

## 鳥類内耳 tegmentum vasculosum の構造と機能 Structure and function of tegmentum vasculosum in avian cochlea

池田 理佐<sup>1,2</sup>・乙野 剛史<sup>1</sup>・池田 直矢<sup>1</sup>・齋藤 昇<sup>2</sup>・安藤 元紀<sup>1,2</sup>  
Risa Ikeda, Tsuyoshi Otono, Naoya Ikeda, Noboru Saito, Motonori Ando

<sup>1</sup>岡山大学大学院教育学研究科・理科教育講座・細胞生理学研究室

<sup>2</sup>岡山大学大学院環境生命科学研究科・動物機能開発学講座・動物生理学研究室

<sup>1</sup>Laboratory of Cell Physiology, Department of Science Education, Graduate School of Education, Okayama University

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Physiology and Pharmacology, Department of Animal Science, Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University

### Summary

In spite of the importance of endocochlear DC potential (EP) and the  $K^+$ -rich endolymph for the avian cochlea, the structure and function of the tegmentum vasculosum (TV) has not yet been fully elucidated, compared with those of the stria vascularis in the mammalian cochlea. In this study, we examined structural analysis of the epithelial cells, gene expressions of  $Na^+K^+$ -ATPase (*Atp1a1*) and Kir4.1 (*Kcnj10*), and protein localizations of  $Na^+K^+$ -ATPase and Kir4.1, in the TV. Tight junctional structures were observed between epithelial dark cells and light cells in the TV. Both *Atp1a1* and *Kcnj10* genes were detected in the TV. In addition, immunopositive signals for both  $Na^+K^+$ -ATPase and Kir4.1 were recognized in the TV. These results indicate that  $Na^+K^+$ -ATPase and Kir4.1 play roles in maintaining the EP and high  $K^+$  concentration of the endolymph. Further studies are needed to clarify the physiological functions of the TV. This is the first report which demonstrates that gene and protein expression data contribute to the avian inner ear homeostasis.

### 1. はじめに

哺乳類内耳蝸牛は音受容を担う感覚器官であり、蝸牛内部は内リンパ液と外リンパ液で満たされている。内リンパ液は細胞外液にも関わらず、生体内で唯一  $K^+$ が主要な陽イオンとなっており、また外リンパ液に対して正の直流電位 (+80 mV, endocochlear DC potential, EP) を示す。この高  $K^+$ 濃度と EP は聴覚受容を担う有毛細胞の興奮に必須である。この特異な内リンパ液を産生、維持している組織が血管条 (stria vascularis, SV) である (Fig. 1)。一方、鳥類内耳では tegmentum vasculosum (TV) が、SV と相同組織として内リンパ液の産生・維持に寄与すると考えられており (Schneider et al. 1987) (Fig. 2), EP は +20mV と報告されている (Schmidt and Fernández 1962)。

SV は、辺縁・中間・基底細胞、および毛細血管網から構成され、エネルギー代謝活性が生体内で最も高い組織の一つである。辺縁細胞は、 $Na^+K^+$ -ATPase 活性が極めて高く、グルコースを大量に消費しながら激しいイオン輸送を行っている (Ando et al, 2008)。また、パッチクランプ法による電流電圧解析および遺伝子・タンパク質の発現解析により、 $K^+$ の分泌および EP 生成に直接関与するイオン輸送体は内向き

整流性  $K^+$ チャネル (Kir4.1) であること、および Kir4.1 が中間細胞に発現していることが証明された (Takeuchi and Ando 1998; Ando and Takeuchi 1999)。一方、TV は電子密度の違いから暗細胞 (dark cell, DC) と明細胞 (light cell, LC) の2種類の上皮細胞の報告があるものの、それ以外の細胞構成や生理機能については未解明である。これまでに酵素組織化学的に

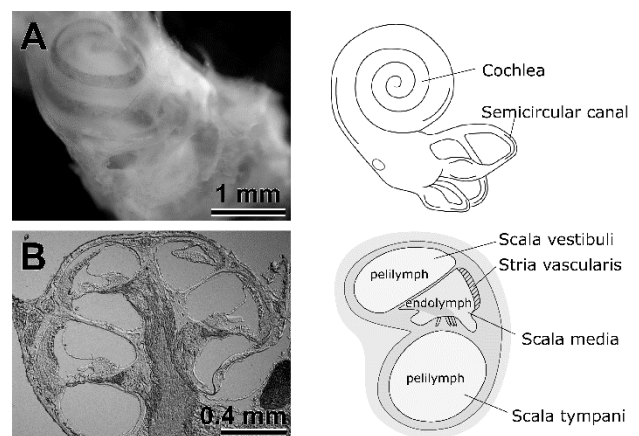


Fig. 1. Anatomy of mammalian cochlea.

