

博士論文（要約）

セミンタクト細胞を用いた
Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程の
再構成とその作用機序の研究

松戸 真理子

目次

略語	5
第 1 章 序論	8
1.1 Rab タンパク質の概要	8
1.2 Rab タンパク質の構造と活性制御	9
1.3 Rab タンパク質のオルガネラターゲティング機構	10
1.4 Rab6 の概要	15
1.5 Rab6A のゴルジ体ターゲティング機構の解析に用いるセミインタクト細胞アッセイの構築	16
第 2 章 結果	19
2.1 セミインタクト HeLa 細胞を用いた GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングアッセイの構築	19
2.2 GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに対する Rab6A のプレニル化、表在性膜タンパク質、および微小管の影響	22
2.3 GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関わる候補因子群の抽出と同定	24
2.4 生細胞における Rab6 の局在に対する BICD2 の影響	26
2.5 セミインタクト HeLa 細胞における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに対する BICD2 の影響	29
2.6 Rab6A のゴルジ体ターゲティングの動的平衡に対する BICD2 の影響	32
2.7 Rab6 の活性制御に対する BICD2 の影響	34
2.8 Rab6A 依存的な小胞輸送経路に対する BICD2 の影響	35
第 3 章 考察と結論	40
3.1 セミインタクト細胞アッセイの特長	40

3.2	GST-Rab6A のプレニル化	41
3.3	BICD1 および BICD2 の構造と機能	42
3.4	BICD2 の制御する Rab6A のゴルジ体ターゲティング機構のモデル	44
3.5	Rab6 のゴルジ体膜結合に対する BICD2 の影響	47
3.6	ゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路に対する BICD2 の機能	48
3.7	結論	49
第 4 章 材料と方法		50
4.1	試薬	50
4.2	抗体	50
4.3	細胞培養	52
4.4	プラスミド	52
4.5	プラスミドのトランスフェクション	54
4.6	siRNA	54
4.7	siRNA のトランスフェクション	55
4.8	蛍光抗体法	55
4.8.1	抗 Rab6 抗体あるいは抗 Rab6-GTP 抗体を用いた生細胞 (インタクト HeLa 細胞) の多重染色	56
4.8.2	抗 Rab6 抗体あるいは抗 Rab6-GTP 抗体以外の抗体を用いた生細胞の二重染色 あるいは単染色	57
4.9	タンパク質発現量の定量	57
4.10	細胞質の調製	58
4.11	ゴルジ体ターゲティングアッセイ	59
4.12	セミインタクト HeLa 細胞のノコダゾール処理	61

4.13	細胞分画法	61
4.14	リコンビナントタンパク質の調製	62
4.14.1	GST-Rab6A および GST の精製	62
4.14.2	His-mBICD2 の精製	63
4.15	GST プルダウンアッセイ	64
4.15.1	Rab6A 結合タンパク質の抽出と同定	64
4.15.2	細胞質からの GST-Rab6A 結合タンパク質の除去	65
4.16	共免疫沈降法	66
4.17	ウェスタンブロッティング	66
4.18	GT-GFP を用いた逆行輸送経路の解析	67
4.19	光褪色後蛍光回復 (FRAP) 法	68
4.20	Triton X-114 を用いた二相分配法	69
4.21	Alexa Fluor® 488 標識 CtxB を用いた逆行輸送経路の解析	70
4.22	VSVGts045-GFP を用いた順行輸送経路の解析	71
4.23	<i>In vitro</i> GEF アッセイ	71
4.24	統計解析	72
第 5 章 図表		74
第 6 章 参考文献		125
第 7 章 謝辞		143

略語

AP	aqueous phase
BFA	brefeldin A
BICD	Bicaudal-D
BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
CCV	clathrin-coated vesicle
cDNA	complementary DNA
CI-M6PR	cation-independent mannose-6-phosphate receptor
COPI	coat protein I
CtxB	cholera toxin B subunit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DP	detergent phase
EE	early endosome
ER	endoplasmic reticulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
FBS	fetal bovine serum
FKBP	FK506-binding protein domain
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
FRB	FKBP-rapamycin-binding domain
GAP	GTPase-activating protein
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GDF	GDI displacement factor

GDI	GDP dissociation inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GGPP	geranylgeranyl pyrophosphate
GST	glutathione S-transferase
GT	galactosyltransferase
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LE	late endosome
mant-GDP	2'-(3')-O-(N-methylanthraniloyl) GDP
PAR1	protease-activated receptor-1
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PI(3)P	phosphatidylinositol 3-phosphate
PM	plasma membrane
PVDF	polyvinylidene difluoride
RabF	Rab family
RabSF	Rab subfamily
RE	recycling endosome
REP	Rab escort protein
RGGT	Rab geranylgeranyl transferase
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA	small interfering RNA
SLO	streptolysin O
Stx1	Shiga toxin 1
SV	secretory vesicle/granule
TB	transport buffer
TBS	tris-buffered saline
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
TIP47	tail-interacting protein of 47 kDa
VSVGts045	ts045 vesicular stomatitis virus glycoprotein

第 1 章 序論

1.1 Rab タンパク質の概要

低分子量 GTP 結合タンパク質は、グアニンヌクレオチド (GTP あるいは GDP) と結合し GTP 加水分解酵素 (GTPase) 活性を持つタンパク質のうち、20-25 kDa 程度であり、単量体として機能するタンパク質の総称である (Takai *et al.* 2001; Wennerberg *et al.* 2005)。Ras スーパーファミリーは低分子量 GTP 結合タンパク質に属し、さまざまな細胞過程の制御を行っている。Ras スーパーファミリーは、一次構造の類似性によって少なくとも 5 つのファミリー (Ras、Rho、Rab、Arf/Sar1、Ran) に分類されており、それぞれ細胞増殖 (Ras)、細胞骨格再編成 (Rho)、細胞内小胞輸送 (Rab、Arf/Sar1)、核輸送 (Ran) を制御することが明らかになってきている (Takai *et al.* 2001; Wennerberg *et al.* 2005)。

Rab タンパク質は、その中でも最大のファミリーを構成しており、これまでに哺乳動物細胞では 60 種類以上、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では 11 種類が同定されている (Wennerberg *et al.* 2005; Stenmark 2009; Pfeffer 2013)。個々の Rab タンパク質は、それぞれが機能する特定のオルガネラにターゲティング・局在し (図 1) (Zerial & McBride 2001; Stenmark 2009; Mitra *et al.* 2011; Wandinger-Ness & Zerial 2014)、細胞内の輸送小胞 (transport vesicle) による輸送 (小胞輸送) のさまざまな段階を制御している (図 2) (Stenmark 2009; Wandinger-Ness & Zerial 2014)。Rab タンパク質が制御する段階は、輸送される積み荷タンパク質 (cargo) の選別、輸送小胞の形成、供与 (オルガネラ) 膜からの輸送小胞の出芽、細胞骨格に沿った輸送小胞の輸送、輸送小胞の特定の標的 (オルガネラ) 膜への繫留 (tethering)、輸送小胞と標的 (オルガネラ) 膜との融合 (fusion) といったさまざまな段階であることが分かっている (Stenmark 2009)。

Rab タンパク質は、Rab エフェクタータンパク質 (Rab effector protein) と呼ばれるタンパク質群と協調して、図 2 に示したような輸送のさまざまな段階の制御を行う。一般的に、Rab エフェクタータンパク質は、活性型 (GTP 結合型) の Rab タンパク質と選択的に相互作用するタンパク質

である (Pfeffer 2005)。Rab エフェクタータンパク質の局在は、それが結合する Rab タンパク質によって決まると言われている (Seabra & Wasmeier 2004)。そのため、Rab タンパク質が特定のオルガネラに正確にターゲティング・局在することは、Rab タンパク質の機能発現のためにも重要である。

1.2 Rab タンパク質の構造と活性制御

Rab タンパク質の特定オルガネラへのターゲティング機構の研究の現状を述べる前に、Rab タンパク質の一般的な構造とその活性制御機構についてふれる。Rab タンパク質には、活性型である GTP 結合型と不活性型である GDP 結合型があり、この二つの状態を行き来している (図 3) (Takai *et al.* 2001; Stenmark 2009; Pfeffer 2013)。Rab タンパク質の C 末端には、1 つあるいは 2 つ (多くの場合は 2 つ) のシステイン残基が存在する (図 4)。新たに生合成された Rab タンパク質 (GDP 結合型) は、Rab エスコートタンパク質 (Rab escort protein: REP) と複合体を形成してゲラニルゲラニル転移酵素 (Rab geranylgeranyl transferase (RGGT) あるいは geranylgeranyl transferase II) に提示され (図 3)、この酵素によって C 末端のシステイン残基にゲラニルゲラニル基 (geranylgeranyl group) が付加 (プレニル化 (prenylation)) される (Stenmark 2009; Wandinger-Ness & Zerial 2014)。

Rab タンパク質は、膜と細胞質の間を循環しており、一般的に、活性型である GTP 結合型の時は膜に結合し、不活性型である GDP 結合型の時は細胞質に存在する (Zerial & McBride 2001; Wandinger-Ness & Zerial 2014)。この 2 つの状態の変換 (活性制御) には、いくつかの因子の関与が知られている (図 3)。プレニル化された GDP 結合型の Rab タンパク質は、単体では細胞質において不安定であるが、GDP 解離抑制因子 (GDP dissociation inhibitor: GDI) と複合体を形成し、GDI が Rab タンパク質のゲラニルゲラニル基を覆うことによって、細胞質に安定的に存在する。この複合体から GDI が解離すると、GDP 結合型 Rab タンパク質は膜と結合することができ

るようになり、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF) の働きによって、Rab タンパク質に結合する GDP の GTP への交換 (GDP 結合型から GTP 結合型への変換) が促進される (活性化)。なお、GDP 結合型 Rab タンパク質からの GDI の解離は、GDI 置換因子 (GDI displacement factor: GDF) によって行われるという報告もある (Dirac-Svejstrup *et al.* 1997; Sivars *et al.* 2003)。結合するヌクレオチドによって、Rab タンパク質のスイッチ I およびスイッチ II と呼ばれる領域 (図 4) の立体構造が変化する (Pfeffer 2005)。これにより、GTP 結合型 Rab タンパク質は、数多くの Rab エフェクタータンパク質 (前述) と結合できるようになる。一方、GTP 結合型から GDP 結合型への変換 (不活性化) は、Rab タンパク質自身が持つ GTPase 活性によって、結合している GTP を加水分解することにより行われるが、この反応は GTPase 活性化タンパク質 (GTPase-activating protein: GAP) によって促進される (図 3) (Stenmark 2009; Wandinger-Ness & Zerial 2014)。

1.3 Rab タンパク質のオルガネラターゲティング機構

Rab タンパク質のオルガネラターゲティング機構については、多くの研究が報告されている。Rab タンパク質は、その C 末端のシステイン残基に付加されたゲラニルゲラニル基を介して、膜と結合する (Stenmark 2009)。このゲラニルゲラニル基が、Rab タンパク質の正確なターゲティング・局在に重要であるという報告もある (Calero *et al.* 2003; Gomes *et al.* 2003)。しかし、この C 末端領域のプレニル化は、すべての Rab タンパク質に共通する特徴であるため、これだけでは個々の Rab タンパク質が特定のオルガネラにターゲティング・局在する理由を十分には説明できない。また、初期の研究では、Rab タンパク質ごとに長さや配列が異なる、Rab タンパク質の C 末端約 35-40 アミノ酸残基の領域 (超可変領域 (hypervariable region)) (図 4) が、特定のオルガネラへの局在を決定するのではないかと考えられていた (Chavrier *et al.* 1991; Brennwald *et al.* 1993; Stenmark *et al.* 1994; Liu & Storrie 2012)。Chavrier ら (Chavrier *et al.* 1991) は、Rab タンパク質の特異的なターゲティング・局在に関わる領域を決定するため、Rab2、Rab5、Rab7 のキメ

ラタンパク質を作製し、キメラタンパク質の細胞内局在を BHK 細胞において蛍光抗体法と細胞分画法を用いて解析した。Rab2 は小胞体-ゴルジ体間中間コンパートメント (ER-Golgi intermediate compartment: ERGIC) にターゲティング・局在する Rab タンパク質であり (Chavrier *et al.* 1990)、小胞体-ゴルジ体間の輸送経路を制御する (Chavrier *et al.* 1990; Tisdale *et al.* 1992; Stenmark 2009; Sato *et al.* 2015)。Rab5 は初期エンドソームおよび形質膜にターゲティング・局在する Rab タンパク質であり (Chavrier *et al.* 1990)、形質膜におけるリガンドの隔離、形質膜由来のクラスリン被覆小胞 (clathrin-coated vesicle: CCV) の初期エンドソームへの輸送・初期エンドソームとの融合 (異型融合; heterotypic fusion)、初期エンドソーム同士の融合 (同型融合; homotypic fusion)、初期エンドソームの微小管に沿った輸送、インスリン刺激によるホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate: PI(3)P) の生成などに関与している (Chavrier *et al.* 1990; Gorvel *et al.* 1991; Zerial & McBride 2001; Lodhi *et al.* 2008)。Rab7 は後期エンドソームにターゲティング・局在する Rab タンパク質であり (Chavrier *et al.* 1990)、後期エンドソームやファゴソームの成熟・リソソームとの融合、後期エンドソームからリソソームへの輸送、トランスゴルジネットワーク (*trans*-Golgi network) へ輸送される積み荷タンパク質の選別に関与すると報告されている (Zerial & McBride 2001; Rojas *et al.* 2008; Stenmark 2009; Vardarajan *et al.* 2012; Wandinger-Ness & Zerial 2014)。Chavrier らの報告 (Chavrier *et al.* 1990) では、Rab5 の C 末端領域 34 アミノ酸残基を、Rab7 の C 末端領域 34 アミノ酸残基と置換したキメラタンパク質は、Rab7 と同様に、後期エンドソームにターゲティング・局在した。このキメラタンパク質をショ糖密度勾配法により分画したところ、後期エンドソームと同じ画分に分画された。また、Rab2 の C 末端領域 46 アミノ酸残基を Rab5 の C 末端領域 35 アミノ酸残基と置換したキメラタンパク質は、初期エンドソームへターゲティング・局在し、Rab2 の C 末端領域 46 アミノ酸残基を Rab7 の C 末端領域 35 アミノ酸残基と置換したキメラタンパク質は、後期エンドソームへターゲティング・局在した。Rab2 のキメラタンパク質を用いたこの解析結果から、Rab5 あるいは Rab7 の C 末端

領域は、それぞれ Rab2 の N 末端側領域を初期エンドソームあるいは後期エンドソームへとターゲティング・局在させることが示唆され、以上の結果から、Chavrier らは、Rab タンパク質の特異的なオルガネラターゲティング・局在を決定する配列が、C 末端の超可変領域に含まれることを報告している (Chavrier *et al.* 1990)。

しかし近年、それ以外のターゲティング・局在制御機構も報告されている。Ali らは、複数の領域が寄与するモデルを提唱し、超可変領域が Rab タンパク質の特定のオルガネラへのターゲティングを決定するとは限らず、超可変領域より N 末端側にある Rab family (RabF) モチーフや Rab subfamily (RabSF) モチーフに含まれる領域 (図 4) (Pereira-Leal & Seabra 2000) が、正確なターゲティングに必要であると報告している (Ali *et al.* 2004)。この報告 (Ali *et al.* 2004) では、Rab5 の超可変領域を、Rab1、Rab2、Rab7 の超可変領域と置換したキメラタンパク質を作製した。Rab1 は、小胞体、ERGIC およびゴルジ体にターゲティング・局在する Rab タンパク質であり (Stenmark 2009)、小胞体・ゴルジ体間の輸送に関与している (Zerial & McBride 2001; Soo *et al.* 2015)。Rab2、Rab5、Rab7 は、前述したように、それぞれ ERGIC、初期エンドソームおよび形質膜、後期エンドソームにターゲティング・局在する Rab タンパク質である (Chavrier *et al.* 1990)。Ali らの報告 (Ali *et al.* 2004) では、細胞において、それぞれのキメラタンパク質および野生型の Rab5 を強制発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、キメラタンパク質は、野生型 Rab5 と同様に初期エンドソームへの局在を示した。このことから、Rab1、Rab2、Rab7 の超可変領域は、Rab5 のターゲティング・局在を攪乱しないことが示唆された。反対に、Rab1 あるいは Rab2 の超可変領域を Rab5 の超可変領域と置換したキメラタンパク質を作製し、それらの細胞内局在を調べたところ、どちらのキメラタンパク質もゴルジ体マーカー Golgin-97 と共局在し、初期エンドソームマーカー Tfn-R とは共局在しなかった。続いて、Rab27 の超可変領域を Rab5 の超可変領域と置換したキメラタンパク質を作製した。Rab27 は、分泌顆粒 (secretory granule) やメラノソーム (melanosome) にターゲティング・局在する Rab タンパク質であり、分泌経路に関

与すると報告されている (Zerial & McBride 2001; Desnos *et al.* 2003; Tolmachova *et al.* 2004; Stenmark 2009; Pavlos *et al.* 2010; Cazares *et al.* 2014)。この Rab27 の超可変領域を Rab5 の超可変領域と置換したキメラタンパク質は、分泌顆粒にターゲティング・局在した。超可変領域を置換したキメラタンパク質を用いたこれらの局在解析結果から、Rab タンパク質のオルガネラターゲティング・局在に、超可変領域が重要でない場合があることが示唆された。続いて、Ali らは、Rab タンパク質のターゲティング・局在に対する RabF モチーフおよび RabSF モチーフ (図 4) の機能を調べるため、Rab5A と Rab27A について、この 2 つのモチーフの一部を置換したキメラタンパク質を作製した。Rab27A の RabSF3 領域を Rab5A の同領域と置換した Rab5A のキメラタンパク質、あるいは Rab5A の RabF4 領域を Rab27 の同領域と置換した Rab5A のキメラタンパク質は、小胞体マーカーPDI およびゴルジ体マーカーGolgin-97 と部分的に共局在した。同様に、Rab27A の RabSF2 領域を Rab5A の同領域と置換した Rab27A のキメラタンパク質は、主にゴルジ体マーカーGolgi-58K と共局在し、Rab27A の RabSF3 領域を Rab5A の同領域と置換した Rab27A のキメラタンパク質は、分泌顆粒ではなく小胞体やゴルジ体で観察された。RabSF モチーフあるいは RabF モチーフを置換したキメラタンパク質を用いたこれらの解析結果から、Ali らは、超可変領域以外の領域、特に Rab5A の RabF4 および RabSF3 領域や Rab27A の RabSF2 および RabSF3 領域は、オルガネラターゲティングに必要であると述べている。

個々の Rab タンパク質の一次構造上にオルガネラターゲティングのシグナルがあるという研究とは別に、GEF が、Rab タンパク質の特定のオルガネラへのターゲティング・局在に関わっているという報告もある (Gerondopoulos *et al.* 2012; Blümer *et al.* 2013)。Blümer ら (Blümer *et al.* 2013) は、GEF を人為的にミトコンドリアに局在させるため、FK506 結合タンパク質 (FK506-binding protein domain: FKBP) と FKBP ラパマイシン結合ドメイン (FKBP-rapamycin-binding domain: FRB) がラパマイシン存在下でヘテロダイマーを形成することを利用し、はじめに、ミトコンドリア局在配列 ActA の FRB 融合タンパク質および FKBP 融

合 Rabex-5 (Rab5A の GEF) を作製した。この 2 つのタンパク質を細胞で共発現させると、ラパマイシン非存在下では、Rabex-5 および Rab5A は内在性の各タンパク質と同様に初期エンドソームに局在し、ActA はミトコンドリアに局在した。しかし、ラパマイシン処理によって、FKBP 融合 Rabex-5 がミトコンドリアに移行し、それに伴って Rab5A もミトコンドリアに移行することが確認された。さらに、Blümer ら (Blümer *et al.* 2013) は、Rab1A に対する GEF 活性を持つ DrrA の GEF 活性ドメイン、および Rab8A の GEF Rabin8 の GEF 活性ドメインに関しても、同様の検証を行った。Rab1A は、小胞体、ERGIC およびゴルジ体にターゲティング・局在する Rab タンパク質である (Stenmark 2009; Wandinger-Ness & Zerial 2014)。Rab8A は主にリサイクリングエンドソームにターゲティング・局在する Rab タンパク質であり、トランスゴルジネットワークから形質膜への輸送に関与する (Stenmark 2009; Wandinger-Ness & Zerial 2014)。ラパマイシン存在下でミトコンドリアに局在した DrrA と Rabin8 の GEF 活性ドメインは、それぞれ Rab1A と Rab8A をミトコンドリアに移行させることが確認された。この、Rab5A、Rab1A および Rab8A のオルガネラターゲティング・局在が、それぞれの GEF を異所性に発現させることによって変化するという結果から、Blümer らは、GEF が Rab タンパク質の特異的な膜へのターゲティングの主要な決定因子である、と結論づけている。

さらに、Rab エフェクタータンパク質が、Rab タンパク質の特定オルガネラへのターゲティング・局在を促進する場合もある。Rab9 は、後期エンドソームにターゲティング・局在する Rab タンパク質であり、後期エンドソームからトランスゴルジネットワークへの輸送に関与すると報告されている (Zerial & McBride 2001; Stenmark 2009; Dong *et al.* 2013)。tail-interacting protein of 47 kDa (TIP47) は、Rab9 のエフェクタータンパク質の 1 つであるが、Rab9 の後期エンドソームへの局在に重要な役割を果たしていると報告されている (Ganley *et al.* 2004; Aivazian *et al.* 2006)。Ganley らは、TIP47 が Rab9 の安定性に関与していると報告している (Ganley *et al.* 2004)。Ganley らは、Rab9 のタンパク質安定性を調べるため、TIP47 をノックダウンした細胞を用いて、

パルスチェイス法を行った。その結果、Rab9 の半減期が 4 分の 1 に減少することが分かった (32 時間から 8 時間に变化した)。また、TIP47 をノックダウンすると、細胞質に存在する Rab9 が約 10%から約 20%に増加した。TIP47 ノックダウンによる Rab9 の半減期および細胞内局在の変化に関するこの結果から、Ganley らは、TIP47 が Rab9 タンパク質の安定性に重要であると結論づけている。

また、後期エンドソームの Rab タンパク質 Rab9 の正確なターゲティング・局在に、TIP47 が関与しているという報告がある (Aivazian *et al.* 2006)。Aivazian らはまず、初期エンドソームにターゲティング・局在する Rab5 の超可変領域を、後期エンドソームにターゲティング・局在する Rab9 の超可変領域と置換したキメラタンパク質 Rab5/9 を作製した。続いて、この Rab5/9 の green fluorescent protein (GFP) 融合タンパク質 (GFP-Rab5/9) の細胞内局在およびエフェクタータンパク質との相互作用を解析し、GFP-Rab5/9 は初期エンドソームにターゲティング・局在し、Rab9 のエフェクタータンパク質 TIP47 と結合することを確認している。TIP47 を GFP-Rab5/9 とともに強制発現させると、GFP-Rab5/9 の局在が変化して初期エンドソームから後期エンドソームへと移動することを確認し、この結果から、TIP47 と Rab5/9 の相互作用が、Rab9 の後期エンドソームへのターゲティング・局在に必要十分であると結論づけている。

このように、Rab タンパク質のオルガネラターゲティングの詳細な分子機構は、当初考えられていたよりも複雑であり、個々の Rab タンパク質の機能発現機構を知るためにも解明されるべき重要な課題である。

1.4 Rab6 の概要

本研究では、Rab タンパク質のうち、Rab6 に注目し、そのゴルジ体ターゲティング過程に関わる細胞質因子の同定を目的とした。Rab6 は、ゴルジ体 (Golgi apparatus) の中間嚢 (medial Golgi cisternae)、トランスゴルジ層 (*trans*-Golgi cisternae) およびトランスゴルジネットワークに局在

するという報告がある (Beranger *et al.* 1994b; Martinez *et al.* 1997)。このタンパク質は、主にゴルジ体-小胞体間の逆行輸送経路に関与しているという報告がある (Martinez *et al.* 1997; Girod *et al.* 1999; White *et al.* 1999)。ゴルジ体から小胞体への逆行輸送には、少なくとも2つの経路が存在する (Rothman & Wieland 1996; Girod *et al.* 1999)。よく知られているのは、コートタンパク質 I (coat protein I: COPI) 依存的な経路であり、この経路は KDEL 配列や KKXX 配列を持つタンパク質、例えばゴルジ体まで移動した小胞体常在性のタンパク質や小胞体-ゴルジ体間を循環するタンパク質を、COPI 被覆輸送小胞によって、小胞体へ戻す働きがある。また、この経路は、上記の配列を持つ cholera toxin などのタンパク質毒素の細胞 (表面) 膜からゴルジ体を経由した小胞体への逆行輸送にも関わっている (Lencer *et al.* 1995; Majoul *et al.* 1996)。一方、Rab6 は COPI 非依存的な経路を制御し、KDEL 配列や KKXX 配列を持たないタンパク質やタンパク質毒素の輸送に関与するという報告がある (Girod *et al.* 1999; White *et al.* 1999)。

Rab6 については、これまでに Rab6A、Rab6A'、Rab6B、Rab6C と呼ばれる4種類のアイソフォームが報告されている (Liu & Storrie 2012)。Rab6A と Rab6A' は哺乳動物細胞において普遍的に発現している (Echard *et al.* 2000)。一方 Rab6B は、脳細胞特異的に発現している (Opdam *et al.* 2000)。Rab6C は、一部の組織 (脳、精巣、前立腺、乳腺など) でのみ発現すると報告されている (Young *et al.* 2010)。Rab6A と Rab6A' は同様の遺伝的特性と生化学的活性を持つ (Echard *et al.* 2000) が、異なる機能を持つという報告もある (Mallard *et al.* 2002; Del Nery *et al.* 2006)。また、Rabkinesin-6 (KIF20A/RAB6KIFL/MKlp2 と呼ばれる) は、既知の Rab6 のエフェクタータンパク質の中では唯一、Rab6A と相互作用するが Rab6A' とは相互作用しないことが報告されている (Echard *et al.* 2000)。Rab6 に関しては、Rab6 の N 末端領域がゴルジ体への局在に必要であるという報告がある (Beranger *et al.* 1994b)。

1.5 Rab6A のゴルジ体ターゲティング機構の解析に用いるセミインタクト細胞アッセイ

の構築

本研究では、Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関わる細胞質タンパク質を探索するため、所属研究室の開発してきたセミインタクト細胞アッセイ (Kano *et al.* 2000; Kano *et al.* 2009; Kano *et al.* 2011) (図 5) を用いて、Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程の再構成を行った。続いて、このアッセイを最適化し、Rab6A のゴルジ体ターゲティングを検出・可視化する「ゴルジ体ターゲティングアッセイ」を構築した。

遺伝子やタンパク質は、細胞内において特定のタイミングで特定の場所に局在することで、その機能を最大限に発揮する。セミインタクト細胞アッセイでは、細胞をすりつぶして行う従来の生化学的手法では困難だった、単一の細胞内で起こるタンパク質機能発現のタイミングや機能発現の場所を可視化解析することができる。セミインタクト細胞とは、孔形成毒素や界面活性剤などを用いて、形質膜を部分的に透過性にした細胞である。本研究では、形質膜透過処理に、連鎖球菌の酵素感受性毒素ストレプトリシン O (streptolysin O: SLO) を用いた (Bhakdi *et al.* 1985; Kano *et al.* 2012)。SLO はコレステロールに選択的に結合するが、これが多量体の環状複合体を形成することによって、形質膜に穴が開く。形質膜の穴から細胞質は流出するが、オルガネラや細胞骨格はそのまま保持される。セミインタクト細胞アッセイでは、セミインタクト細胞に、別に調製した細胞質成分やタンパク質、エネルギー源として ATP 再生系などを加えてインキュベートすることで、添加した細胞質成分に依存的な細胞内現象を再構成・可視化することができる。さまざまな条件下の細胞から調製した細胞質成分、タンパク質、抗体やプラスミドを細胞に加えることができるため、セミインタクト細胞を用いることで、再構成した細胞内現象に不可欠な因子を探索し、解析・検証することができる。

前述したとおり、Rab タンパク質が特定のオルガネラに正確にターゲティング・局在することは、Rab タンパク質の機能発現のためにも重要である。なぜなら、Rab エフェクタータンパク質の局在は、それが結合する Rab タンパク質によって決まると言われ (Seabra & Wasmeier 2004)、Rab

タンパク質と Rab エフェクタータンパク質が協調することで輸送のさまざまな段階の制御 (図 2) を行うからである。細胞骨格系やオルガネラの細胞内配置やトポロジーを保持した状態で、さまざまな生化学的解析ができるセミインタクト細胞アッセイは、Rab タンパク質のオルガネラターゲティング機構の解析に最適な系であると考えられる。そこで、本研究では、このアッセイ系を用いて、大腸菌から調製した Rab6A の glutathione S-transferase (GST) 融合リコンビナントタンパク質 (GST-Rab6A) の細胞質依存的なゴルジ体ターゲティングを再構成した。

続いて、GST-Rab6A の細胞質依存的なゴルジ体ターゲティングに必要な因子を探索するため、GST プルダウンアッセイを用いて、細胞質成分から GST-Rab6A 結合タンパク質群を抽出した。このタンパク質群を SDS-PAGE を用いて分離し、Rab6A に特異的に結合したタンパク質を質量分析法 (liquid chromatography–tandem mass spectrometry: LC–MS/MS) により解析し、Rab6A ゴルジ体ターゲティングの制御候補因子を同定した。続いて、構築したゴルジ体ターゲティングアッセイや生細胞を用いて解析を行い、Rab6A のゴルジ体ターゲティングに対する候補因子の機能を検証した。以上の戦略で絞った候補因子に対して、さらに、ゴルジ体を起点あるいは経由する順行・逆行輸送経路について詳細に解析を行い、候補因子が制御する Rab6A の機能の生理的意義を解析することで、この候補因子が Rab6 を介して制御する細胞機能に迫った。

第 2 章 結果

2.1 セミインタクト *HeLa* 細胞を用いた *GST-Rab6A* のゴルジ体ターゲティングアッセイの構築

Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関与する因子を探索するために、リコンビナントタンパク質として作製した *GST* 融合 *Rab6A* タンパク質 (*GST-Rab6A*) のゴルジ体ターゲティング過程を、セミインタクト細胞アッセイを用いて再構成した。概略は図 6 の通りである。実験手順の概要としては、①大腸菌で *GST-Rab6A* を作製する、②*HeLa* 細胞の形質膜を透過性にする（セミインタクトにする）、③細胞質とともに *GST-Rab6A* をセミインタクト *HeLa* 細胞に添加しインキュベートする、④*GST-Rab6A* の細胞内局在を蛍光標識した抗 *GST* 抗体を用いて検出する、となる。

はじめに、大腸菌発現系を用いて *GST-Rab6A* の発現と精製を行った（詳細は 4.14.1 の項を参照）。*GST-Rab6A* の大腸菌発現プラスミドを導入した大腸菌株 BL21 を、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 存在下で、30°C で 3 時間大量培養した。超音波破碎した後、Glutathione Sepharose 4B ビーズを用いて *GST-Rab6A* を精製した。精製した *GST-Rab6A* の精製度を確認するため、溶出タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) により泳動後、Coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行ったところ、*GST-Rab6A* は単一のバンドとして検出された（図 7A）。抗 *Rab6* 抗体を用いたウェスタンブロットティングの結果、CBB 染色で検出されたバンドは *Rab6* であることを確認することができた（図 7B）。以降のアッセイでは、この *GST-Rab6A* を用いることとした。

次に、*HeLa* 細胞のセミインタクト化の条件検討を行った。先行研究 (Kano *et al.* 2000) を基に SLO の濃度と処理時間の検討を行った結果、*HeLa* 細胞を 0.20 μ g/ml の SLO とともに氷上で 5 分間インキュベート後、32°C で 5 分間 transport buffer (TB) でインキュベートすることで、細胞が膜非透過性核酸染色試薬プロピジウムアイオダイド染色陽性になり、形質膜が透過性になる（セ

ミインタクトになる) ことが確認された。以降はこの条件でセミインタクト化を行うこととした。

続いて、セミインタクト HeLa 細胞に GST-Rab6A を添加することで、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程の再構成を行った(詳細は 4.11 の項を参照)。カバーガラスで培養した HeLa 細胞に上記の条件で SLO 処理を行い、セミインタクトにした。ここに、5 µg/100 µl の精製した GST-Rab6A、ATP 再生系 (1 mM ATP、50 µg/ml creatine kinase、2.62 mg/ml creatine phosphate)、1 mg/ml の glucose および 1 mM の GTP を、マウスリンパ腫由来の L5178Y 細胞から調製した細胞質(最終濃度 3 mg/ml) 存在下あるいは非存在下で、32°C で 30 分間インキュベートした。TB で洗浄後、細胞にパラホルムアルデヒド溶液を加えて室温で 30 分間インキュベートすることにより固定し、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いて直接蛍光抗体法を行った(以降、この実験のことを「ゴルジ体ターゲティングアッセイ」と呼ぶ)。LSM510 共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、細胞質非存在下では GST-Rab6A のシグナルは核近傍領域にかすかにしか見えなもののに対し、細胞質存在下では GST-Rab6A が核近傍領域に強く局在することが分かった(図 8A)。蛍光強度を基に、GST-Rab6A の核近傍領域へのターゲティング量を定量したところ(詳細は 4.11 の項を参照)、細胞質非存在下での蛍光強度を 1 とした時、細胞質存在下では約 1.64 になり(図 8B)、GST-Rab6A の核近傍領域へのターゲティングは細胞質依存性があることが分かった。

続いて、GST-Rab6A がターゲティングした領域がゴルジ体であるかどうかを、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体、およびオルガネラマーカータンパク質に対する抗体を用いた二重染色により確認した。マーカータンパク質として、ERGIC-53 (ERGIC)、GM130 (シスゴルジ層)、p230 (トランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワーク)、EEA1 (初期エンドソーム) に対する抗体を使用した。セミインタクト HeLa 細胞に GST-Rab6A を添加し、L5178Y 細胞質存在下で、32°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を固定し、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体とそれぞれのオルガネラマーカーに対する抗体を用いて蛍光抗体法を行った。その結果、トランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワークのマーカー p230 と GST-Rab6A は強く

