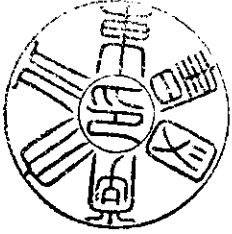


鋭敏な聴覚の源であるモーター蛋白質プレスチンの精製とそれを用いた構造と機能の解明

著者	和田 仁
URL	http://hdl.handle.net/10097/39592



鋭敏な聴覚の源であるモーター蛋白質プレスチンの精製と
それを用いた構造と機能の解明

18390455

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B))研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 和田 仁
東北大学 大学院工学研究科 教授

鋭敏な聴覚の源であるモーター蛋白質プレスチンの精製と
それを用いた構造と機能の解明

18390455

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金
(基盤研究(B))研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 和田 仁
東北大学 大学院工学研究科 教授

<はしがき>

我々の聴覚は、蝸牛内コルチ器に存在する外有毛細胞の伸縮運動により、鋭敏なものになっていると考えられている。外有毛細胞の伸縮運動の源は、細胞側壁に高密度に発現しているタンパク質モーター prestin の変形であると推察されている。Prestin についてその同定以来様々な研究が行われてきたが、prestins の形状や構造変化メカニズムは解明されていない。本研究では、原子間力顕微鏡による prestin の構造解明と、精製 prestin を調製しそれを用いた機能解析を試みた。

研究組織

研究代表者：和田 仁 (東北大学 大学院工学研究科)
研究分担者：小林 俊光 (東北大学大学院医学系研究科)
研究分担者：熊谷 泉 (東北大学大学院工学研究科)
研究分担者：池田 勝久 (順天堂大学・医学部)
研究分担者：津本 浩平 (東京大学・大学院新領域創成科学研究科)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
平成 19 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究発表

(1) 雑誌論文

1. Murakoshi, M., Gomi, T., Iida, K., Kumano, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., Ikeda, K., Kobayashi, T., Wada, H., 2006. Imaging by atomic force microscopy of the plasma membrane of prestin-transfected chinese hamster ovary cells. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.*, 7, 267-278.

(2) 学会発表

1. Koji Iida, Kouhei Tsumoto, Michio Murakoshi, Shun Kumano, Katsuhisa Ikeda, Toshimitsu Kobayashi, Izumi Kumagai, Hiroshi Wada. Purification of the motor protein prestin and its interaction with chloride studied by isothermal titration calorimetry. The 2nd Shanghai International Conference on Physiological Biophysics - Audition and Vision, Shanghai, China (November 2006).
2. Koji Iida, Kouhei Tsumoto, Michio Murakoshi, Shun Kumano, Katsuhisa Ikeda, Toshimitsu Kobayashi, Izumi Kumagai, Hiroshi Wada. Characterization of the interaction between the motor protein prestin and anions by isothermal titration calorimetry. The 9th International Symposium on Future Medical Engineering based on Bio-nanotechnology, Sendai, Japan. (January 2007).

3. 飯田浩司, 津本浩平, 熊野峻, 村越道生, 池田勝久, 小林俊光, 熊谷泉, 和田仁. タンパク質モータプレスティンと塩化物イオンの相互作用解析. 日本機械学会第 19 回バイオエンジニアリング講演会, No. 202, 仙台, 2007 年 1 月.
4. Koji Iida, Michio Murakoshi, Shun Kumano, Toshimitsu Kobayashi, Izumi Kumagai, Hiroshi Wada, Kouhei Tsumoto, Katsuhisa Ikeda. Purification and Isothermal Titration Calorimetric Analysis of the Motor Protein Prestin. The Japan-China Joint Conference on Acoustics 2007, Sendai, Miyagi, Japan (June 2007).
5. Koji Iida, Kouhei Tsumoto, Michio Murakoshi, Shun Kumano, Katsuhisa Ikeda, Toshimitsu Kobayashi, Izumi Kumagai, Hiroshi Wada. Isothermal titration calorimetry study of the interactions between purified prestin and chloride. The 6th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference, Hinxton, UK (July, 2007).
6. 飯田浩司, 池田勝久, 小林俊光, 和田仁. タンパク質モータ prestin の精製. 第 17 回日本耳科学会総会, No. 24, 福岡, 2007 年 10 月.
7. Koji Iida, Kouhei Tsumoto, Michio Murakoshi, Shun Kumano, Katsuhisa Ikeda, Toshimitsu Kobayashi, Izumi Kumagai, Hiroshi Wada. Interaction of the inner ear motor protein prestin with chloride studied by isothermal titration calorimetry. Third Asian Pacific Conference on Biomechanics, Tokyo, Japan. (November 2007).
8. Koji Iida, Kouhei Tsumoto, Michio Murakoshi, Shun Kumano, Katsuhisa Ikeda, Toshimitsu Kobayashi, Izumi Kumagai, Hiroshi Wada. Enthalpy measurement of anion binding to the motor protein prestin by isothermal titration calorimetry. The 3rd Tohoku-NUS Joint Symposium on Nano-Biomedical Engineering in the East Asian-Pacific Rim Region, Singapore. (December 2007).
9. 村越道生, 飯田浩司, 熊野峻, 和田仁. 量子ドットで標識したタンパク質モータプレスティンの原子間力顕微鏡による可視化, Imaging by Atomic Force Microscopy of the Motor Protein Prestin Labeled with Quantum Dots. 日本機械学会第 20 回バイオエンジニアリング講演会, No. 303, 東京, 2008 年 1 月.
10. Michio Murakoshi, Koji Iida, Shun Kumano, Hiroshi Wada. Immune Atomic Force Microscopy of the Plasma Membrane of Prestin-Transfected Chinese Hamster Ovary Cells Using Quantum Dots. The 31st Annual MidWinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Phoenix, Arizona, U.S.A. (February 2008).

(3) 図書

1. Murakoshi, M., Wada, H., 2007. Atomic force microscopy in studies of the motor protein prestin, a membrane protein of cochlear outer hair cells. In: Walker, J. (ed.) Molecular Protocols in Auditory Research, Humana Press, in press.

目次

第1章 研究の背景と目的	1
第2章 原子間力顕微鏡を用いたタンパク質モータ prestin を発現した CHO 細胞の原形質膜の観察.....	11
第3章 量子ドットで標識したタンパク質モータ prestin の原子間力顕微鏡による可視化.....	21
第4章 タンパク質モータ prestin の精製と等温滴定熱量測定による機能評価	29
参考文献	38

第1章 研究の背景と目的

Figure 1.1 にヒトの耳の模式図を示す。空気の粗密波である音は、外耳道を通り、鼓膜を振動させる。この振動はツチ骨、キヌタ骨、アブミ骨よりなる耳小骨連鎖を経て、内耳蝸牛に伝えられる。蝸牛内はリンパ液で満たされており、アブミ骨より伝えられた振動は、リンパ液の圧力変動へと変換される。

蝸牛内をらせん状に走る基底板上にはコルチ器という器官が存在する (Fig. 1.2, Fig. 1.3)。上述のリンパ液の圧力変動により、コルチ器は上下に振動する。コルチ器には、内有毛細胞 (IHC) と、外有毛細胞 (OHC) と呼ばれる 2 種類の感覚有毛細胞が存在し、コルチ器の振動により、有毛細胞上端に存在する聴毛が屈曲する (Fig. 1.4)。IHC では聴毛の屈曲に伴って、そこに存在するイオンチャンネルが開き、陽イオンが流入する。これにより細胞内電位が上昇し、聴神経を発火させる。この信号が脳へと伝達されることで、我々は音を認識する。もう一つの感覚有毛細胞である OHC ではコルチ器の振動に伴い、IHC と同様に細胞内電位が変化する。この電位変化を感知し OHC は自らの細胞長を変化させる (Fig. 1.5) (Brownell et al., 1985; Kachar et al., 1986; Ashmore, 1987)。この細胞長変化はコルチ器の振動を増幅する (Dallos, 1992)。この増幅機構により我々は鋭敏な聴覚を得ている。

OHC は円筒形をしており、その半径は 4–5 μm 、長さは 20–90 μm である。OHC の側壁は細胞膜、細胞骨格、subsurface cisternae の三層からなる (Fig. 1.6)。細胞膜にはタンパク質モータが密に存在し、このモータが細胞内外の電位差に応じてその立体構造を変化させ、上述の細胞長変化を実現していると考えられている (Fig. 1.7)。2000 年に Zheng らによってこのタンパク質モータの遺伝子が同定され、*prestin* と命名された。さらに、2002 年には *prestin* ノックアウトマウスが作製され、聴性脳幹反応の閾値が *prestin* ノックアウトマウスでは、野生型のマウスに比べて上昇することが示された (Liberman et al., 2002; Cheatham et al., 2004)。これは *prestin* が、聴覚の鋭敏性に重要な役割を果たしていることを示している。

Prestin について、その同定以来様々な研究が行われてきたが、*prestin* の形状や構造変化

メカニズムは解明されていない。そこで本研究では、まず、**prestin** 遺伝子を導入した Chinese hamster ovary (CHO)細胞と遺伝子を導入していない CHO 細胞の細胞膜を、それぞれ原子間力顕微鏡により観察した。次に、**prestin** 遺伝子を導入した CHO 細胞膜の **prestin** を、量子ドット(Qdot)で標識し、**prestin** 一分子を原子間力顕微鏡で観察した。最後に **prestin** の遺伝子を導入した細胞から **prestin** 分子を精製した。そして、精製した **prestin** の活性を、等温滴定型カロリメータを用いて評価した。

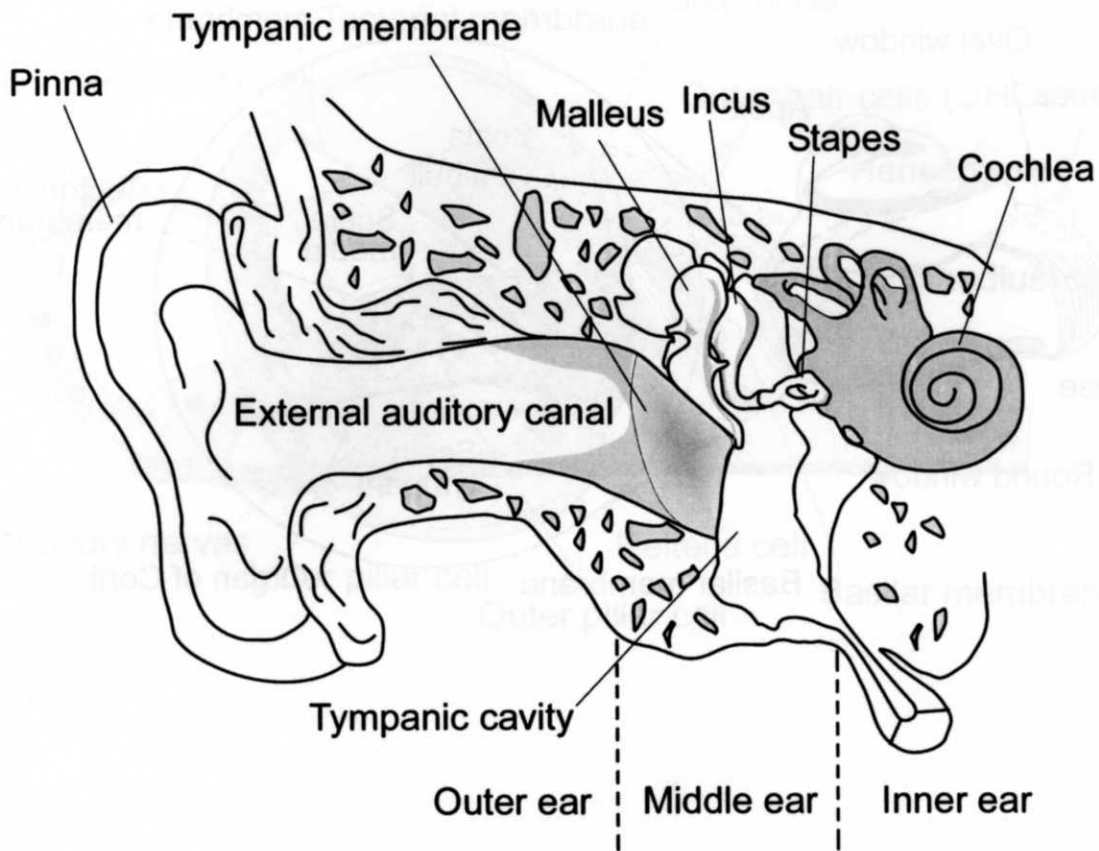


Figure 1.1. Cross section of the human ear. The outer ear collects and transmits sound from the external sound source to the middle ear. The middle ear ossicles, i.e., the malleus, incus and stapes, transmit the mechanical vibrations from the tympanic membrane to the cochlea.

