

リソソーム膜糖蛋白質 LGP85/LIMP II の リソソーム局在化シグナルの解析

田淵紀彦

The analysis of lysosome localization signals of lysosomal membrane glycoprotein LGP85/LIMP II.

Norihiko Tabuchi

ABSTRACT

Lysosomal membrane glycoprotein termed LGP85 or LIMP II has a COOH terminal cytoplasmic tail whose amino acid sequence is R₄₅₉GQGSMDEGTADERAPLIRT₄₇₈. The sequence of D₄₇₀EXXXLI₄₇₆ is crucial for its binding adaptor protein complexes, AP-1 and AP-3, which are involved in vesicular transport to endosomal and lysosomal system. Early and late endosomes and lysosomes constitute this system. I have studied how the sequence determines the localization of LGP85 in the endosomal and lysosomal system. D₄₇₀ and E₄₇₁ function to transport of LGP85 from early endosomes to late endosomes. I₄₇₆ of LI motif is a determinant for proper distribution of LGP85 between late endosomes and lysosomes. In this review, I describe an independent role of pivotal amino acids of the signal sequence in localization of LGP85 in the endocytic organelles.

はじめに

真核細胞の細胞内部には、核 (Nucleous)、ミトコンドリア (Mitochondria)、ペルオキシソーム (Peroxisome)、小胞体 (Endoplasmic reticulum)、ゴルジ複合体 (Golgi complex)、リソソーム (Lysosome) などの、脂質二重膜で囲まれた多数のオルガネラが存在し、それぞれが互いに密接な関係を保ちながら独自の構造と機能を有して細胞活動を支えている。細胞内各オルガネラには特有の蛋白質が存在しており、オルガネラの構造、機能発現はこれらの蛋白質によって司られている。これらの蛋白質は細胞内のリボソーム上で合成された後、適切なオルガネラに輸送されその部位でそれぞれの機能を発揮する。従って、各

オルガネラの蛋白質の輸送にはなんらかのシグナルがその分子中に存在している。一方、細胞にはそのシグナルを特異的に識別・認識し、正確に仕分け・輸送するための厳密な細胞装置を備えていると考えられる。これら蛋白質の細胞内選別・輸送に関する研究は細胞生物学の柱の一つである細胞内オルガネラの形成機構の解明につながる重要な研究課題である。

リソソームは細胞内外の高分子の物質の分解を司る細胞内小器官で、真核細胞に普遍的に存在しその内部には60数種類に及ぶ酸性加水分解酵素を含んでいる¹⁾。これらの酵素は細胞内あるいは外部から細胞内に取り込んださまざまな物質の分解に関与していることが知られている。すなわち、細胞表面からエンドサイトーシスされた物質を含むエンドソームとの融合や細胞内物質の自己消化のためのオートファジーである。このような動きに注目するとき、リソソーム膜蛋白質はリソソーム内腔に存在するリソソーム酵素と細胞質を隔てているという側面だけでなく、Central Vacuolar System (Fig. 1) におけるコンポーネントとしてもその重要性が認識されている²⁻⁵⁾。

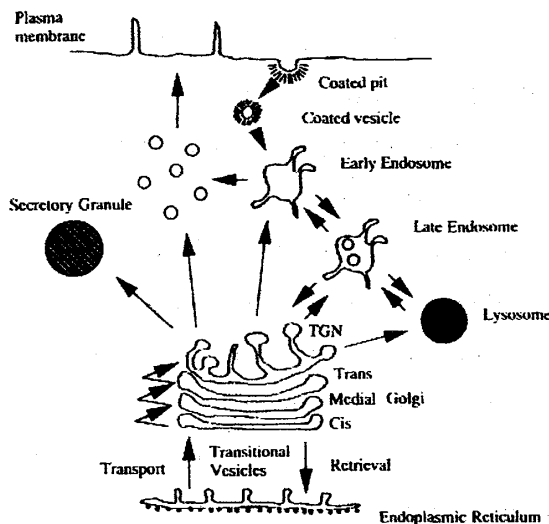


Fig. 1 Central vacuolar system.

リソソーム膜には分子量 120,000~30,000 の間に数本の特徴的な糖蛋白質のバンドが SDS-PAGE 分析により確認されている。この中でも lamp-1 (ラット lamp-1/lgp120/LGP107、マウス LAMP-1、ニワトリ LEP100、ヒト h-lamp-1) ファミリー、lamp-2 (ラット lamp-2/lgp110/LGP96、マウス lamp-2、ヒト h-lamp-2) ファミリーならびに LGP85 (LIMP II) はリソソームの主要な構成成分でそれぞれラット肝リソソーム膜においては蛋白質の 4~6% を占めている⁷⁻¹³⁾。またこれまでに筆者の研究室では、ラット肝リソソーム膜から lamp-1 ($M_r=107,000$)¹⁴⁾、lamp-2 ($M_r=96,000$)¹⁵⁾、LGP85 ($M_r=85,000$)^{16, 17)} の 3 種類のリソソーム膜糖蛋白質を精製しており、このうち、lamp-1 はリソソームだけでなく形質膜の被服ピット (Coated pit) や初期エンドソーム (Early endosome)、後期エンドソーム (Late endosome)

などエンドサイトーシス輸送に関係しているすべての細胞内小器官に存在していることが判明している¹⁸⁾。またパルスチェイスの実験から新たに合成されたlamp-1は *trans*-Golgi network (TGN) から細胞表面、初期エンドソーム、後期エンドソームのいずれかを經由してエンドサイトーシス輸送経路に入り、リソソームへ運ばれることが明らかにされており、さらにシクロヘキシミドで蛋白合成を阻害してもlamp-1のリソソームへの輸送は完全に抑制されないことから、lamp-1は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が示された。またlamp-2でもlamp-1と同じようにリソソームと細胞表面の間を循環しており最終的にリソソームに蓄積することが判っているが、lamp-1とはTGNからエンドサイトーシス経路の各オルガネラへソーティングされる割合が若干異なっていることが示されている¹⁹⁾。またLGP85においては、初代培養ラット肝実質細胞におけるモノクローナル抗体の取り込み実験からlamp-1やlamp-2と同じように細胞表面とリソソームの間を循環していることが報告されている²⁰⁾。このようにリソソーム膜糖蛋白質は各々が独自の移行経路を示しながら、最終的にリソソームに到達しそこに蓄積されるものと考えられるが、その移行を制御する分子機構についてはまだよく判っていない。そこでマウスLGP85 (M-LGP85) cDNA をヒト肝癌由来の細胞株であるHepG2細胞内で安定発現させ細胞分画を行うことにより、野生型および変異型M-LGP85の分布を調べ比較した。そこから得られた結果から明らかにされたリソソーム移行シグナルに含まれる各々アミノ酸の役割について述べる。

I. HepG2細胞におけるM-LGP85の発現およびその局在におけるリソソーム移行シグナルの役割

リソソーム可溶性酵素は、酵素が持つ糖鎖のマノースのC-6位にリン酸が付加された構造 (M-6-P) がリソソームへの局在化に必要であることが明らかとなっている²¹⁾。しかしながら、LGP85やlamp-1、lamp-2などのリソソーム膜糖蛋白質は複合型糖鎖を有するが、その糖鎖中にM-6-Pを持たず、N-結合型糖鎖合成酵素阻害剤であるツニカマイシン存在化でも正常にリソソームに移行することが明らかにされている²²⁾。これら膜結合型糖蛋白質のリソソームへの輸送はその蛋白質部分にシグナルがあることが、種々のグループによりcDNA発現系を用いて明らかにされている²³⁻²⁷⁾。すなわち、lamp-1、lamp-2ではそれらの cytoplasmic tail に認められるGlycine-Tyrosine (GY-motif)、LGP85ではLeucine-Isoleucine (di-leucine type motif) の2種類のリソソーム輸送シグナルが知られている。GY motifに関して、Williams & Fukudaはヒト-lamp-1のcytoplasmic tail部分を変化させた変異体をCOS細胞で発現させ、それら変異体の局在場所を組織学的に研究し、cytoplasmic tail中のGY motifのうちのTyrosine残基とその位置がリソソームの局在に重要であることを報告し

