

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19531

研究課題名（和文）メカノバイオロジーの進展に向けた新しいメカノセンサー分子の同定と機能解析

研究課題名（英文）Attempts to identify a novel mechanosensory channel toward future advances in mechanobiology

研究代表者

鶴川 眞也（Ugawa, Shinya）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授

研究者番号：20326135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：われわれは、マウス蝸牛有毛細胞に発現する新規メカノセンサー候補ASIC-Xの解析に着手した。電気生理学的に検討したところ、ASIC-Xのリーク電流は、強い水流刺激によって増大したが、浸透圧刺激には応答しなかった。また、ASIC-Xを強制発現させた細胞に直接、機械刺激を加えたが、チャネル活性は増強しなかった。ノックアウトマウスを作出し、蝸牛有毛細胞の機械刺激電流を測定したが、特に異常は認められなかった。その一方で、ASIC-Xはナトリウムイオンに選択性を示すことが明らかとなり、メカノセンサーとしてではなく、リーク型ナトリウムチャネルとして何らかの生理機能を果たしていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

萌芽期にあるメカノバイオロジーの進展にとって、新規メカノセンサー分子の同定は喫緊の課題である。われわれは、聴覚刺激を受容する機械刺激電気変換チャネルの遺伝子を探索する過程で、新規メカノセンサー候補ASIC-Xを同定したので、そのメカノセンサーとしての特性を調べた。ASIC-X研究のメカノバイオロジー分野への貢献と聴覚受容体遺伝子の単離の両者に結びつく可能性があったからである。しかし、われわれが調べた範囲では、ASIC-Xは機械刺激感受性を示さず、メカノセンサー分子とは言えなかった。ただし、ASIC-Xはリーク型のナトリウムチャネルであることが明らかとなり、新たな重要研究課題の発見に繋がった。

研究成果の概要（英文）：We identified a putative mechanosensory channel ASIC-X in mouse auditory hair cells, and explored its channel properties using a combination of electrophysiology and ratio-imaging techniques with fura-2 and SBFI. Although the leakage currents of heterologously expressed ASIC-X were augmented by strong shear stress, neither hypotonicity nor direct stretching of plasma membrane enhanced the currents. Mechanoelectrical transduction (MET) currents in outer hair cells (OHCs) of ASIC-X knockout mice did not significantly change in the amplitude, compared to MET currents in wild-type OHCs, which is in good agreement with the in vitro data. However, our investigations revealed that the ASIC-X channel was selective to sodium ions. Therefore, ASIC-X is most likely to function as a sodium leak channel in vivo rather than as a mechanosensitive molecule. The tissue distribution of the channel should be clarified in detail next.

研究分野：神経科学

キーワード：メカノバイオロジー メカノセンサー イオンチャネル ASIC マウス 内耳 有毛細胞 消化管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メカノバイオロジーとは、「ちから」(機械刺激)に対する細胞の応答メカニズムを解明し、医工学などへの応用をめざす新しい複合研究領域である。日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究開発支援事業の一つとしても取り上げられ、まさに萌芽期にある研究領域と言える。われわれは、哺乳類メカノセンサーの有力候補であり、主に神経系に発現する酸感受性イオンチャンネル(ASIC: acid-sensing ion channel)(1a、1b、2a、2b、3、4のサブタイプが知られている)の研究に従事してきた。特に、内耳の有毛細胞において聴覚・平衡覚の受容チャンネル(METチャンネル)として機能していることを想定し、多方面から検討を加えてきた。その結果、ASIC1bとわれわれが同定したASIC-X(塩基配列などの遺伝子情報は未登録)とが複合体としてMETチャンネルを構成している可能性が浮上した。電気生理学的解析では、強制発現させたASIC1bに機械刺激を加えても電流は惹起されないが、ASIC-Xは普段から開いているリークチャンネルであり、その電流量は必ず応力(水流刺激)で増大することがわかった。同時に、ASIC-Xの全身での分布を検討したところ、心臓、消化管壁など、常時、機械刺激に曝されている組織・器官に発現しており、ASIC-Xは有毛細胞以外でもメカノセンサーとして機能していると考えられた。われわれは、これらの知見に基づき、ASIC-Xはメカノバイオロジーの中心課題になり得るものであり、メカノバイオロジーの発展のためにも、ASIC-X研究を全身の広い範囲で展開させなければならないと考えた。

