博士学位論文

低分子量 GTP 結合タンパク質を標的にした オリゴデンドロサイト病態改善のアプローチ

東京薬科大学大学院

生命科学研究科 生命科学専攻

分子神経科学研究室

福島 那奈

目次

1. 序章
1.1. 概要
1.2. 用語解説・・・・・・
2. 第1章 Rab7B のノックダウンによるツニカマイシン誘発の分化不全の回復 Rab7A との
拮抗的な役割
2.1. 概要
2.2. はじめに
2.3. 実験材料と方法 12
 2.3.1. 抗体および化学物質
2.3.2. siRNA とプライマーの塩基配列と PCR 技術
2.3.3. 細胞培養、分化、トランスフェクション
2.3.4. 細胞溶解とイムノブロッティング13
2.3.5. 統計解析
2.3.6. 倫理に関する記述
2.4. 結果
2.4.1. Rab7A は形態分化に正の影響を与える15
2.4.2. Rab7B は形態分化に負の影響を与える 19
2.4.3. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発の形態分化の抑制を回復させる .22
2.4.4. Rab7B のノックダウンがツニカマイシン誘発の小胞体ストレスシグナリングを
回復させる
2.5. 考察
2.6. 引用文献
3. 第2章 FBD-102b 細胞における Rab9 のノックダウンが小胞体ストレスによる
形態分化の障害を回復する
3.1 概要
3.2 はじめに
3.3 実験材料と方法
3.3.1. 抗体および化学物質 40
3.3.2. 細胞培養と分化
3.3.3. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

	3.3.4.	siRNA トランスフェクション	41
	3.3.5.	細胞溶解およびポリアクリルアミドゲル電気泳動	42
	3.3.6.	イムノブロッティング	42
	3.3.7.	統計解析	42
	3.3.8.	倫理的考慮	42
3.	.4. 結果	Į Ž	43
	3.4.1.	Rab9 は細胞形態形成を負に制御する	50
	3. 4. 2.	Rab9のノックダウンはツニカマイシン誘発の形態分化の抑制を回復させる	50
	3.4.3.	Rab9 のノックダウンはジチオスレイトール (Dithiothreitol, DTT) 誘発の	
		形態分化の抑制を回復させる	50
3.	.5. 考察	₹	54
3.	.6. 引用	月文献	56
4.	結論		62
5.	謝辞		63

1.序章

1.1. 概要

オリゴデンドロサイトは中枢神経系でミエリン鞘を形成するグリア細胞の1つであり、神 経伝達の跳躍伝導、軸索の保護など、多岐にわたる重要な役割を担う。これらの細胞が適切 に機能しない場合、神経活動は阻害され、ミエリン形成不全症や脱髄疾患などの神経変性疾 患の発生原因となる。本研究では、オリゴデンドロサイトの分化を促進することにより、こ れらの疾患に対する治療的介入の可能性を探る。具体的には、オリゴデンドロサイトのリソ ソームおよびトランスゴルジネットワークへのタンパク質輸送の制御に着目し、細胞の恒常 性の維持を目指す。この輸送プロセスの最適化が、不要な物質の効率的な分解とタンパク質 の品質管理に寄与し、オリゴデンドロサイトの恒常性の維持につながると予想する。一方、 この輸送プロセスが不適切な場合、物質の分解が不十分となり、結果としてオリゴデンドロ サイトの恒常性が維持できなくなると予測する。この研究では、リソソーム及びトランスゴ ルジネットワークに局在する Rab7 と Rab9 に焦点を当て、これらのタンパク質がオリゴデ ンドロサイトの機能に及ぼす影響を調査する。この研究成果が、Rab7 と Rab9 を標的とする 新たな疾患治療薬の開発に寄与することが期待される。



図1. オリゴデンドロサイトが神経軸索に巻き付きミエリンを形成する様子

1.2. 用語説明

オリゴデンドロサイト

神経軸索を取り巻くミエリン鞘を形成し、これによって神経信号の効率的な伝達を支援す る。このミエリン鞘が適切に形成されない、または維持されない場合、多発性硬化症やペリ チェウス・メルツバッハ病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD) などの重篤な神経変性 疾患が発生するリスクが高まる。これらの疾患は、ミエリンの損傷が神経伝達を不安定にし、 最終的には神経機能の低下や身体的障害を引き起こす。オリゴデンドロサイトの健全な機能 は、中枢神経系の保護と修復過程で極めて重要であり、適切なミエリン化は神経系の健康維 持に不可欠である。

Rab タンパク質

Rab タンパク質は哺乳類で 60 種類以上が同定されており、Ras スーパーファミリーに属す る低分子量 G タンパク質のファミリーである。これらは GTP に結合した活性型と GDP に結合 した不活性型の間で切り替わる分子スイッチとして機能し、細胞内の膜輸送を制御する。Rab タンパク質は特異的なエフェクタータンパク質をリクルートし、膜出芽、輸送、融合などの プロセスを調節することで、細胞の機能と整合性を維持する。

Rab7は、細胞に取り込まれた不要な物質が初期エンドソームから後期エンドソームを経て、 最終的にリソソームと融合して分解されるプロセスを効率的に促進する役割を担う。この活 動は細胞の恒常性とクリアランスに不可欠であり、細胞の健康を保つために中心的な役割を 果たす。

Rab9は、主にゴルジ体からリソソームへのタンパク質輸送を調節し、リサイクルまたは分 解が必要な長寿命のリソソーム酵素が適切に配送されることをサポートする。このタンパク 質は、細胞が消化酵素や分解機構を必要とする際に特に重要であり、機能不全は代謝異常や 細胞の機能障害を引き起こす可能性がある。

6

小胞体ストレス

小胞体は生体恒常性を維持するために不可欠な細胞小器官であり、膜タンパク質や分泌タ ンパク質の翻訳後修飾や適切な折りたたみを担う。酸化ストレスや炎症などの外部からのス トレス、遺伝的要因や代謝異常などの内部からの負荷が細胞に加わると、小胞体でのタンパ ク質の折りたたみが障害される。この結果、折りたたみ不全による不良タンパク質が蓄積し、 小胞体ストレスが生じる。小胞体ストレスが生じると、細胞は状態を改善するために小胞体 ストレス応答 (Unfolded Protein Response, UPR)を発動し、不良タンパク質を排除しよう と試みる。しかし、過度または持続的な小胞体ストレスは UPR で対処しきれず、細胞は最終 的にアポトーシスを引き起こす。このアポトーシスにより細胞の脱落または組織の機能不全 が生じ、さまざまな疾患の発症につながる。

2. 第1章

Rab7Bのノックダウンによるツニカマイシン誘発の分化不全の回復 Rab7A との拮抗的な役割

2.1. 概要

中枢神経系 (Central Nervous System, CNS) では、オリゴデンドロサイトから分化した細 胞膜によって生成される絶縁性のミエリン鞘が神経軸索を取り囲み、活動電位の伝導を可能 にしている。中枢神経系においてミエリン鞘が果たす機能的役割にもかかわらず、オリゴデ ンドロサイト自体の細胞膜がどのような分子機構によって分化するのかは依然として明らか ではない。また、これらのシグナル伝達機構をオリゴデンドロサイト関連疾患の治療に応用 できるかどうかも解明されていない。我々は、オリゴデンドロサイトの前駆細胞である FBD-102b 細胞を用いて、Rab7 サブファミリーの一員である Rab7B がオリゴデンドロサイトの形態 分化を抑制する役割を持つことを明らかにした。Rab7A または Rab7B をそれぞれ特異的な siRNA でノックダウンした結果、形態分化が異なる方向に制御されることが示された。これら の変化は、分化や髄鞘形成に関連するタンパク質やプロテインキナーゼマーカーの発現の変 動を通じて一貫して支持された。さらに、Rab7Bをノックダウンすることで、ツニカマイシン 誘発の小胞体ストレスによる形態分化の抑制が回復されることを確認した。この小胞体スト レスは PMD などの先天性大脳白質形成不全症の主要な分子病理学的原因を模倣している。ま た、Rab7Bをノックダウンすることで小胞体ストレス下の分化不全の表現型が改善した。この 結果は Rab7B のノックダウンは PMD などのオリゴデンドロサイト疾患に対する治療薬の可能 性を示唆するものである。



図 2. Rab7 が分化における役割とツニカマイシン誘発ストレスシグナリングの回復への潜在 的応用の概念図

2.2. はじめに

Rab タンパク質は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質である。 これらは細胞内小胞輸送を媒介し、同種の標的膜や小胞と融合することで基本的な細胞機能 を制御するマスターレギュレーターとして機能する[1-3]。Rab タンパク質は小胞体、ゴルジ 体、ゴルジ体と小胞体の中間体、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、後期エ ンドソームなど、それぞれの小器官に局在する[1-4]。これらの細胞内小胞や成分を区別する ために、60 種以上の Rab タンパク質が存在する[1-4]。特に、Rab7A と Rab42 (Rab7B とも呼 ばれる) は、リソソームや後期エンドソーム周辺の膜輸送に特異的に関与する。Rab7A は広範 囲に研究されており、Rab7A と Rab7B はリソソームの生合成、位置決め、機能だけでなく、細 胞表面の受容体や接着分子の輸送や分解にも関与する[3,4]。Rab7A は後期エンドソームとリ ソソームに特異的に局在し、Rab7B はゴルジ体ネットワーク、後期エンドソーム、リソソーム に局在する[5-10]。

発生過程で、中枢神経系のオリゴデンドロサイトと末梢神経系のシュワン細胞が分化した 細胞膜からミエリン鞘が形成される。ミエリン膜は神経細胞の軸索を包み込み、何層にも重 なったミエリンとなる[11-14]。成熟したミエリンは活動電位の伝導を助けるだけでなく、酸 化的ストレス、機械的損傷、炎症などの多様なストレス要因から軸索を保護し、神経軸索へ の栄養供給にも寄与する[11-16]。

Rab タンパク質がオリゴデンドロサイト細胞の形態分化をどのように制御しているかはま だ不明であり、特に Rab7 サブファミリーの具体的な役割も明らかでない。本章では、オリゴ デンドロサイト前駆細胞の分化モデルである FBD-102b 細胞を使用し、Rab7A と Rab7B が形態 分化を異なる方法で制御していることを示す[17-20]。特に、Rab7B のノックダウンが分化を 大きく促進することが明らかとなった。この発見は、疾患に伴う未分化状態の回復の可能性 を示唆しており、実際に Rab7B のノックダウンは、ツニカマイシン処理によって誘導された 未分化形態の回復させた [21, 22]。小胞体ストレスは、PMD などの神経変性疾患で見られる 主要な病理学的原因であり、PMD のオリゴデンドロサイトはしばしば分化不全の表現型を示 す[12, 23, 24, 25, 26]。この知見は、PMD や他のオリゴデンドロサイト疾患の治療に向けた 新たなターゲットとなる可能性を示唆している。

