

学位請求論文の内容の要旨

| | |
|--|---|
| 論文提出者氏名 | 感覚統合科学領域耳鼻咽喉・頭頸部外科学教育研究分野 氏名 長 岐 孝 彦 |
| <p>(論文題目)</p> <p>Effects of cholesterol alterations are mediated via G-protein-related pathways in outer hair cells</p> <p>(外有毛細胞におけるコレステロール変化がもたらす効果は G 蛋白関連の細胞内シグナル伝達系を介する)</p> | |
| <p>(内容の要旨)</p> <p>哺乳類の蝸牛は能動的に音を増幅する事により、周波数特異的に感受性を高める機能を有する。この蝸牛増幅機構において、外有毛細胞が極めて重要な役割を果たしている事が報告されている。外有毛細胞は電氣的・機械的・化学的刺激により反応性に伸長・短縮する事が可能である。電氣的な刺激に対する伸縮は、細胞膜上のモーター蛋白である prestin によってもたらされ、これによって外有毛細胞は 20kHz 以上の高い振動数に同調し、ナノ単位での伸縮運動が可能である (fast motility)。一方で外有毛細胞は化学的な変化や機械的な刺激により、その長さを変化させる事が可能である (slow motility)。外有毛細胞の細胞骨格は、アクチン・スペクトリンが格子状に細胞膜を裏打ちする事によって形成されている (cortical lattice) が、これらの間には数百の pillars が介在し、骨格を維持している。</p> <p>コレステロールは細胞膜に不可欠な構成要素であり、その硬度や流動性を規定する。過去の研究により、MβCD や水溶性コレステロールによって処理された外有毛細胞は硬度やキャパシタンス、可動性が変化する事が示されている。これらの結果は、MβCD やコレステロールによって細胞骨格の変化が生じている可能性を示唆する。</p> <p>そこで今回我々は G 蛋白を介する細胞内シグナル伝達系に着目し、これらが MβCD やコレステロールによって生じる電位依存性のキャパシタンスの変化に影響を及ぼすかを、パッチクランプ法を用いて検討した。</p> <p>Ginea pig の蝸牛から単離した外有毛細胞に対し、two-sine voltage stimulus protocol により 200m 秒間、-150~140mV の ramp による電位を負荷し、そのキャパシタンスの変化を評価した。一方の群にはパッチピペットを介して細胞内に GTP アナログである 100μM の Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) tetralithium salt (GTPγS) を投与した。もう一方の群には同じくパッチピペットを介して GDP アナログである 600μM の Guanosine 5'-(β-thio) diphosphate trilithium salt (GDPβS) を投与。これらを、細胞内に何も投与しない群 (コントロール群) と比較し検討した。</p> <p>細胞外から 1mM の MβCD を含む細胞外液を 10 分間灌流し、細胞膜上のコレステロールを除去した場合、コントロール群は従来に報告に矛盾しない結果であった。すなわち voltage-Cm (V-Cm) function (いわゆる non-linear capacitance) は脱分極方向へシフトし、キャパシタンスの最大値における電位 (V_{cmpeak}) は増加し (73.32 ± 11.09 mV)、キャパシタンスの最大値 (C_{mpeak}) は低下した (-9.09 ± 2.10 pF) ($n=7$)。</p> <p>一方で GTPγS を細胞内に投与した群においては、同様に MβCD 溶液を細胞外に灌</p> | |

流しても、non-linear capacitance の変化が抑制され、その結果 V_{cmpeak} の増加は $9.73 \pm 10.92\text{mV}$ 、 C_{mpeak} の減少は $-3.08 \pm 1.91\text{pF}$ に抑制された。

更に GDP β S が外有毛細胞に及ぼす影響について検討した。細胞外から 1mM の水溶性コレステロール溶液を灌流し細胞膜上にコレステロールを取り込ませた場合、従来の報告では non-linear capacitance が過分極方向へシフトする事が分かっている。しかしながらこの変化は検出が困難である事から、水溶性コレステロールを負荷する以前に、まず 1mM の M β CD 溶液を 4 分間灌流し、non-linear capacitance を一旦脱分極方向にシフトさせ、その後コレステロール溶液を灌流し、その変化を見る方法を用いた。その結果、コントロール群においては従来の報告通りコレステロール灌流により non-linear capacitance は過分極方向へシフトし、その結果 V_{cmpeak} は $9.19 \pm 6.68\text{mV}$ 減少し、 C_{mpeak} は $2.14 \pm 0.44\text{pF}$ 増加した。一方、細胞内に GDP β S を投与した群においては、non-linear capacitance のシフトが抑制され、 V_{cmpeak} は $5.13 \pm 10.46\text{mV}$ と増加し、 C_{mpeak} は $0.55 \pm 1.39\text{pF}$ 減少した(n=6)。

以上の様に、細胞内に GTP γ S を投与すると M β CD の効果が抑制され、GDP β S を投与するとコレステロールによる効果が抑制される結果が得られた。本研究が示すこれらの結果は、外有毛細胞膜上のコレステロール量に変化した際に生じる細胞骨格の変化が、G 蛋白を介した細胞内シグナル伝達系によって制御されている可能性を示唆する。G 蛋白が外有毛細胞の細胞骨格をいかに制御しているか、そこにコレステロールがどのように関わっているかについては、今後更なる詳細な研究を要する。