

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790176
 研究課題名（和文）
 内耳外有毛細胞に存在する膜電位作動性モータータンパク質複合体の同定
 研究課題名（英文）
 Identification of the voltage-sensitive motor protein complex in the cochlear outer hair cells
 研究代表者
 伊藤 政之 (ITO MASAYUKI)
 生理学研究所・分子生理研究系・特別協力研究員
 研究者番号：20442535

研究成果の概要：内耳外有毛細胞に特異的に発現する膜電位作動性モータータンパク質プレスチンのより詳細な作動機序解明のため、プレスチン結合タンパクの探索を行った。プルダウン法、酵母 2 ハイブリッド法の 2 種の方法で探索を行ったが、最終的に特異的な結合タンパクを同定することができなかった。最近、いくつかのプレスチン結合タンパクが他のグループから報告されており、今後これら分子との相互作用の解析を通して更なる研究の進展が期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：分子生物学, 分子生理学, 細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：プレスチン, 内耳外有毛細胞, SLC26 陰イオントランスポーター

1. 研究開始当初の背景

内耳外有毛細胞 (OHC) は膜電位依存的に伸縮する (electro-motility) という非常にユニークな性質を有し、これにより音に対する感度を 1000 倍も向上させ聴覚のダイナミックレンジを広げる機能を持つ。更にその伸縮は 10 kHz という驚異的に高速な膜電位変化にまで追従していくことから、その機構は長らく関心の的であった。

2000 年に OHC に特異的に発現するモータータンパクとしてプレスチンが同定された (Zheng ら, *Nature* **405**: 149, 2000)。プレスチ

ンは 744 アミノ酸からなる 12 回膜貫通型の膜タンパクで、陰イオントランスポーター SLC26 ファミリーに属する。これまでの研究で、①培養細胞にプレスチンを発現させると、OHC で見られるような electro-motility を再現できること、②プレスチンによる electro-motility は OHC で見られるものと同様に ATP や Ca^{2+} などには依存しないが、膜容量の変化を伴い非線形容量性電流 (ゲート電流) が観察されること、③プレスチンは一価の陰イオン (Cl^- など) を内包し、この陰イオンがプレスチンの膜電位センサーとして機能し

ていること(Oliver ら, *Science* **292**: 2340, 2001)、④プレスティンのノックアウトマウスは聴覚機能の異常を示し、その OHC では electro-motility が消失していることが明らかとなり (Liberman ら, *Nature* **419**: 300, 2002 等)、プレスティンが OHC に存在する膜電位作動性伸縮装置の主要なコンポーネントであることが確立されてきた。

以上のように OHC で見られる electro-motility は、プレスティンのクローニングを契機に分子レベルで議論されるようになってきた。しかし、「プレスティンが単独で膜電位作動性モーターとして機能するのか?」どうかや、「どのようにその機能が調節・制御を受けるのか?」、また「機能発現の場所である OHC の側壁膜へどのように輸送されるのか?」など不明な点も多い。

したがって、これらの点に関するプレスティンのより詳細な作動機序の解明は、プレスティンの蝸牛内における音受容の調節・制御と言う生理学的に重要な機能や、膜電位作動性のモータータンパクという非常に新奇な生物物理学的性質を持つことから、更なる研究の進展が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、プレスティンが単独で機能するのか、他のタンパク分子と相互作用し機能的な膜電位作動性モーターを形成するのかという点に焦点を絞り、「OHC 内でプレスティンが他の膜タンパク、細胞内足場タンパク、細胞骨格などと複合体を形成し、膜電位作動性モーターとして機能する」という仮説の基に実験を進める。

最近では受容体、イオンチャネルなど細胞膜上の機能タンパクは膜上で単独で機能しているのではなく、むしろ他のタンパクと複合体を形成し機能していることが一般的になってきている。例えば、プレスティンと構造の類似している SLC26 陰イオントランスポーターファミリーの DRA (SLC26A3) と PAT1 (SLC26A6) では、STAS ドメインを介して CFTR と結合することが報告されている (Ko ら, *Nat. Cell Biol.* **6**: 343, 2004)。また、以前より電子顕微鏡による解析から OHC の側壁膜には 10 nm 程度の直径を持つタンパク粒子が規則正しく非常に高い密度で存在することが知られており、現在ではこれがプレスティンを主とした膜電位作動性モーターであると考えられている (Kalinec ら, *PNAS* **87**: 8671, 1992 等)。しかし、プレスティン 1 分子が 10 nm のタンパク粒子を形成するとは考えにくく、

