

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08066

研究課題名(和文) 膜タンパク質による新しい転写調節機構の実証

研究課題名(英文) Research on a possible novel transcriptional regulation by a membrane protein

研究代表者

山口 聡一郎 (Yamaguchi, Soichiro)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：50596864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Transmembrane channel like protein 1 (TMC1)は内耳の有毛細胞において音の情報を電気信号に変換するために働くチャネルタンパク質である。私はマウスのTMC1 (mTMC1)を培養細胞の一つであるHEK293細胞に強制的に発現させると、一部の細胞において、核内にmTMC1の細胞内N端領域が集積する現象を見出した。本研究では、強制発現させたmTMC1の細胞内N端領域が切断される部位を明らかにした。また、強制発現させたmTMC1の細胞内N端領域がインポーチン を介した機構で核内に輸送され、いくつかの遺伝子の発現を変化させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、TMC1という膜タンパク質がその切断を介して転写調節を行う可能性があることを示しており、TMC1の内耳有毛細胞での新しい働きの可能性を提示するものである。すなわち、内耳有毛細胞が例えば障害を受けた時など、TMC1の切断減少が起きた時、その遊離したN端領域が核内に移行して、転写調節を行い、有毛細胞機能を変化させる可能性がある。よって、難聴の病態発現の一つの在り方の解明につながる可能性がある成果となる。

研究成果の概要(英文)：Transmembrane channel like protein 1 (TMC1) is the mechanoelectrical transduction (MET) channel in hair cells of the inner ear. I found a phenomenon that the cytosolic N-terminal region of overexpressed mouse TMC1 (mTMC1) is localized in nuclei of a small population of HEK293 cells. This suggests that in some cells the N-terminal region of mTMC1 is cleaved and transported into nuclei. In this study, I revealed the positions of the cleavage of overexpressed mTMC1 and the involvement of Importin in the mechanism of accumulation of the N-terminal region into nuclei. Moreover, overexpression of the N-terminal fragment of mTMC1 changed the expression levels of several genes. These findings suggest the possibility that TMC1 is cleaved and the produced N-terminal fragment regulates transcription in hair cells of the inner ear. However, further investigation is required in order to prove that the transcriptional regulation by mTMC1 happens in vivo.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：TMC1 転写調節 核内移行

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Transmembrane channel like protein 1 (TMC1)は内耳の有毛細胞において音の情報を電気信号に変換するために働くチャネルタンパク質である。近年、Kチャネルの一つである KCNQ1 との共発現によりヒトの TMC1 が形質膜上に発現することが報告されたが、それ以外の強制発現系では TMC1 は主に小胞体に留まり、形質膜に発現しないため、TMC1 についての強制発現系を用いた研究はあまりなされて来なかった。その状況下において私はマウスの TMC1 (mTMC1) を培養細胞の一つである HEK293 細胞に強制的に発現させると、一部の細胞において、核内に mTMC1 の細胞内 N 端領域が集積する現象を見出した。このように膜タンパク質の一部が核内に移行する例としては、調節性膜内切断 (Regulated Intramembrane Proteolysis) などによって SREBP や Notch といった膜タンパク質が切断されて、断片が核内に移行し、転写調節を行う例が知られる。よって、mTMC1 の細胞内 N 端領域も核に移行することで転写調節を行う可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、強制発現させた mTMC1 が切断される機構、切断された断片が核内に輸送される機構、また、核内に移行した断片が転写調節を行うか否かを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) プラスミド作製と細胞へのトランスフェクション

マウスの *Tmc1ex1* (あるいは一部の試験で *Tmc1ex2*) の cDNA を発現ベクターである pcDNA3.1 あるいは pIRES2-EGFP ベクターに挿入した。mTMC1 のアミノ酸の変異は site-directed mutagenesis により行った。プラスミドは HEK293 細胞に Trans-iT 293 Transfection Reagent を用いて、一過性にトランスフェクションした。

#### (2) 免疫細胞染色

トランスフェクションした HEK293 細胞を 4%のパラホルムアルデヒド溶液で固定し、0.1% Triton X-100 を用いて膜の透過処理を行った。ブロッキングを行った後、細胞を anti-mTMC1 Nt (*ex1* の D57-G75 が抗原) ウサギ抗体 (オーダーメイド) と Alexa Fluor 488 conjugated F(ab')<sub>2</sub> goat anti-rabbit IgG(H+L) で染色した。共焦点顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した。

#### (3) Western blot

トランスフェクションした HEK293 細胞を 1% Triton X-100 を含む lysis buffer 中で超音波破碎した。細胞溶解液は 4M の尿素と 2.5%の SDS を含むサンプルバッファーと 1:1 の比率で混ぜ合わせ、37 °C で 10 分間インキュベートした。タンパク質は SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した。一次抗体としては、anti-mTMC1 Nt ウサギ抗体 (abcam, ab199949)を用いた。

