

博士(医学) 泉 智 沙 子

論文題目

Membrane thickness sensitivity of prestin orthologs: the evolution of a piezoelectric protein
(プレスティンの種による膜の厚さに対する反応性：圧電性蛋白質の進化)

論文の内容の要旨

[はじめに]

プレスティンは、SLC26family に属し、哺乳類の内耳の蝸牛にある外有毛細胞の外側壁に分布する。プレスティンは、電位が変化すると変形する蛋白質であり、電位依存性に膜容量が変化する圧電性膜蛋白質である。膜モーターとして働き、外有毛細胞の長さを変える。この現象を *electromotility* と呼び、蝸牛における音の増幅機構に関与している。プレスティンは可動性の電荷を持っており、膜の面積変化と連動している。

非哺乳類の蝸牛の有毛細胞にもプレスティンが分布するが、非哺乳類の有毛細胞では運動性がみられない。哺乳類だけでなく、非哺乳類のプレスティンも可動性の電荷を持っており、電位依存性膜容量はみられる。しかし、運動性のみられない非哺乳類の有毛細胞では、電気的な変化にプレスティンの変形が連動していない。言いかえると、*mechano-electric coupling* が変化したか欠如している。

哺乳類の外有毛細胞の運動性は、哺乳類の革新である。どのように圧電性膜蛋白質は進化していったのか。種による *mechano-electric coupling* の違いを調べることができればその問いにせまることができる。かつてわれわれは、哺乳類のプレスティンで膜の厚さの変化に応じて 150 mV も電位依存性の変化をすることを報告した。このシフトは哺乳類のプレスティンが電位変化で形態的な変化をとることで説明がつく。プレスティンは表面積が大きい形態のときには薄い膜の状態に適合し、表面積が小さい形態のときには厚い膜に順応できる。これは、プレスティンの形が変わっても体積は維持されることに基づいている。

この理由から、当初われわれは、このようなプレスティンの変化は *mechano-electric coupling* により保持され、非哺乳類では、膜の厚さに対する反応性がないかわずかではないかと考えた。

[材料ならびに方法]

細胞外液 140 mM NaCl, 5 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 2 mM CoCl₂, 10 mM Cs-HEPES と 細胞内液 140 mM CsCl 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 10 mM Cs-HEPES で浸透圧 300 mOsm/kg に、pH 7.4 に調整した。スナネズミ、カモノハシ、ニワトリのプレスティンのDNAを Chinese hamster ovary (CHO) cell にトランスフェクションし、膜に発現させた。パッチクランプ法 (whole cell mode) にて電気生理学的測定を行い、解析した。膜の厚さを変化させるため、ガンマ-シクロデキストリンを用いて、短鎖～長鎖のホスファチジルコリンをトランスフェクションした CHO cell に還流した。

[結果]

横軸に電位をとり、縦軸に膜容量をとった場合、グラフは釣り鐘型となり、このピークのシフトをみることで、プレスティンの形態の変化を観察することができた。今回、この方法をニワトリとカモノハシに応用することで、哺乳類と非哺乳類の差をみた。

スナネズミでは、電位依存性膜容量のピークは -88 ± 11 mVで可動性電荷は (0.73 ± 0.07) eであった。短鎖のホスファチジルコリンを還流すると電位依存性膜容量は正にシフトし、線形膜容量は増加した。一方、長鎖のホスファチジルコリンを還流すると電位依存性膜容量は負にシフトした。線形膜容量の変化に対する電位のシフトの傾きは 2.7 ± 0.26 mV/% changeであった。

カモノハシは哺乳類と似た電位依存性膜容量がみられ、ピークは -56 ± 11 mV、可動性電荷 (0.79 ± 0.10) eであった。短鎖と長鎖のホスファチジルコリンを還流するとスナネズミと同様の変化がみられた。線形膜容量の変化に対する電位のシフトの傾きは 4.8 ± 0.06 mV/% changeであった。

