

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05837

研究課題名(和文) リソソーム膜の損傷応答におけるEF-ハンド蛋白質ALG-2の生理機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of physiological functions of EF-hand protein ALG-2 in lysosomal membrane damage response

研究代表者

牧 正敏 (Maki, Masatoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・特任教授

研究者番号：40183610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リソソームは細胞内消化を担う膜で覆われた細胞小器官であるが、食飲作用で取り込まれた結晶物や病原体、ある種の脂質などによってその限界膜は裂孔する。この膜損傷は迅速に修復されるか、自食作用によって除去される。本研究では、膜損傷に伴いリソソームから放出されるCa²⁺に応答するALG-2に着目し、その損傷動員の分子機構を解析した。その結果、ALG-2の損傷リソソームへの動員にはCa²⁺とALG-2結合蛋白質であるALIXが必要であった。また、IST1をALG-2近傍蛋白質として同定し、IST1が損傷リソソームへのVPS4の動員と損傷リソソームの自食作用による除去に必要なことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ca²⁺結合蛋白質ALG-2の損傷リソソームへの動員機構を明らかにした。一方で、ALG-2ノックアウト細胞を用いた解析から、ALG-2以外のCa²⁺結合蛋白質のリソソーム損傷応答への関与の可能性が浮き彫りとなった。これは、リソソーム損傷を起点とするCa²⁺シグナル伝達機構の全容解明につながると考えられる。また、リソソーム損傷を誘発した細胞のALG-2近傍蛋白質の探索からリソソーム損傷に応答しリソソームに動員される蛋白質が複数同定された。これらの生理機能を解析することで、リソソーム損傷応答の分子基盤解明とリソソーム損傷に起因する疾患の病態解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Lysosomes are membrane-enclosed organelles responsible for intracellular digestion. The lysosomal limiting membrane is perforated by endocytosed crystallites, pathogens and certain lipids. This lysosomal membrane damage is rapidly repaired, or the damaged lysosomes are degraded via autophagy. In this study, the molecular mechanism of lysosomal recruitment of the Ca²⁺-sensing protein apoptosis-linked gene 2 (ALG-2) was analyzed. As a result, Ca²⁺ and the ALG-2-interacting protein ALIX was found to be required for the recruitment of ALG-2 to damaged lysosomes. In addition, IST1 was identified as a proximity protein for ALG-2 in cells with damaged lysosomes. Analysis of IST1 knockdown cells revealed that IST1 is required for the recruitment of VPS4 to damaged lysosomes and autophagic removal of damaged lysosomes.

研究分野：応用生物化学

キーワード：カルシウム リソソーム ESCRT IST1 膜損傷

1. 研究開始当初の背景

細胞膜などの生体膜の裂孔を狭窄し、それを閉塞する膜修復システムの解析が進められ、その一端を担う蛋白質装置として endosomal sorting complex required for transport-III (ESCRT-III) が同定されている。ESCRT-III は、膜表面で渦巻き状のポリマーを形成し、それらに AAA 型 ATPase VPS4 が作用し、絞り込まれることで膜が狭窄される。ESCRT-III 装置は、ESCRT-I/ESCRT-II あるいは ALG-2-interacting protein X (ALIX) を起点としてポリマーを形成するが、さらにそれらの上流に位置する ESCRT-0 が ESCRT-III がポリマーを形成する場を指示する⁽¹⁾。リソソーム限界膜の損傷部位に ESCRT 装置が動員されるが、ESCRT-0 は同定されていない。リソソームの損傷部位からはリソソーム内腔の Ca^{2+} が放出され、 Ca^{2+} が ESCRT-III の動員に必要であることが示されている。研究代表者らは、 Ca^{2+} 結合蛋白質 ALG-2 が Ca^{2+} 依存的に ALIX と ESCRT-I に結合することを明らかにしている⁽²⁻⁵⁾。これらの背景から、ALG-2 がリソソーム膜の裂孔を感知し、ESCRT-0 として機能する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ALG-2 の損傷リソソームへの動員の分子機構と生理的意義の解明を目的とする。また、損傷リソソームに動員された ALG-2 の近傍に存在する蛋白質を探索し、同定された蛋白質のリソソーム損傷応答における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) リソソーム損傷の誘導と損傷リソソームへ動員される蛋白質の局在観察

ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa とヒト肺上皮腺がん細胞株 A549 に、L-leucyl-leucine methyl ester (LLOMe) を添加しリソソーム損傷を誘導させた。リソソームマーカーとして抗 LAMP1 抗体、損傷リソソームマーカーとして抗ガレクチン 3 抗体、オートファジーの隔離膜およびオートファゴソーム・オートリソソームマーカーとして抗 LC-3 抗体を用いて、間接蛍光抗体法により局在を観察した。画像は共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。ALG-2 ノックアウト細胞は、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて樹立した細胞を用いた⁽⁶⁾。