プレスティンが自身の多量体化や、他の分子との結合によって複合体化したものであると推測されている。

そこで OHC に存在する膜電位作動性モータータンパク質複合体を同定するため、まずプレスティン結合タンパクを 2 種のアプローチでプルダウン法及び Yeast two-hybrid (Y2H) 法で探索する。そして次のステップとして、このスクリーニングで得られた候補分子について、プレスティンとの相互作用を生化学的 (プレスティンと特異的に結合するか)、免疫組織化学的 (プレスティンと同様に OHC の側壁膜に局在するか)、機能的 (プレスティンの機能を修飾するかどうか) に詳細に解析し、実際に OHC 内に存在する膜電位作動性モーター複合体の構成因子かどうか検討を行う。

本研究では以上のようなストラテジーで、プレスティンと共に膜電位作動性モーターを構成する因子を同定し、その因子の膜電位作動性モーター内での、更には OHC の electro-motility における機能的な意義に迫っていく。

3. 研究の方法

(1) プルダウン法によるプレスティン結合タンパク質の探索

組換えタンパクを用いたプルダウン法によるプレスティン結合タンパクの探索を行うため、以下の 2 種の発現系でプレスティンの全長及び N 末端または C 末端の細胞内領域の組換えタンパク質の大量精製を行った。

C 末端に FLAG タグを付加した全長のプレスティンの組換えタンパク (Prestin-FLAG) については、Baculo virus-Sf9 細胞発現系を用いた大量発現系が所属していた生理学研究所・神経機能素子研究部門にてすでに構築済み (Mio ら, *JBC* **283**: 1137, 2008) であったのでこれを利用した。この系を利用すると $\phi 15$ cm の培養皿 10 枚程度の細胞から CBB 染色レベルでは単一バンドの組換えタンパクが 0.1 mg 程度得ることが出来た。

プレスティンは 12 回膜貫通型の膜タンパクであるため全長を用いたプルダウン法では結合タンパク質の探索が困難になる可能性も高い。そこでプレスティンの細胞内部分の断片の組換えタンパク質の作製も行った。プレスティンの細胞内ループについては未だ確定的な情報がないため、すでに細胞内に存在することが確立されている N 末端 (1~80 アミノ酸) および C 末端 (501~744 アミノ酸) の組換えタンパク質を作製した。これらをコードする cDNA 断片を GST 融合タンパク質発現ベクター pGEX-5X-1 へ挿入し、組換えタン

パク発現用大腸菌株 BL21(DE3)pLysS に導入し、GST タグを付加したプレスチンの N 末端 (GST-PRES-NT) および C 末端 (GST-PRES-CT) の大量発現系を構築した。この系では、250 ml の大腸菌の培養液から単一バンドではないが(分解産物を多少含むと思われる)組換えタンパクが 1 mg 程度得ることができた。

以上のようにして得られた組換えタンパクを用いてプルダウン実験を行った。本来ならば内耳有毛細胞を大量に単離し、そのライセートを使用して実験を行うのが最適であると考えられるが、有毛細胞の存在する蝸牛自体が微量組織であるために実験に使用できる程度の量を採取することは現実的ではないと判断した。そこでマウスの脳を大量に採取し代用することとした。マウス脳を適当なバッファーで溶解し、これを組換えタンパクと混ぜて反応させ、anti-FLAG ビーズ (Prestin-FLAG の場合) または Glutathione ビーズ (GST-PRES-NT および GST-PRES-CT の場合) を用いて組換えタンパク質を回収した。この得られた画分を SDS-PAGE による一次元での電気泳動または等電点電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた二次元電気泳動 (2D-PAGE) により展開し、CBB 染色または銀染色を行って、使用した組換えタンパクとともに精製されてくるバンドもしくはスポットをあるかどうか調べた。この時、使用するバッファーや界面活性剤などの条件は非常に重要なので、何種類もの条件を比較し注意深く検討を行った。

(2) Y2H 法によるプレスチン結合 タンパク質の探索

プルダウン法によるスクリーニングに平行して Y2H 法による結合タンパクの探索も行った。プルダウン法と同様にプレスチンは 12 回膜貫通型の膜タンパクであるため全長をベイトとして使用するとスクリーニングが困難になる可能性も高い。よって細胞内に存在することが確立されているプレスチンの N 末端 (1~80 アミノ酸) および C 末端 (501~744 アミノ酸) をベイトとした。