共局在することが分かった (図 9)。一方、ERGIC-53 や GM130 とは近くにあり一部の局在が重なるものの完全な一致は確認されなかった (図 9)。また、GST-Rab6A と EEA1 の局在は一致しなかった (図 9)。以上の結果より、GST-Rab6A はゴルジ体の特にトランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワークに強くターゲティングすることが明らかとなった。セミインタクト HeLa 細胞における GST-Rab6A の局在は、インタクト HeLa 細胞における内在性 Rab6 の細胞内局在と同じであることが確認できた (Goud *et al.* 1990; Antony *et al.* 1992; Beranger *et al.* 1994b)。

次に、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングの細胞質濃度依存性を検証した。セミインタクト HeLa 細胞に GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP および 0、0.5、1、3 mg/ml の L5178Y 細胞質を添加し、32°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を固定し、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いて細胞を染色した。GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量を、核近傍領域で検出される蛍光強度を基に定量した結果、細胞質濃度の増加に従って、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量が増加することが分かった (図 10)。L5178Y 細胞質の調製 (詳細は 4.10 の項を参照) によって安定的に得られる細胞質濃度の上限が、4 mg/ml 程度であったため、ゴルジ体ターゲティングアッセイを用いた以降の検証では、3 mg/ml の L5178Y 細胞質を基準として使用した。

続いて、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングの時間依存性を検証した。セミインタクト HeLa 細胞に GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、3 mg/ml の L5178Y 細胞質を添加し、32°C で 5、10、30、70 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を固定し、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いて細胞を染色し、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量を定量した。図 11 で示す通り、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは 32°C でインキュベート後、30 分をピークとして、それ以降はターゲティング量の増加が認められなかった。よって、ゴルジ体ターゲティングアッセイには、30 分間のインキュベートで十分であることが分かった。

以降の GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングの検証では、3 mg/ml の L5178Y 細胞質存在下

で、32°C で 30 分間インキュベートする条件を基準とし、さまざまな条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量を比較することとした。

2.2 GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに対する Rab6A のプレニル化、表在性膜タンパク質、および微小管の影響

Rab タンパク質が脂質二重膜に挿入されるためには、Rab タンパク質がプレニル化されている必要がある (Johnston *et al.* 1991; Khosravi-Far *et al.* 1991; Kinsella *et al.* 1992)。また、プレニル化が Rab タンパク質の正確なターゲティング・局在に不可欠であるという報告もある (Calero *et al.* 2003; Gomes *et al.* 2003)。これらの報告を踏まえ、続いて、界面活性剤 Triton X-114 を用いた二相分配法 (Triton X-114 phase partitioning) を行い、ゴルジ体ターゲティングアッセイの L5178Y 細胞質存在下において、GST-Rab6A がプレニル化されているかどうかを検証した。この手法は、膜タンパク質を含む疎水性タンパク質の分離に用いられる手法であり、プレニル化された Rab タンパク質は界面活性剤の相 (detergent phase: DP) に回収される (Bordier 1981; Brusca & Radolf 1994; Bustos *et al.* 2012)。

GST-Rab6A を、セミインタクト HeLa 細胞とともに細胞質存在下 (図 8A の Cytosol (+) 条件と同様) あるいは細胞質非存在下 (図 8A の Cytosol (-) 条件と同様) において 32°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を回収し、Triton X-114 を用いた二相分配法に供した (詳細は 4.20 の項を参照)。その結果、一部の GST-Rab6A が DP に回収された (図 12A)。また、細胞非存在下で GST-Rab6A を L5178Y 細胞質とともにインキュベートした場合 (図 12B の Cytosol (+)) も、DP において GST-Rab6A が検出された (図 12B; プレニル化のネガティブコントロールとして、L5178Y 細胞質の代わりに TB を使用 (図 12B の Cytosol (-))) ことから、細胞質とインキュベートを行うことで、一部の GST-Rab6A が DP に回収されることが分かった。これらの結果から、ゴルジ体ターゲティングアッセイにおいて、L5178Y 細胞質と 32°C で 30 分間

インキュベートする間に、GST-Rab6A の一部がプレニル化されることが示唆された。

図 8 で示したように、細胞質非存在下 (Cytosol (-) 条件) でも、核近傍 (ゴルジ体) 領域に GST-Rab6A のかすかな蛍光シグナルが検出された。このことから、セミインタクト HeLa 細胞に残存する細胞質成分が、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関与している可能性も考えられる。強塩濃度条件ではタンパク質相互作用が阻害され、細胞骨格や膜に強く結合している表在性膜タンパク質が外れることが報告されている (Drenan *et al.* 2004; Boldogh *et al.* 2007)。そこで、セミインタクト HeLa 細胞を高塩濃度バッファー (KCl を含む TB (コントロールとして、KCl を含まない TB)) で洗浄した後、ゴルジ体ターゲティングアッセイを行った。その結果、強塩濃度処理条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量は、コントロール条件 (1.63 ± 0.05) と比較して 1.18 ± 0.03 まで減少した (図 13)。この結果から、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程には、表在性膜タンパク質が関与していることが示唆された。GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは細胞質依存性があった (図 8) ことも踏まえると、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関わる因子が細胞質に含まれており、その因子が他の表在性膜タンパク質と協調的に GST-Rab6A のターゲティングを制御しているか、あるいはその制御因子自身が表在性膜タンパク質である可能性が考えられた。

Rab6A は、微小管に沿った小胞輸送に関与していると報告されている (Young *et al.* 2005; Grigoriev *et al.* 2007)。この 2 つの報告から、ゴルジ体へ輸送される輸送小胞によって、GST-Rab6A がゴルジ体へ運ばれている可能性も考えられる。言い換えると、セミインタクト HeLa 細胞で細胞質依存的に増加した GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量は、微小管に沿った小胞輸送によるものを示している可能性がある。そこで、GST-Rab6A の細胞質依存的なゴルジ体ターゲティングが微小管依存的かどうかを検証するため、微小管重合阻害剤ノコダゾール (nocodazole) 処理によって微小管を破壊したセミインタクト HeLa 細胞を用いて、ゴルジ体ターゲティングアッセイにより、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに対する微小管の影響を評価した。先行研究

(Kano *et al.* 2000) では、2 $\mu\text{g/ml}$ のノコダゾールを用いて細胞を処理することにより、オルガネラの形態に大きな影響を及ぼすことなく微小管を破壊している。この報告を参照し、HeLa 細胞を、2 $\mu\text{g/ml}$ のノコダゾール存在下で、37°Cで 20 分間インキュベートした後、細胞をセミインタクトにし、1 $\mu\text{g/ml}$ のノコダゾールを含む L5178Y 細胞質を加えて、ゴルジ体ターゲティングアッセイを行った(詳細は 4.11 および 4.12 の項を参照)。Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体と抗 β -tubulin 抗体を用いて蛍光抗体法を行ったところ、ノコダゾール未処理細胞では、抗 β -tubulin 抗体によって微小管が染色された(図 14 の Nocodazole (-))が、ノコダゾール処理細胞では、抗 β -tubulin 抗体によって微小管が染色されなかった(図 14 の Nocodazole (+))。一方、同じ条件の細胞について、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体と抗 p230 抗体を用いて蛍光抗体法を行ったところ、ノコダゾール処理細胞でも、ノコダゾール未処理細胞と同様に、抗 p230 抗体によって断片化していないトランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワークが検出された(図 14)。この p230 染色の結果から、ノコダゾール処理細胞でも、ゴルジ体の構造が破壊されないことが確認された。この Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体と抗 p230 抗体を用いて蛍光抗体法を行った細胞では、GST-Rab6A は、ノコダゾール処理細胞でもノコダゾール未処理細胞の場合と同様に、p230 と強く共局在した(図 14)。GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量を定量したところ、ノコダゾール処理細胞でもノコダゾール未処理細胞と同程度、ゴルジ体にターゲティングすることが分かった(図 15)。このことから、セミインタクト HeLa 細胞のゴルジ体において細胞質依存的に増加した GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量(図 8 および 9)は、微小管非依存的であることが示唆された。

2.3 GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関わる候補因子群の抽出と同定

GST-Rab6A は細胞質依存的にゴルジ体にターゲティングしたことから(図 8 および 9)、ゴルジ体ターゲティングに必要な因子は細胞質中にあることが分かった。この因子は Rab6A へ作用し

その機能を制御することから Rab6A に直接結合する可能性があると考え、以下のような方法で Rab6A 結合タンパク質がゴルジ体ターゲティングに関与するかどうかを検討した (図 16)。概略としては、大量の GST-Rab6A と細胞質をインキュベートした後、Glutathione Sepharose 4B ビーズで GST-Rab6A および GST-Rab6A 結合タンパク質の複合体を沈殿させ、上清として GST-Rab6A 結合タンパク質が除去された細胞質を調製する。次に、この細胞質を用いてゴルジ体ターゲティングアッセイを行い、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングが阻害されていれば、GST-Rab6A 結合タンパク質がターゲティングに関与すると言えると考えた。

まず、細胞質から GST-Rab6A 結合タンパク質群を除去した (図 16 の Sup)。GST-Rab6A と細胞質を混合して遠心後、得られた上清を、GST-Rab6A 結合タンパク質除去細胞質 (以下、Cytosol (-RBP) と表記する) とした。コントロールとして、L5178Y 細胞質を GST と混合してインキュベートし、GST 結合タンパク質除去細胞質 (以下、Cytosol (-GST) と表記する) を調製した。図 16 で示したように、遠心後に得られる沈殿 (ビーズ画分) には、GST-Rab6A およびその結合タンパク質 (コントロールとして、GST およびその結合タンパク質) が含まれる。一方、上清 (Cytosol (-RBP)) には、それらのタンパク質は含まれないと考えられる。Cytosol (-RBP) および Cytosol (-GST) について、抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、ビーズ分離前の混合液 (Input) と比較して、遠心後に得られた上清 (Depleted (supernatant)) では、GST-Rab6A あるいは GST は確認されなかった (図 17) ことから、GST-Rab6A あるいは GST は、その大部分が上清 (Cytosol (-RBP) あるいは Cytosol (-GST)) に残っていないと考えられる。

そこで、続いて、ゴルジ体ターゲティングアッセイを用いて、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに対する Cytosol (-RBP) および Cytosol (-GST) の影響を検証した。その結果、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量は、Cytosol (-GST) 存在下では、未処理の L5178Y 細胞質存在下 (1.52 ± 0.01 、図 8A の Cytosol (+) と同様の条件) と比較して、減少 (1.39 ± 0.04) することが分かつ

た (図 18)。この減少は、GST プルダウンアッセイ中の長時間にわたる 4℃でのインキュベートによって、Cytosol (–GST) の成分が一部失活したことによるものだと考えられる。一方、Cytosol (–RBP) 存在下では、Cytosol (–GST) 存在下と比較して、GST–Rab6A のターゲティングが大幅に減少 (1.08 ± 0.05) することが分かった (図 18B)。これらの結果から、GST プルダウンアッセイによって GST–Rab6A とともに細胞質から除去された Rab6A 結合タンパク質が、GST–Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関与していることが示唆された。

そこで次に、GST あるいは GST–Rab6A とインキュベートし回収されたビーズ画分の中から、GST–Rab6A のビーズ画分に特異的に濃縮されているタンパク質群を見つけることで、Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御に関わる候補因子の探索・同定を行った。まず、GST–Rab6A ビーズ画分 (コントロールとして、GST ビーズ画分) (図 16 を参照) の Glutathione Sepharose 4B ビーズから、タンパク質を溶出させた (詳細は 4.15.1 の項を参照)。溶出タンパク質を SDS-PAGE により泳動し、SYPRO Ruby 染色により検出したところ、GST–Rab6A ビーズ画分特異的な約 100 kDa のバンドが確認された (図 19A)。このバンドをゲルから切り出し、LC-MS/MS により解析したところ、Bicaudal-D (BICD) 2 であることが明らかとなった (表 1)。このバンドは、抗 BICD2 抗体を用いたウェスタンブロッティングによっても検出された (図 19B)。さらに、Cytosol (–RBP) および Cytosol (–GST) について、抗 BICD2 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、Cytosol (–RBP) に含まれる BICD2 の量が、Cytosol (–GST) のそれと比較して減少していることが確認された (図 20)。これらの結果から、Rab6A と結合する細胞質タンパク質が、セミインタクト HeLa 細胞において GST–Rab6A のゴルジ体ターゲティングを制御していること、および細胞質タンパク質 BICD2 がその候補因子であることが示唆された。

2.4 生細胞における Rab6 の局在に対する BICD2 の影響

前項までの結果を踏まえ、続いて、低分子干渉 RNA (small interfering RNA: siRNA) による

RNA 干渉法を用いて解析を行い、生細胞（インタクト HeLa 細胞）において、Rab6A ゴルジ体ターゲティング制御の候補因子 BICD2 が内在性 Rab6 の細胞内局在に関与しているかについて、検証を行った。siRNA のオフターゲット効果による影響を最小限に抑えるため、BICD2 に対する 2 つの異なる siRNA (BICD2 siRNA #1、BICD2 siRNA #2) を検証に使用した。ノックダウン効率を確認するため、HeLa 細胞に BICD2 siRNA #1、BICD2 siRNA #2、あるいはコントロールとして scramble siRNA をトランスフェクションした。トランスフェクションしてから 72 時間後、細胞を溶解し、抗 BICD2 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果、BICD2 siRNA をトランスフェクションした HeLa 細胞における BICD2 の発現量は、コントロール細胞のそれと比較して、約 20-30%まで減少した (BICD2 siRNA #1 トランスフェクション細胞では $28.91\% \pm 7.83\%$ 、BICD2 siRNA #2 トランスフェクション細胞では $24.02\% \pm 5.22\%$; 図 21)。抗 Rab6 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、BICD2 をノックダウンした細胞でも、Rab6 タンパク質発現量の大きな変化は確認されなかった (図 21)。

これを踏まえ、続いて、BICD2 ノックダウン細胞における内在性 Rab6 の細胞内局在を解析するため、BICD2 siRNA あるいは scramble siRNA をトランスフェクションして 72 時間後の HeLa 細胞を固定し、抗 Rab6 抗体および抗 p230 抗体（ゴルジ体マーカーとして使用）を用いて、蛍光抗体法による二重染色を行った。HeLa 細胞では、Rab6 のアイソフォームは Rab6A と Rab6A' の 2 種類のみが発現している (Opdam *et al.* 2000; Young *et al.* 2010) が、この 2 つのアイソフォームは互いに類似性が高く、3 アミノ酸残基しか違いがない (Echard *et al.* 2000) ため、Rab6A を特異的に認識する抗体は入手できなかった。そこで、生細胞を用いた検証では、Rab6A と Rab6A' の両方を認識する抗 Rab6 抗体を使用した。その結果、BICD2 ノックダウン細胞において、ゴルジ体領域 (p230 と共局在する領域) の Rab6 の量に関しては、コントロール細胞と比較して大きな変化は確認されなかったが、細胞質領域の Rab6 の量に関しては、増加が観察された (図 22A)。そこで、ゴルジ体領域における Rab6 の量を、蛍光強度を基に定量したところ、BICD2 ノックダ

ウンにより、ゴルジ体領域に存在する Rab6 が減少することが分かった (図 22B)。さらに、抗 Rab6 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、BICD2 をノックダウンした細胞でも、Rab6 タンパク質発現量の大きな変化は確認されなかった (図 21) ことから、BICD2 のノックダウンによって Rab6 のゴルジ体膜への結合が減少することが示唆された。

次に、細胞分画を行い、BICD2 ノックダウンによって膜結合 Rab6 が減少するかどうかを生化学的に検証した。BICD2 siRNA あるいは scramble siRNA をトランスフェクションして 72 時間後、細胞を破碎し、遠心によって膜画分と細胞質画分に分離した。各画分について抗 Rab6 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い、バンド強度を基に Rab6 の量を定量したところ、BICD2 ノックダウン細胞において、細胞質画分に存在する Rab6 の割合が有意に増加し、コントロール細胞において細胞質画分に存在する Rab6 の割合を 1 とした時、細胞質画分に存在する Rab6 は、BICD2 siRNA #1 トランスフェクション細胞では 1.085 ± 0.086 、BICD2 siRNA #2 トランスフェクション細胞では 1.135 ± 0.091 であった (図 23)。一方、膜画分に存在する Rab6 の割合は、BICD2 ノックダウン細胞において有意に減少し、コントロール細胞において膜画分に存在する Rab6 の割合を 1 とした時、膜画分に存在する Rab6 は、BICD2 siRNA #1 トランスフェクション細胞では 0.927 ± 0.043 、BICD2 siRNA #2 トランスフェクション細胞では 0.880 ± 0.038 であった (図 23)。

哺乳動物では、BICD は 2 つのホモログ、BICD1 と BICD2 が発現しており、互いに高い相同性を示し、部分的に互いの機能を補い合う可能性が報告されている (Hoogenraad *et al.* 2001; Matanis *et al.* 2002; Fumoto *et al.* 2006; Dienstbier & Li 2009; Terenzio & Schiavo 2010)。そこで、BICD2 の場合と同様に、BICD1 ノックダウン細胞あるいは BICD1/BICD2 ダブルノックダウン細胞についても細胞分画を行い、BICD1 あるいは BICD1/BICD2 ダブルノックダウンによって膜結合 Rab6 が減少するかどうかを生化学的に検証した。その結果、BICD1/BICD2 ダブルノックダウン細胞において、細胞質画分に存在する Rab6 の割合は有意に増加し (コントロール細胞を 1 とした時、 1.138 ± 0.090)、膜画分に存在する Rab6 の割合は有意に減少することが分かった (コ

ントロール細胞を 1 とした時、 0.878 ± 0.073) (図 24)。これは、BICD2 ノックダウン細胞の場合とほぼ同様の結果であった。一方、BICD1 ノックダウン細胞では、各画分に存在する Rab6 の割合は、コントロール細胞と比較して、有意な変化は見られなかった (図 25)。BICD1 ノックダウン細胞あるいは BICD1/BICD2 ダブルノックダウン細胞でも、BICD2 ノックダウンの場合 (図 21) と同様に、Rab6 タンパク質発現量の大きな変化は確認されなかった (図 26)。これらの結果から、生細胞において、BICD2 は内在性 Rab6 のゴルジ体への局在に関与しているが、BICD1 は関与していないことが示唆された。

2.5 セミインタクト HeLa 細胞における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに対する BICD2 の影響

図 22 および 23 で示したように、生細胞では、BICD2 ノックダウンにより、内在性 Rab6 の細胞内局在が変化した。しかし、その影響は比較的小さく、また、Rab6A を特異的に認識する抗体を入手できなかったため、Rab6A と Rab6A' を区別して検出することはできなかった。そこで次に、抗 BICD2 抗体を加えた細胞質をゴルジ体ターゲティングアッセイに供し、加えた抗体が GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに影響を与えるかどうかを検証した。

本研究で用いた抗 BICD2 抗体は、ヒト BICD2 タンパク質しか認識が確認されていないため、マウス由来の L5178Y 細胞質の代わりにヒト由来の HeLa S3 細胞から調製された細胞質を用いて、ゴルジ体ターゲティングアッセイによる検証を行った。HeLa S3 細胞質を用いた場合も、L5178Y 細胞質の場合と同様に、GST-Rab6A の細胞質依存的なゴルジ体ターゲティングが確認された。抗 BICD2 抗体が GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに影響を与えるかどうかを検証するため、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 3 mg/ml の HeLa S3 細胞質存在下において、セミインタクト HeLa 細胞に抗 BICD2 抗体 (コントロールとして rabbit IgG) を加え、32°C で 30 分間インキュベートした。その結果、抗 BICD2 抗体を加えた細胞質では、GST-Rab6A のゴルジ

体ターゲティングが阻害されることが確認された (図 27)。一方、抗 BICD1 抗体を加えた細胞質を用いて、BICD2 の場合と同様の検証を行ったところ、抗 BICD1 抗体を加えた細胞質では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは阻害されないことが確認された (図 28)。

さらに、コントロールとして、これまでに報告されている Rab6A 結合タンパク質の GST-Rab6A ゴルジ体ターゲティングへの関与の可能性についても、同様の方法で検証してみることにした。Rabkinesin-6 は、キネシン様タンパク質ファミリーに属する既知の Rab6A 結合タンパク質であり (Echard *et al.* 1998; Echard *et al.* 2000)、ゴルジ体の動態や細胞質分裂に関与することが報告されている (Echard *et al.* 1998; Hill *et al.* 2000)。Rabkinesin-6 は、SYPRO Ruby 染色では GST-Rab6A ビーズ画分特異的なバンドは検出されなかった (図 19A) が、抗 Rabkinesin-6 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、GST-Rab6A ビーズ画分特異的に、バンドが検出された (図 29)。そこで、抗 Rabkinesin-6 抗体を用いて、抗 BICD1 抗体、抗 BICD2 抗体の場合 (図 27 および 28) と同様の検証を行った。GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 3 mg/ml の HeLa S3 細胞質存在下において、セミインタクト HeLa 細胞に抗 Rabkinesin-6 抗体 (コントロールとして rabbit IgG) を加え、32°C で 30 分間インキュベートした。その結果、抗 Rabkinesin-6 抗体を加えた細胞質では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは阻害されないことが確認された (図 30)。

次に、RINT-1/ZW10 複合体が、Rab6A ゴルジ体ターゲティングの制御因子として機能する可能性を検討した。ZW10 は小胞体からゴルジ体への順行輸送経路に関与する可能性が報告されている (Hirose *et al.* 2004)。RINT-1 は ZW10 と複合体を形成することが報告されており (Arasaki *et al.* 2006)、Sun らは、Rab6 が RINT-1/ZW10 複合体の関わる経路を制御していることを報告している (Sun *et al.* 2007)。そこで、抗 ZW10 抗体を用いて、抗 BICD1 抗体、抗 BICD2 抗体の場合 (図 27 および 28) や抗 Rabkinesin-6 抗体の場合 (図 30) と同様の検証を行った。GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 3 mg/ml の HeLa S3 細胞質存在下において、セミインタクト HeLa

細胞に抗 ZW10 抗体（コントロールとして rabbit IgG）を加え、32℃で 30 分間インキュベートした。その結果、抗 ZW10 抗体を加えた細胞質では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは阻害されないことが確認された(図 31)。また、GST プルダウンアッセイによって調製した GST-Rab6A ビーズ画分および GST ビーズ画分について、抗 ZW10 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったが、Rab6A と ZW10 との相互作用は確認できなかった(図 29)。この結果から、RINT-1/ZW10 複合体は、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングには関与していないことが示唆された。

各種抗体を加えた細胞質を用いたゴルジ体ターゲティングアッセイによる検証結果(図 27、28、30 および 31) から、生細胞での結果(図 22-25)と同様に、セミインタクト HeLa 細胞において、BICD2 が GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングを制御していることが示唆された。一方、BICD1、Rabkinesin-6、および RINT-1/ZW10 複合体は、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングには関与していないことが示唆された。

これまでの結果から、BICD2 の抗体による機能阻害によってゴルジ体ターゲティングが抑制されたため、次に、BICD2 の添加による Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の変化について調べることにした。BICD2 のリコンビナントタンパク質を Cytosol (–RBP) に加え、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングが回復するかどうかを検証した。この検証を行うため、まず、BICD2 の His 融合リコンビナントタンパク質の調製を行った。はじめに、ヒト BICD2 のリコンビナントタンパク質作製を試みたが、ヒト complementary DNA (cDNA) ライブラリーから BICD2 cDNA を増幅することができず、ヒト BICD2 cDNA も入手できなかった。そこで、ヒト BICD2 と高い相同性(約 95%)を持つマウス BICD2 cDNA を入手し、そこからマウス BICD2 をサブクローニングし、大腸菌発現系を用いてマウス BICD2 の His 融合リコンビナントタンパク質 (His-mBICD2) を発現・精製した。(インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)。続いて、GST-Rab6A および ATP 再生系存在下において、セミインタクト HeLa 細胞に Cytosol (–RBP) および His-mBICD2 タンパク質（コントロールとして、Cytosol (–RBP) のみ）を加

え、32℃で 30 分間インキュベートして、ゴルジ体ターゲティングアッセイを行った。その結果、His-mBICD2 を加えた条件では、コントロール条件（Cytosol（-RBP）のみ）と比較して、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングが有意に回復することが分かった（コントロール条件を 1 とした時、 1.26 ± 0.07 ; 図 33）。以上の結果から、BICD2 が GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングを促進していることが示唆された。

2.6 Rab6A のゴルジ体ターゲティングの動的平衡に対する BICD2 の影響

BICD2 ノックダウン細胞での Rab6 のゴルジ体局在は有意な差で減少していることが検出されているもののその差は小さいが（図 22 および 23）、セミインタクト HeLa 細胞における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは抗 BICD2 抗体によって確かに阻害されていた（図 27）。Rab6A のゴルジ体局在は、細胞質領域からのゴルジ体へのターゲティングと、ゴルジ体から細胞質領域への解離との平衡で成り立っていることを考慮し、Rab6A のゴルジ体領域における交換速度に対する BICD2 の関与を光褪色後蛍光回復 (fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) 法を用いて検証した。この実験では、特に BICD2 と Rab6A との相互作用と Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程との関連を明らかにするために、既知の BICD2 の Rab6A 結合領域をコードするタンパク質を強制発現し、GFP を融合させた Rab6A（GFP-Rab6A）の動態を解析することとした。

BICD2 は、その C 末端領域を介して Rab6 と相互作用することが報告されている (Matanis *et al.* 2002; Bergbrede *et al.* 2009) ため、はじめに、マウス BICD2 の C 末端領域（アミノ酸残基 706 番から 810 番、BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰）に mCherry を融合させた変異体（mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰）、および、C 末端領域を欠失させた mCherry 融合変異体（mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵）を構築した（図 34）。HeLa 細胞において、GFP-Rab6A および mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ を強制発現させ、この細胞を用いて共免疫沈降法を行ったところ、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ の相互作用が確認され

た（図 35 の mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰）。また、同じ条件の細胞を用いて抗 p230 抗体（ゴルジ体マーカーとして使用）を用いた蛍光抗体法を行ったところ、GFP-Rab6A および mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ は、どちらも主にゴルジ体領域に局在することが明らかとなった（図 36 の BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰）。これらの結果から、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ は、主にゴルジ体領域において相互作用することが示唆された。また、共免疫沈降法による検証では、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の相互作用も確認された（図 35 の mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵）が、蛍光抗体法による検証では、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ のゴルジ体領域における共局在はほとんど認められなかった（図 36）。なお、蛍光抗体法による検証では、mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ のどちらを発現させた条件でも、GFP-Rab6A はゴルジ体領域に局在していた（図 36）。ただし、GFP-Rab6A および mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ を強制発現させた細胞では、ゴルジ体の断片化が観察された（図 36）。BICD2 の N 末端領域の発現によりゴルジ体が断片化するというこの結果は、Hoogenraad らの報告（Hoogenraad *et al.* 2001）とも一致する。

以上の結果を踏まえ、続いて、GFP-Rab6A および BICD2 の欠失変異体 (mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ あるいは mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵、コントロールとして mCherry のみの空ベクター (mock)) を共発現させた細胞を用いて、FRAP 法による GFP-Rab6A の動態解析を行った（詳細は 4.19 の項を参照）。まず、HeLa 細胞に GFP-Rab6A および BICD2 の欠失変異体 (コントロールとして mCherry のみの空ベクター) のプラスミドを同時トランスフェクションし、37°C で 24 時間培養した。24 時間後、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像の取得を行った。はじめに、ブリーチ前の画像を取得した。続いて、核近傍領域の GFP-Rab6A の蛍光をブリーチし、ブリーチ後の画像を 10 秒ごとに取得した。取得した画像について、核近傍領域における GFP-Rab6A の蛍光強度を測定した。細胞以外の領域の蛍光強度をバックグラウンドの蛍光強度として使用して、ブリーチ前の蛍光強度に対するブリーチ後各時点における蛍光強度の割合を算出し、蛍光回復率としてグラフを示した。FRAP 法における GFP-Rab6A の蛍光回復曲線は、細胞質領域-ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換

速度とおおよそ一致する。解析の結果、mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ 発現細胞では、コントロール細胞 (mock; mCherry 空ベクターおよび GFP-Rab6A の共発現細胞) と比較して、細胞質領域-ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換速度に有意な変化は見られなかった (図 37)。一方、mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ 発現細胞では、コントロール細胞と比較して、細胞質領域-ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換速度が大幅に低下することが確認された (図 37)。これらの結果から、BICD2 の C 末端領域 (BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰) がゴルジ体に局在する GFP-Rab6A と強く結合することにより、内在性の全長 BICD2 と GFP-Rab6A の結合が競合的に阻害され、それによって細胞質領域-ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換速度が低下する可能性が示された。以上のことを踏まえると、BICD2 の C 末端領域が、ゴルジ体膜に結合する GFP-Rab6A の膜結合の安定化を促進している可能性が考えられる。

2.7 Rab6 の活性制御に対する BICD2 の影響

一般的に、Rab タンパク質は GTP 結合型 (活性型) の時に、膜に結合する (Zerial & McBride 2001)。そこで、BICD2 が Rab6 の膜結合を安定化させる方法として、BICD2 が Rab6 を GTP 結合型に安定化させている可能性を検討した。ここでは、BICD1 ノックダウン細胞、BICD2 ノックダウン細胞、あるいは BICD1/BICD2 ダブルノックダウン細胞について蛍光抗体法を行い、BICD1 および (あるいは) BICD2 ノックダウン時の、GTP 結合型 Rab6 (Rab6-GTP) の発現量を解析した。この検証では、Nizak らの報告 (Nizak *et al.* 2003) を基に、Rab6-GTP (Rab6A-GTP と Rab6A'-GTP の両方を含む) を特異的に認識する抗体を使用した。この抗体は、ウエスタンブロッティングでは使用できなかったが、蛍光抗体法では特異的に Rab6-GTP を検出することができた。そこで、BICD1 siRNA および (あるいは) BICD2 siRNA (コントロールとして scramble siRNA) をトランスフェクションして 72 時間後の HeLa 細胞を固定し、抗 Rab6-GTP 抗体、抗 Rab6 抗体、および抗 p230 抗体を用いた蛍光抗体法により、三重染色を行った。その結果、BICD2 ノックダウ

ン条件 (BICD2 siRNA #1、BICD2 siRNA #2、あるいは BICD1 siRNA #2 および BICD2 siRNA #2 (BICD1+2 siRNA) をトランスフェクションした細胞) では、コントロール条件と比較して、Rab6-GTP の蛍光強度が減少している様子が観察された (図 38)。BICD1 および (あるいは) BICD2 ノックダウンでは、Rab6 タンパク質の総発現量 (total Rab6) (GTP 結合型と GDP 結合型の両方を含む) は大きく変化しないことを確認している (図 21 および 26)。そこで、三重染色を行った細胞 (図 38) について、細胞領域全体に存在する total Rab6 および Rab6-GTP の発現量をそれぞれ定量し、total Rab6 に対する Rab6-GTP の割合 (Rab6-GTP/Rab6) を算出した (詳細は 4.9 の項を参照)。その結果、コントロール条件と比較して、BICD2 をノックダウンした条件 (BICD2 siRNA #1、BICD2 siRNA #2、あるいは BICD1+2 siRNA をトランスフェクションした細胞) では、Rab6-GTP/Rab6 が減少したが、BICD1 のみをノックダウンした条件 (BICD1 siRNA #1 あらういは BICD1 siRNA #2 をトランスフェクションした細胞) では、Rab6-GTP/Rab6 の有意な変化は見られなかった (図 39)。このことから、BICD2 は Rab6 を GTP 結合型に安定化させるが、BICD1 は安定化させないことが示唆された。

2.8 Rab6A 依存的な小胞輸送経路に対する BICD2 の影響

Rab6 は、ゴルジ体を起点とした小胞輸送経路に関与していると報告されている (Martinez *et al.* 1997; Girod *et al.* 1999; White *et al.* 1999; Grigoriev *et al.* 2007)。Rab6A の機能に対する BICD2 の影響を明らかにするため、ゴルジ体を起点あるいは経由する順行・逆行輸送経路について、詳細な解析を行った。

Rab6A は、COPI 非依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路に関与すると報告されている (Martinez *et al.* 1997; Girod *et al.* 1999; White *et al.* 1999)。BICD2 が、この逆行輸送経路に関与しているという報告もある (Matanis *et al.* 2002) が、輸送経路のどの段階に関与しているかについての詳細 (図 2 を参照) は解明されていない。そこで、 Brefeldin A (brefeldin A: BFA)

処理、および GFP 融合 galactosyltransferase (GT; GT-GFP) を用いて、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路について解析を行った。GT は膜貫通型のゴルジ体常在性酵素タンパク質であり、GT-GFP はゴルジ体の形態変化を解析するプローブとして用いられている (Strous *et al.* 1991; Cole *et al.* 1996; Sciaky *et al.* 1997; Kano *et al.* 2000; Morikawa *et al.* 2009)。この輸送解析では、Rab6 ノックダウン細胞あるいは BICD2 ノックダウン細胞 (コントロールとして scramble siRNA トランスフェクション細胞) に GT-GFP のプラスミドをトランスフェクションした後、細胞の BFA 処理を行った。続いて、細胞を固定し、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。まず、Rab6 あるいは BICD2 のノックダウン効率を確認するため、siRNA をトランスフェクションして 72 時間後の細胞を回収し、抗 Rab6 抗体および抗 BICD2 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った (図 40A)。

BFA 処理の時間経過に伴って、ゴルジ体の形態は徐々に変化し消失する。このゴルジ体消失過程には、ゴルジ体からの管状構造の形成や、この管状構造の小胞体との融合などが含まれている (図 40B を参照)。BFA 処理によって誘導されるゴルジ体消失のキネティクスを解析するにあたり、ゴルジ体消失過程を、①形態が変化する前の典型的なゴルジ体 (Golgi)、②管状構造がゴルジ体から出現 (Golgi + tubules)、③管状構造が小胞体と融合しゴルジ体が消失 (tubules + ER)、④管状構造が小胞体に完全に吸収され消失 (ER)、の 4 段階に分割した。そして、BFA 処理開始から 0、5、10、30 分の各時点において、各段階の細胞数をそれぞれ計数することにより解析を行った。図 41 に示したように、「Golgi」の細胞の割合は、どの siRNA トランスフェクション細胞でも、BFA 処理開始から 30 分以内に 0% まで減少した。しかし、Rab6 ノックダウン細胞あるいは BICD2 ノックダウン細胞では、その減少のキネティクスは、コントロール細胞と比較して、わずかに遅れていた。さらに、「Golgi + tubules」の割合は、BFA 処理開始から 10 分間は一時的に増加し、その後 30 分までにおおよそ 0% まで減少したが、Rab6 ノックダウン細胞あるいは BICD2 ノックダウン細胞では、そのキネティクスも、コントロール細胞と比較して、わずかに遅れていた。このことか

