

生体膜脂質の局在可視化法

高鳥 翔, 藤本 豊士

膜脂質は生体膜構造の基盤を作り、シグナル伝達物質の原料となるだけでなく、タンパク質に直接結合してその機能を制御する。さらに膜脂質が作り出すさまざまな性質の膜ドメインは、タンパク質を細胞内の特定の領域にリクルートすることによって機能発現の場を決定する。このような膜脂質の多様な機能を解析するためには、膜脂質の分布を詳細に検索することが必須である。しかし従来タンパク質の分布解析に用いられてきた方法の多くは、低分子で拡散が速く、しかも化学固定法が有効に作用しない膜脂質を検索するには不十分である。このため現時点でナノレベルの分布が明らかになっている膜脂質はごくわずかである。本稿では膜脂質が二次元的に不均一な分布を示すメカニズムについて考察し、これまで膜脂質の分布解析に用いられてきた方法を個別に取り上げ、その問題点について検証する。

1. 膜脂質の分布について何がどれだけわかっているか

生体膜には1,000種以上の膜脂質が存在するが、その詳細な分布に関する情報は乏しく、ゲノム規模の局在解析がなされているタンパク質（たとえば文献1）とは対照的な状況にある。その原因は脂質分布を解析する方法の不十分さにあるといつてよい。タンパク質であれば green fluorescent protein (GFP) などの蛍光タグを導入することで生細胞中の分子の振る舞いを追究することができるし、また細胞・組織を化学固定剤で固定した上でさまざまな免疫学的手法を用いれば精細な分子局在を明らかにすることができる。一方、脂質については遺伝子レベルで標識を付加することは原理的に不可能である。また脂質の分子サイズはタンパク質に比べて非常に小さいため、標識が分子の挙動に大きな影響を及ぼしやすい。さらに化学固定剤は主にアミノ基に結合することによって固定効果を発揮するため、一部を除いてアミノ基を持たない脂質には直接作用せず、大半の膜脂質は固定後の試料でも可動性を維持する。

オルガネラごとに分布する脂質の組成が異なることや、同一膜内でも脂質二重層の内葉と外葉の脂質組成が異なることはかなり以前から知られていた²。最近になって、膜脂質が二次元的にも不均一な分布をとる例が多数明らかに

なってきた（表1）。このような膜脂質の分布はタンパク質の分布に影響し、細胞機能の調節に重要な意義を持つと考えられている。しかし前述した方法上の制約から膜脂質の分布を微細なレベルで可視化し、定量的に扱うことは容易ではない。現に多くの脂質については、より巨視的なレベルでも二次元的な分布の偏りがあるのかが明らかになっていない。

本稿では、膜脂質の不均一分布を作り出すメカニズムについてわかっている事柄を簡単に要約したあと、現時点で脂質の分布を検索する上で利用可能な研究手法を取り上げてその長所と短所を紹介する。最後に、不均一分布を示すことが報告されている脂質の代表例としてガングリオシド GM1 とホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 [PI(4,5)P₂] を取り上げ、その分布を知るために用いられた方法の検討も含め、批判的に検証したい。なお以下、二次元方向の分布の偏りを不均一分布と呼び、三次元方向（つまり内葉・外葉間）の偏りである非対称性分布と区別する。

2. 膜脂質が不均一な分布をとるメカニズム

膜脂質の側方運動はきわめて速い。測定方法によってばらつきがあるが、PI(4,5)P₂ の場合、細胞膜における拡散係数 (D) は $0.8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と報告されており³、1秒間の平均拡散距離 (x) は $x^2 = 4Dt$ から $\sim 1.8 \mu\text{m}$ と見積もられる。この値はコーテッドピットやカベオラの直径よりはるかに大きく、たとえば神経細胞の軸索の直径にほぼ相当する。

このような拡散の速さから容易に推測されるように、膜脂質合成酵素が狭い部位に限局して存在したとしても、生じた脂質はごく短時間のうちに拡散してしまう。このため

名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞学分野（〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65）

Methods to observe distribution of membrane lipids
Sho Takatori and Toyoshi Fujimoto (Department of Anatomy and Molecular Cell Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai, Showa, Nagoya 466-8550, Japan)

表1 膜脂質の不均一分布が示された例

膜脂質	不均一分布を示す部位	方法	プローブ	文献
ガングリオシド GM1	遊走細胞尾部 細胞膜ドメイン	C	コレラ毒素Bサブユニット	109
		B	コレラ毒素Bサブユニット	110
	微絨毛 分裂溝 精子先端部	G	抗体	93
		C	コレラ毒素Bサブユニット	111
		C	コレラ毒素Bサブユニット	112
		B	コレラ毒素Bサブユニット	113
ガングリオシド GM3	細胞先端部	C	抗体	109
	一次絨毛	C	抗体	111
	細胞膜ドメイン	G	抗体	93
スフィンゴミエリン	細胞膜ドメイン	B	Lysenin	110
	分裂溝	C	Lysenin	114
	上皮細胞頂部	C	Lysenin	115
ホスファチジルグルコシド	細胞膜ドメイン	G	抗体	96
ホスファチジルセリン	マクロファージ phagocytic cup	A	Lactadherin C2ドメイン	116
	細胞膜ドメイン	D*	Lactadherin C2ドメイン	88
	芽 (出芽酵母)	A	Lactadherin C2ドメイン	117
ホスファチジルエタノールアミン	分裂溝	B	Ro09-0198ペプチド	118
	極性部位 (出芽酵母、分裂酵母)	B	Ro09-0198ペプチド	119
ジアシルグリセロール	細胞先端部	A	PKCβII C1ドメイン	120
ホスファチジン酸	細胞非接触部	A	DOCK2 C末端部	121
PI(3,4)P ₂	細胞先端部	A	TAPP1 PHドメイン	120
	細胞膜ラフリング	C	TAPP1 PHドメイン	73
PI(4,5)P ₂	花粉管先端部 (タバコ)	A	PLCδ1 PHドメイン	122
	マクロファージ phagocytic cup	A	PLCδ1 PHドメイン	56
	ラメリポディア	E	PLCδ1 PHドメイン	80
	細胞膜ラフリング	A	PLCδ1 PHドメイン	123
	分裂溝	D	PLCδ1 PHドメイン	104
	syntaxin クラスタ	C*	抗体	102
		C*	抗体, PLCδ1 PHドメイン	31
	細胞先端部	A	PLCδ1 PHドメイン	124
	N-cadherin 接着部	A	PLCδ1 PHドメイン	125
	カベオラ	G	PLCδ1 PHドメイン	94
	T細胞免疫シナプス	A	PLCδ1 PHドメイン	126
	シュムー (出芽酵母)	A	PLCδ1 PHドメイン	127
	芽 (出芽酵母)	A	PLCδ1 PHドメイン	22
	細胞膜ドメイン	D	PLCδ1 PHドメイン	114
	菌糸 (カンジダ)	A	PLCδ1 PHドメイン	128
PI(3,4,5)P ₃	マクロピノソーム形成部位	A	AKT/Btk PHドメイン	123
	細胞先端部	A	GRP1 PHドメイン	120
	シナプス (ショウジョウバエ)	A	GRP1 PHドメイン	129
PI(3,4)P ₂ /PI(3,4,5)P ₂	細胞先端部	A	AKT PHドメイン	130
	細胞接触部など	A	AKT PHドメイン	131
	マクロファージ phagocytic cup	A	AKT PHドメイン	132
コレステロール	フィロポディア	E	Perfringolysin O	82
	分裂溝	C	フィリピン	112
エルゴステロール	シュムー (出芽酵母)	B	フィリピン	127

これまでに膜脂質の不均一分布を報告した代表的な例について、その部位、観察方法、用いられたプローブをまとめた。観察方法は生細胞に GFP と融合させた脂質結合タンパク質を発現させてみる方法 (A)、生細胞に脂質結合プローブを作用させる方法 (B)、固定細胞に脂質結合プローブを作用させる方法 (C)、脂質結合タンパク質の分布を固定後にみる方法 (D)、凍結超薄切片標識法 (E)、樹脂包埋切片法 (F)、QF-FRL 法 (G) に分類した。アスタリスクは membrane lawn を用いた方法を表している。

合成酵素の局在が原因となる脂質の不均一分布は、かなり広い領域にわたってみられるものに限られる。化学遊走する細胞の先端に合成酵素 PI3 キナーゼ、後端に分解酵素 PTEN が位置することによって生じると考えられる PI(3,4,5)P₃ の分布密度勾配がその代表例である^{4,5)}。

これに対して出芽酵母の芽 (bud) やマクロファージの phagocytic cup など、数 μm 以下の大きさの領域でみられる膜脂質の不均一分布には、膜脂質の拡散を抑制する何ら

かのメカニズムの存在が必須であると考えられる。ここでは 1) 脂質ラフト、2) フェンス、3) 静電的相互作用、4) 微小コンパートメントの四つの可能性を取り上げ³⁾、詳しくみてゆくことにする。

