

平成30年6月21日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19010

研究課題名(和文) リソソーム膜タンパク質による新規多剤耐性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Lysosomal membrane protein LAPT4a functions in multiple drug resistance.

研究代表者

廣田 有子(Hirota, Yuko)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50588259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リソソーム膜タンパク質LAPT4aはユビキチンリガーゼであるNedd4-1および小胞輸送の因子であるEps15と結合することを明らかにした。さらに、リソソームへの輸送に、ESCRT複合体が関与することも明らかになった。また、LAPT4aはエンドソームの内部小胞に隔離され、リソソーム内で分解されることを明らかにした。LAPT4aが抗がん剤耐性に寄与しているが明らかにするため、LAPT4aをヒト細胞に発現させ、抗がん剤暴露後の細胞生存率を検討したところ、発現前に比べて生存率は有意に上昇した。

研究成果の概要(英文)：Lysosomal-associated protein transmembrane 4 (LAPT4) interacts with E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 via its PY motifs, and as well as with Eps15 via its DIII domain. LAPT4 is trafficked from trans-Golgi network (TGN) to lysosomes in dependent of Nedd4-1's interaction but not of its ubiquitination, and is sequestered within multi vesicular bodies (MVBs) and degraded into lysosomes. Interestingly, these steps are independent of the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) machinery. The ESCRT protein expression interference prevented the recruitment of LAPT4 onto the MVBs, which implies that the ESCRT complex proteins might contribute to the sorting of LAPT4 from TGN to the endosomes but not to its sequestering within MVBs. Furthermore, the overexpression of LAPT4 in mammalian cells exposed to anticarcinogenic agent resulted in the increase of cell viability significantly, implying that LAPT4 might function in drug resistance.

研究分野：細胞生物学

キーワード：リソソーム エンドソーム 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

がん治療において、治療途中に投与歴の有無にかかわらず、作用機構や構造が異なる抗がん剤に対して耐性になる、多剤耐性獲得の存在が知られている。

多剤耐性のメカニズムとして、P-糖タンパク質や Multidrug resistance-associated protein (MRP) が過剰に発現し、抗がん剤を細胞外へ排出することが明らかにされている(図1)。抗がん剤投与時に、生き残ったがん細胞があると、これが多剤耐性獲得のため、P-糖タンパク質や MRP の発現を増加させる。すると、初回に用いた抗がん剤のみならず、他の抗がん剤に対しても耐性を獲得してしまう。現在、P-糖タンパク質や MRP を介した耐性機構を阻止する薬剤の同定が試みられているが有効な手段がないのが現状である。

このように多剤耐性はがん治療における障害であり、治療を受けるがん患者にとって大きな弊害であることはもちろん、社会的な医療費増大の面からも、多剤耐性の克服が求められている。

これまで、P-糖タンパク質や MRP が関与する薬剤耐性機構について多くの研究が進められてきた一方で、生体高分子の分解機能の中核をなすエンドソーム・リソソーム内へ抗がん剤が隔離されるという現象が観察されていた。この現象は、新たな薬剤耐性能獲得の機構を示唆する知見にも関わらず、その詳細については未解明のままである。エンドソーム・リソソーム内への抗がん剤の隔離はそれらの小器官が細胞質に比べ、pH が低いことが原因ではないかと示唆されているが、詳しい機構については明らかにされていない[Mol. Cell Pharmacol. 2, 131-136 (2010)]。

Mouse transporter protein (MTP)はエンドソーム・リソソーム膜に局在し、酵母の薬物感受性株に発現させると P-糖タンパク質や MRP と同様な多剤耐性を示すことが過去の研究から報告されている[J. Biol. Chem. 274, 12877-12882 (1999)]。

しかしながら、MTP のヒトホモログである LAPTМ4αが実際にヒト細胞でこのような機能を発揮しているのかについては未だ不明である。

2. 研究の目的

- (1) LAPTМ4αの細胞内分子メカニズムの解明(LAPTМ4αと相互作用する因子を同定し、その細胞内輸送システムを明らかにする)
- (2) LAPTМ4αの生理機能の解明(ヒト細胞においても、LAPTМ4αが薬剤耐性を誘発するか否か、細胞膜に局在するLAPTМ4α変異体が薬剤耐性に寄与するか否かについて明らかにする)
- (3) 薬剤に対する詳細な基質特異性の解析ならびに P-糖タンパク質および MRP を介した既存の耐性システムへの関与の解

