

内耳のバイオメカニクス

和田 仁

工学研究科 バイオロボティクス専攻 バイオメカニクス講座
生体機械工学分野 教授
E-mail: wada@cc.mech.tohoku.ac.jp



1. 緒言

蝸牛内コルチ器に存在する外有毛細胞 (outer hair cell: OHC) は、外部からの音刺激に応答し自らの細胞長を変化させる [1]. この伸縮運動により基底板 (basilar membrane: BM) の振動は増幅され、我々の鋭敏な聴覚は実現されている (図 1). OHCの伸縮運動は、細胞膜中に存在するタンパク質モータ prestin 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.

OHCが強大音暴露により損傷を受けると、永続的な難聴が引き起こされる. このOHCの損傷は、高温環境下で体温を上昇させるヒートストレスを音暴露の前に施すと、軽減され、これにより聴力低下が抑制されると報告されている [2]. しかし、どのような機序でOHCが強大音暴露による破壊から保護されているかは不明である.

また、OHCの伸縮運動の源である prestin は、その遺伝子が2000年に同定されて以来、様々な角度から研究されてきた [3]. しかし、prestineの詳細な形状やその構造変化メカニズムは不明である.

本研究では、第一に、ヒートストレスがOHCの構造に与える影響を調べるため、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM)によりOHCのヤング率を、共焦点顕微鏡 (confocal laser scanning microscope: CLSM)によりOHC細胞骨格の主構成要素である繊維状アクチン (filamentous actin: F-actin) の量を、そしてWestern blottingによりF-actin重合制御タンパク質の一つである熱ショックタンパク質27 (heat shock protein 27: HSP27) の量を調べた. また、ヒートストレスがOHCの機能に与える影響を調べるため、歪成分耳音響放射 (distortion product otoacoustic emission: DPOAE) および prestin の発現量を CLSM により調べた. ヒートストレスがOHCの構造と機能に与える影響を検討し、音響外傷からの内耳の保護メカニズムの解明を試みた.

第二に、prestineの構造を明らかにするため、AFMを用いて、prestineを発現させたチャイニーズ

ハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary: CHO) 細胞の細胞膜を観察した.

第三に、prestineの構造変化メカニズムを明らかにするため、prestineを構成するアミノ酸内で、構造変化に関わる部位の同定を試みた. Prestineの変異体を作製し、パッチクランプ法および Western blotting により、変異 prestine の特性と野生型 prestine のそれを比較した. その結果から、変異導入部位の prestine における役割を検討した.

第四に、prestineの結晶構造解析による prestine の詳細な構造の解明を目指し、prestineを発現させた CHO 細胞からの prestine の抽出・精製を試みた. そして、SDS-PAGE により prestine の精製度及び精製量を検討した.

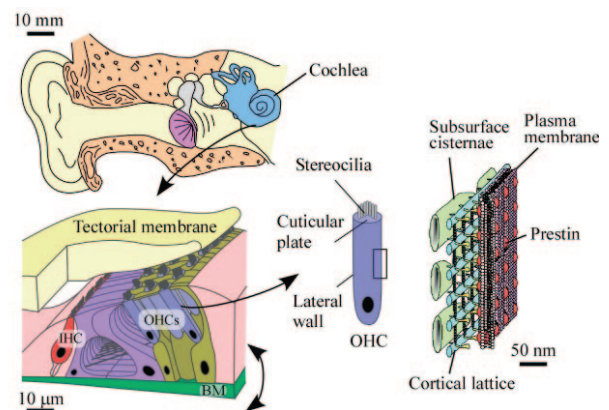


図 1. Human auditory system. Sensory cells, such as outer hair cells (OHCs), inner hair cells and various kinds of the other cells, sit on the basilar membrane (BM). OHCs subject the membrane to force, leading to cochlear amplification, resulting in the high sensitivity of mammalian hearing. Prestin is thought to be the origin of the motility of OHCs.

2. ヒートストレスによる音響外傷からの内耳保護メカニズム

2.1 実験方法

本実験には、10-12 週齢の雄のマウスを用いた。麻酔した動物を 46.5°C に保った水槽に浮かせたアルミ製のボートへ入れ、体温を毎分 0.6°C ずつ 41.5°C まで上昇させた。その体温を 15 分間維持し、その後毎分 0.6°C ずつ初期体温まで戻すことによりヒートストレスを施した。

ヒートストレスの 3, 6, 12, 24 及び 48 時間後に、蝸牛を摘出し、培養液中においてコルチ器を取り出した。酵素処理後、ピペッティングにより OHC を単離した。単離した OHC に対し、AFM (NVB100, オリパス) で微小押し込み試験を行い、ヤング率の計測を行った [4]。

