

# リソソーム膜糖タンパク質の細胞内輸送

赤崎健司、辻 宏

## Intracellular trafficking of lysosomal membrane glycoproteins

Kenji AKASAKI and Hiroshi TSUJI

### ABSTRACT

Lysosomes are single membrane-bounded vacuoles. A vast number of acid hydrolases in the lysosomal matrix degrades intracellular and extracellular macromolecules such as proteins, polysaccharides, and nucleic acids. The limiting lysosomal membrane contains a set of unique glycoproteins. Significant progress has been made recent years towards elucidating the pathways by which these lysosomal membrane glycoproteins are delivered to lysosomes. While some lysosomal membrane glycoproteins follow the constitutive secretory pathway and reach lysosomes indirectly via the cell surface and endocytosis, others exit the trans-Golgi network for direct delivery to early or late endosomes. Sorting from the Golgi or the plasma membrane into the endosomal system is mediated by signals contained in the short cytoplasmic tail of these membrane proteins. This review discusses the intracellular trafficking of lysosomal membrane glycoproteins, with particular emphasis on the structural features and molecular mechanisms for lysosomal targeting of these glycoproteins.

#### 1. エンドサイトーシスとリソソーム

細胞は細胞外のタンパク質や多糖類などの高分子化合物をエンドサイトーシスによって取り込んでいる。低密度リポタンパク質(LDL)やアシアロ糖タンパク質などに見られる受容体を介したエンドサイトーシスの研究によって、図1に示すようなエンドサイトーシスの複雑な過程が明らかにされてきた。<sup>1~9)</sup> LDLのようなリガンドは、細胞表面の発現

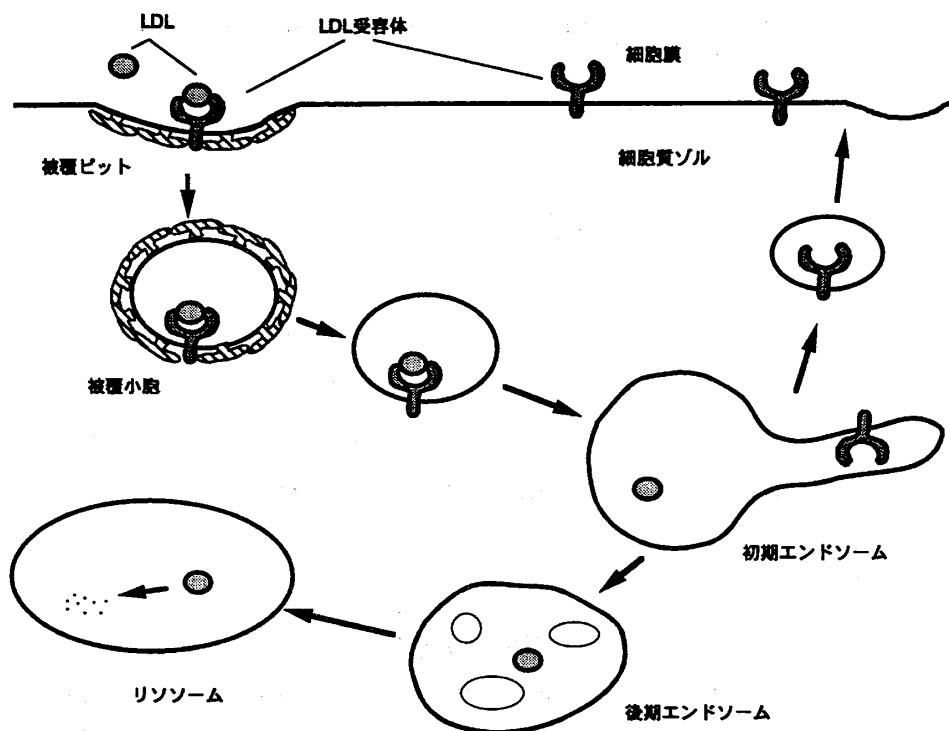


図1 LDLの受容体を介したエンドサイトーシスとリソソームへの輸送

細胞表面の被覆ピットから受容体に結合したLDLは内在化して、被覆小胞に取り込まれる。被覆がとれた小胞は初期エンドソームに移行する。初期エンドソーム内は酸性なので、LDLと受容体は解離する。LDLは核周辺にある後期エンドソームを経て、リソソームへ送られる。リソソームの加水分解酵素により、タンパク質はアミノ酸に分解され、コレステロールが遊離する。一方、解離した受容体は初期エンドソームの管状の領域から輸送小胞によって細胞膜に戻される。

された受容体と結合して、細胞表面の被覆ピットと呼ばれる細胞質側にくぼんだ部分に移動して、そこに集合する。<sup>4)</sup> 被覆ピットはくびり取られて、被覆小胞となる。その後、リガンドと受容体の複合体は初期エンドソームに移行して、そこで両者は解離する。<sup>5,6)</sup> 解離した受容体は、再び細胞表面に戻り、リガンドは、核の周辺に存在する後期エンドソームへ輸送される。<sup>7~9)</sup> リガンドは最終的にはリソソームへ運ばれる。

このように、リソソームは高分子のエンドサイトーシス輸送のターミナルに位置している一重の限界膜に囲まれた小胞である。リソソームへ輸送されてきたタンパク質、多糖類、核酸は、リソソームの内腔にある多数の加水分解酵素によって、それぞれアミノ酸、単糖、ヌクレオチドにまで分解される。<sup>10,11)</sup>

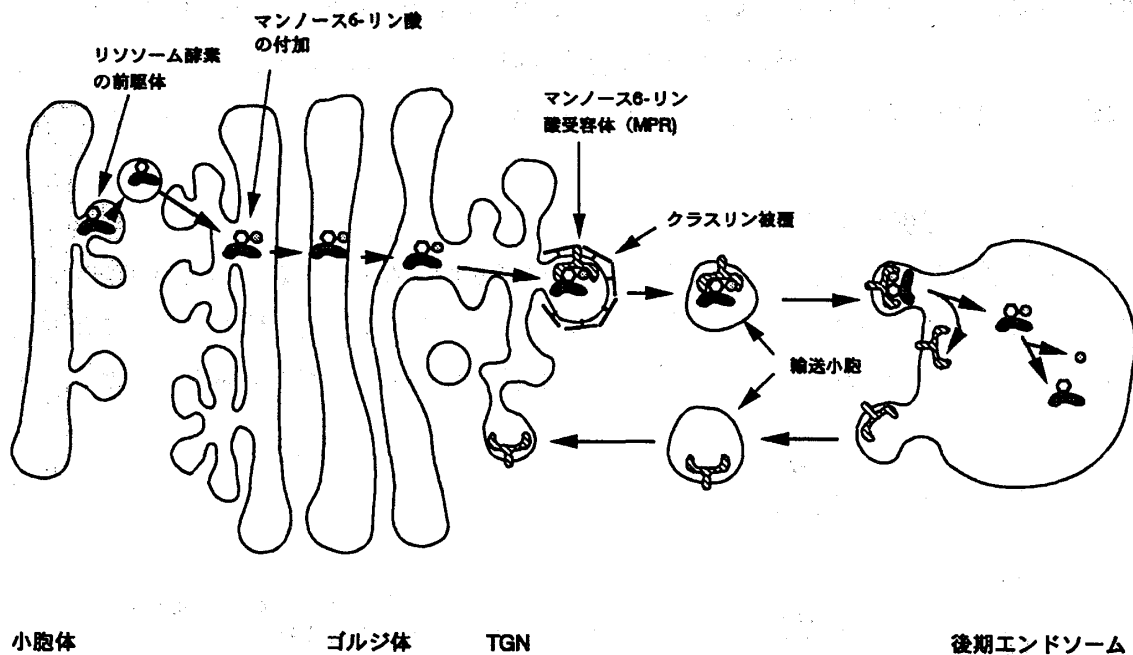


図2 新たに合成されたリソソーム酵素の後期エンドソームへの輸送

ゴルジのシス側でリソソーム酵素前駆体のN-結合型糖鎖にマンノース6-リン酸 (M6P) が付加される。M6Pに特異的な受容体 (MPR) と酵素が結合して、TGNの被覆ピットに集まり、輸送小胞に乗って後期エンドソームへ輸送される。後期エンドソームの内腔は酸性なのでリソソーム酵素とMPRとは解離する。受容体は再利用されるためにゴルジ体へ回収される。リソソーム酵素からリン酸基が切り離される。この結果、リソソーム酵素はMPRと再結合してゴルジ体に戻る確率はさらに低下する。

