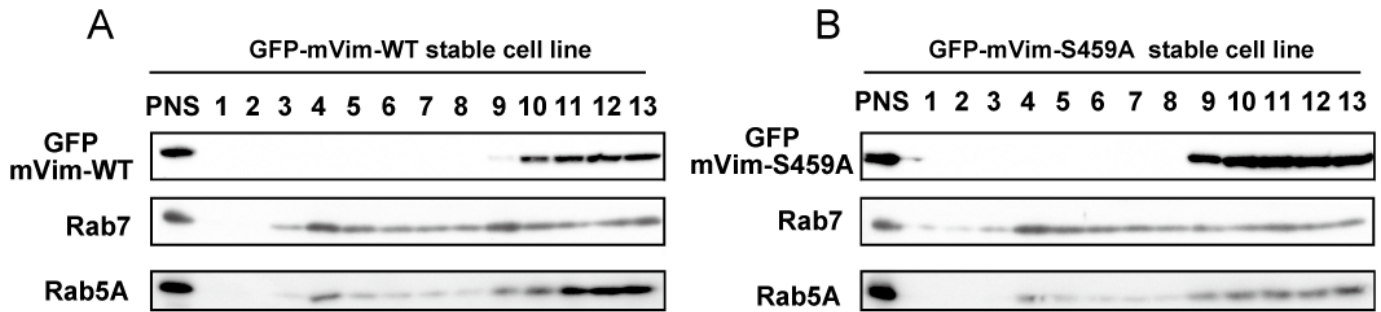


図 18 vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化は vimentin の初期エンドソームへの局在には影響しない (A)GFP-mVim WT stable cell line を初期エンドソーム分画後、サンプル処理し SDS-PAGE で展開して、抗 GFP 抗体、抗 Rab7 抗体、抗 Rab5 抗体でウエスタンブロッティングした。Rab5 は初期エンドソーム、Rab7 は後期エンドソームのマーカーとして用いた。 (B)GFP-mVim S459A stable cell line を初期エンドソーム分画後、サンプル処理し SDS-PAGE で展開して、抗 GFP 抗体、抗 Rab7 抗体、抗 Rab5 抗体でウエスタンブロッティングした。Rab5 は初期エンドソーム、Rab7 は後期エンドソームのマーカーとして用いた。

5. vimentin の 459 番目のリン酸化は、M 期における初期エンドソームの膜融合抑制に必要である

次に、vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化が、M 期における初期エンドソームの膜融合阻害に関与するかについて検討を行った。vimentin をノックダウンした M 期の HeLa 細胞における初期エンドソームの体積を求めたところ、コントロールの細胞と比較して肥大化することがわかった(図 19、A、B)。この肥大化する現象は、S 期の細胞では観察されなかったことから、vimentin が M 期特異的に初期エンドソームの大きさを制御している事がわかった(図 19、C、D)。さらに、M 期における初期エンドソームの膜融合についても検討を行った。その結果、vimentin をノックダウンすると M 期でも初期エンドソームの膜融合が抑制されないことが示された(図 20、A、B; Vimsi GFP、C; Vimsi GFP)。また、この異常は vimentin をノックダウンした細胞に siRNA 耐性のマウス野生型 vimentin (GFP-mVim WT)や 459 番目のセリンをグルタミン酸に置換したリン酸化型変異体(GFP-mVim S459E)を発現させた場合にはレスキューされたが、459 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体(GFP-mVim S459A)を発現させた場合にはレスキューされなかった(図 20、A、B、C)(図 21、A、B、C)。以上の結果から、vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化が、初期エンドソームの膜融合抑

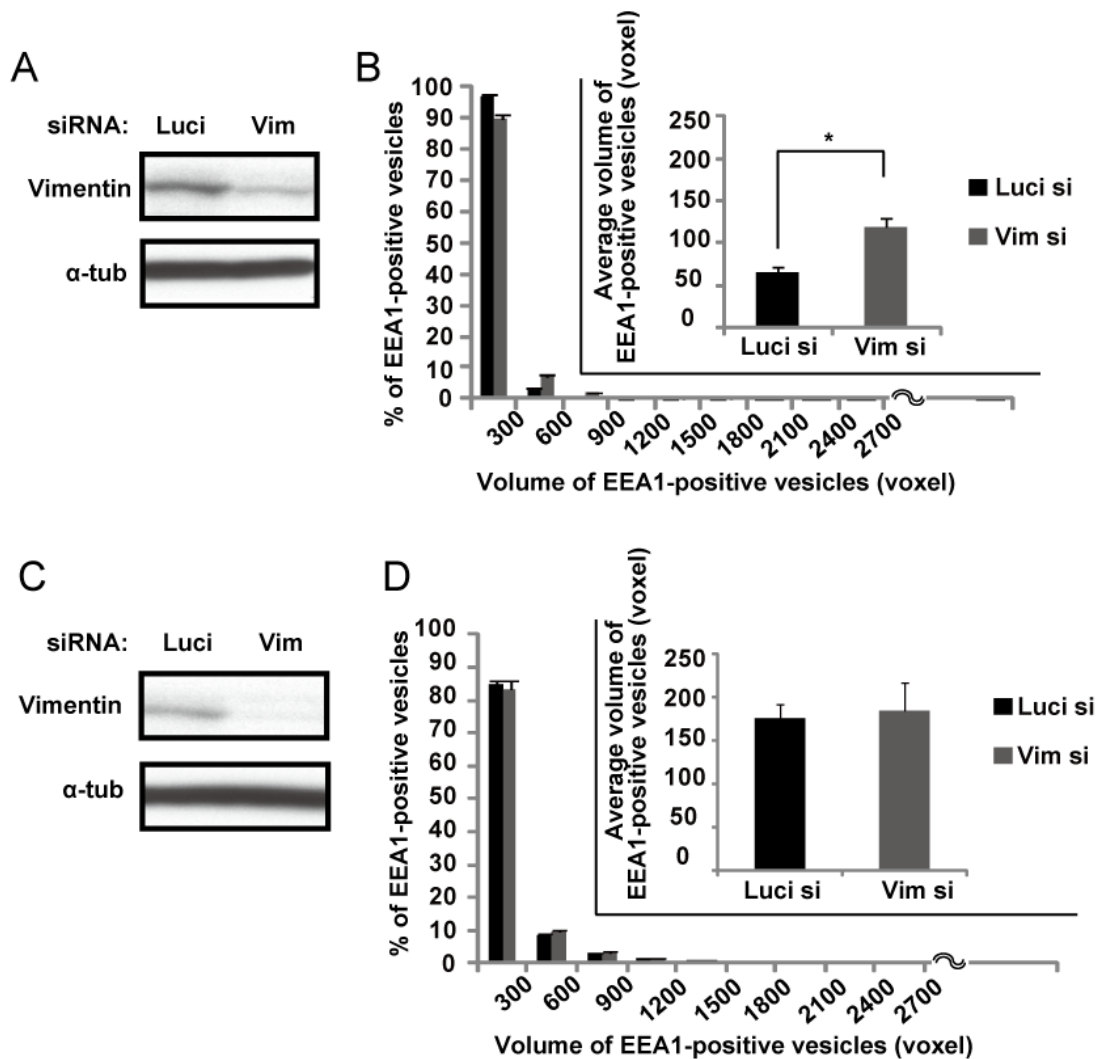


図 19 vimentin のノックダウンによって初期エンドソームは肥大化する

(A)HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、M 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開して、抗 vimentin 抗体、抗 α-tub 抗体でウェスタンブロッティングした。

(B)(A) の実験で、siRNA を導入した HeLa 細胞を抗 EEA1 抗体で染色し、画像を取得した。その後立体的に画像を構築し、初期エンドソームの体積を計測した。さらに t 検定を行った。* $P < 0.05$

(C)HeLa 細胞に siRNA をトランスフェクション後、S 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開し、抗 vimentin 抗体、抗 α-tub 抗体でウェスタンブロッティングした。

