

ユビキチンリガーゼ^{RF}FLによるエンドソーム機能制御機構の解明

著者	酒井 了平
学位名	博士（理学）
学位授与機関	関西学院大学
学位授与番号	34504甲第692号
URL	http://hdl.handle.net/10236/00028258

関西学院大学学位論文

ユビキチンリガーゼ RFFL による
エンドソーム機能制御機構の解明

2019

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻

酒井 了平

略語表

本論文では以下の略語を使用する.

CME: clathrin-mediated endocytosis (クラスリン依存的エンドサイトーシス)
CIE: clathrin-independent endocytosis (クラスリン非依存的エンドサイトーシス)
EE: early endosome (初期エンドソーム)
LE: late endosome (後期エンドソーム)
LY: lysosomes (リソソーム)
TGN: trans-Golgi network (トランスゴルジネットワーク)
RE: recycling endosome (リサイクリングエンドソーム)
PM: plasma membrane (形質膜)
ERC: endocytic recycling compartment
MVBS: multivesicular bodies (多胞体)
ILVs: intraluminal vesicles (腔内膜小胞)
EHDs: eps15 homology domain containing proteins
Rab11-FIPs: Rab11-family interacting proteins
Arf6: ADP-ribosylation factor 6
SNX4: sorting nexin 4
MICALL1: MICAL-like protein1
Ub : ubiquitin (ユビキチン)
Eps15: epidermal growth factor receptor substrate 15
ESCRT: endosomal sorting complex required for transport
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor (上皮成長因子受容体)
UBD: ubiquitin-binding domains
EEA1: Early endosome antigen 1
Hrs: hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate
v-SNARE: vesicular-soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment
protein receptor
Snc1: SNAP receptor SNC1
COPI: coat protein I
WASH: Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homolog complex
CF: Cystic fibrosis (嚢胞性線維症)

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
ΔF508: delta F508
ERQC: ER quality control (小胞体品質管理機構)
ERAD: ER associated degradation (小胞体関連分解)
PMQC: plasma membrane quality control (形質膜品質管理機構)
CFBE: human CF bronchial epithelial cell (CF患者由来ヒト気道上皮細胞株)
RFFL: ring finger and FYVE like domain containing E3 ubiquitin protein ligase
DN: dominant-negative
BioID: Proximity dependent biotin identification
WT: wild type
GFP: green fluorescent protein
PCC: Pearson Correlation Coefficient
Lamp1: lysosomal associated membrane protein 1
GM130: Golgi matrix protein 130 kD
CI-M6PR: cation-independent mannose 6-phosphate receptor (マンノース-6-リン酸受容体)
TEM: Transmission Electron Microscope (透過型電子顕微鏡)
SEM: Scanning Electron Microscope (走査型電子顕微鏡)
MCC: Mander's correlation coefficient
TfR: transferrin receptor (トランスフェリン受容体)
NT: Non-transfected
GPI: glycosylphosphatidylinositol
NA: NeutrAvidin
CID: chemical-induced protein dimerization assay
MB: Myc-Biotin
HB: histidine-biotin
GST: glutathione-S-transferase
LC-MS/MS : liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
KO: knockout
KD: knockdown
MYO1B: myosin IB
MYO6: myosin VI
MYO1E: myosin IE

KIF5B: kinesin family member 5B
KIF16B: kinesin family member 16B
RNF34: ring finger protein 34 (known as CARP1: caspases-8/10 associated RING proteins 1)
XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis
SH3RF1: SH3 domain containing ring finger 1 (known as POSH: Plenty of SH3s)
DTX3L: deltex E3 ubiquitin ligase 3L
DUB: Deubiquitinating enzymes (脱ユビキチン化酵素)
VCPIP1: valosin containing protein interacting protein 1 (kown as VCIP135)
USP15: ubiquitin specific peptidase 15
USP43: ubiquitin specific peptidase 43
SQSTM1: sequestosome 1
FBS: Fetal bovine serum
DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium
MEM: minimum essential medium
PEI: Polyethylenimine
PBS (-): Ca^{2+} , Mg^{2+} free Phosphate Buffered Saline
PBS: Phosphate Buffered Saline
BSA: Bovine serum albumin
BCA 法: bicinchoninic acid assay
SDS: Sodium dodecyl sulfate
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
HRP: Horseradish peroxidase
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
gRNA: guide RNA
PCR: Polymerase Chain Reaction
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

目次

第 1 章	緒論.....	1
第 2 章	RFFL 変異体を用いた機能解析.....	9
第 1 節	本章の目的.....	9
第 2 節	RFFL 細胞内局在解析.....	9
第 3 章	RFFL-DN 変異体がエンドソーム機能に及ぼす影響.....	11
第 1 節	本章の目的.....	11
第 2 節	RFFL-DN 変異体がエンドソームにおよぼす影響.....	11
第 1 項	RFFL-DN 変異体細胞内局在解析.....	11
第 2 項	RFFL-DN 変異体がエンドソーム形態におよぼす影響.....	16
第 3 節	RFFL-DN 変異体が RE 機能におよぼす影響.....	18
第 1 項	RFFL-DN 変異体が EE から RE への分離におよぼす影響.....	18
第 2 項	RFFL-DN 変異体が積荷輸送に及ぼす影響.....	20
第 4 章	クラスター化 ERC 形成の分子メカニズムの解明.....	26
第 1 節	本章の目的.....	26
第 2 節	BioID 法を用いた RFFL 結合因子網羅的解析.....	26
第 3 節	RFFL 結合因子によるクラスター化 ERC 形成機構の解析.....	29
第 5 章	RFFL による Rab11-effector Ub 制御機構の検討.....	38
第 1 節	本章の目的.....	38
第 2 節	<i>In cell</i> における RFFL による Rab11-effector の Ub 化の検証. 38	
第 1 項	RFFL が Rab11-effector の Ub 化におよぼす影響.....	38
第 2 項	Rab11-effector の Ub 化における RFFL の生理的機能.....	40
第 3 項	TfR リサイクリングにおける Rab11-effector の Ub 化の生理的機能..	40
第 3 節	<i>In vitro</i> における RFFL による Rab11-effector の Ub 化の検証	43
第 6 章	考察.....	46
第 1 節	RFFL-DN 変異体におけるクラスター化 ERC 形成分子機構.....	46
第 2 節	RFFL-DN 変異体における積荷リサイクリング制御.....	47
第 3 節	RFFL-DN 変異体における EE から RE への分離制御.....	48
第 4 節	RFFL を含む E3-ligase による Rab11-effecor の Ub 化制御...	49

第 5 節	Rab11-effector Ub 化によるリサイクリング制御	49
第 6 節	Rab11-effector Ub 化制御機構の今後の発展	50
第 7 章	総括	51
第 8 章	実験の部	53
第 1 節	実験材料	53
第 2 節	実験方法	57
第 1 項	細胞培養法	57
第 2 項	遺伝子導入法	57
第 3 項	免疫蛍光染色法	58
第 4 項	Transferrin uptake assay	59
第 5 項	Time-lapse imaging of TfR recycling	59
第 6 項	CFTR uptake assay	60
第 7 項	CD59 uptake assay	60
第 8 項	Dextran uptake assay	60
第 9 項	EGF uptake assay	61
第 10 項	Pull-down assay	61
第 11 項	Western blotting	61
第 12 項	<i>In cell</i> Ubiquitin assay	62
第 13 項	CID assay	63
第 14 項	Cellular localization analysis of biotinylated proteins	63
第 15 項	BioID assay	63
第 16 項	Silver stain	64
第 17 項	Establishment of RFFL KO cells by CRISPR/CAS9 system	64
第 18 項	TfR recycling assay	65
第 19 項	Protein purification	65
第 20 項	<i>In vitro</i> ubiquitination assay	65
第 21 項	Statistical analysis	67
第 22 項	Transmission electron microscopy (TEM)	67
第 23 項	Scanning electron microscopy (SEM)	67
第 24 項	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	67
謝辞	68

参考文献.....70

第1章 緒論

エンドサイトーシスは細胞外物質の細胞内への取り込みや、シグナル受容体などの膜タンパク質のダウンレギュレーションを介して、細胞接着、細胞遊走、細胞極性およびシグナル伝達など、多様な細胞プロセスを調節し、細胞恒常性の維持に必須の役割を果たす^{1,2}。エンドサイトーシスには、クラスリン依存的エンドサイトーシス (clathrin-mediated endocytosis: CME) とクラスリン非依存的エンドサイトーシス (clathrin-independent endocytosis: CIE) の2つの異なる様式が存在するが、エンドサイトーシスされた小胞は、その様式にかかわらず、まず初期エンドソーム (early endosome: EE) へと運ばれる³ (Fig. 1-①)。その後、小胞内の積荷は、EE から後期エンドソーム (late endosomes: LE) を経てリソソーム (lysosomes: LY) へと輸送されるとリソソーム分解を受ける (リソソーム分解経路) (Fig. 1-②)³。一方、EE からトランスゴルジネットワーク (trans-Golgi network: TGN) やリサイクリングエンドソーム (recycling endosome: RE) へと輸送されると、再び形質膜 (plasma membrane: PM) へと戻りリサイクリングされる (リサイクリング経路) (Fig. 1-③)^{4,5}。リサイクリング経路の利点は、PM からエンドサイトーシスした積荷を分解することなく再び PM へと輸送することで、積荷の再合成をしないで済む点にある。EE から PM へと積荷をリサイクルする経路は2つあり、EE から直接 PM へと戻る経路 (fast recycling pathways) (Fig. 1-④) と、核近傍に局在化する ERC (endocytic recycling compartment) を経由して PM へと戻る経路 (slow recycling pathways) (Fig. 1-⑤) が知られている⁶。

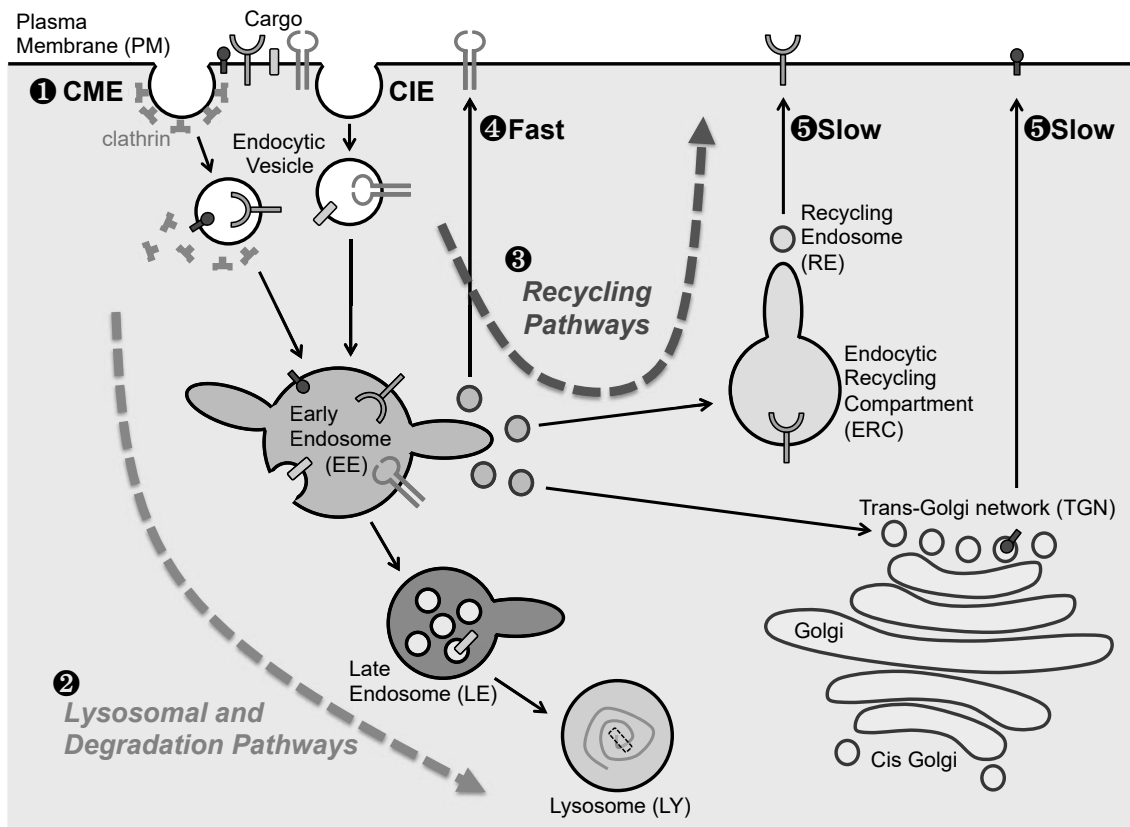


Figure 1. The endosome/lysosome pathway

- ① Endocytosed cargo is usually delivered to the EE that receives incoming material from primary vesicles generated by CME and CIE.
- ② Cargoes are delivered from the EE to the LE and LY for lysosomal degradation.
- ③ Cargoes are delivered from the EE to the TGN or to RE that brings the cargo back to the PM.
- ④ Sorting of membrane proteins from EE leads to the entry of cargoes into fast recycling pathways.
- ⑤ Cargoes are trafficked via slow recycling pathway, which involves traffic through a juxtannuclear endocytic recycling compartment (ERC) and then via the RE before return to the PM.

Slow recycling pathway において, ERC は EE 成熟化に伴ってチューブ状の膜が伸長し形成され, その残りが LE および多胞体 (multivesicular bodies: MVBs) へと移行していく (Fig. 2)². EE から LE へのエンドソーム成熟化は small GTPase である Rab5 から Rab7 への変化 (Rab5-Rab7 switch) とエンドソームの酸性化により起こり, このエンドソーム成熟化と共に積荷タンパク質は EE から LY へ輸送される (Fig. 2)³. エンドソーム成熟化により, EE の膜上に局在化する膜タンパク質が EE 内へと内腔化され, 腔内膜小胞 (intraluminal vesicles: ILVs) が形成され, MVBs が生成される (Fig. 2)³. Small GTPase である Rab11 は ERC のマーカーであり⁷, Rab5 陽性の EE から Rab11 陽性の ERC への移行 (成熟化) は複雑で, ATPase ファミリータンパク質である eps15 homology domain containing proteins (EHDs), Rab11 エフェクター因子である Rab11-family interacting proteins (Rab11-FIPs), 低分子量 G タンパク質である ADP-ribosylation factor 6 (Arf6), Sorting Nexin ファミリータンパク質である Sorting Nexin 4 (SNX4), モータータンパク質である Dynein, Rab ファミリー低分子量タンパク質 Rab10, Rab22A によって制御されている (Fig. 2)^{2,8}. また, ERC から PM への輸送は, Arf6 依存的に形成されたチューブ状の RE² や EHD1 依存的に形成されたチューブ状の RE⁸ など複数の経路が存在する (Fig. 2). さらに, slow recycling pathway における RE の輸送は, RE に局在化する Rab11 とモータータンパク質を Rab11-FIPs が媒介することで制御している (Fig. 2)⁹. MICAL-like protein1 (MICALL1) 依存的に RE に局在化した EHD1 もまた Rab11-FIP2 と相互作用することから, RE 機能は MICALL1, EHDs, Rab11-FIPs の協調的な働きによって制御されていると考えられている (Fig. 2)⁸.

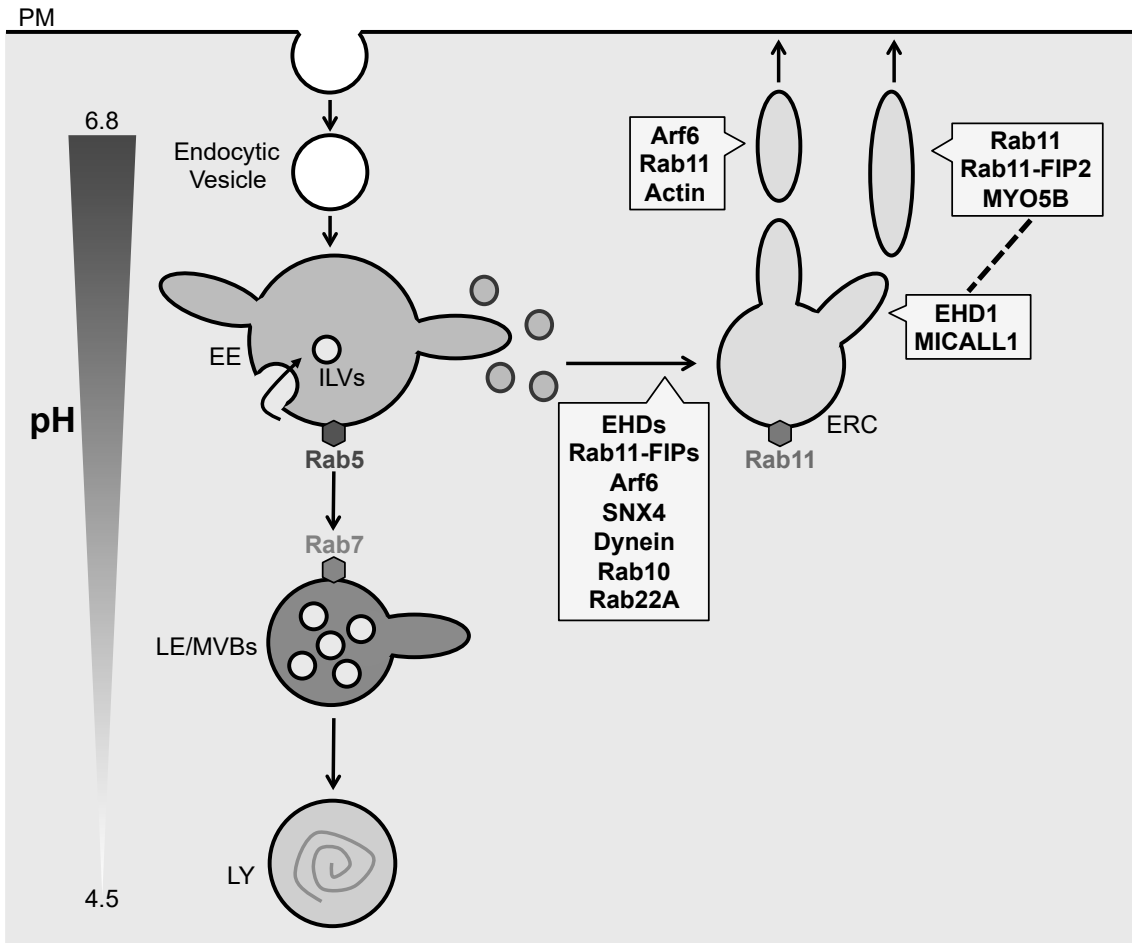


Figure 2. Molecular mechanisms of the endosome/lysosome pathway

ユビキチン (Ubiquitin: Ub) は積荷のエンドサイトーシス, エンドソーム選別機構を制御する重要な因子である¹⁰⁻¹². 積荷の Ub 化は Epsin および Epidermal growth factor receptor substrate 15 (Eps15) によるエンドサイトーシス¹⁰ や endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) 複合体による MVBs への内腔化を誘導する (Fig. 3-①)¹³⁻¹⁵. さらに, エンドソーム輸送もまたエンドソーム関連因子の Ub 化により制御されている. 例えば, Eps15 の Mono-Ub 化は Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の細胞内移行やリソソーム輸送を制御しており^{16,17}, Eps15 に結合した Mono-Ub と自身の UBD (ubiquitin-binding domains) が結合することで Auto-inhibition 型となり Eps15-UBD と Ub 化を受けた積荷との結合阻害を引き起こすなど¹⁸ エンドソーム成熟化に必須である¹⁷. また, EE の融合やエンドソーム成熟化においてテザリング因子として機能する Early endosome antigen 1 (EEA1) の Mono-Ub 化もその機能に必須である¹⁹. さらに, ESCRT タンパク質である Hrs (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) が MVBs へ積荷を内腔化する際, その機能は Ub 化によって誘導される^{18, 20}. これまで Ub は EE から LY へのエンドソーム成熟化機構に関与することが数多く報告されてきた. しかし近年, 酵母の v-SNARE (vesicular-soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein receptor) である Snc1 (SNAP receptor SNC1) の Ub 化が, ゴルジ体周辺に存在する小胞の被覆タンパク質 COPI (coat protein I) との結合を制御するといった報告や²¹, EE からゴルジ体への逆行性輸送経路の 1 つであるレトロマー依存的輸送経路において, エンドソームに局在化する F-actin の重合核形成を制御する WASH (Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homolog complex) の構造変化が K63 型 Ub 鎖によって制御されているといった報告がなされ (Fig. 3-②)^{22,23}, Ub の積荷リサイクリングシグナルとしての機能が示された. しかし, Rab11-effector による ERC を介したリサイクリング機能制御機構における, Ub の関与は全く知られていない.

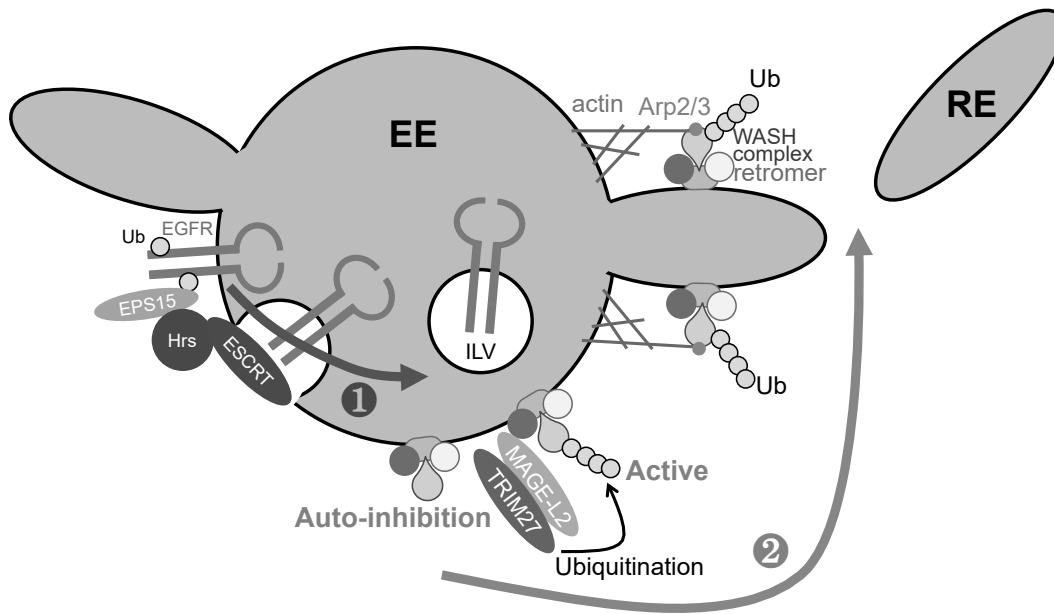


Figure 3. Role of Ub in endosomal sorting

- ① Ubiquitination of cargo stimulates the lysosomal degradation by ESCRT complex.
- ② Reversible poly-ubiquitination of WASH, an actin-nucleating protein essential for recycling, promotes endosomal protein recycling.

