

Gタンパク質共役受容体の 一次繊毛局在機構の解析

伊達山 泉

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子情報薬理学研究室

(伊東 広 教授)

2018年3月14日

目次

第1章 序論

1.1	一次繊毛	4
1.2	細胞のアンテナである一次繊毛	4
1.3	Gタンパク質共役受容体と一次繊毛を介したシグナル伝達	6
1.4	一次繊毛局在性 GPCR の局在機構(1): 一次繊毛局在配列	6
1.5	一次繊毛局在性 GPCR の局在機構(2): 局在関連タンパク質	7
1.6	本研究で着目している ciliary GPCR について	9
1.7	Rab-like 2 について	10
1.8	研究の目的・方針	10

第2章 材料と方法

2.1	株化細胞の培養	12
2.2	試薬	12
2.3	抗体	13
2.4	抗 5HT6 抗体の精製	14
2.5	使用したプラスミド一覧	15
2.6	プラスミドの作製	17
2.7	遺伝子発現抑制	18
2.8	遺伝子導入方法	21
2.9	免疫染色	21
2.10	一次繊毛局在性タンパク質の一次繊毛局在率の定量方法	23
2.11	FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching: 光退色後蛍光回復法)	23
2.12	タンパク質定量	24
2.13	細胞内タンパク質相互作用試験(免疫沈降法)	24
2.14	ウェスタンブロット	24
2.15	検定	25
2.16	レンチウイルスの作製	25
2.17	安定発現細胞株の作製	25
2.18	RNA 抽出	26
2.19	逆転写反応	26
2.20	定量的 PCR	26

第3章 実験結果	
3.1 5HT6の局在関連分子の探索	28
3.1.1 遺伝子発現抑制による5HT6の一次繊毛局在への影響	28
3.1.2 免疫沈降による5HT6と局在関連分子の相互作用の検討	28
3.2 Ciliary GPCRの一次繊毛局在におけるRab12の機能解析	31
3.2.1 GTP結合型Rab12は5HT6の一次繊毛局在を促進する	31
3.2.2 Rab12はGPR161の一次繊毛局在を促進する	37
3.2.3 SSTR3の一次繊毛局在性に対するRab12の発現抑制および過剰発現の効果	37
3.2.4 Ciliary GPCRとRab12の相互作用	42
3.2.5 CEP19、Rab12、IFT88によるGPR161の局在制御機構	48
3.2.6 GTP結合型Rab12はIFT88の一次繊毛局在を促進する	48
3.2.7 SSTR3の一次繊毛局在におけるCEP19、Rab12、IFT-Bの関与は少ない	52
3.2.8 Tulp3はIFT88の一次繊毛局在に影響しない	52
3.3 5HT6のCTSの探索	56
3.3.1 5HT6の一次繊毛局在と細胞内第3ループの影響	56
3.3.2 C末端欠損変異体による5HT6のCTS探索	56
3.3.3 5HT6の324-331a.a.領域に含まれるCTSの探索	59
第4章 考察	
4.1 5HT6の一次繊毛局在を制御する分子群	62
4.2 Rab12によるciliary GPCRの一次繊毛局在機構	64
4.3 5HT6のCTS探索	67
第5章 参考文献	70
謝辞	78

第 1 章 序論

1.1 一次繊毛

哺乳類の細胞には鞭毛や繊毛と呼ばれる細く突き出た毛のような構造物がある。一般的には気管や精子のような特殊化した細胞に見られる動性を持つ鞭毛や多繊毛がよく知られている。鞭毛および多繊毛の主な機能は能動的に動き、細胞自身の移動や細胞外の物質の流動を促進することである。一方、これら動性を持つ鞭毛および多繊毛の他に一次繊毛と呼ばれる細胞器官がある。一次繊毛は全身のほぼ全ての細胞に存在する(Sengupta et al., 2017)。一次繊毛は各細胞に 1 本あり、短く、動性を持たないことから、退化した細胞器官であると考えられてきた。しかしながら、近年、一次繊毛には Sonic Hedgehog や Wnt シグナルの関連因子を始め、受容体やその下流分子が存在し、細胞外からのシグナルを細胞内に伝達するアンテナとしての機能を担うことが明らかとなってきた(Pedersen et al., 2016)。

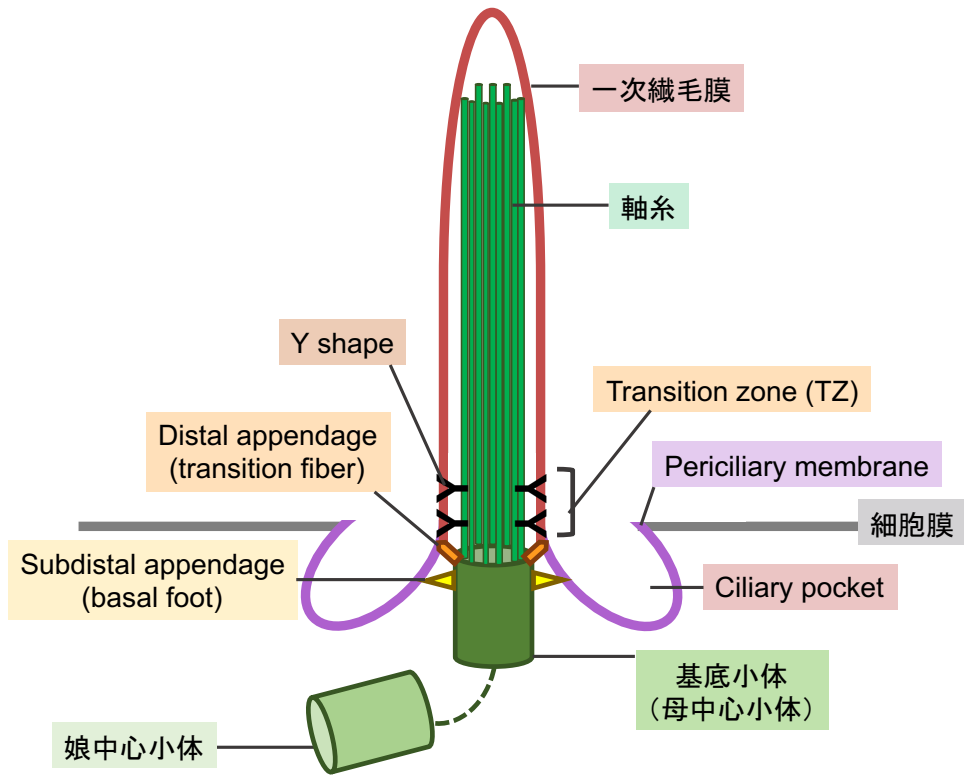
一次繊毛の骨格となる軸糸は中心小体から伸長した微小管である(図 1A) (Kobayashi and Dynlacht, 2011)。2 つの中心小体は 1 対の中心体を形成し、細胞周期中にそれぞれの中心小体から新たな中心小体が複製され、分裂期には 2 対の中心体が紡錘体として機能する(図 1B) (Kobayashi and Dynlacht, 2011)。中心体は母中心小体(基底小体)および娘中心小体により構成され、一次繊毛は基底小体を根元とし、G0期において安定して形成される(図 1B)。基底小体は distal appendages により一次繊毛膜と細胞膜の境界にある periciliary membrane に結合し、periciliary membrane は exocytosis および endocytosis が活発な小胞輸送のセンターである ciliary pocket を形成している(Madhivanan et al., 2014) (図 1A)。また、distal appendages の上部では Y shape と呼ばれる構造が軸糸を一次繊毛膜に固定している。さらに、Y shape 付近は一次繊毛の関所としてタンパク質輸送機構が集中しており、transition zone (TZ)と呼ばれている(Reiter and Leroux, 2017) (図 1A)。一次繊毛は細胞膜とひとつながりでありながら、このように独自の膜と細胞内区画をもつ(図 1A)。

一次繊毛は哺乳類の全身におけるほぼすべての細胞に存在するため、その形成や機能に不具合が生じると、網膜色素変性、多指症、多発性腎嚢胞、肥満、内蔵逆位などの多岐にわたる疾患が引き起こされる(Zaghloul and Katsanis, 2009)。

1.2 細胞のアンテナである一次繊毛

一次繊毛に局在する膜タンパク質として最もよく知られているものには Sonic Hedgehog シグナルの構成因子である Patched1 (Ptch1)、Smoothed (Smo)、GPR161 などがある(Rohatgi et al., 2007; Mukhopadhyay et al., 2013)。これらは一次繊毛を介してシグナルを伝達しており、一次繊毛の形成に必須な IFT172、Kif3 を欠損した変異マウスにおいて Sonic Hedgehog シグナル下流の Ptch1 の発現が減弱し、脊索の発達に異常が生じる(Huangfu et al., 2003)。また、腎臓の一次繊毛に局在するカルシウムチャンネル Polycystin1(PC1)/PC2 は

A.



B.

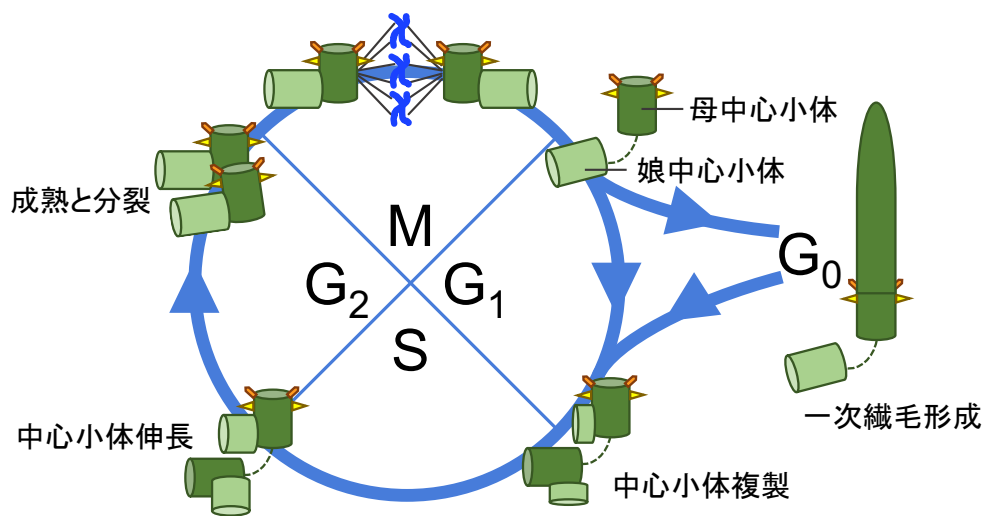


図 1. A. 一次繊毛の構造。B. 一次繊毛の形成と細胞周期。

PC1/PC2 の発現抑制や一次繊毛が形成されなくなることで多発性腎嚢胞が引き起こされることが示された(Nauli et al., 2003)。これらの報告から、一次繊毛はシグナル伝達のハブ、あるいはアンテナとして重要な働きがあると考えられている。

1.3 Gタンパク質共役受容体と一次繊毛を介したシグナル伝達

一次繊毛のシグナル伝達を担う受容体の中に Gタンパク質共役受容体(G protein coupled receptor; GPCR)がある。GPCR は 7 回膜貫通型受容体でヒトでは約 800 種類存在する(Schou and Christensen, 2015)。GPCR はそれぞれ、光、匂い物質、脂質、ペプチドなど特定のリガンドを認識して細胞内へと情報を伝達する。リガンドと結合した GPCR は細胞内で $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ の 3 つのサブユニットからなる 3 量体 Gタンパク質と結合し、 $G\alpha$ ($G\alpha_s$ 、 $G\alpha_q/11$ 、 $G\alpha_i/o$ 、 $G\alpha_{12/13}$)を活性化するとともにヘテロダイマー $G\beta\gamma$ を乖離させ、それぞれの下流にシグナルを伝達する。

$G\alpha_s$ はアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP の産生を促進することで、下流の PKA などを活性化する一方、 $G\alpha_i/o$ はアデニル酸シクラーゼを抑制する。また、 $G\alpha_q$ はホスホリパーゼ $C\beta$ を活性化することにより、Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate からジアシルグリセロールとイノシトール 3 リン酸(IP3)を産生する。IP3 は下流で小胞体からカルシウムを放出させるリガンドとしても知られている。 $G\alpha_{13}$ は RhoGEF を活性化し、 $G\alpha_{12}$ は $G\alpha_{13}$ による RhoGEF 活性作用を抑制する。

これまでにドーパミン受容体 D1R、セロトニン受容体 5HT6、ソマトスタチン受容体 SSTR3、Neuropeptide Y 受容体 2 (NPY2R)など約 30 種類の GPCR が一次繊毛に局在することが報告されている(Marley and von Zastrow, 2010; Hamon et al., 1999; Brailov et al., 2000; Händel et al., 1999; Schulz et al., 2000; Loktev and Jackson, 2013; Hilgendorf et al., 2016)。Loktev らは Bardet-biedl Syndrome (BBS)原因遺伝子群である BBSome 複合体構成因子のノックアウトマウスにおいて NPY2R が一次繊毛に局在しなくなり、肥満の症状が現れることに加え、NPY2R のリガンド依存的な G_i/o 活性化による cAMP の産生抑制が一次繊毛の形成によって効果的になることを示した(Loktev and Jackson, 2013)。しかしながら、一次繊毛に局在する GPCR (ciliary GPCR)の殆どはシグナル伝達機構の詳細が不明であり、また GPCR の一次繊毛を介したシグナル伝達の意義も未解明の部分が多い。

1.4 一次繊毛局在性 GPCR の局在機構(1):一次繊毛局在配列

Ciliary GPCR は一次繊毛局在配列(ciliary targeting sequence; CTS)を持ち、局在関連タンパク質が CTS を認識することで一次繊毛への局在を制御していると考えられている。これまでに報告されている代表的な ciliary GPCR の CTS は(F/Y/W)R モチーフ、(R/K)(I/L)W モチーフ、Ax(S/A)xQ モチーフ(x は任意のアミノ酸)、VxPx モチーフである。

(F/Y/W)R モチーフは *C.elegans* の olfactory receptor ODR-1 および STR-1 の C 末端に含

まれる FR が CTS として同定された(Dwyer et al., 2001)。その後、哺乳類でも Rhodopsin、ソマトスタチン受容体 SSTR3、セロトニン受容体 5HT6、ソニックヘッジホッグシグナル構成因子 Smoothed(SMO)が同様に疎水性アミノ酸/塩基性アミノ酸(FR, YR, WR など)を細胞内 C 末端領域に持つことから、SMO の WR をアラニンに置換したところ、一次繊毛への局在が減少したことが報告されている(Corbit et al., 2005)。(R/K)(I/L)W モチーフは NPY2R、GPR83 の細胞内第 3 ループ(i3)に含まれる一次繊毛局在に十分な配列であることが報告された(Loktev and Jackson, 2013)。また、SSTR3、5HT6、メラニン濃縮ホルモン受容体 MCHR1 の i3 に含まれる Ax(S/A)xQ モチーフあるいは GPR161 の i3 に含まれる(V/I)KARK モチーフも一次繊毛への局在に必要であることが示唆されており(Berbari et al., 2008; Mukhopadhyay et al., 2013)、Tulp3 は Ax(S/A)xQ モチーフおよび(V/I)KARK モチーフに依存して一次繊毛局在を制御していることが示唆された(Badgandi et al., 2017)。VxPx モチーフはロドプシンの細胞内 C 末端に含まれ、低分子量 GTP 結合タンパク質 ARF4 に認識される。ARF4 は Golgi からロドプシンを含む小胞を括り取るための足場を形成し、一次繊毛への輸送を仕掛けることが知られている(Deretic et al., 2005)。

1.5 一次繊毛局在性 GPCR の局在機構(2): 局在関連タンパク質

Ciliary GPCR の一次繊毛局在に介在する分子には、BBSome 複合体、Intraflagellar transport (IFT)複合体、低分子量 GTP 結合タンパク質、そして Tubby like protein 3 (Tulp3) などがある(図 2)。

BBSome 複合体は繊毛病である BBS の原因遺伝子として同定された 8 分子複合体で、SSTR3、MCHR1、NPY2R などの GPCR は BBSome 複合体に認識され、一次繊毛へと輸送される(Berbari et al., 2008; Loktev and Jackson, 2013; 図 2①)。

IFT 複合体には IFT-B および IFT-A の 2 種類ある。kinesin-2 と積み荷を繋ぎ、一次繊毛の根元から先端へと輸送する IFT-B 複合体、そして dynein-2 との結合により、一次繊毛先端から根元へと積荷を輸送する IFT-A 複合体である。IFT-B は 16 分子、IFT-A は 6 分子により構成されている。IFT-B 複合体はドーパミン受容体 D1R の一次繊毛局在に介在し(Leaf and Zastrow, 2015; 図 2②)、Ptch1、GPR161 および Smo は BBSome を介して IFT-A 依存的に一次繊毛から搬出することが報告された(Liew et al., 2014; Egueher et al., 2014; 図 2③)。さらに、IFT-A は GPR161、SSTR3 などの一次繊毛局在にも必要であることが報告された(Hirano et al., 2016)。

一次繊毛に局在するタンパク質輸送に介在する低分子量 GTP 結合分子群には Rab family および ADP ribosylation factor (Arf)/Arf-like(Arl) family がある。Arf family に含まれる Arf4 はロドプシンの CTS を認識してゴルジ体から小胞を形成する足場をつくり、その後ロドプシンを含む小胞は Rab11-Rabin8-Rab8 によりゴルジ体から一次繊毛へと輸送される(Wang et al., 2012; 図 2④)。

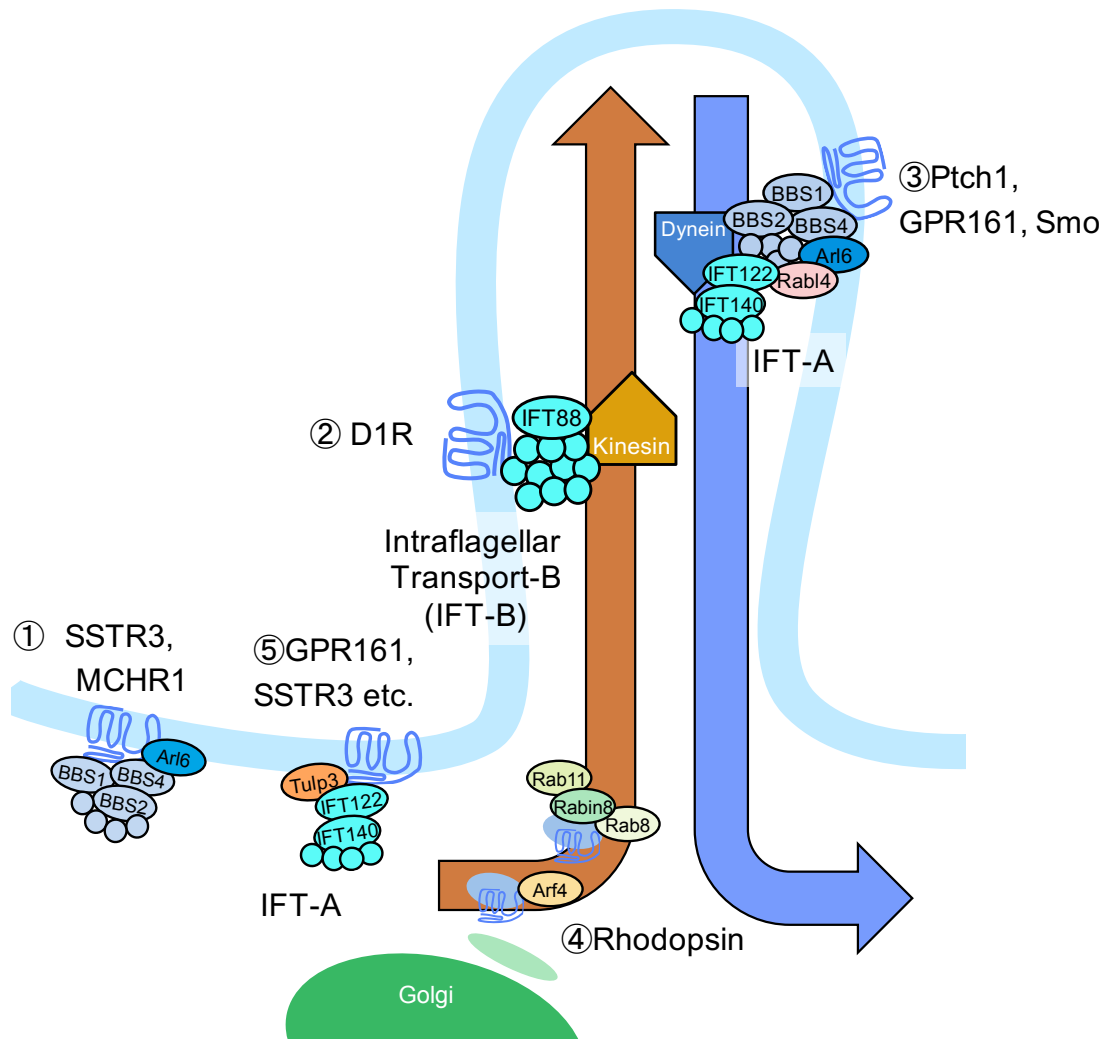


図 2. GPCR の一次繊毛局在に介在する分子の概略

①BBSome/Arl6 は SSTR3 および MCHR1 と相互作用し、一次繊毛局在に介在する。②IFT-B は D1R の一次繊毛局在に必要である。③BBSome 複合体は Arl6、Rabl4 および IFT-A と共に Ptch1、GPR161 および Smo を一次繊毛から除去する。④Rhodopsin は Arf4 と結合することでゴルジ体からの小胞形成が始まり、その後の小胞輸送に Rab11、Rabin8、Rab8 が協調的に働く。⑤GPR161、SSTR3 などの GPCR は一次繊毛局在に Tulp3 を介して IFT-A と結合することが必要である。

一次繊毛疾患に関連した肥満の原因遺伝子として同定された Tubby like protein3 (Tulp3) は SSSTR3、MCHR1、NPY2R、GPR161 を含む 16 種のロドプシンファミリーGPCR の一次繊毛局在に必要であることが明らかとなった(Mukhopadhyay, et al., 2010; Loktev and Jackson, 2013; Mukhopadhyay et al., 2013; Badgandi et al., 2017; 図 2⑤)。Tulp3 は GPCR の第 3 ループに含まれるアミノ酸配列を認識し、IFT-A と GPCR を繋ぐアダプターであると考えられている(Badgandi et al., 2017)。

1.6 本研究で着目している ciliary GPCR について

セロトニン受容体 5HT6

セロトニンは神経伝達物質として知られており、中枢神経および血中や消化管、リンパ系に存在する(Yun et al., 2007)。セロトニンは 16 種類の受容体を介して細胞応答を引き起こし、これらは 7 つのサブファミリー 5HT1-5HT7 に分けられる(Yun et al., 2007)。Ligand-gated イオンチャンネルである 5HT3 以外はいずれも GPCR である。この中でも 5HT6 だけが一次繊毛に局限し、尾状核、海馬および扁桃体など神経細胞で発現することが報告されている(Kohen et al., 1996)。また、5HT6 は神経細胞の遊走に必要であることが報告されている(Jacobshagen et al., 2014)。5HT6 の機能は特異的なアゴニストおよびアンタゴニストを用いることで、情緒調節や認知、摂食機能に関与していることも報告されている(Jastrzębska-Więsek et al., 2017; Kotańska et al., 2018)。

GPR161

様々な細胞に広く発現する GPR161 はリガンド不明な ciliary GPCR であるが、過剰発現により cAMP が増加したことから、G α s と共役することが示唆されている(Mukhopadhyay et al., 2013)。GPR161 はソニックヘッジホッグシグナルの構成分子として知られており、哺乳類ではソニックヘッジホッグシグナルの受容体である Patched1 (Ptch1)が Smoothened (Smo)の一次繊毛局在を負に制御しており、その際 GPR161 は一次繊毛に局在する。しかし、一旦 Ptch1 がソニックヘッジホッグシグナルを受け取ると、Smo の一次繊毛局在が誘導され、同時に GPR161 が一次繊毛から搬出される(Mukhopadhyay et al., 2013)。GPR161 のノックアウトマウスではソニックヘッジホッグシグナル下流で発現する転写因子の Gli1 および Ptch1 が増加し、胎生致死となった(Mukhopadhyay et al., 2013)。これらのことより、GPR161 はソニックヘッジホッグシグナルの負の制御因子であると考えられている。また、GPR161 の一次繊毛局在機構に関しては 4 つの報告がある。1. GPR161 の細胞内第 3 ループに含まれる CTS 依存的な Tulp3 と IFT-A を介した一次繊毛への局在機構(Mukhopadhyay et al., 2013; Hirano et al., 2016)。2. Arl13b 依存的な IFT-A による一次繊毛からの搬出機構(Nozaki et al., 2017)。3. Arl6 依存的な IFT-A/BBSome による一次繊毛からの搬出機構(Liew et al., 2014; Egueher et al., 2014)。4. GPR161 と β Arrestin との相互作用による一次繊毛からの搬出(Pal et al.,

2016)である。

ソマトスタチン受容体 SSTR3

ソマトスタチン(SST)は下垂体からの成長ホルモンや膵臓からのインスリンおよびグルカゴンの分泌を抑制するペプチドホルモンである(Komatsuzaki et al., 1997)。また、中枢神経系においては神経伝達物質として働き、運動や認識機能を制御している(Händel et al., 1999)。ソマトスタチンを認識する GPCR は 5 つのサブタイプ(SSTR1-SSTR5)からなり、いずれも Gi と共役し、アデニル酸シクラーゼを抑制する(Komatsuzaki et al., 1997)。SSTR3 は大脳皮質、視床下部、小脳、海馬の多くの錐体神経細胞(pyramidal neuron)に発現し、一次繊毛に局在する性質を持つ(Händel et al., 1999; Schulz et al., 2000)。SSTR3 は Tulp3 - IFT-A による局在機構および BBSome 複合体を介して一次繊毛に局在する(Mukhopadhyay et al., 2013; Hirano et al., 2016; Händel et al., 1999; Berbari et al., 2008)。また、SSTR3 は SST シグナル依存的に、GPCR の内部移行に参与する β Arrestin を介して一次繊毛から搬出されることが報告された(Green et al., 2015)。

1.7 Rab-like 2 について

Rab-like family は Rab family に含まれ、Rab の持つ 5 つの GTP 結合部位のうちの少なくとも 1 つを欠損し、かつ C 末端側領域の脂質修飾部位を持たない。Rab-like family は Rab12a/b、Rab13、Rab14、Rab15、Rab16 が同定されており、近年一次繊毛における機能が明らかになりつつある。Rab12 の変異(D73G)マウスは精子鞭毛の運動機能に異常が生じ、男性不妊および脂肪肝を引き起こすことが報告された(Lo et al., 2012; Yi Lo et al., 2016)。Rab12 は一次繊毛の根元に局在し、GTP 結合型で IFT-B と結合し、IFT-B の一次繊毛局在を開始することが示唆された(Kanie et al., 2017; Nishijima et al., 2017)。Rab12 をノックアウトすると一次繊毛の形成が低下することから、一次繊毛の形成にも必要であることが報告された(Kanie et al., 2017)。Rab13 の一次繊毛に参与する報告はなく、肝細胞癌で高発現しており、がん細胞の増殖や遊走に参与していることが示唆されている(Li et al., 2010)。Rab14 および Rab15 はそれぞれ IFT27、IFT22 とも呼ばれ、IFT-B 複合体の構成因子として知られている(Qin et al., 2007; Silva et al., 2012)。

1.8 研究の目的・方針

一次繊毛に局在する GPCR (ciliary GPCR)の一次繊毛局在に介在する分子および制御機構の全貌は明らかになっていない。そこで、本研究では ciliary GPCR の一次繊毛局在機構の解明を目的とし、未解明であった 5HT6 の一次繊毛局在関連分子を探索し、それらの機能解析を試みた。5HT6 の一次繊毛局在関連分子として新たに見出された Rab12 の機能解明を目指し、Rab12 が 3 種類の ciliary GPCR(5HT6、GPR161、SSTR3)の一次繊毛局在に

与える影響を解析するとともに、Rab12 を介した GPCR の一次繊毛局在分子機構を解析した。

第 2 章 材料と方法

2.1 株化細胞の培養

マウス胎児皮膚由来 NIH3T3 細胞は 10% の CS (Gibco) 及び、1% ペニシリン(100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 µg/ml) (以下 P/S)を含む Dulbecco's modified eagle's medium (以下 DMEM, Sigma) 培地で培養した。ヒト網膜色素上皮細胞 RPE1 細胞と SSTR3 の C 末端に GFP を融合した SSTR3::GFP を恒常的に発現する RPE1 細胞(RPE1 細胞 SSTR3::GFP 恒常発現株, 当研究室小林哲夫博士から譲渡)はいずれも 10% の FBS (Biosera) 及び、1% P/S を含む DMEM (Sigma あるいは Nacalai) 培地で培養した。マウスの腎臓上皮細胞由来の IMCD3 細胞(浜松医科大 池上浩司博士から譲渡)、IMCD3 細胞 5HT6(WT)恒常発現株、および IMCD3 細胞 5HT6(CTS)恒常発現株はいずれも 10% FBS (Biosera) および 1% P/S を含む Dulbecco's modified eagle's medium nutrient mixture F-12 (Ham) (1:1)(以下 DF, Gibco) 培地で培養した。ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞は 10% CS (Gibco) および 1% P/S を含む DMEM (Nacalai) 培地で培養した。ヒト胎児腎臓由来 Lenti-X HEK293T 細胞(京都大学 萩原正敏教授から譲渡)は 10% FBS (Biosera) および 1% P/S を含む DMEM (Nacalai) 培地で培養した。各細胞はコンフルエントに達する前に 0.25%トリプシン/EDTA 溶液を用いて新たなディッシュに継代し、いずれの細胞も 37°C , 5% CO₂ の条件下で培養した。

2.2 試薬

DNA および RNA の細胞への遺伝子導入

ポリエチレンイミン MAX (PEI MAX, Polysciences, #24765)

LipofectAMINE RNAi MAX (Invitrogen, #13778150)

LipofectAMINE2000(Invitrogen, #11668)

Fugene (Promega)

樹脂ビーズ

NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare)

Anti-FLAG M2 affinity Gel (Sigma Aldrich #A2220)

Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare,#17-0756-01)

Tubulin (MAP-rich 画分)

Tubulin Polymerization Assay Kit 付属品 (Cytoskeleton Inc.)

