

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K12005

研究課題名(和文) LAMP-2のアセンブリ制御を利用した塗布式口腔ケアによる癌治療患者のQOL改善

研究課題名(英文) Improvement of QOL of cancer treatment patients by oral care based on assembly control of LAMP2

研究代表者

横山 三紀 (Yokoyama, Miki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70191533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：リソソームは加水分解酵素を含み、細胞内での分解反応を担当する細胞内小器官であり栄養摂取、不要物の除去、生体防御に必須であり、また神経変性疾患・がんを含む多くの疾患や老化と密接に関連する。Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2)はリソソーム膜に豊富に存在し、リソソームの機能に重要なタンパク質である。本研究では部位特異的な光架橋および立体障害の導入技術を用いてLAMP2の複合体の形成様式を明らかにした。またその複合体形成がおこなわれない場合には、LAMP2によるシャペロン依存性オートファジーの効率が低下することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果はLAMP2の複合体の形成様式に着目することによるリソソームの機能亢進または機能低下の抑制の可能性を示す。LAMP-2はリソソームの食作用に重要な因子であり、本研究の知見は口腔内における細菌排除の効率を高める新たな予防的医療法の開発に役立つことが期待される。またLAMP2はヒトのダノン病(心筋症、ミオパチー、精神遅延を特徴とするX連鎖性遺伝疾患)の責任遺伝子であり、近年ではダノン病に伴う進行性網膜変性やLAMP-2と加齢黄斑変性との関係も報告されている。これらの希少疾患や老化に伴う機能低下への対応においても新たな展開になりうる。

研究成果の概要(英文)：Lysosomes are responsible for intracellular digestion and are essential for nutrient uptake, clearance of unnecessary substances and biological defense. Function of lysosomes is closely related to many diseases including neurodegenerative diseases and cancer, and aging. LAMP2 (lysosomal-associated membrane protein 2) is the abundant protein component of lysosome membrane and important for lysosome function. In the present study, the homophilic interaction of LAMP2 was studied using expanded genetic code technologies that generate photo-crosslinking and/or steric hindrance at specified interfaces. The homophilic interaction of LAMP2 was found to be important for the LAMP2-dependent chaperone-mediated autophagy.

研究分野：口腔生化学、構造生物学

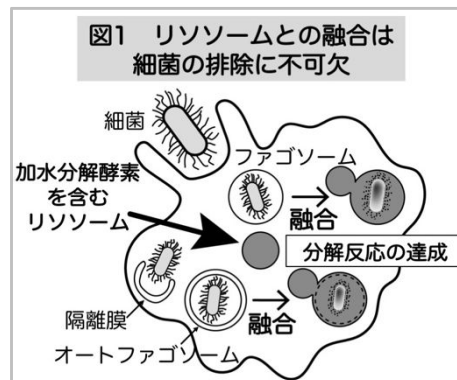
キーワード：LAMP-2 LAMP-1 リソソーム 膜タンパク質アセンブリ 拡張遺伝暗号 光架橋 非天然アミノ酸 シャペロン依存性オートファジー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

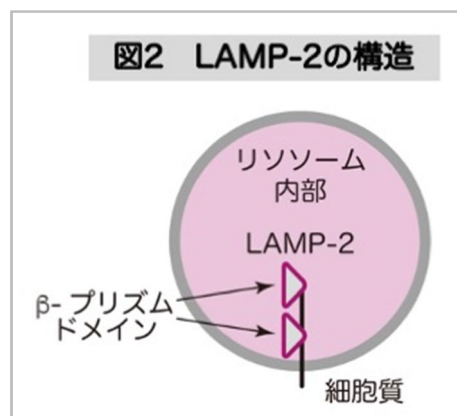
### 1. 研究開始当初の背景

口腔組織は口腔内の常在細菌と絶え間なく侵入する外来性細菌に対する強力な生体防御機構をもつ。しかし、がん治療時には、活発な細胞増殖が抑制され上皮細胞により形成されるバリアが脆弱化することにより歯周組織への細菌の侵入が増加し、感染症による炎症が引き起こされる。これにより口腔機能が低下すると栄養状態の維持が困難になり、全身への二次感染のリスクも増大するため、がん治療時において口腔機能を維持して治療患者のQOLを改善する口腔ケアはきわめて重要である。