## 2. リソソーム酵素の生合成輸送

リソソーム酵素は分泌タンパク質や細胞膜タンパク質と同様に粗面小胞体に結合したリボソームで合成される。合成された酵素タンパク質は小胞体の内腔に放出されると同時に糖鎖の付加を受ける。その後、酵素タンパク質は小胞体の内腔を通り、滑面小胞体へ到達する。そして、そこから発芽した輸送小胞に乗り、ゴルジ体へ輸送される。タンパク質はゴルジ体のスタックを通過する間に修飾を受ける。そして、ゴルジのトランス面 (放出面) に形成されたトランスゴルジネットワーク (TGN) に運ばれる。<sup>12~14)</sup> TGNでは分泌タンパク質の様な細胞表面へ行くものとリソソームへ行くものとに仕分け (ソーティング) される。<sup>15)</sup> 図2に示すようにリソソーム酵素のTGNでのソーティングにはリソソーム酵素に付加されているN-結合型糖鎖が関係している。<sup>16,17)</sup> リソソームがゴルジ体を通過する間にN-結合型糖鎖に含まれるマンノースの6位の水酸基とリン酸とがエステル結合を形成する。TGNにはこのリソソーム酵素にできたマンノース6-リン酸 (M6P) を特異的に認識し、結合する受容体 (MPR) がある。MPRと結合したリソソーム酵素はTGNで形

成される被覆ピットに集まる。被覆ピットはくびり取られ被覆小胞となり、後期エンドソームへ移行する。リソソーム酵素とMPR複合体は後期エンドソームへ運ばれると、そこで解離する。MPRは再びTGNへ戻り、リソソーム酵素はリソソームへと輸送される。<sup>18)</sup>

### 3. リソソーム膜糖タンパク質

リソソーム膜の重要な役割の1つはリソソーム酵素を囲みこみ、これらの酵素が細胞質に漏れないようしていることである。<sup>10,11)</sup> リソソーム膜には多量の糖タンパク質が含有されていることが知られている。<sup>19~23)</sup> ラット肝のリソソーム膜を調製し、これに含ま

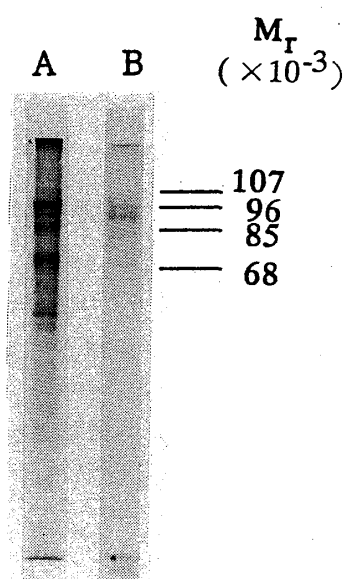


図3 リソソーム膜タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
ラット肝よりリソソーム膜を調製して、膜タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。レーンAはクマシーブリリアントブルーによるタンパク染色、レーンBは過ヨウ素酸-シッフ法による糖染色のパターンを示している。レーンBの右には主要な糖タンパク質のバンドの分子量  $M_r (\times 10^{-3})$  を書いた。

れている糖タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で分析すると(図3)、少なくとも4種類の主要な糖タンパク質が確認できる。図に示すように分子量( $M_r$ )の大きいものから順にlamp-1( $M_r=107,000$ )、<sup>23)</sup> lamp-2( $M_r=96,000$ )、<sup>26)</sup> LGP85( $M_r=85,000$ )<sup>27,28)</sup>と呼ばれている。そして、分子量68,000の糖タンパク質はリソソーム酸性ホスファターゼ(LAP)であることが同定されている。<sup>29,30)</sup> これらのタンパク質をコードしているcDNAはすべてクローニングされ、その塩基配列からタンパク質の一次構造が明らかにされている。<sup>31)</sup>

#### 3-1 lamp-1とlamp-2

lamp-1とlamp-2はリソソーム膜糖タンパク質の中で最もよく研究されているものである。筆者らは長年にわたり、ラット肝リソソーム膜からlamp-1とlamp-2の精製を試みてきた。しかし、両者は類似した酸性の等電点( $pI < 3.0$ )をもち、分子量にも大きな差がないために、通常のカラムクロマトグラフィーでこの二つの糖タンパク質を分離することは不可能であった。そこで、lamp-1とlamp-2に対するモノクローナル抗体(mAb)を

調製し、これを用いたイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製することにした。lamp-1とlamp-2を濃縮した試料を調製し、これを抗原としてマウスを免疫した。免疫したマウスの脾臓よりBリンパ球を取り出し、ミエローマーと融合させ、ハブリドーマをつくり、酵素免疫測定法およびウエスタンブロット法によりlamp-1またはlamp-2の抗体を産生するクローンをスクリーニングした。その結果いくつかの陽性クローンを得るこ

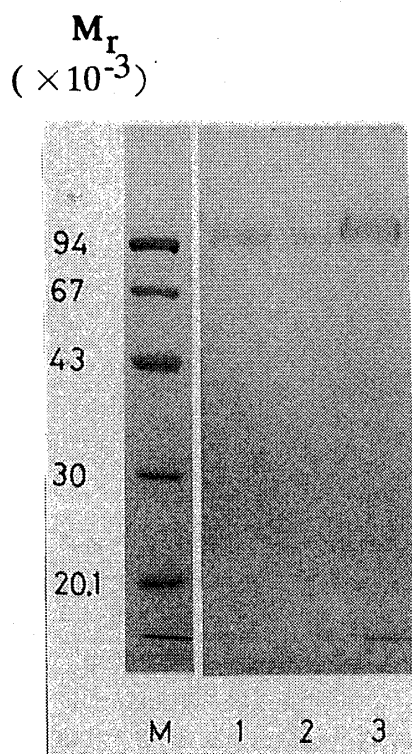


図4 モノクローナル抗体(mAb)を用いたイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーによるlamp-1とlamp-2の精製

ラット肝リソソーム膜タンパク質を中性の界面活性剤で可溶化して、小麦胚凝集素を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより糖タンパク質を濃縮する。一方、mAb156とmAb395をそれぞれセファローズに固定化してカラムに充填する。カラムに糖タンパク質濃縮画分をかける。カラムを洗浄後、mAbに結合したタンパク質を塩基性の緩衝液で溶出した。溶出したタンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。レーン1と2はmAb395-セファローズカラムに結合したタンパク質、レーン3にはmAb156-セファローズカラムに結合したタンパク質をロードした。レーンMは分子量マーカータンパク質を泳動させた。

とができた。これらの陽性クローンつくり出すmAbのうちmAb156とmAb395がそれぞれlamp-1とlamp-2に対して特異的に反応することが明らかになった。<sup>23,26)</sup> 図4はmAb156とmAb395を用いたイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーでリソソーム膜からそれぞれ精製したタンパク質標品のSDS-PAGEを示している。この結果、mAb156で $M_r=107,000$ のタンパク質(=lamp-1)を、mAb395で $M_r=96,000$ タンパク質(=lamp-2)をそれぞれ均一な状態にまで精製することができた。ヒトの細胞からlamp-1とlamp-2を分離精製する場合もmAbを用いるイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーが使われており<sup>24,25)</sup>、この方法はlamp-1とlamp-2の分離、精製にきわめて有効である。

図5にはlamp-2のプロセッシングを示している。lamp-2は $M_r=87,000$ の前駆体として合成される。lamp-2の前駆体をエンド $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼHで処理してN-結合型糖鎖を除去すると、分子量は45,000となった。生合成後30分で $M_r=96,000$ の成熟