プラスミド作製

KOD Plus (TOYOBO)

KOD Plus Buffer (TOYOBO)

FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)

Ligation high ver.2 (TOYOBO)

制限酵素

XhoI (TOYOBO)

BamHI (TOYOBO)

EcoRI (TOYOBO)

XbaI (TOYOBO)

免疫染色

10 mg/ml Hoechst (Nacalai)

Mountant, PermaFluor (Thermo)

ウエスタンブロット、免疫沈降

CBB G-250 溶液 (5 倍濃縮:Nacalai)

DDDDK-tagged Protein Purification gel with Elution peptide #3326/3327 付属品 (MBL)

polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜: Millipore)

Chemi-Lumi One (Nacalai)

Chemi-Lumi One ultra (Nacalai)

レンチウイルス作製

Lenti-X Concentrator (Clontech)

RNA 抽出、逆転写反応、定量的 PCR

Sepasol (Nacalai)

ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO#FSQ-101)

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)

2.3 抗体

免疫染色に用いた抗体

Anti-Glutamylated Tubulin mouse monoclonal antibody (AdipoGen)

Rabbit Anti-Arl13b monoclonal antibody (Proteintech)

Mouse Anti-Arl13b monoclonal antibody (NeuroMab)
Rabbit Anti-Gpr161 monoclonal antibody (Proteintech Group #13398-1-AP)
Rabbit Anti-IFT88 polyclonal antibody (Proteintech Group #13967-1-AP)
Rabbit Anti-m5HT6 polyclonal antibody (MBL ライフサイエンスに作製を委託し、抗血清からの抗体精製を当研究室で行なった。精製法の詳細は 4.4 を参照)
Rabbit Anti-mGPR56TM antibody (当研究室にて作製)
Alexa 350-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe)
Alexa 488-labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probe)
Alexa 594-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe)
Alexa 594-labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probe)

免疫沈降およびウェスタンブロットに用いた抗体

Rabbit anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F7425)
Mouse anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F1804)
Rabbit GST-anti-GFP polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-8334)
Rabbit anti-GPR161 polyclonal antibody (Proteintech Group #13398-1-AP)
Rabbit anti-IFT88 polyclonal antibody (Proteintech Group #13967-1-AP)
Rabbit anti-m5HT6: MBL ライフサイエンスに作製を委託し、抗血清からの抗体精製を当研究室で行なった。精製法の詳細は 4.4 を参照。)
Camel anti-GFP monoclonal nanobody (加藤 洋平博士(京大)から発現プラスミドを譲渡され、当研究室で作製)
Anti-Mouse-IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9310)
Anti-Rabbit-IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9340)

2.4 抗 5HT6 抗体の精製

MBL ライフサイエンスに作製を委託し、抗血清からの抗体精製を当研究室で行なった。抗原は 5HT6 の C 末端 421-437 a.a.(17 アミノ酸)の N 末端にシステインを結合したペプチド CFVTDSVEPEIRQHPLGS を用い、ウサギに免疫した。抗体の精製に用いた樹脂ビーズは NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare)を用い、その手順に従ってペプチド結合アフィニティービーズを作製した。チューブに 10 mg/ml のペプチドを 100 μ l 取り、coupling buffer(最終濃度 0.2 M NaHCO₃、0.5 M NaCl、pH 8.3) 900 μ l と混合した。カラムに 300 μ l の NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow(以下、ビーズ)を加え、ビーズの 10-15 倍の体積の 1 mM HCl で洗浄した。ペプチド溶液をビーズに加え、pH 6.0-9.0 に調整し、4 °C で一晩反転混和させた。0.1 M Tris-HCl (pH 8.5)を加え、数時間反転混和し、樹脂とのカップリング反応を停止させた。0.1 M Tris-HCl (pH 8.0-9.0)および 0.1 M acetate buffer/0.5 M NaCl (pH 4.5)

を3 ml ずつ交互に2回、その後2 ml ずつ交互に3回、さらに1ml ずつ交互に1回添加し、ビーズを洗浄し、アフィニティービーズを準備した。

このアフィニティービーズを用いて、抗体を精製した。0.5 M NaCl を含む PBS 0.5 ml でアフィニティービーズを2回洗浄、0.5 ml の0.1 M グリシン(pH 2.5)で平衡化、0.5 M NaCl を含む PBS 0.5 ml で再び2回洗浄した後、5 ml の抗血清をカラムに加え、1時間、反転混和した。その間に新しいチューブを6本準備し、それぞれに1 M Tris-HCl (pH 8.0)を100 μ l 加えた。1時間後、カラムの栓を開き、自然落下で抗血清を除去した。0.5 M NaCl を含む PBS 0.5 ml で5回洗浄し、0.5ml の0.1 M Glycine (pH 2.5)で抗体を溶出し、前述の100 μ l の1 M Tris-HCl (pH8.0)を含むチューブに回収した。溶出はその後5回繰り返し、6本のチューブに抗体を回収した。この中から、回収量の多かったものを選び、10% Glycerol を含む PBS を用いて4°C で6時間透析し、10% Glycerol を含む PBS を新たに交換した後、さらに18時間透析した。精製した抗体の特異性は GFP 融合 5HT6 を HEK293T 細胞および RPE1 細胞に遺伝子導入し、ウェスタンブロット法と免疫染色法で確認した。

さらに Tubulin Affinity Chromatography を用いて精製抗 5HT6 抗体から Tubulin 結合活性の除去を行なった。5HT6 ペプチドカラムの作製手順と同じ手順で Tubulin (MAP-rich 画分) (Tubulin Polymerization Assay Kit 付属品;Cytoskeleton Inc.)をビーズと反応させた。5HT6 のペプチドカラムを平衡化させた手順と同じ操作でこの tubulin カラムを平衡化させ、5HT6 抗体を 500 μ g 添加した。反転混和により室温で1時間反応させた後、ビーズに吸着されなかった抗体溶液を回収した。

2.5 使用したプラスミド一覧

細胞膜マーカー用プラスミド

pCMV5-hGPR56TM (当研究室坂口さや香が作製)

一次繊毛局在型タンパク質プラスミド

pEGFP-N3-mHtr6 (T. Inoue 博士(Johns Hopkins Univ.)から譲渡)

pEGFP-N3-mHtr6(Δ 324-440) (作製方法は4.6参照)

pEGFP-N3-mHtr6(Δ 332-440) (作製方法は4.6参照)

pEGFP-N3-mHtr6(Δ 379-440) (作製方法は4.6参照)

pEGFP-N3-mHtr6(Δ 415-440) (作製方法は4.6参照)

pEGFP-N3-mHtr6(A230F/Q234F) (作製方法は4.6参照)

pEGFP-N3-mHtr6(327-328A) (作製方法は4.6参照)

pEGFP-N3-mHtr6(329-331A) (作製方法は4.6参照)

pEGFP-N3-mHtr6(327-331A) (作製方法は4.6参照)

pLVX-mHtr6-IRES-Puro(作製方法は4.6参照)

pLVX-mHtr6-GFP-IRES-Puro(作製方法は 4.6 参照)
pLVX-mHtr6-IRES-Puro(327-331A) (作製方法は 4.6 参照)
pCMV5-hGPR161 (当研究室小林哲夫博士が作製)

一次繊毛局在型タンパク質局在関連分子プラスミド

pCMV5-Flag-hRab12b (当研究室太田麗央が作製)
pCMV5-Flag-hRab12b(Q80L) (当研究室太田麗央が作製)
pCMV5-Flag-hRab12b(S35N) (当研究室太田麗央が作製)
pEGFP-C2-hRab12b (当研究室太田麗央が作製)
pEGFP-C2-hRab12b(Q80L) (当研究室太田麗央が作製)
pEGFP-C2-hRab12b(S35N) (当研究室太田麗央が作製)
pCMV5 -Flag-hRab13 (当研究室太田麗央が作製)
pCMV5-Flag -hRab14(当研究室小林哲夫博士が作製)
pCMV5-Flag -hRab15(当研究室太田麗央が作製)
pCMV5-Flag -Rab8a(当研究室小林哲夫博士から譲渡)
pCMV5-Flag -Rab23(福田光則博士(東北大)から譲渡)
pcDNA3-Flag-hKif17 (K. J. Verhey 博士(Univ. of Michigan)から譲渡)
pEGFP-Rangap1(当研究室小林哲夫博士から譲渡)
pEGFP-Arf4(当研究室小林哲夫博士から譲渡)
pEGFP-Rab8a (B. D. Dynlacht 博士(NYU)から譲渡)

レンチウイルス作製用プラスミド

pLVX-IRES-Puro(B. D. Dynlacht 博士(NYU)から譲渡)
Δ8.9(京都大学 萩原正敏教授から譲渡)
VSVG(京都大学 萩原正敏教授から譲渡)
pcREv(京都大学 萩原正敏教授から譲渡)

2.6 プラスミドの作製

以下の表に 1 から 11 のプラスミドを作製するにあたり使用した雛形とプライマーを示す。

1	作製したプラスミド	テンプレートDNA	Primer			
			FW.	5' -		-3'
1	pEGFP-N3-mHtr6(Δ 324-440)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	GGTACCGCGGGCCCGGGAT	-3'
			Rev	5' -	GGGATAGATGATAGGGTTCATGGTGC	-3'
2	pEGFP-N3-mHtr6(Δ 332-440)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	GGTACCGCGGGCCCGGGAT	-3'
			Rev	5' -	CCTCTTGAAGTCCCGCATGA	-3'
3	pEGFP-N3-mHtr6(Δ 379-440)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	GGTACCGCGGGCCCGGGAT	-3'
			Rev	5' -	GGGTGGCAGAGGCAGGGGCA	-3'
4	pEGFP-N3-mHtr6(Δ 415-440)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	GGTACCGCGGGCCCGGGAT	-3'
			Rev	5' -	GGCCCTGGTGGGTGGCGG	-3'
5	pEGFP-N3-mHtr6(A230F/Q234F)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	CTGGC TTC GCCTTGAAACCTTGAG	-3'
			Rev	5' -	CCGT AAA CGTGCCCGTGGTGGAGCG	-3'
6	pEGFP-N3-mHtr6(327-328A)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	TTCAAGAGGGCCCTGGGCAG	-3'
			Rev	5' -	ggccgcatgaagaggggat	-3'
7	pEGFP-N3-mHtr6(329-331A)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	GCCGCGGCGCCCTGGGCAGGTT	-3'
			Rev	5' -	gtcccgcatgaagaggggat	-3'
8	pEGFP-N3-mHtr6(327-331A)	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	GCCGCGGCGCCCTGGGCAGGTT	-3'
			Rev	5' -	ggccgcatgaagaggggat	-3'
9	pLVX-mHtr6-IRES-Puro	pCMV5-flag-mHtr	FW.	5' -	AACTCGAGGCCACCATGGTTCCAGAGCC	-3'
			Rev	5' -	TTGGATCCTCAGTTCATGGGGGAACCAAGTG	-3'
10	pLVX-mHtr6-IRES-Puro(327-331A)	pCMV5-flag-mHtr6(327-331A)	FW.	5' -	AACTCGAGGCCACCATGGTTCCAGAGCC	-3'
			Rev	5' -	TTGGATCCTCAGTTCATGGGGGAACCAAGTG	-3'
11	pLVX-mHtr6-GFP-IRES-Puro	pEGFP-N3-mHtr6	FW.	5' -	TTGAATTCGCCACCATGGTTCCAGAGCCCGCCCT	-3'
			Rev	5' -	ATTCTAGATTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	-3'

1 から 8 は DNA テンプレートを 20 ng、各プライマー(10 pmol/ μ l)を 0.6 μ l ずつ、10x KOD Plus Buffer (TOYOBO)を 2 μ l、2 mM dNTPs を 2 μ l、25 mM MgSO₄を 0.8 μ l、KOD Plus (TOYOBO)を 0.4 μ l 混合した。これらの reaction mix を 94°C で 2 分加熱した後、98°C を 10 秒、60°C を 30 秒、68°C を 7 分で 30 サイクルの条件で PCR を行った。その後、DNA 産物に DpnI を添加し、37°C で 1 時間半反応させた。FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)を用いて DNA を精製し、Ligation high ver2. (TOYOBO)を加えて 16 °C で 1 時間、反応させた。

9 から 11 は DNA テンプレートを 20 ng、各プライマー(10 pmol/ μ l)を 0.6 μ l ずつ、10x KOD Plus Buffer (TOYOBO)を 2 μ l、2 mM dNTPs を 2 μ l、25 mM MgSO₄を 0.8 μ l、KOD Plus (TOYOBO)を 0.4 μ l 混合した。これらの reaction mix を 94°C で 2 分加熱した後、98°C を 10 秒、60°C を 30 秒、68°C を 2 分で 25 サイクルの条件で PCR を行った。増幅して得られた DNA を 9 および 10 は XhoI (TOYOBO)、BamHI (TOYOBO)で、11 は EcoRI (TOYOBO)と XbaI (TOYOBO)で処理した。ベクターとなる pLVX-IRES-Puro も同様に制限酵素処理し、インサートおよびベクターは FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd) を

用いて DNA を精製した。精製されたインサートとベクターに Ligation high ver2. (TOYOBO) を加えて 16°C で 1 時間反応させた。

各種プラスミドの DNA 配列は 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)あるいは ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)を用いて確認した。

2.7 遺伝子発現抑制

免疫染色に用いた条件は以下の各細胞を直径 13 mm または 12 mm のカバーガラスを入れた 24-well plate に播種した。RPE1 細胞、SSTR3::GFP 恒常発現 RPE1 細胞は DMEM(10% FBS、1% P/S を含む) 培地中に 2×10^4 cells/well になるように細胞を播種した。5HT6(WT)恒常発現 IMCD3 細胞は DF(10% FBS、1% P/S を含む) 培地中に 1.5×10^5 cells/well になるように細胞を播種した。翌日 siRNA を導入した。以下に示す siRNA(20 μ M) 0.75 μ l を Opti-MEM 25 μ l に加えた。別のチューブを用意し、Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) 1.5 μ l を Opti-MEM 25 μ l に加え、室温で 5 分静置したあと、siRNA 溶液と Lipofectamine RNAi MAX 溶液を混合し、さらに 5 分室温で静置し、細胞に添加した。5 時間後に新鮮な培地に交換した。

FRAP 実験用には 4 分画ガラスボトムディッシュ(直径 35mm)に RPE1 細胞あるいは SSTR3::GFP 恒常発現 RPE1 細胞を DMEM(10% FBS、1% P/S を含む) 培地中に 2×10^4 cells/well になるように細胞を播種した。免疫染色用に行った上記の手順と同様に、翌日に Lipofectamine RNAi MAX を用いて siLuc、または sihRab12 を導入し、5 時間後 DMEM (10% FBS、1% P/S を含む) 培地に交換した。

以下に、発現抑制実験に用いた siRNA 配列を示す。

Organism	Gene	siRNA	
		name	Senese
Mouse	rabl2a	rabl2a#1	CAGAGUGACACGACCAAGA (dTdT)
		rabl2a#2	GACACGACCAAGAGCCCAU (dTdT)
		rabl2a#3	GAAACUAGACAGGCGUGAU (dTdT)
Mouse	rabl3	rabl3#1	GUUAAUCAGCCCUGAGUUA (dTdT)
		rabl3#2	CAUUAACUUCUCAGGCUUU (dTdT)
		rabl3#3	CCUGUCCCUGAUUAUAGCU (dTdT)
Mouse	rabl4	rabl4#1	GACUAGUGGUUGUGUCUCA (dTdT)
		rabl4#2	CUGGAAUUCUUUGAGACAU (dTdT)
		rabl4#3	GAGAAUCCAACGUCCUGU (dTdT)
Mouse	rabl5	rabl5#1	GGUGGAGUUCAUCAAGUAU (dTdT)

		rab15#2	GCACCCUUCUCCUCUAGAA (dTdT)
		rab15#3	CCAAGCCACCUBAAAGGAAA (dTdT)
Mouse	arl6	arl6#1	CAUUGUUAUUCUGGCCAUU (dTdT)
		arl6#2	CUGGAUAACAGUGGGAAAA (dTdT)
		arl6#3	UCUGUGAAGGUGUCUCAGU (dTdT)
Mouse	arf4	arf4#1	GUGAUGAAGCUUGCCUUGU (dTdT)
		arf4#2	GUGAUGAUUCAUUGGUGAU (dTdT)
		arf4#3	GUCCAAGCCACUUGUCUA (dTdT)
Mouse	rab8a	rab8a#1	CUGACUAGUGCACUCAGAA (dTdT)
		rab8a#2	CAGGAGCGGUUUCGAACAA (dTdT)
		rab8a#3	CAGAUUCCUAACACCAUGA (dTdT)
Mouse	rab8b	rab8b#1	GAACUUAUGGUCGUUCAUU (dTdT)
		rab8b#2	GUAGUUCAGGCAGAUGAUA (dTdT)
		rab8b#3	GACUUUCCUGUCCAUCUUAU (dTdT)
Mouse	rab11a	rab11a#1	UCAUGCUAUGGCUUCUCUA (dTdT)
		rab11a#2	GAGCUUGAAGAUUUUCCA (dTdT)
		rab11a#3	AGUAACCUCUGUCUCGAU (dTdT)
Mouse	rab23	rab23#1	CUGAAGCCUGCAACUCUA (dTdT)
		rab23#2	CUGUAGUGUACCCUAAACU (dTdT)
		rab23#3	GUGUACGUGGACCUUAUCA (dTdT)
Mouse	arl3	arl3#1	GAACUGGGUCUGCAAGAAU (dTdT)
		arl3#2	CUCUCUAUUUUGCGCAAU (dTdT)
		arl3#3	CCGUGCUCUUCUUGCUAA (dTdT)
Mouse	arl13b	arl13b#1	CACAAGACAGGAUGUACAU (dTdT)
		arl13b#2	GUGAUGUUGGUCUCCUAGA (dTdT)
		arl13b#3	GAGACAAGGAAAGUCCAA (dTdT)
Mouse	kif17	kif17#1	CAGACAACAAUACGAUGA (dTdT)
		kif17#2	ACAACGAAGAUGUCCAUGA (dTdT)
		kif17#3	UCUCAUCCGCAGAGACUGU (dTdT)
Mouse	rangap1	rangap1#1	GCUGACCUUGGAUAGCUCA (dTdT)
		rangap1#2	CCUGUGUCAUAUUGGUCCU (dTdT)
		rangap1#3	CCCUGUUGCGAGUCAUCAA (dTdT)
Mouse	ift88	ift88#1	CUGUGAACUCGGAUAGAU (dTdT)
		ift88#2	CUGUCUAAACUGGGAGAGU (dTdT)

		ift88#3	GUUAAUGGAAGAUCCEAAU (dTdT)
Mouse	ift80	ift80#1 ift80#2 ift80#3	CUCUGAGCAAUGACACGAU (dTdT) GAGUCAUUAAGCAUCCUU (dTdT) GAAAUUGCUCUGGAUCAA (dTdT)
Mouse	ift20	ift20#1 ift20#2 ift20#3	AGAAGCUUCUACCGACAGU (dTdT) CACCAUGUUGCAUUCAUCU (dTdT) GAGAAGCUUCUACCGACAG (dTdT)
Mouse	ift122	ift122#1 ift122#2 ift122#3	GACUCUAUACAGUGUGUCU (dTdT) GUAUCUACGACCUCGGAUU (dTdT) CUCAUCUACGAGCUGUACU (dTdT)
Mouse	ift140	ift140#1 ift140#2 ift140#3	CUCAUGAACUUGGCACUGU (dTdT) CGUCUUCAACUUCACGACU (dTdT) CGACUGGACAGAUUGGACA (dTdT)
Mouse	bbs1	bbs1#1 bbs1#2 bbs1#3	GACUUCAGUAUUGCCAGA (dTdT) GUCUCAGUAGCAAGGGCAU (dTdT) CAGUAUUGCCAGACUACUU (dTdT)
Mouse	bbs2	bbs2#1 bbs2#2 bbs2#3	GAGACAAUGUGCAUCCUU (dTdT) GUAUCAUUCAGUGCAUCAA (dTdT) GAUACAAGAUUCGCUGUAA (dTdT)
Mouse	bbs4	bbs4#1 bbs4#2 bbs4#3	CCACUGGAAACACAAACCU (dTdT) CUGACAAACGCUCUCACAA (dTdT) GAGUUUAGAGCCAGAUCAU (dTdT)
Mouse	tulp3	tulp3#1 tulp3#2 tulp3#3	CGACAGAUUUGUCUCGUGA (dTdT) CUGAUGACGUGUUCACACU (dTdT) CACGUACUCGUUCAUGCCU (dTdT)
Mouse	nphp4	nphp4#1 nphp4#2 nphp4#3	CUCUUCGAUGUCACCUACA (dTdT) GUGCUAAGCCAGGCCAUCA (dTdT) GUCUUCGAGGGAAUGAGAU (dTdT)
Mouse	php3	php3#1 php3#2	CGUGUCUUCAUUAUAGGGAA (dTdT) GUUGAAAUUCGGCAGAAAU (dTdT)
Mouse	rab3ip	rab3ip#1 rab3ip#2 rab3ip#3	CUCUGAAGACACUCGUACU (dTdT) CACACAAGGAACAAAAGUA (dTdT) GACACUCGUACUGUCCAGU (dTdT)
	Luciferase	Luciferase	CGUACGCGAAUACUUCGA (dTdT)

Human	rabl2b	rabl2b#1	GCAAUUCGAUUAGCUGUGU (dTdT)
	rabl2b	rabl2b#4	AUACAGAGCUUCGGGAGUU (dTdT)
Human	cep19	Cep19#1	CAAAUUCAACGGGAAACAA (dTdT)
	cep19	Cep19#2	CAGCUAUUAUCUAAAUCUA (dTdT)
Human	rab8a	rab8a#1	GACAAGUUUCCAAGGAACG (dTdT)
	rab8b	rab8b#1	GACAAGUGUCAAAAAGAAAG (dTdT)
Human	IFT88	IFT88#1	GGCAGUUACUAGACCUAUA (dTdT)
	IFT88	IFT88#3	CCAAGUGUCAAUAAAGCAA (dTdT)
Human	Tulp3	Tulp3#1	GAAACAAACGUACUUGGAU (dTdT)
	Tulp3	Tulp3#2	GCAGCUAGAAAGCGGAAAA (dTdT)

2.8 遺伝子導入法

RPE1 細胞、SSTR3::GFP 恒常発現 RPE1 細胞を播種し、18-24 時間後に Fugene (Promega)あるいは Lipofectamine 2000 (Invitrogen、#13778150)を用いてプラスミドを導入した。NIH3T3 細胞、5HT6(WT)恒常発現 IMCD3 細胞も同様に細胞を播種し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて遺伝子導入した。細胞を播種した翌日、プラスミド(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.4 μl を Opti-MEM 25 μl に加えた。別のチューブを準備し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 1.0 μl を Opti-MEM 25 μl に加え、室温で 5 分静置したあと、siRNA 溶液と Lipofectamine RNAi MAX 溶液を混合し、さらに 5 分室温で静置し、細胞に添加した。Fugene (Promega)を用いる場合はプラスミド(1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 0.5 μg 、Fugene 1.5 μl を Opti-MEM 25 μl に加え、15 分室温で静置し、細胞に添加した。いずれも遺伝子導入 5 時間後に培地を交換し、遺伝子導入試薬を除去した。

