

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：11301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659790
 研究課題名（和文） 膜電位コントロールデバイスを備えた AFM によるプレスティン変形挙動可視化の挑戦
 研究課題名（英文） Challenges of visualizing the conformational changes of prestin using an atomic force microscope equipped with a membrane potential control device
 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）：細胞膜中に発現したプレスティンのサイズ変化を誘起できる膜電位コントロールデバイスを新規に開発した。プレスティン発現培養細胞および精製プレスティンを再構成した人工脂質膜を試料とし膜表面微細構造観察および電気特性計測を試みた。その結果、当該デバイスを用いて細胞膜電位をコントロールしながら細胞膜表面膜タンパク質の変形挙動を可視化できる可能性が示唆された。本研究で開発したデバイス及び得られた知見を基に、人工脂質膜中に再構成したプレスティンの変形挙動の可視化に取り組む。

研究成果の概要（英文）：A membrane potential control device, which induces the conformational changes of prestin expressed in the plasma membrane, has been newly developed. Microstructures and electrophysiological properties of the prestin-expressing culture cells and the prestin-reconstituted lipid bilayer were measured by using this device. As a result, it was suggested that the conformational changes of proteins in the plasma membrane may possibly be visualized when the membrane potential is controlled using the developed device. Based on the findings obtained in this study, further research to visualize the conformational changes of prestin reconstituted in the lipid bilayer will be performed using this device.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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

1. 研究開始当初の背景

我々の聴覚は外有毛細胞の伸縮運動によって鋭敏なものとなっている。その運動は、細胞側壁に存在する直径 10 nm 程度のタンパク質モータープレスティンが変形し、大きい状態と小さい状態の 2 状態をとることに起因すると推定されている。我々はこれまでに、プレスティンを発現させた培養細胞の細胞膜や、細胞から抽出・精製したプレスティンを埋め込んだ人工脂質膜を、AFM で観察することで、プレスティンの可視化に成功してきた。

しかし、観察したプレスティンの変形を観察することはできなかった。この変形の観察無しにはプレスティンの構造変化メカニズムの解明は達成できない。

2. 研究の目的

内耳外有毛細胞の伸縮運動の駆動源は、タンパク質モータープレスティンの変形であると考えられている。しかしその変形メカニズムは不明であるうえに、実際に変形を観察した報告は皆無である。本研究では、膜電位コ

ントロールデバイスと備えた原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy: AFM) を新規に開発し、世界に先駆けてプレスチンの変形挙動を可視化することを試みる。これによりプレスチンの動作メカニズムの解明に向けたブレークスルーの創起を狙う。

3. 研究の方法

平成 23 年～24 年の 2 年間で、プレスチンが変形することを証明する。平成 23 年度に「膜電位コントロールデバイスと備えた AFM の開発」を行う。平成 24 年度は、開発したデバイスを用いて、脂質膜に再構成したプレスチンの変形を誘起し、変形前後のプレスチンを AFM で観察し、プレスチンの変形挙動を可視化する。

(1) 平成 23 年度

①膜電位コントロールデバイスと備えた AFM の開発

プレスチンの変形メカニズムを明らかにするためには、脂質膜に再構成されたプレスチンのサイズ変化を誘起しながら AFM で観察できる実験設備が必要である。そこで、最新鋭の高速 DSP を用いたシステム設計を行い、世界で唯一無二な AFM システムの構築を試みる (図 1)。

