

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 5月 30日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791588

研究課題名（和文） 内耳におけるグルタミン酸代謝の解明と遺伝性難聴に関する研究

研究課題名（英文） Glutamine-glutamate recycle system in the inner ear.

研究代表者

小口 智啓 (OGUCHI TOMOHIRO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：10377640

研究成果の概要（和文）：

内耳（聴覚系・末梢前庭系）には様々な神経伝達物質が分布しており、聴覚・平衡覚の維持に重要な働きをしていると考えられている。特に求心系ではグルタミン酸が主たる神経伝達物質と考えられており、内耳においても感覚細胞と支持細胞間に中枢と類似した「グルタミン酸—グルタミンサイクル」が存在している可能性が推測されている。しかし、内耳に関しては、グルタミントランスポーターに関しては現在までに報告がなく、グルタミン酸—グルタミンサイクルの全容は未だ解明されていない。本研究では、グルタミントランスポーターである SAT1、SAT2 グルタミントランスポーターの局在について詳細に検討を行った。その結果、内耳においても中枢と同様のメカニズムが機能していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Glutamate has been implicated in signal transmission between inner hair cells and afferent fibers of the organ of Corti. The inner hair cells are enriched in glutamate and the postsynaptic membranes express AMPA glutamate receptors. However, it is not known whether inner hair cells contain a mechanism for glutamate replenishment. Such a mechanism must be in place to sustain glutamate neurotransmission. Here we provide RT-PCR and immunofluorescence data indicating that system A transporter 1 (SLC38A1), which is associated with neuronal glutamine transport and synthesis of the neurotransmitters GABA and glutamate in CNS, is expressed in inner hair cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：耳科学、グルタミン、神経伝達物質、内耳、難聴

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は新生児 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性疾患のひとつである。分子遺伝学の発展により、これ

まで原因不明とされてきた先天的感音難聴においても、遺伝子解析によって多くの原因遺伝子が次々に特定され始めている。

従来より、聴覚機能維持に蝸牛感覚細胞と

求心系第一次ニューロンの神経伝達物質であるグルタミン酸の代謝が重要と考えられており、感音難聴との関連についても関心もたれている。近年、代謝経路のトランスポーター (VGLUT3) をコードする遺伝子変異が難聴者の家系で発見され遺伝性難聴の原因遺伝子の1つとして報告されており、欧米における大規模な遺伝子連鎖解析においてグルタミン酸代謝に関連する遺伝子が遺伝性難聴の原因遺伝子である可能性が示唆されているなど、聴覚におけるグルタミン酸代謝は重要視されている。

従来より、中枢神経系においては、グルタミン酸作動性神経の神経終末と周囲のグリア細胞の間で効率的にグルタミン酸代謝を行うための「グルタミン酸-グルタミンサイクル」が存在していることがよく知られており、内耳においても感覚細胞と支持細胞間に中枢と類似した「グルタミン酸-グルタミンサイクル」が存在している可能性が推測されている。しかし、内耳に関しては、グルタミン、グルタミン酸の存在、グルタミン酸トランスポーター、グルタミン酸レセプター、各種酵素などの存在は報告されているが、グルタミントランスポーターに関しては現在までに報告がなく、グルタミン酸-グルタミンサイクルの全容は未だ解明されていない状況であった。

2. 研究の目的

先天性難聴は新生児 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性疾患のひとつである。分子遺伝学の発展により、これまで原因不明とされてきた先天性感音難聴においても、遺伝子解析によって多くの原因遺伝子が次々に特定され始めている。

従来より、聴覚機能維持に蝸牛感覚細胞と求心系第一次ニューロンの神経伝達物質であるグルタミン酸の代謝が重要と考えられている。特に、グルタミン酸代謝経路のトランスポーター (VGLUT3) をコードする遺伝子変異が難聴の原因遺伝子の1つとして報告されており、聴覚機能維持におけるグルタミン酸代謝の重要性が明らかとなるとともに、新規難聴原因遺伝子の候補としてのグルタミン酸代謝経路関連遺伝子の関与が示唆されている。