HEK293T 細胞を播種し、翌日 PBS 245 μl にプラスミド 5 μg を加え、別のチューブを用意し、PEI MAX (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 30 μl を PBS 220 μl に加えた。室温で 5 分静置した後、これらを混合してさらに 15 分室温で静置した。その後、この混合液を細胞に添加する際に、細胞培養液を取り除き、トランスフェクション混合液を丁寧に添加し、培養細胞全体になじませ、新たに細胞培養液を加えた。12-24 時間後に PBS で細胞を洗浄することで試薬を取り除き、新鮮な培地に交換し、さらに 24 時間後に細胞を回収した。

2.9 免疫染色

発現抑制あるいは遺伝子導入する場合(その後、一次繊毛の形成を誘導する場合)

24 well plate に入れた直径 12 mm のカバーガラスに NIH3T3 細胞(約 4×10^4 cells/well)、RPE1 細胞(約 4×10^4 cells/well)、SSTR3::GFP 恒常発現 RPE1 細胞(約 4×10^4 cells/well)、あるいは 5HT6 恒常発現 IMCD3 細胞 (約 1.5×10^5 cells/well)を播種し、18-24 時間後に発

現抑制あるいは遺伝子導入を行い、5 時間後に遺伝子導入試薬除去のため培地を交換した。さらに、翌日、細胞を PBS で 2 回洗浄し、血清を含まない培地に交換し、血清飢餓条件により一次繊毛の形成を誘導した。

HEK293T 細胞はポリ-D-リジン(PLD)コートしたカバーガラス上に細胞密度約 40%になるように播種し、翌日遺伝子導入を行なった。

遺伝子導入しない場合

カバーガラスに IMCD3 細胞、IMCD3 細胞 5HT6 (WT あるいは CTS 変異体) 恒常発現株を播種し(約 5×10^4 cells/well)、翌日、細胞を PBS で 3 回洗浄し、血清を含まない培地に交換し、血清飢餓条件により一次繊毛の形成を誘導した。

血清飢餓 48 時間後 (HEK293T 細胞の場合は遺伝子導入後 24 時間後)、細胞を PBS で 2 回洗浄し、4% PFA、または 3.7%ホルマリンで固定した。さらに PBS で 2 回洗浄後、0.2% TritonX-100/PBS により膜透過処理した(HEK293T 細胞は 4%PFA を用い、膜透過処理しなかった)。PBS で洗浄後、5% BSA/PBS(Anti-5HT6 rabbit antibody を用いる場合は BSA #8806, Sigma; それ以外は Albumin, Bovine, F-V, Nacalai)によりブロッキングした。その後、5% BSA/PBS で希釈した一次抗体に浸して室温で 2 時間静置した。10 分間おきに PBS で 3 回洗浄し、5% BSA/PBS で希釈した二次抗体に浸して遮光しながら室温で 1 時間静置した。再び 10 分間おきに遮光しながら PBS で 3 回洗浄し、Mountant, PermaFluor (Thermo) を用いてスライドガラスに封入した。サンプルの観察は蛍光顕微鏡(Axio Observer : Carl Zeiss) を用いた。

使用した一次抗体と二次抗体、及び希釈倍率を以下に示す。

一次抗体

- Anti-Glutamylated Tubulin mouse monoclonal antibody (AdipoGen): 1/1,000
- Rabbit Anti-Arl13b monoclonal antibody (Proteintech): 1/1,000
- Mouse Anti-Arl13b monoclonal antibody (NeuroMab): 1/3,000
- Rabbit Anti-Gpr161 monoclonal antibody (Proteintech Group #13398-1-AP): 1/2000
- Rabbit anti-IFT88 polyclonal antibody (Proteintech Group #13967-1-AP): 1/1,000
- Anti-5HT6 rabbit polyclonal antibody (MBL ライフサイエンスに作製を委託し、抗血清からの抗体精製を当研究室で行なった。精製法の詳細は 4.3 を参照): 1/2,000
- Anti-mGPR56TM antibody (当研究室にて作製): 1/1,000

二次抗体

- Alexa 350-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe): 1/500

- Alexa 488-labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probe): 1/500
- Alexa 594-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe): 1/500
- Alexa 594-labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probe): 1/500

核染色

- 10 mg/ml Hoechst (Nacalai) : 1 /2,000

2.10 一次繊毛局在性タンパク質の一次繊毛局在率の定量法

5HT6 恒常発現 IMCD3 細胞における遺伝子発現抑制後の 5HT6 の一次繊毛局在率の定量(図 3B)は以下のように行なった。1回の実験で一次繊毛を有する 100-300 個の細胞を観察した。

$$\text{一次繊毛へのタンパク質の局在率} = \frac{\text{一次繊毛局在性タンパク質が局在する一次繊毛の数}}{\text{一次繊毛の数(グルタミル化チューブリン)}}$$

2.11 FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching: 光退色後蛍光回復法)

5HT6::GFP の解析には RPE1 細胞に siLuc あるいは siRab12 を導入 29 時間後、レンチウイルスを感染させ 5HT6::GFP を発現させた。レンチウイルスによる遺伝子導入の 12 時間後、血清飢餓培地に交換し、48 時間後に FRAP 解析を行なった。サンプルの観察は共焦点蛍光顕微鏡 LSM710(zeiss) を用いた。FRAP の条件は一次繊毛における 5HT6::GFP の蛍光をレーザーで退色させ、そこから 1 秒間隔で 35 秒間、蛍光の動態を観察した。各時間の蛍光輝度から以下の式を用いて蛍光回復率を算出した。

$$\text{蛍光回復率 (\%)} = \frac{V_r - V_b}{V_0 - V_b} \times 100$$

V0: 蛍光退色する前の輝度値

Vb: 蛍光退色時の輝度値

Vr: 蛍光退色後の輝度値

得られた時間ごとの蛍光回復率のデータセットを用いて Matlab により以下の数式に当てはまるよう fitting curve を作製した。

$$I(t) = A(1 - e^{-bt})$$

t: 時間(秒)

I(t): t(秒)における蛍光回復率

half time は $I(t) = A/2$ となる時間を算出した。

図 10 における画像の二値化には ImageJ を用いた。

2.12 タンパク質定量

タンパク質の濃度は、CBB G-250 溶液 (5 倍濃縮:Nacalai tesque) を用いた Bradford 法により行った。iMark マイクロプレートリーダー(BIO-RAD) を用いて、595 nm の吸光度を測定後、濃度既知の BSA を用いた検量線を基準にタンパク質濃度を算出した。

2.13 細胞内タンパク質相互作用試験(免疫沈降法)

発現プラスミドを導入した HEK293T 細胞を cell lysis buffer (図 5 および図 6 は 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5%(v/v) NP-40、10%(w/v) Glycerol、1 mM DTT、2 µg/ml Leupeptin、0.5 mM PMSF; 図 17、図 18 は 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、150 mM NaCl、5 mM MgCl₂、0.5%(v/v) NP-40、10%(w/v) Glycerol、1 mM DTT、2 µg/ml Leupeptin、0.5 mM PMSF)に懸濁した後、4°Cで 30 分間穏やかに転倒混和した。細胞抽出液を 15,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心分離した。得られた上清と Anti-FLAG M2 affinity Gel (Sigma Aldrich #A2220)、あるいは Anti-5HT6(rabbit)抗体もしくは Rabbit IgG を結合させた Protein A Sepharose (GE Healthcare、#17-1279-02)、あるいは GST-anti GFP nanobody (当研究室で作製)を結合させた Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare,#17-0756-01)を混和し 4°Cで穏やかに攪拌させることで反応させた(図 5 および図 6 は 2 時間、図 17 および図 18 は 30 分)。反応後、レジンを cell lysis buffer で 3 回洗浄し、SDS-PAGE Sample buffer を用いて 95 °Cで 5 分間静置することにより免疫沈降物を溶出させた。図 17A および図 18 は cell lysis buffer で 3 回洗浄し、Flag ペプチド elution buffer (100 mM Tris-HCl (pH7.4), 300 mM NaCl, 1mM DTT, 0.2 mg/ml Flag ペプチド (DDDDK-tagged Protein Purification gel with Elution peptide #3326/3327, MBL))により溶出し、回収した溶液に SDS-PAGE sample buffer を加え、95 °Cで熱処理した。ただし、GPR161 は熱処理しなかった。これを免疫沈降サンプルとし、ウェスタンブロットを行なった。

2.14 ウェスタンブロット

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE) 用に調製したサンプルを、12%あるいは 10%アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離し、その後 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜: Millipore) に転写した。転写後、メンブレンを 4%(W/V) スキムミルクを含む PBST(137 mM NaCl, 8 mM NaHPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 0.5% (W/V) Tween-20) で 1 時間振盪し、ブロッキングを行なった。その後、4%スキムミルクで希釈した一次抗体にメンブレンを浸し、室温で 2 時間反応させた。メンブレンを PBST で 5 分毎に 6 回洗浄した後、4%スキムミルクで希釈した二次抗体にメンブレンを浸し、1 時間静置した。再びメンブレンを PBST で 5 分毎に 6 回洗浄し、Chemi-Lumi One (Nacalai) あるいは Chemi-Lumi One ultra (Nacali)を用いて検出を行った。

用いた抗体および希釈倍率は次の通り。

一次抗体

- Rabbit Anti-FLAG monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F7425): 1/2,000
- Mouse Anti-FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma Aldrich #F1804): 1/2,000
- Rabbit Anti-GFP polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-8334): 1/500
- Rabbit Anti-GPR161 polyclonal antibody (Proteintech Group #13398-1-AP): 1/2,000
- Rabbit Anti-IFT88 polyclonal antibody (Proteintech Group #13967-1-AP): 1/1,000
- Rabbit Anti-5HT6 antibody: 1/2,000 MBL ライフサイエンスに作製を委託し、抗血清からの抗体精製を当研究室で行なった。精製法の詳細は 4.3 を参照。

二次抗体

- Anti-Mouse-IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9310): 1/1,000
- Anti-Rabbit-IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment (GE Healthcare #NA-9340): 1/1,000

2.15 検定

student の t 検定で検定し、危険率(p value) < 0.05 の場合、有意差が有ると判断した。

2.16 レンチウイルスの作製

Lenti-X 293T 細胞 (B. D. Dynlacht 博士(NYU)から譲渡) をトランスフェクション時にコンフルエントになるよう 100 mm dish に播種し培養した。PBS 1 ml に 2.13 μ g のレンチウイルスベクター、1.6 μ g の Δ 8.9、1.06 μ g の vsvg、0.21 μ g の pcRev および 20 μ g を混合し、PEI MAX (1 μ g/ μ l) (polysciences, #24765) を 20 μ l を添加し、室温で 15 分インキュベートした。その後、この混合液を Lenti-X 293T に添加する際に、細胞培養液を取り除き、トランスフェクション混合液を丁寧に添加し、培養細胞全体になじませ、新たに細胞培養液を加えた。37°C、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した後、培地を交換した。72 時間後、培養上清 9 ml に対し、Lenti-X Concentrator (Clontech) 3 ml を混合し、4 °C で 30 分間インキュベートした。その後、1,500 x g で 45 分間遠心し、上清を除去し、ペレットを DMEM 500 μ l に溶解した。

2.17 安定発現細胞株の作製

上記のように作製したレンチウイルスを IMCD3 細胞に感染させ、安定的発現細胞株を作製した。まず、細胞密度約 20%になるよう細胞を 100 mm dish に播種し、10%の FBS (Biosera) 及び、P/S を含む DF (D-MEM/F12, Nacalai) 培地で培養した。翌日、P/S を含む DF(血清なし)に 5 μ g/ml のポリブレンを添加した培地に交換し、レンチウイルス液 1 ml を添加した。翌日、10% FBS (Biosera) 及び、P/S を含む DF (D-MEM/F12, Nacalai) 培地に交換した。さらに翌日、2 μ g/ml の puromycin を加えた FBS (Biosera) 及び、P/S を含む DF (D-MEM/F12, Nacalai) 培地に交換した。2 日間ごとに培地交換を約 1 週間繰り返し、生存

した細胞を安定発現細胞株とした。

2.18 RNA 抽出

24-well plate に播種した細胞を 2.7 の方法で遺伝子を発現抑制し、2.9 の方法で 48 時間血清飢餓させた。この細胞から RNA を抽出するため、Sepasol (Nacalai) を 0.5 ml 加え細胞を懸濁し、室温で 5 分静置した。次に Chloroform を 100 μ l 加え、転倒混和した。室温で 3 分静置し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。その後、水相を回収し Isopropyl alcohol を Sepasol の半量加え、室温で 10 分静置した。15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を除去した。75%エタノール 0.5 ml を加え混和した。15,000 rpm、4°C で 5 分間遠心し、上清を除去した。Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理した MiliQ 水で残ったペレットを溶解し、RNA 濃度を NanoDrop (Thermo Fisher Science) を用いて測定した。

2.19 逆転写反応

ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO#FSQ-101) を用いて逆転写反応を行なった。100-500 ng/5.6 μ l の RNA を 65°C で 5 分間置いた後、氷上で 1 分静置した。5x RT Buffer 1.6 μ l、RT Enzyme mix 0.4 μ l、Primer Mix 0.4 μ l を加え、37°C、15 分、98°C、5 分の条件で逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

2.20 定量的 PCR

2.19 で逆転写した cDNA 0.5 μ l に 10 μ M Forward Primer 0.3 μ l、10 μ M Reverse Primer 0.3 μ l、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 5 μ l、MiliQ 3.9 μ l を加え、反応液を調整した。LightCycler96(Roche)により 95°C で 60 秒間処理し、95°C で 10 秒、56°C で 30 秒を 40 サイクルの条件で定量的 PCR 反応を行い、得られた Cq 値から相対的な mRNA 量を算出した。

定量的 PCR を行う際に用いたプライマーとリファレンス遺伝子として用いた GAPDH のプライマーを以下に示す。

	Primer			
hGAPDH	FW.	5' -	GGCTGAGAACGGGAAGCTTG	-3'
	Rev.	5' -	ACTCCACGACGTACTIONCAGCG	-3'
mGAPDH	FW.	5' -	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	-3'
	Rev.	5' -	ATGCAGGGATGATGTTCTGG	-3'
hRab12#2	FW.	5' -	TGACCCTGTACAAGCACACA	-3'
	Rev.	5' -	TCAAACACCATGATGCAGGC	-3'
hRab12#3	FW.	5' -	GATCATCTGCCTGGGAGACA	-3'

	Rev.	5' -	TGTGTGCTTGTACAGGGTCA	-3'
hCep19#1	FW.	5' -	TTGTTTAGACGTTGGCCTGC	-3'
	Rev.	5' -	GCAGTGCACATCATTCCCAT	-3'
hCep19#2	FW.	5' -	TGAGAGTGAAATCAAGGGGAAA	-3'
	Rev.	5' -	GTAACTCTTGTGTCGCGGAT	-3'
hTulp3#1	FW.	5' -	TGAAGATGCGACAGGCTAAG	-3'
	Rev.	5' -	GTAGCCTGGCTTCTGGATTG	-3'
hTulp3#2	FW.	5' -	ACACCGTGGATACTGCTTCC	-3'
	Rev.	5' -	TCTGGCTTGATGCAGAATTG	-3'
hIFT88#1	FW.	5' -	AACCAATCTCTCAGCCCTGT	-3'
	Rev.	5' -	GCCTTCTCATAATCACCATTTGC	-3'
mRab12	Fw.	5' -	CCTACTACCACAAGGCTCACG	-3'
	Rev.	5' -	CCCGAAGTTCTGCATACCAG	-3'
mRab13	FW.	5' -	GGGAAATCTTCACTCGTCCA	-3'
	Rev.	5' -	TCTTCAGGGGTCCCTTCTTT	-3'
mRab14	FW.	5' -	CAAGGCCTGGAATTCTTTGA	-3'
	Rev.	5' -	CCCGGTACAGCTGGTAGAAC	-3'
mRab15	FW.	5' -	GAAGGCTAAGATCCTCTTCGTG	-3'
	Rev.	5' -	TGTCCGAAGATTCAGTGAGAAA	-3'
mArf4	FW.	5' -	GGGATGTTGGTGGTCAAGAT	-3'
	Rev.	5' -	CCTTCCTGGATTCTTTCACG	-3'
mRab8a	FW.	5' -	ACGCCTTCAACTCCACATTC	-3'
	Rev.	5' -	TTAATCCTCTTGCCATCGAG	-3'
mRab23	FW.	5' -	GGACACTGCAGGTCAAGAGG	-3'
	Rev.	5' -	AGCTGGAAATCGCTTCAAAA	-3'
mKif17	FW.	5' -	TTCTTAGTGCGGGCTTCCTA	-3'
	Rev.	5' -	ACGTTGTGTACCGTGTGCAT	-3'
mRangap1	FW.	5' -	AGAAATCGCCTGGAGAATGA	-3'
	Rev.	5' -	TGTGGCATATGCACCTCTTC	-3'
Tup3	FW.	5' -	CAGCTGAAGCTGGACAATCA	-3'
	Rev.	5' -	GGGTTTGGCTGTACCATGAG	-3'
mRabin8	FW.	5' -	CGTTTACGAAGCCCATCTGT	-3'
	Rev.	5' -	GCTTCCTTCAGCTGCTTCTC	-3'

第3章 実験結果

本研究では GPCR 局在機構の解明を目指し、5HT6 局在関連分子の探索と機能解析、および CTS の解析を行なった。

3章1節(3.1)では一次繊毛局在性タンパク質の局在に関与する分子を含む26の候補遺伝子から、5HT6の一次繊毛局在に影響する分子を探索した。3章2節(3.2)では3章1節において5HT6の一次繊毛局在に関与する分子として新たに見出されたRab12のGPCR局在制御における機能を解析した。さらに、3章3節(3.3)では5HT6のCTSを探索した。

3.1 5HT6の局在関連分子の探索

前述の通り、5HT6の一次繊毛局在に関与する分子は全く報告がない。また、GPCR毎に輸送機構が異なる可能性も考えられた。そこで、一次繊毛輸送関連の遺伝子を含む26遺伝子をこれまでの知見をもとにその候補とし、発現抑制による5HT6の一次繊毛局在への影響を調べると共に、5HT6との相互作用を検証した。

3.1.1. 遺伝子発現抑制による5HT6の一次繊毛局在への影響

5HT6の一次繊毛局在に関与する分子の探索を試みた。マウスの腎臓の髄質集合管(intramedullary collecting duct)由来のIMCD3細胞は血清飢餓条件において一次繊毛を安定して形成することから、IMCD3細胞を用いて5HT6を恒常的に発現する細胞株を作製した。次に一次繊毛輸送関連の遺伝子を含む26遺伝子をその候補とし(図3B)、5HT6恒常発現株にそれぞれの遺伝子に対して2種類もしくは3種類のsiRNAを導入し発現を抑制したところ、5HT6が一次繊毛に局在しない場合が認められた(図3A)。一次繊毛の形成数に対して、5HT6が一次繊毛に局在している割合を定量したものが図3Bである。この結果、小胞輸送に関わるsmall GTPaseであるRab family、Rab-like family(Rab12、Rab13、Rab15)、Arf4、Rab8a、Rab23、Rabin8、一次繊毛局在型キネシン Kif17、核輸送分子 Rangap1、IFT-Aと貨物を繋ぐ Tulp3の10遺伝子の発現抑制により5HT6の一次繊毛局在が有意に低下することが判明した(図3B)。これら10遺伝子の発現抑制効果をqPCRにより検証したところ、いずれもコントロールと比較してmRNA量が減弱していた(図4)。

3.1.2. 免疫沈降による5HT6と局在関連分子の相互作用の検討

次に、これら10遺伝子のうち8遺伝子(Tulp3は遺伝子が得られず、Rabin8は発現が確認できなかった)にRab14を加え、5HT6との相互作用を調べた。Flagを融合したRab12、Rab13、Rab14、Rab15、Rab8a、Rab23、Kif17、あるいはGFPを融合したRangap1、Arf4を野生型5HT6とともにHEK293T細胞に発現させ、免疫沈降を行なった。5HT6の推定分子量は47kDaであるが、抗5HT6抗体により35kDa、75kDa、135kDa、180kDa付近に主にシグナ

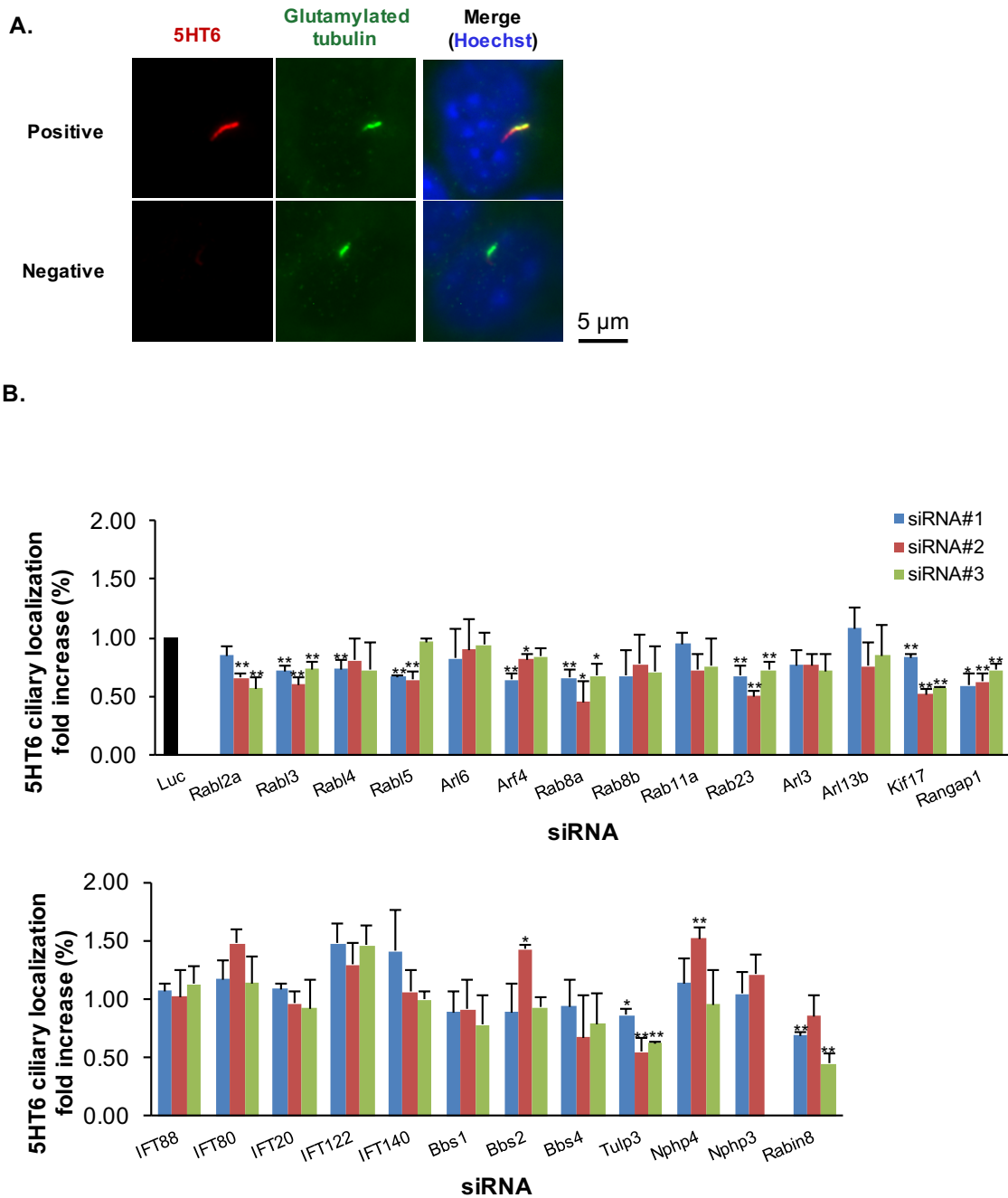


図 3. 5HT6 の一次繊毛局在に介在する分子の探索

- A. マウスの腎臓の髄質集合管 (intramedullary collecting duct) 由来の IMCD3 細胞を用いた 5HT6 恒常発現株を作製し、免疫染色を行なった。赤は 5HT6、緑はグルタミル化チューブリン(一次繊毛のマーカー)、青は核である。5HT6 とグルタミル化チューブリンのシグナルが重なるものを 5HT6 が局在する一次繊毛 (5HT6 positive) とした。
- B. IMCD3 細胞 5HT6 恒常発現株を用いて、一次繊毛に局在するタンパク質の輸送に介在する既知の遺伝子を含む 26 遺伝子をもつ siRNA により発現抑制した。5HT6 およびグルタミル化チューブリンで免疫染色し、5HT6 が一次繊毛に局在する一次繊毛の割合を定量した。各遺伝子について 2 種類または 3 種類の siRNA を用いた。

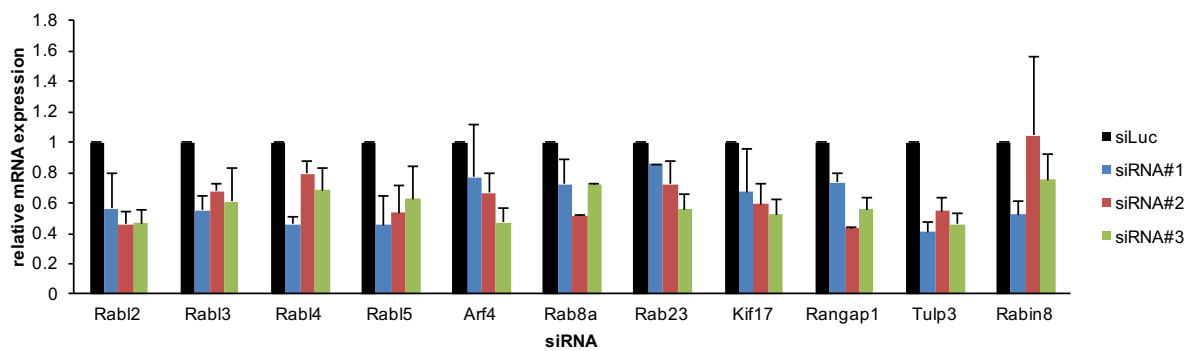


図 4. siRNA による発現抑制の効果の検討

図 3.B の遺伝子発現抑制により 5HT6 の一次繊毛局在率を有意に減少させた siRNA の発現抑制効果を検討するため、qPCR を行なった。エラーバーは 2 回の実験から算出した SEM。

