

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580401

研究課題名(和文) 蝸牛におけるグルタミン酸関連分子ならびに神経栄養因子の動態の解明

研究課題名(英文) The expression of Glutamate-associate molecular and neurotrophic factor in the cochlea.

研究代表者

齋藤 正一郎(Saito, Shouichiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：60325371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：聴覚受容器「蝸牛」は、ヒトにおいては他者との協調関係を築くのに、動物においては外敵から身を守るとともに捕食のためにも重要な器官であり、グルタミン酸がシグナル伝達において主要な働きをしている。本研究では蝸牛におけるグルタミン酸関連分子ならびに神経栄養因子の挙動について、形態学的に解明することを目的とした。結果、有毛細胞が再生することができる鳥類の蝸牛における、グルタミン酸をシナプス小胞へと詰め込む小胞性グルタミン酸トランスポーターの発現性ならびにその局在、グルタミン酸の受け手であるグルタミン酸レセプターの発現性ならびにその局在、哺乳類の蝸牛におけるプロサボシンの挙動について明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The auditory stimulus is detected by inner hair cells and then transmitted to the brain by type I spinal ganglion neurons. In mammals, type I spinal ganglion neurons are revealed to express ionotropic AMPA, NMDA and kainate type receptors to form excitatory synapses with inner hair cells, and also appear to express vesicular glutamate transporter I to release glutamate to neurons in the brain. In birds, receptor neurons and spinal ganglion neurons could not be subdivided as mammals. Among receptor subunits examined, GluA1, 2, 3 and 4 mRNAs for AMPA type, GluN1, 2A, 2B and 3A for NMDA type, and GluK1, 2 and 4 mRNAs for kainate type were observed. Vesicular glutamate transporter II and III were also identified with different expression levels in the basilar papilla, and the spinal ganglion neurons were revealed to express vesicular glutamate transporter II. This study revealed glutamate plays a pivotal role in the excitatory synapse transmission in avian auditory pathway.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：蝸牛 グルタミン酸 グルタミン酸トランスポーター グルタミン酸レセプター 神経栄養因子 プロサボシン In situ hybridization RT-PCR

1. 研究開始当初の背景

音波は、鼓膜から耳小骨を経て、側頭骨岩様部中の蝸牛へと伝達される。音波は蝸牛内の前庭階から鼓室階へと抜けていき、その間に前庭階と鼓室階に挟まれたコルチ器において、音波は有毛細胞により電気信号に変換され、らせん神経節細胞を経て、脳幹の蝸牛神経核へと伝達される。コルチ器は、強大音への暴露のみならず、低酸素、血行障害および抗生物質等に対して非常に鋭敏に反応し、容易に変成して、難聴や聾を引き起こす。幹細胞となる基底細胞も存在しないため、一度重篤な変成に陥れば回復は難しく、また加齢性変化への対応も脆弱なものとなっている。そのため、障害時に既存の細胞を如何に生存させるかが重要な要素となる。

近年、海馬などで観察される虚血による遅発性神経細胞死に対する治療法が、コルチ器の変成予防に有効であることが明らかにされた。遅発性神経細胞死は、細胞間隙でのグルタミン酸濃度上昇によるグルタミン酸神経毒性によるものである。そのため、正常時のコルチ器におけるグルタミン酸関連分子の挙動解明が変成予防の重要な起点となる一方で、未だ不明な点が多いのが現状である。

またコルチ器は内腔を内リンパ液という、 K^+ 濃度が一般細胞外液の数十倍である特殊な体液で満ち(迅速な活動電位を生じさせるためと考えられている)、有毛細胞や支持細胞周囲には毛細血管が少ない(血管の拍動による振動を避けるためと考えられている)ため、細胞の生存因子の分泌は内リンパ液を産生する血管条や、コルチ器各種細胞による神経栄養因子の自己分泌・傍分泌によるところが多く、それがコルチ器の脆弱性にも繋がっているのではないかと我々は考えている。

