

急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を用いた
生体膜におけるホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) の
局在解析に関する研究

鹿児島大学大学院共同獣医学研究科

黒川夕奈

2024 年 3 月

目次

第一章：研究の社会的背景・動機

<1> 生体膜

1.1 生体膜の特徴

<2> リン脂質

2.1 リン脂質の構造、分類

2.2 ホスホイノシタイド (PIs)

2.3 ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 : PI4P

<3> リン脂質解析

3.1 リン脂質解析法

<4> オートファジー経路

4.1 生体内における物質消化の意義

4.2 消化経路の種類

4.3 オートファジー先行研究

4.4 3種類のオートファジー経路

第二章：研究結果

<1> 哺乳類マクロオートファジーにおけるオートファゴソーム膜上の PI4P 局在

1.1 背景

1.2 材料及び方法

1.3 結果

1.4 考察

1.5 結論

<2> 出芽酵母マクロオートファジーにおける PI4K (Pik1p、Stt4p) の役割

2.1 背景

2.2 材料及び方法

2.3 結果

2.4 考察

2.5 結論

<3> 出芽酵母ミクロリポファジーにおける PI4K (Pik1p、Stt4p) の役割

3.1 背景

3.2 材料及び方法

3.3 結果

3.4 考察

3.5 結論

<4> 出芽酵母細胞膜における PI4K (Pik1p、Stt4p) の PI4P、PI(4,5)P₂生成への寄与

4.1 背景

4.2 材料及び方法

4.3 結果

4.4 考察

4.5 結論

第三章：考察・結論

謝辞

参考文献

第一章：研究の社会的背景・動機

生体は全て、核酸（DNA・RNA）、たんぱく質、脂質、糖質、無機化合物から構成されている。分子細胞生物学は、これらの構成要素が細胞内でどのように作用し、どのように細胞の機能やプロセスを制御するかを研究する学問である。現在までの分子細胞生物学研究の飛躍的發展により、DNA・RNA やたんぱく質に関する知見は急速に増加してきた。特に、2003年に30億塩基対のヒトゲノム全塩基配列が決定されてからは、核酸や、遺伝子にコードされるたんぱく質の研究は著しく発展した。対して「脂質」はゲノムにコードされておらず、遺伝子産物であるたんぱく質によって合成される。生命活動の重要なエネルギー源や、生体膜の構成要素として生体に必須であるが、未知な点が多い。生体膜は脂質とたんぱく質から構成され、細胞膜や、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソームなど細胞内小器官の膜を指す。生体膜は、細胞や細胞小器官の内と外を隔てる役割だけでなく、その動態によって、様々な細胞機能維持に重要な役割を持つ。生体膜脂質の主要構成要素の1つにリン脂質があるが、近年、生命体・細胞の活動における重要性が分かってきた。最近では、アテローム性動脈硬化症などの循環器疾患、ガウシェ病・ニーマンピック病などのリソソーム蓄積症、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、癌、感染症などの関連物質としても知られている。しかしながら、脂質の有用な解析方法が限られており、詳細な分子機構は明らかでない。リン脂質の働きを究明することは、生体膜動態を解き明かすことに直結し、様々な生体機能の機序解明、ならびに、疾病の治療法確立に重要である。

そこで本研究では、オートファゴソーム膜と細胞膜において、「急速凍結・凍結切断レプリカ標識（QF-FRL）法」を用いてリン脂質の微細局在解析を行うことで、リン脂質の機能解明を目指した。第一章では、本研究における研究対象である<1>生体膜と、その主要構成要素である<2>リン脂質について、また、生体膜リン脂質を可視化し解析する方法として<3>リン脂質解析、さらに、リン脂質が重要な機能を持つことが期待される<4>オートファジー経路という4つのトピックに分けて研究背景をまとめた。

<1> 生体膜

生体膜は膜脂質と膜たんぱく質から構成される膜であり、細胞の内と外の隔壁としての役割以外にも、セカンドメッセンジャーとしての役割や、膜脂質と膜たんぱく質との作用によって細胞内恒常性を保つ役割を持つ。さらに、細胞内で独立した機能をもつ細胞内小器官の膜を構成し、細胞小器官の機能を維持するために重要である。つまり生体膜は、細胞に必須の要素である。したがって、これら生体膜の動態を解き明かすことが、未だ明らかでない生体内・細胞内現象の解明、ならびに、関連疾患の治療法確立につながることを期待される。<1>生体膜では、生体膜に関する研究背景をまとめた。

1.1 生体膜の特徴

生体膜研究の基は、1972年に提唱された「流動モザイクモデル」である(図1-1) [1]。流動モザイクモデルでは、リン脂質二重層によってつくられる基盤にたんぱく質が表面接着したり、貫通したりし、二次元的に“流動的”に動き回るとされた。このモデルは現在でも本質的に正しいと考えられているが、当時、脂質分子の多様性や役割に関しては、全く考慮されなかった。しかし1990年代初頭から「脂質ラフト」の概念が生まれたことで見直され、脂質に関する研究が進んできた。表1-1には、流動モザイクモデルが提唱されるまでの、生体膜・リン脂質研究の歴史を示した。

流動モザイクモデル(図1-1)に示された生体膜の“流動性”を維持する物質として、脂質が重要な役割を果たす。膜脂質には、リン脂質、糖脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールが存在する。膜脂質は両親媒性を持ち(図1-2)、疎水性尾部を内側に、親水性頭部を外側にして並ぶことで、リン脂質二重層を形成する。リン脂質二重層はチャンネルやトランスポーターなどのたんぱく質と作用し、イオンや分子の出入りを制御する。

生体膜の“流動性”として、横方向においては“相転移現象”がある。低温で脂肪酸の炭化水素鎖が固相となり、高温で融解し液晶相となる現象である。生理温度では液晶相であり、脂肪酸の炭化水素鎖は自由に動き回る[2]。生体膜コレステロールは、膜の流動性を低下させながらも、炭化水素鎖が固相になることを防ぎ、膜の流動性を広い温度範囲で保持する機能を持つ[2]。このように、数々の分子が横方向の流動性を制御することで、生体膜機能を維持している。さらに、細胞質側・管腔側の縦方向の流動性を司るたんぱく質として、生体膜上のフリッパーゼ、フロッパーゼ、スクランブラーゼが存在する[3]。フリッパーゼ、フロッパーゼはATP依存的に単一方向(フリッパーゼ：管腔側→細胞質側、フロッパーゼ：細胞質側→管腔側)へ脂質を輸送する。一方、スクランブラーゼはATPに依存せず、双方向に脂質を輸送する。この縦方向の流動性により特定の脂質が一方の面に分布し、“非対称性”を生むことで、様々な細胞機能に影響を与える。生理条件下において、すべてのリン脂質はフロッパーゼによってゆっくり連続的に管腔側へ移動するが、ホスファチジルセリン(PS)およびホスファチジルエタノールアミン(PE)はフリッパーゼにより直ちに細胞質側に戻される。そのため一般的に、生体膜においてPSおよびPEは細胞質側、ホスファチジルコリン(PC)、スフィンゴミエリン

(SM)は管腔側に局在する[4]。このような脂質非対称性が、膜電位、表面電荷、透過性、形状、安定性などの細胞内特性に重要な働きを担う[5]。例えば、トリプトファン輸送体[6]、プロテインキナーゼC(PKC)[7]、アネキシン[8]、および、スペクトリン[8]などの骨格たんぱく質は、細胞質側のPS依存的に細胞膜に分布する。対して、脂質の非対称性が破壊され、細胞膜の表面(管腔側)にPSが露出すると、マクロファージがアポトーシスの対象として認識する[9, 10]。また、細胞分裂の分裂終期には、娘細胞の分裂溝でPEの非対称性が局所的に解消され、PEが管腔側に露出する[11]。このよう

に、リン脂質の“非対称性”は、生体膜動態が引き起こす細胞内現象において、非常に重要な因子となる。

本研究では、急速凍結・凍結切断レプリカ標識（QF-FRL）法を用いてリン脂質二重層の間で切断し、特定のリン脂質を標識した。標識の局在や密度の解析により、生体膜におけるリン脂質の非対称性や、その特異的な局在を明らかにすることで、その生体膜動態ならびに細胞内現象の解明を目指した。

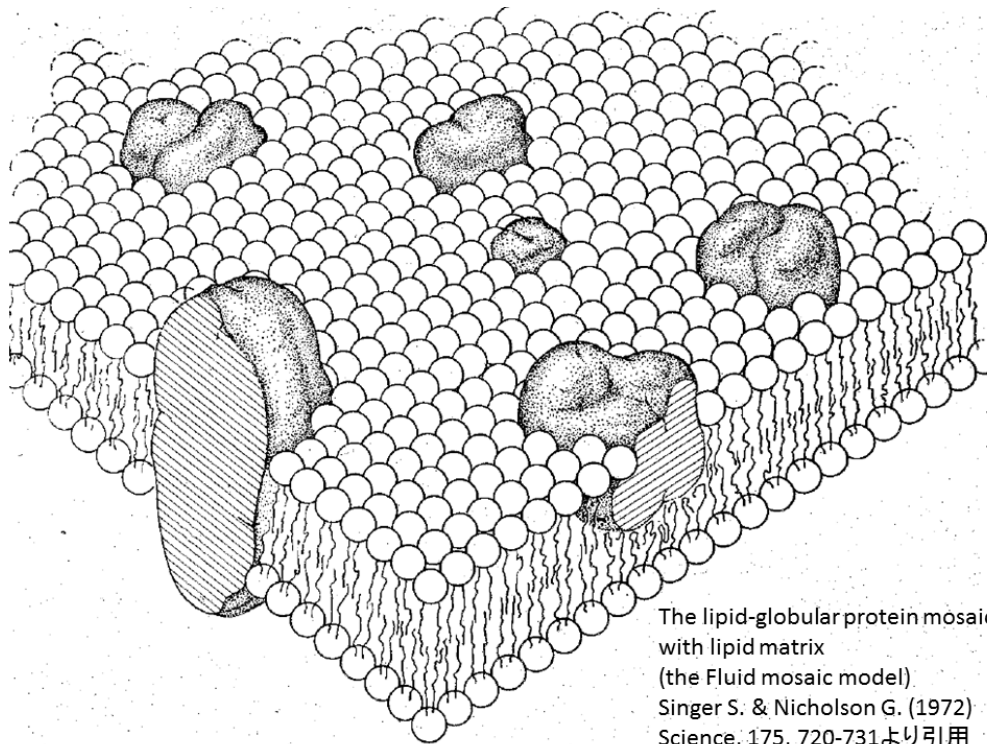


図 1-1 流動モザイクモデル

流動モザイクモデルでは、リン脂質二重層によって作られる粘性基盤にタンパク質が表面接着したり、貫通したりして、2次元的には流動的に動き回っているとされた。そして、これら生体膜の特性を、熱力学のような物理原則に沿っていると説明しつつ、視覚的にも明確なポンチ絵で示した。[1]

1665 年	Robert Hooke	顕微鏡を作製し、観察した小部屋のような構造を Cell と名付け、「細胞」の概念が生まれた。	
1805 年	Lorenz Oken	「全ての生物は細胞から成り立つ」と提唱した。	
1838 年	Matthias Jakob Schleiden	植物細胞の細胞説を提唱した。	「細胞説」の確立[12] “細胞表層のバリア”の実体に対する問題意識が立ち上がり、生体膜に関する研究始動。
1839 年	Theodor Schwann	動物細胞の細胞説を提唱した。	
1846 年	Théodore Nicolas Gobley	卵黄と脳からリンを含む脂質を単離し、レシチン(現在のホスファチジルコリン)と命名し、リン脂質自体の構造が解明された[13]。	
1895 年	Ernest Overton	隔壁を形成する膜の大部分が脂質であることを提唱した[14]。	
1925 年	Evert Gorter と François Grendel	赤血球膜が脂質二重層であることを記述した[15]。	
1935 年	James Danielli と Hugh Davson	リン脂質二重層がたんぱく質の層で囲まれた細胞膜モデルを提唱[16]。	
1940 年代	Jordi Folch	牛の脳のリン脂質分画中のイノシトールを同定し、その中にリン酸塩が含まれることが確認され[17]、ホスホイノシタイド研究始動。	
1972 年	Seymour Jonathan Singer と Garth L. Nicolson	「流動モザイクモデル」を提示した(図 1-1)[1]。	

表 1-1 生体膜、リン脂質研究が立ち上がる歴史の概略

〈2〉 リン脂質

リン脂質は生体膜の主要構成要素である。細胞の内と外の隔壁としてだけでなく、たんぱく質の制御により細胞内恒常性を保つ役割や、セカンドメッセンジャーとしての役割など、その役割は多岐に渡る。しかしながら、脂質の有用な解析技術が無いため、未だ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、QF-FRL法を用いて、オートファゴソーム、および、細胞膜におけるリン脂質の微細局在解析を行い、機能解明を目指した。〈2〉リン脂質では、リン脂質の概要をまとめた。

2.1 リン脂質の構造、分類

リン脂質は、構造中にリン酸エステル部位を持つ脂質の総称である。親水性頭部、疎水性尾部からなる両親媒性を持ち、疎水性尾部を内側にして8-10 nmの脂質二重層を形成し、生体膜を構成する(図1-2)。生体内でシグナル伝達にも関わる重要な分子である。

リン脂質はグリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質の2種類に大別される。グリセロリン脂質の内、親水性頭部の種類によってホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスホイノシタイド (PIs)、ホスファチジルグリセロールに分別される(図1-3)。生体膜のリン脂質は、種類によりその役割だけでなく、それぞれの細胞内局在も異なる。本研究では、近年重要な役割が明らかになってきたPIsに着目し、その微細局在解析を行うことで、PIsが関わる生体膜動態の解明を試みた。

2.2 ホスホイノシタイド (PIs)

ホスホイノシタイド (PIs) はグリセロリン脂質に分類されるリン脂質の1つである。親水性頭部はイノシトール環、疎水性尾部は脂肪酸からなる。イノシトール環のリン酸基の数と位置によって、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P)、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P)、ホスファチジルイノシトール 5-リン酸 (PI5P)、ホスファチジルイノシトール 3, 4-二リン酸 (PI(3, 4)P₂)、ホスファチジルイノシトール 3, 5-二リン酸 (PI(3, 5)P₂)、ホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (PI(4, 5)P₂)、ホスファチジルイノシトール 3, 4, 5-三リン酸 (PI(3, 4, 5)P₃) の8種のイノシトールリン脂質が知られている(図1-4)。

生体膜リン脂質の内、PIsは10%以下であるが、生体膜を構成する役割以外にも、数々の生理的な役割を持つ。個々のPIsの量的な変動や細胞内局在の変化が、様々な細胞生理応答の発現を仲介する。例えば、セカンドメッセンジャー産生を介したシグナル伝達制御である。細胞膜に存在するGたんぱく質共役受容体が活性化すると、ホスホリパーゼCによりPI(4, 5)P₂がイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DG) に分解され、セカンドメッセンジャーの産生が促進される。ま

たPIsは、細胞内の異なる生体膜にそれぞれ分布し、それぞれのエフェクターたんぱく質の時空間的な導引を可能にし、生理反応に秩序をもたらす[18]。加えて、細胞骨格やチャネル機能の制御、細胞の走化性などに関与する。つまり、PIsは細胞機能を支える重要な因子である。

特に本研究では、PI(4,5)P₂の前駆体として知られてきたPI4P自身の、生体膜動態における本質的な機能に着目し、その局在を解析することで、生体膜動態、ならびに生体膜動態によって引き起こされる細胞内現象の解明を目指した。

2.3 ホスファチジルイノシトール4-リン酸：PI4P[18]

PI4Pは、細胞内存在量の最も多いPIsの1つであるが、その機能の詳細に関しては未解明な点が多い。PI4PはPIを基質とし、イノシトール環第4位をリン酸化するPI4キナーゼ(PI4K)により合成される。出芽酵母においては3種類(Pik1p、Stt4p、Lsb6p)、哺乳類においては4種類(PI4KII α/β、PI4KIII α/β)のPI4Kが同定されている[19, 20] (図1-5)。出芽酵母では、中でもPik1p、Stt4pが重要な役割を持つ[21]。Pik1pは可溶性たんぱく質であり、核・トランスゴルジ膜に分布し、分泌経路の制御や、ゴルジからの分泌小胞の出芽、細胞骨格などに直接的な役割を持つ。Stt4pは膜結合たんぱく質であり、細胞膜に分布し、アクチン細胞骨格組織や細胞壁の維持、液胞形態の制御に関わる。Pik1p、Stt4pの遺伝子欠損株は致死となり、相互の強制発現においてもレスキューされないため、機能的に独立し、重複しないとされている[22]。

PI4Pは、それぞれのPI4K分布に沿って、主にゴルジ体と細胞膜に約半数ずつ分布すると考えられている。ゴルジ体においてPik1p/PI4KIII βによって産生されるPI4Pは、エフェクターたんぱく質を導引することでその機能を制御し、アクチン骨格や脂質輸送たんぱく質の機能をコントロールする。細胞膜においてStt4p/PI4KIII αによって産生されるPI4Pは、PI(4,5)P₂の前駆体としての役割に加え、PI(4,5)P₂とは直接関係のない、PI4Pとしての役割の存在があることも示唆されている。細胞膜PI4Pは、PI(4,5)P₂とともに細胞膜の負電荷形成に寄与し、たんぱく質の細胞膜へのリクルートや、チャネル機能の制御に関与することが報告された[23]。PI4Pは、PI4P-5キナーゼ(出芽酵母におけるMss4p)によってイノシトール環第5位がリン酸化され、PI(4,5)P₂となる(図1-5)。PI(4,5)P₂は、細胞内セカンドメッセンジャーの前駆体としての役割や、アクチン細胞骨格やエンドサイトーシス制御に直接的な役割を持つ。最近まで、PI4Pの役割は、PI(4,5)P₂の前駆体としてPI(4,5)P₂レベルを維持することであるとされてきた。しかし近年の知見では、前駆体としての役割に加えて、PI4P自身の重要な役割を持つ説が有力である。さらに、脱リン酸化酵素であるホスファターゼの働きによって、PI4PはPI4P-4ホスファターゼによってPIに、PI(4,5)P₂はPI(4,5)P₂-5ホスファターゼによってPI4Pへと脱リン酸化され、そのバランスが調製されている(図1-5)。

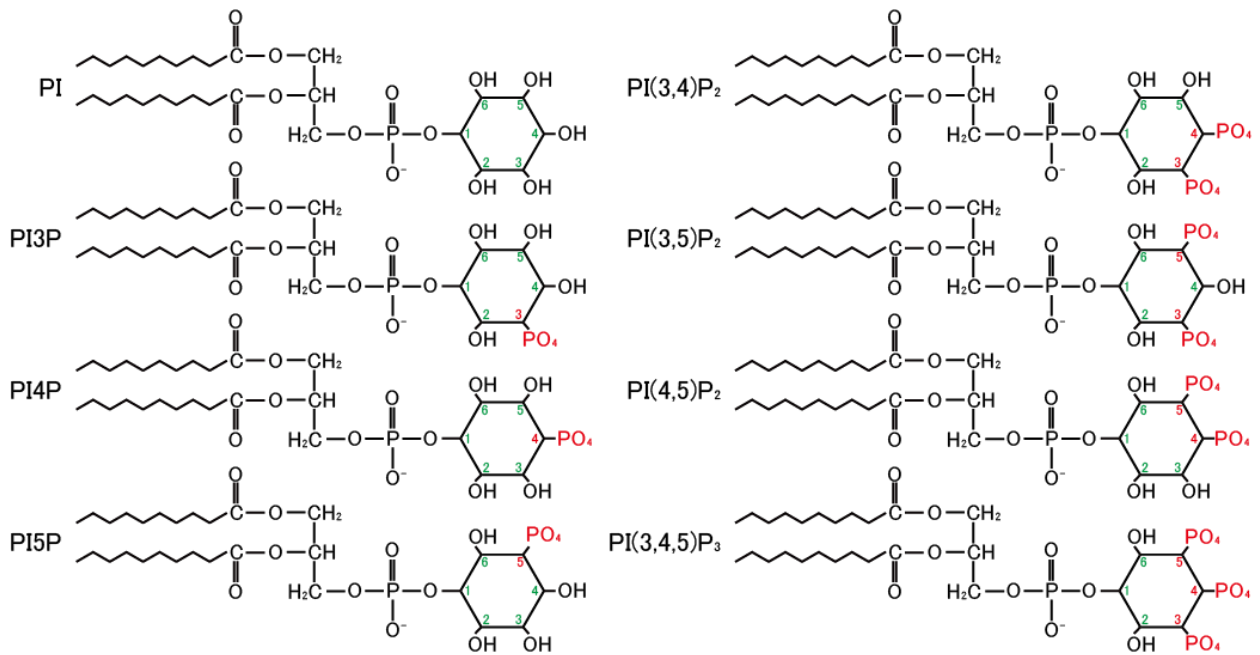


図 1-4 ホスホイノシタイドの種類

イノシトール環のリン酸化部位によって、PI、PI3P、PI4P、PI5P、PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃が存在し、それぞれ異なる機能・役割を持つ。

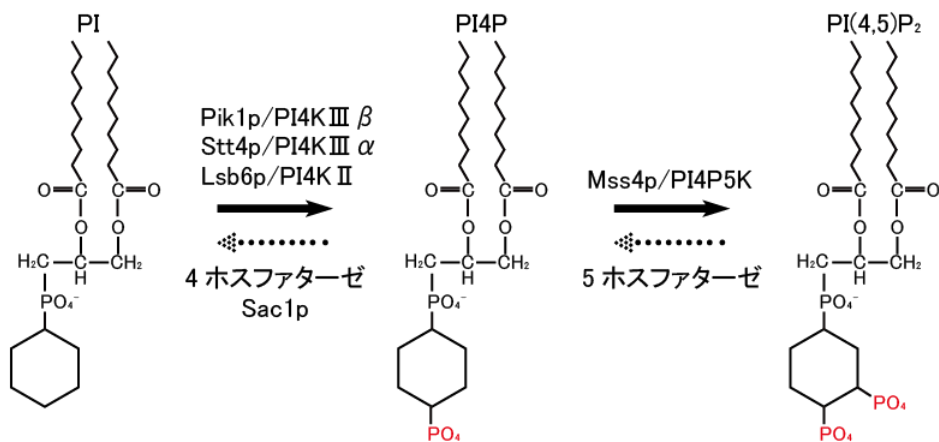


図 1-5 PI4P の生成と代謝

PI4P の生成には、Pik1p(哺乳類の PI4K III β)、Stt4p(PI4K III α)、Lsb6p(PI4K II α / β) の PI4K によるリン酸化が必要であり、Mss4p(PI4P5K)によってさらにリン酸化されて PI(4,5)P₂となる。

〈3〉 リン脂質解析

近年、リン脂質など膜脂質の重要な役割が明らかになってきた。しかしながら、脂質は水に溶けず、DNAに直接コードされず、不安定であることから、扱いが困難であり、有用な解析手法がないため、研究の発展は難渋した。しかし最近では、脂質の多様性やその局在の研究は「リポドミクス」と呼ばれ、複数の有用な脂質解析方法が見出され、注目されている。リン脂質二重層の細胞質側・管腔側において、非対称性があることは古くから知られていたが[24]、近年、脂質イメージングなどのリン脂質解析法の発展により、脂質の不均一分布が、生理的に重要な意義をもつ根拠が多数明らかになってきた。〈3〉リン脂質解析では、それらの解析法について、特徴やデメリットなどを含めまとめた。

3.1 リン脂質解析法[25]

生体膜脂質の網羅的解析のため、脂質を生体試料から抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS/MS)などを用いて分析・解析を行う手法が一般的に用いられる。一方で、脂質の局在や経時的变化を形態的に観察する方法としては、未だ有用な方法は限られているが、現在までに、膜脂質の分布を可視化する様々な方法が用いられてきた。

生細胞を検体として用いる方法では、ライブイメージングによって時間軸に沿った脂質動態を追跡できる。しかし脂質は分子サイズが小さく、GFPなどのイメージングのために用いられるたんぱく質により、分子の性質に大きな変化をもたらす可能性がある。一方、固定細胞を用いる方法では、同一細胞の時間軸に沿った解析は不可能であるが、電子顕微鏡・超解像度光学顕微鏡などの高い空間分解能を活用し、分子の分布と細胞の超微細形態の関連を詳細に解析できる。しかし固定法に関しては、たんぱく質固定に用いられるアルデヒド系の固定剤では、大部分の脂質に反応基がなく、固定することができない。また、固定剤は反応時間が遅く、側方拡散の速い脂質を自然状態で固定することは困難である。そこで、急速凍結によって物理的に脂質を固定する方法が用いられる。主な膜脂質分布解析法を表 1-2 に示した。本研究で用いた QF-FRL 法は、形態的な脂質解析に最も優れた方法と言え、リン脂質のオルガネラ特異的な分布や、その非対称性を形態的に観察することができる。

	方法	特徴・デメリット	
生細胞	脂質アナログ	nitrobenzoxadiazole (NBD) や boron-dipyrromethene(BODIPY)など蛍光団がついた脂質を細胞に取り込ませる。	脂質分布、フリップ・フロップ、輸送に影響が出る[26, 27]。たんぱく質相互作用に影響がある。
		アルキンやアジドなど官能基を導入した化合物を細胞に取り込ませ、クリック反応で蛍光団を結合させる[28]。	内在性の脂質動態とは異なる可能性がある。
	GFP 脂質プローブ	脂質に特異的に結合するたんぱく質ドメインとGFP融合たんぱく質を細胞に発現させる。	エフェクター分子と結合した脂質の検出が困難。GFP プローブによる人工産物生成の可能性がある。
	脂質結合プローブ	細胞表面の脂質に脂質結合プローブを作用させて標識する。	膜脂質にプローブが結合することによって、分布が変化する可能性がある。 管腔内にプローブが到達できず管腔側膜の脂質を標識できない。
固定細胞	脂質結合たんぱく質	タグをつけた脂質結合ドメインを発現した細胞を固定し、タグを標識する。凍結超薄切片や樹脂包埋超薄切片を作製し、金コロイド結合抗体で標識する。	たんぱく質は化学固定で保持されるため、分布変化の心配がない。GFP プローブと同様、人工産物生成の可能性がある。
	凍結超薄切片法	凍結試料を極低温で薄切し、脂質結合ドメインや抗体で標識する。	プローブ反応性が維持されやすい。膜の疎水性断面が水相に露出し、分子の再構成により、脂質局在変化の可能性がある。
	急速凍結・凍結置換・低温樹脂包埋切片	凍結試料を極低温で試料内水分を有機溶媒、次いで樹脂に置換し、超薄切片を作製し脂質プローブで標識し、電子顕微鏡によって観察する。	脂質分布の変化が抑えられ、脂質と細胞内構造の関係を容易に観察できるが、標識効率が低い。脂質二重層の細胞質側・管腔側の不均一分布を見分けられない。
	急速凍結・凍結切断レプリカ標識(QF-FRL)法	凍結試料を、真空中・極低温で脂質二重層の間で切断する。露出面に白金と炭素を真空蒸着し、レプリカを作製する。SDS 処理を行い、脂質プローブや金コロイド結合抗体で標識し、電子顕微鏡で観察する。	膜の広い範囲を二次元の平面として観察できる。プローブのアクセスに障害がなく、標識効率が高いが、細胞内の特定の部位を狙ってサンプルを得られない。膜の曲率が急激に変化する部位を捉えにくい。

表 1-2 膜脂質分布の可視化方法[25]

〈4〉オートファジー経路

生体膜脂質の働きが重要と考えられている経路に、オートファジー経路がある。オートファジーは自食作用とも呼ばれ、細胞内物質を基質として特徴的膜構造「オートファゴソーム」で囲い、リソソームや液胞に運び消化する経路である。最近ではオートファジーの生体における重要性が分かってきた。オートファジー機能不全は、癌やアルツハイマー病、パーキンソン病、クローン病などの様々な疾病に関連する[29-32]。オートファゴソームの主要構成要素はリン脂質であり、PI3Pがオートファジー経路において必須の要素として働くと考えられてきたが、近年、PI4Pも重要であることが明らかになった。しかしながら、その詳細な役割や分子機構は未解明である。そこで本研究では、QF-FRL法を用いてオートファゴソーム膜上のPI4P局在を解析することで、オートファジーにおけるPI4Pの働きの解明を目指した。〈4〉オートファジー経路では、オートファジーの概要および研究背景をまとめた。

4.1 生体内における物質消化の意義

全ての生物は、代謝物や不要物を消化し、再構築する過程を絶え間なく繰り返している。生体内の全てのたんぱく質には、数分~100日以上の半減期がある[33, 34]。つまり、生体を構成するたんぱく質は、外観に明らかな変化がなくとも、1~2か月ごとに、完全に入れ替わる[35]。このように、古い物質を新しい物質へとリサイクルする「細胞内リノベーション機構」によって生体のホメオスタシスが維持される。このリノベーション機構には新しい物質の生成が必要であると同時に、古い物質の消化が必要である[36]。物質の生成と消化のバランスが保たれることは、環境の変化に合わせた生体機能の維持に重要である。オートファジーは物質の消化経路の1つであり、様々な生体機能に影響を及ぼすと考えられる。

4.2 消化経路の種類

真核生物における物質の消化経路には、プロテアソーム系[37]、リソソーム系[38]の2種の経路が存在する[39]。プロテアソーム系は、ユビキチン化された物質が認識されて消化される、特異性の高い経路である[40]。リソソーム系は、基質がリソソームに運ばれ、リソソーム内消化酵素によって消化される。リソソームへの運搬は、エンドサイトーシスによるMVB (Multivesicular body) 経路[41]や、オートファジーによるものが知られている[42]。

細胞内物質の消化において、その経路を制御し、物質生成とのバランスを維持することは生体や細胞にとって重要である。例えばプロテアソーム系では、消化酵素はかご状の複合体を形成し分解活性を制限し、さらにユビキチン化による基質の選択によって調節する。リソソーム系では、加水分解酵素はリソソーム内に隔離され、細胞内で物理的に分離することで調節する。またオートファジー経路

では、リソソーム内でオートファゴソーム膜を特異的に消化する必要があり、何らかの方法で制御されていることが考えられる [35]。

4.3 オートファジー先行研究

オートファジー研究の先駆けは、Christian de Duve らが、細胞内たんぱく質のリソソームによる消化を見つけたことである [43]。また、新生マウスの腎尿細管の観察では、物質を内包する不規則な形の小胞が発見された [44, 45]。その後の電子顕微鏡を用いた研究により、この小胞構造が二重膜構造であり、細胞質や細胞小器官の一部を含むことが明らかとなった [46]。Christian de Duve らはこの消化経路を「オートファジー」、膜構造を「オートファゴソーム」と名付けた [38, 47]。さらに、オートファジー促進因子として、グルカゴン投与 [48]、各種アミノ酸飢餓条件 [49-51] などが発見された。対してオートファジー阻害物質として、PI3K 阻害剤である 3-メチルアデニン (3-MA) [52] や Wortmannin [53]、Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II 阻害剤である KN-62 [54] など、次々と明らかになった (表 1-3)。しかしながら、オートファゴソーム膜構造は不均一な形・内容物であり、その解釈に長く時間がかかった。さらに、当時はオートファジー特異マーカーがなく、活性を定量する方法が無かったため、研究は滞った。また、オートファゴソームは 10 分以下でリソソームと融合する非常に敏速な事象であり、観察においても困難を期した。

そこで、オートファジーのプロセス解明に一躍したのは、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究であった。出芽酵母は真核生物のモデルとして、様々な生体内現象の発見に役立ってきた。出芽酵母には、寿命が短く、ゲノム情報が整備され、分子生物学が駆使できる実験系の優位さに加え、哺乳類などの高等生物と機能的に保存性が高い分子をもつという利点がある [55]。出芽酵母では、オートファゴソームは液胞 (哺乳類におけるリソソーム) と融合し、液胞内消化酵素によって基質の消化が起こる。出芽酵母を用いた研究では、飢餓条件において、たんぱく質消化を必要とする孢子形成や減数分裂が促進された [56]。また、液胞内消化酵素を阻害した上で飢餓条件におくと、液胞周囲の小胞と液胞との融合が観察された [56]。これらの結果から、出芽酵母においても、飢餓条件でオートファジーが起こることが明らかとなった。さらに、オートファゴソーム融合後の構造が、約 500 nm の一重膜構造であり、様々なオルガネラを含むことが解明され、「オートファジックボディー (Autophagic Bodies : AB)」と名付けられた [57]。

また、電子顕微鏡での観察により、哺乳類細胞と出芽酵母細胞において、オートファジー経路は保存されており、真核生物のモデルとしての有用性が示された [57]。QF-FRL 法での観察では、オートファゴソーム膜において、膜内粒子 (IMPs: intramembrane particles) が外膜に限定的に存在するのに対し、内膜にはほとんどなく、両膜は分化し細胞質物質の隔離に特化することが明らかとなった

[58]。さらに、オートファゴソームによって液胞に運ばれると活性化する液胞ホスファターゼ前駆体 Pho8 Δ 60 がオートファジーの定量に用いられるようになった[59]。

その後、出芽酵母を用いて、オートファジー関連遺伝子のスクリーニング解析がさかんに行われ、関連遺伝子・たんぱく質が次々と明らかになった。これらたんぱく質の発見には、世界中の研究者が注力し、1990年代から Apg[60]、Aut[61]、Cvt[62, 63]変異体が発見され、現在広く知られている Atg たんぱく質に統一されたのは2003年であった[64]。現在では約20個の Atg たんぱく質が飢餓誘発非選択的オートファジーに重要であるとされている(表1-4)。これらの Atg たんぱく質と GFP を利用し、オートファジーの解明が進み、Atg たんぱく質が段階的にヒエラルキーを形成し、オートファゴソーム膜形成に寄与することが示された[65-67]。特に、出芽酵母において Atg8-GFP はドット柄を示し、他の Atg 遺伝子欠損株でも検出できた。そのためこの構造はオートファゴソームの前段階「Pre Autophagosomal Structure (PAS)」とされ[68]、PAS に段階的に Atg たんぱく質が集積することが明らかとなった[65-67]。

それまで出芽酵母を用いてさかんに行われてきたオートファジーマカニズムの解明であったが、哺乳類細胞においても研究が進んできた。哺乳類細胞においては、オートファゴソーム前段階の PAS は確認されなかったが、Atg たんぱく質のヒエラルキーは保存されていた[69]。また、出芽酵母と同様に、hAtg12 は hAtg5 と結合し[70]、Atg16L は二量体を形成して hAtg12-hAtg5 の結合を促進することが示された[71]。さらに、Atg8 の人ホモログである LC3-I は hAtg4 によって LC3-II となり、オートファゴソーム膜に局在することが明らかとなった。以降、オートファゴソームマーカーとして LC3-II が用いられており[72]、現在でも主流となっている。以上のようにオートファジー研究は進むも、その全貌は未だ不明である。前述したように、特に脂質に関する研究は滞っている。オートファゴソームの主要構成要素である脂質に関する研究は、オートファジー全貌解明に必須である。

	薬剤	作用機序	出展
誘発剤	Rapamycin	mTOR 阻害	[73]
	Torin1		[73]
	Everolimus		[74]
	Temsirolimus		[75]
	Perifosine	AKT 阻害	[76]
	Ezetimibe	AMPK 活性化、MAPK/ERK 阻害	[77]
	Carbamazepine	IP ₃ 阻害	[78]
	Xestospongine B	IP ₃ 受容体阻害	[79]
	Lithium chloride	Ins(イノシトール)、IMPase(イノシトールリン酸分解酵素)阻害	[80]
	Trehalose	グルコーストランスポーター阻害、AMPK 活性化	[81]
	Amiodarone	カルシウムチャンネル阻害	[82]
阻害剤	Chloroquine	リソソーム酸性化阻害によってリソソーム内酵素による分解阻害	[83]
	Bafilomycin A1		[84, 85]
	3-methyladenine	PI3K 阻害	[52]
	Wortmannin		[53]
	U0126	MAPK キナーゼ(MEK1、MEK2)阻害	[86]

表 1-3 マクロオートファジー誘発剤・阻害剤の代表例とその作用機序、出展

オートファジー関連たんぱく質	役割
Atg1 キナーゼとその制御	Atg1-Atg13 が Atg17-Atg31-Atg29 と複合体形成[87]
PI3 キナーゼ(Vps34)複合体	複合体 I : Vps34、Vps15、Vps30/Atg6、Atg14 →オートファジー 複合体 II : Vps34、Vps15、Vps30/Atg6、Vps38 →VPS (Vacuolar protein sorting) 経路 PI3P: オートファゴソーム形成に重要[88]
Atg18-Atg2 複合体	脂質輸送たんぱく質 Atg2 が Atg18 をアダプターとして PAS (Pre Autophagosomal Structure)に結合し、小胞体から PAS へ脂質を輸送する[89]
膜貫通たんぱく質 Atg9	PAS に局在し、輸送された脂質をスクランブルする[90]
Atg12 結合システム	Atg12 はユビキチン様たんぱく質であり、Atg7 (E1 酵素)によって活性化し、Atg10 (E2 酵素)に転送され、Atg5 と結合することで Atg12-Atg5-Atg16 複合体を形成[91]
Atg8 脂質化システム	飢餓によって制御される Atg4 が Atg8 の C 末端を切断し、Atg7 (E1 酵素)によって活性化され、Atg3 (E2 酵素)に転送され、ホスファチジルエタノールアミン (PE) と結合した Atg8-PE がオートファゴソーム膜に結合する [92]

表 1-4 出芽酵母における、主なオートファジー関連たんぱく質の役割(抜粋)

4.4 3種類のオートファジー経路

オートファジーには、主要な3つの経路【マクロオートファジー、ミクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジー】がある[38, 93] (図 1-6)。その他、特定の基質の分解を司る、クリノファジー、リポファジー、マイトファジーなど様々な経路がある[36]が、基質をリソソーム/液胞に運び消化することは、すべての経路に共通する。本研究では特に、マクロオートファジー、ミクロオートファジーの2つの経路に焦点をあて、PI4Pの局在解析によって、その機能を明らかにし、オートファジー経路の機序解明を目指した。

マクロオートファジーは、3種のオートファジー経路の内、最も古くから研究されてきた。そのため、一般的に“オートファジー”という用語はマクロオートファジーを指すことが多い。近年では、加齢[94]や癌[95]、パーキンソン病[31]、アルツハイマー病[30]などの疾患との関連が示唆されている。現在まで、様々なオートファジー阻害剤・誘発剤 (表 1-3) を用いた実験によって、マクロオートファジー機序が徐々に明らかとなってきた。さらに、癌治療などの際にオートファジー阻害剤・誘発剤を用いる方法なども示されている[95, 96]。マクロオートファジーでは、まず細胞内で隔離膜 (ファゴソーム) という構造が出現し、伸長・封鎖することで二重膜構造のオートファゴソームが完成する。これによって、基質となる細胞内物質がオートファゴソームに取り込まれ、細胞質から隔離される (図 1-6)。オートファゴソームは、リソソームまたは液胞と融合しオートファジックボディーとなり、リソソーム/液胞内で消化される。この経路において、オートファゴソーム膜の起源や、その詳細な形成機序は未だ不明である。

さらに最近では、膜脂質の内のPIsがマクロオートファジーに関連することが明らかになってきた[97, 98]。PIs自体は細胞増殖・細胞内物質輸送・細胞骨格制御などに重要とされており、様々な疾患との関連がある[97]。中でも、PI3Pはマクロオートファジーに必須である[88, 99-101]。これに加え、PI4Pの関与が分かってきた[102-105]が、詳細な機序は不明である。

ミクロオートファジーは、リソソーム/液胞膜が陥入し、細胞質や脂肪滴 (LD: Lipid Droplet)などを直接取り込み消化する経路である[38]。哺乳類、出芽酵母、植物において、ミクロオートファジー様の消化が確認されてきた[106-108]。本研究では出芽酵母を用いて、特に脂肪滴の消化【ミクロリポファジー】に着目した。ミクロリポファジーによる脂肪滴分解は、高脂血症、脂肪肝などの脂質代謝異常による疾患に対する重要な役割が期待される。ミクロリポファジーでは、MVB経路において働くESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) 分子群が液胞膜陥入に必要であることが確かめられた[109]。しかしながら、その他の分子機構については、様々な議論がなされており、現在でも詳細は未だ不明である。

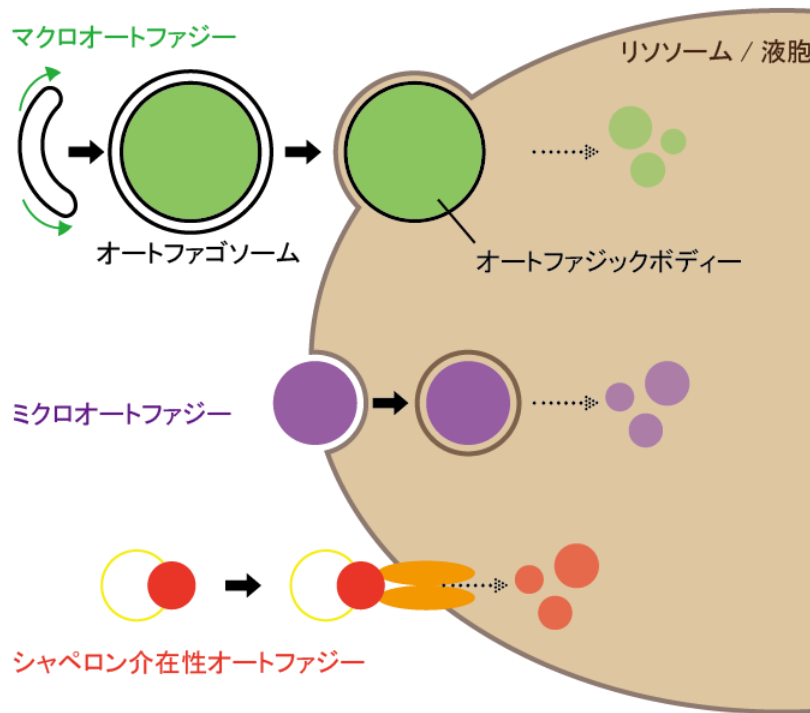


図 1-6 3つのオートファジー経路

マクロオートファジー、マイクロオートファジー、シャペロン介在性オートファジーの3種類が主なオートファジー経路である。マクロオートファジーでは、脂質二重層がさらに二重になったオートファゴソームという特徴的な構造が形成される。マイクロオートファジーではリソソーム/液胞膜自体が陥入することで細胞質成分を取り込む。シャペロン介在性オートファジーでは、LAMP2A というたんぱく質を介して、基質が取り込まれる。3つの経路は共通して、リソソーム/液胞に基質を運び、消化する役割を持つ。

第二章：研究結果

本研究では、リン脂質の1つであるホスファチジルイノシトール4リン酸（PI4P）が生体膜においてどのような役割を持ち、関連分子とどのように作用しているのか、また、どのように制御されているのか、という、詳細な分子機構について、急速凍結・凍結切断レプリカ標識（QF-FRL）法を用いた超微細局在解析によって検討した。本章<1><2>ではマクロオートファジーにおいて、<3>ではマイクロリポファジーにおいて、<4>では細胞膜において、PI4Pの役割を解析した。以下では、それぞれ、背景・方法・結果・考察・結論について記述した。

<1> 哺乳類マクロオートファジーにおけるオートファゴソーム膜上の PI4P 局在

1.1 背景

3 種類の主なオートファジー経路の内、マクロオートファジーは最も古くから研究されており、一般的に“オートファジー”というと、マクロオートファジーを指す。マクロオートファジーは、細胞成分を二重膜構造「オートファゴソーム」内に隔離し、リソソームに輸送し、分解する経路である。この経路では、細胞内で隔離膜（ファゴフォア）という構造が出現し、伸長・封鎖することでオートファゴソームが完成し、細胞内物質が隔離される。哺乳類では、オートファゴソームはリソソームと融合し、オートリソソームとして成熟し、リソソーム内の消化酵素によって細胞内物質は消化される（図 2.1-1）。この経路において、オートファゴソーム膜の起源や、オートファゴソーム形成機序の全貌は未だ不明である。