ルが見られた (図 5A、B)。複数のバンドが見られるのは GPCR のウェスタンでは起こることであり、中には 5HT6 の分解物も含まれると考えている(図 5A、B)。候補分子の発現量にはばらつきが見られたが、いずれのサンプルでも 5HT6 の発現量は同等である(図 5A)。このとき、Flag による免疫沈降により、5HT6 は Rab12、Rab13、Rab14、Rab15、Rab8a、Rab23、Kif17 と共沈降が認められた(図 5A)。また、GFP による免疫沈降により、5HT6 は Arf4 と共沈降した(図 5B)。逆側から、すなわち 5HT6 による免疫沈降により Rab12、Rab13、Rab14、Rab15、Rab8a、Arf4 が 5HT6 と共沈降した(図 6A、B)。コントロール IgG による免疫沈降ではこれらの分子は共沈降しなかった(図 6A、B)。これらの結果をまとめると、Rab12、Rab13、Rab8a、および Arf4 は過剰共発現系で安定して 5HT6 と相互作用することが示唆された(図 7)。

3.2 Ciliary GPCR の一次繊毛局在における Rab12 の機能解析

Rab12 が 5HT6 の一次繊毛局在に関与することが示唆されたが、これまでに、ciliary GPCR の一次繊毛局在における Rab12 の関与は全く報告がない。そこで、ciliary GPCR の一次繊毛局在における Rab12 の機能および分子機構を調べた。さらに、ここでは 3 種類の ciliary GPCR (5HT6、GPR161、SSTR3)への Rab12 の影響を調べることで Rab12 の機能の選択性を検討した。

3.2.1. GTP 結合型 Rab12 は 5HT6 の一次繊毛局在を促進する

内在性の Rab12 は一次繊毛の根元(ciliary base)に局在し、QL 変異体(GTP 結合型)を過剰発現すると一次繊毛内への局在が観察され、SN 変異体(GDP 結合型またはヌクレオチド非結合型)は ciliary base には局在せず、細胞質全体に広がることごとく最近報告された(Kanie et al., 2017)。一次繊毛局在性 GPCR の一次繊毛局在には Rab12 が ciliary base に局在する必要があるのではないかと考え、Rab12 のグアニンヌクレオチド結合型が 5HT6 の一次繊毛局在に影響する可能性を検証した。IMCD3 細胞 5HT6 恒常発現株において GFP 融合 Rab12(WT)、Rab12(QL)、Rab12(SN)を過剰発現させ、免疫染色後、5HT6 の一次繊毛における蛍光強度を imageJ により評価した(図 8A)。その結果、GFP、GFP::Rab12(WT)、GFP::Rab12(QL)、GFP::Rab12(SN)の過剰発現による 5HT6 の平均の蛍光強度はそれぞれ 0.27、0.21、0.55、0.34 となり(単位は任意)、GFP::Rab12(QL)の過剰発現によって 5HT6 の一次繊毛局在率が有意に増加することが判明した(図 8A、B)。

次に、Rab12 が一次繊毛形成後の 5HT6 の一次繊毛局在に関わっていることを検証するため、蛍光退色後蛍光回復法(Fluorescent Recovery After Photobleaching; FRAP)により 5HT6::GFP の動向を調べた。まず、RPE1 細胞において 3 種類の siRNA を導入し、mRNA を qPCR により測定したところ、siRab12#1、siRab12#4 のいずれもがコントロールの siLuciferase siRNA (siLuc)に比べ有意に Rab12 の mRNA が減少させることが確認できた(図 9A)。次に RPE1 細胞に siLuc あるいは siRab12b#1 をトランスフェクションし、5 時間後に

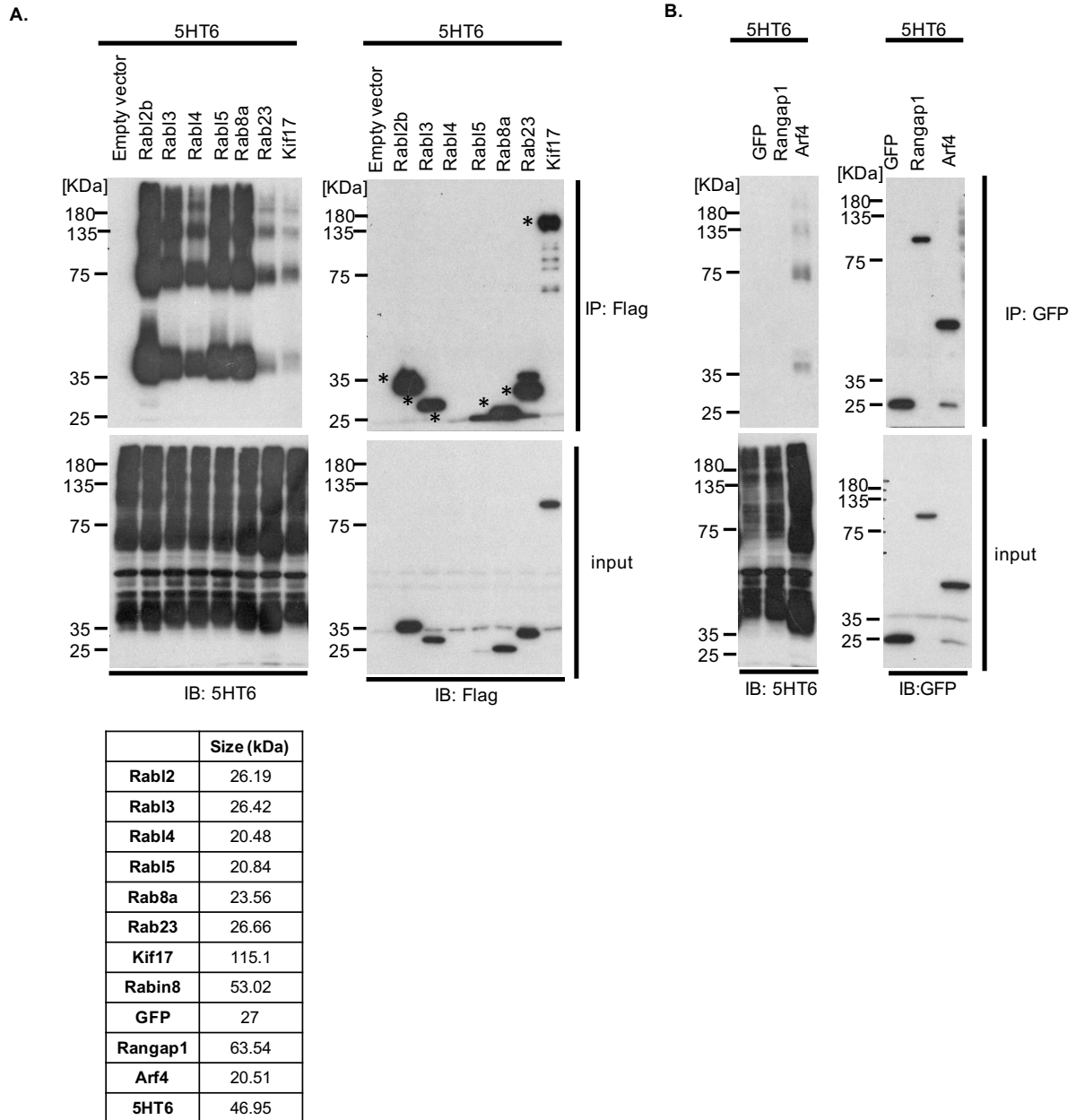


図 5. 5HT6 と局在関連分子の相互作用(1)

図 3B における遺伝子発現抑制により 5HT6 の一次繊毛局在を減弱させた 8 遺伝子および Rab14 を 5HT6 とともに HEK293T 細胞に共発現させ、免疫沈降を行なった。5HT6 は主に 35 kDa, 75 kDa, 135 kDa および 180 kDa にバンドが確認された。*は各遺伝の発現位置。

A. Rab12b, Rab13, Rab14, Rab15, Rab8a, Rab23, Kif17 には Flag タグが融合されており、Flag による免疫沈降を行なった。

B. Rangap1 および Arf4 には GFP タグが融合されており、GFP による免疫沈降を行なった。

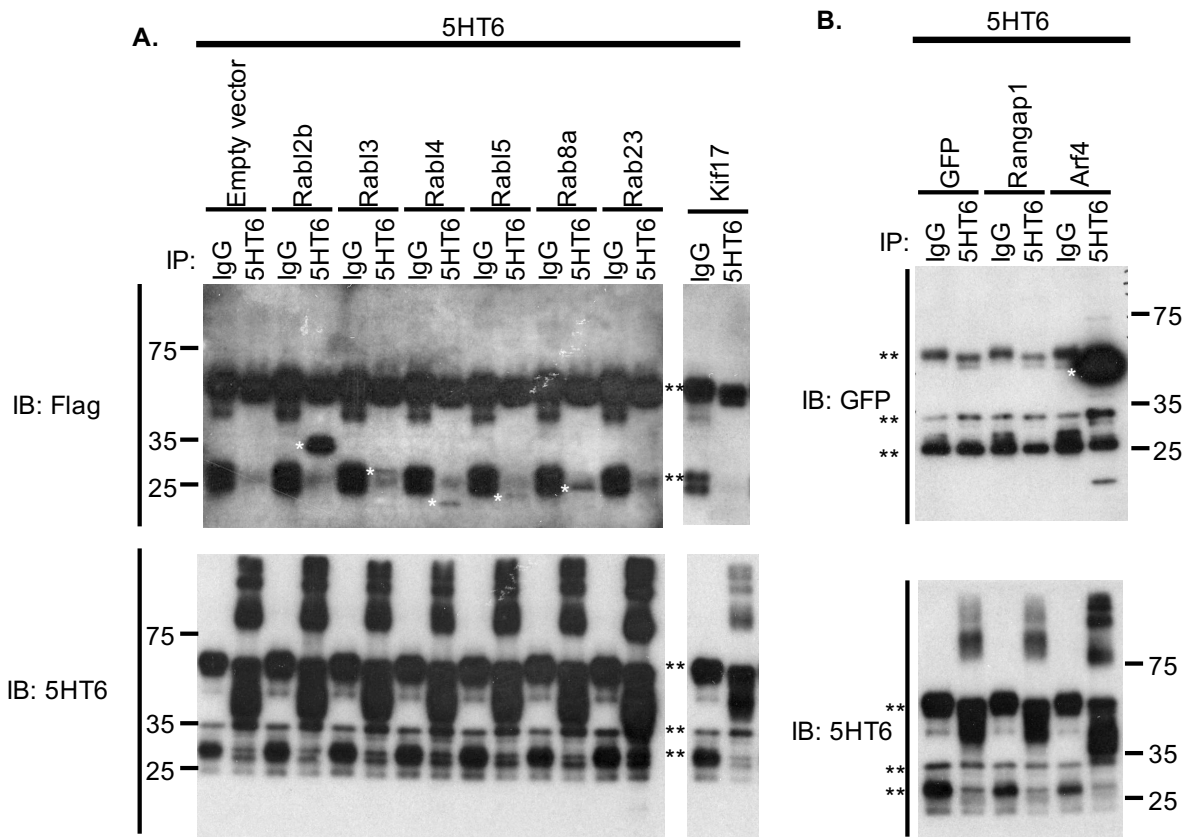


図 6. 5HT6 と局在関連分子の相互作用(2)

5HT6 の一次繊毛局在が発現抑制したときに減弱し 8 遺伝子と Rab14 を 5HT6 とともに HEK293T 細胞に共発現させ、抗 5HT6 抗体による免疫沈降を行なった。コントロールとして rabbit IgG による免疫沈降を行なった。Input は図 5A と同じ。*は各遺伝の発現位置、**は抗体のバンドあるいは非特異的なバンド。

A. Rab12b, Rab13, Rab14, Rab15, Rab8a, Rab23, Kif17 には Flag タグが融合されており、抗 Flag 抗体により各分子を検出した。

B. Rangap1 および Arf4 には GFP タグが融合されており、抗 GFP により各分子を検出した。

	Flag-tagged							
Pull down	vector	Rab12	Rab13	Rab14	Rab15	Rab8a	Rab23	kif17
Flag	×	◎	◎	○	◎	◎	△	△
5HT6	×	◎	○	○	△	◎	×	×

	GFP-tagged		
Pull down	vector	Rangap1	Arf4
GFP	×	×	◎
5HT6	×	×	◎

図 7. 図 5 および図 6 における免疫沈降の結果まとめ

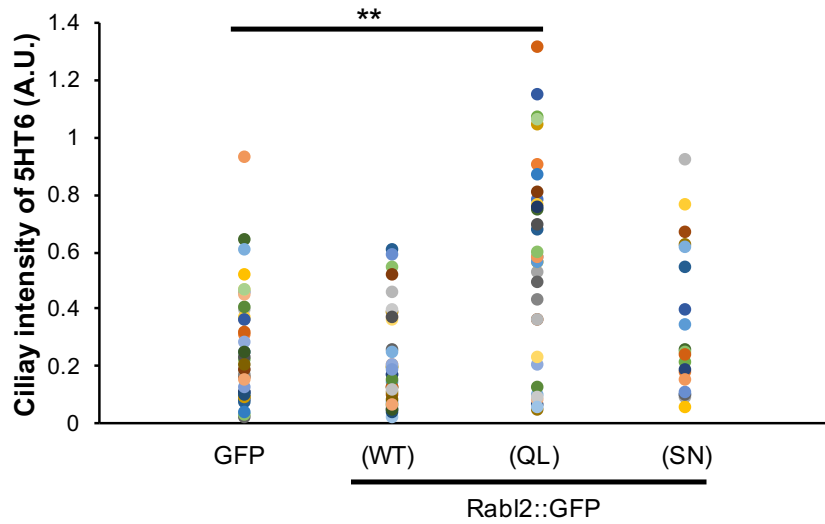
×:共沈降しない

△:比較的効率は低い共沈降する

○:共沈降する

◎:比較的効率よく共沈降する

A.



B.

	GFP	Rabl2(WT)	Rabl2(QL)**	Rabl2(SN)
average	0.270	0.210	0.549	0.342
SEM	3.2E-02	2.7E-02	5.3E-05	5.8E-02
median	0.231	0.162	0.567	0.236
sample	38	39	33	20

図 8. 5HT6 の一次繊毛局在率は GTP 結合型 Rabl2 依存的に増加する

A. IMCD3 細胞 5HT6 恒常発現株に GFP、GFP::Rabl2(WT)、GFP::Rabl2(QL)、GFP::(SN)を遺伝子導入し、血清飢餓 48 時間後、Arl13b(一次繊毛マーカー)および 5HT6 に免疫染色を行なった。一次繊毛における 5HT6 の蛍光強度を imageJ により測定した(単位は任意)。

B. A の平均値、SEM、中間値およびサンプル数。

**P<0.01

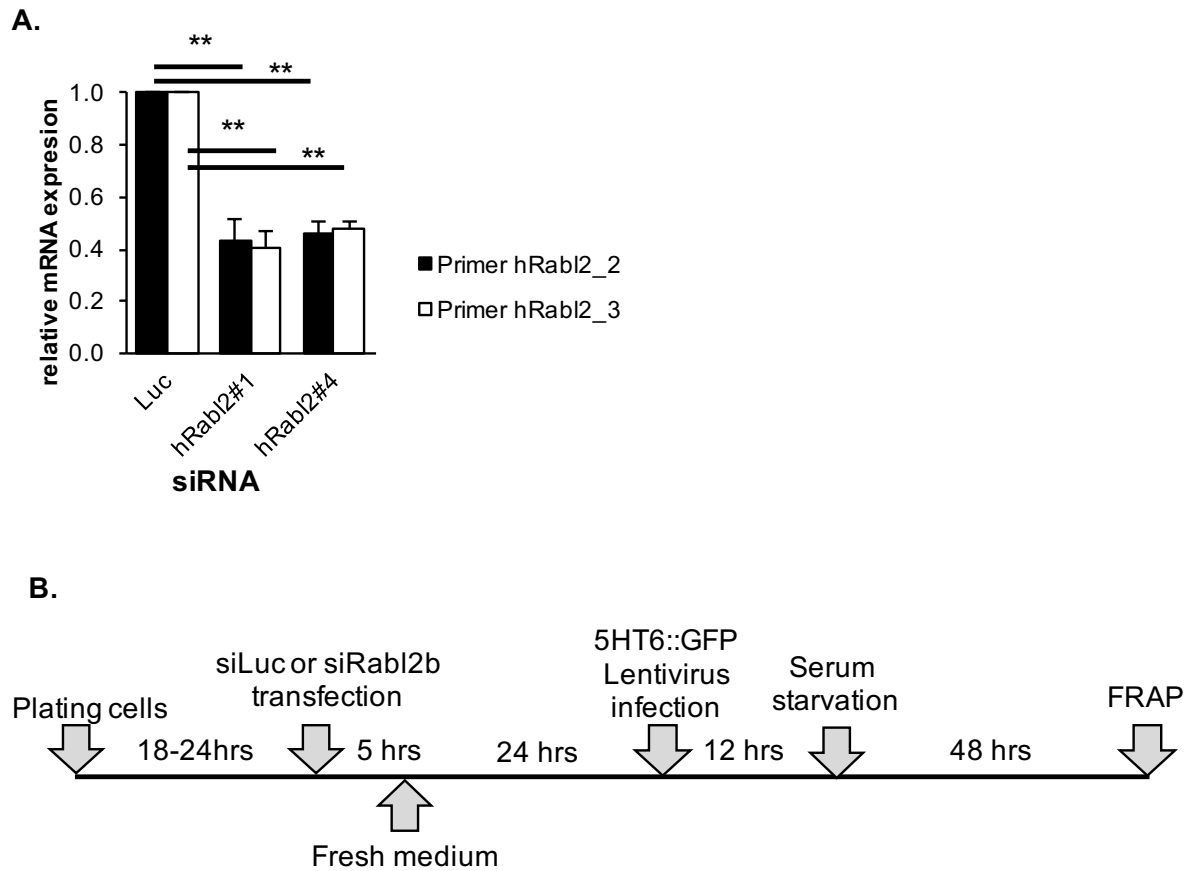


図 9. siRab12 の発現抑制効果の検証と FRAP 解析用細胞の準備方法

- A. 2 種類の Rab12 のプライマーを用いて、RPE1 細胞における siRab12#1 および siRab12#4 の遺伝子発現抑制の効果を qPCR により調べた。** $p < 0.01$
- B. FRAP 解析用細胞の準備方法。RPE1 細胞をガラスボトムディッシュに播種し、18-24 時間後に siLuc あるいは siRab12 をトランスフェクションした。5 時間後に新鮮な培地に交換し、24 時間後に C 末端に GFP を融合した 5HT6(5HT6::GFP)をレンチウイルスにより遺伝子導入した。さらに 12 時間後、一次繊毛形成を誘導するため、血清飢餓培地に交換し、48 時間後に FRAP 解析を行なった。

新鮮な培地に交換し、トランスフェクションから 24 時間後に、5HT6::GFP をレンチウイルスにより遺伝子導入した。ウイルス感染の 12 時間後に一次繊毛の形成を誘導するため、血清飢餓培地に交換し、48 時間後に FRAP の解析を行なった(図 9B)。一次繊毛全体に局在する 5HT6::GFP の蛍光を退色させた後、1 秒毎に一次繊毛の蛍光を測定し、half time($t_{1/2}$; 蛍光の最終回復率の半分に達するまでの時間)を算出した(図 10、11)。その結果、siLuc の $t_{1/2}$ が 4.5 秒であるのに対し、siRabl2 では 5.5 秒となり、siRabl2 では回復時間が有意に増加した(図 11C)。以上より、Rabl2 が 5HT6 の一次繊毛局在を促進することが示唆された。

3.2.2. Rabl2 は GPR161 の一次繊毛局在を促進する

Rabl2 が他の ciliary GPCR の一次繊毛局在にも影響するのかを調べるため、RPE1 細胞において内在的に発現している GPR161 に着目した。RPE1 細胞において Rabl2 の発現を抑制し、GPR161 および一次繊毛の軸系のマーカーであるグルタミル化チューブリンの免疫染色を行なった(図 12A)。ほとんどの GPR161 はグルタミル化チューブリンと重なって均一に染色されていたが、GPR161 のシグナルがグルタミル化チューブリンより幅が広く、隙間なく染色されたシグナルの強いものも見られた(図 12A)。また、GPR161 のシグナルが弱くなると、粒子状の染色になり、最もシグナルが弱いものでは、一次繊毛の軸系上でのシグナルが見られなかった(図 12A)。このような表現型を strong, normal, weak, no signal の 4 つに分類した。RPE1 細胞において 2 種類の siRNA を用いて Rabl2 の発現を抑制したところ、siLuc における strong および normal の割合が合わせて 90%であるのに対し、siRabl2#1、siRabl2#4 ではそれぞれ 58%、63%となり、GPR161 のシグナルが有意に減弱した(図 12B)。さらに、imageJ を用いて、一次繊毛における GPR161 の蛍光強度を定量したところ、siLuc の平均値が 0.834(単位は任意の値)に対して siRabl2#1 では 0.647 となり、有意に減少した(図 12C,D)。

さらに、GPR161 の一次繊毛局在が Rabl2 の GTP 結合状態に依存する可能性を検証するため、Flag::Rabl2(WT)、Flag::Rabl2(QL)、Flag::Rabl2(SN)を RPE1 細胞に過剰発現させ、GPR161 の一次繊毛局在の表現型を免疫染色により評価した。その結果、コントロール、Rabl2(WT)および Rabl2(SN)では一次繊毛における GPR161 の強いシグナル (strong)の割合が 10%以下であるのに対し、Rabl2(QL)を過剰発現させると、57%にまで増加した(図 13)。

以上の結果から、内在性 GPR161 の一次繊毛の局在に関与し、Rabl2(GTP 結合型)が GPR161 の一次繊毛局在を促進することが明らかとなった。

3.2.3. SSTR3 の一次繊毛局在性に対する Rabl2 の発現抑制および過剰発現の効果

神経細胞において発現するソマトスタチン受容体 SSTR3 の一次繊毛局在にも Rabl2 が関与するかを次に検証した。ここでは SSTR3 の C 末端に GFP を融合し(SSTR3::GFP)、これを恒常的に発現する RPE1 細胞株を用いた。

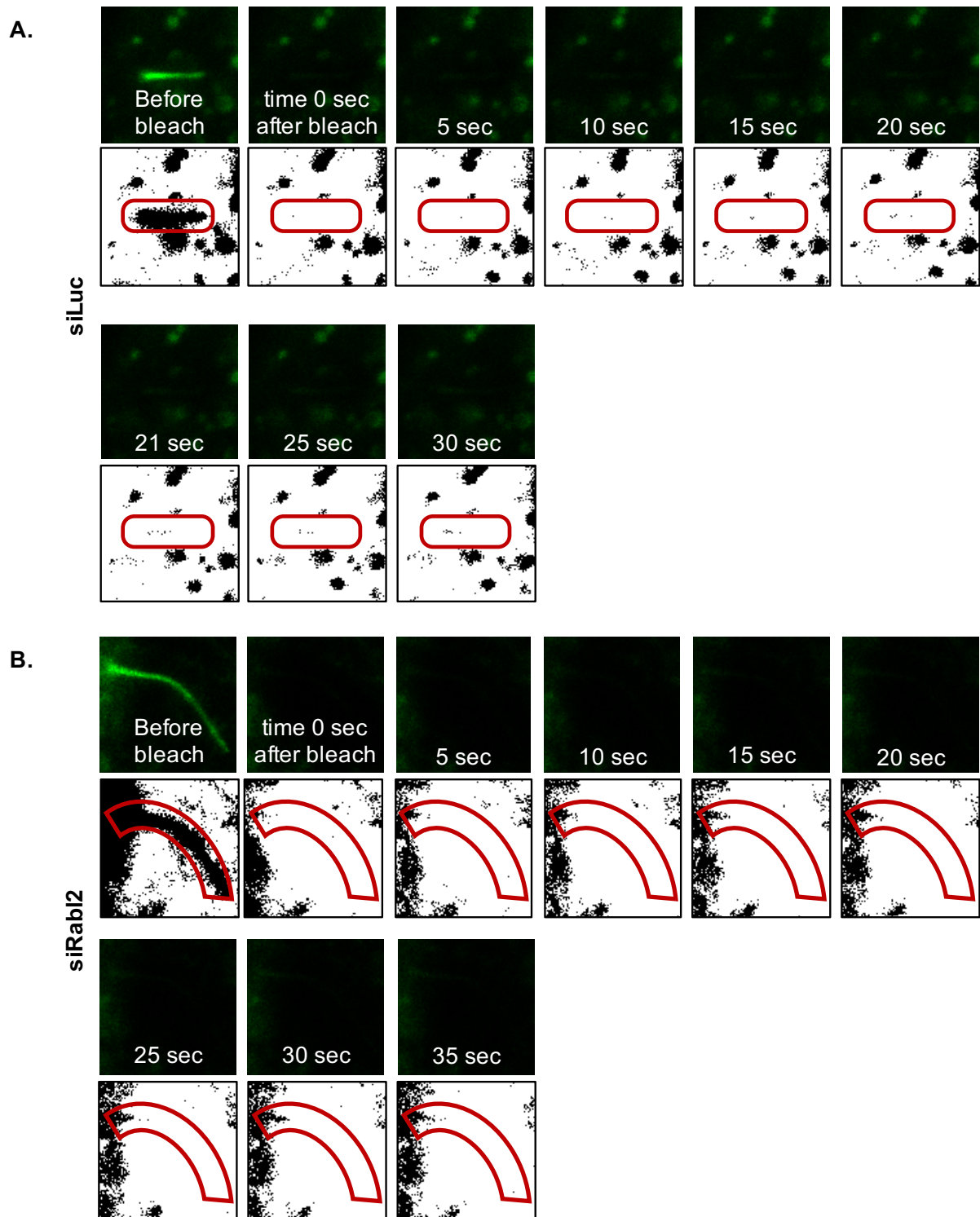


図 10. 光退色後の一次繊毛における 5HT6::GFP の回復

A および B.(上のパネル) siLuc あるいは siRab12 を導入した RPE1 細胞に 5HT6::GFP を一過的に発現させ、5HT6::GFP 光退色前後の一次繊毛の代表的な画像。(下のパネル)上のパネルの写真を二値化し、一次繊毛における 5HT6::GFP の蛍光回復を可視化した。赤枠は一次繊毛。A. siLuc を導入した細胞の一次繊毛。B. siRab12 を導入した RPE1 細胞の一次繊毛。

