

序論

1、聴器の形態、機能について

音刺激が生体に加わると鼓膜が振動し、さらに耳小骨を振動させる。耳小骨の振動は前庭窓を通して内耳へと伝わる。内耳は骨で囲まれた骨迷路とその内部に位置する膜迷路とで構成され、部位により蝸牛、前庭、三半規管とに分けられる。蝸牛は聴覚をつかさどり、前庭および三半規管は平衡感覚に参与している。

蝸牛は、外リンパを満たす前庭階および鼓室階と、膜迷路内で内リンパを満たす蝸牛管とに分けられる。蝸牛管内には基板に付着する形でコルチ器が存在する。コルチ器には聴感覚細胞である内、外有毛細胞とこの周囲をとりまく支持細胞およびこれらの細胞を覆うように存在している蓋膜がある。

コルチ器内において内有毛細胞は一列に、外有毛細胞は3～4列で存在している。内、外有毛細胞には多数の聴毛が存在し、外有毛細胞の聴毛の一部は蓋膜に接している。内耳に音刺激が加わるとコルチ器全体が振動し、蓋膜と基板との間に生じる機械的なズレが刺激となり有毛細胞の聴毛を動かす。この聴毛への機械的刺激が K^+ を主とする各種のイオンチャンネルを開閉し、有毛細胞の膜電位を変化させ、電気的信号へと変換される。有毛細胞にはそれぞれ求心性、遠心性神経線維がシナプスを形成しているが、求心性神経線維の大多数が内有毛細胞に分布し、外有毛細胞には主として遠心性神経線維が分布している¹⁾。この神経支配様式は、内外有毛細胞の機能分化を示しており、内有毛細胞は音刺激を電気的信号に変換し中枢に伝達する、afferent transducerとして機能し、外有毛細胞は遠心性神経支配により内有毛細胞の機能を調節するmodulatorであると考えられている。

Brownell et al.²⁾ は、モルモットの蝸牛から単離し

た外有毛細胞に電気刺激を与え、細胞が伸縮することを報告している。また、アセチルコリン (ACh) を作用させることにより同様の短縮が起きることも報告している。外有毛細胞の伸縮には急速で振幅の小さな伸縮と、緩やかで持続性の伸縮とが存在する。このうち、急速な伸縮は細胞の電位変動に依存して起こる。刺激音の周波数に応じて、基底板上の特定の部位の外有毛細胞では、聴毛の振動により電位変動が生じる。外有毛細胞の側壁の細胞膜には径10 nmの膜蛋白粒子が高密度に存在し³⁾ この粒子が電位変動により細胞の表面積を変えることにより外有毛細胞の細胞体に変形すると考えられる。外有毛細胞の変形は細胞の伸縮として現われ、逆行性に基底板の振動にフィードバックされることになる⁴⁾。これにより、基底板、有毛細胞および蓋膜との間の共鳴が尖鋭化され、より優れた周波数の弁別が得られると考えられている。一方、緩やかな伸縮は細胞外 K^+ イオン濃度の上昇⁵⁾ やAChの作用⁶⁾ により誘発される。この伸縮には収縮性蛋白質のリン酸化が関与していると考えられる⁷⁾。また、急速な伸縮に対して抑制的に作用し、基底板振動を数ms以内で調節する⁵⁾ ことにより、強大音暴露などにおける内耳の保護機能に関わっていると考えられる。

1978年Kempはクリック音を用いた刺激に対して、10 ms前後の遅れをもってエコー様の音響反応が記録できると報告した⁸⁾。現在では、誘発耳音響放射 (evoked otoacoustic emissions, EOAE) として知られるこの現象は、聴力閾値30dB以上の感音性難聴では通常測定され難く⁸⁾、突発性難聴耳では聴力とともに回復する例が報告⁹⁾ されている。また、強大音響による感音性難聴耳の聴力レベルとEOAE検出閾値との間の強い相関関係も報告¹⁰⁾ されている。強大音響による聴力障害の形態学的主病変が、有毛細胞の変性であることを考えても、EOAEは有毛細胞を中心とするコルチ器周

困からの蝸牛内音響現象と考えられる。さらに、神経終末が主として外有毛細胞に接合しているオリーブ蝸牛束への電気刺激により、耳音響放射（OAE）の一種である結合音耳音響放射（DPOAE）が変化することが報告^{11) 12)}されており、OAEは伸縮性を有する外有毛細胞の基底板振動へのフィードバック系に関与して発生していると考えられる。

これら外有毛細胞の伸縮性、およびOAEの研究などは、内耳が能動的により優れた周波数の弁別を行うために外有毛細胞の果たす機能が非常に重大であることを意味し、聴覚現象の基礎研究において外有毛細胞を対象とすることの意義の大きさを示している。