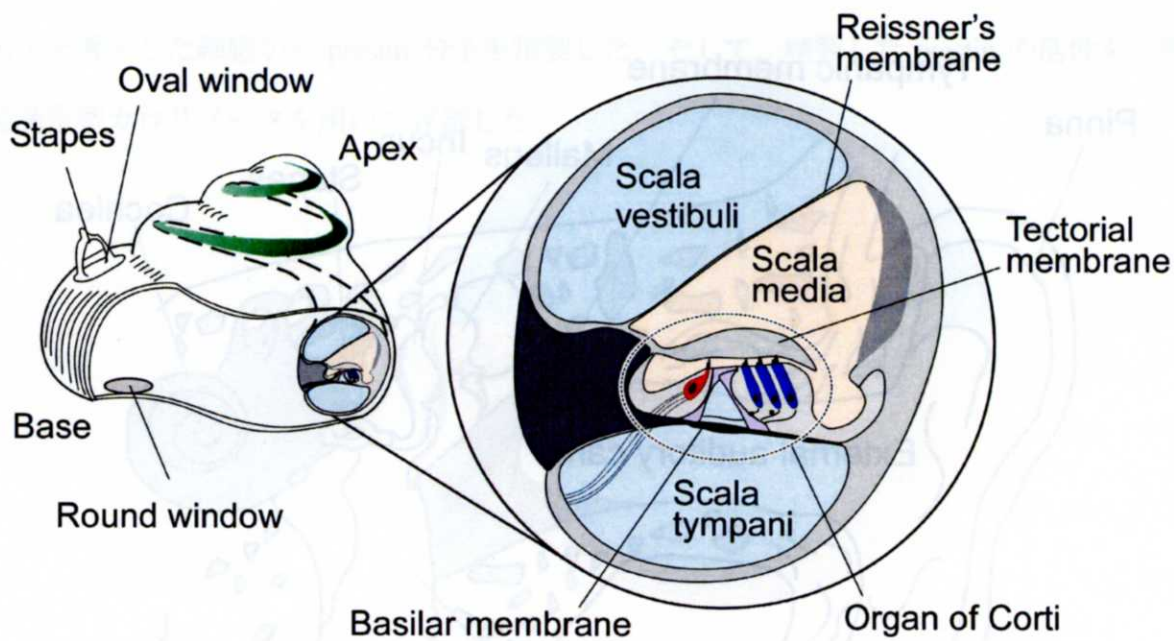


Figure 1.2. Human cochlea and its cross section. The cochlea is a spiral-shaped and fluid-filled chamber, being separated into three parts, i.e., the scala media, scala vestibuli and scala tympani, by Reissner's membrane and the basilar membrane. The scala media and the scala vestibuli and tympani contains endolymph (pale red region) and perilymph (pale blue region), respectively. The organ of Corti, which contains sensory cells, sits on the basilar membrane. The pushing motion of the stapes on the oval window transmits the mechanical vibration from the middle ear into the cochlear fluid and induces its pressure change, leading to the vibration of the basilar membrane. The organ of Corti then senses the motion of this vibration of the basilar membrane and trigger the auditory nerve signals.

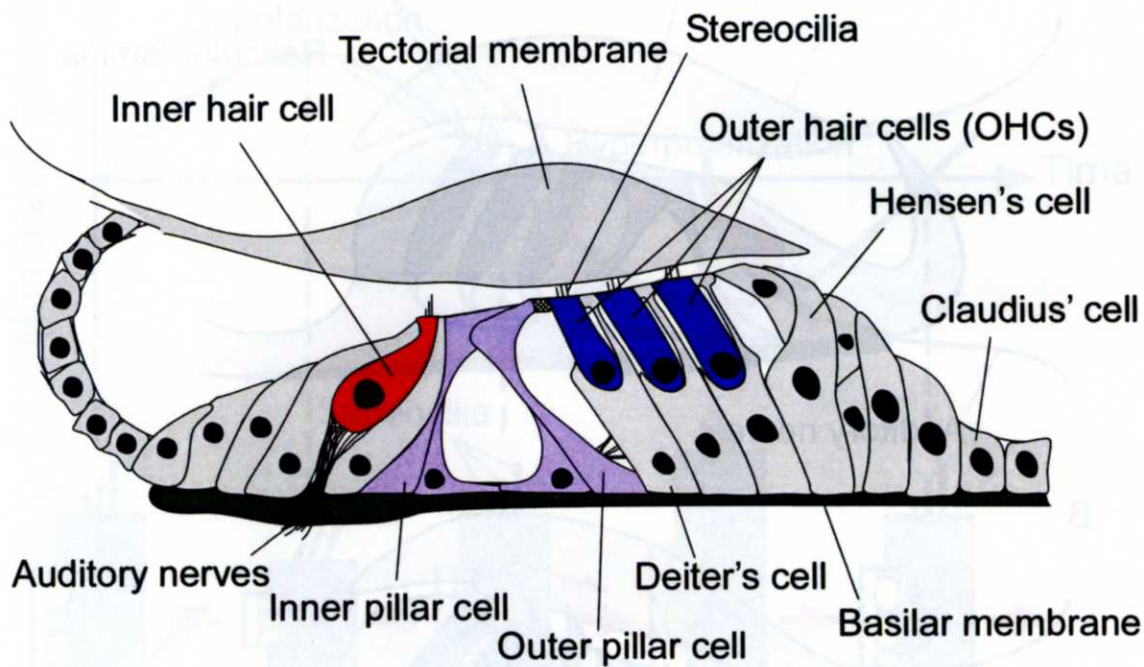


Figure 1.3. Cross section of the organ of Corti. The organ of Corti is located on the basilar membrane, containing an array of sensory cells and supporting cells. The inner and outer pillar cells form a relatively rigid arch structure along the basilar membrane. At the inner side of the pillar cells, the inner hair cells exist with the auditory nerves. Opposite of them are the outer hair cells (OHCs), which are supported by Deiter's cells. Stereocilia are protruded from the tops of the OHCs and are presumed to anchor into the gelatinous membrane called the tectorial membrane.

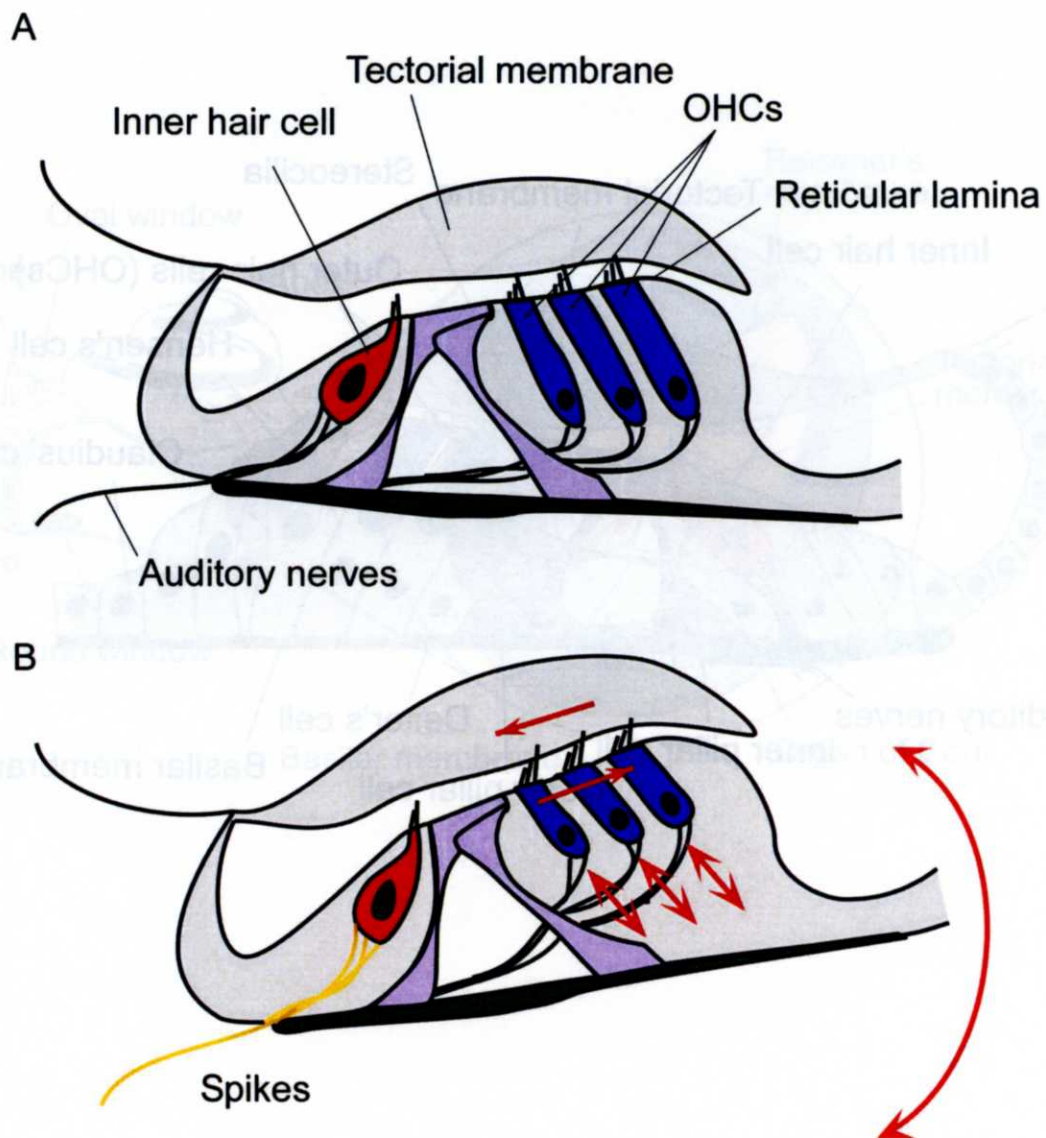


Figure 1.4. Rocking motion of the organ of Corti. (A) Resting state. (B) Excitation state. The vibration of the basilar membrane causes the shear motion between the tectorial membrane and reticular lamina and induces the fluid flow, leading to the deflection of the stereocilia of the OHCs and inner hair cells. This deflection induces the opening or closing of ion channels, resulting in the depolarization or hyperpolarization of the membrane potential. As a result, the transmitter is released from the inner hair cells, resulting in the generation of spikes to the auditory nerves. By contrast, the deflection of the stereocilia of the OHCs triggers the OHC motility, thus leading to the amplification of the basilar membrane vibration, namely, the cochlear amplification.

