

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591980

研究課題名(和文)

モータ蛋白プレスチンの膜発現様式と機能：プレスチン性難聴の病態解明

研究課題名(英文)

Expression of prestin, moter protein of outer hair cells.

研究代表者

松田圭二

宮崎大学・医学部耳鼻咽喉科・講師

研究成果の概要：

プレスチン蛋白は、哺乳類の外有毛細胞に発現し、外有毛細胞の運動を介して音響信号増強に関与している。プレスチン機能の低下は臨床的には語音明瞭度の低下や自発的耳音響放射の消失となって表れ、中～高度難聴の原因となりうると考えられる。プレスチンの機能障害によって起こる聴覚学的な評価は、従来パッチクランプによる細胞レベルでの評価が行われてきた。しかし、プレスチンそのものの発現量の違いによる機能上の評価は、まだ十分に検討されていない。そこでプレスチン発現量を様々なレベルで阻害するsiRNAを作成し、さまざまなレベルのプレスチン発現量を人為的に作り出し、その電気生理的評価を行うことにした。

293 cell の発現実験では、4種類の siRNA は、Prestin 発現量の電気生理学的指標である charge density を wild type のみの発現時(100%) に比べ、15%～46%の範囲に抑制した。Charge density と実際の発現タンパク量の指標である Western blot には相関がみられた。Prestin の発現量が多いほど、V1/2 は脱分極側にシフトするのが観察され、Prestin の発現量そのものが電気生理機能の修飾因子であることが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	600,000	2,600,000
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：モータ蛋白、プレスチン、膜発現、外有毛細胞、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類内耳における外有毛細胞の最も重要な働きは、微弱な音信号を増幅することである。これにより私たちは小さな音を聞けるだ

けでなく、わずかな周波数の違いを鋭敏に区別できる。外有毛細胞による信号増幅には、①stereociliaの機械電気変換チャンネルに起因する不動毛束モータ(Martin & Hudspeth,

1999)、②外有毛細胞体の能動的な伸縮 (Brownell et al., 1985) 以上2つのメカニズムの関与が有力視されている。爬虫類、鳥類など(非ほ乳類)では、①による信号増強がなされ、ほ乳類では、①②両メカニズムの関与が指摘されている。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 (Zheng et al., 2000)、②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(研究業績6)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。唯一のPrestin splicing mutationによる難聴家系の報告では (Liu et al., 2003)、ホモ接合体で高度難聴(100 dB)、ヘテロ接合体で中等度難聴(50 dB)を示した。しかしプレスチンノックアウトマウスでは、ホモ接合体は中等度難聴(40~60 dB)、ヘテロ接合体は正常聴力を示し、ヒトの報告でみられるヘテロ不全は示さない (Lieberman et al., 2002, Cheatham et al., 2004)。この乖離が、いかなる要件によるものかは未だ不明のままである。

一方、私たちは人為的にプレスチンの遺伝子操作体(ミュータント)を作成し、プレスチンの構造と機能の関係、あるいは膜発現様式を明らかにする目的で一連の研究を行ってきた。その結果、

(1) プレスチンは糖蛋白であること。しかしN糖鎖による翻訳後修飾が、プレスチンの膜発現や電気運動機能に与える影響は小さいこと (Matsuda et al., 2004)。(2) プレスチン機能はcGMPによるリン酸化を介して調整されていること (Deak et al., 2005)。(3) プレスチンは、C-末端の端から32塩基対以上の欠損で機能喪失すること。またC-末端のSTAS (Sulphate Transporter and Antisigma-factor antagonist)を含むミュータントでは膜発現が阻害され、結果、機能不全を起こす (Zheng et al., 2005)。(4) また、プレスチンミュータントの一つであるC1ミュータント (K233Q, K235Q, R236Q) は、パッチクランプでベル型の膜容量変化(ノン

リニアキャパシタンス: NLC)を示すが、ピーク (Vpkcm) が過分極側に60mVほど変位している。このC1ミュータントのノックインマウスの聴力は正常で、ノンリニアキャパシタンスの過分極側への変位はin vivo聴力に影響を与えないことが分かった (Gao et al., 2007)。この一連の実験の中で、プレスチンの膜発現様式と電気生理学的機能、それらがin vivoに発現した場合に予想される聴力との関係などが徐々に明らかにされつつある (Matsuda 2007)。