明(薬剤に対しての特異性を明らかにする、P-糖タンパク質や MRP と LAPTМ4αの関連の有無について明らかにする)

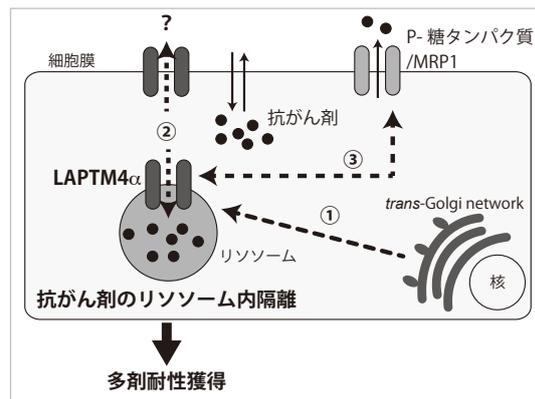


図1. LAPTМ4αによる多剤耐性獲得機構

3. 研究の方法

野生型 LAPTМ4αはリソソームへ局在する[図2(左図)]一方で、LAPTМ4αの PYモチーフ変異体は、図2(右図)に示す通り、野生型と同様に一部リソソームへ輸送されるが一部は細胞膜へと輸送される。この結果から、細胞膜に局在する LAPTМ4αが抗がん剤の細胞外への排出に積極的に関与する可能性と、それとは対照的に、リソソーム内への抗がん剤の隔離に対して負に制御している可能性の両者が考えられる。

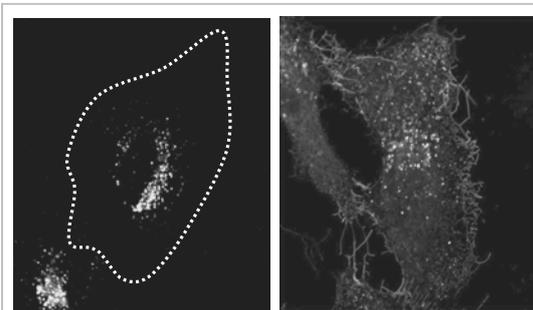


図2. GFP 蛍光タンパク質を付した LAPTМ4α野生型(左)と PYモチーフ変異型(右)を HeLa 細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で撮影(点線は細胞膜外周を示す)

(1) LAPTМ4αの細胞内分子メカニズムの解明

申請者が行ったこれまでの実験から、LAPTМ4αは TGN からリソソームへと輸送されることが明らかとなっている。この輸送が如何にして行われているか、その分子メカニズムを明らかにする。

小胞体で合成されたリソソーム膜タンパク質はゴルジ体を経て TGN で選別され、エンドソーム/リソソームへと輸送される。TGN からの輸送には、アダプタータンパク質(AP)複合体や GGA (Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ARF-binding protein)の関与が考えられる。そこで、LAPTМ4αの輸送について、TGN からリソソームへの輸送に最も関与すると考

えられる AP-1 と GGA3 に注目して以下の実験を行う。(いずれもヒト HeLa 細胞を用いる)

- ① タグ付き LAPTМ4αを用いた Pull-down assay (*in vitro*)および免疫沈降 (*in vivo*)解析で AP-1 と GGA3 との相互作用について検討する。(各タンパク質を外来性で発現させる実験系についても同時に検討する。)
- ② 各輸送タンパク質を RNAi で抑制し LAPTМ4αのリソソームへの輸送の可否を明らかにする。(上記①、②について、AP-1やGGA3との関与が否定された場合は、対象を AP-3 や AP-4、AP-5 まで拡大して検討する。)
- ③ AP 複合体とは非依存的に、LAPTМ4αのユビキチン化がリソソームへの輸送に関与するか、ユビキチン化不能変異体を用いて検討する。
- ④ 上記、輸送タンパク質の同定と並行して、Pull-down assay・LC-MS/MS により LAPTМ4αと相互作用する因子の同定を行う。

### (2) LAPTМ4αの生理機能の解明

LAPTМ4αが実際に薬物輸送タンパク質として機能しているか否か、細胞レベルで検討する。

- ① 多くの抗がん剤 (daunorubicin, doxorubicin 等) は蛍光物質であることを利用し、LAPTМ4α野生型や PY モチーフ変異体、ユビキチン化不能変異体を発現した細胞あるいは正常および LAPTМ4α欠損マウス胎児繊維芽細胞を用いてこれら薬物の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡により調べる。
- ② 細胞膜に局在する LAPTМ4αが抗がん剤の細胞外への排出に寄与するか否か、daunorubicin 等の細胞内への取り込みをフローサイトメトリーによって定量する。
- ③ アデノウイルスベクターによる LAPTМ4αの過剰発現系を構築し、LAPTМ4α欠損マウスの胎児繊維芽細胞で観察される薬物感受性が LAPTМ4αの過剰発現により回復または耐性を獲得するか否かについて検討する。

