

厚生労働省科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

蝸牛内外有毛細胞に発現するタンパク質モータPrestinの活性部位の  
探求に関する研究：Prestin改変による感音難聴とその治療戦略

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者 和田 仁

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目次

I. 総括研究報告	1
研究要旨	1
A. 研究の背景と目的	1
B. 研究方法	3
C. 研究結果および考察	5
D. 結論	8
E. 健康危険情報	8
F. 研究発表	8
G. 知的財産権の出願・登録状況	8
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	10
III. 研究成果の刊行物・別刷	11

蝸牛内外有毛細胞に発現するタンパク質モータPrestinの活性部位の探求に関する研究：

Prestin改変による感音難聴とその治療戦略

主任研究者 和田 仁 東北大学 教授

#### 研究要旨

我々の聴覚は、蝸牛内コルチ器に存在する外有毛細胞（Outer Hair Cell: OHC）の伸縮運動により、鋭敏なものになっていると考えられている。また、その伸縮運動の源は、細胞側壁に存在するタンパク質モータ Prestin の変形であると推察されている。現在、内耳疾患の治療率が低い最大の原因は、内耳増幅機構、すなわち、OHC の伸縮メカニズムが不明なためである。従って、OHC の伸縮運動の源である Prestin の機能を明らかにすることにより、OHC の駆動メカニズムに関する重要な知見が得られれば、OHC 機能不全由来の内耳疾患の原因解明及びその遺伝子治療などにつながると考えている。

そこで、本研究では遺伝子工学的手法を用いて、Prestin の機能発現に重要な役割を果たしている部位の同定を目指す。この度、N 末端細胞内領域および、C 末端側に存在し、遺伝子配列の解析から確認された陰イオン輸送体に共通して存在する配列である STAS（Sulphate Transporters and Antisigmafactor Antagonists）ドメインに注目し、その部分を欠損させ、その際の Prestin の機能を、電気生理学的手法を用いて検討した。その結果、これらの領域を欠損させた場合、Prestin の機能が失われることが明らかになった。

#### A. 研究の背景と目的

図 1 にヒトの耳の模式図を示す。空気の粗密波である音は、外耳道より入り、鼓膜を振動させる。この振動はツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨よりなる耳小骨連鎖を経て、内耳蝸牛へと伝えられる。蝸牛内はリンパ液で満たされており、耳小骨連鎖より伝えられた振動は、リンパ液の振動へと変換される。

蝸牛内にはコルチ器という器官が存在する（図 2）。コルチ器は基底板上に存在し、上述のリンパ液の振動により、コルチ器は上下に振動する。コルチ器には、内有毛細胞と、外

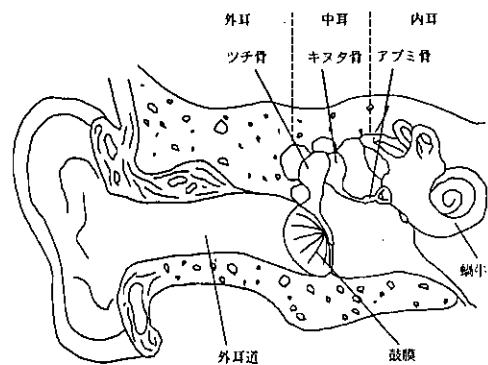


図 1. ヒトの耳の模式図

有毛細胞(OHC)と呼ばれる感覚細胞が存在する。これらの有毛細胞の上端には聴毛が並んでおり、コルチ器の振動により、この聴毛が屈曲する。内有毛細胞では聴網の屈曲に伴って、そこに存在するイオンチャンネルが開き、陽イオンが流入することで細胞内電位が上昇し、聴神経を発火させる。この信号が脳へと伝えられることで、我々は音を認識する。この際、コルチ器の振動は非常に微小なものである。もう一つの有毛感覚細胞である外有毛細胞はコルチ器の振動に伴って、内有毛細胞と同様に細胞内電位を変化させる。これにより、外有毛細胞はその細胞長を変化させる。この細胞長変化は、コルチ器の振動を増幅させる。この機構により我々の聴覚は鋭敏なものとなっている。

