蝸牛血管条の Adenylate Cyclase 活性の局在について†

瀬 口 春 道・小 林 俊 博・岡 田 暉 彦

要 約

内耳の蝸牛管血管条における cholera toxin により賦活化される adenylate cyclase 活性の局在を, cerium 塩法を用いて組織化学的に検出し, alkaline phosphatase (ALPase), Mg-ATPase, Ca-ATPase および Na, K-ATPase 活性局在と比較検討した。cholera toxin 処理による血管条の形態的变化はその辺縁細胞に認められ, 基底陥入部の細胞質突起の萎縮と一部のミトコンドリアの変性像が観察された。adenylate cyclase 活性は血管条の辺縁細胞基底陥入部 および 基底細胞に局在しており, その反応産物は形質膜上に微細な顆粒状として観察され, また基底陥入部の大型のミトコンドリアの outer chamber と cristae に反応産物が認められた。この反応は alloxan により阻害された。辺縁細胞の自由表面形質膜, コルチ器, ライスナー膜およびらせん靱帯の上皮には反応は全く検出されなかった。血管条の辺縁細胞において, adenylate cyclase 活性と Na, K-ATPase 活性の局在は一致し, このことは, 辺縁細胞が内リンパから K イオンを除去する際に, adenylate cyclase 活性は形質膜における電解質の透過性を変化させる調節的役割を担うものと考えられる。

緒 言

血管条を構成する辺縁細胞の基底陥入部形質膜には Na, K-ATPase 活性が局在しており¹⁾²⁾, その働きにより蝸牛管内の内リンパを低 Na 高 K イオン濃度に維持するものと考えられている。一方, 内耳組織には vasopressin や isoproterenol で賦活化される adenylate cyclase 活性があり³⁾, 形質膜におけるイオンの透過性を変化させることにより, 内リンパのイオン組成を調節するものと考えられている⁴⁾。内耳組織における adenylate cyclase 活性の局在についての組織化学的研究は Mees⁵⁾ および Zajic et al⁴⁾ によってなされている。Mees は血管条を構成する内皮細胞以外の全細胞群とらせん隆起部上皮細胞に, Zajic et al は血管条の辺縁細胞とライスナ

ー膜に反応陽性像を観察しており, 両者の結果に反応局在の相違がみられる。また, 彼らは strontium をりん酸捕捉剤とし, さらに鉛塩により反応産物を可視化する二段階法を用いており, 沈着物が細胞間隙に拡散している可能性があり, 厳密な活性の局在を反映しているとは言えない。Rechardt と Hervonen は cerium 塩をりん酸捕捉剤とした一段階法を開発した⁶⁾。cerium は非特異的沈着が少なく⁷⁾, また adenylate cyclase 活性に対する阻害作用が低い⁸⁾ 利点を有する。それ故, 我々は cerium 塩法を用い, 蝸牛管上皮における adenylate cyclase 活性の局在を検索した。一方, 内耳を cholera toxin 処理することにより内リンパ量の増大⁹⁾ と血管条などの c-AMP 量の上昇⁹⁾ が生理学的に観測されていることから, adenylate cyclase 活性の賦活剤として cholera toxin を使用した。また, 同酵素活性の局在を他の phosphatase (ALPase, Mg-ATPase, Ca-ATPase, Na, K-ATPase) 活性局在と比較し, その機能的関連性について検討した。

材料と方法

Hartley 種モルモット (体重 300-400 g) を材料に用いた。

adenylate cyclase 活性の検出法: Nembutal 麻酔下に, モルモット内耳の蝸牛よりらせん靱帯に付着した血管条を摘出し, $1 \mu\text{g/ml}$ cholera toxin (Sigma) を含む Eagle's MEM に 37°C , 10 分間浸漬した。浸漬後, 直ちに 0.1 M カコジル酸緩衝 ($\text{pH } 7.4$) 2% paraformaldehyde にて固定し, カコジル酸緩衝液で 4°C , 一夜洗浄した。酵素反応の条件は 37°C , 60 分, $\text{pH } 8.4$ である。酵素活性の検出には Rechardt と Hervonen の cerium 塩法 (50 mM Tricine buffer, 0.5 mM adenylyl-imidodiphosphate tetralithium: Sigma, 2 mM CeCl_3 , 3 mM MgCl_2 , 10 mM theophylline, 2.5 mM levamisole) を用いた。対照実験には cholera toxin 無処理の組織, 基質無添加あるいは 5 mM alloxan 添加反応液を使用した。

ALPase, Mg-ATPase, Ca-ATPase および Na, K-ATPase の活性の検出のためには, Nembutal 麻酔下に, モルモットの心臓より 0.85% 食塩水を灌流除血後, それぞれの酵素活性検出に至適の固定液を灌流し, 蝸牛か

† Demonstration of adenylate cyclase activity in stria vascularis of guinea pig cochlea.

