Functional role of JLP in lysosome localization

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2020-11-03
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00059766
	This work is licensed under a Creative Commons

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博 士 論 文

リソソームの細胞内分布制御における JLP の機能解析

金沢大学大学院自然科学研究科 自然システム学専攻

学籍番号 1724062005
氏名 鈴木 隆介
主任指導教官名 善岡 克次
提出年日 令和2年1月9日

目次

要		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	3
序	論	ì•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4
方	ī法	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6
	紐	胞	株	と	培	養	方	法	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6
	発	現	プ	ラ	ス	i	ド	の	作	製	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6
	レ	シ	チ	ウ	イ	ル	ス	べ	ク	タ	-	の	作	製	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	7
	ウ	I	ス	タ	$\boldsymbol{\gamma}$	ブ	D	ッ	\mathbb{P}	解	析	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	7
	免	疫	沈	降	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	8
	免	疫	細	胞	染	色	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	8
	IJ	ソ	ソ	-	ム	の;	細	胞	内	分	布	の	定	量	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9
	IJ	ソ	ソ	-	ム	と	融	合	L	た	才	_	Ի	フ	P	ゴ	ソ	_	Ъ	の)定	量	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9
	統	計	学	的	解	析	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9
紸	課	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• •	10
	JL	P	KI	D	細	抱	К.	お	け	る	IJ	ソ	ソ	—,	Ц	の;	細	胞	内	分	布	異	常	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• •	10
	р́	150) ^{Glu}	led	結	合	ド	X	イ	$\boldsymbol{\Sigma}$	欠	損	変	異	体	を	用	61	た	レ	ス	+	ユ	_	実	験	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	11
	JL	P	と	ΤI	ME	M	55	БB	の	相	互	作	用	が	IJ	ソ	ソ	_	ム	の	細	胞	内	分	布	制	御	ю.	与	え	る	影	占,	の角	解	沂	•	• •	12
	Ν	末	ミ側	領	域	の	機	能	的	ド	メ	イ	$\boldsymbol{\gamma}$	を	欠	損	L	た	変	異	体	を	用	61	た	レ	ス	+.	ユ・	-	実	験	•	•	•	•	•	• •	14
	JL	P	KI	C	に	よ	3	栄	養	飢	餓	条	件	下	で	の	才	_	\mathbb{P}	フ	r	ゴ	ソ	_	Ъ	と	リ	ソ	ソ・		40	の層	轴行	<u> 今</u> [且得	丰	•	• •	15
考	察	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• •	18
謝	辪	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 2	20
参	考	文	献	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	• 2	21

リソソームは真核細胞の持つ細胞小器官の一つであり、多様な基質を分解する機能を持 つ。近年では、この分解機能だけでなく、リソソームの細胞内分布が注目を集めており、 そのダイナミックな細胞内分布が様々なシグナル伝達経路や細胞の機能と関連しているこ とが報告されている。JLP は、キネシン-1 およびダイニンのアダプターとして機能するこ とが知られており、微小管上での積荷の輸送制御に関与していることが分かっている。リ ソソームの細胞内輸送制御との関連については、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でのリソソームの凝集を促進することが報告され ているが、その詳細な分子メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。そこで、shRNA を用いて JLP ノックダウン (KD) 細胞を作製し、様々な機能的ドメインを含む領域を欠失 した変異体 JLP を用いてレスキュー実験を行うことで、リソソームの細胞内分布制御にお ける JLP の機能解析を試みた。U87 細胞、HeLa 細胞及び HT1080 細胞において JLP KD 細胞を作出し、リソソームのマーカー分子である LAMP-1 を指標にリソソームの細胞内分 布を観察したところ、先行研究の報告にあるように、JLP KD によって核近傍でのリソソ ームの凝集が解除され、細胞質中に拡散する表現型が認められた。JLP KD によるリソソ ームの拡散は逆行性輸送の阻害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} との相互作用を欠く変異体 (JLP ΔDBD) を用いてレスキュー実験を行っ た。結果、JLP ΔDBD は、野生型 JLP と同程度、*JLP* KD 細胞の表現型をレスキューし、 核近傍でのリソソームの凝集が認められた。また、先行研究の報告にある TMEM55B との 相互作用に注目し、まず、JLP において TMEM55B との相互作用に必要とされる領域の同 定を行った。JLP, JLPN 末端側断片 (JLP_N) および JLPC 末端側断片 (JLP_C) と TMEM55B との相互作用を解析したところ、JLP 及び JLP C では TMEM55B との相互作 用が認められたが、JLPNでは認められなかった。さらに、JLPN, JLPCをJLPKD細 胞で発現させ、リソソームの細胞内分布を解析した結果、JLP N を発現させた細胞では JLP KD 細胞の表現型がレスキューされた。N 末側の領域がリソソームの細胞内分布制御 に重要であると明らかになったことから、その領域に位置する機能的ドメインである MAPK 結合ドメインまたはキネシン重鎖結合ドメインを欠失させた変異体 (JLP_ΔMBD, JLP_ΔKBD) を用いてレスキュー実験を行ったところ、JLP_ΔMBD では JLP KD 細胞の表 現型がレスキューされたが、JLP ΔKBD ではレスキューされなかった。JLP によるリソソ ームの細胞内分布制御の機能的な役割を明らかにするため、オートファジーに注目して解 析したところ、JLP KD 細胞では、オートファジーの誘導には変化が認められなかった が、リソソームとオートファゴソームの融合阻害が観察された。本研究の結果から、JLP によるリソソームの細胞内分布制御には、JLP の N 末側領域、特にキネシン重鎖結合ドメ インが重要であることが明らかになった。また、JLP と TMEM55B の相互作用に非依存的 な、新規の JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構が存在することが示唆された。

