

ショウジョウバエ視細胞の膜タンパク質選別輸送における 低分子量 G タンパク質 Rab6 の役割

Rab6 Functions for Polarized Transports in *Drosophila* Photoreceptors

佐藤 卓至, 中村 祐里, 佐藤 明子

Takunori Satoh, Yuri Nakamura and Akiko K. Satoh

広島大学大学院総合科学研究科

要 旨 私達の体を形作る細胞は多数の膜ドメインを持つが、その形成・維持は細胞機能に必須である。膜タンパク質のドメイン特異的な局在は、生合成後の選別輸送によって実現される。我々はショウジョウバエ視細胞において、低分子量 G タンパク質の Rab6 が頂端面である光受容膜とストーク膜への輸送には必須であるのに対して、側底面膜への輸送には必要ないことを見出した。Rab6 はトランスゴルジ網 (TGN) からリサイクリングエンドソーム (RE) にかけて局在し、TGN では側底面輸送に関わるクラスリンと、RE では光受容膜輸送に関わる Rab11 と共局在した。これらの結果から、まず側底面への選別が TGN で行われ、頂端面へ輸送される膜タンパク質は共に Rab6 によって RE に輸送された後、光受容膜の膜タンパク質は Rab11 依存的に、ストーク膜の膜タンパク質は未同定の因子により各ドメインへ特異的に輸送されるという段階的選別モデルを提案したい。

キーワード：輸送, 極性, 選別, トランスゴルジ網, リサイクリングエンドソーム

1. はじめに

ほとんどすべての膜タンパク質は小胞体膜上で合成され、細胞内小胞輸送によって特異的な細胞内小器官や細胞膜に輸送される。この 30 年間、細胞内小胞輸送の分子機構は培養細胞や酵母を用いて活発に研究され、多くの知見が得られてきた。しかし多細胞生物の体を構成する細胞の多くは多方向性で調節性の小胞輸送機構を持っており、それにより複雑で多様な細胞形態を形成することで高次な機能を実現しているが、このような膜タンパク質の選別輸送 (極性輸送) の分子機構の研究は、高等動物や植物中に *in situ* に存在する細胞を用いる必要があることもあり、まだよく分かっていない。近年、これらの過程の欠損が様々な疾患をもたらすことが理解されるようになり、高等動物・植物を用いた膜輸送システムの研究が世界的に盛んになってきた。

私達の研究グループでは、ショウジョウバエ視細胞をモデルとして用い、膜タンパク質の選別輸送機構の解明を目指している。個眼の末端側の横断面では R1 から R7 の 7 つの視細胞が観察される (図 1A)。視細胞は上皮細胞と同様に接着斑により側底面と頂端面に区分されているが、さらに頂端面はその中央部の光受容膜とその周辺のストーク膜とに分かれている。これに加えて視細胞は軸索やシナプスを形成しており、少なくとも 4 つの異なる膜区画を持つ (図 1B)。

R1 から R6 の周辺視細胞で発現する Rh1 ロドプシンは、ショウジョウバエ視細胞において光受容への極性輸送を調べるのに最も適したタンパク質である。Rh1 ロドプシンは蛹後期において急激に転写翻訳され多量に輸送されるので、蛹後期の視細胞は光受容膜方向への輸送の欠損に極めて敏感である。私達はさらに、青色光により Rh1 ロドプシンの小胞体からの輸送を制御し、光受容膜への輸送を調べる方法 (BLICS

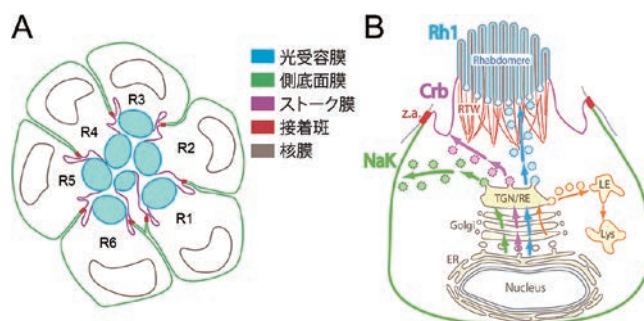


図 1 個眼横断面模式図

A 個眼の末端側の横断面では、R1 ~ R7 の 7 つの視細胞が観察され、個眼中央の細胞間隙に向かって光受容膜を伸ばしている。視細胞は、接着斑 (赤) により側底面 (緑) と頂端面の 2 つの膜区間に区分され、さらに頂端面はその中央部の光受容膜 (青) と周辺のストーク膜 (紫) とに分かれている。

