

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16年度 総括研究報告書

主任研究者 和田 仁

平成17(2005)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	6
D. 考察	8
E. 結論	11
F. 健康危険情報	11
G. 研究発表	11
H. 知的財産権の出願・登録状況	13
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
III. 研究成果の刊行物・別刷	15

厚生労働省科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総括研究報告書

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

我々の聴覚の鋭敏さは、蝸牛内コルチ器に存在する外有毛細胞（Outer Hair Cell: OHC）の伸縮運動により実現され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 の機能を明らかにし、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。

本研究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。そこで、N 末端側の細胞内領域、C 末端側に存在し、Prestin が属する陰イオン輸送体（SLC26a）ファミリーに共通して存在する配列である STAS（Sulphate Transporters and Antisigmafactor Antagonists）ドメイン、及び SLC26a ファミリーのうち6つのタンパク質で完璧に保存されているアミノ酸配列 GTSRH に注目し、これらの部分を欠損または変異させた Prestin を作製した。その後、変異体の特性を、Western blotting, 免疫蛍光染色法そしてパッチクランプ法を用いて検討した。その結果、これらの領域を欠損または変異させた場合、Prestin の特性が変化することが明らかになった。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

小林利光・東北大学・教授

熊谷 泉・東北大学・教授

池田勝久・順天堂大学・教授

津本浩平・東京大学・助教授

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、内耳蝸牛に伝えられる。蝸牛内はリンパ液で満たされており、アブミ骨より伝えられた振動は、リンパ液の圧力変動へと変換される。

蝸牛内をらせん状に走る基底板上にはコルチ器という器官が存在する（図 2）。上述のリンパ液の圧力変動により、コルチ器は上下に振動する。コルチ器には、内有毛細胞（IHC）と、外有毛細胞(OHC)と呼ばれる 2 種類の感覚有毛細胞

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、外耳道を通り、鼓膜を振動させ

胞が存在し、コルチ器の振動により、有毛細胞上端に存在する聴毛が屈曲する。IHC では聴毛の屈曲に伴って、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。これにより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達されることで、我々は音を認識する。もう一つの感覚有毛細胞である OHC ではコルチ器の振動に伴い、IHC と同様に細胞内電位が変化する。この電位変化を感知し OHC は自ら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する。この増幅機構により我々は鋭敏な聴覚を得ている。

OHC 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。OHC 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密に存在し、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、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。これは Prestin が、聴覚の鋭敏性に重要な役割を果たしていることを示している。また、2003 年に遺伝性難聴を引き起こすヒト Prestin 遺伝子の変異が報告された。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 82 kDa、744 残基の膜貫通型タンパク質であり、陰イオン輸送体 (SLC26a) のスーパーファミリーのメンバーであると考えられている(図 4)。我々の聴覚において、OHC による蝸牛増幅機構は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

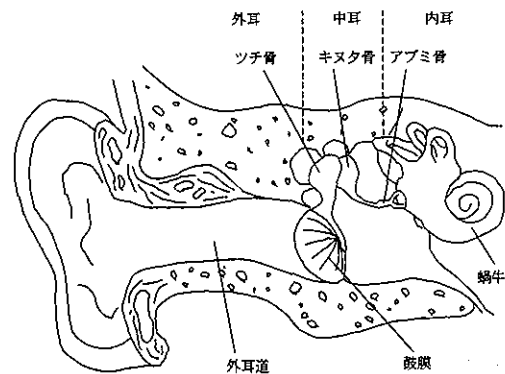


図 1. ヒトの耳の模式図。

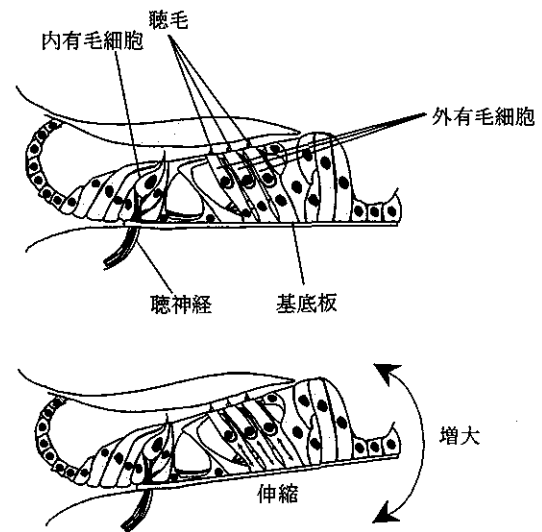


図 2. コルチ器と外有毛細胞によるその振動増幅。外有毛細胞の伸縮運動によりコルチ器の振動は増幅される。

疾患の治癒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 Prestin の機能を明らかにし、OHC の駆動メカニズムを解明することは内耳疾患の原因解明及びその治療にとって重要な意味を持つ。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。

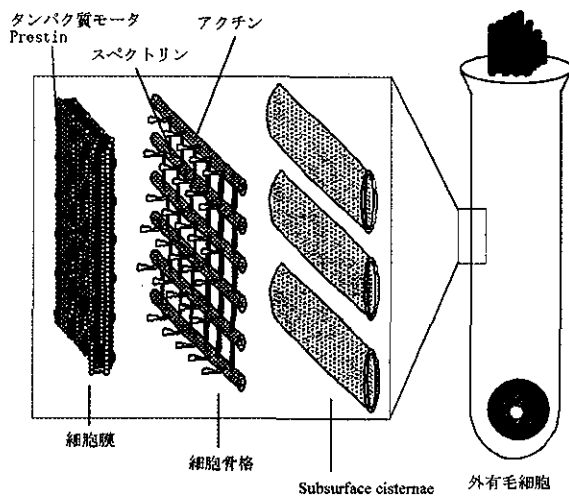


図 3. 外有毛細胞の模式図. 外有毛細胞の側壁は3層からなり, 一番外側の細胞膜にタンパク質モーター Prestin が存在する.

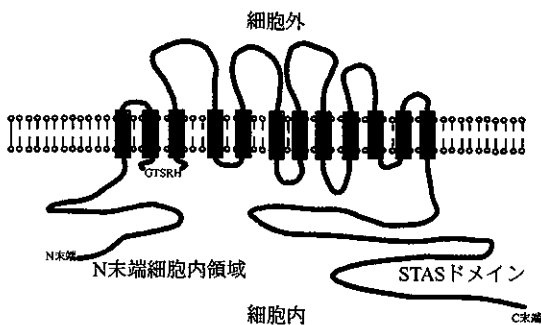


図 4. タンパク質モーター Prestin の2次構造予測図

## B. 研究方法

### B. 1. 変異 Prestin 遺伝子の作製

#### B. 1. 1. N 末端側の細胞内領域欠損 Prestin 遺伝子

N 末端側の細胞内領域 (図 4) は他のタンパク質やイオンと相互作用している可能性がある。そこで、この領域の果たす役割を検討するため、N 末端側の細胞内領域欠損変異体を作製した。

変異遺伝子作製には PCR 法を用いた。N 末端側の細胞内領域より下流をコードする DNA を KOD-Plus DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) を用い増幅した。この際、増幅された DNA の 5'末端と 3'末端に、それぞれ *Bam*HI, *Eco*RI

の制限酵素サイトを付加するよう設計したプライマーを用いた (表 1, N-terminal forward, 3'end reverse)。PCR 産物および哺乳類発現ベクター pIRES-hrGFP-1a (図 5) 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。

