

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390439

研究課題名（和文） 遺伝性難聴の治療を目指した変異膜タンパク質をリフォールディングさせる新手法の創出

研究課題名（英文） Creation of a New Method to Refold the Membrane Protein Mutants for Curing of Hereditary Hearing Loss

研究代表者

和田 仁 (WADA HIROSHI)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30111264

研究成果の概要（和文）：膜タンパク質ペンドリン遺伝子 *SLC26A4* は内耳における内リンパの陰イオン調節を担っており、変異により感音性難聴を引き起こす。しかし、難聴が引き起こされるメカニズムは不明である。そこで本研究では、ペンドリンの突然変異遺伝子を導入した HEK293 細胞を用い、その細胞内局在と陰イオン交換機能を解析した。はじめに、日本人で報告されている 10 種類の変異ペンドリン遺伝子を作製し、免疫染色により局在を調べたところ、正常なペンドリンは膜に局在したのに対し、8 種類の変異体は細胞内に残ったままであった。さらに、サリチル酸の薬剤効果により、機能を回復するか調べたところ、4 種類の変異ペンドリンが 10mM のサリチル酸投与により細胞膜に移動し、機能が回復した。

研究成果の概要（英文）：The *SLC26A4* gene encodes the transmembrane protein pendrin, which is involved in the conditioning of the ion concentration in the endolymph of the inner ear. Mutations in the *SLC26A4* gene cause sensorineuronal hearing loss. However, the mechanisms responsible for such loss have remained unknown. In this study, therefore, cellular localization and anion exchanger activity were analyzed by using HEK293 cells transfected with mutant genes. First, 10 pendrin mutants reported in Japanese patients were constructed. Immunofluorescent staining of the cellular localization of the pendrin mutants revealed that normal pendrin was transported to the plasma membrane; however, 8 mutants were retained in the cytoplasm. Furthermore, we analyzed whether salicylate, as a pharmacological chaperone, restored the function. Incubation with 10 mM of salicylate of the cells transfected with the mutants induced the transport of 4 pendrin mutants from the cytoplasm to the plasma membrane and recovered the anion exchanger activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学, 遺伝性難聴, ペンドリン, タンパク質フォールディング

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性難聴は出生 2000 人に 1 人の割合で発生する疾患であるが、それに対する有効な治療法はまだまだ存在しない。このため、治療

法開発への社会の要求は非常に強い。日本人における遺伝性難聴の大半は、内耳蝸牛に発現する膜タンパク質コネキシン 26（遺伝子名：*GJB2*）及びペンドリン（遺伝子名：

*SLC26A4*)の変異に起因する。コネキシン 26 はコルチ器支持細胞やラセン靱帯に発現し、細胞間のギャップジャンクションを形成している。コルチ器周囲の内リンパ液から有毛細胞に流入したカリウムイオン ( $K^+$ ) は、ギャップジャンクションを通過し、内リンパ液へと戻される。この  $K^+$  のリサイクル機構により、内リンパ液は高電位に維持されており、この高電位は有毛細胞による音刺激受容に不可欠である。一方ペンドリンは、蝸牛内では外ラセン細胞に発現し、内リンパ液のイオン組成を調節し、蝸牛外では内リンパ液を吸収している内リンパ嚢や内リンパ管に発現する。内リンパ液と密接に関わるコネキシン 26 及びペンドリンが変異すると、内リンパ液の電位の低下やイオン組成の変化、または内リンパ液の量の増大につながり、それらが難聴を引き起こすと推察されている。

