

リソソームの細胞内分布制御におけるJLPの機能解析

著者	鈴木 隆介
著者別表示	SUZUKI Ryusuke
雑誌名	博士論文要旨Abstract
学位授与番号	13301甲第5135号
学位名	博士（理学）
学位授与年月日	2020-03-22
URL	http://hdl.handle.net/2297/00059737



リソソームの細胞内分布制御における JLP の機能解析

Functional role of JLP in lysosome localization

金沢大学大学院自然科学研究科
自然システム学専攻

鈴木 隆介

Abstract

Lysosomes are membrane-enclosed acidic organelles which degrade various macromolecules. They are distinguished as terminal degradative organelles, but recent research shows their dynamics and localization are quite important for many biological functions such as autophagy, cholesterol homeostasis and antigen presentation. In addition, abnormal lysosomal distribution contributes to human diseases like neurodegeneration or cancer. JLP, JNK-associated leucine zipper protein, can bind both kinesin and dynein motor proteins, and regulates cargo trafficking as an adaptor protein. Recent study reported JLP is involved in perinuclear lysosome clustering through the interaction with TMEM55B, a lysosomal protein. However, its detailed molecular mechanism remains unclear. In this study, I analyzed *JLP* KD cells and found dispersion of lysosome toward cell periphery, leading impairment of autophagosome-lysosome fusion. Furthermore, I performed rescue experiments using wild-type JLP and its various deletion mutants. As a result, mutant JLPs lacking interaction with p150^{Gleed} or TMEM55B, but not JLP deleted kinesin-1 heavy chain binding domain, restored lysosome localization and autophagosome-lysosome fusion. These findings provide new insights into the mechanisms of lysosomal trafficking regulation.

序論

リソソームは、真核生物の持つ細胞小器官の一つであり、タンパク質、脂質、糖質などの多様な生体高分子を分解する機能を持つ。この分解機能は、細胞が生存・増殖するにあたり非常に重要な役割を担っている。リソソームは、細胞質全体に広く分布しているが、非極性細胞においては、特に核近傍の領域に多く局在し、クラスターを形成することが知られている。先行研究において、細胞内外の環境要因がリソソームの細胞内分布に影響することが報告されており、細胞質中の酸性化や富栄養条件ではリソソームは細胞質中に拡散し、一方でプロテアソームの阻害や栄養飢餓はリソソームの核近傍での凝集を引き起こす。このようなリソソームの動的な細胞内分布は、微小管上を移動するモータータンパク質によって制御されており、細胞辺縁に向かう順行性輸送はキネシン-1、キネシン-2、キネシン-3及びキネシン-13によって、核近傍に向けた逆行性輸送はダイニンモーターによって制御されている。これらのモータータンパク質は、リソソーム膜上で形成されるタンパク質複合体によってリクルートされており、細胞内外での刺激に応じた特異的なタンパク質複合体の形成がリソソームの細胞内分布と機能に強く影響している。また、リソソームの細胞内分布の異常は、様々な病態との関連が指摘されている。アルツハイマー病を発症した神経細胞においては、膨化した軸索におけるリソソームの過剰な蓄積とそれに伴うアミロイドβのプラーク形成が認められており、また、いくつかのタイプのがん細胞においては、リソソームの細胞内分布異常と分泌亢進が細胞遊走や浸潤活性を増加させている

ことが報告されている。これらのことから、近年では、リソソームは分解機能だけでなく、ダイナミックな細胞内分布とその制御機構が注目を集めている。

本研究で着目した **JNK-associated leucine zipper protein (JLP)** は、MAP キナーゼ毛色の足場タンパク質として同定され、JNK 経路および p38 経路を構成するタンパク質との相互作用を通じてこれらのシグナル伝達経路の特異性や活性を制御していることが示されている。また、JLP は、キネシン-1 やダイニンモーターと相互作用することが明らかにされており、これらのモータータンパク質との相互作用を通じて微小管に沿った細胞内輸送の制御に関与していることが報告されている。リソソームの細胞内分布制御との関連については、JLP は、リソソーム膜タンパク質である **TMEM55B** との相互作用を通じて核近傍におけるリソソームの凝集を促進することが報告されており、これらのタンパク質による制御機構が、栄養飢餓やリソソーム内腔でのコレステロールレベルの上昇、酸化ストレスにตอบสนองしたリソソームの局在変化に関与していると考えられている。しかし、JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構については十分な知見は得られていない。

本研究では、JLP によるリソソームの細胞内分布制御の分子基盤解明を目的として、**JLP** ノックダウン (KD) 細胞の作製・解析、および機能的ドメインを含む様々な領域を欠く変異型 JLP を用いたレスキュー実験を行い、リソソームの細胞内分布制御における JLP の機能解析を行った。