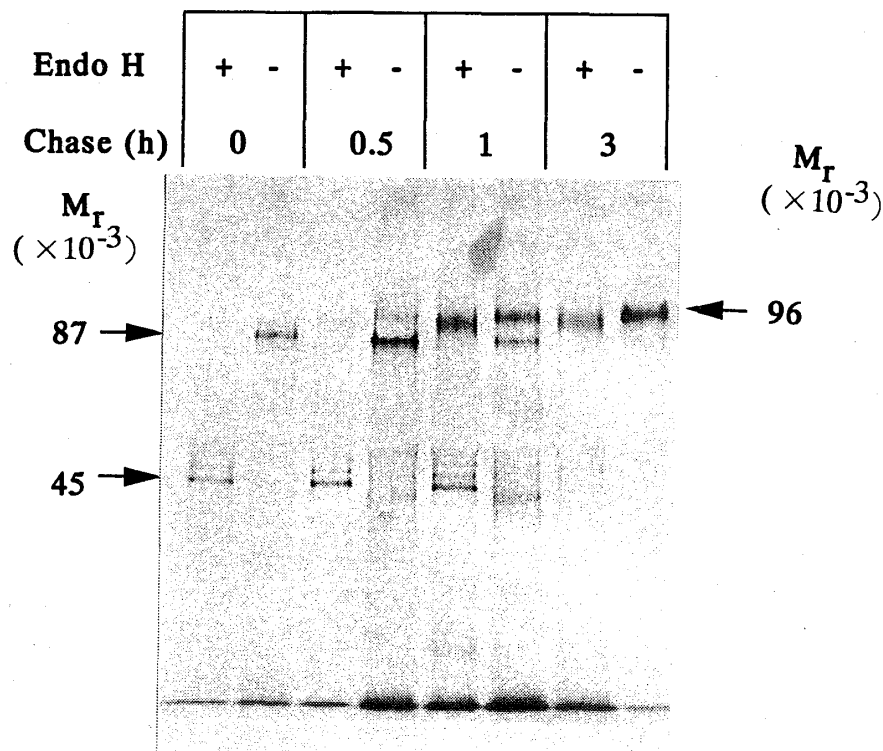


図5 lamp-2のプロセッシング

初代培養ラット肝実質細胞のメチオニンフリーの培養液に [ $^{35}\text{S}$ ] メチオニンを加えて37℃で20分間インキュベートする。その後、コールドのメチオニンを含む培養液で細胞を洗浄して、この培養液で一定の時間 (0.5時間、1時間、3時間) 培養を続ける (chase)。培養終了後、細胞を等張液で洗浄する。そして、細胞を界面活性剤で可溶化する。この可溶化液に抗lamp-2抗体を加え4℃で1晩インキュベートする。これにより形成したlamp-2と抗体の複合体をプロテインA-セファローズに吸着させる。プロテインA-セファローズを十分に洗浄して、1% SDSと2% 2-メルカプトエタノール溶液を加え、100℃で加熱して、lamp-2と抗体を解離させる。解離したlamp-2の半分はそのまま(-)、残りはエンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼH (Endo H) で処理して(+)、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。 [ $^{35}\text{S}$ ] メチオニンでラベルされたlamp-2をフルオログラフィーで検出した。

体が検出され始める。その後、前駆体の減少にともなって成熟体の割合が増加する。そして、生合成3時間では成熟体のみが検出される。エンド  $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼHはN-結合型糖鎖のうち、高マンノース型の糖鎖は切断できるが、糖鎖末端にシアル酸やガラクトースが付加した複合型糖鎖を切断できない。このことより、lamp-2はまず高マンノース型の糖鎖付加されて、それが複合型糖鎖にプロセッシングされることが判明した。また、この酵素処理により減少した前駆体の分子量から、lamp-2は~18本のN-結合型糖鎖を含有していると推定された。塩基配列から推定される一次構造から、lamp-2はタンパク質部分に17カ所N-結合型糖鎖が付加できる部位を持っているので、<sup>34,35)</sup> こ

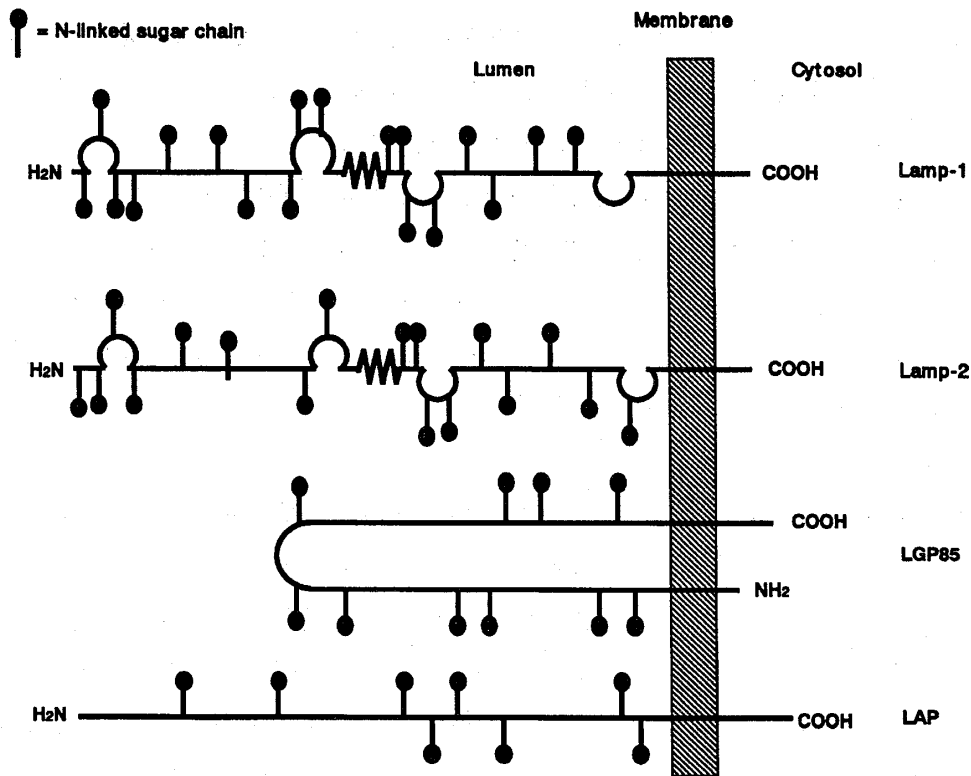


図6 リソソーム膜糖タンパク質の構造と膜への配向性の模式図

cDNAの塩基配列から推定された一次構造を元にして4つの主要な糖タンパク質の構造の模式図を描いた。ジスルフィド結合によるループが存在することはlamp-1では証明されているが、lamp-2についても類似した位置に4個のシステインがあるので、ループが形成されていると考えた。

の実験結果とはほぼ一致している。lamp-1についても同様のN-結合型糖鎖のプロセッシングが起こっている。

図6に示すように、lamp-1とlamp-2のタンパク質の大部分はリソソーム内腔に存在しており、N-結合型糖鎖はすべてこの部分に付加されている。内腔部分はさらに二つの類似した部分に別れ、これらは蝶番構造をとるタンパク部分を介して結合している。<sup>32~35)</sup>

また、内腔のタンパク部分には4つのループが形成されている。<sup>36,37)</sup> lamp-1とlamp-2はCOOH末端側に1カ所膜結合部分を持ち、細胞質側にCOOH末端を含む短いペプチドを突き出している(細胞質テール)。<sup>32~35)</sup> この細胞質テールのアミノ酸配列がlamp-1とlamp-2の細胞内輸送に重要な役割を果たしている。これに関する詳細は後述する。

### 3-2 LGP85

LGP85もlamp-1やlamp-2と同様にモノクローナル抗体を調製して、それによるイムノアフィニティーカラムクロマトグラフィーで均一な状態にまで精製することができた。<sup>27)</sup>

LGP85は $M_r=77,000$ の前駆体タンパク質として合成される。そして、lamp-2と同様に

生合成3時間以内に成熟型にプロセッシングされる。この前駆体をエンド $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼHで処理してN-結合型糖鎖を除去すると、 $M_r=55,000$ のタンパク質となる。この分子量の減少から、LGP85はその分子内に10~12本のN-結合型糖鎖を持っていると考えられる。<sup>27)</sup> LGP85のcDNAから推定されたタンパク質の一次構造からそのタンパク質部分には11カ所のN-結合型糖鎖が付加できる部位があるので、<sup>38,39)</sup> 実際に精製したLGP85にも11本のN-結合型糖鎖が付加しているものとみられる。

LGP85のタンパク質の大部分はリソソーム内腔にあり、NH<sub>2</sub>-末端側とCOOH-末端側にそれぞれ1カ所膜結合部位がある。そしてlamp-1とlamp-2と同様に、COOH-末端を含む細胞質テールを持っている(図6)。<sup>38,39)</sup>

### 3-3 LAP

LAPも高マンノース型の糖鎖が付加された前駆体から糖鎖が複合型になった成熟体にプロセッシングされる。<sup>41)</sup> LAPは膜結合型と可溶性型の2つの型をとってリソソームに存在している。<sup>29,30,41)</sup> この点で膜結合型の状態でしか存在しないlampやLGP85とは異なる。可溶性のLAP (s-LAP) は膜結合性のLAP (m-LAP) より約10K分子量が小さい。<sup>36,41)</sup> m-LAPはlampと同様にCOOH-末端側に1カ所膜結合部位があり、細胞質テールを持つ(図6)。<sup>40)</sup> そして、タンパク質の大部分はリソソーム内腔にあり、N-結合型糖鎖の結合部位、酵素の活性部位もこの内腔部分に存在する。<sup>40)</sup> s-LAPはm-LAPの膜結合部と細胞質テールがタンパク分解酵素により切断されて、可溶性となりリソソーム内腔に放出されたものである。<sup>41)</sup>

