

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592489

研究課題名(和文) プレスチン蛋白の膜発現様式と外有毛細胞機能との関係

研究課題名(英文) Relations with a film expression style of the prestin protein and the outer hair cell function

研究代表者

松田 圭二 (Matsuda, Keiji)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：40253835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)： プレスチンは、ほ乳類の外有毛細胞に特異的に発現し、聴覚機能に大きく関与することが分かっている。今回の研究において、 プレスチンを強制発現させることにより、その細胞容積調節能力が低下した。容積感受性Cl⁻チャンネルに対してプレスチンの競合阻害薬であるサリチル酸を投与すると、プレスチンを強制発現させた細胞のみ、電流は減弱した。以上のことから、プレスチンが、水チャンネルを含む細胞容積調節に関与しており、アポトーシス時に生じる容積感受性Cl⁻チャンネルの過剰な活性化をサリチル酸がプレスチンの働きを阻害することにより減弱させる可能性がある事がわかった。

研究成果の概要(英文)： The prestin specifically emerges at the outer hair cell in mammals, and it is revealed that it greatly participate in a hearing function.

In this study, 1. When we forcibly expressed the prestin on the cell, the ability of the cell volume regulation decreased. 2. When we administered the salicylic acid, which was the competing inhibitor of the prestin in regard to the volume-sensitive Cl⁻ channel, to the cell, the channel current decreased in the cell forcibly expressed the prestin.

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・外科学一般

キーワード： プレスチン 細胞容積調節

1. 研究開始当初の背景

細胞壁を持たない動物細胞は、細胞内膠質浸透圧の存在によって定常的に、そして生理学的な細胞活動自身による細胞内外浸透圧変化や病態生理学的な浸透圧環境変化によって非定常的にも、浸透圧負荷を受けており、細胞容積の調節を不断に行う必要に迫られている。細胞容積調節不全は細胞死(アポトーシスとネクローシス)をもたらすことになるからである。内耳において、メニエール病や変動する感音難聴における内耳液イオン環境とイオン透過性の変化は、局所の浸透圧変化を引き起こし、外有毛細胞の運動能に影響を与え、結果として聴覚機能に何らかの影響を与える可能性が考えられている。浸透圧/機械刺激受容体である TRPV4 受容体が、マウスやモルモットの外有毛細胞に発現しているとの報告がなされ、さらに低浸透圧刺激による外有毛細胞の細胞容積増加に伴い、細胞内カルシウムイオン濃度上昇と NO 産生が引き起こされるということも報告されている。そのため、細胞容積変化の持続は細胞死をもたらすので、細胞は浸透圧負荷に対抗して容積を調節することによって、生存を保っている。高/低浸透圧負荷に対して「調節性容積増加/減少 Regulatory Volume Increase/Decrease (RVI/RVD)」と呼ばれる容積調節能に対抗する。RVD 時には K^+ イオン、 Cl^- イオン、水の流出が生じる。哺乳類において RVD 時の Cl^- イオン流出は容積感受性 Cl^- チャンネルを通して行われる。これらの容積調節はいずれも、細胞内外への $NaCl$ や KCl の輸送による水輸送の駆動によって達成され、それには種々のチャンネルやトランスポーターが関与している。それゆえ、逆にこれらの容積調節異常によって細胞膨張や細胞縮小が持続し、ネクローシス死やアポトーシス死をもたらすことになる。急性感音難聴の発生メカニズムには様々な動物実験モデルにおいて研究が進んでいる。具体的には、アミ

ノ配糖体投与によるモデル、音響外傷モデル、虚血モデル、機械的外傷モデルなどがあげられる。これらに共通して報告されているのは、活性酸素の発生とそれに続く蝸牛内細胞のアポトーシスである。アポトーシス死は Apoptotic Volume Decrease (AVD) と呼ばれる等浸透圧性細胞縮小の誘導と、RVI 不全による細胞縮小持続によってもたらされる。ミトコンドリア仲介性であれデスレセプター仲介性であれ、いかなるアポトーシス刺激も、 K^+ チャンネルと Cl^- チャンネルの活性化による KCl 流出を原因とする AVD の発生をもたらす。この Cl^- チャンネルは、(通常は細胞膨張時に活性化されて RVD をもたらすはずの)容積感受性 Cl^- チャンネルであり、これが細胞膨張なしに(むしろ細胞縮小過程にも)活性化されるのである。プレスチンは、ほ乳類の外有毛細胞に特異的に発現し、膜電位の変化に応じて伸縮するモータ蛋白として同定され、外有毛細胞体の能動的な伸縮のメカニズムを司る責任蛋白と目されている。プレスチンは 744 アミノ酸からなる 10~12 回膜貫通型の膜蛋白であり、ほ乳類の外有毛細胞・側底膜だけに発現する。現在ジャービル、ラット、ヒト、マウスについては既に遺伝子配列が明らかになっている。アニオントランスポーターファミリー (SLC26A) に属し、この属の他のメンバーである pendrin の欠損が Pendred 症候群(神経難聴と甲状腺腫大)を起こすと同様、プレスチン欠損もヒトにおける遺伝性神経難聴の原因になりうると考えられている。現在まで多くのプレスチンに関する研究が報告されてきているが、そのほとんどは、プレスチンの構造、機能およびその聴覚における役割に関するものである。2007年に Zhi らによりプレスチンの競合阻害薬であるサリチル酸で前投与した外有毛細胞に低浸透圧液を負荷すると細胞容積調節が阻害されることが報告された。このことからプレスチンが、細胞容積調節に関与していることが