2. 研究の目的

グルタミン酸を直接標的とした免疫組織化学的、薬理学的および生理学的研究から、有毛細胞は神経伝達物質としてグルタミン酸を放出し、受け手であるらせん神経節の求心性線維末端では主に AMPA 型グルタミン酸受容体がイオンチャンネルを開口させ、らせん神経節細胞は蝸牛神経核へグルタミン酸を放出することが明らかにされている。一方、有毛細胞、らせん神経節細胞では、グルタミン酸作動性の証明である小胞性グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)の発現タイプが未だ不明である。本研究では、脊椎動物の中では例外的に有毛細胞が再生することができる鳥類の蝸牛におけるグルタミン酸関連分子を明らかにすることを目的とした。加えて、未だ不明な点が多い蝸牛における神経栄養因子の作用を解明するため、近年注目されている神経栄養因子プロサポシンの挙動について、齧歯類を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ハトのコルチ器のラセン神経節細胞における小胞性グルタミン酸トランスポーターの発現性について

RT-PCR に雌雄各 1 羽、in situ hybridization に雌雄各 3 羽のハト(*Columba livia*, 202~310 g)を使用した。動物実験は岐阜大学動物実験指針に従って行った(岐阜大学動物実験審査委員会承認番号 11005)。RT-PCR は以下の様に行った。動物をソムノペンチル(共立製薬株式会社、50 mg/kg, i.p.)で麻酔後、直ちに側頭骨から蝸牛管を採材し、TRIzol (Invitrogen, CA, USA)を用いて定法に従い total RNA を抽出し、SuperScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて cDNA を作製した。プライマーとして、GeneBank に登録されているハト VGLUT2 cDNA (FJ428226) およびハト VGLUT3 cDNA (HQ176877)を元に、PCR 産物の塩基長が約 400~500bp となるプライマーを設計した。これら cDNA とプライマーに Takara Ex Taq (Takara Bio Inc.)を加え、サーマルサイクラー(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice, Takara Bio Inc.)を用いて、94 2分を 1 サイクル、94 30秒-55 30秒-72 1分を 30 サイクルもしくは 25 サイクル、72 5分を 1 サイクル、の条件で PCR を行った。

RNA プローブの合成は以下の通り行った。RT-PCR で使用した VGLUT2-F、VGLUT2-R、VGLUT3-2F、VGLUT3-2R のプライマーについて、forward プライマーの 5'側に T7 プロモーター配列(5'TAATACGACTCACTATAGGG)を、reverse プライマーの 5'側に SP6 プロモーター配列(5'ATTTAGGTGACACTATAGAA)を付加したプライマーを設計し、コルチ器 cDNA について、94 2分を 1 サイクル、94 30秒-55 30秒-72 1分を 40 サイクル、72 5分を 1 サイクルの条件で PCR を行い、PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, WIS, USA)で精製した。その後、DIG RNA Labeling Kit(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)を用いて、精製 PCR 産物より DIG 標識 RNA プローブを作製した。

In situ hybridization は以下の通り行った。ハトを生理食塩水および 4%パラホルムアルデヒド -0.1 M PB にて灌流固定後にコルチ器を採材し、定法に従ってパラフィンに包埋し、6 μ m 厚のパラフィン切片を作製し、乾熱滅菌を施したシランおよび poly-L-lysine コートスライドに貼り付けた。脱パラフィン後、4%パラホルムアルデヒド-0.1 M PB で 20 分間固定し、1X PBS で洗浄後、200 mM HCl にて室温で 20 分間インキュベートした。1X PBS で洗浄後、30 μ g/ml プロテナーゼ K-1X PBS で 37、30 分間インキュベートした。1X PBS で洗浄後、アルコール系列で脱水し、乾燥させた。プローブ濃度が 2 μ g/ml となるよう hybridization buffer (5 \times SSC、50%ホルムアミド、5 mg/ml Torula RNA、50 μ g/ml Heparin、0.1%