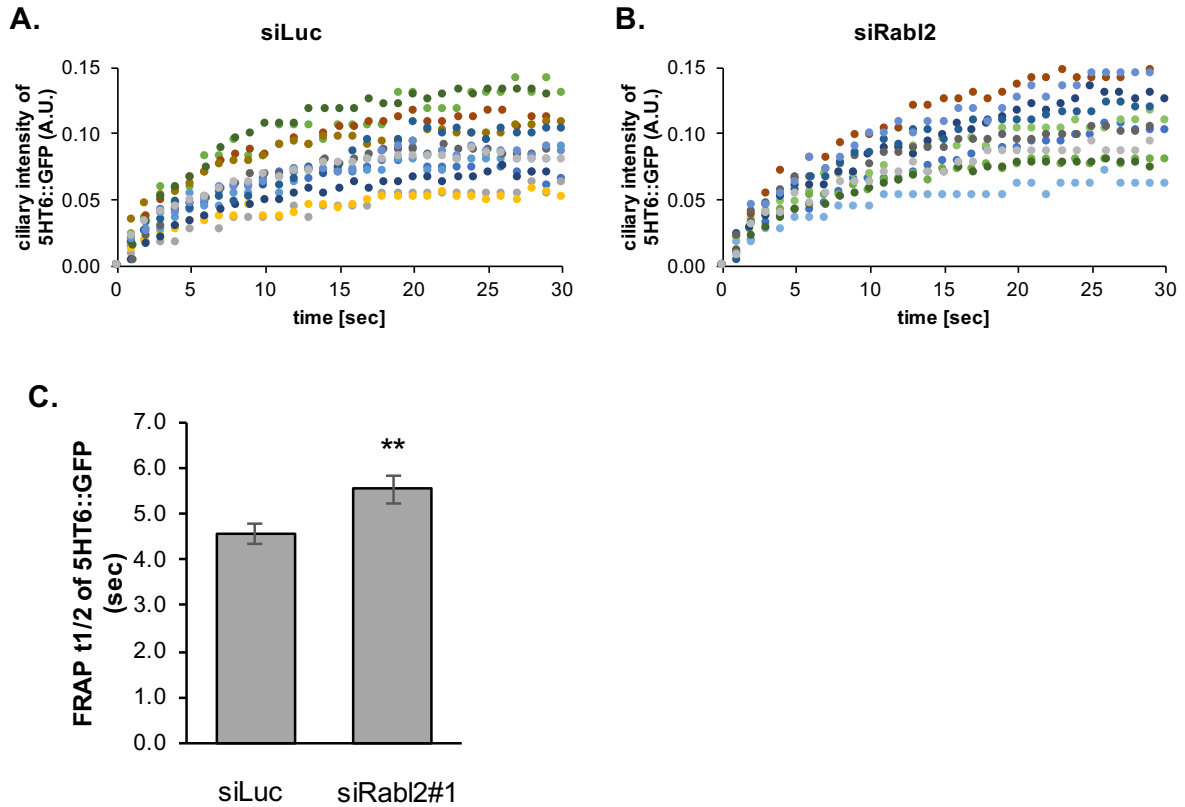


図 11. FRAP による 5HT6::GFP の一次繊毛局在における Rabl2 の機能解析

A.および B. siLuc あるいは siRabl2 を導入した RPE1 細胞に一過的に発現させた 5HT6::GFP の一次繊毛における蛍光強度。縦軸は退色前を 1 とし、退色後を 0 としたときの相対値。

A. siLuc を導入した細胞の FRAP 解析結果(N=15 細胞)。

B. siRabl2 を導入した細胞の FRAP 解析結果(N=14 細胞)。

C. 算出された $t_{1/2}$ の平均値。エラーバーは 4 回の実験から算出した SEM、各実験で 11-15 細胞を解析した。

** $p < 0.01$

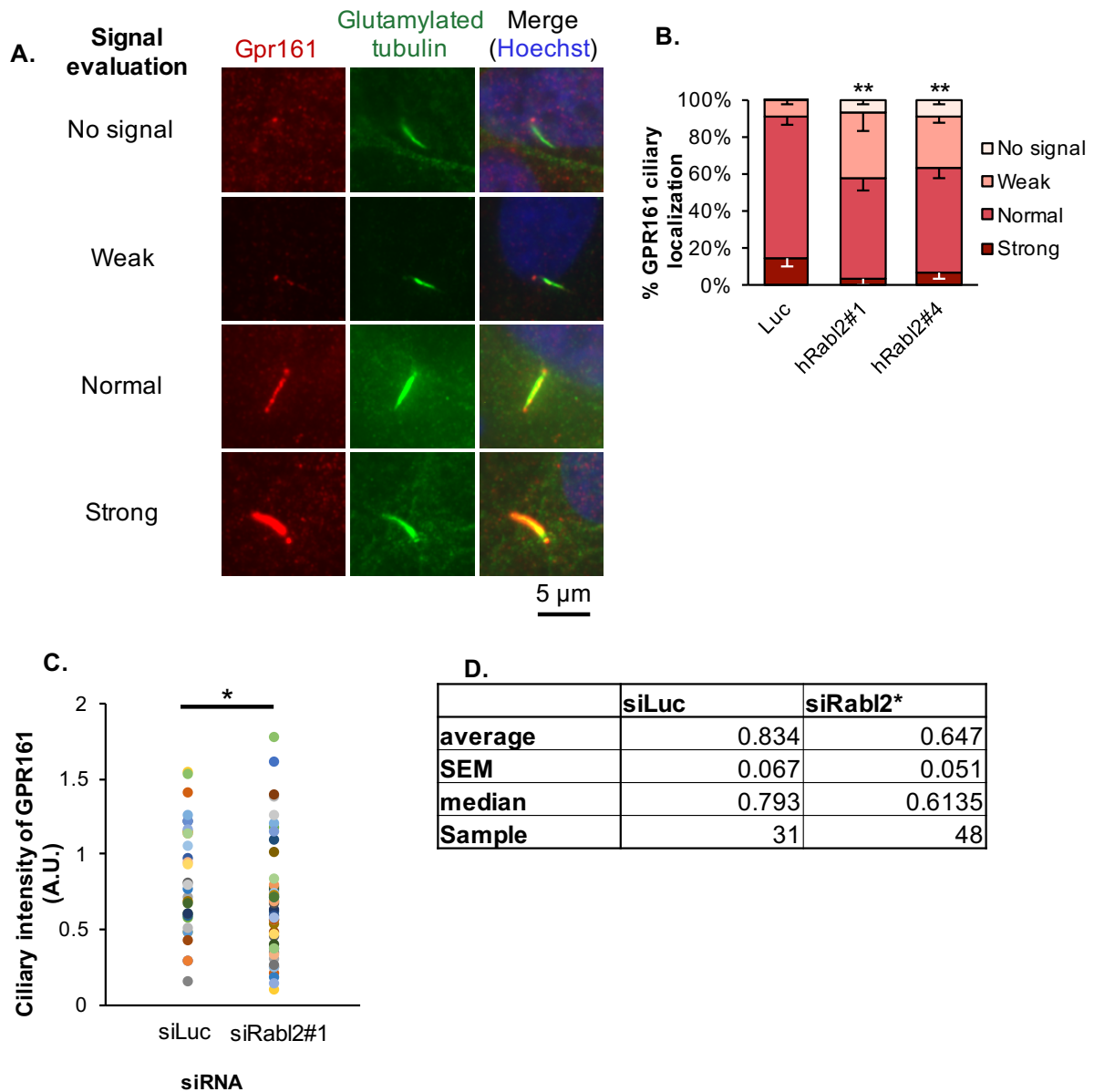


図 12. RPE1 細胞における内在性 GPR161 の一次繊毛局在と Rab12 発現抑制による影響

- A. RPE1 細胞における内在性 GPR161 およびグルタミル化チューブリン(一次繊毛軸糸マーカー)の免疫染色画像。GPR161 の染色の表現型を 4 段階に評価した。
- B. siLuc, siRab12#1, siRab12#4 を導入した細胞における GPR161 およびグルタミル化チューブリンを免疫染色し、GPR161 の一次繊毛局在の表現型を定量した。有意差検定は strong と normal の合計で算出した。エラーバーは 4 回の実験から算出した SEM、各実験で 100-140 細胞を解析した。
- C. RPE1 細胞において GPR161 およびグルタミル化チューブリン(一次繊毛軸糸マーカー)を免疫染色し、一次繊毛における GPR161 の蛍光強度(面積あたりの画素数)を imageJ により定量した。縦軸は任意の値。
- D. C の平均値、SEM、中間値およびサンプル数。

* $0.01 < P < 0.05$ 、** $p < 0.01$

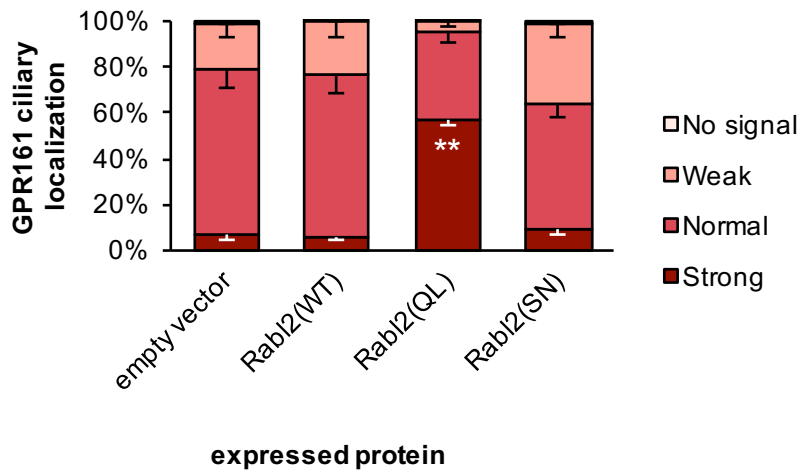


図 13. Rab12(WT)および Rab12 スクレオチド変異体の過剰発現による GPR161 の一次繊毛局在への影響
RPE1 細胞に空ベクター、Rab12(WT), Rab12(QL), Rab12(SN)発現ベクターを遺伝子導入し、一次繊毛における GPR161 の表現型を定量した。有意差検定は Strong でのみ評価。エラーバーは 3 回の実験から算出した SEM、各実験で 80-170 細胞を解析した。**p<0.01

SSTR3::GFP 恒常発現 RPE1 細胞において、siRNA を用いて Rab12 の発現を抑制し、表現型としてシグナルの強さを 4 段階に分けて評価した(図 14A)。コントロールでは no signal と weak を合わせた割合が 32%、siRab12 では 51%となり、有意な差はなかった(図 14B)。しかしながら、一次繊毛における SSTR3 の蛍光強度を imageJ により定量したところ、コントロールでは平均 0.068(単位は任意)であるのに対し、siRab12 では 0.060 となり、有意な差は認められなかった(図 14C、D)。この定量的な結果からは、SSTR3::GFP の一次繊毛への局在は Rab12 の発現抑制により大きな影響を受けないことが示唆された。

次に、Rab12 の野生型およびヌクレオチド変異体を SSTR3::GFP 恒常発現 RPE1 細胞において過剰発現させたところ、コントロールと比較して、Rab12 の WT および QL 変異体では SSTR3::GFP の一次繊毛局在に有意な差は見られなかった。一方、コントロールにおいて strong の割合が 7.4%であるのに対し、SN 変異体を過剰発現させると、24.4%に増加した(図 15)。このことから、SSTR3::GFP は Rab12(SN)により一次繊毛への局在が増加することが示唆された。

さらに、FRAP により SSTR3::GFP の動向を調べた。SSTR3::GFP 恒常発現株において、siRab12#1 をトランスフェクションし、5 時間後に新鮮な培地に交換した。トランスフェクションから 24 時間後に血清飢餓培地に交換し、48 時間後に FRAP を開始した。一次繊毛における SSTR3::GFP の蛍光を退色させ、1 秒毎に一次繊毛における蛍光の回復を測定した。もともと SSTR3::GFP の蛍光が弱く 1 秒毎の測定により蛍光が退色してしまい、half time は算出できなかった(図 16A、B)。ただ、siRab12 を導入するとその退色が弱まるような傾向が得られ、興味深い結果であった。

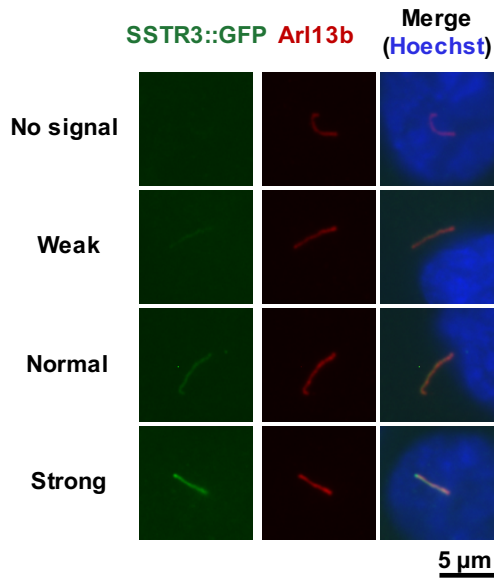
3.2.4 Ciliary GPCR と Rab12 の相互作用

GPR161 の一次繊毛局在が Rab12 の QL 変異体依存的に増加したことから(図 13)、GPR161 および Rab12 のヌクレオチド変異体の相互作用を検証した。Flag tag を融合した Rab12(WT)、QL 変異体、あるいは SN 変異体、および GPR161 を HEK293T 細胞に共発現し、免疫沈降を行なった。その結果、GPR161 は Rab12(WT)と共沈降し、最も強く相互作用することが示唆された(図 17A)。一方、Rab12(QL)との共沈降量は最も少なかった(図 17A)。

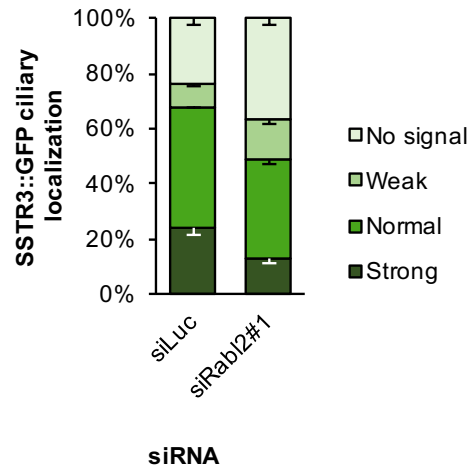
同様に、Rab12(WT)、QL 変異体、あるいは SN 変異体、および GPR161 を HEK293T 細胞に共発現し、Protein A Sepharose に抗 GPR161 抗体もしくは Rabbit IgG を結合したビーズを用いて免疫沈降を行なったところ、Rab12(WT)のみ GPR161 と共沈降し、QL 変異体および SN 変異体は共沈降しなかった(図 17B)。この結果から、GPR161 は Rab12(WT)と強く相互作用し、GTP 結合型 Rab12 との相互作用は弱いことが示唆された。

続いて、5HT6 でも同様に Rab12 のヌクレオチド変異体との相互作用を免疫沈降により検証した。その結果、Rab12(WT)と共沈降した 5HT6 の量を 1 としたときに、Rab12(WT)との共沈降量は 0.97、Rab12(SN)との共沈降は 0.48 となった(図 18)。この結果から、Rab12(WT)およ

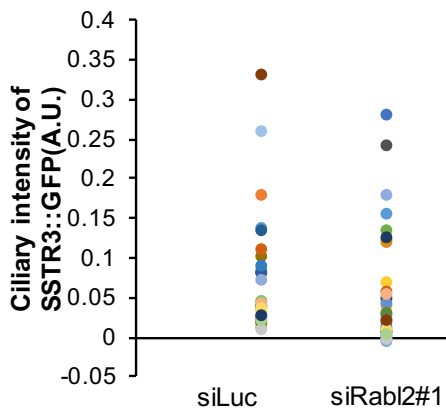
A.



B.



C.



D.

	siLuc	siRab12
average	0.0678	0.0601
SEM	0.0129	0.0132
median	0.0365	0.0290
Sample	32	31

図 14. SSTR3::GFP を恒常発現する RPE1 細胞における一次繊毛での SSTR3::GFP 蛍光強度と Rab12 発現抑制による影響

- RPE1 細胞 SSTR3::GFP 恒常発現株における SSTR3::GFP および Arl13b (一次繊毛膜マーカー) および Hoechst (核) の免疫染色画像。一次繊毛における SSTR3::GFP のシグナルの強さを 4 段階に評価した。
- siLuc, siRab12#1 を遺伝子導入した RPE1 細胞 SSTR3::GFP 恒常発現株を Arl13b で免疫染色し、一次繊毛における SSTR3::GFP の表現型を定量した。エラーバーは 6 回の実験から算出した SEM、各実験で 100-140 細胞を解析した。
- RPE1 細胞の SSTR3::GFP 恒常発現株を Arl13b (一次繊毛膜マーカー) により染色し、一次繊毛における SSTR3::GFP の蛍光強度 (面積あたりの画素数) を imageJ により定量した。縦軸は任意の値。
- C の平均値、SEM、中間値および解析した一次繊毛数。

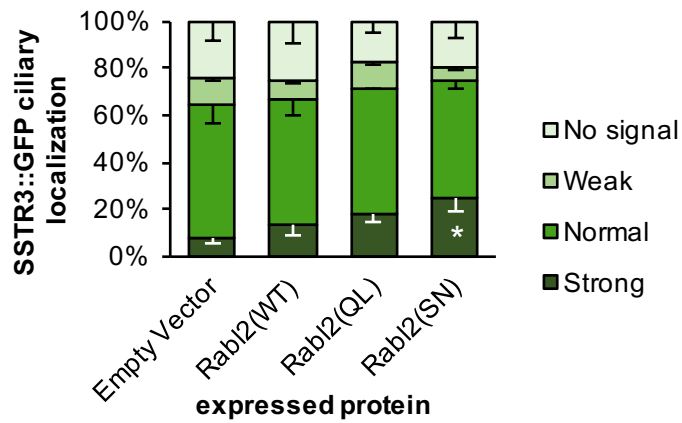


図 15. Rab12(WT)および Rab12 ヌクレオチド変異体の過剰発現による SSTR3::GFP 一次繊毛局在への影響
RPE1 細胞 SSTR3::GFP 恒常発現株に空ベクター、Rab12(WT), Rab12(QL), Rab12(SN)を遺伝子導入し、一次
繊毛における SSTR3::GFP の表現型を定量した。有意差検定は Strong でのみ評価。エラーバーは 3 回の実
験から算出した SEM、各実験で 100-150 細胞を解析した。*0.01<p<0.05

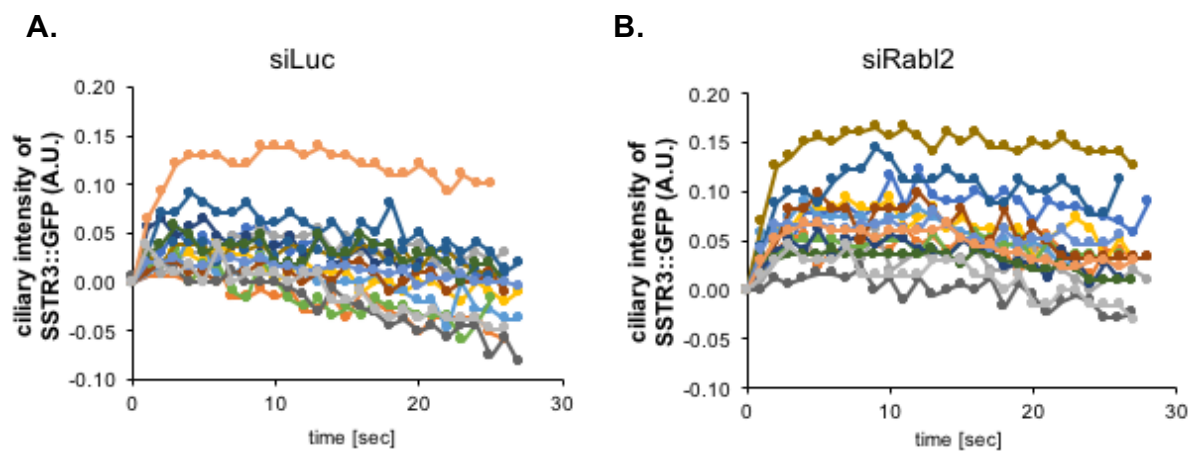


図 16. FRAP を用いた SSTR3::GFP の一次繊毛局在における Rab12 の機能解析

siLuc あるいは siRab12 を導入した RPE1 細胞 SSTR3::GFP 恒常発現株の一次繊毛における SSTR3::GFP の蛍光強度。縦軸は退色前を 1 とし、退職後を 0 としたときの相対値。

A. siLuc を遺伝子導入した細胞の FRAP 解析結果(N=15 細胞)。

B. siRab12 を遺伝子導入した細胞の FRAP 解析結果(N=15 細胞)。

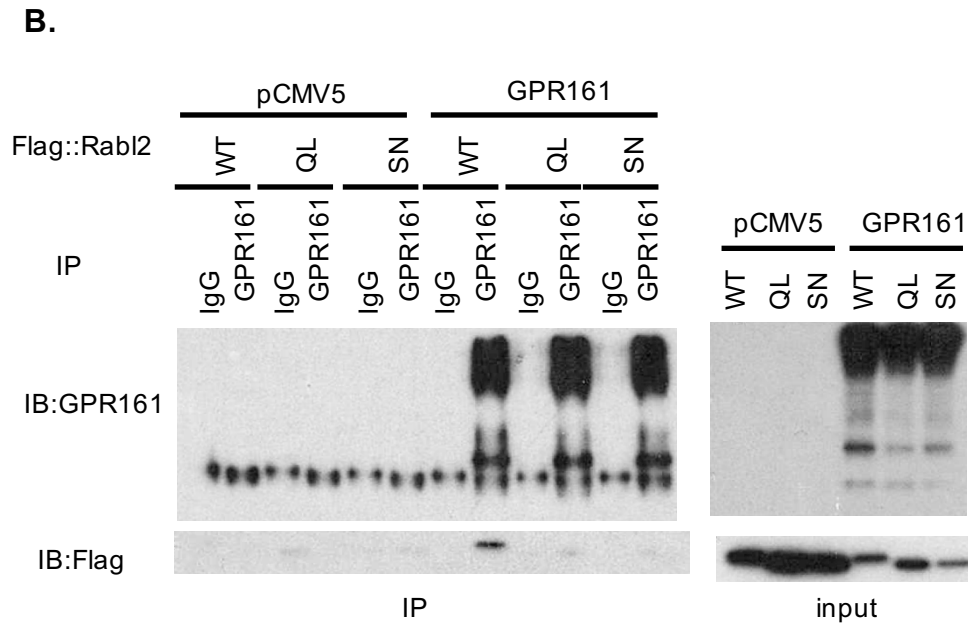
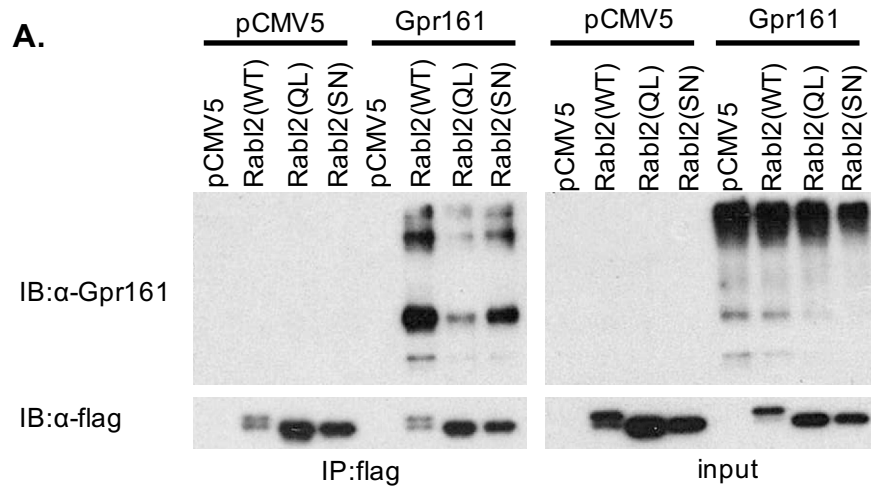


図 17. GPR161 と Rab12 の相互作用

HEK293T 細胞に Flag を融合した Rab12(WT)、Rab12(QL)、あるいは Rab12(SN)と GPR161 を共発現させ、免疫沈降を行なった。

A. Flag による免疫沈降の結果。

B. 抗 GPR161 抗体およびコントロールとして用いた rabbit IgG による免疫沈降の結果。

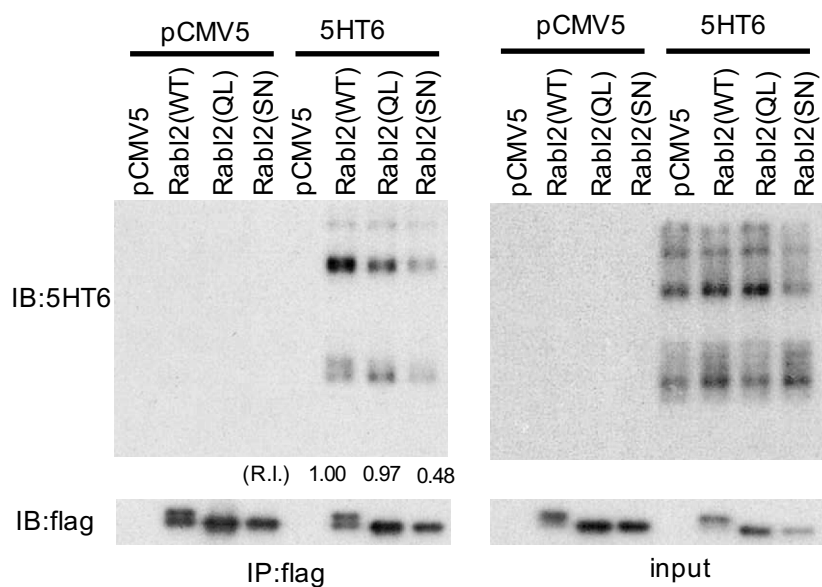


図 18. 5HT6 と Rab12 の相互作用

HEK293T 細胞に Flag を融合した Rab12(WT)、Rab1(QL)、あるいは Rab12(SN)と 5HT6 を共発現させ、Flag による免疫沈降を行なった。Relative Intensity(R.I.)は Rab12(WT)と共沈降した 5HT6 の量を 1 とした時の相対値で、4 回の実験の平均値から算出した。R.I.の平均値(SEM)は Rab12(QL) が 0.97(0.23)、Rab12(SN)が 0.48(0.11)であった。Rab12(WT)と Rab12(SN)と相互作用する 5HT6 の共沈降量は $p < 0.01$ で有意な差があった。

