

【目的】 Transmembrane channel like protein 1 (膜貫通チャネル様タンパク質 1、TMC1) は内耳蝸牛の有毛細胞において、音の振動により開く Mechano-Electrical transducer (機械電気変換、MET) チャネルのポアを構成するタンパク質であり、その変異は難聴を引き起こすことが報告されている。我々はマウスの TMC1 (mTMC1) を HEK293 細胞に強制発現させると、一部の細胞において、その細胞内 N 端領域が核に集積するという現象を見出した。これは TMC1 の細胞内 N 端領域が何らかの機序で切断され、核内に輸送され、核内で何らかの作用を示す可能性を示唆する。そこで、本研究では、細胞内 N 端領域が切断される部位を明らかにし、その断片を強制発現させて HEK293 細胞において、トランスクリプトーム (mRNA の発現) に変化が生じるかを調べる。それにより、TMC1 の切断と核移行現象が難聴病態の発生に関わる可能性があるか否かを明らかにすることが本研究の目的である。

【方法】 野生型や作製した変異体の mTMC1 を HEK293 細胞に強制発現させ、その N 端に対する抗体を用いて、免疫染色あるいは Western blot により、細胞内における局在や N 端断片の大きさや出現を検出した。アミノ酸の置換や欠損をさせた変異体は site-directed mutagenesis により作製した。mTMC1 の細胞内 N 端領域による転写調節の可能性を検討するため、mTMC1 の細胞内 N 端領域を発現した HEK293 細胞をセルソーターで分取し、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。

【結果】 まず、mTMC1 には *mTmc1ex1* と *mTmc1ex2* の二種類のスプライスバリエントがあるが、mTMC1 のタンパク質は *mTmc1ex1* から生じることを明らかにした。よって、以下の実験では *mTmc1ex1* を用いた。Western blot の解析の結果、HEK293 細胞に強制発現させた mTMC1 から、少なくとも二種類の細胞内 N 端領域の断片が生じていることが明らかとなった。アミノ酸を変異させる実験により、それぞれの断片の切断が起こるために必要なアミノ酸配列あるいはアミノ酸残基を明らかにした。mTMC1 の細胞内 N 端領域のみを強制発現させたところ、発現させたほぼ全ての細胞で核に細胞内 N 端領域が核内に集積していた。細胞内 N 端領域には核移行シグナルとなるアミノ酸配列があり、それを変異させた細胞内 N 端領域は核へは集積せず、細胞全体に分布した。細胞内 N 端領域を強制発現させた HEK293 細胞ではいくつかの遺伝子の発現量に変化が見られた。変化した遺伝子が有毛細胞の機能にどのように影響するのかはさらなる研究が必要である。以上、本研究により、mTMC1 の細胞内 N 端領域が転写調節を行う可能性が示唆された。

強制発現させた mTMC1 の切断と核移行と転写調節機能

