

セマフォリンによる
Caenorhabditis elegans 表皮細胞での
小胞輸送制御

田中 洋希

目次

1 要旨	4
2 序論	6
2.1 シグナル伝達による細胞形態制御	6
2.2 セマフォリンとプレキシン	6
2.3 セマフォリンシグナルによる細胞骨格・細胞接着制御	8
2.4 セマフォリンシグナルによる小胞輸送制御	9
2.5 <i>C. elegans</i> におけるセマフォリンの機能	10
2.6 <i>C. elegans</i> におけるセマフォリンシグナル経路	11
2.7 神経軸索末端での synaptotagmin I - stonin2 の役割	12
2.8 本研究の概要	14
3 材料・手法	16
使用した <i>C. elegans</i> 株	16
<i>C. elegans</i> の飼育方法	16
遺伝子型決定	16
プラスミドコンストラクション	17
<i>C. elegans</i> 形質転換体の作成	18
extrachromosomal arrays の染色体への挿入	18
フィーディング RNAi	18
<i>C. elegans</i> の観察と画像解析	19
4 結果	22
4.1 研究背景 - ray の発生過程とセマフォリンシグナルの機能	22
4.2 エンドサイトシス因子の機能欠損による <i>plx-1</i> 変異の ray 表現型抑圧	23
4.3 SNT-1 - UNC-41 の表皮細胞自律的機能	25
4.4 セマフォリンシグナルによる ray 前駆細胞のエンドサイトシスの制御	27

4.5 セマフォリンシグナルによるリサイクリング経路抑制	28
4.6 プレキシンは ray 前駆細胞外側面の頂端側に発現	29
4.7 野生型では SNT-1 は RAB-7 と LMP-1 に局在	31
4.8 セマフォリンシグナルによる SNT-1 細胞内輸送の速度と距離の変化.....	33
4.9 エンドサイトシス抑制による SNT-1 の分解経路への輸送促進	35
4.10 SNT-1 小胞輸送制御と ray 形態形成	36
4.11 セマフォリンシグナルは ray 表皮細胞のオートファゴソーム経路に影響しない..	38
4.12 細胞内輸送と TOR 経路は独立に制御されている可能性がある.....	38
5 考察.....	40
5.1 表皮細胞における SNT-1・UNC-41 系の機能	40
5.2 セマフォリンシグナルによるリサイクリング経路抑制.....	41
5.3 細胞小胞輸送調節による ray 形態形成制御	43
5.4 セマフォリンシグナルによる SNT-1 の分解経路への輸送活性化.....	45
6 総括.....	49
7 図・表	50
8 謝辞.....	100
9 参考文献.....	101

1 要旨

セマフォリンシグナルは動物細胞の形態変化を制御する主要なシグナルのひとつであり、脊椎動物では神経軸索誘導や血管形成での役割が知られている。線虫 *C. elegans* には膜結合型であるセマフォリン (SMP-1、SMP-2) とその受容体であるプレキシシン (PLX-1) が存在し、ray や陰門を形成する表皮細胞の形態制御を担っている。ray は *C. elegans* の成虫雄尾部に存在する左右 9 対の感覚器であるが、*plx-1* 変異体では幼虫期の ray 前駆体表皮細胞の形態異常によって成虫の ray の位置に異常が生じる。これまでに *plx-1* 変異による ray 表現型異常に対する抑圧変異 (サプレッサー) を手がかりとして、セマフォリンシグナルが mRNA 翻訳や細胞骨格を制御することが明らかになっている。

以前の研究によって、*plx-1* 変異体の ray 表現型に対するサプレッサーの中に *unc-41* 変異も含まれることが明らかにされていた。UNC-41 は哺乳類 stonin2 の相同分子であり、synaptotagmin I/SNT-1 による神経軸索末端における神経伝達物質放出後のシナプス小胞膜の細胞内への再取り込みに必須の因子である。synaptotagmin I はシナプス小胞からの神経伝達物質放出における Ca^{2+} センサーとして働き、シナプス小胞のエンドサイトシス・エキソサイトシスにまたがるリサイクリングを調節すると考えられている。*C. elegans* においても SNT-1・UNC-41 系はシナプス小胞リサイクリングを制御することが知られているが、この系の表皮細胞での役割、ならびにこの系とセマフォリンシグナルとの関係についてはこれまで全く知られていない。本研究で、私はセマフォリンシグナルと SNT-1・UNC-41 系の関係を詳細に解析することとした。

私は、最初に *snt-1* 変異が *unc-41* 変異と同様に *plx-1* 変異体 ray 表現型に対する強い抑圧効果を持つことを確認した。そこで、セマフォリンシグナルが ray 前駆細胞において小胞輸送を制御しているのかについて調べ、次に、SNT-1 が ray 前駆細胞内でどのような制御を受けているのかについて検討した。その結果、まず、*plx-1* 変異体ではエンドサイトシスマーカーである HGRS-1::GFP の顆粒数が野生型と比較して増加し

たことから、セマフォリンシグナルはエンドサイトシスを抑制することが示唆された。そして、エキソサイトシスマーカーである GFP::SNB-1 の細胞膜への局在が、*plx-1* 変異体では野生型と比較して増加していたことから、セマフォリンシグナルはエキソサイトシスも抑制することが示唆された。

次に、SNT-1::mCherry と各細胞内小器官マーカーとの共局在解析から、野生型では SNT-1 は後期エンドソームとリソソームでの局在が高いことが示された。その一方で、*plx-1* 変異体では、SNT-1 は後期エンドソームとリソソームでの局在が減少し、初期エンドソームとリサイクリングエンドソームとの局在が増加した。また、SNT-1::mCherry の細胞内での移動をライブセルイメージングによって解析したところ、野生型では *plx-1* 変異体に比べて SNT-1::mCherry の分解経路への輸送は輸送速度が速く、移動距離も長いことが明らかとなった。この輸送は、微小管 (TBB-2) あるいはダイニン (CHE-3) を RNAi によってノックダウンすることで阻害されたことから、SNT-1 の分解経路への輸送は微小管・ダイニン依存的であることも示された。

さらに、*plx-1* 変異体で見られたエンドサイトシスマーカーの増大、エキソサイトシスマーカーの細胞膜への局在上昇は、*snt-1* 変異によって抑圧された。また、UNC-41 のノックダウンは、*plx-1* 変異体で観察された SNT-1 の分解経路への輸送減少を抑圧した。これらの結果より、セマフォリンシグナルは SNT-1・UNC-41 系依存的なエンドサイトシスとエキソサイトシスを抑制し、このエンドサイトシス抑制が SNT-1 の微小管・ダイニン依存的な分解経路への輸送を促進すると考えられる。

近年、脊椎動物神経系の研究において、セマフォリンシグナルがエンドサイトシスを制御することが報告されているが、その詳細な分子機構はまだ不明な部分が多い。さらに、神経細胞以外の細胞でのセマフォリンシグナルとエンドサイトシスの関係も知られていない。本研究の結果は表皮細胞におけるセマフォリンシグナルによる SNT-1・UNC-41 依存的な膜輸送制御という新たな細胞形態制御機構の存在を示唆している。

2 序論

2.1 シグナル伝達による細胞形態制御

多細胞生物の発生過程での形態形成に伴う細胞運動や配置の制御において、細胞間や細胞・細胞外マトリックス(ECM)間の相互作用は重要な役割を担っている。これらの相互作用が起こる時、細胞膜上においてシグナル分子と結合した受容体は細胞内へシグナルを伝達し、遺伝子発現や細胞骨格の調節を介して細胞形態変化を制御する。本研究の対象であるセマフォリンシグナルも、このような細胞形態変化を制御するシグナルの一つである(Kruger et al., 2005)。

2.2 セマフォリンとプレキシン

セマフォリンは、*C. elegans* からヒトまで動物で広く保存されたタンパク質ファミリーを形成する。セマフォリンは分泌型もしくは膜結合型タンパク質であり、このファミリーに特徴的な約 500 アミノ酸残基のセマドメインを含んでいる。セマフォリンファミリーは無脊椎動物ではクラス I・II、脊椎動物ではクラス III~VII の七つのクラスに分類される(Kruger et al., 2005)。

セマフォリンのシグナル分子としての機能は最初に神経系における軸索誘導現象で明らかにされた。動物の神経回路網の発生過程では、伸長する神経軸索線維は特定の経路に沿って誘導される。軸索誘導を行うために、軸索の先端に存在する成長円錐は周辺の細胞やそれを取り囲む ECM へフィロポディアを伸展させて接着するとともに、周辺の細胞・ECM が作り出す外部環境を感知する。こうした外部環境シグナルによって成長円錐が誘引あるいは反発されることによって、特定方向への軸索の誘導が起きる(Tessier-Lavigne and Goodman, 1996)。軸索誘導因子としてのセマフォリンの研究において、まず、分泌型セマフォリンであるクラス III セマフォリン A (Sema3A) が、脊椎動物の培養細胞系で成長円錐の崩壊を引き起こす活性に基づいて同定された。そしてショウジョウバエや脊椎動物(Kolodkin et al., 1992; Luo et al., 1993; Kolodkin et al.,

1993; Mattes et al., 1995; Taniguchi et al., 1997; Shoji et al., 1998; Yu et al., 1998)において、セマフォリンファミリーが実際に生体内での神経回路形成において重要な役割を担っていることが確認された。多くのセマフォリンが軸索の反発的な応答を引き起こすことが知られている一方で、セマフォリンが軸索誘引因子として働く例も報告されている(Wong et al., 1997; Bagnard et al., 1998)。さらに、その後の研究から、セマフォリンが神経系の回路形成だけでなく、心臓や骨格の発生、免疫応答、血管形成、ガンの成長と転移など多様な現象に関わっているということも明らかになった(Behar et al., 1996; Hall et al., 1996; Christensen et al., 1998; Miao et al., 1999)。

セマフォリンの主要な受容体として膜貫通型タンパク質であるニューロピリンとプレキシンが同定されている(Takahashi and Strittmater 2001)。プレキシンも無脊椎動物から脊椎動物までよく保存されたタンパク質であり、四つのクラス(A~D)に分類される。ニューロピリンは脊椎動物でのみ存在するタンパク質であり、プレキシン-A と複合体をつくりクラス III セマフォリンを受容する(Kolodkin et al., 1997; He and Tessier-Lavigne 1997)。ニューロピリンをもたないショウジョウバエでは D-PlexinA が直接 SemaI と結合してシグナルを受容すること、脊椎動物においても Plexin-A が膜貫通型であるクラス VI セマフォリンと、Plexin-B、Plexin-C が膜貫通型のクラス IV セマフォリンおよび GPI アンカー型のクラス VII セマフォリンと、それぞれニューロピリン非依存的に直接結合することから、プレキシンがセマフォリンの中心的な受容体だと考えられている(Winberg et al., 1998; Tamagnone et al., 1999; Kruger et al., 2005)。プレキシンは細胞外領域にセマドメインを、細胞内領域には異なったクラスのプレキシン間においてもよく保存された GTP アーゼ活性化タンパク質(GAP)ドメインを持っており、この領域が後述するセマフォリンシグナルの細胞内への伝達に重要であることが明らかとなっている (Tamagnone and Comoglio 2000; Kruger et al., 2005; Tran et al., 2007)。

2.3 セマフォリンシグナルによる細胞骨格・細胞接着制御

セマフォリンシグナルの下流因子の解明も進んでいる。Sema3Aは成長円錐内でF-アクチン構造の変化を引き起こすことで成長円錐を崩壊させる (Fan et al., 1993; Fan and Raper, 1995)。この時、セマフォリンシグナルは成長円錐内で低分子量GTPアーゼであるRapやRho、Racを介して細胞骨格因子を制御することで細胞骨格の変化を引き起こすと考えられている(Negishi et al., 2005)。プレキシンの細胞内領域に存在するGAPドメインがRapに対して活性を示すことが近年になり報告されている(Wang et al., 2012)。Rapの活性化はインテグリンなどの細胞接着因子やRhoAを介した細胞骨格を制御することで神経突起の伸長を促進することが知られている(Yamada et al., 2005; Richter et al., 2007; Jeon et al., 2010)。ショウジョウバエでは、RhoAがPlexin-Bに直接結合することが知られている一方で (Hu et al., 2001)、哺乳類のPlexin-B1はRhoとは直接結合せずに、Plexin-Bに存在するPDZドメインを介してPDZ-RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor : GEF)やLARGといったRhoGEFが結合し、その結果RhoGTPアーゼの活性レベルが上昇してRhoキナーゼが活性化されるということが明らかにされている(Swiercz et al., 2002; Aurandt et al., 2002; Perrot et al., 2002)。Rhoの活性化が成長円錐の崩壊を引き起こすことが明らかとなっている(Hall, 1998)。また、Racの活性化もDRG (dorsal root ganglion) 細胞や運動神経細胞で成長円錐崩壊を誘発することなどからセマフォリンシグナルの下流で機能するのではないかと考えられている (Jin and Strittmatter, 1997; Kuhn et al., 1999)。実際、RhoAとRac1それぞれの下流因子であるROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinases)とPAK (p21 activated kinase)はLIMキナーゼを活性化し、活性化されたLIMキナーゼはアクチン脱重合因子ADF/コフィリンのセリン残基をリン酸化し、それによってアクチン脱重合やADF/コフィリンのアクチンとの結合を抑制することが知られる (Moriyama et al., 1996; Arber et al., 1998; Maekawa et al., 1999; Edward et al., 1999; Ohashi et al.,

2000; Aizawa et al., 2001)。

また、Rasファミリーの一員であるR-Rasの不活性化は成長円錐の崩壊を引き起こす。R-Rasはプレキシシンに存在するGAPドメインによって不活性化されるが、プレキシシンのGAP活性には細胞外ドメインへのセマフォリンの結合と細胞内ドメインへの低分子量GTP結合タンパク質であるRnd1の結合が必要とされる (Oinuma et al., 2004)。活性化型R-Rasはインテグリンと細胞外マトリックスとの結合を増強するが、ドミナントネガティブ型R-Rasはこれを減少させる (Keely et al., 1999)。実際にインテグリンの不活性化がSema4Dによって引き起こされることが明らかになっており、セマフォリンによる細胞移動制御に重要であることが示されている (Serini et al., 2003; Barberis et al., 2004)。つまり、セマフォリンシグナルは、R-Rasの活性を低下させることでインテグリンの機能を抑制することにより細胞の接着性を減少させ、細胞の動きを抑制すると考えられる。このように、セマフォリンシグナルには、Rho、Rac、R-Rasら低分子量Gタンパク質を介して細胞骨格の再構築や細胞接着因子制御を行う経路が存在すると考えられている。

2.4 セマフォリンシグナルによる小胞輸送制御

近年、脊椎動物の培養細胞において、ネトリンやMAGといった軸索誘導因子や細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化によって軸索誘導あるいは成長円錐崩壊が引き起こされる際に、エンドサイトシスやエキソサイトシスが必要であることが報告されている (Tojima et al., 2007, 2010, 2011; Hines et al., 2010; Carcea et al., 2010; Kabayama et al., 2011; Zylbersztejn et al., 2012)。本研究で注目するセマフォリンシグナルでもエンドサイトシス制御の例が報告されている (Fournier et al., 2000)。Sema3A がエンドサイトシスを促進させることで F-アクチンの細胞骨格配列を再構築させ、成長円錐崩壊を引き起こすという報告もある (Jurney et al., 2002)。最近ではセマフォリンシグナルとエンドサイトシスを仲介する因子も報告されつつある。例えば、Sema3A が細胞膜 t-SNARE

である syntaxin1B の機能を抑制することでマクロピノサイトシスを促進することが知られている(Kabayama et al., 2011)。また、Sema3A が小胞輸送に関わる低分子量 G タンパク質である RAB5 をリン酸化することでエンドサイトシスを促進させる (Wu et al., 2014)、セマフォリンシグナルが R-Ras/RIN2/Rab5 複合体を介してインテグリンのエンドサイトシスを制御する(Sandri et al., 2012)という報告もある。また、エキソサイトシスについても、成長円錐において Sema3A が小胞 v-SNARE タンパク質である Syb2 を介したエキソサイトシスを抑制するということが知られている(Zylbersztein et al., 2012)。このように、セマフォリンシグナルによるエンドサイトシス・エキソサイトシス制御に関する知見が蓄積されつつあるが、その分子メカニズムは未解明な部分が多く残っている。また、神経細胞以外での細胞でもセマフォリンがエンドサイトシスやエキソサイトシス調節にかかわるかどうかは、これまでほとんど報告がない。

セマフォリンシグナルが細胞内輸送を制御することも報告されている(Goshima et al., 1999; Li et al., 2004; Mann and Rougon, 2007; Yamane et al., 2012; Yamashita et al., 2014)。例えば、脊椎動物神経細胞では Sema3A は軸索での順行性輸送を活性化する(Li et al., 2004)。また、Sema3A がプレキシシンと共に AMPA 受容体の逆行性輸送を促進し、樹状突起へと AMPA 受容体を局在させるという報告もある(Yamashita et al., 2014)。このように、セマフォリンシグナルが神経細胞において順行性輸送や逆行性輸送を制御する例は報告されてはいるものの、セマフォリンシグナルによる細胞内輸送の制御機構の詳細は不明であり、また、エンドサイトシス・エキソサイトシスと細胞内輸送との関係も不明である。

2.5 *C. elegans* におけるセマフォリンの機能

これまでのセマフォリンシグナルの下流の経路に関する研究では、脊椎動物培養細胞を用いた生化学的・薬理学的実験が主流であった。しかし、セマフォリン-プレキシシンシグナルの下流で起こる事象は多様であり、未知の部分が多い。そこでセマフォリンシグ

ナルをさらに詳細に明らかにするために、私の所属する研究室では、線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)を用いることで生体内でのセマフォリンシグナル経路に参与する因子を遺伝学的に解明してきた(Nukazuka et al., 2008; 2011)。*C. elegans*には3つのセマフォリン遺伝子、つまり、2種類の膜結合型セマフォリンをコードする *smp-1*、*smp-2*と分泌型セマフォリンをコードする *mab-20*と、2種のプレキシシン遺伝子 *plx-1*、*plx-2* が存在する (Roy et al., 2000; Fujii et al., 2002)。SMP-1, SMP-2はPLX-1と、MAB-20はPLX-2とそれぞれ特異的に相互作用する。*plx-1*変異体に特徴的な表現型として、雌雄同体の生殖器官である陰門、成虫雄特異的な感覚器である尾部の ray の形成異常が知られ、その原因としてこれらの器官の前駆表皮細胞の細胞配列・配置の異常が確認されている (Fujii et al., 2002; Liu et al., 2005) (Figure 1)。

2.6 *C. elegans*におけるセマフォリンシグナル経路

後述するように *plx-1*変異体や *smp-1 smp-2*変異体は高い浸透度で ray1 が前方化するという表現型を示す。この ray1 の位置を指標として *plx-1* 変異体の抑圧変異を単離し解析することによって、セマフォリンシグナルの新たな側面が明らかとなってきた。その例としてセマフォリンシグナルによる mRNA 翻訳制御がある。*gcn-1; plx-1* 変異体や *pek-1; plx-1* 変異体では ray1 の前方化異常が抑圧されることが確認された (Nukazuka et al., 2008)。GCN1はmRNA翻訳開始因子である eIF2 α のリン酸化を促進し、その働きを阻害する (Gebauer and Hentze, 2004)。また、PEK-1は脊椎動物のERストレス応答性の eIF2 α キナーゼである PERK の *C. elegans* ホモログをコードしており、直接 eIF2 α をリン酸化する役割を担っている (Gebauer and Hentze, 2004)。これらの抑圧変異の解析によってセマフォリンシグナルは eIF2 α のリン酸化レベルを下げることで mRNA 翻訳を促進させることが示された。さらに、翻訳制御の標的の一つがアクチン脱重合因子 ADF/コフィリンであることが示され、コフィリン合成の活性化を介した細胞骨格の改変が示唆された (Nukazuka et al., 2008)。興味深いことに、脊椎

動物培養神経系でも Sema3A が成長円錐での局所的な翻訳を制御し、伸長中の軸索末端における翻訳制御を担うことが示されている(Campbell and Holt, 2001)。

gcn-1 や *pek-1* のほかに *rict-1* 変異が ray 前方化異常を抑圧することも報告されている(Nukazuka et al., 2011)。*rict-1* 遺伝子は TOR (target of rapamycin) と結合する Rictor の *C. elegans* ホモログをコードしている(Sarbassov et al., 2004)。TOR は細胞外からの様々な環境刺激を統合することで細胞成長や形態形成に関与するリン酸化酵素として知られ、TOR complex 1 (TORC1) と TOR complex 2 (TORC2) の 2 種類の機能の異なるタンパク質複合体を形成する(Kim et al., 2002, Hara et al., 2002, Sarbassov et al., 2004)。TORC1 は mRNA 翻訳制御を司り、TORC2 はアクチン重合制御に関与することが分かっている(Sarbassov et al., 2004; Jacinto et al., 2004;)。*rict-1* 変異発見が糸口となった線虫 TOR 系の解析から、セマフォリンシグナルは TORC2 量を減少させるとともに TORC1 量を増加させることが明らかになった。そして、その結果として引き起こされた TORC1 活性上昇が、eIF4F と eIF2 の 2 種類の因子を介して翻訳開始を活性化する一方で、TORC2 の活性低下が PKC α の活性を低下させて、アクチン重合を抑制することが示された(Nukazuka et al., 2011) (Figure 3)。このように、*plx-1* 変異体の抑圧変異の研究から、セマフォリンシグナルが mRNA 翻訳や細胞骨格因子の重合・脱重合の制御を介することで細胞の形態を制御するという機構が明らかになってきた。

2.7 神経軸索末端での synaptotagmin I - stonin2 の役割

今回の研究では、*C. elegans* の体内でセマフォリンシグナルに関わる新たな経路を明らかにすることを目的として、*snt-1* と *unc-41* という 2 つの遺伝子を研究対象に選んだ。私の所属研究室の糠塚明によって *unc-41* 変異が *plx-1* 変異体 ray 異常を抑圧することが偶然発見された。*unc-41* は哺乳類 stonin2 と相同タンパク質である UNC-41 をコードしている遺伝子であり、stonin2 はシナプス小胞が細胞膜と融合して神経伝達

物質を放出した後、再び細胞内へシナプス小胞が取り込まれる際に synaptotagmin I と共同して働くことが知られる(Maritzen et al., 2010; Phillips et al., 2010)。

神経軸索末端でのシナプス小胞取り込みはクラスリンを介したエンドサイトシスの最も良く知られている例の一つであるが、synaptotagmin I はこの取り込みに関与する重要な因子である(Brodin et al., 2000; Murthy and De Camilli, 2003)。synaptotagmin I は 1 回膜貫通型のタンパク質で、C2A、C2B という 2 つの細胞内ドメインを保有し、この C2A、C2B ドメインを介して stonin2 と結合し、クラスリン依存的なエンドサイトシスを担う(Perin et al., 1990; 1991; Zhang et al., 1994; Chapman et al., 1998; Fergestad and Broaddie, 2001; Stimson et al., 2001; Walther et al., 2004; Grass et al., 2004; Jung et al., 2007) (Figure 4)。synaptotagmin I - stonin2 系によるシナプス小胞再取り込みにおいて、stonin2 は WxxF モチーフを介して AP-2 と、 μ ホモロジドメイン(μ HD)を介して synaptotagmin I とそれぞれ結合する (Fergestad and Broaddie, 2001; Stimson et al., 2001; Walther et al., 2004; Diril et al., 2006; Jung et al., 2007) (Figure 4)。また、stonin2 は NPF ドメインを介してエンドサイトシス制御タンパク質である eps15 や intersectin とも結合することで AP-2 と共にクラスリン依存的なエンドサイトシスを制御することも分かっている(Martina et al., 2001)。そして、シナプス小胞再取り込みにおいて細胞膜から小胞が乖離するときには synaptotagmin I、EndophilinA が集合して小胞再取り込みを制御する(Ringstad et al., 1997; Patrick et al., 2008; Kjaerulff et al., 2011)。

synaptotagmin I はエキソサイトシス調節因子でもある。神経軸索末端では Ca^{2+} 流入が引き金となって、神経伝達物質の放出が引き起こされる。このとき、synaptotagmin I はシナプス小胞上で主要な Ca^{2+} センサーとして機能し、シナプス小胞と細胞膜の融合を促進することが知られている(Neher and Zucker, 1993; Matthew et al., 1981)。synaptotagmin I の 2 つの細胞内 C2 ドメイン C2A、C2B が Ca^{2+} 結合領域として機能する(Brose et al., 1992; Davletov and Südhof, 1993; Chapman and Jahn, 1994; Desai

et al., 2000)。また、シナプス小胞と細胞膜の融合にはシナプス小胞上の v-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (SNAP) receptor (SNARE)である synaptobrevin1 や細胞膜 t-SNARE である syntaxin1、SNAP-25 が必要とされる (Rothman, 1994; Augustin et al., 2001; Chen and Scheller, 2001; Jahn et al., 2003) (Figure 4)。SNARE タンパク質の複合体がシナプス小胞と細胞膜の融合を担っているが、SNARE タンパク質複合体形成自体には Ca^{2+} は必要とされず、synaptotagmin I が Ca^{2+} の流入を感知することで SNARE タンパク質複合体の細胞膜融合を制御すると考えられている (Augustine, 2001; Chapman, 2002; Koh and Bellen, 2003; Chapman, 2008)。以上のように synaptotagmin I はシナプス小胞のエンドサイトシスとエキソサイトシスに重要な役割を持っている。シナプス小胞膜は伝達物質放出後に細胞内に取り込まれた後、再びシナプス小胞を形成して伝達物質放出に用いられる。このことから synaptotagmin I はエンドサイトシスとエキソサイトシスをカップリングさせることによって、シナプス小胞リサイクリング全体の協調的な進行を調節するという考えが提唱されている。

このように神経細胞でのエンドサイトシス、エキソサイトシスの分子機構はよく調べられているが、そのほかの細胞種でのエンドサイトシス・エキソサイトシスの分子機構やそれらを上流から制御するシグナル伝達機構はまだ解明されていない部分が多い。また、セマフォリンシグナルが synaptotagmin I - stonin2 系の制御に関与するという報告も存在しない。

2.8 本研究の概要

これまでにセマフォリンシグナルによる細胞骨格の調節機構については、かなり詳細に明らかにされている。一方、セマフォリンシグナルによる小胞輸送制御の詳細な分子機構についてはまだ未解明の部分が多い。本研究では神経軸索末端で機能することが知られている SNT-1 – UNC-41系のセマフォリンシグナル下流での制御について C.

C. elegans 表皮細胞を材料として遺伝学的・細胞生物学的手法によって解析した。まず私は、SNT-1・UNC-41系が神経細胞だけでなく、表皮細胞でも機能していることを示した。次に、セマフォリンシグナルが表皮細胞でのSNT-1・UNC-41系を介したエンドサイトシスを抑制する可能性を示唆し、さらには、エキソサイトシスとエンドサイトシスがカップリングすること示唆する知見を得た。また、セマフォリンシグナルがSNT-1の分解経路への微小管・ダイニン依存的な輸送を活性化させることを見出し、この細胞内輸送とエンドサイトシスとの関係を検討した。

3 材料・手法

使用した *C. elegans* 株

本研究では、N2 系統を野生型として用いた。以下の個体を変異型個体として使用した。[LGI] *smp-1(ev715)*, *smp-2(ev709)*, *unc-57(e406)*, *unc-13(e51)*; [LGII] *snt-1(n2665)*, *snt-1(ad596)*, *snt-1(md290)*; *rrf-3(pk1426)*, *unc-104(e1265)*, *ncIs13[ajm-1::gfp]* (Liu et al., 2005); [LGIII] *unc-64(e246)*, *unc-116(e2310)*; [LGIV] *plx-1(nc37)*, *him-8(e1489)*, *unc-26(e205)*; [LGV] *unc-41(e1199)*, *unc-41(e268)*, *him-5(e1490)*, *snb-1(e1563)*; [LGX] *unc-18(e81)*

ただし、*ncIs61[lin-32p::snt-1::mCherry]*, *xnIs96[hmr-1p::hmr-1::GFP::unc-54 3'UTR + unc-119(+)]* (Achilleos et al., 2010), *mhIs9[lin-17::gfp]* (Sawa et al., 1996) の各トランスジーン挿入部位は不明。

C. elegans の飼育方法

NGM アガープレート上で 20°C において *C. elegans* を飼育した。NGM プレートには餌として大腸菌 OP50 を塗布した (Brenner, 1974)。本研究では、雄の ray の観察と交配を容易にするため、雄の生まれる頻度が上昇する変異である *him-5(e1490)* もしくは *him-8(e1489)* を、全系統に導入した。

遺伝子型決定

野生型と *plx-1*、*smp-1*、*smp-2* それぞれの変異の選別のために PCR を用いた。まず、*C. elegans* のゲノム DNA を得るために、*C. elegans* を 10 匹ほど 10 μ l の DW に懸濁した。これに 10 μ l のバッファー (2 \times lysis buffer (40 mM Tris-HCl (pH8.2), 200 mM KCl, 10 mM MgCl₂) : 5 μ l 10% Tween20 : 1 μ l 1% gelatin : 1 μ l DW : 2.5 μ l 20 mg/ml proteinase K (Invitrogen) : 0.5 μ l) を加えた。そして 65°C で 30 分インキュベートし、その後さらに 95°C で 30 分インキュベートすることで proteinase K を失活さ

せた。この方法で得られたゲノム DNA を PCR の鋳型に用いた。PCR は Blend Taq (TOYOBO)を用いて行った。PCR に用いたプライマーの詳細は [Table 1](#) を参照。

プラスミドコンストラクション

ray 前駆細胞内で任意の遺伝子を発現させるために *lin-32* (Nukazuka et al., 2008) もしくは *lin-17* (Sawa et al., 1996) プロモーターを pPD49.26 に挿入したプラスミド、*lin-32p* / *lin-17p*-pPD49.26 を作製した (Fire et al., 1994)。C 末側に蛍光タンパク質を融合させるために、GFP もしくは mCherry を *lin-32p* / *lin-17p*-pPD49.26 vector に挿入した。*snt-1* cDNA を *lin-32p* / *lin-17p*::mCherry-inserted pPD49.26 vector に挿入した。*imp-1* cDNA (Chen et al., 2006)、もしくは *hgrs-1* cDNA (Yu et al., 2006) は *lin-17p*::gfp-inserted pPD49.26 vector へ挿入された。*plx-1* cDNA もまた、*lin-17p*::mCherry-inserted pPD49.26 vector へ挿入した。

N 末に GFP を融合させるために、Gateway Destination vector (Invitrogen) である *vha-6p*::gfp (Chen et al., 2006) の *vha-6p* の配列を *lin-17p* の配列に置き換えたプラスミド、*lin-17p*::gfp を作製した。*rab-5*, *rab-7*, *tram-1* (Kubota et al., 2005)、*syx-16* (Sato et al., 2011)、*snb-1* (Sato et al., 2008) cDNA と *rab-11.1* ゲノム DNA は、Gateway recombination cloning technology (Invitrogen) による BP 反応によって Gateway Entry vector pDONR221 へ挿入し、さらに、*lin-17p*::gfp-inserted Destination vector へ LR 反応 (Invitrogen) によって組み込んだ。*unc-41* cDNA と *unc-26* cDNA は制限酵素サイトを利用して *lin-17p*::mCherry-inserted pPD49.26 へ挿入した。

細胞膜を可視化するために、PLC δ (Ziel et al., 2009) 内の PH domain 配列を用いた。GFP::PH domain を作製するために、PH domain の cDNA フラグメントを PCR と BP 反応によってクローニングした。その後、*lin-17p*::gfp-inserted Destination vector へ LR 反応によって PH domain を挿入した。mCherry::PH domain に mCherry を融合させるために、*lin-17p*-pPD49.26 に mCherry を挿入した、*lin-17p*::mCherry-inserted

pPD49.26 へ PH domain cDNA を挿入した。

SNT-1 および RAB タンパク質の変異型タンパク質、SNT-1(4DN: D168N, D170N, D383N, D385N)、RAB-5(S33L)、RAB-5(Q76L)、RAB-7(T23N)、RAB-7(Q68L)を作製するために、*DpnI*-mediated site-directed mutagenesis を用いた(Fisher and Pei, 1997)。変異導入部位にプライマーを作製し、PCR によってプラスミド全長を増幅した。その後、*DpnI* によって PCR に用いたテンプレートプラスミドを切断する。最後に形質転換を行った。

プラスミドコンストラクション作成に用いたプライマーと制限酵素サイトなどの詳細は Table 2, 3 を参照。

***C. elegans* 形質転換体の作成**

Mello and Fire の方法を用いて行った(Mello and Fire, 1995)。顕微鏡は ZEISS Axiovert 135M を使用し、インジェクターに接続したガラス針を用いてプラスミド溶液を *C. elegans* 雌雄同体成虫の生殖腺に注入した。形質転換マーカを発現した F2 を形質転換体として維持した。各形質転換体を作製したときのプラスミド濃度は Table 4 を参照。

extrachromosomal arrays の染色体への挿入

⁶⁰Co を線源として 40 Gy の γ 線を *Ex[lin-32p::snt-1::mCherry;rol-6]*個体に照射した(Shioi et al., 2001)。 γ 線照射は名古屋大学 ⁶⁰Co 照射施設で行い、12 分間照射した。約 500 匹の子孫(F2)の中から全個体が形質転換マーカを発現する系統を選択し、染色体にトランスジーンが挿入された *ncIs61[lin-32p::snt-1::mCherry;rol-6]*を得た。