11

2.3.1. 抗体および化学物質

抗体および化学物質の詳細は表1に示す。

Part Part Aug Part Aug <th< th=""><th>計畫街面封翹</th><th>創造会社またけ供給酒</th><th>カタロガ委長</th><th>미아노플론</th><th>佑田邊府</th></th<>	計畫 街面 封翹	創造会社またけ供給酒	カタロガ委長	미아노플론	佑田邊府
Amplementation Inter-Ambodies PPAMD128 B15588 L/C 7 av > k (B) 1500 And Section Section IMEPI Bis.gec Bis.dec Bis.dec<	1997年1997年 1997年	支援支付のための	N747 8 9	H711814	医 用氯因
Distance	SNAP	Ada Antibadian	1104004400	0445000	イノノゴロット 計 (ID) 4/500
Mathematic production Product Product </td <td>Anti-proteolipid protein 1 (PLP1)</td> <td>Allas Anubodies</td> <td>HPA004128</td> <td>8115828</td> <td>1 ムノノロット 法 (IB), 1/500</td>	Anti-proteolipid protein 1 (PLP1)	Allas Anubodies	HPA004128	8115828	1 ムノノロット 法 (IB), 1/500
Add:doi:01.00 BRL DVT/3 007 B.1.000 Add:doi:01.00 DVT/3 DVT/3 007 B.1.000 Add:doi:01.00 DVT/3 DVT/3 </td <td>Anti-myelin basic protein (MBP)</td> <td>BioLegend</td> <td>836504</td> <td>B225469</td> <td>IB, 1/500</td>	Anti-myelin basic protein (MBP)	BioLegend	836504	B225469	IB, 1/500
Attac.J.M. Harmins Kanzel, J.M. 2004. Mit (Model Science) 487.145 (251) (11.100) Attac.J.M. Kanzel, J.M. 2004. Mit (Model Science) Sear. Const Electronization (252) (11.100) Attac.J.M. And Attac.J.M. 2004. Attac.J.M. 2005. Science 300 PSI Proteines Construction (252) (11.100) Attac.J.M. 2004. Print Failly, Alley Toy Manuez, S. (197 GWTS) PSI Proteines Construction (252) (252) (251) (11.100) Attac.J.M. 2004. Print Failly, Alley Toy Manuez, S. (197 GWTS) PSI Proteines Construction (11.100) (11.100) Attac.J.M. 2004. Print Failly, Alley Toy Manuez, S. (197 GWTS) PSI Print Manuel Science (11.100) (11.100) Attac.J.M. 2004. Print Pr	Anti-actin (pan-β type)	MBL	M177-3	007	IB, 1/5,000
Add proposed an Meanmal Kines JANK, Jine JA	Anti-c-Jun N-terminal kinase (JNK, pan-JNK [p54 isoforms])	Santa Cruz Biotechnology	sc-7345	J2521	IB, 1/1,000
Applic CLAT Large and British Technology Product (CLAT) Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic Applic CLAT Applic CLAT Large and British CLAT CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic Applic CLAT Stat Applic CLAT Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Pail Proteined Stock, Nu. Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Stat Applic CLAT Pail Proteined CLAT Pail Pro	Anti-phospho-c-Jun N-terminal kinase (pJNK, pan-pJNK [phosphorvlated p54 isoforms])	Santa Cruz Biotechnology	sc-6254	c1722	IB. 1/1.000
Aniheli Son Paula Fanity Alfrad ¹⁰ Number 2 (BP 20075) Color Son Paula Fanity Alfrad ¹⁰ Number 2 (BP 20075) Color Son Paula Fanity Alfrad ¹⁰ Number 2 (BP 20075) Disc Paula Pau	Anti-CCAAT/-Enhancer-Binding Protein Homologous Protein (CHOP_GADD153)	PGI Proteintech Group Inc	15204-AP	00117318	IB 1/1 000
Part Action Construction Construction Construction Construction DASS Construction Con	Anti-Heat Shock Protein Family & (Hen70) Member 5 (BID GRD78)	PGI Proteintech Group, Inc.	11587_AP	00085813	IB 1/1 000
Description Dynamic elemental angroup 1144 EXERCIDE Difference Diselball Nacolai Texase 14728-80 COMUND 1154g T Diselball Tamabi 1428/82 COMUND 1154g T Scorefied TM Diselball 2027013 CAMDST 318 de 20 m strict - 5 Scorefied TM Diselball 2027013 CAMDST 318 de 20 m strict - 5 Scorefied TM Diselball 2027010 2027013 CAMDST 318 de 20 m strict - 5 Scorefied TM Diselball Coperation 194-1818 2867144 318 de 20 m strict - 5 Scorefied TM Diselball Coperation 194-1818 2867144 318 de 20 m strict - 5 Scorefied TM Scorefied TM Diselball 2027013 CAMDST 318 de 20 m strict - 5 Scorefied TM Diselball Diselball 2027014 318 de 20 m strict - 5 Scorefied TM Diselball Diselball 2027014 318 de 20 m strict - 5 Colemand March M	Ante-ricat onock i fotcin r annity A (risp/o) Member 3 (bir , ora 70)	l'Orribleintech Oroup, inc.	11301-Ai	00000010	10, 1/1,000
Display Market Display Display Display Biocheman (DT) Name Name Name Name Second-second (DT) Name Name Name Name Second-second (NPK) Name Name <td< td=""><td>工女後心士物員 Tunicomunin</td><td>Courses abamical company</td><td>11445</td><td>0627420 4</td><td>100 ng/ml</td></td<>	工女後 心士物員 Tunicomunin	Courses abamical company	11445	0627420 4	100 ng/ml
Display Package Package Package Package Package ScientFitt TM Dilation Budger Coperation	DMSO	Waka	047 00252	CDN0170	0.19/11
Base 2001 Packed 105/0 Packed 105/0 <td>Divisio</td> <td>Nasalai Taagua</td> <td>14109.46</td> <td>CDINUT70</td> <td>0.1/024 ·</td>	Divisio	Nasalai Taagua	14109.46	CDINUT70	0.1/024 ·
Backwai ULF XW Wah PAR Control CANOST Bid Bid Description Concernies of Marking Mark Transferdor Reagent Concernies Section 2014 Section 2014 <td>ナード・シング</td> <td></td> <td>14120-40</td> <td></td> <td></td>	ナード・シング		14120-40		
Sourcettor Constraints 2027013 OMN37 III Bit 20 / C Screen Feet TM BRAA Transforces Register CUIP Constraints 94-1913 III Bit 20 IIII Bit 20 IIII Bit 20 IIII Bit 20<	<u>土安な</u> 時余	ELLIJEII M.Waka Bura Chamiaal	1	1	1
Construct MUDIAtion Buller Currention FULTION Water Parc Central 94-18151 Sk15754 影響査社の音楽によった mmunStar Zda Coperation FULTION Water Central 96-1805 Sk15754 影響査社の音楽によった Strange Coperation PLUTIEN Water Parce Central 96-12805 Sk14440 J#144440 J#144404 <	ScreenFect TM siRNA Transfection Reagent	Corporation	292-75013	CAM0357	□製造会社の指示に従った
Soverfield Communities 194-19131 UPSTRYM XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX		Corporation			
International 2016 Constrained 257-204 WTLS19 I ##adt06mitt@orb Chemistania Naccial Faces 1164-40 229134 I ##adt06mitt@orb Sim Mik Powdar PSUBLE Make Descrit@orb 1064-40 229134 I ##adt06mitt@orb Sim Mik Powdar PSUBLE Make Descrit@orb 1064-40 229134 I ##adt06mitt@orb Sim Mik Powdar PSUBLE Make Descrit@orb 1064-100 106200 1166200 I ##adt06mitt@orb I ##adt07mitt@orb I ##adt06mitt@orb I ##adt07mitt@orb I	ScreenFect TM Dilution Buffer		194-18181	SKF5794	□製造会社の指示に従った
Immunicazia Control Market Minima Distruction Control Market Minima Stable 3000 at 125 (2010) Electron Control Market Minima Distruction Control Market M		Corporation			+
Destitution Control Units Contro Units Control Units Control U	ImmunoStar Zeta		295-72404	WTL5319	□製造会社の指示に従った
Order: Land NUMP Land		Corporation	11011.10	0004044	「制造会社の作用に供」
Skin Mike Newsler Politik Union Drie Union Social Fasse SKK-01 III ####10000000000000000000000000000000	Chemi-Lumi One Uitra	Nacalal Lesque	11644-40	L2P1314	□ 裂道会社の指示に使った
Market Bibling (MB) Shipping Solution Notable Testing (MB) Shipping Solution Notable Testing (MB) (MB) (MB) (MB) (MB) (MB) (MB) (MB)	Skim Milk Powder	FUJIFILM Wako Pure Chemical	190-12865	SKG4901	□製造会社の指示に従った
Weber Baland, MM Shipping Solution Nacial Respit ESSE-55 LASCEA Balance Fig. F. E. Science Mark Propriet Tables Inc. (BL, P. A. 1990) Tables Inc. (BL, P. A. 1990) Accessed Balance Fig. (BL, P. A. 1990)		Corporation			
Cale LOR Notional Status Indicate loc (all all all all all all all all all al	Western Blotting (WB) Stripping Solution	Nacalai Lesque	05364-55	L5M5218	□製造会社の指示に従った
Choles PCR shife (Mg2): d(FP pins) Task Bas in Second (数 - Marce Chemical 24 51 - 11/2201 CAUGE CR Second (35 - 25 - 25 - 25 - 25 - 25 - 25 - 25 -	Gflex DNA Polymerase	TaKaRa Bio (滋賀, 日本)	R060A	AL80564A	□製造会社の指示に従った
SOGEN Neigon Rev (第. 2.1.4) D11/2201 T500M (※建設なの書たいなった) Sofens Buffer Solution (bias 2-Mercapicehundi) (4-bid mutures) FL/JFLAL Water Central Cell (1):15727 VDPN805 IE.建築はの書たになった Shrine Soriti Master Ma. Fareface Bio PR005A ACCM40A IE.2.2.5.5 Shrine Soriti Master Ma. Nacada Tesque C255:55 LM8069 IE.2.2.2.5.5 Destinant Potem Masters Bioad Range for SDS-PAGE Commo Bio PM13000 T1000:5 IE.2.2.5.5 Combines 3-concertaints Master Tesque C255:55 LM80690 IE.2.2.5.5 Combines 1-concertaints Master Tesque C255:55 LM80500 T1000:52 IE.2.5.5 Combines 1-concertaints Master Tesque C2000 D10000 T1000-0400 (第.2.8.9.1.5.5.5 IE.3.5.5.5 IE.3.5.5.5.5 COUND CANCOLLORAD Concertaints Note Tesque IE.3.5.5.5.5 IE.3.5.5.5.5 IE.3.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5 COUND CANCOLLORAD Concertaints Note Tesque IE.3.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.5.	2×Gflex PCR Buffer (Mg2+, dNTP plus)	TaKaRa Bio	R060A	AL80564A	□製造会社の指示に従った
Sample Eduction (juits 2-Mecaporeband) (4-60 mixtures) FLUFE-LM Wate Charact Col 191-13272 WD24936 :E32 #210 #75:120 - L Series Start Markers (Roos Range) for S05-PAGE Nacadal Testue 0255-35 L946669 :E32 #210 #75:120 - L Perstande Potein Markers (Roos Range) for S05-PAGE Corno Die MS00 PM1500 PM1500 Exalize Potein Markers (Roos Range) for S05-PAGE Corno Die MS00 PM1500 PM1500 Exalize Potein Markers (Roos Range) for S05-PAGE Corno Die NG0 PM1500 PM1500 Exalize Potein Markers (Roos Range) for S05-PAGE SNO SMAGED TECHNOLOSY, ML2500-2 PM25002112001: Z IE at 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 # # 20 #	ISOGEN	Nippon Gene (東京, 日本)	311-02501	75009K	□製造会社の指示に従った
S-Mine South Maters (Broad Range) for SDS-PAGE TarkAna Bio RR03A AREAU Testion Nanabia Testion	Sample Buffer Solution (plus 2-Mercaptoethanol) (4-fold mixtures)	FUJIFILM Wako Pure Chemical Co	191-13272	WDP4995	□製造会社の指示に従った
Pre-standel Protein Markers (Boad Range) for SDS-PAOE Nacalal Tesque D2262-53 (J946989) : ####2078.trt C2 - fc Pre-standel Protein Markers (Boad Range Protein SMO SMOBID TECHANCLOSY, MC PMI5002 PMI50021100-12 ####2078.trt C2 - fc #TU-Likatis SMO SMOBID TECHANCLOSY, MC PMI50021100-12 ####2078.trt C2 - fc #SINADE (for 65 3) ###act 1 ###act 1 ###act 1 Smise chain for silluofrease (Control sIRNA) CCCAULULUACUCAGACUCIAGACITICI Yamaachi, J. et al. Ep. Cell Res. ###act 1 ###act 1 ###act 1 ###act 1 ###act 1 \$##act 1<	5×Prime Script Master Mix	TaKaRa Bio	RR036A	AIE0440A	□製造会社の指示に従った
Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE Cosmo Bio PM1500 PM15001 PM15002 PM15002 PM25002112005 E ####078712015 E ####078712015 <theftypee=110000000000000000000000000000000000< td=""><td>Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE</td><td>Nacalai Tesque</td><td>02525-35</td><td>L9M9989</td><td>□製造会社の指示に従った</td></theftypee=110000000000000000000000000000000000<>	Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE	Nacalai Tesque	02525-35	L9M9989	□製造会社の指示に従った
BucelBrand 3-solar Ragular Range Protein SMO SMOBIO TECHNOLOGY. NC PM2500-2 PM2500-2 PM2500-2112001-2 重要量金2の音楽に使った FBD-102b cells (mose eligodendocyte progenitor cells) Tyres.utino Tomo-dad (東京草科 Strest APM) (5 the 3 1 Bill Sci L Bill Sci L Bill Sci L Bill Sci L Sci Sci Sci Sci Sci Sci Sci	Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE	Cosmo Bio	PM1500	PM1500211500-5	□製造会社の指示に従った
Calcebrance PAC PACAUL PALADA FBD-1020 cells (incuse eligodendrocyte progenitor cells) XP, FB, IAA XB XB FBD-1020 cells (incuse eligodendrocyte progenitor cells) XP, FB, IAA XB XB Stress chain for siluciferase (Control sRNA) COCAUUCUACOUCOURAGE-GTT XB XB COCUMARACE/INCUSCACAUTOR Yamauchi, J. et al. Exp. Cell Res. XB XB XB COLUCARGACE/UNAAUGOC-GTT Z003 375 2043-2052 XB XB XB XB COLUCARGACE/UNAAUGOC-GTT Z003 375 2043-2052 XB	Fuer Brend A color Berryler Brene Bretein	SMO SMOBIO TECHNOLOGY,	DM0500 0	DM05000440004 0	
使用した細胞 Dr. Yasulino Tomo-oka (東京市) 該主心 該主心 FBD-1020:colis (mouse oligodentoropic progenitor cells) Dr. Yasulino Tomo-oka (東京市) 該主心 該主心 Sinte& finit for sileuforase (Control siRNA) Control siRNA) Yamauchi, J. et al. Exp. Cell Res. 該主心 該当心 COLUNDACCOLUNCACULATION CONT Control siRNA) Yamauchi, J. et al. Exp. Cell Res. 該当心 Sinter Sinter SiRebox 975 Sartes chain for siRebox 976 Xamauchi, J. et al. Exp. Cell Res. 該当心 Sinter	Excelbrand 3-color Regular Range Protein	INC	PINI2000-2	PIM20002112001-2	□設道会社の指示に従うた
Display Div Pail Yasufino Turn-oka (東京田科) 大学, 千葉, 日本) 該当し、 該当し、 Sines chain for alluciferase (Control sRNA) CCAULUCUACCUCARCUCARCA Yanauchi, J. et al. Exp. Cell Res. (2003) 315 2043-2052 該当なし 50 nM CUCUARAGE (UNCCACAUCIARCA) Yanauchi, J. et al. Exp. Cell Res. (2003) 315 2043-2052 該当なし 50 nM CUCUARAGE (UNCCACAUCIARCA) Xiana Kiala X Kiala X Kiala X CUCUARAGE (UNCCACAUCIARCA) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCUARAGE (UNCCACAUCIARCA) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCUARAGE (UNCCACAUCIART) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCUARAGE (UNCCACAUCIART) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCUARAGE (UNCCACAUCIART) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCUARAGE (UNCCAUCIARCAUCIART) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCUARAGE (UNCAURACIART) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCUARAGE (UNCAURACIART) Xiana Kiala X Kiala X So nM CUCU	使用した細胞				
FBD-102 cells (mose eligodentrocyte progenitor cells) 大学、子菜、日本) 勝当なし 勝当なし 勝当なし StRABE#(なから3) State Call for 56 3) State Call for 56 3) State Call for 56 3) GCAUUCUAUCCUCUAACG-ITGT Yamauchi, J. et al. Exp. Cell Res. Italianse chain for Stabba-97h Bill for 1000000000000000000000000000000000000		Dr. Yasuhiro Tomo-oka (東京理科			1
iRNAE列((5 から 3) ICCL 1 HE ENT) I Sense chain for siluciferase (Control siRNA) GCCUUCAGACUCUACACUCUAGACUTT Andisense chain for siluciferase (Control siRNA) (2009) 315:2043-2052 該当なし 50 nM CUCUAGACGUAUAAUGGC-11T Sense chain for silaba58-97h GUUCGACACUCUACACUUCCACACUTT Andisense chain for silaba58-97h GUUCGACACUCCACUUCCACACUTT Ansiesne chain for silaba58-97h GUUCGACACUCCACUUCCACACUTT Ansiesne chain for silaba58-142h GUUCGACACUCCACUUCCACACU-11T #第次 第当なし 第当なし 50 nM GUUCGACACUCCACUUCCACACUTT Ansiesne chain for silaba58-142h GUUCGAUCCACUCCACAUUCGACUCAC-11T #第次 第当なし 第当なし 50 nM GUUCGAUCCACUCCACAUUCGACUTT #誰次 第当なし 第当なし 50 nM GUUCGAUCCACUCCACAUUGGAUUTGT #誰次 第当なし 第当なし 50 nM GUUCGAUCCACUUCCAAUUGGACIT #誰次 第当なし 第当なし 50 nM GUUCGAUCCACUUCGAUUGGAUUGGACIT #誰次 第当なし 50 nM GUUCGAUUCGAUUGGAUUGGAUUGGAUUGGAUUGGAUUG	FBD-102b cells (mouse oligodendrocyte progenitor cells)	大学 千葉 日本)	該当なし	該当なし	
antware la pro-3 J Sense chain for siluefrase (Control sIRNA) GCAUUCUAUCOUCACGCATGT Aliessee chain for siluefrase (Control sIRNA) (2009) 315:2043-2052 (2009) 315:204 (2009) 315:204 (2	-: DN A 石 印 / / かた on	八子,「朱, 日本)			1
Sense chain for siluciterase (Control siRVA) GCCUIQCAACCUUUGAACAGCTGT Anisense chain for siluciterase (Control siRVA) (CUCCAACCUUUGAACAGCTGT Sense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAACCUUUCCAACACTGT Anisense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAACCUUCCAACCUCCAGAUCCTGT Sense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAACCUCCAACUCCCAAUCCTGT Sense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAACUCCAACUCCACAUCCTGT Sense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAAUCUCCAAUUCCCAAUCCTGT Sense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAAUUCCAAUUCCCAAUUCGACGCACTGT Antisense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAAUUCCAAUUCCCAAUUCGACTGT Antisense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAAUUCCAAUUCCCAAUUCGAAUUCGATGT Antisense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAAUUCCAAUUCCAAUUCGAAUUCGAAUUCGACTGT Antisense chain for siluciterase (Control siRVA) CUCCAAUUCCAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUCGAAUUUCGAAUUUCGAAUUUCGAAUUU	SIRINA BE 71 (5 2015)	T	T	1	1
GLCHUUCUAUCUCUUCAACGUUCUAACGUICUUCAACGUICUUCAACGUICUUCAACGUUCAACGUUCAACGUICUUCUCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCCAACGUICUUCUUCCAACGUICUUCUUCCAACGUICUUCUUCCAACGUICUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCU	Sense chain for siLuciterase (Control siRNA)				
Anasense chan for siRabes 1000 minutes (Lotton siRNA) (2009) 415:204:2002 CILCUACACGUAGAUGCACTOT Sense chain for siRabes 97th (2009) 415:204:2002 Bit Status (2009) 415:205:2012 Bit Stat	GCCAUUCUAUCCUCUAGAG-d1d1	Yamauchi, J. et. al. Exp. Cell Res.	該当なし	該当なし	50 nM
CUCUAAGGAUAGAUGACGUCUTIC 50 nM GAULCCCAGCUCUUCCACACHT 50 nM GAULCCCAGCUCUUCCACACHT 50 nM Anisense chain for SiRaba9-101 50 nM GAULCGCAGCUUGGAACGACHT 50 nM Anisense chain for SiRab9-142h 50 nM GUCGUCACACUUCACACUUCHCATH 50 nM GUCGUCACCUUCACACUUCAGAUUCHT 50 nM GUCAUGCACUUCACACUUCAGAUUCATH GUUCACUUCACACUUCACACUUCAGAUUCAGAUT <td< td=""><td>Antisense chain for siLuciferase (Control siRNA)</td><td>(2009) 315:2043-2052</td><td></td><td></td><td></td></td<>	Antisense chain for siLuciferase (Control siRNA)	(2009) 315:2043-2052			
Sense chain for siRabes 97th GUUGCACCUCCUCUCUCACATGT Antisense chain for siRabes 142th GUUGCACCUCCACCUCGGAUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACCUCCACCUCGGAUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACCUCCACCUCGAGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACCUCCACGUC-CTGT GUUCCACCUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACUCCACGUC-CTGT GUUCCACCUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACUCCACGUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACUCCACGUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACCUCCACGUCCACGUC-CTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACCUCCCACGUCCACTGT Antisense chain for siRabes 142th GUUCCACCUCCCACGUCCACTGT Antisense chain for siRabes 1998h GAUCCGUUCCACCUCCAAGUC-GTGT Antisense chain for siRabes 1998h GUCCGUCCCCCUCCAAGUC-GTGT Antisense chain for siRabes 1998h GUCGUCCCCUCCCAGUCUCAGT Sense chain for siRabes 1998h GUCGUCCCCUCCAGUCUCAGGUCGACGGUCAGTGT Antisense chain for siRabes 1998h GUCGGUUCCCACCUCUCAGGUCUCAGT Antisense chain for siRabes 1998h GUCGUCGUCCUCCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGT Sense primer for siRabes 1998h GUCGUCCCCUCCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCAGGUCUCUCGGUCUCUCGGUCUCUCGGUGUCUCUCGUCUCUCGUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCGUCUCUCUCUCGUCUCUCUCGUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUCUC					
GAULCOCAGUCUCUCACACIT UGUGGAAGAGCUUGGAAULC-ATIT Antisense chain for siRab9-142h GAUCGAGGAGGAC-GAU-TIT Sarase chain for siRab9-142h GUCCGUCCACUCCAGAUC-GTAT Sarase chain for siRab9-142h GUCCGUCCACUCCAGAUC-GTAT Sarase chain for siRab9-160h GUUCCAUCCAUCGAGUUGGA-CTAT Antisense chain for siRab9-160h GUUCCAUCCAUCGAGUUGGA-CTAT Antisense chain for siRab9-160h GUUCCAUCCAUCGUGGAC-GAU-TIT Antisense chain for siRab9-142h GUCCGUCCAUCCUCGAGUUGGAC-GAU-TIT Antisense chain for siRab9-160h GUUCCAUCCAUCGUGGAAC-GAU-TIT Sarase chain for siRab9-142h GUCCGUCCAUCUCGGAGUGGAC-GAU-TIT Antisense chain for siRab9-142h GUCCGUCCAUCUCGGAAU-GTAT Antisense chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUCUCGGAAU-GTAT Antisense chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUCUCGUAAU-TIT Sarase chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUCUCGUAAU-TIT Antisense chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUCUCGUAAU-TIT Antisense chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUCUCGUAAU-TIT Antisense chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUUCGAAU-TIT Sarase chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUUCCAAU-TIT Sarase chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUUCGAAU-TIT Antisense chain for siRab9-142h GUCGGUCCAUUCGAAU-TIT Sarase chain for siRab9-12h UCAGGCUUCGAAU-CICUUC-AU-TIT Sarase chain for siRab9-12h UCAGGCUUCGAAU-CICUUC-AU-TIT Sarase chain for siRab9-12h UCAGGCUUCGAAU-CICUUC-AU-TIT Sarase chain for siRab9-12h UCAGGCUUC-AU-TIT Sarase chain for siRab9-12h CUCAGGACCCAUUU-AU-TIT Antisense prime for Rab9a GTIGGCAAGGACTATCCGTCGCAUGATGGAG Sarase chain for siRab9-12h CUCAGGCUUC-AGGCC-AU-TIT Sarase chain for siRab9-12h CUCAGGACGUUC-AU-TIT Sarase chain for siRab9-12h CUCAGGCUUC-AGGCC-AU-TIT Sarase chain for siRab9-12h CUCAGGCACGUUC-AU-TIT Sarase chain for SiRab9-12h CUCAGGCAGAGGUUC-AU-TIT Sarase chain for SiRab9-12h CUCAGGCAGAGGUUC-AU-TIT Sarase chain for SiRab9-12h CUCAGGCAGGACGUUC-AU-TIT Sarase chain for Rab9a GTIGGCAAGGAGTTGCGCUGGGAGGAGG Sarase chain for SiRab9-12h CUCAGGCAGGAGGUUC-AU-TIT Sarase chain for SiRab9-12h CUCAGGCAGGAGGUUC-AU-TIT Sarase chain for SiRab9-12h Sarase chain f	Sense chain for siRab9a-97th				
Antisense chain for siRabs-97h (Current Carlot Carl	GAUUCCCAGCUCUUCCACA-dTdT	太論文	該当な」。	該当な」.	50 nM
