

博士論文（要約）

Saccharomyces cerevisiae におけるオルガネラ間
リン脂質輸送機構の研究

水池 彩

目次

目次.....	1
略称について.....	2
序章.....	4
出芽酵母の主要なリン脂質.....	5
出芽酵母におけるリン脂質の組成と分布.....	6
出芽酵母におけるリン脂質生合成経路.....	6
出芽酵母におけるリン脂質の合成・代謝制御.....	8
脂質の輸送.....	8
脂質輸送の解析法と問題点.....	12
ミトコンドリアと脂質.....	13
本研究の概要.....	14
第1章 Sfh1の機能の解析.....	20
第2章 Sfh1とSec14の機能の違いの解析.....	21
第3章 Sec14ファミリータンパク質の機能解析.....	22
終章.....	23
Reference.....	26
謝辞.....	31

略称について

本論文に使用した略称を以下に示す。

ATCC	American Type Culture Collection
AVED	ataxia with vitamin E deficiency
BSA	bovine serum albumin
CDP	cytidine diphosphate
Cho	choline
CDP-DAG	CDP-diacylglycerol
CL	cardiolipin
COX	cytochrome c oxidase
CTP	cytidine triphosphate
DAG	diacylglycerol
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine
DOPS	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-[phospho-L-serine]
EDTA	Ethylenediamine- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescence protein
EMC	endoplasmic reticulum membrane protein complex
ER	endoplasmic reticulum
ERMES	endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure
ESI	electrospray ionization
Etn	ethanolamine
EUROSCARF	EUROPEAN SACCAROMYCES CEREVISIAE ARCHIVES FOR FUNCTIONAL ANALYSIS
FFAT	two phenylalanines in acidic tract
FRET	fluorescence resonance energy transfer
HOPS	homotypic fusion and vacuole protein sorting complex
IPTG	isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
LTP	lipid transfer protein
MCS	membrane contact site
NAA	1-naphthaleneacetic acid
NVJ	nucleus-vacuole junction
OSBP	oxysterol binding protein
ORD	OSBP-related domain
ORF	open reading frame
PA	phosphatidic acid
PBS	phosphate buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PG	phosphatidylglycerol
PGP	phosphatidylglycerol phosphate

PH domain	pleckstrin-homology domain
PI	phosphatidylinositol
PI3P	phosphatidylinositol-3-phosphate
PI(3,4)P ₂	phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
PI(3,5)P ₂	phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate
PI4P	phosphatidylinositol-4-phosphate
PI(4,5)P ₂	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PLOA	protein lipid overlay assay
PMME	phosphatidylmonomethylethanolamine
POPA	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphate
PS	phosphatidylserine
S1P	sphingosine-1-phosphate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	serine
SFH	Sec Fourteen Homolog
SMP	synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding protein
START	steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer
TBS	Tris buffered saline
TLC	thin-layer chromatography
TIM	translocase of the inner membrane
TOM	translocase of the outer membrane
VAP	vesicle-associated membrane protein-associated protein
vCLAMP	vacuole and mitochondria patch

序章

生体膜は、基本的に脂質二重層により形成され、細胞の内部と外界を、またオルガネラの内部を細胞質あるいは外部と隔てる細胞にとって必須の成分である。生体膜は細胞やオルガネラがその機能を果たすうえでの重要な化学反応の場や、物質・情報のやりとりの場を提供する。

生体膜を構成する脂質成分には、グリセロリン脂質（以下リン脂質）、スフィンゴ脂質、糖脂質、ステロールなど1,000を超える種の膜脂質が存在すると言われている。特に、リン脂質は最も多く存在する膜脂質である。生体膜の主要構成成分であるリン脂質には、その極性頭部の構造からいくつかの種類が存在する。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*においてはホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、カルジオリピン (CL)が主要なリン脂質である (Fig. 0-1¹)。一部の細菌でPC、PIが見られないという例外はあるが、動物から細菌まで全ての生物が基本的にこれらのリン脂質を生体膜の主要構成成分として利用しており、全ての生物においてリン脂質は非常に重要な役割を担っているといえる。

生体膜は、物理的・化学的に性質の異なる多様な種の膜脂質の組成を変化させることで温度変化等による脂質膜の相転移などに対応し、恒常性を維持する。また生体膜は、PEやCLのように極性頭部のサイズが小さく膜に曲率を生み出す脂質を利用して膜の形態を大きく変化させると考えられている。細胞やオルガネラは、生体膜がこのようにダイナミックに膜構造を変化させることで環境の変化に対応する。

一方で、生体膜は融合と分裂を繰り返しており、形状は常に動的な状態にある。例えば、小胞輸送における出芽と融合、オルガネラの分裂と融合、細胞の分裂、接合などにおいて、生体膜はダイナミックな膜構造の再編成を行っている。生体膜の構造変化は時間的・空間的に緻密な制御を受けており、リン脂質も組成・分布を変化させることにより生体膜の構造変化に寄与すると考えられている。

さらに生体膜中では、様々な種の脂質が共存する中で、親和性の高い脂質分子同士が相互作用することにより特性の異なるマイクロドメインが形成されると考えられている。マイクロドメインは、一部のタンパク質の局在や機能に重要な役割を果たし、その反応の場を提供したり、シグナル伝達の効率化に寄与したりする。また、ホスホイノシチドやスフィンゴ脂質はGTPaseなどの機能タンパク質の調節因子として働くことや、それらの派生体がセカンドメッセンジャーとして働くことが知られており、膜脂質は細胞内情報伝達にも関与する。リン脂質の中でも特にPSやPA、ホスホイノシチドなどの酸性脂質は、脂質分子に特異的に結合するタンパク質を生体膜にリクルートする働きを有し、それらの脂質の局所的な分布の時間的・空間的制御により細胞内の様々なプロセスに関与することが報告されている。

出芽酵母の主要なリン脂質

PS

PSは極性頭部にセリンを有する脂質である。PSは負電荷を有し、細胞膜の内層側に多く存在する酸性脂質であり、PC、PIと同様に脂質二重層を構成する。PSは、*S. cerevisiae*のCDP-DAG経路においてPE、PCの前駆体として利用されるほか、PS自体も一部の膜タンパク質の活性や²、ストレスに応答したPkc1の活性化³などに関与している。PSは出芽酵母において生育に必須ではないが、PS合成欠損株はケネディ経路を介したPE、PCの合成を生育に必要とする。

PE

PEは、極性頭部にエタノールアミンを有する生育に必須の両性イオン性の脂質である。PEは極性頭部が小さく、相互に水素結合を形成しやすいことから、常温でpHが5-8の水中において逆位のヘキサゴナル構造 (H_{II} 構造)をとり得ると考えられている。PEはミトコンドリアの機能や形態維持に必須で、PE欠乏状態のミトコンドリアは呼吸機能欠損となる。また、PEは、Atg8との共有結合を介してオートファジーに必須の役割を果たしたり、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI)アンカー合成の過程でホスホエタノールアミンを供与したりするなど細胞内の様々なプロセスに特異的かつ重要な役割を担う。

PC

PCは、極性頭部にコリンを有しており、PEと同様に両性イオン性の脂質である。PCは、PEと比較すると3つのメチル基を有している分より大きな極性頭部を有し、典型的なシリンダー型の構造をとる二重層構成脂質である。PCは、*S. cerevisiae*細胞内のリン脂質の中で最も存在量が多い脂質である。PCは生体膜の主要構成因子というだけでなく、脂質メッセンジャーのリザーバーとしての機能も有する。PCはホスホリパーゼDによりPAに、ホスホリパーゼCによりジアシルグリセロール (DAG)に、ホスホリパーゼAによりリゾPCと遊離脂肪酸に加水分解されるが、これらの産物はいずれも情報伝達に関与する脂質である。例えば、胞子形成の過程では、ホスホリパーゼD活性を有するSpo14によるPA産生の基質になる⁴。このような性質から、PCは生育に必須の脂質と考えられるが、*S. cerevisiae*は生体内には本来存在しないホスファチジルプロパノールアミンをPCの代替として利用し生育できるという報告もある⁵。

PI

PIは、生育に必須の負電荷を有する二重層構成脂質である。PIは、膜の構成因子となるだけでなく、GPIアンカーの合成に利用されたり、シグナル伝達に関与するホスホイノシチドの前駆物質となったりする。また*S. cerevisiae*において、PIのイノシトールはスフィンゴ脂質の合成に利用される。

CL

CLは、ミトコンドリアの機能に必須なリン脂質で、主にミトコンドリア内膜に局在する。CLは呼吸鎖複合体の安定化、活性化、ミトコンドリアの形態維持に関与する。CLは *S. cerevisiae* の生育に必須ではないが、ミトコンドリアのPE合成酵素Psd1とCL合成酵素Crd1の両方を欠失すると細胞は致死となる。CLはグリセロール骨格を2つ有しており、極性頭部が小さく、H_{II}構造をとる。

ホスホイノシチド

ホスホイノシチドは、PIのイノシトール環がリン酸化修飾を受けることで合成される。ホスホイノシチドは、細胞内の存在量は少ないが、生育に重要である。*S. cerevisiae*中に存在するホスホイノシチドは、PI3P、PI(3,5)P₂、PI4P、PI(4,5)P₂であり、その中でもPI4Pの合成酵素をコードするPIK1、STT4と、PI4PからPI(4,5)P₂を合成する酵素をコードするMSS4は生育に必須であることから、PI4P、PI(4,5)P₂は生育に必須であると考えられる。ホスホイノシチドは、Fig. 0-2に示すように特定の膜に局在し、タンパク質を目的の膜にリクルートしたり、セカンドメッセンジャーのイノシトールリン酸を供与したりすることで、様々な細胞プロセスの制御に関与する。また近年では、ホスホイノシチドを利用することにより、濃度勾配に逆らって脂質を膜間で小胞輸送非依存的に輸送するというモデルも提唱されている^{6,7}。

出芽酵母におけるリン脂質の組成と分布

脂質分子は細胞内で不均一に分布しており、各オルガネラはそれぞれ異なった脂質組成を有する (Fig. 0-2, Table. 0-1⁸)。リン脂質についても、例えばPSは細胞膜に多く局在し、CLはミトコンドリアにのみ局在するなど偏った分布を示す。また、脂質分子は、脂質二重層の内層・外層間においても非対称に分布しており、例えば細胞膜ではPSやPEが内層側に多く分布していることが知られている。このようなオルガネラごとの、また、生体膜内層・外層間の偏った脂質分布はオルガネラの特異性や機能に重要であると考えられている。オルガネラごとの異なる脂質組成は脂質の局所的な合成と代謝、及び方向性をもった輸送により形成され、維持されると考えられている。また、膜の内層・外層間の非対称分布は、脂質二重層の内層・外層間で脂質分子を輸送するトランスロカーゼにより生み出され、維持されると考えられている⁹。

