

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

蝸牛内の外有毛細胞に発現するタンパク質モーター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~17 年度 総合研究報告書

主任研究者 和田 仁

平成 18 (2006) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告	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	7
D. 考察	9
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	15
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	16
III. 研究成果の刊行物・別刷	17

蝸牛内の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

蝸牛内コルチ器に存在する外有毛細胞（Outer Hair Cell: OHC）は膜電位に依存した伸縮運動を示す。この伸縮運動により我々の聴覚は鋭敏になっていると考えられている。OHC 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。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 末端細胞内領域、STAS（Sulphate Transporters and Antisigmafactor Antagonists）ドメイン、グリシン（G）、スレオニン（T）、セリン（S）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）からなる GTSRH 配列及び Prestin 特有のアミノ酸である 122 番目のメチオニン（M）、192 番目のシステイン（C）、225 番目のメチオニン（M）、415 番目のシステイン（C）、428 番目のスレオニン（T）に注目し、これらの部位を欠損または変異させた変異 Prestin を作製した。変異体の特性をパッチクランプ法、Western blotting そして免疫蛍光染色法を用いて検討した。その結果、N 末端細胞内領域、STAS ドメイン及び GTSRH 配列が Prestin の機能に不可欠であること、M122 をイソロイシン（I）に、または M225 をグルタミン（Q）に変異させるとアニオン輸送機能が增加すること及び C192 と C415 がジスルフィド結合を作らない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

小林俊光・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

波である音は、外耳道を通り、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

A. 研究の背景と目的

図 1 にヒトの耳の模式図を示す。空気の高圧

する。コルチ器には、内毛細胞 (IHC) と、外毛細胞(OHC)と呼ばれる 2 種類の感覚有毛細胞が存在し、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 μm 、長さは 20-90 μm 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ーが密に存在し、このモーター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ー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

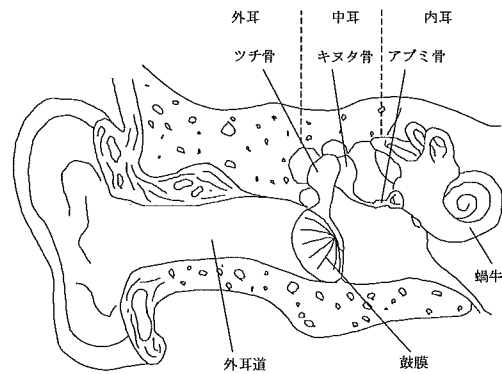


図 1. ヒトの耳の模式図。

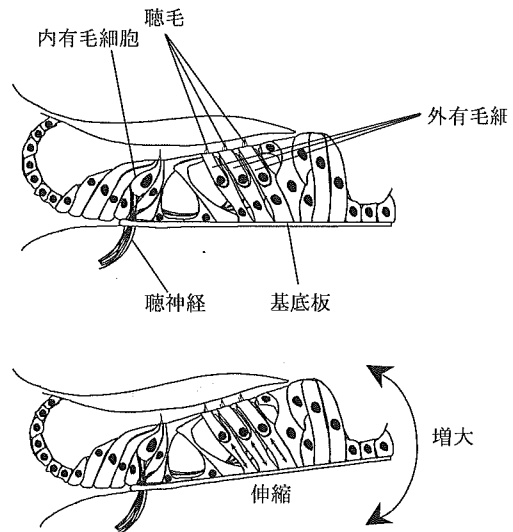


図 2. コルチ器と外有毛細胞によるその振動増幅。外有毛細胞の伸縮運動によりコルチ器の振動は増幅される。

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ことは内耳

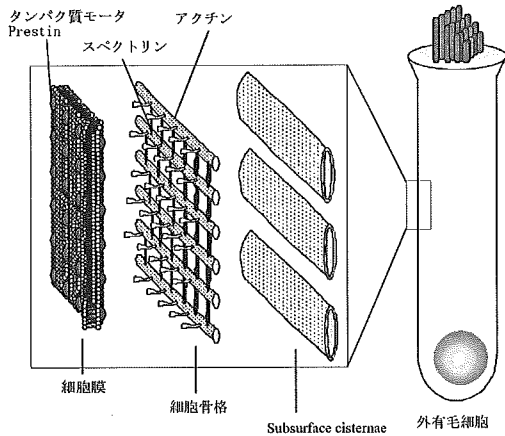


図 3. 外有毛細胞の模式図. 外有毛細胞の側壁は3層からなり, 一番外側の細胞膜にタンパク質モータ Prestin が存在する.

