内耳における神経情報伝達

陣内 自治・小池 靖夫・福井 清*

Glutamatergic Neurotransmission in the Inner Ear

Osamu Jinnouchi and Yasuo Koike

(The University of Tokushima School of Medicine)

Kiyoshi Fukui

(Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima)

Fast excitatory synaptic transmission in the inner ear has been proposed to be mediated by an excitatory amino acid, possibly L-glutamate, and its receptors. Previous studies have revealed that certain types of ionotropic glutamate receptors are expressed in various combinations of subtypes in the cochlea and vestibule. Other studies have suggested that some glutamate receptors may have non-neural functions, such as cell differentiation and migration. Recently the glutamate receptor δ subfamily has been identified, although little is known about its physiological characteristics thus far. Since 1997 it has been known that the $\delta 1$ subunit is highly expressed in hair cells of auditory and vestibular systems, which suggests that the $\delta 1$ subunit may play an important functional role in these systems. The expression of NMDA receptor mRNA in spiral ganglion cells has also been demonstrated, suggesting involvement of the NMDA receptor in neurotransmission in the inner ear. In search of coagonists of the NMDA receptor other than glycine, D-serine has been found to be present in mammalian central nervous systems and is regarded as a possible neuro-modulator of the NMDA receptor. We have demonstrated the gene expression of D-amino acid oxidase (DAO) in the rat temporal bone using RT-PCR analysis. This observation suggests that D-serine, which is the substrate of DAO, may exist in the inner ear and may modulate the neurotransmission of NMDA receptor subunit NR1.

Key words : neurotransmission, ionotroic glutamate receptor, $\delta 1$ subunit, D-amino acid oxidase

はじめに

内耳蝸牛における速い情報伝達機構は、主としてグルタミン酸とイオンチャンネル型のグルタミン酸受容体によって構築され、また脳幹の上オリブ核から外有毛細胞に投射する遠心性神経伝達にはアセチルコリンとGABAが関与することが示唆されている。生化学的、電気生理学的、薬理学的な手法によってグルタミン酸や関連するアミノ酸が内耳有毛細胞-らせん神経節シナプ

スの神経伝達に関与するというデータは諸家^{1)~5)}によって報告されてきた。イオンチャンネル型グルタミン酸受容体は古くからアゴニスト(作動物質)により分類されていたが、電気生理学的特徴により、アスパラギン酸の誘導体として合成されたNMDA(N-メチル-D-アスパラギン酸)に感受性のNMDA型と非感受性のnonNMDA型に大別される。さらにnonNMDA型はAMPA(α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチルイソオキサゾール-4-プロピオ

表 1 イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の分類

分 類	アゴニスト	サブユニット
AMPA* 型	AMPA	GluR1-4 (α 1-4)
KA** 型	カイニン酸	GluR5-7 (β 1-3) KA1, 2 (γ 1, 2)
NMDA*** 型	NMDA	NR1 (ζ 1) NR2A-D (ϵ 1-4)
δ 型	(不明)	δ 1, 2

* alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisooxazole-4-propionic acid

** kainate

*** N-methyl-D-aspartate

ン酸)型と KA (カイニン酸; kainate)型に分類されている。1989年に Heinemann ら⁶⁾のグループによって初めてグルタミン酸受容体がクローニングされて以来、従来のアゴニストによる分類に対応した受容体分子がさまざまなサブタイプとともにクローニングされた(表1)。nonNMDA 型受容体は Na⁺ と K⁺ を透過させ、主として速い興奮性シナプス伝達を担っている。一方 NMDA 型は Na⁺, K⁺, Ca²⁺ に高い透過性を示し、Mg²⁺ から電位依存的阻害を受けるなどシナプスの可塑性に重要な役割を持っていると考えられている。ここではグルタミン酸受容体を中心とした耳科学領域における神経伝達機構の構築と最新の話題につき述べることにする。