出芽酵母におけるリン脂質生合成経路

*S. cerevisiae*において、リン脂質合成に関与する酵素はほぼ全て同定されている (Fig. 0-3)。 *S. cerevisiae*におけるリン脂質合成経路では、まずグリセロール三リン酸に2つのアシル鎖が順次転移され、ホスファチジン酸 (PA)が合成される。続いてPAとCTPから小胞体のCDP-ジアシルグリセロール (CDP-DAG)合成酵素Cds1またはミトコンドリアのTam41

によりCDP-DAGが合成される。CDP-DAG経路では、小胞体のPI合成酵素Pis1がCDP-DAGにmyo-イノシトールを付加してPIを、小胞体のPS合成酵素Pss1がCDP-DAGにL-セリンを付加してPSを合成する。PSの一部はミトコンドリア内膜に局在するPS脱炭酸酵素Psd1、またはエンドソームに局在するPsd2により脱炭酸され、PEへと変換される。PEの一部は小胞体のPEメチル化酵素Pem1、Pem2による3段階のメチル化を受けてPCとなる。また、ミトコンドリアにおいてはCDP-DAGの一部はPgs1によりホスファチジルグリセロールリン酸 (PGP)に変換され、さらにPGPはGep4による脱リン酸化を受けてホスファチジルグリセロール (PG)となる。PGとCDP-DAGからCrd1によりCLが合成される。さらに、CLはホスホリパーゼであるCld1とアシルトランスフェラーゼであるTaz1によるアシル鎖のリモデリングを受け、成熟したCLになる。

これらの経路の他に、PE、PCに関してはケネディ経路を介した合成も行われる。エタノールアミンは細胞質中でEki1によるリン酸化を受けホスホエタノールアミンとなり、Ect1によりCTPと反応し、CDP-エタノールアミンに変換される。最後に、小胞体のEpt1によりDAGに付加され、PEとなる。コリンもまた同様に細胞質中でCki1によるリン酸化を受けてホスホコリンへ、さらにCct1によりCDP-コリンへ変換され、小胞体またはゴルジ体に局在すると考えられているCpt1によりDAGに付加されてPCとなる。ケネディ経路ではPEやPCの分解により生じたエタノールアミン、ホスホエタノールアミン、コリン、ホスホコリンもPE、PCの再合成に利用されることが考えられる。また、Dpl1によるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の分解から生じたホスホエタノールアミンもPEの合成に利用される。

また、CLだけでなく、その他のリン脂質もホスホリパーゼとアシルトランスフェラーゼによるアシル鎖のリモデリングを受けることが知られている。*S. cereisiae*におけるリン脂質アシル鎖のリモデリングの意義としては、酸化などによる障害を受けたアシル鎖を除去修復することや、不飽和度の異なるアシル鎖と交換することで膜の流動性を変化させたりすることであるとされている。

上記のとおり、リン脂質の合成に関与する酵素はそれぞれ特定のオルガネラに分散して局在している。そのためCDP-DAG経路による脂質合成では、PSやPEの効率的な輸送がPEやPCの合成に重要であると考えられる (Fig. 0-4)。

ホスホイノシチドは、PIのイノシトール環の水酸基のリン酸化により合成される。PI3Pは、エンドソームや液胞のPI-3キナーゼVps34によりPIのイノシトール環の3'位の水酸基がリン酸化を受けて合成される。さらにPI3Pは、液胞のPI3P-5キナーゼFab1により5'位がリン酸化を受けPI(3,5)P₂となる。*VPS34*、*FAB1*はどちらも生育に必須ではないが、破壊により生育の悪化がみられる。一方、PI4Pはゴルジ体のPik1あるいは細胞膜のStt4、液胞のLsb6の3種のPI-4キナーゼによりPIの4'位がリン酸化を受けて合成される。そのうちPik1、Stt4は生育に必須である。PI4Pは、細胞膜のPI4P-5キナーゼMss4によりPI4Pの5'位がリン酸化されPI(4,5)P₂となる。Mss4も生育に必須である。

出芽酵母におけるリン脂質の合成・代謝制御

出芽酵母において、脂質の合成と代謝の制御は以下の4つのレベルで行われると考えられている。

脂質合成酵素関連遺伝子の転写制御

- ② 脂質合成酵素の活性制御
- ③ 脂質の分解
- ④ 脂質の輸送

これらの合成・代謝制御機構のうち、①のリン脂質合成酵素関連遺伝子の転写制御に関しては、転写活性化因子Ino2-Ino4と転写抑制因子Opi1による転写制御についてよく研究されており、また、転写活性化因子Vid22がPSD2の転写を制御することが報告されている¹⁰。一方で、②-④に関する知見は少ない。④のリン脂質輸送に関しては、小胞体で合成されたPSのミトコンドリア^{11,12}、エンドソーム¹³、細胞膜⁶への輸送機構についての解析が報告されているが、未解明の部分も多く残されている。

脂質の輸送

細胞内におけるオルガネラ間の脂質輸送機構としては、以下の4つが考えられる。

脂質分子の自由拡散

- ② 小胞輸送を介した脂質の移動
- ③ メンブレンコンタクトサイト (MCS)を介した輸送
- ④ 脂質輸送タンパク質 (LTP) による脂質分子の移動

① 脂質分子の自由拡散について

脂質分子が自発的に膜から抜け、水層中に拡散し、膜と融合する反応による移動である。ほとんどの脂質分子は水に溶けにくいため、自由拡散による脂質分子の輸送は非常に遅く、非効率的であると考えられている。

② 小胞輸送を介した脂質の移動について

輸送小胞では、ドナーのオルガネラ膜から形成された小胞がターゲットのオルガネラ膜に融合するため、バルクな (かつおそらく選択性はそれほど高くない)脂質輸送が可能であると考えられている。一方で、小胞輸送関連遺伝子の変異や薬剤処理により小胞輸送を阻害しても脂質の移動は停止しないことから¹⁴、小胞輸送に依存しない輸送機構が存在することが明らかになっている。また、後述するように、ミトコンドリアへの脂質輸送やミトコンドリアからの脂質輸送には、小胞輸送は関与しないと考えられている。

③ MCSを介した脂質の輸送について

MCSとは、異なるオルガネラの膜と膜が近接しているが融合はしていない領域で、小胞体とミトコンドリア¹¹、小胞体と細胞膜¹⁵、小胞体とゴルジ体¹⁶、核膜と液胞¹⁷、液胞と

ミトコンドリア^{18,19}など様々なオルガネラ間で観察されている。MCSにおいてオルガネラ間の物質交換が行われると考えられており、脂質やカルシウムイオンなどの輸送への関与が提唱されている。例えば、核膜と液胞に間に形成されるNucleus-vacuole junction (NVJ)は核膜上のNvj1と液胞膜上のVac8により構成される。NVJにはステロール輸送に関与すると考えられているOsh1が局在することから、NVJにおいてステロール輸送が行われる可能性が考えられている²⁰。ただし、膜が近接しているだけで脂質分子の移動が起こるかどうかは不明である。このようなことからMCSと後述のLTPが協調して働いたり、LTP自体がMCSの形成に関与したりするモデルも提唱されている²¹。

以下、本研究と関係するコンタクトサイトを形成する因子について簡略的に説明する。

・ERMES (Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure) 複合体は、小胞体-ミトコンドリア間でコンタクトサイトを形成することが示唆されている。ERMESは、ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアDNAの維持に関与することが報告されている¹¹。ERMESは小胞体膜上に局在するMmm1、ミトコンドリア外膜に局在するMdm10及びMdm34、ミトコンドリア周縁部に局在するMdm12からなる複合体で、ミトコンドリア外膜に局在するGTPaseのGem1による制御を受ける²²。ERMESの脂質輸送への関与に関しては、小胞体で合成されたPSのミトコンドリアへの輸送にERMESが関与するという報告がある一方で¹¹、それを否定する結果も報告されている²³。また、ERMESがミトコンドリアで合成されたPEの小胞体への輸送に関与するかという点についても決定的な結果は出ておらず²⁴、ERMESがリン脂質輸送に関与するかということについては決着はついていない。また、ERMESは動物など高等真核生物には保存されていない。

・EMC (Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex) は、ERMESとは独立して小胞体-ミトコンドリア間にコンタクトサイトを形成することが示唆された複合体である¹²。EMCをERMESと同時に欠失させると致死となるが、小胞体-ミトコンドリア間を係留させるための人工タンパク質ChiMERAの発現により生育が回復する¹²。EMCファミリーに属するEmc1-Emc6がミトコンドリア外膜のTom5と相互作用することで小胞体とミトコンドリアを接近させると考えられている。EMCファミリータンパク質をコードする6つの遺伝子のうちの5つを破壊すると、ミトコンドリアのPS、PE量が減少し、呼吸機能を失うことから、EMCによるコンタクトサイトを介したミトコンドリアへのPS輸送が提唱された。

・vCLAMP (Vacuole and Mitochondria Patch) は、液胞とミトコンドリア間で形成されるコンタクトサイトとして2つのグループにより報告された^{18,19}。vCLAMPの構成因子にはエンドソームと液胞の融合に関与するHOPS複合体の構成因子でもあるVps39とGTPaseであるYpt7が含まれると考えられている。vCLAMPとERMESを同時に欠損させると致死となり、ミトコンドリアへのMCSを介した物質輸送は非常に重要であると考えられる。vCLAMPとERMESを条件変異株により同時に欠損させるとミトコンドリアのリン脂質

組成が変化することから、vCLAMPとERMESはミトコンドリアへのリン脂質輸送に関与すると考えられている。

・ Vps13

Vps13は前胞子膜形成や液胞へのタンパク質輸送などに関与する多機能タンパク質であり、真核生物で広く保存されている。Vps13はエンドソーム-ミトコンドリア間でコンタクトサイトを形成することが報告された²⁵。さらに、Vps13はミトコンドリア外膜タンパク質であるMcp1との相互作用を介して液胞-ミトコンドリアでコンタクトサイトを形成することも報告された²⁶。Vps13とERMESの二重欠損は致死となり、ERMES単独欠損による表現型はVPS13への点変異の導入やMCP1の高発現によりバイパスされることから、Vps13-Mcp1によるミトコンドリアと液胞 (あるいはエンドソーム)のコンタクトサイトはミトコンドリアへの物質輸送に重要であると考えられる。

