

平成 22 年 12 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2009
課題番号：18390460
研究課題名（和文）聴覚受容に関するイオンチャネルの解析と難聴モデルマウスの作成
研究課題名（英文）Analysis of ion channels associated with auditory sensation and construction of a model for hereditary hearing impairment
研究代表者
島田 昌一（SHIMADA SHOICHI）
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20216063

研究成果の概要（和文）：我々は内耳の有毛細胞に ASIC1b（Acid sensing ion channel 1b）が発現していることを見いだした。in situ ハイブリダイゼーション法による解析では ASIC1b は、外有毛細胞に強く発現し、内有毛細胞にも発現が認められた。さらに、免疫組織化学法を行ったところ、ASIC1b イオンチャネルは有毛細胞において感覚毛がクチクラプレートに接する部分にのみ限局して分布していることが分かった。そこで ASIC1b のノックアウトマウスを作成し聴覚検査を行ったところ、まだ予備実験の段階ではあるが部分的な難聴を示した（東京医科歯科大学喜多村教授との共同研究）。

研究成果の概要（英文）：We examined whether amiloride-sensitive proton-gated cation channels ASICs (acid-sensing ion channels) are expressed in the stereocilia of mouse cochlear hair cells. In situ hybridization studies revealed that ASIC1b was expressed in the inner and outer hair cells. Fluorescent immunohistochemistry and immunogold electron microscopic studies demonstrated that ASIC1b was located at the insertions of stereocilia into the hair cells. Our findings provide a novel molecular key to the understanding of cochlear physiology and pathophysiology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,000,000	0	4,000,000
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
総計	14,000,000	3,000,000	17,000,000

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：聴覚、内耳、有毛細胞、イオンチャネル、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

感覚器は微小な器官であるがゆえ生化学的な研究が難しく、感覚器に特異的に発現する遺伝子の多くは重要な機能を担っている

にも関わらずその研究が立ち遅れてきた。我々は形態学的な手法と分子生物学的な手法を駆使し、これらの難点に取り組んできた。

2. 研究の目的

本研究では内耳の有毛細胞の感覚毛に特異的に局在する聴覚を受容に関連する遺伝子の同定を目指し、さらに、これらのチャンネルの有毛細胞における分布の微細構造を明らかにすると同時にイオンチャンネルの機能解析を電気生理学的な手法で解析する。そして、この遺伝子のノックアウトマウスを作成し、実際に聴覚検査をし、難聴モデルマウスの作成を目指す。

3. 研究の方法

我々は以前にラットより内耳の cDNA ライブラリーを作成した。本研究で線虫やショウジョウバエで機械刺激受容に関与すると考えられる *degenerin* 遺伝子ファミリーや TRP 遺伝子ファミリーとの相同性を用いて内耳の cDNA ライブラリーをスクリーニングを行ったり、RT-PCR 法を用いて候補遺伝子の断片を得た。

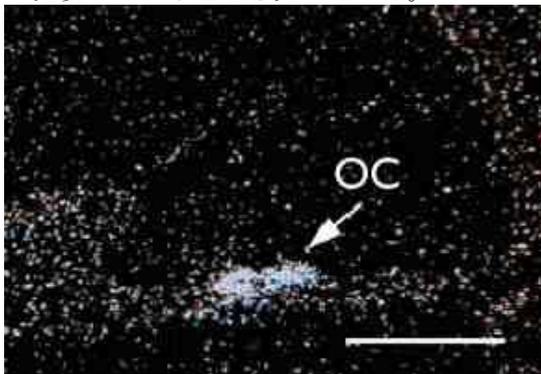
これらの遺伝子断片の情報を用いて、cRNA プロンプを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により、コルチ器や平衡斑の有毛細胞に特異的に発現している遺伝子を形態学的にスクリーニングした。このスクリーニングにより、有毛細胞に強く発現しているクローンの一つとして ASIC1b を選出した。

合成ペプチドを抗原としウサギを用いて ASIC1 抗体を作成する。この抗体を用いて免疫組織化学法を行い、聴覚受容に関与するイオンチャンネルが実際に存在していると考えられている感覚毛にその蛋白が局在しているかどうかを検討した。