真核細胞の細胞小器官の一つであるリソソームは、その内腔を pH5 前後に維持し、この 酸性環境下で活性を持つ種々の加水分解酵素によってタンパク質、脂質、糖質などの生体高 分子をそれらの構成単位にまで分解する機能を持つ1。この分解機能は、細胞内での栄養供 給、異物や病原体の除去、増殖因子によるシグナル伝達経路の遮断などにおいて不可欠であ り、細胞の生存・増殖において非常に重要な役割を担っている^{1,2}。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、特に微小管形成中心周囲の領域に最も 多く局在することが知られている³。リソソームの細胞内分布は、細胞内外の環境要因が強 く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下ではリソソームは細 胞質に拡散し、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4。このような細胞質中におけるリソソームの細胞内分布は、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 -1⁵、キネシン-2⁶、キネシン-3⁷及びキネシン-13⁸によって制御されており、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 9。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ソソームへとリクルートさ れることが知られている。例えば、コレステロールセンサーとして知られる ORP1L は、リ ソソーム内腔での遊離コレステロール濃度の上昇を感知すると、RILP 及び Rab7 との複合 体を形成し、ダイニンモーターのアダプターとして機能することでリソソームの逆行性輸 送を促進する ¹⁰。この例にみられるように、リソソームの細胞内分布は細胞が受容した刺激 に応じて複数のタンパク質が挙動する複雑な分子メカニズムによって制御されている。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 マー病のモデルマウスを用いた解析において、膨化した軸索におけるリソソームの蓄積が 認められており、この輸送障害とそれに伴うリソソームの成熟阻害が神経細胞に対して毒 性を示すアミロイドβのプラーク形成に関与していることが報告されている ¹¹。さらに、が ん細胞においてリソソームの順行性輸送の促進が観察されており、これによりリソソーム に含まれる加水分解酵素の分泌が増加し、細胞遊走や浸潤の亢進を引き起こすことが示唆 されている ¹²⁻¹⁴。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はなく、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 キナーゼ経路の 足場タンパク質として同定され¹⁵、JNK 経路及び 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^{16,17}。また、JLP は順行性輸送のモータータンパク質であるキネシン-1 を構成するサブ ユニットである KIF5 との結合が示されており¹⁸、キネシン-1 の活性と運動性を促進するこ とで神経細胞の軸索輸送に関与していることが報告されている¹⁹。さらに、逆行性輸送のモ ータータンパク質であるダイニンモーターを構成する p150^{Glued} と JLP の相互作用も明らか にされており、細胞質分裂におけるリサイクリングエンドソームの輸送制御に関与していることが示唆されている²⁰。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、酸化ストレスに応じたリソソームの 局在変化に関与していると考えられている²¹。しかしながら、JLP によるリソソームの細胞 内分布制御機構については不明な点が多く残されており、詳細な分子メカニズムは明らか にされていない。

本研究では、JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構を明らかにするため、まず、 shRNA を用いて JLP KD 細胞を作製、解析した。また、機能的ドメインを欠失させた複数 の変異体 JLP を作製し、これらを KD 細胞において発現させ、解析を行った。その結果、 p150^{Glued} および TMEM55B に非依存的な制御機構の存在が明らかとなり、この制御機構に おいて、JLP の N 末端側領域、特にキネシン重鎖結合ドメインが重要な役割を持つことが 示された。また、JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構は、オートファゴソームとリ ソソームの融合のステップにおいて重要な役割を持つことが示唆された。以上の結果を本 論文にて報告する。

方法

細胞株と培養方法

ヒト脳腫瘍細胞株 U87 細胞、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞及びヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 細胞は、37℃、5% CO₂条件下で、以下に示す培養培地を用いて培養した。栄養飢 餓処理においては、血清及びアミノ酸を含まない栄養飢餓培地 (富士フィルム和光純薬株式 会社)を用いて4時間培養した。

培養培地

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (富士フィルム和光純薬株式会社) 10% ウシ胎児血清 (FBS) (JRH Bioscience 社) 100U/ml ペニシリン (明治製菓ファルマ株式会社) 100μg/ml ストレプトマイシン (明治製菓ファルマ株式会社)

発現プラスミドの作製

JLP を標的とした short hairpin RNA (shRNA)、shJLP#1 及び shJLP#2 の発現プラスミドは、レンチウイルス作製用プラスミド pLVTH を用いて作製した。コントロールとして標的を指定しない shRNA (shScr) を用いた。各 shJLP の標的配列は以下に示す。

shJLP#1 5'- GCAGACTTGAAGAAAGAGA -3'

shJLP#2 5'- GCATCACAGTGGTTGGTTG -3'

