

(様式 1-1)

提出日：2026 年 5 月 7 日

2025 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。

昨年度に確立した One-STrEP タグを用いた 2 段階アフィニティー精製系により、TRPML1-LC3C 複合体の立体構造解析に引き続き取り組んだ。LC3C 存在下で実際に複合体を形成していることは mass photometry により裏付けられた。また TRPML1-LC3A 複合体についても、ナノディスク再構築系でのグリッド作製を行った。クライオ電顕画像では細胞質側に LC3C と考えられる密度が認められるものの、構造を高分解能で決定するには至っていない。複合体の安定化に関わる条件探索として、チャンネルを閉鎖型に固定する TRPML1 Y404A 変異の導入、pH（5 および 8）、還元剤（TCEP の有無）、 Ca^{2+} 、PI(3,5)P2 や PI(4,5)P2 の有無を組み合わせた多数の条件でグリッドを作製し、クライオ電顕データを取得したが、改善は見られなかった。一方で、C 末端 3xFLAG タグと TRPML1 の間のリンカーを短縮したコンストラクトを作製し、また C 末端 3xFLAG タグ自体が複合体形成を妨げる可能性を考慮し、N 末端に 8xHis-3xFLAG タグを配置した TRPML1 コンストラクトも新たに導入した。この N 末端タグ型 TRPML1 を用いたゲル濾過解析では、従来の C 末端タグ型ではシフトが見られなかった複数の ATG8 ファミリータンパク質との相互作用が示唆され、これは共免疫沈降法の結果によっても支持された。