(D)(C) の細胞を S 期に同調後、抗 EEA1 抗体で染色した。その細胞の Z スタック画像を取得して立体的に画像を構築し、初期エンドソームの体積を計測した。

制に必要であることが示された。続いて、Plk1 と vimentin をダブルノックダウンした M 期の細胞に GFP-mVim S459A 又は、GFP-mVim S459E を発現させ、Plk1 ノックダウンによる初期エンドソーム膜融合抑制の異常がレスキューされるかについて検討を行った。その結果、GFP-mVim S459E を発現させた場合には、Plk1 ノックダウンによる初期エンドソーム膜融合抑制異常がレスキューされたが(図 22、A、B; GFP-mVim S459E、C; GFP-mVim S459E)、GFP-mVim S459A を発現させた場合には、レスキューされなかった (図 22、A、B; GFP-mVim S459A、C; GFP-mVim S459A)。これらのことから、Plk1 による vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化は、M 期における初期エンドソームの膜融合阻害に必要であることがわかった。

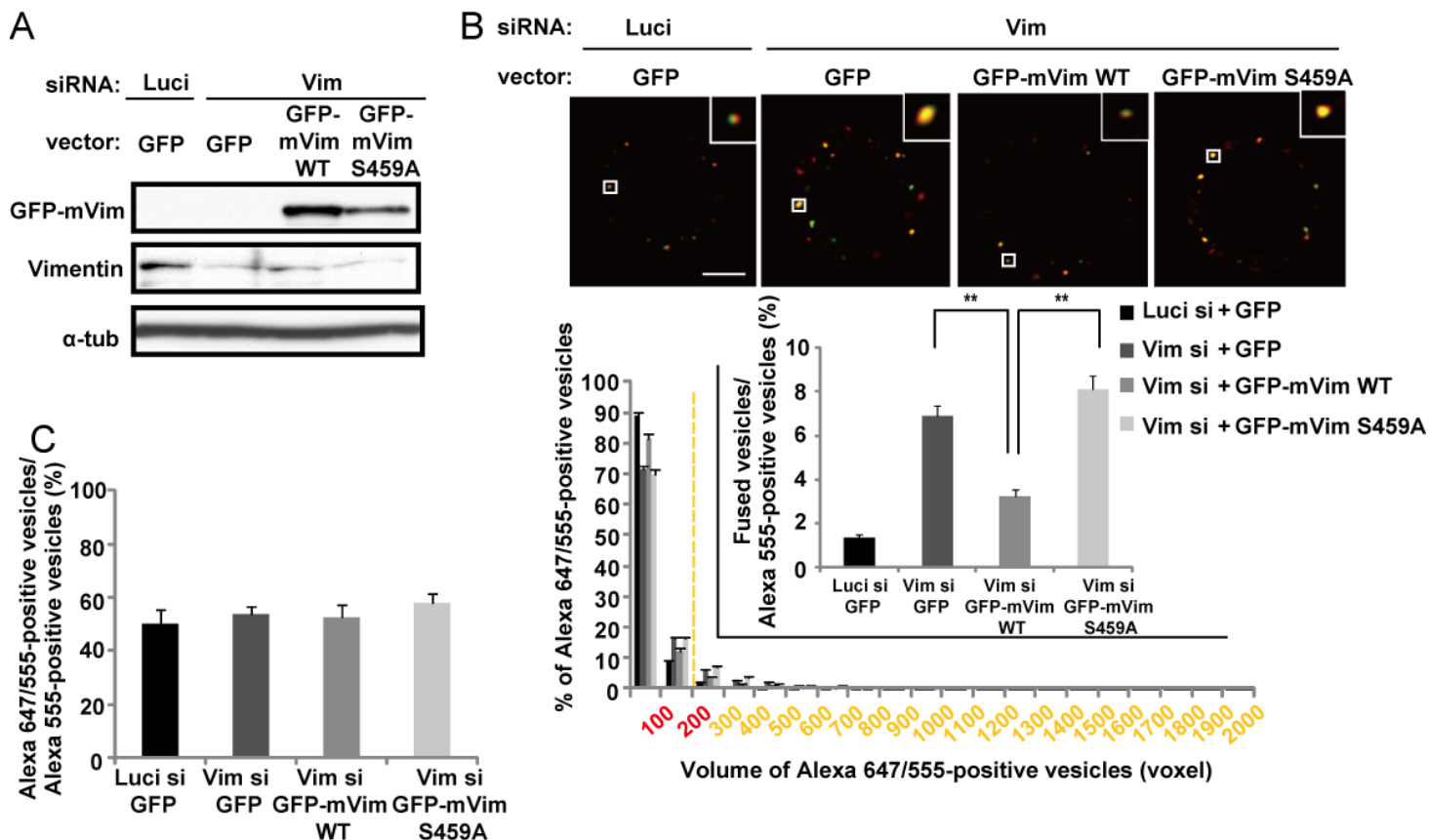


図 20 vimentin は M 期における初期エンドソームの膜融合を制御する

(A) siRNA を導入した HeLa 細胞に表記のベクターをトランスフェクションし、M 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開し、抗 vimentin 抗体、抗 α -tub 抗体でウェスタンブロッティングした。

(B) HeLa 細胞に siRNA とベクターをトランスフェクション後、M 期に同調させ、Alexa647-EGF と Alexa555-EGF を取り込ませて固定した。その細胞の Z スタック画像を取得してマージした部分を定義後、立体的に画像を構築して、その体積を定量化した。その体積の値をもとに膜融合したエンドソームの割合をもとめた。その割合についてダネット多重比較検定を行った。 $**P<0.01$ スケールバーは $5\mu\text{m}$ を示している。