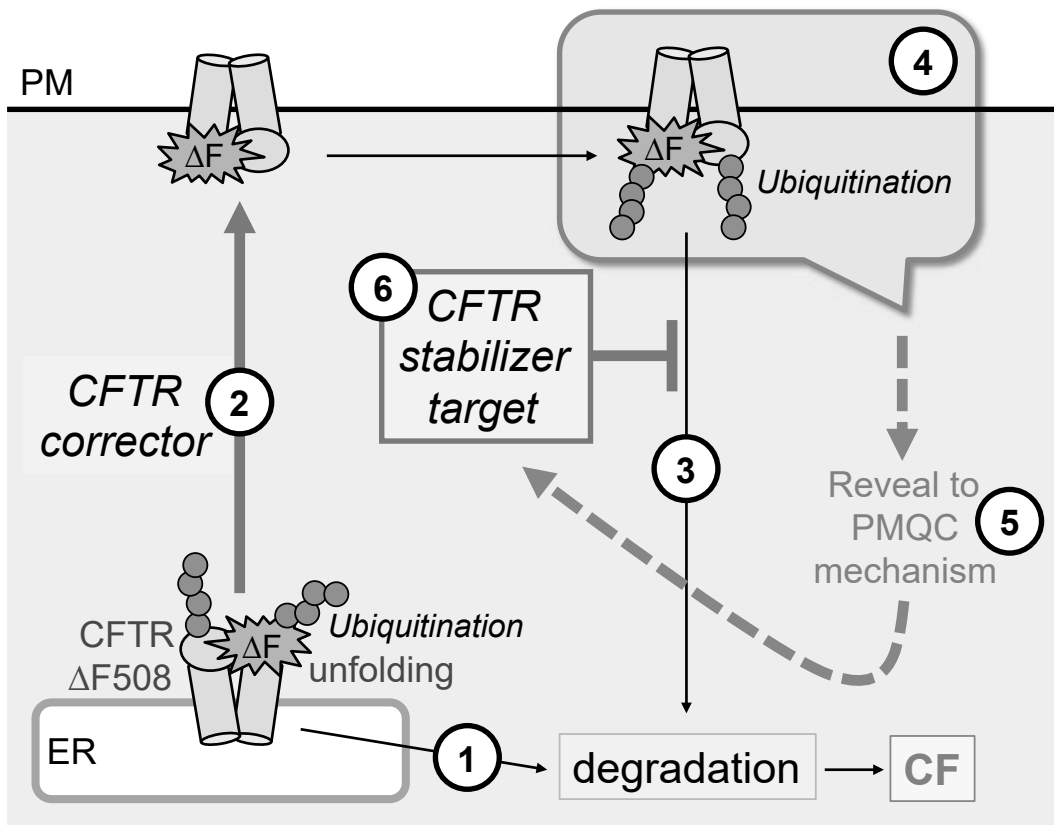


Figure 4. Degradation mechanism of $\Delta F508$ -CFTR

嚢胞性線維症（CF : Cystic fibrosis）は白色人種間で最も頻度が高い常染色体劣性遺伝性疾患である^{24,25}。症状として呼吸器感染症・消化器閉塞が主に挙げられ、その治療法としては抗生物質・気管支拡張薬などの対症療法はあるが、高投与量が必要であり、緑膿菌などの多剤耐性が問題となっているため、根本治療薬の開発が望まれている^{26,27}。本疾患の原因は、細胞の形質膜で塩素イオンチャネルとして働く CFTR（Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator）の機能異常であることが知られている²⁸。通常、CFTR は小胞体でフォールディングされ形質膜へと運ばれ、その機能を発揮する²⁹。しかし、CF 患者においては CFTR が遺伝子変異（90%以上は $\Delta F508$ 変異）による構造異常から小胞体品質管理機構（ERQC: ER quality control）により、分解シグナルである Ub 化を受け、プロテアソームを介した小胞体関連分解（ERAD : ER associated degradation）に送られる（Fig. 4-①）³⁰。そのため CFTR が細胞形質膜上に発現せず発病に至る。また、近年 CF の治療薬として開発されている CFTR コレクターは、部分的に $\Delta F508$ -CFTR 変異体の細胞膜上の発現量を改善するが（Fig. 4-②）³¹、コレクターによる形質膜に送られた $\Delta F508$ -CFTR は形質膜品質管理機構（PMQC: plasma membrane quality control）により Ub 化を受け、速やかにリソソーム分解されるため（Fig. 4-③）、治療効果は弱く、十分な臨床効果は得られていない³²。また、 $\Delta F508$ -CFTR 変異体の細胞膜上からの分解機構は未だ不明な部分が多く、有効な CF 薬物療法開発の大きな障壁となっている（Fig. 4-④）³³。そこで先行研究において、嚢胞性線維症の新規治療法の開発を究極の目的とし、 $\Delta F508$ -CFTR 変異体の PMQC による分解機構の解明（Fig. 4-⑤）および新規治療薬ターゲットの探索が行われた（Fig. 4-⑥）³⁴。形質膜上での $\Delta F508$ -CFTR 変異体の分解を阻害する新薬を開発できれば、CFTR コレクターとの薬物併用療法による治療が可能である³⁴。そのため、まず初めに、PMQC における Ub 化機構の全貌解明を目指し、CF 患者由来ヒト気道上皮細胞株（CFBE: human CF bronchial epithelial cell line）を用いた siRNA 網羅的スクリーニング（E3 ligase: 636 種類）が行われた³⁴。その結果、 $\Delta F508$ -CFTR 変異体の形質膜発現を抑制するエンドソーム局在ユビキチンリガーゼ RFFL (ring finger and FYVE like domain containing E3 ubiquitin protein ligase) が同定された³⁴。そこで、RFFL の機能解明が行われ、RFFL は形質膜やエンドソームに局在する $\Delta F508$ -CFTR 変異体を選択的に Ub 化することが明らかとなり、既存薬との相乗作用を期待できる PMQC を標的とした CF 薬物治療法の開発に貢献する知見を得た³⁴。

そこで、本研究ではエンドソームにおける RFFL のさらなる機能解析を目的とし、種々の検討を行った。まず、第 2 章では RFFL の局在化ドメイン及び RING (Ub 活性) ドメインに変異を導入し局在解析を行った。その結果、RFFL Ub ligase 不活性化変異体である dominant-negative (DN) 変異体は、エンドソーム形態異常を引き起こした。そこで、第 3 章では RFFL DN 変異体がエンドソーム機能におよぼす影響の検討を行った。また、第 4 章では Proximity dependent biotin identification (BioID) 法を用いた RFFL 結合因子網羅的解析を行い、クラスター化 ERC 形成の分子メカニズム解明を試みた。最後に、第 5 章では同定した RFFL 結合因子の RFFL による Ub 制御機構について検討を行った。

以下、各章で得られた知見を詳述する。

第2章 RFFL 変異体を用いた機能解析

第1節 本章の目的

RFFL は PM およびエンドソームに局在し、構造異常膜タンパク質である Δ F508-CFTR を Ub 化することで、リソソーム分解経路への輸送を促進する³⁴. そこで、RFFL の局在化ドメイン及び Ub 活性化ドメインの変異体を用い、RFFL のさらなる機能解析を行った.

第2節 RFFL 細胞内局在解析

RFFL は N 末端にパルミトイル化サイト (C5, C6, C10) を介してエンドソームに局在し、C 末端の RING ドメインにより Ub 化を行っている (Fig. 5A)³⁴. そこで、GFP (green fluorescent protein) tag 融合 RFFL 各種変異体発現プラスミドを構築し、HeLa 細胞にリポフェクション法により一過性に発現させ、その細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した. RFFL-WT (wild type) -GFP はエンドソームに局在化したのに対して、局在化に必須な N 末端を欠損した変異体 (Δ 2-88, Δ 2-10) は細胞質に局在化した (Fig. 5B). 一方、RING ドメイン欠損 (Δ RING) は局在に影響しなかった (Fig. 5B). 興味深いことに、RING ドメインの活性中心に点変異を導入した RFFL-DN 変異体 (H333A, 2CA) は局在が一箇所集積することがわかった (Fig. 5B). そこで、RFFL-DN 変異体の N 末端欠損変異体 (C5610A-2CA, Δ 2-88-2CA, Δ 2-10-2CA) の局在を解析すると一箇所集積することなく細胞質に局在化した (Fig. 5B). 従って、RFFL はエンドソームにおいて Ub 活性を欠失すると、エンドソーム形態異常を引き起こすことが考えられた.

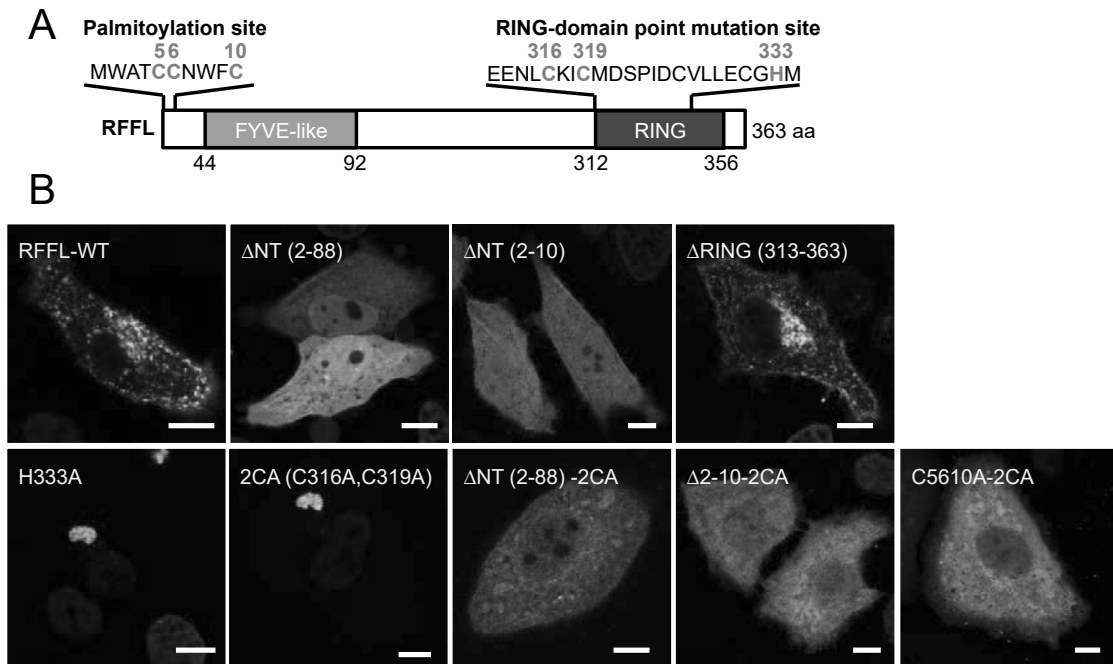


Figure 5. RFFL catalytic inactive mutants induce condensed endosomes.

(A) Predicted function of RFFL domains. (B) Fluorescence micrographs of HeLa Δ F508-CFTR-3HA cells expressing RFFL-GFP variants.

第3章 RFFL-DN 変異体がエンドソーム機能に及ぼす影響

第1節 本章の目的

第2章において、RFFL DN 変異体は、エンドソーム形態異常を引き起こすことを発見した。従って、RFFL は Ub 活性依存的にエンドソーム機能制御を行っていると考えられた。そこで RFFL DN 変異体によって形成されるエンドソーム形態異常が、どのエンドソーム区画で引き起こされるのか、エンドソーム機能である積荷輸送へ影響を及ぼすのか検討した。

第2節 RFFL-DN 変異体がエンドソームにおよぼす影響

第1項 RFFL-DN 変異体細胞内局在解析

RFFL-DN 変異体がどのエンドソーム区画に影響を及ぼすかを検討するため、蛍光タンパク質融合オルガネラマーカートを co-transfection し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて共局在解析を行った。PCC (Pearson Correlation Coefficient) 解析及び HyVolution (Leica) による超解像イメージングを用いた Line scan 解析により RFFL-WT は EE マーカーである Rab5 (PCC: 0.438) や EEA1 (PCC: 0.304), LE マーカーである Rab7 (PCC: 0.467) や Lamp1 (lysosomal associated membrane protein 1) (PCC: 0.442) と部分的に共局在することがわかった (Fig. 6A and B)。また、RE マーカーである Rab11 (PCC: 0.813) とは大部分が共局在した (Fig. 6A)。一方、RFFL-DN 変異体は Rab5 (PCC: 0.568), EEA1 (PCC: 0.758), Rab7 (PCC: 0.661), Lamp1 (PCC: 0.457), Rab11 (PCC: 0.946), trans-Golgi マーカーである TGN46 (PCC: 0.567) を核近傍へと集積させた (Fig. 6A and B)。ER マーカーである Sec61 (PCC: -0.228) や、LE から TGN へ輸送されるマンノース-6-リン酸受容体 (CI-M6PR: cation-independent mannose 6-phosphate receptor) (PCC: 0.156), cis-Golgi マーカーである GM130 (Golgi matrix protein 130 kD) (PCC: -0.104) には影響をおよぼさなかった (Fig. 6B)。HyVolution (Leica) による超解像イメージングを用いた Line scan 解析により詳細に解析した結果、RFFL-DN 変異体は、Rab5, EEA1, Rab7, Lamp1, TGN46 とは部分的に共局在しており、Rab11 とはほぼ完全に共局在した (Fig. 6A and B)。また、免疫蛍光染色法を用いて内在性

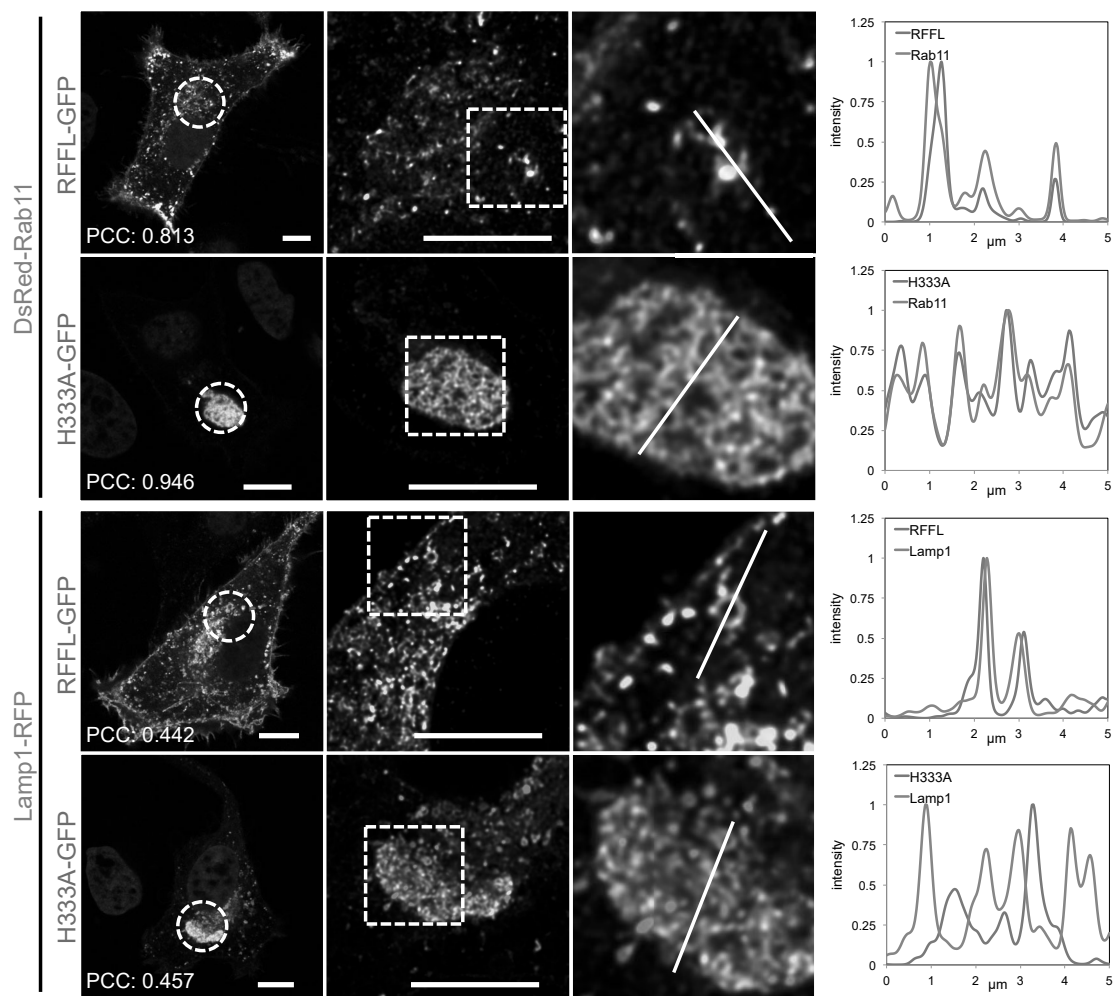


Figure 6. RFFL catalytic inactive mutants are localized to recycling endosomes.
 (-continued)

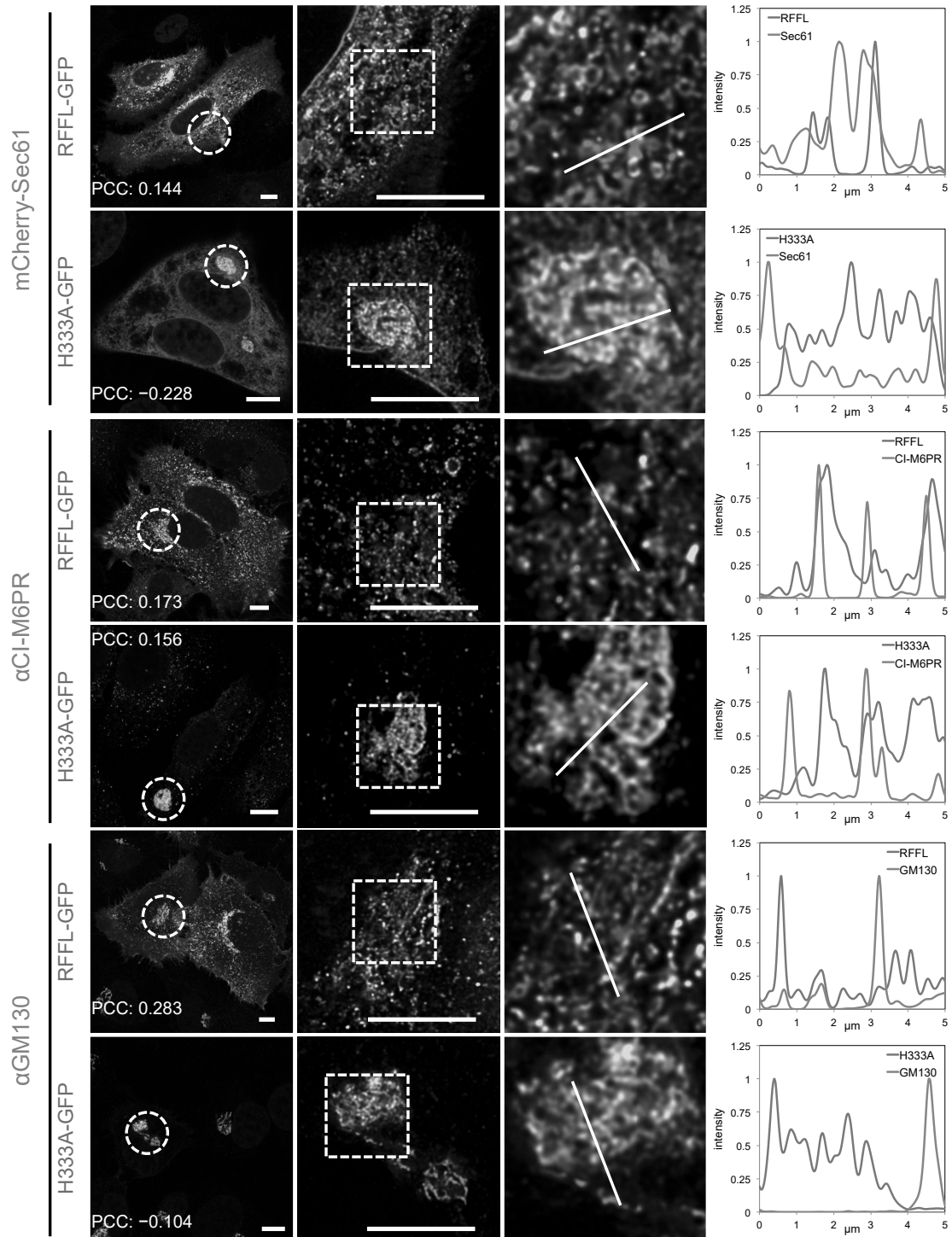


Figure 6. RFFL catalytic inactive mutants are localized to recycling endosomes.

(A) Cellular localization of RFFL-GFP and RFFL-H333A-GFP in HeLa-ΔF508 CFTR-3HA cells was analyzed with the co-transfected organelle markers indicated. Circled regions were further deconvoluted (Hyvolution). Boxed regions are enlarged (Zoom). Line scans show profiles of fluorescence intensity against line distance. Bars, 10 μm. The nucleus was stained by DAPI. Colocalization of RFFL variants

and organelle markers was measured by Pearson's correlation coefficient (PCC). (B) Cellular localization of RFFL-GFP and RFFL-H333A-GFP in HeLa Δ F508-CFTR-3HA cells was analyzed with organelle markers indicated. Circled regions were further deconvoluted (HyVolution). Boxed regions are enlarged (Zoom). Line scans show profiles of fluorescence intensity against line distance. Bars, 10 μ m. The nucleus was stained by DAPI. Colocalization of RFFL variants and organelle markers was measured by PCC.

第2項 RFFL-DN 変異体がエンドソーム形態におよぼす影響

HyVolution 解析によって RFFL-DN 変異体によって形成された RE 異常構造体がチューブ状のオルガネラであることが示唆された (Fig. 7A). そこで、さらなる微細構造を調べるために、透過型電子顕微鏡 (TEM: Transmission Electron Microscope) を用い RE 異常構造体を観察した. RFFL-H333A を過剰発現した細胞において、核近傍にチューブ状の小胞の集積が観察された (Fig. 7B-E). また、その集積したチューブ状小胞の周りには、電子密度の高い LY が局在化しており、Lamp1 の免疫蛍光染色法と同様の結果が得られた (Fig. 7B-E, Fig. 6B). チューブ状小胞の直径は \sim 70 nm であり、リサイクリングエンドソームの一般的な直径 (50 \sim 70 nm) と合致していた³⁵. 従って、RFFL-DN 変異体によって形成されるエンドソーム形態異常はクラスター化した ERC であると考えられる. また、HyVolution 解析と同様にクラスター化した ERC に 100 \sim 300 nm の EE³⁵ が混在することも観察された (Fig. 7E, arrow) .

さらに走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) によってクラスター化した ERC の三次元超微細構造を観察した. TEM と同様に、チューブ状小胞のクラスター化が核近傍で確認され、その周りには LY も局在化していた (Fig. 7F-H). SEM による解析によって、この構造体は、連続したチューブ状で網状のオルガネラではなく、チューブ状の小胞がクラスター化していることがわかった (Fig. 7G and H).

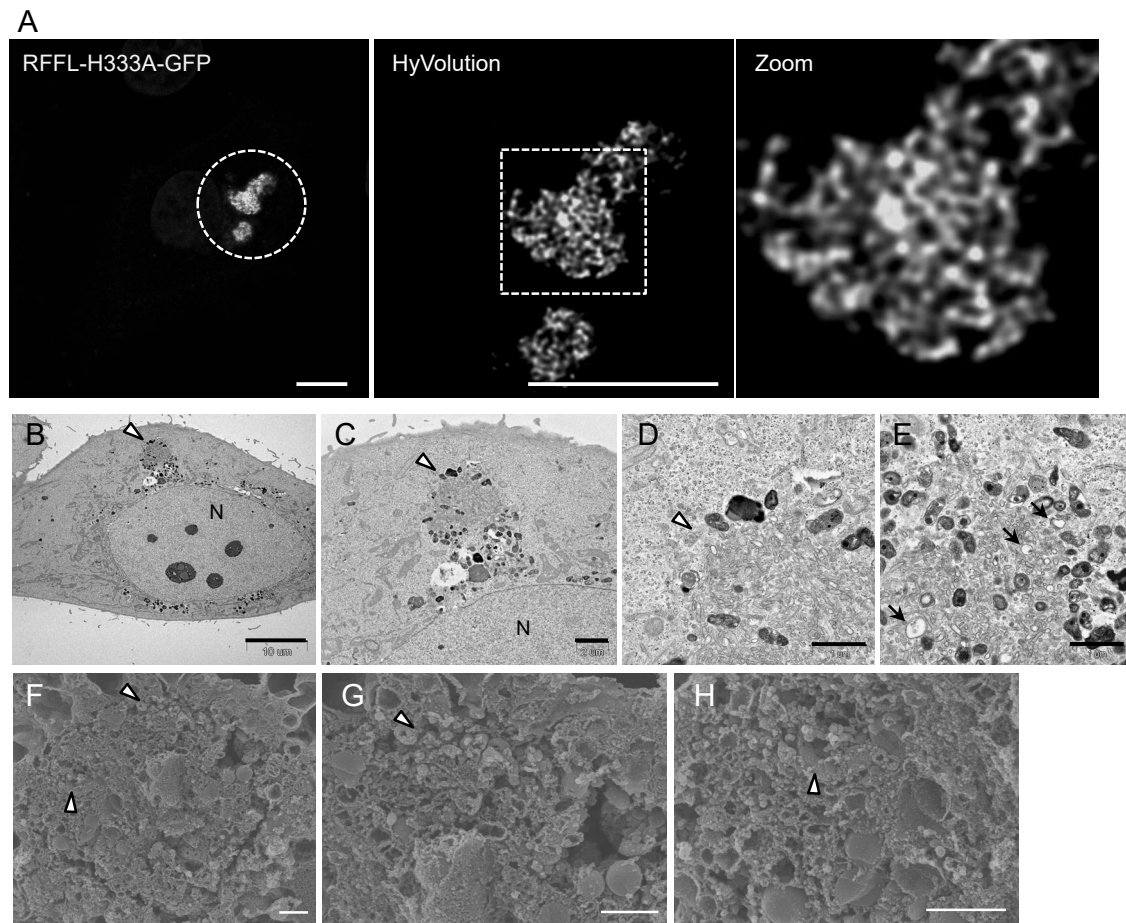


Figure 7. Ultrastructure of RFFL-H333A induced condensed recycling endosomes.

(A) Super-resolution confocal micrograph (HyVolution) of the condensed tubular structures induced by RFFL-H333A-GFP in HeLa Δ F508-CFTR-3HA cells. Circled regions were further deconvoluted (HyVolution). Boxed regions are enlarged (Zoom). Bars, 10 μ m. (B-E) Transmission electron microscopy of HeLa Δ F508-CFTR-3HA cells transfected with RFFL-H333A-GFP. Higher magnification views of the section are shown (C-E). Arrow and arrowhead show EE and the clustered ERC, respectively. N, nucleus. Bars, 10 μ m (B), 2 μ m (C), 1 μ m (D, E). (F-H) Scanning electron microscopy of HeLa Δ F508-CFTR-3HA cells transfected with RFFL-H333A-GFP. Clusters of ERC (blue, arrowhead) are observed around the nucleus (red). Lysosomes (yellow) are located around the clustered ERC in the cytoplasm (purple). Higher magnification views of the section are shown (G-H). Bars, 1 μ m.

