

博士論文

論文題目 逆行性輸送における Sorting
Nexin 27 (SNX27)の機能の解析

氏名 相田 健佑

Contents

Abbreviations	3-5
General Introduction	6-14
Abstract	15-20
Introduction	21-24
Materials & Methods	25-39
Results	40-52
Discussion	54-60
Figures & Figure legends	61-99
Conclusion & Future Aspects	100-103
Acknowledgements	104-106
References	107-120

• **Abbreviations**

ADP: Adenosine diphosphate

ADRB2: Adrenoceptor beta 2

AMPAR: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
receptor

APP: Amyloid precursor protein

ATP: Adenosine triphosphate

cAMP: cyclic Adenosine monophosphate

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CK: Casein kinase

CTxB: Cholera toxin beta subunit

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

EE: Early endosome

EEA1: Early endosome antigen 1

ER: Endoplasmic reticulum

ESCRT: Endosomal sorting complexes required for transport

EV: Empty vector

FBS: fetal bovine serum

GPCR: G protein-coupled receptor

GST: Glutathione S-transferase

GWAS: Genome-wide association studies

HA: Human influenza hemagglutinin

HA-SNX27^R: siRNA 耐性であり、N 末端に HA epitope を融合させた
SNX27

KD: knock down

LDLR: Low density lipoprotein receptor

LRP1: Low density lipoprotein receptor-related protein 1

MPR: Mannose 6-phosphate receptor

MRP: Multidrug resistance-associated protein

NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide

NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor

PAK: Serine/threonine-protein kinase

PI3P: Phosphatidylinositol 3-phosphate

PI(3,4,5)P3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate

PI4P: Phosphatidylinositol 4-phosphate

RE: Recycling endosome

RTK: Receptor tyrosine kinases

shControl-COS-1 細胞: Control shRNA 安定発現 COS-1 細胞

shSNX27-COS-1 細胞: SNX27 shRNA 安定発現 COS-1 細胞

siControl/shControl COS-1 細胞: Control siRNA 処理 shControl-COS-1 細胞

siSNX1/shControl COS-1 細胞: shControl / SNX1 siRNA 細胞

siSNX1/shSNX27 COS-1 細胞: SNX1 siRNA 処理 shSNX27-COS-1 細胞

siSNX27/shSNX27 COS-1 細胞: SNX27 siRNA 処理 shSNX27-COS-1 細胞

SNX: Sorting Nexin

STX: Syntaxin

STxB: Shiga toxin beta subunit

TBCA: Tetrabromocinnamic acid

TGN: Trans golgi network

VPS: Vacuolar protein sorting-associated protein

WASH1: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homolog 1

3×FLAG-SNX27: N 末端に 3×FLAG epitope を融合させた SNX27

各種変異体/shSNX27-COS1 発現細胞: HA-SNX27^R-各種変異体 を発現させた shSNX27-COS-1 細胞

General introduction

コレラはコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) を病原体とする経口感染症である(1)。経口摂取後、小腸下部に達したコレラ菌が産生するコレラ毒素が細胞内に侵入することにより、小腸上皮細胞の水と電解質が大量に流出し、猛烈な下痢と嘔吐が起こる(2)。この毒性発現は、小腸上皮細胞に取り込まれたコレラ毒素が逆行性輸送により小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) に運ばれることに起因する(3)。ER において、毒素活性本体である A1 サブユニットが細胞質に放出され、A1 サブユニットは細胞内の NAD をニコチンアミドと ADP リボースに分解する(4)。A1 サブユニットは、産生された ADP リボースを受容体活性化 Gs タンパク質と結合させ、その結果、アデニルシンクラーゼは常に活性化された状態になり、細胞内 cAMP が上昇する(4)。その結果、Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) の機能が亢進し、電解質と水が大量に細胞外に流出する(5)。コレラ菌にはアジア型、エルトール型、O139 等があり、特にアジア型は高い死亡率を示し、無治療の場合、死亡率は 75~80% に及ぶ(6,7)。コレラによる直接の死亡原因は、猛烈な下痢と嘔吐による水と電解質の大量流出によって起こる脱水症状であるため、水分と電解質を補給することがコレラによる死亡を防ぐ。また、コレラ菌はテトラサイクリン系抗生物質やクロラムフェニコールなどの

抗生物質により死滅する(8)。適切な治療が行われた場合には、コレラ菌感染による死亡率は 1~2%にまで低下する(6,9)。コレラは先進国では大きな問題ではないものの、アフリカ、アジア、中南米の一部の地域ではなお流行しており、毎年、300 万人から 500 万人のコレラ患者が発生し、10 万人から 12 万人がコレラで死亡していると推計されている(6)。

コレラ毒素の輸送経路として利用される逆行性輸送(endosome からゴルジ体への輸送)の生理学的意義に関しては、細胞膜や endosome に存在する cargo の再利用が、一つの目的であると考えられている(10)。Wntless、TGN38、mannose 6-phosphate receptors (MPRs)などが、逆行性輸送によりゴルジ体に運ばれるタンパク質として知られる(10-13)。逆行性輸送は、early endosome(EE)から直接ゴルジ体へ向かう経路、recycling endosome(RE)を経由する経路、リソソームを経由する経路など、複数のルートが存在することが知られているが(10-13)、高解像度の顕微鏡の必要性、オルガネラマーカの染色法など実験障壁の高さから、その分子機構に関しては、他の細胞内小胞輸送に比べて、未だ不明な点が多い。

MPRs は、逆行性輸送の解析に汎用される内因性のタンパク質であり、Rab9 positive late endosome からゴルジ体に運ばれる。この過程には syntaxin 10/syntaxin 16/Vti1a/VAMP3 SNARE complex が

必要であり、syntaxin 10 遺伝子のノックダウン(KD)により、MPRs のゴルジ体への輸送が阻害される(14,15)。

Shiga toxin も逆行性輸送の解析に汎用される。Shiga toxin は、触媒作用を有する A サブユニットと、輸送に関与する 5 量体の B サブユニットからなる AB₅ toxin であり、逆行性輸送の解析においては主に Shiga toxin beta subunit (STxB) が用いられる(16)。スフィンゴ糖脂質である Gb₃ を receptor として用い、clathrin 依存的な経路、非依存的な経路により、細胞内に取り込まれる(17-21)。その後、endosome において、endosome とゴルジ体との間を恒常的に循環している 2 量体膜貫通型タンパク質の GPP130 と相互作用した後、retromer complex により、cargo として認識され、ゴルジ体へと逆行性輸送される(22-25)。endosome から輸送小胞として脱離する際には、clathrin 及び、clathrin adaptor タンパク質である epsinR により、endosome が湾曲する必要がある(26,27)。STxB を含む輸送小胞は、GCC185 の働きによりゴルジ体にテザリングされた後、golgin97、golgin245、2 つの SNARE complexes (syntaxin6-syntaxin16-Vti1a-Vamp3/4 と syntaxin5-Ykt6-GS15-GS28)により、ゴルジ体と小胞融合する(28-32)。

Cholera toxin も逆行性輸送の解析に汎用される AB₅ toxin の一種であり、Shiga toxin の場合と同様に、逆行性輸送の解析では主に

cholera toxin beta subunits (CTxB)が用いられる。しかしながら、CTxB の逆行性輸送には、GPP130 が必須でないように(22)、STxB の逆行性輸送に関わる分子機構とは共通性が乏しい。CTxB は細胞膜上において、GM1 と呼ばれるガングリオシドに結合し、細胞内に取り込まれる(3)。細胞内に取り込まれた CTxB が、ゴルジ体に逆行性輸送される分子機構に関しては、明らかになっていない部分が多いものの(3)、STX5、STX6、Golgin97、eectin-2、SMAP2 等の関与が報告されている(3,30,33-35)。STX5、STX6 は小胞のゴルジ体への融合に、Golgin97 は小胞のゴルジ体へのテザリングに、eectin-2、SMAP2 は Arf の活性制御を担っている(3,30,33-35)。

Sorting Nexin (SNX) family は、phosphoinositides と相互作用する PX domain を有するタンパク質であり、逆行性輸送を含む様々な細胞内小胞輸送に関与する。現在までに、33 の SNX family に属するタンパク質が同定されている(36)。PX domain は、約 110 アミノ酸残基からなる 1 つの β ストランド、3 つの α ヘリックスから形成されるドメインであり、PI3P との相互作用においては、R[Y/F]-X23-30-K-X13-23-R がコンセンサス配列となる(36)。細胞膜、ゴルジ体、ER、endosome に局在する PI4P、細胞膜に局在する PI(4,5)P2 などと相互作用する PX domain も知られており(37)、各オルガネラに特異的に発現する phosphoinositide が存在するため、SNX の細胞内局

在は、主に PX domain の働きにより制御されていると考えられている。一方、各 SNX に固有の分子機能は、各 SNX が有する PX domain 以外のドメインの働きに起因する場合が多い。

SNX family のうち、12 種類の SNX は、膜のリモデリングを行う BAR domain を有す(36)。BAR domain は、2 量体を形成し、正電荷を帯びたバナナの形をした 6 本のヘリックスの束になることで機能する。この束は、負電荷を帯びたリン脂質と相互作用し、小胞形成において膜の湾曲を誘導できる(38)。SNX9 は、BAR domain 機能を介したクラスリン依存的内在化への関与が知られており、vesicle 形成のネック部分における膜の再構成に加え、ダイナミン、AP2、クラスリン、アクチン骨格の構成タンパク質など、vesicle の構成要素となるタンパク質の会合と補充を担う足場タンパク質としての機能も担う(36,39)。

SNX17、SNX27、SNX31 は C 末端に FERM-like domain を持つことが知られている(36)。FERM domain は約 300 のアミノ酸残基からなる domain であり、膜へのテザリングや膜貫通タンパク質の細胞質側 domain との相互作用において役割を有する、情報伝達に関与するタンパク質や足場タンパク質に多く見られる domain であり、Asn-Pro-Xaa-Tyr(NPxY) motif と相互作用する(36)。FERM domain は 3 つのサブドメインから構成され、ユビキチン用の F1 domain と、

PH domain や PTB domain に類似した構造を持つ C 末端の F3 domain を、中心の 4 つの α ヘリックス構造を有する F2 domain が関連付けている。SNX17、SNX27、SNX31 の F2 domain は一般的な F2 domain よりも小さいことから、SNX17、SNX27、SNX31 の FERM domain は FERM-like domain と呼ばれている(40)。これら SNX17、SNX27、SNX31 のうち、FERM-like domain を介した機能については、SNX17 の解析が最も進んでおり、FERM-like domain を介して、LRP1(41-43)、LDLR(43,44)、P-selectin (45-47) 、APP(48)などの膜貫通タンパク質の NPxY motif と相互作用し、細胞内輸送を制御することが明らかとなっている。LDLR に関しては、endosome から細胞膜へのリサイクリングに関与し(43)、APP とは endosome において相互作用し、amyloid A β peptide へのタンパク質分解処理を阻害する(48)。SNX27 の FERM-like domain は、NPxY motif の Y がリン酸化された配列との親和性が高く(40)、NPxY motif は様々な RTK に含まれる配列であることから、SNX27 は FERM-like domain を介して、活性化された RTK と相互作用すると推測されている(40)。また、最近の報告から、SNX27 の FERM-like domain と細胞膜に豊富に存在する PI(3,4,5)P3 との相互作用が明らかとなっており、PX domain とともに、FERM-like domain が SNX27 の細胞内局在を制御している可能性が指摘されている(49)。

SNX23 は kinesin motor を有し、kinesin superfamily に属する(50)。kinesin superfamily は微小管結合タンパク質であり、オルガネラ、タンパク質複合体、RNA などの輸送に関わる。SNX23 は、プラス方向への輸送に働く微小管モータータンパク質であり、PX domain を介して、PI3P が豊富な endosome と相互作用し、endosome のオルガネラの局在制御やレセプターのリサイクリングを制御する役割を持つ(50,51)。

近年、SNX と retromer との関連性について精力的に研究が進められている。retromer と呼ばれるタンパク質複合体は、酵母において、endosome からトランスゴルジネットワーク(TGN)に TGN sorting receptor (Vps10)を輸送する機能を持つタンパク質複合体として最初に定義された(52)。この retromer は 5 つのタンパク質から構成され、2 つのサブコンプレックスに分けることができる。一つは VPS5/SNX、VPS17/SNX のヘテロダイマー、他方は VPS26、VPS29、VPS35 の 3 量体である(52)。SNX-BARs は retromer の細胞内局在制御を担うのに対し、VPS26-VPS29-VPS35 3 量体は、cargo を認識する cargo-selective-complex として働く(52)。cargo-selective-complex は種間の相溶性が高い一方で、SNX-BARs は多様であり、哺乳類では SNX1、SNX2、SNX5、SNX6 等がその機能を担っていると言われている(52)。STxB などの逆行性輸送経路においては、SNX1、

SNX2 が関与する (53)。Genome-wide association studies (GWAS) による解析から、retromer 構成タンパク質とアルツハイマー症、パーキンソン病などの加齢に伴う神経変性疾患との関連が明らかになりつつある (54)。VPS35 の D620N 変異 (55-59) VPS26A の K93E 変異、VPS29 の N72H 変異 (60) とパーキンソン病との関連性が複数の報告から指摘されている。Gene Based analysis による SNX1 とアルツハイマー症の関連性を示唆する報告もある (61)。また、retromer 構成タンパク質の生理学的重要性は、SNX1、SNX2 double KO mouse が胎生致死となるように、遺伝子改変マウスのフェノタイプ解析からも明らかとなってきた (62)。

retromer は、上述の逆行性輸送に加え、膜タンパク質の endosome から細胞膜への小胞輸送に対する関与が示されている。膜タンパク質の endosome から細胞膜へのリサイクリングに関しては、SNX27 が中心的な役割を担っている (63)。SNX27 は、PDZ domain 内の loop を介して VPS26 と、FERM-like domain を介して SNX1 と相互作用し、retromer complex を形成している (63)。膜タンパク質の C 末端に存在する PDZ binding motif を PDZ domain を介して認識し、retromer 機能を介して膜タンパク質の細胞膜へのリサイクリングを担う (63)。

当研究室では、薬物トランスポーター multidrug resistance-

associated protein 4 (MRP4) の相互作用タンパク質として SNX27 を同定し、本タンパク質が MRP4 の細胞膜からの内在化を促進することを見出した(64)。その一方で、SNX27 は、主に EE に局在すること(65)、PDZ domain、FERM-like domain という 2 つの機能性 domain を持つことから、EE での小胞輸送において多彩な機能を担うことが推察された。

以上の背景から、私は、SNX27 の新たな分子機能を明らかにすべく、逆行性輸送に着目し、CTxB をモデルタンパク質として解析を行った。

・ Abstract

[目的]

Sorting Nexin 27 (SNX27)は、PX domain を有すことを特徴とする Sorting Nexin (SNX) family に属するタンパク質である。当研究室では、これまでに Multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) との相互作用タンパク質群に SNX27 が含まれることを見出し、本タンパク質が MRP4 の細胞膜からの内在化抑制に働くことを明らかにしている(64)。この研究により、SNX27 の細胞膜近傍における機能が見出されたが、その一方で、SNX27 は主に early endosome(EE) に局在することから、SNX27 が EE を起点とする細胞内輸送において、役割を有すことも推測された。EE から始まる細胞内小胞輸送として、細胞膜へのリサイクリング、ESCRT 機構を介したリソソーム分解、ゴルジ体への逆行性輸送などが知られている。本研究では、細胞内小胞輸送における SNX27 の役割を明らかにするために、蛍光標識 cholera toxin beta subunit (CTxB)を用い、SNX27 の逆行性輸送に対する寄与を検討した。

[方法・結果]

1. SNX27 のノックダウン(KD)により、CTxB の recycling endosome(RE)からゴルジ体への輸送が遅延する。

CTxB は、EE から RE を経由してゴルジ体に移行する(34)。COS-1 細胞は、RE とゴルジ体を構造的に区別しやすく、CTxB 局在の経時変化の観察に適していることから(34)、本研究では、COS-1 細胞を用いて解析を行った。

COS-1 細胞に取り込まれた CTxB は、5 分後に、EE マーカーである EEA1、90 分後にゴルジ体マーカーである TGN46 との共局在が観察された。RE はゴルジ体の内側に存在するが、CTxB は 15 分後には TGN46 の内側に局在することが観察された。また、CTxB の逆行性輸送に伴い、SNX27 も CTxB と共局在しながら、EE から RE を経由してゴルジ体近傍まで局在が変化することが確認された。一方、SNX27 を KD した細胞では、コントロール細胞と比して、15 分後までは、CTxB の逆行性輸送に明確な差は認められなかったが、90 分後においては、CTxB はゴルジ体ではなく、15 分後と同様に RE 局在を示した。

2. Casein Kinase II (CK2)による SNX27 の PX domain のリン酸化は、SNX27 の EE 局在性を高める

CTxB の逆行性輸送に対する SNX27 の作用は、SNX27 が通常時に存在する EE から生じる膜輸送ではなく、RE からゴルジ体への膜輸送で観察されたことから、本作用発現においては、SNX27 が EE から RE へと移行し、機能発現していることが推測された。

SNX27 の EE 局在は、PX domain が担っていることが報告されている(65)。また、私の予備検討から、SNX27 がリン酸化により局在制御を受けていることが示唆されたため、リン酸化予測サイト (NetPhos 2.0)を用いて PX domain を解析し、高スコアを示したアミノ酸残基を A に置換した変異体及び、恒常的リン酸化モデルである、アミノ酸残基を D に置換した変異体を構築した。EEA1 との共局在に基づき、各種変異体の EE 局在を確認したところ、S263 を A に置換した SNX27(SNX27-S263A)では EE に局在する割合が低下する一方で、D に置換した SNX27(SNX27-S263D)ではその割合が有意に上昇した。また、SNX27 及び両変異体を免疫沈降し、Pro-Q Diamond を用いて、野生型に比した両変異体のリン酸化の程度を比較検討した結果、両変異体共に約 8 割に低下していることから、上記の局在変化がリン酸化を介していることが示唆された。

S263 を含む **S**²⁶³ESDE は CK2 の認識モチーフと合致することから、リコンビナント CK2 を用いた in vitro kinase assay を行った。その結果、SNX27 が実際に CK2 の基質となることが確認された。CK2 阻害剤処理により、SNX27 の EE 局在は有意に減少し、SNX27-S263A と類似した細胞内局在像を示した。一方、SNX27-S263D においては CK2 阻害剤処理の影響はほとんど観察されなかった。以上の結果から、CK2 による S263 のリン酸化が SNX27 の EE 局在性を

高めることが示唆された。

3. CTxB の逆行性輸送には、SNX27 の EE からの移行、並びに SNX27 の FERM-like domain を介した SNX1 との協奏的な働きが必要である

SNX27 KD 細胞に、SNX27-S263D を発現させ、CTxB の逆行性輸送に対するレスキュー効果を評価した。SNX27 を発現させた場合には、細胞内に取り込まれた CTxB は 90 分後にゴルジ体に移行することが可能になったのに対し、SNX27-S263D を発現させた場合には、細胞内に取り込まれた CTxB は RE に留まっていた。本実験では、SNX27 が CTxB の細胞内取り込みに伴い、CTxB と共局在しながらゴルジ体近傍まで局在変化するのに対し、SNX27-S263D は CTxB の細胞内取り込み後も EE に局在し続けることも確認された。従って、CTxB の逆行性輸送において、SNX27 の EE から RE への移行が必須であることが示唆された。

SNX27 は PX domain に加え、PDZ domain、FERM-like domain など機能性ドメインを複数持つ。CTxB の逆行性輸送に関与しているドメインを明らかにするため、各ドメインの機能欠損変異体を構築し、SNX27 KD 細胞において、CTxB の逆行性輸送に対するレスキュー効果を評価した。PDZ domain の変異体である SNX27-H114A、

SNX27-Δ67-77 を発現させた場合には、レスキュー効果が確認され、細胞内に取り込まれた CTxB は 90 分後にゴルジ体中存在した。また、両変異体は、野生型と同様に、CTxB の取り込みに伴い、EE からの逆行性輸送を受け、90 分後には CTxB とともにゴルジ体局在を示した。一方、FERM-like domain の変異体である SNX27-W477A は、CTxB と共に RE までは逆行性輸送を受けるもののレスキュー効果は示さず、細胞内に取り込まれた CTxB は 90 分後も RE に存在した。

これまでの報告から、SNX27 は FERM-like domain を介して SNX1 と相互作用することが明らかになっている(63)。SNX1 は TGN までの小胞輸送に働くことから(37)、SNX27 が FERM-like domain を介して SNX1 の機能を制御し、CTxB が適切に逆行性輸送を受けることが推察された。SNX1 KD 細胞で CTxB の逆行性輸送を評価したところ、SNX27 KD 細胞と同様に CTxB の RE からゴルジ体への輸送が阻害された。また、SNX27 KD 細胞に SNX27, SNX27-S263D を発現させ、CTxB の輸送を評価したところ、SNX27 発現細胞では CTxB とともに、SNX27, SNX1 はゴルジ体近傍に移行したが、SNX27-S263D 発現細胞では SNX1 は SNX27-S263D とともに EE から局在変化しなかった。

[まとめ・考察]

SNX27 は通常時は EE に局在するが、CTxB の細胞内取り込みに
伴い、CTxB、SNX1 とともに RE に局在移行し、FERM-like domain
を介して SNX1 と協奏的に働くことで、CTxB の RE からゴルジ体
への輸送を担うことが示唆された。

Introduction

SNX27 は PX domain と呼ばれる、phosphoinositide と相互作用する domain を有するタンパク質である(36)。PX domain を有するタンパク質の大部分は sorting nexin (SNX) family に属する(36)。SNX27 の EE 局在は、SNX27 の PX domain が EE に豊富に存在する PI3P と特異的に相互作用することに起因することが示されている(65)。また、SNX27 は PX domain の他、PDZ binding motif と相互作用する PDZ domain、NPxY motif と相互作用する FERM-like domain という 2 つの機能性 domain を有する(40)。PDZ domain は、6 つの β -ストランドと 2 本の α -ヘリックス構造の 80~90 のアミノ酸残基からなるドメインであり、PDZ binding motif と相互作用する。PDZ binding motif は Class I : C 末端側の S/T-x- Φ (疎水性残基)、Class II : C 末端側の Φ -x- Φ が知られている(36)。SNX27 の PDZ domain は Class I PDZ binding motif の中でも、S/T の一つ前のアミノ酸が酸性アミノ酸である配列との親和性が高いことが明らかにされている(66)。FERM domain は、F1、F2、そして F3 の 3 つの構造に分けられ、N 末端側の F1 構造はユビキチン様、C 末端側の F3 の構造は PH domain 様の構造を示す(40)。通常の F2 構造は 4 本のヘリックス構造を持つのに対し、SNX27 の F2 構造のヘリックス構造は 3 本であり、通常の F2 構造よりも短いことから、

SNX27 の場合は FERM-like domain と呼ばれている(40)。SNX27 の FERM-like domain は、NPxY motif の Y がリン酸化された配列との親和性が高く、NPxY motif は様々な RTK に含まれる配列であることから、SNX27 は FERM-like domain を介して、活性化された RTK と相互作用すると推測されている(40)。また、SNX27 の FERM-like domain は、細胞膜に豊富に存在する PI(3,4,5)P3 等と相互作用することも報告されており、PX domain とともに SNX27 の局在制御に働く可能性が考えられる(49)。SNX27 は脳において発現しており、methamphetamines を投与したラットにおいて発現量が上昇するタンパク質として同定された(67)。SNX27 の相互作用タンパク質として最初に同定されたタンパク質は、食事や呼吸調整に関わる GPCR である、5-HT₄ R (5-hydroxytryptamine type 4 receptor)である(68)。その他、channel、receptor、transporter などの膜タンパク質から、細胞質に局在する Kinase まで、PDZ binding motif を持つ多くのタンパク質と SNX27 は相互作用することが明らかになっている(65,69,70)。PDZ binding motif を持つ膜タンパク質には、銅や亜鉛のトランスポーター、グルコーストランスポーター、アミノ酸トランスポーターやシグナリングに関わるレセプターなど個体維持に必須となるタンパク質が多く含まれる(63)。SNX27 はこれら膜タンパク質群の細胞内小胞輸送に関わるため、

その生理学的重要性が推測されていた(63)。実際に、SNX27 KO マウスに関しては、メンデルの法則による予想の 6 割程度で生まれてくるため、必ずしも耐性致死は示さないものの、出生体重は軽く、その後の成長速度も遅く、生後 3 週間以内には死んでしまうことから、SNX27 は発生段階に必要なタンパク質であると考えられる(69)。また、ダウン症患者では、SNX27 の発現量が減少し、AMPA、NMDAR の細胞膜上への正常なリサイクリングが破綻する結果、シナプス機能が低下することが報告されている(71)。

当研究室において、SNX27 は薬物トランスポーターMRP4 の相互作用タンパク質として同定された(64)。SNX27 は MRP4 の細胞膜からの内在化促進に働く(64)。本研究から、SNX27 の細胞膜近傍の機能が見出された一方で、SNX27 は主に EE に局在することから(65)、SNX27 は EE を起点とする細胞内小胞輸送においても機能を有することが推察された。

細胞内には、細胞膜からの内在化、endosome から細胞膜へのリサイクリング、endosome からリソソーム分解経路への輸送、endosome からゴルジ体への逆行性輸送などといった様々な小胞輸送が存在する。当研究室を含む多数のグループが、SNX27 の分子機能の解析に積極的に取り組んでおり、これまでに細胞膜からの内在化、endosome から細胞膜へのリサイクリングにおける SNX27

の関与が示されている(63)。Endosome から細胞膜へのリサイクリングにおいては、SNX27 が retromer と呼ばれるタンパク質複合体との相互作用を介した機能が必須となる(63)。Retromer は複数のサブコンプレックスから構成されるタンパク質複合体であり、cargo の認識を担う VPS26、VPS29、VPS35 の三量体サブコンプレックス、retromer の局在を制御する SNX-BARs の二量体サブコンプレックスなどから構成される(63)。ADRB2(72)、AMPA(73,74)、NMDAR(69)等の receptor、GLUT1 等の transporter(63)といった様々な膜タンパク質が、SNX27 と PDZ domain を介して相互作用し、retromer の働きにより、細胞膜にリサイクリングされることが明らかになっている。

本研究では、cholera toxin beta subunit (CTxB) の逆行性輸送に対する SNX27 の機能を解析した。CTxB は逆行性輸送の解析に汎用されるモデルタンパク質であり、細胞膜で GM1 と呼ばれるガングリオシドに結合し、細胞内に取り込まれた後、EE から RE を経由しゴルジ体に移行する(34)。細胞内に取り込まれた CTxB のゴルジ体への輸送過程には、輸送小胞をゴルジ体に融合させる STX5、STX6、輸送小胞をテザリングする Golgin97、Arf の活性制御を担う eectin-2、SMAP2 が関与することが明らかとなっているが、未だ詳細な分子機構は明らかとなっていない(3,30,33-35)。