我々はこれまで、ペンドリンと相同性が高く、内耳外有毛細胞に発現する膜タンパク質プレスチン (遺伝子名: *SLC26A5*) を研究してきた。そして、プレスチンにある種の変異を加えると、プレスチンがミスフォールディングし、細胞質内に蓄積され、機能を失うことを明らかにした (文献 1)。さらに、ミスフォールディングしている変異プレスチンを発現した細胞に、分子シャペロンとして働く物質を投与すると、正しいフォールディングが促され (リフォールディング)、変異プレスチンが細胞膜に輸送され、その結果機能が回復することを発見した。また我々は、いくつかの変異コネキシン 26 がミスフォールディングし、細胞質内に蓄積することを発見した (文献 2)。ペンドリンについても他の研究者が、いくつかの変異体がミスフォールディングし細胞質内に蓄積することを報告している (文献 3)。我々は、ミスフォールディングした変異コネキシン 26 及び変異ペンドリンの機能を、変異プレスチンの場合と同様に分子シャペロンとして働く物質の投与により回復させることができれば、遺伝性難聴を治療できると考えている。分子シャペロンとして働く物質としては、コネキシン 26 及びペンドリンと特異的に結合するペプチドが有力な候補である。

(文献)

1. Kumano S, Wada H, *et al.*, *JSME Int J.* 48C, 403-410 (2005)
2. Oguchi T, Usami S, *et al.*, *J Hum Genet.* 50, 76-83 (2005)
3. Taylor J.P, *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 1778-1784 (2002)

## 2. 研究の目的

我々はこれまで、ペンドリンと相同性が高く、内耳外有毛細胞に発現する膜タンパク質プレスチン (*SLC26A5*) を研究してきた。そ

して、変異によりプレスチンが細胞内でミスフォールディングし機能を失う場合、分子シャペロンとして働く物質を細胞に投与すると、変異プレスチンがリフォールディングし、その結果機能が回復することを発見した。その結果をもとに本研究では、変異プレスチン同様、ミスフォールディングした変異ペンドリンやコネキシンをリフォールディングさせ、それらの機能を回復させる手法を確立する。そして、確立した手法を応用し、遺伝性難聴の革新的治療法を開発することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 日本人で報告されている 10 種類の変異ペンドリンの遺伝子作製。

ヒト野生型ペンドリン cDNA の N 末端に FLAG タグを付加し、pcDNA3.1 プラスミドに組み込んだ。このプラスミドを発現ベクターとして大腸菌 JM109 で増殖させた。増殖させたプラスミドを用い、日本人で報告されている 10 種類の変異遺伝子を 1 塩基置換により作製し、塩基配列をシーケンサーで確認した。

(2) 10 種類の変異ペンドリンの細胞内局在の解析。

(1) で作製した 10 種類の変異ペンドリン遺伝子をもったベクターを HEK293 細胞に導入し、24 - 48 時間後に免疫染色を行った。染色には一次抗体としてマウス anti-FLAG primary antibody を用い、二次抗体として anti-mouse IgG secondary antibody TRITC conjugated を用いた。染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて野生型および 10 種類の変異型ペンドリンの顕微鏡観察を行い、細胞内のどの部分に局在しているか解析を行った。

(3) 放射性同位元素  $^{125}I$  によるペンドリンのイオントランスポート活性測定系の確立。ペンドリンはヨウ素を細胞外に放出する機能を有している。ペンドリンの機能が正常であった場合、ヨウ素は細胞外に排出され細胞内の濃度は低くなる。このことから取り込んだ放射性同位体元素  $^{125}I$  の細胞内濃度を測定し、野生型と比較することでペンドリンの機能を判別する実験系を確立した。この実験系を用い、ベクターを導入しなかった細胞、野生型ペンドリンベクターおよび 10 種類の変異ペンドリンベクターを導入した細胞におけるヨウ素排出能を測定した。

(4) サリチル酸投与による変異ペンドリンタンパク質の局在変化と機能回復の測定。以前の研究で、1 塩基置換を起こした変異プレスチンにサリチル酸を投与すると機能を回復したことから、プレスチンのファミリータンパクであるペンドリンにも同様の効果があるのではないかという仮説を元に、変異ペンドリンを導入した細胞に 10mM サリチル

酸を投与した. サリチル酸投与 12 時間後, (2) および (3) の実験を行った.