Tween20)で希釈し、90 5 分間の熱処理を施した後、250 μ l/slide の量でスライドに滴下し、カバースライドをかぶせ、41 で一晩インキュベートした。その後2X SSCで37、30分間、1X SSCで37、30分間インキュベートし、20 μ g/ml RNaseA (Roche)-NTE buffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA2Na, pH 8.0)にて37、30分間インキュベートした。続いて50%ホルムアルデヒド-1X SSCにて41、30分間、2回洗浄し、流水にて30分間洗浄後、蒸留水で5分間洗浄した。次に、blocking solution (2%ウシ血清アルブミン、2%正常ヤギ血清、25 mM Tris、137 mM NaCl、0.268 mM KCl)を滴下し、室温で30分間インキュベートした。その後、2000倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗DIGヤギ抗体を切片に滴下し、4で一晩インキュベートした。その後、1xTBSにて20分間3回洗浄し、20 μ l/ml NBT/BCIP solution-Detection buffer (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, pH 9.5)で、4で3~4日間インキュベートした。その後、1 mM EDTAを加えた1xPBS溶液に浸漬して発色反応を停止し、蒸留水にて洗浄後、Glycerigel Mounting Medium (Dako)を用いて封入した。

(2)ハトのホルチ器のラセン神経節細胞におけるグルタミン酸レセプターサブユニットの発現性について

(1)と同様の方法で行った。

(3)ラット脈絡叢におけるプロサポシンの alternative splicing forms の発現性について

ラジオアイソトープで標識したDNAプローブを用いた in situ hybridization を以下の通り行った。36merの合成オリゴDNAプローブを in situ hybridization に用いた。ラットプロサポシン mRNA の93~129番目の塩基配列に相補的なオリゴDNA (PSAS-1、TCTGCACACTACTGCTGAGCCCCAGAGCATATCTT)および1704~1739番目の塩基配列に相補的なオリゴDNA (PSAS-2、TTCATTACCCTAGACCCACAAGTAGGCGACTTCTGC)をアンチセンスプローブとして、1704~1739番目の部位に相当するオリゴDNA (PSS-1、GCAGAAGTCGCCTACTTGTGGGTCTAGGGTAATGAA)をセンスプローブとして用いた。定法に従い、terminal deoxynucleotidyl transferase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、各プローブの3'末端に[^{-35S}]dATP (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan)を標識し、濃度が 1.0×10^7 dpm/mlとなるようにハイブリダイゼーションバッファー(4xSSC、50%脱イオン化ホルムアミド、0.12Mリン酸バッファー、1xDenhart's solution、0.025% tRNA、10%硫酸デキストラン)で希釈した。希釈したプローブ溶液には、組織切片に滴下する直前に、ジチオスレイトールを20mMとなるように加えた。凍結

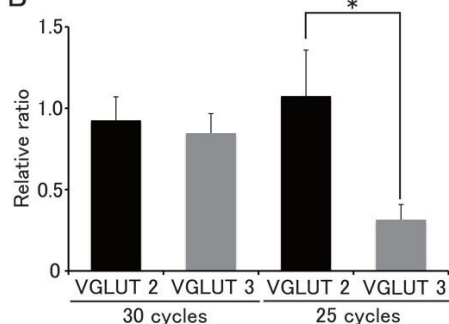
切片を0.1Mリン酸緩衝4%パラフォルムアルデヒド溶液により15分間浸漬固定後、4xSSC溶液(1xSSCは0.15M塩化ナトリウムと15mMクエン酸ナトリウムからなり、pH7.4)で5分間、3回洗浄し、アルコール系列およびクロロホルム溶液で脱脂し、希釈した各プローブを200 μ l/slideで滴下し、42°Cで一晩インキュベートした。その後、1xSSC溶液により、室温で10分間および58°Cで20分間3回洗浄し、アルコール系列で脱水した。脱水後、暗室にて、蒸留水で等倍希釈したNTB-2溶液(Eastman Kodak Company, NY, USA)を切片に塗布し、暗箱に入れて4°Cで3週間感光させ、D-19現像液(Eastman Kodak Company, NY, USA)で切片を現像し、暗視野顕微鏡で検鏡した。

