

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06224

研究課題名(和文)内耳性疾患の克服を指向した蝸牛酸塩基平衡制御の解析

研究課題名(英文)Analysis of acid-base regulation of the cochlea toward overcoming of the inner ear disease

研究代表者

樋口 大河 (HIGUCHI, Taiga)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60757532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：内耳体液「内リンパ液」の特殊なイオン環境はNa⁺、K⁺-ATPaseを主とする様々なイオン輸送分子により形成される。しかしながら、その環境を維持するために恒常的に生じる莫大な呼吸酸(H⁺)の処理を含め、内耳pH制御の詳細は不明である。本研究では、(1)質量分析により内耳血管条に20種類のpH制御性膜タンパク質を見出した。また、(2)これらイオン輸送体の内耳pH制御について検討するためのin vivo内リンパ液pH測定法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The unique ionic environment of endolymph is produced by various ion pumps and transporters in the stria vascularis and spiral ligament. However, acid-base regulation of the inner ear is unclear including the treatment of H⁺ arose from the pumps to maintain the endolymph. In the present study, (1) 20 pH regulatory membrane proteins were found in the stria vascularis by LC-MS/MS. (2) The in vivo measurement system to monitor the endolymph pH was established in order to investigate the involvement of the pH regulatory proteins in the pH regulation of the inner ear.

研究分野：医歯薬学

キーワード：pH制御性膜タンパク質 内耳 蝸牛 イオン電極法 質量分析

1. 研究開始当初の背景

聴覚・バランス覚を各々感知する蝸牛・前庭器から成る内耳は、細胞外液であるにも関わらず 150 mM の高カリウム (K^+) 濃度を示す「内リンパ液」で満たされている (図 1)。この体液の pH は 7.4 である。また、蝸牛の内リンパ液は +80 mV の高電位を示す (図 1)。内リンパ液の特殊なイオン・電位環境は、内耳機能に必須であり、蝸牛と前庭器のそれぞれの上皮組織である血管条・暗細胞層を介した K^+ の一方向性輸送により維持されている。 K^+ 輸送には種々の輸送分子が関わるが、 Na^+, K^+ -ATPase が主体であるため (図 2)、莫大な酸素が消費され、発生する CO_2 に基づいた多量の呼吸酸 (H^+) が生じる。一般に多くのタンパク質活性を修飾する H^+ の濃度制御は、蝸牛・前庭器の上皮組織の恒常化や正常な K^+ 輸送の維持に不可欠であると予想される。特に蝸牛の上皮組織は、体内で最も高い ATPase 活性を示すと言われており、その pH 制御系は内耳機能の維持に重要であるに違いないと想定されるが、その詳細はほとんど謎である。

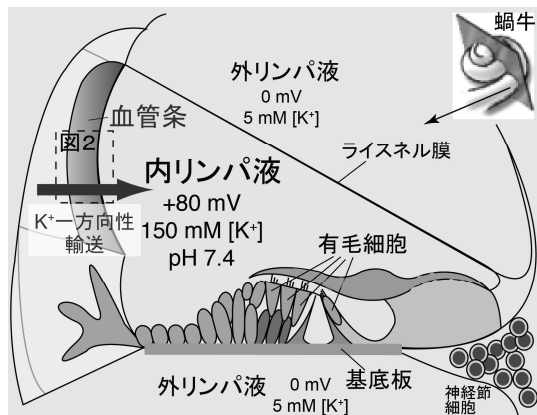


図 1: 内耳蝸牛の断面図

内リンパ液環境の恒常性維持の重要性は、めまい・難聴を主症状とする難治性疾患「メニエール病」の病因として、内リンパ液の過剰が指摘されていることから自明である。近年、内リンパ液の pH 制御に関わる幾つかの輸送タンパク質と、それらと疾患との関連が報告されてきている。 HCO_3^-, Cl^- 交換輸送体である Pendrin は、上述した蝸牛の血管条に近接する別の上皮に分布し、その loss-of-function によりヒトでは難聴を (Nat Genet, 1997) マウスでは難聴および内リンパ液の酸性化と過剰を示す (Am J Physiol, 2007)。特に内リンパ液の過剰は、ヒトのメニエール病に観察される表現系に類似している。また、内耳に発現する Na^+, HCO_3^- 共輸送体 NBC3 の欠損マウスは難聴を示す (Nat Genet, 2003)。以上のように、内耳の pH 制御性輸送タンパク質の分子プロファイルは、少しずつ蓄積されてきてはいるが、他の臓器に比べ、器官レベルにおける pH 制御系の理解は大きく遅れている。中でも、上述した通り、最も呼吸酸の処理を要すると考えられる蝸牛血管条の