B 膜タンパク質は小体膜上で合成された後、ゴルジ体へ送られて修飾を受けた後、さらにトランスゴルジネットワーク (TGN) で選別を受けて適切な部位へと輸送される。視細胞では TGN での選別により、Na⁺/K⁺ATPase (NaK) は側底面膜へ、Crb はストーク膜へ、Rh1 は光受容膜へと輸送される。

〒 739-8521 東広島市鏡山 1-7-1
E-mail: aksatoh@hisoshima-u.ac.jp
2016 年 1 月 8 日受付

A 輸送の同調系の開発

青色光による小胞体からのロドプシンの輸送開始

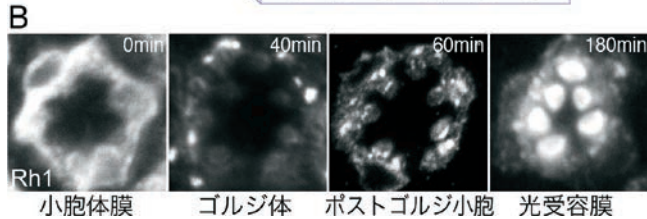
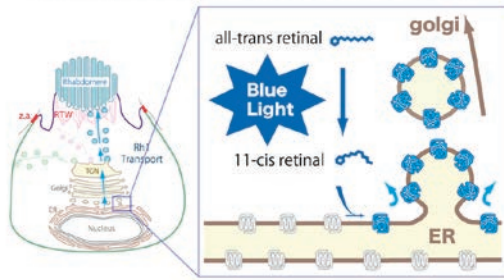


図2 BLICS法によりRh1ロドプシンの輸送を同調できる

A BLICS法についての説明模式図

発色団の供給源であるカロチノイドの欠損したVA-培地で飼育したショウジョウバエにall-trans retinalを暗所で与えた後に、青色光によりall-trans retinalを11-cis retinalに変換し発色団を供給することで一過的にRh1ロドプシンを形成し輸送を開始させることができる。

B BLICS法によりRh1輸送を開始させた時のRh1の局在青色光照射後の各時間でハエを氷麻酔した後、網膜を解剖により取り出し固定を行った。網膜は抗Rh1抗体に一夜、その後2次抗体に数時間浸して、ホルマウント染色を行った後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

野生型のハエではRh1ロドプシンは、青色光照射前(0分)では小胞体、青色光照射後40分ではゴルジ体、60分ではポストゴルジ小胞、180分では光受容膜に局在している。

法)を開発した(図2A)^{1,3)}。Rh1ロドプシンは、タンパク質オプシンに発色団11-cis Retinalの結合したものであるが、ショウジョウバエを11-cis Retinalの供給源であるカロチノイドを欠損した培地(VA-培地)で飼育すると、オプシンは合成されるが、Rh1ロドプシンになれず、小胞体を出ることはできない。BLICS法とは、VA-培地で飼育したショウジョウバエにall-trans retinalを暗所で食べさせた後に、青色光によりall-trans retinalを11-cis retinalに変換することで一過的にRh1ロドプシンを形成し、その輸送を開始させる方法である。野生型のハエでは、Rh1は青色光照射前(0分)には小胞体に局在していたのが(Rh1はロドプシンでなくオプシンの状態)、青色光照射後40分でゴルジ体に濃縮され始め、60分でポストゴルジ小胞、180分で光受容膜に輸送される様子が観察できる(図2B)。この方法を利用して、我々の研究グループはこれまでに、低分子量Gタンパク質のRab1がRh1の小胞体からゴルジ体への輸送に関与すること¹⁾、グリコシルフォスファチジルイノシトールの生合成がトランスゴルジ網(TGN)におけるRh1の選別に必要であること²⁾、Rab11/dRip11/MyoV複合体がRh1のポストゴルジ輸送に関与することを示した^{3,4)}。これら我々のグループの研究に加

え、係留タンパク質複合体であるExocystがRh1のポストゴルジ小胞の光受容膜基部への結合に必要であることや⁵⁾、Rab6Q71Lの過剰発現がRh1輸送の早い段階を阻害すること⁶⁾が報告されている。本総説では、最近私達が明らかにした低分子量Gタンパク質Rab6の膜タンパク質の選別輸送における役割について紹介したい⁷⁾。

2. 光受容膜構造の欠損する変異体のライプイメーシングルーピング

私達は、光受容膜の形成や光受容膜への輸送に関与するさらなる因子を同定するため、変異を導入したF1個体についてGPCRシグナル調節タンパク質のArrestin2::GFPによるRh1局在のライプイメーシングと部位特異的なFLP/FRTモザイク作成法を組み合わせたスクリーニングを行った。この方法では、興味深い表現型を持つハエのみを系統化するため、膨大な数のハエを短時間でスクリーニングできる。ショウジョウバエは5つの主要な染色体腕(X, 2L, 2R, 3L, 3R)を持つが、そのうちの3つの主要な染色体腕(2L, 2R, 3R)についてスクリーニングを行い、光受容膜の形成や輸送に欠損を持つ233系統の変異体を単離することに成功した。