4. 研究成果

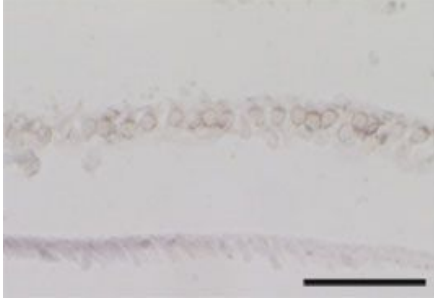
(1)ハトのホルチ器のラセン神経節細胞における小胞性グルタミン酸トランスポーターの発現性について

本研究では、有毛細胞におけるVGLUT 3 mRNAの発現が明らかとなった。哺乳類の内毛細胞においてもVGLUT 3 mRNAの発現性が明らかとなっていることから、鳥類の有毛細胞は哺乳類と同様、VGLUT 3を利用するグルタミン酸作動性神経細胞であることが明らかとなった。鳥類においてVGLUT 2はVGLUT 1の役割をも果たす可能性がある一方で、有毛細胞においてはVGLUT 2は発現せずVGLUT 3のみ発現しているという結果は、VGLUT 3の役割はVGLUT 2では果たせず、また有毛細胞の機能とVGLUT 3の発現性には深い関連性があることを示唆していると考えられる。VGLUT 1ノックアウトマウスは脆弱ではあるが生後数ヶ月生存できることから、哺乳類においてもある程度の発達時期まではVGLUT 2がVGLUT 1の補完ができる一方、VGLUT 3ノックアウトマウスにおいては他のVGLUTによる補完がなされず聾となる事からも、有毛細胞の機能とVGLUT 3の発現性には深い関連性があることが明らかとなっており、本研究結果もこれを支持するものと考えられる。以上、本研究ではハトのラセン神経節細胞はVGLUT 2を発現するグルタミン酸作動性神経細胞であること、有毛細胞はVGLUT 3を発現するグルタミン酸作動性神経細胞であることが明らかとなった。

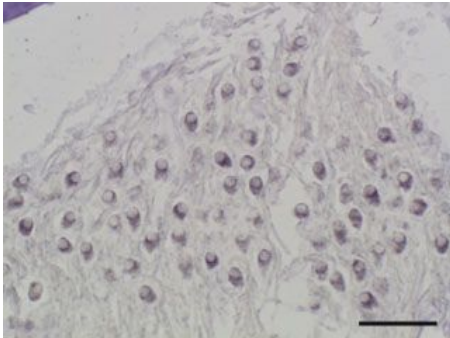
B



付図説明：VGLUT 2 および VGLUT 3 の相対的発現量。



付図説明：有毛細胞における小胞性グルタミン酸トランスポーター3 (VGLUT3) mRNA の発現様式。



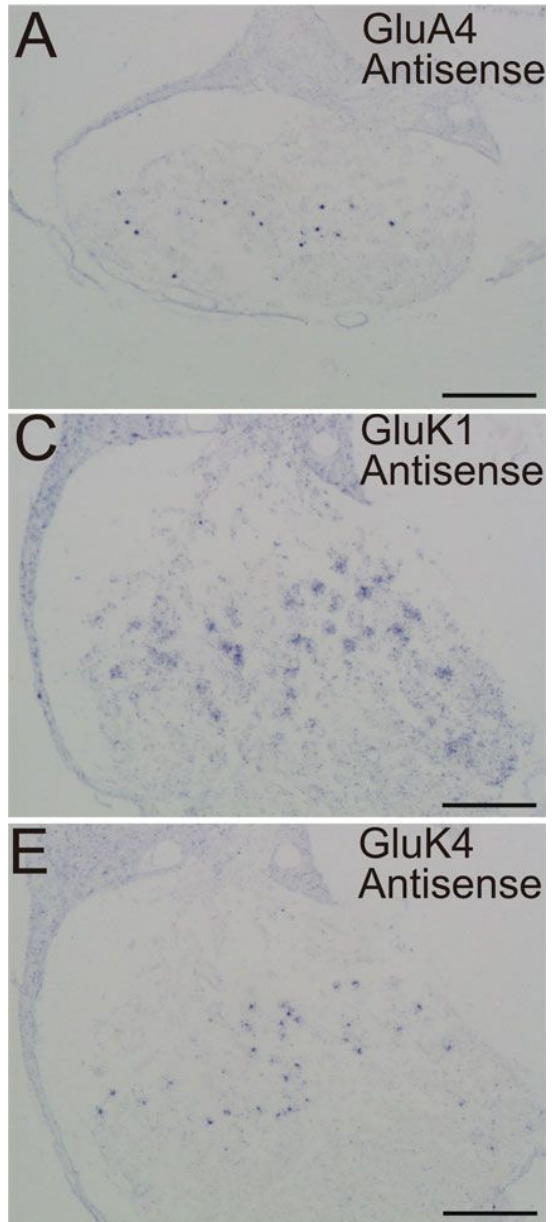
付図説明：ラセン神経節細胞における小胞性グルタミン酸トランスポーター2 (VGLUT2) mRNA の発現様式

