

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04739

研究課題名(和文)内耳増幅の超分子メカニズム解明を目指した膜タンパク質操作・計測技術と新機能の創生

研究課題名(英文)Development of membrane-protein handling and measurement techniques for elucidation of supramolecular mechanisms of inner ear amplification

研究代表者

村越 道生(Murakoshi, Michio)

金沢大学・理工研究域フロンティア工学系・准教授

研究者番号：70570901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、内耳の感覚細胞に発現するタンパク質モーター“プレスティン(prestin)”に着目し、その構造と機能を自在に制御する技術とこれを捉える計測技術の開発に取り組み、音受容メカニズムの解明と新規バイオデバイスの創生を目指した。タグと呼ばれる目印を付加したプレスティンを安定に発現する培養細胞株を構築した。同細胞株よりプレスティン分子を一つずつ引き抜き力-進展曲線を取得することで、プレスティンの膜内構造を解析することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プレスティンは、2000年にその遺伝子が同定されて以来、その構造と機能について研究されてきたが、未だ解明されておらず、そのため我々の音受容メカニズムは解明されていない。従来の手法では多量のタンパク質溶液や結晶化等が必要であったため、プレスティンには適さなかった。本研究で新たに提案した手法により、比較的少量かつ結晶化なしに膜内構造を分析できることが示唆された。またこれにより得られた結果は音受容メカニズムの全容解明に貢献するとともに、遺伝性難聴や老人性難聴のメカニズム解明とその治療法開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on the motor protein “prestine” expressed in the sensory cells in the inner ear. A method to handle its structure and function and a measurement technique to detect them were investigated to elucidate the mechanisms of sound perception and to develop new biodevices. Mammalian cell lines which stably express prestine with a marker peptide tag were constructed and a prestine molecule was pulled out from the plasma membrane of these cells. The force-extension curves obtained demonstrated the membrane structure of prestine.

研究分野：生体工学，機械力学

キーワード：聴覚 内耳増幅 感覚細胞 タンパク質モーター 分子メカニズム

1. 研究開始当初の背景

図1に示すように、外耳道に入射した音は鼓膜、耳小骨連鎖を介して内耳蝸牛へと伝播し、基底音を振動させる。この振動は、感覚細胞（内有毛細胞及び外有毛細胞）の聴毛に存在する機械-電気変換チャンネルを開閉させ、細胞興奮を誘発する。内有毛細胞の興奮は聴神経の発火を促し、これが脳へと伝わることで我々は音を認識する。一方で、外有毛細胞は興奮により細胞長を変化させ、基底音振動を増幅（約千倍）し、入力感度を高める増幅器の役割を担っている。この運動は、細胞膜中の超分子膜タンパク質“プレスチン (prestin)”の構造変化に起因すると予想されている（図1）。しかしこれを観察した報告はない。したがって、音受容メカニズムの解明の鍵は、「超分子 prestin の構造変化メカニズム」にあると言える。

申請者は、機械工学者の立場から、力学的理解（バイオメカニクス）に立脚した実験と理論の両輪で音受容機構の解明に取り組んできた。Prestin の構造解析については、ハンドリングの難しい外有毛細胞を全く使うことなしに実験を可能とする prestin 安定発現細胞株の開発や半導体量子ドット(Qdot)を用いた一分子ラベリングと原子間力顕微鏡 (AFM) を組み合わせた Immune AFM 法の開発など、特に AFM を用いた膜タンパク質可視化技術に注力し、近年では一分子フィッシングにより得られる力学的情報をもとにした構造解析技術へと発展を試みている。しかし、先行研究では prestin の変形状態の制御と運動能(機能)の評価は不可能であった。そこで本研究課題では、膜分子操作技術・AFM 基盤技術を基礎に、これら問題を解決する新たな技術を確立する。さらに得られた知見を基に、prestins のユニークな機能を応用したナノバイオデバイスに挑戦し、これまでになかった機能デバイスの創生を狙う。

2. 研究の目的

本研究では、内耳の感覚細胞に発現するタンパク質モータープレスチンに着目し、その構造と機能を自在に制御する技術とこれを捉える計測技術の開発に取り組み、音受容メカニズムの解明と新規バイオデバイスの創生を目指す。まず、これまでに開発してきた発現・精製系のノウハウを基盤に、遺伝子ベクター構築、細胞株構築、精製の各工程に改良を加え、高発現系の構築に取り組む。さらに我々の先行研究で実現できなかった、精製 prestin に構造変化の制御を可能とし、かつ電気生理学的手法により機能評価が可能なシステムを構築することを目指す。また、我々の強みである AFM 観察により、プレスチンの膜内構造の解析に取り組む。上記で開発する生体膜分子の操作技術を活用し、プレスチンのユニークなピエゾ特性を利用した高感度バイオ変位センサーの開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) プレスチンの発現系構築