(5) サリチル酸の細胞毒性評価.

サリチル酸の細胞毒性を評価するため, HEK293 細胞に 10mM サリチル酸投与 12 時間後, 7-アミノ-アクチノマイシン D(7-AAD) により 10 分間染色した. 7-AAD は生細胞内には浸透せず, 死細胞には浸透し, 共焦点レーザー顕微鏡で判別できる.

(6) サリチル酸誘導体の選択.

10mM サリチル酸に細胞毒性はなかったものの, サリチル酸は耳毒性を持っていることが知られていることから, より低濃度で効果のある化合物を探索するため, サリチル酸に化学構造の良く似た誘導体を選択した.

(7) サリチル酸により局在が膜に移行した 4 種類の変異体のうち 2 種類 (P123S, H723R) のサリチル酸誘導体による局在変化.

サリチル酸投与によりペンドリンの局在が膜に移行し, イオントランスポート活性が回復した 4 種類の変異体のうち P123S, H723R を用い, サリチル酸誘導体によって局在変化が見られるか免疫染色後, 顕微鏡観察を行った.

#### 4. 研究成果

(1) 日本人で報告されている 10 種類の変異ペンドリンの遺伝子作製.

日本人で報告されている 10 種類の変異ペンドリン遺伝子 (P123S, M147V, K369E, A372V, N392Y, C565Y, S657N, S666F, T721M, H723R) の作製に成功した.

(2) 10 種類の変異ペンドリンの細胞内局在の解析.

10 種類の変異ペンドリンのうち 2 種類の変異体 (K369E, C565Y) は野生型 (Wild-type) と同様に細胞膜に発現し, 8 種類は細胞内に蓄積することが明らかとなった (Fig. 1). ここで Empty ベクターは, 野生型も変異体遺伝子も導入されていないベクターでネガティブコントロールとして用いた.

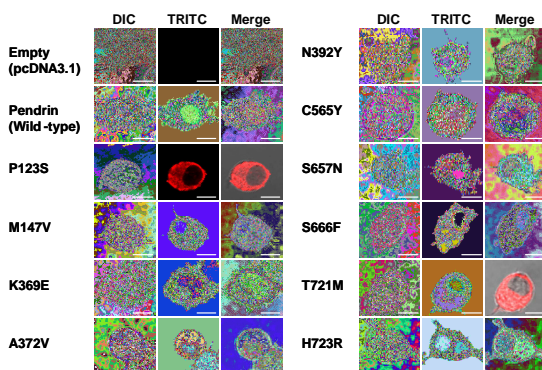


Fig. 1 HEK293 細胞におけるプラスミドベクター導入後免疫染色画像. DIC (Differential interference contrast) は微分干渉画像を示して

おり細胞の輪郭がわかる. TRITC は免疫染色画像でペンドリンが赤く染色されている. Merge は DIC と TRITC を合成した画像である. 各画像の左下白線の長さは 10 $\mu$ m を表わす.

(3) 放射性同位元素 <sup>125</sup>I によるペンドリンのイオントランスポート活性測定系の確立. 実験に使用できる測定系が確立できたので, サリチル酸の効果を測定した. 詳細を (4) に示す.

(4) サリチル酸投与による変異ペンドリンタンパク質の局在変化と機能回復の測定.

(2) において, ペンドリンが細胞内に蓄積した 8 種類の変異体のうち, 4 種類の変異体 (P123S, M147V, S657N, H723R) は, サリチル酸投与により細胞膜に移行することが分かった (Fig. 2).