ら、BICD2 と Rab6 が、BFA 処理によって誘導されるゴルジ体からの管状構造の形成に、一部関与していることが示唆される。一方、このゴルジ体からの管状構造の形成段階とは対照的に、管状構造の小胞体との融合段階は、Rab6 ノックダウンあるいは BICD2 ノックダウンによって著しく影響を受け、Rab6 ノックダウン細胞あるいは BICD2 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して、「tubules + ER」の割合は明らかに高く、「ER」の割合は、明らかに低かった (図 41)。この結果から、BFA 処理によってゴルジ体から生じる管状構造と小胞体膜との融合過程は、Rab6 ノックダウンあるいは BICD2 ノックダウンにより阻害されることが示唆された。さらに、ゴルジ体の消失過程は、Rab6 ノックダウン細胞と BICD2 ノックダウン細胞とでは、同様のキネティクスを示しており (図 41)、このことから、Rab6 と BICD2 が、特に管状構造と小胞体との融合段階で、互いに機能を補うか、相互作用によってともに制御を行っている可能性が考えられる。

続いて、ゴルジ体を経由した形質膜から小胞体への逆行輸送経路に対する、Rab6 あるいは BICD2 ノックダウンの影響を調べるため、COPI 非依存的かつ Rab6 依存的な経路によって輸送されると報告されている Alexa Fluor® 488 標識 Shiga toxin 1 (Stx1) を用いて、輸送解析を試みた (Girod *et al.* 1999; Chen *et al.* 2003)。(インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)。他の逆行輸送経路に関しては、COPI 依存的な経路によって輸送される Alexa Fluor® 488 標識 cholera toxin B subunit (CtxB) を用いて、同様の輸送解析 (詳細は 4.21 の項を参照) を行った (Chen *et al.* 2003)。しかし、Rab6 ノックダウン細胞および BICD2 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB の輸送キネティクスに有意な相違は認められなかった (図 42)。

さらに、ゴルジ体を経由した小胞体から形質膜への順行輸送経路に関しても、GFP を融合させた ts045 vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSVGts045; VSVGts045-GFP) を用いた解析を行った (詳細は 4.22 の項を参照)。VSVGts045 は、VSVG タンパク質の温度感受性変異体であり、39°C でインキュベートすることで小胞体に集まり、その後 32°C に移すと、ゴルジ体を経由し

て形質膜へ輸送される (Presley *et al.* 1997; Hirschberg *et al.* 1998)。この輸送解析では、Rab6 ノックダウン細胞あるいは BICD2 ノックダウン細胞 (コントロールとして scramble siRNA トランスフェクション細胞) に VSVGts045-GFP のプラスミドをトランスフェクションした後、細胞を 39°C で 24 時間培養した。続いて、細胞を 32°C に移し、0、15、30、60、90、120 分間インキュベートした後、細胞を固定し、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。ゴルジ体を経由した小胞体から形質膜への VSVGts045-GFP の順行輸送キネティクスを解析するにあたり、VSVGts045-GFP の細胞内局在を指標に、細胞を①ER、②Golgi、③PM、の 3 種類に分類した。①の ER は、VSVGts045-GFP が細胞質領域に網目状に分布している細胞であり、②の Golgi は、VSVGts045-GFP が典型的なゴルジ体の位置 (核近傍領域) に局在している細胞である。③の PM は、VSVGts045-GFP が細胞の輪郭に局在している細胞である。①～③の局在ごとに細胞数を計数した後、各時点ごとに各段階の細胞の割合を算出することにより、VSVGts045-GFP 輸送のキネティクスを解析した。その結果、Rab6 ノックダウンによって、ゴルジ体から形質膜への VSVGts045-GFP の輸送キネティクスはわずかに遅れたが、輸送キネティクスに対する BICD2 ノックダウンの影響は認められなかった (図 43 および 44)。

続いて、エンドソーム-トランスゴルジネットワーク間の小胞輸送経路について、この経路を循環する膜貫通タンパク質 cation-independent mannose-6-phosphate receptor (CI-M6PR) (Young *et al.* 2005; Adachi *et al.* 2009) を輸送マーカーとして用いて、蛍光抗体法による解析を行った。この解析では、Rab6 ノックダウン細胞あるいは BICD2 ノックダウン細胞 (コントロールとして scramble siRNA トランスフェクション細胞) について、siRNA をトランスフェクションして 72 時間後、細胞を固定し、抗 CI-M6PR 抗体および抗 p230 抗体を用いた蛍光抗体法により解析した。その結果、Rab6 ノックダウン細胞では、p230 と共局在する CI-M6PR の減少が観察されたが、BICD2 ノックダウン細胞では、CI-M6PR の局在に顕著な変化は認められなかった (図 45)。以上の結果から、COPI 非依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路の、特にゴルジ体由来の輸送

小胞と小胞体膜との融合段階に、BICD2 と Rab6 が相互依存的に関与している可能性が示された。

第 3 章 考察と結論

3.1 セミインタクト細胞アッセイの特長

本研究では、Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関わる細胞質タンパク質を探索するため、セミインタクト細胞アッセイを用いて、Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程の再構成を行い、Rab6A のゴルジ体ターゲティングを検出・可視化する「ゴルジ体ターゲティングアッセイ」を構築した。

このアッセイにはいくつかの特長がある。まず、このアッセイは非常に汎用性が高いということである。セミインタクト細胞アッセイは、単一の細胞内においてタンパク質が機能発現する場所を解析することができるため、本研究では、正確なオルガネラターゲティング・局在が機能発現のために重要である Rab タンパク質のうち、Rab6A に注目して、Rab6A のゴルジ体ターゲティングの検出に最適化したゴルジ体ターゲティングアッセイを構築した。しかし、このアッセイは Rab6A だけではなく、60 種類以上存在する他の Rab タンパク質の解析に応用することができる。さらに、他の低分子量 GTP 結合タンパク質など、さまざまな表在性膜タンパク質に対しても応用することができ、同様の方法で表在性膜タンパク質のターゲティング機構を解析することが可能であると考えられる。

他にも、ターゲティング制御因子を絞り込みやすいという特長がある。本研究の Rab6A の場合では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングが細胞質依存的に増加した（図 8 および 9）ことから、ゴルジ体ターゲティング制御因子が細胞質成分に存在することが示唆された。また、GST-Rab6A 結合タンパク質除去細胞質 Cytosol (–RBP) 存在下で GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量が減少したこと（図 18B）から、Rab6A 結合タンパク質が、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関与していることが示唆された。この 2 つの結果を踏まえ、GST-Rab6A のビーズ画分に特異的に濃縮されているタンパク質群を見つけ、LC-MS/MS によって、Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御に関わる候補因子を細胞質成分から同定することができた（図 19A、表 1）。

このように、本研究で構築したゴルジ体ターゲティングアッセイと GST 融合タンパク質によるブルダウンアッセイを併用することにより、ターゲティングを制御するタンパク質の候補をより簡単に体系的に絞り込むことができる。

3.2 GST-Rab6A のプレニル化

本研究では、セミインタクト細胞アッセイを用いて GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングを再構成することに成功した (図 8 および 9)。Rab タンパク質が膜に挿入されるためには、Rab タンパク質がプレニル化されている必要がある (Johnston *et al.* 1991; Khosravi-Far *et al.* 1991; Kinsella *et al.* 1992)。図 12A で示したように、効率は比較的低かったが、L5178Y 細胞質存在下において、セミインタクト HeLa 細胞とともにインキュベートした GST-Rab6A は、プレニル化されていることが確認できた。Rab タンパク質のプレニル化効率は、細胞の種類や個々の Rab タンパク質、その Rab タンパク質の発現量 (内在性か過剰発現か) によっても異なるようである (Beranger *et al.* 1994a; Tisdale *et al.* 1996; Erdman *et al.* 2000; Gomes *et al.* 2003; Coxon *et al.* 2005)。大腸菌発現系により発現・精製した Rab タンパク質のプレニル化に関しては、図 12A で得られた結果は、先行研究 (Hoffenberg *et al.* 1995; Tisdale 1999) と同様の結果であったが、そのプレニル化の程度は本研究の結果の場合、非常に低かった。その理由の 1 つとしては、プレニル基の材料となるゲラニルゲラニルピロリン酸 (geranylgeranyl pyrophosphate: GGPP) が不足していた可能性が考えられる。ゴルジ体ターゲティングアッセイにおけるインキュベート条件 (図 12A で検証した条件) では、GGPP を加えない条件下で、GST-Rab6A と L5178Y 細胞質を混合し、インキュベートを行った。先行研究では、*in vitro* においてリコンビナント Rab タンパク質をプレニル化する場合、GGPP を添加している (Soldati *et al.* 1993; Tisdale 1999; Tisdale 2003; Coxon *et al.* 2005)。以上の 4 つの先行研究を踏まえると、図 12A において GST-Rab6A のプレニル化が不十分であったのは、GGPP を外から加えなかったためだと考えられる。プレニル化されな

かった GST-Rab6A は膜に挿入されていないため、セミインタクト HeLa 細胞において、ゴルジ体以外の細胞領域に分布していると考えられる。あるいは、ゴルジ体ターゲティングアッセイによる検証では、プレニル化に依存的でない、GST-Rab6A とゴルジ体膜との間接的な相互作用を検出している可能性も、完全には否定できない。

3.3 BICD1 および BICD2 の構造と機能

本研究では、GST-Rab6A に結合したタンパク質群の中から得られた約 100 kDa のタンパク質が BICD2であることを、LC-MS/MSによって同定した(図 19A、表 1)。

BICD は、はじめ *Drosophila* において、細胞質タンパク質として同定されており (Dienstbier & Li 2009; Terenzio & Schiavo 2010)、線虫から哺乳動物まで高度に保存された、いくつかのコイルドコイルドメインを持っている。哺乳動物細胞では、BICD のホモログとして、BICD1 と BICD2 が存在する (Hoogenraad *et al.* 2001)。BICD1 および BICD2 の細胞内分布については、細胞質領域、トランスゴルジネットワーク、小胞様構造、中心体に存在すると報告されている (Hoogenraad *et al.* 2001; Matanis *et al.* 2002; Fumoto *et al.* 2006)。また、BICD1 および BICD2 は、トランスゴルジネットワークおよび細胞質領域にある小胞様構造において、Rab6A と共局在すると報告されている (Matanis *et al.* 2002)。

BICD1、BICD2 の機能については、以下のような報告がある。BICD1 および BICD2 に関しては、Rab6 陽性小胞のダイニン依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路に関与しているという報告がある (Matanis *et al.* 2002)。BICD1 に関しては、BICD1 がプロテアーゼ活性化受容体-1 (protease-activated receptor-1: PAR1) と相互作用し、PAR1 の細胞内への移行 (internalization) に関わっているという報告 (Swift *et al.* 2010) や、中心体と微小管の固定に関与するという報告 (Fumoto *et al.* 2006) がある。また、BICD2 に関しては、細胞周期 G2 期において核膜孔複合体タンパク質 RanBP2 と相互作用し、中心体と核の位置を調節するという報告がある (Splinter *et al.*

2010)。このように、BICD1とBICD2が異なる機能を持つ例が報告されているが、BICD1とBICD2が互いに機能を補う可能性を示唆した報告がある (Fumoto *et al.* 2006) ことを踏まえ、本研究では、BICD2 が Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関与しているかについて解析すると同時に、BICD1 に関しても BICD2 の場合と同様の解析を行った。

セミインタクト細胞アッセイの特長の1つは、導入する細胞質とともに抗体などの生体分子を細胞に導入できることである。そこで、BICD1 あるいは BICD2 に対する抗体を加えた細胞質を用いて、抗体添加により GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングが阻害されるかどうかを、構築したゴルジ体ターゲティングアッセイにより調べた。その結果、抗 BICD2 抗体を加えた細胞質存在下では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは阻害された (図 27) が、抗 BICD1 抗体を加えた細胞質存在下では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングは阻害されなかったことが確認された (図 28)。この結果は、細胞質中の BICD2 が Rab6A のゴルジ体ターゲティング候補因子である可能性を強く示唆した。

構築したゴルジ体ターゲティングアッセイは、Rab6A 結合タンパク質である Rabkinesin-6 (Echard *et al.* 1998; Echard *et al.* 2000) の検証にも用いた。抗 Rabkinesin-6 抗体を加えた細胞質存在下では、GST-Rab6A ゴルジ体ターゲティングの阻害は観察されなかった (図 30)。しかし、BICD1、Rabkinesin-6 に対する抗体が、ゴルジ体ターゲティングの機能に影響しない抗体であった可能性も否定はできない (図 28 および 30)。それを確認するためには、BICD1、Rabkinesin-6 の免疫除去 (immunodepletion) が可能な抗体を入手し、BICD1 あるいは Rabkinesin-6 を免疫除去した細胞質を調製した後、その細胞質をセミインタクト HeLa 細胞に導入して解析することにより、BICD1、Rabkinesin-6 の機能を検証することが必要だと考えられる。

セミインタクト細胞アッセイでは、リコンビナントタンパク質を細胞に加え、その影響を検証することも可能である。そこで、BICD2 のリコンビナントタンパク質 (His-mBICD2) を Cytosol (-RBP) とともにセミインタクト HeLa 細胞に加え、構築したゴルジ体ターゲティングアッセイ

を用いて、His-mBICD2 の Rab6A ゴルジ体ターゲティングに対する影響を調べた。その結果、His-mBICD2 を加えた条件では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングが回復することが確認された (図 33)。また、本研究では、Rab6 のゴルジ体局在に対する BICD2 の関与を、siRNA による RNA 干渉法を用いて解析した。この解析では、細胞分画により膜画分と細胞質画分を調製し、抗 Rab6 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより Rab6 の膜結合に対する BICD2 ノックダウンの影響を検証した。コントロール細胞 (scramble siRNA をトランスフェクションした細胞) では、Rab6 は約 50%が膜画分 (主にゴルジ体膜であると考えられる) に存在していた (図 23A、24A、および 25A) が、BICD2 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して、膜画分に存在する Rab6 の割合の減少が確認された (図 23)。BICD1 についても BICD2 の場合 (図 23) と同様の解析を行ったが、BICD1 ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して、膜画分に存在する Rab6 の割合に有意な変化は確認されなかった (図 25)。また、BICD1/BICD2 ダブルノックダウン細胞では、膜画分に存在する Rab6 の割合は、BICD2 ノックダウン細胞と同程度であった (図 24)。これらの細胞分画法による解析結果 (図 23-25) から、細胞質タンパク質 BICD2 が Rab6 ゴルジ体局在の制御因子であることが示唆された。この生細胞を用いた検証で得られた結果 (図 22 および 23) と、構築したゴルジ体ターゲティングアッセイを用いた検証で得られた結果 (図 27 および 33) は相互に裏づけられ、BICD2 が Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御に関与していることを示すことができた。

3.4 BICD2 の制御する Rab6A のゴルジ体ターゲティング機構のモデル

BICD2 による Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御に関わるのは、BICD2 の N 末端領域ではなく、BICD2 の C 末端領域であると考えられる。GFP-Rab6A および BICD2 の C 末端領域 (mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰) を共発現させた細胞では、コントロール細胞と比較して、細胞質領域-ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換速度が大幅に低下する様子が観察された (図 37)。さらに、免疫

沈降法により GFP-Rab6A と mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ の相互作用が確認され (図 35)、蛍光抗体法により両タンパク質ともトランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワークに局在することが確認された (図 36)。一方、BICD2 の N 末端領域 (mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵) に関しては、図 37 に示したように、コントロール細胞と比較して、細胞質領域・ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換速度に有意な変化は見られなかった。さらに、免疫沈降法により GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の弱い相互作用が確認された (図 35) が、蛍光抗体法では両タンパク質の共局在はほとんど認められなかった (図 36)。GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の相互作用が確認された本研究の結果 (図 35) は、BICD2 の N 末端領域と Rab6A は直接相互作用しないという報告 (Fuchs *et al.* 2005) と相反するものである。しかし、BICD2 の N 末端領域がダイニン-ダイナクチン複合体と相互作用するという報告 (Hoogenraad *et al.* 2001; Hoogenraad *et al.* 2003)、Rab6A がダイニン-ダイナクチン複合体のサブユニットと相互作用するという報告 (Short *et al.* 2002; Fuchs *et al.* 2005; Wanschers *et al.* 2008; Bergbrede *et al.* 2009) を考慮すると、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の相互作用は直接的なものではなく、ダイニン-ダイナクチン複合体を介して起きている可能性がある。あるいは、BICD2 の N 末端領域が BICD2 自身と相互作用するという報告 (Hoogenraad *et al.* 2001) を踏まえると、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の相互作用は、内在性の全長 BICD2 を介して起きている可能性もある。そして、ゴルジ体領域において GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の局在が一致しなかったこと (図 36) を踏まえると、共免疫沈降法により検出された GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の相互作用 (図 35) は、ゴルジ体ではなく細胞質領域において起こっている可能性が高い。以上の考察から、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ の相互作用が確認された本研究の結果 (図 35) は、Rab6A と BICD2 の N 末端領域は直接相互作用しないという Fuch らの報告 (Fuchs *et al.* 2005) とは矛盾するものではないと考えられる。そして、本研究の実験結果からは、BICD2 はその C 末端領域による Rab6A との相互作用を介して Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御に関与していると考えられる。

Rab タンパク質は一般的に、GTP 結合型の時は膜に結合し、GDP 結合型の時は GDI と複合体を形成して細胞質に存在する（詳細は 1.2 の項および図 3 を参照）（Zerial & McBride 2001）。また、BICD2 は GTP 結合型 Rab6A と選択的に相互作用するという報告がある（Matanis *et al.* 2002; Fuchs *et al.* 2005; Bergbrede *et al.* 2009）。BICD2 による Rab6A のゴルジ体ターゲティングの制御機構として、BICD2 が GTP 結合型 Rab6A と結合することにより、GTP 結合型 Rab6A の GTPase 活性が阻害され、その結果として Rab6A のゴルジ体膜結合や活性化状態が安定化する、という機構が考えられる。実際、BICD2 ノックダウン細胞では、膜画分に存在する Rab6 の割合が有意に減少し（図 23）、総発現量（total Rab6）に対する GTP 結合型 Rab6（Rab6-GTP）の割合が減少していた（図 38 および 39）。mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ 発現細胞では、細胞質領域-ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換速度が大幅に低下することが観察された（図 37）。BICD2 ノックダウン細胞で GTP 結合型 Rab6 が減少する機構として、BICD2 が Rab6A の GTPase 活性を阻害する Rab エフェクタータンパク質として働く可能性が考えられる。実際、*in vitro*において Rab6A が BICD2 の C 末端領域と相互作用することによって、Rab6A の内在性 GTPase 活性が阻害されるという報告がある（Bergbrede *et al.* 2009）。Rab4 のエフェクタータンパク質 Rabaptin4（Nagelkerken *et al.* 2000）、Rab5 のエフェクタータンパク質 Rabaptin-5（Rybin *et al.* 1996）、Rab9 のエフェクタータンパク質 p40（Díaz *et al.* 1997）など、相互作用により Rab タンパク質の GTPase 活性を阻害する Rab エフェクタータンパク質の例がいくつか報告されている。

別の BICD2 による Rab6A のゴルジ体ターゲティングの制御機構として、BICD2 が GEF として機能することにより、Rab6 が GTP 結合型となり、それによって Rab6 の膜結合を促進する、という機構も考えられる。BICD2 が Rab6A の GEF として機能する可能性を検討するため、Rab6A および BICD2 のリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* GEF アッセイを用いて GEF 活性の測定を行った。しかし、Rab6A および BICD2 のリコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* GEF アッセイでは、BICD2 の Rab6A に対する GEF 活性は確認されなかった（図 46）。本研究の *in vitro*

GEF アッセイ (図 46) では、プレニル化されていないリコンビナント Rab6A タンパク質を使用した、GEF 活性には、Rab タンパク質のプレニル化が必要である例も報告されている (Wada *et al.* 1997)。この報告を踏まえると、Rab6A タンパク質がプレニル化されていなかったため、BICD2 の GEF 活性が検出されなかった可能性も考えられる。

3.5 Rab6 のゴルジ体膜結合に対する BICD2 の影響

一般的に、Rab エフェクタータンパク質は、Rab タンパク質との相互作用によって、特定のオルガネラ膜へリクルートされる (Monier *et al.* 2002; Wu *et al.* 2002; Stenmark 2009)。BICD1 や BICD2 は、Rab6 のエフェクタータンパク質であると報告されており (Matanis *et al.* 2002; Short *et al.* 2002; Fuchs *et al.* 2005)、BICD2 が Rab6 依存的にゴルジ体膜へ結合するという報告もある (Matanis *et al.* 2002)。これらの報告は、BICD2 が Rab6A のゴルジ体ターゲティングに重要な因子であることを示す本研究の結果 (図 33) と逆である。そこで、BICD2 のゴルジ体局在が Rab6 依存的であるかどうかを、以下の実験で検証した。まず、細胞分画法を用いて細胞分画を行ったところ、ほぼすべての BICD2 (コントロール細胞では約 90%) が細胞質画分に存在した (図 47)。この結果は、細胞内の BICD2 のほぼ 90%以上が細胞質に可溶性タンパク質として存在することを意味しており、Rab6 ノックダウン細胞を用いて、細胞内の BICD2 タンパク質自身の膜結合性を生化学的に調べることは難しいと判断した。そこで、BICD2 の細胞内局在を形態的に解析するため、以下の方法で、蛍光抗体法を用いて Rab6 ノックダウン細胞における BICD2 の局在を解析した。蛍光抗体法で内在性 BICD2 を検出できる抗体を入手できなかったため、Rab6 ノックダウン細胞 (あるいはコントロール細胞) に GFP 融合マウス BICD2 (GFP-mBICD2) を強制発現させ、この細胞を用いて検証を行った。その結果、ゴルジ体領域における GFP-mBICD2 の蛍光シグナルは、Rab6 ノックダウンによって減少することが確かめられた (図 48)。これにより、Matanis ら (Matanis *et al.* 2002) が提唱した、Rab6 依存的な BICD2 のゴルジ体ターゲティング機構の存在

が示唆された。以上の結果（図 48）および本研究のセミインタクト細胞アッセイの結果（図 33）を考慮すると、Rab6 による BICD2 のゴルジ体ターゲティング制御、および BICD2 による Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御（特に、ゴルジ体膜への結合の安定化）の両方が生起していると考えられる。これと似た例としては、Rab9 のエフェクタータンパク質の 1 つ TIP47 があり、TIP47 は Rab9 の後期エンドソームへの局在の安定化を制御することが報告されている（Ganley *et al.* 2004; Aivazian *et al.* 2006）と同時に、TIP47 の後期エンドソームターゲティングが Rab9 に依存することが示唆されている（Carroll *et al.* 2001; Barbero *et al.* 2002; Hanna *et al.* 2002; Pfeffer 2011）。BICD2 と Rab6A の相互作用が、お互いの分子のゴルジ体膜へのターゲティングを安定化している可能性もある。

3.6 ゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路に対する BICD2 の機能

本研究で解析した輸送経路については、表 2 にまとめた（詳細は 2.8 の項を参照）。図 2 に示したように、Rab タンパク質は、輸送される積み荷タンパク質の選別、輸送小胞の形成、供与（オルガネラ）膜からの輸送小胞の出芽、細胞骨格に沿った輸送小胞の輸送、輸送小胞の標的（オルガネラ）膜への繫留、輸送小胞と標的（オルガネラ）膜との融合など、小胞輸送経路のさまざまな段階を制御している（Zerial & McBride 2001; Stenmark 2009）。

本研究では、BFA 処理および GT-GFP を用いて、BFA 処理によって誘導されるゴルジ体消失のキネティクスの解析を行った。これにより、COPI 非依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路に対する BICD2 の影響について評価した。その結果、図 41 および表 2 に示したように、BICD2 ノックダウンにより、特にゴルジ体から生じる管状構造と小胞体への融合過程が阻害されることが示唆された。BICD2 ノックダウンによる、この融合過程の阻害の程度は、Rab6 ノックダウンによる阻害と同程度であったこと（図 41 の「tubules + ER」および「ER」）を踏まえると、この結果からは、BICD2 が Rab6 と複合体を形成し、ともに Rab6 依存的な逆行輸送経路のうち、輸送小胞

と小胞体との融合過程に関わっていると考えられる。この図 41 の結果は、BICD2 が Rab6 依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路に関与するという報告 (Matanis *et al.* 2002) と一致する。そして、図 41 の結果からは、さらに詳細に、BICD2 と Rab6 が、この逆行輸送経路のうち特にゴルジ体由来の輸送小胞と小胞体との融合段階に関与している可能性が示された。

3.7 結論

セミンタクト細胞アッセイは、オルガネラの統合性や構造の維持に関与する因子の解析に適している。本研究では、このアッセイを用いて、Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程を再構成し、この過程を可視化する「ゴルジ体ターゲティングアッセイ」を構築し、BICD2 を Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御の候補因子として同定した。さらに、構築したゴルジ体ターゲティングアッセイや生細胞と細胞分画法を用いたさまざまな生化学的解析から、BICD2 が Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御の、特に Rab6A のゴルジ体膜への結合安定化に関与していることを示した。

ゴルジ体ターゲティングアッセイは、Rab6A のゴルジ体ターゲティングの検出・可視化に最適化されたものであるが、このアッセイは Rab6A のみに利用可能な手法ではなく、60 種類以上存在する他の Rab タンパク質や、他の低分子量 GTP 結合タンパク質など、多くのタンパク質に対しても適用することができる。したがって、本研究で構築したアッセイは、Rab6A と同様の方法で、多くのタンパク質の特定オルガネラへのターゲティング機構に関わる因子を解析する、汎用性の高いアッセイ系としての応用が期待できる。

第 4 章 材料と方法

4.1 試薬

GTP、ATP、creatine phosphate、creatine kinase、およびプロテアーゼ阻害剤 (antipain、chymostatin、pepstatin A、leupeptin) は、Sigma より購入した。Nocodazole は Sigma-Aldrich より購入した。マウス BICD2 cDNA は DNAFORM より購入した。SLO は BioAcademia より購入した。大腸菌 (*Escherichia coli*) 株 BL21 (DE3) は Invitrogen より購入した。ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM) および RPMI1640 はニッスイより購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS) は Nichirei Biosciences あるいは Sigma より購入した。ペニシリン-ストレプトマイシン溶液は GIBCO より購入した。ペニシリン ストレプトマイシン-アンホテリシン B 溶液は BioWhittaker より購入した。上記以外の試薬は、Wako Chemicals より購入した。

4.2 抗体

本研究では、下記の抗体を使用した。

<一次抗体>

- Alexa Fluor® 488 標識 rabbit ポリクローナル抗 GST 抗体 (Invitrogen)
- human モノクローナル抗 Rab6-GTP 抗体 (AdipoGen International)
- mouse モノクローナル抗 β -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich)
- mouse モノクローナル抗 Calnexin 抗体 (BD Transduction Laboratories)
- mouse モノクローナル抗 ERGIC-53 抗体 (Hans-Peter Hauri 博士 (University of Basel, Switzerland) からの供与)
- mouse モノクローナル抗 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 抗体 (Millipore)

- mouse モノクローナル抗 GM130 抗体 (BD Transduction Laboratories)
- mouse モノクローナル抗 GST 抗体 (Cell Signaling Technology)
- mouse モノクローナル抗 mCherry 抗体 (Clontech)
- mouse モノクローナル抗 p230 抗体 (BD Transduction Laboratories)
- rabbit ポリクローナル抗 BICD1 抗体 (菊池章教授 (大阪大学) からの供与)
- rabbit ポリクローナル抗 BICD2 抗体 (Abcam)
- rabbit ポリクローナル抗 CI-M6PR 抗体 (IBL)
- rabbit ポリクローナル抗 EEA1 抗体 (BD Transduction Laboratories)
- rabbit ポリクローナル抗 GFP 抗体 (MBL)
- rabbit ポリクローナル抗 GST 抗体 (Sigma)
- rabbit ポリクローナル抗 Rabkinesin-6 抗体 (Bethyl Laboratories, Inc.)
- rabbit ポリクローナル抗 Rab6 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)
- rabbit ポリクローナル抗 ZW10 抗体 (Abcam)
- rabbit モノクローナル抗 BICD1 抗体 (Abcam)

<二次抗体>

- Alexa Fluor® 488 標識抗 human IgG 抗体 (Molecular Probes)
- Cy2 標識抗 mouse IgG 抗体 (Chemicon)
- Cy2 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Chemicon)
- Cy3 標識抗 mouse IgG 抗体 (Chemicon)
- Cy3 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Chemicon)
- Cy5 標識抗 mouse IgG 抗体 (Chemicon)
- horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 mouse IgG 抗体 (Promega)

- ・ HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ Immuno-Aptamer™, Rabbit IgG (ニッポン・ジーン)

4.3 細胞培養

細胞はすべて 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。HeLa 細胞は、DMEM に 10% FBS およびペニシリン・ストレプトマイシン溶液を加えた培地で培養した。L5178Y 細胞は、RPMI1640 に 10% FBS、ペニシリン ストレプトマイシン・アンホテリシン B 溶液を含む培地で培養した。

4.4 プラスミド

本研究では、下記のプラスミドを使用した。

- ・ VSVGts045-GFP

VSVGts045-GFP コンストラクトは、Jennifer Lippincott-Schwartz 博士 (National Institutes of Health (NIH)、Bethesda, MD, USA) から供与いただいた。

- ・ GT-GFP

GT-GFP コンストラクトは、以前に所属研究室から発表された論文 (Kano *et al.* 2000) で使用されたものを用いた。

- ・ GFP-Rab6A

GFP 融合ヒト Rab6A (GFP-Rab6A) コンストラクトは、東京大学大学院薬学系研究科の新井洋由教授から供与いただいた。

- ・ GST-Rab6A

GST 融合ヒト Rab6A (GST-Rab6A) コンストラクトは、GFP-Rab6A を鋳型として、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) によりヒト Rab6A cDNA を増幅し、この DNA 断片を pGEX-5X-1 ベクター (GE Healthcare) の BamHI/EcoRI サイトにサブクローニングしたプラスミドである。

• GFP-mBICD2

GFP 融合マウス BICD2 (GFP-mBICD2) コンストラクトは、pCMV-SPORT6 に挿入されたマウス BICD2 cDNA (MGC clone 5324113) を鋳型として、PCR によりマウス BICD2 cDNA を増幅し、この DNA 断片を pEGFP-C1 ベクター (Clontech) の EcoRI/SalI サイトにサブクローニングしたプラスミドである。

• His-mBICD2

His 融合マウス BICD2 (His-mBICD2) コンストラクトは、pCMV-SPORT6 に挿入されたマウス BICD2 cDNA (MGC clone 5324113) を鋳型として、PCR によりマウス BICD2 cDNA を増幅し、この DNA 断片を pET-28b (+) ベクター (Novagen) の EcoRI/SalI サイトにサブクローニングしたプラスミドである。

• mCherry-BICD2

mCherry 融合マウス BICD2 (mCherry-BICD2) コンストラクトは、pCMV-SPORT6 に挿入されたマウス BICD2 cDNA (MGC clone 5324113) を鋳型として、PCR によりマウス BICD2 cDNA を増幅し、この DNA 断片を pmCherry-C1 ベクター (Clontech) の EcoRI/SalI サイトにサブクローニングしたプラスミドである。

・ mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵

mCherry 融合マウス BICD2¹⁻⁷⁰⁵ (mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵) コンストラクトは、pCMV-SPORT6 に挿入されたマウス BICD2 cDNA (MGC clone 5324113) を鋳型として、PCR によりマウス BICD2 cDNA の 1-705 アミノ酸残基を増幅し、この DNA 断片を pmCherry-C1 ベクター (Clontech) の EcoRI/SalI サイトにサブクローニングしたプラスミドである。

・ mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰

mCherry 融合マウス BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ (mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰) コンストラクトは、pCMV-SPORT6 に挿入されたマウス BICD2 cDNA (MGC clone 5324113) を鋳型として、PCR によりマウス BICD2 cDNA の 706-810 アミノ酸残基を増幅し、この DNA 断片を pmCherry-C1 ベクター (Clontech) の EcoRI/SalI サイトにサブクローニングしたプラスミドである。

4.5 プラスミドのトランスフェクション

35 mm ディッシュで培養している HeLa 細胞の場合、100 μ l の OPTI-MEM (Gibco) に、2 μ g のプラスミドおよび 4 μ l の FuGENE HD Transfection Reagent (Promega) を加えて混合し、室温で 15 分間インキュベートした。60 mm ディッシュで培養している HeLa 細胞の場合、260 μ l の OPTI-MEM に、5.2 μ g のプラスミドおよび 20.8 μ l の FuGENE HD Transfection Reagent を加えて混合し、室温で 15 分間インキュベートした。インキュベート後、ディッシュで培養されている HeLa 細胞の培地中に混合液を加え、37°C で 16-24 時間培養した。培養後、蛍光抗体法、共免疫沈降法、ウエスタンブロッティング、光褪色後蛍光回復法に供した。

4.6 siRNA

使用した siRNA は以下のとおりであり、全ての siRNA は Applied Biosystems より購入した。

- Negative Control siRNA (scramble siRNA)
- human BICD2 siRNA #1: siRNA ID s225943
- human BICD2 siRNA #2: siRNA ID s23498
- human BICD1 siRNA #1: siRNA ID s1983
- human BICD1 siRNA #2: siRNA ID s1984
- human Rab6 siRNA: siRNA ID s11685

4.7 siRNA のトランスフェクション

はじめに、150 μ l の OPTI-MEM に、100-200 pmol の siRNA を加えて混合した (溶液 (1))。続いて、150 μ l の OPTI-MEM に 3-6 μ l の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を加えて混合し、室温で 5 分間インキュベートした (溶液 (2))。5 分後、溶液 (1) に溶液 (2) を加えて混合し、室温で 20 分間インキュベートした。20 分後、混合液に 1.5 ml の OPTI-MEM を加え、その全量を、あらかじめ OPTI-MEM で 2 回洗浄しておいた HeLa 細胞 (35 mm ディッシュで培養したもの) に加えて、37°C で 4 時間培養した。4 時間後、ディッシュから混合溶液を除去し、培地 (10% FBS およびペニシリン・ストレプトマイシン溶液を加えた DMEM) を加えて、さらに 37°C で培養した。siRNA のトランスフェクションから 48 時間後、必要に応じてプラスミドのトランスフェクションを行った。siRNA のトランスフェクションから 72 時間後、細胞を蛍光抗体法、細胞分画法、ウエスタンブロッティング、順行・逆行輸送経路の解析に供した。