最近では、マクロオートファジーにおけるホスホイノシタイド (PIs) の重要性が明らかとなってきた [97, 98]。中でも、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) はマクロオートファジーに必須である [88, 99-101]。加えて、ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) もマクロオートファジーに関連することが分かってきた [102-105]。しかしその詳細は明らかでない。PI4P 自体が、細胞内の様々な生理機能を制御する因子であることから、マクロオートファジーにおいても重要な役割をもつことが期待できる。

そこで本研究では、マクロオートファジーにおける PI4P の詳細な働きや役割を解明することを目的とし、急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法による他オートファジー関連たんぱく質である LC3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3)、GABARAP (GABA type A receptor-associated protein)、GABARAPL1 (GABARAP-like1)、GABARAPL2 (GABARAP-like2)、Rab7 (Ras-related protein in brain 7) との二重標識を行い、PI4P の時空間的局在を検討した。

LC3/GABARAP ファミリー (LC3A/B/C、GABARAP、GABARAPL1/2/3) は、出芽酵母 Atg8 のホモログである。出芽酵母を用いたマクロオートファジー研究の発展によって、マクロオートファジー初期に重要なユビキチン様たんぱく質として、Atg8 が発見された [92]。Atg8 の C 末端アルギニン残基がシステインプロテアーゼである Atg4 によって分解された後、E1 様酵素 (Atg7)、E2 様酵素 (Atg3) が作用し、C 末端にホスファチジルエタノールアミン (PE) が結合することで (Atg8-PE)、マクロオートファジーに働く。最近では、Atg8-PE が脂質膜と相互作用し、その形態を変える性質を持ち、オートファゴソームの効率的な形成を可能にすることが示された [110]。LC3/GABARAP ファミリーも出芽酵母 Atg8 と同様の機序でオートファゴソームに局在する。出芽酵母では Atg8 がオートファゴソーム形成に必須であるが、哺乳類細胞においては、LC3/GABARAP ファミリーは隔離膜が閉鎖するオートファゴソーム完成時に重要であるとされている [111]。

哺乳類において LC3 は、オートファゴソームへの特異的な局在が初めて明らかになったたんぱく質である [112]。マクロオートファジーが開始すると、LC3 は Atg8 と同様の経路を経て働く。LC3 はプロペプチドと

して細胞質で合成され、Atg4によりC末端を切断されてLC3-Iとなる。さらに、Atg7、Atg3が作用し、C末端にPEが付加され、LC3-IIとなる(図2.1-1)。LC3-IIがオートファゴソーム膜に結合しマクロオートファジーに働く。LC3遺伝子には3つのパラログ(LC3A、LC3B、LC3C)が存在し、特に、LC3Bがマクロオートファジーの鍵となるマーカーとして一般的に用いられる[113]。

GABARAPファミリーは、LC3と同様に、オートファゴソームの膜伸長などオートファゴソームの形成後期に働くとされている(図2.1-1)[114, 115]。LC3/GABARAPファミリーは遺伝的に高い相同性を持つ。いずれも117~145のアミノ酸からなり、結晶構造においても相同性が高い[116]。また、オートファゴソームへの局在にもLC3と同様に、C末端へのPEの付加が必要である[117]。GABARAP遺伝子欠損株では、GABARAPL1やGABARAPL2の発現は変化せず、LC3B遺伝子欠損株でも、その他LC3/GABARAPファミリーの発現変化はみられなかった[118]。そのため、これら分子はそれぞれ冗長関係にあることが推察されている。

Rab7は、出芽酵母Ypt7(Yeast Protein two 7)のホモログであり、真核生物における膜輸送調整因子であるRabファミリー小GTPアーゼの1つである。Rabファミリーは、GDP結合不活化状態と、GTP結合活性化状態を切り替えることでエフェクター分子を調節する[119]。Rab7、出芽酵母Ypt7は後期エンドソームやリソソームに分布し、エンドサイトーシスにおいてエンドソームとリソソームの融合、および、リソソームの成熟に働く。マクロオートファジーにおいても、出芽酵母Ypt7はオートファゴソームと液胞との融合段階に、哺乳類Rab7はオートファゴソームとリソソームとの融合時[120, 121]、および、融合後のオートリソソーム成熟[122]に働くことが示されている(図2.1-1)。

本研究では、上記のたんぱく質とPI4Pとの二重標識を行うことで、共局在の有無を検討し、PI4Pがどのようにマクロオートファジーに働くか、その詳細を解明することを目的とした。

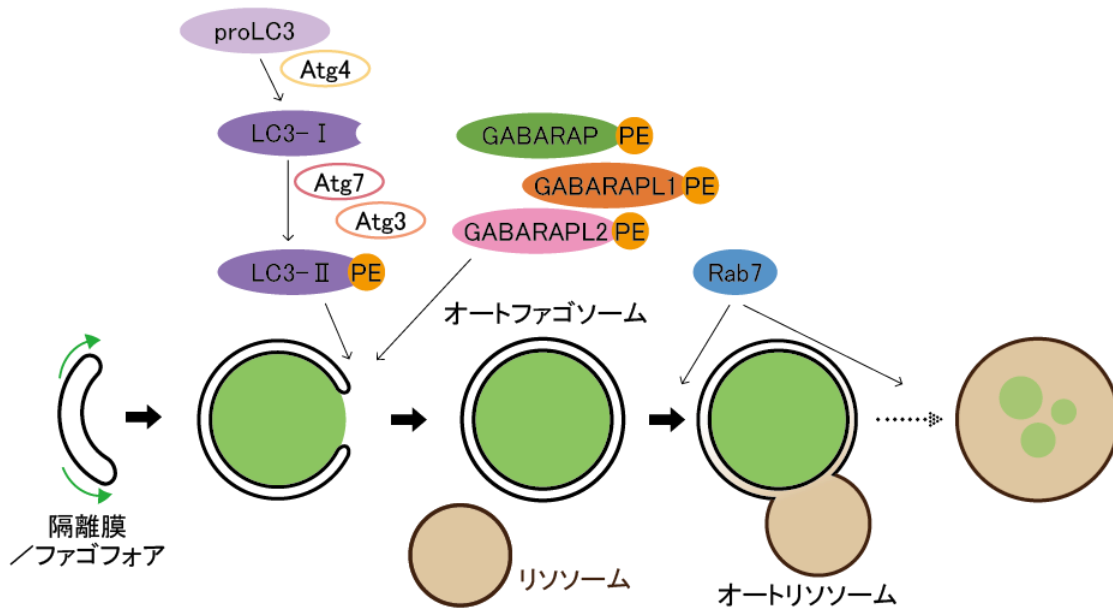


図 2.1-1 哺乳類におけるマクロオートファジーとその関連たんぱく質

隔離膜/ファゴフォアが形成され、伸張することでオートファゴソームが完成する。その後、リソソームと融合することでオートリソソームとなり成熟し、その消化酵素によって基質は消化される。LC3/GABARAP ファミリーは隔離膜の閉鎖などオートファゴソームの形成にはたらく。LC3/GABARAP ファミリーはプロペプチドとして生成し、Atg4 が C 末端を切断し、Atg7 (E1 様酵素)、Atg3 (E2 様酵素) が PE を結合させることで隔離膜に局在する。Rab7 はオートファゴソームとリソソームとの融合、オートリソソームの成熟にはたらく。

1.2 材料及び方法

1.2.1 抗体

マウス抗 PI4P モノクローナル IgM 抗体を、Echelon Biosciences (Salt lake city, UT, USA) から購入した。ウサギ抗 LC3B モノクローナル抗体 (D11)、ウサギ抗 GABARAP モノクローナル抗体 (E1J4E)、ウサギ抗 GABARAPL1 モノクローナル抗体 (D5R9Y)、ウサギ抗 GABARAPL2 モノクローナル抗体 (D1W9T)、ウサギ抗 Rab7 モノクローナル抗体 (D95F2) を Cell Signaling Technology から購入した。また、10 nm 金コロイド結合ヤギ抗マウス IgM+IgG 抗体 (EM. GAF10)、10 nm 金コロイド結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (EM. GFAR 10) を、BBI Solutions から購入した。6 nm 金コロイド結合ヤギ抗マウス IgM+IgG 抗体を Jackson Immuno Research Lab から購入した。Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を Thermo Fisher Scientific から購入した。

1.2.2 プロープ

ホスホリパーゼ C (PLC) - δ 1 PH (pleckstrin homology) ドメインを含むグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合たんぱく質 (GST-PH) を *Escherichia coli* に発現させ、グルタチオンアガロース樹脂 (Sigma) によって精製した。PH ドメインは、GST-PLC δ 1 PH 融合たんぱく質を GST 融合たんぱく質切断用プロテアーゼで切断することにより得た (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) (図 2.1-2)。

1.2.3 細胞培養

Huh7 細胞 (高分化型ヒト肝癌由来細胞株) は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクから取得し、10% FBS、50 U/ml ペニシリン、0.05 mg/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中で、5% CO₂、37°C で維持した。マクロオートファジー誘発のため、Huh7 細胞を 0.25 μ M Torin1、0.4 μ M bafilomycin A1 で 1 時間処理した。

1.2.4 急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法 (図 2.1-3) [123]

a. 凍結法

高圧凍結法を用いて Huh7 細胞を凍結した。アルミニウムディスク (直径 3 mm、厚さ 0.5 mm、Engineering Office M. Wholwend GmbH) に浅いくぼみ (深さ 50 μ m) を形成し、10%ゼラチンを充填し、その上に Huh7 細胞を入れた金箔ディスクを、細胞培養面を下向きに載せた。この試料を高圧凍結機 HPM010 (Leica, Vienna, Austria) を用いて、約 2000 気圧下で凍結した。

b. 凍結割断

凍結サンプルを Balzers BAF400 装置 (Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein) の冷却ステージに移動させ、 -130°C 、 1×10^{-6} millibars 真空下で、割断ナイフによって金箔を持ち上げ、脂質二重層の間で割断した。割断により露出した脂質二重層の疎水面に、炭素 (C) を厚さ約 5 nm 以下になるように 90° の方向からの電子線を用いて真空蒸着し、白金・炭素 (Pt/C) を 1-2 nm になるように 45° の方向からの電子線で真空蒸着した。さらに、炭素 (C) を 20 nm になるように 90° の方向から真空蒸着した。レプリカの厚さは結晶厚モニタによって制御した (EM QSG100; Leica)。解凍した試料を、2.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) / 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.0) 中で、 $60 \sim 70^{\circ}\text{C}$ で一晩処置した。

1.2.5 抗体標識・電子顕微鏡観察 [124-126]

レプリカを 1% Triton X-100/リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) で洗浄し、3% 牛血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA) / PBS で、30 分間室温でブロックした。PI4P 標識では、PI4P に特異的に結合するドメインである PH ドメインを持つ抗 PI4P 抗体を用いた。PI(4,5) P_2 が持つホスホリパーゼ C (PLC) δ の PH ドメインにも結合することを防ぐため [127]、0.1% BSA/PBS で 1 度洗浄し、PLC- δ 1 PH ドメイン (1 mg/ml) で処置した (図 2.1-2) [126]。次に、一次抗体としてマウス抗 PI4P モノクローナル抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 1% BSA/PBS で希釈した。0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄したレプリカを、希釈した一次抗体と 4°C で一晩インキュベートした。インキュベート後、0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄し、10/6 nm 結合抗マウス IgG+IgM 抗体 (1% BSA/PBS 中で 1/40 希釈) と 37°C で 30 分インキュベートした。PI(4,5) P_2 標識では、一次抗体として GST-PH 融合たんぱく質 (100 ng/ml) と 4°C で一晩、二次抗体としてウサギ抗 GST 抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と 37°C で 30 分反応させた。その後、0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄し、10 nm 金コロイド結合抗ウサギ IgG 抗体 (1% BSA/PBS 中で 1/40 希釈) と 37°C で 30 分インキュベートした。PI4P と LC3、GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL、Rab7 との二重標識のために、各抗体と金コロイド結合プローブを用いた。一次抗体と 4°C で一晩インキュベートし、0.1% BSA/PBS で 4 度の洗浄後、6 nm 金コロイド結合抗マウス/ヤギ IgG+IgM 抗体と、10 nm 金コロイド結合抗ウサギ/ヤギ IgG 抗体をそれぞれ 1% BSA/PBS 中で 1/40、1/50 に調整した反応液を作製し、レプリカと 37°C で 30 分インキュベートした。抗体標識後、レプリカを 0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄し、さらに蒸留水で 3 度洗浄し、最後にレプリカをホルムバル膜の EM グリッドに取り上げた。透過型電子顕微鏡 (H7000KU) を 75 kV で作動させ観察した。

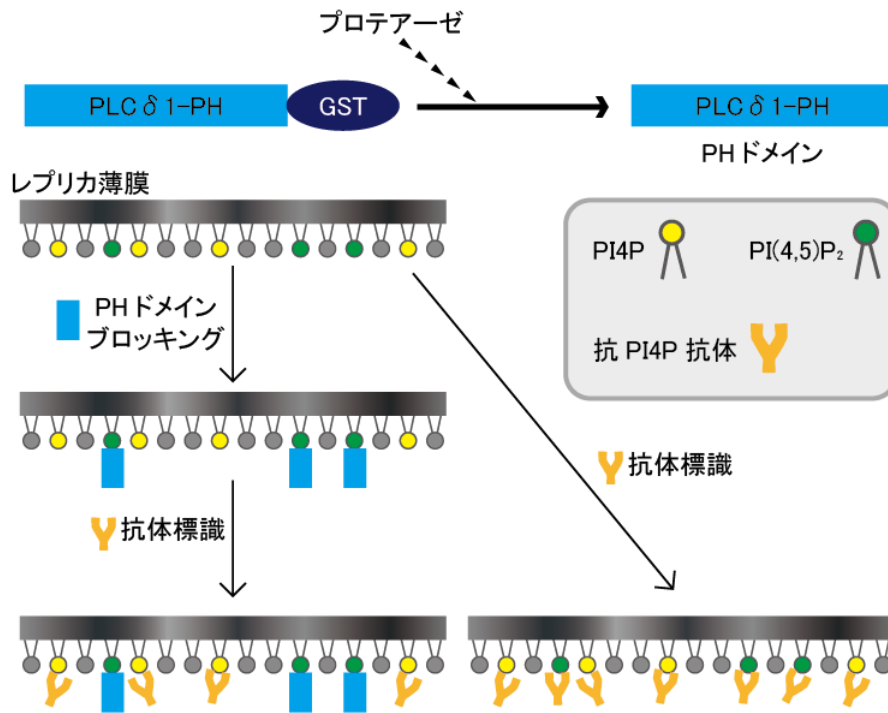
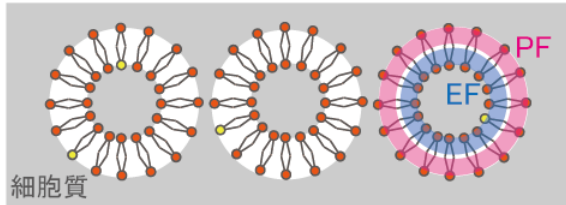


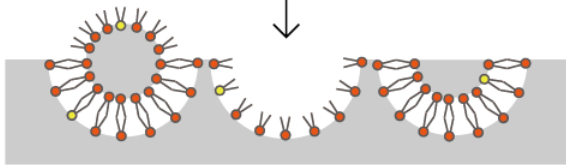
図 2.1-2 PI4P 特異的標識のための PHドメインを用いたブロッキング

PH (Pleckstrin-homology)ドメインは、約 120 アミノ酸残基からなるモジュールで、ある塩基性のアミノ酸残基は、PI 頭部のリン酸基と結合部位を形成する。PLC- δ 1 PH ドメインによって、主要基質である PI(4,5)P₂の特異的検出が可能となる。本研究においては、GST 融合 PLC- δ 1PHドメインをプロテアーゼで処理し GST を除去したものを用いた。PHドメインを用いてブロッキングすることで、抗 PI4P 抗体の PI(4,5)P₂への結合を阻害し、PI4P 特異的標識を可能とした。

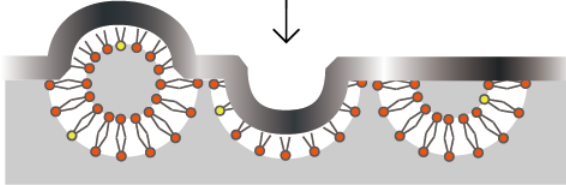
凍結細胞



(1) 凍結切断



(2) Pt/C 真空蒸着



(3) SDS 処置



(4) 抗体標識

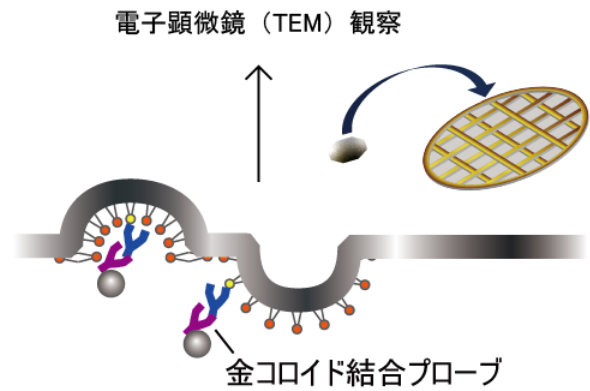


図 2.1-3 急速凍結・凍結切断レプリカ標識(QF-FRL)法の概要

(1)凍結細胞を凍結切断し、脂質二重層の中で生体膜を切断した。(2)白金と炭素を真空蒸着し、(3)SDS 処置によって膜以外の成分を取り除くことで、レプリカを形成した。(4)抗体標識をし、ホルムバル膜を張ったグリッドにレプリカを載せ、電子顕微鏡(TEM)で観察した。

1.2.6 オートファゴソームの観察

QF-FRL 法を用いて作製したレプリカのオートファゴソームを、透過型電子顕微鏡によって観察した。観察時には、その特異的な形態によりオートファゴソームを判別した。オートファゴソームは二重膜構造を持っており、それぞれの膜に膜内粒子 (IMPs) が少ないという特徴を持つ[128]。さらに、QF-FRL 法を用いてオートファゴソームを切断すると、2通りの割れ方がある。二重膜の内膜・外膜や、細胞質側 (PF: Protoplasmic Face)、管腔側 (EF: Exoplasmic Face) については、その構造の凹凸によって区別した (図 2.1-4)。

1.2.7 統計解析

3回以上実験を繰り返し、電子顕微鏡写真を取得し、解析に用いた。ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health (NIH)) を用いて膜構造面積を測定し、金コロイドの数を数えた。膜構造における標識密度を、金コロイドの数と測定面積から計算した。測定面積箇所については、取得した電子顕微鏡写真からそれぞれの構造につき、10 以上の箇所を無作為に抽出した。正規性と等分散を確認し、Student-t 検定で有意差を求めた ($p < 0.05$)。

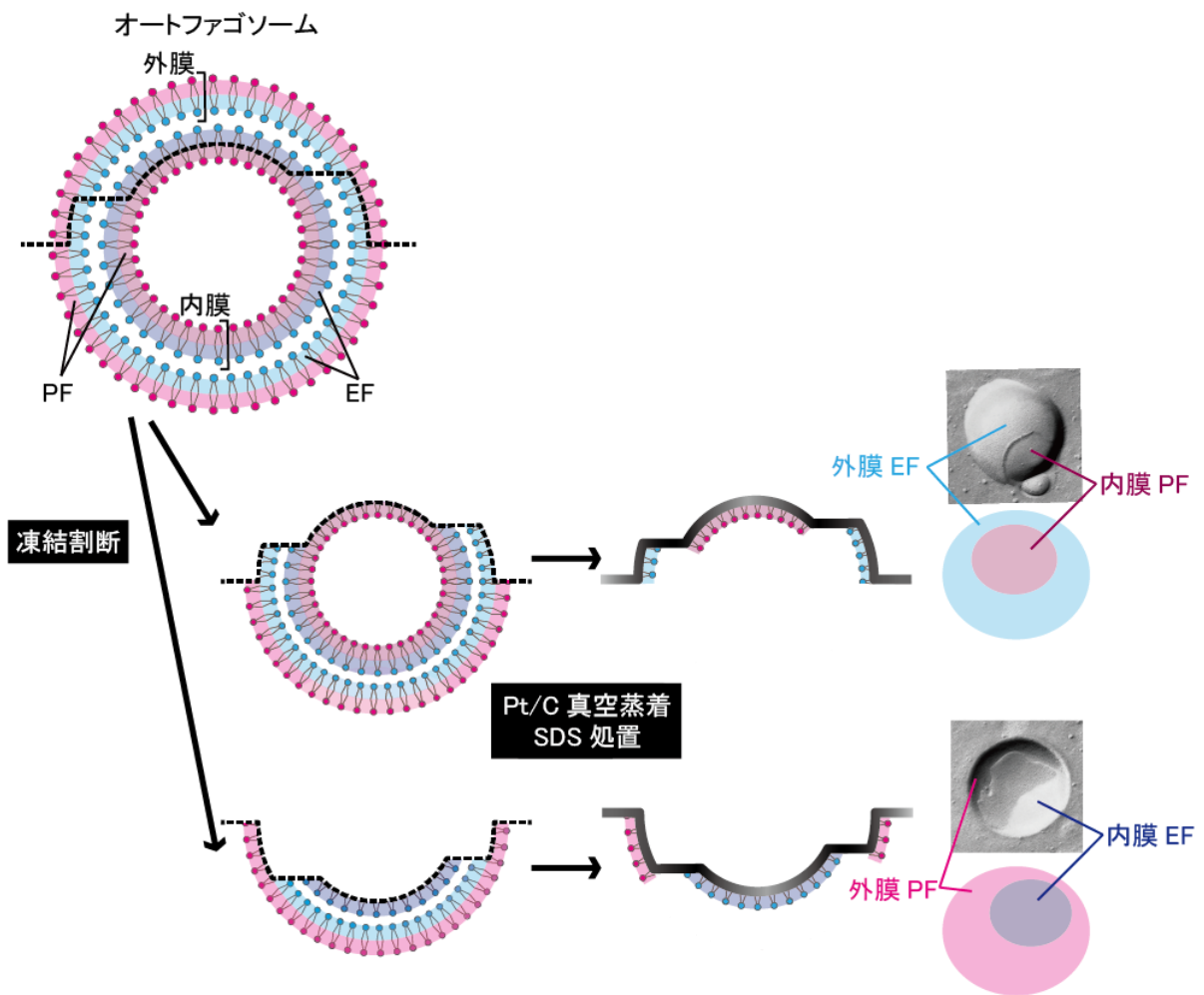


図 2.1-4 オートファゴソームの観察法

オートファゴソームは脂質二重層がさらに二重になった構造を持ち、QF-FRL 法では 2 通りの割断パターンがある。実際の電子顕微鏡写真では、凹凸によって、細胞質側 (PF: Protoplasmic Face)、管腔側 (EF: Exoplasmic Face) を判別した。

1.3 結果

1.3.1 PI4P はオートファゴソーム膜の PF に局在した

哺乳類細胞では飢餓状態において、ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1)の活性化によってマクロオートファジーが始動する。通常状態では、ULK1 は mTORC1 (Mammalian/mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Complex1) によって不活化され、マクロオートファジーは制御されている。Huh7 細胞のオートファゴソームにおける PI4P の局在を確認するため、mTORC1 阻害薬 Torin1 を用いることでマクロオートファジーを誘発した。さらに、Bafilomycin A1 を用いてオートファゴソームとリソソームとの融合を防ぐことにより、細胞質内オートファゴソームを蓄積させた。

我々は以前の研究において、QF-FRL 法を用いて抗 PI4P 抗体による特異的な PI4P 標識が可能であることを示した[126, 129, 130]。本研究では、オートファゴソーム膜において PI4P が細胞質側の PF、管腔側の EF (図 2.1-4) どちらに局在するか明らかにするため、抗 PI4P 抗体で標識し、その局在を検討した。その結果、オートファゴソームの内膜・外膜において、PI4P は EF ではなく、PF に局在した (図 2.1-5A)。また、内膜・外膜 PF における PI4P の標識密度は、両膜 EF に比べ有意に高いことが分かった (図 2.1-5B)。さらに、マクロオートファジーを誘発した Huh7 細胞のオートファゴソームには、PI4P 局在・非局在の構造が両方観察された (図 2.1-5C)。

さらに、マクロオートファジー誘発 Huh7 細胞において PI(4,5)P₂ を標識したところ、オートファゴソームには PI(4,5)P₂ 標識が観察されなかった (資料未記載)。PI(4,5)P₂ は、PI4P がリン酸化酵素 PI4P-5 キナーゼ (出芽酵母における Mss4p) によってさらにリン酸化され生成する。この結果は、出芽酵母で Mss4p がマクロオートファジーに関与しないという報告と一致し、哺乳類細胞においても PI(4,5)P₂ が関与しないことを示した[131]。

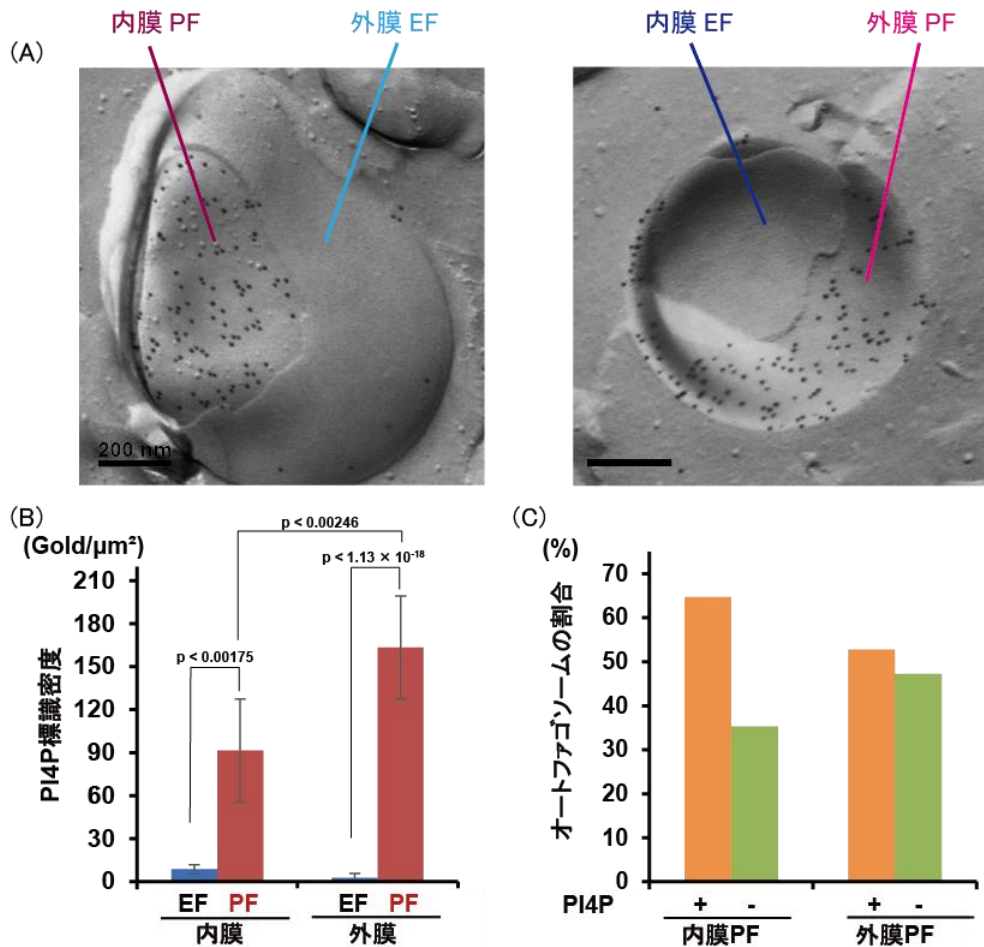


図 2.1-5 オートファゴソーム膜における PI4P 局在

Huh7 細胞を 0.25 μM Torin1、0.4 μM bafilomycin A1 で 1 時間処理し、マクロオートファジーを誘発した。膜内粒子が少なく、二重膜構造である形態からオートファゴソームを判別した。(A)PI4P を標識したレプリカを電子顕微鏡で観察し、観察されたオートファゴソームと PI4P 標識を示した。スケールバー:200 nm。(B)オートファゴソーム膜における PI4P 金コロイド標識密度。オートファゴソームの外膜 EF、PF、内膜 EF、PF の内、両膜において PI4P は PF に有意に多く局在した。さらに、内膜 PF と外膜 PF を比較すると、外膜 PF の PI4P 標識密度は有意に高かった。(p<0.05)(C)オートファゴソーム全体量に対する、PI4P 局在・非局在のオートファゴソームの割合。オートファゴソーム様形態を持つ構造の内、33%~45%の構造は PI4P 非局在の構造であった。

1.3.2 オートファゴソーム特異的マーカーである LC3B の局在

LC3B は、哺乳類オートファゴソームにおける特異的マーカーとされている。マクロオートファジー誘発 Huh7 細胞を用いて QF-FRL 法によってレプリカを作製し、抗 LC3B 抗体で LC3B を標識することで、その局在を観察した。その結果、LC3B は内膜・外膜 PF に高密度に局在した (図 2.1-6A、B)。この結果は、GFP-LC3 を用いた研究報告と一貫している [126]。

しかしながら予想に反し、LC3B が局在するオートファゴソームの数は、観察した全二重膜構造の内、半数以下であった (図 2.1-6C)。LC3B 非局在構造においても、オートファゴソームの特徴的形態は、LC3B 局在構造と同様であった。LC3B の出芽酵母ホモログである Atg8 は、オートファゴソーム形成初期に働く (図 2.1-1) [132]。オートファゴソームが封鎖された後、Atg8 は内膜・外膜から離れ、リサイクルされる。ところが、内膜の Atg8 はオートファゴソーム膜にトラップされてしまう。そのため、蛍光抗体を用いた観察では、酵素によりオートファゴソームが消化されるまで、オートファゴソームにトラップされた Atg8 を検知することができる。LC3 も Atg8 と同様の機序で働くと考えられるため (図 2.1-11)、Atg8/LC3 はオートファゴソーム特異的マーカーとされ、マクロオートファジーの追跡に利用されている。しかし、我々の方法で膜局在 LC3B を検出した場合、マクロオートファジー後期段階においては、LC3B は既にオートファゴソーム膜から離れ、LC3B 非局在の膜として検出される。そのため、今回の結果における LC3B 局在オートファゴソームは、マクロオートファジー初期段階の構造を示したことが分かる。

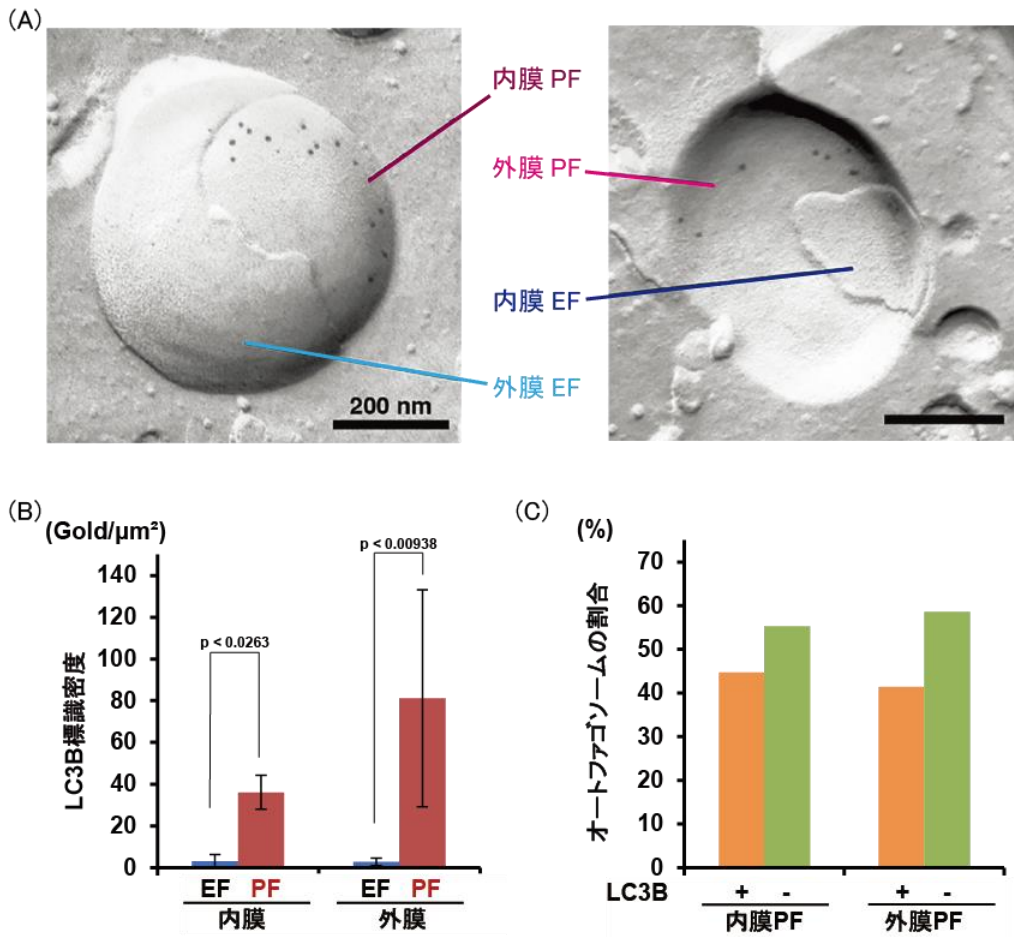


図 2.1-6 オートファゴソーム膜における LC3B 局在

Torin1 によってマクロオートファジーを誘発した Huh7 細胞の LC3B 標識のため、抗 LC3B 抗体を用いた。(A) LC3B 標識はオートファゴソームの内膜 PF(左)、外膜 PF(右)に局在し、EF にはほとんど局在しなかった。スケールバー:200 nm。(B)LC3B の標識密度をグラフで示した。LC3B はオートファゴソーム膜 PF に高密度に局在した。(p<0.05) (C)オートファゴソーム内膜 PF、外膜 PF において、LC3B 局在、非局在オートファゴソームの割合をグラフで示した。LC3B はオートファゴソーム構造の半数以上に局在しなかった。

1.3.3 オートファゴソームにおける PI4P と LC3B との共局在

マクロオートファジーにおける PI4P の役割を追究するため、それぞれオートファゴソーム膜 PF への局在を確認した PI4P と LC3B について、QF-FRL 法を用いて二重標識を行い、共局在の有無を検討した。その結果、PI4P は、LC3B が局在した内膜・外膜両膜には局在しないことが明らかとなった (図 2.1-7)。したがって、PI4P は LC3B が働く隔離膜閉鎖などのマクロオートファジー初期段階よりも後の段階で働くことが示唆された。

1.3.4 オートファゴソームにおける PI4P と GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2 との共局在

LC3B のサブファミリーである GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2 についても、PI4P との二重標識を行い、共局在の有無を確認した。これらたんぱく質は、哺乳類において、LC3 と同様に、オートファゴソームの膜伸長などオートファゴソームの形成後期に働くと考えられている (図 2.1-1) [114, 115]。LC3B や PI4P と同様に、GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2 はオートファゴソーム内膜・外膜 PF に、高密度に局在した (図 2.1-8E、図 2.1-9E、G) が、これらたんぱく質と PI4P の共局在は認められなかった (図 2.1-8、図 2.1-9)。

1.3.5 オートファゴソームにおける PI4P と Rab7 との共局在

Rab7 はマクロオートファジーにおいて、オートファゴソームとリソソームとの融合に働くことが示されている (図 2.1-1) [122]。そこで我々は、QF-FRL 法を用いて、マクロオートファジー誘発 Huh7 細胞のオートファゴソーム膜における Rab7 の局在を解析した。Rab7 はその他のオートファジー関連たんぱく質と同様に、オートファゴソームの内膜・外膜 PF に局在することが明らかとなった (図 2.1-10C)。また、PI4P と Rab7 との二重標識によってその共局在の有無を検討すると、内膜・外膜 PF において共局在が確認された。特に、外膜 PF における共局在の割合が高かった。これらの結果から、PI4P は Rab7 と同段階であるオートファゴソームとリソソームとの融合に働くことが示唆された。

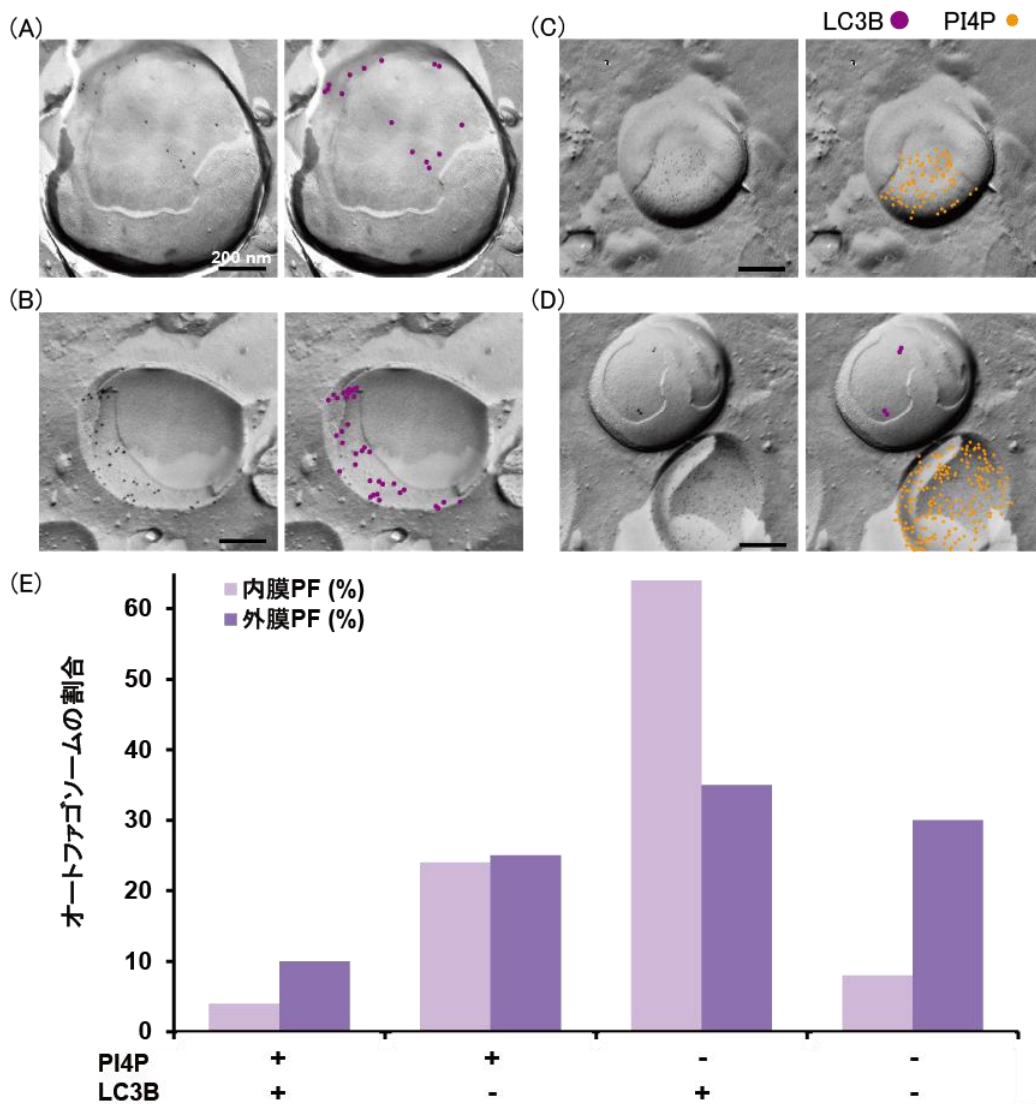


図 2.1-7 オートファゴソーム膜における PI4P と LC3B との二重標識

Torin1 によってマクロオートファジーを誘発した Huh7 細胞を用いて、PI4P と LC3B を二重標識した。LC3B 標識のために 10 nm 金コロイド結合抗体(紫)、PI4P 標識のために 6 nm 金コロイド結合抗体(黄)を用いた。しかし両標識はオートファゴソーム上で共局在せず、LC3B 局在オートファゴソーム(A、B)、PI4P 局在オートファゴソーム(C、D)はそれぞれ存在した。スケールバー:200 nm。(E)オートファゴソーム内膜 PF(薄紫)、外膜 PF(濃紫)における PI4P、LC3B 局在、非局在オートファゴソームの割合をグラフで示した。PI4P と LC3B の共局在の割合は内膜・外膜共に低値であった。

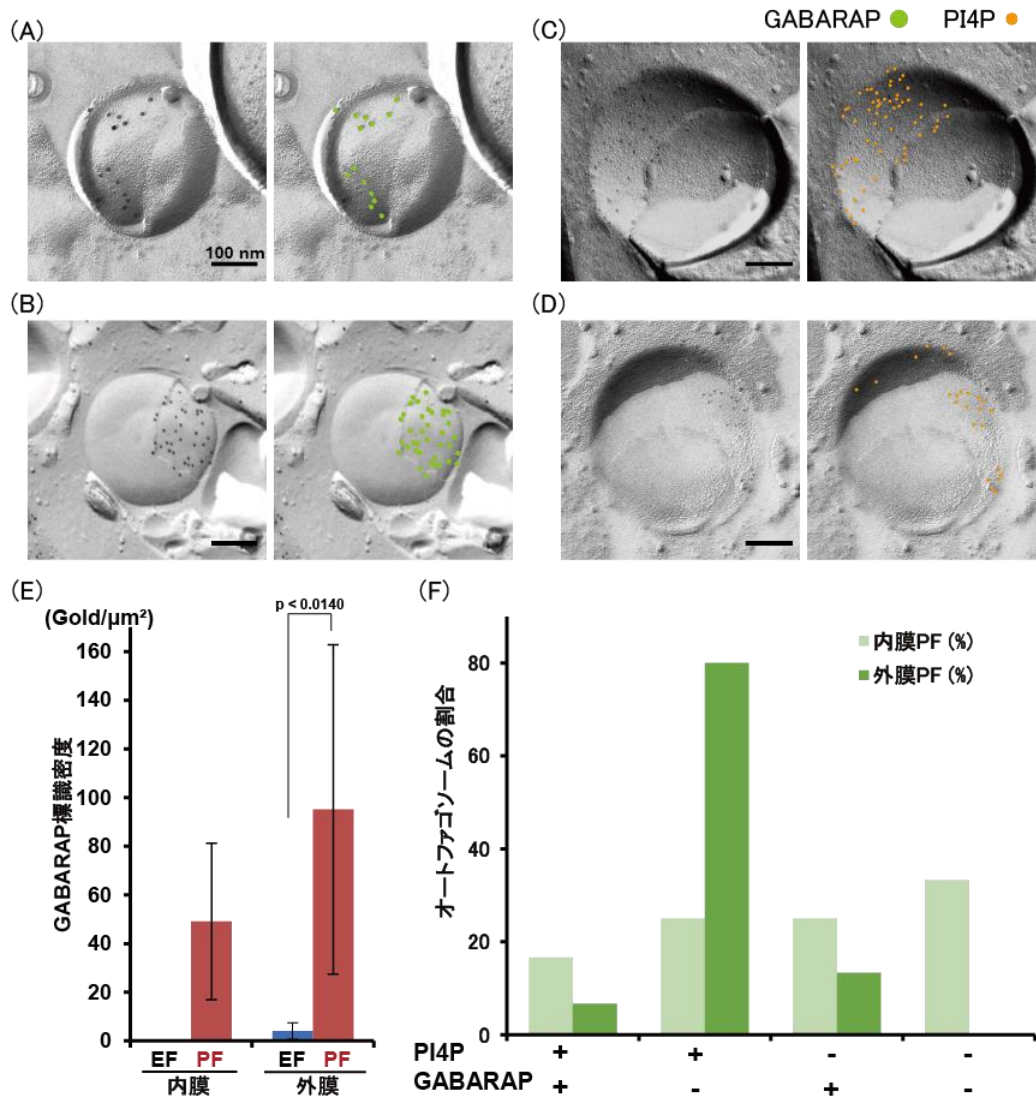


図 2.1-8 オートファゴソーム膜における PI4P と GABARAP の二重標識

PI4P と GABARAP の二重標識のため、10 nm 金コロイド結合抗体 (GABARAP、緑)、6 nm 金コロイド結合抗体 (PI4P、黄) を用いた。GABARAP (A、B)、PI4P (C、D) の金コロイド標識は内膜・外膜の PF に局在したが、PI4P との共局在はほとんどみられなかった。スケールバー: 100 nm。(E) GABARAP の標識密度をグラフに示した。GABARAP はオートファゴソーム膜 EF にはほとんど局在せず、PF に局在した ($p < 0.05$)。 (F) オートファゴソーム内膜 PF (薄緑)、外膜 PF (濃緑) における PI4P、GABARAP 局在、非局在オートファゴソームの割合をグラフで示した。PI4P と GABARAP の共局在の割合は内膜・外膜共に低値であった。