外有毛細胞は図3のように円筒形をしており、その半径は4–5 $\mu\text{m}$ 、長さは20–90 $\mu\text{m}$ である。外有毛細胞の側壁は細胞膜、細胞骨格、subsurface cisternaeの三層からなる。細胞膜にはタンパク質モータが存在しており、このモータが細胞内外の電位差に応じてその立体構造を変化させることにより、上述の細胞長変化を実現していると考えられている。2000年にZhengらによってこのタンパク質モータの遺伝子が同定され、prestinと命名された。さらに、Libermanら(2002)は、聴性脳幹反応の閾値がprestinノックアウトマウスでは、野生型のマウスに比べて上昇することを示した。このことは、prestinが、聴覚を鋭敏なものとするに重要な役割を果たしていることを示している。また、昨年ヒトPrestin遺伝子変異が遺伝性難聴の原因であることも報告された。分子的観点から見ると、Prestinはその遺伝子配列から分子量が約82kDa、744残基の膜貫通型タンパク質であり、陰イオン輸送体の

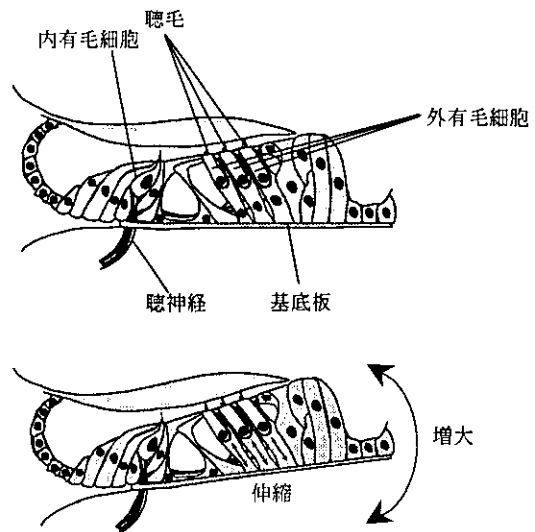


図2. コルチ器と外有毛細胞によるその振動増幅。外有毛細胞の伸縮運動によりコルチ器の振動は増幅される。

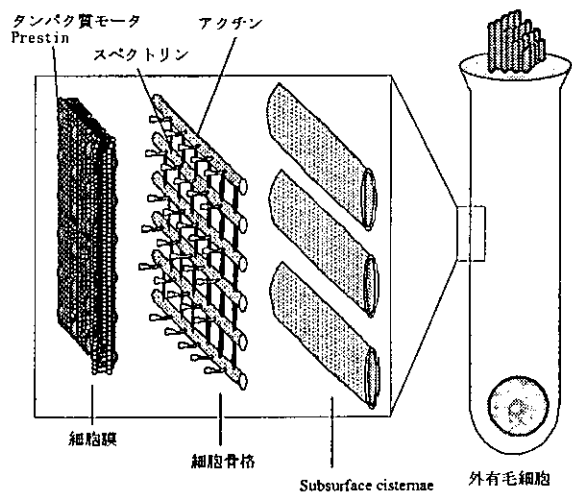


図3. 外有毛細胞の模式図。外有毛細胞の側壁は3層からなり、一番外側の細胞膜にはタンパク質モータ Prestin が存在する。

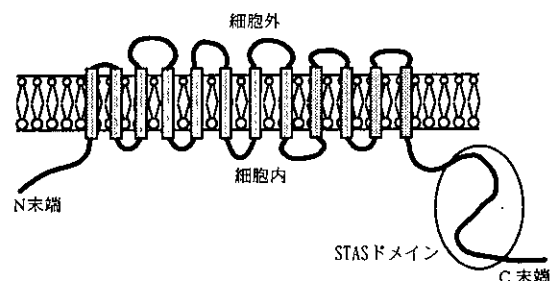


図4. タンパク質モータ Prestin の2次構造

このように我々の聴覚では、外有毛細胞による蝸牛増幅機構が重要な役割を果たしている。しかし、この OHC は一度消失すると再生しない。また、老人性難聴は OHC の機能低下およびその一部の脱落によると考えられている。現在、内耳疾患の治療率が低い最大の原因は、内耳増幅機構、すなわち、OHC の伸縮メカニズムが不明なためである。従って、聴覚にとって重要な役割を果たしている OHC の伸縮運動の源を担っている、タンパク質モーター Prestin の機能を明らかにし、OHC の駆動メカニズムを解明する必要がある。そのため、Prestin の機能発現部位を同定することが必要不可欠である。そこで、本研究では遺伝子工学的手法を用いて、Prestin の機能発現に重要な役割を果たしている部位の同定を目指す。

### B. 1. Prestin を安定発現する細胞株の作製

本研究には動物実験および組換え DNA 実験が含まれる。動物実験は「東北大学におけ