(C)(B) で検出された Alexa647-EGF と Alexa555-EGF のシグナルをもとに、二色のエンドソームが出会う割合を求めた。

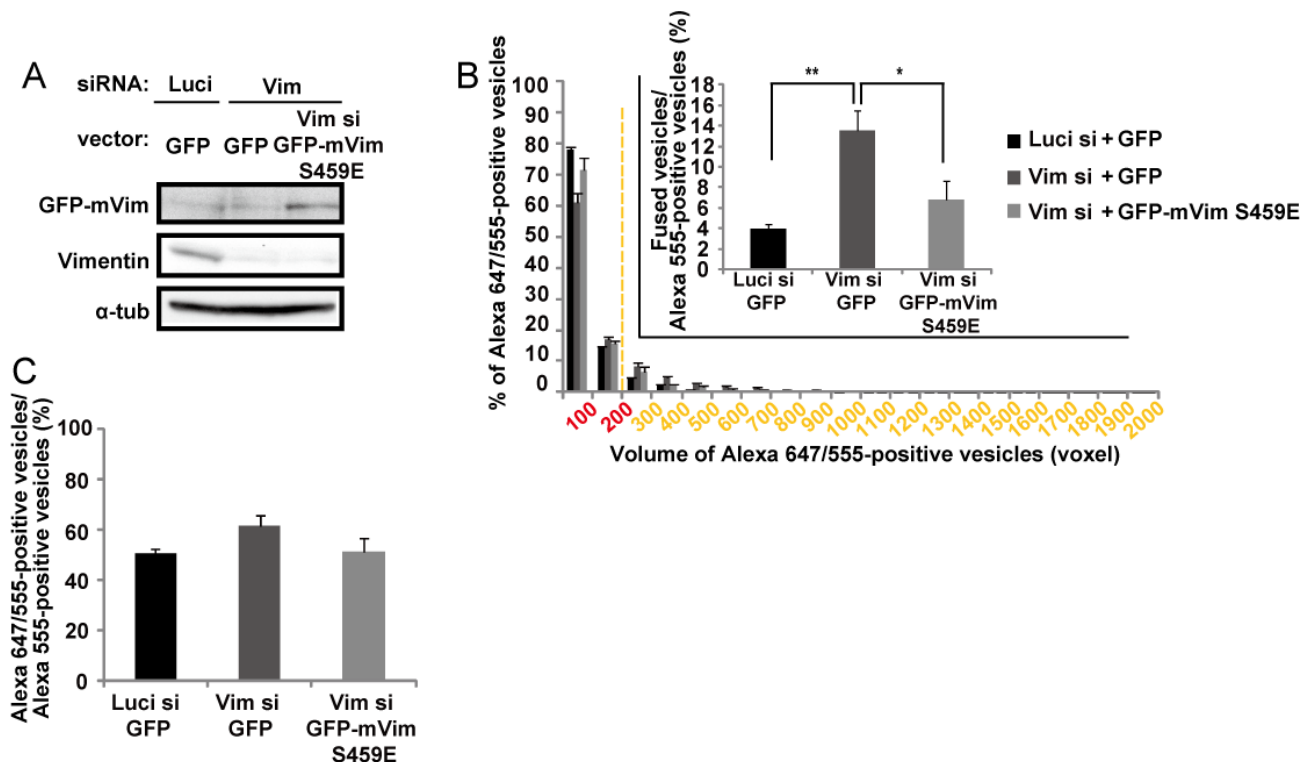


図 21 vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化が初期エンドソームの膜融合に関与する
(A) siRNA を導入した HeLa 細胞に表記のベクターをトランスフェクションし、M 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開し、抗 vimentin 抗体、抗 α -tub 抗体、抗 GFP 抗体でウエスタンブロッティングした。
(B) HeLa 細胞に siRNA とベクターをトランスフェクション後、M 期に同調させ、Alexa647-EGF と Alexa555-EGF を取り込ませて固定した。その細胞の Z スタック画像を取得してマージした部分を定義後、立体的に画像を構築して、その体積を定量化した。その体積の値をもとに膜融合したエンドソームの割合をもとめた。その割合についてダネット多重比較検定を行った。 $**P<0.01$ $*P<0.05$
(C) (B) で検出された Alexa647-EGF と Alexa555-EGF のシグナルをもとに、二色のエンドソームが出会う割合を求めた。

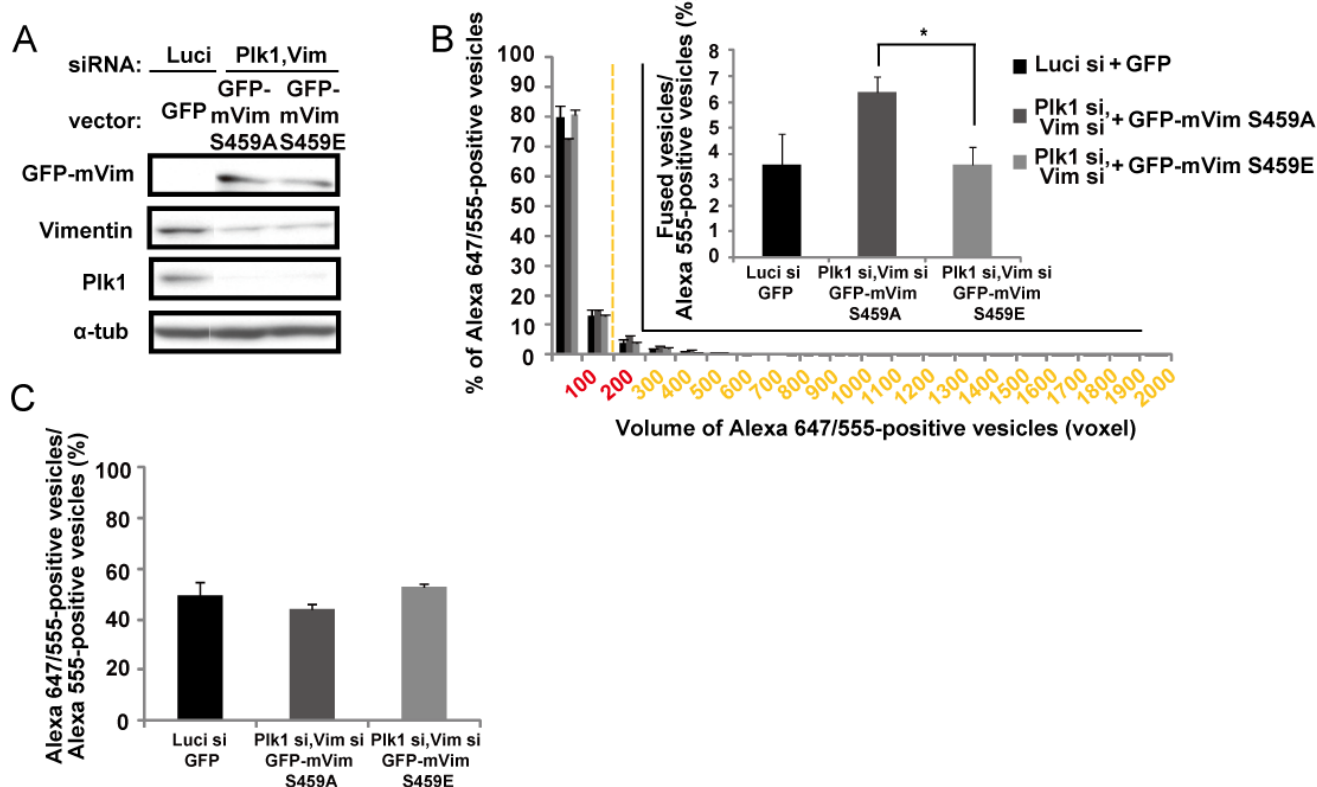


図 22 Plk1 による vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化が初期エンドソームの膜融合を制御する
(A) siRNA を導入した HeLa 細胞に表記のベクターをトランスフェクションし、M 期に同調させ細胞抽出液を調製した。その後サンプル処理し SDS-PAGE で展開し、抗 Plk1 抗体、抗 vimentin 抗体、抗 α -tub 抗体、抗 GFP 抗体でウエスタンブロッティングした。
(B) HeLa 細胞に siRNA とベクターをトランスフェクション後、M 期に同調させ、Alexa647-EGF と Alexa555-EGF を取り込ませて固定した。その細胞の Z スタック画像を取得してマージした部分を定義後、立体的に画像を構築して、その体積を定量化した。その体積の値をもとに膜融合したエンドソームの割合をもとめた。その割合について t 検定を行った。 $*P<0.05$
(C) (B) で検出された Alexa647-EGF と Alexa555-EGF のシグナルをもとに、二色のエンドソームが出会う割合を求めた。

6. vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化は β 1-integrin の分裂溝への輸送を制御する

次に、この Plk1-vimentin による初期エンドソームの膜融合阻害機構が、M 期の現象にどのように関与しているのかを検討した。細胞質分裂では、多くの分子が分裂溝へと輸送される (Fielding et al, 2005; Pellinen et al, 2008; Bastos and Barr, 2010)。その分子の一つとして β 1-integrin が知られている。 β 1-integrin は、細胞-基質間接着を担う膜貫通型タンパク質であり、M 期後期、終期において Rab21 依存的に分裂溝へと輸送され、細胞質分裂を制御することが報告されている (Pellinen et al, 2008)。Rab21 は初期エンドソーム上に局在することが知られており (Simpson et al, 2004; Mai et al, 2011)、Plk1-vimentin による膜融合阻害機構が、M 期中期から終期にかけて β 1-integrin の分裂溝への輸送に関わる可能性が考えられた。そこで、vimentin をノックダウンした HeLa 細胞において、M 期中期か