・ Sfh4

Sfh4は後述のLTPファミリーであるSec14ファミリーに属し、エンドソームのPsd2と相互作用することが報告された²⁷。また、*psd1Δ*株においてSFH4を破壊した株はグルコース培地においてもエタノールアミン要求性を示したことから、Sfh4はPsd2の*in vivo*の活性に重要であることが示唆された¹³。Sfh4は可溶性タンパク質であるが、エンドソームのPsd2の2つのC2ドメインと結合し、さらにPbi1との結合を介して小胞体のScs2と間接的に相互作用することで、小胞体とエンドソームを繫留すると考えられている。そのコンタクトサイトにおいて小胞体膜上で合成されたPSは効率的にPsd2へ輸送されるというモデルが提唱された。しかし、PBI1を破壊しても*psd1Δ*株はエタノールアミン要求性を示さなかったことから、Sfh4-Pbi1間相互作用はPsd2活性に必須ではないことが示唆され²⁸、またSfh4の*in vitro*でのPS輸送活性もみられておらず¹³、小胞体-エンドソーム間でのPSの輸送機構は未だ解明されていない。

④ LTPによる脂質分子の輸送について

LTPは、脂質分子をドナー膜から引き抜き、lipid transfer domain (LTD)により構成される疎水性ポケットに収納して水層中を運搬し、アクセプター膜に挿入する能力を持つタンパク質であり、この性質を利用して細胞内で脂質を輸送すると考えられている。LTPによりリガンドの特異性が異なり、リン脂質、ステロール、セラミドなどの輸送能を有するLTPがこれまでに見つかっている。LTDの構造によりLTPのファミリーが定義され、Sec14、OSBP (oxysterol-binding protein)ファミリーなどが代表的なファミリーである。LTPの中には、LTDの他に、多様なドメインやモチーフを有するものがあり、そのようなドメインやモチーフを膜との相互作用に利用すると考えられている。

個々のLTPの脂質輸送能に関しては*in vitro*での解析により示されてきたが、実際に細胞内で脂質輸送を担っていることが証明されたLTPは少ない。また、LTPによるオルガネラの認識や輸送の方向性の決定がどのようになされるかが大きな課題として残されている。

これまでに解析が行われてきたLTPについて代表的な例を示す。

・ CERT

CERTは哺乳動物に保存されたタンパク質で、LTDとしてSTART (steroidogenic acute regulatory protein-related) ドメインを有する。小胞体から後期ゴルジ体へセラミドを輸送し、スフィンゴリエリンへの変換を推進すると考えられている。CERTは*in vivo*における標識セラミドを用いた解析から、細胞内でセラミドを輸送することが示唆されている^{29, 30}。CERTは、ホスホイノシチドとの結合に関与するPH (pleckstrin homology) ドメインを介してゴルジ体と、また、小胞体に局在するタンパク質VAP (vesicle-associated membrane protein-associated protein) との相互作用に関与するFFATモチーフを介して小胞体と相互作用すると考えられている³¹。酵母にはCERTのオルソログは見出されていない。

・ Oshファミリータンパク質

Oshファミリータンパク質は、LTDとしてORD (Oxysterol binding protein-related domain) を有する。*S. cerevisiae*にはOshファミリータンパク質としてOsh1からOsh7の7個のタンパク質が存在する。Osh1、Osh2、Osh3はORDの他にPHドメインやFFATモチーフを有するが、Osh4、Osh5、Osh6、Osh7はORD以外に知られたドメインやモチーフを有さない。Oshタンパク質をコードする遺伝子を単独で破壊しても生育に影響はないが、7つ全てを破壊すると致死となることから、Oshファミリータンパク質は重複した機能を有すると考えられる。Osh4は人工膜間でステロールを輸送する能力を有することが報告されているが³²、Osh6、Osh7は小胞体から細胞膜へのPS輸送に関与することが報告されており⁶、Oshファミリータンパク質に共通した機能は未解明である。

・ Sec14 ファミリータンパク質

Sec14ファミリータンパク質は、LTDとしてCRAL-TRIOドメインを有する。*S. cerevisiae*にはSec14ファミリータンパク質として、Sec14と5つのSfh (Sec fourteen homolog)タンパク質が存在する。Sec14は生育に必須であるのに対し、5つのSfhは欠失しても生育可能であることから、Sec14は特異的な必須の機能を有すると考えられる。また、Sec14ファミリータンパク質をコードする遺伝子は、これまでにゲノムが解読された全ての真核生物から見つかっていることから、真核細胞にとって重要な機能を有していることが予想される。

SEC14は分泌に欠損を持つ*sec14*株の変異を相補する遺伝子として単離された生育に必須の遺伝子であり、Sec14はゴルジ体からの分泌機構に関与すると考えられている。Sec14やSfh1の結晶構造解析から、CRAL-TRIOドメインが疎水性ポケットを構成し、ポケット内にリン脂質や界面活性剤などのリガンドが挿入されることが示唆された。Sec14は*in vitro*でPIやPCを輸送する活性を有することが示されているが³³、PIやPCをその疎水性ポケットに挿入して水層中を輸送すると考えられている。一方、Sfhタンパク質もPI輸送活性を有するが、PC輸送活性は非常に弱いかあるいは持たないことが報告されている³⁴。Sec14は*in vitro*でPI輸送活性を持つことや、Sec14欠損によりPI4Pが減少することから³⁵、

細胞内でPIをゴルジ体のPI-4キナーゼであるPik1に提示することでPI4P合成を促進するというモデルが提唱されている³⁵。Osh4はPI4PをPIPホスファターゼSac1が局在する小胞体に輸送することでPI4Pの分解を促進する機能を持つことが提唱されているが、*OSH4*の破壊によりSec14欠損がバイパスされることもこのモデルを支持すると考えられる³⁶。しかし、Sec14のPI輸送活性に欠失を持つ変異体が*in vivo*でSec14としての機能を維持するという報告があり³⁷、このモデルではSec14の機能を完全に説明することはできないと考えられる。また、Sec14が*in vitro*でPC輸送活性を有すること、ケネディ経路におけるPC合成関連酵素遺伝子の破壊がSec14欠損をバイパスすることから³⁸、Sec14はPCの代謝を調節することによってシグナリング脂質であるDAGの存在量の制御に関与するという説も提唱されている。しかし、これらバイパス変異の導入による生育の回復度合いは部分的なものであり、Sec14の生育に必須の機能とSec14ファミリータンパク質の細胞内での生理的な機能については未解明な部分が多く残されている。

・ α -TTP

α -TTPは哺乳類に保存されたSec14ファミリータンパク質の一種で、肝臓細胞で α -トコフェロール (ビタミンE) の血漿への分泌に関与することが報告されている³⁹。 α -TTPはLTDとしてCRAL-TRIOドメインを有するが、既知のオルガネラ標的ドメインやモチーフを有さない。 α -TTPは*in vitro*で α -トコフェロールを膜間で輸送する活性を持つことが報告されている。 α -TTPをコードする遺伝子はAVED (ataxia with vitamin E deficiency) の原因遺伝子であり、その患者のゲノム解析より同定された α -TTPの変異体の中に、ホスホイノシチドPI(3,4)P₂やPI(4,5)P₂との結合欠損を示すものが存在した。これらの変異体は*in vitro*での α -トコフェロール輸送活性は維持していたが、*in vivo*では機能を失い、 α -トコフェロール分泌が誘導されなかったことから、 α -TTPが細胞内で機能するうえでホスホイノシチドとの結合が重要であることが示唆された⁴⁰。LTPは疎水性ポケットに対して「蓋」となる領域を有することが結晶構造解析から提唱されており、水層中でリガンドとなる脂質を輸送する際は蓋を閉じて (Closed conformation) 脂質の流出を防ぎ、膜と相互作用する際は蓋を開いて (Open conformation) 脂質の取り込みや挿入を行うと考えられている。結晶構造解析から、 α -TTPはホスホイノシチドと結合した状態では蓋がOpenとCloseの中間の状態であることが示唆されたことから⁴⁰、ホスホイノシチドとの相互作用は α -トコフェロールを挿入して閉じていた蓋を開く効果があると予想された。

脂質輸送の解析法と問題点

上述のように、細胞内脂質輸送の解明が遅れていることの理由として、膜間の脂質輸送の解析法に限られているということが挙げられる。脂質輸送の解析に現在主に用いられている手法としては、

外部から標識脂質を細胞に取り込ませてその挙動を観察する (*in vivo*)

- ② 脂質が合成されたオルガネラから別のオルガネラへ輸送され変換を受ける場合、その変換効率を解析することにより脂質輸送を評価する (*in vivo*、*in vitro*)

③ 人工膜 (リポソーム)や精製オルガネラを用いて、ドナー膜からアクセプター膜への標識脂質の輸送を評価する (*in vitro*) が挙げられる。

①は、細胞膜の外層・内層間輸送の評価や、細胞膜から小胞体などの細胞内オルガネラへの輸送の評価に利用することができる。しかし、この方法が適用できるのは細胞膜からの輸送の解析に限られており、細胞内オルガネラ間の脂質輸送の解析には適用できない。また、エンドサイトーシス等の小胞輸送の影響が無視できないという問題もある。

②は、例えば小胞体で合成されたPSがミトコンドリアでPEに変換される効率を測定することにより小胞体からミトコンドリアへのPSの輸送を*in vivo*、*in vitro*で評価するというように、目的の脂質の変換を利用して脂質の輸送を評価する方法である。この手法を利用して輸送の解析を行った論文も多く発表されているが、輸送を評価できる脂質とオルガネラが極めて限定されている。また、オルガネラによっては小胞輸送の影響が無視できないこと、対象となる脂質の合成効率が低い場合に輸送を解析することが難しいなどの問題もある。

③は、放射性同位元素や蛍光分子で標識した脂質のドナー膜からアクセプター膜への移動を解析する方法である。特にリン脂質の輸送を評価する場合、輸送する脂質の特異性が高い場合には問題ないが、リガンドとなる脂質種が多い場合にはオルガネラ膜やリポソーム膜を構成する脂質まで輸送してしまうため、輸送効率の評価が難しいという問題が生じる。また、標識脂質の種類が限られているという問題もある。