(2) ALG-2 近傍蛋白質のビオチン標識と同定

ダイズ由来アスコルピン酸ペルオキシダーゼ APX の改変型酵素 APEX2 と ALG-2 の融合蛋白質 (APEX2-ALG-2) を恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立した。そして、ビオチンフェノールを培地に添加し 30 分培養後に、 H_2O_2 を 1 分間処理し、APEX2-ALG-2 に近接する蛋白質をビオチン標識した⁽⁷⁾。この手法では、APEX2 の近傍約 20 nm の蛋白質がビオチン標識できると報告されている。細胞を回収後、細胞溶解液を調製し、ストレプトアビジンビーズを用いてビオチン標識タンパク質を精製した。精製された蛋白質を質量分析により同定した。

(3) CDIP1 と ESCRT-I の結合解析

ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 の ALG-2 ノックアウト細胞⁽⁶⁾に、GFP を融合させた CDIP1 と myc タグを付加した ESCRT-I および ALG-2 を発現させ、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降により、CDIP1 と ESCRT-I の結合とその ALG-2 要求性を解析した。

(4) mTORC1 の活性測定

ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293T に、ALG-2 を標的とする siRNA を導入、あるいはカルモデュリン阻害剤を前処理し、培地を Hank's balanced salt solution (HBSS) に交換し、飢餓

処理を行った。その後、アミノ酸を添加し培養後、細胞を回収した。細胞溶解液を SDS-PAGE で展開し、mTORC1 の基質である S6K1 のリン酸化を特異的に認識する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1) 損傷リソソームへの ALG-2 の動員機構と ALG-2 の役割の解明

HeLa 細胞に、L-leucyl-leucine methyl ester (LLOMe) を添加しリソソーム損傷を誘導させ、抗 ALG-2 抗体を用いた間接蛍光抗体法により ALG-2 の局在を観察した。LLOMe 未処理の細胞では、細胞質の ALG-2 は抗 Sec31A 抗体陽性の小胞体の輸送小胞出芽領域への顕著な分布が観察されたが、LLOMe 処理細胞では抗 LAMP1 抗体陽性のリソソームに局在した。LLOMe 処理細胞における ALG-2 のリソソーム局在の Ca^{2+} 依存性を検討する目的で、細胞を細胞内 Ca^{2+} キレータである BAPTA-AM で前処理した後、LLOMe を添加し ALG-2 の局在を観察したところ、BAPTA-AM 前処理細胞では、ALG-2 のリソソーム局在は減少した。一方、FLAG タグを付加した Ca^{2+} 結合能をもたない ALG-2 の変異体 (FLAG-ALG-2^{E47A/E114A}) を ALG-2 ノックアウト細胞に発現させ、ALG-2 の Ca^{2+} 結合能がリソソーム局在に必要なかを検討した。予想外なことに、FLAG-ALG-2^{E47A/E114A} は LLOMe を処理した細胞においてリソソームに局在した。これらの結果から、リソソーム損傷細胞における ALG-2 のリソソーム局在には Ca^{2+} が必要であるが、ALG-2 の Ca^{2+} 結合能は不要であると考えられた。さらに、ALG-2 の相互作用蛋白質であり、リソソーム損傷の修復を担う ESCRT システムの構成蛋白質である ALIX および tumor susceptibility gene 101 (TSG101) の ALG-2 のリソソーム局在における必要性を検討したところ、ALIX のノックダウン細胞では、ALG-2 のリソソーム局在が観察されなかった。また、ALG-2 ノックアウト細胞を用いて、LLOMe 処理後の ESCRT 関連蛋白質のリソソーム動員を検討した結果、ALIX のリソソーム局在が観察されなかった。従って、ALG-2 と ALIX の損傷リソソーム動員には双方の存在が必要であると考えられた。一方で、ALG-2 ノックアウト細胞における ESCRT-III の損傷リソソームへの動員とオートファジー誘導は正常であり、ALG-2 はこれらのリソソーム損傷応答に必須ではないと考えられ、他の Ca^{2+} 結合蛋白質が関与している可能性がある。

