# 博士論文

# 酵母における

# セラミドの非小胞輸送に関する研究

## 令和3年3月

広島大学大学院生物圈科学研究科

## 池田敦子

# 博士論文

# 酵母における

# セラミドの非小胞輸送に関する研究

## 令和3年3月

広島大学大学院生物圈科学研究科

生物機能開発学専攻

## 池田敦子

## 目次

第1章	緒言	••••••••••••••••••••••••••••
第2章	実験	材料 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1 2
第3章	実験	操作 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18
第4章	実験	結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
1. $T_{1}$	CB遺伝	<b>子破壊株における表現型の解析 ・・・・・・・・・・・・・・</b> 23
1-1.	TCB 遺	伝子破壊株は myriosin に対して薬剤感受性を示す ・・・・・・・ 23
1-2.	TCB 遺	伝子破壊株は液胞の断片化を示す ・・・・・・・・・・・・・23
2. ]	とb タン	パク質の局在性の解析 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27
2-1.	過剰発	現させた Tcb3-GFP は小胞体-ゴルジ体コンタクトサイトに局在し、
	その局	在は C2 ドメインおよび Tcb1、Tcb2 を必要とする ・・・・・・ 27
	2-1-1.	過剰発現させた Tcb3-GFP は cER と nER の両方に局在し、
		C2 ドメイン依存的にドットを形成する
	2-1-2.	Tcb3 のドット状の局在は、Tcb1 と Tcb2 を必要とする
	2-1-3.	過剰発現させた Tcb3-GFP のドットは小胞体-ゴルジ体
		コンタクトサイトに局在する
	2-1-4.	PI4P の増加は Tcb3-GFP のドット形成を促進する
	2-1-5.	Tcb3-positive なチューブ状の構造について
2-2.	ネイテ	ィブプロモーター下で発現した Tcb3-GFP の小胞体-ゴルジ体
	コンタ	クトサイトへの局在は小胞体ストレスによって増加する ・・・・・35
	2-2-1.	ネイティブプロモーター下で発現した Tcb3-GFP のドットは、
		tunicamycine の添加によって増加する
	2-2-2.	tunicamycin の添加によって形成された Tcb3-GFP のドットは
		小胞体-ゴルジ体コンタクトサイトに局在する
3. 小唐	包体ーコ	『ルジ体コンタクトサイトの形成に関する解析 ・・・・・・・・・ 3 9
3-1.	Teb タ	ンパク質の C2 ドメインは小胞体-ゴルジ体コンタクトサイトの形成に
	機能す	3 • • • • • • • • • • • • • • • • • • •
	3-1-1.	Tcbタンパク質の欠損により小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトが減少する
	3-1-1.	C2 ドメインをもつ Tcb3 の過剰発現は小胞体-ゴルジ体コンタクトサイト
		を増加させる

4.	小胞輸送における Tcb タンパク質の機能解析	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4	2
4	4-1. Tcb タンパク質は COPII 小胞輸送に関与し	た	2		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4	2

- 5. セラミド非小胞輸送における Tcb タンパク質の機能解析 ・・・・・・・・・ 4 4
  - 5-1. Tcb タンパク質はセラミドの非小胞輸送に必要である ・・・・・・・・44
     5-1-1. TCB遺伝子の破壊はセラミドの非小胞輸送依存的な IPC 合成を減少させる
     5-1-2. TCB遺伝子の破壊は、IPC 合成活性およびセラミド合成に影響を与えない

6. セラミド非小胞輸送と他の細胞機能との関係に関する解析 ・・・・・・	••	53
6-1. セラミド非小胞輸送はセラミドの蓄積を防ぐ役割を担う ・・・・・	••	53
6-1-1. TCB 遺伝子の欠損は LD 形成を促進する		
6-1-2. Tcb3 の過剰発現は sec12 変異株における LD 形成の増加を抑圧す	る	
6-1-3. <i>TCB</i> 遺伝子の欠損は TAG の量には影響を与えない		

第5章	考	察		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	5	7
第6章	参	考	文	献		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6	3
謝辞	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	7	1

#### 第1章 緒言

生体膜は、固有の脂質組成を有しながら多種類の脂質が不均一かつ複雑に配置されて おり、細胞やオルガネラの形態維持や機能と密接に関連している。生体膜の機能性は、 生体膜上における脂質分子の配向や非対称性、分布や動態、脂質間相互作用、膜の相分 離構造や膜同士の接触部位の形成といったダイナミックな膜の構造変化がタンパク質 の構造や機能と複雑に絡み合うことで、制御されている。つまり、生体膜で行われる物 質輸送や情報伝達、酵素による物質代謝などの重要な生命現象に、脂質が深く関与して いると考えられる。したがって、細胞が生命活動を正常に行う上で、細胞膜の脂質の存 在量や分布は細胞内外の環境変化に応じて適切に保たれている必要がある。そのために、 脂質合成の場である小胞体から機能すべき場所への輸送や選別は厳密に制御されてい ると考えられる。近年、脂質の合成と代謝、およびその調節機構はその全貌が明らかに されつつあるのに対し、輸送や選別のメカニズムについては未だ多くが謎のままである。

#### スフィンゴ脂質の細胞機能

スフィンゴ脂質は生体膜を構成する主要分子のひとつである。スフィンゴ脂質とは基本骨格にスフィンゴイド塩基をもつ複合脂質の総称であり、グリセロリン脂質やステロールと共に動物や植物、酵母などの真核細胞の膜を構成している。さらに、スフィンゴ 脂質はステロールとともに秩序液体相(liquid-ordered 相、Lo ドメイン)であるラフトと 呼ばれる膜ドメインの形成に重要であることが知られている。Lo ドメインは液体無秩 序相である liquid-disordered (Ld)ドメインと比べて、膜の厚みが厚く、流動性は低い。ラ フトには受容体タンパク質や glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカータンパク質など が集積していることから、このドメインは生体膜上でシグナル伝達や細胞内小胞輸送に おける積み荷の選別に関与していると推測されている [1] [2]。

スフィンゴ脂質は生体膜を構成するだけでなく、それ自身がシグナル伝達因子として、 細胞内の生命現象において多彩な役割を果たしている。スフィンゴイド塩基はストレス 応答やアクチン細胞骨格、細胞周期の調節などに関与する [3] [4] [5]。また、スフィン ゴ脂質の中心的分子であるセラミドは、増殖抑制の主要なメディエーターとして、また はアポトーシスやマイトファジー、細胞周期の停止や老化といった腫瘍抑制のための細 胞プログラムにおいて機能する [6] [7]。

細胞内におけるセラミドの濃度調整は、細胞の運命を決定する上で非常に重要である。 セラミドの輸送やスフィンゴ脂質代謝に異常が起こると、セラミドの過剰な蓄積によっ て、細胞の機能障害や細胞死が引き起こされる [8] [9]。このようにセラミドの量が一時 的に増加した時に、脂質毒性を防ぐメカニズムの一つとして、セラミドの複合スフィン ゴ脂質への変換を促進することが考えられる。また、セラミド分解酵素による分解も細 胞内のセラミド量を減少させるために重要な役割を持つことが推測できる [10] [11] [12]。加えて、動物細胞を用いた解析から、セラミドはアシルセラミドへと変換され、 脂肪滴(lipid droplets, LDs)に取り込まれることでセラミドの有毒な蓄積を防ぐことが示 唆されている [13]。酵母にも同様の機構が存在することが提唱されているが [14][15]、 その証明には至っていない。

#### スフィンゴ脂質の生合成とその制御機構

モデル生物である出芽酵母においては、スフィンゴ脂質の合成経路やそれに関わる酵素、代謝産物の多くが既に明らかにされている(Fig.1)。スフィンゴ脂質の生合成過程は、 小胞体において、serine palmitoyltransferase (SPT)によるセリンとパルミトイル CoA の縮 合反応から始まり、3-keto sphinganine、dihydrosphingosine (DHS)および phytosphingosine (PHS)が合成される。さらに、DHS から dihydroceramide、PHS からは phytoceramide が 合成される。小胞体で合成されたセラミドは、その後ゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体 に局在する酵素 Aur1 によって複合スフィンゴ脂質の一つである inositol phosphorylceramide (IPC)へと変換される。そこにマンノースが付加されて mannosylinositol phosphorylceramide (MIPC)、さらにホスホリルイノシトール基が付加されて mannosyl-di-inositol phosphorylceramide (M(IP)<sub>2</sub>C)へと反応が進む。このようにスフィンゴ 脂質の生合成過程や各ステップで働くタンパク質をコードする遺伝子(Fig.1)はほぼ明 らかにされてきている。

さらに、スフィンゴ脂質の合成を調節するメカニズムについても、最近その多くが分かってきている [16]。スフィンゴ脂質の量は、その合成に関与する主要な酵素が翻訳後 修飾を受けることによって制御されている。細胞膜におけるスフィンゴ脂質の量が低下 すると、target of rapamycin complex 2 (TORC2)が活性化し、Akt タンパク質(PI3K の下 流に位置して細胞機能の制御に関連するキナーゼ)の酵母ホモログである Ypk1 をリン 酸化する [17]。これにより、SPT の負の調節因子である Orm タンパク質がリン酸化さ れることによってスフィンゴ脂質合成の抑制が解除される [18][19][20]。その他のメカ ニズムとしては、Ypk キナーゼによるセラミド合成の制御 [21]や、Pkh キナーゼの制御 [22]、very-long-chain fatty acid (VLCFA)生合成の制御 [23][24]など、様々なステップにお いて制御機構が働いている。また、複合スフィンゴ脂質合成酵素も制御を受けることが 示唆されている [25]。さらに、スフィンゴ脂質代謝における最初の中間体であるセリン の細胞外からの取り込みが、スフィンゴ脂質ホメオスタシスの維持において重要である ことも示唆されている [26]。



Figure 1. 複合スフィンゴ脂質生合成経路

#### セラミドの小胞輸送経路と非小胞輸送経路について

複合スフィンゴ脂質の前駆体であるセラミドは小胞体で合成され、セラミドから複合 スフィンゴ脂質の一つである IPC への変換はゴルジ体で行われる。小胞体とゴルジ体は それぞれの膜によって区画化されているため、セラミドがその間を移動するためには適 切な輸送過程が必要になる。セラミドの輸送は、輸送小胞を介する小胞輸送、およびそ れを介さない非小胞輸送によって行われることが知られている [27]。セラミドの小胞 輸送は、タンパク質の小胞輸送と同じく Sec タンパク質群および COPII小胞に依存する 輸送である。glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカータンパク質も、小胞体で合成され た後 COPII 小胞輸送によってゴルジ体を経て、細胞膜表面へと輸送される [28]。この とき、小胞体において GPI アンカータンパク質が脂質マイクロドメインに集積する [29] ことによって他のタンパク質との選別を受け、特異的な輸送小胞に乗って運ばれること が示唆されていた。最近になって、実際にこのような選別が行われていることが、高速 超解像ライブイメージング顕微鏡を用いた観察によって確認された [30]その他の知見 として、GPI アンカータンパク質の輸送にはセラミドの正常な合成が必要である [31]。 また、GPIアンカーの生合成に異常を持つ細胞ではセラミドの蓄積が見られる [32][33]。 これらのことから、セラミドの小胞輸送と GPI アンカータンパク質の輸送は相互に調 節し合う関係であると考えられる。

さらに、ステロール結合タンパク質の oxysterol binding protein (OSBP)と、酵母 Osh (OSBP-homolog)タンパク質がセラミドの小胞輸送を制御することも明らかにされている [34]。OSBP は pleckstrin homology (PH)ドメイン、two phenylalanines in an acidic tract (FFAT)モチーフ、OSBP-related ligand-binding domain (ORD)という 3 つの機能性ドメイン

からなるタンパク質である(Fig. 2) [35] [36]。PH ドメインが phosphatidylinositol 4phosphate (PI4P)と結合することにより、OSBP はゴルジ体へ局在化される。FFAT モチー フは小胞体の膜タンパク質 VAP (酵母細胞では Scs2) と相互作用し、小胞体への局在に 必要な領域である。さらに、ORL はステロール結合ドメインである。酵母 Osh タンパ ク質は、OSBP と同様のステロール結合ドメインを有する OSBP-related protein (ORP)の ホモログであり、Osh1-Osh7 が存在する [37]。



Figure 2. タンパク質のドメイン

Osh2, Osh3, Osh4 が欠損した osh2 Δ3 Δ4 Δ では、セラミドの小胞輸送に障害が見られ る。しかしながら、osh2 Δ3 Δ4 Δ において GPI アンカータンパク質である Gas1 の小胞 体への蓄積は見られなかった。このことは、Osh タンパク質が関与しているセラミドの 輸送は、GPI アンカータンパク質との共輸送とは異なる輸送である可能性を示唆してい る。一方、小胞輸送の初期ステップである輸送小胞の形成に働く SEC12 遺伝子の変異 による表現型が、Osh タンパク質の欠損によって抑圧された。このことは、Sec12 の機 能に対して Osh タンパク質の存在がマイナスに働いていることを意味しており、Osh タ ンパク質は輸送の初期ステップにおいては負の制御因子であることを示唆している。こ れにより、Osh タンパク質はセラミドの小胞輸送において、正の制御因子であると同時 に、初期ステップにおいては負の制御因子である、という異なる 2 つの機構による制御 を行っている可能性が示唆された(Fig. 3)。ただし、セラミドが GPI アンカータンパク質 に富む小胞へパッケージングされるのを Osh タンパク質が助けている可能性も排除さ れていないことから、GPI アンカータンパク質を含まずセラミドのみを運ぶ小胞が存在 するかは仮説の域を出ない。



Figure 3. Osh タンパク質による輸送制御機構

一方で小胞を介さない輸送は、ATP を必要としない経路であること、細胞質タンパク 質を必要とすること、オルガネラ膜同士の接触を必要とすることが示唆されている [27]。ヒト細胞においては、セラミドを特異的に輸送するタンパク質として ceramide transport protein (CERT)が知られている [38] [39]。CERT はセラミドを輸送するために必 要な 3 つのドメインから構成されており、OSBP と同様の PH ドメインと FFAT モチー フに加えて、START ドメインをもつ(Fig.2) [39]。START ドメインは小胞体膜からセラ ミドを引き抜き、ゴルジ体への受け渡しに機能するドメインである。CERT はステロー ル結合タンパク質 OSBP とともにセラミド輸送を調節することが示唆されている [40] [41]。真核細胞のモデル生物である出芽酵母においても、これと類似したセラミド非小 胞輸送メカニズムが存在すると推測されるが、酵母細胞には CERT のホモログが存在し ないことから [42]、セラミドの非小胞輸送に関与する因子は長らく不明であった。

#### セラミド非小胞輸送における membrane contact sites の役割

細胞内には異なるオルガネラの膜同士が非常に近接している部分があり、この領域は membrane contact site (MCS)と呼ばれる。これまで、オルガネラはそれぞれのオルガネラ 膜によって区画化されているため、独立した存在であるように捉えられてきた。しかし ながら、実際は、MCS における膜同士の直接的な接触を介して、協調的な機能を発揮 していると推察できる。そのため MCS は近年、オルガネラ間のコミュニケーションの 場として大きな注目を集めている。MCS の役割としては、細胞の機能に重要な脂質代 謝、シグナル伝達、イオンの調節、低分子の輸送やオルガネラの形態など様々な生命現 象に関与していると考えられている。MCS はあらゆるオルガネラ間で見られ、特に小 胞体は非常に発達した網目状の構造を持つことから、様々なオルガネラと MCS を形成 している。代表的な MCS として、核周辺の小胞体と液胞の間の nucleus-vacuole junction (NVJ)、小胞体とミトコンドリアとの endoplasmic reticulum and mitochondria encounter structures (ERMES)、細胞膜辺縁の小胞体を細胞膜に繋ぎ止める ER-PM contact sites など が知られている(Fig.4)。ここ数十年で MCS の形成に関わる因子も次々と同定されてき ている。最近では、Tcb タンパク質を含む 7 つの tether タンパク質(Tcb1, Tcb2, Tcb3, Scs2, Scs22, Ist2, Ice2)が、小胞体と細胞膜のコンタクトサイトを形成する機能を持つことが報 告されている [43] [44]。この小胞体ー細胞膜コンタクトにおいては、MCS は小胞体に 局在する Sac1 による細胞膜上の PI4P を PI に変換する機能の促進に機能している。ま た、Nvj2 は核と液胞が接する領域である NVJ に多く存在するタンパク質として報告さ れた。この接触領域は、小胞体局在性の Nvj1 と液胞膜局在性の Vac8 によって形成され ることが知られている [45]。



**Figure 4. Membrane Contact Sites** 

セラミドの非小胞輸経路は、輸送小胞を介さず、ATP 非依存的であるが、オルガネラ 膜同士の接触を必要とすることが示唆されている [27]。近年になって、通常時には NVJ に局在している Nvj2 が、ストレス条件下で小胞体とゴルジ体の MCS に局在して MCS 形成を促進し、セラミド非小胞輸送に関与することが報告された [14]。Nvj2 は膜貫通 領域によって小胞体に局在する膜タンパク質である。また、PH ドメインと synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding protein (SMP)ドメインも持つ(Fig.2) [46]。酵 母の膜接触部位には、SMP ドメインを持ったタンパク質が多く局在していることが知 られている [46]。バイオインフォマティクス (生命情報科学)に基づく解析により、SMP ドメインが脂質結合および脂質輸送能をもつ tubular lipid-binding protein (TULIP)ドメイ ンと相同性をもつことが示唆されたことから、SMP ドメインを有するタンパク質も同 様に、膜接着部位において脂質輸送に関与しているだろうと推察されている [47]。SMP ドメインの機能は未だ明らかにされていないが、小胞体とミトコンドリアの間での脂質 の交換に関与する可能性が報告されている [48]。