4.8 蛍光抗体法

HeLa 細胞は 35 mm ディッシュ内のカバーガラス上で培養し、蛍光抗体法の操作は室温で行った。

4.8.1 抗Rab6抗体あるいは抗Rab6-GTP抗体を用いた生細胞(インタクトHeLa細胞)

の多重染色

抗 Rab6 抗体あるいは抗 Rab6-GTP 抗体を用いた蛍光抗体法は、Young らの方法を一部改変して行った (Young *et al.* 2005)。カバーガラス上で培養した HeLa 細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 2 回洗浄し、3% パラホルムアルデヒド溶液 (3% paraformaldehyde、0.1 M PIPES (pH 7.2)、3.6 mM CaCl₂、2 mM MgCl₂) を加えて、20 分間インキュベートした。細胞を PBS で 3 回洗浄した後、50 mM NH₄Cl を含む PBS を加えて、15 分間インキュベートした。続いて、細胞を PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液 (0.05% saponin および 0.2% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA) を含む PBS) を加えて、5 分間インキュベートした。インキュベート後、抗 Rab6 抗体あるいは抗 Rab6-GTP 抗体 (多重染色を行う場合は、これに加えて他の抗体) をブロッキング溶液で希釈した一次抗体溶液を細胞に加えて、1 時間反応させた。反応後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、対応する二次抗体をブロッキング溶液で希釈した二次抗体溶液を加えて、1 時間反応させた。二次抗体との反応後、細胞を氷冷した PBS で 4 回洗浄し、カバーガラスを封入剤 (SlowFade® Gold antifade reagent、Molecular Probes) を滴下したスライドガラスの上に載せ、カバーガラスの周囲をパラフィンで封じた。

サンプルの観察と画像の取得は、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて行った。画像の取得は、以下の方法で行った。対物レンズは 63 倍油浸を用いた。画像は optical slice < 1.0 μm の条件で取得し、単染色を行ったサンプルの場合は single track、多重染色を行ったサンプルの場合は multi track を使用した。Alexa Fluor® 488、Cy2、および GFP は、アルゴンレーザー (波長 488 nm、レーザーパワー5%) で励起し、LP 505 フィルター (単染色) あるいは BP 505-530 フィルター (多重染色) を使用した。Cy3 および mCherry は、ヘリウムネオンレーザー (波長 543 nm、レーザーパワー100%) で励起し、LP 560 フィルター (二重染色) あるいは BP 560-615 フィルター (三重染色) を使用した。Cy5 は、ヘリウムネオンレーザー (波長 633 nm、レーザーパワー100%)

で励起し、LP 650 フィルターを使用した。

4.8.2 抗 *Rab6* 抗体あるいは抗 *Rab6-GTP* 抗体以外の抗体を用いた生細胞の二重染色あるいは単染色

その他の抗体を用いた蛍光抗体法 (図 36 および 45) は、Kano らの方法を参照して行った (Kano *et al.* 2011)。カバーガラス上で培養した HeLa 細胞を PBS で 2 回洗浄し、3% パラホルムアルデヒド溶液を加えて、30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.2% (v/v) Triton X-100 を含む PBS を加えて 20 分間インキュベートした。続いて、細胞を PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液 (5% スキムミルクを含む PBS) を加えて、30-60 分間インキュベートした (ブロッキング)。インキュベート後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体溶液を細胞に加えて、2 時間反応させた。反応後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体溶液を細胞に加えて、1 時間反応させた。二次抗体との反応後、細胞を氷冷した PBS で 4 回洗浄し、カバーガラスを、封入剤を滴下したスライドガラスの上に載せ、カバーガラスの周囲をパラフィンで封じた。サンプルの観察と画像の取得は、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った (詳細は 4.8.1 の項を参照)。

4.9 タンパク質発現量の定量

GTP 結合型 *Rab6* (*Rab6-GTP*) の発現量および *Rab6* タンパク質の総発現量 (total *Rab6*) は、以下の方法で定量した。はじめに、細胞内の *Rab6-GTP* および *Rab6* を蛍光抗体法により染色した (詳細は 4.8.1 の項を参照)。染色の一次抗体には、human モノクローナル抗 *Rab6-GTP* 抗体および rabbit ポリクローナル抗 *Rab6* 抗体を使用した。二次抗体には、Alexa Fluor® 488 標識抗 human IgG 抗体、および Cy3 標識抗 mouse IgG 抗体を使用した。次に、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像の取得を行い、染色した *Rab6-GTP* および *Rab6* の蛍光強度を測定した。蛍光強度の

測定は、以下の方法で行った。まず、抗体で染色した HeLa 細胞について、Z 軸方向に 1 μm ずつ焦点をずらした画像 (Z-stack 画像) を取得した (画像取得条件の詳細は 4.8.1 の項を参照)。続いて、この Z-stack 画像を一枚に重ね合わせ、この重ね合わせ画像における各細胞の細胞領域全体のピクセル蛍光強度 (Alexa Fluor® 488 および Cy3 の蛍光) を測定した。細胞外領域の蛍光強度も測定し、これをバックグラウンドの蛍光強度とした。続いて、測定した結果に基づいて、Rab6-GTP および Rab6 のタンパク質発現量を見積もり、total Rab6 (Cy3 の蛍光) に対する Rab6-GTP (Alexa Fluor® 488 の蛍光) の割合 (Rab6-GTP/Rab6) を、細胞ごとに算出した。siRNA 条件ごとに、この Rab6-GTP/Rab6 を算出した後、BICD1 および (あるいは) BICD2 ノックダウン条件における平均の割合を、コントロール (scramble) siRNA 条件における平均の割合で正規化した (コントロール siRNA 条件における平均の割合を 1 とした)。正規化後の BICD1 および (あるいは) BICD2 ノックダウン条件における値とコントロール siRNA 条件における値の有意性は、Steel's test を用いて検定した。

4.10 細胞質の調製

HeLa S3 細胞質は、東京大学の加納ふみ助教から供与いただいた。L5178Y 細胞質の調製は、Kano らの報告を参照し、Pimplikar らの方法を一部改変した方法により行った (Kano *et al.* 2000; Pimplikar *et al.* 1994)。また、遠心操作は 4°C で行った。150 mm ディッシュで培養した L5178Y 細胞を 50 ml チューブに回収し、TS-39LB ローター (TOMY) を用いて、2,000 rpm で 3 分間遠心した。遠心後、上清を除去し、細胞を PBS で懸濁して 1 本の 50 ml チューブに集めた。続いて、TS-39LB ローターを用いて 2,000 rpm で 3 分間遠心した後、上清を除去し、バッファー (1 mM EGTA、1 mM MgCl_2 、30 mM HEPES、45 mM KCl、1 mM DTT、1 μM cytochalasin D) を加えて懸濁した後、氷上で約 5 分間静置した。静置後、TS-39LB ローターを用いて 1,500 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。得られた細胞のペレットをダウンスホモジナイザーに移し、プロテ

アーゼ阻害剤 (antipain、chymostatin、pepstatin A、leupeptin の 4 種類を各 25 µg/ml) を加えて、氷上で 5 回ストロークした。続いて、ペレットに対して、1/10 容量の 10×トランスポートバッファー (250 mM HEPES ·KOH (pH 7.4)、1150 mM CH₃COOK、25 mM MgCl₂) を加え、更に 10 回以上ストロークして、細胞を破碎した。破碎後、サンプルを TLA 55 ローター (Beckman) を用いて 12,000 rpm で 16 分間遠心した。遠心後、上清を回収し、TLA100.3 ローター (Beckman) を用いて 65,000 rpm で 90 分間遠心した。得られた上清 (細胞質) は、氷上でクライオチューブに分注した後、液体窒素で凍結し、液体窒素中で保存した。また、上清 (細胞質) の一部を分取し、Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) を用いて、全タンパク質濃度を測定した。タンパク質濃度測定の標準タンパク質には、BSA を使用した。

4.11 ゴルジ体ターゲティングアッセイ

セミインタクト HeLa 細胞の調製は、Kano らの方法を一部改変して行った (Kano *et al.* 2000)。カバーガラス上で培養した HeLa 細胞を、氷冷した PBS で 2 回洗浄した。続いて、SLO を、最終濃度 0.20 µg/ml となるように、血清を含まない培地 (ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を加えた DMEM) で希釈した。この SLO 希釈溶液を細胞に加え、氷上で 5 分間静置した。細胞を氷冷した PBS で 3 回洗浄することにより、余分な SLO を除去した後、あらかじめ 32°C に温めた TB (25 mM HEPES-KOH (pH 7.4)、115 mM potassium acetate、2.5 mM MgCl₂、2 mM EGTA) を細胞に加えて、32°C で 5 分間インキュベートした。インキュベート後、形質膜が部分的に透過性となった細胞 (セミインタクト HeLa 細胞) を、氷冷した TB で 2 回洗浄し、氷冷した TB を加えて氷上で 10 分間静置することにより、細胞質成分を流出させた。10 分後、細胞を氷冷した TB で 2 回洗浄し、細胞に 5 µg/100 µl の GST-Rab6A、ATP 再生系 (1 mM ATP、50 µg/ml creatine kinase、2.62 mg/ml creatine phosphate)、1 mg/ml の glucose、1 mM の GTP および L5178Y 細胞質 (詳細は 4.10 の項を参照) (あるいは L5178Y 細胞質の代わりに TB) を加え、32°C でインキ

ュベートした。インキュベート後、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いた直接蛍光抗体法を行い、GST-Rab6A の細胞内局在を検出した。

Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いた蛍光抗体法は、Kano らの方法を参照して行った (Kano *et al.* 2011)。以下の手順は、特筆のない限り室温で行った。GST-Rab6A 存在下で 32°C でインキュベートした後のセミインタクト HeLa 細胞を、氷冷した TB で 2 回洗浄し、3% パラホルムアルデヒド溶液を加えて、30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.2% (v/v) Triton X-100 を含む PBS を加えて 20 分間インキュベートした。続いて、細胞を PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液 (5% スkimミルクを含む PBS) を加えて、30-60 分間インキュベートした。インキュベート後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体溶液を細胞に加えて、2 時間反応させた。反応後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体および Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体の溶液を加えて、更に 1 時間反応させた。Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いて単染色を行う場合 (図 8) は、ブロッキング溶液を加えてインキュベートした後、ブロッキング溶液で希釈した Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を細胞に加え、2-3 時間反応させた。(二次) 抗体との反応後、細胞を氷冷した PBS で 4 回洗浄し、カバーガラスを、封入剤を滴下したスライドガラスの上に載せ、カバーガラスの周囲をパラフィンで封じた。

続いて、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いてサンプルの観察と画像の取得を行い、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量を行った。定量は、GST-Rab6A の蛍光強度の測定結果に基づき見積もった。蛍光強度の測定は、以下の方法で行った。まず、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いて GST-Rab6A を染色した HeLa 細胞について、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Z 軸方向に 1 μm ずつ焦点をずらした画像 (Z-stack 画像) を取得した (画像取得条件の詳細は 4.8.1 の項を参照)。続いて、この Z-stack 画像を一枚に重ね合わせ、この重ね合わせ画像における各細胞のゴルジ体のピクセル蛍光強度を測定した。p230 (トランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワークのマーカー) と共局在する GST-Rab6A の蛍光強度を、ゴルジ体の蛍

光強度として測定した。ただし、図 8B に関しては、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いて単染色を行い、核近傍領域に局在する GST-Rab6A の蛍光強度を測定した。各細胞のゴルジ体以外の細胞質領域の蛍光強度も測定し、これをバックグラウンドの蛍光強度とした。

4.12 セミインタクト HeLa 細胞のノコダゾール処理

セミインタクト HeLa 細胞の微小管重合阻害剤ノコダゾール (nocodazole) 処理は、Kano らの方法を一部改変して行った (Kano *et al.* 2000)。35 mm ディッシュ内のカバーガラス上で培養した HeLa 細胞を、氷上で 20 分間静置した。続いて、培地を除去し、2 $\mu\text{g/ml}$ のノコダゾールを含む HeLa 細胞培養培地 (10% FBS およびペニシリン・ストレプトマイシン溶液を加えた DMEM) を細胞に加え、氷上で 30 分間静置した。30 分後、細胞を 37°C に移し、20 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した (詳細は 4.11 の項を参照)。ただし、セミインタクト HeLa 細胞は、1 $\mu\text{g/ml}$ のノコダゾール存在下で GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 3 mg/ml の L5178Y 細胞質とともに、32°C で 30 分間インキュベートした。ノコダゾール処理細胞において微小管が脱重合しているかどうかは、抗 β -tubulin 抗体を用いて確認した。また、抗 p230 抗体をゴルジ体マーカーとして使用した。

4.13 細胞分画法

細胞分画は、Goud らの方法を一部改変して行った (Goud *et al.* 1990)。siRNA をトランスフェクションして 72 時間後、コンフルエント状態になった HeLa 細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、氷冷した分画バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.25 M sucrose、1 mM MgCl_2 、5 mM CaCl_2 、プロテアーゼ阻害剤 (antipain、chymostatin、pepstatin A、leupeptin の 4 種類を各 5 $\mu\text{g/ml}$) を加え、セルスクレーパーでかき取って 1.5 ml チューブに回収した。以下の操作は、特筆のない限り 4°C で行った。回収後、細胞懸濁液を 1 ml シリンジに装着した 27 ゲージ針を 50 回通過させる

ことにより、細胞を破碎した。破碎後の懸濁液は、 $600 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を回収した。この上清を、TLA100.3 ローターを用いて $100,000 \times g$ で 1 時間遠心し、細胞質画分（上清）と膜画分（ペレット）に分離した。粗膜画分は、細胞質画分と等量の分画バッファーで慎重に再懸濁した。各画分は、等量の 2×SDS サンプルバッファーを加えて懸濁後、 100°C で 5 分間煮沸した。ウエスタンブロッティングによる解析では、各画分を等量ずつ泳動した。

4.14 リコンビナントタンパク質の調製

4.14.1 GST-Rab6A および GST の精製

タンパク質の調製は、特筆のない限り 4°C で行った。はじめに、GST-Rab6A のプラスミド、あるいは GST のプラスミド（pGEX-5X-1 ベクターのみ）を、大腸菌株 BL21 に導入した。続いて、プラスミドを導入した大腸菌を、 $100 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む LB 液体培地で OD_{600} が 0.5-0.7 になるまで 37°C で培養した後、培養液に IPTG を最終濃度 0.5 mM となるように加え、 30°C でさらに 3 時間培養した。その後、培養液を $6,000 \times g$ で 5 分間遠心し、得られた大腸菌ペレットを、プロテアーゼ阻害剤（Roche）を加えたソニケーションバッファー（50 mM Tris-HCl（pH 8.0）、50 mM NaCl、1 mM EDTA-NaOH（pH 8.0）、1 mM DTT）で再懸濁した。懸濁後、超音波破碎機（TOMY）を用いて超音波処理することにより、菌体を破碎した。破碎後の懸濁液に、Triton X-100 を最終濃度 1%（v/v）となるように加え、 4°C で 30 分間ローテートした後、AR510-04 ローター（TOMY）を用いて 15,000 rpm で 20 分間遠心した。得られた上清（可溶性画分）に、ソニケーションバッファーで平衡化した Glutathione Sepharose 4B ビーズ（GE Healthcare）を加え、 4°C で 2 時間ローテートした。ローテート後、サンプルを ST-720 ローター（KUBOTA）を用いて 3,000 rpm で 2 分間遠心し、上清を除去した。タンパク質が結合したビーズは、ソニケーションバッファーで 4 回洗浄した後、Poly-Prep Chromatography Columns（Bio-Rad）に移し、プロテアーゼ阻害剤（Roche）を加えた溶出バッファー（10 mM glutathione、50 mM Tris-HCl（pH 8.0））によ

り精製タンパク質を溶出した。

In vitro GEF アッセイ（詳細は 4.23 の項を参照）で用いた GST-Rab6A タンパク質は、上記の方法のうち一部の条件を変更して調製を行った。変更したのは、①ソニケーションバッファの 1 mM EDTA を 1 mM MgCl₂に変更、②大腸菌ペレットを再懸濁するソニケーションバッファに 10 μM GDP を添加、の 2 点である。

溶出した精製タンパク質は、Microcon Centrifugal Filter Devices (Millipore) を用いて濃縮し、Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を測定した（BSA を標準タンパク質として使用）後、1.5 ml チューブに分注して液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。また、濃縮後の精製タンパク質は、SDS-PAGE により泳動し、CBB 染色あるいは抗 Rab6 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出を行い、精製度を確認した。

4.14.2 *His-mBICD2* の精製

タンパク質の調製は、特筆のない限り 4°Cで行った。はじめに、His-mBICD2 のプラスミドを、大腸菌株 BL21 (DE3) に導入した。続いて、プラスミドを導入した大腸菌を、0.5-1% glucose および 20 μg/ml のカナマイシンを含む 2×YT 培地 (1.6% Bacto Tryptone, 1% Bacto Yeast Extract, 0.5% NaCl) で、OD₆₀₀ が 0.5-0.7 になるまで 37°Cで培養した後、培養液に IPTG を最終濃度 0.5 mM となるように加え、25°Cでさらに 5 時間培養した。その後、培養液を 6,000 × *g* で 5 分間遠心し、得られた大腸菌ペレットを、プロテアーゼ阻害剤 (Roche) を加えた溶解バッファ (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) で再懸濁した。懸濁後、超音波破砕機 (TOMY) を用いて超音波処理することにより、菌体を破砕した。破砕後の懸濁液に、Triton X-100 を最終濃度 1% (v/v) となるように加え、4°Cで 30 分間ローテートした後、AR510-04 ローターを用いて 15,000 rpm で 20 分間遠心した。得られた上清（可溶性画分）に、洗浄バッファ (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) で平衡化した Ni-NTA Agarose ビーズ (QIAGEN) を加え、

4℃で2時間ローテートした。ローテート後、サンプルを ST-720 ローター (KUBOTA) を用いて 3,000 rpm で2分間遠心し、上清を除去した。タンパク質が結合したビーズは、洗浄バッファーで4回洗浄した後、Poly-Prep Chromatography Columns に移し、プロテアーゼ阻害剤 (Roche) を加えた溶出バッファー (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) により精製タンパク質を溶出した。

溶出した精製タンパク質は、Microcon Centrifugal Filter Devices を用いて濃縮し、Protein Assay Dye Reagent Concentrate を用いてタンパク質濃度を測定した (BSA を標準タンパク質として使用) 後、1.5 ml チューブに分注して液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。また、濃縮後の精製タンパク質は、SDS-PAGE により泳動し、CBB 染色あるいは抗 BICD2 抗体を用いたウェスタンブロットティングにより検出を行い、精製度を確認した。

4.15 GST プルダウンアッセイ

本研究では、2つの異なる条件で GST プルダウンアッセイを行った。特筆のない限り、操作は4℃で行った。

4.15.1 Rab6A 結合タンパク質の抽出と同定

はじめに、L5178Y 細胞質を取得し、3 mg/ml の濃度に調製した (詳細は 4.10 の項を参照)。細胞質と GST-Rab6A または GST の混合を行う前に、以下の方法により GST-Rab6A または GST と Glutathione Sepharose 4B ビーズの結合を行った。まず、ビーズを TB で平衡化した。続いて、GST-Rab6A (コントロールとして GST) を、ビーズと混合し、4℃で1時間ローテートした。ローテート後、混合溶液を AR015-24 ローター (TOMY) を用いて 15,000 rpm で2分間遠心し、沈殿を取得した。得られた沈殿 (GST-Rab6A または GST が結合したビーズ) は、TB で4回洗浄した後、3 mg/ml の L5178Y 細胞質とともに 4℃で90分間ローテートした。90分後、混合溶液を

AR015-24 ローターを用いて 15,000 rpm で 2 分間遠心し、沈殿を回収した。最後に、沈殿からタンパク質の溶出を行った。タンパク質の溶出は、TB で 4 回洗浄した沈殿（GST-Rab6A ビーズ画分あるいは GST ビーズ画分）に、2×SDS サンプルバッファーを加え、100℃で 5 分間煮沸することにより行った。

溶出させたタンパク質は、SDS-PAGE で分子量ごとに分離後、SYPRO® Ruby protein gel stain (Invitrogen) を用いて染色した。染色されたタンパク質のうち、GST-Rab6A ビーズ画分特異的に検出されたタンパク質を、ゲルから切り出し、LC-MS/MS により解析した。LC-MS/MS による解析は、株式会社アプロサイエンス (Tokushima, Japan) に依頼した。また、溶出させたタンパク質は、各種抗体を用いたウエスタンブロッティングにも供した。

4.15.2 細胞質からの GST-Rab6A 結合タンパク質の除去

GST-Rab6A (コントロールとして GST) を、3 mg/ml の L5178Y 細胞質、ATP 再生系、1 mg/ml の glucose、および 1 mM の GTP と混合し、4℃で 30 分間ローテートした。ローテート後、混合溶液に TB で平衡化した Glutathione Sepharose 4B ビーズを加えて 4℃で 2 時間ローテートした。ローテート後、サンプルを AR015-24 ローターを用いて 15,000 rpm で 5 分間遠心した。得られた上清に、TB で平衡化した新しいビーズを加え、さらに 4℃で 2 時間ローテートした後、AR015-24 ローターを用いて 15,000 rpm で 5 分間遠心した（この操作を 2 回繰り返した）。遠心により得られた上清は、0.22 µm フィルター (Millipore) に通し、ビーズを完全に除去した。フィルターを通した上清 (Cytosol (-RBP)、コントロールとして Cytosol (-GST)) は、ゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。直ちに使用しない場合は、液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。また、サンプルの一部は、2×SDS サンプルバッファーを加えて 100℃で 5 分間煮沸し、ウエスタンブロッティングに供した。

4.16 共免疫沈降法

HeLa 細胞を用いた共免疫沈降法は、Wanschers らの方法を一部改変して行った (Wanschers *et al.* 2007)。60 mm ディッシュで培養している HeLa 細胞に、GFP-Rab6A およびマウス BICD2 の C 末端領域 (アミノ酸残基 706 番から 810 番、BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰) に mCherry を融合させた変異体 (mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰)、あるいは GFP-Rab6A および C 末端領域を欠失させた mCherry 融合変異体 (mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵) のプラスミドをトランスフェクションした。プラスミドのトランスフェクションから 24 時間後、細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤 (Roche) を添加した氷冷した溶解バッファー (100 mM Na₂HPO₄ (pH 8.0)、1% (v/v) Triton X-100、0.2% BSA (pH 8.0)) を加えて、セルスクレーパーでかき取って 1.5 ml チューブに回収した。細胞懸濁液を 4°C で 30 分間ローテートし、さらに 1 ml シリンジに装着した 27 ゲージ針を 30 回通過させることにより、細胞の破碎を行った。破碎後、12,000 × *g* で 10 分間遠心し、上清を回収した (上清の一部を分取し、Input サンプルとした)。続いて、上清に抗 GFP 抗体 (コントロールとして、抗 GFP 抗体の代わりに同重量の normal rabbit IgG (Cell Signaling Technology)) を加え、4°C で一晩ローテートした。ローテート後、この抗体を含む溶液に、溶解バッファーで平衡化した Protein G Sepharose ビーズ (GE Healthcare) を加え、さらに 4°C で 1 時間ローテートした。続いて、混合溶液を AR015-24 ローターを用いて 13,000 rpm で 1 分間遠心した。上清を除去した後、ビーズを高塩濃度バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1.2 M KCl、1% (v/v) Triton X-100) で 4 回洗浄し、さらに PBS で 2 回洗浄した。洗浄後のビーズおよび Input サンプルは、2×SDS サンプルバッファーを加えて懸濁し、100°C で 5 分間煮沸した。煮沸後のサンプルは、ウエスタンブロッティングに供した。

4.17 ウエスタンブロッティング

2×SDS サンプルバッファーを加えたサンプルは、12.5% あるいは 5-20% SuperSep™ Ace

(Wako)、あるいは Gel Factory mini MP SYSTEM (DRC) を用いて作製したポリアクリルアミドゲルを用いて、SDS-PAGE により分離した。泳動後のゲル、ろ紙 (3MM Chr, GE Healthcare)、およびニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad)、あるいはあらかじめメタノールで親水処理を行った polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) を、セミドライブロットティングバッファー (48 mM Tris、39 mM Glycine、20% (v/v) メタノール、0.038% (w/v) SDS) に浸して 10 分間振とうした。振とう後、Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) を用いてセミドライブロットティング法により、ゲル中のタンパク質をメンブレンへ転写した。

転写後、メンブレンを 5% スキムミルク (雪印) を含む tris-buffered saline (TBS) (ブロッキングバッファー) に浸して、室温で 30 分間振とうした。続いて、ブロッキングバッファーあるいは Can Get Signal® Solution 1 (Toyobo) を用いて一次抗体を希釈し、これにメンブレンを浸して、室温で 2 時間あるいは 4℃で一晩反応させた。一次抗体との反応後、メンブレンを TBS あるいは 0.1% Tween 20 を含む TBS (TBST) で 3 回洗浄した。洗浄後、ブロッキングバッファーあるいは Can Get Signal® Solution 2 (Toyobo) を用いて二次抗体を希釈し、これにメンブレンを浸して、室温で 1 時間反応させた。二次抗体との反応後、メンブレンを TBS あるいは TBST で 3 回洗浄した。共免疫沈降法のサンプルについて、抗 GFP 抗体を用いて検出を行う場合は、タンパク質の PVDF メンブレンへの転写以降は、Immuno-Aptamer™, Rabbit IgG (ニッポン・ジーン) のマニュアルに従って、目的タンパク質の検出を行った。二次抗体との反応後、洗浄したメンブレンは、Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer) と反応させ、LAS-4000 mini (FUJIFILM) を用いてバンドを検出した。バンド強度の解析は、Multi Gauge Ver 3.2 (FUJIFILM) を用いて行った。

4.18 GT-GFP を用いた逆行輸送経路の解析

BFA 処理および GT-GFP を用いた、COPI 非依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路の

解析は、Morikawa らの方法に基づいて行った (Morikawa *et al.* 2009)。siRNA をトランスフェクションして 48 時間後、カバーガラス上で培養している HeLa 細胞に、GT-GFP のプラスミドをトランスフェクションした。プラスミドのトランスフェクションから 16-24 時間後、培地を除去し、BFA を最終濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加した HeLa 細胞培養培地 (10% FBS およびペニシリン-ストレプトマイシン溶液を加えた DMEM) を細胞に加えて、37°C で 0、5、10、30 分間インキュベートした。インキュベート後、3% パラホルムアルデヒド溶液を加え、室温で 30 分間インキュベートした。30 分後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、カバーガラスを、封入剤を滴下したスライドガラスの上に載せ、カバーガラスの周囲をパラフィンで封じた。

続いて、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いてサンプルの観察を行った。対物レンズは 63 倍油浸、GFP はアルゴンレーザー (波長 488 nm) で励起し、FSet09 フィルターセットを使用した。はじめに、ゴルジ体消失過程のキネティクスを解析するため、GT-GFP の細胞内局在を指標に、細胞を①Golgi、②Golgi + tubules、③tubules + ER、④ER、の 4 種類に分類した。①の Golgi は、GT-GFP が典型的なゴルジ体の位置 (核近傍領域) に局在している細胞であり、②の Golgi + tubules は、GT-GFP がゴルジ体の位置およびそこから生じる管状構造に局在している細胞である。③tubules + ER は、GT-GFP の核近傍領域への局在が確認されず、GT-GFP が管状構造および細胞質領域の網目構造に分布している細胞である。④の ER は、GT-GFP の管状構造への管状構造が確認されず、細胞質領域の網目構造のみに分布している細胞である。続いて、①～④の局在ごとに細胞数を計数した。各種類の細胞の割合を各時点ごとに算出することにより、ゴルジ体消失過程のキネティクスの解析を行った。

4.19 光褪色後蛍光回復 (FRAP) 法

35 mm ガラスボトムディッシュで培養した HeLa 細胞に、BICD2 の欠失変異体 (mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ あるいは mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵、コントロールとして mCherry のみの

空ベクター) および GFP-Rab6A を同時トランスフェクションし、24 時間培養した。24 時間後、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像の取得を行った。対物レンズは 63 倍油浸、蛍光の励起にはアルゴンレーザー (波長 488 nm) を用いた。測定する領域 (Region of interest) のブリーチは、レーザーパワー100%で行った。画像は、レーザーパワー3%、optical slice < 7 μ m の条件で取得した。ブリーチ後の画像は、10 秒ごとに取得した。画像取得後、LSM510 ソフトウェアを用いて、核近傍領域における GFP-Rab6A の蛍光強度を測定した。また、細胞以外の領域の蛍光強度を、バックグラウンドの蛍光強度として使用した。続いて、ブリーチ前の蛍光強度に対する、ブリーチ後各時点における蛍光強度の割合を算出した。グラフの蛍光回復率は、核近傍領域における蛍光強度の変化に基づいて計算し、ブリーチ前の蛍光強度を 100%、ブリーチ直後 (0 秒時点) の蛍光強度を 0%として示した。

4.20 Triton X-114 を用いた二相分配法

Triton X-114 を用いた二相分配法 (Triton X-114 phase partitioning) は、Bustos らの方法を一部改変して行った (Bustos *et al.* 2012)。以下の手順は、特筆のない限り 4°Cで行った。セミインタクト HeLa 細胞に GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 3 mg/ml の L5178Y 細胞質を加えて、32°Cで 30 分間インキュベートした (詳細は 4.11 の項を参照)。インキュベート後、細胞を氷冷した TB で 3 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤 (Roche) を添加した氷冷した溶解バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、10% (v/v) glycerol、5 mM MgCl₂、1% Triton X-114) を加えて、セルスクレーパーでかき取って 1.5 ml チューブに回収した。回収後、細胞懸濁液を 1 ml シリンジに装着した 27 ゲージ針を 30 回通過させることにより、細胞を破碎した。破碎後の懸濁液は、4°Cで 45 分間インキュベートした後、14,000 $\times g$ で 20 分間遠心した。遠心後の上清を 30°Cの恒温水槽で 15 分間インキュベートした後、室温において 20,000 $\times g$ で 15 分間遠心した。この遠心操作により得られた水相 (aqueous phase: AP) および界面活性剤の相 (DP) に、3

倍量（体積）の氷冷したアセトンを加え、 -20°C で一晚インキュベートした。インキュベート後、サンプルを $12,000 \times g$ で 5 分間遠心した。得られたペレットは、同量ずつ 2×SDS サンプルバッファを加えて再懸濁し、 100°C で 5 分間煮沸した。煮沸後のサンプルは、ウェスタンブロッティングに供した。

4.21 Alexa Fluor® 488 標識 CtxB を用いた逆行輸送経路の解析

Alexa Fluor® 488 標識 CtxB (Invitrogen) を用いた COPI 依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路の解析は、Kano らの方法 (Cy2 標識 Stx1 を用いた輸送アッセイ) を一部改変して行った (Kano *et al.* 2009)。まず、siRNA をトランスフェクションして 72 時間後、カバーグラス上で培養した HeLa 細胞を、氷冷した PBS で 3 回洗浄した。続いて、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB を最終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ となるように添加した HeLa 細胞培養培地 (10% FBS およびペニシリン-ストレプトマイシン溶液を加えた DMEM) を細胞に加えて、氷上で 30 分間静置した。静置後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、あらかじめ 37°C に温めた HeLa 細胞培養培地を加えて、 37°C で 0、0.5、1、2、4、6 時間インキュベートした。インキュベート後、3% パラホルムアルデヒド溶液を加え、室温で 30 分間インキュベートした。30 分後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、カバーグラスを、封入剤を滴下したスライドグラスの上に載せ、カバーグラスの周囲をパラフィンで封じた。

続いて、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いてサンプルの観察を行った。対物レンズは 63 倍油浸、Alexa Fluor® 488 はアルゴンレーザー (波長 488 nm) で励起し、FSet09 フィルターセットを使用した。はじめに、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB の細胞内局在を指標に、細胞を①PM、②Golgi、③ER、の 3 種類に分類した。①の PM は、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB が細胞の輪郭に局在している細胞である。②の Golgi は、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB が典型的なゴルジ体の位置 (核近傍領域) に局在している細胞である。③の ER は、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB が細胞質領域に網目状に分布している細胞である。①～③の局在ごとに細胞数を計数した後、各時点ごとに各

種類の細胞の割合を算出することにより、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB のキネティクスを解析した。

4.22 VSVGts045-GFP を用いた順行輸送経路の解析

VSVGts045-GFP を用いた、ゴルジ体を経由した小胞体から形質膜への順行輸送経路の解析は、Kano らの方法に基づいて行った (Kano *et al.* 2009)。siRNA をトランスフェクションして 48 時間後、カバーガラス上で培養している HeLa 細胞に、VSVGts045-GFP のプラスミドをトランスフェクションし、39°C で 24 時間培養した。続いて、細胞を 32°C に移し、0、15、30、60、90、120 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を氷冷した PBS で 3 回洗浄し、3% パラホルムアルデヒド溶液を加えて、室温で 30 分間インキュベートした。30 分後、細胞を PBS で 4 回洗浄し、カバーガラスを封入剤を滴下したスライドガラスの上に載せ、カバーガラスの周囲をパラフィンで封じた。

続いて、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いてサンプルの観察を行った。対物レンズは 63 倍油浸、GFP はアルゴンレーザー (波長 488 nm) で励起し、FSet09 フィルターセットを使用した。はじめに、VSVGts045-GFP の細胞内局在を指標に、細胞を①ER、②Golgi、③PM、の 3 種類に分類した。①の ER は、VSVGts045-GFP が細胞質領域に網目状に分布している細胞であり、②の Golgi は、VSVGts045-GFP が典型的なゴルジ体の位置 (核近傍領域) に局在している細胞である。③の PM は、VSVGts045-GFP が細胞の輪郭に局在している細胞である。①～③の局在ごとに細胞数を計数した後、各種類の細胞の割合を各時点ごとに算出することにより、VSVGts045-GFP 輸送のキネティクスを解析した。

4.23 *In vitro* GEF アッセイ

GST-Rab6A への GDP の蛍光アナログ 2'-(3')-O-(N-methylanthraniloyl) GDP (mant-GDP、Invitrogen) の付加は、Zhu らの方法を一部改変して行った (Zhu *et al.* 2001)。はじめに、ローデ

イングバッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5 mM EDTA-NaOH (pH 8.0)) に、GST-Rab6A (最終濃度 4 μ M) および mant-GDP (最終濃度 100 μ M) を添加し、反応液を調製した。続いて、この反応液を 25°C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、反応液を氷上に移し、MgCl₂ を最終濃度 10 mM となるように添加した。続いて、反応液を Microcon Centrifugal Filter Devices に加え、14,000 $\times g$ で遠心 (4°C) することにより濃縮し、濃縮された溶液を GEF 活性測定用の反応バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM MgCl₂) で希釈することにより、溶液のバッファー交換および遊離 mant-GDP の除去を行った。得られた mant-GDP 付加 GST-Rab6A は、Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度を測定 (BSA を標準タンパク質として使用) した後、1.5 ml チューブに分注して液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。また、CBB 染色により mant-GDP 付加 GST-Rab6A の検出を行い、GST-Rab6A が分解されていないことを確認した。

GEF 活性の測定は、Delprato らの方法を参照して行った (Delprato *et al.* 2004)。まず、mant-GDP 付加 GST-Rab6A を、最終濃度 1 μ M となるように反応バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM MgCl₂) で希釈した (GST-Rab6A 溶液)。ヌクレオチド交換反応は、0-4 μ M の His-mBICD2 を含む GST-Rab6A 溶液に 100 μ M の GMP-PNP (加水分解されない GTP のアナログ) を添加し、25°C でインキュベートすることにより行った。GST-Rab6A に付加した mant-GDP の遊離にともなう蛍光の変化は、励起波長 360 nm、測定波長 440 nm の条件でモニターした。F-2500 蛍光分光光度計 (Hitachi) を用いて測定を行い、Savitzky-Golay 法を用いてデータのスムージングを行った。

4.24 統計解析

2 群間の差の検定では、F 検定と Student's *t*-test の組み合わせ、または符号検定を用いて、群間の差の有意性を判断した。3 群以上の差の検定では、以下の方法で群間の差の有意性を判断した。

コントロール群と対照群を比較する検定では、Dunnett's test を用いて群間の差の有意性を判断した。すべての2群同士の組み合わせで比較を行う場合は、Tukey-Kramer test あるいは Steel's test を用いて、群間の差の有意性を判断した。検定による P 値が 0.05 未満の場合、群間の差に有意性があると判断した。

第 5 章 図表

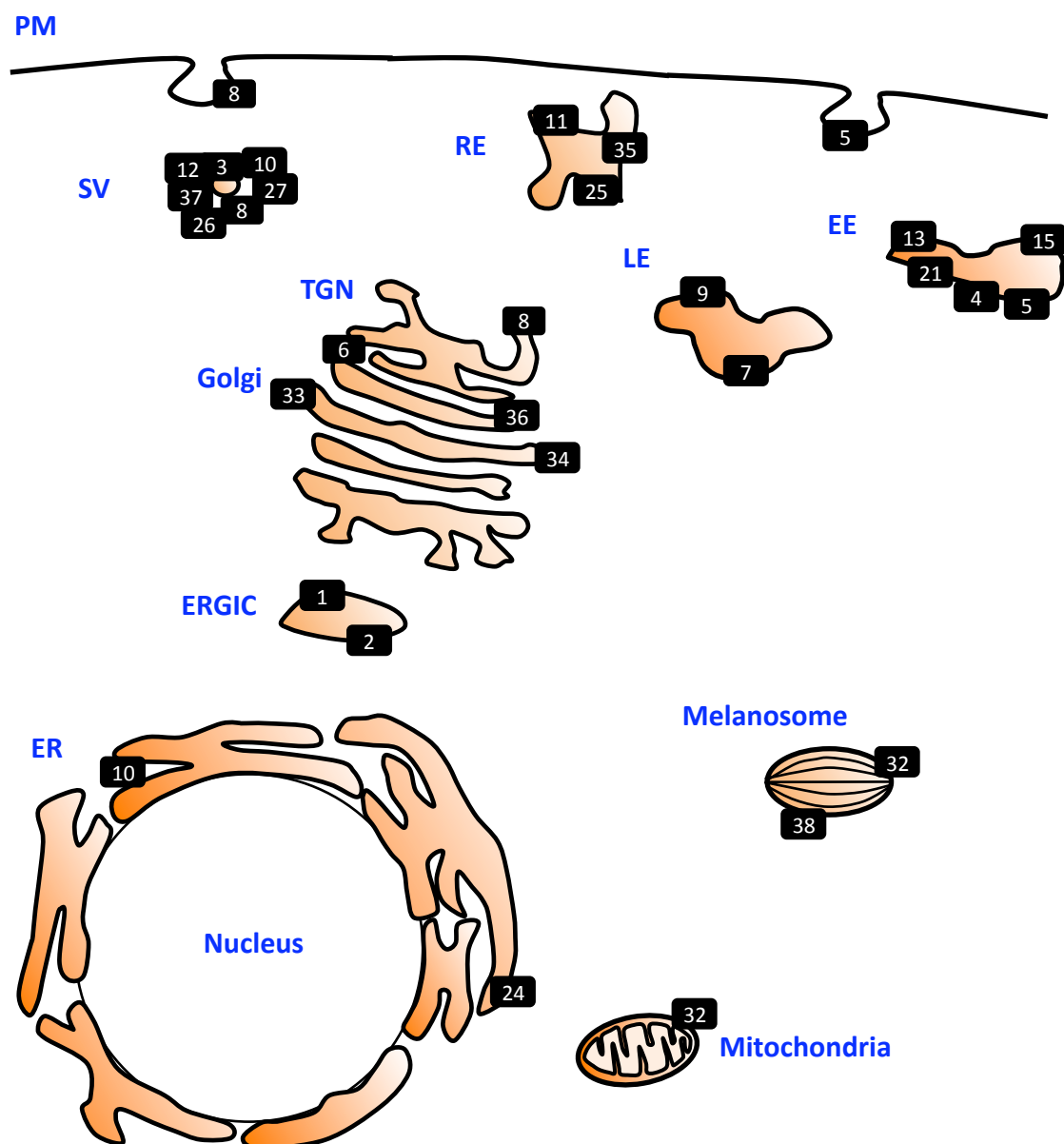


図1 Rab タンパク質の細胞内局在

主要な Rab タンパク質の細胞内局在を示した。数字は、Rab タンパク質の番号を表している。EE: early endosome (初期エンドソーム)、ER: endoplasmic reticulum (小胞体)、ERGIC: ER-Golgi intermediate compartment (小胞体-ゴルジ体間中間コンパートメント)、Golgi: Golgi apparatus (ゴルジ体)、LE: late endosome (後期エンドソーム)、Melanosome (メラノソーム)、Mitochondria (ミトコンドリア)、Nucleus (核)、PM: plasma membrane (形質膜)、RE: recycling endosome (リサイクリングエンドソーム)、SV: secretory vesicle/granule (分泌顆粒)、TGN: *trans*-Golgi network (トランスゴルジネットワーク)。

供与膜

標的膜

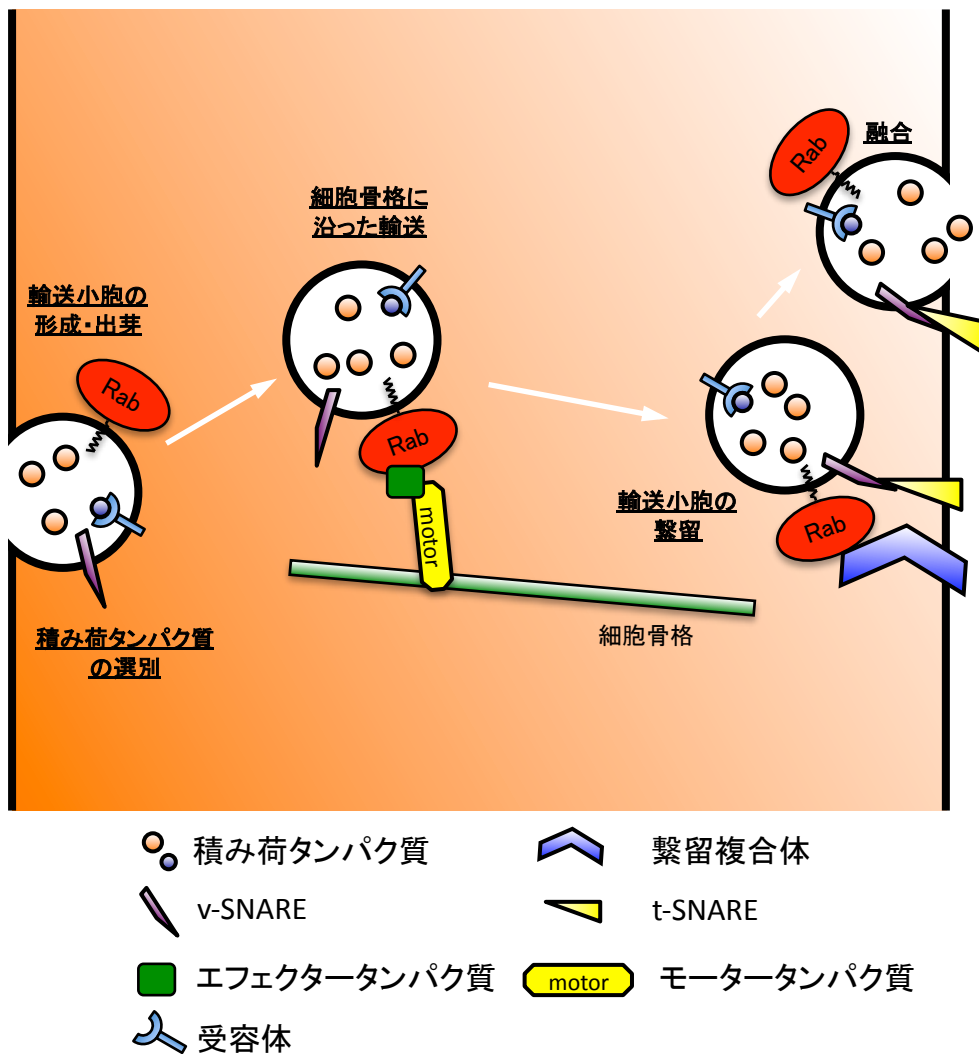


図2 Rab タンパク質の制御する輸送段階

Rab タンパク質は、それぞれが機能する特定のオルガネラにターゲティング・局在し(図1を参照)、輸送される積み荷タンパク質の選別、輸送小胞の形成、供与(オルガネラ)膜からの輸送小胞の出芽、細胞骨格に沿った輸送小胞の輸送、輸送小胞の標的(オルガネラ)膜への繫留、輸送小胞と標的(オルガネラ)膜との融合など、小胞輸送経路のさまざまな段階を制御している。

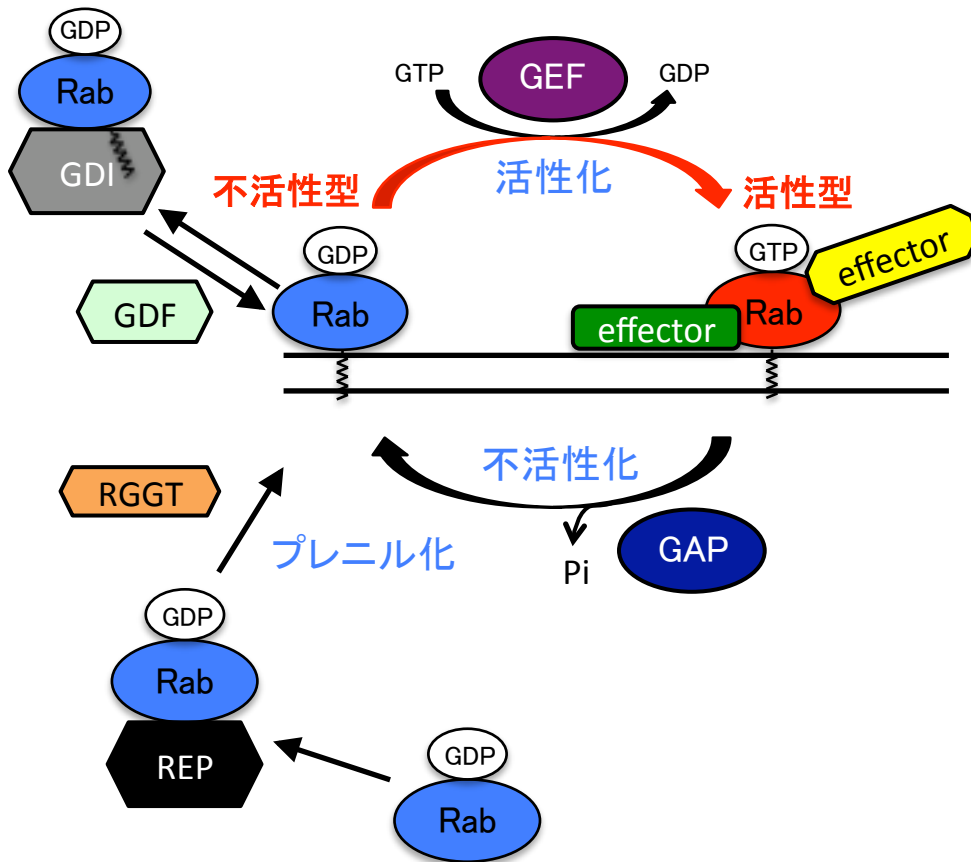


図3 Rab タンパク質の構造と活性制御

新たに生合成された Rab タンパク質 (GDP 結合型) は、Rab エスコートタンパク質 (REP) と複合体を形成してゲラニルゲラニル転移酵素 (RGGT) に提示され、この酵素によって C 末端のシステイン残基にゲラニルゲラニル基が付加 (プレニル化) される。プレニル化された GDP 結合型の Rab タンパク質は、単体では細胞質において不安定であるが、GDP 解離抑制因子 (GDI) と複合体を形成することによって、細胞質に安定的に存在する。この複合体から GDI が解離すると、GDP 結合型 Rab タンパク質は膜と結合することができるようになり、グアニヌヌクレオチド交換因子 (GEF) によって、Rab タンパク質に結合する GDP の GTP への交換が促進される (活性化)。GDP 結合型 Rab タンパク質からの GDI の解離は、GDI 置換因子 (GDF) によって行われる場合もある。活性化により、GTP 結合型 Rab タンパク質は、数多くの Rab エフェクタータンパク質 (effector) と結合できるようになる。GTP 結合型から GDP 結合型への変換 (不活性化) は、Rab タンパク質自身が持つ GTPase 活性によって、結合している GTP を加水分解することで行われるが、この反応は GTPase 活性化タンパク質 (GAP) によって促進される。

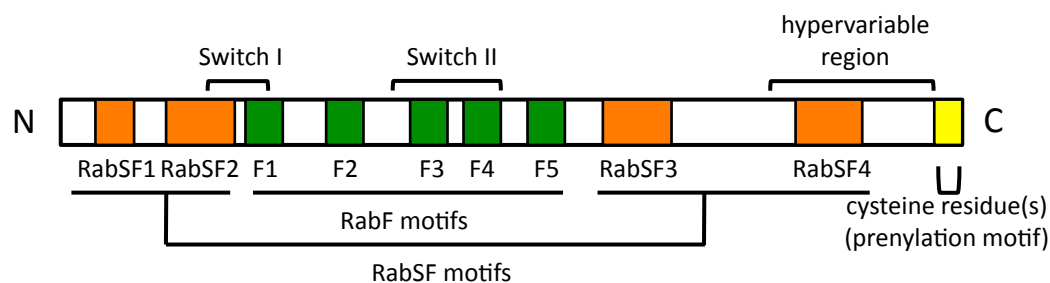


図4 Rab タンパク質の構造

Rab タンパク質の C 末端には、1 つあるいは 2 つ (多くの場合は 2 つ) のシステイン残基 (cysteine residue (s)、黄色) が存在する。この C 末端のシステイン残基には、ゲラニルゲラニル基が付加 (プレニル化 (prenylation)) される (prenylation motif)。Rab タンパク質は、結合するヌクレオチドによって、Switch I および Switch II と呼ばれるスイッチ領域の立体構造が変化する。これにより、GTP 結合型 Rab タンパク質は、数多くの Rab エフェクタータンパク質と結合できるようになる。超可変領域 (hypervariable region) は、C 末端のシステイン残基の N 末端側に隣接し、Rab タンパク質ごとに長さや配列が異なる、Rab タンパク質の C 末端約 35-40 アミノ酸残基の領域である。RabF モチーフ (RabF motifs) は Rab タンパク質特有な配列、RabSF モチーフ (RabSF motifs) は Rab サブファミリーの間で保存された配列であり、RabF モチーフや RabSF モチーフは、その多くが超可変領域より N 末端側に含まれる。

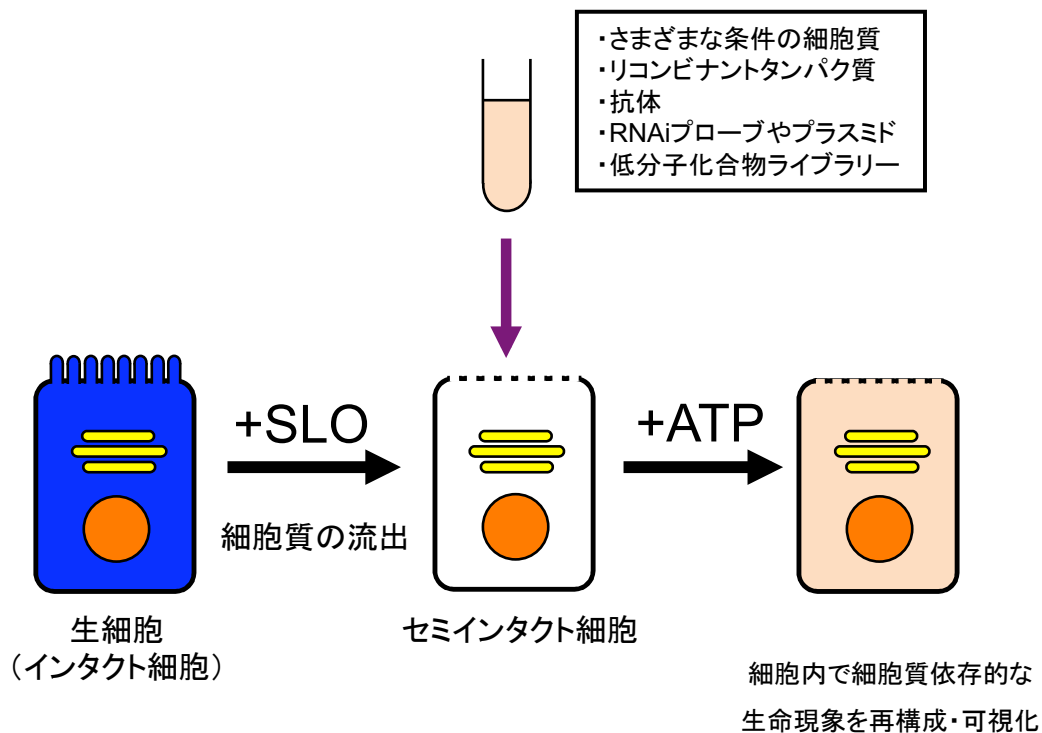


図5 セミインタクト細胞アッセイの概略図

セミインタクト細胞アッセイは、細胞をすりつぶして行う従来の生化学的手法では困難だった、単一の細胞内で起こるタンパク質機能発現のタイミングや機能発現の場所を可視化解析することができるアッセイである。セミインタクト細胞とは、孔形成毒素や界面活性剤などを用いて、形質膜を部分的に透過性にした細胞である。形質膜透過処理には、ストレプトリシンO (SLO) を用いた。形質膜の穴から細胞質は流出するが、オルガネラや細胞骨格はそのまま保持される。セミインタクト細胞に、別に調製した細胞質成分やリコンビナントタンパク質、エネルギー源としてATP再生系などを加えてインキュベートすることで、添加した細胞質成分に依存的な細胞内現象を再構成・可視化することができる。この細胞には、さまざまな条件下の細胞から調製した細胞質成分、タンパク質、抗体、プラスミドなどを加えることもでき、再構成した細胞内現象に不可欠な因子を探索し、解析・検証することができる。

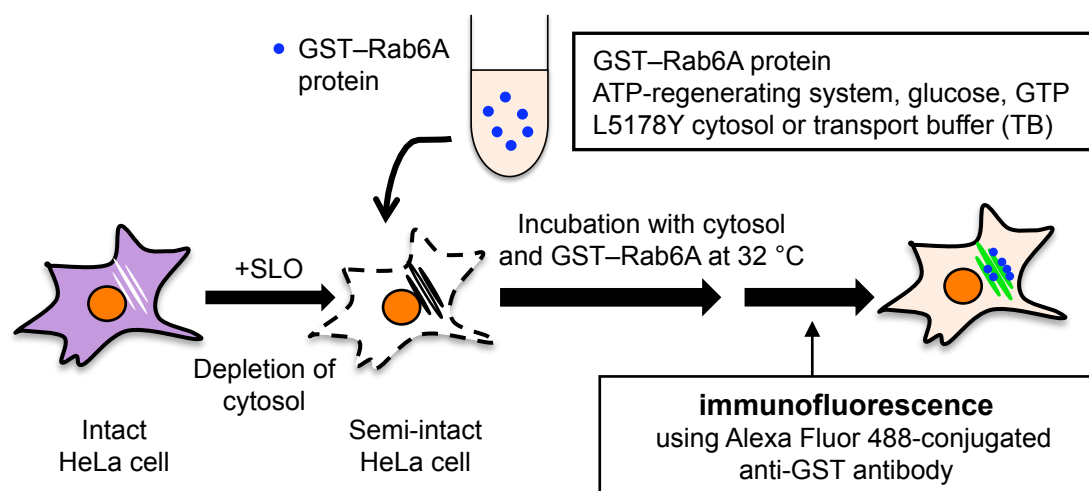


図 6 セミインタクト細胞アッセイ（ゴルジ体ターゲティングアッセイ）の概略図

HeLa 細胞の形質膜を、SLO を用いて透過処理し、細胞質成分を除去した。得られたセミインタクト HeLa 細胞を、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および L5178Y 細胞質（あるいは細胞質の代わりに TB）とともに 32°C でインキュベートした。インキュベート後、細胞を固定して Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体を用いた蛍光抗体法を行い、GST-Rab6A を検出した（詳細は 4.11 の項を参照）。

（出典元：Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.）

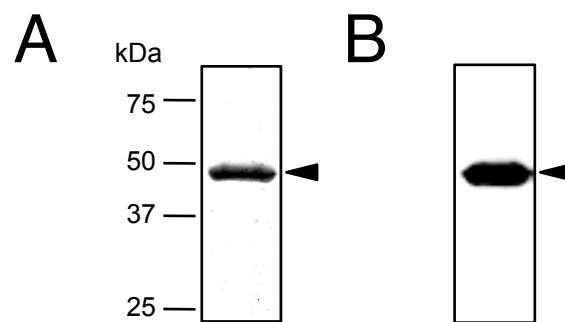


図 7 GST-Rab6A の精製度確認

大腸菌発現系を用いて発現・精製した GST-Rab6A を SDS-PAGE を用いて分離し、CBB 染色 (A)、あるいは抗 Rab6 抗体を用いたウエスタンブロッティング (B) を用いて検出した。CBB 染色の場合は 4 μ g、ウエスタンブロッティングの場合は 2 μ g の GST-Rab6A をポリアクリルアミドゲルにアプライした。左端に分子質量を示した。矢印は、GST-Rab6A のバンドを示している。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

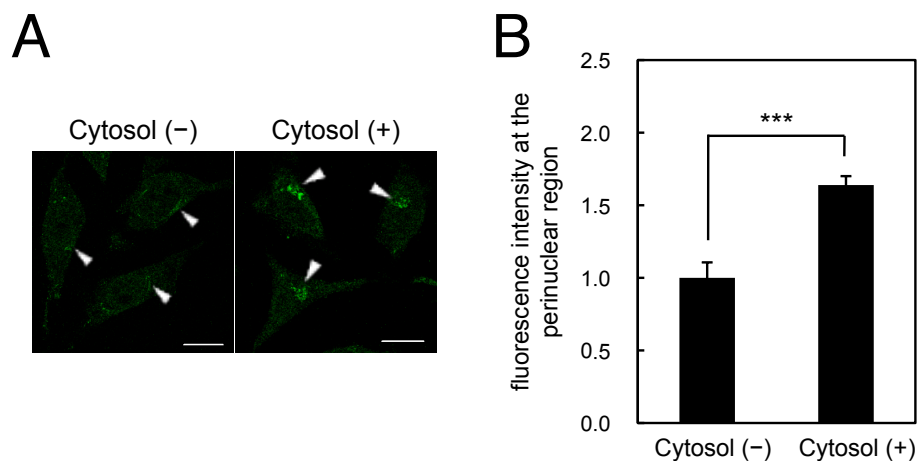


図 8 細胞質依存的な GST-Rab6A の核近傍領域へのターゲティング

(A) GST-Rab6A の細胞内局在。セミインタクト HeLa 細胞を、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 3 mg/ml の L5178Y 細胞質 (Cytosol (+)) (あるいは細胞質の代わりに TB (Cytosol (-)) とともに、32°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。矢印は GST-Rab6A が核近傍領域にターゲティングしている様子を示している。スケールバーは 20 μ m。

(B) (A) の核近傍領域に局在する GST-Rab6A のターゲティング量の定量 (詳細は 4.11 の項を参照)。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 29-61 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-) 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。*** $P < 0.001$ (Student's *t*-test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

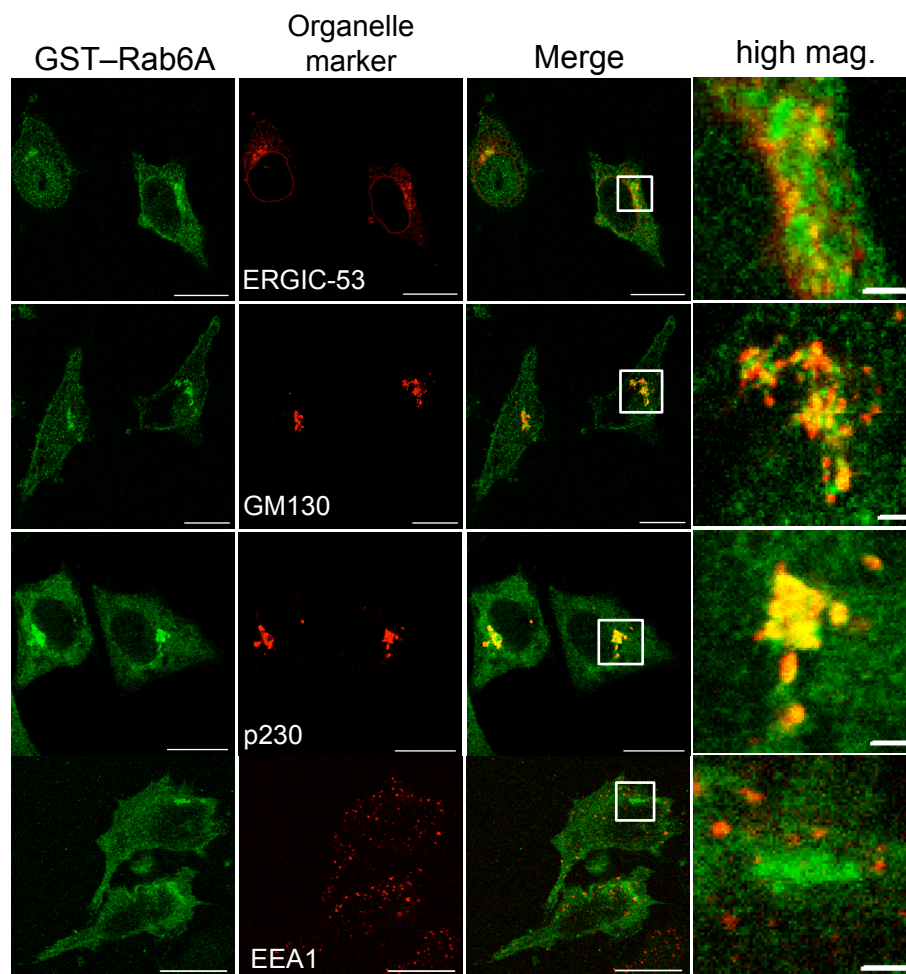


図9 セミインタクト HeLa 細胞における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングの形態学的検証

セミインタクト HeLa 細胞を、L5178Y 細胞質存在下 (図 8A の Cytosol (+) 条件と同様) において、32°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を固定して蛍光抗体法を行った。蛍光抗体法では、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体および各種オルガネラマーカータンパク質に対する抗体を用いた二重染色を行った。マーカータンパク質 (オルガネラ) として、ERGIC-53 (ERGIC)、GM130 (シスゴルジ層)、p230 (トランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワーク)、EEA1 (初期エンドソーム) に対する抗体を使用した。Merge は、GST-Rab6A の画像と各マーカータンパク質の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 20 μm あるいは 2 μm (high mag.)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

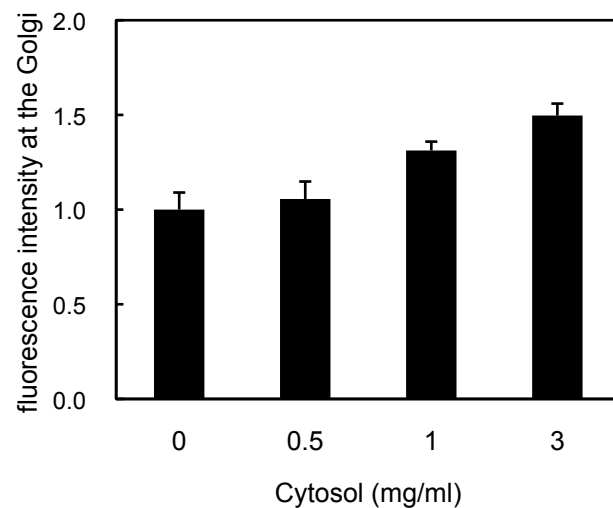


図 10 GST-Rab6A ゴルジ体ターゲティングの細胞質濃度依存性

セミインタクト HeLa 細胞を、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 0、0.5、1、3 mg/ml の L5178Y 細胞質 (0 mg/ml は、図 8A の Cytosol (–) 条件と同様) とともに 32°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均±標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 10 個の細胞を解析)。各実験の 0 mg/ml 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

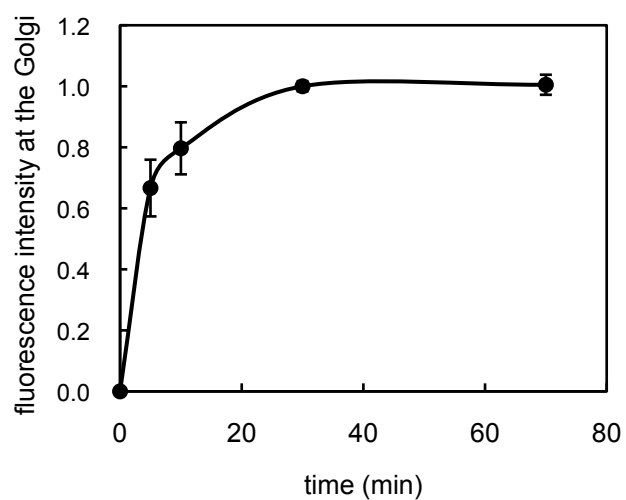
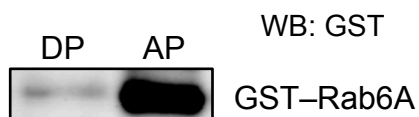


図 11 セミインタクト HeLa 細胞と細胞質のインキュベート時間の検証

セミインタクト HeLa 細胞を、L5178Y 細胞質存在下（図 8A の Cytosol (+) 条件と同様）において、32°C で 5、10、30、70 分間インキュベートし、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均 ± 標準偏差で示した（1 回の実験で 1 条件あたり 24-32 個の細胞を解析）。0 分時点の蛍光強度は 0 とした。各実験の 30 分時点の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。

（出典元：Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.）

A



B

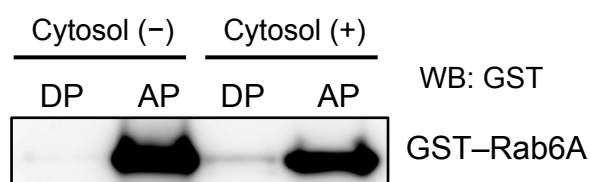


図 12 Triton X-114 二相分配法を用いた GST-Rab6A のプレニル化状態の解析

32°Cで30分間インキュベートした後のセミインタクトHeLa細胞あるいは混合液((A)および(B)を参照)を、Triton X-114を用いた二相分配法に供した(詳細は4.20の項を参照)。等量の界面活性剤の相(DP)あるいは水相(AP)をポリアクリルアミドゲルにアプライし、抗GST抗体を用いたウエスタンブロッティング(WB)により解析を行った。

(A) セミインタクトHeLa細胞を、L5178Y細胞質存在下(図8AのCytosol (+)条件と同様)において、32°Cで30分間インキュベートした。インキュベート後、Triton X-114二相分配法に供した。図は3回の実験の代表的な結果を示す。

(B) セミインタクトHeLa細胞非存在下で、GST-Rab6AをATP再生系、glucose、GTP、および3 mg/mlのL5178Y細胞質(Cytosol (+))あるいはTB(Cytosol (-))とともに32°Cでインキュベートした。インキュベート後、Triton X-114二相分配法に供した。図は3回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

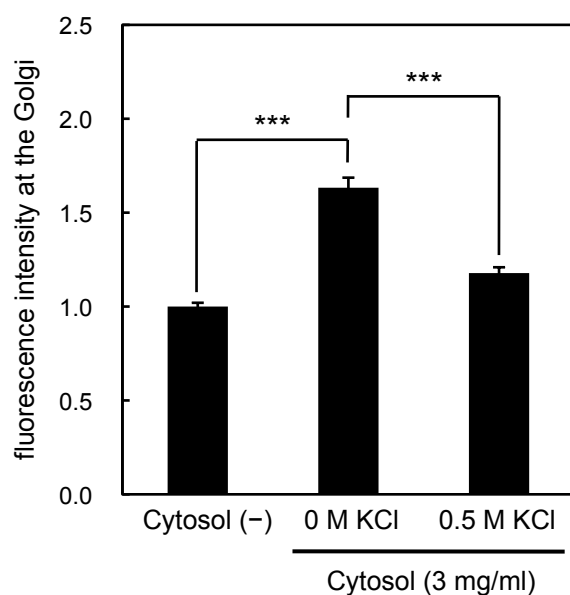


図 13 高塩濃度処理条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング

セミインタクト HeLa 細胞に、0.5 M KCl を含む TB (0.5 M KCl) あるいは KCl を含まない TB (0 M KCl) を加えて、氷上で 10 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を TB で 2 回洗浄し、細胞に GST-Rab6A と ATP 再生系、3 mg/ml の L5178Y 細胞質を加えて、32°C で 30 分間インキュベートした (Cytosol (-) 条件は、図 8A の Cytosol (-) と同様の条件)。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均±標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 29-31 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-) 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。***P < 0.001 (Dunnett's test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