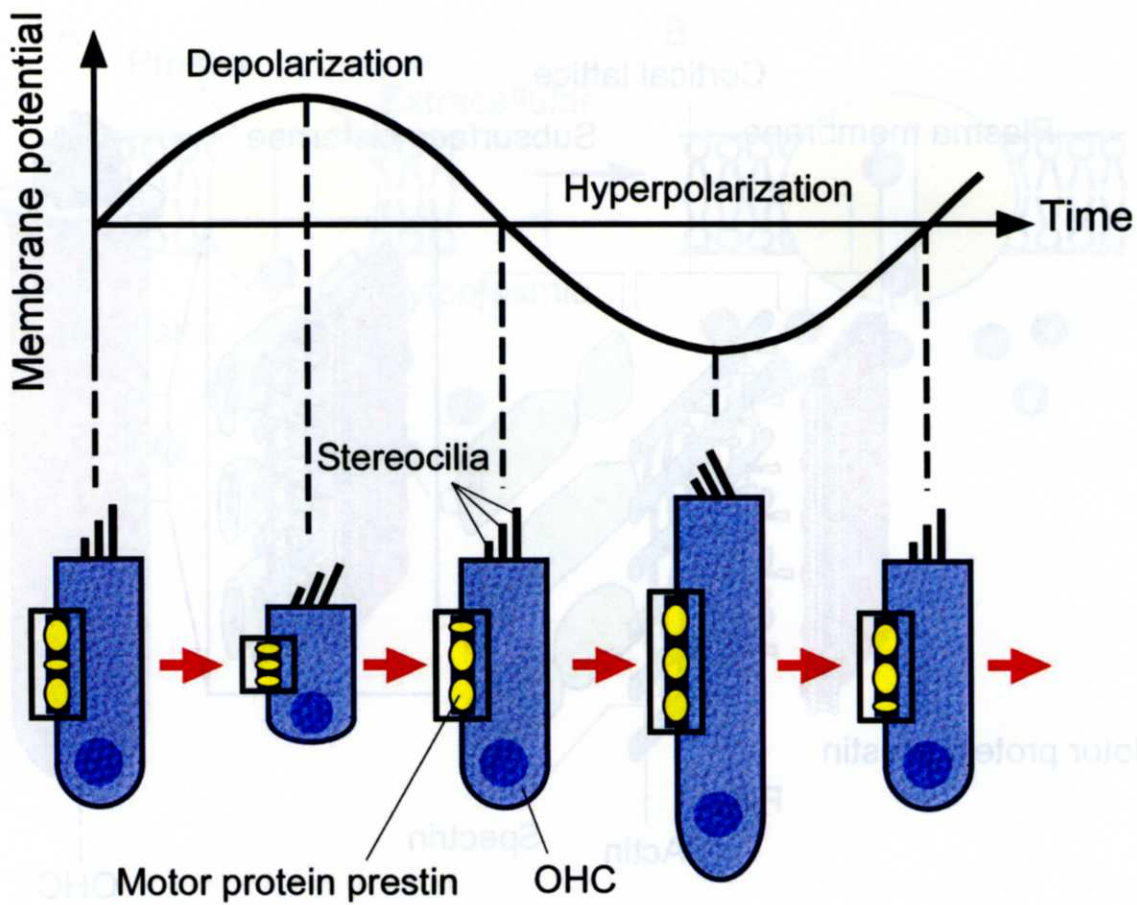


Figure 1.5. Somatic electromotility of OHCs. When OHCs are mechanically stimulated by incoming sound waves, the stereocilia bundle at the top of the OHC is deflected and thereby opening and closing of mechanosensitive ion channels in the stereocilia membrane is triggered. Unlike all other hair cells, OHCs then translate the resulting changes in membrane potential into changes in the length of their cylindrical cell soma. Depolarization induces cell contraction whereas hyperpolarization results in cell elongation.

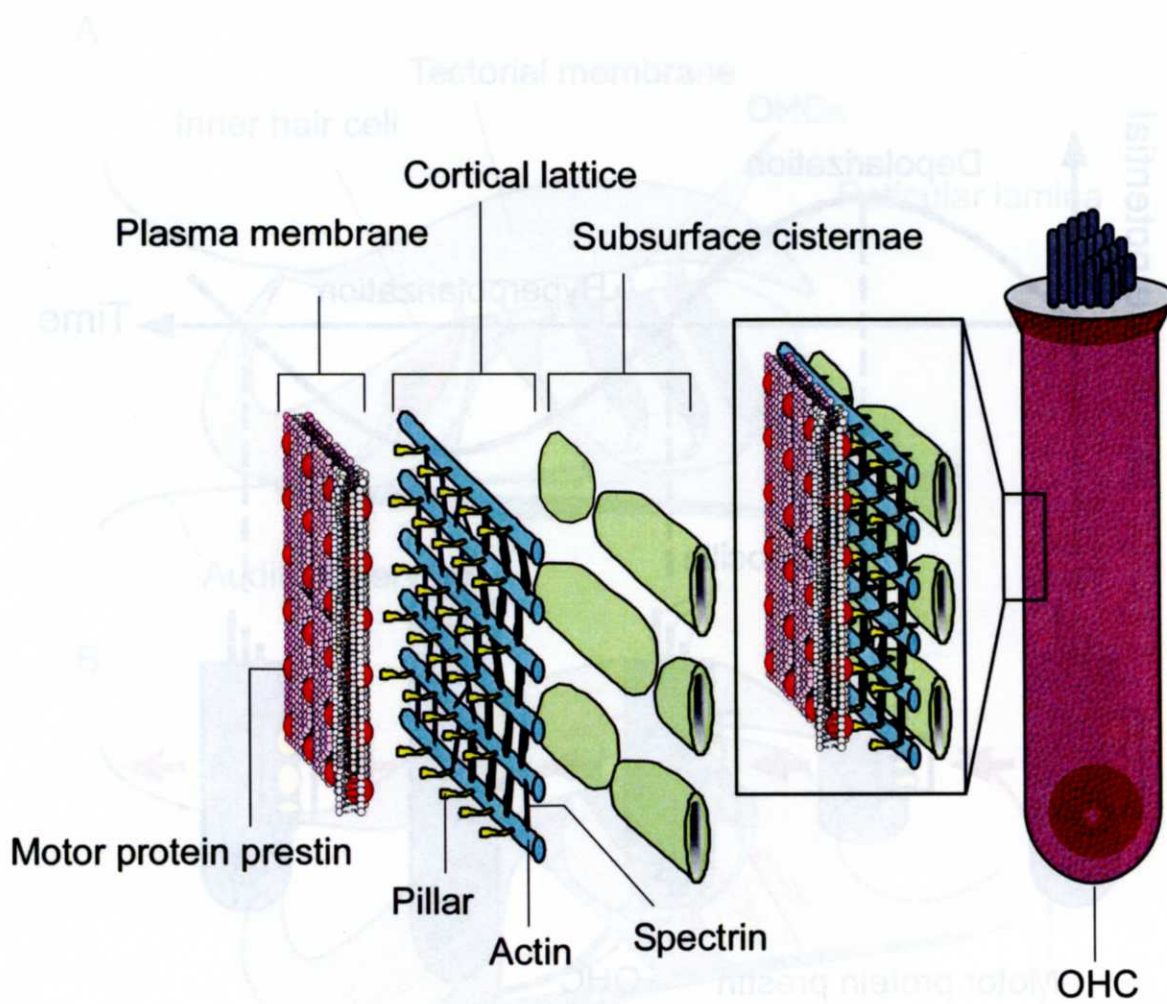


Figure 1.6. Structure of the OHC. The OHC is cylindrical in shape with a rigid structure called the cuticular plate at its apical end, from which the stereocilia protrude. The thin fibers called tip links presumably connect the stereocilia and the ion channels which exist at the ends of the stereocilia. The lateral wall of the OHC consists of three layers, i.e., the plasma membrane, cortical lattice and subsurface cisternae. In the plasma membrane, the motor protein prestin is distributed. The cortical lattice beneath the plasma membrane consists of actin and spectrin filaments, being formed by differently oriented domains.

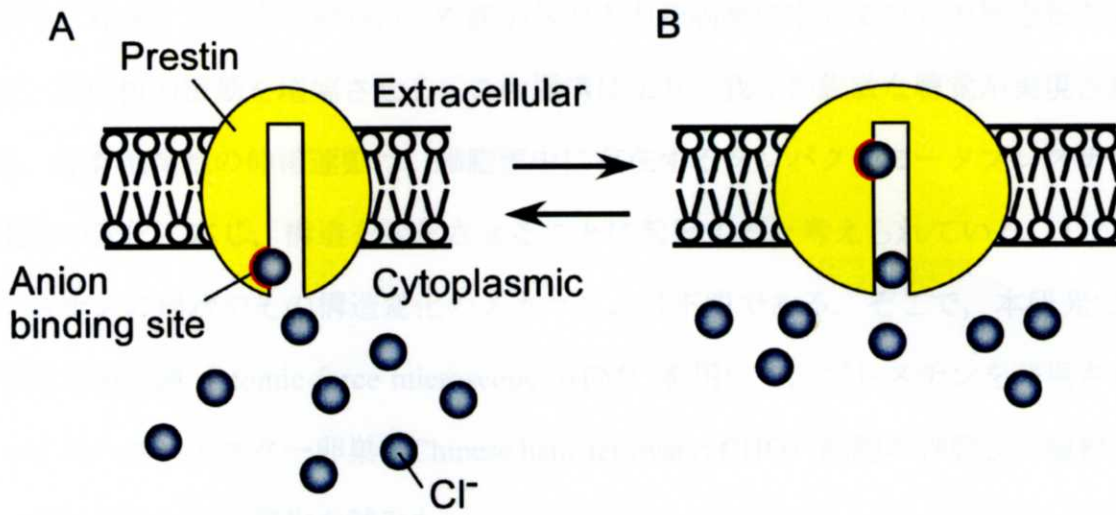


Figure 1.7. A simplified model of conformational change of prestin. Cl^- is assumed to associate with a positive binding site and the combination is translocated across the membrane, resulting in the extended state of prestin. The extended state of prestin corresponds to hyperpolarization of the cell while the compact state corresponds to depolarization. The presence of intracellular chloride is an essential factor for the conformational change of prestin.

第2章 原子間力顕微鏡を用いたタンパク質モータ prestin を発現した CHO 細胞の原形質膜の観察

1. 緒言

蝸牛に存在する外有毛細胞は、外部からの入力音刺激に応じて自らの細胞長を変化させ、基底板の振動を増幅させる。この機構により、我々の鋭敏な聴覚が実現されている。外有毛細胞の伸縮運動は、細胞膜中に存在するタンパク質モータプレスチンが膜電位の変化に応じ、構造を変化させることに起因すると考えられている。しかし、プレスチンの形状やその構造変化のメカニズムは不明である。そこで、本研究では、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いて、プレスチンを発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary: CHO) 細胞の細胞膜の観察を行い、プレスチンの可視化を試みた。

2. 実験方法

2.1. 試料作製

実験にはプレスチンを安定発現させた CHO 細胞 (Iida et al., 2005) と通常の CHO 細胞を使用した。これらの細胞を、10%FBS 含有 RPMI-1640 培地を用いて培養した。まず、CHO 細胞を EDTA により分散し、250 g で 5 分間遠心した。上清を除去後、多量のタンパク質を含む培養液を取り除くため、無タンパク質細胞外溶液により攪拌し、プラスチックディッシュもしくはガラスベースディッシュに播種し、37°C で 30 分間静置した。次に、細胞膜のみを単離するため、細胞を低浸透圧溶液に浸し、超音波処理を行った (Fig. 2.1)。ディッシュ底面に接着して残った細胞膜を高塩濃度溶液に 30 分間、0.05% トリプシンに 5 分間浸すことにより、細胞骨格、表在性膜タンパク質及びプレスチン以外の内在性膜タンパク質を除去し (Ziegler et al., 1998)、その後、1.0% グルタルアルデヒドで 20 分間化学固定した。さらに、単離された細胞膜は明視野での観察は困難であるため、CM-DiI により脂質を蛍光染色し、観察試料とした。

2.2. 原子間力顕微鏡

試料は倒立型蛍光顕微鏡に設置した AFM (NVB100, オリンパス) で観察した. カンチレバーにはピラミダル探針を持つ, ばね定数 0.02 N/m の窒化シリコン製のものを用いた. 試料に与える損傷を最小にするため, タッピングモードで観察を行った. カンチレバーの共振周波数を 3.6-4.7 kHz, 走査速度を 0.3-0.4 $\mu\text{m/s}$, 走査範囲を $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ とした.

2.3. 画像処理と構造解析

AFM 画像は, サンプル全体の傾斜による画像の傾きを除去するため, Digital Instruments 社のソフトウェアによりひずみ補正を行った. その後, 細胞膜上に観察された構造物の形状解析のため, Adobe Photoshop ver. 6.0 により, まず AFM 画像をグレースケールに変換し, 次に平滑化処理を行った.

観察された構造物の構造解析のため, 平滑化処理した AFM 画像に対し輪郭検出を行い, 微分画像を作製した. Figure 2.2 に示すように, 試料上の構造物が球状であると仮定すると, 針先端が曲率を持つために, 構造物は実際より見かけ上大きく観察される. 構造物の見かけ上の直径を 2Δ , 実際の直径を $2r$ とすると両者の関係は,

$$2\Delta = 2\{(R+r)^2 + (R+H/2)^2\}^{1/2} \quad (2.1)$$

で表される (Lärmer et al., 1997). ここに, r は構造物の実際の半径, R は探針の曲率半径, H は細胞膜の厚さであり, 本研究では $R = 16 \text{ nm}$, $H = 5 \text{ nm}$ とした. 取得した AFM 画像に式 (2.1) を適用し, 実際の構造物の大きさを得た.