び GTP 結合型 Rab12 が 5HT6 と強く相互作用することが示唆された。

以上の結果から、GPR161 あるいは 5HT6 は RABL2(WT)と安定して相互作用することが示唆された。また、Rab12 グアニンヌクレオチド変異体との相互作用条件は GPCR ごとに異なることが示唆された。

3.2.5. CEP19、Rab12、IFT88 による GPR161 の局在制御機構

Rab12 は Centrosomal Protein 19kDa (CEP19)と直接結合し、CEP19 依存的に ciliary base に局在する (Kanie et al., 2017; Nishijima et al., 2017)。そこで、RPE1 細胞において 2 種類の siRNA を用いて CEP19 の発現を抑制したところ、siCep19#1、siCep19#2 により、CEP19 の mRNA 量はコントロールの 20%以下にまで低下した(図 19A)。さらに、免疫染色により GPR161 の一次繊毛への局在の表現型を評価した結果、GPR161 の strong および normal の割合を合わせるとコントロールでは 92%、siCep19#1 では 69%、siCep19#2 では 82%となり、GPR161 の一次繊毛におけるシグナルが減弱した(図 19B,C)。これらの結果から、ciliary GPCR の一次繊毛局在には Rab12 が一次繊毛の根元に局在する必要があることが示唆された。

次に Intraflagellar transport-B (IFT-B) complex が一次繊毛内において ciliary base から一次繊毛の先端への様々なタンパク質輸送を担うことが知られていることから、GPR161 の一次繊毛局在への影響を検証した。RPE1 細胞において IFT-B complex の構成因子である IFT88 に対する 2 種類の siRNA (siIFT88#1、siIFT88#3)を導入したところ、IFT88 の mRNA 量はコントロールの 40%程度にまで低下した(図 20A)。これらの siRNA を用いて RPE1 細胞において IFT88 の発現を抑制し、免疫染色を行った。GPR161 の一次繊毛への局在の表現型を調べたところ、strong および normal の割合を合わせるとコントロールでは 87%、siIFT88#1 は 67%、siIFT88#3 では 56%となり、GPR161 の一次繊毛への局在が減弱した(図 19B, 20B)。この結果から GPR161 の一次繊毛局在には IFT88 も必要であることが示唆された。

3.2.6. GTP 結合型 Rab12 は IFT88 の一次繊毛局在を促進する

GPR161 の一次繊毛局在には IFT88 が介在することが示唆されたが、IFT88 の一次繊毛局在が Rab12 による制御を受ける可能性が想定された。そこで次に、Rab12 の発現を抑制し、RPE1 細胞を免疫染色後、IFT88 の一次繊毛におけるシグナルの表現型を 4 段階で評価した。シグナルが最も強いもの(strong)では粒子が大きく、ほぼ隙間なく一次繊毛を埋めている(図 21A)。normal では粒子が strong より小さくなるが、一次繊毛をほぼ隙間なく埋めている(図 21A)。さらにシグナルが弱くなると(weak)、粒子同士に隙間が広がり、ついには一次繊毛の先端にのみ弱いシグナルが見える程度になる(図 21A)。これらの割合を定量したとこ

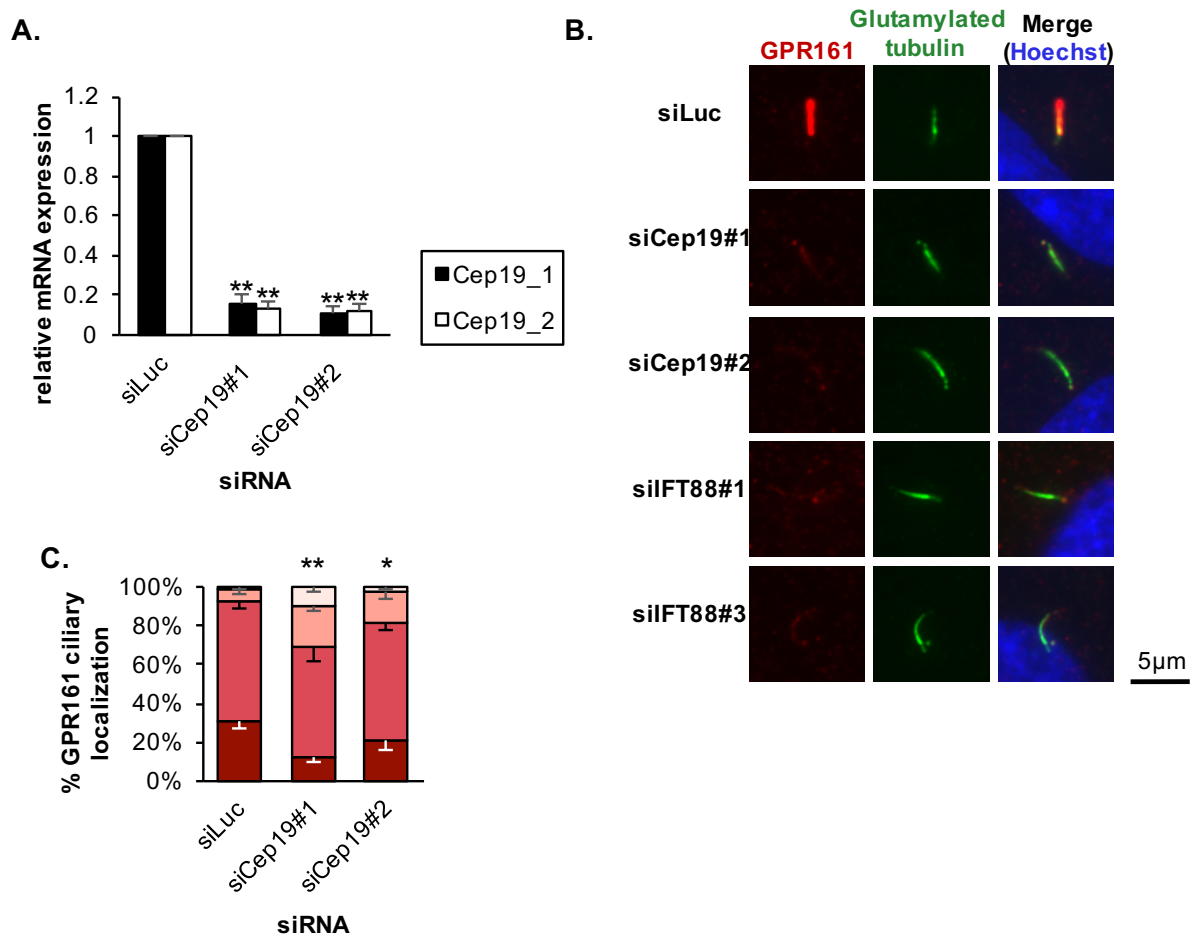


図 19. Cep19 あるいは IFT88 発現抑制による GPR161 の一次繊毛局在への影響

A. 2 種類の Cep19 のプライマーを用いて、RPE1 細胞における siCep19#1 および siCep19#2 の遺伝子発現抑制の効果を qPCR により調べた。

B. Cep19 あるいは IFT88 を発現抑制した RPE1 細胞における内在性 GPR161 およびグルタミル化チューブリン(一次繊毛軸糸マーカー)の免疫染色画像。

C. siLuc, siCep19#1, siCep19#2 を遺伝子導入した細胞を GPR161 およびグルタミル化チューブリンで免疫染色し、GPR161 の一次繊毛局在の表現型を評価した。有意差検定は strong と normal の合計の値で算出。エラーバーは 3 回以上の実験から算出した SEM、各実験で 100-170 本の一次繊毛を解析した。

**p<0.01、*0.01<p<0.05

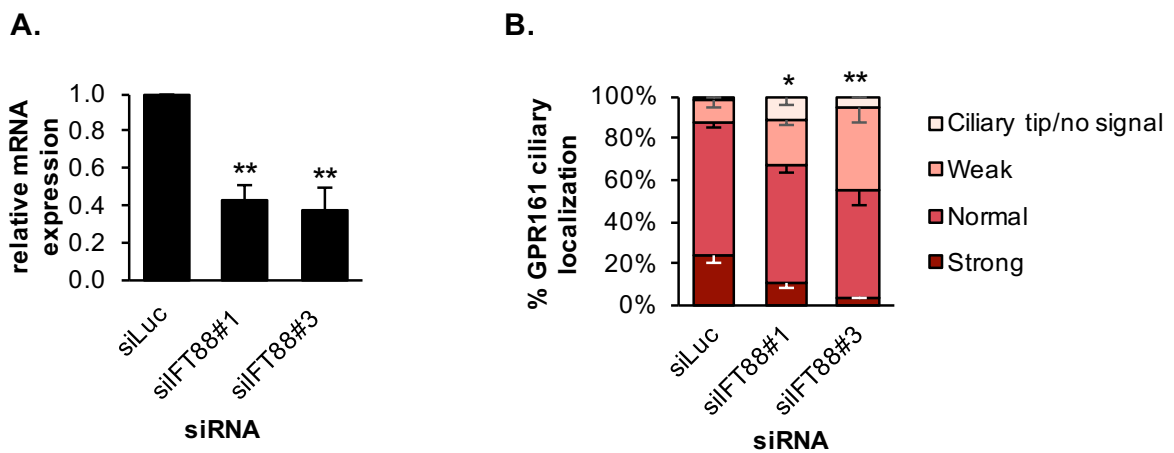
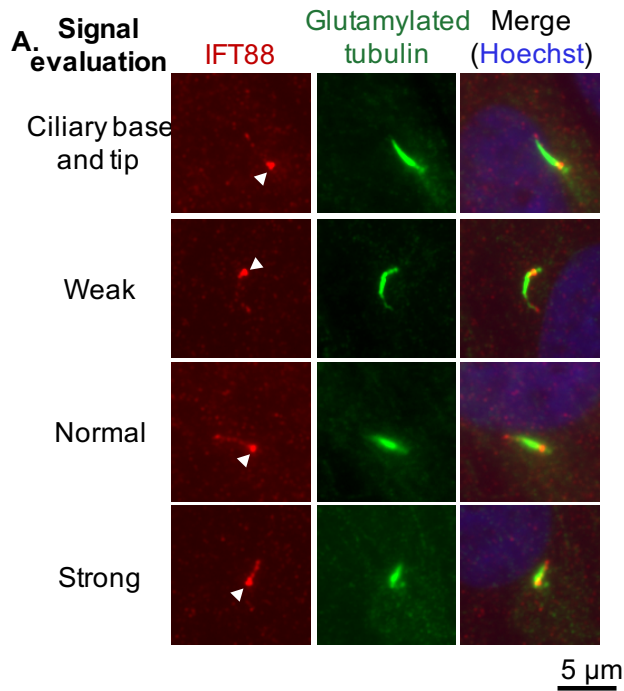
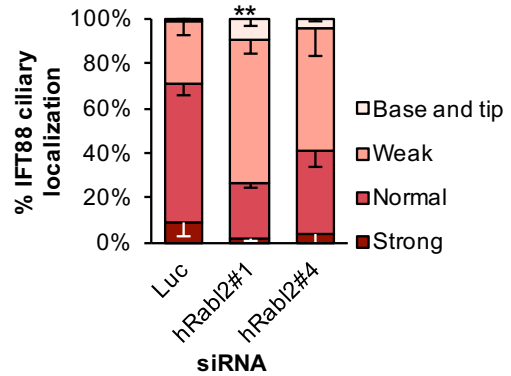


図 20. IFT88 発現抑制による GPR161 の一次繊毛局在への影響

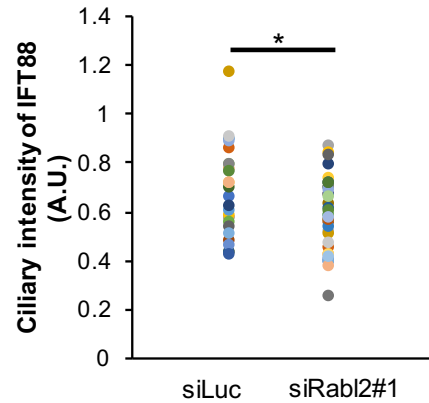
- A. RPE1 細胞における siIFT88#1 および siIFT88#3 の遺伝子発現抑制の効果を qPCR により検証した。エラーバーは 3 回の実験から算出した SEM。
- B. siLuc, siIFT88#1, siIFT88#3 を導入した細胞を GPR161 およびグルタミル化チューブリンで免疫染色し、GPR161 の一次繊毛局在の表現型を評価した。有意差検定は strong と normal の合計の値で算出。エラーバーは 5 回の実験から算出した SEM、各実験で 100-160 細胞を解析した。** $p < 0.01$ 、* $0.01 < p < 0.05$



B.



C.



D.

	siLuc	siRab12
average	0.667	0.580
SEM	0.035	0.026
median	0.649	0.581
Sample	27	30

図 21. RPE1 細胞における内在性 IFT88 の一次繊毛局在と Rab12 発現抑制による影響

- A. RPE1 細胞における内在性 IFT88 およびグルタミル化チューブリン(一次繊毛軸系マーカー)の免疫染色画像。
- B. siLuc, siRab12#1, siRab12#4 を導入した細胞を IFT88 およびグルタミル化チューブリンを免疫染色し、IFT88 の一次繊毛局在の表現型を評価した。有意差検定は strong と normal の合計の値で算出。エラーバーは 4 回の実験から算出した SEM、各実験で 100-130 細胞を解析した。
- C. RPE1 細胞において IFT88 およびグルタミル化チューブリン(一次繊毛軸系マーカー)を免疫染色し、一次繊毛における IFT88 の蛍光強度(面積あたりの画素数)を imageJ により測定した。縦軸は任意の値。
- D. C の平均値、SEM、中間値およびサンプル数。

**p<0.01 、*0.01<p<0.05

ろ、strong と normal の割合を合わせるとコントロールでは平均で 70.6%、siRab12#1 では 26.9%、siRab12#4 では 41.4%となった(図 21B)。IFT88 の一次繊毛への局在率は siRab12#1 において有意な減弱が見られ、siRab12#4 でも減少する傾向が見られた(図 21B)。また、IFT88 の一次繊毛における蛍光強度を imageJ により解析した。その結果、コントロールのシグナルは平均 0.67(単位は任意)に対し、Rab12 発現抑制では 0.58 となり、シグナルが有意に減弱した(図 21C,D)。

次に、GFP::Rab12b(QL)を RPE1 細胞に過剰発現させ、IFT88 の一次繊毛への局在率を定量したところ、コントロールにおける strong と normal の割合を合わせると 74.7%に対して、GFP::Rab12b(QL)を過剰発現させると 95.7%にまで有意に増加した(図 22A,B)。また、このとき、GFP::Rab12b(QL)が一次繊毛に局在することも観察された(図 22A)。この結果は Kanie らの報告と一致しており、IFT88 の一次繊毛への局在を Rab12b(QL)が促進していることを示唆している(Kanie et al., 2017)。これらの結果から、GPR161 は Cep19 依存的に Rab12 が ciliary base に局在し、IFT88 を介して一次繊毛に局在することが示唆された(図 22C)。

3.2.7. SSTR3 の一次繊毛局在における CEP19、Rab12、IFT-B の関与は少ない

次に、SSTR3 の一次繊毛局在に CEP19 および IFT-B 複合体が影響しているかを検証した。SSTR3::GFP を恒常発現する RPE1 細胞株を用いて siRNA により CEP19 あるいは IFT88 の発現を抑制し、免疫染色により、SSTR3::GFP の一次繊毛への局在を評価した。その結果、コントロールでは strong と normal の割合を合わせて 68.1%であるのに対して、siCep19#1 では 75.9%、siCep19#2 では 63.8%、siIFT-88#1 では 64.1%、siIFT88#3 では 54.5%となり、いずれでも優位な差は見られなかった(図 23A)。この結果は Rab12 の発現抑制および過剰発現が SSTR3::GFP の一次繊毛局在に大きく影響しないことと一致しており(図 14、15)、SSTR3 の一次繊毛局在において CEP19、Rab12 および IFT-B 複合体への依存性が弱いことが示唆された。

3.2.8. Tulp3 は IFT88 の一次繊毛局在に影響しない

GPR161 および SSTR3 の CTS は Tulp3 により認識され、一次繊毛に局在することが報告された(Mukhopadhyay et al., 2010; Mukhopadhyay et al., 2013)。そこで、GPR161 の一次繊毛局在制御において、Tulp3 と IFT88 による局在制御機構が互いに影響している可能性を検証した。RPE1 細胞において 3 種類の siRNA を導入し、mRNA を qPCR により測定したところ、Tulp3 に対する 2 種類の siRNA の導入時にいずれも 50%以下にまで低下していた(図 24A)。Tulp3 と IFT88 を共に発現抑制したところ、コントロールでは strong と normal を合わせた割合が平均で 91.6%、siTulp3#2 では 66.7%、siIFT88#3 では 57.1%、siTulp3#2 および siIFT88#3 による共発現抑制では 42.7%となり、siTulp3#2 単独と比較すると siIFT88#3 の付加で相加的に GPR161 の一次繊毛局在率が減少した(図 24B)。さらに、RPE1 細胞において

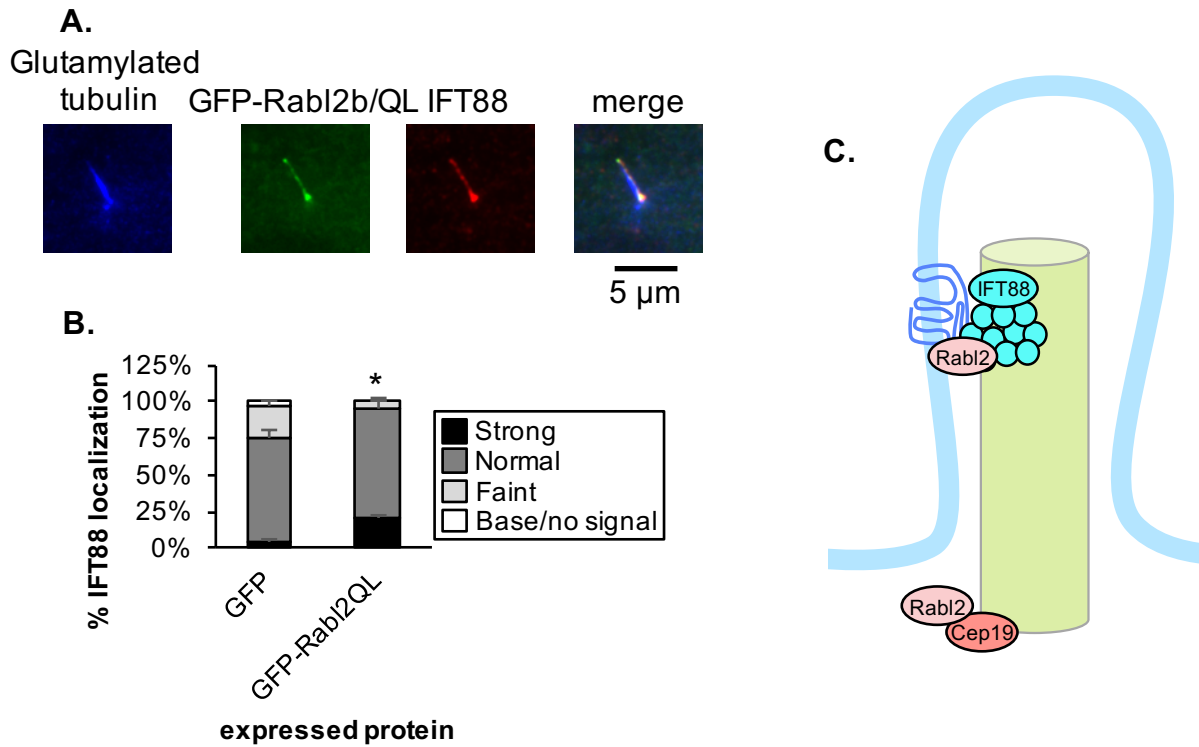


図 22. Rab12(QL)変異体の過剰発現による IFT88 の一次繊毛局在への影響

- A. RPE1 細胞に GFP、GFP::Rab12(QL)を遺伝子導入し、グルタミル化チューブリン(一次繊毛軸系のマーカー)および IFT88 あるいは Cep19(ciliary base のマーカー)を免疫染色した。
- B. RPE1 細胞に GFP、GFP::Rab12(QL)を遺伝子導入後、グルタミル化チューブリン(一次繊毛軸系のマーカー)および IFT88 を免疫染色し、一次繊毛における IFT88 の表現型を定量した。有意差検定は Strong と Normal を合わせた割合で評価。エラーバーは 3 回の実験から算出した SEM、各実験で 51-62 細胞を解析した。 $*0.01 < p < 0.05$
- C. GPR161 の一次繊毛局在に関わる分子のモデル図。GPR161 の一次繊毛局在には Cep19 依存的に Rab12 が ciliary base に局在することが重要であることが示唆された。さらに Rab12 依存的に一次繊毛に局在する IFT88 も GPR161 の一次繊毛局在に関与することが示唆された。

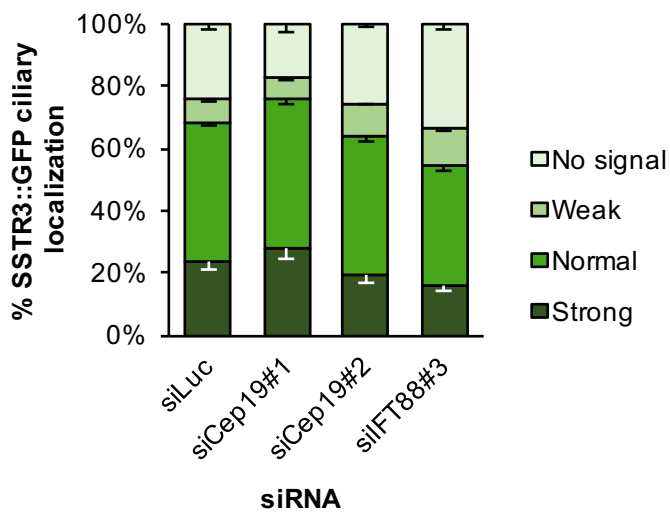


図 23. Cep19 あるいは IFT88 発現抑制による SSTR3::GFP の一次繊毛局在への影響

siLuc, siCep19#1, siCep19#2, siIFT88#3 を導入した細胞を Arl13b 免疫染色し、SSTR3::GFP の一次繊毛局在の表現型を評価した。エラーバーは 6 回の実験から算出した SEM、各実験で 100-170 細胞を解析した。

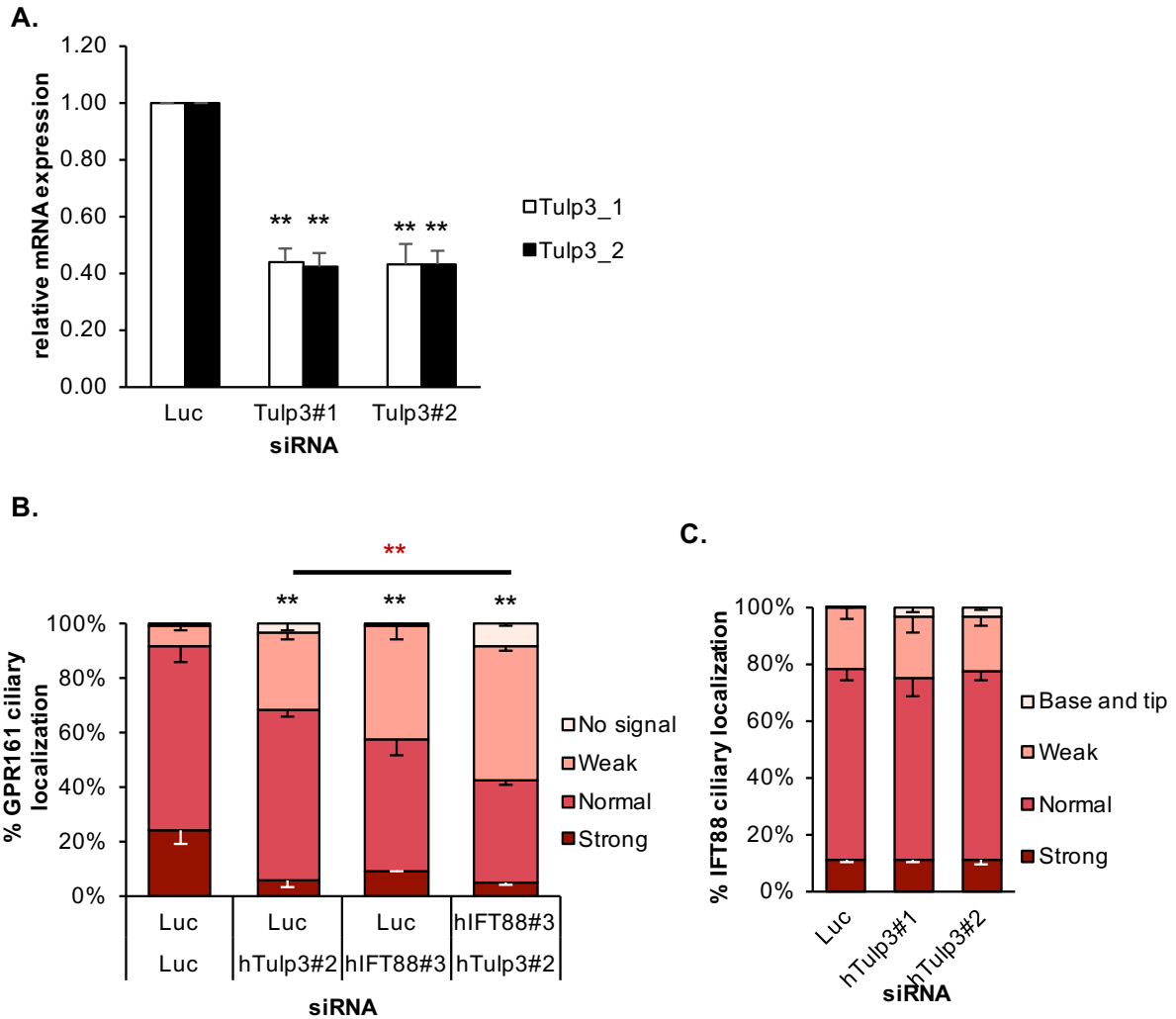


図 24. Tulp3 の発現抑制は IFT88 の一次繊毛局在に影響しない

- A. 2 種類の Tulp3 のプライマーを用いて、RPE1 細胞における siTulp3#1 および siTulp3#2 の遺伝子発現抑制の効果を qPCR により調べた。エラーバーは 3 回の実験から算出した SEM。** $p < 0.01$
- B. siRNA をもちいて Tulp3、IFT88 をそれぞれ単独の発現を抑制、あるいは両遺伝子を発現抑制した。血清飢餓 48 時間後に IFT88 および Glutamylated tubulin を免疫染色し、IFT88 の一次繊毛における表現型を評価した。有意差検定は Strong と Normal の合計で算出。IFT88 の一次繊毛における表現型を評価した。エラーバーは 3 回の実験から算出した SEM、各実験で 100-150 細胞を解析した。** $p < 0.01$ (黒: Luc との比較、赤: Tulp3 との比較)
- C. siTulp3#1 および siTulp3#2 を用いて Tulp3 の発現を抑制し、血清飢餓 48 時間後に IFT88 および Glutamylated tubulin を免疫染色した。IFT88 の一次繊毛における表現型を評価した。エラーバーは 4 回の実験から算出した SEM、各実験で 100-130 細胞を解析した。

