

報道関係各位

2021年4月15日

国立大学法人 東京医科歯科大学

## 「リソソームによる細胞内分解を制御する分子装置のユニークな組み立てを解明」 —ダノン病の治療やシャペロン依存性オートファジーのメカニズム解明に期待—

### 【ポイント】

- リソソーム膜に豊富に存在し、細胞内での分解反応の制御に関与することが報告されながらも、それ自身の構造の知見が不足していた LAMP-2 タンパク質の膜の上での複合体の形成様式をつきとめました。
- シャペロン依存性オートファジーの分子機構やダノン病の病態の解明への道が開かれました。
- リソソームによる口腔内での細菌排除や炎症の制御に着目した医療への応用が期待できます。

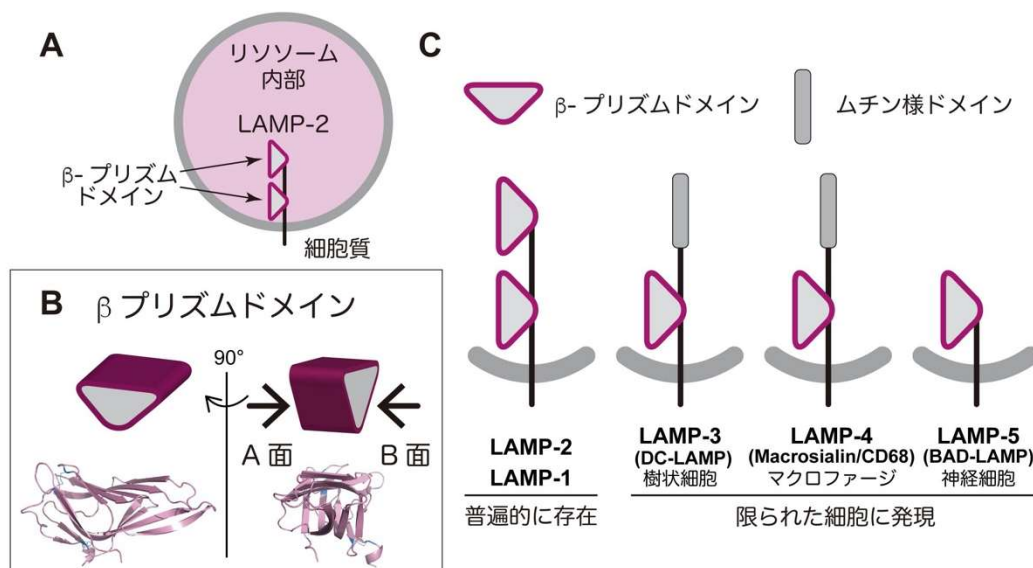
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科病態生化学分野の横山 三紀准教授、寺澤 和恵技術補佐員（現 リベロセラ社）、歯周病学分野の加藤 佑治大学院生（現 生涯口腔保健衛生学分野）の研究グループは、理化学研究所、シンシナティ大学、ストラスブール大学との共同研究で、リソソームの機能に重要なタンパク質である LAMP-2 の複合体形成の構造基盤を明らかにしました。この研究は文部科学省科学研究費補助金の支援のもとでおこなわれたもので、その研究成果は、国際科学誌 Autophagy（オートファジー）に、2021年4月14日、オンライン版で発表されました。

### 【研究の背景】

リソソームは加水分解酵素を含み、細胞内での分解反応を担当する細胞内小器官です。近年リソソームには、細胞内の栄養レベルを感知するセンサー、さらに代謝を制御する司令塔としての役割があることも明らかになっています。リソソームの機能は栄養摂取、不要物の消去、生体防御に必須であり、また神経変性疾患・がんを含む多くの疾患や老化と密接に関連します。Lysosome-associated membrane protein-2 (LAMP-2)はリソソームを形成する膜に豊富に存在する、高度に糖鎖付加されたタンパク質です。発見当初 LAMP-2 の役割は糖衣<sup>※1</sup>を形成してリソソーム膜を内部の加水分解酵素から守ることと考えられていました。しかし LAMP-2 ノックアウトマウスの解析から、LAMP-2 はリソソームの形成やオートファジーの進行に重要であることが明らかになりました。LAMP-2 の遺伝子変異はヒトのダノン病（心筋症、ミオパチー、精神遅延を特徴とする X 連鎖性遺伝疾患）の原因となります。近年ではダノン病に進行性網膜変性が伴うことが報告され、LAMP-2 と加齢黄斑変性との関係も報告されています。また LAMP-2 はシャペロン依存性オートファジー<sup>※2</sup>と呼ばれるタンパク質の分解