ている²³⁾。lamp-2については報告はなされてはいないが、lamp-1と同じようなcytoplasmic tailを持つことより、同様な機構によりリソソームへ輸送されると推察されている。一方、LI motifに関して、Ogata & Fukuda²⁷⁾ および Sandovalら²⁸⁾ は、LGP85のCOS-1細胞における一過性発現により、リソソーム移行シグナルとしてC-末端側に存在するLeucine-Isoleucineが重要であることを報告している。しかしながら、これらの報告で示した一過性発現における免疫組織化学的研究では、細胞表面に出現しているのか、あるいは細胞内に存在しているかという二者択一の判断しかされておらず、細胞内における詳細な分布は調べられていない。一方、これらリソソーム膜蛋白質をリソソームへ輸送するための選別因子としてアダプター蛋白質 (AP-1、AP-2、AP-3、AP-4など) が明らかにされており、特にAP-1やAP-3は核周辺おそらくCentral Vacuolar Systemの分岐点であるTGNに存在し、リソソーム膜蛋白質の輸送に働いているものと考えられている。in vitro 結合実験より、AP-3とLGP85の結合はLGP85のC-末端が関与していることが知られており、特にLI motifとその上流の酸性アミノ酸がこの結合に重要であることが報告されている²⁹⁾。

以上のような報告から考え、筆者はM-LGP85のLI motifのIsoleucineをAlanineあるいはLeucineに変えた変異体 (I476A、I476L)、C-末端から1あるいは3残基削った変異体 (Δ 478、 Δ 476-478)、LI motifの4および5残基上流の酸性アミノ酸をAlanineに変えた変異体 (D470A、E471A) を作成した。これら変異体をHepG2細胞で安定発現させ、それぞれの細胞におけるLGP85の局在しているオルガネラを免疫蛍光顕微鏡法と細胞分画法を用いて明らかにした。

II. リポフェクション法を用いた野生型および変異型M-LGP85のHepG2細胞での発現

培養哺乳類細胞への外来遺伝子導入法としては種々の方法が知られているが、筆者はリポソームを用いたリポフェクション法により、HepG2細胞でのM-LGP85 cDNAの安定形質発現を行った。真核細胞発現ベクター (pcDNA3.1) に、クローニングしたM-LGP85 cDNAおよび変異させたcDNAを組み込んで作成した pcDNA3.1-Wild-type、pcDNA3.1-I476A、pcDNA3.1-I476L、pcDNA3.1- Δ 478、pcDNA3.1- Δ 476-478、pcDNA3.1-D470A、pcDNA3.1-E471A (Fig. 2) をそれぞれリポソーム法を用いてHepG2細胞に導入した。得られた各細胞、コントロールとして未処理のHepG2細胞ならびにpcDNA3.1ベクターのみをトランスフェクションしたHepG2細胞 (MOCK) をホモジネートし、核を除いた上清 (post nuclear supernatant ; PNS) をSDS-PAGE後、イムノブロッティングにより調べた。その結果、Fig. 3に示すように未処理およびMOCKのHepG2細胞ではラット抗LGP85抗体と反応する蛋白質は全く認められないが、野生型および各種変異型M-LGP85を発現した細胞ではそれぞれ85 kDaの位置にラット抗LGP85抗体と反応する蛋白質が認められた。

またLGP85を発現した細胞はクローンによって多少の発現量の違いが認められたので、同程度発現している細胞を選び出し以後の実験に用いた。Fig. 3にみられるように、発現した蛋白質の分子量はマウス肝リソソーム膜におけるLGP85 (80 kDa) の分子量と比較すると若干大きい値を示した。この差異は、HepG2細胞内で発現したM-LGP85とマウス肝内在性のLGP85における糖鎖構造の違いによるためと推定された。

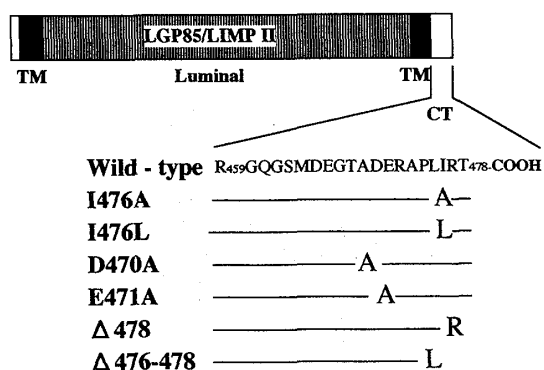


Fig. 2 Schematic representation of the structure of mouse LGP85/LIMP II and its mutants of C-terminal cytoplasmic tail. Substituted residues in the LGP85/LIMP II tail of the mutants are indicated. TM; transmembrane domain, CT ; cytoplasmic tail.

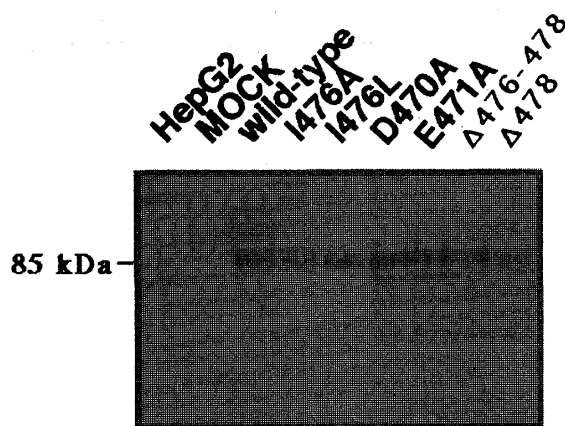


Fig. 3 Immunoblot analysis of M-LGP85 proteins expressed in HepG2 cells. Cultures were homogenized with Teflon Homogenizer and then PNSs (Post Nuclear Supernatants) were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis, using specific anti-rat-LGP85 antibody.

そこでHepG2細胞で発現している蛋白質の糖鎖を調べるために、pcDNA3.1-Wild-typeを導入し発現した細胞のPNSおよびマウス肝リソソーム膜に対してEndo HおよびPNGase F処理後、イムノプロット解析を行った。Endo HはN-結合型の糖鎖部分の高マンノース型糖鎖のみを切断する酵素であり、PNGase Fは複合型、高マンノース型に関わらず両糖鎖を切断する酵素である。その結果、Fig. 4に示すように、Endo H 処理によりM-LGP85は66

kDa、発現したM-LGP85は70 kDaにバンドが認められた。PNGase F処理では、M-LGP85 および発現したM-LGP85は共に55 kDaにバンドがシフトしたことから、蛋白質部分の分子量はM-LGP85とHepG2細胞内で発現したM-LGP85は同じ分子量であり、塩基配列から推定した分子量 54,069と非常に近い値を示した。しかしながら、Endo H処理で分子量の異なるバンドが認められることより、両LGP85の糖鎖における高マンノース型糖鎖含有量が異なっていることが推察された。さらにラット LGP85 (R-LGP85) の糖鎖は、負に荷電した

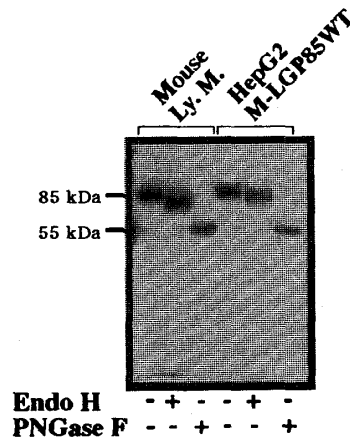


Fig. 4 Endo H and PNGase F sensitivity of M-LGP85 Wild-type transfected HepG2 cells and mouse lysosomal membrane. HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-Wild-type and mouse lysosomal membranes were treated with Endo H and PNGase F and analyzed on SDS-PAGE followed by immunoblotting. Ly. M.; lysosomal membrane.