ヒートストレスの 3, 6, 12, 24, 48 及び 96 時間後に、蝸牛を摘出し、培養液中においてコルチ器を取り出した。4%パラホルムアルデヒドで組織を固定後、0.3 μ M ローダミン-ファロイジンで F-actin を染色した。その後、CLSM (FV500, オリパス) で、細胞側壁においてそれぞれ蛍光を観察した。その輝度より F-actin の量を評価した。

ヒートストレスの 3 時間後に、マウス外耳道形状にあわせて作製したカフを麻酔した動物の外耳道に挿入した。これに接続した DPOAE 計測装置 (ER-10C, Etymotic Research) の 2 つのスピーカーから純音 f_1 及び f_2 ($f_2/f_1 = 1.2$) を入力し、DPOAE ($2f_1-f_2$ 成分) を誘発し、これをマイクで計測した。 f_2 の入力音圧は f_1 のそれより常に 10 dB 小さくした。本実験で f_2 は 9.8 kHz, 入力音圧は 20-70 dB SPL とした。

ヒートストレスの 6 時間後に、蝸牛を摘出し、溶解液中で超音波破碎した。核や未破碎細胞を遠心分離後、アクリルアミドゲルで電気泳動した。分子量ごとに分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、抗 HSP27 抗体を用い、HSP27 のバンドを検出した。検出されたバンドの輝度より HSP27 の発現量を推定した。

ヒートストレスの 6, 24, 48 時間後に、蝸牛を摘出し、コルチ器を取り出した。組織を固定後、prestin 抗体と FITC 標識二次抗体を用いて、prestin を蛍光標識した。その輝度より prestin の量を評価した。

2.2 結果

図 2 に示すように、OHC のヤング率は、ヒートストレスの 3 時間後までに増加傾向を示し、このときコントロールの 1.3 倍となった。6 時間後にコントロールの 1.4 倍となり最大値を示した。12 時間後までに減少傾向に転じ、24 時間後にはヒートストレス前のレベルに戻った。

図 3 に示すように、OHC 細胞側壁の F-actin の蛍光輝度は、ヒートストレスの 3 時間後までに増加傾向を示し、このときコントロールの 1.2 倍となった。12 時間後にコントロールの 1.5 倍となり最大値を示した。24 時間後までに減少傾向に転じ、48 時間後にはヒートストレス前のレベルに戻った。

図 4 に示すように、ヒートストレスの 3 時間後の DPOAE は、全ての入力音圧で、コントロールに比べ増加した。

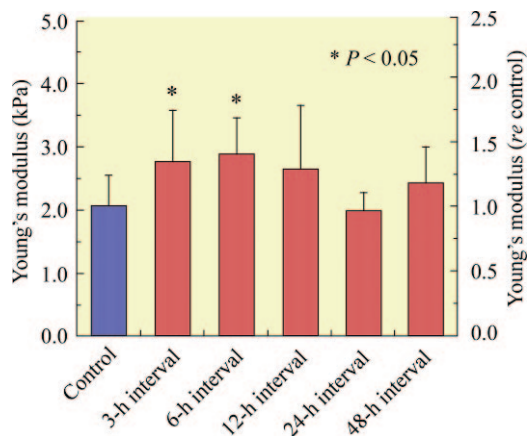


図 2. The mean and standard deviation of Young's moduli of the apical-turn OHCs in the control group ($n = 10$) and the anesthesia + heat groups with 3-h ($n = 13$), 6-h ($n = 5$), 12-h ($n = 8$), 24-h ($n = 7$) and 48-h ($n = 12$) intervals. Statistical analysis indicated significant differences between the control group and the anesthesia + heat groups with 3-h and 6-h intervals, as shown by asterisks ($P < 0.05$ by Student's t -test).

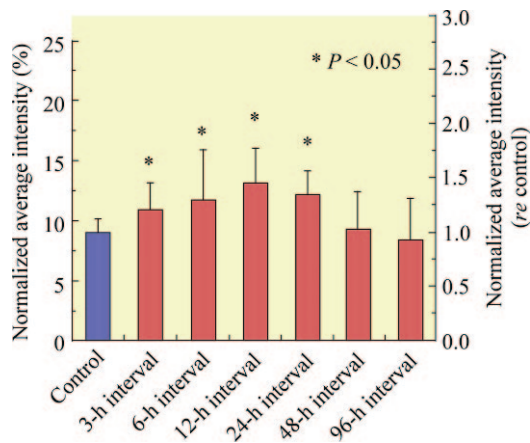


図 3. The mean and standard deviation of the normalized average intensities of F-actin labeling in the control group ($n = 25$) and the anesthesia + heat groups with 3-h ($n = 10$), 6-h ($n = 19$), 12-h ($n = 6$), 24-h ($n = 10$), 48-h ($n = 10$) and 96-h ($n = 8$) intervals. Asterisks indicate statistically significant differences between the control group and the anesthesia + heat groups ($P < 0.05$ by Student's t -test).