第3節 RFFL-DN 変異体が RE 機能におよぼす影響

第1項 RFFL-DN 変異体が EE から RE への分離におよぼす影響

RFFL-DN 変異体がエンドソーム形態だけではなく、エンドソーム機能に影響を及ぼすか検討した。エンドソームの機能は Rab タンパク質により調節されている³⁶。エンドソーム成熟化において、EE に局在化する Rab5 が不活性化されエンドソーム膜から解離し、代わりに Rab7 が活性化され LE が形成される³⁷⁻³⁹。また、エンドソームに活性化した Rab11 が局在化することで、RE や ERC 形成されていく³。HyVolution を用いた MCC (Manders' Colocalization Coefficients) 解析において、Mock および RFFL-WT 過剰発現時、Rab7 および Rab11 の約 30% が Rab5 の局在する EE から解離していることがわかった (Fig. 8A and B)。一方、RFFL-DN 変異体過剰発現時、Rab7 は RFFL-WT 過剰発現時と同様、Rab5 の局在する EE から解離していたのに対して、Rab11 は解離されず Rab5 とほぼ共局在することが明らかとなった (Fig. 8A and B)。従って、RFFL-DN 変異体は LE 成熟化には影響をおよぼさず、EE から RE への分離を選択的に阻害することが示唆された。

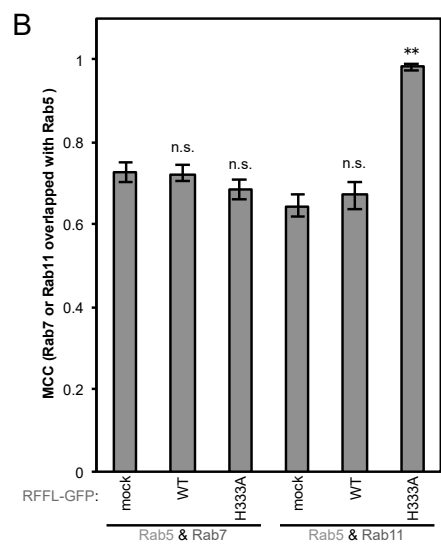
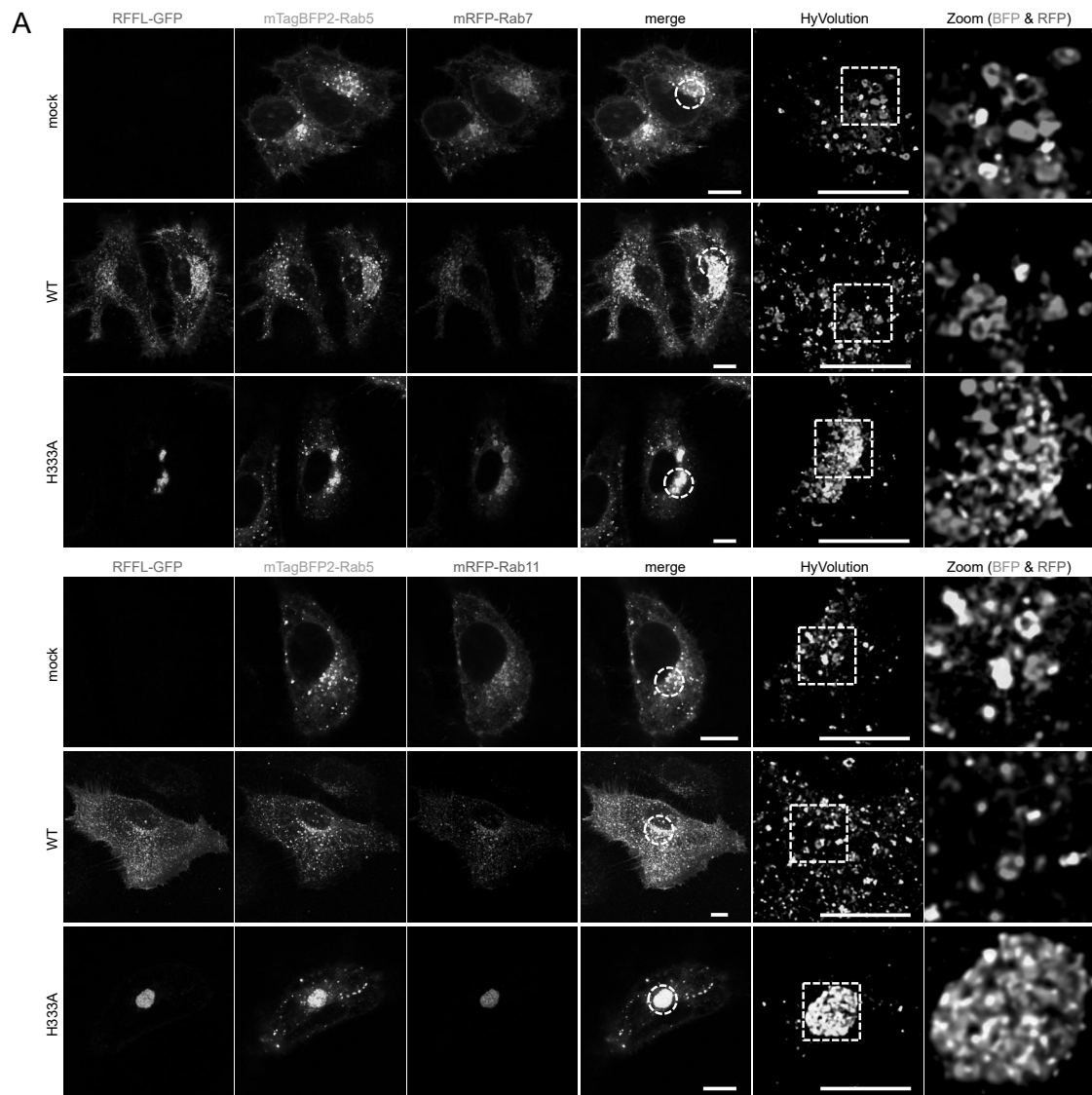


Figure 8. RFFL-H333A inhibits segregation of EE and RE.

(A) Cellular localization of mTagBFP2-Rab5 and mRFP-Rab7 or DsRed-Rab11 in HeLa- Δ F508 CFTR-3HA cells transfected with RFFL-GFP variants or empty vector (mock). Circled regions were further deconvoluted (HyVolution). Boxed regions are enlarged (Zoom). Bars, 10 μ m. (B) Mander's correlation coefficient (MCC) values quantify the mRFP-Rab7 or DsRed-Rab11 overlapped with mTagBFP2-Rab5 in the transfected HeLa cells shown in A. Data represent means \pm SE (n=20 cells per each condition). n.s., not significant, **p < 0.01.

第2項 RFFL-DN 変異体が積荷輸送に及ぼす影響

RFFL-DN 変異体が積荷の PM からのエンドサイトーシス経路に及ぼす影響を検討した。まず、CME によってエンドサイトーシスされ、PM にリサイクリングされるトランスフェリン受容体 (TfR: transferrin receptor) への影響を調べた。Alexa Fluor 647-Tf (A647-Tf) にて PM に局在化する TfR を標識し、Time-lapse イメージングによってエンドサイトーシス後の輸送をモニタリングした。Non-transfected (NT) および RFFL-WT 過剰発現細胞において、細胞表面の TfR を A647-Tf にて 2.5 時間標識し、メディウムチェンジ後 1 時間 chase (T-0) すると TfR はエンドサイトーシスされ核近傍の ERC に局在化していた (Fig. 9A)。一方、RFFL-DN 変異体過剰発現細胞の TfR はクラスター化した ERC に蓄積した。その後、Time-lapse イメージングによって 1 時間 A647-Tf の挙動をモニタリングした結果、NT および RFFL-WT 過剰発細胞の A647-Tf 蛍光強度は徐々に減少していき、最終的に 46%まで減少したことから、標識されエンドサイトーシスした TfR の半分が PM にリサイクリングされたことが示された (Fig. 9B)。一方、RFFL-DN 変異体過剰発現細胞では、TfR は ERC に蓄積しており、細胞内の A647-Tf 蛍光の消失は NT および RFFL-WT 過剰発現時と比較して有意に低く、標識されエンドサイトーシスした TfR のリサイクリングを遅延させることを示した (Fig. 9A and B)。また、TfR と同様に RFFL-DN 変異体過剰発現は CME 積荷である WT-CFTR⁴⁰ を ERC に蓄積させ、リサイクリングの遅延を引き起こした (Fig. 9C)。さらに、CIE によってエンドサイトーシスされる、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型タンパク質である CD59 も RFFL-DN 変異体過剰発現によって ERC に蓄積した⁴¹ (Fig. 9D)。以上の結果より、RFFL のユビキチン活性が CME および CIE 両者の積荷のリサイクリングにおいて重要な

役割を果たすことが示唆された。

次に、リソソーム分解経路へ輸送される積荷タンパク質に対する RFFL-DN 変異体の影響を調べた。NT および RFFL-WT 過剰発現時、RFFL の基質であり直接相互作用し Ub 化するミスフォールド PM タンパク質 r Δ F508-CFTR³⁴ は、4 h chase 後リソソーム分解によって消失した。しかし、RFFL-DN 変異体過剰発現において r Δ F508-CFTR のリソソーム分解は遅延した (Fig. 9E)。一方で、ピノサイトーシスマーカーである Dextran の LY への輸送には、RFFL-DN 変異体過剰発現は影響しなかった (Fig. 9F and G)。最後に、EGFR のエンドサイトーシス経路に及ぼす影響を調べた。EGFR は低 EGF 濃度 (1.5-10 ng/ml) では CME によってエンドサイトーシスされリサイクリング経路へと輸送されるが、高 EGF 濃度 (100 ng/ml) では CIE によりリソソーム分解経路へと輸送される⁴²。抗 EGFR 抗体を用いた免疫蛍光染色法による解析の結果、低 EGF 濃度 (10 ng/ml) によりエンドサイトーシスされた EGFR は RFFL-DN 変異体により ERC に蓄積しリサイクリングが遅延した (Fig. 9H)。しかし、高 EGF 濃度 (100 ng/ml) によりエンドサイトーシスされた EGFR は RFFL-DN 変異体による蓄積は生じず LY へと輸送された (Fig. 9H)。高 EGF 濃度 (100 ng/ml) による EGFR の LY 輸送をさらに調べるために、Alexa Fluor 568-EGF (A568-EGF) により標識した EGFR と EE および LY オルガネラマーカーとの共局在解析を行った。NT および RFFL-WT 過剰発現時の細胞では、15 min chase 後 EEA1 と共局在し、60 min 後 Lamp1 と共局在し LY まで輸送されることが示された (Fig. 9I-L)。また、RFFL-DN 変異体過剰発現においても同様に 60 min 後 Lamp1 と共局在し LY まで輸送されることが示された (Fig. 9I-L)。以上の結果から、RFFL-DN 変異体は RFFL によって制御されている Δ F508-CFTR 以外のリソソーム分解経路には影響せず、ERC からのリサイクリング経路を遅延させることが考えられる。

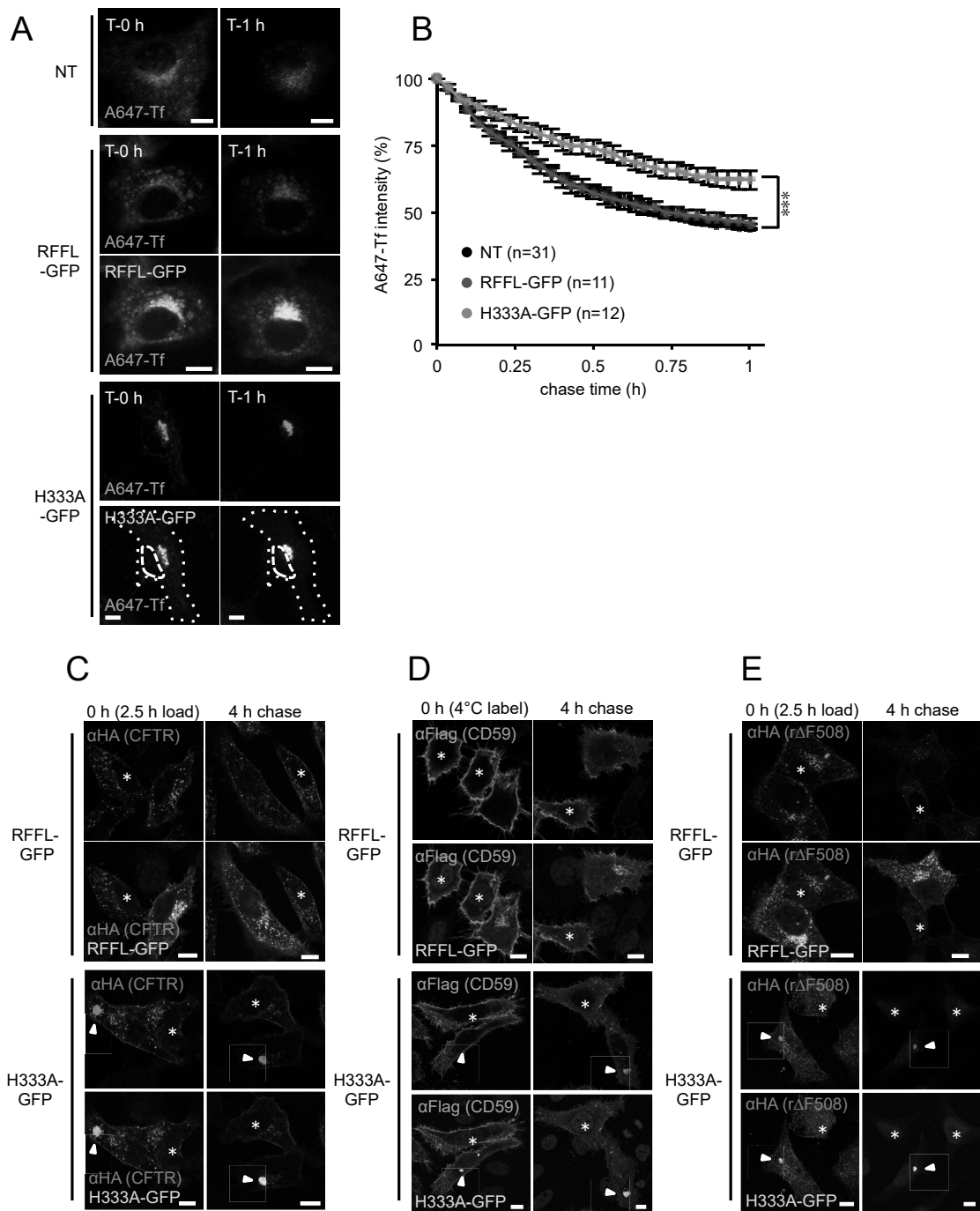


Figure 9. RFFL-H333A inhibits cargo recycling from the ERC (-continued)..

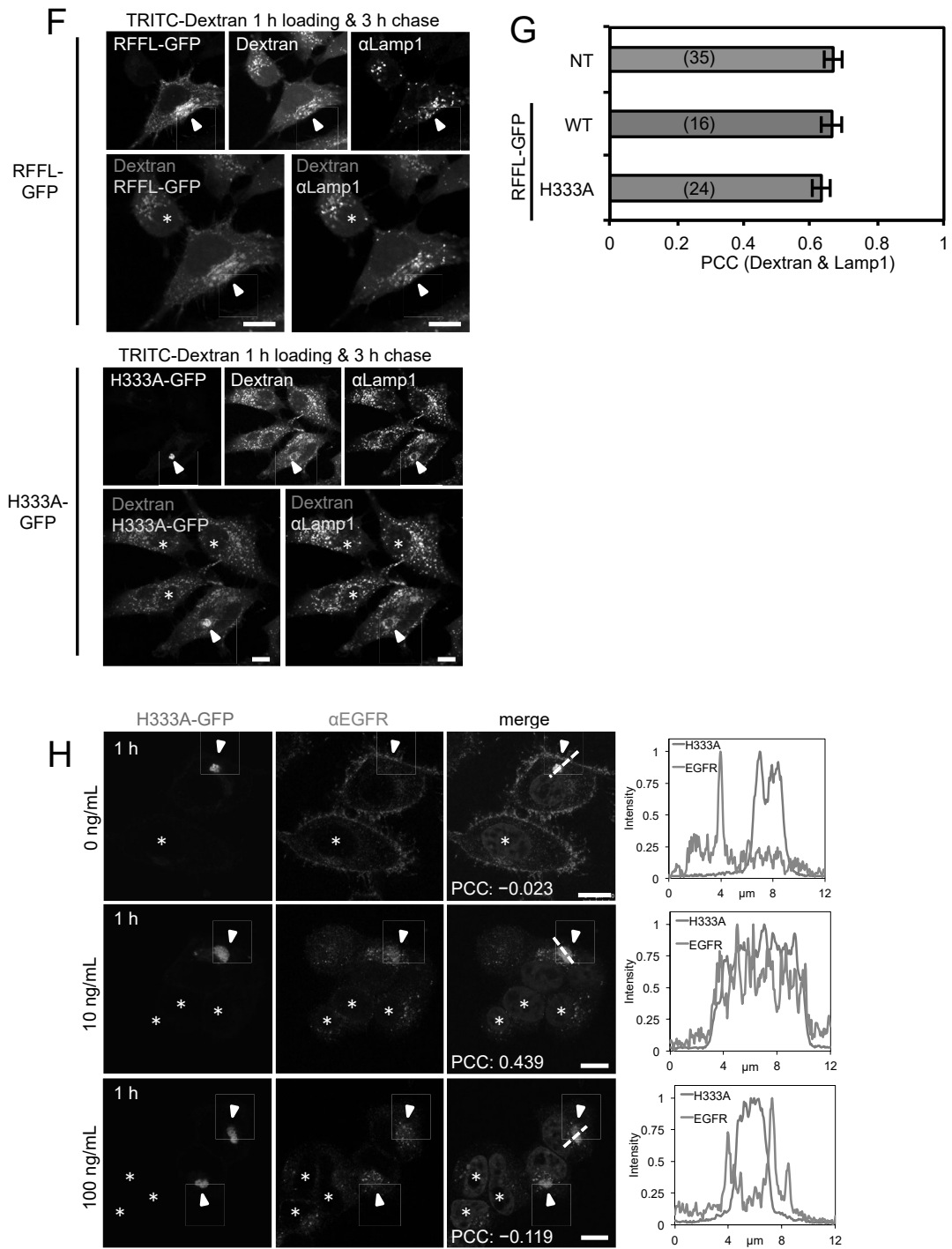


Figure 9. RFFL-H333A inhibits cargo recycling from the ERC (-continued).

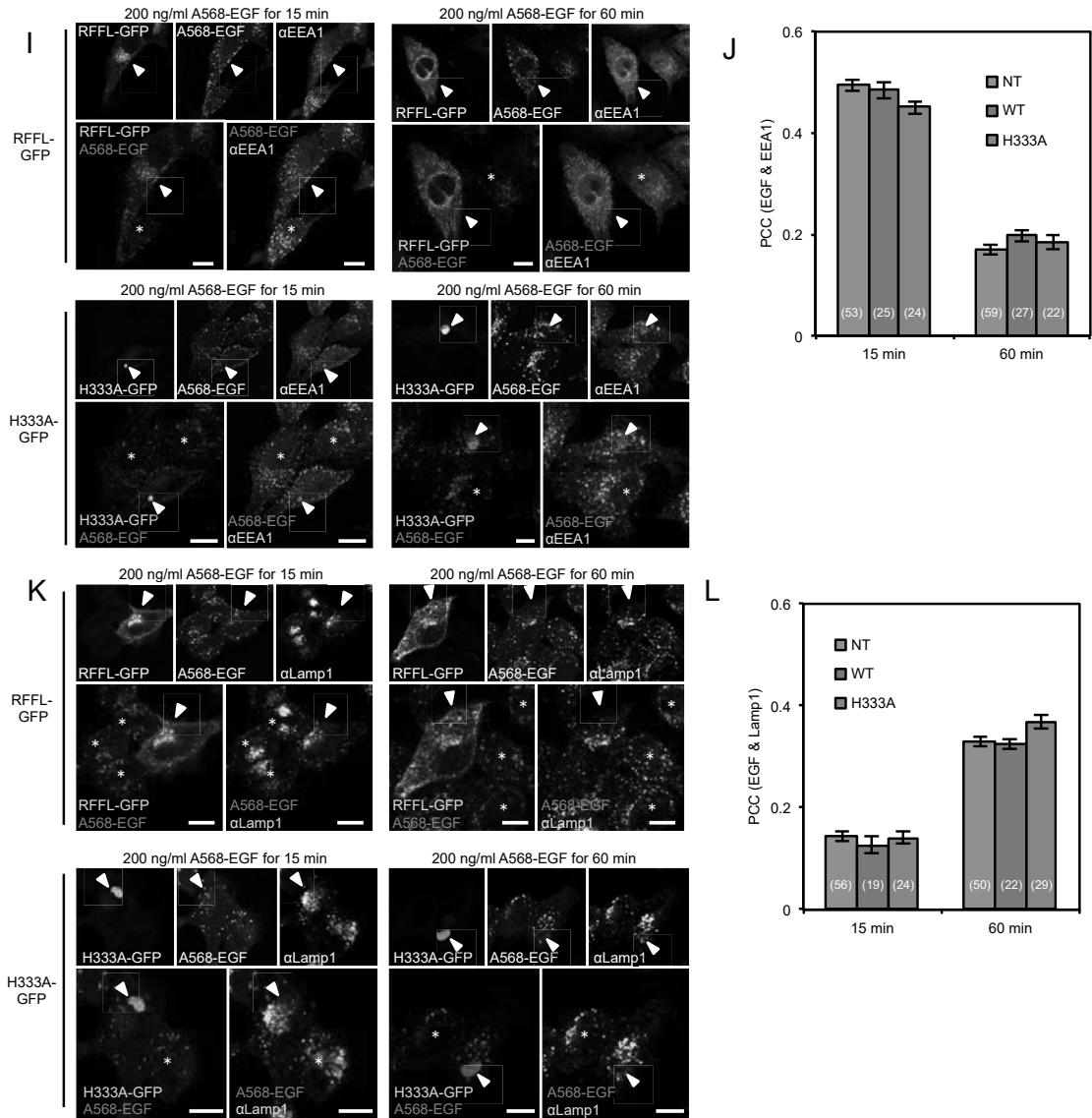


Figure 9. RFFL-H333A inhibits cargo recycling from the ERC (-continued).

Figure 9. RFFL-H333A inhibits cargo recycling from the ERC.

(A, B) Time-lapse images of internalized TfR labeled with Alexa Fluor-647 conjugated Tf (A647-Tf) in HeLa- Δ F508 CFTR-3HA cells non-transfected (NT) or transfected with GFP-fused RFFL variants. Cells were loaded with A647-Tf for 2.5 hours at 37°C (T-0 h) and chased 1 hour at 37°C (T-1 h) to monitor the TfR recycling. Images of same cells at T-0 h and T-1 h were shown in A. Broken lines indicate contour of cell and nucleus. The intracellular A647-Tf intensity was quantified at the indicated time points (B). (C, D) Indirect immunostaining of WT-CFTR-3HA (C) and CD59-Flag (D) in HeLa cells transfected with GFP fused RFFL variants. Internalized WT-CFTR-3HA was labeled with anti-HA antibody for 2.5 hours at 37°C and cell surface CD59-Flag was labeled with anti-Flag antibody for 1 hour at 4°C. Immediately after the labeling (0 h) or after 4 hours chase at 37°C (4 h), cells were fixed and immunostained with secondary antibody. Asterisks and arrowheads indicate the NT cells and the condensed ERC, respectively. (E) Indirect immunostaining of rescued Δ F508-CFTR-3HA (r Δ F508) in HeLa- Δ F508-CFTR-3HA cells transfected with RFFL-GFP or RFFL-H333A-GFP. Internalized r Δ F508-CFTR-3HA was labeled with anti-HA antibodies for 2.5 h at 37°C (T-0 h) and chased for 4 hours. Asterisks and arrowheads indicate the NT cells and the condensed ERC, respectively. (F, G) Lysosomal delivery of TRITC-Dextran loaded at 37°C for 1 hour and chased for 3 hours in HeLa cells transfected with GFP-fused RFFL variants.. Lamp1 was used as a lysosome marker. Colocalization of TRITC-Dextran with Lamp1 was quantified by calculating PCC (G). (H) Indirect immunostaining of EGFR in HeLa cells after EGF treatment at the indicated concentration for 1 hour. Line scans show profiles of fluorescence intensity against line distance. Colocalization of RFFL variants and EGFR was measured by PCC. Asterisks and arrowheads indicate the NT cells and the condensed ERC, respectively. (I, K) EGFR endocytic trafficking in HeLa cells transfected with RFFL-GFP or RFFL-H333A-GFP was monitored by Alexa Fluor-568 conjugated EGF (A568-EGF) loading for 15 min (left) or 60 min (right) with EEA1 (I) or Lamp1 (K) immunostaining. Asterisks and arrowheads indicate the NT cells and the condensed ERC, respectively. (J, L) Colocalization of A568-EGF with EEA1 (J) or Lamp1 (L) in HeLa cells transfected with RFFL-GFP variants was quantified by PCC. The number of cells from at least two independent experiments is indicated in parentheses. Data represent means \pm SE. Bars, 10 μ m.

第4章 クラスター化 ERC 形成の分子メカニズムの解明

第1節 本章の目的

RFFL-DN 変異体は RFFL の基質である r Δ F508-CFTR と強固に相互作用する³⁴. 従って, RFFL-DN 変異体は正常な ERC 形成に重要な分子と強固に相互作用し, その生理機能を阻害する結果, 異常な ERC のクラスター化を誘導する可能性が考えられた. そこで, RFFL 結合因子網羅的解析を行うことで, クラスター化 ERC 形成の分子メカニズムを解明することとした.

第2節 BioID 法を用いた RFFL 結合因子網羅的解析

BioID 法は, 従来の免疫沈降法とは異なり, 結合タンパク質にビオチンを共有結合することで, 一時的な相互作用や微弱な相互作用を高感度に検出できる⁴³. C 末端に BirA* および HA エピトープを融合した RFFL (RFFL- BirA*-HA) 安定高発現 CFBE 細胞において, 培地中に 50 μ M のビオチンを添加すると, RFFL-BirA*-HA と共局在するビオチン化タンパク質が観察された (Fig. 10A). また, RFFL-H333A-BirA*-HA 安定高発現 CFBE 細胞において, クラスター化 ERC が形成され, そこにビオチン化タンパク質が蓄積していたことから, RFFL 結合因子のビオチン化が確認された (Fig. 10A). また, ウェスタンブロッティング法により RFFL-BirA*-HA および RFFL-H333A-BirA*-HA による結合因子のビオチン化を確認した (Fig.10B). そこで, NeutrAvidin アガロースを用いて, ビオチン化タンパク質を精製し銀染色を行った (Fig.10C). 単離したビオチン化タンパク質を質量分析法によって分析した結果, RFFL 特異的に結合する約 100 種類のエンドソーム関連タンパク質を同定した. その中で, 新規 RFFL 結合因子として class I Rab11-FIPs (Rab11-FIP1, Rab11-FIP2, Rab11-FIP5), MICALL1, MICALL2 (JRAB), EHD1 を含む約 30 種類の RE 関連タンパク質 (Fig.10D), 7 種類のモータータンパク質 (Fig.10E), 6 種類の E3-ligase (Fig.10F), 3 種類の DUB (Fig.10F) を同定した. RE 関連タンパク質の中で, 新規 RFFL 結合因子として上位に挙げられた MICALL2 以外の, class I Rab11-FIPs, MICALL1, EHD1 は TfR リサイクリングに関与していることが知られていた⁴⁴⁻⁵¹. そこで, これらの因子に着目し, RFFL-DN 変異体による ERC のクラスター化の分子メカニズム解明を試みた.