3. 結果

CHO 細胞における prestin の発現を確認するため, 緑色蛍光タンパク質 GFP の蛍光を観察した (Fig. 2.3). Prestin 遺伝子導入 CHO 細胞と FLAG タグ融合 prestin 遺伝子

導入 CHO 細胞において、GFP の蛍光が観察された。この結果は、これら細胞に prestin が発現していることを示している (Iida et al., 2004)。

Figure 2.4 に FLAG タグ融合 prestin の遺伝子を導入した CHO 細胞と、遺伝子を導入していない CHO 細胞の細胞膜における、prestina と脂質をそれぞれ染色した蛍光写真と、対応する低倍率 AFM 画像を示す。FLAG タグ融合 prestin の遺伝子を導入した CHO 細胞の細胞膜に prestin を示す蛍光が観察されたことから、単離した細胞膜においても prestin が存在していることが確認された。また、prestina は細胞膜上で不均一に分散していることが確認された。

Figure 2.5 に CHO 細胞およびプレスチンを安定発現させた CHO 細胞の細胞膜の AFM 画像および画像処理により得られたそれぞれの微分画像を示す。いずれの細胞膜上にも、粒子状の構造物 (矢印) が確認された。ここに、粒子状構造物とは、膜タンパク質の大きさが数十 nm であるゆえ、その直径が 100 nm 未満、かつ長軸径に対する短軸径の比 (形状指数) が 0.5-1.0 のものである。

それぞれ5つの CHO 細胞およびプレスチンを安定発現させた CHO 細胞について構造解析を行った。観察された粒子状構造物の直径に対する、その単位面積あたりの数 (粒子状構造物の密度) の関係を Fig. 2.6 に示す。CHO 細胞では、粒子状構造物の直径は、6-30 nm であった。一方、プレスチンを安定発現させた CHO 細胞においてもほぼ同様の範囲に収まった。しかし、直径別に見た粒子状構造物の密度は、プレスチンを安定発現させた CHO 細胞において、直径 8-10 nm および 10-12 nm で、CHO 細胞におけるそれに比べ、有意に大きくなった ($P < 0.05$, Student's t-test)。

4. 考察

4.1. 試料作製

AFM によって生体材料のような柔らかい試料を観察する際には、観察に適した試料作製が不可欠である。本実験では、単離細胞膜を得るため、試料を超音波処理した。露出された細胞膜内側には、細胞骨格、表在性膜タンパク質および内在性膜タンパク

質が多く存在している。プレスチン大きさは、その分子量（～82 kD）から見積もると、およそ直径7 nmである。従って、これらのタンパク質の存在は、プレスチンの観察の妨げになることが考えられる。そこで、高塩濃度溶液とトリプシンにより細胞骨格およびその他のタンパク質を試料から除去することを試みた。プレスチンはトリプシン処理されても活性を失わないことが知られており(Kalinec et al., 1992; Dong and Iwasa, 2004), 今回作製した試料は、細胞膜とプレスチンで構成された AFM による観察に適した試料であることが期待される。

4.2. 原子間力顕微鏡による観察および画像解析

直径8-12 nmの粒子状構造物が、プレスチンを安定発現させた CHO 細胞において、それを発現させていない CHO 細胞よりも有意に大きくなった。両細胞の違いは、プレスチンの有無のみから由来しており、このことは、直径8-12 nmの粒子状構造物の多くがプレスチンであることを示唆している。また、この結果は、分子量から予測されるプレスチンの大きさ（直径7 nm程度）ともよく一致している。

5. 結言

プレスチンを発現させていない CHO 細胞に比べ、それを安定発現させた CHO 細胞の細胞膜上において、直径8-12 nmの粒子状構造物が有意に多く存在した。このことは、これらの多くがプレスチンである可能性を示唆している。

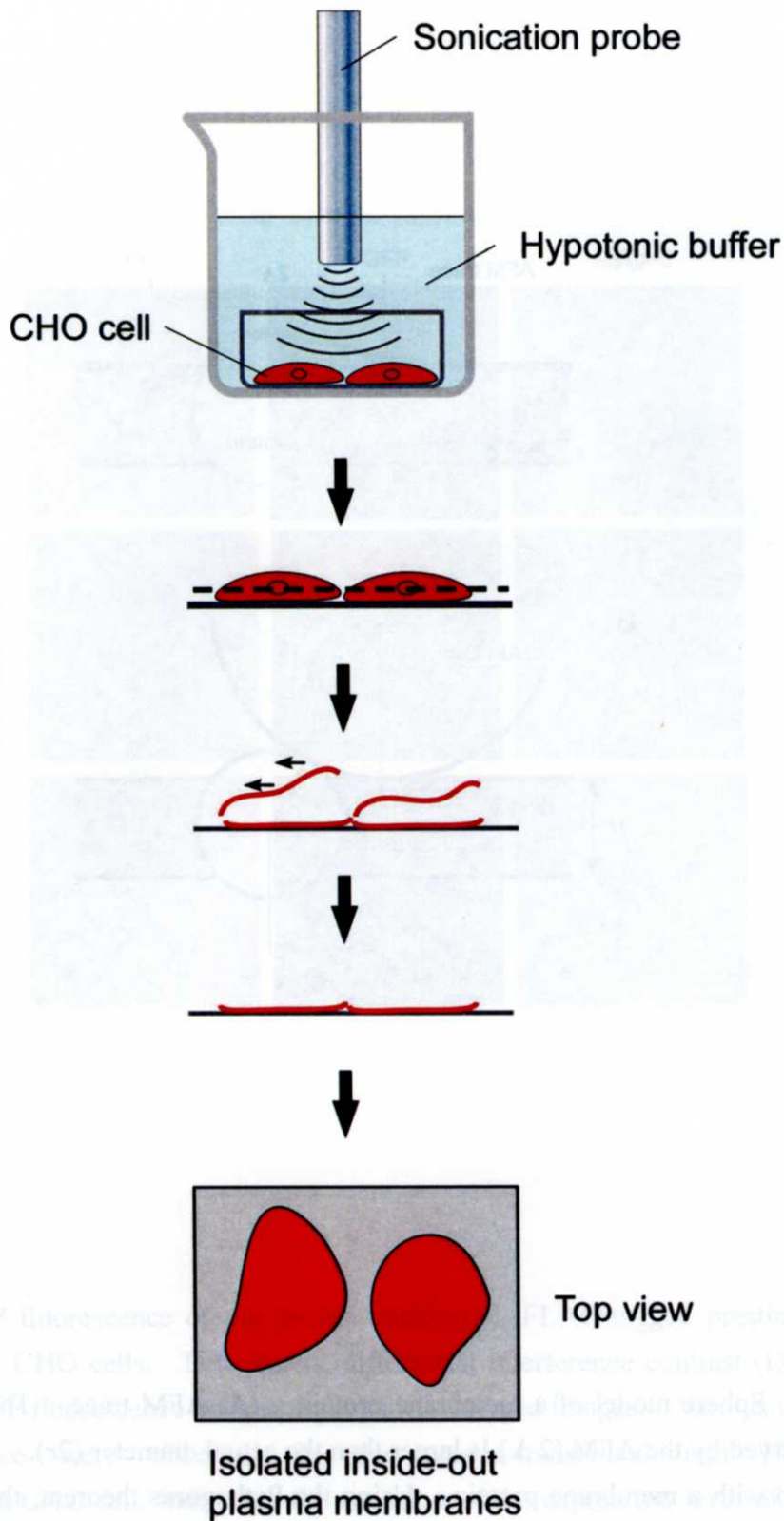


Figure 2.1. A schema of the plasma membrane isolation by sonication. CHO cells attached on the dish are immersed in 60 ml of ice-cold hypotonic buffer in a 100 ml glass beaker using forceps. They are then exposed to ultrasonic waves for ~100 ms in the buffer, i.e., sonication. As a result, the cells are sheared open, exposing their cytoplasmic faces, i.e., inside-out plasma membranes.

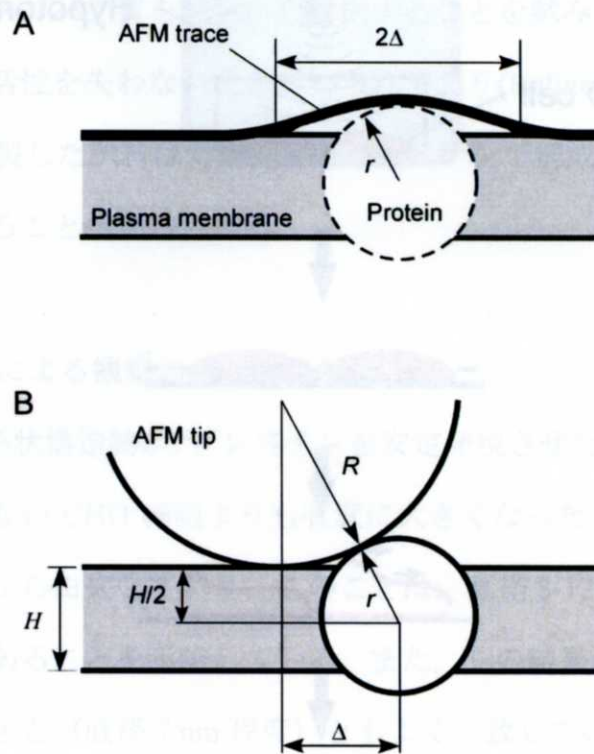


Figure 2.2. Sphere model of a membrane protein. (A) AFM trace. The diameter of the protein observed by the AFM (2Δ) is larger than the actual diameter ($2r$). (B) Interaction of the AFM tip with a membrane protein. Using the Pythagoras theorem, the actual diameter ($2r$) of the protein can be calculated from the radius (R) of the curvature of the AFM tip, the thickness of the bilayer (H) and the diameter of the protein observed by the AFM (2Δ).

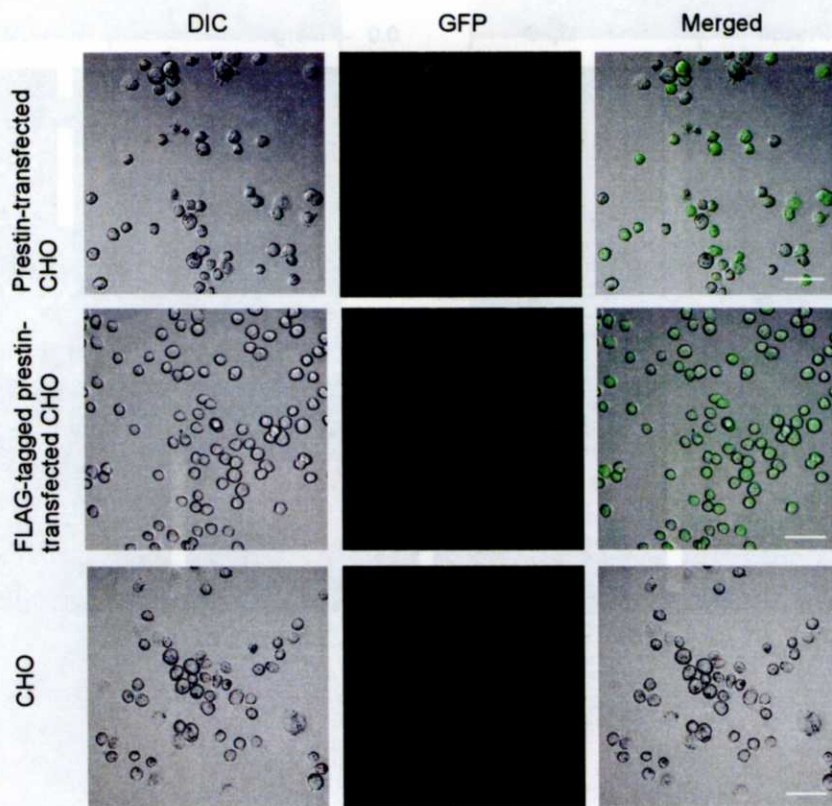


Figure 2.3. GFP fluorescence of the prestin-transfected, FLAG-tagged prestin-transfected and untransfected CHO cells. Left panels, differential interference contrast (DIC) images; middle panels, GFP fluorescence images; right panels, merged images. Various intensities of GFP fluorescence were observed in the prestin-transfected and FLAG-tagged prestin-transfected CHO cell, indicating the variation of the expression level of prestin (top middle and center panels). By contrast, GFP fluorescence was not observed in the untransfected CHO cells (bottom middle panel). Scale bars are 50 μm .