一方のスクリーニングに使用するライブラリーを作製するために大量の mRNA が必要となるが、これも大量に有毛細胞を単離するのが困難なため難しいことが予想される。最近では RNA から合成した cDNA を PCR 法により増幅することで、微量な RNA から cDNA ライブラリーを作製できるキットがいくつか販売されているので、それを利用することにした。クロンテック社から販売されている Matchmaker Library Construction & Screening kit は標準的な GAL4 ベースの Y2H 法によるスクリーニングのためのキットで、上述の仕組みにより微量な RNA からライブラリー作製

ができるため本研究ではこれを使用した。

マウス 50 匹より蝸牛を単離し、ここからポリ A-RNA を精製した (収量約 5 μ g) 。このマウス蝸牛 RNA を鋳型に cDNA を合成し、さらに得られた cDNA を PCR 法により増幅後、マウス蝸牛 cDNA ライブラリーを作製した。ベイトの発現ベクターとライブラリーを同時に酵母 AH109 株に導入し、適当な選択培地上で培養した。この酵母の形質転換をライブラリーを十分カバーする規模 (約 1,000,000 コロニー) で数回行い、レポーター遺伝子の活性を指標にスクリーニングを行った。

4. 研究成果

(1) プルダウン法によるプレスチン結合 タンパク質の探索

まずは膜貫通部分を含む全長の Prestin-FLAG を用いたプルダウン法によるスクリーニングを行った。10 μ g 程度の Prestin-FLAG をマウス脳から調整したライセート (タンパク質濃度は約 1 mg/ml) と反応させ、anti-FLAG ビーズでベイトタンパクを回収し、SDS-PAGE 行った後、CBB または銀染色法によりベイトタンパクと共に精製されてくるバンドを探索した。結果、プレスチン以外のバンドをいくつか見出すことができたが、それらのバンドはネガティブコントロールとしてベイトタンパクを加えずに実験行ったレーンにも存在し (バンドの強弱はあったが) 、プレスチンに特異的に結合しているタンパクではないと考えられた。この実験についてはライセートを膜画分、細胞質画分から調製した場合も試したが、結果に変化は見られなかった。また、バッファーの条件については特にライセート調製時の界面活性剤を何種類か試したが (Triton X-100, NP-40, コール酸, CHAPS, DDM 等) 、この場合も結果に顕著な変化は見られなかった。

次にプレスチンの細胞内部分の組換えタンパク (GST-PRES-NT および GST-PRES-CT) を用いたプルダウン実験を行った。Prestin-FLAG を用いた場合と同様に、ライセートを膜画分や細胞質画分から調製したり、調製時の界面活性剤を何種類か試した。10 μ g 程度の GST-PRES-NT 又は GST-PRES-CT をマウス脳から調整したライセート (タンパク質濃度は約 1 mg/ml) と反応させ、Glutathione ビーズでベイトタンパクを回収し、一次元の SDS-PAGE 行った後、CBB または銀染色法によりベイトタンパクと共に精製されてくるバンドを探索した。こちらの場合もプレスチン以外のバンドをいくつか見出すことが出来たが、それらのバンドはネガティブコントロールとしてベイトタンパクを加えずに実験行ったレーンにも存在していた。そこでこれらのバンドが特異的なバン

ドかどうか調べるために SDS-PAGE より分解能の高いと考えられる 2D-PAGE を行って比較をしたが、再現性のある結果を得ることができず、これらのバンドをプレスチンに特異的に結合しているタンパクであると結論付けることが出来なかった。

プレスチンの C 末端 (501~744 アミノ酸) には STAS ドメインと呼ばれる他の SLC26 ファミリーにも保存され、機能的にも重要であることが知られているドメインが存在する。そこで特に C 末端に注目して更にいくつかのベイトタンパクを作製した。GST-PRES-CT-521 (プレスチンの 521~744 アミノ酸部分)、GST-PRES-CT-541 (プレスチンの 541~744 アミノ酸部分)、GST-PRES-CT-561 (プレスチンの 561~744 アミノ酸部分)、GST-PRES-CT-581 (プレスチンの 581~744 アミノ酸部分)、GST-PRES-CT-601 (プレスチンの 601~744 アミノ酸部分)、GST-PRES-CT-701 (プレスチンの 701~744 アミノ酸部分)、GST-PRES-STAS (プレスチンの 521~720 アミノ酸部分) の 7 種類のベイトタンパクを新たに作製し、上述のプルダウン実験を行ったがプレスチンと特異的に結合するタンパクを見出すことはできなかった。

以上のように全長または部分断片のプレスチンを用いてプルダウン法により結合タンパクの探索を行ったが、ビーズへの非特異的な結合の問題やベイトタンパクの質の問題をクリアすることができず、最終的な結合タンパクの同定に至ることができなかった。