Osh タンパク質の破壊株、osh2 Δ3 Δ4 Δ はセラミド輸送に障害を持つため IPC 合成量 が低下している。そのため、IPC 合成阻害剤である aureobasidin A を含む培地では、osh2 Δ3 Δ4 Δ 株は野生株と比べて生育が著しく悪化する [34]。osh2 Δ3 Δ4 Δ に高発現させる ことによって aureobasidin A 感受性を抑圧するタンパク質のスクリーニングから得られ たのが Nvj2 であった [14]。網羅的な解析において、セラミドとの結合性も示されてい る [49]。*in vivo* および *in vitro* において、小胞輸送が動かない条件下で Nvj2 の高発現が IPC 合成量を増加させた [14]。また、Nvj2-GFP の過剰発現や、小胞体ストレス誘導時 には Nvj2-GFP は小胞体膜上を移動し、小胞体ーゴルジ体の MCS に局在する。さらに、 小胞体ストレスによって小胞体ーゴルジ体のの MCS に局在する。さらに、 小胞体ストレスによって小胞体ーゴルジ体のの MCS に局在する。さらに、 小胞体ストレスによって小胞体ーゴルジ体のコンタクトが増加し、このときのコンタク トの形成には Nvj2 が必要であることが分かった。これらの結果から、Nvj2 は小胞体ー ゴルジ体コンタクトを形成することで、セラミドの非小胞輸送を促進することが示唆さ れている。



Figure 5. Nvj2 と Tcb3

#### Tcb タンパク質について

セラミドの非小胞輸送に関わるタンパク質を明らかにすることが本研究の目的であ る。そこで、セラミド輸送に機能するためにはセラミドと結合する性質を持つであろう という考えから、セラミドと結合する可能性のあるタンパク質に着目した。以前より、 哺乳類のリン脂質加水分解酵素である細胞質型ホスホリパーゼ A2 (cytosolic phospholipase A2, cPLA2)の C2 ドメインが、カルシウムイオンに依存してセラミドと結 合することが分かっている [50]。先行研究での無細胞実験系を用いたセラミドの非小胞 輸送系を測定する解析において、キレート剤(EGTA/MnCl<sub>2</sub>)によって IPC 合成が阻害され た (未発表) ことからも、カルシウムイオンに依存的な C2 ドメインの特徴はセラミド輸 送タンパク質の候補として有力であると考えられた。そこで、酵母遺伝子のデータベース において C2 ドメインを持つタンパク質をサーチしたところ、Three Calcium and lipid Binding domains (tricalbin)ファミリーの 3 つのタンパク質 Tcb1, Tcb2, Tcb3 が該当した (Fig. 2)。Tcb タンパク質の C2 ドメインに関しては、3 つではなく 4 つであることが示 唆された [51]。しかしその後のさらなる解析から、5 つから 6 つであることが分かって いる [52]。

酵母 tricalbins のホモログとして、ヒト細胞は extended synaptotagmins (E-Syt I, 2, 3)を 発現しており、ホモおよびヘテロ複合体を形成している。ヒト E-Syts 複合体は疎水性領 域である transmembrane (TM)ドメインによって小胞体に局在し、C2 ドメインを介して 細胞膜の phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2)と相互作用することにより小胞 体と細胞膜を接着し、MCS の形成に関与する。E-Syt 1 の C2 ドメインは細胞内 Ca2+濃 度依存性に細胞膜と相互作用するため、これら複合体は細胞内 Ca2+濃度の上昇によっ て小胞体 – 細胞膜コンタクトサイトに局在し、その接着を制御することが示唆されてい る [53][54][55]。酵母 Tcb タンパク質も同様に、TM ドメインによって小胞体に局在し、 おそらく Ca<sup>2+</sup>と結合する C2 ドメインによって小胞体 – 細胞膜コンタクトサイトに特異 的に局在し、小胞体膜を細胞膜に繋ぎ止める tether タンパク質としての機能を発揮して いると考えられる [43]。これらのことから、ヒト E-Syts と酵母 tricalbin は進化学的に保 存された小胞体 – 細胞膜コンタクトサイトの tether タンパク質であることが推察され る。

さらに、ヒト E-Syts および酵母 tricalbin は Nvj2 と同様に SMP ドメインを持つため、 脂質輸送タンパク質としての機能を持つ可能性は高い。ヒト E-Syts については、コンタ クトサイトにおいて Ca2+依存的に脂質を輸送する機能をもつことが示唆されている [56]。

また、酵母 Tcb タンパク質の TM ドメインは小胞体膜にヘアピン状に挿入されてお り、小胞体の曲率を高めて湾曲した形状の形成に寄与することが示唆されている [57] [58]。膜の曲率が高い場所では脂質のパッキングに欠陥が起こりやすいことから、脂 質単分子の交換が促進されると考えられている [59] [60]。また、Osh4 は細胞膜表面か ら小胞体へのステロールの非小胞輸送を担っており [61] [62]、膜の曲率したところに 局在することが分かっている [63]。これらのことから、曲率した膜に脂質輸送タンパク 質が局在することで脂質の非小胞輸送を促進している可能性も考えられる。

酵母の Tcb タンパク質については脂質輸送における機能は分かっていないが、網羅的 な解析から Tcb3 がセラミドと結合することが示されている [49]。また、Tcb タンパク 質をコードする遺伝子の破壊株は、スフィンゴ脂質生合成の初期反応ステップを阻害す る薬剤である myriocin に対して感受性を示すことが報告されており [46]、スフィンゴ 脂質の代謝に関与している可能性が考えられる。

以上に述べたような Tcb タンパク質の構造的特徴と、スフィンゴ脂質代謝に関与する

可能性があることから、Tcb タンパク質はセラミドの非小胞輸送に関与しているのでは ないかと考えた。そこで本研究では、小胞体からゴルジ体へのセラミド非小胞輸送にお ける Tcb タンパク質の役割、およびセラミド非小胞輸送と他の細胞機能との関連につい て解析を行った。

## 第2章 実験材料

## 使用酵母株

Strain	Name	Mat	Genotype
FKY66	WT	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 bar1
FKY73	$tcb1\Delta2\Delta3\Delta$	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 tcb1∆::TRP1
			$tcb2\Delta$ ::HIS3 $tcb3\Delta$ ::LEU2
FKY74	sec18-20	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 bar1 sec18-20(ts)
FKY76	$sec18-20 tcb1\Delta2\Delta3\Delta$	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 sec18-20(ts)
			$tcb1\Delta$ :: $TRP1 tcb2\Delta$ :: $HIS3 tcb3\Delta$ :: $LEU2$
FKY2577	WT	a	ura3 his3 leu2 lys2 trp1 bar1
FKY2734	WT	alpha	ura3 his3 lys2 leu2 trp1 suc2
FKY2755	stt4-4	alpha	stt4A::HIS3 ura3 his3 lys2 leu2 trp1 suc2
			pRS415 / stt4-4
FKY2756	mss4-102	alpha	mss4∆::HIS3 ura3 his3 lys2 leu2 trp1 suc2
			Ycplac / mss4-102
FKY2906	$tcb2\Delta$	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 tcb2∆::HIS3
FKY2909	$tcb1\Delta$	a	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 tcb1∆::TRP1
FKY2924	$tcb3\Delta$	a	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 tcb3∆::LEU2
FKY2926	$sec18-20 tcb1\Delta2\Delta3\Delta$	a	ura3 leu2 his3 trp1 bar1 sec18-20(ts)
			$tcb1\Delta$ :: $TRP1 tcb2\Delta$ :: $HIS3 tcb3\Delta$ :: $LEU2$
FKY2927	$tcb1\Delta2\Delta3\Delta$	a	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 tcb1∆::TRP1
			$tcb2\Delta$ ::HIS3 $tcb3\Delta$ ::LEU2
FKY2928	WT	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1
FKY2929	sec18	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 bar1 sec18-20(ts)
FKY2960	sec12-4	a	usa3 leu2 his3 lys2 bar1 sec12-4(ts)
FKY2984	$sec12-4 tcb1\Delta2\Delta3\Delta$	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 sec12-4(ts)
			$tcb1\Delta$ :: $TRP1 tcb2\Delta$ :: $HIS3 tcb3\Delta$ :: $LEU2$
FKY3114	$sac1\Delta$	a	sac1∆::HIS3 ura3 his3 leu2 lys2 trp1 bar1
FKY3343	Tcb3-GFP	a	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 TCB3-GFP::TRP1
FKY4663	Sec13-Venus	a	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1
			SEC13-Venus::KanMX
FKY4876	Sec13-Venus $tcb1\Delta2\Delta$	$\Delta 3\Delta$	
		a	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1 tcb1∆::TRP1

tcb2∆::HIS3 tcb3∆::LEU2 SEC13-Venus::KanMX

FKY4892	$dgal\Delta lrol\Delta$	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1
			$dga1\Delta$ ::KanMX lro1 $\Delta$ ::KanMX
FKY4987	Sec13-Venus sec12-4	$tcb1\Delta2$	$\Delta 3 \Delta$
		a	ura3 leu2 his3 lys2 bar1 sec12-4(ts)
			tcb3∆::LEU2 SEC13-mCherry::KanMX
FKY5161	WT	a	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1
FKY5167	$tcb1\Delta2\Delta3\Delta$	alpha	ura3 leu2 his3 trp1 lys2 bar1
			$tcb1\Delta$ ::KanMX $tcb2\Delta$ ::HIS3 $tcb3\Delta$ ::LEU2
FKY5188	$sac1\Delta$	a	$sac1\Delta$ ::HIS3 ura3 his3 leu2 lys2 trp1 bar1
FKY5191	WT	a	ura3 his3 leu2 lys2 trp1 bar1

使用プラスミド

Plasmid	Name	Relevant information
FKP22	pRS416- <i>TDH3</i>	CEN, yeast TDH3 promoter, URA3
FKP258	pRS425	2 micron, empty, LEU2
FKP356	pRS314-TDH3 /mRFP-SED5	CEN, yeast TDH3 promoter,
		mRFP-SED5, TRP1
FKP359	pRS314-TDH3 /mRFP-GOS1	CEN, yeast TDH3 promoter,
		mRFP-GOS1, TRP1
FKP471	YCplac22 /SEC7-mRFP	CEN, yeast ADH promoter,
		SEC7-mRFP, TRP1
FKP621	pTDH3 / EGFP-CPS1	CEN, yeast TDH3 promoter,
		GFP-CPS1, URA3
FKP847	pRS416-TDH3 /TCB3(\DeltaTM)-GFP	CEN, yeast TDH3 promoter,
		TCB3 <sup>259F-1545R</sup> -GFP, URA3
FKP848	pRS416-TDH3 /TCB3(SMP)-GFP	CEN, yeast TDH3 promoter,
		<i>TCB3</i> <sup>259F-489R</sup> - <i>GFP</i> , <i>URA3</i>
FKP849	pRS416- <i>TDH3 /TCB3</i> (ΔSMP-C2)-GFP	CEN, yeast TDH3 promoter,
		TCB3 <sup>1F-259R</sup> -GFP, URA3
FKP865	pRS416-TDH3 /TCB3-GFP	CEN, yeast TDH3 promoter,
		TCB3-GFP, URA3
FKP871	pRS425 / SAC1	2 micron, own oromoter,

		SAC1, LEU2
FKP894	pRS416-TDH3 /TCB3(C2)-GFP	CEN, yeast TDH3 promoter,
		<i>TCB3</i> <sup>489F-1545R</sup> - <i>GFP</i> , <i>URA3</i>
FKP1008	pAT155-TDH3 / NVJ2	CEN, yeast TDH3 promoter,
		NVJ2, URA3
FKP1011	pRS416-TDH3 /TCB3	CEN, yeast TDH3 promoter,
		TCB3, URA3
FKP1025	pRS416- <i>TDH3 /TCB3</i> (ΔSMP-C2)	CEN, yeast TDH3 promoter,
		<i>TCB3</i> <sup>1F-259R</sup> , URA3
FKP1028	pRS416- <i>TDH3 /TCB3</i> (ΔC2)	CEN, yeast TDH3 promoter,
		<i>TCB3</i> <sup>1F-489R</sup> , URA3
FKP1031	pRS416- <i>TDH3 /TCB3</i> (ΔTM)	CEN, yeast TDH3 promoter,
		<i>TCB3</i> <sup>259F-1545R</sup> , URA3
FKP1038	pRS416- <i>TDH3 /TCB3</i> (ΔC2)-GFP	CEN, yeast TDH3 promoter,
		TCB3 <sup>1F-489R</sup> -GFP, URA3
FKP1044	pRS416-TDH3 /TCB3(ΔSMP)	CEN, yeast TDH3 promoter,
		TCB3 <sup>1F-259R,489F-1545R</sup> , URA3
FKP1045	KAR2-ss-GFP-HDEL	CEN, yeast ADH promoter,
		KAR2-ss-GFP-HDEL, HIS3
FKP1046	pRS416-TDH3 /TCB3(\DeltaSMP)-GFP	CEN, yeast TDH3 promoter,
		TCB3 <sup>1F-259R,489F-1545R</sup> -GFP, URA3

## 使用プライマー

Primer	Name	Sequence
For plas	smids	
ON664	TCB3-1F	-fusion-pRS416-woS
		ACTAGTGGATCCCCC-ATGACTGGCATCAAAGCT
ON665	TCB3-14	54R-fusion-pRS416-woS
		GAATTCCTGCAGCCC-CC-CTGCGTGTATTCTTGAGGAAC
ON666	TCB3-25	9R-fusion-pRS416-woS
		GAATTCCTGCAGCCC-CC-GTCATCTCTGATATTTCTG
ON667	TCB3-25	9F-fusion-pRS416-woS
		ACTAGTGGATCCCCC-ATGTTGAAAAGAGTTACAGTCG

ON668	TCB3-489R	e-fusion-pRS416-woS
		GAATTCCTGCAGCCC-CC-AGCTTCTTTTGATTGAGCAGC
ON692	TCB3-489F	-fusion-pRS416-woS
		ACTAGTGGATCCCCC-ATGATTGGTGTCCTTGCCGTAACC
ON715	TCB3-1454	R-fusion-pRS416-woS-wSTOP
		GAATTCCTGCAGCCC-CC-TTA-CTGCGTGTATTCTTGAGGAAC
ON978	TCB3-259R	-fusion-pRS416 (without SmaI site, with STOP codon)
		GAATTCCTGCAGCCC-CC-TTA-GTCATCTCTGATATTTCTG
ON979	TCB3-489R	-fusion- pRS416 (without SmaI site, with STOP codon)
		GAATTCCTGCAGCCC-CC-TTA-AGCTTCTTTTGATTGAGCAGC
ON1010	TCB3-489F	-InFusion-pRS416-ClaI
		GAATTCGATATCAAGCTTATCG-ATTGGTGTCCTTGCCGTAACC
ON1011	TCB3-1454	R-InFusion-pRS416-ClaI
		CCTCGAGGTCGACGGTATCG-TTACTGCGTGTATTCTTGAGG
ON1024	TCB3-1454	R-InFusion-pRS416-ClaI-woStop-plusT
		CCTCGAGGTCGACGGTATCGT-CTGCGTGTATTCTTGAGG
For strai	ins	
ON140	YML-FT	GGTCAGGTACCTCCCGTGCCAGAAGTTCCTCAAGAATACACG
		CAG-CGGATCCCCGGGTTAATTAA
ON141	YML-RT	GAAAAGACACCTGTTAACACACCAAATGTGCCCTTATTGAGCG
		TA-GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
ON926	SEC13-FT	GTTACTTTATGGAAGGAAAATCTTGAGGGTAAATGGGAACCC
		GCTGGTGAAGTTCATCAG-CGGATCCCCGGGTTAATTAA
ON927	SEC13-RT	CGATAGACTCATTTGCATTCTTTTTTTTTTTGAGATGTTTCATT
		TTAAATTCTTGATACTCT-GAATTCGAGCTCGTTTAAAC
ON963	Dga1 KF	CCAGTACTTCCACCGCATTTC
ON965	Dga1 KB	GCCTGGTAAGCTATGTAGTGC
ON966	Lro1 KF	GCTTGATATACGTCAAGTGTACG
ON968	Lro1 KB	GCAGCCTACTTAGAAAACAGTG
ON1008	TCB1-KF	GACTAGTTGGCTCATTTCCATGGCAAAATG
ON1009	TCB1-KR	GTTCAACCAAATCAGGAATACCCAATTGGC

#### 使用培地組成

agarose は寒天培地を作成する際に加えた。

YPD 培地	
yeast extract	1 %
poly pepton	2 %
glucose	2 %
(agarose	2 %)
amino acid/base	
adenine	80 mg/L
uracil	80 mg/L
tryptophan	80 mg/L

上記をイオン交換水に溶解させ、オートクレーブ(121℃, 20分間)により滅菌した。

<u>SD</u> 培地	
yeast nitrogen base (w/o amino acid)	0.17 %
ammonium sulfate	0.5 %
glucose	2 %
(agarose	2 %)
amino acid/base	
*adenine	80 mg/L
*uracil	80 mg/L
*leucine	80 mg/L
*lysine	80 mg/L
*histidine	80 mg/L
*tryptophan	80 mg/L

上記をイオン交換水に溶解させ pH を 5.8-6.0 に調整した後、オートクレーブ(121℃ 20 分)により滅菌した。フィルター滅菌した tryptophan 溶液を加え、SD 培地とした。 \*上記のアミノ酸および塩基はプラスミドのマーカーに応じて培地に添加した。