## B. 2. 変異 prestin 遺伝子の作製

上述の Prestin 遺伝子を鋳型とし、KOD-Plus DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用いて PCR 法により、N 末端細胞内領域より下流をコードする DNA を増幅した。この際、増幅された DNA の 5' 末端と 3' 末端にはそれぞれ *Bam*HI、*Eco*RI の制限酵素サイトを付加した。増幅した DNA および哺乳類発現ベクター pIRES-hrGFP-1a を、制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RI により消化後、この 2 つを T4 DNA ligase を用いて結合させた。反応後のプラスミドベクターを、大腸菌 JM109 株を用いてクローニング、増幅し、精製した。構築した発現ベクターの挿入部分の塩基配列を、DNA シーケンサー ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いて確認した。

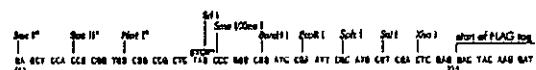
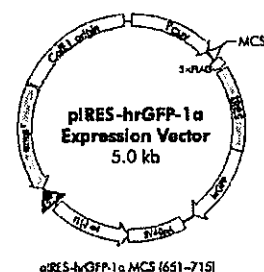


図 5. pIRES-hrGFP-1a 哺乳類発現ベクター

### B. 2. 2. STAS ドメイン欠損変異 Prestin 遺伝子

C 末端側に存在し、遺伝子配列の解析から確認された陰イオン輸送体に共通して存在する配列である STAS (Sulphate Transporters and Antisigmafactor Antagonists) ドメイン欠損変異 Prestin の作製には Overlap extension PCR 法を用いた。N 末端欠損 Prestin の作製と同様に野生型 Prestin 遺伝子を鋳型とした。まず、STAS ドメインの上流側領域と下流側領域をそれぞれ別に PCR 法によって増幅した。この際、上流側領域と下流側領域が 20bp 重複するように増幅させた。こうして得られた 1 次 PCR 産物を混合し、2 次 PCR を行うことで、重複部位で 2 種類の PCR 産物は接合し、増幅する。このようにして得られた PCR 産物を N 末端欠損変異 Prestin と同様の手法で哺乳類発現ベクターに挿入し、増幅後、精製し、塩基配列の確認を行った。

### B. 3. 哺乳類細胞への遺伝子導入

培養細胞は CHO-K1 細胞を用いた。B.1.で述べた方法と同様にして、この CHO-K1 細胞に、構築した変異 Prestin の発現ベクターを導入した。本研究で用いた、発現ベクター pIRES-hrGFP-1a には GFP (Green fluorescent protein) の遺伝子が挿入されており、遺伝子導入の有無は GFP の緑色蛍光を蛍光顕微鏡で観察することで確認できる。