JLP をコードする cDNA 配列 (NM_001130528.2) は、ヒトのアストロサイトより抽出した RNA を鋳型に RT-PCR を行うことで取得した。その後、レンチウイルス作製用プラスミド pCL20c に挿入し、5'末端側に HA タグを付加した。機能的ドメイン欠損変異体 JLP をコー ドする cDNA 配列は、先行研究を参考に、p150^{Glued} 結合ドメイン (371-490 番アミノ酸残 基)、キネシン-1 重鎖結合ドメイン (45-75 番アミノ酸残基)、p38 MAP キナーゼ結合ドメイ ン (197-213 番アミノ酸残基) を指定する領域を、それぞれオーバーラッピング PCR 法に より欠失させることで作製した。JLP の N 末端側領域および C 末端側領域をコードする cDNA 配列は、それぞれ 1-656 番アミノ酸残基、647-1321 番アミノ酸残基を指定する領域 を PCR 法によって増幅し、作製した。shJLP#2 抵抗性 JLP および JLP 変異体は、オーバ ーラッピング PCR 法を用いて、shJLP#2 標的領域内の各コドンにおいて指定するアミノ酸 が変更されないように塩基置換を入れることで作製した。mRFP-GFP-LC3 発現プラスミド、 ptfLC3 は、Addgene 社より購入し、mRFP-GFP-LC3 のコード領域を PCR 法によって増幅 し、pCL20c ベクターに挿入して解析に用いた。

レンチウイルスベクターの作製

VSV-G シュードタイプヒト免疫不全ウイルスベクターを使用した。ヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞に以下に示すプラスミドを PEI 法によってトランスフェクションし、48 時 間後にウイルスを含む培養上清を回収した。培養上清はポリエーテルスルホン膜でろ過し た後、26,000 rpm で超遠心を行い、100 倍濃縮になるように 1xPBS で懸濁した。

pCL20c レンラ	トウィ	「ルスベク	フター
------------	-----	-------	-----

pCL20c	10µg
pCAGkGP1R	6µg
pCAG4RTR2	2μg
pCAGVSVG	2µg

pLVTH レンチウイルスベクター

pLVTH	15µg
pMD2.G	3.75µg
psPAX2	11.25µg

ウエスタンブロット解析

35mm ディッシュでサブコンフルエントの状態の細胞に RIPA バッファー (50mM Tris-HCI pH8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS) を加え、超音 波処理によって細胞を破砕後、13,200 rpm で遠心し、上清を細胞抽出液として回収した。 調製した細胞抽出液に SDS サンプルバッファー (312.5mM Tris-HCl pH6.8, 10% SDS, 50% glycerol, 25% 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol Blue) を加え、室温で30分間静置し タンパク質を変性させ、泳動用サンプルを作製した。細胞抽出液中のタンパク質濃度は、 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて測定した。7.5%または 10%ポ リアクリルアミドゲルの各ウェルに 20µg のタンパク質をアプライし、定電流 (30mA) で 60 分間電気泳動を行った。その後、切り出したゲルをトランスファーバッファー中で洗浄 し、PVDF 膜 (Millipore 社) と重ね合わせ、氷水中のトランスファー装置に設置し、定電流 (100mA) で 90 分間トランスファーを行った。タンパク質がトランスファーされたメンブ レンは、1xTBST 中で洗浄し、ブロッキングバッファー (5% スキムミルク/1xTBST) を用 いて 1 時間ブロッキングし、ブロッキングバッファーにより希釈した一次抗体液を加え、 4℃で一晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを 1xTBST 溶液で洗浄し、必要に応じ て二次抗体反応を行った。タンパク質の検出は、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore 社) を用いて行い、LAS-4000 (GE healthcare 社) を使用して画像を取 得した。使用した一次抗体及び二次抗体は下記に示す。

一次抗体

anti-JLP (0.25mg/ml)²², anti-actin (1:2000; A6050, Sigma-Aldrich 社), anti-p150^{Glued} (1:1000; 610474, BD Biosciences 社), anti-HA (1:5000; 11867423001, Sigma-Aldrich 社), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-Flag (1:2000; Sigma-Aldrich), anti-LC3 (1:2000; MBL 社)

二次抗体

HRP-conjugated anti-mouse, rabbit IgG (1:2000; GE Healthcare 社), HRP-conjugated antirat IgG (1:10000; Thermo Fisher Scientific 社)

免疫沈降

HA タグ標識タンパク質及び Flag タグ標識タンパク質を発現させた HEK293T 細胞に Lysis バッファー (50mM Tris-HCl pH7.4, 150mM NaCl, 4% Sodium deoxycholate, 1% NP-40, 1mM EDTA)を加え、4°Cで回転攪拌後、15,000 rpm で遠心し、上清を細胞抽出液とし て回収した。回収した細胞抽出液の一部をとりわけ、SDS バッファーを加えてインプット サンプルを作製し、残りの細胞抽出液に抗 HA 抗体ビーズ (富士フィルム和光純薬株式会 社)を加え、4°Cで一晩回転攪拌を行った。その後、5,000 rpm で遠心し、1xPBS で洗浄後、 SDS バッファーを加え、免疫沈降サンプルを作製した。サンプル中のタンパク質の検出は、 ウエスタンブロット解析により行った。