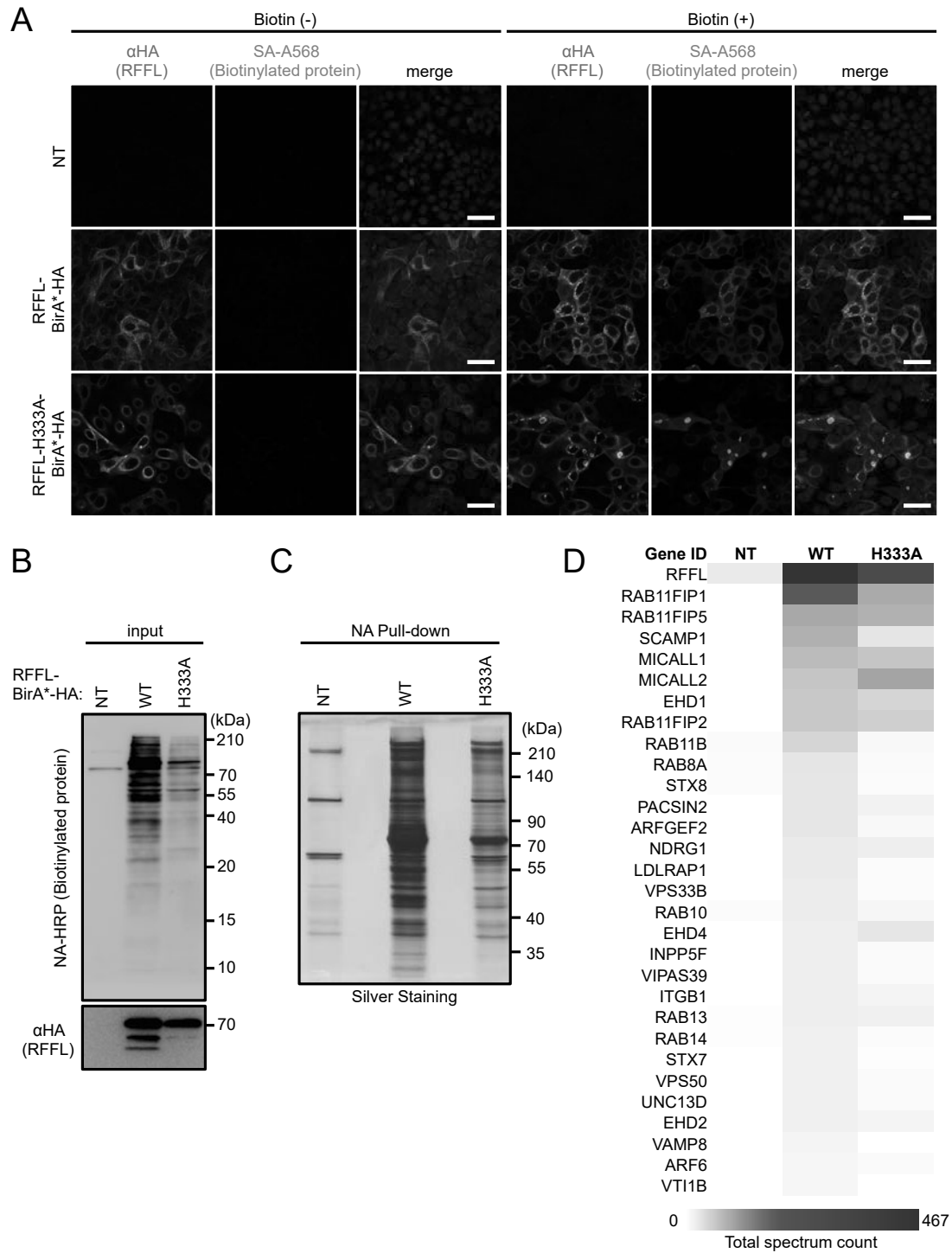


Figure 10. RFFL interactome analysis by BioID (-continued).

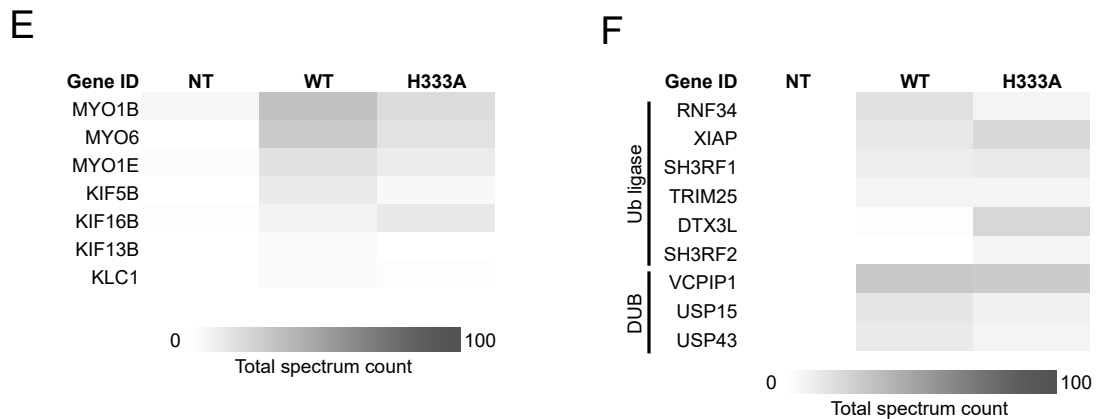


Figure 10. RFFL interactome analysis by BioID.

(A) Fluorescence micrographs of CFBE cells stably expressing RFFL-BirA^{*}-HA or RFFL-H333A-BirA^{*}-HA with or without 50 μ M biotin treatment. The RFFL variants and proximal biotinylated proteins were stained with anti-HA antibody and streptavidin-Alexa Fluor 568 (SA-A568). The non-transfected CFBE cells (NT) were used as a negative control. Bars, 50 μ m. (B) Western blotting confirmed the proximal biotinylated proteins and expression of RFFL-BirA^{*}-HA or RFFL-H333A-BirA^{*}-HA. Biotinylated proteins were detected with NeutrAvidin (NA)-HRP. (C) SDS-PAGE analysis of the BioID pull-down using the CFBE cells stably expressing RFFL-BirA^{*}-HA or RFFL-H333A-BirA^{*}-HA after 50 μ M biotin treatment. (D) Comparison of the 30 RE-associated proteins identified with high confidence in RFFL-BirA^{*} BioID. Heat maps represent total spectral counts of individual proteins per condition. (E, F) Comparison of the 7 motor proteins (E), 6 Ub ligase and 3 DUB (F) identified with high confidence in RFFL-BirA^{*} BioID. The non-transfected (NT) CFBE cells were used for as a negative control. Heat maps represent total spectral counts of individual proteins per condition.

第3節 RFFL 結合因子によるクラスター化 ERC 形成機構の解析

BioID 法の結果の確認のため、まず RFFL 結合因子と RFFL の共局在解析を、PCC 解析により行った。RFFL-mCherry と GFP-MICALL1 (PCC: 0.445), -EHD1 (PCC: 0.592), -Rab11-FIP1C/RCP (PCC: 0.363), -Rab11-FIP2 (PCC: 0.278), -Rab11-FIP5 (PCC: 0.265) は共局在した (Fig.11A)。さらに予想通り、MICALL1 (PCC: 0.717), EHD1 (PCC: 0.723), Rab11-FIP1C (PCC: 0.861), Rab11-FIP2 (PCC: 0.952), Rab11-FIP5 (PCC: 0.955) は RFFL-DN 変異体により形成されたクラスター化 ERC に蓄積した (Fig.11A)。また、HyVolution (Leica) による超解像イメージングを用いた Line scan 解析においても Rab11-effector は RFFL-DN 変異体により形成されたクラスター化 ERC に蓄積した (Fig.11A)。Pull-down assay において、RFFL-DN 変異体は RFFL-WT よりも Rab11-effector と強固に結合することがわかった (Fig.11B-H)。RFFL-WT と Rab11-effector との共局在解析と一致して、EHD1 は他の Rab11-effector と比較して RFFL-WT と強く相互作用した (Fig.11D-H)。免疫蛍光染色法によって、RFFL-DN 変異体による内在性 Rab11-effector への影響を検証したところ、形成されたクラスター化 ERC に MICALL1, EHD1, Rab11-FIP1C, Rab11-FIP5 が蓄積した (Fig.11I)。Rab11-FIP2 においては、内在性分子を認識する抗体が利用できなかったため、解析できなかった。これらの結果から、RFFL-DN 変異体が Rab11-effector をエンドソームにトラップし解離を阻害することがそれらの生理的機能の阻害を引き起こし、クラスター化 ERC が形成されるという仮説を立てた。

そこで、その仮説を実証するために、Rab11-effector を RFFL-WT に強制的に結合させる chemical-induced protein dimerization (CID) assay⁵² を用いることで検証した。Rab11-effector に FRB-GFP を RFFL-WT に FKBP-mCherry を融合し CID assay を行った。FRB および FKBP の 2 量体化を誘導するラパマイシン添加前は、RFFL-WT および Rab11-effector はエンドソームに局在化していた (Fig.11J and K)。一方、ラパマイシンを添加すると RFFL-WT と Rab11-effector が共局在しクラスター化 ERC が形成された (Fig.11J)。RFFL-DN 変異体の表現型と一致して、CID assay により誘導されたクラスター化 ERC に、エンドサイトーシスされた WT-CFTR が蓄積した (Fig.11L)。従って、RFFL がエンドソーム上で Rab11-effector をトラップすることが、クラスター化 ERC 形成および積荷のリサイクリング阻害を引き起こすことが考えられる。

A

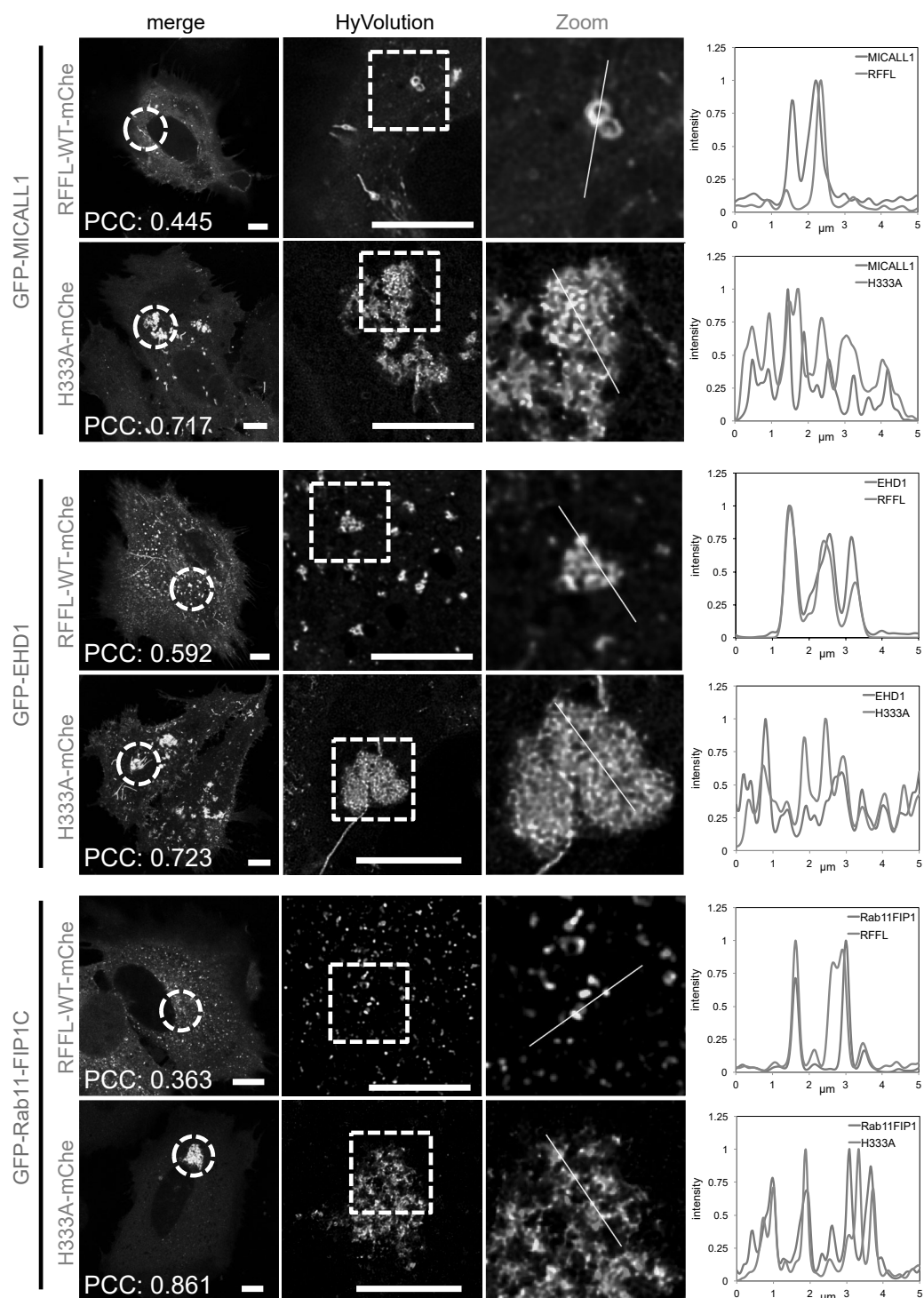


Figure 11. Prolonged RFFL association with Rab11 effectors induces the clustered ERC (-continued).

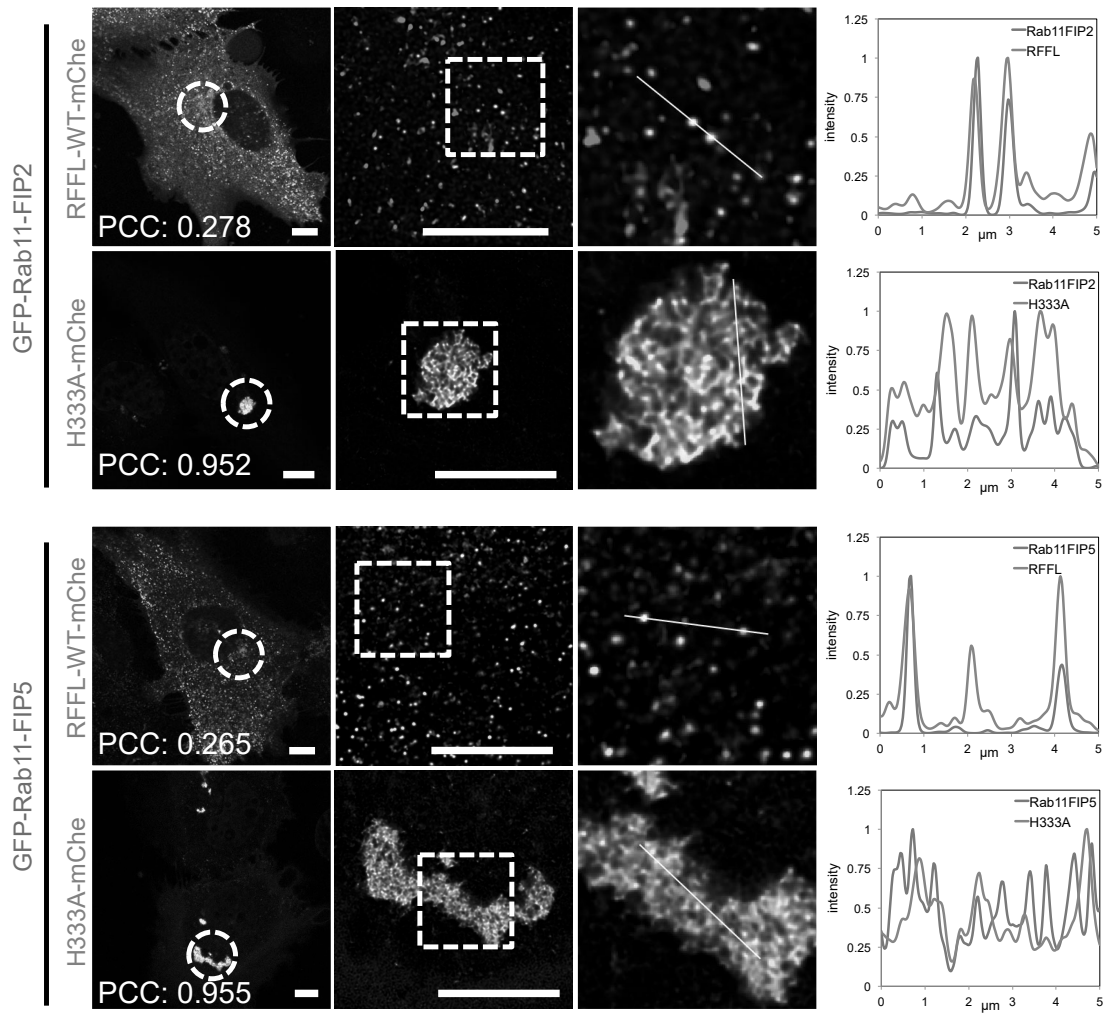


Figure 11. Prolonged RFFL association with Rab11 effectors induces the clustered ERC (-continued).

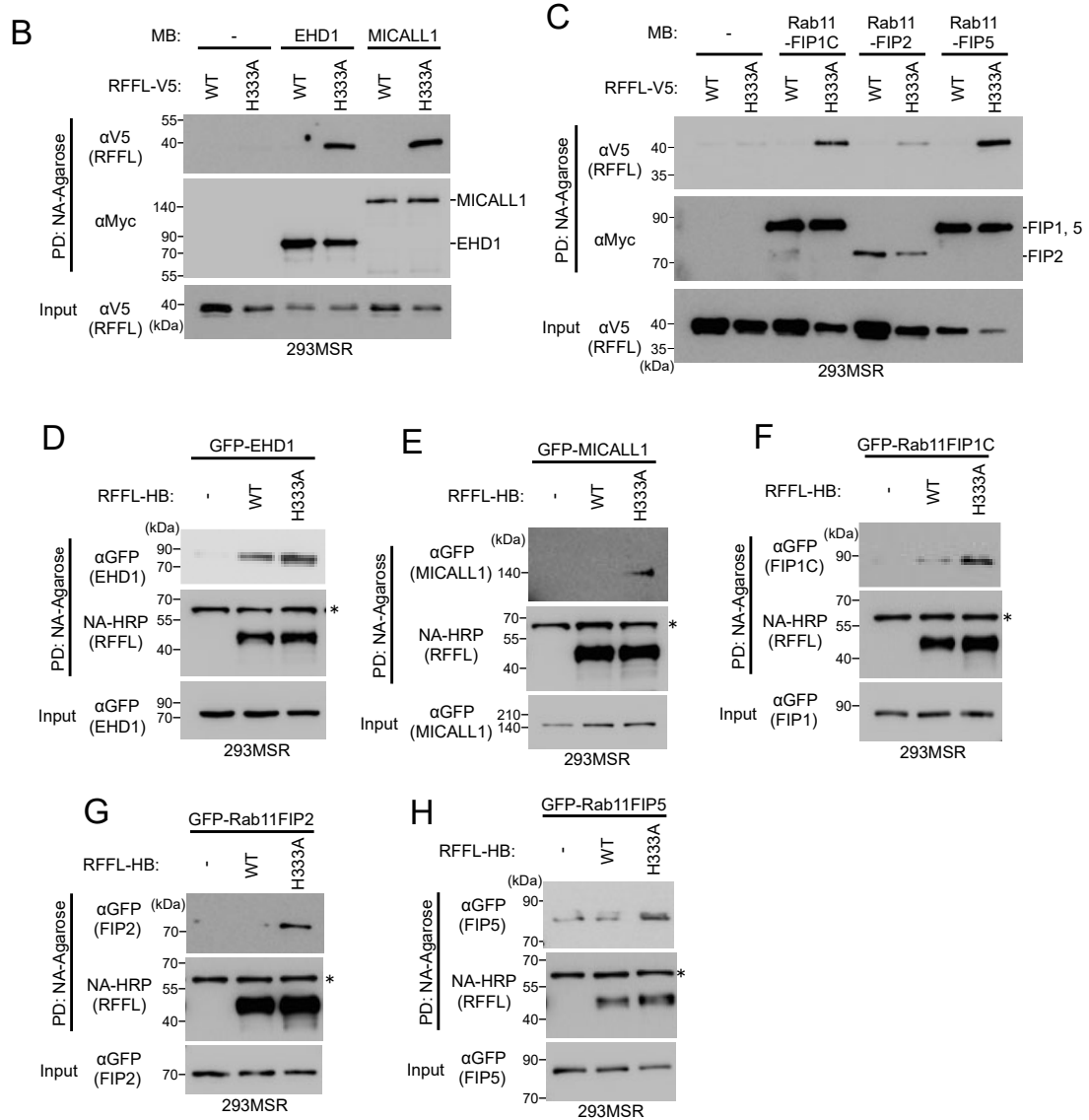


Figure. 11. Prolonged RFFL association with Rab11 effectors induces the clustered ERC (-continued).

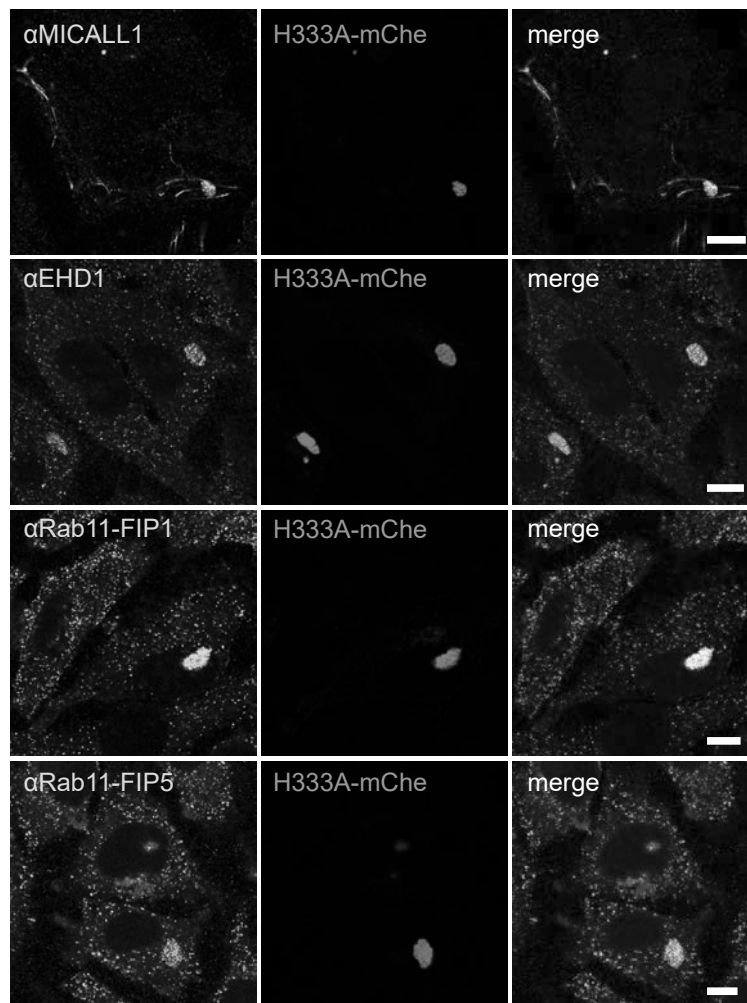


Figure. 11. Prolonged RFFL association with Rab11 effectors induces the clustered ERC (-continued).

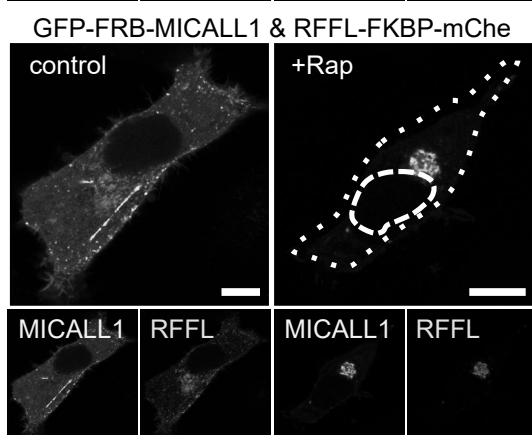
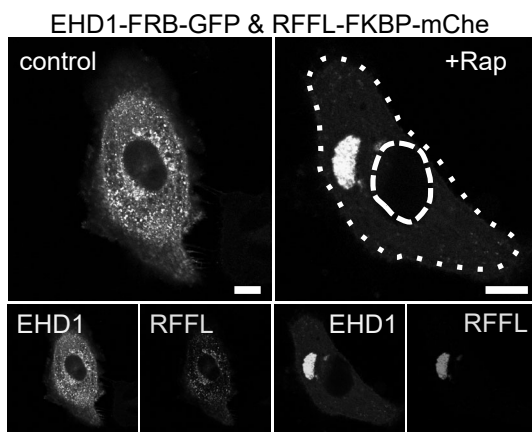
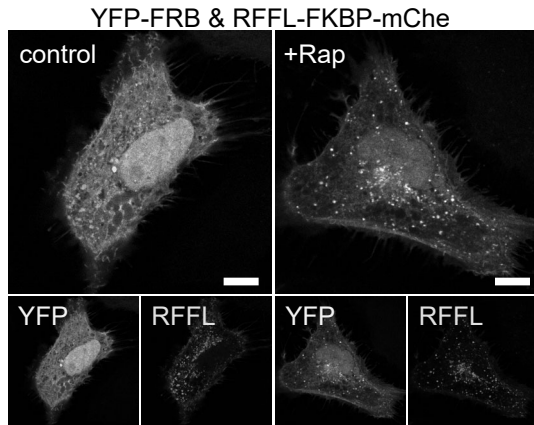
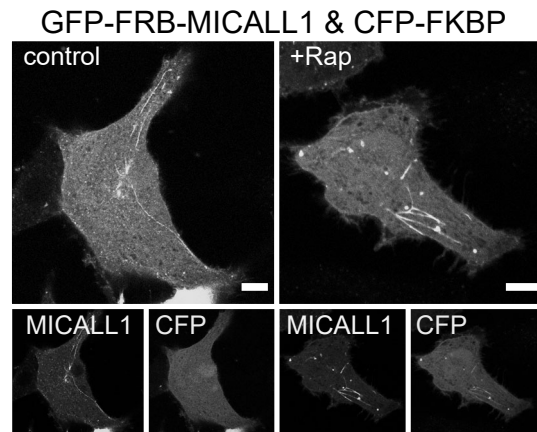
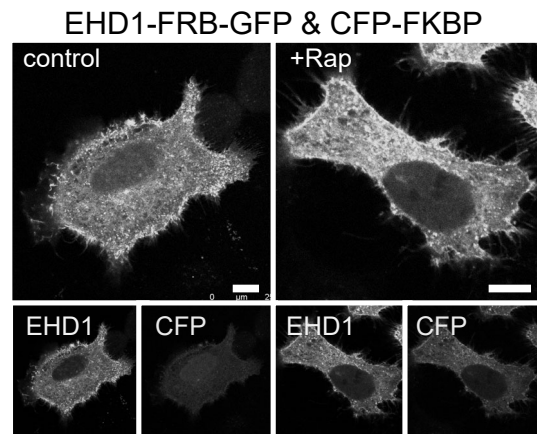
J**K**

Figure 11. Prolonged RFFL association with Rab11 effectors induces the clustered ERC (-continued).