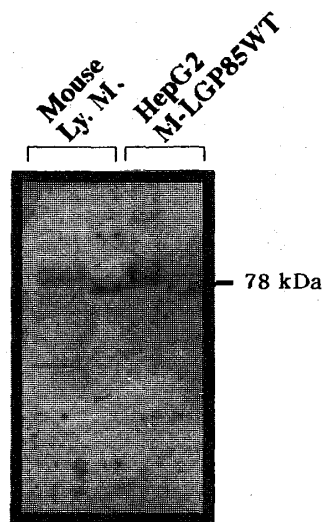


Fig. 5 Neuraminidase sensitivity of M-LGP85 Wild-type transfected HepG2 cells and mouse lysosomal membrane. HepG2 cells transfected with pcDNA3.1-Wild-type and mouse lysosomal membranes were treated with neuraminidase and analyzed on SDS-PAGE followed by immunoblotting. Ly. M.; lysosomal membrane.

シアル酸を持つことでも知られているので、M-LGP85ならびに発現したM-LGP85においてノイラミニダーゼ処理を行いSDS-PAGE後、イムノブロットングにより解析した(Fig. 5)。M-LGP85および発現したM-LGP85はノイラミニダーゼ処理により共に78 kDaの位置にバンドが認められ、1分子のLGP85当たり23分子のシアル酸をその糖鎖中に含有することが明らかとなった。これらの結果より、HepG2細胞へのM-LGP85の過剰発現を行った場合においても、マウス肝臓で発現している内在性LGP85と同じようにその糖鎖にシアル酸の付加が起こることが明らかとなった。

III. 蛍光抗体法によるM-LGP85の局在部位の分析

野生型および各種変異型 M-LGP85 の発現体について、それらの局在部位を明らかにするために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光抗体法による観察を行った。一次抗体としてラット抗LGP85抗体とヒトlamp-1モノクローナル抗体、二次抗体としてfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識したウサギ抗ヤギIgG抗体とTexas-Red標識したマウス抗ヤギIgG抗体を用いた。野生型M-LGP85はFig. 6に示すように、細胞内の核周辺のリソソームと思われる顆粒に局在化し、HepG2内在性のlamp-1とほぼ同じ局在を示した。このことより両蛋白質はco-localizationすることが明らかとなった(Fig. 6, C)。また各種変異型I476A、I476L、D470A、E471Aでも野生型M-LGP85と同じ様に核周辺の顆粒状のオルガネラに局在し、内在性lamp-1と同じ部位に局在しているのが観察された(Fig. 6, D-O)。しかしながらC-末端から3つアミノ酸を削った変異型 Δ 476-478では他の細胞と比べて、はっきりとした違いが認められ、かなりの量の蛍光シグナルが細胞表面に認められると同時に、一部細胞内においても内在性lamp-1とco-localizationする顆粒を確認することができた(Fig. 6, R)。これらの細胞をサポニン処理を行わずに蛍光抗体法を行ったところ、野生型M-LGP85および Δ 476-478以外の変異型では蛍光シグナルをほとんど観察することが出来ず、 Δ 476-478だけが細胞表面に蛍光シグナルを強く認めることができた(データ未掲載)。これらの結果は、 Δ 476-478を発現したM-LGP85の大部分が細胞表面に局在していることを示している。そこで野生型および変異型M-LGP85の細胞内分布をより詳細に調べるためにPercoll密度勾配遠心法を用いて細胞分画し、その局在をイムノプロット法により調べた。

IV. HepG2細胞の細胞分画

HepG2細胞内部でのM-LGP85の分布を明らかにするために、細胞分画法を行った。各種細胞のPNSをPercoll連続密度勾配遠心により細胞分画し、イムノプロット法により各種M-LGP85発現体を定量細胞内分布を明らかにした。Fig. 7に示したように、この分画法

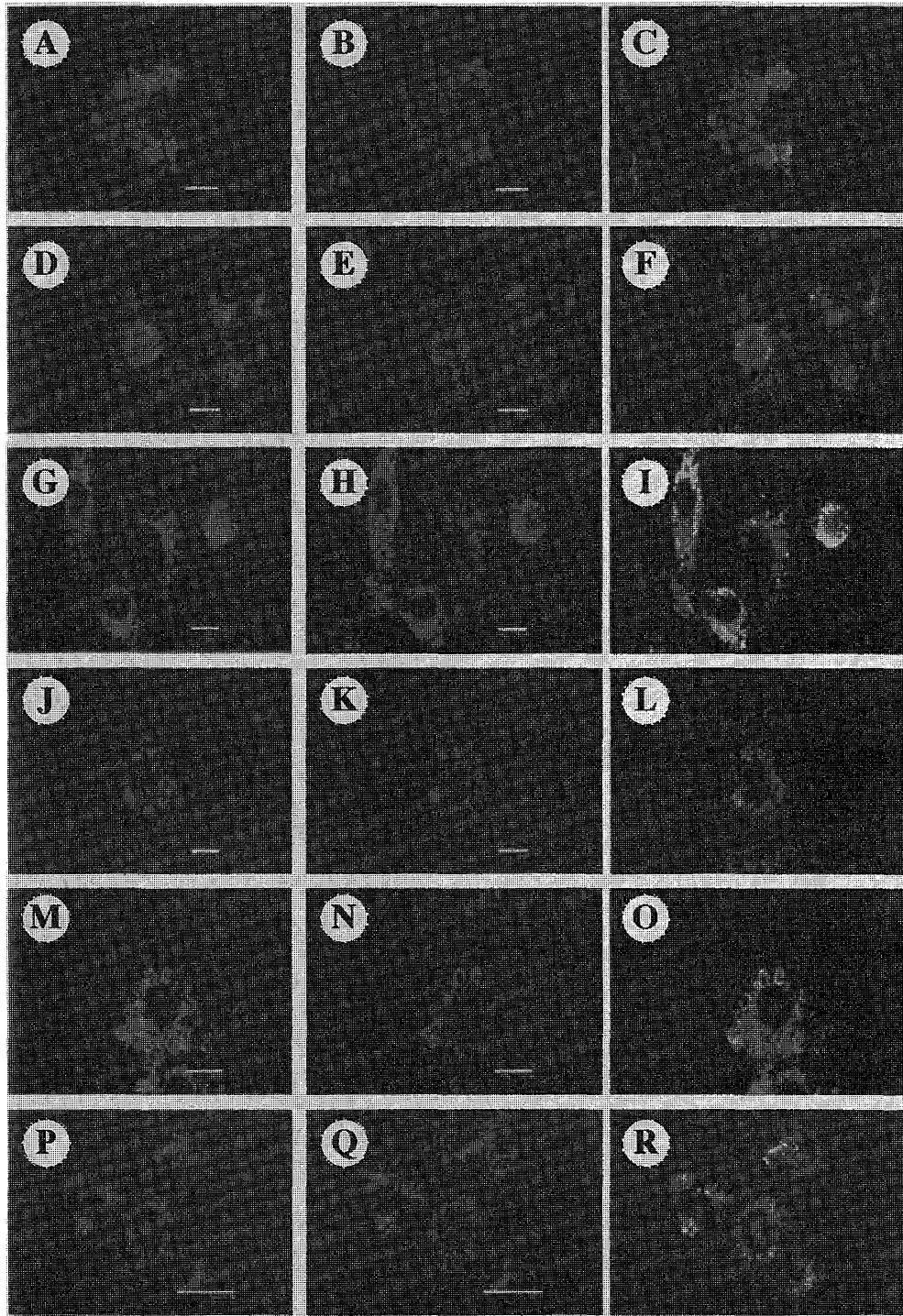


Fig. 6 Double Immunofluorescence analysis of the localization of expressed M-LGP85 and endogenous lamp-1 in HepG2 cells by confocal microscopy. Fixed cells were incubated with the rabbit anti-LGP85 polyclonal antibody and with mouse anti-h-lamp-1 monoclonal antibody and subsequently with FITC-conjugated antibodies to rabbit Ig and Texas Red-conjugated antibodies to mouse Ig. A, D, G, J, M, P ; endogenous lamp-1, B ; Wild-type, E ; I476A, H ; I476L, K ; D470A, N ; E471A, Q ; Δ 476-478, C, F, I, L, O, R ; merge. Bar, 10 μ m.

