

# 膜交通のハブ TGN でのソーティングを支える膜脂質

伊藤 容子

お茶の水女子大学 ヒューマンライフサイエンス研究所  
〒112-8610 東京都文京区大塚 2-1-1

## Membrane lipids in the cargo sorting at the TGN, the intracellular trafficking hub

Yoko Ito

Institute for Human Life Science, Ochanomizu University  
2-1-1, Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo, 112-8610, Japan

Keywords: lipid, membrane traffic, *trans*-Golgi network

DOI: 10.24480/bsj-review.15c3.00268

### 1. はじめに

真核生物の細胞内では、膜で区切られたオルガネラ同士が、小胞やチューブを介して盛んに物質のやりとりを行っている。小胞体 (ER) で合成されたタンパク質を機能すべきオルガネラへ届けたり、細胞外から取り込んだタンパク質を分解のために液胞へ送ったりと、正しいタンパク質を正しい目的地へ運ぶために、多くの輸送ルートが厳密に制御されている。この仕組みは、人間社会の交通網になぞらえて『膜交通 (メンブレントラフィック)』と呼ばれている。

膜交通を制御する分子機構にせよ、運ばれる“積荷”にせよ、タンパク質が注目されがちであるが、“膜”交通の名の通り、そこには脂質でできた生体膜が常に存在している。オルガネラや小胞の単なるビルディングブロックとしてだけでなく、特定の脂質はこの交通網における積荷の仕分けと配送に欠かせない機能分子でもある。本稿では、多くの輸送ルートが交錯するオルガネラであるトランスゴルジ網 (*trans*-Golgi Network; TGN) で膜脂質が積荷のソーティングに果たす役割について、植物以外の知見も交えつつ紹介するとともに、植物の膜交通研究と脂質研究の融合についても展望を述べたい。

### 2. TGNでの積荷ソーティングと膜脂質

#### 2-1. TGNからの極性輸送

ER で新規に合成されたタンパク質は、ゴルジ体を通った後、ゴルジ体の出口側に存在するオルガネラである TGN に運ばれる。TGN はたくさんの小胞がブドウの房のように繋がりあった構造で、かつてはゴルジ体の一部として扱われていたものの、ゴルジ体本体とは異なりクラスリン被覆小胞を形成すること (Robinson and Pimpl 2014)、そして何より、植物細胞で TGN がゴルジ体から離れたり再会したりと独自の挙動を見せることが明らかになり (Viotti et al. 2010; Uemura et al. 2014)、ゴルジ体とは別のオルガネラとしての認識が広がりつ

つある。さらに TGN がゴルジ体本体と異なる点として、TGN は細胞膜・細胞外からエンドサイトーシスによって取り込まれた積荷も受け取っており、動物細胞の初期エンドソームに相当する役割も担っていることが挙げられる (Dettmer et al. 2006; Viotti et al. 2010)。このようにして ER・ゴルジ体から、あるいはエンドサイトーシス経路から TGN へと運ばれてきた積荷は、次の目的地に応じて仕分けされ、膜でできた輸送小胞に詰め込まれて様々なルートへと送り出される。複数の輸送経路が交わり出入りすることから、TGN は膜交通の『ハブ』と表現されることもある。

TGN からの輸送の目的地のひとつである細胞膜は、一細胞につきひとつつながりの膜である。しかし、細胞膜に局在するタンパク質の中には、その一部にだけ偏在するものが存在している。例えば根の細胞では、地上部側 (apical 面) か根端側 (basal 面) か、表層側か中心柱側かといった極性に従って、細胞のどこかの面にのみ偏って局在することで機能するタンパク質がある。そういったものの中でも、オーキシン輸送体である PIN-FORMED (PIN) ファミリータンパク質は、植物の形態形成や環境応答において占めている役割の重要さもあって、常に注目を集めてきた。PIN ファミリーのメンバーは、根においては PIN1 は中心柱の細胞の basal 面に、PIN2 は表皮細胞の apical 面にといったように、それぞれ異なる組織で異なる極性を持って細胞膜に局在することが知られており、この偏りが根全体を巡るオーキシンの流れを作り出すことにつながっている (Tanaka et al. 2006; 松浦, 田中 2020)。動物細胞のタイトジャンクションのような境界のないひと続きの植物細胞膜において、PIN の偏在がどのようにして達成されているのかについては、細胞内から細胞膜への輸送、細胞膜上での拡散と細胞壁との相互作用、さらに細胞膜から細胞内への取り込みと再度細胞膜へ向かうリサイクリングという多くの要素が絡み合っているため、長い間様々な議論が重ねられてきた (Geldner et al. 2001; Boutté et al. 2006; Tanaka et al. 2013; 松浦, 田中 2020)。こうした中、新規に合成された PIN タンパク質は、細胞膜への輸送の段階で、既に極性を持って運ばれていることが示された (Kleine-Vehn et al. 2011; Łangowski et al. 2016)。さらに、一度細胞膜からエンドサイトーシスによって取り込まれた PIN タンパク質の細胞膜へのリサイクリングについても、やはり極性があることが明らかになった (Drdová et al. 2013; Łangowski et al. 2016; Tan et al. 2016)。ER で合成され、細胞膜で機能しつつ細胞質との間でリサイクリングされる PIN タンパク質も、積荷として TGN を介して運ばれている。前述のように、新規合成からの輸送にせよリサイクリングにせよ、PIN が細胞膜へ運ばれる時点で極性があるということは、TGN から運び出される際に、単に「細胞膜行き」ではなく、少なくとも「細胞膜の apical 面行き」あるいは「細胞膜の basal 面行き」として、特定の輸送小胞へと細かく仕分けされていることを示唆している。しかし、TGN というひとつのオルガネラの中で、このような細かい仕分けをどのようにして実現しているのかについてはほとんどわかっていない。

## 2-2. TGN のスフィンゴ脂質と PI4P

TGN での積荷の仕分けにおいて、特に重要であると考えられている膜脂質が、スフィンゴ脂質とホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI4P) である。スフィンゴ脂質は、長鎖塩基に脂肪酸が結合したセラミドを基本構造とする脂質であり、さらにリン酸や糖といった親水

性の頭部が付加されることでグルコシルセラミド (GlcCer) や様々な種類のグリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) となる (Cassim et al. 2020; 石川 2020)。植物の脂質に占めるスフィンゴ脂質の割合は 10%程度であり、生体膜の大部分を占めるグリセロ脂質と比較するとかなり少ない (Lynch and Dunn 2004)。また、グリセロ脂質と比較して、スフィンゴ脂質の脂肪酸には炭素分子の数が 21 個以上である超長鎖脂肪酸 (Very-Long-Chain Fatty Acid; VLCFA) が特に多く含まれており、二重結合の数も少ない (Sperling and Heinz 2003; Pata et al. 2010; Cassim et al. 2020)。このような長く直線状に近い分子構造上の特徴が強い分子間疎水性相互作用を生むため、脂質膜上のスフィンゴ脂質はステロールと共に密に集まり、分子の流動性が低い『脂質ラフト』あるいは『脂質ナノドメイン』と呼ばれる小さな領域を形成する (Lingwood and Simons 2010; Cacas et al. 2012; Ott 2017)。さらに植物のスフィンゴ脂質は、長鎖塩基と脂肪酸鎖の両方ともにヒドロキシ化を受ける場合が多い。脂肪酸鎖の 2 つ目の炭素へのヒドロキシ基の付加は、シロイヌナズナではセラミドの頭部に多様な親水基が結合した複合スフィンゴ脂質の 90%に及ぶ割合で見られ、これが脂質分子同士の水素結合によりナノドメイン形成を促進することが、シロイヌナズナとイネで報告されている (Markham and Jaworski 2007; Nagano et al. 2016; Ukawa et al. 2022)。植物細胞におけるこのような脂質のナノドメインは、膜の相状態を可視化できる蛍光プローブの利用によって (プローブが脂質二重膜の中に入り込むこと自体によって膜の状態が変わってしまうという懸念は残るものの)、細胞膜での観察例が蓄積されつつある (Nagano et al. 2016; Jaillais and Ott 2019; Ukawa et al. 2022)。細胞膜のナノドメインには、その物理的性質により特定のタンパク質が濃縮し、病原菌といった細胞外からの刺激に対する効率的なシグナル伝達のためのプラットフォームになっていると考えられている (Cacas et al. 2012; Jaillais and Ott 2019)。