内耳におけるグルタミン酸受容体の機能と局在

1. non-NMDA 型受容体

non-NMDA 型のサブユニットは AMPA 型 (GluR1-4), KA 型 (GluR5-7, KA1, 2) がクローニングされている。内耳有毛細胞-らせん神経節シナプスにおける AMPA 型, KA 型の介在も電気生理学的に^{7,8)}, 免疫細胞化学的に³⁾, また In Situ Hybridization (以下 ISH)法や^{9,10)}, PCR 法で¹¹⁾ それぞれ示されてきた。通常は non-NMDA 型受容体の構成は GluR2 サブユニットを含んだ組み合わせで複合体が形成され、その組み合わせによって透過するイオンの選択性が異なっていると考えられている。さらに蝸牛の発達段階における nonNMDA 型受容体の発現パターンを ISH 法でみると、らせん板縁の線維細胞など非神経組織にも発現を認め、グルタミン酸受容体サブユニットが膜レセプターとして組織分化、器官形成といった non-neuronal function を持つ可能性も考えら

れている¹²⁾。また土井¹³⁾は alternative splicing によって GluR3 の塩基配列より少し短くなった mRNA が内耳に特異的に発現していることを報告し、このバリエーションの受容体は電気生理学的には inhibitory subunit である可能性を推察している。このように non-NMDA 型受容体は神経伝達のみならず未だ解明されていない側面は多い。

2. NMDA 型受容体

1980年代はじめには内耳有毛細胞-らせん神経節シナプスにおける NMDA 型受容体の介在は否定的であった。しかし NMDA 型受容体が海馬における長期増強 (Long-term Potentiation; LTP) や小脳における長期抑圧 (Long-term Depression; LTD) に深く関与することや、脱分極するにはグリシン^{14,15)} や D-セリン^{16,17)} を必要としたり、高頻度刺激のような強い入力が必要であること¹⁸⁾ などユニークな特徴が次々に明らかになり、内耳においても研究がなされた。Puel ら¹⁹⁾は NMDA 型受容体の阻害物質を蝸牛に灌流し、音刺激が強い場合 (110 dB SPL, 8 kHz トーンバースト) には、灌流しない時よりも CAP の振幅が約40%低下することを報告した。NMDA 型受容体は分子生物学的には通常 NR1 サブユニットと他の NMDA 型サブユニット (NR2A-D) の組み合わせでチャンネルを構成していると考えられているが、Safieddine ら¹⁰⁾ と Kuriyama ら²⁰⁾は NR1 がらせん神経節に発現していることを ISH 法でそれぞれ示している。しかし nonNMDA 型と NMDA 型の発現は両者ともに、らせん神経節、前庭神経節のニューロン、グリアでみられており、内耳有毛細胞に特異的な発現はみられていない。

3. δ 型受容体

第4番目のサブファミリーとしては δ 型 (δ 1, δ 2) が同定されている。このサブファミリーは分子構造からイオンチャンネル型に分類されているが、他のイオンチャンネル型受容体とは一次構造上アミノ酸レベルでのホモロジーも低く、阻害物質が未同定なことなど不明な点が多い受容体であった。最近になって δ 2 型はマウスでは胎生15日より認められ、発達段階の小脳で発現し、成熟期には小脳プルキンエ細胞の dendritic spine に限局して発現する²¹⁾ ことが明らかにされた。アンチセンス法 (翻訳開始部位を含んだアンチセンス鎖のオリゴヌクレオチドを培養細胞に添加しセンス鎖 RNA からの翻訳を阻害する方法)を用いて δ 2 型レセプターの発現を抑制した実験系では小脳における長期抑圧現象が阻害され²²⁾,

小脳の高次機能における $\delta 2$ 型レセプターの重要性が強く示唆されている。さらに $\delta 2$ 型ミュータントマウスでは小脳での協調運動障害が出現し、前庭代償が認められないことも報告された²³⁾。このことから平衡機能との関与が推測され、北原ら²⁴⁾は一側の内耳を破壊したラットでは小脳のプルキンエ細胞層で $\delta 2$ 型レセプターの mRNA の発現が減少することを明らかにした。Kashiwabuchi ら²⁵⁾によれば $\delta 2$ 型は小脳平行線維-プルキンエ細胞間シナプスの長期抑圧現象に深く関与することから、北原らは内耳破壊後の対側前庭と小脳は $\delta 2$ 型の発現を抑制することにより小脳のシナプス伝導効率を変化させ、前庭代償を誘導すると推察している。