さて最近、プレスチンは、ほ乳類の細胞膜で安定した4量体 (tetramer) として存在することがあきらかになった (Zheng et al., 2006)。プレスチンが機能するためには、4量体構造が必須なのだろうか。プレスチン突然変異による難聴の発現様式を考える上で、この事は重要なキーポイントになる。ミュータントプレスチンが、①膜に発現できないことによる機能不全の場合と、②機能しないミュータントプレスチンが膜に発現する場合、では表現形の聴力に大きな違いが生じる可能性がある。というのは、①のヘテロ接合体では、ヘテロ不全は観察されず聴力が正常であるのに対して、②のヘテロ接合体においては、ミュータントプレスチンがワイルドタイププレスチン(正常プレスチン)と複合体を形成し、機能を障害する可能性があるからである。

2. 研究の目的

哺乳類蝸牛の外有毛細胞 (outer hair cell: OHC) は、電位依存性にその長さを変えることが知られている。そのユニークな動きは、electromotilityと言われ、音を聴くという働きにおいて、音響信号の増強や周波数弁別能の向上に重要な働きを演じている。PrestinはOHC側壁のplasma membraneに存在するモータ蛋白で、外有毛細胞を伸縮させている責任タンパクと考えられている。電気生理学的には、OHCやPrestinを発現させた培養細胞にパッチクランプを行うと、膜電位の変化に応じた膜容量 (capacitance) の非線形 (nonlinear) の変化 (non-linear capacitance, NLC) が観察できる。NLCは、electromotilityを代弁する現象と考えられ、原波形にBoltzmann式をフィッティングすることによって得られるパラメーターを使って、プレスチンがどれくらい発現しているかを電気生理学的に求めることが可能である。プレスチン発見以来、タンパクの構造と機能評価のために数々の意図でmutantが作られ、培養細胞系に発現させて評価されている。しかしmutantによっては、膜への発現効率が

大きく変化するものもある。蛍光抗体法による膜発現確認だけでは発現量自体を定量的に評価できない以上、電気生理学的な機能に影響を与えているのが内因する構造変化なのか、膜への発現量低下のためなのかは、きっちりと分けて考えなければならない。また、プレスティン機能自体に数々の外因が影響を及ぼすことも知られており、電気生理学的な評価は単純にはいかない。そこで、本研究では Prestin の電気生理学的機能と蛋白発現量との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

293 細胞 (ヒト胎児腎細胞由来の培養細胞) に mouse Prestin、EGFP を co-transfection したものをコントロールとした。これに Prestin 発現を抑制する 4 種類の異なる short interference RNA (siRNA) を co-transfection した 4 群を作成した。
 siRNA 2 (320-338) AAGAGAGCTGCACGTCAA
 siRNA 4 (616-634) ACCTCAAGACACATATCTA
 siRNA 3 (1151-1169) GATTTAACCTACATGAGTC
 siRNA 5 (2385-2403) GGCAATGGCTGAACAAGAA

電気生理学的な解析: transfection 48~72 時間後に GFP 陽性細胞に対してホールセルパッチクランプ法を行い、膜電位変化に伴う膜容量の変化を測定した。ソフトウェアとして、刺激・測定には j-clamp を、データ解析には IgoPro を使用した。Charge density (Q_{max}/C_{lin} 、単位膜面積あたりの最大チャージ量: プレスチンの発現量と相関すると言われている)、NLC カーブのピーク値である $V_{1/2}$ を電気生理学的な指標とした。これをコントロール群と抑制群 4 群とで比較した。

Western blot: 各群のプレスティン蛋白発現量を Western blot 法で測定し、電気生理学的指標と比較検討した。また、膜発現の確認は免疫染色にて行った。