Harumichi Seguchi, Toshihiro Kobasyahi and Teruhiko Okada

高知医科大学第2解剖学教室

らせん靱帯に付着した血管条を剔出して、さらに氷上にて固定液で1時間浸漬した。

ALPase 活性の検出法：固定液には 0.1 M カコジル酸緩衝 (pH 7.4) 2% glutaraldehyde を用いた。Mayahara et al の方法¹⁰⁾により 37°C, 15分間反応を行った。対照実験には基質無添加あるいは 2.5 mM levasisole 添加反応液を使用した。

Mg-ATPase 活性の検出法：上記固定液にて固定した組織を用いた。酵素活性は Ogawa と Mayahara の方法¹¹⁾で検出し、37°C, 15分間反応させた。対照実験には基質無添加あるいは 10 mM EDTA 添加反応液を用いた。

Ca-ATPase 活性の検出法：上記固定液にて固定した組織を用いた。酵素活性は Ando et al の方法¹²⁾で検出し、37°C, 10分間反応させた。対照実験には基質無添加、10 mM EGTA あるいは 10 mM PCMB 添加反応液を用いた。

Na, K-ATPase 活性の検出法：固定液には 0.1 M カコジル酸緩衝 2% paraformaldehyde を用い、Mayahara et al の方法¹³⁾で 37°C, 10分間反応を行った。対照実験には、基質無添加、10 mM ouabain 添加あるいはイオンを K イオンで置換した反応液を使用した。

反応終了後、試料を酵素反応液に用いた緩衝液で、ついで 0.1 M カコジル酸緩衝液にて洗浄後、1% オスミウム酸による後固定を施し、脱水後、Spurr のエポキシ樹脂に包埋した。Reichert OmU4 にて超薄切した。ade-

nylate cyclase および Na, K-ATPase 活性反応切片は無染色で、ALPase, Mg-ATPase および Ca-ATPase 活性反応切片は、酢酸ウラニルとくえん酸鉛の二重染色を行い、JEM-100S 電子顕微鏡にて観察した。

結 果

モルモット内耳の蝸牛管上皮において、cholera toxin で賦活化される adenylate cyclase 活性は血管条に観察された。cholera toxin 無処理の血管条では反応産物が認められず、酵素反応後の辺縁細胞は形態的に正常像を呈していた (図1)。一方、10分間の cholera toxin 処理により、adenylate cyclase 活性は辺縁細胞と基底細胞に観察されたが、辺縁細胞の基底陥入部の細胞質突起の萎縮と一部のミトコンドリアの変性像がみられた (図2, 3, 4, 5, 6)。中間細胞 (図3)、血管条内の血管内皮細胞およびその周皮細胞には認められなかった。辺縁細胞において adenylate cyclase 活性は基底陥入部に局在しており (図2, 3)、その反応産物は微細な顆粒状に形質膜上に観察された (図5)。細胞質内 および細胞間隙には非特異的沈着物はほとんど認められなかった。また、基底陥入部の大型のミトコンドリアでは outer chamber に反応の強陽性像が、cristae に弱陽性像が観察された (図4)。辺縁細胞の自由表面形質膜は反応陰性であった (図2)。対照実験として、cholera toxin 処理後、基質無添加あるいは 5 mM alloxan 添加反応液に浸漬した場合は、反応産物は検出されなかった (図6)。基底細胞層は扁平な細胞が数層重なっているが、adny-

図1 cholera toxin 無処理血管条の辺縁細胞基底陥入部。adenylate cyclase 活性は検出されない。×22,000 スケール=1 μm

図2 cholera toxin 処理血管条の辺縁細胞。adenylate cyclase 活性は基底陥入部形質膜とミトコンドリアに認められる。自由表面形質膜 (FS) は反応陰性である。×30,000 スケール=1 μm

