

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463072

研究課題名(和文) LAMP2を標的としたリソソーム細胞内輸送のブロッキングによる顎骨吸収の抑制

研究課題名(英文) Structural basis of LAMP2 aimed to modulate intracellular trafficking of lysosome

研究代表者

横山 三紀 (Miki, Yokoyama)

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リソソームは細胞内での分解反応に中心的な役割を担う細胞内小器官である。一方骨吸収においてはリソソーム内の加水分解酵素が細胞外に分泌されて骨基質を分解する。リソソーム膜タンパク質の主要成分LAMP-1/2は、リソソームの細胞内輸送に関与することが示唆されているが、LAMPそのものの高次構造に関する知見はほとんどなかった。本研究では(1)結晶構造解析によりLAMP-1/2のドメイン構造が β -シートから形成される β プリズム構造であること、(2)今まで構造の共通性が想定されていたLAMP-1とLAMP-2が異なる様式でアセンブリすること、を見出し報告した。

研究成果の概要(英文)：Lysosomes play a central role in the intracellular degradation. Lysosomes are also involved in the degradation of bone-matrix after fusion of lysosomes with plasma membranes. Lysosome-associated membrane proteins 1 and 2 (LAMP-1/2) are the most abundant protein components of lysosome membranes and suggested to be involved in the intracellular transport of lysosomes. However, the structural aspects of LAMPs have not been elucidated. In the present study, we demonstrated that (1) the subdomains of LAMP-1 and LAMP-2 adopt the unique β -prism fold, (2) the assembly modes of LAMP-1 and LAMP-2 are different.

研究分野：口腔生化学

キーワード：リソソーム LAMP-1 LAMP-2 アセンブリ

1. 研究開始当初の背景

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。リソソームはエンドソーム、ファゴソーム、オートファゴソーム、あるいは細胞膜と活発に膜融合することによりその機能を果たしている。膜融合する相手と出会うためには、リソソームが細胞内を適切に移動することが必要である。微小管に沿ったリソソームの細胞内輸送には、細胞の中央部(核近傍にある微小管形成中心)に向かう方向と、細胞膜に向かう方向がある。両方向に輸送されることによりリソソームは細胞内をパトロールして必要な分解反応を遂行することができる。

一方、骨吸収においてはリソソームが細胞膜に輸送されることが必須である。破骨細胞のリソソームは細胞膜(波状縁)と融合してプロトンポンプやクロライドチャンネルを移行させ、吸収窩を酸性化して脱灰を進める。そしてMMPやカテプシンを分泌して骨基質を分解する。また、がん化の過程ではがん細胞をとりまくがん微小環境が酸性化すると、がん細胞のリソソームが細胞膜に向かって輸送され、プロテアーゼが分泌されてがんの浸潤・転移が亢進する。そこでリソソームの細胞膜への輸送は、歯周病や口腔癌による癌関連骨破壊など、口腔領域において重要な問題である顎骨吸収を抑制するために解明すべき本質的な課題である。

Lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP2)はリソソームの膜タンパク質の主要な成分である。LAMP2が欠損すると、ヒトではダノン病が発症し、マウスでは致死率の増加や体重低下がみられる。またLAMP2欠損マウスでは歯周病が引き起こされる [J. Immunol. (2008) 180, 475-482]。LAMP2の欠損によりリソソームはファゴソームやオートファゴソームと膜融合が抑制されるが、その原因としてLAMP2はリソソームと微小管を連結する足場の形成を介してリソソームの細胞内輸送に関与することが示唆されている [EMBO J. (2007) 26, 313-324]。

2. 研究の目的

本研究ではリソソーム膜とモーター分子を連結する分子機構の解明をめざして、リソソーム膜主成分であるLAMP1, LAMP2の構造基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)結晶構造解析

マウス LAMP-1, LAMP-2 の N ドメイン、C-ドメインを糖鎖合成不全変異(N-アセチルグルコサミン転移酵素欠損)HEK293 細胞で分泌タンパク質として発現させた。精製されたタンパク質の高マンノース N 型糖鎖をエンドグリコシダーゼHで処理して根元のN-アセチラクトサミンだけを残し、結晶化させた。LAMP-1 の C ドメイン (208-370), LAMP-2 の N-ドメイン (26-189)の結晶から反射を得ることができ、構造解析をおこなった。

(2)免疫沈降

マウス LAMP-1, LAMP-2 の全長または N-ドメインを欠いたものに FLAG タグもしくは Myc タグを付加し、HEK293 細胞または前骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞に一過性に発現させた。FLAG タグ、Myc タグをもつものを共発現させ、抗 FLAG-抗体を結合させたアガロースを用いて免疫沈降をおこない、免疫沈降物を抗 FLAG-抗体、抗 Myc 抗体でイムノプロットした。