リソソームはさまざまな加水分解酵素を含む細胞内小器官である。細菌を取り込んだファゴソームやオートファゴソームがリソソームと融合して細菌が分解される(図1)。またオートファゴソームは酸化ストレスの原因となる障害を受けたミトコンドリアや、不必要に活性化された炎症開始複合体(インフラマソーム)を分解して炎症のレベルを適切な範囲に制御する。リソソームとの融合はファゴサイトーシスとオートファジーによる生体防御、過剰な炎症の抑制の前提条件である。口腔内、特に歯周組織の感染症の発症には多くの原因が複雑に関係するが、リソソーム膜の融合効率を向上させることは、感染症リスクを軽減する基礎的な方策である。



Lysosome-associated membrane proteins 1/2 (LAMP-1, LAMP-2)はリソソーム膜の主要な膜タンパク質である。どちらもタンパク質の大部分はリソソームの内側に向いており、二つの相同なドメインがリンカーで連結された部分、膜貫通領域、短い細胞質側領域から形成される(図2)。本研究者は結晶構造解析によりLAMP-1, LAMP-2のドメインがβ-プリズム構造(短い三角柱)であることを示した(文献1)。



LAMP-1, LAMP-2の単量体の構造は酷似しているにもかかわらず機能的には大きく異なる。LAMP-1欠損マウスは顕著な表現型を示さないが、LAMP-2欠損マウスは多くの組織にオートファゴソームが蓄積し、半数は生後20日から40日以内に死亡する。LAMP-2欠損はヒトのダノン病の原因であり、特に心筋、骨格筋にオートファゴソーム様の小胞が蓄積する。またLAMP-2欠損マウスではリソソームとファゴソームの融合が低下することが示唆され、歯周病の症状を呈する。このようにLAMP-2がリソソームの融合に密接に関与することは知られているが、そのメカニズムは不明である。本研究者はLAMP-1, LAMP-2は異なる部位を用いて複合体を形成すること(分子アセンブリ)を示唆する結果を報告した(文献1)(図2)。その知見をふまえ、分子アセンブリに注目することがLAMP-2に特有のリソソームの融合における役割を解明するための突破口になると考えるに至った。

### 2. 研究の目的

LAMP-2のアセンブリを標的として感染症リスクを軽減するための創薬の開発に貢献するために、部位特異的な非天然アミノ酸の導入技術を用いてLAMP-2のアセンブリ様式を明らかにすることを主な目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 部位特異的な架橋部位の導入によるLAMP2アセンブリ様式の推定

##### 部位特異的な架橋部位の導入

結晶構造解析の結果(文献1)にもとづき、マウスLAMP-2の分子表面(T235, K252, P261, P272, R278, L330)に光反応性の架橋部位(非天然アミノ酸、*p*Bpa: 4-Benzoyl-L-phenylalanine)を導入した。架橋を導入したい位置をAmberコドンに変異させたLAMP-2を作成し、人工的に改変したタンパク質合成系システムと共にHEK293c18細胞に発現させた。培地中に添加した*p*Bpaはタンパク質のAmberコドンの位置に取りこまれる。

##### 光反応性架橋反応を用いた接触面の同定

架橋導入部位が相互作用しているタンパク質との接触面の近傍であれば、光照射により両者の間に共有結合が形成される。このことは細胞を可溶化して電気泳動すれば分子量が大きくなることで確認できる。架橋部位を導入する方にFLAGタグ、相手側にMycタグを付加して抗FLAG抗体による免疫

沈降物を解析することにより、どの位置に架橋を導入した時に架橋が起こるかを調べた。

(2) 部位特異的立体障害の導入による LAMP2 アセンブリの接触面の確認

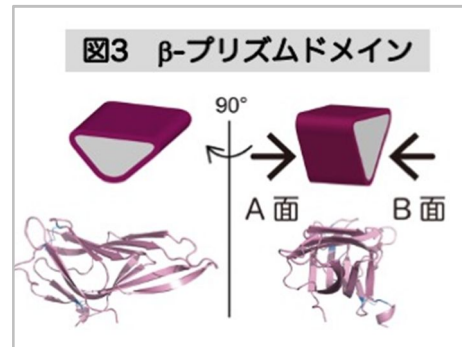
pBpa ではなく、側鎖が大きな非天然アミノ酸である Aloc-Lys を LAMP2-FLAG, LAMP-2-Myc に部位特異的に導入し (T235, Q283)、抗 FLAG 抗体による免疫沈降物中の LAMP-2-Myc を解析した。これにより Aloc-Lys による立体障害により相互作用が弱まる位置を同定した。