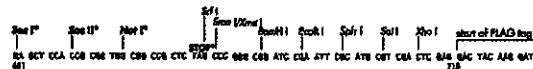
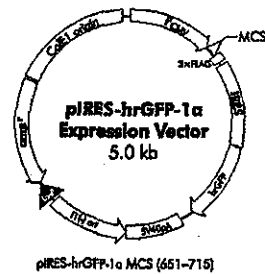


図 5. 哺乳類発現ベクター pIRES- hrGFP-1a

#### B. 1. 2. STAS ドメイン欠損 Prestin 遺伝子

SLC26a ファミリーに共通して存在する配列である STAS (Sulphate Transporters and Antisigmafactor Antagonists) ドメイン (図 4) は、Prestin において C 末端側に存在し、イオン輸送機能に重要な領域である可能性がある。そこで、この領域の果たす役割を検討するため、STAS ドメイン欠損変異体を作製した。

変異遺伝子作製には Overlap extension PCR 法を用いた。N 末端側の細胞内領域欠損 Prestin 遺伝子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

(表 1, 5' end forward, STAS reverse 及び STAS forward, 3' end reverse). 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. 1. 3. 部位特異的変異を導入した Prestin 遺伝子

127 番目のアミノ酸から始まる GTSRH 配列は Prestin が属する SLC26a ファミリーのうち 6 種類のタンパク質で保存されている配列である. さらに, この配列内のセリン(S)がスレオニン(T)に変わる変異が SLC26a ファミリーの一つである Pendrin で起こると, Pendred 症候群と呼ばれる症候群性難聴を引き起こすことが知られている. このため, この配列がイオン輸送に大きく関わっている可能性がある. そこで, この配列の果たす役割を検討するため, GTSRH をそれぞれアラニン(A)に変異させた Prestin (G127A, T128A, S129A, R130A, H131A) 及び S を T に変異させた Prestin (S129T) を作製した.

変異遺伝子作製には Overlap extension PCR 法を用いた. 野生型 Prestin 遺伝子を鋳型とした. 上流側領域と下流側領域を変異させたいアミノ酸をコードするコドン付近で 25bp ほど重複するように増幅させた. この際, プライマーにより, 対象のコドンを A または T をコードするように変異させた (表 1, 5' end forward, G127A reverse 及び G127A forward, 3' end reverse 等). このようにして得られた PCR 産物を STAS ドメイン欠損変異 Prestin 遺伝子の作製と同様に Overlap extension PCR 法で接合後, 哺乳類発現ベクターに挿入した. さ

ら, 作製したベクターを増幅, 精製し, 塩基配列の確認を行った.

### B. 1. 3. FLAG 融合 Prestin 遺伝子

後述する Western blotting 及び免疫蛍光染色法を行うために, 抗原となる FLAG ペプチドを C 末端に融合した Prestin を作製した.

pIRES-hrGFP-1a ベクターには, *XhoI* サイトの直後に FLAG ペプチドの遺伝子が挿入されている. そこで, 作製したそれぞれの変異遺伝子を鋳型にし, 5'末端と 3'末端にそれぞれ *BamHI*, *XhoI* サイトが付加するように PCR 法で増幅した (表 1, 5' end forward, 3' end FLAG reverse). 増幅した DNA および pIRES-hrGFP-1a を, *BamHI* と *XhoI* により消化後, 結合させた. さらに, 作製したベクターを増幅, 精製し, 塩基配列の確認を行った.

### (倫理面への配慮)

本研究には組換え DNA 実験が含まれる. 組換え DNA 実験に関しては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき, 学内の倫理委員会にて組換え DNA 実験計画書の承認を得た上で実験を行った. 具体的には P2 レベルの基準を適正に満たしている実験室を利用し, 安全性に最大限の配慮をした.

### B. 2. 哺乳類細胞への遺伝子導入

実験には HEK293 細胞を用いた. 細胞は 10%ウシ胎児血清, 100 U penicillin/ml, 100 mg streptomycin/ml を加えた RPMI-1640 培養液を用いて培養した. 作製した遺伝子はそれぞれ LipofectAMIN2000 (Invitrogen) を用いて, HEK293 細胞に導入した. 本研究で用いた, 発現ベクター pIRES-hrGFP-1a には Green fluorescent

表 1. 変異体作製に用いたプライマーの配列

Name	Sequence
N-terminal forward	5' CGGGATCCATGGTGTGGGTGACTTGGTTTCAG 3'
3' end reverse	5' GGAATTCTTATGCCTCGGGTGTGGTGG 3'
5' end forward	5' CGGGATCCATGGATCATGCCGAAGAAAAATG 3'
STAS forward	5' GACATAGACCATGTTTCGAGAGGCAATGGCTG 3'
STAS reverse	5' CTCGAACATGGTCTATGTCAATGTATAACATCGGTGTC 3'
3'end FLAG reverse	5' CCGCTCGAGTGCCTCGGGTGTGGTGGG 3'
G127A forward	5' CTGTTTCTTTGCGACCTCCAGAC 3'
G127A reverse	5' GTCTGGAGGTCGCAAAGAAACAG 3'
T128A forward	5' GTTTCTTTGGGGCCTCCAGACAC 3'
T128A reverse	5' GTGTCTGGAGGCCCAAAGAAAC 3'
S129A forward	5' CTTTGGGACCGCCAGACACATATC 3'
S129A reverse	5' GATATGTGTCTGGCGGTCCCAAAG 3'
R130A forward	5' CTTTGGGACCTCCGCACACATATCTATAG 3'
R130A reverse	5' CTATAGATATGTGTGCGGAGGTCCCAAAG 3'
H131A forward	5' GGGACCTCCAGAGCCATATCTATAGG 3'
H131A reverse	5' CCTATAGATATGGCTCTGGAGGTCCC 3'
S129T forward	5' CTTTGGGACCACCAGACACATATC 3'
S129T reverse	5' GATATGTGTCTGGTGGTCCCAAAG 3'

protein (GFP)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. 3. Western blotting

変異プレスティンの発現及び発現したタンパク質の分子量を評価するために SDS-PAGE 及び Western blotting を行った。野生型 Prestin または変異 Prestin を発現した HEK293 細胞を溶解し、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、分子量ごとに分離し、タンパク質をニトロセルロース膜に転写した。抗 FLAG 抗体及び HRP 標識抗マウス IgG 二次抗体を用いて Prestin を標識し、化学発光により検出した。

### B. 4. 免疫蛍光染色法

野生型 Prestin または変異 Prestin を発現した細胞をパラホルムアルデヒドで固定後、調整乳タンパク質を用いて非特異吸着をブロックした。界面活性剤による処理を行い、抗 FLAG 抗体及び TRITC 標識抗マウス IgG 二次抗体で蛍光染色した。共焦点顕微鏡 FV500 (Olympus) を用い GFP の緑色蛍光により遺伝子導入された細胞を選択し、標識抗体の蛍光を観察した。

### B. 5. パッチクランプ法による機能評価

HEK293 細胞に発現した Prestin の活性を評価するため、パッチクランプ法により、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

存性の非線形性を示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、及び計測されたベル型の形で Prestin の活性を評価できる。

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 まで変化させた時の膜容量を計測した。電極はポロシリケート管より作製した、アクセス抵抗が 2-4 M $\Omega$  のものを用いた。ピペット内溶液の組成は 140 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7.2 である。また、細胞外溶液は 120 mM NaCl, 20 mM TEA-Cl, 2 mM CoCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5 mM glucose, pH 7.2 のものを用いた。