免疫細胞染色

カバーグラス上に細胞を播種し、一晩培養後、4% パラホルムアルデヒド/1xPBS で細胞 を固定した。1xPBS で洗浄後、ブロッキングバッファー (5% BSA/1xTBST) で室温、1 時 間ブロッキングを行い、その後4°Cで一晩、一次抗体反応を行った。1xTBST で洗浄後、二 次抗体反応を室温、2 時間行った。DAPI (ナカライテスク株式会社)を加えて細胞核を染色 し、1xTBST で洗浄後、蛍光用封入剤 (vector laboratories 社)で封入した。サンプルは、蛍 光顕微鏡 (BZ-9000,株式会社キーエンス)、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (LSM510 META, Carl Zeiss 社または TCS SP8, Leica 社)を用いて観察し、画像を取得した。使用し た一次抗体及び二次抗体は下記に示す。

一次抗体

anti-LAMP-1 (1:300; H4A3, Developmental Studies Hybridoma Bank), anti-HA (1:100; 11867423001, Sigma-Aldrich 社)

二次抗体

Alexa 568-, 647-conjugated anti-mouse IgG, Alexa 568-conjugated anti-Rat IgG (1:500; Thermo Fisher Scientific 社)

リソソームの細胞内分布の定量

リソソームの細胞内分布の定量は、Willett らの方法²¹を参考に行った。抗 LAMP-1 抗体免 疫染色画像において、核辺縁から細胞辺縁に向けて幅 1.5 μ m の直線を引き、この直線状の LAMP-1 陽性シグナルの輝度を Image J (National institute of Health) の plot profile を用い て定量した。核辺縁から 5 μ m の領域を核近傍として、全体のシグナル輝度に対する核近傍 でのシグナル輝度の割合 (% Lysosome accumulation) を算出した。

リソソームと融合したオートファゴソームの定量

リソソームと融合したオートファゴソームの定量は、Michelet らの方法²³を参考に行っ た。栄養飢餓処理を施した mRFP-GFP-LC3 発現細胞に抗 LAMP-1 抗体免疫染色を行い、取 得した画像において、mRFP と LAMP-1、GFP と LAMP-1、mRFP と GFP の各陽性シグナ ルが共局在する領域の面積 (mRFP+LAMP-1, GFP+LAMP-1, mRFP+GFP) を Image J を用 いて定量した。その後、LAMP-1 陽性領域の面積に対する mRFP+LAMP-1 または GFP+LAMP-1 の割合、および mRFP 陽性領域の面積に対する mRFP+GFP の割合 (% Colocalization) を算出した。

統計学的解析

Student's *t-test* を用いて解析を行った。P 値は、P<0.05 を統計的に有意とした。

結果

JLP KD 細胞におけるリソソームの細胞内分布異常

先行研究において、siRNA による JLP KD が核近傍でのリソソームの凝集を解除し、リソ ソームの細胞質中での拡散を引き起こすことが報告されている²¹。本研究では、shRNAを 用いて、U87 細胞、HeLa 細胞及び HT1080 細胞において JLP KD を行い、先行研究と同様 な表現型が観察されるか確認した。まず、レンチウイルスベクターを用いて、JLP を標的と した 2 種類の shRNA (shJLP#1, shJLP#2)、コントロールとして標的を指定しない shRNA (shScr) をそれぞれ発現させ、ウエスタンブロット法により JLP の発現を解析した。その結 果、各細胞株において shJLP による JLP の発現抑制が認められた (Fig. 1A)。リソソームの マーカー分子である LAMP-1 を標的とした細胞免疫染色によりリソソームの細胞内分布を 解析したところ、JLPKD細胞においてリソソームの細胞質中での拡散が認められ (Fig. 1B)、 核近傍でのリソソームの凝集が約 50%有意に減少した (Fig. 1C)。また、shScr を発現させ たコントロール細胞では、親細胞と比較してリソソームの細胞内分布に有意な変化は認め られなかった (Fig. 1B, C)。この結果より、本研究で作製した JLP KD 細胞でも先行研究の 報告と同様に、核近傍でのリソソームの凝集が解除され、リソソームが細胞質中で拡散する ことが確認された。



Figure 1 JLP KD 細胞における核近傍でのリソソーム凝集の解除

(A) ウエスタンブロット法による JLP の発現解析。内部標準としてアクチンを用いた。(B)
 リソソームの細胞内分布の解析。親細胞 (parent)、コントロール細胞 (shScr)、JLP KD 細胞 (shJLP#1, shJLP#2)において抗 LAMP-1 抗体を用いた細胞免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を使用して画像を取得した。(C) 核近傍におけるリソソーム凝集の定量結果。核辺縁から 5µm の範囲を核近傍とし、その領域内での LAMP-1 陽性シグナルの全体に対する割合を算出した。20 細胞以上を解析し、解析は3回行った。Scale bar, 10µm. "P<0.01; ""P<0.001;