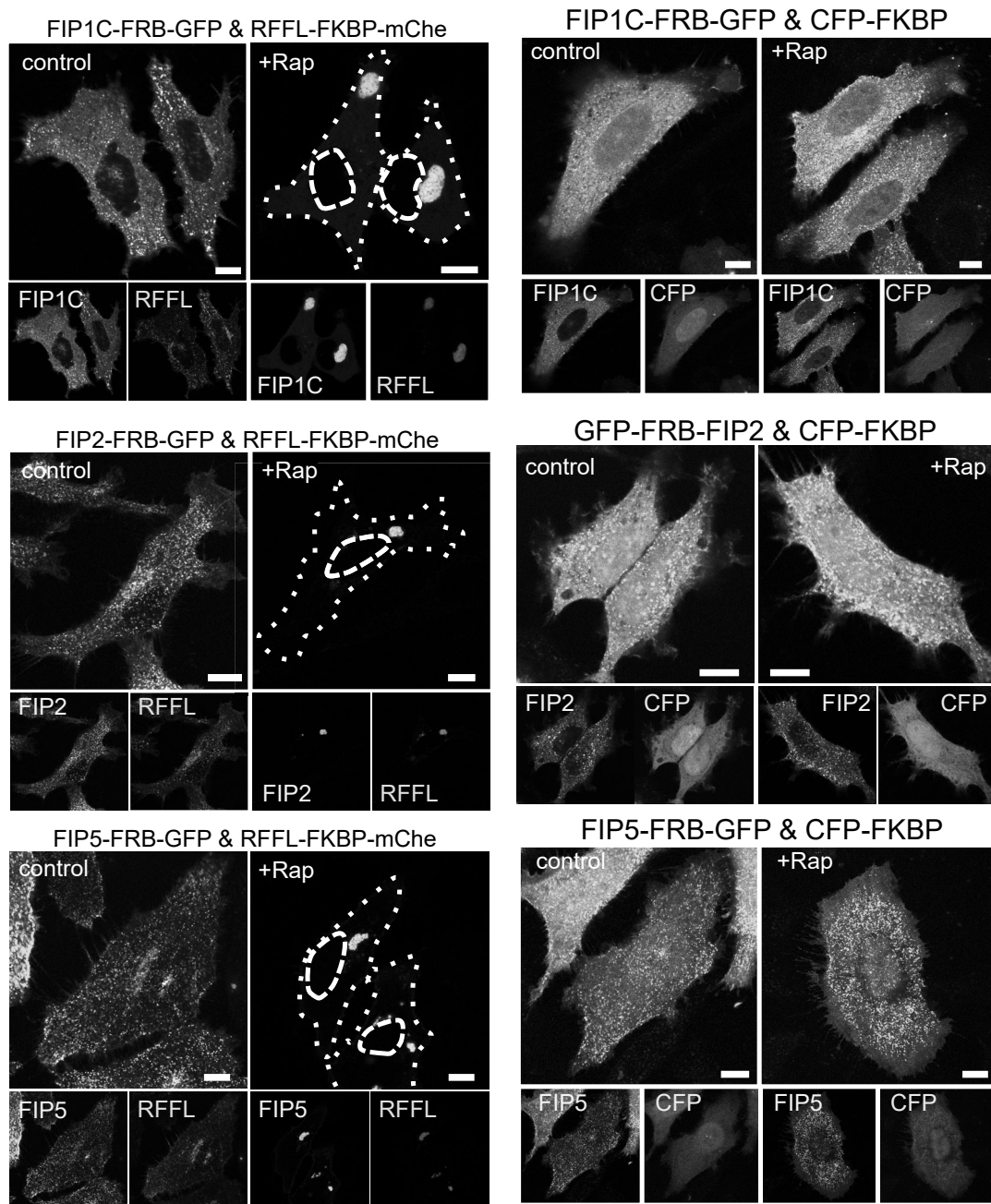


Figure 11. Prolonged RFFL association with Rab11 effectors induces the clustered ERC (-continued).

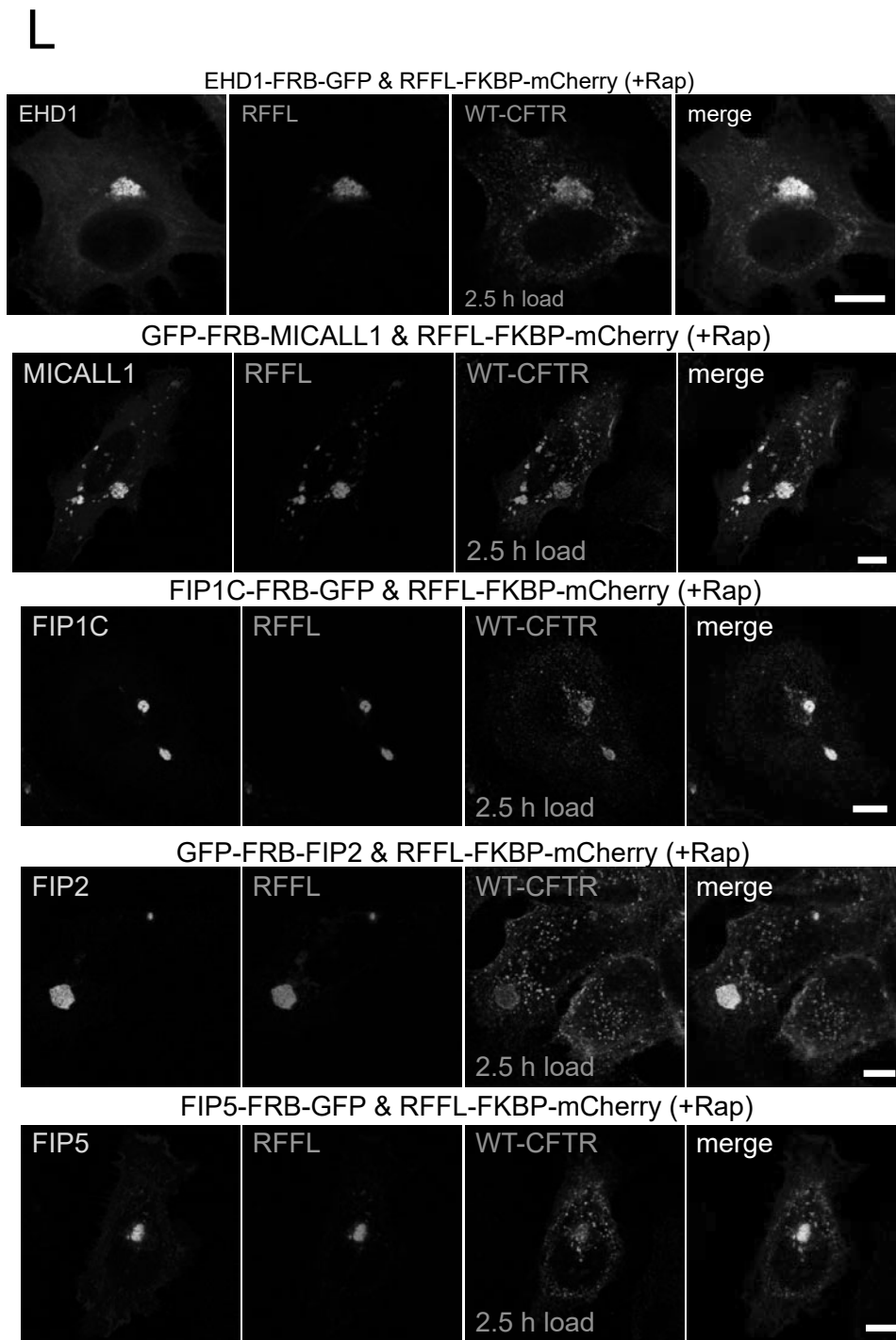


Figure 11. Prolonged RFFL association with Rab11 effectors induces the clustered ERC.

(A) Cellular localization of the transfected GFP-fused Rab11 effectors in HeLa- Δ F508 CFTR-3HA cells was analyzed with the co-transfected RFFL-mCherry or RFFL-H333A-mCherry. Circled regions were further deconvoluted (HyVolution). Boxed regions are enlarged (Zoom). Line scans show profiles of

fluorescence intensity against line distance. Colocalization of RFFL variants and Rab11 effectors was measured by PCC. (B, C) Interaction of Myc-Biotin (MB) tagged Rab11 effectors with RFFL-V5 or RFFL-H333A-V5 is shown by NA pull-down in 293MSR cells. (D-H) Interaction of histidine-biotin (HB) tagged RFFL or RFFL-H333A with GFP-Rab11 effectors is shown by NA pull-down in 293MSR cells. (I) Cellular localization of endogenous Rab11 effectors was analyzed by immunostaining with the indicated antibodies in HeLa- Δ F508 CFTR-3HA cells transfected with RFFL-H333A-GFP. (J) Fluorescence imaging of the clustered ERC formation after forced RFFL-FKBP-mCherry association with Rab11 effectors-FRB-GFP in HeLa- Δ F508 CFTR-3HA cells with or without 500 nM rapamycin (+Rap) treatment for 5 min followed by 16 hours chase after rapamycin washout. Broken lines indicate contour of cell and nucleus. (K) Negative control experiments of CID technique in HeLa- Δ F508 CFTR-3HA cells transfected with Rab11 effectors-FRB-GFP and CFP-FKBP with or without 500 nM rapamycin (+Rap) treatment for 5 min followed by 16 hours chase after rapamycin washout. (L) Internalized WT-CFTR was accumulated in the clustered ERC induced by the CID in HeLa-CFTR-3HA cells expressing EHD1-FRB-GFP, GFP-FRB-MICALL1, Rab11-FIP1C-FRB-GFP, GFP-FRB-Rab11-FIP2 or Rab11-FIP5-FRB-GFP and RFFL-FKBP-mCherry with rapamycin treatment. Internalized WT-CFTR was labeled with anti-HA antibody as Fig. 9C. Bars, 10 μ m.

第5章 RFFL による Rab11-effector Ub 制御機構の検討

第1節 本章の目的

RFFL-DN 変異体が Rab11-effector をトラップし、クラスター化 ERC 形成を引き起こすことから、RFFL は Ub 化によって Rab11-effector の機能調節を行っている可能性が考えられた。そこで、*in cell* および *in vitro* の条件下で RFFL による Rab11-effector の Ub 化制御を検証した。

第2節 *In cell* における RFFL による Rab11-effector の Ub 化の検証

第1項 RFFL が Rab11-effector の Ub 化におよぼす影響

293MSR 細胞に Myc-Biotin (MB)-Rab11-effector を過剰発現し、変性条件下で細胞を可溶化後、NeutrAvidin にて Pull-down を行い、ウェスタンブロッティング法により Ub 化の検出を試みた。その結果、Rab11-FIP5 以外の MICALL1, EHD1, Rab11-FIP1C, Rab11-FIP2 において Ub 化が検出された (Fig. 12A)。さらに、そこに RFFL-DN 変異体を過剰発現すると Rab11-effector の Ub 化は劇的に阻害された (Fig. 12A-B and 11C-F, lane 4)。また、Rab11-effector の Ub 化は分子量から mono-Ub 化である可能性が考えられた。そこで、Ub-K0 変異体 (全てのリジンをアルギニンに置換し mono-Ub 鎖は形成できるものの、poly-Ub 鎖は形成できない変異体) を用いて実験を行ったところ、Rab11-effector の Ub 化は WT-Ub を使用した際と同様の分子量に検出されたことから、これらの大部分は mono-Ub 化である可能性が考えられた (Fig. 12C-F, lane 6)。また、liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) により MICALL1, EHD1, Rab11-FIP1C, Rab11-FIP2 の Ub 化部位を同定した (Fig. 12G)。RFFL-WT を過剰発現すると、MICALL1 と EHD1 の Ub 化は変化無かったのに対して、Rab11-FIP1C は poly- and/or multiple-Ub 化が増加した (Fig. 12C-F, lane 3)。興味深いことに、Rab11-FIP2 においては poly- and/or multiple-Ub 化が劇的に増加した (Fig. 12F, lane 3)。

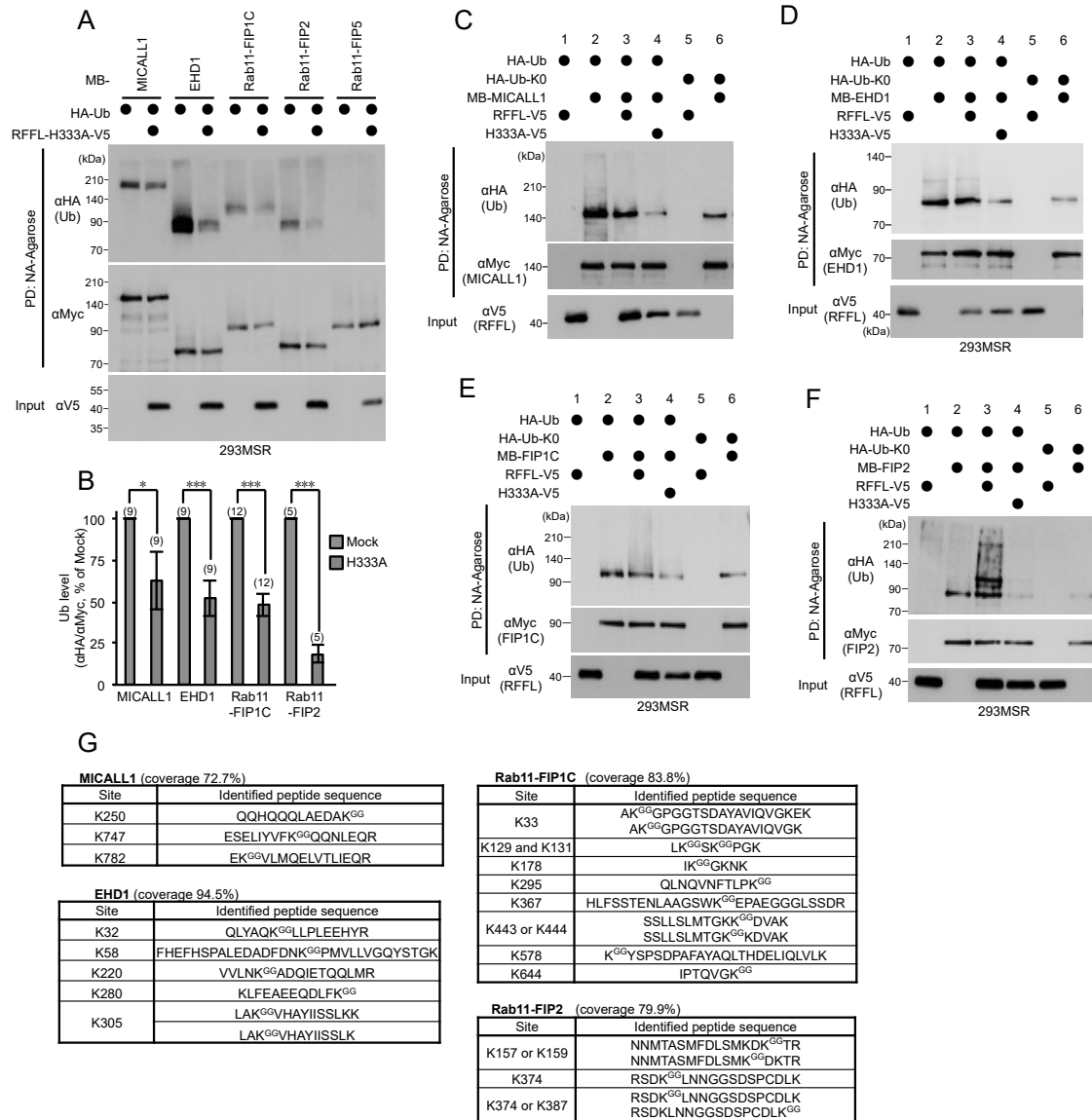


Figure 12. RFFL-H333A inhibits ubiquitination of Rab11 effectors.

(A, B) Ubiquitination level of MB-EHD1, MB-MICALL1, MB-Rab11-FIP1C, MB-Rab11-FIP2 and MB-Rab11-FIP5 in 293MSR cells transfected with HA-Ub and RFFL-H333A-V5 was measured by NA pull-down (A). Ubiquitination level of Rab11 effector proteins were quantified. At least 4 independent experiments were performed for quantification. Sample number was indicated in parentheses. Data represent means \pm SE. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (B). (C-F) Ubiquitination level of MB-MICALL1 (C), MB-EHD1 (D), MB-Rab11-FIP1C (E) or MB-Rab11-FIP2 (F) in 293MSR cells transfected with HA-Ub or HA-Ub-K0 and RFFL-V5 or RFFL-H333A-V5 was measured by NA pull-down. (G) Ubiquitination sites of MB-MICALL1, MB-EHD1, MB-Rab11-FIP1C, and MB-Rab11-FIP2 in 293MSR cells transfected with HA-Ub were analyzed by LC-MS/MS. Three, five, ten and five ubiquitination sites were identified in the MICALL1, EHD1, Rab11-FIP1C, and Rab11-FIP2 respectively.

第2項 Rab11-effector の Ub 化における RFFL の生理的機能

RFFL の生理的機能を検証するために, CRISPR / CAS9 システムによって RFFL KO (knockout) 293MSR 細胞を樹立し (Fig. 13A-C), RFFL KO における Rab11-effector の Ub 化に及ぼす影響を検証した. RFFL KO によって Rab11-FIP1C の Ub 化は有意に減少し, そこに RFFL-WT を再導入することで Ub 化の減少は回復した (Fig. 13D lane 6 and 7, and Fig. 13E). 一方, RFFL KO によって, MICALL1, EHD1, Rab11-FIP2 の Ub 化は減少しなかった (Fig. 13E, 12F-H lane 6). 興味深いことに, RFFL KO 細胞に RFFL-DN 変異体を過剰発現すると, RFFL WT 細胞と同様に Rab11-effector の Ub 化を減少させた (Fig. 13D, 12F-H lane 8). 以上の結果より, Rab11-FIP1C の Ub 化は主に RFFL によって制御されている可能性が考えられる. また, 他の Rab11-effector の Ub 化は RFFL を KO しても減少しないことから, RFFL を補うように他の E3-ligase が制御している可能性が考えられる. 他の E3-ligase に関しては, BioID 法により RFFL に結合する E3-ligase が候補として挙げられるであろう (Fig.10F). また, RFFL KO 細胞に RFFL-DN 変異体を過剰発現した際, Rab11-effector の Ub 化が減少したことから, RFFL-DN 変異体が Rab11-effector と強固に長時間結合することで, 他の E3-ligase の結合を阻害している可能性が示唆された.

第3項 TfR リサイクリングにおける Rab11-effector の Ub 化の生理的機能

次に RFFL KO における TfR のリサイクリングを検証したところ, RFFL-DN 変異体過剰発現時とは異なり, RFFL KO による TfR リサイクリングの阻害は確認されなかった (Fig. 13I, J). 一方, RFFL KO 細胞に RFFL-DN 変異体を過剰発現すると, RFFL WT 細胞と同様に TfR のクラスター化 ERC における蓄積が確認された (Fig. 13J). 以上のことから, 積荷のリサイクリングにおいて, Rab11-effector の Ub 化は必須であるが, Rab11-FIP1C の Ub 化のみを阻害しても不十分であるということが明らかとなった.

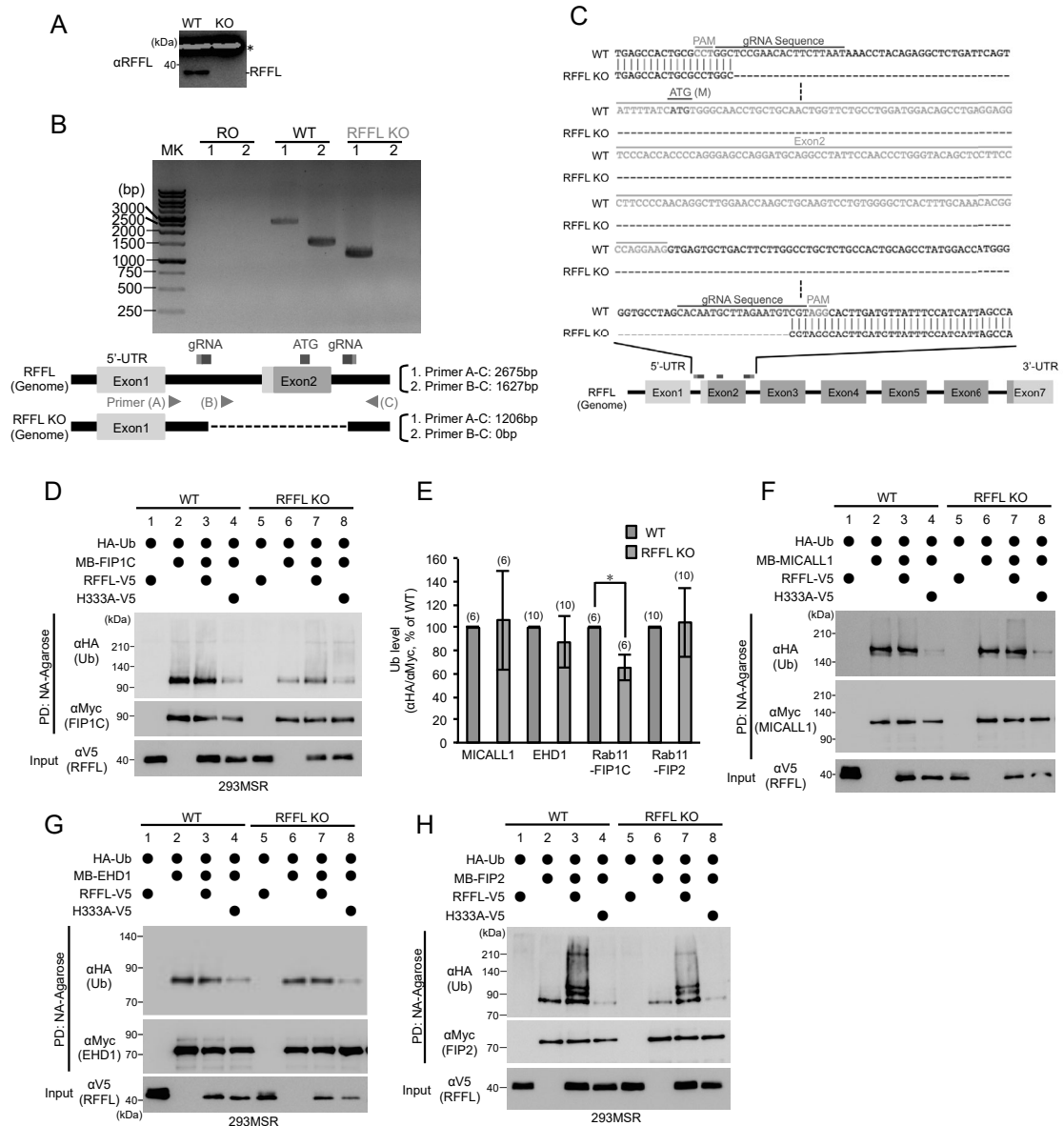


Figure 13. RFFL regulates ubiquitination of the Rab11 effectors *in cell* (-continued).

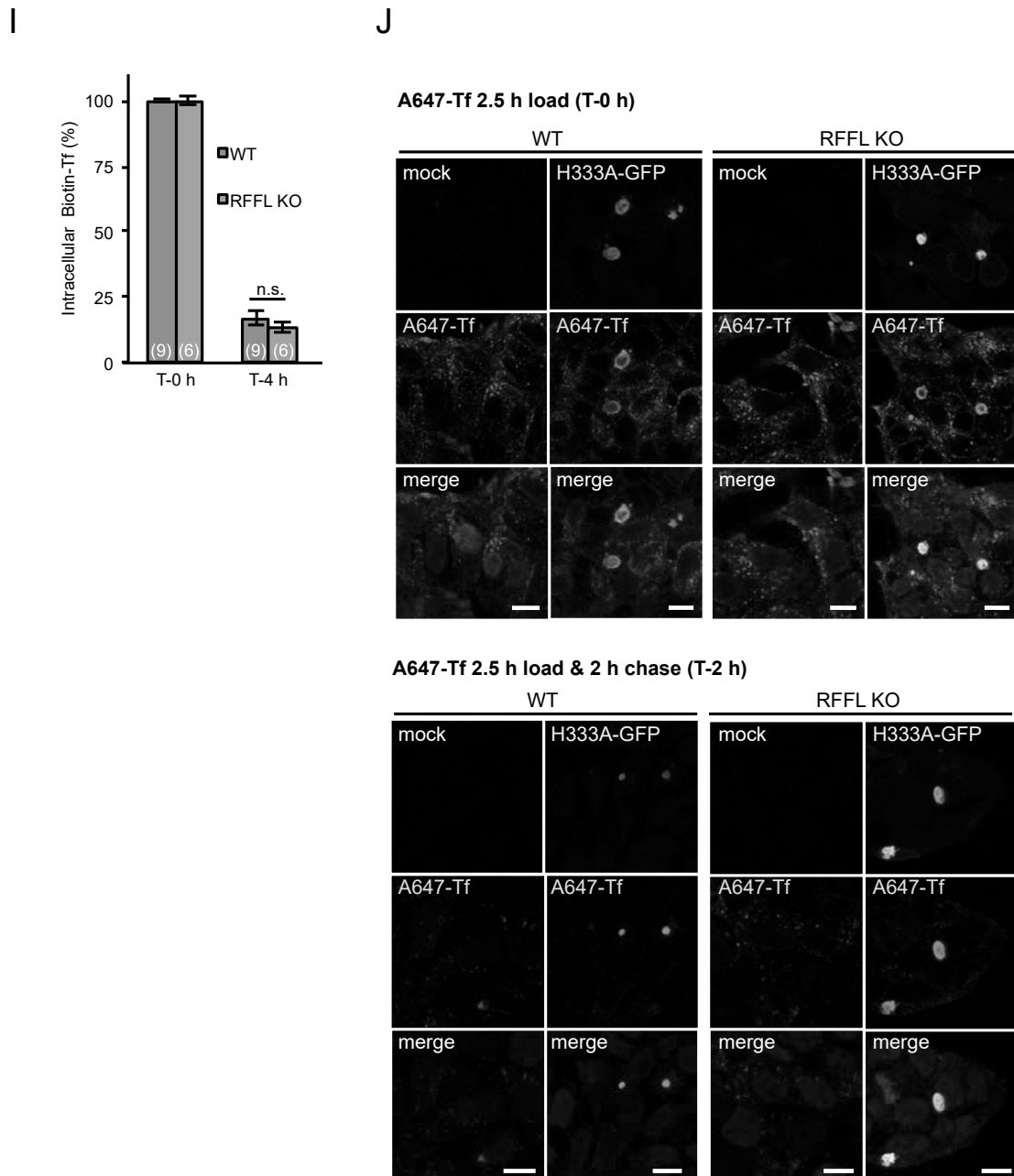


Figure 13. RFFL regulates ubiquitination of the Rab11 effectors *in cell*.