により得られた各画分について、リソソームのマーカ酵素である β -グルクロニダーゼ(β -G)と形質膜のマーカ酵素であるアルカリ性ホスホジエステラーゼI(APDE I)の活性を測定した。 β -Gは高密度画分(画分17)で最も強いピーク活性を示し、低密度画分側の画分7でも活性を認めることができた。APDE I活性では、低密度画分5で最も強いピーク活性を示した。これらの結果は画分17、18にリソソーム、画分4-6に形質膜、ならびに画分6-8にミクロソームが回収されることを示している。またここで得られた酵素活性のパターンは、以前筆者の研究室で行った初代培養ラット肝実質細胞をPercoll分画したときの酵素分布に非常に類似したパターンを示しており¹⁸⁾、HepG2細胞においてもPercoll分画による実験系を用いることが可能であることが判明した。さらにHepG2細胞を壊す条件として、テフロンホモジナイザーを用いてストローク数をかえて細胞を壊したときにおいてもリソソームの画分17における β -G活性の減少が認められず、依然として画分7周辺の β -G活性に変化が見られなかった。このことから低密度画分6-8の β -G活性はリソソームの崩壊によるものではなく、ミクロソーム由来の活性であると結論した。

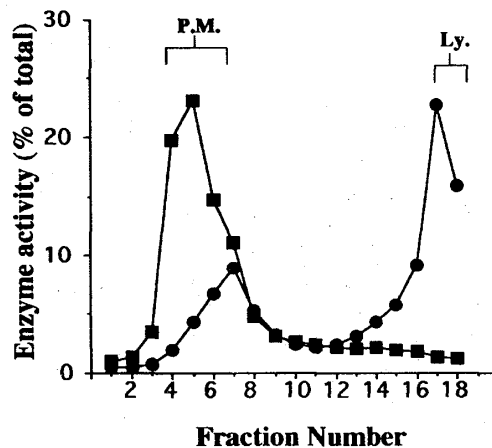


Fig. 7 Subcellular fractionation of HepG2 cells by Percoll density gradients. HepG2 cells were homogenized and the post nuclear supernatants were fractionated on a Percoll gradient. After the centrifugation, gradients were divided into 0.5 ml fractions collected from the top and each fraction was assayed for alkaline phosphodiesterase I (plasma membrane, ■), β -glucuronidase (Lysosome, ●). P.M.; plasma membrane, Ly.; lysosomes.

V. HepG2細胞におけるエンドサイトーシス系オルガネラの分布

HepG2細胞は細胞表面にアシアロ糖蛋白質受容体を発現しており、細胞外より糖鎖末端にガラクトースを持つ糖蛋白質を取り込こんでいることが知られている³⁰⁾。そこで受容体を介した細胞内への取り込み(receptor-mediated endocytosis)を利用して、Percoll分画に

おけるエンドサイトーシス系の各コンパートメントを同定するために、アシアロフェチュイン (ASF) と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合させたASF-HRPをトレーサーとして用い、ASF-HRPの輸送のカイネティックを調べた。ASF-HRPは16~20℃で細胞と共にインキュベーションすると細胞表面付近の初期エンドソームに蓄積することが報告されている³¹⁻³³⁾。そこでこれらの報告に従って、HepG2細胞とASF-HRPを20℃で60分反応させ、引き続き37℃で0、15、30、60、120、360分チェイス後、Percoll密度勾配遠心し、各画分のHRP活性を測定した (Fig. 8)。20℃で60分 (37℃で0分) インキュベーションにおいて、HRP活性は画分5で最も高いピークを示した (ピーク1)。この画分は形質膜マーカー酵素の APDE I 活性のピークと一致していた。37℃で15分インキュベーションした場合は0分と

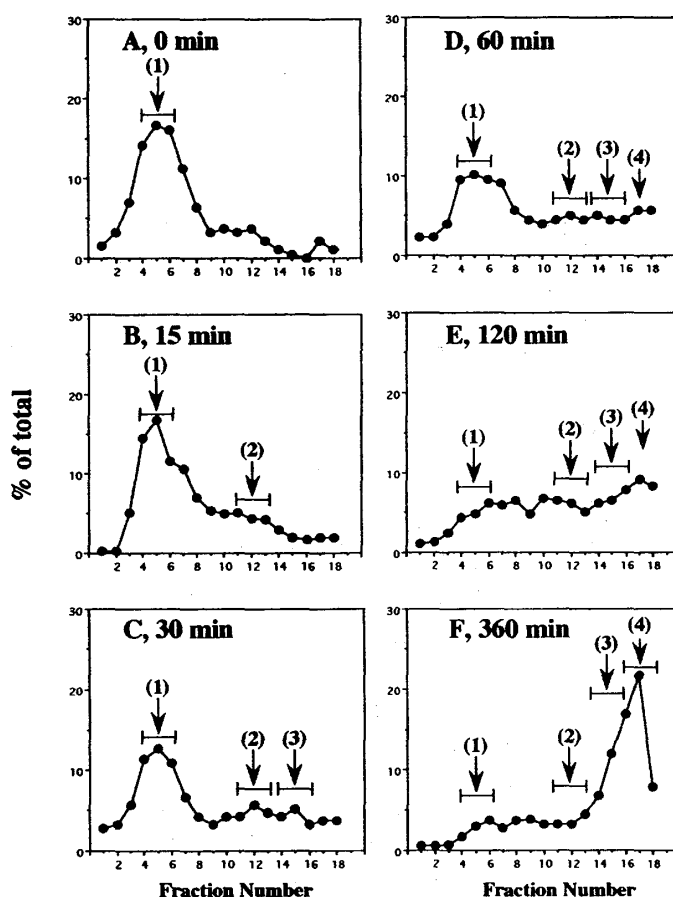


Fig. 8 Subcellular distribution of asialofetuin conjugated with horseradish peroxidase (ASF-HRP). The confluence of wild-type LGP85 expressed HepG2 cells were incubated ASF-HRP (5 μ g for ASF) under the conditions as follows. The cells were incubated with ASF-HRP at 20°C for 60 min and then without ligands at 37°C for 0 min (A), 15 min (B), 30 min (C), 60 min (D), 120 min (E), and 360 min (F). After five washings with PBS, the cells were homogenated and centrifuged at 650g for 10 min. The resultant supernatants (PNSs) were fractionated by percoll density centrifugation. The marker enzymes activity were indicated Fig. 7. Arrows indicated the positions of major endocytic organelles.

