

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22381

研究課題名（和文）リソソーム膜のタンパク質、脂質成分の統合的な解析とリソソームの分子基盤の解明

研究課題名（英文）Identification of novel molecules on lysosomal membrane using our unique technique

研究代表者

長谷川 純矢（Hasegawa, Junya）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：00533788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：リソソームはエンドソーム等により取り囲まれた物質が最終的に到達する場所で、加水分解酵素によりタンパク質などの生体高分子が分解される。この重要なオルガネラであるリソソームの膜がどのような因子で構成されているか、現在全く理解されていない。申請者はリソソームを高い純度で精製可能な方法を構築した。この方法で各種リン脂質を測定したところ、興味深いことにこれまでリソソーム膜への局在が知られていない脂質を幾つか見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リソソームの機能異常は、がんや中枢神経障害を含む様々な疾患の原因となる。リソソームの基盤的研究を推進し、その分子メカニズムを解明することは、上記疾患における創薬ターゲットの創出に貢献でき、各種疾患の予防、診断、治療法に繋がることが強く期待できる。

研究成果の概要（英文）：Lysosomes are acidic organelles, which are crucial for the degradation of many different proteins and lipids. The degradative products (e.g. amino acids) are then released and reused for cell survival. However, it has been unclear what proteins/lipids are included on the membrane of lysosomes. We have established the method for the isolation of pure lysosomes. Using this method, we found that some interested phospholipids are detected in the lysosomal fraction, but not other fractions, by our LC-MS system.

研究分野：脂質生物学

キーワード：イノシトールリン脂質 リソソーム 質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

リソソームはエンドソームやオートファゴソーム等により取り囲まれた物質が最終的に到達する場所である。そこでは加水分解酵素によりタンパク質などの生体高分子が分解される。リソソームの機能異常により、細胞の恒常性が崩壊し、細胞内に不要物質が蓄積することで、細胞死が引き起こされる。生体では、その分解系の異常は、がんや中枢神経障害を含む様々な疾患の原因となる。このように極めて重要なオルガネラであるリソソームであるが、実はリソソーム膜がどのような因子で構成されているか、現在全く理解されていない。その理由としては、1) リソソームを高純度に単離するのが難しい、2) 単離に成功してもリソソーム内部には多くの分解物が混入しているため、リソソーム膜の純粋な構成成分の分析が困難、が挙げられる。申請者はリソソームの構成成分を網羅的に解析することで、リソソームの基盤的研究の推進だけでなく、上記疾患の治療法開発に繋がるのではないかと着想し、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

申請者は、簡単かつ純度の高いリソソームを単離する方法を見出した。それを以下に記載する。イノシトールリン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール 3,5-ニリン酸 (PI(3,5)P<sub>2</sub>) はリソソーム膜に局在し、本脂質が欠損するとリソソーム内のイオンバランスが崩壊しリソソームが大きくなることが知られている。実際 PI(3,5)P<sub>2</sub> の合成酵素である PIKfyve のノックアウト細胞では、リソソームが巨大化している (図 1)。興味深いことに、通常のリソソーム内部は多くの分解産物が含まれているのに対して、本細胞ではリソソーム内には内容物がほとんどないことを見出した (図 2)。このように空洞化したリソソームではあるが、実はリソソーム内の酸性環境は維持され (リソトラッカー陽性) リソソームマーカーである LAMP1 も局在することから、リソソームとしての性質は保持されている。さらに、本細胞株は野生株と同程度の細胞分裂を引き起こすことから、空洞化リソソームは細胞の生存には影響しない。従って、本細胞株を利用すれば内容分解物を含まないリソソームを高純度で精製することが可能となり、リソソーム膜の構成成分を同定できるのでと着想した。

よって、本申請課題は申請者が独自に保有している細胞株を用いてリソソームを単離し、未だ謎に満ちたリソソーム膜の構成因子を統合的に理解し、その分子基盤を解明することで疾患の治療に繋げることを目的とする。