遺伝子導入から 24-48 時間後に蛍光顕微鏡 TE300 (NIKON) を用いて、GFP の蛍光が観

察される細胞、すなわち遺伝子導入された細胞を選択し、電位依存性膜容量の計測を行った。

## C. 研究結果

### C.1. Western blotting

FLAG 融合野生型, FLAG 融合 N 末端側の細胞内領域欠損変異体, そして FLAG 融合 STAS ドメイン欠損変異体の Western blotting の結果を図 6 に示す。アミノ酸配列 GTSRH に変異を加えた 6 種類の FLAG 融合部位特異的変異体の結果を図 7 に示す。FLAG 融合野生型, FLAG 融合 N 末端側の細胞内領域欠損変異体, FLAG 融合 STAS ドメイン欠損変異体そして FLAG 融合部位特異的変異体の理論分子量はそれぞれ約 84.6 kDa, 75.4 kDa, 63.6 kDa, 84.6 kDa である。

Western blotting の結果、野生型では 100 kDa と 70 kDa, N 末端側の細胞内領域欠損変異体は 175 kDa と 60 kDa, STAS ドメイン欠損変異体

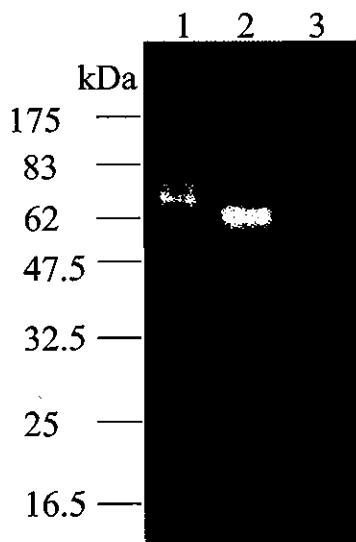


図 6. 欠損変異体の Western blotting の結果。Lane1: 野生型 Prestin. Lane2: N 末端側の細胞内領域欠損 Prestin. Lane3: STAS ドメイン欠損 Prestin. いずれの変異体も細胞に発現した。

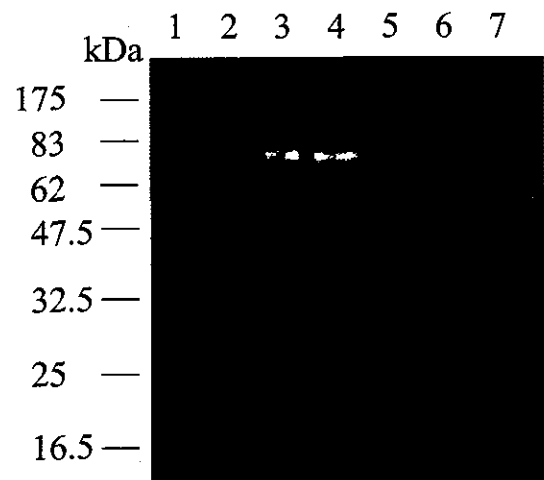


図 7. 部位特異的変異体の Western blotting の結果。Lane 1: 野生型 Prestin. Lane 2: G127A. Lane 3: T128A. Lane 4: S129A. Lane 5: R130A. Lane 6: H131A. Lane 7: S129T. いずれの変異体も細胞に発現した。



は 50 kDa と 45 kDa の位置にメジャーバンドがそれぞれ現れている。一方で部位特異的変異体では 80 kDa の位置に一つのバンドが現れている。

## C. 2. 免疫蛍光染色法

FLAG 融合野生型, FLAG 融合 N 末端側の細胞内領域欠損変異体, FLAG 融合 STAS ドメイン欠損変異体そしてアミノ酸配列 GTSRH に変異を加えた 6 種類の FLAG 融合部位特異的変異体の免疫蛍光の結果を図 8 に示す。染色の結果から, 野生型 Prestin, N 末端側の細胞内領域欠損 Prestin, G127A, S129A, R130A, H131A そして S129T は細胞膜上に発現していることが明らかになった。一方, STAS ドメイン欠損 Prestin と T128A は細胞膜上及び細胞質にも発現していることが明らかになった。

## C. 1. 変異 Prestin の機能評価

野生型, Prestin 遺伝子を挿入していないベクター, N 末端側の細胞内領域欠損変異体または STAS ドメイン欠損変異体を発現した HEK293 細胞から得られた細胞膜容量を図 9 に示す。

野生型の遺伝子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 9(a))。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。野生型 Prestin の計測結果を式(1)にフィッティングさせると,  $C_{lin} = 15.0 \pm 5.5$  pF,  $Q_{max} = 310.3 \pm 160.9$  fC,  $\alpha = 30.2 \pm 3.7$  mV and  $V_{1/2} = -63.2 \pm 9.6$  mV ( $n = 42$ , mean  $\pm$  SD)となった。一方, Prestin 遺伝子が挿入されていないベクターを導入した HEK293 細胞では電位変化に対して一定の膜容量を示した (図 9(b))。次に, N 末端側の細胞内領域欠損変異体, または STAS ドメイン欠損変異体の遺伝子を導入した HEK293 細胞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(c), (d))。

アミノ酸配列 GTSRH に変異を加えた 6 種類の部位特異的変異体をそれぞれ発現した

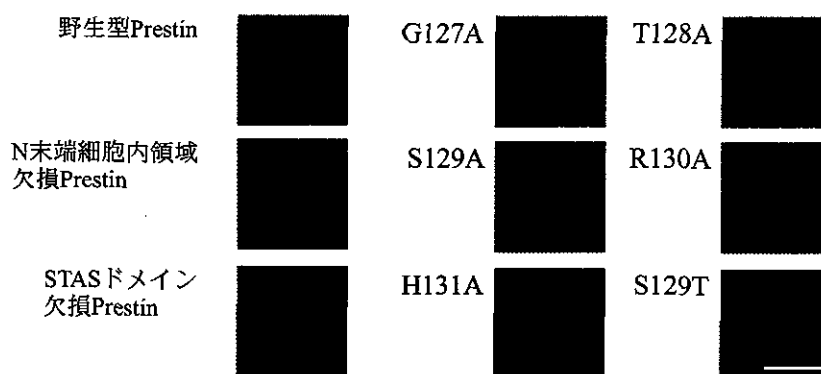
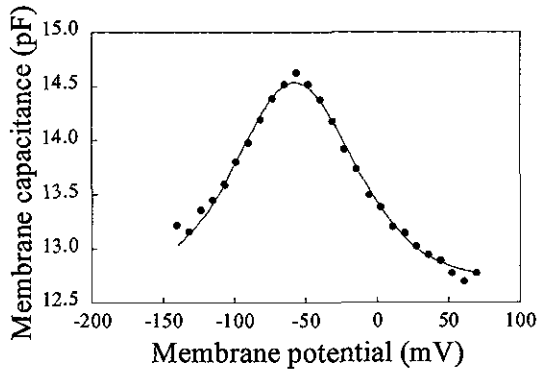
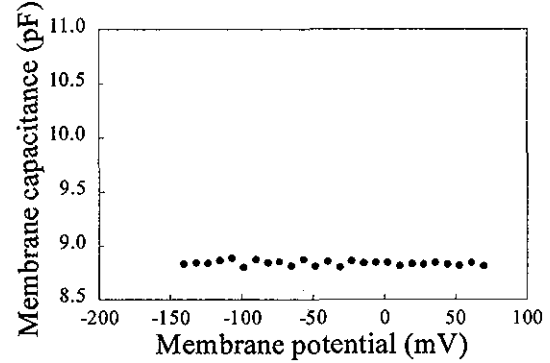


図 8. 免疫蛍光染色画像。スケールバーは 10  $\mu$ m を示す。STAS ドメイン欠損 Prestin と T128A は細胞膜及び細胞質に発現している。その他の変異体と野生型 Prestin は細胞膜に発現している。