さらに、オルガネラ間の脂質輸送には複数の機構や経路がある場合も多く、脂質輸送に関与することが想定される因子を欠損させても、他の機構、経路による輸送が行われるため、評価が困難であるという問題もある。

ミトコンドリアと脂質

ミトコンドリアは全ての真核細胞に存在し、クエン酸回路、酸化的リン酸化など、細胞のエネルギー代謝において重要な反応が行われる器官である。ミトコンドリアはエネルギー代謝の他にも、一部の脂質やホルモンの合成、アポトーシスの制御などにも関与する。脂質はこれらのミトコンドリアの機能にも重要な役割を果たしており、例えば、PEやCLは呼吸鎖複合体の安定化や活性に必要である^{41,42}。また、PEやCLは膜電位の維持にも必要であり、欠失するとミトコンドリアの融合に欠損が生じ⁴³、TOM複合体やTIM複合体を介したミトコンドリアへのタンパク質輸送が低下すること^{41,44}が報告されている。

上で述べたように、ミトコンドリアのPE及びCLは、ミトコンドリア内膜に局在するPsd1、Crd1により合成され、利用される。ミトコンドリアにおけるPE合成の基質となるPSやCL合成の基質となるPAは小胞体で合成されるため、ミトコンドリアへ輸送される必要がある。また、PEやCL以外の脂質についても他のオルガネラで合成されるため、ミトコンドリアへの輸送が必須である。*S. cerevisiae*においてミトコンドリアと他のオルガネラの間で小胞輸送が観察されないことから、これらの脂質は小胞輸送に依存しない機構により輸送されると考えられる。従って、ミトコンドリアを対象とした脂質輸送は、小

胞輸送の影響を考慮する必要がない。また、ミトコンドリア脂質の異常は呼吸機能に影響する場合があります、ミトコンドリアへの脂質輸送を呼吸を必要とする非発酵性炭素源培地での生育により簡便に評価することが可能であると期待される。以上のことから、ミトコンドリアは、小胞輸送に依存しない細胞内脂質輸送機構の解明を進めるうえで良いモデルオルガネラとして利用できると考えられる。

本研究の概要

ここまで述べてきたように、リン脂質は生体膜やオルガネラにとって重要な役割を有している。脂質の輸送は膜やオルガネラの構造や機能、さらに脂質の合成や代謝に深く関わる重要な現象であるが、リン脂質の細胞内輸送機構についてはPSの輸送に関する研究が一部進められているほかは、ほとんど未解明である。

本研究ではオルガネラ間リン脂質輸送機構の解明を目的として、*S. cerevisiae*を用いて解析を行った。当研究室では、ミトコンドリアのPE合成欠損株である*psd1Δ*株のミトコンドリアPE量の低下と呼吸機能欠損を高発現により回復させる遺伝子として*SFH1*を同定し、その機能の解析を進めてきた。しかしながら、*Sfh1*がどのような機構によりミトコンドリアへのPE供給量を増やし、その機能を回復させるか未解明であった。

第1章では、*Sfh1*の生理的機能の解明を目的とした解析を行い、*Sfh1*が小胞体-エンドソーム間のリン脂質輸送に関与するというモデルを提唱した。また、ミトコンドリアへのPE輸送へのMCSの関与について解析した。

第2章では、*Sfh1*と*Sec14*の機能の違いを生じる要因の解明を目的として*Sfh1*と*Sec14*の比較解析を行い、*Sfh1*のエンドソームとの相互作用が重要であることを示唆する結果を得た。さらに、*Sfh1*の生体膜との相互作用機構について解析を行った。

第3章では、*Sfh1*以外の*Sec14*ファミリータンパク質が細胞内リン脂質輸送に関与するかを検討するため、全ての*Sec14*ファミリータンパク質を欠損させた株の作製と解析を行った。

