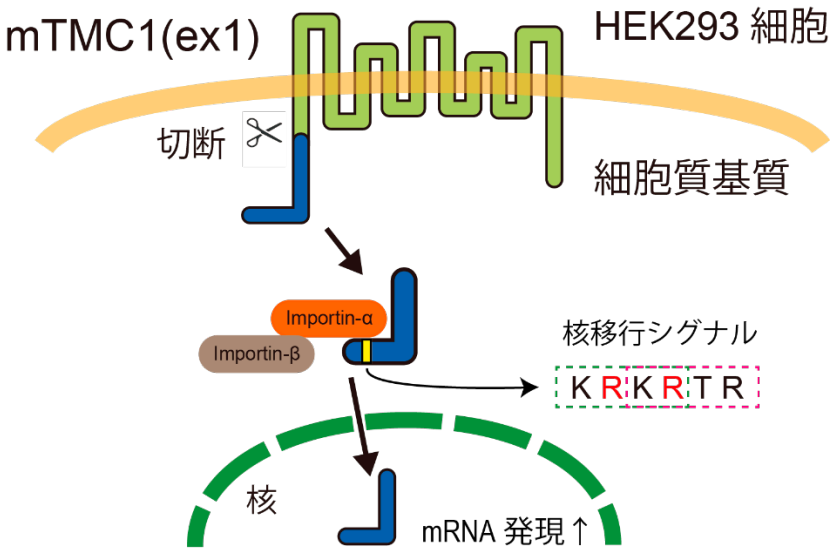
159　音受容チャネルの細胞内領域の核移行現象と難聴病態	山口　聡一郎

【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アントがあるが、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



159. 音受容チャネルの細胞内領域の核移行現象と難聴病態

山口　聡一郎

北海道大学 大学院獣医学研究院 基礎獣医科学分野 生理学教室

Key words：TMC1，有毛細胞，HEK293 細胞，転写調節

緒　言

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［1］、その変異はヒトやマウスで難聴を引き起こす。近年、K チャネルの一つである KCNQ1 との共発現によりヒトの TMC1 が形質膜上に発現することが報告されたが［2］、それ以外の強制発現系では TMC1 は主に小胞体に留まり、形質膜に発現しないため、TMC1 についての強制発現系を用いた研究はあまりなされて来なかった。その状況下において我々は、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 TMC1 の細胞内 N 端領域が核内に集積するという現象を見出した。このように膜タンパク質の一部が核内に移行する例としては、調節性膜内切断（Regulated Intramembrane Proteolysis）などによって SREBP や Notch といった膜タンパク質が切断されて、断片が核内に移行し、転写調節を行う例が知られる。よって、mTMC1 の細胞内 N 端領域も核に移行することで転写調節を行い、有毛細胞の機能変化を通じて、難聴の病態発生に関わる可能性が考えられた。

そこで本研究では、強制発現させた TMC1 が切断される機構、切断された断片が核内に輸送される機構、また、核内に移行した断片が転写調節を行うか否かを明らかにすることを目的とした。そして実験の結果、強制発現系において mTMC1 の細胞内 N 端領域が切断されて、核に移行する機構の一部が明らかとなった。また、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。

方　法

1.　プラスミド作製と細胞へのトランスフェクション

マウスの *Tmc1ex1*（あるいは一部の実験で *Tmc1ex2*）の cDNA を pcDNA3.1 あるいは pIRES2-EGFP ベクターに挿入した。mTMC1 のアミノ酸の変異は site-directed mutagenesis により行った。プラスミドは HEK293 細胞に Trans-iT 293 Transfection Reagent を用いて、一過性にトランスフェクションした。

2.　免疫細胞染色

トランスフェクションした HEK293 細胞を 4%のパラホルムアルデヒド溶液で固定し、0.1% Triton X-100 を用いて膜の透過処理を行った。ブロッキングを行った後、細胞を anti-mTMC1 Nt（ex1 の D57-G75 が抗原）ウサギ抗体 （オーダーメイド）と Alexa Fluor 488 conjugated F(ab')2 goat anti-rabbit IgG（H＋L）で染色した。共焦点顕微鏡を用いて蛍光画像を取得した。

3.　Western blot

トランスフェクションした HEK293 細胞を 1% Triton X-100 を含む lysis buffer 中で超音波破砕した。細胞溶解液は 4 M の尿素と 2.5%の SDS を含むサンプルバッファーと 1：1 の比率で混ぜ合わせ、37℃で 10 分間インキュベートした。タンパク質は SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した。一次抗体としては、anti-mTMC1 Nt ウサギ抗体（abcam、ab199949）を用いた。