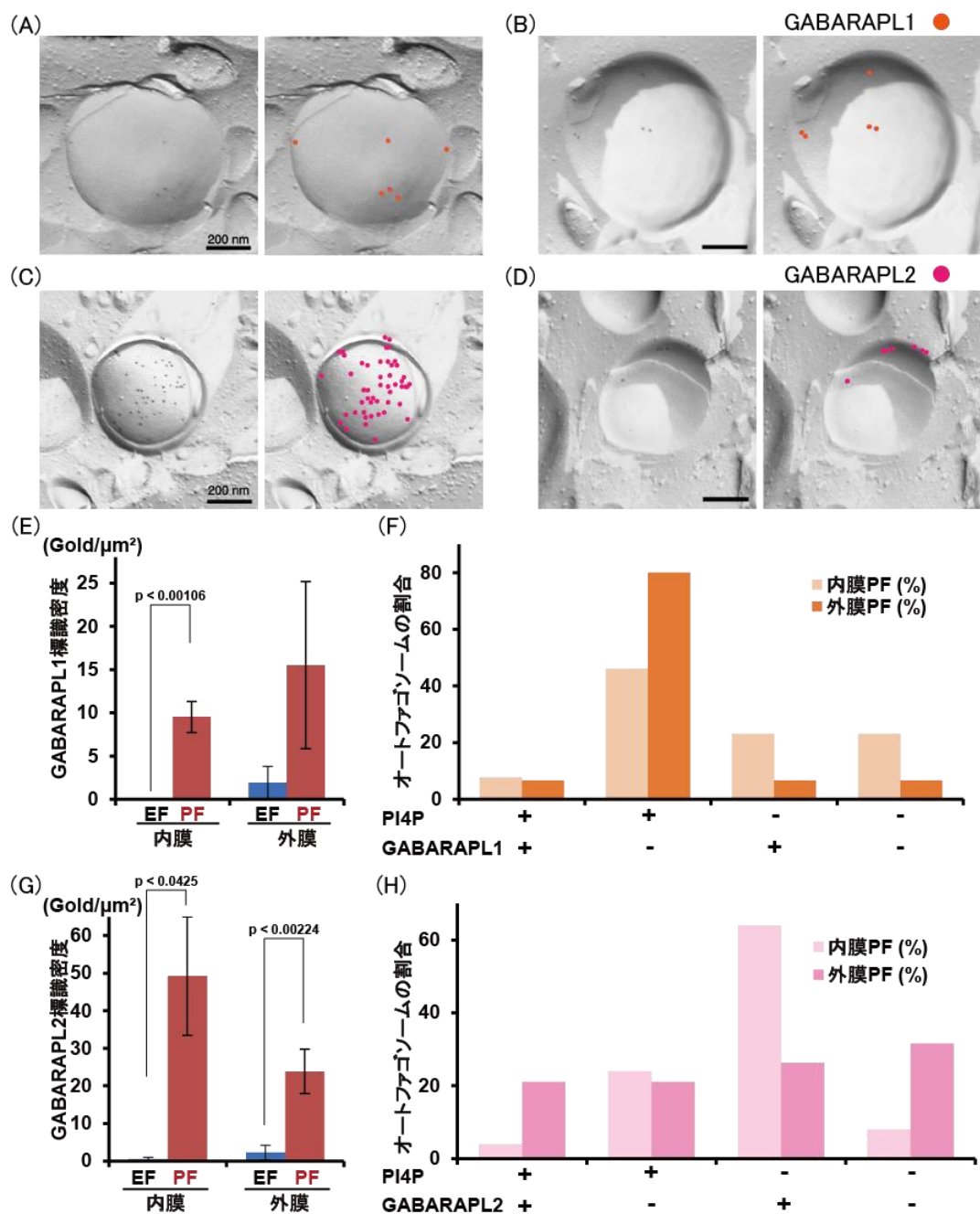


図 2.1-9 オートファゴソーム膜における PI4P と GABARAPL1、L2 の二重標識

PI4P と GABARAPL1、L2 の二重標識のため、10 nm 金コロイド結合抗体 (GABARAPL1、橙) (GABARAPL2、桃)、6 nm 金コロイド結合抗体 (PI4P) を用いた。GABARAPL1 (A、B)、GABARAPL2 (C、D) の金コロイド標識は内膜・外膜の PF に局在した (E、G)。(p<0.05)スケールバー:200 nm。(F)オートファゴソーム内膜 PF (薄橙)、外膜 PF (濃橙) における PI4P、GABARAPL1 局在、非局在オートファゴソームの割合をグラフで示した。(H)オートファゴソーム内膜 PF (薄桃)、外膜 PF (濃桃) における PI4P、GABARAPL2 局在、非局在オートファゴソームの割合をグラフで示した。PI4P と GABARAPL1、PI4P と GABARAPL2 との共局在の割合は内膜・外膜共に低値であった。

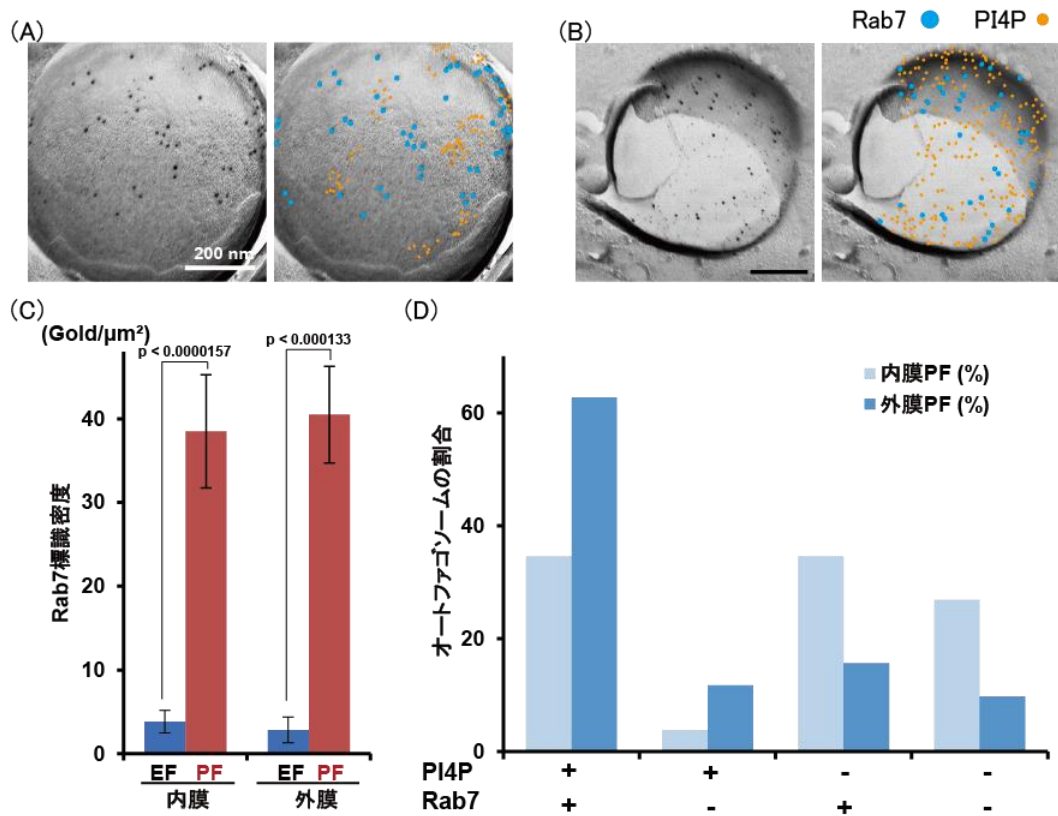


図 2.1-10 オートファゴソーム膜における PI4P と Rab7 の二重標識

PI4P と Rab7 の二重標識のため、10 nm 金コロイド結合抗体 (Rab7、青)、6 nm 金コロイド結合抗体 (PI4P、黄) を用いた。(A、B) 内膜・外膜 PF において PI4P と Rab7 との共局在が観察された。スケールバー: 200 nm。(C) オートファゴソーム膜における Rab7 標識密度をグラフで示した。PI4P や他たんぱく質と同様に、内膜・外膜 PF に高密度に局在した。(p<0.05) (D) PI4P、Rab7 の内膜 PF (薄青)・外膜 PF (濃青) における局在・非局在オートファゴソームの割合をグラフで示した。共局在の割合が高値であり、特に、外膜 PF の共局在割合が高かった。

1.4 考察

本研究において、以下の画期的な発見をすることができた。

- (1) PI4P、内在性 LC3B、GABARAP サブファミリー (GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2)、Rab7 はオートファゴソーム内膜・外膜 PF に局在した。特に PI4P は外膜 PF に高密度に局在した。
- (2) 全オートファゴソームの内、LC3B 局在オートファゴソーム膜の割合は約 40%であった。
- (3) PI4P は、オートファゴソーム内膜・外膜 PF において、マクロオートファジー後期に働く Rab7 と共局在した。

先行研究では、哺乳類・出芽酵母のゴルジ体膜、エンドソーム膜、リソソーム/液胞膜、細胞膜において、PI4P が PF に局在することが示された[126, 129, 130]。本研究では、オートファゴソームにおいても PI4P が PF に局在し、特に、細胞質に面する外膜 PF に高密度に局在するという結果を得た。この結果は、その他のオートファジー関連たんぱく質と PI4P が直接的に相互作用し、それぞれの細胞小器官のシグナル伝達に機能することを示唆した。オートファゴソームにおける PI4P の局在解析は、PI4P の機能を解明するために必須である。

1.4.1 PI4P のオートファゴソームにおける局在

近年、出芽酵母・哺乳類細胞のマクロオートファジーにおいて、PI4P が重要な役割を果たすことが分かってきた[102, 103, 131]。PI4P はホスファチジルイノシトール (PI) を基質とし、イノシトール環第 4 位をリン酸化する PI4 キナーゼ (PI4K) により合成される。出芽酵母においては 3 種類 (Pik1p、Stt4p、Lsb6p)、哺乳類においては 4 種類 (PI4KII α/β 、PI4KIII α/β) の PI4K が同定されている[19, 20] (図 1-5)。哺乳類における PI4KIII α 、PI4KIII β はそれぞれ、出芽酵母 Stt4p、Pik1p のホモログである。また、哺乳類 PI4KII α/β のホモログは、出芽酵母では Lsb6p の 1 種類のみが同定されている。出芽酵母では、PI4K がマクロオートファジーに重要な役割を持つとされている[102, 131]。哺乳類細胞においては、PI4KII α/β 由来の PI4P がオートファゴソームに局在し、オートファゴソームとリソソームとの融合に働くことが示唆されている[103]。本研究では、QF-FRL 法を用いた微細局在解析により、Huh7 細胞のオートファゴソーム内膜・外膜 PF への PI4P 局在が明らかとなった。さらに、オートファゴソーム外膜 PF の PI4P 標識密度は内膜 PF の PI4P 標識密度よりも有意に高かった (図 2. 1-5B)。つまり、細胞質から PI4K が働くことで、PI4P がオートファゴソーム外膜 PF に生成され、エフェクターとの相互作用によってリソソームとの融合に重要な役割を持つことが示唆された。

一方で、PI(4,5)P₂ はオートファゴソームに局在しないことが分かった (資料未記載)。PI(4,5)P₂ は、PI4P を基質として、PI4P-5 キナーゼが PI4P のイノシトール環第 5 位をリン酸化することで生成する。PI4P-5 キナーゼは、哺乳類細胞では PIP5K (Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase) $\alpha/\beta/\gamma$

が同定されており、出芽酵母では Mss4p の 1 種類のみが同定されている。本研究における結果は、出芽酵母の飢餓誘発非選択的マクロオートファジーには Mss4p が必要ないという報告[103]と一貫しており、哺乳類においても、PIP5Ks がマクロオートファジーに必要でないことが示唆された。PI(4, 5)P₂はシグナル伝達に必須であり、古くから、PI4P の「PI(4, 5)P₂の前駆体」としての役割が示されてきた。しかし近年では、PI(4, 5)P₂と独立した PI4P 自体の役割があることが報告された[23]。オートファゴソーム膜において、PI(4, 5)P₂ではなく PI4P のみが局在したという結果により、マクロオートファジーでは PI4P が独自の役割を持ち、働くことが示唆された。

1.4.2 PI4P は LC3B 非局在オートファゴソーム膜に局在した

本研究では、オートファゴソームにおける内因性 LC3B と PI4P の局在について、QF-FRL 法を用いて観察した。オートファジー研究初期から、Atg8/LC3 はオートファゴソーム形成過程に重要であり、オートファゴソーム特異的マーカーとして用いられてきた[72, 132-134]。LC3 は早期オートファゴソーム膜に局在し、オートファゴソームの形成に働く。オートファゴソームが封鎖されると、外膜に分布する LC3 は切り離されるが、内膜に分布する LC3 は封鎖されたオートファゴソームにトラップされる(図 2.1-11)。これにより、光学顕微鏡などを用いた観察では、消化を受けるまでのマクロオートファジー経路の全貌を、LC3 標識によって解析できる。しかし、外因性の GFP 結合 LC3 の過発現によるマクロオートファジーの観察では、オートファジー非誘発条件においてもオートファジーレベルの上昇が確認されており[133]、非生理的条件であることが考えられる。したがって、オートファゴソームにおける内因性 LC3 の局在を明らかにすることは、マクロオートファジー全貌を解明するために必須である。本研究において用いた QF-FRL 法では、内因性膜結合 LC3 の局在を観察することができた。

本研究において、QF-FRL 法を用いて LC3B 局在を解析すると、オートファゴソーム内膜・外膜 PF に局在した(図 2.1-6A、B)。LC3B が局在するオートファゴソーム膜 PF の割合は、内膜では 44.7%、外膜では 41.4%であり(図 2.1-6C)、半数以上のオートファゴソーム膜に LC3B は局在しなかった。これらの結果において、LC3B 非局在オートファゴソームは、LC3B が膜から離れ内腔にトラップされた封鎖後のオートファゴソームであると考えられる。

また、マクロオートファジー誘発 Huh7 細胞において、PI4P が局在するオートファゴソームの割合は、内膜では 64.7%、外膜では 52.8%であった(図 2.1-5C)。さらに、PI4P は主に LC3B 非局在オートファゴソーム膜に局在することが明らかとなった(図 2.1-7)。先行研究では、脂質プローブによる免疫蛍光抗体を用いた光学顕微鏡観察によって、PI4P と LC3 がオートファゴソームに共局在することが示された[103]。しかし第一章で示したように、アルデヒドなどの化学固定では、脂質をその場に固定することは困難であり、加えて、脂質プローブによって PI4P の再分布が生じた可能性がある。さらに、光学

顕微鏡観察では、封鎖後オートファゴソームにトラップされた LC3B と、封鎖後オートファゴソーム膜に局在する PI4P との共局在が検出された可能性があり、膜における共局在に関する結果としての信頼性には、議論の余地が伺える。

本研究では、PI4P は主に LC3B 非局在オートファゴソーム膜、つまり、隔離膜封鎖後のオートファゴソームに局在し働くことが示唆された。

1.4.3 PI4P はオートファゴソームにおいて GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2 と共局在しなかった

オートファゴソーム形成過程において、LC3 はファゴフォアの膜伸長、GABARAP サブファミリーはオートファゴソーム形成の後期段階に働くと考えられている[114, 115, 134]。本研究では、QF-FRL 法を用いて PI4P と GABARAPs との二重標識解析を行い、マクロオートファジーにおける PI4P の関与を追究した。

GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2 の標識はオートファゴソーム膜の内膜・外膜両膜において、PF に局在した。さらに、オートファゴソーム膜において、PI4P と GABARAPs との共局在は確認されなかった(図 2.1-8、図 2.1-9)。脂質プローブを用いた先行研究では、PI4P と GABARAPs の共局在が報告された[103]。しかし LC3B について上記で述べたように、LC3B と同様の機序でオートファゴソーム膜に局在する GABARAPs は、封鎖後のオートファゴソームでは内腔にトラップされることが考えられる。

以上の結果から、PI4P はオートファゴソーム形成段階より下流段階で働くことが期待される。

1.4.4 PI4P はオートファゴソームにおいて Rab7 と共局在した

以前の超薄切片を用いた研究報告において、GFP-Rab7 標識密度はオートファゴソーム成熟の間に増加し、さらに、GFP-Rab7 のオートファゴソームへの輸送は、リソソームマーカールとの融合以前に起こることが示された。また、Rab7 をノックダウンし、Rab7 変異体 Rab7 T22N を発現させると、オートファゴソームとリソソームとの融合段階が阻害され、オートファゴソームが蓄積した[120, 121]。そのため、Rab7 はオートファゴソームとリソソームとの融合段階に重要な役割を持つとされた。

哺乳類細胞において、マクロオートファジーは飢餓などのストレスによって ULK1 が活性化することで始動するが、通常時には ULK1 は mTORC1 により不活化されている。本研究では、Huh7 細胞のオートファゴソームにおける PI4P 局在を確認するため、mTORC1 阻害剤 Torin1 を用いることで、活性型 ULK1 によるマクロオートファジーを誘発した。さらに、Bafilomycin A1 を用いてオートファゴソームとリソソームとの融合を防ぐことで、細胞質内オートファゴソームを蓄積させた。しかしながら、Bafilomycin A1 の影響は実験条件により変容する[135]。そのため、Rab7 はマクロオートファジー後期段階のオートファゴソームだけでなく、リソソームとの融合後のオートリソソームにも分布する可能

性がある。また、融合直後の構造は二重膜構造に見えることを留意し、注意を払って観察・解析した。オートリソソーム膜やリソソーム膜における IMPs はオートファゴソームよりもはるかに多量であることから、IMPs の数を数えることで、オートファゴソームとオートリソソームとを区別し、オートファゴソームを抽出し、PI4P と Rab7 との共局在の有無を検討した。

QF-FRL 法を用いた観察の結果、オートファゴソーム内膜・外膜 PF において、PI4P と Rab7 が共局在することが明らかになった (図 2. 1-10)。この結果は、PI4P がマクロオートファジー後期である、オートファゴソームとリソソームとの融合段階に働くことを強く示唆した。

1.5 結論

本研究において、PI4P がオートファゴソーム内膜・外膜 PF に局在し、内膜 PF に比べて外膜 PF に多量に局在することが明らかとなった。また、PI4P と LC3B、GABARAP、GABARAPL1、GABARAPL2 との非共局在、Rab7 との共局在により、PI4P はマクロオートファジー後期に働くことが示唆された (図 2. 1-12)。これらの結果を世界に先駆けて報告し、オートファジー研究の進歩に貢献した。オートファジー経路の解明のため、QF-FRL 法を用いた PI4P の微細局在解析は非常に有用である。

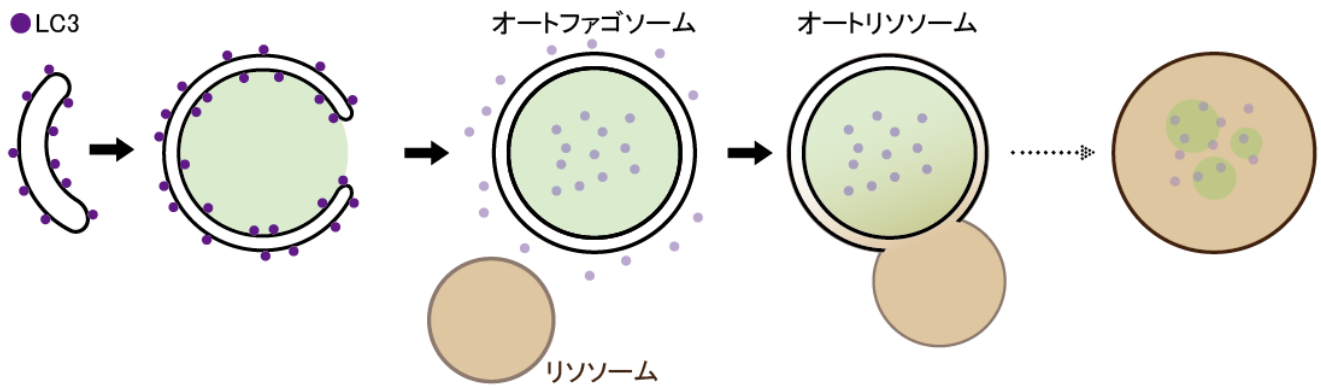


図 2.1-11 マクロオートファジーにおける LC3 動態

LC3 は隔離膜/ファゴフォアの膜伸長、膜封鎖などのオートファゴソーム形成に働くと考えられており、オートファゴソームが完成すると膜結合は切り離される。しかしながら、内膜 PF に局在する LC3 は封鎖されたオートファゴソーム内にトラップされる。

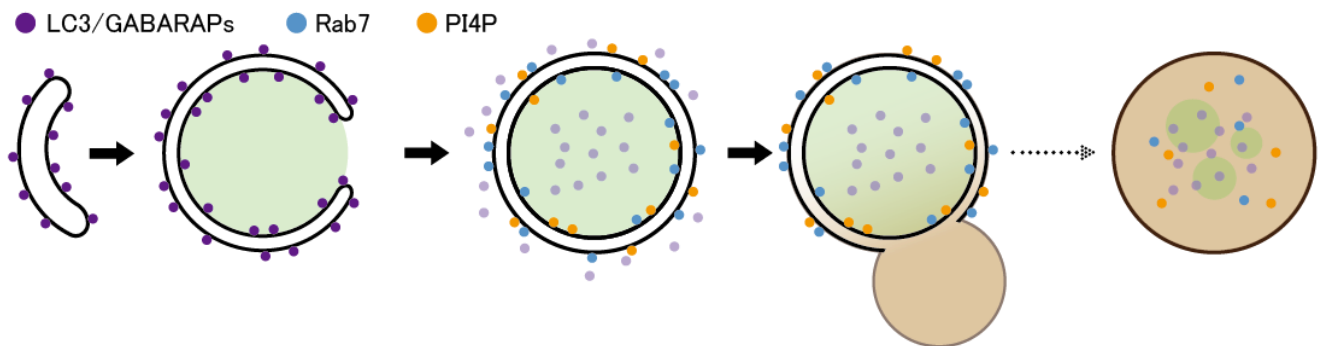


図 2.1-12 マクロオートファジーにおける PI4P の動態

本研究によって、PI4P(黄)が Rab7(青)と共局在し、LC3/GABARAPs(紫)と共局在しなかったことから、オートファゴソーム形成段階(オートファジー初期)ではなく、オートファゴソームとリソソームとの融合(オートファジー後期)に働くことが示唆された。

〈2〉 出芽酵母マクロオートファジーにおける PI4K (Pik1p, Stt4p) の役割

2.1 背景

マクロオートファジーは生命機能に重要な役割を持ち、パーキンソン病[31, 136-138]、クローン病[139]など様々な疾患への関連が知られている[36]。マクロオートファジーの分子メカニズム解明には、出芽酵母を用いた実験がさかんに行われてきた。出芽酵母のマクロオートファジーでは、まず細胞質において隔離膜/ファゴフォアが出現し、細胞質成分を取り囲み、伸長し、二重膜構造「オートファゴソーム」が完成する。オートファゴソームは液胞（哺乳類におけるリソソーム）と融合した後、液胞内で「オートファジックボディー」と呼ばれる構造となり、液胞内消化酵素によって消化される（図 1-6）。最近では、オートファジー関連たんぱく質 (Atg たんぱく質) に関する研究が進み、その分子メカニズムが明らかになってきた（表 1-4）。Atg2、Atg3、Atg4、Atg5、Atg7、Atg8、Atg9、Atg12、Atg16、Atg18、Vps15、Vps34 の変異株では、オートファゴソーム・オートファジックボディーが消失したことが報告されており、マクロオートファジーにおける主要な役割を持つことが分かった[140]。しかし、オートファゴソーム膜の発生や、その形成については未だ不明である[141, 142]。オートファゴソーム膜に関する研究の発展のためには、オートファゴソーム膜の主要構成要素である膜脂質の動態を解明することが必須である。近年、出芽酵母・哺乳類細胞では、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸 (PI3P) がマクロオートファジーに必須であることが明らかになった[143, 144]。さらに、ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) を生成する PI4 キナーゼもまた、重要な役割を持つことが分かってきた[103, 131]。

第二章〈1〉の研究結果では、PI4P は哺乳類オートファゴソーム膜において細胞質側 (PF: Protoplasmic Face) に局在し、管腔側 (EF: Exoplasmic Face) には局在しないことが分かった。さらに、PI4P はマクロオートファジー後期段階である、オートファゴソームとリソソームとの融合に働くことが示唆された。しかしながら、PI4P が働く機序や、その制御など、不明な点が数多く存在した。そこで我々は、詳細な PI4P のマクロオートファジーへの寄与を解明するため、出芽酵母の遺伝子操作技術を用いた実験を行った。出芽酵母は哺乳類細胞に比べて単純な構造を持ち、寿命が短く、ゲノム情報が整備され、分子生物学が駆使できる実験系の有意性に加え、哺乳類などの高等生物と機能的に保存性が高いという利点を持つ[55]。出芽酵母はこれまでもオートファジーの発見や、関連分子の解明に役立ってきた。つまり、出芽酵母の単純な遺伝子・構造を利用することは、全く未解明であった事象を明らかにするために非常に有用である。

本研究で用いた QF-FRL 法は、有用な脂質解析法に限られている中、物理的に生体膜脂質を凍結固定し、標識することで、微細局在を観察することができる。そこで、第二章〈1〉と同様に、QF-FRL 法を用いて、マクロオートファジーにおける PI4P の詳細な役割を解明するため、出芽酵母における局在を検討した。

第一章〈リン脂質〉で示したように、PI4P はイノシトール環の第 4 位をリン酸化する PI4 キナーゼ (PI4K)

により合成される。出芽酵母においては3種類 (Pik1p、Stt4p、Lsb6p) のPI4Kが同定されている[19, 20] (図1-5)。これらPI4Kはそれぞれ独立した分布、役割を持つと考えられている。3種のPI4Kがマクロオートファジーに寄与するPI4Pをどのように生成しており、制御しているのか、遺伝子操作技術を用いて作製したPI4K変異株を解析することで検討した。

2.2 材料及び方法

2.2.1 抗体、プローブ

一次抗体として、マウス抗PI4PモノクローナルIgM抗体を、Echelon Biosciences (Salt lake city, UT, USA) から購入した。二次抗体として、10 nm金コロイド結合抗マウスIgM抗体をBioCell (Cardiff, UK) から購入した。ホスホリパーゼC (PLC) - δ 1 PH (pleckstrin homology) ドメインを含むグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合たんぱく質 (GST-PH) を *Escherichia coli* に発現させ、グルタチオンアガロース樹脂 (Sigma) によって精製した。PHドメインは、GST-PLC δ 1 PH融合たんぱく質をプロテアーゼで切断し得た (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)。

2.2.2 出芽酵母株

AAY102株はCornell UniversityのDr. Scott D. Emrから譲渡していただき、AAY104株はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から譲り受けた。出芽酵母はYPD培地 (1% Yeast Extract, 2% Bacto Peptone, 2% dextrose) 中で、対数期または静止期まで30°Cで培養した。すべての出芽酵母株は親株である *Saccharomyces cerevisiae* SEY6210 (*MAT α leu2-3, 112 ura3-52 his3- Δ 200 trp1- Δ 901 suc2- Δ 9 lys2-801; GAL*) に由来している (表2-1)。本研究で作製した遺伝子欠損変異株は、pUG6を鋳型としたPCRに基づいた遺伝子導入技術を用いて作製した[147]。使用した出芽酵母株は表2-1に示した。

株名	遺伝子型	出展/研究
SEY6210	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ 200 trp1-Δ 901 suc2-Δ 9 lys2-801; GAL</i>	[148]
AAY102	SEY6210; <i>stt4Δ::HIS3</i> carrying pRS415 <i>stt4-4 (LEU2 CEN6 stt4-4)</i>	[22]
AAY104	SEY6210; <i>pik1Δ::HIS3</i> carrying pRS314 <i>pik1-83 (TRP1 CEN6 pik1-83)</i>	[22]
AKF001	SEY6210; <i>lsb6Δ::KanMX</i>	本研究
AKF002	SEY6210; <i>ypt7Δ::KanMX</i>	本研究
AKF003	SEY6210; <i>vam7Δ::KanMX</i>	本研究
AKF006	SEY6210; <i>atg4Δ::KanMX</i>	本研究
AKF007	SEY6210; <i>atg2Δ::KanMX</i>	本研究
AKF008	SEY6210; <i>atg3Δ::KanMX</i>	本研究
AKF009	SEY6210; <i>vps34Δ::KanMX</i>	本研究

表 2-1 本研究で用いた出芽酵母株 *S. cerevisiae* とその遺伝子型、出展の一覧

2.2.3 マクロオートファジー誘発法

マクロオートファジーを誘発するため、YPD 液体培地で培養した出芽酵母を水で洗浄し、窒素/炭素欠損 S (-NC) 培地 (0.17% Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate; Bacton Dickison) で、3~5 時間 30°C でインキュベートした。S (-NC) 培地には、セリンプロテアーゼ阻害剤である、1 mM フェニルメチルスルフォニルフロライド (PMSF; Sigma) を添加し、液胞内構造物を蓄積させ、オートファジックボディーを観察した。

2.2.4 急速凍結・凍結切断レプリカ標識 (QF-FRL) 法 (図 2.1-3) [123]

a. 凍結法

メタルサンドウィッチ法を用いて、出芽酵母を凍結した。少量の出芽酵母ペレットを銅箔にのせ、薄い金箔で覆った (面積~4 mm²、厚さ 20 μ m)。液体窒素で予冷した 2 つの金メッキ銅ブロック間で挟むことによって凍結した [126, 149]。

b. 凍結切断

第三章<1>1.2.4 と同様の手順で Balzers BAF400 装置 (Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein) を用いて脂質二重層の間で切断した。レプリカの厚さを結晶厚モニタによって制御しながら (EM QSG100; Leica)、炭素と白金を真空蒸着した。解凍した試料を、2.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) /0.1 M トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.0) 中で、60~70°C で一晩処置した。

c. 出芽酵母細胞壁溶解

0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中 2.5% SDS 溶液中で、60~70°C で一晩処理することで細胞質成分や細胞外成分を変性・除去し、トラップされた細胞膜分子のみをレプリカに残した。さらに出芽酵母の細

胞壁を溶解するため、0.1% Triton X-100、1% 牛血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA)、プロテアーゼインヒビターカクテル (Nacalai Tesque) 含有リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) 中の 1 mg/mL Zymolyase 20T で、37°Cで 2 時間処理した。続いて 2.5% SDS 溶液で処理し、標識に用いるまで 50%グリセロール中に-30°Cで保存した。

2.2.5 抗体標識・電子顕微鏡観察

レプリカを 3% BSA/PBS で、30 分間室温でブロックした。ブロッキング後、抗 PI4P 抗体が PI(4,5)P₂ に非特異的に結合することを防ぐため、0.1% BSA/PBS で 1 度洗浄し、PLC- δ 1 PH ドメイン (1 mg/mL) で処置した (図 2.1-2)。一次抗体と 4°Cで一晩インキュベートした後、0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄し、金コロイド結合二次抗体と 37°Cで 30 分インキュベートした。その後レプリカを 0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄し、さらに蒸留水で 3 度洗浄し、最後にレプリカをホルムバル膜の EM グリッドに取り上げた。透過型電子顕微鏡 (H7000KU) を 75 kV で作動させ観察した。

2.2.6 オートファゴソーム、オートファジックボディーの観察

レプリカの「オートファゴソーム」、また、液胞とオートファゴソームとの融合後の「オートファジックボディー」を、透過型電子顕微鏡によって観察した。オートファゴソームにおいては、第二章 <1>1.2.6 で示したように、特徴的な形態によりオートファゴソームを判別した。オートファゴソームは二重膜構造であり、膜内粒子が少ない[128]。さらに、QF-FRL 法を用いてオートファゴソームを切断すると、2 通りの割れ方がある。二重膜の内膜・外膜や、細胞質側 (PF: Protoplasmic Face)、管腔側 (EF: Exoplasmic Face) については、その構造の凹凸によって区別した (図 2.2-1)。

オートファジックボディーは液胞内の構造物である。PMSF を培地に添加し液胞内プロテアーゼを阻害することでオートファジックボディーを蓄積させ、観察した。液胞内オートファジックボディーにおいてもオートファゴソームと同様に 2 通りの切断パターンがあるが、オートファゴソーム内膜由来の一重膜である。凹凸によってその切断面を判別した (図 2.2-1)。

2.2.7 統計解析

上記の方法で 3 回以上実験を繰り返し、電子顕微鏡写真を取得し、解析に用いた。ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health(NIH)) を用いて特定膜構造の面積を測定し、金コロイドの数を数えた。特定膜構造における標識密度を、金コロイドの数と測定面積から計算した。正規性と等分散を確認し、Student-t 検定で有意差を求めた。確認できない場合、Welch の t 検定によって有意差を求めた。更に、標本が多数の場合は、Dunnnett の多重比較検定を用いて有意差を求めた (p<0.05)。

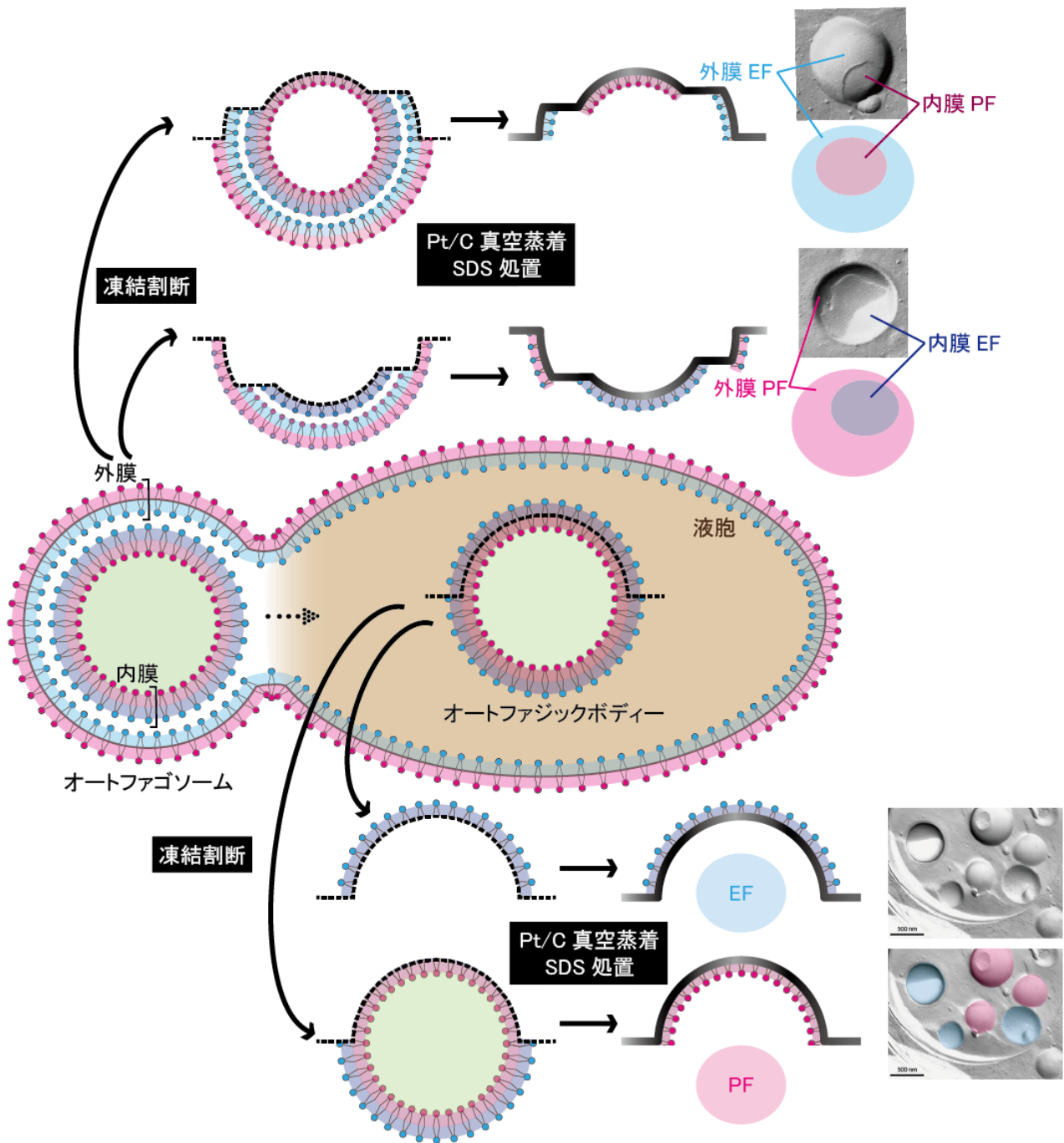


図 2.2-1 オートファゴソーム・オートファジックボディーの観察

オートファゴソームは脂質二重層がさらに二重になった構造を持ち、オートファジックボディーはオートファゴソーム内膜由来の一重膜構造である。QF-FRL 法で割断し、実際の電子顕微鏡写真では、凹凸によって、細胞質側 (PF: Protoplasmic Face)、管腔側 (EF: Exoplasmic Face) を判別した。

2.3 結果

2.3.1 出芽酵母オートファゴソームにおける PI4P 局在

オートファゴソームにおける PI4P 微細局在を正確に観察するため、出芽酵母を窒素/炭素欠損 S (-NC) 培地で 3~5 時間培養した。この条件によりマクロオートファジーを誘発することで、最も状態の良いオートファゴソームが観察可能となる[140]。我々は以前の研究において、QF-FRL 法を用いて抗 PI4P 抗体による特異的な PI4P 標識が可能であることを示した[126, 129, 130]。本研究では、オートファゴソーム膜において PI4P が細胞質側の PF、管腔側の EF (図 2.2-1) どちらに局在するか明らかにするため、抗 PI4P 抗体を用いて検討した。

第二章<1>で示したように、マクロオートファジーを誘発した哺乳類 Huh7 細胞では、PI4P はオートファゴソーム内膜・外膜 PF に局在した (図 2.1-5)。真核細胞のモデルとされる出芽酵母細胞でも、PI4P 局在は保存されているものと予想された。しかしながら、出芽酵母オートファゴソーム膜では、PF・EF 両面に PI4P が分布した。さらに驚くべきことに、PI4P は PF に比べて EF に高密度に局在し、特に外膜では有意な差がみられた。つまり、哺乳類細胞と真逆の局在であった (図 2.2-2)。

また、我々は PI(4,5)P₂ を標識した 10 回以上の実験によって、100 以上のオートファゴソームを観察したが、PI(4,5)P₂ 標識は確認されなかった (資料未記載)。つまり、オートファゴソームには PI(4,5)P₂ が局在しないことが明らかとなった。この結果は、第二章<1>哺乳類 Huh7 細胞において PI(4,5)P₂ がオートファゴソームに局在しなかったことと一貫している。

2.3.2 出芽酵母オートファジックボディーにおける PI4P 局在

オートファジックボディーは、オートファゴソームと液胞とが融合した後、液胞内に観察される球状構造物である (図 1-6)。オートファゴソーム内膜由来の構造であると考えられる。我々の QF-FRL 法では、切断された液胞内にランダムに分布する直径 400~800 nm の球状構造物が観察され、以前の報告におけるオートファジックボディーの形態と一致した[58, 140]。また、それらの液胞内構造物の膜は EF、PF 共に膜内粒子 (IMPs: intramembrane particles) の少ないスムーズな膜として観察され、オートファゴソーム膜と共通する特徴的形態であったことから、オートファジックボディーと判断した。

抗 PI4P 抗体によってオートファジックボディーにおける PI4P の標識を観察すると、オートファジックボディー膜 EF、PF 両面に PI4P はほとんど局在しなかった (図 2.2-3A, B)。しかし、わずかに PI4P 局在のあったオートファジックボディー膜においては、PI4P はほとんど EF に局在しており (図 2.2-3C)、オートファゴソーム内膜の局在と同様であった。

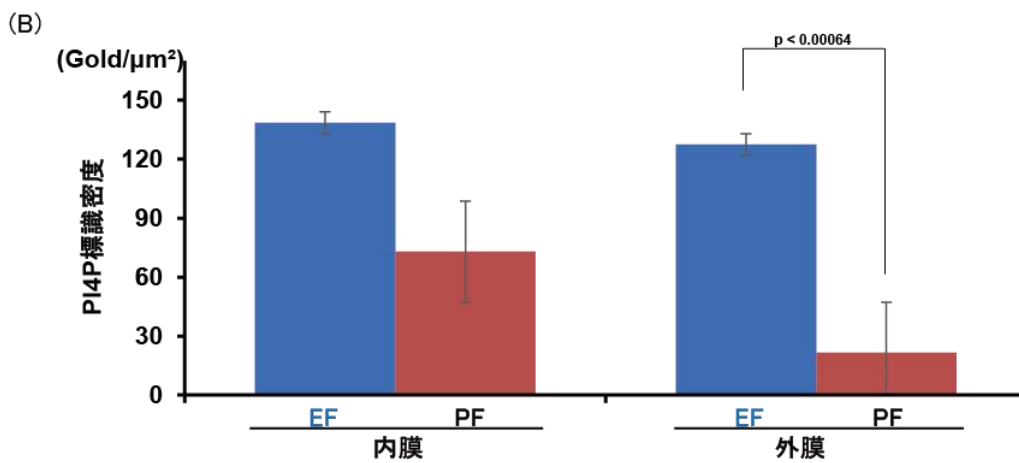
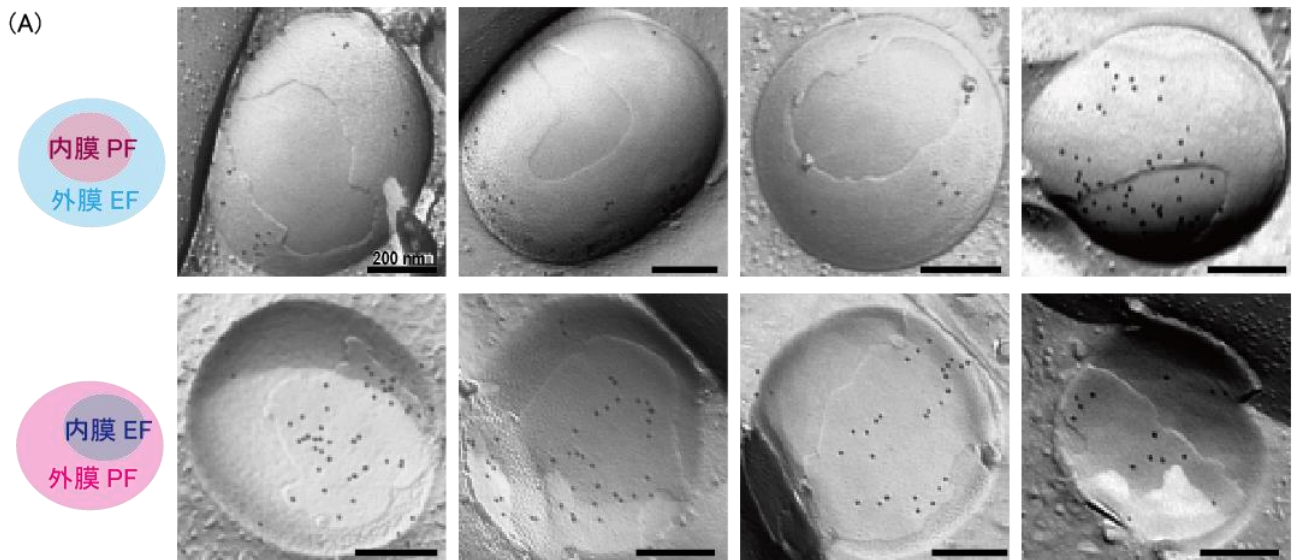


