

氏名(本籍)	せなりた 瀬成田	まさ 雅	みつ 光	(茨城県)
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博乙第1,160号			
学位授与年月日	平成8年1月31日			
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当			
審査研究科	医学研究科			
学位論文題目	哺乳類コルチ器及び鳥類基底乳頭のカルシウム結合蛋白の研究			
主査	筑波大学教授	理学博士	坂内四郎	
副査	筑波大学教授	医学博士	小山哲夫	
副査	筑波大学教授	薬学博士	後藤勝年	
副査	筑波大学教授	医学博士	本村幸子	
副査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直	

## 論文の要旨

### (目的)

カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) は内耳における音受容機構において重要な働きを果たしていると考えられている。特に、哺乳類内耳の外有毛細胞において確認されている‘遅い収縮’は  $\text{Ca}^{2+}$  に依存性であると考えられており、細胞内貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  の動員が必要であることが実験的に証明されている。しかしながら、現在のところ、その貯蔵部位の詳細は明らかになっていない。また、コルチ器内の  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白についても、これまで免疫組織化学的方法により既知の蛋白の分布を調べることはなされてきたが、生化学的方法を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  と結合する蛋白を同定する試みはなされていなかった。

一方、鳥類の内耳については哺乳類ほど研究が進んでおらず、音受容のメカニズムはよく解明されていない。また哺乳類のコルチ器に相当する基底乳頭における  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白についての研究もほとんど行われていなかった。

以上のような背景から本研究では電気泳動法と放射性同位体  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  の組み合わせを用い、哺乳類コルチ器と鳥類基底乳頭の  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白の総合的解析を行うことを目的とした。

### (対象と方法)

- 1) 実験動物として有色モルモットとヒヨコを用いた。
- 2) 凍結乾燥した側頭骨から顕微鏡下にコルチ器と基底乳頭を採取した。両者の可溶性蛋白を、非変性化ゲルを用いた等電点電気泳動により分離後ナイロン膜に転写し、 $20\mu\text{M}$  の  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  と10分間インキュベートし、洗浄乾燥後オートラジオグラフにより  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白を検出した。
- 3) 等電点電気泳動により分離された蛋白を SDS の存在下に2次元に展開し、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$  に結合した蛋白の分子量を算定した。
- 4) Calmodulin など、既知の  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白に対するモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法で  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白を同定した。

### (結果と考察)

- 1) コルチ器、基底乳頭ともに2種類の蛋白が  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  と結合した。

- 2) コルチ器における  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白の 1 つは Calmodulin で、可溶性蛋白中最多を占め、活発な  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の活動の存在を支持した。
- 3) コルチ器における  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白の他の 1 つは等電点が 3.3 と極めて酸性度が高く、分子量は約 15kDa であった (15k-CBP)。この蛋白は脳、肝、筋などの他組織あるいは内耳組織の一部である血管条及びラセン靭帯などのコルチ器以外の組織には存在を確認できず、コルチ器において重要かつ特殊な働きをしていることを示唆した。特に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の貯蔵部位として機能している可能性があり、構造の決定とコルチ器における詳細な分布を調べる必要があると考えられた。
- 4) 哺乳類の内耳組織に選択的に存在し、アミノ酸配列の分析結果から EF-ハンド様の構造を持ち、 $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白の可能性が示唆されている蛋白 OCP2 は、本実験系では  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  との結合を示さず、 $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白である可能性は否定的であった。
- 5) 基底乳頭における  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白の 1 つはコルチ器同様 Calmodulin であったが、他の 1 つは Calbindin-D28kDa でその量は全可溶性蛋白の 20% 近くにも達した。その機能については中枢神経系で考えられているのと同様、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の buffering に関わる可能性が考えられた。

## 審 査 の 要 旨

本研究では、モルモットのコルチ器及びヒヨコの基底乳頭について  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白を分析し、コルチ器には 15k-CBP と名付けた新しい  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白が存在することを明らかにしている。この蛋白は等電点が極めて低く、通常の等電点電気泳動では見逃しやすいところであるが、分析範囲を広め、注意深い実験によりこの蛋白を発見したことは高く評価できる。また、基底乳頭においては Calbindin-D28kDa が多量に存在することを明らかにした。この蛋白が基底乳頭に存在することは免疫組織化学的に示唆されていたが、蛋白としての存在量や  $\text{Ca}^{2+}$  結合能を明確に示し、その存在を確実なものとした。

以上の研究成果はコルチ器、基底乳頭両方に存在する Calmodulin を含め、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白が聴覚器官のどのような細胞に存在し、どのような機能を営むのかという重要な問題を提起するものである。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。