ショウジョウバエ個眼中央部では、各々の光受容膜の間にある細胞外空間inter-rhabdomeral space (IRS)により1本1本の光受容膜が分離されており、各々が個別の光ファイバーのように機能し、網膜に高い空間分解能を与えている。IRSの形成には、網膜色素変性症の原因遺伝子であるプロテオグリカンのEysが視細胞のストーク膜から分泌されることが必要十分であることが報告されている^{8,9)}。スクリーニングによりIRSを欠損しているがEysとは異なる遺伝子の変異体546Pを単離した。SNPマッピングと次世代シーケンサーによる解析により表現型の原因となる変異を同定したところ、Rab6に入ったノンセンス変異が原因であり、Rab6^{546P}アレルは、新規Rab6ヌル変異と考えられた。この結果は、Eysの分泌にRab6が必要であることを示している。本総説では、このRab6^{546P}に加え、既存のRab6ヌル変異のRab6^{D23D}、さらにRab6機能の調節に関わるRichのヌル変異体のRich¹¹⁰⁾に関する解析結果とRab6局在より導かれた、視細胞における極性輸送の2段階選別モデルを紹介したい。

3. Rab6はショウジョウバエ視細胞では、頂端面膜への輸送に重要だが、側底面膜への輸送には必要ではない。

Rab6は細胞内小胞輸送に必須な低分子量Gタンパク質であるRabタンパク質ファミリーの1つである。ヒトでは66種類、ショウジョウバエでも31種類のRabタンパク質が報告されており、各々のRabタンパク質は特異的な局在を示し、特定の輸送過程の制御を行っていることが知られている¹¹⁾。Rab6は、ゴルジ体から小胞体への逆行性輸送^{12,13)}、Shiga毒素サブユニットBのエンドソームからゴルジ体への逆行性輸送^{14,15)}、単純ヘルペスウイルスの膜タンパク質のポストゴルジ輸送¹⁶⁾や水疱症口内炎ウイルスGタンパク質の

細胞膜への輸送¹⁷⁾に関与することが示されている。

私達は、FLP/FRT モザイク作成法を用いて、*Rab6*^{546P}、*Rab6*^{D23D} さらに *Rich*¹ のホモ接合体視細胞と野生型細胞をモザイク状に持つ網膜を作成し、表現型の詳細な解析を行った(図3)。先に述べたように *Rab6*^{546P} 変異個眼では Eys の合成

もしくはストーク膜からの分泌が欠損していると考えられたので、その Eys の局在を検討したところ、Eys は細胞質中の球形のオルガネラに蓄積していた(図3A)。そこで同じくストーク膜に輸送される頂部極性制御因子 Crb、光受容膜に輸送される Rh1、一過性受容器電位チャネル TRP、糖タンパク

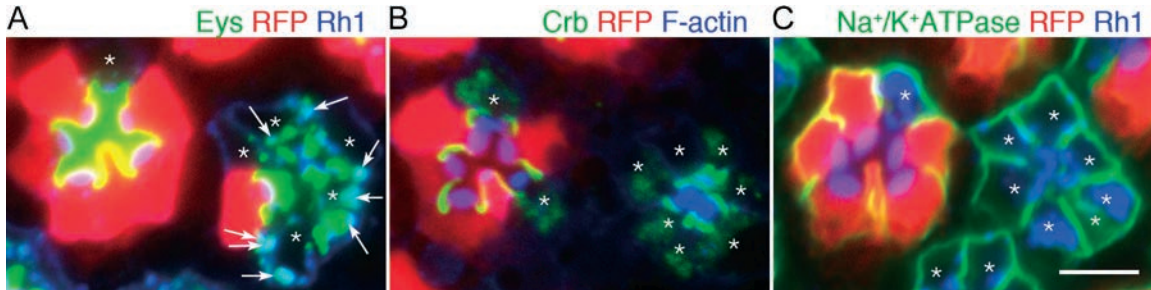


図3 *Rab6*^{546P} スル変異モザイク網膜における膜タンパク質

Rab6^{546P} スル変異モザイク網膜の間接蛍光抗体法による観察。赤色蛍光タンパク質 (RFP) 陽性は野生型の細胞、アスタリスクは *Rab6*^{546P} スル変異ホモ細胞を示す。スケールバーは5 μmを示す。