### (3) LAPTМ4αの基質特異性の解析ならびに P-糖タンパク質および MRP を介した既存の耐性システムへの関与の解明

- ① 様々な抗がん剤を、LAPTМ4α野生型や各種 PY モチーフ変異体変異体を発現した細胞 LAPTМ4α欠損マウス胎児繊維芽細胞に投与し、細胞生存率を指標とした MTT アッセイにより、それぞれの抗がん剤に対する IC50 を比較解析することで LAPTМ4αの基質特異性を調べる。
- ② これまでに報告されている P-糖タンパク質および MRP との基質特異性の違いを比較解析することにより、LAPTМ4αとこれら薬物輸送ポンプとの機能的相関性について検討する。

③ LAPTМ4αを過剰発現させた細胞を MRP の阻害剤 (MK517 あるいは buthionine sulfoximine) で前処理し、薬物のリソソーム内隔離に対する阻害剤の効果を解析することで、LAPTМ4αが MRP とは異なる分子機構により薬物輸送ポンプとして機能しているか否かを明らかにする。

④ LAPTМ4α欠損あるいは過剰発現が P-糖タンパク質あるいは MRP の発現レベルに与える影響について mRNA およびタンパク質レベルで解析し、LAPTМ4αと P-糖タンパク質あるいは MRP との機能的相補性について検討する。(P-糖タンパク質や MRP のみならず、LAPTМ4βや LAPTМ5 による機能的相補性についても同様の検討を行う。)

## 4. 研究成果

本研究から得られた成果について以下に記す。

(1) LAPTМ4αの TGN からエンドソーム/リソソームへの輸送にはGGAタンパク質は関与せず、ESCRT 複合タンパク質が必要であることが明らかになった (図 3)。本来、ESCRT タンパク質は多胞体様小胞 (Multi Vesicular Bodies: MVBs) の形成に必要な一群のタンパク質であるが、本研究ではこれらのタンパク質は LAPTМ4αのエンドソーム上への輸送に寄与することを見いだした。これは既存のタンパク質に対して新たな機能を見出す結果である。

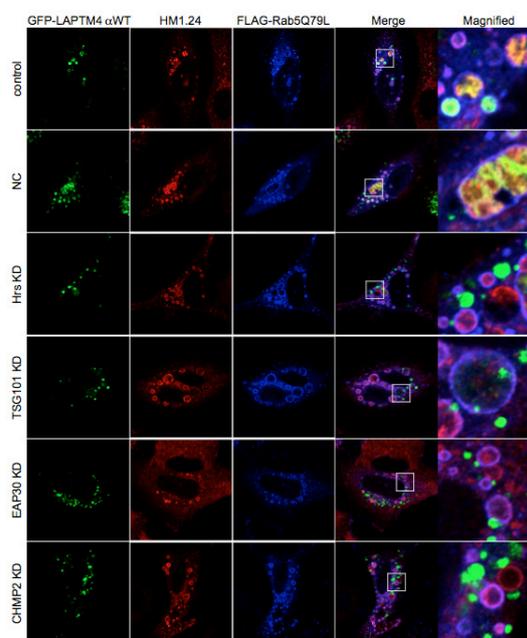


図 3

(2) LAPTМ4αは ESCRT 複合タンパク質によって、エンドソームへ運ばれた後、MVBs 内に隔離され (図 4) リソソーム内で分解されることを新たに見出した (図 5)。

