

(様式 1-1)

提出日：2025 年 5 月 8 日

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：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ください。）

リソソームエキソサイトーシスを制御する Ca^{2+} チャンネル 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

*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 Ca^{2+} 依存的なプロセスを制御するイオンチャンネル 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 Ca^{2+} を供給する。本研究では、TRPML1-LC3 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、C 端に 3xFLAG タグを融合させた TRPML1 と N 端に 8xHis タグおよび mEGFP を融合させた LC3C を、バキュロウイルス感染により HEK293 浮遊細胞に安定発現させ、FLAG タグに対するアフィニティー精製で両者の複合体を取得し、単粒子解析を行ってきた。しかし、TRPML1 の 4 量体のチャンネル構造は容易に認められるものの、LC3C の球状ドメインのボリュームは確認できなかった。

そこで次に、野生型のコンストラクトを用いて安定な複合体の調製と構造解析を試みた。また、より天然に近い膜環境が必要な可能性があるため、大豆由来のフォスファチジルコリンを主成分としたナノディスクへの複合体の再構築も同時に試みた。しかし、両者が含まれるサンプルは精製できたものの、残念ながら LC3C は依然として観察されなかった。

次に、LC3C の N 端にサイズの小さい One-STrEP タグを融合させて 2 段階のアフィニティー精製を行ったところ、TRPML1-LC3C 複合体を効率よく得ることができた。さらに、TRPML1 のチャンネル構造の細胞質側に新奇のボリュームが認められ始めたため、クライオ電顕画像のクラス分けに入れていた C4 対称を除いたところ、細胞質側の密度が対称性を示さなくなっていた。ただし、細胞質側の新奇マップのサイズに応じて TRPML1 チャンネルの構造の対称性が崩れているようで、状態の異なる複数の population が存在するために、分解能は期待していたようには上がらなかった。