

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658036

研究課題名（和文） 分泌型リソソームの革新的な機能解析法の開発

研究課題名（英文） Development of functional analysis of secretory lysosomes

## 研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA TAKAO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：20242307

## 研究成果の概要（和文）：

リソソームは、生体成分の分解に必須な細胞小器官であり、可溶性の酸性加水分解酵素以外に、リソソーム膜タンパク質が局在している。細胞傷害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞では、細胞傷害顆粒と呼ばれる分泌型リソソームが存在している。本研究では、細胞傷害顆粒等の分泌型リソソームの細胞内動態の可視化や高純度精製法の開発を目的として、リソソーム膜タンパク質を用いた新しい分子プローブを作製し、様々な細胞におけるこれらの分子プローブの細胞内局在を検討した。

## 研究成果の概要（英文）：

Lysosomes are organelles essential for the degradation of biological components, and contain soluble acid hydrolases as well as lysosomal membrane proteins. Secretory lysosomes referred to as lytic granules are present in cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. In this study novel molecular probes using lysosomal membrane proteins were constructed for the visualization and purification of secretory lysosomes such as lytic granules and the intracellular localization of these molecular probes on various types of cells was analyzed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：(1) 生体分子 (2) バイオテクノロジー (3) リソソーム膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

リソソームは、その内部 pH が液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase によって酸性に維持され、エンドサイトシスやオートファジーで取り込んだ生体成分の分解に必須な細胞小器官である。リソソームには、可溶性の酸性加水分解

酵素以外に、lysosome-associated membrane protein (LAMP) ファミリーや lysosomal integral membrane protein (LIMP) ファミリー等のリソソーム膜タンパク質が存在している。

造血細胞や色素細胞では、典型的なリソソ

ームとしての機能および分泌装置としての機能が分泌型リソソームと総称される特殊な細胞小器官で行われる。分泌型リソソームには、細胞傷害性T細胞やナチュラルキラー細胞に存在する細胞傷害顆粒等が含まれている。細胞傷害顆粒には、LAMP-1等のリソソーム膜タンパク質が存在している。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞傷害顆粒を含む分泌型リソソームの細胞内動態の可視化や高純度精製の開発を目的として、リソソーム膜タンパク質（LAMPファミリーおよびLIMPファミリー）を用いた新しい分子プローブの作製と機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

LAMPファミリーおよびLIMPファミリーには、膜貫通ドメインとC末端に短いサイトゾル領域（10-20アミノ酸程度）を有している。本研究では、LAMPファミリー遺伝子とLIMPファミリー遺伝子をクローニングした後、C末端のサイトゾル領域に分子タグを挿入した融合遺伝子を作製した。さらに、これらのリソソーム膜タンパク質の融合遺伝子を動物細胞に一過的にトランスフェクションし、細胞内局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

(1) 蛍光タンパク質を付加したリソソーム膜タンパク質の融合遺伝子の作製

ラットナチュラルキラー細胞株 RNK-16 細胞の cDNA ライブラリーを作製し、LAMPファミリーおよびLIMPファミリーとして、LAMP-1、LAMP-2、CD63/LAMP-3/LIMP-1、LIMP-2 の4個の遺伝子をクローニングした。これらのリソソーム膜タンパク質のC末端側に、エピトプタグとして FLAG 配列、もしくは蛍光タンパク質として EGFP と DsRed モノマーを付加した融合遺伝子を構築した。さらに、様々な細胞株で発現させることを目的として、EGFPもしくはDsRedモノマーを付加したリソソーム膜タンパク質を、異なるプロモーター（CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター）の下流に挿入したプラスミドベクターを構築した。

(2) リソソーム膜タンパク質の細胞内局在の解析

ラット腎臓由来 NRK 細胞、ハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞、チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-K1 細胞、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞、ヒト肺がん由来 A549 細胞に、EGFP を付加した LAMP-1、LAMP-2、CD63、LIMP-2 を一過的に発現させ、LysoTracker<sup>®</sup> Red DND-99 との共局在を共焦点レーザー走査型顕

微鏡によって検討した。その結果、NRK 細胞や A549 細胞では、LAMP-1、LAMP-2、CD63、LIMP-2 の局在が LysoTracker<sup>®</sup> Red DND-99 の局在とほとんど一致することが観察された（図1）。一方、BHK-21 細胞、CHO-K1 細胞、HeLa 細胞においては、LAMP-1、LAMP-2、CD63、LIMP-2 の局在が LysoTracker<sup>®</sup> Red DND-99 の局在と必ずしも一致しなかった。

