

Title	Molecular architecture of the stria vascularis membrane transport system, which is essential for physiological functions of the mammalian cochlea
Author(s)	上塚, 学
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55757
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	上塚 学
論文題名 Title	Molecular architecture of the stria vascularis membrane transport system, which is essential for physiological functions of the mammalian cochlea (内耳の特殊体液の恒常性が立脚する膜輸送系の網羅的タンパク質解析)
論文内容の要旨	
〔目 的 (Purpose)〕	
内耳蝸牛を満たす内リンパ液は、150 mMのK⁺濃度と+80 mVの高電位を示す細胞外液である。聴覚機能に不可欠なこの環境の維持には、内リンパ液に面する蝸牛側壁の血管条を介したK⁺輸送が貢献するとされている。しかし、血管条におけるK⁺以外のイオンや薬物輸送系の分子構築の解明は今も不十分である。本研究では、血管条の膜輸送分子の網羅的解明を指向し、プロテオーム解析を行った。	
〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕	
実験動物としてBN/SsNS1cラット、7週齢・オスを用いた。冷却生理食塩水にて全身を灌流後、蝸牛を摘出し、Protease Inhibitorを含んだ人工細胞外液内で実体顕微鏡下に血管条を分離した。血管条は、隣接するらせん靱帯と共に蝸牛側壁を構築するため、分離の際に後者の混入が問題となる。我々は、血管条とらせん靱帯それぞれに特異的に発現する遺伝子を対象としたReal-time PCRを行い、摘出した血管条組織にらせん靱帯成分が極めて少ないことを確認した。この血管条組織から膜画分を精製し、タンパク質を抽出した後、還元・アルキル化、トリプシン消化を行った。得られた消化ペプチドは高pH条件下で逆相クロマトグラフィーを用いて分画した後、LC-MS/MSを施行した。解析にはMascotとProteome Discovererを用いた。 その結果、3236個のタンパク質を同定した。その中には膜タンパク質として注釈づけされたものが1807個含まれていた。細胞膜のイオンチャネルは25個検出し、そのうち16個が血管条に発現報告のないタンパク質であった。K⁺チャネル以外に、Ca²⁺、Cl⁻チャネルが多くみられた。また79個のトランスポーターを検出し、そのうち62個が血管条に発現報告のないタンパク質であった。その内訳は、イオン輸送のトランスポーターではH⁺輸送が多く、血管条の輸送機構がpH制御に関わる可能性が示唆された。その他のトランスポーターでは、アミノ酸や薬物を輸送するトランスポーターが数多くみられた。なお、そのうち2つについてウェスタンブロッティングを行ったところ、血管条に強い発現を認めた。この結果は、我々の質量分析の高い信頼性の証明になった。 さらに同定されたタンパク質データを用いて、ネットワーク解析をおこなった結果、血管条においてハブタンパク質としてERK1/2, APP, PKA, AKT, Ca²⁺ シグナルの重要性、が示唆された。また、解析した血管条タンパク質の情報を難聴遺伝子座に照合させることにより遺伝性難聴の原因遺伝子解析をおこなった。その結果、16個の遺伝子座から19個の新しい難聴遺伝子候補を同定した。	
〔総 括 (Conclusion)〕	
プロテオーム解析により血管条に発現報告のないタンパク質として、Ca²⁺・Cl⁻チャネルを含む16個のイオンチャネルと、アミノ酸・薬物を輸送するトランスポーターを含む65個のトランスポーターを同定した。ネットワーク解析により血管条におけるCa²⁺ シグナルの重要性が示唆された。また遺伝性難聴の原因遺伝子解析により新たに19個の難聴遺伝子候補を検出した。本研究の成果は、聴覚機能の仕組みや各種内耳疾患の病態の理解にとって極めて有用な情報を提供するものと考ええる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 上塚 学	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 猪俣 勇典
	副 査 大阪大学教授 佐藤 真
	副 査 大阪大学教授 島田 昌一

論文審査の結果の要旨

内耳蝸牛を満たす内リンパ液は、150 mMのK⁺濃度と+80 mVの高電位を示す細胞外液である。聴覚機能に不可欠なこの環境の維持には、血管条を介したK⁺輸送が貢献するとされている。しかし、血管条におけるイオンや薬物輸送系の分子構築の解明は今も不十分である。本研究では、血管条の膜輸送分子の網羅的解明を指向し、プロテオーム解析を行った。実験動物はBN/SsNSIcラット、7週齢・オスを用いた。生理食塩水にて全身を灌流後、蝸牛を摘出し、顕微鏡下に血管条を分離した。この組織から得た膜画分に対し、LC-MS/MS解析を施行した。血管条に発現報告のない16個のイオンチャンネルと62個のトランスポーターを見出した。同定されたタンパク質データを用いて、ネットワーク解析と遺伝性難聴の解析をおこなった。ネットワーク解析により血管条においてCa²⁺シグナルの重要性が示唆された。また遺伝性難聴の解析により新たに19個の難聴遺伝子候補を検出した。研究の成果は、聴覚機能の仕組みや各種内耳疾患の病態の理解にとって有用な情報を提供すると考える。以上の内容は学位に値するものと認める。