



## Electrically driven motor in the outer hair cell : effect of a mechanical constraint

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 足立, 昌彦 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1622">http://hdl.handle.net/10271/1622</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 345号	学位授与年月日	平成13年 4月20日
氏名	足立昌彦		
論文題目	Electrically driven motor in the outer hair cell : effect of a mechanical constraint (外有毛細胞の電気運動 : 力学的な制約の影響)		

博士(医学) 足立昌彦

論文題目

Electrically driven motor in the outer hair cell : effect of a mechanical constraint

(外有毛細胞の電気運動：力学的な制約の影響)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

哺乳動物の外有毛細胞(Outer hair cell, OHC)は、細胞膜電位の変化に伴ってその円柱状の細胞体を伸縮させるという運動性を持ち、蝸牛の active mechanism における中心的な作用体として働いている。形質膜の外側壁において引き起こされるこの運動メカニズムの特徴を明らかにするために細胞骨格をトリプシンで融解させ、細胞を球状にした状態で、膜容量と細胞半径の電位依存に対する変化について調べた。

〔材料ならびに方法〕

パッチクランプ法(Patch-clamp technique)のホールセルモード(Whole-cell mode)で実験を行い静止膜電位(Holding potential)は $-80\text{mV}$ とした。外有毛細胞の細胞骨格を融解するためにパッチパイペットから $0.2\text{mg/ml}$ のトリプシンを注入した。トリプシンを含む細胞内溶液がパイペットから細胞内に注入されると、細胞骨格は融解され細胞は球形に変化する。パッチパイペットの圧力を調節することによって $0\sim 1\text{kPa}$ まで細胞内圧を変化させた。電位変化に対する膜容量の測定に際しては、階段状に変化する電位波形を与え、その間の電荷の移動量により決定した。電位波形の持続時間は電位変化中に細胞内の体積が変化しないように短くして( $3\text{ms}$  間隔)実験を行った。一方で、持続時間の長い( $100\text{ms}$  間隔)電位波形でも同様の実験を行い、その時の半径と電荷の移動量を調べた。

〔結果〕

短い電位波形を加えた場合の結果は以下の通りである。細胞内圧が $0.2\text{kPa}$ 以下の状態では、膜容量は円柱状細胞と同様のベル型の膜電位依存性を示した。しかし、 $0.3\text{kPa}$ 以上の内圧を加えた時の膜容量は、最大値が大きく下がった。この実験中、細胞半径は測定可能なほどの変化は見られなかった。

長い持続時間の電位波形を加えた場合は、細胞内圧を $0.3\text{kPa}$ 以上に保っても面積を完全に制約することができないために膜容量に変化がおこる。上昇電位を与えた時の方が下降電位を与えた時よりも膜容量は小さな値となった。細胞半径の変形は最大 $1\%$ の範囲内で確認された。

〔考察〕

外有毛細胞の形質膜は、膜を横断する電荷を蓄えており、この電荷の移動に伴って細胞体が伸縮運動を起こす。この運動性には、形質膜に存在するモーター蛋白質が関与していると考えられているがその詳細な機構は未だ不明である。高周波領域でこの伸縮運動が起こるためには、セカンド・メッセンジャーを介さず、電気的エネルギーから機械的エネルギーへの変換が直接起こる機構が理想である。

一般論として円柱状等の他の形と比べて球形の状態では、等しい表面積において最大の体積を持つという特徴がある。さらに主に水から成り立つ細胞内成分の圧縮は球形細胞においては不可能であるから

表面積の変化は起こらない。今回の実験では、細胞を球形にしたうえでパイペットより加圧して細胞内圧を上げることにより表面積の変化を力学的に制約した。この細胞に短い電位波形を与えた場合、膜容量の値は減少し膜の電荷移動は制限された。つまり、膜面積変化と電荷移動は直接カップリングしていることから、電気エネルギーを保持するモーター蛋白質がこのエネルギーを直接的に機械的エネルギーに変えていることを示した。長い電位波形を加えた場合においても、パイペットと細胞内に水の移動が存在したと考えられる半径変化と膜容量の変化が観察され、直接的な電気機械エネルギー変換機構を証明することができた。