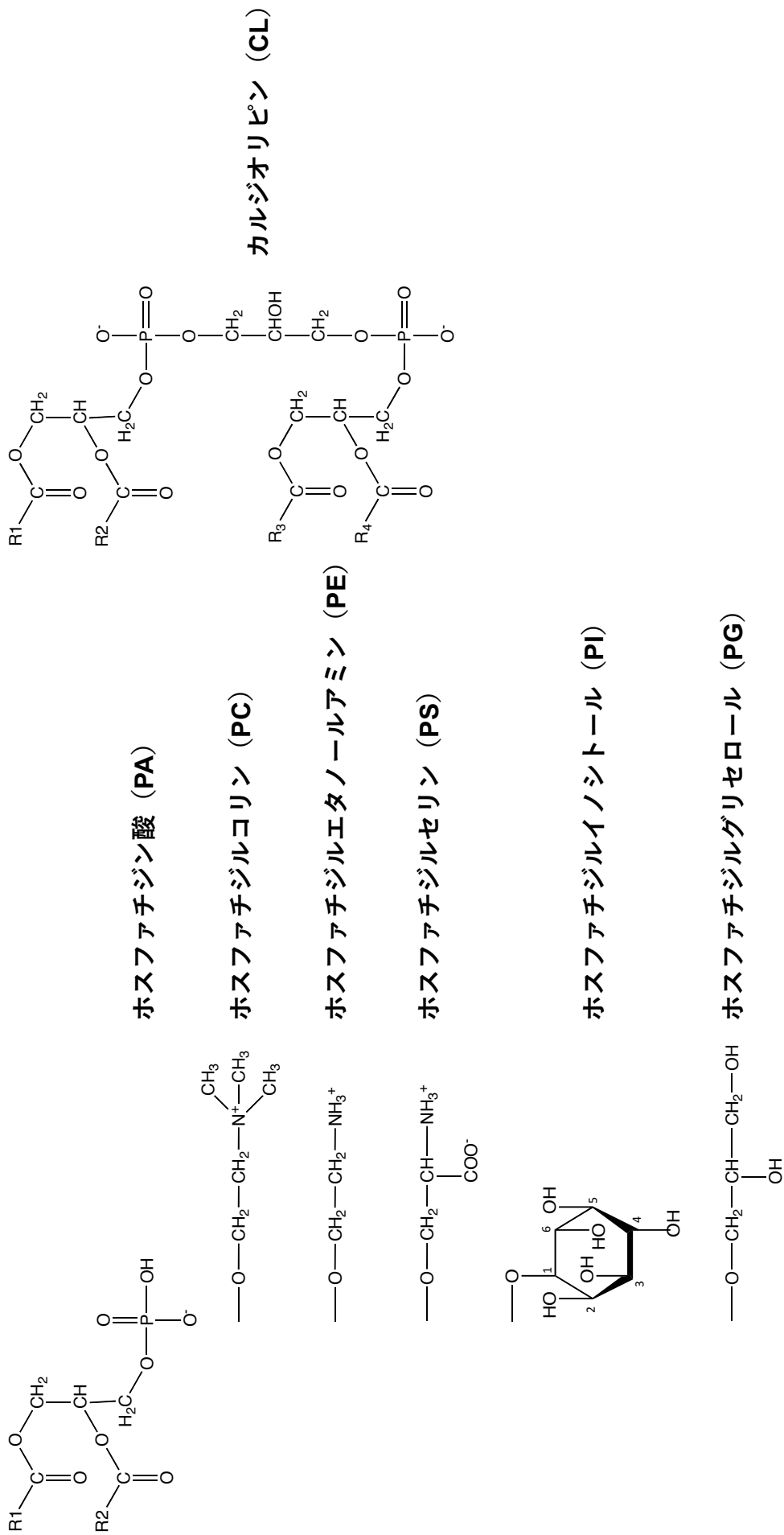


Fig. 0-1 主要なグリセリン脂質の構造

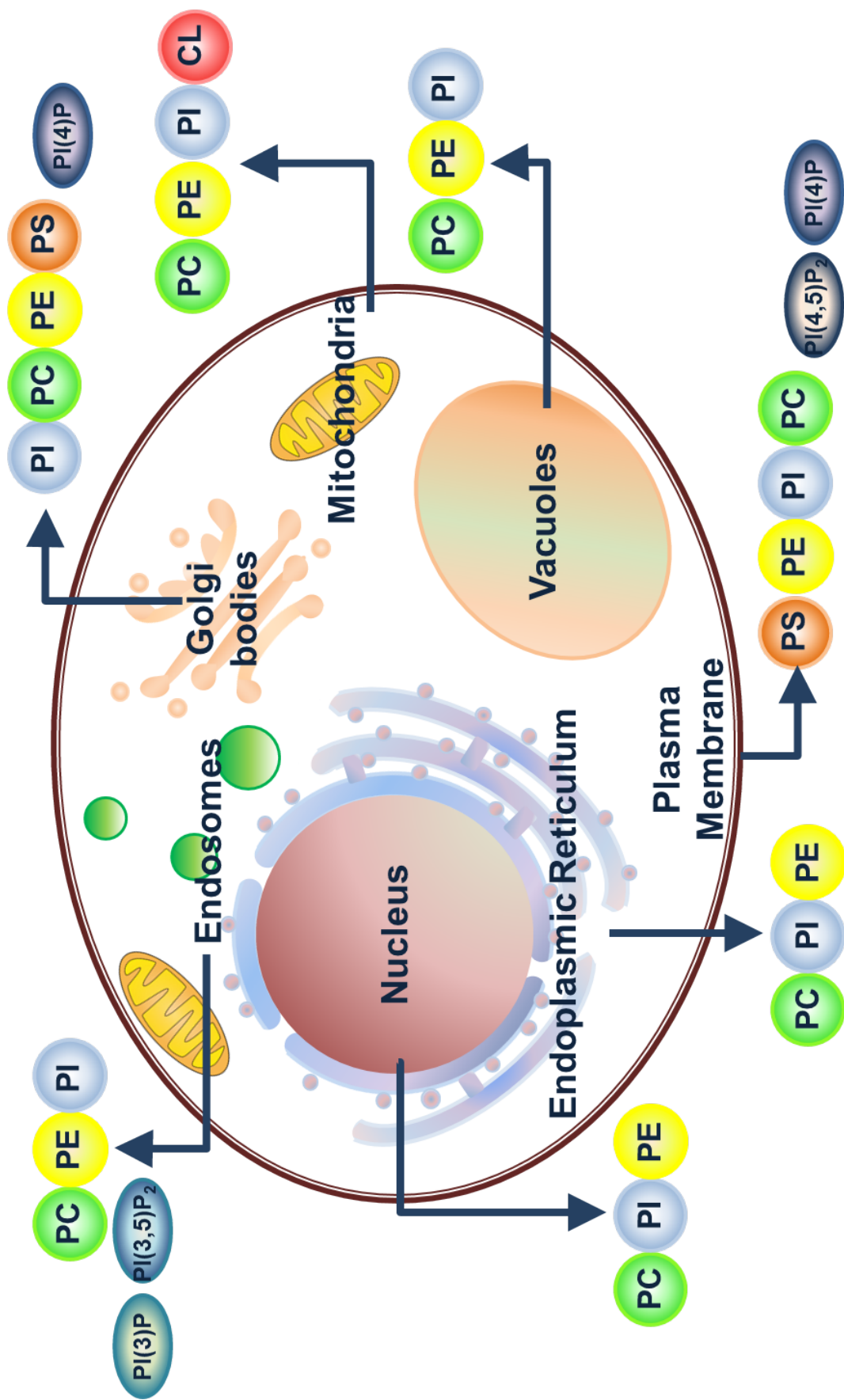


Fig. 0-2 出芽酵母におけるリン脂質の分布

代表的なオルガネラのリン脂質、ホスホイノシチドについて、それぞれ左から多い順に示した。

Table 0-1 出芽酵母における各オルガネラのリン脂質組成

Sub-cellular fraction	% of total phospholipid						
	PC	PE	PI	PS	CL	PA	others
Plasma membrane	16.8	20.3	17.7	33.6	0.2	3.9	6.9
Secretory vesicles, <i>sec1 (sec6-4)</i>	35.0 (37.6)	22.3 (19.5)	19.1 (19.5)	12.9 (16.8)	0.7	1.2	8.8 (6.7)
Golgi	~26	~25	~27	~24	-	-	-
Heavy microsomes	45.2	21.9	11.4	8.0	1.0	4.1	5.6
Light microsomes	49.6	22.6	8.0	9.6	0.7	2.1	4.5
Nucleus	44.6	26.9	15.1	5.9	<1.0	2.2	4.3
Vacuoles	46.5	19.4	18.3	4.4	1.6	2.1	7.7
Peroxisomes	48.2	22.9	15.8	4.5	7.0	1.6	-
Mitochondria	40.2	26.5	14.6	3.0	13.3	2.4	-
Inner mitochondrial membrane	38.4	24.0	16.2	3.8	16.1	1.5	-
Outer mitochondrial membrane	45.6	32.6	10.2	1.2	5.9	4.4	-
Mitochondrial membrane contact sites	31.1	34.9	4.9	0.4	17.0	0.9	10.8
Lipid particles	36.4	20.0	31.6	5.4	ND	2.7	3.9

Zinser E. and Daum G. *Yeast* 11, 493-536 (1995)

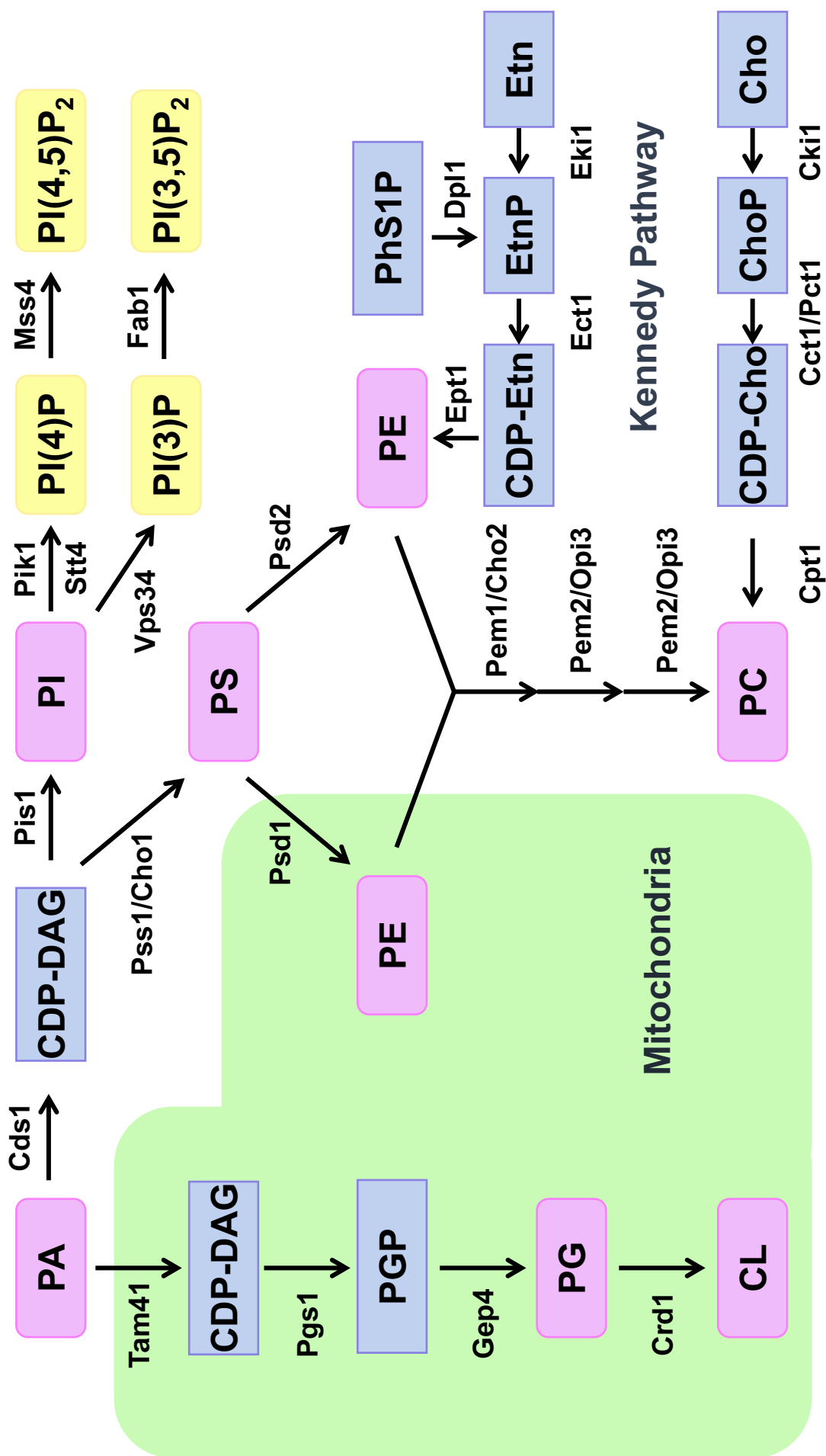


Fig. 0-3 出芽酵母におけるリン脂質の合成経路

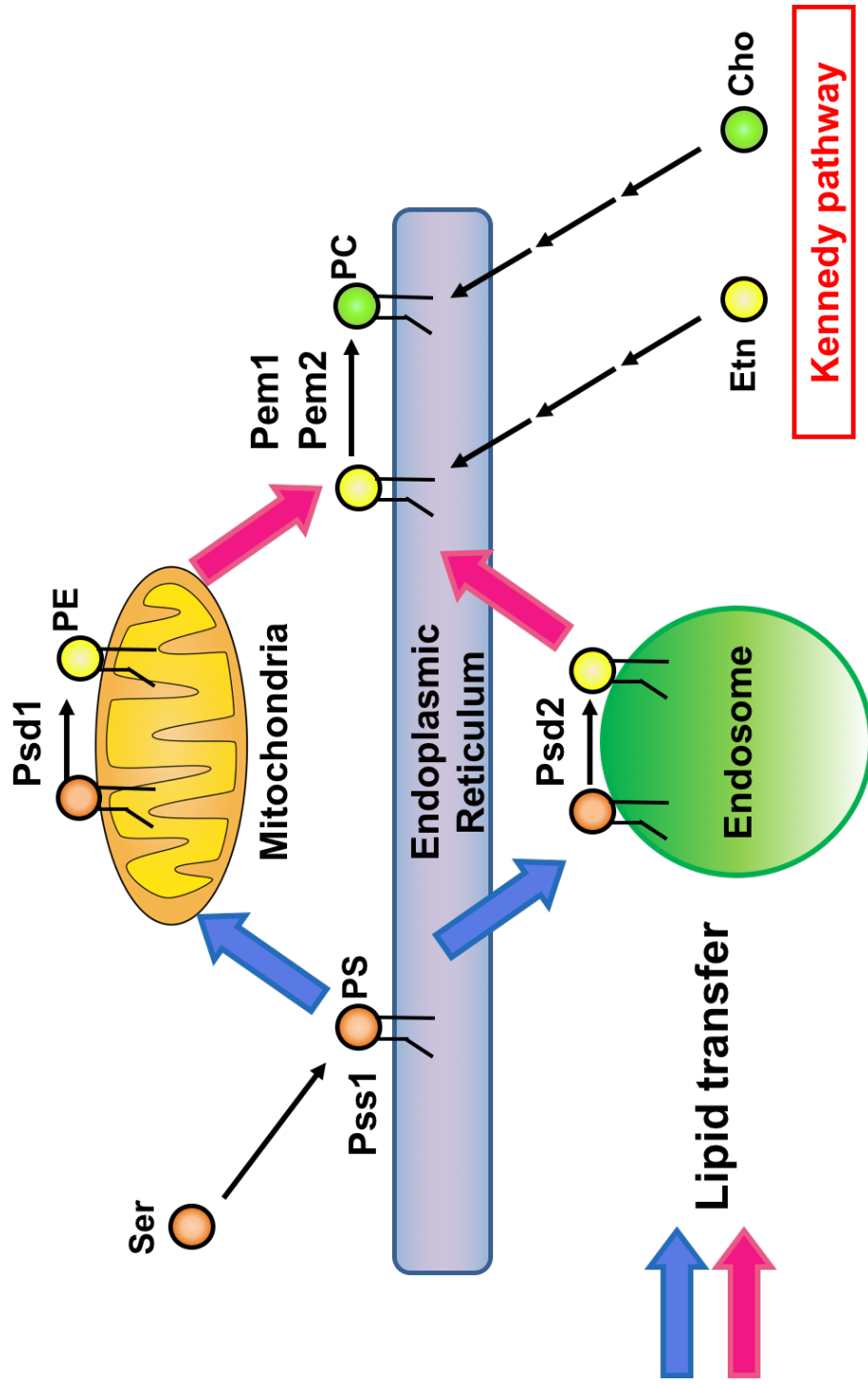


Fig. 0-4 出芽酵母におけるリン脂質合成における輸送の重要性
 Ser; serine、 Etn; ethanolamine、 Cho; choline

第1章 Sfh1の機能の解析

本章の内容は学術論文として出版する予定があるため公表できない。
1年以内に出版予定。

第2章 Sfh1とSec14の機能の違いの解析

本章の内容は学术论文として出版する予定があるため公表できない。
5年以内に出版予定。

第3章 Sec14ファミリータンパク質の機能解析

本章の内容は学術論文として出版する予定があるため公表できない。
5年以内に出版予定。

終章

本章では、第1章から第3章の内容について総合的に討論する。本研究ではオルガネラ間リン脂質輸送機構の解明を目的として、*S. cerevisiae*を用いて解析を行った。