過程に必要な因子です。LAMP-2 の欠損がリソソームによるタンパク質分解に関連したさまざまな機能低下を引き起こす分子機構を解明するために、LAMP-2 の複合体形成の構造を明らかにすることが望まれていました。

図 1 LAMP-2 の構造



A LAMP-2 タンパク質のリソソームでの存在状態。B  $\beta$ -シートから形成される三角柱 (β-プリズムドメイン) の A 面と B 面。 C LAMP-ファミリータンパク質の構造の比較。

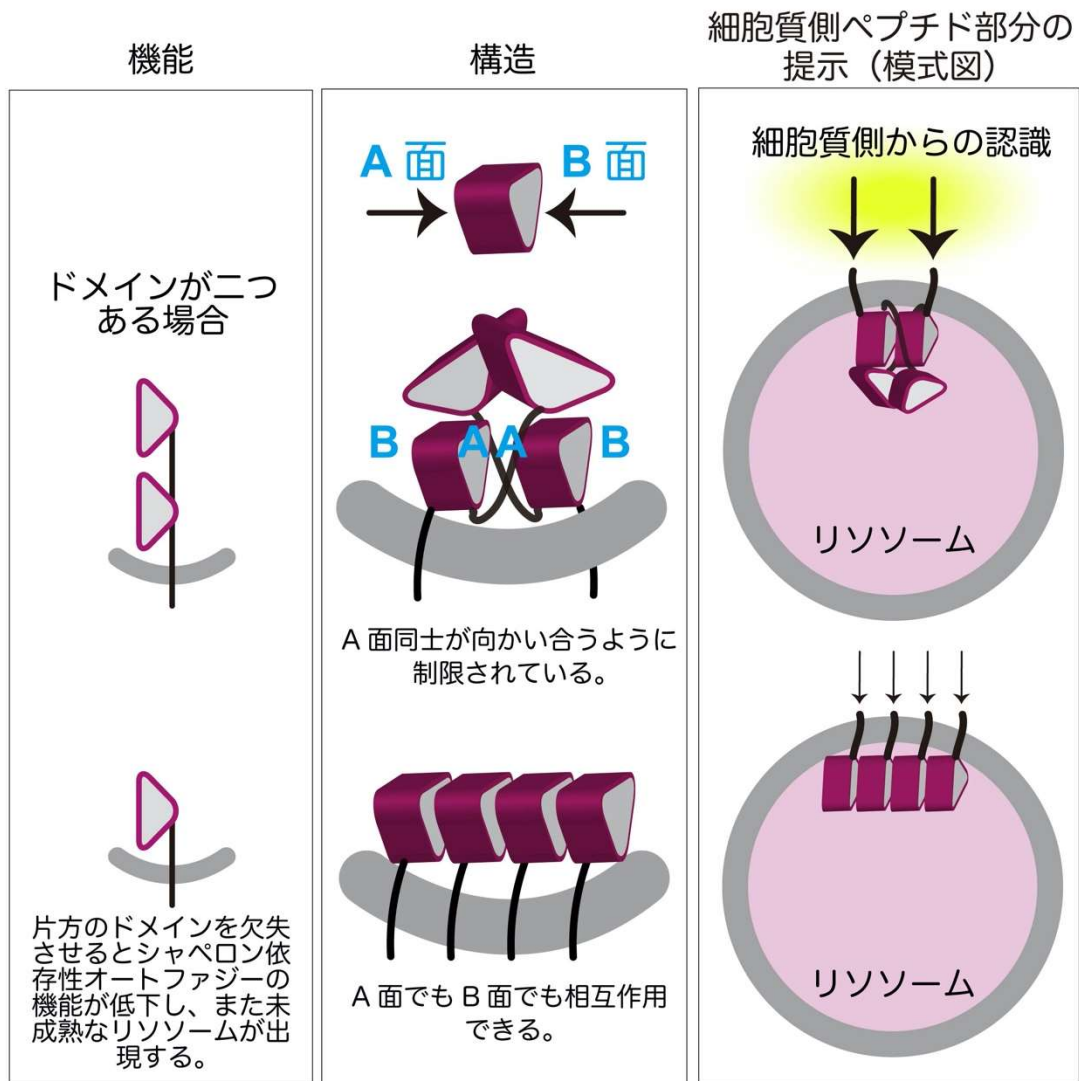
### 【研究成果の概要】

LAMP-2 の大部分はリソソームの内側に存在し、 $\beta$ -プリズムフォールド<sup>※3</sup>をもつユニークな三角柱 (β-プリズムドメイン) が二つ連結しています。これに膜貫通領域が続き、細胞質側に短いペプチド部分を突き出しています (図 1A, B)。LAMP-2 は多くの組織に広く発現しますが、LAMP ファミリーに属して特殊な細胞に発現する LAMP-3, LAMP-4, LAMP-5 には  $\beta$ -プリズムドメインが一つしかありません (図 1C)。

研究グループでは、 $\beta$ -プリズムドメインが二つあることが LAMP-2 の機能にどのような意味をもつかを調べました (図 2 左)。LAMP-2 の片方のドメインを除いたところ、シャペロン依存性オートファジーの機能が顕著に低下しました。またリソソームの成熟過程も影響を受けました。次に拡張遺伝暗号<sup>※4</sup>を用いた非天然アミノ酸の導入技術を利用して、細胞内で膜上に発現している状態の LAMP-2 分子同士の相互作用を調べました (図 2 中央)。 $\beta$ -プリズムドメインの三角柱の上面と底面をそれぞれ A 面、B 面とすると、LAMP-2 分子は A 面同士を向かい合わせていました。一方、片方のドメインを除いた LAMP-2 は A 面でも B 面でも相互作用できました。この結果から、LAMP-2 が二つのドメインをもつことにより A 面同士を向かい合わせていることがわかりました。