1) 脂質ラフト

生体内のグリセロリン脂質の多くが不飽和脂肪酸鎖を持つものに対し、スフィンゴ脂質の大半は飽和炭化水素鎖を持

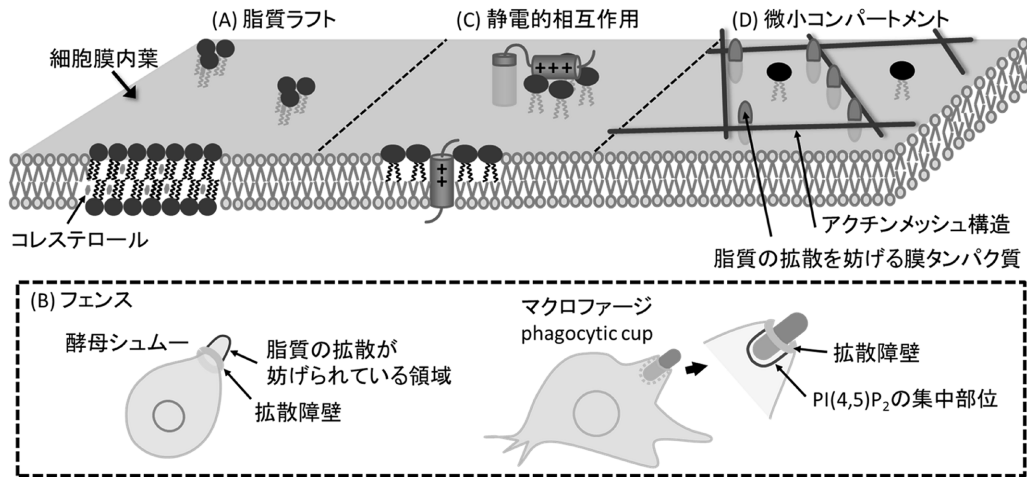


図1 脂質集合をもたらすメカニズム

- (A) 脂質ラフト：飽和炭化水素鎖に富むスフィンゴ脂質とコレステロールが形成する秩序液体相を基盤とする集合体。
- (B) フェンス：膜領域の周囲にあるリング状の細胞骨格構造が障壁となり、脂質の拡散を妨げる。
- (C) 静電的相互作用：塩基性タンパク質がPI(4,5)P₂など強い負電荷を持つ脂質と相互作用することにより局所からの拡散を妨げる。
- (D) 微小コンパートメント：膜直下のアクチンメッシュ構造に係留された膜貫通タンパク質が杭のように並び、数十nmサイズの微小コンパートメントを形成して、脂質の拡散を妨げる。

つ、スフィンゴ脂質とグリセロリン脂質からなる人工膜では、前者の相転移温度 (T_m) が高いため、常温で両者の間に相分離が観察され、飽和炭化水素鎖のみを持つスフィンゴ脂質はゲル相の硬い構造をとる。一方、これら両者に加えてコレステロールが存在する場合には、スフィンゴ脂質とコレステロールは液体秩序相 (liquid-ordered phase: l_o) を形成する。 l_o はゲル相と違って流動性を持つが、主にグリセロリン脂質で作られる液体非秩序相 (liquid-disordered phase: l_d) とは分離して別のドメインを形成する。細胞膜 (形質膜) は30~40 mol%のコレステロールを含有する⁶⁾ ことから、人工膜と同様の現象が起こるとする議論がなされ、液体秩序相に相当するドメインは脂質ラフトと名づけられた⁷⁾。脂質ラフトにはraft-philicな (ラフト親和性を持つ) タンパク質が集合し、ラフトはそれらのタンパク質が効率的に相互作用する場として機能すると推測されてきた。

人工膜では μm レベルを超える大きさの液体非秩序相の脂質ドメインが形成されることが観察されている⁸⁾。しかし生体膜で同様のドメインが存在するの否か、またもし存在するとしたらその大きさや寿命はどれぐらいかという点について意見が分かれてきた⁹⁾。このような疑問は生体膜が人工膜と異なる多くの性質を持つことに由来する。たとえば、細胞膜では人工膜と異なり、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスによって膜成分に絶え間ない流入があるために平衡状態に達することがない¹⁰⁾。また生体膜には多種多様な膜タンパク質が高密度に存在している¹¹⁾。さらに細胞膜ではスフィンゴ脂質は外葉に限局して存在するのに対し、コレステロールに関しては内外葉のどちらにどれだけ分布しているかについて確定的なデータはまだない¹²⁾。むしろ種々の方法を用いてコレステロールが内葉に

多いとする結果が多数報告されており^{13,14)}、ラフト仮説が想定するスフィンゴ脂質とコレステロールによるドメイン形成と整合しない。

また精製されたラフト標品と解釈されがちな界面活性剤不溶性画分 (detergent-resistant membrane: DRM) には、スフィンゴ脂質やコレステロール、さらにraft-philicなタンパク質が濃縮されるが、形態的には直径 $1\mu\text{m}$ 以上に達する膜小胞が含まれる¹⁵⁾。この膜構造は、界面活性剤によって膜分子分布が人工的に再編成されたり¹⁶⁾、不溶性画分どうしが融合した¹⁷⁾結果として人工的に形成されたものと考えられる。つまりDRMはraft-philicな分子の集合体ではあるが、生体膜にある膜領域をそのまま精製したものとは考えにくい。

その他のさまざまな実験結果をもとにして、現在の多くの研究者の理解は、ラフトが存在するとしてもその大きさは高々直径20~100 nm以下で寿命はミリ秒オーダー、何らかの刺激を受けた場合にのみ、やや大きく寿命の長いラフトが形成されるというものである (図1A)^{18,19)}。しかし上皮細胞の頂部細胞膜のようにスフィンゴ脂質とコレステロールが占める割合が非常に大きい膜では、ラフトがより大きく安定した領域を作る可能性が指摘されている²⁰⁾。性フェロモンで刺激された出芽酵母の細胞膜に形成されるシュムー (shmoo) と呼ばれる突起には、周囲の細胞膜よりも高密度のPI(4,5)P₂が存在することが知られているが、ここには同時にエルゴステロールの集中が観察されており、安定化した大きなラフトが存在しうる²¹⁾。

2) フェンス

ここでいうフェンスとは μm サイズの領域の周囲を遮る構造であり、それが二次元方向の脂質の拡散を妨げると考

える (図 1B)。たとえば、上述したシユームの基部には細胞骨格タンパク質であるセプチン (septin) が重合して作られるリング状構造がある²²⁾。マクロファージの貪食部位に形成される phagocytic cup³⁾、哺乳類細胞の分裂溝²³⁾など、PI(4,5)P₂が高密度に存在することが知られているほかの部位でもセプチン構造が周囲に存在する。セプチンはPI(4,5)P₂と結合する^{24,25)}ことによって膜に密着し、拡散障壁となると想定されている。

一方、phagocytic cupの周囲ではアクチンも高密度に存在し、アクチン結合タンパク質とともに形成する構造がフェンスとなりうる分布を示す。しかし、アクチンと膜の距離を0.5 nmと仮定してもPI(4,5)P₂の拡散速度は高々20%しか低下しないとする模擬実験の結果が報告されており、アクチン骨格がフェンスとして機能する可能性は低い³⁾。

3) 静電的相互作用

脂質とタンパク質の間の静電的相互作用 (図 1C) によって、脂質の拡散速度が低下すると考える仮説である。たとえば myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS)²⁶⁾ は、塩基性アミノ酸のクラスター領域を持ち、負に荷電した膜分子と結合することができる。PI(4,5)P₂の頭部は中性条件では4個の負電荷を有するため²⁶⁾、MARCKSとの静電的な相互作用で集合し、1,000倍程度に濃縮されると予測される^{27,28)}。MARCKSは細胞内に1~10 μMという高い濃度で存在し、1コピーあたり2~4分子のPI(4,5)P₂を結合するため²⁷⁾、かなりの割合のPI(4,5)P₂と結合できると考えられる。MARCKSと同様に正電荷のクラスター領域を持ち、静電的な相互作用でPI(4,5)P₂に結合する分子としてはほかに growth-associated protein 43 (GAP43)、CAP23、syntaxin 1A^{29~31)}などが知られている。MARCKS、GAP43、CAP23はアシル化修飾を受けて脂質ラフトに局在化することが指摘されており³⁰⁾、PI(4,5)P₂の集合と脂質ラフトを結びつける役割をしているのかもしれない。

4) 微小コンパートメント

楠見らは、マイクロ秒レベルの超高速一分子イメージング法による結果をもとに、細胞膜を裏打ちするアクチンの網目に沿って膜タンパク質が並んで一辺の長さ数十 nm 程度の微小コンパートメントを形成し、脂質の側方拡散を妨げるとする「ピケ (picket)」モデルを提唱した (図 1D)³²⁾。各コンパートメントの内部での脂質の拡散は速いが、コンパートメントの境界を越えるような拡散は遅い。通常の顕微鏡を用いた観察では、ミリ秒レベルの時間分解能と200 nm程度の空間分解能しかないため、微小コンパートメント内の動きを捉えることはできず、拡散は遅くみえることになる。

ディープエッチング電子顕微鏡で観察されるアクチンの網目の大きさは一分子イメージング法で予測される微小コンパートメントのサイズとよく相関する³³⁾。膜タンパク質

の場合はアクチンが直接、物理的な障壁となって隣接するコンパートメントへの拡散を妨げるのに対し³⁴⁾、膜脂質の場合はアクチンに沿って並ぶ膜貫通タンパク質間の細い間隙を通過する際に生じる流体力学的な摩擦が拡散を抑制する。ただし膜脂質の種類によって拡散抑制の程度がどの程度異なるかは明らかでないため、PI(4,5)P₂に特異的な現象を説明できるかどうかは不明である。

上記四つのメカニズムのほか、PI(4,5)P₂に関しては、親水性頭部どうしの水素結合³⁵⁾、カルシウムなど2価陽イオンで誘導されるクラスター形成³⁶⁾などがモデル実験で示されており、不均一分布形成に寄与している可能性がある。

3. 膜脂質の分布をみる方法

ここでは膜脂質の分布を可視化するための手法を概観する。生きた細胞を直接観察する方法と固定処理後に観察する方法に大別して述べる。

1) 生きた細胞を用いる方法

この方法のメリットはライブイメージングで時間軸に沿った脂質動態を追跡できることにある。また観察に光学顕微鏡を用いるため、形態学を専門としない研究者にも取り組む敷居が低い。最近のさまざまな超解像度顕微鏡法と組み合わせることにより、大幅な解像度の改善も期待できる。

一方、生きた細胞をみる場合には、顕微鏡観察のために行う処理が分子の挙動を変化させている可能性を常に考慮する必要がある。この点はタンパク質をみる場合でも同じだが、分子サイズがはるかに小さい脂質では標識のための修飾が分子の性質に大きな変化をもたらすことが多い。