(A) Western blotting confirms the RFFL KO in 293MSR cells. (B) PCR analysis confirmed the RFFL KO. Schematic of the RFFL gene with the sgRNA-targeted sites, the start codon (ATG), and the PCR primers for genotyping are indicated. (C) RFFL KO in 293MSR cells was confirmed by DNA sequencing of the genomic locus. The guide sequences, PAM sequences, and the RFFL start codon are indicated. (D) Ubiquitination level of MB-Rab11-FIP1C in 293MSR (WT) and RFFL KO cells transfected with HA-Ub and RFFL-V5 or RFFL-H333A-V5 was measured by NA pull-down. (E) Ubiquitination level of the Rab11 effector proteins was quantified. At least 3 independent experiments were performed for

quantification. Sample number was indicated in parentheses. Data represent means \pm SE. * $P < 0.05$. (F-H) Ubiquitination level of MB-MICALL1 (F), MB-EHD1 (G), and MB-Rab11-FIP2 (H) were measured as in panel D. (I) TfR recycling was measured in 293MSR (WT) and RFFL KO cells as the disappearance of internalized Biotin-Tf after 4 hours chase. (J) Fluorescent micrograph of internalized TfR in 293MSR (WT) or RFFL KO cells transfected with RFFL-H333A-GFP. TfR were labeled with A647-Tf for 2.5 hours at 37°C (T-0 h) and further chased for 2 hours (T-2 h).

第3節 *In vitro* における RFFL による Rab11-effector の Ub 化の検証

RFFL KO では Rab11-effector の Ub 化に影響をおよぼさなかったが、RFFL-DN 変異体が Rab11-effector の Ub 化を減少させたことや RFFL と Rab11-effector が相互作用することから、RFFL は Rab11-effector の Ub 化を制御する可能性が考えられた。そこで、この可能性を検証するため *in vitro* ユビキチン再構成実験を行うこととした。まず、GST (glutathione-S-transferase) -EHD1, GST-Rab11-FIP1C, ubiquitination enzymes, を大腸菌より精製した³⁴ (Fig. 14A)。GST-EHD1 または GST-Rab11-FIP1C を E1, UbcH5c, RFFL, Ub と共にインキュベートし反応させた後、基質をグルタチオンビーズにて単離し、抗 Ub 抗体を用いてウェスタンブロットティング法にて検出した。その結果、E1, E2, RFFL, Ub の全てが含まれる条件下でのみ GST-EHD1 および GST-Rab11-FIP1C の Ub 化が再構成された (Fig. 14B and C lane 2)。MICALL1 および Rab11-FIP2 は大腸菌からの精製が困難であったため、哺乳類細胞からの精製を試みた。精製した MB-MICALL1 または MB-Rab11-FIP2 を E1, UbcH5c, RFFL, HA-Ub と共にインキュベートし反応後、基質を NeutrAvidin アガロースにて単離した。Pull-down サンプルを基質の Ub 化検出に用い、RFFL の Ub 化酵素活性の検出のため、上清は抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロットティング法での検証に用いられた (Fig. 14D)。Rab11-FIP2 の Ub 化は ubiquitination enzymes 全てが含まれる条件下で、*in cell* における RFFL 過剰発現実験と同様に poly- and/or multiple-Ub 化が検出された (Fig. 14E lane 3)。MICALL1 の Ub 化は ubiquitination enzymes 全てが含まれる条件下で、poly- and/or multiple- and/or mono-Ub 化が検出された (Fig. 14F lane 2)。MICALL1 の Ub 化は、E1 を除くと多少検出されたが (Fig. 14F lane 3), UbcH5c (Fig. 14F lane 4) および HA-Ub (Fig. 14F lane 6) を除くと全く検出されなかった。興味深いことに、RFFL を除くと poly- and/or multiple-Ub からなる高分子の Ub 鎖は消失したもの

の, mono-Ub 化は消失しなかった (Fig. 14F lane 5). この MICALL1 の RFFL 非依存的 mono-Ub 化は, 哺乳類細胞からの精製過程において, MICALL1 と結合する E3-ligase が共に精製され Ub 化反応を起こしたためであると考えられる. この他の E3 の関与は RFFL を KO しても MICALL1 の Ub 化に影響を及ぼさなかったことと一致している. 以上の結果より, RFFL は Rab11-effector を直接 Ub 化する可能性が考えられる.

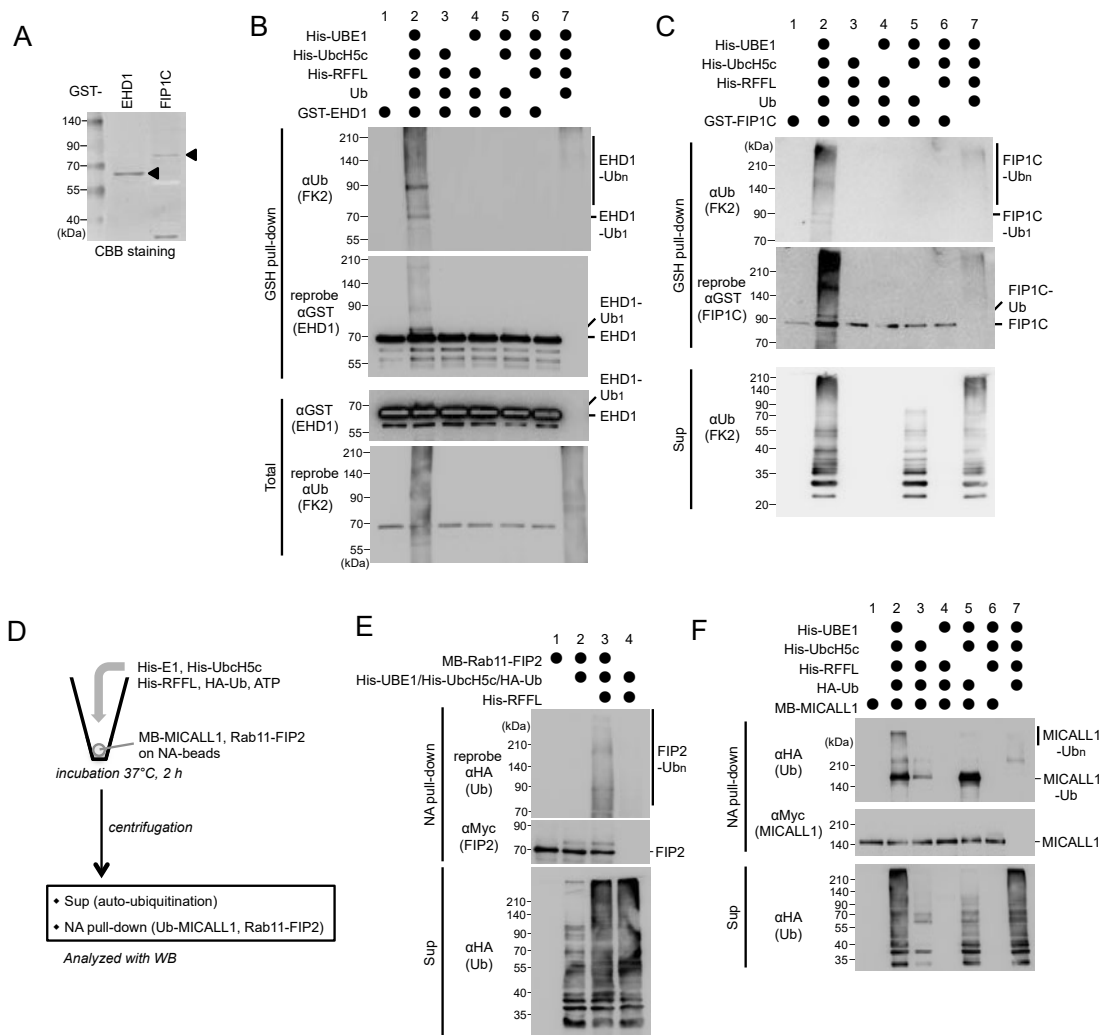


Figure 14. RFFL regulates ubiquitination of the Rab11 effectors *in vitro*.

(A) Recombinant GST-EHD1 or GST-Rab11-FIP1C was affinity purified and analyzed by SDS-PAGE with Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining. Arrowheads indicate the full-length proteins. (B, C) *In vitro* ubiquitination of GST-EHD1 (B), GST-Rab11-FIP1C (C) by RFFL was measured by Western blotting after elution from the affinity beads. After the ubiquitination, total sample (B) or supernatant (C)

including E1, E2, RFFL, and Ub was analyzed for auto-ubiquitination to confirm their activity. (D) Schematic diagram of *in vitro* ubiquitination assay of MB-MICALL1 and MB-RAB11-FIP2 purified from mammalian cells. After the ubiquitination, supernatant (Sup) including E1, E2, RFFL, and HA-Ub is analyzed for auto-ubiquitination. The pellet containing MB-MICALL1 or MB-RAB11-FIP2 was washed, and their ubiquitination was analyzed by Western blotting after elution from NA-beads. (E, F) *In vitro* ubiquitination of purified MB-Rab11-FIP2 (E) or MB-MICALL1 (F) from 293MSR cells by recombinant RFFL was analyzed by Western blotting following the protocol shown in D.

第6章 考察

本研究では, RE の機能調節を担う Rab11-effector の Ub 化が RFFL E3-ligase によって制御されていることを明らかにした. RFFL-DN 変異体は, クラスター化 ERC を形成し, ERC からの積荷のリサイクリングを阻害した. さらに, EE から LE 成熟化を阻害することなく, Rab5 陽性 EE から Rab11 陽性 RE の分離を阻害した. さらに, BioID 法により新規 RFFL 結合因子として, Rab11-FIP1C, -FIP2, -FIP5, EHD1, MICALL1 を同定した. RFFL-DN 変異体は, これらの結合因子をトラップし Ub 化を阻害することでリサイクリング機能を破綻させた. RFFL KO は Rab11-FIP1C の Ub 化のみを減少させたが, *in vitro* において RFFL は結合因子全ての Rab11-effector を直接的 Ub 化することが示唆された. これらの結果より, RFFL を含む複数の E3-ligase による Rab11-effector の Ub 化が, リサイクリング経路の機能において必要不可欠であることが示唆された. 以上のことを踏まえ本章では, これまで得られている知見と, 今回我々が導いてきた知見とを合わせることで, RFFL による Rab11-effector Ub 化の意義を考察した.

第1節 RFFL-DN 変異体におけるクラスター化 ERC 形成分子機構

我々の以前の研究において, RFFL は EE や LE にて構造異常膜タンパク質と選択的に相互作用し Ub 化を介してリソソーム分解へ導く, *peripheral quality control* に関与することが報告されている³⁴. 一方本研究では, HyVolution 解析を用いることで, 以前の報告と一致して, EE や LE だけではなく RE の局在化を明らかにし⁵³, リサイクリング経路における生理的役割が示唆された. また以前の報告では, 本研究において発見した RFFL-DN 変異体の表現型と同様に, TfR, Rab5, Rab11 が核周辺に蓄積することや, TfR のリサイクリングの遅延が RFFL-WT の過剰発現により示されていた⁵³. 実際に, RFFL-WT 過剰発現においてもクラスター化 ERC が時折観察された. しかし, RFFL-WT と RFFL-DN 変異体の発現量が同等の際, RFFL-DN 変異体でのみクラスター化 ERC が観察されたことから, 以前の研究において RFFL-WT で観察されたクラスター化 ERC は RFFL-WT の過剰量な発現による Rab11-effector との相互作用の長期化が原因であると考えられる. 理由としては, (1) 同じ Ub ligase 不活性化変異体でも, アミノ酸を欠損させた RFFL- Δ RING ではなく, 点変異を導入し全長を残した RFFL-DN

変異体でのみ、クラスター化 ERC が観察されたこと、(2) RFFL-WT よりも RFFL-DN 変異体の方が Rab11-effector と強固に相互作用し、RE 上でトラップしたこと、(3) CID 法により RFFL-WT と Rab11-effector の強制的な結合によりクラスター化 ERC が形成されたことがあげられる。従って、RFFL-WT と RFFL-DN 変異体の発現量が同等の場合、RFFL-WT は Rab11-effector と結合し速やかに Ub 化を行い短時間で解離するのに対して、RFFL-DN 変異体は Rab11-effector を Ub 化することができず、長期的な相互作用が引き起こされ、クラスター化 ERC の形成を引き起こしていると考えられる。

第2節 RFFL-DN 変異体における積荷リサイクリング制御

RFFL-DN 変異体は積荷のエンドサイトーシスには影響を及ぼさず、CME や CIE によりエンドサイトーシスされた積荷をクラスター化 ERC に蓄積しリサイクリングを遅延させた。これらの表現型は、EHD1 KD (knockdown)^{45,54}、MICALL1 KD⁴⁴、class I Rab11-FIPs 変異体^{55,56}、MYO5B tail⁵⁷の表現型と類似している。従って、RFFL-DN 変異体はこれらの Rab11-effector の機能を阻害する可能性がある。Class I Rab11-FIPs (FIP1, 2, 5) は Rab11 と相互作用し、それぞれがリサイクリング経路の異なるプロセスで、膜のダイナミックな構造変化に影響を及ぼし、協調的な働きにより積荷のリサイクリングを制御している⁵⁸。Rab11-FIP2 は、ERC から Rab11 陽性の RE をアクチンのプラス末端の方向に移動することで輸送するモータータンパク質の1つである MYO5B と協調して働く^{57,59,60}。また、EHD1 は Rab11-FIP2⁶¹ や MICALL1 と相互作用することで ERC に局在化し、ERC の輸送や RE 膜のチューブ化や分離を行う^{44,62,63,64}。これらの知見から、RFFL-DN 変異体と Rab11-effector の強力な結合は、ERC から PM への積荷のリサイクリングおよび RE 膜の構造制御に必須な Rab11-effector 複合体 (e.g., MYO5B-Rab11-Rab11-FIPs-EHD1) 形成を阻害している可能性が考えられる。また、EHD1 や Rab11-FIP1C は EE/RE から TGN への輸送を制御しており^{46,65}、RFFL-DN 変異体は TGN46 をクラスター化 ERC へと混在させたことや、EHD1 や Rab11-FIP1C の KD と同様に^{65,66} RFFL-DN 変異体が LE から TGN へと輸送される CI-M6PR をクラスター化 ERC へと混在させたことから、RFFL を介した Rab11-effector の Ub 化が ERC から TGN への輸送も制御している可能性が考えられる。

アクチンや微小管依存的なモータータンパク質はエンドソームの輸送において非常に重要な役割を果たす。BioID法により RFFL の結合因子として MYO1B (myosin IB) , MYO6 (myosin VI) , MYO1E (myosin IE) , KIF5B (kinesin family member 5B) , KIF16B (kinesin family member 16B) が同定された (Fig.10E)。MYO1B は TGN⁶⁷ および EE⁶⁸ からの輸送を制御しており、膜のリサイクリングに参与している⁶⁹。MYO1E は ERC への TfR の輸送に参与している⁷⁰。MYO6 は Ub binding ドメインを有し^{71,72}、KD すると Rab5 を核周辺に集積させ⁷³、EE から ERC への積荷の輸送を阻害する⁷⁴。KIF5B は EE から RE への輸送を制御しており⁷⁵、RFFL-DN 変異体で観察されるような LY の核周辺への局在化を誘導する⁷⁶。これらの知見より、RFFL はリサイクリング経路においてこれらのモータータンパク質と Rab11-effector の相互作用を制御する可能性も考えられる。

第3節 RFFL-DN 変異体における EE から RE への分離制御

興味深いことに、RFFL-DN 変異体は Rab5 陽性 EE から Rab7 陽性 LE の分離を阻害することなく、Rab5 陽性 EE から Rab11 陽性 RE の分離を阻害した。この表現型と一致して、RFFL-DN 変異体は EGFR および Dextran の LY 輸送を阻害することなく、積荷のリサイクルのみを阻害した。LY へと輸送させる積荷タンパク質の中で、RFFL-DN 変異体によって輸送が阻害される積荷は rΔF508-CFTR のみであった。RFFL は peripheral quality control において構造異常膜タンパク質である rΔF508-CFTR と選択的に相互作用するため³⁴、RFFL-DN 変異体は EE/ERC において構造異常膜タンパク質をトラップし、LY 輸送を遅延させる可能性が考えられる。RFFL-DN 変異体による Rab5 陽性 EE から Rab11 陽性 RE への分離阻害はおそらく、Rab11-effector の機能阻害が原因であると考えられる。何故なら、Rab11-FIP2 は RE の制御だけではなく、EE や RE の初期段階にも関与する報告や⁷⁷、EHD1 や MICALL1 は、EE から RE への積荷輸送におけるチューブ状の膜形成に参与しており^{44,78}、EHD1 および MICALL1 KD により EE と ERC が混在してしまい積荷の輸送が阻害される報告があるためである⁷⁸。RFFL-DN 変異体も同様に EE を ERC に混在させることから、RFFL および他の E3-ligase による EHD1 および MICALL1 の Ub 化制御は、EE から RE へのチューブ状の小胞形成や EE から ERC への分離に必須であると考えられる。

第4節 RFFL を含む E3-ligase による Rab11-effector の Ub 化制御

本研究により, Rab11-effector である EHD1, MICALL1, Rab11-FIP1C, Rab11-FIP2 は Ub 化を受けることを明らかにした. この Ub 化修飾によるタンパク質発現量の変化は見られなかったことから, RFFL による Rab11-effector Ub 化は分解制御ではなく機能制御であると考えられる. *In vitro* において, RFFL は Rab11-effector を直接的に Ub 化することを証明した. RFFL-DN 変異体は Rab11-effector の Ub 化を減少させたが, RFFL KO による Ub 化の減少は EHD1, MICALL1, Rab11-FIP2 では確認されず, Rab11-FIP1C のみで確認された. 従って, Rab11-FIP1C の Ub 化は主に RFFL によって制御され, 他の Rab11-effector の Ub 化は RFFL を含む他の E3-ligase によって制御されていると考えられる. その他の E3-ligase の候補として, BioID 法により同定された RFFL 結合因子, RNF34 (ring finger protein 34) (known as CARP1: caspases-8/10 associated RING proteins 1), XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), SH3RF1 (SH3 domain containing ring finger 1) (known as POSH: Plenty of SH3s), DTX3L (deltex E3 ubiquitin ligase 3L) が考えられる (Fig.10F). RFFL のホモログである RNF34 は EE および LE に局在化する^{79,80}. 実際に RFFL RNF34 2KO 細胞を樹立し, TfR のリサイクリングに及ぼす影響を検証したところ, コントロール細胞に比べて 2KO 細胞の方が有意に TfR のリサイクリングを阻害する結果が得られている. この結果より, RNF34 が RFFL の機能を補っている可能性が強く示唆された. また, TGN に局在する E3-ligase である SH3RF1 は, TGN から PM への Gag ウイルス糖タンパク質の輸送を制御する⁸¹. DTX3L は EE に局在し, AIP4 E3-ligase 活性を調節する⁸². これらの知見より同定した E3-ligase は, Rab11-effector を Ub 化し, RFFL KO において RFFL 機能を補う可能性が考えられる.

第5節 Rab11-effector Ub 化によるリサイクリング制御

興味深いことに, Rab11-effector は poly- and/or multiple- and/or mono-Ub 化が検出されたが, その中でも特に mono-Ub 化が多く検出された. さらに, RFFL DN 変異体は Rab11-effector の Ub 化を減少させ, それはクラスター化 ERC における Rab11-effector の蓄積と一致した. Mono-Ub 化は分子間相互作用や分子内相互作用に影響を及ぼすという報告があることから¹⁸, RFFL は Rab11-effector の Ub

化により Rab11-effector 複合体形成や複合体解離を時空間的に制御している可能性が考えられる. RFFL KO は Rab11-FIP1C の Ub 化を減少させたが, TfR のリサイクリングには影響を及ぼさなかった. しかし, Rab11-FIP1 KD は TfR のリサイクリングに影響を及ぼさないことから^{47,83}, Rab11-FIP1C の機能に Ub 化が関与しないとは言い切れない. また, RFFL KO による Rab11-FIP2 の Ub 化減少は確認できなかったが, RFFL 過剰発現により Rab11-FIP2 の Ub 化は劇的に増加させた. Rab11-FIP2 は EHD1, Rab11-FIP1, Rab11-FIP5, MYO5B と相互作用し, これらの複合体形成に重要である^{57,61,84}. 我々は LC-MS/MS 解析において, Rab11-FIP2 の MYO5B 結合領域⁸⁵における Ub 化サイトを複数同定した. 以上のことから, RFFL は Rab11-FIP1C や FIP2 の Ub 化によってそれらの複合体形成を制御している可能性が考えられる. ERC は一箇所に集中して集まることで, RE 膜にモータータンパク質や細胞骨格が結合し, 効率よく PM へのリサイクリングが促進されている⁷⁸. 従って, RFFL も同様に濃縮された ERC において, 複数の Rab11-effector の Ub 化によって複合体形成を制御し, 効率の良いリサイクリングに貢献している可能性が考えられる.

第6節 Rab11-effector Ub 化制御機構の今後の発展

我々は, BioID 法により RFFL 結合因子として脱ユビキチン化酵素 (DUB: Deubiquitinating enzymes) VCPIP1 (valosin containing protein interacting protein 1) (known as VCIP135), USP15 (ubiquitin specific peptidase 15), USP43 (ubiquitin specific peptidase 43) を同定した (Fig.10F). VCPIP1 は syntaxin 5 の mono-Ub を脱ユビキチン化することで, SNARE 複合体形成やゴルジ構造を調節することが報告されている⁸⁶. USP15 は SQSTM1 (sequestosome 1) の脱ユビキチン化によるエンドソームの核周辺における局在化を調節する⁸⁷. 従って, RFFL 結合因子である DUB は Rab11-effector の脱ユビキチン化を制御し, リサイクリングの機能を制御する可能性が考えられる.

第7章 総括

Ub は積荷のエンドサイトーシス，エンドソーム選別機構を制御する重要な因子であり，その制御機構に積荷自身の Ub 化やエンドソーム関連因子の Ub 化が報告されている．これまで Ub は EE から LY へのエンドソーム成熟化機構に関与することが数多く報告されてきた．また近年，EE からゴルジ体への逆行性輸送経路の 1 つであるレトロマー依存的輸送経路における Ub 化の制御機構も報告されている．しかし，Rab11-effector による ERC を介したリサイクリング機能制御機構における，Ub の関与は全く知られていない．

本研究では，RFFL E3-ligase 不活性化変異体によってエンドソームの蓄積が引き起こされることを発見した．そこで，その蓄積が，どのエンドソーム区画に影響を及ぼすのかを検証した（第 2 章）．その結果，EE から LE への輸送には（RFFL の基質である $\Delta F508$ -CFTR を除いて）影響を及ぼさないのに対して，EE から RE および PM への輸送は，RFFL-DN 変異体によりクラスター化 ERC が形成され，阻害することが明らかとなった．

次に，RFFL-DN 変異体によるクラスター化 ERC 形成の分子メカニズム解明を試みた（第 3 章）．その結果，RFFL に点変異を導入し，E3-ligase 活性を不活性化することで，RFFL と Rab11-effector の結合の長期化が引き起こされた．また，RFFL-DN 変異体により Rab11-effector の Ub 化が有意に減少した．以上のことから，RFFL と Rab11-effector の結合の長期化が Rab11-effector の Ub 化の減少を引き起こし，クラスター化 ERC が形成されるのではないかと考えている．

最後に，RFFL-DN 変異体が強固に Rab11-effector と相互作用したことから，Rab11-effector が RFFL によって Ub 化制御を受けている可能性が考えられた．そこで，RFFL による Rab11-effector の Ub 化制御を検証した（第 4 章）．その結果，RFFL KO によって Rab11-effector の Rab11-FIP1C の Ub 化のみ有意に減少が確認され，RFFL 過剰発現では Rab11-FIP2 の Ub 化が上昇し，*in vitro* Ub 化再構成実験では，全ての Rab11-effector の Ub 化が RFFL によって再構成されたことから，Rab11-effector は RFFL によって Ub 化制御を受けていることが示唆された．また，RFFL KO によって Rab11-FIP1C 以外の Rab11-effector の Ub 化が減少

しなかった理由としては、BioID 法を用いて RFFL 結合因子として同定された E3-ligase が補っているためではないかと考えている。

以上、本研究の知見から、RFFL を初めとした E3 Ub 化酵素による Rab11-effector の Ub 化制御は、リサイクリング経路において非常に重要である可能性が高い。今回の研究により、エンドソームリサイクリングにおける Ub 化の役割について新たな知見が見出せたと考えている (Fig. 15)。今後、Rab11-effector の Ub 化および脱ユビキチン化による制御機構をさらに研究することで、エンドソームリサイクリングにおける Ub 化の明確な役割を明らかにできると考えている。

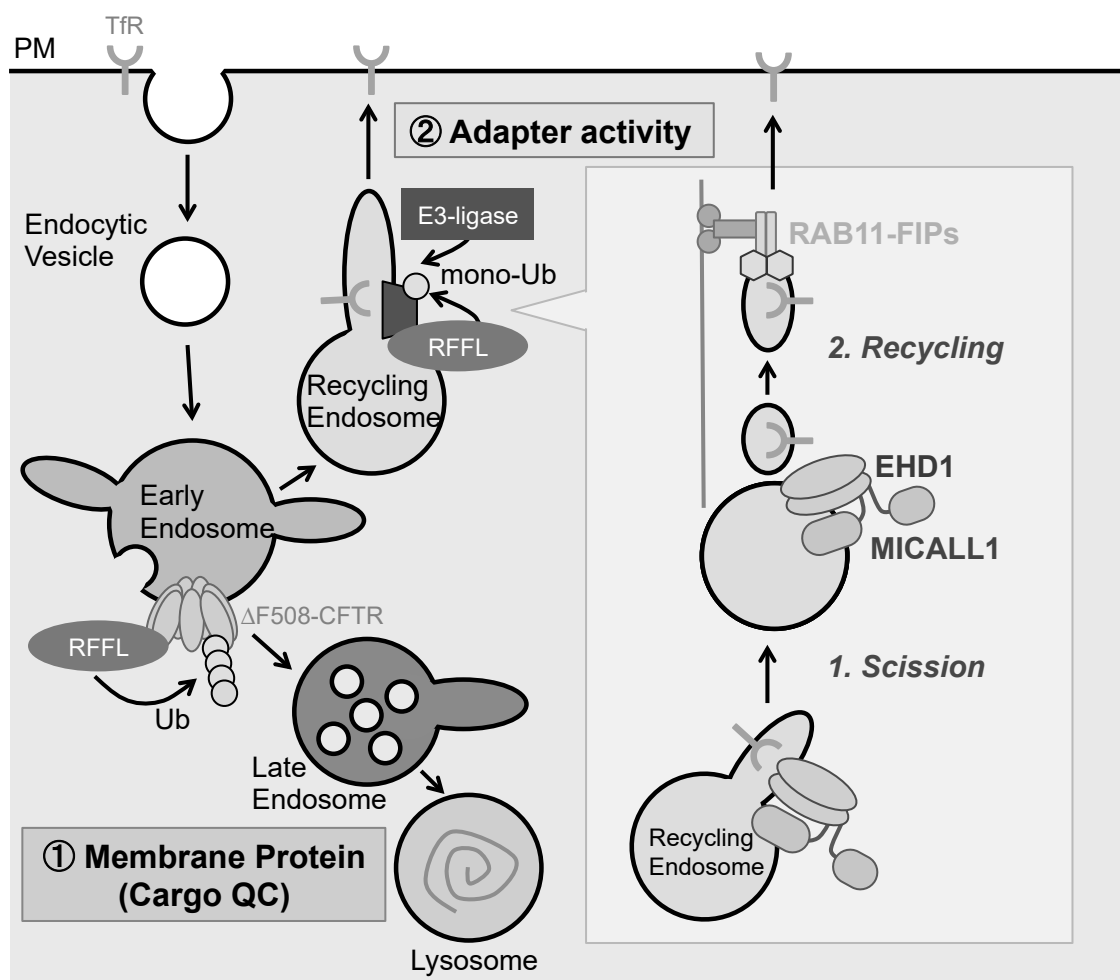


Figure 15. Molecular mechanisms of RFFL-mediated ubiquitination of Rab11 effectors

第8章 実験の部

第1節 実験材料

下記に本研究で用いた実験材料を示す.