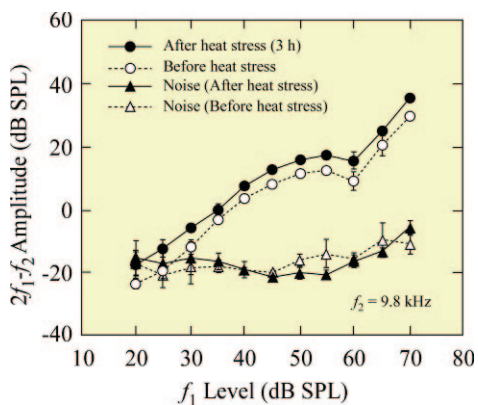


図 4. DPOAE amplitude as a function of the stimulus level of f_1 . DPOAE amplitudes 3 h after heat stress at $f_2 = 9.8$ kHz were enhanced with statistical significance ($P < 0.05$ by two-way ANOVA).

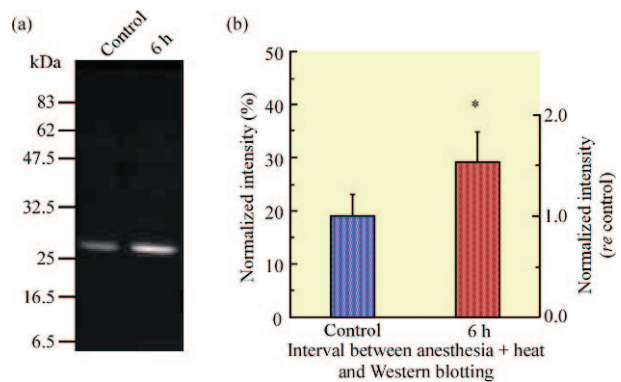


図 5. Expression of HSP27 in the mouse cochlea. (a) An example of Western blotting. (b) The mean intensity of the normalized intensity of the HSP 27 band in the control group ($n = 14$) and the anesthesia + heat group ($n = 14$). The asterisk indicates a statistically significant difference between the control group and the anesthesia + heat group ($P < 0.05$, Student's t -test).

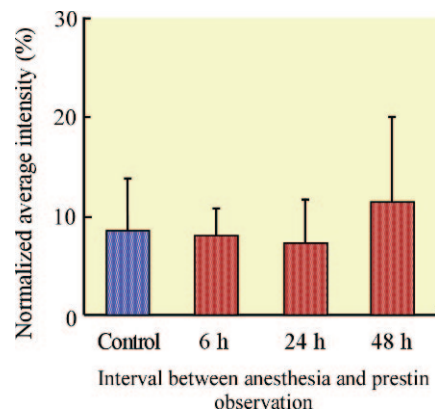


図 6. The mean and standard deviation of the normalized average intensities of prestin labeling in the control group ($n = 18$) and the anesthesia + heat groups with 6-h ($n = 10$), 24-h ($n = 11$) and 48-h ($n = 10$) intervals. Statistically significant differences between the control group and the anesthesia + heat groups with any intervals were found ($P > 0.05$, Student's t -test).

図 5 に示すように、コントロールおよびヒートストレスを加えたグループのいずれにおいても 27kDa 付近にバンドが確認された。このことは、HSP27 が蝸牛内に発現していることを示す。その輝度は、ヒートストレスから 6 時間後に、コントロールの 1.53 倍に増加した。

図 6 に prestin の輝度の規格化した平均値を示す。ヒートストレス後の prestin 輝度の平均値とコントロールのそれとの間には統計的に有意な差は見られなかった。

2.3 考察

2.3.1 ヒートストレスが OHC の構造に及ぼす影響

OHC において F-actin は主に細胞側壁、クチクラ板、聴毛に分布しており、特に OHC 細胞骨格の主構成要素であり、細胞全体の剛性に大きく寄与している[5-7]。また、ヒートストレスを含む各種ストレスに反応して、細胞中では HSP が過剰発現することが知られている[2, 8-12]。なかでも HSP27 は F-actin の重合および脱重合の制御タンパク質であり、これらタンパク質の増加は F-actin の重合を促進すると考えられる[8]。

図 2, 3 および 5 に示すように、ヒートストレスによるコンディショニングから 3-6 時間後に、OHC のヤング率、F-actin および HSP27 が増加した。これらの結果は、ヒートストレスによるコンディショニングが、その後数時間のうちに HSP27 の発現量を増加させ、OHC の F-actin の増加を誘発し、これにより細胞を硬化させたことを示唆している。

2.3.2 ヒートストレスが OHC の機能に及ぼす影響

ヒートストレスによる prestin の発現量に変化は無かったものの、DPOAE の増加が確認された。DPOAE の増加の原因として、OHC が発生する力の増加が考えられるが、これらの結果は、この力の増加が prestin に依存しないメカニズム、すなわち OHC の剛性が増加することにより引き起こされたことを示唆している。

図 7 に内耳の等価機械モデルを示す。このモデルより、OHC が発生する力 F 及び BM の変位 x_2 は

$$F = \frac{k_{\text{OHC}}k_{\text{BM}}}{k_{\text{OHC}} + k_{\text{BM}}}x_1 = \frac{k_{\text{BM}}}{1 + \frac{k_{\text{BM}}}{k_{\text{OHC}}}}x_1 \quad (1)$$

$$x_2 = \frac{F}{k_{\text{BM}}} \quad (2)$$

で与えられる。ここに k_{OHC} , k_{BM} はそれぞれ OHC, BM のバネ定数, x_1 は OHC の変位発生源の変位である。式(1)より、ヒートストレスによる OHC の剛性の増加は、OHC が発生する力 F の増加を導く。式(2)より、 F の増加は BM の変位 x_2 を増加させる。より大きな BM の振幅が、DPOAE の増加を誘発すると考えられる。

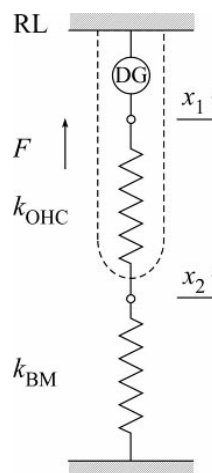


図 7. Equivalent mechanical model of the organ of Corti. The organ of Corti was expressed as a series consisting of the reticular lamina (RL), which was expressed as a rigid wall since it is undeformable, the OHC, which was represented by a series of a displacement generator (DG), i.e., the motor protein prestin, and a spring indicating the OHC stiffness, k_{OHC} , and the basilar membrane (BM), which was shown as a spring with a stiffness of k_{BM} [13, 14]. When the DG deforms x_1 , the OHC subject the BM to force, F , leading to a certain amount of displacement of the BM, x_2 .

2.3.3 ヒートストレスによる音響外傷からの内耳保護メカニズム

ヒートストレスから 3-6 時間後に、OHC のヤング率および F-actin の増加がみられた。このことは、ヒートストレスによるコンディショニングが OHC の繊維状アクチンの増加を誘発し、これにより細胞を硬化させたことを示唆している。この硬化現象が、後の強大音暴露によって生じる細胞の歪みを減少させ、結果として細胞の損傷が防がれるために聴力低下が抑制された可能性が考えられる。

3. 遺伝子導入 CHO 細胞と原子間力顕微鏡を用いたタンパク質モータ prestin の可視化

3.1 実験方法

実験には prestin を安定発現させた CHO 細胞 [17] 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. 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 prestin 以外の内在性膜タンパク質を除去し, 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.

試料は倒立型蛍光顕微鏡が組み込まれた 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 mm/s, 走査範囲を 0.5-1.0 μm とした. 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. 図 8 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,

$$2\Delta = 2\{(R+r)^2 + (R+H/2)^2\}^{1/2} \quad (3)$$

で表される [18]. 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 $R = 16$ nm, $H = 5$ nm とした. 取得した AFM 画像に式(3)を適用し, 実際の構造物の大きさを得た.

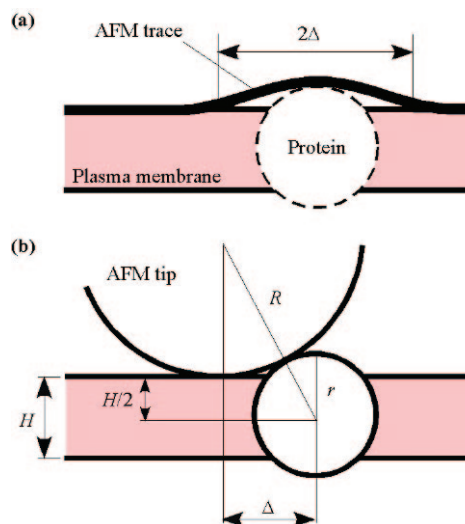


図 8. A sphere model of a membrane protein. (a) AFM trace. (b) Geometric relationship between the AFM tip and a membrane protein. Due to the curvature of the AFM tip, the lateral dimensions of the image are overestimated.

3.2 結果

図 9 (a), (b)に CHO 細胞および prestin を安定発現させた CHO 細胞の細胞膜の AFM 画像を示す. いずれの細胞膜上にも, 粒子状の構造物が確認された. ここに, 粒子状構造物とは, 膜タンパク質の大きさが数 10 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 prestin 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) の関係を図 10 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, prestin 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, prestin 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).