(3) シャペロン依存性オートファジーの測定

LAMP2 の機能評価のために、シャペロン依存性オートファジーに注目した。Seki らの方法に従い (文献 2, 3)、代表的なシャペロン依存性オートファジーの基質である GAPDH と Halo タグタンパク質との融合タンパク質 (GAPDH-HT) の細胞質からリソソームへの移行を共焦点顕微鏡により観察した。野生型 LAMP2 およびアセンブリに異常がある N-ドメイン欠失型 LAMP2 を MEF 細胞に発現させた。MEF 細胞は LAMP2 と RBC1CC1/FIP200 を予め欠損させたものを用いた。

4. 研究成果

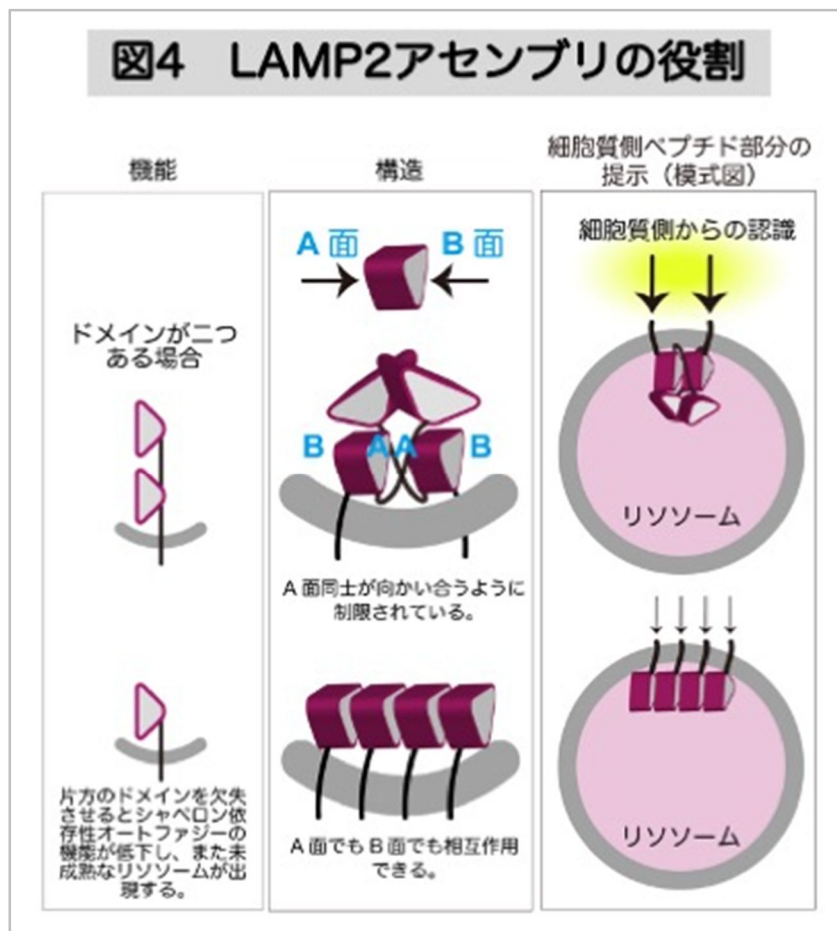
LAMP-2 は三角柱構造 (β-プリズムドメイン) が二つ連結した構造を取り、多くの組織に広く発現している。これに対して LAMP ファミリーに属して特殊な細胞に発現する LAMP-3, LAMP-4, LAMP-5 には β-プリズムドメインが一つしかない。そこでまず β-プリズムドメインが二つあることが LAMP-2 の複合体形成にどのような意味をもつかを調べた。LAMP-2 はシャペロン依存性オートファジーに必須である。LAMP-2 の片方のドメインを除いたところ、シャペロン依存性オートファジーの機能が顕著に低下した (文献 4)。またリソソームの成熟過程も影響を受けた。次に拡張遺伝暗号を用いた非天然アミノ酸の導入技術を利用して、細胞内で膜上に発現している状態の LAMP-2 分子同士の相互作用を調べた。β-プリズムドメインの三角柱の上面と底面をそれぞれ A 面、B 面とすると (図 3)、LAMP-2 分子は A 面同士を向かい合わせていた。一方、片方のドメインを除いた LAMP-2 は A 面でも B 面でも相互作用できた。この結果から、LAMP-2 が二つのドメインをもつことにより A 面同士を向かい合わせていることが明らかになった (図 4) (文献 4)。



LAMP-2 の片方のドメインを除くと A 面でも B 面でも相互作用できるために LAMP-2 分子同士の相互作用は強まるが、その状態で機能は低下していた。そこで、β-プリズムドメインの A 面同士を向かい合わせている構造は LAMP-2 の機能に重要であると考えられる。