## 4. リソソーム膜糖タンパク質の細胞内分布

リソソーム膜タンパク質の細胞内分布は免疫組織化学的手法を用いて研究されてきた。<sup>42~47)</sup> ここではlamp-1の細胞内分布に関する筆者らの研究<sup>42)</sup>を中心に述べることにする。lamp-1に対して特異的な抗体を用いた蛍光抗体法でラットの肝実質細胞におけるlamp-1分布を調べると(図7)、強い蛍光が核の回りの小胞に局在していることがわかる。また、細胞表面にも弱い蛍光が観察される。さらに、免疫電子顕微鏡法(EM)でlamp-1の分布を調べると、lamp-1は核周辺の種々の大きさや形態をしたリソソームに局在している(図8, I)。lamp-1はリソソームだけでなくバソラテラル面の細胞膜(培養肝細胞では培地と接する面)にある被覆ピット(図8, II a)、細胞周辺に存在するエンドソーム(初期エンドソーム)(図8, II b)そして、核周辺のエンドソーム(後期エンドソーム)(図8, II c)にも存在することが明らかになった。このことから、ラット肝実質細胞では、lamp-1は先に述べたエンドサイトーシス輸送に関係しているすべての小器官に存在していることが判明した。lamp-1はリソソーム以外に初期エンドソームや後期エンドソームに存在していることは、ラットNRK細胞、<sup>45,55)</sup> ニワトリの繊維芽細胞<sup>43,44)</sup>を用いた実験でも明ら



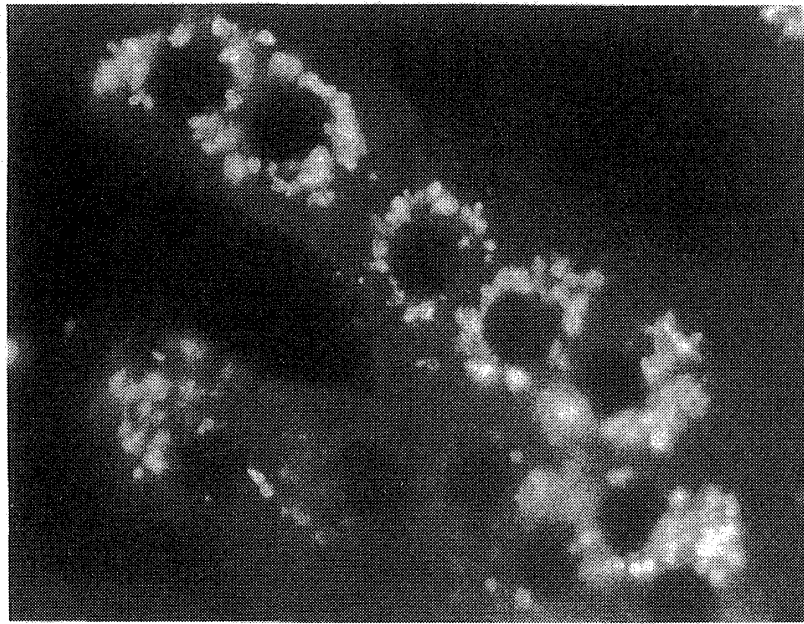


図7 lamp-1の細胞内分布を示す免疫蛍光顕微鏡写真

顕微鏡用のカバーガラス上で肝細胞を培養して固定化する。次に、フルオレセインで標識した抗lamp-1抗体をサポニンを含む溶液で希釈して、肝細胞とインキュベートする。未反応抗体を洗浄して、蛍光顕微鏡で観察した。

かにされている。しかし、lamp-1は細胞表面にはわずかに存在する場合と、全く存在しない場合がある。<sup>25)</sup> また、ラット肝実質細胞では、LAPも初期エンドソームや後期エンドソームに存在することが示されている。<sup>46,47)</sup>

##### 5. リソソーム膜糖タンパク質のエンドサイトーシス輸送

前述したようにlamp-1は定常状態で、エンドサイトーシスに関係したオルガネラに存在している。このことは、lamp-1が細胞表面とリソソーム間を動いていることを示唆している。筆者らはlamp-1に対する特異的な抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識したもの(HRP-lamp-1抗体)を培養液に加えて、37℃で種々の時間インキュベートして、HRP-lamp-1抗体の所在をEMで調べた。<sup>42)</sup> HRP-lamp-1抗体を加えてインキュベートしない場合は、抗体は細胞表面の被覆ピットにのみに検出される。10分のインキュベーションでは初期エンドソームはHRPにより染色され始める。20分のインキュベーションで、後期のエンドソームに検出されるようになり、40分では、後期のエンドソームのHRPによる染色は最大となり、リソソームが染色され始める。インキュベーション2時間で、観察されるリソソームはすべてHRPにより染色される。このことは、細胞表面の被覆ピットのlamp-1は内在化して、初期エンドソームに輸送され、そこから後期エンドソームを経由してリソソームへ輸送されていることを示している。HRP-lamp-1抗体を培養液に加えて、種々の時間培養した肝細胞からパーコール密度勾配遠心法を用いてリソソーム

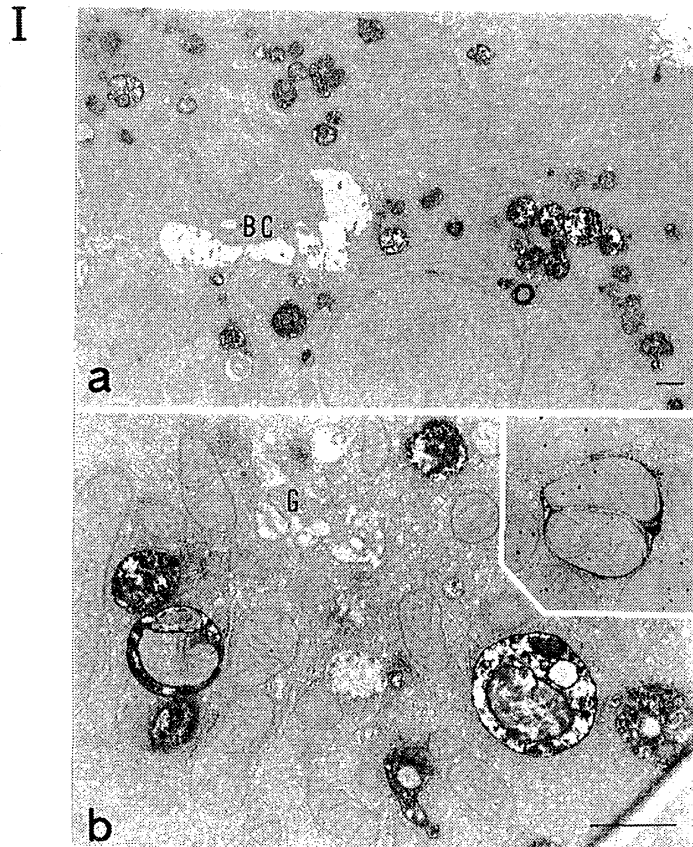


図8 lamp-1の細胞内局在を示す免疫電子顕微鏡写真

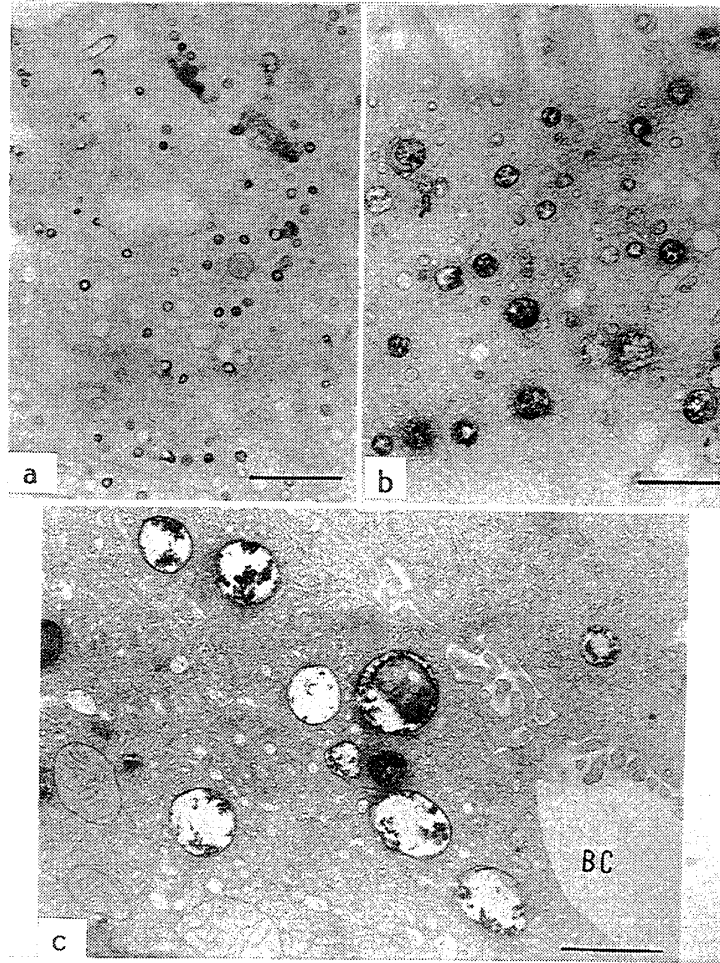
培養肝細胞を固定して、HRPで標識したlamp-1抗体のFab'とサポニン溶液中で反応させる。細胞をリン酸緩衝液で十分に洗浄して、 $H_2O_2$ を含むジアミノベンジジン溶液と反応させて、発色させる。その後、細胞をオスミウム染色して、樹脂に包埋し、細胞の切片を調製する。その細胞の切片を電子顕微鏡で観察した。