積荷の仕分けの場としての脂質ラフトのコンセプトは、動物の上皮細胞において細胞膜の頂端側へのみ向かう輸送ルートがあることを説明するために、実際に細胞膜でナノドメインの存在が観察されるより前に考え出されたものであった。Simons らは、ゴルジ体で新規に合成された GlcCer や、オルガネラ膜の内腔側のリーフレットに局在し、サイトゾル側でクラスリン等のコートタンパク質と相互作用できないグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質が、タイトジャンクションによって区切られた細胞膜の頂端側に多く輸送されていることを発見した (Simons and Meer 1988)。このことから、TGN の膜においてスフィンゴ脂質のクラスターが形成され、脂質やタンパク質のソーティングセンターとなることで、特定の積荷が TGN から頂端側へ運ばれている可能性を提唱した (Simons and Meer 1988; Simons and Ikonen 1997; Lingwood and Simons 2010)。TGN に脂質のドメインが存在するかは顕微鏡観察によって直接的に確かめられてはいないが、哺乳類細胞で最も多いスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンの代謝が TGN からの輸送に関与しているという報告があるほか、TGN から作られた小胞にスフィンゴ脂質とステロールが多く含まれていることが、植物と酵母で明らかになっている (Klemm et al. 2009; Surma et al. 2011; Wattlelet-Boyer et al. 2016; Ramazanov et al. 2021)。

もう一つの重要な膜脂質である PI4P は、スフィンゴ脂質とは異なりグリセロール骨格を持ち、ホスホイノシタイドと総称される脂質群のひとつである。ホスホイノシタイドには親水

基のイノシトール環に受けるリン酸化の位置や数によっていくつもの種類があり、かつそれらは特異的なリン酸化酵素と脱リン酸化酵素の働きによって互いに迅速に転換される (Noack and Jaillais 2017)。それぞれのホスホイノシタイドは細胞内で異なる局在を示すことが知られており、オルガネラ膜のアイデンティティに大きく関わっていると言える。この細胞内分布は生物種によって多少異なっており、PI4P に結合するバイオセンサー (後述) を用いた研究では、動物では PI4P は主にゴルジ体/TGN に局在して、少量が細胞膜やエンドソームにも見られるが、植物では大半が細胞膜に蓄積し、少量が TGN にも観察されることが報告されている (Balla et al. 2005; Hammond et al. 2014; Simon et al. 2016)。

PI4P は、頭部が大きくマイナスチャージを持っているという物理化学的な性質によって直接生体膜の形やタンパク質のリクルートに関与するだけでなく、特異的な結合ドメインを介していくつもの膜交通関連タンパク質と相互作用し、TGN からの様々な輸送キャリアの形成に不可欠な役割を果たしている。PI4P を産生する PI4 キナーゼ (PI4K) の働きがゴルジ体・TGN からの積荷の運び出しに深く関わっていることは、酵母や動物細胞で 20 世紀の終わりがごろから明らかになり始めた (Godi et al. 1999; Hama et al. 1999; Walch-Solimena and Novick 1999; Wang et al. 2003)。また逆に、動物細胞で PI4P の脱リン酸化酵素である Sac1 を人為的に TGN に局在させることで局所的に PI4P のレベルを下げると、細胞膜へ運ばれるはずの積荷タンパク質の輸送が阻害されることも、TGN における PI4P の重要性を示している (Szentpetery et al. 2010)。PI4P がタンパク質との特異的な結合によって積荷の選別に関与する詳細な分子機構はここでは網羅しきれないが、例えば TGN から形成されるクラスリン小胞に積荷を積み込むアダプタータンパク質である AP-1 や GGA は、小胞形成を制御する低分子量 GTPase である Arf1 の活性化型と PI4P の両方に相互作用する。Arf1 は PI4K の膜への局在を促進することでさらなる PI4P を産生し、より多くのアダプターを形成中の小胞にリクルートする (Wang et al. 2003, 2007)。また、動物細胞では、PI4P に結合する GOLPH3 が、特定の積荷の小胞への積み込みのアダプターとなるだけでなく、ミオシンとも結合することで TGN からの膜キャリア形成のための物理的な力を発生させていると考えられている (Dippold et al. 2009; Rizzo et al. 2021)。クラスリンのような被覆を持たない輸送キャリアについても、動物細胞で TGN から細胞膜への特定の積荷の輸送を担う CARTS (carriers of the TGN to cell surface) の形成に、TGN 膜の PI4P が必要であることが近年明らかになった (Wakana et al. 2015)。植物 TGN において PI4P が膜交通に関わる例としては、膜交通の制御因子である Rab GTPase のひとつである RabA4b が PI4K を TGN 膜にリクルートし、PI4P を産生する例が挙げられる。FLS2 の輸送レギュレーターである PUB13 が、RabA4b と産生された PI4P を認識することで、免疫反応に関わる FLS2 の TGN から液胞分解経路への輸送を行うというモデルが提唱されている (Antignani et al. 2015; Noack and Jaillais 2017)。

### 2-3. PI4P, スフィンゴ脂質と ER-TGN コンタクトサイト

動物細胞では、TGN における PI4P の恒常性が、他の膜脂質と深く関わっていることが知られている。カギとなるのは、TGN と ER のコンタクトサイトである。ER と TGN の間に、互いの膜が 10-20 nm と近接していながら融合はしていないコンタクトサイトが存在している

ことは、哺乳類細胞での電子顕微鏡観察によって 1960 年代から指摘されていたが、その重要な役割が小胞輸送に依らない膜脂質の輸送であることが明らかになってきたのは近年のことである。TGN 膜上の PI4P は、このオルガネラをまたいだ脂質の輸送を担うタンパク質群の ER-TGN コンタクトサイトへの局在に必要であることがわかっている。ステロールの輸送を行う OSBP (oxysterol-binding protein) やセラミドの輸送を行う CERT (ceramide transport protein) は、PI4P に結合する PH (pleckstrin homology) ドメインを持っている。PI4K のノックダウンや阻害剤処理により TGN での PI4P レベルを低下させると、これらのタンパク質の TGN への局在が減少し、コンタクトサイトを介した ER-TGN 間の膜脂質の輸送も低下する (Levine and Munro 2002; Tóth et al. 2006; Antonny et al. 2016; Kumagai and Hanada 2019)。さらに、PI4P はそれ自体が他の膜脂質と引き換えに対向輸送される場合もある。OSBP の場合は、ER から TGN へ 1 分子のコレステロールを運ぶと同時に、逆に TGN から ER へ PI4P を運ぶ。ER と TGN の間の PI4P 濃度の勾配が、ステロールを輸送する“燃料”となるのである (Antonny et al. 2016)。最近の研究では、ER-TGN コンタクトサイトにおいて、同様の対向輸送が PI4P とホスファチジルセリンの組み合わせでも起きることが提唱されている (Venditti et al. 2019)。