p150^{Glued}結合ドメイン欠損変異体を用いたレスキュー実験

JLP は、ダイニンモーターの構成要素であるダイナクチンのサブユニット p150^{Glued} との 相互作用を通じて細胞内における積荷の逆行性輸送制御に関与していることが報告されて おり、JLPにおける 371-490番アミノ酸残基が p150Glued の結合領域であることが明らかに されている²⁰。JLP KD 細胞で認められたリソソームの細胞内分布異常は、JLP と p150^{Glued} の相互作用による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、p150^{Glued} 結合領域を欠損した変異体 (JLP ΔDBD) を作製し、これを JLP KD 細胞で発現させること でレスキュー実験を行った。まず、野生型 JLP (JLP WT) 及び JLP ΔDBD と p150^{Glued}の 結合を免疫沈降法により解析した。免疫沈降したサンプルを、抗 p150^{Glued} 抗体を用いたウ エスタンブロット解析により調べたところ、JLP WT を発現させたサンプルでは p150^{Glued} が検出されたが、JLP ΔDBD を発現させたサンプルでは p150^{Glued} が検出されなかった (Fig. 2A)。この結果から、JLP ΔDBD における p150^{Glued} との相互作用の欠失が確認された。次 に、shJLP#2 抵抗性になるように塩基置換を施し、N 末端に HA タグを付加した JLP WT または JLP ΔDBD を、レンチウイルスベクターを用いて U87 JLP KD 細胞において発現さ せ、これらの導入効率を細胞免疫染色法によって、また発現量をウエスタンブロット法によ って解析した。Fig. 2B 及び 2C に示してあるように、導入した JLP WT または JLP △DBD は、観察した細胞の 90%以上で発現が認められ、発現量はコントロール細胞で認められる 内在性 JLP の発現量と同程度であった。これらの細胞においてリソソームの細胞内分布を 解析したところ、JLP WT の発現は JLP KD 細胞の表現型をレスキューし、コントロール細 胞と同様に核近傍でのリソソームの凝集が認められた (Fig. 2D, E)。また、JLP ΔDBD の発 現によっても核近傍でのリソソームの凝集が認められ、コントロール細胞と比較して有意 な差は認められなかった。これらの結果から、JLP によるリソソームの細胞内分布制御は、 p150^{Glued}との相互作用に非依存的である可能性が示された。



Figure 2 JLP と p150^{Glued} の相互作用に非依存的なリソソーム細胞内分布制御 (A) 免疫沈降法による JLP_WT または JLP_ΔDBD と p150^{Glued} の相互作用の解析。(B) U87 *JLP* KD 細胞に導入した HA-JLP_WT または HA-JLP_ΔDBD の導入効率の確認。抗 HA 抗体 を用いた細胞免疫染色により行った。細胞核は DAPI を用いて染色した。(C) U87 *JLP* KD 細胞に導入した HA-JLP_WT または HA-JLP_ΔDBD の発現量の解析。ウエスタンブロット 法により行った。内部標準としてアクチンを用いた。(D) リソソームの細胞内分布の解析。 (C)で用いた細胞において解析を行った。(E) 核近傍におけるリソソーム凝集の定量結果。 20 細胞以上を解析し、解析は3回行った。Scale bar, 20µm (B). Scale bar, 10µm (D). ^{**}P<0.01; n.s., not significant.

JLP と TMEM55B の相互作用がリソソームの細胞内分布制御に与える影響の解析

先行研究において、JLP は、リソソーム膜タンパク質である TMEM55B の細胞質側領域 (TMEM55B_CD) と結合することが明らかにされており、この相互作用を通じてストレス 刺激に応答したリソソームポジショニングの制御を行っていると考えられている²¹。JLP と TMEM55B の相互作用がリソソームポジショニングに与える影響を解析するにあたり、 まず、免疫沈降法を用いて JLP における TMEM55B 結合領域の同定を行った。HA タグで 標識した JLP_WT、N 末端側領域 (JLP_N) または C 末端側領域 (JLP_C) と Flag タグで 標識した TMEM55B_CD を共発現させたサンプルをそれぞれ抗 HA 抗体で免疫沈降し、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロット法により解析を行った結果、JLP_WT または JLP_C を発現させたサンプルでは Flag-TMEM55B_CD が検出されたが、JLP_N を発現させたサ ンプルでは検出されなかった (Fig. 3A)。この結果より、JLP における TMEM55B 結合領 域は C 末端側領域に存在することが示唆された。さらに、JLP_N または JLP_C を U87 JLP KD 細胞で発現させ、レスキュー実験を行った。上述にあるように、JLP_N および JLP_C の導入効率と発現量を調べたところ、細胞集団の 90%以上で発現が認められ、同程 度の発現量であることが確認された (Fig. 3B, C)。リソソームの細胞内分布を抗 LAMP-1 抗体を用いた免疫染色により解析したところ、JLP_N を発現させた細胞では、コントロー ル細胞と比較して有意差なく核近傍でのリソソームの凝集が認められ、一方、JLP_C を発 現させた細胞では、細胞質中に拡散したリソソームの細胞内分布に変化は認められなかっ た (Fig. 3D, E)。これらの結果から、JLP は、TMEM55B との相互作用に非依存的にリソソ ームポジショニング制御を行っていることが示唆された。



HA-JLP_C

2

Figure 3 JLP と TMEM55B の相互作用に非依存的なリソソーム細胞内分布制御

(A) 免疫沈降法による JLP_WT、JLP_N または JLP_C と TMEM55B_CD の相互作用の解析。
(B) U87 JLP KD 細胞に導入した HA-JLP_N または HA-JLP_C の導入効率の確認。抗 HA 抗体を用いた細胞免疫染色によって行った。細胞核は DAPI を用いて染色した。(C) U87 JLP KD 細胞に導入した HA-JLP_N または HA-JLP_C の発現量の解析。ウエスタンブロット法により行った。内部標準としてアクチンを用いた。(D) リソソームの細胞内分布の解析。
(C)で用いた細胞において解析を行った。(E) 核近傍におけるリソソーム凝集の定量結果。
20 細胞以上を解析し、解析は 3 回行った。Scale bar, 20µm (B). Scale bar, 10µm (D). "P<0.01; ""P<0.001; n.s., not significant.