(2) Y2H 法によるプレスチン結合タンパク質の探索

プレスチンの N 末端及び C 末端の細胞内領域をベイトとし、マウス蝸牛 cDNA ライブラリーを用いて Y2H 法によるスクリーニングを行ったが、ライブラリーの 10 分の 1 程度をスクリーニングした段階で大量の陽性クローンが得られた (N 末端をベイトにした場合で約 200 クローン、C 末端をベイトにした場合で約 300 クローン)。この陽性クローンのシーケンスを解析すると、ゲノムやノンコーディング配列、あるタンパク質の細胞外ドメイン (プレスチンの細胞内ドメインと結合する可能性の低いと想像される) がほとんどで、実際にプレスチンと結合が予想されるようなコーディング配列を持つクローンはほとんど得られなかった。

次にこの得られたクローンがほとんど擬陽性クローンだった結果を踏まえ以下のようにスクリーニングの条件の検討を行った。

① より条件の厳しい選択培地の使用

最初のスクリーニングではレポーターとして *HIS3* を使用しヒスチジンの要求性を指標にスクリーニングを行ったが、より条件を厳しくするためこれに加えレポーターとして *ADE2* も使用しアデニンの要求性も指標にすることにした。しかし、若干の効果はみられたが基本的には最初のスクリーニングとほぼ同数のクローンが得られ、それらはほとんど擬陽性クローンだと想像された。

② ベイトの発現量を減らすため低コピーベクターの使用

ベイトタンパクが酵母内で高発現し、それが非特異的な結合を引き起こしている可能性を考え、ベイトのベクターを高コピーベクターから低コピーベクターに変え、ベイトの発現量がより低くなっていると想像される条件で同様のスクリーニングを行った。この場合の効果は非常に劇的で、今度は陽性クローンを一つも得ることができなかった。

③ ライブラリー作製の際の逆転写反応に使用するプライマーをランダムプライマーからオリゴ dT プライマーに変更

逆転写反応の際、ランダムプライマーを使用すると mRNA のいろいろな部位から逆転写が行われるため、最終的に得られる cDNA 断片は一つの遺伝子に対してさまざまな部分の断片が得られる。そこで常に特定の場所から逆転写が起こるオリゴプライマーを使用してライブラリーを作製し、同様のスクリーニングを行った。この場合も②と同様に効果は非常に劇的で、陽性クローンを一つも得ることができなかった。

スクリーニング条件の検討と並行して、得られた数少ない陽性クローンについて、実際にタンパク質同士が結合しているかどうかを、組換えタンパクを用いたプルダウン法、もしくは培養細胞に発現させて免疫沈降法により確認したが特異的な結合は検出できなかった。

最後にこの Y2H 法のシステムでベイトが機能的な形で発現しているかどうかチェックを行った。すなわちプレスチンの C 末端の組換えタンパク質は 4 量体を形成することが知られているので、この C 末端同士の結合を Y2H 法により検出を試みた。しかし、タンパク質の発現自体はウエスタンブロット法により確認できたが、期待された相互作用はこの Y2H 法の系では検出できなかった。以上の結果よりこの系でプレスチン結合タンパクを探索するのは適当ではない可能性が高いと考えられた。最近では膜タンパク質のスクリーニングのために改良された Y2H 法のキットが数社から販売されているので、今後はそれらを

使うことも検討中である。

以上のように2年間に渡り2種類の方法でプレスチン結合タンパクの探索を行ったが、いくつかの問題点が解決できず最終的な結合タンパク質の同定には至らなかった。最近、細胞骨格系タンパクβVスペクトリンがPHドメインを介してプレスチンのC末端と間接的に結合することが報告された (Legendre ら, *J. Cell Sci.* **121**: 3347, 2008)。この報告は膜電位の変化を感知したプレスチンがどのようにして最終的にOHCのelectro-motilityを引き起こすのかを考察する上で非常に興味深い。また、膜タンパク用に改良されたY2H法を用いて上記の報告とは異なる何種類かのプレスチン結合タンパク質が同定された (Zheng ら, *BMC Genomics* **10**: 127, 2009)。どちらの報告においてもプレスチンと結合タンパクの相互作用について機能的な解析は行われておらず、今後これら報告された候補分子とプレスチンとの相互作用の解析を通して、OHCに存在する膜電位作動性モーターの分子実体が解明されていくものと期待される。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 政之 (ITO MASAYUKI)
生理学研究所・分子生理研究系・特別協力
研究員
研究者番号：20442535

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし