

# 蝸牛管側壁におけるミオイノシトール輸送体タンパク質の発現

Immunological identification of  $H^+$ -coupled *myo*-inositol cotransporter in the lateral wall of the cochlea duct

<sup>1</sup> 山地 真裕美・<sup>1</sup> 井上 理佐・<sup>2</sup> 枝松 緑・<sup>1</sup> 安藤 元紀

Mayumi Yamaji, Risa Inoue, Midori Edamatsu, Motonori Ando

<sup>1</sup> 岡山大学大学院教育学研究科・理科教育講座・細胞生理学研究室

<sup>2</sup> 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・分子医化学分野

<sup>1</sup> Laboratory of Cell Physiology, Department of Science Education, Graduate School of Education, Okayama University

<sup>2</sup> Department of Molecular Biology and Biochemistry, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

## 1. はじめに

哺乳類の聴覚機能を担う内耳蝸牛は、内リンパ液 (endolymph) で満たされた中央階と外リンパ液 (perilymph) で満たされた前庭階・鼓室階の3つの区画から構成されている (図 1)。有毛細胞を含むコルチ器や血管条とラセン靱帯からなる蝸牛管側壁は中央階に面している (図 1B)。内リンパ液は細胞外液にも関わらず、生体内で唯一  $K^+$  が主要な陽イオンとなっており、また外リンパ液に対して +80 mV の正の直流電位を示す。これらの特徴は聴覚機能の発現に必要不可欠で、内リンパ液の産生・維持に中心的な役割を果たしているのが蝸牛管側壁を構成する血管条 (stria vascularis) とラセン靱帯 (spiral ligament) である。特に血管条組織ではエネルギーを大量に消費しながら活発なイオン輸送を行っており、そのエネルギー供給システム (糖輸送経路) の解明が重要な課題となっている。

糖輸送体分子の網羅的な遺伝子発現解析から、蝸牛管側壁において8つの促進拡散型グルコース単輸送体 (GLUT) 遺伝子アイソフォームの発現が確認された (Edamatsu et al. 2011)。その中で、比較的発現量の多い GLUT13 ( $H^+$ -coupled *myo*-inositol cotransporter, HMIT) 遺伝子は GLUT 型に分類されるもののグルコース輸送活性はなく、 $H^+$  と *myo*-inositol の共輸送体であることが分かっている (Uldry et al. 2001)。内リンパ液の pH および浸透圧調節の破綻は聴覚機能不全を引き起こすことから、HMIT 分子はその調節に極めて重要な役割を果たしていると示唆される。

蝸牛管側壁のラセン靱帯に含まれるラセン隆起 (spiral prominence) および外ラセン溝 (outer sulcus) を構成している細胞群には  $HCO_3^-$  輸送に関与する pendrin (Wangemann et al. 2004) や水チャネル (aquaporin, AQP) (Merves et al. 2003) の発現が確認されており、pH および浸透圧調節部位として注目されている。本研究では、内耳でその遺伝子発現が確認された HMIT タンパク質分子に着目し、免疫組織化学法による局在解析を行った。

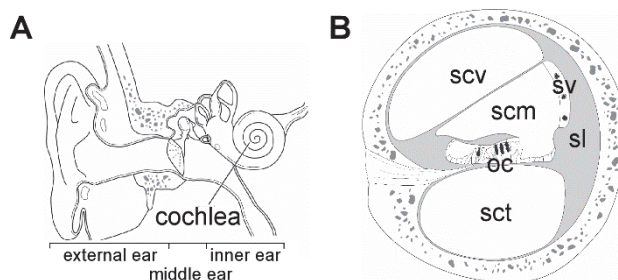


図 1. 聴覚系の模式図

聴覚器の構造 (A)。外耳, 中耳, 内耳からなり最深部に蝸牛が位置する。蝸牛管の構造 (B)。前庭階 (scala vestibuli, scv), 中央階 (scala media, scm), 鼓室階 (scala tympani, sct), 血管条 (stria vascularis, sv), ラセン靱帯 (spiral ligament, sl), コルチ器 (organ of Corti, oc)。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 実験動物

