

平成21年5月14日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591953
 研究課題名（和文） 有毛細胞の音受容に関与するアクチン関連蛋白と遺伝性難聴 DFNA20/26 の研究
 研究課題名（英文） Actin related proteins in the mechano-electrical transduction of the hair cells and hereditary hearing loss DFNA20/26.
 研究代表者
 香取 幸夫（KATORI YUKIO）
 東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師
 研究者番号：20261620

研究成果の概要：

モルモット蝸牛試料を界面活性剤で脱膜処理後に細胞質可溶性成分を除外して電界放射型走査電子顕微鏡により観察し、従来に無い広い範囲での不動毛細胞骨格の超微細構造の観察を可能にした。音受容に関係する有毛細胞不動毛のアクチンおよび関連蛋白分子の三次元的配列を明らかにした。加えて細胞外カルシウム濃度によるそれらの構造の変化を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経科学、細胞組織、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

内耳有毛細胞は聴覚・平衡覚の振動受容器であり、細胞頂面に備わる不動毛束の変異により非選択的陽イオンチャンネルの開閉頻度が変化して電氣的に興奮することが知られている。不動毛間を架橋する紐状の細胞外基質（tip link）がこの機械電気変換チャンネルの開閉の頻度に関与することが示唆されている。研究代表者の香取は1990年代より研究協力者

のFurness博士（英国 Keele 大学）のグループとともに有毛細胞の細胞外基質の形態に関する研究を続けており、不動毛間の架橋構造がケラタン硫酸に被覆されていることをはじめとする新知見を発表してきた（1996 Cell Tissue Res, 1996 J Electorn Microsc, 1998 Hear Res, 2005 Hear Res）。しかしながら、tip link の構造と不動毛の細胞骨格であるアクチン蛋

白との繫留関係は未だ明らかにされておらず、これらの構造関係を解明することは内耳における聴覚受容のしくみの一端を明らかにするとともに、2000年代になって同定されたアクチンの遺伝子異常と関与する難聴 DFNA20/26 の病態解明の一助となることが期待され、本研究を企画することになった。

2. 研究の目的

蝸牛における音受容機構ならびにアクチン分子の異常にともなう遺伝性難聴の解明の一助とするため、蝸牛有毛細胞の不動毛間架橋構造である tip link と不動毛の細胞骨格であるアクチン細糸の結合を高解像の電界放射型走査電子顕微鏡を用いて明らかにする。数ナノメートルの細さである tip link を広い範囲で同一試料から数十本以上の単位で測定することは従来不可能であり、安定した観察法を確立する。その上で、有毛細胞による音受容すなわち機械電気変換機能は細胞外カルシウム濃度に依存することが知られていることから、カルシウム濃度の変化による tip link の形状変化について検討する。

また種々のアクチン関連蛋白に対する抗体を用いた免疫組織化学を行い、アクチン分子と細胞外架橋構造を仲立ちする蛋白を同定する。

3. 研究の方法

モルモットおよびマウス蝸牛の有毛細胞を含むコルチ器感覚上皮をマイクロダイセクション技術により採取した。採取した組織に対して無処理ないし 0.01% から 2.5% の界面活性剤 Triton-X による細胞膜脱膜処理を行い、アクチンを含む細胞骨格と

tip-link の構造がより良く保存される条件を検討し、さらに両者の連結部位の形態学的特徴に関して、数ナノメートルの単位の起伏が数ミリの大きさの試料において連続して観察可能な電界放射型走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察した。Tip-link ならびに周囲構造の形態計測に際しては、半永久的に形態保存が可能なエポキシ樹脂に試料を包埋して不動毛の配列に沿った超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡を用いて測定を行った。

細胞外カルシウム濃度（生体内の外リンパ液の組成と一致した人工外リンパ緩衝液では約 2 mM）を 1 mM、50 μ M、1 μ M と変化させた試料を用いて各々のカルシウム濃度と tip-link の長さおよび観察時に保存されている割合について検討を加えた。

Ezrin, paxillin, focal adhesion kinase, prestin といったアクチン関連蛋白に関する免疫組織化学を行い、有毛細胞不動毛におけるこれらの蛋白の有無、局在について検討を行った。

4. 研究成果

0.25% triton-X を含むパラホルムアルデヒド固定液を用いて有毛細胞を処理することで、従来の観察法ではなし得なかった組織上の広い範囲で、細胞膜を除去した不動毛のアクチン細糸と tip-link を同時観察することを可能とした。（図 1）

アクチン細糸上には約 50 ナノメートル径の板上構造が tip-link 付着部に一致して認められた。この構造は過去の研究代表者らの報告でも散発的に観察されていたが、同一組織の広い範囲で規則的に観察されたのは本報告が初めてであり、試料処理中の人口産物ではなく、tip-link の繫留に関与していることが示唆された。

電界放射型走査電子顕微鏡の観察で認められた上述の所見は、樹脂包埋した資料を透過型電子顕微鏡で確認した像でも認められ、形態測定を行うことが可能であった。(図2)