2. 研究の目的

(1)本研究のねらいは、ASIC-X研究がメカノバイオロジーの発展のために必要不可欠であることを内外に示すことにあった。そのためには、ASIC-Xのメカノセンサーとしての機能を、in vitroとin vivoの両方で証明する必要があった。in vivoでの解析には、これまでの経緯もあり、代表的な機械刺激受容細胞である有毛細胞がその対象として最適と考えられた。また、研究を内耳以外で展開させるために、新たな解析対象(細胞・組織・器官)をスクリーニングすることも重要であった。これらの理由により、具体的な研究目標を下記の3項目に大別した。

強制発現系を用いたASIC-Xの機能解析

ASIC-X分子自体が機械刺激に感受性を示すことをin vitroで証明する。ASIC-Xにメカノセンサーとしての特性が備わっていることを明らかにする必要があり、そのための研究である。

有毛細胞に発現するASIC-Xの機能解析

ASIC-X分子がメカノセンサーとしての特性を備えていたとしても、実際に生体内で働いていなければメカノセンサーとは呼べない。逆に言えば、ASIC-Xのメカノセンサーとしての役割をin vivoで証明しない限り、メカノセンサーとは呼べない。内耳の有毛細胞は、メカノセンサー機能をもつ代表的な細胞であるので、有毛細胞を実験対象として、in vivoでの証明を試みた。

全身に分布するASIC-X陽性細胞の同定

今後、ASIC-X研究を進展させて行くためには、全身のどの細胞にASIC-Xが発現しているのかについて、予め調べておいた方がよい。そのための研究である。

(2)本研究には、挑戦的研究として、以下に記す三つの意義・可能性が認められた。

①本研究は、日本医療研究開発機構(AMED)の革新的先端研究開発支援事業「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療機器及び医療技術の創出」の「期待される研究提案のイメージ」に挙げられていた「新規な物理的センサー(力、熱、電場、磁場)の分子同定、作動機序の解明」に該当するものであり、まさに挑戦すべき課題であった。萌芽期にあるメカノバイオロジーの進展にとって、新規メカノセンサー分子の同定は欠かせないものであるが、その遺伝子発現が一部の組織・器官に限局している限り、大規模な展開は望みにくい。ASIC-Xは全身に広く分布しており、この点からも、本研究は挑戦すべき課題と思われた。

②分子遺伝学等の進展に伴い、視覚・嗅覚・触覚・痛覚など、ほとんどの感覚受容体遺伝子が同定され、残るは聴覚・平衡覚のMETチャンネル遺伝子のみとなった。ASIC1bはMETチャンネルを構成するサブユニットの一つと思われるが、ASIC1bが機械刺激で開閉されるという直接的な証拠はない。本研究で、メカノセンサーASIC-XとそのサブユニットASIC1bとの(感覚毛における)複合体形成を証明すれば、待望の「世界初」哺乳類METチャンネル遺伝子の同定として報告・発信できると予想された。

③歴史的に、哺乳類メカノセンサーの候補として同定されたASICであるが、既知のサブタイプを培養細胞等に発現させても機械刺激には応答しないことから、機械刺激の受容ではなく、他の分子が機械刺激を受容した後のシグナリングに関与すると考えられつつある。本研究において、メカノセンサーASICという概念を再構築することで、医学・生物学の分野に大きな足跡を残すことが予想された。

3. 研究の方法

研究目的の ～ に従い、三つに分けて記載した。

「強制発現系を用いた ASIC-X の機能解析」に関するもの

(a) 二電極膜電位固定法を用いた ASIC-X の電気生理学的解析

アフリカツメガエル卵母細胞に ASIC-X を発現させ、リーク電流の多価陽イオン (Zn^{2+} と Gd^{3+})、アミロライド (ASIC の阻害剤) に対する薬剤感受性 (IC_{50}) を調べた。また、電流-電圧曲線を作成し、イオン選択性を調べた。浸透圧変化、ずり応力、圧迫刺激 (ガラス棒で押す) を加え、機械刺激感受性を調べた。

(b) 直接伸展刺激による ASIC-X 活性の増強

CHO-K1 細胞に ASIC-X を強制発現させ、フィブロネクチンでコートした厚さ 0.1 mm のシリコン膜上で培養した。次に、Fura-2 (蛍光 Ca^{2+} 指示薬)、SBFI (蛍光 Na^+ 指示薬) を細胞内へ導入し、シリコン膜を伸展させ、この細胞伸展刺激により増大すると予想される ASIC-X 電流 (蛍光強度) を、顕微鏡下で観察した。