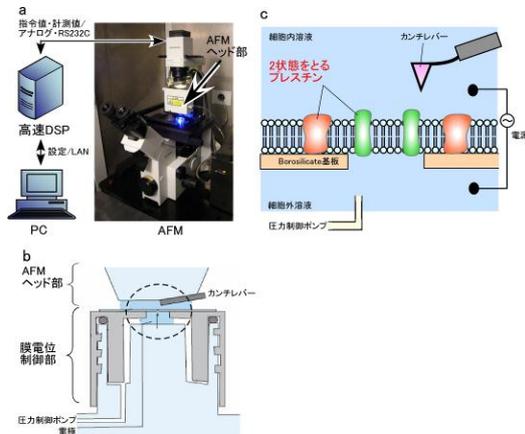


図 1. 膜電位コントロールデバイスと備えた AFM システム。(a) システムブロック図。高速 DSP で AFM と膜電位制御デバイスを統合する。(b) 膜電位制御デバイスの模式図。ボロシリケート製の穴開き基板が AFM ヘッド下にセットされる。(c) プレスチンの構造変化計測の模式図。人工脂質に再構成したプレスチンの膜電位を制御しながらカンチレバーで細胞膜表面をスキャンする。

ボロシリケートで作製した基板には、直径数 μm のポアが開いており、ここが電極の役割を果たす。すなわち、基板の上側と下側の電位差をコントロールすることができ、さらに、プレスチンの陰イオン輸送

能も調べることができる。また、基板の上下の溶液は自由に交換できるようにし、細胞膜の上下で溶液の組成を自由に換えられるようにする。

②精製プレスチンの脂質膜への再構成

実験流れ図を図 2 に示す。DOPC 及び DPPC の 2 種類の脂質で脂質小胞を作製する。脂質小胞を雲母の基板に滴下し、その後高温に保持することで、脂質を雲母上に展開させ、平面脂質二重膜を形成する。形成した平面脂質膜に弱い界面活性剤を加え、脂質膜にむらを作る。精製プレスチンを界面活性剤で弱らせた平面脂質膜に加え、プレスチンを脂質膜に再構成する。プレスチンが再構成されたかどうかは、プレスチンを認識する抗体で、脂質膜を染色し、共焦点顕微鏡で観察することで確認する。

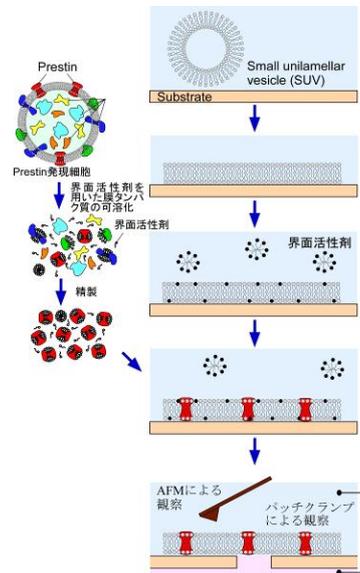


図 2. Prestin の脂質膜への再構成の方法。雲母上に形成した平面脂質膜を、界面活性剤で弱らせ、そこに精製 prestin を再構成する。Prestin が再構成された脂質膜を AFM で観察する。

(2) 平成 24 年度

①再構成されたプレスチンの機能解析

膜に再構成したプレスチンが正常通り機能を有しているかを調べる必要がある。プレスチンは膜電位の変化に反応し、Cl⁻イオンを輸送することが報告されている (Santos-sacchi, 1991)。そこで、膜電位をコントロールし、再構成したプレスチンの Cl⁻輸送能を評価し、細胞膜に発現した時と同等の機能を有しているかを調べる。

②プレスチンの大きい状態と小さい状態の構造制御

プレスチンは膜電位変化を感知して、そのサイズを変化させ、大きい状態と小さい状態

の 2 状態をとると考えられている (Dallos and Fakler, 2002). そこで, 脂質膜上下の電位差をコントロールし, プレスチンのサイズ変化を誘起させる. その状態で, AFM を用いプレスチンを観察し, プレスチンが大きい状態と小さい状態の 2 状態を示すことを証明する.

③イオン組成がプレスチンの変形に与える影響

プレスチンがどのようなメカニズムで大きい状態と小さい状態の間を遷移するのか, すなわち変形メカニズムを下記の実験で調べる.

