

学 位 論 文

SNARE protein Syntaxin 3 is involved in
functional regulation of serotonin transporter
(SNARE タンパク質 Syntaxin 3 はセロトニン
トランスポーターの機能制御に関わる)

本池 芹佳

広島大学大学院医歯薬保健学研究科
博士課程 医歯薬学専攻

2019 年度

主指導教員：入船 正浩 教授
(医系科学研究科 歯科麻酔学)

略語一覧

5-HT : セロトニン (5-hydroxytryptamine)

SERT : セロトニントランスポーター (serotonin transporter)

SSRI : セロトニン再取り込み阻害薬 (selective serotonin reuptake inhibitor)

ER : 小胞体 (endoplasmic reticulum)

SigR1 : シグマ 1 受容体 (sigma 1 receptor)

STX3 : シンタキシン 3 (syntaxin 3)

SNARE : 可溶性 N-エチルマレイミド感受性因子付着タンパク質 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein)

D-MEM : ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium)

FBS : ウシ胎児血清 (fetal bovine serum)

PNGase F : Peptide-N-Glycosidase F

Endo H : Endoglycosidase H

PFA : パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde)

NGS : 正常ヤギ血清 (normal goat serum)

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 136 回 日本薬理学会近畿部会 2019.11 (大阪)

目 次

要旨	1
緒言	4
材料と方法	10
結果	
第1部	25
第2部	30
第3部	34
考察	38
謝辞	45
参考文献	46

要 旨

【背景と目的】

セロトニントランスポーター (SERT) は、神経終末から放出されたセロトニン (5-HT) を神経終末に再取り込みすることにより、5-HT 神経伝達の終了を担う膜タンパク質である。SERT は翻訳された後に小胞体 (ER) にて糖鎖修飾を受ける。その後、ゴルジ体を経由し、細胞膜へと運ばれる。我々は以前の研究で、SERT の C 末端の膜輸送と糖鎖修飾に対する役割を明らかにするために、SERT の C 末端欠損変異体 (SERT Δ CT) の特性を検討した。その結果、SERT Δ CT は、折りたたみ不全タンパク質であり、膜輸送が阻害され ER に停留すること、ER ストレスは、SERT の膜輸送を障害し SERT を ER に停留させ、SERT Δ CT と同様な状態を作ることを明らかにした。

SERT や SERT Δ CT の膜輸送を促進する薬物は、SERT の機能修飾を介して 5-HT 神経伝達を変化させうる。また、このような薬物は、ER ストレス緩和作用を持つことも期待できる。我々は、SERT Δ CT の取り込み活性を著明に改善させる薬物としてシグマ 1 受容体作用薬の SKF-10047 を見出した。また、SKF-10047 の 24 時間投与で変動する遺伝子として、膜輸送に重要な働きを持つ Syntaxin 3 (STX3) を同定した。そこで本研究では、SERT 機能に及ぼす STX3 の影響について検討した。

【結果】

① SERT に対する STX3 過剰発現の影響

Myc-DDK-STX3 cDNA と野生型 FLAG-SERT を、電気穿孔法を用いて AD293 細胞 (HEK293 の亜型) および COS-7 細胞に遺伝子導入した。また、FLAG-SERT 安定発現 HEK293 細胞 (FLAG-SERT HEK 細胞) には Myc-DDK-STX3 cDNA を同様に遺伝子導入した。遺伝子導入 48 時間後に細胞 1 個当たりの蛍光 SERT 基質取り込み量を平均し、取り込み活性として測定した。その結果、一過性 FLAG-SERT 発現 AD293 細胞と COS-7 細胞では、STX3 の過剰発現は、SERT 取り込み活性を減少させた。

一方、western blotting による検討では、STX3 の過剰発現により、SERT タンパク質の完全糖鎖修飾体が減少した。

Myc-DDK-STX3 と HA-SERT を COS-7 細胞に発現させて蛍光免疫染色にて観察すると、HA-SERT、Myc-DDK-STX3 は、主に小胞体やゴルジ体で共局在し、一部凝集体を形成することが確認された。また、STX3 が過剰発現している細胞では SERT の膜発現が抑制されていた。

これらの結果から、過剰発現された STX3 は SERT をゴルジ体や小胞体に留め、凝集して細胞膜発現を抑制する可能性があることが示唆された。

② SERT に対する STX3 ノックダウンの影響

STX3 siRNA と野生型 SERT を、電気穿孔法を用いて AD293 細胞および COS-7 細胞に遺伝子導入した。また、FLAG-SERT HEK 細胞には STX3 siRNA を同様に遺伝子導入した。遺伝子導入 48 時間後に取り込み活性を測定したところ、STX3 のノックダウンは、いずれの細胞でも影響を及ぼさなかった。

一方、western blotting では、STX3 のノックダウンにより、SERT の完全糖鎖修飾体のバンドが上方移動した。また、糖鎖切断酵素の検討から、この上方移動は糖鎖修飾の変化に起因するものであることが明らかとなった。

この結果から、STX3 は SERT の糖鎖修飾に何らかの影響を与えることが示唆された。

③ 内在性に SERT と STX3 を発現するヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞における SERT の局在および取り込み活性の検討

Caco-2 細胞の内在性 SERT および STX3 の局在を免疫蛍光染色で観察したところ、SERT と STX3 は微絨毛マーカーの villin と共局在し、SERT と STX3 の一部は微絨毛に局在することが明らかとなった。

STX3 siRNA を電気穿孔法により Caco-2 細胞に遺伝子導入した。72 時間後、単位タンパク質あたりの³H]5-HT の取り込み量を SERT の取り込み活性として測定した。その結果、Caco-2 細胞では、STX3 をノックダウンすると SERT 取り込み活性が抑制された。

これらの結果から、STX3 は Caco-2 細胞において共局在する SERT の機能を調整する可能性があることが示唆された。

【考察とまとめ】

以上の結果から、AD293 細胞と COS-7 細胞では SERT と STX3 は細胞内で共局在し、STX3 は SERT の糖鎖修飾に何らかの影響を与えることが考えられた。また、Caco-2 細胞においても、STX3 は共局在する SERT の取り込み活性を正に制御することが示唆された。本研究より、STX3 は SERT の膜輸送の過程で SERT と共局在し、SERT の機能を調節する可能性が示唆された。

緒 言

セロトニン (5-HT) は、情動、睡眠、摂食、運動、体温など、様々な生理学的機能に影響を与える神経伝達物質およびホルモンである (1)。セロトニントランスポーター (SERT) は、遊離した 5-HT を細胞内に再取り込みすることにより、セロトニン作動性シグナル伝達を停止する重要なメカニズムを担う

(1)、12 回膜貫通型構造を持つ Na⁺/Cl⁻-共輸送型のトランスポーターである (2,3)。SERT は、抗うつ薬 (selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) や三環系抗うつ薬)、薬物乱用 (アンフェタミン、メタンフェタミン等) の作用点として知られている (4-7)。また、SERT はうつ病を含む気分障害や、薬物依存の発症メカニズムに関与すると考えられている。さらに、SSRI は抗うつ効果以外にも、パニック障害、強迫神経症、睡眠や摂食障害などの不安障害にも効果を示す (8,9)。そして、このような精神疾患だけでなく、慢性疼痛治療にも用いられている。近年、SERT の翻訳領域の遺伝子変異が広汎性発達障害 (自閉症) の多発家系において見出されている (10,11)。以上のように SERT は、気分障害、薬物依存、不安障害、発達障害などの様々な精神神経疾患の病態に関わる分子として注目を集めている。また、末梢組織における SERT は、血小板 (12,13) や肺内皮 (14)、胎盤 (13)、腸管などの非神経細胞にも発現しており (1)、腸管での 5-HT は過敏性腸症候群 (IBS) および炎症性腸疾患の病態生理に関連している (15)。そのため、5-HT の SERT を介した働きについての研究も、これら関連疾患の病態生理を明らかにするために注目されている。

SERT を含む膜タンパク質は、通常 mRNA から翻訳された後に小胞体 (ER) で糖鎖修飾を受け、また分子シャペロンによって正常な三次元構造に折りたたまれる。その後、ゴルジ体を経由し、細胞膜へと運ばれる。

膜タンパク質は、はじめに小胞体で高マンノース型オリゴ糖が付加する糖鎖修飾を受け、不完全糖鎖修飾体 (high mannose type) となる。その後、ゴルジ体にて、この糖鎖修飾はトリミングされ、さらに N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸が付加し、複合型オリゴ糖鎖修飾へと成熟し、膜タンパク質は完全糖鎖修飾体となる。

SERT においては、第 2 細胞外ループに糖鎖修飾部位が存在する (16) 。 SERT においても、他の膜タンパク質と同様に、まず ER で不完全糖鎖修飾体 (high mannose type) となり、その後ゴルジ体で完全糖鎖修飾体に成熟し、細胞膜へ移行することが分かっている (17-19) 。また、SERT の膜発現には、SERT が正常に糖鎖修飾されることが不可欠であることも明らかになっている (16) 。

さらに以前の研究で、SERT の C 末端の、膜輸送と糖鎖修飾における役割を明らかにする目的で、SERT の C 末端欠損変異体 (SERT Δ CT) を作成し、その特性が検討された。その特徴として、SERT Δ CT の 5-HT 取り込み能力は、野生型 SERT に比べ顕著に減少した (20-22) 。また、タンパク質発現を western blotting (WB) 解析で確認すると、野生型 SERT では完全糖鎖修飾体と不完全糖鎖修飾体の複数のバンドが確認される。一方で、SERT Δ CT では、完全糖鎖修飾体が減少し、不完全糖鎖修飾体が増加した (図 1A) 。さらに、野生型 SERT は主に細胞膜や ER に存在するが、SERT Δ CT は細胞膜にほとんど存在せず、ER に停留して凝集し (図 1B) 、小胞体(ER)ストレスを惹起すると考えられた。

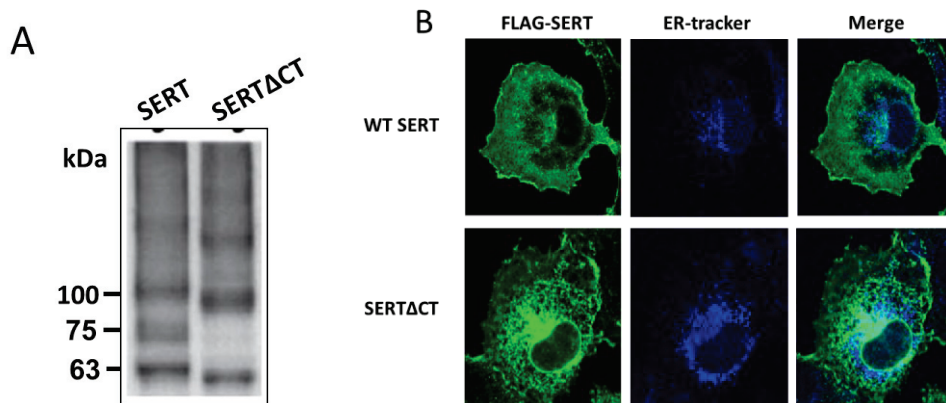


図 1 : SERT および SERT Δ CT の特徴

A : FLAG タグで標識した SERT では約 75kDa の完全糖鎖修飾体のバンドと約 63kDa と 100kDa の不完全糖鎖修飾体のバンドが確認される。SERT Δ CT では完全糖鎖修飾体が減少し、不完全糖鎖修飾体が増加する。

B : SERT の局在を免疫蛍光染色で観察すると、野生型 SERT は主に細胞膜や小胞体に存在するが、SERT Δ CT では小胞体に停留する。

緑 : FLAG-SERT 青 : ER-tracker

そこで、ER ストレスが SERT の膜輸送と機能に及ぼす影響が検討された (22)。プロテアソーム阻害薬である ALLN で ER ストレスを惹起したところ、SERT の取り込み活性が減少し、SERT は ER に停留した (22)。SERT Δ CT で、ER からゴルジ体への膜輸送が阻害され、SERT タンパク質が ER に停留するのと同様に、プロテアソーム阻害薬で ER ストレス状況下を作ると膜輸送障害が起こり、SERT が ER に停留した。したがってこの状況は、SERT Δ CT が ER ストレス状況下の SERT を模倣していると考えられた (図 2)。

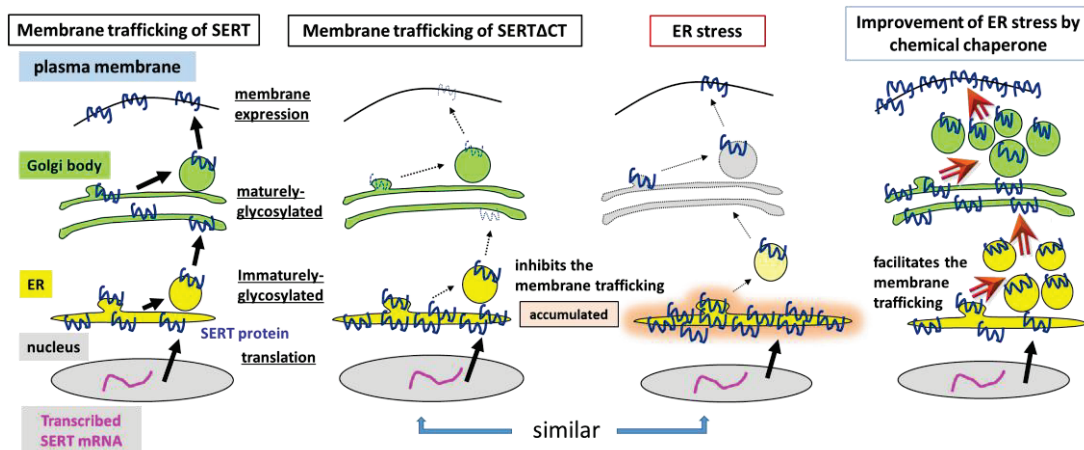


図 2 : SERT および SERT Δ CT 膜輸送の模式図

SERT Δ CT では小胞体からゴルジ体への膜輸送が阻害され、SERT タンパク質が小胞体に滞留する。また、プロテアソーム阻害薬で ER ストレス状況下を作ると、膜輸送障害が起こり、SERT が小胞体に滞留する。この状況は SERT Δ CT の膜輸送を模倣していると考えられる。従って、SERT、SERT Δ CT の膜輸送を促進する薬物は ER ストレスを緩和する可能性がある。