Dissected mouse cochlea (A) and its cross section (B), respectively. Each panel consists of a light micrograph (left) and a schematic drawing (right).

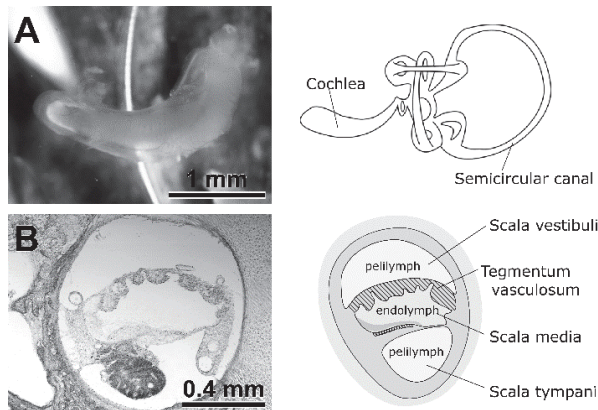


Fig. 2. Anatomy of avian cochlea.

Dissected chick cochlea (A) and its cross section (B), respectively. Each panel consists of a light micrograph (*left*) and a schematic drawing (*right*).

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  活性が暗細胞に局在しているとされるが (Hossler et al. 2002a; Schneider et al. 1987), 遺伝子・タンパク質レベルでの解析は行われていない。

本研究では、哺乳類 SV の相同組織とされながら、その組織構築やイオン輸送機構が解明されていない鳥類 TV の生理機能について、哺乳類でその解析が進んでいる  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  および Kir4.1 に着目し解析を行った。解剖学的構造が異なる鳥類および哺乳類蝸牛の構造と機能を比較することにより、聴覚受容器における新たな生理機能の提唱と聴覚機能の進化の過程の解明が可能となる。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 実験動物

すべての実験は岡山大学動物実験規則に従い、岡山大学動物実験委員会の承認のもとに実施した。ニワトリ (*Gallus gallus*) の幼雛 (孵化後 7~14 日齢) を用いた。麻酔下、生理的塩溶液 (PBS) あるいは化学固定液で経心灌流後、TV を含む内耳組織を摘出した (Fig. 2)。

### 2-2. 遺伝子解析

左右蝸牛の TV を含む内耳組織から total RNA を抽出後、DNase I 処理を行い、RT-PCR 用試料とした。遺伝子特異的プライマーは過去の報告を参考にし、独自のデザインが必要となった場合には、Primer 3 program (<http://primer3.sourceforge.net/>) を用いてプライマーを作製した (Table 1)。PCR サイクル数は 30 とした。

Table 1. Specific primers used for conventional RT-PCR analysis.

Gene	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)	Gene Bank	Reference
$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ( <i>Atp1a1</i> )	ATGAAGCCCAG	334	NM_205521	Gal-Garber et al., 2003
	AGCAAAAGA			
Kir4.1 ( <i>Kcnj10</i> )	GGGGTGTGAA	167	XM_003643494	
	GGTCTCAAA			
$\beta$ -actin ( <i>Actb</i> )	ATGAAGCCCAG	223	NM_205518	Kamisoyama et al., 2009
	AGCAAAAGA			
	GGGGTGTGAA			
	GGTCTCAAA			

### 2-3. 形態学的・免疫組織化学的解析

形態学的解析のために電子顕微鏡用試料を作製した。一般固定用として 2.5% glutaraldehyde (GA) と 2% paraformaldehyde (PFA) による前固定, 1%  $\text{OsO}_4$  による後固定, 常法に従い樹脂包埋後, 超薄切片を作製した。免疫電子顕微鏡用試料については, 0.1% GA と 4% PFA による固定処理後 LR White に包埋, 超薄切片作成後, 免疫染色を行った。すべての超薄切片は電子染色後, 電子顕微鏡 (H-7650, Hitachi) で観察した。

