前庭単離有毛細胞の F-アクチン

宮脇 浩紀・工田 昌也・有重 秀三

原田 康夫

F-actin of Isolated Vestibular Hair Cells

Hironori Miyawaki, Masaya Takumida, Shuzo Arishige
Yasuo Harada

Department of Otolaryngology, Hiroshima University School of Medicine

Isolated living vestibular sensory cells are capable of producing self movement. After exposure to a medium containing a high concentration of potassium, type I cells show tilting of the neck portion accompanied by tilting of the hair bundle. Actin, a protein associated with the cytoskeleton and cell motility, is thought to be related to vestibular hair cell motility. The localization of F-actin in isolated vestibular hair cells has been studied with the use of FITC-labeled phalloidin. In hair cells fixed by paraformaldehyde, actin filaments are distributed in the hair bundle and cuticular plate. In frozen fixed cells perfused by artificial perilymph, strong localization was found in the hair bundle and cuticular plate, as well as throughout the cytoplasm. In frozen fixed cells perfused with artificial endolymph containing a high concentration of potassium, the staining of hair bundle and cuticular plate was less. The changes of this actin staining pattern may be closely related to the mechanism of self movement.

Key words: isolated vestibular cell, self movement, F-actin

はじめに

近年、蝸牛外有毛細胞には運動性¹⁾²⁾が認められ、その運動にはアクチンを主体とした細胞骨格の関与することが明らかにされている。

一方、最近、前庭有毛細胞にも同様の運動性のあることが明らかにされている³⁾。すでに我々も外液環境の変化により前庭単離有毛細胞が運動性を示すことを報告した⁴⁾。今回はその運動に関与する構造を明らかにするため、前庭単離有毛細胞の F-アクチンの局在について免疫組織学的に検

討した。

方 法

前庭有毛細胞の単離はプライエル耳介反射正常な体重約 250-300g の有色モルモットを用いた。pentobarbital 25mg/kg 腹腔内投与による全身麻酔後、断頭し側頭骨を摘出し、実体顕微鏡下に卵形囊斑及び膨大部稜を採取した。さらに 0.5mg/ml papain にて酵素処理した後、人工外リンパ液 (NaCl 130.0mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.25mM, Glucose 10.0mM, HEPES 5.0mM, 300mosm pH 7.2) 中で前庭有毛細胞の機械的単離を行った。単離細胞における F-アクチンの局在を

観察するために、人工外リンパ液中の前庭単離有毛細胞を1% paraformaldehyde にて2分間固定した後、0.1% Triton x-100 で2分間処理し、F-アクチン特異抗体である4 μ g/ml phalloidin で30分間反応させ、0.1M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 で5分づつ3回洗浄した状態と、dry ice で冷却した Ethanol で固定し、0.5% Triton x-100 で2分間処理し、phalloidin に反応させた状態での2方法で試料作製し落射蛍光装置 EFD 2, 顕微鏡 OPTIPHOT 2 にて観察した。

更に運動によるF-アクチンの局在の変化を調べるため単離有毛細胞の外液を人工外リンパ液から高濃度カリウムを含む人工内リンパ液 (NaCl 10.0mM, KCl 120.0mM, Glucose 8.0mM, HEPES 5.0mM 300mosm pH 7.2) に置換した後、dry ice で冷却した Ethanol で凍結固定し、Triton x-100 で処理して phalloidin を同様に反応させ観察した。

結 果

F-アクチンの局在

人工外リンパ液中の単離有毛細胞を paraformaldehyde で固定すると細胞の cuticular plate と cilia に強い蛍光が認められた。しかし細胞質には余り強い蛍光は認められなかった (図1)。Ethanol で凍結固定した細胞では、cuticular pla-

te 及び cilia に強い蛍光がみられたのに加え、細胞質もびまん性に蛍光が認められた (図2)。

人工外リンパ液から人工内リンパ液に置換した状態で凍結固定した細胞では人工外リンパ液中の細胞を固定した状態に比べ cuticular plate 及び

図2 dry ice で冷却した ethanol で固定した人工外リンパ液中の I 型細胞
cilia 及び cuticular plate に強い蛍光が認められる。細胞質全体にもびまん性に強い蛍光が認められる。

図1 paraformaldehyde で固定し phalloidin で染色した I 型細胞
cilia 及び cuticular plate に強い蛍光が認められる。

図3 dry ice で冷却した ethanol で固定した人工内リンパ液中の I 型細胞
cilia 及び cuticular plate の蛍光が低下し、細胞質の蛍光の方が強くなっている。

cilia の蛍光が低下し、逆に相対的に細胞質の蛍光が強くなる変化がみられた (図3)。

考 察

近年、単離蝸牛外有毛細胞を用いた研究が数多く行われ、外有毛細胞は電気刺激に対するいわゆる「速い運動」と高濃度カリウムを負荷した時や低浸透圧にした場合にみられる「遅い反応」を有していることが知られている。一方、前庭単離有毛細胞にも蝸牛外有毛細胞と同様な運動性の認められることが最近報告されている⁹⁾。我々も外液環境を高濃度カリウムを含む人工内リンパ液に置換することにより、細胞体の頸部及び cilia が kinocilium 側へ傾く変化がみられることを報告した⁹⁾。この運動は外有毛細胞と同様に形質膜を介したイオン輸送に連動した水の移動と細胞内に Ca^{2+} が増加し、アクチンとミオシンの相互作用によって収縮がおこることによると考えられている⁹⁾。