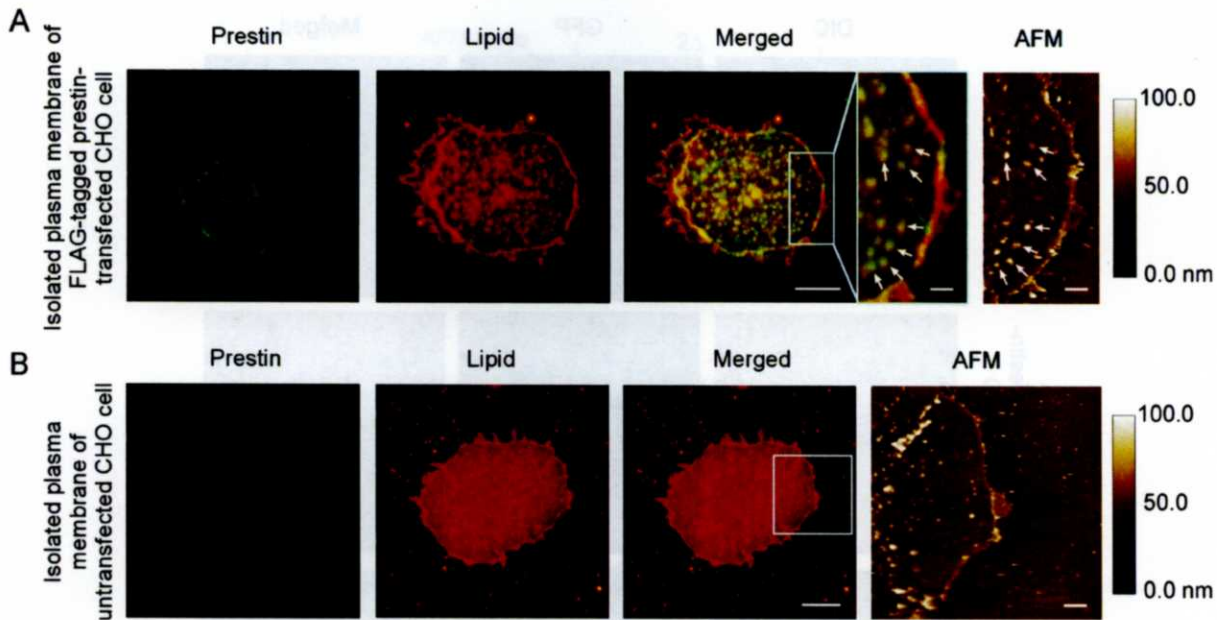


Figure 2.4. Fluorescence images of the prestin and lipid labeling, and the corresponding AFM images of the isolated plasma membranes of the CHO cells. (A) Isolated membrane of a FLAG-tagged prestin-transfected CHO cell. The prestin labeling (left panel, green), which was visualized by incubation with mouse anti-FLAG primary antibody and FITC-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody, was colocalized with the lipid labeling (second panel from the left, red), which was visualized by incubation with CM-DiI, as shown by yellow region in the merged image (second panel from the right). A magnified image of the boxed area in the merged image is shown to the right. A low-magnification AFM image was obtained from the boxed area. Globular structures approximately 100 nm in diameter were observed. They correspond to the colocalized bright patches in the merged image as indicated by the arrows. (B) Isolated plasma membrane of an untransfected CHO cell. The prestin labeling was not detected (left panel). The lipid labeling was observed (second panel from the left, red). A low-magnification AFM image was obtained from the boxed area indicated in the merged image. Scale bars of the fluorescence images, the magnified image in A and the AFM images are 5.0 μm , 1.0 μm and 1.0 μm , respectively.

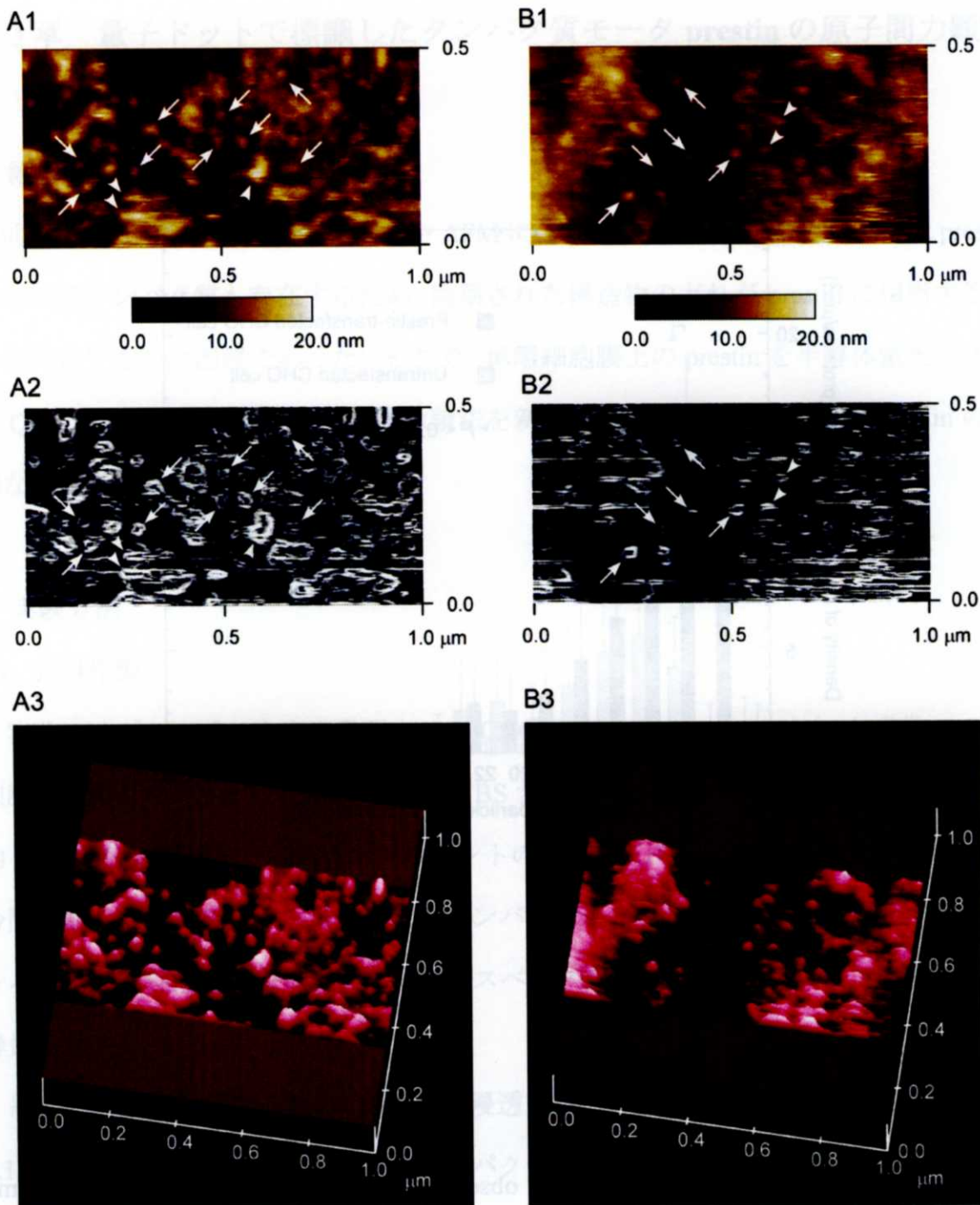


Figure 2.5. AFM images of membranes of the CHO cells. (A1) Original flattened AFM image of the prestin-transfected CHO cell. (B1) Original flattened AFM image of the untransfected CHO cell. (A2) Differential AFM image of A1. (B2) Differential AFM image of B1. (A3) 3-D image of A1. (B3) 3-D image of B1. Arrows indicate particle-like structures recognized in the plasma membranes of the prestin-transfected CHO cells and the untransfected CHO cells, whereas arrow heads indicate structures which did not meet the criteria for particle-like structures. However, no distinctive difference in such particle-like structures was found between these cells.

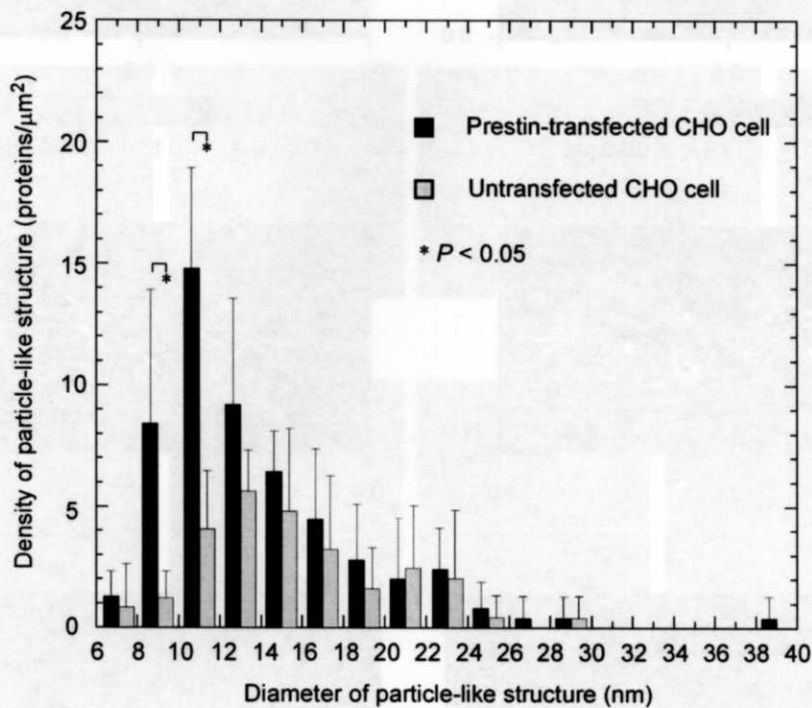


Figure 2.6. Frequency distribution of the observed particle-like structures in the plasma membrane. The density of the particle-like structures is plotted against the interval in 2-nm classes. Data were obtained from five AFM images of the prestin-transfected CHO cells and five such images of the untransfected CHO cells. When the sizes of the particle-like structures were 8–10 nm and 10–12 nm, differences of their densities between the prestin-transfected CHO cells and the untransfected CHO cells were statistically significant for $P < 0.05$ using the Mann-Whitney test, as shown by asterisks. Error bars represent standard deviations.

第3章 量子ドットで標識したタンパク質モータ prestin の原子間力顕微鏡による可視化

1. 緒言

前章では, CHO 細胞の細胞膜表面を AFM により可視化したが, 細胞膜上には prestin 以外の膜タンパク質も存在するため, 観察された構造物のどれが prestin に相当するのかを同定するのは困難であった. そこで, 単離細胞膜上の prestin を半導体蛍光ナノ粒子 Qdot で標識する免疫原子間力顕微鏡法を新たに考案し, 細胞膜表面の prestin の詳細な微細構造解析を試みた.

2. 実験方法

2.1. 試料作製

実験にはプレスチンを安定発現させた CHO 細胞 (Iida et al., 2005) と通常の CHO 細胞を使用した. これらの細胞を, 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地を用いて培養した. 約 48 時間静地培養後, 80%コンフルエントの段階で EDTA により分散し, 250 g で 5 分間遠心した. 上清を除去後, 多量のタンパク質を含む培養液を取り除くため, 無タンパク質細胞外溶液により攪拌し, ガラススペースディッシュに播種し, 37°C で 5 分間静置した.

細胞膜のみを単離するため, 細胞を低浸透圧溶液に浸し, 細胞膜単離を行った (Fig. 3.1). その後, 細胞骨格, 表在性膜タンパク質及びプレスチン以外の内在性膜タンパク質を除去するため, ディッシュ底面に単離した細胞膜を PBS で 3 回リンス後, 高塩濃度溶液に浸し室温で 30 分間インキュベートし, さらに PBS で 3 回リンス後, 0.05% トリプシン/PBS に浸し室温で 5 分間インキュベートした. PBS で 3 回リンス後, 4.0% パラホルムアルデヒドを用い, 室温で 30 分間化学固定した.