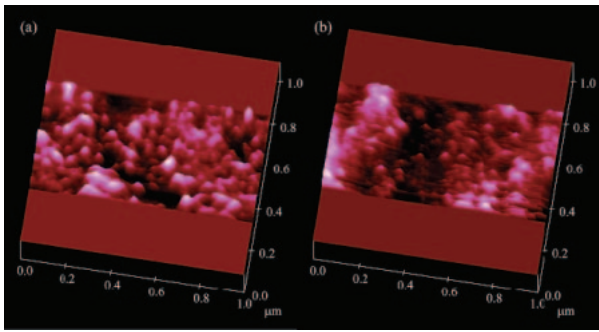


図 9. Three-dimensional AFM images of the isolated plasma membranes of the CHO cells. (a) Prestin-transfected CHO cell. (b) Untransfected CHO cell. More particle-like structures with a diameter of 8–12 nm exist in the plasma membrane of the prestin-transfected CHO cells than in that of the untransfected CHO cells.

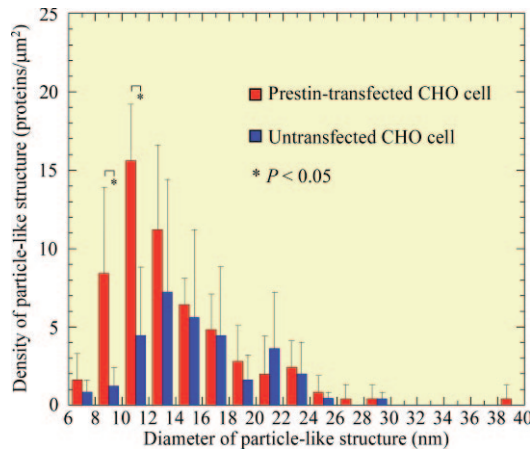


図 10. Frequency distribution of the observed particle-like structures in the plasma membrane. The density of the particle-like structure is plotted against the interval in 2-nm classes. Data were obtained from five AFM images of the prestin-transfected CHO cells and five such images of the untransfected 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-expressing CHO cells and the untransfected CHO cells were statistically significant for $P < 0.05$ using Student's *t*-test, as shown by the asterisks. Error bars represent standard deviations.

3.3 考察

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。prestín 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、prestín 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。prestín 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 [19]、今回作製した試料は、細胞膜と prestín 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。

直径 8-12 nm の粒子状構造物が、prestín 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、prestín 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 prestín 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 prestín の大きさ (直径 7 nm 程度) とよく一致している。

4. タンパク質モーター prestín の変異体解析

4.1 実験方法

本研究では、prestín が属する SLC26A ファミリーのうち 6 種類のタンパク質で完璧に保存されている、prestín の 127-131 番目のアミノ酸 GTSRH 配列に注目した (図 11)。保存配列は SLC26A ファミリーの活性に重要な働きをしている可能性がある。そこで、GTSRH 配列を別々にアラニン (A) に置き換えた 5 種類の変異 prestín、加えて S を T へと置き換えた変異 prestín、すなわち、G127A, T128A, S129A, R130A, H131A, S129T を human embryonic kidney (HEK) 293 細胞にそれぞれ発現させた。また、Western blotting を行うため、抗原となる FLAG-tag を C 末端に融合した変異 prestín も HEK293 細胞に発現させた。

変異 prestín の発現確認と発現したタンパク質の分子量を推定するため、Western blotting を行った。抗 FLAG 抗体を用い、検出されたバンドとマーカーとの位置を比較し、発現したタンパク質の分子量を推定した。

変異 prestín の機能評価にはホールセルパッチクランプ法を用いた。Prestín を発現させた細胞はベル型非線形膜容量 (NLC) を示す。NLC は電位に

依存して prestin がアニオンを輸送することに起因する。よって NLC により prestin のアニオン輸送機能を評価することができる。本実験では、細胞の膜電位を -140 mV から $+70$ mV まで変化させた時の細胞膜容量を計測し、膜容量を膜電位に対してプロットした。計測した NLC を以下に示すボルツマン関数の一次微分でフィッティングした。

$$C_m(V) = C_{lin} + C_{nonlin} = C_{lin} + \frac{Q_{max}}{\alpha e \frac{v-v_{1/2}}{\alpha} \left(1 + e^{-\frac{v-v_{1/2}}{\alpha}}\right)^2} \quad (4)$$

ここに、 C_{lin} は線形膜容量、 C_{nonlin} は非線形膜容量、 Q_{max} は最大電荷移動量、 $v_{1/2}$ は非線形膜容量が最大となる膜電位そして α は勾配を表す係数である。

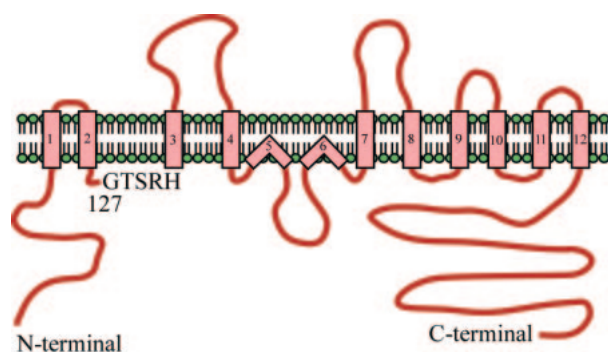


図 11. Putative topology model of prestin [20]. The GTSRH sequence of amino acids at positions 127-131 was completely conserved in six proteins of the SLC26A family.