LAMP-2 の片方のドメインを除くと A 面でも B 面でも相互作用できるために LAMP-2 分子同士の相互作用は強まるのですが、その状態で機能は低下していました。そこで、 $\beta$ -プリズムドメインの A 面同士を向かい合わせている構造は LAMP-2 の機能に重要であると考えられました。

図2 LAMP-2 の二つの  $\beta$ -プリズムドメインの片方を欠失させた場合の影響



**【研究成果の意義】**

本研究の意義はLAMP-2が一定の様式で複合体を形成し、それには二つのドメインの存在が必須であることを初めて明らかにした点にあります。LAMP-2には末端の配列の異なる3種類のスプライスバリエント<sup>※5</sup> (LAMP-2A/2B/2C)があり、それらは細胞質側に突き出した短いペプチド部分の配列が異なります。それぞれのペプチド部分に細胞質に存在する分子が結合することにより、異なる作用が引き起こされます。リソソームの内側でのLAMP-2の複合体形成が縁の下の力持ちとして細胞質側ペプチドを一定の配置(距離間隔)でリソソーム膜上に提示することが、ペプチド部分の認識に重要である可能性が考えられます(図2, 右図)。本研究の知見は、シャペロン依存性オートファジーなどLAMP-2が関与する現象の分子機構の解明に貢献し、ダノン病などの疾患や老化にともなうタンパク質分解制御の破綻を抑制する治療の開発に寄与することが期待されます。LAMP-2はリソソームの食作用にも重要な因子なので、口腔内における細菌排除の効率を高める新たな予防的医療法の開発も期待されます。