## 3. 研究の方法

上述したように、リソソームが空洞化した細胞株でリソソームを単離するが、問題となるのが高い純度のリソソームを単離する方法である。ショ糖密度勾配法など生化学的な方法でリソソームを単離可能ではあるが、実験手法的にやや煩雑で難しいことと、他のオルガネラの混入の可能性が高い。重要なことに、近年リソソームを簡単に且つ高純度で精製可能な方法が報告された (Science, 358, 807-813, 2017)。本論文の方法はいたって簡単である。リソソーム膜局在タンパク質 TMEM192 を細胞に発現させ、タグ抗体で免疫沈降させることで簡単に素早く (5-10 分) リソソームだけを選択的に単離できる。用いる細胞株により条件検討は必須ではあるが、申請者は本方法を応用し内容物を含まない高純度のリソソームを精製する。この方法でリソソームを単離し、既知のオルガネラマーカータンパク質を用いウェスタンブロットなどで精製度合いを検証する。

精製したリソソーム (膜) は、本学の共同実験施設で、ショットガン法による質量分析 (MS) でリソソーム膜を構成するタンパク質を網羅的に同定する。また、申請者の所属する研究室は脂質を網羅的に解析可能な LC-MS/MS 装置を保有し独自に稼働させているため、リソソーム膜を構成する脂質を網羅的に解析できる。LAMP1 やコレステロールなど既知のリソソーム局在分子が含まれているか確認し、リソソームの単離実験系が機能しているか検討する。以上のアプローチにより、内容物を含まないリソソームを高純度に単離し、リソソーム膜を構成する成分分析を行う。

## 4. 研究成果

HEK293T 細胞に TMEM192-GFP (コントロール) および TMEM192-GFP-3xHA を発現させ、

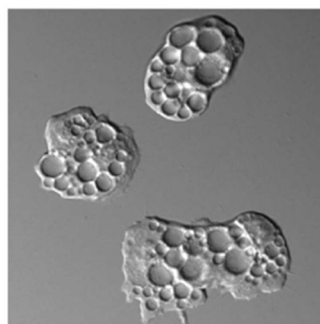


図 1 PIKfyve ノックアウト細胞ではリソソームがクレーターのよう構造を示す。

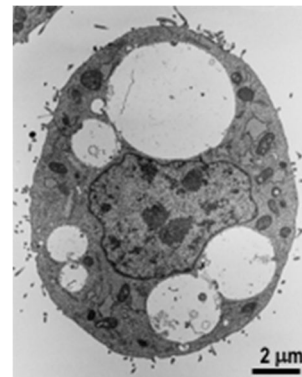
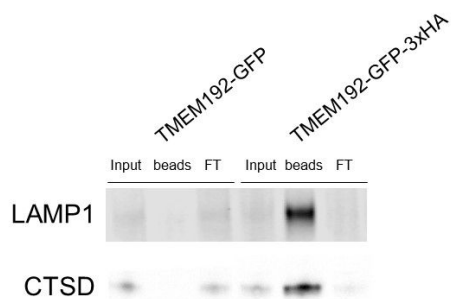


図 2 PIKfyve ノックアウト細胞の巨大化リソソームは空洞化している。空洞化リソソーム内は白く、内容物を含んでいない。

HA タグ抗体の beads で免疫沈降した。そのサンプルの一部を用いて Western blot を行ったところ、TMEM192-GFP-3xHA の beads 画分でのみ、リソソームマーカーである LAMP1 及びカテプシン D (CTSD) が濃縮して検出された (図3)。このことから、本実験系で綺麗にリソソームを単離できていることが判明した。この条件で、申請者が保有するリソソームが空洞化する細胞株を用いて検証する予定ではあるが、その細胞株は遺伝子導入効率が悪いいため、現在ウイルスを用いた発現細胞株を作製中である。研究期間内に樹立できなかったため、HEK293T 細胞を用いてリソソーム膜の構成因子の解析を実施した。HEK293T 細胞を用いた実験では、リソソーム膜だけでなく、リソソーム内部の分解産物も含まれてしまうため、その内容物を除去しなければならない。その問題は、申請者は浸透圧差を利用した方法で解決できた。単離したリソソームに低浸透圧のバッファーを処理し、膜を破裂させ内容物を流出させることで、リソソーム膜画分のみを得ることに成功した。実際に Western blot でリソソーム膜に局在する LAMP1 は検出されたが、リソソーム内部に局在する酵素である CTSD は検出されなかった。すなわち、本方法で高純度のリソソーム”膜”画分を得ることができた。

