

氏 名（本籍）	よし だ なお ひろ 吉 田 尚 弘
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 2 2 7 号
学位授与年月日	平 成 6 年 9 月 7 日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻
学位論文題目	遠心性神経による聴覚，平衡覚受容機構への修飾 作用の研究

（主 査）

論文審査委員	教授 高 坂 知 節 教授 西 山 明 徳
	教授 丹 治 順

論文内容要旨

【目 的】

内耳有毛細胞は、聴覚、平衡覚の受容器細胞である。有毛細胞には求心性神経と抑制的に働くと考えられる遠心性神経とが分布している。この遠心性神経伝達物質の有力な候補はアセチルコリン (ACh) であるが、作用機序に関しては不明な点が多い。そこで本研究ではすべての脊椎動物に形態学的に類似の構造を持ち、平衡覚、一部の周波数の聴覚受容器であるウシカエル前庭器球形嚢より単離した有毛細胞を用いて、遠心性神経のシナプス伝達機序の詳細を patch clamp 法を用いた whole cell recording 法, fura-2 を用いた Ca^{2+} 蛍光顕微測光法を用いて明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

すべての実験は室温 (20–25 度) で行った。ウシカエル (*Rana Catesbeiana*, 体重 200–300 グラム) 耳石器 (球形嚢) より有毛細胞を機械的に単離した。パッチ電極を用いた whole cell recording 法を用いて膜電位, 膜電流変化を記録した。細胞外液は peristaltic pump を用いて 3–5 ml/分の速度で灌流した。

また、有毛細胞に fura-2/AM を充填し細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変化を測定した。340nm, 380nm で励起した際の蛍光強度の比を測定することにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を測定した。静止状態の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は $153 \pm 37 \text{ nM}$ であった ($n=7$)。

【結 果】

I. ACh は Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルを活性化する。

有毛細胞を -50 mV に膜電位固定し, $100 \mu\text{M}$ の ACh を 1 秒間投与すると外向き電流が oscillatory に生じた。平均の ACh 依存性電流持続時間は 14.2 ± 11 秒 ($n=109$), 平均 ACh 依存性電流量は $75.1 \pm 30 \text{ pA}$ であった。この ACh 依存性電流量の K_d は $37 \mu\text{M}$, Hill 係数は 1.1 となった。ACh 依存性電流の反転電位は細胞外液の K^+ 濃度に依存し, Nernst の式で計算される K^+ の反転電位とよく一致したことから, ACh は K^+ コンダクタンスを主として活性化することがわかった。また, 細胞を反転電位より脱分極側に膜電位固定すると ACh 依存性電流量は増加したが -50 mV を境に ACh 依存性電流量は減少した。

Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルブロッカーである apamin ($1 \mu\text{M}$), TEA (tetraethyl-ammonium, 20 mM) は ACh 依存性電流を可逆的に抑制した。また, ACh 投与により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は幾つかの

ピークを持って増加した。

II. ACh 依存性電流の細胞内情報伝達機序

有毛細胞を -50mV に膜電位固定し、GTP γS を細胞内へ投与すると外向き電流が生じ（平均電流量は $46.1 \pm 12\text{pA}$ ($n=3$)), 約数分間持続した。ACh ($100\ \mu\text{M}$) を様々なタイミングで GTP γS による電流が生じている間に投与すると ACh 依存性電流量は次第に減少し、外向き電流が持続的に流れた。次に有毛細胞を -50mV に膜電位固定しパッチ電極から InsP_3 を細胞内へ投与すると外向き電流が生じ、次第に時間とともに減少した。さらに、 InsP_3 の受容体への結合を阻害するヘパリン (10mg/ml), あるいは InsP_3 分解を阻害する Li^+ (1mM) をパッチ電極から細胞内へ投与し ACh を 30–40 秒毎に投与した。パッチ電極にヘパリンを入れると、ACh 依存性電流は時間経過とともにすばやく減少した。一方、細胞内への Li^+ 投与により whole cell 記録開始後 200 秒間は ACh 依存性電流量は増加し、その後減少に転じた。