#### (4) 次世代シーケンサー (NGS) による RNA-seq とリアルタイム PCR

mTMC1 の細胞内 N 端領域をコードした pIRES2-EGFP と、元の pIRES2-EGFP をトランスフェクションした HEK293 細胞を、EGFP の蛍光を指標にしてセルソーターにかけて、プラスミドがトランスフェクションされた細胞を分取した。mRNA を抽出し、Ion Proton sequencing system (ThermoFisher, 米国)を用いて RNA-seq を行った。mTMC1 の細胞内 N 端領域を発現する細胞としない細胞の間の遺伝子発現量の統計解析を EdgeR で行った。有意な差があり、かつ 2 倍以上の変化があった遺伝子を抽出した。さらにその遺伝子の中で変化量が大きかった三つの遺伝子について mRNA 発現量を SYBR Green 法を用いたリアルタイム PCR を行い、Actb を参照遺伝子として  $\Delta\Delta Ct$  法により相対的な発現量を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) マウスの TMC1 を翻訳する mTmc1 のスプライシングバリエーションの同定

マウスの *Tmc1* の mRNA にはスプライシングバリエーションとして *mTmc1ex1* と *mTmc1ex2* があることが報告されているが、それぞれをクローニングして強制発現させ、Western blot による解析を行ったところ、*mTmc1ex1* からは mTMC1 のタンパク質が翻訳されたが、*mTmc1ex2* からは mTMC1 のタンパク質がほぼ翻訳されなかった。よって、以下の実験では *mTmc1ex1* を用い、また、その翻訳されたタンパク質を mTMC1 とした。

#### (2) mTMC1 の細胞内 N 端領域が核に集積する細胞の数の計測

HEK293 細胞に mTMC1 を強制発現させると一部の細胞で mTMC1 の細胞内 N 端領域が集積するが、免疫染色を実施し、核に集積する細胞の割合を計測した。細胞全体に対して核で mTMC1 の細胞内 N 端領域が 6 割以上見られた細胞を、核に mTMC1 の細胞内 N 端領域が集積した細胞とすると、全体の mTMC1 発現全体細胞の  $13.5 \pm 1.4\%$  の細胞で核に集積していた。(図 1)

(3) mTMC1 の細胞内 N 端領域の断片の検出と切断に必要なアミノ酸配列の同定

mTMC1 の細胞内 N 端領域の断片を検出するため、細胞内 N 端領域に対する抗体 (図 2a) を用いて Western blot 法により、HEK293 細胞に強制発現させた mTMC1 を検出した。すると、全長の mTMC1 が検出された他に、少なくとも二つの細胞内 N 端領域の断片が検出された (図 2b)。より強くバンドが検出された断片を Fragment 1、次に多く検出される断片を Fragment 2 と呼ぶことにした。

Fragment 1 の切断のために必要な配列をアミノ酸変異実験により調べたところ、最終的に 125 番目のバリンと 126 番目のセリンをアラニンに置換すると Fragment 1 が大きく減少することが明らかとなった (図 2c, d)。Fragment 2 に関しては、87 番目のロイシンから 92 番目のアラニンまでを欠損させると Fragment 2 がほぼ消失した (図 2e, f) ことからこの配列が Fragment 2 が生じるために必要であることが明らかとなった。さらに、127 番目のグルタミン酸まで、あるいは 89 番目のアルギニンまでの mTMC1 の細胞内 N 端領域を強制発現させて、Western blot によりバンドの位置を Fragment 1 と Fragment 2 とで順に比較するとほぼ同じ位置であったため、切断に必要なアミノ酸配列の近傍で切断が生じていることが示唆された。