Materials & Methods

Materials

抗体は以下のものを使用した：rabbit polyclonal anti-SNX27 (東京医科歯科大学 精神科 大学院医歯学総合研究科 西川徹教授より御供与頂いた(67)), mouse monoclonal anti-EEA1 (610457, BD Transduction Laboratories), rabbit polyclonal anti-TGN46 (T7576, sigma), mouse monoclonal anti-GM130 (610822, BD Transduction Laboratories), mouse monoclonal anti-SNX27 (1c6, abcam), rabbit polyclonal anti-Rab11 (71-5300, Life technologies), mouse monoclonal anti-SNX1 (611482, BD Bioscience), goat polyclonal anti-VPS26A (EB06256, Everest Biotech), rabbit polyclonal anti-WASH1 (SAB4200372, sigma), mouse monoclonal anti-FLAG epitope antibody (m2, sigma), rat monoclonal anti-HA epitope antibody (3F10, Roche), mouse monoclonal anti-beta-actin (C4, ICN), goat polyclonal anti-GST (27457701V, GE healthcare)

免疫染色の2次抗体に関しては Alexa fluor 抗体 (Life technologies) を用いた。WB の2次抗体に関しては、Anti-Human IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep (NA933-1ML, GE healthcare)、Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (NA934-1ML, GE healthcare)、Anti-Rat IgG, HRP-Linked Whole Ab Goat (NA935, GE healthcare)、

Donkey anti-Goat IgG Antibody, HRP conjugate (AP180P, Millipore)、その他の試薬に関しては、analytical grade の市販されている物を使用した。

Plasmid

Human SNX27b (SNX27b) cDNA (NM_030918.5) (当研究室で作成済み(64)。本論文では SNX27b を SNX27 と定義する) を pcDNA3.1(+), p3xFLAG-CMV™、の EcoRV の制限酵素サイトにサブクローニングし、SNX27 発現ベクター(pcDNA3.1(+)-SNX27)、3xFLAG-SNX27 発現ベクター(p3xFLAG-CMV™-SNX27)を構築した。また、pcDNA3.1(+)-SNX27 を用い、SNX27 の N 末端に HA タグを導入することで、HA-SNX27 発現ベクターを構築した(pcDNA3.1(+)-HA-SNX27) (当研究室で作成済み)。

以下変異体は下記 primer set および、Kod-plus-mutagenesis kit (TOYOBO) を用いて作成した。SNX27 shRNA 耐性の SNX27(SNX27^R)は pcDNA3.1(+)-HA-SNX27 を template に用い、shRNA_Protect-1、shRNA_Protect-2、shRNA_Protect-3 の変異を全て導入した(pcDNA3.1(+)-HA-SNX27^R)。SNX27-S263A、SNX27-S263D に関しては、p3xFLAG-CMV™-SNX27、及び pcDNA3.1(+)-HA-SNX27^R を template に変異を導入した。SNX27-H114A、SNX27-

△67-77、および SNX27-W477A は pcDNA3.1(+)-HA-SNX27^R を template に変異を導入した。

Control shRNA 及び、SNX27 shRNA 安定発現細胞構築のため、pBAsi-hU6 Pur DNAvector (TaKaRa)に下記 primer set を Quikchange XL Site-Directed Mutagenesis kit (stratagene)を用いて導入し、Control shRNA または、SNX27 shRNA 発現ベクター(pBAsi-Control shRNA、pBAsi-SNX27 shRNA)を構築した。

PX domain(アミノ酸配列：158-270) (66) の GST 融合組み換えタンパク質 (GST-SNX27-PX(WT)、GST-SNX27-PX(S263A)、および GST-SNX27-PX(S263D))を作成するため、p3xFLAG-CMVTM-SNX27、p3xFLAG-CMVTM-SNX27-S263A、および p3xFLAG-CMVTM-SNX27-S263D を template に用いて、下記 primer set と Kod FX neo (TOYOBO)を用いて PCR 反応をかけ、PCR 産物を pGEX6P-2 (Amersham Biosciences)の Sma1 の制限酵素サイトに、サブクローニングし、pGEX6P-2-SNX27-PX(WT)、pGEX6P-2-SNX27-PX(S263A)、pGEX6P-2-SNX27-PX(S263D)を構築した。

作成mutant	Forword or Reverse	配列
siRNA_protect-1	F	gttggcatggatagtagcacag
	R	ctgtcgtactatccatgccaac
siRNA_protect-2	F	caaaggttggaatggatagtag
	R	gtactatccattccaacctttg
siRNA_protect-3	F	gaatggatagcacgacagtg
	R	cactgtcgtgctatccattc
S263A	F	Gcagaatccgatgagaactacaatgg
	R	taggaattcctgcatgatgtcactc
S263D	F	GACgaatccgatgagaactacaatgg
	R	taggaattcctgcatgatgtcactc
H114A	F	Gccaagcaggtggtggacgtgattcg
	R	tgtcgccccctcaacattcacgtggttc
Δ67-77	F	ctgcagcatgtgagcgccgtgctgc
	R	ttgccccccctcgctcacttgccccgc
W477A	F	Gcggacacagatgaagaagggatggcc
	R	tcgctgcatctcatccattcaaatgc
SNX27 shRNA	F	gatcgttggcatggacagtacgttctcaagagaaacgtactgtccatgccaaacttttttg
	R	aattcaaaaaagtgtggcatggacagtacgttctcttgagaacgtactgtccatgccaaacg
control shRNA	F	gatcggcgccacgtagatagagtttctcaagagaaaactctatctacgtgcgccttttttg
	R	aattcaaaaaaggcgccacgtagatagagtttctcttgagaaaactctatctacgtgcgcctgg
GST-PX	F	acagaaaaagcaagcagtgcccatatcgg
GST-PX WT	R	ccattgtagtctcatcggattctga
GST-PX S263A	R	ccattgtagtctcatcggattctgC
GST-PX S263D	R	ccattgtagtctcatcggattcGTC

SNX27 shRNA 安定発現株の構築

6well プレートに 2.0×10^5 cells/well で播いた COS-1 細胞に対し、pBAsi-hU6- Control shRNA、あるいは pBAsi-hU6-SNX27 shRNA 2 μ g と FuGene HD(Promega) 6 μ l を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後から、1 μ g/ml の puromycin を含む細胞培養液で培養を開始し、セレクションをかけ、puromycin 耐性細胞株を回収することにより、Control shRNA 安定発現 COS-1 細胞、SNX27 shRNA 安定発現 COS-1 細胞を構築した。

siRNA

SNX27、SNX1 のノックダウン(KD)には、Ambion から購入した以下の siRNA を用いた。

- SNX27 siRNA

sense; 5'- GGUUGGCAUGGACAGUACGtt,

antisense; 5'- CGUACUGUCCAUGCCAACctt、

- SNX1 siRNA

sense; 5'- GAACAAGACCAAGAGCCACtt

antisense; 5'- GUGGCUCUUGGUCUUGUUCtt

- Control siRNA

Silencer Negative Control #1 (Ambion, #AM4635)

細胞培養

COS-1 細胞は 10 % FBS(Sigma-Aldrich) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; 11965, GIBCO BRL) で、Control shRNA 安定発現 COS-1 細胞、SNX27 shRNA 安定発現 COS-1 細胞は本培養液に 1µg/ml の puromycin を加え 37 °C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

免疫染色法

カバーガラス(C1100, Matsunami Glass Ind.)を入れた 12well プレートに、COS-1 細胞を 0.5×10^5 cells/well でまき、24 時間培養する。Casein Kinase II を阻害する場合には、最後の 2 時間を Casein Kinase II Inhibitor III, TBCA (sc-203869, santa cruz) $200 \mu\text{M}$ (final 1% DMSO) を含む、DMDM+10% FBS で培養した。

PBS 1ml で wash を 2 回行った後、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を 1ml 加え 10 分間固定した。次に、PBS 1ml で 1 回 wash し、0.1% Triton-X PBS 1ml 加え、10 分間透過処理を行った (Rab11 を染色する時のみ、透過処理には 0.1% saponin PBS 1ml を用いた)。3% BSA/PBS 1ml を加え、室温で 30 分間 blocking を行った後、2% BSA/PBS で希釈した 1 次抗体と室温で 2 時間反応させた。反応後、PBS 1ml で 3 回 wash し、2% BSA/PBS で希釈した 2 次抗体と室温 (遮光) で 1 時間反応させた。なお、2 次抗体の選び方に関しては、2 色での染色の場合は、Alexa-488 と Alexa-594 の組み合わせ、3 色での染色の場合は、Alexa-488、Alexa-555 と Alexa-647 の組み合わせで行い、希釈倍率は全て 1/250 で行った。反応後、PBS 1ml で 3 回 wash した。スライドガラスに Prolong gold(P36934、Life technology)を一滴垂らしその上にカバーガラスを被せ、カバーガラスのまわりをマニキュアで固定した。サンプルを共焦点レーザー顕

微鏡(TCS-SP5, Leica)または超解像顕微鏡(STED, Leica)を用いて観察した。

抗体名	固定条件	透過処理条件	1次抗体希釈倍率
rabbit polyclonal anti-SNX27	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/200
mouse monoclonal anti-EEA1	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/50~1/100
rabbit polyclonal anti-TGN46	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/250
mouse monoclonal anti-GM130	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/50~1/100
mouse monoclonal anti-SNX27	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/50~1/100
rabbit polyclonal anti-Rab11	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% saponin PBS r.t 10min	1/50~1/100
mouse monoclonal anti-SNX1	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/50~1/100
goat polyclonal anti-VPS26A	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/50~1/100
rat polyclonal anti-HA epitope antibody	4%パラホルムアルデヒド r.t 10min	0.1% TritinX or 0.1% saponin PBS r.t 10min	1/100

Alexa 標識 CTxB の取り込み実験

Control shRNA 安定発現 COS-1 細胞(shControl-COS-1 細胞)、SNX27 shRNA 安定発現 COS-1 細胞(shSNX27-COS-1 細胞)を用いる実験では、各細胞を、カバーガラスを入れた 12well プレートに 0.5×10^5 cells/well でまき、24 時間培養する。SNX1 の KD 効果を検討する実験では、shControl-COS-1 細胞を 12well プレートに 1.0×10^5 cells/well でまいた後、SNX1 siRNA 24pmol, Lipofectamine RNAi MAX (Life technologies) 0.8 μ l の complex を reverse transfection した。24 時間培養後、カバーガラスを入れた 12well プレートに 0.5×10^5 cells/well にまき直し、さらに 24 時間培養する。SNX27 の Rescue 実験の場合には、shControl-COS-1 細胞、shSNX27-COS-1 細胞を 12well プレートに 1.0×10^5 cells/well でまいた後、Control siRNA、あるいは SNX27 siRNA 24pmol, Lipofectamine RNAi MAX (Life technologies) 0.8 μ l の complex を reverse transfection し、24 時間

培養する。次に、1 μ g の各種 pcDNA3.1(+)-HA-SNX27^R、2 μ l の Polyethylenimine Max (24765-2, PSI)の complex をトランスフェクションし、24 時間培養する。カバーガラスを入れた 12well プレートに 0.5 \times 10⁵ cells/well にまき直し、さらに 24 時間培養する。

カバーガラス上で培養した細胞を 37 $^{\circ}$ C の PBS(+) で 2 回 wash した後、DMEM+10% FBS で 1 μ g/ml に希釈した Alexa 標識 CTxB (Alexa488: C-34775, Alexa555: C-34776, life technologies)とともに 37 $^{\circ}$ C で 3 分間培養した。次に、37 $^{\circ}$ C の PBS(+) で 2 回 wash し、DMEM+10% FBS で一定時間 37 度で培養した。4 $^{\circ}$ C の 1% BSA/PBS(+) で 2 回 wash した後、細胞膜に結合している蛍光標識 CTxB をはがすため、Acid Buffer (glycine50mM, NaCl100mM, pH3.0@4 $^{\circ}$ C) で 4 $^{\circ}$ C、3 分間培養した。4 $^{\circ}$ C の 1% BSA/PBS(+) で 2 回 wash した後、免疫染色の protocol に従い、各種マーカータンパク質を染色した。

- PBS(+):100 μ M CaCl₂ 、1 mM MgCl₂ PBS

免疫沈降法

15cm シャーレに COS-1 細胞を 1.5 \times 10⁶ 個/シャーレでまき、24 時間培養後に 10 μ g の p3xFLAG-CMVTM-SNX27(コントロールは pcDNA 3.1(+))と 20 μ l の Xtreme gene HP (# 06366236001, Roche)

のコンプレックスを加えることでトランスフェクションした。トランスフェクション 48 時間後、Lysis buffer 1mL にて細胞を懸濁し、4°C で 1 時間 rotation した。その後 4°C、12000g で 10 分間遠心後、上清を回収し、cell lysate とした。lysate に Anti-FLAG M2 Affinity Gel (A2220, sigma) 80 μ l を加え、4°C で 2 時間 rotation した。27G の針で上清を除いた後、Wash buffer を 600 μ l 加えてビーズを suspension することで wash する操作を 3 回行った。サンプルは、3 \times FLAG Peptide (F4799, sigma) で溶出を行った。

- Lysis buffer:

50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X , phosstop (04906837001, Roche), protease inhibitor cocktail (P8340 , Sigma)

- Wash buffer:

50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.1% Triton X , phosstop (04906837001, Roche), protease inhibitor cocktail (P8340 , Sigma)

- Elution buffer

50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 150 μ g/ml 3 \times FLAG Peptide

リン酸化タンパク質の検出

3×SDS sample buffer (B7709S, NEB):免疫沈降サンプル= 1:2 の割合で混合し、可溶化した免疫沈降サンプルを 8.5% SDS-polyacrylamide gel により、泳動、分離した。140V, 90 分で泳動後、Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Life technologies)の protocol に従い、SDS-polyacrylamide gel に Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain 処理を施し、リン酸化タンパク質を染色後、Typhoon FLA 9500 (GE healthcare) で検出した。さらに、total タンパク質を染色するため、SYPRO® Ruby Protein Gel Stain (Life technologies)の protocol に従い、上記 SDS-polyacrylamide gel を SYPRO® Ruby Protein Gel Stain 処理し、total タンパク質を染色後、Typhoon FLA 9500 (GE healthcare) で検出した。

Western blot 法

3×SDS sample buffer (B7709S, NEB):免疫沈降サンプル、または lysate サンプル=1:2 の割合で混合し、可溶化したサンプルを 8.5% SDS-polyacrylamide gel により、泳動、分離した。140V, 90 分で泳動後、タンパク質はタンク式ブロッター (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) を用いて 100V、75 分の条件で nitrocellulose

membrane (Millipore, Bedford, MA)へ転写した。得られた membrane に対し、Can get signal blocking solution (TOYOBO)で室温、1 時間ブロッキングした後、TTBS 20ml で 1 回 wash した。次に、一次抗体に浸し、4 度で 12 時間反応させた。TTBS 20ml で 1 回 wash した後、二次抗体に浸し室温で 1 時間反応させた。TTBS 20ml で 2 回 wash した後、ECL prime Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Inc)のプロトコルに従い化学発光反応を行い、検出は LAS3000mini (Fuji Film Corp. Tokyo, Japan)にて行った。

抗体	一次(buffer, dilution)	二次(host, buffer, dilution)
SNX27	CGS 1/1000	rabbit, CGS, 1/10000
SNX1	CGS 1/1000	mouse, CGS, 1/10000
WASH-1	CGS 1/1000	rabbit, CGS, 1/10000
β -actin	CGS 1/1000	mouse, CGS, 1/10000
GST	1%スキムミルク PBS 1/2000	goat, 1%スキムミルク PBS 1/10000

- TTBS: 0.05% Tween 20, 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.0

GST タンパク質の精製

pGEX6P-2 、 pGEX6P-2-SNX27-PX(WT) 、 pGEX6P-2-SNX27-PX(S263A)、pGEX6P-2-SNX27-PX(S263D)を大腸菌 BL21 に形質転

換する。コロニーを ampicilin 50 μ g/ml を含む、2 \times YT medium (1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) 1L で、30 $^{\circ}$ C で培養し、濁度が 0.5 に達したところで、100 mM の isopropyl-D-thiogalactoside を 1ml 加え、30 $^{\circ}$ C で一晩培養した。集菌した後、PBS 20ml で 1 回 wash し、PBS 24ml に懸濁した。次に 4ml ずつ分注し、バイオラプター (UCD-250、コスモバイオ) を用いて、(10 秒破碎 \rightarrow 10 秒冷却) のサイクルを合計 10 分間行い破碎し、菌液をまとめた後、4 度、1,000g で 5 分遠心した。遠心後、上清を回収し、4 度、100,000g で 1 時間超遠心した後、上清を回収した。上清は glutathione-agarose beads (Amersham Biosciences) とともに 4 度、30 分、反応させた。4 度、5,000g で 1 分間遠心後、上清を捨て、GST タンパク質が吸着した glutathione-agarose beads を 0.1% Triton X を含む PBS 0.5ml で 3 回、PBS 0.5ml で 3 回 wash した。その後、溶出 buffer (3.1mg/ml GSH, 50mM Tris pH8.0) 1ml を glutathione-agarose beads に加え、4 度で 1 時間 rotation した。次に、4 度、5,000g で 1 分間遠心し、上清を回収することで GST タンパク質を溶出した。最終溶出量が 2.5ml になるように、溶出 buffer 1ml で 1 回、0.5ml で 1 回溶出した。その後、PD-10 empty column (17-0435-01, GE healthcare) を用いて GSH を除き、3.5ml の PBS で溶出した。

CBB 染色

3×SDS sample buffer(B7709S, NEB):サンプル=1:2 になるように混合し、で可溶化した GST タンパク質を 12.5 % SDS-polyacrylamide gel により、泳動、分離した。140V, 90 分で泳動後、固定液(組成:メタノール 100ml, 酢酸 20ml, 脱イオン水 80ml)で 30 分浸透し、Quick-CBB kit (299-50101, Wako)を用いて染色する。

in vitro kinase assay

以下の反応系で実験を行う

- 10×NEBuffer for Protein Kinases (Casein Kinase 2 の付属品) :
1.5μl
- GST タンパク質 : 10μl (100μg)
- Casein kinase 2(P6010S, NEB) : 1.0μl (50 units)
- DMSO or CK2 阻害剤 : 1.5μl (DMSO 濃度 final 1%)
- 4mM ATP : 0.5μl
- Adenosine 5'-triphosphate, [gamma-32P] (NEG002, perkinelmer) : 0.5μl (0.5μCi)
final : 15μl

37°C、10min incubation した後、3×SDS sample buffer (B7709S, NEB) を 7.5μl を加え、反応を停止させる。12.5% SDS-polyacrylamide gel

により、140V, 90 分で泳動、分離した。泳動後、固定液(組成：メタノール 100ml, 酢酸 20ml, 脱イオン水 80ml)で 30 分浸透した。固定後、ゲルをゲル乾燥機で 80℃、2 時間処理し、BAS-TR2025 (fujifilm) に感光した。O.N.で感光後、Typhoon FLA 9500 (GE healthcare) で検出した。

lipid overlay assay

chloroform : methanol : Ponceau sol.(0.01% Ponceau S in 0.5% acetic acid) = 20 : 9 : 1 の混合液を作成した後、PI3P (P-3016, Echelon)を混合液に溶かし、PI3P の希釈系列を作成する。希釈系列を GE healthcare Amersham Protran Supported NC 0.45 μ m (GE, #10600052)に 2 μ l ずつスポットし、室温で 1 時間乾燥させ、membrane を作成した。Membrane を 1% スkimミルクを含む PBS で 1 時間、室温でブロッキングした後、最終濃度 0.1 μ g/ml になるように 1% スkimミルク PBS で希釈した GST、GST-SNX-PX、GST-SNX-PX-S263A、および GST-SNX-PX-S263D と 1 時間、室温で incubation した。0.1% Tween-20 を含む PBS 20ml で membrane を 1 回 wash した後、GST タンパク質と GST 抗体との反応を、Western blot 法の protocol に従い、検出した。

免疫染色画像解析

共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像を、LAS AF (Leica)を用いて解析を行った。相関係数の算出は LAS AF の colocalization 解析用 tool を利用し、円状を示す TGN46 または GM130 のシグナルを含むように ROI を設定し、TGN46 または GM130 と蛍光標識 CTxB の共局在の程度を Pearson's correlation を算出した。

統計解析

全ての実験は少なくとも 3 度の再現性を取り、グラフは means \pm standard error of the mean (SEM)を含んでいる。二変数および多変数の P-value は Prism software (GraphPad Software)を用いて算出し、unpaired Student's t test および one-way analysis of variance (ANOVA、Dunnett's test)を用いて行い、95%信頼水準で評価した。

Result

1. SNX27 は EE に局在し、retromer 構成タンパク質と共局在する。

SNX27 は主に EE に局在すること (65)、retromer 構成タンパク質と相互作用することが報告されている (63)。COS-1 細胞において、SNX27 の細胞内局在を、共焦点顕微鏡を用いて観察したところ、EE マーカーである EEA1、retromer の構成タンパク質である VPS26A、SNX1 と SNX27 の共局在が確認された (Fig.1A)。一方、共焦点顕微鏡の分解能の限界である 200nm 以下の分解能を実現する超解像顕微鏡を用いて観察した場合には、SNX27 と VPS26A、SNX1 の共局在が確認された一方で、EEA1 との共局在は認められなかった (Fig. 1B)。以上の結果から、SNX27 は EE において、retromer と近接して存在することが示唆された (Fig1. B)。

2. SNX27 KD 細胞では、CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送が阻害される。

shControl-COS-1 細胞、shSNX27-COS-1 細胞を構築し、Alexa-488 標識した CTxB の逆行性輸送における SNX27 KD の影響を評価した (Fig. 2A)。Alexa-488 標識した CTxB を取り込ませた細胞を一定時間培養し、EE マーカーの EEA1、TGN マーカーの TGN46 と共染色した。CTxB は、培養 5、15、90 分後にそれぞれ、EE、RE、ゴルジ

体に局在する(34)。CTxB は、 shControl-COS-1 細胞、 shSNX27-COS-1 細胞において、5 分後に EE、15 分後に RE に存在するのに対し、90 分後には、shControl-COS-1 細胞では、ゴルジ体に局在する一方で、shSNX27-COS-1 細胞では RE に留まっていた(Fig. 2B)。CTxB のゴルジ体への逆行性輸送を定量的に評価するため、TGN46 と CTxB との共局在の程度を、Pearson's correlation coefficient を用いて評価した。Pearson's correlation coefficient は、1 に近いと共局在の程度が大きく、0.5~0 の場合には、ほぼ共局在していないことを示す。5、15 分間培養した場合、TGN46 と CTxB との共局在に関する Pearson's correlation coefficient は、shControl-COS-1 細胞、shSNX27-COS-1 細胞ともに約 0.25、約 0.5 を示した (Fig.2C)。一方、90 分間培養した場合、shControl-COS-1 細胞では、約 0.7 を示したのに対し、shSNX27-COS-1 細胞では約 0.5 であった(Fig.2C)。以上の結果から shSNX27-COS-1 細胞では、CTxB の RE からゴルジ体への輸送が阻害されていることが示唆された。

3. SNX27 は CTxB とともに逆行性輸送される。

Alexa-488 標識した CTxB を取り込ませた COS-1 細胞を 5 分間培養後、SNX27 を EEA1 と共染色したところ、CTxB、EEA1、SNX27 の共局在が確認された。CTxB のみで存在するシグナルも観察され

たことから、SNX27 は細胞膜近傍ではなく、EE において初めて CTxB と共局在すると考えられる (Fig. 3)。同様の実験を 15、90 分間培養した細胞を用いて行ったところ、いずれの時間においても細胞内の半分以上の SNX27 が CTxB と共局在しているように見えた。EEA1 との共局在は観察されなかったことから、SNX27 が CTxB とともに EE から局在移行しているものと推測された (Fig. 3)。GM130 を用いた共染色実験では、90 分間培養した細胞において、CTxB、SNX27、GM130 の共局在像が観察された。通常、SNX27 は GM130 と共局在しないことから (Fig.1A)、CTxB とともに EE から RE を経由してゴルジ体近傍に逆行性輸送されたものと考えられる。SNX27 の上記局在移行は、cholera toxin を用いた実験でも確認された (Data not shown)

4. Casein Kinase 2(CK2)による S263 のリン酸化は、SNX27 の EE 局在性を高める。

SNX27 は、CTxB とともに逆行性輸送されることから、SNX27 の局在を制御する因子について解析を進めた。SNX27 は PDZ domain、PX domain、FERM-like domain の 3 つの機能性 domain を持つが、変異体による解析から PX domain が局在を制御することが報告されている (65)。私は、マウス小腸上皮細胞を Optiprep 密度勾配遠心法

により fractionation する際に、Phosphatase inhibitor を加えないと、SNX27 が適切な fraction に分布せず、endosome から離れた低密度 fraction に分布することを予備検討から見出していたため (Data not shown)、SNX27 が EE に局在するためには、PX domain のリン酸化が必須となるのではないかと考えた。

リン酸化予測サイト (NetPhos 2.0) を用いて PX domain を解析し、最も高いリン酸化スコアを示した S263 をアラニンに置換した変異体、およびアスパラギン酸に置換した恒常的リン酸化モデルを作成した。3×FLAG-SNX27、3×FLAG-SNX27-S263A、3×FLAG-SNX27-S263D を発現させた COS-1 細胞を FLAG 抗体による免疫沈降に供し、免疫沈降産物を電気泳動した。ProQ diamond は、アクリルアミドゲル内のリン酸化タンパク質を選択的に染色する試薬であり、リン酸基への特異性に関しても、47%フッ化水素酸 2 時間処理によって β カゼインのリン酸化シグナルが完全に消失することにより、担保されている (75)。ProQ diamond でリン酸化タンパク質を、Sypro Ruby で総タンパク質を染色することにより、リン酸化状態を確認したところ、S263A、S263D は WT に比してリン酸化状態が約 2 割低下していた (Fig. 4A)。S263 変異体では、約 80% のリン酸化シグナルが残存していたが、Phosphosite (リン酸化 peptide のデータベース) では、SNX27 のリン酸化部位が複数報告されていることから

(S51、Y186、K222、Y269 等)、他のリン酸化部位に由来するものと推測される。現在、S263 のリン酸化を LC-MS/MS で検出する条件の確立を進めている。

S263 を含む **S**₂₆₃ESDE は CK2 の認識モチーフ (S/T-x-x-D/E) と合致する(76)。CK2 は Plasma membrane, Cytoplasm, Cytoskeleton, Centrosome, Mitotic spindle, Nucleus など細胞内で広範囲に分布する(76)。機能解析は主にガン細胞で進んでおり、cell proliferation, differentiation, apoptosis への関与が示唆されているが、正常細胞での機能解析に関する報告は少ない(76)。基質は、Channel, Receptor、DNA binding protein、転写因子、SNX27 のような sorting に関わるアダプタータンパク質など多岐に渡る(76)。PX domain (66)の WT、S263A、S263D の GST タンパク質 (GST-SNX-PX、GST-SNX-PX(S263A)、GST-SNX-PX(S263D)) を精製し、精製 CK2、ATP[γ -32P] と反応させた(in vitro kinase assay)ところ、GST-SNX-PX では CK2 によるリン酸化が確認された。一方、GST-SNX-PX(S263A)、GST-SNX-PX(S263D)ではリン酸化は確認されたものの、そのシグナルは GST-SNX-PX に比して軽微であった (Fig. 4B)。GST-SNX-PX のリン酸化シグナルは、反応液中に CK2 阻害剤 (TBCA) を添加することにより、減弱した (Fig. 4B)。以上の結果から、CK2 は PX domain の S263 をリン酸化することが示唆された。CK2 は S/T-x-x-D/E の

他、S/T-D/E も認識する報告がある(76)。PX domain 内には、S263 以外にも S/T-D/E 配列が 2 つ (S255、S265) 存在することから、S263A、S263D においても、CK2 に由来するシグナルが観察されたと考えられる。次に、CK2 による S263 のリン酸化が、SNX27 の細胞内局在に及ぼす影響を評価した。内因性の SNX27、HA-SNX27^R、HA-SNX27^R-S263D が主に EE 局在を示すのに対し、HA-SNX27^R-S263A では、一部は EE 局在を示すものの、大部分は円状の構造に変化していることが観察された。EE 局在を示していた内因性 SNX27、HA-SNX27^R は、CK2 阻害剤処理により、円状の構造への変化が確認された (Fig4. C)。その一方で、HA-SNX27^R-S263D、HA-SNX27^R-S263A に関しては、CK2 阻害剤処理の影響は弱かった (Fig4. C)。以上の結果から、CK2 による S263 のリン酸化は、SNX27 の EE 局在性を高めることが示唆された。本実験では、CK2 阻害剤処理を 2 時間行ったが、処理時間が 1 時間の場合は、その効果が不十分であった。従って、SNX27 は通常時は高い割合で CK2 により S263 がリン酸化されており、リン酸化と脱リン酸化のサイクルが 2 時間程度であると考えられる。

他のグループによる SNX27 の interactome 解析では、相互作用タンパク質に kinase が含まれている(63)。SNX27 の細胞内局在制御に働く CK2 以外の kinase の存在を検討するため、interactome に含ま

れる kinase の PAK1、PAK2、PAK3、CK1 に関して、SNX27 の細胞内局在に対する影響を、各種阻害剤を用いて検討した。しかしながら、いずれの阻害剤で処理した場合においても、SNX27 の細胞内局在は変化しなかった (Data not shown)。

次に CK2 による S263 のリン酸化が、SNX27 の分子機能に与える影響を検討した。SNX27 の EE 局在においては、SNX27 の PX domain と EE に豊富に存在する PI3P との相互作用が 1 つの重要な要素となる (65)。GST-SNX-PX、GST-SNX-PX(S263A)、GST-SNX-PX(S263D)を用いた lipid overlay assay により、S263 変異が PX domain と PI3P との相互作用に及ぼす影響を評価したが、各種 GST タンパク質間で PI3P との相互作用に優位な差は認められなかった (Fig. 4E)。SNX27 は、retromer 構成タンパク質と相互作用し、hub タンパク質として働くことにより、各種 cargo の EE から細胞膜へのリサイクリングを行う。3×FLAG-SNX27、3×FLAG-SNX27-S263A、そして 3×FLAG-SNX27-S263D を発現させた COS-1 細胞の FLAG 抗体による免疫沈降物をウエスタンブロットに供し、各種 retromer 構成タンパク質を検出した。FERM-like domain を介した相互作用タンパク質である SNX1、WASH1 との相互作用は、WT、S263A、そして S263D 発現細胞において、優位な差は認められなかった (Fig. 4F)

5. CTxB の逆行性輸送には、SNX27 の EE からの局在移行が必要である。

SNX27 は、CTxB とともに EE から逆行性輸送を受けることから (Fig. 3)、この SNX27 の局在移行が CTxB の逆行性輸送において必要であるかを、EE 局在性に差のある S263 変異体を用いて解析した。HA-SNX27^R、HA-SNX27^R-S263A、HA-SNX27^R-S263D を発現させた shSNX27-COS-1 細胞(それぞれ WT/shSNX27-COS-1 発現細胞、S263A/shSNX27-COS-1 発現細胞、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞と表記)に、Alexa-555 標識された CTxB を取り込ませた後、90 分間培養し、HA と cis-golgi marker の GM130 との共染色を行った。その結果、WT/shSNX27-COS-1 発現細胞、S263A/shSNX27-COS-1 発現細胞では、CTxB のゴルジ体までの逆行性輸送が確認され、HA-SNX27 もゴルジ体近辺に移行していた (Fig5. A,C)。一方、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞では、CTxB は RE に観察され、HA-SNX27 は、EE に留まっていた (Fig5. A,C)。CTxB と GM130 との共局在を Pearson's correlation coefficient を用いて評価したところ、WT/shSNX27-COS-1 発現細胞、S263A/shSNX27-COS-1 発現細胞では、shControl-COS-1 細胞と同程度の相関係数を示し、rescue 効果が認められたのに対し、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞、相関係数は shSNX27-COS-1 細胞と同程度であり、rescue 効果は観察されなかった (Fig5. B)。以上の結果から、SNX27 の EE からの局

在移行が、CTxB の逆行性輸送に必要であることが示唆された。

shSNX27-COS-1 細胞、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞では、CTxB は RE まで到達することから、CTxB の EE から RE までの輸送に関しては SNX27 に非依存的なイベントであることが推察された。

6. CTxB の逆行性輸送には、SNX27 の FERM-like domain が必須である。

SNX27 は、PX domain の他に、PDZ domain、FERM-like domain の 2 つの機能性 domain を持つことから、HA-SNX27^R に、これらの domain の機能欠失変異を導入し、CTxB の逆行性輸送における SNX27 の機能を考察した。PDZ domain に関しては 2 つの変異体を作成した。一つは、ADRB2 の PDZ binding motif と相互作用できない HA-SNX27^R-H114A である(72)。本変異の導入により、GIRK3、MRP4 など ADRB2 以外の PDZ binding motif を有するタンパク質とも相互作用できなくなることを当研究室において確認している (Data not shown)。他方は、VPS26A との相互作用部位である loop 部分を欠損させた HA-SNX27^R-Δ67-77 変異体である。この変異体は、PDZ binding motif との相互作用は可能であるが、VPS26-VPS29-VPS35 を介した細胞内輸送に関する機能が欠損している(63)。FERM-like domain は、NPxY motif を有するタンパク質との相互作用に必要な domain である。本相互作用に必須である FERM-like

domain 内の W477 に変異を導入した HA-SNX27^R-W477A を FERM like-domain の不活性体として作成した(40)。

いずれの変異体も COS-1 細胞において、WT と同様の局在を示した(Fig6. A)。そこで、shSNX27-COS-1 細胞に、これらの変異体を発現させ(それぞれ H114A/shSNX27-COS-1 発現細胞、 Δ 67-77/shSNX27-COS-1 発現細胞、W477A/shSNX27-COS-1 発現細胞と表記)、CTxB の逆行性輸送に対する rescue 効果を評価した。Alexa-555 標識された CTxB を細胞に取り込ませた後、90 分間培養し、HA と GM130 との共染色を行った。CTxB と GM130 との共局在を Pearson's correlation coefficient を用いて評価したところ、WT/shSNX27-COS-1 発現細胞、H114A/shSNX27-COS-1 発現細胞、 Δ 67-77/shSNX27-COS-1 発現細胞では、shControl-COS-1 細胞と同程度の相関係数を示し、rescue 効果が認められたのに対し、W477A/shSNX27-COS-1 発現細胞では、相関係数は shSNX27-COS-1 細胞と同程度であり、rescue 効果は観察されなかった(Fig6. B,C)。また、HA-SNX27^R、HA-SNX27^R-H114A、HA-SNX27^R- Δ 67-77 は CTxB とともにゴルジ体近傍まで逆行性輸送されるのに対し、HA-SNX27^R-W477A は CTxB とともに RE で留まっていた (Fig6. B)。以上の結果から、CTxB の逆行性輸送において、SNX27 の FERM-like domain を介した機能が必須であることが明らかとなった。

7. SNX27 は、FERM-like domain を介して SNX1 と協奏的に働き、CTxB の逆行性輸送を制御する

SNX27 は FERM-like domain を介して、SNX1 と相互作用することが報告されている(63)。SNX1 は、BAR domain を介して膜のリモデリングなどを行うことで endosome からの小胞の切り出しなどを行うことで、TGN への小胞輸送を担う(37)。shSNX27-COS-1 細胞では、CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送が阻害されていたことから、CTxB の逆行性輸送における SNX1 の寄与を検討した。SNX1 を siRNA により、KD したところ、SNX1 の発現量低下とともに、SNX27 の発現量増加が確認された。一方、SNX27 を siRNA により、KD した場合には、SNX27 の発現量低下とともに、SNX1 の発現量増加が確認され、SNX27 と SNX1 の発現量には負の相関があることが示唆された (Fig7. A)。SNX27、SNX1 の KD は、SNX1、SNX27 の細胞内局在に影響を与えなかった (Fig7. B)。Control siRNA 処理 shControl-COS-1 細胞 (siControl/shControl-COS-1 細胞)、SNX1 siRNA 処理 shControl-COS-1 細胞 (siSNX1/shControl-COS-1 細胞)、SNX27 siRNA 処理 shSNX27-COS-1 細胞 (siSNX27/shSNX27-COS-1 細胞)、SNX1 siRNA 処理 shSNX27-COS-1 細胞 (siSNX1/shSNX27-COS-1 細胞)に、Alexa-488 標識した CTxB を取り込ませた後、90 分

間培養し、GM130 との共染色を行った。(Fig. 7B)。CTxB と GM130 の共局在を Pearson's correlation coefficient を用いて評価したところ、siSNX1/shControl-COS-1 細胞では、siSNX27/shSNX27-COS-1 細胞と同様に、siControl/shControl-COS-1 細胞に比して優位に値が低下し、CTxB の RE からゴルジ体への輸送が阻害されていることが示唆された (Fig7. C,D)。

SNX27 の場合と同様に、CTxB の逆行性輸送に対する SNX1 の作用は、SNX1 が通常時に存在する EE から生じる膜輸送ではなく (Fig1. A,B)、RE からゴルジ体への膜輸送で観察されたことから、SNX1 も CTxB とともに EE から RE へと移行し、機能発現していることが推測された。そこで、CTxB 処理時に SNX1 の局在を確認したところ、SNX1 は CTxB とともに、EE から RE を経由してゴルジ体近傍に逆行性輸送されていた (Fig7. E)。WT/shSNX27-COS-1 発現細胞、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞に CTxB を取り込ませた後、90 分間培養したところ、WT/shSNX27-COS-1 発現細胞では、SNX1 は CTxB、HA-SNX27 とともにゴルジ体近傍まで移行しているのに対し、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞では、HA-SNX27-S263D とともに EE に留まっていた (Fig7. F)。従って、CTxB 存在時の SNX1 の局在変化は SNX27 依存的であることが示唆された。一方、siSNX1/shControl-COS-1 細胞においても、SNX27 は CTxB ととも

に RE まで逆行性輸送を受けることから (Fig7. G)、CTxB 存在時の SNX27 の局在変化は SNX1 に非依存的であることが示唆された。

Discussion

本研究から、SNX27 が CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送に働くことが明らかとなった。SNX27 は、通常、主に EE に局在するが、CTxB の存在下では、CTxB、SNX1 とともに RE、ゴルジ体近傍へと逆行性輸送を受ける。SNX27 は、細胞内局在を制御する PX domain に加え、PDZ domain、FERM-like domain の 2 つの機能性 domain を持つが(40)、両機能性 domain は主に他のタンパク質との相互作用に働く domain であり、逆行性輸送に対し、直接的な機能を有する可能性は低い。一方、SNX27 の FERM-like domain と相互作用する SNX1 は、BAR domain を介して endosome 膜の tubulation を促進する機能を有し、TGN への逆行性輸送に働くタンパク質である(37,63)。また、SNX27 の PX domain が EE に豊富に存在する PI3P と特異的に相互作用するのに対し、SNX1 の PX domain は、ゴルジ体に豊富に存在する PI4P と相互作用することから(37)、SNX27-SNX1 複合体のゴルジ体へのテザリング補助に働く可能性がある。従って、CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送に対する SNX27 の働きは、主に SNX1 の機能に依存するものと考えられる。SNX27、SNX1 double KD 細胞では、SNX27 KD 細胞や SNX1 KD 細胞に比して、CTxB の逆行性輸送異常に関し、より顕著な影響は認められなかったことは、本仮説と一致する(Fig.

7C,D)。今後、SNX1、SNX27 double KD 細胞に、SNX27 と SNX1 を同時に発現させた際には、CTxB の逆行性輸送の異常が正常化するのに対し、SNX27-W477A (SNX1 と相互作用する FERM-like domain 変異体)と SNX1 を発現させた場合には、CTxB の逆行性輸送に対する rescue 効果が観察されないことを確認することにより、SNX27 は、FERM-like domain を介して SNX1 の機能制御に働き CTxB の逆行性輸送を担っていることをより明確に示す予定である。

SNX27 を中心とした interactome 解析が他のグループにより報告されているが、これまでに CTxB の逆行性輸送への関与が示されている evectin-2、SMAP2、STX5、STX6、Golgin97 との相互作用は確認されていない(63)。COS-1 細胞において、evectin-2、SMAP2 を KD すると、SNX27 を KD した場合と同様に、CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送が阻害される(34,35)。SMAP2 と evectin-2 は、ともに RE に局在するタンパク質であり、SMAP2 の RE 局在には、evectin-2 との相互作用が必要であることが示唆されている。evectin-2 KD 時には、CTxB の逆行性輸送の阻害だけではなく、TGN46 がドット状の構造を示し、ゴルジ体に局在しなくなる一方で、SMAP2 を KD した際には、TGN46 は正常にゴルジ体に局在する(34,35)。従って、RE からゴルジ体への逆行性輸送において

は、evectin-2 が hub となり、SMAP2 がエフェクターとして働くことにより、evectin-2 を中心とする複合体に多彩な機能をもたらすものと考えられる。SNX27-SNX1 複合体は、CTxB とともに RE に逆行性輸送を受けた後、両タンパク質とともに協調的に働く可能性がある。

過去に HeLa 細胞を用い、CTxB の逆行性輸送における SNX1 の寄与を検討した報告では、CTxB のゴルジ体への逆行性輸送に SNX1 は関与しないと結論付けられている(77)。一方、本論文では、COS-1 細胞で SNX1 を KD した場合に、CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送が阻害されるという知見を得ている。結論が一致しない理由として、両研究で用いたホスト細胞の違いが考えられる。ゴルジ体、RE は核近縁部に存在するが、核近縁部は様々なオルガネラが入り混じる領域であり、本細胞で使用した COS-1 細胞などの RE とほかのオルガネラとの空間的な分離が高い細胞を用いない限り、CTxB が RE、ゴルジ体のどちらに存在するのかを適切に評価できない。しかしながら、STxB の輸送においては、HeLa 細胞を用いた場合にも、FITC-STxB と TGN46 との共局在の程度が、Control 細胞に比して SNX1 KD 細胞では優位に低下していたことから(77)、単純に HeLa 細胞と COS-1 細胞で CTxB の逆行性輸送に関わる分子が異なり、SNX1 は COS-1 細胞においてのみ CTxB

の逆行性輸送に関与する可能性も考えられる。COS-1 細胞に限らず、PC12 細胞、T 細胞、HEK293 細胞、単核細胞なども RE が球形のゴルジ体に含まれる構造である(78)。今後、これらの細胞を用いて CTxB の逆行性輸送を評価することで、CTxB の逆行性輸送における SNX1 の関与、CTxB の逆行性輸送経路の多様性について検討する予定である。

SNX27、SNX1 の KD 細胞において、CTxB が RE まで正常に逆行性輸送される理由については、CTxB の EE から RE への輸送機構に関する知見が乏しいため、現時点では不明であるが、代替経路の存在が考えられる。SNX27、SNX1 の KD 細胞において、EE からの逆行性輸送に働く retomer の構成因子である VPS26 は、正常な細胞内局在像を示しており、VPS26-VPS29-VPS35 複合体の機能は両細胞において、正常であると考えられる。また、SNX1 と同じ SNX-BAR タンパク質であり、類似した機能を持つ SNX2 は、SNX1 に比して SNX27 との相互作用が弱く(63)、SNX27 とは別個の複合体構成因子として逆行性輸送に寄与すると想定されており、実際に VPS26-VPS29-VPS35 複合体と複合体を形成する報告がある。この複合体の機能により、CTxB は、SNX27、SNX1 の KD 細胞においても、RE までは正常に逆行性輸送される可能性がある。

本研究から、SNX27 が RE において、CTxB の逆行性輸送に働くためには、EE からの RE への局在移行が必須であり、その局在変化において、SNX27 の PX domain 内に存在する S263 が関与している可能性が明らかとなった。本アミノ酸残基は、通常は CK2 によるリン酸化を受けているが、CTxB 存在下では脱リン酸化され、上記局在移行に至ることが恒常的リン酸化変異体 (SNX27-263D) を用いた解析から示唆された。SNX27 は、CK2 阻害剤処理時に EE から脱離する染色像を示し、CTxB 存在下では、ゴルジ体近傍まで逆行性輸送を受けるのに対し、SNX27-S263D は、CK2 阻害剤処理時、CTxB 存在下においても、通常時と同様に EE に局在する。CK2 阻害剤の効果は、処理後 2 時間で始めて観察されることから、S263 のリン酸化、脱リン酸化の周期は、2 時間程度であると推察される。CK2 は constitutive active な kinase であることを考慮すると(76)、CTxB 存在下における S263 のリン酸化制御は、主に Phosphatase が担っていると推察される。CTxB 存在時に局在変化した SNX27 は、全て CTxB と共局在していることから、CTxB と接触した SNX27 のみが、S263 の脱リン酸化を受け、局在移行すると考えられる。EE において、SNX27 が CTxB 存在時に脱リン酸化される機序については不明であるが、SNX1 を KD した場合において、SNX27 は RE まで逆行性輸送を受けること、SNX27

S263D 発現細胞では、SNX1 は CTxB 存在時に EE に留まることから、SNX27-SNX1 複合体が、EE において SNX27 依存的に CTxB を認識することが、S263 の脱リン酸化の起端になるものと想定される。Cholera toxin と同じ AB5 型毒素に属する Shiga toxin のサブユニットの 1 つである STxB の場合には、2 量体膜貫通型タンパク質の GPP130 が、輸送小胞の luminal 側で STxB と相互作用しており、STxB と細胞質側をつなぐ hub として働くことにより、STxB の逆行性輸送を担っている(22-25)。GPP130 自体は CTxB の輸送には関与しないが、CTxB の関しても、同様に貫通型タンパク質を介して EE において luminal 側の CTxB と細胞質側の SNX27 が相互作用する可能性がある。以上の点から、CTxB 存在下において SNX27 の S263 の脱リン酸化を担う phosphatase を同定するとともに、CTxB を EE の luminal 側で認識する膜タンパク質の同定を進めることにより、SNX27 が EE において CTxB を認識し、CTxB とともにゴルジ体近傍まで逆行性輸送される機序を明らかにできると考えられる。SNX27 の機能性 domain 変異体を用いた rescue 実験では、PDZ domain の変異体では、CTxB の正常な逆行性輸送が認められたことから、FERM-like domain、PX domain といった他の機能性 domain と相互作用する貫通型タンパク質の同定が、今後研究を進める上で鍵になると想定している。

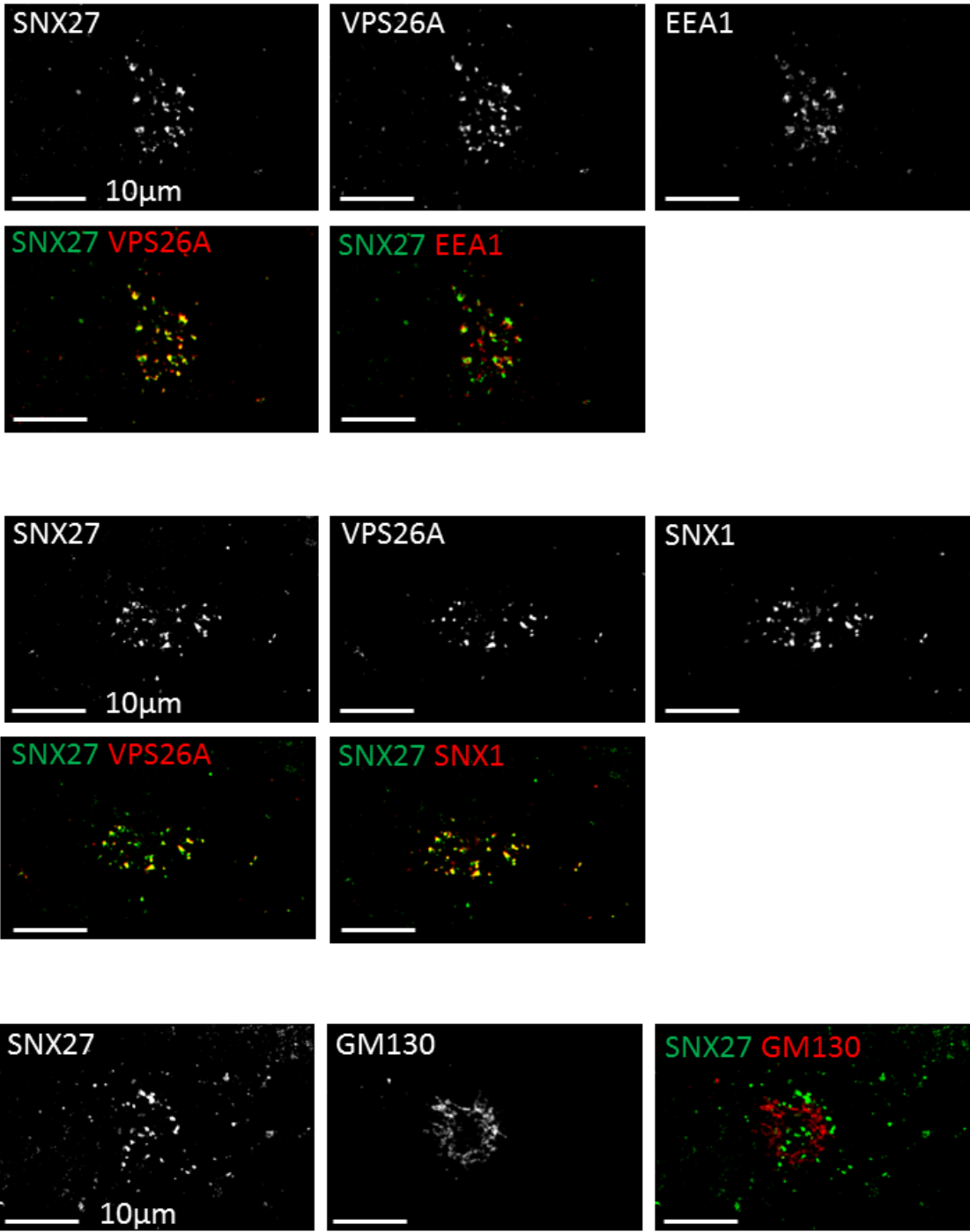
本研究より明らかになった CTxB の逆行性輸送における働きに加え、SNX27 は、膜タンパク質との直接的な相互作用を介し、細胞膜からの内在化、あるいは細胞膜へのリサイクリングに関与することが、当研究室の解析などから示されている(63,64)。このような細胞内小胞輸送における SNX27 の多彩な機能は、SNX27 が、PDZ domain、FERM-like domain といった複数の機能性 domain を持ち、hub として働くことに起因すると考えられる。SNX27 は、PX domain を介し、EE に豊富な PI3P と相互作用することにより、EE に局在すると考えられていたため、SNX27 が細胞膜からの内在化に関与する機序については疑問が残されていた。しかしながら、最近の報告から SNX27 の FERM-like domain が、細胞膜に豊富に存在する PI(4,5)P₂ に加え、PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(3,4,5)P₃ と相互作用することが明らかになり、SNX27 が FERM-like domain を介して、細胞膜に局在し、細胞膜から内在化する輸送小胞との相互作用が可能であることが明らかとなった(49)。また、SNX27 は、EE において PDZ domain の働きにより、膜タンパク質の細胞質側に露出している PDZ binding motif を認識し、膜タンパク質を細胞膜へと積極的にリサイクリングする(63)。SNX27 が存在しない場合には、PDZ binding motif を有する膜タンパク質は、リソソーム分解経路に輸送されてしまう(63)。リサイクリング過程は、SNX27 の機能のみでは不可能であり、

SNX27 の PDZ domain と相互作用する VPS26-VPS29-VPS35 複合体、FERM-like domain と相互作用するタンパク質群が必要となる(63)。膜タンパク質ごとに、リサイクリングに要する SNX27 のパートナータンパク質群は異なることが示唆されている(79)。今後、SNX27 と複合体を構成する膜輸送に関わるタンパク質群の同定を進めることにより、各膜タンパク質に特異的な SNX27 複合体が必要となる理由などが明らかになると期待している。

Figures & Figure legends

Figure. 1

A.



B.

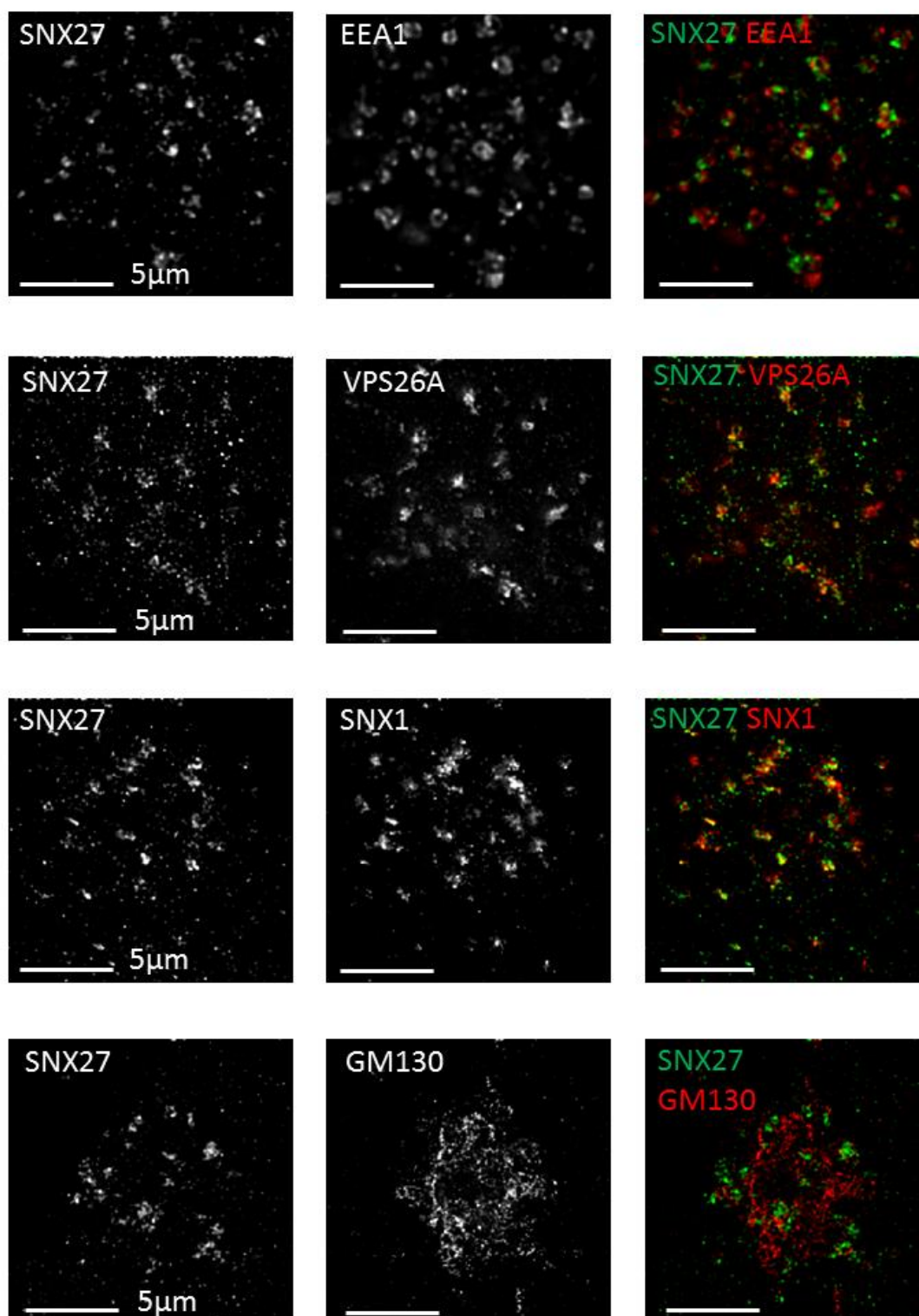


Fig. 1: COS-1 細胞における SNX27 の細胞内局在

(A) 共焦点顕微鏡での撮影

上段： SNX27 と VPS26A (Retromer 構成タンパク質)、EEA1 (early endosome marker) との共染色像

中段： SNX27 と VPS26A (Retromer 構成タンパク質)、SNX1 (Retromer 構成タンパク質) との共染色像

下段： SNX27 と GM130 (cis-golgi marker) との共染色像

scale bar: 10 μ m

(B) 超解像顕微鏡での撮影

上： SNX27 と EEA1 との共染色像

中上： SNX27 と VPS26A との共染色像

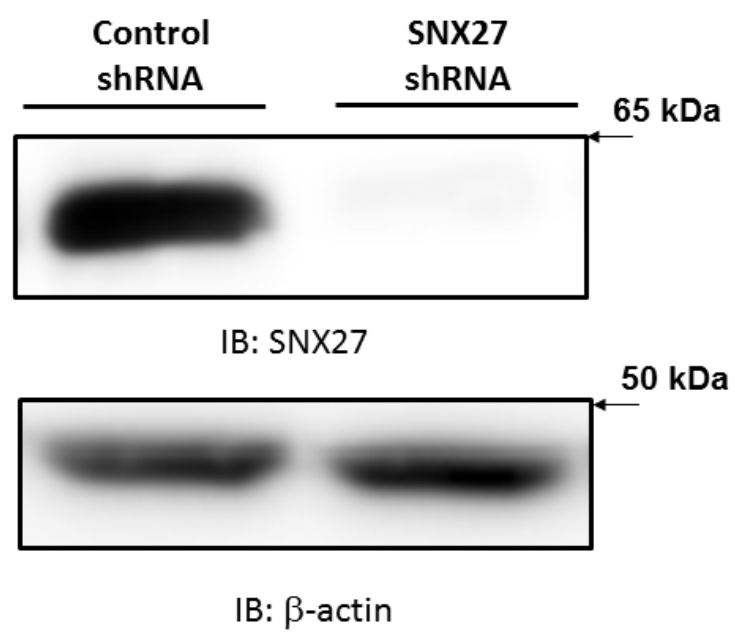
中下： SNX27 と SNX1 との共染色像

下： SNX27 と GM130 との共染色像

scale bar: 5 μ m

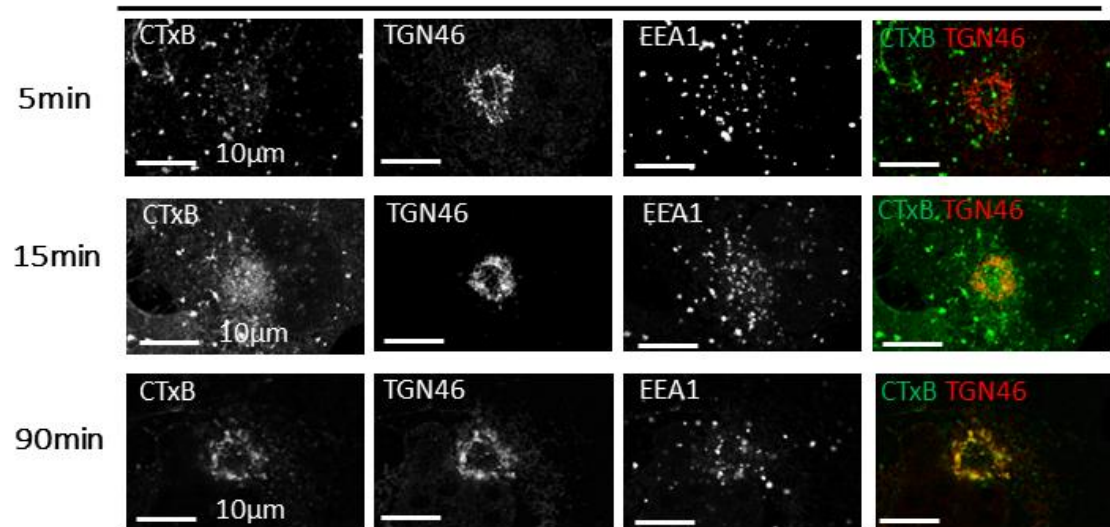
Figure. 2

A.

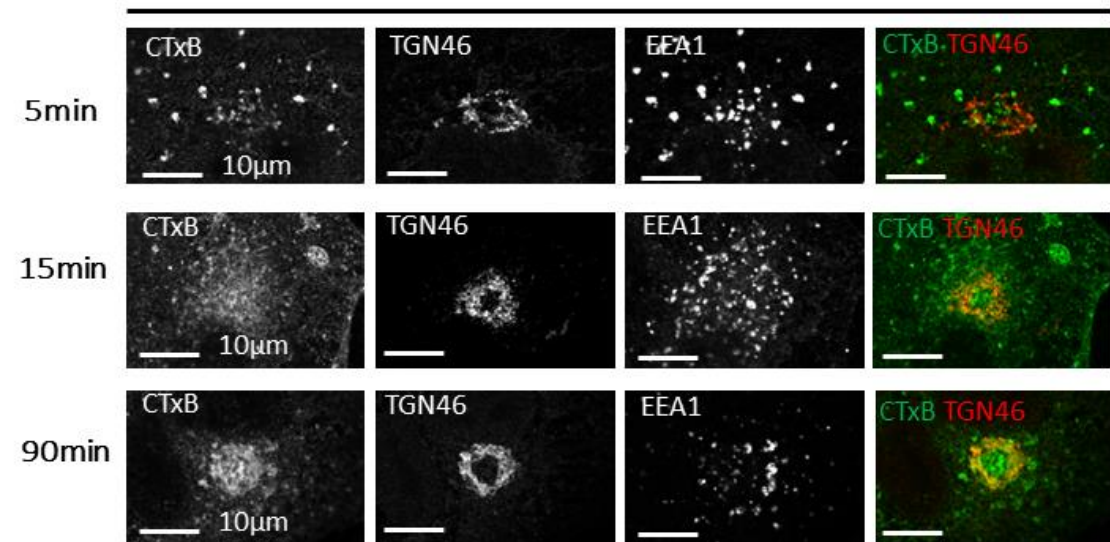


B.

Control shRNA



SNX27 shRNA



C.

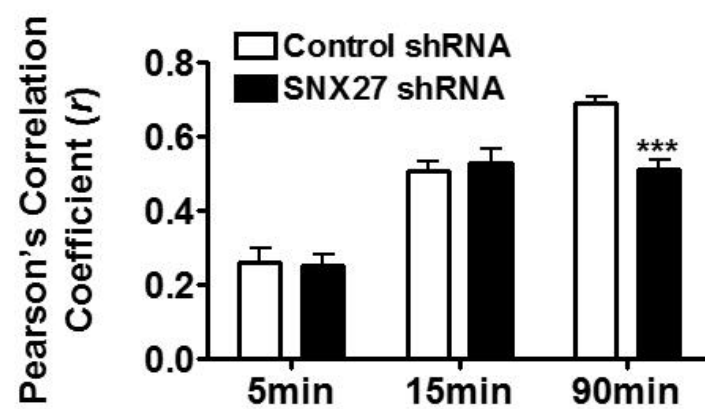


Fig. 2: CTxB の逆行性輸送に対する SNX27 KD の影響

(A) shSNX27-COS-1 細胞の構築

shControl-COS-1 細胞、shSNX27-COS-1 細胞から細胞可溶液を調製し、SNX27 の発現量を評価した。

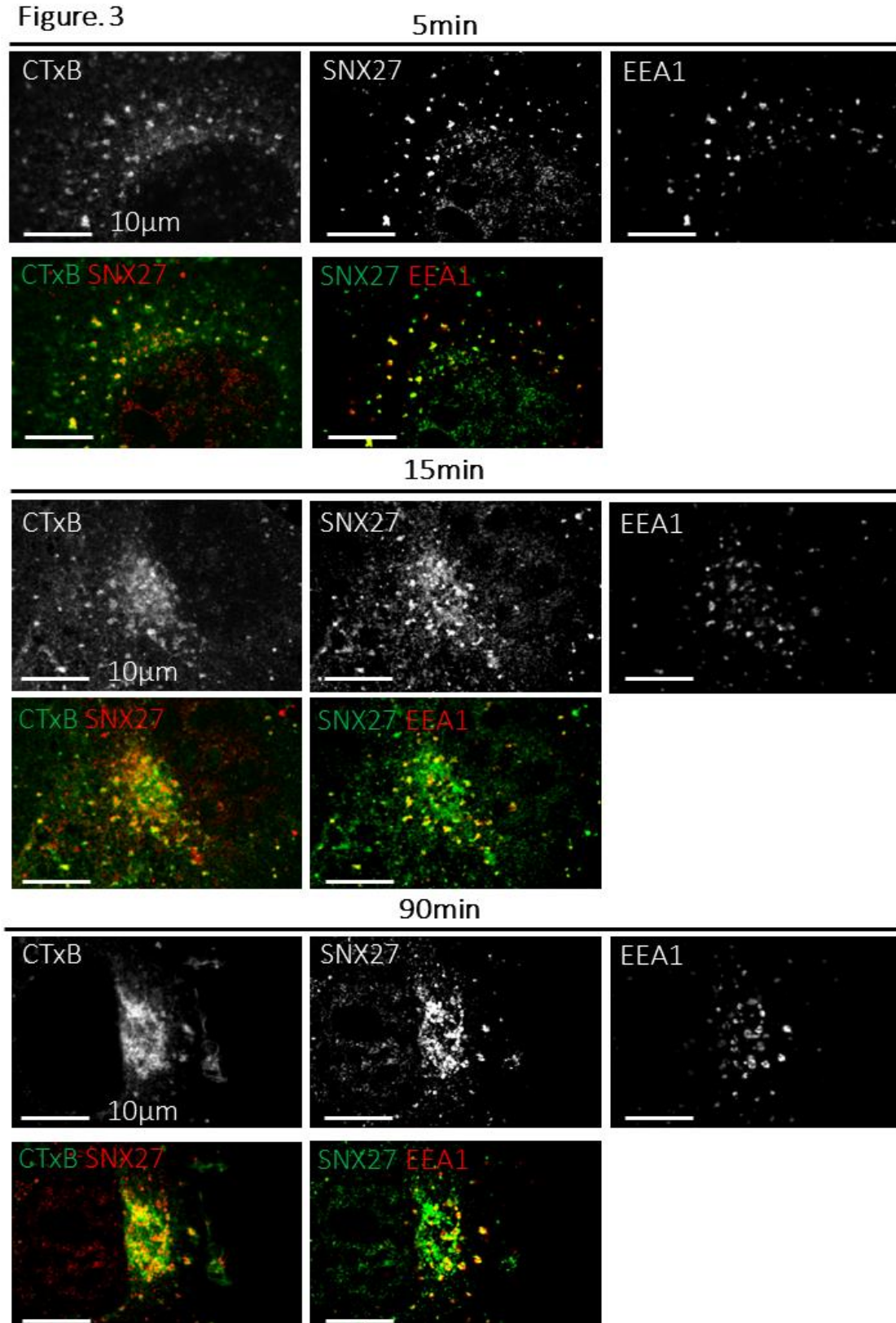
(B) shSNX27-COS-1 細胞における CTxB の逆行性輸送の観察

shControl-COS-1 細胞(上段)、shSNX27-COS-1 細胞(下段)に Alexa-488 標識 CTxB を取り込ませた後、5(上)、15(中)、90(下)分間培養し、EEA1 (early endosome marker)、TGN46 (trans golgi network marker) との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

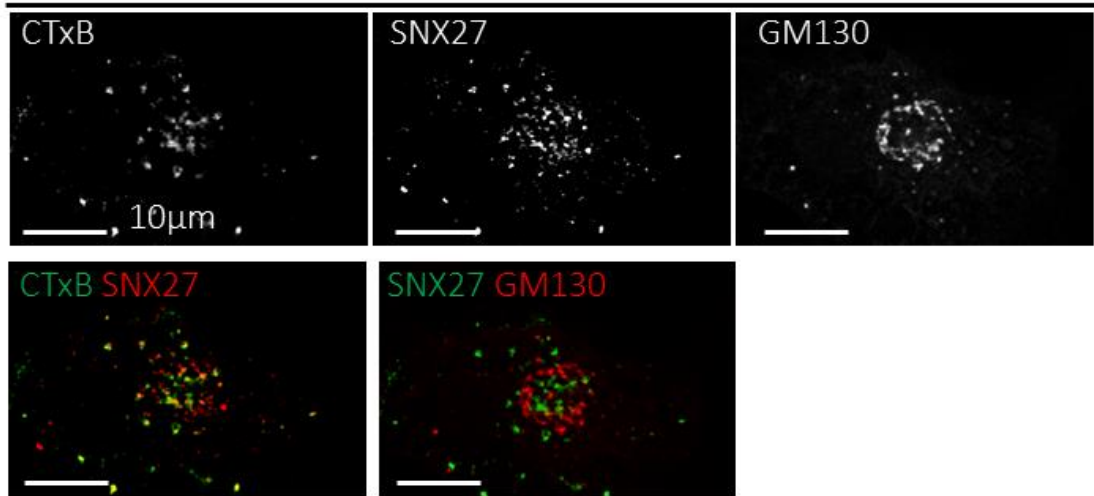
(C) Alexa-488 標識 CTxB と TGN46 との共局在に関する定量的評価

(B)の画像データから、LAS AF を用いて Alexa-488 標識 CTxB と TGN46 との共局在に関する Pearson's Correlation Coefficient を算出した。各値は Mean \pm SEM (N=15~23)を示している。***; $p < 0.001$ vs. shControl-COS-1 細胞

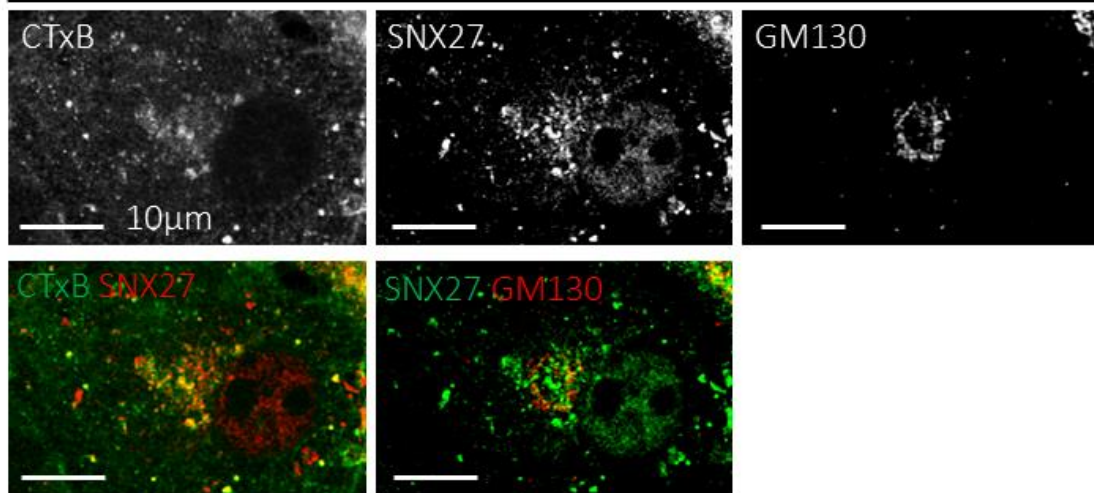
Figure.3



5min



15min



90min

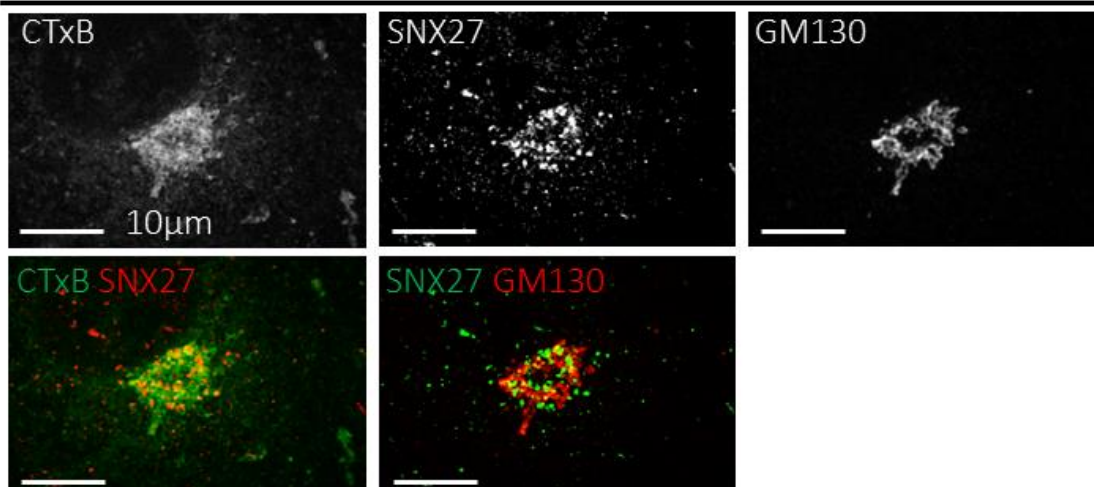
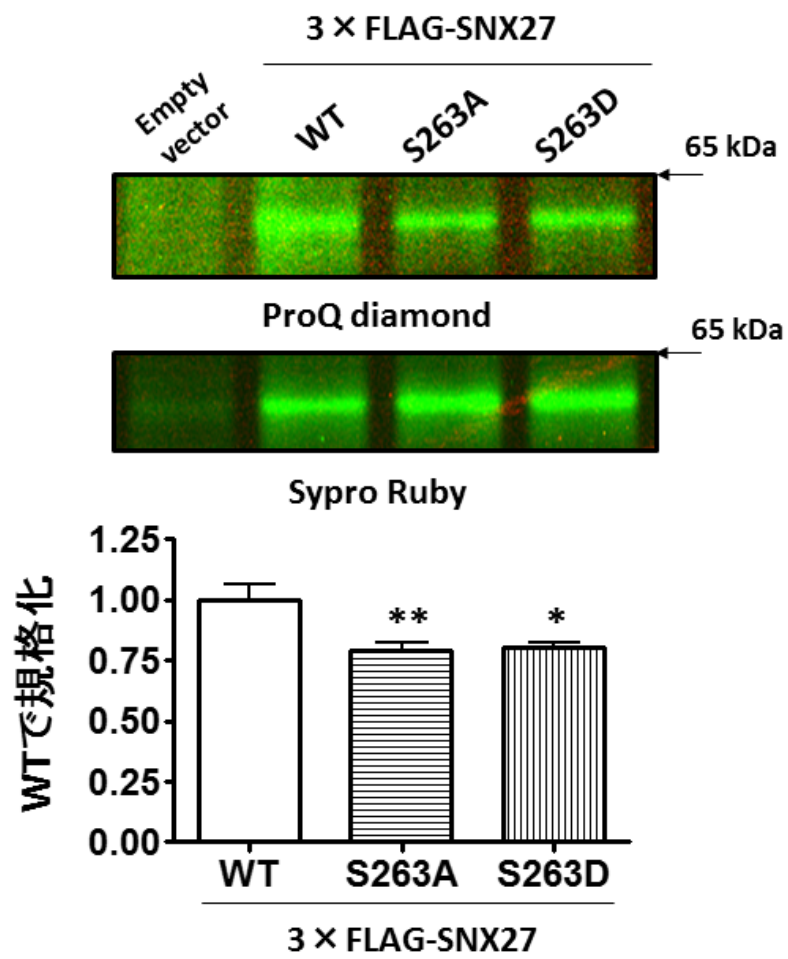


Fig. 3: CTxB 存在時の SNX27 の細胞内局在変化

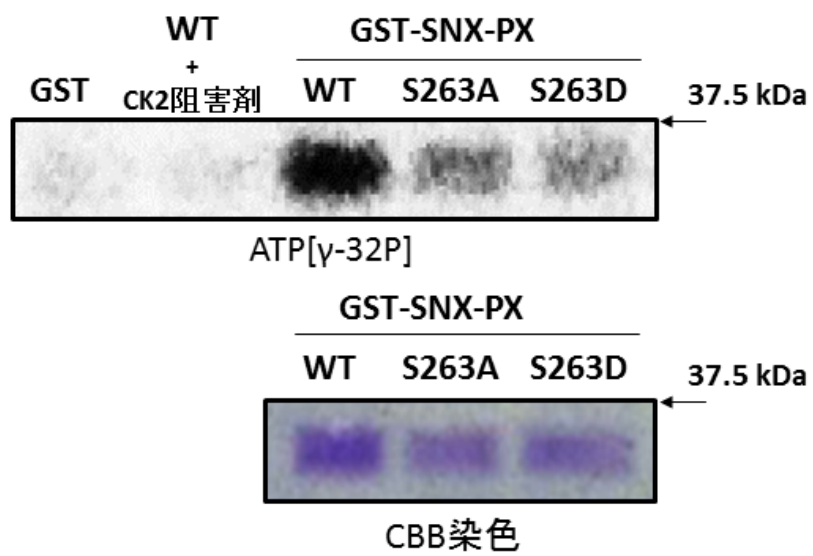
Alexa-488 標識 CTxB を取り込ませた COS-1 細胞を 5(上段)、15(中段)、90(下段)分間培養し、SNX27 と EEA1(early endosome marker) (1 枚目) または GM130 (cis-golgi marker) (2 枚目) との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

Figure. 4

A.

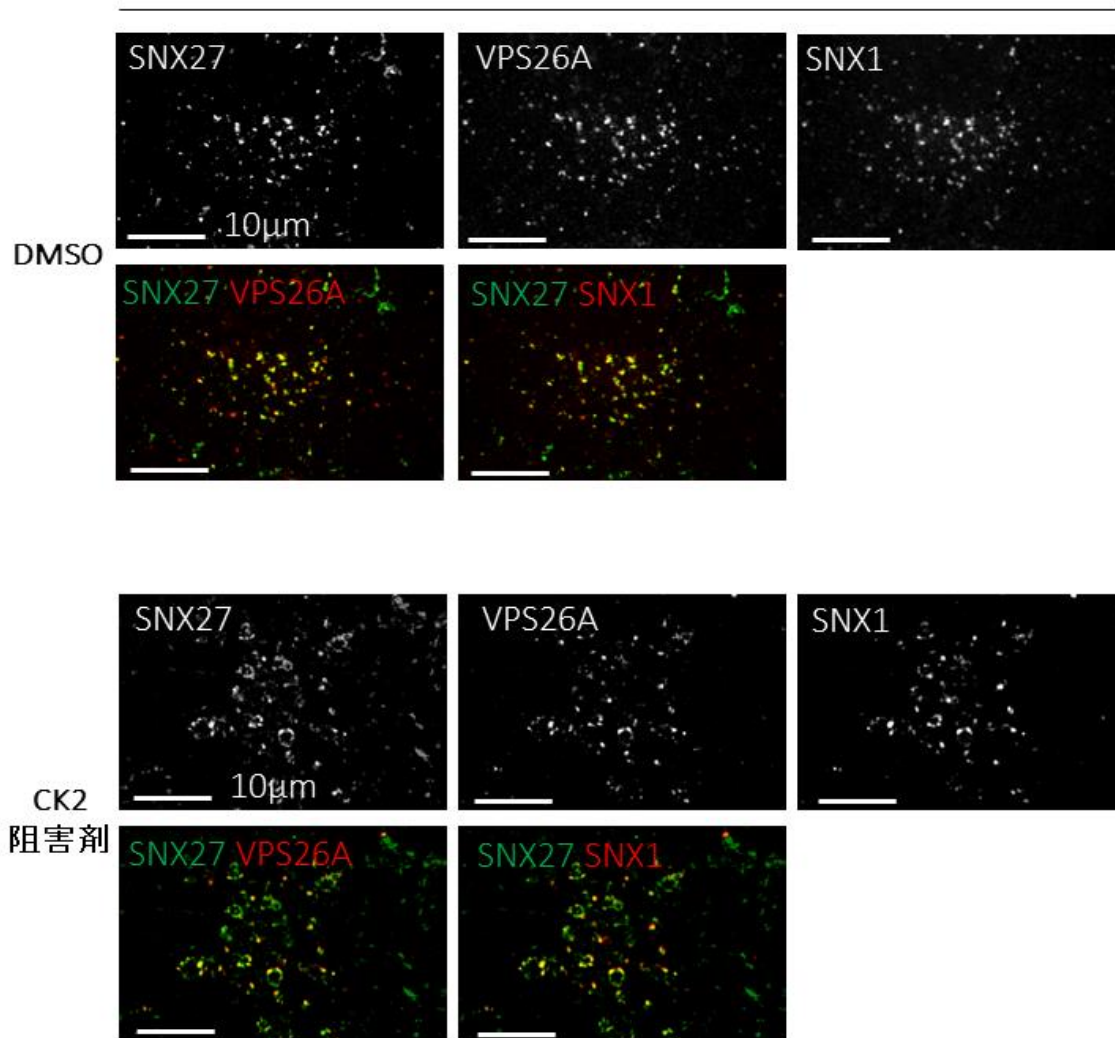


B.