### B. 4. パッチクランプ法による機能評価

CHO-K1 細胞に発現した Prestin の活性を評価するため、ホールセルパッチクランプを行い、電位依存性膜容量を計測した。Prestin が存在する細胞では、膜容量がベル型と呼ばれる電位依存性の非線形膜容量を表すことが知られており、計測によってベル型の非線形膜

容量が計測されるか否かで Prestin の活性を評価できる (図 5)。

計測には Axopatch 200B パッチクランプ用アンプ (Axon Instruments) を使用し、pCLAMP 8.0 ソフトウェアの membrane test モードを利用して、膜電位を -140 mV から +70 mV まで変化した時の膜容量を計測した。電極はガラス管より作製した、アクセス抵抗が 2-3 M $\Omega$  のものを用いた。ガラス電極内は細胞内溶液 (140 mM KCl, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EGTA, 5 mM HEPES, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM Na<sub>2</sub>ATP, P.H.7.3) で満たした。また、細胞外溶液は 145 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, P.H.7.3 のものを用いた。遺伝子導入から約 24 時間後に蛍光顕微鏡 TE300 (NIKON) を用いて、GFP の蛍光観察から、遺伝子導入された細胞を選択し、計測を行った。

### B.5. 原子間力顕微鏡による OHC 側壁の観察

聴覚のメカニズムにおいて非常に重要な役割を果たす OHC の Prestin が局在する場所である側壁を、生理的環境下において生体試料の形態観察が可能な原子間力顕微鏡を用いて観察した。

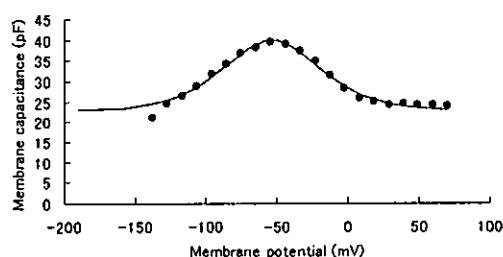


図 6. 外有毛細胞の電位依存性膜容量。外有毛細胞では Prestin が存在するため、電位変化に対してベル型非線形な膜容量を示す。

体重 200 から 300 g のモルモットより単離した外有毛細胞を用いた。単離した外有毛細胞は、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、また同時に 2.5% Triton X-100 で細胞膜の透過処理を行った。その後、0.1 M リン酸緩衝液で 3 回リンスし、原子間力顕微鏡で液中観察を行った。また、スペクトリンの存在を同定するため、アクチンとスペクトリンの結合を減少させるジアミドを 2 もしくは 5 mM 含む溶液により処理した標本も同様に作製した。

観察には原子間力顕微鏡 NVB100 (Olympus) を使用した。探針には先端がピラミダル形状、バネ定数が 0.08 N/m、先端の曲率半径は 20  $\mu\text{m}$  以下である、三角形シリコンニトロイドカンチレバー (OMCL-TR400PSA-2, Olympus) を用いた。計測は接触時間を短くかつ摩擦抵抗を少なくすることができることから生体観察に適する、探針を共振周波数付近で振動させながらスキャンするタッピングモードを用いた。

すべての画像は、Digital Instruments (Santa Barbara) のプログラムを用いて行った。スキャンラインの分散やバックグラウンドノイズを消すために、平滑化を行った。その後、画像を鮮明にするため、コントラストを上げた。表面形状の情報は、断面解析によって取得し、隣接するフィラメント間隔を求めた。

#### B.6. 有限要素法を用いたコルチ器の振動解析

コルチ器の複雑な構造を再現すると共に、その周囲に存在するリンパ液も考慮した、コルチ器断面の 2 次元有限要素法モデルを構築し、コルチ器の周波数特性の予測と外有毛細胞による増幅メカニズムの解明を試みた。スナネズミの蝸牛基底回転におけるコルチ器形状の計測データを基に、コルチ器モデルの形