I a) 胆細管(BC)を囲んでいる2つの肝細胞の部分像。胆細管の周りにHRP陽性の空胞が存在する。また核の周りにもHRP陽性の空胞の集団が観察される。

b) 拡大像。HRP陽性の空胞は分解途中の物質を含んでいる。これがリソソームである。HRPの反応生成物はリソソーム膜だけでなく内腔の不定形の物質を染色している。しかし、新たに形成されつつあるオートリソソーム(ミトコンドリアを貪食して、分解している)ではlamp-1に対する標識は膜に限定されている(挿入写真)。ゴルジ体(G)は染色されていない。バーは $1\mu m$ 、a)  $\times 6,500$ ; b)  $\times 20,000$

を分画して、HRPを定量すると、リソソームでのHRP量は増加した。<sup>48)</sup> また、タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドを存在させて、同様にHRP-lamp-1抗体の取り込み実験をしたとき、取り込みの40%が阻害された。このことは、既に細胞内のエンドソームやリソソームに存在するlamp-1が細胞表面に戻り、再び内在化していることを示している。また、HRP-lamp-2抗体、HRP-LAP抗体、およびHRP-LGP85抗体を用いて、培養肝細

## II



- II a) 肝細胞のバソラテラル側の細胞膜を膜に対して水平に切った部分像。lamp-1に対する染色は細胞表面のくぼみ（被覆ピット）に観察される。
- b) バソラテラル側の細胞膜の周辺のエンドソーム（初期エンドソーム）に強い染色が認められる。
- c) 細胞の核周辺のエンドソーム（後期エンドソーム）の膜と内腔に取り込まれた微小胞が染色されている。BCは胆細管、バーは1  $\mu\text{m}$ 、a)、b)、c)のいずれも $\times 20,000$ 。

胞による取り込みをみると、これらの抗体はHRP-lamp-1抗体と同様にエンドサイトーシスされ、その後リソソームへ輸送される。<sup>49,50)</sup> さらに、シクロヘキシミドで処理しても、これらのリソソームへの輸送は完全には抑制されない。これらの結果は、大部分のリソソーム膜糖タンパク質がリソソームと細胞表面の間をエンドサイトーシスの経路に沿って循環していることを示している。

lamp-1が細胞表面とリソソーム間を循環していることは、ニワトリの繊維芽細胞<sup>43,44)</sup> やヒトの乳癌の細胞<sup>50,51)</sup> でも明らかにされている。特に、Hellströmらのグループはlamp-1の抗体が細胞表面からリソソームへ移行する性質を利用して、抗ガン剤を効率的

に癌細胞内に送り込むことに成功している。<sup>50)</sup>

## 6. リソソーム膜タンパク質の生合成輸送経路

初期の生合成の研究では、リソソーム膜糖タンパク質は粗面小胞体で合成されたはN-結合型の糖鎖の付加を受け、ゴルジ体で糖鎖の修飾を受けて、その後、直接リソソームへ輸送されると考えられていた。<sup>53)</sup> BraunらはBHK細胞にヒトのLAPを発現させ、その細胞を用いて、LAPの生合成輸送経路を調べた。<sup>54)</sup> その結果、新たに合成されたLAPはゴルジを通過すると、その大部分は細胞表面に輸送される。その後、LAPは内在化して、エンドソームへ輸送されて、細胞表面とエンドソーム間を循環する。そして、一部のLAPが循環から逃れてリソソームへ輸送されることが明らかになった。これに対して、ラット肝細胞では、新たに合成されたLAPは細胞表面を経由せずに、細胞内のエンドソームを通してリソソームへ輸送される。<sup>46,47)</sup> また、ラットNRK細胞とマウスマクロファージでは、新たに合成されたlamp-1とlamp-2は細胞表面を通過することなしに、ゴルジ体から後期エンドソームを経由してリソソームへ輸送される。<sup>55,56)</sup> ヒトのHL60細胞でも、新たに合成されたlamp-1の90%以上は細胞表面を経由せずにリソソームへ輸送される。<sup>57)</sup> ところが、Nabiらはイヌ腎臓の上皮細胞由来のMDCK細胞を用いて、新たに合成されたlamp-2の70%以上が細胞のバソラテラル側を経由してリソソーム輸送されることを示した。<sup>58)</sup> また、マウスリンパ球由来のL細胞に発現させたニワトリlamp-1のほとんどはTGNから細胞表面へ輸送された後、細胞表面とエンドソームとの間を循環しながら、リソソーム到達することが報告された。<sup>59)</sup> このように、粗面小胞体で合成されたリソソーム膜糖タンパク質はゴルジ体を通過して、一旦、細胞表面に運ばれた後にエンドサイトーシスの輸送経路に沿ってリソソームへ輸送される経路とゴルジ体を通過して、直接後期のエンドソームへ輸送されてリソソームへ至る二つの経路があることが明らかになった。しかし、初期エンドソームや後期エンドソームなどのエンドサイトーシスに関係した個々のコンパートメントへ新たに合成されたリソソーム膜タンパク質がどの程度輸送されてくるか、また、どのようなカイネティックで輸送されるかについてを調べた研究はなされていなかった。筆者らはこのことを明らかにするために、培養ラット肝細胞から、パーコール密度勾配遠心法により、初期エンドソーム、後期エンドソームおよびリソソームを同時に分画して、各々の画分への新たに合成されたlamp-1とlamp-2の輸送のカイネティックを調べた(表1)。<sup>60,61)</sup>

細胞表面へ現れるlamp-1とlamp-2は新たに生合成されたうちの5%未満である。従って、ラット肝細胞では大部分のlamp-1とlamp-2は細胞表面を経由せずにリソソームへ輸送されている。しかし、lamp-1では新たに生合成されたうちの25%が、lamp-2では45%が初期エンドソームへ直接輸送されている。これまでに、リソソーム酵素のカテプシンDの一部