ここでは標識に付随して生じる問題について批判的に検証することに主眼をおき、個々の顕微鏡法については優れた総説^{37,38)}が多く発表されているため詳述を避ける。

a. 脂質アナログを用いる方法

nitrobenzoxadiazole (NBD) や boron-dipyrromethene (BODIPY) などの蛍光団がついた脂質を細胞に取り込ませ、その挙動を観察する方法が用いられてきた。リン脂質の頭部または尾部に蛍光団が導入されたものがあり、また蛍光修飾された脂肪酸を前駆体として細胞に取り込ませてリン脂質を標識する方法も用いられる。コレステロールについても蛍光団を結合させた分子 (NBD-cholesterol など) が用いられている。

NBD、BODIPYの分子量はそれぞれ160、190、これに対してたとえばホスファチジルコリン (脂肪酸鎖16:0、18:1)、コレステロールの分子量はそれぞれ760、390であり、相対的な分子量の比だけを見ればGFP融合タンパク質、たとえばGFP (分子量約27,000)・アクチン (分子量約45,000) 間の比と大差はない。しかし、NBD、

BODIPY を脂肪酸鎖に導入すると、膜内分布、フリップ・フロップ、細胞内輸送などに影響を与えることが知られている^{39,40)}。これは、本来親水性のNBD（および程度は軽いBODIPY）が膜外に突き出るような立体配座を示し、内在性脂質とは大きく異なる構造をとるために生じたものと考えられる^{41,42)}。一方、蛍光標識を脂質の頭部に導入した場合にはタンパク質との相互作用などに影響が出る可能性が推測される。標識した脂質を用いた細胞内動態の追跡や拡散係数などの物理化学的パラメータの測定結果の解釈には注意が必要である。

リン脂質よりもさらに小さいコレステロールの場合、わずかな分子構造の違いが液体秩序相の形成などに重大な影響をもたらすと推測される。このためNBD-cholesterolなど分子の外側に蛍光団を結合させたものよりも、全体としての分子構造がコレステロールとほぼ同じで、しかも蛍光を発するデヒドロエルゴステロール (dehydroergosterol) の方が内在性コレステロールの性質をより正確に反映すると考えられている⁴³⁾。

分子改変を最小限に抑える工夫として、蛍光団に比べて小さく、不活性な官能基であるアルキンやアジドを導入し

た化合物を用い、細胞に取り込ませたあとにクリック反応で蛍光団を結合させる方法が報告されている。たとえばプロパルギル基 (propargyl: $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$) を持つコリンアナログ化合物 (propargylcholine) を使うと、ホスファチジルコリン、スフィンゴミエリンの頭部にプロパルギル基が付加された分子が細胞内で作られ、アジド基を持つ蛍光物質を結合させることによって可視化することができる⁴⁴⁾。この場合にも蛍光物質結合後の脂質の性質は内在性のものとは異なる可能性があり、またクリック反応液に含まれる1価の銅イオンなどの影響にも注意する必要がある。しかしこのようなケミカルバイオロジー的なアプローチは今後重要になってくるものと予想される。

b. GFPと融合させた脂質結合タンパク質を発現させてみる方法

この方法では脂質そのものを標識するのではなく、脂質に特異的に結合するタンパク質ドメインとGFPの融合タンパク質（以下、GFPプローブと略称）を細胞に発現させ、間接的に標的脂質の分布を可視化する（図2A）。GFPプローブの代表例を表にまとめた（表2）。これらは脂質分

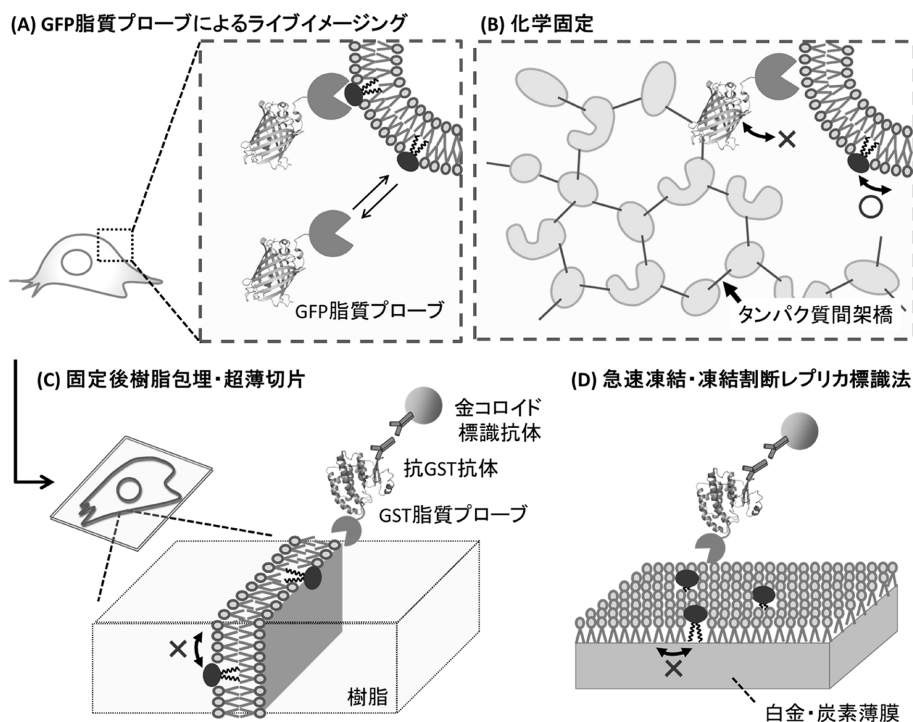


図2 脂質の可視化手法の比較

- GFP脂質プローブによるライブイメージング法. GFP脂質プローブの生細胞での局在を蛍光顕微鏡観察する。
- 通常の化学固定による方法. 脂質は化学固定されないため、標識の過程で局在を変える可能性がある。これに対し、タンパク質である脂質プローブは周囲のタンパク質と架橋されてその場にとどまると考えられる。
- 樹脂包埋切片標識法. 急速凍結した試料を凍結置換し、低温で樹脂包埋することにより、脂質局在は比較的よく保たれると考えられる。しかし脂質プローブは、樹脂切片の表面に露出した一部の脂質としか反応できない。
- 凍結割断レプリカ標識法. 急速凍結した試料の凍結割断レプリカを作製すると、膜脂質は白金・炭素薄膜により物理的に固定され、その場にとどまる。膜の広い平面が露出されるためプローブとの反応効率が高い。

表2 脂質プローブ

膜脂質	プローブ	用法と代表的な文献
ガングリオシド GM1	コレラ毒素Bサブユニット	B (133); C (134); G (93)
スフィンゴミエリン	Lysenin Equinatoxin-II	B, C (135, 136) C (137)
ホスファチジルセリン	アネキシンV Lactadherin C2ドメイン Evectin-2 PHドメイン	B (60) A, D (138); F (88) D (139)
ホスファチジルエタノールアミン	Ro09-0198	B (118, 140)
ジアシルグリセロール	PKC C1ドメイン	A (141, 142)
ホスファチジン酸	Raf1 PA結合ドメイン Spo20 PA結合ドメイン Sos PHドメイン DOCK2 C末端部	D (143) A, D (144) D (145) A (121)
PI(3)P	EEA1 FYVEドメイン Hrs FYVEドメイン FENS-1 FYVEドメイン p40phox PXドメイン	A (146) C, D, E (147) D (148) A, D (149, 150)
PI(4)P	OSBP PHドメイン FAPP1 PHドメイン	A, D (151, 152) A, D (153, 154)
PI(5)P	ING2 PHドメイン	A, D (155)
PI(3,4)P ₂	TAPP1 PHドメイン	A, D (156, 120); E (81)
PI(4,5)P ₂	PLCδ1 PHドメイン Tubby C末端部	A (45, 46); E (80); G (94) A, D (157, 50)
PI(3,5)P ₂	TRPML1 N末端部	A, D (158)
PI(3,4,5)P ₃	GRP1 PHドメイン ARNO PHドメイン Btk PHドメイン	A (159, 54) A (160) A (161)
PI(3,4)P ₂ /PI(3,4,5)P ₃	AKT PHドメイン PDK1 PHドメイン	A (130) D (162)
コレステロール	フィリピン Perfringolysin O	B, C (75) B, C, E (82, 163)
エルゴステロール	フィリピン	B (21)

膜脂質の可視化に使われたプローブをまとめた。観察方法は表1と同様に七つに分類した。

布の時間的変化を追究するためには優れた手法であり、特にPI(4,5)P₂の分布解析ではホスホリパーゼCδ1(PLCδ1)のPHドメインにGFPタグをつけたプローブ(GFP-PLCδ1-PH)を用いる方法が広く利用されている^{45,46)}。

GFPプローブを用いる方法の問題点は繰り返し指摘されてきた。たとえばGFP-PLCδ1-PHの場合、内在性のエフェクター分子が結合した状態のPI(4,5)P₂を検出することはできないと考えられる。またGFP-PLCδ1-PHはPI(4,5)P₂から産生されるイノシトール1,4,5-三リン酸[Ins(1,4,5)P₃]に影響を受ける。すなわちGFP-PLCδ1-PHとPI(4,5)P₂の結合定数が2 μM程度であるのに対し、GFP-PLCδ1-PHとIns(1,4,5)P₃の結合定数は0.1 μMである⁴⁷⁾。このため受容体刺激を受けた細胞でみられるGFP-PLCδ1-PHの分布変化が正確にPI(4,5)P₂動態を反映しているのか否かについては議論がある^{48,49)}。Ins(1,4,5)P₃の干渉を回避するために、Ins(1,4,5)P₃との親和性が低いTubby⁵⁰⁾や、膜上でのみ強い蛍光を発する改変ENTHドメイン⁵¹⁾を用いたプローブも考案されている。