UGUGGAAGAACUUGGAAAUC4TdT GAUCUGGACGUUGACGAAUC4TdT Anisene chain for siRabba-142hn GUUCGUUCCAGUUCAGAULC4TdT Sense chain for siRabba-168hn GUUCCAUCCAGAULGGAGUGGACG4TdT Anisene chain for siRabba-168hn GUUCCAUCCAGAULGGUAC-4TdT Anisene chain for siRabba-162hn Sense chain for siRabba-162hn GUUCGAUCGGAUGGACGAC-4TdT Anisene chain for siRabba-142hn GUUCGAUCCAGAUGGUAC-4TdT Sense chain for siRabba-142hn GUUCGAUCCAGAUC-4TdT Anisene chain for siRabba-142hn GAUCUGAAGGUUCACAUGUAC-4TdT Anisene chain for siRabba-142hn GAUCUGAAGGUUCACAUGUAC-4TdT Anisene chain for siRabba-142hn GAUCUGAAGGUUCCAGAUC-4TdT Sense chain for siRabba-198h UCAGGUUCCAAGUUC-4TdT Sense chain for siRabba-198h GUCCGUUCCAAGUUC-4TdT Sense chain for siRabba-12hn GUUCAAGUUCGGCGCACGUUC-4TdT Sense chain for siRabba-12hn GUUCAAGUUCGGCGCGCACGUUC-4TdT Kaibox	Antisense chain for siRab9a-97th	1.111	22100	M1 00	
Sense dnah for siRab9-142h GAUCGGACGACAC-dTdT Antisense chain for siRab9-142h GUCCGAUCCACAUCCASAUUC-dTdT Sense dnah for siRab9-16bh GULACAUCGAUUCGAUUC-dTdT Sense dnah for siRab9-16bh CCCAAUUCGGAUUCGAUGUAC-dTdT Antisense chain for siRab9-172h GAUCUGGAUUCGAUGUUCAC-dTdT Antisense chain for siRab9-172h GAUCUGGAUUCGAUUC-dTdT Sense dnah for siRab9-142h GUUCCUCAAUUCCAAUUCGAUUC-dTdT Sense dnah for siRab9-142h GUUCGUUCCAAUUCCAAUUCGAUUC-dTdT Antisense chain for siRab9-142h GUUCGUUCCAAUUCCAAUUCGAUUCAC-dTdT Antisense chain for siRab9-142h GUUCGUUCCAAUUCCAAUUCA-dTdT Antisense chain for siRab9-142h GUUCGUUCAAUUCAAUUCAAUUCA-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGUUCAAUUCA-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGUU-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGUU-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGUU-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGUU-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGCCCAAUU-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGCCCAUUU-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGCCCCAUUU-A-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGCCCCAUUU-A-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGACCCCAUUU-A-dTdT Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGCCCAUUU-A-dTd Antisense chain for siRab9-12bh UCAGGUUUGGAAGCCCCAUUU-A-dTd Antisense chain for siRab9-12bh UAAUUGGCGUCUUCAGGC-dTdT PORT J A Antisense primer for Rab9a Antisense primer for Rab9b Antisense primer	UGUGGAAGAGCUGGGAAUC-dTdT				
GAUCUGGAGGUGGACGAC-dTdT Antisense chain for siRab9-168th GUCCCAUCCACAUUC-GTdT Antisense chain for siRab9-168th GUUCCAUGCAGAUUUGGCA-GTdT Antisense chain for siRab9-168th GAUCUGGAGGUGGACGAC-dTdT Antisense chain for siRab9-168th GUUCCAUGCAGAUUGGAC-GAC-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GAUCUGGAGGUGGACGAC-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCCAUCCAUCUCAAUC-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCCGAUCUCCAAUUC-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGAUGUCACGUGAUU-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGAUGUCACGCUUC-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGAUUCGGAAGCGUUU-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGAUUUCGGAAGCGUUU-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGAUUUCGGAAGCGUUU-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGUUCGGAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGUUCGGAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGUUCCCCCCGGGCUUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9-172th GUUCGGUUCCCCCCGGGCUUUUA-dTdT Antisense primer for actin (internal control) ATCGATUCAUGGCUUCCUCAGGC-dTGT CICAGAUUUCGGAUUU-dTdT Antisense primer for actin (internal control) ATCGATUCAUGGCGUCCUUCATGCGGGCGTGT CICAGAGUUCUCAGGC-dTGT CICAGAGUUCUCAGGC-dTGT CICAGAGUUUCGGAAGCTTCCCGGGGCGGGC Antisense primer for Rab9a GTTGGCAGGAAUUUAATGGT Antisense primer for Rab9a ACAGCAUGGGUCCUTTTTTAAATATTCTTCTTG Sense primer for Rab9a ACAGCAUGGGGCGTGT CICAGAGGCGGGGGGGG ACTIGGAGGAGGGGGGGGGGGG ACTIGGAGGAACTGGCTGTT Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGTGGTGTGCGCAATGGGTGGG ACTIGGAGGAACTGGCTGTTG CICAGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	Sense chain for siRab9a-142th				
Antisense chain for siRab9-142th 이 가 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이 이	GAUCUGGAGGUGGACGGAC-dTdT	★論文	該当台	該当たけ	50 nM
GUCCQUCCACUCCAAUC-dTdT GUUACCAUGCAAUC-dTdT Antisense chain for siRab9a-168h GUUACCAUGCAGAUUUGGG-dTdT Antisense chain for siRab9a-168h GUUCCGAAUC-dTdCAUGGUACC-dTdT Antisense chain for siRab9a-142h GAUCCGCAAUC-dTdT Antisense chain for siRab9a-142h GUUCCGAAUC-dTdT Antisense chain for siRab9a-142h GUUCCGAAUC-dTdT Antisense chain for siRab9a-142h GUUCCGAAUC-dTdT Antisense chain for siRab9a-142h GUUCCGAAUC-dTdT Antisense chain for siRab9a-142h GAUCCGCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9a-199h GAACCCUUCCGAACCUUA-dTdT Antisense chain for siRab9a-199h GAACCCUUCCGAACCUUA-dTdT Antisense chain for siRab9a-199h GAACCCUUCCGAACCUUA-dTdT Antisense chain for siRab9a-199h GAACCCUUCCGAACCGUUA-dTdT Antisense chain for siRab9a-122h GCUUGGGAACGCAUUU-ATdT Antisense chain for siRab9a-212h GCUUCGGAACCGUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212h GCUUCGGAACCGUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212h GCUUCGGAACCGUUA-dTdT Antisense primer for aclu (internal control) ATGGATGACGCCAUUUA-dTdT Antisense primer for aclu (internal control) ATGGATGACGGGCCGTGCACCGGGG Sense primer for aclu (internal control) ATGGATGACGGCGCGCGGCGTGCACCGAGG Antisense primer for aclu (internal control) ATGGATGACGGCGCCAUUUA-dTGT Antisense primer for aclu (internal control) ATGGATGACGGCGCCAUUUA-dTGT Antisense primer for aclu (internal control) ATGGATGACGGCGCCAGGGG GTTGCCACGAGTTCCTCTGCGGTGCACCGAGG Sense primer for Rab9a Antisense primer for Rab9a Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGTTGCTCTTTTGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGTTGGCTGCTTTTTGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGTTGGCTGTGTTTTTGAACAG ACAGCAAGTTGGCTCTTTTTGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGTTGGCTGTGTG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGTTGGCTGTGTG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGTTGGCTTTTTGAACAG ACGACGAAGTTGGCTTTTTGAACAG ACGACGAAGTTGGCTGTGGGTGGCGGG Sense primer for Rab9a ACAGCAAGTTGGCTGTGTG ATGGAGGAACTGTGCTTTTTGAACAG ACGACGAAGATGGTTGGCTGTGG ATGGAGGAACATGGTCTGTGGGTGGGGGGGGG ACGACGAAGATGGGTGGCGGGGG ACGACGAAGATGGGTGGCGGGGGG	Antisense chain for siRab9a-142th	半 調入	×3,40	x340	
Sense chain for siRab9a-166th 該当なし 該当なし 該当なし 50 nM CULACALGECAGAUUUGGATTT 50 nM CCCAAUCUGCAUGGUAAC-GTGT 50 nM Sense chain for siRab9a-166th CULGAUGGUAGCAGAUUUGGAGCGAAC-GTGT 50 nM GAUCUGGAGCUCCAAUCUCCGAUC-GTAT 50 nM GUCCUUCCAUCCUCCAAUC-CICCAAUC-CICCAAUC-CITT 50 nM GUCCUUCCAAUGCUUCGAAUC-CICCAAUC-CICCATT 50 nM Sense chain for siRab9b-199th 50 nM CUCGUACGAUUCGAAUUUUA-cTdT	GUCCGUCCACCUCCAGAUC-dTdT				
GULACAUGCAUGCAGAUUUGGG-dTdT 林識文 該当なL 50 nM Antisense chain for siRab6160h 本識文 該当なL 50 nM CCCAAAUCUGCAUGGUAAC-dTdT Antisense chain for siRab9b-142th GULCIGCAGQUGGACCGAC-dTdT Antisense chain for siRab9b-142th GUCCGCAUCUCCACCUCCAGAUC-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th GACGCUUCCGAAGCUUC-dTdT 50 nM CACGCOUCCGAAGCCUUC-dTdT GULCAGGAUGCCAAGUUU-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th CAGCUUCCGAAGCUUL-dTdT Sense chain for siRab9b-121th UAAAUGGCGUUC-dCAGGAGCUU-dTdT	Sense chain for siRab9a-166th				
Antisense chain for siRab9-166th CCCAAUCUIGCAUGGUAC-GTGT CAUGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGUAGU	GUUACCAUGCAGAUUUGGG-dTdT	★論文	該当台	該当たけ	50 nM
CCCAAUCUGCAUGGUAC-dTdT Sense chain for siRab9b-142th GAUCUGGAGGGAC-dTdT Antisense chain for siRab9b-142th GUCCGUCCACCUCCAGAUC-dTdT Sense chain for siRab9b-199th GAACCGUUCCGAACCUUC-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th UCAGCCUUCGGAACCCUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-199th UCAGCCUUCGGAACCUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-199th GCACCGCAUUC-GGAACCCUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-12th UCAGCCUUCGGAACCCUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-12th UCAGCCUUCGGAACCCUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-12th UCAGCCUUCGGAACCCAUUU-dTdT Antisense chain for siRab9b-12th UCAGCGUUCUCAGGC-dTdT PCRプライマ- (5 か6 3) Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACCATTACCGCTGCCGCTGGTC Antisense primer for actin (internal control) ATGGATGACCATTCGCGTCCCAGTGGAG Sense primer for Rab9a Antisense primer for Rab9a ACAGCAGAGTGCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAGAGTGACTTGCTTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAGGAGTGACTTGCTTTTGAACAGG ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ACGCAGGAGGAGGAGTGCTTTTGGCTTGCGG Sense primer for Rab9b ACGCCAGGAGGAGTGGTTTGGCTGGGG Sense primer for Rab9b ACGCCAGGAGGAGTGGTTTGGCTGGGG Sense primer for Rab9b ACGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAGG ACGCCAGGAGGAGGGTGCTTGGCTGGGG Sense primer for Rab9b	Antisense chain for siRab9a-166th	平 冊文	1×3/20	243/20	30 110
Sense chain for siRab9b-142th GAUCUGGAGGUGGACGUGCATdT Antisense chain for siRab9b-142th GUCCGUCCACCUCCAGAUC-dTdT Sense chain for siRab9b-199th UCAGCCUUCGAAGCCUUC-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th UCAGCCUUCGCAAGCCUUC-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th UCAGCCUUCGGAAGCCUUC-dTdT GCCUGAGGACGCUC-dTdT GCCUGAGGACGCUC-dTdT GCCUGAGGACGCCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th GCCUGAGGACGCCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th GCCUGAGGACGCCCAUUUUA-dTdT Antisense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATATCGCTGCGGTGC Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTCCGTGGCGCAGGAGG Sense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTGCGTGGCACGATGGGG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAATCGTCTCTTTTGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCACAGATGGCTTGCTGGGG ACGCGGGAAAATCGTCTCTTTTGAACAG Antisense primer for Rab9a ACGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTGAACAG ATISENse primer for Rab9b ACGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTGAATATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ACGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTGAACAG ATISENSE primer for Rab9b ACGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTTAAAATATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b	CCCAAAUCUGCAUGGUAAC-dTdT				
GAUCUGGAGGUGGACGAC-GTdT Antisense chain for siRab9b-192th GAACGCUUCCAAUC-CTdT Sense chain for siRab9b-199th GAACGCUUCCGAAGCCUGA dTdT Antisense chain for siRab9b-193th UCAGGCUUCGGAAGCGUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-192th GCUGAGCACCCACUCCAGG-CTdT Sense chain for siRab9b-212th CACGCUULUA-4TdT Antisense chain for siRab9b-212th UAAAUGGCGUCCUCAGGC-CTdT PCRプライマー (5'か5 3) Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATGACGTGCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTGACGTTAGCCTGC Antisense primer for Rab9a ACAGCACAGTGACGTTGCGCTGTC Antisense primer for Rab9a ACAGCAGAGTGACGTTGCGCTGTG Antisense primer for Rab9a ACAGCAGAGTGACGTTGCGCTGTG Antisense primer for Rab9a ACGCAGAGATGACGTTGCGTTGGG AGGCAGGAAATCGTCTCTTTTGAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ACGCAGAGATGACGTTTGCGCTGGG	Sense chain for siRab9b-142th				
Antisense chain for siRab9b-142th (加速 (中国) (加速 (加速 (加速 (中国) (加速 (加速 (加速 (中国) (加速 (加速 (加速 (加速 (加速 (Put) (加速 (Put) (Du) (Du) (Du) (Du) (Du) (Du) (Du) (Du	GAUCUGGAGGUGGACGGAC-dTdT	+ ** +*	林 业+N	⇒ 坐 ナ>1	50 pM
GUCCGUCCACCUCCAGAUC-dTdT Sense chain for SRab9b-199th Antisense chain for sRab9b-199th UCAGCCUUCGAACCCUCA-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th UCAGCCUUCGGAACCCUC-4TdT Sense chain for siRab9b-212th GCCUGAGGACGCCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th GCCUCAGGC-4TdT PCRプライマー (5 から 3) Sense primer for actin (Internal control) ATGGATGACGATATCGCTGCGGTGGAC Antisense primer for actin (Internal control) CTAGAAGCACTTTAGCGGTGCACGATGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGCATTCGCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a GTTGGCAAGCATTGCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a GTTGGCAAGCATTGCGTTGG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGCATTGCGTTGGTG AGGATGACGATTGCGTTGGTG ACAGCACAGTGACGTTTGCGTTGG AGGAGGAAAATCGTCTCTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGAGAAATCGTCTCTTTTGAACAG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGAGATATCGTCTCTTTTGAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b	Antisense chain for siRab9b-142th	今 冊又	該当なし	該当なし	50 HW
Sense chain for siRab9b-199th GAACGCUUCCGAAGCCUGAGTGT Antisense chain for siRab9b-192th UCAGGCUUCGGAAGCGCUUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-212th Antisense chain for siRab9b-212th CCUGAGAGCGCAUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th UAAAUGCGUCUCCAGCC-dTdT PCRプライマ (5 か6 3) Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATACCGTGCGGTGCACGATGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTTGCGTTGG AGGGAGAAATCGGTCTCTTTTGAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGAGATGAGTTGGGTGGAG	GUCCGUCCACCUCCAGAUC-dTdT				
GAACGCUUCCGAAGCCUGA-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th UCAGGCUUCGGAACGCUUC-dTdT Sense chain for siRab9b-212th GCCUGAGGACGCCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th UAAAAUGCGCUCCUCAGC-dTdT PCRプライマ (5 から 3) Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTC Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTCACTCTATGAACAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCGCTTGGCTG Sense primer for Rab9a Sense primer for Rab9a CTTGGCAGAGAGTTCGCTTGGCTG Sense primer for Rab9a ACAGCAAGAGTCGCTTGCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATTGGCTTGGCTTG Sense primer for Rab9a ACAGCAAGATTGGCTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCTGCAAGATTCGCTTGGCTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGAGATTGGCTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGAGATTGGCTTGGCTTGG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGACAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGACAATCGTCTCTTTTGAACAG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGACAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGACAATTCGCTTGGCTTGG	Sense chain for siRab9b-199th				
Antisense chain for siRab9b-199th 小副文 陸当なし 医当々し 50 nM UCAGGCUUCGGAAGCGUUC-4TdT GCCUGAGGACGCCUUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th GCCUGAGGACGCCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th UCAAAUGCGCUCCUCAGGCC-dTdT PCRプライマー (5 から 3) Sense primer for actin (internal control) ATIGGATGACGATATCGCTGCGGTGGACG ATIGGATGACGATATCGCTGCGGTGGAGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGGACTTCCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTGCTTGGCTTG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTGCTTGCTTG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTGCTTGCTTG ATGGACGACAGTTGGCTTGGCTTG ATGGCAGGATAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG ATGGCAGGACAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG ATGGCAGGACAATCGTCTGCTTGGG ATGGCAGGACAATCGTCTGCTTGGG ATGGCAGGACAATCGTCTTGGGTGAGGAG	GAACGCUUCCGAAGCCUGA-dTdT	+	=+ 1/ +>1	=+ 1/ +>1	50 -M
UCAGGCUUCGGAAGCGUUL-dTdT Sense chain for siRab9b-212th Antisense chain for siRab9b-212th CCUCAGGCAGCCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th UAAAUGCGUCUCAGCG-C4TdT PCRプライマー (5 かる 3) Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATATCGCTGCGGTGCACGATGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGACTTTGCGCTCGTC Antisense primer for Rab9b ACGGCAGGAAAATCGCTCCTTTTTAAAATAATTCTTCTTGG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGATTGCGCTCGTCTTTTGAAATAATTCTTCTTGG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGAGATGCGTTTGGCGTGGAG	Antisense chain for siRab9b-199th	本語 义	該当なし	該当なし	50 NM
Sense chain for siRab9b-212th GCCUQAGGACGCQCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th UAAAAUGGCGUCCUCAGGC-dTdT PCRプライマ (5 から 3) Sense primer for actin (internal control) ATIGAGTAGCGATCCGCTGCGCTGCTC Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTCGCTGCGCTGCACGATGGAG GTTGGCAAGAGTCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATTGGCTTGG Sense primer for Rab9a ACAGCAAGATTGGCTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ACGGCAAGATTGGCTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ACGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGATTGGCTTGGCTTGG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGATTGGCTTGGCTTGG ACGCAAGATGGCTTTGGCTTGGC	UCAGGCUUCGGAAGCGUUC-dTdT				
GCCUGAGGACGCCAUUUULA-dTdT Antisense chain for silkab9b-212th UAAAAUGCGCUCCUCAGCAGCC-dTdT PCRプライマー (5 から 3) Sense primer for actin (Internal control) ATGGATGACGATATCGCTGCGGTGC Antisense primer for ractin (Internal control) CTAGAAGCACTTGCGGTGCACCGATGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGCAGTTGCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a GTTGGCAAGCAGTTGCTTGGTG Sense primer for Rab9b ACGGCAGGAAAATCGTCTGTTTTGAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGAGTTGGCTTGGGTG	Sense chain for siRab9b-212th				
Antisense inter for action (internal control) CTAGAAGCAGATGACGTTCECCGAGGCATGT PCRプライマー (5 から 3) Sense primer for actin (internal control) ATIGGAGGAGATGACGATATCGCTGCGGTC Antisense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCGCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGACTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ACGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGAGAATCGTTTGGCTTGGG	GCCUGAGGACGCCAUUUUA-dTdT	+ ***	=+ 1/ +1	ま ** ナン	50 -M
UAAAUGGCGULCUCAGGC-dTdT PCRプライマー(5から3) Sense primer for actin (internal control) ATIGAT GACGATATCCCTGCGCTGGTC Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCAGTCGCGCGCGCGGGAGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTGGG ATIGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAAGATGAGTTTGGCTTGGG	Antisense chain for siRab9b-212th	本語 义	該当なし	該当なし	50 NM
PCRプライマー (5 から 3) Sense primer for actin (internal control) ATIGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTC Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTGCGGTGCACCAATGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCGCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAGGATTGGCTTGGGTTGGG	UAAAAUGGCGUCCUCAGGC-dTdT				
Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATATCGCTGCGGGTC Antisense primer for Actin (internal control) CTAGAAGCACTTGCGGTGCACGATGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGACTTTGGCTTG ATGGCAAGAATCGTCTCTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b ATGGCAAGATGAGTTTGGCTTGGG	PCRプライマー (5' から 3')	•	•		
ATGGÀTGACGATATĊGCTGCGCTGĞTC Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTGCGGTGCACGATGGAG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTAAAATAATTCTTCTTG ACAGCCAAGATGAGTTGGCTTGGG	Sense primer for actin (internal control)				
Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTCCCGGTGCACCATGGAG Sense primer for Rab9a GTIGGCAAGAGTTCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ACAGCAAGATGAGTTGGCTTGGCTTG ACAGCAAGATGAGTTGGCTTGGGTTGGG ACTION ACTION AC	ATGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTC	Kato, Y. et. al. Exp. Cell Res.		=+ 117 +- 1	50 . M
CTAGAAGCACTTGCGGTGCACGATGGÁG Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b	Antisense primer for actin (internal control)	(2021) 405:112654	該当なし	該当なし	50 NM
Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTIGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b CCAACAGCAGATGAGTTLGGCTTGGG	CTAGAAGCACTTGCGGTGCACGATGGÁG	[```',			
GTTGGCAAGAGTTCTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b CCAACAGCAGAGTGAGTTGGCTTGGG	Sense primer for Rab9a	1			
Antisense primer for Rab9a 本離文 該当なし 該当なし 50 nM ACAGCAAGATGAGTTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b TCAACAGCAGCAAGATGAGTTTGGCTTGGG	GTTGGCAAGAGTTCTCTTATGAACAG	+=++	=== 10 == 1	24 yr 4 y	
ACAGCAAGATGAGTTGGCTTG Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b TCAACAGCGCAGAATGAGTTTGGCTTGG	Antisense primer for Rab9a	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Antisense primer for Rab9b ArtigGCAGGAAAATCGTCTCTTTTTAAAATAATTCTTCTTG Antisense primer for Rab9b TCAACAGCAGAGTGAGTTTGGCTTGG	ACAGCAAGATGAGTTGGCTTG	1			
ATGGCAGGGAAATCGTCTTTTTTAAAATAATAATTCTTCTTCTG Antisense primer for Rab9b TCCAACAGCGCAGATTGAGCTTTGGCTTGG	Sense primer for Rab9b				
Antisense primer for Rab9b TICAACAGCAAGATGAGCTTTGGCTTGG	ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTAAAATAATTCTTCTTG		1		
TCAACAGCAAGATGAGTIIGGCTIGG	Antisense primer for Rab9b	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
	TCAACAGCAAGATGAGTTTGGCTTGG				