そこで、SERT および SERT Δ CT の膜輸送を促進する薬剤を検索することは、ER ストレスの改善につながると考え、そのような薬物を検索した。そこで注目したのが、シグマ受容体アゴニストの SKF-10047 である。シグマ受容体には、シグマ 1 受容体 (Sigma-1R) とシグマ 2 受容体 (Sigma-2R) の 2 つのサブタイプがある (23)。シグマ 1 受容体は小胞体に発現するタンパク質で、様々な機能を持つことが知られている (23,24)。最近の研究ではシグマ 1 受容体が神経保護活性を持ち、分子シャペロンとして働くことがわかっている (25-27)。そこで、SKF-10047 の効果を検討した。SKF-10047 を野生型 SERT および SERT Δ CT に処置すると、濃度依存的に 5-HT 取り込み活性が上昇した (28)。さらに、シグマ 1 受容体ノックダウン細胞においても、SKF-10047 は SERT Δ CT の 5-HT 取り込み活性を上昇させた (28) (図 3)。したが

って、SKF-10047 は、シグマ 1 受容体を介さないメカニズムにより SERT の機能に影響することが示唆された。

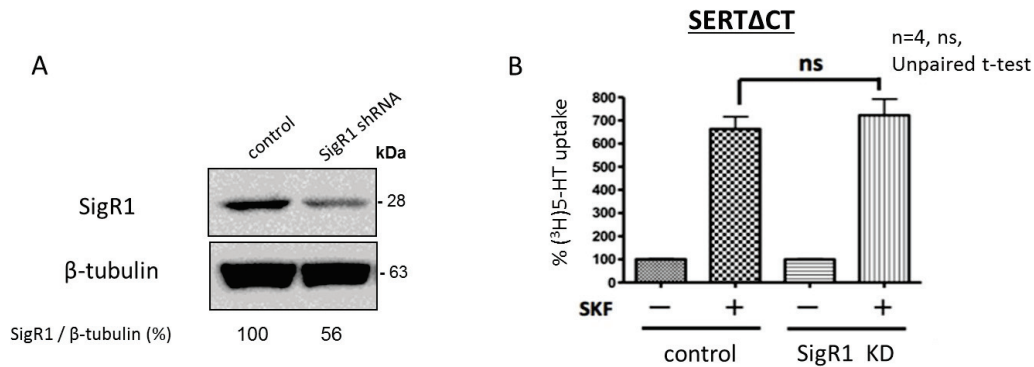


図 3 : SigR1 ノックダウン細胞における SERT ΔCT の取り込み活性に対する SKF-10047 の効果

A : ウェスタンブロット解析による shRNA によるシグマ 1 受容体ノックダウンの確認。

B : コントロール細胞とシグマ 1 受容体ノックダウン細胞における SERT ΔCT の取り込み活性を比較した。いずれの細胞においても SKF-10047 は取り込み活性を上昇させた。

次に、SKF-10047 の 24 時間投与で変動する遺伝子を cDNA アレイで検索したところ、膜輸送に重要な働きを持つ SNARE タンパク質の一つである Syntaxin 3 (STX3) が同定された (28)。さらに、STX3 のタンパク質発現に対する SKF-10047 の効果を調べると、SKF-10047 は STX3 の発現を上昇させることが確認された (28)。

Syntaxin とは、細胞内小胞輸送において膜融合をつかさどるタンパク質ファミリーおよびそのメンバーである (29)。さらに Syntaxin ファミリーは、SNARE (soluble “N”-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment protein receptor) と称される膜融合関連タンパク質スーパーファミリーの一員でもある。SNARE は、輸送小胞に局在する v (vesicular)-SNARE と、標的膜に存在し、v-SNARE の受容体となる t (target-membrane)-SNARE の 2 種類

に大別される (30)。Syntaxin はその局在から、t-SNARE に属する (31)。Syntaxin ファミリーは、ヒトでは少なくとも 16 種類のアイソフォームが存在する (32)。その中で、STX3 は脾臓や肺、腎臓などの広範な器官の細胞膜に分布しており (33)、多種多様な極性上皮細胞の頂端細胞膜に局在し (34-39)、膜タンパク質の輸送に関連する。しかし、SERT との機能連関は不明である。

これらの背景に基づいて、本研究では、STX3 が SERT 機能に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

1. 細胞培養

- COS-7 細胞：サルの腎臓由来である COS-7 細胞は理化学研究所 (RIKEN BRC) より入手した。この細胞を D-MEM 混合培地にて、37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養した。これらの培地には 10%非動化 FBS 及びペニシリン (100 units/ml) とストレプトマイシン (100 µg/ml) を添加した。
- AD293 細胞：ヒト胎児の腎臓由来の HEK293 細胞の亜種である AD293 細胞は Agilent 社より入手した。この細胞を、D-MEM 混合培地にて、37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養した。これらの培地には 10%非動化 FBS 及びペニシリン (100 units/ml) とストレプトマイシン (100 µg/ml) を添加した。
- Caco-2 細胞：ヒト結腸癌由来である Caco-2 細胞は広島大学医系科学研究科分子病理学教室より入手した。この細胞を MEM α 混合培地にて、37 °C, 5% CO₂ インキュベーターで培養した。これらの培地には 10%非動化 FBS 及びペニシリン (100 units/ml) とストレプトマイシン (100 µg/ml) を添加した。
- FLAG-SERT HEK 細胞：ヒト胎児の腎臓由来の HEK293 細胞に FLAG-SERT を遺伝子導入し、FLAG-SERT 安定発現細胞を作製した (40)。D-MEM 混合培地にて、37°C, 5%CO₂ インキュベーターで培養した。これらの培地には 10%非動化 FBS 及びペニシリン (100 units/ml) とストレプトマイシン (100 µg/ml) に加え、G-418 Sulfate Solution (Fuji Film 社) を 250 µg/ml 添加した。

2. 材料

- フルボキサミン (Tocris Bioscience 社) : 蒸留水で溶解し 10 mM にして使用

した。

- FLAG-SERT cDNA : FLAG-SERT in pTB701 (41)
- Myc-DDK-STX3 cDNA : Myc-DDK-STX3 in pCMV6-Entry (OriGene 社から購入)
- Mock vector : pcDNA3 (Invitrogen 社から購入)
- HA-SERT cDNA : HA-SERT in pTB701 (22)
- [³H]5-HT (1676 GBq/mmol) : Perkin Elmer 社
- NucRed Live 647 ReadyProbes Reagent (Thermo Fisher Scientific 社)
- Neurotransmitter Transporter Activity Assay Reagent : Molecular Devices 社 (42) 一つのバイアルを KRH バッファー10 ml に溶解して使用した。

- KRH バッファー

NaCl : 7.012 g, 1M KCl 溶液 : 4.7 ml, 1 M CaCl₂ 溶液 : 2.2 ml,
1 M KH₂PO₄ : 1.2 ml, 1 M MgSO₄ : 1.2 ml, HEPES : 5.958 g,
グルコース : 1.80 g を蒸留水 1000 ml に溶解し、pH 7.4 になるよう調整した。

- RIPA バッファー

Tris-HCl : 5 ml, デオキシコール酸ナトリウム : 0.5 g, SDS : 0.5 g
NaCl : 4.383 g, EDTA : 1 ml, NP-40 : 5 ml を蒸留水で 500 ml に溶解し、
pH 7.4 になるよう調整した。

- Protein Assay Bicinchoninate kit (ナカライテスク社) : 96 well plate、1well
あたり 250 μl の PAB 液を以下の割合で調整し、使用した。

PAB kit Solution A : PAB kit Solution B = 50 : 1

- 9%ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル

以下の組成で作製した。

	Lower gel / 2 枚	Upper gel / 2 枚
Lower gel buffer	4 ml	—
Upper gel buffer	—	1.25 ml
30%アクリルアミド溶液	2.4 ml	0.75 ml
H ₂ O	3.6 ml	3 ml
10%APS	60 μ l	5 μ l
TEMED	40 μ l	20 μ l

• Lower gel buffer … Tris : 90.8 g, SDS : 2 g を蒸留水 500 ml に溶解し、pH 8.8 に調製した。

• Upper gel buffer … Tris : 15.1 g, SDS : 1 g を蒸留水 250 ml に溶解し、pH 6.8 に調製した。

• 30%アクリルアミド溶液 … アクリルアミド (モノマー) : 30 g, Bis acrylamide : 0.8 g を蒸留水 100 ml に溶解した。

● ゲルの作製方法は以下の通り。

70%エタノールで付着物を除去したガラス板とガスケット (ATTO 社) を合わせ、ガラス板の両端をクリップで挟み、Lower gel を底から約 7 cm の高さまで流し込み、その上に 100%エタノールを適量加え、約 15 分静置した。

エタノールを除去し、Upper gel をその上に流し込み、コームを挿入した後、約 30 分静置した。

● Running buffer … Tris : 18 g, Glycine : 84 g, SDS : 3 g を蒸留水で 3 L に溶解した。

● PBS-T … 10% Triton-X : 15 ml, 0.2 M PB : 250 ml, NaCl : 45 g を蒸留水で 5 L に溶解した。

- 各抗体の購入先は以下の通り
 - ・抗 DYKDDDDK (FLAG) tag, Monoclonal 抗体 : Wako 社
 - ・HA-Tag Mouse Monoclonal 抗体, Villin Mouse Monoclonal 抗体, GAPDH Polyclonal 抗体 : Proteintech 社
 - ・抗 STX3 抗体 : Alomone Labs 社
 - ・Myc-Tag Mouse mAb 抗体, Myc-Tag Rabbit mAb 抗体 : Cell Signaling Technology 社
 - ・抗 GM130 pAb 抗体 : MBL ライフサイエンス社
 - ・抗 SERT N 末端血清抗体 神戸大学バイオシグナル総合研究センターから譲渡 (43)
 - ・Alexa488 標識抗マウス/ウサギ IgG 抗体 : Molecular Probe 社
 - ・Alexa568 標識抗マウス/ウサギ IgG 抗体 : Molecular Probe 社
 - ・ β -tubulin 抗体 : Sigma 社
 - ・HRP 標識抗 Mouse/Rabbit IgG 抗体 : Jackson Lab 社
 - ・Phalloidin-TRITC : Sigma 社
- Control siRNA : Ambion 社
- STX3 siRNA : life technologies 社

100 μ l で溶解し、100 pmol/ μ l にして使用した。 配列は以下の通り。

#1 5'-CCAAGCAGCUGACACAGGAUGAUGA-3'

5'-UCAUCAUCCUGUGUCAGCUGCUUGG-3'

#2 5'-CCAACAACGUCCGGAACAAACUGAA-3'

5'-UUCAGUUUGUUCGGACGUUGUUGG-3'

#3 5'-GGUGGAGAAUCAGGGUGAGAUGUUA-3'

5'-UAACAUCUCACCCUGAUUCUCCACC-3'

3. 細胞への遺伝子導入

3-1. COS-7 細胞および AD293 細胞への遺伝子導入

10 cm シャーレに confluent な COS-7 または AD293 細胞を用意した。PBS 2 ml で洗浄した後、0.25%Trypsin-EDTA 1 ml を添加した。37°Cで1分間インキュベートした後、浮遊した細胞を PBS 5 ml で 15 ml tube に回収した。15 ml tube を 1000 rpm で遠心 (KN-70、Kubota 社) し、上清を除去した。沈殿した細胞を 2 ml の Opti-MEM 培地 (Life Technologies 社) に懸濁し、およそ 10 μ l を用いてセルカウンター (TC20™ Automated Cell Counter : BIO-RAD 社) にて細胞数を測定した。2.0 \times 10⁶の細胞に、目的のプラスミド 10 μ g と Opti-MEM 培地 100 μ l をエッペンチューブで懸濁混和し、キュベットに分注した。その後すぐに

	電圧(V)	パルス幅(ms)	パルス間隔(ms)	回数	減衰率(%)
COS-7	125	2.5	50	2	10
AD293	175	2.5	50	2	10

の条件で NEPA21 (NEPA GENE 社) にて電気穿孔を行い、各種ディッシュに播種した。

3-2. FLAG-SERT HEK 細胞への遺伝子導入

3-1 のように、細胞の回収および細胞数測定を行った。2.0 \times 10⁶の細胞に、目的のプラスミド 10 μ g もしくは siRNA 1 μ l と Opti-MEM 培地 100 μ l をエッペンチューブで懸濁混和し、キュベットに分注した。その後すぐに 3-1 の AD293 の条件で NEPA21 (NEPA GENE 社) にて電気穿孔を行い、各種ディッシュに播種した。

