

平成 2 6 年 6 月 1 0 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791739

研究課題名（和文）新規パッチクランプ原子間力顕微鏡による Prestin 構造変化の分子メカニズム解明

研究課題名（英文）Study of molecular mechanisms of structural change of prestin using a novel atomic force microscope combined with a patch clamp system

研究代表者

村越 道生（Murakoshi, Michio）

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70570901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円、（間接経費） 990,000 円

研究成果の概要（和文）：細胞膜電位コントロールデバイスを開発し、これ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。その結果、デバイス基板の微小孔（直径約2 μm）上に細胞をポジショニングすることに成功し、細胞膜表面の詳細構造の可視化にも成功した。さらに、デバイス基板の微小孔上に、人工脂質膜を作製することを試み、脂質膜形成後にギガオームシールが形成されることが確認された。このことは、当該デバイスで脂質膜中に再構成したタンパク質の変形挙動を可視化できる可能性を示唆している。今後、得られた知見を基に、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 cell membrane potential control device was developed. Using this device, the microstructure and electrophysiological properties of prestin-expressing culture cells were investigated. A cell was successfully positioned on a micropore of the device (about 2 μm in diameter) and the microstructure of the cell surface was visualized. In addition, an artificial lipid bilayer was created on the micropore, resulting in the formation of a gigaohm seal. These results suggest that it may be possible to visualize protein reconstituted in the lipid bilayer by using this device. Based on these findings, further research to visualize the conformational change of prestin will be performed.

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：タンパク質 走査プローブ顕微鏡 生物・生体工学 外有毛細胞 Prestin

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の鋭敏な聴覚は、内耳に存在する感覚細胞である外有毛細胞 (outer hair cell: OHC) の伸縮運動に起因する。この運動能は、OHC 細胞側壁の膜タンパク質“Prestin (プレスティン)”の構造変化で実現されると予測されている。しかし現状では膜タンパク質の立体構造とその構造変化を計測する方法は確立されておらず、そのため prestin の構造変化メカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、原子間力顕微鏡法 (Atomic force microscopy: AFM) を基盤とした、prestins の構造変化を直接計測できる新たな技術を確認し、分子レベルでその構造変化メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、分子生物学的アプローチにより AFM 計測に最適な膜タンパク質の処理技術を確認し、工学的アプローチにより膜タンパク質の詳細構造とその構造変化を捉えられる AFM システムの構築を行う。これら技術をもとに prestin の構造変化挙動を可視化し、これにより、本研究がこれまでの研究で得てきた prestin の構造に関する静的な知見を、動く prestin の構造変化メカニズムという動的知見へと発展させる。

(1) 平成 24 年度の計画

Prestin の多量体構造を制御する

1. Prestin を安定発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞から、prestins を精製・抽出する。
2. Prestin 分子を人工脂質二重膜へ再構成する。まず、DOPC 及び DPPC の 2 種類の脂質で平面脂質二重膜を形成する。精製 prestins を界面活性剤で弱らせた平面脂質膜に加え、prestins を脂質膜に再構成する (図 1a, b)。
3. むらを作るために用いた界面活性剤の種類を変えることで、再構成される prestins の多量体構造を制御することを試みる (図 1c)。
4. マイルドな界面活性剤 PFO を使った PFO-PAGE を行うことで多量体構造を確認する。

Prestin の変形状態を制御する

1. 統合計測・制御・解析システムを構築する。電気刺激アンプ、ポンプの制御および電気生理的データ、AFM 画像データの収集を高速に行い、これにこれを解析するまでをシームレスに実行するため、最新の高速デジタル信号処理機 (digital signal processor: DSP) をアルゴリズム開発とシステム構築を行う (図 2a)。
2. AFM 用膜電位制御デバイスを作製する。具体的には、「脂質膜上下の電位差」を調