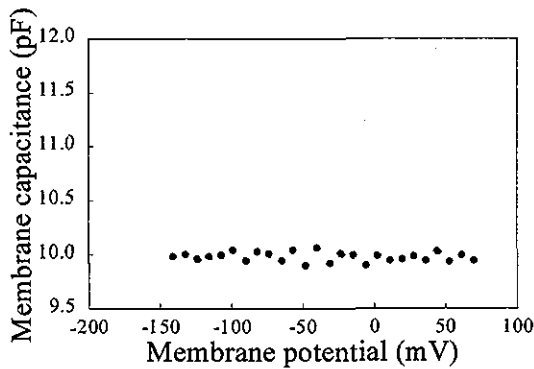
(a) 野生型



(b) Prestinの遺伝子の挿入されていないベクター



(c) N末端細胞内領域欠損体



(d) STASドメイン欠損変異体

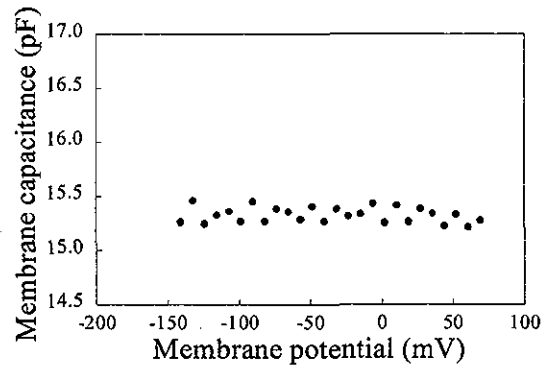


図9. パッチクランプ法の結果. 野生型 Prestin はモータ機能に由来する特徴的なベル型非線形な膜容量が計測された. 欠損変異体はそれを示さなかった. つまり, 変異体より Prestin のモータ機能が失われたことが明らかになった.

HEK293 細胞から得られた細胞膜容量を図 10 に示す. また, これらの計測から得られた式(1) に対するフィッティングパラメータを表 2 に示す. G127A, T128A, S129A そして R130A は非線形膜容量が確認された. しかし, 野生型の  $\alpha$  と G127A, T128A そして R130A のそれは有意に異なった. また野生型の  $V_{1/2}$  と G127A のそれは有意に異なった. 一方 H131A と S129T は非線形膜容量を示さなかった.

## D. 考察

### D.1. Western blotting

過去の報告から, 野生型プレスティンに見られる 100 kDa のバンドは小胞体及びゴルジ体で糖修飾を受けた Prestin を示し, 70 kDa のバンドは糖修飾を受けていない Prestin を示すと考えられた. しかし, このバンドは理論分子量よりも低い位置に現れている. これは Prestin が 12 回膜貫通タンパク質であり疎水性のアミノ酸が多く存在することに起因すると考えられる.

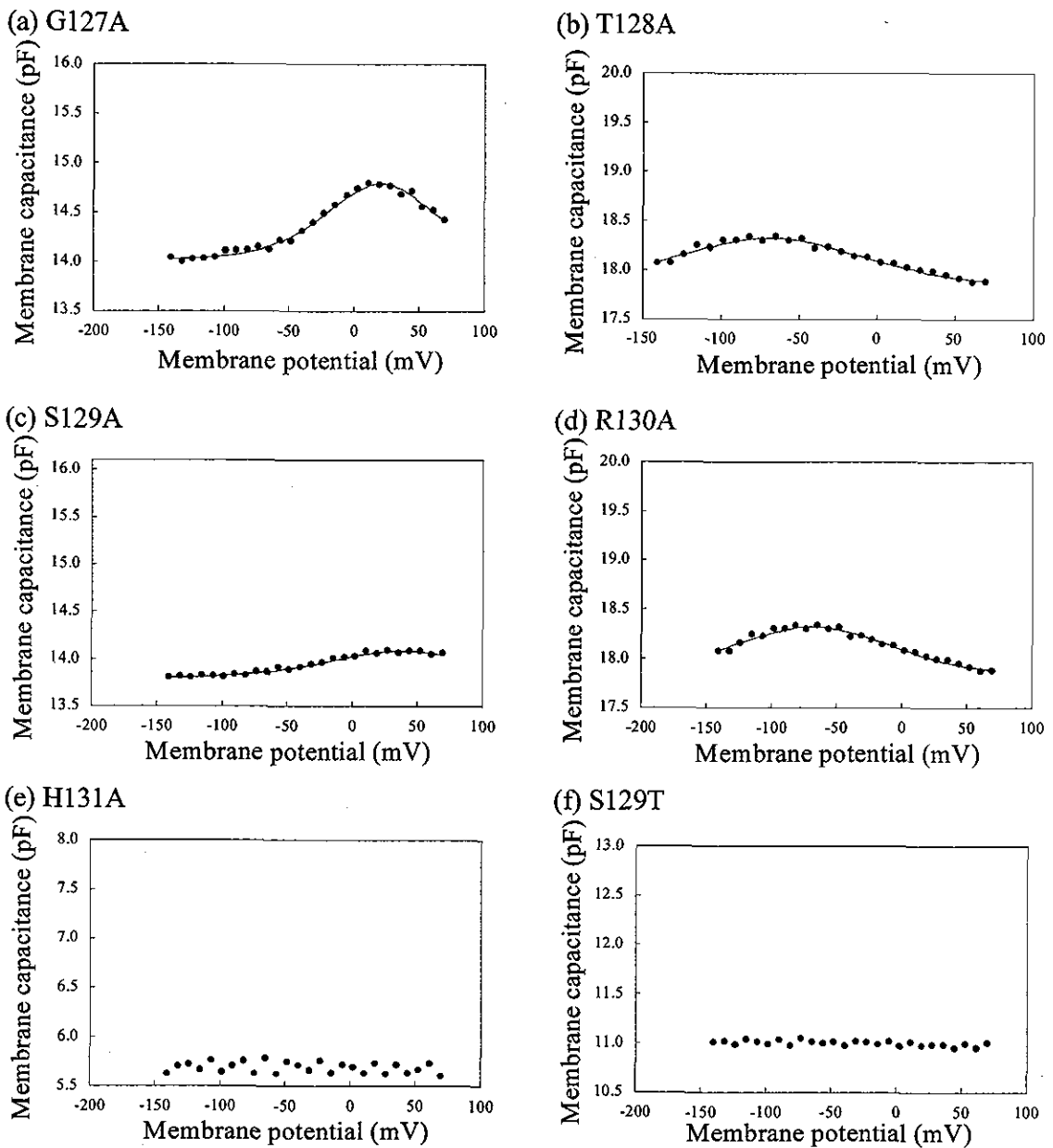


図 10. パッチクランプ法の結果. G127A, T128A, S129A そして R130A はモータ機能に由来する特徴的なベル型非線形な膜容量を示した. 一方 H131A, S129T は非線形膜容量を示さなかった.