免疫組織化学的解析のために試料作製を行った。摘出した内耳組織を 4% PFA, および 0.12 M ethylenediamine tetraacetic acid 中で脱灰後, 凍結包埋して凍結切片を作製した。間接蛍光抗体法により免疫染色を行った。一次抗体として polyclonal goat anti- $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  antibody (sc-16041; Santa Cruz Biotechnology Inc.) と本研究室で作成した polyclonal rabbit anti-Kir4.1 antibody を用いた。二次抗体として Alexa-488-conjugated donkey anti-goat IgG (A-11055; Life Technologies Japan) と Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (711-165-152; Jackson Immuno Research) を用いた。また F-actin 標識用として Alexa-546-phalloidin (A-22283; Life Technologies Japan), 核標識用として DAPI を用いた。共焦点レーザー顕微鏡 (FV1200, Olympus) で観察した。

## 3. 結果

### 3-1. 遺伝子発現解析

TV において  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  (*Atp1a1*) および Kir4.1 (*Kcnj10*) の遺伝子発現が確認された (Fig. 3)。陽性コントロールである網膜 (retinal tissue, RE) において Kir4.1 の発現が確認された。

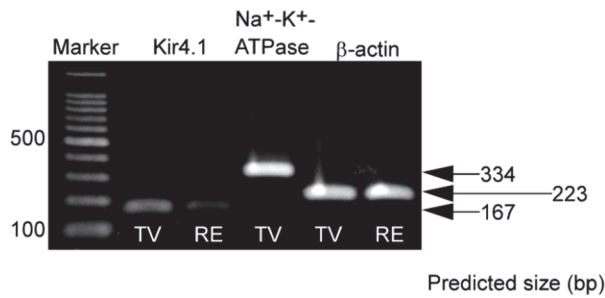


Fig. 3. Conventional RT-PCR analysis.

Expression of Kir4.1 (*Kcnj10*) and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (*Atp1a1*) in chick TV. Chick retinal tissue (RE) as a positive control for Kir4.1. β-actin (*Actb*) as an internal control.

### 3-2. 形態学的解析

電子顕微鏡観察から、TVを構成する上皮細胞は、細胞質の電子密度が高い暗細胞 (DC) と電子密度が低い明細胞 (LC) から構成されており、暗細胞の頂端膜には微絨毛が認められた。加えて、両者の間に密着結合様構造が観察された (Fig. 4)。

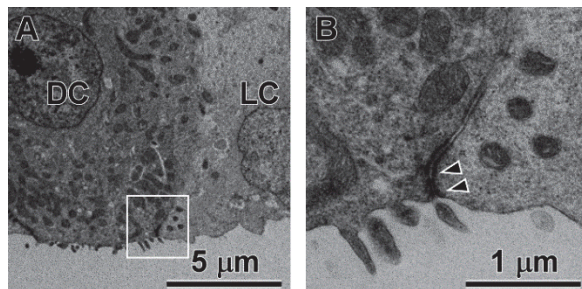


Fig. 4. Ultrastructure of TV.

(A) An electron micrograph showing tegmentum vasculosum consisting of epithelial dark cells (DC) and light cells (LC). (B) Enlargement of the rectangular area in A. Arrowheads indicate tight junctions between DC and LC. DC exhibits microvilli apically.

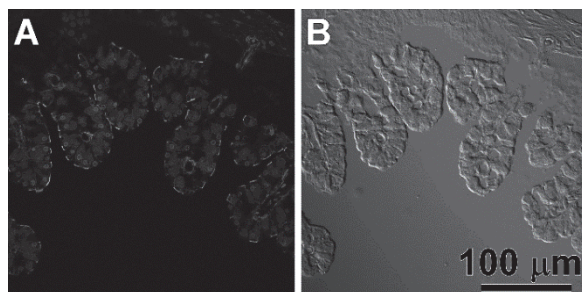


Fig. 5. Labeling for F-actin in TV.

(A) Positive signals for fluorescent phalloidin were localized on apical membranes of epithelial cells. Nuclei were counterstained with DAPI. (B) A transmission light micrograph of the same visual field as in A.