また本研究では非天然アミノ酸の導入を用いたタンパク質の構造解析において、従来の光架橋部位の導入に加えて、側鎖が大きな非天然アミノ酸を導入して部位特異的に立体障害の影響を調べました。その結果として、「接触はしていないが、ごく近傍に位置する状態」を示すことに成功しました。これは20種類のアミノ酸の中だけでの改変では達成できない、非天然アミノ酸導入の新たな有用性を示すものです。

## 【用語解説】

### ※<sup>1</sup> 糖衣

電子顕微鏡で観察するとリソソームの膜と内容物との隙間に 8 nm 程度の電子密度の低い部分が認められ、その部分は多糖や糖タンパク質に対する染色法で染色される。そこで、この部分はリソソーム内部の加水分解酵素からリソソーム膜を保護するための糖質でできた層、Glycocalyx(糖衣)と呼ばれている。

### ※<sup>2</sup> シャペロン依存性オートファジー

細胞質のタンパク質が Hsc70 などのシャペロンに認識されるとリソソームに運ばれ、リソソーム膜を通過して内部に移行して分解される反応。運ばれたタンパク質・シャペロンは、リソソーム膜上に突出している LAMP-2 の末端に結合する。運ばれたタンパク質がリソソーム膜を通過する分子機構はまだ解明されていない。

### ※<sup>3</sup> $\beta$ -プリズムフォールド

$\beta$ -シートで形成される平面に中央で曲がった $\beta$ -シートが屋根のようにかぶさってできるタンパク質の構造。レクチンなどに見出されていた。

### ※<sup>4</sup> 拡張遺伝暗号

通常は、アミノ酸に翻訳されない終止コドン(amber 終止コドン)を非天然のアミノ酸に対応させる技術。終止コドン(amber 終止コドン)を認識するサブレッサー-tRNA と、その tRNA に非天然アミノ酸を付加できるように触媒部位を改変したアミノアシル tRNA 合成酵素から成る人工的タンパク質合成系を用いる。本研究では、LAMP-2 の遺伝子の特定の部位のコドン(amber 終止コドン)を変えたものと人工的タンパク質合成系を動物細胞に共発現させ、培地に非天然アミノ酸(光反応性架橋を調べる場合には  $\mu$ Bpa:  $\mu$ -benzoyl-L-phenylalanine, 立体障害を起こす場合には AlocLys:  $N^{\epsilon}$ -allyloxycarbonyl-L-lysine)を加えて培養した。

### ※<sup>5</sup> スプライスバリエント

転写過程でエクソンが除去されて(スプライシング)、一つの遺伝子から複数の転写産物が生じる場合に、翻訳により複数のタンパク質が合成される。そのように生じた複数のタンパク質をスプライスバリエントとよぶ。

## 【論文情報】

掲載誌: Autophagy

論文タイトル: Direct homophilic interaction of LAMP2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells

## 【研究者プロフィール】

横山 三紀 (ヨコヤマ ミキ) Yokoyama Miki

東京医科歯科大学

病態生化学分野 准教授

### ・研究領域

生化学、構造生物学



寺澤 和恵 (テラサワ カズエ) Terasawa Kazue

東京医科歯科大学

病態生化学分野 技術補佐員 (現 リベロセラ社)

### ・研究領域

生化学



加藤 佑治 (カトウ ユウジ) Kato Yuji

東京医科歯科大学

歯周病学分野 大学院生 (現 生涯口腔保健衛生学分野)

### ・研究領域

歯周病学、口腔生化学



## 【問い合わせ先】

### ＜研究に関すること＞

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

病態生化学分野 氏名 横山 三紀 (ヨコヤマ ミキ)

TEL: 03-5803-5567 FAX: 03-5803-0187

E-mail: m.yokoyama.bch@tmd.ac.jp

### ＜報道に関すること＞

東京医科歯科大学 総務部総務秘書課広報係

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

TEL: 03-5803-5833 FAX: 03-5803-0272

E-mail: kouhou.adm@tmd.ac.jp