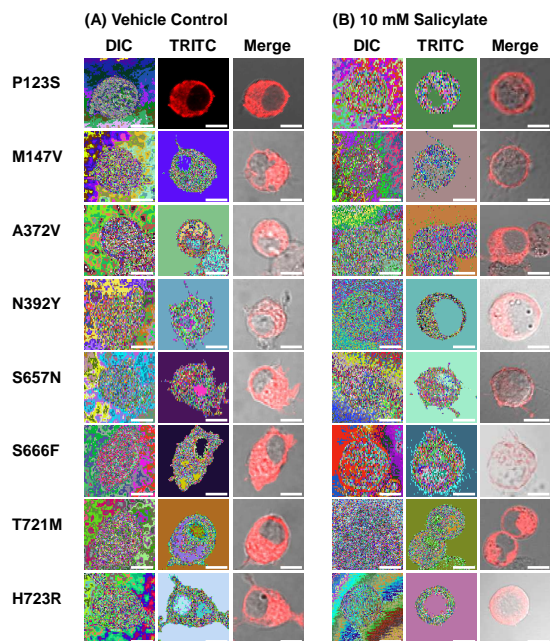


Fig. 2 HEK293 細胞におけるプラスミドベクター導入後, サリチル酸投与を行った免疫染色画像. (A) はサリチル酸を溶解した水, (B) は 10mM サリチル酸を投与して 12 時間後に免疫染色した.

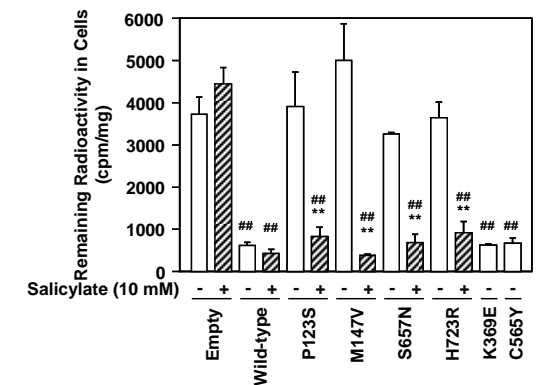


Fig. 3 放射性同位元素  $^{125}\text{I}$  による変異ペンドリンのイオントランスポート活性測定.

サリチル酸によりペンドリンが細胞膜に移行した変異体と同じ変異体 (P123S, M147V, S657N, H723R) において, ヨウ素の排出機能が回復した (Fig. 3).

(5) サリチル酸の細胞毒性評価.

10mM サリチル酸の細胞毒性を調べたところ, 7-AAD での染色は見られなかったことから, 10mM では細胞毒性はないと考えられる (Fig. 4).

(6) サリチル酸誘導体の選択.

低濃度でサリチル酸と同様の効果が期待できそうな誘導体 4 種類 (サリゲニン, 2-ヒドロキシアセトフェノン, 2,3-ジヒドロキシ安息香酸, サリチル酸メチル) を選択した.

(7) サリチル酸により局在が膜に移行した 4 種類の変異体のうち 2 種類 (P123S, H723R) のサリチル酸誘導体による局在変化.

サリチル酸によりペンドリンの局在が膜に移行し, ヨウ素排出機能が回復した P123S において, 低濃度のサリチル酸誘導体が同様の効果を示すか調べたところ, 2 種類のサリチル酸誘導体 (サリゲニン, 2,3-ジヒドロキシ安息香酸) が, サリチル酸の 1/10 の濃度で変異体の細胞膜への移行を促進した (Fig. 5).

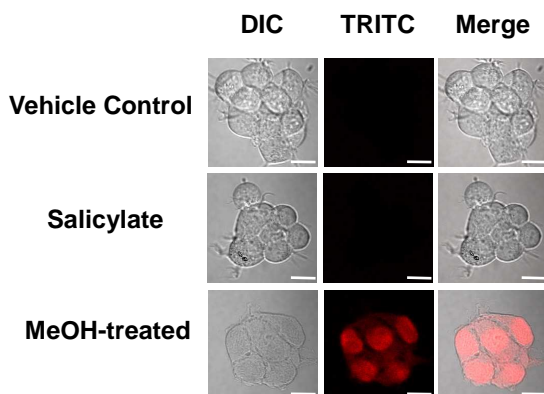


Fig. 4 HEK293 細胞に水, サリチル酸, メタノール投与を行った免疫染色画像.