Prestin を Qdot 標識するため, 化学固定した試料をブロッキング後, 抗プレスチン 1 次抗体を用いて 4°C でオーバーナイト, さらに Qdot 標識抗 IgG 2 次抗体を用いて 37°C で 1 時間インキュベートした. その後, ハンクス平衡塩に浸し観察試料とした. Qdot

は蛍光を発するので、この蛍光を観察することで、プレスチンがラベルされているか否かを確認できる。Qdot はサイズの均一な半導体材料であるため、AFM 画像中において、容易にその存在を確認でき、これにより、プレスチンの位置を特定することができる (Fig. 3.2).

2.2. 原子間力顕微鏡

試料は倒立型蛍光顕微鏡がついた AFM (NVB100, オリンパス) で観察した。カンチレバーにはピラミダル探針を持つ、ばね定数 0.02 N/m の窒化シリコン製のものを用いた。試料に与える損傷を最小にするため、タッピングモードで観察を行った。カンチレバーの共振周波数は 3.6-4.7 kHz, 走査速度は 0.3-0.4 $\mu\text{m/s}$ とした。

2.3. 画像処理と構造解析

AFM 画像は、サンプル全体の傾斜による画像の傾きを除去するため、Digital Instruments 社のソフトウェアによりひずみ補正を行った。その後、Adobe Photoshop ver. 6.0 により、AFM 画像をグレースケールに変換し、次に平滑化処理を行った。観察された構造物の構造解析のため、平滑化処理した AFM 画像に対し輪郭検出を行い、その微分画像を作製した。

3. 結果及び考察

Figure 3.3 に、prestin 発現 CHO 細胞および prestin を導入していない CHO 細胞から単離した細胞膜中の prestin を Qdot で染色した蛍光画像を示す。蛍光写真より prestin の発現が確認できる。

Figure 3.4 に Qdot で標識した prestin の高倍率 AFM 画像を示す。黒矢じりで示した構造物の高さは 7.9 nm であり、用いた Qdot の粒径と一致している (Michalet et al., 2005)。その近傍 (白矢印) に、4 つの Peak と中央に一つのくぼみを持つ Ring-like な構造物が観察された。この結果は、これら構造物が prestin であり、prestin が四量体の

Ring-like 構造であることを示唆している。

近年のMioらの研究によると, prestinの外形は弾丸形状であり, 細胞質側中央には, 突起状構造物が存在し, 中央部が空洞になっているという報告がある (Mio et al., 2008). これに対して今回の計測では, prestinにはそのような突起構造は無く, むしろ, 中央部にはくぼみが観察された. これまでにタンパク質の剛性については, タンパク質の一分子進展試験において, 100 pN 程度の力で変形することが示されている (Hertadi et al., 2003; Janovjak et al., 2006; Dietz et al., 2006; Cao and Li, 2008). 本実験では, カンチレバーにより, およそ 100 pN 以上の力が試料に加わっていると見積もることができる. そのため今回の AFM による観察結果は, 観察時に prestin の細胞質側の突起状構造物を prestin 中央空洞内に押し込んだ状態で得られたと考えられる. しかし, この点については更なる検討が必要である.

4. 結言

Qdot 標識した prestin を高倍率で AFM 観察し, Qdot 近傍に, 中央にくぼみがあり, 4つのドメインから構成された粒子状構造物を確認した. このことは, prestin が四量体の Ring-like 構造である可能性を示唆している.

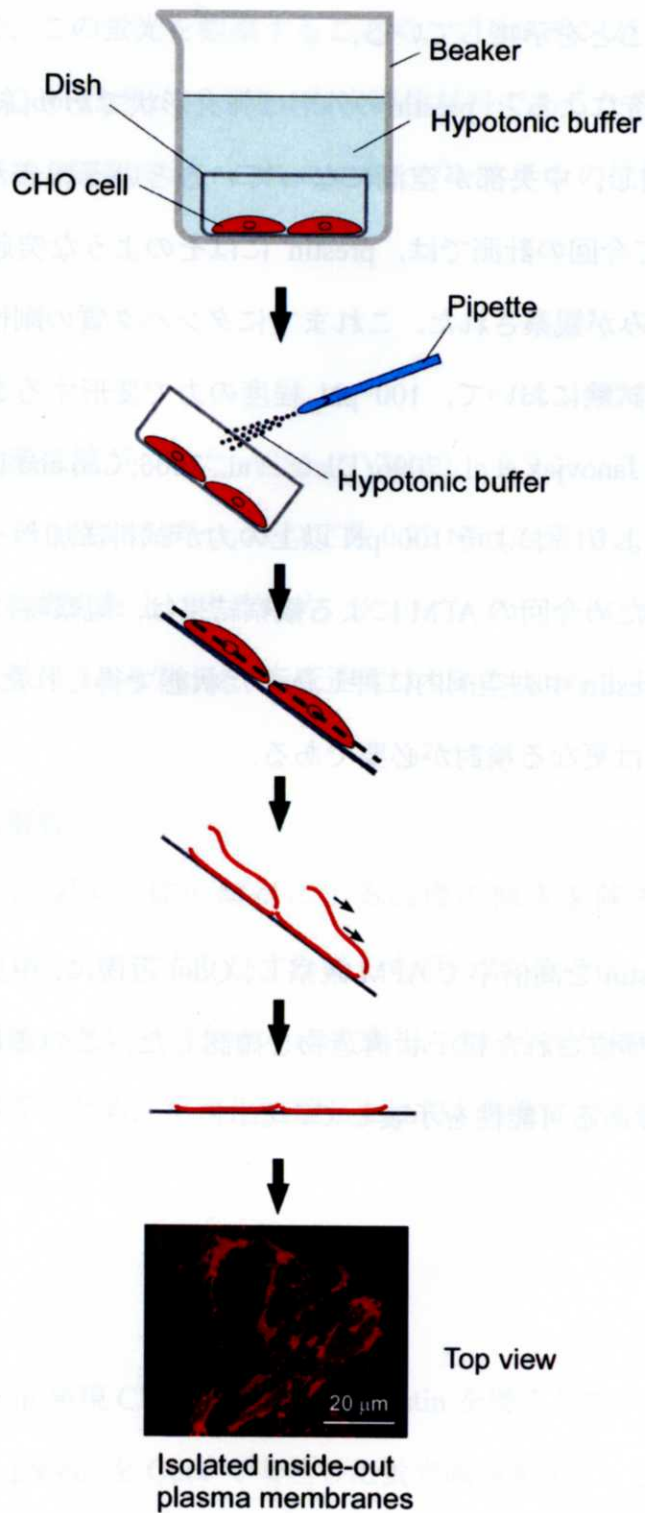


Figure 3.1. A schema of plasma membrane isolation by squirting of hypotonic buffer. CHO cells attached to the dish are immersed in 60 ml of ice-cold hypotonic buffer in a 100-ml glass beaker using forceps for 3 min, the beaker having been cooled to 4°C (top panel). The cells were gently exposed to a stream of hypotonic buffer using a 1-ml pipette several times (second from the top). Due to this, the cells were sheared at around the dotted line (third from the top) and the apical plasma membranes were removed (third from the bottom), resulting in the isolation of inside-out basal plasma membranes (second from the bottom). Bottom panel shows a fluorescence image of the isolated plasma membranes of the prestin-transfected CHO cells, which were labeled with a lipophilic membrane probe CM-DiI.

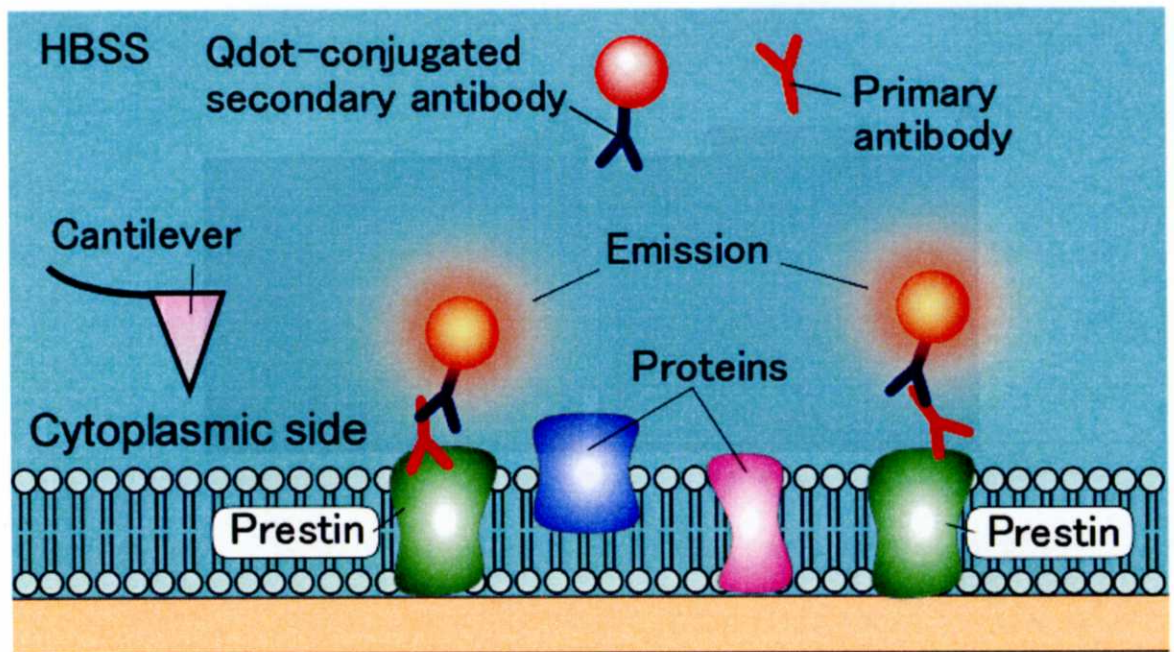


Figure 3.2. Immune AFM of prestin expressing in the isolated inside-out plasma membrane of the prestin-transfected CHO cell.

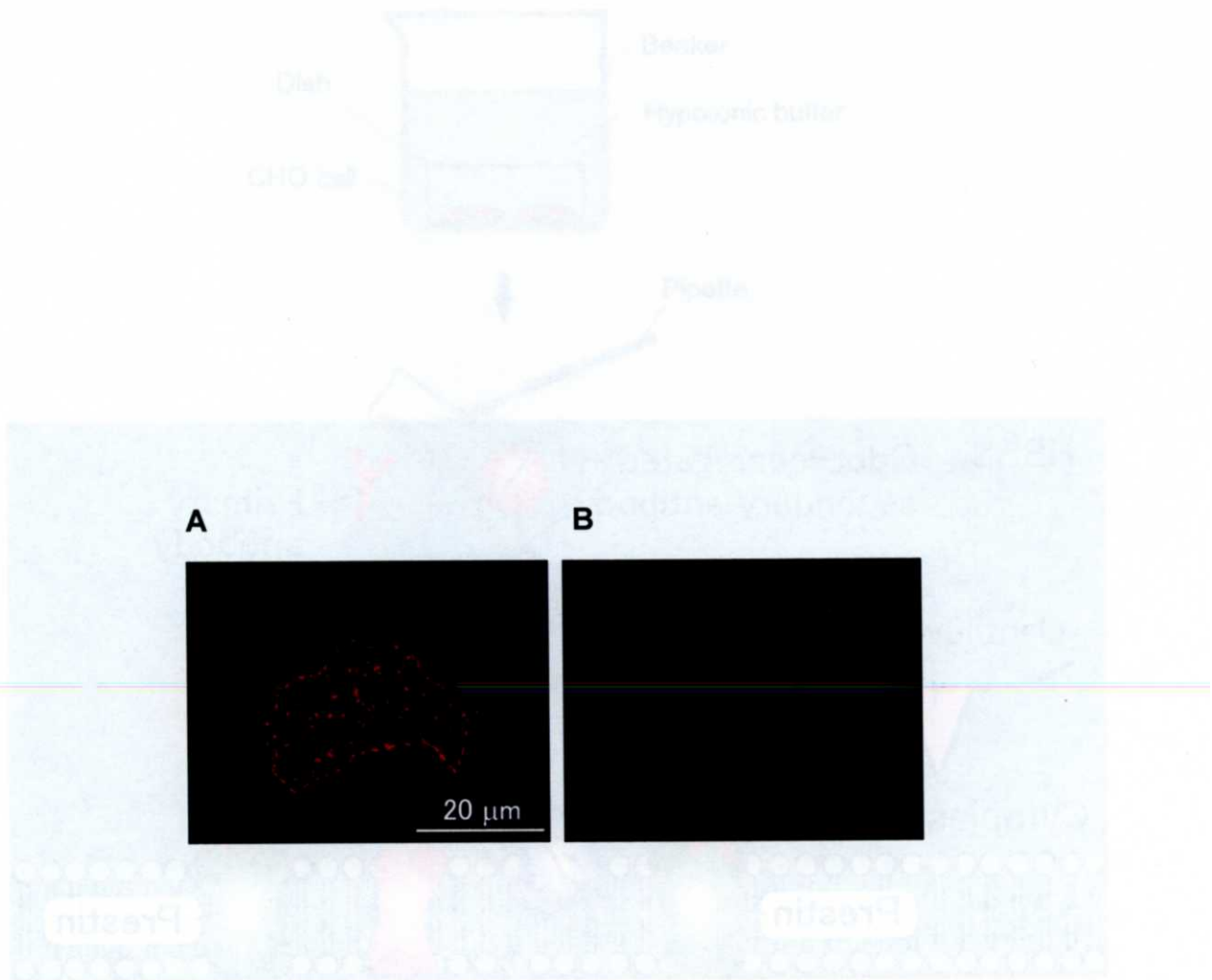


Figure 3.3. Fluorescence images of isolated plasma membranes of the prestin-transfected and untransfected CHO cells. (A) prestin-transfected CHO cell. (B) untransfected CHO cell. Prestin labeling (red), which labels the N-terminus of prestin, was observed in the isolated plasma membrane of the prestin-transfected CHO cell, but not observed in the isolated plasma membrane of the untransfected CHO cell.