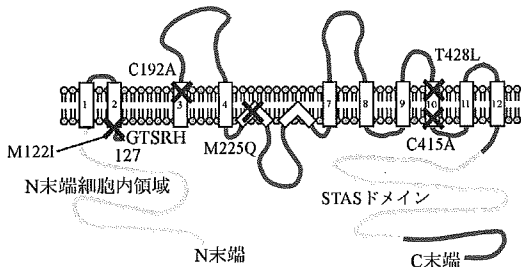


図 4. タンパク質モータ Prestin の 2 次構造予測図.

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.

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.

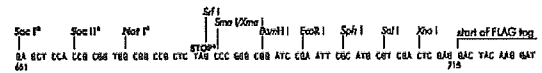
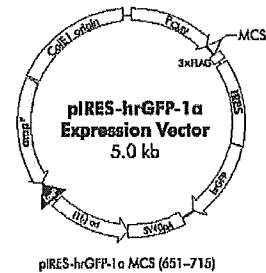


図 5. 哺乳類発現ベクター pIRES- hrGFP-1a.

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 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. GTSRH 配列への変異導入

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) 及びセリン (S) をスレオニン (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 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。

B. 1. 4. Prestin に特有なアミノ酸への変異導入

OHC の伸縮運動を引き起こす電位依存性の構造変化は Prestin 特有である。そのため、Prestin が属する SLC26A ファミリーの他のタンパク質と比較し、Prestin のみに存在するアミノ酸がその特性に重要な役割を果たしている可能性が高い。本研究では、SLC26A ファミリーに属するタンパク質の全アミノ酸配列を比較し、Prestin 特有のアミノ酸である、122 番目のメチオニン (M)、192 番目のシステイン (C)、225 番目のメチオニン (M)、415 番目のシステイン (C)、428 番目のスレオニン (T) に注目した。これらのアミノ酸の役割を調べるために、M122 をイソロイシン (I)、C192 をアラニン (A)、M225 をグルタミン (Q)、C415 をアラニン (A)、T428 をロイシン (L) へとそれぞれ変異させた。変異遺伝子は B. 1. 3. と同様の方法で作製した。

B. 1. 5. 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。

表 1. 変異体作製に用いたプライマーの配列

Name	Sequence
5' end forward	5' CGGGATCCATGGATCATGCCGAAGAAAAATG 3'
3' end reverse	5' GGAATTCTTATGCCTCGGGTGTGGTGG 3'
3'end FLAG reverse	5' CCGCTCGAGTGCCTCGGGTGTGGTGGG 3'
N-terminal forward	5' CGGGATCCATGGTGTGGGTGACTTGGTTTCAG 3'
STAS forward	5' GACATAGACCATGTTTCGAGAGGCAATGGCTG 3'
STAS reverse	5' CTCGAACATGGTCTATGTCAATGTATACATCGGTGTC 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'
M122I forward	5' CCTGTTATCATATACTGTTTCTTTGGGACC 3'
M122I reverse	5' GGTCCCAAAGAAACAGTATATGATAACAGG 3'
C192A forward	5' GAATCATTTCAGTTTGCCCTAGGTGTGTGC 3'
C192A reverse	5' GCACACACCTAGGGCAAACCTGAATGATTC 3'
M225Q forward	5' CACGTCTTCACATCCCAGTTGAAATACCTG 3'
M225Q reverse	5' CAGGTATTTCAACTGGGATGTGAAGACGTG 3'
C415A forward	5' CACAGCTCGCAGGTGCCTTGGCCTCGCTG 3'
C415A reverse	5' CAGCGAGGCCAAGGCACCTGCGAGCTGTG 3'
T428L forward	5' GGTCATTTTACCCCTGGATTCCTCTTTG 3'
T428L reverse	5' CAAAGAGGAATCCAGGGGCTAAAATGACC 3'

pIRES-hrGFP-1a ベクターには, *Xho*I 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 *Bam*HI, *Xho*I 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, *Bam*HI と *Xho*I 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、学内委員会にて組換え DNA 実験計画書の承認を得た上で安全に最大限の配慮をし、実験を行った。

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 µg 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 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. 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。電極はボロシリケート管より作製した、アクセス抵抗が 2-4 MΩ のものを用いた。ピペット内溶液の組成

