

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19390438
 研究課題名 (和文) 内耳有毛細胞に存在する新規機械電気変換イオンチャネルの単離と機能解析
 研究課題名 (英文) Isolation and functional expression of novel putative mechano-electrical transduction channels in cochlear hair cells
 研究代表者
 鶴川 真也 (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

研究成果の概要 (和文)：酸感受性イオンチャネル ASIC1b ノックアウトマウスを作製し、聴力検査を行ったところ、聴性脳幹反応検査で軽度から中等度の異常を示した。また、外有毛細胞の機械刺激電流も有意に減少していた。

研究成果の概要 (英文)： ASIC1b knockout (-/-) mice exhibited significantly elevated ABR (auditory brainstem response) thresholds in the presence of typical inner ear histology. Mechano-electrical transducer currents were slightly reduced in the outer hair cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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、機械刺激電気変換チャネル、有毛細胞

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛有毛細胞の感覚毛には機械的に開閉されるイオンチャネル (MET チャネル) が存在し、このチャネルが機械刺激 (感覚毛の屈曲) を電気信号に変換する役割を担っているが、その分子実体は不明である。我々は、哺乳類 MET チャネルのアミロライドに対する親和性が線虫機械刺激受容チャネルの哺乳類ホモログである酸感受性イオンチャネル ASIC (acid-sensing ion channel) のも

のと極めて類似していることに着目し、ASIC 遺伝子ファミリーのサブタイプの一つである ASIC1b が蝸牛有毛細胞の感覚毛に発現していることを見出した。そこで、ASIC1b ノックアウトマウスを作製し、ABR (聴性脳幹反応) を調べたところ、低周波数領域において難聴が生じていた (8 KHz において 40 dB の難聴が見られた)。さらに、DPOAE (歪成分耳音響放射検査) にて外有毛細胞の機能を検査したところ、両側性に重度の機能不全を起こ

していることが判明した。また、5' -RACE 法を用いて ASIC1a・ASIC1b とは異なった N 末端配列をコードしていると思われる遺伝子断片（新規 ASIC1 スプライスバリエント）を内耳から単離した。この遺伝子全長のクローニングを行い、ASIC1b との関連性も含めて、これら遺伝子の聴覚受容における役割について研究を開始した。

2. 研究の目的

生物種を問わず内耳有毛細胞に発現する MET チャンネルの分子実体は長い間不明であった。2003 年になって zebrafish の聴覚受容器官から *nompC* が単離され、MET チャンネルの有力な候補遺伝子であることが報告された。哺乳類における MET チャンネル遺伝子に関しては、2004 年に TRP 遺伝子ファミリーのメンバーである TRPA1 が有力な候補として Nature 誌に報告されたが、ノックアウトマウスの聴力にも異常が見られなかった。我々が作製した ASIC1b ノックアウトマウスには聴力障害が認められることから、ASIC1b は聴覚受容に直接関与し、かつ感覚毛に発現する唯一の同定済みチャンネル分子である。本課題において内耳 ASIC1b に関する研究の更なる発展を目指した。

3. 研究の方法

ASIC1b ノックアウトマウスの聴力に関するデータ (ABR・DPOAE) を得る。ノックアウトマウス有毛細胞を用いて、感覚毛の屈曲時に発生する電流 (MET 電流) をパッチクランプ法により記録する。分子生物学的手法を駆使して、新たな MET チャンネル候補分子の単離を行う。

4. 研究成果

聴覚受容体候補遺伝子としてアミロライド感受性チャンネルの一つである酸感受性イオンチャンネル ASIC1b を同定した。ASIC1b は、内・外、両有毛細胞の感覚毛基部に発現していた。ノックアウトマウスを作製し、その聴力を調べたところ、4, 8, 12 週齢において、8, 16, 32 kHz のトーンピップ音に対し、お

よそ 10~20 dB の閾値上昇が認められ、ASIC1b ノックアウトマウスには軽度から中等度の難聴が生じていることがわかった。さらに DPOAE (歪成分耳音響放射) 検査を用いて外有毛細胞の機械刺激受容能を評価したところ、僅かではあるが野生型に比べ有意に低下していた。これらの事実は、ASIC1b が有毛細胞において機械刺激受容に関与していることを強く示唆するものである。以上の結果は、「聴覚受容体チャンネルは感覚毛の先端付近に位置する」という生理学的仮説と相反するものであり、関連学会や研究者の対応も冷ややかで、学術雑誌への投稿もままならないが、彼らは、線虫機械刺激受容チャンネルの哺乳類ホモログである ASIC1b が感覚毛基部に位置することは解剖学的事実であり、仮説ではないことをはっきりと認識しなければならない。