#### Sporulation 培地

potassium acetate	1%

作製した溶液を 5ml ずつ試験管に分注し、オートクレーブ(121℃、20 分間)により滅菌 した。

LB 培地	
poly pepton	1 %
yeast extract	0.5 %
NaCl	0.5 %
(Agarose	2 %)

上記をイオン交換水に溶解させ、オートクレーブ(120℃、20分間)により滅菌した。 LBA (アンピシリンを含む LB) 培地は、LB 培地にアンピシリンを最終濃度 100 μg/ml になるように加えて作製した。

SD±inositol 培地 、Semi SD 培地

Yeast extract は Semi SD 培地を作成する際に加えた。								
glucose	2 %							
(yeast extract	2 g/L)							
trace elements <sup>*1</sup>	1 mL/L							
solution A <sup>*2</sup>	20 mL/L							
solution B* <sup>3</sup>	20 mL/L							
vitamin $\pm$ inositol * <sup>4</sup>	10 mL/L							
amino acid/base								
histidine	80 mg/L							
leucine	80 mg/L							
lysine	80 mg/L							
methionine	80 mg/L							
tryptophan	80 mg/L							
uracil	80 mg/L							

\*1 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 100 mM CuCl<sub>2</sub>, 100 mM KI, 100 mM FeCl<sub>3</sub>, 100 mM ZnCl<sub>2</sub>

\*<sup>2</sup> 43.75 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6.25 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g/L NaCl, 250 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

\*<sup>3</sup> 25 g/L MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 5 g/L CaCl<sub>2</sub>

\*<sup>4</sup> 2 mg/L biotin, 200 mg/L Ca pantothenate, 40 mg/L nicotinic acid,

20 mg/L p-aminobenzoic acid, 40 mg/L pyridoxin, 20 mg/L thiamine,

20 mg/L riboflavin, 0.2 mg/L folic acid, 1000 mg/L myo-inositol

上記をイオン交換水に溶解させ、オートクレーブ(121℃、20分間)により滅菌した後、

フィルター滅菌した vitamin 溶液と tryptophan 溶液を加えた。上記のアミノ酸および塩 基はプラスミドのマーカーに応じて培地に添加した。

#### 第3章 実験操作

#### 胞子形成、四分子解析

2 倍体を選択するのに必要なアミノ酸、または塩基を含まない SD 寒天培地に MAT(a) の酵母細胞を塗り、その上から MAT( $\alpha$ )の酵母細胞を塗り重ね 25℃で 3 - 5 日間培養し た。2 倍体となった株を再度同じ SD 寒天培地で 25℃、1~2 日間培養後、YPD 寒天培 地で 25℃、1~2 日間培養した後、この株を Sporulation 液体培地 5 mL の試験管に少量 とり、胞子形成が確認されるまで 25℃で振盪培養を行った。チューブに菌液 100  $\mu$ L と 20T zymolyase (1 mg / mL) 2  $\mu$ L を入れ、軽く転倒混和した後 20 分間室温で静置した。 YPD 寒天培地にこの液を薄く広げ、マイクロマニピュレーターを用いて胞子をそれぞ れ単離した。その後、25 ℃で 4 - 6 日間培養した。

#### 希釈系列スポット

プレートからとった酵母細胞を滅菌水で OD<sub>600</sub>=1.0 になるように調整し、この溶液を もとに 1/5 倍ごとの希釈系列を滅菌水で作製した。これらを SD 寒天培地に 7 μL ずつス ポットした。スポットした培地を各条件温度で 3~5 日培養した。

#### 大腸菌へのトランスフォーム

凍結保存されたコンピテントセル 100 μL を氷上で溶かした後、DNA(1 ~ 10 μL)を加 えて穏やかに混合し、氷上で1時間置いた。42℃で 90 秒間ヒートショックした後、直 ちに氷上に置いた。LB 液体培地を1 mL 加え、37 ℃で1時間培養した。その後、LBA 寒天培地にまいて 37℃で培養した。

#### 大腸菌からのプラスミド回収

プラスミドの回収は FastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics Co., Lid)または NucleoSpin Plasmid EasyPure (TaKaRa)を使用して行った。方法はプロトコルに従った。

#### 酵母への形質転換

酵母細胞を YPD または SD-(選択マーカー)液体培地で一晩培養し、細胞を遠心分離 (3000xg, 3min, RT)で回収した。Li-TE buffer (50 mM lithium acetate dihydrate, 50 mM tris-HCl, 5 mM EDTA)を 10 mL 加えて細胞を懸濁したのち、再度遠心分離で細胞を回収し た。これを 2 回繰り返した後、OD<sub>600</sub>=50 になるように Li-TE buffer を加えて形質転換用 酵母を調製した。新しいチューブに ssDNA (single strand DNA: 10 mg / mL) (1  $\mu$ L)、プラ スミド DNA (1  $\mu$ L)、酵母細胞 (100  $\mu$ L) を混合した。さらに 70% PEG (polyethylene glycol 4000)を最終濃度が 35%になるように 102  $\mu$ L 加え攪拌した後、室温で 1 時間置いた。 42 ℃で 15 分間ヒートショックを与えた後、滅菌水 1 mL を加え転倒混和し、遠心分離 (6,000 xg, 2 min, RT)した。上清を除いた後、滅菌水 100 µL に細胞を懸濁し、プレートに まいて 25 ℃で培養した。

#### 蛍光タンパク質の局在観察

蛍光タンパク質を発現するベクターを形質転換した細胞を 25℃、SD 液体培地で一晩 培養し、再び 25℃、SD 液体培地で対数増殖期(OD<sub>600</sub> = ~0.1)まで培養した。細胞を遠心 分離(6,000 xg, 2 min, RT)で回収し、SD 培地で 2 度洗った後、少量の同培地に懸濁して 蛍光顕微鏡観察を行った。Tcb3 とゴルジ体の共局在の観察は、立体的な位置関係を確認 するために通常とは異なる方法での撮影を行った。細胞の中心から上下 2.5 μm の範囲 を設定し、その範囲内を 0.2 μm ごとの高さで区切って撮影した。

#### Nile Red 染色

細胞を 25℃、SD 液体培地で一晩培養した。細胞培養液 1 mL に対して Nile Red を最 終濃度が 1 µg / mL となるように加え、10 分間培養した。滅菌水で細胞を 2 度洗い、少 量の滅菌水に懸濁して蛍光顕微鏡観察を行った。

#### ウエスタン解析

酵母細胞を SD 培地で OD<sub>600</sub>=0.6~1.0 になるように培養し、15 mL チューブに移して 250 µL の trichloroacetic acid (TCA)を穏やかに加え、氷上に置いた。遠心分離(3,500 xg, 2 min, 4°C)によって細胞を回収し、スクリューキャップチューブに移した。遠心分離(6,000 xg, 2 min, 4°C)して上清を除いた後、冷えたアセトンで細胞を洗い遠心分離(12,000 xg, 2 min, 4°C)し、アスピレーターで上清を除いた。アセトンによる洗浄を 2 度行った後、細 胞を室温で乾燥させた。 0.5mM PMSF、0.5×PPi、1 µg/mL PLA を含む UB buffer (50 mM tris (pH7.5)、5 mM EDTA、6 M Urea、1 % SDS) 100µL に細胞を懸濁し、懸濁液の約半 分の量のグラスビーズを加えて低温室で 5 分間ボルテックスによって激しく撹拌する ことで細胞を破砕した。65°Cで 10 分間熱処理を加えた後、遠心分離(12,000 xg, 5 min, RT)によって上清を回収した。上清 100 µL に 100 µL の Sample buffer (4×)と 20 µL の PPi (10×) を加え、ボルテックスでよく混合した後、再び 65°Cで 10 分間熱処理を加えてサ ンプルとした。SDS-PAGE による泳動後、ニトロセルロース膜に移した。一次抗体とし て 20,000 倍に希釈した Rabbit anti-Gas1 抗体と Rabbit anti-CPY 抗体、二次抗体として 40,000 倍に希釈した anti-Rabbit IgG 抗体を使用し、Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Substrate (BIO-RAD)により検出した。

# PPi (10×) 4.2 mg NaF 4.5 mg NaN3 6.5 mg

i (ui ()	ole ling
p-nitrophenylphosphate	37.1 mg
β-glycerolphosphate	30.6 mg
	-

上記を滅菌水 1mL に溶解させた。

## PLA(1mg/ml)

pepstatin A	1 mg
leupeptin	1 mg
antipain	1 mg

上記を滅菌水 1mL に溶解させた。

Sample buffer (4×)

1M Tris (pH6.8)	6.4 mL
bromophenol blue	12 mg
glycerol	10mL
2-mercaptoethanol	7.5 mL
SDS	2 g

上記を蒸留水に溶解させて 25 mL にした。

#### [<sup>3</sup>H]myo-inositol によるスフィンゴ脂質の代謝ラベリング

酵母細胞を Semi SD 培地で OD<sub>600</sub>=0.6~1.0 になるように培養し、遠心分離(3,000 xg, 3 min)によって細胞を回収した。SD-inositol 液体培地で細胞を3 度洗い、OD<sub>600</sub>=20 となる ように SD-inositol 液体培地に懸濁した。懸濁した細胞 500 µL を室温で 30 分間静置した 後、各条件温度で 30 分間培養した。その後、[<sup>3</sup>H]*myo*-inositol を 10 µCi 添加し 30~90 分 間各条件温度で培養しながら標識した。標識後 250 mM NaF/NaN3 混合溶液を添加し、 氷上に置き代謝ラベリングを停止させた。細胞を遠心分離(15,000 xg, 5 min, 4℃)により 回収し、冷えた滅菌水で3 度洗い、終量 66 µL になるように冷えた滅菌水で再懸濁し た。懸濁液と同量のグラスビーズを加え、低温を保ちながらボルテックスで激しく撹拌 することで細胞を破砕した。chloroform-methanol 混合液(1/1 [vol/vol], CM)を 440 µL 添加 して、激しく撹拌し、遠心分離(20,000 xg, 5 min, 20℃)によって液相を回収した。細胞 破砕片に chloroform-methanol-water (10/10/3 [vol/vol/vol], CMW)を 200 µL 添加し、激しく 撹拌させ、10 分間ソニケーションをかけた後、再度遠心分離(20,000 xg, 5min, 20℃)によ って得た液相を先に回収した液相に加えた。さらに細胞破砕片に CMW を 100 μL 添加 し、激しく撹拌させ、同様に液相を回収した。回収した液相に窒素ガスを吹き付けなが ら 30℃で乾燥させ、脂質粗抽出物を得た。粗抽出物に滅菌水 100 µL と butanol 100 µL を添加して、ボルテックスで激しく撹拌し、遠心分離(20,000 xg, 5 min, 20℃)によって butanol 層(上相)を回収した。butanol の添加、butanol 層の回収を3度繰り返した。回 収した butanol に窒素ガスを吹き付けながら 30℃で乾燥させ、これを脂質精製物とした。 脂質精製物を CMW 25 μL に溶解させ、1 μL の放射能量 cpm (count per minute) を測定 し、1,000,000 cpm になるように計算した量を TLC プレートにロードした。脂質を展開 溶媒 chloroform-methanol-0.25% potassium chloride solution (55/45/10 [vol/vol])により 展開した。脂質の解析はイメージングアナライザー(FLA-7000, Fujifilm)で行った。

#### [<sup>3</sup>H]DHS によるスフィンゴ脂質の代謝ラベリング

酵母細胞を Semi SD 培地で OD<sub>600</sub>=0.6~1.0 になるように培養し、遠心分離(3,000 xg, 3 min)によって細胞を回収した。SD+inositol 液体培地で細胞を 3 度洗い、OD<sub>600</sub>=20 とな るように SD+inositol 液体培地に懸濁した。懸濁した細胞 500  $\mu$ L を室温で 30 分間静置 した後、各条件温度で 30 分間培養した。その後、[<sup>3</sup>H]DHS を 10  $\mu$ Ci 添加し各条件時間 で培養しながら標識した。標識後 250 mM NaF/NaN<sub>3</sub> 混合溶液を添加し、氷上に置き代 謝ラベリングを停止させた。上記と同様の方法で脂質を抽出、精製した。得られた脂質 精製物を CMW 20  $\mu$ L に溶解させ、全量を TLC プレートにロードした。脂質を展開溶媒 chloroform-methanol-4.2 N ammonium hydroxide (9:7:2, [vol/vol/vol])により展開した。

セラミドの量を解析するため、展開後のプレートからセラミドを含むシリカゲルを回 収して 400 μL の CM (1:1)に溶かし、15 分間ソニケーションをかけた後、遠心分離 (20,000xg, 5 min, 20°C)によって液相を回収した。残ったペレットに CM (1:1)を 200 μL 添 加し、激しく撹拌させ、再度遠心分離(20,000 xg, 5 min, 20°C)によって得た液相を先に回 収した液相に加えた。回収した液相に窒素ガスを吹き付けながら 30°Cで乾燥させ、脂 質粗抽出物を得た。粗抽出物を上記と同様の方法で精製した。得られた脂質精製物を CMW 20  $\mu$ L に溶解させ、全量を TLC プレートにロードし、脂質を展開溶媒 chloroformmethanol-2M ammonium hydroxide (40:10:1, [vol/vol//vol])により展開した。脂質の解析は イメージングアナライザー(FLA-7000, Fujifilm)で行った。

#### 中性脂質の解析

酵母細胞を Semi SD 培地、25°Cで一晩培養し、その後 25°Cまたは 37°Cで 30 分間培養した。回収した細胞(OD<sub>600</sub>=0.6~1.0)から、脂質ラベリングと同様の方法で脂質を抽出、精製した。精製した脂質を TLC プレートに全量スポットし、petroleum ether: diethyl ether: acetic acid = 1:1:0.04 でプレートの 1/3 まで展開し、プレートを乾かしたのち、petroleum ether: diethyl ether = 49:1 でプレート上部まで展開した。展開後、乾かしたプレートを検出用試薬 (0.63 g MnCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>O, 60 mL water, 60 mL methanol, 4 mL conc. sulfric acid) に 10 秒間浸し、110°Cで 5 分から 15 分間加熱してバンドを検出した。カメラで撮影した写真をパソコンに取り込み、Image J を用いて定量した。

#### 第4章 実験結果

#### 1. TCB 遺伝子破壊株における表現型の解析

1-1. TCB 遺伝子破壊株は myriosin に対して薬剤感受性を示す

TCB 遺伝子が欠損した株は、スフィンゴ脂質合成の初期ステップを阻害する薬剤であ る myriocin (Fig.6)に対して感受性を示すことがこれまでに報告されている [48]。これ は、TCB 遺伝子破壊株ではスフィンゴ脂質合成が低下していることを意味しており、 TCB 遺伝子がスフィンゴ脂質の代謝に関与している可能性を示唆している。そこで、再 現性が得られるかどうか、TCB 遺伝子破壊株の生育における myriocin の影響を調べた。 また、セラミドから複合スフィンゴ脂質への変換を阻害する薬剤である aureobasidin A (Fig.6)による TCB 遺伝子破壊株の生育への影響も調べた。胞子形成および四分子解析 によって得られた、TCB1, TCB2, TCB3 遺伝子の各単独、二重、三重破壊株を用いて解析 を行った。myriocin または aureobasidin A を含む培地における各破壊株の生育を調べた 結果、薬剤感受性の程度は株によってバラつきが見られたが、その中でも TCB1 遺伝子 単独破壊株と TCB3 遺伝子単独破壊株の一部は myriocin に対して感受性を示した。一 方、いずれの遺伝子破壊株においても、aureobasidin A に対しては WT と比較して顕著 な生育の変化は見られなかった(Fig.7)。

#### 1-2. TCB 遺伝子破壊株は液胞の断片化を示す

当研究室でのこれまでの解析から、スフィンゴ脂質合成の初期ステップを触媒する酵素や複合スフィンゴ脂質 IPC の合成を触媒する酵素をコードする遺伝子の変異(*lcb1-100, aur1-1*)や、それらの合成阻害剤である myriosin や aureobasiden A 処理によって、液胞が断片化することが明らかにされている。そこでスフィンゴ脂質の合成に対して *TCB* 遺伝子が関与している可能性について探るために、*TCB* 遺伝子破壊株の液胞の形態を調べた。液胞に局在する加水分解酵素である carboxypeptidase S (Cps1)に GFP が融合したプラスミドを形質転換し、蛍光顕微鏡によって液胞の観察を行った。その結果 WT ではGFP によって標識された液胞が1細胞につき1つであるのがほとんどなのに対して、*TCB* 遺伝子の各単独破壊株および三重破壊株では1細胞中に小さな液胞が多数見られた。したがって、Tcb タンパク質の欠損は液胞の断片化を引き起こすことが示唆された(Fig.8)。

myriocin に対する感受性および液胞の断片化は、スフィンゴ脂質代謝に異常の株に 共通してみられる表現型である。*TCB* 遺伝子破壊株において、これらの表現型が見ら れたことから、Tcb タンパク質がスフィンゴ脂質の代謝に関与している可能性が示唆 された。