は 140 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 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 CoCl₂, 2 mM MgCl₂, 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。野生型の遺伝子を導入した細胞は、Prestin の機能に由来する特徴的なベル型非線形な膜容量を示す。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、 α 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。得られた Q_{max} を C_{lin} で割り、単位細胞膜面積当たりの Prestin の最大電荷輸送量を意味する charge density を求めた。

また、細胞膜単位体積当たりの非線形膜容量を評価するために、面積で規格化した非線形膜容量を以下のように定義する。

$$C_{nonlin/lin}(V) = \frac{C_{nonlin}}{C_{lin}} = \frac{C_m(V) - C_{lin}}{C_{lin}} \quad (2)$$

ここで、 C_{nonlin} は膜容量の非線形成分である。また、変異体のデータと野生型のデータを比較するために、計測されたデータを野生型の $C_{nonlin/lin}$ の最大値でデータを規格化し、Relative $C_{nonlin/lin}$ と定義した。

B. 4. GTSRH への変異と糖修飾の関係

B. 4. 1. 脱糖鎖処理

N 末端細胞内領域, STAS ドメイン及び GTSRH 配列の変異が, Prestin が受ける糖修飾に及ぼす影響を脱糖鎖処理により調べた. 脱糖鎖酵素として, Endo H 及び PNGase を用いた. Endo H は小胞体で付加される高マンノース型糖鎖のみを, PNGase は高マンノース型及び, ゴルジ体で付加されるすべての複合型糖鎖を消化する.

B. 4. 2. Western blotting

脱糖鎖処理した HEK293 細胞を用い SDS-PAGE 及び Western blotting を行った. 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. 5. 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.

C. 研究結果

C. 1. 変異 Prestin の機能評価

野生型 Prestin の遺伝子を含んだベクター, Prestin 遺伝子を挿入していない空のベクター, 変異体の遺伝子を含んだベクターをそれぞれ導入した HEK293 細胞から得られた細胞膜容量を図 6 に示す. N 末端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 細胞では空のベクターを導入した細胞同様, 膜電位の変化に対し, 膜容量は一定の値になった. GTSRH 配列に関する変異体のうち, G127A, T128A, S129A 及び R130A は非線形膜容量を示したのに対し, H131A 及び S129T は非線形膜容量を示さなかった. Prestin 特有のアミノ酸に関する変異体

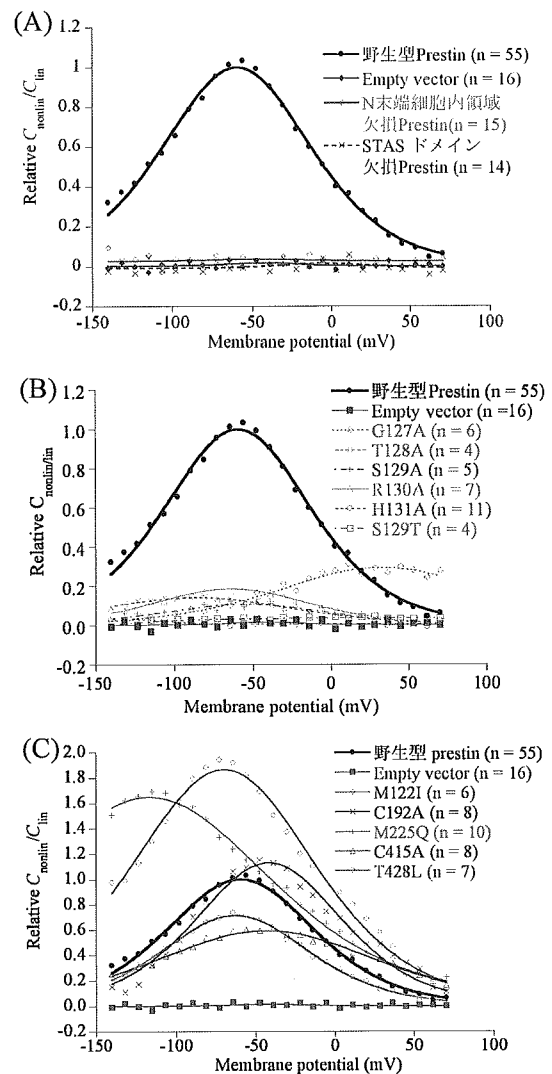


図 6. パッチクランプの結果. (A) N 末端細胞内領域欠損 Prestin 及び STAS ドメインの結果. (B) GTSRH 配列に関する変異体の結果. (C) Prestin 特有のアミノ酸に関する変異体の結果.