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
CI-M6PR (D3V8C)	Cell Signaling Technology	Cat#143364
GM130 (5G8)	MBL	Cat#M179-3
EEA1 (3C10)	MBL	Cat#M176-3
Lamp1 (D2D11)	Cell Signaling Technology	Cat#9091P
Flag (1E6)	Wako	Cat#018-22381
HA (16B12)	BioLegend	Cat#901515
EGFR (6F1)	MBL	Cat#MI-12-1
MICALL1	Abnova	Cat#H00085377-B01P
EHD1	abcam	Cat#ab75886
Rab11FIP1 (N1N2)	GeneTex	Cat#GTX117197
Rab11FIP5	NOVUS Biologicals	Cat#NBP1-57009
V5 (6F5)	Wako	Cat#011-23591
Myc (9E10)	Wako	Cat#017-21871
GFP (mFX75)	Wako	Cat#012-22541
RFFL	SIGMA	Cat#HPA019492
GST (5A7)	Wako	Cat#013-21851
Ubiquitin (FK2)	Enzo Life Sciences	Cot#302-06751
Alexa Fluor® 594 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	JACKSON IMMUNO RESEARCH	Cat#715-585-150
Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	JACKSON IMMUNO RESEARCH	Cat#115-605-146
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	JACKSON IMMUNO RESEARCH	Cat#715-545-150
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		

DAPI	Wako	Cat#340-07971
Alexa Fluor 647-Transferrin	Thermo Fisher	Cat#T23366
TRITC-Dextran	SIGMA	Cat#T1162
Biotin-EGF	Thermo Fisher	Cat#E3477
Biotin	Wako	Cat#023-08716
NeutrAvidin agarose	Thermo Fisher	Cat#29200
Alexa Fluor 568-Streptavidin	Thermo Fisher	Cat#S-11226
HRP-NeutrAvidin	Thermo Fisher	Cat#31001
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher	Cat#34080
ImmunoStar Zeta	Wako	Cat#297-72403
rapamycin	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	Cat#R0097
recombinant Ub	Boston Biochem	Cat#U-100H
recombinant HA-Ub	Boston Biochem	Cat#U-110-01M
Experimental Models: Cell Lines		
HeLa-ΔF508 CFTR-3HA	33	N/A
HeLa-CFTR-3HA	33	N/A
CFBE-teton-ΔF508 CFTR-3HA	34	N/A
CFBE-teton-ΔF508 CFTR-3HA, RFFL-WT-BirA*-HA	This paper	N/A
CFBE-teton-ΔF508 CFTR-3HA, RFFL-H333A-BirA*-HA	This paper	N/A
293MSR	Thermo Fisher	Cat#R79507
293MSR-RFFL KO	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pDest-eGFP-N1	88	addgene #31796
pDest-RFFL-GFP	34	N/A
pDest-RFFL-Δ2-44-GFP	This paper	N/A
pDest-RFFL-Δ2-10-GFP	This paper	N/A
pDest-RFFL-Δ313-363-GFP	34	N/A
pDest-RFFL-H333A-GFP	This paper	N/A
pDest-RFFL-C316A, C319A-GFP	This paper	N/A

pDest-RFFL-C5A, C6A, C10A, C316A, C319A-GFP	This paper	N/A
pDest-RFFL-Δ2-44, C316A, C319A-GFP	This paper	N/A
pDest-RFFL-Δ2-10, C316A, C319A-GFP	This paper	N/A
mRFP-Rab5	38	addgene #14437
mRFP-Rab7	38	addgene #14436
DsRed-Rab11	89	addgene #12679
Lamp1-RFP	90	addgene #1817
mTagBFP2-Rab5	This paper	N/A
mCherry-Sec61	91	addgene #49155
mCherry-TGN46	Michael Davidson, unpublished	addgene #55145
pME-mCherry-FLAG-CD59-GPI	92	addgene #50378
pLX304-V5	93	addgene #25890
pLX304-BirA(R118G)-HA	This paper	N/A
pLX304-RFFL-BirA(R118G)-HA	This paper	N/A
pLX304-RFFL-H333A-BirA(R118G)-HA	This paper	N/A
pLX304-RFFL-V5	34	N/A
pLX304-RFFL-H333A-V5	This paper	N/A
pLX304-HB	34	N/A
pLX304-RFFL-HB	34	N/A
pLX304-RFFL-H333A-HB	34	N/A
pEZY-eGFP	94	addgene #18671
pEZY-eGFP-EHD1	This paper	N/A
pEZY-eGFP-MICAL1	This paper	N/A
pEZY-eGFP-Rab11FIP1	This paper	N/A
pEZY-eGFP-Rab11FIP2	This paper	N/A
pEZY-eGFP-Rab11FIP5	This paper	N/A
EGFR-GFP	95	addgene #32751
pDest-mCherry-N1	88	addgene #31907
pDest-RFFL-mCherry	34	N/A

pDest-RFFL-H333A-mCherry	This paper	N/A
pcDNA-Myc-Bio	This paper	N/A
pcDNA-Myc-Bio-EHD1	This paper	N/A
pcDNA-Myc-Bio-MICALL1	This paper	N/A
pcDNA-Myc-Bio-Rab11FIP1	This paper	N/A
pcDNA-Myc-Bio-Rab11FIP2	This paper	N/A
pcDNA-Myc-Bio-Rab11FIP5	This paper	N/A
YFP-tagged FRB (YR)	52	addgene #20148
pDest-EHD1-FRB-GFP	This paper	N/A
pDest-Rab11-FIP1C-FRB-GFP	This paper	N/A
pDestRab11-FIP5-FRB-GFP	This paper	N/A
pEZY-GFP-FRB-MICALL	This paper	N/A
CFP-FKBP (CF)	52	addgene #20160
pDest-RFFL-FKBP-mCherry	This paper	N/A
pcDNA3.1(-) HA-Ub	This paper	N/A
pcDNA3.1 (-) HA-Ub K0	This paper	N/A
GST-EHD1	This paper	N/A
GST-Rab11-FIP1C	This paper	N/A
His-Ube1/PET21d	96	addgene #34965
His ₆ -sumo-UbcH5c	34	N/A
His ₆ -sumo-RFFL	34	N/A

第2節 実験方法

第1項 細胞培養法

GripTite 293 MSR cells (293MSR, ThermoFisher) と RFFL KO 293MSR cells は DMEM (Wako: Cat#4330085) に 10% FBS (SIGMA: Cat#F7524), 500 µg/ml G418 (Wako: Cat#077-06433), Penicillin (100 units/ml) -Streptomycin (100 µg/ml) (Wako: Cat#16823191)を添加したものを細胞培養溶液として用いた.

WT-CFTR-3HA (HeLa-CFTR) および ΔF508-CFTR-3HA (HeLa-ΔF508) 安定高発現 HeLa cells は DMEM に 10% FBS, 2 µg/ml puromycin (Sigma: Cat#P9620-10ML), 100 units/ml Penicillin-100 µg/ml Streptomycin を添加したものを細胞培養溶液として用いた.

RFFL-BirA^{*}-HA および RFFL-H333A-BirA^{*}-HA 安定高発現 CFBE41o- cells は MEM (Wako: Cat#5107615) に 10% FBS, 200 µg/ml G418, 3 µg/ml puromycin, 10 µg/ml blasticidin (科研製薬株式会社 Cat#KK-400) を添加したものを細胞培養溶液として用いた. 培養皿は 10 µg/ml Fibronectin (Wako: Cat#6305591)をコーティングし培養した.

なお, すべての細胞培養における培養皿は 10 cm dish (Thermo Fisher: Cat#172958)を使用した.

第2項 遺伝子導入法

本研究では, Polyethylenimine (PEI) Max (Polysciences Inc, Warrington, PA) を用いたリポフェクション法により遺伝子導入を行った. Plasmid 1 µg に対し 1µg/µl の PEI 溶液 3 µl 用した. まず無血清培地 (Opti-MEM)に PEI を加え 20 分間室温で反応させた (Sol A). その後目的遺伝子を Sol A に加えさらに室温で 20 分間反応させた (Sol B). 細胞を 60-80% confluent まで培養し, 無血清培地 (Opti-MEM)に置換した. そこに Sol B を滴下し, 37°C 5% CO₂ で 24-48 時間培養した.

第3項 免疫蛍光染色法

カバーガラス (松浪: Cat#83-0200) 上に培養した細胞から培養液を除き, PBS (-) で2回細胞を洗浄し, 4% paraformaldehyde in PBS (-) を1ml加え, 室温で20分間静置し, 細胞を固定した. その後, 0.1% Triton-X100 in PBS (-) を1ml加え, 室温で5分間静置し, 細胞を膜透過した. PBS (-) 3回洗浄し, 0.5% BSA in PBS (-) (BSA-PBS) を1ml加え, 室温で30分間静置し, 細胞をブロッキングした. その後, BSA-PBS で希釈した一次抗体を用いて室温, 1時間 一次抗体反応を行った. 一次抗体反応後, PBS (-) で3回洗浄し, BSA-PBS で希釈した二次抗体を用いて室温で1時間, 二次抗体反応を行った. 二次抗体反応後, 細胞を PBS (-) で3回洗浄し, PBS (-) で5000倍希釈した DAPI を500 μ l加え, PBS (-) で3回洗浄後, 細胞を VECTASHIELD mounting medium (VECTOR Laboratories) および ProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher) を用いて封入し, 共焦点レーザー顕微鏡により細胞を観察した.

Lamp1, CI-M6PR, Rab11-FIP1, Rab11-FIP5 は0.1% saponin を1ml加え, 室温で15分間静置し, 細胞を膜透過した. EHD1 は0.2% saponin を1ml加え, 室温で15分間静置し, 細胞を膜透過した.

オルガネラマーカである, mRFP-Rab5 (addgene #14437), mRFP-Rab7 (addgene #14436), DsRed-Rab11 (addgene #12679), mCherry-TGN46 (addgene #55145), Lamp1-RFP (addgene #1817), mCherry-Sec61 (addgene #49155) は PEI Max を用いて遺伝子導入した.

対物レンズ HC PL APO 63X/NA 1.40 を装着した, 共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) を用い, 観察を行った. 画像処理は Photoshop CS6 (Adobe) を用いた. 共局在解析 (Pearson's correlation coefficient および Mander's correlation coefficient) は Volocity 5 (PerkinElmer) を用いた.

超解像度化の画像の取得は, 共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) に搭載された HyVolution システム (Leica Microsystems) を用いた. x-y-z 画像取得は, 0.5 Airy unit pinhole, voxel sizes 43 nm/pixel (x, y - axes), 130 nm/pixel (z - axis) に設定を行った. また, Huygens Essential software (Scientific Volume Image, Hilversum, The Netherlands)を用いてデコンボリューションした.なお, 超解像度画像取得においては No.1S ハイトランスカバーガラス (松浪: Cat#CS00802) を使用した.

免疫蛍光染色法に用いた抗体の希釈倍率を下記に示す.

抗体	希釈倍率
CI-M6PR (D3V8C)	1:400
GM130 (5G8)	1:200
EEA1 (3C10)	1:500
Lamp1 (D2D11)	1:200
Flag (1E6)	1:500
HA (16B12)	1:500
EGFR (6F1)	1:100
MICALL1	1:500
EHD1	1:500
Rab11FIP1 (N1N2)	1:500
Rab11FIP5	1:500
Alexa Fluor® 594 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	1:500
Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:500
Alexa Fluor® 488 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	1:500
DAPI	1:5000
Alexa Fluor 568-Streptavidin	1:2000

第4項 Transferrin uptake assay

HeLa-ΔF508 cells を serum-free medium にて 45 分間 37°C にてインキュベート後, 25 μg/ml Alexa Fluor 647-Tf (Thermo Fisher) を添加した pre-warmed medium にて 2.5 時間 37°C にてインキュベートした. インキュベート後, PBS にて 2 回細胞を洗浄し, full medium にて各時間 37°C にてインキュベートした. 細胞を固定化後, 共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) を用い, 観察を行った.

第5項 Time-lapse imaging of TfR recycling

HeLa-ΔF508 cells を serum-free medium にて 45 分間 37°C にてインキュベート後, 25 μg/ml Alexa Fluor 647-Tf (Thermo Fisher) を添加した pre-warmed medium

にて 2.5 時間 37°C にてインキュベートし, PBS にて細胞を洗浄後, full medium にて 1 時間 37°C にてインキュベートした (T-0). その後, NaKH solution (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM MgCl₂, pH 7.3) に浸し, 37°C にて Time-lapse imaging を 1 時間行った. Time-lapse imaging は対物レンズ HC PL APO 63X/NA 1.40 を装着した共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) を用いた. z-section は 2 分おきに取得した. 細胞内に取り込まれた Alexa Fluor 647-Tf の fluorescence intensities は LAS X software を用いて取得し, Microsoft Excel を用いて解析した.

第6項 CFTR uptake assay

HeLa-CFTR および HeLa- Δ F508 cells を anti-HA antibody (16B12, BioLegend) を添加した pre-warmed medium にて 2.5 時間 37°C でインキュベートし (T-0), PBS にて細胞を洗浄後, full medium にて各時間 37°C にてインキュベートした. 細胞を固定化後, 0.1% Triton-X100 in PBS (-) にて膜透過し, Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG (Thermo Fisher) にて染色した. Rescued Δ F508-CFTR の染色は anti-HA antibody 反応前に 26°C で 36-48 時間インキュベートした. 観察は共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) を使用した.

第7項 CD59 uptake assay

CD59-Flag (addgene #50378) を HeLa- Δ F508 cells に遺伝子導入し, BSA-PBS にてブロッキング後, anti-Flag antibody (1E6, Wako) in BSA-PBS を 1 時間 4°C でインキュベートした (T-0). PBS にて細胞を洗浄後, full medium にて各時間 37°C にてインキュベートした. 細胞を固定化後, 0.1% Triton-X100 in PBS (-) にて膜透過し, Alexa Fluor. 647-conjugated anti-mouse IgG (Thermo Fisher) にて染色した.

第8項 Dextran uptake assay

HeLa- Δ F508 cells を 1 mg/ml TRITC-Dextran (Sigma) を添加した pre-warmed

medium にて 1 時間 37°C でインキュベートし (T-0), PBS にて細胞を洗浄後, full medium にて 3 時間 37°C にてインキュベートした. 細胞を固定化後, 0.1% saponin にて膜透過し, Dextran と LY オルガネラマーカークとの共局在解析のため anti-Lamp1 (D2D11, Cell Signaling Technology) antibody を用い免疫染色した. 観察は共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) を使用した.

第9項 EGF uptake assay

HeLa-ΔF508 cells を serum-free medium にて overnight 37°C にてインキュベート後, 10, 100 ng/ml EGF (PeproTech) および 200 ng/ml EGF-Biotin (ThermoFisher) and streptavidin-Alexa Fluor 594 complex を添加した pre-warmed medium にて各時間 37°C にてインキュベートした. 免疫染色における EGFR は anti-EGFR (6F1, MBL) を用いた. EGF とオルガネラマーカークとの共局在解析は anti-EEA1 (3C10, MBL) および anti-Lamp1 (D2D11, Cell Signaling Technology) antibody を用いた. Lamp1 染色は 0.1% saponin にて膜透過を行った. 観察は共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) を使用した.

第10項 Pull-down assay

293MSR cells を 10 cm dish (Thermo Fisher: Cat# 172958) に 60 % confluent になるよう播種し, RFFL および Rab11 effectors を transfection した. Transfection から 40 時間以上経過した後, 1 ml の Mild lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% NP-40, pH 8.0, supplemented with 1 mM PMSF, 5 μg/ml leupeptin and pepstatin) にて可溶化し, 60 μl の NeutrAvidin agarose (Thermo Fisher) にて 2 時間 4°C でインキュベートした. その後, 500 μl の Mild lysis buffer にて 4 回 Wash 後, 10% β-mercaptoethanol と 3 mM biotin を添加した 100 μl 2X Laemmli sample buffer にて 10 分間 98°C インキュベートし Elution した. 遠心後 (6000 rpm, 1 分間), supernatant を SDS-PAGE 及び Western blotting 法に用いた.

第11項 Western blotting

Western blotting 法は常法に従った. なお, 以下にその方法を示す. まず, 細胞

から, Lysis buffer を用いて, cell lysate を回収し, BCA 法によりタンパク定量を行い, 各サンプルのタンパク量を一定にした. 各サンプルについて SDS-PAGE を行った後, ニトロセルロース膜に転写 (100 V, 2 h) した. 転写したニトロセルロース膜は 5% スキムミルクで 30 分~1 時間 室温でブロッキングを行った. 0.1 % PBS-Tween で洗浄後, PBS-Tween で希釈した一次抗体を用いて, 室温 1 時間, 一次抗体反応を行った. 一次抗体反応後, ニトロセルロース膜を洗浄し, 0.1 % PBS-Tween で希釈した二次抗体を用いて, 室温 1 時間, 二次抗体反応を行った. 2 次抗体反応終了後, ニトロセルロース膜を洗浄し, Chemiluminescence solution A 500 μ l と Chemiluminescence solution B 500 μ l (/1 メンブレン) [ImmunoStar Zeta (Wako)] を混ぜ, 添加し, ニトロセルロース膜を浸した後, 化学発光を LAS-4000miniPR (FUJIFILM) で検出した.

ビオチン化タンパク質の検出において, ブロッキングおよび HRP-streptavidin の希釈は 2.5% BSA in PBS-Tween を用いた.

Western blotting に用いた抗体の希釈倍率を下記に示す.

抗体名	希釈倍率
V5 (6F5)	1:1000
Myc (9E10)	1:1000
GFP (mFX75)	1:1000
HA (16B12)	1:1000
RFFL	1:200 (Canget)
GST	1:1000
Ub (FK2)	1:200 (Canget)
HRP-NeutrAvidin	1:5000

第12項 *In cell* Ubiquitin assay

293MSR cells を 10 cm dish (Thermo Fisher: Cat# 172958) に 60 % confluent になるよう播種し, HA-Ub, RFFL-V5 および Myc-Bio (MB)-EHD1, MB-MICALL1, MB-Rab11-FIP1C, MB-Rab11-FIP2, MB-Rab11-FIP5 を transfection 後, 500 μ l の lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1% SDS, 1 mM EDTA) にて細胞を可

溶化後、10 分間 98°C にてボイルした。cell lysates を 27-gauge needle に数回通すことで粘度を減少させた。1.5 ml の 1.33% Triton-X100 buffer を用いて、SDS の濃度を 0.25% になるよう希釈し、60 μ l の NeutrAvidin agarose (Thermo Fisher) を overnight 4°C でインキュベートした。その後、2 M urea を添加した RIPA buffer 500 μ l にて 5 回 Wash 後、10% β -mercaptoethanol と 3 mM biotin を添加した 2X Laemmli sample buffer 100 μ l にて 10 分間 98°C インキュベートし Elution した。遠心後 (6000 rpm, 1 分間), supernatant を SDS-PAGE 及び Western blotting 法に用いた。

第13項 CID assay

HeLa-CFTR および HeLa- Δ F508 cells に YFP-FRB, EHD1-FRB-GFP, GFP-FRB-MICALL1, Rab11-FIP1C-FRB-GFP, Rab11-FIP2-FRB-GFP, Rab11-FIP5-FRB-GFP, CFP-FKBP, RFFL-FKBP-mCherry を遺伝子導入後、500 nM Rapamycin を添加した medium を 5 分間 37°C にてインキュベートした。full medium に変更し 16 時間 37°C にてインキュベートし、固定化し共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) にて観察した。

第14項 Cellular localization analysis of biotinylated proteins

RFFL-BirA^{*}-HA および RFFL-H333A-BirA^{*}-HA 安定高発現 CFBE41o- cells を 50 μ M biotin を添加した medium にて overnight 37°C でインキュベートした。細胞固定化後、0.1% Triton-X100 in PBS (-) を用い膜透過した。その後、Alexa Fluor 568-conjugated streptavidin (Invitrogen) および anti-HA antibody, Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody を用いて染色した。観察は共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) を使用した。

第15項 BioID assay

RFFL-BirA^{*}-HA および RFFL-H333A-BirA^{*}-HA 安定高発現 CFBE41o- cells を Fibronectin コートした 10 cm dish に播種し、50 μ M biotin を添加した medium にて overnight 37°C でインキュベートした。1 ml の RIPA buffer (20 mM Tris, 150 mM

NaCl, 0.1 % SDS, 1 % Triton-X100, 0.5 % Sodium Deoxycholate)にて細胞を可溶化後, 50 μ l の NeutrAvidin agarose (Thermo Fisher) にて overnight 4°C でインキュベートした. その後, 1 ml の Wash buffer 1 (1% SDS) で 2 回, 1 ml の Wash buffer 2 (0.1% deoxycholic acid, 1% Triton-X100, 1m M EDTA, 500 mM NaCl, 50 mM HEPES), 1 ml の Wash buffer 3 (0.5% deoxycholic acid, 0.5% NP-40, 1mM EDTA, 250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl pH7.4) で 1 回 Wash 後, 50 μ l の 2X Laemmli sample buffer (containing 10% β -mercaptoethanol) にて 10 分間 98°C インキュベートし Elution した. 遠心後 (6000 rpm, 1 分間), supernatant を SDS-PAGE, Western blotting 法及び Silver stain 法に用いた.

第16項 Silver stain

Silver stain は EzStain Silver (ATTO: AE-1360) を使用した. 電気泳動したゲルを 100 ml の固定液 (蒸留水 : 40 ml + メタノール : 50 ml + 酢酸 : 10 ml + S-1 溶液 : 1 ml) に浸し, overnight で振とうした. 固定液を捨て, 100 ml の 30%メタノールで 2 回 10 分間浸透し, 蒸留水で 1 回 10 分間浸透した. 蒸留水を捨て, 100 ml の染色液 (蒸留水 : 100 ml + S-2 溶液 : 1 ml) を加え, 10 分間浸透した. 染色液を捨て, 100 ml の蒸留水を加え, 30 秒間浸透した. 蒸留水を捨て, 100 ml の発色液 (蒸留水 : 200 ml + S-3 溶液 : 1 ml + S-4 溶液 : 1 ml) を加え, 30 秒間浸透した. 最初の発色液を捨て, 残りの発色液 100 ml を加え, 適切な染色像になる少し前まで浸透した. 発色液を捨て, 100 ml の停止液 (蒸留水 : 100 ml + 酢酸 : 1 ml) を加え, 10 分間浸透した. 停止液を捨て, 100 ml の蒸留水を加え, 5 分間浸透した.

第17項 Establishment of RFFL KO cells by CRISPR/CAS9 system

RFFL 遺伝子座における guide RNA (gRNA) の設計は CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>). を用いた. 20-bp guide sequence RFFL gRNA #1 (5'-GGCTCCGAACACTTCTTAAT-3') および RFFL gRNA #2 (5'-CACAATGCT TAGAATGTCGT-3') を pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (addgene #62988) に BbsI restriction enzyme site を用いて挿入し, RFFL sgRNA expression vectors を作製した. RFFL KO 293MSR cells は, 293MSR cells に2つの RFFL sgRNA expression

vectors を co-transfection し, 翌日 3 μ g/ml puromycin にて 1 日セレクション後, 1 cell を 96 well plate の 1 well に播種し単一のクローンを取得し樹立した. RFFL KO は Western blotting 法および DNA シーケンスにより確認した. シーケンスは RFFL 遺伝子座を PCR (FW primer (5'-GTCCCCAGTACCTGCATTTGATATG-3'), RV primer (5'-GGGAGGGTGCACACCTAGACACCAT-3')) にて増幅し, PCR product を pMD20-T に Mighty TA-cloning Kit (Takara Bio) を用いて挿入し, シーケンス解析を行った.

第18項 TfR recycling assay

293MSR (WT) および RFFL KO cells を 24 well plate に播種し, serum-free medium にて 45 分間 37°C にてインキュベート後, 25 μ g/ml Transferrin Biotin-XX conjugate (Tf-Biotin, Thermo Fisher) を添加した pre-warmed medium にて 2.5 時間 37°C にてインキュベートし (T-0), PBS にて細胞を洗浄後, full medium にて 4 時間 37°C にてインキュベートした (T-4). 細胞を固定化後, 0.1% Triton-X100 in PBS (-) にて膜透過し, 0.5% BSA-PBS にてブロッキングを行い, HRP-NeutrAvidin (Thermo Fisher) in 0.5% BSA-PBS を 1 時間室温でインキュベートした. PBS にて細胞を 6 回洗浄後, Amplex Red (Thermo Fisher) を 20 分間室温で反応させ HRP 活性を plate reader (Varioskan, Thermo Fisher) にて測定した (544-nm excitation, 590-nm emission wavelengths).