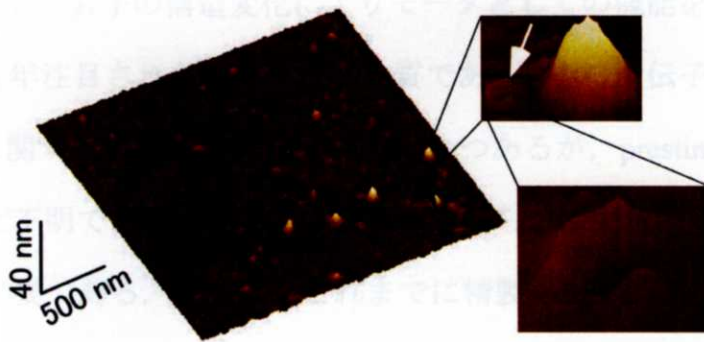


Figure 3.4. High-magnification 3-D AFM images of prestin on the cytoplasmic face of the plasma membrane of the prestin-transfected CHO cells. Qdots 8 nm in height were clearly observed, as indicated by black arrowheads. As shown in the magnification at the right, a squarish ring-like structure with four peaks and one valley at its center, possibly corresponding to a prestin molecule, was observed in the vicinity of the Qdot (arrow).

第4章 タンパク質モータ prestin の精製と等温滴定熱量測定による機能評価

1. 緒言

哺乳類の聴覚器官に存在する外有毛細胞(outer hair cell: OHC)は、細胞膜電位の変化に同期して自身の細胞長を変化させる。OHCの細胞長変化の源は、細胞膜電位の変化に応じた、細胞側壁に存在するタンパク質モータ prestin の構造変化であると考えられている。Prestin は、100 kHz にまで及ぶ高い応答性や、ATP 非依存で電位を直接エネルギー源とすること、一分子の構造変化によりモータとしての機能を果たすなどの特徴を有しており、近年注目されているタンパク質である。その遺伝子が同定された2000年以降、prestina に関する知見は徐々に蓄積されつつあるが、prestina の構造変化の分子メカニズムは未だ不明である。そのメカニズムを明らかにするには、精製した prestin を用いた解析が必要である。しかし、これまでに精製 prestin を用いた解析を行った例はない。そこで本研究では、まず、prestina を発現させた培養細胞から prestin を精製した。次に、精製した prestin の活性を確認するため、細胞内の Cl^- が prestin に結合し、それが電位センサとして働き prestin の変形を引き起こすという報告 (Oliver et al., 2001) に基づいて、精製した prestin と Cl^- との相互作用を、分子間相互作用を溶液状態で計測できる等温滴定型熱量計を用いて解析した。

また、サリチル酸が prestin の機能を阻害するということが報告されている (Kakehata and Santos-Sacchi, 1996)。これまでの報告では、サリチル酸が prestin に結合しその機能を阻害するというサリチル酸の作用機序の他に、サリチル酸が細胞膜の剛性や電荷の分布を変化させることが指摘されており、サリチル酸が prestin に与える影響と、細胞膜に与える影響を分離することができなかった。これに対して等温滴定熱量測定では細胞膜の要素を含まず、サリチル酸と prestin の相互作用のみを解析できる。そこで、サリチル酸が prestin と Cl^- の相互作用に与える影響を調べるため、サリチル酸存在下で同様の熱量測定を行った。

2. 実験方法

2.1. 精製prestinの調製

本研究では、これまでに構築したC末端にFLAGタグを融合したprestinを安定発現するCHO細胞株よりprestinを精製した。2×10⁹個のFLAGタグ融合prestinを発現したCHO細胞を緩衝液(10 mM HEPES (pH 7.3), 150 mM Na₂SO₄)で洗浄後、40 mlの緩衝液に懸濁し、超音波処理を行い、4°C、1,000 × gで7分間遠心し、未破碎の細胞や核などを取り除いた。続いてその上清を4°C、20,360 × gで2時間遠心し、細胞膜画分を沈殿させた。回収した細胞膜画分を、40 mlの10 mM *n*-nonyl-β-D-thiomaltopyranosideを含む緩衝液に再懸濁し、氷中で2時間保温し、膜タンパク質の可溶化を行った。その後4°C、20,360 × gで2時間遠心し、可溶化されたprestinが含まれている遠心後の上清を回収した。この上清を抗FLAG抗体カラムに加え、カラムにprestinを吸着させ、それを緩衝液で洗浄後、FLAGペプチドを用いてprestinを競合溶出させ、精製prestinを得た (Fig. 4.1)。

2.2 等温滴定熱量測定

分子間で相互作用が起こる際、必ず熱の出入りが伴う。等温滴定熱量測定は、溶液中のタンパク質の分子間相互作用を、この熱の出入りを計測し解析する方法である (Fig. 4.2)。本研究では精製prestinとCl⁻との相互作用を、この等温滴定熱量測定により評価し、prestinの活性を調べた。測定にはVP-ITC (MicroCal)を用いた。全ての測定には、組成が10 mM HEPES (pH 7.3), 150 mM Na₂SO₄, 10 mM *n*-nonyl-β-D-thiomaltopyranosideである緩衝液を用いた。測定セルに精製したprestin溶液を、インジェクターに20 mM NaCl溶液をそれぞれセットした。測定温度は25°Cとし、攪拌しながらインジェクターのNaCl溶液を10 μlずつ10回、210秒間隔で滴下し、その間の温度変化を計測した。得られた測定結果はOriginソフトウェアを用いて解析した。

また、サリチル酸ナトリウムがprestinの機能を阻害するという報告に基づき、サリチル酸ナトリウム存在下で計測を行った。精製prestin溶液で上述と同様の計測を行っ

た後、終濃度 1 mM となるようにサリチル酸ナトリウムを添加し、1 mM サリチル酸ナトリウムを含む 20 mM NaCl 溶液を滴下し熱量測定を行った。さらにその後、終濃度 10 mM となるようにサリチル酸ナトリウムを添加し同様の計測を行った。

3. 結果及び考察

3.1 Prestin の精製

精製により得られた prestin の SDS-PAGE の結果を Fig. 4.3 に示す。Prestin の理論分量は約 82 kDa である。矢印で示した prestin を表すバンドが明瞭に確認され、上述の精製過程により、prestin が精製されていることが確認された。検出されたバンドが広がりを持っているのは prestin が糖修飾されているためであると考えられる。また、SDS-PAGE の結果で prestin 以外を示すバンドがいくつか見られるが、これらは精製過程で取り除けなかった夾雑物を示すと考えられる。

3.2 Prestin と NaCl の相互作用

Prestin を精製することができたので、次に精製した prestin の活性を等温滴定型熱量計を用いて評価した。精製 prestin と NaCl との相互作用の測定結果を Fig. 4.4 に示す。Figure 4.4A においてプラスは吸熱をマイナスは発熱を示す。各滴定の、滴定開始から次の滴定開始までの間に計測された熱量を積分し、その滴定によって発生した熱量を求め、これらを Fig. 4.4B にプロットした。緩衝液に対して NaCl を滴定した場合、摩擦熱に由来する発熱が計測された。これに対し、prestin 溶液に NaCl を滴定した場合、緩衝液の時に比べ、滴定曲線が上方に現れた。Prestin を溶解した緩衝液中には Na^+ が既に存在しているので、これらの結果は、prestin が Cl^- と相互作用し、吸熱したことを示している。従って、精製した prestin が Cl^- と結合するという活性を有していると考えられる。

熱の発生原因として、新しい結合ができたこと、脱水和が起こったこと、タンパク質の構造が変化したことなどが挙げられる。一般に新たな結合ができる時には発熱、

脱水和など結合が切れるときには吸熱が起こる。これらの収支を決定することは困難であるが、prestin に Cl^- が結合するなど新たな結合の生成に由来する発熱は比較的小さく、脱水和や結合が切れることに由来する吸熱が比較的大きく、全体の熱の出入りに貢献をし、反応全体としては吸熱となっていると考えられる。

本研究により、活性のある精製 prestin の調製が可能であることが示された。これにより今後精製 prestin を用いた prestin の構造変化の分子メカニズムの解明が可能になると期待される。また、本研究に用いた等温滴定熱量測定は、精製した prestin の機能を、純粋な溶液状態で評価することができるため、prestin に関する新たな知見が得られると考えられる。

本研究では、精製 prestin とサリチル酸との相互作用を等温滴定熱量測定により解析した。サリチル酸存在下で prestin と Cl^- の相互作用を計測すると、prestin と Cl^- の相互作用によると考えられる吸熱が、サリチル酸ナトリウム濃度依存的に抑制された (Fig. 4.5)。本計測の反応系には、prestin、 Cl^- 及びサリチル酸のみしか存在しないため、本実験結果は、サリチル酸が prestin に直接作用し、prestin と Cl^- との相互作用を阻害したことを示している。このことから、サリチル酸が prestin の陰イオン結合部位に Cl^- よりも強く結合する、すなわちサリチル酸は prestin の拮抗剤であることを強く支持する。

4. 結言

本研究では prestin の精製を行った。得られた精製 prestin の活性を等温滴定熱量測定により評価した。その結果、prestin と Cl^- の相互作用に伴う吸熱反応が検出され、精製した prestin が活性を有していることが明らかになった。また、サリチル酸ナトリウムは拮抗剤として prestin に直接作用することが示された。

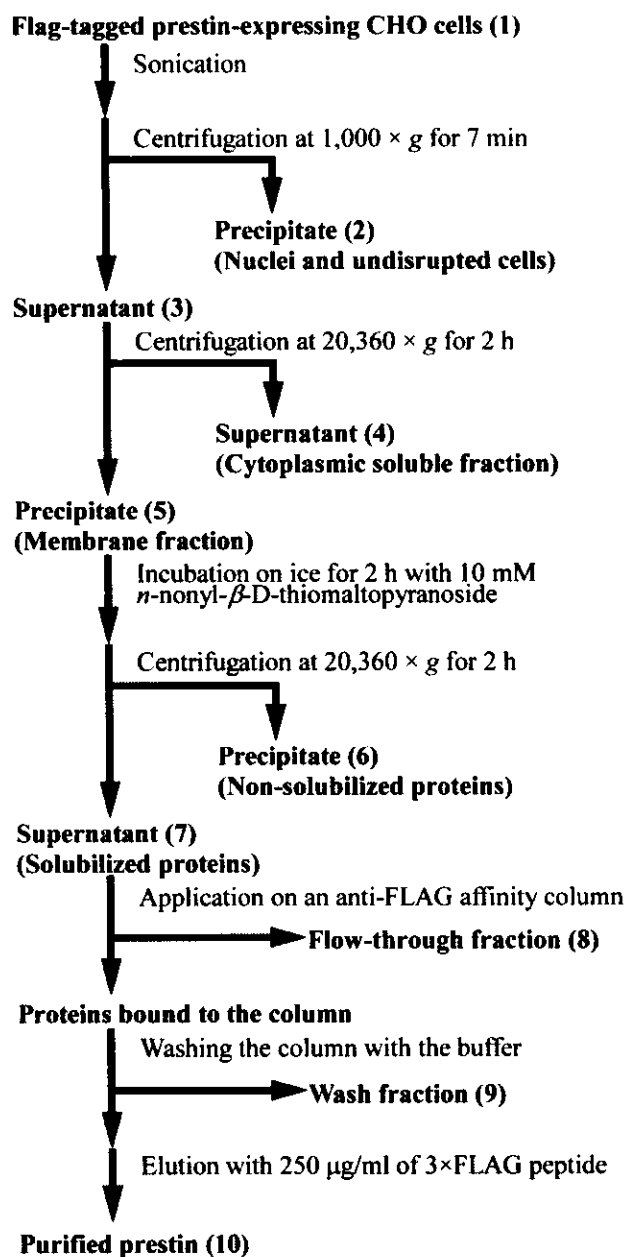


Figure 4.1. Schematic diagram of purification procedure.