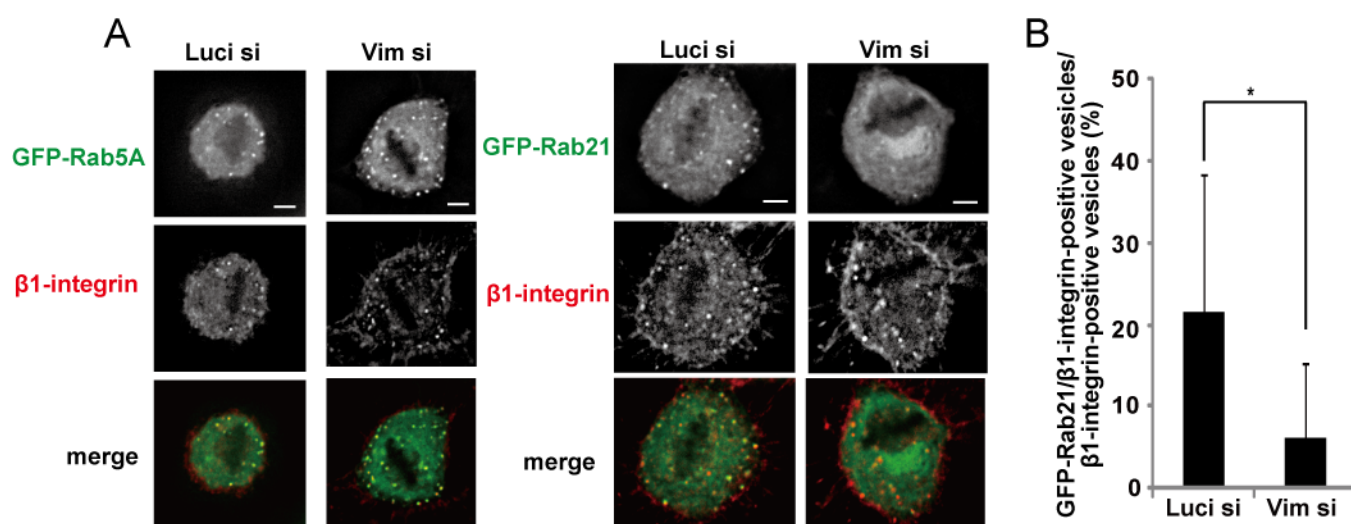


図 23 vimentin をノックダウンすると β 1-integrin 小胞への Rab21 の局在が減弱する

(A) siRNA を導入した HeLa 細胞に GFP-Rab5A 又は GFP-Rab21 をトランスフェクションし、AlexaFluor 546 でラベルした抗 β 1-integrin 抗体を取り込ませて固定した後、画像を取得した。スケールバーは 5 μ m を示している。

(B) (A) の画像から β 1-integrin と Rab21 の共局在の割合を算出した。さらに t 検定を行った。* $P < 0.05$

ら終期での β 1-integrin と Rab21 の局在について検討を行った。まず、GFP-Rab5 又は GFP-Rab21 を発現した M 期中期の細胞に、Alexa546 をラベルした抗 β 1-integrin 抗体を取り込ませて、Rab21 又は、Rab5 と β 1-integrin の局在を観察した。その結果、Rab5 と β 1-integrin は、コントロール細胞でも vimentin をノックダウンした細胞でも、両者は共局在している様子が観察された (図 23、A; 左側)。これに対して、Rab21 と β 1-integrin は、コントロール細胞では共局在するが、vimentin をノックダウンした細

胞では $\beta 1$ -integrin 小胞に Rab21 が局在しなくなる様子が観察された(図 23、A; 右側)。GFP-Rab21 と $\beta 1$ -integrin が共局在している割合を求めたところ、観察結果と同様に、vimentin をノックダウンした場合、共局在の割合が減少する傾向が認められた(図 23、B)。また、同様の結果は BI2536 で細胞を処理した場合でも観察された(図 24)。これらのことから、Plk1-vimentin による初期エンドソームの膜融合阻害機構が、 $\beta 1$ -integrin 小胞への Rab21 の局在を制御することが示唆された。次に、M 期中期から後期にかけての $\beta 1$ -integrin の局在の変化をタイムラプス観察した。その結果、コントロール細胞では分裂溝に $\beta 1$ -integrin が集積し、分裂溝での蛍光強度が上昇する様子が観察された(図 25; Luci si)。この結果は、 $\beta 1$ -integrin が M 期後期において分裂溝へと積極的に輸送されとの過去の報告と一致している(Pellinen et al, 2008)。一方、vimentin をノックダウンした細胞においては、分裂溝への $\beta 1$ -integrin の集積は観察されず、蛍光強度の上昇もみられなかった (図 25; Vim si)。また、固定した細胞において、M 期後期から終期の細胞の $\beta 1$ -integrin の局在についても観察を行ったところ、タイムラプス観察の結果と同様に、vimentin をノックダウンすると、コントロールと比較して、 $\beta 1$ -integrin の分裂溝への局在が減弱していた(図 26、A; Vim si、B; Vim si)。さらに、vimentin をノックダウンした細胞に GFP-mVim WT 又は GFP-mVim S459A 発現させた結果、GFP-mVim WT を発現させた場合には、分裂溝への $\beta 1$ -integrin の集積が認められたのに対し、GFP-mVim S459A を発現させた場合には

分裂溝への $\beta 1$ -integrin の集積は回復しなかった(図 26、A、B)。分裂溝にける $\beta 1$ -integrin の蛍光強度の計測と分裂溝に $\beta 1$ -integrin のシグナルを持つ細胞を計数によって、この現象を定量化したところ、観察結果と同様の傾向が得られた(図 27、A、B)。以上の結果か

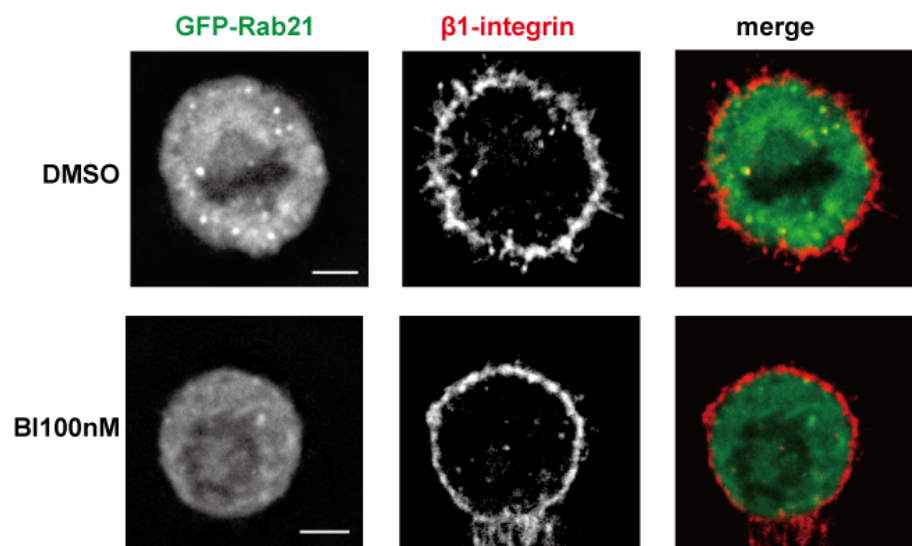


図 24 Plk1 阻害によって $\beta 1$ -integrin 小胞への Rab21 の局在が減弱する HeLa 細胞に GFP-Rab21 をトランスフェクションし、BI2536 処理と共に AlexaFluor 546 でラベルした抗 $\beta 1$ -integrin 抗体を取り込ませて固定した後、画像を取得した。スケールバーは $5\mu\text{m}$ を示している。

ら、Plk1-vimentin による初期エンドソームの膜融合阻害機構が、M 期中期において $\beta 1$ -integrin 小胞への Rab21 の局在を促進し、その結果 M 期後期から終期での $\beta 1$ -integrin の分裂溝への輸送を制御することが示唆された。最後に、この Plk1-vimentin による integrin 輸送機構が細胞質分裂の制御に関与しているのかを、多核化した細胞数を数えることで検討した。その結果、vimentin をノックダウンすると多核化した細胞の割合が増加することが観察された(図 28)。vimentin をノックダウンした細胞に GFP-mVim WT 又は GFP-mVim S459A、GFP-mVim S459E を発現させて、レスキュー実験を行ったところ、GFP-mVim WT と GFP-mVim S459E を発現させた場合には細胞の多核化はレスキューされたが GFP-mVim S459A を発現させた場合にはレスキューされなかった(図 28)。この結果から、Plk1-vimentin による $\beta 1$ -integrin の分裂溝への輸送機構が、正常な細胞質分裂に必要であることが示唆された。