解析に適した prestin が効率よく発現する系を探索するため、prestins の C 末端に目印となるアミノ酸残基もしくは短いペプチド鎖からなるタグを付加し、複数種の哺乳類発現ベクターへ導入する。作製したベクターを哺乳類細胞 (CHO 細胞) に遺伝子導入し目的タンパク質を発現させる。発現は、複数の方法で確認する。GFP を共発現させた系ではその発光で確認し、その他の系では免疫蛍光染色により確認する。また、ウェスタンブロットティングによっても発現確認を行う。

(2) プレスチン構造変化の制御・計測

膜電位・溶液組成・脂質膜張力の三つを制御できる新規デバイスを開発する。チャンバー部には、溶液状態が目で確認でき、金属にみられる溶液接触によるイオンの染み出しがなく、電気・化学特性に優れたパイレックスガラスもしくはシリコーン樹脂 (PDMS) を検討する。基板部には、電気生理計測時に電氣的漏れがない状態 (ギガシール) を達成するためにボロシリケートガラスもしくはテフロン樹脂を用い、微細加工により電計測用の微小孔を作製する。プレスチン発現細胞もしくは精製プレスチンを用いて、性能評価を行う。

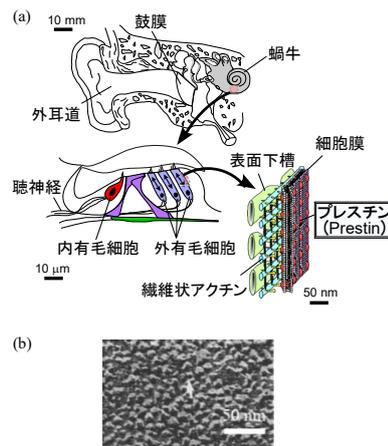


図1. ヒトの聴覚器官. (a) 器官全容から感覚細胞（外有毛細胞）の微細構造にいたる模式図. (b) 外有毛細胞の細胞膜に発現する超分子 prestin とされる電子顕微鏡写真 (Forge A, 1991). 10 nm 程度の粒子状構造物が高密度にパッキングされている。これら超分子の協調運動が我々の鋭敏な聴覚の鍵を握っている。

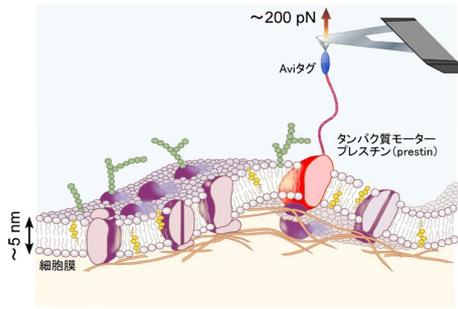


図2. AFMによるプレスティンの力学計測のデザイン. カンチレバーを prestin のC末端に付加した Avi タグを介して取り付け、カンチレバーを引き上げることで細胞膜から引き抜き、力-進展 (force-extension: FE) 曲線を取得する. これにみみず鎖モデルを適用し、膜内構造を解析する.

(3) プレスチンの膜内構造解析

開発したプレスティン発現系 (Avi タグ付加プレスティン) を用いてプレスティンの膜内構造解析を行う. AFMに取り付けたカンチレバー (ごく小さな板バネ) を Avi タグを介してプレスティンに結合させ、ピコニュートンレベルの力を負荷して引き上げる (図2). その際に取得される力-進展 (force-extension: FE) 曲線を用いて、プレスティンと細胞膜との結合力からその膜内構造を解析する. 解析には、高分子鎖の粘弾性挙動をよく再現できるとされるみみず鎖モデルを使用する.