(2) ALG-2 とエンドソーム・リソソーム局在蛋白質 CDIP1 の相互作用解析

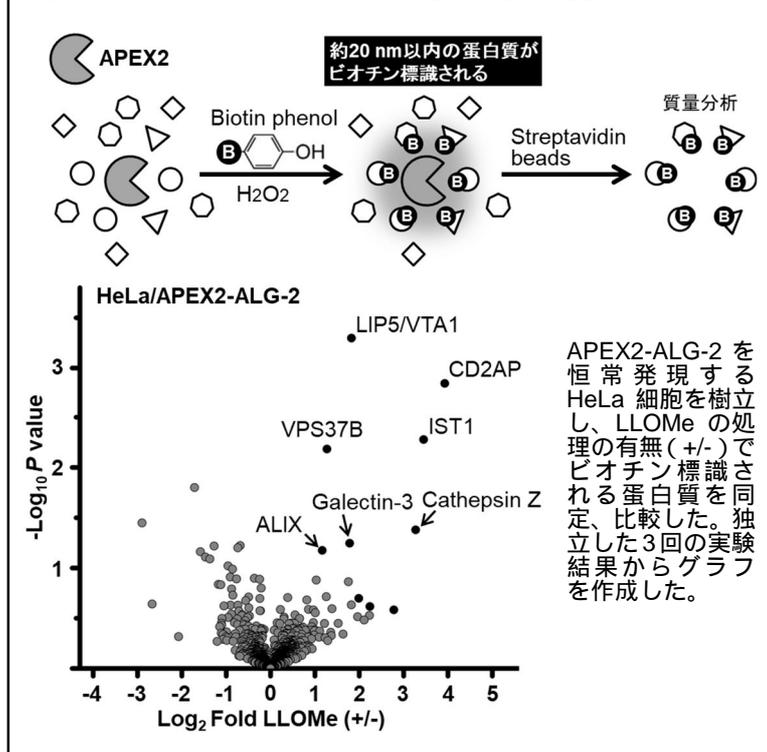
Cell death-inducing p53-target protein 1 (CDIP1) は、転写因子 p53 によって発現誘導されるアポトーシス促進性蛋白質であり、エンドソーム・リソソームに局在する。CDIP1 が ALG-2 の Ca^{2+} 依存的結合モチーフをもつことに着目し、ALG-2 と CDIP1 の相互作用を検討した。その結果、ALG-2 と CDIP1 が結合すること、さらに ALG-2 が CDIP1 と ESCRT-I の結合を Ca^{2+} 依存的に橋渡しすることが判明した。CDIP1 が ALG-2 を介してリソソームの損傷応答に関与する可能性が考えられ、今後の解析が待たれる。

(3) リソソーム損傷細胞における ALG-2 近傍蛋白質の探索とその生理機能解析

ALG-2 が LLOMe 処理依存的にリソソームに動員される現象を利用し、LLOMe 処理にตอบสนองして ALG-2 の近傍に位置する蛋白質、つまり損傷リソソームに動員される蛋白質の同定を、APEX2 を用いたビオチン標識法により試みた。LLOMe 処理細胞と未処理細胞で精製されるビオチン標識蛋白質を比較したところ、LLOMe 処理細胞ではリソソーム膜蛋白質 LAMP1、内腔のカテプシン Z などに加え、損傷リソソームへの動員が報告されているガレクチン 3 や、ALIX などの ESCRT 関連蛋白質が同定された (図 1)。この中から、ALG-2 との相互作用を報告している IST1 に着目した⁽⁹⁾。IST1 は ESCRT-III に分類される蛋白質であり、

細胞質分裂における細胞膜のくびり切りと AAA ATPase VPS4 の膜への動員を担うことが報告されている。まず IST1 の局在を観察し、LLOMe 未処理細胞では IST1 が細胞質に散在し、LLOMe 処理でリソソームに局在することを確認した。BAPTA-AM を前処理すると、LLOMe 処理細胞での IST1 のリソソーム局在は減少したことから、IST1 のリソソーム局在には Ca^{2+} が必要である成分があると考えられたが、ALG-2 ノックアウト細胞では LLOMe 処理により IST1 のリソソーム局

図 1. APEX2 を用いた ALG-2 近傍蛋白質の同定



在が観察された。次に、IST1 の発現抑制が VPS4 のリソソーム動員に与える影響を解析した。その結果、A549 細胞において IST1 の発現抑制により、LLOMe 処理細胞の VPS4 のリソソーム動員が減少した。また、IST1 の発現抑制細胞は、LLOMe 処理後のオートファジー誘導が減少し、アポトーシスが促進していることが判明した。

(4) mTORC1 のアミノ酸応答における ALG-2 の役割の検討

mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) は、セリン・スレオニン蛋白質リン酸化酵素 mTOR を含む複合体であり、アミノ酸に応答してリソソーム膜上で活性化されることが知られている。研究代表者らは、細胞をアミノ酸飢餓培地で培養後、アミノ酸を添加すると細胞外から Ca^{2+} が流入すること、および流入する Ca^{2+} が mTORC1 の活性化に必要なことを見出している。mTORC1 のアミノ酸応答における ALG-2 の役割を検討する目的で、ALG-2 の発現抑制細胞をアミノ酸飢餓培地で培養し、アミノ酸を添加後の mTORC1 活性を追跡した。その結果、ALG-2 の発現抑制は mTORC1 の活性に対して顕著な影響を及ぼさなかった。他の Ca^{2+} 結合蛋白質の関与を検討するためカルモデュリン阻害剤を用いて解析した結果、カルモデュリンが mTORC1 の活性化に必要なことが明らかとなった。