ER から TGN へスフィンゴ脂質であるセラミドを輸送する CERT は、OSBP のように PI4P との対向輸送を行うわけではないが、前述のように局在が PI4P に依存している以上、ER と TGN の間の PI4P のバランスは TGN でのスフィンゴ脂質の恒常性に影響する。さらに、スフィンゴ脂質の側から PI4P へのフィードバック機構が存在することも報告されている (Capasso et al. 2017)。CERT によって TGN に運ばれたセラミドは、ホスホコリンの付加によってスフィンゴミエリンになるが、この際副産物としてジアシルグリセロール (DAG) が産生される。この DAG によって TGN で PKD (protein kinase D) が活性化され、PI4K がそのリン酸化を受けて活性化し、PI4P を増産する。PKD は OSBP も同時にリン酸化して活性化するため、OSBP はより多くの PI4P を ER へと運び、結果として TGN の PI4P レベルが下がるというモデルである。こうして TGN の PI4P レベルが減少すると CERT の TGN へのリクルートも減り、結果として TGN へのセラミドの供給も減るというネガティブループになっていると考えられる (Capasso et al. 2017)。このように、ER-TGN コンタクトサイトを介して、PI4P とスフィンゴ脂質という 2 種類の全く異なる膜脂質の相互調節機構が存在しているのである (図 2 左側)。

このモデルを植物に当てはめてみたとき問題となるのは、ER-TGN コンタクトサイトが植物にも存在するか否かである。ゴルジ体の動きが微小管に依存している動物細胞とは対照的に、植物のゴルジ体は他の多くのオルガネラと同じようにアクチン-ミオシン系に依存し、原形質流動に乗って毎秒数  $\mu\text{m}$  の速度で移動する (Ito et al. 2014)。TGN は、移動するゴルジ体本体の *trans* 側に会合しているものもあれば、ゴルジ体から離れて全く異なる動きをするポピュレーションもある (Viotti et al. 2010; Uemura et al. 2014)。このような激しいダイナミクスの中で、ER とコンタクトサイトを形成して脂質のやりとりをすることが可能であるか、現在のところ全く不明である。シロイヌナズナの根のメリステム領域における電子線トモグラフィ解析では、ゴルジ体は必ず *cis* 側を ER に向けており、ER からゴルジ体へ向かう COPII 小胞の出芽部位 (ER exit site; ERES) のほとんどがゴルジ体から 300 nm の範囲にあると報告さ

れている (Kang and Staehelin 2008)。これは ER とゴルジ体 *cis* 槽との密接な関係を示すものではあるが、一般に「オルガネラコンタクトサイト」と呼ばれるような膜同士の近接とは異なっており、ER と TGN の関係も定かではない。光ピンセットを用いてゴルジ体を引っ張るというアプローチにより、ER 膜とゴルジ体膜とが物理的に繋留されていることを明らかにし、ゴルジ体に局在するコイルドコイルタンパク質がそれに寄与しているという報告もなされているが、これが TGN に関係するかどうかはわかっていない (Sparkes et al. 2009; Osterrieder et al. 2017)。哺乳類の ER-TGN コンタクトサイトで機能する OSBP と共通したステロール結合ドメインを持つ ORP (OSBP-related proteins) は植物にも存在し、シロイヌナズナのゲノムには 12 個の ORP 候補遺伝子がコードされている (Skirpan et al. 2006)。そのうちのひとつである ORP3a は、動物の OSBP と結合する ER 局在膜タンパク質 VAP のホモログ PVA12 (VAP27-3 と呼ばれる) と相互作用し、タンパク質全長では ER に、PVA12 結合部位に変異を導入するとサイトゾルとゴルジ体に局在する。このことから、OSBP と同じように ER とゴルジ体/TGN の間にまたがってステロールの輸送を行っているのではないかと推測されているが (Saravanan et al. 2009)、決定的な証拠はまだ欠けていると言わざるを得ないのが現状である。

### 2-3. 植物細胞の TGN でのスフィンゴ脂質による PI 4 P 調節機構

筆者が所属していたフランスのボルドー大学・CNRS の研究グループでは、TGN に局在する SANRE 分子である SYP61 をマーカーとして、シロイヌナズナ個体から TGN の膜小胞を免疫沈降し、そこに含まれる脂質を解析することで、VLCFA を持つスフィンゴ脂質が特に多く濃縮していることを見出していた。さらに、VLCFA の炭素鎖の伸長を阻害する薬剤である Metazachlor (Mz, 図 1 上) を用いて、このスフィンゴ脂質の脂肪酸鎖の長さを短い状態にすると、根において細胞膜の apical 面へ本来輸送されるべき PIN2 の TGN からの輸送が異常になり、その結果、巨視的な表現型として根の重力屈性異常が引き起こされることも発見していた (Wattelet-Boyer et al. 2016)。驚くべきことに、細胞膜の basal 側に局在する PIN1 の輸送や極性は Mz 処理によって全く影響されず、Mz が引き起こすスフィンゴ脂質の脂肪酸鎖長の変化は、TGN からの全ての輸送に一律に関わるのではなく、少なくとも PIN2 を含む特異的な輸送ルートにのみ関与していることが示唆された。

TGN は本来小胞がブドウの房のようにチューブで繋がった形態をしているが、Mz 処理によって小胞の肥大やチューブ状構造の減少という異常を示す (Wattelet-Boyer et al. 2016)。このような TGN の膜構造の形態異常は、TGN で PI4P を産生する PI4K $\beta$  をコードする遺伝子欠損変異体で見られるものと共通しており、さらにその変異体は Mz 処理への感受性が低いことがわかった (Kang et al. 2011; Ito et al. 2021b)。これらの結果は、植物でもスフィンゴ脂質と PI4P の間になんらかのつながりがあることを示していた。そこで、PI4P に特異的なバイオセンサーを用いて PI4P の細胞内局在を観察したところ、Mz 処理を行うと TGN に PI4P が蓄積することが明らかになった (図 1 下)。これは単離 TGN 小胞のリピドミクス解析によっても確認することができた。同様の TGN への PI4P の蓄積は、セラミドから GIPC を合成する経路で働く酵素 IPCS のノックダウンによっても観察されたことから、やはりスフィンゴ脂質により TGN の PI4P レベルが影響されることが確認された。この PI4P がどこからやってくるの

かを明らかにするため、動物で PI4P と対向輸送されるステロールやホスファチジルセリンについても単離小胞膜の解析やバイオセンサーを用いた観察を行ったが、Mz 処理による変化はなく、これらの脂質の対向輸送システムが関わっている可能性は低いと考えられた (Ito et al. 2021b)。PI4K と PI3K の阻害剤である Wortmannin を使った解析により、PI4K による PI4P の生成は直接的には関わっていないことを示唆する結果も得られた (Ito et al. 2021a)。