フィーディング RNAi

Feeding 法による RNAi を行った。この方法では二本鎖 RNA を合成している大腸菌

を食べることで線虫に RNAi が引き起こされる(Kamath et al., 2001)。pPD129.36 プラスミドは反転して存在している 2 つの T7 プロモーターを含んでおり、RNAi を引き起こしたい各遺伝子に対応した DNA 断片を T7 プロモーター間に挿入すれば、IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) による *lavUV5 promoter* -T7 RNA polymerase 発現誘導系を介した二本鎖 RNA の合成を誘導することができる。このプラスミドで大腸菌 HT115(DE3)を形質転換し、増殖した菌をアンピシリン 100 μ g/ml を含む LB アガープレート上に撒いて 37°C で培養した。1 個のコロニーから大腸菌をアンピシリン 100 μ g/ml を含む LB 液体培地 1 ml の中で 37°C、一晚震盪培養する。これをアンピシリン 100 μ g/ml、IPTG 1 mM を含む LB アガープレートに 150 μ l ずつ撒いて室温で乾燥させ、線虫の餌とした。L2 もしくは L3 ステージの雌雄同体を形質転換した大腸菌をまいたプレートへ置き、F1 もしくは F2 世代の雄の ray を観察した。コントロール実験には遺伝子を挿入していない空の pPD129.36 を形質転換させた大腸菌を用いた。

snt-1、*unc-26*、*unc-57*、*tbb-2*、*dyn-1*、*rab-35*、*snb-2*、*daf-15*、*syx-2*、*syx-3*、*syx-4* の cDNA と *unc-41*、*che-3*、*dhc-3*、*dhc-4*、*clic-1*、*dpy-23* のゲノム DNA をプラスミド pPD129.36 (Kamath et al., 2001)内へ挿入した。

RNAi 用のプラスミド作成に用いたプライマーと制限酵素の詳細は Table 2, 3 を参照。

***C. elegans* の観察と画像解析**

NGM アガープレート上の線虫の観察には実体顕微鏡 OLYMPUS SZ11 を用いた。ノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察する場合は、スライドガラス上に 4%アガーを用いてパッドを作成し、虫の不動化のために 10 mM レバミゾール溶液を滴下し、そこに線虫をのせ、カバーガラスで封入した。ray の観察ノマルスキー微分干渉顕微鏡 (ZEISS Axioplan2 imaging)を、成虫の雄個体の ray 画像の取得には CoolSNAP HQ2 CCD カ

メラ (Photometrics)を用いた。ray の表現型を定量化するために 3 種類に分類した (Nukazuka et al., 2008)。Level 1 は ray 1 が ray 2 とほぼ接して存在し、Level 2 は ray 1 が ray 2 から離れた位置に存在しているが ray 1 が fan という構造の内側にとどまっている状態、Level 3 は ray 1 が ray 2 からより前方に離れて fan より外に出ている状態と定義した(Figure 6)。ほとんどの野生型では ray1 は Level 1 である。NGM アガープレート上の線虫の蛍光観察は OLYMPUS SZX12 を用いた。

*ncIs13*や *mhIs9* を用いて ray 前駆細胞の細胞境界を GFP によって可視化した画像の取得と解析は共焦点レーザー顕微鏡 OLYMPUS FV300 を用いた。

HGRS-1::GFP、SNT-1::mCherry、PLX-1::mCherry の蛍光画像の観察と取得は、室温において MetaMorph (Molecular Devices) によって制御されたスピニングディスク (CSU-W1, Yokogawa)、レーザー(488 nm, OBIS 488 LS, Coherent; 561 nm, OBIS 561 LS, Coherent)と EM-CCD カメラ(iXon3 888, ANDOR)、倒立顕微鏡 (BX51W1、Olympus) からなる光学システムを用いて行った。

後期 L3 ステージの片側の全ての ray 前駆細胞内の HGRS-1::GFP の画像を CSU-W1 によって取得し、HGRS-1::GFP 顆粒の数を目視で計測した。ray 前駆細胞内での HGRS-1::GFP 顆粒の Z 軸に沿った細胞内分布を把握するために、AJM-1::GFP とほぼ同じ輪郭で観察される mCherry::PH domain の高さを“頂端”面と定義した。その高さから 1 μ m、もしくは 2 μ m 基底膜側へ移動した高さをそれぞれ“中央”、“基底”面と定義した。HGRS-1::GFP 顆粒は蛍光シグナルが存在しない画像の蛍光強度の平均値に対して 2.5 倍以上の明るさのシグナルを蛍光シグナルとして認識し、4×4 ピクセル以上の範囲内の背景の蛍光強度に対して 6 倍以上の蛍光シグナルが存在しているピクセルの領域を蛍光顆粒として定義した。定量化したデータを Kruskal-Wallis test with post-hoc Steel-Dwass multiple comparison test によって検定した。

後期 L3 ステージの ray 前駆細胞内の SNT-1::mCherry 顆粒の移動を定量化するために、移動性の mCherry 顆粒を CSU-W1 を用いて露光時間を 100 ミリ秒で 0.1 秒ごと

に顆粒を追尾して 1 秒間画像を取得した。ImageJ プラグインである Particle tracker 2D/3D を用いて取得した画像内の SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と距離を追尾して定量化した(Sbalzarini and Koumoutsakos, 2005)。定量は各系統 3 個体に対して行い、3 個体の追尾した SNT-1 顆粒を合計してグラフとした(合計した顆粒数は約 65~110 個)。定量化したデータを Mann-Whitney *U* test によって検定した。

後期 L3 ステージの ray 前駆細胞内の SNT-1 と各細胞内小器官マーカー、もしくは SNB-1 と PH ドメインとの共局在を解析するために、共局在画像を CSU-W1 システムを用いて取得した。取得した画像は ImageJ プラグインである Intensity Correlation Analysis を用い、共局在性解析のために、ピアソンの相関係数によって定量化した(Lau et al., 2004, Barlow et al., 2010)。定量化したデータを Kruskal-Wallis test with post-hoc Steel-Dwass multiple comparison test あるいは Mann-Whitney *U* test によって検定した。画像は各形質転換体の WT と *plx-1* 変異体との間で同様のセッティングで取得した(レーザーパワー, 露光時間, ゲイン; GFP::RAB-5/SNT-1::mCherry: 40% (OBIS 488 LS), 100 ms, 100 /50% (OBIS 561 LS), 100 ms, 100 ; RAB-7/SNT-1: 50%, 100 ms, 100 /90%, 100 ms, 100 ; RAB-11/SNT-1: 50%, 100 ms, 100 /50%, 100 ms, 100 ; LMP-1/SNT-1: 50%, 100 ms, 100 /40%, 100 ms, 100 ; TRAM-1/SNT-1: 90%, 300 ms, 100 /50%, 300 ms, 100 ; SYX-16/SNT-1: 90%, 3000 ms, 100 /90%, 500 ms, 100) (SNB-1/PH ドメイン: 90%, 1000 ms, 100 /9%, 500 ms, 100)。

PLX-1::mCherry 画像はレーザーパワー: 90% (OBIS 561 LS), 露光時間: 1000 ms, ゲイン: 100 で取得した。

4 結果

4.1 研究背景 - ray の発生過程とセマフォリンシグナルの機能

本論に入る前に、まず本実験系である ray について概説しておく。感覚器である ray は成虫雄尾部の左右に 9 対の感覚突起として存在しており、頭部側から尾部側へかけて ray1~ray9 と名付けられている(Baird et al., 1991) (Figure 1)。ray は幼虫期雄尾部に存在する表皮細胞集団である ray 前駆細胞群に由来する。雄 3 齢幼虫(L3)の尾部両側には頭部側から尾部側にかけて 9 つの表皮細胞(Rn 細胞)が一行に並んでおり R1 から R9 と名付けられている。各 Rn 細胞は、まず 1 回分裂して Rn.a と Rn.p 細胞となる。Rn.p 細胞はこれ以上分裂しない。Rn.a 細胞はもう一度細胞分裂をし、Rn.aa 細胞、Rn.ap 細胞となる。そして、Rn.aa 細胞、Rn.ap 細胞はともにもう一度細胞分裂をし、それぞれ Rn.aaa 細胞と Rn.aap 細胞、Rn.apa 細胞と Rn.app 細胞が生じる。Rn.aap 細胞は細胞死によって消失し、残りの 3 つの細胞が ray 前駆細胞群として最終的に 1 つの ray を形成する。その後、Rn.p 細胞は融合を開始する。まず、R1.p 細胞と R2.p 細胞が融合し、さらに R1.p 細胞から R5.p 細胞までが融合して一つの表皮細胞を形成する。また、R6.p、R7.p、R8.p、R9.p 細胞は別の表皮細胞と融合する(Baird et al., 1991) (Figure 2)。

R1.p 細胞と R2.p 細胞の融合直前までがほぼ 3 齢(L3)ステージ、融合開始後からが 4 齢 (L4) ステージにあたる(Figure 2)。野生型では後期 L3 ステージの段階で ray 前駆細胞群は R1 と R2 がほぼ隣り合った状態となっている。そして、初期 L4 ステージにおいて R1.p 細胞と R2.p 細胞が融合した後でも R1 と R2 の ray 前駆細胞群はそのまま隣り合った状態が維持されている(Baird et al., 1991) (Figure 1)。それに対して、*plx-1* 変異体では L3 後期ステージの段階で R1 の ray 前駆細胞群が R2 の ray 前駆細胞群から離れて前方方向へ移動してしまっている(Figure 1)。これは R1.p 細胞と R2.p 細胞の細胞境界が *plx-1* 変異体では野生型と比較して前方方向へ移動しているために、それに応じて R1 の ray 前駆細胞群が移動したためではないかと考えられる(Nukazuka et al.,

2008)。セマフォリンシグナルは L3 後期ステージの段階で R1.p 細胞と R2.p 細胞の細胞境界を後ろ側に留めておく役割を担っていると考えられる。

4.2 エンドサイトシス因子の機能欠損による *plx-1* 変異の ray 表現型抑圧

当研究室の糠塚により *unc-41(e1199)* 変異が *plx-1* 変異による ray 表現型異常を抑圧することが偶然発見された (Figure 5A)。UNC-41 は哺乳類 stonin2 の線虫ホモログであり、stonin2 は神経終末でのシナプス小胞再取り込み時に synaptotagmin I のアダプターとして機能することが知られている (Fergestad and Broadie, 2001; Stimson et al., 2001; Walther et al., 2004; Jung et al., 2007; Maritzen et al., 2010; Phillips et al., 2010)。そこで線虫のシナプス小胞からの伝達物質放出に關与する主要な synaptotagmin である SNT-1 をコードする *snt-1* 遺伝子変異の 3 種類の allele、*snt-1(n2665) (me290) (ad596)*、および *unc-41* の別 allele である *unc-41(e268)*、それぞれの背景で *plx-1* 変異体の ray 表現型を調べた。その結果、*snt-1* 変異、*unc-41* 変異ともに *plx-1* 変異による ray 異常を抑圧し、また、allele の ray 抑圧の程度と運動異常表現型(Unc)の強さが相関していた (Figure 5, 6, 7, Table 5)。また、*snt-1*、*unc-41* の RNAi ノックダウンも *plx-1* 変異による ray 異常を弱く抑圧していたことから、SNT-1・UNC-41 系の機能阻害が抑圧を引き起こすことが確認された (Table 5)。後期 L3 ステージにおいても、*snt-1*、*unc-41* 変異は R1 クラスターの位置異常を抑圧した (Figure 5)。一方、野生型の背景では、*snt-1*、*unc-41* 単独変異は成虫の ray1 位置異常を引き起こさなかった (Table 5)。

synaptotagmin I はシナプス小胞再取り込みだけでなくシナプス小胞からの Ca^{2+} 依存的な伝達物質放出にも関わり、シナプス小胞のリサイクリングにおいて重要であることが示されている。そこでシナプス小胞リサイクリングに関わる他の因子の変異が ray1 表現型を抑圧するかどうかを検討した。synaptojanin1(UNC-26) や endophilinA(UNC-57)はクラスリン依存的なエンドサイトシスにおける実行因子であ

り、シナプス小胞の再取り込みでも重要である(Ringstad et al., 1997; Patrick et al., 2008; Kjaerulff et al., 2011)。 *unc-26*、 *unc-57* 変異は *plx-1* 変異体における ray 異常を、 *snt-1* や *unc-41* 変異ほどではないが、ある程度抑圧した(Table 5)。 RNAi によるこれらの遺伝子のノックダウンでも ray 異常が抑圧された(Table 5)。これらの遺伝子の単独変異体では ray 表現型に異常はなかった(Table 5)。以上から一般的なエンドサイトシス制御因子の変異でも *plx-1* 変異体における ray 異常が抑圧されることが分かった。*snt-1*、 *unc-41* 変異には、ほかのエンドサイトシス制御因子の変異よりも強い抑圧効果があったことから、セマフォリンシグナルが SNT-1・UNC-41 を介したエンドサイトシスと強く関係している可能性が高いことが示唆された。

一方、神経伝達物質の放出時には、synaptotagmin I が SNARE である syntaxin1(UNC-64)、synaptobrevin1(SNB-1)やその制御因子と協調して働くことが知られている (Rothman, 1994; Augustin et al., 2001; Chen and Scheller, 2001; Jahn et al., 2003)。神経伝達物質放出時の必須因子である MUNC-18 の線虫オーソログをコードする *unc-18* 変異は *plx-1* 変異による ray 異常をある程度抑圧した(Gengyo-Ando et al., 1993) (Table 5)。また、v-SNARE である synaptobrevin1 をコードする *snb-1* 遺伝子変異も *plx-1* 変異による異常を弱く抑圧した(Table 5)。同じく、v-SNARE である *snb-2* の RNAi ノックダウンにおいて単独では抑圧能がなかったが、*snb-1* 遺伝子変異の抑圧能を増強した(Table 5)。しかし、神経伝達物質放出時の必須因子である Munc13 の線虫オーソログをコードする *unc-13* 変異は *plx-1* 変異による ray 異常を抑圧しなかった(Maruyama and Brenner, 1991) (Table 5)。神経細胞の細胞膜に局在する t-SNARE タンパク質 syntaxin をコードする *unc-64* 変異も抑圧能がなかった(Table 5)。神経細胞以外では syntaxin である SYX-2、SYX-3、SYX-4 が t-SNARE として機能することが知られている(Kasai and Akagawa, 2001) (Table 5)。そこでこれらの *syx* 遺伝子の RNAi ノックダウンを試みたところ、*syx-2*、*syx-3* (RNAi) は *plx-1* による ray 異常を抑圧しなかったが、*syx-4* (RNAi) は *plx-1* による ray 異常を強くはないが抑圧した(Table

5)。これらの結果から遺伝学的にはセマフォリンシグナルがエキソサイトシスも負に制御している可能性が考えられる。また、神経伝達能低下に由来した運動異常という表現型を示す *unc-64*、*unc-13* 変異に ray 異常の抑圧能がなかったことから、シナプス小胞放出制御とは異なるメカニズムが抑圧に関与することが示唆される。エキソサイトシス関連では単独因子の機能阻害で強い抑圧はおこらなかったが、複数のエキソサイトシス関連因子を抑制しなければ *plx-1* 変異による ray 異常を強く抑圧しないのかもしれない。

4.3 SNT-1 - UNC-41 の表皮細胞自律的機能

SNT-1/UNC-41 は神経細胞で機能することが知られているが、表皮細胞のような非神経細胞での機能についてはほとんど報告がない。また、*unc-41* 変異体の運動異常救済能を持つトランスジーンレポーター *unc-41p::gfp::unc-41* では神経細胞での GFP 発現は観察されたが ray 前駆細胞での発現は確認できなかった (田中 未発表データ)。これらの事実から考えると、*plx-1* 変異による ray 表現型異常の抑圧は神経伝達異常の二次的な効果である可能性がある。しかし、上述のように、神経末端での神経伝達物質の放出不全により運動異常を示す *unc-64* および *unc-13* 変異が *plx-1* 変異体の ray 異常を抑圧しなかったことから、神経伝達物質の放出阻害、あるいはそれによって引き起こされる運動異常自体が ray 表現型抑圧を引き起こすことは考えにくい。そこで、私は SNT-1 と UNC-41 が ray 前駆細胞で機能している可能性を検証することにした。

まず、*snt-1*; *plx-1* 変異に ray 前駆細胞特異的プロモーターである *lin-32p* を用いて SNT-1::mCherry を ray 前駆細胞内で発現させた (Portman et al., 2000)。その結果、*snt-1*; *plx-1* 変異体の ray 前駆細胞内での SNT-1 の発現によって *plx-1* 単独変異体と同様の ray 前方化が認められ、*snt-1* 変異による ray 表現型抑圧がレスキューされたことが分かった (Figure 8)。さらに LIN-17 (Frizzled ホモログ) のプロモーター *lin-17p* を用いて SNT-1 と UNC-41 をそれぞれ発現させて、同様のレスキュー実験を行った

(Sawa et al., 1996)。 *lin-17p* は ray 前駆細胞特異的ではないが、 *lin-32p* に比べて ray 前駆細胞での遺伝子発現をより強く駆動するプロモーターである。 *lin-17p* による SNT-1 と UNC-41 の ray 前駆細胞内での発現はそれぞれ *snt-1; plx-1*、 *unc-41; plx-1* による ray 表現型抑圧をレスキューした (Figure 8)。これらの結果より、SNT-1 と UNC-41 は表皮細胞である ray 前駆細胞において細胞自律的に機能することが示された。また、UNC-26 を *lin-17p* を用いて ray 前駆細胞内で発現させても *unc-26; smp-1 smp-2* による ray 表現型抑圧がレスキューされことも、ray 前駆細胞におけるエンドサイトシスの抑制が ray 表現型抑圧に関わることを支持している (Table 5)。

脊椎動物神経細胞末端では、synaptotagmin I は Ca^{2+} センサーとして機能してエキソサイトシスやエンドサイトシスを引き起こすことが知られている。synaptotagmin I の Ca^{2+} センサーとして機能する C2A と C2B ドメインに 4 ヶ所の変異を挿入することで Ca^{2+} 結合力を消失させた SNT-1(4DN) を作製した (Yao et al., 2011)。SNT-1(4DN) を *lin-17p* によって ray 前駆細胞で発現させたところ、*snt-1; plx-1* による ray 表現型抑圧をレスキューしなかった (Figure 8)。このことから、ray 前駆表皮細胞においても SNT-1 は Ca^{2+} 依存的に機能することが示唆された。

以上の結果をまとめると、複数のエンドサイトシス・エキソサイトシス因子の機能阻害が *plx-1* 表現型を抑圧することから、遺伝学的にはセマフォリンシグナルが ray 前駆細胞内でのエンドサイトシス・エキソサイトシスを負に制御すると考えられる。また、他のエンドサイトシス・エキソサイトシス関連遺伝子の変異に比べて、*snt-1* 変異と *unc-41* 変異がとりわけ高い抑圧効果を持つことから、セマフォリンシグナルが主として SNT-1/UNC-41 系を介したエンドサイトシス・エキソサイトシスを制御していることが示唆される。次に細胞生物学的手法を用いて、この可能性をより直接的に検討することにした。

4.4 セマフォリンシグナルによる ray 前駆細胞のエンドサイトシスの制御

セマフォリンシグナルが ray 前駆細胞においてエンドサイトシスを制御しているかどうかを検証するため、私は ESCRT pathway の最初の過程を担う因子である HGRS-1 の ray 前駆細胞内での局在を調べた。エンドサイトシス後に細胞内へ取り込まれた小胞や、それらの小胞から形成される初期エンドソームにはホスファチジルイノシトール 3-リン酸(PI(3)P)が多く存在するが、HGRS-1 は FYVE domain を介して PI(3)P と結合する(Yu et al., 2006; Lemmon, 2008; Posor et al., 2013)。そこで、HGRS-1 を初期エンドソームマーカーとして用いた形質転換体 *ncEx9111[lin-17p::mCherry::PH domain; lin-17p::hgrs-1::gfp]* を作製し、高感度ニポウディスク共焦点顕微鏡を用いて ray 前駆細胞内での HGRS-1 の発現パターンを観察した。

HGRS-1 は ray 前駆細胞内において顆粒状に存在し、後期 L3 ステージの ray 前駆細胞内で、*plx-1* 変異では HGRS-1::GFP の顆粒数が野生型により多かった(Figure 9)。*plx-1* 変異における HGRS-1 の顆粒はエンドサイトシスによって取り込まれた直後の小胞および初期エンドソームを可視化していると考えられ、HGRS-1 顆粒数が少ない野生型ではエンドサイトシスが ray 前駆細胞内で低下していることを示すと解釈できる。このことから、セマフォリンシグナルはエンドサイトシスを抑制することが示唆された。一方、体壁筋など ray 前駆細胞以外の細胞では HGRS-1 顆粒が野生型でも *plx-1* 変異と同様に観察された。*plx-1* 変異において HGRS-1 顆粒は ray 前駆細胞の頂端面から 0.5-1.0 μm の深度で多く観察され、これはアドヘレンスジャンクションに局在する AJM-1 とほぼ同じ深さである。これより深部では HGRS-1 顆粒数が減少していた(Figure 9)。この初期エンドソームの局在パターンから、*plx-1* 変異体でのエンドサイトシスは ray 前駆細胞の頂端面または頂端に近い外側で局所的に起きている可能性が考えられる。

次に、*snt-1* 変異が HGRS-1 顆粒に及ぼす効果を調べた。*snt-1; plx-1* 変異および *unc-41(RNAi); plx-1* の HGRS-1 の顆粒数は *plx-1* 変異と *control(RNAi); plx-1* よりも少な

く、野生型と同程度まで減少していた(Figure 9)。さらに *unc-41* ノックダウンでも同様の効果がみられ、*unc-41(RNAi); plx-1* の HGRS-1 の顆粒数は *control(RNAi); plx-1* よりも少なく *control(RNAi)* と同程度まで減少していた(Figure 10)。これらの結果は、初期エンドソームマーカーである HGRS-1 顆粒数の *plx-1* 変異体での増加が SNT-1/UNC-41 系に依存する事を示しており、セマフォリンシグナルが UNC-41 依存的なエンドサイトシスを抑制することが示唆された。

4.5 セマフォリンシグナルによるリサイクリング経路抑制

次に、セマフォリンシグナルがエキソサイトシス制御にも関わるのかどうかを調べるため、エキソサイトシス関連因子の可視化を試みた。*ray1* 表現型抑圧効果が認められた *snb-1* 変異に対応する v-SNARE タンパク質 SNB-1 について、*ray* 前駆細胞内での発現パターンに野生型と *plx-1* 変異体との間で変化があるのかどうかを後期 L3 ステージにおいて調べることにした。GFP を融合させた GFP::SNB-1 を *lin-17p* を用いて *ray* 前駆細胞内で発現させた *ncEx9113[lin-17p::gfp::snb-1; lin-17p::mCherry::PH domain]* 系統を作製し、*ray* 前駆細胞内での SNB-1 の発現パターンを観察した (Sato et al., 2008)。野生型では、GFP::SNB-1 は細胞膜上と細胞内に顆粒状となって発現していた(Figure 11A)。その一方で *plx-1* 変異体では GFP::SNB-1 は細胞膜上にのみ発現し、細胞内の顆粒はほとんど観察されなかった(Figure 11A)。ImageJ を用いて後期 L3 ステージの GFP::SNB-1 と細胞膜マーカー(mCherry::PH domain)の共局在性を定量した。その結果、野生型のほうが *plx-1* 変異体よりも局在の相関値が低かった(Figure 11B, C)。 *plx-1* 変異体ではエキソサイトシスが活発に起きているために細胞膜に局在している SNB-1 が多く、野生型ではエキソサイトシスが抑制されたために細胞内にも SNB-1 が顆粒状となって存在していると解釈できる結果である。また、*snt-1; plx-1* 変異での SNB-1 と細胞膜との共局在は野生型と同程度であり、*snt-1* 変異が *plx-1* 変異で増加した SNB-1 と細胞膜との共局在を抑圧することがわかった(Figure 11)。この結果は、*plx-*

1 変異体でのエキソサイトシスの変化が SNT-1 に依存する事を示しており、セマフォリンシグナルが SNT-1 を介したエキソサイトシスを抑制することが示唆された。

さらに、エンドサイトシスとエキソサイトシスの関連を調べるために、エキソサイトシスを抑制したときにエンドサイトシスにも影響が及ぶのかどうかについて形質転換体 *ncEx9102[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::PH domain]* を用いて検証した。後期 L3 ステージの *snb-1; snb-2(RNAi); plx-1* と *syx-4(RNAi); plx-1* での初期エンドソームマーカー HGRS-1 顆粒の数を測定した。その結果、*snb-1; snb-2(RNAi); plx-1* では *control(RNAi)* と同程度まで HGRS-1 顆粒数は減少していた (Figure 12)。また、*syx-4(RNAi); plx-1* でも *control(RNAi); plx-1* と比較して、HGRS-1 顆粒の数はほぼ同数であった (Figure 12)。これらの結果から、エキソサイトシスが抑制されれば、エンドサイトシスも抑制されることが示唆される。*syx-4(RNAi); plx-1* は *plx-1* 変異による ray 表現型異常を弱くしか抑圧しなかった理由としては、*syx-4(RNAi)* によって完全にはエキソサイトシスが抑制されないという可能性が考えられる。神経軸索末端でのシナプス小胞による伝達物質放出などでは、シナプス小胞からのエキソサイトシスとその後のエンドサイトシスがカップリングされていることが報告されている (Haucke et al., 2011; Yuan et al., 2015)。表皮細胞でも SNT-1 は同様にエキソサイトシスとエンドサイトシスをカップルさせて小胞リサイクリングを制御し、さらに、セマフォリンシグナルはこれを抑制するという可能性が考えられる。

4.6 プレキシンは ray 前駆細胞外側面の頂端側に発現

これまでの結果から、セマフォリンシグナルが頂端で SNT-1 - UNC-41 依存的エンドサイトシスを抑制することが明らかになった。そこで、PLX-1 と mCherry の融合タンパク質を発現する *ncEx9112[lin-17p::plx-1::mCherry; nclIs13[ajm-1::gfp]]* を作製し、PLX-1 の ray 前駆細胞内の発現場所を観察した。なお、この PLX-1 発現実験は小林理奈氏 (名古屋大学 理学研究科 大学院生) と共同で行ったものである。その結果、PLX-

1::mCherry は細胞頂端側に近い側面で AJM-1::GFP とほぼ重なって局在し、そのほかの外側にはほとんど存在していなかった (Figure 13)。前述の HGRS-1 の局在解析結果とともに、ray 前駆細胞内の頂端でのセマフォリンシグナルによる小胞輸送制御を支持する所見である。

線虫表皮細胞のアピカルジャンクションは細胞の頂端でカドヘリン-カテニン複合体 (CCC) と DLG-1/AJM-1 複合体 (DAC) から構成されている (Costa et al., 1998; Koppen et al., 2001; Knust and Bossinger, 2002)。そこで、これらの細胞接着因子複合体がセマフォリンシグナルによって制御されている可能性を調べるために、CCC と DAC をそれぞれ構成する因子である HMR-1 と AJM-1 の発現パターンを野生型と *plx-1* 変異体との間で比較した。

まず、CCC を構成する古典的 E-カドヘリンである HMR-1 と GFP の融合タンパク質を発現する形質転換体 *xnIs96* を用いて、ray 前駆細胞内での HMR-1::GFP の発現を野生型と *plx-1* 変異体とで比較した (Achilleons et al., 2010)。野生型でも *plx-1* 変異体でも HMR-1::GFP は ray 前駆細胞の細胞側面の頂端に局在していたが、ray 前駆細胞内には顆粒状となった HMR-1::GFP はほとんど存在しなかった。 (Figure 14)。次に、DAC を構成する AJM-1 と GFP の融合タンパク質を発現させた形質転換体 *ncIs13* においても ray 前駆細胞内での AJM-1::GFP の発現を調べた (Liu et al., 2005)。AJM-1 も HMR-1 と同様に ray 前駆細胞の頂端に局在し、野生型と *plx-1* 変異体との間で発現パターンに違いは見られなかった (Figure 1)。

また、セマフォリンシグナルによる小胞リサイクリングを介した発現制御を受ける標的因子としてシグナル分子の受容体が考えられる。その候補の一つとして Wnt 受容体 *frizzled* のホモログである LIN-17 と GFP 融合タンパク質を発現させた形質転換体を用いて *mhIs9[LIN-17::GFP]* の ray 前駆細胞内の発現パターンを野生型と *plx-1* 変異体と比較した (Sawa et al., 1996)。LIN-17::GFP は ray 前駆細胞の全ての細胞膜上で頂端面から基底面にかけて一様に発現していたが、野生型においても *plx-1* 変異体においても

発現パターンに違いは見られなかった(Figure 15)。

本節の結果をまとめる。セマフォリンシグナルは ray 前駆細胞の頂端のアピカルジャンクション付近でエンドサイトシスを制御している可能性が高い。特定の細胞膜分子が選択的に小胞リサイクリングを介した発現制御を受ける可能性が考えられるが、現在、そのような分子が実在するかは不明である。

4.7 野生型では SNT-1 は RAB-7 と LMP-1 に局在

セマフォリンシグナルが SNT-1 - UNC-41 依存的なエンドサイトシス(そして、おそらくリサイクリング)を阻害することから、SNT-1 の ray 前駆細胞膜での局在が野生型と *plx-1* 変異とで異なるのではないかと考えた。そこで、後期 L3 ステージで ray 前駆細胞内での SNT-1::mCherry の局在を観察した。SNT-1 は ray 前駆細胞内で顆粒状に発現し、細胞の基底側付近に特に多く発現していた。しかし野生型と *plx-1* 変異体いずれの ray 前駆細胞でも細胞膜上に存在する SNT-1 はほとんど検出することはできず、細胞膜上の SNT-1 の違いを比較することはできなかった(Figure 15)。これはおそらく、SNT-1 の細胞膜上での存在量が少ないために、現在用いている光学系では検出できないためと考えられる。そこで私たちは、ray 前駆細胞内で顆粒状に発現している SNT-1 の局在パターンを詳細に検討してみるとし、高感度ニポウディスク共焦点顕微鏡を用いて後期 L3 ステージでの各細胞内小器官と SNT-1 の共局在を ImageJ によって定量した。

一般的に細胞膜タンパク質は翻訳されると小胞体、ゴルジ体を経て細胞膜へと輸送される(Stenmark, 2009; Grant & Donaldson, 2009)。細胞膜上の膜タンパク質はエンドサイトシスによって初期エンドソームへと取り込まれ、リサイクリングエンドソームを通過してエキソサイトシスによって再び細胞膜へと戻るリサイクリング経路を通ることが知られる(Sato et al., 2014)。また、リサイクリング経路とは別に後期エンドソームを通過してリソソームへと輸送される分解経路も存在する。初期エンドソーム、後期エンド

ソーム、リサイクリングエンドソームマーカーとしてそれぞれ RAB-5, 7, 11.1 を、リソソームマーカーとして LAMP オーソログである LMP-1 を、小胞体マーカーとして TRAM-1 を、ゴルジ体マーカーとして SYX-16 を用いて、ray 前駆細胞で発現させ、野生型と *plx-1* 変異体での SNT-1 との共局在を比較した(Bucci et al., 1992; Poteryaev et al., 2010; Grant and Hirsh, 1999; Kostich et al., 2000; Rolles et al., 2002; Kubota et al., 2006; Simonsen et al., 1998; Chen et al., 2006; Sato et al., 2011)。

RAB-5, 7, 11.1 は ray 前駆細胞内に顆粒として発現しているものと拡散して発現するものが観察できた。まず、初期エンドソームマーカーである RAB-5 と SNT-1 の共局在性を RAB-5 と SNT-1 を共発現させたトランスジーン *ncEx9105[lin-17p::gfp::rab-5; lin-17p::snt-1::mCherry]*を用いて検証したところ、*plx-1* 変異体では野生型よりも少し増加していた(Figure 16A, B)。さらに、RAB-11.1 と SNT-1 を共発現させたトランスジーン *ncEx9107[lin-17p::gfp::rab-11.1; lin-17p::snt-1::mCherry]*を用いて同様に局在性を定量したところ、*plx-1* 変異では RAB-11.1 と SNT-1 の共局在性が野生型と比べ、少し高かった(Figure 16C, D)。一方で、RAB-7 と SNT-1 を共発現させたトランスジーン *ncEx9106[lin-17p::gfp::rab-7; lin-17p::snt-1::mCherry]*を用いて SNT-1 と RAB-7 の局在を調べたところ、野生型では、SNT-1 は RAB-7 との共局在性が *plx-1* 変異と比較して上昇していた(Figure 16E, F)。さらに、リソソームとの局在を LMP-1 と SNT-1 を共発現させたトランスジーン *ncEx9108[lin-17p::lmp-1::gfp; lin-17p::snt-1::mCherry]*を用いて調べた。LMP-1 は野生型では大きい顆粒が見られたが、*plx-1* 変異では野生型で見られたような顆粒は観察できなかった(Figure 16G, H)。野生型では、SNT-1 と LMP-1 との共局在性は *plx-1* 変異体に比べて高かった(Figure 16)。最後に、小胞体マーカー TRAM-1 と SNT-1 を共発現させたトランスジーン *ncEx9108[lin-17p::gfp::tram-1; lin-17p::snt-1::mCherry]*、ゴルジ体マーカー SYX-16 と SNT-1 を共発現させたトランスジーン *ncEx9109[lin-17p::gfp::syx-16; lin-17p::snt-1::mCherry]*を用いて SNT-1 との共局在性を調べた。TRAM-1 は ray 前駆細胞内で野生型でも *plx-1* 変異でも網目状に発現