単位細胞膜面積当たりの NLC を見積もるため、NLC を細胞膜面積で規格化した $C_{nonlin/lin}$ を以下の式で定義した。

$$C_{nonlin/lin}(V) = \frac{C_{nonlin}}{C_{lin}} = \frac{(C_m(V) - C_{lin})}{C_{lin}} \quad (5)$$

さらに、変異 prestin の $C_{nonlin/lin}(V)$ と野生型 prestin のそれを比較するため、 $C_{nonlin/lin}(V)$ を野生型 prestin の $C_{nonlin/lin}(V)$ の最大値で規格化し、Relative $C_{nonlin/lin}(V)$ と定義した。

4.2 結果

Western blotting の結果を図 12 に示す。FLAG-tag を融合した野生型 prestin 及び変異 prestin の理論分子量はともに約 84.6 kDa である。野生型 prestin を

発現させた細胞では約 100 kDa と約 70 kDa の位置にバンドが現れ、変異 prestin を発現させた細胞では約 80 kDa の位置にバンドが現れた。

ホールセルパッチクランプ法で得られたデータから計算された Relative $C_{nonlin/lin}(V)$ を図 13 に示す。H131A 及び S129T は NLC を示さなかった。一方、G127A、T128A、S129A 及び R130A は NLC を示したが、prestins の活性を表す Relative $C_{nonlin/lin}(V)$ の最大値が野生型 prestin のそれより著しく低かった。

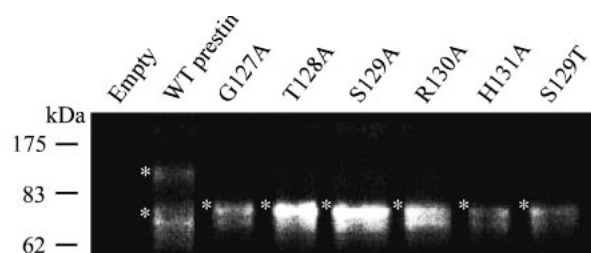


図 12. Result of Western blotting. Major bands are indicated by asterisks. There was no band in the empty vector. Two major bands of about 100 kDa and 70 kDa were detected in wild-type (WT) prestin. One major band of about 80 kDa was detected in the prestin mutants.

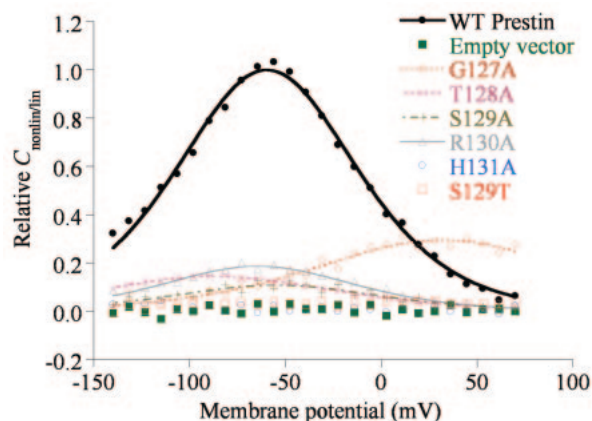


図 13. Results of whole-cell patch-clamp for WT prestin and the prestin mutants. WT prestin ($n = 20$), G127A ($n = 10$), T128A ($n = 10$), S129A ($n = 10$) and R130A ($n = 11$) exhibited the NLC versus membrane potential. On the other hand, the membrane capacitance of cells expressing H131A ($n = 11$) or S129T ($n = 10$) versus membrane potential was constant, similar to the data from the cells transfected with the empty vector.

4.3 考察

松田らは prestin を発現させた TSA-201 細胞を用いて Western blotting を行うと、約 100 kDa の位置にメジャーバンドが現れ、酵素を用いて糖鎖を切断すると、メジャーバンドが約 70 kDa の位置に現れることを示した [21]。この報告から、本実験で観測した野生型 prestin の 100 kDa 及び 70 kDa のバンドはそれぞれ、糖修飾を受けた prestin と糖修飾を受けていない prestin を表していると考えられた。変異 prestin の 80 kDa のバンドは、野生型 prestin の糖修飾を受けていないと考えられるバンドより高く、また糖修飾を受けていると考えられるバンドより低く現れている。このため、変異 prestin は糖修飾を受けているが、その糖鎖は 100 kDa を示している野生型 prestin のそれとは大きさが異なっていると考えられた。