すべての実験は岡山大学動物実験規則に従い、岡山大学動物実験委員会の承認のもとに実施した。本実験では、マウス (*Mus musculus*) の成獣を用いた。麻酔下、化学固定液で経心灌流後、側頭骨から蝸牛を摘出した。

### 2-2. 電子顕微鏡法

蝸牛を前固定 (2.5% glutaraldehyde および 2% paraformaldehyde, 24 時間), および後固定 (1%  $OsO_4$ , 2 時間) を行い, 脱灰 (0.12 M ethylenediamine tetraacetic acid, 72 時間), エタノール系列で脱水, Spurr 樹脂に包埋した。厚切り切片 (1  $\mu m$ ) を作製し, toluidine blue 染色により光学顕微鏡観察を行った。超薄切片 (90 nm) を作製し, 電子染色により透過型電子顕微鏡観察を行った (H-7650, Hitachi)。

### 2-3. 免疫組織化学法

蝸牛を化学固定 (4% paraformaldehyde, 24 時間), 脱灰 (0.12 M ethylenediamine tetraacetic acid, 72 時間), ショ糖液に置換, 凍結包埋後, 凍結切片を作製し免疫組織化学法を適用した。一次抗体として polyclonal goat anti-HMIT antibody (sc-244166, Santa

Cruz Biotechnology Inc.), 二次抗体として Alexa488 donkey anti goat IgG (A-11055, Life technologies) を用い, 共焦点レーザー顕微鏡 (FV1200, Olympus) で観察した。

### 3. 結果

#### 3-1. 蝸牛管側壁の形態学的解析

厚切り切片の光学顕微鏡像 (図 2) を示す。中央階は内リンパ液で満たされており, 音受容器である有毛細胞が位置する基底膜, 内リンパ液産生に関わる蝸牛管側壁, およびライスネル膜に取り囲まれた閉鎖腔であることが分かる (図 2A)。蝸牛管側壁はその上皮組織である血管条とラセン靱帯から構成されている。ラセン靱帯の大部分は血管条の直下 (骨壁側) に位置しているが, その一部を構成するラセン隆起から外ラセン溝にかけては内リンパ腔に面している (図 2B)。

超薄切片の電子顕微鏡像 (図 3) を示す。ラセン隆起に続く外ラセン溝は上皮細胞 (outer sulcus cell) とその直下に位置する根細胞 (root cell) から構成されている (図 3A)。細胞間にはギャップ結合が発達していることが分かる (図 3B)。