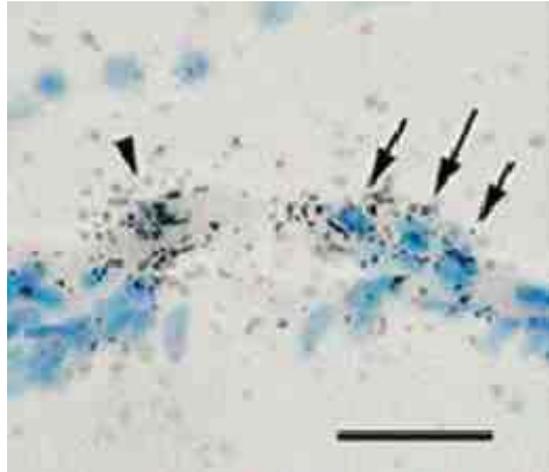
ASIC1b に関しては cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、低浸透圧などの刺激でチャンネルが開くかどうかを検討した。さらに、ASIC1b のノックアウトマウスを作成し、聴覚機能検査を行った。

4. 研究成果

内耳において Deg/ENaC 遺伝子ファミリーや TRP 遺伝子ファミリーを、分子生物学的、組織学的に検索し酸感受性イオンチャンネルの一つである ASIC1b が蝸牛内耳の有毛細胞に発現していることを見いだした。

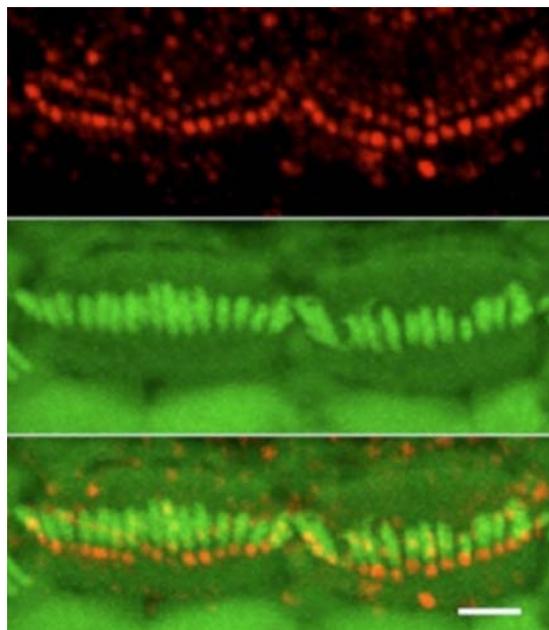


【図1】 ASIC1b mRNA のコルチ器における発現 (*in situ* ハイブリダイゼーション法による監視や顕微鏡写真



【図2】 蝸牛の内毛細胞と外毛細胞における ASIC1b mRNA の発現

図1、図2の様に *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析で、ASIC1b は内耳の蝸牛のコルチ器において、内毛細胞と外毛細胞に局在していることが分かった。さらに詳細なタンパク質の細胞内での局在を明らかにするために、ASIC1 に特異的な抗体を作製し免疫組織化学法を用いて、蝸牛の有毛細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。