4. 次世代シーケンサー（NGS）による RNA-seq とリアルタイム PCR

mTMC1 の細胞内 N 端領域をコードした pIRES2-EGFP と、元の pIRES2-EGFP をトランスフェクションした HEK293 細胞を、EGFP の蛍光を指標にしてセルソーターにかけて、プラスミドがトランスフェクションされた細胞を分取した。mRNA を抽出し、Ion Proton sequencing system（Thermofisher、米国）を用いて RNA-seq を行った。mTMC1 の細胞内 N 端領域を発現する細胞としない細胞の間の遺伝子発現量の統計解析を EdgeR で行った。有意な差があり、かつ 2 倍以上の変化があった遺伝子を抽出した。さらにその遺伝子の中で変化量が大きかった三つの遺伝子について mRNA 発現量を SYBR Green 法を用いたリアルタイム PCR を行い、*Actb* を参照遺伝子としてΔΔCt 法により相対的な発現量を比較した。

結　果

1. マウスの TMC1 を翻訳する *mTmc1* のスプライシングバリアントの同定

マウスの *Tmc1* の mRNA にはスプライシングバリアントとして *mTmc1ex1* と *mTmc1ex2* があることが報告されているが [4]、それぞれをクローニングして強制発現させ、Western blot による解析を行ったところ、*mTmc1ex1* からは mTMC1 のタンパク質が翻訳されたが、*mTmc1ex2* からは mTMC1 のタンパク質がほぼ翻訳されなかった。よって、以下の実験では *mTmc1ex1* を用い、また、その翻訳されたタンパク質を mTMC1 とした。

2. mTMC1 の細胞内 N 端領域の断片の検出と切断に必要なアミノ酸配列の同定

mTMC1 の細胞内 N 端領域の断片を検出するため、細胞内 N 端領域に対する抗体（図 1a）を用いて Western blot 法により、HEK293 細胞に強制発現させた mTMC1 を検出した。すると、全長の mTMC1 が検出された他に、少なくとも二つの細胞内 N 端領域の断片が検出された（図 1b）。より強くバンドが検出された断片を Fragment 1、次に多く検出される断片を Fragment 2 と呼ぶことにした。

Fragment 1 の切断のために必要な配列をアミノ酸変異実験により調べたところ、最終的に 125 番目のバリンと 126 番目のセリンをアラニンに置換すると Fragment 1 が大きく減少することが明らかとなった（図 1c、d）。Fragment 2 に関しては、87 番目のロイシンから 92 番目のアラニンまでを欠損させると Fragment 2 がほぼ消失した（図 1e、f）ことからこの配列が Fragment 2 が生じるために必要であることが明らかとなった。

3. mTMC1 の細胞内 N 端領域の核内への輸送への核移行シグナルの関与

mTMC1 の細胞内 N 端領域には古典的単節的核移行シグナル（cNLS, K-K/R-X-K/R）となりうる配列（K38RKRTR43）があったため、その関与を調べた。cNLS はインポーチンαが結合できる配列である。まず、Fragment 1 に相当する mTMC1 の 127 番目のグルタミン酸（E127）までの細胞内 N 端領域（M1～E127）を強制発現させると、ほぼ全ての細胞で核に集積した（図 2 上段）。それに対し、cNLS となりえる配列のアルギニンをアラニンに置換することで無くした変異体（R39A／R41A）では細胞全体へと分布し、核内に集積することが抑制された（図 2 下段）。これらの結果から、切断された mTMC1 の細胞内 N 端領域は核移行シグナルと介して核内へと輸送されることが示され、インポーチンによる輸送が関与することが示唆された。