はすべて非線形膜容量を示した。計測されたフィッティングパラメータを図 7 に示す。α では, G127A, R130A, M122I 及び M225Q は野生型 Prestin よりも有意に大きかった。V_{1/2} では, G127A と C415A は野生型 Prestin よりも有意に大きく, M122I と M225Q は野生型 Prestin よりも有意に小さかった。Charge density では, G127A, T128A, S129A 及び R130A が野生型 Prestin よりも有意に小さく, M122I と M225Q が野生型 Prestin よりも有意に大きかった。

C. 2. 脱糖鎖酵素の影響

図 8 に N 末端細胞内領域欠損 Prestin, STAS ドメイン欠損 Prestin 及び GTSRH 配列に関する

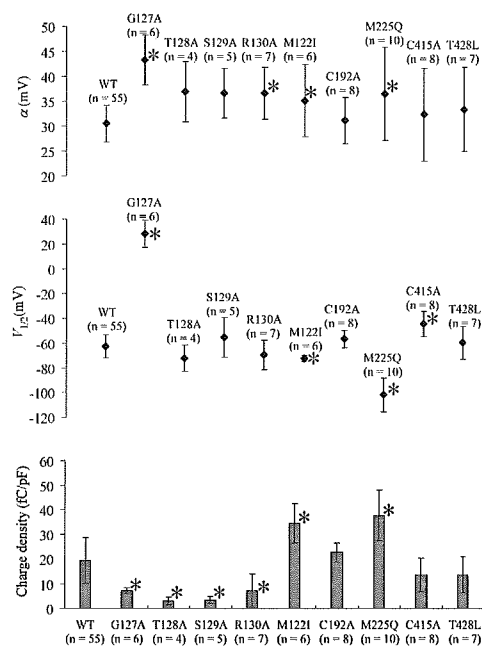


図 7. 非線形膜容量が計測された野生型及び変異体のフィッティングパラメータ。(A) α. Prestin の電位に対する敏感さを表す。(B) V_{1/2}. Prestin がもっとも敏感に反応する膜電位を表す。(C)の最大電荷輸送量を意味する。*は野生型と変異体の間に有意差があることを示す。

変異体の Western blotting の結果を示す。FLAG 融合型野生型 Prestin, FLAG 融合型 N 末端細胞内領域欠損 Prestin, FLAG 融合型 STAS ドメイン欠損 Prestin, GTSRH 配列に関する FLAG 融合型変異体の理論分子量はそれぞれ 84.6 kDa, 75.4 kDa, 63.6 kDa, 84.6 kDa である。酵素処理していない野生型 Prestin では約 100 kDa のシャープなバンドと約 70 kDa のスミアなバンドが観測された。Endo H により酵素処理すると約 100 kDa のバンドは変化しなかったが, スミアな約 70 kDa のバンドは輝度の高いシャープな 70 kDa のバンドに変化した。PNGase により酵素処理した際は, 約 100 kDa のバンドが

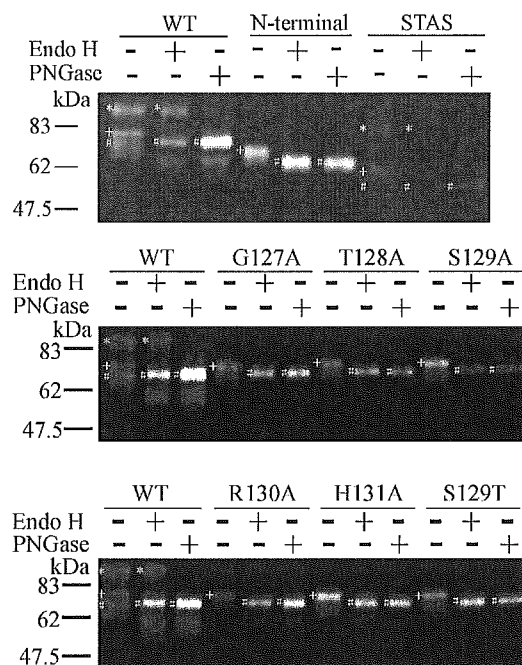


図 8. Western blotting の結果。Endo H は高マンノース型の糖鎖のみを, PNGase は複合型糖鎖を含むすべての糖鎖をタンパク質から取り除く酵素である。+, -はそれぞれ酵素処理したサンプル, していないサンプルを示す。*は複合型糖鎖が結合した Prestin の, +は高マンノース型糖鎖が結合した Prestin の, そして#は糖修飾を受けていない Prestin のバンドを示している。