状を決定した。計測値が報告されている部位のヤング率については、その値を採用した。一方、報告の無い部位については、報告されているコルチ器を静的に変形させた際のステイフネスの計測値と、FEM 解析による結果が等しくなる様にそのヤング率を決定した(図 7)。

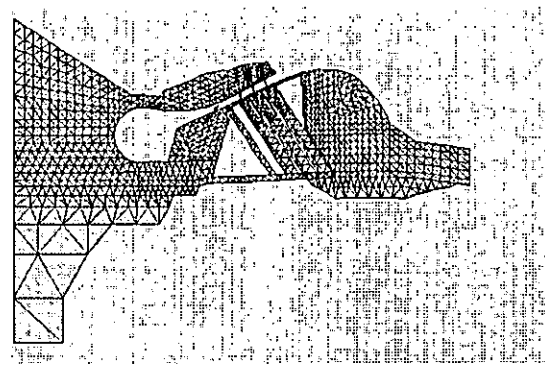


図 7. 構築したコルチ器の有限要素モデル

### C. 研究結果および考察

#### C.1. 変異 Prestin の機能評価

はじめに、構築した野生型 Prestin を安定発現する細胞株を用いて、パッチクランプ法により、野生型 Prestin が示す電位依存性膜容量の特性を計測した。野生型 Prestin を導入した細胞では、Prestin の機能に由来する特徴的なベル型非線形な膜容量が計測された (図 8)。一方、遺伝子導入していない細胞 CHO 細胞では電位変化に対して一定の膜容量を示した。Prestin に由来する非線形な膜容量は、

$$C_m(V) = C_{lin} + \frac{Q_{max}}{\alpha e^{\frac{V-V_{1/2}}{\alpha}} \left( 1 + e^{-\frac{V-V_{1/2}}{\alpha}} \right)^2} \quad (1)$$

に示すボルツマン関数によくフィッティングすることが知られている。ここで、 $C_{lin}$  は膜容量の線形成分、 $Q_{max}$  は電荷移動量の最大値、 $\alpha$  は傾斜因子、 $V_{1/2}$  は Prestin の半分が活性化さ

れる電位である。計測結果より、野生型 Prestin で(1)式に対するフィッティングパラメータを求めると、 $C_{lin} = 19.6 \pm 4.3$  pF,  $Q_{max} = 66.9 \pm 50.0$  fC,  $\alpha = 36.0 \pm 7.7$  mV and  $V_{1/2} = -55.4 \pm 10.7$  mV ( $n = 17$ , mean  $\pm$  SD)となった。

次に、N 末端細胞内領域を欠損させた Prestin、または STAS ドメイン欠損させた Prestin の遺伝子を CHO 細胞に導入した場合では電位依存性の非線形膜容量は計測されなかった (図 9)。

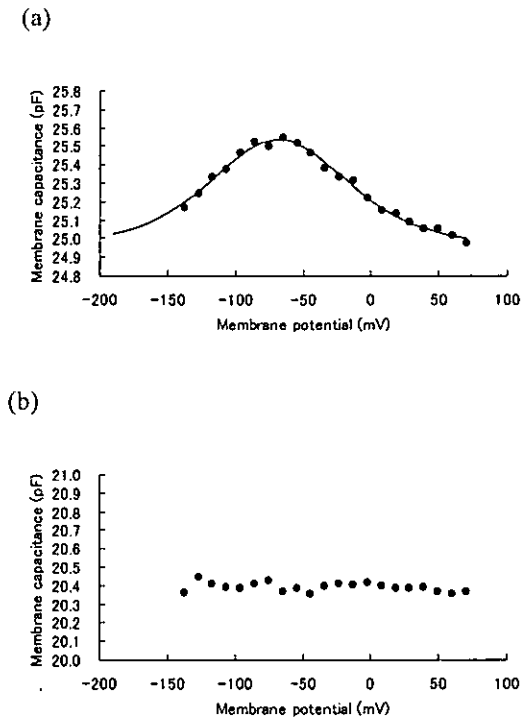


図 8. 電位依存性膜容量. (a) 作製した Prestin を安定に発現する細胞の膜容量. (b) 遺伝子導入していない CHO 細胞の膜容量. 作製した Prestin を安定に発現する細胞株も特徴的な非線形な膜容量が計測された。一方、遺伝子導入していない CHO 細胞では電位変化に対して一定な膜容量を示した。