2、内耳におけるカルシウム結合性蛋白質について

一般にカルシウム依存性の反応は、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することにより促進される。この際の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇には膜を介した外液からの流入と、細胞内カルシウムイオン貯蔵部位からの動員がある。この細胞内カルシウムイオン貯蔵部位としてミトコンドリア、小胞体さらにカルシウム結合性蛋白質などがある。

これまでに、内耳において様々なカルシウム結合性、依存性蛋白質の同定および局在が報告されてきた。Slepecky et al.¹³⁾は組織学的検討によりcalmodulin（以下CAL）、calbindin、calsequestrin等のカルシウム結合性蛋白質の内耳における局在を明らかにし、高橋ら¹⁴⁾はゴルチ器におけるCALの定量を行い、外有毛細胞に高濃度のCALが存在していることを生化学的に検討し報告した。Oberholtzer et al.¹⁵⁾は、鳥類の聴器である基底乳頭に高濃度に存在する蛋白質BPP 23が、calbindinである可能性について報告し、Senarita et al.¹⁶⁾はウエスタンプロット法を用いて生化学的にこれを証明した。

Thalman et al.はモルモットのコルチ器に高濃度に存在する蛋白質を発見し、これをOCP1、OCP2と命名した。また、これら蛋白質のアミノ酸配列分析を行い、OCP2のアミノ酸配列の一部がCALと類似していたことから、OCP2がカルシウム結合性蛋白質である可能性について報告¹⁷⁾した。Senarita et al.^{16, 18)}は等電点電気泳動法および2次元電気泳動法を用いてOCP1、OCP2のカルシウム結合性について検証した。これら蛋白質のカルシウム結合性は確認できなかったが、OCP1、OCP2とは異なり、等電点が3.3と非常に酸性で、分子量が約15kDaと小さなカルシウム結合性蛋白質の存在を確認し、calcium-binding protein 15 kDa (以下CBP-15)として報告¹⁶⁾した。この蛋白質はコルチ器に特異的に存在し、他の組織やコルチ器以外の内耳組織では存在が確認されなかった。また、分子量および等電点をもとに検索した範囲において、CBP-15に相当するカルシウム結合性蛋白質の報告は確認されなかった。コルチ器内の局在については不明であったが、有毛細胞を取り巻く特殊な形態、機能の維持に参与しているものと推測された。

研究の目的

Senarita et al.の報告¹⁶⁾したカルシウム結合性蛋白質CBP-15がこれまで内耳において存在が確認されている他のいかなるカルシウム結合性蛋白質とも分子量、等電点において異なっていたことから、この蛋白質の同定は有毛細胞を中心とするコルチ器の特異的な機能、および形態維持を探るうえで極めて重要なものと考えられた。我々は、アミノ酸配列分析およびWestern Blot法を用いて、このCBP-15の同定を行い^{19, 20)}、CBP-15がカルシウム結合性蛋白質parvalbuminのサブタイプの一つ、oncomodulin (以下OM)である可能性につ

いて検討^{2.1)}し、コルチ器内の局在部位についても検討^{2.2)}した。さらにモルモットに加えて、ラット、マウスなど他の哺乳類のコルチ器についても、この蛋白質の存在を検討^{2.2)}した。

対象および方法

1、組織採取

対象にはプライエル反射正常な有色モルモット（体重250~350 g）、ラットおよびマウスを用いた。ペントバルビタール（ネンブタール[®]33 mg/kg）で腹腔内麻酔を行った後に断頭した。直ちに側頭骨を採取し、軟部組織を除いた後に、液体窒素により融解点にまで冷却されたFreon-12中に浸した。この後-40℃で約5日間凍結乾燥を行った。コルチ器およびコルチ器以外の内耳組織の採取は、湿度40%以下に維持された常温室内において立体顕微鏡下に行った。モルモットのコルチ器については一部のサンプルを、内有毛細胞を含むInner Layerと、外有毛細胞を含むOuter Layerとに分離した。Outer Layerはさらに、外有毛細胞と支持細胞とに分離し、Inner Layerは内有毛細胞と柱細胞とに分離した^{2.3)}（図1）。また、モルモットの一部のサンプルでは、耳石器の平衡斑である球形囊斑、および卵形囊斑を採取した。

2、非変性等電点電気泳動法

凍結乾燥を行った組織を蒸留水にて溶解し、遠心分離を行った。この上清を取り出し、2倍濃度のサンプル溶液（60% glycerol(v/v), 4% ampholytes (2.5% pl;3.5-10, 1.25% pl;3-5, 0.25% pl;2.5-4))を同量加えてサンプルとした。サンプルをsodium dodecyl sulfate（以下SDS）を含まない非変性の状態にて、5.5%アクリルアミドのゲル（5.5% polyacrylamide, 10% glycerol(v/v), ampholytes(3.75% pl;3.5-