図 2.2-2 出芽酵母オートファゴソームにおける PI4P 局在

(A)PI4P を標識した出芽酵母オートファゴソームの電子顕微鏡写真。スケールバー:200 nm。(B)オートファゴソーム膜における内膜 EF・PF、外膜 EF・PF それぞれの PI4P 標識密度をグラフで示した。出芽酵母オートファゴソーム膜において、PI4P は内膜・外膜 EF・PF 両面に分布し、EF により高密度で局在した。(p<0.05)

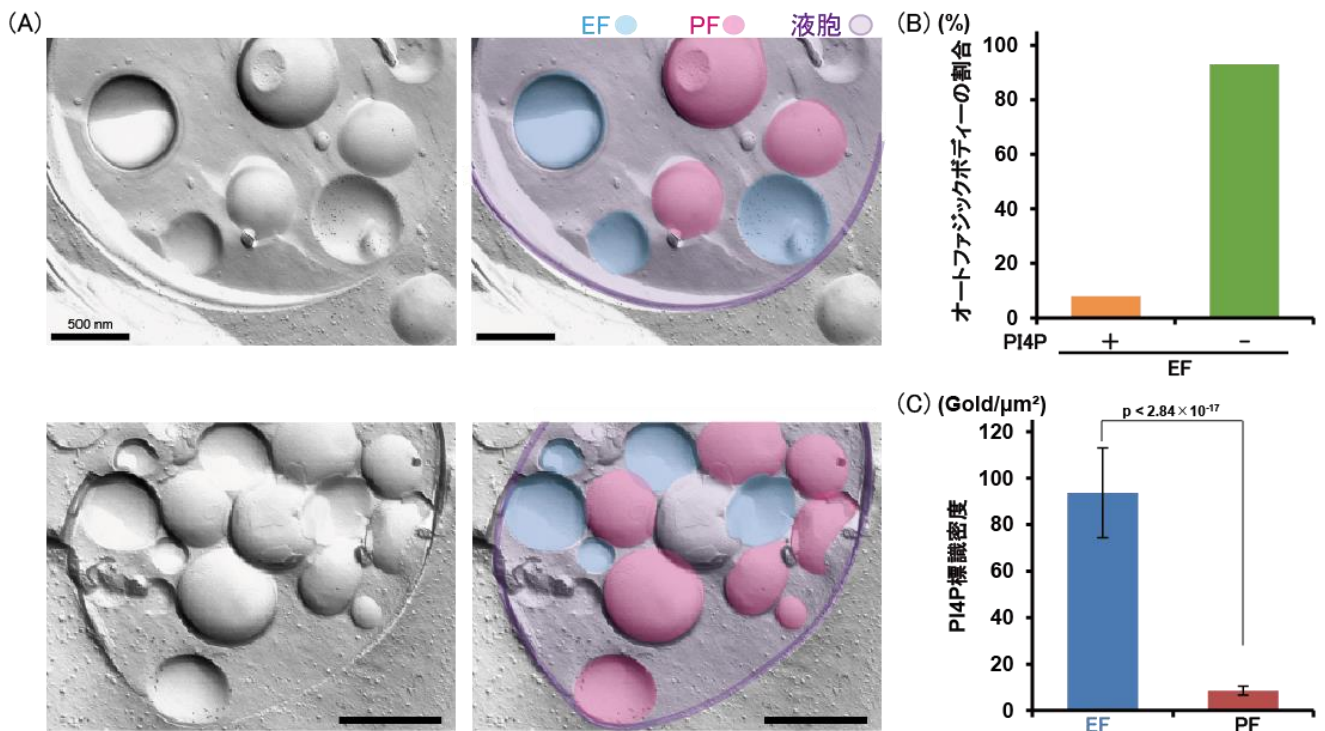


図 2.2-3 出芽酵母オートファジックボディーにおける PI4P の局在

(A)PI4P を標識した出芽酵母の液胞(紫)内オートファジックボディー膜 EF(青)、PF(桃)の電子顕微鏡写真。ほとんどのオートファジックボディー膜に PI4P は局在しなかった。スケールバー:500 nm。(B)全オートファジックボディー膜 EF における PI4P の局在有無の割合をグラフで示した。ほとんどのオートファジックボディー膜は PI4P 非局在の膜であった。(C)PI4P が局在するオートファジックボディー膜における、EF・PF それぞれの PI4P 標識密度をグラフで示した。EF に高密度に局在した。(p<0.05)

2.3.3 液胞内オートファジックボディーにおけるPI4K (Pik1p、Stt4p) の役割

PI4Pは、ホスファチジルイノシトール (PI) のイノシトール環第4位がPI4Kによってリン酸化されて生成するリン脂質である。以前、出芽酵母において、選択的・非選択的マクロオートファジーにPI4KであるPik1p、Stt4pが重要であると報告された[102-104, 131]。そこで本研究では、Pik1p、Stt4pそれぞれの温度感受性株 (*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*) を用いてより詳細な役割を解析した。温度感受性株では、38°C (制限温度) でPI4K不活性、26°C (許容温度) でPI4K活性となり、活性をコントロールできる[150]。温度感受性株を用いた液胞内のオートファジックボディーの観察では、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*それぞれの許容温度 (26°C) では野生株 (WT) とほとんど差異が確認されなかった一方で、制限温度 (38°C) では、オートファジックボディーの減少が確認された。オートファジックボディーの数・相対面積比を用いた統計結果より、許容温度 (26°C) に対する制限温度 (38°C) での有意な減少が確認された (図 2.2-4)。このことから、Pik1p、Stt4pはオートファジックボディーの形成、つまり、液胞との融合以前の段階において働くことが示唆された。

また、出芽酵母PI4KにはPik1p、Stt4pの他にLsb6pが同定されている。しかし現在まで、細胞機能に重要な役割を持たないことが報告されてきた。確認のため、本研究においても、Lsb6p遺伝子欠損株を用いてオートファジックボディーを確認したが、野生株 (WT) とほとんど差異は認められなかった (図 2.2-5A、B)。オートファゴソーム膜のPI4P局在を観察するも、野生株 (WT) と同様の局在を示し、顕著な減少は確認されなかった (図 2.2-5C、D)。以上から、Lsb6pによって産生されるPI4Pはオートファゴソーム形成に関与しないことが確認できた。

2.3.4 オートファゴソーム形成におけるPI4K (Pik1p、Stt4p) の役割

PI4Kのマクロオートファジーでの役割解明を目的とし、PI4Kの不活性化が、オートファゴソームの数・大きさに与える影響を調べるため、PI4K温度感受性株を用いた実験を行った。許容温度 (26°C) の活性化条件では、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*ともに26°Cでの野生株 (WT) と同程度のオートファゴソームの数・大きさが確認された (図 2.2-6)。また、野生株 (WT) を制限温度 (38°C) で観察するも、温度による変化はみられなかった。さらに、*stt4^{ts}*を制限温度 (38°C) の不活性化条件では、オートファゴソームの数・サイズは野生株 (WT) や、*stt4^{ts}*の許容温度 (26°C) と同程度であった。しかしながら、*pik1^{ts}*においては、制限温度 (38°C) の不活性化条件では、許容温度 (26°C) の活性化条件と比較し、数・大きさ共に減少が確認された (図 2.2-6)。これらの結果から、Pik1pがオートファゴソーム形成段階において働くことが示唆された。Stt4pはオートファゴソーム形成後～液胞との融合前の段階において、マクロオートファジーに関与することが考えられる。

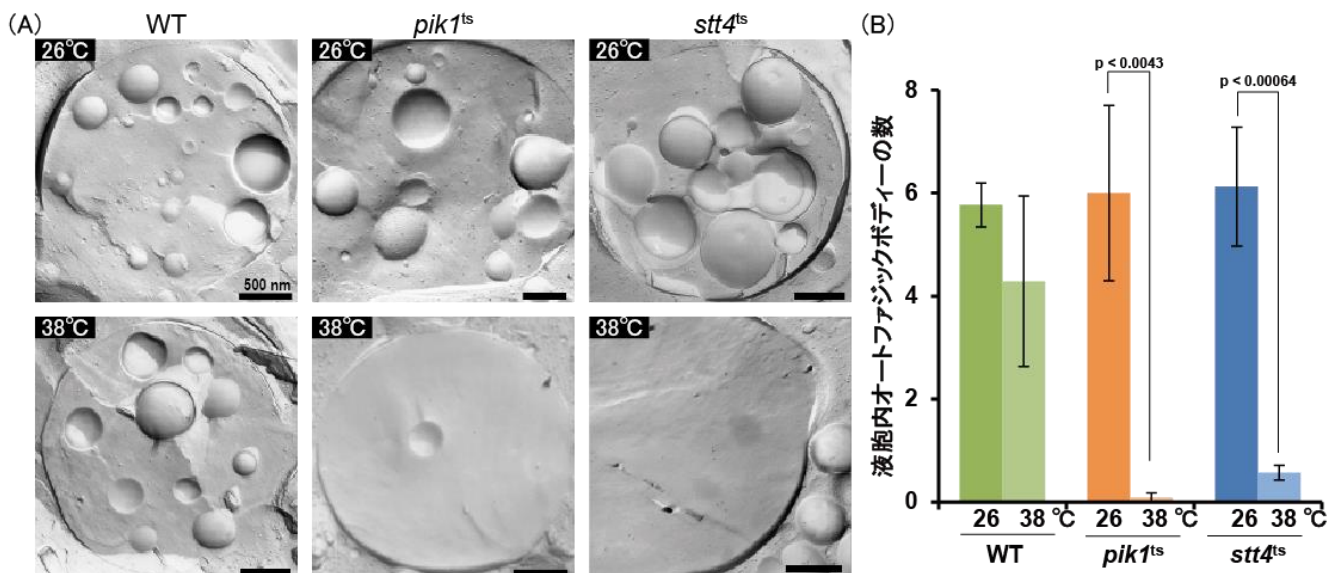


図 2.2-4 PI4K(Pik1p, Stt4p)の温度感受性株における液胞内オートファジックボディー

(A)野生株 (WT)、PI4K(Pik1p, Stt4p)の温度感受性株 (*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*)の液胞内オートファジックボディーの電子顕微鏡写真。PI4K は制限温度 (38°C) で不活化し、許容温度 (26°C) で活性化する。スケールバー: 500 nm。
 (B) WT、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* の液胞内オートファジックボディーの数をグラフで示した。*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* では、制限温度 (38°C) において、オートファジックボディーの数の減少が観察された。(p<0.05)

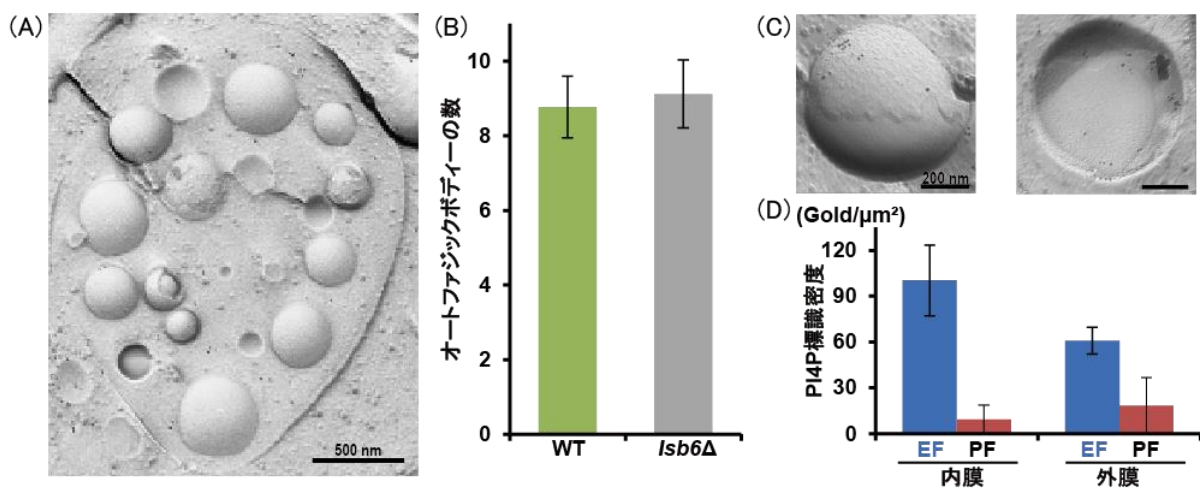


図 2.2-5 PI4K(Lsb6p)遺伝子欠損株における液胞内オートファジックボディー、オートファゴソーム

(A) Lsb6p 遺伝子欠損株 (*lsb6Δ*) の液胞内オートファジックボディーの電子顕微鏡写真。スケールバー: 500 nm。
 (B) 野生株 (WT)、*lsb6Δ* の液胞内オートファジックボディーの数をグラフで示した。
 (C) *lsb6Δ* において PI4P を標識したオートファゴソームの電子顕微鏡写真。スケールバー: 200 nm。
 (D) *lsb6Δ* のオートファゴソームにおける PI4P の標識密度をグラフで示した。オートファジックボディーの数、および、オートファゴソームにおける PI4P 局在パターンについて、WT と *lsb6Δ* での差はみられなかった。

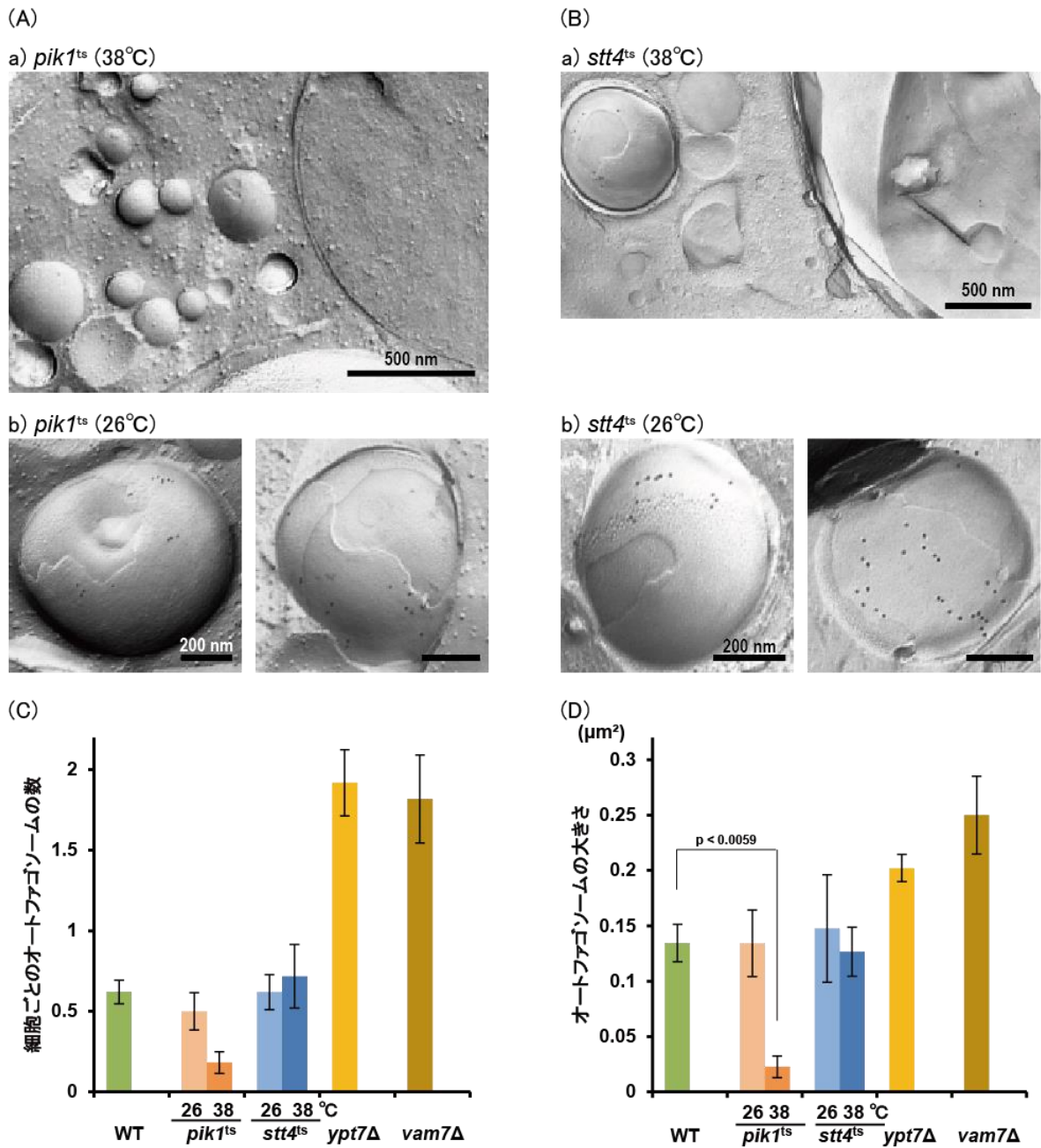


図 2.2-6 PI4K(Pik1p、Stt4p)温度感受性株におけるオートファゴソームの観察

(A) Pik1p 温度感受性株 (*pik1^{ts}*) の制限温度 (38°C) (a)、許容温度 (26°C) (b) におけるオートファゴソームの電子顕微鏡写真。スケールバー: 500 nm (a)。200 nm (b)。(B) Stt4p 温度感受性株 (*stt4^{ts}*) の 38°C (制限温度) (a)、26°C (許容温度) (b) におけるオートファゴソームの電子顕微鏡写真。スケールバー: 500 nm (a)。200 nm (b)。(C、D) 細胞あたりのオートファゴソームの数 (C)、サイズ (D) をグラフで示した。Pik1p 不活化条件 (*pik1^{ts}*、38°C) では、オートファゴソームの数・サイズ両方が減少した。(p < 0.05)

2.3.5 オートファゴソームと液胞膜との融合前後における PI4P 局在

上述の結果では、Stt4p 由来の PI4P が融合段階に重要であることが示唆された。そこで、膜融合前後における PI4P の動態をさらに追究するため、条件を検討し、PI4P 局在を観察した。

まず、オートファゴソームと液胞との融合直前の状態を観察するために、オートファゴソームと液胞との融合を司るたんぱく質の遺伝子欠損株 (*ypt7Δ*、*vam7Δ*) を実験に用いた。Ypt7p (Yeast Protein two 7) は、哺乳類 Rab7 のホモログであり、Vam7p (Vacuolar Morphogenesis 7) は SNARE (Soluble NSF attachment protein receptor) たんぱく質の 1 つである。本研究では、*ypt7Δ*、*vam7Δ* を飢餓条件におくことで、マクロオートファジーを誘発した。マクロオートファジーの誘発因子は様々存在する (表 1-3) が、飢餓条件におくことは最も単純な誘発因子である [151, 152]。

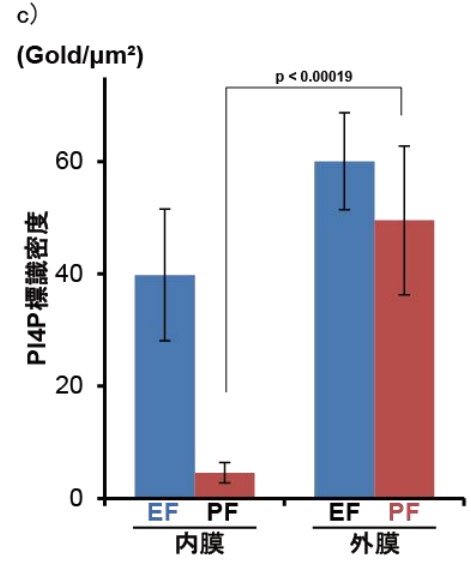
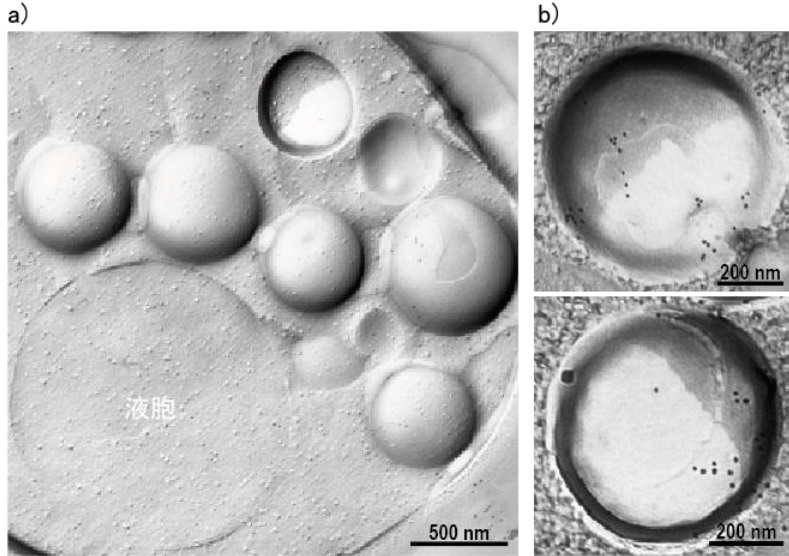
飢餓条件下の *ypt7Δ*、*vam7Δ* では、液胞内オートファジックボディーは観察されず、二重膜構造オートファゴソームが液胞周囲に多数蓄積した (図 2.2-7A、B)。通常、オートファゴソームが液胞と融合するとオートファゴソーム外膜が液胞膜の一部となり、PI4P が液胞膜に移動し、液胞膜 PI4P は増加することが考えられる。しかし、*ypt7Δ*、*vam7Δ* では液胞膜 PF の PI4P はマクロオートファジー非誘発条件と同程度であり、液胞膜 EF には PI4P は確認されなかった。すなわち、マクロオートファジー誘発時と比較し、液胞とオートファゴソームとの融合レベルが低下したことが確認できた。

マクロオートファジー融合段階が阻害された *ypt7Δ*、*vam7Δ* において、液胞周囲に蓄積したオートファゴソームは、融合直前の段階であると考えられる。そこで、蓄積したオートファゴソームの PI4P 局在を観察すると、驚くべきことに、*ypt7Δ*、*vam7Δ* 共に、外膜 PF における PI4P 標識密度の大幅な増加が確認された (図 2.2-7A(c)、B(c))。飢餓条件下の野生株 (WT) のオートファゴソームにおける PI4P 分布と比較すると、*ypt7Δ*、*vam7Δ* では内膜 PF の PI4P 分布割合が低下し、外膜 PF の PI4P 分布割合が上昇し、EF・PF に均一に分布することが分かった (図 2.2-7C)。このことから、液胞との融合直前には、オートファゴソーム外膜 PF で増加した PI4P が液胞との融合に働くことが示唆された。

次に、オートファゴソームと液胞との融合直後の PI4P 局在を解析するため、飢餓条件においた野生株 (WT) の液胞膜 PI4P を観察した。飢餓条件下では、オートファゴソームと液胞との融合がさかんに起こり、液胞は、既にオートファゴソームが大量に融合した状態であると考えられる。飢餓条件下で液胞膜の PI4P 局在を観察したところ、野生株 (WT) と比較し、液胞膜 PF において PI4P が急増した (図 2.2-8)。また、液胞との融合中のオートファゴソーム外膜 PF において PI4P が減少した像が確認できた。

以上より、オートファゴソーム外膜 PF の PI4P が液胞との融合に働き、液胞膜 PF に移動する可能性が示唆された。

(A) *ypt7*Δ



(B) *vam7*Δ

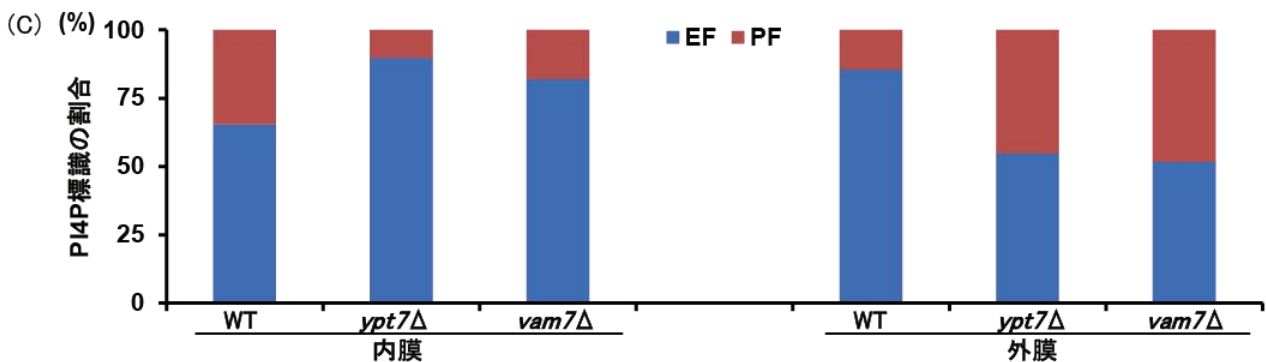
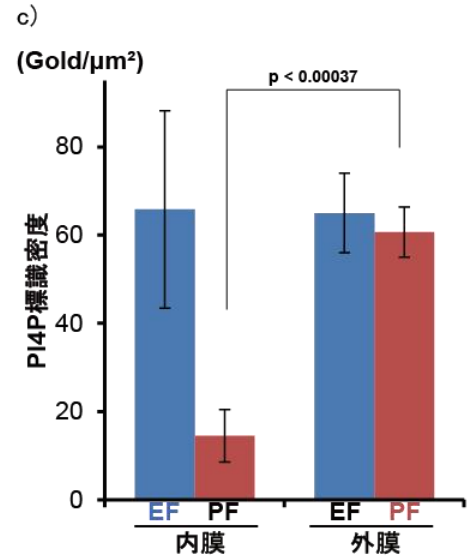
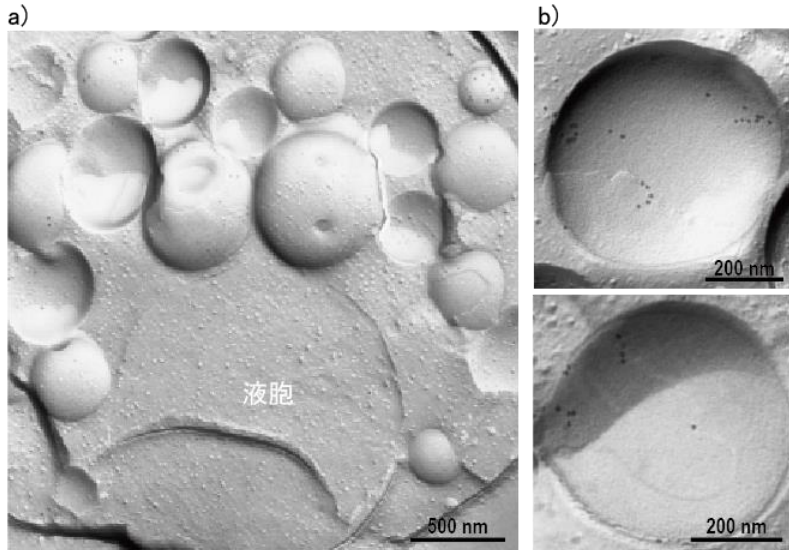


図 2.2-7 融合を司るたんぱく質 Ypt7p、Vam7p 遺伝子欠損株のオートファゴソームにおける PI4P 局在

(A) *ypt7* 欠損株 (*ypt7*Δ)、(B) *vam7* 欠損株 (*vam7*Δ) それぞれにおいて PI4P を標識した細胞内(a)、オートファゴソーム(b)の電子顕微鏡写真と、その PI4P 標識密度をグラフで示した(c)。スケールバー: 500 nm (a)、200 nm (b)。(p<0.05) (C) 野生株 (WT)、*ypt7*Δ、*vam7*Δ のオートファゴソーム内膜、外膜における PI4P の標識割合をグラフで示した。*ypt7*Δ、*vam7*Δ 共に、外膜 PF では PI4P 標識密度、割合の大幅な増加が確認された。

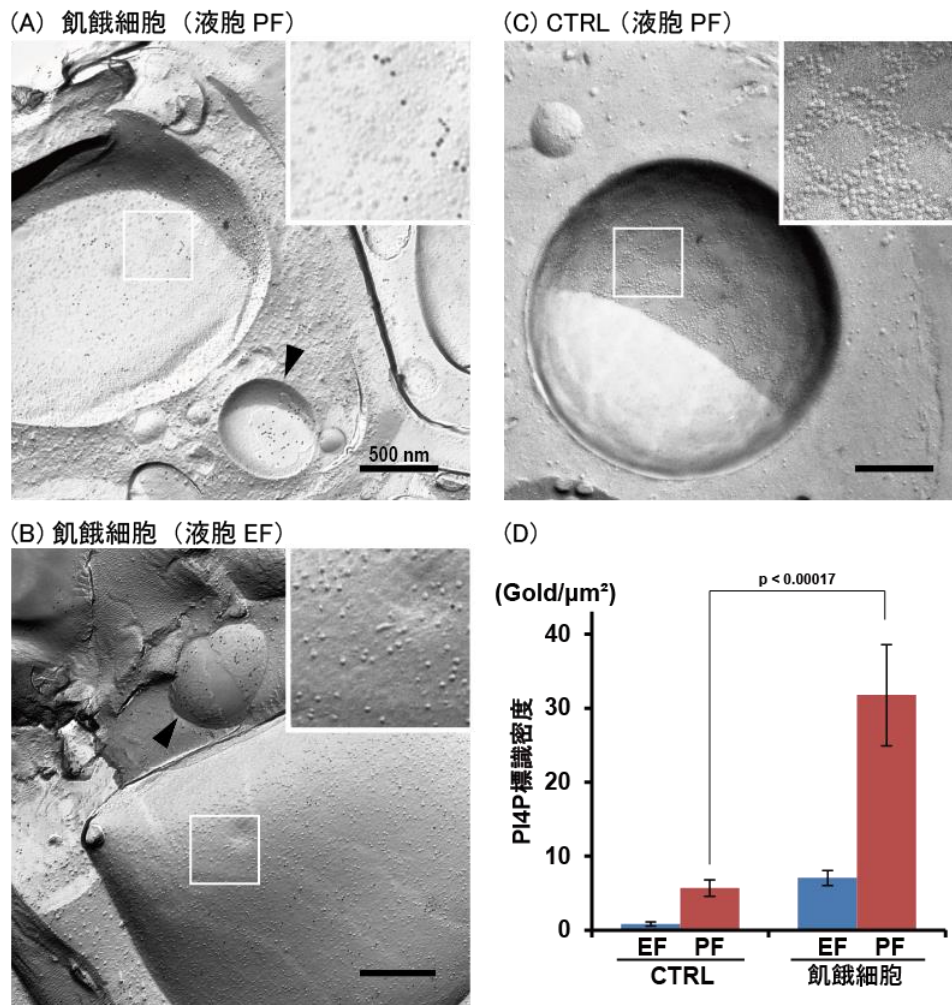


図 2.2-8 飢餓細胞における液胞膜 PI4P 局在

(A、B、C) 液胞膜において、PI4P を標識した電子顕微鏡写真。マクロオートファジー誘発飢餓細胞の液胞膜 PF(A)と液胞 EF(B)、マクロオートファジー非誘発細胞(CTRL)の液胞膜 PF(C)を示した。オートファゴソームを矢頭で示した。スケールバー:500 nm。(D) 液胞膜 EF、PF における PI4P 標識密度をグラフで示した。マクロオートファジー非誘発細胞(CTRL)に比べ、マクロオートファジー誘発細胞(飢餓細胞)の液胞膜 PF では、PI4P が高密度に局在した。(p<0.05)

2.4 考察

本研究では、以下の画期的な発見をすることができた。

- (1) 哺乳類オートファゴソームの内膜・外膜 PF に局在した PI4P は、出芽酵母オートファゴソームにおいて内膜・外膜 EF・PF 両面に分布し、EF により高密度に局在した。
- (2) 出芽酵母のオートファジックボディーには、PI4P がほとんど分布しなかった。
- (3) 出芽酵母 PI4K の内、Pik1p の不活化条件ではオートファゴソーム・オートファジックボディー両方が減少し、Stt4p の不活化条件ではオートファジックボディーのみが減少した。
- (4) 融合直前のオートファゴソームでは、外膜 PF の PI4P が急増した。また、融合後の液胞膜 PF には PI4P が局在した。

これらの結果は、PI4P がオートファゴソームに局在し、マクロオートファジーにおけるオートファゴソームの形成、および、オートファゴソームと液胞との融合に重要な役割を担うことを示唆した。さらに、本研究において PI4P 局在を詳細に検討したことから、そのマクロオートファジーにおける動態が明らかになりつつある。今後、マクロオートファジーを制御する因子として、PI4P 動態がより一層解明されていくことへの期待は大きい。

2.4.1 出芽酵母細胞と哺乳類細胞では、オートファゴソームにおける PI4P 局在が真逆であった

近年のマクロオートファジーと膜脂質との関連についての研究によって、PI4P がマクロオートファジーに関連し、重要な役割を持つことが分かってきた[102-105]。さらに我々は、第二章<1>において、哺乳類細胞での PI4P 局在を検討した。その結果、PI4P は哺乳類オートファゴソーム膜 PF に局在することが明らかとなった。しかしながら本研究では、出芽酵母オートファゴソームにおける PI4P の局在は哺乳類とは真逆であり、オートファゴソーム膜 EF、PF 両面に分布し、EF にはより高密度で局在することが分かった(図 2.2-2)。出芽酵母は真核生物のモデルとして、オートファジー現象自体や、関連分子の発見にも役立ってきた。そして、多くのオートファジー関連分子は、出芽酵母と哺乳類で保存されていると考えられてきた。しかし、近年の研究では、出芽酵母から哺乳類に至る進化の過程において、マクロオートファジー機序に差異がみられることが徐々に明らかになってきており、多彩な応用機能を可能にするために分子機構の変容が生じたことが伺える[153]。

例えば、マクロオートファジーの始動段階では、出芽酵母・哺乳類間で差異があることが知られている。マクロオートファジーは、出芽酵母・哺乳類で共通し、飢餓などのストレス条件により誘発される。出芽酵母において、マクロオートファジーが誘導されると、Atg1、Atg13、Atg17、Atg29、Atg31 の 5 つのたんぱく質からなる「Atg1 複合体」が形成され、液胞近傍に集積することで基盤構造が形成される。対して哺乳類においては、Atg1 ホモログの ULK1/2 や、Atg13 および Atg17 の機能類縁体である FIP200、

そして Atg101 の 4 つのたんぱく質から構成される「ULK 複合体」がマクロオートファジーの始動を担う。出芽酵母では、「Atg1 複合体」固有たんぱく質である Atg29、Atg31 は Atg17 と直接相互作用するが、Atg13 と結合しない。一方、哺乳類の「ULK 複合体」固有たんぱく質である Atg101 は、Atg17 機能類縁体の FIP200 とは結合せず、Atg13 と相互作用してその安定化に寄与する[154-156]。Atg101 がその下流の Atg たんぱく質の集積を担うことが示唆されている[157]。

また、出芽酵母 Atg8 はオートファゴソーム形成に必須のたんぱく質である[158]。しかし、Atg8 の哺乳類ホモログである LC3 は、マクロオートファジーで中心的な役割を持つが、必須ではない。LC3-II のオートファゴソーム膜局在に、Atg5-Atg12-Atg16L 複合体がユビキチン様たんぱく質として関わり[71, 91]、LC3-II よりもさらに後期段階に重要な作用点があるとされている。

そしてより臨床応用的な部分では、哺乳類では Atg16L において、クローン病に感受性を示す一塩基多型が発見されている。それは C 末端の WD リピードドメインに位置するが、出芽酵母 Atg16 には WD リピードドメインは存在しない。クローン病の原因は、腸内細菌と免疫系の複雑な相互作用の破綻によると推測されており[159]、マクロオートファジーによる病原体除去機能との関係が疑われている。つまり、哺乳類における Atg16L の WD リピードはこの機能に重要な役割を持つ制御モジュールである可能性がある。

さらに、脂質に関連するたんぱく質に関する差異についても報告がある。PI3P は PI のイノシトール環第 3 位をリン酸化する PI3 キナーゼ (PI3K) によって生成する。哺乳類・出芽酵母双方において、マクロオートファジーに必須であり、PI3K を阻害すると、オートファゴソーム形成が消失する [143]。この PI3K について、出芽酵母では 1 種の PI3K が Atg たんぱく質と作用し、複合体を形成するが (表 1-4)、哺乳類では少なくとも 3 種類の PI3K 複合体が存在することが報告されている[160]。

以上のように、徐々に明らかになった出芽酵母・哺乳類間における差異は、進化上現れてきたものである。今後、マクロオートファジー研究によって、マクロオートファジーを制御し関連疾患の制圧を目指すためには、より臨床応用に近い哺乳類を用いた実験が必須となる。しかし、出芽酵母は単純な構造を持ち、真核生物のモデルとされ、ゲノム情報が既に整備されている。そのため、出芽酵母を用いた研究は、全く明らかでない未解明事象の解明に非常に有用である。長年の進化を経た哺乳類において、複雑な相互作用や機序を持つオートファジーのような経路についても、出芽酵母を用いた研究を行うことで、手探りの状態の中、真実を解明する一端を掴むことができる。特に、我々が注目した脂質に関しては、第一章で述べたように、たんぱく質や DNA・RNA に比べて不明な点が数多く残されている。中でも膜脂質の非対称性分布やその局在に関しては、全くの手探り状態といえる。このような状況下で、本研究によって初めて明らかとなった、PI4P が哺乳類と真逆の局在を示したという結果は、マクロオートファジーにおける脂質研究を進める上で、貴重な結果である。

2.4.2 飢餓出芽酵母のオートファゴソーム膜では、PI4P は EF に局在した

哺乳類細胞・出芽酵母細胞では、細胞膜・ミトコンドリア膜・核膜・液胞膜などの細胞小器官膜において、PI4P は PF に局在し、細胞質の様々なたんぱく質との相互作用によってその機能を制御することが知られている[130]。しかし、本研究の結果では、飢餓条件によりマクロオートファジーを誘発した出芽酵母のオートファゴソーム膜において、PI4P は EF に高密度に局在していた (図 2.2-2)。

オートファゴソームにおける膜脂質の分布に寄与するたんぱく質として、近年、出芽酵母 Atg9 がスクランブラーゼとして働くことが明らかになった[161]。リン脂質二重層の間で特定の脂質を移動させる役割を持つたんぱく質は、フリッパーゼ、フロッパーゼ、スクランブラーゼが知られている。フリッパーゼ、フロッパーゼは ATP 依存的に単一方向 (フリッパーゼ: EF→PF、フロッパーゼ: PF→EF) へ脂質を輸送する。対してスクランブラーゼは ATP 非依存的に、双方向に脂質を輸送する。これらたんぱく質の働きによって、リン脂質二重層の非対称性分布が生まれ、細胞機能に大きな影響を与えられている。最近では、オートファゴソーム膜の PI4P についても Atg9 が働き、スクランブルされることで EF、PF に対称的に分布すると報告された[162]。我々の結果とは相反する結果である。この相違点について、実験環境の違いなどが原因として考えられる。さらに本研究の PI4P 非対称性分布を裏付ける新たな報告として我々は、PI4P の脱リン酸化酵素である Sac1p がマクロオートファジーに必須であり、PI4P の非対称性分布に寄与することを示した[163]。Sac1p が細胞質側から働くことで、オートファゴソーム膜 PF の PI4P を脱リン酸化し、PI4P レベルを下げている可能性が考えられる。

また、Sac1p 以外のたんぱく質が非対称性分布に寄与する可能性も考えられる。マクロオートファジーに関する研究は、未だ発展段階であり、特に脂質に関連する分子機序の全貌は明らかでない。役割が解明されていないたんぱく質や、同定されていないたんぱく質が数多く関わっていることが推測される。すなわち、未だ同定されていないフリッパーゼやフロッパーゼが、PI4P 非対称性に寄与する可能性も期待できる。PI4P の非対称性分布、および、その分布とマクロオートファジーとの関係について、より詳細な検討が必要である。

2.4.3 オートファジックボディー膜 EF、PF において PI4P は局在しなかった

オートファゴソーム内膜に由来すると考えられるオートファジックボディー膜には、PI4P はほとんど局在しないことが分かった (図 2.2-3)。出芽酵母において、オートファゴソーム内膜・外膜の EF、PF 両面に PI4P が分布するという結果に対して、矛盾が生じる。この問題は、液胞内消化酵素によってオートファジックボディーが分解される際に、液胞膜は分解されず、オートファジックボディー特異的に分解が起こる、という未だ解明されていない謎に関連すると考えられる。

近年の我々の報告では、ホスファチジルセリン (PS) はオートファゴソーム膜への分布はわずかであ

るが、オートファジックボディー膜において高密度に分布することが示された。本研究における PI4P 局在とは逆の動態であるといえる。オートファジックボディー膜上の PS 密度が高い一方で、液胞膜 EF には PS がほとんど分布しないことから、PS がオートファジックボディー膜特異的な消化の鍵となる可能性が示唆された[164]。この報告によって、オートファゴソーム内膜・外膜間で、融合直前または融合時、PI4P と PS の膜間移動が起こる可能性が考えられる。

真核細胞において、異なる細胞内小器官の膜間では、脂質輸送たんぱく質 (LTPs) による脂質輸送が起こることが知られている。PI4P は LTP リガンドとして、PI4P 濃度勾配を利用し、基質を他方の膜へ輸送させる。つまり、オートファゴソーム内膜・外膜における PI4P の濃度勾配によって、PS を内膜 (オートファジックボディー膜) へ輸送することが考えられる。Osh6 (OSBP homolog 6) は、小胞体や細胞膜の間など、2つの膜間で PS と PI4P を交換することが知られている LTPs の 1 つである[165, 166]。しかし、我々の実験では液胞内のオートファジックボディーは *osh6Δ* 株でも同様に観察され、オートファジックボディー膜 EF および PF 上の PS 標識密度は野生株 (WT) と同等であった[164]。したがって、PS と PI4P の交換は Osh6p 以外の機構によって起こることが示唆される。今後、PS と PI4P を交換する機構を突き止めることで、オートファジーによる物質分解の制御が可能となることが期待できる。

2.4.4 Pik1p はオートファゴソーム形成に、Stt4p はオートファゴソームと液胞との融合に働く

PI4K (Pik1p/PI4KIII β 、Stt4p/PI4KIII α 、Lsb6p/PI4KII α/β) は、PI のイノシトール環第 4 位をリン酸化して PI4P を生成する役割を持つたんぱく質である。中でも出芽酵母において、Pik1p、Stt4p は選択的・非選択的マクロオートファジーに重要であると報告された[102-104, 131]。そこで我々は、Pik1p、Stt4p の温度感受性株 (*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*) でのオートファゴソーム、オートファジックボディーの数・サイズを観察・解析することで、PI4K や PI4K によって生成される PI4P のより詳細な役割について検討した。得られた結果(図 2.2-4、図 2.2-6)の概略を表 2-2 に示した。Pik1p の不活化条件(*pik1^{ts}*、38°C)では、オートファゴソーム、オートファジックボディー両方が減少したのに対し、Stt4p の不活化条件 (*stt4^{ts}*、38°C) では、オートファジックボディーのみ減少した。すなわち、Pik1p はオートファゴソームの形成に、Stt4p はオートファジックボディーの形成、つまり、オートファゴソームと液胞との融合時に、PI4P を生成する働きを持つことが示唆された (図 2.2-9)。

また、PI4 キナーゼの内 Lsb6p は、現在まで、マクロオートファジーやその他の細胞内機能において重要な役割を持たないと報告されてきた。本研究では *lsb6* 欠損株 (*lsb6Δ*) を用いてオートファジックボディーの数やサイズを確認したが、野生株 (WT) と同等である結果が得られた (図 2.2-5A、B)。続いてオートファゴソーム膜の PI4P 分布を確認したが、*lsb6Δ* は野生株 (WT) と同様の分布を示し、顕著な減少は確認されなかった (図 2.2-5C、D)。以上から、Lsb6p、および、Lsb6p によって産生される