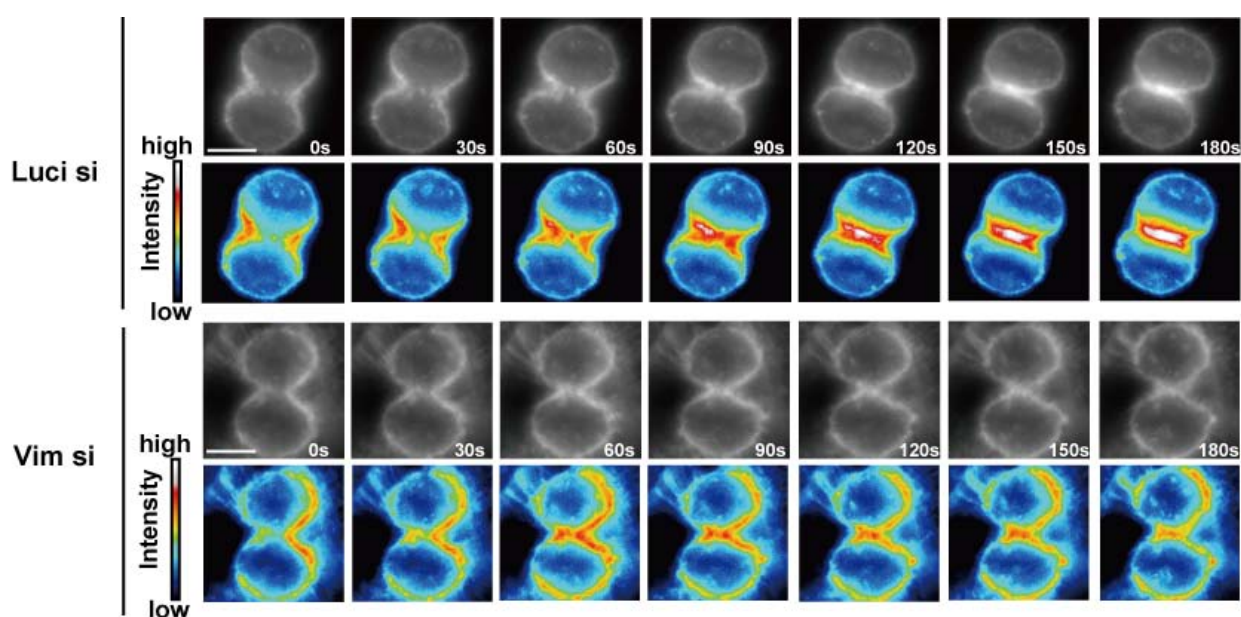


図 25 vimentin をノックダウンすると $\beta 1$ -integrin の分裂溝への局在が減弱する
(A) siRNA を導入した HeLa 細胞に AlexaFluor 546 でラベルした抗 $\beta 1$ -integrin 抗体を取り込ませて 40 秒間隔でタイムラプス観察した。その画像を $\beta 1$ -integrin の蛍光強度によるヒートマップとして示した。スケールバーは $5\mu\text{m}$ を示している。

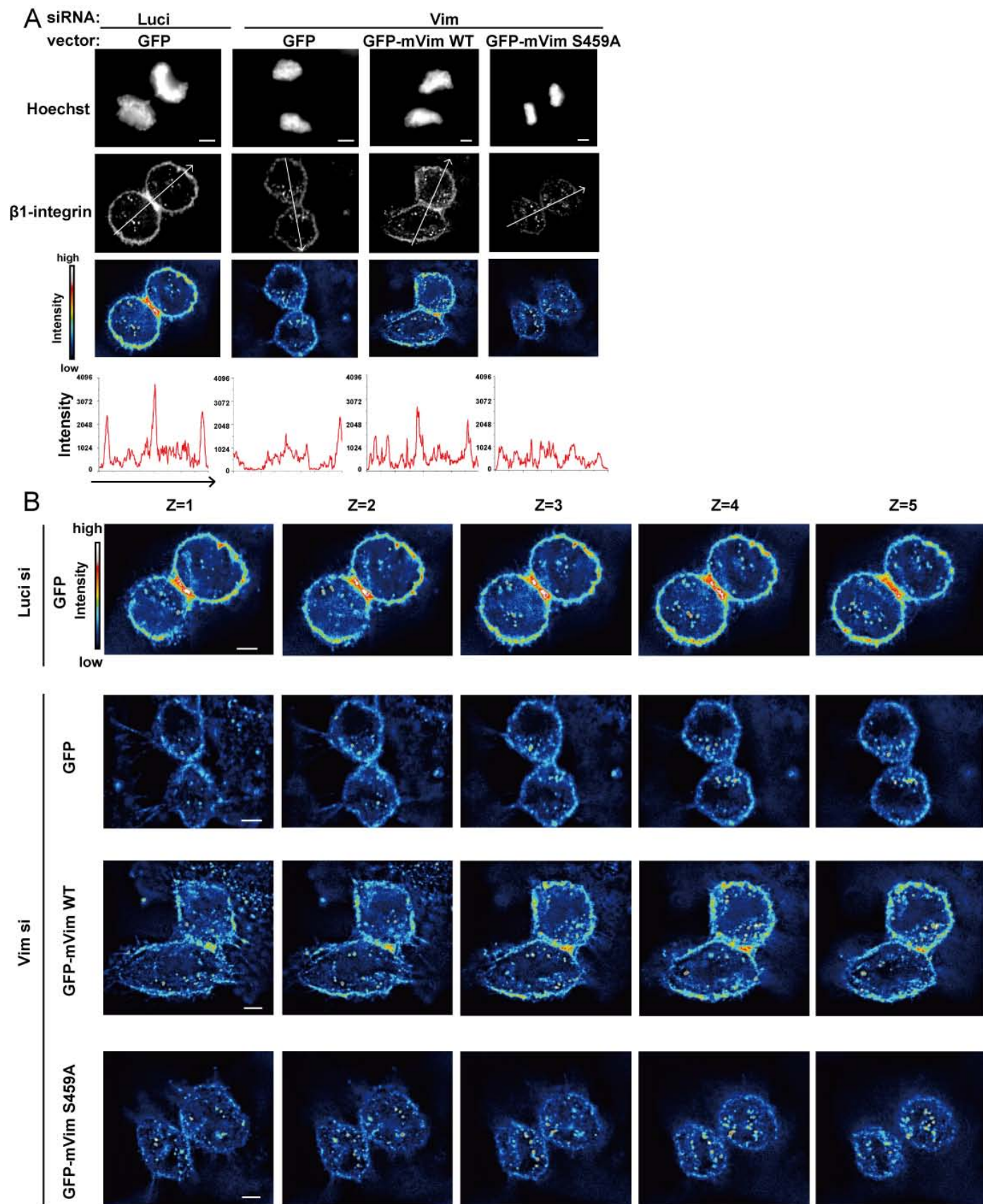


図 26 vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化によって分裂溝への $\beta 1$ -integrin の局在が制御される 1
 (A) siRNA を導入した HeLa 細胞に表記のベクターをトランスフェクション後、AlexaFluor 546 でラベルした抗 $\beta 1$ -integrin 抗体を取り込ませて固定し画像を取得した。核は hoechst によって染色した。さらにその画像を $\beta 1$ -integrin の蛍光強度によるヒートマップとして示した。矢印上の蛍光強度についてもグラフとして示した。スケールバーは 5 μ m を示している。
 (B) (A) で得られた画像の 0.9 μ m 間隔の Z スタック画像を示した。