4. 研究成果

(1)DC-LAMP のβ-プリズム構造は LAMP-1, LAMP-2 のドメイン構造にも保存されている。

LAMP ファミリーのタンパク質の中でこれまでに構造解析が行われているのは DC-LAMP (LAMP-3)のみである (PDB 4AKM)。DC-LAMP はβ-シートに富むβ-プリズム構造をとることが報告されている。

LAMP-1, LAMP-2 は高度に糖鎖付加されたタンパク質であり、各ドメインには8-9箇所ずつの N 型糖鎖が存在する。今回私達は糖鎖合成不全変異体細胞を用いて LAMP-1 の C ドメインと LAMP-2 の N ドメインの結晶構造解析に成功した(図1)。

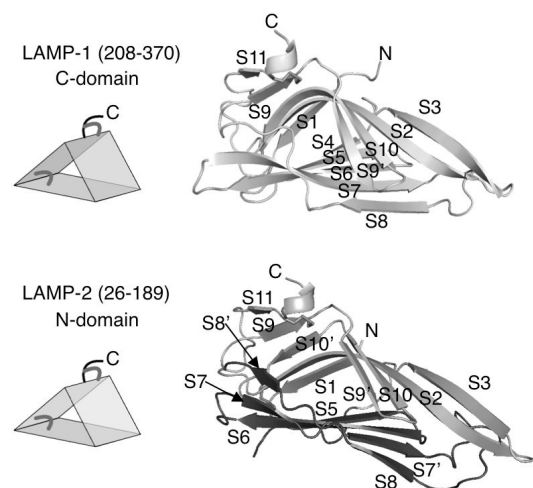


図1 LAMP-1 Cドメイン, LAMP-2 のN-ドメインのβ-プリズム構造

結晶構造解析の結果 LAMP-1 の C ドメインと LAMP-2 の N ドメインもβ-プリズム構造をもつことが明らかになった。β-プリズム構造は、LAMP ファミリーのタンパク質に共通することが強く示唆された。

(2) LAMP-1/LAMP-1 および LAMP-2/LAMP-2 相互作用における N-ドメインの効果は反対である。

LAMP-1-FLAG により LAMP-1-Myc が沈降したことから、LAMP-1 分子同士は直接または間接的に相互作用していることがわかった。しかし LAMP-1 の N-ドメインを欠失させると沈降が顕著に抑制されたことから、相互作用には N-ドメインが重要であった。驚いたことに LAMP-2-FLAG による LAMP2-Myc の沈降は、N ドメインを欠失させると顕著に亢進された(図 2)。

LAMP-1 と LAMP-2 の組み合わせでも沈降が観察されたことから、両者は相互作用していることが示された。この組み合わせにおいて

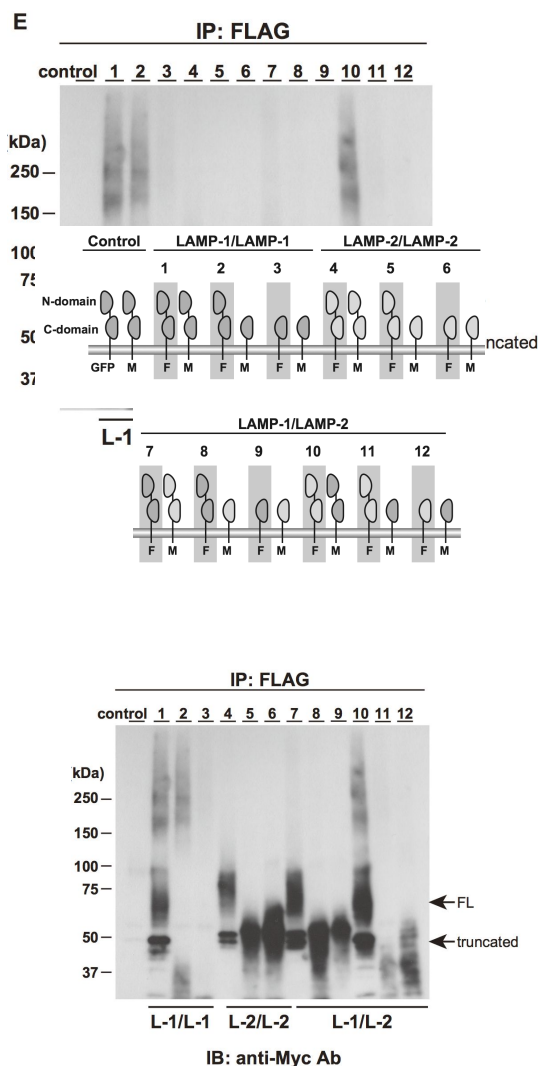


図 2 LAMP-1, LAMP-2 相互作用における N-ドメイン欠失の影響

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 7 件)

Doino, Mizuki; Arakawa, Shinichi; Yokoyama, Miki; Sasaki, Yoshiyuki; Kondo, Keiko; Yasuda, Masayo, Evaluation of the relationship between salivary concentration of anti-heat shock protein immunoglobulin and clinical manifestations of Behçet's disease, *Scandinavian Journal of Rheumatology* (査読有) Feb 14, 2017, pp. 1-7, doi: 10.1080/03009742.2016.1249942.

