

新井 洋由

東京大学大学院薬学系研究科・教授

生体膜リン脂質多様性の構築機構の解明と
高度不飽和脂肪酸要求性蛋白質の同定

§1. 研究実施の概要

本研究では、線虫、動物細胞およびマウスを材料として用い、遺伝学、生化学的手法、およびマスペクトロメトリーによる脂質メタボローム解析を駆使しながら、1. リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定、2. 高度不飽和脂肪酸(PUFA) 要求性遺伝子の同定を行う。これらの分子の機能解析を通して、「生体膜を構成するリン脂質分子種多様性の構築機構とその生理的意義」という生体膜構造および機能の基本的かつ本質的問題を解決する。

§ 2. 研究実施体制

(1)「新井」グループ

① 研究分担グループ長:新井 洋由 (東京大学薬学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定
- ・PUFA 要求性遺伝子の同定
 - 特定のリン脂質分子種を要求する分子の同定
 - 生体膜脂肪酸環境の変化に対する応答機構の解明
- ・不飽和度の低い脂肪酸を多く含む膜環境形成(ラフト形成)に関わる分子の解析

(2)「中台」グループ

① 研究分担グループ長:中台 枝里子 (東京女子医科大学医学部第2生理学教室、助教)

② 研究項目

- ・スクリーニング等によって得られた候補分子の系統的なノックアウト線虫の作製

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

以下の三点について研究を遂行した。

- 1) リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定
- 2) 生体膜脂肪酸環境の変化に対する応答機構の解明
- 3) 不飽和度の低い脂肪酸を多く含む膜環境形成(ラフト形成)に関わる分子の解析

1)に関して、ホスファチジルイノシトール(PI)の *sn*-1 の脂肪酸鎖を規定する分子群を同定した(Imae *et al*, *Mol Biol Cell*, 2010)。2)に関連して、生体膜リン脂質中の脂肪酸組成のバランス(飽和/不飽和のバランス)を変化させた際の生体応答について解析を行った(Ariyama *et al*, *J Biol Cell*, 2010)。また、3)に関して、オルガネラ膜にコレステロールを輸送する脂質結合蛋白群の解析を行った(Kobuna *et al*, *PLoS Genetics*, 2010)。以下にそれぞれの研究概要を述べる。

1)リン脂質分子種多様性形成に関わる分子群の同定

- ホスファチジルイノシトール(PI)の *sn*-1 の脂肪酸鎖を規定する分子群の同定 -

ホスファチジルイノシトール(PI)は極性頭部にイノシトール環を有するリン脂質で、イノシトール環のリン酸化により、細胞増殖や小胞輸送、アクチン骨格の制御など、様々なシグナル伝達に関与する。また、PI は脂肪酸部分においても特徴的な構造を有しており、その多くが *sn*-1 位にステアリン酸(18:0)、*sn*-2 位にアラキドン酸(20:4)を持つ(図1)。このような PI の特徴的な脂肪酸組成は、PI が生合成された後、ホスホリパーゼにより脂肪酸鎖が切り出され、脂肪酸転移酵素により特定の脂肪酸鎖が再導入されることにより形成されると考えられている(脂肪酸リモデリング)。我々はこれまで、線虫 *C. elegans* を用いた RNAi スクリーニングにより、PI の *sn*-2 位にアラキドン酸を選択的に導入する脂肪酸転移酵素として *mboa-7*LPIAT を同定してきた(Lee *et al*, *Mol Biol Cell*, 2008)。一方、PI の *sn*-1 位についても、脂肪酸リモデリングにより 18:0 が導入されることが示唆されていたが、この過程に関与する酵素は未だ同定されていなかった。我々は 22 年度の研究成果として、PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成を規定するホスホリパーゼ A₁ ならびに脂肪酸転移酵素を同定することに成功した。以下に具体的な成果を述べる。