パッチクランプ法を用いて有毛細胞の機械刺激電流 (MET 電流) を測定したところ、ノックアウトマウス有毛細胞の MET 電流は野生型のものに比べ有意に減少していた。さらに、MET 電流の惹起に ASIC1b がどの程度、直接関与しているのかを評価するため、野生型マウス有毛細胞の MET 電流を ASIC1b の特異的阻害剤であるフサン存在下で記録したところ、約 20% の電流値減少が見られた。このことは、MET 電流の発生に少なくとも ASIC1b が寄与しているという我々の仮説を強く支持するものであり、同時に他の遺伝子も機械刺激受容に関与していることを暗示している。また、ノックアウトマウス、ヘテロマウス、野生型マウス有毛細胞の酸性溶液に対する応答を調べたところ、ヘテロおよび野生型マウスの内・外、両有毛細胞において、酸 (pH 5.0) 刺激により一過性のナトリウム電流が惹起され、この反応は ASIC の阻害剤アミロライドによって完全に抑制された。一方、ノックアウトマウスの有毛細胞においては、水素イオンに対する有意な応答は認められなかった。これらの結果は、ASIC1b チャンネルを取り巻く内リンパ環境の酸性度 (正常は pH 7.5) が、有毛細胞の正常な機能発現にとって重要であることを示すものである。また、電位依存性電流 (basolateral current) についても解析したが、各遺伝子型間で違いは

認められなかった。このことから、ノックアウトマウスにおける難聴の原因として第一義的に ASIC1b の欠損が挙げられ、遺伝子改変に伴う副次的なものではないと言える。

上記一連の結果は、ASIC1b が聴覚受容体遺伝子であることを証明するものであり、世界初の哺乳類聴覚受容体分子の報告となるべきものであるが、既存の概念と異なる点が多く、なかなか受け入れられないことが痛恨の極みである(発現系を用いて、ASIC1b を直接、機械刺激により活性化することができれば、完全な証明になるが、世界的に見ても誰も成功していない)。

上記実験と並行して、他の機械刺激受容チャネルを単離するため、新たに作製したマウス蝸牛 cDNA ライブラリーのランダムシーケンスを開始した。約 120 個の遺伝子配列を調べたところ、約 1/4 がデータベースに登録されていない遺伝子であった。しばらくこの作業を続け、cDNA ライブラリーの特性を評価した後、ホモロジースクリーニングも組み合わせ、本格的な遺伝子探索作業を開始する予定である。

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)

- ① Hypotonic stimuli enhance proton-gated currents of acid-sensing ion channel-1b. Ugawa S, Ishida Y, Ueda T, Yu Y, Shimada S. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Mar 14;367(3):530-4. 査読有り.
- ② Nafamostat mesilate reversibly blocks acid-sensing ion channel currents. Ugawa S, Ishida Y, Ueda T, Inoue K, Nagao M, Shimada S. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Nov 9;363(1):203-8. 査読有り.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 鶴川真也. マウス蝸牛有毛細胞感覚毛に発現する酸感受性イオンチャネル ASIC1b の機能解析. 第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 2011 年 3 月誌上開催(横浜). (震災のため)
- ② 鶴川真也. 蝸牛有毛細胞に存在する機械刺激電気変換イオンチャネル候補遺伝子の同定. 第 115 回日本解剖学会総会. 2010 年 3 月 28-30 日(盛岡).
- ③ 鶴川真也. 内耳蝸牛有毛細胞に存在する機械電気変換イオンチャネル候補遺伝子の同定. 自然科学研究機構生理学研究「バイオ分子センサー連携研究プロジェクト」レクチャーコース. 2008 年 10 月 6-7 日(岡崎).
- ④ 鶴川真也, 石田雄介, 植田高史, 山田貴博, 梶田健二, 佐久間英輔, 島田昌一. 内耳蝸牛に発現する酸感受性イオンチャネル ASIC1b の聴力における役割. 第 68 回日本解剖学会中部支部会. 2008 年 10 月 11-12 日(名古屋).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴川 真也 (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

(2) 研究分担者

島田 昌一 (SHIMADA SHOICHI)

大阪大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20216063
(2009 年度まで研究分担者)

植田 高史 (UEDA TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90244540

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

石田 雄介 (ISHIDA YUSUKE)
大阪大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30381809
(2009年度まで研究分担者)

梶田 健二 (KAJITA KENJI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・
研究員
研究者番号：80381820

(3)連携研究者

島田 昌一 (SHIMADA SHOICHI)
大阪大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20216063
(2010年度のみ)

石田 雄介 (ISHIDA YUSUKE)
大阪大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：30381809
(2010年度のみ)