表1. 新たに合成されたlamp-1とlamp-2のエンドサイトーシスに  
関係した小器官への輸送のカイネティック

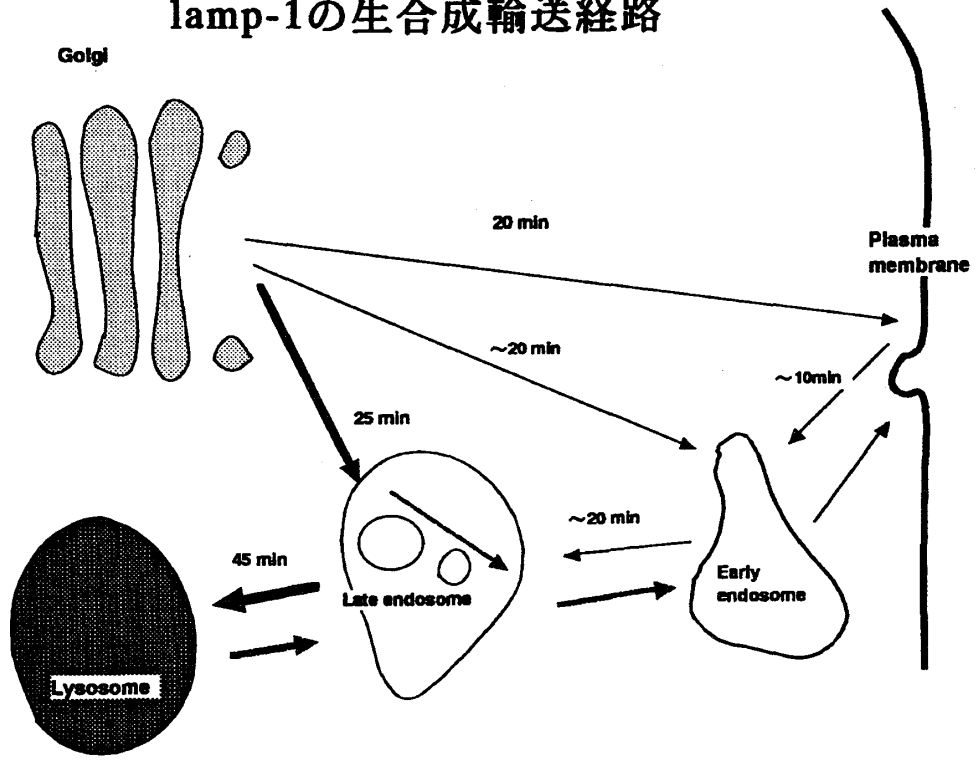
小器官	輸送速度 ( $t_{1/2}$ ) (min)		最大レベル [ $^{35}\text{S}$ で標識されたlamp全体 に対する割合(%)]	
	lamp-1	lamp-2	lamp-1	lamp-2
TGN	13	32	—	—
細胞表面	32	47	~5	~3.5
初期エンドソーム	33	38	25	45
後期エンドソーム	45	48	40	38
リソソーム	85	90	70	50

がゴルジ体から初期エンドソームへ輸送されることが報告されているが、<sup>62)</sup> 新たに合成されたリソソーム膜タンパク質のかなりの量が初期エンドソームへ直接輸送されるというのは新たな知見である。さらに興味深いことに、lamp-1とlamp-2はタンパク質の構造はきわめて類似しているが、これらふたつの生合成輸送は必ずしも同じではない。即ち、lamp-2はlamp-1に比べて、高い割合で初期のエンドソームへ輸送される(表1)。細胞表面と初期エンドソームへの輸送のハーフタイム( $t_{1/2}$ )を比べると、lamp-2は細胞表面より初期エンドソームの方へ早く到達している(表1)。従って、lamp-2は初期エンドソームへの輸送されて、その一部が細胞表面へ輸送されている経路が考えられる(図9)。一方、lamp-1は細胞表面と初期エンドソームへほぼ同じハーフタイムで到達しているので、TGNで直接細胞表面へ輸送されるものと、初期エンドソームへ輸送されるものとに分かれていると考えられる(図9)。筆者らの研究結果から、lamp-1とlamp-2は細胞表面、初期エンドソームそして後期エンドソームのいずれかからエンドサイトーシス輸送経路に入り、これらの小器官を循環しながらリソソームへ到達することが明らかになった。

## 7. リソソーム移行シグナル

リソソーム膜糖タンパク質は輸送にはN-結合型糖鎖中のM6P標識とそれを認識するMPRは関与していない。このことは、1) lamp-1とlamp-2のN-結合型糖鎖中にM6P標識がない。<sup>32,35)</sup> 2) ツニカマイシンでN-結合型糖鎖の付加を阻害した状態でもlamp-2とLGP85はリソソームへ到達するという実験結果により証明された。<sup>22)</sup> 一方で、細胞質テールを除去したlamp-1とLAPはリソソームへ移行することができないことが報告された。<sup>56,59,64,65,67,68)</sup> さらに、LGP85の細胞質テールを細胞表面に常在する膜タンパク質の細胞質テールと入れ替えたキメラタンパク質はリソソームへ輸送されなかった。<sup>69,70)</sup>

### lamp-1の生合成輸送経路



### lamp-2の生合成輸送経路

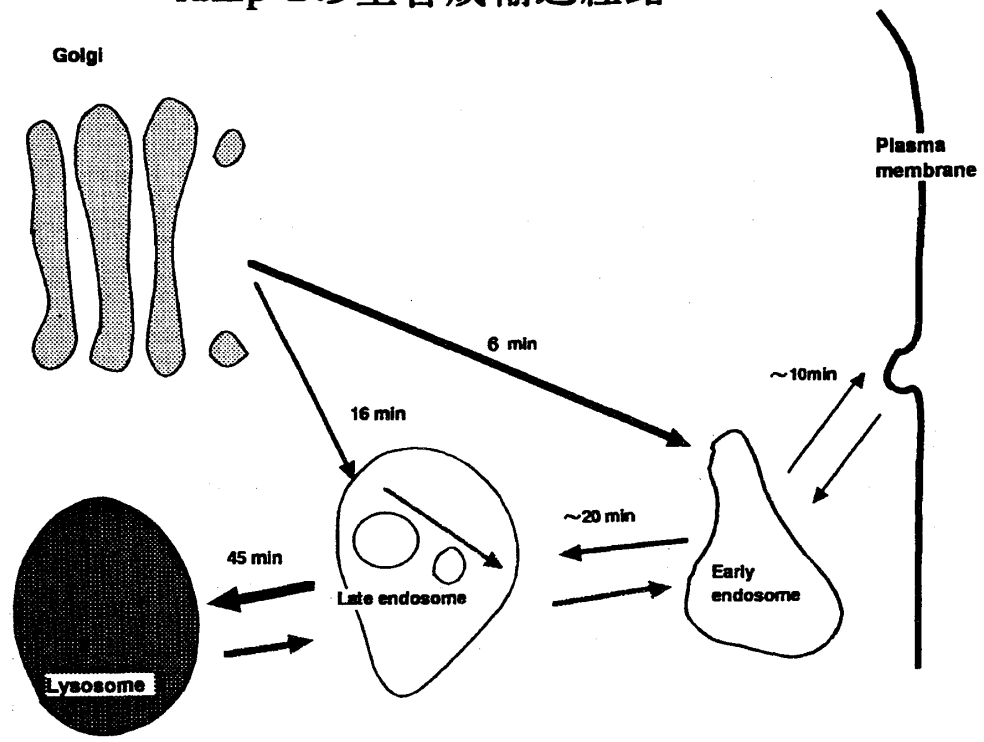


図9 lamp-1とlamp-2の生合成輸送経路

これらの実験結果はリソソーム膜糖タンパク質の細胞質テールがリソソーム移行に必要であり、そして、このテールのアミノ酸配列の中にリソソーム移行シグナルが存在することを示した。<sup>56,59,63~66,68,69,71,72)</sup> そして、現在までに2種類のリソソーム移行シグナルが同定されている。一つはlamp-1、lamp-2そしてLAPの細胞質テールに存在するG-Y-X-X-Z配列である。もう一つはLGP85の細胞質テールに見られるL-I配列である。

### 7-1 G-Y-X-X-Z 移行シグナル

G-Y-X-X-Z 移行シグナルの研究はlamp-1とLAPの遺伝子の組換えを用いて行われてきた。lamp-1の移行シグナルはCOOH末端に位置しているが、LAPの移行シグナルは

表2. リソソーム膜糖タンパク質の細胞質テールのアミノ酸配列

		1	5	10
human lamp-1		R-K-R-S-H-A-	<u>G-Y-Q-T-I</u>	
mouse lamp-1		R-K-R-S-H-A-	<u>G-Y-Q-T-I</u>	
rat lamp-1		R-K-R-S-H-A-	<u>G-Y-Q-T-I</u>	
chicken lamp-1		R-K-R-S-H-A-	<u>G-Y-Q-T-I</u>	
human lamp-2		L-K-H-H-H-A-	<u>G-Y-E-Q-F</u>	
mouse lamp-2		L-K-R-H-H-T-	<u>G-Y-E-Q-F</u>	
rat lamp-2		L-K-R-H-H-T-	<u>G-Y-E-Q-F</u>	
chicken lamp-2		K-K-H-H-N-T-	<u>G-Y-E-Q-F</u>	
rat LGP85	1		10	20
		R-G-Q-G-S-T-D-E-G-T-A-D-E-R-A-P-	<u>L-I-R-T</u>	
human LAP		1		10
		R-M-E-A-E-P-P-	<u>G-Y-R-H-V-A-D-G-Q-D-H-A</u>	