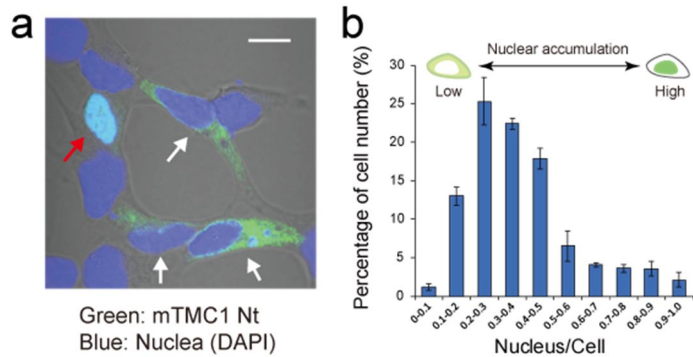


図 1 核に mTMC の細胞内 N 端領域が集積する細胞の計測

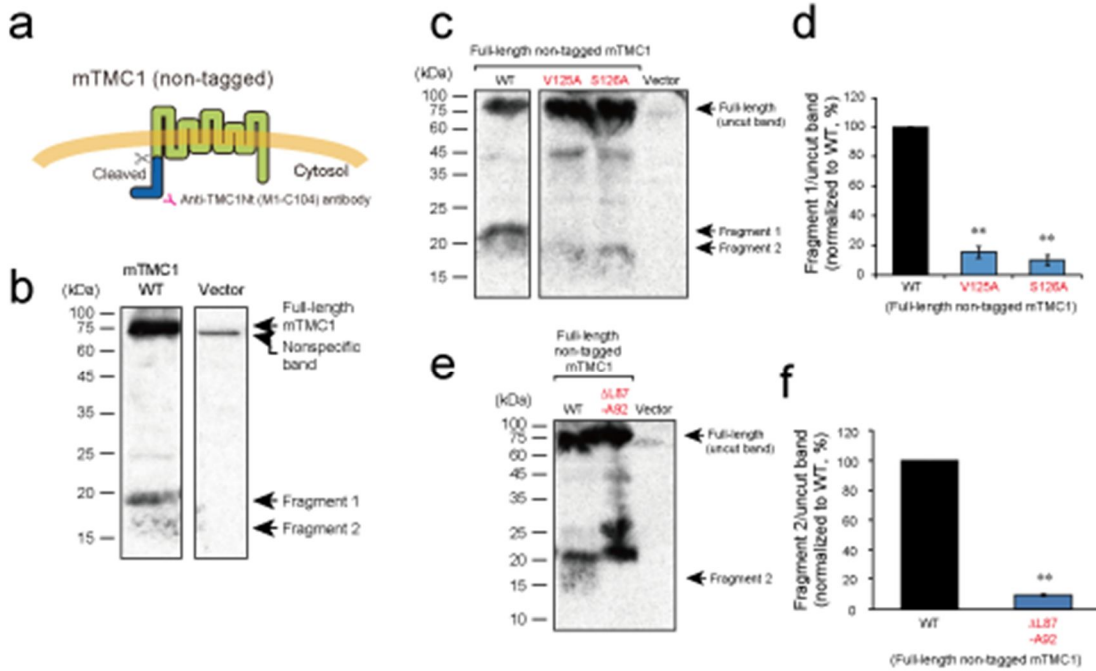


図 2 Western blot による切断部位の解析

(4) mTMC1 の細胞内 N 端領域の核内への輸送への核移行シグナルの関与

mTMC1 の細胞内 N 端領域には古典的単節的核移行シグナル (cNLS, K-K/R-X-K/R) となりうる配列 (K38RKTR43) があったため、その関与を調べた。cNLS はインポーチン が結合できる配列である。まず、Fragment 1 に相当する mTMC1 の 127 番目のグルタミン酸 (E127) までの細胞内 N 端領域 (M1-E127) を強制発現させると、

ほぼ全ての細胞で核に集積した (図 3 上段)。それに対し、cNLS となりえる配列のアルギニンをアラニンに置換することで無くした変異体 (R39A/R41A) では細胞全体へと分布し、核内に集積

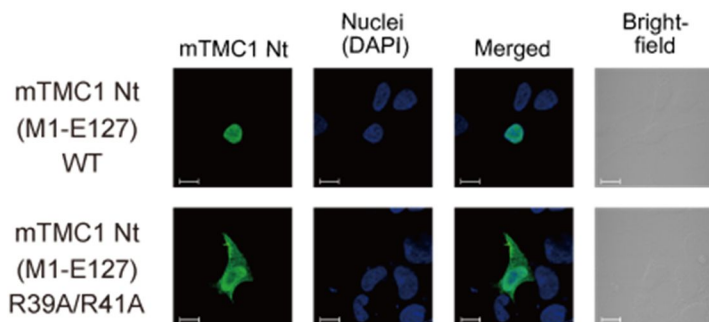


図 3 核移行シグナルの変異による局在の変化

することが抑制された(図3下段)これらの結果から、切断された mTMC1 の細胞内 N 端領域は核移行シグナルと介して核内へと輸送されることが示され、インポーチンによる輸送が関与することが示唆された。

#### (5) mTMC1 の細胞内 N 端領域の強制発現による遺伝子発現の変化

次世代シーケンサーを用いて、mTMC1 の細胞内 N 端領域 (M1-E127) までを発現させた HEK293 細胞と、Vector のみをトランスフェクションした HEK293 細胞とで、トランスクリプトームを比較したところ、16 個の遺伝子において有意に二倍以上の変化が認められた(図 4a)。この中で変化量が大きかった三つの遺伝子 (Aurkc、Npc1L1、Tagln) についてリアルタイム PCR で再度発現量を調べたところ、いずれも同様の有意な変化が認められた(図 4b)。