消え、輝度の高いシャープな 70 kDa のバンドのみが観測された。一方で、N 末端細胞内領域欠損 Prestin では、酵素処理していない場合、約 65 kDa のバンドのみが観測された。Endo H で酵素処理した場合、PNGase で処理した場合、共に、約 65 kDa のバンドは約 60 kDa にシフトした。また、STAS ドメイン欠損 Prestin では、約 80 kDa のシャープなバンドと約 50 kDa のスミアなバンドが観測された。Endo H により酵素処理すると約 80 kDa のバンドは変化しなかったが、スミアな約 50 kDa のバンドはシャープな 50 kDa のバンドに変化した。PNGase により酵素処理した際は、約 80 kDa のバンドが消え、輝度の高いシャープな 50 kDa のバンドのみが観測された。一方で、GTSRH に関する変異体では、酵素処理していない場合、約 80 kDa のバンドのみが観測された。Endo H で酵素処理した場合、PNGase で処理した場合、共に、約 80 kDa のバンドは約 70 kDa にシフトした。

C. 3. 免疫蛍光染色法

FLAG 融合野生型、FLAG 融合 N 末端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 9 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。

D. 考察

D. 1. N 末端細胞内領域

パッチクランプ法の結果より、N 末端側の細胞内領域が欠損すると、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。

脱糖鎖処理後の Western blotting の結果から、野生型 Prestin では、約 100 kDa のバンドは複合型糖鎖が結合した Prestin を、幅の広い約 70 kDa のバンドは高マンノース型の糖鎖が結合した Prestin 及び糖鎖の結合していない Prestin を示していると考えられた。すなわち、野生型 Prestin の遺伝子を導入した細胞には、複合型糖鎖が結合した Prestin、高マンノース型の

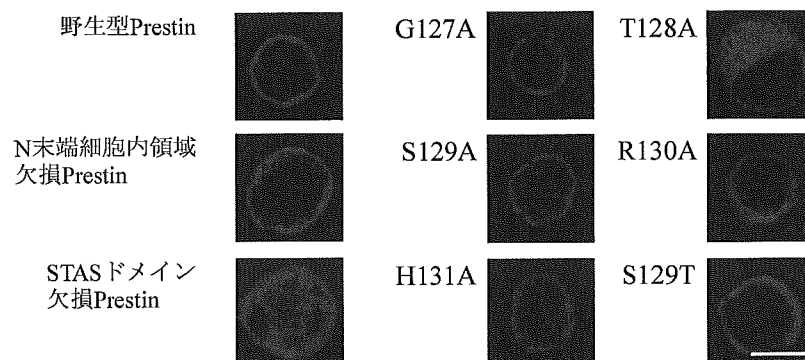


図 9. 免疫蛍光染色画像。スケールバーは 10 μm を示す。STAS ドメイン欠損 Prestin と T128A は細胞膜及び細胞質に発現している。その他の変異体と野生型 Prestin は細胞膜に発現している。

糖鎖が結合した Prestin 及び糖鎖の結合していない Prestin が存在していると考えられた。約 70 kDa のバンドがスミアになっているのは、高マンノース型の糖鎖が結合した Prestin のバンドと糖鎖の結合していない Prestin のそれが重なっているためだと推察された。一方、N 末端細胞内領域欠損 Prestin では、約 65 kDa のバンドは高マンノース型の糖鎖が結合した Prestin を示していると考えられた。すなわち、N 末端細胞内領域欠損 Prestin の遺伝子を導入した細胞では、高マンノース型の糖鎖が結合した変異 Prestin のみが存在していることが示唆された。複合型糖鎖の結合の有無は、糖修飾を受けるアスパラギン (N) が糖を付加する酵素と反応しやすい位置に存在するかが大きく関わってくる。変異による糖鎖の変化は、変異によりタンパク質の構造が変化し、糖修飾を受けるアミノ酸のタンパク質内での位置が変化したためであると考えられた。このことから、N 末端細胞内領域が Prestin の構造に大きく関わっており、変異体の機能低下は変異による構造の乱れが原因であることが示唆された。

糖鎖がついていない Prestin 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 回細胞膜を通過する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。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。

D. 2. STAS ドメイン

パッチクランプ法の結果より、STAS ドメインの欠損で、Prestin のモーター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。