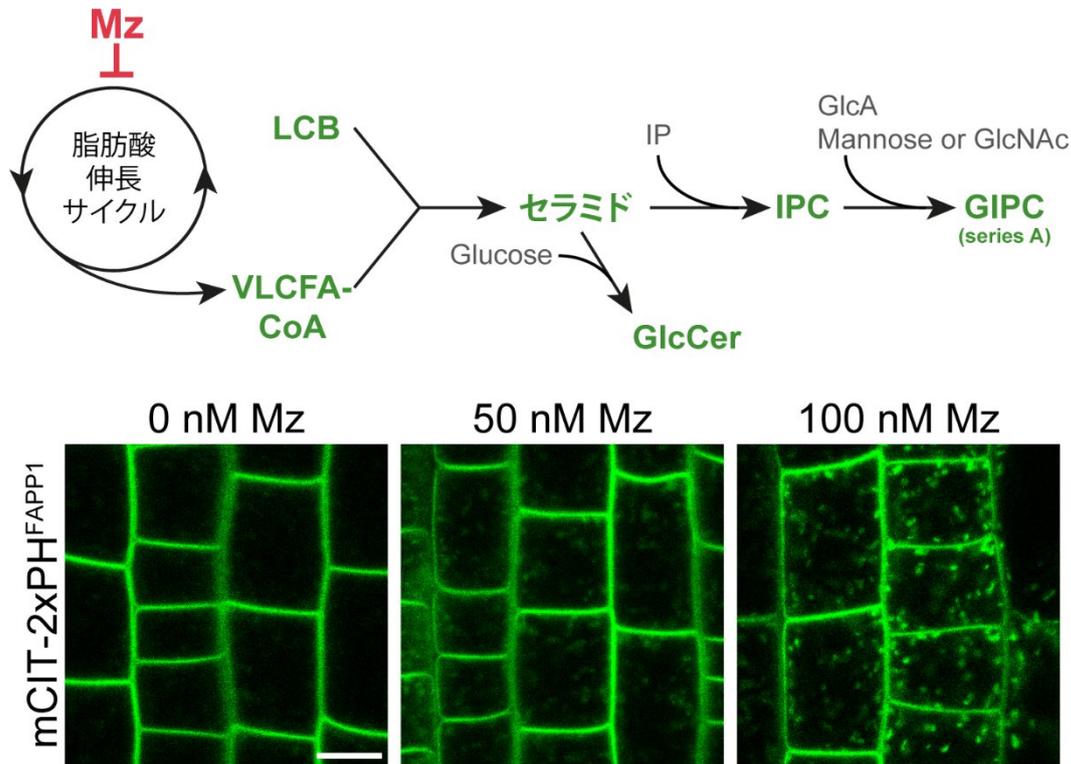


図 1. Mz 処理による PI4P 局在の変化

(上) 植物のスフィンゴ脂質合成経路の模式図。Mz は最初の脂肪酸伸長サイクルを阻害する。Ito et al. 2021b より改変。

(下) PI4P バイオセンサーである mCitrine-2xPH<sup>FAPP1</sup> を発現させたシロイヌナズナに Mz 処理を行った際の、根の表皮細胞の共焦点蛍光像。Mz の濃度を上げると、細胞内のドット (TGN) への PI4P の蓄積が起こる。スケールバー=10  $\mu\text{m}$ 。

他のオルガネラからの供給でも、PI4K による産生でもない、新たな PI4P レベル調整メカニズムで機能する分子として明らかになったのはホスホイノシタイドの加水分解酵素 PI-PLC (phosphoinositide-specific phospholipase C) であった。単離 TGN 小胞のプロテオミクス解析を行ったところ、多くの TGN マーカーやホスホイノシタイド関連タンパク質が Mz 処理で変化しなかった一方、PI-PLC2/7 が Mz 処理下で大幅に減少していたのである。PI-PLC は PI4,5P<sub>2</sub> や PI4P の親水頭部を切断する酵素であるため、TGN において PI-PLC が減少すれば、PI4P の分解が減少し、結果として PI4P 量の増加につながる。これを裏付けるように、PI-PLC の阻害剤 U73122 の処理は、TGN への PI4P の蓄積、PIN2 の輸送阻害と極性の喪失という、Mz 処理と同様の現象を引き起こした。これらの結果を総合して、スフィンゴ脂質が TGN に局在する PI-PLC の量を介して PI4P レベルをローカルに調節し、それが PIN2 を含む特定の積荷の TGN

におけるソーティングに寄与するという、スフィンゴ脂質-PI4P 間の新たな関係を提唱するに至った (図 2 右側, Ito et al. 2021b)。

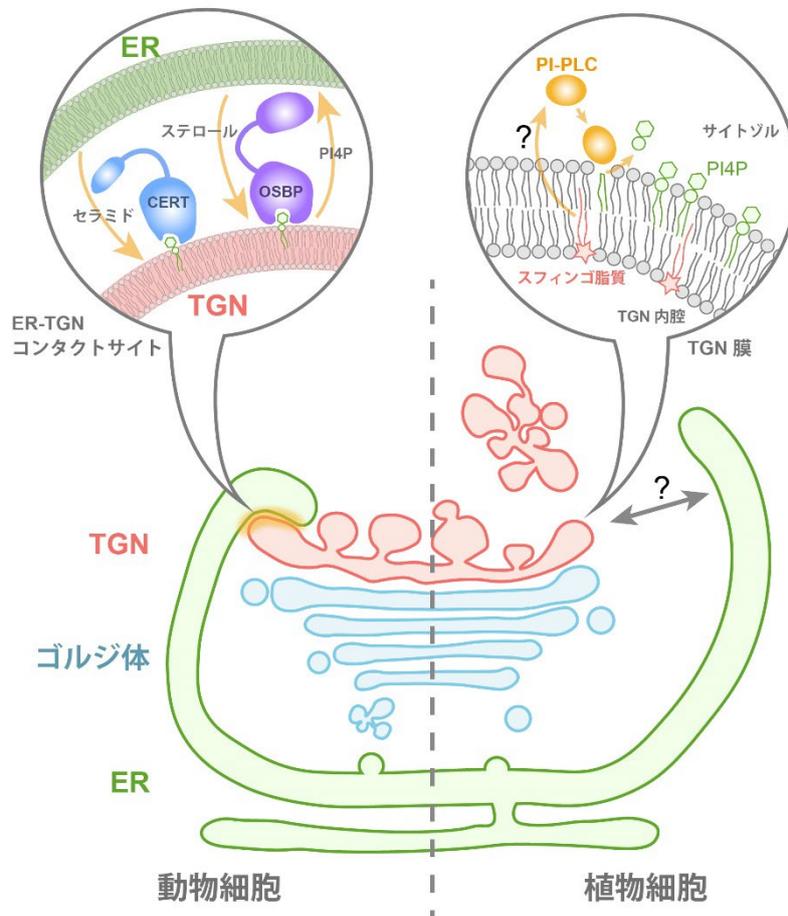


図 2. 動物と植物の TGN における脂質動態

(左側) 動物細胞の ER-TGN コンタクトサイトにおける膜脂質のやりとり。例として CERT と OSBP のみを示しているが、このほかにも多数のタンパク質が機能している。(右側) 植物細胞の TGN 膜におけるスフィンゴ脂質と PI4P の関係。TGN 内腔側リーフレットのスフィンゴ脂質が、サイトゾル側での PI-PLC のリクルートを介して PI4P の恒常性に関与する。ER-TGN コンタクトサイトの存在は確認されていない。

興味深いのは、スフィンゴ脂質の種類によって、TGN での積荷ソーティングにおける役割に違いがあることが示唆されたことである。Markham らの報告によると、VLCFA をセラミド分子に取り込むセラミド合成酵素を特異的に阻害する Fumonisin B1 処理を行うと、Mz とは逆に PIN1 の輸送・局在が阻害される一方で、PIN2 は影響を受けない (Markham et al. 2011)。Mz と Fumonisin B1 の効果を比較すると、両者とも脂質の量には影響しないが、Mz は糖付加を受けたスフィンゴ脂質 (GlcCer や GIPC) の脂肪酸鎖の長さに、Fumonisin B1 はセラミドの脂肪酸鎖の長さに働きかける傾向がある (Markham et al. 2011; Ito et al. 2021b)。すなわち、TGN から apical 面と basal 面への異なる輸送小胞を形成するにあたって、スフィンゴ脂質を使い分けた別々のメカニズムが働いているのではないかと考えられる。