Figure 6. 複合スフィンゴ室生合成経路および薬剤による阻害標的ステップ

							myriocin										aureobasidin A														
				nor	ne			0.5 μg/mL						1.0 μg/mL						0.05 μg/mL							0.1 μg/mL				
WT	FKY2917	۰			• •	85 B	۲	۲	۲	٠	20	-1	۲	۲	1	÷ .	: -	•	۲	2	4	÷	•	膨	23						
	FKY2909	۲			• 1	1	0	0	100				0	8				۲		1	25	•	٠	\$			Í .				
	FKY2920	۲	۲	۲	• •	* *	۲	۲	۲				۲	۲				۲	۲				2								
tch1A	FKY2938	۲	۲	۲	@ 4	i 95		۲					۲					۲	۲	۲	4	•	•								
10010	FKY3002	•	۲	۲		* *	۲	۲					0										•								
	FKY3010		0	۲		*	۲	۲				٠	۲						1	2											
	<sup>I</sup> FKY3016	Ì 🙆	٢	۲	0 (									-				-3	2	-24											
	FKY2906					1 12	۲						0						٩	2				52							
	FKY2999		•			1 36			۲			10	۲	۲				60					9								
tcb2∆	FKY3012					1. 杨	۲						0					$\odot$	0	۲	۲		•	\$	•						
	FKY3015					¥ (		۲		1		ŵ.	۲					0	۲	1		Ξ.	•	10							
	FKY3018							۲	۲	-		1	۲	۲				-			*	-35	12								
	FKY2924	۲	۲			容	۲											۲	•	-38	5	τ.		4.							
	FKY2931	۲	۲			9 %?	۲	۲				44	۲					۲				12									
tcb3∆	FKY2933	۲	۲	۲			۲	۲											۲	۲	۲	۲	-	*							
	FKY2942	0	۲	۲		•	۲						۲					•		۲	۲	-	-	۲	$\beta_{i}$						
	FKY2954			۲	•		۲	۲					6					•			-	ŵ	.7								



#### Figure 7. TCB 遺伝子破壊株のスフィンゴ脂質合成阻害剤に対する感受性

各 *TCB* 遺伝子破壊株を、myriocin または aureobasidin A を各濃度含む SD+all 寒天培地にスポット し、25℃で培養した。写真は5日目のプレートを示した。



Figure 8. TCB 遺伝子破壊株は液胞の断片化を示す

WT (FKY2577)、*tcb1*Δ2Δ3Δ(FKY2927)、*tcb1*Δ(FKY2909)、*tcb2*Δ(FKY2906)、*tcb3*Δ(FKY2924)に GFP-Cps1 (FKP621)を形質転換した細胞を 25℃、SD-Ura 液体培地で培養し、蛍光顕微鏡観察を行っ た。

#### 2. Tcb タンパク質の局在性の解析

2-1. 過剰発現させた Teb3-GFP は小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトに局在し、その 局在は C2 ドメインおよび Teb1、Teb2 を必要とする

## 2-1-1. 過剰発現させた Tcb3-GFP は cER と nER の両方に局在し、C2 ドメイン依存的 にドットを形成する

Tcb3 タンパク質は、ひとつの膜貫通領域(TM ドメイン)、SMP ドメインおよび、5つ または6つのC2 ドメインを持つ [43] [46] [64] [65]。Tcb1-GFP、Tcb2-GFP、Tcb3-GFPを own promoter 下で発現させたとき、細胞膜に近接したメッシュ状の小胞体である cortical ER (cER)に局在する [46]。近年、ステロール枯渇といった環境の変化に応じて、Tcb3 の 発現量が増加することが報告された [44]。そこで、Tcb3 のタンパク質のレベルが増加 したときの Tcb3 の局在性を調べることにした。C 末端に GFP をタグ付けした Tcb3-GFP を TDH3 promoter 下で恒常的に発現させるプラスミドを構築し、これを Tcb3 が欠損し た細胞に発現させて蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、プラスミド導入によって 過剰発現させた Tcb3-GFP は、cER だけでなく核の外膜とつながった perinuclear ER (nER) にも局在することが判った(Fig.9A)。

TM ドメインを欠いた Tcb3( $\Delta$ TM)-GFP、Tcb3( $\Delta$ TM $\Delta$ C2)-GFP および Tcb3( $\Delta$ TM-SMP) -GFP を高発現させた細胞を観察したところ、それらの GFP 融合タンパク質は小胞体膜 への局在性を失い、細胞質や核へ誤輸送されたことから、TM ドメインが Tcb3 の小胞 体膜への局在に必須であることが示された(Fig.9A)。SMP ドメインと C2 ドメインの両 方を欠損させた Tcb3( $\Delta$ SMP-C2)-GFP は cER と nER の両方への局在が見られた(Fig.9A) が、その nER/cER シグナル比率は全てのドメインを所有する Tcb3(Full)-GFP よりも高 くなった(Fig.9B)。さらに、全てのドメインを所有する Tcb3(Full)-GFP よりも高 くなった(Fig.9B)。さらに、全てのドメインを所有する Tcb3(Full)-GFP と比較して、SMP ドメインのみを欠いた Tcb3( $\Delta$ SMP)-GFP は nER/cER 比率の増加を示さなかったが、 C2 ドメインのみを欠いた Tcb3( $\Delta$ C2)-GFP は Tcb3( $\Delta$ SMP-C2)-GFP と同様に、高い nER/cER 比率を示した(Fig.9B)。したがって、これらの結果から、TM ドメインおよび C2 ドメイ ンは Tcb3 の cER への局在に重要であるが、SMP ドメインは Tcb3 の cER への局在性に は関与していないことが示唆された。

興味深いことに、Tcb3-GFP を過剰発現させた細胞のうち、40%以上の細胞で Tcb3-GFP の一部がドット状の局在を示した(Fig.9A,C)。それらのドットは主に、nER 上に見られた(Fig.9D)。Tcb3-GFP のドットを持つ細胞の割合は、C2 ドメインを欠いた Tcb3( $\Delta$ SMP-C2)-GFP や Tcb3( $\Delta$ C2)-GFP を発現させた細胞では減少したが、SMP ドメインのみを欠いた Tcb3( $\Delta$ SMP)-GFP を発現させた細胞では減少は見られなかった(Fig.9C)。この結果から、Tcb3-GFP のドット形成には Tcb3 の C2 ドメインが関与していることが示唆された。また、SMP ドメインと C2 ドメインの両方を欠いた Tcb3( $\Delta$ SMP-C2)-GFP では、C2

ドメインのみを欠いた Tcb3( $\Delta$ C2)-GFP と比較して、ドットの形成にさらなる減少が見 られた。このことは、Tcb3 の SMP ドメインもドットを形成させる働きを有している可 能性を示唆している。例えば、Tcb3 の SMP ドメインは Tcb1 と Tcb2 との複合体形成に 寄与している可能性が推測できる。

#### 2-1-2. Tcb3 のドット状の局在は、Tcb1 と Tcb2 を必要とする

Tcb3 は他の Tcb タンパク質である Tcb1 および Tcb2 と、機能的または物理的に相互 作用している [66] [67]。そこで、Tcb1 および Tcb2 が Tcb3 の局在性に関与しているか どうか調べた。 $tcb3\Delta$  細胞および  $tcb1\Delta tcb2\Delta tcb3\Delta$  細胞に Tcb3-GFP を発現させ、ドット を持つ細胞の数を調べたところ、Tcb1 と Tcb2 が欠損した  $tcb1\Delta tcb2\Delta tcb3\Delta$  細胞では、 欠損していない細胞に比べてドットを持つ細胞の割合が著しく減少した (Fig. 10A, B)。 この結果から、Tcb1 と Tcb2 は Tcb3 のドットの形成に関与することが示唆された。 方で、Tcb1 と Tcb2 の欠失によって Tcb3-GFP の nER/cER シグナル比率は変化しなかっ たことから (Fig. 10C)、Tcb1 と Tcb2 は Tcb3 の cER への局在には関与しないことが示 唆された。Tcb3 は Tcb1 および Tcb2 と物理的に相互作用することから、Tcb1 と Tcb2 は nER において Tcb3 と複合体を形成することで Tcb3-GFP のドット形成に寄与している

### 2-1-3. 過剰発現させた Tcb3-GFP のドットは小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトに局 在する

Tcb3-GFPのドットは nER 上に優先的に局在していることが示された(Fig.9D)。そこで 次に、Tcb3-GFPのドットとゴルジ体との位置関係を探るために、シス、メディアル、トラ ンスゴルジのマーカーである mRFP-Sed5 [68]、mRFP-Gos1 [68]、Sec7-mRFPを同時発現さ せた株を用いて解析を行った。その結果、Tcb3-GFPのドットとゴルジ体マーカーとが近接 している部分が観察された。その中でも特に、mRFP-Gos1をマーカーとするメディアル ゴルジとの近接が最も多く、約40%の細胞で共局在化することが分かった(Fig.11A, B)。 したがって、Tcb3の一部はゴルジ体と接する場所、つまり小胞体ーゴルジ体コンタクト サイトに局在し、しかもメディアルゴルジと優先的に共局在することが示唆された。

さらに、理化学研究所光量子工学研究センターの中野明彦先生と黒川量雄先生のご協 カにより、高速超解像ライブイメージング顕微鏡(Super-resolution Confocal Live Imaging Microscopy, SCLIM)による観察を行った。2次元共焦点を用いて再構成された Tcb3-GFP と mRFP-Gos1 の 3 次元画像により、メディアルゴルジが Tcb3-GFP と近接して存在し ている様子が観察された(Fig.11C)。また、タイムラプス観察によって、Tcb3-GFP とメデ ィアルゴルジが接触したり乖離したりする様子が観察され、小胞体ーゴルジ体コンタク トサイトがダイナミックな挙動を示していることが明らかとなった(Fig.11C)。

#### 2-1-4. PI4P の増加は Tcb3-GFP のドット形成を促進する

Tcb3-GFP のドットがゴルジ体とのコンタクト領域に局在していることから、ゴルジ 体膜上の特定の脂質を標的としている可能性が考えられる。そこで、標的としている脂 質を特定する目的で、脂質代謝に関与する遺伝子の破壊株または変異株を用いて、Tcb3-GFP のドット形成の量が変化するかを調べた。Sac1 は小胞体局在タンパク質であり、 細胞膜やゴルジ体の phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P)を脱リン酸化して PI に変換す るホスファターゼである(Fig.12A)。*sac1*Δ 細胞では、PI4P が蓄積する (Fig.12B)。PI4P が Tcb3 の結合パートナーであるかどうか調べるために、*sac1*Δ における Tcb3-GFP のド ットを調べたところ、WT と比べてドット形成の増加が見られた(Fig.12C)。

次に、PI4P をリン酸化して PI4,5P2に変換するキナーゼである Mss4 および、PI をリ ン酸化して PI4P に変換するキナーゼである Stt4 の変異株を用いて、Tcb3-GFP のドット 形成を調べた。その結果、PI4P のレベルを減少させる stt4-4 変異株では、許容温度と非 許容温度のどちらにおいても、WT と比較して Tcb3-GFP のドットを持つ細胞の割合が 減少していた(Fig.12D)。また、PI4P を蓄積させる mss4-102 変異株では、Tcb3-GFP のド ットを持つ細胞の割合に有意な差は見られなかったものの、ドットのサイズが大きくな っている様子がしばしば観察された。

これらの結果から Tcb3-GFP のドット形成は PI4P の量に応じて増加することが示さ れた。このことは、Tcb3 の小胞体ーゴルジ体コンタクトへの局在に、ゴルジ体膜の PI4P が関与していることを示唆している。

#### 2-1-5. Tcb3-positive なチューブ状の構造について

Tcb3-GFP を TDH3 promoter によって過剰発現させた細胞では、cER と nER の両方に GFP のシグナルが見られた。また、このとき稀にではあるがいくつかの細胞におい て、"elongated Tcb3-positive structure"が観察された(Fig.13)。しかしながら、Tcb3-GFP が 局在するこのような構造が過剰発現された Tcb3 に特異的なものであるか、もしくはタ ンパク質の異常蓄積による小胞体ストレスが原因であるかは不明である。以前の報告 [69]において、未成熟型タンパク質の蓄積が小胞体ストレスを引き起こし、小胞体の形 態に影響を与えることが分かっている。Tcb3 の過剰発現によって小胞体ストレスが起 こっていることが原因であるのかもしれない。

一方で、Tcb タンパク質はチューブ状に伸びた小胞体に局在することが報告されている [70]ことから、この伸張した構造の形成は Tcb3 の特異的な働きによるのかもしれない。Tcb タンパク質がチューブ状の小胞体ネットワークの形成に関与しているかどうかは、さらなる解析を必要とする。



#### Figure 9. 過剰発現させた Tcb3-GFP の局在解析

(A) tcb3∆(FKY2924)に Tcb3(Full)-GFP(FKP865)、Tcb3(∆SMP)-GFP(FKP1046)、Tcb3(∆C2)-GFP(FKP1038)、
 Tcb3(∆SMP-C2)-GFP(FKP849)、 Tcb3(∆TM)-GFP(FKP847)、 Tcb3(∆TM∆C2)-GFP(FKP848)、 Tcb3(∆TM-SMP)-GFP(FKP894)、をそれぞれ形質転換した細胞を 25℃、SD-Ura 液体培地で培養し、蛍光顕微鏡観察を行った。

(B) (A)で観察した 100 細胞について、cER と nER を通るように細胞上に直線をひき、その直線上の GFP 強度を測定した。1つめと4つめのピークを cER、2つめと3つめのピークを nER の値とした。 測定した値から nER と cER の比率を算出し、値をボックスプロットで示した。

(C) (A)で観察した 100 細胞のうち、Tcb3-GFP のドットが観察された細胞をカウントし、それぞれの 割合を計算した。

(D)(A)の Tcb3(Full)-GFP で観察した細胞 100 個について、Tcb3-GFP のドットが、"nER"、"neck"、"cER" のいずれに局在しているかをそれぞれカウントし、その割合を求めた。

(B,C,D)3回の実験結果について平均を示し、標準偏差(Bar)とp値を求めた(\*\*,P<0.01; \*\*\*,P<0.001)。



#### Figure 10. Tcb3-GFP のドット形成における Tcb1 と Tcb2 タンパク質の関与

(A) tcb3∆(FKY2924)または tcb1∆2∆3∆(FKY2927)に Tcb3-GFP(FKP865)を形質転換した細胞を、25℃の SD-Ura 液体培地で一晩培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(B)(A)で観察した 100 細胞のうち、Tcb3-GFP のドットが観察された細胞をカウントし、それぞれの 割合を計算した。

(C) (A)で観察した細胞 100 個について、nER と cER の GFP 強度を測定してその比率を算出し、値を ボックスプロットで示した。

(B,C)3 回の実験結果について平均を示し、標準偏差(Bar)とp 値を求めた(\*, P < 0.05)。



#### Figure 11. Tcb3 とゴルジ体との局在

 (A) tcb3∆(FKY2924)に Tcb3-GFP (FKP865)を形質転換した株に、mRFP-Sed5 (FKP356)、mRFP-Gos1
 (FKP359)、Sec7-mRFP(FKP471)をそれぞれ形質転換した細胞を 25℃、SD-U-W 液体培地で培養し、蛍 光顕微鏡観察を行った。

(B) (A)で観察した 60 細胞のうち、Tcb3-GFP とゴルジ体マーカーとの共局在が観察された細胞をシス ゴルジ、メディアゴルジ、トランスゴルジごとにカウントし、それぞれの割合を計算した。3回行っ た結果の平均をグラフに示した。

(C) (A)と同じ条件で培養した細胞を、SCLIM 顕微鏡を用いて観察した。右下は Time-lapse images (Interval: 4.2 sec) で観察した様子を示す。



Figure 12. Tcb3-GFP のドット形成におけるターゲット脂質の探索

(A) PI, PI4P および PI4,5P2の代謝経路

(B) WT(FKY2577)、*sac1*Δ(FKY3114)に empty ベクター(FKP258)または *SAC1* 過剰発現ベクター(FKP871) を形質転換した。得られた形質転換体を用いて放射性イノシトールラベリングを行った。

[<sup>3</sup>H]myo-inositol を 25 µCi 添加し 25℃で 90 分間ラベリングを行った後、細胞から脂質を回収した。 (C) WT(FKY5191)または *sac1*Δ(FKY5188)に Tcb3-GFP(FKP865)を形質転換した細胞を、25℃の SD-Ura 液体培地で一晩培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(D) WT(FKY2734)、*stt4-4*(FKY2755)、*mss4-102*(FKY2756)にTcb3-GFP(FKP865)を形質転換した細胞を、
 25℃の SD-Ura 液体培地で一晩培養し、37℃に4時間シフトした後、蛍光顕微鏡観察を行った。

(C,D) 観察した 100 細胞のうち、Tcb3-GFP のドットが観察された細胞をカウントし、それぞれの割合を計算した。3 回の実験結果について平均を示し、標準偏差(Bar)と p 値を求めた(\*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01)。



Figure 13. 過剰発現させた Tcb3-GFP の elongated structure について tcb3∆ (FKY2924)に Tcb3(Full)-GFP (FKP865)を形質転換した細胞を 25℃、SD-Ura 液体培地で培養し、 蛍光顕微鏡観察を行った。矢印の頭は "elongated Tcb3-positive structure"を示す。
2-2. ネイティブプロモーター下で発現した Tcb3-GFP の小胞体ーゴルジ体コンタクト サイトへの局在は小胞体ストレスによって増加する

# 2-2-1. ネイティブプロモーター下で発現した Tcb3-GFP のドットは、tunicamycine の添 加によって増加する

過剰発現させるために用いた TDH3 プロモーターは、高い発現能力を持つプロモータ ーのひとつである。Tcb3 がひとつの細胞当たり約 10,000 分子発現するのに対して、Tdh3 は約 700,000 分子であるため、このレベルで発現させた Tcb3-GFP の局在は、通常の生 理状態を反映していない可能性がある。そこで、ゲノムの TCB3 の C 末端に GFP をタ グ付けした株を作製し、内在性の TCB3 promoter 下で発現させた Tcb3-GFP の局在を観 察した。以前の報告 [46]と一致して Tcb3-GFP は cER に局在していた(Fig.14A, B, 15A)。 極めてわずかな割合(約 2%)の細胞ではあるが、nER に小さなドット状の局在を見る ことができた(Fig.14A, B)。