これらの結果より、N 末端細胞内領域、または STAS ドメインの欠損により、Prestin のモータとしての機能が失われることが明らかになった。このことから、これら領域が、構造変化という Prestin の機能に深く関わっていることが示唆された。

過去の報告で、Prestin の機能が失われるとおよそ 40 dB の聴力損失がおこることが報告されている。以上の結果から、N 末端細胞内領域、または STAS ドメインに突然変異が起ると、遺伝性難聴が引き起こされる可能性が

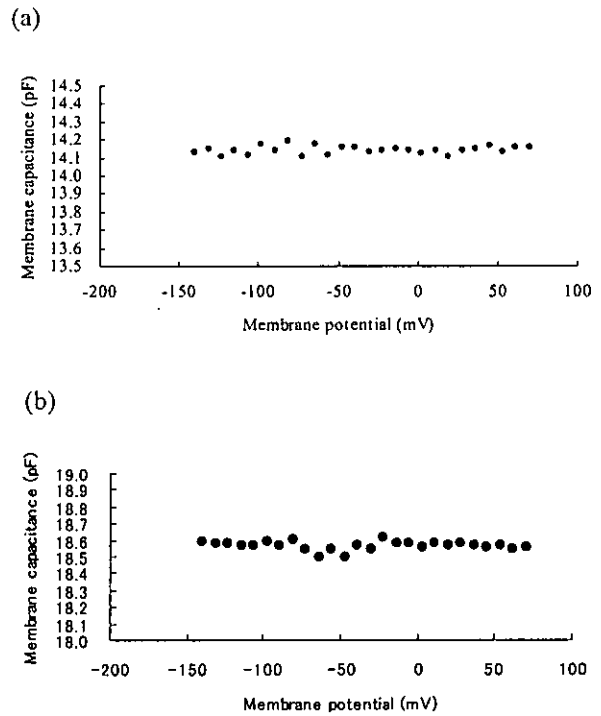


図 9. 変異 Prestin を導入した CHO 細胞の電位依存性膜容量. (a) N 末端細胞内領域欠損 Prestin. (b) STAS ドメイン欠損 Prestin. いずれの部位を欠損させた場合も、特徴的なベル型非線形の膜容量が失われた。従って、これらの変異によりモータとしての機能が失われることが明らかになった。

あることが示唆された。しかしながら、N 末端細胞内領域および STAS ドメイン内の、どのアミノ酸の変異が難聴を引き起こすかは明らかになっていない。今後アミノ酸レベルでの変異 Prestin を作製し、その解明を行う必要がある。また、本研究においては N 末端細胞内領域と STAS ドメインに注目し、評価を行った。しかし、その他の部位にも Prestin の活性に重要な部位は存在すると考えられる。それらの探索も今後行っていく必要がある。