Tulp3 を発現抑制し、一次繊毛における IFT88 の表現型を評価したところ、strong および normal を合わせた割合はコントロールと比べ、ほとんど差がなかった(図 24C)。これらの結果から、Tulp3 は IFT88 を介した GPR161 の一次繊毛局在機構に影響しないことが示唆された。

3.3 5HT6 の CTS の探索

3.3.1. 5HT6 の一次繊毛局在と細胞内第 3 ループの影響

Berbari らの報告から(Berbari et al., 2008)、5HT6 の細胞内第 3 ループに含まれる A²³⁰ と Q²³⁴ が CTS の候補として示唆されていたため、この 2 箇所をフェニルアラニンに置換した変異体(A230F/Q234F)を作製した。5HT6 野生型および A230F/Q234F の C 末端に GFP を融合し、血清飢餓状態で安定的に一次繊毛を形成するヒト網膜上皮細胞 RPE1 およびマウス繊維芽細胞 NIH3T3 に発現させた。これらの細胞を免疫染色し、5HT6 野生型および A230F/Q234F 変異型の発現部位を蛍光顕微鏡で確認した。その結果、いずれの細胞においても、野生型と変異型の 5HT6 で一次繊毛局在率に有意な差は見られなかった(図 25)。このことから、5HT6 の CTS は A²³⁰ と Q²³⁴ 以外に優位に働く CTS があるのではないかと考えた。

3.3.2. C 末端欠損変異体による 5HT6 の CTS 探索

5HT6 の CTS 候補であった A²³⁰/Q²³⁴ の部分変異による CTS の必要性が認められなかったため、改めて CTS を探索した。これまでに報告された一次繊毛に局在するタンパク質の CTS を参考に 5HT6 の細胞内 C 末端領域(324-440)に含まれる 3 箇所を有力な候補と考えた。一つ目は ³²⁷RDFKR³³¹ である。この配列は一次繊毛に局在するロドプシン GPCR ファミリーの一つである GPR161 の CTS として報告された塩基性に富む [I/V]KARK の配列と類似している (Mukhopadhyay et al., 2013)。さらに、371-373 番目と 426-428 番目に含まれる VxP の配列は一次繊毛局在膜タンパク質である Polycystin-2 の CTS として報告されたものである (Geng et al., 2006)。これらを参考に、5HT6 の細胞内 C 末端領域を Δ324-440、Δ332-440、Δ379-440、および Δ415-440 a.a. の 4 通りに欠損させ、C 末端 GFP 融合タンパク質として発現するプラスミドを作製した。これらを RPE1 に発現させ、血清飢餓により一次繊毛を誘導後、免疫染色を行った。その結果、野生型、Δ332-440、Δ379-440、Δ415-440 では 65%以上の一次繊毛への局在が観察されたが、Δ324-440 では一次繊毛への局在率は約 3%であった(図 26A, B)。また、RPE1 細胞に発現させた GFP 融合 5HT6 のウェスタンブロットにより、Δ324-440 の発現量は野生型よりも多いことが認められたことから、Δ324-440 の一次繊毛への局在率の低下は発現量の低下が原因でないことが示唆された(図 26C)。以上の結果が

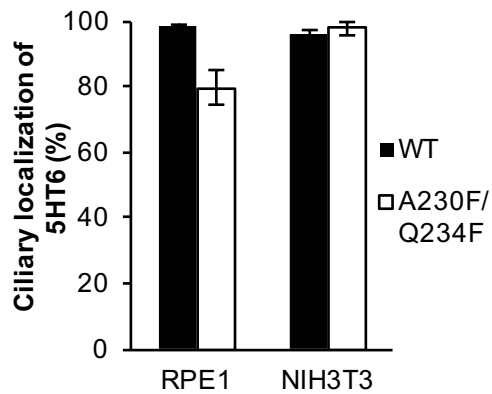


図 25. A230F/Q234F の変異による 5HT6 一次繊毛局在への影響

GFPを融合した5HT6(WT)あるいは5HT6の細胞内第3ループに変異を入れたA230F/Q234F変異体をRPE1細胞あるいはNIH3T3細胞に遺伝子導入し、血清飢餓状態で48時間培養した。免疫染色により5HT6(WT)あるいは5HT6(A230F/Q234F)変異体の一次繊毛局在率を定量した。エラーバーは2回の実験から算出したSD、各実験で100-130細胞を解析した。

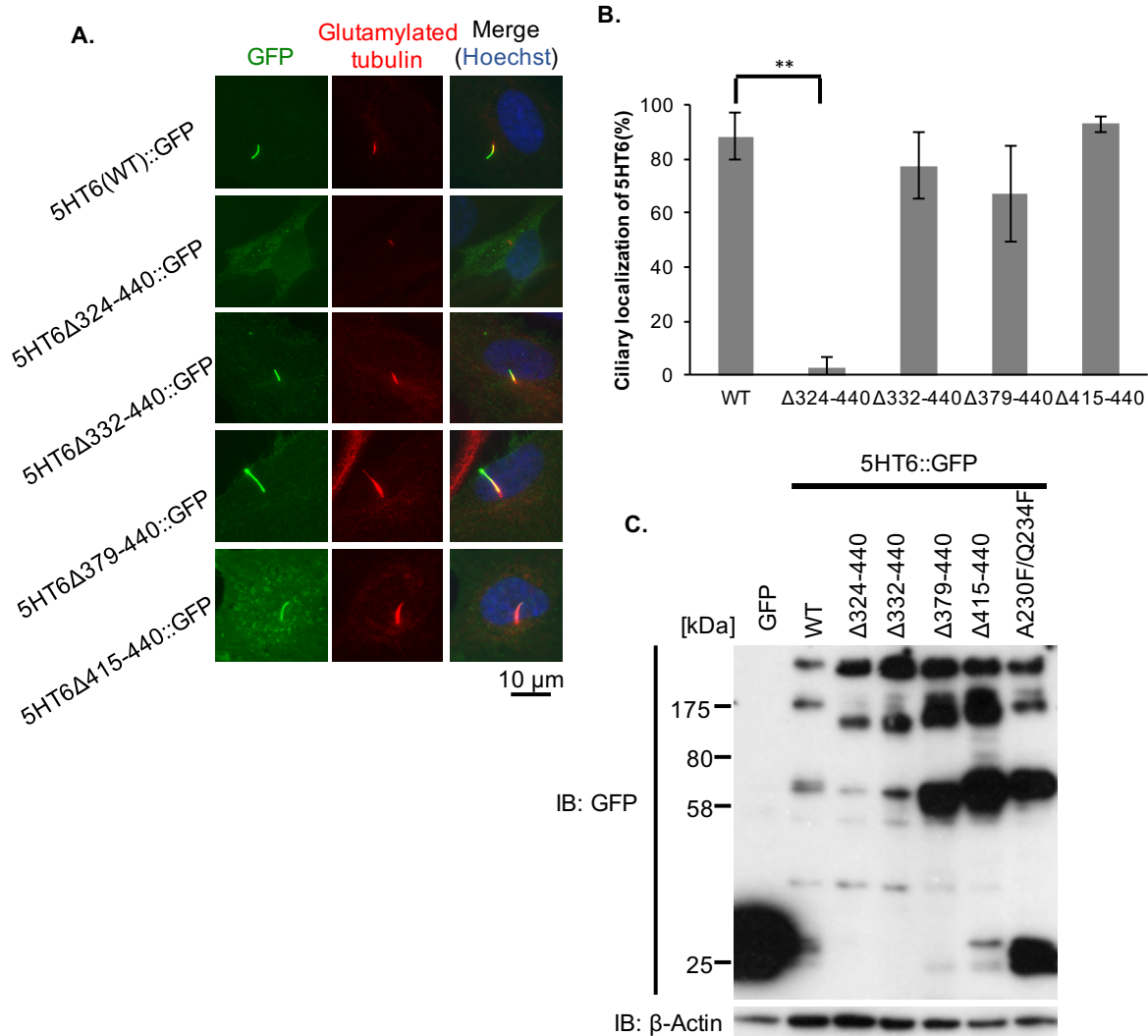


図 26. 5HT6 の C 末端欠損変異体を用いた CTS 探索

A. GFP を融合した 5HT6(WT)あるいは 5HT6 の細胞内 C 末端領域欠損変異体(Δ324-440、Δ332-440、Δ379-440、Δ415-440)を RPE1 細胞に遺伝子導入し、血清飢餓状態で 48 時間培養した。その後、グルタミル化チューブリンを免疫染色した。画像は一次繊毛における 5HT6(WT)あるいは 5HT6 の各種 C 末端欠損変異体の局在を示す。

B. A.における 5HT6(WT)あるいは 5HT6 の各種 C 末端欠損変異体の一次繊毛局在率を定量した。エラーバーは 3 回の実験から算出した SD、各実験で 100-120 細胞を解析した。

C. RPE1 細胞における 5HT6 および細胞内 C 末端変異体および A230F/Q234F の発現量をウェスタンブロットにより検討した。GFP は 27kDa、5HT6(WT)::GFP は推定 74kDa。

ら、5HT6 の 324-331 a.a.に含まれるアミノ酸配列が 5HT6 の CTS である可能性が示唆された。

3.3.3. 5HT6 の 324-331a.a.領域に含まれる CTS の探索

5HT6 の 324-331a.a.領域には CTS の候補である ³²⁷RDFKR³³¹ が存在する。そこで、5HT6 の一次繊毛局在におけるこの 5 アミノ酸の必要性を調べるために、³²⁷RD³²⁸ の 2 アミノ酸、³²⁹FYR³³¹ の 3 アミノ酸、さらに 5 アミノ酸全てをそれぞれアラニンに置換した 3 種類の変異体を作製した(順に 327-328A、329-331A、327-331A とする)。先の実験で用いたプラスミドと同様に、C 末端 GFP 融合タンパク質として、RPE1 に発現させた後、免疫染色を行った。その結果、野生型、327-328A、および 329-331A は 95%以上の一次繊毛局在率を示したのに対し、327-331A は約 9%の局在率であった(図 27A)。RPE1 細胞に発現させた GFP 融合 5HT6 のウェスタンブロットにより 327-331A の発現量は野生型とほぼ同等であったことから、327-331A の一次繊毛局在率の低下はタンパク質の発現量低下によるものではないことが示唆された(図 27B)。以上の結果から、5HT6 の ³²⁷RDFKR³³¹ は一次繊毛への局在に必要であることが示唆された。

次に、CTS 変異体が膜へ輸送されていない可能性があると考え、CTS 変異体の細胞内局在を調べた。HEK293T 細胞に GFP を融合した野生型 5HT6、A230F/Q234F 変異体、あるいは CTS 変異体を膜タンパク質である GPR56 とともに遺伝子導入し、免疫染色を行なった(図 28)。野生型 5HT6 および A230F/Q234F 変異体は GPR56 と共局在したが、CTS 変異体は GPR56 の層より内側にあり、ほとんどの細胞において核付近に蓄積した区画での局在が見られた。以上の結果から、5HT6 の CTS 変異体は細胞膜への輸送が減弱することが示唆された。

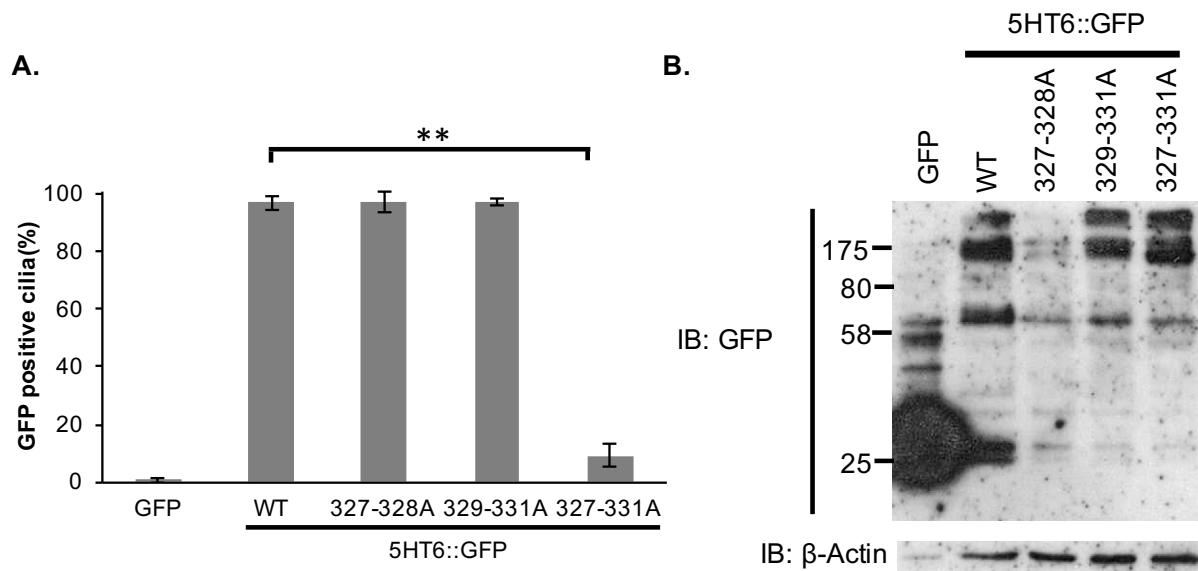


図 27. 一次繊毛局在における 5HT6 の細胞内 C 末端領域 327-331 アミノ酸配列の必要性の検討

A. GFP、GFPを融合した 5HT6 の(WT)、327-328A 変異体、329-331A 変異体、あるいは 327-331A 変異体を RPE 細胞に遺伝子導入し、血清飢餓 48 時間後、免疫染色した。5HT6 および各種変異体の一次繊毛局在率を定量した。エラーバーは 3 回の実験から算出した SD、各実験で 100-150 細胞を解析した。

B. RPE1 細胞における GFP、5HT6(WT)::GFP、5HT6(327-328A)::GFP、5HT6(329-331A)::GFP および 5HT6(327-331A)::GFP の発現量をウェスタンブロットにより検討した。GFP は 27kDa、5HT6::GFP は推定 74kDa。

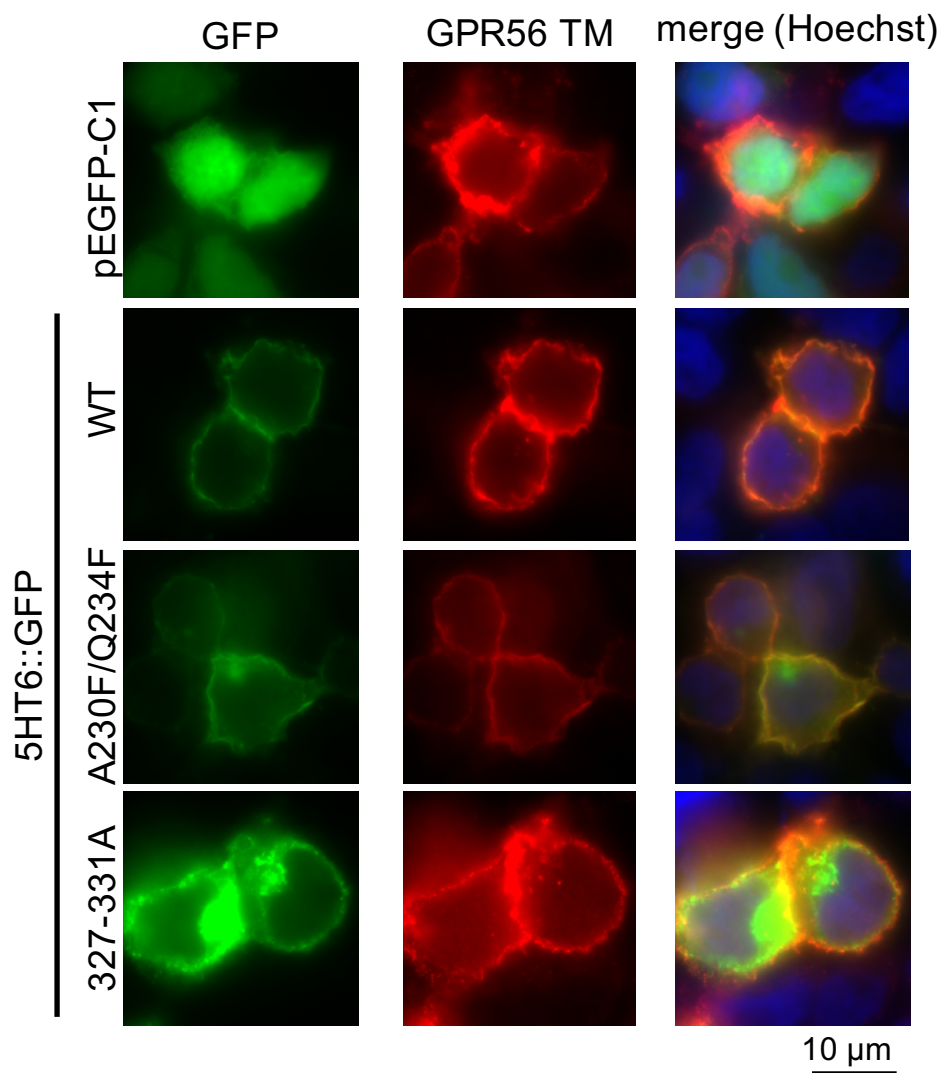


図 28. 5HT6 の CTS 変異体は細胞膜への発現量が減弱した

GFP、5HT6(WT)::GFP、5HT6(A230F/Q234F)::GFP、5HT6(327-331A)::GFP を GPR56(膜のマーカーとした)と共に HEK293T 細胞に遺伝子導入し、GPR56 抗体を用いて免疫染色を行なった。

第4章 考察

本研究では ciliary GPCR の一次繊毛局在機構を明らかにするために種々の解析を行った。以下にその結果を考察する。

4.1 5HT6 の一次繊毛局在を制御する分子群

これまで、5HT6 の一次繊毛局在に介在する分子は全く知られておらず、本研究において初めて 5HT6 の一次繊毛局在関連分子の解析が行われた。一次繊毛局在タンパク質の輸送に関わる既知の分子を含む 26 個の候補分子に着目し、5HT6 の一次繊毛局在に与える影響と相互作用を検証した。局在関連分子の候補の発現抑制により 5HT6 の一次繊毛への局在を有意に減少させ、さらに免疫沈降により 5HT6 と相互作用した分子として Rab12、Rab13、Rab8a、Arf4 が見出された。そのうち、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab12 は一次繊毛の根元(ciliary base)に局在し、IFT-B の一次繊毛局在に必要であることが最近報告された(Kanie et al., 2017) (図 29①)。また、Rab12 は当研究室の先行研究により、Rab8 との相互作用が示唆されている(太田麗央修士, 2015)。さらに、Rab8 は Arf4 と共に Rhodopsin の一次繊毛局在に介在していることから(Wang et al., 2012)、Arf4、Rab8、Rab12 が 5HT6 の一次繊毛局在に介在することが想定される(図 29②)。今回、FRAP 解析により Rab12 を発現抑制すると 5HT6::GFP の傾向回復にかかる時間が増加したことは、Rab12 が 5HT6 の一次繊毛局在を促進することを支持している。

Rab23、Kif17、および Rangap1 は遺伝子発現抑制により 5HT6 の一次繊毛への局在を有意に減少させたが、5HT6 との相互作用は弱い、あるいはほとんどみられなかった。Ragap1 は低分子量 GTP 結合タンパク質 Ran のグアニンヌクレオチド活性因子である。Kif17 は RanGTP/Importin 複合体を介して一次繊毛に局在し(Dishinger et al., 2010)、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab23 は Kif17 と IFT-B 複合体と共にドーパミン受容体 D1R の一次繊毛局在に必要であることが報告された (Leaf and Von Zastrow, 2015)。また、Rab23 は GTP 結合型で importin と結合し、Kif17 を一次繊毛に輸送することから(Lim and Tang, 2015)、Rab23、Kif17、Rangap1 が GPCR の一次繊毛局在において同経路で働くことが想定され、遺伝子発現抑制の結果から、5HT6 がこの経路にも依存している可能性が考えられる。一次繊毛に局在しないドーパミン受容体 D1R に恒常活性型 Rab23 を融合すると、一次繊毛への局在が誘導されたことから(Leaf and Von Zastrow, 2015)、GPCR が Rab23 と相互作用し、一次繊毛に局在することが想定される。しかしながら免疫沈降の結果から、Rab23/Kif17/Rangap1 と 5HT6 の相互作用はいずれも弱く(図 7)、さらに別の分子が 5HT6 および Rab23/Kif17/Rangap1 の間に介在する可能性も考えられた。

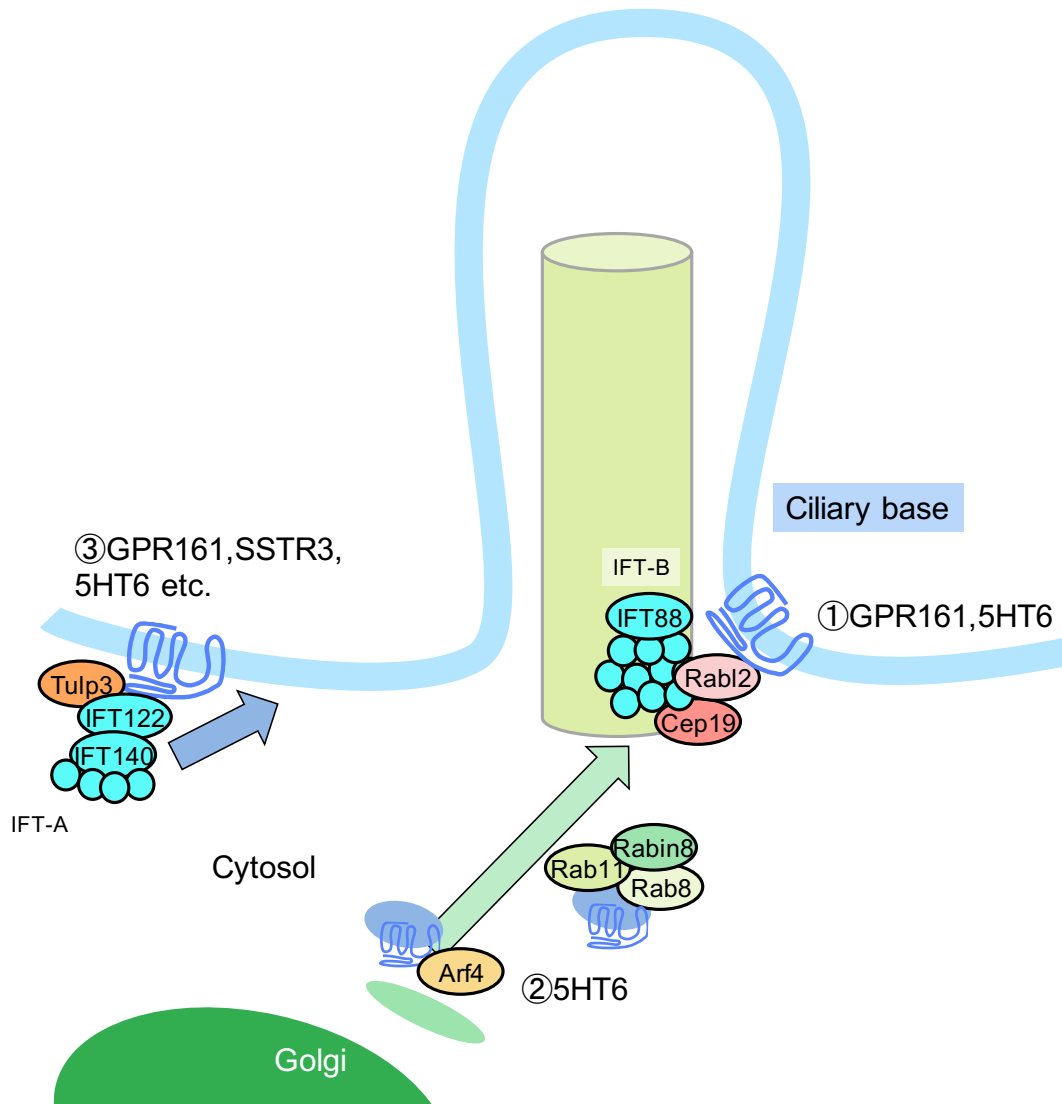


図 29. 本研究から想定された 5HT6、GPR161 および SSTR3 の一次繊毛局在制御機構のモデル。

①Rabl2 は Cep19 依存的に ciliary base に局在し、GPR161 および 5HT6 の一次繊毛局在を選択的に促進していると考えられる。Rabl2 は IFT88 を介して GPR161 の一次繊毛局在を制御していることが示唆された。②5HT6 は Arf4 および Rab8 を介してゴルジ体から一次繊毛へと運ばれることが想定される。③5HT6 は GPR161 および SSTR3 と同様に Tulp3 を介して IFT-A と結合し、一次繊毛へと運ばれることも考えられる。

今回、Tulp3 と 5HT6 の相互作用は調べられていないが、Tulp3 の発現抑制により、5HT6 の一次繊毛局在は減弱したことから(図 3B)、5HT6 も Tulp3 と相互作用して一次繊毛に局在する可能性も示唆された(図 29③)。

GPCR の一次繊毛局在には複数の輸送機構が想定される(図 30)。1.ゴルジ体から細胞膜を介した一次繊毛への局在機構、2.ゴルジ体から ciliary pocket を介した一次繊毛への局在機構、3.一次繊毛から細胞膜、あるいは細胞内への搬出機構、4.一次繊毛から内部移行した後、再び一次繊毛へと運搬されるリサイクル機構である。しかしながら、GPCR の局在制御分子がこれらの想定される輸送機構にどのように寄与しているかは不明である。今回、Rab12 は一次繊毛の根元に局在し、選択的に GPCR の一次繊毛局在を制御していることが示唆され、局所的な新たな GPCR 局在制御機構の存在が見えてきた。また、Tulp3 は phosphatidylinositol4,5-bisphosphate を介して細胞膜に局在していることから (Santagata et al., 2003)、Tulp3 は細胞膜を介して GPCR の一次繊毛局在に介在することが想定される。今後は GPCR の一次繊毛局在の詳細な分子機構を解明が進められるとともに、局在制御分子が GPCR を選択的に輸送する意義の解明が期待される。