また、脱糖鎖処理後の Western blotting の結果から、STAS ドメイン欠損 Prestin では、約 80 kDa のバンドは複合型糖鎖が結合した Prestin を、約 50 kDa のバンドは高マンノース型の糖鎖が結合した Prestin 及び糖鎖の結合していない Prestin を示していると考えられた。すなわち、STAS ドメイン欠損 Prestin の遺伝子を導入した細胞では、野生型同様 3 種類存在していることが示唆された。

免疫染色の結果において、STAS ドメイン欠損 Prestin 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。

D. 3. GTSRH 配列

パッチクランプ法の結果において、GTSRH 配列に変異が起きると、非線形膜容量が計測されたが、野生型に対し α 、 $V_{1/2}$ 及び charge density が変化した。Prestin の電位に対する感受性を表す α は G127A 及び R130A が野生型に対し有意に変化した。Prestin がもっとも感受性に反応する膜電位を表す $V_{1/2}$ は G127A が野生

型に対し有意に変化した。 α や $V_{1/2}$ が変異によって変化したという結果は、変異をかけたアミノ酸が Prestin の電位感受性に密接に関わっていることを示唆している。さらに単位細胞膜面積当たりの Prestin の最大電荷輸送量を意味する charge density の野生型 Prestin に対する有意な減少は、細胞全体として Prestin の機能が減退したことを示していると考えられた。

脱糖鎖処理後の Western blotting の結果から、GTSRH に関する点変異体では、約 80 kDa のバンドは高マンノース型の糖鎖が結合した Prestin を示していると推察された。GTSRH に関する点変異体の遺伝子を導入した細胞では、高マンノース型の糖鎖が結合した変異 Prestin のみが存在していることが示唆された。N 末端細胞内領域欠損 Prestin 同様複合型糖鎖が結合した Prestin が検出されなかったことから、変異により Prestin の構造が変化したことが示唆された。

免疫染色の結果から、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。いくらかの T128A は変異により構造が乱れ、細胞質に溜まったと考えられた。

D. 4. Prestin 特有のアミノ酸

Prestin 特有のアミノ酸に関する変異体は野生型 Prestin 同様、非線形膜容量を示したが、 α 、 $V_{1/2}$ 及び charge density は変化していた。 α は M122I 及び M225Q が野生型に対し有意に変化した。 $V_{1/2}$ は M122I、M225Q 及び C415A が野生型に対し有意に変化した。変異により α や $V_{1/2}$ が変化したという結果は、変異をかけたアミノ酸が Prestin の電位感受性に強く関わっていることを示している。さらに charge density は M122I 及び M225Q では野生型に対し有意に上昇した。Charge density の有意な上

昇は、変異により Prestin の発現量が上昇した、あるいは一つの Prestin が運ぶ電荷の量が上昇したと考えられた。システイン (C) はシステイン同士でタンパク質の構造を決める上で重要なジスルフィド結合を作る可能性があることが知られている。しかし、本研究で作製した C192A 及び C415A はともにアニオン輸送機能を維持した。この結果は、C192 と C415 がジスルフィド結合を作らないことを示していると考えられた。

E. 結論

本研究で以下のことが示唆された。

1. N 末端細胞内領域が欠損すると Prestin の構造が変化し、アニオン輸送機能が消失する。
2. STAS ドメインが欠損すると Prestin のアニオン輸送機能が消失する。またこの領域は Prestin の細胞内での局在にも関わっている。
3. GTSRH 配列は Prestin の構造に関わっており、変異が加わるとアニオン輸送機能が低下もしくは消失する。
4. M122 をイソロイシン (I) に、または M225 をグルタミン (Q) に変異させるとアニオン輸送機能が增加する。
5. C192 と C415 がジスルフィド結合を作らない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Murakoshi, M., Yoshida, N., Kobayashi, T.