スフィンゴ脂質がどのようにして PI-PLC の局在を変化させるのかは、現在のところ全く不明である。特に、ノックダウンによって Mz と同様の表現型が得られた IPCS が生合成に関わ

る GIPC は、TGN の内腔側のリーフレットに局在していると考えられているのに対し、PLC はサイトゾル側に存在するタンパク質であり、両者が直接的に相互作用することは考えにくい。この現象にスフィンゴ脂質の脂肪酸鎖の長さが重要であることを鑑みると、VLCFA が脂質二重膜の中で反対側のリーフレットにまで侵入することでサイトゾル側の膜表面を変化させ、タンパク質のリクルートにも影響するのかもしれない。あるいは、膜貫通型の未知のタンパク質が介在している可能性も考えられる。また最近、通常塩ストレス下で観察されるサイトゾルへの  $\text{Ca}^{2+}$  の蓄積が、IPCS の下流ではたらく酵素 IPUT1 (IPC glucuronosyltransferase 1) の変異体では起こらないということが報告された。この結果を足掛かりとした解析により、細胞膜の GIPC の頭部への  $\text{Na}^+$  イオンの結合が、カルシウムチャネルによるサイトゾルへの  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を促進することが明らかになった (Jiang et al. 2019)。植物の PI-PLC は C 末に  $\text{Ca}^{2+}$  に結合する C2 ドメインを有しており、このドメインのホスホイノシタイドへの結合が  $\text{Ca}^{2+}$  によって正に制御されていると考えられている (Pokotylo et al. 2014)。TGN においても、積荷の増加といったなんらかのトリガーによって、内腔側へ流入した  $\text{Na}^+$  が GIPC と結合することでサイトゾルへの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が起こり、局所的に PI-PLC の膜へのリクルートが促進されるのではといったことも考えられるが、未だ仮説段階である。さらに、このスフィンゴ脂質による PI4P の制御が、植物のみが獲得したメカニズムであるのか、または他の真核生物にも保存されているのかについても、今後の研究が待たれる。

### 3. 細胞生物学的手法と脂質解析の融合

脂質研究の分野と細胞生物学的研究分野では、よく使われる手法に多少の違いがある。ここでは、両分野の融合にあたって特に強力と思われるツールを細胞生物学側の立場から紹介し、将来の展望を述べたい。

#### 3-1. 薬剤処理の活用

細胞生物学や膜交通の分野では、様々な薬剤を用いて特定の生化学反応を阻害し、その反応を観察するのは定石のひとつである。前章で紹介した植物のスフィンゴ脂質-PI4P の関わりと膜交通への影響を調べる過程でも、解析のカギとなった Mz に加え、Brefeldin A, Wortmannin, Fumonisin B1, U73122 と、いくつもの阻害剤を駆使することとなった。TGN からの輸送をブロックするために Brefeldin A を用いるように、阻害剤処理が引き起こす結果そのものをツールとして利用する場合はさておき、特定のタンパク質を阻害する目的で用いる場合には特異性の問題が常につきまとうため、同じタンパク質に作用する全く別の阻害剤との比較や変異体を用いた遺伝学的な解析など、他の手段による補強がほぼ不可欠になる。とはいえ、遺伝子重複が多く、多重変異体の作出に多大な時間と労力を要する植物の場合、薬剤処理は類似の分子の機能を一気に阻害できる魅力的な手段であると言える。例えば Mz は除草剤として用いられるクロロアセトアミドのひとつであり、分子的なターゲットは 3-ケトアシル CoA 合成酵素 (KCS) である (Böger 2003)。シロイヌナズナの KCS ファミリータンパク質は 21 個に及び、そのうち調べられている 7 個の KCS すべてが Mz によって強く阻害される (Joubès et al. 2008; Tresch et al. 2012)。これらすべての多重変異体を作成するのは至難の業であり、数

十分～数日の処理で効果が観測できる薬剤処理の利便性は言うまでもない。近年は、膨大な化合物ライブラリーの中から特定の効果を持つものをスクリーニングし、そのターゲットを特定することで分子機構の解明につなげたり、薬剤処理への感受性によって変異体のスクリーニングを行ったりと、ケミカルバイオロジー、ケミカルジェネティクスと呼ばれる手法が発達しつつあり、植物研究への応用も進んできている（能年 2016）。薬剤の活用は、今後ますます広がっていくと期待される。

### 3-2. 膜脂質の可視化

顕微鏡の発明が「細胞」の発見をもたらしたことに始まり、細胞生物学は常に顕微鏡や可視化技術の進歩と共に発展してきた。GFP を代表とする蛍光タンパク質による生きた細胞でのタンパク質の可視化が爆発的な成果を生み続けている現在、膜交通やオルガネラ研究の分野において、脂質、特に細胞内膜系の膜脂質の可視化が待ち望まれている。特定の脂質については、親水基に特異的に結合するタンパク質の脂質結合ドメインに蛍光タンパク質を融合させたものを発現させることで、間接的に局在を観察できる（Colin et al. 2021）。ホスホイノシタイドはその最たる例であり、前述の PI4P の細胞内分布の可視化は、様々な PI4P 結合タンパク質の PH ドメインに蛍光タンパク質をつなげた「バイオセンサー」を利用して行われた（Simon et al. 2014, 2016; Ito et al. 2021b）。PI4P だけでなく、同様にして他のホスホイノシタイド分子種も可視化したシロイヌナズナ株のシリーズは、Jaillais らのグループによって“PIP line”として配布されている（Simon et al. 2014）。こういったバイオセンサーの活用は、ダイナミックに変化する細胞内の脂質の挙動を知るのに非常に有用であると言える一方、脂質認識ドメインが脂質に結合してマスクしてしまうことで、膜脂質の本来の機能を損ない、結果的に生理学的に意味のある観察が行えない危険も織り込んでおく必要がある。また、植物のスフィンゴ脂質のように頭部に多様な修飾が付加される場合、その頭部を認識するバイオセンサーの開発は困難であり、動物で利用されているヒトのスフィンゴ脂質結合ドメインを用いたバイオセンサーを植物に応用する試みも、現在のところ成功には至っていない（Fougère et al. 2024）。

このような状況を打破する福音となりうるのが、2022 年のノーベル化学賞となったクリックケミストリーの利用である。クリックケミストリーとは、特定の組み合わせの官能基（代表的なのはアジドとアルキン）を持った分子が、特異的かつ効率よく共有結合を形成する反応であり、官能基が付加された 2 種類の分子を生体内で繋ぐことができる。ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンといったコリンを含むリン脂質については、クリック反応のためのアジドを付加したコリンと、オルガネラ特異的に局在する蛍光物質にアルキンを付加したものを組み合わせて、オルガネラ特異的に脂質をラベルする方法が開発され、生きた動物細胞での観察例が報告されている（Tamura et al. 2020）。また、異なるオルガネラ局在傾向を持つアジドコリンアナログを用いることで、オルガネラ特異的にホスファチジルコリンをラベルする手法も提案されている（Chiu and Baskin 2022）。植物細胞での観察例はまだ報告されていないものの、今後の展開が期待される。