していた。SYX-16 は ray 前駆細胞内に顆粒状に発現していた(Figure 17A, B)。野生型でも *plx-1* 変異でも一部の SNT-1 は小胞体やゴルジ体と共局在したが、共局在性には差はなかった(Figure 17C, D)。

以上の局在解析の結果をまとめる。野生型では SNT-1 は後期エンドソーム、リソソームと高い共局在性を示す。それに対し、*plx-1* 変異体では SNT-1 の後期エンドソームやリソソームへの局在が大きく減少し、一方、初期エンドソームやリサイクリングエンドソームへの局在は弱いながらも野生型よりも増加する。これらのことから、新たに合成された SNT-1 は野生型と *plx-1* 変異体ともに小胞体からゴルジ体までは同様に輸送されるが、その後、野生型ではゴルジ体から直接エンドソームへ移り、後期エンドソームやリソソームへと輸送されるものが多いことが示唆される。一方、*plx-1* 変異体では新たに合成された SNT-1 は小胞体やゴルジ体を通った後に一度細胞膜へと輸送され、その後、細胞膜から初期エンドソームやリサイクリングエンドソームを介したリサイクリング経路へと輸送されるものが増加することが推測される。

4.8 セマフォリンシグナルによる SNT-1 細胞内輸送の速度と距離の変化

以上の SNT-1 の局在解析によってセマフォリンシグナルが SNT-1 を含む小胞の細胞内輸送を制御することが示唆された。そこでこの SNT-1 小胞の輸送をさらに詳細に解明するために、私は動的な解析を行うことにした。レスキュー実験で用いた形質転換体と同じトランスジーン *ncIs61[lin-32p::snt-1::mCherry]* を用いて、ray 前駆細胞内での SNT-1::mCherry 蛍光像をニポウディスク共焦点顕微鏡によって 0.1 秒毎に記録した。多くの SNT-1::mCherry 顆粒ではイメージング期間を通して目立った動きが見られなかったが、野生型では移動距離が長く、移動速度が速い顆粒が一部存在していた(Figure 18A)。これらの SNT-1 顆粒の移動は ray 前駆細胞内の基底側に近い部分で多く観察できた。後期 L3 ステージでは観察期間中に移動方向が逆転する顆粒も見られた。これに対し、後期 L3 ステージでの *plx-1* 変異では、移動距離が長く移動速度が速い顆粒は観

察できなかった(Figure 18A)。これらを定量化するために、ImageJ プラグインである Particle Tracker を用いて SNT-1 顆粒を追尾した。野生型では 1 秒間の観察中に移動距離が 0.4 μm 以上、移動速度が 1.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上の速さで移動する顆粒がそれぞれ約 10 %、15%であったの対し、*plx-1* 変異ではそれぞれ 1%、0%と、ほとんど観察されなかった(Figure 18B)。さらには、移動距離が 0.3 μm 以下の顆粒の数は野生型の 10 %と比較して *plx-1* 変異では約 30 %と大幅に増加していた(Figure 18B)。

次にこれらの SNT-1 顆粒の動きは細胞内のどのような現象に対応しているのかを調べた。RAB-7 と共局在している SNT-1 顆粒から一部の SNT-1 顆粒が分離する例、SNT-1 顆粒の一部が GRP::RAB-7 と共局在しながら移動する例、移動性の SNT-1 顆粒が LMP-1 と共局在している SNT-1 顆粒へ融合する例が見られた(Figure 19)。これらの SNT-1 顆粒は分解経路の小胞輸送を可視化したものと考えられる。

顆粒の移動速度が 1.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上のものが見られることから、微小管依存的な輸送であることが予想された。そこで微小管の構成因子である *tbb-2*(β -tubulin)を RNAi によってノックダウンしたところ、SNT-1 の顆粒数が減少し、顆粒の大きさも巨大化するという異常が見られた。さらに、野生型で見られる速度が速く距離の長い SNT-1 顆粒の移動が観察されなくなった(Strome et al., 2001) (Figure 20)。また、微小管依存的な逆方向への輸送を制御する *che-3* (ダイニンヘビーチェーン 1b) の RNAi ノックダウンでも SNT-1 顆粒の速い、移動距離の長い輸送が減少していた(Wicks et al., 2000) (Figure 20)。このことから、SNT-1 輸送は CHE-3 依存的に輸送されていると考えられる。*dhc-3* (ダイニンヘビーチェーン 1) や *dhc-4* (ダイニンヘビーチェーン 10) の RNAi では SNT-1 顆粒の輸送速度は *control(RNAi)* とあまり変わなかったが、輸送距離は少し短くなっていた(Green et al., 2011; Mulder et al., 2003) (Figure 21)。 *dhc-3* や *dhc-4* は SNT-1 の輸送に弱いながらも関与しているのかもしれない。これらの結果から、セマフォリンシグナルは SNT-1 顆粒の微小管依存的な細胞内輸送を活性化し、輸送は主としてダイニン CHE-3 依存的であると考えられる。

4.9 エンドサイトシス抑制による SNT-1 の分解経路への輸送促進

以上の結果から、*plx-1* 変異体ではエンドサイトシスが亢進することが示唆されると同時に、SNT-1 顆粒の後期エンドソーム・リソソームへの局在が低下し、SNT-1 顆粒の速くて長い細胞内輸送も低下することが明らかになった。セマフォリンシグナルはエンドサイトシス、そしておそらく小胞リサイクリングを抑制し、SNT-1 顆粒の速くて長い細胞内輸送を促進して SNT-1 を後期エンドソーム・リソソームへの分解経路へ振り分けることが示唆される。では、セマフォリンシグナルは SNT-1 のリサイクリング経路と分解経路との間の振り分けをどのように制御しているのでしょうか。*plx-1* 変異体は示すエンドサイトシス亢進と SNT-1 の分解経路の活性低下というこの 2 つの表現型はセマフォリンシグナルの異常によってそれぞれ独立に引き起こされるのか、あるいは、両者が相互依存的であるのかどうか検討するために、セマフォリン変異体においてエンドサイトシスを抑制し、SNT-1 の輸送および局在に対する効果を調べることにした。

まず、*unc-41(RNAi)*によってエンドサイトシスを抑制することで SNT-1 の輸送と局在性に変化があるのかを検証した。*plx-1* 変異体で *unc-41* をノックダウンしたときの後期エンドソームマーカー RAB-7 と SNT-1 との共局在性を *ncEx9106[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::rab-7]; plx-1; unc-41 (RNAi)* 個体で調べたところ、局在の相関値は *control(RNAi); plx-1* よりも増加し、*plx-1* 変異による SNT-1 と RAB-7 との局在性低下表現型は抑圧されていた(Figure 22A)。また、*unc-41(RNAi); plx-1* 個体での SNT-1 と RAB-7 の局在相関値は、*unc-41(RNAi)*や *control(RNAi)*における値とほぼ同じであった(Figure 22B)。以上のことから *unc-41* ノックダウンが *plx-1* 変異体の SNT-1 の局在異常表現型を抑圧することが明らかになった。また、*ncIs61; plx-1; unc-41(RNAi)* 個体では SNT-1 輸送は速度が速く、移動距離の長い顆粒が *ncIs61; plx-1; control(RNAi)* に比べて増加し、*unc-41* ノックダウンが輸送異常表現型も抑圧することが分かった(Figure 23)。同様に SNT-1 輸送に対する *unc-26(RNAi)* の効果を調べたと

ころ、*ncIs61;plx-1;unc-26(RNAi)*では SNT-1 顆粒の移動距離は *control (RNAi)*と比較して移動距離の長いものが少数であるが観察できた(Figure 24)。SNT-1 の輸送速度は *control(RNAi); plx-1* とは有意差がなかったが、一部ではあるが移動速度の速いものが観察でき、分布も速いほうへシフトしていた(Figure 24)。これは SNT-1 顆粒の動きが特に UNC-41 に依存しているためではないかと考えられる。以上、*plx-1* 変異体においてもエンドサイトシスが抑制されると、SNT-1 輸送が分解経路へと切り替わることが明らかになった。セマフォリンシグナルが SNT-1 - UNC-41 依存的エンドサイトシスを抑制することによって SNT-1 顆粒の細胞内輸送を制御する可能性が示唆された。

4.10 SNT-1 小胞輸送制御と ray 形態形成

以上の解析から、野生型ではエンドサイトシスが抑制されることが強く示唆され、また、SNT-1 の分解経路へ輸送が促進されていることが分かった。一方、*plx-1* 変異ではエンドサイトシスが活発化し、SNT-1 のリサイクリング経路への輸送が亢進すると考えられる。そこで、SNT-1 リサイクリングの抑制のみが ray の表現型に影響を及ぼすのか、もしくは SNT-1 の分解経路への輸送も ray 表現型に影響を与えるのかどうかを検証することとした。SNT-1 顆粒の細胞内輸送経路を操作するために、RAB-5、RAB-7 の DN (dominant negative) 型、CA (constitutively active) 型をそれぞれ作製し、ray 前駆細胞内でこれらを発現させ、SNT-1 顆粒の局在を調べるとともに ray 表現型を観察した(Gallegos et al., 2012)。

まず、ray 前駆細胞に変異体型 RAB-5 である DN-RAB-5(S33N)あるいは CA-RAB-5(Q78L)を発現させた。DN-RAB-5 は WT-RAB-5 と同様に細胞内に拡散した状態と顆粒状とで観察され、野生型でも *plx-1* 変異体個体でも一部の SNT-1 と DN-RAB-5 が共局在している様子が観察できた(Figure 25A)。それに対し CA-RAB-5 は細胞内に拡散しているものではなく、顆粒状のものだけが観察された(Figure 25A)。CA-RAB-5 も SNT-1 の一部と局在しており、野生型と *plx-1* 変異体個体で違いが認められなかった(Figure

25A)。野生型の ray 前駆細胞に DN-RAB-5 を発現させた個体では WT-RAB-5 発現の場合と同様に ray 表現型は正常であった。一方、野生型での CA-RAB-5 発現個体には、少数だが *plx-1* 変異体と同様の ray 前方化異常を示すものが現れた(Figure 25B, Table 5)。また、*plx-1* 変異体では、DN-RAB-5 発現は ray 表現型異常を弱く抑圧した(Figure 25B, Table 5)。

次に、野生型個体と *plx-1* 変異体の ray 前駆細胞に変異体型 RAB-7 である DN-RAB-7(T23N)あるいは CA-RAB-7(Q68L)を発現させた。WT-RAB-7 と同様に、細胞内に拡散状態と顆粒状の両方の DN-RAB-7 が観察できた(Figure 26A)。しかし、野生型個体でも *plx-1* 変異体でも SNT-1 と局在している DN-RAB-7 はほとんど観察できなかった(Figure 26A)。そして CA-RAB-7(Q68L)を ray 前駆細胞に発現させたところ、WT-RAB-7 では観察できなかった非常に大きい顆粒が存在した(Figure 26A)。SNT-1 も非常に大きい顆粒となり、CA-RAB-7 と局在していた(Figure 26A)。野生型個体で DN-RAB-7 を ray 前駆細胞に発現させると ray 前方化異常が引き起こされたが、CA-RAB-7 発現は WT-RAB-7 発現と同様 ray 表現型にほとんど影響しなかった(Figure 26B, Table 5)。また、*plx-1* 変異体での発現では、CA-RAB-7 発現は WT-RAB-7 発現とほとんど同じ効果しかなく、DN-RAB-7 の発現では WT-RAB-7 発現に比べて異常程度がやや大きくなった(Figure 26B, Table 5)。

以上から、野生型背景での DN-RAB-7 あるいは CA-RAB-5 発現によって ray 表現型が異常となるという結果が得られた。これらの分子の発現によって引き起こされると予想される後期エンドソームへの輸送障害が ray 前駆細胞の形態に影響することが考えられる。後期エンドソームへの SNT-1 輸送障害が ray 表現型に影響を与える機構として、①この分解経路への SNT-1 輸送が直接 ray 前駆細胞の形態調節に関わる、あるいは、②エンドサイトシスを介して間接的に ray 前駆細胞の形態調節に影響する、という 2 つの可能性が考えられるが、その峻別は今後の課題である。

4.11 セマフォリンシグナルは ray 表皮細胞のオートファゴソーム経路に影響しない

ショウジョウバエの神経軸索では、synaptotagmin I は FEZ1/UNC-76 と UNC-51 を介してキネシンによって軸索上を輸送され、軸索伸長といった軸索発生に関与することが知られている(Tomoda et al., 2004; Toda et al., 2008)。そこで、これらの因子が線虫の ray 前駆細胞においても SNT-1 の輸送に関与しているのかどうかを検証した。まず、*C. elegans* UNC-51 や UNC-76 が ray 形成に関与しているのかどうか調べるために *unc-51*, *unc-76* それぞれの変異体で ray 表現型を観察したが共に異常はなかった (Table 5)。UNC-51 は哺乳類 Atg1 のホモログであり、オートファゴソーム形成を制御する(Meléndez et al., 2003)。そこで、オートファジーマーカーである LGG-1/Atg8/LC3 と GFP の融合タンパク質を ray 前駆細胞内で発現させた形質転換体 *Ex[lin-17p::lgg-1::gfp; lin-17p::snt-1::mCherry]* を用いて、LGG-1::GFP と SNT-1::mCherry の共局在を野生型と *plx-1* 変異とで比較した(Meléndez et al., 2009)。その結果、野生型でも *plx-1* 変異体でも LGG-1 と共局在する SNT-1 はほとんど存在しなかった (Figure 27)。これらのことから、ray 前駆細胞での SNT-1 顆粒のリソソームへの輸送にはオートファゴソームを介した経路は関与しないことが示唆された。

4.12 細胞内輸送と TOR 経路は独立に制御されている可能性がある

序論で述べたように、セマフォリンシグナルは TORC2 を減少させ TORC1 を増加させる(Nukazuka et al., 2011) (Figure 3)。TOR シグナルはエンドサイトシス制御にも関与するが報告されていることから、本実験系の SNT-1・UNC-41 系輸送と TOR シグナルとの間に関連性があるのかどうかを検証することとした(Henning et al., 2006)。

まず、TORC1 経路がエンドサイトシスを制御するかどうかを検討した。野生型において TORC1 経路を阻害するために、TORC1 複合体の構成因子である Raptor の線虫ホモログである *daf-15* を *RNAi* ノックダウンし、HGRS-1 顆粒数を測定した。その結果、HGRS-1 顆粒数は変化せず、*plx-1* 変異体で予想されるようなエンドサイトシス亢

進が起きないことが示唆された (Figure 28)。これは、セマフォリンシグナルによる TORC1 亢進がエンドサイトシス抑制をもたらすというモデルとは適合しない結果である。

次に、エンドサイトシスが TORC1 経路に影響するかどうかを検討した。*plx-1* 変異の ray 前駆細胞内での SNT-1::mCherry の発現量が野生型よりも低かったことから、セマフォリンシグナルは SNT-1 の翻訳を制御している可能性が高い。しかし、*plx-1* 変異体に対する *unc-41 RNAi* ノックダウンによってエンドサイトシスを抑制しても、SNT-1::mCherry の発現量は上昇しなかった。この結果は、セマフォリンシグナルによるエンドサイトシス抑制が翻訳制御の上流に位置するというモデルとは適合しない。以上の所見から、本研究で解明した小胞輸送経路と TOR シグナル経路はそれぞれ独立にセマフォリンシグナルによって制御されている可能性が高いと考えられる。

5 考察

本研究において私はまず、*snt-1*、*unc-41*変異が*plx-1*変異によるray表現型異常を抑圧することを明らかにし、SNT-1・UNC-41系による小胞輸送がセマフォリンシグナルの下流において制御されている可能性を遺伝学的に示した。次に、*C. elegans*のray前駆表皮細胞内でのエンドサイトシスやSNT-1輸送をイメージングすることによって、セマフォリンシグナルが小胞輸送をどのように制御しているのかを細胞生物学的手法によって解析した。その結果、ray前駆細胞内ではセマフォリンシグナルがSNT-1・UNC-41依存的エンドサイトシス・エキソサイトシスを抑制する可能性が示唆された。さらにエンドサイトシス抑制によりSNT-1の分解経路への輸送が促進されることを明らかにし、また、エンドサイトシスがray前駆細胞の形態制御に関わることを示した。

5.1 表皮細胞における SNT-1・UNC-41 系の機能

今回、*snt-1*; *plx-1* 変異体中で ray 前駆細胞特異的に野生型 *snt-1* 遺伝子を発現させたレスキュー実験を行うことによって、私は UNC-41/stonin2 と SNT-1/synaptotagmin が表皮細胞で機能することを示した。脊椎動物において stonin2 と結合するタンパク質である synaptotagmin I は神経軸索終末におけるシナプス小胞の細胞膜への融合・再取り込みを制御する因子として有名だが、これまで非神経細胞での機能は知られていなかった(Fergestad and Broaddie, 2001; Stimson et al., 2001; Walther et al., 2004; Jung et al., 2007; Maritzen et al., 2010; Phillips et al., 2010)。シナプトタグミンファミリーには複数種の分子が存在し、synaptotagmin I 以外のメンバーが神経軸索終末以外で機能する例が知られている(Südhof, 2002; Pang and Südhof, 2010)。例えば、synaptotagmin II、V、VII がエキソサイトシスを制御することで白血球の細胞移動に関与することや synaptotagmin VII が繊維芽細胞においてリソソーム由来の小胞による細胞膜修復に関与することが報告されている(Reddy et al., 2001; Colvin et al., 2010)。哺乳類でも synaptotagmin I が神経細胞以外で機能し、小胞輸送調節を介して細胞形

態の変化など、発生制御に寄与する状況があるかもしれない。

HGRS-1 顆粒数の実験から、私はセマフォリンシグナルが SNT-1 - UNC-41 依存的なエンドサイトシスを制御する可能性があることを発見した。*ray* 前駆細胞内でのエンドサイトシスを脂溶性蛍光色素である FM4-64 を用いて可視化することを試みたが、野生型と *plx-1* 変異体との間で色素取り込み量の違いを検出させることはできなかった。pH 感受性の GFP を用いることで、*ray* 前駆細胞内で生じているエンドサイトシスやエキソサイトシスを可視化できるようになる可能性は高い(Hoopmann et al., 2010)。もしくは、エンドサイトシスを阻害、あるいは亢進させる薬剤を使用して HGRS-1 を観察することでもセマフォリンシグナルがエンドサイトシスを制御するかどうかをより直接的に示すことができるかもしれない。これらは今後の課題となる。

研究背景で述べたように、*plx-1* 変異体では後期 L3 ステージにおいて R1.p 細胞と R2.p 細胞の細胞境界が前方へずれるという異常が生じる。セマフォリンシグナルがエンドサイトシスを制御することで、細胞膜の取り込み量に変化が生じ、細胞融合や細胞形態に変化が生じるのかもしれない。

5.2 セマフォリンシグナルによるリサイクリング経路抑制

plx-1 変異体抑圧変異の解析からセマフォリンシグナルが *ray* 前駆細胞内でエンドサイトシスとエキソサイトシスの両方を抑制することが遺伝学的に示唆された。さらに、HGRS-1 の顆粒数の解析によって、セマフォリンシグナルが *ray* 前駆細胞内でエンドサイトシスを抑制する可能性が示された。*ray* 表現型抑圧において、SNT-1 と UNC-41 の変異による *ray* 表現型抑圧が他のエンドサイトシス因子の変異よりも強いこと、*unc-41(RNAi); plx-1* 個体と *unc-41(RNAi)* 個体とで HGRS-1 顆粒がほぼ同数であったことから、セマフォリンシグナルが UNC-41 依存的エンドサイトシスを選択的に抑制する可能性が高いと考えている。しかし本研究の結果からだけでは、*ray* 前駆細胞内での SNT-1 - UNC-41 非依存的エンドサイトシスの実態は不明であり、今後の課題として残

されている。

セマフォリンシグナルはこれまで神経軸索誘導や成長円錐崩壊ではエンドサイトシスを促進することが報告されている(Fournier et al., 2000; Wu et al., 2014)。今回の結果は、セマフォリンシグナルがエンドサイトシスに対して表皮細胞と神経細胞で正反対の効果を持つことを示唆している。これまでの神経細胞の研究では、セマフォリンシグナルによるエンドサイトシス調節に **SNT-1 - UNC-41** が関わるという報告はなく、両者の違いは関与するエンドサイトシス制御因子が異なることに起因するのかもしれない。

成長円錐では、例えば **Sema3A** が細胞膜 t-SNARE である **syntaxin1B** の発現を抑制するとマクロピノサイトシスが促進されることや(Kabayama et al., 2011)、**RAB-5** エフェクターである **Rabaptin5** を介して **RAB-5** 依存的なエンドサイトシスが促進されることが報告されている(Wu et al., 2014)。また、セマフォリンシグナルは v-SNARE タンパク質である **Syb2** を介したエキソサイトシスを抑制するという報告もある(Zylbersztein et al., 2012)。本研究でも、**SNB-1** 局在解析の結果から、エキソサイトシスもセマフォリンシグナルによる抑制を受ける可能性が示された。しかし、一般的なエキソサイトシス因子の遺伝子変異による **ray** 表現型抑圧効果は *snt-1* や *unc-41* 変異と比較して弱かったことから、**SNT-1** 依存的なエキソサイトシスが選択的に制御されている可能性が考えられる。さらに、**HGRS-1** 顆粒の発現解析では、エキソサイトシス抑制によってエンドサイトシスも抑制されることが示唆された。神経細胞では **SNT-1 - UNC-41** 系はシナプス放出とその後の細胞膜取り込みの両方(リサイクリング)を制御しているが、表皮細胞においても **SNT-1 - UNC-41** 系依存的なエンドサイトシスとエキソサイトシスは連動しており、セマフォリンシグナルは **SNT-1 - UNC-41** 系によるリサイクリングを選択的に抑制している可能性が考えられる。

SNT-1 は神経軸索末端において Ca^{2+} センサーとして機能し、シナプス小胞のリサイクリングを担っている。本系でも、 Ca^{2+} が **SNT-1** の機能を調節し、小胞リサイクリン

グに対して重要な役割を担っている可能性が挙げられる。これまでに、脊髄神経細胞の成長円錐崩壊において、Sema3A は細胞内 cGMP 濃度を上昇させることで CNGC (Cyclic Nucleotide-Gated Channels)を活性化させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが知られている(Togashi et al., 2008)。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がエンドサイトシスを亢進させるという報告もある(Tojima et al., 2011)。ray 前駆細胞においてもセマフォリンシグナルが Ca^{2+} チャネルを制御することでリサイクリングを抑制する可能性が考えられる。本系においては最近、私の所属研究室の小林理奈が *itr-1*/IP3 受容体変異が *plx-1* 変異による ray 表現型異常を抑圧することを発見した(小林 未発表)。セマフォリンシグナルは IP3 受容体を調節することで細胞内 Ca^{2+} 濃度を変化させ、SNT-1 を介したエンドサイトシスを調節しているのかもしれない。

5.3 細胞小胞輸送調節による ray 形態形成制御

unc-41; *plx-1*や*snt-1*; *plx-1*変異体において*plx-1*変異体によるray前駆細胞の配列異常およびray表現型異常が抑圧されたことから、エンドサイトシス(そして、おそらくリサイクリング経路)抑制が正常なray前駆細胞の形態制御に必要であることが示唆された。このことは、エンドサイトシス制御因子であるRAB-5のCA型のray前駆細胞内での発現によるray表現型解析実験からも示唆される。ray前駆細胞内で発現させたCA-RAB-5は顆粒様の状態でのみ存在していたが、これはエンドサイトシスが過剰に生じることで初期エンドソームが融合して巨大化した、もしくはCA-RAB-5が初期エンドソームから脱離できないため初期エンドソームから後期エンドソームへの転換が阻害されて巨大なエンドソームが形成されたためだと考えられる(Stenmark et al., 1994; Roberts et al., 1999; Rink et al., 2005)。CA-RAB-5発現の結果、SNT-1の分解経路への輸送が阻害されてSNT-1とCA-RAB-5との共局在性が高まるとともに、ray表現型が*plx-1*変異体と同様の異常を示したものと考えられる。また、エンドサイトシス制御因子であるRAB-5のDN型をray前駆細胞内での発現させた場合に、一部のSNT-1とDN-

RAB-5が共局在していた。これはray前駆細胞内でのDN-RAB-5発現がSNT-1のエンドサイトシスを阻害したために、SNT-1が初期エンドソームまで輸送されなかったためだと考えられる(Roberts et al., 1999; Rink et al., 2005)。

脊椎動物の培養細胞においても、軸索誘導時に、成長円錐崩でのエンドサイトシスやエキソサイトシスが必要であることが報告されている(Tojima et al., 2007, 2010, 2011; Hines et al., 2010; Carcea et al., 2010; Kabayama et al., 2011; Zylbersztejn et al., 2012)。また、細胞接着因子であるL1CAMは神経細胞の成長円錐で、セマフォリンの補助受容体であるNP-1(Neuropilin-1)とヘテロ二量体を形成することが知られ、さらに、Semaphorin3A に反応してL1/NP-1やPlexin/NP-1/L1といった複合体が細胞内にエンドサイトシスされるという報告もある(Kamiguchi, 2003; Castellani et al., 2000; 2002; 2004)。セマフォリンシグナルが小胞の動態制御を介して細胞接着因子の輸送を調節することで成長円錐の形態変化を引き起こし、軸索を誘導することが考えられる。神経細胞以外でも小胞輸送が細胞の形態調節や細胞移動、初期胚の発生に関与する例がこれまでに知られている(Sato et al., 2007; Desclozeaux et al., 2008; Kawauchi et al., 2010; Song 2013)。血管形成において、R-Ras/RIN2/Rab5複合体がインテグリンのエンドサイトシスを制御する例が知られており(Sandri et al., 2012)、さらにセマフォリンシグナルがR-Rasを抑制する報告も存在することから(Uesugi et al., 2008)、これらの事実を組み合わせると、セマフォリンシグナルはR-Ras/RIN2/Rab5複合体を介してインテグリンのエンドサイトシスを抑制する可能性が考えられる。表皮細胞由来であるrayの形態形成においても、セマフォリンシグナルによる細胞接着因子の小胞輸送を介した調節が重要であるかもしれない。

ray前駆細胞内でのPLX-1発現パターンから、PLX-1がアピカルジャンクション付近に局在することが明らかになった。ray前駆細胞内では、初期エンドソームマーカであるHGRS-1顆粒の数に、ray前駆細胞の頂端側において野生型と*plx-1*変異で顕著な違いが見られた。このことからセマフォリンシグナルは、ray前駆細胞内の頂端付近でエ

ンドサイトシスを抑制している可能性が示唆される。PLX-1とHGRS-1の局在パターンから、アピカルジャンクションの構成分子が小胞輸送の標的となっている可能性が示唆される。線虫のアピカルジャンクションは細胞側面の頂端に存在し、カドヘリン-カテニン複合体(CCC)とDLG-1/AJM-1複合体(DAC)から構成されている(Costa et al., 1998; Koppen et al., 2001; Knust and Bossinger, 2002)。CCCに存在する膜タンパク質が古典的E-カドヘリンであるHMR-1である。野生型と*plx-1*変異体との間で発現パターンに違いは見られず、HMR-1は小胞輸送による制御を受けていないと考えられる。DACを構成するAJM-1もray前駆細胞の頂端に局在し、野生型と*plx-1*変異体との間で局在パターンに変化が見られず、DACを構成するタンパク質でもセマフォリンシグナルによる制御を受けていることを支持するデータは得られていない。しかし、インテグリンなどの他の細胞接着因子がセマフォリンシグナルによる小胞輸送を介した発現調節を受けている可能性は残されており、今後の課題である。

また、エンドサイトシスとエキソサイトシスが細胞の表面積の調節を介して細胞形態を制御するという可能性も考えられる(Sanford et al., 2008)。軸索ガイダンスでは、成長円錐内のエンドサイトシスやエキソサイトシスが非対称に生じることで局所的な細胞表面積の変化が引き起こされ、軸索伸長がシグナルに対して誘因もしくは反発される、という機構が提唱されている(Tojima et al., 2011, 2014; Vitriol and Zheng, 2012)。本研究の対象であるray前駆細胞でも細胞内のエンドサイトシスやエキソサイトシスが局所的に調節されることが細胞の正常な形態変化に寄与する可能性が考えられる。セマフォリンシグナルを受容できないと、細胞のいたところでエンドサイトシスやエキソサイトシスが起こるため、細胞形態変化に異常が生じるのかもしれない。

5.4 セマフォリンシグナルによる SNT-1 の分解経路への輸送活性化

脊椎動物神経細胞でも、セマフォリンシグナルが神経軸索内の逆行性の小胞輸送を調節することで AMPA 受容体の局在を制御し、樹状突起の形成に関与すると考えられて

いる(Yamashita et al., 2014)。本研究においては、野生型個体で移動速度が速く、移動距離の長い SNT-1 顆粒が存在し、その輸送は β -tubulin / TBB-2、ダイニンヘビーチェーン 1b ホモログ CHE-3 に依存することが明らかになった。SNT-1 と各細胞内小器官マーカーとの共局在解析により、野生型では SNT-1 は後期エンドソーム・リソソームとの共局在性が上昇していた。このことから、SNT-1 は分解経路へと輸送されていると考えられる。そして、移動性の SNT-1 顆粒が後期エンドソームやリソソームと共局在していたことから、野生型では SNT-1 は新たに合成された後、少なくともその一部が後期エンドソームを通過してリソソームへと分解経路へ、微小管・ダイニン依存的に輸送されることが示唆される。本研究では、野生型線虫では新たに合成された SNT-1 が分解経路へ輸送される可能性が示された。ゴルジ体から直接分解経路へと輸送されるタンパク質としてリソソーム形成に関与するマンノース 6 リン酸受容体 (M6PR)やリソソーム膜貫通タンパク質 2 (LIMP2)、リソソーム膜タンパク質 1 (LAMP1)、リソソーム内でのタンパク質分解を担う酸性ヒドロゲナーゼなどが知られている(Ghosh et al., 2003; Pfeffer, 2009; Schultz et al., 2011; Siebert et al., 2014)。例えば、M6PR はトランスゴルジネットワークで新たに合成された酸性ヒドロゲナーゼをエンドソームへと輸送する役割を担っている(Dell'Angelica and Payne, 2001; Luzio et al., 2003)。SNT-1 がリソソーム内でのタンパク質分解に必要なタンパク質やリソソーム形成に必要なタンパク質の輸送を担っている可能性も考えられる。

plx-1 変異体では野生型に比べて SNT-1 の後期エンドソーム・リソソームと共局在性は低く、前述のように SNT-1 のリサイクリング経路での輸送が促進されている可能性が高い。セマフォリンシグナルは分解経路からリサイクリング経路へと SNT-1 輸送を切り替えると考えられる。*plx-1* 変異体背景での *unc-41(RNAi)* ノックダウンによるエンドサイトシス抑制が、逆行性輸送されている移動性 SNT-1 顆粒の頻度を野生型程度まで回復させ、さらに、SNT-1 と後期エンドソームマーカーとの共局在性も野生型とほぼ程度まで上昇した。この結果からセマフォリンシグナルが直接 SNT-1 の分解経路へ

の輸送を促進しているのではなく、セマフォリンシグナルによって SNT-1・UNC-41 依存的エンドサイトシスが抑制された結果、SNT-1 の逆行性輸送が活性化されることが示唆される。

細胞膜タンパク質でも、合成後に細胞膜ではなくエンドソームに輸送される例が報告されている(Sandoval and Bakke, 1994)。新たに合成されたトランスフェリン受容体 (TfR) や asialoglycoprotein receptor H1 の一部はリサイクリングエンドソームを経て細胞膜へ輸送される。おそらく野生型個体では SNT-1 も初期エンドソームに輸送されたのち、後期エンドソーム/リソソームへと振り分けられるのではないかと思われる。極性を持つ上皮細胞では、細胞膜タンパク質はゴルジ体以降、複数の経路によって細胞の頂端側と基底側へ輸送が割り振られる。上述したように、ray 前駆細胞においても、頂端側に PLX-1 が局在していることから、セマフォリンシグナルによって制御されているエンドサイトシス(リサイクリング)は頂端側の外側で起きている可能性が高い。SNT-1 を介したリサイクリングによって細胞膜へ輸送される膜タンパク質の細胞内極性に応じた分布が促進されるのかもしれない。

