

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390315

研究課題名（和文） Lipid raftによるOHC細胞骨格制御機構—聴覚における脂質の機能解明—

研究課題名（英文） Regulation of the OHC cytoskeleton induced by lipid raft. -Effects of cholesterol alterations on hearing-

研究代表者

欠畑 誠治 (KAKEHTA SEIJI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90261619

研究成果の概要（和文）：蝸牛外有毛細胞は電氣的・機械的・化学的刺激により短縮・伸長し、この可動性は蝸牛増幅機構において極めて重要である。我々はこれまでの研究において、細胞膜上のコレステロールを操作した外有毛細胞の硬度やキャパシタンス、可動性が変化する事を示した。そこで今回我々はG蛋白を介する細胞内シグナル伝達系に着目し、これらが細胞膜上のコレステロール操作によって生じる変化に影響を及ぼすかを検討した。その結果、細胞内にG蛋白のアナログを投与する事によりコレステロール操作による効果が抑制され、細胞内シグナル伝達系が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cholesterol is an essential component of cell membranes, and determines their rigidity and fluidity. Alterations in membrane cholesterol by M β CD or water-soluble cholesterol affect the stiffness, capacitance, motility and cell length of outer hair cells (OHCs). This suggests that reconstruction of the cytoskeleton may be induced by cholesterol alterations. In this study, we investigated intracellular signaling pathways involving G proteins to determine whether they modulate the changes in voltage-dependent capacitance caused by cholesterol alterations. As a result, internally perfused GTP γ S (agonist of G proteins) inhibited the M β CD effects and GDP β S (antagonist of G proteins) inhibited the cholesterol effects, indicating that cytoskeletal reconstruction of OHCs might be induced by cholesterol alteration through intracellular signaling pathways involving G proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医学

科研費の分化・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳・パッチクランプ法・細胞内シグナル伝達系

1. 研究開始当初の背景
哺乳類の蝸牛は能動的に音を増幅する事に

より、周波数特異的に感受性を高める機能を有する。この蝸牛増幅機構において外有毛細胞

胞が極めて重要な役割を果たしている。外有毛細胞は電氣的・機械的・化学的刺激により反応性に伸長・短縮する事が可能である。電氣的な刺激に対する伸縮は、細胞膜上のモーター蛋白である **prestin** によってもたらされ、ナノ単位での伸縮運動が可能となっている (**fast motility**)。一方で外有毛細胞は化学的な変化や機械的な刺激により、その長さを変化させる (**slow motility**)。

コレステロールは細胞膜の必須な構成要素であり、その硬度や流動性に大きく関わっている。これまでの報告によると、外有毛細胞膜におけるコレステロール量がモーター蛋白であるプレスティンの効果に関わっている事が示唆されている。細胞骨格の維持には、低分子量 G 蛋白を中心とした細胞内シグナル伝達系が重要な役割を果たす事が分かっており、中でも代表的な低分子量 G 蛋白である Rho ファミリー、特に RhoA、cdc42、Rac1 はアクチンの重合・脱重合によるターンオーバーを制御しており、これらは外有毛細胞膜上に発現している事が分かっている (Kalinec et.al. 2000)。

2. 研究の目的

本研究では外有毛細胞膜上のコレステロール量を調節する事によって生じる変化が、細胞膜のみからもたらされる変化なのか、あるいは細胞骨格の変化を伴うものであるかは議論が分かれる。そこで細胞骨格の維持に重要な役割を果たす G 蛋白に着目し、コレステロール量の調節によってもたらされる変化が、G 蛋白を介する細胞内シグナル伝達系に影響されうるかを検討した。