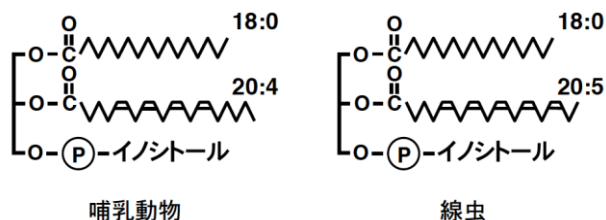


図 1. 哺乳動物および線虫における主要な PI 分子種

1-1. *ipla-1* 変異体および *acl-8 acl-9 acl-10* 三重変異体は PI におけるステアリン酸 (18:0) の割合が減少する

我々はこれまで、細胞内型ホスホリパーゼ A₁ (*ipla-1*) の機能解析を行っており、本酵素が線虫において上皮系幹細胞 (seam 細胞) の非対称分裂を制御していることを見出している (Kanamori *et al*, *EMBO J*, 2008)。この現象にどのようなリン脂質代謝が関与するかを調べるため、*ipla-1* 変異体の脂質メタボローム解析を行ったところ、*ipla-1* 変異体では PI の脂肪酸分子種が顕著に変化していることが分かった。線虫における PI の主要な分子種は、*sn-1* 位は哺乳動物と同様に 18:0 であるが、*sn-2* 位にはアラキドン酸 (20:4) ではなく EPA (20:5) が結合している (図1)。*ipla-1* 変異体では 18:0/20:5 の PI 分子種が減少し、代わりに 18:1/20:5 PI が増加していた (図2B)。さらに、PI に結合した脂肪酸量を定量したところ、*ipla-1* 変異体では 18:0 の割合が減少しており、代わりに 18:1 が増加していた (図2A)。PI の *sn-2* 位の主要な脂肪酸である 20:5 に関しては変化が見られていない。このことから、*ipla-1* 変異体では PI の *sn-1* 位の脂肪酸が 18:0 から 18:1 へ入れ替わっていることが明らかになった。

一方、中台グルー

プが樹立した脂質関連分子群の線虫欠損変異体を網羅的に解析したところ、互いに高い相同性を有する *acl-8*, *acl-9*, *acl-10* の三重変異体が *ipla-1* 変異体と非常に類似した表現型を示すことを見出した (後述)。そこで、*acl-8 acl-9 acl-10* 三重変異体のメタボローム解析を行ったところ、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体は *ipla-1* 変異体と同様に、PI の *sn-1* 位の脂肪酸鎖が 18:0 から 18:1 に

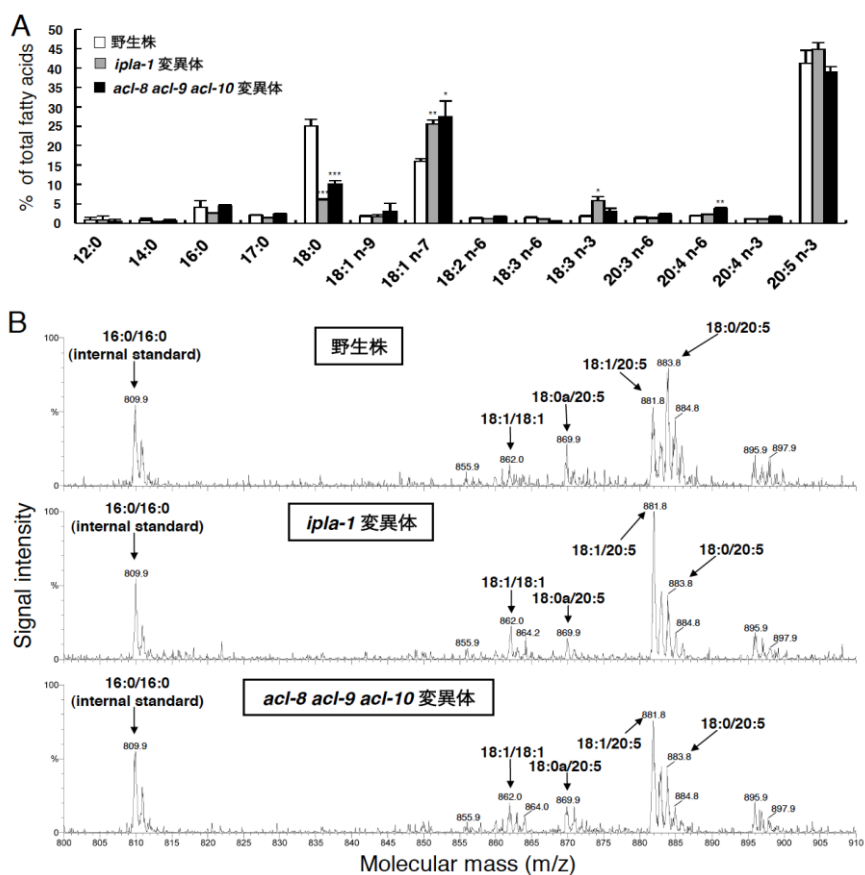


図 2. *ipla-1* 変異体と *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体は同様の PI の脂肪酸組成を持つ (A) ガスクロマトグラフィーによる PI の脂肪酸定量 (n=3, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) (B) PI のマスペクトル