変異 prestin では、NLC が観測されないか、または NLC は観測されるが、Relative $C_{\text{nonlin/lin}}(V)$ の最大値が野生型 prestin のそれより著しく低かった。この結果は、GTSRH 配列への変異により prestin の細胞膜上でのアニオン輸送量が低下したことを示している。以上の結果から、GTSRH 配列は prestin の糖修飾及びアニオン輸送機能に関わっていることが明らかになった。

5. タンパク質モーター prestin の精製

5.1 実験方法

実験には筆者らが構築した FLAG タグ融合 prestin が安定発現している CHO 細胞を用いた [17]。疎水性の強い膜タンパク質である prestin を緩衝液中に溶解するためには、界面活性剤が必要である。膜タンパク質の可溶化に用いられる界面活性剤には様々な種類が存在するが、いずれの界面活性剤が prestin の可溶化に適しているかは明らかでない。そこで、膜タンパク質研究で頻用される 8 種類の界面活性剤、すなわち Octyl glucoside, Dodecyl maltoside, Nonyl thiomaltoside, Sucrose monocholate, Sucrose monocaprato, Sucrose monolaurate, MEGA-9, CHAPSO を使い、種々の濃度における prestin の可溶化率を評価した。5×10⁶ 個の FLAG タグ融合 prestin を発現した CHO 細胞を、それぞれの界面活性剤を種々の濃度で含む 100 µl の緩衝液(10 mM Hepes buffer (pH 7.3), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 1.5 mM CaCl₂) に懸濁し、氷中で 30

分間保温した。その後 4°C, 20,360×g で 2 時間遠心し、上清に含まれる prestin を可溶化された prestin、沈殿に含まれる prestin を可溶化しなかった prestin と定義した。可溶化した prestin と可溶化しなかった prestin を含むサンプルを用いて、抗 FLAG 抗体による Western blotting を行い、検出されたバンドの輝度を比較し、prestine の可溶化率を求めた。

次に、選択した界面活性剤を用いて prestin の精製を試みた。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 の界面活性剤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。

5.2 結果及び考察

Prestin の可溶化剤として、界面活性剤 nonyl thiomaltoside が優れた可溶化性能を示した。図 14 に、Western blotting により得られた nonyl thiomaltoside 濃度に対する prestin の可溶化率を示す。点線で示した nonyl thiomaltoside の臨界ミセル濃度である 2.4 mM 以上の濃度で、急激に可溶化率が上昇した。この傾向は、nonyl thiomaltoside が prestin を変性させずに可溶化していることを示唆している。可溶化率が飽和した濃度 10 mM が、prestine の可溶化に最適な界面活性剤濃度であると考えられた。この時の prestin の可溶化率は 73%であった。

そこで次に 10 mM nonyl thiomaltoside を用いて膜タンパク質を可溶化し、抗 FLAG 抗体カラムを利用し prestin の精製を行った。図 15 に、得られたサンプルの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による解析結果を示す。Prestin を示す単一バンドが明瞭に認められ、prestine が精製されていることが確認された。定量 Western blotting により、2×10⁹ 個の細胞から約 120 µg の精製 prestin が得られたことが明らかになった。

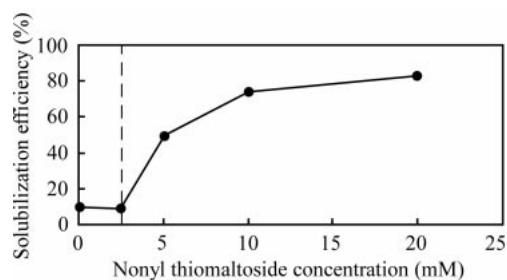


図 14. Relationships between the nonyl thiomaltoside concentration and the solubilization efficiency. The filled circles, connected by solid lines, indicate the measured values. Dashed lines show each critical micelle concentration (cmc).

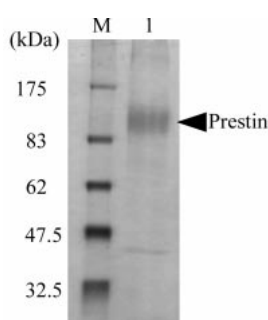


図 15. Silver-stained SDS-PAGE gel loaded with purified prestin. The arrowhead shows prestin. Lane M: molecular weight marker. Lane I: purified prestin.