アミノ酸は1文字で表示している。リソソーム移行シグナルは下線で示した。また番号は膜結合部分のすぐあとに続くアミノ酸を1とした。

細胞質テールの中にある(表2)。lamp-1が細胞表面をほとんど通過しない条件で、細胞質テールペプチドの膜側から7番目のグリシン(G7)、8番目のチロシン(Y8)、そして11番目のイソロイシン(I11)のいずれかをアラニン置換したlamp-1の変異体を作り細胞に発現させると、いずれの変異体もTGNから細胞表面に輸送される。<sup>56,64,65)</sup>しかし、Y8A変異体とI11A変異体は細胞表面に蓄積されるが、G8A変異体は細胞表面から内在化してリソソームへ輸送される。従って、G8はlamp-1が細胞表面を經由して移行する場合、シグナルとしては認識されていないことになる。lamp-1が細胞表面に輸送されるときはY8とI11が認識されて、lamp-1が内在化して、エンドサイトーシスの経路に入りリソソーム

へ輸送されると考えられる。このように、G7はTGNレベルで、Y8とI11はTGNと形質膜レベルでリソソームへのソーティングに重要な役割を果たしている。<sup>56,63~65)</sup> 最近の報告では、G-Y-X-X-Zと膜との距離が、lamp-1のリソソームへの移行に重要であることが示された。<sup>66)</sup>

TGNや細胞表面で形成される被覆小胞はクラスリンと呼ばれる三本足構造のタンパク質に覆われている。<sup>4)</sup> 被覆の構成タンパク質として2番目に重要なのはアダプタータンパク(AP)と呼ばれるタンパク質である。APはクラスリンと膜の結合にも、種々の被覆小胞に取り込まれる膜貫通タンパク質との結合にも必要である。lamp-1の細胞質テールもAPと結合して、被覆小胞に取り込まれると考えられる。TGNで形成される被覆小胞に結合しているAPはAP-1と呼ばれ、細胞表面の被覆小胞のアダプタータンパク(AP-2)とは異なる。<sup>4)</sup> *in vitro*でAP-1とlamp-1の細胞質テールとの結合を調べた実験では、テールペプチドはAP-1と結合することが明らかになった。<sup>67)</sup> さらに、G7、Y8そしてI11がテールペプチドの結合に重要であることがわかってきた。このことは、lamp-1がTGNでAP-1を介して、被覆小胞に取り込まれ後期エンドソームへ輸送されること示唆している。そして、G7A、Y8A、I11A変異体はAP-1と結合できないので、<sup>67)</sup> 被覆小胞に取り込まれず、結果として、この小胞に乗って直接、後期エンドソームへ行くことができずに細胞表面に輸送されたと考えられる。

LAPのリソソーム移行シグナルも細胞質テールにある。<sup>68,69)</sup> lamp-1の移行シグナルに相当するのはG-Y-X-X-V配列である(表2)。シグナル配列のV12のCOOH側に7個のアミノ酸が続いている点がlamp-1やlamp-2とは異なる。しかし、移行シグナルと膜との距離はlamp-1、lamp-2とLAPの三者ともほぼ同じである。lamp-1とLAPのシグナル配列は極めて類似しているが、LAPの細胞質ペプチドはAP-1とは結合しない。<sup>70)</sup>

## 7-2 L-I 移行シグナル

LGP85の細胞質テールにはlamp-1やlamp-2に見られるチロシンを含む移行シグナルがないので、別のシグナルが存在すると考えられた。<sup>31)</sup> 細胞質テールのアミノ酸を置換した変異体やテールのアミノ酸を逐次除去した変異体を作り、リソソームへの移行を調べると、COOH末端に近い17番目のロイシン(L17)と18番目のイソロイシン(I18)がリソソームへの移行に重要であることが示された。<sup>71,72)</sup> L17とI18を他のアミノ酸に置換した場合、LGP85は細胞表面に出現して、そして内在化されない。このL-IシグナルはT細胞抗原受容体CD3 $\gamma$ 鎖と $\delta$ 鎖の細胞質領域に存在するL-Lリソソーム移行シグナルに関連しているものと見られる。<sup>73)</sup>

## 8 今後の展望

この10年間でリソソーム膜糖タンパク質が辿る細胞内輸送経路がかなり明らかとなっ



た。しかし、いくつかの未解決の問題が残っている。その主なものは

- i) lamp-2やLGP85の細胞質テールもlamp-1のようにAP-1と結合できるのか
- ii) TGNで被覆小胞に取り込まれたlamp-1は後期エンドソームだけに輸送されるのか。  
もしそうであれば、初期エンドソームへの移行する別の小胞が存在するはずである。初期エンドソームへの輸送小胞の同定
- iii) MPRは後期エンドソームに移行するとTGNに戻るが、lamp-1はリソソームへ移行する。このように、後期エンドソームにもまたソーティング機構が存在すると思われるが、その機構の分子レベルでの解明

である。これらの解明とともにlamp-1、lamp-2そしてLGP85の生理機能の解明が今後の課題である。

#### 参考文献

1. Brown, M. S., Anderson, R. G. W., and Goldstein, J. L. (1983) Recycling receptors: the round-trip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* **32**, 663-667
2. Hubbard, A. L. (1989) Endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1**, 675-683
3. Gruenberg, J. and Howell, K.E. (1989) Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 453-481
4. Pearse, B.M.F. and Robinson, M. S. (1990) Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 151-171
5. Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Lodish, H.F., and Schwartz, A.L. (1983) Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: Double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* **32**, 277-287
6. Mueller, S.C. and Hubbard, A.L. (1986) Receptor-mediated endocytosis of asialoglycoproteins by rat hepatocytes: receptor-positive and receptor-negative endosomes. *J. Cell Biol.* **102**, 932-942
7. Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I., and Kornfeld, S. (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**, 329-341
8. Runquist, E. A. and Havel, R. J. (1991) Acid hydrolases in early and late endosome fractions from rat liver. *J. Biol. Chem.* **266**, 2255-2263
9. Mullock, B.M., Perez, J.H., Kuwana, T., Gray, S.R., and Luzio, J.P. (1994) Lysosomes can fuse with a late endosomal compartment in a cell-free system from

- rat liver. *J. Cell Biol.* **126**, 1173-1182
10. de Duve, C. (1983) Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* **137**, 391-397
  11. Holtzman, E. (1989) Lysosomes, Plenum Press, New York
  12. Palade, G. E. (1975) Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* **189**, 347-385
  13. Gruenberg, J. and Clague, M. J. (1992) Regulation of intracellular membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 593-599
  14. Rothman, J. E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63
  15. Griffiths, G. and Simons, K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex, *Science* **234**, 438-443
  16. Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525
  17. von Figura, K. Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 642-646
  18. Brown, W. J., Goodhouse, J., and Farquhar, M. G. (1986) Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J. Cell Biol.* **103**, 1235-1247
  19. Yamamoto, K., Ikehara, Y., Kawamoto, K., and Kato, K. (1980) Characterization of enzymes and glycoproteins in rat liver lysosomal membranes. *J. Biochem.* **87**, 237-248
  20. Burnside, J. and Schneider, D.L. (1982) Characterization of the membrane proteins of rat liver lysosomes. *Biochem. J.* **204**, 525-534
  21. Lewis, V., Green, S.A., Marsh, M., Vihko, P., Helenius, A., and Mellman, I. (1985) Glycoproteins of the lysosomal membrane. *J. Cell Biol.* **100**, 1839-1847
  22. Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L., and Sandoval, I.V. (1986) Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **261**, 16755-16763
  23. Akasaki, K., Yamaguchi, Y., Ohta, M., Matsuura, F., Furuno, K., and Tsuji, H. (1990) Purification and characterization of a major glycoprotein in rat liver lysosomal membrane. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2766-2770
  24. Carlsson, S. R., Roth, J. Piller, F., and Fukuda, M. (1988) Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and

- h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* **263**, 18911-18919
25. Mane, S. M., Marzella, L., Baiton, D. F., Holt, V. K., Cha, Y., Hildreth, J. E. K., and August, J. T. (1989) Purification and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 360-378
  26. Akasaki, K., Yamaguchi, Y., Furuno, K., and Tsuji, H. (1991) Purification, some properties, and tissue distribution of a major lysosome-associated membrane glycoprotein (r-lamp-2) of rat liver. *J. Biochem.* **110**, 922-927
  27. Akasaki, K., Kinoshita, H., Fukuzawa, M., Maeda, M., Yamaguchi, Y., Furuno, K., and Tsuji, H. (1992) Isolation and characterization of a novel membrane glycoprotein of 85000 molecular weight from rat liver lysosomes. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 170-173
  28. Okazaki, I., Himeno, M., Ezaki, J., Ishikawa, T., and Kato, K., (1992) Purification and characterization of an 85-kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *J. Biochem.* **111**, 763-769
  29. Himeno, M., Koutoku, H., Tsuji, H., and Kato, K. (1988) *J. Biochem.* **104**, 773-776
  30. Himeno, M., Koutoku, H., Ishikawa, T., and Kato, K. (1989) Acid phosphatase in rat liver lysosomal membranes: purification and characterization. *J. Biochem.* **105**, 449-456
  31. Fukuda, M. (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **266**, 21327-21330
  32. Howe, C.L., Granger, B.L., Hull, M., Green, S.A., Gabel, C.A., Helenius, A., and Mellman, I. (1988) Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7577-7581
  33. Himeno, M., Noguchi, Y., Sasaki, H., Tanaka, Y., Furuno, K., Kono, A., Sakaki, Y., and Kato, K. (1989) Isolation and sequencing of cDNA encoding 107 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membrane. *FEBS Lett.* **244**, 351-356
  34. Noguchi, Y., Himeno, M., Sasaki, H., Tanaka, Y., Kono, A., Sakaki, Y., and Kato, K. (1989) Isolation and sequencing of cDNA clone encoding 96 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1113-1120
  35. Granger, B.L., Green, S.A., Gabel, C.A., Howe, C.L., Mellman, I., and