表1. 使用した抗体及び化学物質の詳細

2.3.2. siRNA とプライマーの塩基配列と PCR 技術

siRNA とプライマーの塩基配列は表 1 に示した。逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) では、cDNA を ISOGEN (NIPPON GENE,東京、日本)から抽出した全 RNA から PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio,京都、日本)を使用して調製した。メーカーの説明に従い、RT 産 物からの PCR 増幅は Gflex DNA Polymerase (Takara Bio,京都、日本)を使用し、98℃での 変性反応 (0.2 分)、アニーリング温度に応じて 56~65℃でのアニーリング反応 (0.25 分)、 68℃での伸長反応 (0.5 分) からなるサイクルを 30~36 回行った。得られた PCR 産物を 1% アガロースゲル (Nacalai Tesque,京都、日本)にロードし、ゲル電気泳動で解析した。

2.3.3. 細胞培養、分化、トランスフェクション

FBD-102b 細胞(東京理科大学・岡友博博士より提供)は、オリゴデンドロサイト前駆細胞 株に属し[15-18]、10%熱不活性化ウシ胎児血清(FBS)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 混合培地(Nacalai Tesque, 京都、日本)で、通常の培養皿(Nunc ブラ ンド、Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)上で培養した。ペニシリ ンとストレプトマイシンの混合溶液(Nacalai Tesque, 京都、日本)を含む、5%C02、37℃ の条件下で培養を行った[16,18]。ScreenFect siRNA transfection kit (FUJIFILM, 東京、 日本)を使用し、dTdT で合成した 21-mer siRNA で細胞をトランスフェクトし、トランスフェ クションの 4 時間後に培地を交換した。分化を誘導するため、細胞をポリリジン(Nacalai Tesque, 京都、日本)でコートした培養皿(Greiner Bio-One, Oberösterreich, Austria) 上で、FBSを含まない培養液中、5%C02、37℃で3日間培養した[15-18]。一次突起を持たな い細胞をカテゴリー1、一次突起を持つ細胞をカテゴリー2、一次突起から分岐した二次突起 やミエリン膜様の広範な突起を持つ細胞をカテゴリー3と分類した。

2.3.4. 細胞溶解とイムノブロッティング

細胞を溶解バッファー (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl2, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethane sulfonylfluoride, 1 μ g/ml of leupeptin, 1 mM EDTA, 1 mM Na3V04, 10 mM NaF, and 0.5% NP-40) で溶解し、遠心分離して細胞溶解液として回収した。その上清をサンプルバッファー (Nacalai Tesque, 京都、日本) で変性した後、あらかじめ作製したドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (Nacalai Tesque, 京

都、日本)で分離した。電気泳動で分離したタンパク質を、ろ紙(FUJIFILM,東京、日本)で 挟んだ PVDF 膜(FUJIFILM,東京、日本)に移し、スキムミルクブロッカー(FUJIFILM,東京、 日本)でブロッキングした後、一次抗体を用いてイムノブロッティングを行い、続いてペル オキシダーゼ標識二次抗体を用いた。CanoScan LiDE400 イメージスキャナー(Canon,東京、 日本)でペルオキシダーゼ反応性バンドを X線フィルム(FUJIFILM,東京、日本)に取り込 んだ後、UN-SCAN-IT ソフトウェア(Silk Scientific, Orem, UT, USA)を用いてデジタルス キャンした。定量された免疫反応性バンド(3ブロット)は、Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて、100%に設定したコントロールの免疫反応性バンドと比較した。

2.3.5. 統計解析

実験データは平均値±標準偏差(SD)で示され、グループ間の比較は Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA)を使用して独立した Student's t-test で行った。p 値が 0.05 未満であれば、結果を統計的に有意と判断した。

2.3.6. 倫理に関する記述

in vitro および in vivo での遺伝子組換え技術を、東京薬科大学遺伝子・動物愛護委員会 が承認したプロトコール(承認番号 LS28-20 および LSR3-011)に従って実施した。