PI4P はオートファゴソーム形成にほとんど関与しないことが確認できた。

上記のように、PI4K である Pik1p、Stt4p がマクロオートファジーに重要な役割を果たすことを明らかにした。しかしながら最近の我々の研究では、PI4P の脱リン酸化酵素である Sac1p、Sjl13p によって、PI4P が脱リン酸化されることがマクロオートファジーに重要であるという結果を報告した[164]。Sac1p 遺伝子を欠損させた株 (*sac1Δ*) では、オートファゴソームと液胞との融合がブロックされ、オートファゴソーム膜 PF の PI4P が急増した。つまり、Sac1p は特にオートファゴソームと液胞との融合段階にオートファゴソーム膜 PF の PI4P 脱リン酸化に関わっており、この脱リン酸化が、融合が進行する上で必須であることが分かった。また、Sac1p と Sjl13p 両方の機能が不活化された株では、オートファゴソーム、オートファジックボディー両方が観察できず、マクロオートファジー自体が起こらなかった。つまり、マクロオートファジー初期において、Sac1p、Sjl13p が司る PI4P 脱リン酸化が重要であることが明らかとなった。すなわち、本研究で示された PI4K による PI4P の生成がマクロオートファジーに重要であることに加えて、PI4P 4-ホスファターゼによる PI4P の脱リン酸化も重要であることが分かった。したがって、PI4P の生成・代謝のターンオーバーがマクロオートファジーには必須であることが示唆された。

	PIK1 不活化	STT4 不活化
オートファゴソーム	減少	WT と同等
オートファジックボディー	減少(ほとんど無し)	減少(ほとんど無し)

表 2-2 PI4K(Pik1p、Stt4p)の温度感受性株を用いた、制限温度(38°C)における PI4K 不活化時のオートファゴソーム、オートファジックボディーの数・サイズの観察結果

2.4.5 オートファゴソームと液胞との融合段階前後における PI4P 分布

PI4K を不活化した実験では、PI4P がオートファゴソームの形成、および、オートファゴソームと液胞との融合に働くことが示唆された。しかし、オートファゴソームと液胞との融合段階というマクロオートファジーの最終ステージは、非常に短時間に進行する事象であり、観察は不可能であった。そこで特に融合段階における PI4P 動態を検討するため、融合直前のオートファゴソーム、また、融合後の液胞膜における PI4P 分布を観察した。

融合直前のオートファゴソームを観察するため、Ypt7p、Vam7p それぞれの遺伝子欠損株 (*ypt7Δ*、*vam7Δ*) を用いた。Ypt7p は哺乳類 Rab7 のホモログであり、Rab ファミリー小 GTP アーゼの良く特性化されたメンバーの 1 つである。出芽酵母においては、液胞同士の融合にも関わるたんぱく質である。マクロオートファジーでは、オートファゴソームと液胞との融合に必須であることが分かっている[167]。

Vam7p は、液胞膜上 SNARE たんぱく質の 1 つであり、Ypt7p や HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) 複合体、および、オートファゴソーム上の Ykt6p と共にオートファゴソームと液胞との融合を司る [168, 169]。本研究では、*ypt7Δ*、*vam7Δ* を用いて飢餓条件での実験を行うことで、融合を阻害し、細胞質に蓄積する融合直前のオートファゴソームにおける PI4P 分布を解析した。*ypt7Δ*、*vam7Δ* 共に液胞内オートファジックボディーは観察されず、液胞周囲には、二重膜構造のオートファゴソームが多数蓄積した (図 2. 2-7)。さらに驚くべきことに、オートファゴソームにおいては、*ypt7Δ*、*vam7Δ* 共に、外膜 PF の PI4P 標識密度が内膜 PF に比べ、大幅に増加したことが確認された。野生株 (WT) の飢餓条件でのオートファゴソームにおける PI4P 分布と比較すると、外膜 PF の PI4P 急増は明らかであり、外膜 EF・PF にほぼ均一に PI4P が分布した (図 2. 2-7)。このことから、液胞との融合直前に急増した外膜 PF の PI4P が、オートファゴソームと液胞との融合に働くことが示唆された。

さらに、PI4P のオートファゴソーム融合後の動態を解析するため、飢餓条件下でマクロオートファジーを誘発し、液胞膜における PI4P 分布を観察した。マクロオートファジーを誘発した出芽酵母液胞内にはオートファジックボディーが多数観察され、液胞膜は既に多数のオートファゴソーム外膜と融合した後であると考えられた。通常状態の出芽酵母液胞膜における PI4P 分布はごく少数であった (図 2. 2-8C、D) が、飢餓状態の液胞膜では、特に液胞膜 PF の PI4P 標識密度の有意な増加が観察された (図 2. 2-8A、D)。つまり、オートファゴソーム外膜 PF で増加した PI4P が融合後には液胞膜 PF の一部となり、液胞膜 PI4P を急増させることが示唆された。さらに、Stt4p を不活化すると融合が阻害された (図 2. 2-4、表 2-2) ことから、オートファゴソーム外膜 PF に Stt4p が生成した PI4P が、融合段階に重要な働きを持ち、融合後には液胞膜 PF の PI4P となることが期待される。

また現在まで、通常状態の出芽酵母では、液胞膜 PF に PI4P が局在することが示されてきた [130]。しかしながら、マクロオートファジー誘発条件では、液胞膜 EF (図 2. 2-8D) にも PI4P が分布し、これらの PI4P はオートファゴソーム外膜 EF (図 2. 2-2) 由来であると推定できる。生理的条件においてもマクロオートファジーが起こることを考慮すると、液胞膜 EF に PI4P が全く分布しないことは、矛盾である。液胞膜 EF から PF に PI4P を移動させるメカニズム、あるいは、液胞との融合時に、オートファゴソーム外膜 EF の PI4P を減少させるメカニズムの存在が考えられる。このメカニズムには、フリッパーゼ、フロッパーゼ、スクランブラーゼ、脂質転移酵素による脂質移動や、酵素の誘導など、様々な可能性があげられる。今後、より詳細な検討を行うことで、PI4P 局在メカニズムを明らかにし、マクロオートファジー制御機構を解明することができると期待する。

2.5 結論

本研究では、出芽酵母オートファゴソーム膜において、PI4P 局在は哺乳類と真逆であり、EF に局在することが明らかとなった。さらに、PI4K である Pik1p 由来の PI4P がオートファゴソームの形成、Stt4p 由来の PI4P がオートファゴソームと液胞との融合に働くことが分かった。以上の結果と、我々の最近の報告から、PI4P の生成・脱リン酸化によるターンオーバーがマクロオートファジーに必須であることが示唆された。また、融合段階では、オートファゴソーム外膜 PF の PI4P が急増したことから、Stt4p によって生成された外膜 PF の PI4P が融合に役割を担うことが考えられる。マクロオートファジーにおける PI4P の動態に関するさらなる研究が、マクロオートファジー制御に役立つことが期待される。

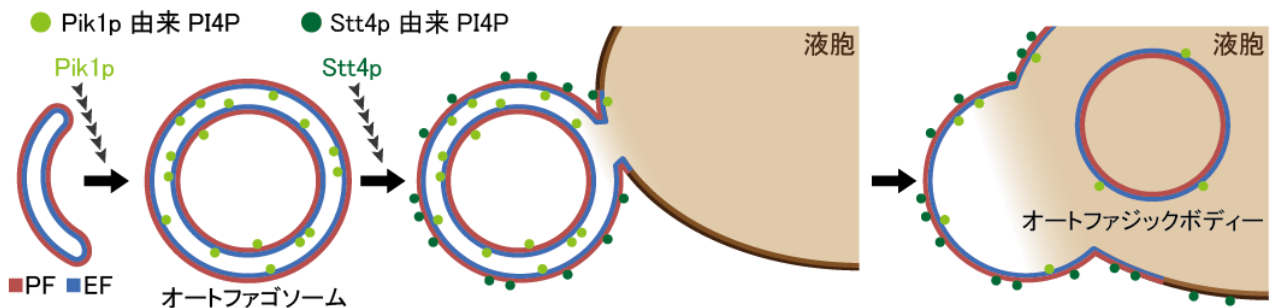


図 2.2-9 マクロオートファジーにおける PI4K (Pik1p、Stt4p) の働き

本研究によって、オートファゴソームの形成時に働く PI4P 生成に Pik1p、オートファゴソームと液胞との融合時に働く外膜 PF の PI4P 生成に Stt4p が働くことが示唆された。

〈3〉 出芽酵母ミクロリポファジーにおける PI4K (Pik1p、Stt4p) の役割

3.1 背景

第二章〈1〉〈2〉では、3種類的主要なオートファジー経路(図1-6)の内、最も古くから研究されてきたマクロオートファジーについて、PI4Pの役割解明を目的とした。第二章〈3〉では、ミクロオートファジーによる脂肪滴取り込み「ミクロリポファジー」におけるPI4Pの役割解明を目的とした。マクロオートファジーの分子機構については長い歴史を経て徐々に明らかになってきたが、ミクロオートファジーについては、ほとんどのメカニズムが現在も未解明である。

ミクロオートファジーは、液胞膜が直接陥入し、細胞成分を取り込み消化する経路である[106-108]。特に我々は、液胞膜の陥入によって脂肪滴(LD: lipid droplet)を消化するミクロリポファジーに着目した。脂肪滴は、脂質を脂肪酸として内に貯蔵する。脂質は、代謝エネルギーの蓄積や、シグナル伝達経路、構造維持に重要な生体膜を構成するなど、生命維持に必須である。しかしながら、脂質の過度な蓄積は、脂肪毒性を引き起こし、病的な状態を引き起こす[170, 171]。長い間、単なる脂肪の細胞質内封入体と認識されてきた脂肪滴は、脂質およびエネルギー恒常性に重要な機能を持つオルガネラとして、近年特に注目されている[172-174]。

脂肪滴はコレステロールエステル(CE)、ジアシルグリセロール(DAG)、トリアシルグリセロール(TAG)などの脂質エステルでつくられるコア部分が体積の大部分を占め、表面はリン脂質一重層で覆われている[175]。脂肪滴の形成は小胞体で行われる。小胞体に分布する脂肪酸合成酵素によってTAGが合成され、小胞体の脂質二重層間に蓄積することで、脂肪滴の初期構造が形成される[176]。この構造が拡大し、出芽する。小胞体膜との架橋を介した脂肪小滴へのTAGの転移や、脂肪小滴表面でのTAG合成によってさらに拡大し、脂肪滴が完成する。脂肪滴は脂肪細胞や脂肪肝などで顕著な構造であるが、ほとんどの組織の細胞に存在し、脂質の貯蔵と、必要に応じた分解によるエネルギー産生、脂質合成、熱産生などに関与する。さらに、非アルコール性脂肪肝疾患、神経変性、ウイルスなど病原体の感染、癌、循環器疾患などの様々な疾患との関連が明らかになってきた[177]。ミクロリポファジーによる脂肪滴分解は、細胞内における脂肪の過度な蓄積を防ぎ、生体内の脂肪の適切な種類・量のバランスを保つために重要である。しかしながら、その詳細な機序は未だ不明な点がほとんどである。

現在まで、ESCRT(Endosomal Sorting Complex Required for Transport)がミクロリポファジーに必要であるという報告がされてきた[109]。ESCRTは通常、エンドソームで機能し、エンドソーム膜を陥入させることで細胞質成分の取り込みに寄与することが知られている。一方でミクロリポファジーにはESCRTの1つであるVps27(Vacuolar Protein Sorting 27)が必須であり、ミクロリポファジー誘導時には、液胞膜上にリクルートされることが示された[109]。つまり、エンドソーム膜と同様に、ESCRTが液胞膜を陥入させ、脂

肪滴を液胞内に取り込むことが期待されている。しかし、その関連分子、分子機序、ミクロリポファジー小胞を構成する脂質や、液胞膜陥入時の脂質供給についてなど、未だ不明な点が数多く残されている。そこで本研究では、ミクロリポファジーのさらなる分子機序の解明を目指し、ミクロリポファジー小胞膜の主要構成要素である脂質に着目し、その分布を明らかにするため、実験を行った。

第二章<1><2>に示したように、マクロオートファゴソームにおいては、ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) が哺乳類で細胞質側 (PF: Protoplasmic Face)、出芽酵母で管腔側 (EF: Exoplasmic Face) に局在し、PI4P がマクロオートファジーに必須の要素であることが示された。そこで本研究では、ミクロリポファジーにおける PI4P の直接的関与を期待し、急速凍結・凍結切断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を用いたミクロリポファジー小胞膜上の PI4P 微細局在解析を行った。これにより、PI4P、および、PI4P を生成する PI4 キナーゼ (PI4K) のミクロリポファジーにおける役割を検討し、ミクロリポファジーの詳細な分子機序解明を目指した。

3.2 材料及び方法

3.2.1 抗体、プローブ

一次抗体として、マウス抗 PI4P モノクローナル IgM 抗体を、Echelon Biosciences (Salt lake city, UT, USA) から購入した。二次抗体として、10 nm 金コロイド結合抗マウス IgM 抗体を BioCell (Cardiff, UK) から購入した。ホスホリパーゼ C (PLC) - δ 1 PH (pleckstrin homology) ドメインを含むグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合たんぱく質 (GST-PH) を *Escherichia coli* に発現させ、グルタチオンアガロース樹脂 (Sigma) によって精製した。PH ドメインは、GST-PLC δ 1 PH 融合たんぱくをプロテアーゼで切断することにより得た (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)。

3.2.2 出芽酵母株

AAY102 株は Cornell University の Dr. Scott D. Emr から譲渡していただき、AAY104 株はナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から譲り受けた [22]。出芽酵母は YPD 培地 (1% Yeast Extract, 2% Bacto Peptone, 2% dextrose) 中で、対数期または静止期まで 30°C で培養した。すべての出芽酵母株は親株である *Saccharomyces cerevisiae* SEY6210 (*MAT α leu2-3, 112 ura3-52 his3- Δ 200 trp1- Δ 901 suc2- Δ 9 lys2-801; GAL*) に由来している (表 3-1)。本研究で作製した遺伝子欠損変異体は、pUG6 を鋳型とした PCR に基づいた遺伝子導入技術を用いて作製した [147]。静止期のリポファジーを起こすために、出芽酵母 (OD600 = 約 0.15) を synthetic complete (SC) 培地 (0.67% yeast nitrogen base, amino acids, 2% dextrose) 中で 30°C、65~70 時間培養した。また、マクロオートファジーを誘発するため、YPD 液体培地で培養した出芽酵母 (OD600 = 約 1.0) を水で洗浄し、窒素/炭素欠損 S (-

NC) 培地 (0.17% Yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate; Bacton Dickison) で、3~5 時間 30°C でインキュベートした。S (-NC) 培地には、セリンプロテアーゼ阻害剤である、1 mM フェニルメチルスルフォニルフロライド (PMSF; Sigma) を添加し、液胞内構造物を蓄積させ、マイクロポファジー小胞を観察した。使用した出芽酵母株は表 3-1 に示した。

株名	遺伝子型	出展/研究
SEY6210	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ 200 trp1-Δ 901 suc2-Δ 9 lys2-801; GAL</i>	[148]
AAY102	SEY6210; <i>stt4Δ::HIS3</i> carrying pRS415 <i>stt4-4</i> (<i>LEU2 CEN6 stt4-4</i>)	[22]
AAY104	SEY6210; <i>pik1Δ::HIS3</i> carrying pRS314 <i>pik1-83</i> (<i>TRP1 CEN6 pik1-83</i>)	[22]
AKF001	SEY6210; <i>lsb6Δ::KanMX</i>	本研究
AKF010	SEY6210; <i>vps27Δ::KanMX</i>	本研究

表 3-1 本研究で用いた出芽酵母株 *S. cerevisiae* とその遺伝子型、出展の一覧

3.2.3 急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法 (図 2.1-3) [123]

a. 凍結法

第三章<2>2.2.4 と同様に、メタルサンドウィッチ法を用いて、出芽酵母を凍結した。少量の出芽酵母ペレットを銅箔にのせ、薄い金箔で覆った (面積~4 mm²、厚さ 20 μ m)。そして、液体窒素で予冷した 2 つの金メッキ銅ブロック間で挟むことによって凍結した [126, 149]。

b. 凍結割断

第三章<1>1.2.4 と同様の手順で、凍結サンプルを Balzers BAF400 装置 (Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein) を用いて、-130°C、 1×10^{-6} millibars 真空下で脂質二重層の間で割断した。レプリカの厚さを結晶厚モニタによって制御しながら (EM QSG100; Leica)、露出面に白金と炭素を真空蒸着した。解凍した試料を、2.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) /0.1 M トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl、pH 8.0) 中で、60~70°C で一晩処置した。

c. 出芽酵母細胞壁溶解

第三章<2>2.2.4 と同様に、0.1 M Tris-HCl (pH 8.0) 中 2.5% SDS 溶液中で、60~70°C で一晩処理することで、トラップされた細胞膜分子のみをレプリカに残した。さらに出芽酵母の細胞壁を溶解するため、0.1% Triton X-100、1% 牛血清アルブミン (Bovine serum albumin: BSA)、プロテアーゼインヒビターカクテル (Nacalai Tesque) 含有リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) 中の 1 mg/mL Zymolyase 20T で、37°C で 2 時間処理した。続いて 2.5% SDS 溶液で処理し、標識に用い

るまで 50%グリセロール中に -30°C で保存した。

3.2.4 抗体標識・電子顕微鏡観察

第三章<2>2.2.5と同様に、3% BSA/PBSにより30分室温でブロックしたレプリカを、0.1% BSA/PBSで1度洗浄後、PLC- δ 1 PHドメイン(1 mg/mL)で処置した(図 2.1-2)。一次抗体と 4°C で一晩インキュベートし、0.1% BSA/PBSで4度洗浄し、二次抗体と 37°C で30分インキュベートした。その後レプリカを0.1% BSA/PBSで4度洗浄し、蒸留水で3度洗浄し、ホルムバル膜EMグリッドに取り上げた。透過型電子顕微鏡(H7650, HITACHI)を80 kVで作動させ観察した。

3.2.5 ミクロリポファジー小胞の観察

QF-FRL法を用いて作製したレプリカのミクロリポファジー小胞を、透過型電子顕微鏡によって観察した。ミクロリポファジー小胞は、液胞膜が直接陥入し、基質を液胞内部へと取り込んだ構造であり、液胞内小胞として観察される(図 2.3-1)。QF-FRL法を用いて凍結切断したミクロリポファジー小胞は2通りの割れ方がある。電子顕微鏡写真においては、ミクロリポファジー小胞膜のEF、PFは小胞の凹凸によって判断した。

3.2.6 統計解析

上記の方法で3回以上実験を繰り返し、電子顕微鏡写真を取得し、解析に用いた。ImageJソフトウェア(National Institutes of Health(NIH))を用いて特定構造の面積を測定し、金コロイドの数を数えた。特定の構造における標識密度を、金コロイドの数と測定面積から計算した。正規性と等分散を確認し、Student-t検定で有意差を求めた。確認できない場合、Welchのt検定によって有意差を求めた。標本が多数の場合は、Dunnettの多重比較検定を用いて有意差を求めた。(p<0.05)

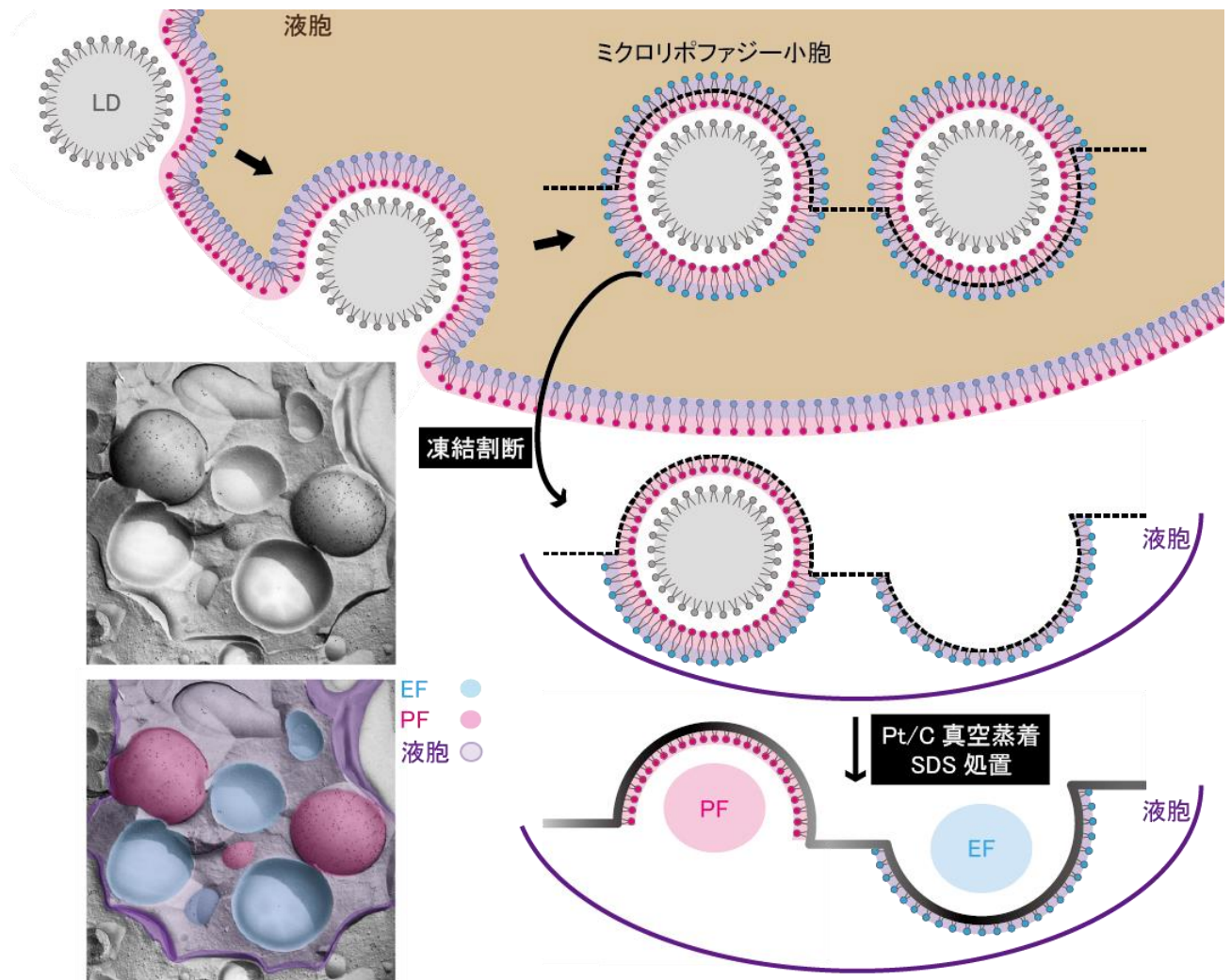


図 2.3-1 ミクロリポファジー小胞の観察方法

マイクロリポファジーでは、液胞膜が陥入して脂肪滴(LD:Lipid Droplet)を取り込むことで液胞内マイクロリポファジー小胞が形成される。QF-FRL 法では 2 通り割断パターンがある。電子顕微鏡写真の凹凸によって区別した。

3.3 結果

3.3.1 ミクロリポファジー小胞膜において、PI4P が PF に密に局在した

静止期の出芽酵母において、液胞膜上に膜内粒子 (IMPs: intramembrane particles) 欠損ラフト様ドメインが形成され幾何学パターンを示し (図 2.3-2A)、ミクロリポファジーが起こる [178, 179]。辻らは、液胞膜ラフト様ドメインとミクロリポファジーとの関係について、QF-FRL 法によって明確に示した [179]。彼らは、IMPs 欠損ラフト様ドメインが広がることでミクロリポファジーが起こることを発見した。この事実は、本研究でも確認できた。以前の我々の研究では、PI4P は液胞膜 PF において、IMPs が豊富に分布する部分ではなく、IMPs 欠損ラフト様ドメインにのみ局在することを報告した (図 2.3-2A) [130]。つまり、液胞膜が直接陥入し、液胞内ミクロリポファジー小胞となる際に、PI4P は、ミクロリポファジー小胞膜 PF に局在することが推察された。予想通り、長期培養によってミクロリポファジーを誘発した出芽酵母の液胞内小胞膜において、PI4P は PF に局在した (図 2.3-2B、D)。この PI4P 標識密度をその他の小器官膜上の密度と比較するため、0.2~5 mol% の PI4P を含む単層リポソームを用いた QF-FRL 法による PI4P 抗体標識実験を行ったところ、標識密度が高いほど PI4P 含有量が高い結果となった (図 2.3-3)。リポソームにおける標識密度を基準とすると、ミクロリポファジー小胞膜 PF の PI4P 含有量は 5% を超えることが推定された。これは、マクロオートファゴソーム膜 EF (図 2.2-2) の標識密度や、液胞膜 PF の PI4P 標識密度 ($14\sim 16 \text{ Gold}/\mu\text{m}^2$) [130] から推定する PI4P 含有量と比べて極めて高かった。この PI4P の非対称性分布は、第二章<2>において示した、出芽酵母のマクロオートファジーにおける膜構造での PI4P 局在とは真逆であった。オートファゴソームにおいては、内膜・外膜 EF に PI4P が高密度に局在した (図 2.2-2)。また、オートファジックボディーにおいて、PI4P はほとんど分布しなかったが、中でも PI4P が分布するオートファジックボディー膜では、PI4P は EF に局在した (図 2.2-3)。しかしながら本研究に示す静止期におけるミクロリポファジー小胞膜では、PI4P は PF に高密度に局在した (図 2.3-2B、D)。この結果を用いてマクロオートファゴソームとミクロリポファジー小胞を区別することが有用であると考えた。

そこで、PI4P が PF に密集する液胞内小胞がミクロリポファジー小胞であることを確認するため、ミクロリポファジーに必須である Vps27p を利用した。Vps27p は、ESCRT たんぱく質の 1 つである [109]。vps27 欠損株 (*vps27Δ*) の液胞内には、PI4P 局在小胞は観察されなかった (図 2.3-4)。さらに、液胞周囲には脂肪滴が集積した。したがって、PI4P 局在液胞内小胞はミクロリポファジー小胞であることが確かめられた。さらに、液胞膜上の拡張した IMPs 欠損ラフト様ドメインが脂肪滴を取り込む際の接触部位において、PI4P 標識の密集が観察された (図 2.3-2C)。一方、PI4P 標識は脂肪滴表面には検出されなかった。つまり、PI4P 局在ミクロリポファジー小胞膜は液胞膜 IMPs 欠損ラフト様ドメイン由来であることが示唆された。

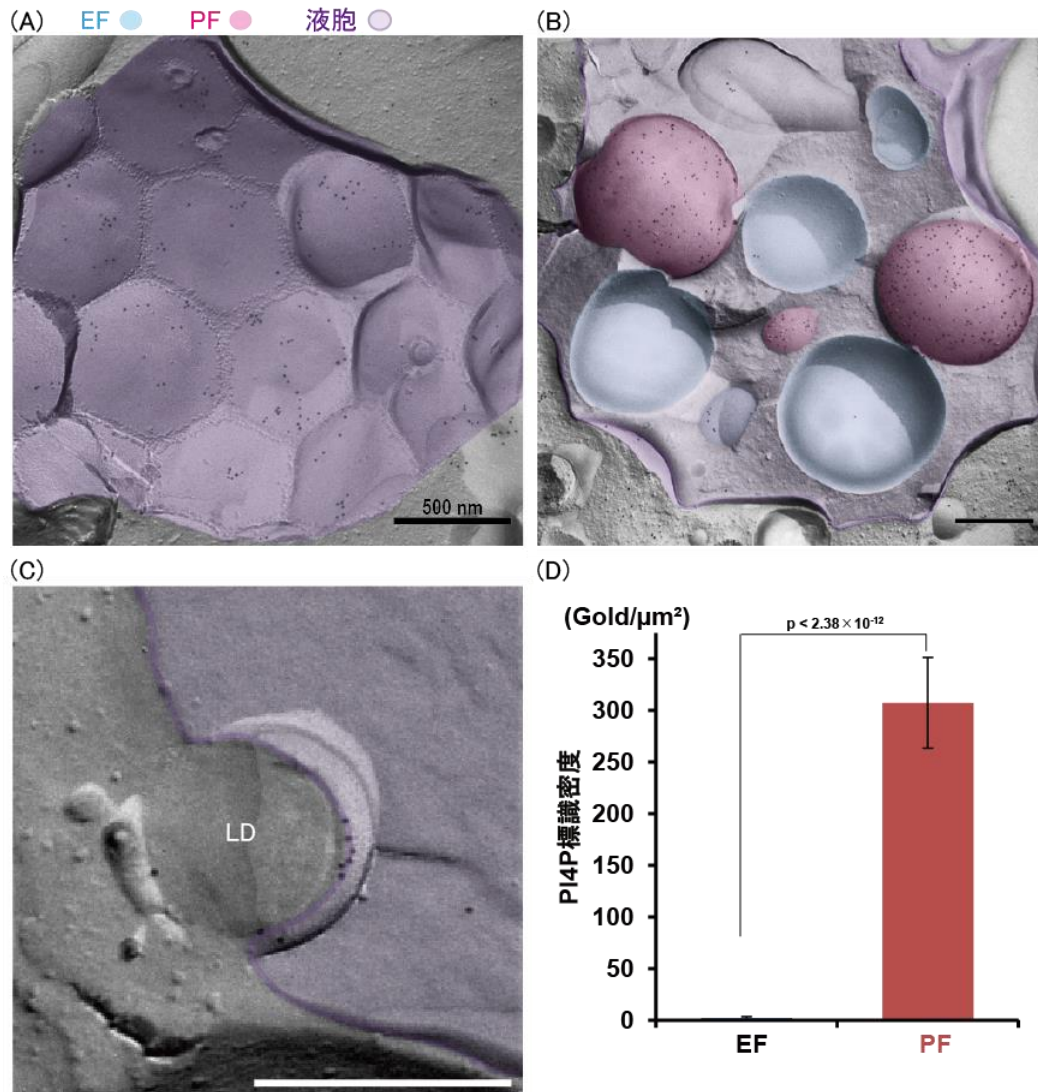


図 2.3-2 ミクロリポファジー誘発細胞における液胞、液胞内小胞の PI4P 局在

(A) 長期培養(30°C、70 時間)によってミクロリポファジーを誘発した液胞膜(紫)の電子顕微鏡写真。液胞膜ラフト様ドメインが幾何学模様を示しており、ラフト様ドメインが陥入することでミクロリポファジーが起こると知られている。PI4P はラフト様ドメインにのみ局在した。(B)ミクロリポファジーを誘発した出芽酵母の液胞(紫)内小胞膜の EF(青)と PF(桃)の電子顕微鏡写真。PI4P はほとんど PF にのみ局在した。(C)液胞膜が陥入し脂肪滴(LD)を取り込む際の電子顕微鏡写真。PI4P は陥入部分に局在した。スケールバー:500 nm。(D)ミクロリポファジーを誘発した細胞の液胞内小胞膜における PI4P の EF、PF の標識密度をグラフで示した。ほとんどの PI4P が PF にのみ局在した。(p<0.05)

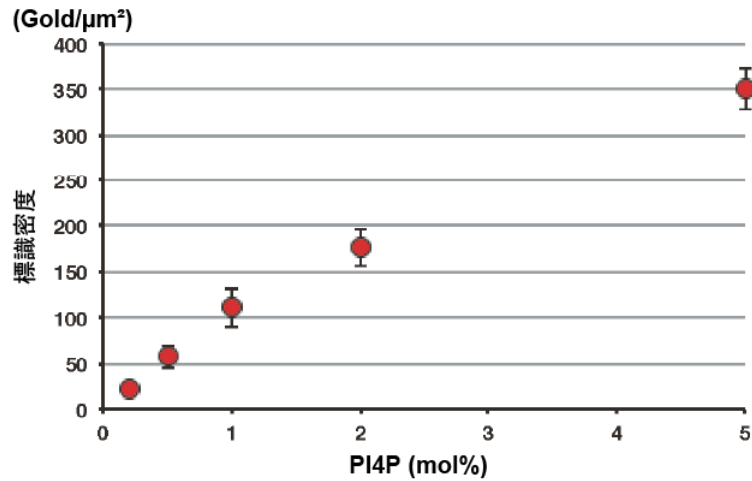


図 2.3-3 PI4P 含有リポソームにおける標識密度

PI4P を 0.2~5 mol%含むリポソームにおいて、その標識密度を計測し、グラフに示した。PI4P 含有量が多いほど標識密度は高く、マイクロリポファジーを誘発した液胞内小胞の PI4P 標識密度 (260~350 Gold/μm²) では、5 mol%以上の PI4P 含有量を持つと推定される。

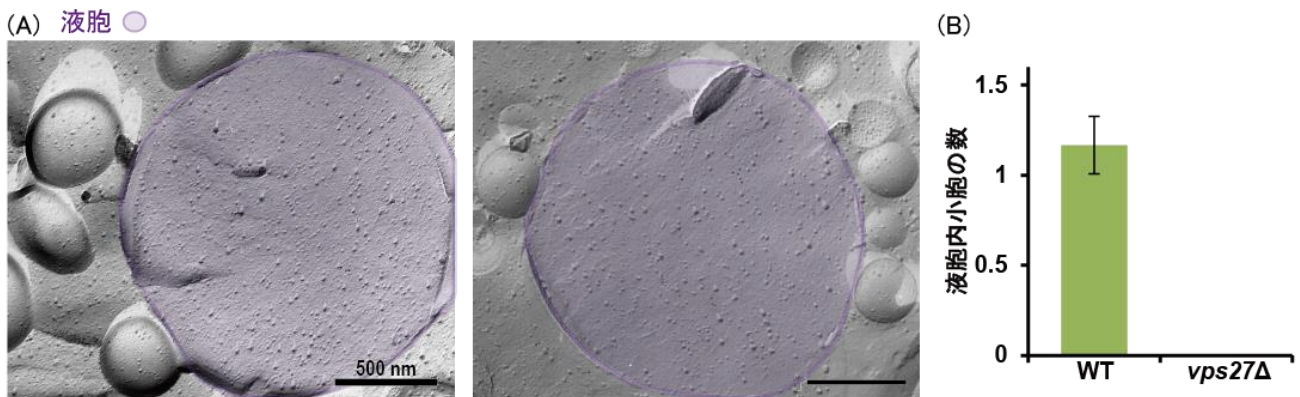


図 2.3-4 *vps27*欠損株におけるマイクロリポファジー小胞

Vps27p 遺伝子欠損株 (*vps27Δ*) を用いて、長期培養 (30°C、70 時間) によってマイクロリポファジーを誘発し、液胞内小胞を観察した。(A) 電子顕微鏡写真。液胞 (紫) 内には PI4P 局在小胞は観察されず、液胞周囲に脂肪滴の蓄積が観察された。スケールバー: 500 nm。(B) 液胞内小胞の数を野生株 (WT) と *vps27Δ* とで比較しグラフに示した。*vps27Δ* では、液胞内小胞は全くみられなかった。

3.3.2 ミクロリポファジーにおいて、Pik1p、Stt4p が重要な役割をもつ

PI4P は、ホスファチジルイノシトール (PI) のイノシトール環第 4 位が PI4K によってリン酸化されて生成するリン脂質である。先行研究では、PI4K である Pik1p、Stt4p は出芽酵母において、選択的・非選択的マクロオートファジーに重要であると報告された[102-104, 131]。本研究では、PI4P 局在ミクロリポファジー小胞における PI4P の詳細な役割について深く検討するため、Pik1p、Stt4p の温度感受性株 (*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*) を用いた。温度感受性株は、制限温度 (38°C) で培養することにより、たんぱく質が不活化される株である。この方法を用いて、Pik1p、Stt4p それぞれの不活化条件における、液胞内小胞の形態を観察した。

PI4P 局在小胞は、Pik1p の不活化条件 (*pik1^{ts}*、38°C) において著しく減少し、Stt4p 不活化条件 (*stt4^{ts}*、38°C) においては全く観察されなかった (図 2.3-5A、B、C)。また、Pik1p 不活化条件で観察された PI4P 局在小胞のサイズは、特に顕著な縮小がみられた (0.2~0.4 μm) (図 2.3-5A、F)。しかし、脂肪滴を内包するミクロリポファジー小胞は脂肪滴のサイズ (0.4~0.6 μm) 以上であることが推察される。さらに、Pik1p 不活化条件において観察された PI4P 局在小胞における PI4P 標識密度は、野生株 (WT) と比較して有意に低かった (図 2.3-5D)。そのため、Pik1p 不活化条件で観察された PI4P 局在小胞がミクロリポファジー小胞である可能性は低い。

また、*pik1^{ts}* の制限温度 (38°C) で観察された PI4P 局在小胞の数・サイズの減少は、許容温度 (26°C) でも同様に観察され、*stt4^{ts}* の許容温度 (26°C) においても、制限温度 (38°C) での結果と同様に、PI4P 局在小胞は消失した。温度感受性株の許容温度 (26°C) で Pik1p、Stt4p の活性が低下したという以前の報告[22]から、本実験の許容温度 (26°C) では Pik1p、Stt4p の活性が低下していたことが考えられる。さらに、*pik1^{ts}* の制限温度 (38°C) では、液胞内に PI4P 非局在微小小胞が多数観察された (図 2.3-5A、E)。

一方、Pik1p、Stt4p に対して、もう 1 つの PI4K である Lsb6p 遺伝子を欠損させた株 (*lsb6Δ*) を用いて同様の実験を行ったところ、野生株 (WT) とほとんど同様の結果が得られた (図 2.3-6)。そのため、Lsb6p はミクロリポファジーに重要でないことが分かった。

以上の結果は、Pik1p、Stt4p 両方の PI4K がミクロリポファジーに必要であることを示唆している。

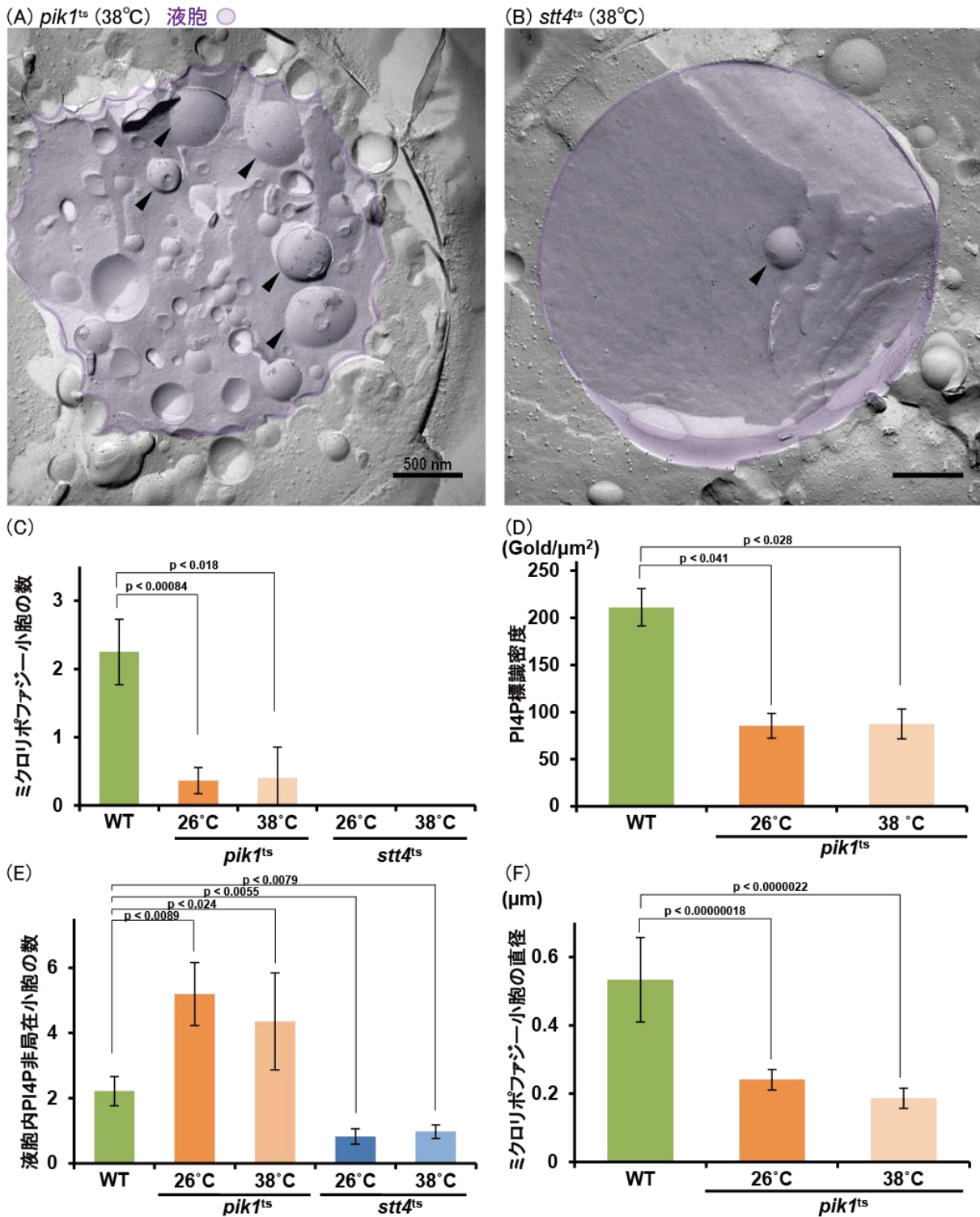


図 2.3-5 PI4K(Pik1p、Stt4p)温度感受性株におけるマイクロポファジー小胞

PI4K(Pik1p、Stt4p)温度感受性株(*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*)を用いて、長期培養(30°C、70 時間)によってマイクロポファジーを誘発し、PI4P 局在マイクロポファジー小胞を観察した。Pik1p(A)、Stt4p(B)不活化条件での電子顕微鏡写真。PI4P 局在小胞:黒矢頭。スケールバー:500 nm。(C)PI4P 局在小胞の数、(D)PI4P 標識密度、(E)PI4P 非局在小胞の数、(F)マイクロポファジー小胞の直径をグラフで示した。*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*ではマイクロポファジーの数が減少し、*pik1^{ts}*では小胞サイズが縮小した。(p<0.05)

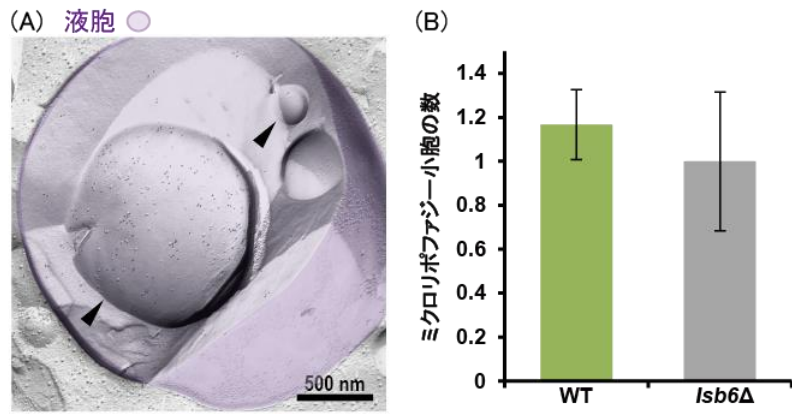


図 2.3-6 PI4K(Lsb6p) 遺伝子欠損株におけるマイクロポファジー小胞

PI4K(Lsb6p) 遺伝子欠損株 (*lsb6Δ*) 用いて、長期培養 (30°C、70 時間) によってマイクロポファジーを誘発し、PI4P 局在マイクロポファジー小胞を観察した。(A) *lsb6Δ* の電子顕微鏡写真。液胞 (紫) 内 PI4P 局在マイクロポファジー小胞を黒矢頭で示した。スケールバー: 500 nm。(B) 電子顕微鏡写真を解析し、PI4P 局在マイクロポファジー小胞の数を野生株 (WT) と比較してグラフで示した。WT と *lsb6Δ* では有意な差はみられなかった。

3.3.3 飢餓条件においても、PI4P 依存性マイクロリポファジーは起こる

上述の実験では、静止期の出芽酵母におけるマイクロリポファジーを観察した。マイクロリポファジーに関する報告では、マクロオートファジーが誘発される飢餓条件においても、脂肪滴はマイクロオートファジーによって液胞へ取り込まれることが示された[180]。この現象に PI4P、また PI4K が必要であるか検討するため、飢餓条件においた出芽酵母を用いて実験を行った。