第1章ではSfh1の機能解析を行った結果、Sfh1が*in vitro*でPSを輸送する活性を有すること、酵母細胞内でSfh1はPSを含む主要リン脂質と結合していること、高発現により*psd1Δ*の乳酸培地での生育を回復させる機能を失ったSfh1のPC/PE結合欠損変異体ではPC、PEだけでなくPSとの結合能も低下していること、Sfh1は細胞質に加えて一部がエンドソームに局在することが示唆された。また、*psd1Δ*株において*SFH1*を破壊するとリン脂質組成が変化し、乳酸培地における生育が悪化するという表現型が観察された。

第2章ではSfh1とSec14の比較解析及びこれらのキメラタンパク質を用いた解析を行った結果、Sfh1とSec14の機能の違いは、リン脂質との結合能の違いと、細胞内局在の違いに起因する可能性が考えられた。Sfh1の112-185領域が*psd1Δ*株の乳酸培地での生育欠損の抑圧、PEやPCとの結合、エンドソームとの相互作用にも重要である可能性が考えられた。さらに、Sfh1のオルガネラ相互作用機構の解明を目的として膜結合欠損型変異体を取得した。得られた変異体の一つSfh1^{K134E,G246D}は細胞内で結合しているリン脂質種・量に変化はみられなかったが、膜面分から検出されるSfh1^{K134E,G246D}の量が減少し、高発現により*psd1Δ*株の乳酸培地での生育を回復する機能を失っていたことから、K134とG246がSfh1のオルガネラ膜との相互作用及び機能に重要であると考えられた。

第3章ではSec14ファミリータンパク質の細胞内における機能の解明のため、Sec14ファミリータンパク質を全て欠損させた株を2種作製し、解析を行った。*SFH1-SFH5*を破壊することにより*sec14-1*株の温度感受性が悪化したことから、Sec14ファミリータンパク質が生育に重要な機能を共有することが示唆された。さらに、Sec14の欠損株は細胞内に多重膜小胞を蓄積するとともに、ミトコンドリアの形態に異常を示すが、それらの表現型も*SFH*遺伝子の破壊により悪化した。また、Sec14ファミリータンパク質を全て欠損することにより細胞内脂質組成が変化するだけでなく、ミトコンドリアのリン脂質の組成と量が減少することも明らかになった。これらの結果から、Sec14ファミリータンパク質がリン脂質の輸送または合成や代謝の制御を介してミトコンドリアのリン脂質組成と形態に関与する機能を共有する可能性が示唆された。また、Sec14バイパス変異により、*SFH1-5*を全て破壊した株においてもSec14欠損による生育不全をバイパスできる可能性が示唆された。本章で作製した種々のSec14ファミリータンパク質全欠損株は、Sec14ファミリータンパク質を単独で発現させ、機能を解析するためのプラットフォームとして今後活用することが期待できる。

第1章と第2章の結果から、Sfh1が小胞体からエンドソームへのPSを輸送する機能を持つ可能性が考えられた。当研究室の小林による解析から、*SFH1*が高発現によりPsd2によるPE合成を亢進させると予想されたが、その詳細な機構は不明であった。今回得られた結果から、*SFH1*の高発現により*psd1Δ*株の乳酸培地での生育が回復する理由としては、小胞体で合成されたPSのエンドソームへの輸送が*SFH1*の高発現により増加し、それにより

Psd2によるPE合成が亢進されるというモデルがたてられた。また、Bankaitisらは、*SEC14*の全ゲノム重複により生じた*SFHI*は、機能を失った偽遺伝子であると主張しているが、第1章の結果から、*SFHI*が生理的機能を有する可能性が初めて示唆された。今回、*Sfh1*が*in vitro*でPEを輸送する活性を有するかについては明確な結果が得られなかったが、NBD-PEのリボソーム間での輸送を解析した結果では、*Sfh1*を添加した場合にはタンパク質を添加しない場合や無関係のタンパク質を添加した場合とは異なる傾向パターンを示したことから、*Sfh1*がPEを輸送する可能性は十分考えられ、今後のさらなる検討が期待される。現在解析の進んでいるLTPの多くは、オルガネラ間で脂質の交換輸送を行うモデルが提唱されている^{21,32}。オルガネラ膜を増殖させたい場合には交換輸送では目的のオルガネラ膜の脂質を増やすことはできないが、特定の脂質を濃度勾配に逆らって輸送する場合などには交換輸送モデルが適していると考えられている。従って、*Sfh1*が小胞体からエンドソームへPSを輸送し、Psd2によって合成されたPEをエンドソームから小胞体へ輸送するという*Sfh1*による小胞体-エンドソーム間でのPS/PE交換輸送も考えられる。高発現により*psd1Δ*株の乳酸培地での生育を弱くではあるが回復させた*Sec14*や、Psd2へのPS輸送への関与が報告されている*Sfh4*など、他の*Sec14*ファミリータンパク質についてもPS、PE輸送活性の解析を行うことで、小胞体-エンドソーム間PS、PE輸送機構の解明が期待される。

*Sfh1*による細胞内PS輸送の可能性が示唆されたが、細胞内リン脂質輸送が*Sec14*ファミリータンパク質の共通の機能であるかについては第3章の結果からは結論づけることはできなかった。Bankaitisらは、*Sec14*がPI-4-kinaseにPIを提示することによりPI4P合成を促進するというモデルを提唱しており、さらに*Sec14*以外に*Sfh2*や*Sfh5*もPI4P合成制御に関与する可能性を報告しているが⁹²、ホスホイノシチドの合成制御が*Sec14*ファミリータンパク質に共通した機能かは不明である。*SFHI*は点変異の導入により*sec14*変異株の細胞内PI4P量を回復させることができるが、野生型の*SFHI*はPI4P量をほとんど変化させない⁹³。*Sfh1*の一部は高発現した際にゴルジ体にも局在することが第2章の結果から示唆されたが、*in vitro*でのPIの輸送活性は低いとされることから⁴⁵、*Sfh1*はPI4P合成には関与しない可能性が考えられる。一方で、進化的に*S. cerevisiae*と遠縁種である二形成酵母の*Yarrowia lipolytica*では、*SEC14*のホモログが菌糸成長の制御に関与することが報告されている⁹⁴。当研究室の渡邊による解析では*SFH2*ホモログも菌糸成長の制御に関与する可能性が示唆され、*SFH2*ホモログの破壊により細胞膜のPI4Pが減少する様子が観察されている(渡邊未発表)。菌糸成長において極性の形成、維持にホスホイノシチドが関与する説が提唱されており^{95,96}、*Y. lipolytica*において*Sec14*や*Sfh2*がPI4P合成制御に関与している可能性も考えられる。このことから、一部の*Sec14*ファミリータンパク質のホスホイノシチド合成制御に関する機能は酵母の間で保存される重要な機能である可能性も考えられる。*Sec14*ファミリータンパク質に共通する機能とホスホイノシチド合成の関連についてはさらなる解析が必要である。

バイパス変異を導入することにより*SEC14*ファミリー遺伝子を全て破壊した株が作製可能であれば、その株において個々の*Sec14*ファミリータンパク質を発現させて解析を行うことで、各*Sec14*ファミリータンパク質の機能を明らかにできるかもしれない。

LTPによる脂質のオルガネラ間輸送機構はその解析の困難さから未だ未解明な部分が多く、オルガネラごとの不均一な脂質組成や脂質合成・代謝制御機構、オルガネラ及びオルガネラ膜の恒常性維持機構などの解明のために、さらなる発展が期待される分野である。本研究を進め、Sec14ファミリータンパク質の役割や制御機構を明らかにできれば、生体膜の形成・維持機構の解明につながる重要な知見が得られることが期待される。