A 抗 Eys 抗体染色 (緑), 抗 Rh1 抗体染色 (青)。Eys と Rh1 の共局在箇所を矢印で示した。

B 抗 Crb 抗体染色 (緑), ファロイジン染色 (青)。

C 抗 Na⁺/K⁺ATPase 抗体染色 (緑), 抗 Rh1 抗体染色 (青)。

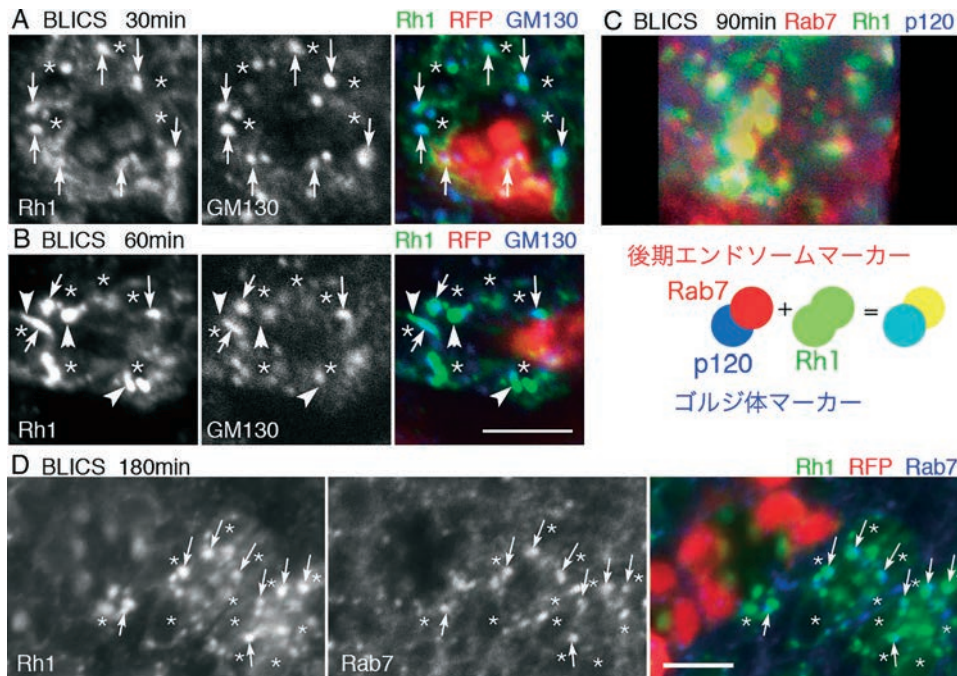


図4 BLICS 法による Rh1 ロドプシンの輸送の解析

BLICS 後の *Rab6*^{546P} スル変異モザイク網膜の間接蛍光抗体法による観察。赤色蛍光タンパク質 (RFP) 陽性は野生型の細胞、アスタリスクは *Rab6*^{546P} スル変異ホモ細胞を示す。スケールバーは5 μmを示す。

A, B BLICS による Rh1 輸送の開始から30分後(A)と60分後の(B)の Rh1 の局在の検討。抗 Rh1 抗体染色(緑), ゴルジ体マーカー GM130 に対する抗体による染色(青)を示す。Rh1 は野生型の細胞と同様の動態でゴルジ体へ局在したが(矢印), その後ゴルジ体から出て行くのが遅く, ゴルジ体に多量に蓄積した後, チューブや球形の構造体(矢頭)としてゴルジ体から出芽する。

C BLICS による Rh1 輸送の開始から90分後の網膜を抗 Rh1 抗体(緑), ゴルジ体マーカー p120 に対する抗体(青), 後期エンドソームマーカー Rab7 に対する抗体(赤)で染色した後, 共焦点レーザー顕微鏡で0.5 μm 間隔・20枚の光学切片像を取り, これを投影した画像。ゴルジ体と後期エンドソームが隣り合って存在し, Rh1 がその両者にまたがって局在している。

D BLICS による Rh1 輸送の開始から180分後の網膜を抗 Rh1 抗体(緑), 後期エンドソームマーカー Rab7 に対する抗体(青)で染色した。野生型細胞では Rh1 は光受容膜に局在するが, *Rab6*^{546P} スル変異ホモ細胞では Rh1 は細胞質の Rab7 で染色される後期エンドソームに蓄積している。

質の Choptin (Chp) の局在を検討したところ、これらすべての膜タンパク質の輸送が阻害され、細胞質に蓄積していた(図3A, B)⁷⁾。さらに、これらの膜タンパク質は細胞質中の球形オルガネラで共局在したので、ストーク膜と光受容膜へ輸送される膜タンパク質の選別が起こる前の段階が阻害された可能性がある。一方、側底面膜へ輸送される Na⁺/K⁺ATPase と、側底面膜へ輸送された後に接着斑に局在化する *Drosophila* epithelial cadherin, DE-Cad について局在を検討したところ、Na⁺/K⁺ATPase は側底面膜に、DE-Cad は接着斑に正常に局在した(図3C)⁷⁾。これらの結果は、視細胞において Rab6 は頂端面のストーク膜及び光受容膜への輸送に重要だが、側底面膜への輸送には必要ではないことを示している。