【結 語】

ACh は有毛細胞膜の過分極を引き起こし、この膜過分極応答は、GTP 結合タンパクの活性化 $\rightarrow \text{InsP}_3$ 濃度の上昇 \rightarrow 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出 \rightarrow 最終的に Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルを活性化して膜を過分極させることを明らかにし、これら一連の反応がある種のムスカリン性受容体を介して起こる結果を得た。しかし、ムスカリン、ニコチンでも ACh 応答を mimic できなかった。この有毛細胞上に存在する ACh 受容体は現在まで知られている受容体とは異なり新たな G protein coupled の ACh 受容体であると考えられた。今後はこの有毛細胞上に存在する ACh 受容体を分子生物学的手法を用いて分子構造を明らかにすることが大きな課題である。

また、遠心性神経の興奮は有毛細胞膜過分極を引き起こし求心性神経伝達物質の放出を抑制する。強大音、頭位変換等の過度の刺激に対して遠心性神経が有毛細胞レベルで抑制的に働いていることは生理的に合目的であると考えられた。

審査結果の要旨

吉田論文では、ウシカエル (*Rana Catesbeiana*, 体重 200–300 グラム) を用いて前庭器球形嚢より有毛細胞を単離し、遠心性神経のシナプス伝達機序について詳細に研究した結果について報告している。実験方法は (1) パッチ電極を用いた whole cell recording 法にて膜電位と膜電流の変化を記録するとともに、(2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を fura-2 を用いた Ca^{2+} 蛍光顕微測光法にて測定した。その結果、下記の 9 項目の知見を得た。即ち、

- a) 有毛細胞を $-50mV$ に膜電位固定し、 $100 \mu M$ の ACh を 1 秒間投与すると外向き電流が oscillatory に生じ、平均の ACh 依存性電流持続時間は 14.2 ± 11 秒 ($n=109$)、平均 ACh 依存性電流量は $75.1 \pm 30pA$ であり、この ACh 依存性電流量の K_d は $37 \mu M$ 、Hill 係数は 1.1 となった。
- b) ACh 依存性電流の反転電位は細胞外液の K^+ 濃度に依存し、Nernst の式で計算される K^+ の反転電位とよく一致したことから、ACh は K^+ コンダクタンスを主として活性化することが示された。
- c) 細胞を反転電位より脱分極側に膜電位固定すると ACh 依存性電流は増加したが $-50mV$ を境に ACh 依存性電流は減少した。
- d) Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルブロッカーである apamin ($1 \mu M$)、TEA (tetraethylammonium, $20 \mu M$) は ACh 依存性電流を可逆的に抑制した。
- e) ACh 投与により $[Ca^{2+}]_i$ は幾つかのピークをもって増加した。
- f) 有毛細胞を $-50mV$ に膜電位固定し、GTP γS を細胞内へ投与すると外向き電流が生じ数分間持続した。
- g) ACh ($100 \mu M$) を様々なタイミングで GTP γS による電流が生じている間に投与すると ACh 依存性電流量は次第に減少し、外向き電流が持続的に流れた。
- h) InsP3 の受容体への結合を阻害するヘパリン ($10mg/ml$) をパッチ電極から細胞内へ投与し ACh を 30–40 秒毎に投与すると ACh 依存性電流は時間経過とともに素早く減少した。
- i) 同様に Li^+ ($1ml$) を投与すると whole cell 記録開始後 200 秒間は ACh 依存性電流は増加し、その後減少に転じた。

以上の結果に基づき、この有毛細胞上に存在するムスカリン受容体を介して ACh は膜を過分極させるが、現在までに知られる受容体とは異なり新たな G protein coupled の ACh 受容体である可能性を示唆した。今後、分子生物学的手法を用いてこの受容体の分子構造を明らかにする必要があるが、種々の新知見を明らかにしたことにより本論文は学位論文としてふさわしいものと判定した。