Tcb3-GFP のドットがどのような条件で増加するかを探索するために、様々な条件下 でその局在の様子を観察した。長時間の培養によって栄養を枯渇させたとき死細胞が増 加したが、Tcb3-GFP の局在に変化は見られなかった(Fig. 15B)。他にも、セラミド生合 成酵素である Lag1 の過剰発現(Fig. 15C)、スフィンゴ脂質合成阻害剤である aureobasidin A や myriocin の添加(Fig. 15D)、高濃度のカルシウムイオン存在下での培養(Fig. 15E)や、 TORC1 の阻害剤である rapamycin の添加(Fig. 15E)といった条件は、いずれも内在性 Tcb3-GFP のドットの形成に影響を与えなかった。しかしながら、小胞体ストレスを誘 導する tunicamycin および dithiothreitol (DTT)を処理した細胞において、内在性の Tcb3-GFP のドットを持つ細胞の割合が増加した(Fig.15 F, G)。

# 2-2-2. tunicamycin の添加によって形成された Tcb3-GFP のドットは小胞体-ゴルジ体 コンタクトサイトに局在する

小胞体ストレスを誘導する薬剤で細胞を処理することによって、内在性の TCB3 promoter 下で発現させた Tcb3-GFP のドットを持つ細胞の割合が増加した。そこで、次に、このドットがゴルジ体とのコンタクトサイトに局在しているかを調べた。

tunicamycin 処理した細胞における Tcb3-GFP とメディアルゴルジのマーカーである mRFP-Gos1 の局在を観察したところ、Tcb3-GFP のドットと mRFP-Gos1 が隣接して局 在している様子が見られた(Fig. 16A, 16B)。このことから、小胞体ストレス時に Tcb3 が 小胞体-ゴルジ体コンタクトに局在化することが示された。また、tunicamycin 処理した 細胞における小胞体-ゴルジ体コンタクトサイトの動的な様子について、SCLIM 顕微 鏡を用いたタイムラプス観察によって調べたところ、Tcb3-GFP とメディアルゴルジが 接触したり乖離したりする様子が見られ、小胞体ストレス時においても小胞体-ゴルジ 体コンタクトサイトがダイナミックな挙動を示すことが分かった (Fig. 16B)。



# Figure 14. own promoter で発現させた Tcb3-GFP の局在

(A) ゲノム上の TCB3 に GFP を付加した株 (FKY3341)に mRFP-Gos1(FKP359)を形質転換した細胞を
 SD 液体培地で一晩培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(B)(A)と同じ条件で培養した細胞を、SCLIM 顕微鏡を用いて観察を行った。矢印は Tcb3-GFP と nER のコンタクトを示し、矢じりは Tcb3-GFP と cER のコンタクトを示す。



Figure 15. own promoter で発現させた Tcb3-GFP がドットを形成する条件の探索

(A) TCB3-GFP (FKY3343)を 25℃の SD 液体培地で一晩培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。
 (B) TCB3-GFP (FKY3343)を 25℃の SD 液体培地で 32 時間または 55 時間培養し、蛍光顕微鏡で観察を

行った。

 (C) ゲノム上の TCB3 に GFP を付加した株 (FKY3343)に LAG1 過剰発現プラスミド(FKP391)を形質 転換した細胞を SD-His 液体培地で一晩培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(D) ゲノム上の *TCB3* に GFP を付加した株 (FKY3343)を SD 液体培地で一晩培養し、aureobasidin A (0.1 および 0.5 µg/mL)または myriocin (1.0 および 5.0 µg/mL)で 2 時間または 4 時間処理したのち、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(E) ゲノム上の *TCB3* に GFP を付加した株 (FKY3343)を SD 液体培地で一晩培養し、rapamycin (0.2 µg/mL)で4時間処理したのち、蛍光顕微鏡で観察を行った。または、25 mM CaCl2 を含む SD 液体培地で一晩培養し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(F)ゲノム上の *TCB3* に GFP を付加した株 (FKY3343)を SD 液体培地で一晩培養し、tunicamycin (2.5 µg/mL)または DTT (10 mM)で4 時間処理したのち、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(G)(F)で観察した 100 細胞のうち、Tcb3-GFP のドットが観察された細胞をカウントし、それぞれの割 合を計算した。3 回の実験結果について平均を示し、標準偏差(Bar)と p 値を求めた(\*\*\*, P<0.001)。





(A) ゲノム上の *TCB3* に GFP を付加した株 (FKY3341)に mRFP-Gos1(FKP359)を形質転換した細胞を
 SD 液体培地で一晩培養し、tunicamycin (2.5 μg/mL) で4時間処理したのち、蛍光顕微鏡で観察した。
 矢印は、Tcb3-GFP のドットと RFP-Gos1 が近接していると思われる部分を示す。

(B, C) (A)と同じ条件で培養した細胞を、SCLIM 顕微鏡を用いて観察した。(C) は Time-lapse images (Interval: 4.2 sec) で観察した様子を示す。矢印は nER 上の Tcb3-GFP と RFP-Gos1 のコンタクト、矢じ りは cER 上の Tcb3-GFP と RFP-Gos1 のコンタクトを示す。

# 3. 小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトの形成に関する解析

# 3-1. Tcb タンパク質の C2 ドメインは小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトの形成に機能 する

# 3-1-1. Tcb タンパク質の欠損によって小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトが減少する

Tcb3の一部が小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトに局在することから、Tcb タンパク 質はコンタクトサイトの形成に関与している可能性が考えられる。そこで、実際に小胞 体ーゴルジ体コンタクトサイトの形成に Tcb タンパク質が必要であるかを調べるため に、小胞体マーカー(Kar2-SS-GFP)とメディアルゴルジマーカー(mRFP-Gos1)を用いて、 小胞体ーゴルジ体コンタクト形成における *TCB* 遺伝子破壊の影響を調べた。定量的に 評価するために、100 細胞の mRFP-Gos1 について、cER と接しているもの、nER と接 しているもの、どちらとも接していないものに分類し、それぞれの程度を求めた。その 結果、mRFP-Gos1 のドットの合計数はほとんど差がないにもかかわらず、cER または nER と接している mRFP-Gos1 は、*tcb1*Δ *tcb2*Δ *tcb3*Δ 細胞では WT と比較して顕著に減 少していた(Fig.17A)。同様の結果が、*tcb3*Δ 細胞でも確認された(Fig.17B)。

# 3-1-1. C2 ドメインをもつ Tcb3 の過剰発現は小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトを増加 させる

そこで、 $tcb3\Delta$  細胞に Tcb3 を過剰発現させたところ、小胞体ーゴルジ体コンタクトの 回復が見られた。さらに、コンタクトの形成に重要な Tcb3 タンパク質のドメインを明 らかにする目的で、 $tcb3\Delta$  細胞に Tcb3 のドメイン欠損変異体を発現させたところ、 Tcb3( $\Delta$ SMP)はコンタクトの形成を回復したが、Tcb3( $\Delta$ SMP-C2)および Tcb3( $\Delta$ C2)は回復 しなかった(Fig.17B)。

これらの結果から Tcb タンパク質が小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトを形成する tether としての機能を持つことが示唆された。また、小胞体ーゴルジ体コンタクト形成 において、Tcb3 の C2 ドメインが重要であることが示唆された。



4 0

# Figure 17. 小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトの解析

(A) WT (FKY5161)または tcb1∆2∆3∆ (FKY5167)に mRFP-Gos1 (FKP359)と kar2-ss-GFP (FKP335)を形質 転換した形質転換した細胞を 25℃、SD-UraTrp 液体培地で培養し、蛍光顕微鏡観察を行った。

(B) WT (FKY5161)または tcb3△(FKY5163)に mRFP-Gos1 (FKP359)と kar2-ss-GFP (FKP1045)を形質転換した株に、empty (FKP22)、Tcb3(Full) (FKP1011)、Tcb3(△SMP) (FKP1044)、Tcb3(△C2) (FKP1028)、Tcb3(△SMP-C2) (FKP1025)をそれぞれ形質転換した細胞を 25℃、SD-Ura,His,Trp 液体培地で培養し、蛍

光顕微鏡観察を行った。

(A,B) 観察した 100 細胞のゴルジ体について、cER と接しているもの、nER と接しているもの、どち らとも接していないものに分けてカウントした。グラフは、cER または nER に接しているもの、cER と接しているもの、nER と接しているものについてそれぞれの割合を示した。3回行った結果の平均 と標準偏差(Bar)をグラフに示した。

# 4. 小胞輸送における Tcb タンパク質の機能解析

# 4-1. Tcb タンパク質は COPII 小胞輸送に関与しない

Tcb3 は、メディアルゴルジだけではなくシスゴルジと近接した領域にも局在している(Fig.11A,B)。シスゴルジは、小胞体から出芽してできた COPII 小胞が融合する場であり、ER exit sites (ERES)に近づいて接触することが知られている[71]。そこで、小胞体からゴルジ体への小胞輸送に Tcb タンパク質が関与するかどうかを調べた。GPI アンカー型タンパク質である Gas1 および非 GPI アンカー型タンパク質である carboxypeptidase Y (CPY)は、小胞輸送によって小胞体からゴルジ体、そして細胞膜や液胞へ運ばれる過程で成熟型へと変換される。tcb1Δtcb2Δtcb3Δ細胞において、これらのタンパク質の成熟の程度を調べたところ、いずれも影響は見られなかった(Fig. 18)。一方、コントロールとして、小胞輸送をブロックする sec18-20 変異株では、Gas1 と CPY のいずれも小胞体局在型の未成熟体の蓄積が見られた。また、この sec18-20 変異株の TCB1, TCB2, TCB3 遺伝子を破壊しても、未成熟体の蓄積は影響を受けなかった。この結果から、Tcb タンパク質は COPII 小胞を介した小胞体からゴルジ体への小胞輸送経路には関与していないことが示唆された。

また、ERES のマーカーである Sec13-mCherry の数を調べたところ、WT と  $tcb1\Delta tcb2\Delta$   $tcb3\Delta$  の間に有意な差は見られなかったことから(Fig. 19)、TCB 遺伝子の破壊株では ERES の形成が正常であることが示唆された。

さらに Tcb3-GFP のドットが ERES に局在しているかを調べる目的で、Tcb3-GFP のド ットと Sec13-mCherry のドットを同時に観察した。*sec12-4* 変異株を用いて、小胞体から の COPII 小胞の出芽をブロックした条件下において解析を行ったところ、Tcb3-GFP と Sec13-mCherry のドットの局在は一致しなかった(Fig. 20)。

以上の結果から、Tcb タンパク質は小胞体からの小胞輸送に関与しないことが強く示 唆された。



## Figure 18. Tcb タンパク質の欠損は小胞輸送に影響を与えない

*tcb3*∆(FKY2924)、*tcb1*∆2∆3∆(FKY2927)、*sec18 tcb3*∆(FKY2923)、*sec18 tcb1*∆2∆3∆(FKY2926)を YPD 液体培地で一晩培養し、37℃に表記の時間シフトした。





Sec13 に蛍光標識をつけた株である、Sec13-Venus (FKY4663)と Sec13-Venus *tcb1* $\Delta 2\Delta 3\Delta$ (FKY4876)を SD+all 液体培地で一晩培養し、細胞を回収して蛍光顕微鏡観察を行った。細胞当たりの Sec13-Venus のドットをカウントし、値をボックスプロットで示した。



# Figure 20. Tcb3 のドットは、ERES の局在と一致しない

ゲノムの *SEC13* に蛍光標識をつけた株である、Sec13-Venus *sec12-4 tcb1*∆2∆3∆(FKY4987)に Tcb3-GFP (FKP865)を形質転換した細胞を SD-Ura 液体培地で一晩培養し、30℃に1 時間シフトした。その後、 細胞を回収して蛍光顕微鏡観察を行った。

# 5. セラミド非小胞輸送における Tcb タンパク質の機能解析

#### 5-1. Tcb タンパク質はセラミドの非小胞輸送に必要である

# 5-1-1. TCB 遺伝子の破壊はセラミドの非小胞輸送依存的な IPC 合成を減少させる

これまでの結果から、Tcb タンパク質はメディアルゴルジと優先的に共局在し(Fig. 11A, B)、小胞体とメディアルゴルジ体間のコンタクトの形成に関与することが示された(Fig. 17A, B)。過去の報告から、*in vitro* の解析によってセラミドの非小胞輸送は小胞体とゴルジ体との膜同士のコンタクトを必要とすることが示されている [27]。しかしながら、セラミドの非小胞輸送経路において、ゴルジ体のシス層、メディアル層、トランス層のうちどの層とのコンタクトが重要であるかは分かっていない。ただ、IPC 合成酵素である Aurl が、メディアルゴルジに優先的に局在していることが知られていることから [72]、メディアルゴルジはセラミドから IPC への変換に重要な場であると考えられている。

小胞体ーゴルジ体コンタクトを形成する役割をもつ Tcb タンパク質が、セラミドの小 胞体からゴルジ体への輸送に必要である可能性は十分に考えられる。そこで、これを調 べるために[<sup>3</sup>H]*myo*-inositol を用いた脂質代謝ラベリング解析を行った。その結果、*sec18-*20 変異株(Fig. 21A)および *sec12-4* 変異株(Fig. 21B)では非許容温度において IPC 合成量 が大幅に減少するが、*tcb1*Δ *tcb2*Δ *tcb3*Δ 細胞では影響が見られなかった。このことは、 Tcb タンパク質がセラミドの輸送に強く関与しないことを示唆している。セラミドの約 70-80%は小胞輸送を介して、残りのセラミドは非小胞輸送を介してゴルジ体へ運ばれ ることが分かっている。したがって、Tcb タンパク質がセラミドの非小胞輸送に関与し ている可能性は否定できない。

もしも Tcb タンパク質がセラミド非小胞輸送に必要であるならば、SEC 遺伝子の変異 と TCB 遺伝子の破壊を組み合わせると、SEC 遺伝子変異株と比べて、IPC 合成量がさ らに減少するはずである。そこで、SEC 遺伝子変異によって小胞体からゴルジ体への小 胞輸送をブロックした条件下での IPC 合成における TCB 遺伝子破壊の影響を調べた。 その結果、sec18-20 変異株と比較して sec18-20 tcb1Δtcb2Δtcb3Δ 変異株では IPC 合成量 が約 50%減少した(Fig. 21A)。sec12-4 変異株を用いた解析においても、同様の結果が得 られた(Fig. 21B)。これらの結果から、Tcb タンパク質は非小胞輸送依存的な IPC 合成に 関与していることが示され、セラミドの非小胞輸送経路に関与している可能性が示唆さ れた。

#### 5-1-2. TCB 遺伝子の破壊は、IPC 合成活性およびセラミド合成に影響を与えない

Tcb タンパク質は非小胞輸送依存的な IPC 合成に関与していることから、Tcb タンパク質 がセラミドの非小胞輸送に関与している可能性が示唆された。しかし、TCB 遺伝子の破壊 が IPC の合成活性やセラミドの合成に影響を与えている可能性も考えられる。

これらの可能性の有無を検証するために、まず  $tcb1\Delta tcb2\Delta tcb3\Delta$  細胞における IPC 合成活性の解析を行った。側鎖の短い C2-ceramide は、細胞外から加えることによって拡散またはエンドサイトーシス経路を介してゴルジ体へ到達し、C2-IPC へ変換される。したがって、C2-IPC の合成は小胞体を経由せず行われることから、C2-ceramide を使って IPC の合成活性を in vivo で解析することができる。そこで、[<sup>3</sup>H]*myo*-Inositol を用いた脂質代謝ラベリング解析によって、C2-ceramide から合成される C2-IPC の量を測定した。その結果、 $tcb1\Delta tcb2\Delta tcb3\Delta$  細胞では、WT と比較して C2-IPC の合成量に影響は見られなかった(Fig. 22)。また、sec12 変異株における *TCB* 遺伝子の破壊も同様に、C2-IPC の合成量には影響を及ぼさなかった(Fig. 22)。

Phosphatidylinositol (PI)は、C2-ceramide から C2-IPC に変換される際に、IPC 合成酵素 の基質として用いられる。もし Tcb タンパク質が PI の輸送に関与しているのであれば *TCB* 遺伝子の欠損は C2-IPC 合成量の低下を引き起こすと考えられる。しかしながら、 C2-IPC 合成量の減少は *TCB* 遺伝子の破壊株で見られなかったことから(Fig. 22)、PI の 輸送にも Tcb タンパク質は関与していないことが示唆された。

さらに、WT および  $tcb1\Delta tcb2\Delta tcb3\Delta$  細胞におけるセラミド量の測定を行った。コン トロールとして、セラミドを蓄積させる aureobasidin A 処理した細胞、セラミドをアシ ルセラミドへ変換する酵素をコードする DGA1 および LRO1 遺伝子の二重破壊株を用 いた。DGA1 と LRO1 遺伝子の二重破壊株では、アシルセラミドの合成量の低下が観察 されるはずである。解析の結果、セラミドの合成量は、 $tcb1\Delta tcb2\Delta tcb3\Delta$  細胞で減少は 見られず、むしろセラミドの蓄積がわずかに観察された(Fig. 23A)。また、 $tcb1\Delta tcb2\Delta$  $tcb3\Delta$  細胞ではアシルセラミドの有意な増加も観察された。同じような結果は、SEC 遺 伝子変異によって小胞輸送をブロックした条件下においても観察された (Fig. 23B)。