(2) ハトのコルチ器のラセン神経節細胞におけるグルタミン酸レセプターサブユニットの発現性について

(1)の研究では脊椎動物の中で例外的に、有毛細胞が再生することができる鳥類の蝸牛を対象として、グルタミン酸関連分子のうちグルタミン酸をシナプス小胞へと詰め込む小胞性グルタミン酸トランスポーターの発現性ならびにその局在を明らかにしたが、蝸牛におけるグルタミン酸神経伝達機構を明らかにするには、受け手であるグルタミン酸レセプターの発現性ならびにその局在をも明らかにする必要がある。そのため(2)の研究として、鳥類の蝸牛における AMPA 型、Kainate 型、NMDA 型のグルタミン酸レセプターについて検討した。結果、RT-PCR により GluA1、A2、A3 および A4 (AMPA 型) GluK1 および K4 (Kainate 型) および GluN1 (NMDA 型) mRNA の発現が明らかとなった。In situ hybridization により、これら分子は主にラセン神経節細胞に局在することが明らかとなった。本研究と(1)の研究結果から、鳥類においてもグルタミン酸が主要な神経伝達物質として機能していることが強く支持され、また鳥類の蝸牛におけるグルタミン酸関連分子の挙動が明らかとなった。



付図説明：RT-PCR による、ハト蝸牛における各グルタミン酸レセプターサブユニットの発現様式の検討。AMPA 型のレセプターでは GluA2、GluA3、GluA4、カイン酸型では GluK1 および GluK4、NMDA 型では GluN1 のサブユニットの発現が明らかとなった。

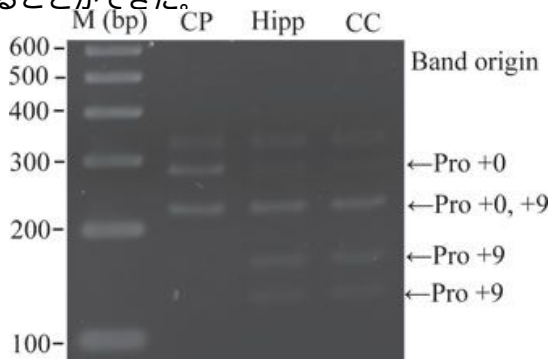


付図説明：In situ hybridization によるハトラセン神経節におけるグルタミン酸レセプターサブユニットの局在の検討。RT-PCR で確認された分子の、ラセン神経節細胞での発現が確認された。

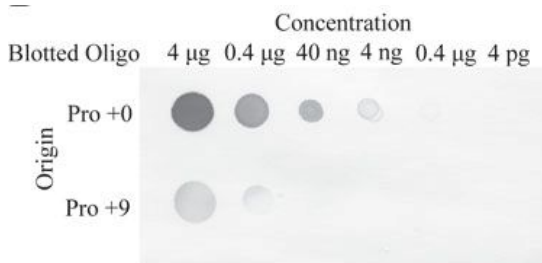
(3) ラット脈絡叢におけるプロサポシンの alternative splicing forms の発現性について

本研究では神経栄養因子プロサポシンの発現性について検討した。プロサポシンは転写の際に選択的スプライシングを受け、齧歯類では 9 塩基の挿入の有無により 2 種類の mRNA が合成されているが、それらの機能的相違については不明である。蝸牛での詳細のた