- 図3 cholera toxin 処理血管条の辺縁細胞基底陥入部。adenylate cyclase 活性は中間細胞 (IC) には認められない。×18,000 スケール=1 μm
- 図4 cholera toxin 処理血管条の辺縁細胞内の大型ミトコンドリアの adenylate cyclase 活性。反応産物は outer chamber および一部の cristae にみられる。×50,000 スケール=0.1 μm
- 図5 辺縁細胞基底陥入部の拡大像。adenylate cyclase 活性の反応産物は微細な顆粒として形質膜上に認められる。×93,000 スケール=0.1 μm
- 図6 対照実験。cholera toxin 処理血管条を 5 mM alloxan 添加反応液に浸漬した場合には酵素活性は阻害され反応産物は検出されない。×16,000 スケール=1 μm

late cyclase 活性は相隣接する基底細胞の形質膜に観察され、その反応産物は同様に微細顆粒状に形質膜上にみられた。細胞間隙には沈着物は認められなかった (図8)。らせん靱帯に面する基底細胞の形質膜およびらせん靱帯中の線維芽細胞は反応陰性であった (図7)、コルチ器、らせん隆起部の上皮細胞, stroma cell と血管内皮細胞 (図9), およびライスナー膜を構成する蝸牛管側

の上皮細胞と前庭階側の内皮細胞 (図10) には adenylate cyclase 活性は認められなかった。上述の adenylate cyclase 活性の局在を、他の phosphatases (ALPase, Mg-ATPase, Ca-ATPase, Na, K-ATPase) 活性の局在と比較した。ALPase 活性は相接する辺縁細胞と中間細胞あるいは基底細胞の形質膜、相接する基底細胞の形質膜 (図11)、血管の内皮細胞に反応が観察され、その

図7 cholera toxin 処理血管条の基底細胞層。相接する基底細胞 (BC) の形質膜に adenylate cyclase 活性が観察される。らせん靱帯の線維細胞 (FC) は反応陰性である。×20,000 スケール=1 m μ

図8 基底細胞の拡大像。反応産物は形質膜上に微細な粒子として認められる。×50,000 スケール=0.1 μ m

図9 らせん隆起部の上皮細胞 (ESP), stroma cell (SC) および毛細血管 (C) には, adenylate cyclase 活性はみられない。×16,000 スケール=1 μ m

図10 ライスナー膜を構成する上皮細胞および内皮細胞には adenylate cyclase 活性は反応陰性である。×16,000 スケール=1 μ m

反応産物は形質膜の細胞間隙に面した部位に認められた。辺縁細胞の自由表面形質膜は反応陰性であった。反応液に 2.5 mM levasirole を添加することにより酵素反応は阻害された。Mg-ATPase 活性は血管内皮細胞には反応が認められず、辺縁細胞の自由表面形質膜に反応が観察された他は、ALPase 活性と同様の局在を示した

(図12)。対照実験として基質無添加あるいは 10 mM EDTA 添加反応液を用いた場合は反応産物は認められなかった。Ca-ATPase 活性は ALPase 活性と全く同様の局在を示した (図13)。この活性は 10 mM EGTA あるいは 10 mM PCMB により阻害された。上記三種の phosphatase の活性は中間細胞あるいは基底細胞と接

していない辺縁細胞の基底陥入部には認められなかった(図11, 12, 13)。Na, K-ATPase の活性は、血管条では辺縁細胞の基底陥入を形成する細胞突起の形質膜に観察され(図14)、その反応産物は形質膜の細胞質側に認められた。この活性は 10 mM ouabain により阻害され、K イオン依存性を示した。辺縁細胞の自由表面形質膜、

中間細胞、基底細胞および血管内皮細胞は反応陰性であった。今回、観察した5種類の phosphatase の血管条における活性局在を表1に示した。辺縁細胞基底陥入部において、adenylate cyclase 活性と Na, K-ATPase 活性の局在性の一致が確認された(表1)。

- 図11 血管条における ALPase 活性の反応像。反応は辺縁細胞と中間あるいは基底細胞の相接する細胞間隙、および相接する基底細胞間に陽性である。
×6,000 スケール=1 μ m
- 図12 血管条における Mg-ATPase 活性の反応像。辺縁細胞と中間あるいは基底細胞の相接する細胞間隙、および相接する基底細胞間に酵素活性が観察される。毛細血管の内皮細胞は反応陰性である。×6,000 スケール=1 μ m
- 図13 血管条における Mg-ATPase 活性の反応像。辺縁細胞と中間あるいは基底細胞の相接する細胞間隙、相接する基底細胞間に酵素活性、および毛細血管(C)の内皮細胞に反応が認められる。×6,000 スケール=1 μ m
- 図14 血管条における Na, K-ATPase 活性の反応像。酵素活性は辺縁細胞の基底陥入部に局在しており、自由表面形質膜や基底細胞は反応陰性である。
×6,000 スケール=1 μ m

表1 血管条における phosphatase 群の活性局在
Localizations of phosphatase activities in Guinea pig Stria vascularis