これらの結果から、SEC 遺伝子変異と TCB 遺伝子破壊の組み合わせによる IPC 合成 の低下は、IPC 合成酵素の活性低下や基質である PI の輸送障害、あるいはセラミド合 成の異常によるものではないことが示された。したがって、IPC 合成における TCB 遺伝 子破壊の影響は、セラミドを IPC 合成酵素がある区画へと送り届ける過程であると考え られるため、Tcb タンパク質はセラミドの非小胞輸送に関与していることが強く示唆さ れた。

4 5



Figure 21. sec18 変異株および sec12 変異株における TCB 遺伝子破壊による IPC 合成量への影響

(A) WT (FKY66)、*tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY73)、*sec18-20* (FKY74) *sec18-20 tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY76) を 25°Cで培養 した細胞を SD-Inositol 培地に懸濁させ、37°Cで 20 分間培養した。[<sup>3</sup>H]*myo*-Inositol を添加して 37°Cで 60 分間標識し、脂質を回収して精製した。複合スフィンゴ脂質(IPC-C, MIPC, M(IP)<sub>2</sub>C)を検出するため に NaOH 処理を行い、C:M:0.25% KCl=55:45:10 で展開した。定量値は、複合スフィンゴ脂質(IPC-C ま たは IPC-C+MIPC)に取り込まれた放射能のシグナル強度を求め、*sec18-20* の値を 100%としたときの 相対量(%)を示す。3 回の実験結果について標準偏差(±)を求めた。

(B) WT (FKY2928)、tcb1∆2∆3∆(FKY2927)、sec12-4 (FKY2960) sec12-4 tcb1∆2∆3∆(FKY2984) を25℃で培養した細胞を SD-Inositol 培地に懸濁させ、30℃で 30 分間培養した。[<sup>3</sup>H]myo-Inositol を添加して 30℃で 90 分間標識し、脂質を回収して精製した。精製後、C:M:0.25% KCl=55:45:10 で展開した。定量値は、複合スフィンゴ脂質(IPC-C または IPC-C + MIPC)に取り込まれた放射能のシグナル強度を求め、sec12-4 の値を 100%としたときの相対量(%)を示す。



Figure 22. TCB 遺伝子の破壊による C2-IPC 合成活性への影響

WT (FKY2928)、*tcb1*Δ2Δ3Δ(FKY2927)、*sec12* (FKY2960)、*sec12 tcb1*Δ2Δ3Δ(FKY2984)を SD-Inositol 培 地に懸濁させ、30°Cで 20 分間培養した。10 mM C2-Ceramide 10 µL を加え、30°Cでさらに 20 分間培 養した後、10 µCi [<sup>3</sup>H]*myo*-Inositol を添加して 30°Cで 60 分間標識した。その後 1500 µL SD+all 培地を 加えてさらに 120 分間培養した。反応停止後、脂質を回収して精製し、C:M:0.25% KCl=55:45:10 で展 開した。



Figure 23. TCB 遺伝子の破壊によるセラミド合成量への影響

(A) WT (FKY2928)、*tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY2927)、*dga1*Δ*lro1*Δ (FKY4892)の細胞、および WT を 0.2 µg/mL AbA で 120 分間処理した細胞を Semi SD に懸濁させ、25°Cで 30 分間培養した。10 µCi [<sup>3</sup>H]DHS を添 加して 25°Cで 60 分間標識した後、1500 µL Semi SD を加えてさらに 120 分間培養した。反応停止後、 脂質を回収して精製し、C:M:4.2N ammonium hydroxide=9:7:2 で展開した。展開後のプレートからセラ ミドを含むバンドの脂質を回収して精製し、C:M:2M ammonium hydroxide=40:10:1 で展開した。
(B) WT (FKY5399)、*tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY5401)、*sec12-4* (FKY5402)、*sec12-4 tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY5400)の細胞を Semi SD に懸濁させ、25°Cで 30 分間培養した。10 µCi [<sup>3</sup>H]DHS を添加して 25°Cで 180 分間標識した。反応停止後、 脂質を回収して精製し、C:M:4.2N ammonium hydroxide=9:7:2 で展開した。展開後のプレートからセラミドを含むバンドの脂質を回収して精製し、C:M:4.2N ammonium hydroxide=9:7:2 で展開した。

(A, B) グラフは、セラミド(CerA, B, B', C)またはアシルセラミドに取り込まれた放射能のシグナル強 度を求め、WT または *sec12-4* の値を 100%としたときの相対量(%)を示す。3回行った結果の平均と標 準偏差(Bar)をグラフに示した(\* p<0.05, \*\*\* p<0.001)。

# 5-2. Tcb3 の過剰発現は SMP ドメインおよび C2 ドメイン依存的にセラミドの非小胞 輸送を促進させる

# 5-2-1. Tcb3 の過剰発現は小胞輸送非依存的な IPC 生合成を促進する

*TCB* 遺伝子の破壊株を用いた解析により、Tcb タンパク質がセラミドの非小胞輸送に 関与していることが示唆された。そこで次に、Tcb3 の過剰発現がセラミドの非小胞輸送 を促進させるかどうかを調べた。非許容温度で小胞体からゴルジ体への小胞輸送が阻害 される *sec12-4* 変異株に Tcb3 を過剰発現させたときの IPC の合成量を測定した。その 結果、*sec12-4* 変異株における IPC の合成量は Tcb3 の過剰発現によって増加した (Fig. 24A)。一方で、同じ条件下でタンパク質の成熟過程はまったく影響を受けなかったこと から (Fig. 24B)、Tcb3 過剰発現による IPC 合成の増加は小胞輸送ではなく非小胞輸送の 促進によるものであることが示唆された。

#### 5-2-2. Tcb3 による IPC 合成の促進には SMP および C2 ドメインが必要である

Tcb3 の過剰発現による IPC 合成の促進に、Tcb3 のどのドメインが重要であるかを調 べるために、各ドメインを欠損した Tcb3 を過剰発現させて、IPC 合成への影響を調べ た。その結果、SMP ドメインのみを欠いた Tcb3(ΔSMP)、C2 ドメインのみを欠いた Tcb3(ΔC2)、SMP と C2 の両方のドメインを欠いた Tcb3(ΔSMP-C2)のいずれも、sec12-4 変異株における IPC の合成を促進させなかった(Fig. 25)。このことから、セラミドの非 小胞輸送を介した IPC の合成には、Tcb3 の SMP ドメインと C2 ドメインの両方が必要 であることが示唆された。C2 ドメインを欠いた Tcb3(ΔC2)および Tcb3(ΔSMP-C2)が sec12-4 変異株における IPC 合成を促進させなかったのは、Fig.17B の結果から示される ように、小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトを形成できないことが原因であると考えら れる。これに対して、SMP ドメインを欠いた Tcb3(ΔSMP)を発現する細胞では小胞体ー ゴルジ体コンタクトサイトの形成に影響が見られなかったことから、IPC 合成を促進さ せなかったのは、コンタクトの形成の阻害でなく、膜からのセラミドの引き抜きやゴル ジ体への受け渡しが異常になっていることが原因である可能性が考えられる。



**Figure 24.** *sec12* 変異株における *TCB3* 過剰発現による IPC 合成およびタンパク質輸送への影響 (A) *sec12-4* (FKY2960)に empty(−) (FKP22)、*TCB3* OE (FKP1011)を形質転換した細胞を SD-Ura 培地 で培養し、SD-Ura,Inositol 培地に懸濁させ、30℃で 30 分間培養した。[<sup>3</sup>H]*myo*-Inositol を添加して 30℃で 60 分間標識した後、1500 µL SD-Ura を加えてさらに 120 分間培養した。反応停止後、脂質を 回収して精製し、C:M:0.25% KCl=55:45:10 で展開した。

(B) (A)に示した解析について、IPC-C に取り込まれた放射能のシグナル強度を求め、empty(-)の値 を 100%としたときの相対量(%)を示す。3 回の実験結果について平均を示し、標準偏差(Bar)とp 値 を求めた (\*\* p<0.01)。

(C) WT (FKY2577)または *sec12-4* (FKY2960)に empty(-) (FKP22)、*TCB3* OE (FKP1011)を形質転換した細胞を SD-Ura 液体培地で一晩培養し、30℃に 4 時間シフトした。

(D) (C)に示したウエスタン解析について、成熟型の Gas1p の割合を示す。3 回の実験結果について 平均を示し、標準偏差(Bar)とp 値を求めた (\*\* p<0.01)。



Figure 25. sec12 変異株における TCB3 過剰発現による IPC 合成への影響

WT (FKY2577)または *sec12-4* (FKY2960)に empty(-) (FKP22)、*TCB3* OE (FKP1011)、*TCB3*(ΔSMP) OE (FKP1044)、*TCB3*(ΔC2) OE (FKP1028)、*TCB3*(ΔSMP-C2) OE (FKP1025) を形質転換した細胞を SD-Ura 培地で培養し、SD-Ura,Inositol 培地に懸濁させ、30°Cで 30 分間培養した。[<sup>3</sup>H]*myo*-Inositol を添 加して 30°Cで 60 分間標識した後、1500 µL SD-Ura を加えてさらに 120 分間培養した。反応停止後、 脂質を回収して精製し、C:M:0.25% KCl=55:45:10 で展開した。IPC-C に取り込まれた放射能のシグ ナル強度を求め、empty(-)の値を 100%としたときの相対量(%)を示す。3 回の実験結果について平 均を示し、標準偏差(Bar)と p 値を求めた(\* p<0.05)。

# 6. セラミド非小胞輸送と他の細胞機能との関係に関する解析

# 6-1. セラミド非小胞輸送はセラミドの蓄積を防ぐ役割を担う

小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送に障害を持つ細胞では、セラミドが小胞体に異 常蓄積すると考えられる。小胞体における脂質の過剰な蓄積は小胞体ストレスを引き起 こすことから、細胞にとって有毒である。その毒性を緩和させるため、細胞は、過剰に 生産された脂質を中性脂質へと変換されて脂肪滴(lipid droplet; LD)に隔離させる仕組み を備えている。過剰な脂質を細胞がどのようにセンスしているか、そのメカニズムはわ からないが、脂質の過剰蓄積は LD の形成を促進させることが知られている [73]。出芽 酵母においてセラミドは、アシルトランスフェラーゼである Lrol および Dgal によっ て、アシルセラミドに変換される [15]。これは、過剰なセラミドを小胞体から除くため のメカニズムのひとつであると考えられている [9] [13] [14] [15]。 tcb1Δ tcb2Δ tcb3Δ 細 胞ではアシルセラミドが蓄積していたことから(Fig.23C)、Tcb タンパク質の欠損による セラミド非小胞輸送の障害は LD 形成を促進させるのではないかと考えた。この仮説を 検証するため、変異株や過剰発現株における LD の形成量を調べた。

### 6-1-1. TCB 遺伝子の欠損は LD 形成を促進する

脂溶性染色試薬である Nile Red [74] [75]によって細胞を染色して LD の観察を行い、 細胞当たりの LD 数を測定した。その結果、Tcb タンパク質の欠損株で LD の形成が増 加していた(Fig.26)。また、sec12-4 変異株と sec18-20 変異株でも LD の増加が観察され た。さらに、TCB 遺伝子破壊と sec18-20 変異を組み合わせた株を非許容温度で培養し た時に、LD の量は最も多くなった。これらの結果から、小胞輸送と非小胞輸送の障害 によって、LD の形成が促進されることが示唆された。セラミドの輸送障害によって蓄 積したセラミドがアシルセラミドへ変換し、それによって LD の形成が促進したと考え られる。

#### 6-1-2. Tcb3 の過剰発現は sec12 変異株における LD 形成の増加を抑圧する

Tcb3 の過剰発現はセラミドの非小胞輸送を促進させることから (Fig. 24A)、Tcb3 の 過剰発現によって sec12-4 変異株における LD 形成の増加を回復させるかどうかを調べ ることにした。その結果、非許容温度の sec12-4 変異株における LD 形成の増加が、Tcb3 の過剰発現によって抑圧された(Fig. 27)。また、セラミドの非小胞輸送に関与すること が知られている Nvj2 の過剰発現も、LD 形成の増加を抑圧することがわかった。このこ とは、セラミドの非小胞輸送が LD の形成を負に制御していることを示唆している。こ れらの結果は、小胞輸送の障害による LD 形成の増加をセラミドの非小胞輸送が緩和で きることを示しており、小胞輸送の異常により蓄積したセラミドが非小胞輸送を介して ゴルジ体へバイパスされることを示唆している。

### 6-1-3. TCB 遺伝子の欠損は TAG の量には影響を与えない

以上の結果から、セラミドの輸送障害によって蓄積したセラミドのアシルセラミドへ 変換が、LD形成の促進の原因であると考えられた。しかしながら、LDの増加には他の 中性脂質が寄与している可能性も考えられる。そこで、LDの主成分であるトリアシル グリセロールとステロールエステルの量を調べた。

その結果、tcb1Δtcb2Δtcb3Δ破壊株において、トリアシルグリセロールとステロール エステルの量に増加は見られず、むしろステロールエステルについては減少していた (Fig. 28)。このことから、tcb1Δtcb2Δtcb3Δ破壊株における LD の増加はトリアシルグリ セロールやステロールエステルなどの中性脂質の増加によるものではないことが示唆 された。

一方で、*secl2-4* 変異株では非許容温度において中性脂質の著しい増加が見られたこ とから、*SEC* 遺伝子変異株における LD の増加は、トリアシルグリセロールやステロー ルエステルなどの中性脂質の蓄積が原因である可能性が考えられる。また、*secl2-4* 変 異と *TCB* 遺伝子破壊の二重変異株では *secl2-4* の単独変異株と比較してトリアシルグ リセロールおよびステロールエステルのさらなる蓄積を示さなかった。このことは、中 性脂質の蓄積が小胞輸送のブロックのみによって引き起こされることを示唆しており、 *TCB* 遺伝子の欠損による LD の増加はそれらの中性脂質の蓄積でなくアシルセラミド の蓄積が原因であることを支持している。

まとめると、これらの結果は、セラミドの輸送がセラミドの量を適切に保つために重 要であることを示しており、また、セラミドが過剰に蓄積した際には、それによる毒性 を緩和させるために、セラミドをアシル化し、LDの形成を促し貯蔵していることを示 唆している。



#### Figure 26. TCB 遺伝子の破壊による LD 形成への影響

WT (FKY2928)、*tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY2927)、*sec12-4* (FKY2960) *sec12-4 tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY2984)、*sec18-20* (FKY2929) *sec18-20 tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY2926)を一晩培養し、回収した細胞を Nile Red で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。



# Figure 27. sec12 変異株における TCB3 過剰発現による LD 形成への影響

*sec12-4* (FKY2960)に empty(-)(FKP22)、*TCB3* OE (FKP1011)、*NVJ2* OE (FKP1008)を形質転換した細胞 を SD-Ura 培地で培養し、SD-Ura 培地に懸濁させ、30℃で 30 分間培養した。回収した細胞を Nile Red で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。



# Figure 28. TCB 遺伝子破壊による中性脂質への影響

WT (FKY2928), *tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY2927), *sec12-4* (FKY2960), *sec12-4 tcb1*Δ2Δ3Δ (FKY2984)の細胞を Semi SD 培地、25°Cで一晩培養し、その後 25°Cまたは 37°Cで 30 分間培養した。培養後、脂質を回収して 精製した。精製した脂質を TLC プレートに全量スポットし、petroleum ether : diethyl ether : acetic acid =1:1:0.04 でプレートの 1/3 まで展開し、プレートを乾かしたのち、petroleum ether : diethyl ether =49:1 でプレート上部まで展開した。展開後、乾かしたプレートを検出用試薬 (0.63g MnCl2・4H2O, 60ml water, 60ml methanol, 4ml conc. sulfric acid) に 10 秒間浸し、110°Cで 5 分から 15 分間加熱した。グラフ は、steryl esters または TAG または sterol のシグナル強度を求め、WT(25°C)の値を 100%としたときの 相対量 (%) を示す。3 回行った結果の平均と標準偏差(Bar)をグラフに示した(\* p<0.05, \*\*\* p<0.001)。

# 第5章 考察

Tcb タンパク質はもともと、小胞体 - 細胞膜コンタクトサイトに局在する tether タンパク質で、PI4P の代謝制御に関与している分子として同定された一群のタンパク質である [43][46]。しかしながら、本研究の解析によって、Tcb タンパク質は小胞体 - ゴルジ体コンタクトの形成にも関与しており、セラミドの非小胞輸送において重要な役割を持つことが明らかとなった。また、本研究では、Tcb タンパク質や Nvj2 による小胞体からゴルジ体へのセラミドの非小胞輸送の促進がセラミドの有毒な蓄積を防ぎ、LD 形成を押さえる役割があることが示唆された。

#### セラミド非小胞輸送における Tcb3 タンパク質ドメインの機能メカニズム

セラミドの非小胞輸送過程において、Tcb タンパク質がどのようなメカニズムで機能 しているのか、その詳細は不明である。Tcb タンパク質が小胞体-細胞膜コンタクトに 局在し細胞膜に結合するためには、SMP ドメインが必要であることから [46]、小胞体 ーゴルジ体コンタクトの形成に対しても、SMP ドメインは重要である可能性がある。 しかしながら、SMP ドメインの欠損は、小胞体-メディアルゴルジ体コンタクトの形 成に影響を与えなかった。一方で SMP ドメインの欠損は、*sec12-4* 変異株における IPC 合成の減少を回復しなかったことから、SMP ドメインは小胞体とゴルジ体の間でセラ ミドの交換を行っているのかもしれない。Tcb タンパク質のヒトオルソログである E-Syts は脂質と結合し、その SMP ドメインは脂質の膜間での輸送に必要であることが知 られている [56]。脂質を固定化したニトロセルロース膜を用いてタンパク質と脂質の 相互作用を調べた網羅的な解析から、Tcb3 はフィトセラミド(phytoceramide)と結合する ことが分かっている [49]。したがって、Tcb3 の SMP ドメインがセラミドをドナー膜か ら引き抜き、ターゲット膜へ受け渡す機能を有している可能性は十分に考えられる。