1997年に Safieddine ら²⁶⁾は $\delta 1$ 型が蝸牛の内有毛細胞と前庭有毛細胞に強く発現していることを ISH で報告した。外有毛細胞に発現はなく、小脳に発現していた $\delta 2$ 型は内耳に発現していなかった。このことは蝸牛内有毛細胞と外有毛細胞が明らかに機能的違いをもつことを示唆する。 δ 型サブファミリーは $\delta 1$ 型が内耳、 $\delta 2$ 型が小脳と2つの組織においてサブユニットは異なるものの聴覚平衡機能に重要な役割を持つレセプターサブファミリーである可能性がでてきた。今後はアゴニストの発見やレセプター複合体としての発現様式など、 δ 型レセプターの持つ特質をつまびらかにすることが必要であると思われる。

NMDA 型受容体とコアゴニスト

NMDA 型受容体は常時 active でない上、activate されにくいという特徴をもつ受容体であり、小脳の長期抑圧や海馬の記憶など神経の可塑性に深く関与していると考えられている。また最近では NMDA 型受容体のコアゴニスト (coagonist) という概念²⁷⁾が定着しつつある。現在コアゴニストの候補としてはグリシンと D-セリンが注目を集めているが、グリシンよりも D-セリンの方がより強く刺激を増強する²⁸⁾ことや両者の臓器分布、生理的濃度²⁹⁾を考慮するとグリシンの生理的濃度より、D-セリンの生理的濃度の方がコアゴニストとしての活性としては effective であると考えられる。また Snyder のグループ³⁰⁾は小脳、小脳、脳幹において NMDA 型受容体の NR1 と D-セリンの組織の局在には高い相関性があることを示している。

D-アミノ酸は老化に伴い血液中で濃度が上昇することが知られ³¹⁾、神経機能の老化と D-アミノ酸の関連も

示唆されてきた。D-アミノ酸のうち D-セリンは中枢神経系のシナプス³²⁾やグリア細胞³³⁾で産生されると考えられ、通常はグリア細胞内に留まり、グルタミン酸による神経刺激によりシナプス間隙に放出される³⁴⁾。D-セリンはシナプスの NR1 に存在するグリシン結合部位に結合¹⁴⁾し、神経刺激を増強する。このグルタミン酸による刺激を増強する作用によってグルタミン酸による神経傷害性を強めていると考えられている。

D-セリンは D-アミノ酸を特異的に酸化する D-アミノ酸酸化酵素 (EC 1.4.3.3; DAO) により代謝をうける。この酵素は腎臓、小脳でその発現が強く認められるが (図 1a) 我々はラットにおいて内耳組織を含んだ側頭骨から、DAO の mRNA の発現を RT-PCR 法で確認した (図 1b)。1995年に Kuriyama ら²⁰⁾は NR1 がらせん神経節ニューロンで発現していることを報告したが、NR1 と D-セリンの局在がよく相関する³⁰⁾ことと合わせて考えれば、らせん神経節のサテライトグリアにも DAO が存在する可能性が示唆される。グリア細胞は中枢神経系で D-セリンのスカベンジャーとしての働きをもつとされているが蝸牛においてもらせん神経節のサテライトグリアが同様に D-セリンの放出、スカベンジを行っていると推定される。また蝸牛神経核すべて (背側核、前腹側核、後腹側核) に NR1 の mRNA が発現しており、上行性聴覚伝導路の興奮性シナプスにおいても NMDA 型受容体の関与が示唆されている。

D-アミノ酸 1 分子は DAO により代謝される際、1 分子の H_2O_2 を生じ、周辺の細胞を障害することは腎臓では知られていた³⁵⁾。最近では D-アミノ酸代謝で産生される H_2O_2 は脳腫瘍に対する遺伝子治療に応用できる可能性があるほどの Reactive Oxygen Species であることが示されている³⁶⁾。加齢に伴って体内の D-セリン濃度が上昇し、それにより H_2O_2 産生が徐々に増加し、細胞内で処理できない量に達すれば、神経細胞や周辺組織に傷害的に働く可能性がある。現在我々は大脳皮質由来のグリア初代培養細胞を用いて neuro-modulator として位置づけられる DAO の遺伝子発現とその調節機構を解析し³⁷⁾、D-セリンならびに DAO の生理的意義の解明を目指している。今後 D-セリンが蝸牛や聴覚伝導路の NMDA 型受容体でも機能する因子であるという魅力的な仮説を検討していきたいと考えている。

図1 RT-PCRを用いたD-アミノ酸化酵素(DAO)の遺伝子発現

a) ラット小脳, 腎臓における DAO 遺伝子の発現

Lane 1: λ /Hind III 5 μ l

2: 小脳(mRNA 1 μ g),

3: 腎臓(mRNA 0.1 μ g)

b) ラット側頭骨組織における DAO 遺伝子の発現

Lane 4: ϕ X174/Hae III 4 μ l

5: 腎臓(total RNA 5 μ g),

6: 側頭骨組織(total RNA 5 μ g)

括弧内はテンプレート量.