4. BLICS 法による *Rab6^{546P}*, *Rab6^{D23D}*, *Rich¹* 変異視細胞におけるロドプシン輸送の観察

次に、*Rab6^{546P}*, *Rab6^{D23D}* さらに *Rich¹* のホモ変異視細胞における Rh1 の輸送過程を BLICS 法により詳細に観察した(図4)⁷⁾。青色光照射前には、野生型と Rab6・Rich ヌル変異視細胞の両方で Rh1 は小胞体膜上に蓄積していた。青色光照射後 30 分では、野生型・Rab6・Rich ヌル変異視細胞のい

ずれにおいても Rh1 はゴルジ体に局在していた(図4A)。これに対して、青色光照射後 60 分では、*Rab6^{546P}* 変異視細胞のゴルジ体における Rh1 染色は野生型と比較して著しく強くなり(図4B 矢印)、また、ゴルジ体とつながりながら伸びている Rh1 を含むチューブ状構造や球形のオルガネラが観察された(図4B 矢頭)。これらのチューブ状構造や球形オルガネラが後期エンドソームであるかを調べるために、*Rab6^{546P}* 変異視細胞をゴルジ体マーカーである p120, Rh1, 後期エンドソームマーカー Rab7 で染色し三次元的に観察を行ったところ、ゴルジ体と後期エンドソームは隣り合って存在し、その両者にまたがって Rh1 が局在する像が多数観察された。その投影画像と模式図を図6Cに示した。青色光照射後 180 分では、野生型では Rh1 が光受容膜に蓄積しているのに対し、Rab6・Rich ヌル変異視細胞では Rh1 は後期エンドソームに局在した(図4D)。これらの観察から、*Rab6^{546P}* 変異視細胞では小胞体から輸送されてきた Rh1 がゴルジ体から正常に光受容膜に輸送されずに多量に蓄積し、その後、後期エンドソームに濃縮した形でゴルジ体から直接出芽すると考えられた。

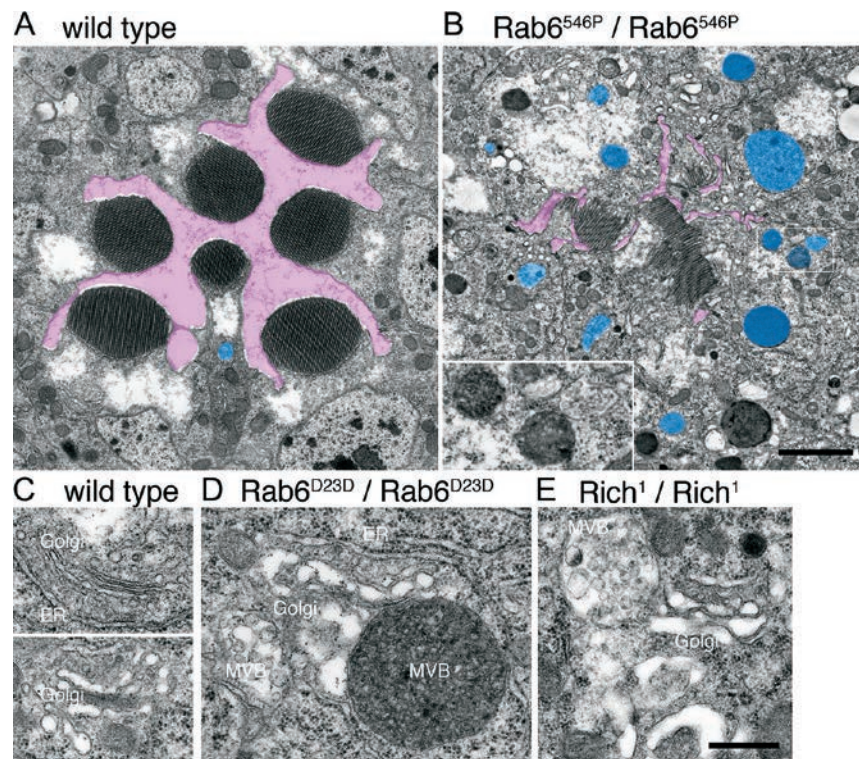


図5 個眼構造とオルガネラ構造の電子顕微鏡による観察

野生型, *Rab6^{546P}*, *Rab6^{D23D}*, *Rich¹* の変異細胞からなる個眼の電子顕微鏡による観察像を示した。認識しやすいよう光受容膜の間にある空間 (IRS) を紫, 多胞体 (MVB) を青で示した。

