[受賞]

哺乳類蝸牛の外有毛細胞における膜輸送

金子 敏彦

(耳鼻咽喉科学講座)

Membrane Traffic in Outer Hair Cells of the Adult Mammalian Cochlea

Toshihiko KANEKO

(Department of Otolaryngology)

はじめに

蝸牛の感覚細胞として2種類の有毛細胞、内有毛細胞と外有毛細胞が存在する。音信号は内有毛細胞より求心性繊維を通じて経由して伝えられる。外有毛細胞は能動的運動能を持ち音信号を増幅するとされている (Dallos & Harris, 1978)。外有毛細胞は少なくとも70 kHzまでの周波数に反応して機械的な力を発生する (Frank *et al.*, 1999)。その能動的運動は外有毛細胞側壁に高密度 (少なくとも $7,500/\mu\text{m}^2$, Huang & Santos-Sacchi, 1993) に存在するプレスチンによっておこる (Zheng *et al.*, 2000)。しかし、外有毛細胞のプレスチンの代謝はほとんど解明されていない。

近年、蛍光色素 FM1-43 を用いて endocytosis の機能を検討した論文が多く見られる。FM1-43 は可逆的に脂質二重層に結合し、細胞膜に結合している間に endocytosis によって取り込まれることにより、小胞の可視化を可能とする。内耳の有毛細胞頂部における endocytosis は非常に早く、rapid endocytosis と呼ばれ注目を集めている (Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2002, 2004)。Rapid endocytosis は内分泌細胞で有名な現象であり、細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin によって制御されていると考えられている。今回の報告においては、rapid endocytosis によって取り込まれた細胞膜の運搬先、そして、細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin の影響を検討した。

方 法

外有毛細胞の単離

200–400 g の有色モルモットから外有毛細胞を単離した。側頭骨を取り出し冷却したハンクス氏液 (4°C) に保存し、実験を行う直前に側頭骨より外有毛細胞を単離した。poly-L-lysine によってコーティングされた coverslip 上の 1.0 ml ハンクス氏液内に外有毛細胞を含むコルチ器を置き、100- μL のマイクロピペットを用いて機械的に単離、その後 coverslip に定着するように 10 分間放置した後、実験を行った。なお、外有毛細胞は健康な状態に見える細胞のみを使用した。また、すべての実験は $21.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の室温に調節された環境で行われた。

蛍光色素

endocytosis や transcytosis を調べるため、蛍光色素 FM1-43 (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) を用いた。dimethylsulphoxide を用いて作られた 20 mM のストック溶液を -20°C で保存した。実験直前にハンクス氏液にて 20 μM の最終濃度に調節した。FM1-43 は borosilicate glass capillary (GC150F-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) に満たし、pressure application にて細胞に局所投与した (Transjector 5246, Eppendorf)。キャピラリーの先端は 2.5 μm に調節し (DMZ Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Germany)、キャピラリー先端はマイクロマニピレーターに

て細胞中央部から約 40 μm の位置に合わせた (Mini 25, Luigs and Neumann, Ratingen, Germany). この方法によって局所投与することにより FM1-43 は細胞全体を包み込む様に投与される. なお, 先端の位置 (頂部, 中央部, 底部) による細胞内蛍光信号への影響はなかった.

薬剤付加

rapid endocytosis は細胞内への Ca^{2+} 流入がトリガーと考えられている (Neher & Zucker, 1993; Artalejo *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2002, 2004). 細胞内 Ca^{2+} 依存性を調べるため, 細胞内 Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM を用いた. BAPTA-AM (25 μM) を 30 分間付加し, ハンクス氏液にて wash out した後 FM1-43 を局所投与した. また Calmodulin の影響を調べるため, Calmodulin 依存性リン酸抑制剤である Trifluoperazine (TFP; 20 μM ; Levin & Weiss, 1978; Cook *et al.*, 1994; Vondonselaar *et al.*, 1994) を 15 分間付加し, wash-out せずに FM1-43 を投与した.

共焦点レーザスキャン顕微鏡

蛍光の観察には Zeiss 社の共焦点レーザスキャン顕微鏡 LSM510 を用いた (Oberkochen, Germany). 正立型顕微鏡 Axioskop 2 FS MOT に対物レンズには Zeiss 40 $\times$ (IR-achnoplan, water-immersion lens NA0.8, WD 3.61 mm) を用いた. FM1-43 の蛍光は 480 nm のアルゴンレーザーにて励起され, 505 nm 以上のロングパスフィルターを用いて観察をした. 観察した画像は 12 ビットで 256 $\times$ 512 ピクセルか 512 $\times$ 512 ピクセルの解像度で保存した. 蛍光信号の解析には Zeiss LSM510, フォトショップ 6.0 (Adobe), Origin 7 (Origin Lab) を用いた.