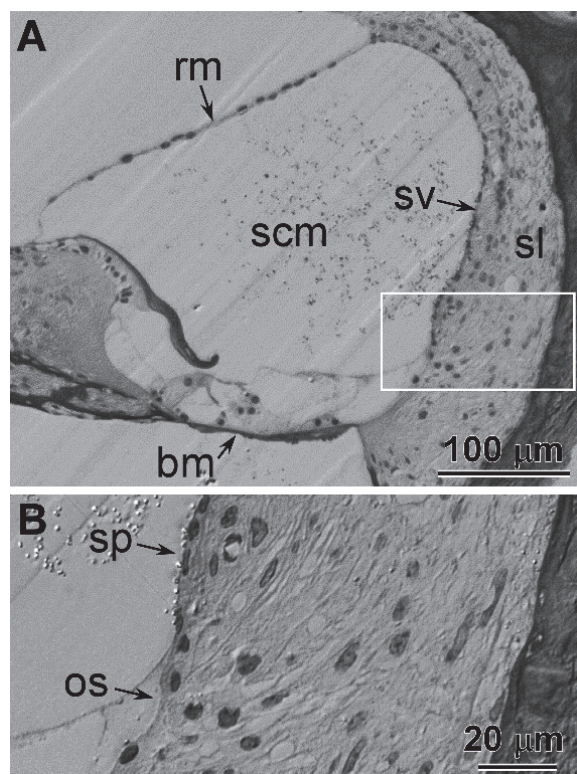


図 2. 蝸牛管 (中央階) の光学顕微鏡像

蝸牛管の横断像 (厚切り切片の toluidine blue 染色像)。中央階 (scala media, scm) を取り囲むように基底膜 (basilar membrane, bm), 血管条 (stria vascularis, sv) とラセン靱帯 (spiral ligament, sl) からなる蝸牛管側壁, およびライスネル膜 (Reissner's membrane, rm) が位置する (A)。A の白四角の拡大像 (B)。ラセン隆起 (spiral prominence, sp), 外ラセン溝 (outer sulcus, os)。

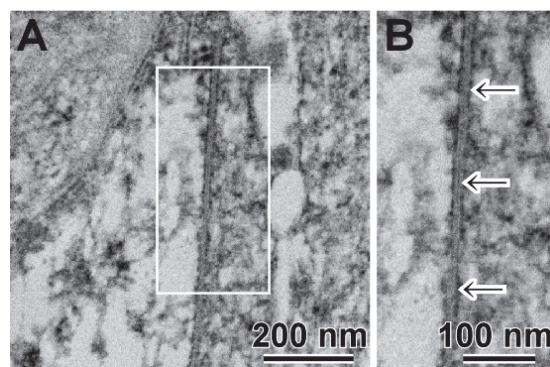


図 3. 外ラセン溝周辺の電子顕微鏡像

蝸牛管側壁ラセン靱帯の一部を構成する外ラセン溝に位置する細胞群 (A)。A の白四角の拡大像 (B)。細胞間に発現しているギャップ結合構造が認められた (矢印)。

#### 3-2. 蝸牛管側壁における HMIT 分子の局在解析

免疫組織化学法により蝸牛管側壁における HMIT タンパク質分子の局在を調べた (図 4)。外ラセン溝の上皮細胞およびその直下の細胞群に抗 HMIT 抗体由来する強い陽性シグナルが認められた (図 4A)。抗原ペプチドによる吸収試験を行ったところ, その陽性シグナルは消失した (陰性コントロール, 図 4B)。

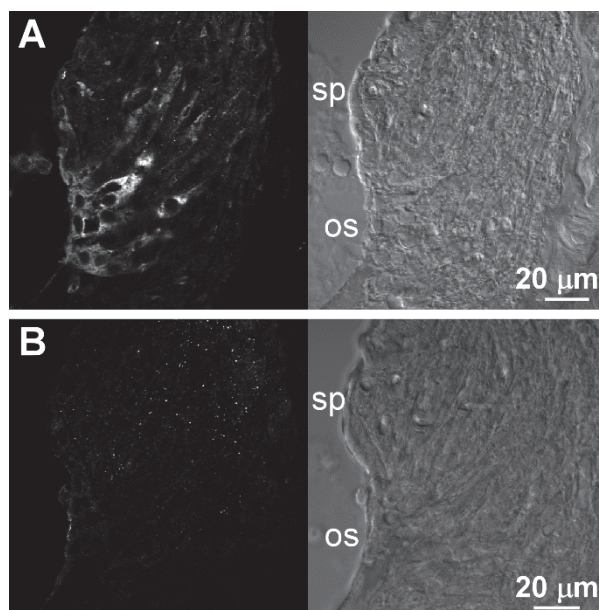


図 4. 外ラセン溝付近の HMIT 分子の局在

抗 HMIT 抗体による共焦点レーザー顕微鏡画像 (A 左) と同視野の透過像 (A 右)。抗原ペプチド吸収試験による共焦点レーザー顕微鏡画像 (B 左) と同視野の透過像 (B 右)。ラセン隆起 (spiral prominence, sp), 外ラセン溝 (outer sulcus, os)。