収縮蛋白であるアクチンは monomeric な状態と polymerized な型で細胞内に存在するが、polymerized された型で contractile component として働く⁹⁾。polymerized された型である F-アクチンの局在を明らかにするため免疫組織学的に多くの検討が行われている。F-アクチンを特異抗体である phalloidin で染色すると蝸牛外有毛細胞では、stereocilia 及び cuticular plate に強い蛍光がみられ、lateral wall にも F-アクチンの局在が認められるとされている⁹⁾。また、ホルマリンなどで化学固定した場合には cuticular plate から核に向かってのびる infra cuticular network (ICN) として強い蛍光が認められる⁹⁾。Carlisle ら⁸⁾ は、ICN は蝸牛の上方回転に顕著に認められるが、第1回転には認められないとし、ICN は細胞体を支える役割をすると推測しているが、Slepecky¹⁰⁾ は化学固定や音響負荷、薬剤により細胞が侵襲を受けた結果としても生じる可能性を示唆しており、その存在意義は明らかではない。一方、山根ら¹⁰⁾ はホルマリン固定で前庭単離有毛細胞でも蝸牛外有毛細胞と同様に ICN が認められたとしているが、今回の我々が Slepecky の方法⁹⁾ に従い paraformaldehyde で固定した状態では、cuticular plate 及び cilia には強い蛍光が認められたが、はっきりとした ICN は認められなかった。いずれにせよ cilia 及び cuticular plate

に F-アクチンの存在することは間違いないと考えられる。また、Slepecky¹⁰⁾ は外有毛細胞をエタノールで凍結固定することにより細胞質にびまん性に F-アクチンの存在することを報告しているが、今回の実験でも単離前庭有毛細胞において同様に、cuticular plate, cilia に強い蛍光が認められ、細胞質にもびまん性の蛍光がみられた。

蝸牛外毛細胞においてはミオシンは stereocilia における存在には議論のあるものの cuticular plate に存在することは確実とされている⁹⁾。前庭有毛細胞ではトロポミオシンとともにミオシンは、cuticular plate に同定されている¹²⁾。Alain ら¹³⁾ はミオシン、トロポミオシンは共に cuticular plate ではなく感覚細胞の頂部表面にのみ同定できたとしながらも cuticular plate での存在を否定できないとしている。アクチンとミオシンの相互作用は、これまでの研究から主に cuticular plate でおこっていると予想される。今回の実験で人工内リンパ液中の細胞を凍結固定した場合に、cuticular plate 及び cilia の蛍光が低下したことは、F-アクチンの局在に変化が起こり、これが高濃度 K^{+} を負荷することにより細胞体の cilia 及び頸部が傾く運動に関係していると考えられた。

ま と め

1) 人工外リンパ液中の単離前庭有毛細胞を 1% paraformaldehyde で固定し、F-アクチン特異抗体である phalloidin で染色すると cilia 及び cuticular plate に蛍光が認められ、この部に F-アクチンの存在する可能性が示唆された。しかし、ICN の存在は、はっきり認められなかった。

2) dry ice で冷却した Ethanol で固定した状態では cilia 及び cuticular plate に蛍光が認められたが、細胞質にもびまん性に蛍光が認められた。

3) 外液環境を人工内リンパ液に置換し高濃度 K^{+} を負荷した状態で Ethanol で凍結固定すると、cilia 及び cuticular plate の蛍光が低下し相対的に細胞質の蛍光が上昇した。これは F-アクチンの局在に変化が起こり、これが細胞体の運動性に関係していると考えられた。

本研究の一部は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班の研究費補助により行われた。

本論文の要旨は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班平成4年度総会において発表した。

文 献

- 1) Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, et al : Evoked mechanical response of isolated cochlear outer hair cell. *Science* 227 : 194-196, 1985
- 2) Zenner HP, Zimmerman V, Schmitt V : Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear Res* 18 : 127-133, 1985
- 3) Dider A, Decory L, Cazals Y : Evidence for potassium induced motility in type I vestibular hair cells in the guinea pig. *Hear Res* 46 : 171-176, 1989
- 4) 宮脇浩紀, 有重秀三, 工田昌也, 他 : 前庭単離有毛細胞の運動性について. *Equilibrium Res Suppl* 8 : 95-99, 1992
- 5) 高坂知節 : 蝸牛の微細構造と音受容機構. *Otology Japan Suppl* 2, 1991
- 6) NB Slepecky, M Ulfendahl : Actin-binding microtubule associated proteins in the organ of Corti. *Hear Res* 57 : 201-215, 1992
- 7) PR Throne, L Carlisle, G Zajic, et al : Differences in the distribution of F-actin in outer hair cells along the organ of Corti. *Hear Res* 30 : 253-266, 1987
- 8) L Carlisle, G Zajic, RA Altshuler, et al : Species differences in the distribution of infracuticular F-actin in outer hair cells of the cochlear. *Hear Res* 33 : 201-206, 1988
- 9) N Slepecky : An infracuticular network is not required for outer cell shortening. *Hear Res* 38 : 135-140, 1989
- 10) 山根英雄, 中井義明, 小西一夫, 他 : 内耳感覚細胞の運動性と細胞骨格. *Equilibrium Res Suppl* 6 : 47-51, 1990
- 11) N Slepecky : Cytoplasmic actin and cochlear outer hair cell motility. *Cell Tissue Res* 257 : 69-75, 1989
- 12) D Dreckhahn, T Schafer, M Prinz : Actin, myosin, and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs : immunocytochemical and biochemical studies. In : DG Drescher (ed) *Auditory Biochemistry*. Charles C Thomas Publisher, Springfield, 1985, 317-335
- 13) A Sans, P Atger, C Cavadore, et al : Immunocytochemical localization of myosin, tropomyosin and actin in vestibular hair cells of human fetuses and cats. *Hear Res* 40 : 117-126, 1989

(原稿到着 : 平成 5 年 4 月 16 日
 別刷請求先 : 宮脇浩紀
 〒734 広島市南区霞 1 丁目 2 番 3 号
 広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)