後期エンドソーム/リソソームへの小胞輸送で機能する RAB-7 の活性操作は SNT-1 の局在と ray 表現型に影響を与えた。ray 前駆細胞内で発現させた CA-RAB-7 は肥大した顆粒状であり、SNT-1 はこれと高い共局在を示した。これは後期エンドソームへ輸送される小胞が増加したため、後期エンドソームが肥大化した、もしくは CA-RAB-7 がリソソームの核周辺の領域への集合を促進したためと考えられる(Mukhopadhyay et al., 1997; Bucci et al., 2000)。したがって、SNT-1 は CA-RAB-7 によって分解経路へ積極的に輸送され、肥大化して CA-RAB-7 と共局在したと考えられる。しかし、CA-RAB-7 の発現は *plx-1* 変異での ray 表現型を抑圧しなかったもので、分解経路の活性化自体は ray 前駆細胞の形態調節に直接関与しないと思われる。一方、DN-RAB-7 を ray 前駆細胞に発現させた場合には、リソソームへの輸送経路が阻害されると考えられる(Mukhopadhyay et al., 1997; Bucci et al., 2000)。野生型個体の ray 前駆細胞内での

DN-RAB-7 の発現では ray 表現型に *plx-1* 変異体と同様の異常を引き起こした。DN-RAB-7 の ray1 表現型への影響は分解経路への輸送阻害による直接的なものか、分解経路輸送抑制によるエンドサイトシスの促進を介した間接的なものであるかは不明である。

雄尾部における *plx-1* 変異体の表現型は ray1 でしか認められないが、SNT-1 輸送の表現型は全ての ray 前駆細胞で認められた。このことから、SNT-1 の分解経路への輸送が、ray 発生過程で ray1 の位置決定以外にも、何らかの役割を担っている可能性が考えられる。*plx-1* 変異体での表現型に関して、感覚突起の形成過程などのさらに詳細な解析が今後の課題として残されている。

6 総括

*C. elegans*の幼虫表皮細胞において、セマフォリンシグナルがSNT-1・UNC-41依存的エンドサイトシスとエキソサイトシスを含むSNT-1のリサイクリング経路を抑制している可能性が示唆された。野生型個体ではセマフォリンシグナルによるSNT-1・UNC-41依存的エンドサイトシス抑制によって、小胞体・ゴルジ体経路から新たに合成されたSNT-1が、微小管（TBB-2）・ダイニン（CHE-3）系を介して、細胞膜ではなく後期エンドソーム・リソソームへの分解経路へと輸送されることが示唆された（Figure 29）。

7 図・表

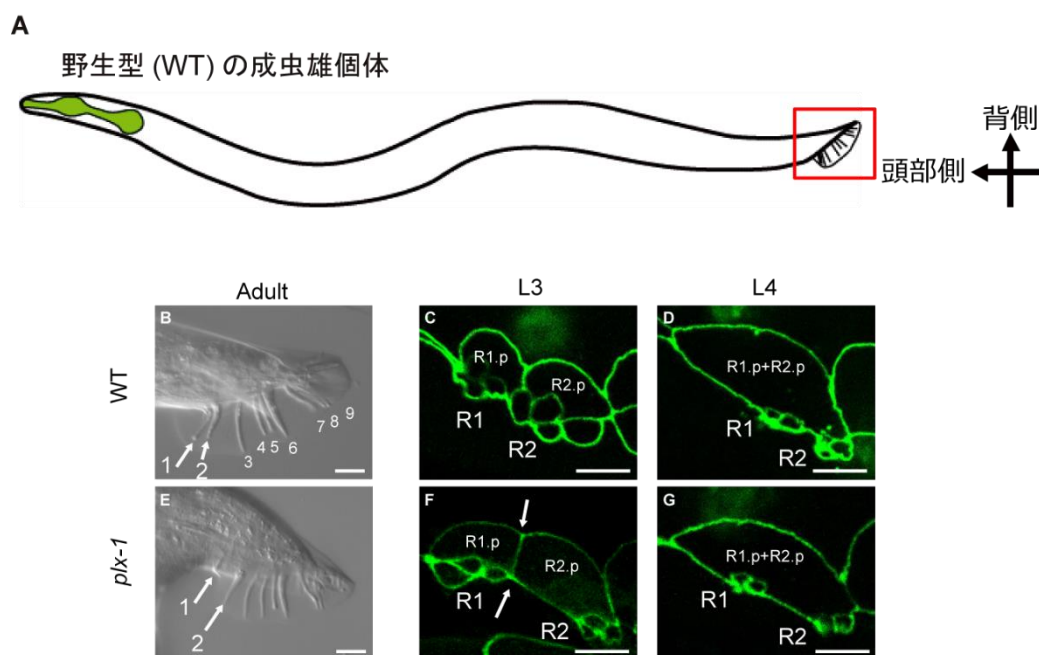


Figure 1 野生型個体と *plx-1* 変異体の ray の形態

(A) *C. elegans* 野生型(WT)雄個体の模式図。雄尾部には ray と呼ばれる感覚器が存在する。

(B) *C. elegans* 野生型(WT)雄個体の ray。雄成虫尾部側面の微分干渉顕微鏡像。右側が頭部側、上側が背側である。尾部には ray と呼ばれる左右 9 対の感覚突起が fan と呼ばれるクチクラ質の膜の内側に収まる形で存在している。頭部側から尾部側にかけて ray1 から ray9 と名付けられ、野生型個体では ray1 と ray2 が隣接している。数字が各 ray の番号を示している。

(C) 野生型個体での ray 前駆細胞。雄幼虫（後期 L3 ステージ）尾部側面の蛍光顕微鏡像。ここでは *ncls3[ajm-1::gfp]* という形質転換体を用いて ray 前駆細胞の細胞境界を GFP で可視化している。ray 前駆細胞では ray 1 と ray 2 をそれぞれ形成することとなる R1 前駆細胞群と R2 前駆細胞群が隣接している。

(D) 野生型個体での ray 前駆細胞。雄幼虫（初期 L4 ステージ）尾部側面の蛍光顕微鏡

像。R1.p と R2.p 細胞が融合した初期 L4 ステージでは R1、R2 前駆細胞群がそのまま隣り合った状態を維持している。

(E) *plx-1* 変異体の ray。雄成虫尾部側面の微分干渉顕微鏡像。ray1 が ray2 から離れて前方にずれた位置に存在するという異常が見られる。

(F) 後期 L3 ステージの *plx-1* 変異体では R1.p と R2.p 細胞の細胞境界が野生型個体と比較して前方向へずれており、細胞境界に誘引されるように R1 前駆細胞群も前方化している。

(G) *plx-1* 変異体初期 L4 ステージでは R1 前駆細胞群がそのまま前方向にずれて位置する。

スケールバー = 5 μ m

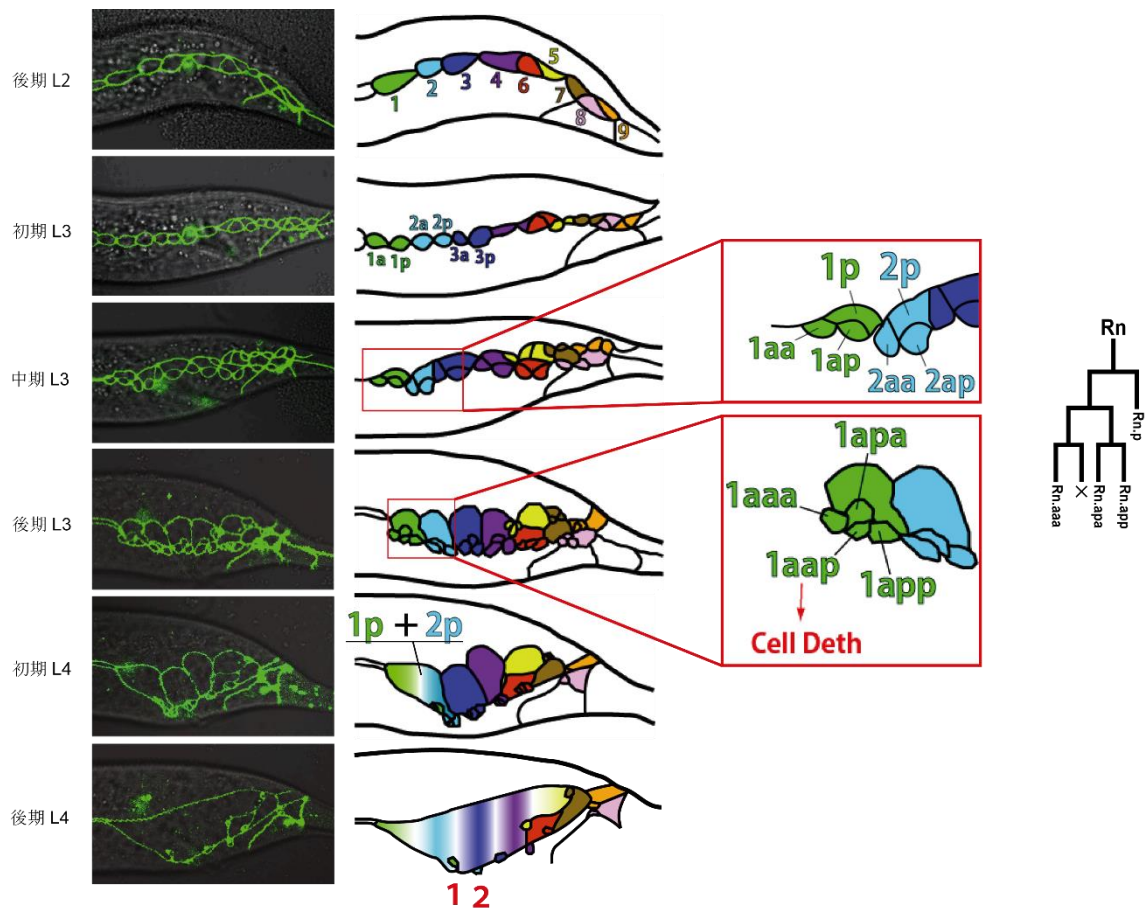


Figure 2 ray の発生過程

左) 雄幼虫 (後期 L3-L4 ステージ) 尾部側面の蛍光顕微鏡像。 *ncIs3[ajm-1::gfp]* を用いて ray 前駆細胞の細胞境界を GFP で可視化している。右) 雄幼虫 (後期 L3-L4 ステージ) ray 前駆細胞の模式図。右端に各 ray 前駆細胞である Rn(n=1-9)細胞の細胞系譜を示している。後期 L2 から初期 L3 ステージにかけて各 Rn 細胞は一度細胞分裂を行い、Rn.a と Rn.p 細胞になる。Rn.p 細胞はこれ移行細胞分裂が行われない。中期 L3 ステージまでに Rn.a 細胞はこの後に再び細胞分裂をし、Rn.aa と Rn.ap 細胞となる。さらに、後期 L3 ステージではそれぞれの細胞はもう一度細胞分裂が行われ、それぞれ、Rn.aaa と Rn.aap 細胞、Rn.apa と Rn.app 細胞となる。Rn.aap 細胞は細胞死によって消滅するが、それ以外の 3 つの細胞が ray 前駆細胞群として最終的に感覚突起を形成する。R1.p と R2.p 細胞が最初に融合を始め、その後 R1.p から R5.p 細胞までが融

合して表皮細胞となり、R6.p から R9.p 細胞が別の表皮細胞と融合していく。

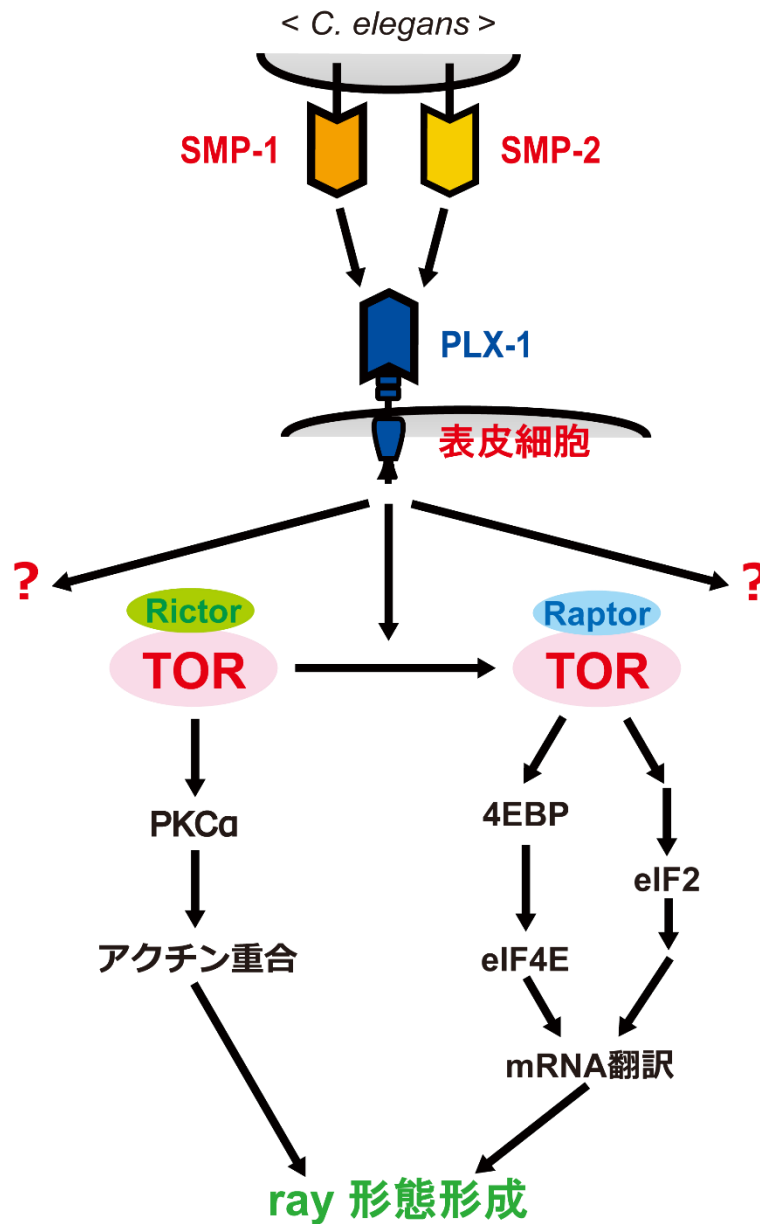


Figure 3 セマフォリン-TOR シグナリングモデル

TORC1 は eIF4F 系と eIF2 系を介した翻訳開始経路の両方を活性化させる。TORC2 の下流には PKC α を介した細胞骨格制御機構が存在する。セマフォリンシグナルは TORC2 量を減少させるとともに TORC1 量を増加させることで、翻訳の活性化と細胞骨格の制御の両面から ray の形態形成を制御する。

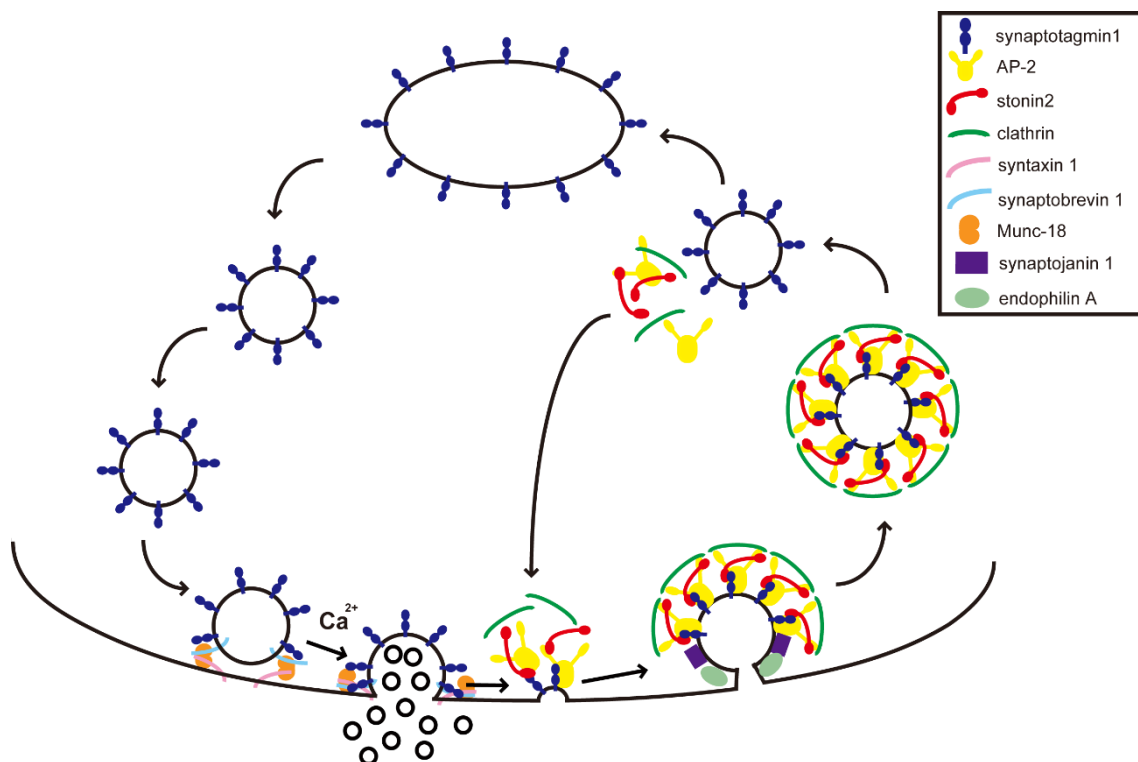


Figure 4 神経軸索末端でのシナプス小胞

シナプス小胞からの神経伝達物質の放出はカルシウムイオンの流入を感知するタンパク質である synaptotagmin I（線虫では SNT-1）によって制御されている。synaptotagmin I は SNARE タンパク質である syntaxin1(UNC-64) と synaptobrevin1(SNB-1)、Munc-18(UNC-18)によるシナプス小胞と細胞膜の融合を引き起こす。神経伝達物質放出後にシナプス小胞は再取り込みされる。その時、synaptotagmin I が AP-2、stonin2(UNC-41)とともに形成した複合体にクラスリンがリクルートされ、さらに synaptojanin, endophilinA によって小胞が細胞膜から切り離されることで、シナプス小胞のクラスリン依存的な細胞内への再取り込みが行われる。

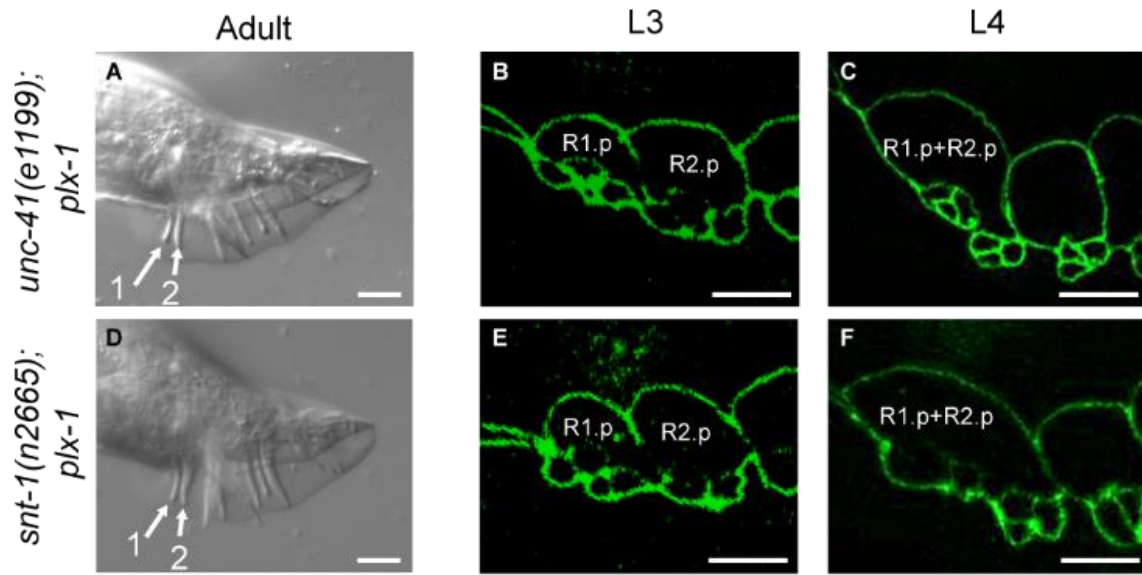


Figure 5 *unc-41*, *snt-1* 変異による *plx-1* 変異体 ray 表現型の抑圧

(A) *unc-41(e1199);plx-1* 変異体雄尾部の微分干渉顕微鏡像。 *unc-41(e1199)* 変異が *plx-1* 変異による ray 異常を抑圧している。

(B, C) 後期 L3 ステージと初期 L4 ステージでの *unc-41(e1199);plx-1* 変異体 ray 前駆細胞。どちらのステージでも R1 と R2 前駆細胞が野生型と同様に隣接しており、 *unc-41(e1199)* 変異が ray 前駆細胞の段階から *plx-1* 変異による ray 前駆細胞の表現型異常を抑圧している。

(D) *snt-1(n2665);plx-1* 変異体雄尾部の微分干渉顕微鏡像。 *snt-1(n2665)* 変異が *plx-1* 変異による ray 異常を抑圧している。

(E, F) 後期 L3 ステージと初期 L4 ステージでの *snt-1(n2665);plx-1* 変異体 ray 前駆細胞。どちらのステージでも R1 と R2 前駆細胞が野生型と同様に隣接しており、 *snt-1(n2665)* 変異が ray 前駆細胞の段階から *plx-1* 変異による ray 前駆細胞の表現型異常を抑圧している。

スケールバー=5 μm

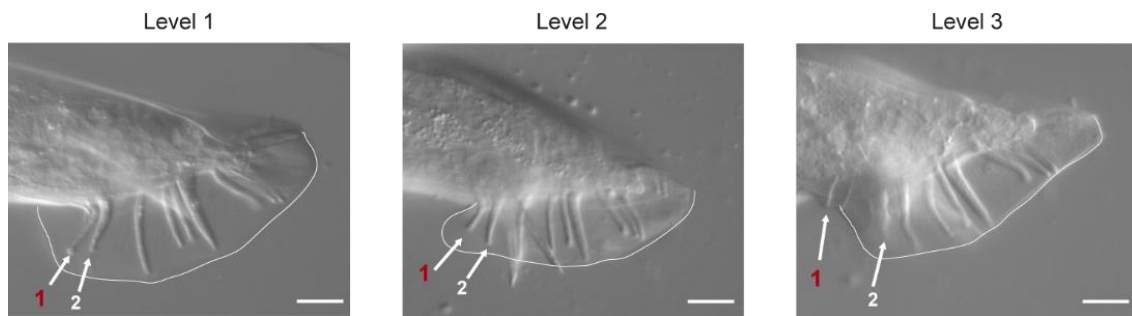


Figure 6 ray1 の位置の定量化

ray1 が ray2 とほぼ隣接した状態を Level 1、ray1 が ray2 から離れて前方化しているが、fan という構造（白線）の中に納まっている状態を Level 2、そして ray1 が ray2 から離れて前方化して fan の外に存在するものを Level 3 と分類した。

スケールバー＝5 μm

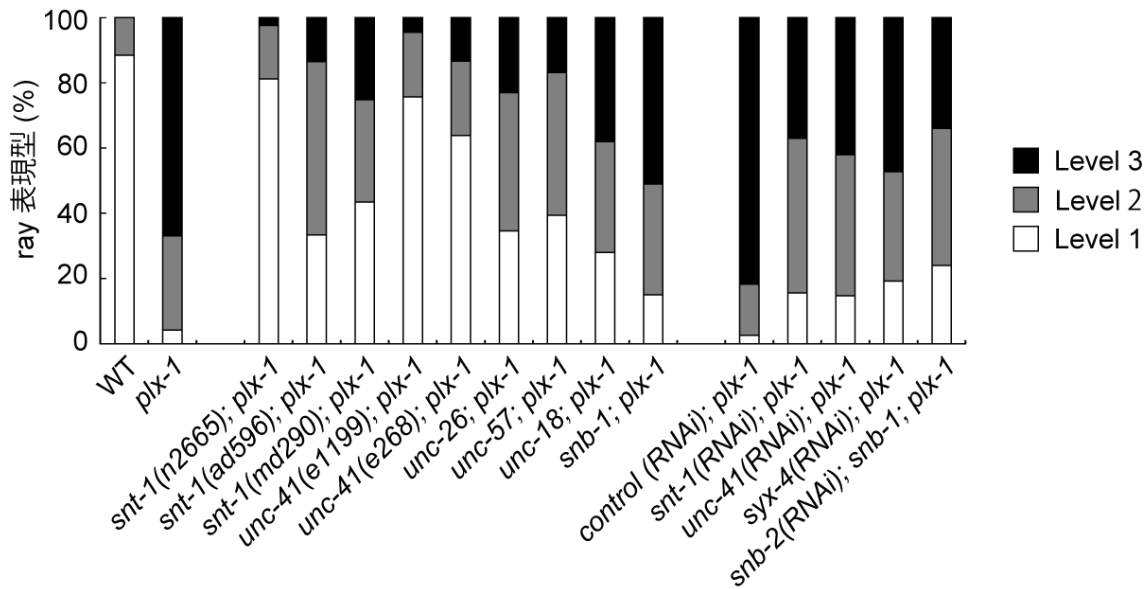


Figure 7 野生型と各変異体の ray 表現型

遺伝子変異、および RNAi ノックダウン個体の ray1 の位置を定量したグラフ。野生型ではほとんどの個体が Level 1 である。それに対し、*plx-1* 変異体では異常の強い Level 3 の割合が最も高く、Level 1 はほとんどない。

snt-1 変異体は 3 種類の変異 allele、*n2665*、*nd290*、*ad596* を用いている。*snt-1(n2665)*変異は *plx-1* 変異体による ray 表現型異常を強く抑圧する。*snt-1(ad596); plx-1*、と *snt-1(md290); plx-1* 変異体はどちらも中程度の抑圧を示す。*snt-1(RNAi); plx-1* でも弱い *control(RNAi); plx-1* による ray 表現型異常を抑圧する。*unc-41* 変異は 2 種類の変異 allele、*e1199*、*e268* を用いている。*unc-41(e1199)* 変異は *plx-1* 変異体の ray 表現型異常を強く抑圧し、*unc-41(e268)*変異は *plx-1* 変異体による ray 表現型異常を中程度であるが抑圧する。2 種類の allele どちらも抑圧効果がある。*unc-41(RNAi)*も弱い *plx-1* による ray 表現型異常を抑圧する。

神経軸索末端で SNT-1 や UNC-41 と共にエンドサイトシスを制御している *unc-26*変異や *unc-56* 変異も *plx-1* 変異体による ray 表現型異常を中程度抑圧する。エキソサイトシスを制御する *unc-18* 変異や *syx-4(RNAi)* ノックダウンは *plx-1* 変異体の ray 表現

型異常を弱いが抑圧する。SNARE タンパク質である *snb-1* 変異体は *plx-1* 変異体による ray 表現型異常を抑圧し、さらに *snb-2(RNAi); snb-1; plx-1* 変異体での抑圧は *snb-1; plx-1* 変異体よりも強い。

すべての個体に雄の生まれる頻度が上昇する変異である *him-5(e1490)* もしくは *him-8(e1489)* を導入している。

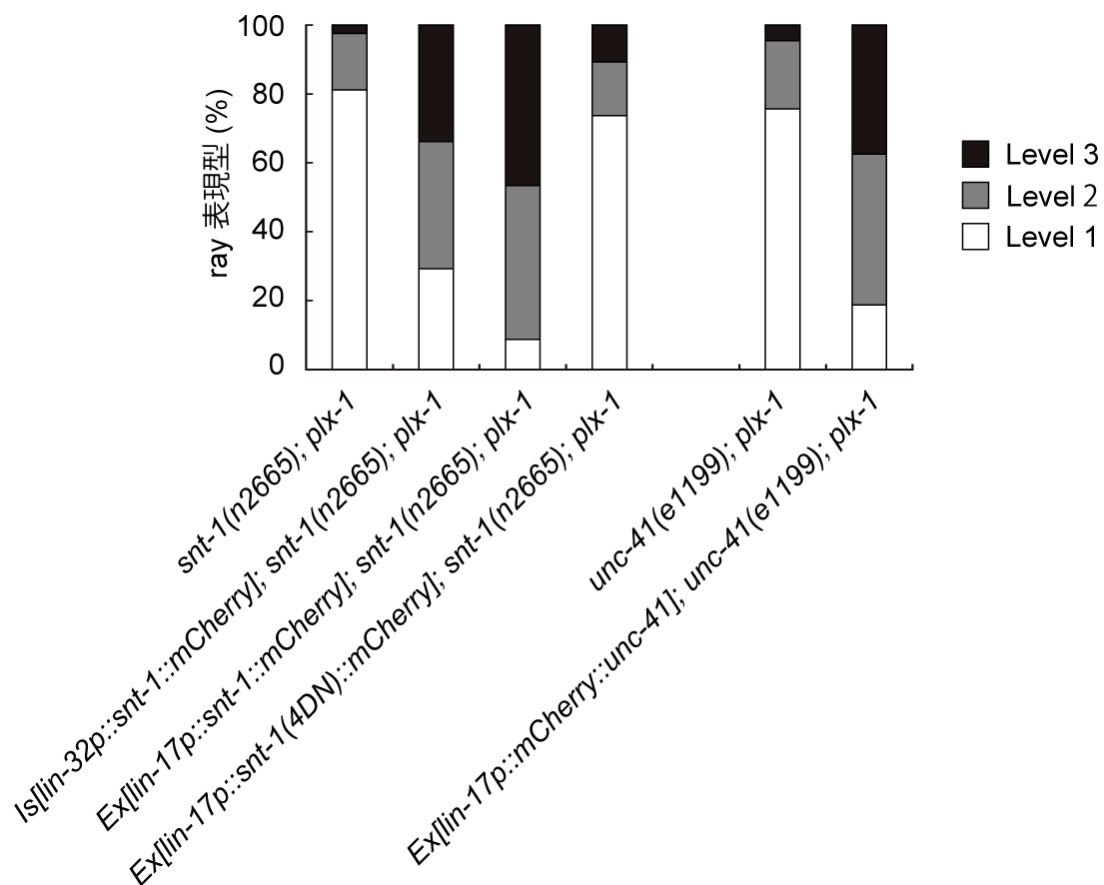


Figure 8 変異体 ray 前駆細胞での SNT-1、UNC-41 発現による ray 表現型救済

ray 前駆細胞特異的プロモーターである *lin-32p* を用いて ray 前駆細胞内で SNT-1::mCherry を発現させたトランスジーン *ncIs61[lin-32p::snt-1::mCherry]* は *snt-1(n2665)* 変異による *plx-1* 変異体における ray 表現型抑圧を救済している。ray 前駆細胞特異的ではないが、ray 前駆細胞での発現効率が *lin-32p* よりも強い *lin-17p* を用いて SNT-1::mCherry を発現させた形質転換体 *ncEx9102[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::PH domain]* でも *snt-1(n2665)* 変異による ray 表現型抑圧を救済する。*lin-17p* を用いて mCherry::UNC-41 を過剰発現させた形質転換体 *ncEx9103[lin-17p::mCherry::unc-41]* も *unc-41(e1199)* 変異による *plx-1* 変異体における ray 表現型抑圧を救済している。

Ca²⁺結合ドメインに変異を導入して Ca²⁺との結合力を消失させた変異型 SNT-

1(4DN)::mCherry を *lin-17p* によって過剰発現させた形質転換体 *ncEx9114[lin-17p::snt-1(4dn)::mCherry]*では *snt-1(n2665)*変異による *plx-1* 変異体における ray 表現型抑圧を救済していない。