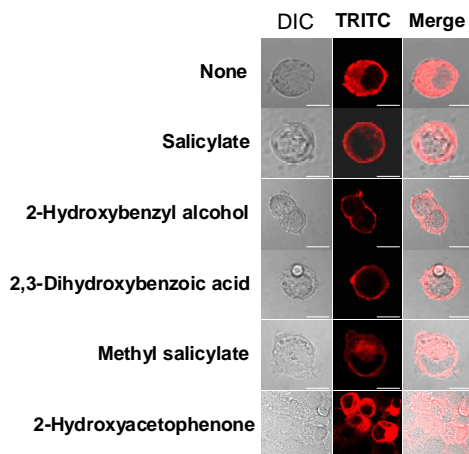


Fig. 5 P123S 変異体導入後の HEK293 細胞におけるサリチル酸および 4 種類のサリチル酸誘導体投与後の免疫染色画像.

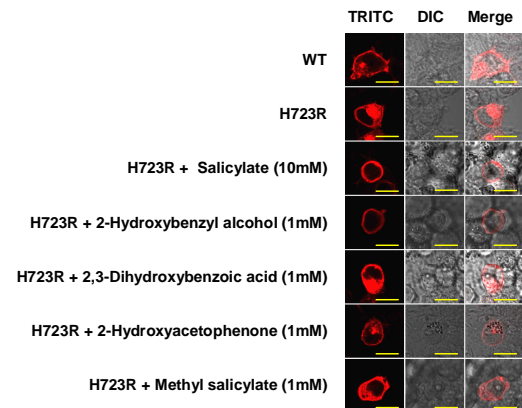


Fig. 6 H723R 変異体導入後の HEK293 細胞におけるサリチル酸および 4 種類のサリチル酸誘導体投与後の免疫染色画像.

また, H723R においては 2 種類のサリチル酸誘導体 (サリゲニン, 2-ヒドロキシアセトフェノン) が, サリチル酸の 1/10 の濃度で変異体の細胞膜への移行を促進した (Fig. 6).

(まとめ)

以上の結果から, HEK293 細胞に日本人で知られている 10 種類の変異ペンドリンを導入した際, 8 種類は細胞膜に移行せず, ヨウ素の排出機能が失われていたが, 10mM サリチル酸投与により, 4 種類の変異体では細胞膜への移行とヨウ素排出機能の回復が見られた. この成果は, [雑誌論文] の①に掲載した *Hearing Research* にまとめられている. また, P123S 変異体においては, サリチル酸と化学構造が良く似た 2 種類のサリチル酸誘導体 (サリゲニン, 2,3-ジヒドロキシ安息香酸) で膜移行活性が見られ, H723R 変異体においては, 2 種類のサリチル酸誘導体 (サリゲニン, 2-ヒドロキシアセトフェノン) で膜移行活性が見られたことから, これらサリチル酸およびサリチル酸誘導体は, 今後の遺伝性難聴治療の創薬に貢献すると考えられる.

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件) 全ての論文で査読有

- ① Ishihara K, Okuyama S, Kumano S, Iida K, Hamana H, Murakoshi M, Kobayashi T, Usami S, Wada H, Salicylate restores transport function of missense pendrin mutation, *Hear. Res.*, 270, 2010, 110–118.
- ② Kumano S, Murakoshi M, Iida K, Hamana H, Wada H, Atomic force microscopy imaging of the structure of the motor protein prestin

reconstituted into an artificial lipid bilayer, FEBS Lett., 584, 2010, 2872-2876.