2.4. 結果

2.4.1. Rab7A は形態分化に正の影響を与える

Rab7A がオリゴデンドロサイトの形態分化の調節に関与しているかを調べるために、FBD-102b 細胞に Rab7A 特異的な siRNA (図 3 参照) をトランスフェクトした。Rab7A のノックダ ウンは、対照のルシフェラーゼと比較して、形態分化を抑制した (図 4、A および B)。これら の変化は、分化および髄鞘形成マーカータンパク質の MBP および PLP1 の発現レベルが減少し たことによって確認した (図 5、A および B)。対照的に、アクチンの発現レベルは、Rab7A ノ ックダウン細胞と対照ノックダウン細胞で変化がないことから、Rab7A が形態分化を促進す る役割を果たしていることを示唆している。



図3. FBD-102b 細胞における Rab7A および Rab7B siRNA のノックダウン効率の比較 A, B. FBD-102b 細胞に、製造業者の指示に従って各 siRNA(siRNA 番号は A1TG3 から のヌクレオチドを示す)をトランスフェクションした。それぞれのトータル RNA を用 いて逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応を行い、各ノックダウン効率を評価した。Rab7A siRNA の 96 番と Rab7B siRNA の 217 番を実験に使用した。



図 4. Rab7A のノックダウンはオリゴデンドロサイトの形態分化を抑制する

A. FBD-102b 細胞に対して、コントロールのルシフェラーゼまたは Rab7A の siRNA をトランスフェクションした。分化を促すか否かの条件(+分化、-分化なし)で3日間培養した。代表的な細胞画像(黒線で示されている)から拡大した画像も図に示した。
B. 分化の状態により、一次突起を持たない細胞はカテゴリー1として、一次突起を持つ細胞はカテゴリー2、一次突起から分岐する二次突起を持つ細胞や広範な膜を持つ細胞はカテゴリー3として分類した。各カテゴリーに属する細胞は顕微鏡下で数え、その割合を示した。分化の促進またはコントロール条件下で3日後に、統計的評価を行った(**p<0.01; n=10フィールド[合計 480 細胞])。

図 5. Rab7A のノックダウンはオリゴデンドロサイト分化

マーカータンパク質の発現を減少させる

25

A, B. 細胞にコントロールのルシフェラーゼまたは
Rab7AのsiRNAをトランスフェクションした。分化誘導後、細胞を溶解し、プロテオリピドタンパク質1
(PLP1)、ミエリン基本タンパク質(MBP)、または
コントロールのアクチンに対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的評価を実施した(*p<0.05; n=3ブロット)。



2.4.2. Rab7B は形態分化に負の影響を与える

次に、FBD-102b 細胞に Rab7B 特異的な siRNA (図 3 参照) をトランスフェクトした。Rab7B のノックダウンは、コントロールのルシフェラーゼと比較し、オリゴデンドロサイトの形態 分化を促進した (図 6、A および B)。また、ノックダウンは分化および髄鞘形成マーカータン パク質の発現レベルを増加させたが、対照タンパク質の発現レベルには影響を与えなかった (図 7、A および B)、これは Rab7B が形態分化に抑制的な役割を果たしていることを示して いる。



図 6. Rab7B のノックダウンは形態分化を著しく促進する

A. FBD-102b 細胞に対して、コントロールのルシフェラーゼまたは Rab7B の siRNA をト ランスフェクションした。分化を促すか否かの条件(+ 分化、- 分化なし)で3日間培 養した。代表的な細胞画像(黒線で示されている)から拡大した画像も図に示した。

B. 分化の促進またはコントロール条件下での3日後に、統計的評価を行った(**p<0.01 および*p<0.05; n=10 フィールド[合計 520 細胞])。各分化カテゴリーに属する細胞は その割合で示した。

図 7. Rab7B のノックダウンは分化マーカータンパク 質の発現増加を著しく促進する

A, B. 細胞にコントロールのルシフェラーゼまたは
 Rab7Bの siRNAをトランスフェクションした。分化誘
 導後、細胞を溶解し、プロテオリピドタンパク質1

(PLP1)、ミエリン基本タンパク質(MBP)、または コントロールのアクチンに対する抗体を使用してイ ムノブロッティングを行い、統計的評価を実施した (*p<0.05; n=3 ブロット)。</p>



2.4.3. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発の形態分化の抑制を回復させる

Rab7B の結果から、Rab7B のノックダウンが、疾患状態などで抑制された形態分化を回復す るのに役立つ可能性が示唆された[25, 26]。ツニカマイシンを用いて小胞体ストレスを誘導 し[21, 22]、オリゴデンドロサイトおよび多くの神経疾患でよく見られる細胞病態を模倣し た[23, 24]。実際に、ツニカマイシンは FBD-102b 細胞において用量依存的に形態分化を抑制 した(図 8)。さらに、ツニカマイシンは FBD-102b 細胞において用量依存的に形態分化を抑制 した(図 8)。さらに、ツニカマイシンは小胞体ストレスシグナルの発現を増加させ、JNK と eIF2A のリン酸化レベルを上昇させた。JNK および eIF2A のリン酸化は小胞体ストレスシグナ リングの主要な下流である[29, 30]一方、JNK および eIF2A 自体の発現レベルには影響を与え なかった。予想された通り、実験条件下で、Rab7B のノックダウンはツニカマイシンによって 誘導された形態分化の抑制を回復させた(図 9、A および B)。また、分化マーカータンパク質 の発現レベルが増加したことから、Rab7B が小胞体ストレス誘発の形態分化抑制を回復させ る効果的なターゲットであることが示された(図 10、A および B)。一方、Rab7A のノックダ ウンは、ツニカマイシンによる形態分化の抑制効果(図 11) やマーカータンパク質の発現レ ベルの変化(図 12)を回復させることができなかった。



図 8. ツニカマイシンの小胞体ストレス誘導剤としての影響

A, B. FBD-102b 細胞にツニカマイシンまたはコントロールのそれぞれの濃度をトラ ンスフェクションした。細胞を溶解し、ミエリン基本タンパク質(MBP)またはコン トロールのアクチンに対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的 に評価した(, p<0.01; n=3 ブロット)。C-F. 同じ条件で、リン酸化 c-Jun N 末端 キナーゼ (pJNK)、c-Jun N 末端キナーゼ (JNK)、リン酸化真核翻訳開始因子 2A (peIF2A)、または真核翻訳開始因子 2A (eIF2A)に対する抗体を使用してイムノブ ロッティングを行い、統計的に評価した(, p<0.01; n=3 ブロット)。



図 9. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発小胞体ストレスによる形態分化 抑制を回復する

A. Rab7Bの siRNA をトランスフェクションした細胞にツニカマイシン(100 ng/ml) を投与した。細胞は分化を促すか否かの条件(+ 分化、- 分化なし)で3日間培養 した。代表的な細胞画像(黒線で示されている)から拡大された画像も図に示した。
B. 分化の促進またはコントロール条件下での3日後に、統計的評価を行った (**p<0.01 および*p<0.05; n=10 フィールド[合計 512 細胞])。各分化カテゴリ ーに属する細胞はその割合で示した。 図 10. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発小胞 体ストレスによる分化マーカータンパク質の発現減少を 回復する

A, B. Rab7Bの siRNA をトランスフェクションした細胞に ツニカマイシン (100 ng/ml) を投与し、分化誘導後、細胞 を溶解し、プロテオリピドタンパク質1 (PLP1)、ミエリ ン基本タンパク質 (MBP)、またはコントロールのアクチン に対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統 計的評価を実施した (*p<0.05; n=3 ブロット)。





図 11. Rab7A のノックダウンはツニカマイシンによる形態分化抑制を回復しない

 A, B. FBD-102b 細胞に Rab7A の siRNA をトランスフェクションし、ツニカマイシンを 投与した。代表的な細胞画像(黒線で示されている)から拡大された画像も図に示した。
 分化した細胞は統計的に評価した(**, p<0.01 および*, p<0.05; n=10 フィールド)。 図 12. Rab7A のノックダウンはツニカマイシンによる 分化マーカータンパク質発現の抑制を回復できない A, B. 細胞に Rab7A の si RNA をトランスフェクション し、ツニカマイシンを投与した。細胞を溶解し、プロ テオリピドタンパク質1 (PLP1)、ミエリン基本タンパ ク質 (MBP)、またはコントロールのアクチンに対する 抗体を使用してイムノブロッティングが行われ、統計

的に評価された(*, p<0.05; n=3 ブロット)。



2.4.4. Rab7B のノックダウンがツニカマイシン誘発の小胞体ストレスシグナリング を回復させる

最後に、Rab7Bのノックダウンが小胞体スト レスシグナルを回復するかどうかを検討し た。Rab7Bのノックダウンは細胞内でJNK およ び eIF2A のリン酸化レベルを減少させたが、 JNK および eIF2A の発現レベルには変化を与え なかった(図13、A および B)。これらの結果 と併せて、Rab7Bのノックダウンはツニカマイ シン誘発の小胞体ストレスに対して効果的で あると考えられる。

さらに、Rab7Bのノックダウンは小胞体スト レス条件下でキナーゼ活性の増加に関わる HSPA5 タンパク質の発現レベルを減少させた。 HSPA5 は Rab7B ノックダウンによる小胞体スト レスシグナリングの回復を目指すターゲット である可能性が高い[29]。

図 13. Rab7B のノックダウンはツニカマイシ ン誘発小胞体ストレスシグナリングを回復す る

A, B. Rab7BのsiRNAをトランスフェクション
 した細胞にツニカマイシン (100 ng/ml)を投
 与し、分化誘導後、細胞を溶解し、リン酸化 c Jun N 末端キナーゼ (pJNK) または c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) に対する抗体を使用してイ



ムノブロッティングを行い、統計的評価を実施した(**p<0.01; n=3 ブロット)。

C, D. これと同じ条件で、リン酸化真核翻訳開始因子 2A (peIF2A) または真核翻訳開始因子
 2A (eIF2A) に対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的評価を実施した
 (*p<0.05; n=3 ブロット)。

2.5. 考察

Rab7A と Rab7B はさまざまな細胞や組織で広く発現し、後期エンドソームとリソソーム間 の輸送システムの調節に直接関与している[31-34]。したがって、Rab7 サブファミリー分子の 機能不全は、タンパク質の状態を制御するための細胞内輸送システムの不全に直接関連して いると考えられる[31-34]。また、この不全は細胞の恒常性におけるオートファジーの不具合 とも関連している[31-34]。さらに、基本的な細胞代謝のマスターレギュレーターである mTOR に関連したリソソームシグナリングの減少が見られる[35, 36]。したがって、Rab7 は基本的 な細胞機能の多くの側面にとって重要であると考えられる。

実際に、Rab7Aの特定のアミノ酸突然変異は、末梢神経系で進行性神経障害を引き起こす。 これにはシャルコー・マリー・トゥース病型 2B(CMT2B)が含まれ、その共通の特徴は遠位感 覚の喪失、難治性の足の潰瘍などである[37-40]。特に注目すべきは、すべての Rab7A 突然変 異が一貫して恒常的に Rab7A の活性化を引き起こすことである[40, 41]。後期エンドソーム とリソソーム間の輸送を含む細胞生理機能を円滑にするため、Rab タンパク質は通常、活性型 の GTP 結合型と不活性型の GDP 結合型の間でサイクルを必要とする [1-3]。 このスイッチング サイクルは関連する小胞の輸送に不可欠である[1-3]。したがって、GTP ロックされた Rab7A が細胞内で小胞のリサイクルを阻害すると推定されるが、GTP ロックされた Rab7A が特に末 梢神経障害を引き起こす理由はまだ明らかではない。さらに、Rab7B の突然変異が CMT2B や 他の末梢神経障害を引き起こすかどうかも未解明である。本研究では、オリゴデンドロサイ ト前駆細胞の分化モデルである FBD-102b 細胞に Rab7A をノックダウンすると形態分化が抑 制されることを初めて記述し、Rab7A が分化に必要であることを示した[18, 42]。我々は以 前、中枢神経系の神経細胞分化モデルとしてしばしば使用される N1E-115 細胞で、GTP ロッ クされたRab7Aが神経細胞の形態分化を抑制することを報告した[18, 42]。中枢神経系では、 Rab7A は神経細胞とグリア細胞の形態分化において重要な役割を果たす。さらなる研究によ り、Rab7A が中枢神経系の疾患に対する影響を持つかどうかを明らかにすることができると 予想される。さらに、後期エンドソームとリソソーム間だけでなく、トランスゴルジネット ワークにおける輸送システムの調節にも Rab7B が関与すると考えられる[5-9]。Rab7B は特に 後期エンドソームとトランスゴルジネットワーク間の小胞トラフィックを調節する[5-9]。 今 回の研究では、細胞において Rab7B をノックダウンするとオリゴデンドロサイトの形態分化

29

が促進されることを示し、Rab7Bが分化の負の調節因子であることを明らかにした。この原因 は、後期エンドソームとトランスゴルジネットワーク間の逆行性輸送がオリゴデンドロサイ トにとって不必要な輸送経路を提供するためであると考えられるが、この逆行性輸送システ ムの正確な細胞内役割についてはまだ解明されていない。成熟したミエリン鞘は通常、ミエ リン形成前の細胞膜の総面積よりもはるかに大きくなるため、細胞内でのミエリン成分の輸 送システムは非常に活性化されると考えられる。その結果、順行性の輸送システムが逆行性 輸送よりも優先される可能性がある。さらに、Rab7B はオリゴデンドロサイトにおいて特有の 機能を果たすかもしれない。Rab7A は Rab-リソソーム相互作用タンパク質である RILP(Rabinteracting lysosomal protein) などのエフェクターと結合し、100 種以上の結合パートナ ーを持つことが BioGRID ウェブサイトで確認できる。しかし、Rab7B とこれらのタンパク質 との相互作用はまだ十分に調査されていない。一部のエフェクタータンパク質は特異的に Rab7A にのみ結合し、他は Rab7B にのみ結合する可能性がある。これまでに知られていない 分子メカニズムとして、Rab7B と Rab7A が形態形成を拮抗的に調節する可能性がある。オリ ゴデンドロサイトに関連する疾患(オリゴデンドロパチーとも呼ばれる)は深刻であり、そ の治療標的分子はしばしば未知である。その一つである PMD (Pelizaeus-Merzbacher disease、 または大脳白質形成不全症 (Hypomyelinating Leukodystrophy 1, HLD1) とも呼ばれる) は、 運動調整や技能、知的機能の低下を伴う進行性の中枢神経系疾患である[25, 26]。PMD はミ エリン膜の主要なタンパク質をコードする plp1 遺伝子の増加を含む様々な遺伝子変異と関 連しており、これにより PLP1 が小胞体内に蓄積し、タンパク質の折りたたみ不全が起こる。 これが小胞体ストレスを引き起こし、オリゴデンドロパチーの細胞病理的表現型を引き起こ すと考えられる[21, 23, 25, 26]。未分化または低髄鞘化したオリゴデンドロサイト細胞が 増加するのは、このためであると考えられる。実際に、小胞体ストレスを減少させる化学物 質は、ツニカマイシンなどの小胞体ストレス誘発因子による病理的表現型を逆転させる可能 性がある[22]。 我々は、Rab7B のノックダウンが小胞体ストレスによる分化不全を促進するだ けでなく、小胞体ストレスを減少させる効果も持つという仮説を立て、これに基づいて研究 を進めてきた。ここで、Rab7Bのノックダウンが実際にツニカマイシン誘発の分化不全を回復 し、さらに小胞体ストレスも減少させることを発見した。

この研究の最後に残された疑問は、Rab7B が小胞体ストレスをどのように制御しているか という点である。Mateus et al. による報告では、Rab7B が人間の上皮細胞および上皮様細

30

胞で小胞体ストレスと密接な関係があることが示されている[43]。Rab7A のノックダウンま たはドミナントネガティブ変異体の発現は細胞周辺へシート状の小胞体構造を拡大させる。 この抑制は、小胞体ストレスを引き起こし、小胞体の拡大を誘導するが、Rab7A の再発現は実 験条件下で小胞体ストレスを軽減し、拡大した小胞体の表現型を救済する。このことから、 Rab7A は小胞体の恒常性維持に重要な役割を担っている可能性が高い。さらに、エンドリソソ ームは、Rab7 およびリソソーム関連膜タンパク質1 (LAMP1)の両方の抗原に陽性で、過剰な ストレスを受けた小胞体を取り込む[44]。エンドリソソームが特定の小胞体を取り込んでい るかは明確ではないが、ストレスが高い小胞体を取り込んで細胞の恒常性を維持する可能性 がある。これらのプロセス中、Rab7A は小胞体を中心とした細胞の恒常性を伸介する可能性が 高い。Rab7B が小胞体ストレスをどのように調節するかを決定することは、我々の研究から、 Rab7B が HSPA5 タンパク質の発現レベルを維持することで、小胞体ストレス信号伝達の中心 的な調節因子としての役割を果たすことを示唆している[45,46]。