「有毛細胞に発現する ASIC-X の機能解析」に関するもの

(a) ノックインマウスを用いた有毛細胞における細胞内局在の解析

ASIC-X ノックイン (KI) マウス (野生型 ASIC-X を ASIC-X とタグ配列 AU1-3xFLAG-AU1 との融合蛋白質で置換) を作出し、抗 AU1 抗体を用いて細胞内局在を調べた。

(b) 免疫沈降法を用いた in vivo 複合体形成の証明

ASIC-X KI マウスと作出済みの ASIC1b KI マウス (ASIC1b-HA タグ-mTagBFP2 (青色蛍光蛋白質)-HA タグ) とを交配させ、ダブル KI マウスを獲得した。得られた個体から、有毛細胞を含んだ感覚上皮を集め、蛋白質を抽出し、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行った。

(c) 聴覚検査

聴覚への関与を調べるため、ASIC-X KO マウスを対象に、聴性脳幹反応 (ABR) 検査を行った。さらに、外有毛細胞の機能を評価するため、歪成分耳音響放射 (DPOAE) を測定した。

(e) 平衡機能検査

平衡覚への関与を調べるため、ASIC-X KO マウスを対象に、前庭動眼反射 (VOR) 検査を行った。新たに開発したバイオメディカ製のマウス用 VOR 記録解析システムを使用した。

(f) 外有毛細胞における機械刺激電流の測定

ASIC-X KO マウスの外有毛細胞を対象に、機械刺激電流のパッチクランプ測定を行った。圧電素子を利用して、周期的に前後するジェット水流を作り、これを当てることで感覚毛を屈曲させた。有毛細胞の成熟度を評価するため、電位依存性カリウム電流の記録も行った。

「全身に分布する ASIC-X 陽性細胞の同定」に関するもの

(a) レポーターマウスを用いた ASIC-X 陽性細胞の検出

ASIC-X レポーターマウス (ASIC-X プロモーターの下流にベータガラクトシダーゼの遺伝子を導入) を作出し、ベータガラクトシダーゼ産生による発色反応、抗ベータガラクトシダーゼ抗体を用いた免疫染色にて ASIC-X を発現する細胞 (ASIC-X 陽性細胞) の同定を試みた。

(b) ノックインマウスを用いた全身における細胞内局在の解析

同定した ASIC-X 陽性細胞において、ASIC-X KI マウスを用いて、細胞内局在を調べた。

4. 研究成果

上記の研究方法の分類に準じて、結果を記載した。

「強制発現系を用いた ASIC-X の機能解析」に関するもの

(a) 二電極膜電位固定法を用いた ASIC-X の電気生理学的解析

ASIC-X のリーク電流に対する Zn^{2+} 、 Gd^{3+} 、アミロライドの IC_{50} 値は、アフリカツメガエルの系では、それぞれ、約 20、200、120 μM であった。また、電流-電圧曲線を作成したところ、逆転電位は約 25 mV であり、ASIC-X はナトリウムチャンネルであることがわかった。浸透圧変化に対する応答を調べたが、生理的に起こりうる変化の範囲内では、明らかな電流量の増減は認められなかった。ずり応力 (水流) に対しては、電流量の増大が認められたが、10 dyne 毎平方センチメートル以上の力が必要であり、血流での値に近い数 dyne 毎平方センチメートルでは、明らかな変化は認められなかった。細胞への直接圧迫刺激でも、明らかな応答はみられなかった。

(b) 直接伸展刺激による ASIC-X 活性の増強

Fura-2、SBFI を、ASIC-X を発現した CHO-K1 細胞内へ導入し、伸展刺激を加えたが、蛍光強度の明らかな上昇は観察されなかった。機械刺激感受性の TRPV4 を使って同様の実験を行った場

合は、いずれの色素でも蛍光強度の増強が観察されたことから、実験系自体は正常に稼働していたと考えられた。

「有毛細胞に発現する ASIC-X の機能解析」に関するもの

(a) ノックインマウスを用いた有毛細胞における細胞内局在の解析

ASIC-X ノックイン (KI) マウスの作出に成功した。Western blot 法を使って抗 AU1 抗体の特異性を確かめた後、KI マウスの内・外有毛細胞を染色した。その結果、いずれの細胞とも、細胞質全体が薄く染まっている像が得られた。ASIC-X が、感覚毛の先端あるいは基部 (感覚毛とクチュラ板との交差部位) に局在しているような画像は得られなかった。

(b) 免疫沈降法を用いた *in vivo* 複合体形成の証明

ASIC-X/ASIC1b ダブル KI マウスの蝸牛から通常の方法で蛋白質を抽出し、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、沈降物の中に ASIC-X が含まれていることがわかった。

