

(様式 1-1)

提出日：2023 年 5 月 11 日

2022 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：光岡 薫

所属機関名・部局名・職名：大阪大学・超高压電子顕微鏡センター・教授

(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。）

哺乳類細胞由来 V-ATPase の構造解析を目指した精製法の確立

(4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：加藤 貴之（研究室名：電子顕微鏡生物学研究室）

(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。

液胞型 ATPase (Vacuolar-type ATPase、以下 V-ATPase と記す) は、細胞内のほとんどの空胞系膜や細胞膜に存在し、空胞内部または細胞外を酸性化することで、多くの生命現象に関わる。研究代表者らは、これまでに好熱菌由来 V-ATPase を材料とし、その全体構造および中間体構造を Cryo-EM を用いた単粒子解析により明らかにしてきた (Nakanishi A *et al.* *J. Biol. Chem.* 2023, Kishikawa J *et al.* *Nat. Commun.* 2022, Nakanishi A *et al.* *Nat. Commun.* 2018)。一方で、哺乳類細胞由来 V-ATPase は試料調製が困難な膜タンパク質超複合体であるため、その機能・構造に関する知見は限られている。そこで研究代表者らは、近年開発された V-ATPase を効率よく精製する技術を様々な哺乳類細胞へ応用することで、哺乳類細胞由来 V-ATPase の精製システムの構築を計画した。

今年度はヒト乳腺がん細胞由来 V-ATPase の精製系確立を中心に研究を行った。まずヒト乳腺がん細胞の膜画分を調製し、界面活性剤を用いて V-ATPase の可溶化を行った。次に、V-ATPase と特異的に結合する分子を精製タグとして用いて、アフィニティー精製を行った。その結果、ワンステップで高純度の V-ATPase を精製することに成功した。精製試料の負染色観察の結果、試料中にサブ複合体の混在が確認されたことから、ゲル濾過クロマトグラフィーにより、複合体とサブ複合体を分離した。以上の結果から、構造解析に適した哺乳類細胞由来 V-ATPase 試料作製のため有用な情報を得ることができた。