112 タンパク質モータプレスチン発現CHO細胞の原形質膜の観察 -原子間力顕微鏡を用いて-

Observation of the plasma membrane of the CHO cells expressing the motor protein prestin by atomic force microscopy

○学 村越 道生 (東北大院) 正 和田 仁 (東北大)

Michio MURAKOSHI, Tohoku University, 6-6-01 Aoba-yama, Sendai 980-8579
Hiroshi WADA, Tohoku University

Key words: Outer Hair Cell, Prestin, Plasma Membrane, Atomic Force Microscope

1. 緒言

蝸牛 (chochlea) に存在する外有毛細胞 (outer hair cell) は、外部からの入力音刺激に応じて自らの細胞長を変化させ、基底板 (basilar membrane) の振動を増幅させる (Fig. 1)。この機構により、我々の鋭敏な聴覚が実現されている。外有毛細胞の伸縮運動は、細胞膜中に存在するタンパク質モータプレスチン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。しかし、プレスチンの形状やその構造変化のメカニズムは不明である。そこで、本研究では、原子間力顕微鏡 (atomic force microscope: AFM) を用いて、プレスチンを発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary: CHO) 細胞の細胞膜の観察を行い、プレスチンの可視化を試みた。

2. 実験方法

2.1 試料作製 実験にはプレスチンを安定発現させた CHO 細胞⁽¹⁾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プレスチン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-Dil により脂質を蛍光染色し、観察試料とした。

2.2 原子間力顕微鏡 試料は倒立型蛍光顕微鏡がついた 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 $\mu\text{m/s}$ 、走査範囲を $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$ とした。

2.3 画像処理と構造解析 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。Fig. 2 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、

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

で表される⁽²⁾。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 $R = 16 \text{ nm}$ 、 $H = 5 \text{ nm}$ とした。取得した AFM 画像に式 (1) を適用し、実際の構造物の大きさを得た。

3. 結果

Fig. 3 (a), (c) に CHO 細胞およびプレスチンを安定発現させた CHO 細胞の細胞膜の AFM 画像、Fig. 3 (b), (d) に画像処理に

Fig. 1. Internal structure of the cochlea. Sensory cells, such as outer hair cells, inner hair cells and various kinds of the other cells, sit on the basilar membrane. Change in length of the outer hair cells in response to acoustical stimulation amplifies the vibration of the basilar membrane, leading to the high sensitivity of mammalian hearing.

Fig. 2. 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.

より得られたそれぞれの微分画像を示す。いずれの細胞膜上にも、粒子状の構造物（矢印）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十 μm であるゆえ、その直径が100 μm 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細胞およびプレスティンを安定発現させた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Fig. 4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、プレスティンを安定発現させた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、プレスティンを安定発現させた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）。

4. 考察

4.1 試料作製 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。プレスティン大きさは、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、プレスティン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。プレスティン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⁽³⁾、今回作製した試料は、細胞膜とプレスティンで構成されたAFMによる観察に適した試料であることが期待される。

4.2 原子間力顕微鏡による観察および画像解析 直径8-12 nmの粒子状構造物が、プレスティンを安定発現させた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、プレスティン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プレスティン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プレスティンの大きさ（直径7 nm程度）ともよく一致している。

5. 結言

プレスティン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、これらの多くがプレスティンである可能性を示唆している。

参考文献

- (1) Iida, K., Konno, K., Oshima, T., Tsumoto, K., Ikeda, K. and Kumagai, I., Stable expression of the motor protein prestin in Chinese hamster ovary cells, *JSME Int. J.*, 46-4, C (2003), 1266-1274.
- (2) Larmer, J., Schneider, S.W., 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, (1997), 254-260.
- (3) Kakehata, S. and Santos-Sacchi, J., Membrane tension directly shifts voltage dependence of outer hair cell motility and associated gating charge, *Biophys. J.*, 68, (1995), 2190-2197.

Fig. 3. AFM images of membranes of CHO cells. (a) Original AFM image of the untransfected CHO cell. (b) Differential AFM image of (a). (c) Original AFM image of the prestin-expressing CHO cell. (d) Differential AFM image of (b). Arrow heads represent particle-like structures.

Fig. 4. Density of the particle-like structures in the plasma membrane versus their diameter after compensation. Error bars and asterisks represent standard deviation and statistically significant difference ($P < 0.05$ by Student's *t*-test), respectively.