### C.2. OHC 細胞骨格の形態観察

Triton X-100 で細胞膜を剥がしグルタールアルデヒドで固定した OHC の細胞骨格を、AFM で観察した。図 10 (a)は観察された細胞骨格の AFM イメージを表す。図 10 (b)は図 10 (a)で観察された繊維を表す模式図である。図 (a)において、明るい領域は試料において高い位置を示しており、横方向は OHC の長軸方向に対応している。この画像より、細胞骨格はいくつかのドメイン構造を形成していることが分かる。それぞれのドメインにおいて、比較的太い円周方向のフィラメントがほぼ並行に走査しているのが分かる。また、フィラメント間は、規則正しく、また場所によっては不規則に、より細いフィラメントによって架橋されている。このようなドメイン構造と 2 種類のフィラメントからなる格子構造は、OHC 側壁の全ての場所において観察された。ドメイン内における円周方向のフィラメント間の間隔は、を OHC 底部から中央部の領域と、頂部の領域ではそれぞれ、 $51.5 \pm 9.78 \text{ nm}$  ( $n = 550$ , mean  $\pm$  SD),  $47.0 \pm 10.2 \text{ nm}$  ( $n = 352$ )となった。同様にクロスリンクの間隔はそれぞれ、 $24.9 \pm 6.85 \text{ nm}$  ( $n = 214$ ),  $25.7 \pm 7.29 \text{ nm}$  ( $n = 86$ )であ

った。また、ジアミド処理した試料においては、クロスリンクが観測されなくなった。

これらの結果、OHC 細胞骨格は異なるドメイン構造から形成されており、また円周方向のフィラメントは、クロスリンクで架橋されていることを原子間力顕微鏡を用いて初めて示した。クロスリンクはお互いに平行ではなく、また枝分かれているが、円周方向のフィラメントは各ドメイン内において、ほぼ並行に走査している。またジアミド処理によってクロスリンクが観測されなくなったことから、このフィラメントがスペクトリンであると考えられる。

### C.3. 有限要素法を用いたコルチ器の振動解析

外有毛細胞の聴毛の屈曲に対する力発生の位相を変化させ、OHC の伸縮運動による増幅メカニズムを解析した。その結果、外有毛細胞による力発生の位相を-135 度とした際に、基底板の振動振幅は最も大きくなり、計測結果と同等の増幅率となる事が示唆された。

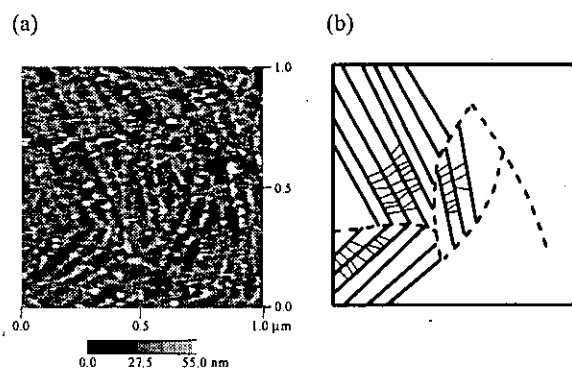


図 10. 原子間力顕微鏡を用いた OHC 側壁の観察。

(a) 観察画像。 (b) 画像に見られる繊維を表す模式図。不連続で方向の異なるドメインが存在し、ドメイン内ではアクチン繊維の方向が揃っており、その間をスペクトリンが接続している細胞骨格が観察された。

#### D. 結論

N 末端細胞内領域または, STAS ドメインに突然変異が起こると, Prestin の構造変化という機能が失われることが明らかになった. したがって, これらの部位に突然変異が起こると遺伝性難聴が引き起こされる可能性が示唆された.

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Sugawara, M., Ishida, Y., Wada, H., Mechanical properties of sensory and supporting cells in the organ of Corti of the guinea pig cochlea-study by atomic force microscopy, Hearing Research, in press.
2. Wada, H., Kimura, K., Sugawara, M., Katori, Y., Kakehata, S., Ikeda, K., Kobayashi, T., Imaging of the cortical cytoskeleton of guinea pig outer hair cells using atomic force microscopy, Hearing Research, 2004, 187, 51-62.
3. Andoh, M., Wada, H., Dynamic characteristics of the force generated by outer hair cell motility in the organ of Corti (theoretical consideration), JSME International Journal, 2003, 46C, 1256-1265.
4. Iida, K., Konno, K., Oshima, T., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T., Wada, H., Stable expression of the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells, JSME International Journal, 2003, 46C, 1266-1274.