- Helenius, A. (1990) Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 12036-12043
36. Carlsson, S. R. and Fukuda, M. (1989) Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1: assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement. *J. Biol. Chem.* **264**, 20526-20531
37. Arterburn, L. M., Earles, B. J., and August, J. T. (1990) The disulfide structure of mouse lysosome-associated membrane protein 1. *J. Biol. Chem.* **265**, 7419-7423
38. Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno, M., and Kato, K. (1991) Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 444-452
39. Vega, M.A., Seguí-Real, B., Caric, J.A., Caléa, C., Rodríguez, F., Vanderkerckhove, J., and Sandoval, I.V. (1991) Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* **266**, 16818-16824
40. Himeno, M., Fujita, H., Noguchi, Y., Kono, A., and Kato, K. (1989) Isolation and sequencing of cDNA clone encoding acid phosphatase in rat liver lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 1044-1053
41. Tanaka, Y., Harada, R., Himeno, M., and Kato, K. (1990) Biosynthesis, processing, and intracellular transport of lysosomal acid phosphatase in rat hepatocytes. *J. Biochem.* **108**, 278-286
42. Furuno, K., Ishikawa, T., Akasaki, K., Yano, S., Tanaka, Y., Yamaguchi, Y., Tsuji, H., Himeno, M., and Kato, K. (1989) Morphological localization of a major lysosomal membrane glycoprotein in the endocytic membrane system. *J. Biochem.* **106**, 708-716
43. Lippincott-Schwartz, J. and Fambrough, D.M. (1986) Lysosomal membrane dynamics: structure and interorganellar movement of a major lysosomal membrane glycoprotein. *J. Cell Biol.* **102**, 1593-1605
44. Lippincott-Schwartz, J., and Fambrough, D.M. (1987) Cycling of the integral membrane glycoprotein, LEP100, between plasma membrane and lysosomes: kinetic and morphological analysis. *Cell* **49**, 669-677
45. Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I., and Kornfeld, S. (1988)

- The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* **52**, 329-341
46. Tanaka, Y., Yano, S., Okada, K., Ishikawa, T., Himeno, M., and Kato, K. (1990) Lysosomal acid phosphatase is transported via endosomes to lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**, 1176-1182
47. Tanaka, Y., Yano, S., Furuno, K., Ishikawa, T., Himeno, M., and Kato, K. (1990) Transport of acid phosphatase to lysosomes does not involve passage through the cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 1067-1073
48. Furuno, K., Yano, S., Akasaki, K., Tanaka, Y., Yamaguchi, Y., Tsuji, H., Himeno, M., and Kato, K. (1989) Biochemical analysis of the movement of a major lysosomal membrane glycoprotein in the endocytic membrane system. *J. Biochem.* **106**, 717-722
49. Akasaki, K., Fukuzawa, M., Kinoshita, H., Furuno, K. and Tsuji, H. (1993) Cycling of two endogenous lysosomal membrane proteins, lamp-2 and acid phosphatase, between the cell surface and lysosomes in cultured rat hepatocytes. *J. Biochem.* **114**, 598-604
50. Akasaki, K., Michihara, A., Fukuzawa, M., Kinoshita, H., and Tsuji, H. (1994) Cycling of an 85-kDa lysosomal membrane glycoprotein between the cell surface and lysosomes in cultured rat hepatocytes. *J. Biochem.* **116**, 670-676
51. Hellström, I. Garrigues, H. J., Garrigues, U. and Hellström, K. E. (1990) Highly tumor-reactive, internalizing, mouse monoclonal antibodies to Le<sup>Y</sup>-related cell surface antigens. *Cancer Res.* **50**, 2183-2190
52. Garrigues, J. , Anderson, J., Hellström, K. E., and Hellström, I. (1994) Anti-tumor antibody BR96 blocks cell migration and binds to a lysosomal membrane glycoprotein on cell surface microspikes and ruffled membranes. *J. Cell Biol.* **125**, 129-142
53. D'Souza, M. P. and August, J. T. (1986) A kinetic analysis of biosynthesis and localization of a lysosome-associated membrane glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **249**, 522-532
54. Braun, M., Waheed, A., and von Figura, K. (1989) Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *EMBO J.* **8**, 3633-3640
55. Green, S. A., Zimmer, K. P., Griffiths, G., and Mellman, I. (1987) Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins. *J. Cell Biol.* **105**, 1227-1240

56. Harter, C. and Mellman, I. (1992) Transport of the lysosomal membrane glycoprotein lgp120 (lgp-A) to lysosomes does not require appearance on the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **117**, 311-325
57. Carlsson, S.R. and Fukuda, M. (1992) The lysosomal membrane glycoprotein lamp-1 is transported to lysosomes by two alternative pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 630-639
58. Nabi, I.R., Le Bivic, A., Fambrough, D., and Rodriguez-Boulan, E. (1991) An endogenous MDCK lysosomal membrane glycoprotein is targeted basolaterally before delivery to lysosomes. *J. Cell Biol.* **115**, 1573-1584
59. Mathews, P.M., Martinie, J.B. and Fambrough, D. M. (1992) The pathway and targeting signal for delivery of the integral membrane glycoprotein LEP100 to lysosomes. *J. Cell Biol.* **118**, 1027-1040
60. Akasaki, K., Michihara, A., Mibuka, K., Fujiwara, Y., and Tsuji, H. (1995) Biosynthetic transport of a major lysosomal membrane glycoprotein, lamp-1: convergence of biosynthetic and endocytic pathways occurs at three distinctive points. *Exp. Cell Res.* **220**, 464-473
61. Akasaki, K., Michihara, A., Fujiwara, Y., Mibuka, K., and Tsuji, H. (1996) Biosynthetic transport of a major lysosome-associated membrane glycoprotein 2, lamp-2: a significant fraction of newly synthesized lamp-2 is delivered to lysosomes by way of early endosomes. *J. Biochem.* **120**, 1088-1094
62. Ludwig, T., Griffiths, G., and Hoflack, B. (1991) Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of normal rat kidney cells. *J. Cell Biol.* **115** 1561-1572
63. Williams, M.A. and Fukuda, M. (1990) Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* **111**, 955-966
64. Guarnieri, F. G., Arterburn, L. M., Penno, M. B., Cha, Y., and August, J. T. (1993) The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J. Biol. Chem.* **268**, 1941-1946
65. Honing, S. and Hunziker, W. (1995) Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat lgp120 (lamp-1) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **128**, 321-332
66. Rohrer, J., Schweizer, A., Russell, D., and Kornfeld, S. (1996) The targeting

- of lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J. Cell Biol.* **132**, 565-576
67. Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.-C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T. and Bonifacino, J. S. (1995) Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science*, **269**, 1872-1875
68. Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., and von Figura, K. (1990) Targeting of a lysosomal membrane glycoprotein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* **9**, 3497-3506
69. Lehmann, L.E., Eberle, W., Krull, S., Prill, V., Schmidt, B., Sander, C., von Figura, K., and Peters, C. (1992) The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHV. *EMBO J.* **11**, 4391-4399
70. Sosa, M. A., Achmidt, B., von Figura, K., and Hille-Rehfeld, A. (1993) In vitro binding of plasma membrane-coated vesicle adaptors to the cytoplasmic domain of lysosomal acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12537-12543
71. Ogata, S. and Fukuda, M. (1994) Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **269**, 5210-5217
72. Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., Gonzalez Noriega, A., Vandekerckhove, J, Jimenez, M. A., and Rico, M. (1994) The residue Leu(Ile)475-Ile(Leu)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 6622-6631
73. Letourneur, F. and Klausner, R.D. (1992) A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**, 1143-1157