	Marginal cells		Intermediate cells	Basal cells	Endothelial cells
	Free surface	Basal infolding			
Alkaline phosphatase	—	—	+	+	+
Mg-ATPase	+	—	+	+	—
Ca-ATPase	—	—	+	+	+
Na, K-ATPase	—	+	—	—	—
Adenylate cyclase	—	+	—	+	—

考 察

内耳の蝸牛管上皮において, cerium 塩法により cholera toxin で賦活化される adenylate cyclase の活性は血管条にのみ観察された。らせん隆起の上皮およびライスナー膜には同酵素の活性は全く認められず, Mees あるいは Zajic et al の報告とは一致せず, 彼らの結果には酵素反応によらない非特異的沈着物を検出した可能性が考えられる。そのため, adenylate cyclase の厳密な活性局在を得るためには, 酵素活性の検出法について再度, 検討する必要があると考えられる。今回, adenylate cyclase 活性は cerium 塩法により, Na, K-ATPase 活性は鉛法を用いて検出し, 両酵素共に辺縁細胞において一致した活性局在を示したが, Na, K-ATPase 活性を cerium 塩法で検出した場合, 鉛法の場合と活性局在が一致しており¹⁴⁾¹⁵⁾, 酵素活性により遊離されたりん酸を捕捉する物質の種類による局在性への影響はないものと考えられる。cholera toxin は adenylate cyclase 活性の特異的な賦活剤であることが腸粘膜¹⁶⁾, 肝臓¹⁷⁾, 甲状腺¹⁸⁾, 腎臓¹⁹⁾など多くの組織で報告されており, 内耳組織においても cholera toxin を注入した場合, ライスナー膜および血管条の c-AMP 量が上昇し, 内リンパ量が増大する⁸⁾⁹⁾ことが報告されており, 内耳の adenylate cyclase 活性の組織化学的検出には, 賦活剤として cholera toxin を利用した。adenylate cyclase の機能については, 腎臓の集合管において, vasopressin 結合部位を有する adenylate cyclase が上皮細胞の基底部形質膜にあり, 産生される c-AMP を介して, 管腔に面する上皮細胞形質膜に水の透過性に変化を生ぜしめる²⁰⁾という報告がある。蝸牛にある adenylate cyclase 活性が vasopressin で賦活化される³⁾ことから, Zajic et al⁴⁾は, 血管条の場合も腎臓集合管と同様な機構があると考えている。ライスナー膜に adenylate cyclase 活性があることが生理学的に示唆されている⁵⁾が, 今回の結果ではライスナー膜には adenylate cyclase 活性の局在は認められず, 上記の報告とは一致しなかった。adenylate cyclase 活性

の局在を他の phosphatase 活性の局在と比較した場合(表1), 血管条辺縁細胞においては, adenylate cyclase 活性は Na, K-ATPase 活性と一致した局在を示し, 辺縁細胞の Na, K-ATPase 活性が内リンパから Na イオンを除去し, 内リンパに K イオンを供給することにより, 内リンパを高 K 低 Na イオン濃度組成に維持する際に, adenylate cyclase 活性は辺縁細胞の形質膜のイオン透過性を変化させることにより内リンパ量の動的平衡状態を変える役割があるものと考えられる。このことは, 何らかの原因により adenylate cyclase 活性に異常が生じた場合, それにともなって内リンパ圧の変化が起こり得る可能性を示唆するものである。

謝 辞

この研究は昭和62年度厚生省特定疾患, 前庭機能異常調査研究班(班長 北原正章)の研究費補助金の援助による。

文 献

- 1) Seguchi H, Kobayashi T: Ultracytochemical localization of ouabain-sensitive, K^+ -dependent p-nitrophenyl phosphatase activity in the guinea pig stria vascularis. *Acta Histochem Cytochem* 16: 610-613, 1983
- 2) Kobayashi T, Seguchi H, Okada T, Yagyu K: Ultracytochemical study of the stria vascularis of the guinea pig cochlea. *Anat Anz* 160: 101-114, 1985
- 3) Zenner HP, Zenner B: Vasopressin and isoproterenol activate adenylate cyclase in the guinea pig inner ear. *Arch Otorhinolaryngol* 222: 275-283, 1979
- 4) Zajic G, Annkio M, Schacht J: Cellular localization of adenylate cyclase in the developing and mature inner ear of the mouse. *Hearing Res* 10: 249-261, 1983
- 5) Mees K: Cytochemical localization of adenylcy-

