

ラット培養肝実質細胞に内在する2種のリソソーム膜蛋白質 (lamp-2および酸性ホスファターゼ) の細胞表面とリソソーム間の循環

赤崎健司、福澤正隆、木下弘子、古野浩二、辻 宏

J. Biochem. 114(4), 598-604 (1993)

Cycling of Two Endogenous Lysosomal Membrane Proteins, Lamp-2 and Acid Phosphatase, between the Cell Surface and Lysosomes in Cultured Rat Hepatocytes

Akasaki, K., Fukuzawa, M., Kinoshita, H., Furuno, K. and Tsuji, H.

Abstract Our previous studies provided evidence that a 107-kDa major lysosomal membrane glycoprotein termed lamp-1 shuttles between lysosomes and the plasma membrane along the endocytic pathway in rat hepatic cells [Furuno et al. (1989) *J. Biochem.* 106, 708-716 & Furuno et al. (1989) *J. Biochem.* 106, 717-722]. In the present study, we investigated the movement of a 96-kDa major lysosomal membrane glycoprotein, referred to as lamp-2, and lysosomal acid phosphatase (LAP) in the endocytic membrane transport system of cultured rat hepatocytes. Fab' fragments of anti-lamp-2 and anti-LAP antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP) were used as probes to analyze quantitatively the transport of these two membrane proteins from the cell surface to lysosomes. After the addition of HRP-anti-lamp-2 and anti-LAP Fab' fragments to the culture medium, the delivery of the antibody conjugates to lysosomes was examined by cell fractionation on a Percoll density gradient. The amount of these HRP tracers in the lysosomal fraction became larger as the period of cell incubation was increased. K_m values for uptake of HRP-anti-lamp-2, and LAP Fab' fragments were 0.74 and 0.62 μM , respectively, which were comparable to that of HRP-anti-lamp-1 Fab' (0.57 μM). The endocytic process of the two HRP-antibodies continued for an extended period in the cells exposed to the protein synthesis inhibitor, cycloheximide.

Furthermore, we measured the transit times of HRP-anti-lamp-1, anti-lamp-2 and anti-LAP Fab' fragments from the cell surface to lysosomes. Anti-lamp-1 and lamp-2 antibodies move to lysosomes at almost the same rates ($t_{1/2}$ = approximately 2.2 h), while anti-LAP antibody is delivered to lysosomes with a shorter half time ($t_{1/2}$ = 0.78 h). Taken together, these results suggest that the three major lysosomal membrane proteins shuttle continuously between the cell surface and lysosomes in rat hepatocytes, but LAP cycles more rapidly than the lamp molecules in the endocytic vacuolar system.

これまでの研究で、107-kDaのリソソーム膜糖蛋白質(lamp-1)がエンドサイトーシス系を介して、ラット肝細胞のリソソームと形質膜の間を往来していることが示された。本研究では、96-kDaのリソソーム膜糖蛋白質(lamp-2)とリソソーム酸性ホスファターゼ(LAP)の培養ラット肝実質細胞のエンドサイトーシス系における挙動を調べた。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識した抗lamp-2および抗LAP抗体のFab'をプローブとして用いて、lamp-2とLAPの細胞表面からリソソームへの輸送を定量的に分析した。HRP-抗-lamp-2 Fab'およびHRP-抗-LAP Fab'を培養溶液に添加し、Percoll密度勾配遠心法により細胞より分画し、形質膜からリソソームに輸送される標識抗体の量を測定した。リソソーム画分のHRPの量はインキュベーションの時間を長くするに従って増加した。HRP-抗-lamp-2 Fab'およびHRP-抗-LAP Fab'の取り込みに対する K_m 値は、それぞれ0.74および0.62 μ Mであり、HRP-抗-lamp-1 Fab'取り込みに対する K_m 値(0.57 μ M)と類似していた。2種の蛋白質の細胞へのインターナリゼーションはシクロヘキシミドで蛋白質の合成を阻害しても、継続して起こった。さらに、lamp-1, lamp-2およびLAPのリソソームへの移行時間を測定した。抗lamp-1およびlamp-2抗体はリソソームへほとんど同じ速度($t_{1/2}$ =約2.2 h)で移行しているのに対して、抗LAP抗体は抗lamp抗体に比べて、より短い時間($t_{1/2}$ =0.78h)で移行していた。これらの結果から、3種の主要なリソソーム膜蛋白質はラットの肝実質細胞の細胞膜とリソソームの間を間断なく循環しているが、LAPはlamp-1やlamp-2に比べて、迅速にエンドサイトーシス系を循環していることが示唆された。