入れ替わっていることが分かった (図2)。*ipla-1* 変異体、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体ではいずれも、PI 以外のリン脂質である PC や PE、PS の脂肪酸組成には大きな変化は見られていない。以上の結果から、*ipla-1* ならびに *acl-8*, *-9*, *-10* は PI の *sn-1* 位の脂肪酸組成を規定する分子であることが明らかになった。*ipla-1* および *acl-10* の遺伝子産物はそれぞれ *in vitro* において、PI に対

するホスホリパーゼ A₁ 活性、LysoPI に対する脂肪酸転移活性を有していたことから、*ipla-1* および *acl-8*, *-9*, *-10* が PI の *sn*-1 位の脂肪酸リモデリングを担っており、PI の *sn*-1 位に 18:0 を導入していると考えられる。

1-2. *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体は *ipla-1* 変異体と類似した表現型を示す

我々はこれまで、*ipla-1* 変異体が上皮系幹細胞である seam 細胞の非対称分裂に異常を示すことを明らかにしている。Seam 細胞は線虫の側面に並ぶ上皮細胞で、胚発生後も分裂を続け、幹細胞様の分裂パターンを示す(図3A, B)。野生株において seam 細胞は線虫の前後軸と平行に分裂し、前側の娘細胞は分化して seam 細胞の性質を失うが、後ろ側の娘細胞は seam 細胞の運命を維持する(図3C)。一方、*ipla-1* 変異体では seam 細胞が分裂した後、前側の娘細胞が seam 細胞としての運命をたどるものや、両方の娘細胞が seam 細胞になるものが観察された(図3C)。*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体を同様に解析したところ、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体でも同様に、seam 細胞の非対称分

裂に異常が観察された(図3C)。我々はさらに *ipla-1* 変異体、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体の非対称分裂の異常が共に、逆行性小胞輸送を制御する分子 (*tbc-3*RabGAP、*mon-2*ArfGEF-like) の変異によって回復することを見出している。以上の結果から、*ipla-1* 変異体および *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体における異常は、逆行性小胞輸送を介する同様の分子機構で生じていると考えられる。

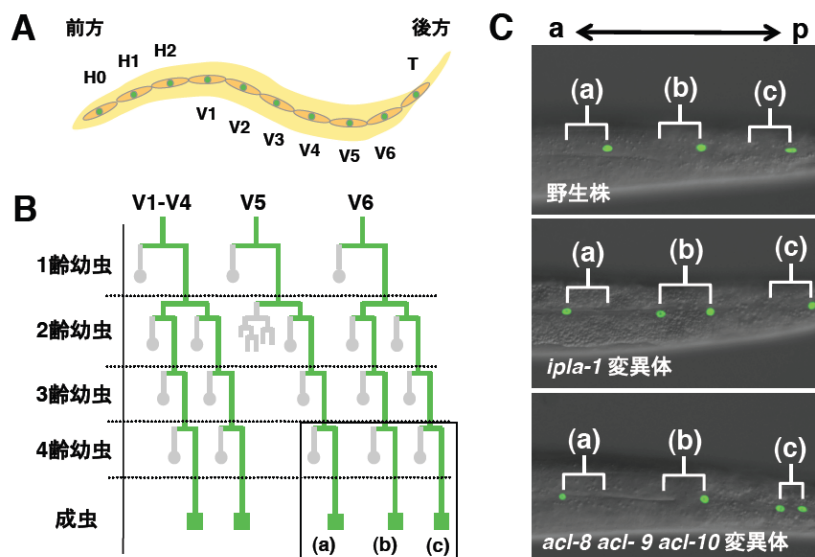


図3. *ipla-1* 変異体、*acl-8 acl-9 acl-10* 変異体では上皮幹細胞の非対称分裂に異常が生じる (A)seam 細胞の模式図。(B)seam 細胞の細胞系譜。seam 細胞は線虫の前後軸に沿って分裂した後、前側の娘細胞は分化して seam 細胞の性質を失うが(灰色)、後ろ側の娘細胞は seam 細胞の運命を維持する(緑)。(C)線虫の微分干涉顕微鏡像(seam 細胞の核に GFP を発現するトランスジェニック体を用いて、seam 細胞を可視化している)。B の四角で囲った(a), (b), (c) の分裂パターンを示している。野生株では後方の娘細胞のみが seam 細胞となるが、*ipla-1* 変異体や *acl-8 acl-9 acl-10* 変異体ではこの非対称性の崩壊が見られる。a: anterior, p: posterior