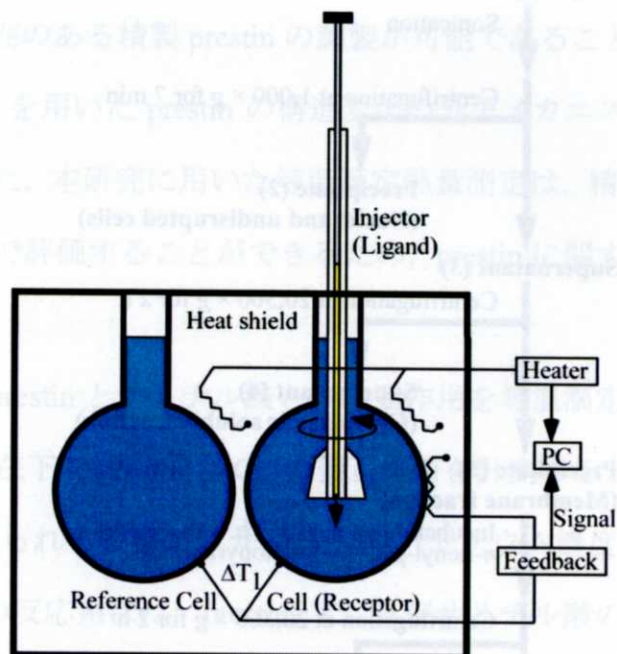


Figure 4.2. Schematic diagram of the isothermal titration calorimeter. The calorimeter has twin cells mounted in a cylindrical adiabatic environment, which are connected to the outside through narrow access tubes. A thermoelectric device measures the temperature difference between the two cells (ΔT_1). As chemical reactions occur in the sample cell, heat is generated or absorbed. The temperature difference between the sample and reference cells (ΔT_1) is kept at a constant value by the addition or removal of heat to the sample cell. The integral of the power required to maintain $\Delta T_1 = \text{constant}$ over time is a measure of total heat resulting from the process being studied.

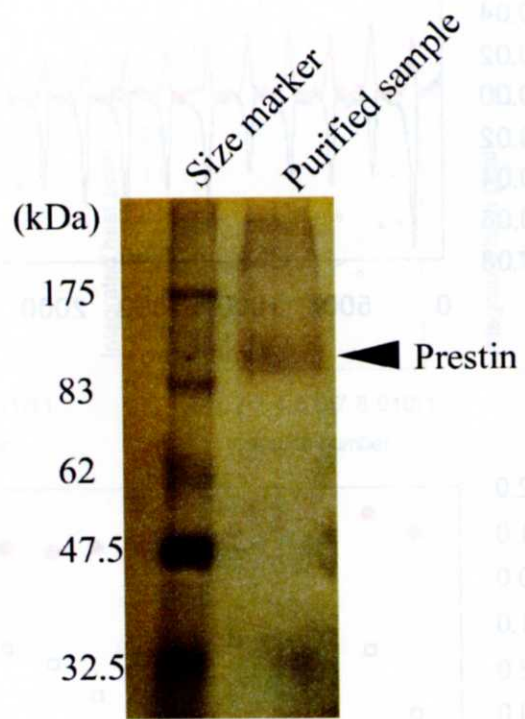


Figure 4.3. Silver-stained SDS-PAGE gel loaded with purified prestin. Analysis was carried out on 1/200 volume of purified prestin. The arrowhead shows prestin.

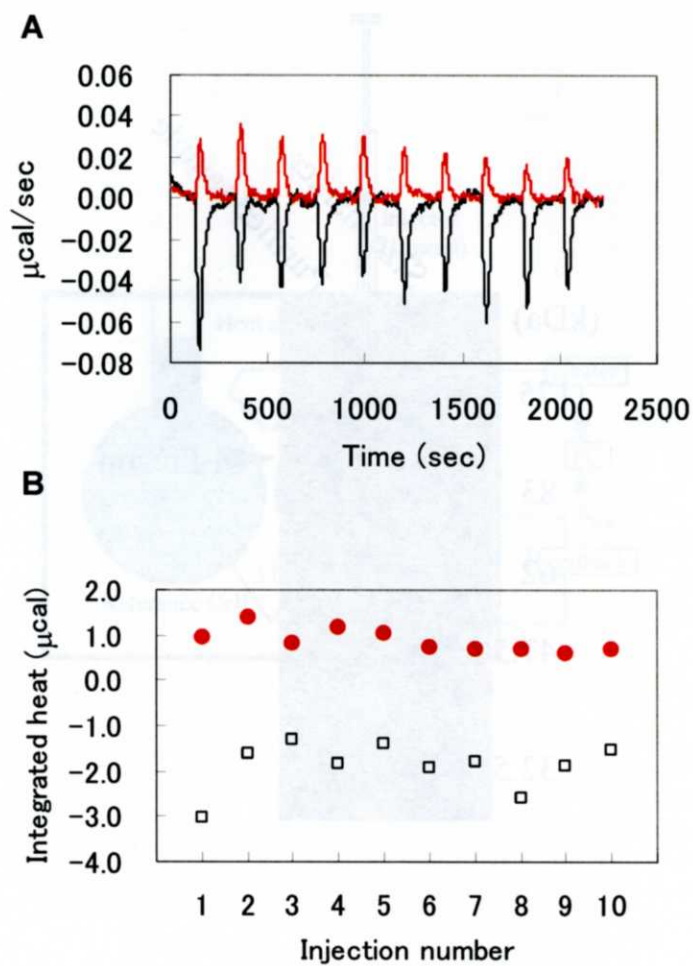


Figure 4.4. Representative data of isothermal titration calorimetry of prestin and that of buffer only with NaCl. (A) Raw data. Each deflection corresponds to the injection of 10 μl of the 20 mM NaCl solution into a calorimeter cell. The red line shows prestin. The black line shows buffer only. (B) Integrated heat against the injection number calculated from the raw data. Closed red circles show prestin. Open black squares show buffer only.

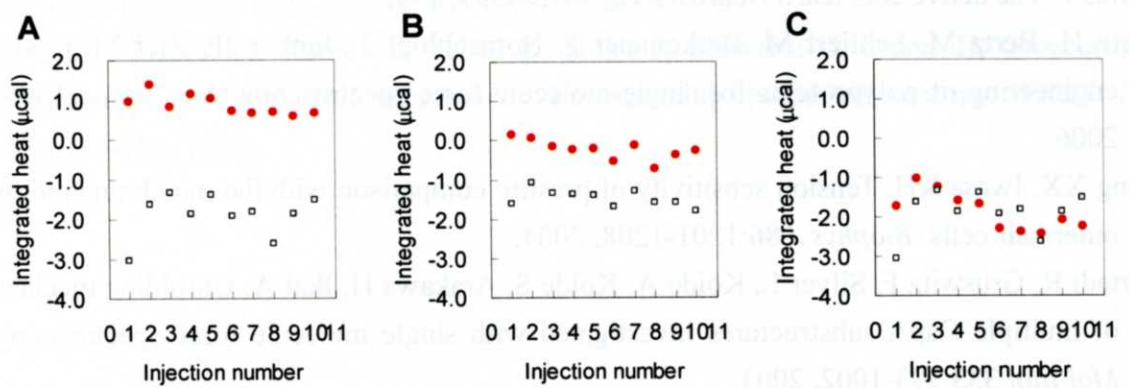


Figure 4.5. Representative data of isothermal titration calorimetry of prestin and that of buffer only with NaCl solution under the existence of salicylate. (A) Salicylate concentration: 0 mM. Raw data. (B) Salicylate concentration: 1 mM. (C) Salicylate concentration: 10 mM. Closed red circles show prestin. Open black squares show buffer only.

REFERENCES

- Ashmore JF. A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: the cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol* **388**:323-347, 1987.
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de Ribaupierre Y. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* **227**:194-196, 1985.
- Cao Y, Li H. How do chemical denaturants affect the mechanical folding and unfolding of proteins? *J Mol Biol* **375**:316-324, 2008.
- Cheatham MA, Huynh KH, Gao J, Zuo J, Dallos P. Cochlear function in Prestin knockout mice. *J Physiol* **560**:821-830, 2004.
- Dallos P. The active cochlea. *J Neurosci* **12**: 4575-4585, 1992.
- Dietz H, Bertz M, Schlierf M, Berkemeier F, Bornschlogl T, Junker JP, Rief M. Cysteine engineering of polyproteins for single-molecule force spectroscopy. *Nat Protoc* **1**:80-84, 2006.
- Dong XX, Iwasa KH. Tension sensitivity of prestin: comparison with the membrane motor in outer hair cells. *Biophys J* **86**:1201-1208, 2004.
- Hertadi R, Gruswitz F, Silver L, Koide A, Koide S, Arakawa H, Ikai A. Unfolding mechanics of multiple OspA substructures investigated with single molecule force spectroscopy. *J Mol Biol* **333**:993-1002, 2003.
- Iida K, Nagaoka T, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, Wada H. Relationship between fluorescence intensity of GFP and the expression level of prestin in a prestin-expressing Chinese hamster ovary cell line. *JSME Int J* **47C**: 970-976, 2004.
- Iida K, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, Wada H. Construction of an expression system for the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells. *Hear Res* **205**:262-270, 2005.
- Janovjak H, Kedrov A, Cisneros DA, Sapra KT, Struckmeier J, Muller DJ. Imaging and detecting molecular interactions of single transmembrane proteins. *Neurobiol Aging* **27**:546-561, 2006.
- Kachar B, Brownell WE, Altschuler R, Fex J. Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. *Nature* **322**:365-368, 1986.
- Takehata S, Santos-Sacchi J. Effects of salicylate and lanthanides on outer hair cell motility and associated gating charge. *J Neurosci* **16**: 4881-4889, 1996.
- Kalincic F, Holley MC, Iwasa KH, Lim DJ, Kachar B. A membrane-based force generation mechanism in auditory sensory cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:8671-8675, 1992.
- Lärmer J, Schneider SW, Danker T, Schwab A, Oberleithner H. Imaging excised apical plasma membrane patches of MDCK cells in physiological conditions with atomic force microscopy. *Pflugers Arch* **434**:254-260, 1997.
- Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J. Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* **419**:300-304, 2002.

- Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**:538-544, 2005.
- Mio K, Kubo Y, Ogura T, Yamamoto T, Arisaka F, Sato C. The motor protein prestin is a bullet-shaped molecule with inner cavities. *J Biol Chem*, **283**:1137-1145, 2008.
- Oliver D, He DZZ, Klocker N, Ludwig J, Schulte U, Waldegger S, Ruppersberg JP, Dallos P, Fakler B. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science* **292**:2340-2343, 2001.
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* **405**:149-155, 2000.
- Ziegler U, Vinckier A, Kernen P, Zeisel D, Biber J, Semenza G, Murer H, Groscurth P. Preparation of basal cell membranes for scanning probe microscopy. *FEBS Lett* **436**:179-184, 1998.