第19項 Protein purification

His₆-E1 (UBE1, addgene #34965), His₆-sumo-UbcH5c, His₆-sumo-RFFL, GST-EHD1, and GST-Rab11-FIP1C は BL21 rosetta2 *E. coli* strain (Merck Millipore) を用いて発現させた. *E. coli* は 1 mg/ml lysozyme を on ice で 30 分間インキュベート後, sonication を行い可溶化した. His-tagged proteins および GST-tagged proteins は Ni-affinity および Glutathione-affinity を用いて精製した.

第20項 *In vitro* ubiquitination assay

精製した GST-EHD1 (1.5 μ g) は 0.2 μ M His₆-E1, 4 μ M His₆-sumo-UbcH5c, 2 μ M

His₆-sumo-RFFL, 20 μ M Ub と共に 45 μ l の reaction buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM ATP, 2 mM DTT, and 20 μ M MG-132) と混ぜ, 2 時間 37°C で反応させた. 反応後 5 μ l を Western blotting 法を用いて RFFL のユビキチン酵素活性を確認した. 残りのサンプル (40 μ l) から Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences) を用いて GST-EHD1 を精製し, 精製した EHD1 の Ub 化を Western blotting 法を用いて anti-Ub antibody にて検出した. Rab11-FIP1C の Ub 化は, GST-Rab11-FIP1C (2 μ g) を Glutathione Sepharose 4B に固定化後, 0.2 μ M His₆-E1, 4 μ M His₆-sumo-UbcH5c, 2 μ M His₆-sumo-RFFL, 20 μ M Ub 20 μ l の reaction buffer と混ぜ, 2 時間 37°C で反応した. 反応後, 上清を Western blotting 法を用いて RFFL のユビキチン酵素活性を確認した. Glutathione Sepharose 4B から GST-Rab11-FIP1C を溶出後, 溶出した GST-Rab11-FIP1C の Ub 化を Western blotting 法を用いて anti-Ub antibody にて検出した.

MICALL1 および Rab11-FIP2 は, MB-MICALL1 および MB-Rab11-FIP2 を transfection した 293MSR cells を mild lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% NP-40, pH 8.0, supplemented with 1 mM PMSF, 5 μ g/ml leupeptin and pepstatin) にて可溶化し, NeutrAvidin agarose (Thermo Fisher) にて 2 時間 4°C でインキュベートし精製した. その後, mild lysis buffer にて 4 回 agarose beads を洗浄後, agarose beads に結合し精製された MB-MICALL1 および MB-Rab11-FIP2 と 0.2 μ M His₆-E1, 4 μ M His₆-sumo-UbcH5c, 4 μ M His₆-sumo-RFFL, 20 μ M HA-Ub (BostonBiochem) を reaction buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM ATP, 2 mM DTT, 20 μ M MG-132) と混ぜ 2 時間 37°C で反応した. 反応後, 上清を Western blotting 法を用いて RFFL のユビキチン酵素活性を確認した. Agarose beads を mild lysis buffer にて 3 回, 1% SDS buffer で 3 回, high salt buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl) で 3 回, 2 M urea in RIPA buffer にて 2 回洗浄した. 洗浄は全て 37°C にて 5 分間 mixing shaker を用いて行った. Wash 後, MB-MICALL1 および MB-Rab11-FIP2 の Ub 化は, 10% β -mercaptoethanol と 3 mM biotin を添加した 2X Laemmli sample buffer にて 10 分間 98°C インキュベートし溶出し, Western blotting 法を用いて anti-HA antibody にて検出した.

第21項 Statistical analysis

定量的データは全て独立した実験を 2 回以上繰り返し行い，データを平均 □ SEM で示している．統計的有意差は Excel software (Microsoft) を用いて，two-tailed paired Student's t-test によって評価した．

第22項 Transmission electron microscopy (TEM)

TEM は共同研究先 株式会社 東海電子顕微鏡解析 川村 秀二 博士に行っていた。

第23項 Scanning electron microscopy (SEM)

SEM は共同研究先 旭川医科大学 甲賀 大輔 准教授, 鹿児島大学 久住 聡 助教に行っていた。

第24項 Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

EHD1, MICALL1, Rab11-FIP1C, Rab11-FIP2 の Ub 化サイトの同定における LC-MS/MS 解析は 東京工業大学 遠藤 彬則 博士, 福嶋 俊明 助教, 駒田 雅之 教授に行っていた。

BioID assay RFFL 結合因子同定における LC-MS/MS 解析は 理研 CLST 中川 れい子 博士に行っていた。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御指導と御鞭撻を賜り，本稿作成にあたり 多大なる御教示，御援助を戴きました 関西学院大学 理工学部 生命医化学科 沖米田 司准教授に心から厚く感謝の意を表します。

本研究に際し，御指導と御校閲を賜りました 関西学院大学理工学部 生命医化学科 福田 亮介助教に心から感謝の意を表します。

本研究に際し，御指導とご鞭撻を賜り，多くの面でお世話になりました 関西学院大学理工学部 生命医化学科 海老原 史樹文教授 関西学院大学理工学部 生命医化学科 平井 洋平教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際し，透過型電子顕微鏡観察において多大なご協力をいただきました 株式会社 東海電子顕微鏡解析 川村 秀二 博士に深謝いたします。

本研究に際し，走査型電子顕微鏡観察において多大なご協力をいただきました 旭川医科大学 甲賀 大輔 准教授 鹿児島大学 久住 聡 助教に深謝いたします。

本研究に際し，RFFL 結合因子同定において多大なご協力をいただきました 理研 CLST 中川 れい子 博士に深謝いたします。

本研究に際し，Ub 化サイト同定において多大なご協力をいただきました 東京工業大学 遠藤 彬則 博士，福嶋 俊明 助教，駒田 雅之 教授に深謝いたします。

本研究に際し，ノックアウト細胞樹立において多大なご協力をいただきました 関西学院大学生命医化学科 関 由行 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、多大なご協力をいただきました関西学院大学 生命医化学科 沖米田研究室 宇仁田 伸君，小野 裕司君に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、切磋琢磨し、多くの面で刺激し合い、共に成長してきた沖米田研究室の諸氏に深謝致します。

最後に、これまで私を支えてくれた、家族に心から感謝します。

参考文献

- 1 Doherty, G. J. & McMahon, H. T. in *Annual Review of Biochemistry* Vol. 78 *Annual Review of Biochemistry* 857-902 (Annual Reviews, 2009).
- 2 Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 597-608, doi:10.1038/nrm2755 (2009).
- 3 Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *Embo Journal* **30**, 3481-3500, doi:10.1038/emboj.2011.286 (2011).
- 4 Maxfield, F. R. Role of Endosomes and Lysosomes in Human Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a016931 (2014).
- 5 Wandinger-Ness, A. & Zerial, M. Rab Proteins and the Compartmentalization of the Endosomal System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a022616 (2014).
- 6 Li, X. Y. & DiFiglia, M. The recycling endosome and its role in neurological disorders. *Progress in Neurobiology* **97**, 127-141, doi:10.1016/j.pneurobio.2011.10.002 (2012).
- 7 Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. & Parton, R. G. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *Journal of Cell Biology* **135**, 913-924, doi:10.1083/jcb.135.4.913 (1996).
- 8 Naslavsky, N. & Caplan, S. EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends in Cell Biology* **21**, 122-131, doi:10.1016/j.tcb.2010.10.003 (2011).
- 9 Horgan, C. P. & McCaffrey, M. W. The dynamic Rab11-FIPs. *Biochemical Society Transactions* **37**, 1032-1036, doi:10.1042/bst0371032 (2009).
- 10 Clague, M. J., Liu, H. & Urbe, S. Governance of Endocytic Trafficking and Signaling by Reversible Ubiquitylation. *Developmental Cell* **23**, 457-467, doi:10.1016/j.devcel.2012.08.011 (2012).
- 11 Piper, R. C. & Lehner, P. J. Endosomal transport via ubiquitination. *Trends in Cell Biology* **21**, 647-655, doi:10.1016/j.tcb.2011.08.007 (2011).
- 12 Haglund, K. & Dikic, I. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *Journal of Cell Science* **125**, 265-275,

- doi:10.1242/jcs.091280 (2012).
- 13 Piper, R. C., Dikic, I. & Lukacs, G. L. Ubiquitin-Dependent Sorting in Endocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**, doi:10.1101/cshperspect.a016808 (2014).
 - 14 Raiborg, C. & Stenmark, H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* **458**, 445-452, doi:10.1038/nature07961 (2009).
 - 15 Eden, E. R., Huang, F. T., Sorkin, A. & Futter, C. E. The Role of EGF Receptor Ubiquitination in Regulating Its Intracellular Traffic. *Traffic* **13**, 329-337, doi:10.1111/j.1600-0854.2011.01305.x (2012).
 - 16 Savio, M. G. *et al.* USP9X Controls EGFR Fate by Deubiquitinating the Endocytic Adaptor Eps15. *Current Biology* **26**, 173-183, doi:10.1016/j.cub.2015.11.050 (2016).
 - 17 Gschweidl, M. *et al.* A SPOPL/Cullin-3 ubiquitin ligase complex regulates endocytic trafficking by targeting EPS15 at endosomes. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.13841 (2016).
 - 18 Hoeller, D. *et al.* Regulation of ubiquitin-binding proteins by monoubiquitination. *Nature Cell Biology* **8**, 163-U145, doi:10.1038/ncb1354 (2006).
 - 19 Ramanathan, H. N., Zhang, G. F. & Ye, Y. H. Monoubiquitination of EEA1 regulates endosome fusion and trafficking. *Cell and Bioscience* **3**, doi:10.1186/2045-3701-3-24 (2013).
 - 20 Hanafusa, H. *et al.* Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nature Communications* **2**, doi:10.1038/ncomms1161 (2011).
 - 21 Xu, P. *et al.* COPI mediates recycling of an exocytic SNARE by recognition of a ubiquitin sorting signal. *Elife* **6**, doi:10.7554/elife.28342.001 (2017).
 - 22 Hao, Y. H. *et al.* Regulation of WASH-Dependent Actin Polymerization and Protein Trafficking by Ubiquitination. *Cell* **152**, 1051-1064, doi:10.1016/j.cell.2013.01.051 (2013).
 - 23 Hao, H. *et al.* USP7 Acts as a Molecular Rheostat to Promote WASH-Dependent Endosomal Protein Recycling and Is Mutated in a Human Neurodevelopmental Disorder. *Molecular Cell* **59**, 956-969,

- doi:10.1016/j.molcel.2015.07.033 (2015).
- 24 Collins, F. S. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**, 774-779 (1992).
- 25 Tsui, L. C. THE CYSTIC-FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR GENE. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **151**, S47-S53 (1995).
- 26 Toso, C., Williams, D. M. & Noone, P. G. Inhaled antibiotics in cystic fibrosis: A review. *Annals of Pharmacotherapy* **30**, 840-850 (1996).
- 27 Burns, J. L. *et al.* Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *Journal of Infectious Diseases* **179**, 1190-1196, doi:10.1086/314727 (1999).
- 28 Riordan, J. R. *et al.* IDENTIFICATION OF THE CYSTIC-FIBROSIS GENE - CLONING AND CHARACTERIZATION OF COMPLEMENTARY-DNA. *Science* **245**, 1066-1072 (1989).
- 29 Lukacs, G. L. *et al.* CONFORMATIONAL MATURATION OF CFTR BUT NOT ITS MUTANT COUNTERPART (DELTA-F508) OCCURS IN THE ENDOPLASMIC-RETICULUM AND REQUIRES ATP. *Embo Journal* **13**, 6076-6086 (1994).
- 30 Lukacs, G. L. & Verkman, A. S. CFTR: folding, misfolding and correcting the Delta F508 conformational defect. *Trends in Molecular Medicine* **18**, 81-91, doi:10.1016/j.molmed.2011.10.003 (2012).
- 31 Van Goor, F. *et al.* Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18843-18848, doi:10.1073/pnas.1105787108 (2011).
- 32 Rehman, A., Baloch, N. U. A. & Janahi, I. A. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *New England Journal of Medicine* **373**, 1783-1783, doi:10.1056/NEJMc1510466 (2015).
- 33 Okiyoneda, T. *et al.* Peripheral Protein Quality Control Removes Unfolded CFTR from the Plasma Membrane. *Science* **329**, 805-810, doi:10.1126/science.1191542 (2010).
- 34 Okiyoneda, T. *et al.* Chaperone-Independent Peripheral Quality Control of CFTR by RFFL E3 Ligase. *Developmental Cell* **44**, 694-+,

- doi:10.1016/j.devcel.2018.02.001 (2018).
- 35 Marsh, E. W., Leopold, P. L., Jones, N. L. & Maxfield, F. R. OLIGOMERIZED TRANSFERRIN RECEPTORS ARE SELECTIVELY RETAINED BY A LUMENAL SORTING SIGNAL IN A LONG-LIVED ENDOCYTIC RECYCLING COMPARTMENT. *Journal of Cell Biology* **129**, 1509-1522, doi:10.1083/jcb.129.6.1509 (1995).
- 36 Sonnichsen, B., De Renzis, S., Nielsen, E., Rietdorf, J. & Zerial, M. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5 and Rab11. *Journal of Cell Biology* **149**, 901-913, doi:10.1083/jcb.149.4.901 (2000).
- 37 Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749, doi:10.1016/j.cell.2005.06.043 (2005).
- 38 Vonderheit, A. & Helenius, A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of semliki forest virus to late endosomes. *Plos Biology* **3**, 1225-1238, doi:10.1371/journal.pbio.0030233 (2005).
- 39 Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell* **141**, 497-508, doi:10.1016/j.cell.2010.03.011 (2010).
- 40 Lukacs, G. L., Segal, G., Kartner, N., Grinstein, S. & Zhang, F. Constitutive internalization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator occurs via clathrin-dependent endocytosis and is regulated by protein phosphorylation. *Biochemical Journal* **328**, 353-361 (1997).
- 41 Donaldson, J. G., Porat-Shliom, N. & Cohen, L. A. Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular Signalling* **21**, 1-6, doi:10.1016/j.cellsig.2008.06.020 (2009).
- 42 Sigismund, S. *et al.* Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental Cell* **15**, 209-219, doi:10.1016/j.devcel.2008.06.012 (2008).
- 43 Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. & Burke, B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* **196**, 801-810, doi:10.1083/jcb.201112098 (2012).
- 44 Sharma, M., Giridharan, S. S. P., Rahajeng, J., Naslavsky, N. & Caplan, S.

- MICAL-L1 Links EHD1 to Tubular Recycling Endosomes and Regulates Receptor Recycling. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 5181-5194, doi:10.1091/mbc.E09-06-0535 (2009).
- 45 Rapaport, D. *et al.* Recycling to the plasma membrane is delayed in EHD1 knockout mice. *Traffic* **7**, 52-60, doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00359.x (2006).
- 46 Lin, S. X., Grant, B., Hirsh, D. & Maxfield, F. R. Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nature Cell Biology* **3**, 567-572, doi:10.1038/35078543 (2001).
- 47 Peden, A. A. *et al.* The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 3530-3541, doi:10.1091/mbc.E03-12-0918 (2004).
- 48 Lindsay, A. J. *et al.* Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 12190-12199, doi:10.1074/jbc.M108665200 (2002).
- 49 Lindsay, A. J. & McCaffrey, M. W. Rab11-FIP2 functions in transferrin recycling and associates with endosomal membranes via its COOH-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 27193-27199, doi:10.1074/jbc.M200757200 (2002).
- 50 Terai, T., Nishimura, N., Kanda, I., Yasui, N. & Sasaki, T. JRAB/MICAL-L2 is a junctional Rab13-binding protein mediating the endocytic recycling of occludin. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 2465-2475, doi:10.1091/mbc.E05-09-0826 (2006).
- 51 Schonteich, E. *et al.* The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling. *Journal of Cell Science* **121**, 3824-3833, doi:10.1242/jcs.032441 (2008).
- 52 Inoue, T., Do Heo, W., Grimley, J. S., Wandless, T. J. & Meyer, T. An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways. *Nature Methods* **2**, 415-418, doi:10.1038/nmeth763 (2005).
- 53 Coumailleau, F. *et al.* Over-expression of rififylin, a new RING finger and FYVE-like domain-containing protein, inhibits recycling from the endocytic recycling compartment. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 4444-4456, doi:10.1091/mbc.E04-04-0274 (2004).
- 54 Jovic, M., Naslavsky, N., Rapaport, D., Horowitz, M. & Caplan, S. EHD1

- regulates beta 1 integrin endosomal transport: effects on focal adhesions, cell spreading and migration. *Journal of Cell Science* **120**, 802-814, doi:10.1242/jcs.03383 (2007).
- 55 Schafer, J. C., McRae, R. E., Manning, E. H., Lapierre, L. A. & Goldenring, J. R. Rab11-FIP1A regulates early trafficking into the recycling endosomes. *Experimental Cell Research* **340**, 259-273, doi:10.1016/j.yexcr.2016.01.003 (2016).
- 56 Ducharme, N. A. *et al.* Rab11-FIP2 regulates differentiable steps in transcytosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **293**, C1059-C1072, doi:10.1152/ajpcell.00078.2007 (2007).
- 57 Hales, C. M., Vaerman, J. P. & Goldenring, J. R. Rab11 family interacting protein 2 associates with myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 50415-50421, doi:10.1074/jbc.M209270200 (2002).
- 58 Baetz, N. W. & Goldenring, J. R. Rab11-family interacting proteins define spatially and temporally distinct regions within the dynamic Rab11a-dependent recycling system. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 643-658, doi:10.1091/mbc.E12-09-0659 (2013).
- 59 Wang, Z. P. *et al.* Myosin Vb Mobilizes Recycling Endosomes and AMPA Receptors for Postsynaptic Plasticity. *Cell* **135**, 535-548, doi:10.1016/j.cell.2008.09.057 (2008).
- 60 Gidon, A. *et al.* A Rab11A/Myosin Vb/Rab11-FIP2 Complex Frames Two Late Recycling Steps of Langerin from the ERC to the Plasma Membrane. *Traffic* **13**, 815-833, doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01354.x (2012).
- 61 Naslavsky, N., Rahajeng, J., Sharma, M., Jovic, M. & Caplan, S. Interactions between EHD proteins and Rab11-FIP2: A role for EHD3 in early endosomal transport. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 163-177 (2006).
- 62 Roland, J. T., Kenworthy, A. K., Peranen, J., Caplan, S. & Goldenring, J. R. Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 2828-2837, doi:10.1091/mbc.E07-02-0169 (2007).
- 63 Cai, B. S. *et al.* Differential Roles of C-terminal Eps15 Homology Domain Proteins as Vesiculators and Tubulators of Recycling Endosomes. *Journal of*

- Biological Chemistry* **288**, 30172-30180, doi:10.1074/jbc.M113.488627 (2013).
- 64 Giridharan, S. S. P., Cai, B. S., Vitale, N., Naslavsky, N. & Caplan, S. Cooperation of MICAL-L1, syndapin2, and phosphatidic acid in tubular recycling endosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 1776-1790, doi:10.1091/mbc.E13-01-0026 (2013).
- 65 Jing, J. A. *et al.* FIP1/RCP Binding to Golgin-97 Regulates Retrograde Transport from Recycling Endosomes to the trans-Golgi Network. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 3041-3053, doi:10.1091/mbc.E10-04-0313 (2010).
- 66 Gokool, S., Tattersall, D. & Seaman, M. N. J. EHD1 interacts with retromer to stabilize SNX1 tubules and facilitate endosome-to-golgi retrieval. *Traffic* **8**, 1873-1886, doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00652.x (2007).
- 67 Almeida, C. G. *et al.* Myosin 1b promotes the formation of post-Golgi carriers by regulating actin assembly and membrane remodelling at the trans-Golgi network. *Nature Cell Biology* **13**, 779-U424, doi:10.1038/ncb2262 (2011).
- 68 Salas-Cortes, L. *et al.* Myosin 1b modulates the morphology and the protein transport within multi-vesicular sorting endosomes. *Journal of Cell Science* **118**, 4823-4832, doi:10.1242/jcs.02607 (2005).
- 69 Neuhaus, E. M. & Soldati, T. A myosin I is involved in membrane recycling from early endosomes. *Journal of Cell Biology* **150**, 1013-1026, doi:10.1083/jcb.150.5.1013 (2000).
- 70 Cheng, J., Grassart, A. & Drubin, D. G. Myosin 1E coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 2891-2904, doi:10.1091/mbc.E11-04-0383 (2012).
- 71 Penengo, L. *et al.* Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell* **124**, 1183-1195, doi:10.1016/j.cell.2006.02.020 (2006).
- 72 He, F. H. *et al.* Myosin VI Contains a Compact Structural Motif that Binds to Ubiquitin Chains. *Cell Reports* **14**, 2683-2694, doi:10.1016/j.celrep.2016.01.079 (2016).
- 73 Masters, T. A., Tumbarello, D. A., Chibalina, M. V. & Buss, F. MYO6 Regulates Spatial Organization of Signaling Endosomes Driving AKT Activation and Actin Dynamics. *Cell Reports* **19**, 2088-2101, doi:10.1016/j.celrep.2017.05.048 (2017).

- 74 Chibalina, M. V., Seaman, M. N. J., Miller, C. C., Kendrick-Jones, J. & Buss, F. Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *Journal of Cell Science* **120**, 4278-4288, doi:10.1242/jcs.014217 (2007).
- 75 Yi, P. *et al.* KIF5B transports BNIP-2 to regulate p38 mitogen-activated protein kinase activation and myoblast differentiation. *Molecular Biology of the Cell* **26**, 29-42, doi:10.1091/mbc.E14-03-0797 (2015).
- 76 Tanaka, Y. *et al.* Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* **93**, 1147-1158, doi:10.1016/s0092-8674(00)81459-2 (1998).
- 77 Ducharme, N. A., Ham, A. J., Lapierre, L. A. & Goldenring, J. R. Rab11-FIP2 influences multiple components of the endosomal system in polarized MDCK cells. *Cell Logist* **1**, 57-68, doi:10.4161/cl.1.2.15289 (2011).
- 78 Xie, S. W. *et al.* The endocytic recycling compartment maintains cargo segregation acquired upon exit from the sorting endosome. *Molecular Biology of the Cell* **27**, 108-126, doi:10.1091/mbc.E15-07-0514 (2016).
- 79 Jin, H. B. *et al.* Ring Finger Protein 34 (RNF34) Interacts with and Promotes gamma-Aminobutyric Acid Type-A Receptor Degradation via Ubiquitination of the gamma 2 Subunit. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 29420-29436, doi:10.1074/jbc.M114.603068 (2014).
- 80 McDonald, E. R. & El-Deiry, W. S. Suppression of caspase-8-and-10-associated RING proteins results in sensitization to death ligands and inhibition of tumor cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6170-6175, doi:10.1073/pnas.0307459101 (2004).
- 81 Alroy, I. *et al.* The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV Woe 1 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1478-1483, doi:10.1073/pnas.0408717102 (2005).
- 82 Holleman, J. & Marchese, A. The ubiquitin ligase deltex-31 regulates endosomal sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4. *Molecular Biology of the Cell* **25**, 1892-1904, doi:10.1091/mbc.E13-10-0612 (2014).
- 83 Carson, B. P., Del Bas, J. M., Moreno-Navarrete, J. M., Fernandez-Real, J. M. & Mora, S. The Rab11 Effector Protein FIP1 Regulates Adiponectin Trafficking

- and Secretion. *Plos One* **8**, doi:10.1371/journal.pone.0074687 (2013).
- 84 Cullis, D. N., Philip, B., Baleja, J. D. & Feig, L. A. Rab11-FIP2, an adaptor protein connecting cellular components involved in internalization and recycling of epidermal growth factor receptors. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 49158-49166, doi:10.1074/jbc.M206316200 (2002).
- 85 Schafer, J. C. *et al.* Rab11-FIP2 Interaction with MYO5B Regulates Movement of Rab11a-Containing Recycling Vesicles. *Traffic* **15**, 292-308, doi:10.1111/tra.12146 (2014).
- 86 Huang, S. J., Tang, D. M. & Wang, Y. Z. Monoubiquitination of Syntaxin 5 Regulates Golgi Membrane Dynamics during the Cell Cycle. *Developmental Cell* **38**, 73-85, doi:10.1016/j.devcel.2016.06.001 (2016).
- 87 Jongsma, M. L. M. *et al.* An ER-Associated Pathway Defines Endosomal Architecture for Controlled Cargo Transport. *Cell* **166**, 152-166, doi:10.1016/j.cell.2016.05.078 (2016).
- 88 Hong, T. T. *et al.* BIN1 Localizes the L-Type Calcium Channel to Cardiac T-Tubules. *Plos Biology* **8**, doi:10.1371/journal.pbio.1000312 (2010).
- 89 Choudhury, A. *et al.* Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 1541-1550, doi:10.1172/jci200215420 (2002).
- 90 Sherer, N. M. *et al.* Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**, 785-801, doi:10.1034/j.1600-0854.2003.00135.x (2003).
- 91 Zurek, N., Sparks, L. & Voeltz, G. Reticulon Short Hairpin Transmembrane Domains Are Used to Shape ER Tubules. *Traffic* **12**, 28-41, doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01134.x (2011).
- 92 Rivier, A. S. *et al.* Exit of GPI-Anchored Proteins from the ER Differs in Yeast and Mammalian Cells. *Traffic* **11**, 1017-1033, doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01081.x (2010).
- 93 Yang, X. P. *et al.* A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. *Nature Methods* **8**, 659-U680, doi:10.1038/nmeth.1638 (2011).
- 94 Guo, F., Chiang, M. Y., Wang, Y. & Zhang, Y. Z. An in vitro recombination method to convert restriction- and ligation-independent expression vectors.

- Biotechnol J* **3**, 370-377, doi:10.1002/biot.200700170 (2008).
- 95 Carter, R. E. & Sorokin, A. Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem* **273**, 35000-35007 (1998).
- 96 Berndsen, C. E. & Wolberger, C. A spectrophotometric assay for conjugation of ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Anal Biochem* **418**, 102-110, doi:10.1016/j.ab.2011.06.034 (2011).