

2023 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

研究成果報告書

(1) 事業名（下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。）

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：上西達也

所属機関名・部局名・職名：大阪大学・大学院医学系研究科・助教

(3) 研究課題名（申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。）

リソソームエキソサイトーシスを制御する Ca²⁺チャネル TRPML1 複合体の構造解析

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：中川敦史（研究室名：超分子構造解析学）

(5) 研究成果の概要（公開）

*背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で 1 ページ以内 で記載。

リソソームはその内容物を細胞外に放出することにより、様々な生命現象において重要な役割を果たしている。この Ca²⁺依存的なプロセスを制御するイオンチャネル TRPML1 は、脂質化を受けた LC3 ファミリータンパク質と結合することで、リソソーム内腔から細胞質に Ca²⁺を供給する。TRPML1 は一方で、リソソーム膜と細胞膜の融合を Ca²⁺依存的に促進する myoferlin とも相互作用する。本研究では、TRPML1-LC3 複合体および TRPML1-myoferlin 複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡法で解明し、リソソームエキソサイトーシス制御機構の構造生物学的基盤を確立する。

これまでに、TRPML1-3xFLAG と EGFP-LC3A あるいは EGFP-LC3C が安定な複合体を形成することを見出ししており、これらのコンストラクトを HEK293 浮遊細胞に一過性に発現させ、FLAG タグに対するアフィニティー精製を行ったところ、共発現させた LC3A および LC3C は TRPML1 と同様に濃縮された。そこでバキュロウイルス感染による安定発現へと移行し、リットルスケールで培養した HEK293 浮遊細胞から TRPML1-LC3C 複合体のアフィニティー精製を同様に試みたところ、両者が溶出液中に含まれる主要なタンパク質であることをクマシー染色で確認することができた。

さらに両者が実際に複合体を形成していることを蛍光ゲル濾過法で確認した後に、高度に濃縮したサンプルを電顕用の試料支持グリッド上で凍結し、Krios G3i を用いて 6282 枚のクライオ電顕画像を取得した。続いてモデルフリーで *ab initio* の単粒子解析を行ったところ、35272 粒子からの再構成で分解能 (3.2Å) のポテンシャルマップを得ることができた。TRPML1 の 4 量体のモデルを重ね合わせたところ、膜貫通領域やリソソーム内腔側のドメインとよい一致が見られたが、LC3C の約 14 kDa の球状ドメインのボリュームは確認できなかった。現在、引き続き詳細な解析を行なっている。