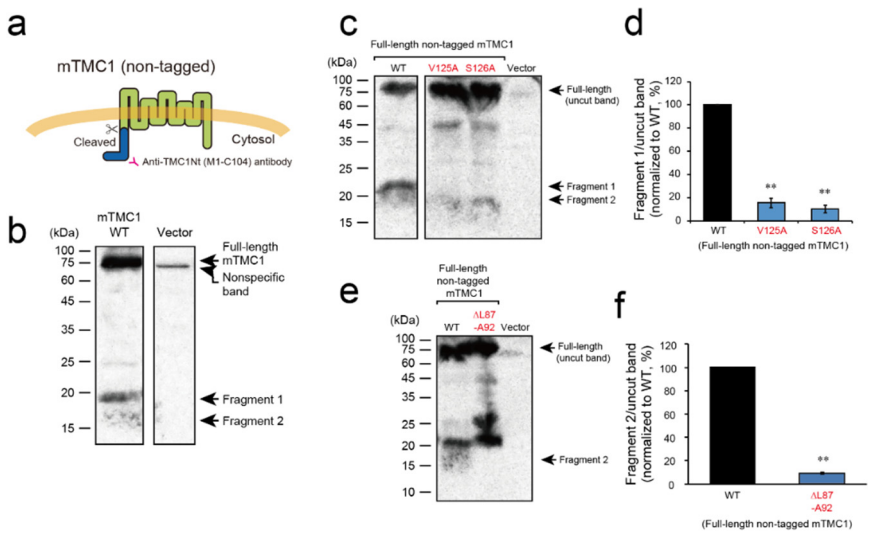


図 1. HEK293 に強制発現させた mTMC1 の細胞内 N 端領域の断片の検出と切断に必要なアミノ酸残基の同定

a) mTMC1 の予想される膜トポロジーと抗原部位。

b) mTMC1 を発現させた細胞（WT、左）と元のベクターをトランスフェクションした細胞（Vector、右）の mTMC1 抗体を用いた Western blot の結果。

c) V125A あるいは S126A の変異を持つ mTMC1 の Western blot の結果。

d) Fragment 1 のバンドのシグナルを全長のバンドのシグナルで割った値を、さらに野生型（WT）の mTMC1 の値を 100 として標準化した値を示す。Dunnett の検定により、V125A と S126A の変異により、有意に値が低下した（p<0.01、n=4 あるいは 5、平均値±標準誤差）。

e) ΔL87～A92 の変異を持つ mTMC1 の Western blot の結果。

f) Fragment 2 のバンドのシグナルを全長のバンドのシグナルで割った値を、さらに野生型（WT）の mTMC1 の値を 100 として標準化した値を示す。Welch の t-検定により、ΔL87～A92 の変異により、WT に比べ有意に値が低下した（p<0.01、n=3、平均値±標準誤差）。

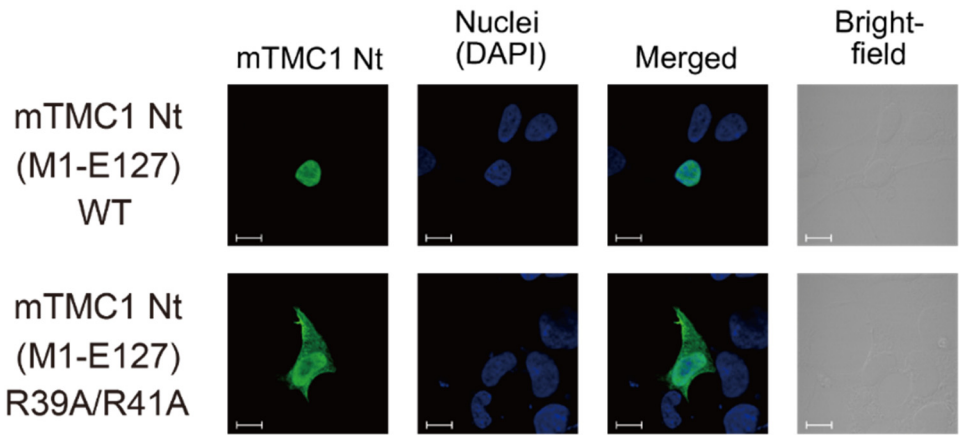


図 2. 強制発現させた細胞内 N 端領域の核への局在と核移行シグナルの関与

上段）Fragment 1 に相当する、mTMC1 の 127 番目のグルタミン酸までを強制発現させた細胞での細胞内 N 端領域を検出した免疫染色画像。緑が mTMC1 の細胞内 N 端領域で、青が DAPI による核を示す

下段）核移行シグナルとなる可能性がある配列（K38RKRTR43）の二つのアルギニンをアラニンに置換した（R39A／R41A）細胞内 N 端領域の変異体の局在。スケールバーは 10 μm。

4. mTMC1 の細胞内 N 端領域の強制発現による遺伝子発現の変化

次世代シーケンサーを用いて、mTMC1 の細胞内 N 端領域（M1～E127）までを発現させた HEK293 細胞と、Vector のみをトランスフェクションした HEK293 細胞とで、トランスクリプトームを比較したところ、16 個の遺伝子において有意に二倍以上の変化が認められた（図 3a）。この中で変化量が大きかった三つの遺伝子（*Aurkc*、*Npc1L1*、*Tagln*）についてリアルタイム PCR で再度発現量を調べたところ、いずれも同様の有意な変化が認められた。