1-3. まとめと展望

本研究において我々は、PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成を規定する分子として、*ipla-1*(ホスホリパーゼ A₁)と *acl-8*, *-9*, *-10*(脂肪酸転移酵素)を同定することに成功した。1) *ipla-1* 変異体と *acl-8*

*acl-9 acl-10*変異体はPIの *sn*-1位の脂肪酸組成において同様の変動が見られること、2) *ipla-1*変異体と *acl-8 acl-9 acl-10*変異体は共に seam 細胞の非対称分裂に異常が生じること、3)これらの seam 細胞の異常は共に同じ遺伝子 (*tbc-3*あるいは *mon-2*)の変異によって抑圧されることから、*ipla-1*と *acl-8, -9, -10*は協調的にPIの *sn*-1位の脂肪酸リモデリングに関与し(図4)、この脂肪酸リモデリングにより生じるPIの脂肪酸組成が非対称分裂の獲得に重要な役割を果たすことが予想される。

最近、線虫受精卵の分裂過程において PIPs 産生酵素 (PI(4)P5-kinase)が母細胞内で非対称に局在することが報告されており、非対称分裂におけるPIPsの重要性が示唆されている。一方で、

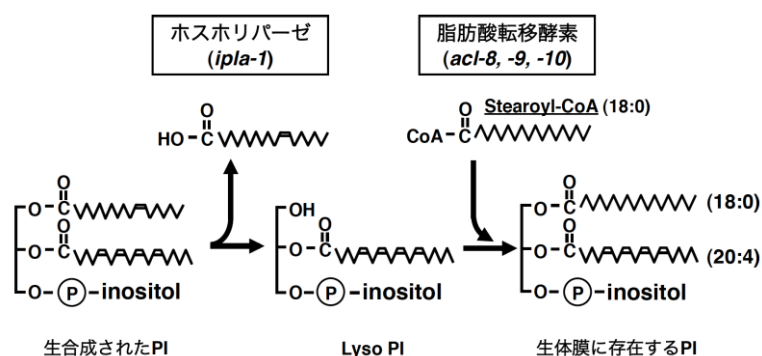


図4. PIの *sn*-1位の脂肪酸リモデリング

PIPsは各オルガネラ膜で特徴的な分布を示し、PIPsの偏在性が小胞輸送の重要な制御基盤であることが明らかにされている。「*ipla-1, acl-8, -9, -10*欠損によるPIの脂肪酸組成の変動」、「seam細胞の非対称分裂異常」、「逆行性小胞輸送」の関連は現時点では不明であるが、PIの脂肪酸組成の変動が何らかのPIPsの代謝に影響を及ぼし、小胞輸送系に異常が生じた結果、非対称分裂の異常が引き起こされるのではないかと考えられる。本研究は、生体膜リン脂質の *sn*-1位の脂肪酸リモデリングの分子実体を初めて提唱するものであり、また、PIの脂肪酸構造と小胞輸送、非対称分裂の関連を初めて示すものである。今後、異常発症のメカニズムを分子レベルで解析することにより、なぜPIの *sn*-1位に18:0を含む分子種が多いのか、その生物学的意義が明らかになるものと期待される。

2) 生体膜脂肪酸環境の変化に対する応答機構の解明

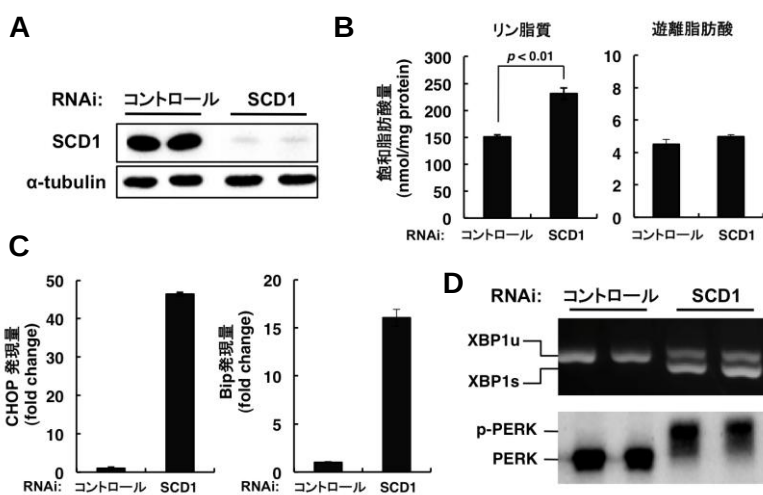
生体膜構成する主要な構成成分であるリン脂質には、パルミチン酸などの飽和脂肪酸からアラキドン酸、DHAなどの高度不飽和脂肪酸まで、様々な脂肪酸が結合している。これらの脂肪酸により形成される生体膜の疎水性環境は、膜のダイナミクスや膜タンパク質の機能に重要であると考えられており、細胞内シグナル伝達にも影響を与えると予想される。しかしながら、生体膜リン脂質脂肪酸組成が変化した時の生体応答はほとんど明らかとなっていない。我々は22年度の研究成果として、培養細胞において、リン脂質の脂肪酸組成(飽和/不飽和のバランス)を変化させた際に小胞体ストレス応答が引き起こされることを明らかにした。以下に具体的な成果を述べる。