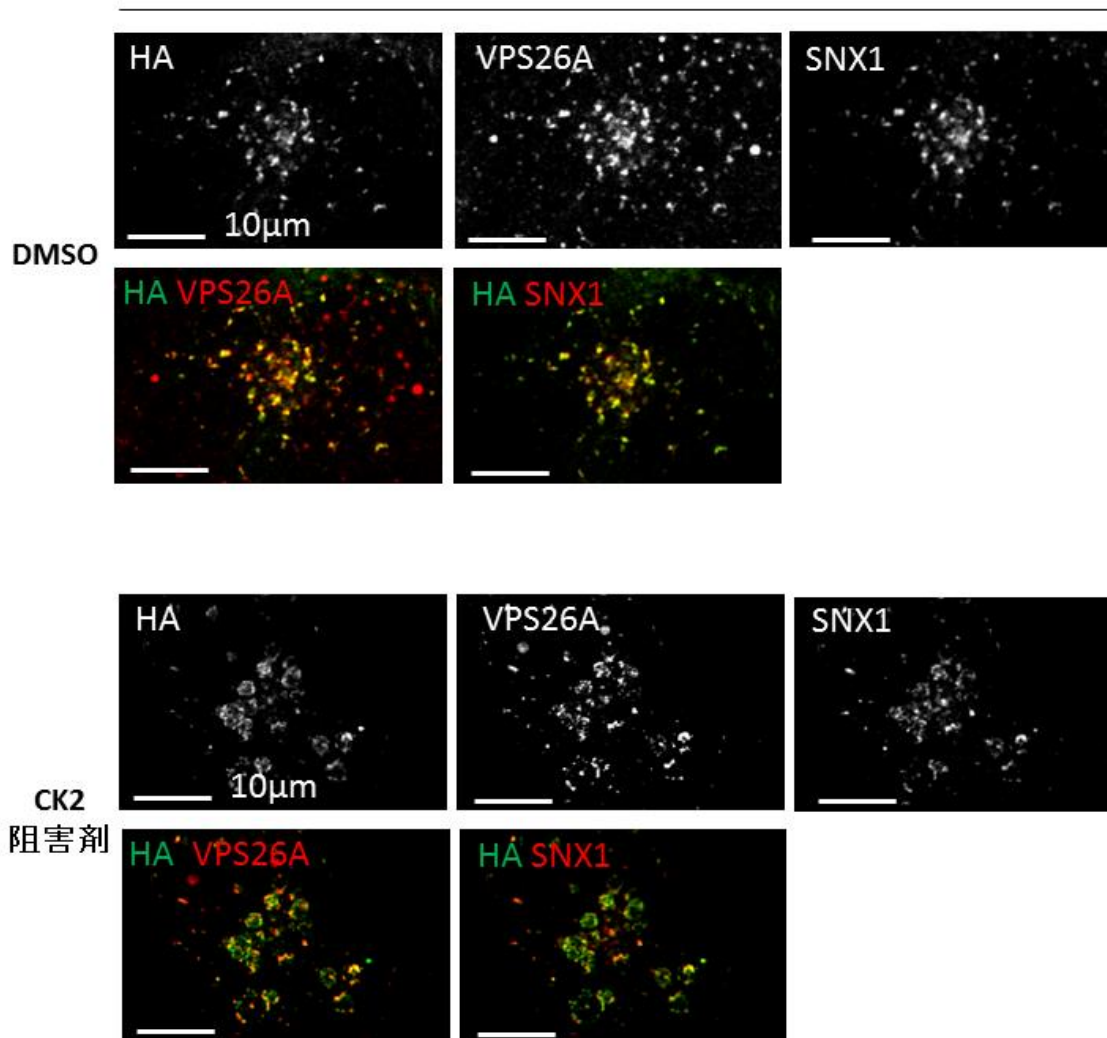


C.

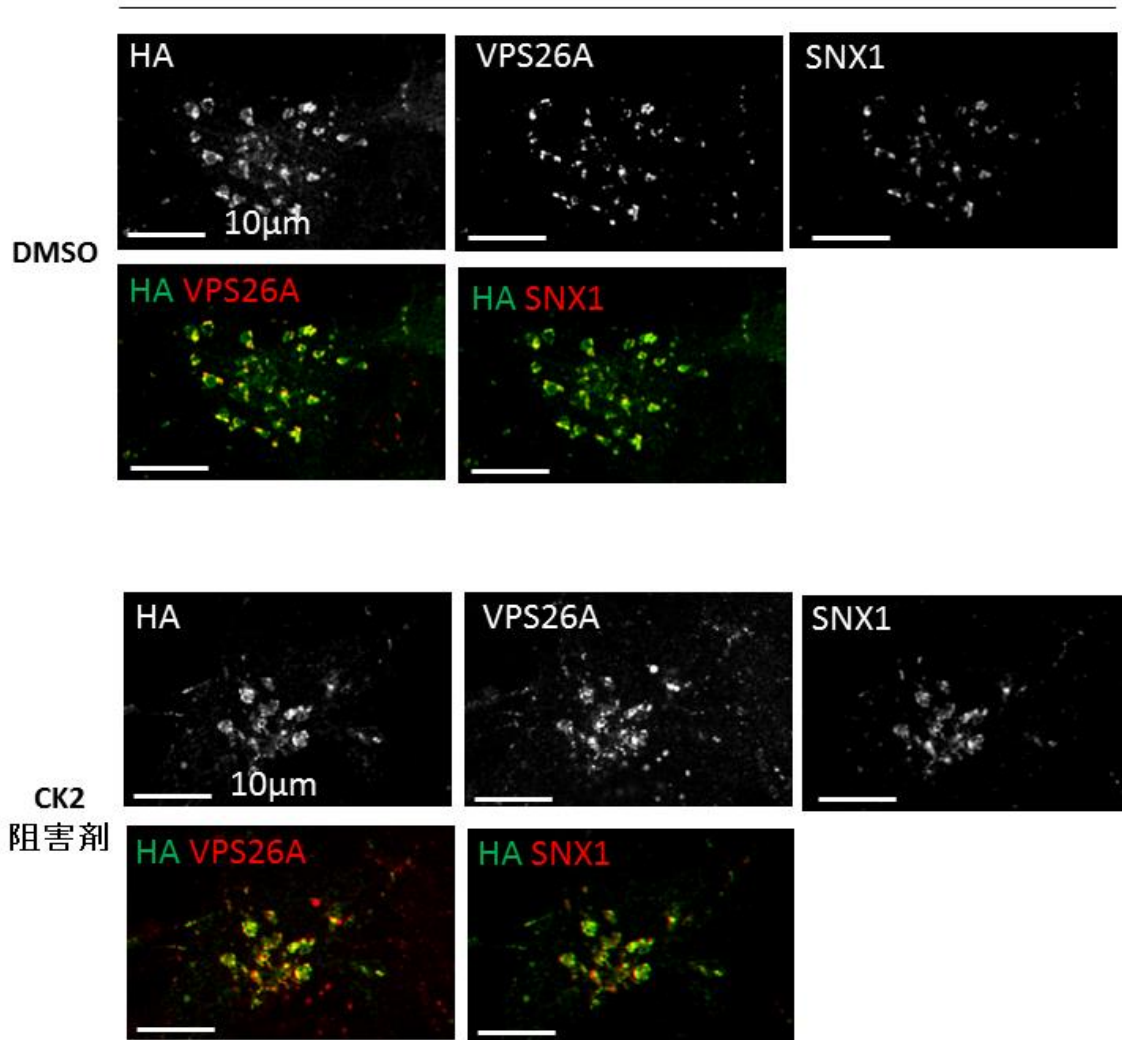
内因性SNX27



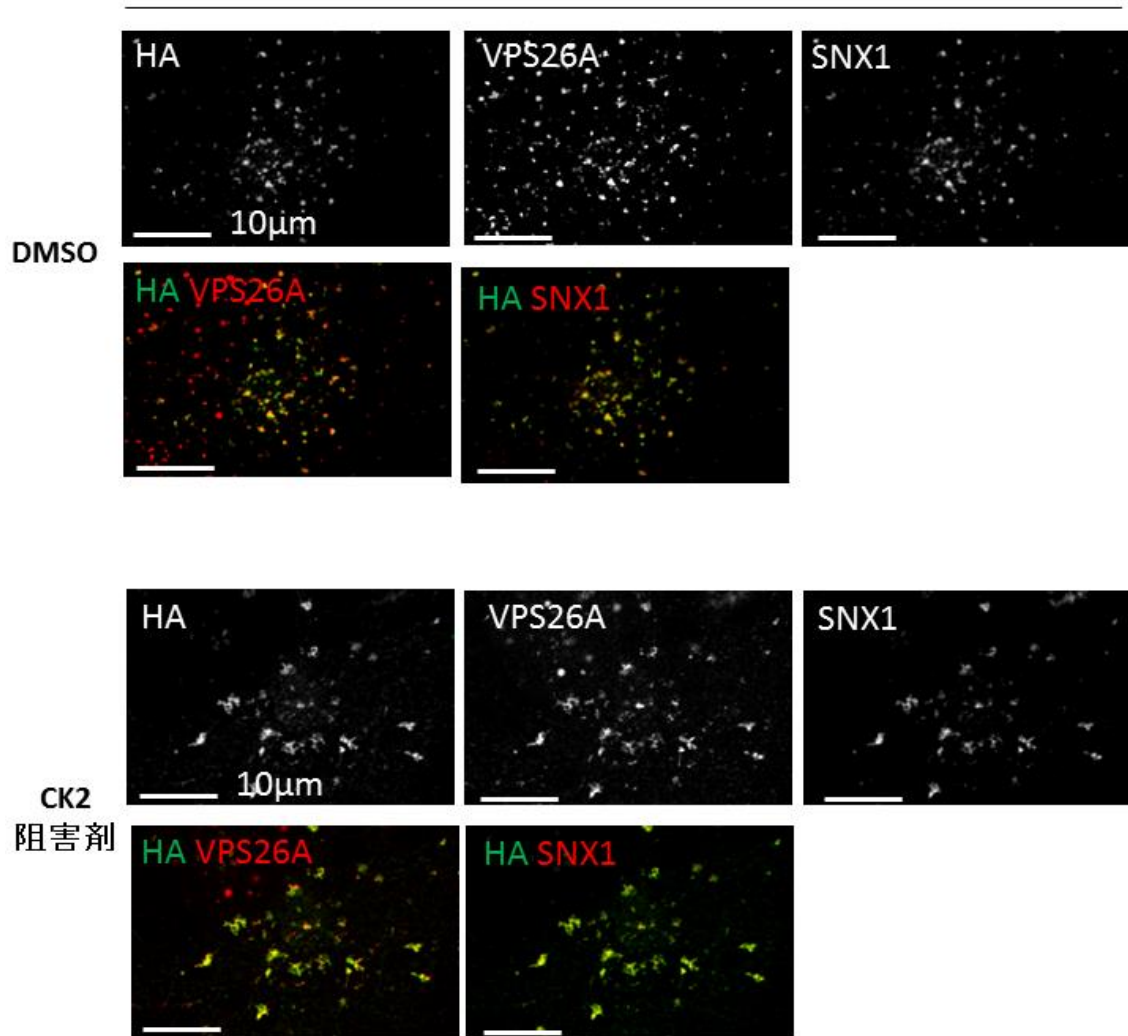
HA-SNX27^R-WT



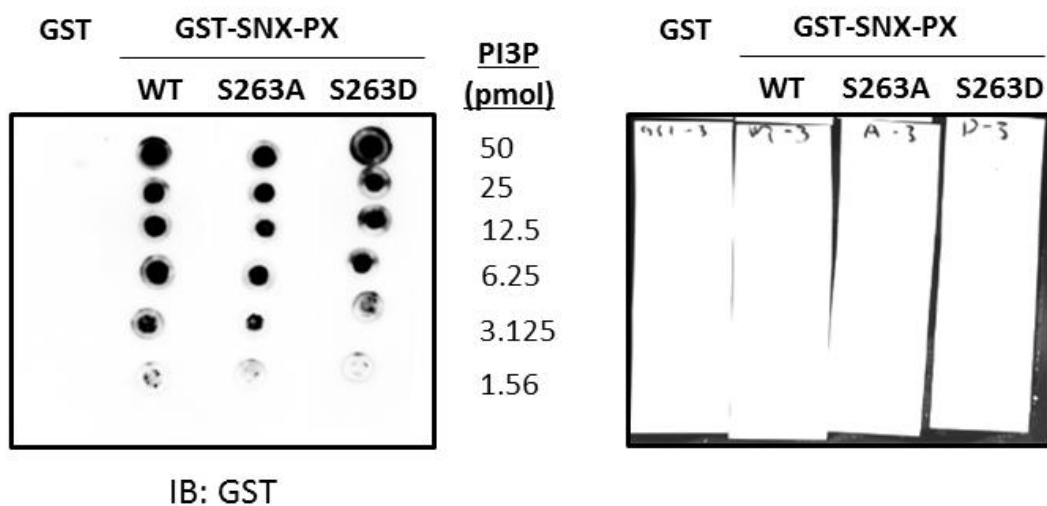
HA-SNX27^R-S263A



HA-SNX27^R-S263D



D.



E.

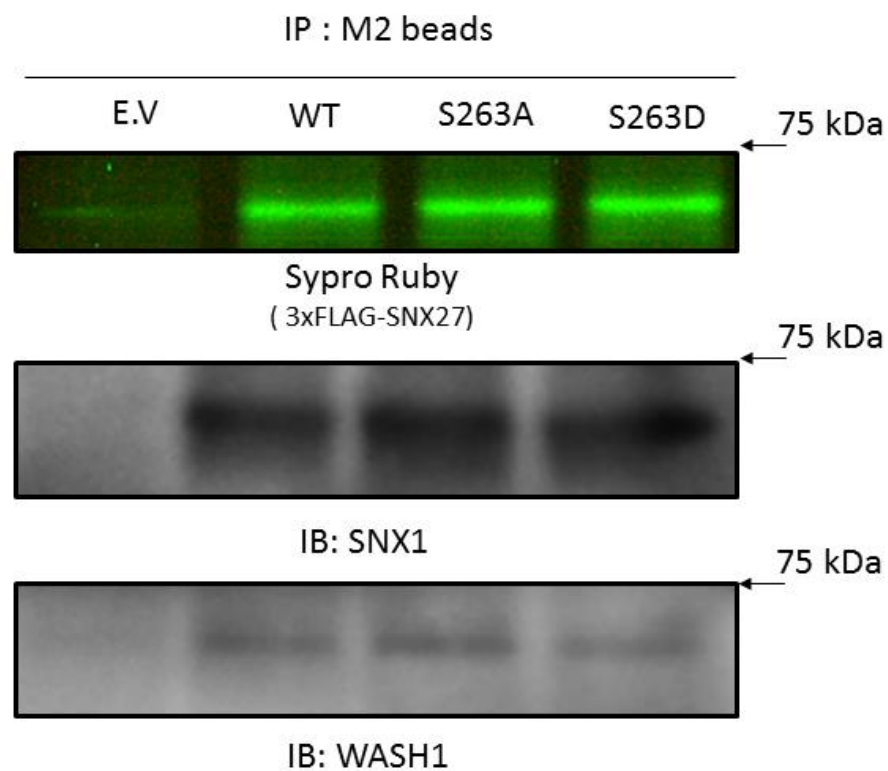


Fig. 4: CK2 による S263 のリン酸化による SNX27 の EE 局在制御

(A) S263 変異体のリン酸化状態の確認

上 : 3×FLAG-SNX27、3×FLAG-SNX27-S263A、3×FLAG-SNX27-S263D を発現させた COS-1 細胞から、FLAG 抗体を用いて調製した免疫沈降産物を電気泳動した後、ProQ diamond でリン酸化タンパク質を、Sypro Ruby で総タンパク質を染色し、リン酸化状態を確認した。

下 : 3×FLAG-SNX27 で規格化した S263 変異体のリン酸化状態

各値は Mean ± SEM (N=3~4)を示している。**: p<0.01、*; p<0.05 vs 3×FLAG-SNX27

(B) CK2 による S263 のリン酸化の確認

ATP[γ-32P]の存在下で、GST、GST-SNX-PX、GST-SNX-PX(S263A)、GST-SNX-PX(S263D)を精製 CK2 と 37℃で 10 分間反応させた。反応産物を電気泳動し、分離した。固定後、ゲルをゲル乾燥機で 80℃、2 時間処理し、BAS-TR2025 に感光した。O.N.で感光後、Typhoon FLA 9500 で検出した。

(C) CK2 阻害剤存在下での SNX27 の細胞内局在

COS-1 細胞に DMSO(上段)、CK2 阻害剤(200μM, 2 時間 ; 下段) 処理を施し、内因性 SNX27(1 枚目)および HA-SNX27^R(2 枚目)、HA-SNX27^R-S263A (3 枚目)、HA-SNX27^R-S263D (4 枚目)と VPS26A、

SNX1 との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

(D) PI3P と GST-SNX27 PX の相互作用実験

PI3P をプロットした membrane を GST-SNX PX、GST-SNX PX-S263A、GST-SNX PX-S263D と incubation した後、GST 抗体と反応させた。

左：GST 抗体を HRP 標識 2 次抗体を用い、化学発光により検出した。

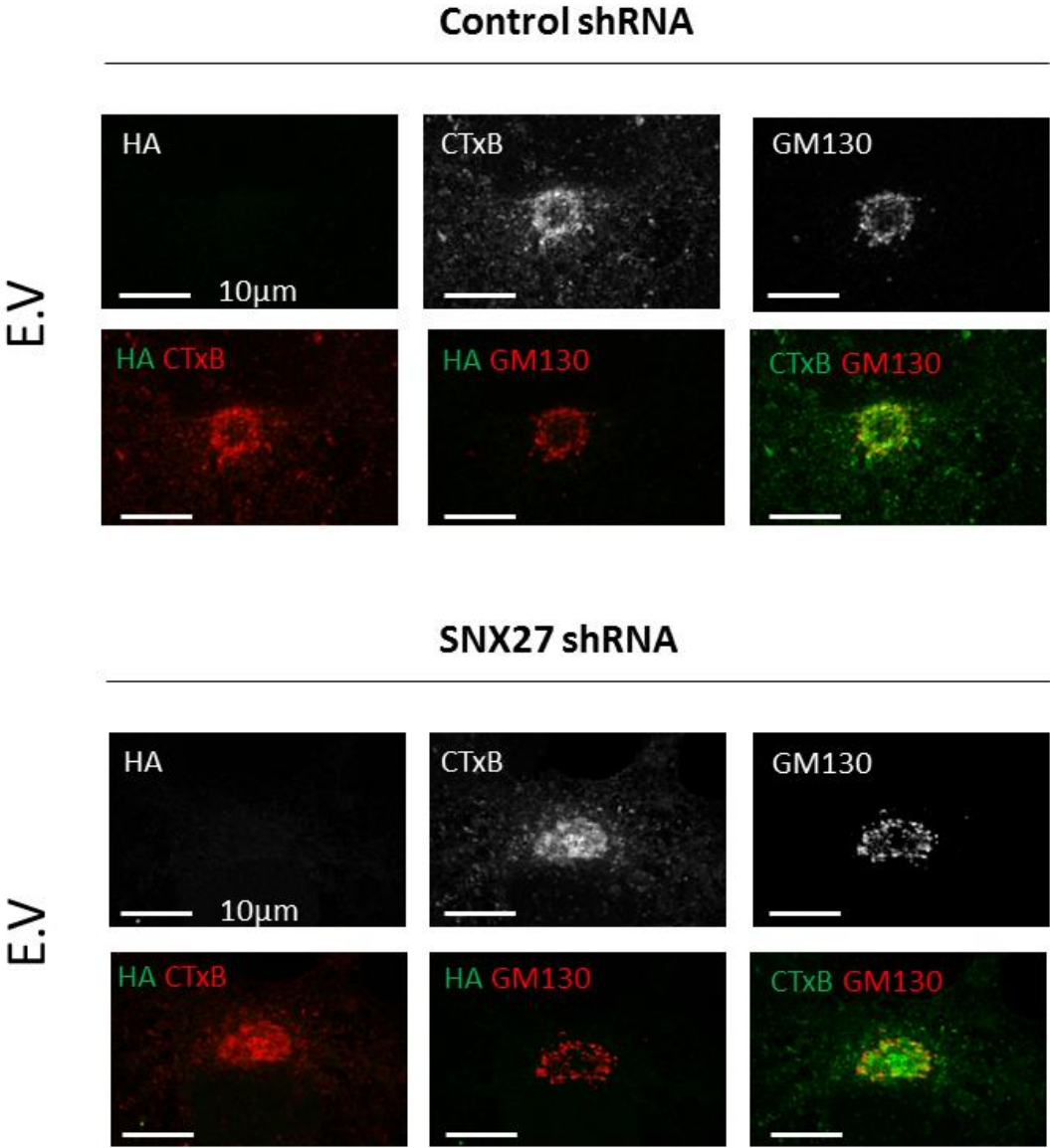
右：自然光により membrane を撮影した。

(E) SNX27 と retromer 構成タンパク質との相互作用

3 \times FLAG-SNX27、3 \times FLAG-SNX27-S263A、3 \times FLAG-SNX27-S263D を発現させた COS-1 細胞から、FLAG 抗体を用いて免疫沈降産物を調製し、WB を行った。3 \times FLAG-SNX27 の検出には、Sypro Ruby 染色を用いた。

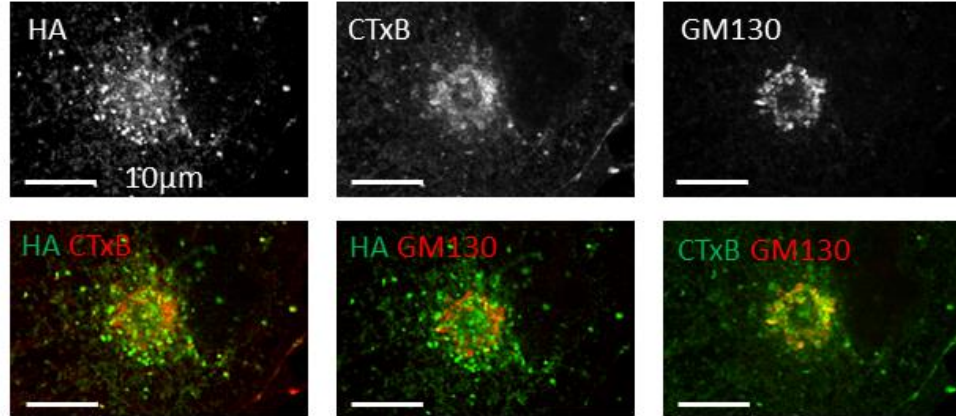
Figure. 5

A.

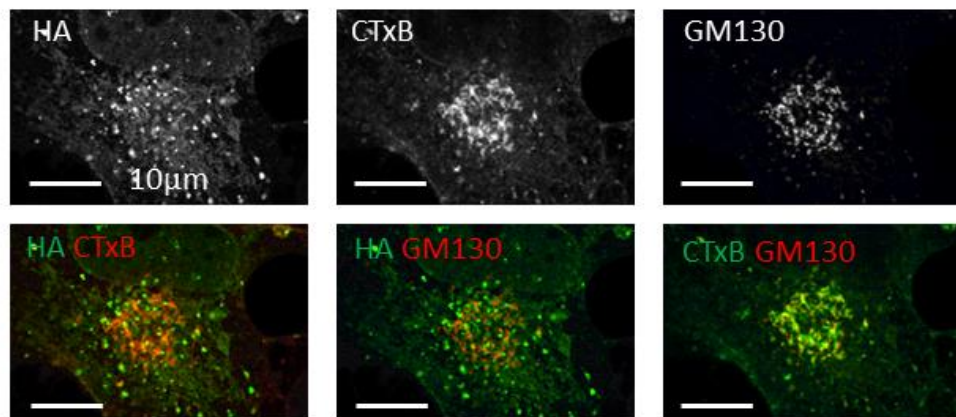


SNX27 shRNA

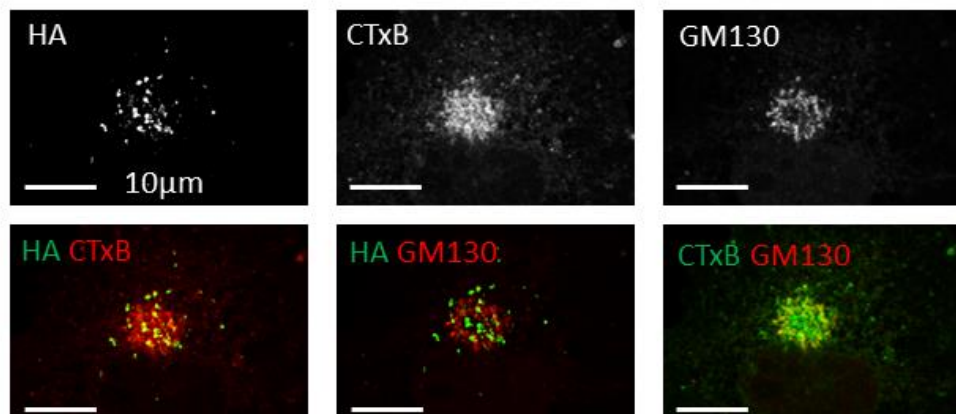
HA-SNX27^R



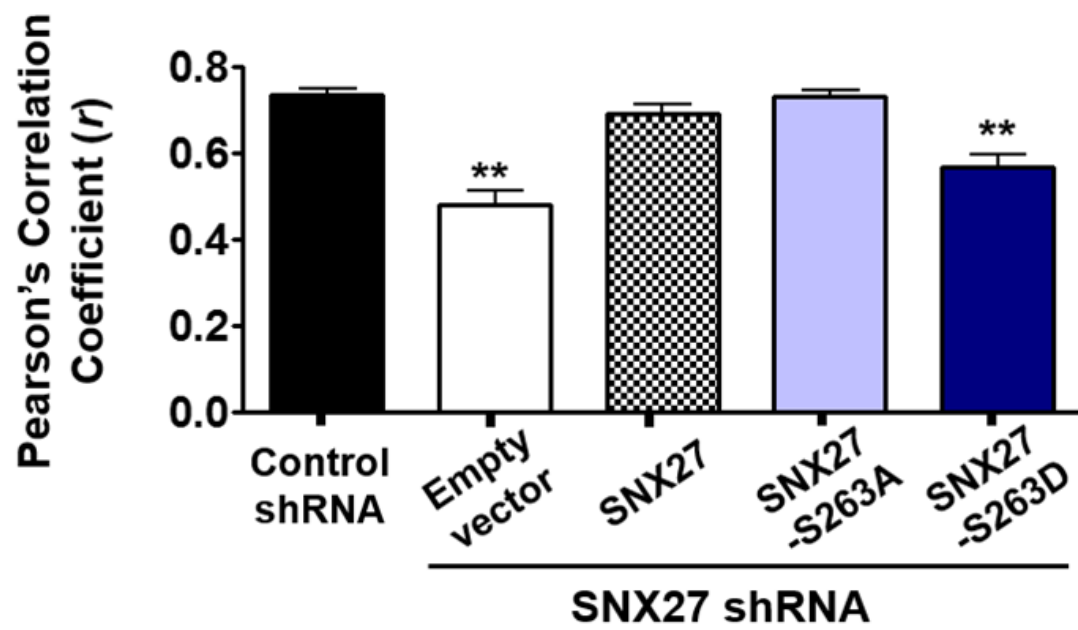
HA-SNX27^R-S263A



HA-SNX27^R-S263D

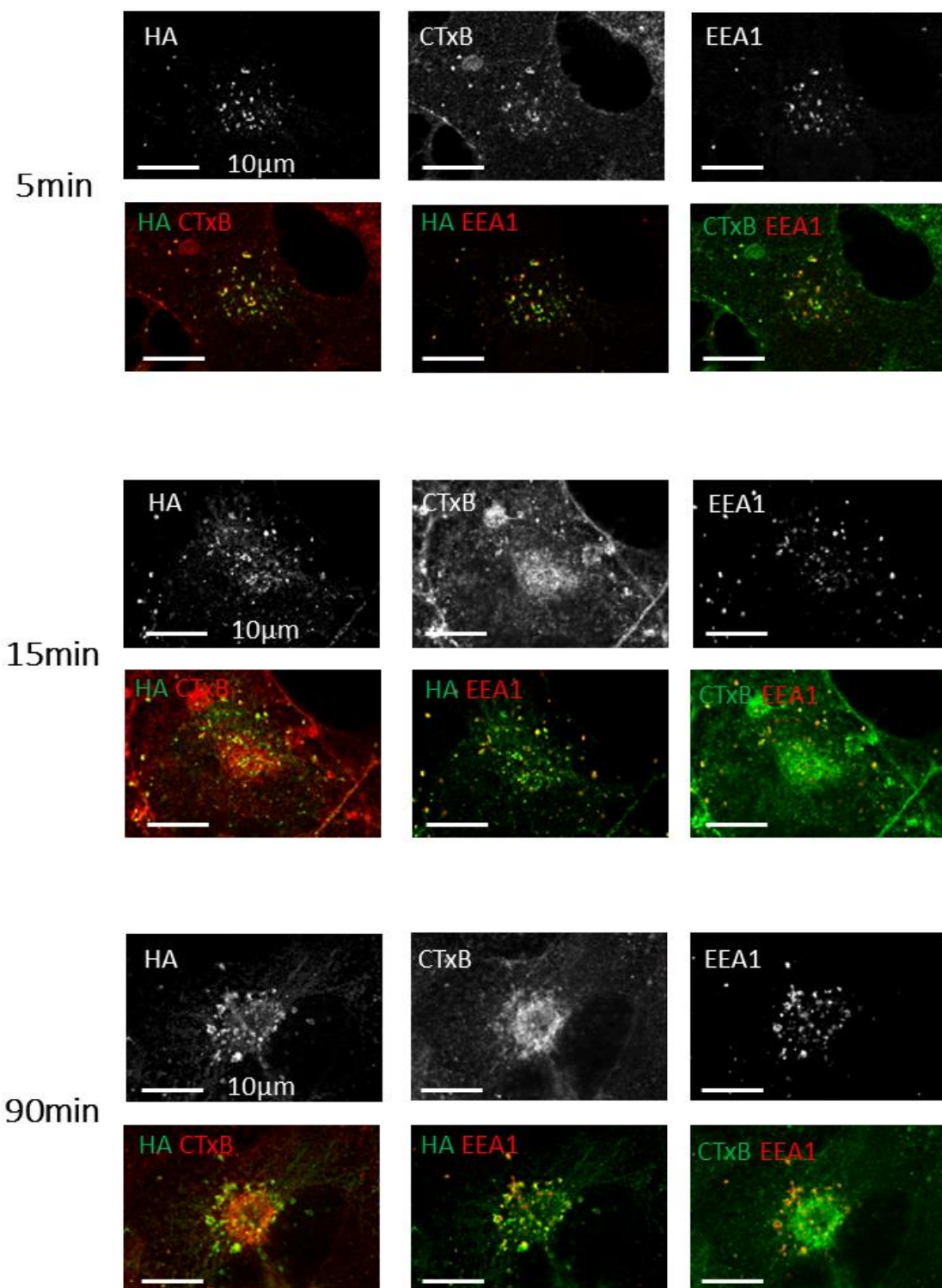


B.