- ③ Kumano S, Iida K, Ishihara K, Murakoshi M, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, Wada H, Salicylate-induced translocation of prestin having mutation in the GTSRH sequence to the plasma membrane, FEBS Lett., 584, 2010, 2327-2332.
- ④ Kumano S, Tan X, He DZZ, Iida K, Murakoshi M, Wada H, Mutation-induced reinforcement of prestin-expressing cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 389, 2009, 569-574.
- ⑤ Murakoshi M, Iida K, Kumano S, Wada H, Immune atomic force microscopy of prestin-transfected CHO cells using quantum dots, Pflugers Archiv., 457, 2009, 885-898.
- ⑥ Tadenuma T, Iida K, Murakoshi M, Kumano S, Tsumoto K, Ikeda K, Kobayashi T, Kumagai I, Wada H, Functional expression of prestin, the outer hair cell motor protein, using the baculovirus/insect cell system, J. Biomech. Sci. Eng., 3, 2008, 287-298.
- ⑦ Iida K, Murakoshi M, Kumano S, Tsumoto K, Ikeda K, Kobayashi T, Kumagai I, Wada H, Purification of the motor protein prestin from Chinese hamster ovary cells stably expressing prestin, J. Biomech. Sci. Eng., 3, 2008, 221-234.

[学会発表] (計 37 件)

- ① 村越 道生, 内耳モータータンパク質プレスティンの膜貫通構造解析-原子間力顕微鏡を用いて-(Analysis of transmembrane structure of the inner ear motor protein prestin-atomic force microscopy study-), 日本機械学会第23回 バイオエンジニアリング講演会, 2011年1月8日, 熊本
- ② 小山 眞, 極低周波変動磁場と化学物質の複合曝露によるA172細胞内APサイト形成の増幅効果 (ELF magnetic fields enhance chemically induced formation of apurinic/apyrimidinic (AP) sites in A172 cells), 日本機械学会第23回 バイオエンジニアリング講演会, 2011年1月8日, 熊本
- ③ 鈴木 翔, 内耳増幅機構における外有毛細胞の協調運動の重要性 (Importance of outer hair cell coordinating movement for cochlear amplification), 日本機械学会第23回 バイオエンジニアリング講演会, 2011年1月8日, 熊本
- ④ 和田 仁, 人工脂質二重膜と原子間力顕微鏡を利用したタンパク質モーター prestin の可視化, 第55回 日本聴覚医学会総会・学術講演会, 2010年11月11日, 奈良
- ⑤ Murakoshi M, Analysis of transmembrane structure of prestin by single molecule force spectroscopy, The 47th Inner Ear Biology, 2010年8月29日, プラハ, チェコ
- ⑥ Wada H, Translocation of prestin having mutation in the GTSRH sequence by salicylate, The 47th Inner Ear Biology, 2010年8月29日, プラハ, チェコ
- ⑦ Wada H, Recovery by salicylate of the plasma membrane expression of prestin mutants, The 6th World Congress of Biomechanics, 2010年8月2日, シンガポール, シンガポール
- ⑧ Murakoshi M, Single molecule force spectroscopy of the inner-ear motor protein prestin using an atomic force microscope, The 6th World Congress of Biomechanics, 2010年8月2日, シンガポール, シンガポール
- ⑨ Wada H, Site-directed mutagenesis of the motor protein prestin, 第12回 東北大学 GCOE国際シンポジウム, 2010年3月27日, 仙台
- ⑩ Kumano S, High resolution imaging by atomic force microscopy of prestin purified and reconstituted into an artificial lipid bilayer, 33rd ARO MidWinter Meeting, 2010年2月8-10日, カリフォルニア, 米国
- ⑪ 熊野 峻, 人工脂質二重膜に再構成したタンパク質モータープレスティンの原子間力顕微鏡を用いた構造解析, 日本機械学会第22回 バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月9日, 岡山
- ⑫ 瀬下 直矢, Sweep Frequency Impedance Meter を用いた新生児と成人の中耳動特性の比較解析, 日本機械学会 第22回 バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月9日, 岡山
- ⑬ 鈴木 翔, 蝸牛増幅機構における3列の外有毛細胞の重要性, 日本機械学会 第22回 バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月9日, 岡山
- ⑭ Murakoshi M, Atomic force microscopic imaging of the inner ear motor protein prestin using quantum dots, Watching Biomolecules in Action, 2009年12月14日, 大阪
- ⑮ 村越 道生, 原子間力顕微鏡とQdotを用いた内耳モータータンパク質プレスティンの可視化, 第43回 日本生体医工学会 東北支部大会, 2009年11月21日, 福島
- ⑯ 和田 仁, 遺伝性難聴に関わる変異 Pendrinのサリチル酸及びその誘導体によ