比べて殆ど変化が見られなかったが、若干画分11-13でHRP活性が増加し(ピーク2)、30分ではピーク1の活性が減少するにともないより明確なピーク2およびピーク3が出現した。さらにインキュベーション時間を60分まで延ばすと、リソソーム画分であるピーク4でのHRP活性の上昇が認められ、ピーク1の活性は0分と比べて約半分まで減少した。インキュベーション時間120分ではピーク1のHRP活性がほとんど消失するとともに、ピーク4が増加し、360分ではHRP活性の大部分がピーク4に認められた。このようにHepG2細胞へのASF-HRPを取り込ませた時の時間依存的変化は、低密度画分から高密度画分へHRP活性が次第にシフトし、形質膜からエンドサイトーシスによってリソソームまで到達していることが判明した。これらの結果はピーク1に初期エンドソーム、ピーク2におそらくCarrier vesicle、ピーク3に後期エンドソームが回収されているものと考えられる。しかしながら、この実験により得られたHRPの活性パターンは初代培養ラット肝実質細胞を用いた実験と類似しているが、ASF-HRPが形質膜からリソソームに到達するのにラット肝実質細胞よりも実に6倍もの時間を費やしていた¹⁸⁾。これら両実験における時間的ずれは不明であるが、M-LGP85を過剰発現させているために、各オルガネラ間における輸送装置の飽和がおこりASF-HRP輸送の遅延が起こっている可能性が考えられる。

VI. HepG2細胞の細胞分画における後期エンドソームの確認

後期エンドソームが画分14-15に回収されることが推定されたが、さらに後期エンドソーム画分を明確にするためにGlycyl-L-phenylalanin- β -2-naphtylamide (GPN) を用いて、リソソームから後期エンドソームの分離を試みた。Bergら³⁴⁾はリソソーム可溶性酵素カテプシンCの基質であるGPNを反応させ生成したGPNの分解産物がリソソーム内の浸透圧を変化させることにより、リソソームを選択的に壊し後期エンドソームを分離することに成功した。そこでHepG2細胞をホモジネート後、PNSにGPNを37℃で10分間反応させ選択的にリソソームを壊し後期エンドソームの分離を試みた。GPN処理と未処理のPNSをPercoll密度勾配遠心後、各画分の β -G活性およびlamp-1量を測定した。Fig. 9に示したように、GPN処理した β -G活性は画分16から18にかけて減少し、リソソームが選択的に壊れていることが明らかとなった。また β -Gは細胞質に放出したために、全ての画分の β -G活性が未処理と比べて高く検出された。一方、lamp-1は未処理の細胞ではリソソーム画分(画分17)に最も多く存在しているのに対し、GPN処理した細胞では画分17のlamp-1含量は減少し、画分6-10においてlamp-1含量は増加した。これに対し画分14-15ではlamp-1の相対量に変化が認められなかった。この結果は、GPNによってリソソームは破壊され、壊れたリソソーム膜が形質膜画分(画分6-10)にシフトしていることが明らかとなった。また、lamp-1はリソソームに主として存在しているが後期エンドソームにもその存在が確認されているので^{4, 5)}、

GPN処理した細胞における画分14-15のlamp-1は後期エンドソーム由来であることが示唆された。

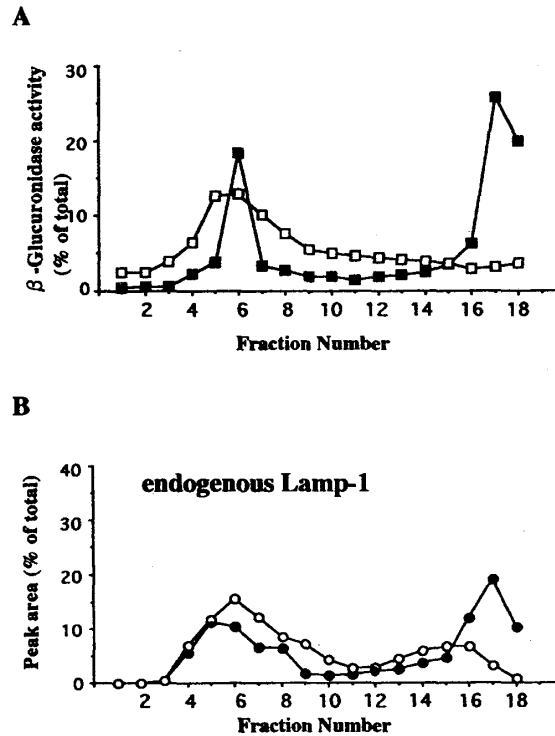


Fig. 9 Selective disruption of lysosomes with glycy-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN). PNS was incubated with 300 μ M GPN in a homogenizing buffer at 37°C for 10 min and then fractionated by percoll density centrifugation. (A) Distribution of β -glucuronidase of wild-type in the fractions obtained from PNS treated with GPN (□) and without GPN (■). (B) Densitometric tracing patterns of immunoblot analysis of endogenous h-lamp-1 in the fractions (1-18) obtained from PNS treated with GPN (○) and without GPN (●).

VII. HepG2細胞の細胞分画におけるゴルジ体の確認

リソソーム膜蛋白質およびリソソーム可溶性酵素などは、粗面小胞体上で合成されて小胞体内腔に入り、さらにゴルジ体を経てそれぞれの場所に輸送される。LGP85やlamp-1、lamp-2などのリソソーム膜蛋白質はゴルジ体を通過する間に糖鎖の装飾を受けており、ゴルジ体の *cis* 領域では前駆体として存在し、*trans* 領域では成熟型になると考えられている。そこでM-LGP85を発現したHepG2細胞のpercoll分画において、ゴルジ体がどの画分に局在するかを確認するために、Golgi 58K protein モノクローナル抗体を用いてイムノブロット解析を行った。Golgi 58K protein はゴルジ体に特異的に存在する蛋白質で、微小管とゴルジ体をこの蛋白質を介してゴルジ体構造の維持に寄与している蛋白質として知られている³⁵⁾。

Fig. 10 に示したように Percoll 分画の各画分をイムノプロット法で検討した結果、画分5-7に分子量 58 kDaのバンドが検出された。従ってTGNを含めたゴルジ体は画分5-7に局在することが明らかとなった。

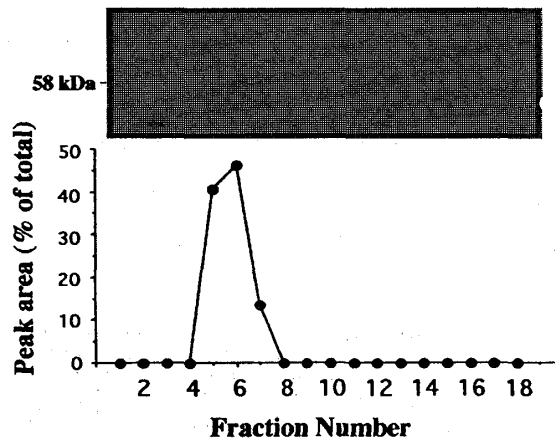


Fig. 10 Western blot analysis of Golgi-58K protein in fractionated HepG2 cells by percoll density gradients. The resultant supernatants (PNSs) were fractionated by percoll density centrifugation. Equal volume from each fractions were separated through 10% SDS-PAGE and electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were probed and quantitated with Monoclonal anti-Golgi 58K protein antibody. Densitometric tracing patterns of immunoblotting were indicated below.

VIII. 野生型および変異型M-LGP85を発現したHepG2細胞での細胞内分布

前項までの実験で、HepG2細胞をPercoll分画することによって、エンドサイトーシス系の各オルガネラがどの画分に存在しているかが明らかとなったので、HepG2細胞で発現した野生型および変異型M-LGP85の細胞内分布について検討した。野生型M-LGP85はリソソーム画分(画分17)に最も多く局在しているが、低密度画分にもその局在を認めることが出来た(Fig. 11)。HepG2細胞由来の内在性lamp-1およびlamp-2も画分17に最も多く局在し、野生型M-LGP85とほぼ同じ細胞内分布を示すことが明らかとなった。これに対して、変異型I476Aはリソソームよりも若干密度の軽い後期エンドソーム画分(画分15)に最も多く局在しており、高密度リソソーム画分にはわずかにしか存在しなかった(Fig. 12-A, TABLE 1)。変異型I476Lはリソソーム画分のLGP85は減少し、後期エンドソーム画分および後期エンドソームより低密度のオルガネラに広がって分布しているのが認められた(Fig. 12-B, TABLE 1)。これらの結果はLI motifのIsoleucineをAlanineあるいはLeucineに変えることにより、LGP85のリソソームへの輸送過程が抑制されていることを示唆している。I476Aでは主として後期エンドソームからリソソームへ輸送される過程、I476Lでは後