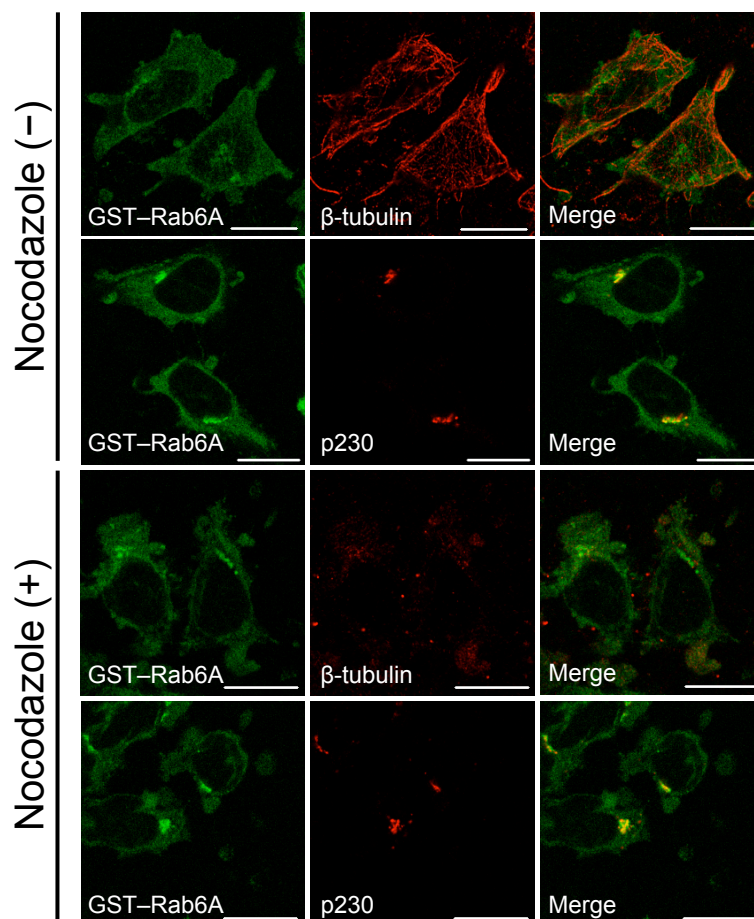


図 14 セミインタクト HeLa 細胞のノコダゾール処理

ノコダゾール処理を行った HeLa 細胞の形質膜を、SLO を用いて透過処理し、細胞質成分を除去した。得られたセミインタクト HeLa 細胞を、ノコダゾール存在下 (Nocodazole (+)) あるいは非存在下 (Nocodazole (-)) において、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および 3 mg/ml の L5178Y 細胞質とともに 32°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を固定して蛍光抗体法を行った。蛍光抗体法では、Alexa Fluor® 488 標識抗 GST 抗体、および β -tubulin あるいは p230 に対する抗体を用いた二重染色を行った (詳細は 4.12 の項を参照)。Merge は、 β -tubulin あるいは p230 の画像と、GST-Rab6A の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 20 μ m。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

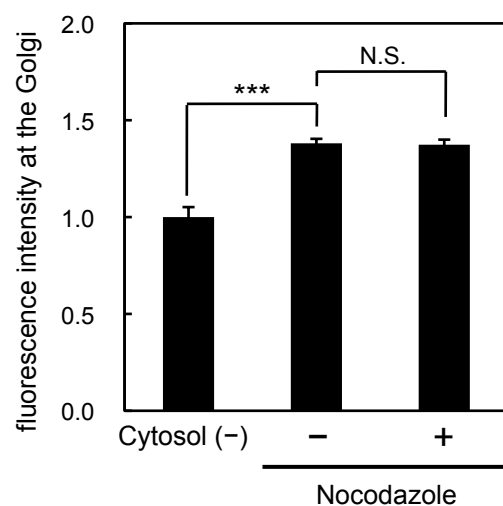


図 15 GST-Rab6A ゴルジ体ターゲティングの微小管非依存性

ノコダゾール処理を行ったセミインタクト HeLa 細胞（図 14）における、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均±標準偏差で示した（1 回の実験で 1 条件あたり 27・31 個の細胞を解析）。各実験の Cytosol (-) 条件（Cytosol (-) 条件は、図 8A の Cytosol (-) と同様の条件）の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。*** $P < 0.001$ 、N.S. $P > 0.05$ （Tukey-Kramer test）。

（出典元：Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.）

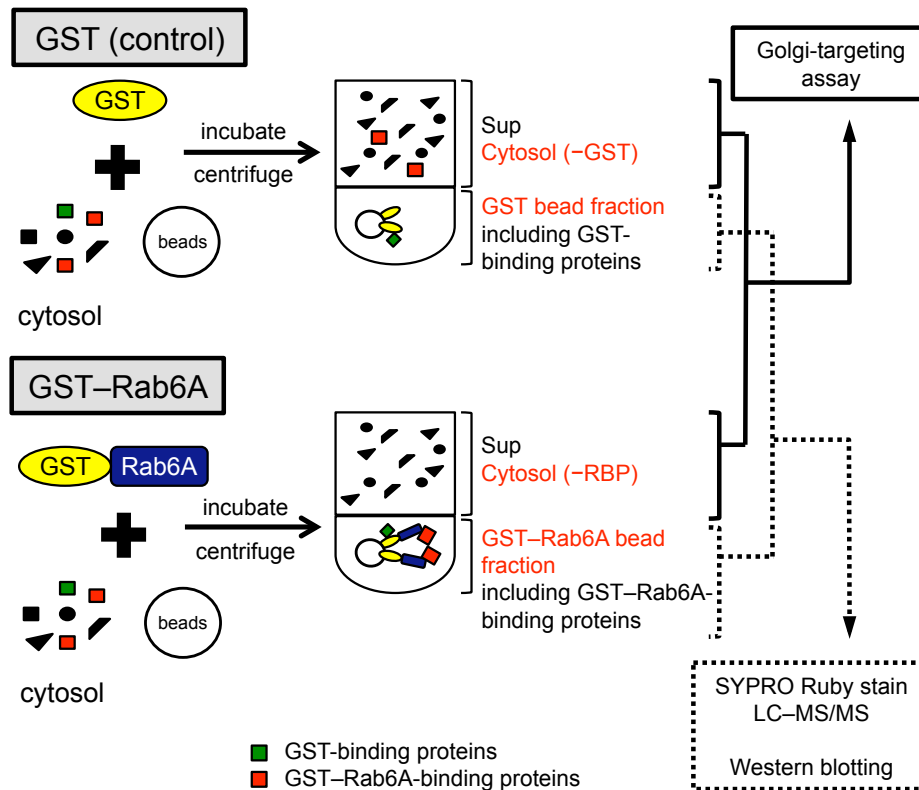


図 16 GST プルダウンアッセイの概略図

GST-Rab6A (あるいはコントロールとして GST) を Glutathione Sepharose 4B ビーズ (beads) 存在下で 3 mg/ml の L5178Y 細胞質 (cytosol) とインキュベートした後、混合液を遠心した。遠心により得られたペレット (ビーズ画分 (bead fraction)) には、混合液中に存在した GST-Rab6A (あるいは GST) およびその結合タンパク質 (GST-binding proteins あるいは GST-Rab6A-binding proteins) が含まれる。遠心により得られた上清 (Sup; Cytosol (-RBP) あるいは Cytosol (-GST)) は、ゴルジ体ターゲティングアッセイ (Golgi-targeting assay) に供し、セミインタクト HeLa 細胞において GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに及ぼす影響を調べた。ビーズ画分 (GST-Rab6A bead fraction、あるいは GST bead fraction) は、SDS-PAGE に供し、SYPRO Ruby 染色 (SYPRO Ruby stain) と質量分析法 (LC-MS/MS)、あるいはウェスタンブロッティング (Western blotting) により解析して、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングを制御する候補因子の検出と同定を行った (詳細は 4.15 の項を参照)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.を一部改変)

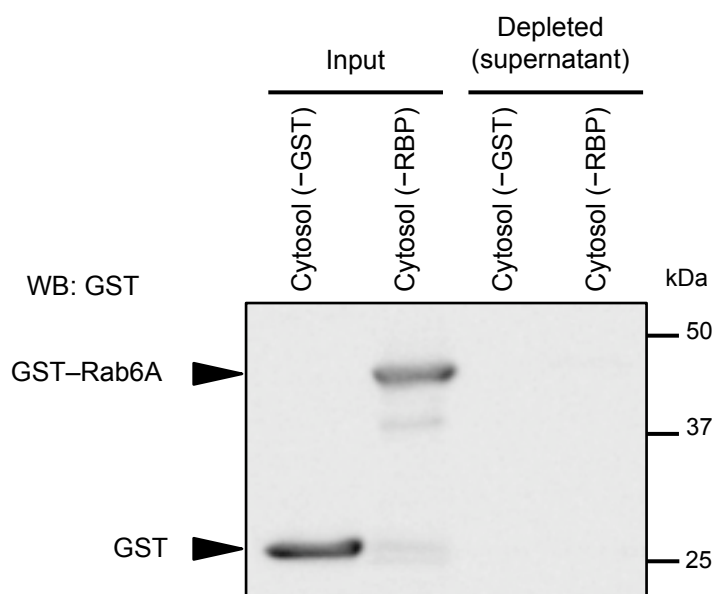


図 17 GST プルダウンアッセイ上清に含まれる GST-Rab6A あるいは GST 量の解析
 GST プルダウンアッセイにより得られた Cytosol (-GST) および Cytosol (-RBP) (図 16 を参照) を、SDS-PAGE を用いて分離し、抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロッティング (WB) により解析した。Depleted (supernatant) は、GST プルダウンアッセイの遠心後の上清であり、ゴルジ体ターゲティングアッセイに供した細胞質を示している。一方、Input は、GST プルダウンアッセイの遠心による分離前の混合液 (3 mg/ml の L5178Y 細胞質および GST-Rab6A (あるいは GST) を含む) である。右端に分子質量を示した。図は 3 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

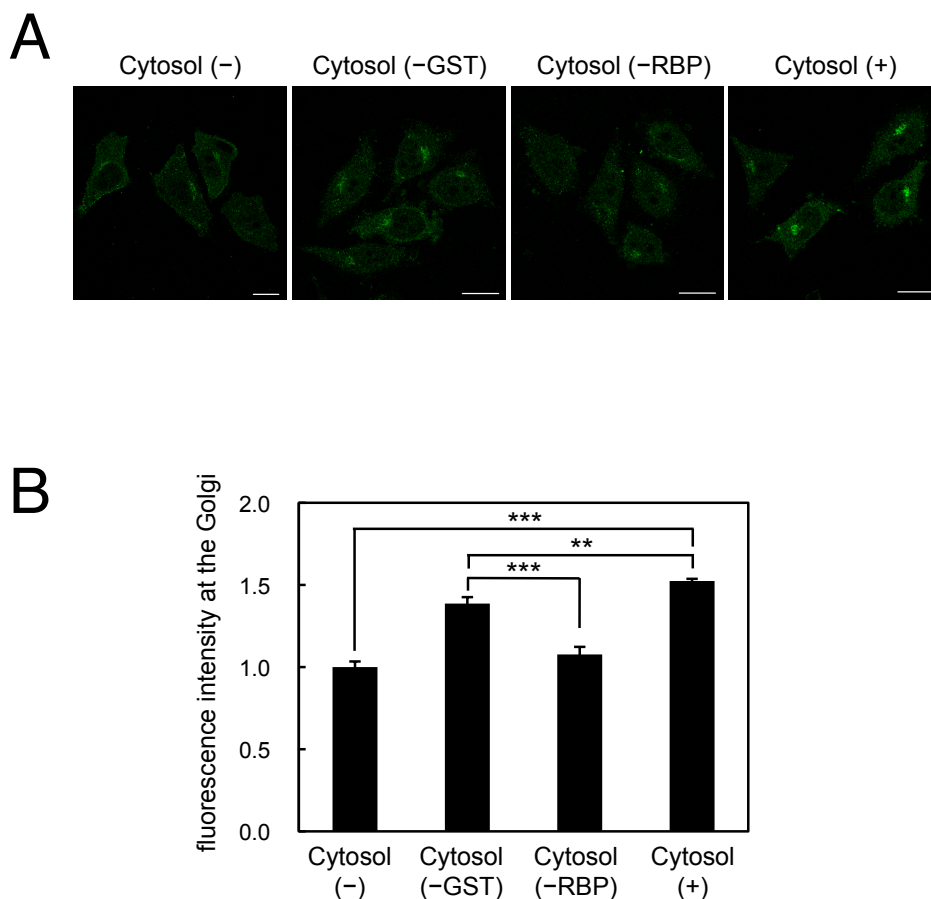


図 18 ゴルジ体ターゲティングアッセイを用いた Cytosol (-RBP) の解析

(A) セミインタクト HeLa 細胞を、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および Cytosol (-RBP) (あるいは Cytosol (-GST)) とともに、32°C で 30 分間インキュベートした (ただし、Cytosol (-) 条件および Cytosol (+) 条件は図 8A と同様の条件)。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。図は、各条件における代表的な画像を示している。スケールバーは 20 μm 。

(B) (A) の細胞における、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 17-31 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-) 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。*** $P < 0.001$ 、** $P < 0.01$ (Tukey-Kramer test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

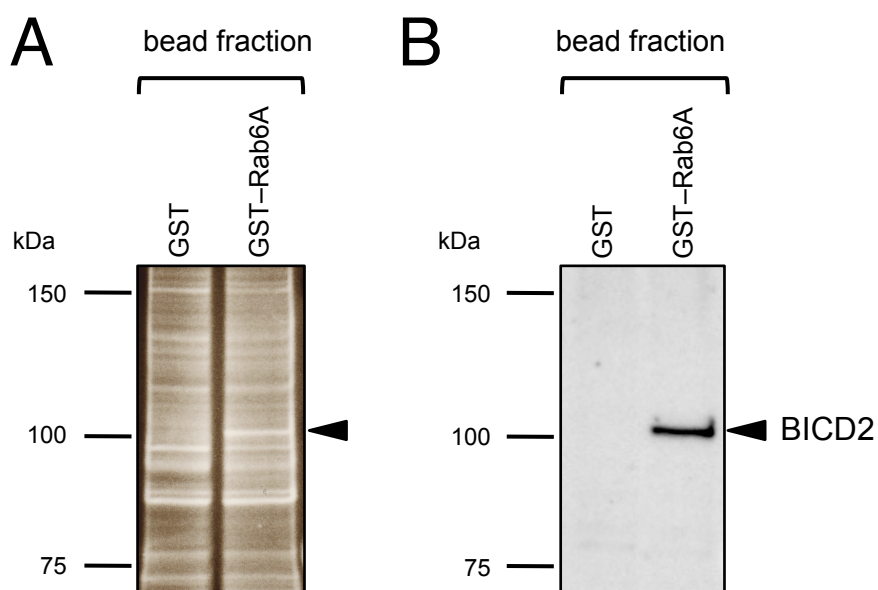


図 19 GST-Rab6A ビーズ画分からの BICD2 の抽出と同定

(A) GST プルダウンアッセイ (図 16 を参照) により得られた、GST-Rab6A ビーズ画分あるいは GST ビーズ画分から溶出されたタンパク質を、SDS-PAGE を用いて分離し、SYPRO Ruby 染色により検出した。左端に分子質量を示した。矢印は、GST-Rab6A ビーズ画分で特異的に検出されたタンパク質のバンドを示している。このバンドは、ゲルから切り出し、LC-MS/MS に供した。

(B) (A) の溶出タンパク質を、SDS-PAGE を用いて分離し、抗 BICD2 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。左端に分子質量を示した。図は 4 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

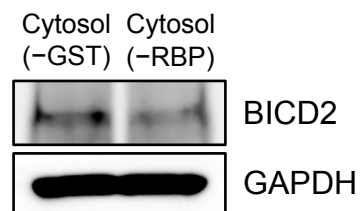


図 20 GST プルダウンアッセイ上清に含まれる BICD2 量の解析

GST プルダウンアッセイにより得られた Cytosol (-GST) および Cytosol (-RBP) (図 16 を参照) を、SDS-PAGE を用いて分離し、抗 BICD2 抗体および抗 GAPDH 抗体 (ローディングコントロールとして使用) を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。図は 2 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)



図 21 ウェスタンブロッティングを用いた BICD2 ノックダウン効率および Rab6 発現量に対する影響の解析

HeLa 細胞に、scramble siRNA (control) あるいは BICD2 に対する 2 つの異なる siRNA (BICD2 #1、BICD2 #2) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を溶解し、抗 Rab6 抗体、抗 BICD2 抗体、および抗 GAPDH 抗体（ローディングコントロールとして使用）を用いたウェスタンブロッティングに供した。図は 3-4 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

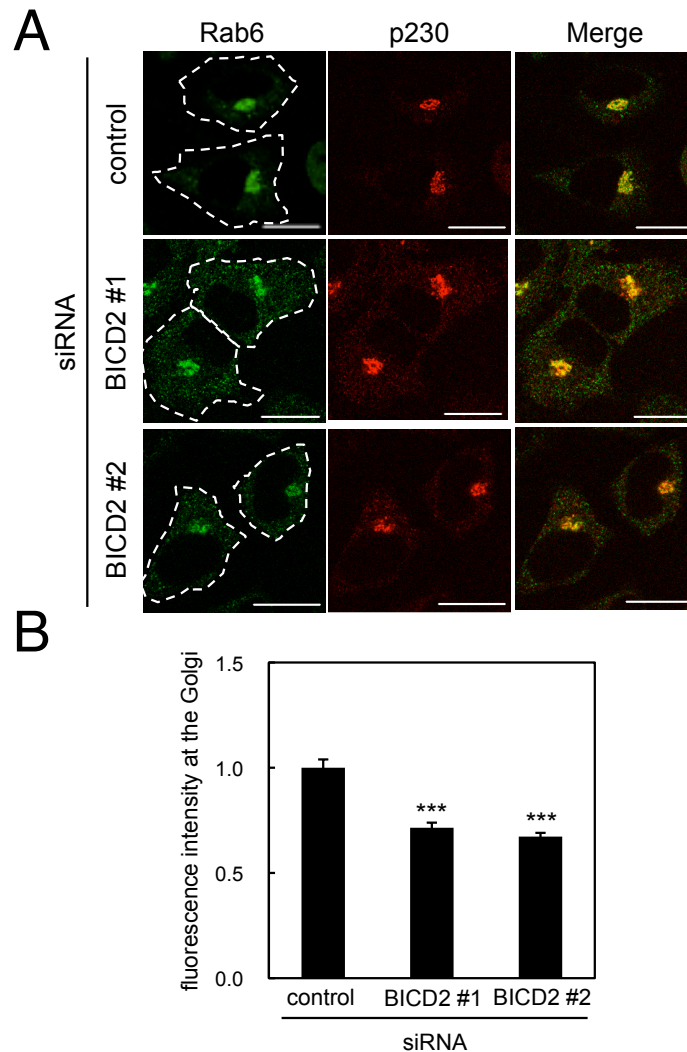


図 22 蛍光抗体法を用いた BICD2 ノックダウン HeLa 細胞の解析

(A) HeLa 細胞に、scramble siRNA (control) あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #1、BICD2 #2) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を固定し、抗 Rab6 抗体および抗 p230 抗体を用いて二重染色を行った。破線は細胞の輪郭を示している。Merge は、Rab6 の画像と p230 の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 20 μm 。

(B) (A) のゴルジ体領域における Rab6 量の定量。LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ゴルジ体領域の Rab6 の蛍光強度を測定した (ゴルジ体以外の細胞質領域における蛍光強度をバックグラウンドとした)。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 20-22 個の細胞を解析)。各実験の control 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。***は、control 条件と比較して P 値が 0.001 未満であることを示す (Dunnett's test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

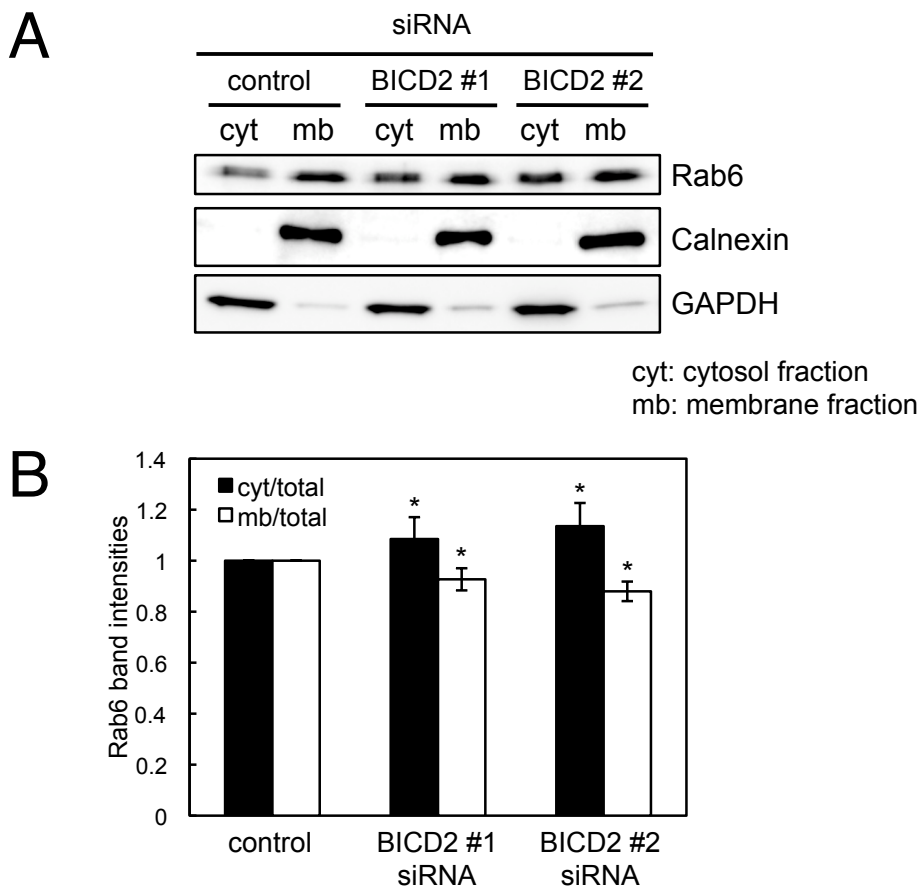


図 23 細胞分画法を用いた BICD2 ノックダウン HeLa 細胞の生化学的解析

(A) HeLa 細胞に、scramble siRNA (control) あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #1、BICD2 #2) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を回収し、破碎と遠心を行って細胞質画分 (cyt) と膜画分 (mb) に分離した (詳細は 4.13 の項を参照)。各画分は SDS-PAGE を用いて分離し、抗 Rab6 抗体、抗 Calnexin 抗体、および抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。Calnexin は膜画分のマーカー、GAPDH は細胞質画分のマーカーとして用いた。図は 5 回の実験の代表的な結果を示す。

(B) (A) の各画分に存在する Rab6 量の定量。Rab6 のバンド強度を、Multi Gauge Ver 3.2 を用いて測定した。次に、条件ごとに、細胞質画分と膜画分のバンド強度の和を算出した。この和を 100% とし、和に対する各画分の割合を求めた。続いて、BICD2 ノックダウン細胞 (BICD2 #1 siRNA 条件あるいは BICD2 #2 siRNA 条件) における細胞質画分の割合を、コントロール細胞 (control 条件) の細胞質画分の割合で正規化した (コントロール細胞における割合を 1 とした)。同様に、BICD2 ノックダウン細胞における膜画分の割合を、コントロール細胞の膜画分の割合で正規化した。データは、5 回の実験の平均±標準偏差で示した。*は、control 条件と比較して P 値が 0.05 未満であることを示す (the sign test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

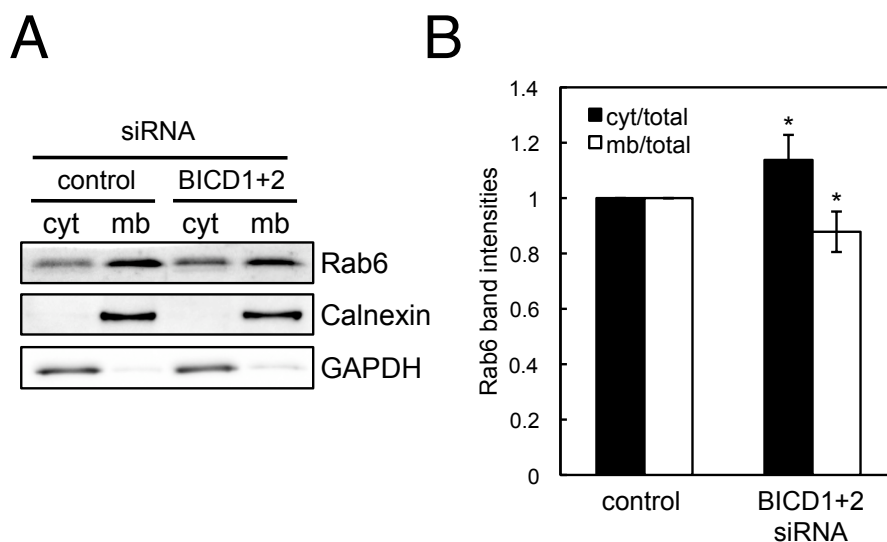


図 24 BICD1/BICD2 ダブルノックダウン HeLa 細胞の生化学的解析

(A) HeLa 細胞に、scramble siRNA (control)、あるいは BICD1 に対する siRNA および BICD2 に対する siRNA を混合したもの (BICD1 #2 siRNA および BICD2 #2 siRNA; BICD1+2) をトランスフェクションした。72 時間後、図 23A の場合と同様の方法により、細胞質画分 (cyt) と膜画分 (mb) に分離した。各画分は、SDS-PAGE を用いて分離し、抗 Rab6 抗体、抗 Calnexin 抗体、および抗 GAPDH 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。図は 6 回の実験の代表的な結果を示す。

(B) (A) の各画分に存在する Rab6 量の定量。図 23B の場合と同様の方法により定量を行った。データは、6 回の実験の平均±標準偏差で示した。*は、control 条件と比較して P 値が 0.05 未満であることを示す (the sign test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

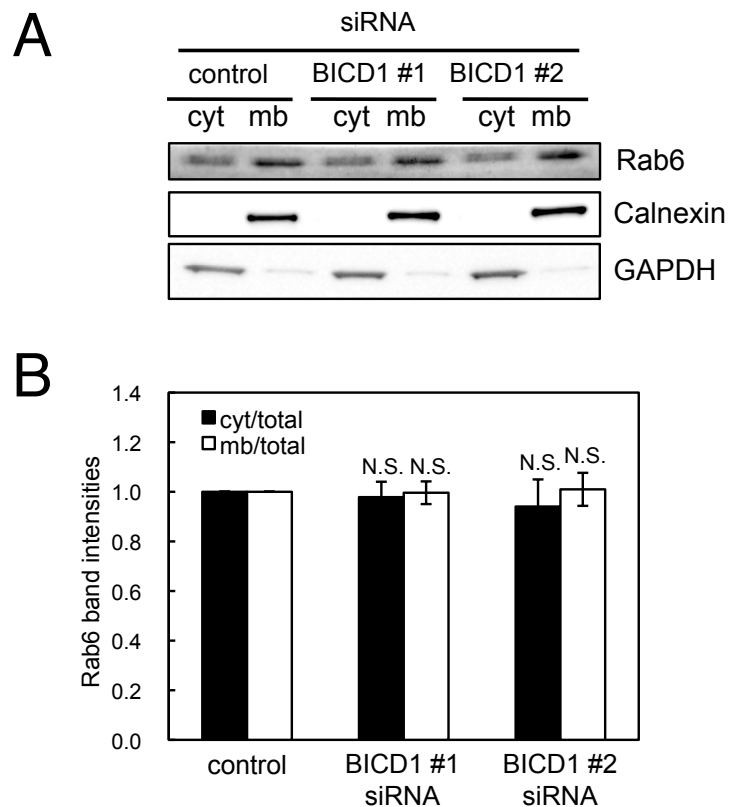


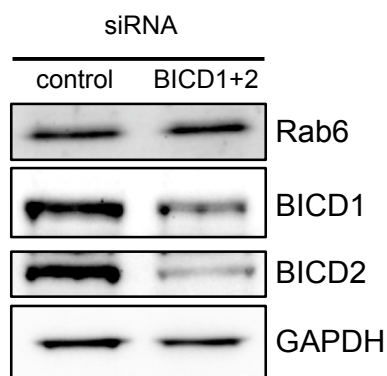
図 25 BICD1 ノックダウン HeLa 細胞の生化学的解析

(A) HeLa 細胞に、scramble siRNA (control) あるいは BICD1 に対する 2 つの異なる siRNA (BICD1 #1、BICD1 #2) をトランスフェクションした。72 時間後、図 23A の場合と同様の方法により、細胞質画分 (cyt) と膜画分 (mb) に分離した。各画分は、SDS-PAGE を用いて分離し、抗 Rab6 抗体、抗 Calnexin 抗体、および抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。図は 6 回の実験の代表的な結果を示す。

(B) (A) の各画分に存在する Rab6 量の定量。図 23B の場合と同様の方法により定量を行った。データは 6 回の実験の平均±標準偏差で示した。N.S.は、control 条件と比較して P 値が 0.05 より大きいことを示す (the sign test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

A



B

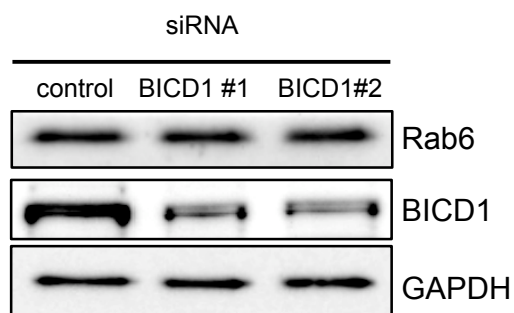


図 26 ウェスタンブロッティングを用いた BICD1 あるいは BICD2 のノックダウン効率および Rab6 発現量に対する影響の解析

(A) HeLa 細胞に、scramble siRNA (control)、あるいは BICD1 に対する siRNA および BICD2 に対する siRNA を混合したもの (BICD1 #2 siRNA および BICD2 #2 siRNA; BICD1+2) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を溶解し、抗 Rab6 抗体、抗 BICD1 抗体、抗 BICD2 抗体、および抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。図は 3 回の実験の代表的な結果を示す。

(B) HeLa 細胞に、scramble siRNA (control) あるいは BICD1 に対する siRNA (BICD1 #1、BICD1 #2) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を溶解し、抗 Rab6 抗体、抗 BICD1 抗体、および抗 GAPDH 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。図は 3 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

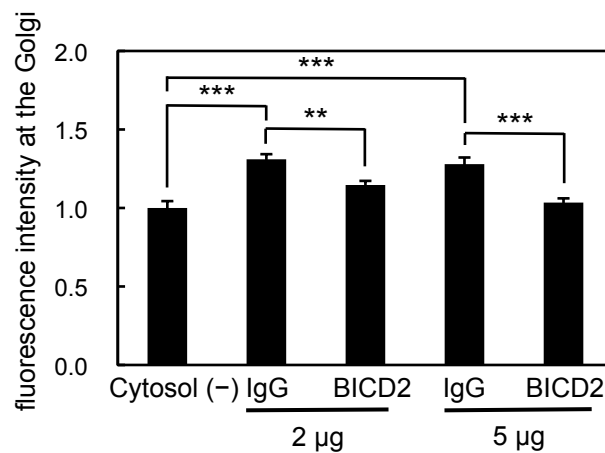


図 27 抗 BICD2 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング

抗 BICD2 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量。セミインタクト HeLa 細胞に、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、3 mg/ml の HeLa S3 細胞質、および 2-5 µg の抗 BICD2 抗体 (BICD2) (あるいはコントロールとして normal rabbit IgG (IgG)) を加え、32°C で 30 分間インキュベートした (Cytosol (-) 条件は、図 8A の Cytosol (-) と同様の条件)。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均±標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 27-34 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-) 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。***P < 0.001、**P < 0.01 (Tukey-Kramer test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

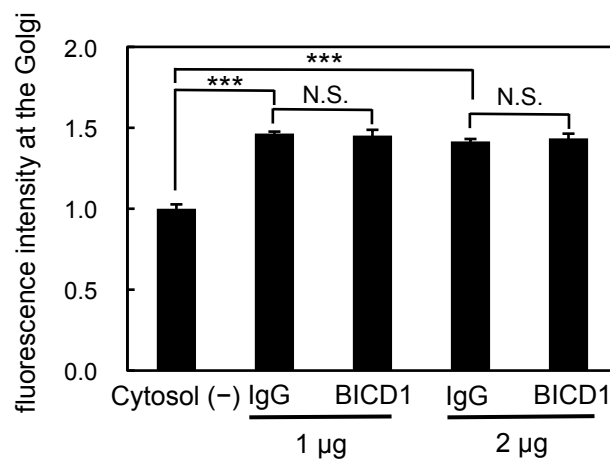


図 28 抗 BICD1 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング

抗 BICD1 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量。セミインタクト HeLa 細胞に、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、3 mg/ml の HeLa S3 細胞質、および 1-2 µg の抗 BICD1 抗体 (BICD1) (あるいはコントロールとして normal rabbit IgG (IgG)) を加え、32°C で 30 分間インキュベートした (Cytosol (-) 条件は、図 8A の Cytosol (-) と同様の条件)。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均±標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 15-31 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-) 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。***P < 0.001、N.S.P > 0.05 (Tukey-Kramer test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

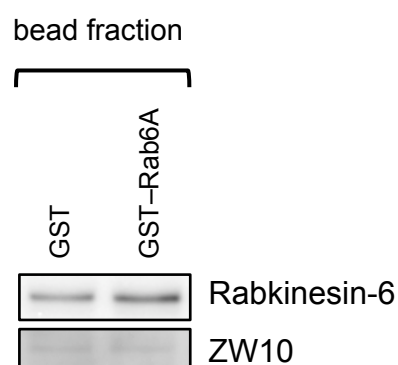


図 29 ウェスタンブロッティングを用いた GST プルダウンアッセイビーズ画分の解析
 GST プルダウンアッセイ (図 16 を参照) により得られた、GST-Rab6A ビーズ画分あるいは GST ビーズ画分から溶出されたタンパク質を、SDS-PAGE を用いて分離し、抗 Rabkinesin-6 抗体あるいは抗 ZW10 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。図は 3 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