つまり電気泳動によりタンパク質を分離する際、負の電荷をもった SDS が一般的なタンパク質に比べ多く Prestin に結合したことで陽極側に強く引かれ、Prestin がより早く下に流れると考えられた。この結果、理論分子量よりも低い位置にバンドが現れたと考えられた。

N 末端側の細胞内領域欠損 Prestin の 60 kDa のバンドと STAS ドメイン欠損 Prestin の 45 kDa のバンドは、それぞれ欠損させたアミノ酸の分子量分だけ、野生型 Prestin の糖修飾を受けていないバンドに対して低い位置に現れている。N 末端側の細胞内領域欠損 Prestin の 175 kDa

表2. フィティングパラメータ

Gene	$C_{lin}$ (pF)	$Q_{max}$ (fC)	$\alpha$ (mV)	$V_{1/2}$ (mV)
WT (n = 42)	15.0 ± 5.5	310.3 ± 160.9	30.2 ± 3.7	-63.2 ± 9.6
G127A (n = 6)	12.3 ± 1.9	91.7 ± 28.0	43.3 ± 5.1	27.8 ± 11.7
T128A (n = 2)	16.7 ± 1.6	65.0 ± 9.1	39.8 ± 3.4	-77.7 ± 13.1
S129A (n = 1)	13.8	47.3	40.2	38.2
R130A (n = 7)	19.4 ± 11.4	117.2 ± 77.3	37.6 ± 4.0	-71.4 ± 15.9

のバンドと STAS ドメイン欠損 Prestin の 50 kDa のバンドは野生型同様、共に糖修飾を受けたバンドであると考えられた。

部位特異的変異体のバンドは野生型に現れている小胞体及びゴルジ体で糖修飾を受けたと考えられる 100 kDa のバンドと、糖修飾を受けていないと考えられる 70 kDa のバンドの間に現れているため、小胞体のみで糖修飾を受けた Prestin を示すと考えられた。ゴルジ体で糖修飾を受けるか否かは、糖修飾を受けるアスパラギンの分子内での位置によって変化する。以上から、GTSRH 配列に変異が加わることで、Prestin の構造が変化し、分子内でのアスパラギンの位置が変化したと考えられた。

#### D.2. 免疫蛍光染色

STAS ドメイン欠損変異体は細胞内における発現部位が変化することから、STAS ドメインは Prestin の局在に関わっていると考えられた。STAS ドメインを持つ他のタンパク質においても、STAS ドメインを欠損させると局在が変化することが報告されており、今回の結果と一致している。T128 が A に変異することで Prestin の局在が変化することが明らかになった。この結果から、Prestin が膜に発現する際に T128 が重要な働きをしていることが推察された。

#### D.3. 変異 Prestin の機能

パッチクランプ法の結果より、N 末端側の細胞内領域、または STAS ドメインの欠損で、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。この結果は、これらの領域が、Prestin の構造変化に不可欠であることを示唆している。近年、STAS ドメインは Prestin 同士の結合や CFTR との相互作用に関わっているという報告がなされており、STAS ドメインを欠損すると、それらの結合や相互作用ができなくなり、機能を失ったと考えられた。

GTSRH 配列に変異が起きると、野生型に対し  $\alpha$  及び  $V_{1/2}$  が変化した。これは Prestin の電位感受性が変化したことを示している。同時に  $Q_{max}$  が小さくなることから、細胞全体として Prestin の機能が減退していると考えられた。Western blotting の結果から GTSRH 配列の変異により糖修飾の受け方が変化したことが示唆されたが、松田らにより糖修飾の有無は Prestin のモータ機能に直接影響を与えないとの報告がされており、変異体の機能低下は糖修飾の受け方の変化によるものではないと考えられた。以上から、Prestin の電位感受性の変化及び機能低下は GTSRH 配列に変異が加わったことにより生じた Prestin の構造変化の

影響であると考えられた。

パッチクランプ法の結果から、N 末端側の細胞内領域、STAS ドメインまたは GTSRH 配列に変異が起こると、Prestin の機能が低下または失われることが明らかになった。これまでに、Prestin の機能が失われるとおよそ 40 dB の聴力損失が起こることが報告されている。従って、N 末端側の細胞内領域、STAS ドメインまたは GTSRH 配列に遺伝子変異が加わると遺伝性難聴が引き起こされる可能性が示唆された。

本研究において、N 末端側の細胞内領域、STAS ドメイン及び GTSRH 配列に注目し、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。そこで、今後 Prestin とその他の SLC26a ファミリーのアミノ酸配列を、配列全体にわたって比較し、Prestin のみに存在するアミノ酸配列に着目し、Prestin 特有の機能を実現している部位の特定を目指す。得られた結果から、内耳増幅機構、すなわち OHC の伸縮メカニズムを明らかにし、内耳疾患の原因究明を目指す。さらに内耳疾患の細胞治療、再生医療及び遺伝子治療の可能性を検討する。

## E. 結論

本研究で以下のことが明らかになった。

1. N 末端側の細胞内領域は Prestin のモータ機能に不可欠な領域である。
2. STAS ドメインは Prestin の細胞内における発現部位に関わる領域であると共に、モータ機能にも要求される。
3. GTSRH 配列に遺伝子変異が起こると、Prestin はゴルジ体での糖修飾を受けなくなり、またそのモータ機能が減退することが示唆された。この結果は GTSRH 配列の変異により、Prestin の構造が変化したことを示唆している。

以上より、N 末端側の細胞内領域、STAS ドメインまたは GTSRH 配列に変異が起こると OHC の機能が低下し、遺伝性難聴が引き起こされる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

1. Wada, H., Murakoshi, M., Gomi, T., Iida, K., Kumano, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Ikeda, K., Kobayashi, T., Imaging of the plasma membrane of prestin-expressing Chinese hamster ovary cells by atomic force microscopy, *Biophysical Journal*, being submitted.
2. Andoh, M. and Wada, H., Phase of the neural excitation relative to the basilar membrane motion in the organ of Corti: Theoretical considerations, *J. Acoust. Soc. Am.*, being submitted.
3. Iida, K., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T. and Wada, H., Construction of an expression system for the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells, *Hear. Res.*, in press.
4. Andoh, M. and Wada, H., Prediction of the characteristics of two types of pressure waves in the cochlea: Theoretical considerations, *J. Acoust. Soc. Am.*, 2004, 116, 417-425.
5. Iida, K., Nagaoka, T., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T. and Wada, H.,

Relationship between fluorescence intensity of GFP and the expression level of prestin in a prestin-expressing Chinese hamster ovary cell line. JSME International Journal, 2004, 47C, 970-976.

6. Sugawara, M., Ishida, Y. and Wada, H., Mechanical properties of sensory and supporting cells in the organ of Corti of the guinea pig cochlea - study by atomic force microscopy, *Hear. Res.*, 2004, 192, 57-64.

#### 学会発表

1. Wada, H., Murakoshi, M., Iida, K., Gomi, T., Kimura, K., Uskura, H., Sugawara, M., Katori, Y., Kakehata, S., Ikeda, K., Kobayashi, T., Atomic force microscopic imaging of the intra cellular membrane surface of prestin-expressing Chinese hamster ovary cells, The Ninth "Mechanics of Hearing" Workshop, Portland, Oregon, U.S.A. (July 2005).
2. Murakoshi, M., Iida, K., Kumano, S., Yoshida, N., Kobayashi, T., Wada, H., Heat stress-induced changes in the mechanical properties of mouse outer hair cells, The Ninth "Mechanics of Hearing" Workshop, Portland, Oregon, U.S.A. (July 2005).
3. Andoh, M., Wada, H., Estimation of the force generated by the outer hair cell motility and the phase of the neural excitation relative to the basilar membrane motion: Theoretical considerations, The Ninth "Mechanics of Hearing" Workshop, Portland, Oregon, U.S.A. (July 2005).