結 果

細胞内輸送

円筒形の外有毛細胞における細胞内輸送を詳細に検討した. 図 1A に示す細胞内各部位における FM1-43 の蛍光変化を観察した. 蛍光の経時変化を図 1B に示した. ピペットを用いて FM1-43 を 30 秒間, 300 秒毎に局所投与を 3 回試みた. stereocilia を含む細胞膜の部位では投与直後より蛍光強度は上昇し, FM1-43 投与中止後は速やかに exponentially に低下が見られ, ほぼ投与前の強

度になった. infracuticular zone (細胞頂部, 細胞内) においては FM1-43 投与中止後も蛍光強度の上昇が見られ 30 秒程で信号強度の exponentially な減少が始まった. しかし, 蛍光強度は次の色素付加までに initial level にまでは低下しなかった.

細胞底部 (細胞核近傍) における蛍光強度の変化は特徴的で, 蛍光強度は徐々に上昇し続けた. 細胞底部における蛍光は hot spot 等も見られず均一である (図 1D). FM1-43 投与後の急激な蛍光強度上昇も見られないことから, この部位での蛍光強度の上昇は外有毛細胞頂部で取り込まれた小胞が底部に transport されていると考えられる.

細胞内輸送速度

図 1A, C に示すように外有毛細胞長軸に沿って細胞内の何ヶ所か調べると, 頂部から底部にいくにつれ, 蛍光強度上昇の開始点の遅延が見られた. これにより細胞内輸送速度を $0.37 \pm 0.01 \mu\text{m/s}$. と計算することが可能であった. 15 の細胞からの平均では $0.36 \pm 0.03 \mu\text{m/s}$. であった.

細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin 依存性 rapid endocytosis

我々は細胞内 Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM と calmodulin 阻害剤 TFP を用いた. 両者ともコントロールの実験に比較して, rapid endocytosis を著明に抑制した (図 2). この結果により, rapid endocytosis は細胞内 Ca^{2+} /Calmodulin により制御されていることが解った.

考 察

rapid endocytosis と細胞内輸送

我々は細胞頂部より取り込まれた小胞がヘンゼン体, 細胞側壁そして細胞核近傍の細胞底部に輸送されることを示した. Kachar (1997) は電子顕微鏡を用いてウシガエルの前庭有毛細胞の頂部を観察し, 2 種類の小胞; clathrin-coated pits と non-clathrin-coated pits を発見した. rapid endocytosis は clathrin を必要としない現象と考えられており (Artalejo *et al.*, 1995), 小胞形成必要な時間はわずか 1 秒以下と考えられている. 一方, clathrin-dependent endocytosis では小胞形成に数百秒の時間が必要である (Henkel & Almers *et al.*, 1996). Griesinger (2004) は外有毛細胞において, clathrin-dependent endocytosis と non-clathrin-dependent

図1 FM1-43 付加による蛍光の経時変化。(A) 上図: 蛍光を付加した細胞。下図: 610 秒における蛍光変化。細胞全体と内部に蛍光が見られる。スケールバーは 10 μm 。(B) FM1-43 は 30 秒間、300 秒ごとに付加した。stereocilia を含む細胞膜の部位では投与直後より蛍光強度は上昇し、FM1-43 投与中止後は速やかに exponentially に低下が見られ、ほぼ投与前の強度になった (①)。infracuticular zone (細胞頂部、細胞内) においては FM1-43 投与中止後も蛍光強度の上昇が見られ 30 秒程で信号強度の exponentially な減少が始まった。しかし、蛍光強度は次の色素付加までに initial level にまでは低下しなかった (②)。細胞底部 (細胞核近傍) における蛍光強度の変化は特徴的で、蛍光強度は徐々に上昇し続けた (⑥)。(C) ヘンゼン体 (頂部) から細胞核 (底部) になるにつれて、蛍光上昇開始点の遅延が見られる (②~⑥)。細胞内の小胞の移動速度が計算可能となる ($0.37 \pm 0.01 \mu\text{m/s}$)。この図は (B) の点線の部分を拡大している。(D) 900 秒の時点の蛍光変化。細胞核近傍 (底部) に色素の集積が見られる (矢印)。

endocytosis の両方が存在する事を示した。我々は clathrin-dependent endocytosis については検討していないが、今回の実験では細胞内の蛍光観察に 1 秒以下の時間しか必要としておらず、我々が観察した endocytosis は clathrin-independent である rapid endocytosis と考えられる。