C.

HA-SNX27^R



HA-SNX27^R-S263D

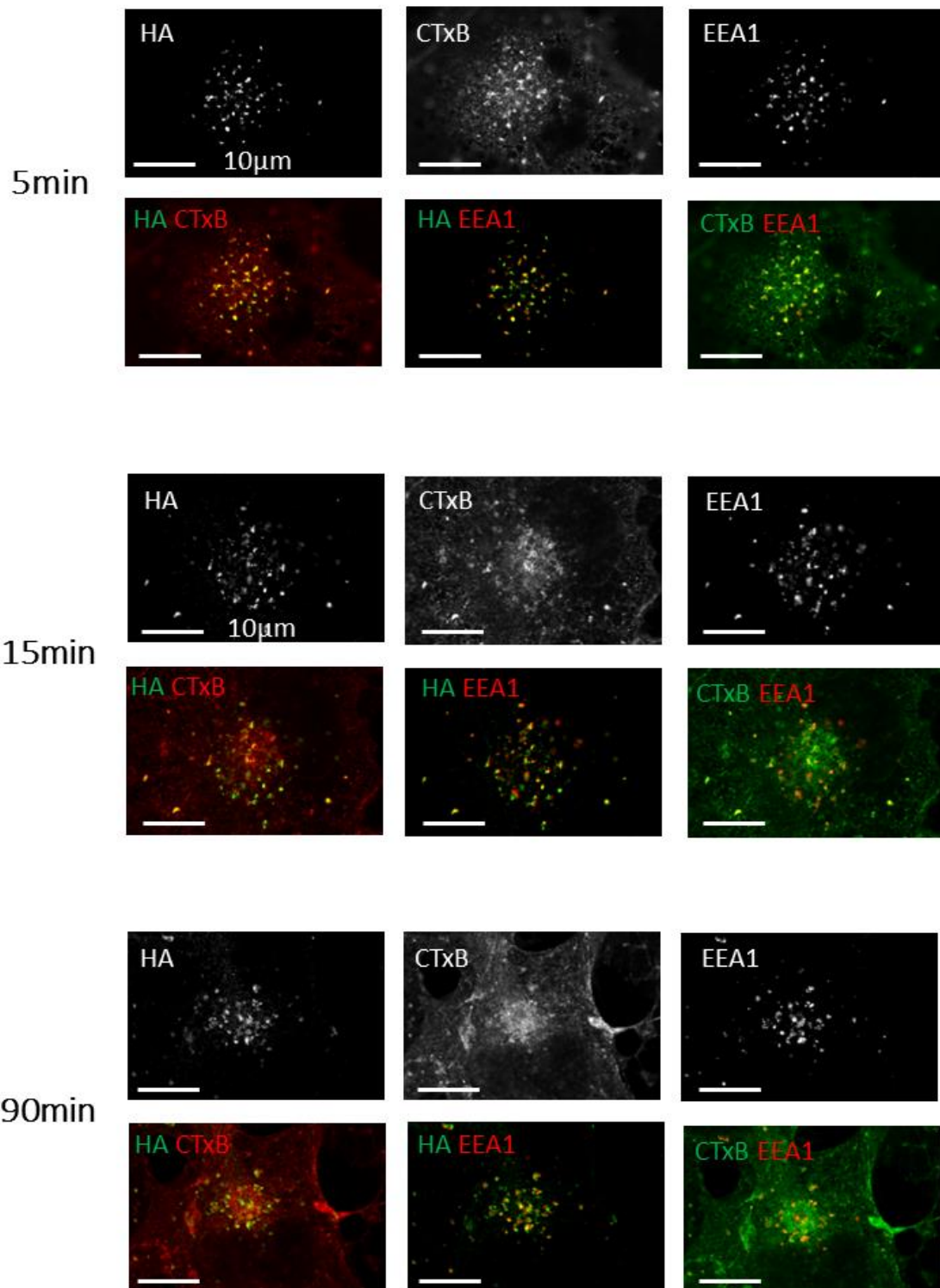


Fig. 5: CTxB の逆行性輸送と SNX27 の局在変化の関連性の検討

(A) shSNX27-COS-1 細胞における CTxB の逆行性輸送異常に対する S263 変異体の rescue 効果の検討

shControl-COS-1 細胞 (1 枚目上段)、shSNX27-COS-1 細胞 (1 枚目下段)、WT/shSNX27-COS-1 発現細胞 (2 枚目上段)、S263A/shSNX27-COS-1 発現細胞 (2 枚目中段)、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞 (2 枚目下段) に、Alexa-555 標識 CTxB を取り込ませた。90 分間培養後、HA-SNX27、GM130 (cis-golgi marker) との共染色像を観察した。
Scale bar: 10 μ m

(B) shSNX27-COS-1 細胞における CTxB の逆行性輸送異常に対する S263 変異体の rescue 効果の定量的評価

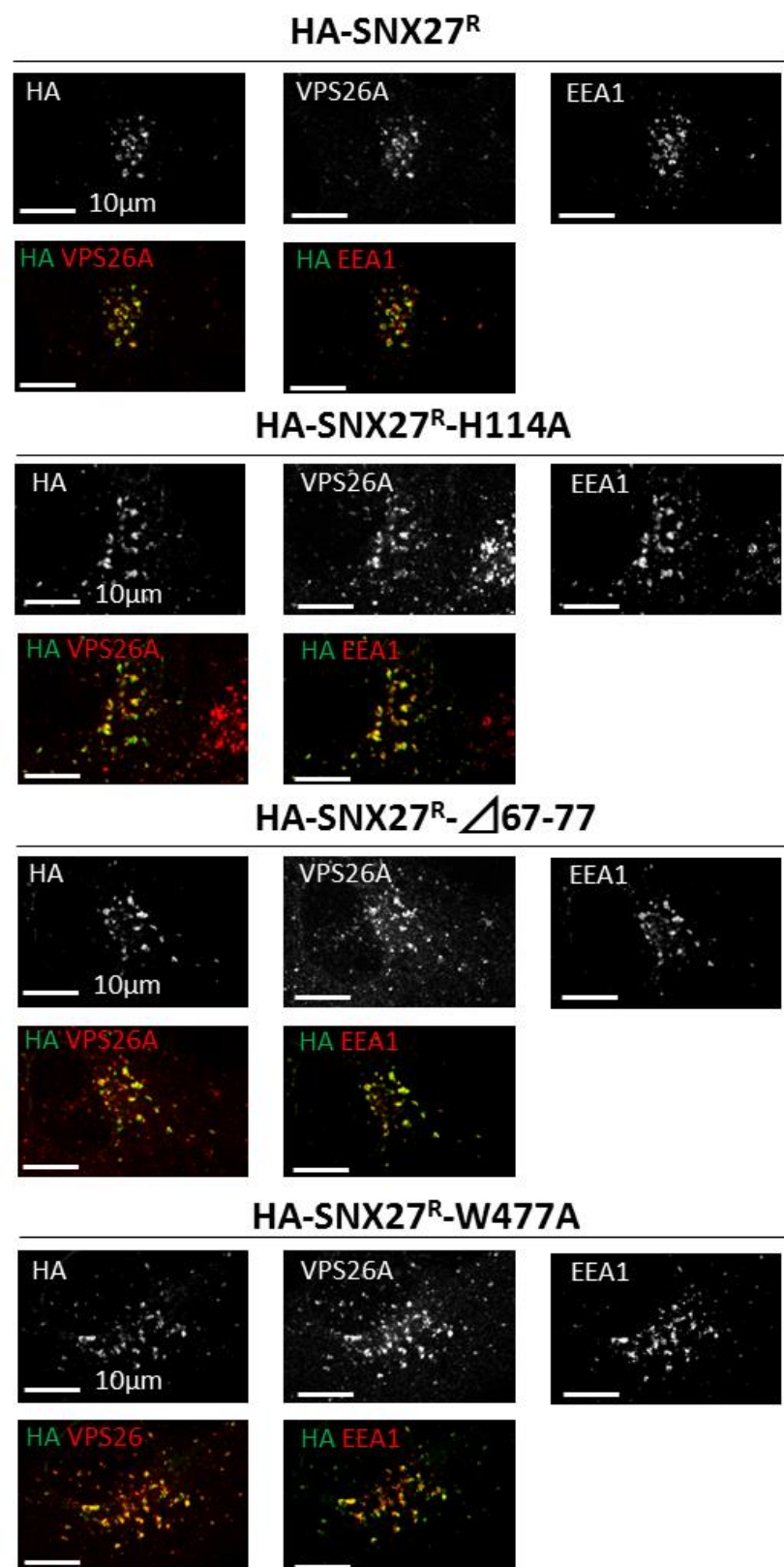
(A) の画像データから、LAS AF を用いて Alexa-555 標識 CTxB と GM130 との共局在に関する Pearson's Correlation Coefficient を算出した。各値は Mean \pm SEM (N=15~27) を示している。*; p<0.01 vs shControl-COS-1 細胞細胞

(C) CTxB 存在時の HA-SNX27^R-S263D の細胞内局在変化

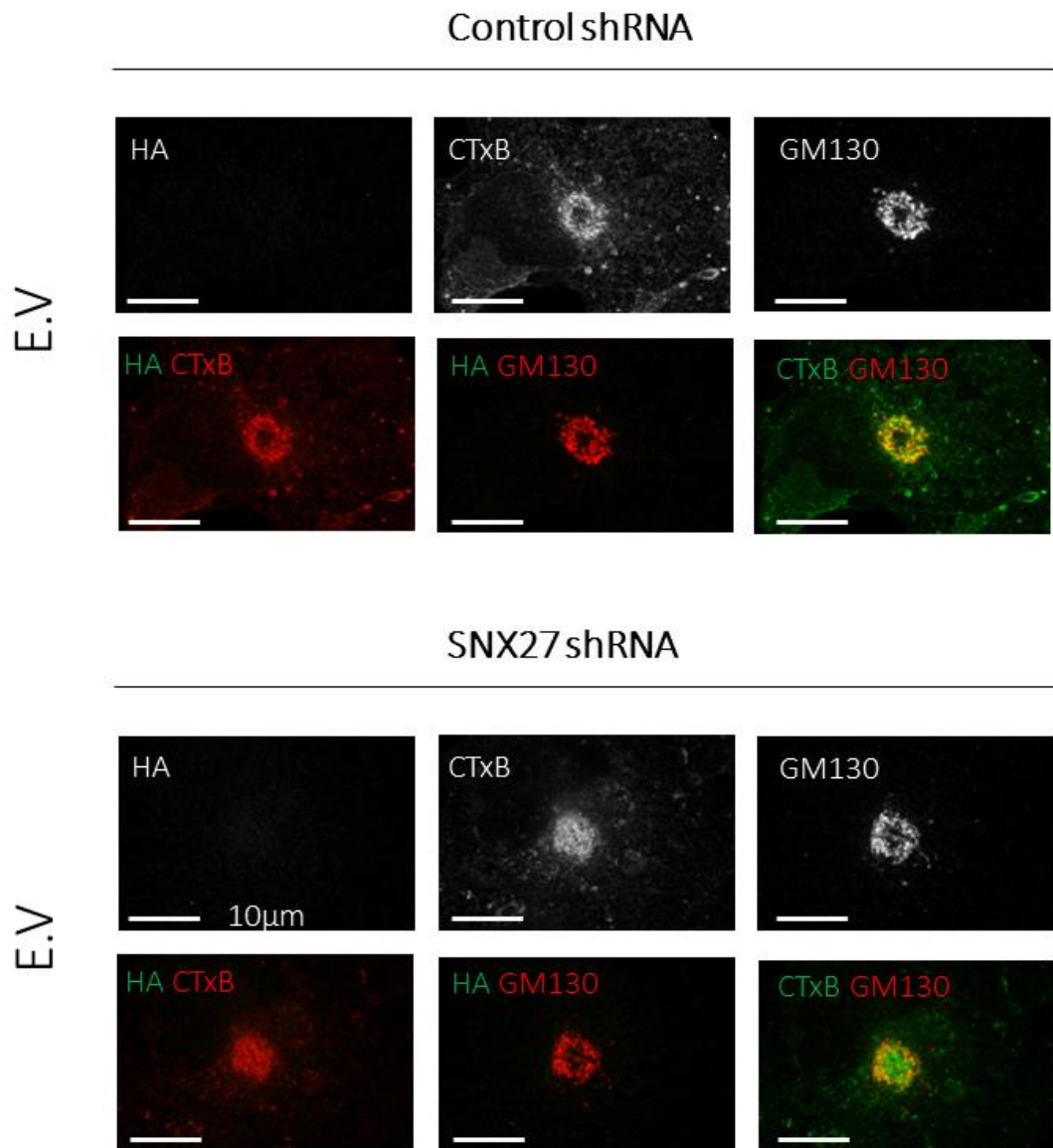
WT/shSNX27-COS-1 発現細胞 (1 枚目)、S263D/shSNX27-COS-1 発現細胞 (2 枚目) に、Alexa-555 標識 CTxB を細胞に取り込ませた後、5 (上段)、15 (中段)、90 (下段) 分間培養し、HA-SNX27 と EEA1 (early endosome marker) との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

Figure. 6

A.

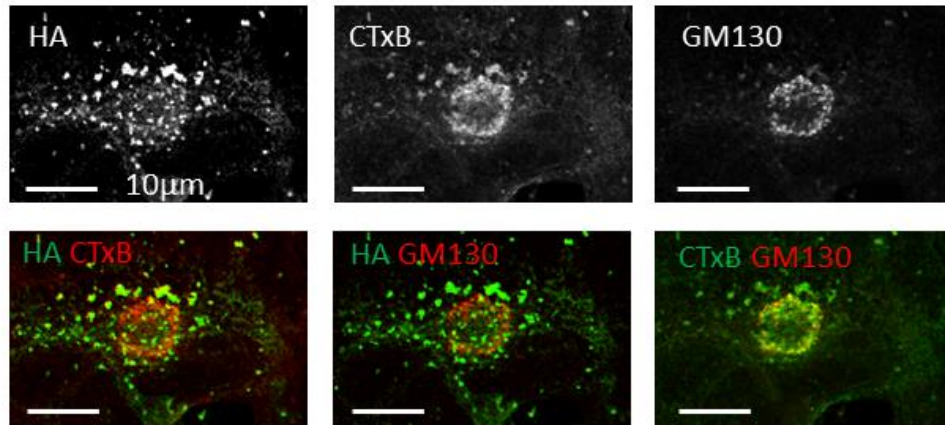


B.

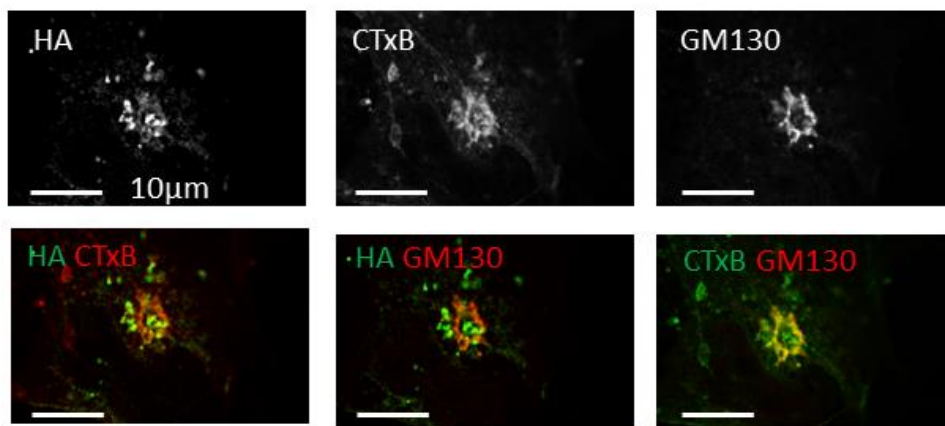


SNX27 shRNA

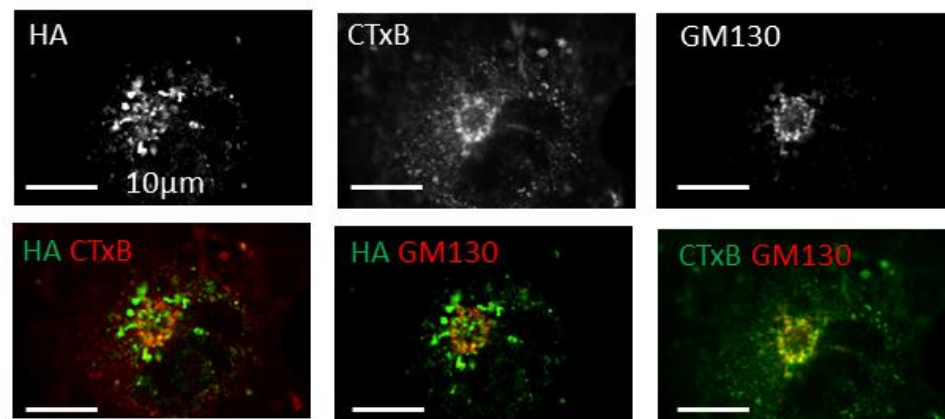
HA-SNX27^R



HA-SNX27^R-H114A

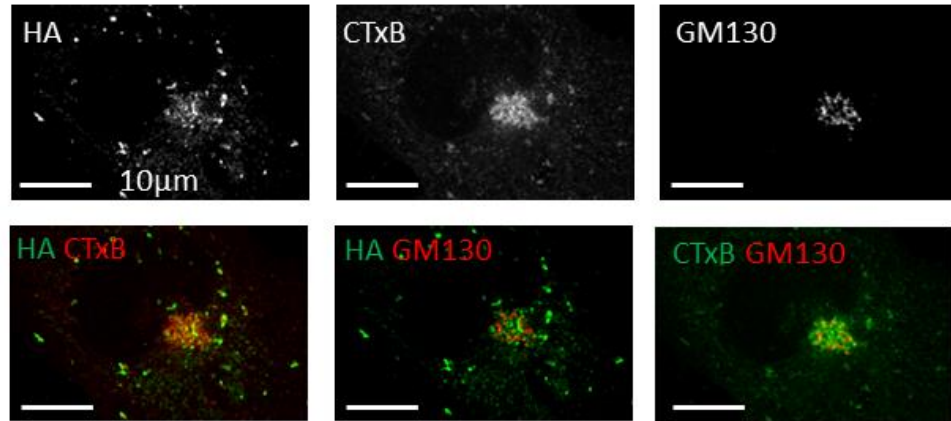


HA-SNX27^R-Δ67-77



SNX27 shRNA

HA-SNX27^R-W477A



C.

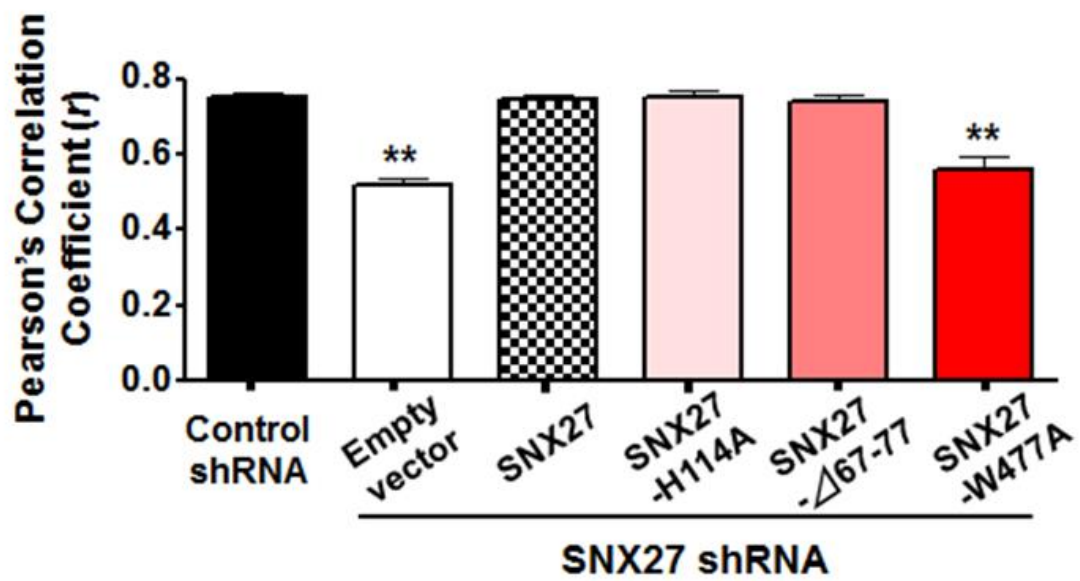


Fig. 6: CTxB の逆行性輸送に関わる SNX27 の domain の探索

(A) HA-SNX27^R 機能性 domain 変異体の細胞内局在

COS-1 細胞に、HA-SNX27^R (上段)、HA-SNX27^R-H114A (中上段)、HA-SNX27^R- Δ 67-77 (中下段)、HA-SNX27^R-W477A (下段)を発現させ、VPS26A (Retromer 構成タンパク質)、EEA1 (early endosome marker) との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

(B) shSNX27-COS-1 細胞における CTxB の逆行性輸送異常に対する HA-SNX27^R 機能性 domain 変異体の rescue 効果の検討

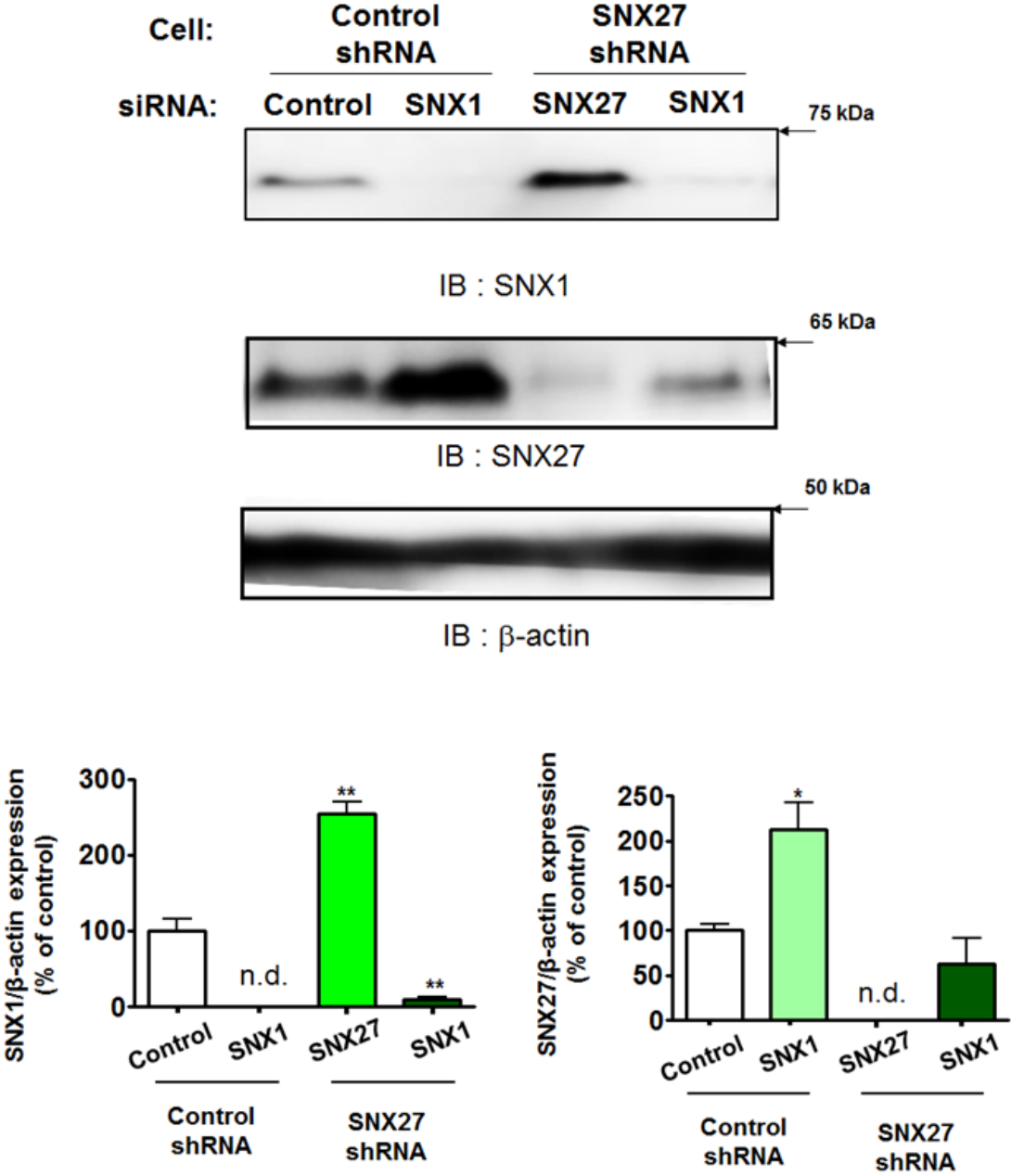
shControl-COS-1 細胞(1 枚目上段)、shSNX27-COS-1 細胞(1 枚目下段)、WT/shSNX27-COS-1 発現細胞(2 枚目上段)、H114A/shSNX27-COS-1 発現細胞(2 枚目中段)、 Δ 67-77/shSNX27-COS-1 発現細胞(2 枚目下段)、W477A/shSNX27-COS-1 発現細胞(3 枚目)に、Alexa-555 標識 CTxB を取り込ませた。90 分間培養後、HA、GM130 (cis-golgi marker) との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

(C) shSNX27-COS-1 細胞における CTxB の逆行性輸送異常に対する HA-SNX27^R 機能性 domain 変異体の rescue 効果の定量的評価

(B)の画像データから、LAS AF を用いて Alexa-555 標識 CTxB と GM130 との共局在に関する Pearson's Correlation Coefficient を算出した。各値は Mean \pm SEM (N=20~24)を示している。*; p<0.01 vs shControl-COS-1 細胞細胞

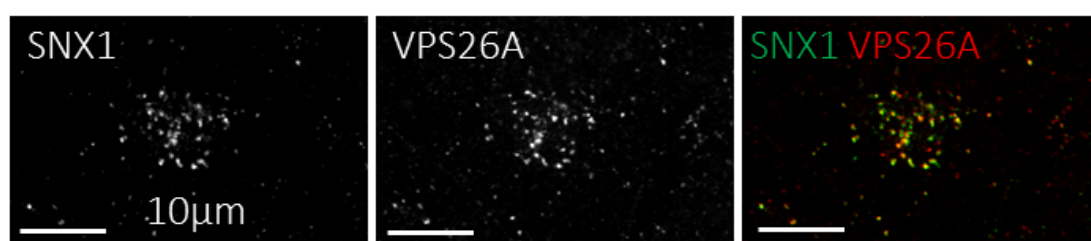
Figure. 7

A.