我々の研究室では従来より内耳におけるグルタミン酸代謝について研究を行っており、中枢神経系でのグルタミン酸代謝に類似した機構を持つことを明らかにしてきた。しかし中枢とは異なり、内耳では未だ明らかになっていないトランスポーターがあり、それら代謝回路全容の解明が機能理解および新規の難聴原因候補遺伝子の探索に必要である。

本研究ではグルタミン酸代謝回路である「グルタミン酸-グルタミン回路」の全容を解

明することを目的とした。具体的には、グルタミン酸-グルタミン回路のうち、中枢では確認されているものの、内耳では未だ証明されていないグルタミントランスポーターに関して、内耳での存在および局在を明らかにすることを目的とした。現在までにグルタミントランスポーターとして5種の遺伝子が報告されており、それらの抗体を作成、免疫染色などの組織学的手法や分子生物学的、分子細胞形態学的手法を用いて局在を明らかにし、内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路の全容を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

RT-PCR 法による解析には、8 週齢の C57BL6/J マウスを深麻酔下にて断頭し、速やかに内耳を摘出し、RNAlater 液に浸けた。実体顕微鏡下で RNAlater 液中の内耳より膜迷路を摘出した。RNA 抽出は、ビーズクラッシャーで組織を破砕した後に、QIAGEN 社の RNeasy mini kit を用い RNA の抽出を行った。

得られた RNA を Agilent 社の Bioanalyser 2000/ RNA pico 6000 kit を用いて定量および品質確認を行った後に、Applied biosystems 社の High capacity RNA to cDNA kit を用いて逆転写を行い cDNA を得た。得られた cDNA を用いて、各トランスポーター遺伝子を増幅する PCR primer を用いて増幅を行い、内耳におけるトランスポーター遺伝子の発現を確認した。

また、組織蛍光免疫染色には、8 週齢の C57BL6/J マウスを深麻酔下にて、経鼓膜にて 4%パラホルムアルデヒドを投与するとともに、速やかに 4%パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行った。その後側頭骨を摘出し、EDTA による脱灰、シュクロース溶液による平衡化を行った後に、OCT コンパウンドに包埋を行い切片を作成した。各トランスポーターに対する 1 次抗体にて染色を行った後、Cy3 と Cy5 でそれぞれラベルされた 2 次抗体を用いて免疫染色を行った。Zeiss LSM 5 Pascal confocal microscope を用いて撮像を行い、各種トランスポーターの発現部位の確認を行った。

4. 研究成果

過去の報告では、中枢神経系におけるグルタミン酸-グルタミン回路が、内耳と類似しており、それぞれ酵素や受容体などに相同性が確認されている。しかし、内耳のグルタミン酸-グルタミン回路では、グルタミントランスポーターの存在が解明されていないため、その詳細については明らかとなっていない。

本研究では、現在まで中枢において確認されているグルタミントランスポーター 5 種に関して、分子生物学的手法、免疫学的、分子細胞形態学的手法を用いて内耳での局在を

解析し、内耳におけるグルタミン酸-グルタミン回路の解明を行った。

中枢において発現および局在が確認されているグルタミントランスポーター5種に関してはデータが一般に公表されている。データベースを介して公表されている遺伝子配列を入手し、それを基にプライマーを作成、実験動物内耳から作成した cDNA ライブラリーを用いて RT-PCR を行うことにより、内耳での発現の有無を確認を行った。その結果、内耳における SAT1、VGLUT1、VGLUT2、VGLUT3 の発現を確認した。