N末側領域の機能的ドメインを欠損した変異体を用いたレスキュー実験

前述の結果より、JLP の N 末端側領域がリソソームポジショニング制御において重要な 役割を持つことが示された。先行研究において、N 末端側領域に存在する機能的ドメイン として、キネシン-1 重鎖結合ドメイン (KBD)¹⁸ と p38 MAP キナーゼ結合ドメイン (MBD)¹⁵ が報告されており、これらのドメインを欠損させた変異体 (JLP_AKBD、 JLP_AMBD) では、結合パートナーとの相互作用が欠失することが報告されている^{18,22}。 そこで、これらのドメイン欠損変異体を U87 JLP KD 細胞において発現させ、リソソーム の細胞内分布にどのような影響があるか、免疫細胞化学的解析を行った。まず、導入した JLP_AKBD または JLP_AMBD の導入効率と発現量を調べたところ、90%以上の導入効率 が認められ、内在性 JLP と同程度の発現が確認された (Fig. 4A, B)。抗 LAMP-1 抗体を用 いて細胞免疫染色を行い、リソソームの細胞内分布を調べた結果、JLP_AKBD 発現細胞で は変化が認められず、細胞質中にリソソームが散在していたが、JLP_AMBD 発現細胞では 核近傍でのリソソームの凝集が認められ、コントロール細胞と比較して有意な差は認めら れなかった (Fig. 4C, D)。これらの結果から、JLP とキネシン-1 重鎖との相互作用がリソ ソームポジショニング制御において重要であると推察される。



Figure 4 JLP_ΔKBD におけるリソソームの分布制御機能の欠損 (A) U87 *JLP* KD 細胞に導入した HA-JLP_ΔKBD または HA-JLP_ΔMBD の発現量の解析。ウ エスタンブロット法によって行った。内部標準としてアクチンを用いた。(B) U87 *JLP* KD 細胞に導入した HA-JLP_ΔKBD または HA-JLP_ΔMBD の導入効率の確認。抗 HA 抗体を用 いた細胞免疫染色によって行った。細胞核は DAPI を用いて染色した。(C) リソソームの細 胞内分布の解析。(A)で用いた細胞において解析を行った。(D) 核近傍でのリソソーム凝集 の定量結果。20 細胞以上解析し、解析は 3 回行った。Scale bar, 20µm (B). Scale bar, 10µm (C). **P*<0.01; n.s., not significant.

JLP KD による栄養飢餓条件下でのオートファゴソームとリソソームの融合阻害

リソソームが関与する主要な機能としてオートファジーがあげられ、この経路において リソソームの細胞内分布制御が重要な役割を担っていることが報告されている⁴。本研究 では、栄養飢餓によってオートファジーを誘導し、JLP によるリソソームの細胞内分布制 御がどのような役割を持つか、解析を行った。まず、栄養飢餓処理を施した HeLa JLP KD 細胞およびコントロール細胞において、オートファゴソーム形成の指標として一般に用い られる LC3-II の量をウエスタンブロット法によって解析した。その結果、JLP KD 細胞と コントロール細胞の間に LC3-II の量に大きな差は認められず、また、リソソームとオート

ファゴソームの融合阻害剤であるクロロキンを追加した条件下においても両細胞で同程 度の LC3-II の増加が認められた (Fig. 5A)。この解析結果から、JLP KD は、栄養飢餓によ り誘導されるオートファゴソームの形成に影響を与えないと考えられる。次に、リソソー ムとオートファゴ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。GFP は酸性環境下では消光する一方、mRFP の蛍光は安定であるため、mRFP-GFP-LC3 を含むオートファゴソームは、リソソームと融合すると mRFP の蛍光のみを発する ²⁴。HeLa *JLP* KD 細胞およびコントロール細胞において、mRFP-GFP-LC3 を発現させ、 栄養飢餓処理後、抗 LAMP-1 抗体を用いて細胞免疫染色を行い、GFP と LAMP-1、mRFP と LAMP-1、GFP と mRFP の共局在をそれぞれ定量した。結果、JLP KD 細胞ではコント ロール細胞と比較して、GFPとmRFPの共局在の増加が認められ、一方でmRFPとLAMP-1の共局在は減少していた (Fig. 5B, C 上段, D)。さらに、JLP KD 細胞において JLP WT、 JLP N または JLP △KBD を発現させ、同様な解析を行ったところ、JLP WT 発現細胞と JLP N 発現細胞では、コントロール細胞と同様な共局在のパターンを示したのに対し、 JLP ΔKBD 発現細胞では変化は認められず、JLP KD 細胞と同様な共局在のパターンを示 した (Fig. 5B, C下段, D)。これらの結果から、JLP によるリソソームの細胞内分布制御は、 栄養飢餓により誘導されるオートファジーにおいて、オートファゴソームとリソソームが 融合する過程で重要な役割を担っていることが示唆された。