次に、単離したリソソーム”膜”の脂質組成を、所属研究室が保有している脂質に特化した分析を用いた測定法で検討した。これまでの報告では 8 種類あるイノシトールリン脂質のうち、PI3P と PI(3,5)P2 がリソソーム膜に局在することが知られている。しかし、申請者が上記で単離したリソソーム膜の脂質組成を解析した結果、量の違いはあるものの PI, PI3P, PI4P, PI(3,5)P2, PI(4,5)P2 のイノシトールリン脂質が検出できた。また、他のリン脂質であるホスファチジルセリンも豊富に存在することが分かった。さらに興味深いことに、細胞全体で検出される各種イノシトールリン脂質と、リソソーム”膜”で検出される脂質とでは、リン脂質の脂肪酸組成が大きく異なっていた。このことは、リソソーム膜は特異的な脂肪酸組成を有するリン脂質が多く存在することを意味しており、この脂肪酸の違いがリソソームの機能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

本研究期間内では、HEK293T 細胞からのリソソーム膜の単離方法の確立と、リソソーム膜のリン脂質組成を明らかにすることができた。今後、単離リソソーム膜のタンパク質の網羅的解析を行うとともに、リソソームが空洞化する細胞株を用いて同様な検討を行い、リソソーム膜のタンパク質、脂質を網羅的に解析し、リソソームの基盤的研究を推進する。



**図 3 HEK293T 細胞に TMEM192-GFP および TMEM192-GFP-3xHA を発現させ、HA 抗体ビーズでリソソームを単離。各々の画分を Western blot。**  
 Input : ビーズで処理する前サンプル、  
 beads : ビーズ画分、  
 FT : ビーズに結合しなかった画分

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa Junya, Jebri Imen, Yamamoto Hikaru, Tsujita Kazuya, Tokuda Emi, Shibata Hideki, Maki Masatoshi, Itoh Toshiki	4. 巻 132
2. 論文標題 SH3YL1 cooperates with ESCRT-I in the sorting and degradation of the EGF receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 229179-229179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.229179	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木 雄彦, 山本 利義, 森岡 真, 徳田 恵美, 長谷川 純矢, 佐々木 純子
2. 発表標題 リン脂質の多様性が紡ぐ生命現象 イノシトールリン脂質とタンパク質の新しい相互作用様式
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田 拓海, 長谷川 純矢, 佐々木 純子, 佐々木 雄彦
2. 発表標題 膵臓がん細胞特性へのPI(3)Pの関与
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森岡 真, 濁川 清美, 佐々木 純子, 長谷川 純矢, 佐々木 雄彦
2. 発表標題 PI(4,5)P2の脱リン酸化を介した新規マクロファージ食食抑制メカニズム
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 恒一郎, 長谷川 純矢, 佐々木 純子, 佐々木 雄彦
2. 発表標題 酸化ストレスによるイノシトールリン脂質の変動とその意義の解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 太地, 佐々木 純子, 長谷川 純矢, 佐々木 雄彦
2. 発表標題 イノシトールリン脂質分子種の機能解析方法の開発
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 純子, 山本 詠士, 長谷川 純矢, 佐々木 雄彦
2. 発表標題 リボクオリティが解き明かす生命現象 イノシトールリン脂質のアシル基と生理機能
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川 純矢, Weisman Lois S, 佐々木 雄彦
2. 発表標題 膜脂質が制御するオルガネラの新機能 イノシトールリン脂質によるmTORC1の制御機構の解析
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019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			
英国	ケンブリッジ大学			