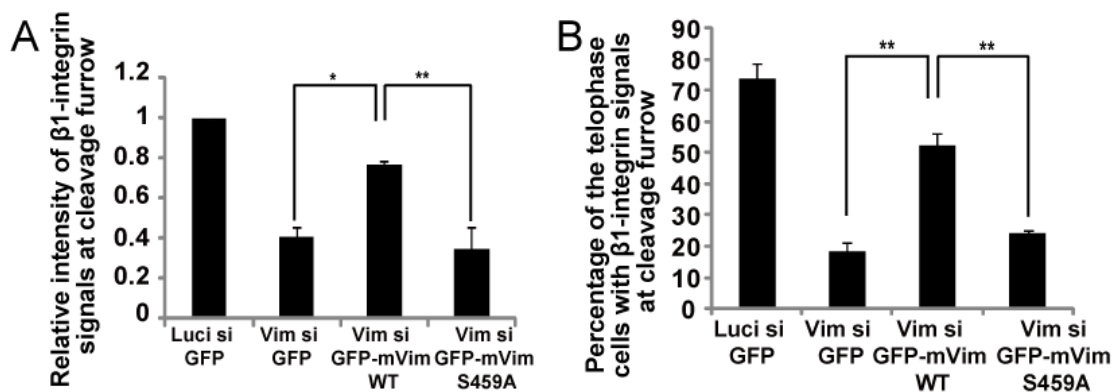


図 27 vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化によって分裂溝への $\beta 1$ -integrin の局在が制御される 2
(A) 図 26 で取得した画像の分裂溝における integrin の蛍光強度の比率を示した。さらにダネット多重比較検定を行った。
** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

(B) 図 26 で得られた細胞のうち、分裂溝に integrin のシグナルを持つものの割合を求めた。さらにダネット多重比較検定を行った。** $P < 0.01$

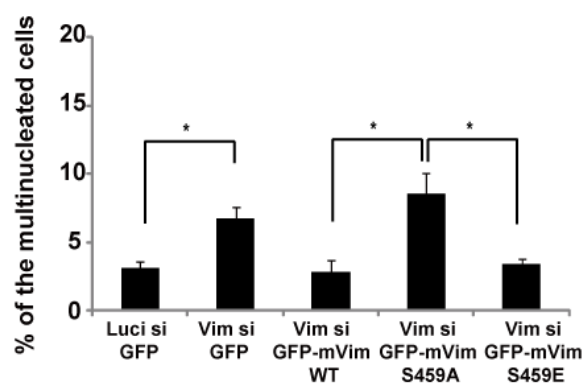


図 28 vimentin の 459 番目のセリンのリン酸化によって細胞質分裂が制御される
siRNA を導入した HeLa 細胞に表記のベクターをトランスフェクション後、hoechst によって核を染色した。この細胞のうち、多核化した細胞の割合を求めた。さらにダネット多重比較検定と t 検定を行った。* $P < 0.05$

第四章 考察

本研究では、M 期において Plk1 が vimetnin の 459 番目のセリンをリン酸化し、初期エンドソームの膜融合を阻害する機構を明らかにした。また、この膜融合阻害機構が M 期後期から終期における integrin の分裂溝への輸送を促進することを示めた。これらのことから、現在以下のような仮説を立てている。M 期前期、中期において Plk1 は vimentin をリン酸化し、初期エンドソームの膜融合を阻害する。この膜融合阻害により $\beta 1$ -integrin を含むエンドソームと、他の積み荷分子を含むエンドソームとを別々に隔離することが保証される。その結果、各エンドソームに含まれる積荷依存的に、特定の Rab がエンドソーム上に局在することが可能となる、すなわち $\beta 1$ -integrin が含まれる場合には Rab21 が特異的に局在する。特定の Rab が局在したそれぞれのエンドソームは、M 期後期から終期において、速やかに且、的確にその積み荷分子を必要とする場所へ輸送される。 $\beta 1$ -integrin 小胞の場合は、Rab21 依存的に分裂溝へと輸送される(図 29)。

初期エンドソームの膜融合には、活性型 Rab5 とそのエフェクター及び、SNARE が必要であることが知られている(Gruenberg, 2001; Zerial and McBride, 2001)。M 期において、Rab5 や Rab5 のエフェクターである Vps34 の活性が負に制御されとの報告があり(Lanzetti et al, 2007; Furuya et al, 2010)、我々が明らかにした機構との関連が考えられた。しかしながら、Plk1 を阻害した場合でも Rab5 の活性や Vps34 の活性には変化が無かった(図 17、図 18)。このことから、Plk1-vimentin による初期エンドソーム膜融合阻害機構は、Rab5 や Vps34 の活性には依存しないと考えられる。Rab5 は初期エンドソームの膜融合だけではなく、エンドサイトーシスにも関与することが知られている(Bucci et al, 1992)。M 期においては、エンドサイトーシスも間期に比べて抑制される傾向があると報告されており(Fielding et al, 2012)、Rab5 の活性抑制はこちらの機構に関わるのかもしれない。また、Vps34 はオートファジーの制御因子としても良く知られている(Simonsen and Tooze, 2009; Funderburk et al, 2010)。オートファジーはプロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解系で、不要になったオルガネラやタンパク質を分解する機構である。オートファジーも、エンドサイトーシスや初期エンドソームの膜融合と同様に、M 期において阻害されることが報告されているため(Eskelinen et al, 2002)、Vps34 の活