A, B 野生型細胞から形成される個眼 (A) と, *Rab6^{546P}* 変異細胞から形成される個眼 (B) を示した。B の左下のインセットは B の画像中の四角で囲まれた部分を 4 倍に拡大したもので、MVB の構造を明瞭に見えるよう無着色で示した。スケールバーは 2 μm を示す。

C-E 野生型, *Rab6^{D23D}*, *Rich¹* 細胞で観察されるゴルジ体と MVB。野生型細胞では、ここで用いた固定条件下では MVB はほとんど観察されないで示していない。スケールバーは 500 nm を示す。

5. 透過型電子顕微鏡による Rab6D23D 変異モザイク網膜の観察

Rab6^{546P}・Rab6^{D23D}・Rich¹ のホモ変異視細胞における細胞内小器官や各々の細胞膜ドメインの微細構造を透過型電子顕微鏡を用いて観察した (図 5)⁷⁾。間接蛍光抗体法での観察と同様に、*Rab6^{546P}, Rab6^{D23D}, Rich¹* のヌル変異個眼では IRS が小さく、個眼を形成するすべての視細胞の光受容膜が接着し融合していた。また、光受容膜も野生型と比較すると著しく小さく、光受容膜への輸送も減少していると考えられた。ストーク膜と側底面膜の長さを定量したところ、ストーク膜の長さは *Rab6^{546P}, Rab6^{D23D}, Rich¹* で減少していたが、側底面膜の長さには差はなかった。また、これらの結果は間接蛍光抗体法での観察と同様に、Rab6 ヌル変異細胞の方が、Rich ヌル変異細胞よりも強い表現型を示していた。

細胞小器官に着目して観察してみると、*Rab6^{546P}, Rab6^{D23D}, Rich¹* のヌル変異細胞のゴルジ体は野生型と比較して大きく内腔が膨潤していた (図 5C-E)。これは以前の哺乳類 Rab6 欠損細胞における報告と一致している¹⁸⁾。しかし、同じ論文で報告されたゴルジ体周辺部での小胞の増加は観察されなかった。ゴルジ体の変化に加えて、*Rab6^{546P}, Rab6^{D23D}, Rich¹* のヌル変異細胞では、多胞体 (MVB) の数とサイズの著しい増加が観察された。また、これらの MVB の内部小胞はしばしば黒化しており、消化が進んでいるものと考えられた。さらに、このような MVB はしばしばゴルジ体のトランス面に付着した状態で観察され、BLICS 後 90 分において間接蛍光抗体法により観察されたゴルジ体と後期エンドソームが接した構造を示していると考えられる。この結果は、ゴルジ体から正しく輸送されなかった積荷タンパクがゴルジ体に多量に蓄積し、これが後期エンドソームに濃縮した形でゴルジ体から直接出芽するという間接蛍光抗体法からの仮定を支持し、後期エンドソームが MVB の形態をとることを示している。一方で、ER、ミトコンドリア、核は正常であり、このことは Rab6 がゴルジ体以降の輸送に特異的に働くことを示している。

6. Rab6 は TGN とゴルジ体に結合した Rab11 陽性 RE に局在する

ショウジョウバエ視細胞における選別輸送の分子機構と Rab6 の機能を解明するためには、Rab6 の局在を詳細に調べる必要がある。そこで、ショウジョウバエ Rab6 に特異的な抗体を作製し、間接蛍光抗体法により Rab6 の局在を検討したところ、Rab6 はショウジョウバエ視細胞ではゴルジ体のトランス側及び光受容膜基部に局在していることが分かった。光受容膜基部の Rab6 染色はドット状で Rab11 と共局在することから、光受容膜基部に係留したポストゴルジ小胞と考えられた。Rab6 のゴルジ体への局在の詳細を知るために、シスゴルジマーカーである GM130 や TGN マーカーである GalT、リサイクリングエンドソーム (RE) マーカーである