3-3. COS-7 細胞および AD293 細胞への FLAG-SERT cDNA と Myc-DDK-STX3 の遺伝子導入

3-1 のように、細胞の回収および細胞数測定を行った。 2.0×10^6 の細胞に、プラスミド (FLAG-SERT 7 μg + Myc-DDK-STX3 3 μg) と Opti-MEM 培地 100 μl をエッペンチューブで懸濁混和し、キュベットに分注した。その後すぐに 3-1 と同様の条件で NEPA21 (NEPA GENE 社) にて電気穿孔を行い、各種ディッシュに播種した。

3-4. COS-7 細胞および AD293 細胞への FLAG-SERT cDNA と STX3 siRNA の遺伝子導入

3-1 のように、細胞の回収および細胞数測定を行った。 2.0×10^6 の細胞に、FLAG-SERT cDNA 10 μg と STX3 siRNA 1 μl および Opti-MEM 培地 100 μl をエッペンチューブで懸濁混和し、キュベットに分注した。その後すぐに 3-1 と同様の条件で NEPA21 (NEPA GENE 社) にて電気穿孔を行い、各種ディッシュに播種した。

3-5. Caco2 細胞への STX3 siRNA の遺伝子導入

フラスコに confluent な細胞を用意した。PBS 6 ml で洗浄した後、0.25% Trypsin-EDTA 4 ml を添加した。37°C で 1 分間インキュベートした後、浮遊した細胞を PBS 20 ml で 50 ml tube に回収した。50 ml tube を 1000 rpm で遠心し、上清を除去した。沈殿した細胞を 4 ml の Opti-MEM 培地に懸濁し、およそ 10 μl を用いてセルカウンターにて細胞数を測定した。 2.0×10^6 の細胞に、siRNA 1 μl と Opti-MEM 培地 99 μl をエッペンチューブで懸濁混和し、キ

ュベットに分注した。その後すぐに

	電圧(V)	パルス幅(ms)	パルス間(ms)	回数	減衰率(%)
Caco-2	150	5	50	2	10

の条件で NEPA21 (NEPA GENE 社) にて電気穿孔を行い、各種ディッシュに播種した。

使用した si RNA は **3-4** と同様。

4. SERT のセロトニン (5-HT) 取り込み活性の測定

4-1. 蛍光基質 SERT による 5-HT 取り込み活性の測定

COS-7 細胞または AD293 細胞に FLAG-SERT および Myc-DDK-STX3 または STX3 siRNA を電気穿孔法で遺伝子導入し、96 well plate に適量まいて 37°C で 48 時間培養した。培地を吸引し、NucRed™ Live 647 ReadyProbes™ Reagent (2 drops / 培地 1 ml) を加え、30 分インキュベートし、核染色した。その後培地を吸引し、KRH buffer 100 μ l で洗浄し、再度 KRH buffer 100 μ l を加えた。SSRI を処置する well には fluvoxamine 10 μ M を含む KRH buffer 100 μ l を加えた。蛍光基質 SERT (Neurotransmitter Transporter Activity Assay Reagent) を 100 μ l 加え、Opera Phenix™ ハイスループット・ハイコンテントイメージングシステム (PerkinElmer 社) で解析した。蛍光基質の添加から 45 分後の 1 細胞あたりの蛍光強度を SERT 取り込み活性として計測した (28)。

4-2. [³H]5-HT 取り込み量の測定

Caco-2 細胞に STX3 siRNA を電気穿孔法で遺伝子導入し、24 well plate に適量まいて 37°C で 48 時間培養した。

24 well plate の各 well の培地を吸引し、KRH buffer 200 μ l で洗浄した。各 well に RI 含有 buffer を 200 μ l 加え、37°C で 15 分間インキュベートした。非

特異的な取り込み活性を見るために数 well には非特異的セロトニン取り込み測定用 RI buffer を加えた。

[SERT 活性測定用 RI 含有 buffer]

- 100 mM L-ascorbic acid/100 mM pargyline mix 6 μ l
- [³H]5-HT Final 100 nM
- KRH buffer 6 ml

[非特異的セロトニン取り込み測定用 RI buffer]

- 20 mM フルボキサミン 2 μ l(Final 20 μ M)
- 前述の SERT 活性測定用 RI buffer 2 ml

インキュベート後、Wash buffer (KRH+フルボキサミン final 10 μ M) 200 μ l で 1 回または 2 回洗浄した。Wash buffer を吸引後 RIPA buffer を 750 μ l 加え、37°C で数分インキュベートした。その後、ピペッティングにて細胞を RIPA buffer に溶解させた。シンチレーションカウンター用のチューブにシンチレーション液 (クリアゾル、ナカライテスク社) 4 ml を入れておき、そこに RIPA buffer で細胞を溶解した液を 500 μ l 入れた。そして、シンチレーションカウンター (日立社) で RI 活性を測定した。

4-3. タンパク定量

Protein Assay Bicinchoninate kit を用いて行った。取り込み量を測定した各 well の細胞溶解液を 96 well plate に 25 μ l/well で移し入れた。また、スタンダードとして BSA を用いた。各 well に PAB 液を 250 μ l ずつ加え、37°C で 30 分

インキュベーションした後、マイクロプレートリーダーで吸光度測定を行った。

4-4. [³H]5-HT 取り込み活性の計算

4-2 で測定した RI 活性を [³H]5-HT 取り込み量とした。 [³H]5-HT 取り込み量を、4-3 で測定したタンパク濃度に基づいて求めた各サンプルのタンパク量で割り、単位タンパク質量あたりの [³H]5-HT 取り込み量を計算した。

5. SDS-PAGE および Western blotting

5-1. サンプル調整

目的の遺伝子を発現させた COS-7 細胞、AD293 細胞、FLAG-SERT HEK 細胞を、それぞれ 10 cm シャーレ confluent 1 枚分用意した。培地を吸引し、PBS 2 ml で洗浄した後、PBS 1 ml で細胞をスクレーピングし、1.5 ml のエッペンチューブに回収した。3000 rpm、4°C で 5 分遠心 (MX-150 TOMY 社) し、上清を除去した。沈殿を適量の RIPA buffer に懸濁し、ソニケーションを行って細胞を破碎し、溶出させた。そのサンプルを蒸留水で 10 倍希釈し、96 well plate に 5 µl/well で移し入れた。その後は 4-3 と同様にタンパク定量を行った。タンパク定量の結果から算出した必要量のサンプルを 5×loading buffer と混和した後、95°C、3 分間の加熱し、western blotting のサンプルとした。

● 5×loading buffer … SDS: 1.25 g (10%), 100% glycerol : 6.25 ml (50%), 0.5 M Tris-HCl : 7.81 ml (0.3125 M) を MilliQ 12.5 ml に溶解し、pH 6.8 に調整した。さらに少量の Bromophenol Blue を加え、青い色をつけた。使用時は、94 : 6 の割合で 2-メルカプトエタノールを加えた。

5-2. SDS-PAGE

作成した 9%ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルからコームを外し、Running buffer を適当量入れた電気泳動槽に据え付け、さらに上槽に Running buffer を加えた。その後、well を整え調製したサンプルを well に流し入れた。300 V、25 mA/ゲル板 1 枚に設定し、60 分間泳動した。

5-3. Western Blotting

PVDF 膜を 100%メタノールで 30 秒間浸漬した後、EZ fast blot 液を 10 倍希釈したものに 60 分間振盪させながら浸した。転写装置に EZ fast blot 10 倍希釈液で十分湿らせた濾紙 3 枚、PVDF 膜、ゲル、濾紙 3 枚を、この順で据え置き、空気を抜いて固定した。次いで、300 V、120 mA /ゲル 1 枚、30 分で、アクリルアミドゲル内で分離されたタンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後、PVDF 膜をタッパーに入れ、5%スキムミルク入り PBS-T で満たした後、30~60 分間室温で振盪し、ブロッキングした。その後、PBS-T で 3 回洗浄し、1 次抗体液をタッパーに加え、4°Cで一晩振盪させた。

1 次抗体液は以下の通り。

- ・抗 FLAG 抗体 (抗 DYKDDDDK 抗体) : CanGetSignal Solution1 (TOYOBO 社) で 1 : 1000 に希釈した。

- ・抗 STX3 抗体 : CanGetSignal Solution1 (TOYOBO 社) で 1 : 500 に希釈した。

翌日に 1 次抗体液を除去し、PBS-T で洗浄した後、2 次抗体液をタッパーに加え、60 分間室温で振盪した。

2 次抗体液は以下の通り。

- ・HRP 標識抗 Mouse IgG 抗体 : CanGetSignal Solution2 (TOYOBO 社) で 1 :

10000 に希釈した。

・HRP 標識抗 Rabbit IgG 抗体 : CanGetSignal Solution2 (TOYOBO 社) で 1 : 10000 に希釈した。

2 次抗体液を除去し、PBS-T で洗浄した後、PVDF 膜を Chemi-Lumi One L (ナカライテスク社) の 2 つの溶液を 500 ml ずつ混和した溶液に浸し、ECL 反応を行った。ただちに、AE-9300H Ez-Capture MG (ATTO 社) を用いて画像を取り込み、画像解析ソフト Multi Gauge (Fuji Film 社) で解析した。

6. 免疫蛍光染色

6-1. 細胞の固定とブロッキング

ガラスボトムディッシュに播種し、適宜培養を行ったサンプルの培地を吸引し、PBS 1 ml で洗浄し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) 含有 PBS を 1 ml 加え、室温で 30 分インキュベートして固定した。

その後、PBS 1 ml で洗浄し、細胞内への抗体の透過性を上げるために 0.3%Triton 5%NGS 入り PBS を 500 μ l 加えて 15 分振盪した (ブロッキング)。

6-2. COS-7 細胞における抗 HA 抗体と抗 Myc 抗体を用いた蛍光染色

COS-7 細胞に HA-SERT および Myc-DDK-STX3 を電気穿孔法によって共遺伝子導入した後、ガラスボトムディッシュに播き、48 時間インキュベートした。

6-1 のように固定とブロッキングを行い、1 次抗体液 (抗体液 : HA-Tag Mouse Monoclonal 抗体 (1:500 希釈) + 1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1ml で洗浄した後、2 次抗体液 (抗体液:Alexa488 標識抗 mouse IgG 抗体 (1:500 希釈) + 1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

次に、1 次抗体液（抗体液：Myc -Tag Rabbit mAb 抗体（1:200 希釈））+ 1%NGS in PBS-T）を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した後、2 次抗体液（抗体液：Alexa568 標識抗 rabbit IgG 抗体（1:500 希釈）+1%NGS in PBS-T）を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

ガラスボトムディッシュに PBS-T 1 ml を加えた状態で共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

6-3. 抗 KDEL 抗体による小胞体の免疫蛍光染色

COS-7 細胞に HA-SERT および Myc-DDK-STX3 を電気穿孔法によって共遺伝子導入した後、ガラスボトムディッシュに播き、48 時間インキュベートした。

6-1 のように固定とブロッキングを行い、1 次抗体液（抗体液：KDEL mouse 抗体（1:100 希釈）+1%NGS in PBS-T）を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した後、2 次抗体液（抗体液：Alexa488 標識抗 mouse IgG 抗体（1:500 希釈）+1%NGS in PBS-T）を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

次に、以下のいずれかの 1 次抗体液を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。

- ・抗 HA 抗体…rabbit poly 抗 HA 抗体（1：200 希釈）+1%NGS in PBS-T
 - ・抗 Myc 抗体…Myc-Tag Rabbit mAb 抗体（1:200 希釈）+1%NGS in PBS-T
- 抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した後、2 次抗体液（抗体液：Alexa568 標識抗 rabbit IgG 抗体（1:500 希釈）+1%NGS in PBS-T）を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

ガラスボトムディッシュに PBS-T 1 ml を加えた状態で共焦点レーザー顕微

鏡にて細胞を観察した。

6-4. 抗 GM130 抗体によるゴルジ体の免疫蛍光染色

COS-7 細胞に HA-SERT および Myc-DDK-STX3 を電気穿孔法によって共遺伝子導入した後、ガラスボトムディッシュに播き、48 時間インキュベートした。

6-1 のように固定とブロッキングを行い、抗 GM130 抗体液（抗体液：Anti-GM130 pAb (rabbit) 抗体(1:500 希釈)+1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した後、2 次抗体液（抗体液:Alexa488 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:500 希釈) +1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

次に、以下のいずれかの 1 次抗体液を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。

- ・抗 HA 抗体…HA-Tag Mouse Monoclonal 抗体 (1 : 500 希釈) +1%NGS in PBS-T

- ・抗 Myc 抗体…Myc-Tag Mouse Monoclonal 抗体 (1:500 希釈)+1%NGS in PBS-T

抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した後、2 次抗体液(抗体液：Alexa568 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:500 希釈) +1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

ガラスボトムディッシュに PBS-T 1 ml を加えた状態で共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

6-5. Caco-2 細胞における内在性 SERT および STX3 の免疫蛍光染色

ガラスボトムディッシュに適量播種し、48 時間培養した Caco-2 細胞に 6-1 のように固定とブロッキングを行い、以下のいずれかの 1 次抗体液を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。

- ・ SERT-N 末端血清抗体…抗 SERT-N 末 rabbit 抗体 (1 : 200 希釈) + 1%NGS in PBS-T

- ・ 抗 STX3 抗体… 抗 STX3 (rabbit) 抗体(1 : 100 希釈) + 1%NGS in PBS-T

抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した後、2 次抗体液 (抗体液 : Alexa488 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1:500 希釈) + 1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