4. 研究成果

(1) プレスチンの発現系構築

目的に応じて自在にプレスティン分子を操作するために、C末端に Avi タグを付加したプレスティンを発現する発現系の構築を行った. 図3に作製した7つのクローンにおける GFP 蛍光画像を示す. クローン4, 6および7の平均輝度が高く、プレスティンの高発現が期待さされた. 次に、ウェスタンブロッティングによって、プレスティンの発現確認を行った. その結果、培養開始から2日後に発現量が最大となりその後4日目から10日目までは一定量の発現に収束することが示唆された. また、糖による修飾状態のことなるプレスティンが共発現している可能性が示された. さらに、免疫蛍光染色によって発現部位の確認を行い、プレスティンが細胞膜中に発現していることが明らかとなった. これらの結果より、構築した細胞株において Avi タグ付加プレスティンは、野生型プレスティンと同様の発現状態にあることが示唆された.

(2) プレスチン構造変化の制御・計測

上記(1)に時間を要し、試作機の作製に先行して電気生理学的手法によるプレスティンの機能解析を実施した. 開発した Avi タグ付加プレスティン発現細胞株に対しパッチクランプ法により膜電位の変化に対する膜要領の変化を計測した. プレスチンは細胞内陰イオン (Cl⁻) をセンシングすることで、構造変化を起こすと考えられ、機能を有していれば非線形な膜容量変化を起こすと予想される. 図5に計測結果を示すように、作製した Avi タグ付加プレスティンは、野生型プレスティンと同様に非線形な膜容量を示しており、機能を有して発現していることが示唆された.

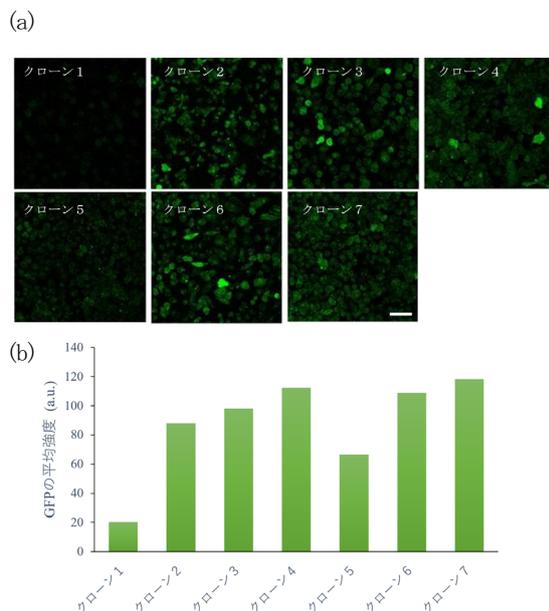


図3. Avi タグ付加プレスティン発現 CHO 細胞の GFP 蛍光画像. (a) GFP 画像. (b) GFP の平均輝度.

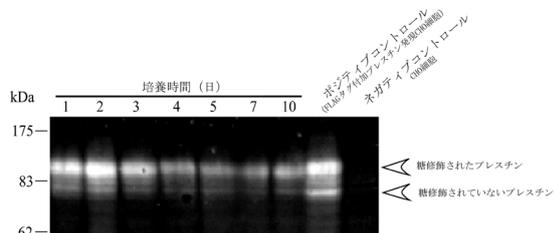


図4. 構築した Avi タグ付加プレスティン発現細胞株におけるウェスタンブロッティングの結果.

(3) プレスチンの膜内構造解析

プレスチンの膜内構造の解明のため、構築したプレスチン発現 CHO 細胞および遺伝子導入していない CHO 細胞から細胞膜を単離した。これらの膜に対し、AFM による一分子フィッシング（引抜試験）を実施した。引き抜きの際に得られる FE 曲線には、のこぎり状波形が観察された。これに対し、みみず鎖モデルを適用したところ、C 末端領域や、膜貫通領域の細胞膜からの引き抜きに由来すると考えられる力が検出された（図 6）。これらの結果より、プレスチンが 10 個の膜貫通部と、2 個の半貫通部を有している可能性が示唆された。

本研究により、プレスチンを自在に制御する技術とこれを捉える計測技術の開発が実現した。しかし一方で、これを利用した新規デバイスの開発にはいたらなかった。今後は、プレスチンの構造と機能を結び付け統合的に理解することでその基本動作原理の解明を試み、さらにその技術をデバイス化応用に進化させるため生理条件下にプレスチンの構造状態を変化させながら、構造変化の可視化が可能な新規技術の開発に取り組む。これにより、プレスチンのユニークなピエゾ特性を利用した新規のバイオデバイスの創出を目指す。

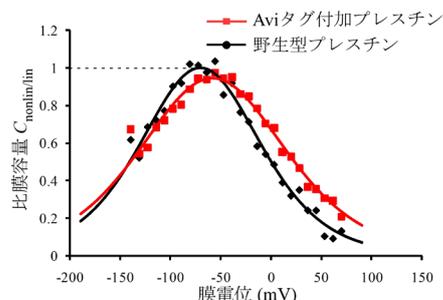


図 5. パッチクランプによる Avi タグ付加 CHO 細胞の機能評価結果.