プレスチンがサイズ変化するためには, プレスチンと陰イオンの結合が不可欠であることが知られている (Oliver et al., 2001). 上述した Cl⁻以外の陰イオンにも結合すると考えられているが, 具体的にどの陰イオンと結合するかは明らかではない. そこで, 脂質膜上下の溶液に含まれる陰イオンの種類を様々に変え, どの陰イオン下でプレスチンがサイズ変化を示すかを調べる. また, プレスチン周囲の溶液にサリチル酸が存在すると, プレスチンは変形できないことが報告されている (Kakehata and Santos-sacchi, 1996). 溶液にサリチル酸を添加した際のプレスチンの挙動も解析する.

4. 研究成果

(1) 平成 23 年度

①膜電位コントロールデバイスを備えた

AFM の開発

膜電位コントロールデバイスはパイレックスガラス製のチャンバーと, 試料をのせるテフロン製基板から構成される. チャンバーは AFM に組み込むことが可能なように, 直径 12 mm, 高さ 4 mm の円筒形状とし, 中央には細胞外溶液を溜める窪み (直径 5 mm, 深さ 3 mm) を設けた. 基板は, テフロンの電気特性を考慮し, 厚みを約 30 μm とし, その中央に直径約 2 μm の微小ポアを作製した (図 3).

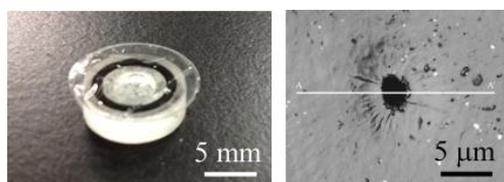


図 3. 膜電位コントロールデバイス. 全体写真 (左). テフロン製基板に作製した微小ポア (右).

作製したデバイスを評価するため, テフロン基板の電気抵抗特性を計測した結果, 材料物性及び形状から算出される理論値と計測値が一致し (図 4), 設計通りにデバイスが作製できたことが明らかとなった.

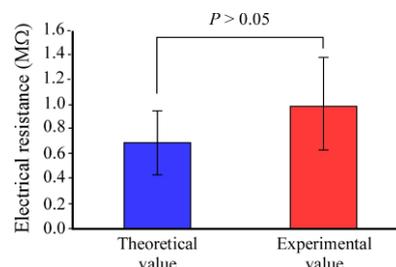


図 4. 微小ポアを有するテフロン基板の電気抵抗特性. 計測値は理論値に一致した.

②精製プレスチンの脂質膜への再構成

図 5 にプレスチンが発現している CHO 細胞の免疫蛍光画像を示す. 当該培養細胞をプレスチンの精製に用いた. 図 6 にプレスチンの精製結果を示す. プレスチンが発現させた CHO 細胞では, 110 kDa 付近にバンドが確認された. これは糖鎖を含むプレスチンの分子量と一致しており, プレスチンが精製されたことを示唆している. 一方, プレスチンが発現させていない CHO 細胞では, バンドは確認されなかった.

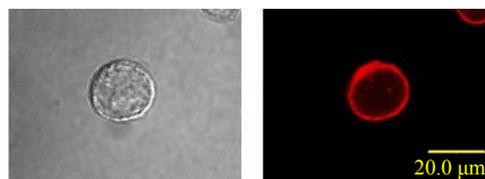


図 5. プレスチン発現 CHO 細胞. 微分干渉画像 (左). 免疫蛍光画像 (右). 赤色はプレスチンを示す.

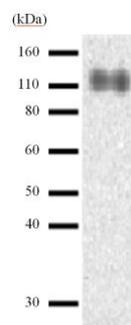


図 6. 精製プレスチンのウェスタンブロッティングの結果. 110 kDa 付近のみにプレスチンの存在を示すバンドが確認された.