ガラスボトムディッシュに PBS-T 1 ml を加えた状態で共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

6-5. Caco-2 細胞における抗 Villin 抗体による微絨毛の免疫蛍光染色

6-4 のサンプルに 1 次抗体液 (Villin Mouse Monoclonal 抗体 (1 : 50 希釈) + 1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。

抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した後、2 次抗体液 (抗体液 : Alexa568 標識抗 mouse IgG 抗体 (1:500 希釈) + 1%NGS in PBS-T) を 200 ml/dish 加え、1 時間以上振盪した。抗体液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

ガラスボトムディッシュに PBS-T 1 ml を加えた状態で共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

6-6. Caco-2 細胞におけるファロイジンによるアクチンの免疫蛍光染色

6-4 のサンプルに、Phalloidin-TRITC (1 : 1000 希釈) を 200 ml/dish 加え、

30 分間振盪した。Phalloidin 液を除去し、PBS-T 1 ml で洗浄した。

ガラスボトムディッシュに PBS-T 1 ml を加えた状態で共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

6-7. 共焦点レーザー顕微鏡を使った細胞の観察

Alexa488 の蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510, Carl Zeiss 社) を用い、488 nm argon レーザーで励起させ、505-535 nm band pass barrier filter を用いて観察した。Alexa546 蛍光は 543 nm ヘリウムネオンレーザーで励起し、560 nm long pass filter を用いて検出した。

7. Caco-2 細胞・COS-7 細胞・AD293 細胞の SERT mRNA 発現の検討

Caco-2 細胞、COS-7 細胞、AD293 細胞を、メルカプトエタノールと RLT buffer の混合液で回収し、シュレッダーカラムへ移した。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて mRNA 抽出と cDNA 合成を行った。各細胞株の SERT mRNA 発現は、ABI Prism model 7500 sequence detection system (Applied Biosystems 社) を用いて Real-time PCR 法にて解析した。GAPDH を内標として Δ Ct 値を測定し、相対発現量を評価した。Real-time PCR 法に用いた各プライマーは、Sigma 社から入手した。各プライマーの配列を以下に列挙する。

hSERT sense1 : 5'- CATCTGGAAAGGCGTCAAG -3'

hSERT antisense1 : 5'- CGAAACGAAGCTCGTCATG -3'

human GAPDH f : 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'

human GAPDH r : 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

結 果

1. 野生型 SERT に対する STX3 過剰発現の影響

STX3 が SERT の機能に及ぼす影響を明らかにするために、まず野生型 SERT に対する STX3 過剰発現の影響を調べた。

1-1. SERT の 5-HT 取り込み活性に対する STX3 過剰発現の影響

FLAG-SERT と Myc-DDK-STX3 cDNA を、電気穿孔法を用いて AD293 細胞および COS-7 細胞に遺伝子導入した。その 48 時間後にこれらの細胞 1 個当たりの蛍光 SERT 基質の取り込み量の平均を取り込み活性として測定した。その結果、AD293 細胞、COS-7 細胞では、STX3 を過剰発現すると、図 4 に示すように、SERT 取り込み活性が減少した。

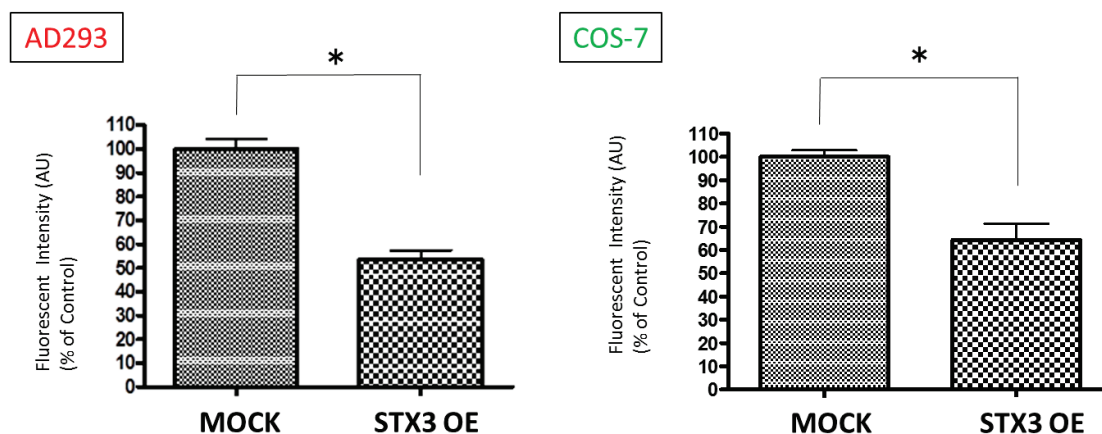


図 4 : SERT の 5-HT 取り込み活性に対する STX3 過剰発現の影響

FLAG-SERT と MOCK(pcDNA3)、FLAG-SERT と Myc-DDK-STX3 を遺伝子導入した AD293 細胞および COS-7 細胞において、SERT の 5-HT 取り込み活性を比較した。STX3 過剰発現細胞(STX3 OE)では取り込み活性が減少した。

AD293 cells : n=9, 3 experiments, *P<0.0001 t-test

COS-7 cells : n=12, 4 experiments, *P<0.0001 t-test

1-2. SERT のタンパク質発現および糖鎖修飾に対する STX3 過剰発現の影響

次に、FLAG-SERT と Myc-DDK-STX3 cDNA を、電気穿孔法を用いて AD293 細胞および COS-7 細胞に遺伝子導入した。また、FLAG-SERT HEK 細胞には Myc-DDK-STX3 cDNA を電気穿孔法にて遺伝子導入した。遺伝子導入 48 時間後に回収したサンプルのウェスタンブロッティングによるタンパク質発現の検討では、STX3 の過剰発現により、SERT タンパク質の完全糖鎖修飾体が減少する傾向があった(図 5A)。そこで、完全糖鎖修飾体の発現量を定量化したが、有意差は認められなかった(図 5B)。

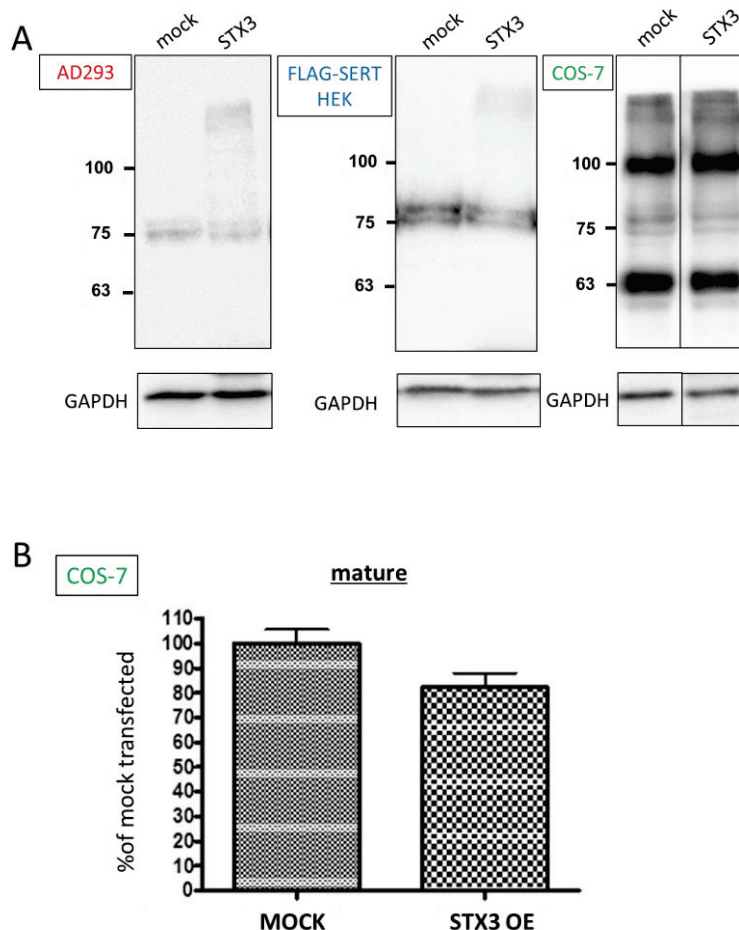


図 5 : SERT のタンパク質発現および糖鎖修飾に対する STX3 過剰発現の影響

A : FLAG 抗体による SERT のウェスタンブロット解析結果を示す。

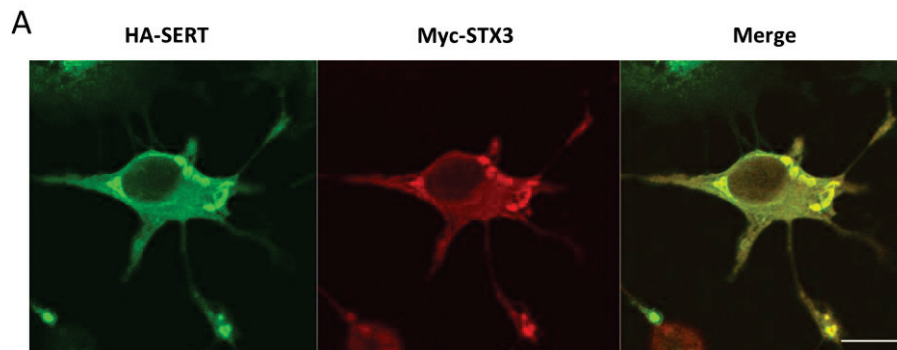
STX3 を過剰発現させると、完全糖鎖修飾体のバンドの濃さが減少傾向にあった。

MOCK : pcDNA3 発現細胞、STX3 : Myc-DDK-STX3 発現細胞

B : COS-7 細胞における SERT 完全糖鎖修飾体のバンドの定量化の結果を示す。
STX3 を過剰発現させると、完全糖鎖修飾体の減少傾向がみられたが、有意差は認められなかった。n=5, ns

1-3. COS-7 細胞における SERT と STX3 の局在

Myc-DDK-STX3 と HA-SERT を COS-7 細胞に発現させて免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、HA-SERT、Myc-DDK-STX3 は、図 6A のように細胞内小器官に凝集して共局在する様子が確認された。そこで、共局在する細胞内小器官を特定するために、KDEL 抗体で小胞体を標識し、SERT および STX3 との局在を観察したところ、いずれも小胞体との共局在が確認された (図 6B)。さらに、GM130 抗体でゴルジ体を標識し、SERT および STX3 との局在を観察したところ、いずれもゴルジ体との共局在が確認された (図 6C)。