Ode T, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Inokuch J, Kobayashi T, Watabe T, Izumi Y, Hara-Yokoyama M, PDMP, a ceramide analogue, acts as an inhibitor of mTORC1 by inducing its translocation from lysosome to endoplasmic reticulum. *Experimental Cell Research* (査読有) Vol. 350, No. 1, 2017, pp. 103-114. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.11.011.

Kazue Terasawa, Yuri Tomabechei, Mariko Ikeda, Haruhiko Ehara, Mutsuko Kukimoto-Niino, Motoaki Wakiyama, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Anupama R. Rajapakshe, Tetsuro Watabe, Mikako Shirouzu and Hara-Yokoyama M, Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読有) Vol. 479, No. 3, 2016, pp. 489-495. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.093.

Podyma-Inoue KA, Moriwaki T, Rajapakshe AR, Terasawa K, Hara-Yokoyama M, Characterization of heparan sulfate proteoglycan-positive recycling endosomes isolated from glioma cells. *Cancer Genomics & Proteomics*(査読有) Vol. 13, No.6, 2016, pp. 443-452.

Terasawa K, Rajapakshe AR, Podyma-Inoue KA, Mishima-Tsumagari C, Yanagishita M, Hara-Yokoyama M. Preferential recognition of isocitrate dehydrogenase by a rabbit monoclonal antibody (ab124797) against the C-terminal peptide of RANKL. *Journal of Immunological Methods*(査読有) Vol. 420, (2015) pp. 1-10. doi: 10.1016/j.jim.2015.03.006.

Rajapakshe AR, Podyma-Inoue KA, Terasawa K, Hasegawa K, Namba T, Kumei

Y, Yanagishita M, Hara-Yokoyama M. Lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) regulate intracellular positioning of mitochondria in MC3T3-E1 cells. *Experimental Cell Research* (査読有) Vol. 331, No. 1, 2015, pp. 211-222. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.09.014.

Hara-Yokoyama M, Terasawa K, Ichinose S, Watanabe A, Podyma-Inoue KA, Akiyoshi K, Igarashi Y, Yanagishita M. Sphingosine kinase 2 inhibitor SG-12 induces apoptosis via phosphorylation by sphingosine kinase 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (査読有) Vol. 23, No. 7, 2013, 2220-2224. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.01.083.

[学会発表](計 4 件)

Anupama R. Rajapakshe, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Kazue Terasawa, Miki Hara-Yokoyama. Lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) regulate intracellular positioning of mitochondria in MC3T3-E1 cells. ZING Conferences “The Pathobiology of the Lysosome and Lysosomal Diseases Conference”, 2016年7月7-10日、ケンブリッジ、イングランド

Miki Hara-Yokoyama Glycosylation regulates CD38 assembly on the cell surface, OMICS International Conference: Glycobiology, 2015年8月10-12日、フィラデルフィア、米国

Takashi Ode, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Shinichi Arakawa, Miki Hara-Yokoyama, Yuichi Izumi. Intracellular cholesterol trafficking is involved in osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells. 第58回春季日本歯周病学会学術大会、2015年5月15-16日、千葉県

Anupama R. Rajapakshe, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Takashi Ode, Miki Hara-Yokoyama. Lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) regulate bidirectional transport of lysosomes in MC3T3-E1 cells. 第58回春季日本歯周病学会学術大会、2015年5月15-16日、千葉県

[その他]

<http://cellular-biochemistry-tmdu.net/project/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 三紀 (YOKOYAMA, Miki)
東京医歯大学・大学院医歯学総合研究科・
准教授
研究者番号：70191533

(2) 研究分担者

KA 井上 (INOUE, KA)
東京医歯大学・大学院医歯学総合研究科・
助教
研究者番号：90302877

(3) 連携研究者

坂本 健作 (SAKAMOTO Kensaku)
独立行政法人理化学研究所・拡張型遺伝暗
号システム研究・チームリーダー
研究者番号：50240685

白水 美香子 (SHIROUZU Mikako)

独立行政法人理化学研究所・生命分子シス
テム基盤研究領域・上級研究員
研究者番号：70280732

(4) 研究協力者

寺澤 和恵 (TERASAWA Kazue)