また、C2 ドメインの欠損によって小胞体-メディアルゴルジ体コンタクトが減少し たことから、Tcb3 の C2 ドメインは小胞体をゴルジ体へと繋ぎ止めるために必要である ことが示唆される。これはヒトオーソログにおける研究とも矛盾していない。3 つの E-Syts をノックダウンすると、小胞体-細胞膜のコンタクトサイトが減少するが、このと き細胞質の Ca<sup>2+</sup>がコンタクトサイトの形成に関与することから、コンタクトの形成はお そらく Ca<sup>2+</sup>と結合する C2 ドメインによって媒介されると考えられている [53] [54]。 Tcb タンパク質の C2 ドメインは、ホスファチジルセリン(phosphatidylserine)やイノシト ールリン脂質(phosphoinositides) を含む酸性のリン脂質とも結合することから [49] [51]、 小胞体-ゴルジ体コンタクトの形成は C2 ドメインと acidic phospholipids との結合を介 して行われている可能性が考えられる。本研究の解析において、PI4P レベルを増加させ る変異株において、Tcb3-GFP のドット形成が促進されることが示された。PI4P が Tcb3 の C2 ドメインの結合ターゲットとしてコンタクト形成に関与しているのかもしれない。 これらをふまえると、Tcb タンパク質は、小胞体ーゴルジ体コンタクトで行われるセ ラミド非小胞輸送過程において、tether タンパク質および脂質輸送タンパク質の両方の 機能を果たしているのではないかと考えられる。

# Lyso-PI の蓄積について

[<sup>3</sup>H]myo-inositol を用いた脂質代謝ラベリング解析において、sec12-4 tcb1Δ2Δ3Δ 変異 株では、lysophosphorylinositol (lyso-PI)の増加が見られた。この表現型は、sec18-20, sec12-4 変異株でも見られた。また、Puoti らの過去の解析 [76]において、sec12, sec13, sec16, sec23, sec18, sec6, sec7, sec14 といった他の SEC 遺伝子変異株においても、非許容温度で lyso-PIの増加が見られる。これらのことから、sec12-4 tcb1∆2∆3∆ 変異株における lyso-PIの蓄積は TCB 遺伝子の機能に特異的なものではなく、小胞輸送経路の障害による一 般的な表現型であることが推察される。リゾ体のリン脂質は COPII 小胞形成を促進す る働きが示唆されていることから [77]、COPII 小胞を介した小胞輸送は lyso-PI による フィードバック機構によって厳密に制御されているのかもしれない。他の可能性として は、Tcb タンパク質によって形成される小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトが、lyso-PI の輸送や代謝に関与していることも考えられる。Lyso-PI は、Plb1, Plb2, Plb3, Nte1 な どのホスフォリパーゼによって PI から作られ、Slc1, Slc4, Cst26 などのアシルトランス フェラーゼによって PI へ変換される。Ntel, Slc1, Slc4 などの酵素は ER に局在すること が知られているが [78][79]、それらの酵素活性が小胞体-ゴルジ体コンタクトサイトに よって調節されている可能性が考えられる。同じようなメカニズムとして、小胞体ー細 胞膜コンタクトサイトによって、小胞体に局在する Sacl の細胞膜上の PI4P を PI に変 換する機能が制御されることも知られており [43]、様々な脂質の代謝におけるコンタ クトサイトの重要性について、今後の研究の進展が期待される。

# セラミドの非小胞輸送が行われる場所について

Tcb3のドットに近接して見られたメディアルゴルジは IPC 合成酵素である Aurl が局 在している区画である [72]。また、Tcb3 は Tcb1 や Tcb2 と複合体を形成すると考えら れることから [66][67]、Tcb タンパク質複合体が小胞体ーメディアルゴルジコンタクト の形成において tether 複合体として機能し、IPC を合成するためのセラミドを小胞体か らメディアルゴルジへ直接的かつ効率的に供給しているのではないかと考えられる。こ のことは、Tcb3 のドットがメディアルゴルジに優先的に局在していることと、そのドッ トの形成に Tcb1 と Tcb2 が必要であるという結果と一致している。また、本研究では、 Tcb3 のドットが nER に優先的に局在していることを明らかにした。このことは、nER とメディアルゴルジ間で形成されるコンタクトサイトがセラミドの非小胞輸送の最も 有力な場であることを示唆している。しかしながら、Tcb3 の多くは cER に局在してお り、cER に局在している Tcb3 がメディアルゴルジと共局在していることも示された。 したがって、セラミドの非小胞輸送の場は、cER-メディアルゴルジコンタクトサイト である可能性も考えられる。セラミドの非小胞輸送が実際にどの場所で行われているか については、更なる解析が必要である。

# 小胞体ーゴルジ体コンタクトにおける Tcb タンパク質の機能について

Tcb タンパク質を欠損させても、小胞体ーゴルジ体のコンタクトが完全に消失するわけではないことから、コンタクト形成には Tcb タンパク質以外の繋留因子(teher)も関与している可能性がある。もしくは、Tcb タンパク質はコンタクトの形成に直接働く tether としての役割を果たしているのではなく、未知の tether の働きを調節する役割を担っているのかもしれない。

#### 小胞体-メディアルゴルジコンタクト以外のコンタクトについて

本研究では、小胞体とメディアルゴルジのコンタクトがセラミドの非小胞輸送に重要 であることを明らかにした。しかしながら小胞体はメディアルゴルジ以外のゴルジ体区 画や細胞膜ともコンタクトしており、それらにも何らかの生理的意義があると思われる。 例えば、小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送は細胞膜を経由して行われる可能性が考 えられる。他にも、LDにはアシル化されたセラミドが貯蔵されていると考えられるが、 貯蔵したアシルセラミドを利用する必要が生じたときには、LD-ゴルジ体のコンタク トを介してアシルセラミドがゴルジ体へ運ばれ、IPC への変換が行われる可能性も十分 に考えられる。

# 小胞輸送と非小胞輸送の関連(相補、使い分け、選別)について

小胞輸送と非小胞輸送はそれぞれがお互いに補うことができるかもしれない。なぜな ら、Tcb タンパク質の欠損では小胞体ーゴルジ体のコンタクトが減少するが、IPC の合 成量は減少しない。これは、非小胞輸送経路に損傷があるとき、細胞がそれを感知して 小胞輸送を促進しようとするのかもしれない。反対に、小胞輸送をブロックした細胞で も 20~30%は IPC 合成が進んでいる。これはもともともの非小胞輸送の寄与によるも のかもしれない。もしくは、小胞輸送における損傷を細胞が感知し、それを非小胞輸送 によって補おうとした結果なのかもしれない。

セラミドの輸送において、小胞輸送と非小胞輸送という異なる2つの経路が用意され ている意義は何であろうか?また、それらはどのように使い分けられているのであろう か?小胞輸送はATPの加水分解エネルギーを必要とするのに対して、非小胞輸送はATP を必要としないことから、セラミド輸送のエネルギーを節約できるという利点があると 思われる。また、これらの使い分けにおける一つの仮説として、アシル化がその選別に 関与する可能性があるかもしれない。それは、非小胞輸送によって輸送されるのはアシ ル化されたセラミドであるという仮説である。Tcb タンパク質の欠損によって非小胞輸 送が低下したとき、アシルセラミドの蓄積が顕著であるのに対して、セラミドの蓄積は 弱い。一方で、小胞輸送のみを遮断する sec 変異株では、アシルセラミドの蓄積は見ら れない。これらの結果は、非小胞輸送がアシルセラミドを優先的に運ぶ機構であるとい う仮説と矛盾しない。非小胞輸送は小胞体-ゴルジ体-LDのコンタクトを介すること によって、セラミドとアシルセラミドのバランスをモニタリングしながら、輸送をコン トロールしているのかもしれない。

# セラミド輸送障害と LD 形成の関連について

セラミドの輸送障害によって LD の形成が促進されるメカニズムは不明である。セラ ミドの輸送障害によってセラミドが小胞体に異常蓄積することで、小胞体に局在する Lrol および Dgal が活性し、それによってアシルセラミドが増加し [15]、LD 形成が促 進されるモデルが考えられる。実際に、Tcb タンパク質が欠損した株ではアシルセラミ ドの有意な増加が見られた。また、酵母の LD にセラミドが含まれていることも報告さ れている [80]。しかし、小胞体に異常蓄積したセラミドがどのようにセンスされ、どの ように Lrol や Dgal が活性化され、どのようにアシルセラミドが LD に取り込まれるの かは不明である。もし Tcb タンパク質がセラミドと直接結合するなら、セラミドと結合 する Tcb タンパク質のセラミド結合ポケットが飽和することが Lrol や Dgal の活性化 を促すのかもしれない。Tcb タンパク質が Lrol や Dgal と物理的に相互作用するかどう か興味がもたれる。

出芽酵母を用いた所属研究室の以前の解析によって、GPIアンカー生合成または GPI アンカリングに障害を持つ株では、LD形成が促進していることが明らかにされた [33]。 また、出芽酵母遺伝子 CWH43 の分裂酵母遺伝子ホモログの変異株では、GPI の脂質部 分のセラミドへのリモデリングが異常となっており [81][82]、この株でも同様に LD の 増加が観察されている [83]。これらの gpi 変異株は IPC 合成障害を示すことからも [34]、 これらの変異株における LD 形成の増加は、セラミドの輸送の障害によるセラミドの蓄 積が原因であると考えられる。さらに、TCB3 の過剰発現は sec12-4 変異株における LD 形成を抑圧することが示された。TCB3 の過剰発現は輸送小胞によるタンパク質輸送に は影響を与えなかったことから、小胞輸送障害によって小胞体に蓄積したセラミドは、 非小胞輸送経路によってバイパスされる可能性が示唆された。したがって、小胞輸送に 欠陥が生じた際に、セラミドの有毒な蓄積から細胞を守るためのシステムとして、セラ ミドの非小胞輸送が重要な役割を担っていると考えられる。

# Tcb タンパク質の欠損によって LD が増加する原因について

LD に貯蔵される中性脂質としては、TAG が最もよく知られているが、本研究の解析 では Tcb タンパク質の欠損によって TAG は変化しないことが分かった。代わりに、蓄 積したアシルセラミドが LD の中身として使われ、LD の形成を促進したのではないか と考えた。しかしながら、その他の可能性も否定できない。本研究によって、Tcb タンパク質は小胞体 ー細胞膜だけでなく小胞体 ーゴルジ体のコンタクト形成に関与することが明らかとなった。Tcb タンパク質の欠損はこれらのコンタクトに損傷を与えるため、その影響はセラミドやアシルセラミドだけではなく、その他の広範囲な脂質代謝も影響を受けるかもしれない。LD 表面を包むリン脂質のレベル、または細胞全体の脂質組成が変化し、その結果として LD が増加するという可能性も十分に考えられる。

#### 総括

総括として本研究の解析から、小胞体ーゴルジ体コンタクトサイトを介したセラミド の非小胞輸送における、Tcb タンパク質の新たな機能が示唆された。Tcb タンパク質の C2 ドメインによるメディアルゴルジの認識は何を目印に行われているのか、または SMP ドメインがセラミドの結合し、セラミドの膜間輸送を行っているかは未だ不明で ある。今後は、C2 ドメインおよび SMP ドメインのリガンドの同定、そしてそれぞれの リガンドとの結合サイトを特定するために、ポイントミュータントや photocrosslinkable ligands [84]を用いた生化学的な解析が必要であると思われる。また、ヒトオルソログが 小胞体とゴルジ体間でのセラミド輸送を行っているのか、についても興味深い点である。 Nvj2 は小胞体ーゴルジ体間のコンタクトサイトの tether タンパク質であり、ゴルジ体へ のセラミド非小胞輸送を促進することが示されている [14]。Tcb タンパク質と Nvj2 が 協調的な役割を持っているかどうかも、今後明らかにしなければならない課題である。 最後に、セラミドの非小胞輸送に関与する細胞質タンパク質について、その存在は示唆 されている [27]が未だ同定には至っておらず、その同定も今後の重要な課題であると 思われる。

# 今後の展望

哺乳細胞には、Tcb タンパク質のホモログとして extended synaptotagmins (E-Syt1,2,3) が存在する。E-Syt は、小胞体と細胞膜の MCS 形成に機能することが分かっているが、 他のオルガネラとのコンタクトについては報告されていない。本研究において Tcb タ ンパク質が小胞体と細胞膜のコンタクトだけでなくゴルジ体とのコンタクトにも局在 することが明らかになったことから、E-Syt もゴルジ体や他のオルガネラとのコンタク トで脂質輸送に機能している可能性が考えられる。また哺乳細胞ではトランスゴルジネ ットワークが小胞体とのコンタクトを形成していることが分かっており、このコンタク トサイトに哺乳細胞のセラミド輸送タンパク質である CERT が局在すると考えられて いる [85]。哺乳動物のスフィンゴミエリン合成酵素である SMS1 はトランスゴルジネ ットワークに局在している [86]ことから、酵母 Tcb タンパク質によるセラミド非小胞 輸送において IPC 合成酵素 Aur1 の局在するメディアルゴルジが重要であるのと同様 に、哺乳動物においても SMS1 の局在場所とセラミドの非小胞輸送には重要な関連が あると考えられる。しかしながらこれまでに、CERTの欠損によってアシルセラミドや LDが蓄積するという知見は報告されていない。本研究において Tcb タンパク質の欠損 によってみられるこれらの表現型が、哺乳細胞でも同じくみられる可能性がある。高等 動物における脂質代謝が関連する疾患を理解するためにも、本研究で得られた知見は今 後の研究の進展に大いに貢献するであろう。

酵母は様々な環境ストレスに対応するためにあらゆる機構を備えている。近年では、 ヒトの神経細胞や植物細胞において、細胞内の様々な MCS がストレス耐性に寄与して いることが示唆されている。MCS は脂質代謝に関与し、膜の品質管理や形態維持に重 要な役割を持つことが分かっていることからも、MCS はストレス応答に密接に関連が あると推測できる。しかしながら、MCS を介したストレス耐性機構や他の細胞機能と の関連性については、未だ不明な部分が多く残されている。本研究対象とした Tcb タン パク質は、小胞体ー細胞膜間および小胞体ーゴルジ体間の2つの異なる MCS の形成に 関与する特異な因子であることが分かった。そのため本研究のさらなる発展は、ストレ ス耐性機構をはじめとする、細胞内で生じる生命現象を理解するうえで、2つの MCS によって繋がれた 3 つのオルガネラの連携という観点からアプローチできる可能性が ある。また一般に、産業的な発酵生産環境は酵母にとって過酷なストレス環境であると 考えられる。酵母が持つ環境ストレス応答・耐性メカニズムを科学的に理解し、その知 見を活用して酵母に優れたストレス耐性を付与することで、産業利用酵母の品質や生産 向上に向けた戦略を練ることが可能となることから、本研究は、酵母に関する産業技術 の高度化にも貢献することが期待できる。

# 第6章 参考文献

- Lingwood D, Simons K. (2010), "Lipid rafts as a membrane-organizing principle.," Science. 327:46-50.
- [2] Schroeder R, London E, Brown D. (1994), "Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior.," Proc Natl Acad Sci U S A. 91:12130-12134.
- [3] Epstein S, Riezman H. (2013), "Sphingolipid signaling in yeast: potential implications for understanding disease.," Front Biosci (Elite Ed). 5:97-108.
- [4] Montefusco DJ, Matmati N, Hannun YA. (2014), "The yeast sphingolipid signaling landscape.," Chem Phys Lipids. 177:26-40.
- [5] Spincemaille P, Matmati N, Hannun YA, Cammue BP, Thevissen K. (2014), "Sphingolipids and mitochondrial function in budding yeast.," Biochim Biophys Acta. 1840:3131-3137.
- [6] Morad SA, Cabot MC. (2013), "Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells.," Nat Rev Cancer. 13:51-65.
- [7] Ogretmen B. (2018), "Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy.," Nat Rev Cancer. 18:33-50.
- [8] Eisenberg T, Büttner S. (2014), "Lipids and cell death in yeast.," FEMS Yeast Res. 14:179-197.
- [9] Tani M, Funato K. (2018), "Protection mechanisms against aberrant metabolism of sphingolipids in budding yeast.," Curr Genet. 64:1021-1028.
- [10] Ito M, Okino N, Tani M. (2014), "New insight into the structure, reaction mechanism, and biological functions of neutral ceramidase.," Biochim Biophys Acta. 1841:682-691.
- [11] Kus G, Kabadere S, Uyar R, Kutlu HM. (2015), "Induction of apoptosis in prostate cancer cells by the novel ceramidase inhibitor ceranib-2.," In Vitro Cell Dev Biol Anim. 51:1056-1063.
- [12] Voynova NS, Roubaty C, Vazquez HM, Mallela SK, Ejsing CS, Conzelmann A. (2015), "Saccharomyces cerevisiae Is Dependent on Vesicular Traffic between the Golgi Apparatus and the Vacuole When Inositolphosphorylceramide Synthase Aur1 Is Inactivated.," Eukaryot Cell. 14:1203-1216.
- [13] Senkal CE, Salama MF, Snider AJ, Allopenna JJ, Rana NA, Koller A, Hannun YA,

Obeid LM. (2017), "Ceramide Is Metabolized to Acylceramide and Stored in Lipid Droplets.," Cell Metab. 25:686-697.