推測された。

2. 研究の目的

プレスティンは細胞容積調節に関与することで細胞死にも関わっているのではないかと推測される。今回、我々はプレスティンが細胞容積調節にどのように関わっているかを調べることにした。

3. 研究の方法

(cell culture and transfection)

HEK293細胞を財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入した。37度、5%CO2の状態ではDMEM溶液を用いて単層培養した。Confluentとなった細胞をトリプシンを用いて収穫し、血清を含んだDMEM溶液によりトリプシンを不活性化させて、今回の研究に使用した。

Transfectionは、Effectene(Qiagen, Valencia, CA, USA) reagentsを用いてGFPとプレスティンとをcotransfectionさせた。

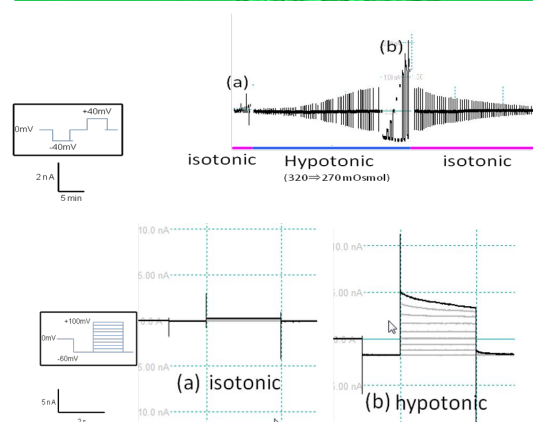
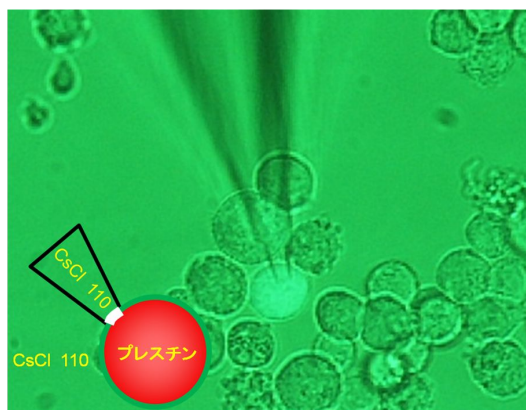
(volume measurements)

浸透圧による細胞容積(V)の変化を測定するためにニコン社製のDSカメラを用いて細胞面積(S)を測定した。 $V=4/3 * S * \sqrt{S}$ として算出した。用いた溶液の組成は、NaCl 95, KCl 4.5, mannitol 110, HEPES 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1, (mM) pH 7.4 浸透圧 310 mosmol で低張液はmannitolを0にして210 mosmolとした。細胞を倒立顕微鏡のチャンバーの上に載せ、低張液へ灌流置換させ、DSカメラで記録した。

(electrophysiology)

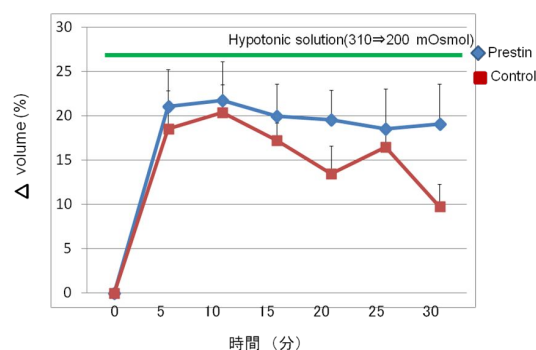
ホールセル・パッチクランプ法を用いて容積感受性クロライドチャンネル電流を測定した。細胞外液の組成は、CsCl 110, MgSO₄ 5, mannitol 90, HEPES 10, (mM) pH 7.4 浸透圧 320 mosmol で低張液はmannitolを40にして270 mosmolとした。ピペット溶液の組成は、CsCl 110, MgSO₄ 2, mannitol 60, HEPES 1, Na₂ATP 2, EGTA 1, pH 7.2 浸透圧 290 mosmolとした。低張液へ灌流置換させ、holding potentialの0mVから±40mVのstep pulse(持続1秒)を与える事で電流の経時

的变化を測定した。低浸透圧負荷により惹起された容積感受性電流の電位依存性を測定するために-60mVから100mVまで20mVずつ40mVのstep pulse(持続1秒)を与える事で電流の経時変化を測定した。低浸透圧負荷により惹起された容積感受性電流の電位依存性を測定するために-60mVから100mVまで20mVずつstep pulse(持続2秒)を負荷した。