矢印は塩基配列から予想される 398 bp のバンドを示す.

おわりに

神経伝達をアッセイする方法として神経耳科学領域は *in vivo* で比較的容易に定量性が得られる特性がある. しかし内耳組織は側頭骨に内包され, 構成する細胞が少ない割に細胞の種類が多いことが研究の大きな障壁になってきた. 最近では分子生物学的新技術の導入や組織培養の工夫により以前は検出困難であった遺伝情報のメッセージや形態も明らかになり, 内耳外有毛細胞の運動能³⁸⁾や, 蝸牛における虚血時のグルタミン酸放出の測定とそれに伴う聴力域値の上昇³⁹⁾など次々に新たな知

見がもたらされている. 今後はより複雑な生理現象が分子レベルで発現される機能によって説明できるように研究が進展することが期待される.

参考文献

- 1) Bledsoe SC, Bobbin RP and Puel JL : Neurotransmission in the inner ear. Physiology of the Ear. pp 385~406, Raven Press, NY, 1988.
- 2) Altschuler RA, Sheridan CE, Horn JW, et al : Immunocytochemical localization of glutamate immunoreac-

- tivity in the guinea pig cochlea. *Hear Res* **42** : 167~174, 1988.
- 3) Kuriyama H, Jenkins O and Altschuler RA : Immunocytochemical localization of AMPA selective glutamate receptor subunits in the rat cochlea. *Hearing Research* **80** : 233~240, 1994.
- 4) Gleich O, Johnstone BM and Robertson D : Effects of L-glutamate on auditory afferent activity in view of its proposed excitatory transmitter role in the mammalia cochlea. *Hear Res* **45** : 295~311, 1990.
- 5) Hunter C, Doi K and Wenthold RJ : Neurotransmission in the auditory system. *Otolaryngol Clin North. Am* **25** : 1027~1052, 1992.
- 6) Hollmann M, Hartley M and Heinemann S : Ca^{2+} permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channel depends on subunit composition. *Science* **252** : 851~853, 1991.
- 7) Jenison GL, Winbery S and Bobbin RP : Comparative actions of quisqualate and N-methyl-D-Aspartate, excitatory amino acid agonists on guinea pig cochlea. *Comp Biochem Physiol* **84** : 385~389, 1985.
- 8) Jenison GL and Bobbin RP : Quisqualate excites spiral ganglion neurons of guinea pig. *Hear Res* **20** : 261~265, 1986.
- 9) Ryan AF, Watts AG and Simmons DM : Preservation of mRNA during in situ hybridization in the cochlea. *Hear Res* **56** : 148~152, 1991.
- 10) Safieddine S and Eybalin M : Co-expression of NMDA and AMPA/kainate receptor mRNAs in cochlear neurones. *Neuroreport* **3** : 1145~1148, 1992.
- 11) Doi K, Hunter C and Wenthold RJ : DNA amplification of subunits of the AMPA selective glutamate receptor family of the rat and guinea pig cochlea. pp 19, *Abstr Assoc Res Otolaryngol*, NJ, 1992.
- 12) Luo L, Brumm D and Ryan AF : Distribution of non-NMDA glutamate receptor mRNAs in the developing rat cochlea. *J Comp Neurol* **361** : 372~382, 1995.
- 13) 土井勝美 : 内耳 Glutamate・Acetylcholine・GABA receptor の分子構造. *ブレインサイエンス 1* (俣野彰三編). 17~29頁, 厚生社, 大阪, 1994.
- 14) Johnson JW and Ascher P : Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325** : 529~531, 1987.
- 15) Williams K, Chao J, Kashiwaguchi K, et al : Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycine. *Mol Pharmacol* **50** : 701~708, 1996.
- 16) Kleckner NW and Dingledine R : Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in xenopus oocytes. *Science* **241** : 835~837, 1988.
- 17) Wood PL, Emmett MR and Rao TS : In vivo modulation of the N-methyl-D-aspartate receptor complex by D-serine. *J Neurochem* **53** : 979~981, 1989.
- 18) Collingridge GI, Herron CE and Lester RAJ : Frequency-dependent N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampus. *J Physiol* **399** : 301~312, 1988.
- 19) Puel JL, Ladrech S and Eybalin M : Electrophysiological evidence for the presence of NMDA receptors in the guinea pig cochlea. *Hear Res* **51** : 255~264, 1991.
- 20) Kuriyama H, Albin RL and Altschuler RA : Expression of NMDA-receptor mRNA in the rat cochlea. *Hear Res* **69** : 215~220, 1993.
- 21) Takayama C, Nakagawa S, Watanabe M, et al : Developmental changes in expression and distribution of the glutamate receptor channel delta 2 subunit according to the purkinje cell maturation. *Brain Res Dev Brain Res* **92** : 147~155, 1996.
- 22) Jeromin A, Haganir RL and Linden DJ : Suppression of the glutamate receptor delta 2 subunit produces a specific impairment in cerebellar long-term depression. *J Neurophysiol* **76** : 3578~3583, 1996.
- 23) Funabiki K, Mishina M and Hirano T : Retarded vestibular compensation in mutant mice deficient in delta 2 glutamate receptor subunit. *Neuroreport* **7** : 189~192, 1995.
- 24) 北原 紇, 武田憲昭, 久保 武, 他 : 分子生物学的手法による前庭代償分子機構の解明 —Differential Display 法を用いて—. *日耳鼻* **101** : 37~43, 1998.
- 25) Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, et al : Impairment of motor coordination, purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in gluR delta 2 mutant mice. *Cell* **81** : 245~252, 1995.
- 26) Safieddine S and Wenthold RJ : The glutamate receptor subunit $\delta 1$ is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J Neuroscience* **17** : 7523~7531, 1997.
- 27) Kuryatov A, Laube B, Betz H, et al : Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor. *Neuron* **12** : 1291~1300, 1994.
- 28) Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, et al : Functional comparison of D-serine and glycine in rodents ; the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* **65** : 454~458, 1995.
- 29) Hashimoto A, Nishikawa T, Takahashi K, et al : Endogenous D-serine in rat brain ; N-methyl-D-aspartate receptor-related distribution and aging. *J Neurochem*