め、まずプロサポシンを活発に分泌していると考えられている脈絡叢におけるプロサポシンの発現様式について検討した。結果、脈絡叢は9塩基の挿入のないPro+0 mRNAを優勢に合成するという特性を持ち、また脳脊髄液へと分泌されている分泌型プロサポシンはPro-0 mRNAに由来するのではないかと考えられた。蝸牛においては血管条からプロサポシンが分泌されているという実験結果と合わせると、プロサポシンによる蝸牛の損傷治癒を検討する上での有用な事実を解明することができた。

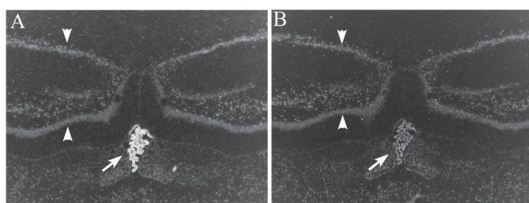


付図説明：各種組織由来のプロサポシン mRNA を RT-PCR で増幅後、制限酵素処理を施した。脈絡叢 (CP) 由来のプロサポシンは1箇所切断され2本のバンドが認められた一方、海馬 (Hipp) や大脳皮質 (CC) 由来のプロサポシンは2箇所切断され3本のバンドが認められた。脈絡叢では9塩基の挿入のないプロサポシン (Pro+0)、海馬や大脳皮質では9塩基の挿入のあるプロサポシン (Pro+9) の発現性が示された。



Hybridization with PS-AS4

付図説明：9塩基の相違を検出するDNAプローブの作成結果。プローブPS-AS4を、9塩基の挿入のあるプロサポシン (Pro+9) および挿入のないプロサポシン (Pro+0) をドットプロットしたメンブレンにハイブリダイズした。結果、PS-AS4はPro+0に選択的に結合することが立証された。同様に、Pro+9に特異的に結合するPS-AS3も作出した。



付図説明：作出したDNAプローブを用いた in situ hybridization 像。Pro+0 を認識する

PS-AS4により脈絡叢は強度に染色された(A)一方、Pro+9を認識するPS-AS3による染色像は弱度であった(B)。両プローブとも、海馬(矢頭)における染色強度は同等であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Saito S., Saito K., Nabeka H., Shimokawa T., Kobayashi N., Marsuda S. Differential expression of the alternatively spliced forms of prosaposin mRNAs in the rat choroid plexus. *Cell Tissue Res.* 356, 231-242, 2014. (査読有り)

Terashita T., Saito S., Nabeka H., Hato N., Wakisaka H., Shimokawa T., Kobayashi N., Gyo K., Matsuda S. Prosaposin-derived peptide alleviates ischemia-induced hearing loss. *Acta Otolaryngol.* 133, 462-468, 2012. (査読有り)

[学会発表](計 4 件)

齋藤 正一郎、阿閉 泰郎. 2013. 脈絡叢におけるプロサポシン mRNA の選択的スプライシングの発現性について. 第155回日本獣医学会学術集会(東京). 2013年3月28日~30日. 講演要旨集 p.184.

齋藤 正一郎、カリム Mohammad ラビウル、阿閉 泰郎. 2012. ハト聴覚受容器におけるグルタミン酸レセプターおよび小胞性グルタミン酸トランスポーターについて. 第35回日本神経科学大会(名古屋). 2012年9月18日~21日. 講演要旨集 p. 261

阿閉 泰郎、齋藤 正一郎. 2012. ゼブラフィンチ脳における2型小胞性グルタミン酸トランスポーターの免疫組織化学的局在. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(甲府). 2012年3月26日~28日. 講演要旨集 p. 145.

齋藤 正一郎、Mohammad Rabiul Karim、阿閉 泰郎. 2012. ハトのコルチ器のラセン神経節細胞における小胞性グルタミン酸トランスポーターの発現性について. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(甲府). 2012年3月26日~28日. 講演要旨集 p. 146.

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 正一郎 (SAITO SHOICHIRO)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：60325371

(2)研究分担者

阿閉 泰郎 (ATOJI YASURO)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：90151084