2-1. SCD1の発現抑制によりリン脂質中の脂肪酸組成が変化し、小胞体ストレスが誘導される

Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1)は、飽和脂肪酸に二重結合を導入することでモノ不飽和脂肪酸を合成する活性を持ち、細胞内の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスを規定する重要

な酵素である。HeLa 細胞において SCD1 の発現抑制を行ったところ、リン脂質中の飽和脂肪酸の増加、モノ不飽和脂肪酸の減少がみられた。一方、遊離脂肪酸の量および脂肪酸組成には変化がみられなかった(図 5A, B)。またリン脂質の脂肪酸組成変化に加えて、SCD1 を発現抑制した細胞では顕著な細胞死がみられた。この細胞死はカスパーゼ依存的な細胞死であったことから、SCD1 の発現抑制により何らかの細胞内シグナルが活性化していることが考えられた。

SCD1 の発現抑制により引き起こされる生体応答を探索した結果、SCD1 の発現抑制により、小胞体ストレス応答の下流で誘導される CHOP や Bip の遺伝子発現が著しく上昇していることを見出した(図 5C)。小胞体ストレス応答は、小胞体内に異常タンパク質が蓄積すると活性化し、小胞体の



【Fig. 5】 SCD1 発現抑制によるリン脂質飽和脂肪酸の増加と小胞体ストレス応答の誘導

恒常性維持に重要な細胞内シグナルである。小胞体ストレス応答のセンサータンパク質である IRE1、PERK の活性化を検討した結果、SCD1 発現抑制下では IRE1 の活性化によって起こる XBP1 mRNA のスプライシング、PERK の活性化によって起こる自己リン酸化がみられた(図 5D)。以上の結果から、SCD1 の発現抑制により小胞体ストレス応答が引き起こされることが明らかとなった。

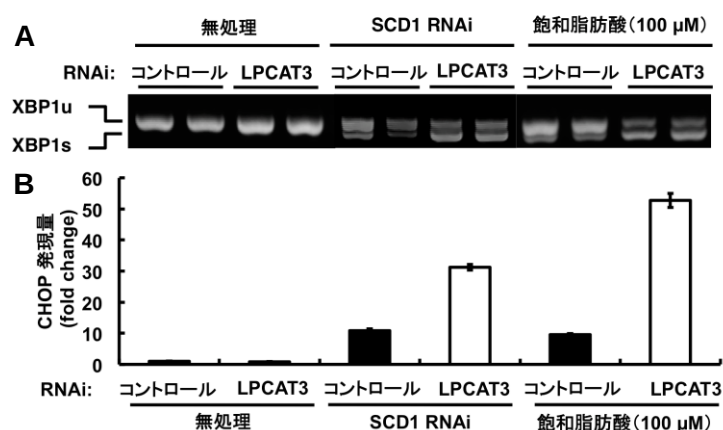
SCD1 発現抑制によって起こる小胞体ストレス応答の活性化に対する脂肪酸添加の効果を調べたところ、SCD1 の生成物であるオレイン酸を培地に添加することにより、SCD1 発現抑制時の小胞体ストレス応答の活性化は完全に抑制された。この抑制効果はオレイン酸のみならず、他の不飽和脂肪酸においても観察された。一方、飽和脂肪酸の添加は SCD1 の発現抑制による小胞体ストレス応答を大きく増強させた。

2-2. LPCAT3 の発現抑制により、SCD1 発現抑制時の小胞体ストレス応答が増強される

SCD1 の発現抑制による小胞体ストレス応答の活性化が様々な不飽和脂肪酸の添加により抑制されたことから、リン脂質中の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが小胞体ストレス応答の活性化に重要であると考えられた。そこで SCD1 の発現抑制下において、様々なリン脂質アシルトランスフェラーゼを発現抑制し、SCD1 の発現抑制により誘導される小胞体ストレス応答に影響を与える分子を探索した。その結果、LPCAT3 (Lyso-phosphatidylcholine acyltransferase 3) の発現抑制により、SCD1 の発現抑制によって起こる小胞体ストレス応答が著しく増強した(図 6A, B)。LPCAT3 は生体膜リン脂質の主要な分子種であるホスファチジルコリン(PC)に不飽和脂肪酸を