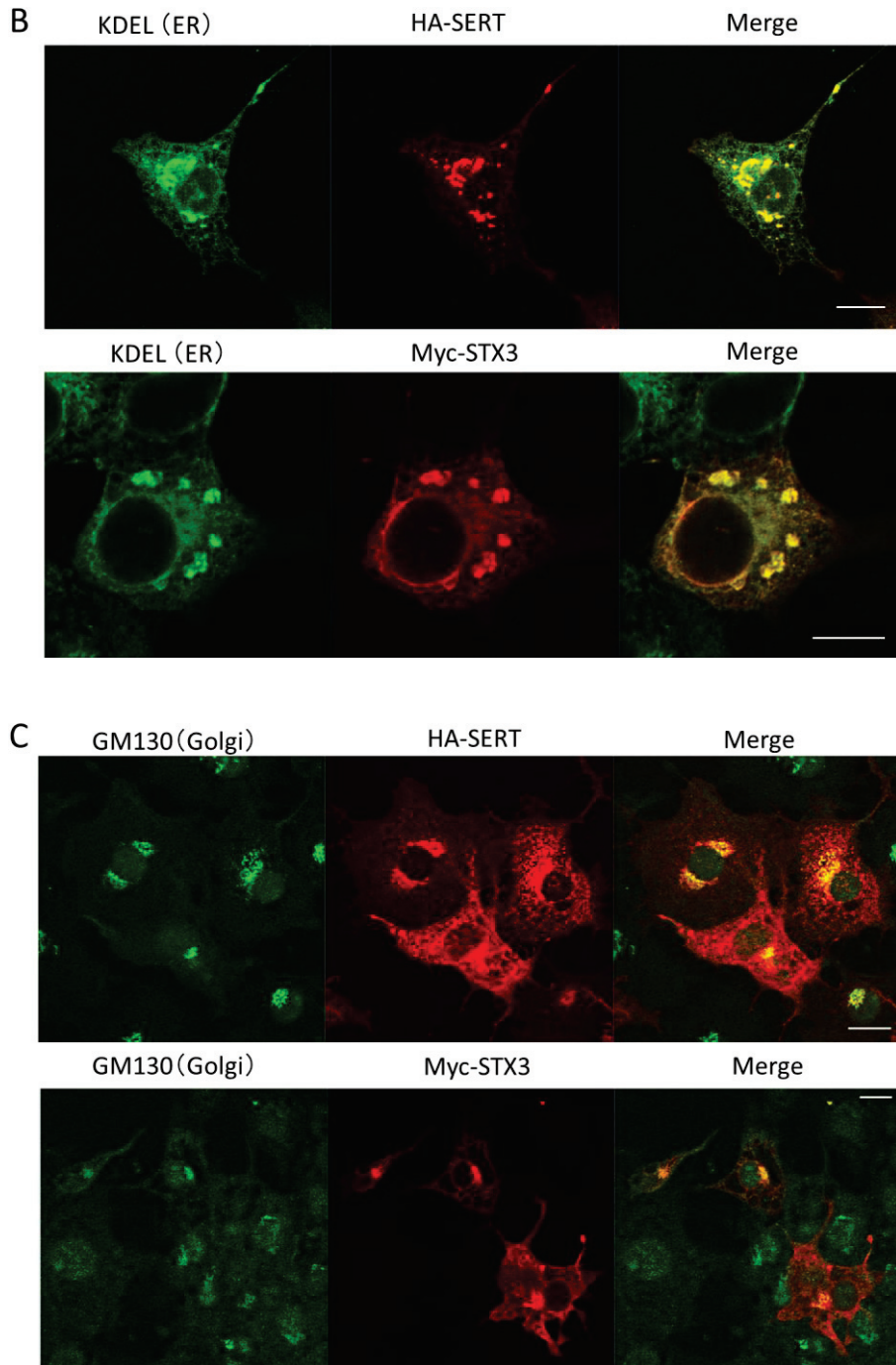


図 6 : COS-7 細胞における SERT と STX3 の局在

A : HA-SERT および Myc-DDK-STX3 を遺伝子導入した COS-7 細胞における SERT と STX3 の局在を示す。

緑 : HA-SERT 赤 : Myc-STX3 bar : 10 μ m

B : KDEL 抗体で小胞体を標識し、SERT および STX3 との局在を比較した結果を示す。

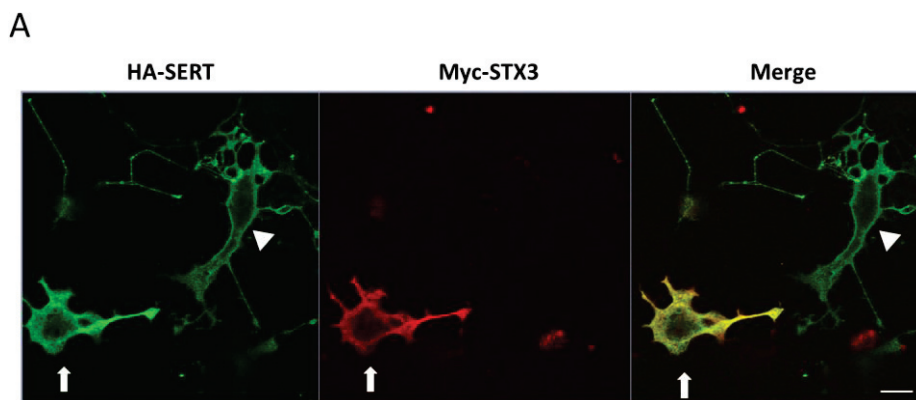
緑：KDEL 赤：上段…HA-SERT 下段…Myc-STX3 bar：10 μ m

C：GM130 抗体でゴルジ体を標識し、SERT および STX3 との局在を比較した結果を示す。緑：GM130 赤：上段…HA-SERT 下段…Myc-STX3 bar：10 μ m

1-4. SERT の膜発現に対する STX3 過剰発現の影響

HA-SERT と Myc-DDK-STX3 を遺伝子導入した COS-7 細胞を観察すると、STX3 発現細胞と非発現細胞の存在が確認された。それらの細胞の SERT の発現を観察してみると、図 7A のように、STX3 発現細胞では SERT が細胞全体に発現しているが、STX3 非発現細胞では SERT が細胞膜に発現している傾向があった。そこで、STX3 は SERT を細胞内に留める効果があると推測した。したがって、その推測を確かめるために、STX3 発現細胞と非発現細胞における SERT の細胞膜発現をラインプロファイル解析によって、比較検討した（図 7B）。その結果、STX3 非発現細胞では、SERT の蛍光強度が細胞膜において非常に高いことがわかり、STX3 発現細胞では蛍光強度が均一に広がっていることがわかった（図 7C）。この結果を定量化すると、STX3 が過剰発現している細胞では SERT の膜発現が抑制されていることが明らかになった（図 7D）。

これらの結果から、過剰発現された STX3 は SERT をゴルジ体や小胞体に留め、凝集し、細胞膜発現を抑制する可能性があることが示唆された。



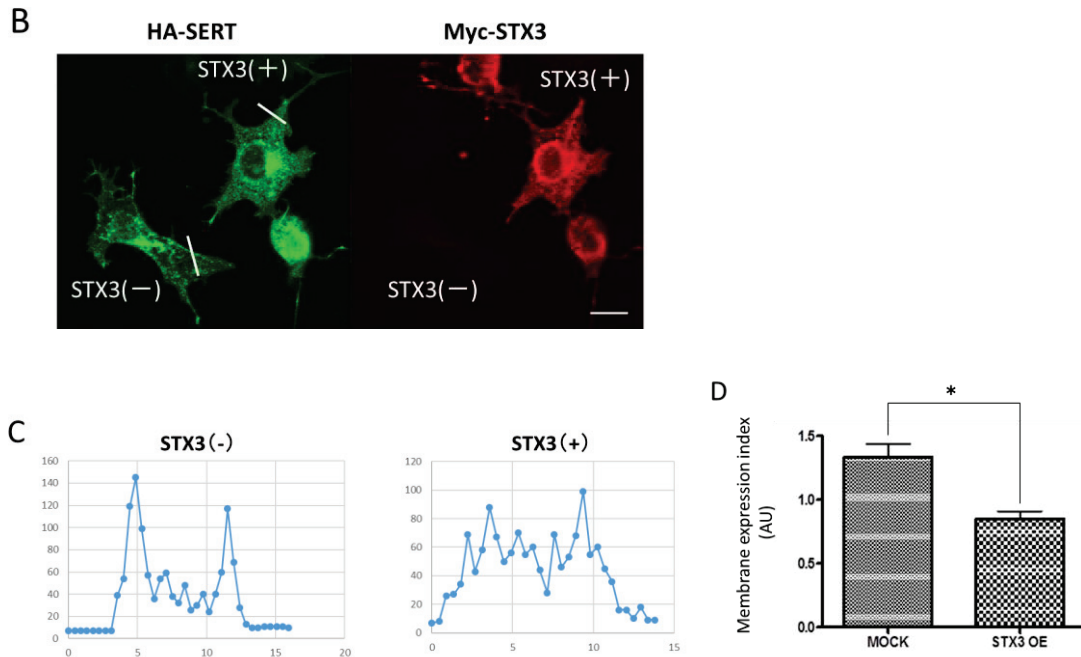


図 7 : SERT の膜発現に対する STX3 過剰発現の影響

A : HA-SERT および Myc-DDK-STX3 を遺伝子導入した COS-7 細胞における SERT の発現を比較した結果を示す。STX3 が発現している細胞 (矢印) では SERT の発現が細胞全体にみられたが、発現していない細胞では SERT の発現が細胞膜にみられる傾向があった (矢頭) 。 bar : 10 μ m

B : STX3 発現細胞と非発現細胞における SERT の膜発現を比較した一例を示す。 bar : 10 μ m

C : ラインプロファイル解析における蛍光強度の積分値の一例を示す。

細胞膜間で蛍光強度の積分値と細胞膜間の長さを測定し、平均蛍光強度を求めた。

また、蛍光強度のピークの平均値を求め、細胞膜の蛍光強度とした。

(細胞膜の蛍光強度) / (平均蛍光強度) = 細胞膜発現の指標として計算し、定量化した。

D : 細胞膜発現の指標を定量化した結果を示す。STX3 を過剰発現させると SERT の細胞膜発現が抑制されたことが明らかになった。

MOCK n=39 STX3 OE n=33 3 experiments *P<0.001

2. 野生型 SERT に対する STX3 ノックダウンの影響

次に、STX3 が SERT の機能に及ぼす影響を明らかにするために、野生型 SERT に対する STX3 ノックダウンの影響を調べた。

2-1. SERT の 5-HT 取り込み活性に対する STX3 過剰発現の影響

電気穿孔法を用い、AD293 細胞および COS-7 細胞に FLAG-SERT cDNA と STX3 siRNA を遺伝子導入した。また、FLAG-SERT HEK 細胞には STX3 siRNA を電気穿孔法で遺伝子導入した。その 48 時間後にこれらの細胞 1 個当たりの蛍光 SERT 基質の取り込み量の平均を取り込み活性として測定した。その結果、図 8 に示すように、一過性 FLAG-SERT 発現 AD293 細胞、COS-7 細胞、FLAG-SERT-HEK 細胞では、STX3 のノックダウンは SERT 取り込み活性に影響を及ぼさないことがわかった。

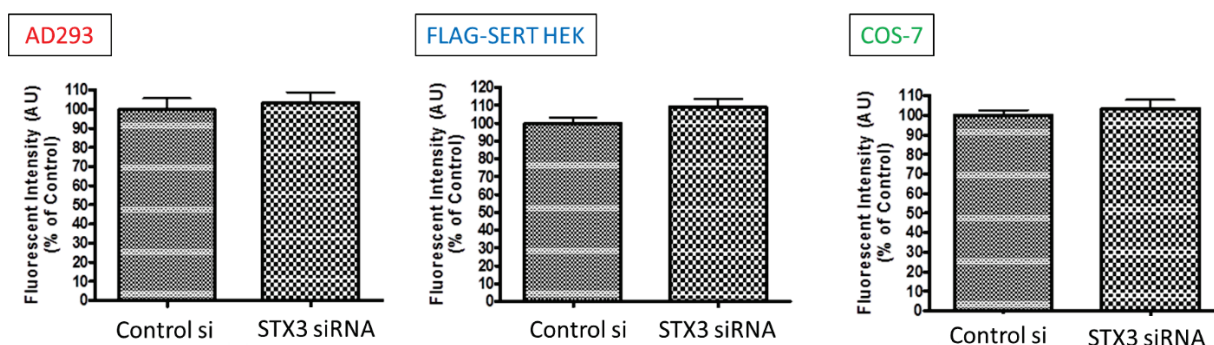


図 8 : SERT の 5-HT 取り込み活性に対する STX3 ノックダウンの影響

FLAG-SERT と control siRNA、FLAG-SERT と STX3 siRNA を遺伝子導入した AD293 細胞、COS-7 細胞および、control siRNA または STX3 siRNA を遺伝子導入した FLAG-SERT HEK 細胞において、5-HT 取り込み活性を測定した。その結果、STX3 をノックダウンによる 5-HT 取り込み活性に対する影響はほとんどみられなかった。

AD293 cells : n=9 3 experiments, ns, t-test

FLAG-SERT HEK cells : n=9 3 experiments, ns, t-test

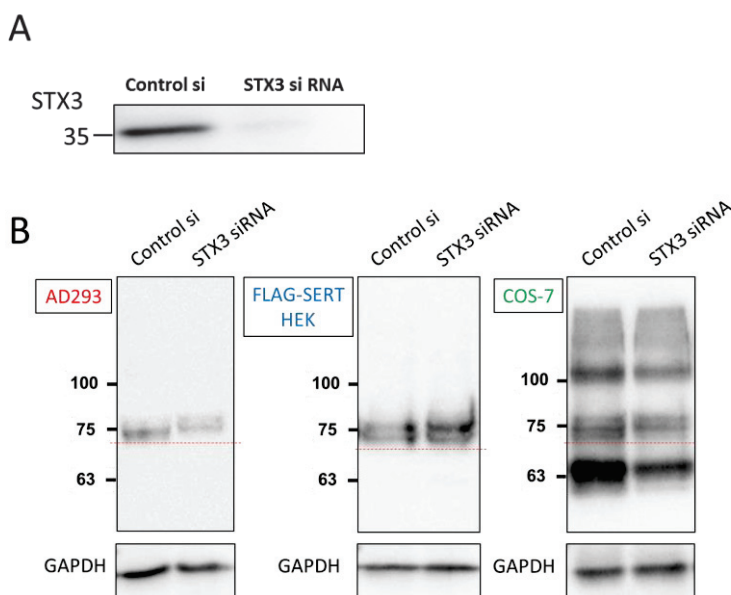
COS-7 cells : n=18 6 experiments, ns, t-test

2-2. SERT のタンパク質発現および糖鎖修飾に対する STX3 ノックダウンの影響

一方、遺伝子導入 48 時間後に回収したサンプルをウエスタンブロッティング

で解析すると、図 9A のように STX3 siRNA によって、STX3 がノックダウンされたことが確認され、また STX3 ノックダウンによる SERT の完全糖鎖修飾体のバンドの上方移動が認められた (図 9B)。このバンドシフトが糖鎖修飾に起因するかどうか調べるために、2 種類の糖鎖切断酵素を用いて実験を行った。その際、すべての糖鎖修飾を切断する酵素である PNGase F と、不完全糖鎖修飾を切断する酵素である Endo H を用いた。その結果、PNGase F を処置すると、完全糖鎖修飾体のバンドが下方移動したため、糖鎖修飾が切断されたことが確認された。また、PNGase F 処置によって、STX3 ノックダウンによって確認されたバンドシフトがみられなくなった。そして、Endo H は、不完全糖鎖修飾を切断する酵素であるため、完全糖鎖修飾体のバンドには影響を与えなかった (図 9C)。さらに、STX3 ノックダウンによる SERT のタンパク質発現への影響をウエスタンブロッティングの結果を解析することによって確かめたが、ノックダウンによる影響はなかった (図 9D)。