Reference

1. Kobayashi, S. 東京大学大学院農学生命科学研究科博士論文 「出芽酵母におけるホスファチジルエタノールアミンの代謝と輸送に関する研究」. 2012.
2. Nakamura, H.; Miura, K.; Fukuda, Y.; Shibuya, I.; Ohta, A.; Takagi, M., Phosphatidylserine synthesis required for the maximal tryptophan transport activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **2000**, *64* (1), 167-72.
3. Nomura, W.; Ito, Y.; Inoue, Y., Role of phosphatidylserine in the activation of Rho1-related Pkc1 signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Signal* **2017**, *31*, 146-153.
4. Mendonsa, R.; Engebrecht, J., Phospholipase D function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1791* (9), 970-4.
5. Choi, J. Y.; Martin, W. E.; Murphy, R. C.; Voelker, D. R., Phosphatidylcholine and N-methylated phospholipids are nonessential in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **2004**, *279* (40), 42321-30.
6. Maeda, K.; Anand, K.; Chiapparino, A.; Kumar, A.; Poletto, M.; Kaksonen, M.; Gavin, A. C., Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. *Nature* **2013**, *501* (7466), 257-61.
7. Mesmin, B.; Antonny, B., The counterflow transport of sterols and PI4P. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1861* (8 Pt B), 940-951.
8. Zinser, E.; Daum, G., Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1995**, *11* (6), 493-536.
9. Montigny, C.; Lyons, J.; Champeil, P.; Nissen, P.; Lenoir, G., On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1861* (8 Pt B), 767-783.
10. Miyata, N.; Miyoshi, T.; Yamaguchi, T.; Nakazono, T.; Tani, M.; Kuge, O., VID22 is required for transcriptional activation of the PSD2 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **2015**, *472* (3), 319-28.
11. Kornmann, B.; Currie, E.; Collins, S. R.; Schuldiner, M.; Nunnari, J.; Weissman, J. S.; Walter, P., An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **2009**, *325* (5939), 477-81.
12. Lahiri, S.; Chao, J. T.; Tavassoli, S.; Wong, A. K.; Choudhary, V.; Young, B. P.; Loewen, C. J.; Prinz, W. A., A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospholipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol* **2014**, *12* (10), e1001969.
13. Wu, W. I.; Routt, S.; Bankaitis, V. A.; Voelker, D. R., A new gene involved in the transport-dependent metabolism of phosphatidylserine, PSTB2/PDR17, shares sequence similarity with the gene encoding the phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein, SEC14. *J Biol Chem* **2000**, *275* (19), 14446-56.
14. Lev, S., Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11* (10), 739-50.
15. Pichler, H.; Gaigg, B.; Hrastnik, C.; Achleitner, G.; Kohlwein, S. D.; Zellnig, G.; Perktold, A.; Daum, G., A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* **2001**, *268* (8), 2351-61.
16. Ladinsky, M. S.; Mastronarde, D. N.; McIntosh, J. R.; Howell, K. E.; Staehelin, L. A., Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* **1999**, *144* (6), 1135-49.
17. Pan, X.; Roberts, P.; Chen, Y.; Kvam, E.; Shulga, N.; Huang, K.; Lemmon, S.; Goldfarb, D. S., Nucleus-vacuole junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol Biol Cell* **2000**, *11* (7), 2445-57.
18. Elbaz-Alon, Y.; Rosenfeld-Gur, E.; Shinder, V.; Futerman, A. H.; Geiger, T.; Schuldiner, M., A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev Cell* **2014**, *30* (1), 95-102.
19. Hönscher, C.; Mari, M.; Auffarth, K.; Bohnert, M.; Griffith, J.; Geerts, W.; van der Laan, M.; Cabrera, M.; Reggiori, F.; Ungermann, C., Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev Cell* **2014**, *30* (1), 86-94.

20. Kvam, E.; Goldfarb, D. S., Nvj1p is the outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **2004**, *117* (Pt 21), 4959-68.
21. Chung, J.; Torta, F.; Masai, K.; Lucast, L.; Czaplá, H.; Tanner, L. B.; Narayanaswamy, P.; Wenk, M. R.; Nakatsu, F.; De Camilli, P., INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* **2015**, *349* (6246), 428-32.
22. Kornmann, B.; Osman, C.; Walter, P., The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (34), 14151-6.
23. Nguyen, T. T.; Lewandowska, A.; Choi, J. Y.; Markgraf, D. F.; Junker, M.; Bilgin, M.; Ejsing, C. S.; Voelker, D. R.; Rapoport, T. A.; Shaw, J. M., Gem1 and ERMES do not directly affect phosphatidylserine transport from ER to mitochondria or mitochondrial inheritance. *Traffic* **2012**, *13* (6), 880-90.
24. Kannan, M.; Sivaprakasam, C.; Prinz, W. A.; Nachiappan, V., Endoplasmic reticulum stress affects the transport of phosphatidylethanolamine from mitochondria to the endoplasmic reticulum in *S.cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1861* (12 Pt A), 1959-1967.
25. Park, J. S.; Thorsness, M. K.; Policastro, R.; McGoldrick, L. L.; Hollingsworth, N. M.; Thorsness, P. E.; Neiman, A. M., Yeast Vps13 promotes mitochondrial function and is localized at membrane contact sites. *Mol Biol Cell* **2016**, *27* (15), 2435-49.
26. John Peter, A. T.; Herrmann, B.; Antunes, D.; Rapoport, D.; Dimmer, K. S.; Kornmann, B., Vps13-Mcp1 interact at vacuole-mitochondria interfaces and bypass ER-mitochondria contact sites. *J Cell Biol* **2017**, *216* (10), 3219-3229.
27. Riekhof, W. R.; Wu, W. I.; Jones, J. L.; Nikrad, M.; Chan, M. M.; Loewen, C. J.; Voelker, D. R., An assembly of proteins and lipid domains regulates transport of phosphatidylserine to phosphatidylserine decarboxylase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **2014**, *289* (9), 5809-19.
28. Kannan, M.; Riekhof, W. R.; Voelker, D. R., Transport of phosphatidylserine from the endoplasmic reticulum to the site of phosphatidylserine decarboxylase2 in yeast. *Traffic* **2015**, *16* (2), 123-34.
29. Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Hanada, K., Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* **1999**, *144* (4), 673-85.
30. Funakoshi, T.; Yasuda, S.; Fukasawa, M.; Nishijima, M.; Hanada, K., Reconstitution of ATP- and cytosol-dependent transport of de novo synthesized ceramide to the site of sphingomyelin synthesis in semi-intact cells. *J Biol Chem* **2000**, *275* (39), 29938-45.
31. Hanada, K.; Kumagai, K.; Tomishige, N.; Yamaji, T., CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1791* (7), 684-91.
32. Raychaudhuri, S.; Im, Y. J.; Hurley, J. H.; Prinz, W. A., Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J Cell Biol* **2006**, *173* (1), 107-19.
33. Bankaitis, V. A.; Malehorn, D. E.; Emr, S. D.; Greene, R., The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* **1989**, *108* (4), 1271-81.
34. Li, X.; Routt, S. M.; Xie, Z.; Cui, X.; Fang, M.; Kearns, M. A.; Bard, M.; Kirsch, D. R.; Bankaitis, V. A., Identification of a novel family of nonclassic yeast phosphatidylinositol transfer proteins whose function modulates phospholipase D activity and Sec14p-independent cell growth. *Mol Biol Cell* **2000**, *11* (6), 1989-2005.
35. Schaaf, G.; Ortlund, E. A.; Tyeryar, K. R.; Mousley, C. J.; Ile, K. E.; Garrett, T. A.; Ren, J.; Woolls, M. J.; Raetz, C. R.; Redinbo, M. R.; Bankaitis, V. A., Functional anatomy of phospholipid binding and regulation of phosphoinositide homeostasis by proteins of the sec14 superfamily. *Mol Cell* **2008**, *29* (2), 191-206.
36. Li, X.; Rivas, M. P.; Fang, M.; Marchena, J.; Mehrotra, B.; Chaudhary, A.; Feng, L.; Prestwich, G. D.; Bankaitis, V. A., Analysis of oxysterol binding protein homologue Kes1p function in regulation of Sec14p-dependent protein transport from the yeast Golgi complex. *J Cell Biol* **2002**, *157* (1), 63-77.
37. Phillips, S. E.; Sha, B.; Topalof, L.; Xie, Z.; Alb, J. G.; Klenchin, V. A.; Swigart, P.; Cockcroft, S.; Martin, T. F.; Luo, M.; Bankaitis, V. A., Yeast Sec14p deficient in phosphatidylinositol transfer activity is functional in vivo. *Mol Cell* **1999**, *4* (2), 187-97.

38. Skinner, H. B.; McGee, T. P.; McMaster, C. R.; Fry, M. R.; Bell, R. M.; Bankaitis, V. A., The *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein effects a ligand-dependent inhibition of choline-phosphate cytidyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92* (1), 112-6.
39. Traber, M. G.; Arai, H., Molecular mechanisms of vitamin E transport. *Annu Rev Nutr* **1999**, *19*, 343-55.
40. Kono, N.; Ohto, U.; Hiramatsu, T.; Urabe, M.; Uchida, Y.; Satow, Y.; Arai, H., Impaired α -TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency. *Science* **2013**, *340* (6136), 1106-10.
41. Böttinger, L.; Horvath, S. E.; Kleinschroth, T.; Hunte, C.; Daum, G.; Pfanner, N.; Becker, T., Phosphatidylethanolamine and cardiolipin differentially affect the stability of mitochondrial respiratory chain supercomplexes. *J Mol Biol* **2012**, *423* (5), 677-86.
42. Zhang, M.; Mileykovskaya, E.; Dowhan, W., Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem* **2005**, *280* (33), 29403-8.
43. Joshi, A. S.; Thompson, M. N.; Fei, N.; Hüttemann, M.; Greenberg, M. L., Cardiolipin and mitochondrial phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **2012**, *287* (21), 17589-97.
44. Becker, T.; Horvath, S. E.; Böttinger, L.; Gebert, N.; Daum, G.; Pfanner, N., Role of phosphatidylethanolamine in the biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. *J Biol Chem* **2013**, *288* (23), 16451-9.
45. Schnabl, M.; Oskolkova, O. V.; Holic, R.; Brezná, B.; Pichler, H.; Zágorsek, M.; Kohlwein, S. D.; Paltauf, F.; Daum, G.; Griac, P., Subcellular localization of yeast Sec14 homologues and their involvement in regulation of phospholipid turnover. *Eur J Biochem* **2003**, *270* (15), 3133-45.
46. Gietz, R. D.; Sugino, A., New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **1988**, *74* (2), 527-34.
47. Nikawa, J.; Kawabata, M., PCR- and ligation-mediated synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **1998**, *26* (3), 860-1.
48. Goldstein, A. L.; McCusker, J. H., Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1999**, *15* (14), 1541-53.
49. Gietz, R. D.; Woods, R. A., Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **2002**, *350*, 87-96.
50. Szewczyk, E.; Nayak, T.; Oakley, C. E.; Edgerton, H.; Xiong, Y.; Taheri-Talesh, N.; Osmani, S. A.; Oakley, B. R.; Oakley, B., Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat Protoc* **2006**, *1* (6), 3111-20.
51. BLIGH, E. G.; DYER, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37* (8), 911-7.
52. Schaaf, G.; Betts, L.; Garrett, T. A.; Raetz, C. R.; Bankaitis, V. A., Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of phospholipid-bound Sfh1p, a member of the *Saccharomyces cerevisiae* Sec14p-like phosphatidylinositol transfer protein family. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **2006**, *62* (Pt 11), 1156-60.
53. Houjou, T.; Yamatani, K.; Nakanishi, H.; Imagawa, M.; Shimizu, T.; Taguchi, R., Rapid and selective identification of molecular species in phosphatidylcholine and sphingomyelin by conditional neutral loss scanning and MS3. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, *18* (24), 3123-30.
54. Watanabe, Y.; Tamura, Y.; Kawano, S.; Endo, T., Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria. *Nat Commun* **2015**, *6*, 7922.
55. Miyata, N.; Watanabe, Y.; Tamura, Y.; Endo, T.; Kuge, O., Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria. *J Cell Biol* **2016**, *214* (1), 77-88.
56. Baker, C. D.; Basu Ball, W.; Pryce, E. N.; Gohil, V. M., Specific requirements of nonbilayer phospholipids in mitochondrial respiratory chain function and formation. *Mol Biol Cell* **2016**, *27* (14), 2161-71.
57. Gulshan, K.; Shahi, P.; Moye-Rowley, W. S., Compartment-specific synthesis of phosphatidylethanolamine is required for normal heavy metal resistance. *Mol Biol Cell* **2010**, *21* (3), 443-55.
58. Balderhaar, H. J.; Ungermann, C., CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* **2013**, *126* (Pt 6), 1307-16.