5. Wada, H., Usukura, H., Sugawara, M., Katori, Y., Kakehata, S., Ikeda, K., Kobayashi, T., Relationship between the local stiffness of the outer hair cell along the cell axis and its ultrastructure observed by atomic force microscopy, Hearing Research, 2003, 177, 61-70.

##### 学会発表

1. Masayoshi Andoh, Hiroshi Wada, Dynamic behavior of the organ of Corti: Theoretical consideration, Eleventh International Congress on Sound and Vibration, St. Petersburg, Russia (July 2004).
2. Michio Murakoshi, Hiroshi Wada, Mechanical properties of outer hair cell in heat-stressed mice -atomic force microscopy study-, Eleventh International Congress on Sound and Vibration, St. Petersburg, Russia (July 2004).
3. Masayoshi Andoh, Hiroshi Wada, Frequency characteristics of fast and slow waves in the cochlea: a finite element analysis, The 18th International Congress on Acoustics, Kyoto, Japan (April 2004).
4. Hiroshi Wada, Takashi Gomi, Michiko Sugawara, Izumi Kumagai, Katsuhisa Ikeda, Atomic force microscopic imaging of the lateral wall of the guinea pig outer hair cell, First Asian Pacific Biomechanics Conference, Osaka, Japan (March 2004).
5. Koji Iida, Kouhei Tsumoto, Izumi Kumagai, Hiroshi Wada, Expression system of prestin and characterization of CHO cells stably expressing prestin, The 27th Association for Research in Otolaryngology Midwinter

Meeting, Daytona Beach, Florida, U.S.A.  
(February 2004).

6. Masayoshi Andoh, Hiroshi Wada,  
Estimation of the amplitude and phase of the  
force generated by the outer hair cell  
motility using a finite-element model of the  
organ of Corti, The 27th Association for  
Research in Otolaryngology Midwinter  
Meeting, Daytona Beach, Florida, U.S.A.  
(February 2004).
7. 飯田浩司, 津本浩平, 熊谷泉, 和田仁,  
ファージディスプレイ法を用いた抗プレ  
スチン抗体の作製, 日本機械学会第 16  
回バイオエンジニアリング講演会, 北九  
州 (2004 年 1 月).
8. 五味誉人, 菅原路子, 和田仁, 原子間力  
顕微鏡による外有毛細胞側壁に存在する  
タンパク質モータプレスチンの観察, 第  
16 回バイオエンジニアリング講演会, 北  
九州 (2004 年 1 月).
9. 五味誉人, 菅原路子, 和田仁, 原子間力  
顕微鏡を用いた外有毛細胞側壁部の観察,  
第 14 回バイオフィロンティア講演会, 宮城  
(2003 年 9 月).
10. 飯田浩司, 津本浩平, 熊谷泉, 和田仁,  
タンパク質モータ Prestin の発現系の構築,  
日本機械学会 2003 年度次大会, 徳島  
(2003 年 8 月).

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Iida, K., Konno, K., Oshima, T., <u>Tsumoto, K.</u> , <u>Ikeda, K.</u> , <u>Kumagai, I.</u> , <u>Kobayashi, T.</u> , <u>Wada, H.</u>	Stable expression of the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells	JSME International Journal	46C	1266-1274	2003
<u>Wada, H.</u> , Kimura, K., Sugawara, M., Katori, Y., Kakehata, S., <u>Ikeda, K.</u> , <u>Kobayashi, T.</u>	Imaging of the cortical cytoskeleton of guinea pig outer hair cells using atomic force microscopy	Hear. Res.	187	51-62	2004
Andoh, M., <u>Wada, H.</u>	Dynamic characteristics of the force generated by outer hair cell motility in the organ of Corti (theoretical consideration)	JSME International Journal	46C	1256-1265	2003

20030584

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。