(c) 聴覚検査

ASIC-X KO マウスを対象に、聴性脳幹反応 (ABR) 検査と歪成分耳音響放射 (DPOAE) 測定を行ったが、野生型マウスとの差異は認められず、聴力は正常であると考えられた。

(d) 平衡機能検査

前庭動眼反射 (VOR) を調べたが、野生型マウスとの差異は認められなかった。

(d) 外有毛細胞における機械刺激電流の測定

ASIC-X KO マウスの外有毛細胞を対象に、機械刺激電流 (MET チャネル電流) のパッチクランプ測定を行ったが、電流値の減少は認められなかった。また、有毛細胞の成熟に伴って発現パターンの変化する電位依存性カリウム電流も測定したが、野生型マウスとの間で大きな違いは認められず、ASIC-X KO マウスの外有毛細胞は正常に成長していると考えられた。

「全身に分布する ASIC-X 陽性細胞の同定」に関するもの

(a) レポーターマウスを用いた ASIC-X 陽性細胞の検出

ASIC-X レポーターマウスのベータガラクトシダーゼ産生による発色反応を利用して、ASIC-X 陽性細胞の分布を調べたところ、消化管の壁内神経叢でその反応を認めた。抗ベータガラクトシダーゼ抗体を用いて免疫染色を行ったところ、発色反応の場合と同様に、消化管の壁内神経叢に免疫陽性反応を認めた。そこで、神経細胞のマーカーである NeuN との共存を調べたところ、全ての ASIC-X 陽性細胞が NeuN 陽性であった。その他、副腎髄質のクロム親和性細胞、心臓の刺激伝導系にある一部の細胞も、ASIC-X 陽性、NeuN 陽性であった。

(b) ノックインマウスを用いた全身における細胞内局在の解析

(a) の結果と一致して、消化管の壁内神経叢の細胞 (神経節細胞と思われる) と副腎髄質クロム親和性細胞が免疫反応陽性であり、いずれの細胞でも、細胞膜のみならず、細胞質全体に陽性反応が観察された。

5. 総括

本研究課題において、ASIC-X 分子のメカノセンサーとしての特性を、*in vitro* 発現系と生理学的手法とを組み合わせることで明らかにすることを試みた。しかし、生理的にはあり得ない極端な高浸透圧刺激あるいは低浸透圧刺激でのみ電流量に変化が生じただけで (未発表データ) ASIC-X がメカノセンサー分子としての基準を満たしているとは言えなかった。また、内耳有毛細胞では、ASIC-X が MET チャネルのサブユニットとして機能していることも想定されたが、*in vitro* 解析の結果と一致するかのように、ASIC-X KO マウスの MET 電流に異常は認められなかった。

一方で、ASIC-X のチャネル特性に関して、ASIC-X はリーク型のナトリウムチャネルであるという非常に有益なデータが得られた。形態学的解析を行い、ASIC-X は消化管壁内神経叢の神経節細胞に発現していることがわかったが、予備段階の実験において、ASIC-X KO マウスの消化管蠕動運動に異常が認められたことから (未発表データ) ASIC-X は生体内で何らかの重要な役割を果たしていることは間違いないと考えられる。ASIC-X は、蛋白質レベルで、蝸牛有毛細胞、副腎髄質クロム親和性細胞にも発現しているため、それぞれにおける ASIC-X の生理機能について、今後、詳細な解析を行う必要がある。

本研究の主目的は、ASIC-X のメカノセンサーとしての機能を証明し、メカノバイオロジーの分野に新しい研究の柱を打ち立てることであったが、予期に反して、ASIC-X は機械刺激非感受性のナトリウムチャネルであることが明らかになった。そのこともあって、与えられた研究期間内に原著論文を作成することはできなかったが、ナトリウムチャネル ASIC-X の機能解析という新たな研究課題を提示することができた。そういう点で、挑戦的研究としての役割は十分に果たしたと考えられる。今後の展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田泰宏、星川真理子、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 マウス前庭系におけるASIC1bの発現と分布
3. 学会等名 第18回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浸透圧センサーとしてのASIC-Xの可能性
2. 発表標題 柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
3. 学会等名 第19回ORIGIN神経科学研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴田 泰宏 (Shibata Yasuhiro) (10534745)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	島田 昌一 (Shimada Shoichi) (20216063)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	熊本 奈都子 (Kumamoto Natsuko) (30467584)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究 分 担 者	植田 高史 (Ueda Takashi) (90244540)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	