また蛍光顕微鏡で観察されるGFPプローブの蛍光強度は焦点平面内に含まれる膜の面積に左右されるため、たとえ対象脂質の膜内分布密度が一定であっても、rufflingな

ど膜が重畳する部位では周囲の領域よりも蛍光強度は強くなる⁵²⁾。このため超微構造が明らかでない領域に蛍光標識の集中がみられた場合には、見かけ上の集中ではないことを示す対照実験が必要である⁵³⁾。対象脂質と結合した場合だけにFörster resonance energy transfer (FRET)が生じるように設計されたプローブでは、FRET強度とプローブの総量との比率をみることで、対象脂質の分布密度を推計することが可能になる⁵⁴⁾。

さらにGFPプローブを細胞に発現させることによってさまざまな人工産物が生じる可能性がある。まずプローブが標的脂質そのものの量や分布に影響を与える恐れがある。この可能性は数理シミュレーションを用いた理論的考察でも確かめられており⁴⁹⁾、GFPプローブではないが、PI(4,5)P₂と結合するMARCKSを過剰発現した細胞においてPI(4,5)P₂の増加が報告されている³⁰⁾。またプローブが標的脂質とエフェクター分子の結合に対してドミナントネガティブな効果を示した事例が多く報告されている。たとえば高レベルに発現したGFP-PLCδ1-PHは、PI(4,5)P₂の加水分解反応に競合的に作用すること⁴⁶⁾、細胞膜と細胞骨格の相互作用を減弱させること⁵⁵⁾、ファゴサイトーシスやトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスを阻害す

ること^{53,56}が示されている。特に Botelho らの報告では、1細胞あたりの GFP-PLC δ 1-PH 発現量を 25 μ M と見積もっているが、この値は PI(4,5)P₂ 濃度 (約 1~10 μ M²⁸) よりもかなり高く、GFP-PLC δ 1-PH の解離定数 (2 μ M) を当てはめれば、約 90% の PI(4,5)P₂ がプローブによってマスクされていると推測される。前述の数値シミュレーションを活用した解析では、GFP-PLC δ 1-PH の発現量を 6 μ M 程度とした場合でも、PI(4,5)P₂ および InsP(1,4,5)₃ の量的変化に対して緩衝作用を発揮した⁴⁹。さらに過剰発現によるドミナントネガティブな効果は対象となる脂質がマスクされることによってだけでなく、脂質結合ドメイン自体が特定のタンパク質と相互作用して生じた可能性も指摘されている⁵⁷。このようなプローブ発現による影響を最小限にするために細胞内の GFP プローブ濃度を可能な限り抑えることが推奨されるが⁵⁸、実際にどこまで濃度を下げれば問題が起こらなくなるかを知ることは難しい。

なお脂質に対するプローブの結合特異性を検証するための方法にはスポットアレイ法(ドットプロット)やリボソーム共沈アッセイ、FRET や BIACORE を利用する方法などがあるが、手法によってしばしば結果が異なることが知られている⁵⁹。最も簡便で頻用されているスポットアレイ法の結果が、細胞に導入した蛍光脂質プローブの結合特異性と一致しないこともある。このような方法による不一致は、タンパク質に関して、ウェスタンブロッティングでは特異的な反応を示す抗体が蛍光抗体標識では非特異的な結合を示すという事例と似た現象といえるかもしれない。できる限り実際に解析を行う方法を用いて、プローブの特異性を検証することが求められる。

c. 脂質結合プローブを作用させる方法

細胞表面に露出した脂質については、生細胞に脂質結合プローブを作用させて標識することができる。アポトーシスの際に細胞膜外葉に現れるホスファチジルセリンを可視化する際に使われるアネキシン V⁶⁰が代表例であるが、このほかガングリオシド GM1 を認識するコレラ毒素 B サブユニット⁶¹やホスファチジルエタノールアミンと結合する Ro09-0198 ペプチド (cinnamycin)⁶²などがある。あらかじめ蛍光物質を結合させたプローブで直接可視化する場合、生細胞にプローブだけを作用させておき、固定後に蛍光標識する場合がある。いずれの場合も膜脂質にプローブが結合することによって分布が変化する可能性が高く、膜脂質の本来の分布を反映しない恐れがある。

2) 固定細胞を用いる方法

a. 脂質の固定

固定した細胞を用いる方法では、同一細胞を時間軸に沿って解析することはできないが、電子顕微鏡や超解像度光学顕微鏡の高い空間分解能をフルに活用して、分子の分布と細胞の超微形態の関連を詳細に解析できる利点がある。その点では、一般的な光学顕微鏡の分解能の限界より

も小さい数十 nm サイズの脂質集合の解析に適した手法であるといえる。顕微鏡の能力を最大限に発揮させるためには、細胞構造を保持しつつ観察対象の分子を *in situ* の場にとどめるために何らかの固定処理を施す必要がある。本節では脂質の固定法について議論する。

タンパク質の免疫電子顕微鏡観察には通常ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなどアルデヒド系の固定剤が用いられるが、これらはタンパク質のチオール基やアミノ基と反応して分子間架橋を引き起こす。一方、アミノ基を持つホスファチジルセリンとホスファチジルエタノールアミンを除く大部分の脂質はアルデヒド系固定剤とは反応しない⁶³。実際、アルデヒド系固定剤の処理後も大半の脂質が側方拡散することや⁶⁴、化学固定の条件によって脂質が一様な分布を示したり、 μ m サイズのクラスターとしてみえたりすることが報告されている³⁰。極端なケースでは、アルデヒド固定した二つの試料切片間を脂質分子が移動したという例もある⁶⁵。また仮に脂質と反応する固定剤を用いたとしても、固定剤が組織・細胞内に浸透し反応するまでには少なくとも秒単位の時間がかかってしまう。これは前述のように側方拡散の速い脂質を相手にする上では十分に長い時間といえる。その他、化学固定が引き起こす人工産物についてはさまざまな報告がある⁶⁶。これらの理由から化学固定法で *in situ* の脂質局在を保存し、可視化できるとは考えにくい。

これに対して、凍結することにより物理的に脂質の動きを止めるという原理に基づくのが急速凍結法である。単に試料を凍らせたのでは、水が凍結する過程で生じる氷晶で細胞の微細構造が破壊されてしまうが、-10,000°C/s 以上の速さで冷却すれば氷晶形成のない凍結 (ガラス化) が起こる。このような急速凍結を実現する方法として、液体ヘリウムや液体窒素などで冷却した純銅ブロックに試料を圧着させるメタルコンタクト法、液体エタンや液体プロパンなど沸点と融点の温度差の大きい冷媒に直接浸漬する方法、冷媒を試料に勢いよく吹きつけるジェットフリージング法などが開発されてきたが、ガラス化が起こる領域は試料表面からせいぜい 10~40 μ m 程度にすぎず、厚みのある試料には適用できなかった⁶⁷。これに対して、試料を瞬間的に 2,100 bar の高圧条件におき、液体窒素を吹きつけて凍結する加圧凍結法では、0.2~0.6 mm の深さまで氷晶のない状態で凍結が起こる⁶⁸。この方法を用いることによって急速凍結法をさまざまな細胞や組織に応用することが可能になった。

急速凍結法では一瞬に分子の動きを止めることができるため、きわめて高い時間分解能が得られる。たとえばメタルコンタクト法ではサブミリ秒~ミリ秒の時間内に凍結が完了する⁶⁹ (J. Heuser, 私信)。これは細胞内のほとんどの現象の解析には十分速い。たとえば緩やかな温度降下の際にみられるリボソーム膜の相転移は、急速凍結の過程ではみられないことが確かめられている⁷⁰。

しかし膜脂質解析に関しては、急速凍結法の時間・空間

分解能は必ずしも十分とはいえない可能性がある。上述のように脂質の拡散係数は大きく、ミリ秒オーダーの時間でも大きな距離を移動しうる。たとえば GM1 分子の場合、モデル膜中での拡散係数は $0.47 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と報告されており⁷¹⁾、この数値は GM1 が 0.1 ミリ秒の間に 13.7 nm 動くことを意味する。これは直径 $20\sim 100 \text{ nm}$ 以下と推測される脂質ラフトとの関係を問題にする場合には十分に大きな数値である（ただし低温条件下では拡散係数が小さくなるため、実際の移動可能距離は上の値より小さい）。

また急速凍結法のほかの問題点として、凍結時の物理的ストレスがある。メタルコンタクト法では銅ブロックへの圧着方向に強い力がかかり、加圧凍結では瞬間的に試料全体に非常に高い圧力が負荷される。いずれの場合も瞬時に試料が凍結されるため重大な構造変化は起こらないと考えられているが、潜在的には人工産物の原因になりうる。たとえば加圧凍結法では加圧と凍結が正しく同期して起こることが必須であり、両者のタイミングがずれると構造変化の可能性が高まる。このように急速凍結法にも固有の問題があるが、膜脂質をその場で固定するという点に関しては、化学固定にない利点があるといえる。

b. 固定後の細胞の脂質分布をみる方法

①固定細胞に脂質結合プローブを作用させる方法

細胞固定後に脂質に対する抗体や脂質結合ドメインを反応させ、蛍光顕微鏡観察する方法が用いられることが多い^{66, 72~74)}。細胞内の脂質を標識するためには、脂質プローブが透過できるように細胞膜を処理する必要がある。Triton X-100 などの界面活性剤は膜脂質の大部分を可溶化して膜構造を破壊してしまうため、ジギトニンやサポニン、タンパク質性の溶血毒素であるストレプトリジン O などコレステロールに結合して膜に孔を開ける試薬を用いるのが一般的である。これらの試薬を作用させると、コレステロールに富む細胞膜や初期エンドソーム膜などは透過性となるが、小胞体などコレステロール含量の低い膜は無傷のまま残るため、細胞の微細構造は比較的良好に保たれる。一方、小胞体などの管腔内にはプローブが到達できないため、管腔側膜葉の標識は行えない。化学処理以外の方法として、凍結融解で膜に孔を開ける方法、基質接着細胞の上半分を超音波処理によって破碎し、基質接着部の細胞膜だけを残したサンプル (membrane lawn と呼ばれる) を用いる方法もある。