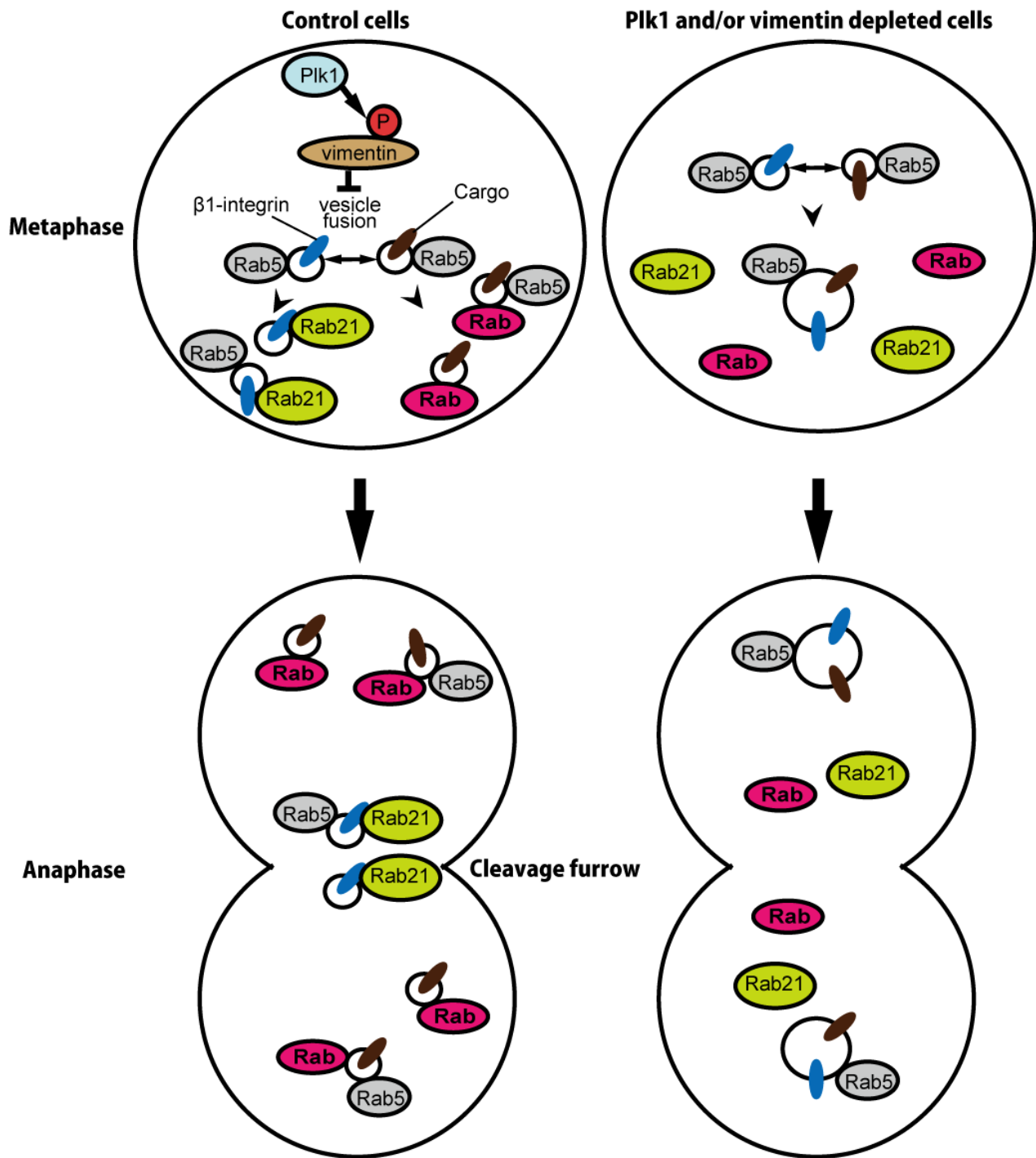


図 29 Plk1-vimentin による M 期の小胞輸送制御モデル

左図) コントロール細胞。M 期中期では、初期エンドソーム (Rab5 ポジティブ小胞) の融合が Plk1-vimentin 経路によって阻害されているため、それぞれの積み荷は別々の小胞に分かれて存在する。M 期後期になると、Rab21 が $\beta 1$ -integrin 小胞へリクルートされ、インテグリン小胞は分裂溝へ輸送される。

右図) Plk1-vimentin 経路が阻害された細胞。初期エンドソームの膜融合が抑制されず、積み荷が同一の小胞内で混ざる。これが原因となって、Rab21 が $\beta 1$ -integrin 小胞へ正常にリクルートされなくなり、Rab21 依存的な $\beta 1$ -integrin 小胞の分裂溝への輸送が機能しなくなる。

性抑制はこの M 期におけるオートファジー抑制機構に関与することが考えられる。Rab5 のエフェクターである EEA1 は細胞質に存在するタンパク質であるが、PI3P との結合を司る FYVE ドメインや、活性型 Rab5 との結合ドメインを持つため、初期エンドソームに局在し膜融合を正に制御する (Simonsen et al, 1998; Grosshans et al, 2006)。このため、EEA1 は細胞質と初期エンドソーム上を行き

来するサイクルを繰り返す。近年、M 期においては、この EEA1 のサイクルが間期とは変化し、初期エンドソーム上への滞在時間が短くなることが報告された(Bergeland et al, 2008)。本研究では、vimentin が初期エンドソームへ局在することを示しており(図 16)、Plk1 によるリン酸化に伴って初期エンドソーム上に膜融合を阻害する因子をリクルートしていることが考えられる。この因子は、EEA1 の細胞質と初期エンドソーム上を行き来するサイクルを変化させるものかもしれない。M 期中期においては、リサイクリング経路も阻害されることが古くから報告されている (Warren et al, 1984; Boucrot and Kirchhausen, 2007; Furthauer and Gonzalez-Gaitan, 2009)。リサイクリング経路の抑制は、M 期におけるトランスフェリンとトランスフェリンレセプターの輸送の観察によって発見された現象である(Warren et al, 1984)。このリサイクリング経路の抑制は、細胞の表面積を減少させることによって、細胞の rounding に関与すると考えられている(Boucrot and Kirchhausen, 2007; Furthauer and Gonzalez-Gaitan, 2009)が、詳細な分子機構は未だ明らかではない。Plk1-vimentin の機構は Rab21 の初期エンドソーム上への局在を制御し得ることが分かった(図 19、図 20)。Rab21 は主に β 1-integrin のリサイクリングに関わる因子であることが報告されている(Mai et al, 2011)。このことから、Plk1-vimentin の機構は Rab21 を含むリサイクリングに関与する Rab、例えば Rab11 などの局在も制御し、初期エンドソームの膜融合阻害機構だけではなく、リサイクリング阻害機構をも制御している可能性がある。

M 期における小胞輸送機構の研究は、これまで主に M 期後期から終期にかけての細胞質分裂にのみ焦点をあてたものが多く、M 期前、中期から終期にかけての M 期全体を通した仕組みは明らかにされていなかった。ここで明らかになった仕組みは M 期全体を通したものであり、M 期の極性を持った小胞輸送システム全体の根幹を担う可能性がある。例えば、MDCK 細胞のシスト形成過程においては、M 期後期から終期において apical 側の因子を含んだ小胞が分裂溝へと輸送され、細胞の極性が決定される (Schluter et al, 2009)。このような M 期後期から終期にかけての極性を持った輸送には、Plk1-vimentin の初期エンドソーム膜融合阻害機構による、M 期前、中期における積み荷分子と、そこに局在する Rab の選別が関与している可能性がある。また、*Drosophila* においては、M 期特異的な極性をもった小胞輸送が細胞の運命決定に関与するとの報告も存在し、この Plk1-vimentin によ

る機構の関与が考えられる(Coumaille et al, 2009; Furthauer and Gonzalez-Gaitan, 2009)。今日、私が明らかにした Plk1-vimentin による初期エンドソーム膜融合阻害機構は、細胞極性や運命決定などの複雑な生命現象を明らかにする鍵となるかもしれない。

参考文献

Archambault V, Glover DM (2009) Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 265-275.

Bastos RN, Barr FA (2010) Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J. Cell Biol.* 191, 751-760.

Bergeland T, Haugen L, Landsverk OJ, Stenmark H, Bakke O (2008) Cell-cycle-dependent binding kinetics for the early endosomal tethering factor EEA1. *EMBO Rep.* 9, 171-178.

Boucrot E, Kirchhausen T (2007) Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7939-7944.

Brighouse A, Dacks JB, Field MC (2010) Rab protein evolution and the history of the eukaryotic endomembrane system. *Cell. Mol. Life. Sci.* 67, 3449-3465.

Bruinsma W, Raaijmakers JA, Medema RH (2012) Switching Polo-like kinase-1 on and off in time and space. *Trends. Biochem. Sci.* 37, 534-542.

Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.

Casenghi M, Meraldi P, Weinhart U, Duncan PI, Korner R, Nigg EA (2003) Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev. Cell* 5, 113-125.

- Casenghi M, Barr FA, Nigg EA (2005) Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome. *J. Cell Sci.* 118, 5101-5108.
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621-625.
- Coumailleau F, Furthauer M, Knoblich JA, Gonzalez-Gaitan M (2009) Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division. *Nature* 458, 1051-1055.
- Dephoure N, Zhou C, Villen J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ, Gygi SP (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10762-10767.
- Elia AE, Rellos P, Haire LF, Chao JW, Ivins FJ, Hoepker K, Mohammad D, Cantley LC, Smerdon SJ, Yaffe MB (2003a) The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 115, 83-95.
- Elia AE, Cantley LC, Yaffe MB (2003b) Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299, 1228-1231.
- Eskelinen EL, Prescott AR, Cooper J, Brachmann SM, Wang L, Tang X, Backer JM, Lucocq JM (2002) Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic* 3, 878-893.
- Feng Y, Hodge DR, Palmieri G, Chase DL, Longo DL, Ferris DK (1999) Association of polo-like kinase with alpha-, beta- and gamma-tubulins in a stable complex. *Biochem. J.* 339, 435-442.

Fielding AB, Schonteich E, Matheson J, Wilson G, Yu X, Hickson GR, Srivastava S, Baldwin SA, Prekeris R, Gould GW (2005) Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *EMBO J.* 24, 3389-3399.

Fielding AB, Willox AK, Okeke E, Royle SJ (2012) Clathrin-mediated endocytosis is inhibited during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6572-6577.

Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z (2010) The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends. Cell Biol.* 20, 355-362.

Furthauer M, Gonzalez-Gaitan M (2009) Endocytosis and mitosis: a two-way relationship. *Cell Cycle* 8, 3311-3318.

Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, Shen Y, Rameh L, Yankner B, Tsai LH et al (2010) Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol. Cell* 38, 500-511.