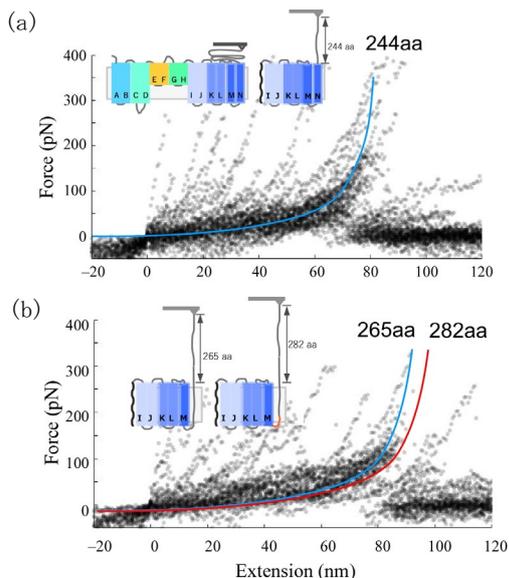


図 6. Avi タグ付加プレスチン発現 CHO 細胞の単離細胞膜から取得した FE 曲線と適用したみみず鎖モデル.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murakoshi M, Wada H	4. 巻 in press
2. 論文標題 Analysis of membrane structure of the inner ear motor protein prestin by force spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 村越道生	4. 巻 28
2. 論文標題 聴覚のメカニクスに学ぶ - 内耳組織から膜タンパク質まで - (Learn from the mechanics of hearing - From the inner ear tissue to the membrane protein-)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会誌	6. 最初と最後の頁 4~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村越道生	4. 巻 73
2. 論文標題 三列に並ぶ外有毛細胞の役割とその分子構造 (The role of the outer hair cells stacked in three rows and its molecular structure)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本音響学会誌	6. 最初と最後の頁 662~669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 6件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Murakoshi M, Wada H
2. 発表標題 Effects of rotation of the stereociliary bundles of outer hair cells on the cochlear amplification
3. 学会等名 The 43rd Annual MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, January 25-29, 2020, San Jose, California, USA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1 . 発表者名 Murakoshi M, Wada H
2 . 発表標題 Development of recombinant inner-ear motor protein prestin equipped with affinity tag
3 . 学会等名 The 2019 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (SB3C 2019), June 25-28, 2019, Seven Springs, Pennsylvania, USA (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Murakoshi M, Wada H
2 . 発表標題 Effects of rotation of the stereociliary bundles of outer hair cells on the cochlear amplification
3 . 学会等名 The 43rd Annual MidWinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, January 25-29, 2020, San Jose, California, USA (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Murakoshi M
2 . 発表標題 Membrane topology of inner ear motor protein prestin
3 . 学会等名 The 3rd Thailand-Japan Research Exchange Joint Symposium, August 21, 2019, KMUTT Knowledge Exchange for Innovation Center (KX), Bangkok, Thailand (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 村越道生, 和田仁
2 . 発表標題 外有毛細胞の聴毛回転が蝸牛増幅に及ぼす影響の数値解析 (Numerical analysis of the effect of rotation of the outer hair cell stereocilia on the cochlear amplification)
3 . 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会, 050-3, 山形, 2019年10月10-12日
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 村越道生, 和田仁
2. 発表標題 内耳感覚細胞の奇形が蝸牛増幅に及ぼす影響 (Effects of abnormality of the inner-ear sensory cells on the cochlear amplification)
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会, 2A22, 金沢, 2019年12月20-21日
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村越道生
2. 発表標題 Cochlear amplifierの温故知新 (Cochlear amplifier: past, present and future)
3. 学会等名 第66回聴覚生理研究会, 日本聴覚医学会, 2018年10月18日, 神戸 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田書大, 村越道生, 松崎健一郎
2. 発表標題 外有毛細胞の機能損失が蝸牛内コルチ器の動的挙動に及ぼす影響の数値解析 (Numerical analysis of effects of outer hair cell dysfunction on the dynamic behavior of the organ of Corti in the cochlea)
3. 学会等名 日本機械学会第29回バイオフロンティア講演会, 千葉, 2018年10月24-25日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村越道生, 和田仁
2. 発表標題 内耳陰イオン輸送タンパク質ペンドリンの遺伝子変異による局在異常の回復手法開発 (Development of a method for recovering the localization anomaly caused by genetic mutation of an anion exchange protein pendrin in the inner ear)
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会, 郡山, 2018年12月14-15日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白井秀和, 村越道生, 和田仁