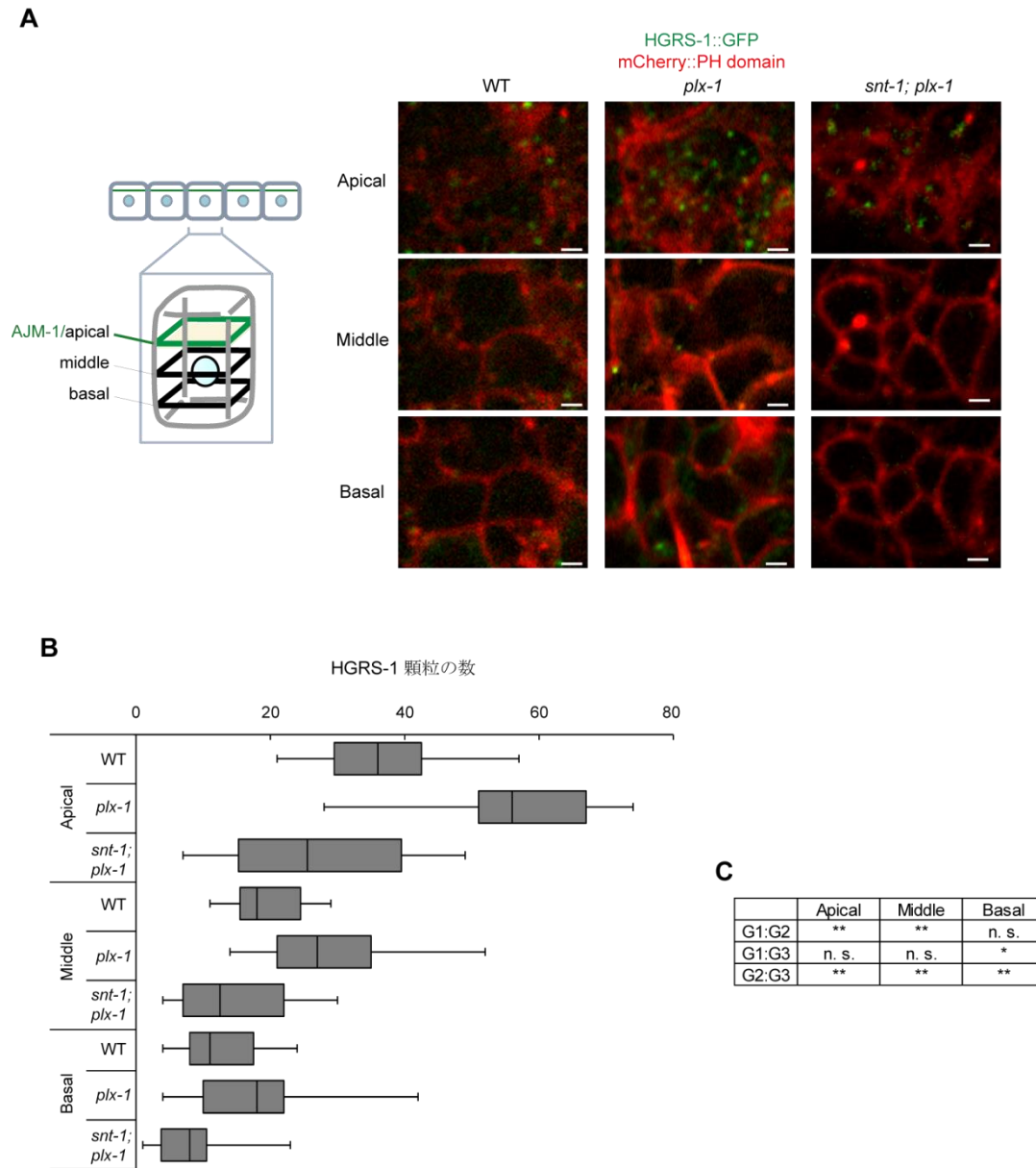


Figure 9 野生型と *plx-1* 変異体での HGRS-1 発現パターン

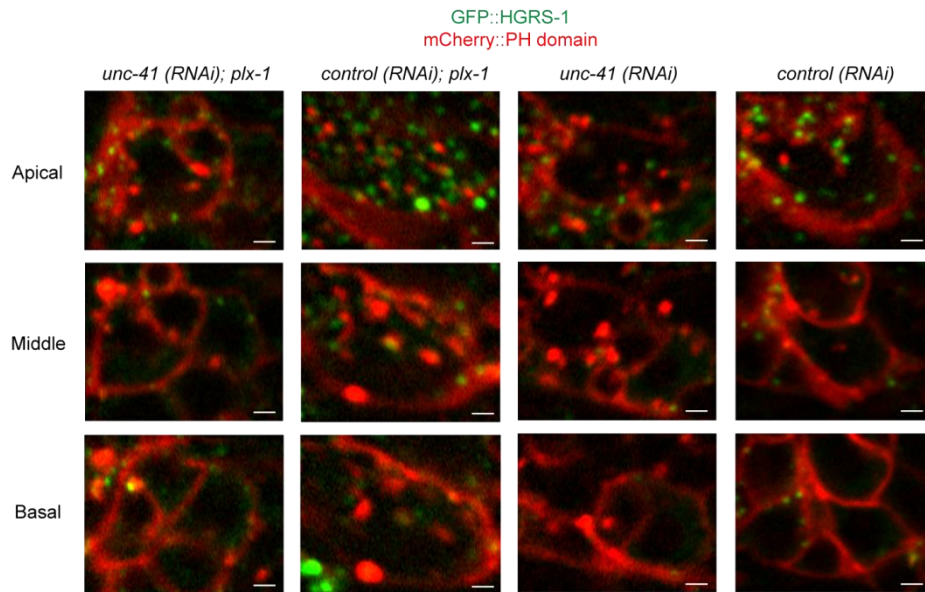
(A) 野生型と *plx-1* 変異体後期 L3 幼虫での ray 前駆細胞の HGRS-1::GFP と mCherry::PH domain の蛍光画像。ray 前駆細胞のアピカルジャンクションマーカー AJM-1::GFP とほぼ同じ高さを'頂端面'と定めた。頂端側から 1 μ m 基底面側へ移行した高さを'中央面'、さらに基底面側へ 1 μ m 移行した面を'基底面'とした。頂端側での野生型の HGRS-1 顆粒の数は *plx-1* 変異体と比較して少なく、*snt-1; plx-1* 変異体とはほ

ば違いがない。中央側では頂端側に比べ顆粒数は減少するが、ここでも野生型の HGRS-1 顆粒の数は *plx-1* 変異体と比較して少なく、*snt-1; plx-1* 変異体とはほぼ違いがない。基底側では野生型、*plx-1* 変異体、*snt-1; plx-1* 変異体すべてにおいて HGRS-1 顆粒の数はほとんど違いがない。

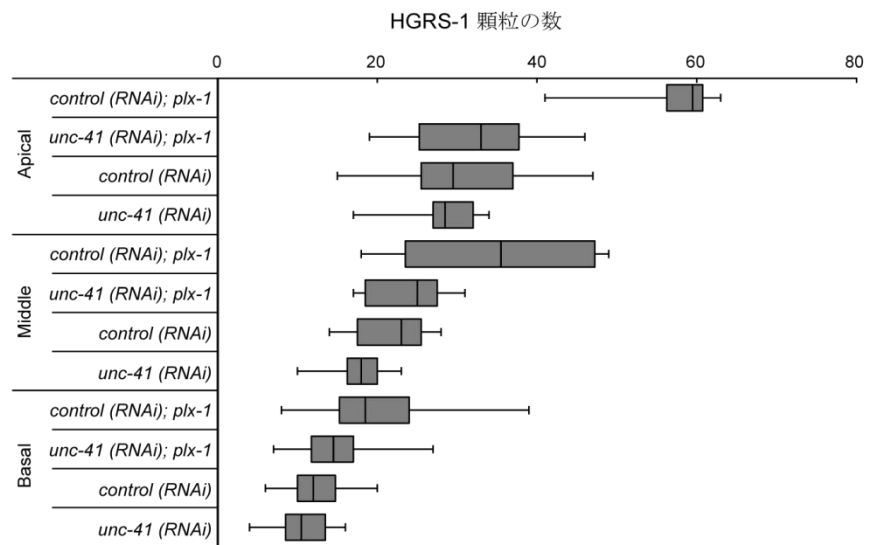
スケールバー=1 μm

(B, C) 頂端、中央、基底側の焦点面での野生型と *plx-1* 変異体、*snt-1; plx-1* 変異体での HGRS-1::GFP の顆粒数を比較したグラフ。頂端側の焦点面では野生型に比べ *plx-1* 変異体での HGRS-1 の顆粒数は増加している。中央の焦点面でも野生型に比べ *plx-1* 変異体での HGRS-1 の顆粒数は多いが、基底側の焦点面では野生型でも *plx-1* 変異体でも HGRS-1 顆粒数は変化がない(WT: G1 (n=23), *plx-1*: G2 (n=21), *snt-1; plx-1*: G3 (n=20), Steel-Dwass test, (**) $p<0.01$)。

A



B



C

	Apical	Middle	Basal
G1:G2	**	n. s.	n. s.
G1:G3	**	n. s.	n. s.
G1:G4	**	**	*
G2:G3	n. s.	n. s.	n. s.
G2:G4	n. s.	n. s.	n. s.
G3:G4	n. s.	n. s.	n. s.

Figure 10 *unc-41(RNAi)*における ray 前駆細胞内での HGRS-1 発現パターン

(A) *control(RNAi); plx-1*, *unc-41(RNAi); plx-1*, *control(RNAi)*, および *unc-41(RNAi)* 個体 ray 前駆細胞の HGRS-1::GFP と mCherry::PH domain の蛍光画像。頂端での *control(RNAi); plx-1* の HGRS-1 顆粒の数は *unc-41(RNAi); plx-1*, *control(RNAi)*, *unc-41(RNAi)*と比較して多い。中央側でも *control(RNAi); plx-1* の HGRS-1 顆粒の数は *unc-41(RNAi); plx-1*, *control(RNAi)*, *unc-41(RNAi)*と比較して多い。基底端ではどの個体でも HGRS-1 顆粒の数はほとんど違いが見られない。

スケールバー=1 μm

(B, C) 頂端、中央、基底側の各焦点面での *control(RNAi); plx-1*, *unc-41(RNAi); plx-1*, *control(RNAi)*, *unc-41(RNAi)*の HGRS-1::GFP の顆粒数を表示したグラフ。頂端側の面では *control(RNAi); plx-1* に比べ *unc-41(RNAi); plx-1* の HGRS-1 顆粒数は減少していた。また、*unc-41(RNAi)*や *control(RNAi)*とは同程度の顆粒数であった。中央側の面では *control(RNAi); plx-1* に比べ *unc-41(RNAi); plx-1* の HGRS-1 の顆粒数は増加傾向にある。それに対し、基底側の面では *control(RNAi); plx-1* と *unc-41(RNAi); plx-1* には HGRS-1 顆粒数は変化がない(n=10 (*control(RNAi); plx-1*: G1, *unc-41(RNAi); plx-1*: G2, *control(RNAi)*: G3, *unc-41(RNAi)*: G4), Steel-Dwass test, (**) $p<0.01$, (*) $p<0.05$)。

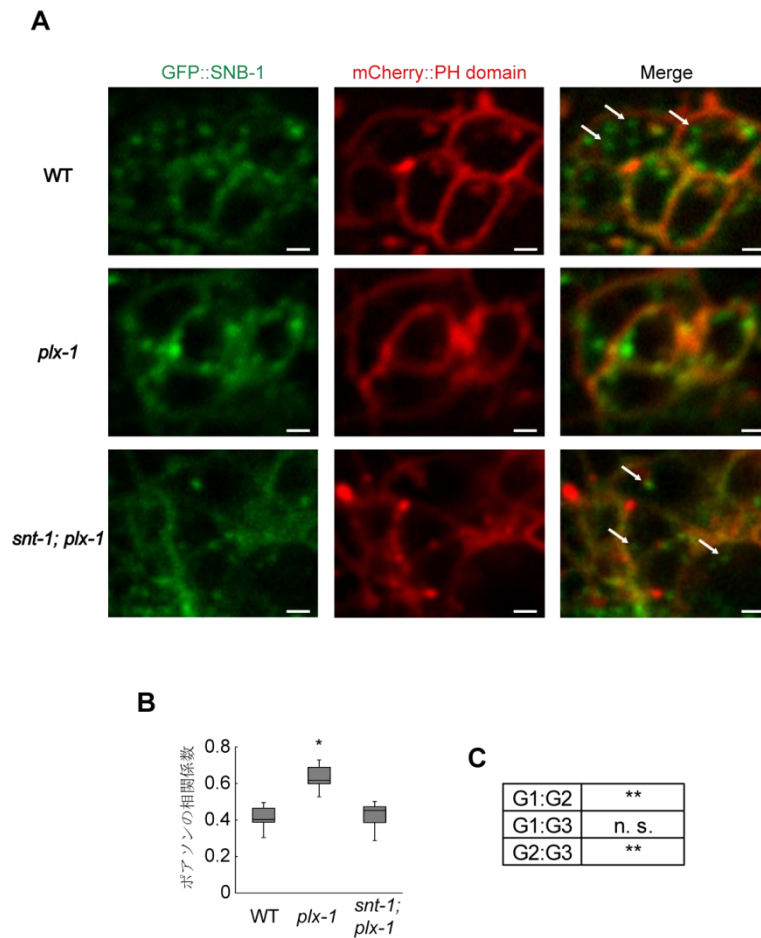


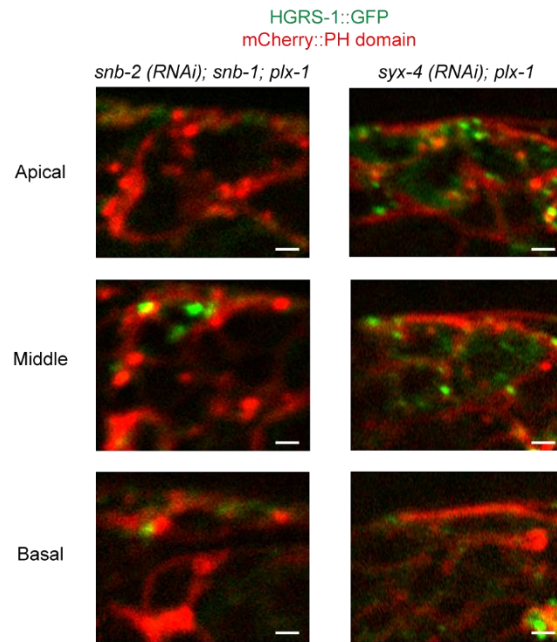
Figure 11 ray 前駆細胞内での SNB-1 の発現パターン

(A) 野生型と *plx-1* 変異体の後期 L3 ステージでの ray 前駆細胞での GFP::SNB-1 と細胞膜マーカーである mCherry::PH domain 発現の蛍光画像。野生型では細胞膜上 (mCherry::PH domain) に局在する SNB-1 と細胞内に顆粒状に存在する SNB-1 が見られる。一方、*plx-1* 変異体では多くの SNB-1 が細胞膜上に局在するように観察される。また、*snt-1; plx-1* 変異体は *plx-1* 変異体による SNB-1 と細胞膜との共局在を抑圧する。スケールバー=1 μ m

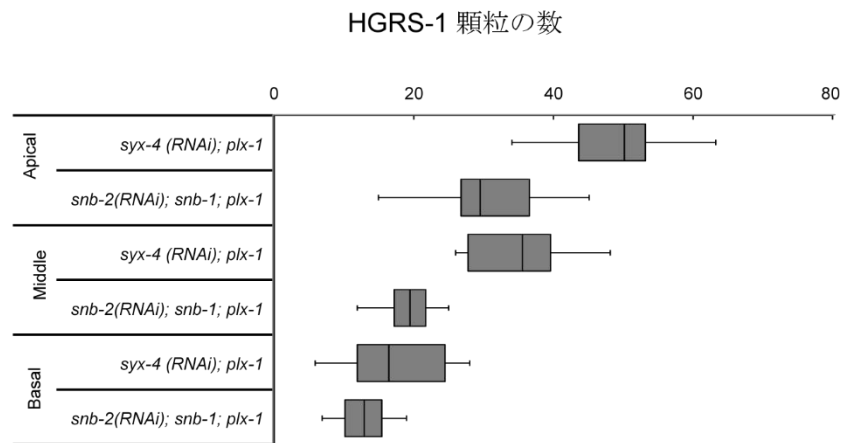
(B, C) GFP::SNB-1 と mCherry::PH domain の局在パターンの相関を ImageJ プラグインである Intensity Correlation Analysis を用いてのピアソン相関係数によって定量化したグラフ。*plx-1* 変異のほうが野生型や *snt-1; plx-1* 変異より共局在性が高い(WT: G1

(n=11), *plx-1*: G2 (n=13), *snt-1; plx-1*: G3 (n=9), Steel-Dwass test, (**) $p < 0.01$ 。

A



B



C

	Apical	Middle	Basal
G1:G3	n. s.	n. s.	n. s.
G1:G4	**	**	n. s.
G3:G4	**	n. s.	*

	Apical	Middle	Basal
G2:G3	**	**	n. s.
G2:G4	n. s.	n. s.	n. s.
G3:G4	**	n. s.	*

Figure 12 エキソサイトシス抑制によるエンドサイトシスの抑制

(A) *snb-2(RNAi); snb-1; plx-1*, *syx-4(RNAi); plx-1* 後期 L3 幼虫の ray 前駆細胞の HGRS-1::GFP と mCherry::PH domain の蛍光画像。HGRS-1::GFP と mCherry::PH domain の画像は ImageJ Subtract Background を用いた後、蛍光輝度の最大値を上昇させて画像処理を行った。*snb-2(RNAi); snb-1; plx-1*, *syx-4(RNAi); plx-1* の頂端側の焦点面での HGRS-1 顆粒の数は *control(RNAi); plx-1* と比較して減少している。中央側、基底側の焦点面での HGRS-1 顆粒の数は *control(RNAi); plx-1* と比較してほとんど違いが見られない。

スケールバー=1 μm

(B, C) 頂端、中央、基底側の各焦点面での *syx-4(RNAi); plx-1* 変異と *snb-2(RNAi); snb-1; plx-1* 変異の HGRS-1::GFP の顆粒数を表示したグラフ。*snb-2(RNAi); snb-1; plx-1* の HGRS-1 顆粒数は頂端では *control(RNAi); plx-1* に比べ減少している。中央側でも *snb-2(RNAi); snb-1; plx-1* の HGRS-1 の顆粒数は *control(RNAi); plx-1* に比べ減少していた。基底側の面では違いはない。*syx-4(RNAi); plx-1* の HGRS-1 の顆粒数は *control(RNAi); plx-1* に比べ、頂端面、中央面、基底端どの面でも変化ない(*syx-4(RNAi); plx-1*: G1 (n=10), *snb-2(RNAi); snb-1; plx-1*: G2 (n=10), *control(RNAi); plx-1*: G3 (n=10), *control(RNAi); plx-1*: G4 (n=10) Steel-Dwass test, (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$)。

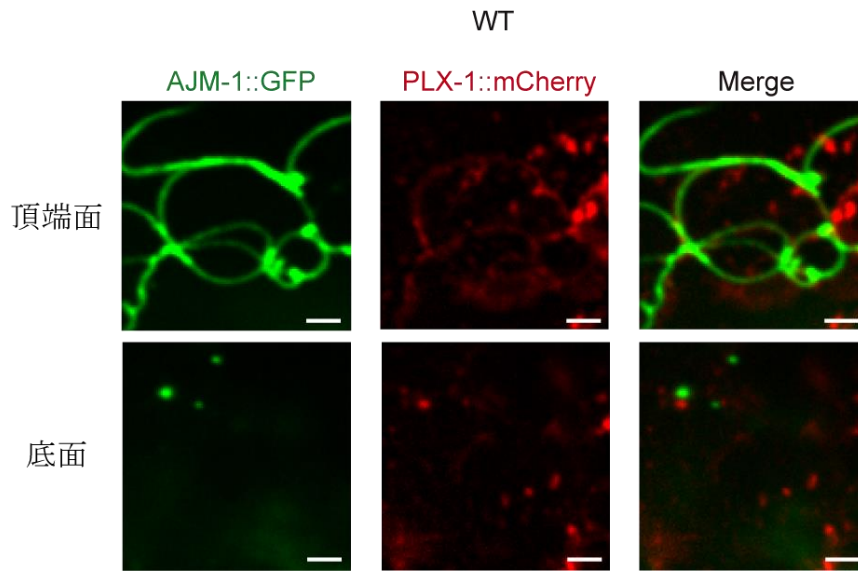


Figure 13 ray 前駆細胞内での PLX-1 発現パターン

後期 L3 ステージでの野生型 ray 前駆細胞内に *lin-17p* によって PLX-1::mCherry を発現させた蛍光画像。野生型では PLX-1::mCherry は細胞の頂端側で AJM-1::GFP に沿ってほぼ一様に発現している（頂端）。頂端側の面から 2 μm 基底側へ移動した基底側の面（基底）では PLX-1::mCherry はほとんど存在しない。

スケールバー=1 μm

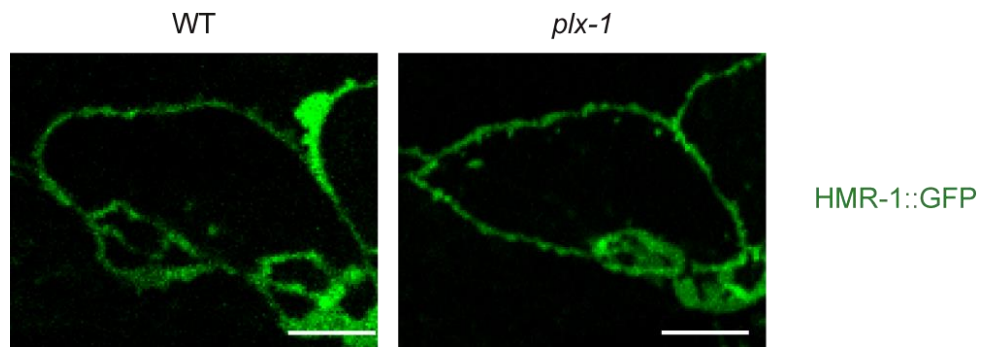


Figure 14 ray 前駆細胞内での細胞接着因子の発現パターン

後期 L3–初期 L4 ステージでの野生型と *plx-1* 変異の ray 前駆細胞内の HMR-1::GFP の蛍光画像。HMR-1 は ray 前駆細胞の細胞膜上に発現していて、細胞内にはほとんど存在せず、。野生型でも *plx-1* 変異でも局在パターンに大きな違いは見られない。

スケールバー=1 μm

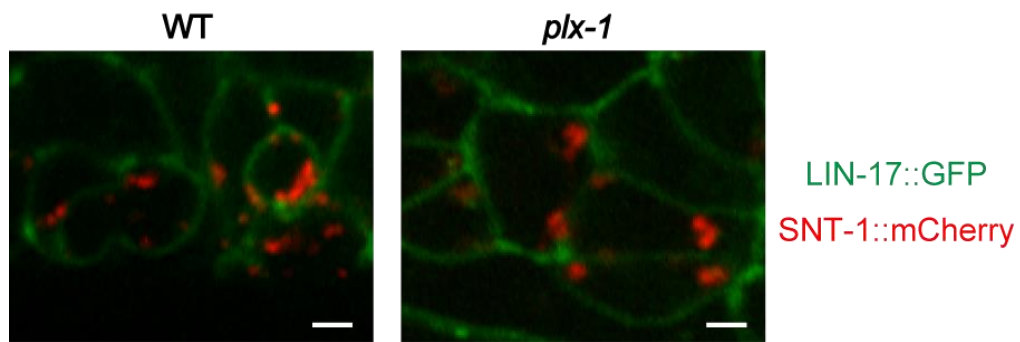


Figure 15 ray 前駆細胞内での SNT-1 の発現パターン

後期 L3 ステージの野生型と *plx-1* 変異での ray 前駆細胞で、SNT-1::mCherry を *lin-17p* を用いて ray 前駆細胞内に発現させた蛍光画像。細胞膜マーカーとして LIN-17::GFP も発現させている。野生型でも *plx-1* 変異でも SNT-1 は細胞膜上にはほとんど局在しない。

スケールバー=1 μm

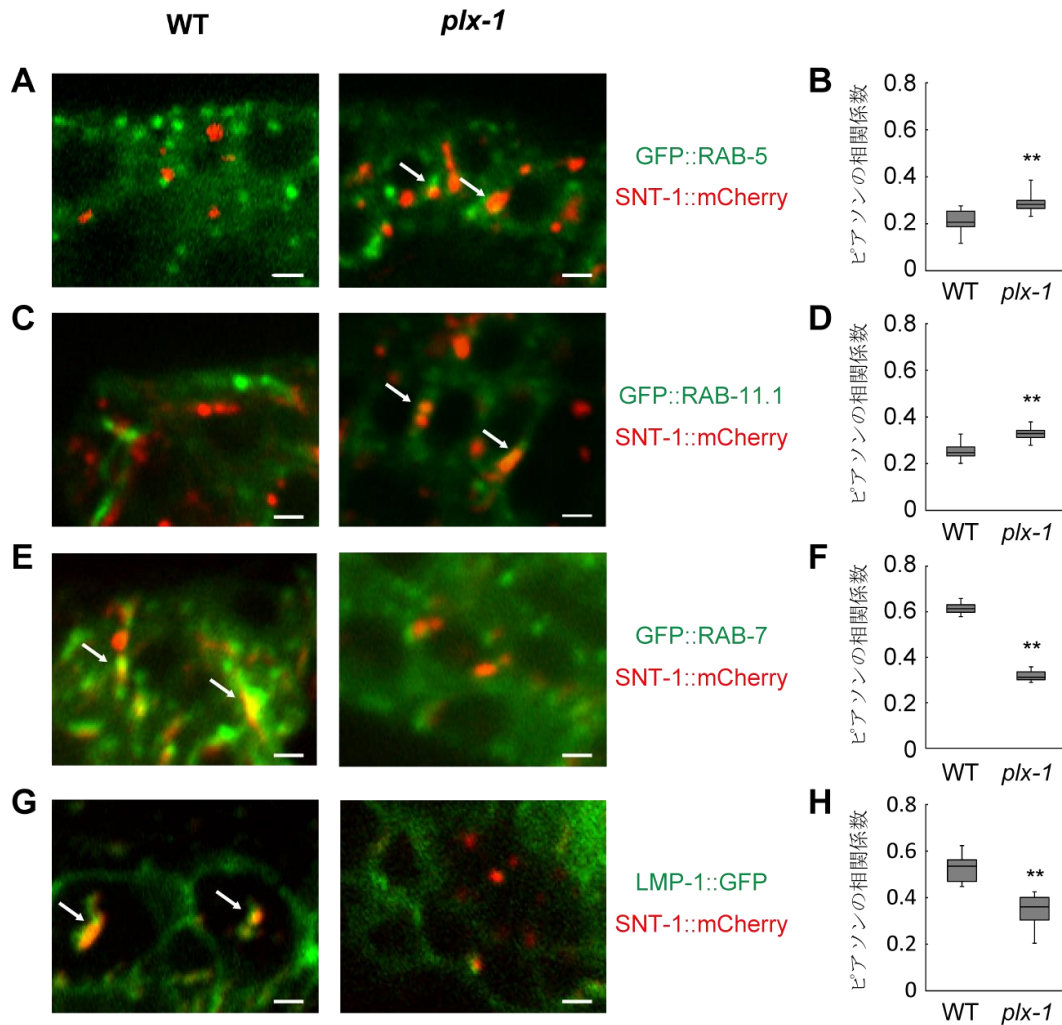


Figure 16 野生型と *plx-1* 変異体での SNT-1 と各細胞内小器官マーカーの局在パターン

(A) 後期 L3 ステージの野生型と *plx-1* 変異において SNT-1::mCherry と GFP::RAB-5 を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内にそれぞれ発現させた蛍光画像。野生型では GFP::RAB-5 と SNT-1::mCherry はほとんど共局在していないが、*plx-1* 変異では一部の SNT-1::mCherry が初期エンドソームマーカーである GFP::RAB-5 と共局在している(矢印)。

(B) SNT-1::mCherry と GFP::RAB-5 の局在パターンの相関を ImageJ プラグインである Intensity Correlation Analysis を用いてピアソンの相関係数によって定量したグラ

フ。*plx-1* 変異のほうが野生型より共局在の相関性が高い(WT (n=8), *plx-1* (n=11), Mann-Whitney *U*test, (**) $p<0.01$)。

(C) 後期 L3 ステージの野生型と *plx-1* 変異において SNT-1::mCherry とリサイクリングエンドソームマーカーである GFP::RAB11.1 を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた画像。野生型では GFP::RAB-11.1 と SNT-1::mCherry はほとんど共局在していないが、*plx-1* 変異では一部の SNT-1::mCherry が GFP::RAB-11.1 と共局在している(矢印)。

(D) SNT-1::mCherry と GFP::RAB-11.1 の局在パターンの相関をピアソンの相関係数によって定量したグラフ。*plx-1* 変異のほうが野生型より共局在の相関性が高い(WT (n=10), *plx-1* (n=10), Mann-Whitney *U*test, (**) $p<0.01$)。

(E) 後期 L3 ステージの野生型と *plx-1* 変異において SNT-1::mCherry と後期エンドソームマーカーである GFP::RAB7 を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた画像。野生型では多くの SNT-1::mCherry が GFP::RAB-7 と共局在している。それに対し、*plx-1* 変異では SNT-1::mCherry と GFP::RAB-7 はほとんど共局在していない(矢印)。

(F) SNT-1::mCherry と GFP::RAB-7 の局在パターンの相関をピアソンの相関係数によって定量したグラフ。野生型のほうが *plx-1* 変異より共局在の相関性が高い(WT (n=12), *plx-1* (n=9), Mann-Whitney *U*test, (**) $p<0.01$)。

(G) 後期 L3 – 初期 L4 ステージの野生型と *plx-1* 変異において SNT-1::mCherry とリソソームマーカーである LMP-1::GFP を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた画像。野生型では多くの SNT-1::mCherry が LMP-1::GFP と共局在している。それに対し、*plx-1* 変異では SNT-1::mCherry と LMP-1::GFP はほとんど共局在していない(矢印)。

(H) SNT-1::mCherry と LMP-1::GFP の局在パターンの相関をピアソンの相関係数によって定量したグラフ。野生型のほうが *plx-1* 変異より共局在の相関性が高い(WT

(n=8), *plx-1* (n=8), Mann-Whitney *U* test, (**) $p < 0.01$ 。

スケールバー=1 μm

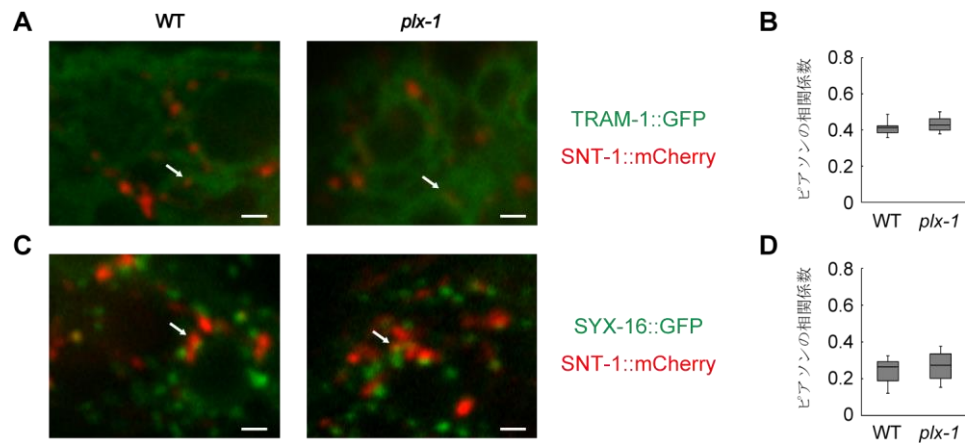


Figure 17 ray 前駆細胞内での SNT-1 とゴルジ体、小胞体との局在パターン

(A) 後期 L3 ステージの野生型と *plx-1* 変異において SNT-1::mCherry とゴルジ体マーカである TRAM-1::GFP を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた蛍光画像。野生型でも *plx-1* 変異でも一部の SNT-1::mCherry が TRAM-1::GFP と共局在している(矢印)。

(B) SNT-1::mCherry と TRAM-1::GFP の局在パターンの相関をピアソンの相関係数によって示したグラフ。野生型と *plx-1* 変異体との間で共局在の相関性に差がない(WT (n=8), *plx-1* (n=8), Mann-Whitney *U* test, n. s.)。

(C) 後期 L3 ステージの野生型と *plx-1* 変異において SNT-1::mCherry と小胞体マーカである GFP::SYX-16 を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた画像。野生型でも *plx-1* 変異でも一部の SNT-1::mCherry が GFP::SYX-16 と共局在している(矢印)。

(D) SNT-1::mCherry と GFP::SYX-16 の局在パターンの相関をピアソンの相関係数によって表したグラフ。野生型と *plx-1* 変異体との間で共局在の相関性に差がない(WT (n=9), *plx-1* (n=8), Mann-Whitney *U* test, n. s.)。