4. Nakajima, C., Andoh, M., Wada, H., Finite-element analysis of the auditory transduction process in the guinea pig cochlea, Twelfth International Congress on Sound and Vibration, Lisbon, Portugal. (July 2005).
5. Iida, K., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T. and Wada, H., Optimization of culture conditions for established stable prestin-expressing CHO cell lines, The 28th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, New Orleans, Louisiana, U.S.A. (February 2005).
6. Murakoshi, M., Gomi, T. and Wada, H., Imaging of the cytoplasmic face of the prestin-expressing CHO cell membrane by atomic force microscopy, The 28th Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, New Orleans, Louisiana, U.S.A. (February 2005).
7. Iida, K., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T. and Wada, H., Expression system for the motor protein prestin, The 5th Molecular Biology of Hearing and Deafness, Bethesda, Maryland, U.S.A. (September 2004).
8. Murakoshi, M., Yoshida, N., Kobayashi, T. and Wada, H., 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).

9. Andoh, M. and Wada, H., Dynamic behavior of the organ of Corti: Thoretical consideration, Eleventh International Congress on Sound and Vibration, St. Petersburg, Russia. (July 2004).
  10. 安藤真好, 和田仁, 外有毛細胞の伸縮運動に起因する蝸牛増幅機構の数値解析, 機会学会東北支部第 40 期総会・講演会, 仙台 (2005 年 3 月).
  11. 熊野峻, 内藤直幸, 飯田浩司, 津本浩平, 池田勝久, 熊谷泉, 小林俊光, 和田仁. タンパク質モータ prestin の機能へ及ぼす遺伝子変異の影響, 日本機械学会第 17 回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋 (2005 年 1 月).
  12. 安藤真好, 和田仁, コルチ器における基底板振動挙動と聴神経発火の関係 -理論的考察-, 日本機械学会第 17 回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋 (2005 年 1 月).
  13. 永岡知致, 飯田浩司, 津本浩平, 池田勝久, 熊谷泉, 小林俊光, 和田仁. GFP 蛍光輝度によるタンパク質モータ prestin の発現量の評価, 日本機械学会第 17 回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋(2005年1月).
  14. 村越道生, 和田仁, タンパク質モータプレスティン発現 CHO 細胞の原形質膜の観察 -原子間力顕微鏡を用いて-, 日本機械学会第 17 回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋 (2005 年 1 月).
  15. 飯田浩司, 津本浩平, 池田勝久, 熊谷泉, 小林俊光, 和田仁. CHO 細胞を用いたタンパク質モータプレスティンの安定発現細胞株の作製, 日本機械学会第 15 回バイオフロンティア講演会, 宇部(2004年11月).
  16. 村越道生, 吉田尚弘, 小林俊光, 和田仁, ヒートストレスがマウス外有毛細胞の機械的特性に及ぼす影響, 日本機械学会第 15 回バイオフロンティア講演会, 宇部 (2004 年 11 月).
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし.

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., Nagaoka, T., <u>Tsumoto, K., Ikeda, K.,</u> <u>Kumagai, I., Kobayashi,</u> <u>T. and Wada, H.</u>	Relationship between fluorescence intensity of GFP and the expression level of prestin in a prestin-expressing Chinese hamster ovary cell line	JSME Int. J.	47C	970-976	2004
Andoh, M. and <u>Wada, H.</u>	Prediction of the characteristics of two types of pressure waves in the cochlea: Theoretical considerations	J. Acoust. Soc. Am.	116	417-425	2004
Sugawara, M., Ishida, Y. and <u>Wada, H.</u>	Mechanical properties of sensory and supporting cells in the organ of Corti of the guinea pig cochlea - study by atomic force microscopy	Hear. Res.	192	57-64	2004



# Relationship between Fluorescence Intensity of GFP and the Expression Level of Prestin in a Prestin-Expressing Chinese Hamster Ovary Cell Line\*

Koji IIDA\*\*, Tomoyuki NAGAOKA\*\*, Kouhei TSUMOTO\*\*\*, Katsuhisa IKEDA\*\*\*\*, Izumi KUMAGAI\*\*\*, Toshimitsu KOBAYASHI† and Hiroshi WADA\*\*

Outer hair cells (OHCs) in mammals can elongate and contract at frequencies up to 100 kHz in response to changes in their membrane potential. The origin of this unique motility is the motor protein prestin, which is densely packed in the lateral membrane of the OHCs. In a previous work, we constructed a prestin-expressing cell line using Chinese hamster ovary (CHO) cells to obtain a stable supply of prestin. When we research prestin using constructed cells, it is necessary to estimate the expression level of prestin in the cells easily and non-invasively. As the prestin gene and a green fluorescent protein (GFP) gene were introduced into constructed cells using the same vector, the expression level of prestin and fluorescence intensity of GFP are possibly correlated. Since this correlation is not clear, however, in this study, we therefore investigated whether the expression level of prestin evaluated by patch-clamp recording and the fluorescence intensity of GFP obtained from fluorescence images are correlated or not. As a result, it was demonstrated that they were correlated. The expression level of prestin can therefore be evaluated by measuring the fluorescence intensity of GFP.

**Key Words:** Acoustic, Biomechanics, Measurement, Sound, Prestin, Green Fluorescent Protein, Chinese Hamster Ovary Cell, Outer Hair Cell, Patch Clamp Technique

## 1. Introduction

The high sensitivity and sharp tuning of mammalian hearing originates from a mechanical amplification mechanism known as the 'Cochlear amplifier'<sup>(1)</sup> (Fig. 1). The outer hair cells (OHCs) in the organ of Corti, which alter their longitudinal length in response to changes in their membrane potential, are involved in this mechanism. This unique type of cell motility, called 'electromotility'<sup>(2)-(6)</sup>, operates at frequencies up to 100 kHz and does not require

ATP hydrolysis<sup>(7)</sup>. The molecular mechanism of electromotility is thought to be a voltage-dependent conformational change of a motor protein densely embedded in the lateral membrane of the OHCs<sup>(8)</sup> (Fig. 2).

In 2000, this motor protein was identified by a cDNA library subtraction procedure and termed prestin<sup>(9)</sup>. Since its identification, prestin has been researched intensively to understand its function. Cultured kidney cells transfected with prestin cDNA were found to show voltage-dependent membrane capacitance<sup>(9),(10)</sup> and electrically evoked changes in cell shape<sup>(9)</sup>, similar to OHCs. The importance of prestin for the auditory mechanism was demonstrated by the fact that prestin knock-out mice exhibited a loss of outer hair cell electromotility *in vitro* and a significantly elevated hearing threshold of 40–60 dB *in vivo*<sup>(11)</sup>.

For further explication of the function of prestin, it is necessary to study prestin at the molecular level. As a springboard for such study, access to a stable supply of prestin is essential. For this reason, we constructed a prestin-expressing Chinese hamster ovary (CHO) cell line and confirmed that the constructed cells expressed

\* Received 24th May, 2004 (No. 04-4125)

\*\* Department of Bioengineering and Robotics, Tohoku University, 6-6-01 Aoba-yama, Sendai 980-8579, Japan

\*\*\* Department of Biomolecular Engineering, Tohoku University, 6-6-07 Aoba-yama, Sendai 980-8579, Japan

\*\*\*\* Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

† Department of Otolaryngology—Head and Neck Surgery, Tohoku University School of Medicine, 1-1 Seiryomachi, Sendai 980-8575, Japan.

E-mail: iida@wadalab.mech.tohoku.ac.jp

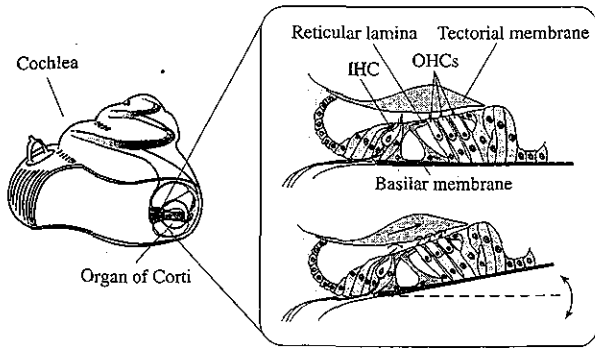


Fig. 1 A schematic of the cochlea and a cross section of the organ of Corti. When the basilar membrane vibrates, shear motion occurs between the reticular lamina and the tectorial membrane. The stereocilia of the IHC and OHCs are deflected by this shear motion, and ions flow into the cells, resulting in intracellular depolarization which causes auditory nerve fiber activation in the IHC. Simultaneously, the OHCs show a motile response and apply force to the basilar membrane.