(2) 平成 24 年度

①再構成されたプレスティンの機能解析

平成 23 年度に開発した膜電位コントロールデバイスを用いて、プレスティンを発現させた培養細胞の電気特性計測及び単離細胞膜表面の微細構造観察を試みた。さらに同デバイス上に人工脂質膜を形成し、その電気特性の計測を試みた。

培養細胞を用いた実験において、開発した膜電位コントロールデバイス基盤の微小ポア（直径約 $2\mu\text{m}$ ）上に、培養細胞をポジショニングすることに成功した（図 7）。これにより、電気抵抗値が細胞ポジショニング前に比べて 50 倍程度増加する様子が観察できたと同時に、細胞膜表面の詳細構造の可視化に成功した（図 8）。

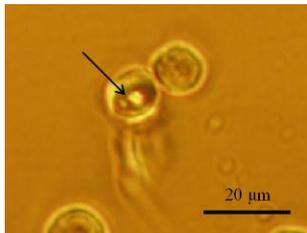


図 7. 膜電位コントロールデバイス基盤の微小ポア（直径約 $2\mu\text{m}$ 、矢印）上にポジショニングした培養細胞。

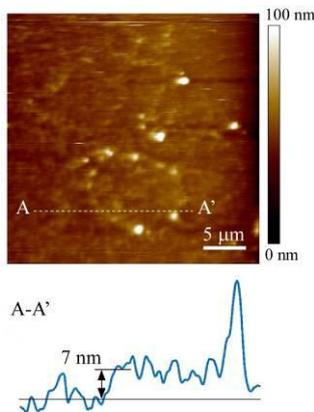


図 8. 膜電位コントロールデバイスを組み込んだ AFM によって観察した細胞膜表面の詳細構造。

人工脂質膜を用いた実験においては、開発した膜電位コントロールデバイス基盤の微小ポア上に、人工脂質膜を形成することに成功した。これにより、 $2\text{G}\Omega$ の電気抵抗値が計測され、ギガオームシールの形成が確認された（図 9）。

これらの結果より、開発したデバイスを用いて細胞膜電位をコントロールしながら細胞膜表面膜タンパク質の変形挙動を可視化できることが示唆された。

一方で当初計画していた平成 24 年度計画の②「プレスティンの大きい状態と小さい状態

の構造制御」および③「イオン組成がプレスティンの変形に与える影響」については、平成 23 年度計画の膜電位制御デバイスの開発及びプレスティンの抽出・精製法の確立に当初計画よりも時間を要したため、十分に実験が行えなかった。今後、当該研究計画で開発したデバイス及び得られた知見を基に、人工脂質膜中に精製プレスティンを再構成し、その電気特性の計測と変形挙動の可視化に取り組む計画である。

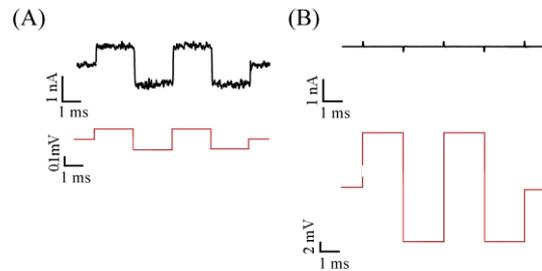


図 9. 膜電位コントロールデバイス基盤の微小ポア上に形成した人工脂質膜の電気抵抗値。(A) 人工脂質膜なし。(B) 人工脂質膜あり。上段は入力電流、下段は計測電圧値を示す。人工脂質膜を形成した際に $2\text{G}\Omega$ の電気抵抗値（ギガオームシール）が計測された。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Ogawa Y, Murakoshi M, Wada H. Evaluation of electrophysiological properties of the motor protein prestin expressed in the inner ear. The 6th East Asian Pacific Student Workshop on Nano-Biomedical Engineering, March 23-34, 2013, Singapore.
2. 小川雄大, 村越道生, 和田仁. 内耳に発現する膜タンパク質プレスティンの電気生理学的特性計測のための平面パッチクランプシステムの開発 (Development of a planar patch clamp system for measuring electrophysiological properties of a membrane protein prestin expressed in the inner ear). 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 筑波, 2013 年 1 月 9 日-11 日.

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

村越 道生 (MURAKOSHI MICHIO)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：70570901

小山 眞 (KOYAMA SHIN)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：10465487

小林 俊光 (KOBAYSHI TOSHIMITSU)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：80133958