導入する活性を有する酵素として、最近我々を含む複数の研究グループから報告された分子である。脂質解析の結果、SCD1、LPCAT3 同時発現抑制細胞では、SCD1 単独発現抑制細胞に比べてリン脂質画分の不飽和脂肪酸量の減少が認められた。以上の結果から、リン脂質中の飽和/不飽和のバランスが飽和に傾くと、小胞体ストレス応答が活性化することが強く示唆された。

近年、肥満や糖尿病でみられる高脂肪酸血症により起こる脂肪毒性(インスリン抵抗性などの細胞機能障害)の分子機構として、飽和脂肪酸によって引き起こされる小胞体ストレス応答が注目されている。リン脂質の脂肪酸組成変化が脂肪毒性に関与するか検証するために、飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答の活性化に対する LPCAT3 発現抑制の効果を調べた。その結果、LPCAT3 の発現抑制により、飽和脂肪酸添加による小胞体ストレス応答の活性化は著しく増強した(図 6A, B)。このことから、LPCAT3 は脂肪毒性に関与する新規遺伝子であり、リン脂質の脂肪酸組成は脂肪毒性に関与することが示唆された。



【Fig. 6】 SCD1 発現抑制および飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答の LPCAT3 発現抑制による増強

本研究の結果から、生体膜リン脂質の脂肪酸組成の飽和/不飽和のバランスが飽和に傾くと、小胞体ストレス応答が誘導されることが示唆された。小胞体ストレス応答は小胞体の恒常性維持に重要な細胞内シグナルであるが、その下流ではシャペロンタンパク質や小胞体関連分解 (ERAD) に関わるタンパク質のみならず、多くの脂質代謝関連タンパク質も制御されている。今後、生体膜リン脂質の脂肪酸組成変化による小胞体ストレス応答活性化の分子機構、および小胞体ストレス応答の下流で制御されるリン脂質・脂肪酸代謝酵素の解析を行うことにより、生体膜リン脂質の脂肪酸組成の恒常性維持における小胞体ストレス応答の意義について明らかにしていきたい。

3) 不飽和度の低い脂肪酸を多く含む膜環境形成(ラフト形成)に関わる分子の解析

- 細胞内コレステロール輸送脂質結合蛋白群の機能解析 -

生体膜環境はリン脂質の脂肪酸組成だけでなく、コレステロールやスフィンゴ脂質等の含量によっても大きく影響を受ける。従って、「生体膜リン脂質多様性の生物学的意義」を解明するためには、コレステロールやスフィンゴ脂質を含めて包括的に理解していく必要がある。22 年度においては、細胞内のオルガネラ膜にコレステロールを供給すると考えられる脂質結合蛋白質群 (ORP) に注目し、線虫変異体を用いた解析を行った。この結果、ORP ならびにコレステロールが後期エンド

ソームにおける特徴的な構造であるMultivesicular body の形成および機能に重要であることを見出した。以下にその概要を述べる。

1. 線虫 ORP 遺伝子はMultivesicular body 形成の関連遺伝子と強い遺伝学的相互作用を示す

OSBP (Oxysterol-binding protein) はコレステロールの酸化物であるオキシステロールと結合するタンパク質として精製、クローニングされた 97kDa の可溶性タンパク質である。ヒトには OSBP と相同性を有する分子がさらに 11 存在し、ORP ファミリー (OSBP-related protein family) を形成している (図 7)。OSBP を含め、ORP 分子の多くは N 末端側に PH ドメイン、C 末端側にステロール結合ドメインを有している。近年、ORP 分子がコレステロール輸送活性を有すること、また、ORP

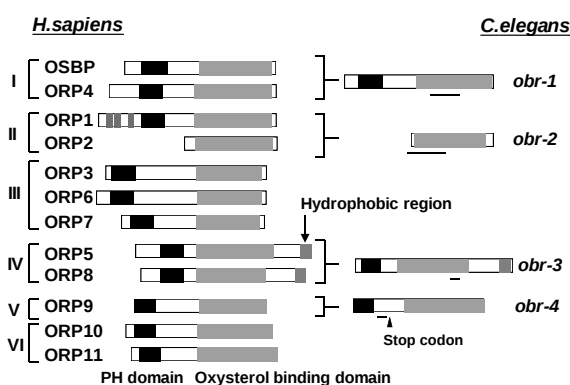


図 7. ORP (OSBP-related protein) ファミリー
下線部は線虫 *obr* 変異体における欠損部位を示す

分子が細胞内オルガネラ膜のコレステロール分布に影響を与えることが明らかにされ、ORP 分子が細胞内コレステロール輸送蛋白質として機能すると考えられている。しかしながら、ORP 分子の機能はほとんど解明されていない。我々は、オルガネラ膜におけるコレステロールの機能を明らかにするため、線虫 ORP 分子 (*obr-1*, *obr-2*, *obr-3*, *obr-4*) の欠損変異体を作製し、解析を行った。