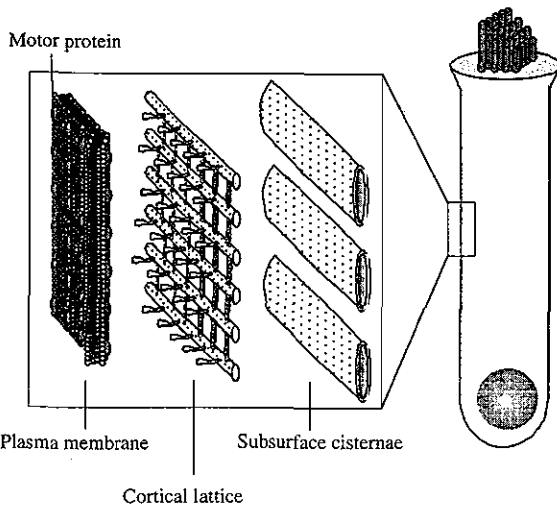


Fig. 2 Lateral wall of the OHC<sup>(12)</sup>. The OHC lateral wall consists of three layers: plasma membrane, cortical lattice and subsurface cisternae. The motor protein is believed to be embedded in the plasma membrane.

prestin in their plasma membrane and exhibited prestin-originated voltage-dependent nonlinear membrane capacitance<sup>(12)</sup>. With this cell line, we can obtain prestin-expressing cells anytime without killing animals.

Generally, proteins are expressed and resolved dynamically in a living cell, and each cell has a different cycle of protein expression. As a result, the expression level of prestin in constructed cells may change with time and differ among cells. An indicator of the expression level of prestin in constructed cells is therefore required. The expression level of prestin in prestin-expressing cells is usually determined by analyzing the voltage-dependent nonlinear membrane capacitance, which is derived from a conformational change of prestin, using the whole-cell

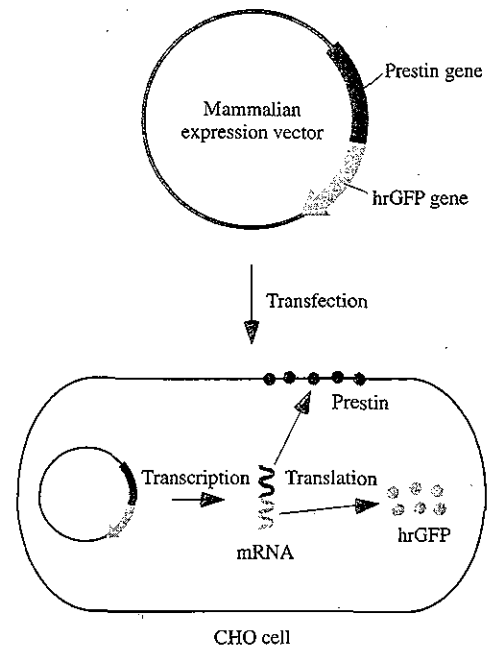


Fig. 3 A schematic of the expression of hrGFP and prestin in a CHO cell. When we constructed a prestin-expressing CHO cell line, the prestin gene and the hrGFP gene were transfected into CHO cells using a mammalian expression vector. In CHO cells, the prestin gene and the hrGFP gene are transcribed into sequential mRNA. Prestin and hrGFP are then translated from this mRNA and localized to the plasma membrane and the cytoplasm of the cell, respectively.

patch-clamp recording technique. However, the procedure of such recording is complicated and requires making an injurious hole in the cell membrane. It is therefore necessary to develop a method by which the expression level of prestin in each cell can be easily and non-invasively investigated.

In the construction of a prestin-expressing CHO cell line in our previous study<sup>(12)</sup>, the prestin gene was transfected into CHO cells using a mammalian expression vector. The humanized *Renilla reniformis* green fluorescent protein (hrGFP) gene, which is a subspecies of the green fluorescent protein (GFP) gene, was inserted as a marker in the vector to confirm the expression of prestin in the cell. GFP is widely used as a marker protein because it yields a green fluorescence, whose intensity is proportional to the amount of GFP, when it is exposed to blue light<sup>(13)</sup>. When the vector is transfected into CHO cells, the prestin gene and the hrGFP gene are transcribed into sequential mRNA. Prestin and hrGFP are then translated from this mRNA and are localized to the plasma membrane and the cytoplasm of the cell, respectively (Fig. 3). As the prestin gene and the hrGFP gene are transcribed into the same mRNA, the expression level of prestin and fluorescence intensity of hrGFP are possibly correlated. If they do have a correlation, the expression level of prestin

can be evaluated by the fluorescence intensity of hrGFP. However, this correlation has not been clarified yet.

In this study, an attempt was therefore made to determine the relationship between the fluorescence intensity of hrGFP and the expression level of prestin. The fluorescence intensity of hrGFP and the expression level of prestin were evaluated using fluorescence micrographs and whole-cell patch-clamp recordings, respectively.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Cell preparation

A prestin-expressing CHO cell line, cultured in flasks with RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, was used. This cell line had been previously constructed<sup>(12)</sup>. When the prestin gene was transfected into CHO cells, the mammalian expression vector pIRES-hrGFP-1a (Stratagene, La Jolla, CA) was used. In the constructed cells, prestin-coding and hrGFP-coding sequences of the vector are transcribed into the same mRNA. Prestin and hrGFP are then independently translated from this mRNA and are localized in the plasma membrane and the cytoplasm of the cell, respectively.

To transfer the cells to an experimental chamber, they were detached from the flasks by incubating them with 100 µM EDTA in PBS solution for 5–10 min. The EDTA/PBS solution containing CHO cells was then transferred to a conical tube and centrifuged at 250 × *g* for 5 min. After centrifugation, all of the supernatant was removed, and the cell pellet was resuspended in culture medium. This medium containing the cells was plated on a glass base dish, i.e., the experimental chamber, and incubated for 2–15 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for cell adhesion to the base of the dish. After the incubation, the medium was replaced by an external solution composed of 145 mM NaCl, 5.8 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 5.6 mM glucose, adjusted to pH 7.3, and the prepared samples were then used for the following experiment.