- and Wada, H., Local Mechanical Properties of Mouse Outer Hair Cells: Atomic Force Microscopic Study, *Auris Nasus Larynx*, in press.
2. Andoh, M., Nakajima, C. and Wada, H., Phase of Neural Excitation Relative to Basilar Membrane Motion in the Organ of Corti: Theoretical Considerations. *J. Acoust. Soc. Am.*, 2005, 118, 1554-1565.
 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.*, 2005, 205, 262-270.
 4. Kumano, S., Iida, K., Murakoshi, M., Naito, N., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T. and Wada, H., Effects of Mutation in the Conserved GTSRH Sequence of the Motor Protein Prestin on Its Characteristics. *JSME Int. J.*, 2005, 48C, 403-410.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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. Iida, K., Murakoshi, M., Kumano, S., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T., and Wada, H., Heterogeneous Expression of the Motor Protein Prestin. The 6th International Symposium on Future Medical Engineering based on Bio-nanotechnology, Sendai, Japan (November 2005).
2. Kumano, S., Iida, K., Murakoshi, M., Naito, N., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T. and Wada, H., The Role of the Conserved GTSRH Sequence of the Motor Protein Prestin in Its Characteristics. The 2nd Asian Pacific Conference on Biomechanics, Taipei, Taiwan (November 2005).
3. Murakoshi, M., Kitsunai, Y., Yoshida, N., Kobayashi, T. and Wada, H., Protection of outer hair cells from traumatic noise by prior whole-body heat stress, The 2nd Asian Pacific Conference on Biomechanics, Taipei, Taiwan (November 2005).
4. Murakoshi, M., Kitsunai, Y., Yoshida, N., Kobayashi, T. and Wada, H., Changes in Structure and Mechanical Properties of Mouse Outer Hair Cells in Response to Whole-body Heat Stress, The Second Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, Kyoto, Japan (September 2005)
5. Murakoshi, M., Iida, K., Kumano, S., Yoshida, N., Kobayashi, T. and Wada, H., Heat stress-induced changes in the mechanical properties of mouse outer hair cells. The 9th "Mechanics of Hearing" Workshop, Portland, Oregon, U.S.A. (July 2005).
6. Wada, H., Murakoshi, M., Iida, K., Gomi, T., Kimura, K., Uskura, H., Sugawara, M., Katori, Y., Kakehata, S., Ikeda, K. and Kobayashi, T., Atomic force microscopic imaging of the intra cellular membrane surface of prestin-expressing Chinese hamster ovary cells. The 9th "Mechanics of Hearing" Workshop, Portland, Oregon, U.S.A. (July 2005).
7. 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).
8. 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).
9. 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).
10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).
 1. Andoh, M. and Wada, H., Frequency characteristics of fast and slow waves in the cochlea: a finite element analysis, The 18th International Congress on Acoustics, Kyoto, Japan (April 2004).
 2. Wada, H., Gomi, T., Sugawara, M., Kumagai, I. and Ikeda, K., Atomic force microscopic imaging of the lateral wall of the guinea pig outer hair cell, First Asian Pacific Biomechanics Conference, Osaka, Japan (March 2004).
 3. Iida, K., Tsumoto, K., Kumagai, I. and Wada, H., 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).
 4. Andoh, M., and Wada, H., 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).
 14. 飯田浩司, 熊野峻, 村越道生, 津本浩平, 池田勝久, 熊谷泉, 小林俊光, 和田仁. 蝸牛外有毛細胞に存在するタンパク質モーター prestin の精製とその機能評価. 日本機械学会第 18 回バイオエンジニアリング講演会, 新潟 (2006 年 1 月).
 15. 熊野峻, 飯田浩司, 村越道生, 津本浩平, 池田勝久, 熊谷泉, 小林俊光, 和田仁. “部位特異的変異導入によるタンパク質モーター prestin の保存配列 GTSRH の解析. 日

- 本機械学会第 18 回バイオエンジニアリング講演会, 新潟 (2006 年 1 月).
16. 村越道生, David Z.Z. He, 飯田浩司, 熊野峻, 和田仁. 電位依存性タンパク質モーター prestin の構造変化観察. 日本機械学会第 18 回バイオエンジニアリング講演会, 新潟 (2006 年 1 月).
 17. 飯田浩司, 津本浩平, 池田勝久, 熊谷泉, 小林俊光, 和田仁. タンパク質モーター prestin の安定発現細胞株の構築と高発現株の選択, 第 28 回日本バイオレオロジー学会年会, 仙台 (2005 年 7 月).
 18. 村越道生, 吉田尚弘, 小林俊光, 和田仁. ヒートストレスによるマウス外有毛細胞の機械的特性の変化, 第 28 回日本バイオレオロジー学会年会, 仙台 (2005 年 7 月).
 19. 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).
 20. 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. タンパク質モーター 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).
 21. 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).
 22. 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ー 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).
 23. 村越道生, 和田仁, タンパク質モータープレスチン発現 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).
 24. 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ープレスチ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).
 25. 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).
 26. 飯田浩司, 津本浩平, 熊谷泉, 和田仁, フェ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).
 27. 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ープレスチンの観察, 第 16 回バイオエンジニアリング講演会, 北九州 (2004 年 1 月).