- ase in the lateral wall of the inner ear. Arch Otorhinolaryngol 240 : 55-61, 1984
- 6) Rechart L, Hervonen H : Cytochemical demonstration of adenylate cyclase activity with cerium. Histochemistry 82 : 501-505, 1985
 - 7) Robinson JM, Karnovsky MJ : Ultrastructural localization of several phosphatases with cerium. J Histochem Cytochem 31 : 1197-1208, 1983
 - 8) Feldman AM, Brusilow SW : Effects of cholera toxin on cochlear endolymph production : Model for endolymphatic hydrops. Proc Natl Acad Sci 73 : 1761-1764, 1976
 - 9) Thalmann R : Effects of loop diuretics, mercurials and other diuretic substances upon the physiological chemistry of the cochlea. Scand Audiol 514 : 119-129, 1981
 - 10) Mayahara H, Ogawa K : The effect of thickness of specimen on the ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the rat proximal convoluted tubule. J Histochem Cytochem 16 : 721-724, 1968
 - 11) Ogawa K, Mayahara H : Intramitochondrial localization of adenosine triphosphatase activity. J Histochem Cytochem 17 : 487-490, 1969
 - 12) Ando T, Fujimoto K, Mayahara H, Miyajima H, Ogawa K : A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of Ca^{2+} -ATPase activity. Acta Histochem Cytochem 14 : 705-726, 1981
 - 13) Mayahara H, Fujimoto K, Ogawa K : A new one-step method for the cytochemical localization of ouabainsensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity. Histochemistry 677 : 125-138, 1980
 - 14) Okada T, Kobayashi T, Hakoi K, Seguchi H : A simple method for light microscopical visualization of phosphohydrolase activities in materials processed for cerium-based ultracytochemistry. Acta Histochem Cytochem 20 : 105-110, 1987
 - 15) Kobayashi T, Okada T, Seguchi H : Cerium-based cytochemical method for detection of ouabain-sensitive potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity at physiological pH. J Histochem Cytochem 35 : 601-611, 1987
 - 16) Sharp GW, Hynie S : Stimulation of intestinal adenyl cyclase by cholera tolera toxin. Nature 229 : 266-269, 1971
 - 17) Gorman RE, Bitensky MW : Selective effects of cholera toxin on the adrenaline responsive component of hepatic adenyl cyclase. Nature 235 : 439-440, 1972
 - 18) Mashiter K, Mashiter GD, Hauger RL, Field JB : Effects of cholera and E. coli enterotoxins on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate levels and intermediary metabolism in the thyroid. Endocrinology 92 : 541-549, 1973
 - 19) Dousa TP, Walter R, Schwartz IL, Sands H, Hechter O : Role of cyclic AMP in the action of neurohypophyseal hormones on kidney. In ed Greengard P. and Robinson GA. Advances in Cyclic Nucleotide Research. Vol 1. pp 121-135, Raven Press, New York, 1972
 - 20) Strewler GJ, Orloff J : Role of cyclic nucleotides in the transport of water and electrolytes. Adv Cyc Nucl Res 8 : 311-316, 1977

Abstract

Cholera toxin-stimulated adenylate cyclase activity was demonstrated cytochemically in the stria vascularis of the guinea pig inner ear by the cerium method of Rechart and Hervonen, and it was compared with ALPase, Mg-ATPase, Ca-ATPase and Na, K-ATPase activity. Adenylate cyclase activity was observed in the marginal and basal cells. The reaction products were fine granular particles on the plasma membrane of the basal infoldings of the marginal cells, but not on that of the free surface facing the endolymphatic space. Enzyme activity was also observed in the large mitochondria ; the reaction was intense in the outer chamber and weak in the cristae, was inhibited by 5 mM alloxan. The plasma membranes of adjacent basal cells showed a positive reaction. No enzyme activity was detected in the intermediate cells, the endothelial cells of the capillaries in the stria vascularis, fibrocytes in the spiral ligament, epithelial cells of the spiral prominence, Corti's organ or Reissner's membrane. In the marginal cells, the location of adenylate cyclase activity corresponded with that of Na, K-ATPase activity. Therefore, the adenylate cyclase activity of the stria vascularis may play a role in the regulation of the membrane permeability to water and electrolytes while Na, K-ATPase acts as an ion pump to maintain high potassium

and low sodium ion concentrations in the endolymph.

Key words: stria vascularis, adenylate cyclase,
enzyme histochemistry

(原稿到着：昭和63年4月18日)
(別刷請求先：瀬口春道
〒781-51 南国市岡豊町小蓮
高知医科大学第2解剖学教室)