- るリフォールディング, 第19回 日本耳科学会総会・学術講演会, 2009年10月9日, 東京
- ⑰ Kumano S, Remarkable enhancement of the activity of prestin by point mutation, Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics, 2009年9月2日, エンゲルベルク, スイス
- ⑱ Suzuki S, Significant decline in cochlear amplification caused by the functional loss of one of the three rows of outer hair cells, Third Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics, 2009年9月2日, エンゲルベルク, スイス
- ⑲ 和田 仁, 哺乳類の聴覚システムの分子レベルでの理解, 第11回 東北大学GCOE 国際シンポジウム, 2009年7月25日, 東京
- ⑳ Wada H, Development of an apparatus for non - invasive measurement of the middle ear function in neonates, GCOE 第7回 国際シンポジウム, 2008年10月17日, 台湾, 台南
- ㉑ 飯田 浩司, 等温滴定熱量測定による精製タンパク質モータ prestin の機能解析, 第18回 日本耳科学会総会・学術講演会, 2008年10月16日, 神戸
- ㉒ 和田 仁, Qdot と原子間力顕微鏡を利用したタンパク質モータ prestin の可視化, 第53回 日本聴覚医学会総会・学術講演会, 2008年10月2日, 東京
- ㉓ Murakoshi M, Topological characterization by atomic force microscopy of prestin in the plasma membrane of prestin-transfected chinese hamster ovary cells using quantum dots, The 10th International Workshop on the Mechanics of Hearing, 2008年7月28日, イギリス, キール
- ㉔ Iida K, Assessment of the activity of purified prestin and the effect of salicylate on prestin-chloride binding studied by isothermal titration calorimetry, The 10th International Workshop on the Mechanics of Hearing, 2008年7月27-31日, イギリス, キール
- ㉕ Kumano S, Increase in the activity by mutations of the motor protein prestin, The 10th International Workshop on the Mechanics of Hearing, 2008年7月27-31日, イギリス, キール
- ㉖ 飯田 浩司, タンパク質モータ prestin の精製と陰イオンとの相互作用計測による精製 prestin の機能評価, 第47回 生体医工学会大会, 2008年5月9日, 神戸
- [図書] (計2件)
- ① Michio Murakoshi *et al.*, Springer Protocols, Atomic force microscopy in studies of the cochlea. *Methods Mol. Biol.*, 493, 2009, 401-413.
- ② 新宅 博文 他, シーエムシー出版, “MEMS技術による人工内耳の開発” ヘルステクアとバイオ医療のための先端デバイス機器, 2009, 326-335.
- [その他]
- ホームページ等
- (1)<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/b6669433b8717e8ca8124a5ee024cc9f.html>
- (2)<http://www.wadalab.mech.tohoku.ac.jp/index-j.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
和田 仁 (WADA HIROSHI)  
東北大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 30111264
- (2) 研究分担者  
宇佐美 真一 (USAMI SHINICHI)  
信州大学・医学部・教授  
研究者番号: 10184996
- 石原 研治 (ISHIHAR A KENJI)  
茨城大学・教育学部・准教授  
研究者番号: 00312596
- (3) 連携研究者  
小林 俊光 (KOBAYASHI TOSHIMITSU)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 80133958
- 熊谷 泉 (KUMAGAI IZUMI)  
東北大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 10161689