ステロールと特異的に結合するフィリピンは膜を透過するので、細胞内膜系も標識される。フィリピンは蛍光を発するだけでなく⁷⁵⁾、膜を特有の形状に変形させるため、電子顕微鏡でも結合部位を同定することが可能である⁷⁶⁾。しかしコーテッドピットなどのように裏打ちタンパク質が密に存在する部位では膜の変形が起こらず、ステロール密度を反映しないという問題がある⁷⁷⁾。

②脂質結合タンパク質の分布を固定後にみる方法

タグをつけた脂質結合ドメインを生細胞に発現させて脂質と結合させておき、細胞を固定した後にタグを標識し、脂質結合ドメインの分布を電子顕微鏡観察することができる。凍結超薄切片や樹脂包埋後の超薄切片を作製し、抗タグ抗体で標識し、金コロイドをマーカーとして観察する⁷⁸⁾。

タンパク質である脂質プローブは化学固定で保持されるので、脂質自体を切片上でラベルする場合に比べて分布が変化する心配が少ない (図 2B)。しかし脂質結合ドメインの発現に伴う問題点は GFP プローブについて述べたとおりであり、対象となる脂質の分布を正しく反映しているとは限らない。

③凍結超薄切片法

凍結した試料を極低温下で薄切し、脂質結合ドメインや抗体などで標識する手法である。氷晶の形成を防ぐため、化学固定後の試料を高濃度のショ糖溶液に浸漬してから液体窒素で凍結する方法 (徳安法) が一般的であるが、無固定で急速凍結した試料の凍結超薄切片を用いる方法もある⁷⁹⁾。PI(3)P⁷²⁾、PI(4,5)P₂⁸⁰⁾、PI(3,4)P₂⁸¹⁾などが凍結超薄切片法で解析されており、特に PI(4,5)P₂ についてはラメリポディア様の構造に豊富に存在することが示されている⁸⁰⁾。

凍結超薄切片法では、後述する樹脂包埋法と比較してプローブとの反応性が維持されやすいメリットがある。一方、凍結切片が解凍される際には、切片表面で膜の疎水性断面が水相に露出されるため、分子の再構成が生じて脂質局在が変化する可能性が指摘されている。実際、コレステロールは膜から脱落し、切片全体に拡散する⁸²⁾。このような切片解凍後の脂質分布変化は、リン脂質頭部のリン酸基と結合して膜脂質を固定する作用を持つ酢酸ウラン^{83, 84)}で防ぐことができる。たとえば凍結超薄切片を回収する溶液に酢酸ウランを添加しておく、解凍と同時にリン脂質との反応が起こり⁸⁵⁾、細胞膜のコレステロール標識が可能になる⁸²⁾。

さらに化学固定の段階で起こりうる人工産物の可能性を除外するため、急速凍結と凍結超薄切片を組み合わせた方法も考案された。急速凍結した試料を酢酸ウランを含むアセトン中で凍結置換し、その後に凍結超薄切片を作製し標識する方法 (RHM 法)⁸⁶⁾、および急速凍結した試料の凍結超薄切片を凍結状態で電子顕微鏡用グリッドに付着させ、酢酸ウランあるいは酢酸ウラン・四酸化オスミウム混合液で固定する方法 (VIS2FIX_{ES} 法および VIS2FIX_H 法)⁸⁷⁾である。実際に膜脂質に応用した例は少ないが、VIS2FIX_{ES} 法、VIS2FIX_H 法による糖脂質 (フォルスマン抗原) の標識結果が報告されている⁸⁷⁾。

④急速凍結・凍結置換・低温樹脂包埋切片を用いる方法

試料を急速凍結したあと、極低温で試料内の水分をアセ

トンなどの有機溶媒、次いで樹脂に置換する方法である。有機溶媒に酢酸ウランを添加しておくことでリン脂質の保持能を高める。また低温下の紫外線照射で重合する Lowicryl HM20 などの樹脂を用いることにより、脂質の拡散・溶出の少ない極低温の状態まで包埋までの過程を完結させる。その後、超薄切片を作製して脂質プローブで標識し、電子顕微鏡観察する (図 2C)。ホスファチジルセリン⁸⁸⁾の分布がこの方法で調べられている。

この手法では極低温で処理することにより、脂質の分布変化は抑制されていると期待され、また脂質と細胞内構造の関係が容易に観察できる点もメリットである。一方、問題点として標識効率の低さがあげられる。樹脂包埋切片では試料は樹脂に埋まった状態にあるため、高分子の抗体やプローブは切片表面に露出した分子としか反応することができない⁸⁹⁾。膜の二次元的平面と直交する向きの切片では、標識可能なのは切片表面近くのごくわずかの膜脂質分子だけになる。リン脂質頭部の直径は 1 nm 程度なので⁹⁰⁾、抗体やプローブの立体障害により標識効率は非常に低くなるざるをえない。

また生体膜の厚みは約 5 nm であるが、標識プローブと金コロイド (5 nm 径) 標識抗体の合計サイズは 16 nm 程度あり、内葉・外葉のどちらに対象脂質があるかを見分けることは容易ではない。さらに切片法では膜は一次元的な線として観察されるため、二次元的な分布を定量的に評価することが困難である。

⑤急速凍結・凍結切断レプリカ標識法 (QF-FRL 法)

細胞や組織試料を急速凍結した後、凍結状態のまま真空中の低温ステージに移して -100°C 以下の極低温で切断する。このとき切断は脂質二重層の間の疎水性界面に沿って起こる⁹¹⁾。凍結切断で露出した面に白金と炭素を真空蒸着すると、白金と炭素の微粒子は、切断面に面した膜タンパク質や脂質の脂肪酸鎖などに付着して連続した 1 枚の薄膜 (レプリカ) を作る。これにより膜分子は物理的にトラップされる。この状態の試料を常温・常圧下に取り出し、SDS 溶液で処理すると、白金・炭素で物理的に固定されていない生体成分 (主に膜外の成分) は溶解除去される。レプリカにトラップされた膜分子は側方運動することがないので、安定な試料として取り扱うことができる。レプリカからの脂質の離脱はほとんどなく、脂質プローブと金コロイド標識抗体などを用いて標識を行い、電子顕微鏡観察することができる (図 2D)。これまでに QF-FRL 法で観察された膜脂質はホスファチジルコリン⁹²⁾、ガングリオシド GM1、GM3⁹³⁾、PI(4,5)P₂^{94,95)}、ホスファチジルグルコシド⁹⁶⁾などである。

凍結切断は膜平面に沿って起こるため、細胞膜では $100\ \mu\text{m}^2$ 以上の広い範囲を二次元の平面として観察することができる⁹³⁾。また膜脂質頭部が試料表面に露出されているので、樹脂包埋法と比べてプローブのアクセスに障害が少ない。実際の適用例では、GM1 について 19~28%⁹³⁾、

PI(4,5)P₂ については約 30~50%⁹⁴⁾ という高い標識効率が得られている。また膜の内外葉を明確に区別して解析できる点もメリットである⁹²⁾。

標的分子の分布密度が高い場合には、プローブ間の立体障害のために標識密度に限界が生じる。金コロイドの粒子径は特に影響が大きく、5 nm 径と 10 nm 径の金コロイドの比較では前者の標識強度が約 2 倍になる。これ以外にも凍結切断法自体の問題として、細胞内の特定の部位を狙ってサンプルを得ることができないことや、突起や深い陥入構造など膜の曲率が急激に変化する部位を捉えにくいことなどがあげられる。

4. 脂質の不均一分布についての検証

ここではこれまでに不均一分布が報告されている GM1 と PI(4,5)P₂ を取り上げ、それぞれの分布をみるために使われている方法を吟味したい。

1) GM1

ガングリオシド GM1 は多くの細胞に発現するため、ラフトのマーカ分子として取り上げられることが多い。GM1 の大部分が細胞膜外葉にあり、何ら特別な処理なしにプローブを結合させることができる点もラフトマーカとして頻用される理由である。

GM1 をみるためのプローブとしてはコレラ毒素 B サブユニット (CTB) が最もよく使われる。CTB は 5 分子の GM1 の頭部に結合し、それによって結合親和性を増す。生細胞に CTB を作用させると、CTB は大きなクラスターを形成し、リンパ球などでは一極に集中するキャップを作る。またホルムアルデヒドだけで固定した細胞でも蛍光顕微鏡で観察可能な大きさのパッチ状分布が誘導される。これらはいずれも CTB が複数の GM1 を架橋したために生じた人工的な分布であり、本来の GM1 分布とはいえない。架橋による分布変化を防ぐために氷温で CTB を作用させることも行われるが、温度降下で引き起こされる膜の相転移が GM1 の分布に影響を与えるため、この方法も本来の分布をみるには不適當である⁹³⁾。

化学固定で GM1 の膜局在を安定化することは難しく⁶⁵⁾、我々は QF-FRL 法でみた GM1 分布が最も正しく内在性分布を反映していると考えている⁹³⁾。この方法による GM1 標識は、通常培養条件下の細胞では直径約 94 nm のクラスターを形成するが、細胞膜コレステロールが減少するとクラスター形成の程度は有意に減弱した。一方、GM3 もコレステロール濃度感受性のクラスターを形成するが、GM1 と共通のクラスターを形成する頻度は低く、アクチン依存性に相互に排除する傾向がみられた⁹⁷⁾。これらの結果は GM1、GM3 の分布が脂質の性質だけでなく、アクチンなどのタンパク質にも影響を受けている可能性を強く示唆している。

2) PI(4,5)P₂

PI(4,5)P₂は主に細胞膜内葉に存在する。イノシトールリン脂質の中では最も存在量が多く、エンドサイトーシスなどの膜動態や、細胞膜とアクチン骨格の相互作用制御、イオンチャネルやトランスポーターなどの活性制御など多種多様な現象に影響を与える。このためPI(4,5)P₂の詳細な分布を知ることは機能的意義を解明する上で非常に重要である^{26,98)}。