pH 制御系については、pH 制御性イオン輸送体の発現の報告がわずかにある程度で、その大部分が謎であるというのが現状である。

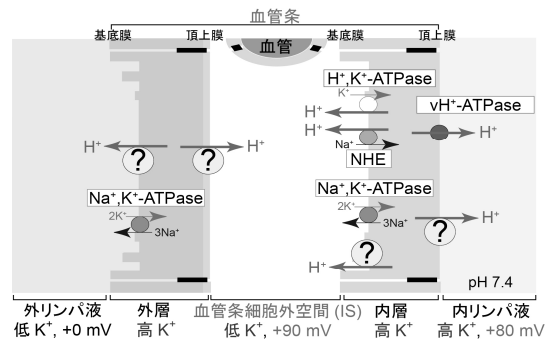


図 2: 血管条の構造と pH 制御性輸送体
②: 未知の pH 制御性輸送体

2. 研究の目的

本研究では、内リンパ液環境の維持に不可欠な蝸牛の「血管条」(図 1、2) に焦点を当てる。内耳血管条では、複数種の炭酸脱水酵素をはじめとして、細胞内の酸塩基平衡に関わるタンパク質は幾つか重要なものが同定されているが、形質膜に分布する pH 制御性輸送タンパク質は十分に見出されていない。そこで、この上皮組織の膜分画を対象に質量分析し、網羅的に得られたタンパク質群から、データベースを活用して蝸牛で重要と想定される pH 制御性膜タンパク質を抽出する。並行して、内外リンパ液 pH の in vivo 測定系を確立し、将来、内リンパ液の酸塩基平衡に寄与する輸送タンパク質解明の基盤を立ち上げる。

3. 研究の方法

(1) 血管条膜タンパク質の網羅的解析

7 週齢オス BN/SsNSIc ラットより単離した血管条から精製した膜画分に対して LC-MS/MS 解析した。

(2) In vivo イオン電極法を用いた電位・pH 同時測定法の確立

麻酔下のマウス蝸牛骨壁に電極挿入用の孔(径: 0.4 μ m)を作成し、電位と pH を同時測定するための 2 連管イオン電極を刺入した。その後、シルガードで孔を覆い、外リンパ液からの CO_2 の揮発(pH 上昇)を防いだ。約 30 分で外リンパ pH は安定した。外リンパ pH 測定後、電極先端を内リンパ腔へと刺入し、内リンパ液 pH と電位を同時測定した。

4. 研究成果

(1) 血管条膜タンパク質の網羅的解析

血管条「膜」画分の質量分析により、原形質膜タンパク質を 513 種類同定した。このうち 20 種類の pH 制御性タンパク質 (H^+ transporter, 15 種; HCO_3^- transporter, 5 種) を見出した。

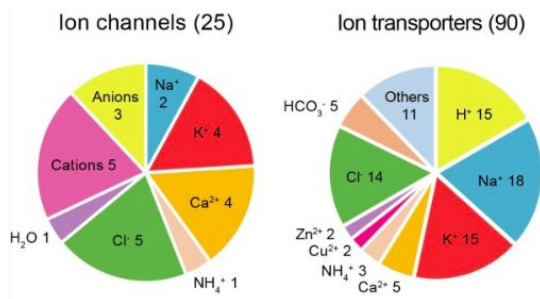


図 3: プロテオミクス解析により同定されたイオン輸送タンパク質プロファイル

(2) In vivo イオン電極法を用いた電位・pH 同時測定法の確立

生後 20 日のマウスの外リンパ液 pH は 7.37 ± 0.03 であった。その後、内リンパ空に向けて電極を刺入し、内リンパ液高電位(EP)を検出した。EP は $+86.6 \pm 5.1$ mV であり、聴覚に重要な正の高電位を示した。この時、同時測定した内リンパ液 pH は 7.55 ± 0.02 であり、内リンパ液 pH は外リンパ液 pH よりアルカリ化していることを見出した。