4. 研究成果

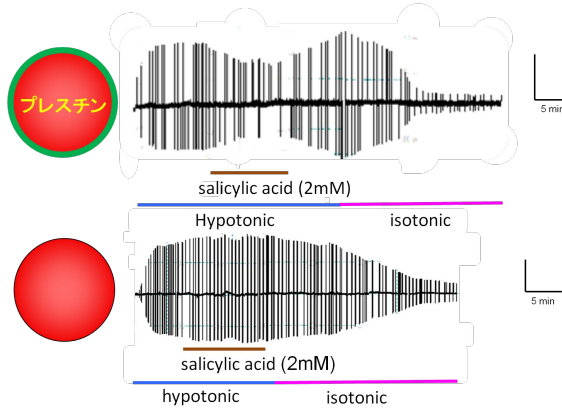
低浸透圧負荷した時の細胞容積変化を图示した。縦軸は容積増加率、横軸は時間である。



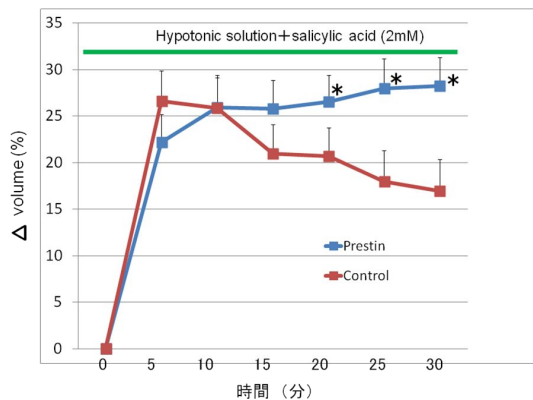
低浸透圧負荷する事により増加した細胞容積が元の容積に戻ろうとする変化(RVD)が認

められる。しかし、プレスチン を transfection させる事により、RVD 能力が低下する事が判った。

プレスチンを transfection させた細胞での容積感受性クロライドチャンネルの電流は、サリチル酸(2mM)投与により減弱した。



また、サリチル酸投与により RVD は認められなくなった。



この事よりプレスチンが、容積感受性クロライドチャンネルに影響を及ぼして細胞容積調節に関与している事が推測された。

内耳において、メニエール病や変動する感音難聴における内耳液イオン環境とイオン透過性の変化は、局所の浸透圧変化を引き起こし、外有毛細胞の運動能に影響を与え、結果として聴覚機能に何らかの影響を与える可能性が考えられている。カナマイシンを投与する事により、外有毛細胞のアポトーシスが生じ、聴覚器への影響が出やすい事は非常によく知られている。このアポトーシスを引き起こすメカニズムとして、プレスチンの関与を強く示唆する報告がなされた。この報告

では、プレスチンにより細胞内 Cl^- イオンの上昇が生じ、アポトーシスを生じる推測がなされた。また、アポトーシスが細胞内 Cl^- イオンの上昇につづき、細胞容積調節破綻によって生じる事、プレスチンが、細胞容積調節に関与している事から、細胞容積調節におけるプレスチンの働きを明らかにすることで、外有毛細胞におけるアポトーシスのメカニズムが明らかになるのではないかと考えた。

今回の研究において、プレスチンを強制発現させたことによって RVD 能力が低下した。この結果は、外有毛細胞に低浸透圧溶液を負荷した時に見られる RVD の報告に類似している。また、プレスチンと同じ SLC26A ファミリーである Pendrin を強制発現させた HEK293 cell においても同様の報告がある。発生学的にもラットで聴覚機能の芽生える生後 8 日目から 12 日目の間に外有毛細胞の水チャンネルの発現と electromotility の増加が密接に関係しているという報告がある。以上のことから、外有毛細胞において electromotility を担当するプレスチンが、水チャンネルを含む細胞容積調節に関与しているのではないかと推測される。次に、プレスチンが、細胞容積調節にどのように関与しているかを検証するため、パッチクランプ法を用いた。アポトーシスの際に重要な働きをする容積感受性 Cl^- チャンネルを抽出し、プレスチンの競合阻害薬であるサリチル酸を投与すると、プレスチンを強制発現させた HEK293 cell のみ、電流は減弱した。プレスチンが、細胞容積調節において容積感受性 Cl^- チャンネルの機能に関与していることが示唆された。Li らは、プレスチンが、容積感受性 Cl^- チャンネルを介してアポトーシスを生じさせているかもしれないと考察で述べている。サリチル酸を用いることで騒音によって生じる難聴を減弱させたという報告がある。これは、アポトーシス時に生じる容積感受性 Cl^- チャンネルの過剰な活性化、すなわち

Apoptotic Volume Decrease (AVD) をサリチル酸がプレステチンの働きを阻害することにより減弱させるのではないかと推測する。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

細胞容積調節におけるプレステチンの及ぼす影響

鍋倉 隆 松田 圭二 中村 雄 東野 哲也

第 23 回日本耳科学会総会 宮崎市

2013 年 11 月 24 日-26 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 圭二 ()

研究者番号 : 40253835

(2)研究分担者

鍋倉 隆 ()

研究者番号 : 20301385

長井 慎成

研究者番号 : 70404457