Α





С



JLP KD + HA-JLP_WT

JLP KD +



JLP KD



■ control ■ JLP KD ■ JLP KD + HA-JLP_WT ■ JLP KD + HA-JLP_N ■ JLP KD + HA-JLP_AKBD

Figure 5 JLP KD によるリソソームとオートファゴソームの融合阻害 (A) HeLa *JLP* KD 細胞またはコントロール細胞における LC3-II 量の解析。栄養飢餓処理は 4時間行い、リソソームとオートファゴソームの融合阻害剤としてクロロキン (50mM) を 使用した。LC3-II はウエスタンブロット法により検出し、内部標準としてアクチンを用い た。(B) リソソームとオートファゴソーム融合の解析。mRFP-GFP-LC3 を各細胞で発現さ せ、栄養飢餓処理4時間後、抗 LAMP-1 抗体を用いた細胞免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を 使用して画像を取得した。(C) (B)において白線で囲った領域の拡大図。矢印は mRFP と GFP の共局在を示し、矢頭は LAMP-1 と mRFP の共局在を示す。(D) LAMP-1 と mRFP、LAMP-1 と GFP、mRFP と GFP の共局在の定量結果。20 細胞以上解析し、解析は 3 回行った。 Scale bar, 20µm (B). Scale bars, 2µm (C). "*P*<0.01; ^{***}*P*<0.001; n.s., not significant.

考察

本研究では、JLPKD 細胞を作製し、機能的ドメインを含む領域を欠失した変異体 JLP を 用いたレスキュー実験によって、リソソームの細胞内分布制御機構における JLP の機能解 析を行った。また、JLP によるリソソームの細胞内分布制御の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。

U87 細胞、HeLa 細胞および HT1080 細胞において、JLP KD により先行研究での報告と 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観察された (Fig. 1B)。異なる組織由来の複数の細胞株で同様な結果が得られたことから、JLP によるリ ソソームの細胞内分布制御は組織普遍的に行われていることであると考えられる。

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介在されている ことが明らかにされている¹⁰。また、JLP は、ダイニンモーターの構成要素である p150^{Glued} と結合し、積荷の逆行性輸送制御に関与していることが報告されている²⁰。これらのことか ら、p150^{Glued} との相互作用を欠失した JLP_ADBD を作製し、レスキュー実験を行ったとこ ろ、JLP_ADBD は野生型 JLP と同様に *JLP* KD 細胞の表現型をレスキューし、再び核近傍 でのリソソームの凝集が認められた (Fig. 2D)。この結果より、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を制御していると考えられる。先行研究にお いて、JLP は、ダイナミチン(p50)²⁰ や ダイニン中間軽鎖 (DLIC1)²⁵ といったダイニンモー ターの構成要素との相互作用が示唆されている。これらの報告から、JLP は、p150^{Glued} 以 外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輸送を制御している可 能性が考えられる。

リソソーム膜タンパク質の一種である TMEM55B は、JLP との相互作用を通じてリソソ ームの細胞内分布を制御し、核近傍でのリソソームの凝集を促進していると考えられてい る²⁷。JLP と TMEM55B の相互作用を解析したところ、C 末端側半分の JLP_C において TMEM55B との相互作用が認められ、N 末端側半分の JLP_N では認められなかった (Fig. 3A)。これらを用いてレスキュー実験を行ったところ、TMEM55B との相互作用を欠く JLP_N の発現によって JLP KD 細胞の表現型がレスキューされた (Fig. 3D)。これら結果か ら、JLP は、TMEM55B との相互作用とは非依存的な経路においてもリソソームの細胞内分 布を制御している可能性が示唆された。JLP と相互作用可能であると考えられており、かつ TMEM55B と同様にリソソーム膜上に局在するタンパク質として、Rab36²⁶、LIMP2、メラ ノレギュリン²⁷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。

JLP_N に含まれる機能的ドメインであるキネシン-1 重鎖結合ドメインを欠失させた JLP_ΔKBD では、*JLP* KD 細胞の表現型がレスキューされなかった (Fig. 4C)。この結果か ら、JLP とキネシン-1 の相互作用がリソソームの細胞内分布制御において重要な役割を持 つと考えられる。線虫の神経細胞において、キネシン-1 が、線虫における JLP のホモログ である UNC-16 との相互作用を介してダイニンを微小管の+端へ輸送し、このメカニズム により軸索におけるタンパク質の逆行性輸送が制御されていることが報告されている²⁶。 この例にみられるように、リソソームにおいても JLP とキネシン-1 の相互作用によって逆 行性輸送が制御されている可能性がある。

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にリソソームの細胞内分布を制御する、新規の分子メカニズムが存在する可能性が示された。本研究により示唆された JLP によるリソソームの細胞内分布制御機構をさらに解析することにより、リソソームの機能異常によって引き起こされるさまざまな病態の分子メカニズム解明につながることが期待される。

謝辞

本研究に関し、終始御指導賜りました金沢大学がん進展制御研究所シグナル伝達研究分野 の善岡克次教授、I Ketut Gunarta 博士、並びに同研究室所属の皆様に深く感謝申し上げま す。また、博士課程の3年間を温かく見守り、研究および論文をまとめるにあたり支えて くれました家族に感謝します。