今後、質量分析より見出した血管条 pH 制御候補分子の阻害剤の効果を in vivo で検討し、内耳蝸牛の酸塩基平衡に関わる分子を明らかにする予定である。

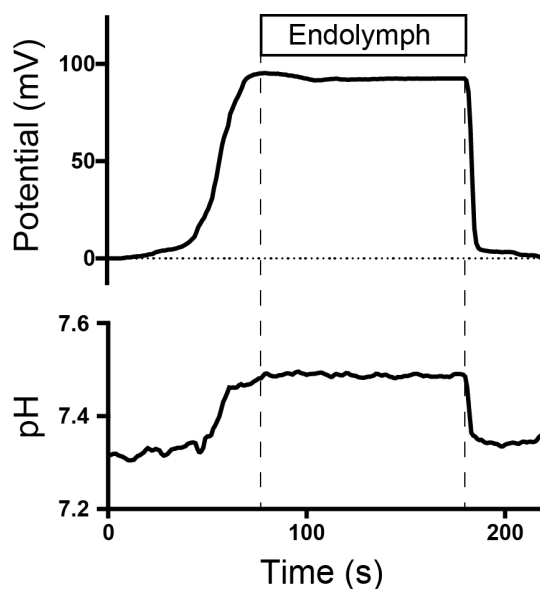


図 4: In vivo 電気生理実験結果。上図は電位計測結果を、下図は同時測定した pH 計測結果を示す。

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)

[学会発表](計 7 件)

(1) 佐藤 満雄、樋口 大河、任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、堀 かりん、上塚 学、竹林 浩秀、土井 勝美、田中 謙二、日

比野 浩 光遺伝学を駆使した難聴モデルマウスの作成 口頭発表:第 17 回 応用薬理シンポジウム 平成 27 年 9 月 4 日(金)~5 日(土) 発表 4 日(金) 「新潟大学医学部 有壬記念館(新潟県・新潟市)」

(2) 樋口 大河、清水 貴浩、藤井 拓人、Nilius Bernd、酒井 秀紀 PKD2L1 カチオンチャネル調節機構の分子構造基盤 口頭発表:第 17 回 応用薬理シンポジウム 平成 27 年 9 月 4 日(金)~5 日(土)発表 4 日(金) 「新潟大学医学部 有壬記念館(新潟県・新潟市)」

(3) Mitsuo P Sato, Fumiaki Nin, Taiga Higuchi, Satoru Uetsuka, Takamasa Yoshida, Shizuo Komune, Hidenori Inohara, Katsumi Doi, Hirohide Takebayashi, Kenji Tanaka, Hiroshi Hibino. Transient induction of deafness by optogenesis targeting the endocochlear potential in the inner ear. Poster presentation: Inner ear biology 2015. September 12 – 15. 「Roma (Italy)」

(4) 佐藤 満雄、樋口 大河、任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、堀 かりん、上塚 学、増田 正次、渡部 高久、神崎 晶、小川 郁、土井 勝美、田中 謙二、日比野 浩 光遺伝学を駆使した難聴モデルマウスの作成 口頭発表:第 62 回中部日本生理学会 平成 27 年 11 月 13 日(金)~14 日(土) 発表 14 日(土) 「富山大学五福キャンパス(富山県・富山市)」

(5) Mitsuo P Sato, Fumiaki Nin, Taiga Higuchi, Satoru Uetsuka, Takamasa Yoshida, Masatsugu Masuda, Takahisa Watabw, Sho Kanzaki, Kaoru Ogawa, Katsumi Doi, Hirohide Takebayashi, Kenji Tanaka, Hiroshi Hibino. Transient induction of deafness by optogenesis targeting the endocochlear potential in the inner ear. Oral presentation: Association for Research in Otolaryngology 39th MidWinter Meeting. February 20 – 24. 「San Diego, California (USA)」

(6) 佐藤 満雄、樋口 大河、任 書晃、吉田 崇正、上塚 学、土井 勝美、田中 謙二、日比野 浩 内耳血管条を標的とした光遺伝学による可逆性難聴の誘導 口頭発表:第 89 回日本薬理学会年会 平成 28 年 3 月 9 日(水)~11 日(金) 発表 9 日(水) 「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

(7) Mitsuo P Sato, Fumiaki Nin, Taiga Higuchi, Satoru Uetsuka, Takamasa Yoshida, Katsumi Doi, Hirohide Takebayashi, Kenji Tanaka, Hiroshi Hibino. Creation of novel model mice for reversible sensorineural

hearing loss with optogenetics. 口頭発表:
第 93 回日本生理学会大会 平成 28 年 3
月 22 日(火)~24 日(木) 発表 22 日(火)
「札幌コンベンションセンター(北海
道・札幌市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 大河 (HIGUCHI, Taiga)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 60757532

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

日比野 浩 (HIBINO, Hiroshi)
永森 收志 (NAGAMORI, Shushi)
上塚 学 (UETSUKA, Satoru)
任 書晃 (NIN, Fumiaki)
緒方 元気 (OGATA, Genki)