59. Birner, R.; Bürgermeister, M.; Schneiter, R.; Daum, G., Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **2001**, *12* (4), 997-1007.
60. Bürgermeister, M.; Birner-Grünberger, R.; Nebauer, R.; Daum, G., Contribution of different pathways to the supply of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine to mitochondrial membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1686* (1-2), 161-8.
61. Bankaitis, V. A.; Aitken, J. R.; Cleves, A. E.; Dowhan, W., An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* **1990**, *347* (6293), 561-2.
62. Moser von Filseck, J.; Vanni, S.; Mesmin, B.; Antonny, B.; Drin, G., A phosphatidylinositol-4-phosphate powered exchange mechanism to create a lipid gradient between membranes. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6671.
63. Holič, R.; Simová, Z.; Ashlin, T.; Pevala, V.; Poloncová, K.; Tahotná, D.; Kutejová, E.; Cockcroft, S.; Griač, P., Phosphatidylinositol binding of *Saccharomyces cerevisiae* Pdr16p represents an essential feature of this lipid transfer protein to provide protection against azole antifungals. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1842* (10), 1483-90.
64. Ghaemmaghami, S.; Huh, W. K.; Bower, K.; Howson, R. W.; Belle, A.; Dephoure, N.; O'Shea, E. K.; Weissman, J. S., Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **2003**, *425* (6959), 737-41.
65. Kulak, N. A.; Pichler, G.; Paron, I.; Nagaraj, N.; Mann, M., Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods* **2014**, *11* (3), 319-24.
66. Kojima, R.; Endo, T.; Tamura, Y., A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro. *Sci Rep* **2016**, *6*, 30777.
67. Voss, C.; Lahiri, S.; Young, B. P.; Loewen, C. J.; Prinz, W. A., ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* **2012**, *125* (Pt 20), 4791-9.
68. Boldogh, I. R.; Nowakowski, D. W.; Yang, H. C.; Chung, H.; Karmon, S.; Royes, P.; Pon, L. A., A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell* **2003**, *14* (11), 4618-27.
69. Chan, E. Y.; McQuibban, G. A., Phosphatidylserine decarboxylase 1 (Psd1) promotes mitochondrial fusion by regulating the biophysical properties of the mitochondrial membrane and alternative topogenesis of mitochondrial genome maintenance protein 1 (Mgm1). *J Biol Chem* **2012**, *287* (48), 40131-9.
70. Jeong, H.; Park, J.; Jun, Y.; Lee, C., Crystal structures of Mmm1 and Mdm12-Mmm1 reveal mechanistic insight into phospholipid trafficking at ER-mitochondria contact sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114* (45), E9502-E9511.
71. Dowler, S.; Kular, G.; Alessi, D. R., Protein lipid overlay assay. *Sci STKE* **2002**, *2002* (129), pl6.
72. Kobayashi, S. 東京大学大学院農学生命科学研究科博士論文 「アルカン資化性酵母の n-アルカン応答における遺伝子発現制御機構に関する研究」 . 2012.
73. Robzyk, K.; Kassir, Y., A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **1992**, *20* (14), 3790.
74. Cleves, A. E.; McGee, T. P.; Whitters, E. A.; Champion, K. M.; Aitken, J. R.; Dowhan, W.; Goebel, M.; Bankaitis, V. A., Mutations in the CDP-choline pathway for phospholipid biosynthesis bypass the requirement for an essential phospholipid transfer protein. *Cell* **1991**, *64* (4), 789-800.
75. Duex, J. E.; Tang, F.; Weisman, L. S., The Vac14p-Fig4p complex acts independently of Vac7p and couples PI3,5P2 synthesis and turnover. *J Cell Biol* **2006**, *172* (5), 693-704.
76. Li, S. C.; Diakov, T. T.; Xu, T.; Tarsio, M.; Zhu, W.; Couoh-Cardel, S.; Weisman, L. S.; Kane, P. M., The signaling lipid PI(3,5)P₂ stabilizes V₁-V(o) sector interactions and activates the V-ATPase. *Mol Biol Cell* **2014**, *25* (8), 1251-62.
77. Huang, J.; Zhu, H.; Haggarty, S. J.; Spring, D. R.; Hwang, H.; Jin, F.; Snyder, M.; Schreiber, S. L., Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101* (47), 16594-9.
78. Trotter, P. J.; Voelker, D. R., Identification of a non-mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase activity (PSD2) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **1995**, *270* (11), 6062-70.
79. McCartney, A. J.; Zhang, Y.; Weisman, L. S., Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance. *Bioessays* **2014**, *36* (1), 52-64.

80. Mousley, C. J.; Tyeryar, K. R.; Vincent-Pope, P.; Bankaitis, V. A., The Sec14-superfamily and the regulatory interface between phospholipid metabolism and membrane trafficking. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1771* (6), 727-36.
81. Cleves, A. E.; Novick, P. J.; Bankaitis, V. A., Mutations in the SAC1 gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J Cell Biol* **1989**, *109* (6 Pt 1), 2939-50.
82. Esmon, B.; Novick, P.; Schekman, R., Compartmentalized assembly of oligosaccharides on exported glycoproteins in yeast. *Cell* **1981**, *25* (2), 451-60.
83. Altmann, K.; Westermann, B., Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **2005**, *16* (11), 5410-7.
84. Fang, M.; Kearns, B. G.; Gedvilaite, A.; Kagiwada, S.; Kearns, M.; Fung, M. K.; Bankaitis, V. A., Kes1p shares homology with human oxysterol binding protein and participates in a novel regulatory pathway for yeast Golgi-derived transport vesicle biogenesis. *EMBO J* **1996**, *15* (23), 6447-59.
85. Tschopp, J.; Esmon, P. C.; Schekman, R., Defective plasma membrane assembly in yeast secretory mutants. *J Bacteriol* **1984**, *160* (3), 966-70.
86. Beh, C. T.; Cool, L.; Phillips, J.; Rine, J., Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics* **2001**, *157* (3), 1117-40.
87. van den Hazel, H. B.; Pichler, H.; do Valle Matta, M. A.; Leitner, E.; Goffeau, A.; Daum, G., PDR16 and PDR17, two homologous genes of *Saccharomyces cerevisiae*, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs. *J Biol Chem* **1999**, *274* (4), 1934-41.
88. Novick, P.; Field, C.; Schekman, R., Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **1980**, *21* (1), 205-15.
89. Geng, J.; Nair, U.; Yasumura-Yorimitsu, K.; Klionsky, D. J., Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **2010**, *21* (13), 2257-69.
90. Arakawa, S.; Honda, S.; Yamaguchi, H.; Shimizu, S., Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **2017**, *93* (6), 378-385.
91. Bissig, C.; Gruenberg, J., Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5* (10), a016816.
92. Mousley, C. J.; Tyeryar, K. R.; Ryan, M. M.; Bankaitis, V. A., Sec14p-like proteins regulate phosphoinositide homeostasis and intracellular protein and lipid trafficking in yeast. *Biochem Soc Trans* **2006**, *34* (Pt 3), 346-50.
93. Schaaf, G.; Dynowski, M.; Mousley, C. J.; Shah, S. D.; Yuan, P.; Winklbauer, E. M.; de Campos, M. K.; Trettin, K.; Quinones, M. C.; Smirnova, T. I.; Yanagisawa, L. L.; Ortlund, E. A.; Bankaitis, V. A., Resurrection of a functional phosphatidylinositol transfer protein from a pseudo-Sec14 scaffold by directed evolution. *Mol Biol Cell* **2011**, *22* (6), 892-905.
94. Lopez, M. C.; Nicaud, J. M.; Skinner, H. B.; Vergnolle, C.; Kader, J. C.; Bankaitis, V. A.; Gaillardin, C., A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J Cell Biol* **1994**, *125* (1), 113-27.
95. Ghugtyal, V.; Garcia-Rodas, R.; Seminara, A.; Schaub, S.; Bassilana, M.; Arkowitz, R. A., Phosphatidylinositol-4-phosphate-dependent membrane traffic is critical for fungal filamentous growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112* (28), 8644-9.
96. Vernay, A.; Schaub, S.; Guillas, I.; Bassilana, M.; Arkowitz, R. A., A steep phosphoinositide bis-phosphate gradient forms during fungal filamentous growth. *J Cell Biol* **2012**, *198* (4), 711-30.

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さり、いつも温かいご指導を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科細胞遺伝学研究室教授、堀内裕之先生に深く感謝致します。普段より親身に討論して頂き、また本論文の校閲をして下さいました同研究室助教、福田良一先生に心より感謝致します。また、多くのご助言を頂きました中部大学応用生物学部応用生物化学科教授、太田明德先生にも深く感謝致します。

走査型電子顕微鏡観察にご協力頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科技術基盤センターマイクロ観察技術室室長の東京大学大学院農学生命科学研究科水族生理学研究室教授、金子豊二先生、副室長の東京大学大学院農学生命科学研究科生物素材化学研究室特任准教授、木村聡先生、また、実際に電子顕微鏡像の撮影を行って頂いた技術職員、富田憲司氏に深く感謝致します。

また、ウェスタン解析のための抗体をご提供下さった、東京大学大学院農学生命科学研究科分子生命工学研究室前教授、依田幸司先生、同研究室助教、野田陽一先生、東京大学大学院理学系研究科発生細胞生物学研究室教授、中野明彦先生に深く感謝致します。

研究の手ほどきをして頂き、共同研究者でもある小林新吾氏 (現カネカ) に心より感謝致します。また、多くのご協力、ご助言を頂きました細胞遺伝学研究室の、OBも含めた皆さまに深く感謝致します。