期エンドソームからリソソームへの輸送過程だけでなく、それ以前の輸送過程において抑制が起こっていることを示している。Sandovalら²⁸⁾は Isoleucine の Alanine 置換体の一過性発現では、発現したLGP85は内在化され、リソソームに移行することを報告している。筆者の実験においても発現したM-LGP85の一部はリソソームへの輸送が認められたが、特にI476Aにおいてはリソソームよりもむしろ後期エンドソームに主に局在した。これらの差異は一過性発現と安定性発現で調べた実験の違いによることが推察される。これらのことより、LGP85が持つリソソーム移行シグナルのLI motifのうちの Isoleucine は後期エンドソームからリソソームへの移行ならびに定常状態におけるLGP85のリソソームでの蓄積を保持するために非常に重要であることが明らかとなった。

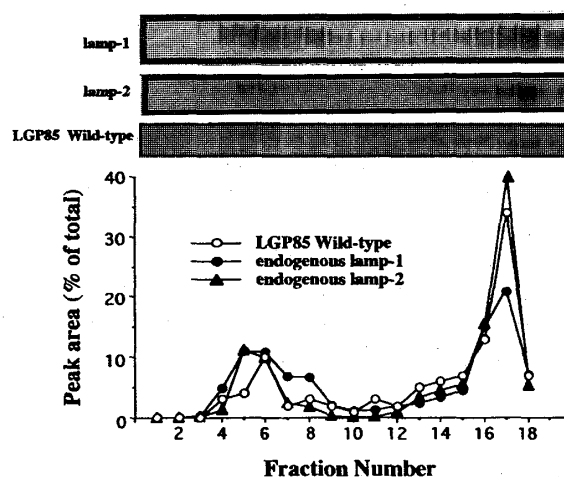


Fig. 11 The detection of M-LGP85 Wild-type and endogenous lamp-1 and lamp-2 in fractionated HepG2 cells. The resultant supernatants (PNSs) were fractionated by percoll density centrifugation. Equal volume from each fraction was separated through 10% SDS-PAGE and electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were probed and quantitated with anti-rat-LGP85 antibody and Anti-human Lamp-1 and Lamp-2 monoclonal antibody. Densitometric tracing patterns of immunoblotting were indicated below.

次にLGP85の cytoplasmic tail 部分がAP-3との結合に関与していることが知られているので、C-末端のアミノ酸を1および3残基削った $\Delta 478$ と $\Delta 476-478$ について検討した。 $\Delta 478$ ではリソソーム画分のLGP85の相対量は、野生型M-LGP85と比べて相対量は減少したものの、 $\Delta 478$ の細胞内分布はリソソームに最も多く存在し (Fig. 12-C, TABLE 1)、3残基削った $\Delta 476-478$ では発現したLGP85の大部分が低密度画分4-7に局在していることが判った (Fig. 12, F)。これらの事実はC-末端の3アミノ酸残基がTGNから後期エンドソームへの輸送に関与していることを示している。すなわち、AP-1あるいはAP-3は主としてTGNに存在し、TGNから輸送された $\Delta 476-478$ はアダプター蛋白質 (AP-1あるいはAP-3) との結合

が弱くなり、defaultの経路に入り形質膜へ移行する分子の割合が増加したものと考えられる。従ってC-末端側のアミノ酸3残基はこれらアダプター蛋白質と結合するための重要なドメインであることが示唆された。

これまでに酵母細胞を用いた yeast two-hybrid system あるいは in vitro 結合実験よりこれら膜蛋白質の cytoplasmic tail がどのようなアダプター蛋白質と結合するか解析が行われてきた。これらの報告によればLGP85の cytoplasmic tail はAP-3と強い親和性を有し²⁹⁾、さらにAP-1とも結合することが示されている³⁶⁾。そこでLGP85の cytoplasmic tail 中の酸性アミノ酸の Alanine 置換体D470AおよびE471Aを同じように安定形質発現させ、それらの細胞についてイムノブロット解析により細胞内分布を調べた。その結果、D470AではLGP85のリソソーム画分への蓄積を認めることが出来ず、初期および後期エンドソームな

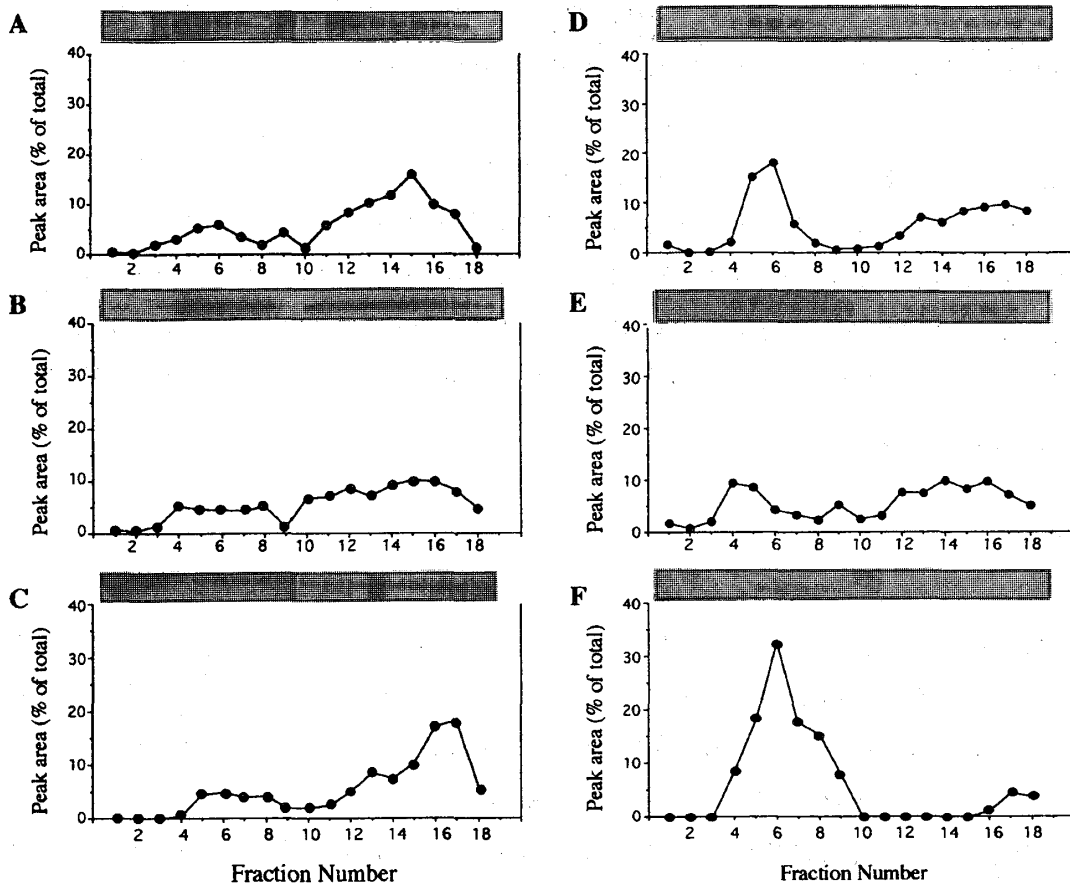


Fig. 12 The detection of M-LGP85 mutants in fractionated HepG2 cells. The resultant supernatants (PNSs) were fractionated by percoll density centrifugation. Equal volume from each fractions were separated through 10% SDS-PAGE and electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Membranes were probed and quantitated with anti-rat-LGP85 antibody. Densitometric tracing patterns of immunoblotting were indicated below. These experiments were performed three times with similar results. A ; I476A, B ; I476L, C ; Δ 478, D ; Δ 475A, E ; D476A, F ; Δ 476-478.