### 4. 考察

本研究により, 蝸牛管側壁のラセン靱帯の一部を構成する外ラセン溝周辺の上皮細胞やその直下に位置する細胞群に HMIT タンパク質分子の局在

が明らかとなった。HMIT 分子は  $H^+$  と *myo*-inositol の共輸送体であるため、内リンパ液の pH 調節や浸透圧調節に関与していることが示唆された。

蝸牛管側壁およびコルチ器には上皮細胞系と結合組織細胞系の二つのギャップ結合ネットワークが形成されており、これらのネットワークは内耳機能を維持するための物質輸送のリサイクリングに関与すると考えられている (Xia et al. 1999; Kikuchi et al. 2000; Jagger and Forge 2013)。外ラセン溝周辺の細胞群は上皮細胞系ギャップ結合ネットワークの蝸牛管側壁側の最も端に位置する (図 5A)。また外ラセン溝周辺の細胞群には、重炭酸イオン ( $HCO_3^-$ ) の輸送を含む陰イオン交換体である *pendrin* の発現 (Wangemann et al. 2004; Nakaya et al. 2007; Wangemann et al. 2007; Kim and Wangemann 2011)、および水輸送に関与する aquaporin (AQP4, AQP5) の発現が確認されている (Hirt et al. 2010; Huang et al. 2002; Merves et al. 2003)。

HMIT は  $H^+$  と浸透圧物質となりうる *myo*-inositol の輸送体であること、またその発現部位が *pendrin* や aquaporin の局在部位とほぼ一致する外ラセン溝周辺の細胞群であることから、HMIT は内耳機能において *pendrin* や aquaporin と

協働して pH および浸透圧調節に関与する新たな膜輸送体分子であることが示唆される。*Pendrin* による重炭酸イオンの輸送、aquaporin による水分子の輸送、HMIT による  $H^+$  と *myo*-inositol の輸送についての概略を図 5B~D に示す。

## 5. おわりに

内耳の複雑な解剖学的構造はその生理機能の発現に密接に関係している。蝸牛管側壁では、音受容に伴う内リンパ液の産生・維持のために、腎臓に匹敵する活発な物質輸送が行われており、一度その調節機構の破綻がおこれば直ちに難聴が引き起こされる。本研究でその局在が明らかとなった HMIT 分子は pH と浸透圧調節の両方に関与することが予想される。既に報告のある *pendrin* および aquaporin の局在と HMIT のそれが類似している点も注目される。本研究の遂行により、新たな内耳疾患の病態解明に繋がる可能性が高い。今後は組織や単離細胞を利用した生理的実験系の開発を行うとともに、特に pH 刺激や浸透圧刺激を加えた場合の HMIT 分子の挙動の変化について解析を進めていく予定である。

## 6. 参考文献

- Edamatsu M, Kondo Y, Ando M (2011). Multiple expression of glucose transporters in the lateral wall of the cochlear duct studied by quantitative real-time PCR assay. *Neurosci Lett*, 490, 72-77.
- Hirt B, Penkova ZH, Eckhard A, Liu W, Rask-Andersen H, Müller M, Löwenheim H (2010). The subcellular distribution of aquaporin 5 in the cochlea reveals a water shunt at the perilymph-endolymph barrier. *Neuroscience*, 168, 957-970.
- Huang D, Chen P, Chen S, Nagura M, Lim DJ, Lin X (2002). Expression patterns of aquaporins in the inner ear: evidence for concerted actions of multiple types of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res*, 165, 85-95.
- Jagger DJ, Forge A (2013). The enigmatic root cell - emerging roles contributing to fluid homeostasis within the cochlear outer sulcus. *Hear Res*, 303, 1-11.
- Kikuchi T, Kimura RS, Paul DL, Takasaka T, Adams JC (2000). Gap junction systems in the mammalian cochlea. *Brain Res Rev*, 32, 163-166.
- Kim HM, Wangemann P (2011). Epithelial cell stretching and luminal acidification lead to a retarded development of stria vascularis and deafness in mice lacking *pendrin*. *PLoS One*, 6, e17949.
- Merves M, Krane CM, Dou H, Greinwald JH, Menon AG, Choo D (2003). Expression of aquaporin 1 and 5 in the developing mouse inner ear and audiovestibular assessment of an Aqp5 null mutant. *J Assoc Res Otolaryngol*, 4, 264-275.
- Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, Schultz BD, Green ED, Wall SM, Marcus DC (2007). Lack of