< 引用文献 >

- Campsteijn C. et al. *Curr Opin Cell Biol.* 2016, 41: 1-8
- Shibata H. et al. *J Biochem.* 2004, 135: 117-128
- Katoh K. et al. *Biochim J.* 2005, 391: 677-685
- Okumura M. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009: 237-241
- Okumura M. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013: 1715-1721
- Takahara T. et al. *J Biol Chem.* 2017: 17057-17072
- Hung V et al. *Nat Protoc.* 2016, 11: 456-475
- Takahara T. et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018, 497: 492-498
- Okumura M. et al. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013: 1049-1054

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 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Amemiya Y, Nakamura N, Ikeda N, Sugiyama R, Ishii C, Maki M, Shibata H, Takahara T	4. 巻 22
2. 論文標題 Amino Acid-Mediated Intracellular Ca ²⁺ Rise Modulates mTORC1 by Regulating the TSC2-Rheb Axis through Ca ²⁺ /Calmodulin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	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） 10.3390/ijms22136897	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 Inukai Ryuta, Mori Kanako, Kuwata Keiko, Suzuki Chihiro, Maki Masatoshi, Takahara Terunao, Shibata Hideki	4. 巻 22
2. 論文標題 The Novel ALG-2 Target Protein CDIP1 Promotes Cell Death by Interacting with ESCRT-I and VAPA/B	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22031175	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 Zhang Wei, Muramatsu Ayaka, Matsuo Rina, Teranishi Naoki, Kahara Yui, Takahara Terunao, Shibata Hideki, Maki Masatoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 The Penta-EF-Hand ALG-2 Protein Interacts with the Cytosolic Domain of the SOCE Regulator SARAF and Interferes with Ubiquitination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21176315	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 Takahara Terunao, Amemiya Yuna, Sugiyama Risa, Maki Masatoshi, Shibata Hideki	4. 巻 27
2. 論文標題 Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Science	6. 最初と最後の頁 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12929-020-00679-2	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 雨宮優奈、池田奈央、牧正敏、柴田秀樹、高原照直
2. 発表標題 動物細胞の成長制御を司るmTORC1経路のCa ²⁺ シグナルによる調節機構の解析
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雨宮優奈、杉山理紗、高原照直
2. 発表標題 mTORシグナルとカルシウムシグナルのクロストーク
3. 学会等名 第11回TOR研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雨宮優奈、池田奈央、柴田秀樹、牧正敏、高原照直
2. 発表標題 動物細胞のアミノ酸応答におけるカルシウムの作用機序の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第190回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林海咲、石井千愛、牧正敏、柴田秀樹、高原照直
2. 発表標題 細胞成長制御を司る mTORC1 経路の新規制御因子の探索と同定
3. 学会等名 日本農芸化学会中部支部第190回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高原照直
2. 発表標題 Ca ²⁺ シグナルを介したTSC2-Rheb-mTORC1経路の制御
3. 学会等名 第2回シロリムス新作用研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟橋里帆、高原照直、牧正敏、柴田秀樹
2. 発表標題 ALS原因遺伝子産物TDP-43の定量的解析を目的としたモデル培養細胞の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度（令和4年度）大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高原照直
2. 発表標題 カルシウムシグナルによるTSC2-Rheb経路を介したmTORC1制御
3. 学会等名 第10回TOR研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原由衣、高原照直、柴田秀樹、牧正敏
2. 発表標題 ストア作動性カルシウム流入制御因子二量体形成におけるALG-2の役割
3. 学会等名 第187回日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 雨宮優奈、池田奈央、柴田秀樹、牧正敏、高原照直
2. 発表標題 アミノ酸応答シグナル経路におけるカルシウムを介した新規制御機構の解明
3. 学会等名 第187回日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野琢己、舟橋里帆、森花菜子、桑田啓子、牧正敏、高原照直、柴田秀樹
2. 発表標題 損傷リソソームへのCa ²⁺ 結合タンパク質ALG-2動員の分子機構解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高原照直
2. 発表標題 アミノ酸応答mTORC1シグナル経路のCa ²⁺ シグナルを介した制御機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	高原 照直 (Takahara Terunao) (90708059)	名古屋大学・生命農学研究科・講師 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	柴田 秀樹 (Shibata Hideki) (30314470)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	

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