2.6. 引用文献

- 1. Pfeffer, S. R., Soldati, T., Geissler, H., Rancaño, C., Dirac-Svejstrup, B. Selective membrane recruitment of Rab GTPases. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1995 60:221-227
- Ng, E. L., Tang, B. L. Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. Brain Res. Rev. 2008 58:236-246
- 3. Homma, Y., Hiragi, S., Fukuda, M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. FEBS J. 2021 288:36-55
- Snider, M. D. A role for Rab7 GTPase in growth factor-regulated cell nutrition and apoptosis. Mol. Cell 2003 12:796-797
- 5. Progida, C., Cogli, L., Piro, F., De Luca, A., Bakke, O., Bucci, C. Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. J. Cell Sci. 2010 123:1480-1491
- Borg, M., Bakke, O., Progida, C. A novel interaction between Rab7b and actomyosin reveals a dual role in intracellular transport and cell migration. J. Cell Sci. 2014 127:4927-4939
- Distefano, M. B., Kjos, I., Bakke, O., Progida, C. Rab7b at the intersection of intracellular trafficking and cell migration. Commun. Integr. Biol. 2015 8:e1023492
- Marubashi, S., Fukuda, M. Rab7B/42 Is functionally involved in protein degradation on melanosomes in keratinocytes. Cell Struct. Funct. 2020 45:45-55
- Vestre, K., Persiconi, I., Borg Distefano, M., Mensali, N., Guadagno, N. A., Bretou, M., Wälchli, S., Arnold-Schrauf, C., Bakke, O., Dalod, M., Lennon-Dumenil, A. M., Progida, C. Rab7b regulates dendritic cell migration by linking lysosomes to the actomyosin cytoskeleton. J. Cell Sci. 2021 134:jcs259221
- Tian, X., Teng, J., Chen, J. New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion. Autophagy. 2021 17:2680-2688

- Simons, M., Nave, K. A. Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015 8:a020479
- Barateiro, A., Brites, D., Fernandes, A. Oligodendrocyte development and myelination in neurodevelopment: Molecular mechanisms in health and disease. Curr. Pharm. Des. 2016 22:656-679
- Elbaz, B., Popko, B. Molecular control of oligodendrocyte development. Trends. Neurosci. 2019 42:263-277
- 14. Adams, K. L., Dahl, K. D., Gallo, V., Macklin, W. B. Intrinsic and extrinsic regulators of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation. Semin. Cell Dev. Biol. 2021 116:16-24
- 15. Bercury, K. K., Dai, J., Sachs, H. H., Ahrendsen, J. T., Wood, T. L., Macklin, W. B. Conditional ablation of raptor or rictor has differential impact on oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. J. Neurosci. 2014 34:4466-4480
- 16. Figlia, G., Gerber, D., Suter, U. Myelination and mTOR. Glia 2018 66:693-707
- Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Chan, J. R., Okada, A., Tomooka, Y., Hisanaga, S., Tanoue, A. Cdk5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. J. Cell Sci. 2007 120:4355-4366
- 18. Urai, Y., Yamawaki, M., Watanabe, N., Seki, Y., Morimoto, T., Tago, K., Homma, K., Sakagami, H., Miyamoto, Y., Yamauchi, J. Pull down assay for GTP-bound form of Sar1a reveals its activation during morphological differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2018 503:2047-2205
- Nishino, S., Fujiki, Y., Sato, T., Kato, Y., Shirai, R., Oizumi, H., Yamamoto, M., Ohbuchi, K., Miyamoto, Y., Mizoguchi, K., Yamauchi, J. Hesperetin, a citrus flavonoid, ameliorates inflammatory cytokine-mediated inhibition of oligodendroglial cell morphological differentiation. Neurol. Int. 2022 14:471-487

- 20. Kato, Y., Tago, K., Fukatsu, S., Okabe, M., Shirai, R., Oizumi, H., Ohbuchi, K., Yamamoto, M., Mizoguchi, K., Miyamoto, Y., Yamauchi, J. CRISPR/CasRx-mediated RNA knockdown reveals that ACE2 is involved in the regulation of oligodendroglial cell morphological differentiation. Non-Coding RNA. 2022 8:42
- Morimura, T., Numata, Y., Nakamura, S., Hirano, E., Gotoh, L., Goto, Y. I., Urushitani, M., Inoue,
 K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. Exp. Biol. Med. 2014 239:489-501
- 22. Wilding, A. S., Patte-Mensah, C., Taleb, O., Brun, S., Kemmel, V., Mensah-Nyagan, A. G. Protective effect of 4-phenylbutyrate against proteolipid protein mutation-induced endoplasmic reticulum stress and oligodendroglial cell death. Neurochem. Int. 2018 118:185-194
- 23. Dhaunchak, A. S., Colman, D. R., Nave, K. A. Misalignment of PLP/DM20 transmembrane domains determines protein misfolding in Pelizaeus-Merzbacher disease. J. Neurosci. 2011 31:14961-14971
- 24. Wrabetz, L., D'Antonio, M., Pennuto, M., Dati, G., Tinelli, E., Fratta, P., Previtali, S., Imperiale, D., Zielasek, J., Toyka, K., Avila, R. L., Kirschner, D. A., Messing, A., Feltri, M. L., Quattrini, A. Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. J. Neurosci. 2006 26:2358-2368
- 25. Torii, T., Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Tanoue, A. Pelizaeus-Merzbacher disease: cellular pathogenesis and pharmacologic therapy. Pediatr. Int. 2014 56:659-666
- 26. Wolf, N. I., Ffrench-Constant, C., van der Knaap, M. S. Hypomyelinating leukodystrophies unravelling myelin biology. Nat. Rev. Neurol. 2021 17:88-103
- 27. Miyamoto, Y., Torii, T., Tago, K., Tanoue, A., Takashima, S., Yamauchi, J. BIG1/Arfgef1 and Arf1 regulate the initiation of myelination by Schwann cells in mice. Sci. Adv. 2018 4:eaar4471
- 28. Miyamoto, Y., Torii, T., Homma, K., Oizumi, H., Ohbuchi, K., Mizoguchi, K., Takashima, S.,

Yamauchi, J. The adaptor SH2B1 and the phosphatase PTP4A1 regulate the phosphorylation of cytohesin-2 in myelinating Schwann cells in mice. Sci. Signal. 2022 15:eabi5276

- 29. Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science 2000 287:664-666
- Hotamisligil, G. S., Davis, R. J. Cell signaling and stress responses. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2016 8:a006072
- 31. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. Wang T, Ming Z, XiaochunW, Hong W. Cell Signal. 2011 Mar;23(3):516-21. doi: 10.1016/j.cell
- 32. Balderhaar, H. J., Ungermann, C. CORVET and HOPS tethering complexes coordinators of endosome and lysosome fusion. J. Cell Sci. 2013 126:1307-1316
- 33. Kuchitsu, Y., Fukuda, M. Revisiting Rab7 functions in mammalian autophagy: Rab7 knockout studies. Cells. 2018 7:215
- 34. Stroupe, C. This is the end: regulation of Rab7 nucleotide binding in endolysosomal trafficking and autophagy. Front. Cell Dev. Biol. 2018 6:129
- 35. Condon, K. J., Sabatini, D. M. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. J. Cell Sci. 2019 132:jcs2225
- Bar-Peled, L., Sabatini, D. M. Regulation of mTORC1 by amino acids. Trends Cell Biol. 2014 24:400-406
- 37. Shy, M. E. Charcot-Marie-Tooth disease: an update. Curr. Opin. Neurol. 2004 17:579-585
- 38. Auer-Grumbach, M. Hereditary sensory neuropathies. Drugs Today 2004 40:385-394
- 39. Verhoeven, K., Timmerman, V., Mauko, B., Pieber, T. R., De Jonghe, P., Auer-Grumbach, M. Recent advances in hereditary sensory and autonomic neuropathies. Curr. Opin. Neurol. 2006 19:474-480

- 40. Cogli, L., Piro, F., Bucci, C. Rab7 and the CMT2B disease. Biochem. Soc. Trans. 2009 37:1027-1031
- 41. Yamauchi, J., Torii, T., Kusakawa, S., Sanbe, A., Nakamura, K., Takashima, S., Hamasaki, H., Kawaguchi, S., Miyamoto, Y., Tanoue, A. The mood stabilizer valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7 through the JNK signaling pathway. J. Neurosci. Res. 2010 88:3189-3197
- 42. Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., Narumiya, S. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. J. Cell Biol. 1998 141:1625-1636
- Mateus, D., Marini, E. S., Progida, C., Bakke, O. Rab7a modulates ER stress and ER morphology. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 2018 1865:781-793
- 44. Loi, M., Raimondi, A., Morone, D., Molinari, M. ESCRT-III-driven piecemeal micro-ER-phagy remodels the ER during recovery from ER stress. Nat. Commun. 2019 10:5058
- 45. Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., Elfiky, A. A. GRP78: A cell's response to stress. Life Sci. 2019 226:156-163
- 46. Chen, H. S., Wang, J., Li, H. H., Wang, X., Zhang, S. Q., Deng, T., Li, Y. K., Zou, R. S., Wang, H. J., Zhu, R., Xie, W. L., Zhao, G., Wang, F., Chen, J. G. Long noncoding RNA Gm2694 drives depressive-like behaviors in male mice by interacting with GRP78 to disrupt endoplasmic reticulum homeostasis. Sci. Adv. 2022 8:eabn2496

3. 第2章

FBD-102b 細胞における Rab9 のノックダウンが小胞体ストレスによる 形態分化の障害を回復する

3.1. 概要

低分子量 GTP 結合型タンパク質である Rab ファミリーは、細胞内の小胞の移動をコントロ ールする。これらの中で、Rab9 はトランスゴルジネットワークだけでなく、後期エンドソ ーム周辺の輸送システムを制御する役割で知られる。しかし、異なる細胞タイプや組織にお ける具体的な機能は依然として不明である。ここでは、初めて Rab9 が形態変化を負に調節 することを報告する。オリゴデンドロサイト前駆細胞株である FBD-102b 細胞において形態 分化が進行する中、Rab9のノックダウンは細胞形状の変化を増加させ、広範な膜の拡張を 特徴とした。これらの変化には、オリゴデンドロサイトの分化および髄鞘形成マーカータン パク質の発現レベルの増加が伴った。特に、ツニカマイシンによって誘導される小胞体スト レス-これはペリチェウス・メルツバッハ病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD、 Hypomyelinating Leukodystrophy 1, HLD1 ともいう) などのオリゴデンドロサイト疾患の 主要な原因の一つである-の下での形態分化の欠陥の回復が Rab9 のノックダウンにより可能 であった。さらに、Rab9のノックダウンは小胞体ストレスマーカータンパク質および分化 マーカーの発現レベルを回復させた。ジチオスレイトール(Dithiothreitol, DTT)など他 の小胞体ストレス誘発剤によっても同様の結果が得られた。これらの結果から、Rab9がオ リゴデンドロサイトの形態変化においてユニークな役割を果たし、PMD などの疾患の分子お よび細胞レベルでの治療標的としての潜在的可能性を示唆する。

3.2. はじめに

中枢神経系(Central Nervous System, CNS)は、神経細胞とグリア細胞を含む多様な組織と細胞で構成されている[1-4]。オリゴデンドロサイトは、その分化した細胞膜で神経軸索を取り巻きミエリン鞘を形成する[5-8]。ミエリン鞘は、神経インパルスの効率的な伝導と軸索の保護に不可欠な役割を果たす。しかし、ミエリン鞘が適切に形成されない場合や損傷を受けた場合、炎症性[9, 10]または遺伝的[11-16]神経変性疾患が発生する。

低分子量 GTP 結合型タンパク質である Rab タンパク質は Ras スーパーファミリーに属し、 ほぼ全ての細胞内小胞の運搬を制御することで知られている[17-20]。これらのタンパク質 は活性型の GTP 結合型と不活性型の GDP 結合型の二つの形態があり、GTPase 活性化タンパ ク質 (GTPase-activating proteins, GAP) と GDP/GTP 交換因子 (GDP/GTP exchange factors, GEF) によってその切り替えが調節される[17-20]。各 Rab タンパク質は特定の細 胞小胞、膜、または組織に局在し、小胞の運搬や融合を制御することで健康と病態の両方で 多様な細胞生理に影響を及ぼす[21, 22]。Rab タンパク質の中でも、Rab9 はトランスゴルジ ネットワーク、後期エンドソーム、その他の小器官に広く局在しており[23-25]、マンノー ス-6-リン酸受容体タンパク質のリサイクルを制御し、これはトランスゴルジネットワーク 周辺の典型的な細胞内リサイクル小胞マーカーである[23-25]。Rab9 はまた、リソソームへ のタンパク質の分類と運搬にも寄与し[26-28]、リソソームの生物学的生成を促進し、オー トファジーシステムの構築において橋渡しの役割を果たす[26-28]。Rab9 は 2 つの異なる相 同体、Rab9A と Rab9B から構成されるが、一般的に Rab9A は Rab9 として認識されることか ら、本研究でも Rab9A を Rab9 分子として扱う[23-28]。

小胞体(Endoplasmic Reticulum, ER)は、細胞内カルシウム貯蔵のみならず、分泌タン パク質や膜タンパク質の適切な折りたたみを通じたタンパク質品質管理にも中心的な役割を 果たす[29-32]。細胞が外部および内部のストレスにさらされた場合、小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response, UPR)として知られる反応やタンパク質の生成が活性化され る[29-32]。持続的または過剰なストレス状態の下で、これらの折りたたまれていないタン パク質が蓄積し、細胞の成長と分化が損なわれる。その結果、小胞体ストレスはさまざまな 組織や臓器に影響を及ぼす疾患の一因となる。中枢神経系のグリア細胞関連疾患には、大脳 白質形成不全症(Hypomyelinating Leukodystrophy 1, HLD1)、通称ペリチェウス・メルツ

39

バッハ病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD) や他の HLD が含まれる[33-36]。HLD1 お よび特定の HLD は、オリゴデンドロサイト由来の分化したミエリン鞘が不適切に形成される 劣性疾患として現れる[11-16]。

3.3 材料と方法

3.3.1. 抗体および化学物質

主な材料、抗体、化学物質、およびヌクレオチドは表2に記載する。

試業や原材料	製造会社または供給源	カタログ番号	ロット書号	使用濃度
			0	
Anti-proteolipid protein 1 (PLP1)	Atlas Antibodies	HPA004128	8115828	イムノフロット 法(IB), 1:500
Anti-myelin basic protein (MBP)	BioLegend	836504	B225469	IB, 1:500
Anti-actin (also called pan-beta type actin)	MBL	M1//-3	007	IB, 1:5,000
Anti-eukaryotic initiation factor 2 alpha (elF2a)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13312	J1922	IB, 1:1,000
Anti-phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase (pelF2a)	PGI Proteintech Group Inc	28740-1-AP	00089246	IB, 1:1,000
Anti-C/EBP homologous protein (CHOP)	PGI Proteintech Group, Inc.	15204-AP	00117318	IB, 1:1,000
Anti-heat shock protein family A member 5 (HSPA5)	PGI Proteintech Group, Inc.	11587-AP	00085813	IB, 1:1,000
Anti-IgG (H+L chain) (Mouse) pAb-HRP	MBL	330	365	IB, 1:5,000
Anti-IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP	MBL	458	353	IB, 1:5,000
主要な化学物質				
Tunicamycin (TMC)	Cayman chemical campany	11445	0637439-4	100 ng/ml
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	FUJIFILM Wako Pure Chemical	047-29353	CDN0170	0.1%以下
	Corporation			
Dithiothreitol (DTT)	Nacalai Tesque	14128-46	not described	1 mnol/L
主要な評業		1	1	1
ScreenFect TM siRNA Transfection Reagent	FUJIFILM Wako Pure Chemical	292-75013	CAM0357	□製造会社の指示に従った
g	Corporation			
ScreenFect TM Dilution Buffer	FUJIFILM Wako Pure Chemical	194-18181	SKF5794	□製造会社の指示に従った
	Corporation			
ImmunoStar TM Zeta	FUJIFILM Wako Pure Chemical	295-72404	WTL5319	□製造会社の指示に従った
	Corporation			
Chemi-Lumi TM One Ultra	Nacalai Tesque	11644-40	L2P1314	□製造会社の指示に従った
Skim milk	FUJIFILM Wako Pure Chemical	190-12865	SKG4901	□製造会社の指示に従った
	Corporation	100 12000	01101001	
Western blotting stripping solution	Nacalai Tesque	05364-55	L5M5218	□製造会社の指示に従った
Fujifilm TM Sample buffer	FUJIFILM Wako Pure Chemical	191-13282	WDP4995	□製造会社の指示に従った
	Corporation			
Isogen	Nippon Gene	311-02501	75009K	□製造会社の指示に従った
5×PrimeScript master mix	TaKaRa Bio	RR036A	AIE0440A	□製造会社の指示に従った
Gflex DNA polymerase	TaKaRa Bio	R060A	AL80564A	□製造会社の指示に従った
2×Gflex PCR buffer (Mg2+, dNTP plus; wth or without dye)	TaKaRa Bio	R060A	AL80564A	□製造会社の指示に従った
TaKaRa Bio TM loading buffer	TaKaRa Bio	9157	A7201A	□製造会社の指示に従った
Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE	Nacalai Tesque	02525-35	L9M9989	□製造会社の指示に従った
ExcelBand All Blue Regular Range Protein Marker	Cosmo Bio	PM1500	PM1500211500-5	□製造会社の指示に従った
ExcelBrand 3 Color Regular Range Protein Marker	Smo Bio	PM2500-2	PM25002112601-2	□裂道会社の指示に従った
使用した細胞				
	Dr. Yasuhiro Tomo-oka (Riken,			
FBD-102b cells (mouse oligodendrocyte progenitor cells)	Saitama, Japan/Tokyo University	該当なし	該当なし	
	of Science, Chiba, Japan)			
PCRプライマー (5'から 3')			-	
Sense chain for sil uciferase-105th (control siRNA)				
GCCAUUCUAUCCUCUAGAG-dTdT	Yamauchi, J. et. al. Exp. Cell Res.			
Antisense chain for sil uciferase-105th	(2009) 315:2043-2052	該当なし	該当なし	50 nM
CUCUAGAGGAUAGAAUGGC-dTdT	()			
Sense chain for siraby-142th				
	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Antigeneg sheip for siBab0h 100th	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Sanaa ahain far aiBah0 212th				
Antigeneg abain for aiRab0h 212th	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
DCP primers (5' to 3')				
Sense primer for actin (internal control)			1	I
	Kato V at al Evo Call Res			
Antisanse primer for actin	(2021) 405-112654	該当なし	該当なし	250 nM
CTAGAAGCACTTGCGGTGCACGATGGAG	12021/ 100.112004			
Sense primer for Rahg				
Antisense primer for Rah9h	本論文	該当なし	該当なし	250 nM
TCAACAGCAAGATGAGTTGGCTTGG				
	L			

表 2. 使用した抗体及び化学物質の詳細

3.3.2. 細胞培養と分化

FBD-102b 細胞株(東京理科大学・岡友博博士から提供)は、マウスのオリゴデンドロサイト前駆細胞株である。これらの細胞は、Nunc の細胞および組織培養ディッシュ

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) で、DMEM および Ham の F-12 栄養混合培地 (Nacalai Tesque, 京都、日本; Fujifilm, 東京、日本) に 10%の熱不活性化した胎牛血清 (FBS) と PenStrep 混合抗生物質 (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
Massachusetts, USA)を加え、5%の二酸化炭素と 37° C の条件で培養。分化を誘導するため、ポリリジンでコーティングされた培養ディッシュ (Nacalai Tesque, 京都、日本) で、低濃度の血清を含む培地で 5%の二酸化炭素と 37° C で培養。一次突起から分岐する二次突起を持つか、0.03 mmを超える直径の円を含むことができる広範なミエリン膜様の突起を示す細胞は、分化した表現型とみなした[37, 38]。細胞の形態は、Micronet, Saitama, Japanの i-NTER LENS および i-NTER SHOT ver.2 を装備した顕微鏡システムを使用して捉え、
Image J ソフトウェア (https://imagej.nih.gov/) で分析した。

3.3.3. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

RT-PCR において、cDNA は ISOGEN (Nippon Gene, 東京、日本) で抽出した全細胞 RNA から、メーカーの指示に従い PrimeScript RT Master Mix キット (Takara Bio, 京都、日本) を使用して調製した。RT 生成物からの PCR 増幅は、Gflex DNA ポリメラーゼ (Takara Bio, 京都、日本) を使用して 35 サイクルで行い、各サイクルは、98°C での変性反応 (0.2 分)、アニーリング温度に応じた 56~65°C でのアニーリング反応 (0.25 分)、および 68°C での伸長反応 (0.5 分) から構成。得られた PCR 産物は、あらかじめ作成したアガロースゲル (Nacalai Tesque, 京都、日本) で電気泳動解析を行った。

3.3.4. siRNA トランスフェクション

細胞は、ScreenFect siRNA トランスフェクションキット(Fujifilm,東京、日本)を使 用して、各 siRNA でトランスフェクションを行った。トランスフェクションの4時間後に培 地を交換し、トランスフェクション後 48 時間以上経過した細胞を使用した。

3.3.5. 細胞溶解およびポリアクリルアミドゲル電気泳動

細胞は、細胞および組織抽出バッファー (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl2, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethane sulfonylfluoride, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM EDTA, 1 mM Na3VO4, 10 mM NaF, 0.5% NP-40) で溶解した。変性条件のもとで、細胞溶解液は事前に製造されたサンプルバッファー (Fujifilm, 東京、日本) で変性し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (Nacalai Tesque, 京都、日本) で分離した。

3.3.6. イムノブロッティング

電気泳動により分離したタンパク質は、ポリビニリデンフルオライド膜(Fujifilm, 東 京、日本)に転写し、スキムミルクブロッカー(Fujifilm, 東京、日本)でブロックッキン グした後、一次抗体を使用してイムノブロッティングを行った。次に、ペルオキシダーゼ酵 素結合二次抗体でインキュベーションした。ペルオキシダーゼ反応性バンドは、CanoScan LiDE 400 (Canon, 東京、日本) と CanoScan LiDE 400 Scanner Driver Ver. 1.01で撮影し た。イムノブロッティングでは複数回の実験を行い、Image J ソフトウェアを使用して免疫 反応性バンドの定量を行い、他のサンプルの免疫反応性バンドを 100%として比較した。

3.3.7. 統計解析

データは別々の実験からの平均値±標準偏差(SD)で示される。グループ間の比較は、
 Studentの補正を用いた独立したt検定でExcelソフトウェア(Microsoft, Redmond, WA,
 USA)を使用して行った。p値が0.05未満の場合、結果は統計的に有意と判断した。

3.3.8. 倫理的考慮

遺伝子改変細胞および関連手続きに関連する技術は、東京薬科大学遺伝子・動物愛護委員 会が承認したプロトコール(承認番号 LS28-20 および LSR3-011)に従って実施した。

3.4. 結果

3.4.1. Rab9 は細胞形態形成を負に制御する

FBD-102b 細胞で Rab9 をノックダウンした(図 3.1. 参照)。分化誘導後、コントロールの ルシフェラーゼ(Luciferase, Luc)でノックダウンした細胞は、通常 3 日目でオリゴデンド ロサイト様の広範な膜を持つ分化表現型の約 50%を示した【37, 38】。対照的に、Rab9 をノ ックダウンした細胞では、広範な膜を持つ表現型が顕著に増加し、約 75%に達した(図 3.2. A)。これらの結果は、プロテオリピドタンパク質 1(Proteolipid Protein 1, PLP1) やミエリン塩基性タンパク質(Myelin Basic Protein, MBP)を含むオリゴデンドログリア 細胞分化および髄鞘形成マーカータンパク質の発現レベルの上昇と一致していた(図 3.2. B)。逆に、内部コントロールマーカータンパク質であるアクチンの発現レベルは、コン トロール細胞と Rab9 ノックダウン細胞で同等であった。これらの結果は、Rab9 ノックダウ ンが形態分化を促進することを示唆している。



図 14. Rab9 の特異的な siRNA を使用したノックダウン

A. FBD-102b 細胞にそれぞれの siRNA (A1TG からの 142 番、199 番、212 番のターゲット 配列)をトランスフェクションした。これらの細胞からの全 RNA を RT-PCR で分析し、ノ ックダウンの効率を評価した。実験には 212 番のターゲット配列を使用した。





A. FBD-102b 細胞にコントロールのルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をトランスフェクションした。分化の誘導後、細胞の形態を撮影し、分 化したオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞を 0 日または 3 日目に統計的 に示した (*** p < 0.001; n = 10 fields) 。典型的なオリゴデンドロサイト様の 広範な膜を持つ細胞の形態は白い点線で囲まれている。B. 分化の誘導後 3 日目の 細胞溶解物を、PLP1、MBP、および内部コントロールのアクチンに対する抗体を用 いてイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots)。

45

3.4.2. Rab9 のノックダウンはツニカマイシン誘発の形態分化の抑制を回復させる

小胞体ストレスシグナルと小胞体ストレス応答を誘導するツニカマイシン[39, 40]で処理 すると、FBD-102b細胞では小胞体ストレスシグナルが刺激され、形態分化が 30-40%低下し た[42]。ツニカマイシンは PLP1 と MBP の発現レベルを低下させただけでなく、熱ショック タンパク質ファミリーA メンバー5 (Heat Shock 70kDa Protein 5 [HSPA5], または免疫グ ロブリン重鎖結合タンパク質 [BiP] または78 kDa グルコース制御タンパク質 [GRP78] と も呼ばれる)とCCAAT/エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質(C/EBP Homologous Protein [CHOP], C/EBP6 または DNA 損傷誘導性転写産物 3 [DDIT3] とも呼ばれる)の発現 レベルも上昇させた(図16)。さらに、真核翻訳開始因子 2A (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A, eIF2A)のリン酸化レベルも上昇させた(図16)。次に、Rab9のノ ックダウンが、ツニカマイシン誘導による形態分化の低下を回復させる能力があるかどうか を調べた。Rab9をノックダウンすると、PLP1とMBPの発現レベルの上昇と一致して、膜が 広がった表現型が約50~60%回復した(図17A)。これは、図17Bでも確認された。対照的 に、アクチンの発現レベルはコントロール細胞と Rab9 ノックダウン細胞で同等であった。 さらに、Rab9 ノックダウンにより、HSPA5 (図 18A および B) と CHOP (図 18C および D) の 発現レベル、ならびに eIF2A のリン酸化レベルが回復し (図 18E および F)、Rab9 ノックダ ウンがツニカマイシン誘導の表現型に対して保護効果を持つことが示された。



図 16. ツニカマイシンが FBD-102b 細胞の小胞体ストレスシグナルを刺激する

A, B. ツニカマイシン 100 ng/ml の存在下で分化を誘導した後、FBD-102b 細胞溶解物 を MBP とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を 示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。C, D. 同様に、HSPA5 とアクチンに対する抗 体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。E, F. さらに、CHOP とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計 的にパーセンテージで比較を示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。G, H. また、リ ン酸化された eIF2a (peIF2a)、eIF2a、アクチンに対する抗体でイムノブロットし、統 計的にパーセンテージで比較を示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。





A. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をト ランスフェクションし、100 ng/ml のツニカマイシンの存在下で分化を誘導した。その 後、細胞の形態を撮影し、分化したオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞を 0 日または3 日目に統計的に示した (*** p < 0.001; n = 10 fields) 。典型的なオリ ゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞の形態は白い点線で囲まれている。B. 分化 の誘導後3 日目の細胞溶解物を、PLP1、MBP、およびアクチンに対する抗体でイムノブ ロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots)。

48



図 18. Rab9 のノックダウンはツニカマイシンによって誘導された小胞体ストレスシグ ナルを減少させる

A, B. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) を トランスフェクションし、100 ng/ml のツニカマイシンの存在下で分化を誘導した。そ の後、3 日目の細胞溶解物を、HSPA5 とアクチンに対する抗体でイムノブロッティング し、パーセンテージ比較で統計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots) 。C, D. 同様 に CHOP とアクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統 計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots) 。E, F. さらに、リン酸化 eIF2a (peIF 2a) 、eIF2a、アクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較 で統計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots) 。

3.4.3. Rab9 のノックダウンはジチオスレイトール (Dithiothreitol, DTT) 誘発の 形態分化の抑制を回復させる

小胞体におけるストレスシグナルと小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response, UPR)のもう一つの誘導因子であるジチオスレイトール(Dithiothreitol, DTT)【39,40】 で処理すると、小胞体ストレスシグナルが刺激されるかどうかを調べた。DTT で処理する と、HSPA5 と CHOP の発現レベルが eIF2A のリン酸化レベルとともに上昇し、一方で MBP マ ーカータンパク質の発現レベルは低下した(図 19)。

ツニカマイシンでの発見と同様に、Rab9 をノックダウンすることで DTT 誘発の形態分化 の低下を回復できるかどうかを調べた。Rab9 をノックダウンすると、PLP1 と MBP の発現レ ベルの上昇と一致して、膜が広がった表現型が 50~60%回復した(図 20A および図 4B)。さ らに、Rab9 のノックダウンは、HSPA5(図 21A および図 21B)と CHOP(図 21C および図 21D)の発現レベルと eIF2A(図 21E および図 21F)のリン酸化レベルの両方を回復させた。 まとめると、Rab9 ノックダウンは DTT 誘発の表現型に対して保護効果を持つことが示され た。



図 19. DTT が FBD-102b 細胞の小胞体ストレスシグナルを刺激する

A, B. 1 mM DTT の存在下で分化を誘導した後、FBD-102b 細胞溶解物を MBP とアクチン に対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した(* p < 0.05; n = 3 ブロット)。C, D. 同様に、HSPA5 とアクチンに対する抗体でイムノブロッ トし、統計的にパーセンテージで比較を示した(* p < 0.05; n = 3 ブロット)。E, F. さらに、CHOP とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで 比較を示した(* p < 0.05; n = 3 ブロット)。G, H. また、リン酸化された eIF2a (peIF2a)、eIF2a、アクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテー ジで比較を示した(* p < 0.05; n = 3 ブロット)。



図 20. Rab9 のノックダウンは DTT によって誘導された表現型を回復する

A. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をトラ ンスフェクションし、1 mM DTT の存在下で分化を誘導した。その後、細胞の形態を撮影 し、分化したオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞を 0 日または 3 日目に統計 的に示した (*** p < 0.001; n = 10 fields)。典型的なオリゴデンドログリア細胞様の 広範な膜を持つ細胞の形態は白い点線で囲まれている。B. 分化の誘導後 3 日目の細胞溶 解物を、PLP1、MBP、およびアクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセン テージ比較で統計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots)。



図 21. Rab9 のノックダウンは DTT によって誘導された小胞体ストレスシグナルを減少 させる。

A, B. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) を トランスフェクションし、1 mM の DTT の存在下で分化を誘導した。その後、3 日目の細 胞溶解物を、HSPA5 とアクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテー ジ比較で統計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots)。C, D. 同様に CHOP とアクチン に対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示された (* p < 0.05; n = 3 blots)。E, F. さらに、リン酸化 eIF2a (peIF2a)、 eIF2a、アクチン に対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* p < 0.05; n = 3 blots)。