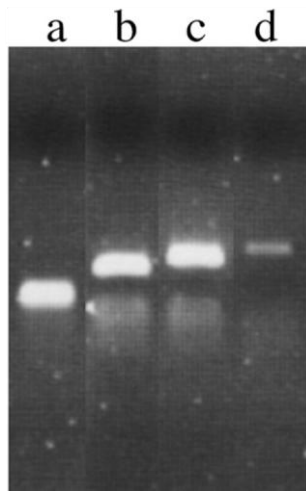


図1：内耳におけるグルタミントランスポーターの発現 (RT-PCR 法) a: SAT1, b: VGLUT1, c: VGLUT2, d: VGLUT3 を表す。いずれのトランスポーターも内耳において発現が確認された。

また、免疫染色では、SAT1、SAT2 共に蝸牛では内毛細胞に、前庭では感覚細胞層に認められたことより、内耳においても神経伝達物質としてグルタミン酸を放出しており、感覚細胞において SAT1、SAT2 にて支持細胞から放出されるグルタミンの取り込みメカニズムが脳のグリア細胞と同様に存在することが推測することができた。ま本研究の成果より内耳においても中枢と同様のメカニズムでのグルタミン酸-グルタミンサイクルシステムが機能していることを明らかにした。

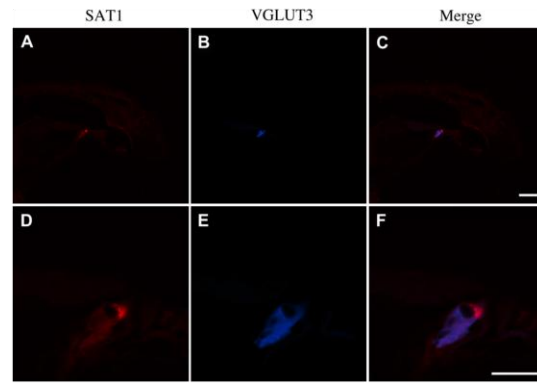


図2：内耳におけるグルタミントランスポーターの発現 (蛍光免疫染色) SAT1 と VGLUT3 の発現部位を表す。有毛細胞の上部で SAT1 が、下部で VGLUT3 が発現している様子が見て取れる。

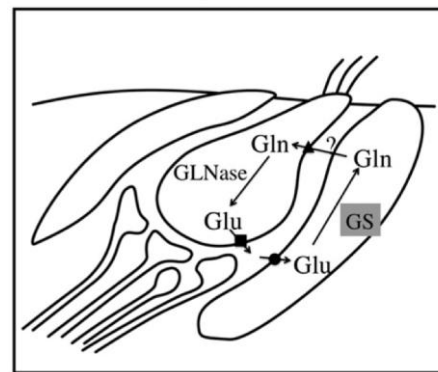


図3：内耳におけるグルタミントランスポーターの発現部位 図中▲：SAT1、■VGLUT3 を表す。本研究により内耳におけるグルタミン酸-グルタミン経路が明らかとなってきた。

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 Oguchi T, Suzuki N, Hashimoto S, Chaudhry GA, Chaudhry FA, Usami S, Ottersen OP.

Inner hair cells of mice express the glutamine transporter SAT1.

Hear Res. 2012 Oct;292(1-2):59-63. 査読あり

doi: 10.1016/j.heares.2012.07.005.

[学会発表] (計 2 件)

①Oguchi T, Nishio S, Suzuki N, Takumi Y, Usami S. The effect of microgravity on gene expression in the vestibular end-organs. Otoconin 90 was up-regulated by microgravity. 27th Barany Society Meeting 2012. 6. 10-13 Uppsala, Sweden

②Oguchi T, Suzuki N, Takumi Y, Usami S. The effect of Microgravity on Gene Expression in the Vestibular Endorgans. 8TH Symposium on the Role of the Vestibular Organs in Space Explorartion 2011. 4. 8-10 ヒューストン, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小口 智啓 (OGUCHI TOMOHIRO)

信州大学・医学部・助教

研究者番号 : 10377640