各 *obr* 変異体は顕著な表現型を示さなかったが、すべての *obr* 分子を欠損した *obr* 四重変異体では成長遅延 (35%) や胚生致死 (11%) の異常が生じることを見出した。さらに、遺伝学的な解析から、*obr* 変異体が Multivesicular body (MVB) 形成の関連分子と強い遺伝学的相互作用を示すことを見出した (図 8: *obr* 四重変異体では MVB 形成関連分子の発現を低下させると著しい胚致死性を示す。野生株では致死性は見られない)。

2. *obr* 四重変異体では MVB の形成および機能に異常を生じる

MVB は後期エンドソーム内腔に多数の小胞を持つ多胞体オルガネラであり、EGF 受容体等の形質膜タンパク質をエンドソーム内に取り込み、分解する機能を有している。線虫において、MVB の形成を阻害すると高い胚致死性を示す。*obr* 四重変異体の胚致死性が MVB の形成に関わる遺伝子 (*vps2*, *vps4*,

vps20, *vps27*, *vps28*, *vps34* 等) の発現量を低下させると顕著に上昇することから、*obrr* 四重変異体において MVB 形成の過程に何らか

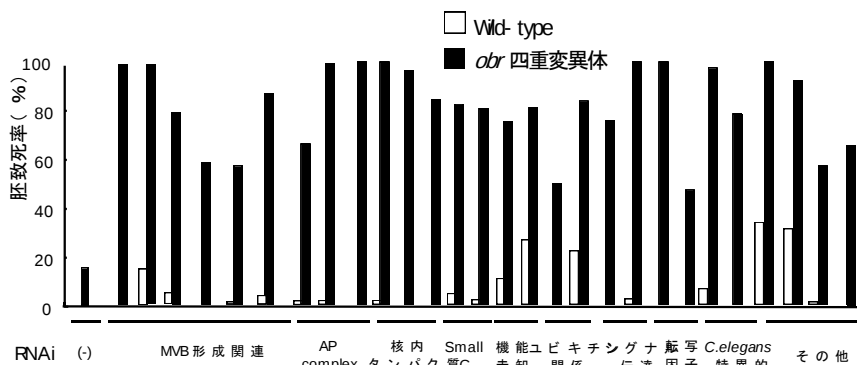


図 8. *obr* 四重変異体のエンハンサー分子。MVB の形成に関連する遺伝子を抑制すると、*obr* 四重変異体の胚致死率が著しく上昇する。

の影響が生じていると予想された。そこで、後期エンドソームの形態・機能に着目して解析を行った。

MVB 関連分子の機能を阻害すると、後期エンドソームにおける内腔の小胞形成が抑制され、後期エンドソームやリソソームが膨張することが知られている。この状況下では、エンドソームまで輸送された形質膜蛋白質がエンドソーム内腔に取り込まれないため、膜蛋白質の分解が阻害される。*obr* 四重変異体(以降は単に *obr* 変異体と記述)において、後期エンドソームおよびリソソームマーカーの形態を調べたところ、MVB 関連分子を機能阻害した時と同様に後期エンドソームやリソソームが膨張することが分かった(図9)。さらに、MVB 経路で分解されるカベオリンの動態を調べたところ、*obr* 変異体ではカベオリンの分解が遅延していることが明らかになった。カベオリンの分解抑制は MVB 関連分子の機能阻害より程度が弱いことから、*obr* 分子は MVB 形成に必須ではなく、MVB 形成を促進するものと考えられる。次に、HeLa 細胞を用いて同様に解析を行ったところ、後期エンドソームに局在する ORP 分子である ORP1 の発現抑制により MVB の形成が抑制され(図10)、また EGF 受容体の分解が遅延することが分かった。以上の結果から、ORP 分子は MVB の形成および機能に重要であり、その機能は進化的に保存されていることが明らかになった。