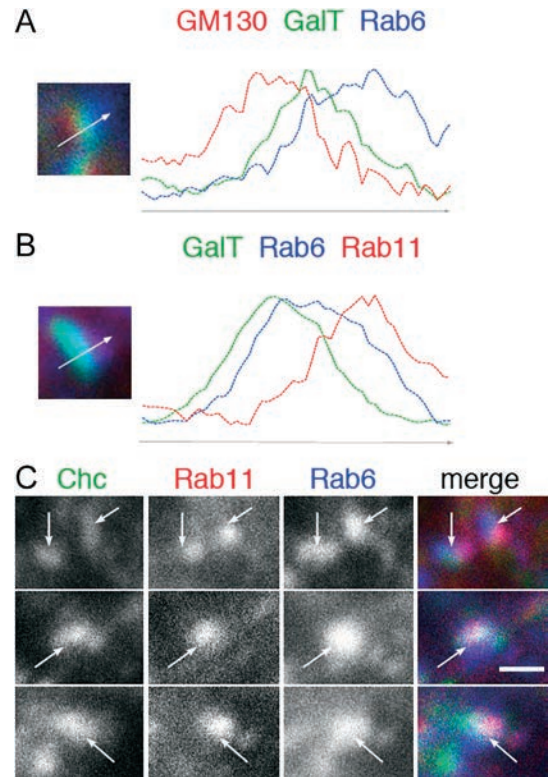


図 6 ショウジョウバエ視細胞における Rab6 のゴルジ体局在の解析

野生型、もしくは GalT::CFP を発現させた初期蛹の網膜の間接蛍光抗体法による観察。

A 抗 GFP 抗体染色による GalT の可視化 (緑), 抗 GM130 抗体染色 (赤), 抗 Rab6 抗体染色 (青). 左に、右の画像における染色強度を矢印にそってプロットしたグラフを示した。

B 抗 GFP 抗体染色による GalT の可視化 (緑), 抗 Rab11 抗体染色 (赤), 抗 Rab6 抗体染色 (青). 左に、右の画像における染色強度を矢印にそってプロットしたグラフを示した。

C 抗クラスリン重鎖 (Chc) 抗体染色 (緑), 抗 Rab11 抗体染色 (赤), 抗 Rab6 抗体染色 (青). スケールバーは 1 μm を示す。

Rab11 との共局在を検討した⁷⁾ (図 6A, B)。その結果、Rab6 は TGN から Rab11 で染色される RE にかけて広く分布することがわかった。TGNからはクラスリン被覆小胞を含んだ多数のポストゴルジ小胞が形成されることが期待される。哺乳類上皮細胞ではクラスリン被覆小胞が側底面膜への極性輸送を担っていることが示されているので、特に Rab6, Rab11, クラスリン重鎖の局在を解析した (図 6C)。その結果、Rab11 とクラスリン重鎖はともにゴルジ体周辺で Rab6 と共局在するが、互いの局在領域はほとんど重なっていない。この結果は、Rab6 は TGN から RE に広がって局在し、TGN においてクラスリン重鎖と共局在し、RE において Rab11 と共局在する可能性を示していた。

7. 多方向への膜タンパク質の極性輸送に関する分子機構 一段階的選別モデル

これまで紹介した我々の Rab6 変異細胞の表現型と Rab6 の局在から提案される、ショウジョウバエ視細胞における膜

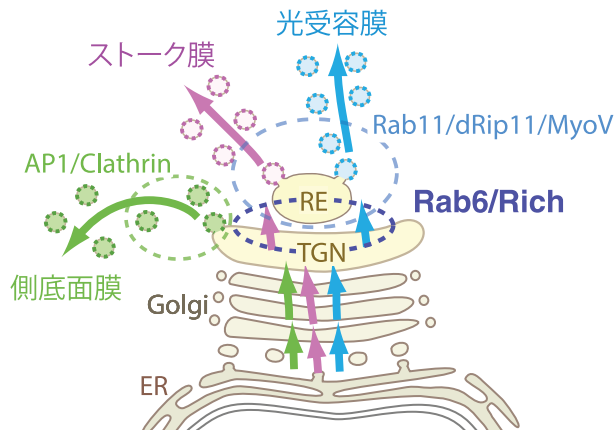


図7 3つの極性輸送経路へのRab6機能のモデル

膜タンパク質は小胞体膜上で合成された後、ゴルジ体へと輸送され、その後トランスゴルジ網 (TGN) に到着する。TGNにおいて、まず側底面 (緑) へ輸送される膜タンパク質が選別され側底面へと輸送される。この過程にはAP1Bとクラスリンが関わっているかもしれない。一方、TGNにおいて選別を受けなかった頂端面のストック膜 (紫) と光受容膜 (青) へ輸送される膜タンパク質は、Richにより活性化されたRab6を必要とする過程により、リサイクリングエンドソーム (RE) へと送られる。REでは光受容膜へ送られる膜タンパク質とストック膜へ輸送される膜タンパク質とが未同定の分子機構により選別される。その後、光受容膜へと向かう小胞はRab11/dRip11/MyoV依存的に光受容膜へと輸送される。