我々が今回観察した細胞内運搬速度 $0.36 \pm 0.03 \mu\text{m/s}$ (n15) は微小管に沿った細胞内運搬の過去の報告に一致する (Nakata *et al.*, 1998; Toomre *et al.*, 1999; Kipp & Arias, 2002; Mundy *et al.*, 2002)。微小管は一般的に細胞内小胞の運搬に重要な役割を果たしていると考えられている (Kachar *et al.*, 1997)。外有毛細胞でも微小管は細胞全体に見られ特に細胞頂部、細胞底部により多く存在することが確認されている (Furness *et al.*, 1990)。以上

より我々の観察した細胞内小胞の移動は微小管に沿った現象と考えられる。

Ca^{2+} /Calmodulin の影響

カルシウムの細胞内流入は rapid endocytosis のトリガーと考えられている (Neher & Zucker, 1993; Artalejo *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2002, 2004)。細胞内 Ca^{2+} キレーター BAPTA-AM を用いた実験では、細胞内 Ca^{2+} 濃度低下では rapid endocytosis の活動性が低下する事を確認した。rapid endocytosis では calmodulin は Ca^{2+} レセプターとして働く可能性の有ることが示唆されている (Artalejo *et al.*, 1996)。我々は今回 calmodulin inhibitor である TFP を用いて rapid endocytosis の抑制を確認した。

図2 細胞内 Ca^{2+} キレート剤と Calmodulin 阻害剤による蛍光上昇の抑制. 細胞内 Ca^{2+} は BAPTA-AM (25 μM) によってキレートされた. Calmodulin は Trifluoperazine (TFP; 20 μM) によって阻害されている. 蛍光変化はヘンゼン体の領域で計測した. (A) 蛍光の経時変化 (Control n6; BAPTA-AM n4; TFP n4). (B) 600 秒の地点における蛍光変化. 両薬剤共に蛍光強度の抑制が見られる.

rapid endocytosis の役割

これまで transcytosis によって運搬される様々な物質が同定されている (Tuma & Hubbard, 2003). 細胞膜タンパク質は一定の寿命を持っており, それゆえ持続的に交換される必要がある. Endocytosis, exocytosis は細胞膜タンパク質代謝に関わるメカニズムであることが知られている. 過去の報告では細胞側壁に存在するプレスチンは非常に高密度であり (Huang & Santos-Sacchi, 1993), 活発なタンパク質代謝が必要と考えられている (Meyer *et al.*, 2001; Griesinger *et al.*, 2004). rapid endocytosis はこのプレスチンのリサイクリングに関わっているかもしれないと考察されている. 実際, 今回の報告において endocytosis によって取り込まれた細胞膜は, 細胞頂部からタンパク質代謝に関わる ER やゴルジ体の集合体であるヘンゼン体 (Saito, 1983) への運搬される事を確認している.

rapid endocytosis の役割として我々は神経伝達物質の運搬という可能性も考えている. 神経伝達物質のグルタミン酸塩とアスパラギン酸塩は有毛細胞に存在するだけでなく, 周辺の細胞にも存在する (Altschuler *et al.*, 1989; Usami & Ottersen, 1996). また有毛細胞の支持細胞であるダイテルス細胞には glutamate-aspartate transportor (GLAST)

の存在が確認されている (Furness *et al.*, 2002). また, グルタミン酸塩とアスパラギン酸塩の濃度は perilymph に比して endolymph に非常に高いことが示されている (Thalmann *et al.*, 1981). グルタミン酸塩やアスパラギン酸塩は神経伝達物質としてだけでなく, 細胞運動のエネルギー源としても重要と考えられている (Erecinska & Silver, 1990; Usami & Ottersen, 1996; Ottersen *et al.*, 1998). もしかするとグルタミン酸塩とアスパラギン酸塩は, 外有毛細胞においては高周波数に伴う運動エネルギー源として, 内有毛細胞においては, その運動能にを反映した神経伝達物質として必要ではないかと考察する.

いずれにせよ, 今回報告した細胞内輸送によって運搬される物質を同定することが次の大きな目標である.

文 献

- 1) Altschuler, R. A., Sheridan, C. E., Horn, J. W. and Wenthold, R. J.: Immunocytochemical localization of glutamate immunoreactivity in the guinea pig cochlea. *Hear Res*, 42: 167-173, 1989.
- 2) Artalejo, C. R., Elhamdani, A. and Palfrey, H. C.: Calmodulin is the divalent cation receptor for rapid endocytosis, but not exocytosis, in adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 16: 195-205, 1996.