マクロオートファジーを誘発した飢餓条件下の出芽酵母には、オートファゴソーム、液胞内オートファジックボディーに加えて、PF に PI4P が高密度に局在する小胞が観察された (図 2.3-7A)。マイクロリポファジーに必須である Vps27p 遺伝子を欠損させると PI4P 局在小胞が消失した (図 2.3-7B、D) ため、これらの PI4P 局在小胞は、マイクロリポファジーによるものであると確かめられた。したがって、PI4P 局在マイクロリポファジー小胞の形成は、飢餓条件下でも起こることが明らかとなった。

次に、飢餓条件における PI4K の関与について調べるため、Pik1p、Stt4p それぞれの温度感受性株 (*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*) を用いて実験を行った。その結果、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* それぞれの許容温度 (26°C)、制限温度 (38°C) において、PI4P 局在マイクロリポファジー小胞はほとんど消失した (図 2.3-8)。さらに、第二章<2>では PI4K の不活化条件でマクロオートファジーが抑制されたことを示したように、液胞内オートファジックボディーもまた、観察されなかった (図 2.3-8A、B)。つまり、飢餓条件において、Pik1p、Stt4p はマクロオートファジーだけでなく、マイクロリポファジーにも必須であることが示された。一方で、Lsb6p 遺伝子欠損株 (*lsb6Δ*) についても、同様に飢餓条件下での実験を行うも、野生株との差は全くみられなかった (図 2.3-9)。つまり、Lsb6p はマクロオートファジー誘発条件においても、マイクロリポファジー小胞の形成には関与しないことが明らかとなった。

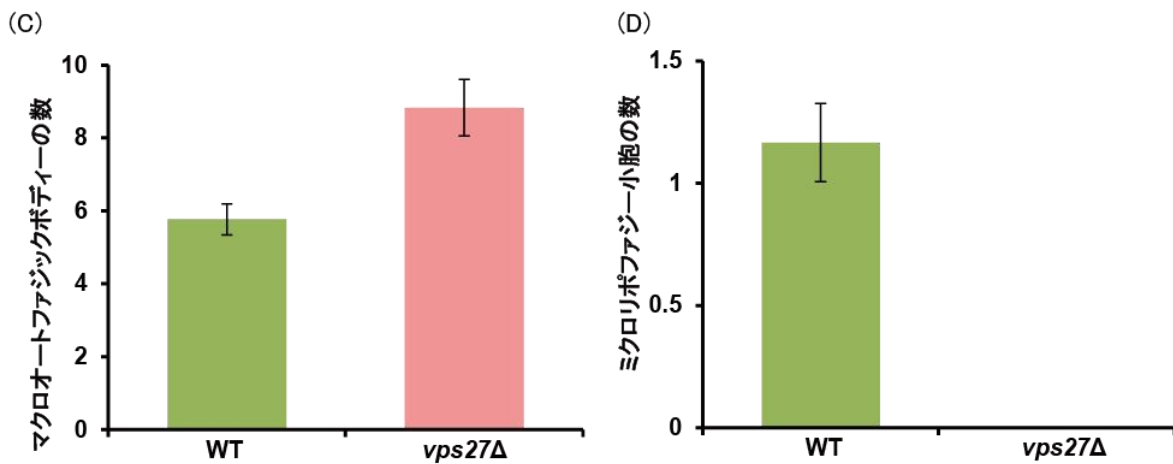
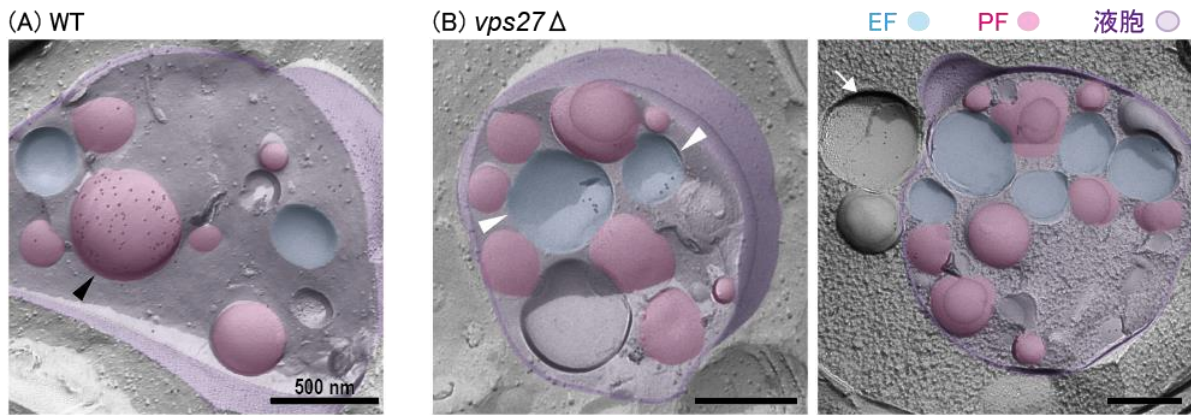


図 2.3-7 マクロオートファジー誘発条件におけるマイクロリポファジー小胞

飢餓(S(-)NC)培地中で 30°C、5 時間培養)によるマクロオートファジー誘発条件に野生株(WT)と Vps27p 遺伝子欠損株 (*vps27Δ*)をおき、液胞内マクロオートファジックボディー・マイクロリポファジー小胞を観察した。WT (A)、*vps27Δ* (B)の液胞内電子顕微鏡写真。WT では PI4P 局在マイクロリポファジー小胞(黒矢頭)が観察されたが、*vps27Δ*では PI4P が EF に局在するマクロオートファジックボディー(白矢頭)や、マクロオートファゴソーム(白矢印)が観察された。スケールバー:500 nm。マクロオートファジックボディーの数(C)、マイクロリポファジー小胞の数(D)を WT、*vps27Δ*で比較しグラフに示した。マクロオートファジーを誘発するための飢餓条件においても、Vps27p 依存性のマイクロリポファジーは起こっていた。

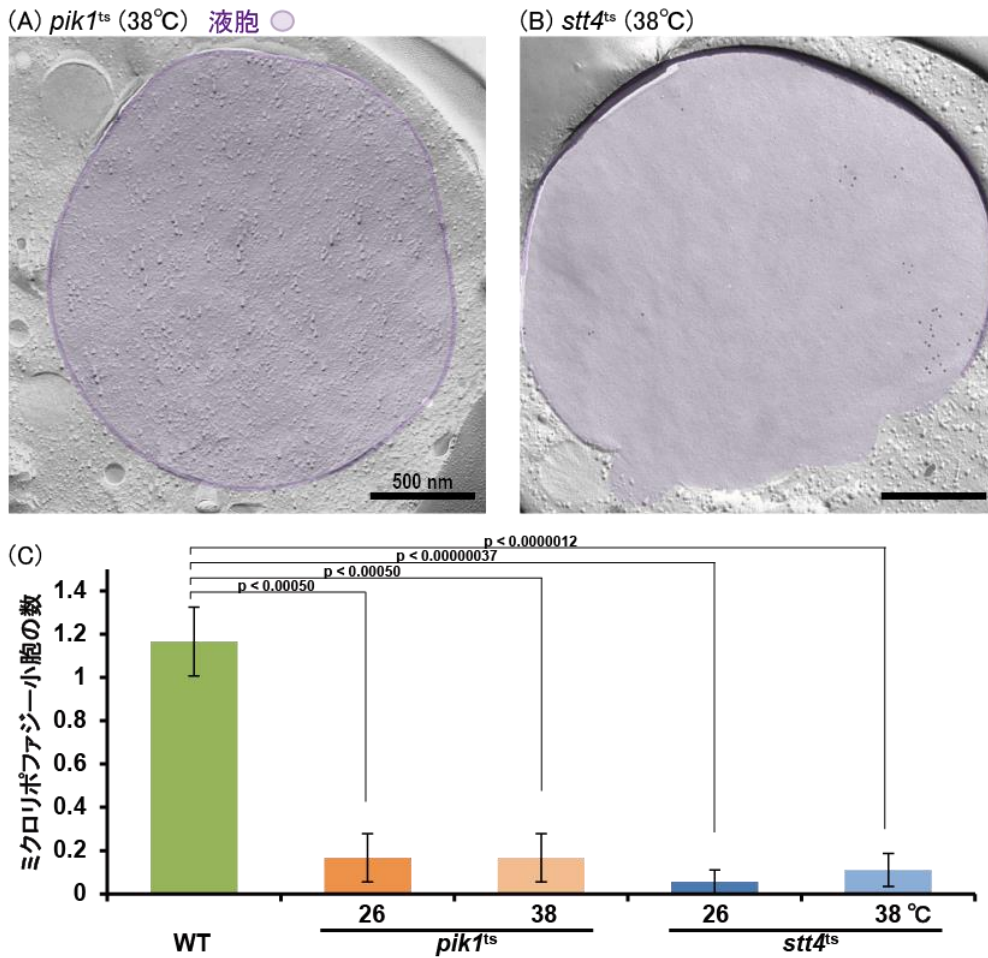


図 2.3-8 PI4K(Pik1p、Stt4p)温度感受性株における、飢餓条件下でのマイクロポファジー小胞

PI4K(Pik1p、Stt4p)温度感受性株(*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*)を用いて、飢餓(S(-NC)培地中で30°C、5時間培養)によるマクロオートファジー誘発条件での、液胞内マイクロポファジー小胞を観察した。*pik1^{ts}*(A)、*stt4^{ts}*(B)の38°Cでの不活化条件における液胞内電子顕微鏡写真。液胞(紫)内には、マクロオートファジーによるオートファジックボディーや、PI4P局在マイクロポファジー小胞は確認されなかった。スケールバー:500 nm。(C)電子顕微鏡写真を解析し、PI4P局在マイクロポファジー小胞の数を野生株(WT)、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*を比較しグラフに示した。マクロオートファジーを誘発する飢餓条件下においても、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*ではマイクロポファジー小胞が減少した。(p<0.05)

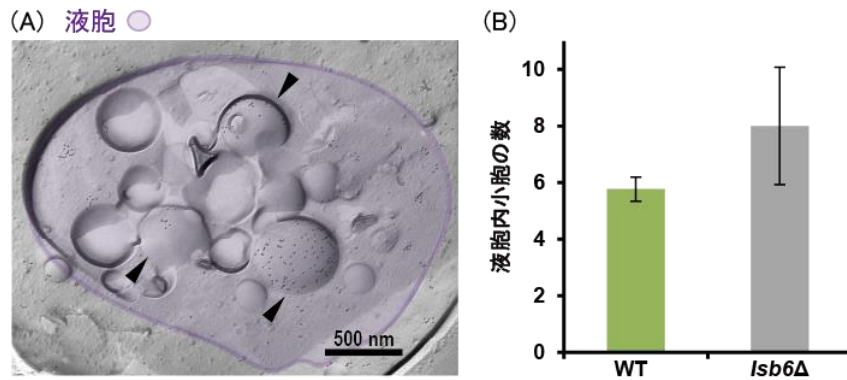


図 2.3-9 PI4K(Lsb6p) 遺伝子欠損株における、マクロオートファジー誘発条件下での液胞内小胞

PI4K(Lsb6p) 遺伝子欠損株 (*Lsb6Δ*) 用いて、飢餓(S(-)NC)培地中で 30°C、5 時間培養)によるマクロオートファジー誘発条件下での液胞内小胞を観察した。(A) *Lsb6Δ* の電子顕微鏡写真。黒矢頭: 液胞(紫)内 PI4P 局在マイクロリポファジー小胞。スケールバー: 500 nm。(B) 電子顕微鏡写真を解析し、液胞内小胞の数を野生株(WT)と比較してグラフで示した。WT と *Lsb6Δ* との有意な差は見られなかった。

3.4 考察

本研究では、以下の画期的な事象が明らかとなった。

- (1) PI4P はマイクロリポファジー小胞膜の PF に高密度に局在し、マクロオートファジーでみられる膜構造 EF における PI4P 局在とは真逆であった。
- (2) PI4P を生成する PI4K の内、Pik1p、Stt4p それぞれの働きがマイクロリポファジーに必須であった。
- (3) PI4K の内、Lsb6p はマイクロリポファジー小胞形成に関与しなかった。
- (4) PI4K 依存性マイクロリポファジーは、マクロオートファジー誘発条件においても起こった。

第二章<1>、<2>では、PI4K である Pik1p、Stt4p がマクロオートファジーに重要な働きを持つ因子であることが明らかとなった。本研究では、Pik1p、Stt4p がマクロオートファジーだけでなく、マイクロオートファジーによる脂肪滴取り込み「マイクロリポファジー」にも重要な役割を持つことが示された。

3.4.1 PI4P はマイクロリポファジーに重要な役割を担う

マイクロリポファジーによる脂肪滴取り込みは、段階的に行われる。まず、(1)液胞膜に IMPs 欠損ラフト様ドメインが形成される。次に、(2)細胞質の脂肪滴と、液胞膜ラフト様ドメインが接触する。そして、(3)液胞膜が陥入し脂肪滴が取り込まれ、(4)マイクロリポファジー小胞が液胞内部に形成される。最終的に、(5)液胞内消化酵素によって、取り込まれた液胞膜由来の小胞膜・脂肪滴が消化される。以上のマイクロリポファジー経路において、液胞膜ダイナミクスが重要であることが分かる。

液胞膜上の IMPs 欠損ラフト様ドメインは、ステロールが高密度に分布するドメインである [184]。ステロールは膜の物理化学的特性に影響を与え、また、2つの膜リーフレット間の迅速な移動（フリップ・フロップ）を可能にする。ステロールは小胞体で形成されるが、それぞれの細胞内小器官において、不均一に分布する [185]。この不均一な分布は、他脂質成分のステロール安定化能力の違いによるものに加え、各細胞小器官間での特異的なステロール輸送によって形成される。ステロールの細胞内輸送は、小胞・非小胞輸送経路によるが、非小胞性の経路が主である [184, 186]。

近年、出芽酵母において、IMPs 欠損ラフト様ドメインの拡張に、ステロールトランスポーターである NPC (Niemann-pick type C) たんぱく質 (NPC1、NPC2) が重要であることが示された [179]。NPC たんぱく質は、コレステロールを細胞内の異なるコンパートメントに移動させる役割をもつ [181, 182]。これらたんぱく質の変位は、重度の神経症状を特徴とするニーマンピック病 C 型を引き起こす [183]。NPC たんぱく質がラフト様ドメインの拡張に重要であり、マイクロリポファジーによる脂肪代謝に必須であることが明らかとなった。つまり、NPC たんぱく質によって液胞膜にステロールが輸送されることが、マイクロリポファジーに重要であることが確かめられた。一方で、IMPs 欠損ラフト様ドメインは、NPC 遺伝子欠損細胞においても、野生株 (WT) に比べて少ないレベルで存在した。つまり、IMPs 欠損ラフト様

ドメインの形成には、NPC たんぱく質とは別メカニズムの存在が考えられた[179]。

別メカニズムとして、細胞小器官間でのステロール非小胞輸送に関与するたんぱく質である、脂質輸送たんぱく質 (LTPs: lipid transfer proteins) [187]の存在が考えられる。これまで、セラミドを輸送する CERT (ceramide transfer protein) [188]や、コレステロールを輸送する OSBP (oxysterol binding protein) [189-191]など、膜接触部位で機能する LTPs について精査されてきた。OSBP は、哺乳類では 12 種類の ORP (OSBP related proteins)、出芽酵母では 7 種類の Osh (OSBP homolog) たんぱく質ファミリーである。特に、Osh4p は出芽酵母における最も豊富な Osh たんぱく質である[192]。Osh4p は、細胞小器官の膜間において、特にステロールと PI4P を交換する可能性が示されている[190, 193-195]。本研究では、PI4P は液胞の IMPs 欠損ラフト様ドメインにのみ局在することが確認された(図 2.3-2A)。さらに我々は以前、IMPs 欠損ラフト様ドメインにおける PI4P クラスターの大きさは、IMPs 欠損ラフト様ドメインの大きさと共に増加することを示唆する結果を示した[130]。脂肪滴膜にはステロールが高密度に分布する[196, 197]ことから、PI4P は Osh4p などの LTPs を介して脂肪滴膜から液胞膜にステロールを輸送することで、IMPs 欠損ラフト様ドメインの拡張に役割を担うことが推測できる。

また、Pik1p、Stt4p を不活化した実験における結果(図 2.3-5) から、Pik1p、Stt4p 両方の PI4K が PI4P 機能に必須であることが示された。さらに、飢餓条件下でも PI4P 局在マイクロリポファジー小胞が観察された。つまり、飢餓条件下で誘発されたマクロオートファジーと同時に、マイクロリポファジーが起こり、Pik1p、Stt4p が重要な役割を持つことが分かった。

マクロオートファジー、マイクロリポファジーにおいて Pik1p、Stt4p によって PI4P が生成されることは、経路の正常な進行に必須であり(図 2.3-10)、マイクロリポファジーでは、PI4P や PI4K と、液胞膜のラフト様ドメインの拡張との関連が期待される。今後、LTPs などのマイクロリポファジー関連分子と PI4P との作用についてのより深い検討が必要となる。

3.5 結論

本研究では、マイクロオートファジーによる脂肪滴取り込み「マイクロリポファジー」における PI4P の関与について検討し、PI4P、ならびに PI4K の重要な役割が明らかとなった。さらに、液胞膜、脂肪滴膜間における PI4P とステロールの脂質輸送がマイクロリポファジーに必要である可能性が示唆された。ミトコンドリア [198]、細胞質 [199]、小胞体 [200]、ペルオキシソーム [201]、核 [202] など、脂肪滴以外の様々な細胞小器官がマイクロオートファジーによる消化を受けることが報告されている。これらの選択的マイクロオートファジーにおいても、QF-FRL 法を用いた解析によって、PI4P の重要な役割が明らかになることが期待できる。しかしながら、細胞内において Stt4p 由来の PI4P は細胞膜、Pik1p 由来の PI4P はゴルジ体膜に分布するが、これらの PI4K、PI4P がどのようにオートファジー経路に働くか、その動態は未だ突き止められていない。今後、PI4P のより詳細な役割を解明し、オートファジー経路を制御する因子を特定するため、PI4P の動態について、検討をより一層深める必要がある。

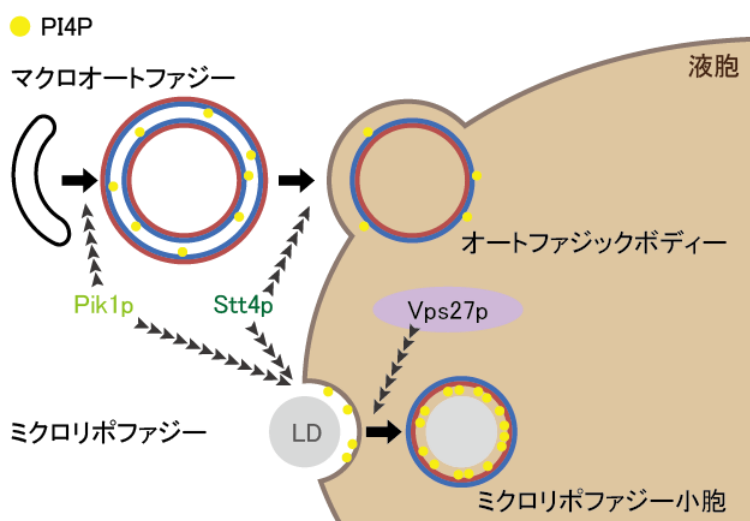


図 2.3-10 ミクロリポファジー、マクロオートファジーと PI4K (Pik1p、Stt4p) の関連

本研究では、液胞内マイクロリポファジー小胞はマクロオートファジックボディーとは異なり、小胞膜 PF において高密度に PI4P が局在する構造であることが明らかとなった。さらに、マイクロリポファジー経路にはマクロオートファジーと同様に Pik1p、Stt4p が必要であることが示された。

<4> 出芽酵母細胞膜における PI4K (Pik1p、Stt4p) の PI4P、PI(4,5)P₂生成への寄与

4.1 背景

細胞膜は、細胞を包む生体膜であり、内部を保護するとともに細胞の形を維持し、細胞の内と外を隔て、細胞内外の物質の出入りを調節する役割を持つ。細胞膜は、リン脂質の親水性頭部が外に、疎水性尾部が内側に向いたリン脂質二重層 (図 1-2) と、膜たんぱく質から形成される。そのため、親水性のイオンなどは膜を通過できない。物質の細胞内外のやり取りは、細胞膜に埋め込まれたチャネルや膜輸送たんぱく質 (トランスポーター) による輸送と、小胞輸送によるものがある。イオンなどの低分子物質は、チャネルやトランスポーターなど、膜たんぱく質の働きによって輸送される。チャネルは輸送基質自体が持つ電気化学的な勾配によって受動輸送される。トランスポーターでは、ATP を利用した構造変化により能動輸送が行われる [203]。高分子物質については、細胞外から細胞内への輸送 (エンドサイトーシス)、細胞内から細胞外への輸送 (エキソサイトーシス) があり、いずれも、リン脂質膜からなる小胞が細胞内を移動する小胞輸送である [204]。以上のような細胞膜を介した輸送が正常に行われず、細胞内外の物質のバランスが崩れることで、様々な疾患が起こることが知られている。

生体膜たんぱく質については、流動モザイクモデル (図 1-1) が提唱されてから、急速に知見が集まり、詳細な機序が分かってきた。しかしながら、細胞膜を主に構成し、細胞内輸送小胞の主要構成要素でもある膜脂質に関しては、その詳細な役割や、分子機序、膜たんぱく質と膜脂質との関連や、膜脂質量の制御などについて、不明な点が数多く残されている。したがって、細胞膜脂質の分子機序や、細胞膜における役割を解明することは、様々な疾患の画期的な治療法を生み出すことにつながると期待できる。

そこで本研究では、近年重要な役割があることが知られてきた、ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) について、その分子機序を明らかにし、細胞膜における機能や役割を解明するため、急速凍結・凍結切断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を用いてその局在を解析した。PI4P はホスファチジルイノシトール (PI) が PI4 キナーゼ (PI4K) によってイノシトール環第 4 位がリン酸化されることで生成する。そして、PI4P のイノシトール環第 5 位が PI4P-5 キナーゼ (出芽酵母における Mss4p) によってリン酸化されることでホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI(4,5)P₂) が生成する (図 1-5)。PI(4,5)P₂ は細胞膜に分布し、イノシトール 3 リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DG) に加水分解されることで、セカンドメッセンジャーとして働く [205]。さらに、細胞膜 PI(4,5)P₂ と細胞膜のチャネルが作用することで、その機能が制御される [206]。また、PI(4,5)P₂ はエンドサイトーシスやエキソサイトーシスを制御することが分かっている [207]。このように多岐に渡る役割を持つ PI(4,5)P₂ の前駆体の役割を持つ脂質として、古来より PI4P が知られていた。しかしながら、細胞膜 PI4P の大部分は、PI(4,5)P₂ 生成にほとんど利用されておらず、PI(4,5)P₂ と独立した PI4P 自体の重要な役割を示唆する結果が報告された [23] のは、これまでの脂質研究の歴史から考える

と、最近のことと言える。しかし、細胞膜における PI4P の詳細な機能や役割は明らかでない。

本研究では、細胞膜における PI4P や PI(4,5)P₂ の役割や動態を解明することを目的とし、出芽酵母の遺伝子改変技術によって PI4K を不活化した株の細胞質側 (PF: Protoplasmic Face)、細胞外側 (EF: Exoplasmic Face) を区別し (図 2.4-1)、PI4P、PI(4,5)P₂ の微細局在を解析した。出芽酵母のエフェクターや脂質関連たんぱく質の多くは哺乳動物と保存されており、これらの動態を解明するために有用なモデルである [208]。

4.2 材料及び方法

4.2.1 抗体、プローブ

一次抗体として、マウス抗 PI4P モノクローナル IgM 抗体を、Echelon Biosciences (Salt lake city, UT, USA) から、ウサギ抗 GST ポリクローナル抗体を Bethyl Lab (Montgomery, TX, USA) から購入した。二次抗体として、ヤギ 10 nm 金コロイド結合抗マウス IgG + IgM 抗体 (EM. GAF10)、ヤギ 10 nm 金コロイド結合抗ウサギ IgG 抗体 (EM. GFAR10) を BBI Solutions (Cardiff, UK) から購入した。ホスホリパーゼ C (PLC) - δ 1 PH (pleckstrin homology) ドメインを含むグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合たんぱく質 (GST-PH) を *Escherichia coli* に発現させ、グルタチオンアガロース樹脂 (Sigma) によって精製した [125, 126]。PH ドメインは、GST-PLC δ 1 PH 融合たんぱくをプロテアーゼで切断することにより得た (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)。

4.2.2 出芽酵母株

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の SEY6210 株 (*MATα leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ 200 trp1-Δ 901 suc2-Δ 9 lys2-801; GAL*) は、大隅良典博士 (東京工業大学)、藤本豊志博士 (順天堂大学) から譲渡していただいたものを本研究で用いた。AAY102 株、AAY104 株、AAY105 株は Cornell University の Dr. Scott D. Emr、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) から譲り受けた。出芽酵母は YPD 培地 (1% Yeast Extract, 2% Bacto Peptone, 2% dextrose) で、対数期または静止期まで 30°C で培養した。

4.2.3 急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法

a. 凍結法

第三章<2>2.2.4 と同様に、メタルサンドウィッチ法を用いて、出芽酵母を凍結した。少量の出芽酵母ペレットを銅箔にのせ、薄い金箔で覆った (面積 ~ 4 mm²、厚さ 20 μm)。そして、液体窒素で予冷した 2 つの金メッキ銅ブロック間で挟むことによって凍結した [126, 149]。

b. 凍結割断

第三章<1>1.2.4と同様の手順で、凍結サンプルを Balzers BAF400 装置 (Bal-Tec AG, Balzers, Lichtenstein) を用いて、 -130°C 、 1×10^{-6} millibars 真空下で脂質二重層の間で割断した。レプリカの厚さを結晶厚モニタによって制御しながら (EM QSG100; Leica)、露出面に白金と炭素を真空蒸着した。解凍した試料を、2.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) /0.1 M トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl, pH 8.0) 中で、 $60 \sim 70^{\circ}\text{C}$ で一晩処置した。出芽酵母細胞壁溶解は、第三章<2>2.2.4と同様の手順で行った。

4.2.4 抗体標識・電子顕微鏡観察

PI4P を標識するために、第三章<2>2.2.5と同様に、3% BSA/PBS により 30 分室温でブロックしたレプリカを、0.1% BSA/PBS で 1 度洗浄後、PLC- $\delta 1$ PH ドメイン (1 mg/mL) で処置した (図 2.1-2)。一次抗体と 4°C で一晩インキュベートし、0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄し、二次抗体と 37°C で 30 分インキュベートした。

PI(4,5) P_2 を標識するために、レプリカを、1% BSA/PBS 中で GST-PLC $\delta 1$ PH ドメイン融合タンパク質 (100 ng/ml) とともに 4°C で一晩インキュベートした。0.1% BSA/PBS で洗浄した後、レプリカをウサギ抗 GST 抗体 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 30 分間処理し、次に 10 nm の金コロイド結合抗ウサギ IgG 抗体 (1/40 希釈) と、 37°C で 30 分間インキュベートした。最後にレプリカを 0.1% BSA/PBS で 4 度洗浄し、蒸留水で 3 度洗浄した。レプリカをホルムバール膜 EM グリッドに取り上げた。透過型電子顕微鏡 (H7650, HITACHI) を 80 kV で作動させ観察した。

4.2.5 統計解析

上記の方法で 3 回以上実験を繰り返し、電子顕微鏡写真を取得し、解析に用いた。ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health (NIH)) を用いて特定構造の面積を測定し、金コロイドの数を数えた。特定の構造における標識密度を、金コロイドの数と測定面積から計算した。正規性と等分散を確認し、Dunnett の多重比較検定、Kruskal-Wallis の一元配置分散分析を用いて有意差を求めた ($p < 0.05$)。

4.3 結果

4.3.1 出芽酵母の細胞膜における PI(4,5)P₂の局在

細胞膜において、PI4P、PI(4,5)P₂はどちらも PF に局在することが知られている [130, 209, 210]。以前の我々の研究では、GST-PLC δ 1 PH ドメイン融合タンパク質が PI(4,5)P₂に特異的に結合し [125]、細胞膜 PF に局在することを報告した [123, 125]。本研究においても、同様の結果となった (図 2.4-2)。

さらに、出芽酵母の細胞膜 PF には、3つのドメインが存在するとされている。(1)直線の溝状の陥入を伴うドメイン領域 (図 2.4-3、橙色「溝状エリア」、(2)六角形の規則的な結晶粒パターンを持つドメイン領域 (図 2.4-3、青色「六角形エリア」、(3)それ以外の平坦な部分 (図 2.4-3、緑「平坦エリア」)である。以前我々は、出芽酵母において、PI4P は細胞膜 PF 上の六角形・溝状エリアを避けて分布し、平坦エリアに主に分布することを報告した [130]。またこのことは、本研究でも確かめられた (図 2.4-3B)。PI(4,5)P₂標識はPI4P 標識と同様、細胞膜 PF に局在し、六角形エリアを避けて分布した (図 2.4-3A、青)。しかし、いくつかの PI(4,5)P₂の金コロイド標識は六角形エリア端にも分布した (図 2.4-3A、白丸)。標的分子から金コロイドへの距離が 16 nm であったため [211]、六角形エリア端の標識は、平坦エリアの PI(4,5)P₂を標識したと考えられる。また、PI4P とは異なり、PI(4,5)P₂標識は溝状エリアの周囲に集中し、溝状エリア中心には分布しなかった (図 2.4-3A、橙)。図 2.4-3B には、出芽酵母細胞膜 PF 上の3つのエリアにおける PI4P、PI(4,5)P₂の局在割合を示した。PI(4,5)P₂標識は、溝状エリアにおいて、六角形あるいは平坦エリアに比べて高い割合で局在した。対して、PI4P 標識は、溝状エリアには他の2エリアに比べて低い割合で分布した [130]。また、その標識密度においても、溝状エリアにおける PI(4,5)P₂標識密度は、他2エリアと比較し有意に高かった (図 2.4-3C)。

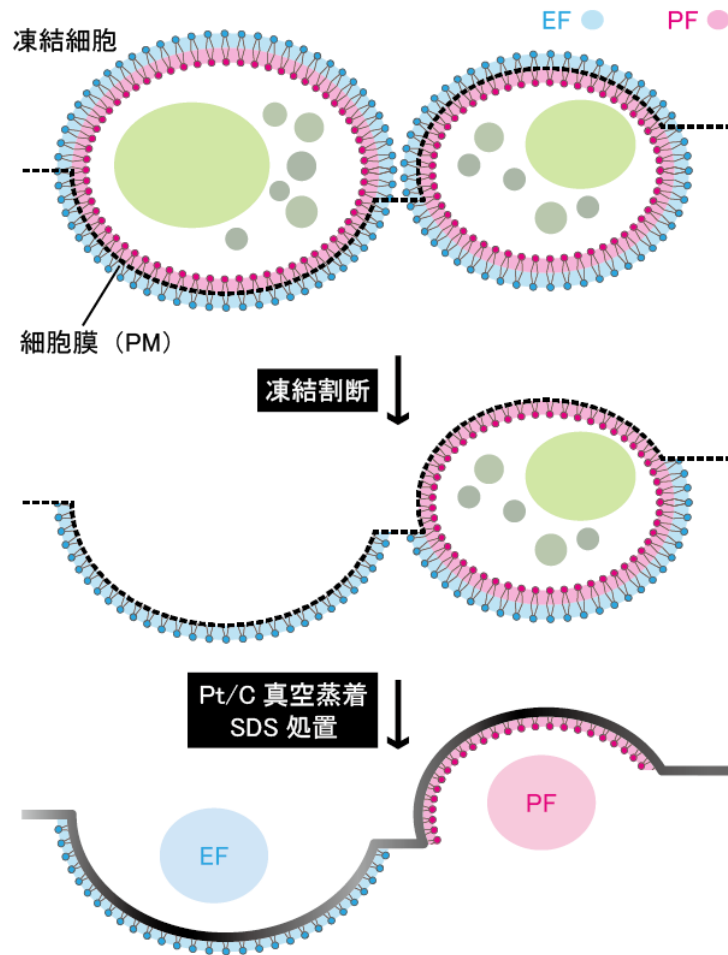


図 2.4-1 急速凍結・凍結切断レプリカ標識(QF-FRL)法による細胞膜の切断

QF-FRL 法を用いて出芽酵母細胞膜を切断し、凹凸によって EF、PF を区別し、脂質特異抗体で標識することで、本研究における目的の脂質(PI4P、PI(4,5)P₂)の非対称性分布を解析した。

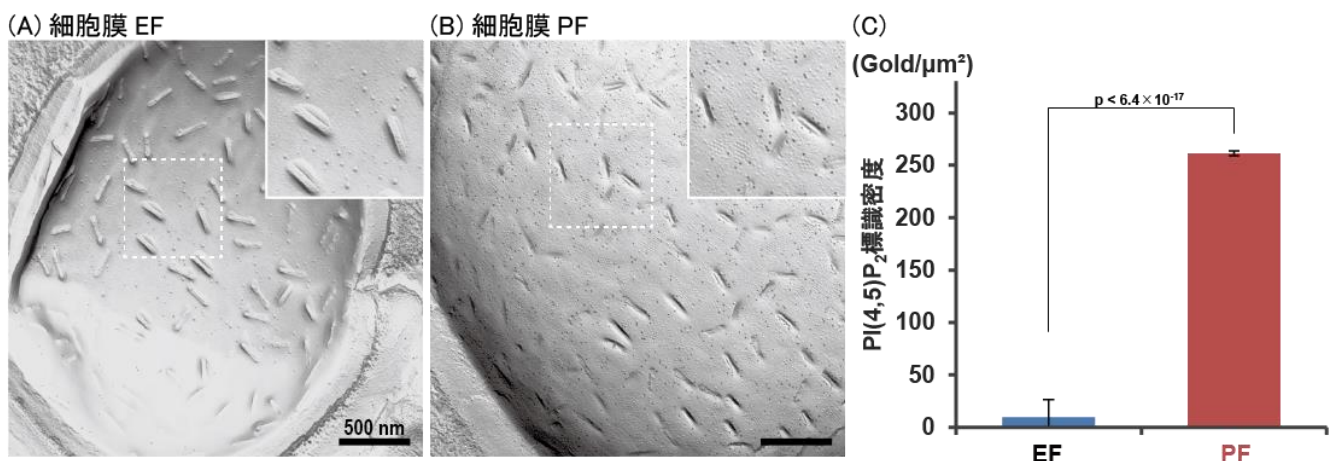


図 2.4-2 出芽酵母細胞膜における PI(4,5)P₂局在

QF-FRL 法によって切断した出芽酵母細胞膜 EF(A)、PF(B)において、PI(4,5)P₂を抗体標識した電子顕微鏡写真。スケールバー:500 nm。(C) 電子顕微鏡写真を解析し、PI(4,5)P₂の標識密度をグラフで示した。PI(4,5)P₂は出芽酵母細胞膜 EF にはほとんど局在せず、PF に高密度に局在した。(p<0.05)

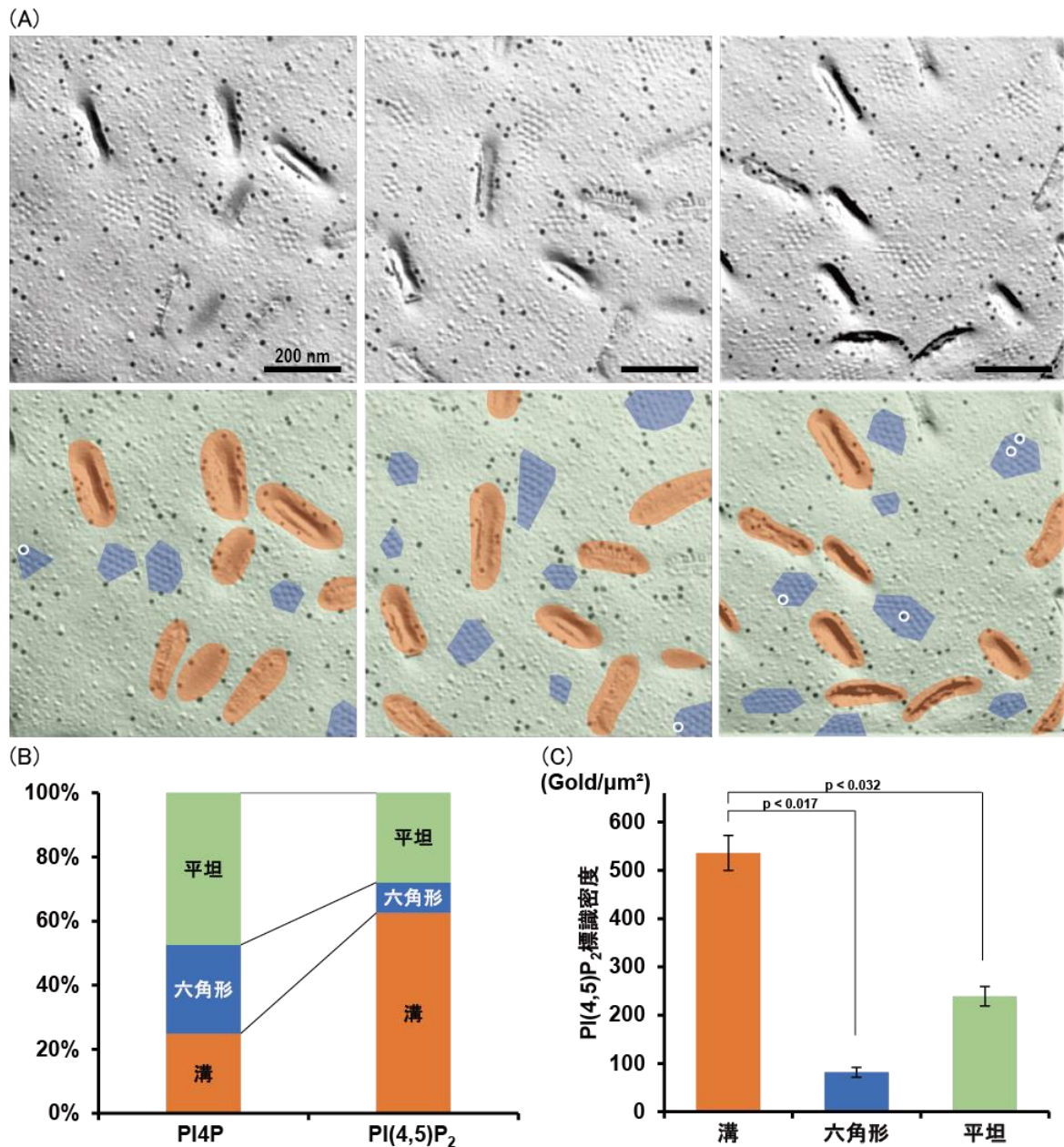


図 2.4-3 出芽酵母細胞膜の 3 つのエリアにおける PI(4,5)P₂局在

(A) QF-FRL 法によって切断した出芽酵母細胞の PI(4,5)P₂を標識し、細胞膜 PF の溝状(橙)、六角形(青)、平坦(緑)の 3 つのエリアに分けて示した電子顕微鏡写真。スケールバー: 200 nm。(B) PI4P、PI(4,5)P₂について、溝状(橙)、六角形(青)、平坦(緑)エリアの標識局在割合をグラフで示した。(C) PI(4,5)P₂の標識密度をグラフで示した。PI(4,5)P₂は溝状エリアに集中して局在した。(p<0.05)

4.3.2 細胞膜のPI4P生成におけるPik1p、Stt4pの役割

出芽酵母において、PI4Pを生成するPI4Kは3種類(Pik1p、Stt4p、Lsb6p)知られている。中でも、出芽酵母の生命維持や細胞機能に重要な役割を持つものはPik1p、Stt4pとされており、それぞれ遺伝子をノックアウトすると致死となる[22]。そこで我々は、Pik1p、Stt4pそれぞれの温度感受性株(*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*)を用いて、制限温度(38°C)での不活化条件、許容温度(24°C)での活性化条件を調節し、QF-FRL法によって細胞膜におけるPI4P、PI(4,5)P₂の局在を解析した。*pik1^{ts}*では、制限温度(38°C)、許容温度(24°C)両方の条件において、細胞膜PI4Pはほとんど観察されなかった(図2.4-4)。*stt4^{ts}*では、制限温度(38°C)、許容温度(24°C)両方でPI4P標識密度が低下した(図2.4-4)。つまり、Pik1p、Stt4pは、許容温度(24°C)においても、既に不活化されたことが考えられる。このことは、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*を用いた実験で制限温度・許容温度両方の条件下でたんぱく質が不活化されたことを示した以前の報告と一貫している[22]。

pik1^{ts}、*stt4^{ts}*とは異なり、*lsb6Δ*では、細胞膜PF上のPI4P標識密度は野生株(WT)におけるもの変化がみられなかった(図2.4-5A、B)。また、その分布様式も全く変化が確認されなかった(図2.4-5A、C)。つまり、Lsb6pは細胞膜PI4Pの生成に関与しないことが明らかとなった。