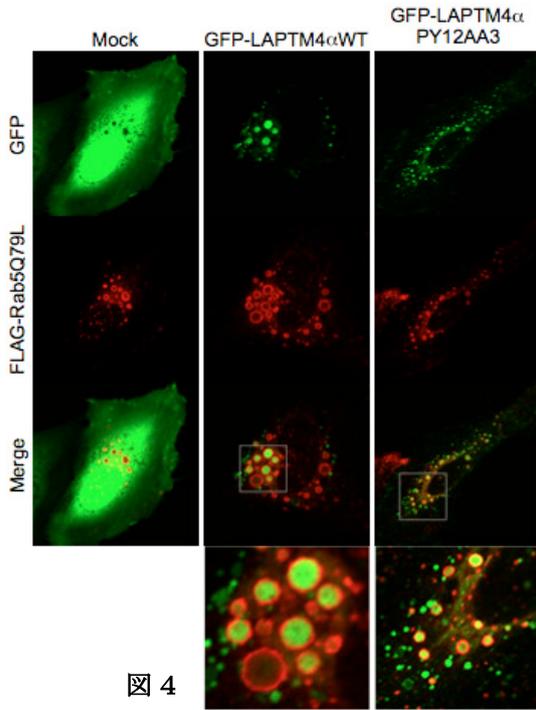


図 4

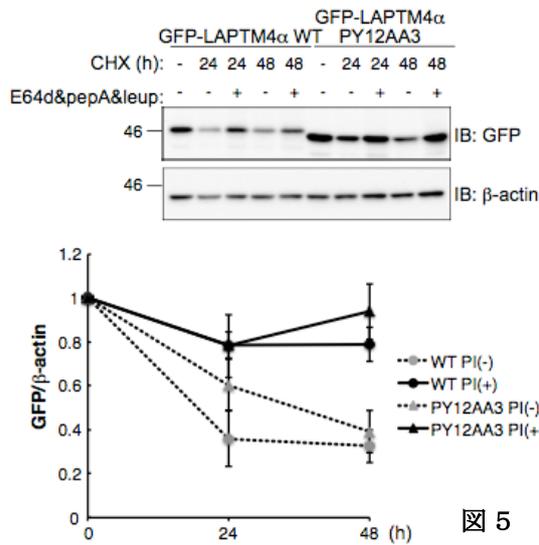


図 5

(3) LAPTM4 $\alpha$ はユビキチンリガーゼであるNedd4-1と結合するため、このリガーゼによってユビキチン化されると考えられてきたが、LAPTM4 $\alpha$ のユビキチン化はNedd4-1のみによるものではないことを示唆する結果であった (図6)。さらにLAPTM4 $\alpha$ のリソソームへの輸送にはユビキチン化は必要ではなく、単にNedd4-1との相互作用に依存することも明らかにした (図7)。

(4) LAPTM4 $\alpha$ のTGN からリソソームへの輸送に必要な新たな因子としてEps15が同定された。Eps15は主に4つのドメインからなるがLAPTM4 $\alpha$ との結合はUbiquitin-interacting motifを含むDIVドメインを介することが明らかになった (図8)。