3.5.考察

Rab9 はトランスゴルジネットワーク周辺の小胞に広く分布し、細胞内小胞輸送において 多様な役割を担う。Rab9 は後期エンドソーム周辺にも存在し、リソソームへのタンパク質 の選別と輸送を促進する。また、オートファジー系の構築において橋渡し役として機能し、 リソソームとオートファゴソームの融合を促進することでオートリソソームの形成を助ける とされる[23-28]。

細胞内小胞輸送系で Rab9 が果たす基本的な役割は広く認識されているが、それが具体的 にどの細胞タイプのどの特性を形作るか、または単に基本的な細胞機能の維持に関わるだけ かは、未だにはっきりとは分かっていない。例えば、分子系統樹上で Rab9 と近縁な Rab フ ァミリー分子である Rab7 のノックアウトは、神経細胞や腎臓上皮細胞を含む様々な細胞タ イプにおいて、オートファゴソームやリソソームの融合不全を引き起こす。しかし、Rab を ノックアウトすると、神経細胞は特定のアミノ酸の飢餓に反応しなくなるだけで、リソソー ムの機能は欠損しない[21, 22]。ここで我々は、Rab9 がオリゴデンドロサイト前駆細胞株 において、オリゴデンドロサイト様の広範な膜を生成する特性に特異的に拮抗することを明 らかにした。この結論は、Rab9 をノックダウンすると、オリゴデンドロサイトの分化と髄 鞘形成マーカータンパク質の発現の増加とともに、広範な膜を持つ特性が増加することを示 す結果によって支持される。

Rab9A は一般的な Rab9 分子であるが、Rab9B も Rab9A と同様の機能を果たすと考えられる [23-28]。ただし、Rab9A と Rab9B は脳細胞タイプで全く異なる転写プロファイルを示す

(Human Protein Atlas ウェブサイト、https://www.proteinatlas.org 参照)。Rab9A はオ リゴデンドロサイト系細胞に多く存在するが、Rab9B は特定の脳細胞タイプに特有の表現を 示さない。この観察は、Rab9A とオリゴデンドロサイトの分化との間に密接な関連があるこ とを強調している。Rab9 サブファミリー分子とオリゴデンドロサイトの分化不全および HLD1 で観察される低髄鞘化表現型との関連を明らかにするためには、さらなる研究が必要 である。

Rab9 が ER ストレスに関連するシグナル伝達を減少させるメカニズムはまだ不明である。 S. cerevisiae では、Ypt1 と呼ばれる Rab タンパク質が ER ストレス、ひいては UPR を直接 制御している[47, 48]。このタンパク質は、塩基性ロイシンジッパー転写因子

54

HAC1 (Homologous to Atf/Creb1) タンパク質をコードする RNA の安定性を制御し、UPR 制御 遺伝子のプロモーターにある UPR エレメントを認識して結合する[47,48]。小胞体ストレス は、Ypt1 タンパク質の細胞質への急速な局在化を引き起こし、pre-HAC1 mRNA からの解離に つながる。この変化により pre-HAC1 mRNA の分解が減少し、その結果 UPR が活性化される [47,48]。Ypt1 タンパク質が哺乳類の Rab9 タンパク質の非常に近いオルソログである可能 性は低いが、Rab9 を含む Rab タンパク質が、哺乳類細胞における ER 周囲の輸送系を介し て、ER ストレスと UPR に関係していることは考えられる。あるいは、神経細胞を含む哺乳 動物細胞は、小器官の輸送や小胞体周囲の膜接触に影響する Rab タンパク質の発現レベルを 調節することによって、小胞体ストレスに応答しているかもしれない。実際、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis, MS) などの炎症性脱髄疾患や実験モデルでは、Rab32 のアップレギ ュレーションが、小胞体ストレスに応答して小胞体とミトコンドリアの膜接触に影響を与え ている[49]。いずれのメカニズムにおいても、これまで予想されていたことではなく、Rab タンパク質は ER ストレスと UPR に直接的または間接的に関与している可能性がある。

3.6.引用文献

- Simons, N., Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol. Rev. 2001 81(2):871-927
- Simons, M., Lyons, D. A. Axonal selection and myelin sheath generation in the central nervous system.
 Curr. Opin. Cell Biol. 2013 25(4): 512-519
- Saab, A. S., Nave, K. A. Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions. Curr. Opin. Neurobiol. 2017 47: 104-112
- 4. Abu-Rub, M., Miller, R. H. Emerging cellular and molecular strategies for enhancing central nervous system (CNS) remyelination. Brain Sci. 2018 8(6): E111
- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., Dombrowski, Y. Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. Cells 2019 8(11):1424
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., Saab, M. Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology. Physiol. Rev. 2019 99:1381-1431
- Yu, Q., Guan, T., Guo, Y., Kong, J. The initial myelination in the central nervous system. ASN Neuro 2023 15:17590914231163039
- Barnes-Vélez, J. A., Aksoy Yasar, F. B., Hu, J. Myelin lipid metabolism and its role in myelination and myelin maintenance. Innovation 2023 4(1):100360
- 9. Dobson, R., Giovannoni, G. Multiple sclerosis-a review Eur. J. Neurol. 2019 26(1):27-40
- Shirai, R., Yamauchi, J. New insights into risk genes and their candidates in multiple sclerosis. Neurol. Int. 2022 15(1):24-39
- Garbern, J., Cambi, F., Shy, M., Kamholz, J. The molecular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher disease. Arch. Neurol. 1999 56:1210-1214

- Wolf, P, J, W., Vanderver, A., Bernard, G., Wolf, N, I., Dreha-Kulczewksi, S, F., Deoni, S, C, L., Bertini, E., Kohlschütter, A., Richardson, W., Ffrench-Constant, C., Köhler, W., Rowitch, D., Barkovich, A, J. Hypomyelinating leukodystrophies: translational research progress and prospects. Ann. Neurol. 2014 76(1):5-19
- Inoue, K. Pelizaeus-Merzbacher disease: molecular and cellular pathologies and associated phenotypes. Adv. Exp. Med. Biol. 2019 1190:201-216
- Wolf, N. I., Ffrench-Constant, C., van der Knaap, M. S. Hypomyelinating leukodystrophiesunravelling myelin biology. Nat. Rev. Neurol. 2021 17: 88-103
- Torii, T., Yamauchi, J. Molecular pathogenic mechanisms of hypomyelinating leukodystrophies (HLDs). Neurol. Int. 2023 15(3):1155-1173
- 16. Dhaunchak, A. S., Colman, D. R., Nave, K. A. Misalignment of PLP/DM20 transmembrane domains determines protein misfolding in Pelizaeus-Merzbacher disease. J. Neurosci. 2011 31(42):14961-14971
- Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009 10(8):513-525
- Hutagalung, A. H., Novick, P. J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. Physiol. Rev. 2011 91(1):119-149
- Cherfils, J., Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. Physiol. Rev. 2013 93(1):269-309
- Langemeyer, L., Fröhlich, F., Ungermann, C. Rab GTPase function in endosome and lysosome biogenesis. Trends Cell Biol. 2018 28(11):957-970
- 21. Guadagno, N. A., Progida, C. Rab GTPases: switching to human diseases. Cells 2019 8(8):909
- 22. Wilmes, S., Kümmel, D. Insights into the role of the membranes in Rab GTPase regulation. Curr.

Opin. Cell Biol. 2023 83:102177

- 23. Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M., Pfeffer, S. R. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. EMBO J. 1993 12(2):677-682
- 24. Barbero, P., Bittova, L., Pfeffer, S. R. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. J. Cell Biol. 2002 156(3):511-518
- 25. Ganley, I. G., Carroll, K., Bittova, L., Pfeffer, S. Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. Mol. Biol. Cell 2004 15:5420-5430
- 26. Ao, X., Zou, L., Wu, Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. Cell Death Differ.2014 21:348-358
- 27. Kucera, A., Bakke, O., Progida, C. The multiple roles of Rab9 in the endolysosomal system.Commun. Integr. Biol. 2016 9(4):e1204498
- 28. Kucera, A., Borg Distefano, M., Berg-Larsen, A., Skjeldal, F., Repnik, U., Bakke, O., Progida, C. Spatiotemporal resolution of Rab9 and CI-MPR dynamics in the endocytic pathway. Traffic 2016 17(3):211-229
- 29. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond.Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012 13(2):89-102
- 30. Oakes, S. A., Papa, F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. Annu. Rev. Pathol. 2015 10:173-194
- Hetz, C., Saxena, S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. Nat. Rev. Neurol. 201713(8):477-491
- 32. Marciniak, S. J., Chambers, J. E., Ron, D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. Nat. Rev. Drug Discov. 2022 21(2):115-140
- 33. Lin, W., Harding, H. P., Ron, D., Popko, B. Endoplasmic reticulum stress modulates the response of

myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. Journal of Cell Biology. 2005 169(4):603-612

- 34. Potter, E. CHOP and the endoplasmic reticulum stress response in myelinating glia. Bone 200823(1):1-7
- 35. D'Antonio, M., Feltri, M. L., Wrabetz, L. Myelin under stress. J Neurosci Res. 2009 87(15):3241
- 36. Tong, B. C. K., Benjamin Chun-Kit Tong. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia. Physiol. Behav. 2017 176(5):139-148
- 37. Horiuchi, M., Tomooka, Y. An oligodendroglial progenitor cell line FBD-102b possibly secretes a radial glia-inducing factor. Neurosci. Res. 2006 56(2):213-219
- 38. Fukatsu, S., Miyamoto, Y., Oka, Y., Ishibashi, M., Shirai, R., Ishida, Y., Endo, S., Katoh, H., Yamauchi, J. Investigating the protective effects of a citrus flavonoid on the retardation morphogenesis of the oligodendroglia-like cell line by Rnd2 knockdown. Neurol. Int. 2023 16(1):33-61
- Morimura, T., Numata, Y., Nakamura, S., Hirano, E., Gotoh, L., Goto, Y. I., Urushitani, M., Inoue,
 K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an antimalaria drug, chloroquine. Exp. Biol. Med. 2014 239(4):489-501
- 40. Higa, A., Taouji, S., Lhomond, S., Jensen, D., Fernandez-Zapico, M. E., Simpson, J. C., Pasquet, J.-M., Schekman, R., Chevet, E. Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. Mol. Cell. Biol. 2014 34(10):1839-1849
- 41. Healy, S., McMahon, J., FitzGerald, U. UPR induction prevents iron accumulation and oligodendrocyte loss in ex vivo cultured hippocampal slices. Front. Neurosci. 2018 12:969
- 42. Fukushima, N., Shirai, R., Sato, T., Nakamura, S., Ochiai, A., Miyamoto, Y., Yamauchi, J.

Knockdown of Rab7B, but not of Rab7A, which antagonistically regulates oligodendroglial cell morphological differentiation, recovers tunicamycin-induced defective differentiation in FBD-102b cells. J. Mol. Neurosci. 2023 73(6):363-374

- 43. Kuchitsu, Y., Homma, Y., Fujita, N., Fukuda M. Rab7 knockout unveils regulated autolysosome maturation induced by glutamine starvation. J. Cell Sci. 2018 131(7):jcs215442
- 44. Kuchitsu, Y., Fukuda, M. Revisiting Rab7 functions in mammalian autophagy: Rab7 knockout studies. Cells 2018 7(11):215
- 45. Xing, R., Zhou, H., Jian, Y., Li, L., Wang, M., Liu, N., Yin, Q., Liang, Z., Guo, W., Yang, C. The Rab7 effector WDR91 promotes autophagy-lysosome degradation in neurons by regulating lysosome fusion J. Cell Biol. 2021 220(8):e202007061
- 46. Torisu, H., Iwaki, A., Takeshita, K., Hiwatashi, A., Sanefuji, M., Fukumaki, Y., Hara, T. Clinical and genetic characterization of a 2-year-old boy with complete PLP1 deletion. Brain Dev. 2012 34(10):852-856
- 47. Tsvetanova, N. G., Riordan, D. P., Brown, P. O. The yeast Rab GTPase Ypt1 modulates unfolded protein response dynamics by regulating the stability of HAC1 RNA. PLoS Genet. 2012 8(7):e1002862
- 48. Paira, S., Chakraborty, A., Das, B. The Sequential recruitments of Rab-GTPase Ypt1p and the NNS Complex onto pre-HAC1 mRNA promote its nuclear degradation in baker's yeast. Mol. Cell. Biol. 2023 43(8):371-400
- 49. Haile, Y., Deng, X., Ortiz-Sandoval, C., Tahbaz, N., Janowicz, A., Lu, J. Q., Kerr, B. J., Gutowski,
 N. J., Holley, J. E., Eggleton, P., Giuliani, F., Simmen, T. Rab32 connects ER stress to mitochondrial defects in multiple sclerosis. J. Neuroinflammation 2017 14(1):19
- 50. Wang, J., Yang, X., Zhang, J. Bridges between mitochondrial oxidative stress, ER stress and mTOR

signaling in pancreatic beta cells. Cell. Signal. 201628(8):1099-1104

- 51. Kim, S., Woo, C. H. Laminar flow inhibits ER stress-induced endothelial apoptosis through PI3K/Akt-dependent signaling Pathway. Mol Cells. 2018 41(11):964-970
- 52. Zhu, Y., Shi, F., Wang, M., Ding, J. Knockdown of Rab9 suppresses the progression of gastric cancer through regulation of Akt signaling pathway. Technol. Cancer Res. Treat. 2020 19:153303
- Hotamisligil, G. S., Davis, R. J. Cell signaling and stress responses. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2016 8(10):a006072
- 54. Johnson, G. L., Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science 2002 298(5600):1911-1912
- 55. Schinzel, R. T., Higuchi-Sanabria, R., Shalem, O., Moehle, E. A., Webster, B. M., Joe, L., Bar-Ziv, R., Frankino, P. A., Durieux, J., Pender, C., Kelet, N., Kumar, S. S., Savalia, N., Chi, H., Simic, M., Nguyen, N. T., Dillin, A. The hyaluronidase, TMEM2, promotes ER homeostasis and longevity independent of the UPR. Cell 2019 179(6):1306-1318.e18

4. 結論

本研究では、オリゴデンドロサイトの形態分化におけるRab7およびRab9の役割に焦点を当 て、小胞体ストレス応答との関係を調査した。Rab7B、Rab9のノックダウンが形態分化を促 進し、特に小胞体ストレス下での細胞の機能不全を回復させる効果を示したことから、これ らのRabタンパク質が神経変性疾患の進行において重要な役割を果たしている可能性が示唆 される。

この研究から得られた知見は、オリゴデンドロサイト関連疾患のPMDをはじめとする様々 な神経変性疾患の治療に向けた新たな治療標的の同定に貢献するものであり、特に小胞体ス トレスが関与する疾患の治療法開発において、Rab7BおよびRab9を標的とするアプローチが 有望であることを示唆している。今後はこれらのRabタンパク質の詳細な機能機序およびオ リゴデンドロサイトの健康と病態における具体的な役割の解明に向けて、さらなる研究が求 められる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの皆様の御指導・御支援を賜りました。謹んで感謝を申 し上げます。

山内淳司先生(東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 分子神経科学研究室 教授) には研究遂行、論文作成に当たり、終始御指導・御鞭撻を賜りました。森本高子先生と関洋 一先生(同上 准教授および助教)には温かい御指導・御協力を頂きました。白井玲美奈先生 (同上 嘱託助教)には実験技術など多くの御指導を頂きました。

また、熊澤義之先生 (東京薬科大学 生命科学部 応用生命科学科 食品科学研究室 教授)、 平位 秀世先生 (東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 幹細胞制御学研究室 教授)、には 副指導教員として御指導を頂きました。

更に、東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 分子神経科学研究室の皆様、東京薬科 大学 生命科学部の多くの先生方には実験を遂行するに当たり御協力を頂きました。

本研究は、文部科学省(MEXT)からの科学研究費補助金、厚生労働省(MHLW)からの医 学科学研究費補助金の支援を受けて行われました。また、第一三共科学財団(第一三共株式 会社)、武田科学財団(武田薬品工業株式会社)、三菱田辺ファーマ財団(三菱田辺製薬)か らの助成もあり、この場を借りて深く感謝いたします。