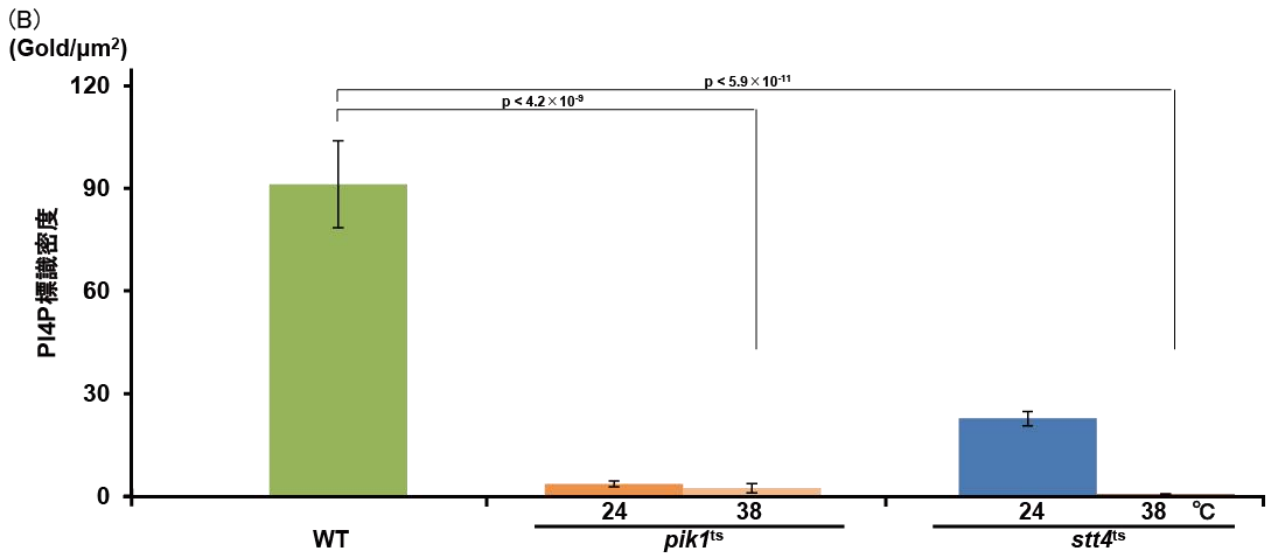
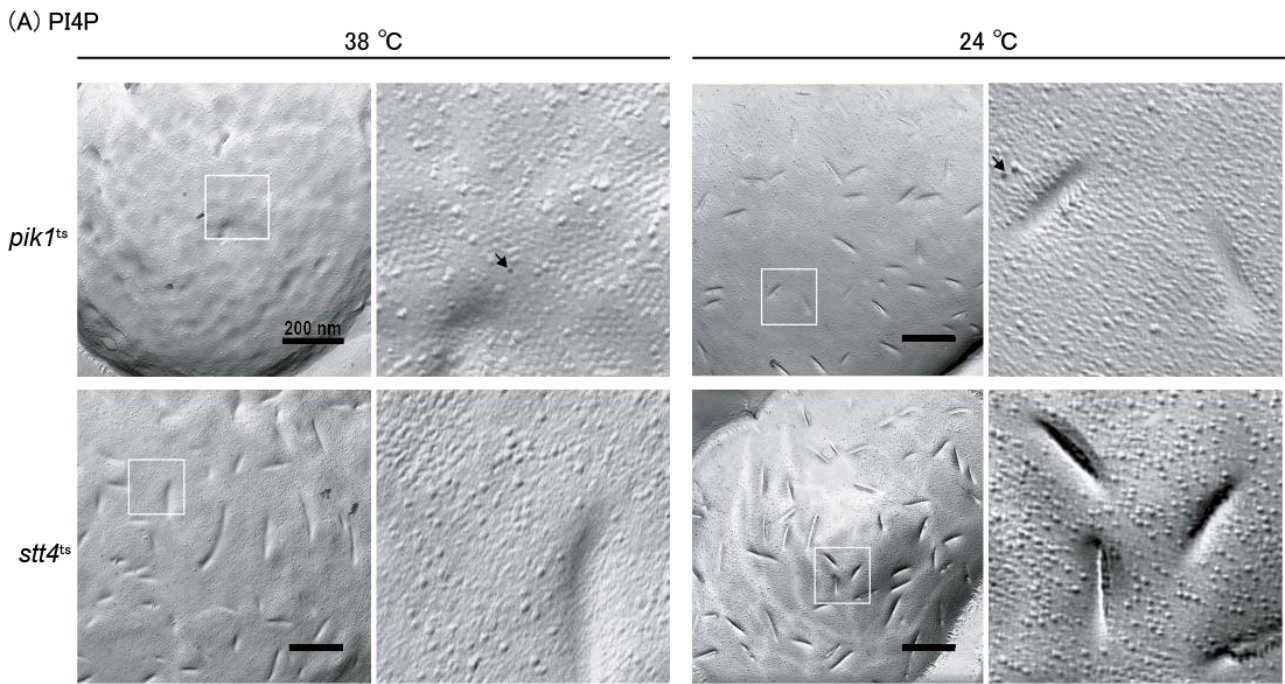
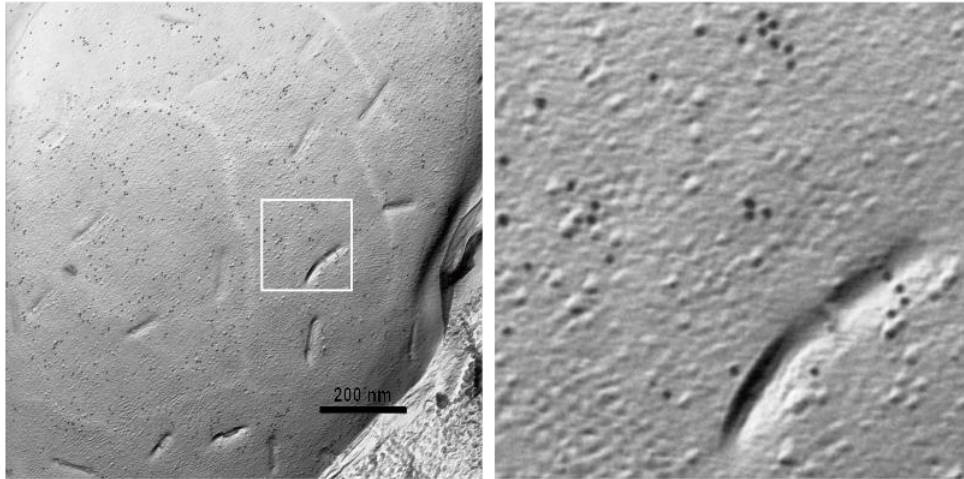


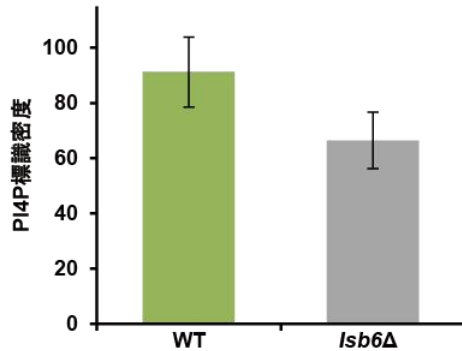
図 2.4-4 出芽酵母細胞膜における PI4P 局在への PI4K (Pik1p、Stt4p) の影響

(A) QF-FRL 法によって切断した PI4K (Pik1p、Stt4p) 温度感受性株 (*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*) において、PI4P を標識した細胞膜 PF の電子顕微鏡写真。観察された PI4P 標識を黒矢印で示した。スケールバー: 200 nm。(B) PI4P 標識密度について、野生株 (WT)、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* を比較してグラフで示した。*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* では WT と比較して、PI4P 標識密度が有意に低かった。(p<0.05)

(A) PI4P



(B)
(Gold/ μm^2)



(C)
(Gold/ μm^2)

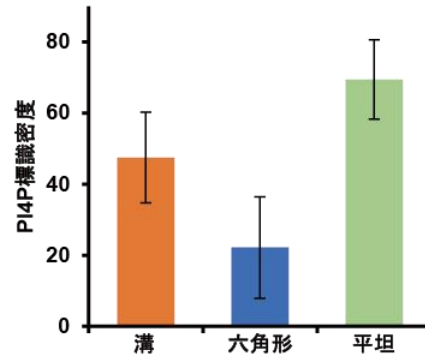


図 2.4-5 出芽酵母細胞膜における PI4P 局在への PI4K(Lsb6p)の影響

(A) QF-FRL 法によって切断した PI4K(Lsb6p) 遺伝子欠損株 (*lsb6* Δ) において、PI4P を標識した細胞膜 PF の電子顕微鏡写真。スケールバー: 200 nm。(B) PI4P 標識密度について、野生株 (WT)、*lsb6* Δ を比較してグラフで示した。(C) PI4P 標識密度を、溝 (橙)、六角形 (青)、平坦 (緑) エリアに分けてその分布をグラフで示した。WT と *lsb6* Δ では PI4P 標識密度・分布パターン共に差異は見られなかった。

4.3.3 細胞膜の PI(4,5)P₂ 生成における Pik1p、Stt4p の役割

以前の HPLC 解析を用いた報告では、Pik1p、Stt4p は PI4P を生成し、PI4P-5 キナーゼの基質として PI(4,5)P₂ の生成に働くとされていた[22]。そこで、細胞膜 PI(4,5)P₂ の生成源としての PI4P の役割を詳細に検討するため、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* を用いて PI(4,5)P₂ の分布を解析した。しかしながら驚くべきことに、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* の制限温度 (38°C) では、PI(4,5)P₂ の標識密度は野生株 (WT) と同等であった (図 2.4-6)。したがって、Pik1p、Stt4p それぞれは出芽酵母細胞膜 PI(4,5)P₂ の生成に必須ではないことが分かった。一方で、Pik1p、Stt4p を両方不活化した状態での PI(4,5)P₂ を観察するため、Pik1p、Stt4p 両方の温度感受性株 (*pik1^{ts}/stt4^{ts}*) を用いて同様の実験を行ったところ、制限温度 (38°C) で PI(4,5)P₂ 標識がほとんど消失した。しかし、許容温度 (24°C) では、野生株 (WT) とほとんど同等の PI(4,5)P₂ 標識密度であった (図 2.4-6)。つまり、出芽酵母細胞膜の PI(4,5)P₂ の生成には、Pik1p、Stt4p どちらかによって生成された PI4P が必要であることが示唆された。

また、PI4P 局在と同様に、*Lsb6Δ* では、細胞膜 PF 上の PI(4,5)P₂ 標識密度は野生株 (WT) におけるものと変化がみられなかった (図 2.4-7A、B)。その分布様式も、全く変化は確認されなかった (図 2.4-7A、C)。すなわち、Lsb6p は細胞膜 PI(4,5)P₂ の生成には関わらないことが明らかとなった。

(A) PI(4,5)P₂

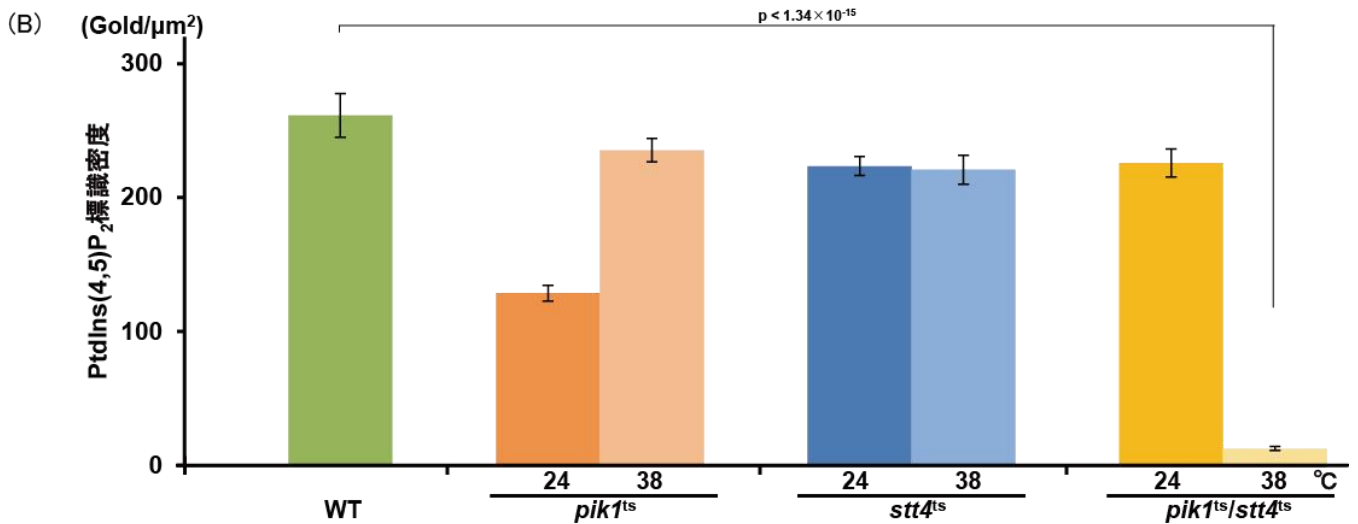
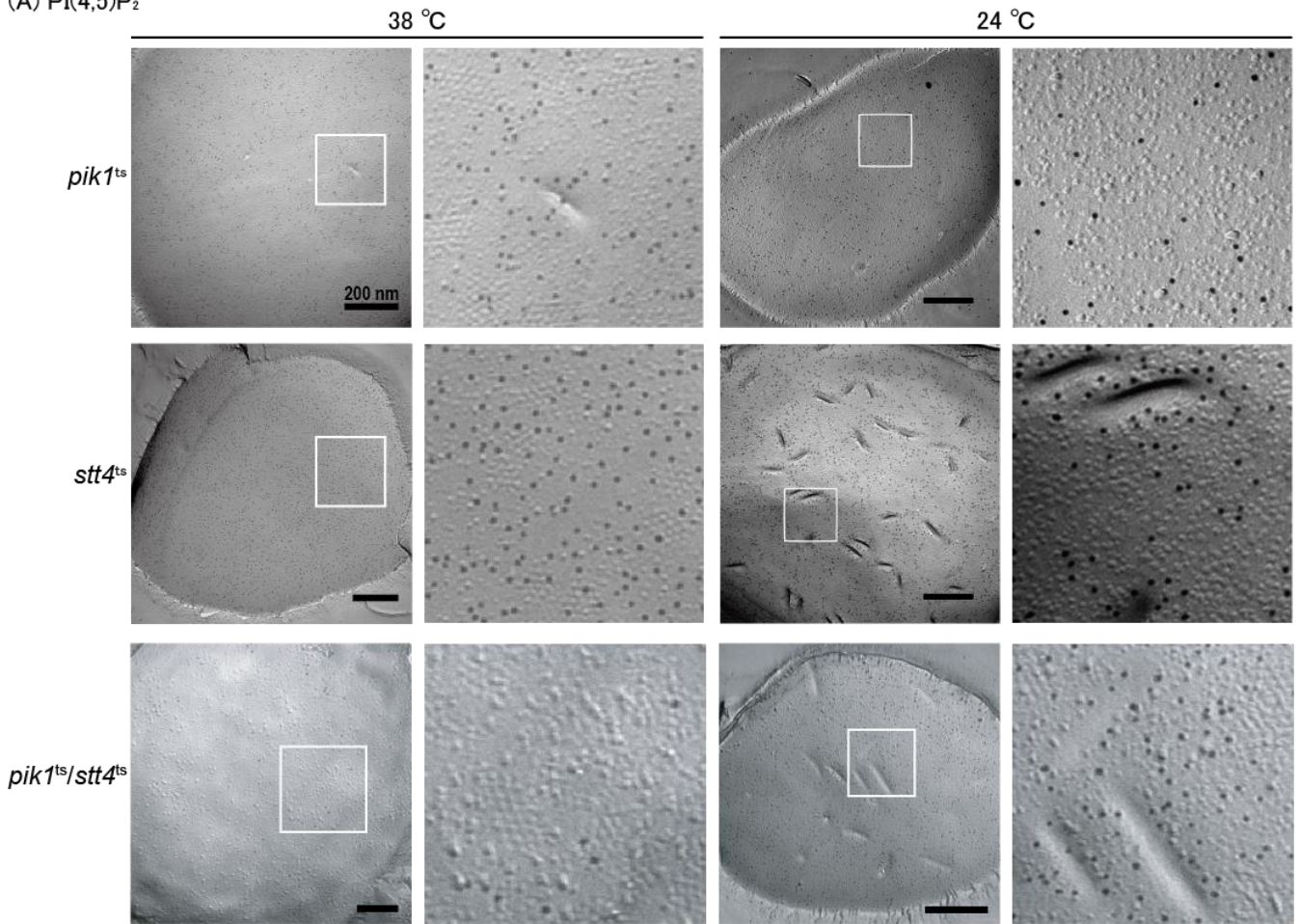
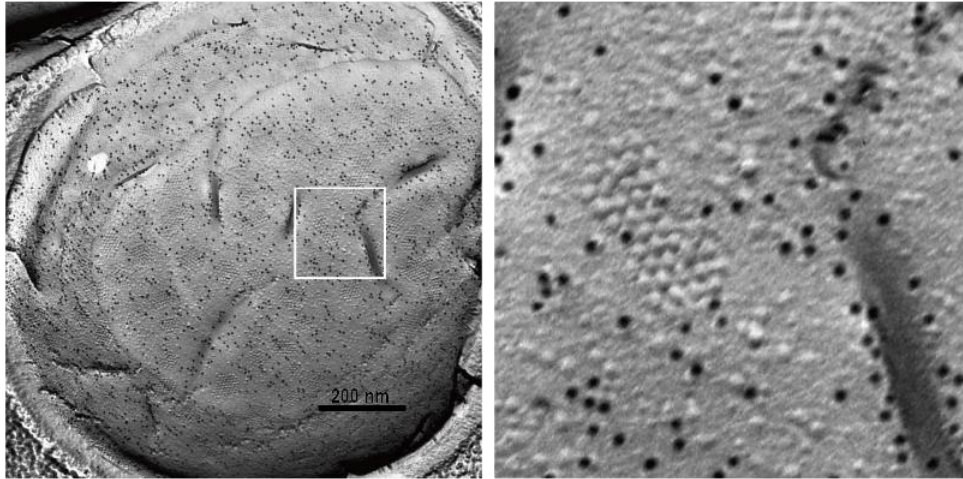


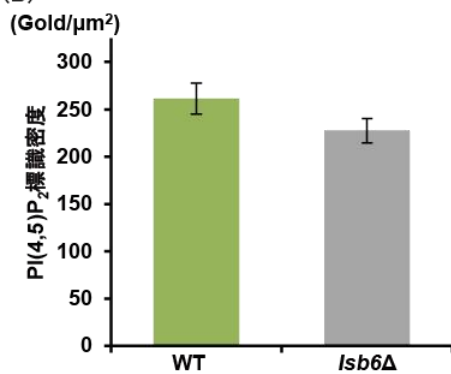
図 2.4-6 出芽酵母細胞膜における PI(4,5)P₂局在への PI4K(Pik1p、Stt4p)の影響

(A) PI4K(Pik1p、Stt4p)温度感受性株 (*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*)を、38°Cの制限温度、24°Cの許容温度それぞれで培養し、QF-FRL法によって切断し、PI(4,5)P₂を標識した細胞膜PFの電子顕微鏡写真。スケールバー:200 nm。(B) PI(4,5)P₂標識密度について、野生株(WT)、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}*、*pik1^{ts}/stt4^{ts}*を38°C、24°Cそれぞれで比較してグラフで示した。Pik1p、Stt4pを両方不活化した株では、PI(4,5)P₂密度は有意に低かった。(p<0.05)

(A) PI(4,5)P₂



(B)



(C)

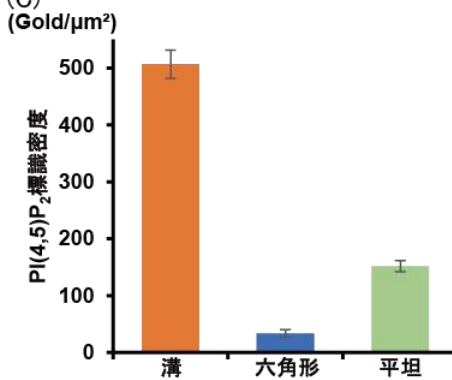


図 2.4-7 出芽酵母細胞膜における PI(4,5)P₂局在への PI4K(Lsb6p)の影響

(A) QF-FRL 法によって切断した PI4K(Lsb6p) 遺伝子欠損株 (*Isb6Δ*) において、PI(4,5)P₂ を標識した細胞膜 PF の電子顕微鏡写真。スケールバー: 200 nm。(B) PI(4,5)P₂ 標識密度について、野生株 (WT)、*Isb6Δ* を比較してグラフで示した。(C) PI(4,5)P₂ 標識密度を、溝 (橙)、六角形 (青)、平坦 (緑) エリアに分けてその分布をグラフで示した。WT と *Isb6Δ* では差がみられなかった。

4.4 考察

本研究において、以下の画期的な事象を発見することができた。

- (1) PI4P、PI(4,5)P₂は出芽酵母細胞膜 PF に局在したが、PI4P は平坦エリアに、PI(4,5)P₂は溝状エリア周囲に集中して局在した。
- (2) 出芽酵母細胞膜 PF の PI4P は、Pik1p、Stt4p それぞれの不活化条件でほとんど消失した。
- (3) 出芽酵母細胞膜 PF の PI(4,5)P₂は、Pik1p、Stt4p それぞれの不活化条件では野生株と同等の標識密度であったが、Pik1p、Stt4p 両方の不活化条件では PI(4,5)P₂標識密度は有意に減少した。

4.4.1 PI(4,5)P₂の出芽酵母細胞膜における分布パターン

細胞膜は細胞の保護バリアとして機能し、その役割は、エンドサイトーシス、分泌、栄養素の取り込み、イオン恒常性、シグナル伝達、形態維持、細胞壁・細胞外マトリックスの合成など、多岐に渡る[212]。細胞膜のバリア機能を維持しながらも、様々な機能をどのように調節しているか、という問題は、分子細胞生物学における重要な課題である。近年では、細胞膜をドメインに分割することで、細胞機能の調整にどのように役立つかという理解が着々と進んでいる。しかしながら従来は、主に脂質から構成される細胞膜ドメインを定義づけることは、技術的に困難であった[213]。現在では、たんぱく質分布解析に基づく研究によって、出芽酵母細胞膜には、顕著な膜ドメインやネットワークパターンが存在することが明らかとなっている[214]。そのドメインは、(1)MCC (membrane compartment of Can1) /エイソソーム、(2)MCT (membrane compartment containing target of rapamycin kinase complex 2 (TORC2))、(3)MCP (membrane compartment containing Pma1) である[214]。

MCC には細胞膜たんぱく質 Sur7[215]や、アルギニントランスポーターCan1[216, 217]が特異的に局在する。さらに、Pil1、Lsp1 というたんぱく質が細胞膜に結合し、MCC の下にエイソソームと呼ばれる複合体を形成する[218]。つまり、細胞膜内在性膜たんぱく質と脂質は MCC の一部であり、末梢膜たんぱく質複合体をエイソソーム、この複合体全体を MCC/エイソソームと呼ぶ。先行研究では、この MCC/エイソソームは電子顕微鏡で観察される溝状構造[219]に対応することが示された [220]。Pil1、Lsp1 には膜の湾曲を促進する BAR (Bin-amphiphysin-Rvs) ドメインが含まれており、細胞膜の溝を形成するフィラメントをつくる [221, 222]。この時の Pil1、Lsp1 の細胞膜への結合、および、MCC/エイソソームの形成は、細胞膜 PI(4,5)P₂に依存することが分かっている[222, 223] (図 2.4-8①)。また、PI(4,5)P₂の生成と加水分解のサイクルが適切なエイソソーム構築に重要であることが報告された[224]。これらの報告は、本研究において、出芽酵母細胞膜 PF の溝状エリアにおける PI(4,5)P₂の局在と一貫している (図 2.4-3)。したがって、PI(4,5)P₂は MCC/エイソソームに局在することが分かった。PI(4,5)P₂は細胞膜において、様々なイオンチャネル、トランスポーターに直接結合し制御するとされ

ている [225]。MCC/エイソソームには、Can1 (アルギニントランスポーター)、Fur4 (ウラシルトランスポーター)、Tat2 (トリプシン・チロシントランスポーター)、Lyp1 (リシントランスポーター)、Mup1 (メチオニントランスポーター) などのたんぱく質が分布する [226]。これらのトランスポーターを PI(4,5)P₂ が直接制御することに関してはこれまで示されていないが、今後、QF-FRL 法を用いたナノスケールでのさらなる分布解析によって、証明が可能となることが期待できる (図 2.4-8②)。

さらに、MCC/エイソソームが細胞膜 PI(4,5)P₂ を制御することで正常な形態維持および細胞壁ストレスへの耐性の保持につながるとも考えられている。細胞膜 PI(4,5)P₂ は、細胞壁形態、分泌、エンドサイトーシスなどに重要な役割を持つ [227]。エイソソームを構成するたんぱく質である Pi11 の遺伝子欠損変異体では、異常な内側への細胞壁成長がみられ、その他の MCC/エイソソーム局在たんぱく質変異体でも形態的異常が観察された [215, 218, 228]。また、PI(4,5)P₂ ホスファターゼ (Inp51/Sj11、Inp52/Sj12、Inp53/Sj13) 変異体によって PI(4,5)P₂ レベルを増加させると、Pi11 遺伝子欠損変異体と同様に、異常な内側への細胞壁成長がみられることが報告された [229]。PI(4,5)P₂ ホスファターゼ遺伝子解析によって、Inp51/Sj11 は Pi11 との機能的関係を持ち [230]、Inp51/Sj11 がエイソソームたんぱく質と物理的に相互作用するため [231]、直接的な関係があることが示唆された。さらに、Pi11 遺伝子欠損株では、Inp51/Sj11 遺伝子欠損株と同様に、細胞膜 PI(4,5)P₂ レベルが上昇することが明らかとなった [230]。以上より、エイソソームを構成する Pi11 は、Inp51/Sj11 を細胞膜にリクルートし、PI(4,5)P₂ レベルを制御する役割をもつと結論づけられた [230] (図 2.4-8③)。

つまり、本研究における PI(4,5)P₂ の MCC/エイソソームへの局在は、上記のように、PI(4,5)P₂ による MCC/エイソソームの形成促進、および、MCC/エイソソームによる PI(4,5)P₂ の制御の根拠の 1 つとなる結果であると言える。MCC/エイソソームに局在する PI(4,5)P₂ のターンオーバーが働き、PI(4,5)P₂ レベルが一定に保たれることが重要であると考えられる。

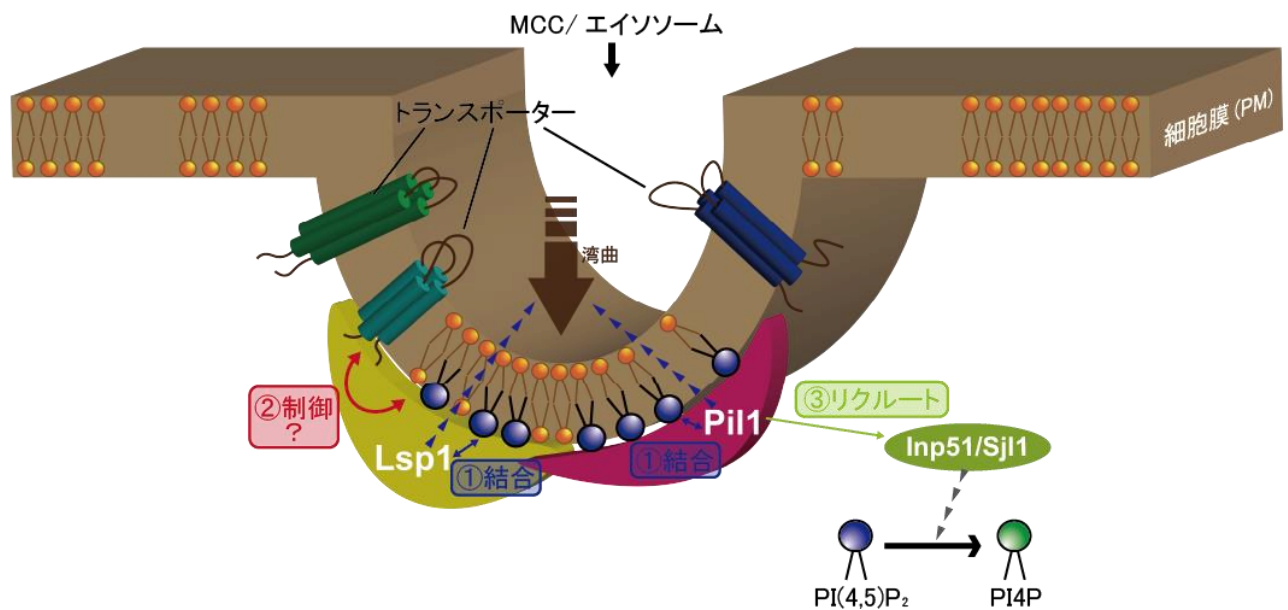


図 2.4-8 出芽酵母細胞膜 MCC/エイソソームにおける PI(4,5)P₂局在の役割

①MCC/エイソソーム複合体を構成する Lsp1、Pil1 は PI(4,5)P₂依存性に膜へ結合し、膜を湾曲させる。②MCC/エイソソームに分布する数々のトランスポーターは、PI(4,5)P₂によって制御される可能性が期待できる。③Pil1 は PI(4,5)P₂ホスファターゼである Inp51/Sjl1 を膜にリクルートすることで、PI(4,5)P₂のターンオーバーを促進し、その正常な局在レベルを保つ。

4.4.2 出芽酵母細胞膜 PF 上への PI4P 局在における PI4K の影響

PI4K (Pik1p/PI4KIII β 、Stt4p/PI4KIII α 、Lsb6p/PI4KII α/β) は、PI のイノシトール環第 4 位をリン酸化して PI4P を生成する。中でも、出芽酵母では Pik1p、Stt4p が重要な役割を持つ[21]。Pik1p はゴルジ体に[22, 232-234]、Stt4p は細胞膜に分布する[235]。以前の報告では、GFP タグで PI4P の Osh2-PH ドメインを標識したところ、*stt4^{ts}* の制限温度で細胞膜 PI4P が消失し、*pik1^{ts}* の制限温度ではゴルジ体 PI4P が消失した[22]。つまり細胞膜 PI4P は Stt4p 由来であることが示された。しかしながら、Osh2 の PH ドメインは PI(4,5)P₂ にも非特異的に結合する[23, 236]。したがって、PI4P の局在解析には、特異性への細心の注意が必要であり、細胞内 PI4P 分布に関する報告は刷新されるべきである。本研究では、抗 PI4P 抗体の PI(4,5)P₂ への非特異的な結合を防ぐため、ブロッキング後のサンプルを PLC- δ 1 PH ドメイン (1 mg/mL) で処置した (図 2.1-2)。この方法による抗 PI4P 抗体の特異性について確認し、既に報告した[126]。

本研究では、*pik1^{ts}*、*stt4^{ts}* それぞれの制限温度 (38°C) において、細胞膜 PI4P 標識は消失し (図 2.4-4)、Pik1p、Stt4p 両方が細胞膜 PI4P レベルの維持を担うことが示唆された。出芽酵母[235]・哺乳類において、細胞膜に分布する Stt4p/PI4KIII α が細胞膜 PI4P を生成し[237]、ゴルジ体に分布する Pik1p/PI4KIII β は、ゴルジ体の PI4P を生成すると考えられてきた[22, 232, 234]。本研究の結果は、古くからの認識と矛盾するが、本研究の結果を支持する報告も複数存在する。哺乳類細胞では、PLC シグナル伝達が誘導され活性化される間、ゴルジ体 PI4P は細胞膜 PI(4,5)P₂ プールの維持に関連することが示された[238]。また、*pik1* 変異株においてゴルジ-細胞膜分泌が阻害されたことから、Pik1p が、細胞膜への分泌に必要であると報告された[22]。輸送小胞の分泌・融合メカニズムは、真核生物の間で保存されており[239, 241]、輸送小胞は、小胞体からゴルジ体を経て分泌され、細胞表面や特定の細胞内小器官へ融合する[239, 240]。以前我々は、QF-FRL 法を用いた観察時に、ゴルジ体膜に加えて、100~200 nm の小胞構造にも PI4P が高密度に検出されることを示した[130]。この小胞構造を輸送小胞であると考え、細胞膜 PI4P の一部は、ゴルジ体 Pik1p 由来の PI4P が小胞により輸送されたものであると仮説を立てられる。細胞内膜輸送経路の全貌は未だ解き明かされておらず、今後のさらなる研究によって解決されていくべき重要な課題である。

4.4.3 出芽酵母細胞膜 PF に局在する PI(4,5)P₂ の生成における、PI4K の影響

現在まで、Stt4p によって生成された細胞膜 PI4P は、細胞膜 PI(4,5)P₂ の前駆体として働くことが示されてきた[235, 242]。PI4P-5 キナーゼである Mss4p は細胞膜に分布し、PI4P のイノシトール環第 5 位をリン酸化することで PI(4,5)P₂ を生成する。リン酸化酵素 Stt4p、Mss4p は細胞膜皮質構造上のそれぞれ異なるパッチに分布するため[235, 243]、Stt4p 由来の細胞膜 PI4P が PI(4,5)P₂ の前駆体で

あると考えられてきた[222]。

しかし、Stt4p 由来 PI4P の細胞膜 PI(4,5)P₂生成への直接的な関与については、近年様々な報告があり、議論のさなかである。ある報告では、*stt4* ノックダウン細胞において、細胞膜 PI(4,5)P₂ レベルの変化が見られなかったことから、Stt4p 由来 PI4P は細胞膜 PI(4,5)P₂の生成に関与しないことが確かめられた[244]。また哺乳類細胞における実験では、人為的に細胞膜 PI4P レベルを低下させるも、細胞膜 PI(4,5)P₂ レベルには影響を与えなかったと報告された[23]。さらに、4.4.2にも記述したように、PLC シグナル伝達が誘導され活性化される間、ゴルジ体の PI4P は細胞膜 PI(4,5)P₂プールの維持に関連することが示された[238]。

本研究では、出芽酵母細胞膜 PF に局在する PI(4,5)P₂レベルに関して、Pik1p、Stt4p 両方の不活性化条件では低下が見られたが、Pik1p、Stt4p 一方の不活性化では変化が見られなかった (図 2.4-6)。つまり、細胞膜 PF に PI4P が局在しない条件においても、細胞膜 PI(4,5)P₂は生成され、Pik1p 由来の PI4P、Stt4p 由来の PI4P どちらかが必要であることが示めされた。

4.5 結論

以前の報告では、出芽酵母において、PI(4,5)P₂を生成する Mss4p は、ほとんどが細胞膜に分布した一方で、細胞内点状構造にも少量観察されたとされている[245]。上記の報告と本研究における結果を受け、以下の2つの仮説を立てることができる (図 2.4-9)。(1) ゴルジ体で Pik1p によって生成された PI4P が輸送小胞またはゴルジ体に少量分布する Mss4p の基質となり、PI(4,5)P₂が生成され、細胞膜へ輸送される。(2) 細胞膜で Stt4p によって生成された PI4P、あるいは、ゴルジ体で Pik1p によって生成され、輸送小胞を介して細胞膜へ分泌された PI4P が細胞膜 Mss4p の基質となり、細胞膜 PI(4,5)P₂が生成される。以上の2つの仮説が同時に起こり細胞膜 PI4P、PI(4,5)P₂レベルを維持する可能性がある。これらについて、今後さらなる検討が必要である。

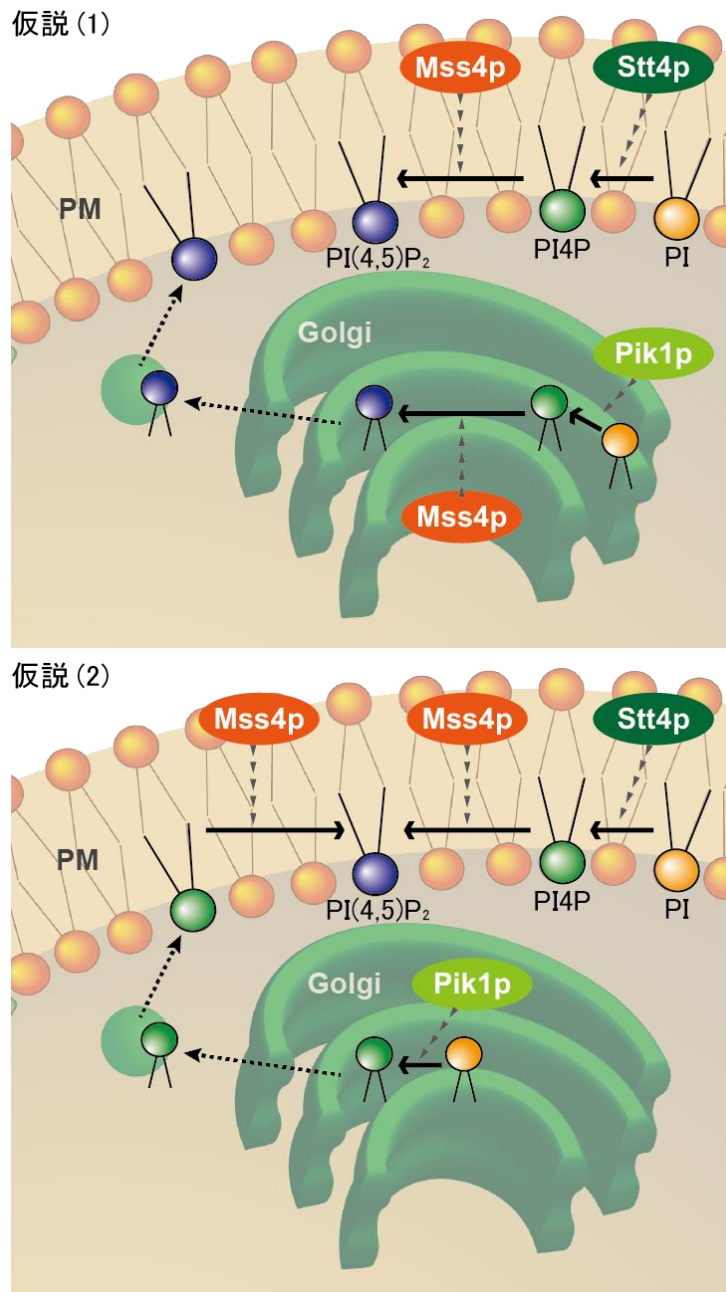


図 2.4-9 出芽酵母細胞膜における PI(4,5)P₂局在の機序に関する仮説

本研究において、細胞膜 PI4P の生成には、細胞膜 Stt4p だけでなく、ゴルジ体 Pik1p も必要であることが明らかとなった。さらに、細胞膜 PI(4,5)P₂の生成には、Stt4p または Pik1p どちらかが必要であることが分かった。細胞膜において PI4P は、細胞膜 Stt4p によって PI のイノシトール環第 4 位がリン酸化されて生成する。そして、細胞膜 PI4P を起源として、Mss4p がイノシトール環第 5 位をリン酸化し、PI(4,5)P₂が生成する。この経路と別に、2 つの経路が仮説として考えられる。(仮説 1)ゴルジ体に分布する Pik1p が PI をリン酸化し、ゴルジ体で PI4P を形成する。この PI4P が細胞質またはゴルジ体に分布する Mss4p によってリン酸化され、PI(4,5)P₂が生成する。この PI(4,5)P₂がゴルジ体からの分泌小胞により細胞膜に分泌される。(仮説 2)ゴルジ体に分布する Pik1p により生成された PI4P が、分泌小胞を介して細胞膜へ分泌され、細胞膜 Mss4p によってさらにリン酸化されることで、PI(4,5)P₂が生成する。以上 2 つの仮説が同時に起こる可能性が考えられる。

第三章：考察・結論

本研究では、リン脂質ホスファチジルイノシトール4リン酸 (PI4P) について、オートファジーで形成される膜構造において (第二章<1><2><3>)、また、細胞の内と外を隔て、細胞内部の恒常性を維持する役割を持つ細胞膜において (第二章<4>)、急速凍結・凍結割断レプリカ標識 (QF-FRL) 法を用いた、PI4P の微細局在解析という観点から、その機能解明を試みた。

第二章<1><2>では、3種類のオートファジー経路の内、マクロオートファジーにおけるPI4Pの役割について検討した。第二章<1>では、哺乳類細胞のオートファゴソーム細胞質側 (PF: Protoplasmic Face) にPI4Pが局在し、オートファジー後期段階で働くことが示唆された。第二章<2>では、出芽酵母オートファゴソーム膜においてPI4Pは哺乳類細胞とは真逆の管腔側 (EF: Exoplasmic Face) に局在した。さらにPI4Kの内、Pik1pはオートファゴソームの形成、Stt4pはオートファゴソームと液胞との融合に働くことが示唆された。第二章<3>では、マイクロオートファジーによる脂肪滴取り込み「マイクロリポファジー」におけるPI4Pの役割について、出芽酵母を用いて検討した。PI4Pはマイクロリポファジー小胞膜PFに高密度に局在し、Pik1p、Stt4pどちらもマイクロリポファジーに必須であった。最後に、第二章<4>では、出芽酵母細胞膜におけるPI4P、PI(4,5)P₂の微細局在解析を行い、PI4Kの関与について検討した。細胞膜PFを3つのエリアに分けて解析すると、PI4Pは平坦エリアに、PI(4,5)P₂は溝状エリアに集中した。また、細胞膜PI4P生成には、細胞膜Stt4pだけでなく、ゴルジ体Pik1p両方が必須であり、細胞膜PI(4,5)P₂生成には、細胞膜Stt4p由来PI4Pか、ゴルジ体Pik1p由来PI4Pかのどちらかが必要であることが示唆された。

近年では、PI4Pに加えPI(4,5)P₂もオートファジーに関連することを示す報告もある。しかしながら、本研究結果では、PI(4,5)P₂はオートファゴソーム膜には分布しなかった (第二章<2>)。そのため本研究において、古くから考えられていた「PI(4,5)P₂の前駆体」としてのPI4Pではなく「PI4P独自」の重要な役割があることが強く示唆された。また細胞膜において、細胞膜PI4Pが消失した条件においても細胞膜PI(4,5)P₂は維持された (第二章<4>) ことから、PI(4,5)P₂レベル維持が一次元的で単純なものではなく、複雑な膜動態に関連することが示唆された。

生体膜におけるPI4Pなどリン脂質の局在やその制御を明らかにすることは、脂質分布や代謝の異常が原因で起こる疾患の解決策を見出すことに直結する。生体膜動態の解明には、その主要構成要素である膜脂質の詳細な機能や制御方法を見出すことが必須である。本研究で用いたQF-FRL法は、膜脂質の非対称性分布を解析することにより、膜脂質の分子機序を解き明かすことができる有用な方法である。今後、脂質研究のさらなる発展によって、脂質の分布や代謝制御、生体膜動態を解明し、ライフイノベーションの推進に大きな貢献ができると考えている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官として終始多大なご指導を賜りました、鹿児島大学 共同獣医学部 獣医学科 教授 藤田秋一先生に深謝いたします。副指導教官としてご指導賜りました、同学科 准教授 宇野泰広先生、岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 准教授 正谷達膳先生、山口大学大学院 共同獣医学研究科 教授 日下部健先生には、本論文の作成や研究の遂行に適切なお助言を頂きました。また、本研究に用いた出芽酵母株の譲渡、ならびに博士課程の内 1 年間の留学受け入れによりご指導賜りました、コーネル大学 ワイル細胞分子生物学研究所所長 分子生物学・遺伝学部門 Dr. Scott D. Emr には、研究遂行にあたりご助言いただきました。ここに感謝の意を表します。本研究は、JSPS 科研費における特別研究員奨励費 課題番号「21J21088」「22KJ2527」の助成を受けたものであります。

最後に、鹿児島大学 共同獣医学部 獣医学科 分子病態学研究室の皆様には、本論文の執筆にあたり多くのご助言、激励をいただき、ご協力いただきました。ここに誠意の意を表します。

参考文献

- [1] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* 175(4023) (1972) 720-731.
- [2] T. Araiso, Fluidity in Membrane Lipid Layer and Protein Dynamics, *membrane* 19(1) (1994) 3-13.
- [3] W.R. Bishop, R.M. Bell, Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer: the phosphatidylcholine transporter, *Cell* 42(1) (1985) 51-60.
- [4] P.F. Devaux, Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes, *Biochemistry* 30(5) (1991) 1163-73.
- [5] D. Marquardt, B. Geier, G. Pabst, Asymmetric lipid membranes: towards more realistic model systems, *Membranes (Basel)* 5(2) (2015) 180-96.
- [6] 田中一馬、鉢呂健、山本隆晴、「膜脂質の非対称性とタンパク質輸送制御、脂質がかかわる新しい細胞機能」、*化学と生物* 52(9) (2014) 563-564.
- [7] H.C. Palfrey, A. Waseem, Protein kinase C in the human erythrocyte. Translocation to the plasma membrane and phosphorylation of bands 4.1 and 4.9 and other membrane proteins, *J Biol Chem* 260(29) (1985) 16021-9.
- [8] P. Meers, T. Mealy, Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge, *Biochemistry* 32(43) (1993) 11711-21.
- [9] V.A. Fadok, D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, P.M. Henson, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J Immunol* 148(7) (1992) 2207-16.
- [10] J. Suzuki, S. Nagata, Phospholipid scrambling on the plasma membrane, *Methods Enzymol* 544 (2014) 381-93.
- [11] K. Emoto, T. Kobayashi, A. Yamaji, H. Aizawa, I. Yahara, K. Inoue, M. Umeda, Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23) (1996) 12867-72.
- [12] 花田賢太郎、「生命、細胞、生体膜」、2013. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biochem/4186-2013-12-11-06-12-40.html?showall=1>.