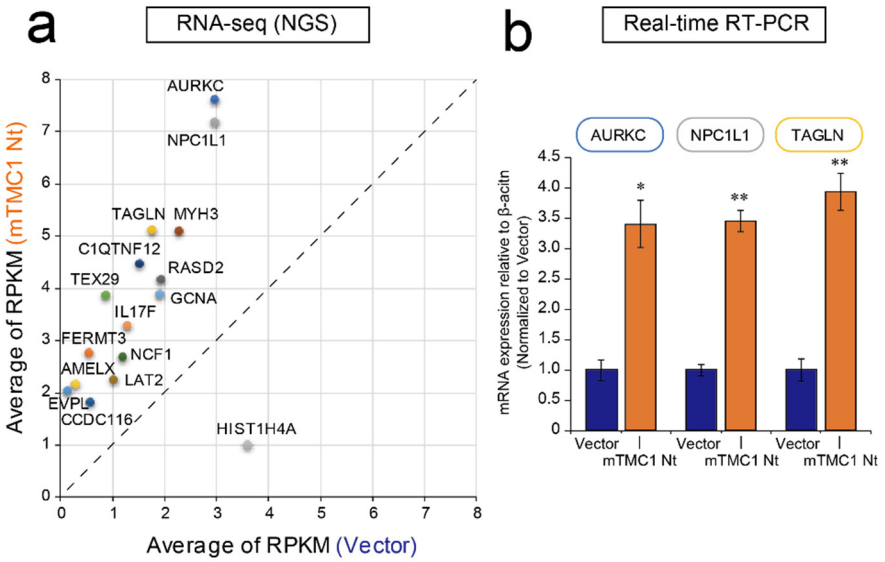


図 3. mTMC1 細胞内 N 端領域の発現による遺伝子発現量の変化

a) 次世代シーケンサー（NGS）による RNA-seq の結果。縦軸に mTMC1 の細胞内 N 端領域を発現させた HEK293 細胞、横軸は Vector をトランスフェクションした HEK293 細胞の各遺伝子の RPKM（Reads Per Kilobase per Million reads）の平均値。RPKM が 2 倍以上変化し、有意差があった遺伝子を表示している（EdgeR による統計解析と FDR による多重検定補正を行った後の $p<0.05$、n = 3）。

b) リアルタイム PCR による *Aurkc*、*Npc1L1*、*Tagln* 遺伝子の発現比較。Vector での発現量を 1 として標準化した（*$p<0.05$、**$p<0.01$、Welch の t-検定、n=3）。

考　察

本研究により、HEK293 細胞に強制発現させた mTMC1 の細胞内 N 端部位が切断される箇所と核内への輸送機所の一端が明らかとなった。さらに核内へと輸送された mTMC1 の細胞内 N 端領域が何らかの形で一部の遺伝子の発現量を変化させる可能性が示唆された。ただし、変動のあった遺伝子には、有毛細胞の機能に直結することが明確なものはなく、有毛細胞の難聴病態にどのような影響があるかは未解明である。

さらに、生体内の有毛細胞において、本研究で観察されたような TMC1 の切断が起きて転写調節が起こるか否かは非常に大事な問題である。しかし、試した三種類の抗体によっては、マウスの蝸牛の whole mount の標本の免疫染色では特異的な mTMC1 の染色は認められなかった。また、蝸牛から抽出したタンパク質を用いた western blot も行ったが、全長の mTMC1 も検出できなかった。よって、*in vivo* において、TMC1 の切断減少とそれに伴う転写調節が行われているか否かを明らかにするには更なる研究が必要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院獣医学研究院基礎獣医科学分野薬理学教室の神野真帆氏、濱村真帆氏、乙黒兼一教授である。

文　献

1） Pan B, Akyuz N, Liu XP, Asai Y, Nist-Lund C, Kurima K, Derfler BH, György B, Limapichat W, Walujkar S, Wimalasena LN, Sotomayor M, Corey DP, Holt JR. TMC1 Forms the Pore of Mechanosensory Transduction Channels in Vertebrate Inner Ear Hair Cells. Neuron. 2018 Aug 22;99(4):736-753.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.07.033. PMID: 30138589

2） Harkcom WT, Papanikolaou M, Kanda V, Crump SM, Abbott GW. KCNQ1 rescues TMC1 plasma membrane expression but not mechanosensitive channel activity. J Cell Physiol. 2019 Aug;234(8):13361-13369. doi: 10.1002/jcp.28013. Epub 2019 Jan 5. PMID: 30613966

3） Kawashima Y, Géléoc GS, Kurima K, Labay V, Lelli A, Asai Y, Makishima T, Wu DK, Della Santina CC, Holt JR, Griffith AJ. Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. J Clin Invest. 2011 Dec;121(12):4796-809. doi: 10.1172/JCI60405. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22105175