28. 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).

29. 飯田浩司, 津本浩平, 熊谷泉, 和田仁, タンパク質モーター 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).

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
Murakoshi, M., Yoshida, N., Iida, K., Kumano, S., Kobayashi, T. and Wada, H.	Local Mechanical Properties of Mouse Outer Hair Cells: Atomic Force Microscopic Study	Auris Nasus Larynx		In press	
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.	205	262-270	2005
Kumano, S., Iida, K., Murakoshi, M., Naito, N., Tsumoto, K., Ikeda, K., Kumagai, I., Kobayashi, T. and Wada, H.	Effects of Mutation in the Conserved GTSRH Sequence of the Motor Protein Prestin on Its Characteristics.	JSME Int. J.	48C	403-410	2005
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 Int. J.	47C	970-976	2004
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.	192	57-64	2004
Wada, H., Kimura, K., Sugawara, M., Katori, Y., Kakehata, S., Ikeda, K. and Kobayashi, T.	Imaging of the cortical cytoskeleton of guinea pig outer hair cells using atomic force microscopy	Hear. Res.	187	51-62	2004
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 Int. J.	46C	1266-1274	2003



Local mechanical properties of mouse outer hair cells: Atomic force microscopic study

Michio Murakoshi^{a,*}, Naohiro Yoshida^b, Koji Iida^a, Shun Kumano^a,
Toshimitsu Kobayashi^b, Hiroshi Wada^a

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

^b Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Tohoku University Graduate School of Medicine, 1-1 Seiryō-machi, Sendai 980-8574, Japan

Received 16 June 2005; accepted 11 November 2005

Abstract

Objectives: Outer hair cells (OHCs) are capable of altering their cell length in response to changes in membrane potential. Due to this electromotility, OHCs probably subject the basilar membrane to force, resulting in cochlear amplification. To understand the mechanism of such amplification, knowledge of the mechanical properties of OHCs is required since the force produced by OHC electromotility is thought to depend on such properties. Various studies have been conducted to investigate the mechanical properties of guinea pig OHCs. With regard to mice, however, although various kinds of transgenic and knockout mice possess great potential as research models, the mechanical properties of mouse OHCs have not as yet been reported since the cells and/or tissues in the mouse hearing organ are relatively small and vulnerable to external stimuli, rendering sample preparation difficult. In this study, therefore, to establish indicators of the mechanical properties of OHCs in mice, such properties were measured by atomic force microscopy (AFM).

Methods: CBA/JNCrj strain male mice aged 10–12 weeks (25–30 g) were used. Cochleae were dissected out from the animal and both the basilar membrane and the organ of Corti were simultaneously unwrapped from the modiolus with forceps. Dissected coiled tissue was then incubated with an enzymatic digestion medium for 15 min. After digestion, OHCs were isolated by gently triturating the coiled tissue. Local mechanical properties of the OHCs were then measured by an indentation test using an AFM.

Results: Young's modulus and stiffness of the OHC in the apical turn of the mouse cochlea were 2.1 ± 0.5 kPa and 4.4 ± 1.2 mN/m, respectively.

Conclusions: Young's modulus of the OHC in the apical turn of the cochlea in mice was roughly the same as that in the apical turn of the cochlea in guinea pigs; however, the stiffness of the former was about two times greater than that of the latter because the cell length of the former was shorter than that of the latter.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Mouse; Outer hair cell; Local mechanical property; Atomic force microscopy

1. Introduction

Hearing in mammals is characterized by high sensitivity, wide dynamic range and sharp frequency selectivity. These remarkable profiles are realized by the well-ordered system of the hearing organ. When sound enters the ear, it is transmitted through the outer and middle ears and finally causes vibration of the stapes. This mechanical vibration of

the stapes generates pressure fluctuation of the cochlear fluid across the basilar membrane, the stiffness of which decreases from the base toward the apex of the cochlea, creating traveling waves on the membrane [1]. Outer hair cells (OHCs), which are located on the basilar membrane as a part of the organ of Corti, were found to be motile by previous *in vitro* studies [2–6]. Based on these experiments, OHCs are thought to respond to acoustical stimulation from the outer and middle ear with elongation and contraction of their cylindrical soma *in vivo*. Due to this motility, OHCs are thought to subject the basilar membrane to force, causing

* Corresponding author. Tel.: +81 22 795 4048; fax: +81 22 795 6939.
E-mail address: michio@wadalab.mech.tohoku.ac.jp (M. Murakoshi).