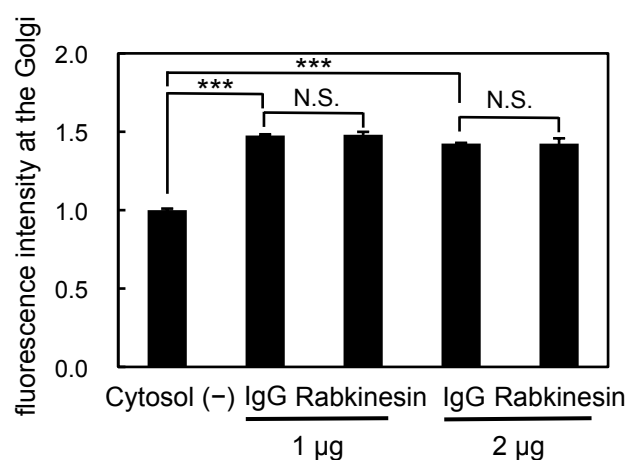


図 30 抗 Rabkinesin-6 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング
 抗 Rabkinesin-6 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量。セミインタクト HeLa 細胞に、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、3 mg/ml の HeLa S3 細胞質、および 1-2 µg の抗 Rabkinesin-6 抗体 (Rabkinesin) (あるいはコントロールとして normal rabbit IgG (IgG)) を加え、32°C で 30 分間インキュベートした (Cytosol (-) 条件は、図 8A の Cytosol (-) と同様の条件)。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均±標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 20-23 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-) 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。***P < 0.001、N.S.P > 0.05 (Tukey-Kramer test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

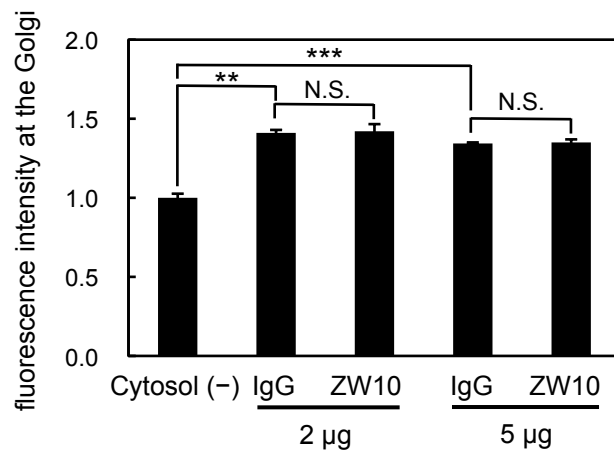


図 31 抗 ZW10 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング

抗 ZW10 抗体添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量。セミインタクト HeLa 細胞に、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、3 mg/ml の HeLa S3 細胞質、および 2-5 µg の抗 ZW10 抗体 (ZW10) (あるいはコントロールとして normal rabbit IgG (IgG)) を加え、32°C で 30 分間インキュベートした (Cytosol (-) 条件は、図 8A の Cytosol (-) と同様の条件)。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均±標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 26-34 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-) 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。**P < 0.01、***P < 0.001、N.S.P > 0.05 (Tukey-Kramer test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

図 32 (インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)

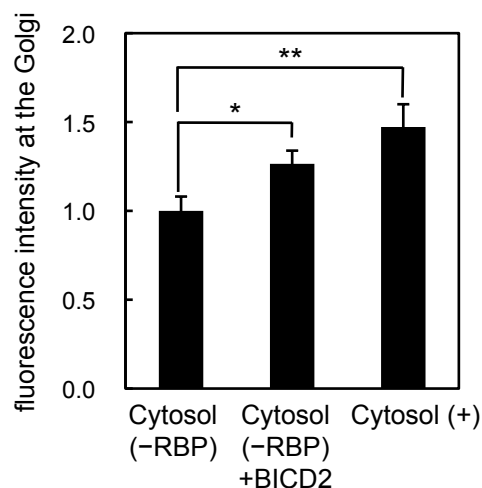


図 33 His-mBICD2 添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング

His-mBICD2 添加条件における GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量の定量。セミインタクト HeLa 細胞に、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP および Cytosol (-RBP) を加え、10 μ g の His-mBICD2 の存在下 (Cytosol (-RBP) + BICD2) あるいは非存在下 (Cytosol (-RBP)) で、32°C で 30 分間インキュベートした (Cytosol (+) 条件は、図 8A の Cytosol (+) と同様の条件)。インキュベート後、細胞をゴルジ体ターゲティングアッセイに供した。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 26-32 個の細胞を解析)。各実験の Cytosol (-RBP) の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ (Dunnett's test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

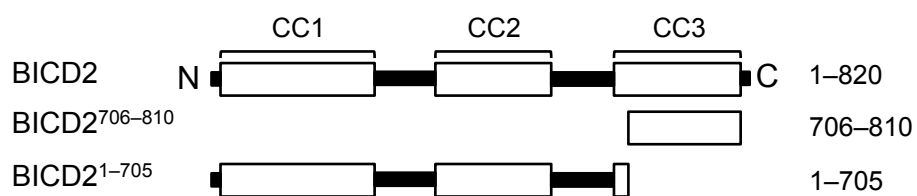


図 34 マウス BICD2 タンパク質およびその欠失変異体のドメイン構造

マウス BICD2 タンパク質およびその欠失変異体 (BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ および BICD2¹⁻⁷⁰⁵) のドメイン構造を示した。3つのコイルドコイル領域をそれぞれ、CC1、CC2、CC3 とした (白色四角部分)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

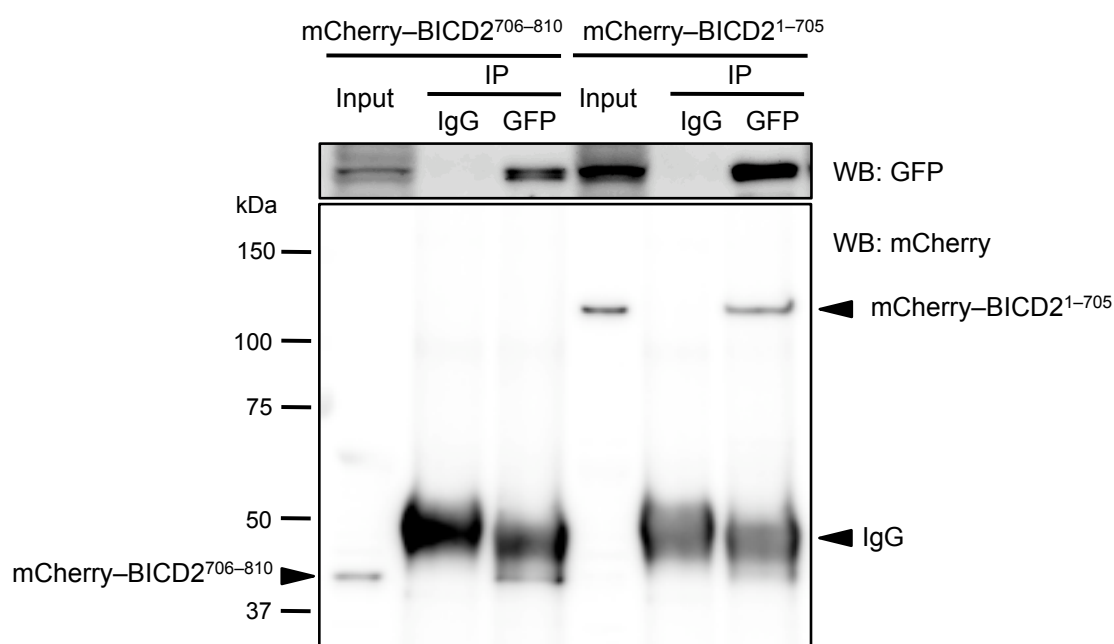


図 35 共免疫沈降法を用いた GFP-Rab6A と mCherry 融合 BICD2 欠失変異体の相互作用解析

HeLa 細胞に GFP-Rab6A と mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰、あるいは GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ のプラスミドを同時トランスフェクションし、抗 GFP 抗体 (GFP) あるいはコントロールとして normal rabbit IgG (IgG) を用いた共免疫沈降法 (IP) を行った (詳細は 4.16 の項を参照)。抗体と混合する前の細胞懸濁液 (上清) を Input とした。サンプルは、抗 GFP 抗体あるいは抗 mCherry 抗体を用いたウエスタンブロッティング (WB) により解析した。左端に分子質量を示した。図は 3 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.を一部改変)

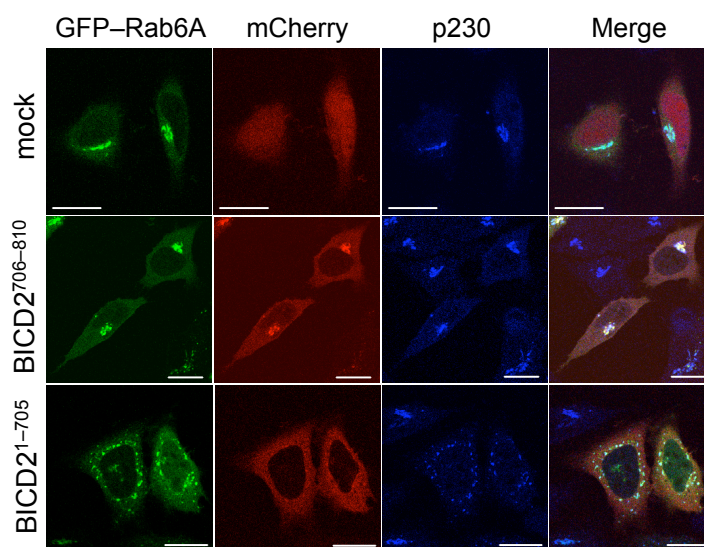


図 36 蛍光抗体法を用いた GFP-Rab6A および mCherry 融合 BICD2 欠失変異体の局在解析

HeLa 細胞に GFP-Rab6A と mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ (BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰)、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ (BICD2¹⁻⁷⁰⁵)、あるいはコントロールとして GFP-Rab6A と mCherry 空ベクター (mock) のプラスミドを同時トランスフェクションした。24 時間後、細胞を固定し、抗 p230 抗体を用いて染色を行った。Merge は、GFP-Rab6A の画像、mCherry (mCherry、mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ あるいは mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵) の画像、および p230 の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 20 μm 。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

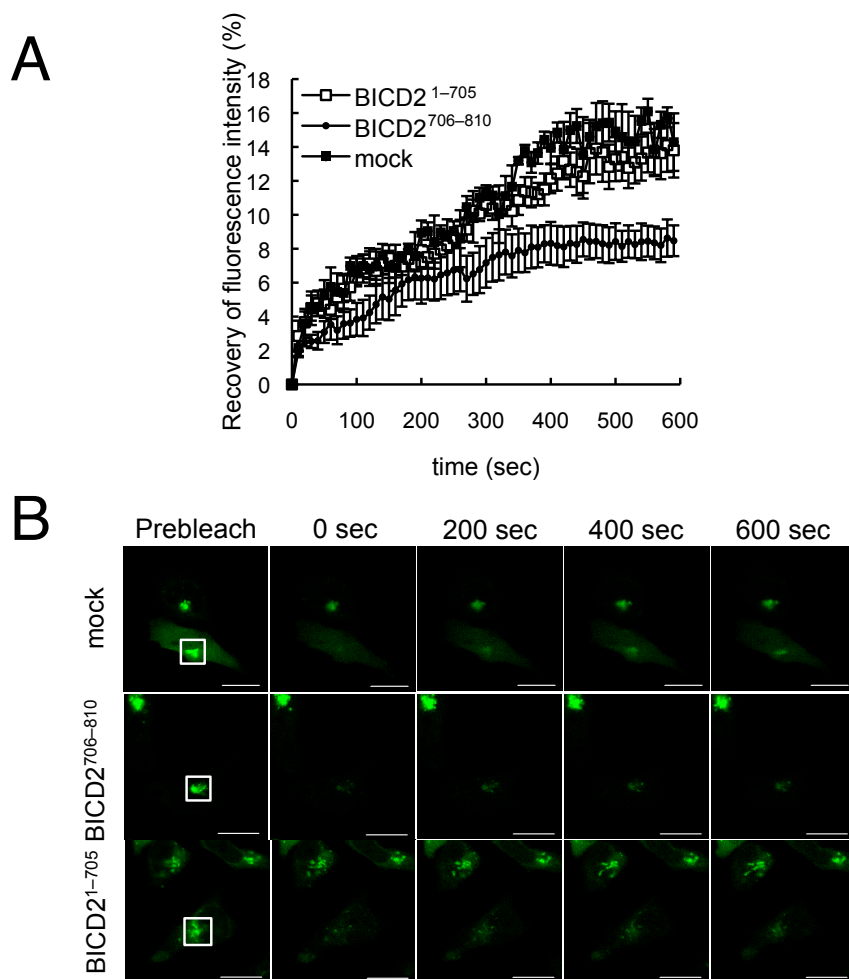


図 37 mCherry 融合 BICD2 欠失変異体発現細胞を用いた GFP-Rab6A の動態解析

(A) HeLa 細胞に GFP-Rab6A と mCherry-BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰ (BICD2⁷⁰⁶⁻⁸¹⁰)、GFP-Rab6A と mCherry-BICD2¹⁻⁷⁰⁵ (BICD2¹⁻⁷⁰⁵)、あるいはコントロールとして GFP-Rab6A と mCherry の空ベクター (mock) のプラスミドを同時トランスフェクションした。24 時間後、FRAP 法により解析を行った (詳細は 4.19 の項を参照)。図は 3 回の実験の代表的な結果であり、蛍光強度のデータ (Recovery of fluorescence intensity) は、条件ごとに各細胞の平均±標準誤差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 3-5 個の細胞を解析)。

(B) (A) の解析において、GFP-Rab6A のブリーチ前 (Prebleach) および示した時間における代表的な画像を示している。スケールバーは 20 μ m。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

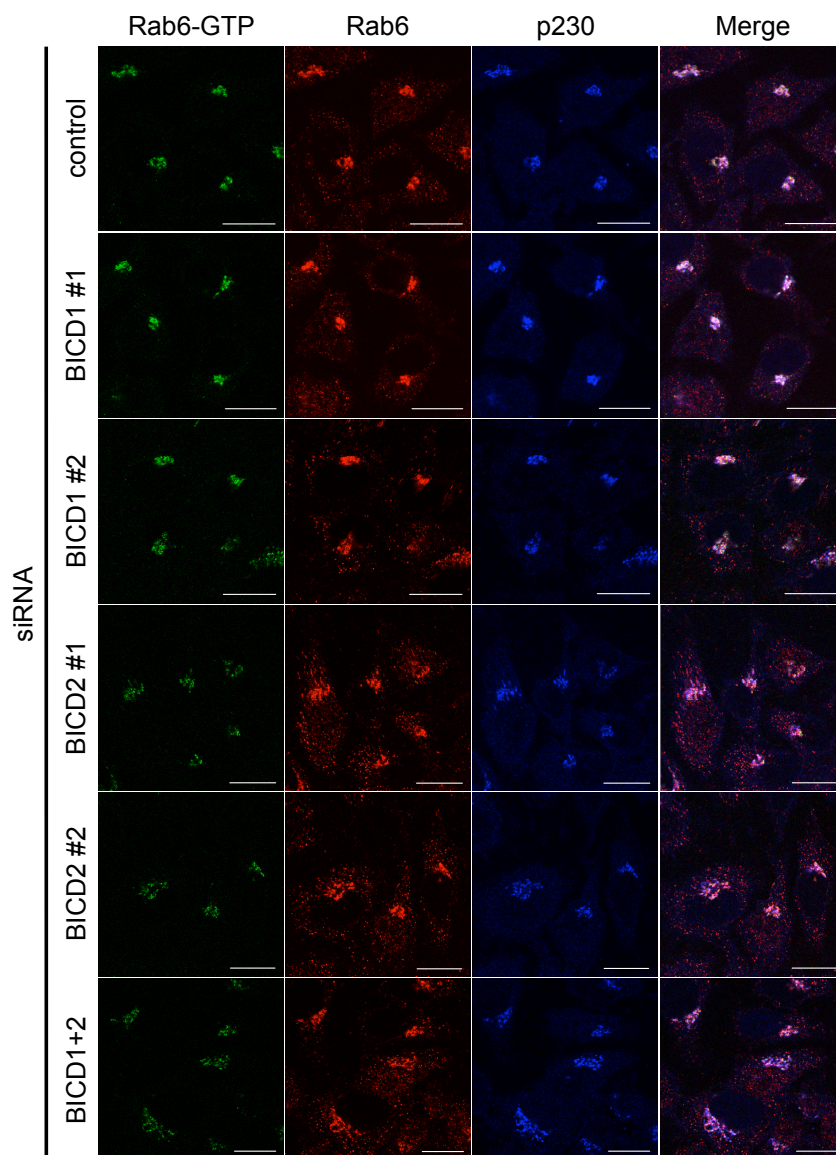


図 38 蛍光抗体法を用いた GTP 結合型 Rab6 の検出

HeLa 細胞に、①scramble siRNA (control)、②BICD1 に対する siRNA (BICD1 #1、BICD1 #2)、③BICD2 に対する siRNA (BICD2 #1、BICD2 #2)、④BICD1 に対する siRNA および BICD2 に対する siRNA を混合したもの (BICD1 #2 siRNA および BICD2 #2 siRNA; BICD1+2) のいずれかをトランスフェクションした。72 時間後、細胞を固定し、抗 GTP 結合型 Rab6 (Rab6-GTP) 抗体、抗 Rab6 抗体および抗 p230 抗体を用いて三重染色を行った。Merge は、Rab6-GTP の画像、Rab6 の画像、および p230 の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 20 μm 。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

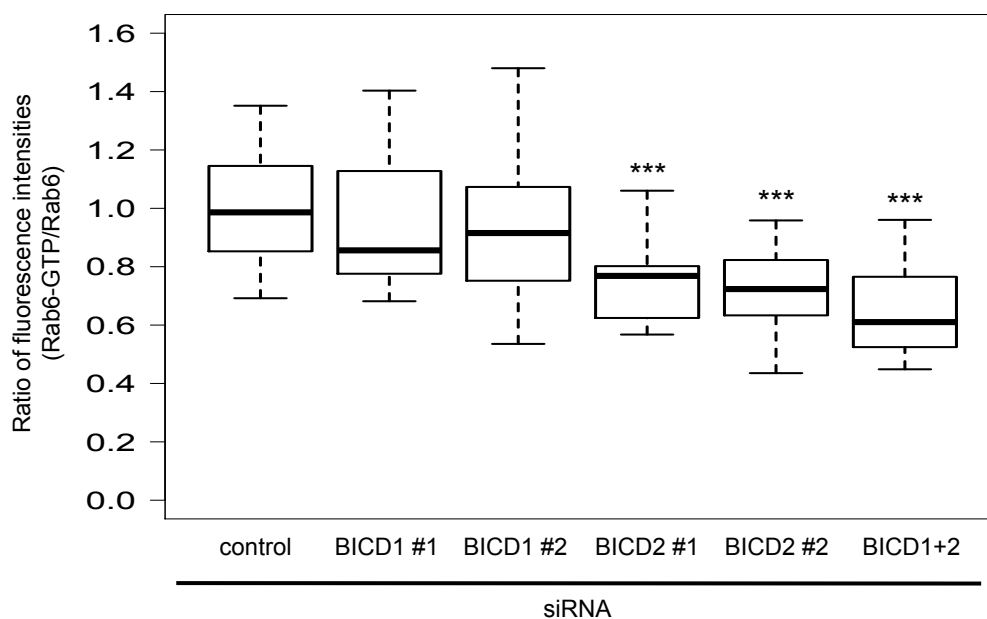


図 39 蛍光抗体法を用いた GTP 結合型 Rab6 量の解析

図 38 の細胞について、Rab6 の発現量に対する Rab6-GTP の発現量の割合 (Rab6-GTP/Rab6) を表した箱ひげ図。タンパク質発現量の定量は、図 38 の細胞について、Rab6-GTP および Rab6 の蛍光強度を測定することに基づいて行った (詳細は 4.9 の項を参照)。箱は第 3 四分位数 (上端) から第 1 四分位数 (下端) まで、箱内の横線は第 2 四分位数 (中央値)、ひげの両端は最小値と最大値を示す。図は 2 回の実験の代表的な結果を示す。Control 条件の平均の割合を 1 とした (1 条件あたり 30 個の細胞を解析)。***は、control 条件と比較して P 値が 0.001 未満であることを示す (Steel's test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

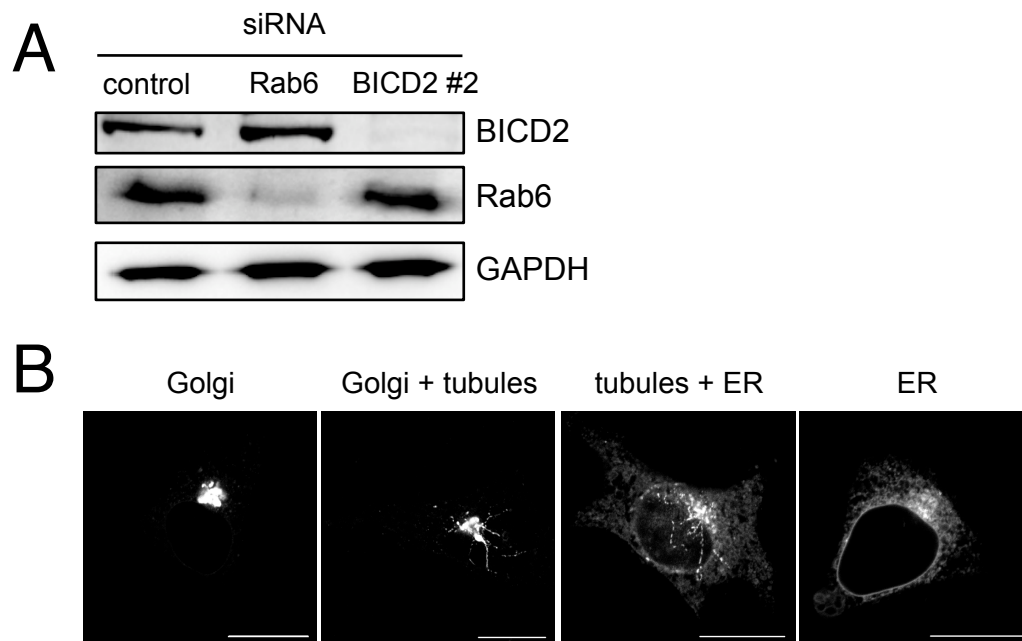


図 40 BFA 処理および GT-GFP を用いたゴルジ体消失のキネティクスの解析

(A) ウェスタンブロッティングを用いたノックダウン効率の確認。HeLa 細胞に、scramble siRNA (control)、Rab6 に対する siRNA (Rab6)、あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #2) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を溶解し、抗 Rab6 抗体、抗 BICD2 抗体、および抗 GAPDH 抗体（ローディングコントロールとして使用）を用いたウェスタンブロッティングに供した。図は 3 回の実験の代表的な結果を示す。

(B) BFA 処理を行った HeLa 細胞の、ゴルジ体消失過程の各段階における代表的な画像。消失過程は、①Golgi : GT-GFP が典型的なゴルジ体の位置（核近傍領域）に局在、②Golgi + tubules : 管状構造がゴルジ体から出現、③tubules + ER : 管状構造が小胞体（細胞質領域に GT-GFP により可視化される網目構造）と融合し核近傍領域の典型的なゴルジ体構造が消失、④ER : GT-GFP が小胞体に吸収され管状構造が完全に消失、の 4 段階に分割した。スケールバーは 20 μm 。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

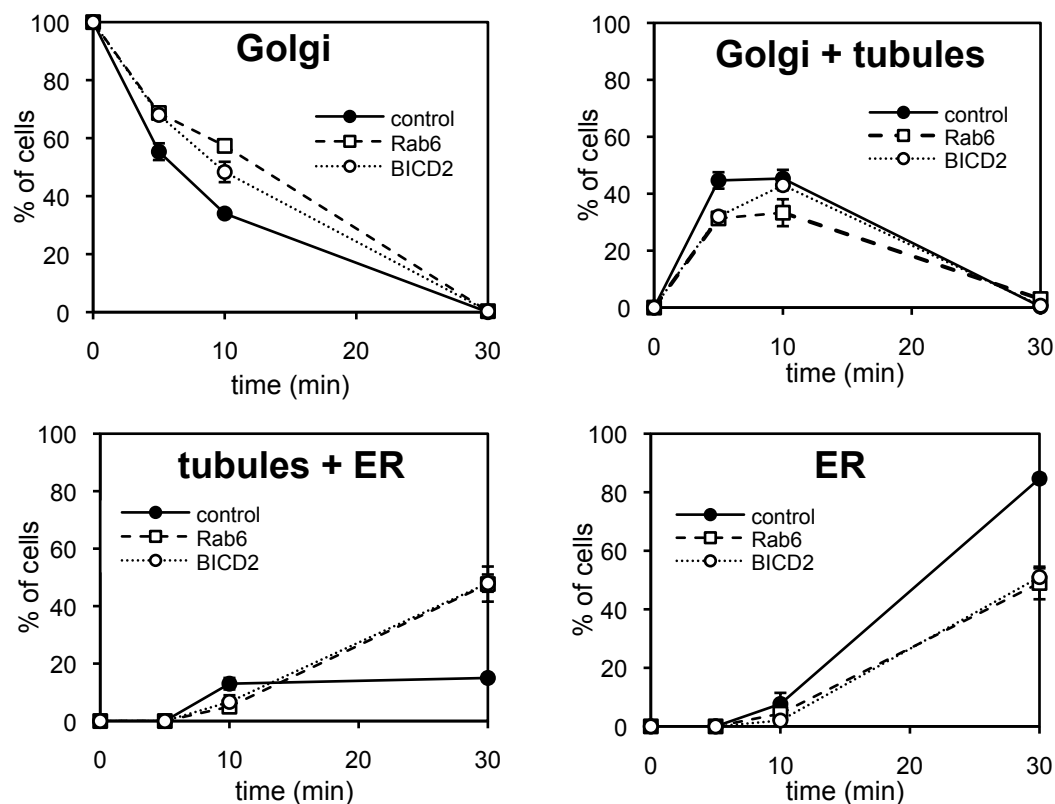


図 41 ゴルジ体消失過程のキネティクスに対する Rab6 ノックダウンあるいは BICD2 ノックダウンの影響

HeLa 細胞に、scramble siRNA (control)、Rab6 に対する siRNA (Rab6)、あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #2) をトランスフェクションして 48 時間後、GT-GFP のプラスミドをトランスフェクションした。続いて、細胞を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の BFA で 0、5、10、30 分間処理した。処理後、細胞を固定し、LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。BFA によって誘導されるゴルジ体消失過程のキネティクスは、この消失過程を 4 段階に分割 (図 40B を参照) し、各段階の細胞数を計数した後、各時点ごとに各段階の細胞の割合を算出することにより解析した。データは、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 100 個の細胞を解析)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

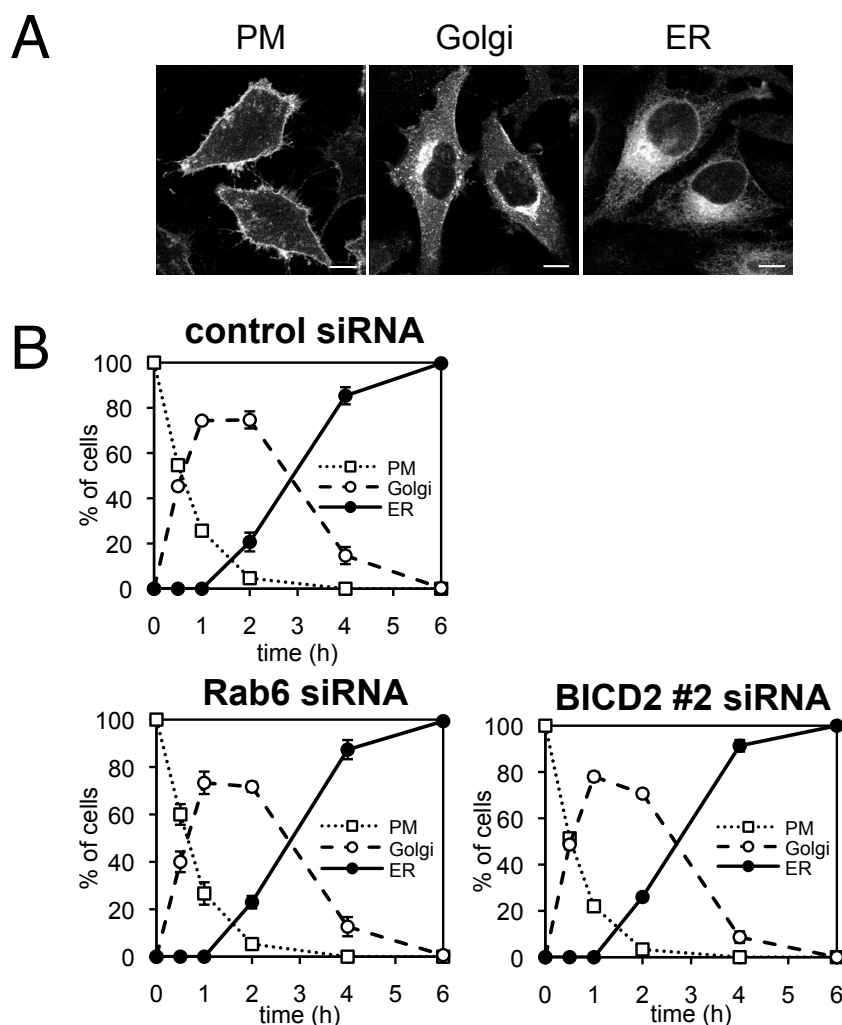


図 42 Alexa Fluor® 488 標識 CtxB を用いた逆行輸送経路の解析

(A) Alexa Fluor® 488 標識 CtxB が形質膜 (PM)、ゴルジ体 (Golgi)、小胞体 (ER) の各領域に局在している細胞の代表的な画像。スケールバーは 10 μm 。

(B) Scramble siRNA (control)、Rab6 に対する siRNA (Rab6)、あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #2) をトランスフェクションした HeLa 細胞における、Alexa Fluor® 488 標識 CtxB の輸送キネティクス。データは、CtxB の局在ごとに細胞の割合 (%) を計数・算出し、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 100 個の細胞を解析)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

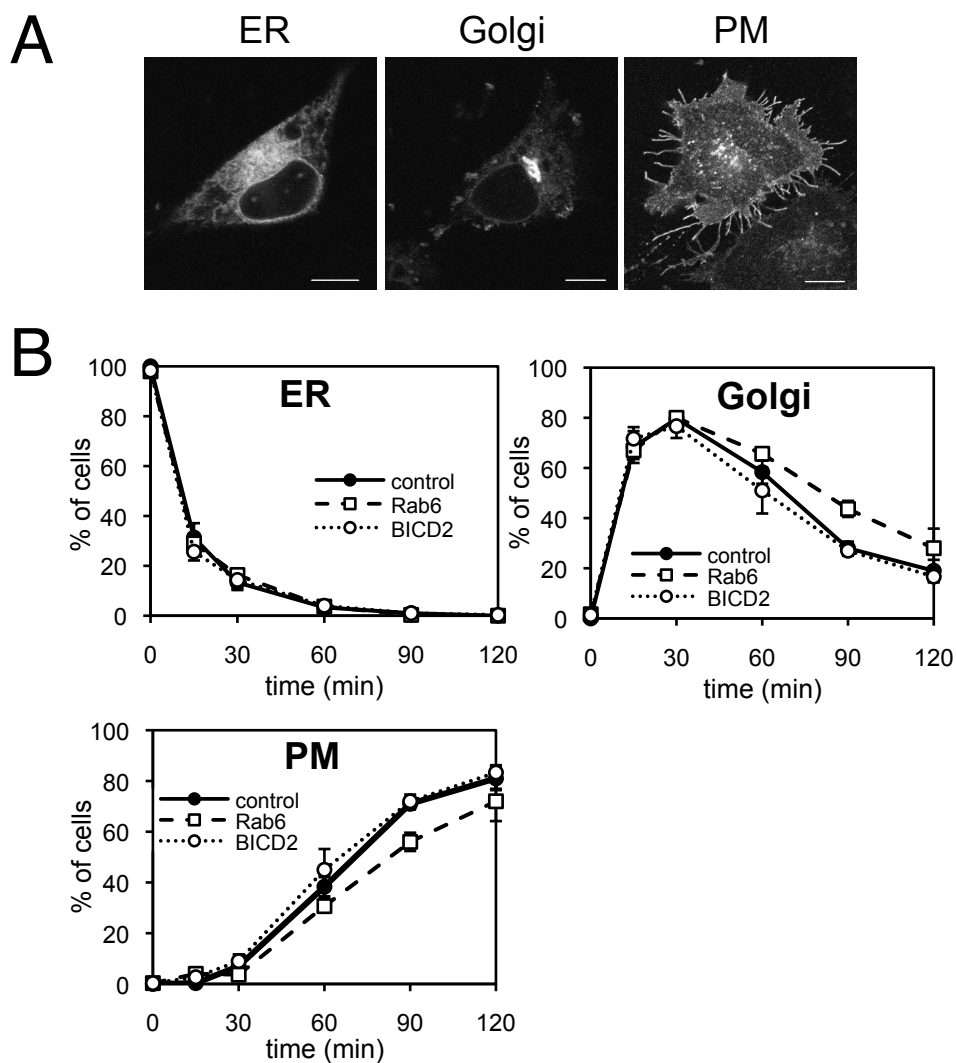


図 43 VSVGts045-GFP を用いた順行輸送経路の解析

(A) GFP 融合 VSVGts045 (VSVGts045-GFP) が小胞体 (ER)、ゴルジ体 (Golgi)、形質膜 (PM) の各領域に局在している細胞の代表的な画像。スケールバーは 10 μm 。

(B) Scramble siRNA (control)、Rab6 に対する siRNA (Rab6)、あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #2) をトランスフェクションした HeLa 細胞における、VSVGts045-GFP の輸送キネティクス。データは、VSVGts045-GFP の局在ごとに細胞の割合 (%) を計数・算出し、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 100 個の細胞を解析)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