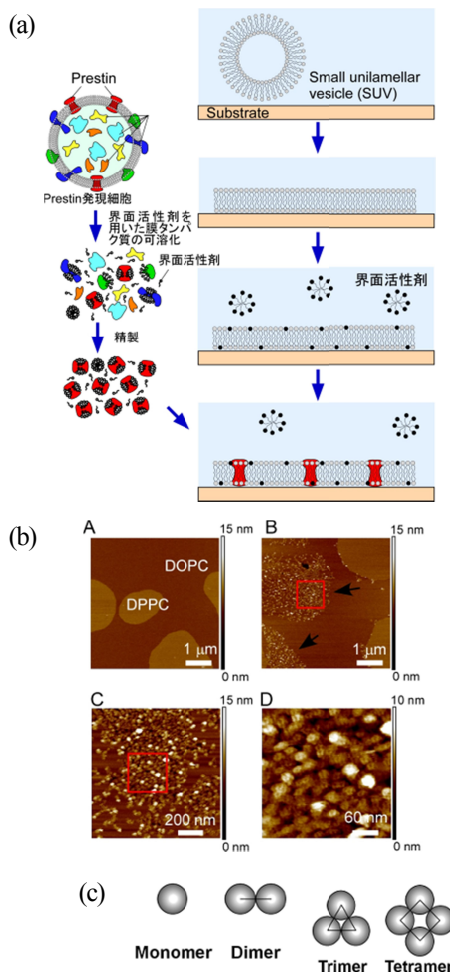


図 1. Prestin の脂質膜への再構成の方法および多量体構造の制御方法。(a) Prestin の精製および人工脂質膜への再構成の模式図。(b) 人工脂質膜および再構成 prestins の AFM 画像。A; マイカ上に展開した 2 種類の人工脂質膜の低解像度 AFM 画像。B; 精製 prestins を再構成した脂質膜の低解像度 AFM 画像。C; B の赤枠内の拡大 AFM 画像。D; C の赤枠内の拡大 AFM 画像。(c) 脂質膜に再構成させる prestins の多量体構造模式図。

整できるデバイスであり、かつ我々の所有する高性能 AFM に組み込むことができるものである (図 2b)。デバイスはチャンバー (図 2b) と基板 (図 2c) から構成される。

3. 作製したデバイス上において細胞膜の単離を試みる。

(2) 平成 25 年度の計画

Prestin の運動能 (機能) を評価する

1. AFM に組み込んだ膜電位制御デバイス上に上記 1 (平成 24 年度) で作製した試料を用意し、脂質膜上下の電位差をコントロールすることで prestins の構造変化を誘起させる。その状態で、AFM を用い prestins を観察し、prestins の構造変化を可視化することを試みる (図 2d)。
2. 同時にパッチクランプを行う。非線形膜容

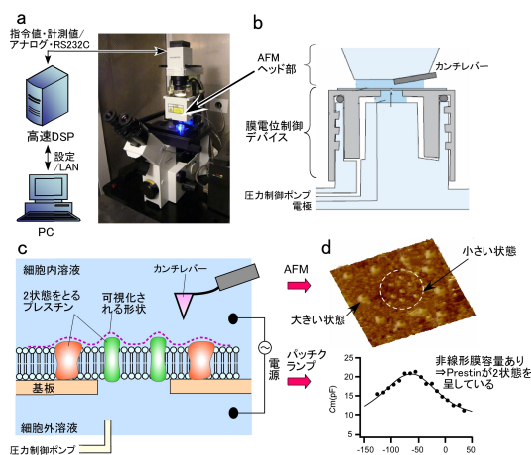


図 2. 膜電位コントロールデバイスと備えた AFM システム。(a) システムブロック図、高速 DSP で AFM と膜電位制御デバイスを統合する。(b) 膜電位制御デバイスの模式図、ポロシリケート製の穴開き基板が AFM ヘッド下にセットされる。(c) プレスチンの構造変化計測の模式図、人工脂質に再構成したプレスティンの膜電位を制御しながらカンチレバーで細胞膜表面をスキャンする。(d) 予想される AFM 画像及び非線形膜容量 (NLC)。

量 (nonlinear capacitance: NLC) を計測し、prestin が活性を持って構造変化をしているか確認する (図 2d)。

- 上記 (1) および (2) より、prestin が脂質膜内においてどのような多量構造を有しているときにどのような運動能を発揮するのか、すなわち prestin の構造と機能の関係が明らかとなる。
- Prestin の構造変化を確かに捉えていることを確かめるための比較実験を行う。Prestin は Cl⁻ イオンと結合することで構造変化が引き起こされることが知られている。また、サリチル酸は prestin のアンタゴニストとして働き、その変形を阻害することが報告されている。そこで、脂質上下の溶液に含まれる Cl⁻ イオン濃度を变化させた場合及びサリチル酸を添加した場合の prestin の挙動を比較解析する。

4. 研究成果

(1) 平成 24 年度の計画

Prestin の多量体構造を制御する

図 3 にプレスティンが発現している CHO 細胞の免疫蛍光画像を示す。当該培養細胞をプレスティンの精製に用いた。図 4 にプレスティンの精製結果を示す。プレスティンが発現させた 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ティンの分子量と一致しており、プレスティンが精製されたことを示唆している。一方、プレスティ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。

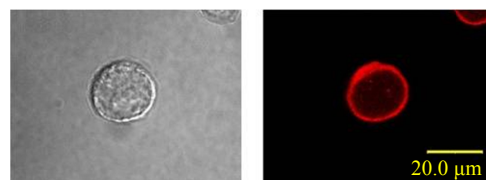


図 3. プレスチン発現 CHO 細胞。微分干渉画像 (左)。免疫蛍光画像 (右)。赤色はプレスティンを示す。

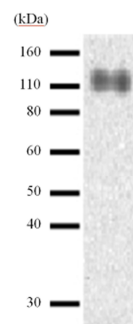


図 4. 精製プレスティンのウェスタンブロッティングの結果。110 kDa 付近のみにプレスティンの存在を示すバンドが確認された。

Prestin の変形状態を制御する

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パーと、試料をのせるテフロン製基板から構成される。チャンパーは 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 5)。