2. 発表標題 Aviタグ標識したタンパク質モータープレスティンの機能解析 (Functional analysis of the motor protein prestin labeled with AviTag)
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会, 郡山, 2018年12月14-15日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田書大, 村越道生, 和田仁
2. 発表標題 外有毛細胞の機能損失がコルチ器の動的挙動に及ぼす影響の解析 (Analysis of the effects of the functional loss of outer hair cells on the dynamic behavior of the organ of Corti)
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会, 郡山, 2018年12月14-15日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田博樹, 村越道生, 和田仁
2. 発表標題 Hisタグ標識プレスティンの安定発現株の構築とその評価 (Construction and evaluation of cell lines stably expressing the His-tagged prestin)
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会, 郡山, 2018年12月14-15日
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Murakoshi M, Wada H
2. 発表標題 Decipherment of the membrane structure of the inner ear motor protein prestin by force spectroscopy
3. 学会等名 The 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), September 14-17, 2017, Zermatt, Switzerland (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越道生
2. 発表標題 聴覚の工学的考察とその応用 (Engineering consideration of hearing and its application)
3. 学会等名 一般社団法人近畿化学協会エレクトロニクス部門平成28年度第3回研究会「広がりを見せる多様なナノサイズ材料とその応用最前線」, 大阪, 2017年1月16日 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 勝田廉弥, 村越道生, 松崎健一郎, 和田仁
2. 発表標題 CHO細胞を用いたHisタグ標識プレスティン発現システムの構築 (Construction of an expression system of the His-tagged prestin using Chinese hamster ovary cells)
3. 学会等名 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 名古屋, 2017年1月19-20日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 並河伶弥, 松崎健一郎, 村越道生
2. 発表標題 外傷刺激による内耳外有毛細胞傷害が引き起こすコルチ器の動的挙動解析 (Numerical analysis of the changes in the dynamic behavior of the organ of Corti caused by the cochlear outer hair cell injury due to traumatic stimuli)
3. 学会等名 日本機械学会九州学生会第48回卒業研究発表講演会, 那覇, 2017年3月3日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越道生
2. 発表標題 聴覚のメカニクスに学ぶ - 内耳組織から膜タンパク質まで -
3. 学会等名 応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会研究会「有機分子・バイオエレクトロニクスの最新動向と応用展開」, 2017年6月6日, 北九州 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越道生, 和田仁
2. 発表標題 内耳タンパク質モータープレスチンを安定発現する哺乳動物細胞株の構築 (Construction of a mammalian cell line stably expressing the inner-ear motor protein prestin)
3. 学会等名 第62回日本聴覚医学会総会・学術講演会, 福岡, 2017年10月18-20日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松野光太郎, 松崎健一郎, 村越道生
2. 発表標題 Avi タグ標識プレスチン発現 CHO 細胞の構築とフローサイトメトリーによる高発現株の選択 (Establishment of CHO cells expressing Avi-tagged prestin and selection of high expressing lines by flow cytometry)
3. 学会等名 日本機械学会第28回バイオフロンティア講演会, 徳島, 2017年10月27-29日
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越道生
2. 発表標題 聴覚のメカニズムとその計測・制御 (Hearing mechanism and its measurement and control)
3. 学会等名 SICE九州フォーラム2017, 鹿児島, 2017年11月24日 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村越道生, 和田仁
2. 発表標題 アフィニティタグ標識された遺伝子組換え内耳モータータンパク質のCHO発現システムの構築 (Development of CHO expression systems of recombinant inner-ear motor proteins having different affinity tags)
3. 学会等名 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 京都, 2017年12月14-15日
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Murakoshi M and Muraoka T	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 400
3. 書名 Molecular technology for membrane functionalization	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学理工研究域フロンティア工学系生体機械工学研究室 https://biomech.w3.kanazawa-u.ac.jp/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------