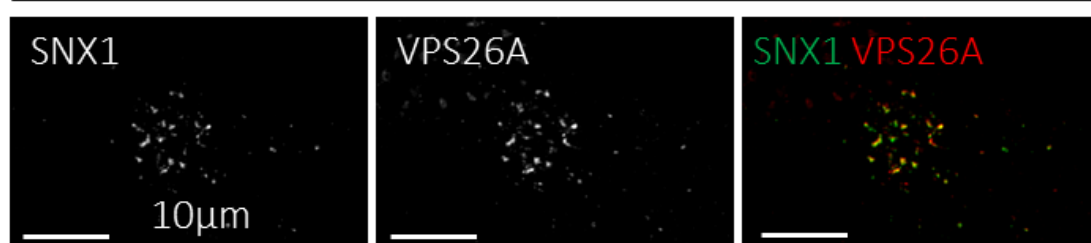


B.

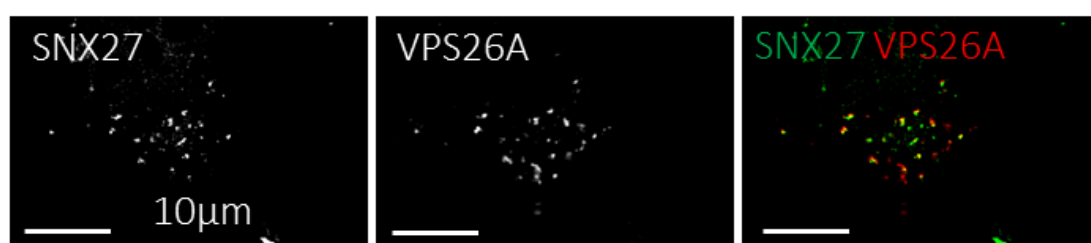
siControl/shControl



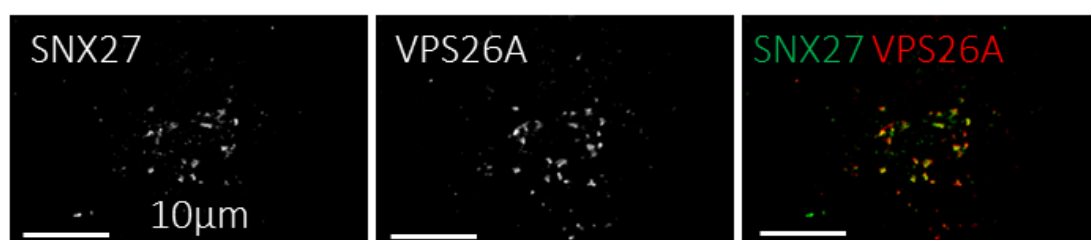
siSNX27/shSNX27



siControl/shControl

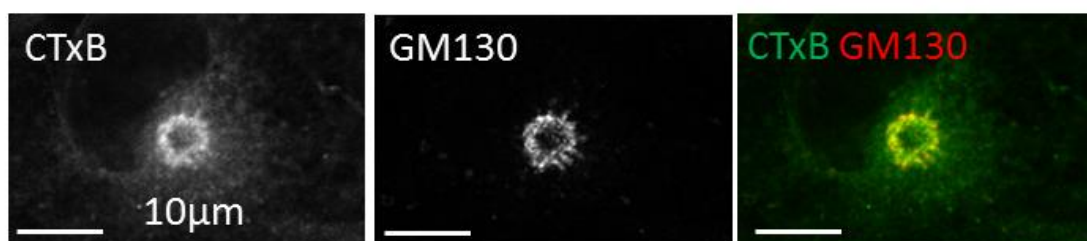


siSNX1/shControl

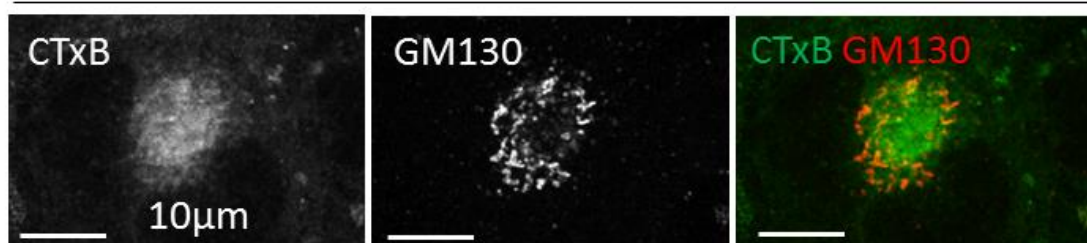


C.

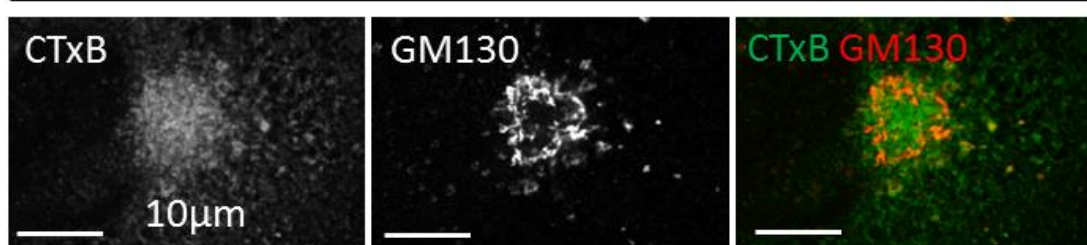
siControl/shControl



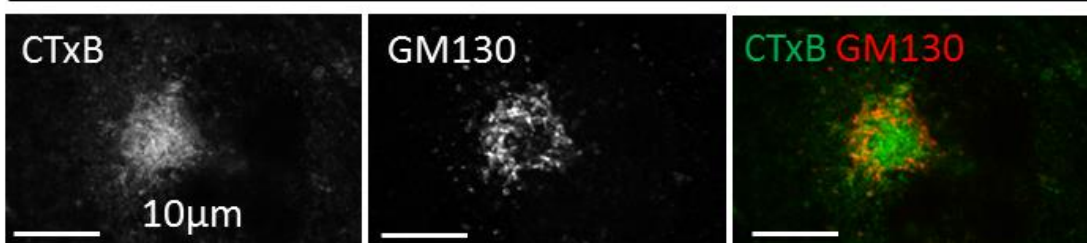
siSNX1/shControl



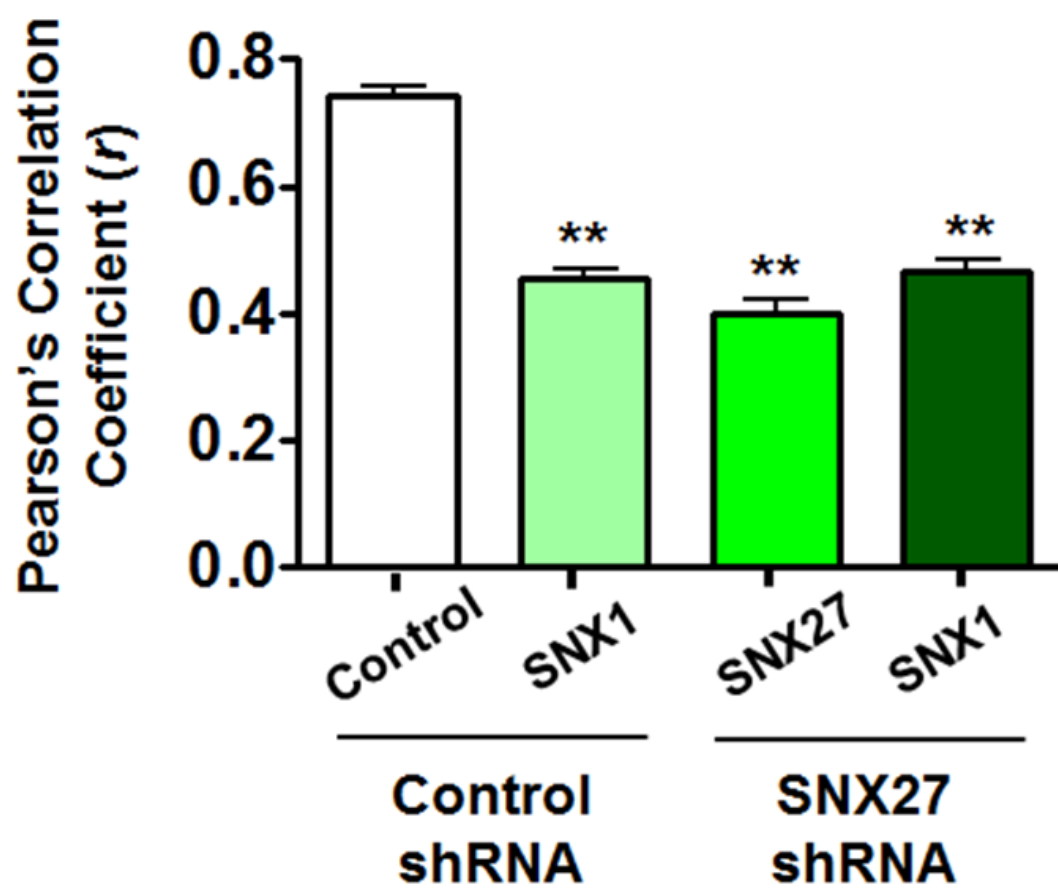
siSNX27/shSNX27

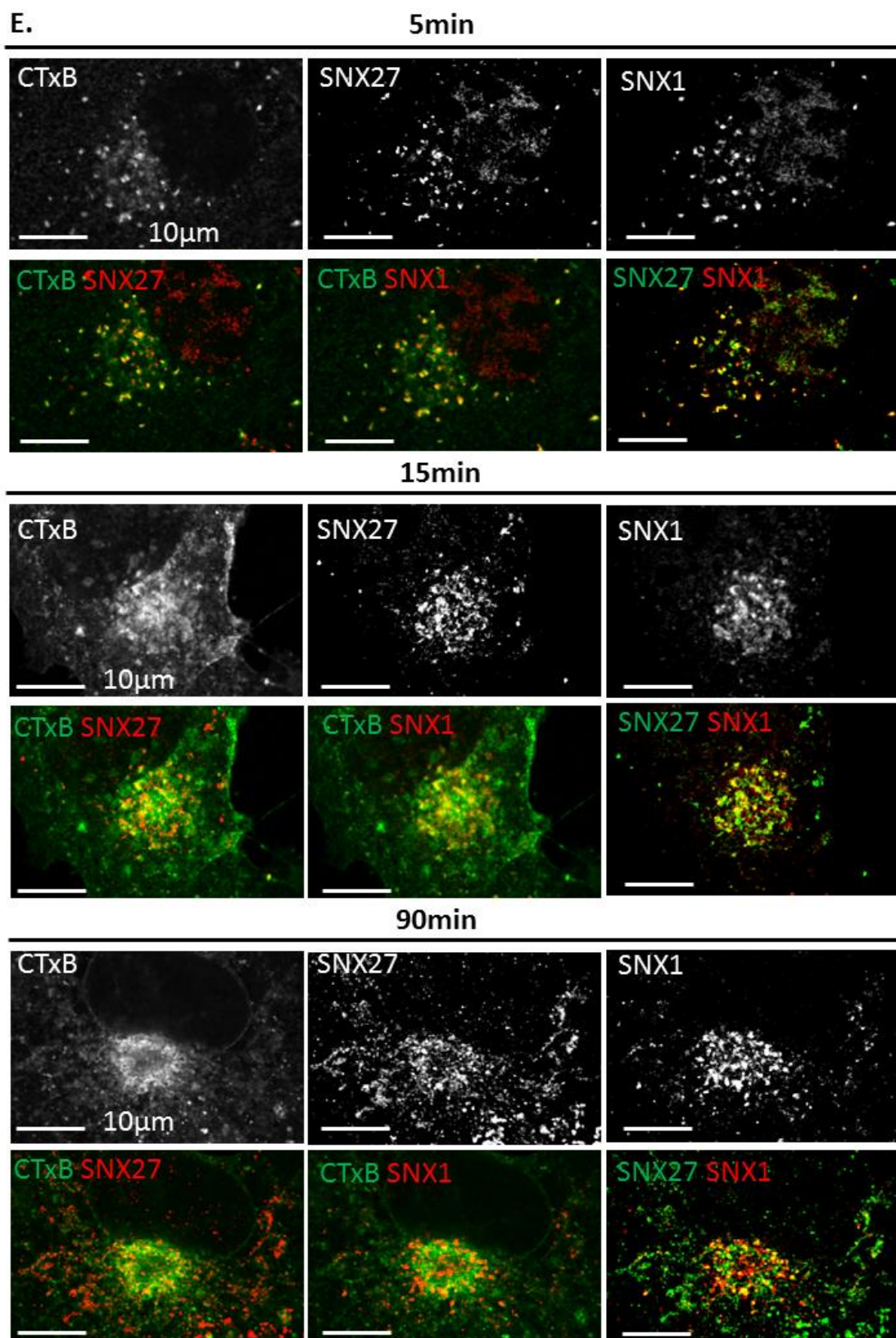


siSNX1/shSNX27



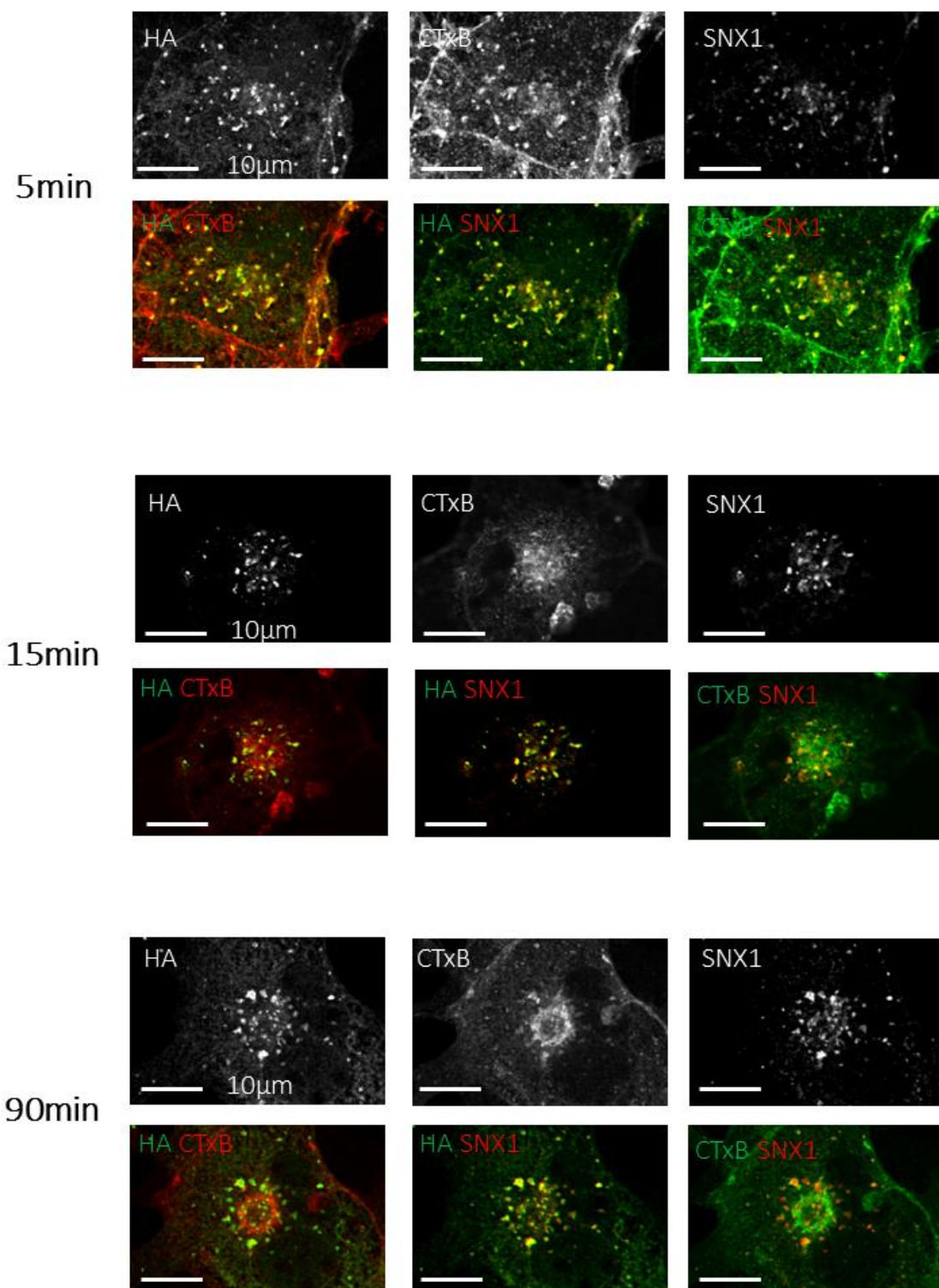
D.



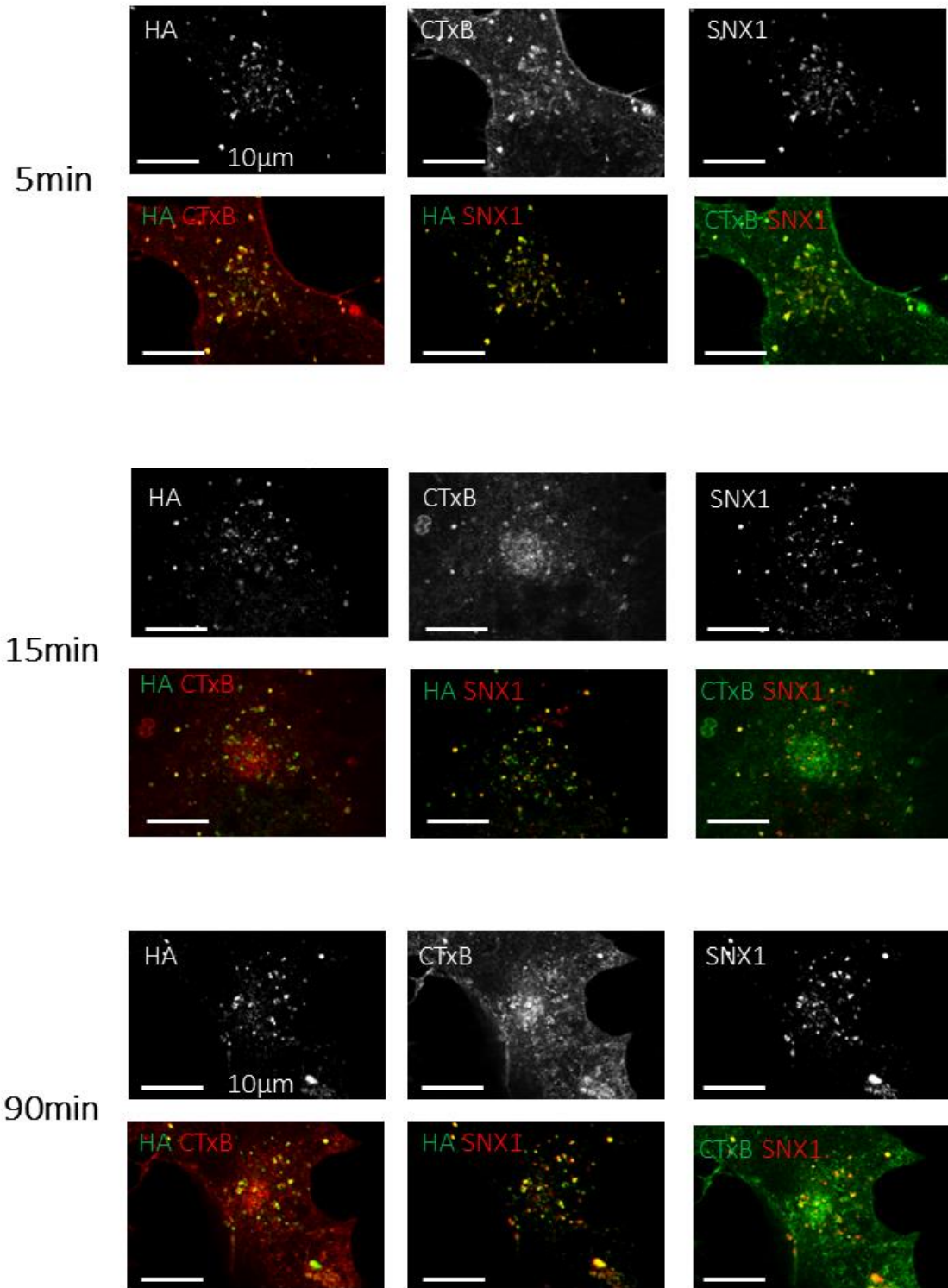


F.

HA-SNX27^R

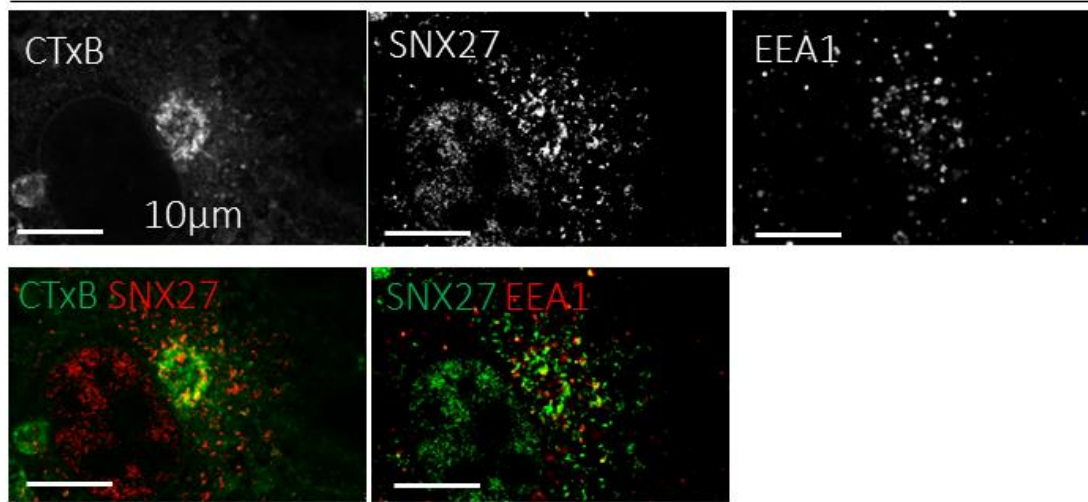


HA-SNX27^R-S263D



G.

siControl/shControl



siSNX1/shControl

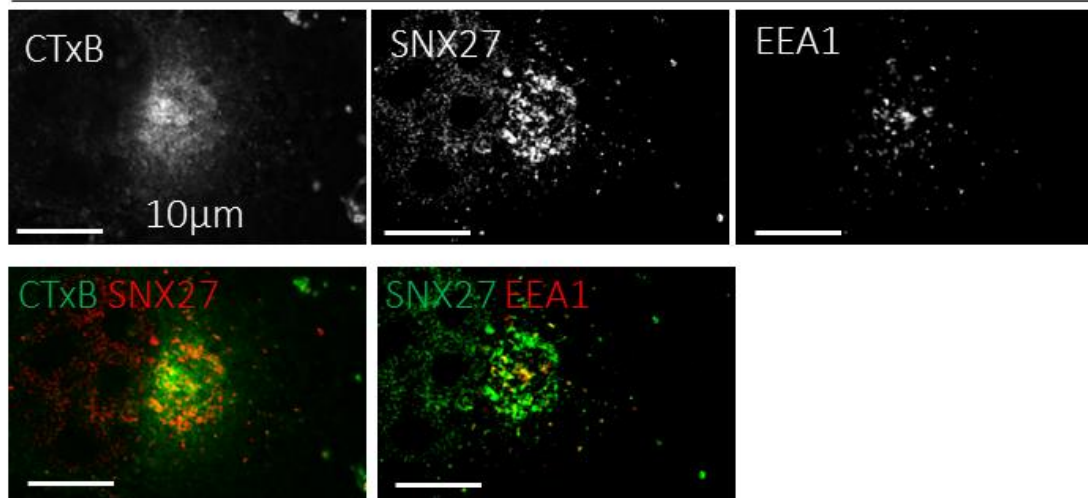


Fig. 7: CTxB の逆行性輸送における SNX1 の機能

(A) SNX1 の KD 条件の確立

上 : siControl/shControl-COS-1 細胞、siSNX1/shControl-COS-1 細胞、siSNX27/shSNX27-COS-1 細胞、siSNX1/shSNX27-COS-1 細胞から細胞可溶液を調製し、SNX1、SNX27 の発現量を評価した。

下 : 各細胞の SNX1、SNX27 の発現量を、siControl/shControl-COS-1 細胞における SNX1、SNX27 の発現量に対する百分率で定量化した。各値は Mean \pm SEM (N=3)を示している。*; p<0.05、**; p<0.01 vs siControl/shControl-COS-1 細胞