### 3-3. 脂質がもたらす植物膜交通研究の展望

クリックケミストリーのような技術的な進展は確実にあるものの、細胞内での膜脂質の可視化、それもサブオルガネラレベルの観察は現在のところは困難であり、細胞内膜系において脂質のナノドメインの存在はまだ確かめられていない。しかしタンパク質サイドからは、植物の TGN の中に複数の異なるサブドメイン、あるいは『ゾーン』が存在するという認識が、複数の TGN 局在タンパク質の可視化と、光学顕微鏡の分解能の向上によって広まりつつある。TGN 局在のタンパク質同士でも共局在しない例があることは 2000 年代の初めから報告されていたが、近年超解像顕微鏡での 3 色同時観察によって、実際にひとつの TGN 上で、細胞膜・細胞外へ向かう膜交通経路で機能するタンパク質と、液胞へ向かう膜交通経路で機能するタンパク質が別々に局在していることが確かめられた (Shimizu et al. 2021)。こういったゾーンがどのように形成されるのかは明らかではないが、膜脂質が関与していることは大いに考えられ、超解像レベルでのタンパク質と膜脂質の同時可視化の実現は、この謎の解明のための重要な鍵となるだろう。また、TGN 以外でも、酵母の ER では積荷の種類によってゴルジ体への輸送小胞が出芽する ERES が使い分けられ、そのソーティングにセラミドの脂肪酸鎖の長さに関わっていることがわかっている (Muñiz et al. 2001; Rodriguez-Gallardo et al. 2020)。植物でも、タバコ BY-2 細胞で Fumonisin B1 処理によって ER からゴルジ体へのタンパク質輸送が阻害されることが報告されており、分泌経路の中で TGN より早い段階においても、膜脂質が積荷のソーティングや輸送になんらかの役割を果たしていることが推測される (Aubert et al. 2011)。今後も、様々なオルガネラ間に張り巡らされた複雑な交通網のあらゆるステップで、膜脂質の役割に光が当たっていくかもしれない。

## 4. おわりに

本稿は、日本植物学会第 87 回大会において開催されたシンポジウム『脂質が旗振る植物の生命現象』がきっかけとなって執筆された。筆者の専門である膜交通やオルガネラ研究の分野においては、オルガネラも輸送小胞も膜脂質なしには成り立たないにもかかわらず、タンパク質に着目した解析の比重が非常に大きい。筆者もたまたま脂質の世界に足を踏み入れることになったが、苦手意識を持っていたことは否定できない。そんな中、このシンポジウムで話をしないかとお声掛けいただき、また脂質研究の垣根を低くしたいというオーガナイザーの先生方のお話を伺って、脂質についてはほとんど素人であることを言い訳しつつ、本稿で紹介した植物 TGN のスフィンゴ脂質と PI4P について発表をさせていただいた。膜交通研究の側と脂質研究の側の双方に、新しい発見や視点を提供できていれば幸甚である。

細胞生物学では顕微鏡で“観る”ことが重視されているが、脂質は分子特異的な可視化ツールに乏しかったことが、脂質研究との間に溝があった理由のひとつなのではないかと思われる。近年、新しい可視化手段の発展に伴って、植物だけでなくオルガネラ研究の分野全体で膜脂質の注目度が高まっているのを感じている。これから先、両分野のさらなる融合によって新たな扉が開かれていくことを願ってやまない。

## 謝辞

最後に、シンポジウムのオーガナイザーである永田賢司先生（東京大学）と神保晴彦先生（埼玉大学）に、また本稿で紹介した TGN の脂質の研究において筆者の postdoc supervisor であった Yann Boutté 先生と、ボルドー大学・CNRS の Membrane Biogenesis Laboratory の関係者の皆様、そして本稿の執筆にあたりアドバイスをいただいた現所属先の植村知博先生（お茶の水女子大学）に、厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- Antignani V, Klocko AL, Bak G, Chandrasekaran SD, Dunivin T, Nielsen E (2015) Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4K $\beta$ 1/ $\beta$ 2 Phosphatidylinositol-4 Kinases by the Small GTPase RabA4B Plays Important Roles during Salicylic Acid-Mediated Plant Defense Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 243–261. doi: 10.1105/tpc.114.134262
- Antony B, Bigay J, Mesmin B (2016) The Oxysterol-Binding Protein Cycle: Burning Off PI(4)P to Transport Cholesterol. *Annu Rev Biochem* 87: 1–29. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044924
- Aubert A, Marion J, Boulogne C, Bourge M, Abreu S, Bellec Y, Faure J, Satiat-Jeunemaitre B (2011) Sphingolipids involvement in plant endomembrane differentiation: the BY2 case. *Plant J* 65: 958–971. doi: 10.1111/j.1365-313x.2011.04481.x
- Balla A, Tuymetova G, Tsiomenko A, Várnai P, Balla T (2005) A Plasma Membrane Pool of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Is Generated by Phosphatidylinositol 4-Kinase Type-III Alpha: Studies with the PH Domains of the Oxysterol Binding Protein and FAPP1. *Mol Biol Cell* 16: 1282–1295. doi: 10.1091/mbc.e04-07-0578
- Böger P (2003) Mode of Action for Chloroacetamides and Functionally Related Compounds. *J Pestic Sci* 28: 324–329. doi: 10.1584/jpestics.28.324
- Boutté Y, Crosnier MT, Carraro N, Traas J, Satiat-Jeunemaitre B (2006) The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: studies on PIN proteins. *J Cell Sci* 119: 1255–1265. doi: 10.1242/jcs.02847
- Cacas JL, Furt F, Guédard ML, Schmitter JM, Buré C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule JJ, Simon-Plas F, Mongrand S (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Prog Lipid Res* 51: 272–299. doi: 10.1016/j.plipres.2012.04.001
- Capasso S, Sticco L, Rizzo R, Pirozzi M, Russo D, Dathan NA, Campelo F, Galen J, Hölltä-Vuori M, Turacchio G, et al (2017) Sphingolipid metabolic flow controls phosphoinositide turnover at the *trans*-Golgi network. *EMBO J* 36: 1736–1754. doi: 10.15252/embj.201696048
- Cassim AM, Grison M, Ito Y, Simon-Plas F, Mongrand S, Boutté Y (2020) Sphingolipids in plants: a guidebook on their function in membrane architecture, cellular processes, and environmental or developmental responses. *Febs Lett* 594: 3719–3738. doi: 10.1002/1873-3468.13987
- Chiu DC, Baskin JM (2022) Organelle-Selective Membrane Labeling through Phospholipase D-Mediated Transphosphatidylation. *JACS Au* 2: 2703–2713. doi: 10.1021/jacsau.2c00419