これらの結果から、STX3 は SERT の糖鎖修飾に何らかの影響を与えることが示唆された。



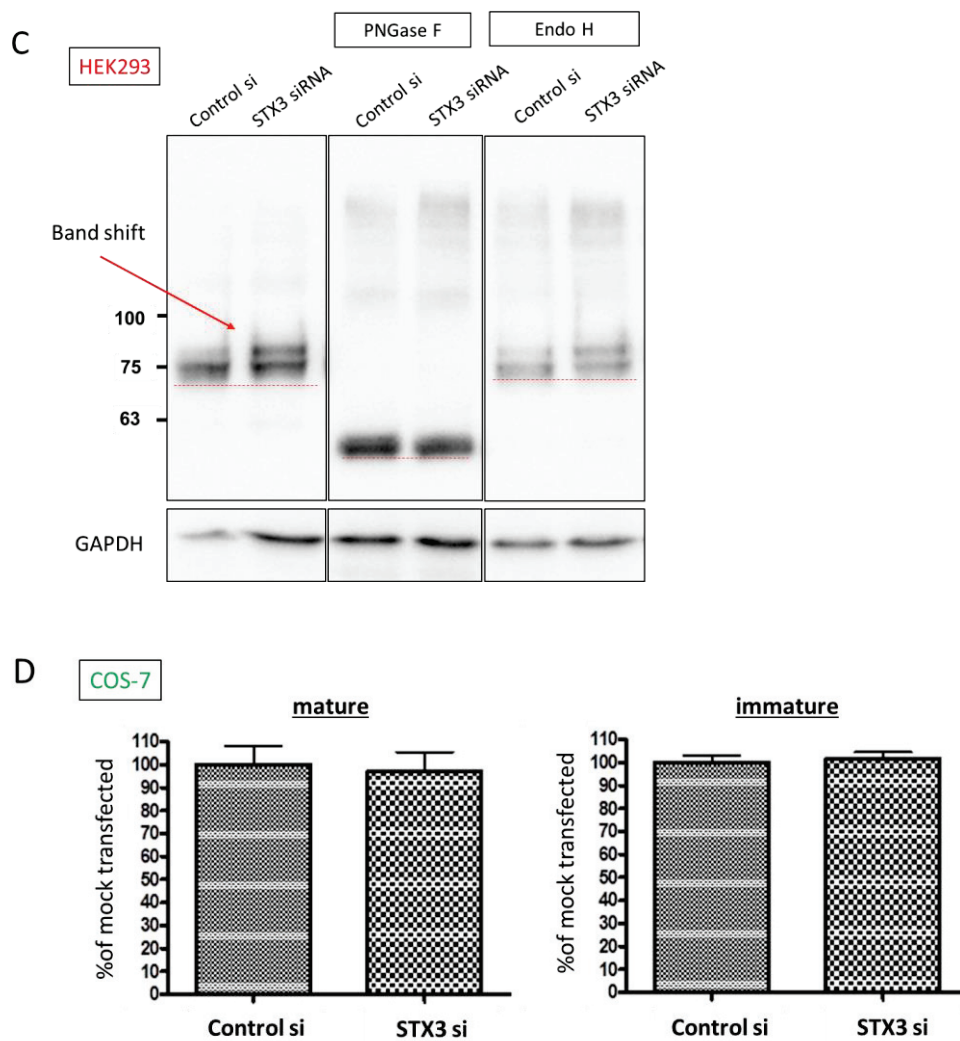


図 9 : SERT のタンパク質発現および糖鎖修飾に対する STX3 ノックダウンの影響

A : control siRNA または STX3 siRNA を遺伝子導入した AD293 細胞を STX3 抗体による STX3 のウエスタンブロット解析した結果を示す。STX3 siRNA によって STX3 がノックダウンされたことが確認された。

B : 各種細胞に FLAG-SERT を発現させた細胞を FLAG 抗体による SERT のウエスタンブロット解析した結果を示す。STX3 siRNA のサンプルでは完全糖鎖修飾体のバンドがまもなく上方移動していることが観察される。

C : AD293 細胞に発現させた FLAG-SERT に対して糖鎖切断酵素処置後の SERT のウエスタンブロット解析結果を示す。

D : COS-7 細胞における SERT 完全糖鎖修飾体 (mature)、不完全糖鎖修飾体 (immature) の発現を定量化した結果を示す。n=5, ns

3. 内在性に SERT と STX3 を発現する Caco-2 細胞を用いた検討

さらに、SERT と STX3 の関連を明らかにするために、内在性に SERT と STX3 が発現しており、STX3 についての研究によく用いられている、ヒト結腸癌由来の細胞株である Caco-2 細胞を用いた検討を行った。

3-1. Caco-2 細胞の内在性 SERT による 5-HT 取り込み活性の確認

Caco-2 細胞を 24 穴プレートで 72 時間培養後、 $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ を用いて、内在性 SERT による 5-HT 取り込み活性の測定を行った。その結果、図 10 に示すように、5-HT 取り込み活性がみとめられた。また、フルボキサミン 20 μM を処置すると、5-HT 取り込み活性は減少した。したがって、Caco-2 細胞には SSRI 感受性の 5-HT の取り込みが可能な内在性 SERT が発現していることがわかった。

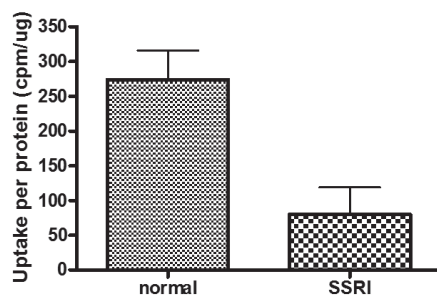


図 10 : Caco-2 細胞の内在性 SERT による 5-HT 取り込み活性の確認

Caco-2 細胞の内在性 SERT による 5-HT 取り込み活性の測定結果を示す。

Normal : 通常の KRH buffer 下の 5-HT 取り込み活性

SSRI : SSRI の fluvoxamine 存在下の 5-HT 取り込み活性

3-2. 各種細胞株における SERT mRNA 発現の比較

Caco-2 細胞、COS-7 細胞、AD293 細胞における SERT mRNA 発現を Real-Time PCR で解析した。その結果、図 11 に示されるように、Caco-2 細胞では、他の細胞と比較して SERT の mRNA 発現が顕著にみられることがわかつ

た。一方、COS-7 細胞および AD293 細胞では SERT mRNA 発現は極めて少なかった。

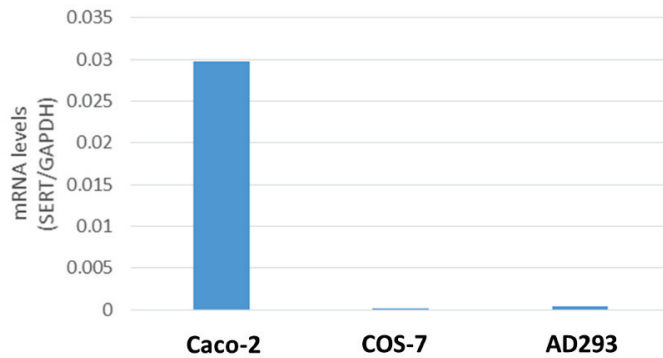


図 11：各種細胞株における SERT mRNA 発現の比較

Caco-2 細胞、COS-7 細胞、AD293 細胞における SERT mRNA 発現の Real-Time PCR による解析結果を示す。

3-3. Caco-2 細胞における SERT および STX3 の局在

Caco-2 細胞は小腸の刷子縁に似た形態学的特徴を示し、微絨毛を形成する (44)。そこで、Caco-2 細胞の内在性 SERT および STX3 をそれぞれの抗体で免疫蛍光染色し、微絨毛マーカーである villin 抗体との局在を比較した。その結果、図 12A のように、SERT と STX3 は点状の構造物に局在し、それらは villin の局在とほぼ一致した。次に、アクチンとともに SERT と STX3 を免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で 3D 画像を構築した。図 12B に示すように、3D 画像を X 軸、Y 軸の断面図から観察すると、SERT と STX3 が細胞内に加えて、微絨毛にも局在している様子が確認された (矢頭)。

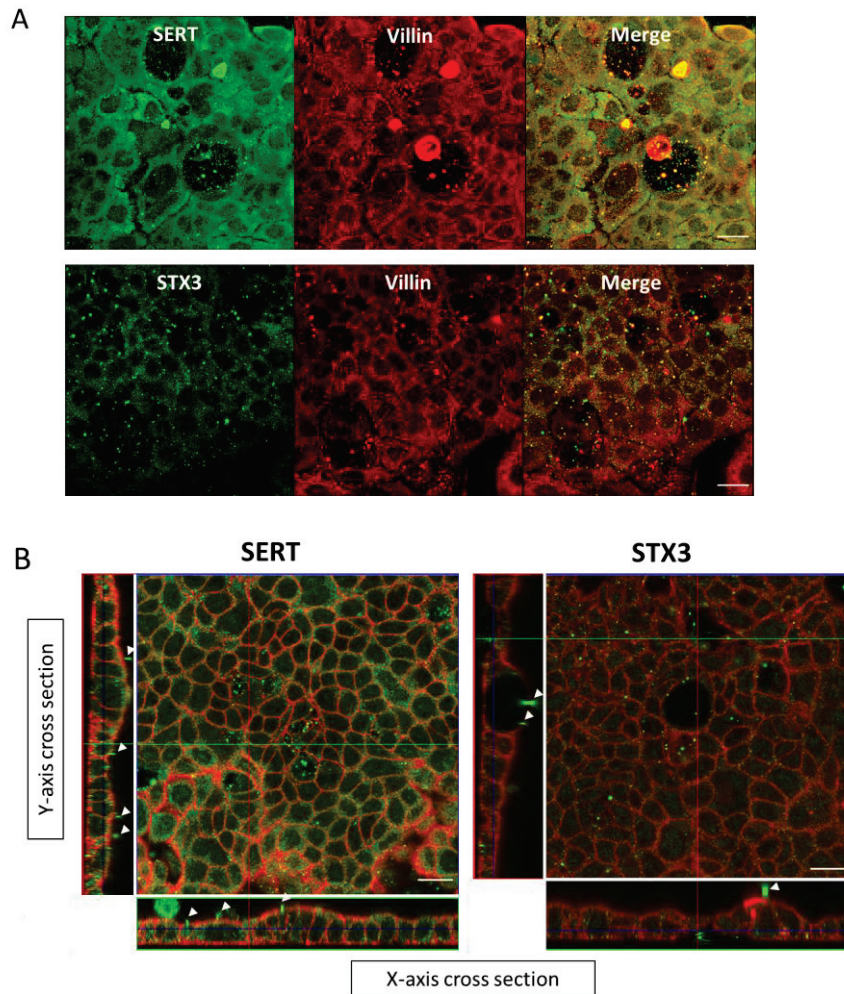


図 12 : Caco-2 細胞における SERT および STX3 の局在

A : Caco-2 細胞の内在性 SERT および STX3 と微絨毛マーカーvillin 抗体との局在を比較した結果を示す。bar : 20 μ m

B : アクチンとともに SERT と STX3 を免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で 3D 画像を構築した結果を示す。bar : 20 μ m 赤 : アクチン 緑 : SERT, STX3

3-4. Caco2 細胞の 5-HT 取り込み活性に対する STX3 ノックダウンの影響

Caco-2 細胞に STX3 siRNA を遺伝子導入し、48 時間後に ^3H 5-HT を用いて 5-HT 取り込み活性を測定した。またサンプルのタンパク定量を行い、単位タンパク量当たりの ^3H 5-HT 取り込み量を計算した。その結果、STX3 をノックダウンすると、図 13A のように、取り込み活性が減少した。また、ウエスタンブ

ロット解析で STX3 ノックダウンを確認した (図 13B)。

以上の結果から、Caco-2 細胞において内在性の STX3 は SERT の機能を調整する可能性があることが示唆された。

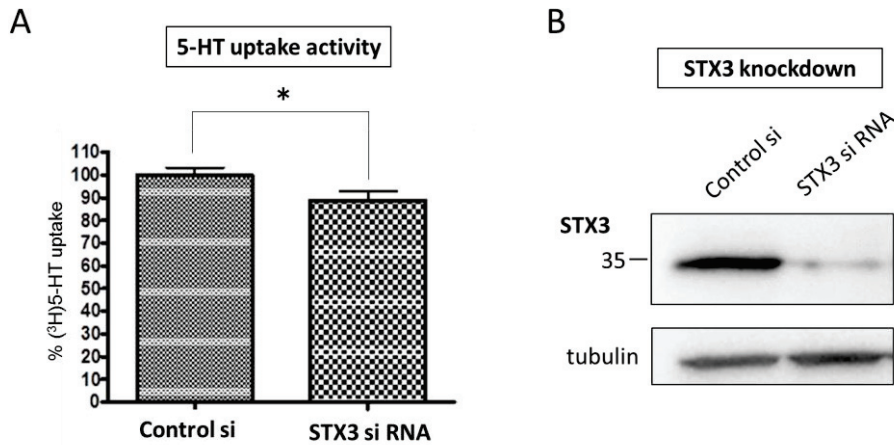


図 13 : Caco2 細胞の 5-HT 取り込み活性に対する STX3 ノックダウンの影響

A : STX3 をノックダウンした Caco-2 細胞における 5-HT 取り込み活性の測定結果を示す。n=28, 7experiments *P=0.0295

B : ウェスタンブロット解析による、STX3 ノックダウンの確認結果を示す。

考 察

・AD293細胞、COS-7細胞におけるSTX3とSERTの機能連関

今回の研究では、COS-7細胞やAD293細胞に対しSERTやSTX3を過剰発現させることで、その局在を観察した。Real-time PCRの結果に示されたように、COS-7細胞やHEK293細胞ではSERT mRNAの発現は微小であるため、免疫蛍光染色やウエスタンブロット解析を行ったとしても、内在性のSERTの発現は確認できない可能性が高かった。一方、STX3は、ウエスタンブロット解析により発現が確認できているものの、その発現はCaco-2細胞と比較するとかなり少ない。そのため、COS-7細胞やAD293細胞においてSERTとSTX3の両者の局在変化を検討するには両者を過剰発現する系での実験が適していると考えられ、本研究では、そのような実験系を用いることとした。