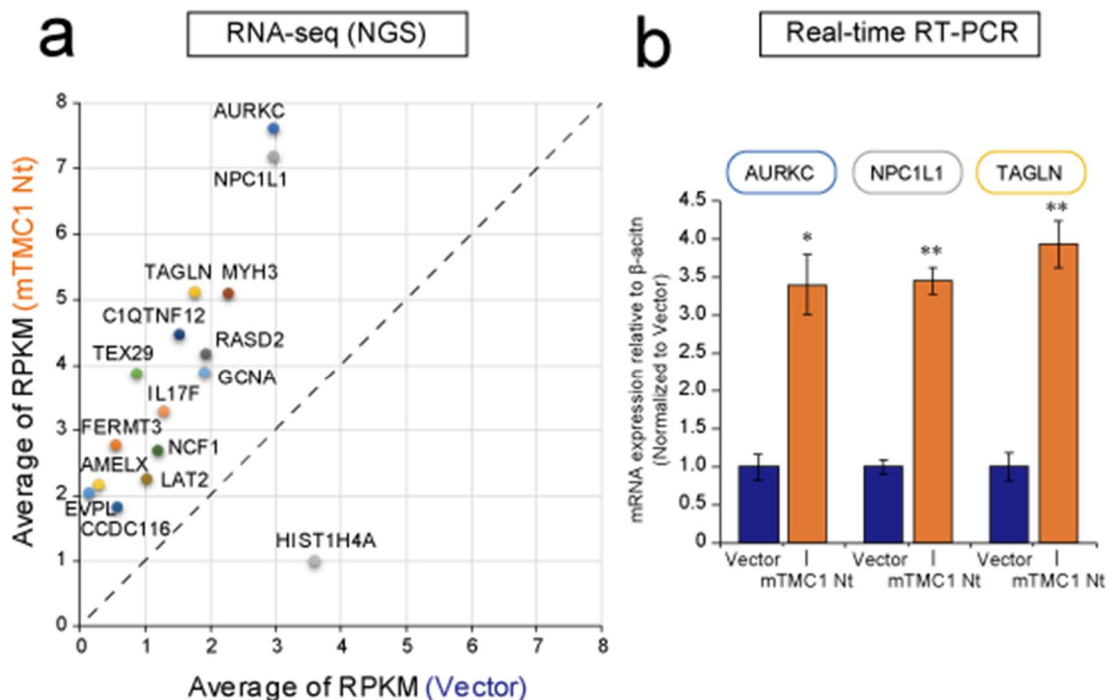


図 4 細胞内 N 端領域の強制発現による遺伝子発現変化

#### (6) 研究成果の意義と今後の展開

本研究により、HEK293 細胞に強制発現させた mTMC1 の細胞内 N 端部位が切断される箇所と核内への輸送機所の一端が明らかとなった。さらに核内へと輸送された mTMC1 の細胞内 N 端領域が何らかの形で一部の遺伝子の発現量を変化させる可能性が示唆された。ただし、変動のあった遺伝子には、有毛細胞の機能に直結することが明確なものではなく、有毛細胞の難聴病態にどのような影響があるかは未解明である。

本研究成果は、TMC1 という膜タンパク質がその切断を介して転写調節を行う可能性があることを示しており、TMC1 の内耳有毛細胞での新しい働きの可能性を提示するものである。すなわち、内耳有毛細胞が例えば障害を受けた時など、TMC1 の切断減少が起きた時、その遊離した N 端領域が核内に移行して、転写調節を行い、有毛細胞機能を変化させる可能性がある。よって、難聴の病態発現の一つの在り方の解明につながる可能性がある成果となる。

ただし、生体内の有毛細胞において、本研究で観察されたような TMC1 の切断が起きて転写調節が起こるか否かは非常に重要な問題である。しかし、試した三種類の抗体によっては、マウスの蝸牛の whole mount の標本の免疫染色では特異的な mTMC1 の染色は認められなかった。また、蝸牛から抽出したタンパク質を用いた western blot も行ったが、全長の mTMC1 も検出できなかった。よって、in vivo において、TMC1 の切断減少とそれに伴う転写調節が行われているか否かを明らかにするには更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神野真帆、濱村真帆、山口聡一郎、乙黒兼一
2. 発表標題 TMC1の細胞内N端領域における核移行機序および切断部位の同定
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Soichiro Yamaguchi, Maho Kamino, Maho Hamamura, and Ken-ichi Otsuguro
2. 発表標題 A cytosolic N-terminal region of Transmembrane Channel-like protein 1 (TMC1) is cleaved and imported into the nucleus in an overexpression system
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>本研究成果の一部に関して、第160回日本獣医学会学術集会（鹿児島、2017年9/13-15）内の薬理毒性分科会における若手勉強会にて口頭発表を行った。</p>
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----