Gimenez-Abian JF, Sumara I, Hirota T, Hauf S, Gerlich D, de la Torre C, Ellenberg J, Peters JM (2004) Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr. Biol.* 14, 1187-1193.

Golsteyn RM, Mundt KE, Fry AM, Nigg EA (1995) Cell cycle regulation of the activity and subcellular localization of Plk1, a human protein kinase implicated in mitotic spindle function. *J. Cell Biol.* 129, 1617-1628.

Grosshans BL, Ortiz D, Novick P (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11821-11827.

Gruenberg J (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 721-730.

Hauf S, Roitinger E, Koch B, Dittrich CM, Mechtler K, Peters JM (2005) Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol.* 3, e69.

Hornig NC, Uhlmann F (2004) Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. *EMBO J.* 23, 3144-3153.

Hsu JL, Huang SY, Chow NH, Chen SH (2003) Stable-isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Anal. Chem.* 75, 6843-6852.

Ishida M, Ohbayashi N, Maruta Y, Ebata Y, Fukuda M (2012) Functional involvement of Rab1A in microtubule-dependent anterograde melanosome transport in melanocytes. *J. Cell Sci.* 125, 5177-5187.

Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ (2005) PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J.* 24, 3834-3845.

Izawa I, Inagaki M (2006) Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* 97, 167-174.

Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631-643.

Lane HA, Nigg EA (1996) Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* 135, 1701-1713.

Lanzetti L, Margaria V, Melander F, Virgili L, Lee MH, Bartek J, Jensen S (2007) Regulation of the Rab5 GTPase-activating protein RN-tre by the dual specificity phosphatase Cdc14A in human cells. *J. Biol. Chem.* 282, 15258-15270.

Lee KS, Yuan YL, Kuriyama R, Erikson RL (1995) Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol. Cell Biol.* 15, 7143-7151.

Lin CY, Madsen ML, Yarm FR, Jang YJ, Liu X, Erikson RL (2000) Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12589-12594.

Mai A, Veltel S, Pellinen T, Padzik A, Coffey E, Marjomaki V, Ivaska J (2011) Competitive binding of Rab21 and p120RasGAP to integrins regulates receptor traffic and migration. *J. Cell Biol.* 194, 291-306.

Matsumura S, Toyoshima F, Nishida E (2007) Polo-like kinase 1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J. Biol. Chem.* 282, 15217-15227.

McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, Zerial M (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98, 377-386.

Mundt KE, Golsteyn RM, Lane HA, Nigg EA (1997) On the regulation and function of human polo-like kinase 1 (PLK1): effects of overexpression on cell cycle progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 377-385.

Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, Kopajtich R, Nigg EA, Mayer TU, Barr FA (2003) Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J. Cell Biol.* 162, 863-875.

Niiya F, Tatsumoto T, Lee KS, Miki T (2006) Phosphorylation of the cytokinesis regulator ECT2 at G2/M phase stimulates association of the mitotic kinase Plk1 and accumulation of GTP-bound RhoA. *Oncogene* 25, 827-837.

Park JE, Soung NK, Johmura Y, Kang YH, Liao C, Lee KH, Park CH, Nicklaus MC, Lee KS (2010) Polo-box domain: a versatile mediator of polo-like kinase function. *Cell Mol. Life. Sci.* 67, 1957-1970.

Pellinen T, Tuomi S, Arjonen A, Wolf M, Edgren H, Meyer H, Grosse R, Kitzing T, Rantala JK, Kallioniemi O et al (2008) Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Dev. Cell* 15, 371-385.

Pfeffer SR (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends. Cell Biol.* 11, 487-491.

Rapley J, Baxter JE, Blot J, Wattam SL, Casenghi M, Meraldi P, Nigg EA, Fry AM (2005) Coordinate regulation of the mother centriole component nlp by nek2 and plk1 protein kinases. *Mol. Cell Biol.* 25, 1309-1324.

Roberts RL, Barbieri MA, Ullrich J, Stahl PD (2000) Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 68, 627-632.

Schluter MA, Pfarr CS, Pieczynski J, Whiteman EL, Hurd TW, Fan S, Liu CJ, Margolis B (2009) Trafficking of Crumbs3 during cytokinesis is crucial for lumen formation. *Mol. Biol. Cell* 20, 4652-4663.

Seong YS, Kamijo K, Lee JS, Fernandez E, Kuriyama R, Miki T, Lee KS (2002) A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells. *J. Biol. Chem.* 277, 32282-32293.

Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, Toh BH, Murphy C, Zerial M, Stenmark H (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394, 494-498.

Simonsen A, Gaullier JM, D'Arrigo A, Stenmark H (1999) The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J. Biol. Chem.* 274, 28857-28860.

Simonsen A, Tooze SA (2009) Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186, 773-782.

Simpson JC, Griffiths G, Wessling-Resnick M, Fransen JA, Bennett H, Jones AT (2004) A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J. Cell Sci.* 117, 6297-6311.

Sorkin A, Goh LK (2008) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp. Cell Res.* 314, 3093-3106.

Stenmark H, Olkkonen VM (2001) The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3007.

Sugiyama N, Masuda T, Shinoda K, Nakamura A, Tomita M, Ishihama Y (2007) Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 1103-1109.

Sumara I, Vorlauffer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM (2002) The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol. Cell* 9, 515-525.

Sumara I, Gimenez-Abian JF, Gerlich D, Hirota T, Kraft C, de la Torre C, Ellenberg J, Peters JM (2004) Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr. Biol.* 14, 1712-1722.

- Sutterlin C, Lin CY, Feng Y, Ferris DK, Erikson RL, Malhotra V (2001) Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9128-9132.
- Tsuboi T, Fukuda M (2006) Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci.* 119, 2196-2203.
- Tuomikoski T, Felix MA, Doree M, Gruenberg J (1989) Inhibition of endocytic vesicle fusion in vitro by the cell-cycle control protein kinase cdc2. *Nature* 342, 942-945.
- van Vugt MA, van de Weerd BC, Vader G, Janssen H, Calafat J, Klompaker R, Wolthuis RM, Medema RH (2004) Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279, 36841-36854.
- Warren G, Davoust J, Cockcroft A (1984) Recycling of transferrin receptors in A431 cells is inhibited during mitosis. *EMBO J.* 3, 2217-2225.
- Yamaguchi T, Goto H, Yokoyama T, Sillje H, Hanisch A, Uldschmid A, Takai Y, Oguri T, Nigg EA, Inagaki M (2005) Phosphorylation by Cdk1 induces Plk1-mediated vimentin phosphorylation during mitosis. *J. Cell Biol.* 171, 431-436.
- Yarm FR (2002) Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell Biol.* 22, 6209-6221.
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107-117.

Zhou T, Aumais JP, Liu X, Yu-Lee LY, Erikson RL (2003) A role for Plk1 phosphorylation of NudC in cytokinesis. *Dev. Cell* 5, 127-138.

謝辞

修士課程からの5年間、研究ができる環境を提供して下さい、論文の投稿にも御尽力頂いた豊島文子教授に心より感謝申し上げます。

また、実験方法など研究に必要な基本的な物事を、丁寧に御指導頂いた松村繁助教と論文投稿にあたり実験の補助をして頂いた福原充子さんにも心より深く感謝申し上げます。

京都大学大学院薬学研究科製剤機能解析学分野の石濱泰教授、杉山直幸准教授、佐藤綾香さんにはリン酸化プロテオーム解析をして頂きました。愛知県がんセンター研究所の稲垣昌樹教授、後藤英仁室長にはvimentinのcDNAやリコンビナントタンパクを分与頂き、東北大学大学院生命科学研究科福田光則教授にはRab5A、Rab5CA、Rab21のベクターを分与頂きました。この場を借りて感謝の意を表させていただきます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Keisuke Ikawa, Ayaka Satou, Mitsuko Fukuhara, Shigeru Matsumura, Naoyuki Sugiyama, Hidemasa Goto, Mitsunori Fukuda, Masaki Inagaki, Yasushi Ishihama, Fumiko Toyoshima

Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis

Cell Cycle, in press, 2013