

Title	An ATP-Dependent Inwardly Rectifying Potassium Channel, KAB-2(Kir4.1), in Cochlear Stria Vascularis of Inner Ear : Its Specific Subcellular Localization and Correlation with the Formation of Endocochlear Potential
Author(s)	日比野, 浩
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155285
rights	Copyright: Society for Neuroscience
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	日比野 浩
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14531 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	An ATP-Dependent Inwardly Rectifying Potassium Channel, K_{AB-2} (Kir4.1), in Cochlear Stria Vascularis of Inner Ear : Its Specific Subcellular Localization and Correlation with the Formation of Endocochlear Potential (内耳蝸牛血管条における ATP 依存性内向き整流カリウムチャンネル, K_{AB-2} (Kir4.1) : その特異的な分布と蝸牛内高電位の成立との相関)
論文審査委員	(主査) 教授 久保 武 (副査) 教授 倉智 嘉久 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

内耳蝸牛は内リンパ液と外リンパ液という2種類の液体で満たされている。そのうち内リンパ液は音の一次受容器である有毛細胞が触れている液である。この液は細胞外液でありながら約150mMの K^+ イオンを含んでおり、その静止電位は約+80mVと高電位になっている。これは蝸牛内電位 (endocochlear potential : EP) と呼ばれ、蝸牛に極めて特異なものである。内リンパ液の K^+ イオンは、音刺激により有毛細胞に流入しそれを興奮させる。その結果、有毛細胞から神経伝達物質であるグルタミン酸が放出され、音刺激は中枢に伝達される。高電位 EP は K^+ イオン流入の driving force を増大し、聴覚の音に対する高い感受性を形成している。従って内リンパ液が高電位であることは内耳聴覚機能にとって不可欠である。以前より、この高電位 EP の成立には K^+ イオンを中心としたイオン動態が深く関わっているとされてきた。しかしながら EP の成立機構はいまだ謎のままである。我々は高電位 EP の成立の分子機構を解明するために、内リンパ生成の場とされている蝸牛血管条の K^+ チャンネルについて検討し、高電位 EP の成立に極めて重要な役割を果たしていると考えられる K^+ チャンネルを分子レベルで初めて同定した。

【方法ならびに成績】

最初にどの種類の K^+ チャンネルが EP 産生に大きく関連しているかを検討するために、種々の K^+ チャンネル阻害薬をモルモットの血管条に灌流し、その EP に対する効果を検討した。内向き整流 K^+ (Kir) チャンネルの阻害薬である Ba^{2+} を投与したところ、急速で著明な EP の低下を観察したのに対し、電位依存性 K^+ (Kv) チャンネルの阻害薬である 4-aminopyridine, tetraethylammonium を投与しても殆ど EP の変化を認めなかった。よって、EP 成立には Kv チャンネルではなく、Kir チャンネルが重要であると考えられた。次に、ラット内耳血管条において、どの Kir チャンネルサブユニットが発現しているかを、EP 産生の場と考えられている血管条の mRNA を用いて RT-PCR 法にて検討したところ、今までクローニングされた全て (11種) の Kir チャンネルサブユニットの中で、 K_{AB-2} (Kir4.1) のみが血管条に発現していることを見出した。*in situ* ハイブリダイゼーション法により、 K_{AB-2} の蝸牛における分布を検討したところ、 K_{AB-2} の mRNA が確かに血管条に強く発現していることを確認した。更に、 K_{AB-2} の組織、細胞内分布を詳細に検討するために、Kir4.1 に特異的な抗体を用いて免疫組織化学 (光顕、電顕) を行った。血管条は辺縁細胞、中間細胞、基底細胞の3種類の細胞からなるが、その中で Kir4.1 は辺縁細胞の basolateral

membrane のみに特異的に発現し、辺縁細胞の apical membrane, 中間細胞, 基底細胞には全く発現していないことが明らかとなった。次に平衡器における K_{AB-2} の発現を検討した。平衡器は蝸牛と同じ組成の内リンパ液を持ちながらその電位は 0 mV である。平衡器における内リンパ液を維持しているのは暗細胞という上皮細胞で、今まで蝸牛血管条の辺縁細胞と全く同じチャネルやポンプ, トランスポーターが発現していると報告されていた。しかしながら、暗細胞には K_{AB-2} は全く発現していなかった。 K_{AB-2} の血管条における developmental な発現のパターンを生後早期のラットを用いて免疫組織化学にて検討し、EP, 内リンパ液の K^+ 濃度の上昇パターンと比較すると、EP の上昇パターンと極めてよく一致することが明らかとなった。さらに、EP が低いために遺伝性難聴を来す W^v/W^v マウスの血管条には Kir4.1 が殆ど発現していないことを見出した。

【総括】

以上の結果より、 K_{AB-2} は高電位 EP の成立に欠くことの出来ない分子であることが強く示唆された。恐らく K_{AB-2} は、辺縁細胞の basolateral membrane に発現し、やはり EP 成立に重要な役割を演じている Na, K-ATPase の活性維持に不可欠なものであろうと考えている。高電位 EP の発見から約半世紀がたつが、本研究は EP 形成に関するチャネルとして初めての分子レベルでの同定であり、EP 成立のメカニズムの完全なる解明にとって新しい糸口となると考えられる。今後、更に K_{AB-2} dominant negative 体を強制発現させた、トランスジェニックマウスを作成し、それを解析することで、EP 成立の分子機構を解明していこうと考えている。

論文審査の結果の要旨

聴覚は動物にとって最も大切な感覚の一つである。音情報を受容する器官として高度に分化したのが内耳である。多くの研究にも関わらず内耳は現在でも最も謎が多い器官のひとつである。特に、 $+80\text{ mV}$ と高値を示す内耳蝸牛内電位 EP (endocochlear potential) は、その発見から約半世紀が経つが、その成立メカニズムはまだ解明されていない。

本研究では、EP 成立に不可欠であるカリウムチャネル、 K_{AB-2} を初めて分子レベルで同定している。最初に、カリウムチャネルの阻害薬を、EP 成立の場である血管条に灌流し、その EP に対する効果を検討することで、電位依存性カリウムチャネルではなく、内向き整流カリウムチャネルが重要であることを見出した。更に、RT-PCR 法、光顕、電顕を駆使した免疫組織化学法にて、 K_{AB-2} は血管条に発現する唯一の内向き整流カリウムチャネルで、血管条辺縁細胞の basolateral membrane に局在していることを明らかにした。また、内リンパ液の電位が 0 mV である平衡器の暗細胞には K_{AB-2} が全く発現していないこと、developmental な K_{AB-2} の発現のパターンは生後の EP の上昇パターンとよく相関すること、EP が約 0 mV と低い遺伝性難聴 W^v/W^v マウスの血管条には K_{AB-2} が全く発現していないことより、 K_{AB-2} は EP 成立に必須の分子である可能性が極めて高いと結論している。

本研究は、内耳という骨に囲まれた研究し難い組織における、特異な環境の成立機構を、いくつもの手法を用いることで多面的に検討した優れた研究である。本研究は EP 成立の機構の完全な解明への新しい糸口となると同時に、感音難聴など原因が明らかでない疾患の病態解明や治療法の開発に結び付く可能性を含んでいる。よって学位に値するものと考えられる。