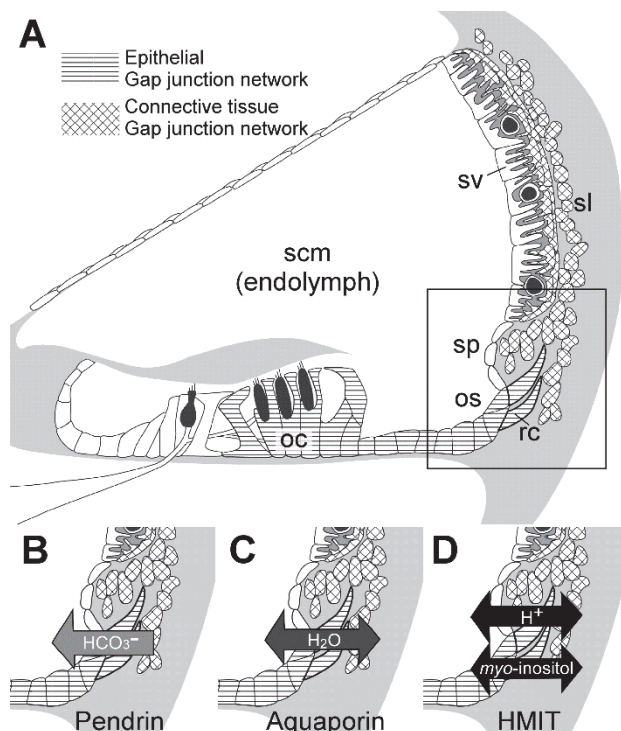


図 5. pH および浸透圧調節分子の局在

蝸牛管側壁およびコルチ器における細胞群とギャップ結合ネットワークの模式図 (A)。A の黒四角の拡大像 (B~D)。中央階 (scala media, scm)、血管条 (stria vascularis, sv)、ラセン靱帯 (spiral ligament, sl)、ラセン隆起 (spiral prominence, sp)、外ラセン溝 (outer sulcus, os)、根細胞 (root cell, rc)、コルチ器 (organ of Corti, oc)。Pendrin, aquaporin, HMIT の局在部位と物質輸送経路の概略 (B~D)。

- pendrin  $\text{HCO}_3^-$  transport elevates vestibular endolymphatic  $\text{Ca}_2^+$  by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, 1314-1321.
- Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B (2001). Identification of a mammalian  $\text{H}^+$ -myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J*, 20, 4467-4477.
- Wangemann P, Itza EM, Albrecht B, Wu T, Jabba SV, Maganti RJ, Lee JH, Everett LA, Wall SM, Royaux IE, Green ED, Marcus DC (2004). Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BMC Medicine*, 2, 30.
- Wangemann P, Nakaya K, Wu T, Maganti RJ, Itza EM, Sanneman JD, Harbidge DG, Billings S, Marcus DC (2007). Loss of cochlear  $\text{HCO}_3^-$  secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of  $\text{Ca}_2^+$  reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol*, 292, 1345-1353.
- Xia A, Kikuchi T, Hozawa K, Katori Y, Takasaka T (1999). Expression of connexin 26 and Na, K-ATPase in the developing mouse cochlear lateral wall: functional implications. *Brain Res*, 846, 106-111.