本研究において、STX3を過剰発現させると、AD293細胞、COS-7細胞では、SERTによる5-HT取り込み活性が減少した。また、ウエスタンブロッティングによるタンパク質発現の検討では、STX3の過剰発現により、SERTタンパク質の完全糖鎖修飾体が減少する傾向がみられた。さらに、COS-7細胞における局在を観察すると、HA-SERT、Myc-DDK-STX3は、小胞体やゴルジ体といった細胞内小器官に凝集して共局在する様子が確認された。また、STX3が過剰発現している細胞ではSERTの膜発現が抑制されたことが示された。これらの結果から、過剰発現されたSTX3はSERTをゴルジ体や小胞体に留め、凝集し、細胞膜発現を抑制する可能性があることが示唆された。その結果、SERTの取り込み活性を減少させた可能性がある。以前の研究で、STX7およびSTX8の過剰発現は嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (cystic fibrosis transmembrane

conductance regulator: CFTR) の活性を抑制する(45)という報告があり、STX3 を含む syntaxin ファミリーが SERT を含む膜タンパク質の発現および活性を制御する働きがある可能性が考えられた。

STX3 をノックダウンさせると、SERT 取り込み活性やタンパク質発現量には影響を及ぼさなかったが、SERT の糖鎖修飾に何らかの影響を及ぼすことが示唆された。

SERT タンパク質は mRNA から翻訳され、小胞体で膜に組み込まれ、まず high-mannose type の不完全な糖鎖修飾を受ける。その後ゴルジ体へ輸送され、完全な糖鎖修飾を受け、細胞膜へ発現し機能を発揮する。本研究では、COS-7 細胞において STX3 を過剰発現させると、免疫蛍光染色の結果にて、SERT と STX3 がゴルジ体や小胞体といった細胞内小器官に凝集して共局在する様子が観察された。したがって、STX3 はそれらの細胞内小器官で、SERT の糖鎖修飾に影響を与える可能性がある。以前に、STX3 は $\Delta F508$ -CFTR の糖鎖修飾 (46) に、また、STX5 は VLDL-R の糖鎖修飾 (47) に関係しているという報告があることから、STX3 が膜タンパク質である SERT の糖鎖修飾に関連する可能性も大いにあり得る。

STX3 をノックダウンさせると、SERT の完全糖鎖修飾体のバンドがやや上方移動し、このバンド移動は、何らかの糖鎖修飾の違いによって生じていることが明らかになった。バンドが上方移動するということは、通常糖鎖修飾よりも多くの修飾がなされている可能性がある。STX3 を過剰発現させると SERT の完全糖鎖修飾体が減少する傾向が見られ、5-HT の取り込みが減少した。したがって、STX3 をノックダウンし、糖鎖修飾に変化が起こることで、SERT の膜発現が促進される可能性もあるかもしれない。

本研究において、ER ストレスの改善を目的に SKF-10047 に注目し、SKF に

よって発現が上昇する遺伝子・タンパク質として **STX3** に注目した。**ER** ストレスとは、細胞がさまざまな内的あるいは外的環境変化にさらされることで、小胞体内腔においてタンパク質が正常に折りたたまれなくなり、不良タンパク質として蓄積していく状態をいう。その **ER** ストレスが関連する疾患としては、アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis : ALS) などの神経変性疾患がある。神経変性疾患では、変性タンパク質の蓄積により、特定の神経細胞が障害され、細胞死を起こすことが知られている。神経系以外の疾患では、糖尿病の発症にも **ER** ストレスが関連しているといわれている。膵臓 β 細胞において **ER** ストレスが生じると、アポトーシスが引き起こされ、 β 細胞の脱落が起こり、生体内でインスリン不足を来すことが糖尿病の発症につながると考えられている (48)。

以前に、syntaxin ファミリーのうち、小胞体-ゴルジ体中間区画に存在する **STX5** が **ER** ストレス応答および、アルツハイマー病に関連する β -アミロイド前駆体タンパク質の代謝において役割を果たす (49) という報告がなされている。**ER** ストレス関連疾患と **STX3** の関連は不明であるが、**STX3** は **STX5** と同様に小胞体とゴルジ体に発現するので、**ER** ストレスの発現にも関与するのかもしれない。

・ *Caco-2* 細胞における **STX3** と **SERT** の機能関連

STX3 に関する研究において、ヒト結腸癌由来の細胞株である、*Caco-2* 細胞がよく用いられている。また、その *Caco-2* 細胞には内在性に **STX3** と **SERT** が発現しており、**STX3** と **SERT** の相互作用を検討するのに適当な細胞モデルであると考えた。そこで、*Caco-2* 細胞を用いた検討を行った。

まず *Caco-2* 細胞の 5-HT 取り込み活性を測定したところ、5-HT 取り込み活

性が確認され、Caco-2 細胞は、SSRI 感受性を持つ内在性 SERT を発現していることが予想された。さらに、Real-Time PCR による SERT の mRNA 発現の確認を行ったところ、Caco-2 細胞は他の細胞に比べて顕著に SERT の mRNA を発現していることを確認した。

Caco-2 細胞における SERT タンパク質の発現をウエスタンブロット解析で検討を試みた。SERT を含む膜タンパク質は熱処理により凝集し、解析が困難になることがある。そのため、様々な工夫を凝らしたが、未だ適当な手法を得られておらず、確認に至っていない。

以前の研究で、SERT と微絨毛構成タンパク質 villin がヒト十二指腸および回腸において共局在する (50) という報告があった。そのため、今回の研究では Caco-2 細胞の微絨毛との局在を検討したところ、Caco-2 細胞においても SERT と villin の共局在が確認された。また、STX3 も villin との共局在がみとめられたため、SERT と STX3 は微絨毛で共局在していることが示唆された。

一般的に、微絨毛は、栄養吸収を助けるために小腸の表面積を増やすための構造であることが知られている (51)。微絨毛には毛細血管およびリンパ管が分布しており、ブドウ糖やアミノ酸は毛細血管から、脂肪酸・グリセリンはリンパ管より吸収される。今回、微絨毛において、SERT と STX3 の発現がみられたことから、これらの 2 つのタンパク質が微絨毛において何らかの機能を発揮していることが予想された。腸管での 5-HT は、通常、腸管を収縮させる働きがあることは知られているが、微絨毛における働きは一般的には知られていない。しかし、以前の Caco-2 細胞を用いた研究で、5-HT がヒトの腸上皮細胞の細胞骨格と刷子縁膜の構造を改変する (52) という報告がある。これによると、5-HT 処置により、刷子縁膜が通常に比べて凸状ドーム型に変化し、微絨毛が短くなるということが報告されている。したがって、微絨毛における 5-HT は、この腸上皮細胞

での構造変化に関連しているのではないかと考えられた。そして、その構造変化により腸での水や電解質や栄養素の吸収といった機能に影響を与えることが考えられる。SERT は 5-HT を取り込むことで絨毛での 5-HT 濃度の調整に関わっている可能性がある。

また、STX3 が関連する病態として、微絨毛封入体病がある。この病態は、STX3 の欠損により生じると考えられており、腸上皮細胞の微絨毛が腸管腔側に正常に局在できないために、大量の水様下痢をきたし、水、電解質や重炭酸の喪失と栄養素の吸収障害を引き起こす難病 (53) である。つまり、STX3 も腸上皮細胞における構造の変化に関連している可能性があり、微絨毛の構造の調節という点で SERT と STX3 が相互作用している可能性が示唆される。今回の研究では、Caco-2 細胞における SERT や STX3 の過剰発現やノックダウンによる局在に対する影響は確認できていないが、STX3 や SERT が関連する病態を解明するためには、さらなる検討が必要である。

今回、Caco-2 細胞において、STX3 をノックダウンすると、SERT による 5-HT 取り込み活性が減少した。COS-7 細胞や AD293 細胞では STX3 をノックダウンしても取り込み活性には影響がなかったにも関わらず、Caco-2 細胞では取り込み活性が減少した。このことは、COS-7 細胞や AD293 細胞では、内在性の STX3 が少ないため、ノックダウンしてもほとんど影響を受けないが、Caco-2 細胞では内在性の STX3 が多いため、ノックダウンすることで、SERT の膜輸送における STX3 の働きが抑制され、SERT の膜発現も抑えられることで、取り込み活性が減少したのではないかと考えられる。

さらに考慮すべき点は、SERT と STX3 の機能相関の検討は、AD293 細胞、COS-7 細胞においては強制発現系で行ったのに対し、Caco-2 細胞の場合は、内在性に発現している SERT と STX3 に対して行った点である。Caco-2 細胞では

SERT と STX3 は内在性に発現しているが故に、すでに強固な相互関係を築いている可能性がある。一方、COS-7 細胞においては、SERT も STX3 も外来性に発現させているが故に、その相互関係は一過性で弱い可能性がある。そのため、STX3 のノックダウンの影響は、Caco-2 細胞では強く出現し、AD293 細胞、COS-7 細胞では、顕著に出現しなかったのかもしれない。

また、COS-7 細胞や AD293 細胞で STX3 を過剰発現させると、5-HT の取り込み活性が減少し、Caco-2 細胞では STX3 をノックダウンさせると、5-HT の取り込み活性が減少した。つまり、STX3 を過剰発現させても、ノックダウンさせても、SERT による 5-HT の取り込み活性が減少するという結果であった。この結果は、STX3 と SERT の細胞による局在する場所と働きの違いによるものではないかと考えた。前述のように、COS-7 細胞で STX3 を過剰発現させると、細胞内の小胞体やゴルジ体に局在し、SERT を細胞内に留めるため、SERT が膜発現しにくくなり、取り込み活性が減少すると考えられる。一方で、Caco-2 細胞では、内在性の SERT と STX3 が細胞膜付近の刷子縁に局在し SERT の膜発現を促進している可能性があるが、STX3 をノックダウンすることで SERT の膜発現が抑制され 5-HT 取り込み活性が減少すると考えられた。そのため、STX3 の SERT への機能調節に関しては、異なった細胞では異なった結果が得られたのではないかと推察する。

今回の検討では、STX3 と SERT の直接的な相互作用を免疫沈降実験では確認できなかった。一方、Caco-2 細胞を用いた研究の中には、STX3 と SERT は相互作用し、TGF- β 1 処置でその相互作用は増強する (54) という報告があり、免疫沈降を用いて STX3 と SERT の相互作用が確認されている。また、その研究の中で、SERT と STX3 は同じエキソサイトーシスプールに存在しているという報告もある。STX3 は細胞内小胞輸送において膜融合をつかさどる SNARE

タンパク質の一つである (29)。この膜融合過程に関わる分子には、小胞側タンパク質の synaptobrevin および VAMP と、細胞膜側タンパク質の syntaxin と SNAP-25 があり、これらがヘテロ三量体の SNARE 複合体を形成して機能している (55)。したがって、STX3 は細胞膜において SERT のエキソサイトーシスに関連しているのではないかと考えられる。また、STX3 はイオンチャネルの一種である CFTR のエキソサイトーシスの調節に関与する (56) という報告があり、STX3 が様々な膜タンパク質のエキソサイトーシスに関与する分子であることが考えられる。

SERT に関しては、中枢神経系での働きもあり、セロトニン再取り込み阻害薬は精神疾患の治療に広く用いられている。STX3 は、中枢神経系での発現は比較的少なく、そこでの働きは不明な点が多い。中枢神経系における STX3 に関しては、初代培養した海馬ニューロンにおいて STX3 が細胞体や樹状突起に加え成長円錐にも存在するという報告 (57) や、STX3 および 4 が海馬ニューロンにおいて長期増強など神経活動の亢進時に、AMPA 受容体のスパインへの組込みに関与しシナプス可塑性に重要な役割を果たしている (58-60) という報告がある。しかし、中枢神経系における SERT との関連はほとんど知られていない。ただし、syntaxin ファミリーの 1 つである STX1A は、神経系の細胞において SERT と結合する (61) という報告があり、STX3 も中枢神経系において SERT との何らかの機能連関があるかもしれない。

結論としては、今回の検討により、STX3 は SERT の膜輸送の過程で SERT と共局在し、SERT の機能を調節する可能性が示唆された。

謝 辞

本稿の攞筆にあたり、始終ご懇切なご指導・ご高閲を賜りました広島大学大学院医系科学研究科歯科麻酔学研究室 入船 正浩 教授に心より深謝の意を表します。また、本研究に対して終始ご指導、御校閲を賜りました本学大学院医系科学研究科神経薬理学研究室 酒井 規雄 教授に心から感謝いたします。また、本研究のまとめに際し御校閲を賜りました本学医系科学研究科歯髄生物学研究室 柴 秀樹 教授、本学医系科学研究科顎顔面解剖学研究室 寺山 隆司 教授、本学医系科学研究科薬効解析科学研究室 森岡 徳光 教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたってご指導、ご協力いただきました本学大学院医系科学研究科神経薬理学研究室 田中 茂 講師、秀 和泉 講師、原田 佳奈 助教 に御礼申し上げます。

最後に、本研究の完遂に際して、多大なるご支援ならびにご協力をいただきました歯科麻酔学、神経薬理学の研究室関係者各位に心より奉謝いたします。

参考文献

1. Gill RK, Pant N, Saksena S, Singla A, Nazir TM, Vohwinkel L, Turner JR, Goldstein J, Alrefai WA, Dudeja PK.
Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008; 294: G254-G262.
2. Blakely RD, Berson HE, Fremeau Jr RT, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC.
Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain.
Nature, 1991; 354: 66-70.
3. Kuhar MJ, Roth RH, Aghajanian GK.
Synaptosomes from forebrains of rats with midbrain raphe lesions: selective reduction of serotonin uptake.
J Pharmacol Exp Ther, 1972; 181: 36-45.
4. Douglas JG, Munro JF.
Drug treatment and obesity.
Pharmac Ther, 1982; 18: 351-373.
5. Rowland NE, Carlton J.
Neurobiology of an anorectic drug: Fenfluramine.
Progress in Neurobiology, 1986; 7: 13-62.
6. Rudnick G, Wall SC.
Binding of the cocaine analog 2 beta-[3H] carboxymethoxy-3 beta-(4-fluorophenyl) tropane to the serotonin transporter.
Mol Pharmacol, 1991; 40: 421-426.
7. Rudnick G, Wall SC.
Non-neurotoxic amphetamine derivatives release serotonin through serotonin transporters.
Mol Pharmacol, 1993; 43: 271-276.
8. Den Boer JA, Westenberg HG.
Effects of a serotonin and noradrenaline uptake inhibitor in panic disorder: a double-blind comparative study with fluvoxamine and maprotiline.
Int Clin Psychopharmacol, 1988; 3: 59-74.
9. Den Boer JA, Westenberg HG.
Serotonin function in panic disorder: a double blind placebo controlled study with

fluvoxamine and ritanserin.