スケールバー=1 μ m

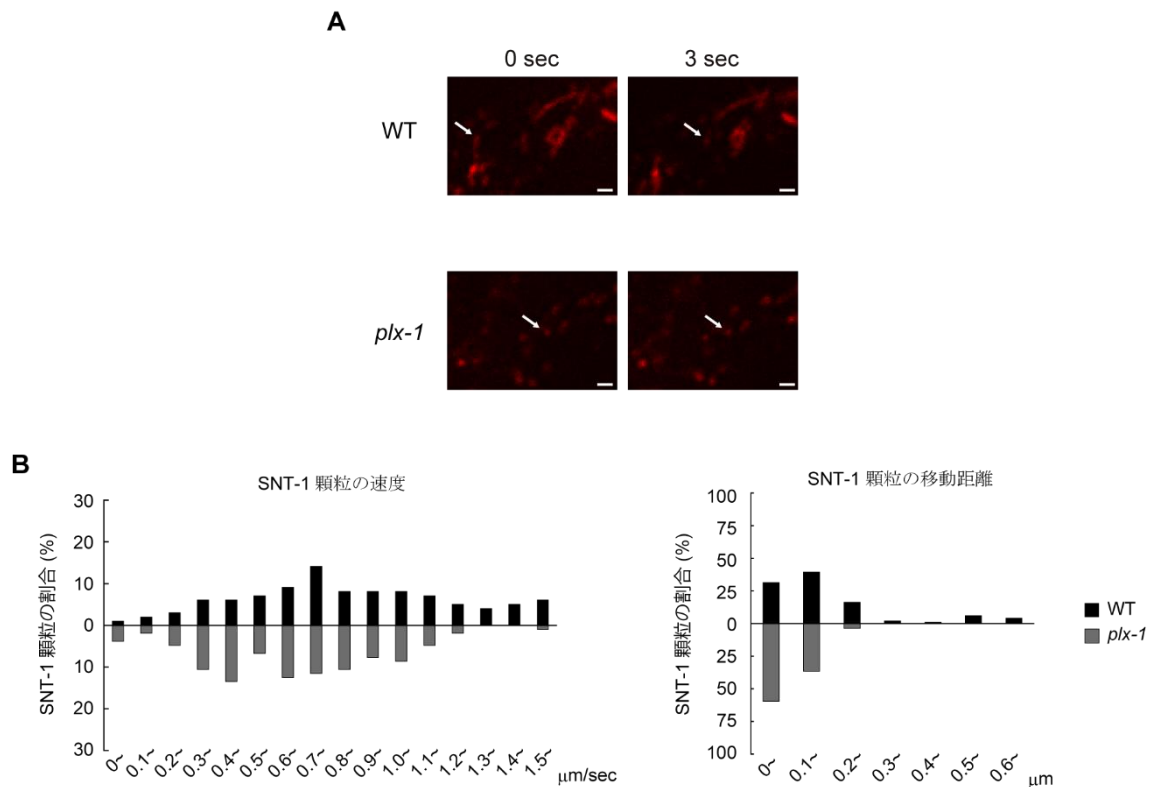


Figure 18 ray 前駆細胞内での SNT-1 顆粒の動き

(A) 野生型と *plx-1* 変異での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の蛍光画像。野生型では一部の SNT-1::mCherry 顆粒が移動している(矢印)。 *plx-1* 変異体では野生型のように移動している SNT-1 顆粒はほとんど存在せず、大半の顆粒が移動しない(矢印)。

スケールバー=1 μm

(B) 野生型と *plx-1* 変異での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。ray 前駆細胞内の SNT-1 顆粒の動きを 0.1 秒ごとに 1 秒間、イメージングによって追尾した。SNT-1 顆粒の動きを ImageJ プラグイン Particle Tracker 2D/3D によって解析した。SNT-1 顆粒の速度は各 0.1 秒間の速度を 1 秒で平均化し、距離は撮影開始 0 秒での SNT-1 顆粒の始点と撮影開始 1 秒後の SNT-1 顆粒の始点から終点までの位置から算出している。

野生型では、*plx-1* 変異と比較して SNT-1 顆粒の移動速度が速く (n=3, Mann-Whitney *U*test, $p<0.01$)、SNT-1 顆粒の移動距離も長くなっている (n=3, Mann-Whitney *U*test, $p<0.01$)。

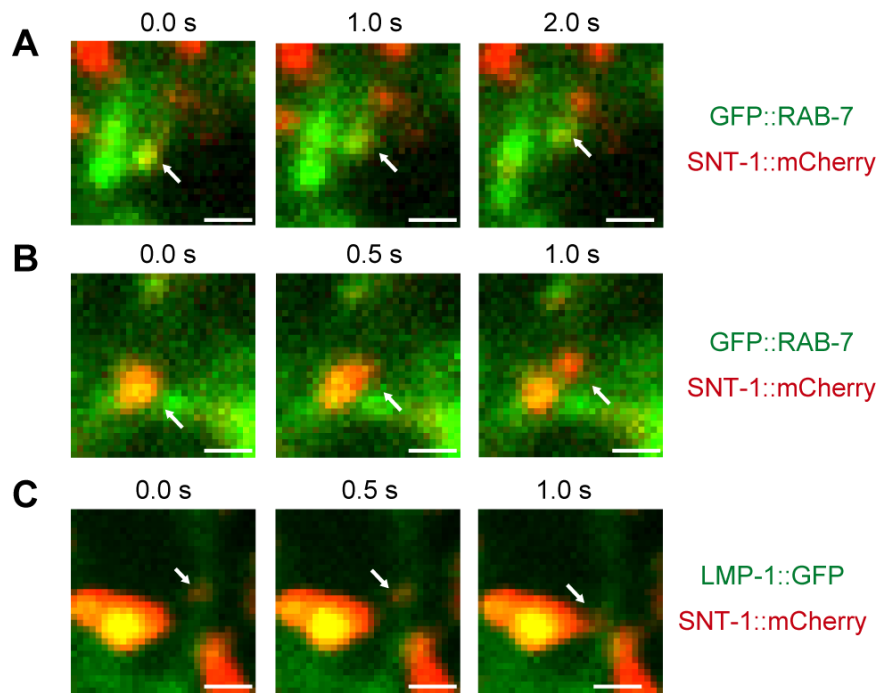


Figure 19 移動性 SNT-1 顆粒は分解経路の輸送を反映

(A) 後期 L3 ステージの野生型の SNT-1::mCherry と GFP::RAB-7 を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた画像。移動速度が速く、移動距離の長い SNT-1 顆粒が RAB-7 と共に移動している様子が観察される(矢印)。

(B) 後期 L3 ステージの野生型の SNT-1::mCherry と GFP::RAB-7 を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた画像。移動速度が速く、移動距離の長い SNT-1 顆粒が RAB-7 から分離して移動している(矢印)。

(C) 後期 L3 ステージの野生型の SNT-1::mCherry と LMP-1::GFP を *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた画像。移動速度が速く、移動距離の長い SNT-1 顆粒が LMP-1 へ融合する SNT-1 が観察される(矢印)。

スケールバー=1 μ m

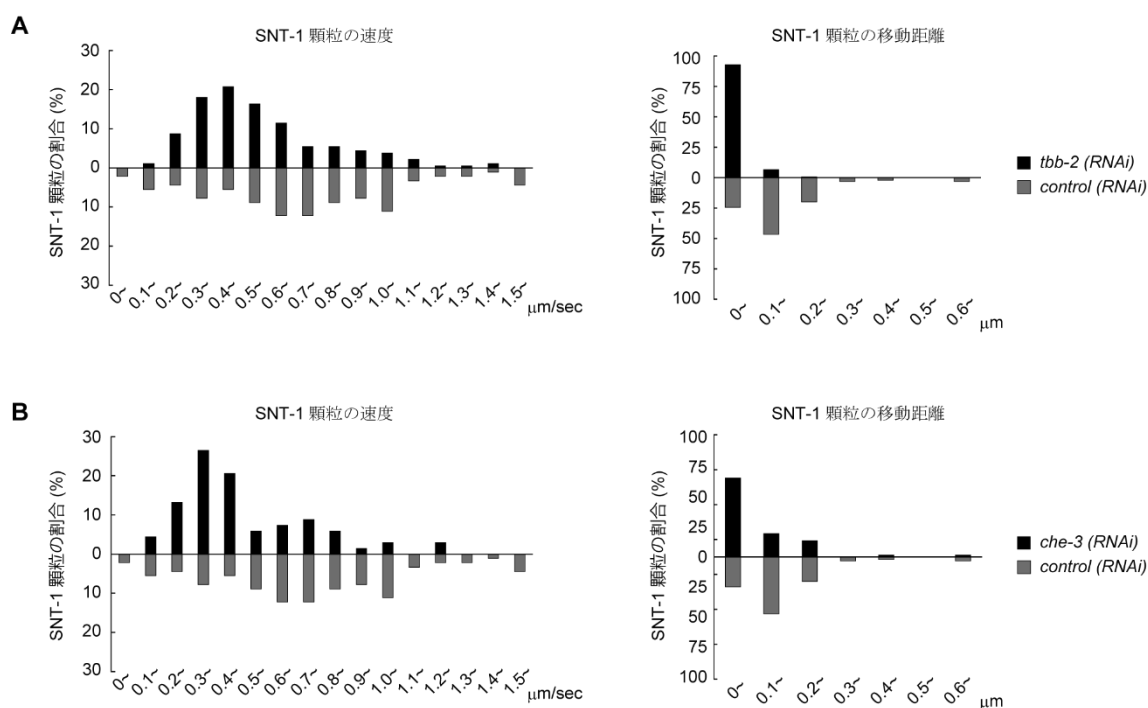


Figure 20 *tbb-2(RNAi)*、*che-3(RNAi)*による SNT-1 顆粒の輸送

(A) *control(RNAi)*と *tbb-2(RNAi)*での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*tbb-2(RNAi)*では *control(RNAi)*と比較して SNT-1 顆粒の移動速度が遅く (n=3, Mann-Whitney *U* test, $p<0.01$)、SNT-1 顆粒の移動距離も短くなっている (n=3, Mann-Whitney *U* test, $p<0.01$)。

(B) *control(RNAi)*と *che-3(RNAi)*での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*che-3(RNAi)*では *control(RNAi)*と比較して SNT-1 顆粒の移動速度が遅く (n=3, Mann-Whitney *U* test, $p<0.01$)、SNT-1 顆粒の移動距離も短くなっている (n=3, Mann-Whitney *U* test, $p<0.01$)。

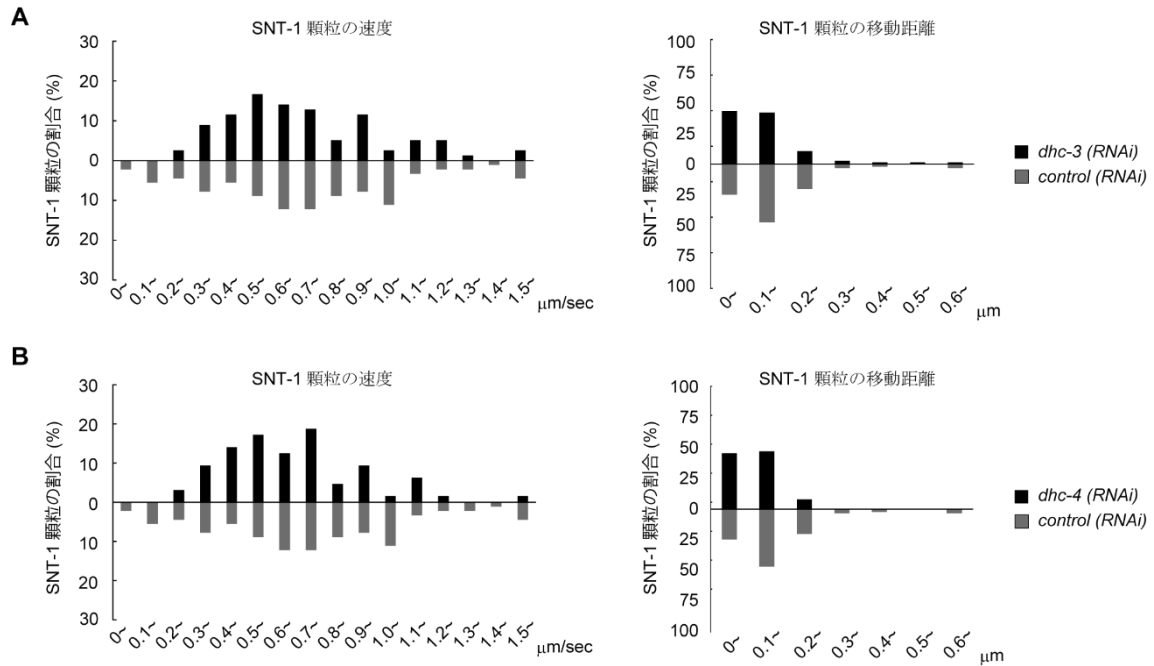


Figure 21 *dhc-3(RNAi)*、*dhc-4(RNAi)*による SNT-1 顆粒の輸送

(A) *control(RNAi)*と *dhc-3(RNAi)*での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*dhc-3(RNAi)*では *control(RNAi)*と比較して SNT-1 顆粒の移動速度に有意差は出なかったが (n=3, Mann-Whitney *U* test, n. s.)、SNT-1 顆粒の移動距離は短くなっている (n=3, Mann-Whitney *U* test, $p<0.05$)。

(B) *control(RNAi)*と *dhc-4(RNAi)*での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*dhc-4(RNAi)*では *control(RNAi)*と比較して SNT-1 顆粒の移動速度に有意差は出なかったが (n=3, Mann-Whitney *U* test, n. s.)、SNT-1 顆粒の移動距離は短くなっている (n=3, Mann-Whitney *U* test, $p<0.05$)。

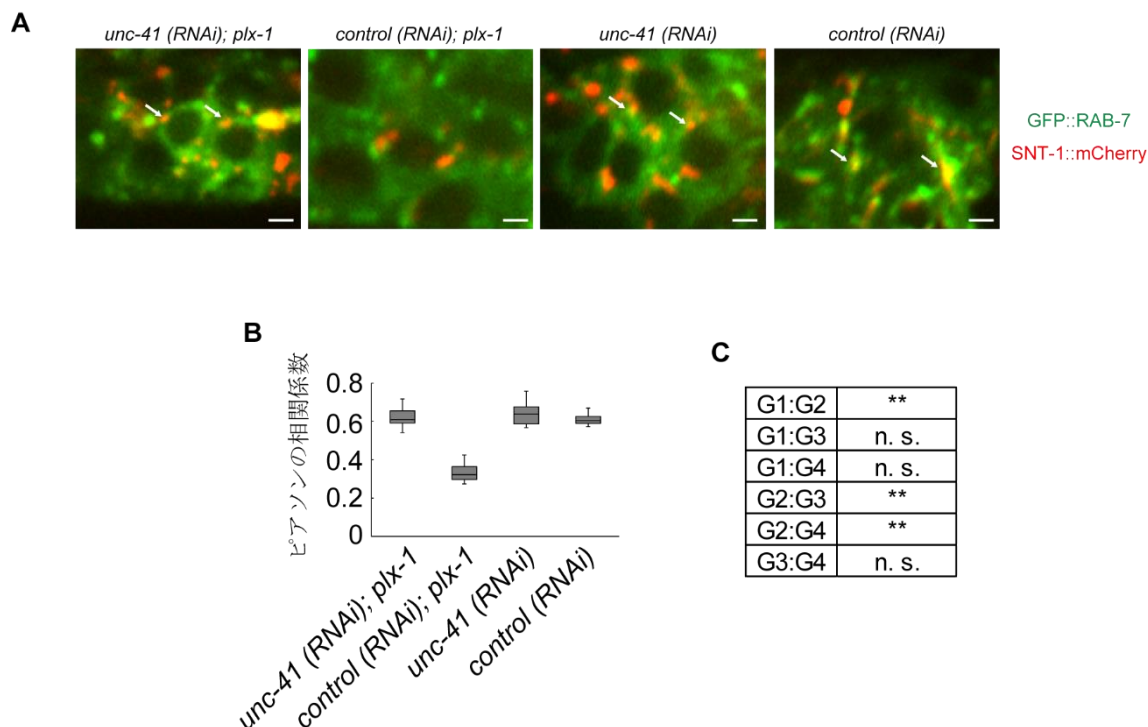


Figure 22 UNC-41 依存的エンドサイトシス抑制による ray 前駆細胞内での SNT-1 の局在変化

(A) 後期 L3 ステージの SNT-1::mCherry と後期エンドソームマーカーを *lin-17p* によって ray 前駆細胞内に発現させた蛍光画像。 *unc-41(RNAi); plx-1*、 *unc-41(RNAi)*、 *control(RNAi)*において、多くの SNT-1::mCherry と GFP::RAB-7 が共局在している。それに対して、 *control(RNAi); plx-1* では一部の SNT-1::mCherry のみが GFP::RAB-7 と共局在している。

スケールバー=1 μ m

(B, C) SNT-1::mCherry と GFP::RAB-7 の局在パターンをピアソンの相関係数によって定量したグラフ。 *unc-41(RNAi); plx-1* は *control(RNAi); plx-1* と比較すると、共局在の相関値が増加している。また、 *unc-41(RNAi); plx-1* を *unc-41(RNAi)*と比較すると、共局在の相関性は差がなかった (n=10 (*control(RNAi)*: G1, *control(RNAi); plx-1*: G2, *unc-41(RNAi); plx-1*: G3, *unc-41(RNAi)*: G4), Steel-Dwass test, (**) p<0.01, (*) p<0.05)。。

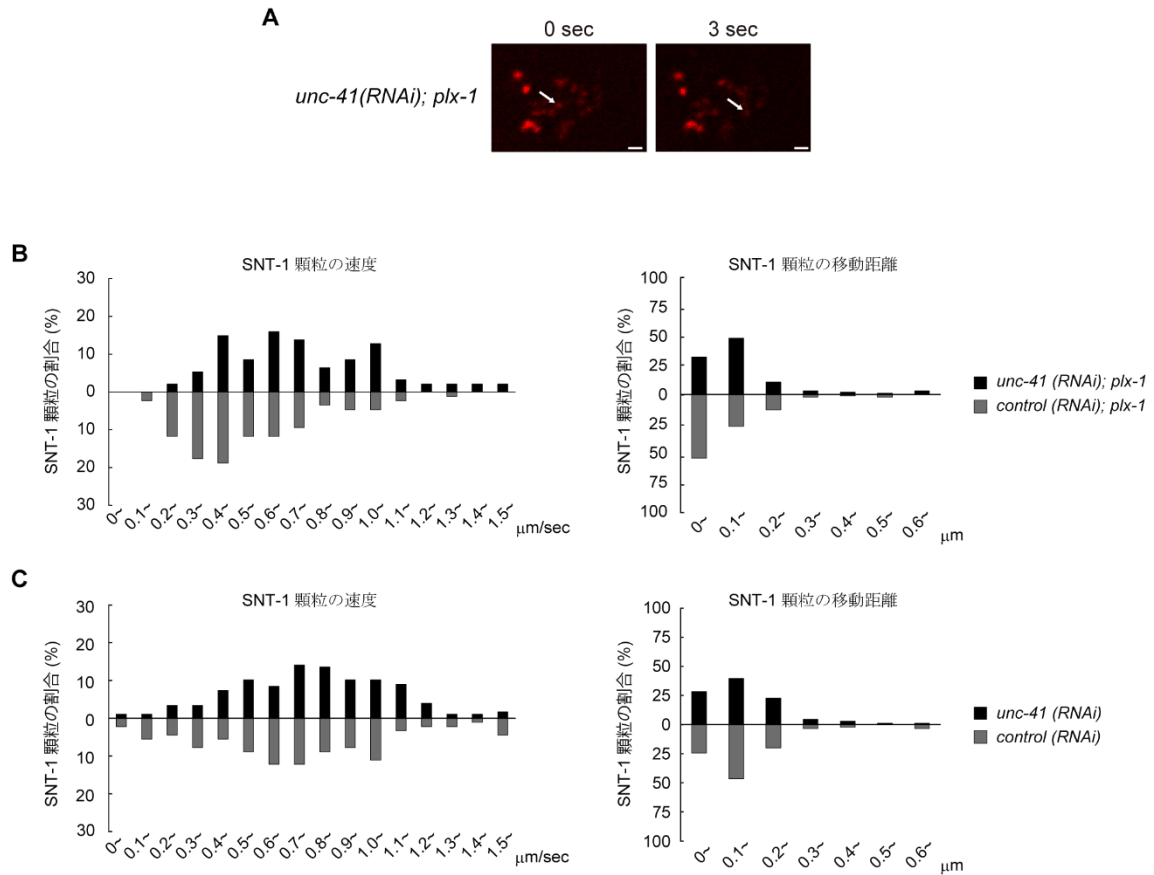


Figure 23 *unc-41(RNAi)*による SNT-1 顆粒の輸送

(A) *unc-41(RNAi); plx-1* 変異での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の画像。一部の SNT-1::mCherry 顆粒が移動している(矢印)。

スケールバー=1 μm

(B) *control(RNAi); plx-1* と *unc-41(RNAi); plx-1* での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*unc-41(RNAi); plx-1* では *control(RNAi); plx-1* と比較して SNT-1 顆粒の移動速度が速く ($n=3$, Mann-Whitney U test, $p<0.01$)、SNT-1 顆粒の移動距離も長くなっている ($n=3$, Mann-Whitney U test, $p<0.01$)。

(C) *control(RNAi)* と *unc-41(RNAi)* での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆

細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*unc-41 (RNAi)*では *control(RNAi)*と比較して SNT-1 顆粒の移動速度も(n=3, Mann-Whitney *U* test, n. s.)、SNT-1 顆粒の移動距離も変化がない(n=3, Mann-Whitney *U* test, n. s.)。

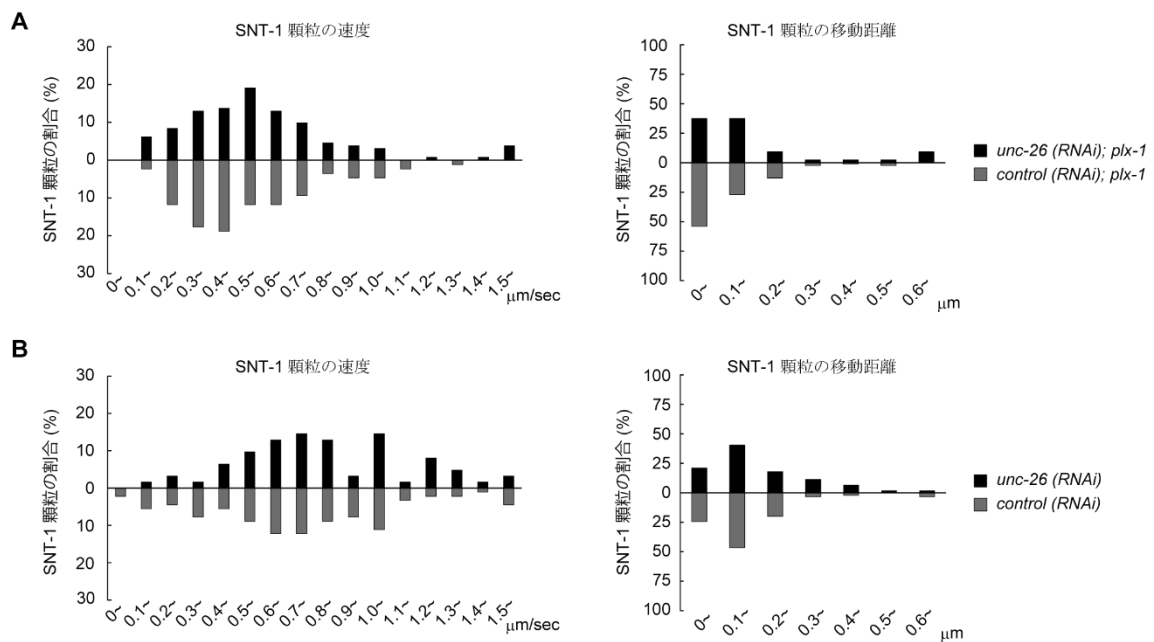


Figure 24 *unc-26 (RNAi)*による SNT-1 顆粒の移動

(A) *control(RNAi); plx-1* と *unc-26(RNAi); plx-1* での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*unc-26(RNAi); plx-1* では *control(RNAi); plx-1* と比較して SNT-1 顆粒の移動速度が速い傾向はあるが有意差はない(Mann-Whitney *U* test, n. s., n=3)。また、SNT-1 顆粒の移動距離は長くなっていたものも存在している(Mann-Whitney *U* test, $p < 0.05$, n=3)。

(B) *control(RNAi)* と *unc-26(RNAi)* での後期 L3 ステージの *lin-32p* によって ray 前駆細胞内に発現させた SNT-1::mCherry 顆粒の移動速度と移動距離をグラフとした。*unc-26 (RNAi)* では *control(RNAi)* と比較して SNT-1 顆粒の移動速度も(Mann-Whitney *U* test, n. s., n=3)、SNT-1 顆粒の移動距離も変化がない(Mann-Whitney *U* test, n. s., n=3)。

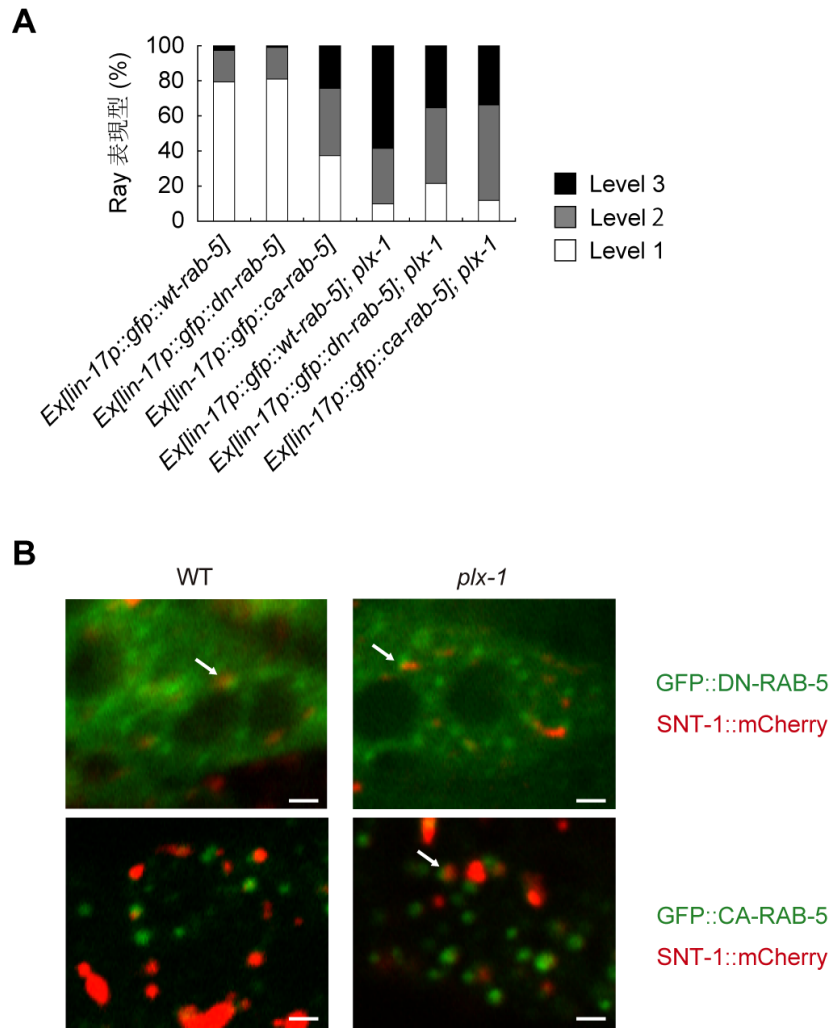


Figure 25 RAB-5 活性操作による ray 表現型と SNT-1 の局在パターンの変化

(A) 野生型と *plx-1* 変異それぞれの ray 前駆細胞に *lin-17p* によって WT/DN/CA-RAB-5 を発現させた各形質転換体の ray 表現型のグラフ。 *Ex[lin-17p::gfp::wt-rab-5]* や *Ex[lin-17p::gfp::dn-rab-5]* では ray 表現型は野生型とほぼ同様であるが、 *Ex[lin-17p::gfp::ca-rab-5]* では *plx-1* 変異体と似た ray 表現型を示す個体が増える。 *Ex[lin-17p::gfp::wt-rab-5]; plx-1* や *Ex[lin-17p::gfp::ca-rab-5]; plx-1* では ray 表現型は異常だが、 *Ex[lin-17p::gfp::dn-rab-5]; plx-1* では、 *Ex[lin-17p::gfp::wt-rab-5]; plx-1* による ray 表現型異常を弱いが抑圧する。

(B) 後期 L3 ステージで野生型と *plx-1* 変異それぞれの ray 前駆細胞内に *lin-17p* によ

って SNT-1::mCherry と GFP::DN-RAB-5 もしくは GFP::CA-RAB-5 を発現させた蛍光画像。野生型でも *plx-1* 変異でも SNT-1::mCherry の一部が DN-RAB-5 と共局在している(矢印)。CA-RAB-5 は WT 型 RAB-5 とは異なり、ray 前駆細胞内で拡散するように発現することなく、すべて顆粒状になっている。顆粒状の GFP::CA-RAB-5 は一部の SNT-1::mCherry と共局在している(矢印)。

スケールバー=1 μm

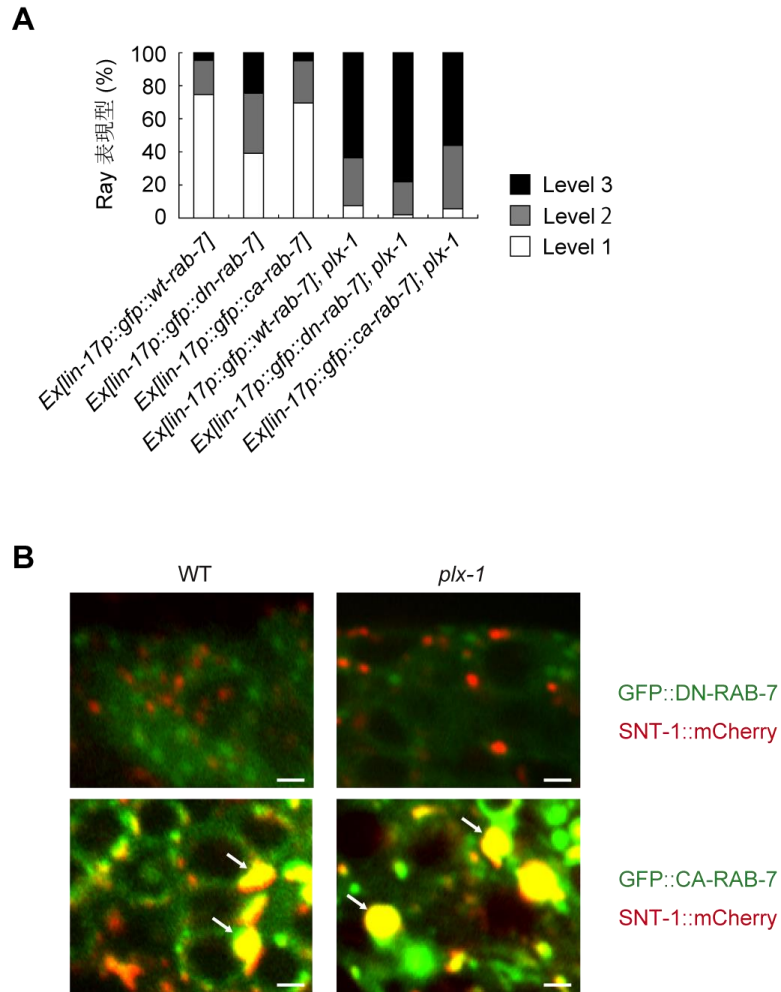


Figure 26 RAB-7 活性操作による ray 表現型と SNT-1 の局在パターンの変化

(A) 野生型と *plx-1* 変異それぞれの ray 前駆細胞に *lin-17p* によって WT/DN/CA-RAB-7 を発現させた各形質転換体の ray 表現型を定量したグラフ。 *Ex[lin-17p::gfp::wt-rab-7]* や *Ex[lin-17p::gfp::ca-rab-7]* では ray 表現型が正常だが、 *Ex[lin-17p::gfp::dn-rab-7]* では ray 表現型が異常となっている。 *Ex[lin-17p::gfp::dn-rab-7]; plx-1* や *Ex[lin-17p::gfp::ca-rab-7]; plx-1* では *Ex[lin-17p::gfp::wt-rab-7]; plx-1* と同様に ray 表現型は異常である。

(B) 後期 L3 ステージで野生型と *plx-1* 変異それぞれの ray 前駆細胞内に *lin-17p* によって SNT-1::mCherry と GFP::DN-RAB-7 もしくは GFP::CA-RAB-7 を発現させた画

像。野生型でも *plx-1* 変異でも SNT-1::mCherry が DN-RAB-7 と共局在していない(矢印)。CA-RAB-7 は WT 型 RAB-7 とは異なり、*ray* 前駆細胞内で非常に大きな顆粒状となり、また、SNT-1::mCherry も非常に大きな顆粒となって発現していた。これらの非常に大きな SNT-1::mCherry と GFP-CA-RAB-7 顆粒が共局在している(矢印)。スケールバー=1 μ m

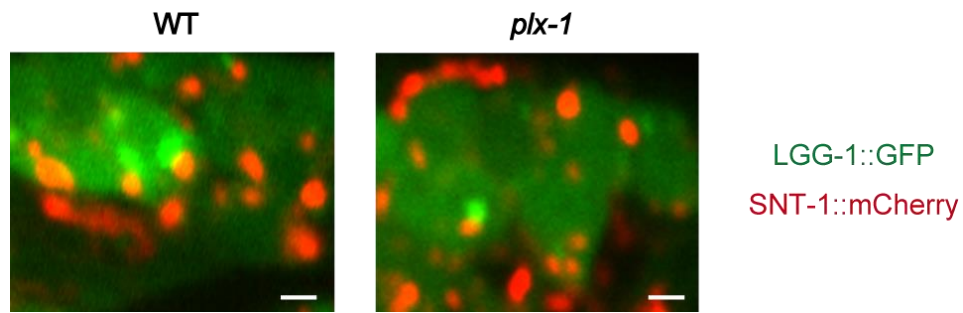


Figure 27 ray 前駆細胞内でのオートファゴソームの発現パターン

後期 L3 ステージでの野生型と *plx-1* 変異の ray 前駆細胞内におけるオートファジーマーカーである LGG-1::GFP と SNT-1::mCherry の共局在画像。野生型でも *plx-1* 変異でも LGG-1 の発現パターンに大きな違いは見られない。野生型でも *plx-1* 変異でも一部の SNT-1 は LGG-1 と共局在しているがほとんどの SNT-1 は LGG-1 とは共局在していない。