参考文献

- 1. Lawrence RE, Zoncu R. The lysosome as a cellular centre for signaling, metabolism and quality control. Nat Cell Biol. 2019 Feb;21(2):133-142.
- Ballabio A, Bonifacino JS. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Nov 25.
- Cabukusta B, Neefjes J. Mechanisms of lysosomal positioning and movement. Traffic. 2018 Oct;19(10):761-769.
- 4. Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, Bonifacino JS. Mecanisms and functions of lysosome positioning. J Cell Sci. 2016 Dec 1;129(23):4329-4339.
- Nakata T, Hirokawa N. Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. J Cell Biol. 1995 Nov;131(4):1039-53.
- Brown CL, Maier KC, Stauber T, Ginkel L. M, Wordeman L, Vernos I, Schroer TA. Kinesin-2 is a motor for late endosomes and lysosomes. Traffic. 2005 Dec;6(12):1114-24.
- Matsushita M, Tanaka S, Nakamura N, Inoue H, Kanazawa H. A novel kinesin-like protein, KIF1Bβ3 is involved in the movement of lysosomes to the cell periphery in nonneuronal cells. Traffic. 2004 Mar;5(3):140-51.
- Santama N, Krijnse-Locker J, Griffiths G, Noda Y, Hirokawa N, Dotti CG. KIF2beta, a new kinesin superfamily protein in non-neuronal cells, is associated with lysosomes and may be implicated in their centrifugal translocation. EMBO J. 1998 Oct 15;17(20):5855-67.
- Harada A, Takei Y, Kakei Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. J Cell Biol. 1998 Apr 6;141(1):51-9.
- Rocha N, Kuijil C, van der Kant R, Janssen L, Houben D, Janssen H, Zwart W, Neefjes J. Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. J Cell Biol. 2009 Jun 29;185(7):1209-25.
- Lee S, Sato Y, Nixon RA. Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. J Neurosci. 2011 May 25;31(21):7817-30.
- 12. Reddy A, Caler EV, Andrew NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)regulated exocytosis of lysosomes. Cell. 2001 Jul 27;106(2):157-69.
- Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. Nat Rev Cancer. 2006 Oct;6(10):764-75.

- Dykes SS, Gray AL, Coleman DT, Saxena M, Stephens CA, Carroll JL, Pruitt K, Cardelli JA. The Arf-like GTPase Arl8b is essential for three-dimensional invasive growth of prostate cancer in vitro and xenograft formation and growth in vivo. Oncotarget. 2016 May 24;7(21):31037-52.
- Lee CM, Onesime D, Reddy CD, Dhanasekaran N, Reddy EP. JLP: A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 14189-14194.
- 16. Kelkar N, Standen CL, Davis RJ. Role of the JIP4 in the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Mol Cell Biol. 2005; 25: 2733-2743.
- Jagadish N, Rana R, Selvi R, Mishra D, Garg M, Yadav S, Herr JC, Okumura K, Hasegawa A, Koyama K, Suri A. Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein. Biochem J. 2005; 389: 73-82.
- Nguyen Q, Lee CM, Le A, Reddy EP. JLP associates with kinesin light chain 1 through a novel leucine zipper-like domain. J Biol Chem. 2005; 280: 30185-30191.
- 19. Sun F, Zhu C, Dixit R, Caballi V. Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility. EMBO J. 2011; 30: 3416-3429.
- Montagnac G, Sibarita JB, Loubery S, Davit L, Romano M, Raposo G, Chavrier P. ARF6 interavts with JIP4 to control a motor switch mechanism regulating endosome traffic in cytokinesis. Curr Biol. 2009 Feb 10;19(3):184-95.
- Willet R, Martina JA, Zewe JP, Wills R, Hammond GRV, Puertollano R. TFEB regulates lysosomal positioning by modulating TMEM55B expression and JIP4 recruitment to lysosomes. Nat Commun. 2017 Nov 17;8(1):1580.
- 22. Li R, Gunarta IK, Suzuki R, Boldbaatar J, Nakazato R, Yuliana D, Davaakhuu G, Oyunsuren T, Takamatsu N, Kobayashi M, Hirao A, Yoshioka K. JLP-JNK signaling protects cancer cells from reactive oxygen species-induced cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2018; 501:724-730.
- Michelet X, Garg S, Wolf BJ, Tuli A, Ricciardi-Castagnoli P, Brenner MB. MHC class II presentation is controlled by the lysosomal small GTPase, Arl8b. J Immunol. 2015; 194:2079-2088.
- 24. Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. Autophagy. 2007 Sep-Oct;3(5):452-60.
- 25. Arimoto M, Koushika SP, Choudhary BC, Li C, Matsumoto K, Hisamoto N. The Caenorhabditis elegans JIP3 protein UNC-16 functions as an adaptor to link kinesin-1 with cytoplasmic dynein. J Neurosci. 2011; 31:2216-2224.

- 26. Matsui T, Ohbayashi N, Fuluda M. The Rab interacting lysosomal protein (RILP) homology domain functions as a novel effector domain for small GTPase Rab36: Rab36 regulates retrograde melanosome transport in melanocytes. J Biol Chem. 2012 Aug 17;287(34):28619-31.
- 27. Huttlin EL, Ting L, Bruckner RJ, Gebreab F, Gygi MP, Szpyt J, Tam S, Zarraga G, Colby G, Baltier K, Dong R, Guarani V, Vaites LP, Ordureau A, Rad R, Erickson BK, Wuehr M, Chick J, Zhai B, Kolippakkam D, Mintseris J, Obar RA, Harris T, Artavanis-Tsakonas S, Sowa ME, De Camilli P, Paulo JA, Harper JW, Gygi SP. The BioPlex Network: A Systematic Exploration of the Human Interactome. Cell. 2015 Jul 16;162(2):425-440.