TABLE 1 Quantitation of Wild-type LGP85 and Mutants in the Endocytic Organelles

	Early endosome	carrier vesicle	Late endosome	Lysosome
Wild-type	19	5	18	54
D470A	41	5	22	27
E471A	26	11	26	22
I476A	17	13	37	21
L475A	19	15	24	20
Δ478	15	7	23	42
Δ476-478	72	0	0	7
Lamp-1	33	3	10	43
Lamp-2	25	1	13	61

Note. Amounts (% of the total) of early endosomes, carrier vesicles, late endosome, and lysosomes are sums of the amounts in fractions 4-7, fractions 11 and 12, fractions 13-15, and fractions 16-18, respectively. The data represent the average of three independent experiments.

どに幅広く分布することが判明した (Fig. 12-E, TABLE 1)。これに対し、E471Aではリソソーム画分よりも低密度画分側 (形質膜、TGN、初期エンドソーム) により強いシグナルを検出する事が出来た (Fig. 12-D, TABLE 1)。これらの事実はLGP85の細胞内輸送においてLI motifだけでなく、その上流の酸性アミノ酸もLGP85のリソソーム移行に重要な役割を果たしており、D470、E471は初期エンドソームから後期エンドソームへの移行を抑制する役割をしているものと推察される。

まとめ

HepG2細胞で発現した野生型 M-LGP85 は、内在性 lamp-1、lamp-2 と同じようにリソソームに主に局在化することが免疫蛍光抗体法ならびに細胞分画法により明らかとなった。Le Borgneら³⁷⁾は、LGP85を一過性発現させると後期エンドソームにAP-3が多量に蓄積し、過剰に発現したLGP85を正常にリソソームに輸送することを報告している。従ってこの報告から考えると安定発現させた野生型 M-LGP85 のとりうる細胞内分布は過剰に蛋白分子を発現しているのにも関わらず、定常状態では内在性リソソーム膜蛋白質と同じような分布を示しているものと思われる。一方、I476A 変異型 M-LGP85 ではリソソームよりもむしろ後期エンドソームに蓄積が認められ、I476L では後期エンドソームとリソソームに同程度局在していることが明らかとなった。この差異は Isoleucine という側鎖の大きいアミノ酸を Alanine という側鎖の小さいアミノ酸に置き換えることにより、後期エンドソームからリソソームへの輸送に関与するアダプター蛋白質とLGP85との結合力に変化が生じたためだと

考えられる。しかしながら、これら変異型M-LGP85 (I476A、I476L) のリソソームへの輸送経路がゴルジ体以後、直接リソソームに向かっているのか、または一旦形質膜および初期エンドソームなどを経てリソソームに向かっているのかは不明である。さらに Le Borgne ら³⁷⁾ は、AP-3のアンチセンスを細胞内にトランスフェクションさせたとき新たに合成されたLGP85が細胞表面に誤輸送されることより、AP-3がTGNで機能している可能性を示している。これらのことより推察すると、I476A変異型では、発現したM-LGP85は、まず形質膜への誤輸送を引き起こし、その後、内在化されて後期エンドソームでの蓄積を引き起こしていることが推察される。

C-末端をdeletionさせた Δ 478および Δ 476-478変異型M-LGP85では、野生型の分布と比較すると、 Δ 478では野生型と類似した分布を示したが、 Δ 476-478ではリソソームにほとんど到達しておらず、形質膜あるいは初期エンドソームに蓄積しているのが確認された。LGP85はin vitro結合実験からAP-1とAP-3に結合することが知られているので^{29,36)}、LGP85はTGNでまずAP-1もしくはAP-3と相互作用した後、後期エンドソームへ向かう輸送小胞に積み込まれ、次に後期エンドソームに到達したLGP85はAP-3と相互作用しリソソームへ向かっているものと考えられる。しかし、今回調べた低密度画分に見られるM-LGP85の局在を説明するには不十分であり、それ以外の異なった経路も存在していることが考えられる。すなわち、TGNにおける選別過程ではもっと複雑な制御機構が働いていることが予想される。このことを裏付ける報告として、マンノース6リン酸受容体(MPR)とlamp-1はともにAP-1の μ サブユニットと結合するが^{38,41)}、TGNから後期エンドソームへ向かう輸送小胞において、MPRとlamp-1とは別々の小胞に積み込まれて輸送されていることがKarlssonら⁴²⁾によって示されている。すなわち、同じアダプター蛋白質に結合するからといって同じ小胞に積み込まれるわけではなく、アダプター蛋白質への結合力の違いによって別々の輸送小胞に選別されていることを示している。さらにMPRのcytoplasmic tailではカゼインキナーゼIIによりセリン残基がリン酸化されることによりAP-1の結合が強くなることが報告されている⁴³⁾。またMPRのcytoplasmic tailの2つのCysteine残基がパルミトイル化されることによってリソソーム酵素の正常な輸送を示すことが知られている⁴⁴⁾。以上の報告から考えると、 Δ 476-478ではリソソームにほとんど局在が認められないことから、TGNにおいてアダプター蛋白質と結合することができなくなり、default経路により細胞表面に向かっていることが強く示唆された。すなわち、LGP85のC-末端3残基はアダプター蛋白質に結合するための重要なドメインであることが推察された。

最近、di-leucine typeの移行シグナルの近傍にある酸性アミノ酸が重要な働きを果たしていることが報告されている。主要組織適合抗原複合体(major histocompatibility complex class II; MHC II)のサブユニットであるInvariant chain蛋白質Iip31^{45, 46)}、酵母細胞のVam3p⁴⁷⁾や液胞膜結合型蛋白質であるアルカリ性フォスファターゼ⁴⁸⁾、メラノ細胞

におけるチロシナーゼ、P-protein、Pmel7、TRP-1など⁴⁹⁾ではコンセンサス配列として、di-leucine motifの上流-4、-5アミノ酸残基に酸性アミノ酸が存在し、このアミノ酸がこれらの蛋白質の移行に重要な役割を果たしていることが指摘されている。LGP85においてもLI motif上流に酸性アミノ酸が存在することより、その細胞内移行にこのアミノ酸が密接に関与している可能性が考えられている。Honingら²⁹⁾はLGP85のcytoplasmic tailペプチドを合成し、各種アダプター蛋白質との結合実験を行った。この報告によれば、LGP85の酸性アミノ酸Aspartic acidとGlutamic acidをそれぞれAlanineに置換したペプチドはAP-3との結合が、野生型LGP85のそれと比較すると20~60倍減少することを示している。またPondら⁴⁵⁾もMHC class II分子Iip31にみられるLI motifの上流の酸性アミノ酸がこの分子の細胞表面からの内在化およびエンドソームへの移行に重要な働きを持っていることを報告している。この実験で得られた酸性アミノ酸の変異体での結果は、野生型で見られるようなリソソームへの極端な蓄積が認められず、D470Aでは初期エンドソームに主として局在し、後期エンドソームやリソソームにも存在していることが明らかとなった。この事実は発現したD470AがTGNからエンドサイトーシス輸送経路に運ばれ、形質膜、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームへと順次輸送される経路において、初期エンドソームから後期エンドソームへの輸送過程で酸性アミノ酸(Aspartic acid)が重要であることが推察された。この結果を裏付ける理由として、予備的な実験であるが、AP-1、AP-3のモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果、画分5-7(TGNと初期エンドソームが共存する画分)においてこれらアダプター蛋白質の存在を確認することができた(データ未掲載)。このことは、これまでAP-3は組織学的な実験より、後期エンドソームに局在すると考えられていたが、今回の実験で、初期エンドソームにも存在していることが明らかとなった。従って、AP-3は初期エンドソームから後期エンドソームへのリソソーム膜蛋白質輸送過程にも関与していることが考えられ、Aspartic acidをAlanineに置換したD470AはAP-3との結合力が低下し、初期エンドソームへの蓄積が認められたのかもしれない。また、E471Aにおいてもリソソームへの濃縮が認められず、エンドサイトーシス系のオルガネラに均等に分布していた。それ故、LGP85の分布においてこれら酸性アミノ酸は固有のシグナルとして働き、LGP85がリソソームに蓄積するためには重要なアミノ酸であると結論付けた。LGP85が持つcytoplasmic tailにおいて、LI motifはリソソームに移行させるシグナルとして働いているが、その上流に存在する酸性アミノ酸Aspartic acid、Glutamic acid(di-acidic residues)もLGP85の細胞内輸送に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