スケールバー=1 μm

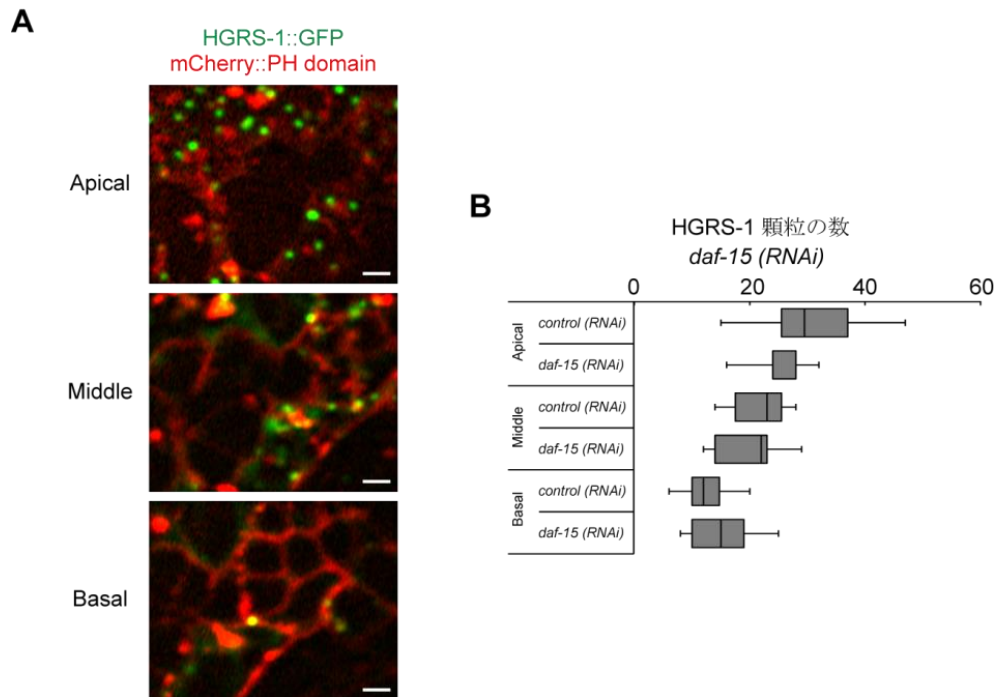


Figure 28 TOR シグナルと細胞内輸送の関連性

(A) *daf-15(RNAi)* 個体 ray 前駆細胞内での HGRS-1::GFP の蛍光画像。頂端側の焦点面での *control(RNAi)* と *daf-15(RNAi)* の HGRS-1 顆粒数は差異がない。中央側、基底側の焦点面でも差異はない。

スケールバー=1 μm

(B) 頂端、中央、基底の各面での *daf-15(RNAi)* 変異の HGRS-1::GFP の顆粒数を表示したグラフ。頂端、中央、基底側の全ての焦点面で *control(RNAi)* と *daf-15(RNAi)* の HGRS-1 の顆粒数に差異はない ($n=10$, Mann-Whitney U test, n. s.)。

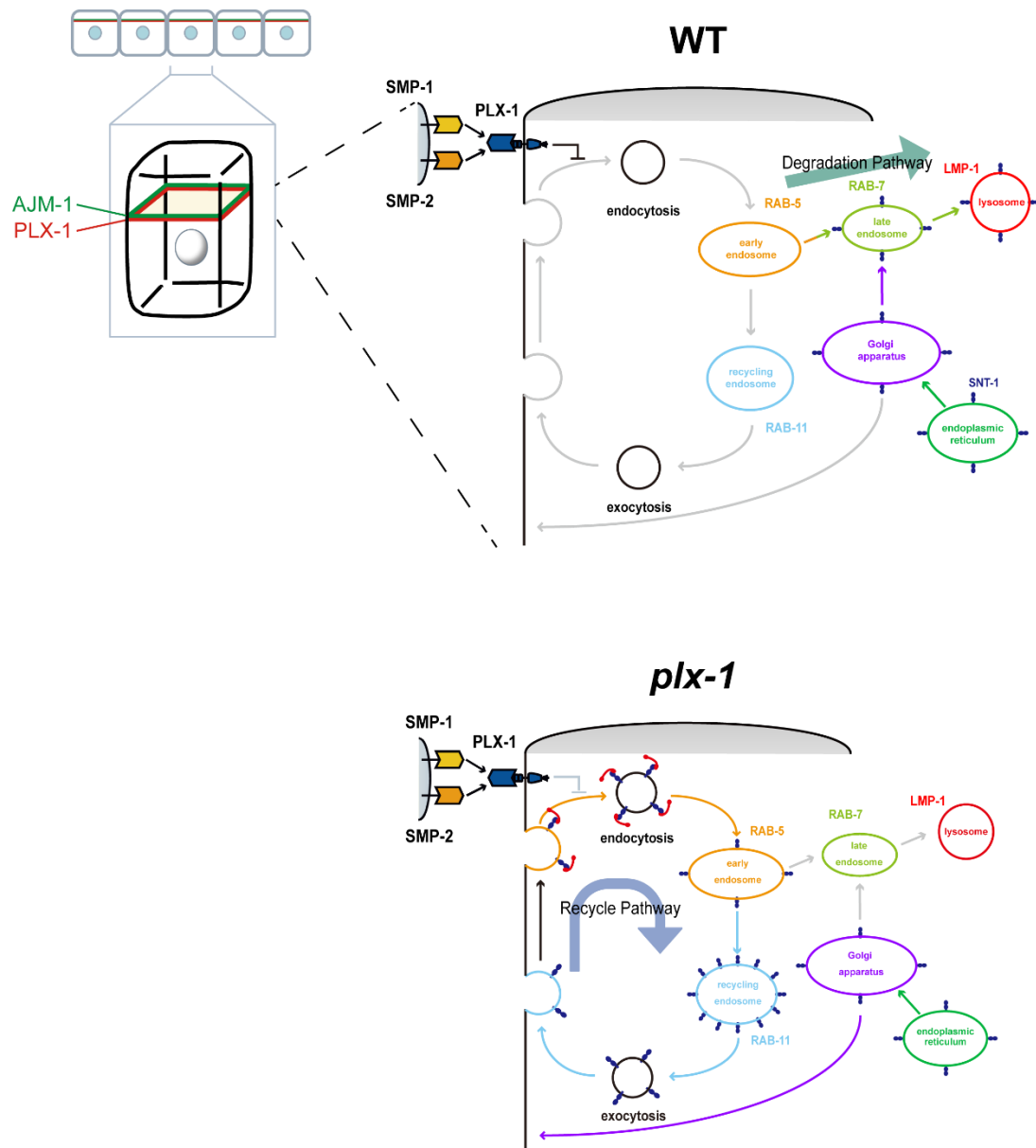


Figure 29 モデル

野生型ではセマフォリンシグナルはエンドサイトシスとエキソサイトシスを抑制する。小胞体とゴルジ体で新たに合成された SNT-1 タンパク質はリサイクリング経路が抑制されたことによって、リソソームへ向かう分解経路へと輸送される。

plx-1 変異体では、エンドサイトシスとエキソサイトシスが促進され、小胞体とゴルジ体で新たに合成された SNT-1 はリサイクリング経路上で輸送されている。

遺伝子	検出	プライマー名	プライマー	Annealing 温度 (°C)	Extension 時間(min)	Cycle
<i>plx-1(nc37)</i>	WT検出(1回目)	6537	ATGTCGGTCCAACATCGTG	55	2.5	30
		10407c	TAATAAAGTTCTAAGTTGTATGGCC	55	2.5	30
	WT検出(2回目)	8293	CTCGCCACTATCAATCATTC	55	2.5	30
		10270c	TCAGTGAAAAATAGGTGATTTC	55	2.5	30
	Deletion検出(1回目)	4096	CTCGATGAAGACGTCTCAAGG	55	2.5	30
		16095c	ATCGTCATTGACGAGAACC	55	2.5	30
	Deletion検出(2回目)	4442	GGAAGCGTGACCGAGATAAAG	55	2.5	30
		16065c	CTTCTTGAGTCCAGACGTTCC	55	2.5	30
<i>smp-1(ev715)</i>	1回目	Y54E5B: 7652	CCAGCTCAAACCTTGTTGC	55	2.5	30
		Y54E5B: 8999c	CAGAACTTTTCCATCGGACG	55	2.5	30
	WT検出(2回目)	Y54E5B: 8113	AATTTTCCAGAAGCCGTATCG	55	1	30
		Y54E5B: 8712c	CACATTGATTGGGCATTATTCTG	55	1	30
	Deletion検出(2回目)	Y54E5B: 7705	GTTTCGAGAGATTGCCAGTG	55	1	30
		Y54E5B: 8956c	TTATGTCCACCAACTGCACG	55	1	30
<i>smp-2(ev709)</i>	1回目	2713-2732	GCGAGTGGATATAAGGAGTC	60	1	30
		4585-4565	ATGATGACGAACGAGATGATG	60	1	30
	WT検出(2回目)	3498-3519	ACTGCGCCGAATGCCTAGCG	60	1	30
		4114-4096	TTGGTGGTGTCAGTCGAGGAG	60	1	30
	Deletion検出(2回目)	2717-2737	GTGGATATAAGGAGTCAACAC	60	1	30
		4114-4096	TTGGTGGTGTCAGTCGAGGAG	60	1	30

Table 1 遺伝子決定用プライマー

プライマー名	プライマー
gfp 5' KpnI	AAGGTACCATGGTGAGCCAAGGGCGAGG
gfp 3' SacI	TTGAGCTCTCACTTGTACAGCTCGTCGTCATGC
mCherry 5' BamHI (5' fusion)	AAGCATGCGGTACCGGTAGAAAAAATGGTCTCAAAGGGTGAAG
mCherry 3' NheI (5' fusion)	AATCTAGAGTGGGCTCTTATACAATTCATCCATGC
mCherry 5' KpnI (3' fusion)	AAGGTACCATGGTCTCAAAGGGTGAAG
mCherry 3' SacI (3' fusion)	TTGAGCTCTTAGGATCCACTAGCTTATAC
snt-1 5' KpnI	CCGGTACCGGTAGAAAAAATGGTGAAATTAGACTTTTC
snt-1 3' KpnI	AAGGTACCCTTTCTTATCATCTTTCTTATC
snt-1-4DN 502-4 508-10 5'	CAATATAAACTTAATTATAATTTCCAACAAGG
snt-1-4DN 502-4 508-10 3'	CCTTGTTGGAAATTATAATTAAGTTTATATTG
snt-1-4DN 1147-9 1153-5 5'	GATCACTGTGATGAATTATAATAAACTTGGATC
snt-1-4DN 1147-9 1153-5 3'	GATCCAAGTTTATTATAATTCATCACAGTGATC
unc-41 5' NheI	AAAGCTAGCATGGAACAAGCAGAAGAAAAAG
unc-41 3' KpnISacI	AAAGAGCTCGGTACCTTAATATCCATAATTCTTC
rab-5 5' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGTGGCCGCCCCGAAACG
rab-5 3' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGTTATTTACAGCATGAAC
rab-7 5' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGTGTGCGGGAACCAGAAAG
rab-7 3' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGTTAACAATTGCATCC
rab-11.1 5' genomic DNA Kpn	AAGGTACCATGGGCTCTCGTGACGATGAATACG
rab-11.1 3' genomic DNA Kpn	AAGGTACCCTTATGGGATGCAACACTGCTTCTTTGG
rab-11.1 5' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGTGGGCTCTCGTGACG
rab-11.1 3' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGTTATGGGATGCAACAC
lmp-1 5' KpnI	AAGGTACCGTAGAAAAAATGTTGAAATCGTTTGTGCATCTTG
lmp-1 3' KpnI	AAGGTACCGACGCTGGCATATCCTTGTCTCT
tram-1 5' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGTGGTTAAGCCGCAAGG
tram-1 3' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGTTAATTTTCTTCTTCG
PH domain 5' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTTGAACTAGTCACGGGCTCC
PH domain 3' gateway	GGGGACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGTTACTTCTGCCGCTGGTCC
PH domain 5' KpnI	AAGGTACCACTAGTCACGGGCTCC
PH domain 3' SacI	AAGAGCTCTTACTTCTGCCGCTGGTCC
unc-26 5' NheI	AAAGCTAGCTCAGTTTCGAGGGATTTCGG
unc-26 3' KpnI	AAGGTACCTACATATTTTTTGGTCTAGA
lin-17promoter 5' SbfI	AACCTGCAGGAATTGTGAAAAAATGCACTG
lin-17promoter 3' PstI	AACTGCAGCTCGAGGAGCCTTCAAAAAG
lin-17promoter 3' KpnI	AAGGTACCCTCGAGGAGCCTTCAAAAAG
dn-rab-5 97-9 5'	GCTGTAGGCAAAAATTCTCTCGTATTG
dn-rab-5 97-9 3'	GCTGTAGGCAAAAATTCTCTCGTATTG

ca-rab-5 233-4 5'	GATACTGCAGGACTCGAAAGATATCATTC
ca-rab-5 233-4 3'	GAATGATATCTTTTCGAGTCCTGCAGTATC
dn-rab-7 68-9 5'	GGCGTTGGAAAAAATTCTTTGATGAATC
dn-rab-7 68-9 3'	GATTCATCAAAGAATTTTTTCCAACGCC
ca-rab-7 202-4 5'	GATACAGCCGGCTTGGAACGTTTCCAATC
ca-rab-7 202-4 3'	GATTGGAAACGTTCCAAGCCGGCTGTATC
hgrs-1 5' KpnI	CCGGTACCGGTAGAAAAAATGGCTACAAAATTC
hgrs-1 3' KpnI	TTGGTACCGTCAAATGAAATAAGTGGTTG
plx-1 5' KpnI	AAGGTACCGGTAGAAAAAATGCCACATTTCTCC
plx-1 3' KpnI	AAGGTACCCAGTCGATCACGTGGCATTAG
rab-7 (no gfp) 5' TOPO	CACCGGTAGAAAAAATGTCGGGAACCAGAAAG
rab-7 (no gfp) 3' TOPO	TTAACAATTGCATCCCGAATTC
snt-1 RNAi 5' KpnI	AGGTACCATGGTGAAATTAGACTTTTCGTCGC
snt-1 RNAi 3' SacI	TGAGCTCAAGCGACTTTAAAAATGAATGTCTC
unc-41 RNAi 5' SacI	AAGAGCTCCGGCTGCGTCAACAGCAG
unc-41 RNAi 3' KpnI	TTGGTACCGCAGCAGCTTACGCTGAAG
unc-26 RNAi 5' NheI	AAAGCTAGCTCAGTTCGAGGGATTTCGG
unc-26 RNAi 3' NheI	AAGCTAGCCTTTGAAATGAAAAATGAAG
unc-57 RNAi 5' KpnI	AAGGTACCATGTGCTTGTGCGGGGTAC
unc-57 RNAi 3' NheI	AAGCTAGCTCAAGTCGACGTCCTTTCAG
tbb-2 RNAi 5' XbaI	AATCTAGAATGAGAGAGATCGTCCACGTGCAAG
tbb-2 RNAi 3' KpnI	AAGGTACCTGTCTAGAGGGCCTCGTTGTCAATG
dyn-1 RNAi 5' NheI	AAAGCTAGCATGTGCTGGCAAAACCAG
dyn-1 RNAi 3' KpnI	AAGGTACCGATGAATGTGAGAATCATGTC
clic-1 RNAi 5' NheI	AAAGCTAGCATGTGCGATCCAGTGGC
clic-1 RNAi 3' Kpn	AAGGTACCGAAGGGTCTTCTCGCGTTG
dpy-23 RNAi 5' NheI	AAAGCTAGCACCAAAGAGGAGCAGTCACAAATCAC
dpy-23 RNAi 3' KpnI	AAGGTACCCTCATCAGCTCGTACTCGCCGTC
dhc-3 RNAi 5' XhoI	AAACTCGAG ATGTACGAAAATGGATTTGGTAACATTTATCATTCG
dhc-3 RNAi 3' SacI	AACCGCGGTTTACATAAACCAAGTAGAATATTCACTTTCTGCC
dhc-4 RNAi 5' XhoI	TTTCTCGA GTCTCCCCAAAGCTCACC GAAGAAGAGCTAATCAA
dhc-4 RNAi 3' SacI	AACCGCGGTTAACATGCTTATAATACCCACTGGTCGCCTCAAAA
che-3 RNAi 5' XhoI	AAACTCGA GTGGTTCATTGCATGATGAGATCAGAAGTTGGAAAAG
che-3 RNAi 3' SacI	TTCCGCGGCTGGCTAGTTTGTGCGCAATCCAAACAATTCTAGC

Table 2 プラスミドコンストラクション用プライマー

plasmids	gene template	insert gene	insert site
<i>lin-32p / lin-17p::snt-1::mCherry in pPD49.26</i>	cDNA (<i>yk1734a.07</i>)	<i>snt-1</i>	<i>KpnI / KpnI</i>
<i>lin-17p::mCherry::unc-41 in pPD49.26</i>	cDNA (<i>pMG13</i>)	<i>unc-41</i>	<i>NheI / KpnI</i>
<i>lin-17p::mCherry::unc-26 in pPD49.26</i>	cDNA (<i>yk453b7</i>)	<i>unc-26</i>	<i>NheI / KpnI</i>
<i>lin-17p::gfp::PH domain in Destination vector</i>	PH domain (Ziel et al., 2009)	PH domain	BP / LR reaction
<i>lin-17p::mCherry::PH domain in pPD49.26</i>	PH domain (Ziel et al., 2009)	PH domain	BP / LR reaction
<i>lin-17p::gfp::rab-5 in Destination vector</i>	cDNA	<i>rab-5</i>	BP / LR reaction
<i>lin-17p::gfp::rab-7 in Destination vector</i>	cDNA	<i>rab-7</i>	BP / LR reaction
<i>lin-17p::gfp::rab-11.1 in Destination vector</i>	genomic DNA	<i>rab-11.1</i>	BP / LR reaction
<i>lin-17p::lmp-1::gfp in pPD49.26</i>	cDNA (Chen et al., 2006)	<i>lmp-1</i>	<i>KpnI / KpnI</i>
<i>lin-17p::gfp::tram-1 in Destination vector</i>	cDNA (Kubota et al., 2005)	<i>tram-1</i>	BP / LR reaction
<i>lin-17p::gfp::syx-16 in Destination vector</i>	cDNA (Sato et al., 2011)	<i>syx-16</i>	LR reaction
<i>lin-17p::hgrs-1::gfp in pPD49.26</i>	cDNA (Yu et al., 2006)	<i>hgrs-1</i>	<i>KpnI / KpnI</i>
<i>lin-17p::gfp::snb-1 in Destination vector</i>	cDNA (Sato et al., 2008)	<i>snb-1</i>	LR reaction
<i>lin-17p::plx-1::mCherry in pPD49.26</i>	cDNA	<i>plx-1</i>	<i>KpnI / KpnI</i>
<i>lin-17p::dn-rab-7 in Destination vector</i>	cDNA	<i>dn-rab-7</i>	TOPO / LR reaction
<i>lin-17p::snt-1(4DN)::mCherry in pPD49.26</i>	cDNA	<i>snt-1(4DN)</i>	<i>KpnI / KpnI</i>
<i>lin-32p in pPD49.26</i>	(Nukazuka et al., 2008)	<i>lin-32p</i>	<i>PstI / PstI</i>
<i>lin-17p in pPD49.26</i>	pSH19 (Sawa et al., 1996)	<i>lin-17p</i>	<i>PstI / PstI</i>
<i>lin-17p::gfp(C term) in pPD49.26</i>		<i>gfp</i>	<i>KpnI / SacI</i>
<i>lin-17p::mCherry(C term) in pPD49.26</i>		<i>mCherry</i>	<i>KpnI / SacI</i>
<i>lin-17p::mCherry(N term) in pPD49.26</i>		<i>mCherry</i>	<i>BamHI / XhoI</i>
<i>lin-17p::gfp(N term) in Destination vector</i>	pSH19 (Sawa et al., 1996)	<i>lin-17p</i>	<i>SbfI / KpnI</i>
RNAi plasmids	gene template		insert site
<i>snt-1 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk1734a.07</i>)	nt: 1-700	<i>KpnI / SacI</i>
<i>unc-26 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk453b7</i>)	nt: 1-500	<i>NheI / XhoI</i>
<i>unc-57 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk1459f03</i>)	nt: 1-500	<i>KpnI / XhoI</i>
<i>tbb-2 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>pJH4.66</i>)	nt: 1-700	<i>XbaI / KpnI</i>
<i>dyn-1 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk527c06</i>)	nt: 1-500	<i>NheI / KpnI</i>
<i>rab-35 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk1245d09</i>)	nt: 1-630	<i>NheI / KpnI</i>
<i>snb-2 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk1333e01</i>)	nt: 1-345	<i>SacI / KpnI</i>
<i>unc-41 in pPD129.36</i>	genomic DNA	C27H6: 8236-9069	<i>SacI / KpnI</i>
<i>che-3 in pPD129.36</i>	genomic DNA	F18C2: 19511-20529	<i>XhoI / SacI</i>
<i>dhc-3 in pPD129.36</i>	genomic DNA	B0365: 24993-26064	<i>XhoI / SacI</i>
<i>dhc-4 in pPD129.36</i>	genomic DNA	W05B2: 17823-18715	<i>XhoI / SacI</i>
<i>clic-1 in pPD129.36</i>	genomic DNA	T05B11: 22751-24070	<i>NheI / KpnI</i>
<i>dpy-23 in pPD129.36</i>	genomic DNA	R160:25928-26424	<i>NheI / KpnI</i>
<i>syx-2 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk736h4</i>)	nt: 1-761	<i>PstI / XhoI</i>
<i>syx-3 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk745c4</i>)	nt: 181-815	<i>XhoI / SacI</i>
<i>syx-4 in pPD129.36</i>	cDNA (<i>yk493b10.5</i>)	nt: 1-891	<i>KpnI / PstI</i>
<i>daf-15 in pPD129.36</i>	cDNA (Nukazuka et al., 2011)	nt: 1-555	

Table 3 作成プラスミド

transgenic lines	plasmid	concentration
<i>ncIs61[lin-32p::snt-1::mCherry]</i>	<i>lin-32p::snt-1::mCherry</i>	2.25 µl (0.18 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	0.3 µl (1.3 µg/µl)
<i>ncEx9102[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::PH domain]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::PH domain</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>myo-2p::gfp</i>	1.0 µl (0.035 µg/µl)
	<i>pBluescript</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9103[lin-17p::mCherry::unc-41; lin-17p::gfp::PH domain]</i>	<i>lin-17p::mCherry::unc-41</i>	1.0 µl (0.035 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::PH domain</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>myo-2p::gfp</i>	1.0 µl (0.025 µg/µl)
	<i>pBluescript</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9104[lin-17p::mCherry::unc-26; lin-17p::gfp::PH domain]</i>	<i>lin-17p::mCherry::unc-26</i>	1.0 µl (0.04 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::PH domain</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pCFJ90</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pBluescript</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9105[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::rab-5]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::rab-5</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9106[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::rab-7]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::rab-7</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9107[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::rab-11.1]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::rab-11.1</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9108[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::lmp-1::gfp]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::lmp-1::gfp</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9109[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::tram-1]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::tram-1</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9110[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::syx-16]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::syx-16</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>ncEx9111[lin-17p::hgrs-1::gfp; lin-17p::mCherry::PH domain]</i>	<i>lin-17p::hgrs-1::gfp</i>	0.3 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::mCherry::PH domain</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.09 µg/µl)
	<i>pBluescript</i>	0.7 µl (0.08 µg/µl)
<i>ncEx9112[lin-17p::plx-1::mCherry]</i>	<i>lin-17p::plx-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.09 µg/µl)
	<i>pBluescript</i>	1.0 µl (0.08 µg/µl)
<i>ncEx9113[lin-17p::gfp::snb-1; lin-17p::mCherry::PH domain]</i>	<i>lin-17p::gfp::snb-1</i>	1.2 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::mCherry::PH domain</i>	0.3 µl (0.55 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	0.9 µl (0.2 µg/µl)
<i>ncEx9114[lin-17p::snt-1(4DN)::mCherry; lin-17p::gfp::PH domain]</i>	<i>lin-17p::snt-1(4DN)::mCherry in pPD49.26</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::PH domain</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>myo-2p::gfp</i>	1.0 µl (0.04 µg/µl)
	<i>pBluescript</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::dn-rab-5]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::dn-rab-5</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::ca-rab-5]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::ca-rab-5</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::dn-rab-7]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::dn-rab-7</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::ca-rab-7]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::gfp::ca-rab-7</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)
<i>Ex[unc-41p::gfp::unc-41]</i>	<i>unc-41p::gfp::unc-41 (pMG13)</i>	0.4 µl (0.9 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (1.3 µg/µl)
<i>Ex[lin-17p::lgg-1::gfp; lin-17p::snt-1::mCherry]</i>	<i>lin-17p::snt-1::mCherry</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>lin-17p::lgg-1::gfp</i>	1.0 µl (0.03 µg/µl)
	<i>pRF4</i>	1.0 µl (0.1 µg/µl)

Table 4 インジェクションプラスミドとインジェクション濃度

#	lines	Level 1	Level 2	Level 3	n	Fisher's exact test (p)	compared with #
1	WT	88%	12%	0%	217		
2	<i>plx-1</i>	4%	29%	67%	239		
3	<i>smp-1 smp-2</i>	3%	32%	65%	220		
4	<i>snt-1(n2665); plx-1</i>	81%	16%	2%	207	1.22E-79	2
5	<i>snt-1(n2665);smp-1 smp-2</i>	78%	20%	2%	129	1.10E-61	3
6	<i>snt-1(n2665)</i>	95%	5%	0%	206	0.0136272	1
7	<i>snt-1(ad596);plx-1</i>	33%	53%	14%	207	3.28E-35	2
8	<i>snt-1(ad596); smp-1 smp-2</i>	22%	40%	37%	206	9.39E-13	3
9	<i>snt-1;(ad596)</i>	85%	13%	2%	209	0.0613121	1
10	<i>snt-1(md290); plx-1</i>	43%	31%	25%	214	6.71E-29	2
11	<i>snt-1(md290)</i>	83%	15%	2%	203	0.0476035	1
12	<i>snt-1(RNAi); plx-1</i>	16%	47%	37%	154	3.15E-13	37
13	<i>unc-41(e1199); plx-1</i>	76%	20%	5%	222	3.12E-73	2
14	<i>unc-41(e1199); smp-1 smp-2</i>	79%	14%	6%	201	1.57E-70	3
15	<i>unc-41(e1199)</i>	97%	3%	0%	201	0.00115418	1
16	<i>unc-41(e268); plx-1</i>	64%	23%	13%	210	8.19E-51	2
17	<i>unc-41(e268); smp-1 smp-2</i>	76%	15%	8%	204	2.80E-66	3
18	<i>unc-41(e268)</i>	90%	10%	0%	216	0.640316	1
19	<i>unc-41(RNAi); plx-1</i>	15%	43%	42%	150	1.11E-10	37
20	<i>snt-1(n2665); unc-41(e1199); plx-1</i>	85%	11%	4%	105	6.12E-56	2
21	<i>unc-26; plx-1</i>	35%	42%	23%	217	1.83E-26	2
22	<i>unc-57; plx-1</i>	39%	44%	17%	226	6.30E-35	2
23	<i>unc-26</i>	97%	2%	0%	216	0.000201192	1
24	<i>unc-26; smp-1; smp-2</i>	42%	42%	15%	111	1.83E-26	3
25	<i>unc-57</i>	98%	2%	0%	206	0.000229067	1
26	<i>unc-26 (RNAi); plx-1</i>	23%	43%	34%	100	5.16E-13	36
27	<i>unc-57 (RNAi); plx-1</i>	17%	29%	54%	100	1.19E-05	37
28	<i>Is[lin-32p::snt-1::mCherry]; snt-1(n2665); plx-1</i>	29%	37%	34%	222	4.10E-31	4
29	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry]; snt-1(n2665); plx-1</i>	9%	45%	47%	103	3.20E-40	4
30	<i>Ex[lin-17p::mCherry::unc-41]; unc-41(e1199); plx-1</i>	19%	44%	38%	112	9.60E-26	13
31	<i>Ex[lin-17p::mCherry::unc-26]; unc-26; smp-1 smp-2</i>	9%	30%	60%	106	3.59E-13	24
32	<i>Ex[lin-17p::snt-1(4DN)::mCherry]; snt-1(n2665); smp-1 smp-2</i>	74%	16%	11%	167	3.31E-27	29
33	<i>unc-64; plx-1</i>	3%	16%	81%	207	0.00283812	2
34	<i>snb-1; plx-1</i>	15%	34%	51%	203	3.23E-05	2
35	<i>unc-64</i>	87%	12%	0%	202	0.761864	1
36	<i>snb-1</i>	99%	1%	0%	214	1.56E-05	1
37	<i>control (RNAi); plx-1</i>	3%	16%	82%	115		
38	<i>syx-2 (RNAi); plx-1</i>	6%	13%	81%	104	0.521791	37
39	<i>syx-3 (RNAi); plx-1</i>	1%	3%	97%	115	0.00037861	37
40	<i>syx-4 (RNAi); plx-1</i>	19%	34%	47%	146	7.82E-09	37
41	<i>snb-2 (RNAi); plx-1</i>	1%	14%	85%	106	0.712654	37
42	<i>snb-2 (RNAi); snb-1; plx-1</i>	24%	42%	34%	129	0.0082137	34
43	<i>rab-35 (RNAi); plx-1</i>	7%	33%	60%	162	0.000597238	37

44	<i>clic-1 (RNAi); plx-1</i>		4%	12%	84%		127	0.588486	36
45	<i>dpy-23 (RNAi); plx-1</i>		3%	46%	51%		102	3.00E-05	36
46	<i>unc-18.2 (RNAi); plx-1</i>		0%	8%	92%		125	0.0244111	36
47	<i>unc-13; plx-1</i>		8%	18%	74%		106	0.0432445	2
48	<i>unc-18; plx1</i>		28%	34%	38%		100	3.56E-10	2
49	<i>unc-13</i>		95%	5%	0%		102	0.0655471	1
50	<i>unc-18</i>		85%	14%	1%		112	0.224195	1
51	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::wt-rab-5]</i>		79%	18%	3%		111		
52	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::dn-rab-5]</i>		81%	18%	1%		105	0.764003	51
53	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::ca-rab-5]</i>		37%	38%	24%		107	9.60E-11	51
54	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::wt-rab-5]; plx-1</i>		10%	32%	58%		101		
55	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::dn-rab-5]; plx-1</i>		22%	43%	35%		130	0.00133504	54
56	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::ca-rab-5]; plx-1</i>		12%	54%	34%		101	0.00144987	54
57	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::wt-rab-7]</i>		75%	21%	5%		107		
58	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::dn-rab-7]</i>		39%	36%	25%		102	1.45E-07	57
59	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::ca-rab-7]</i>		70%	25%	5%		102	0.669656	57
60	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::wt-rab-7]; plx-1</i>		7%	29%	64%		107		
61	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::dn-rab-7]; plx-1</i>		2%	20%	78%		105	0.0372304	60
62	<i>Ex[lin-17p::snt-1::mCherry; lin-17p::gfp::ca-rab-7]; plx-1</i>		63%	21%	16%		103	2.02E-19	60
63	<i>unc-14</i>		62%	38%	1%		112	5.16E-08	1
64	<i>unc-51</i>		74%	26%	0%		102	0.106288	1
65	<i>unc-76</i>		97%	3%	0%		118	0.0134249	1
66	<i>unc-104</i>		90%	10%	0%		100	0.847375	1
67	<i>control (RNAi)</i>		77%	20%	3%		108		
68	<i>che-3 (RNAi)</i>		76%	19%	6%		107	0.626357	67
69	<i>dhc-3 (RNAi)</i>		73%	21%	5%		112	0.635367	67
70	<i>dhc-4 (RNAi)</i>		86%	11%	3%		118	0.152759	67

Table 5 ray 表現型

8 謝辞

本研究を行うにあたって多くのご指導、ご鞭撻を賜った高木新准教授に心から御礼申し上げます。また、小田洋一教授、谷本昌志助教をはじめ、研究室の皆さんには多くのご支援を頂き、大変お世話になりました。心から感謝いたします。

9 参考文献

- Achilleos, A., Wehman, A. M., Nance, J. PAR-3 mediates the initial clustering and apical localization of junction and polarity proteins during *C. elegans* intestinal epithelial cell polarization. *Development* 1842, 1833–1842 (2010).
- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat. Neurosci.* 4, 367–373 (2001).
- Augustine, G. J., How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 320–326 (2001).
- Aurandt, J., Vikis, H. G., Gutkind, J. S., Ahn, N., Guan, K. L., The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 12085–12090 (2002).
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O. and Caroni, P. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805–809 (1998).
- Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Püschel, A. W., Bolz, J., Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043–5053 (1998).
- Barlow, A. L., Macleod, A., Noppen, S., Sanderson, J., Guérin, C. J., Microscopy Microanalysis Colocalization Analysis in Fluorescence Micrographs: Verification of a More Accurate Calculation of Pearson's Correlation Coefficient. *Microsc Microanal.* 6, 710–724 (2010).
- Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J., Fishman, M. C., Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature*

383, 525–528 (1996).