- [13] 花田賢太郎、「リン脂質、スフィンゴ脂質およびセラミドの命名事始め」、2018. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-biochem/8290-2018-09-04-06-56-14.html>.
- [14] C.E. Overton, Ueber die osmotischen eigenschaften der lebenden pflanzen- und tierzelle, Fäsi & Beer 1895.
- [15] E. Gorter, F. Grendel, ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD, *J Exp Med* 41(4) (1925) 439-43.
- [16] J.F. Danielli, H. Davson, A contribution to the theory of permeability of thin films, *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 5(4) (1935) 495-508.
- [17] J. Folch, Brain diphosphoninositide, a new phosphatide having inositol metadiphosphate as a constituent, *J Biol Chem* 177(2) (1949) 505-19.
- [18] F. Nakatsu, Role of phosphatidylinositol 4-phosphate in cellular function., *Leading Author's* 5, e008 (2016).
- [19] T. Balla, Phosphatidylinositol 4-kinases, *Biochim Biophys Acta* 1436(1-2) (1998) 69-85.
- [20] A. Balla, T. Balla, Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions, *Trends Cell Biol* 16(7) (2006) 351-61.
- [21] G.S. Han, A. Audhya, D.J. Markley, S.D. Emr, G.M. Carman, The *Saccharomyces cerevisiae* LSB6 gene encodes phosphatidylinositol 4-kinase activity, *J Biol Chem* 277(49) (2002) 47709-18.
- [22] A. Audhya, M. Foti, S.D. Emr, Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics, *Mol Biol Cell* 11(8) (2000) 2673-89.
- [23] G.R. Hammond, M.J. Fischer, K.E. Anderson, J. Holdich, A. Koteci, T. Balla, R.F. Irvine, PI4P and PI(4,5)P2 are essential but independent lipid determinants of membrane identity, *Science* 337(6095) (2012) 727-30.
- [24] A.J. Verkleij, R.F. Zwaal, B. Roelofsen, P. Comfurius, D. Kastelijn, L.L. van Deenen, The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy, *Biochim Biophys Acta* 323(2) (1973) 178-93.
- [25] S. Takatori, T. Fujimoto, [Methods to observe distribution of membrane lipids], *Seikagaku* 86(1) (2014) 5-17.
- [26] S.M. Elvington, F. Bu, J.W. Nichols, Fluorescent, acyl chain-labeled phosphatidylcholine analogs reveal novel transport pathways across the plasma membrane of yeast, *J Biol Chem* 280(49) (2005) 40957-64.
- [27] T.Y. Wang, J.R. Silvius, Different sphingolipids show differential partitioning into sphingolipid/cholesterol-rich domains in lipid bilayers, *Biophys J* 79(3) (2000) 1478-89.
- [28] C.Y. Jao, M. Roth, R. Welti, A. Salic, Metabolic labeling and direct imaging of choline phospholipids in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(36) (2009) 15332-7.
- [29] R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, E. White, Role of autophagy in cancer, *Nat Rev Cancer* 7(12) (2007) 961-7.
- [30] Q. Li, Y. Liu, M. Sun, Autophagy and Alzheimer's Disease, *Cell Mol Neurobiol* 37(3) (2017) 377-388.
- [31] X. Hou, J.O. Watzlawik, F.C. Fiesel, W. Springer, Autophagy in Parkinson's Disease, *J Mol Biol* 432(8) (2020) 2651-2672.
- [32] N. Azzman, Crohn's Disease: Potential Drugs for Modulation of Autophagy, *Medicina (Kaunas)* 55(6) (2019).
- [33] R.E. Ganschow, R.T. Schimke, Independent genetic control of the catalytic activity and the rate of degradation of catalase in mice, *J Biol Chem* 244(17) (1969) 4649-58.
- [34] F. Kalish, N. Chovick, J.F. Dice, Rapid in vivo degradation of glycoproteins isolated from cytosol, *J Biol Chem* 254(11) (1979) 4475-81.

- [35] Y. Ohsumi, Historical landmarks of autophagy research, *Cell Res* 24(1) (2014) 9-23.
- [36] N. Mizushima, M. Komatsu, Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell* 147(4) (2011) 728-41.
- [37] A.P. Arrigo, K. Tanaka, A.L. Goldberg, W.J. Welch, Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome), *Nature* 331(6152) (1988) 192-4.
- [38] C. De Duve, R. Wattiaux, Functions of lysosomes, *Annu Rev Physiol* 28 (1966) 435-92.
- [39] Y. Wang, W.D. Le, Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System, *Adv Exp Med Biol* 1206 (2019) 527-550.
- [40] D. Nandi, P. Tahiliani, A. Kumar, D. Chandu, The ubiquitin-proteasome system, *J Biosci* 31(1) (2006) 137-55.
- [41] R. Sardana, S.D. Emr, Membrane Protein Quality Control Mechanisms in the Endo-Lysosome System, *Trends Cell Biol* 31(4) (2021) 269-283.
- [42] C. Yang, X. Wang, Lysosome biogenesis: Regulation and functions, *J Cell Biol* 220(6) (2021).
- [43] C. De Duve, B.C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans, Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue, *Biochem J* 60(4) (1955) 604-17.
- [44] A.B. Novikoff, H. Beaufay, C. De Duve, Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver, *J Biophys Biochem Cytol* 2(4 Suppl) (1956) 179-84.
- [45] S.L. Clark, Jr., Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope, *J Biophys Biochem Cytol* 3(3) (1957) 349-62.
- [46] A.U. Arstila, B.F. Trump, Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration, *Am J Pathol* 53(5) (1968) 687-733.
- [47] R.A. Malt, Ciba Foundation Symposium: Lysosomes, *Archives of Internal Medicine* 114(4) (1964) 566-567.
- [48] R.L. Deter, P. Baudhuin, C. De Duve, Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon, *J Cell Biol* 35(2) (1967) C11-6.
- [49] G.E. Mortimore, W.F. Ward, Behavior of the lysosomal system during organ perfusion. An inquiry into the mechanism of hepatic proteolysis, *Front Biol* 45 (1976) 157-84.
- [50] U. Pfeifer, P. Strauss, Autophagic vacuoles in heart muscle and liver. A comparative morphometric study including circadian variations in meal-fed rats, *J Mol Cell Cardiol* 13(1) (1981) 37-49.
- [51] U. Pfeifer, M. Warmuth-Metz, Inhibition by insulin of cellular autophagy in proximal tubular cells of rat kidney, *Am J Physiol* 244(2) (1983) E109-14.
- [52] P.O. Seglen, P.B. Gordon, 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(6) (1982) 1889-92.
- [53] E.F. Blommaert, U. Krause, J.P. Schellens, H. Vreeling-Sindelárová, A.J. Meijer, The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes, *Eur J Biochem* 243(1-2) (1997) 240-6.
- [54] I. Holen, P.B. Gordon, P.O. Seglen, Protein kinase-dependent effects of okadaic acid on hepatocytic autophagy and cytoskeletal integrity, *Biochem J* 284 (Pt 3)(Pt 3) (1992) 633-6.
- [55] M. Mizunuma, D. Hirata, Recent Developments in Budding Yeast Aging Research and Future Directions, *JOURNAL OF THE BREWING SOCIETY OF JAPAN* 106(12) (2011) 794-800.
- [56] K. Takeshige, M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda, Y. Ohsumi, Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and

- conditions for its induction, *J Cell Biol* 119(2) (1992) 301-11.
- [57] M. Baba, K. Takeshige, N. Baba, Y. Ohsumi, Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization, *J Cell Biol* 124(6) (1994) 903-13.
- [58] M. Baba, M. Osumi, Y. Ohsumi, Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method, *Cell Struct Funct* 20(6) (1995) 465-71.
- [59] T. Noda, D.J. Klionsky, The quantitative Pho8Delta60 assay of nonspecific autophagy, *Methods Enzymol* 451 (2008) 33-42.
- [60] M. Tsukada, Y. Ohsumi, Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett* 333(1-2) (1993) 169-74.
- [61] M. Thumm, R. Egner, B. Koch, M. Schlumpberger, M. Straub, M. Veenhuis, D.H. Wolf, Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett* 349(2) (1994) 275-80.
- [62] T.M. Harding, K.A. Morano, S.V. Scott, D.J. Klionsky, Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway, *J Cell Biol* 131(3) (1995) 591-602.
- [63] M. Baba, M. Osumi, S.V. Scott, D.J. Klionsky, Y. Ohsumi, Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome, *J Cell Biol* 139(7) (1997) 1687-95.
- [64] D.J. Klionsky, J.M. Cregg, W.A. Dunn, Jr., S.D. Emr, Y. Sakai, I.V. Sandoval, A. Sibirny, S. Subramani, M. Thumm, M. Veenhuis, Y. Ohsumi, A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes, *Dev Cell* 5(4) (2003) 539-45.
- [65] K. Suzuki, Y. Ohsumi, [The pre-autophagosomal structure (PAS), required for the formation of autophagosome membrane], *Seikagaku* 75(6) (2003) 492-9.
- [66] K. Suzuki, Y. Kubota, T. Sekito, Y. Ohsumi, Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization, *Genes Cells* 12(2) (2007) 209-18.
- [67] K. Suzuki, T. Noda, Y. Ohsumi, Interrelationships among Atg proteins during autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 21(12) (2004) 1057-65.
- [68] K. Suzuki, T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, Y. Ohsumi, The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation, *Embo j* 20(21) (2001) 5971-81.
- [69] E. Itakura, N. Mizushima, Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins, *Autophagy* 6(6) (2010) 764-76.
- [70] N. Mizushima, H. Sugita, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy, *J Biol Chem* 273(51) (1998) 33889-92.
- [71] N. Mizushima, A. Kuma, Y. Kobayashi, A. Yamamoto, M. Matsubae, T. Takao, T. Natsume, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate, *J Cell Sci* 116(Pt 9) (2003) 1679-88.
- [72] Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing, *Embo j* 19(21) (2000) 5720-8.
- [73] D.D. Sarbassov, S.M. Ali, S. Sengupta, J.H. Sheen, P.P. Hsu, A.F. Bagley, A.L. Markhard, D.M. Sabatini, Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB, *Mol Cell* 22(2) (2006) 159-68.

- [74] G. Chen, X.F. Ding, H. Bouamar, K. Pressley, L.Z. Sun, Everolimus induces G(1) cell cycle arrest through autophagy-mediated protein degradation of cyclin D1 in breast cancer cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 317(2) (2019) C244-c252.
- [75] W. Liu, S. Huang, Z. Chen, H. Wang, H. Wu, D. Zhang, Temsirolimus, the mTOR inhibitor, induces autophagy in adenoid cystic carcinoma: in vitro and in vivo, *Pathol Res Pract* 210(11) (2014) 764-9.
- [76] Y. Tong, Y.Y. Liu, L.S. You, W.B. Qian, Perifosine induces protective autophagy and upregulation of ATG5 in human chronic myelogenous leukemia cells in vitro, *Acta Pharmacol Sin* 33(4) (2012) 542-50.
- [77] S.H. Kim, G. Kim, D.H. Han, M. Lee, I. Kim, B. Kim, K.H. Kim, Y.M. Song, J.E. Yoo, H.J. Wang, S.H. Bae, Y.H. Lee, B.W. Lee, E.S. Kang, B.S. Cha, M.S. Lee, Ezetimibe ameliorates steatohepatitis via AMP activated protein kinase-TFEB-mediated activation of autophagy and NLRP3 inflammasome inhibition, *Autophagy* 13(10) (2017) 1767-1781.
- [78] A. Fleming, T. Noda, T. Yoshimori, D.C. Rubinsztein, Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics, *Nat Chem Biol* 7(1) (2011) 9-17.
- [79] A. Criollo, M.C. Maiuri, E. Tasdemir, I. Vitale, A.A. Fiebig, D. Andrews, J. Molgó, J. Díaz, S. Lavandero, F. Harper, G. Pierron, D. di Stefano, R. Rizzuto, G. Szabadkai, G. Kroemer, Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor, *Cell Death Differ* 14(5) (2007) 1029-39.
- [80] D. Nie, Y. Peng, M. Li, X. Liu, M. Zhu, L. Ye, Lithium chloride (LiCl) induced autophagy and downregulated expression of transforming growth factor β -induced protein (TGFB1) in granular corneal dystrophy, *Exp Eye Res* 173 (2018) 44-50.
- [81] Y.S. Yoon, E.D. Cho, W. Jung Ahn, K. Won Lee, S.J. Lee, H.J. Lee, Is trehalose an autophagic inducer? Unraveling the roles of non-reducing disaccharides on autophagic flux and alpha-synuclein aggregation, *Cell Death Dis* 8(10) (2017) e3091.
- [82] C.W. Lin, Y.S. Chen, C.C. Lin, Y.J. Chen, G.H. Lo, P.H. Lee, P.L. Kuo, C.Y. Dai, J.F. Huang, W.L. Chung, M.L. Yu, Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy, *Sci Rep* 5 (2015) 15807.
- [83] M. Mauthe, I. Orhon, C. Rocchi, X. Zhou, M. Luhr, K.J. Hijlkema, R.P. Coppes, N. Engedal, M. Mari, F. Reggiori, Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion, *Autophagy* 14(8) (2018) 1435-1455.
- [84] Y. Yan, K. Jiang, P. Liu, X. Zhang, X. Dong, J. Gao, Q. Liu, M.P. Barr, Q. Zhang, X. Hou, S. Meng, P. Gong, Bafilomycin A1 induces caspase-independent cell death in hepatocellular carcinoma cells via targeting of autophagy and MAPK pathways, *Sci Rep* 6 (2016) 37052.
- [85] A. Yamamoto, Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, Y. Tashiro, Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells, *Cell Struct Funct* 23(1) (1998) 33-42.
- [86] A. Wang, H. Zhang, Z. Liang, K. Xu, W. Qiu, Y. Tian, H. Guo, J. Jia, E. Xing, R. Chen, Z. Xiang, J. Liu, U0126 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and autophagy in myocardium through MEK/ERK/EGR-1 pathway, *Eur J Pharmacol* 788 (2016) 280-285.
- [87] M.J. Ragusa, R.E. Stanley, J.H. Hurley, Architecture of the Atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis, *Cell* 151(7) (2012) 1501-1512.
- [88] K. Obara, T. Noda, K. Niimi, Y. Ohsumi, Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes Cells* 13(6) (2008) 537-47.

- [89] T. Osawa, T. Kotani, T. Kawaoka, E. Hirata, K. Suzuki, H. Nakatogawa, Y. Ohsumi, N.N. Noda, Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation, *Nat Struct Mol Biol* 26(4) (2019) 281-288.
- [90] N.N. Noda, Atg2 and Atg9: Intermembrane and interleaflet lipid transporters driving autophagy, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1866(8) (2021) 158956.
- [91] N. Mizushima, T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M.D. George, D.J. Klionsky, M. Ohsumi, Y. Ohsumi, A protein conjugation system essential for autophagy, *Nature* 395(6700) (1998) 395-8.
- [92] T. Kirisako, Y. Ichimura, H. Okada, Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Yoshimori, M. Ohsumi, T. Takao, T. Noda, Y. Ohsumi, The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway, *J Cell Biol* 151(2) (2000) 263-76.
- [93] J.F. Dice, Chaperone-mediated autophagy, *Autophagy* 3(4) (2007) 295-9.
- [94] F. Xu, C. Hua, H.M. Tautenhahn, O. Dirsch, U. Dahmen, The Role of Autophagy for the Regeneration of the Aging Liver, *Int J Mol Sci* 21(10) (2020).
- [95] T. Liu, J. Zhang, K. Li, L. Deng, H. Wang, Combination of an Autophagy Inducer and an Autophagy Inhibitor: A Smarter Strategy Emerging in Cancer Therapy, *Front Pharmacol* 11 (2020) 408.
- [96] S. Mohsen, P.T. Sobash, G.F. Algwaiz, N. Nasef, S.A. Al-Zeidaneen, N.A. Karim, Autophagy Agents in Clinical Trials for Cancer Therapy: A Brief Review, *Curr Oncol* 29(3) (2022) 1695-1708.
- [97] K.O. Schink, K.W. Tan, H. Stenmark, Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics, *Annu Rev Cell Dev Biol* 32 (2016) 143-171.
- [98] L. Li, Q. Zhong, Autophagosome-lysosome fusion: PIs to the rescue, *Embo j* 35(17) (2016) 1845-7.
- [99] E.L. Axe, S.A. Walker, M. Manifava, P. Chandra, H.L. Roderick, A. Habermann, G. Griffiths, N.T. Ktistakis, Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol* 182(4) (2008) 685-701.
- [100] C.A. Lamb, T. Yoshimori, S.A. Tooze, The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex, *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(12) (2013) 759-74.
- [101] A.C. Nascimbeni, P. Codogno, E. Morel, Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics, *Febs j* 284(9) (2017) 1267-1278.
- [102] S. Yamashita, M. Oku, Y. Wasada, Y. Ano, Y. Sakai, PI4P-signaling pathway for the synthesis of a nascent membrane structure in selective autophagy, *J Cell Biol* 173(5) (2006) 709-17.
- [103] H. Wang, H.Q. Sun, X. Zhu, L. Zhang, J. Albanesi, B. Levine, H. Yin, GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion, *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(22) (2015) 7015-20.
- [104] D. Judith, H.B.J. Jefferies, S. Boeing, D. Frith, A.P. Snijders, S.A. Tooze, ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase III β , *J Cell Biol* 218(5) (2019) 1634-1652.
- [105] T. Baba, T. Balla, Emerging roles of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as regulators of multiple steps in autophagy, *J Biochem* 168(4) (2020) 329-336.
- [106] D. Mijaljica, M. Prescott, R.J. Devenish, Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum, *Autophagy* 7(7) (2011) 673-82.

- [107] C.H. Moeller, W.W. Thomson, Uptake of lipid bodies by the yeast vacuole involving areas of the tonoplast depleted of intramembranous particles, *J Ultrastruct Res* 68(1) (1979) 38-45.
- [108] A. Chanoca, N. Kovinich, B. Burkel, S. Stecha, A. Bohorquez-Restrepo, T. Ueda, K.W. Eliceiri, E. Grotewold, M.S. Otegui, Anthocyanin Vacuolar Inclusions Form by a Microautophagy Mechanism, *Plant Cell* 27(9) (2015) 2545-59.
- [109] M. Oku, Y. Maeda, Y. Kagohashi, T. Kondo, M. Yamada, T. Fujimoto, Y. Sakai, Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy, *J Cell Biol* 216(10) (2017) 3263-3274.
- [110] T. Maruyama, J.M. Alam, T. Fukuda, S. Kageyama, H. Kirisako, Y. Ishii, I. Shimada, Y. Ohsumi, M. Komatsu, T. Kanki, H. Nakatogawa, N.N. Noda, Membrane perturbation by lipidated Atg8 underlies autophagosome biogenesis, *Nat Struct Mol Biol* 28(7) (2021) 583-593.
- [111] N. Fujita, M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto, H. Omori, A. Yamamoto, T. Noda, T. Yoshimori, An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure, *Mol Biol Cell* 19(11) (2008) 4651-9.
- [112] A. Kuma, M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhiya, N. Mizushima, The role of autophagy during the early neonatal starvation period, *Nature* 432(7020) (2004) 1032-6.
- [113] M.W. Baeken, K. Weckmann, P. Diefenthaler, J. Schulte, K. Yusifli, B. Moosmann, C. Behl, P. Hajieva, Novel Insights into the Cellular Localization and Regulation of the Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C, *Cells* 9(10) (2020).
- [114] T.N. Nguyen, B.S. Padman, J. Usher, V. Oorschot, G. Ramm, M. Lazarou, Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation, *J Cell Biol* 215(6) (2016) 857-874.
- [115] K. Tsuboyama, I. Koyama-Honda, Y. Sakamaki, M. Koike, H. Morishita, N. Mizushima, The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane, *Science* 354(6315) (2016) 1036-1041.
- [116] J.N. Le Grand, F.Z. Chakrama, S. Seguin-Py, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot, M. Boyer-Guittaut, GABARAPL1 (GEC1): original or copycat?, *Autophagy* 7(10) (2011) 1098-107.
- [117] Y. Kabeya, N. Mizushima, A. Yamamoto, S. Oshitani-Okamoto, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation, *J Cell Sci* 117(Pt 13) (2004) 2805-12.
- [118] G.M. Cann, C. Guignabert, L. Ying, N. Deshpande, J.M. Bekker, L. Wang, B. Zhou, M. Rabinovitch, Developmental expression of LC3alpha and beta: absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice, *Dev Dyn* 237(1) (2008) 187-95.
- [119] S.R. Pfeffer, Rab GTPase regulation of membrane identity, *Curr Opin Cell Biol* 25(4) (2013) 414-9.
- [120] M.G. Gutierrez, D.B. Munafó, W. Berón, M.I. Colombo, Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells, *J Cell Sci* 117(Pt 13) (2004) 2687-97.
- [121] S. Jäger, C. Bucci, I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, P. Saftig, E.L. Eskelinen, Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles, *J Cell Sci* 117(Pt 20) (2004) 4837-48.
- [122] Y. Kuchitsu, M. Fukuda, Revisiting Rab7 Functions in Mammalian Autophagy: Rab7 Knockout Studies, *Cells* 7(11) (2018).
- [123] A. Fujita, T. Fujimoto, N. Ozato-Sakurai, H. Suzuki, A method for efficient observation of intracellular membranes of monolayer culture cells by quick-freeze and freeze-fracture electron microscopy, *J Electron Microsc (Tokyo)* 61(6) (2012) 441-6.

- [124] A. Fujita, J. Cheng, T. Fujimoto, Quantitative electron microscopy for the nanoscale analysis of membrane lipid distribution, *Nat Protoc* 5(4) (2010) 661-9.
- [125] A. Fujita, J. Cheng, K. Tauchi-Sato, T. Takenawa, T. Fujimoto, A distinct pool of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolae revealed by a nanoscale labeling technique, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(23) (2009) 9256-61.
- [126] A. Yoshida, M. Shigekuni, K. Tanabe, A. Fujita, Nanoscale analysis reveals agonist-sensitive and heterogeneous pools of phosphatidylinositol 4-phosphate in the plasma membrane, *Biochim Biophys Acta* 1858(6) (2016) 1298-305.
- [127] N. Shinozaki-Narikawa, Y. Shibasaki, [Visualization of phosphoinositide: signaling lipids in living cells], *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 49(10) (2004) 1361-6.
- [128] M. Fengsrud, E.S. Erichsen, T.O. Berg, C. Raiborg, P.O. Seglen, Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy, *Eur J Cell Biol* 79(12) (2000) 871-82.
- [129] A. Yoshida, H. Hayashi, K. Tanabe, A. Fujita, Segregation of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into distinct microdomains on the endosome membrane, *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859(10) (2017) 1880-1890.
- [130] K.N. Tomioku, M. Shigekuni, H. Hayashi, A. Yoshida, T. Futagami, H. Tamaki, K. Tanabe, A. Fujita, Nanoscale domain formation of phosphatidylinositol 4-phosphate in the plasma and vacuolar membranes of living yeast cells, *Eur J Cell Biol* 97(4) (2018) 269-278.
- [131] K. Wang, Z. Yang, X. Liu, K. Mao, U. Nair, D.J. Klionsky, Phosphatidylinositol 4-kinases are required for autophagic membrane trafficking, *J Biol Chem* 287(45) (2012) 37964-72.
- [132] T. Kirisako, M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda, Y. Ohsumi, Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast, *J Cell Biol* 147(2) (1999) 435-46.
- [133] E.L. Eskelinen, Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells, *Autophagy* 1(1) (2005) 1-10.
- [134] H. Weidberg, E. Shvets, T. Shpilka, F. Shimron, V. Shinder, Z. Elazar, LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis, *Embo j* 29(11) (2010) 1792-802.
- [135] D.J. Klionsky, Z. Elazar, P.O. Seglen, D.C. Rubinsztein, Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes?, *Autophagy* 4(7) (2008) 849-50.
- [136] N. Matsuda, S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C.A. Gautier, Y.S. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori, K. Tanaka, PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy, *J Cell Biol* 189(2) (2010) 211-21.
- [137] D. Narendra, A. Tanaka, D.F. Suen, R.J. Youle, Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy, *J Cell Biol* 183(5) (2008) 795-803.
- [138] C. Vives-Bauza, C. Zhou, Y. Huang, M. Cui, R.L. de Vries, J. Kim, J. May, M.A. Tocilescu, W. Liu, H.S. Ko, J. Magrané, D.J. Moore, V.L. Dawson, R. Grailhe, T.M. Dawson, C. Li, K. Tieu, S. Przedborski, PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(1) (2010) 378-83.
- [139] T. Saitoh, N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B.G. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, S. Akira, Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production, *Nature* 456(7219) (2008) 264-8.

- [140] J. Cheng, A. Fujita, H. Yamamoto, T. Tatematsu, S. Kakuta, K. Obara, Y. Ohsumi, T. Fujimoto, Yeast and mammalian autophagosomes exhibit distinct phosphatidylinositol 3-phosphate asymmetries, *Nat Commun* 5 (2014) 3207.
- [141] S.A. Tooze, T. Yoshimori, The origin of the autophagosomal membrane, *Nat Cell Biol* 12(9) (2010) 831-5.
- [142] Y. Yang, L. Zheng, X. Zheng, L. Ge, Autophagosomal Membrane Origin and Formation, *Adv Exp Med Biol* 1208 (2021) 17-42.
- [143] A. Kihara, T. Noda, N. Ishihara, Y. Ohsumi, Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* 152(3) (2001) 519-30.
- [144] A. Petiot, E. Ogier-Denis, E.F. Blommaert, A.J. Meijer, P. Codogno, Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells, *J Biol Chem* 275(2) (2000) 992-8.
- [145] T. Balla, Imaging and manipulating phosphoinositides in living cells, *J Physiol* 582 (Pt 3) (2007) 927-37.
- [146] K.A. Tanaka, K.G. Suzuki, Y.M. Shirai, S.T. Shibutani, M.S. Miyahara, H. Tsuboi, M. Yahara, A. Yoshimura, S. Mayor, T.K. Fujiwara, A. Kusumi, Membrane molecules mobile even after chemical fixation, *Nat Methods* 7(11) (2010) 865-6.
- [147] U. Güldener, S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, J.H. Hegemann, A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast, *Nucleic Acids Res* 24(13) (1996) 2519-24.
- [148] J.S. Robinson, D.J. Klionsky, L.M. Banta, S.D. Emr, Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases, *Mol Cell Biol* 8(11) (1988) 4936-48.
- [149] T. Fujimoto, K. Fujimoto, Metal sandwich method to quick-freeze monolayer cultured cells for freeze-fracture, *J Histochem Cytochem* 45(4) (1997) 595-8.
- [150] S. Yoshida, Y. Ohya, M. Goebel, A. Nakano, Y. Anraku, A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 269(2) (1994) 1166-72.
- [151] N. Mizushima, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, Autophagosome formation in mammalian cells, *Cell Struct Funct* 27(6) (2002) 421-9.
- [152] C.W. Wang, D.J. Klionsky, The molecular mechanism of autophagy, *Mol Med* 9(3-4) (2003) 65-76.
- [153] T. Yoshimori, [Autophagy: from discovery of the marker to debate on membrane biogenesis], *Seikagaku* 83(2) (2011) 81-92.
- [154] C.A. Mercer, A. Kaliappan, P.B. Dennis, A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy, *Autophagy* 5(5) (2009) 649-62.
- [155] N. Hosokawa, T. Sasaki, S. Iemura, T. Natsume, T. Hara, N. Mizushima, Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13, *Autophagy* 5(7) (2009) 973-9.
- [156] N. Mizushima, The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation, *Curr Opin Cell Biol* 22(2) (2010) 132-9.
- [157] H. Suzuki, T. Kaizuka, N. Mizushima, N.N. Noda, Structure of the Atg101-Atg13 complex reveals essential roles of Atg101 in autophagy initiation, *Nat Struct Mol Biol* 22(7) (2015) 572-80.
- [158] H. Nakatogawa, K. Suzuki, Y. Kamada, Y. Ohsumi, Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(7) (2009) 458-67.
- [159] R.J. Xavier, D.K. Podolsky, Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature* 448(7152) (2007) 427-34.
- [160] S. Kimura, T. Noda, T. Yoshimori, Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with

- lysosomes, *Cell Struct Funct* 33(1) (2008) 109-22.
- [161] K. Matoba, T. Kotani, A. Tsutsumi, T. Tsuji, T. Mori, D. Noshiro, Y. Sugita, N. Nomura, S. Iwata, Y. Ohsumi, T. Fujimoto, H. Nakatogawa, M. Kikkawa, N.N. Noda, Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion, *Nat Struct Mol Biol* 27(12) (2020) 1185-1193.
- [162] M. Orii, T. Tsuji, Y. Ogasawara, T. Fujimoto, Transmembrane phospholipid translocation mediated by Atg9 is involved in autophagosome formation, *J Cell Biol* 220(3) (2021).
- [163] M. Muramoto, Y. Yamakuchi, R. Konishi, S. Koudatsu, H. Tomikura, K. Fukuda, S. Kuriyama, Y. Kurokawa, T. Masatani, H. Tamaki, A. Fujita, Essential roles of phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatases Sac1p and Sjl3p in yeast autophagosome formation, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1867(9) (2022) 159184.
- [164] Y. Yamakuchi, Y. Kurokawa, R. Konishi, K. Fukuda, T. Masatani, A. Fujita, Selective increment of phosphatidylserine on the autophagic body membrane in the yeast vacuole, *FEBS Lett* 595(17) (2021) 2197-2207.
- [165] K. Maeda, K. Anand, A. Chiapparino, A. Kumar, M. Poletto, M. Kaksonen, A.C. Gavin, Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins, *Nature* 501(7466) (2013) 257-61.
- [166] J. Moser von Filseck, A. Čopič, V. Delfosse, S. Vanni, C.L. Jackson, W. Bourguet, G. Drin, INTRACELLULAR TRANSPORT. Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate, *Science* 349(6246) (2015) 432-6.
- [167] S. Yang, A.G. Rosenwald, The roles of monomeric GTP-binding proteins in macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*, *Int J Mol Sci* 15(10) (2014) 18084-101.
- [168] J. Gao, F. Reggiori, C. Ungermann, A novel in vitro assay reveals SNARE topology and the role of Ykt6 in autophagosome fusion with vacuoles, *J Cell Biol* 217(10) (2018) 3670-3682.
- [169] L. Bas, D. Papinski, M. Licheva, R. Torggler, S. Rohringer, M. Schuschnig, C. Kraft, Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion, *J Cell Biol* 217(10) (2018) 3656-3669.
- [170] L.L. Listenberger, X. Han, S.E. Lewis, S. Cases, R.V. Farese, Jr., D.S. Ory, J.E. Schaffer, Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6) (2003) 3077-82.
- [171] S.D. Kohlwein, Obese and anorexic yeasts: experimental models to understand the metabolic syndrome and lipotoxicity, *Biochim Biophys Acta* 1801(3) (2010) 222-9.
- [172] R.V. Farese, Jr., T.C. Walther, Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T, *Cell* 139(5) (2009) 855-60.
- [173] J.A. Olzmann, P. Carvalho, Dynamics and functions of lipid droplets, *Nat Rev Mol Cell Biol* 20(3) (2019) 137-155.
- [174] Y. Tatenaka, H. Kato, M. Ishiyama, K. Sasamoto, M. Shiga, H. Nishitoh, Y. Ueno, Monitoring Lipid Droplet Dynamics in Living Cells by Using Fluorescent Probes, *Biochemistry* 58(6) (2019) 499-503.
- [175] T. Fujimoto, Y. Ohsaki, J. Cheng, M. Suzuki, Y. Shinohara, Lipid droplets: a classic organelle with new outfits, *Histochem Cell Biol* 130(2) (2008) 263-79.
- [176] V. Choudhary, N. Ojha, A. Golden, W.A. Prinz, A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER, *J Cell Biol* 211(2) (2015) 261-71.
- [177] A. Zadoorian, X. Du, H. Yang, Lipid droplet biogenesis and functions in health and disease, *Nat Rev Endocrinol* (2023) 1-17.

- [178] C.W. Wang, Y.H. Miao, Y.S. Chang, A sterol-enriched vacuolar microdomain mediates stationary phase lipophagy in budding yeast, *J Cell Biol* 206(3) (2014) 357-66.
- [179] T. Tsuji, M. Fujimoto, T. Tatematsu, J. Cheng, M. Orii, S. Takatori, T. Fujimoto, Niemann-Pick type C proteins promote microautophagy by expanding raft-like membrane domains in the yeast vacuole, *Elife* 6 (2017).
- [180] T. van Zutphen, V. Todde, R. de Boer, M. Kreim, H.F. Hofbauer, H. Wolinski, M. Veenhuis, I.J. van der Klei, S.D. Kohlwein, Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Biol Cell* 25(2) (2014) 290-301.
- [181] H.J. Kwon, L. Abi-Mosleh, M.L. Wang, J. Deisenhofer, J.L. Goldstein, M.S. Brown, R.E. Infante, Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol, *Cell* 137(7) (2009) 1213-24.
- [182] M.L. Wang, M. Motamed, R.E. Infante, L. Abi-Mosleh, H.J. Kwon, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes, *Cell Metab* 12(2) (2010) 166-73.
- [183] A.I. Rosenbaum, F.R. Maxfield, Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches, *J Neurochem* 116(5) (2011) 789-95.
- [184] A. Toulmay, W.A. Prinz, Direct imaging reveals stable, micrometer-scale lipid domains that segregate proteins in live cells, *J Cell Biol* 202(1) (2013) 35-44.
- [185] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2) (2008) 112-24.
- [186] B. Mesmin, F.R. Maxfield, Intracellular sterol dynamics, *Biochim Biophys Acta* 1791(7) (2009) 636-45.
- [187] B. Mesmin, B. Antonny, The counterflow transport of sterols and PI4P, *Biochim Biophys Acta* 1861(8 Pt B) (2016) 940-951.
- [188] K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, M. Nishijima, Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide, *Nature* 426(6968) (2003) 803-9.
- [189] R.J. Perry, N.D. Ridgway, Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein, *Mol Biol Cell* 17(6) (2006) 2604-16.
- [190] B. Mesmin, J. Bigay, J. Moser von Filseck, S. Lacas-Gervais, G. Drin, B. Antonny, A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP, *Cell* 155(4) (2013) 830-43.
- [191] A. Arora, J.H. Taskinen, V.M. Olkkonen, Coordination of inter-organelle communication and lipid fluxes by OSBP-related proteins, *Prog Lipid Res* 86 (2022) 101146.
- [192] G.D. Fairn, C.R. McMaster, Emerging roles of the oxysterol-binding protein family in metabolism, transport, and signaling, *Cell Mol Life Sci* 65(2) (2008) 228-36.
- [193] M. de Saint-Jean, V. Delfosse, D. Douguet, G. Chicanne, B. Payrastre, W. Bourguet, B. Antonny, G. Drin, Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers, *J Cell Biol* 195(6) (2011) 965-78.
- [194] J. Moser von Filseck, S. Vanni, B. Mesmin, B. Antonny, G. Drin, A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes, *Nat Commun* 6 (2015) 6671.
- [195] B. Mesmin, J. Bigay, J. Polidori, D. Jamecna, S. Lacas-Gervais, B. Antonny, Sterol transfer, PI4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP, *Embo j* 36(21) (2017) 3156-3174.
- [196] S. Prattes, G. Hörl, A. Hammer, A. Blaschitz, W.F. Graier, W. Sattler, R. Zechner, E. Steyrer, Intracellular distribution and

- mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures, *J Cell Sci* 113 (Pt 17) (2000) 2977-89.
- [197] K. Tsuchi-Sato, S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, T. Fujimoto, The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition, *J Biol Chem* 277(46) (2002) 44507-12.
- [198] I. Kissová, B. Salin, J. Schaeffer, S. Bhatia, S. Manon, N. Camougrand, Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast, *Autophagy* 3(4) (2007) 329-36.
- [199] O. Müller, T. Sattler, M. Flötenmeyer, H. Schwarz, H. Plattner, A. Mayer, Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding, *J Cell Biol* 151(3) (2000) 519-28.
- [200] S. Schuck, C.M. Gallagher, P. Walter, ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery, *J Cell Sci* 127(Pt 18) (2014) 4078-88.
- [201] Y. Sakai, A. Koller, L.K. Rangell, G.A. Keller, S. Subramani, Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates, *J Cell Biol* 141(3) (1998) 625-36.
- [202] P. Roberts, S. Moshitch-Moshkovitz, E. Kvam, E. O'Toole, M. Winey, D.S. Goldfarb, Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Biol Cell* 14(1) (2003) 129-41.
- [203] O. Nureki, Structural basis for molecular mechanism of membrane channels and transporters., 領域融合レビュー, 2013, p. e009.
- [204] 高野幹久、川見昌史、湯元良子、「細胞膜を介したトランスポーター介在性輸送と小胞輸送によるその制御」、膜 40(1) (2015) 21-28.
- [205] S.S. Stojilkovic, T. Balla, PI(4,5)P₂-dependent and -independent roles of PI4P in the control of hormone secretion by pituitary cells, *Front Endocrinol (Lausanne)* 14 (2023) 1118744.
- [206] B. Hille, E.J. Dickson, M. Kruse, O. Vivas, B.C. Suh, Phosphoinositides regulate ion channels, *Biochim Biophys Acta* 1851(6) (2015) 844-56.
- [207] V. Haucke, Phosphoinositide regulation of clathrin-mediated endocytosis, *Biochem Soc Trans* 33(Pt 6) (2005) 1285-9.
- [208] G. Odorizzi, M. Babst, S.D. Emr, Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast, *Trends Biochem Sci* 25(5) (2000) 229-35.
- [209] G. Di Paolo, P. De Camilli, Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics, *Nature* 443(7112) (2006) 651-7.
- [210] S. McLaughlin, D. Murray, Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics, *Nature* 438(7068) (2005) 605-11.
- [211] A. Fujita, J. Cheng, M. Hirakawa, K. Furukawa, S. Kusunoki, T. Fujimoto, Gangliosides GM1 and GM3 in the living cell membrane form clusters susceptible to cholesterol depletion and chilling, *Mol Biol Cell* 18(6) (2007) 2112-22.
- [212] C. Schuberth, R. Wedlich-Söldner, Building a patchwork - The yeast plasma membrane as model to study lateral domain formation, *Biochim Biophys Acta* 1853(4) (2015) 767-74.
- [213] S. Munro, Lipid rafts: elusive or illusive?, *Cell* 115(4) (2003) 377-88.
- [214] N.E. Ziolkowska, R. Christiano, T.C. Walther, Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast, *Trends Cell Biol* 22(3) (2012) 151-8.
- [215] M.E. Young, T.S. Karpova, B. Brügger, D.M. Moschenross, G.K. Wang, R. Schneider, F.T. Wieland, J.A. Cooper, The Sur7p

- family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation, *Mol Cell Biol* 22(3) (2002) 927-34.
- [216] K. Malinská, J. Malínský, M. Opekarová, W. Tanner, Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells, *Mol Biol Cell* 14(11) (2003) 4427-36.
- [217] K. Malinska, J. Malinsky, M. Opekarova, W. Tanner, Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells, *J Cell Sci* 117(Pt 25) (2004) 6031-41.
- [218] T.C. Walther, J.H. Brickner, P.S. Aguilar, S. Bernales, C. Pantoja, P. Walter, Eisosomes mark static sites of endocytosis, *Nature* 439(7079) (2006) 998-1003.
- [219] H. Moor, K. Mühlethaler, FINE STRUCTURE IN FROZEN-ETCHED YEAST CELLS, *J Cell Biol* 17(3) (1963) 609-28.
- [220] V. Strádalová, W. Stahlschmidt, G. Grossmann, M. Blazíková, R. Rachel, W. Tanner, J. Malinsky, Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1, *J Cell Sci* 122(Pt 16) (2009) 2887-94.
- [221] N.E. Ziółkowska, L. Karotki, M. Rehman, J.T. Huiskonen, T.C. Walther, Eisosome-driven plasma membrane organization is mediated by BAR domains, *Nat Struct Mol Biol* 18(7) (2011) 854-6.
- [222] L. Karotki, J.T. Huiskonen, C.J. Stefan, N.E. Ziółkowska, R. Roth, M.A. Surma, N.J. Krogan, S.D. Emr, J. Heuser, K. Grünewald, T.C. Walther, Eisosome proteins assemble into a membrane scaffold, *J Cell Biol* 195(5) (2011) 889-902.
- [223] H. Zhao, A. Michelot, E.V. Koskela, V. Tkach, D. Stamou, D.G. Drubin, P. Lappalainen, Membrane-sculpting BAR domains generate stable lipid microdomains, *Cell Rep* 4(6) (2013) 1213-23.
- [224] R. Kabeche, A. Roguev, N.J. Krogan, J.B. Moseley, A Pil1-Sle1-Syjl-Tax4 functional pathway links eisosomes with PI(4,5)P2 regulation, *J Cell Sci* 127(Pt 6) (2014) 1318-26.
- [225] B.C. Suh, B. Hille, PIP2 is a necessary cofactor for ion channel function: how and why?, *Annu Rev Biophys* 37 (2008) 175-95.
- [226] C.E. Lanze, R.M. Gandra, J.E. Foderaro, K.A. Swenson, L.M. Douglas, J.B. Konopka, Plasma Membrane MCC/Eisosome Domains Promote Stress Resistance in Fungi, *Microbiol Mol Biol Rev* 84(4) (2020).
- [227] J.O. De Craene, D.L. Bertazzi, S. Bär, S. Friant, Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways, *Int J Mol Sci* 18(3) (2017).
- [228] K.E. Moreira, S. Schuck, B. Schrul, F. Fröhlich, J.B. Moseley, T.C. Walther, P. Walter, Seg1 controls eisosome assembly and shape, *J Cell Biol* 198(3) (2012) 405-20.
- [229] L.E. Stolz, C.V. Huynh, J. Thorner, J.D. York, Identification and characterization of an essential family of inositol polyphosphate 5-phosphatases (INP51, INP52 and INP53 gene products) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 148(4) (1998) 1715-29.
- [230] F. Fröhlich, R. Christiano, D.K. Olson, A. Alcazar-Roman, P. DeCamilli, T.C. Walther, A role for eisosomes in maintenance of plasma membrane phosphoinositide levels, *Mol Biol Cell* 25(18) (2014) 2797-806.
- [231] E.R. Murphy, J. Boxberger, R. Colvin, S.J. Lee, G. Zahn, F. Loor, K. Kim, Pil1, an eisosome organizer, plays an important role in the recruitment of synaptojanins and amphiphysins to facilitate receptor-mediated endocytosis in yeast, *Eur J Cell Biol* 90(10) (2011) 825-33.
- [232] H. Hama, E.A. Schnieders, J. Thorner, J.Y. Takemoto, D.B. DeWald, Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate

- in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 274(48) (1999) 34294-300.
- [233] T. Strahl, H. Hama, D.B. DeWald, J. Thorner, Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, *Pik1*, has essential roles at the Golgi and in the nucleus, *J Cell Biol* 171(6) (2005) 967-79.
- [234] C. Walch-Solimena, P. Novick, The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase *pik1* regulates secretion at the Golgi, *Nat Cell Biol* 1(8) (1999) 523-5.
- [235] A. Audhya, S.D. Emr, *Stt4* PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the *Pkc1*-mediated MAP kinase cascade, *Dev Cell* 2(5) (2002) 593-605.
- [236] A. Balla, Y.J. Kim, P. Varnai, Z. Szentpetery, Z. Knight, K.M. Shokat, T. Balla, Maintenance of hormone-sensitive phosphoinositide pools in the plasma membrane requires phosphatidylinositol 4-kinase III α , *Mol Biol Cell* 19(2) (2008) 711-21.
- [237] F. Nakatsu, J.M. Baskin, J. Chung, L.B. Tanner, G. Shui, S.Y. Lee, M. Pirruccello, M. Hao, N.T. Ingolia, M.R. Wenk, P. De Camilli, *PtdIns4P* synthesis by *PI4KIII α* at the plasma membrane and its impact on plasma membrane identity, *J Cell Biol* 199(6) (2012) 1003-16.
- [238] Z. Szentpetery, P. Várnai, T. Balla, Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18) (2010) 8225-30.
- [239] M.K. Bennett, R.H. Scheller, The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7) (1993) 2559-63.
- [240] J.E. Rothman, F.T. Wieland, Protein sorting by transport vesicles, *Science* 272(5259) (1996) 227-34.
- [241] R. Schekman, L. Orci, Coat proteins and vesicle budding, *Science* 271(5255) (1996) 1526-33.
- [242] A. Roy, T.P. Levine, Multiple pools of phosphatidylinositol 4-phosphate detected using the pleckstrin homology domain of *Osh2p*, *J Biol Chem* 279(43) (2004) 44683-9.
- [243] D. Baird, C. Stefan, A. Audhya, S. Weys, S.D. Emr, Assembly of the *PtdIns* 4-kinase *Stt4* complex at the plasma membrane requires *Ypp1* and *Efr3*, *J Cell Biol* 183(6) (2008) 1061-74.
- [244] W. Yamamoto, S. Wada, M. Nagano, K. Aoshima, D.E. Siekhaus, J.Y. Toshima, J. Toshima, Distinct roles for plasma membrane *PtdIns(4)P* and *PtdIns(4,5)P(2)* during receptor-mediated endocytosis in yeast, *J Cell Sci* 131(1) (2018).
- [245] K. Homma, S. Terui, M. Minemura, H. Qadota, Y. Anraku, Y. Kanaho, Y. Ohya, Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis, *J Biol Chem* 273(25) (1998) 15779-86.