- 60 : 783~786, 1993.
- 30) Schell MJ, Brady JRO, Snyder SH, et al : D-Serine as a neuromodulator ; regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neuroscience* **17** : 1604~1615, 1997.
- 31) Nagata Y, Akino T, Ohno K, et al : Free D-amino acids in human plasma in relation to senescence and renal diseases. *Clin Science* **73** : 105~108, 1987.
- 32) Dunlop DS and Neidle A : The origin and turnover of D-serine in brain. *Biochem Biophys Res Commun* **235** : 26~30, 1997.
- 33) Sato K, Yoshida S, Fujiwara K, et al : Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Res* **567** : 64~70, 1991.
- 34) Schell MJ, Molliver ME and Snyder SH : D-serine, an endogenous synaptic modulator ; localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 3948~3952, 1995.
- 35) Carone FA and Ganote CE : D-serine nephrotoxicity. *Arch Pathol* **99** : 658~662, 1975.
- 36) Stegmann L, Yoseph OB and Ross BD : Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing rhodotorulagracilis D-amino acid oxidase ; a cancer gene therapy strategy. *Hum Gene Ther* **9** : 185~193, 1998.
- 37) Fukui K, Kanamori T, Jinnouchi O, et al : Tissue specific expression of the D-amino acid oxidase gene. *Flavins and Flavoproteins* (Stevenson KJ Ed). pp 199~202, Univ of Calgary Press, Calgary, 1996.
- 38) 大西純夫, 山下敏夫 : 内耳蝸牛外有毛細胞とイオンチャネル. *ブレインサイエンス1* (俣野彰三編). 39~47頁, 厚生社, 大阪, 1994.
- 39) Hakuba N, Gyo K, Yanagihara N, et al : Efflux of glutamate into the perilymph of the cochlea following transient ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett* **230** : 67~71, 1997.

(別刷請求先 : 陣内自治
〒770-8503 徳島市蔵本町3丁目18-5
徳島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)