

2024 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、ほかは削除してください。)

共同研究員

(2) 研究代表者

氏名：中西 真弓

所属機関名・部局名・職名：岩手医科大学 薬学部 生物薬学講座 機能生化学分野 教授

(3) 研究課題名

オルガネラおよび小胞の細胞内輸送におけるプロトンポンプ V-ATPase a サブユニットと輸送調節因子 Rab タンパク質との相互作用

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：中川 敦史 教授

(研究室名：超分子構造解析学研究室)

(5) 研究成果の概要 (公開)

骨密度は、骨形成と骨吸収のバランスにより維持されている。骨吸収を行う破骨細胞への分化に伴い、分泌リソソームは形質膜に向かって移動・融合し、リソソーム酵素を骨に向かって分泌する。当研究室では、遺伝子改変マウスなどを用い、分泌リソソームに局在する液胞型プロトンポンプ ATPase (V-ATPase) の a3 イソフォームが、リソソームの輸送因子である Rab7 やその活性化因子である Mon1-Ccz1 と結合し、リソソームへリクルートしていることを明らかにした。さらに、我々は、遺伝子改変マウスや培養細胞を用いた実験により、膵β細胞のインスリン分泌や、エナメル芽細胞の歯原性エナメル芽細胞関連蛋白質 ODAM の分泌においても、a3 イソフォームが、小胞輸送因子である Rab27 と結合しリクルートしていることを見出した。また、興味深いことに、インスリンを分泌しなかった一部のインスリン顆粒は、グルコースの刺激解除後 5 分以内に細胞の内側に向かって輸送された。我々は、ロックダウン細胞などを用い、a2 が Rab27 との結合を介して、インスリン顆粒の内向き輸送に関与することを示唆した。

以上の結果から、破骨細胞、膵β細胞、エナメル芽細胞など高次機能を担う細胞に特徴的なオルガネラ輸送において、a2 および a3 イソフォームが小胞輸送因子と結合・リクルートしているという共通原理が見えてくる。こうした分子機構をより深く理解するために、a2、a3 と小胞輸送因子群との結合様式および複合体の立体構造の解析に着手している。具体的には、超分子構造解析学研究室の PEAQ-ITC を用いて、a2・a3 と輸送調節因子の解離定数、結合比、エンタルピー変化、エントロピー変化から相互作用解析を行う。得られた相互作用情報に基づいて、タンパク質複合体の結晶化と結晶構造解析を目指す。

結合解析に用いる各リコンビナント タンパク質を得るため、大腸菌を用いた発現系を構築し、可溶性画分へ回収する条件を検討している。2023 年度までに、a3、Rab27、Ccz1 について適切な条件を見出した。2024 年度は、Mon1 に加えて a2 の可溶化に取り組んだが、残念ながら適切な条件は見出せなかった。タグや宿主の種類、発現させる領域など、さらなる検討が必要である。