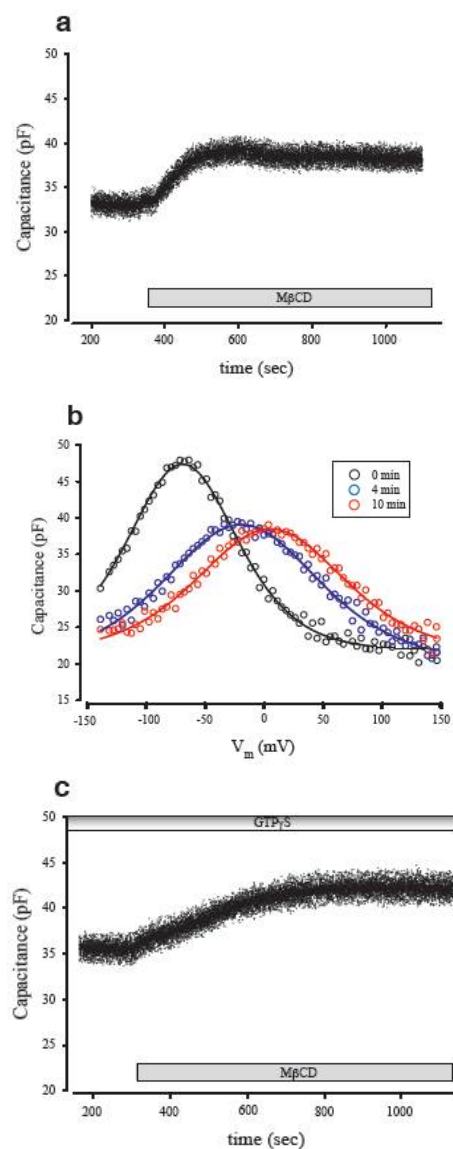
3. 研究の方法

ハートレー型モルモットをペントバルビタール腹腔内投与 (30mg/kg) により麻酔し断頭の上、側頭骨を摘出し、蝸牛から外有毛細胞

胞を単離した。これをパッチクランプ法により電気生理学的な機能を測定するとともに、パッチピペットを介して細胞内に G 蛋白のアナログを投与し、その変化を測定した。

4. 研究成果

- (1) 外有毛細胞内に G 蛋白のアゴニストとして作用する GTP γ S を投与すると、M β CD によって細胞膜上のコレステロールを除去する事による効果 (細胞長の短縮や、キャパシタンスの脱分極方向へのシフト) が抑制された (図 1a-d)。