結果

リソソームの細胞内分布制御における JLP の機能解析を行うにあたり、まず、shRNA を用いて **JLP KD** 細胞を作製した。U87 細胞、HeLa 細胞および HT1080 細胞において **JLP KD** 細胞を作製し、リソソームのマーカータンパク質である **LAMP-1** を指標に細胞免疫染色を行い、リソソームの細胞内分布を解析したところ、先行研究の報告と同様に、核近傍でのリソソームの凝集が解除され、細胞質中に散在する表現型が認められた。

JLP KD 細胞において認められた表現型は、リソソームの逆行性輸送制御機構が破綻したことによるものであると考え、ダイニンモーターの構成要素である **p150^{Glued}** との相互作用を欠失させた変異型 JLP (**JLP_{ΔDBD}**) を作製し、レスキュー実験を行った。その結果、予想に反し、**JLP_{ΔDBD}** においても野生型 JLP と同様に **JLP KD** 細胞の表現型がレスキューされ、再び核近傍におけるリソソームの凝集が認められた。この結果から、JLP は **p150^{Glued}** との相互作用とは非依存的にリソソームの細胞内分布制御を行っていると考えられる。

次に、JLP と **TMEM55B** の相互作用に着目して解析を行った。まず、免疫沈降法により、野生型 JLP、N 末端側領域 (1-656 アミノ酸残基、**JLP_N**) または C 末端側領域 (647-1321 アミノ酸残基、**JLP_C**) と **TMEM55B** の相互作用を解析した。結果、**JLP_C** において **TMEM55B** との相互作用が認められたが、**JLP_N** においては認められなかった。さらに、**JLP_N** および **JLP_C** を用いてレスキュー実験を行ったところ、興味深いことに、

TMEM55B との相互作用を欠く JLP_N によって JLP KD 細胞の表現型がレスキューされた。これらの結果から、JLP は、TMEM55B との相互作用に非依存的な経路においてリソソームの細胞内分布を制御可能であることが示唆された。

N 末端側領域に存在する機能的ドメインである、キネシン-1 重鎖結合ドメイン (KBD) および MAP キナーゼ結合ドメイン (MBD) に着目し、それぞれを欠損させた変異型 JLP (JLP_ΔKBD、JLP_ΔMBD) を作製した。これらの変異型 JLP を用いてレスキュー実験を行ったところ、JLP_ΔKBD では JLP KD 細胞の表現型をレスキューできなかった。一方、JLP_ΔMBD では、野生型 JLP を用いてレスキュー実験を行った場合と同様な結果が得られた。この解析結果から、JLP はキネシン-1 との相互作用を通じてリソソームの細胞内分布制御に関与していると推察される。

JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構の機能的な役割を明らかにするため、栄養飢餓により誘導されるオートファジーに着目して解析を行った。まず、オートファゴソーム形成の指標として用いられる LC3-II 量をウエスタンブロット法により解析した。結果、JLP KD 細胞において、栄養飢餓処理により誘導される LC3-II 量の増加にコントロール細胞と比較して変化は認められなかった。また、オートファゴソームとリソソームの融合過程を mRFP-GFP-LC3 融合タンパク質を用いて解析したところ、JLP KD によりオートファゴソームとリソソームの融合阻害が認められた。JLP KD 細胞において認められたリソソームのオートファゴソームの融合阻害は、野生型 JLP または JLP_N によってレスキューされたが、JLP_ΔKBD ではレスキューされなかった。これらの結果から、JLP KD とそれに伴うリソソームの細胞内分布異常は、栄養飢餓によるオートファジーの誘導には影響を与えないが、リソソームとオートファゴソームの融合を阻害することが明らかとなった。

考察

本研究では、JLP KD 細胞の解析および機能的ドメインを含む領域を欠失させた変異型 JLP を用いたレスキュー実験により、JLP がリソソームの細胞内分布制御、オートファゴソームとリソソームの融合過程において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

核近傍に向けたリソソームの逆行性輸送は、ダイニンモーターによって制御されていることが知られている。JLP はダイニンモーターの構成要素である p150^{Glued} と相互作用し、細胞内の逆行性輸送制御に関与していることが示されているが、今回の解析の結果、p150^{Glued} との相互作用を欠失した JLP_ΔDBD によって JLP KD 細胞の表現型がレスキューされ、再び核近傍においてリソソームが凝集することが明らかとなった。このことは、リソソームの細胞内分布制御が JLP と p150^{Glued} の相互作用に非依存的であることを示している。先行研究において、JLP は、p150^{Glued} だけでなく、p50 やダイニン中間軽鎖 1 (DLIC1) といったほかのダイニンモーター構成要素との結合が指摘されている。したがって、JLP はこれらのダイニンモーター構成要素との相互作用を通じてリソソームの逆行性

輸送を制御していることが考えられる。

リソソーム膜タンパク質である **TMEM55B** は、**JLP** との相互作用を通じて核近傍におけるリソソームの凝集を促進することが報告されているが、このメカニズムにおいて **TMEM55B** は **JLP** をリソソーム膜上へリクルートする機能を持つことが示されている。本研究では、**TMEM55B** との相互作用を欠失した **JLP_N** によって **JLP KD** 細胞の表現型がレスキューされることが明らかとなった。**JLP** との相互作用が指摘されており、かつ **TMEM55B** と同様にリソソーム膜への局在が認められるタンパク質として、**Rab36**、**LIMP2**、メラノレギュリンが報告されているが、これらのタンパク質が **JLP** によるリソソームの細胞内分布制御に関与しているか、さらなる解析が必要である。