Psychopharmacology, 1990; 102: 85-94.

10. Sutcliffe JS, Delahanty RJ, Prasad HC, McCauley JL, Han Q, Jiang L, Li C, Folstein SE, Blakely RD.

Allelic Heterogeneity at the Serotonin Transporter Locus (SLC6A4) Confers Susceptibility to Autism and Rigid-Compulsive Behaviors.

Am J Hum Genet, 2005; 77: 265-279.

11. Ozaki N, Goldman D, Kaye WH, Plotnicov K, Greenberg BD, Lappalainen J, Rudnick G, Murphy DL.

Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype.

Molecular Psychiatry, 2003; 8: 933-936.

12. Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, Kilic F.

Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter.

J Neurochem, 2007; 102: 206-215.

13. Ramamoorthy S, Cool DR, Mahesh VB, Leibach FH, Melikian HE, Blakely RD, Ganapathy V.

Regulation of the human serotonin transporter. Cholera toxin-induced stimulation of serotonin uptake in human placental choriocarcinoma cells is accompanied by increased serotonin transporter mRNA levels and serotonin transporter-specific ligand binding.

J Biol Chem, 1993; 268: 21626-21631.

14. Lee SL, Fanburg BL.

Serotonin uptake by bovine pulmonary artery endothelial cells in culture. I. Characterization.

Am J Physiol Cell Physiol, 1986; 250: C761-C765.

15. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL.

Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome.

Gastroenterology, 2004; 126:1657-1664.

16. Tate CG, Blakely RD.

The effect of N-linked glycosylation on activity of the Na(+)- and Cl(-)-dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells.

J Biol Chem, 1994; 269: 26303-26310.

17. Samuvel DJ, Jayanthi LD, Bhat NR, Ramamoorthy S.

A role for p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of the serotonin transporter: evidence for distinct cellular mechanisms involved in transporter surface expression.

J Neurosci, 2005; 25: 29-41.

18. Zhu CB, Carneiro AM, Dostmann WR, Hewlett WA, Blakely RD. p38 MAPK activation elevates serotonin transport activity via a trafficking-independent, protein phosphatase 2A-dependent process.

J Biol Chem, 2005; 280: 15649-15658.

19. Zhu CB, Hewlett WA, Feoktistov I, Biaggioni I, Blakely RD. Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation.

Mol Pharmacol, 2004; 65: 1462-1474.

20. El-Kasaby A, Just H, Malle E, Stolt-Bergner PC, Sitte HH, Freissmuth M, Kudlacek O.

Mutations in the carboxyl-terminal SEC24 binding motif of the serotonin transporter impair folding of the transporter.

J Biol Chem, 2010; 285: 39201-39210.

21. Larsen MB, Fjorback AW, Wiborg O.

The C-terminus is critical for the functional expression of the human serotonin transporter.

Biochemistry, 2006; 45: 1331-1337.

22. Nobukuni M, Mochizuki H, Okada S, Kameyama N, Tanaka A, Yamamoto H, Amano T, Seki T, Sakai N.

The C-terminal region of serotonin transporter is important for its trafficking and glycosylation.

J Pharmacol Sci, 2009; 111: 392-404.

23. Cobos EJ, Entrena JM, Nieto FR, Cendan CM, Del Pozo E.

Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands.

Curr Neuropharmacol, 2008; 6: 344-366.

24. Hayashi T, Su TP.

Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of neuropsychiatric disorders.

CNS Drugs, 2004; 18: 269-284.

25. Hayashi T, Maurice T, Su TP.

Ca(2+) signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca(2+) concentration.

- J Pharmacol Exp Ther, 2000; 293: 788-798.
26. Hayashi T, Su TP.
The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology.
Curr Neuropharmacol, 2005; 3: 267-280.
27. Hayashi T, Su TP.
Regulating ankyrin dynamics: roles of sigma-1 receptors.
Proc Natl Acad Sci U S A, 2001; 98: 491-496.
28. Asano M, Motoike S, Yokota C, Usuki N, Yamamoto H, Urabe T, Katarao K, Hide I, Tanaka S, Kawamoto M, Irifune M, Sakai N.
SKF-10047, a prototype Sigma-1 receptor agonist, augmented themembrane trafficking and uptake activity of the serotonin transporterand its C-terminus-deleted mutant via a Sigma-1receptor-independent mechanism.
Journal of Pharmacological Sciences, 2019; 139: 29-36.
29. Bennett MK, Calakos N, Scheller RH.
Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones.
Science, 1992; 257: 255-259.
30. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE.
SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion.
Nature, 1993; 362: 318-24.
31. Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R.
Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs.
Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95: 15781-15786.
32. Teng FYH, Wang Y, Tang BL.
The syntaxins.
Genome Biology, 2001; 2(11): 3012.1–3012.7.
33. Bennett MK, García-Arrarás JE, Elferink LA, Peterson K, Fleming AM, Hazuka CD, Scheller RH.
The syntaxin family of vesicular transport receptors.
Cell, 1993; 74: 663-673.
34. Low SH, Chapin SJ, Weimbs T, Komuves LG, Bennett MK, Mostov KE.
Differential localization of syntaxin isoforms in polarized Madin-Darby canine kidney cells.
Mol Biol Cell, 1996; 7: 2007-2018.

35. Low SH, Chapin SJ, Wimmer C, Whiteheart SW, Kömüves LG, Mostov KE, Weimbs T.
The SNARE machinery is involved in apical plasma membrane trafficking in MDCK cells.
J Cell Biol, 1998; 141: 1503-1513.
36. Low SH, VasANJI A, Nanduri J, He M, Sharma N, Koo M, Drazba J, Weimbs T.
Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity.
Mol Biol Cell, 2006; 17: 977-989.
37. Delgrossi MH, Breuza L, Mirre C, Chavrier P, Le Bivic A.
Human syntaxin 3 is localized apically in human intestinal cells.
J Cell Sci, 1997; 110: 2207-2214.
38. Weimbs T, Low SH, Chapin SJ, Mostov KE.
Apical targeting in polarized epithelial cells: There's more afloat than rafts.
Trends Cell Biol, 1997; 7: 393-399.
39. Li X, Low SH, Miura M, Weimbs T.
SNARE expression and localization in renal epithelial cells suggest mechanism for variability of trafficking phenotypes.
Am J Physiol Renal Physiol, 2002; 283: 1111-1122.
40. Mochizuki H, Amano T, Seki T, Matsubayashi H, Mitsuhashi C, Morita K, Kitayama S, Dohi T, Mishima HK, Sakai N.
Role of C-terminal region in the functional regulation of rat serotonin transporter (SERT).
Neurochem Int, 2005; 46: 93-105.
41. Sakai N, Kodama N, Ohmori S, Sasaki K, Saito N.
Involvement of the actin cytoskeleton in the regulation of serotonin transporter (SET) activity: possible mechanism underlying SET regulation by protein kinase C.
Neurochem Int, 2000; 36: 567-579.
42. Katarao K, Murakawa S, Asano M, Usuki N, Yamamoto H, Shirafuji T, Tanaka S, Hide I, Sakai N.
The development of screening methods to identify drugs to limit ER stress using wild-type and mutant serotonin transporter.
Acta Histochem Cytochem, 2016; 49: 197-206.
43. Yamamoto H, Fujimiya M, Shirai Y, Nakashita M, Oyasu M, Saito N.
Immunohistochemical localization of serotonin transporter in normal and colchicine treated rat brain.
Neurosci Res, 1998; 32: 305-312.

44. Peterson MD, Mooseker MS.
Characterization of the enterocyte-like brush border cytoskeleton of the C2BBE clones of the human intestinal cell line, Caco-2.
J Cell Sci, 1992; 102: 581-600.
45. Bilan F, Nacfer M, Fresquet F, Norez C, Melin P, Martin-Berge A, Costa de Beauregard MA, Becq F, Kitzis A, Thoreau V.
Endosomal SNARE proteins regulate CFTR activity and trafficking in epithelial cells.
Exp Cell Res, 2008; 314: 2199-2211.
46. Wagner T, Dieckmann M, Jaeger S, Weggen S, Pietrzik CU.
Stx5 is a novel interactor of VLDL-R to affect its intracellular trafficking and processing.
Exp Cell Res, 2013; 319: 1956-1972.
47. Sabirzhanova I, Boinot C, Guggino WB, Cebotaru L.
Syntaxin 8 and the Endoplasmic Reticulum Processing of Δ F508-CFTR.
Cell Physiol Biochem, 2018; 51: 1489-1499.
48. 金本 聡自, 今泉 和則.
小胞体ストレスと疾患. *Journal of Japanese Biochemical Society*, 2018; 90: 51-59.
49. Suga K, Saito A, Akagawa K.
ER stress response in NG108-15 cells involves upregulation of syntaxin 5 expression and reduced amyloid β peptide secretion.
Exp Cell Res, 2015; 332: 11-23.
50. Gill RK, Pant N, Saksena S, Singla A, Nazir TM, Vohwinkel L, Turner JR, Goldstein J, Alrefai WA, Dudeja PK.
Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008 ;294: G254-262.
51. Krause J. William.
Krause's Essential Human Histology for Medical Students.
Universal-Publishers, 2005 pp. 37-. ISBN 978-1-58112-468-2.
52. Gill RK, Shen L, Turner JR, Saksena S, Alrefai WA, Pant N, Esmaili A, Dwivedi A, Ramaswamy K, Dudeja PK.
Serotonin modifies cytoskeleton and brush-border membrane architecture in human intestinal epithelial cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008; 295: G700-708.
53. Wiegerinck CL, Janecke AR, Schneeberger K, Vogel GF, van Haaften-Visser DY, Escher JC, Adam R, Thöni CE, Pfaller K, Jordan AJ, Weis CA, Nijman IJ, Monroe GR, van Hasselt PM, Cutz E, Klumperman J, Clevers H, Nieuwenhuis EE, Houwen RH, van

- Haaften G, Hess MW, Huber LA, Stapelbroek JM, Müller T, Middendorp S.
Loss of Syntaxin 3 Causes Variant Microvillus Inclusion Disease.
Gastroenterology, 2014; 147: 65-68.
54. Nazir S, Kumar A, Chatterjee I, Anbazhagan AN, Gujral T, Priyamvada S, Saksena S, Alrefai WA, Dudeja PK, Gill RK.
Mechanisms of Intestinal Serotonin Transporter (SERT) Upregulation by TGF- β 1 Induced Non-Smad Pathways.
PLoS One, 2015 May 8;10(5): e0120447.
55. 森 寿, 真鍋 俊也, 渡辺 雅彦, 岡野 栄之, 宮川 剛.
脳神経科学イラストレイテッド 2000 羊土社
56. Collaco A, Marathe J, Kohnke H, Kravstov D, Ameen N.
Syntaxin 3 is necessary for cAMP- and cGMP-regulated exocytosis of CFTR: implications for enterotoxigenic diarrhea.
Am J Physiol Cell Physiol, 2010; 299: C1450-C1460.
57. Darios F, Davletov, B.
Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3.
Nature, 2006; 440: 813-817.
58. Kennedy MJ, Davison IG, Robinson CG, Ehlers MD.
Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines.
Cell, 2010; 141: 524-35.
59. Mohanasundaram P, Shanmugam MM.
Role of syntaxin 4 in activity-dependent exocytosis and synaptic plasticity in hippocampal neurons.
Sci Signal, 2010; 3: jc7.
60. Jurado S, Goswami D, Zhang Y, Molina AJ, Südhof TC, Malenka RC.
LTP requires a unique postsynaptic SNARE fusion machinery.
Neuron, 2013; 77: 542-58.
61. Ciccone MA, Timmons M, Phillips A, Quick MW.
Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Regulates the Interaction between the Serotonin Transporter and Syntaxin 1A.
Neuropharmacology, 2008; 55: 763-770.