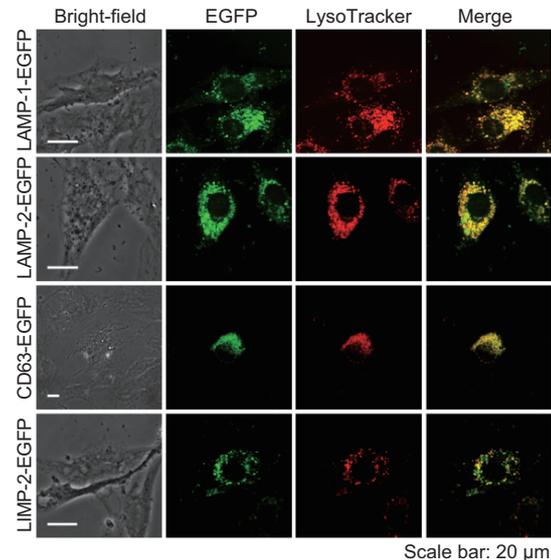


図1 NRK細胞におけるリソソーム膜タンパク質の細胞内局在  
EGFPを付加したリソソーム膜タンパク質をNRK細胞に一過的に発現させた。LysoTracker<sup>®</sup> DND-99で染色した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

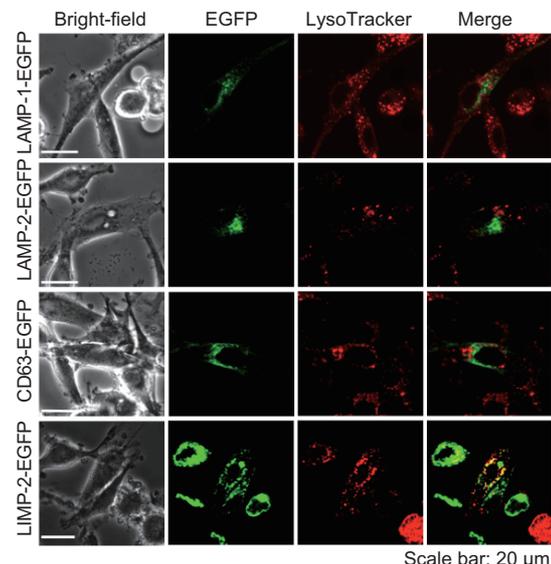


図2 BHK-21細胞におけるリソソーム膜タンパク質の細胞内局在  
EGFPを付加したリソソーム膜タンパク質をBHK-21細胞に一過的に発現させた。LysoTracker<sup>®</sup> DND-99で染色した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

(3) BHK-21 細胞における LAMP-1 と LIMP-2 の細胞内局在の解析

BHK-21 細胞では、LIMP-2 の局在と LysoTracker® DND-99 との局在が部分的に一致していたが、LAMP-1、LAMP-2、CD63 の局在と LysoTracker® DND-99 の局在がほとんど一致していなかった (図 2)。さらに、BHK-21 細胞においては、LAMP-1、LAMP-2、CD63 が共局在していること、並びに LAMP-1 が小胞体マーカーであるカルレティキュリンやゴルジ体マーカーである GM130 と共局在せず、初期エンドソームマーカーである EEA1 と共局在していることが観察された。LAMP-1、LAMP-2、CD63 の C 末端のサイトゾル領域にはチロシンモチーフ (YXXΦ: Φは疎水性アミノ酸) が存在し、一方、LIMP-2 の C 末端サイトゾル領域にはジロイシンモチーフ (DEXXXLL) が存在している。そこで、LAMP-1 と LIMP-2 の C 末端サイトゾル領域を交換したキメラタンパク質を作製し、BHK-21 細胞に発現させたところ、LAMP-1×LIMP-2 では LysoTracker® DND-99 との共局在が観察され、LIMP-2×LAMP-1 では LysoTracker® DND-99 との共局在がほとんど観察されなくなった (図 3)。以上の結果から、BHK-21 細胞では、チロシンモチーフによるリソソームへの輸送機構が正常に行われず、LAMP-1 が主に初期エンドソームへと輸送される可能性が示唆された。