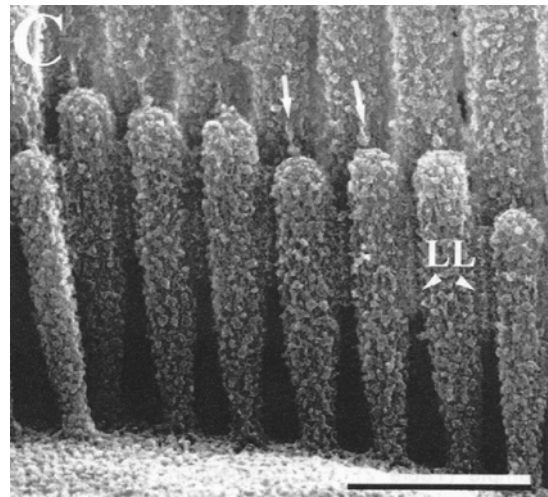
エポキシ樹脂包埋された tip-link の長さは有毛細胞の蝸牛内での位置にかかわらず150ナノメートル前後であった。この長さは過去に研究協力者の Furness らが爬虫類(カメ)の蝸牛で計測した長さとはほぼ同等であり、tip-link の形状は系統発生的にかなり以前から分化が進んでいたことが認識された。

tip-link の長さは、人工外リンパ緩衝液内での組織処理(カルシウム濃度約2 mM)に比べ、1 mM、50 μ M、1 μ Mと細胞外液を低カルシウム濃度にするほど延長していた。(図3)

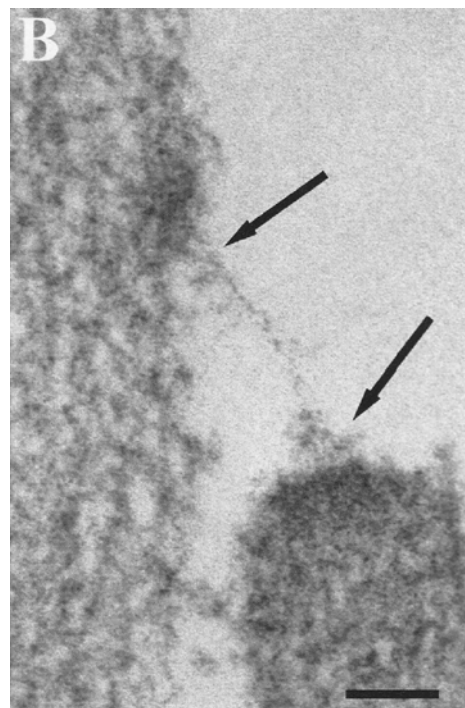
また、走査電子顕微鏡観察時における tip-link の保存される割合も、人工外リンパ液では52%保存されていたが、1 μ Mで5%へと、低カルシウム濃度にするほど急激に低下していた。

このように細胞外のカルシウム濃度を勾配的に変化させ、他の研究グループがすでに報告している有毛細胞の機械電気変換が認められない低カルシウム濃度と同等以下に条件に設定すると、tip-link とアクチン細糸との連結が大きく減少することが明らかになった。これらの構造が音受容に重要な役割を担っていることが示唆され、以上の成果を後述の論文(2008 Neuroscience)に発表した。

一方、アクチン関連蛋白に関する免疫組織化学の実験では未だ一定の根拠のある結果が得られておらず、継続中である。

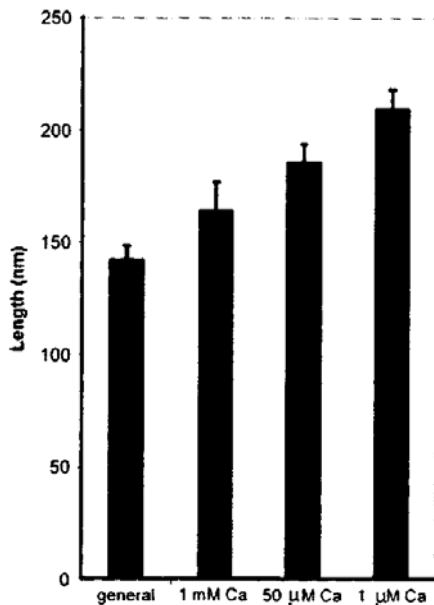


(図1) 0.25%triton-Xを含む固定液で処理したモルモット外有毛細胞不動毛束の走査電子顕微鏡像。細胞膜が除去されて不動毛の長軸に沿ったアクチン細束が観察される。不動毛間架橋構造(矢印:短い不動毛の先端から隣の長い不動毛の側面を架橋する tip-link、L:同じ高さの列の隣有る不動毛を架橋する lateral-link)の構造が同時に広い範囲で保存され観察可能となった。



(図2) 脱膜処理、樹脂包埋したモルモット外有毛細胞不動毛の透過電子顕微鏡像。

不動毛の細胞骨格と tip-link 接合部 (矢印) が明瞭に描出されている。接合部では分岐した tip-link が電子密度の高い板上の構造に挿入されている。短い不動毛の先端の構造はアクチン関連蛋白である capping protein であることが他の報告で示唆されているが、長い不動毛の側面でアクチン細糸の外側に板状存在する構造については今回の報告で初めて明らかにされた。



(図3) モルモット蝸牛外有毛細胞における tip-link 長の計測結果では、低カルシウム濃度にするにつれて (グラフ右側) 観察し得た tip-link 長は延長する傾向にあった。

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1件)

① Furness DN, Katori Y, Kumar N, and Hackney CM. (2008) The dimensions and structural attachments of tip links in mammalian cochlear hair cells and the

effects of exposure to different levels of extracellular calcium. *Neuroscience* 154: 10-21.

(査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香取 幸夫 (KATORI YUKIO)
東北大学・大学院医学系研究科・
非常勤講師
研究者番号 : 20261620

(2) 研究分担者

山内 大輔 (YAMAUCHI DAISUKE)
東北大学・大学院医学系研究科・
非常勤講師
研究者番号 : 70361102

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

David N Furness
Keele University (United Kingdom)
Director of electron microscopic unit