(2) 平成 25 年度の計画

Prestin の運動能 (機能) を評価する

前年度に開発した膜電位コントロールデバイスを用いて、プレスティンが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 μm) 上に、培養細胞をポジショニングすることに成功した (図 6)。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 7)。

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 GΩ 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 8)。

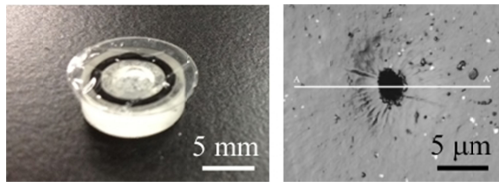


図5. 膜電位コントロールデバイス．全体写真（左）．テフロン製基板に作製した微小ポア（右）．

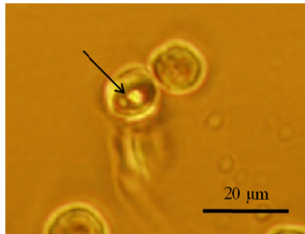


図6. 膜電位コントロールデバイス基盤の微小ポア（直径約2μm，矢印）上にポジショニングした培養細胞．

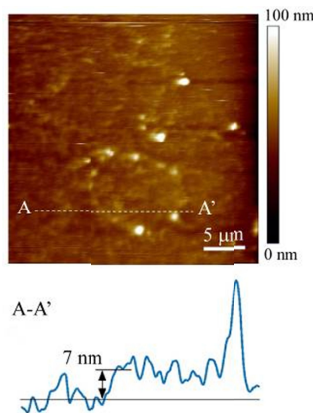


図7. 膜電位コントロールデバイスを組み込んだAFMによって観察した細胞膜表面の詳細構造．

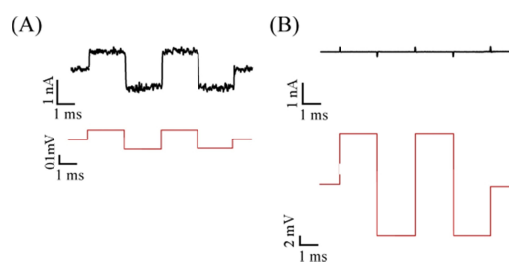


図8. 膜電位コントロールデバイス基盤の微小ポア上に形成した人工脂質膜の電気抵抗値．(A) 人工脂質膜なし．(B) 人工脂質膜あり．上段は入力電流，下段は計測電圧値を示す．

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．

「Prestin の多量体構造の制御法」については，prestín を発現させた CHO 細胞から prestín を精製・抽出することには成功した．しかしながら，当該実験に当初計画よりも時間を要したために，多量体制御の実験が十分に行え

なかった．この点は今後速やかに実施する計画である．さらに今後，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チンを再構成し，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．

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Surovtseva EV, Johnston AH, Zhang W, Zhang Y, Kim A, Murakoshi M, Wada H, Newman TA, Zou J, Pyykko I. Prestin binding peptides as ligands for targeted polymersome mediated drug delivery to outer hair cells in the inner ear. *Int J Pharm* 424: 121-127, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Murakoshi M, Wada H. Force spectroscopy study on transmembrane structure of the motor protein prestin expressed in the inner ear. The 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, September 1-4, 2014, Shima, Mie.

Murakoshi M, Suzuki S, Wada H. Changes in cochlear amplification by incoordination of three-row outer hair cells. *Mechanics of Hearing*, The 12th International Workshop, June 23-29, 2014, Attica, Greece.

Murakoshi M, Wada H. Effects of coordinating movement of three-row outer hair cells on the cochlear amplification. Lecture in the Faculty of Science, The University of Rome Tor Vergata, December 6, 2013, Rome, Italy.

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.

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チ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．

〔図書〕(計 1 件)

Murakoshi M, Kumano S, Ishihara K, Iida K, Hamana H, Wada H. Challenges in research on auditory mechanics. In: T. Yamaguchi (Ed.), *Nano-Biomedical Engineering 2012*, Imperial College Press, London, pp. 15-29, 2012. 総ページ数 676

〔その他〕
ホームページ等
鹿児島大学研究者総覧
<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/615244.html>

鹿児島大学大学院理工学研究科機械工学専
攻村越研究室
<http://www.mech.kagoshima-u.ac.jp/~michio/index.html>

6．研究組織
研究代表者
村越 道生 (MURAKOSHI, Michio)
鹿児島大学・理工学研究科・准教授
研究者番号：70570901