ニワトリの電位依存性膜容量は、ピークが著しく陽電位であり、100 mVを超えているため、正の方向へのシフトの結果を得るのが困難であった。細胞内液のCsClを20 mM CsIに置換し、ピークを観察できた。この条件下で、可動性電荷は (0.35 ± 0.12) eで線形膜容量の変化に対する電位のシフトの傾きは 8.5 ± 0.7 mV/% changeであった。

[考察]

今回調べた3つの種のプレスティンは、電位の正へのシフトに対して膜の厚さが薄くなるという単調な変化を示したが、種により反応性が異なっていた。ニワトリが膜の厚さの変化に対する電位の変化で一番急な傾きをとり、スナネズミの変化が最も緩やかであった。

プレスティンの膜の厚さへの反応性と膜モーターとしての効率性はどう関連しているのか。なぜ、哺乳類のプレスティンは、特別なのか。当初の推論では、膜の厚さへの反応性がスナネズミで最も大きく、ニワトリが膜の厚さへの反応性がないかわずかで、膜モーターとして機能していないと考えていた。結果は予想に反し、運動性のある外有毛細胞をもつ哺乳類で膜の厚さへの反応性が低かった。逆に、運動性のない有毛細胞をもつニワトリで膜の厚さへの反応性が存在し、その反応性が高かったことは興味深い結果となった。つまり、膜の厚さへの反応性が低い方が力を生じやすく、運動性に有利であったからと考えられる。有毛細胞の運動性は、膜の厚さの変化に対する電位の移動量が重要な因子ではなく、電位依存性の力発生が大きいことが重要な因子と考えることができる。

[結論]

哺乳類のプレスティンの性質は、大きな可動性電荷を持ち、膜の厚さに対する反応性が小さい、という組み合わせが、有毛細胞の外側壁の伸縮するための効率のよさをもたらした。哺乳類のイノベーションは、この効率のよさの獲得だったと考える。

論文審査の結果の要旨

哺乳類の蝸牛の外有毛細胞外側壁に特異的に分布するプレスティンは、可動性の電荷を持ち、電位依存性に変形し膜容量を変化させる圧電性膜蛋白質である。膜モーターとして働き、外有毛細胞の長さを変え、蝸牛における音の増幅機構に関与している。

非哺乳類のプレスティンも可動性の電荷を持っており、電位依存性膜容量がみられるにもかかわらず運動性がみられない。外有毛細胞の運動性は哺乳類が獲得した形質であり、どのように圧電性膜蛋白質が進化したのかを調べるため、スナネズミ、カモノハシ、ニワトリのプレスティンの cDNA を Chinese hamster ovary (CHO) cell にトランスフェクションし、膜に発現させ、ホールセルパッチクランプ法で電気生理学的に膜容量を測定した。ガンマ-シクロデキストリンを用いて、短鎖～長鎖のホスファチジルコリンを還流し CHO cell の膜厚を変化させ、電位-膜容量曲線のピークのシフトをみることで、プレスティンの形態変化を解析した。

その結果、今回調べた 3 種のプレスティンはすべて電位の正へのシフトに対して膜厚が薄くなるという単調な変化を示したが、種により反応性が異なっていた。そのうち、ニワトリが電位-膜容量曲線のピークシフトが最大で、スナネズミが最小で、カモノハシはその中間であったが、スナネズミにより近かった。すなわち、運動性のある外有毛細胞をもつ哺乳類で膜厚への反応性が低く、運動性のない有毛細胞をもつ鳥類で膜の厚さへの反応性が高かった。以上から、膜厚への反応性が低い方が力を生じやすく、運動性に有利であると考えられた。

審査委員会では、申請者が、膜厚の変化に対するプレスティンの電荷移動量よりも、電位依存性の力の発生がより重要なことを初めて示し、哺乳類の進化の過程でこの形質を獲得したことにより、有毛細胞の外側壁の伸縮効率のよさをもたらしたとする仮説の提案にまで至った点を高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 福田 敦夫
副査 堀田 喜裕 副査 宮嶋 裕明