- 3) Artalejo, C. R., Henley, J. R., McNiven, M. A. and Palfrey, H. C.: Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca^{2+} , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92: 8328–8332, 1995.
- 4) Cook, W. J., Walter, L. J. and Walter, M. R.: Drug binding by calmodulin: crystal structure of a calmodulin-trifluoperazine complex. *Biochemistry*, 33: 15259–15265, 1994.
- 5) Dallos, P. and Harris, D.: Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol*, 41: 365–383, 1978.
- 6) Erecinska, M. and Silver, I. A.: Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol*, 35: 245–296, 1990.
- 7) Frank, G., Hemmert, W. and Gummer, A. W.: Limiting dynamics of high-frequency electromechanical transduction of outer hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 4420–4425, 1999.
- 8) Furness, D. N., Hackney, C. M. and Steyger, P. S.: Organization of microtubules in cochlear hair cells. *J Electron Microsc Techn*, 15: 261–279, 1990.
- 9) Furness, D. N., Hulme, J. A., Lawton, D. M. and Hackney, C. M.: Distribution of the glutamate/aspartate transporter GLAST in relation to the afferent synapses of outer hair cells in the guinea pig cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol*, 3: 234–247, 2002.
- 10) Griesinger, C. B., Richards, C. D. and Ashmore, J. F.: FM1-43 reveals membrane recycling in adult inner hair cells of the mammalian cochlea. *J Neurosci*, 22: 3939–3952, 2002.
- 11) Griesinger, C. B., Richards, C. D. and Ashmore, J. F.: Apical endocytosis in outer hair cells of the mammalian cochlea. *Eur J Neurosci*, 20: 41–50, 2004.
- 12) Henkel, A. W. and Almers, W.: Fast steps in exocytosis and endocytosis studied by capacitance measurements in endocrine cells. *Curr Opin Neurobiol*, 6: 350–357, 1996.
- 13) Huang, G. and Santos-Sacchi, J.: Mapping the distribution of the outer hair cell motility voltage sensor by electrical amputation. *Biophys J*, 65: 2228–2236, 1993.
- 14) Kachar, B., Battaglia, A. and Fex, J.: Compartmentalized vesicular traffic around the hair cell cuticular plate. *Hear Res*, 107: 102–112, 1997.
- 15) Kipp, H. and Arias, I. M.: Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol*, 64: 595–608, 2002.
- 16) Levin, R. M. and Weiss, B.: Specificity of the binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of phosphodiesterase and to a series of other calcium-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 540: 197–204, 1978.
- 17) Meyer, J., Mack, A. F. and Gummer, A. W.: Pronounced intracuticular endocytosis in mammalian outer hair cells. *Hear Res*, 161: 10–22, 2001.
- 18) Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y. S., Anderson, R. G. and Bloom, G. S.: Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 115: 4327–4339, 2002.
- 19) Nakata, T., Terada, S. and Hirokawa, N.: Visualization of the dynamics of synaptic vesicle and plasma membrane proteins in living axons. *J Cell Biol*, 140: 659–674, 1998.
- 20) Neher, E. and Zucker, R. S.: Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, 10: 21–30, 1993.
- 21) Ottersen, O. P., Takumi, Y., Matsubara, A., Landsend, A. S., Laake, J. H. and Usami, S.: Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog Neurobiol*, 54: 127–148, 1998.
- 22) Saito, K.: Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti: subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. *Cell Tissue Res*, 229: 467–481, 1983.
- 23) Thalmann, R., Comegys, T. H., DeMott, J. E. and Thalmann, I.: Steep gradients of amino acids between cochlear endolymph and perilymph. *Laryngoscope*, 91: 1785–1791, 1981.
- 24) Toomre, D., Keller, P., White, J., Olivo, J. C. and Simons, K.: Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J Cell Sci*, 112: 21–33, 1999.
- 25) Tuma, P. L. and Hubbard, A. L.: Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev*, 83: 871–932, 2003.
- 26) Usami, S. and Ottersen, O. P.: Aspartate is enriched in sensory cells and subpopulations of non-neuronal cells in the guinea pig inner ear: a quantitative immunoelectron microscopic analysis. *Brain Res*, 742: 43–49, 1996.
- 27) Vondonselaar, M., Hickie, R. A., Quail, J. W. and Delbaere, L. T.: Trifluoperazine-induced conformational change in Ca^{2+} -calmodulin. *Nat Struct Biol*, 1: 795–801, 1994.
- 28) Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D. and Dallos, P.: Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature*, 405: 149–155, 2000.