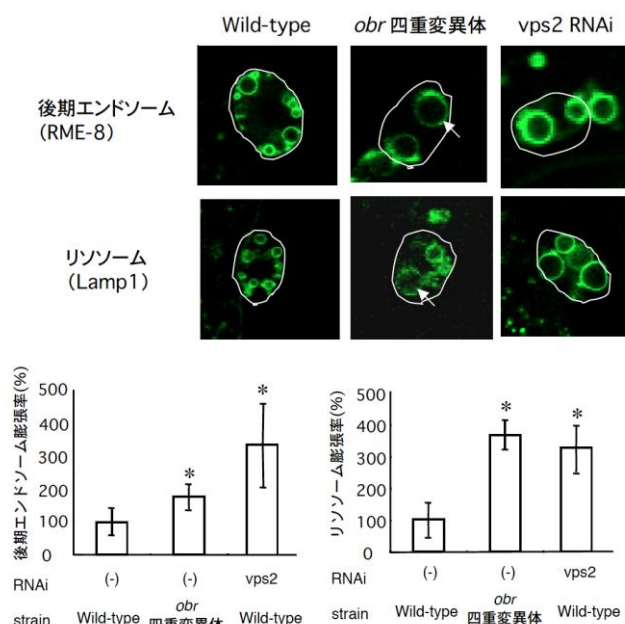


図 9. *obr* 四重変異体では、後期エンドソームおよびリソソームが膨張する

3. コレステロールは MVB の形成に必須である

ORP 分子は細胞内のコレステロール輸送に関与すると考えられるため、コレステロールと MVB 形成の関連を解析した。まず、*obr* 四重変異体において後期エンドソーム/リソソームの画分を単離し、コレステロール量を定量したところ、*obr* 変異体では後期エンドソーム/リソソームのコレステロール量が減少していた。また、野生型線虫のコレステロール量を減少させた条件でオルガネラの形態を解析したところ、*obr* 変異体と同様に後期エンドソームやリソソームが膨張することが分かった。さらに、コレステロール量を減少させた条件下で MVB 関連遺伝子の発現を低下させると胚致死性が著しく上昇した。以上の結果から、後期エンドソーム膜のコレステロー

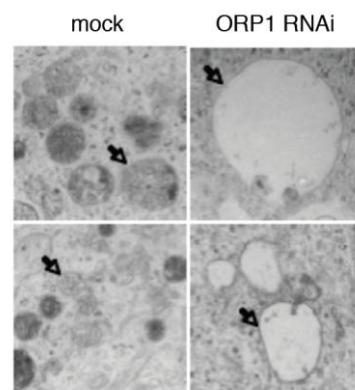


図 10. ORP1 を発現抑制すると、MVB が膨張し、内部小胞も減少する。矢印; multivesicular body

ルが減少した状況では、MVB の形成が減弱していると考えられ、さらにこの条件下で MVB 関連分子の発現を低下させると、個体レベルでも異常が生じると考えられた。

本研究において、ORP 分子ならびにコレステロールが MVB 形成に重要であることが初めて明らかになった。MVB における小胞形成時はエンドソームの内側に膜が陥入するため、クラスリン等のコートマー蛋白は介在しえず、別の曲率形成機構が存在すると考えられている。本研究は「MVB 形成にはコレステロールを豊富に含む膜環境が必要である」ことを強く示唆しており、曲率形成の新しい分子機構を解明する切り口になると期待される。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Hiroyuki Ariyama, Nozomu Kono, Shinji Matsuda, Takako Inoue and Hiroyuki Arai, “Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, No. 29, pp.22027-35, 2010 (DOI: 10.1074/jbc.M110.126870)
2. Hiroyuki Kobuna, Takao Inoue, Machiko Shibata, Keiko Gengyo-Ando, Akitsugu Yamamoto, Shohei Mitani and Hiroyuki Arai, “Multivesicular Body Formation Requires OSBP-Related Proteins and Cholesterol”, *PLoS Genetics*, vol. 6, No. 8, pp.e1001055, 2010 (DOI: 10.1371/journal.pgen.1001055)
3. Rieko Imae, Takao Inoue, Masako Kimura, Takahiro Kanamori, Naoko H. Tomioka, Eriko Kage-Nakadai, Shohei Mitani and Hiroyuki Arai, “Intracellular Phospholipase A1 and Acyltransferase, Which Are Involved in *Caenorhabditis elegans* Stem Cell Divisions, Determine the *sn*-1 Fatty Acyl Chain of Phosphatidylinositol”, *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 21, pp.3114–3124, 2010 (DOI: 10.1091/mbc.E10-03-0195)