- Brenner, S., The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77, 71–94 (1974).
- Brodin, L., Löw, P., Shupliakov, O., Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 312–320 (2000).
- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C., Jahn, R., Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256, 1021–1025 (1992).
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., Zerial, M., The Small GTPase rab5 Functions as a Regulatory Factor in the Early Endocytic Pathway. *Cell*. 70, 715–728 (1992).
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., van Deurs B. Rab7 : A Key to Lysosome Biogenesis. *Mol Biol Cell*. 11, 467–480 (2000).
- Campbell, D. S., Holt, C. E., Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron* 32, 1013–1026 (2001).
- Carcea, I., Ma'ayan, A., Mesias, R., Sepulveda, B., Salton, S. R., Benson, D. L., Flotillin-Mediated Endocytic Events Dictate Cell Type-Specific Responses to Semaphorin 3A. *J Neurosci*. 30(45):15317-29 (2010).
- Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., Rougon, G., Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance, *Neuron*. 27. 237-249. (2000).
- Castellani V., De Angelis, D., Kenwrick, S., Rougon, G., Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.*, 21. 6348– 6357. (2002).
- Castellani, V., Falk, J., Rougon, G., Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol Cell Neurosci*. 26. 89-

100. (2004).

- Chapman, E. R., Jahn, R., Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *J. Biol. Chem.* 269, 5735–41 (1994).

- Chapman, E. R., Desai, R. C., Davis, A. F., Tornehl, C. K., Delineation of the oligomerization, AP-2 binding, and synprint binding region of the C2B domain of synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 273, 32966–32972 (1998).

- Chapman, E. R. SYNAPTOTAGMIN: Synaptotagmin: A Ca(2+) sensor that triggers exocytosis?. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (7):498-508.3, 1–11 (2002).

- Chapman, E. R., How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? *Annurev. Biochem.* 77:615-41 (2008).

- Chen C. C., Schweinsberg, P. J, Vashist, S., Mareiniss, D. P., Lambie, E. J., Grant, B. D., RAB-10 Is Required for Endocytic Recycling in the *Caenorhabditis elegans* Intestine. *Mol Biol Cell.* 3. 1286–1297 (2006).

- Chen, Y. A., Scheller, R. H., SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 98–106 (2001).

- Christensen, C. R., Klingelhöfer, J., Tarabykina, S., Hulgaard, E. F., Kramerov, D., Lukanidin, E., Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res.* 58, 1238–1244 (1998).

- Colvin, R. A., Means, T. K., Diefenbach, T. J., Moita, L. F., Friday, R.P., Sever, S., Campanella, G. S., Abrazinski, T., Manice, L. A., Moita, C., Andrews, N. W., Wu, D., Hacohen, N., Luster, A. D., Synaptotagmin-mediated vesicle fusion regulates cell migration. *Nat Immunol.* 6. 495-502. (2010).

- Costa, M., Raich, W., Agbunag, C., Leung, B, Hardin, J., Priess, J. R., A putative

catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Biol.* 141, 297–308 (1998).

- Davletov, B. A., Sudhof, T. C., A Single C2 Domain From Synaptotagmin-I Is Sufficient for High-Affinity Ca^{2+} /Phospholipid Binding. *J. Biol. Chem.* 268, 26386–26390. (1993).

- Dell'Angelica, E. C., Payne, G. S., Intracellular cycling of lysosomal enzyme receptors: cytoplasmic tails' tales. *Cell.* 106. 395-8. (2001).

- Desai, R. C., Vyas, B., Earles, C. A., Littleton, J. T., Kowalchuck, J. A., Martin, T. F., Chapman, E. R., The C2B domain of synaptotagmin is a Ca^{2+} -sensing module essential for exocytosis. *J. Cell Biol.* 150, 1125–1135 (2000).

- Desclozeaux, M., Venturato, J., Wylie, F. G., Kay J. G., Joseph, S. R., Le, H. T., Stow J. L., Active Rab11 and functional recycling endosome are required for E-cadherintrafficking and lumen formation during epithelial morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295, C545-56. (2008).

- Diril, M. K., Wienisch, M., Jung, N., Stonin 2 Is an AP-2-Dependent Endocytic Sorting Adaptor for Synaptotagmin Internalization and Recycling. *Dev. Cell*, 1, 233–244 (2006).

- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., Gill, G. N., Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1, 253–259 (1999).

- Fan, J., Mansfield, S. G., Redmond, T., Gordon-Weeks, P. R., Raper, J. A., The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J. Cell Biol.* 121, 867–878 (1993).

- Fan, J., Raper, J. A., Localized collapsing cues can steer growth cones without inducing their full collapse. *Neuron* 14, 263–274 (1995).

- Fergestad, T., Broadie, K., Interaction of stoned and synaptotagmin in synaptic vesicle endocytosis. *J. Neurosci.* 21, 1218–27 (2001).
- Fire, A. White-Harrison, S., Dixon D., Vectors for ectopic expression in *C. elegans* *Worm Breeder's Gazette* 12, 17 (1992).
- Fisher, C. L., Pei, G. K., Modification of a PCR-based site-directed mutagenesis method. *Biotechniques* 23, 570-574. (1997).
- Fujii, T., Nakao, F., Shibata, Y., Shioi, G., Kodama, E., Fujisawa, H., Takagi, S., *Caenorhabditis elegans* PlexinA , PLX-1 , interacts with transmembrane semaphorins and regulates epidermal morphogenesis. *Development.* 129(9):2053-63. (2002).
- Gallegos, M. E., Balakrishnan, S., Chandramouli, P., Arora, S., Azameera, A., Babushekar, A., Bargoma, E., Bokhari, A., Chava, S. K., Das, P., Desai. M., Decena, D., Saramma, S. D., Dey, B., Doss, A. L., Gor, N., Gudiputi, L., Guo, C., Hande, S., Jensen M, Jones S, Jones N, Jorgens D, Karamchedu P, Kamrani K, Kolora LD, Kristensen, L., Kwan, K., Lau, H., Maharaj, P., Mander, N., Mangipudi, K., Menakuru, H., Mody, V., Mohanty, S., Mukkamala, S., Mundra, S. A., Nagaraju, S., Narayanaswamy, R., Ndungu-Case, C., Noorbakhsh, M., Patel, J., Patel, P., Pendem, S. V., Ponakala, A., Rath, M., Robles, M. C., Rokkam, D., Roth, C., Sasidharan, P., Shah, S., Tandon, S., Suprai, J., Truong, T. Q., Uthayaruban, R., Varma, A., Ved, U., Wang, Z., Yu, Z., The *C. elegans* Rab Family: Identification, Classification and Toolkit Construction. *PLoS One.* 7, 11, (2012).
- Gebauer, F., Hentze, M. W., Molecular Mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10. 827-35. (2004).
- Gengyo-Ando, K., Kuroyanagi, H., Kobayashi, T., Murate, M., Fujimoto, K., Okabe, S., Mitani, S., The SM protein VPS-45 is required for RAB-5-dependent endocytic

transport in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep.* 2. 152-7. (2007).

- Ghosh, P., Dahms, N. M., Kornfeld, S., Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4. 202-12. (2004).

- Goshima, Y., Hori, H., Sasaki, Y., Yang, T., Kagoshima-Maezono, M., Li, C., Takenaka, T., Nakamura, F., Takahashi, T., Strittmatter, S. M., Misu, Y., Kawakami, T., Growth Cone Neuropilin-1 Mediates Collapsin-1 / Sema III Facilitation of Antero- and Retrograde Axoplasmic Transport. *J Neurobiol.* 39(4). 579-89. (1999).

- Grant, B., Hirsh, D., Receptor-mediated Endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* Oocyte. *Mol Biol Cell.* 10. 4311-26. (1999).

- Grant, B. D., Donaldson, J. G., Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 597-608. (2009).

- Grass, I., Thiel, S., Höning, S., Haucke, V., Recognition of a basic AP-2 binding motif within the C2B domain of synaptotagmin is dependent on multimerization. *J. Biol. Chem.* 279, 54872–80 (2004).

- Grant, B., Zhang, Y., Paupard, M. C., Lin, S. X., Hall, D. H., Hirsh, D., Evidence that RME-1 , a conserved *C. elegans* EH-domain protein , functions in endocytic recycling. *Nat Cell Biol.* 3. 573-9. (2001).

- Green, R. A., Kao, H. L., Audhya, A., Arur, S., Mayers, J. R., Fridolfsson, H. N., Schulman, M., Schloissnig, S., Niessen, S., Laband, K., Wang, S., Starr, D. A., Hyman, A. A., Schedl, T., Desai, A., Piano, F., Gunsalus, K. C., Oegema, K., Resource, A., High-Resolution *C. elegans* Essential Gene Network Based on Phenotypic Profiling of a Complex Tissue. *Cell* 145, 470–482 (2010).

- Hall, K. T., Boumsell, L., Schultze, J. L., Boussiotis, V. A., Dorfman, D. M., Cardoso, A. A., Bensussan, A., Nadler, L. M., Freeman, G. J., Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U. S. A. 93, 11780–11785 (1996).

- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., Yonezawa, K., Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177–189 (2002).

- Harris, T. W., Hartwig, E., Horvitz, H. R., Jorgensen, E. M., Mutations in Synaptojanin Disrupt Synaptic Vesicle Recycling. *J Cell Biol.* 3. 589–599 (2000).

- Haucke, V., Neher, E., Sigrist, S. J., Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Neurosci.* 3127-38. (2011).

- He, Z., Tessier-Lavigne, M., Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent semaphorin III. *Cell* 90, 739–751 (1997).

- Hennig, K. M., Colombani, J., Neufeld, T. P., TOR coordinates bulk and targeted endocytosis in the *Drosophila melanogaster* fat body to regulate cell growth. 173, 963–974 (2006).

- Hennig, K. M., Colombani, J., Neufeld, T. P., Asymmetric endocytosis and remodeling of $\beta 1$ -integrin adhesions during growth cone chemorepulsion by MAG. *Nat. Publ. Gr.* 13, 829–837 (2010).

- Hoopmann, P., Punge, A., Barysch, S. V., Westphal, V., Buckers, J., Opazo, F., Rizzoli, S. O. Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(44), 19055–19060 (2010).

- Hu, H., Marton, T. F., Goodman, C. S., Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron* 32, 39–51 (2001).

- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg, M. A., Hall, A., Hall, M. N., Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin

insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122–1128 (2004).

- Jahn, R., Lang, T., Südhof, T. C., Membrane fusion. *Cell* 112, 519–533 (2003).
- Jeon C. Y., Kim H. J., Lee J. Y., Kim J. B., Kim S. C., Park J. B., p190RhoGAP and Rap-dependent RhoGAP (ARAP3) inactivate RhoA in response to nerve growth factor leading to neurite outgrowth from PC12 cells. *Exp Mol Med.*, 42:335–344. (2010.)
- Jin, Z., Strittmatter, S. M., Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* 17, 6256–6263 (1997).
- Jung, N., Wienisch, M., Gu, M., Rand, J. B., Müller, S. L., Krause, G., Jorgensen, E. M., Klingauf, J., Haucke, V. Molecular basis of synaptic vesicle cargo recognition by the endocytic sorting adaptor stonin 2. *J Cell Biol.* 179.1497-510. (2007).
- Journey, W. M., Gallo, G., Letourneau, P. C., McLoon, S. C., Rac1-mediated endocytosis during ephrin-A2- and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* 22, 6019–6028 (2002).
- Kabayama, H., Takeuchi, M., Taniguchi, M., Tokushige, N., Kozaki, S., Mizutani, A., Nakamura, T., Mikoshiba, K., Syntaxin 1B Suppresses Macropinocytosis and Semaphorin 3A-Induced Growth Cone Collapse. *J Neurosci.* 31, 7357–7364 (2011).
- Kamath, R. S., Ahringer, J., Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods.* 30, 313–321 (2003).
- Kamiguchi, H., Hlavin, M. L., Yamasaki, M., Lemmon, V., Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 21. 97-125. (1998)
- Kasai, K., Akagawa, K., Roles of the cytoplasmic and transmembrane domains of syntaxins in intracellular localization and trafficking. *J Cell Sci.* 114. 3115-24. (2001).
- Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y., Hoshino, M., Article Rab GTPases-Dependent

Endocytic Pathways Regulate Neuronal Migration and Maturation through N-Cadherin Trafficking. *Neuron* 67, 588–602 (2010).

- Keely, P. J., Rusyn, E. V, Cox, A. D. Parise, L. V., R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *J. Cell Biol.* 145, 1077–88 (1999).

- Kim D. H., Sarbasso, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M., mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* 110, 163–175 (2002).

- Kjaerulff, O., Brodin, L., Jung, A., The Structure and Function of Endophilin Proteins. *Cell Biochem Biophys.* 60. 137–154 (2011).

- Knust, E. Bossinger, O., Composition and Formation of Intercellular Junctions in Epithelial Cells. *Science.* 298. 1955-9.

- Koh, T. W., Bellen, H. J. Synaptotagmin I., a Ca^{2+} sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26, 413–422 (2003).

- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., O'Connor, T. P., Patel, N. H., Admon, A., Bentley, D., Goodman, C. S., Fasciclin IV sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron.* 9, 831–845 (1992).

- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., Goodman, C. S., The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389–1399 (1993).

- Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J., Ginty, D. D., Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762. (1997)

- Köppen, M., Simske, J. S., Sims, P. A., Firestein, B. L., Hall, D. H., Radice, A. D., Rongo, C., Hardin, J. D., Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional

integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat Cell Biol.* 3, 983–991 (2001).

- Kostich, M., Fire, A., Fambrough, D. M., Identification and molecular-genetic characterization of a LAMP / CD68-like protein from *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci.* 2606, 2595–2606 (2000).

- Kruger, R. P., Aurandt, J., Guan, K. L. W., Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6, 789–800 (2005).

- Kubota, Y, Sano, M., Goda, S., Suzuki, N., Nishiwaki, K., The conserved oligomeric Golgi complex acts in organ morphogenesis via glycosylation of an ADAM protease in *C. elegans*. *Development.* 263–273 (2004).

- Kuhn, T. B., Brown, M. D., Wilcox, C. L., Raper, J. A., Bamburg, J., Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of *rac1*. *J. Neurosci.* 19, 1965–1975 (1999).

- Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 99-111. (2008).

- Li, C., Sasaki, Y., Takei, K., Yamamoto H, Shouji M, Sugiyama Y, Kawakami T, Nakamura F, Yagi T, Ohshima T, Goshima Y. Correlation between Semaphorin3A-Induced Facilitation of Axonal Transport and Local Activation of a Translation Initiation Factor Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *J Neurosci.* 24, 6161–6170 (2004).

- Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci.* 24, 4070–4081 (2004).

- Liu Z, Fujii T, Nukazuka A, Kurokawa R, Suzuki M, Fujisawa H, Takagi S. *C. elegans* PlexinA PLX-1 mediates a cell contact-dependent stop signal in vulval precursor cells. *Dev Biol.* 282, 138–151 (2005).

- Luo, Y., Raible, D. Raper, JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217–227 (1993).
- Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, Pryor PR. Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol.* 20. 141-54. (2003).
- Maekawa, M. Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science.* 285, 895–898 (1999).
- Mann F, Rougon G. Mechanisms of axon guidance: membrane dynamics and axonal transport in semaphorin signalling. *J Neurochem.* 102, 316–323 (2007).
- Maritzen, T. & Podufall, J. Stonins – Specialized Adaptors for Synaptic Vesicle Recycling and Beyond ? 8–15 (2010). doi:10.1111/j.1600-0854.2009.00971.x
- Martina JA, Bonangelino CJ, Aguilar RC, Bonifacino JS.: An Adaptor-like Protein that Interacts with Components of the Endocytic Machinery. *J Cell Biol.* 153, 1111–1120 (2001).
- Maruyama, I. N., Brenner, S., A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 5729–5733 (1991).
- Matthes, D. J., Sink, H., Kolodkin, A. L., Goodman, C. S., Semaphorin II can function as a selective inhibitor of specific synaptic arborizations. *Cell* 81, 631–9 (1995).
- Matthew, W. D., Tsavaler, L., Reichardt, L. F., Identification of a synaptic vesicle-specific membrane protein with a wide distribution in neuronal and neurosecretory tissue. *J. Cell Biol.* 91, 257–269 (1981).
- Meléndez, A., Levine, B. T., Autophagy in *C. elegans*. *WormBook.* 24 1-26. (2009).
- Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E. L., Hall, D. H., Levine, B.. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C.*

elegans. *Science*. 301. 1387-91. (2003).

• Meijer, A. J., Codogno, P., Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 36, 2445-62. (2004).

• Mello, C., Fire, A., DNA transformation. *Methods Cell Biol*. 48, 451-82. (1995).

• Miao, H., Han, K., Gu, F., Stereologic estimates of glomerular volume in unilaterally nephrectomized rats. *Anal Quant Cytol Histol*. 21, 89-92. (1999).

• Mukhopadhyay, A., Funato, K., Stahl, P. D., Rab7 Regulates Transport from Early to Late Endocytic Compartments in *Xenopus* Oocytes. *J Biol Chem*. 272, 13055-9. (1997).

• Mulder, N. J., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Barrell, D., Bateman, A., Binns, D., Biswas, M., Bradley, P., Bork, P., Bucher, P., Copley, R. R., Courcelle, E., Das, U., Durbin, R., Falquet, L., Fleischmann, W., Griffiths-Jones, S., Haft, D., Harte, N., Hulo, N., Kahn, D., Kanapin, A., Krestyaninova, M., Lopez, R., Letunic, I., Lonsdale, D., Silventoinen, V., Orchard, S. E., Pagni, M., Peyruc, D., Ponting, C. P., Selengut, J. D., Servant, F., Sigrist, C. J., Vaughan, R., Zdobnov, E. M., The InterPro Database , 2003 brings increased coverage and new features. 31, 315–318 (2003).

• Moriyama, K., Iida, K., Yahara, I., Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* 1, 73–86 (1996).

• Murthy, V. N., De Camilli, P., Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu. Rev. Neurosci*. 26, 701–728 (2003).

• Nakamura, F., Kawamoto, S., Goshima, Y., Kalb, R. G., Strittmatter, S. M., Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse. *J. Cell Biol*. 149, 411–421 (2000).

• Negishi, M., Oinuma, I., Katoh, H., Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci*. 62, 1363–1371 (2005).

- Neher, E., Zucker, R. S., Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10, 21–30 (1993).
- Nukazuka, A., Fujisawa, H., Inada, T., Oda, Y., Takagi, S., Semaphorin controls epidermal morphogenesis by stimulating mRNA translation via eIF2alpha in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 22, 1025–36. (2008).
- Nukazuka, A., Tamaki, S., Matsumoto, K., Oda, Y., A Shift of the TOR Adaptor from Rictor toward Raptor by Semaphorin in *C. elegans*. *Nat Commun.* 484. (2011).
- Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., Negishi, M. The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 305, 862–865 (2004).
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., Mizuno, K., Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 3577–82 (2000).
- Pang, Z. P., Südhof, T. C., Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 4. 496–505. (2010).
- Loll, P. J., Swain, E., Chen, Y., Turner, B. T., Zhang, J. F., Structure of the SH3 domain of rat endophilin A2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 64, 243–6. (2008).
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. a, Jahn, R., Südhof, T. C., Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260–263 (1990).
- Perin, M. S., Brose, N., Jahn, R., Südhof, T. C., Domain structure of synaptotagmin (p65). *J. Biol. Chem.* 266, 623–629 (1991).
- Perrot, V., Vazquez-Prado, J., Gutkind, J. S., Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J. Biol. Chem.* 277, 43115–43120 (2002).

- Pfeffer, S. R., Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Lett.* 583. 3811-6. (2009).
- Phillips, A. M., Smith, M., Ramaswami, M., Kelly, L. E., The Products of the *Drosophila* stoned Locus Interact with Synaptic Vesicles via Synaptotagmin. *J Neurosci.* 20, 8254–8261 (2000).
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell* 141, 497–508 (2010).
- Posor, Y., Eichhorn-Gruenig, M., Puchkov, D., Schöneberg, J., Ullrich, A., Lampe, A., Müller, R., Zarbakhsh, S., Gulluni, F., Hirsch, E., Krauss, M., Schultz, C., Schmoranz, J., Noé, F., Haucke, V., Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature.* 499, 233-7 (2013).
- Reddy, A., Caler, E. V., Andrews, N. W., Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell.* 106. 157-69. (2001).
- Ringstad, N., Nemoto, Y., De Camilli, P., The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 8569-74. (1997).
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., Zerial, M. Médecine, F. De., Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell.* 122, 735–749 (2005).
- Richter M, Murai K. K., Bourgin C, Pak D. T., Pasquale E. B., The EphA4 receptor regulates neuronal morphology through SPAR-mediated inactivation of Rap GTPases. *J Neurosci.* 27:14205– 14215. (2007).
- Roberts, R. L., Barbieri, M. A., Pryse, K. M., Chua, M., Morisaki, J. H., Stahl, P. D., Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J Cell Sci.* 112, 3667-75. (1999).

- Rolls, M. M., Hall, D. H., Victor, M., Stelzer, E. H. K., Rapoport, T. A., Targeting of Rough Endoplasmic Reticulum Membrane Proteins and Ribosomes in Invertebrate Neurons. 13, 1778–1791 (2002).
- Rothman, J. E., Mechanism of Intracellular Protein-Transport. *Nature* 372, 55–63 (1994).
- Roy, P. J., Zheng, H., Warren, C. E. Culotti, J. G., mab-20 encodes Semaphorin-2a and is required to prevent ectopic cell contacts during epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 127, 755–767 (2000).
- Sandoval, I.,V., Bakke O., Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* 4. 292-7. (1994).
- Sandri, C., Caccavari, F., Valdembrì, D., Camillo, C., Veltel, S., The R-Ras / RIN2 / Rab5 complex controls endothelial cell adhesion and morphogenesis via active integrin endocytosis and Rac signaling. *Cell Res.* 22, 1479–1501 (2012).
- Sanford, S. D., Gatlin, J. C., Hökfelt, T., Pfenninger, K. H., Growth cone responses to growth and chemotropic factors. *Eur J Neurosci.* 28. 268-78. (2008).
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M., Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 1296-302. (2004).
- Sato, M., Grant B. D., Harada, A., Sato, K., Rab11 is required for synchronous secretion of chondroitin proteoglycans after fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci.* 121, 3177-86. (2008)
- Sato, M., Saegusa, K., Sato, K., Hara, T., Harada, A., Sato, K., *Caenorhabditis elegans* SNAP-29 is required for organellar integrity of the endomembrane system and general exocytosis in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 22, 2579-87. (2011).

- Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R., Harada, A., The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature*. 448, 366-9. (2007).
- Sawa, H, Lobel, L, Horvitz, H. R., The *Caenorhabditis elegans* gene *lin-17*, which is required for certain asymmetric cell divisions, encodes a putative seven-transmembrane protein similar to the *Drosophila* frizzled protein. *Genes Dev*. 10, 2189-97. (1996).
- Sbalzarini, I. F., Koumoutsakos, P., Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J Struct Biol*. 151, 2-95. (2005)
- Schultz, M. L., Tecedor, L., Chang, M., Davidson, B. L., Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci*. 34, 401–410 (2011).
- Serini, G., Valdembrì, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zammataro, L., Primo, L., Tamagnone, L., Logan, M., Tessier-Lavigne, M., Taniguchi, M., Püschel, A. W., Bussolino, F., Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 424, 391–7 (2003).
- Shioi, G., Shoji, M., Nakamura, M., Ishihara, T., Katsura, I., Fujisawa, H., Takagi, S., Mutations Affecting Nerve Attachment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 157, 11-22. (2001).
- Shoji, W., Yee, C. S., Kuwada, J. Y., Zebrafish semaphorin Z1a collapses specific growth cones and alters their pathway in vivo. *Development*. 25, 1275–83 (1998).
- Siebert, M., Sidransky, E., Westbroek, W., Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies. *Brain*. 137. 1304-22. (2014).
- Simonsen. A., Lippé, R., Christoforidis, S, Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., Stenmark, H., EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*. 394, 4-8. (1998).

- Stimson, D. T., Estes, P. S., Rao, S., Krishnan, K. S., Kelly, L. E., Ramaswami, M., *Drosophila* stoned proteins regulate the rate and fidelity of synaptic vesicle internalization. *J. Neurosci.* 21, 3034–44 (2001).
- Song, S., Eckerle, S., Onichtchouk, D., Marrs, J. A., Nitschke, R., Driever, W., Pou5f1-dependent EGF expression controls E-cadherin endocytosis, cell adhesion, and zebrafish epiboly movements. *Dev Cell.* 4. 486-501. (2013).
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-mortimer, O., Lutcke, A., Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion. *EMBO J.* 13. 1287-96. (1994).
- Stenmark, H., Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 513-25. (2009).
- Strome, S., Powers, J., Dunn, M., Reese, K., Malone, C. J., White, J., Seydoux, G., Saxton, W., Spindle dynamics and the role of gamma-tubulin in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Mol Biol Cell.* 12, 1751–1764 (2001).
- Südhof, T. C., Synaptotagmins: why so many? *J Biol Chem.* 10. 7629-32. (2002)
- Swiercz, J. M., Kuner, R., Behrens, J., Offermanns, S., Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. *Neuron* 35, 51–63 (2002).
- Takahashi, T., Strittmatter, S. M., PlexinA1 Autoinhibition by the Plexin Sema Domain. *Neuron* 29, 429–439 (2001).
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M., Tessier-Lavigne, M., Comoglio, P. M., Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71–80 (1999).
- Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Signalling by semaphorin receptors: Cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol.* 10, 377–383 (2000).

- Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., Yagi, T., Disruption of Semaphorin III/D Gene Causes Severe Abnormality in Peripheral Nerve Projection. *Neuron*. 19, 519–530 (1997).
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., The molecular biology of axon guidance. *Science*. 274, 1123-33. (1996).
- Toda, H., Mochizuki, H., Flores, R., Josowitz, R., Krasieva, T. B., Lamorte, V. J., Suzuki, E., Gindhart, J. G., Furukubo-Tokunaga, K., Tomoda, T., UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes Dev*. 22, 3292-307. (2008).
- Togashi, K., von Schimmelmann, M. J., Nishiyama, M., Lim, C. S., Yoshida, N., Yun, B., Molday, R. S., Goshima, Y., Hong, K., Cyclic GMP-Gated CNG Channels Function in Sema3A-Induced Growth Cone Repulsion. *Neuron*. 58, 694-707. (2008).
- Tojima, T., Akiyama, H., Itofusa, R., Li, Y., Katayama, H., Miyawaki, A., Kamiguchi, H., Attractive axon guidance involves asymmetric membrane transport and exocytosis in the growth cone. *Nat Neurosci*. 10, 58-66. (2007).
- Tojima, T., Itofusa, R., Kamiguchi, H., Report Asymmetric Clathrin-Mediated Endocytosis Drives Repulsive Growth Cone Guidance. *Neuron* 66, 370–377 (2010).
- Tojima, T., Hines, J. H., Henley, J. R., Kamiguchi, H., Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nat Rev Neurosci*. 12, 191-203. (2011).
- Tojima, T., Itofusa, R., Kamiguchi, H., Steering Neuronal Growth Cones by Shifting the Imbalance between Exocytosis and Endocytosis. *J Neurosci*. 34, 7165–7178 (2014).
- Tomoda, T., Kim, J. H., Zhan, C., Hatten, M. E., Role of Unc51.1 and its binding partners in CNS axon outgrowth Role of Unc51.1 and its binding partners in CNS

axon outgrowth. *Genes Dev.* 541–558 (2004).

• Tran, T. S., Rubio, M. E., Clem, R. L., Johnson, D., Case, L., Tessier-Lavigne, M., Huganir, R. L., Ginty, D. D., Kolodkin, A. L., Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS. *Nature* 462, 1065–1069 (2009).

• Uesugi, K., Oinuma, I., Katoh, H., Negishi, M., Different requirement for Rnd GTPases of R-Ras GAP activity of Plexin-C1 and Plexin-D1. *J Biol Chem* 284, 6743–6751. (2009).

• Vitriol, E. A., Zheng, J. Q., Growth cone travel in space and time: the cellular ensemble of cytoskeleton, adhesion, and membrane. *Neuron*. 73. 1068–81. (2012).

• Walther, K., Krauss, M., Diril, M. K., Lemke, S., Ricotta, D., Honing, S., Kaiser, S., Haucke, V., Human stoned B interacts with AP-2 and synaptotagmin and facilitates clathrin-coated vesicle uncoating. *EMBO Rep.* 2, 634–640 (2001).

• Wicks, SR., de Vries, C. J., van Luenen, H. G., Plasterk, R. H., CHE-3, a cytosolic dynein heavy chain, is required for sensory cilia structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* 307, 295–307 (2000).

• Winberg, M. L., Noordermeer, J. N., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Spriggs, M. K., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95, 903–16 (1998).

• Wong, J. T., Yu, W. T., O'Connor, T. P., Transmembrane grasshopper Semaphorin I promotes axon outgrowth in vivo. *Development* 124, 3597–607 (1997).

• Wu, K. Y., He, M., Hou, Q. Q., Sheng, A. L., Yuan, L., Liu, F., Liu, W. W., Li, G., Jiang, X. Y., Luo, Z. G., Semaphorin 3A activates the guanosine triphosphatase Rab5 to promote growth cone collapse and organize callosal axon projections. *Sci Signal.* 7, 340. (2014).

• Yamada, T., Sakisaka, T., Hisata, S., Baba, T., Takai, Y., RA-RhoGAP, Rap-activated

Rho GTPase-activating protein implicated in neurite outgrowth through Rho. *The Journal of biological chemistry*. 280:33026–33034. (2005).

• Yamane, M., Yamashita, N., Yamamoto, H., Iizuka, A., Shouji, M., Usui, H., Goshima, Y., *Biochemical and Biophysical Research Communications* Semaphorin3A facilitates axonal transport through a local calcium signaling and tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 333–338 (2012).

• Yamashita, N., Usui, H., Nakamura, F., Chen, S., Sasaki, Y., Hida, T., Suto, F., Taniguchi, M., Takei, K., Goshima, Y., Plexin-A4-dependent retrograde semaphorin 3A signalling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. *Nat Commun.* 5, 3424. (2014).

• Yao, J., Kwon, S. E., Gaffaney, J. D., Dunning, F. M. and Chapman, E. R. Uncoupling the roles of synaptotagmin I during endo- and exocytosis of synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.* 15, 243–249 (2011).

• Yu, H. H., Araj, H. H., Ralls, S. A., Kolodkin, A. L., The transmembrane Semaphorin Sema I is required in *Drosophila* for embryonic motor and CNS axon guidance. *Neuron* 20, 207–220 (1998).

• Yu, X., Odera, S., Chuang, C. H., Lu, N., Zhou, Z., *C. elegans* Dynamin Mediates the Signaling of Phagocytic Receptor CED-1 for the Engulfment and Degradation of Apoptotic Cells. *Dev Cell.* 743–757 (2006).

• Yuan, T., Liu, L., Zhang, Y., Wei, L., Zhao, S., Zheng, X., Huang, X., Boulanger, J., Gueudry, C., Lu, J., Xie, L., Du, W., Zong, W., Yang, L., Salamero, J., Liu, Y., Chen, L., Diacylglycerol Guides the Hopping of Clathrin-Coated Pits along Microtubules for Exo-Endocytosis Article Diacylglycerol Guides the Hopping of Clathrin-Coated Pits along Microtubules for Exo-Endocytosis Coupling. *Dev. Cell* 35, 120–130 (2015).

- Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Südhof, T. C., Anderson, R. G., Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: Implications for membrane recycling. *Cell* 78, 751–760 (1994).
- Ziel, J. W., Hagedorn, E. J., Audhya, A., Sherwood, D. R., UNC - 6 (netrin) orients the invasive membrane of the anchor cell in *C. elegans*. *Nat Cell Biol.* 11, (2009).
- Zylbersztein, K., Petkovic, M., Burgo, A., Deck, M., Garel, S., Marcos, S., Bloch-Gallego, E., Nothias, F., Serini, G., Bagnard, D., Binz, T., Galli, T., The vesicular SNARE Synaptobrevin is required for Semaphorin 3A axonal repulsion. *J Cell Biol.* 4, 37–46 (2012).