(B) SNX27 の細胞内局在に対する SNX1 の影響、SNX1 の細胞内局在に対する SNX27 の影響

siControl/shControl-COS-1 細胞(上)、siSNX27/shSNX27-COS-1 細胞(中上)において、SNX1、VPS26 の共染色像を観察した。また、siControl/shControl-COS-1 細胞(中下)、siSNX1/shControl-COS-1 細胞(下)において、SNX27、VPS26 の共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

(C) CTxB の逆行性輸送に対する SNX1 KD の影響

siControl/shControl-COS-1 細胞(上)、siSNX1/shControl-COS-1 細胞(中上)、siSNX27/shSNX27-COS-1 細胞(中下)、siSNX1/shSNX27-

COS-1 細胞(下)に、Alexa-488 標識 CTxB を取り込ませた後、90 分間培養し、GM130 との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

(D) CTxB の逆行性輸送に対する SNX1 KD の影響に関する定量的評価

(C)の画像データから、LAS AF を用いて Alexa-488 標識 CTxB と GM130 との共局在に関する Pearson's Correlation Coefficient を算出した。各値は Mean \pm SEM (N=37~52)を示している。*; p<0.01 vs siControl/shControl-COS-1 細胞

(E) CTxB 存在時の SNX1 の細胞内局在変化

COS-1 細胞に Alexa-488 標識 CTxB を取り込ませた後、5(上段)、15(中段)、90(下段)分間培養し、SNX27、SNX1 との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

(F) CTxB 存在時の SNX1 の細胞内局在変化に対する SNX27 の関与 WT/shSNX27 発現細胞(1 枚目)、S263D/shSNX27 発現細胞 (2 枚目)に、Alexa-555 標識 CTxB を細胞に取り込ませた後、5 (上段)、15 (中段)、90 (下段)分間培養し、HA-SNX27 と SNX1 との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

(G)CTxB 存在時の SNX27 の細胞内局在変化における SNX1 KD の影響

siControl/shControl-COS-1 細胞(上段)、siSNX1/shControl-COS-1 細胞

胞(下段)に、Alexa-488 標識 CTxB を取り込ませた後、90 分間培養し、SNX27、EEA1 との共染色像を観察した。scale bar: 10 μ m

Conclusion & Future Aspects

本研究から、CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送には、SNX27 と SNX1 の協調的な働きが必要となることが明らかとなった。今後、その機序について、より詳細な知見を得るに当たり、[1] CTxB 存在時に SNX27 の PX domain 内にある S263 を脱リン酸化する phosphatase を同定し、[2] EE において cytosol 側に存在する SNX27 が、どのようにして luminal 側に存在する CTxB を認識するかを明らかにする必要がある。

HeLa 細胞に GFP-SNX27 を発現させ、GFP-SNX27 と相互作用するタンパク質を網羅的に探索した interactome 解析では、phosphatase は同定されていない(63)。しかしながら、CTxB 処理を施した後に、同様の interactome 解析を行うことにより、CTxB 存在時に SNX27 の S263 を脱リン酸化する phosphatase を同定できる可能性があると考えている。CTxB 処理時の SNX27 との相互作用タンパク質群に phosphatase が含まれていた場合には、細胞内局在、基質のコンセンサス配列などの informatics 解析により、候補 phosphatase を絞った後、GST-SNX-PX、CK2 とともに候補 phosphatase を in vitro kinase assay に供し、CK2 によりリン酸化された S263 を脱リン酸化できる phosphatase を探索する。次に、本 phosphatase を KD した細胞に CTxB を取り込ませ、CTxB の

RE からゴルジ体への輸送が阻害させること、SNX27 が CTxB とともに逆行性輸送を受けないことの 2 点を確認することにより、CTxB 存在時に SNX27 の S263 を脱リン酸化する phosphatase を同定できると考えている。また、EE において cytosol 側に存在する SNX27 が、luminal 側に存在する CTxB を認識する機序に関しては、Discussion に記載したように、まずは EE において、cytosol 側で SNX27 と luminal 側で CTxB と相互作用する膜タンパク質が存在することを想定し、SNX27 の機能性 domain 変異体を用いながら、相互作用タンパク質を網羅的に探索する予定である。

本研究では、CTxB を対象タンパク質として SNX27 の逆行性輸送に対する影響を検討した。逆行性輸送によってゴルジ体まで運ばれる物質は、cholera toxin に限らず、Wntless、TGN38、TGN46、mannose 6-phosphate receptors (MPRs)などの内因性のタンパク質から、Shiga toxin、Ricin などの外因性の毒素まで多岐にわたる(10-13)。SNX27 KD 細胞では、CTxB の RE からゴルジ体への逆行性輸送が阻害されたのに対し、TGN46 は正常なゴルジ体局在を示した。この結果は、これまで報告されているように、逆行性輸送に複数の経路、分子機構が存在することを示唆するものであり、上記タンパク質の逆行性輸送における SNX27 の寄与もタンパク質ごとに異なると推察される。今後、各種タンパク質の逆行性輸送に対する

SNX27 の関与を検討することにより、逆行性輸送の経路、分子機構、各経路の基質選択性について詳細な知見が得られるものとする。

CTxB 処理により、内因性に発現する SNX27 の半分以上が細胞内局在の変化を示した。従って、CTxB 処理により、通常時の SNX27-retromer の働きが破綻している可能性がある。SNX27-retromer 機能に関しては、本複合体により細胞膜へのリサイクリングを受ける Glut-1、ADRB2 のリサイクリング速度を CTxB 処理前後で比較検討することにより、直接的に評価できる。また、SNX27-retromer 形成についても、SNX27 抗体による免疫沈降物中に含まれる VPS26A、SNX1、WASH1 などの retromer 構成タンパク質の量を CTxB 処理前後で比較検討することにより、可能である。これまでに SNX27 の機能変化に関する報告はないが、細胞内局在変化については、本研究成果に加え、T 細胞において、抗原提示細胞および Staphylococcal enterotoxin E 存在時に、免疫シナプスに SNX27 がリクルートされることが示されている(49)。従って、SNX27 が細胞内外の多彩な perturbation に応答し、細胞内局在変化、機能変化することにより、細胞が perturbation に対して正しく応答している可能性、あるいは恒常性が破綻し、病態の発症に繋がっている可能性が考えられる。当研究室では、SNX27 の conditional knockout mouse を作出しており、今後本考察を踏まえ

て解析を進めることにより、SNX27 の生理学的重要性についても
明らかにしていきたい。

Acknowledgements

COS-1 細胞をご供与いただきました東京大学大学院 薬学系研究科 衛生化学教室 新井洋由教授、田口友彦准教授に深謝いたします。

rabbit polyclonal anti-SNX27 をご供与いただきました東京医科歯科大学 精神科 大学院医歯学総合研究科 西川 徹教授に深謝いたします。

6 年間、楠原 洋之教授には大変お世話になりました。コロキウムでの先生との Discussion を通して、考える能力、議論する能力が養われました。また、その Discussion を活かすことで、私の研究が進んでいきました。今後は、先生のような、知識が豊富であり、思考力に富んだ研究者を目指して、日々努力していきたいと思います。

担当教官の林 久允助教には、実験手法をはじめ、プレゼンテーションの仕方から、論文の書き方まで、様々なことを教えていただき、本当に感謝いたします。博士課程在籍時には、頻繁に議論をする機会をいただいたおかげで、研究を順調に進めることができました。

今後も、先生から学んだことを活かしていきたいと思います。

前田 和哉講師には、様々な観点から研究について教えていただき、大変お世話になりました。先生のプレゼンテーションは人を惹きつけるものであり、とても勉強になりました。私も人を惹きつけられるようなプレゼンテーションができるようになりたいと思います。

水野 忠快特任助教には、学生時代からとてもお世話になりました。気楽に相談ができる先輩がいたことで、とても助かりました。

杉山雄一先生には、研究室に配属後、修士2年生までの3年間お世話になりました。講義、セミナー、コロキウムなどを通して先生に徹底的にご指導していただいた、サイエンスに対する考え方を活かして、今後も精進していきたいと思います。

わからないことを教えてくださり、一緒に Discussion して下さった研究室の先輩方、研究室を盛り上げてくれた後輩には大変お世話になりました。博士課程まで一緒に学んだ、直井壯太郎さん、修士課程まで一緒に学んだ、小谷直生さん、豊島純子さん、の同期メンバー皆が頑張っていることが私のモチベーションにもなりました。

研究室の皆さんがいたから、ここまで頑張ってくられました。

家族、友人にも感謝いたします。

最後に、皆様本当にありがとうございました。

References

1. Reidl, J., and Klose, K. E. (2002) *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 125-139
2. Holmgren, J., and Svennerholm, A. M. (1977) Mechanisms of disease and immunity in cholera: a review. *J Infect Dis* **136 Suppl**, S105-112
3. Wernick, N. L., Chinnapen, D. J., Cho, J. A., and Lencer, W. I. (2010) Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins (Basel)* **2**, 310-325
4. Spangler, B. D. (1992) Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol Rev* **56**, 622-647
5. Thiagarajah, J. R., and Verkman, A. S. (2003) CFTR pharmacology and its role in intestinal fluid secretion. *Curr Opin Pharmacol* **3**, 594-599
6. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/>.
7. portal, b. w. <http://seesaawiki.jp/book-wiki/d/%B4%B6%C0%F7%BE%C9%A4%CB%A4%E8%A4%EB%C3%D7%BB%E0%CE%A8%B0%EC%CD%F7>.
8. Bhattacharya, S. K., and Sur, D. (2003) An evaluation of current shigellosis treatment. *Expert Opin Pharmacother* **4**, 1315-1320
9. 横 浜 市 衛 生 研 究 所 .

<http://www.city.yokohama.lg.jp/kenko/eiken/idsc/disease/cholera1.html>.

10. Chia, P. Z., Gunn, P., and Gleeson, P. A. (2013) Cargo trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Histochem Cell Biol* **140**, 307-315
11. Bonifacino, J. S., and Rojas, R. (2006) Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 568-579
12. Popoff, V., Mardones, G. A., Bai, S. K., Chambon, V., Tenza, D., Burgos, P. V., Shi, A., Benaroch, P., Urbé, S., Lamaze, C., Grant, B. D., Raposo, G., and Johannes, L. (2009) Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. *Traffic* **10**, 1868-1880
13. Lieu, Z. Z., and Gleeson, P. A. (2011) Endosome-to-Golgi transport pathways in physiological processes. *Histol Histopathol* **26**, 395-408
14. Wang, Y., Tai, G., Lu, L., Johannes, L., Hong, W., and Tang, B. L. (2005) Trans-Golgi network syntaxin 10 functions distinctly from syntaxins 6 and 16. *Mol Membr Biol* **22**, 313-325
15. Ganley, I. G., Espinosa, E., and Pfeffer, S. R. (2008) A syntaxin 10-SNARE complex distinguishes two distinct transport routes from endosomes to the trans-Golgi in human cells. *J Cell Biol* **180**, 159-172
16. Mukhopadhyay, S., and Linstedt, A. D. (2013) Retrograde trafficking of AB₅ toxins: mechanisms to therapeutics. *J Mol Med (Berl)* **91**, 1131-1141

17. Lindberg, A. A., Brown, J. E., Strömberg, N., Westling-Ryd, M., Schultz, J. E., and Karlsson, K. A. (1987) Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J Biol Chem* **262**, 1779-1785
18. Lingwood, C. A., Manis, A., Mahfoud, R., Khan, F., Binnington, B., and Mylvaganam, M. (2010) New aspects of the regulation of glycosphingolipid receptor function. *Chem Phys Lipids* **163**, 27-35
19. Lingwood, C. A., Binnington, B., Manis, A., and Branch, D. R. (2010) Globotriaosyl ceramide receptor function - where membrane structure and pathology intersect. *FEBS Lett* **584**, 1879-1886
20. Johannes, L., and Römer, W. (2010) Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* **8**, 105-116
21. Bergan, J., Dyve Lingelem, A. B., Simm, R., Skotland, T., and Sandvig, K. (2012) Shiga toxins. *Toxicon* **60**, 1085-1107
22. Mukhopadhyay, S., and Linstedt, A. D. (2012) Manganese blocks intracellular trafficking of Shiga toxin and protects against Shiga toxicosis. *Science* **335**, 332-335
23. Puri, S., Bachert, C., Fimmel, C. J., and Linstedt, A. D. (2002) Cycling of early Golgi proteins via the cell surface and endosomes upon luminal pH disruption. *Traffic* **3**, 641-653

24. Linstedt, A. D., Mehta, A., Suhan, J., Reggio, H., and Hauri, H. P. (1997) Sequence and overexpression of GPP130/GIMPc: evidence for saturable pH-sensitive targeting of a type II early Golgi membrane protein. *Mol Biol Cell* **8**, 1073-1087
25. Bachert, C., Lee, T. H., and Linstedt, A. D. (2001) Lumenal endosomal and Golgi-retrieval determinants involved in pH-sensitive targeting of an early Golgi protein. *Mol Biol Cell* **12**, 3152-3160
26. Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L., and Sandvig, K. (2004) Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin. *J Cell Sci* **117**, 2321-2331
27. Saint-Pol, A., Yélamos, B., Amessou, M., Mills, I. G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H. T., Lamaze, C., and Johannes, L. (2004) Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell* **6**, 525-538
28. Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B., and Johannes, L. (2002) Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol* **156**, 653-664
29. Yoshino, A., Setty, S. R., Poynton, C., Whiteman, E. L., Saint-Pol, A., Burd, C. G., Johannes, L., Holzbaur, E. L., Koval, M., McCaffery, J. M., and

- Marks, M. S. (2005) tGolgin-1 (p230, golgin-245) modulates Shiga-toxin transport to the Golgi and Golgi motility towards the microtubule-organizing centre. *J Cell Sci* **118**, 2279-2293
30. Lu, L., Tai, G., and Hong, W. (2004) Autoantigen Golgin-97, an effector of Arl1 GTPase, participates in traffic from the endosome to the trans-golgi network. *Mol Biol Cell* **15**, 4426-4443
 31. Derby, M. C., Lieu, Z. Z., Brown, D., Stow, J. L., Goud, B., and Gleeson, P. A. (2007) The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. *Traffic* **8**, 758-773
 32. Tai, G., Lu, L., Wang, T. L., Tang, B. L., Goud, B., Johannes, L., and Hong, W. (2004) Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* **15**, 4011-4022
 33. Amessou, M., Fradagrada, A., Falguières, T., Lord, J. M., Smith, D. C., Roberts, L. M., Lamaze, C., and Johannes, L. (2007) Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. *J Cell Sci* **120**, 1457-1468
 34. Uchida, Y., Hasegawa, J., Chinnapen, D., Inoue, T., Okazaki, S., Kato, R., Wakatsuki, S., Misaki, R., Koike, M., Uchiyama, Y., Iemura, S., Natsume,

- T., Kuwahara, R., Nakagawa, T., Nishikawa, K., Mukai, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Sheff, D., Lencer, W. I., Taguchi, T., and Arai, H. (2011) Intracellular phosphatidylserine is essential for retrograde membrane traffic through endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15846-15851
35. Matsudaira, T., Uchida, Y., Tanabe, K., Kon, S., Watanabe, T., Taguchi, T., and Arai, H. (2013) SMAP2 regulates retrograde transport from recycling endosomes to the Golgi. *PLoS One* **8**, e69145
 36. Teasdale, R. D., and Collins, B. M. (2012) Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochem J* **441**, 39-59
 37. Niu, Y., Zhang, C., Sun, Z., Hong, Z., Li, K., Sun, D., Yang, Y., Tian, C., Gong, W., and Liu, J. J. (2013) PtdIns(4)P regulates retromer-motor interaction to facilitate dynein-cargo dissociation at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **15**, 417-429
 38. van Weering, J. R., Verkade, P., and Cullen, P. J. (2010) SNX-BAR proteins in phosphoinositide-mediated, tubular-based endosomal sorting. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 371-380
 39. Lundmark, R., and Carlsson, S. R. (2009) SNX9 - a prelude to vesicle release. *J Cell Sci* **122**, 5-11
 40. Ghai, R., Bugarcic, A., Liu, H., Norwood, S. J., Skeldal, S., Coulson, E. J.,

- Li, S. S., Teasdale, R. D., and Collins, B. M. (2013) Structural basis for endosomal trafficking of diverse transmembrane cargos by PX-FERM proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E643-652
41. van Kerkhof, P., Lee, J., McCormick, L., Tetrault, E., Lu, W., Schoenfish, M., Oorschot, V., Strous, G. J., Klumperman, J., and Bu, G. (2005) Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome. *EMBO J* **24**, 2851-2861
42. Betts, G. N., van der Geer, P., and Komives, E. A. (2008) Structural and functional consequences of tyrosine phosphorylation in the LRP1 cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **283**, 15656-15664
43. Stockinger, W., Sailer, B., Strasser, V., Recheis, B., Fasching, D., Kahr, L., Schneider, W. J., and Nimpf, J. (2002) The PX-domain protein SNX17 interacts with members of the LDL receptor family and modulates endocytosis of the LDL receptor. *EMBO J* **21**, 4259-4267
44. Burden, J. J., Sun, X. M., García, A. B., and Soutar, A. K. (2004) Sorting motifs in the intracellular domain of the low density lipoprotein receptor interact with a novel domain of sorting nexin-17. *J Biol Chem* **279**, 16237-16245
45. Knauth, P., Schlüter, T., Czubayko, M., Kirsch, C., Florian, V., Schreckenberger, S., Hahn, H., and Bohnensack, R. (2005) Functions of

sorting nexin 17 domains and recognition motif for P-selectin trafficking.

J Mol Biol **347**, 813-825

46. Florian, V., Schlüter, T., and Bohnensack, R. (2001) A new member of the sorting nexin family interacts with the C-terminus of P-selectin. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 1045-1050
47. Williams, R., Schlüter, T., Roberts, M. S., Knauth, P., Bohnensack, R., and Cutler, D. F. (2004) Sorting nexin 17 accelerates internalization yet retards degradation of P-selectin. *Mol Biol Cell* **15**, 3095-3105
48. Lee, J., Retamal, C., Cuitiño, L., Caruano-Yzermans, A., Shin, J. E., van Kerkhof, P., Marzolo, M. P., and Bu, G. (2008) Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J Biol Chem* **283**, 11501-11508
49. Ghai, R., Tello-Lafoz, M., Norwood, S. J., Yang, Z., Clairfeuille, T., Teasdale, R. D., Mérida, I., and Collins, B. M. (2014) Phosphoinositide binding by the SNX27 FERM domain regulates localisation at the immune synapse of activated T-cells. *J Cell Sci*
50. Hoepfner, S., Severin, F., Cabezas, A., Habermann, B., Runge, A., Gillyooly, D., Stenmark, H., and Zerial, M. (2005) Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell* **121**, 437-450

51. Blatner, N. R., Wilson, M. I., Lei, C., Hong, W., Murray, D., Williams, R. L., and Cho, W. (2007) The structural basis of novel endosome anchoring activity of KIF16B kinesin. *EMBO J* **26**, 3709-3719
52. Seaman, M. N. (2012) The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci* **125**, 4693-4702
53. Utskarpen, A., Slagsvold, H. H., Dyve, A. B., Skånland, S. S., and Sandvig, K. (2007) SNX1 and SNX2 mediate retrograde transport of Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 566-570
54. Reitz, C. (2014) The role of the retromer complex in aging-related neurodegeneration: a molecular and genomic review. *Mol Genet Genomics*
55. Vilariño-Güell, C., Wider, C., Ross, O. A., Dachsel, J. C., Kachergus, J. M., Lincoln, S. J., Soto-Ortolaza, A. I., Cobb, S. A., Wilhoite, G. J., Bacon, J. A., Behrouz, B., Melrose, H. L., Hentati, E., Puschmann, A., Evans, D. M., Conibear, E., Wasserman, W. W., Aasly, J. O., Burkhard, P. R., Djaldetti, R., Ghika, J., Hentati, F., Krygowska-Wajs, A., Lynch, T., Melamed, E., Rajput, A., Rajput, A. H., Solida, A., Wu, R. M., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., Vingerhoets, F., and Farrer, M. J. (2011) VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **89**, 162-167
56. Zimprich, A., Benet-Pagès, A., Struhal, W., Graf, E., Eck, S. H., Offman,

- M. N., Haubenberger, D., Spielberger, S., Schulte, E. C., Lichtner, P., Rossle, S. C., Klopp, N., Wolf, E., Seppi, K., Pirker, W., Presslauer, S., Mollenhauer, B., Katzenschlager, R., Foki, T., Hotzy, C., Reinthaler, E., Harutyunyan, A., Kralovics, R., Peters, A., Zimprich, F., Brücke, T., Poewe, W., Auff, E., Trenkwalder, C., Rost, B., Ransmayr, G., Winkelmann, J., Meitinger, T., and Strom, T. M. (2011) A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* **89**, 168-175
57. Sheerin, U. M., Charlesworth, G., Bras, J., Guerreiro, R., Bhatia, K., Foltynie, T., Limousin, P., Silveira-Moriyama, L., Lees, A., and Wood, N. (2012) Screening for VPS35 mutations in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **33**, 838.e831-835
58. Lesage, S., Condroyer, C., Klebe, S., Honoré, A., Tison, F., Brefel-Courbon, C., Dürr, A., Brice, A., and Group, F. P. s. D. G. S. (2012) Identification of VPS35 mutations replicated in French families with Parkinson disease. *Neurology* **78**, 1449-1450
59. Kumar, K. R., Weissbach, A., Heldmann, M., Kasten, M., Tunc, S., Sue, C. M., Svetel, M., Kostić, V. S., Segura-Aguilar, J., Ramirez, A., Simon, D. K., Vieregge, P., Münte, T. F., Hagenah, J., Klein, C., and Lohmann, K. (2012) Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease.

60. Shannon, B., Soto-Ortolaza, A., Rayaprolu, S., Cannon, H. D., Labbé, C., Benitez, B. A., Choi, J., Lynch, T., Boczarska-Jedynak, M., Opala, G., Krygowska-Wajs, A., Barcikowska, M., Van Gerpen, J. A., Uitti, R. J., Springer, W., Cruchaga, C., Wszolek, Z. K., and Ross, O. A. (2014) Genetic variation of the retromer subunits VPS26A/B-VPS29 in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* **35**, 1958.e1951-1952
61. Vardarajan, B. N., Bruesegem, S. Y., Harbour, M. E., Inzelberg, R., Friedland, R., St George-Hyslop, P., Seaman, M. N., and Farrer, L. A. (2012) Identification of Alzheimer disease-associated variants in genes that regulate retromer function. *Neurobiol Aging* **33**, 2231.e2215-2231.e2230
62. Schwarz, D. G., Griffin, C. T., Schneider, E. A., Yee, D., and Magnuson, T. (2002) Genetic analysis of sorting nexins 1 and 2 reveals a redundant and essential function in mice. *Mol Biol Cell* **13**, 3588-3600
63. Steinberg, F., Gallon, M., Winfield, M., Thomas, E. C., Bell, A. J., Heesom, K. J., Tavaré, J. M., and Cullen, P. J. (2013) A global analysis of SNX27-retromer assembly and cargo specificity reveals a function in glucose and metal ion transport. *Nat Cell Biol* **15**, 461-471
64. Hayashi, H., Naoi, S., Nakagawa, T., Nishikawa, T., Fukuda, H., Imajoh-

- Ohmi, S., Kondo, A., Kubo, K., Yabuki, T., Hattori, A., Hirouchi, M., and Sugiyama, Y. (2012) Sorting nexin 27 interacts with multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) and mediates internalization of MRP4. *J Biol Chem* **287**, 15054-15065
65. Lunn, M. L., Nassirpour, R., Arrabit, C., Tan, J., McLeod, I., Arias, C. M., Sawchenko, P. E., Yates, J. R., and Slesinger, P. A. (2007) A unique sorting nexin regulates trafficking of potassium channels via a PDZ domain interaction. *Nat Neurosci* **10**, 1249-1259
66. Balana, B., Maslennikov, I., Kwiatkowski, W., Stern, K. M., Bahima, L., Choe, S., and Slesinger, P. A. (2011) Mechanism underlying selective regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channels by the psychostimulant-sensitive sorting nexin 27. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5831-5836
67. Kajii, Y., Muraoka, S., Hiraoka, S., Fujiyama, K., Umino, A., and Nishikawa, T. (2003) A developmentally regulated and psychostimulant-inducible novel rat gene mrt1 encoding PDZ-PX proteins isolated in the neocortex. *Mol Psychiatry* **8**, 434-444
68. Joubert, L., Hanson, B., Barthet, G., Sebben, M., Claeysen, S., Hong, W., Marin, P., Dumuis, A., and Bockaert, J. (2004) New sorting nexin (SNX27) and NHERF specifically interact with the 5-HT4a receptor splice variant:

- roles in receptor targeting. *J Cell Sci* **117**, 5367-5379
69. Cai, L., Loo, L. S., Atlashkin, V., Hanson, B. J., and Hong, W. (2011) Deficiency of sorting nexin 27 (SNX27) leads to growth retardation and elevated levels of N-methyl-D-aspartate receptor 2C (NR2C). *Mol Cell Biol* **31**, 1734-1747
 70. Rincón, E., Santos, T., Avila-Flores, A., Albar, J. P., Lalioti, V., Lei, C., Hong, W., and Mérida, I. (2007) Proteomics identification of sorting nexin 27 as a diacylglycerol kinase zeta-associated protein: new diacylglycerol kinase roles in endocytic recycling. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1073-1087
 71. Wang, X., Zhao, Y., Zhang, X., Badie, H., Zhou, Y., Mu, Y., Loo, L. S., Cai, L., Thompson, R. C., Yang, B., Chen, Y., Johnson, P. F., Wu, C., Bu, G., Mobley, W. C., Zhang, D., Gage, F. H., Ranscht, B., Zhang, Y. W., Lipton, S. A., Hong, W., and Xu, H. (2013) Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. *Nat Med* **19**, 473-480
 72. Lauffer, B. E., Melero, C., Temkin, P., Lei, C., Hong, W., Kortemme, T., and von Zastrow, M. (2010) SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane. *J Cell Biol* **190**, 565-574
 73. Loo, L. S., Tang, N., Al-Haddawi, M., Dawe, G. S., and Hong, W. (2014) A role for sorting nexin 27 in AMPA receptor trafficking. *Nat Commun* **5**,

74. Hussain, N. K., Diering, G. H., Sole, J., Anggono, V., and Huganir, R. L. (2014) Sorting Nexin 27 regulates basal and activity-dependent trafficking of AMPARs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 11840-11845
75. Toda, and Toshifusa. (2004) リン酸化タンパク質のプロテオーム解析. *Molecular Medicine* **41**, 530~537
76. Faust, M., and Montenarh, M. (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* **301**, 329-340
77. Bujny, M. V., Popoff, V., Johannes, L., and Cullen, P. J. (2007) The retromer component sorting nexin-1 is required for efficient retrograde transport of Shiga toxin from early endosome to the trans Golgi network. *J Cell Sci* **120**, 2010-2021
78. Taguchi, and Tomohiko. (2013) A new aspect of membrane traffic through recycling endosomes. in 領域融合レビュー
79. McGough, I. J., Steinberg, F., Gallon, M., Yatsu, A., Ohbayashi, N., Heesom, K. J., Fukuda, M., and Cullen, P. J. (2014) Identification of molecular heterogeneity in SNX27-retromer-mediated endosome-to-plasma-membrane recycling. *J Cell Sci* **127**, 4940-4953