キネシン-1 重鎖結合ドメインを欠損させた **JLP_ΔKBD** では、**JLP KD** 細胞の表現型がレスキューされなかった。この結果は、**JLP** とキネシン-1 との相互作用がリソソームの細胞内分布制御に重要であることを示唆している。線虫における **JLP** ホモログである **UNC-16** は、キネシン-1 との相互作用を通じて神経細胞の軸索におけるタンパク質の逆行性輸送を促進していることが報告されている。核近傍に向けたリソソームの逆行性輸送においても同様に、**JLP** とキネシン-1 の相互作用が重要な機能を担っている可能性が考えられる。

まとめると、本研究によって、**JLP** が、**p150^{Glued}** や **TMEM55B** との相互作用とは非依存的な、新規のメカニズムによってリソソームの細胞内分布を制御していることが示唆された。このメカニズムを解明することで、リソソームの分布異常に起因する様々な病態について新たな知見が得られることが期待される。

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

リソソームの細胞内分布制御における JLP の機能解析

2. 論文提出者 (1) 所属 自然システム学 専攻

(2) 氏名 ふり がな すぎき りゅうすけ
鈴木 隆介

3. 審査結果の要旨（600～650字）

リソソームは、様々な基質を分解する機能を持つ細胞小器官の一つである。近年、神経変性疾患やがんなど多くの疾患において、リソソームの細胞内分布異常が報告されている。一方、本研究で注目した JLP は、最初、MAP キナーゼシグナル伝達経路の足場タンパク質として同定され、その後の研究から、キネシンやダイニンモーターのアダプターとして細胞内輸送制御に関与していることが分かってきた。また、JLP はリソソーム膜タンパク質 TMEM55B との相互作用を通じて核近傍におけるリソソームの凝集を促進することも報告されている。しかし、JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構については、十分な知見が得られていないのが現状である。そこで、本研究では、分子細胞学的手法を用い、JLP によるリソソームの細胞内分布制御の分子基盤解明を目的として解析を行った。まず、JLP ノックダウン (KD) 細胞の作製・解析を行い、JLP KD により核近傍でのリソソームの凝集が解除され、リソソームが細胞質中に散在することを明らかにした。次に、機能的ドメインを含む様々な領域を欠く変異型 JLP を用いたレスキュー実験を行い、p150^{Glued} (ダイニンモーターの構成要素の1つ) や TMEM55B との相互作用には依存しない、新たなリソソーム細胞内分布制御機構が存在する可能性を見出した。さらに、この新規制御機構において、JLP とキネシン-1 の相互作用が重要であることを強く示唆する結果を得た。

本論文は、リソソームの細胞内分布制御における JLP の新たな役割とその分子基盤の一端を明らかにした労作であり、学位に値すると評価された。

4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士 (理学)

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

リソソームの細胞内分布制御における JLP の機能解析

2. 論文提出者 (1) 所属 自然システム学 専攻

(2) 氏名 鈴木 隆介

3. 審査結果の要旨（600～650字）

リソソームは、様々な基質を分解する機能を持つ細胞小器官の一つである。近年、神経変性疾患やがんなど多くの疾患において、リソソームの細胞内分布異常が報告されている。一方、本研究で注目した JLP は、最初、MAP キナーゼシグナル伝達経路の足場タンパク質として同定され、その後の研究から、キネシンやダイニンモーターのアダプターとして細胞内輸送制御に関与していることが分かってきた。また、JLP はリソソーム膜タンパク質 TMEM55B との相互作用を通じて核近傍におけるリソソームの凝集を促進することも報告されている。しかし、JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構については、十分な知見が得られていないのが現状である。そこで、本研究では、分子細胞学的手法を用い、JLP によるリソソームの細胞内分布制御の分子基盤解明を目的として解析を行った。まず、JLP ノックダウン (KD) 細胞の作製・解析を行い、JLP KD により核近傍でのリソソームの凝集が解除され、リソソームが細胞質中に散在することを明らかにした。次に、機能的ドメインを含む様々な領域を欠く変異型 JLP を用いたレスキュー実験を行い、p150^{Glued} (ダイニンモーターの構成要素の1つ) や TMEM55B との相互作用には依存しない、新たなリソソーム細胞内分布制御機構が存在する可能性を見出した。さらに、この新規制御機構において、JLP とキネシン-1 の相互作用が重要であることを強く示唆する結果を得た。

本論文は、リソソームの細胞内分布制御における JLP の新たな役割とその分子基盤の一端を明らかにした労作であり、学位に値すると評価された。

4. 審査結果 (1) 判定 (いずれかに○印) 合格 ・ 不合格

(2) 授与学位 博士(理学)