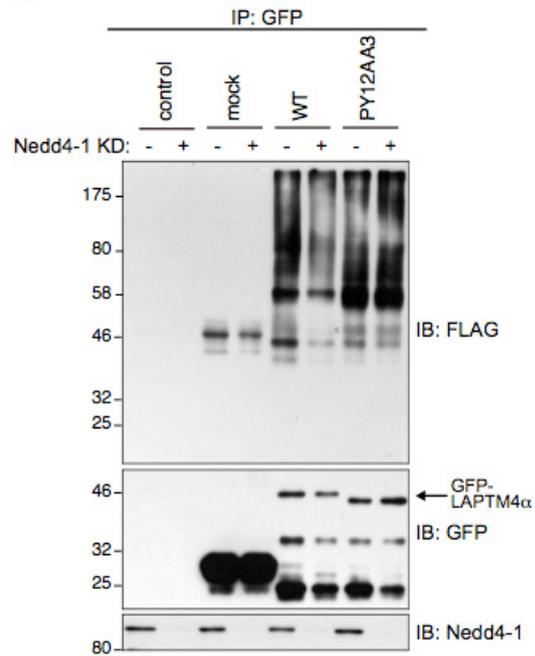


図 6

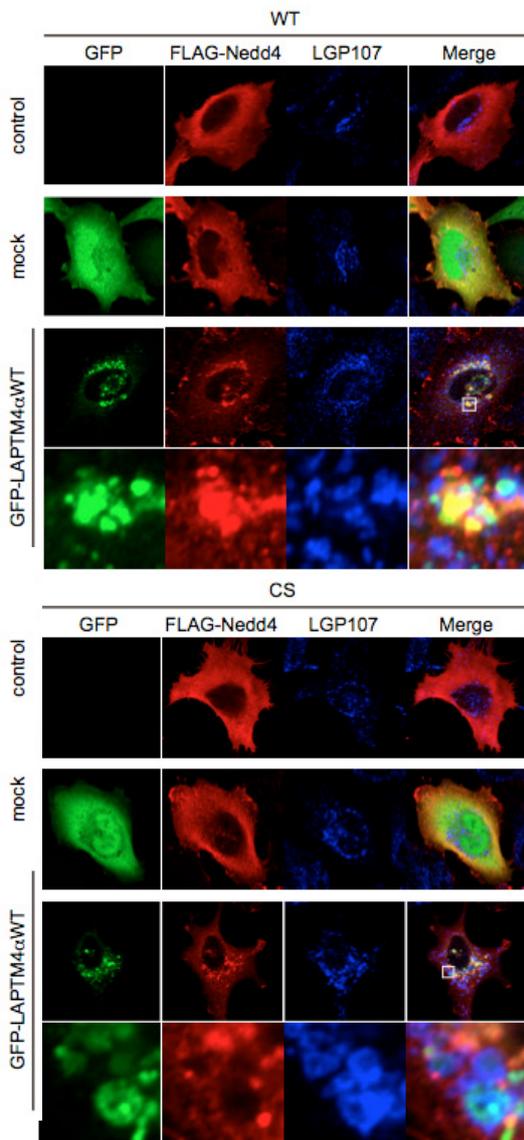


図 7

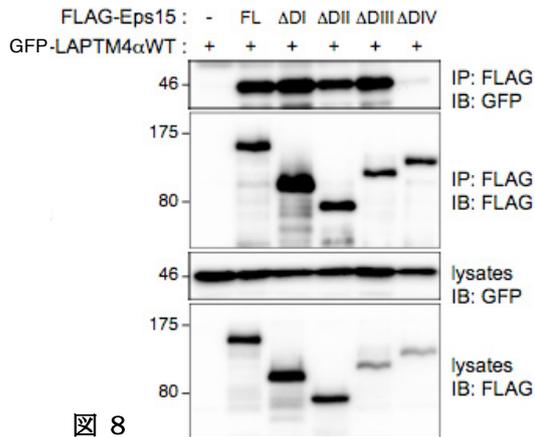


図 8

- (5) LAPTM4αを一過性に過剰発現したHeLa細胞を抗がん剤doxorubicinで短時間処理したところ、大部分のdoxorubicinは核内に取り込まれるが、一部はLAPTM4α陽性のリソソーム内に取り込まれることが明らかになった(図9)。

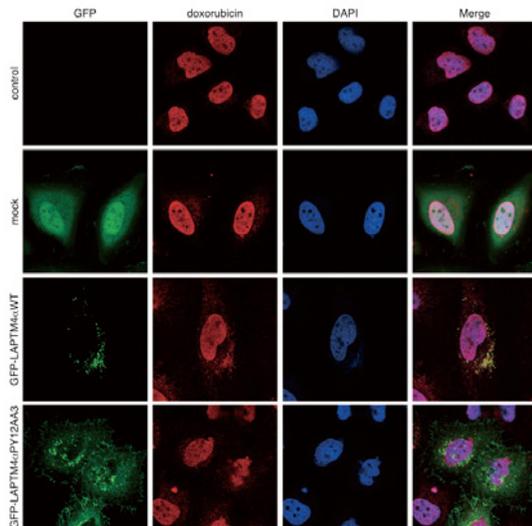


図 9

- (6) LAPTM4αを安定発現したCOS-1細胞をdoxorubicinで48時間処理したところ、LAPTM4α野生型およびPYモチーフ変異体のいずれにおいても、LAPTM4αを安定発現していない通常のCOS-1細胞と比較して、細胞生存率が有意に上昇した(図10)。

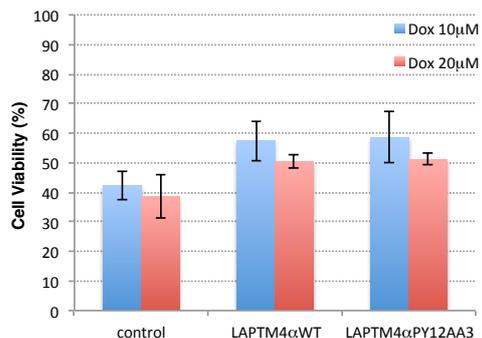


図 10

本研究により得られた結果から、リソソーム膜タンパク質LAPTM4αの細胞内輸送メカニズムを明らかにすることが出来た。

LAPTM4αが抗がん剤処理による細胞生存に関与する可能性は示唆されたが、その詳細なメカニズムを明らかにするまでには至らなかった。今後は、P-糖タンパク質やMRP1との関与を含めてLAPTM4αの多剤耐性への寄与について明らかにしていく予定である。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣田 有子 (HIROTA, Yuko)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50588259