今回の実験から得られた、細胞骨格を破壊した状態のモーター蛋白質の基本的特性は、すでに報告されている円柱状態の外有毛細胞の特性と同様であり、細胞外側壁に存在するモーター蛋白質が運動性に重要な役割を持っていることを示唆している。

#### 〔結論〕

トリプシン処理をして外有毛細胞の細胞骨格を破壊し、細胞内圧を上げた状態で、膜電位に依存した膜容量と細胞の半径変化について調べた。表面積を力学的に制約すると電荷移動が減少することから、外有毛細胞においては面積変化と電荷の移動がカップリングしている事が明らかにされた。この結果は外有毛細胞の形質膜に存在するモーターを分子レベルで解明する手がかりになると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

蝸牛の外有毛細胞は聴覚における周波数弁別能に大きな役割を果たしていることが知られているが、その実際の機構については明確にはわかっていない。特に、外有毛細胞がその形状を膜電位に応じて変化させ運動することができる点が周波数弁別能との関連において重要視されているが、その運動の分子機構について不明な点が多い。申請者は、この運動性の特徴を明らかにする目的で、細胞内骨格を取り去りほぼ細胞膜だけにした外有毛細胞標本において、駆動モーターの活性の指標として膜タンパクの電荷移動量(すなわち膜容量)と細胞運動の指標としての細胞径の変化を測定し、細胞内圧を選んだ条件で、それらの電圧依存性を調べた。

申請者は、モルモットの蝸牛から外有毛細胞を単離し、パッチクランプ法を用いた実験を行った。細胞膜にパッチ電極を当て、この電極を通してトリプシンを細胞内に導入して細胞内骨格を融解した。この結果球形に変化した細胞において、パッチ電極より細胞内に静水圧をかけながら膜電圧固定実験を行い、膜電圧と膜電荷移動量の関係を調べた。同時に微分干渉顕微鏡下に電圧に応じた細胞の変形の程度を観察した。

短い(3 ms)パルス電圧で膜容量測定をした場合で、細胞内圧が低い(0.2kPa 以下の)ときには、電荷移動量は過分極側と脱分極側の両端で減少するようなベル型の電圧依存性を示した。また、細胞内圧を高めた(0.3kPa 以上の)ときには、電荷移動量のベル型中央の最大値が大きく減少した。いずれの場合も細胞の大きさの変化は認められなかった。一方、長い(100ms)パルス電圧で膜容量測定をした場合には、細胞内圧が低いときには短いパルスで測定したときと同じ電圧依存性が認められ、細胞内圧が高くても大きな膜容量変化が見られ、細胞半径は約1%程度の減少をすることが分かった。静水圧の上昇では細胞半径は変化しなかった。

細胞を球形にしさらに細胞内に加圧し細胞膜面積が変化しにくいように制約を与えた条件では、電位

依存性の膜電荷の動きは減少することが明らかになった。膜電位のエネルギーが直接的に細胞膜タンパクの機械的変形のエネルギーになっていることを示している。長いパルス電圧を与えたときに大きな膜容量変化が観察され、同時に細胞の大きさの変化が検出されたことは、細胞内骨格やセカンドメッセンジャーの関与を否定し、電気エネルギーが直接的に膜の機械的変形を引き起こすことを結論づけた。

審査委員会は、困難な実験手技により、特殊な能力をもつ細胞である外有毛細胞の起動力が細胞膜にあることを示し、その運動機構の大筋を明らかにした点を高く評価した。

上記のような申請者の論文の示説に対し、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 鼓膜の生理学的役割はどのようなものか
- 2) 有毛細胞が伸縮するときに細胞体積はどのように変化するのか
- 3) 球形細胞における細胞骨格はどのような状態にあるのか
- 4) 有毛細胞内のミトコンドリアについて
- 5) ATP は運動性に関係があるか
- 6) Subsurface cistern の役割はどのようなものか
- 7) プレスチンの膜タンパクとしての特徴は何か
- 8) アスピリンの有毛細胞収縮運動に及ぼす効果について
- 9) 膜容量変化のうち細胞膜面積の変化が占める分はどのように取り扱うか
- 10) イオンチャネル活動が運動の起源であるとする説はどのように検証されるか
- 11) 実験結果とモデルの妥当性について
- 12) モデルを完全に証明する実験はどのようなものが考えられるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 寺川 進  
副査 福田 敦夫 副査 梅村 和夫