PI(4,5)P₂はDRMに濃縮されるため、ラフト構成成分の一つという考えが提唱された⁹⁹⁾。極性分化した上皮細胞において、側・基底部細胞膜より頂部細胞膜に密に存在するという結果¹⁰⁰⁾にはラフトとの親和性に関与している可能性がある。しかしPI(4,5)P₂は多価不飽和脂肪酸に富み¹⁰¹⁾、飽和炭化水素鎖に富む脂質とともにラフトを構成するとは考えにくい。実際、上皮細胞でも頂部細胞膜への集中がみられない場合がある⁹⁵⁾。また線維芽細胞の細胞膜では有意なクラスター形成はみられず、一方、カベオラ開口部には顕著に集中する⁹⁴⁾。以上のことから、PI(4,5)P₂がDRMに濃縮するという結果は液体秩序相の形成によるのではなく、カベオリンなどのタンパク質との結合によってもたらされたと考えられる。

PC12細胞などのmembrane lawnを脂質プローブで標識すると、PI(4,5)P₂がラフトよりはるかに大きいμmサイズの集合として観察される^{31,102,103)}。この結果は正電荷を持つsyntaxinとPI(4,5)P₂の静電的相互作用によって共集合が形成されたためと解釈されているが、上記の方法が本来のPI(4,5)P₂分布を正しくみているかどうかについては議論の余地がある。すでに述べたとおりアルデヒド固定した試料でも膜脂質の側方拡散は起こりうるため、脂質プローブの結合が脂質の分布変化を誘導した可能性がある。人工産物の危険性は脂質プローブ結合後に固定操作を行う場合でも同様で、固定剤が脂質プローブどうしを架橋することによってさらに集合を大きくする恐れもある。MARCKSなどを発現させた細胞で抗PI(4,5)P₂による標識をみた場合、ホルムアルデヒド単独で固定した試料ではμmサイズの集合がみえるが、グルタルアルデヒド固定すると一様な分布が観察され³⁰⁾、固定条件が大きな影響を与えることが実証されている。グルタルアルデヒドはタンパク質に対する作用が強いため、膜タンパク質や膜骨格が強く架橋され、その結果、膜脂質についてもμmレベルの巨視的な分布変化は阻止される。しかし膜脂質自体が固定されているわけではないので、より小さなレベルで分布変化が生じている可能性は否定できない。

ライブイメージングでは、GFP-PLCδ1-PHがphagocytic cup、分裂溝などに高密度に分布する^{56,104)}。同じ部位にPI(4)Pをリン酸化してPI(4,5)P₂を産生するPIP5キナーゼ(PIP5K)が集中していること¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾、およびPI(4,5)P₂の拡散を抑制するフェンスを作ると想定されているセプチンが領域の周囲にリング状に存在すること^{23,107)}もPI(4,5)P₂の集中を支持する。ただしセプチン構造体のフェンス機能

についてはまだ実験的証拠はなく、塩基性タンパク質との静電的相互作用など、ほかの何らかの機構がPI(4,5)P₂の拡散抑制に関与している可能性は残る。

5. おわりに

膜脂質はタンパク質と高い親和性で結合して活性や局在の制御に関わるだけでなく、電荷、曲率など弱い親和性の結合の総体としてもタンパク質の機能調節に関与する¹⁰⁸⁾。このことは、タンパク質の機能がいつどこで発現し、どのように制御されているのかを理解するためには、膜脂質の分布をできるだけ微細なレベルで定量的に知ることが非常に重要であることを意味する。

本稿では主に膜脂質の二次元的分布をみるための方法について解説し、それぞれの方法の特徴や利点・欠点について述べた。膜脂質のための方法にはタンパク質とは異なる困難さがあるが、逆に本文中で紹介したケミカルバイオロジーの方法⁴⁴⁾のように、タンパク質よりも膜脂質に応用しやすいアプローチもある。長年にわたってタンパク質のために進化してきた方法の改良・改変だけでなく、膜脂質のための新たな可視化法が創出され、膜脂質の生理的役割についての理解が飛躍的に進むことに期待したい。

文 献

- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., & O'Shea, E.K. (2003) *Nature*, **425**, 686-691.
- Verkleij, A.J., Zwaal, R.F., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelij, D., & van Deenen, L.L. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 178-193.
- Golebiewska, U., Kay, J.G., Masters, T., Grinstein, S., Im, W., Pastor, R.W., Scarlata, S., & McLaughlin, S. (2011) *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3498-3507.
- Funamoto, S., Meili, R., Lee, S., Parry, L., & Firtel, R.A. (2002) *Cell*, **109**, 611-623.
- Swaney, K.F., Huang, C.H., & Devreotes, P.N. (2010) *Annu. Rev. Biophys.*, **39**, 265-289.
- van Meer, G. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **5**, 247-275.
- Simons, K. & Ikonen, E. (1997) *Nature*, **387**, 569-572.
- Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K., & Gratton, E. (2001) *Biophys. J.*, **80**, 1417-1428.
- Munro, S. (2003) *Cell*, **115**, 377-388.
- Turner, M.S., Sens, P., & Socci, N.D. (2005) *Phys. Rev. Lett.*, **95**, 168301.
- Engelman, D.M. (2005) *Nature*, **438**, 578-580.
- van Meer, G. (2011) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**.
- Mondal, M., Mesmin, B., Mukherjee, S., & Maxfield, F.R. (2009) *Mol. Biol. Cell*, **20**, 581-588.
- Schroeder, F., Nemezc, G., Wood, W.G., Joiner, C., Morrot, G., Ayrault-Jarrier, M., & Devaux, P.F. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 183-192.
- Brown, D.A. & Rose, J.K. (1992) *Cell*, **68**, 533-544.
- Heerklotz, H. (2002) *Biophys. J.*, **83**, 2693-2701.
- Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S., & Morris, R. (1999) *EMBO J.*, **18**, 6917-6926.
- Lingwood, D. & Simons, K. (2010) *Science*, **327**, 46-50.
- Simons, K. & Toomre, D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*,