4.2 Rab12 による ciliary GPCR の一次繊毛局在制御機構

Ciliary GPCR の局在化における Rab12 の機能を詳細に調べるため、本研究では 5HT6、GPR161 および SSTR3 の 3 種類の ciliary GPCR に着目した。Rab12 の発現抑制および過剰発現は 5HT6 および GPR161 の一次繊毛局在に影響したが、SSTR3 の一次繊毛局在への影響は弱かった(図 31)。このことから、Rab12 は GPCR の一次繊毛局在を選択的に制御している可能性が示唆された。Cep19 および IFT88 の発現抑制は SSTR3 の一次繊毛局在にほとんど影響しなかったことはこれを支持する。さらに、Tulp3 と IFT88 の発現抑制は相加的に GPR161 の一次繊毛局在を減弱させたことから(図 31)、Cep19 - Rab12 - IFT88 を介した局在機構は Tulp3 の制御を受けない新たな局在制御機構であることが示唆された。

5HT6 および GPR161 の一次繊毛局在は Rab12 により促進されることが示唆されたが、5HT6 は Rab12(QL)との相互作用が比較的強く、GPR161 は Rab12(QL)との相互作用は弱かった(図 31)。また、GPR161 は IFT88 を介して一次繊毛に局在することが示唆されたが、5HT6 は IFT88 の発現抑制による一次繊毛局在への影響を受けなかった(図 31)。5HT6 と GPR161 が Rab12 による局在制御を受けるにも関わらず、IFT88 の発現抑制による影響は異なった。なぜこのような違いがあるのかは不明であるが、GPR161 はソニックヘッジホッグシグナルを受け、一次繊毛から除去されることから(Mukhopadhyay et al., 2013)、局在制御分子との相互作用もシグナル依存的に変化する可能性が考えられた。

SSTR3 の一次繊毛局在における Cep19 - Rab12 - IFT88 の影響はほとんどなかったが、唯一、Rab12(SN)の過剰発現は SSTR3 の一次繊毛局在率を増加させた(図 31)。Rab12(SN)は

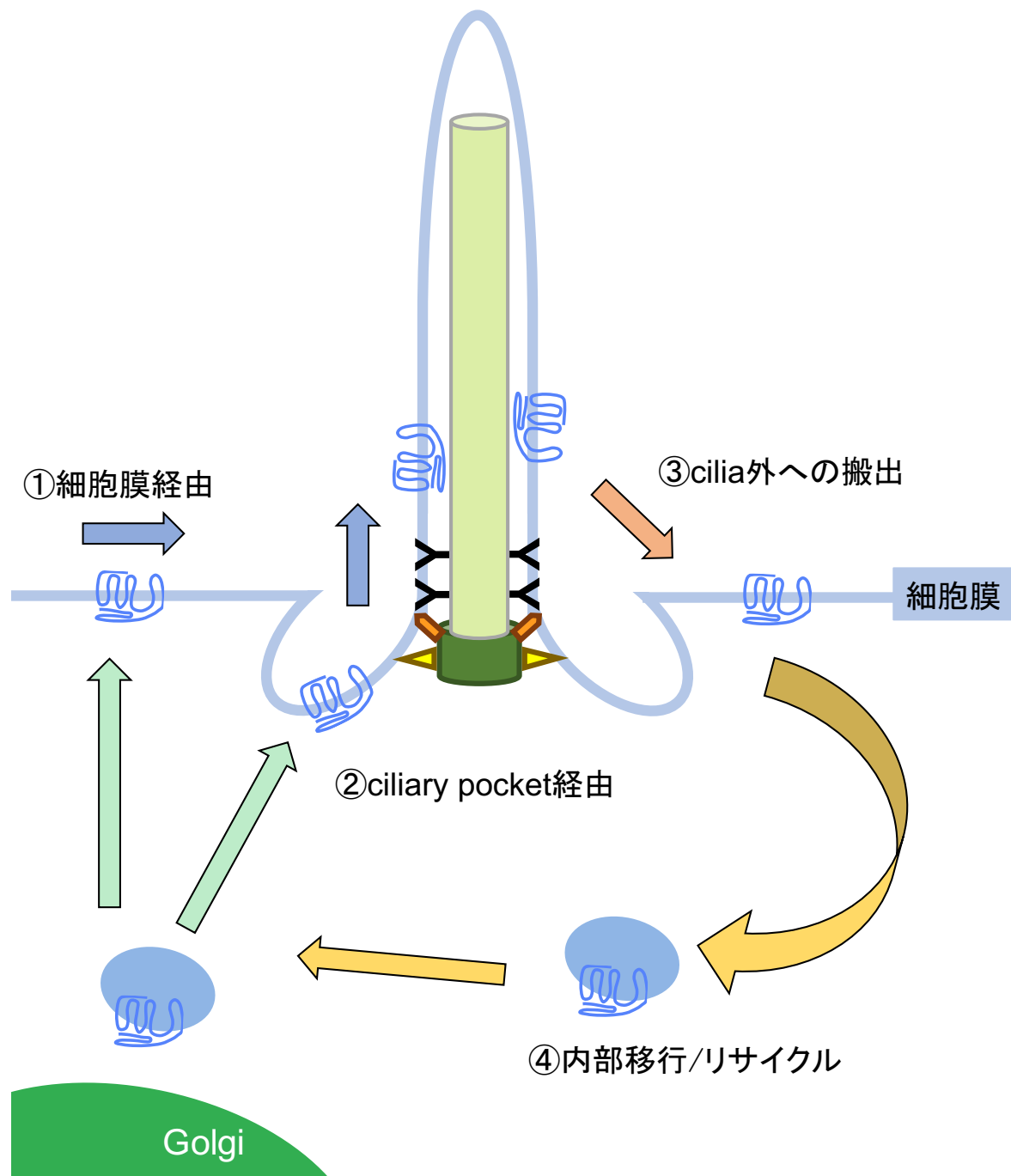


図 30.想定されている GPCR の輸送経路

①GPCR がゴルジ体から細胞膜を経由して一次繊毛へと運ばれる経路。②GPCR を含む小胞がゴルジ体から一次繊毛の根元にある ciliary pocket に融合し、GPCR が一次繊毛へと運ばれる経路。③一次繊毛に局在する GPCR が一次繊毛から細胞膜、あるいは細胞内に内部移行する経路。④内部移行した GPCR が①または②の経路を通過して再び一次繊毛へと運ばれるリサイクリング経路。

		5HT6	GPR161	SSTR3	IFT88	
Rab12	FRAP(T _{1/2})	↑ by Rab12 depletion	N.D.	N.D.	N.D.	
	IP	WT	◎	◎	N.D.	○*
		QL	○	△	N.D.	◎*
		SN	△	○	N.D.	△*
Ciliary localization						
Rab12	knock down	↓	↓	→	↓	
	over expression	QL ↑	QL ↑	SN ↑	QL ↑	
Cep19	knock down	N.D.	↓	→	N.D.	
IFT88	knock down	→	↓	→	—	
Tulp3	knock down	↓	↓	↓**	→	

図 31. GPCR の輸送機構における各種分子の機能解析のまとめ

FRAP 解析におけるオレンジの矢印は 50%回復時間 half time の増加を示す。

IP は免疫沈降の結果。◎は相互作用が強い、○は相互作用する、△は相互作用が弱い。

免疫染色による一次繊毛への局在の結果は矢印で示した。オレンジの矢印は一次繊毛局在率の増加、黄色の矢印はやや弱い増加、灰色の矢印は変化なし、水色の矢印は減少を示す。

N.D.は未解析。* Nishijima et al., 2017; ** Mukhopadhyay et al., 2010

一次繊毛の根元には局在せず、細胞内に拡散していることから、なぜ Rab12(SN)だけが SSTR3 の一次繊毛局在が増加したのかは不明である。

4.3 5HT6 の CTS 探索

本研究により、5HT6 の一次繊毛局在には細胞内 C 末端に含まれる $^{327}\text{RDFKR}^{331}$ が必要であることが新たに見出された。しかしながら、この 5 アミノ酸を全てアラニンに置換した変異体(327-331A)は細胞膜表面にほとんど運ばれず、細胞内の区画に滞っていた(図 28)。この原因として、 $^{327}\text{RDFKR}^{331}$ に含まれる疎水性アミノ酸であるフェニルアラニンが関与している可能性がある。ロドプシンの構造解析の結果、細胞内 C 末端領域に含まれるロドプシンの CTS でもある FR の配列が疎水性モチーフの核となっており、構造を維持する上でも重要であることが示唆されている(Palczewski et al., 2000)。5HT6 の $^{329}\text{FK}^{330}$ もロドプシンの FR と類似していることから構造維持に関与している可能性が考えられる。しかし、その一方で、 $^{329}\text{FKR}^{331}$ を $^{329}\text{AAA}^{331}$ に置換しても一次繊毛への局在に影響はなかったことから(図 27A)、329-331 a.a.の変異だけであれば、局在に必要なほかの分子との相互作用に影響するほどの構造変化はないと考える。

一次繊毛に局在する他の GPCR (GPR161、Sstr3、Mchr1)と比較すると(図 32A)、類似した配列 FK あるいは FR といった[疎水性アミノ酸]/[塩基性アミノ酸]が細胞内 C 末端領域の類似箇所が存在するだけでなく、その周辺に塩基性のアミノ酸が存在している。一次繊毛に局在しないセロトニン受容体 5HT7 の細胞内 C 末端領域の配列を比較すると(図 32B)、5HT6 の CTS に類似した 4 配列があり、どちらも FxRD[疎水性アミノ酸]/[塩基性アミノ酸]を含んでいる。しかしながら、CTS の機能性を検証した 5HT6 にはさらにアルギニン(塩基性アミノ酸)が含まれているが、5HT7 では極性を持たないスレオニンになっていることから、FK だけではなく、周辺のアミノ酸配列も重要であることが想定される。

Brodsky らは 5HT6 の i3 に含まれる($^{230}\text{ATAGQ}^{234}$)を欠損させる、あるいは 5HT6 の i3 を 5HT7 の i3 と置換させた 2 種類の変異体がいずれも 20%程度、一次繊毛に局在すると報告した(Brodsky et al., 2017)。これは、新たに 5HT6 の CTS として見出された細胞内 C 末端に含まれる $^{327}\text{RDFKR}^{331}$ が i3 における CTS($^{230}\text{ATAGQ}^{234}$)を否定するものではなく、5HT6 が複数の CTS を持つことが支持する。さらに、Tulp3 は GPR161、MCHR1 などの i3 に含まれる配列(GPR161:VKARK、MCHR1:APASQ)、あるいは細胞内領域に含まれる塩基性に富んだ配列に依存して膜タンパク質の一次繊毛局在に介在していることが示唆されている(Badgandi et al., 2017)。MCHR1 の CTS と類似した配列($^{230}\text{ATAGQ}^{234}$)を含む 5HT6 の i3 が一次繊毛局在に十分な配列であることが示唆されており(Berberi et al., 2008)、本研究で見出された細胞内 C 末端領域に含まれるアミノ酸配列 $^{327}\text{RDFKR}^{331}$ は塩基性に富むことから、Tulp3 が i3 あるいは細胞内 C 末端に見出されたアミノ酸配列を認識する可能性が想定される。Tulp3 の発現抑制による 5HT6 の一次繊毛局在の減弱はこれを支持する。5HT6 が i3 お

A. 5HT6 323 PLFMRDFKRA 332
 GPR161 344 NKTVRKELLG 353
 SSTR3 325 SYRFKQGFRR 334
 Mchr1 382 ETRKRLVLS 391

B. 5HT6 325 FMRDFKRALGRFVPCV 340
 5HT7 390 FNRDLRTYRSLLQCQ 405

図 32. GPCR の細胞内 C 末端領域に含まれる配列の比較

- A. 5HT6、GPR161、SSTR3、Mchr1 の細胞内 C 末端領域に含まれる配列の比較。黄色は今回見出された 5HT6 の CTS。赤は[疎水性アミノ酸]/[塩基性アミノ酸]、青は塩基性のアミノ酸。
- B. 5HT6 と 5HT7 の細胞内 C 末端領域に含まれる配列の比較。黄色は互いに類似する配列。

よび細胞内 C 末端領域に CTS を持つことを検証するには、5HT6 と 5HT7 の i3 あるいは細胞内 C 末端領域をそれぞれ置換したキメラ変異体を作製し、CTS の必要十分性を検証することが必要である。

今回、5HT6 の一次繊毛局在に関わる分子を探索し、Rab12、Rab13、Rab8、Arf4 など複数の分子に依存して局在することが示唆された。また、新たな局在制御分子として見出された Rab12 が選択的に GPCR の一次繊毛局在を制御している可能性が示唆された。Rab12 の詳細な分子機構を解析するにあたり、BBSome 複合体などの一次繊毛局在性タンパク質の局在機構への影響も検証すべきである。今後さらに、局在制御分子の機能解析および CTS の解析が進み、GPCR の一次繊毛局在制御機構の全貌が明らかになることが期待される。

第 5 章 参考文献

Badgandi, H., Hwang, S., Shimada, I., Lorient, E., and Mukhopadhyay, S. (2017). Tubby family proteins are adapters for ciliary trafficking of integral membrane proteins. *J Cell Biol.* *216*, 743-760.

Berbari, N., Lewis, J., Bishop, G., Askwith, C., and Mykytyn, K. (2008). Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* *105*, 4242-4246.

Brailov, I., Bancila, M., Brisorgueil, M., Miquel, M., Hamon, M., and Vergé, D. (2000). Localization of 5-HT(6) receptors at the plasma membrane of neuronal cilia in the rat brain. *Brain Res.* *872*, 271-275.

Brodsky, M., Lesiak, A., Croicu, A., Cohenca, N., Sullivan, J., and Neumaier, J. (2017). 5-HT6 receptor blockade regulates primary cilia morphology in striatal neurons. *Brain Res.* *1660*, 10-19.

Corbit, K., Aanstad, P., Singla, V., Norman, A., Stainier, D., and Reiter, J. (2005). Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature.* *437*, 1018-1021.

Deretic, D., Williams, A., Ransom, N., Morel, V., Hargrave, P., and Arendt, A. (2005). Rhodopsin C terminus, the site of mutations causing retinal disease, regulates trafficking by binding to ADP-ribosylation factor 4 (ARF4). *Proc Natl Acad Sci U S A.* *102*, 3301-3306.

Dishinger, J., Kee, H., Jenkins, P., Fan, S., Hurd, T., Hammond, J., Truong, Y., Margolis, B., Martens, J., and Verhey, K. (2010). Ciliary entry of the kinesin-2 motor KIF17 is regulated by importin- β 2 and RanGTP. *Nat Cell Biol.* *12*, 703-710.

Dwyer, N., Adler, C., Crump, J., L'Etoile, N., and Bargmann, C. (2001). Polarized dendritic transport and the AP-1 mu1 clathrin adaptor UNC-101 localize odorant receptors to olfactory cilia. *Neuron.* *31*, 277-287.

Eguether, T., San Agustin, J., Keady, B., Jonassen, J., Liang, Y., Francis, R., Tobita, K., Johnson, C., Abdelhamed, Z., and Lo, C. et al. (2014). IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment. *Dev Cell.* *31*, 279-290.

Geng, L., Okuhara, D., Yu, Z., Tian, X., Cai, Y., Shibasaki, S., and Somlo, S. (2006). Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J Cell Sci.* *119*, 1383-1395.

Green, J., Schmid, C., Bley, E., Monsma, P., Brown, A., Bohn, L., and Mykytyn, K. (2015). Recruitment of β -arrestin into neuronal cilia modulates somatostatin receptor subtype 3 ciliary localization. *Mol Cell Biol.* *36*, 223-35.

Hamon, M., Doucet, E., Lefèvre, K., Miquel, M., Lanfumey, L., Insausti, R., Frechilla, D., Del Rio, J., and Vergé, D. (1999). Antibodies and antisense oligonucleotide for probing the distribution and putative functions of central 5-HT₆ receptors. *Neuropsychopharmacology.* *21*, 68S-76S.

Händel, M., Schulz, S., Stanarius, A., Schreff, M., Erdtmann-Vourliotis, M., Schmidt, H., Wolf, G., and Höllt, V. (1999). Selective targeting of somatostatin receptor 3 to neuronal cilia. *Neuroscience*. 89, 909-926.

Hilgendorf, K., Johnson, C., and Jackson, P. (2016). The primary cilium as a cellular receiver: organizing ciliary GPCR signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 39, 84-92.

Hirano, T., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2017). Intraflagellar transport-A complex mediates ciliary entry and retrograde trafficking of ciliary G protein-coupled receptors. *Mol Biol Cell*. 28, 429-439.

Huangfu, D., Liu, A., Rakeman, A., Murcia, N., Niswander, L., and Anderson, K. (2003). Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature*. 426, 83-87.

Jacobshagen, M., Niquille, M., Chaumont-Dubel, S., Marin, P., and Dayer, A. (2014). The serotonin 6 receptor controls neuronal migration during corticogenesis via a ligand-independent Cdk5-dependent mechanism. *Development*. 141, 3370-3377.

Jastrzębska-Więsek, M., Siwek, A., Partyka, A., Kołaczkowski, M., Walczak, M., Smolik, M., Latacz, G., Kieć-Kononowicz, K., and Wesółowska, A. (2018). Study on the effect of EMD386088, a 5-HT6 receptor partial agonist, in enhancing the anti-immobility action of some antidepressants in rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 391, 37-49.

Kanie, T., Abbott, K., Mooney, N., Plowey, E., Demeter, J., and Jackson, P. (2017). The CEP19-RABL2 GTPase complex binds IFT-B to initiate intraflagellar transport at the ciliary base. *Dev Cell.* *42*, 22-36.e12.

Kobayashi, T., and Dynlacht, B. (2011). Regulating the transition from centriole to basal body. *J Cell Biol.* *193*, 435-444.

Kohen, R., Metcalf, M., Khan, N., Druck, T., Huebner, K., Lachowicz, J., Meltzer, H., Sibley, D., Roth, B., and Hamblin, M. (1996). Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J Neurochem.* *66*, 47-56.

Komatsuzaki, K., Murayama, Y., Giambarella, U., Ogata, E., Seino, S., and Nishimoto, I. (1997). A novel system that reports the G-proteins linked to a given receptor: a study of type 3 somatostatin receptor. *FEBS Lett.* *406*, 165-170.

Kotańska, M., Lustyk, K., Bucki, A., Marcinkowska, M., Śniecikowska, J., and Kołaczkowski, M. (2018). Idalopirdine, a selective 5-HT₆ receptor antagonist, reduces food intake and body weight in a model of excessive eating. *Metab Brain Dis.* DOI: 10.1007/s11011-017-0175-1.

Leaf, A., and Von Zastrow, M. (2015). Dopamine receptors reveal an essential role of IFT-B, KIF17, and Rab23 in delivering specific receptors to primary cilia. *Elife.* *4*. DOI: 10.7554/eLife.06996.

Li, Q., Wang, L., Zeng, L., Li, K., Jin, P., Su, B., and Wang, L. (2010). Evaluation of the novel gene Rabl3 in the regulation of proliferation and motility in human cancer cells. *Oncol Rep.* *24*, 433-440

Liew, G., Ye, F., Nager, A., Murphy, J., Lee, J., Aguiar, M., Breslow, D., Gygi, S., and Nachury, M. (2014). The intraflagellar transport protein IFT27 promotes BBSome exit from cilia through the GTPase ARL6/BBS3. *Dev Cell.* 3, 265-78.

Lim, Y., and Tang, B. (2015). A role for Rab23 in the trafficking of Kif17 to the primary cilium. *J Cell Sci.* 128, 2996-3008.

Lo, J., Jamsai, D., O'Connor, A., Borg, C., Clark, B., Whisstock, J., Field, M., Adams, V., Ishikawa, T., and Aitken, R. et al. (2012). RAB-like 2 has an essential role in male fertility, sperm intra-flagellar transport, and tail assembly. *Plos Genet.* 8, e1002969.

Loktev, A., and Jackson, P. (2013). Neuropeptide Y family receptors traffic via the Bardet-Biedl syndrome pathway to signal in neuronal primary cilia. *Cell Rep.* 5, 1316-1329.

Madhivanan, K., and Aguilar, R. (2014). Ciliopathies: the trafficking connection. *Traffic.* 15, 1031-1056.

Marley, A., and von Zastrow, M. (2010). DISC1 Regulates Primary Cilia That Display Specific Dopamine Receptors. *Plos ONE* 5, e10902.

Mukhopadhyay, S., Wen, X., Chih, B., Nelson, C., Lane, W., Scales, S., and Jackson, P. (2010). TULP3 bridges the IFT-A complex and membrane phosphoinositides to promote trafficking of G protein-coupled receptors into primary cilia. *Genes Dev.* 24, 2180-2193.

Mukhopadhyay, S., Wen, X., Ratti, N., Loktev, A., Rangell, L., Scales, S., and Jackson, P. (2013). The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell*. *152*, 210-223.

Nauli, S., Alenghat, F., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A., Lu, W., Brown, E., and Quinn, S. et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*. *33*, 129-137.

Nishijima, Y., Hagiya, Y., Kubo, T., Takei, R., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2017). RABL2 interacts with the intraflagellar transport-B complex and CEP19 and participates in ciliary assembly. *Mol Biol Cell*. *28*, 1652-1666.

Nozaki, S., Katoh, Y., Terada, M., Michisaka, S., Funabashi, T., Takahashi, S., Kontani, K., and Nakayama, K. (2017). Regulation of ciliary retrograde protein trafficking by the Joubert syndrome proteins ARL13B and INPP5E. *J Cell Sci*. *130*, 563-576.

Pal, K., Hwang, S., Somatilaka, B., Badgandi, H., Jackson, P., DeFea, K., and Mukhopadhyay, S. (2016). Smoothed determines β -arrestin-mediated removal of the G protein-coupled receptor Gpr161 from the primary cilium. *J Cell Biol*. *212*, 861-875.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C., Motoshima, H., Fox, B., Le Trong, I., Teller, D., Okada, T., and Stenkamp, R. et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. *289*, 739-745.

Pedersen, L., Mogensen, J., and Christensen, S. (2016). Endocytic control of cellular signaling at the primary cilium. *Trends Biochem Sci*. *41*, 784-797.

Qin, H., Wang, Z., Diener, D., and Rosenbaum, J. (2007). Intraflagellar transport protein 27 is a small G protein involved in cell-cycle control. *Curr Biol.* *17*, 193-202.

Reiter, J., and Leroux, M. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *18*, 533-547.

Rohatgi, R., Milenkovic, L., and Scott, M. (2007). Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science.* *317*, 372-376.

Santagata, S., Boggon, T., Baird, C., Gomez, C., Zhao, J., Shan, W., Myszka, D., and Shapiro, L. (2001). G-Protein signaling through tubby proteins. *Science* *292*, 2041-2050.

Schou, K., Pedersen, L., and Christensen, S. (2015). Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep.* *16*, 1099-1113.

Schulz, S., Händel, M., Schreff, M., Schmidt, H., and Höllt, V. (2000). Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J Physiol Paris* *94*, 259-264.

Sengupta, P. (2017). Cilia and sensory signaling: The journey from “animalcules” to human disease. *Plos Biol.* *15*, e2002240.

Silva, D., Huang, X., Behal, R., Cole, D., and Qin, H. (2012). The RABL5 homolog IFT22 regulates the cellular pool size and the amount of IFT particles partitioned to the flagellar compartment in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cytoskelet. (Hoboken NJ)* *69*, 33-48.

Wang, J., Morita, Y., Mazelova, J., and Deretic, D. (2012). The Arf GAP ASAP1 provides a platform to regulate Arf4- and Rab11-Rab8-mediated ciliary receptor targeting. *EMBO J.* *31*, 4057-4071.

Yi Lo, J., O'Connor, A., Andrews, Z., Lo, C., Tiganis, T., Watt, M., and O'Bryan, M. (2016). RABL2 Is Required for Hepatic Fatty Acid Homeostasis and Its Dysfunction Leads to Steatosis and a Diabetes-Like State. *Endocrinology.* *157*, 4732-4743.

Yun, H., Kim, S., Kim, H., Kostenis, E., Kim, J., Seong, J., Baik, J., and Rhim, H. (2007). The novel cellular mechanism of human 5-HT₆ receptor through an interaction with Fyn. *J Biol Chem.* *282*, 5496-5505.

Zaghloul, N., and Katsanis, N. (2009). Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest.* *119*, 428-437.

太田麗央 本学修士論文(2015)

謝辞

本論文は、著者が奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・バイオサイエンス専攻・博士課程において配属された分子情報薬理学研究室での研究成果をまとめたものである。

同研究室の教授である伊東広先生には指導教官として本研究の機会を与えていただきました。5 年間、研究の進め方、論文の書き方の丁寧なご指導を賜るとともに、研究室内外で多くの学びの機会をいただき、行き詰まった時に幾度も励ましてくださったことは決して忘れません。小林哲夫先生には、実験の手法の初歩から丁寧に教えていただき、一次繊毛の魅力、研究を進める上で必要な科学的手法だけでなく、コミュニケーションの大切さなど様々な方面でご指導をいただきました。研究を遂行する上で必要な多くの技術と知識を習得することは挑戦の連続でしたが、忍耐強くご指導くださった先生方に心より感謝申し上げます。

同専攻の教授である加藤順也先生、石田靖雅先生には副査として 5 年もの間、きめ細かなご助言、ご指導をいただき、厚く感謝申し上げます。

奈良先端科学技術大学院大学・情報科学研究科の Felix von Drigalski 氏には FRAP のデータ解析のご援助を頂きましたことを感謝申し上げます。

同研究室の梶紀子先生には研究技術を教えていただき、本研究を遂行することができました。研究生活を優しく支えてくださった先輩方、共に笑い励まし合った留学生たち、研究をする面白さを分かち合えた後輩たちの支えがあり、本研究を進めることができました。同期の堀部修平氏とは研究に関する議論をすることが多く、たくさんの発見と成長の機会を与えてくれました。秘書の方々には様々な手続きなどでお世話になるとともに、優しい言葉と笑顔にいつも励まされました。5 年間の研究室生活を支えてくださった研究室の皆様にこの場を借りてお礼申し上げます。

最後に、大学院生生活のために祈り、励ましながら支えてくれた友人たち、進学することを理解し、経済的にも精神的にも支えてくれた家族に感謝の意を申し上げます。