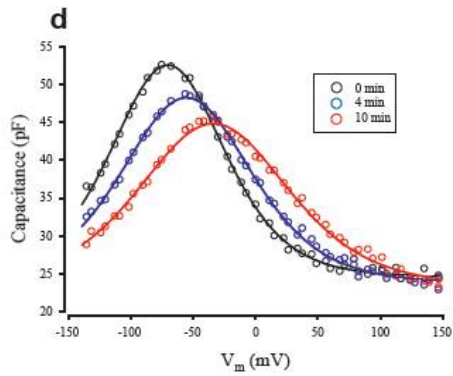
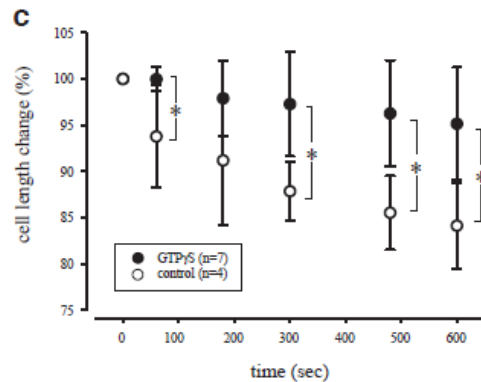
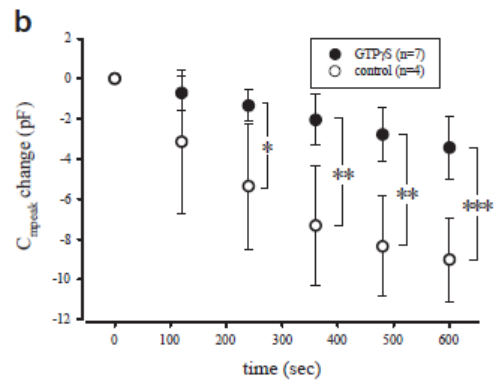
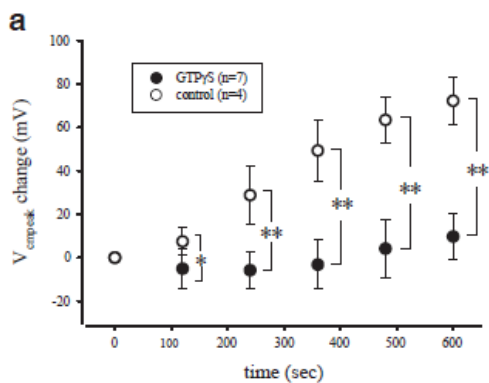
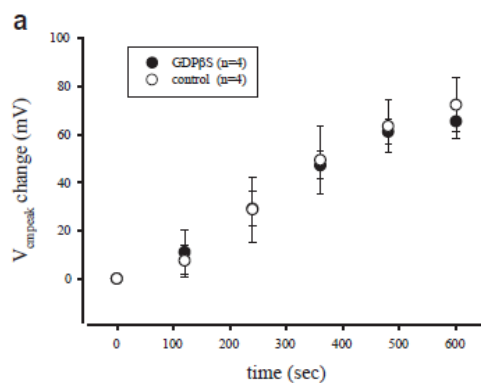
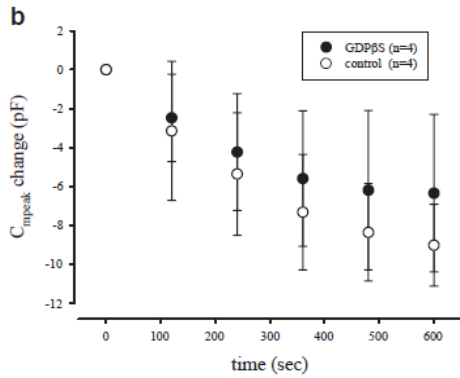


図 1a,b は外有毛細胞膜のコレステロールを M β CD によって除去する事によって得られる変化を示している。M β CD 投与により蝸牛外有毛細胞に特有のベル型のキャパシタンス変化(non-linear capacitance)が脱分極方向にシフトする。一方で図 1c,d は細胞内に GTP γ S を投与した場合のキャパシタンス変化を示しており、コントロールに比べて緩徐にキャパシタンスが変化するのが分かる。これらの変化を non-linear capacitance のピーク時におけるキャパシタンス値 C_{mpeak} と電位 V_{cmpeak} 及び細胞長変化をパラメータとしてプロットする事によって得られたグラフが図 2a-c である。

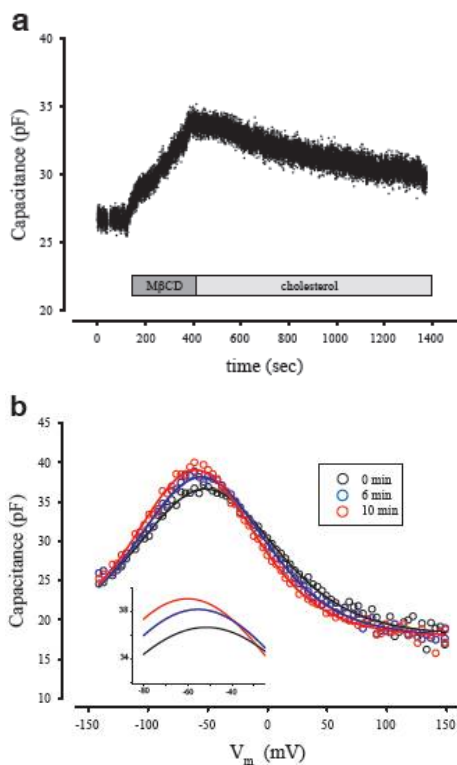


これらのグラフが示す様に、GTP γ S を投与した群では有意差を持って M β CD によって細胞膜上のコレステロールを除去する事による効果が抑制された。尚、細胞内に GDP β S を投与して同様の実験を行ったが、コントロール群と比較して有意差は得られなかった(図 3a,b)。