- 1, 31–39.
- 20) Meder, D., Moreno, M.J., Verkade, P., Vaz, W.L., & Simons, K. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 329–334.
 - 21) Bagnat, M. & Simons, K. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14183–14188.
 - 22) Garrenton, L.S., Stefan, C.J., McMurray, M.A., Emr, S.D., & Thorne, J. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 11805–11810.
 - 23) Schmidt, K. & Nichols, B.J. (2004) *Curr. Biol.*, 14, 1002–1006.
 - 24) Casamayor, A. & Snyder, M. (2003) *Mol. Cell Biol.*, 23, 2762–2777.
 - 25) Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P.S., Grinstein, S., & Trimble, W.S. (1999) *Curr. Biol.*, 9, 1458–1467.
 - 26) McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., & Murray, D. (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 31, 151–175.
 - 27) Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G., Zaitseva, I., Cafiso, D. S., Wang, J., Murray, D., Pentylala, S.N., Smith, S.O., & McLaughlin, S. (2004) *Biophys. J.*, 86, 2188–2207.
 - 28) McLaughlin, S. & Murray, D. (2005) *Nature*, 438, 605–611.
 - 29) Lam, A.D., Tryoen-Toth, P., Tsai, B., Vitale, N., & Stuenkel, E.L. (2008) *Mol. Biol. Cell*, 19, 485–497.
 - 30) Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., & Caroni, P. (2000) *J. Cell Biol.*, 149, 1455–1472.
 - 31) van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Risselada, H.J., Amin, H., Willig, K.I., Hubrich, B.E., Dier, M., Hell, S.W., Grubmuller, H., Diederichsen, U., & Jahn, R. (2011) *Nature*, 479, 552–555.
 - 32) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K., & Kusumi, A. (2002) *J. Cell Biol.*, 157, 1071–1081.
 - 33) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., & Kusumi, A. (2006) *J. Cell Biol.*, 174, 851–862.
 - 34) Kusumi, A. & Sako, Y. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 566–574.
 - 35) Redfern, D.A. & Gericke, A. (2004) *Biophys. J.*, 86, 2980–2992.
 - 36) Ellenbroek, W.G., Wang, Y.H., Christian, D.A., Discher, D. E., Janmey, P.A., & Liu, A.J. (2011) *Biophys. J.*, 101, 2178–2184.
 - 37) Schermelleh, L., Heintzmann, R., & Leonhardt, H. (2010) *J. Cell Biol.*, 190, 165–175.
 - 38) Sengupta, P., Van Engelenburg, S., & Lippincott-Schwartz, J. (2012) *Dev. Cell*, 23, 1092–1102.
 - 39) Elvington, S.M., Bu, F., & Nichols, J.W. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 40957–40964.
 - 40) Wang, T.Y. & Silvius, J.R. (2000) *Biophys. J.*, 79, 1478–1489.
 - 41) Chattopadhyay, A. & London, E. (1987) *Biochemistry*, 26, 39–45.
 - 42) Kaiser, R.D. & London, E. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1375, 13–22.
 - 43) Mukherjee, S., Zha, X., Tabas, I., & Maxfield, F.R. (1998) *Biophys. J.*, 75, 1915–1925.
 - 44) Jao, C.Y., Roth, M., Welti, R., & Salic, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 15332–15337.
 - 45) Stauffer, T.P., Ahn, S., & Meyer, T. (1998) *Curr. Biol.*, 8, 343–346.
 - 46) Varnai, P. & Balla, T. (1998) *J. Cell Biol.*, 143, 501–510.
 - 47) Hirose, K., Kadowaki, S., Tanabe, M., Takeshima, H., & Iino, M. (1999) *Science*, 284, 1527–1530.
 - 48) Varnai, P. & Balla, T. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 957–967.
 - 49) Xu, C., Watras, J., & Loew, L.M. (2003) *J. Cell Biol.*, 161, 779–791.
 - 50) Quinn, K.V., Behe, P., & Tinker, A. (2008) *J. Physiol.*, 586, 2855–2871.
 - 51) Yoon, Y., Lee, P.J., Kurilova, S., & Cho, W. (2011) *Nat. Chem.*, 3, 868–874.
 - 52) van Rheenen, J. & Jalink, K. (2002) *Mol. Biol. Cell*, 13, 3257–3267.
 - 53) Huang, S., Lifshitz, L., Patki-Kamath, V., Tuft, R., Fogarty, K., & Czech, M.P. (2004) *Mol. Cell Biol.*, 24, 9102–9123.
 - 54) Sato, M., Ueda, Y., Takagi, T., & Umezawa, Y. (2003) *Nat. Cell Biol.*, 5, 1016–1022.
 - 55) Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M.P., & Meyer, T. (2000) *Cell*, 100, 221–228.
 - 56) Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., & Grinstein, S. (2000) *J. Cell Biol.*, 151, 1353–1368.
 - 57) Varnai, P., Bondeva, T., Tamas, P., Toth, B., Buday, L., Hunyady, L., & Balla, T. (2005) *J. Cell Sci.*, 118, 4879–4888.
 - 58) Balla, T. (2007) *J. Physiol.*, 582, 927–937.
 - 59) Narayan, K. & Lemmon, M.A. (2006) *Methods*, 39, 122–133.
 - 60) van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C.P. (1998) *Cytometry*, 31, 1–9.
 - 61) Fishman, P.H. (1982) *J. Membr. Biol.*, 69, 85–97.
 - 62) Aoki, Y., Uenaka, T., Aoki, J., Umeda, M., & Inoue, K. (1994) *J. Biochem.*, 116, 291–297.
 - 63) Hopwood, D. (1969) *Histochem. J.*, 1, 323–360.
 - 64) Tanaka, K.A., Suzuki, K.G., Shirai, Y.M., Shibutani, S.T., Miyahara, M.S., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T.K., & Kusumi, A. (2010) *Nat. Methods*, 7, 865–866.
 - 65) Heffer-Laue, M., Laue, G., Nimrichter, L., Fromholt, S.E., & Schnaar, R.L. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, 1686, 200–208.
 - 66) Hammond, G.R., Schiavo, G., & Irvine, R.F. (2009) *Biochem. J.*, 422, 23–35.
 - 67) Severs, N.J. & Shotton, D.M. (1995) *Rapid Freezing, Freeze Fracture, and Deep Etching*, Wiley-Liss, New Jersey.
 - 68) Dahl, R. & Staehelin, L.A. (1989) *J. Electron. Microsc. Tech.*, 13, 165–174.
 - 69) Heuser, J.E., Reese, T.S., Dennis, M.J., Jan, Y., Jan, L., & Evans, L. (1979) *J. Cell Biol.*, 81, 275–300.
 - 70) Luna, E.J. & McConnell, H.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 509, 462–473.
 - 71) Goins, B., Masserini, M., Barisas, B.G., & Freire, E. (1986) *Biophys. J.*, 49, 849–856.
 - 72) Gillooly, D.J., Raiborg, C., & Stenmark, H. (2003) *Histochem. Cell Biol.*, 120, 445–453.
 - 73) Irino, Y., Tokuda, E., Hasegawa, J., Itoh, T., & Takenawa, T. (2012) *J. Lipid Res.*, 53, 810–819.
 - 74) Yip, S.C., Eddy, R.J., Branch, A.M., Pang, H., Wu, H., Yan, Y., Drees, B.E., Neilsen, P.O., Condeelis, J., & Backer, J.M. (2008) *Biochem. J.*, 411, 441–448.
 - 75) Bittman, R. & Fischkoff, S.A. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 3795–3799.
 - 76) Elias, P.M., Friend, D.S., & Goerke, J. (1979) *J. Histochem. Cytochem.*, 27, 1247–1260.
 - 77) Steer, C.J., Bisher, M., Blumenthal, R., & Steven, A.C. (1984) *J. Cell Biol.*, 99, 315–319.
 - 78) van Rheenen, J., Achame, E.M., Janssen, H., Calafat, J., & Jalink, K. (2005) *EMBO J.*, 24, 1664–1673.
 - 79) Slot, J.W. & Geuze, H.J. (2007) *Nat. Protoc.*, 2, 2480–2491.
 - 80) Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P., & Lucocq, J.M. (2002) *Biochem. J.*, 363, 657–666.
 - 81) Watt, S.A., Kimber, W.A., Fleming, I.N., Leslie, N.R., Downes, C.P., & Lucocq, J.M. (2004) *Biochem. J.*, 377, 653–663.
 - 82) Mobius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E.G., Oorschot, V.M., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F., Geuze,

- H.J., & Slot, J.W. (2002) *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 43–55.
- 83) Ginsburg, H. & Wolosin, J.M. (1979) *Chem. Phys. Lipids*, **23**, 125–131.
- 84) Huang, T.H., Blume, A., Das Gupta, S.K., & Griffin, R.G. (1988) *Biophys. J.*, **54**, 173–179.
- 85) Liou, W., Geuze, H.J., & Slot, J.W. (1996) *Histochem. Cell Biol.*, **106**, 41–58.
- 86) van Donselaar, E., Posthuma, G., Zeuschner, D., Humbel, B. M., & Slot, J.W. (2007) *Traffic*, **8**, 471–485.
- 87) Karreman, M.A., van Donselaar, E.G., Gerritsen, H.C., Verrips, C.T., & Verkleij, A.J. (2011) *Traffic*, **12**, 806–814.
- 88) Fairn, G.D., Schieber, N.L., Ariotti, N., Murphy, S., Kuerschner, L., Webb, R.I., Grinstein, S., & Parton, R.G. (2011) *J. Cell Biol.*, **194**, 257–275.
- 89) Bendayan, M., Nanci, A., & Kan, F.W. (1987) *J. Histochem. Cytochem.*, **35**, 983–996.
- 90) Nagle, J.F. & Tristram-Nagle, S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1469**, 159–195.
- 91) Branton, D. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 1048–1056.
- 92) Fujimoto, K., Umeda, M., & Fujimoto, T. (1996) *J. Cell Sci.*, **109**, 2453–2460.
- 93) Fujita, A., Cheng, J., Hirakawa, M., Furukawa, K., Kusunoki, S., & Fujimoto, T. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2112–2122.
- 94) Fujita, A., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Takenawa, T., & Fujimoto, T. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 9256–9261.
- 95) Ozato-Sakurai, N., Fujita, A., & Fujimoto, T. (2011) *PLoS One*, **6**, e23567.
- 96) Murate, M., Hayakawa, T., Ishii, K., Inadome, H., Greimel, P., Watanabe, M., Nagatsuka, Y., Ito, K., Ito, Y., Takahashi, H., Hirabayashi, Y., & Kobayashi, T. (2010) *Biochemistry*, **49**, 4732–4739.
- 97) Fujita, A., Cheng, J., & Fujimoto, T. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 388–396.
- 98) Di Paolo, G. & De Camilli, P. (2006) *Nature*, **443**, 651–657.
- 99) Pike, L.J. & Casey, L. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 26453–26456.
- 100) Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V., & Mostov, K. (2007) *Cell*, **128**, 383–397.
- 101) Wenk, M.R., Lucast, L., Di Paolo, G., Romanelli, A.J., Suchy, S.F., Nussbaum, R.L., Cline, G.W., Shulman, G.I., McMurray, W., & De Camilli, P. (2003) *Nat. Biotechnol.*, **21**, 813–817.
- 102) Aoyagi, K., Sugaya, T., Umeda, M., Yamamoto, S., Terakawa, S., & Takahashi, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 17346–17352.
- 103) Milosevic, I., Sorensen, J.B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., Jahn, R., & Neher, E. (2005) *J. Neurosci.*, **25**, 2557–2565.
- 104) Emoto, K., Inadome, H., Kanaho, Y., Narumiya, S., & Umeda, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 37901–37907.
- 105) Doughman, R.L., Firestone, A.J., & Anderson, R.A. (2003) *J. Membr. Biol.*, **194**, 77–89.
- 106) Mao, Y.S., Yamaga, M., Zhu, X., Wei, Y., Sun, H.Q., Wang, J., Yun, M., Wang, Y., Di Paolo, G., Bennett, M., Mellman, I., Abrams, C.S., De Camilli, P., Lu, C.Y., & Yin, H.L. (2009) *J. Cell Biol.*, **184**, 281–296.
- 107) Huang, Y.W., Yan, M., Collins, R.F., Diccicco, J.E., Grinstein, S., & Trimble, W.S. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 1717–1726.
- 108) Bigay, J. & Antonny, B. (2012) *Dev. Cell*, **23**, 886–895.
- 109) Gomez-Mouton, C., Abad, J.L., Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S., & Martinez, A.C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9642–9647.
- 110) Kiyokawa, E., Baba, T., Otsuka, N., Makino, A., Ohno, S., & Kobayashi, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24072–24084.
- 111) Janich, P. & Corbeil, D. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 1783–1787.
- 112) Ng, M.M., Chang, F., & Burgess, D.R. (2005) *Dev. Cell*, **9**, 781–790.
- 113) Buttke, D.E., Nelson, J.L., Schlegel, P.N., Hunnicutt, G.R., & Travis, A.J. (2006) *Biol. Reprod.*, **74**, 889–895.
- 114) Abe, M., Makino, A., Hullin-Matsuda, F., Kamijo, K., Ohno-Iwashita, Y., Hanada, K., Mizuno, H., Miyawaki, A., & Kobayashi, T. (2012) *Mol. Cell Biol.*, **32**, 1396–1407.
- 115) Ikenouchi, J., Suzuki, M., Umeda, K., Ikeda, K., Taguchi, R., Kobayashi, T., Sato, S.B., Kobayashi, T., Stolz, D.B., & Umeda, M. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 9525–9533.
- 116) Yeung, T., Heit, B., Dubuisson, J.F., Fairn, G.D., Chiu, B., Inman, R., Kapus, A., Swanson, M., & Grinstein, S. (2009) *J. Cell Biol.*, **185**, 917–928.
- 117) Fairn, G.D., Hermansson, M., Somerharju, P., & Grinstein, S. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **13**, 1424–1430.
- 118) Emoto, K., Kobayashi, T., Yamaji, A., Aizawa, H., Yahara, I., Inoue, K., & Umeda, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12867–12872.
- 119) Iwamoto, K., Kobayashi, S., Fukuda, R., Umeda, M., Kobayashi, T., & Ohta, A. (2004) *Genes Cells*, **9**, 891–903.
- 120) Nishioka, T., Aoki, K., Hikake, K., Yoshizaki, H., Kiyokawa, E., & Matsuda, M. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4213–4223.
- 121) Nishioka, T., Frohman, M.A., Matsuda, M., & Kiyokawa, E. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 35979–35987.
- 122) Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolia, K., Carpenter, C., & Chua, N.H. (1999) *J. Cell Biol.*, **145**, 317–330.
- 123) Araki, N., Egami, Y., Watanabe, Y., & Hatae, T. (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 1496–1507.
- 124) Golub, T. & Caroni, P. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 151–165.
- 125) El Sayegh, T.Y., Arora, P.D., Ling, K., Laschinger, C., Janmey, P.A., Anderson, R.A., & McCulloch, C.A. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3026–3038.
- 126) Fooksman, D.R., Shaikh, S.R., Boyle, S., & Edidin, M. (2009) *J. Immunol.*, **182**, 5179–5182.
- 127) Jin, H., McCaffery, J.M., & Grote, E. (2008) *J. Cell Biol.*, **180**, 813–826.
- 128) Vernay, A., Schaub, S., Guillas, I., Bassilana, M., & Arkowitz, R.A. (2012) *J. Cell Biol.*, **198**, 711–730.
- 129) Khuong, T.M., Habets, R.L., Kuenen, S., Witkowska, A., Kasprovicz, J., Swerts, J., Jahn, R., van den Bogaart, G., & Verstreken, P. (2013) *Neuron*, **77**, 1097–1108.
- 130) Servant, G., Weiner, O.D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W., & Bourne, H.R. (2000) *Science*, **287**, 1037–1040.
- 131) Haugh, J.M., Codazzi, F., Teruel, M., & Meyer, T. (2000) *J. Cell Biol.*, **151**, 1269–1280.
- 132) Marshall, J.G., Booth, J.W., Stambolic, V., Mak, T., Balla, T., Schreiber, A.D., Meyer, T., & Grinstein, S. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 1369–1380.
- 133) Kenworthy, A.K., Petranova, N., & Edidin, M. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 1645–1655.
- 134) Wilson, B.S., Steinberg, S.L., Liederman, K., Pfeiffer, J.R., Surviladze, Z., Zhang, J., Samelson, L.E., Yang, L.H., Kotula, P.G., & Oliver, J.M. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 2580–2592.
- 135) Yamaji, A., Sekizawa, Y., Emoto, K., Sakuraba, H., Inoue, K., Kobayashi, H., & Umeda, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 5300–5306.
- 136) Ishitsuka, R., Yamaji-Hasegawa, A., Makino, A., Hirabayashi, Y., & Kobayashi, T. (2004) *Biophys. J.*, **86**, 296–307.
- 137) Yachi, R., Uchida, Y., Balakrishna, B.H., Anderluh, G., Kobayashi, T., Taguchi, T., & Arai, H. (2012) *Genes Cells*, **17**, 720–727.