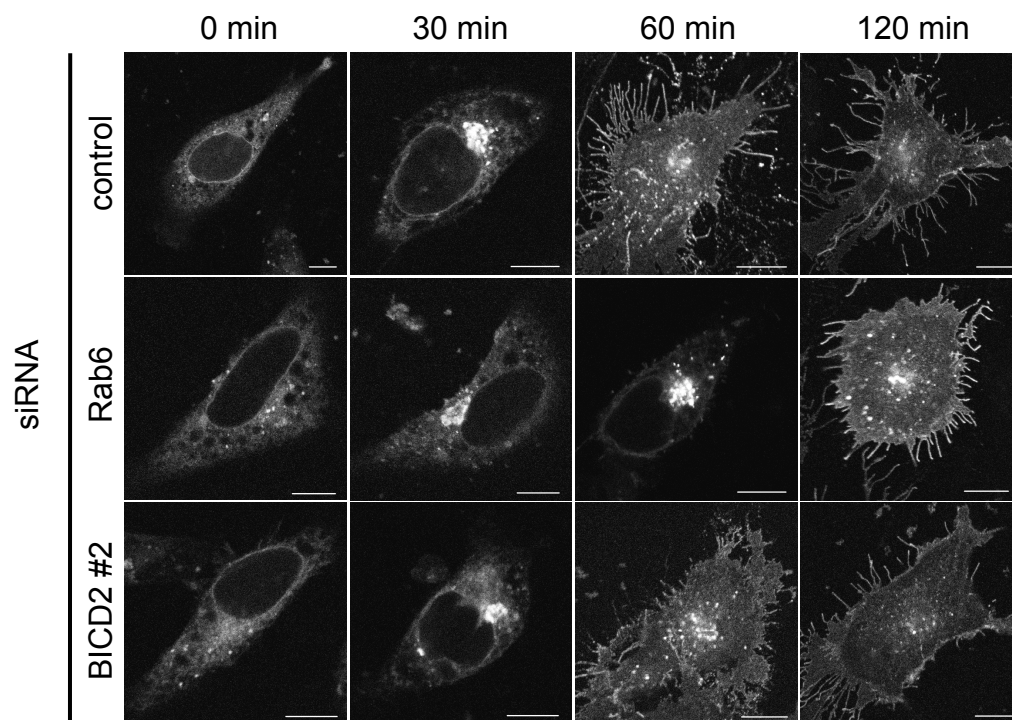


図 44 VSVGts045-GFP の局在

Scramble siRNA (control)、Rab6 に対する siRNA (Rab6)、あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #2) をトランスフェクションした HeLa 細胞について、32°Cでのインキュベート開始から 0、30、60、120 分時点の VSVGts045-GFP の局在の代表的な画像を示している（詳細は 4.22 の項を参照）。スケールバーは 10 μm 。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

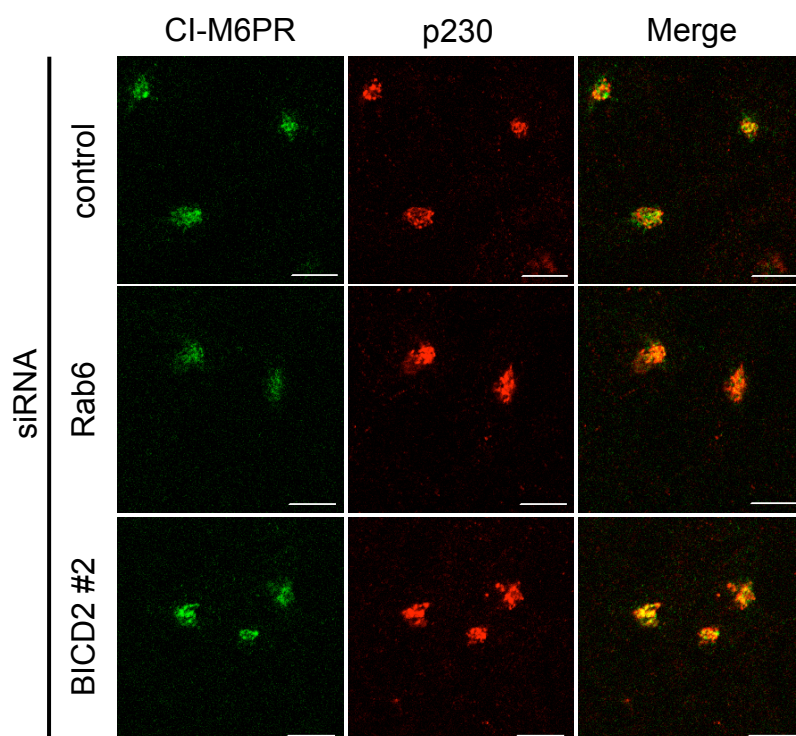


図 45 CI-M6PR を用いたエンドソーム-トランスゴルジネットワーク間の輸送解析

HeLa 細胞に、scramble siRNA (control)、Rab6 に対する siRNA (Rab6)、あるいは BICD2 に対する siRNA (BICD2 #2) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を固定し、抗 CI-M6PR 抗体および抗 p230 抗体を用いて二重染色を行った。Merge は、CI-M6PR の画像と p230 の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 20 μ m。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

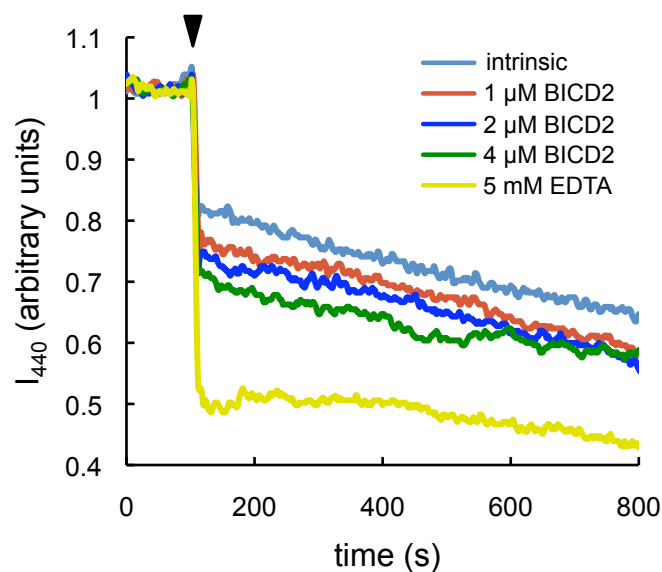


図 46 *In vitro* GEF アッセイを用いた BICD2 の GEF 活性測定

GST-Rab6A に結合した mant-GDP の遊離キネティクス。キネティクスは、1 μ M (赤)、2 μ M (青)、4 μ M (緑) の His-mBICD2 を反応液に添加した条件、添加しないコントロール条件 (intrinsic、水色)、あるいは 5 mM の EDTA を添加した条件 (黄) において測定した。His-mBICD2 は測定開始前に反応液に加えて混合し、100 μ M の GTP あるいは 5 mM EDTA は測定開始から 100 秒時点 (矢印) で、反応液に添加した。Intrinsic における約 100 秒時点の測定値の急激な減少は、mant-GDP の遊離ではなく、GTP あるいは EDTA 溶液を加えたことによって反応液が希釈されたことを示している。図は 1-3 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

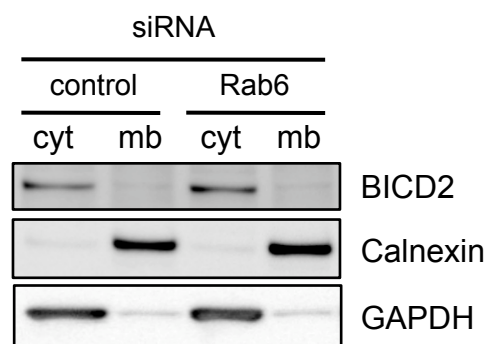


図 47 Rab6 ノックダウン HeLa 細胞の生化学的解析

HeLa 細胞に、scramble siRNA (control) あるいは Rab6 に対する siRNA (Rab6) をトランスフェクションした。72 時間後、細胞を回収し、細胞分画法により細胞質画分 (cyt) と膜画分 (mb) に分離した (詳細は 4.13 の項を参照)。各画分は SDS-PAGE を用いて分離し、抗 BICD2 抗体、抗 Calnexin 抗体、および抗 GAPDH 抗体を用いたウエスタンブロッティングに供した。Calnexin は膜画分のマーカー、GAPDH は細胞質画分のマーカーとして用いた。図は 4 回の実験の代表的な結果を示す。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

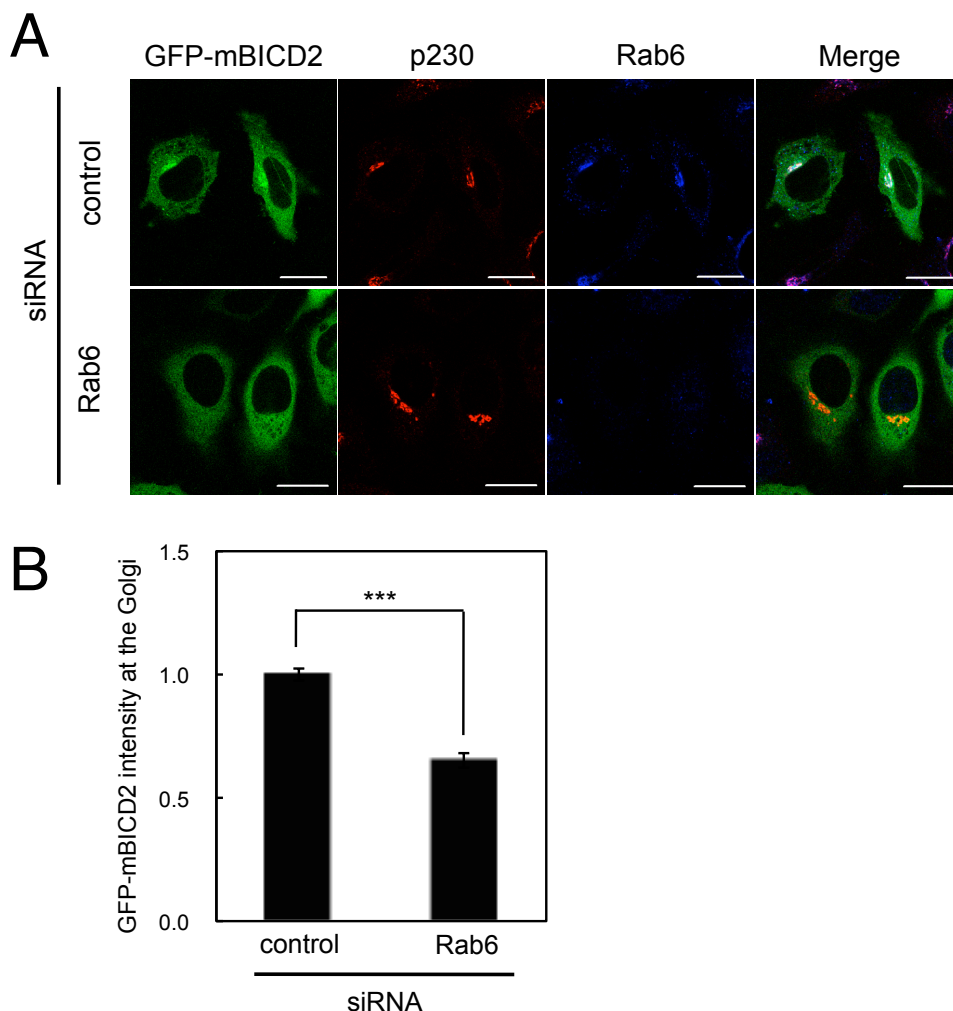


図 48 蛍光抗体法を用いた GFP-mBICD2 の局在解析

(A) HeLa 細胞に、scramble siRNA (control) あるいは Rab6 に対する siRNA (Rab6) をトランスフェクションし、37℃で 48 時間培養した。48 時間後、GFP 融合マウス BICD2 (GFP-mBICD2) のプラスミドをトランスフェクションし、37℃でさらに 24 時間培養した。24 時間後、細胞を固定し、抗 Rab6 抗体および抗 p230 抗体を用いて二重染色を行った。Merge は、GFP-mBICD2 の画像、p230 の画像、および Rab6 の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 20 μ m。

(B) (A) のゴルジ体領域における GFP-mBICD2 量の定量。LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、ゴルジ体領域の GFP-mBICD2 の蛍光強度を測定した (ゴルジ体以外の細胞質領域における蛍光強度をバックグラウンドとした)。蛍光強度のデータは、3 回の実験の平均 \pm 標準偏差で示した (1 回の実験で 1 条件あたり 20-22 個の細胞を解析)。各実験の control 条件の蛍光強度を平均し、その値を 1 として正規化した。*** $P < 0.001$ (Student's *t*-test)。

(出典元 : Matsuto *et al.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* **1853** (10), 2592-2609.)

表 1 (インターネット公表に対する共著者全員の同意が得られていないため未掲載)

プローブ	輸送経路	Rab6ノックダウン	BICD2ノックダウン	対応する図
BFA処理 および GT-GFP	ゴルジ体からの 管状構造の形成	阻害	阻害	41
	管状構造と 小胞体との融合	阻害	阻害	41
CtxB	PM→Golgi	○	○	42B
	Golgi→ER	○	○	42B
VSVGts045	ER→Golgi	○	○	43B、44
	Golgi→PM	阻害	○	43B、44
CI-M6PR	エンドソーム ⇄TGN	攪乱	○	45

○: 変化が確認されなかった

表 2 小胞輸送に対する Rab6 ノックダウンあるいは BICD2 ノックダウンの影響
本研究で行った輸送解析の結果をまとめた（詳細は 2.8 の項を参照）。

第 6 章 参考文献

Adachi, A., Kano, F., Saido, T.C. & Murata, M. (2009) Visual screening and analysis for kinase-regulated membrane trafficking pathways that are involved in extensive beta-amyloid secretion. *Genes Cells* **14**, 355-369.

Aivazian, D., Serrano, R.L. & Pfeffer, S. (2006) TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J. Cell Biol.* **173**, 917-926.

Ali, B.R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. & Seabra, M.C. (2004) Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J. Cell Sci.* **117**, 6401-6412.

Antony, C., Cibert, C., Géraud, G., Santa Maria, A., Maro, B., Mayau, V. & Goud, B. (1992) The small GTP-binding protein rab6p is distributed from medial Golgi to the trans-Golgi network as determined by a confocal microscopic approach. *J. Cell Sci.* **103**, 785-796.

Arasaki, K., Taniguchi, M., Tani, K. & Tagaya, M. (2006) RINT1 regulates the localization and entry of ZW10 to the syntaxin 18 complex. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2780-2788.

Barbero, P., Bittova, L. & Pfeffer, S.R. (2002) Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J. Cell Biol.* **156**, 511-518.

Beranger, F., Cadwallader, K., Porfiri, E., Powers, S., Evans, T., de Gunzburg, J. & Hancock, J.F. (1994a) Determination of structural requirements for the interaction of Rab6 with RabGDI and

Rab geranylgeranyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**, 13637-13643.

Beranger, F., Paterson, H., Powers, S., de Gunzburg, J. & Hancock, J.F. (1994b) The effector domain of Rab6, plus a highly hydrophobic C terminus, is required for Golgi Apparatus localization. *Mol. Biol. Cell* **14**, 744-758.

Bergbrede, T., Chuky, N., Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Geyer, M., Fuchs, E., Goody, R.S., Barr, F. & Alexandrov, K. (2009) Biophysical analysis of the interaction of Rab6a GTPase with its effector domains. *J. Biol. Chem.* **284**, 2628-2635.

Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. & Sziegoleit, A. (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect. Immun.* **47**, 52-60.

Blümer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y.W., Bastiaens, P., Goody, R.S. & Itzen, A. (2013) RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J. Cell Biol.* **200**, 287-300.

Boldogh, I.R., Pon, L.A., Sheetz, M.P. & De Vos, K.J. (2007) Cell-free assays for mitochondria-cytoskeleton interactions. *Methods in Cell Biol.* **80**, 683-706.

Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604–1607.

Brennwald, P. & Novick, P. (1993) Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* **362**, 560-563.

Brusca, J.S. & Radolf, J.D. (1994) Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. *Methods Enzymol.* **228**, 182-193.

Bustos, M.A., Lucchesi, O., Ruete, M.C., Mayorga, L.S. & Tmes, C.N. (2012) Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E2057– E2066.

Calero, M., Chen, C.Z., Zhu, W., Winand, N., Havas, K.A., Gilbert, P.M., Burd, C.G. & Collins, R.N. (2003) Dual prenylation is required for Rab protein localization and function. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1852-1867.

Carroll, K.S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P. & Pfeffer, S.R. (2001) Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* **292**, 1373-1376.

Cazares, V.A., Subramani, A., Saldate, J.J., Hoerauf, W. & Stuenkel, E.L. (2014) Distinct actions of Rab3 and Rab27 GTPases on late stages of exocytosis of insulin. *Traffic* **15**, 997-1015.

Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K. & Zerial, M. (1990) Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-329.

Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. & Zerial, M. (1991) Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772.

Chen, A., AbuJarour, R.J. & Draper, R.K. (2003) Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab6A and COPI. *J. Cell Sci.* **116**, 3503-3510.

Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M. & Lippincott-Schwartz, J. (1996) Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* **273**, 797-801.

Coxon, F.P., Ebetino, F.H., Mules, E.H., Seabra, M.C., McKenna, C.E. & Rogers, M.J. (2005) Phosphonocarboxylate inhibitors of Rab geranylgeranyl transferase disrupt the prenylation and membrane localization of Rab proteins in osteoclasts in vitro and in vivo. *Bone* **37**, 349-358.

Del Nery, E., Miserey-Lenkei, S., Falguières, T., Nizak, C., Johannes, L., Perez, F. & Goud, B. (2006) Rab6A and Rab6A' GTPases play non-overlapping roles in membrane trafficking. *Traffic* **7**, 394-407.

Delprato, A., Merithew, E. & Lambright, D.G. (2004) Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell* **118**, 607-617.

Desnos, C., Schonn, J.S., Huet, S., Tran, V.S., El-Amraoui, A., Raposo, G., Fanget, I., Chapuis,

C., Ménasché, G., de Saint Basile, G., Petit, C., Cribier, S., Henry, J.P. & Darchen, F. (2003) Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J. Cell Biol.* **163**, 559-570.

Díaz, E., Schimmöller, F. & Pfeffer, S.R. (1997) A novel Rab9 effector required for endosome-to-TGN transport. *J. Cell Biol.* **138**, 283-290.

Dienstbier, M. & Li, X. (2009) Bicaudal-D and its role in cargo sorting by microtubule-based motors. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 1066-1071.

Dirac-Svejstrup, A.B., Sumizawa, T. & Pfeffer, S.R. (1997) Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**, 465-472.

Dong, B., Kakihara, K., Otani, T., Wada, H. & Hayashi, S. (2013) Rab9 and retromer regulate retrograde trafficking of luminal protein required for epithelial tube length control. *Nat. Commun.* **4**, 1358.

Drenan, R.M., Liu, X., Bertram, P.G. & Zheng, X.F. (2004) FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* **279**, 772-778.

Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J.J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I. & Goud, B. (1998) Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**,

580-585.

Echard, A., Opdam, F.J., de Leeuw, H.J., Jollivet, F., Savelkoul, P., Hendriks, W., Voorberg, J., Goud, B. & Fransen, J.A. (2000) Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3819-3833.

Erdman, R.A., Shellenberger, K.E., Overmeyer, J.H. & Maltese, W.A. (2000) Rab24 is an atypical member of the Rab GTPase family. Deficient GTPase activity, GDP dissociation inhibitor interaction, and prenylation of Rab24 expressed in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 3848-3856.

Fuchs, E., Short, B. & Barr, F.A. (2005) Assay and properties of rab6 interaction with dynein-dynactin complexes. *Methods Enzymol.* **403**, 607-618.

Fumoto, K., Hoogenraad, C.C. & Kikuchi, A. (2006) GSK-3 β -regulated interaction of BICD with dynein is involved in microtubule anchorage at centrosome. *EMBO J.* **25**, 5670-5682.

Ganley, I.G., Carroll, K., Bittova, L. & Pfeffer, S. (2004) Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5420-5430.

Gerondopoulos, A., Langemeyer, L., Liang, J.R., Linford, A. & Barr, F.A. (2012) BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Curr. Biol.* **22**, 2135-2139.

Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T. & Pepperkok, R. (1999) Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* **1**, 423-430.

Gomes, A.Q., Ali, B.R., Ramalho, J.S., Godfrey, R.F., Barral, D.C., Hume, A.N. & Seabra, M.C. (2003) Membrane targeting of Rab GTPases is influenced by the prenylation motif, *Mol. Biol. Cell* **14**, 1882-1899.

Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M. & Gruenberg, J. (1991) rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925.

Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A. & Saraste, J. (1990) Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* **345**, 553-556.

Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P.S., Demmers, J., Ohtsuka, T., Modesti, M., Maly, I.V., Grosveld, F., Hoogenraad, C.C. & Akhmanova, A. (2007) Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev. Cell* **13**, 305-314.

Hanna, J., Carroll, K. & Pfeffer, S.R. (2002) Identification of residues in TIP47 essential for Rab9 binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7450-7454.

Hill, E., Clarke, M. & Barr, F.A. (2000) The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J.* **19**, 5711-5719.

Hirose, H., Arasaki, K., Dohmae, N., Takio, K., Hatsuzawa, K., Nagahama, M., Tani, K., Yamamoto, A., Tohyama, M. & Tagaya, M. (2004) Implication of ZW10 in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *EMBO J.* **23**, 1267-1278.

Hirschberg, K., Miller, C.M., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E.D., Phair, R.D. & Lippincott-Schwartz, J. (1998) Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.* **143**, 1485-1503.

Hoffenberg, S., Sanford, J.C., Liu, S., Daniel, D.S., Tuvín, M., Knoll, B.J., Wessling-Resnick, M. & Dickey, B.F. (1995) Biochemical and functional characterization of a recombinant GTPase, Rab5, and two of its mutants. *J. Biol. Chem.* **270**, 5048-5056.

Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Howell, S.A., Dortland, B.R., De Zeeuw, C.I., Willemsen, R., Visser, P., Grosveld, F. & Galjart, N. (2001) Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J.* **20**, 4041-4054.

Hoogenraad, C.C., Wulf, P., Schieffermeier, N., Stepanova, T., Galjart, N., Small, J.V., Grosveld, F., de Zeeuw, C.I. & Akhmanova, A. (2003) Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *EMBO J.* **22**, 6004-6015.

Johnston, P.A., Archer 3rd, B.T., Robinson, K., Mignery, G.A., Jahn, R. & Südhof, T.C. (1991)

rab3A attachment to the synaptic vesicle membrane mediated by a conserved polyisoprenylated carboxy-terminal sequence. *Neuron* **7**, 101-109.

Kano, F., Sako, Y., Tagaya, M., Yanagida, T. & Murata, M. (2000) Reconstitution of brefeldin A-induced golgi tubulation and fusion with the endoplasmic reticulum in semi-intact chinese hamster ovary cells. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3073-3087.

Kano, F., Yamauchi, S., Yoshida, Y., Watanabe-Takahashi, M., Nishikawa, K., Nakamura, N. & Murata, M. (2009) Yip1A regulates the COPI-independent retrograde transport from the Golgi complex to the ER. *J. Cell Sci.* **122**, 2218–2227.

Kano, F., Arai, T., Matsuto, M., Hayashi, H., Sato, M. & Murata, M. (2011) Hydrogen peroxide depletes phosphatidylinositol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependent manner and perturbs endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 784-801.

Kano, F., Nakatsu, D., Noguchi, Y., Yamamoto, A. & Murata, M. (2012) A resealed-cell system for analyzing pathogenic intracellular events: perturbation of endocytic pathways under diabetic conditions. *PLoS ONE* **7**, e44127.

Khosravi-Far, R., Lutz, R.J., Cox, A.D., Conroy, L., Bourne, J.R., Sinensky, M., Balch, W.E., Buss, J.E. & Der, C.J. (1991) Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6264-6268.

Kinsella, B.T. & Maltese, W.A. (1992) rab GTP-binding proteins with three different carboxyl-terminal cysteine motifs are modified in vivo by 20-carbon isoprenoids. *J. Biol. Chem.* **267**, 3940-3945.

Lencer, W.I., Constable, C., Moe, S., Jobling, M.G., Webb, H.M., Ruston, S., Madara, J.L., Hirst, T.R. & Holmes, R.K. (1995) Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. *J. Cell Biol.* **131**, 951-962.

Liu, S. & Storrie, B. (2012) Are Rab proteins the link between Golgi organization and membrane trafficking? *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 4093-4106.

Lodhi, I.J., Bridges, D., Chiang, S.H., Zhang, Y., Cheng, A., Geletka, L.M., Weisman, L.S. & Saltiel, A.R. (2008) Insulin stimulates phosphatidylinositol 3-phosphate production via the activation of Rab5. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2718-2728.

Majoul, I.V., Bastiaens, P.I. & Söling, H.D. (1996) Transport of an external Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) protein from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum: studies with cholera toxin in Vero cells. *J. Cell Biol.* **133**, 777-789.

Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. & Johannes, L. (2002) Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J. Cell Biol.* **156**, 653-664.

Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E.G., Salamero, J. & Goud, B. (1997) GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1828-1833.

Matanis, T., Akhmanova, A., Wulf, P., Del Nery, E., Weide, T., Stepanova, T., Galjart, N., Grosveld, F., Goud, B., De Zeeuw, C.I., Barnekow, A. & Hoogenraad, C.C. (2002) Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat. Cell Biol.* **4**, 986-992.

Mitra, S., Cheng, K.W. & Mills, G.B. (2011) Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 57-68.

Monier, S., Jollivet, F., Janoueix-Lerosey, I., Johannes, L. & Goud, B. (2002) Characterization of novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic* **3**, 289-297.

Morikawa, R.K., Aoki, J., Kano, F., Murata, M., Yamamoto, A., Tsujimoto, M. & Arai, H. (2009) Intracellular phospholipase A1gamma (iPLA1gamma) is a novel factor involved in coat protein complex I- and Rab6-independent retrograde transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **284**, 26620-26630.

Nagelkerken, B., Van Anken, E., Van Raak, M., Gerez, L., Mohrmann, K., Van Uden, N., Holthuisen, J., Pelkmans, L. & Van Der Sluijs, P. (2000) Rabaptin4, a novel effector of the small GTPase rab4a, is recruited to perinuclear recycling vesicles. *Biochem. J.* **346**, 593-601.

Nizak, C., Monier, S., del Nery, E., Moutel, S., Goud, B. & Perez, F. (2003) Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* **300**, 984-987.

Opdam, F.J., Echard, A., Croes, H.J., van den Hurk, J.A., van de Vorstenbosch, R.A., Ginsel, L.A., Goud, B. & Fransen, J.A. (2000) The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* **113**, 2725-2735.

Pavlos, N.J., Grønborg, M., Riedel, D., Chua, J.J., Boyken, J., Kloepper, T.H., Urlaub, H., Rizzoli, S.O. & Jahn, R. (2010) Quantitative analysis of synaptic vesicle Rabs uncovers distinct yet overlapping roles for Rab3a and Rab27b in Ca^{2+} -triggered exocytosis. *J. Neurosci.* **30**, 13441-13453.

Pereira-Leal, J.B. & Seabra, M.C. (2000) The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* **301**, 1077-1087.

Pfeffer, S.R. (2005) Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J. Biol. Chem.* **280**, 15485-15488.

Pfeffer, S.R. (2011) Entry at the trans-face of the Golgi. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a005272.

Pfeffer, S.R. (2013) Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 414-419.

Pimplikar, S.W., Ikonen, E. & Simons, K. (1994) Basolateral protein transport in streptolysin O-permeabilized MDCK cells. *J. Cell Biol.* **125**, 1025-1035.

Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J. & Lippincott-Schwartz, J. (1997) ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**, 81-85.

Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G.A., Prabhu, Y., Rojas, A.L., Mohammed, S., Heck, A.J., Raposo, G., van der Sluijs, P. & Bonifacino, J.S. (2008) Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.* **183**, 513-526.

Rothman, J.E. & Wieland, F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234.

Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M.C., Goody, R. & Zerial, M. (1996) GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* **383**, 266-269.

Sato, K., Roboti, P., Mironov, A.A. & Lowe, M. (2015) Coupling of vesicle tethering and Rab binding is required for in vivo functionality of the golgin GMAP-210. *Mol. Biol. Cell* **26**,

537-553.

Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E., Terasaki, M., Siggia, E. & Lippincott-Schwartz, J. (1997) Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1137-1155.

Seabra, M.C. & Wasmeier, C. (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 451-457.

Short, B., Preisinger, C., Schaletzky, J., Kopajtich, R. & Barr, F.A. (2002) The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr. Biol.* **12**, 1792-1795.

Sivars, U., Aivazian, D. & Pfeffer, S.R. (2003) Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**, 856-859.

Soldati, T., Riederer, M.A. & Pfeffer, S.R. (1993) Rab GDI: a solubilizing and recycling factor for rab9 protein. *Mol. Biol. Cell* **4**, 425-434.

Soo, K.Y., Halloran, M., Sundaramoorthy, V., Parakh, S., Toth, R.P., Southam, K.A., McLean, C.A., Lock, P., King, A., Farg, M.A. & Atkin, J.D. (2015) Rab1-dependent ER–Golgi transport dysfunction is a common pathogenic mechanism in SOD1, TDP-43 and FUS-associated ALS. *Acta Neuropathol.* **130**, 679-697.

Splinter, D., Tanenbaum, M.E., Lindqvist, A., Jaarsma, D., Flotho, A., Yu, K.L., Grigoriev, I., Engelsma, D., Haasdijk, E.D., Keijzer, N., Demmers, J., Fornerod, M., Melchior, F., Hoogenraad, C.C., Medema, R.H. & Akhmanova, A. (2010) Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol.* **8**, e1000350.

Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, O., Ullrich, O., Goud, B. & Zerial, M. (1994) Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *EMBO J.* **13**, 575-583.

Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 513-525.

Strous, G.J., Berger, E.G., van Kerkhof, P., Bosshart, H., Berger, B. & Geuze, H.J. (1991) Brefeldin A induces a microtubule-dependent fusion of galactosyltransferase-containing vesicles with the rough endoplasmic reticulum. *Biol. Cell* **71**, 25-31.

Sun, Y., Shestakova, A., Hunt, L., Sehgal, S., Lupashin, V. & Storrie, B. (2007) Rab6 regulates both ZW10/RINT1 and conserved oligomeric Golgi complex-dependent Golgi trafficking and homeostasis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4129-4142.

Swift, S., Xu, J., Trivedi, V., Austin, K.M., Tressel, S.L., Zhang, L., Covic, L. & Kuliopulos, A. (2010) A novel protease-activated receptor-1 interactor, Bicaudal D1, regulates G protein signaling and internalization. *J. Biol. Chem.* **285**, 11402-11410.

Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* **81**, 153-208.

Terenzio, M. & Schiavo, G. (2010) The more, the better: the BICD family gets bigger. *EMBO J.* **29**, 1625-1626.

Tisdale, E.J., Bourne, J.R., Khosravi-Far, R., Der, C.J. & Balch, W.E. (1992) GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **119**, 749-761.

Tisdale, E.J. & Balch, W.E. (1996) Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. *J. Biol. Chem.* **271**, 29372-29379.

Tisdale, E.J. (1999) A Rab2 mutant with impaired GTPase activity stimulates vesicle formation from pre-Golgi intermediates. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1837-1849.

Tisdale, E.J. (2003) Rab2 interacts directly with atypical protein kinase C (aPKC) iota/lambda and inhibits aPKC_{iota/lambda}-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **278**, 52524-52530.

Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., Huxley, C. & Seabra, M.C. (2004) A general role for Rab27a in secretory cells. *Mol. Biol. Cell* **15**, 332-344.

Vardarajan, B.N., Bruesegem, S.Y., Harbour, M.E., St George-Hyslop, P., Seaman, M.N. & Farrer, L.A. (2012) Identification of Alzheimer disease-associated variants in genes that regulate retromer function. *Neurobiol. Aging* **33**, 2231.e15-2231.e30.

Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y. & Takai, Y. (1997) Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 3875-3878.

Wandinger-Ness, A. & Zerial, M. (2014) Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a022616.

Wanschers, B.F., van de Vorstenbosch, R., Schlager, M.A., Splinter, D., Akhmanova, A., Hoogenraad, C.C., Wieringa, B. & Fransen, J.A. (2007) A role for the Rab6B Bicaudal-D1 interaction in retrograde transport in neuronal cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3408-3420.

Wanschers, B., van de Vorstenbosch, R., Wijers, M., Wiering, B., King, S.M. & Fransen, J. (2008) Rab6 family proteins interact with the dynein light chain protein DYNLRB1. *Cell Motil. Cytoskeleton* **65**, 183-196.

Wennerberg, K., Rossman, K.L. & Der, C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843-846.

White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B.,

Echard, A., Goud, B. & Stelzer, E.H. (1999) Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J. Cell Biol.* **147**, 743-760.

Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Hammer 3rd, J.A. (2002) Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat. Cell Biol.* **4**, 271-278.

Young, J., Stauber, T., del Nery, E., Vernos, I., Pepperkok, R., Nilsson, T. (2005) Regulation of microtubule-dependent recycling at the trans-Golgi network by Rab6A and Rab6A'. *Mol. Biol. Cell* **16**, 162-177.

Young, J., Ménétrey, J. & Goud, B. (2010) RAB6C is a retrogene that encodes a centrosomal protein involved in cell cycle progression. *J. Mol. Biol.* **397**, 69-88.

Zerial, M. & McBride, H. (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117.

Zhu, Z., Dumas, J.J., Lietzke, S.E. & Lambright, D.G. (2001) A helical turn motif in Mss4 is a critical determinant of Rab binding and nucleotide release. *Biochemistry* **40**, 3027-3036.

第 7 章 謝辞

本研究を行うにあたり、多くのご支援とご指導を賜りました指導教官である村田昌之教授に深く御礼申し上げます。多岐にわたりご指導を賜りました加納ふみ助教に深く御礼申し上げます。GEF 活性の測定におきまして、F-2500 蛍光分光光度計を使用させていただくとともにご指導を賜りました東京大学の佐藤健准教授に深く御礼申し上げます。本研究データの統計解析等に関してご助言いただいた中津大貴博士、本研究の実験遂行にご協力いただいた菅原太一博士に深く感謝申し上げます。さまざまな助言をくださり、研究生生活を助けていただきました村田研究室の皆様に深く感謝申し上げます。最後に、大学院生活に理解を示し支えてくれた家族に感謝いたします。