### 2.2 Quantification of hrGFP fluorescence intensity

#### 2.2.1 System for measuring fluorescence intensity

The hrGFP fluorescence intensity of prestin-expressing CHO cells was quantified using the following system (Fig. 4). Samples were observed using an inverted microscope (TE300, Nikon, Tokyo, Japan) with a filter cube (a excitation filter for wavelengths of 450–490 nm, a dichroic mirror for wavelengths of 505 nm or more and a emission filter for wavelengths of 520 nm or more). All of the optical components of the microscope, such as a mercury lamp, filters, iris diaphragms and lenses, were kept under the same conditions during the measurements. Micrographs were detected by a black and white CCD camera (C2400-77, Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) with

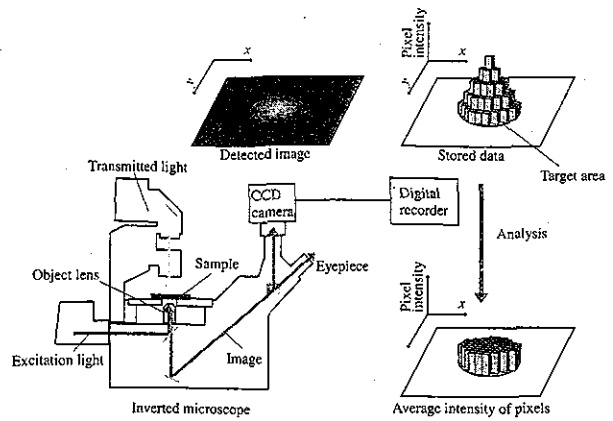


Fig. 4 Measurement system of hrGFP fluorescence intensity. Samples were observed using an inverted microscope. Images were detected by CCD camera, and signals of images were continuously transmitted to a digital recorder. One frame of the transmitted signals was stored in the digital recorder as a static image. The average intensity of pixels in the target area in the stored image was calculated using Eq. (1).

a contrast gain of 10.0, image signals being transmitted to a digital recorder (DCR-PC110, Sony, Tokyo, Japan) at 30 frames per second. One frame of the transmitted signals was stored in the digital recorder as a static image at a resolution of 640 × 480 pixels with 256 levels. The stored images were analyzed using the histogram function of Adobe Photoshop image processing software (Adobe systems, San Jose, CA). The average intensity of pixels in the target area was calculated using the following equation:

$$\text{Average intensity} = \frac{\sum_{i=1}^n I_i}{n}, \quad (1)$$

where  $n$  is the number of pixels included in the target area and  $I_i$  is the intensity of the  $i$ th pixel.

Before evaluation of the hrGFP fluorescence intensity of the constructed cells, the relationship between the intensity of the light entering the object lens and the obtained pixel intensity was calibrated within the range of hrGFP fluorescence intensity. Transmitted light for bright field observation, the output voltage of which was fixed, was used as incoming light. Incoming light intensity was altered by passing the transmitted light through neutral density (ND) filters (Olympus, Tokyo, Japan) located on a stage. The relative light intensity in the absence of a filter was defined as 100%, and intensities with ND50, ND25, ND12 and ND6 filters were defined as 50%, 25%, 12% and 6%, respectively. When light was completely shielded, relative incoming light intensity was defined as 0%. The filter cube was used to obtain images. The same range of wavelengths as that of the hrGFP fluorescence is included in the transmitted light and is detected by the CCD camera. Images were taken of the respective in-

coming light intensities. The obtained average intensity of pixels within the area, corresponding to a circle with a diameter of 20  $\mu\text{m}$  located in the center of the image, was calculated using Eq. (1) and plotted against relative incoming light intensities controlled by the ND filters. Measurements were made in a dark room and room temperature was maintained at 23–25°C through out the experiment.

**2.2.2 Quantification of hrGFP fluorescence intensity of prestin-expressing CHO cells** After replacement of the medium by the external solution, prestin-expressing CHO cells plated on the experimental chamber were observed using the microscope under exposure of excitation light at a wave length of 450–490 nm to detect brightly fluorescent cells with spherical shape. The focus plane was set at the center of a target cell. The fluorescence image of the cell was then stored as mentioned above. Furthermore, a bright field image was taken under white light exposure in the same area as that of the fluorescence image.

To obtain the hrGFP fluorescence intensity of a cell, first, the outline of the target cell was determined from the bright field image. Next, in the fluorescence image, the average intensity of pixels within the determined outline of the target cell was calculated (Fig. 5). The obtained value represents the hrGFP fluorescence intensity of the cell and was termed 'GFP intensity'. This GFP intensity is a relative value depending on the equipment.

### 2.3 Electrophysiological measurements

It is well known that prestin-expressing cells exhibit voltage-dependent nonlinear membrane capacitance against membrane potential. This nonlinear membrane capacitance reflects the charge movements across the plasma membrane of the cell due to prestin. To evaluate the expression level of prestin in prestin-expressing CHO cells, the membrane capacitance of each target cell was measured by the whole-cell patch-clamp method just after its fluorescence image was taken.

Measurements of membrane capacitance were conducted according to the previously reported procedure (see Ref. (12)) using the 'membrane test' feature of pCLAMP 8.0 acquisition software (Axon Instruments, Foster City, CA). Measurements were continuously repeated three times, and when maximum variations of membrane capacitance at each membrane potential obtained from three sequential measurements were 2% or less, the obtained data were used for the following analysis.

After the measurements, the values of membrane capacitance were plotted against membrane potential and fitted to the derivative of a Boltzmann function,

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

where  $C_{\text{lin}}$  is linear capacitance,  $Q_{\text{max}}$  is maximum charge transfer,  $V$  is membrane potential,  $V_{1/2}$  is the voltage at

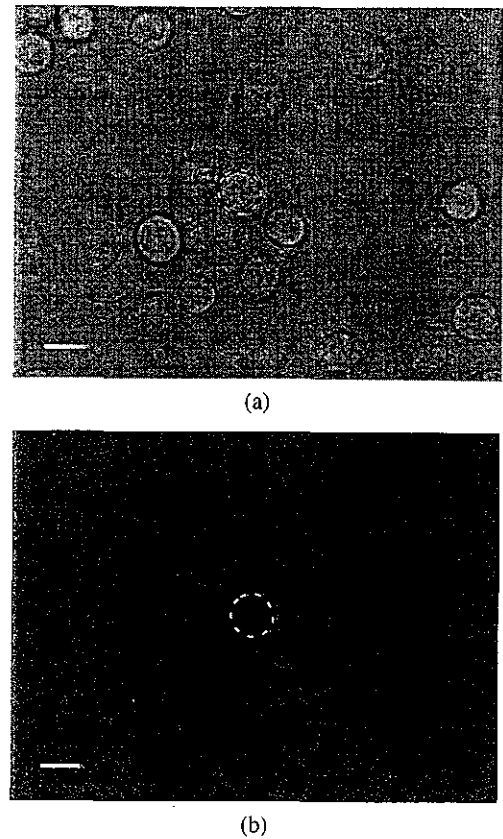


Fig. 5 Determination of an outline of the target cell. (a) Bright field image of prestin-expressing CHO cells. (b) Fluorescence image taken in the same frame as (a) under blue light (450–490 nm) exposure. Scale bars are 10  $\mu\text{m}$ . The target cell was made identifiable by outlining it with the dashed circular curve in (a). Using the image in (b), the average intensity of pixels within the determined outline of the cell in (a) was calculated.

which the maximum charge is equally distributed across the membrane and  $\alpha = kT/ze$  is the slope factor of the voltage dependence of the charge transfer where  $k$  is Boltzmann's constant,  $T$  is absolute temperature,  $z$  is valence and  $e$  is electron charge. Fitting was performed using the Levenberg-Marquardt method.

As  $Q_{\text{max}}$  is the total amount of charge transferred by prestin and  $e$  is electron charge, which equals the charge transferred by one prestin molecule, the number of prestin molecules in the cell is given by  $Q_{\text{max}}/e$ . As  $C_{\text{lin}}$  expressed in picofarads indicates the total capacitance of the plasma membrane of the cell, and the membrane capacitance of the cell per unit surface area is known to be 0.01 pF/ $\mu\text{m}^2$ (14), the surface area of the cell is expressed by  $C_{\text{lin}}/0.01 \mu\text{m}^2$ . The expression level of prestin per unit surface area, i.e., charge density, of the cell is therefore obtained from

$$\text{Charge density} = \frac{Q_{\text{max}}}{e} \bigg/ \frac{C_{\text{lin}}}{0.01}. \quad (3)$$