- [14] Liu LK, Choudhary V, Toulmay A, Prinz WA. (2017), "An inducible ER-Golgi tether facilitates ceramide transport to alleviate lipotoxicity.," J Cell Biol. 216:131-147.
- [15] Voynova NS, Vionnet C, Ejsing CS, Conzelmann A. (2012), "A novel pathway of ceramide metabolism in Saccharomyces cerevisiae.," Biochem J. 447:103-114.
- [16] Olson DK, Fröhlich F, Farese RV Jr, Walther TC. (2016), "Taming the sphinx: Mechanisms of cellular sphingolipid homeostasis.," Biochim Biophys Acta. 1861:784-792.
- [17] Heinisch JJ, Rodicio R. (2018), "Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity.," FEMS Microbiol Rev. 42.
- [18] Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, Ejsing CS, Weissman JS. (2010), "Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis.," Nature. 463:1048-1053.
- [19] Berchtold D, Piccolis M, Chiaruttini N, Riezman I, Riezman H, Roux A, Walther TC, Loewith R. (2012), "Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis.," Nat Cell Biol. 14:542-547.
- [20] Roelants FM, Breslow DK, Muir A, Weissman JS, Thorner J. (2011), "Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in Saccharomyces cerevisiae.," Proc Natl Acad Sci U S A. 108:19222-19227.
- [21] Muir A, Ramachandran S, Roelants FM, Timmons G, Thorner J. (2014), "TORC2dependent protein kinase Ypk1 phosphorylates ceramide synthase to stimulate synthesis of complex sphingolipids.," Elife. 3:e03779.
- [22] Fröhlich F, Moreira K, Aguilar PS, Hubner NC, Mann M, Walter P, Walther TC.
  (2009), "A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling.," J Cell Biol. 185:1227-1242.
- [23] Olson DK, Fröhlich F, Christiano R, Hannibal-Bach HK, Ejsing CS, Walther TC. (2015), "Rom2-dependent phosphorylation of Elo2 controls the abundance of very long-chain fatty acids.," J Biol Chem. 290:4238-4247.
- [24] Zimmermann C, Santos A, Gable K, Epstein S, Gururaj C, Chymkowitch P, Pultz D, Rødkær SV, Clay L, Bjørås M, Barral Y, Chang A, Færgeman NJ, Dunn TM, Riezman H, Enserink JM. (2013), "TORC1 inhibits GSK3-mediated Elo2

phosphorylation to regulate very long chain fatty acid synthesis and autophagy.," Cell Rep. 5:1036-1046.

- [25] Fröhlich F, Olson DK, Christiano R, Farese RV Jr, Walther TC. (2016), "Proteomic and phosphoproteomic analyses of yeast reveal the global cellular response to sphingolipid depletion.," Proteomics. 16:2759-2763.
- [26] Esch BM, Limar S, Bogdanowski A, Gournas C, More T, Sundag C, Walter S, Heinisch JJ, Ejsing CS, André B, Fröhlich F. (2020), "Uptake of exogenous serine is important to maintain sphingolipid homeostasis in Saccharomyces cerevisiae.," PLoS Genet. 16:e1008745.
- [27] Funato K, Riezman H. (2001), "Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast.," J Cell Biol. 155:949-959.
- [28] Mayor S, Riezman H. (2004), "Sorting GPI-anchored proteins.," Nat Rev Mol Cell Biol. 5:110-120.
- [29] Bagnat M, Keränen S, Shevchenko A, Shevchenko A, Simons K. (2000), "Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast.," Proc Natl Acad Sci U S A. 97:3254-3259.
- [30] Rodriguez-Gallardo S, Kurokawa K, Sabido-Bozo S, Cortes-Gomez A, Ikeda A, Zoni V, Aguilera-Romero A, Perez-Linero AM, Lopez S, Waga M, Araki M, Nakano M, Riezman H, Funato K, Vanni S, Nakano A, Muñiz M. (2020), "Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites.," Sci Adv. 6:eaba8237.
- [31] Sütterlin C, Doering TL, Schimmöller F, Schröder S, Riezman H. (1997), "Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast.," J Cell Sci. 110:2703-2714.
- [32] Swain E, Stukey J, McDonough V, Germann M, Liu Y, Sturley SL, Nickels JT Jr.
   (2002), "Yeast cells lacking the ARV1 gene harbor defects in sphingolipid metabolism. Complementation by human ARV1.," J Biol Chem. 277:36152-36160.
- [33] Kajiwara K, Watanabe R, Pichler H, Ihara K, Murakami S, Riezman H, Funato K. (2008), "Yeast ARV1 is required for efficient delivery of an early GPI intermediate to the first mannosyltransferase during GPI assembly and controls lipid flow from the endoplasmic reticulum.," Mol Biol Cell. 19:2069-2082.
- [34] Kajiwara K, Ikeda A, Aguilera-Romero A, Castillon GA, Kagiwada S, Hanada K, Riezman H, Muñiz M, Funato K. (2014), "Osh proteins regulate COPII-mediated vesicular transport of ceramide from the endoplasmic reticulum in budding yeast.,"

J Cell Sci. 127:376-387.

- [35] Perry RJ, Ridgway ND. (2005), "Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport.," Biochim Biophys Acta. 1734:220-234.
- [36] Olkkonen VM. (2015), "OSBP-Related Protein Family in Lipid Transport Over Membrane Contact Sites.," Lipid Insights. 8:1-9.
- [37] Beh CT, Cool L, Phillips J, Rine J. (2001), "Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues.," Genetics. 57:1117-1140.
- [38] Tomishige N, Kumagai K, Kusuda J, Nishijima M, Hanada K. (2009), "Casein kinase I{gamma}2 down-regulates trafficking of ceramide in the synthesis of sphingomyelin.," Mol Biol Cell. 20:348-357.
- [39] Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Yamaji T. (2009), "CERT-mediated trafficking of ceramide.," Biochim Biophys Acta. 1791:684-691.
- [40] Perry RJ, Ridgway ND. (2006), "Oxysterol-binding protein and vesicle-associated membrane protein-associated protein are required for sterol-dependent activation of the ceramide transport protein.," Mol Biol Cell. 17:2604-2616.
- [41] Peretti D, Dahan N, Shimoni E, Hirschberg K, Lev S. (2008), "Coordinated lipid transfer between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex requires the VAP proteins and is essential for Golgi-mediated transport.," Mol Biol Cell. 19:3871-3884.
- [42] Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M. (2003), "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide.," Nature. 426:803-809.
- [43] Manford AG, Stefan CJ, Yuan HL, Macgurn JA, Emr SD. (2012), "ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology.," Dev Cell. 23:1129-1140.
- [44] Quon E, Sere YY, Chauhan N, Johansen J, Sullivan DP, Dittman JS, Rice WJ, Chan RB, Di Paolo G, Beh CT, Menon AK. (2018), "Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites integrate sterol and phospholipid regulation.," PLoS Biol. 16:e2003864.
- [45] Pan X, Roberts P, Chen Y, Kvam E, Shulga N, Huang K, Lemmon S, Goldfarb DS. (2000), "Nucleus-vacuole junctions in Saccharomyces cerevisiae are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p.," Mol Biol Cell. 11:2445-2457.
- [46] Toulmay A, Prinz WA. (2012), "A conserved membrane-binding domain targets proteins to organelle contact sites.," J Cell Sci. 125:49-58.

- [47] Kopec KO, Alva V, Lupas AN. (2011), "Bioinformatics of the TULIP domain superfamily.," Biochem Soc Trans. 39:1033-1038.
- [48] Kopec KO, Alva V, Lupas AN. (2010), "Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria.," Bioinformatics. 26:1927-1931.
- [49] Gallego O, Betts MJ, Gvozdenovic-Jeremic J, Maeda K, Matetzki C, Aguilar-Gurrieri C, Beltran-Alvarez P, Bonn S, Fernández-Tornero C, Jensen LJ, Kuhn M, Trott J, Rybin V, Müller CW, Bork P, Kaksonen M, Russell RB, Gavin AC. (2010), "A systematic screen for protein-lipid interactions in Saccharomyces cerevisiae.," Mol Syst Biol. 6:430.
- [50] Huwiler A, Johansen B, Skarstad A, Pfeilschifter J. (2001), "Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release.," FASEB J. 15:7-9.
- [51] Schulz TA, Creutz CE. (2004), "The tricalbin C2 domains: lipid-binding properties of a novel, synaptotagmin-like yeast protein family.," Biochemistry. 43:3987-3995.
- [52] Jiménez JL, Davletov B., "Beta-strand recombination in tricalbin evolution and the origin of synaptotagmin-like C2 domains.," Proteins., 2007.
- [53] Min SW, Chang WP, Südhof TC. (2007), "E-Syts, a family of membranous Ca2+sensor proteins with multiple C2 domains.," Proc Natl Acad Sci U S A. 104:3823-3828.
- [54] Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, Gracheva EO, Bagriantsev SN, Borgese N, De Camilli P. (2013), "PI(4,5)P(2)dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins.," Cell. 153:1494-1509.
- [55] Idevall-Hagren O, Lü A, Xie B, De Camilli P. (2015), "Triggered Ca2+ influx is required for extended synaptotagmin 1-induced ER-plasma membrane tethering.," EMBO J. 34:2291-2305.
- [56] Yu H, Liu Y, Gulbranson DR, Paine A, Rathore SS, Shen J. (2016), "Extended synaptotagmins are Ca2+-dependent lipid transfer proteins at membrane contact sites.," Proc Natl Acad Sci U S A. 113:4362-4367.
- [57] Collado J, Kalemanov M, Campelo F, Bourgoint C, Thomas F, Loewith R, Martínez-Sánchez A, Baumeister W, Stefan CJ, Fernández-Busnadiego R. (2019), "Tricalbin-Mediated Contact Sites Control ER Curvature to Maintain Plasma Membrane Integrity.," Dev Cell. 51:476-487.

- [58] Hoffmann PC, Bharat TAM, Wozny MR, Boulanger J, Miller EA, Kukulski W. (2019), "Tricalbins Contribute to Cellular Lipid Flux and Form Curved ER-PM Contacts that Are Bridged by Rod-Shaped Structures.," Dev Cell. 51:488-502.
- [59] Bigay J, Antonny B. (2012), "Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity.," Dev Cell. 23:886-895.
- [60] Grafmüller A, Lipowsky R, Knecht V. (2013), "Effect of tension and curvature on the chemical potential of lipids in lipid aggregates.," Phys Chem Chem Phys. 15:876-881.
- [61] Raychaudhuri S, Im YJ, Hurley JH, Prinz WA. (2006), "Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding proteinrelated proteins and phosphoinositides.," J Cell Biol. 173:107-119.
- [62] Schulz TA, Choi MG, Raychaudhuri S, Mears JA, Ghirlando R, Hinshaw JE, Prinz WA. (2009), "Lipid-regulated sterol transfer between closely apposed membranes by oxysterol-binding protein homologues.," J Cell Biol. 187:889-903.
- [63] McMahon HT, Boucrot E. (2015), "Membrane curvature at a glance.," J Cell Sci. 128:1065-1070.
- [64] Jiménez JL, Davletov B. (2007), "Beta-strand recombination in tricalbin evolution and the origin of synaptotagmin-like C2 domains.," Proteins. 68:770-778.
- [65] Schauder CM, Wu X, Saheki Y, Narayanaswamy P, Torta F, Wenk MR, De Camilli P, Reinisch KM. (2014), "Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer.," Nature. 510:552-555.
- [66] Creutz CE, Snyder SL, Schulz TA. (2004), "Characterization of the yeast tricalbins: membrane-bound multi-C2-domain proteins that form complexes involved in membrane trafficking.," Cell Mol Life Sci. 61:1208-1220.
- [67] Tarassov K, Messier V, Landry CR, Radinovic S, Serna Molina MM, Shames I, Malitskaya Y, Vogel J, Bussey H, Michnick SW. (2008), "An in vivo map of the yeast protein interactome.," Science. 320:1465-1470.
- [68] Matsuura-Tokita K, Takeuchi M, Ichihara A, Mikuriya K, Nakano A. (2006), "Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation.," Nature. 441:1007-1010.
- [69] Kajiwara K, Muneoka T, Watanabe Y, Karashima T, Kitagaki H, Funato K. (2012), "Perturbation of sphingolipid metabolism induces endoplasmic reticulum stressmediated mitochondrial apoptosis in budding yeast.," Mol Microbiol. 86:1246-1261.

- [70] Chang KH, Lu FJH, Chyi T, Hsu YW, Chan SW, Wang ETW. (2017), "Examining the stress-burnout relationship: the mediating role of negative thoughts.," PeerJ. 5:e4181.
- [71] Kurokawa K, Okamoto M, Nakano A. (2014), "Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER.," Nat Commun. 5:3653.
- [72] Levine TP, Wiggins CA, Munro S. (2000), "Inositol phosphorylceramide synthase is located in the Golgi apparatus of Saccharomyces cerevisiae.," Mol Biol Cell. 11:2267-2281.
- [73] Walther TC, Farese RV Jr. (2012), "Lipid droplets and cellular lipid metabolism.," Annu Rev Biochem. 81:687-714.
- [74] Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD. (1985), "Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.," J Cell Biol. 100:965-973.
- [75] Radulovic M, Knittelfelder O, Cristobal-Sarramian A, Kolb D, Wolinski H, Kohlwein SD. (2013), "The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches.," Curr Genet. 59:231-242.
- [76] Puoti A, Desponds C, Conzelmann A. (1991), "Biosynthesis of mannosylinositolphosphoceramide in Saccharomyces cerevisiae is dependent on genes controlling the flow of secretory vesicles from the endoplasmic reticulum to the Golgi.," J Cell Biol. 113:515-525.
- [77] Melero A, Chiaruttini N, Karashima T, Riezman I, Funato K, Barlowe C, Riezman H, Roux A. (2018), "Lysophospholipids Facilitate COPII Vesicle Formation.," Curr Biol. 28:1950-1958.
- [78] Fernández-Murray JP, Gaspard GJ, Jesch SA, McMaster CR. (2009), "NTE1encoded phosphatidylcholine phospholipase b regulates transcription of phospholipid biosynthetic genes.," J Biol Chem. 284:36034-36046.
- [79] Klug L, Daum G. (2014), "Yeast lipid metabolism at a glance.," FEMS Yeast Res. 14:369-388.
- [80] Epstein S, Castillon GA, Qin Y, Riezman H. (2012), "An essential function of sphingolipids in yeast cell division.," Mol Microbiol. 84:1018-1032.
- [81] Ghugtyal V, Vionnet C, Roubaty C, Conzelmann A. (2007), "CWH43 is required for the introduction of ceramides into GPI anchors in Saccharomyces cerevisiae.," Mol Microbiol. 65:1493-1502.
- [82] Umemura M, Fujita M, Yoko-O T, Fukamizu A, Jigami Y. (2007), "Saccharomyces cerevisiae CWH43 is involved in the remodeling of the lipid moiety of GPI anchors

to ceramides.," Mol Biol Cell. 18:4304-4316.

- [83] Nakazawa N, Teruya T, Sajiki K, Kumada K, Villar-Briones A, Arakawa O, Takada J, Saitoh S, Yanagida M. (2018), "The putative ceramide-conjugation protein Cwh43 regulates G0 quiescence, nutrient metabolism and lipid homeostasis in fission yeast.," J Cell Sci. 131:jcs217331.
- [84] Dadsena S, Bockelmann S, Mina JGM, Hassan DG, Korneev S, Razzera G, Jahn H, Niekamp P, Müller D, Schneider M, Tafesse FG, Marrink SJ, Melo MN, Holthuis JCM. (2019), "Ceramides bind VDAC2 to trigger mitochondrial apoptosis.," Nat Commun. 10:1832.
- [85] Fugmann T, Hausser A, Schöffler P, Schmid S, Pfizenmaier K, Olayioye MA. (2007), "Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein.," J Cell Biol. 178:15-22.
- [86] Yeang C, Ding T, Chirico WJ, Jiang XC. (2011), "Subcellular targeting domains of sphingomyelin synthase 1 and 2.," Nutr Metab (Lond). 8:89.
## 謝辞

高速超解像ライブイメージング顕微鏡(SCLIM)による局在解析を行っていただき ました、理化学研究所光量子工学研究センターの中野明彦先生、黒川量雄先生に深く 感謝いたします。

Lipid Droplet の解析を行っていただきました、オスナブリュック大学からの留学生 Philipp Schlarmann に深く感謝いたします。

株の提供およびアドバイスを頂きました、ジュネーヴ大学の Howard Riezman 先生に 深く感謝いたします。

本研究を遂行するに当たり、多大なる御指導、御助言を賜りました本学統合生命科 学研究科 准教授 船戸耕一先生に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

研究に関する御助言、御協力を下さいました本学生物圏科学研究科 教授 水田啓子 先生、江坂宗春先生、統合生命科学研究科 教授 三本木至宏先生、堀内浩幸先生、矢 中規之先生に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。

学部、大学院を通して日々の研究で様々な助言をいただき研究に協力をしてくださった、 船戸研究室の岡野樹さん、中園航太さん、廣田彩花さん、辛島健文さん、芳方茉美さん、池田拓真さん、矢吹友佳理さん、岡野晃さん、中路彩さん、衛藤克樹さん、傳田 寛人さん、中村浩樹さん、宗野有雅さん、西川謙介さん、關川裕一郎さん、平松友貴さん、荒木美彩子さん、加藤芽伊さん、李航慶さん、岡井遥さん、中里光希さん、池間諒子さん、佐野美咲さん、山下紗夕美さん、後田梨緒さん、藤内孝樹さん、西井日向子さん、櫻木桂 子さん、花岡和樹さんに深く感謝いたします。