- Colin L, Martin-Arevalillo R, Bovio S, Bauer A, Vernoux T, Caillaud MC, Landrein B, Jaillais Y (2021) Imaging the living plant cell: from probes to quantification. *Plant Cell* 34: 247–272. doi: 10.1093/plcell/koab237
- Dettmer J, Hong-Hermesdorf A, Stierhof YD, Schumacher K (2006) Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 715–730. doi: 10.1105/tpc.105.037978
- Dippold HC, Ng MM, Farber-Katz SE, Lee SK, Kerr ML, Peterman MC, Sim R, Wiharto PA, Galbraith KA, Madhavarapu S, et al (2009) GOLPH3 Bridges Phosphatidylinositol-4- Phosphate and Actomyosin to Stretch and Shape the Golgi to Promote Budding. *Cell* 139: 337–351. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.052
- Drdová EJ, Synek L, Pečenková T, Hála M, Kulich I, Fowler JE, Murphy AS, Žárský V (2013) The exocyst complex contributes to PIN auxin efflux carrier recycling and polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant J* 73: 709–719. doi: 10.1111/tpj.12074
- Fougère L, Mongrand S, Boutté Y (2024) The function of sphingolipids in membrane trafficking and cell signaling in plants, in comparison with yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids* 1869: 159463. doi: 10.1016/j.bbalip.2024.159463
- Geldner N, Friml J, Stierhof YD, Jürgens G, Palme K (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425–428. doi: 10.1038/35096571
- Godi A, Pertile P, Meyers R, Marra P, Tullio GD, Iurisci C, Luini A, Corda D, Matteis MAD (1999) ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase- $\beta$  and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> on the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 1: 280–287. doi: 10.1038/12993
- Hama H, Schnieders EA, Thorner J, Takemoto JY, DeWald DB (1999) Direct Involvement of Phosphatidylinositol 4-Phosphate in Secretion in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274: 34294–34300. doi: 10.1074/jbc.274.48.34294
- Hammond GRV, Machner MP, Balla T (2014) A novel probe for phosphatidylinositol 4-phosphate reveals multiple pools beyond the Golgi. *J Cell Biol* 205: 113–126. doi: 10.1083/jcb.201312072
- 石川寿樹 (2020) 植物固有なスフィンゴ脂質糖鎖の多様な構造と機能 植物で独自に進化したスフィンクスのナゾ. *化学と生物* 58: 659–666. doi: 10.1271/kagakutoseibutsu.58.659
- Ito Y, Esnay N, Fougère L, Platre MP, Cordelières F, Jaillais Y, Boutté Y (2021a) Inhibition of Very Long Chain Fatty Acids Synthesis Mediates PI3P Homeostasis at Endosomal Compartments. *Int J Mol Sci* 22: 8450. doi: 10.3390/ijms22168450
- Ito Y, Esnay N, Platre MP, Wattelet-Boyer V, Noack LC, Fougère L, Menzel W, Claverol S, Fouillen L, Moreau P, et al (2021b) Sphingolipids mediate polar sorting of PIN2 through phosphoinositide consumption at the *trans*-Golgi network. *Nat Commun* 12: 4267. doi: 10.1038/s41467-021-24548-0
- Ito Y, Uemura T, Nakano A (2014) Formation and maintenance of the Golgi apparatus in plant cells. In: Kwang JW (ed) *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, pp 221–87
- Jaillais Y, Ott T (2019) The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective. *Plant Physiol* 182: 1682–1696. doi: 10.1104/pp.19.01349

- Jiang Z, Zhou X, Tao M, Yuan F, Liu L, Wu F, Wu X, Xiang Y, Niu Y, Liu F, et al (2019) Plant cell-surface GIPC sphingolipids sense salt to trigger Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* 572: 341–346. doi: 10.1038/s41586-019-1449-z
- Joubès J, Raffaele S, Bourdenx B, Garcia C, Laroche-Traineau J, Moreau P, Domergue F, Lessire R (2008) The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling. *Plant Mol Biol* 67: 547–566. doi: 10.1007/s11103-008-9339-z
- Kang BH, Nielsen E, Preuss ML, Mastronarde D, Staehelin LA (2011) Electron Tomography of RabA4b- and PI-4K $\beta$ 1-Labeled *Trans* Golgi Network Compartments in *Arabidopsis*. *Traffic* 12: 313–329. doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01146.x
- Kang BH, Staehelin LA (2008) ER-to-Golgi transport by COPII vesicles in *Arabidopsis* involves a ribosome-excluding scaffold that is transferred with the vesicles to the Golgi matrix. *Protoplasma* 234: 51–64. doi: 10.1007/s00709-008-0015-6
- Kleine-Vehn J, Wabnik K, Martinière A, Łangowski Ł, Willig K, Naramoto S, Leitner J, Tanaka H, Jakobs S, Robert S, et al (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol Syst Biol* 7: 540–540. doi: 10.1038/msb.2011.72
- Klemm RW, Ejsing CS, Surma MA, Kaiser HJ, Gerl MJ, Sampaio JL, Robillard Q de, Ferguson C, Proszynski TJ, Shevchenko A, et al (2009) Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the *trans*-Golgi network. *J Cell Biology* 185: 601–612. doi: 10.1083/jcb.200901145
- Kumagai K, Hanada K (2019) Structure, functions and regulation of CERT, a lipid-transfer protein for the delivery of ceramide at the ER–Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett* 593: 2366–2377. doi: 10.1002/1873-3468.13511
- Łangowski Ł, Wabnik K, Li H, Vanneste S, Naramoto S, Tanaka H, Friml J (2016) Cellular mechanisms for cargo delivery and polarity maintenance at different polar domains in plant cells. *Cell discovery* 2: 16018. doi: 10.1038/celldisc.2016.18
- Levine TP, Munro S (2002) Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and -Independent Components. *Curr Biol* 12: 695–704. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00779-0
- Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Sci New York N Y* 327: 46–50. doi: 10.1126/science.1174621
- Lynch DV, Dunn TM (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *N Phytol* 161: 677–702. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.00992.x
- Markham JE, Jaworski JG (2007) Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21: 1304–1314. doi: 10.1002/rcm.2962
- Markham JE, Molino D, Gissot L, Bellec Y, Hématy K, Marion J, Belcram K, Palauqui JC, Satiat-JeuneMaître B, Faure JD (2011) Sphingolipids Containing Very-Long-Chain Fatty Acids Define a

- Secretory Pathway for Specific Polar Plasma Membrane Protein Targeting in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 2362–2378. doi: 10.1105/tpc.110.080473
- 松浦友紀, 田中博和 (2020) オーキシン輸送体の局在制御因子が関わる発生制御. *BSJ-Rev* 11: 172–182. doi: 10.24480/bsj-review.11b7.00189
- Muñiz M, Morsomme P, Riezman H (2001) Protein Sorting upon Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Cell* 104: 313–320. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00215-x
- Nagano M, Ishikawa T, Fujiwara M, Fukao Y, Kawano Y, Kawai-Yamada M, Shimamoto K (2016) Plasma Membrane Microdomains Are Essential for Rac1-RbohB/H-Mediated Immunity in Rice. *Plant Cell* 28: 1966–1983. doi: 10.1105/tpc.16.00201
- Noack LC, Jaillais Y (2017) Precision targeting by phosphoinositides: how PIs direct endomembrane trafficking in plants. *Curr Opin Plant Biol* 40: 22–33. doi: 10.1016/j.pbi.2017.06.017
- 能年義輝 (2016) 植物科学におけるハイスループットケミカルスクリーニングとその利用. *植物の生長調節* 51: 138–143. doi: 10.18978/jsr.51.2\_138
- Osterrieder A, Sparkes IA, Botchway SW, Ward A, Ketelaar T, Ruijter N de, Hawes C (2017) Stacks off tracks: a role for the golgin AtCASP in plant endoplasmic reticulum-Golgi apparatus tethering. *J Exp Bot* 68: 3339–3350. doi: 10.1093/jxb/erx167
- Ott T (2017) Membrane nanodomains and microdomains in plant–microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* 40: 82–88. doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.008
- Pata MO, Hannun YA, Ng CK (2010) Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *N Phytol* 185: 611–630. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x
- Pokotylo I, Kolesnikov Y, Kravets V, Zachowski A, Ruelland E (2014) Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: Variations around a canonical theme. *Biochimie* 96: 144–157. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.004
- Ramazanov BR, Tran ML, Blume J von (2021) Sending out molecules from the TGN. *Curr Opin Cell Biol* 71: 55–62. doi: 10.1016/j.ceb.2021.02.005
- Rizzo R, Russo D, Kurokawa K, Sahu P, Lombardi B, Supino D, Zhukovsky MA, Vocat A, Pothukuchi P, Kunnathully V, et al (2021) Golgi maturation-dependent glycoenzyme recycling controls glycosphingolipid biosynthesis and cell growth via GOLPH3. *EMBO J* 40: e107238. doi: 10.15252/embj.2020107238
- Robinson DG, Pimpl P (2014) Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci* 19: 134–139. doi: 10.1016/j.tplants.2013.10.008
- 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, et al (2020) Ceramide chain length–dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites. *Sci Adv* 6: eaba8237. doi: 10.1126/sciadv.aba8237
- Saravanan RS, Slabaugh E, Singh VR, Lapidus LJ, Haas T, Brandizzi F (2009) The targeting of the oxysterol-binding protein ORP3a to the endoplasmic reticulum relies on the plant VAP33 homolog PVA12. *Plant J* 58: 817–830. doi: 10.1111/j.1365-313x.2009.03815.x