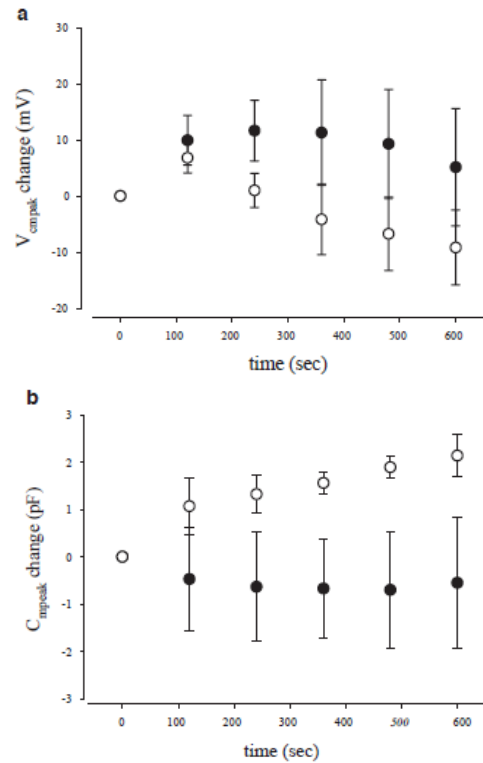


- (2) 外有毛細胞に G 蛋白のアンタゴニストである GDPβS を投与した際には細胞膜上のコレステロールを増加させる事による効果（キャパシタンスの過分極方向へのシフト）が抑制された。図 4a,b は外有毛細胞膜のコレステロールを一旦除去し、次いで水溶性コレステロールを灌流する事によって得られるキャパシタンス変化を示す。コレステロール投与により non-linear capacitance が過分極方向へシフトする結果が得られた。



一方、細胞内に GDPβS を投与する事により、コレステロールを灌流する事によって生じる変化が抑制された。これらを(1)

同様に C_{mpeak} と V_{cmpeak} をパラメータとしてプロットして得られた結果を図 5a,b に示す。いずれも有意差を持って GDPβS を投与した群でコレステロール投与の効果が抑制された。



- (3) 本研究が示すこれらの結果は、外有毛細胞膜上のコレステロール量が増加した際に生じる細胞骨格の変化が、G 蛋白を介した細胞内シグナル伝達系によって制御されている可能性を示唆しており、今後外有毛細胞の機能を解明する上での端緒となりうる。G 蛋白が外有毛細胞の細胞骨格をいかに制御しているか、そこにコレステロールがどのように関わっているかについては、今後更なる詳細な研究を要する。

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 Nagaki T, Kakehata S, Kitani R, Abe T, Shinkawa H. Effects of cholesterol alterations

are mediated via G-protein-related pathways in outer hair cells. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 2013 Feb 17. [Epub ahead of print]、査読有

- ② Kitani R, Kakehata S, Kalinec F. Motile responses of cochlear outer hair cells stimulated with an alternating electrical field. Hear Res. 2011 Oct; 280(1-2):209-18、査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ①長岐 孝彦 G 蛋白を介した細胞内シグナル伝達系が蝸牛外有毛細胞膜の脂質変化に及ぼす効果 第 20 回日本耳科学会 2010 年 10 月 7 日愛媛県松山市、ひめぎんホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

欠畑 誠治 (KAKEHATA SEIJI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：90261619

(2) 研究分担者

上野 伸哉 (UENO SHINYA)
弘前大学・医学 (系) 研究科・教授
研究者番号：00312158
和田 仁 (WADA HIROSHI)
東北大学・工学 (系) 研究科・教授
研究者番号：30111264
村越 道生 (MURKOSHI MITHIO)
東北大学・工学 (系) 研究科・助教
研究者番号：70570901
丸屋 信一郎 (MARUYA SHINITHIRO)
国際医療福祉大学・大学病院・講師
研究者番号：90396408