タンパク質の選別輸送のモデルを図7に示した⁷⁾。ほとんどすべての膜タンパク質は小胞体膜上で合成された後、ゴルジ体のシス面へと輸送され、その後TGNに到着する。TGNにおいて、まず、側底面へ輸送される膜タンパク質が選別され、側底面へと輸送される。一方、頂端面を構成するストック膜と光受容膜へ輸送される膜タンパク質はTGNにおいて選別を受けずに、Richにより活性化されたRab6を必要とする過程によりREへと送られる。REにおいて光受容膜へ送られる膜タンパク質とストック膜へ輸送される膜タンパク質とが未同定の分子機構により選別され、その後、光受容膜へと向かう小胞はRab11/dRip11/MyoV依存的にアクチン繊維上を移動^{3,4)}、光受容膜基部にてexocyst依存的に係留し⁵⁾、未同定のSNAREタンパク質複合体によって光受容膜と融合すると考えられる。

哺乳類の上皮細胞ではアダプター複合体AP1Bとクラスリンが側底面への輸送に関わることが示されている^{19,20)}。筆者らは以前の研究において、ショウジョウバエ唯一のAP1が側底面への輸送に関わることを示唆した²⁾。ショウジョウバエでは、側底面輸送へのクラスリンの関与についての報告はないが、ここに示したクラスリン重鎖がTGNに結合していること、特に頂端面輸送に関わるRab11とは分離した形で局在していることは、クラスリンがAP1と一緒に側底面への輸送に関わることを示唆しているかもしれない。

本総説では、最近の私達の研究、多方向への選別輸送を解

析することで、TGNとREの2つの場において、膜タンパク質が段階的に選別を受けることを示した論文について主に解説した。今後は、TGNとREの間の輸送の詳細な分子機構や側底面、ストック膜、光受容膜へ輸送される膜タンパク質の選別機構の実態、まだ全く明らかになっていないストック膜への輸送に関わる因子の同定を進めていきたい。

図1, 3, 4, 5, 6, 7は文献7)より改変後転用した。

文 献

- 1) Satoh, A., Tokunaga, F., Kawamura, S. and Ozaki, K.: *J. Cell Sci.*, 110, 2943–2953 (1997)
- 2) Satoh, T., Inagaki, T., Liu, Z., Watanabe, R. and Satoh, A.K.: *Development*, 140, 385–394 (2013)
- 3) Satoh, A.K., O'Tousa, J.E., Ozaki, K. and Ready, D.F.: *Development*, 132, 1487–1497 (2005)
- 4) Li, B.X., Satoh, A.K. and Ready, D.F.: *J. Cell Biol.*, 177, 659–669 (2007)
- 5) Beronja, S., Laprise, P., Papoulas, O., Pellikka, M., Sisson, J. and Tepass, U.: *J. Cell Biol.*, 169, 635–646 (2005)
- 6) Shetty, K.M., Kurada, P. and O'Tousa, J.E.: *J. Biol. Chem.*, 273, 20425–20430 (1998)
- 7) Iwanami, N., Nakamura, Y., Satoh, T., Liu, J. and Satoh, A.K.: *PLoS Genet.*, 12, e1005828 (2016)
- 8) Husain, N., Pellikka, M., Hong, H., Klimentova, T., Choe, K.M., Clandinin, T.R. and Tepass, U.: *Dev. Cell*, 11483–11493 (2006)
- 9) Zehlf, A.C., Hardy, R.W., Becker, A. and Zuker, C.S.: *Nature*, 443, 696–699 (2006)
- 10) Tong, C., Ohshima, T., Tien, A.C., Rajan, A., Haueter, C.M. and Bellen, H.J.: *Neuron*, 71, 47–59 (2011)
- 11) Stenmark, H.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 513–525 (2009)
- 12) Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T. and Pepperkok, R.: *Nat. Cell Biol.*, 1, 423–443 (1999)
- 13) White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B. and Stelzer, E.H.: *J. Cell Biol.*, 147, 743–760 (1999)
- 14) Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B. and Johannes, L.: *J. Cell Biol.*, 156, 653–664 (2002)
- 15) Utskarpen, A., Slagsvold, H.H., Iversen, T.G., Wälchli, S. and Sandvig, K.: *Traffic*, 7, 663–672 (2006)
- 16) Johns, H.L., Gonzalez-Lopez, C., Sayers, C.L., Hollinshead, M. and Elliott, G.: *Traffic*, 15, 157–178 (2014)
- 17) Miserey-Lenkei, S., Chalancon, G., Bardin, S., Formstecher, E., Goud, B. and Echard, A.: *Nat. Cell Biol.*, 12, 645–654 (2010)
- 18) Storrie, B., Micaroni, M., Morgan, G.P., Jones, N., Kamykowski, J.A., Wilkins, N., Pan, T.H. and Marsh, B.J.: *Traffic*, 13, 727–744 (2012)
- 19) Bonifacino, J.S.: *J. Cell Biol.*, 204, 7–17 (2014)
- 20) Deborde, S., Perret, E., Gravotta, D., Deora, A., Salvezza, S., Schreiner, R. and Rodriguez-Boulan, E.: *Nature*, 452, 719–723 (2008)