- Shimizu Y, Takagi J, Ito E, Ito Y, Ebine K, Komatsu Y, Goto Y, Sato M, Toyooka K, Ueda T, et al (2021) Cargo sorting zones in the *trans*-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. *Nat Commun* 12: 1901. doi: 10.1038/s41467-021-22267-0
- Simon MLA, Platre MP, Assil S, Wijk R van, Chen WY, Chory J, Dreux M, Munnik T, Jaillais Y (2014) A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in *Arabidopsis*. *Plant J* 77: 322–337. doi: 10.1111/tpj.12358
- Simon MLA, Platre MP, Marquès-Bueno MM, Armengot L, Stanislas T, Bayle V, Caillaud MC, Jaillais Y (2016) A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat Plants* 2: 16089. doi: 10.1038/nplants.2016.89
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569–572. doi: 10.1038/42408
- Simons K, Meer GV (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197–6202. doi: 10.1021/bi00417a001
- Skirpan AL, Dowd PE, Sijacic P, Jaworski CJ, Gilroy S, Kao T (2006) Identification and characterization of PiORP1, a *Petunia oxysterol-binding-protein* related protein involved in receptor-kinase mediated signaling in pollen, and analysis of the ORP gene family in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 61: 553–565. doi: 10.1007/s11103-006-0030-y
- Sparkes IA, Ketelaar T, Ruijter NCA de, Hawes C (2009) Grab a Golgi: laser trapping of Golgi bodies reveals in vivo interactions with the endoplasmic reticulum. *Traffic* 10: 567–71. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00891.x
- Sperling P, Heinz E (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids* 1632: 1–15. doi: 10.1016/s1388-1981(03)00033-7
- Surma MA, Klose C, Klemm RW, Ejsing CS, Simons K (2011) Generic Sorting of Raft Lipids into Secretory Vesicles in Yeast. *Traffic* 12: 1139–1147. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01221.x
- Szentpetery Z, Várnai P, Balla T (2010) Acute manipulation of Golgi phosphoinositides to assess their importance in cellular trafficking and signaling. *Proc Natl Acad Sci* 107: 8225–8230. doi: 10.1073/pnas.1000157107
- Tamura T, Fujisawa A, Tsuchiya M, Shen Y, Nagao K, Kawano S, Tamura Y, Endo T, Umeda M, Hamachi I (2020) Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells. *Nat Chem Biol* 16: 1361–1367. doi: 10.1038/s41589-020-00651-z
- Tan X, Feng Y, Liu Y, Bao Y (2016) Mutations in exocyst complex subunit SEC6 gene impaired polar auxin transport and PIN protein recycling in *Arabidopsis* primary root. *Plant Sci* 250: 97–104. doi: 10.1016/j.plantsci.2016.06.001
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB, Friml J (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci CMLS* 63: 2738–2754. doi: 10.1007/s00018-006-6116-5

- Tanaka H, Kitakura S, Rakusová H, Uemura T, Feraru MI, Rycke RD, Robert S, Kakimoto T, Friml J (2013) Cell Polarity and Patterning by PIN Trafficking through Early Endosomal Compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 9: e1003540. doi: 10.1371/journal.pgen.1003540
- Tóth B, Balla A, Ma H, Knight ZA, Shokat KM, Balla T (2006) Phosphatidylinositol 4-Kinase III $\beta$  Regulates the Transport of Ceramide between the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *J Biol Chem* 281: 36369–36377. doi: 10.1074/jbc.m604935200
- Tresch S, Heilmann M, Christiansen N, Looser R, Grossmann K (2012) Inhibition of saturated very-long-chain fatty acid biosynthesis by mefluidide and perfluidone, selective inhibitors of 3-ketoacyl-CoA synthases. *Phytochemistry* 76: 162–171. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.12.023
- Uemura T, Suda Y, Ueda T, Nakano A (2014) Dynamic Behavior of the *trans*-Golgi Network in Root Tissues of *Arabidopsis* Revealed by Super-Resolution Live Imaging. *Plant Cell Physiol* 55: 694–703. doi: 10.1093/pcp/pcu010
- Ukawa T, Banno F, Ishikawa T, Kasahara K, Nishina Y, Inoue R, Tsujii K, Yamaguchi M, Takahashi T, Fukao Y, et al (2022) Sphingolipids with 2-hydroxy fatty acids aid in plasma membrane nanodomain organization and oxidative burst. *Plant Physiol* 189: 839–857. doi: 10.1093/plphys/kiac134
- Venditti R, Rega LR, Masone MC, Santoro M, Polishchuk E, Sarnataro D, Paladino S, D’Auria S, Varriale A, Olkkonen VM, et al (2019) Molecular determinants of ER–Golgi contacts identified through a new FRET–FLIM system. *J Cell Biol* 218: jcb.201812020. doi: 10.1083/jcb.201812020
- Viotti C, Bubeck J, Stierhof YD, Krebs M, Langhans M, Berg W van den, Dongen W van, Richter S, Geldner N, Takano J, et al (2010) Endocytic and Secretory Traffic in *Arabidopsis* Merge in the *Trans*-Golgi Network/Early Endosome, an Independent and Highly Dynamic Organelle. *Plant Cell* 22: 1344–1357. doi: 10.1105/tpc.109.072637
- Wakana Y, Kotake R, Oyama N, Murate M, Kobayashi T, Arasaki K, Inoue H, Tagaya M (2015) CARTS biogenesis requires VAP–lipid transfer protein complexes functioning at the endoplasmic reticulum–Golgi interface. *Mol Biol Cell* 26: 4686–4699. doi: 10.1091/mbc.e15-08-0599
- Walch-Solimena C, Novick P (1999) The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase Pik1 regulates secretion at the Golgi. *Nat Cell Biol* 1: 523–525. doi: 10.1038/70319
- Wang J, Sun HQ, Macia E, Kirchhausen T, Watson H, Bonifacino JS, Yin HL (2007) PI4P Promotes the Recruitment of the GGA Adaptor Proteins to the *Trans*-Golgi Network and Regulates Their Recognition of the Ubiquitin Sorting Signal. *Mol Biol Cell* 18: 2646–2655. doi: 10.1091/mbc.e06-10-0897
- Wang YJ, Wang J, Sun HQ, Martinez M, Sun YX, Macia E, Kirchhausen T, Albanesi JP, Roth MG, Yin HL (2003) Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. *Cell* 114: 299–310. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00603-2
- Wattelet-Boyer V, Brocard L, Jonsson K, Esnay N, Joubès J, Domergue F, Mongrand S, Raikhel N, Bhalerao RP, Moreau P, et al (2016) Enrichment of hydroxylated C24- and C26-acyl-chain sphingolipids mediates PIN2 apical sorting at *trans*-Golgi network subdomains. *Nat Commun* 7: 12788. doi: 10.1038/ncomms12788