- 138) Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., & Grinstein, S. (2008) *Science*, 319, 210–213.
- 139) Uchida, Y., Hasegawa, J., Chinnapan, D., Inoue, T., Okazaki, S., Kato, R., Wakatsuki, S., Misaki, R., Koike, M., Uchiyama, Y., Iemura, S., Natsume, T., Kuwahara, R., Nakagawa, T., Nishikawa, K., Mukai, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Sheff, D., Lencer, W.I., Taguchi, T., & Arai, H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 15846–15851.
- 140) Emoto, K. & Umeda, M. (2000) *J. Cell Biol.*, 149, 1215–1224.
- 141) Oancea, E., Teruel, M.N., Quest, A.F., & Meyer, T. (1998) *J. Cell Biol.*, 140, 485–498.
- 142) Sato, M., Ueda, Y., & Umezawa, Y. (2006) *Nat. Methods*, 3, 797–799.
- 143) Rizzo, M.A., Shome, K., Watkins, S.C., & Romero, G. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 23911–23918.
- 144) Nakanishi, H., de los Santos, P., & Neiman, A.M. (2004) *Mol. Biol. Cell*, 15, 1802–1815.
- 145) Zhao, C., Du, G., Skowronek, K., Frohman, M.A., & Barsagi, D. (2007) *Nat. Cell Biol.*, 9, 706–712.
- 146) Burd, C.G., & Emr, S.D. (1998) *Mol. Cell*, 2, 157–162.
- 147) Gillooly, D.J., Morrow, I.C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N.J., Gaullier, J.M., Parton, R.G., & Stenmark, H. (2000) *EMBO J.*, 19, 4577–4588.
- 148) Ridley, S.H., Ktistakis, N., Davidson, K., Anderson, K.E., Manifava, M., Ellison, C.D., Lipp, P., Bootman, M., Coadwell, J., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Cooper, M.A., Thuring, J.W., Lim, Z.Y., Holmes, A.B., Stephens, L. R., & Hawkins, P.T. (2001) *J. Cell Sci.*, 114, 3991–4000.
- 149) Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C., & Yaffe, M.B. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3, 675–678.
- 150) Ellison, C.D., Gobert-Gosse, S., Anderson, K.E., Davidson, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Coadwell, J., Chilvers, E.R., Hawkins, P.T., & Stephens, L.R. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3, 679–682.
- 151) Levine, T.P. & Munro, S. (1998) *Curr. Biol.*, 8, 729–739.
- 152) Levine, T.P. & Munro, S. (2002) *Curr. Biol.*, 12, 695–704.
- 153) Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D.R., Kular, G.S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J.M., & De Matteis, M.A. (2004) *Nat. Cell Biol.*, 6, 393–404.
- 154) Balla, A., Tuymetova, G., Tsiomenko, A., Varnai, P., & Balla, T. (2005) *Mol. Biol. Cell*, 16, 1282–1295.
- 155) Gozani, O., Karuman, P., Jones, D.R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A.A., Baird, C.L., Zhu, H., Field, S.J., Lessnick, S.L., Villasenor, J., Mehrotra, B., Chen, J., Rao, V.R., Brugge, J.S., Ferguson, C.G., Payastre, B., Myszka, D.G., Cantley, L.C., Wagner, G., Divecha, N., Prestwich, G.D., & Yuan, J. (2003) *Cell*, 114, 99–111.
- 156) Kimber, W.A., Trinkle-Mulcahy, L., Cheung, P.C., Deak, M., Marsden, L.J., Kieloch, A., Watt, S., Javier, R.T., Gray, A., Downes, C.P., Lucocq, J.M., & Alessi, D.R. (2002) *Biochem. J.*, 361, 525–536.
- 157) Santagata, S., Boggon, T.J., Baird, C.L., Gomez, C.A., Zhao, J., Shan, W.S., Myszka, D.G., & Shapiro, L. (2001) *Science*, 292, 2041–2050.
- 158) Li, X., Wang, X., Zhang, X., Zhao, M., Tsang, W.L., Zhang, Y., Yau, R.G., Weisman, L. S., & Xu, H. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 21165–21170.
- 159) Venkateswarlu, K., Gunn-Moore, F., Oatey, P.B., Tavare, J. M., & Cullen, P.J. (1998) *Biochem. J.*, 335, 139–146.
- 160) Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavare, J.M., & Cullen, P.J. (1998) *Curr. Biol.*, 8, 463–466.
- 161) Varnai, P., Rother, K.I., & Balla, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 10983–10989.
- 162) Komander, D., Fairservice, A., Deak, M., Kular, G.S., Prescott, A.R., Peter Downes, C., Safrany, S.T., Alessi, D.R., & van Aalten, D.M. (2004) *EMBO J.*, 23, 3918–3928.
- 163) Waheed, A.A., Shimada, Y., Heijnen, H.F., Nakamura, M., Inomata, M., Hayashi, M., Iwashita, S., Slot, J.W., & Ohno-Iwashita, Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4926–4931.

著者寸描

●高鳥 翔 (たかとり しょう)



日本学術振興会特別研究員 PD (名古屋大学大学院医学系研究科分子細胞学分野) 博士 (薬学)。

■略歴 1982年埼玉県に生る。2005年東京大学薬学部卒業。10年同大学院薬学系研究科博士後期課程修了(岩坪威研究室)。10~11年同博士研究員(日本学術振興会特別研究員, ターゲットタンパク研究員)。11年名古屋大学大学院医学系

研究科特任助教を経て12年より現職。

■研究テーマと抱負 脂質膜の生物学。生物が外界との境界として確立した脂質膜をどこまで多機能化してきたのか見極めたい。

■趣味 読書, 古都散策, サイエンスカフェなど学際的な集まりに顔をだすこと。

●藤本 豊士 (ふじもと とよし)

名古屋大学大学院医学系研究科教授。医学博士。

■略歴 1954年京都府に生る。78年京都大学医学部卒業。同年京都大学医学部助手。82年同助教授。95年群馬大学医学部教授。99年名古屋大学医学部教授。その後、組織改編等により現職名となる。

■研究テーマと抱負 細胞膜脂質ドメインの解析, 脂肪滴構造の解析。ひとと違ったことを違った方法で研究したい。

■ホームページ <http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cel-bio>

■趣味 歩くこと (ただしフィールドはおもに都会)。