【図3】 内耳蝸牛の内毛細胞感覚毛における ASIC1 の免疫陽性構造

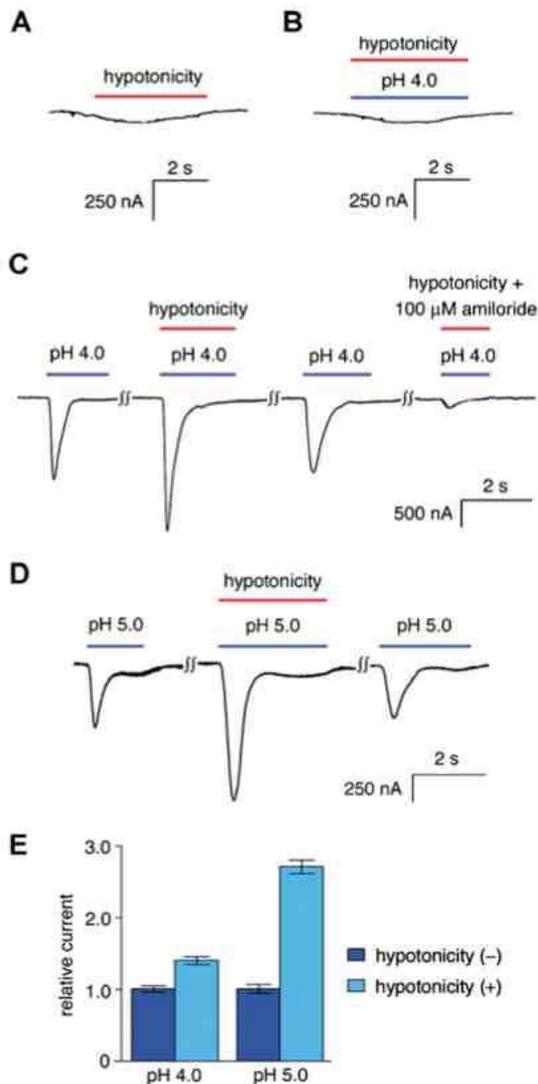
上段：ASIC1 の免疫陽性構造が赤色で染色されている。

中段：ファロイジンによるアクチンの染色、アクチンを多量に含む感覚毛が緑色に染色されている。

下段：上段と中段を重ねて表示した蛍光顕微

鏡写真

図3から、ASIC1bの蛋白の局在は、内耳蝸牛の有毛細胞の感覚毛の付け根の部分に局在していることが明らかとなった。この部分は感覚毛が音の刺激によって振動する際に、物理的な力のかかる部分なので興味深い。



【図4】アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いたASIC1bの機能発現

A:ASIC1bを発現させていない細胞は低浸透圧では応答を示さない。

B:ASIC1bを発現していない細胞は低浸透圧と酸の刺激を組み合わせても応答を示さない。

C,D:ASIC1bを発現させた細胞では酸に対するASIC1bの応答を低浸透圧刺激が増強させる。またこの応答はアミロライドで抑制される。

E:CとDの応答をグラフに示す。

次にASIC1bの機能を解析するためにアフリカツメガエル卵母細胞にASIC1bのcRNAを注入し、ボルテージクランプ法を用いて、物理的な刺激の一種である低浸透圧刺激に対

するASIC1bの応答を調べた。図4の様にASIC1bの酸に対する応答は低浸透圧刺激によって増強された。

次にASIC1bに対するノックアウトマウスを作成し東京医科歯科大学喜多村教授との共同研究でそのノックアウトマウスの聴覚検査を行ったところまだ予備実験の段階ではあるが部分的な難聴を示すことが分かった。今後さらに詳しい聴覚機能の解析を進め、ASIC1bがどのような難聴のモデル動物になるのか、ASIC1bのノックアウトによってどのようなメカニズムで聴覚障害をきたすのか等の検討を進めていく方針である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

- ① Ishida Y, Ugawa S, Ueda T, Yamada T, Shibata Y, Hondoh A, Inoue K, Yu Y, Shimada S. P2X(2)- and P2X(3)-positive fibers in fungiform papillae originate from the chorda tympani but not the trigeminal nerve in rats and mice. *J Comp Neurol.* 査読有り, 2009, 514:131-44.
- ② Inagaki A, Ugawa S, Yamamura H, Murakami S, Shimada S. The CaV3.1 T-type Ca²⁺ channel contributes to voltage-dependent calcium currents in rat outer hair cells. *Brain Res.* 査読有り, 2008, 1201:68-77.
- ③ Ugawa S, Ishida Y, Ueda T, Yu Y, Shimada S. Hypotonic stimuli enhance proton-gated currents of acid-sensing ion channel-1b. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有り, 2008, 367:530-4.
- ④ Ugawa S, Ishida Y, Ueda T, Inoue K, Nagao M, Shimada S. Nafamostat mesilate reversibly blocks acid-sensing ion channel currents. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有り, 2007;363:203-8.
- ⑤ Ugawa S, Inagaki A, Yamamura H, Ueda T, Ishida Y, Kajita K, Shimizu H, Shimada S. Acid-sensing ion channel-1b in the stereocilia of mammalian cochlear hair cells. *Neuroreport.* 査読有り, 2006;17:1235-9.

[学会発表] (計10件)

- ① 鶴川真也、石田雄介、島田昌一 Hair cell-ASIC is a candidate for the mechano-electric transduction channel of mammalian hair cells. 日本生物学的精神医学会第28回・日本神経精神薬理学会第36回・日本神経化学第49回大会合同年会(2006年9月14日)名古屋
- ② 鶴川真也、植田高史 内耳蝸牛有毛細胞に発現する酸感受性イオンチャネルASIC1bの生理的役割 日本解剖学会第115

回全国学術集会（2010年3月28日）岩手

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 昌一 (SHIMADA SHOICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20216063

(2) 研究分担者

村上 信五 (MURAKAMI SHINGO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80157750

鵜川 眞也 (UGAWA SHINYA)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20326135

(H21：連携研究者)

石田 雄介 (ISHIDA YUSUKE)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30381809