以上のようにリソソーム膜糖蛋白質LGP85のcytoplasmic tail中にはこの蛋白質の移行を司るさまざまな情報をアミノ酸配列中に保持していることが示唆された。今回、筆者の結果を含めて真核細胞ではそれぞれ独自の蛋白質の選別・輸送機構が働いており、LGP85については安定発現体の細胞分画を行うことにより、これまで不明であった細胞内分布をより明

確にすることができ、LGP85の cytoplasmic tail 中におけるアミノ酸残基が果たす役割についての手掛かりを得ることができた。特に cytoplasmic tail 中の L₄₇₆、D₄₇₀、E₄₇₁ は細胞質側の因子 (アダプター蛋白質) と相互作用し、エンドサイトーシス系において複雑な移行制御がなされていることが推察された。

謝辞

本研究は福山大学薬学部、辻 宏教授の御指導のもとに行われたものであり、先生の御懇篤な御指導と御助言に厚く感謝します。また本研究の遂行にあたり、終始直接御指導・御鞭撻を賜りました福山大学薬学部、赤崎健司助教授ならびに道原明宏助手に深謝致します。

参考文献

- 1) Bainton, D. F. (1981) The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* **91**, 66s-76s.
- 2) 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.
- 3) Lippincott-Schwartz, J., and Fambrough, D. M. (1987) Cycling of Integral membrane Glycoprotein, LEP100, between plasma Membrane and Lysosomes: Kinetic and Morphological Analysis. *Cell* **49**, 669-677.
- 4) 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 pathway. *J. Biochem.* **106**, 717-722.
- 5) 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.
- 6) Chen, J. W., Cha, Y., Yuksel, K. U., Gracy, R. W., and August, J. T. (1988) Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding lysosomal membrane glycoprotein mouse LAMP-1. Sequence similarity to proteins bearing onco-differentiation antigens. *J. Biol. Chem.* **263**, 8754-8758.
- 7) Cha, Y., Holland, S. M., and August, J. T. (1990) The cDNA sequence of mouse LAMP-2. Evidence for two classes of lysosomal membrane glycoproteins.

- J. Biol. Chem.* **265**, 5008–5013.
- 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) Viitala, J., Carlsson, S. R., Siebert, P. D., and Fukuda, M. (1988) Molecular cloning of cDNAs encoding lamp A, a human lysosomal membrane glycoprotein with apparent Mr approximately equal to 120,000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3743–3747.
 - 11) Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J., and Carlsson, S. R. (1988) Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences. *J. Biol. Chem.* **263**, 18920–18928.
 - 12) Himeno, M., Noguchi, Y., Sasaki, H., Tanaka, Y., Kono, A., Sakaki, Y., and Kato, K. (1989) Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 107 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *FEBS Lett.* **244**, 351–356.
 - 13) Noguchi, Y., Himeno, M., Sasaki, H., Tanaka, Y., Kono, A., Sakaki, Y., and Kato, K. (1989) Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 96 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 1113–1120.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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 85,000 molecular weight from rat liver lysosomes. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 170–173.

- 17) 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.
- 18) 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 encaustic pathways occurs at three distinctive points. *Exp. Cell Res.* **220**, 464-473.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Kornfeld, S. and Mellman, I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483-525.
- 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) 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.
- 24) Guarneri, 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.
- 25) Honing, S., and Hunziker, W. (1995) Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat lgp120 (lamp-I) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **128**, 321-332.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Sandoval, I. V., Arredondo, J. J., Alcalde, J., Gonzalez Noriega, A., Vandekerckhove, J., Zimenez, M. A., and Rico, M. (1994) The residues Leu(Ile)475–Ile(Leu, Val, Ala)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.
 - 29) Honing, S., Sandoval, I. V., and von Figura, K. (1998) A di-leucine-based motif in the cytoplasmic tail of LIMP-II and tyrosinase mediates selective binding of AP-3. *EMBO J.* **17**, 1304–1314.
 - 30) Gruenberg, J., and Howell, K. E. (1989) Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 453–481.
 - 31) 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.
 - 32) 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.
 - 33) Ludwig, T., Griffiths, G., and Hoflack, B. (1991) Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the encaustic pathway of normal rat kidney cells. *J. Cell Biol.* **115**, 1561–1572.
 - 34) Berg, T. O., Stromhaug, P. E., Lovdal, T., Seglen, P. O., and Berg, T. (1994) Use of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide, a lysosome-disrupting cathepsin C substrate, to distinguish between lysosomes and prelysosomal encaustic vacuoles. *Biochem. J.* **300**, 229–236.
 - 35) Bloom, G. S., and Brashear, T. A. (1989) A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules. *J. Biol. Chem.* **264**, 16083–16092.
 - 36) Fujita, H., Saeki, M., Yasunaga, K., Ueda, T., Imoto, T., and Himeno, M. (1999) In vitro binding study of adaptor protein complex (AP-1) to lysosomal targeting motif (LI-motif). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 54–58.
 - 37) Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U., Hoflack, B. (1998) The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 29451–29461.
 - 38) Le Borgne, R., Griffiths, G., and Hoflack, B. (1996) Mannose 6-Phosphate

- Receptors and ADP-ribosylation Factors Cooperate for High Affinity Interaction of the AP-1 Golgi Assembly Proteins with Membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 2162-2170.
- 39) Le Borgne, R., and Hoflack, B. (1997) Mannose 6-Phosphate Receptors Regulate the Formation of Clathrin-coated Vesicles in the TGN. *J. Cell Biol.* **137**, 335-345.
- 40) Ohno, H., Stewart, J., Fourni, 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.
- 41) Honing, S., Griffith, J., Geuze, H. J., and Hunziker, W. (1996) The tyrosine-based lysosomal targeting signal in lamp-1 mediates sorting into Golgi-derived clathrin-coated vesicles. *EMBO J.* **15**, 5230-5239.
- 42) Karlsson, K., and Carlsson, S. R. (1998) Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/gamma-adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* **273**, 18966-18973.
- 43) Mauxion, F., Le Borgne, R., Munier-Lehmann, H., Hoflack, B. (1996) A casein kinase II phosphorylation site in the cytoplasmic domain of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor determines the high affinity interaction of the AP-1 Golgi assembly proteins with membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 2171-2178.
- 44) Schweizer, A., Kornfeld, S., and Rohrer, J. (1996) Cysteine34 of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting. *J. Cell Biol.* **132**, 577-584.
- 45) Pond, L., Kuhn, L.A., Teyton, L., Schutze, M-P., Tainer, J. A., Jackson, M. R., and Peterson, P. A. (1995) A Role for Acidic Residues in Di-leucine Motif-based Targeting to the Endocytic Pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 19989-19997.
- 46) Bremnes, B., Madsen, T., Gedde-Dahl, M., and Bakke, O. (1994) An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J. Cell Sci.* **107**, 2021-2032.
- 47) Cowles, C. R., Odorizzi, G., Payne, G. S., and Emr, S. D. (1997) The AP-3

- Adaptor Complex Is Essential for Cargo-Selective Transport to the Yeast Vacuole. *Cell* **91**, 109-118.
- 48) Stepp, J. D., Huang, K., and Lemmon, S. K. (1997) The Yeast Adaptor Protein Complex, AP-3, Is Essential for the Efficient Delivery of Alkaline Phosphatase by the Alternate Pathway to the Vacuole. *J. Cell Biol.* **139**, 1761-1774.
- 49) Odorizzi, G., Cowles, C. R., and Emr, S. D. (1998) The AP-3 complex: a coat of many colors. *Trends Cell Biol.* **8**, 282-287.