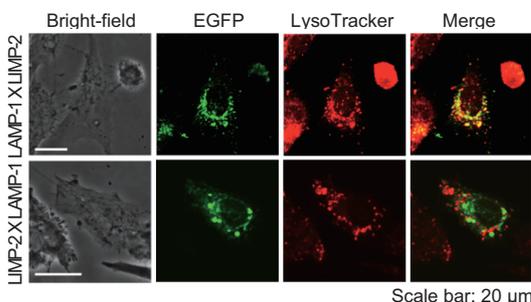


図3 BHK-21 細胞における LAMP-1 と LIMP-2 のキメラタンパク質の細胞内局在  
EGFP を付加した LAMP-1×LIMP-2 および LIMP-2×LAMP-1 を BHK-21 細胞に一過的に発現させた。LysoTracker® DND-99 で染色した後、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

(4) 今後の展望

本研究では、蛍光タンパク質を付加した LAMP-1、LAMP-2、CD63、LIMP-2 の作製と細胞内局在の解析を行い、これらのリソソーム膜タンパク質がリソソームの可視化に有用な分子プローブであることを示した。今後、細胞傷害顆粒を有するナチュラルキラー細胞に、エピトープタグや蛍光タンパク質を付加したリソソーム膜タンパク質を遺伝子導入することによって、細胞傷害顆粒の細胞内動態の可視化や高純度精製が可能になることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Seiya Hirano, Takao Kataoka, Deoxynivalenol induces ectodomain shedding of TNF receptor 1 and thereby inhibits the TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B signaling pathway, *European Journal of Pharmacology*, 査読有, Vol.701, 2013, 144-151  
DOI: 10.1016/j.ephar.2013.01.019
- ② Mari Sawamoto, Takao Kataoka, Shigeru Taketani (他 3 名、5 番目), The p53-dependent expression of frataxin controls 5-aminolevulinic acid-induced accumulation of protoporphyrin IX and photo-damage in cancerous cells, *Photochemistry and Photobiology*, 査読有, Vol. 89, 2013, 163-172  
DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01215.x
- ③ Ryuichi Tamura, Takao Kataoka (他 5 名、最後), Santonin-related compound 2 inhibits the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B subunit p65 by targeting cysteine 38 in TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B signaling pathway, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, Vol. 76, 2012, 2360-2363  
DOI: 10.1271/bbb.120619
- ④ Ryuichi Tamura, Takao Kataoka (他 10 名、最後), Eudesmane-type sesquiterpene lactones inhibit multiple steps in the NF- $\kappa$ B signaling pathway induced by inflammatory cytokines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, Vol. 22, 2012, 207-211  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.11.029
- ⑤ Takao Kataoka, Translation inhibitors and their unique biological properties, *European Journal of Pharmacology*, 査読有, Vol. 676, 2012, 1-5  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.11.044
- ⑥ Yuriko Yamada, Takao Kataoka (他 2 名、最後), Cytotrienin A, a translation inhibitor that induces ectodomain shedding of TNF receptor 1 via activation of ERK and p38 MAP kinase, *European Journal of Pharmacology*, 査読有, Vol. 667, 2011, 113-119

DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.05.072

- ⑦ Tomonobu Yokomichi, Takao Kataoka (他 6 名、最後)、Ursolic acid inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and prevents TNF- $\alpha$ -induced gene expression by blocking amino acid transport and cellular protein synthesis、*Biomolecules*、査読有、Vol. 1、2011、32-47  
DOI: 10.3390/biom1010032
- ⑧ Yoshiko Ohgari, Takao Kataoka, Shigeru Taketani (他 5 名、6 番目)、Roles of porphyrin and iron metabolisms in the  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photodamage of tumor cells、*Photochemistry and Photobiology*、査読有、Vol. 87、2011、1138-1145  
DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00950.x
- ⑨ Tuan Thanh Chau, Mutsumi Ishigaki, Takao Kataoka、Shigeru Taketani、Ferrochelatase catalyzes the formation of Zn-protoporphyrin of dry-cured ham via the conversion reaction from heme in meat、*Journal of Agricultural and Food Chemistry*、査読有、Vol. 59、2011、12238-12245  
DOI: 10.1021/jf203145p
- ⑩ Yuriko Yamada, Takao Kataoka (他 3 名、最後)、Mycotrienin II, a translation inhibitor that prevents ICAM-1 expression induced by pro-inflammatory cytokines、*Journal of Antibiotics*、査読有、Vol. 64、2011、361-366  
DOI: 10.1038/ja.2011.23
- ⑪ Ming Zhao, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他 9 名、8 番目)、The structure of a new cardenolide diglycoside and the biological activities of eleven cardenolide diglycosides from *Nerium oleander*、*Chemical & Pharmaceutical Bulletin*、査読有、Vol. 59、2011、371-377  
DOI: 10.1248/cpb.59.371
- ⑫ Liming Bai, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他 10 名、10 番目)、Polar cardenolide monoglycosides from stems and twigs of *Nerium oleander* and their biological properties、*Journal of Wood Science*、査読有、Vol. 57、2011、47-55  
DOI: 10.1007/s10086-010-1138-x
- ⑬ Yuhua Bai, Takao Kataoka, Masayoshi Ando (他 8 名、9 番目)、The biological activities of cardenolide triglycosides from stems, twigs, and leaves of *Nerium oleander*、*Journal of Wood Science*、査読有、Vol. 57、2011、56-65  
DOI: 10.1007/s10086-010-1132-3
- ⑭ Saki Gotoh, Takayuki Nakamura, Takao Kataoka、Shigeru Taketani、Egr-1 regulates the transcriptional repression of mouse  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase 1 by heme、*Gene*、査読有、Vol. 472、2011、28-36  
DOI: 10.1016/j.gene.2010.10.008
- ⑮ Takumi Chinen, Takao Kataoka, Takeo Usui (他 6 名、6 番目)、Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway、*Toxicology Letters*、査読有、Vol. 199、2010、341-346  
DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.09.017
- ⑯ Tuan Thanh Chau, Mutsumi Ishigaki, Takao Kataoka、Shigeru Taketani、Porcine ferrochelatase: the relationship between iron-removal reaction and the conversion of heme to Zn-protoporphyrin、*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*、査読有、Vol. 74、2010、1415-1420  
DOI: 10.1271/bbb.100078
- [学会発表] (計 22 件)
- ① 田村隆一 (片岡孝夫)、オイデスマン誘導体は転写因子 NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路において複数のステップを阻害する、日本農芸化学会 2012 年度 (平成 24 年度) 大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ② 平野誠也 (片岡孝夫)、TNF レセプター-1 のシグナル伝達経路に対するタンパク質合成阻害剤の作用機序の解析、日本農芸化学会 2012 年度 (平成 24 年度) 大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ③ 森元今日子 (片岡孝夫)、炎症性サイトカインによる NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路と遺伝子発現に対するキナクリンの作用機序の解析、日本農芸化学会 2012 年度 (平成 24 年度) 大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学 (京都府京都市)
- ④ 木村奏恵 (片岡孝夫)、ヒト白血病細胞株におけるカスパーゼ 8 の細胞内局在性、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

⑤ 松下由果 (片岡孝夫)、カスパーゼ制御因子 c-FLIP<sub>L</sub> は Fas リガンドによる NF-κB の活性化を正負に調節する、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

⑥ 西田愛 (片岡孝夫)、T-box 転写因子 T-bet および eomesodermin のサイトカイン産生誘導における作用機序の解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学 (京都府京都市)

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :

⑦ 松下由果 (片岡孝夫)、転写因子 NF-κB の活性化におけるカスパーゼ 8 とその調節因子 c-FLIP の機能解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学 (京都府京都市)

⑧ 片岡孝夫、マイコトリエニン II はタンパク質合成阻害剤として NF-κB 応答性遺伝子の発現を阻害する、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都府京都市)

⑨ 横道公伸 (片岡孝夫)、炎症性サイトカインによる細胞接着因子 ICAM-1 の発現誘導に対するウルソール酸の作用機序の解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都府京都市)

⑩ 田村隆一 (片岡孝夫)、転写因子 NF-κB のシグナル伝達経路に対するオイデスマン誘導体の作用機序の解析、日本農芸化学会 2011 年度 (平成 23 年度) 大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学 (京都府京都市)

[図書] (計 2 件)

① Liming Bai、Takao Kataoka、Masayoshi Ando (他 10 名、11 番目)、Daya Publishing House、Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine Vol. 1、2012、1-77

② Liming Bai、Takao Kataoka、Masayoshi Ando (他 14 名、12 番目)、Nova Science Publishers、Pentacyclic triterpenes as promising agents in cancer、2010、89-126

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA TAKAO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号 : 20242307