本研究の意義は LAMP-2 が一定の様式で複合体を形成すること、それには二つのドメインの存在が必須であることを初めて明らかにした点である。LAMP-2 には末端の配列の異なる 3 種類のスプライズバリエント (LAMP-2A/2B/2C) があり、それらは細胞質側に突き出した短いペプチド部分の配列が異なる。それぞれのペプチド部分に細胞質に存在する分子が結合することにより、異なる作用が引き起こされる。リソソームの内側での LAMP-2 の複合体形成が縁の下の力持ちとして細胞質側ペプチドを一定の配置 (距離間隔) でリソソーム膜上に提示するこ

図4 LAMP2アセンブリの役割



とが、ペプチド部分の認識に重要である可能性が考えられる（図4，右図）。本研究の知見は、LAMP-2が関与する現象の分子機構の解明に貢献する。

#### 引用文献

1. Kazue Terasawa, Yuri Tomabechi, Mariko Ikeda, Haruhiko Ehara, Mutsuko Kukimoto-Niino, Motoki Wakiyama, Katarzyna A Podyma-Inoue, Anupama R Rajapakshe, Tetsuro Watabe, Mikako Shirouzu, Miki Hara-Yokoyama, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479 (2016)489-495.
2. T. Seki, K.I. Yoshino, S. Tanaka, E. Dohi, T. Onji, K. Yamamoto, I. Hide, H.L. Paulson, N. Saito, N. Sakai, Establishment of a novel fluorescence-based method to evaluate chaperone-mediated autophagy in a single neuron, *PLoS one*, 7 (2012) e31232.
3. M. Sato, T. Seki, A. Konno, H. Hirai, Y. Kurauchi, A. Hisatsune, H. Katsuki, Fluorescent-based evaluation of chaperone-mediated autophagy and microautophagy activities in cultured cells, *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 21 (2016) 861-873.
4. Kazue Terasawa, Yuji Kato, Yuta Ikami, Kensaku Sakamoto, Kazumasa Ohtake, Seisuke Kusano, Yuri Tomabechi, Mutsuko Kukimoto-Niino, Mikako Shirouzu, Jun-Lin Guan, Toshihide Kobayashi, Takanori Iwata, Tetsuro Watabe, Shigeyuki Yokoyama, and Miki Hara-Yokoyama, *Autophagy* (in press) <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1911017>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Daisuke Yamamoto, Kou Kayamori, Kei Sakamoto, Maiko Tsuchiya, Tohru Ikeda, Hiroyuki Harada, Tetsuya Yoda, Tetsuro Watabe, Miki Hara-Yokoyama	4. 巻 111
2. 論文標題 Intracellular claudin-1 at the Invasive Front of Tongue Squamous Cell Carcinoma Is Associated With Lymph Node Metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 700-712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14249.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuji Kato, Satoko Arakawa, Kazue Terasawa, Jin-Ichi Inokuchi, Takanori Iwata, Shigeomi Shimizu, Tetsuro Watabe, Miki Hara-Yokoyama	4. 巻 30
2. 論文標題 The Ceramide Analogue N-(1-hydroxy-3-morpholino-1-phenylpropan-2-yl)decanamide Induces Large Lipid Droplet Accumulation and Highlights the Effect of LAMP-2 Deficiency on Lipid Droplet Degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 126891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2019.126891.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miki Hara-Yokoyama, Hidetake Kurihara, Shozo Ichinose, Hironori Matsuda, Shizuko Ichinose, Masaru Kurosawa, Norihiro Tada, Chihiro Iwahara, Kazue Terasawa, Katarzyna A Podyma-Inoue, Koichi Furukawa, Kazuhisa Iwabuchi	4. 巻 67
2. 論文標題 KIF11 as a Potential Marker of Spermatogenesis Within Mouse Seminiferous Tubule Cross-sections	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 813-824
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155419871027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terasawa Kazue, Kato Yuji, Ikami Yuta, Sakamoto Kensaku, Ohtake Kazumasa, Kusano Seisuke, Tomabechi Yuri, Kukimoto-Niino Mutsuko, Shirouzu Mikako, Guan Jun-Lin, Kobayashi Toshihide, Iwata Takanori, Watabe Tetsuro, Yokoyama Shigeyuki, Hara-Yokoyama Miki	4. 巻 -
2. 論文標題 Direct homophilic interaction of LAMP2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2021.1911017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺澤和恵、草野清輔、横山茂之、渡部徹郎、横山三紀
2. 発表標題 二つのbeta-プリズムドメインをもつLAMP-1, LAMP-2は異なるアセンブリ様式を示す
3. 学会等名 第37回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------