6. 結言

ヒートストレスがOHCの構造と機能に及ぼす影響の解析, AFMによるprestínの可視化, prestínの変異体解析及びprestínの精製を試み, 以下の結果を得た。

1. ヒートストレスにより蝸牛内の HSP27 の発現量が増加した。これに伴い OHC の細胞側壁の F-actin の量が増加した。また, OHC の細胞側壁のヤング率が増加した。これらの結果は, ヒートストレスによる OHC の細胞側壁の剛性の増加が, 強大音暴露時の細胞の歪みを減少させることにより細胞の損傷が軽減され, 音響外傷から内耳を保護する可能性を示唆している。また, 歪成分耳音響放射(DPOAE)は増加したものの, prestín の量は変化しなかった。DPOAE の増加は, OHC が伸縮運動時に発生する力が増加していることを示す。この力の増加は prestín に依存しないメカニズム, すなわ

ち OHC の剛性が増加することにより誘発されたと考えられる。

2. Prestín 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 prestín である可能性を示唆している。
3. GTSRH 配列への変異は, prestín の糖修飾のパターンの変化及びアニオン輸送機能の低下を引き起こした。この結果は, GTSRH 配列が prestín の糖修飾及びアニオン輸送機能に関わっていることを示している。
4. Prestín の可溶化には 10 mM nonyl thiomaltoside が適していることが明らかになった。 2×10^9 個の prestín を安定発現した CHO 細胞から約 120 μ g の精製 prestín が得られた。

謝辞

本研究の一部は, グローバル COE 「新世紀世界の成長焦点に築くナノ医工学拠点」, 科学研究費補助金特定領域研究 (課題番号 15086202), 基盤研究 (B) (課題番号 18390455), 萌芽研究 (課題番号 18659495), 日本学術振興会特別研究員奨励費 (課題番号 19002194, 19001898) を受けていることを報告し謝意を表します。

文献

- [1] Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, and de Ribaupierre Y. Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* **227**, 194-196, 1985.
- [2] Yoshida N, Kristiansen A, and Liberman MC. Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *J Neurosci* **19**, 10116-10124, 1999.
- [3] Dallos P, Zheng J, and Cheatham MA. Prestín and the cochlear amplifier. *J Physiol* **576**, 37-42, 2006.
- [4] Murakoshi M, Yoshida N, Iida K, Kumano S, Kobayashi T, and Wada H. Local mechanical properties of mouse outer hair cells: atomic force microscopic study. *Auris Nasus Larynx* **33**, 149-157, 2006.
- [5] Oghalai JS, Patel AA, Nakagawa T, and Brownell WE. Fluorescence-imaged microdeformation of the outer hair cell lateral wall. *J Neurosci* **18**, 48-58, 1998.

- [6] Sugawara M and Wada H. Analysis of elastic properties of outer hair cell wall using shell theory. *Hear Res* **160**, 63-72, 2001.
- [7] Sugawara M and Wada H. Analysis of force production of the auditory sensory cell. In: *The 8th International Congress on Sound and Vibration*, edited by L. Cheng, et al., Hong Kong, 917-924, 2001.
- [8] Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, and Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* **268**, 24210-24214, 1993.
- [9] Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA, and Landry J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* **15**, 505-516, 1995.
- [10] Leonova EV, Fairfield DA, Lomax MI, and Altschuler RA. Constitutive expression of Hsp27 in the rat cochlea. *Hear Res* **163**, 61-70, 2002.
- [11] Sugahara K, Inouye S, Izu H, Katoh Y, Katsuki K, Takemoto T, Shimogori H, Yamashita H, and Nakai A. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hear Res* **182**, 88-96, 2003.
- [12] Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* **72**, 1063-1081, 1992.
- [13] Hallworth R. Passive compliance and active force generation in the guinea pig outer hair cell. *J Neurophysiol* **74**, 2319-2328, 1995.
- [14] He DZZ and Dallos P. Somatic stiffness of cochlear outer hair cells is voltage-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8223-8228, 1999.
- [15] He DZZ and Dallos P. Properties of voltage-dependent somatic stiffness of cochlear outer hair cells. *J Assoc Res Otolaryngol* **1**, 64-81, 2000.
- [16] Liberman MC. Chronic ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear Res* **26**, 65-88, 1987.
- [17] Iida K, Tsumoto K, Ikeda K, Kumagai I, Kobayashi T, and Wada H. Construction of an expression system for the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells. *Hear Res* **205**, 262-270, 2005.
- [18] Larmer J, Schneider SW, Danker T, Schwab A, and Oberleithner H. Imaging excised apical plasma membrane patches of MDCK cells in physiological conditions with atomic force microscopy. *Pflugers Arch* **434**, 254-260, 1997.
- [19] Kakehata S and Santos-Sacchi J. Membrane tension directly shifts voltage dependence of outer hair cell motility and associated gating charge. *Biophys J* **68**, 2190-2197, 1995.
- [20] Deák L, Zheng J, Orem A, Du GG, Aguiñaga S, Matsuda K, and Dallos P. Effects of cyclic nucleotides on the function of prestin. *J Physiol* **563**, 483-496, 2005.
- [21] Matsuda K, Zheng J, Du GG, Klöcker N, Madison LD, and Dallos P. N-Linked glycosylation sites of the motor protein prestin: effects on membrane targeting and electrophysiological function. *J Neurochem* **89**, 928-938, 2004.