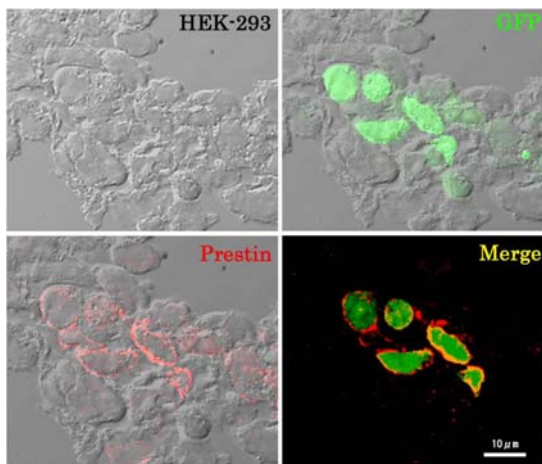


図 1. 免疫染色所見

4. 研究成果

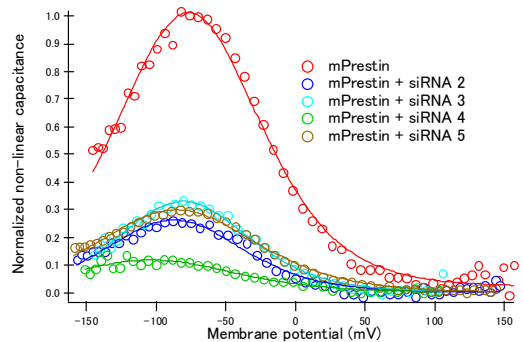


図 2. 異なる 4 種類の siRNA と共発現させたときの NLC curve。

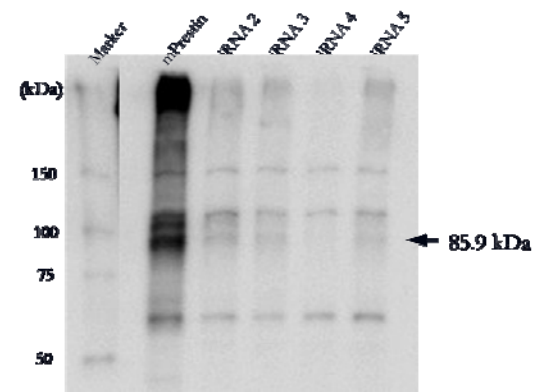


図 3. ウェスタンブロットとスコア

mPrestin	100.0	(%)
siRNA 2	17.1	
siRNA 3	11.3	
siRNA 4	2.7	
siRNA 5	10.8	

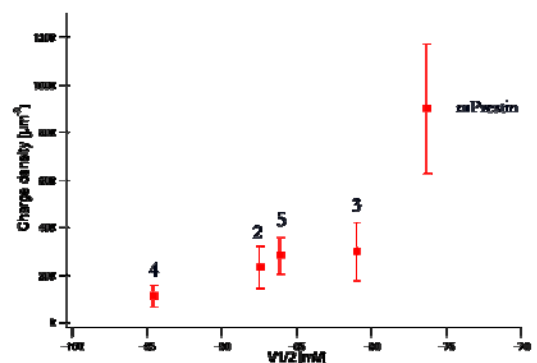


図 4. CD と $V_{1/2}$ の関係。マークのそばに付いた番号は、siRNA の番号を示す。charge density が大きくなるにつれて、NLC の $V_{1/2}$ は、より脱分極側にシフトする。

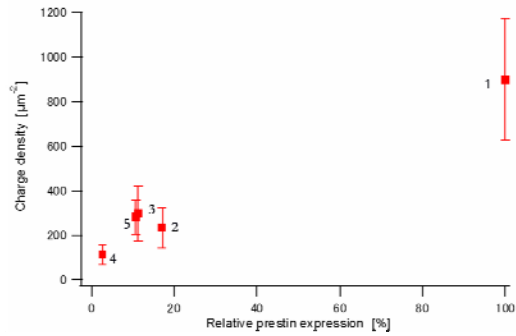


図5. プレスチン発現量と charge density の関係。電気生理学的指標である Charge density と実際のタンパク発現量には相関がある。

(まとめ)

293 cell の発現実験では、4 種類の siRNA は、Prestin 発現量の電気生理学的指標である charge density を wild type のみの発現時 (100%) に比べ、15%~46% の範囲に抑制した。Charge density と実際の発現タンパク量の指標である Western blot には相関がみられた。Prestin の発現量が多いほど、V1/2 は脱分極側にシフトするのが観察され、Prestin の発現量そのものが電気生理機能の修飾因子であることが確認された。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)
現在投稿準備中。

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 圭二 (MATSUDA KEIJI)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：40253835

(2) 研究分担者

河野 浩万 (KAWANO HIROKAZU)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：20204745

東野 哲也 (TONO TETSUYA)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：80145424

佐藤 伸矢 (SATO SHINYA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：50468047

下菌 正巳 (SHIMOZONO MASAMI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80271138