蛍光 phalloidin により F-actin を標識したところ、TV の上皮細胞層の一部の細胞においてその頂端膜側に強い陽性シグナルが認められた (Fig. 5)。DAPI 染色による核と細胞の関係から、phalloidin 陽性の頂端膜を有する細胞と陰性の細胞が混在していることが分かった。

### 3-3. 免疫組織化学的解析

免疫組織化学法により Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase の TV 組織内局在を調べた。蛍光 phalloidin との二重標識の結果から、頂端膜側が phalloidin で標識されている細胞の基底側膜側に Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase の陽性シグナルが検出された (Fig. 6)。免疫電子顕微鏡法により Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase の細胞内局在について解析を行った。細胞質の電子密度が高い暗細胞の高度に折れたたまった基底側膜上にその陽性シグナルとなる金コロイド粒子が多数認められた (Fig. 7)。

Kir4.1 の局在について、免疫組織化学法により検討した。主に、上皮細胞の基底側膜側にその陽性シグナルが認められた (Fig. 8)。

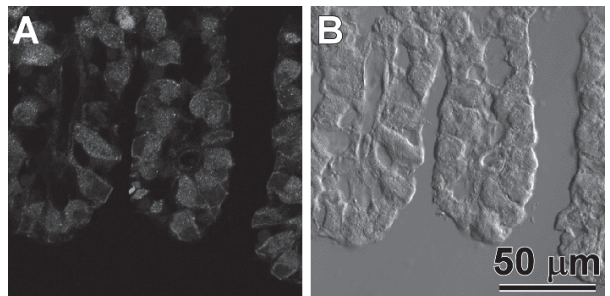


Fig. 6. Immunoreactivity for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in TV.

(A) Immunopositive signals for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase were localized in epithelial cells labeled with fluorescent phalloidin. (B) A transmission light micrograph of the same visual field as in A.

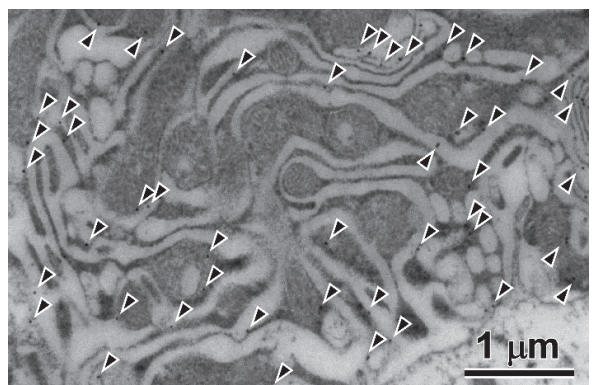


Fig. 7. Immunoreactivity for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in dark cells.

An immuno-electron micrograph showing 20-nm colloidal gold particles localized on the basolateral membranes of dark-cell basal infoldings.



Kir4.1 と  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  の二重免疫染色の結果から、それぞれの陽性シグナルは異なる分布を示した（結果は省略）。

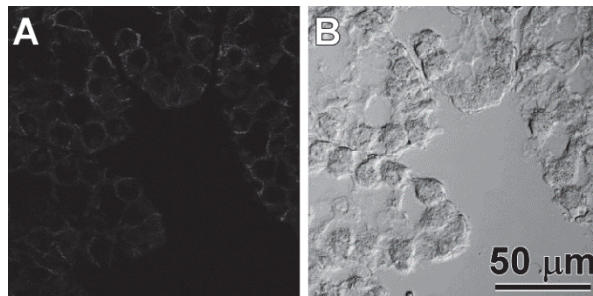


Fig. 8. Immunoreactivity for Kir4.1 in TV.

(A) Immunopositive signals for Kir4.1 were localized in epithelial cells. (B) A transmission light micrograph of the same visual field as in A.

#### 4. 考察

本研究における超微形態学的解析から、鳥類内耳 TV を構成する暗細胞と明細胞の 2 種類の細胞間にタイトジャンクション (tight junction, TJ) 様構造の存在が明らかとなった。鳥類内耳の EP の値は哺乳類のそれに比べて低く、その要因の一つに TJ の関与が示唆されている (Schneider et al. 1987)。また、哺乳類 SV は TJ によって辺縁細胞層と基底細胞層の 2 つの細胞層から構成されていることが分かっている (Salt et al. 1987; Wangemann and Schacht 1996; Takeuchi et al. 2000)。今後は、暗細胞と明細胞の間に認められた TJ 様構造に関与すると予想される関連分子の探索を行い、SV の組織構築と比較しつつ解析を進めていく必要がある。

免疫組織化学的解析から、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  の陽性細胞と蛍光 phalloidin で標識される細胞が一致していることが分かった。TV の暗細胞頂端膜に細胞骨格として actin を内包する微絨毛が存在していること (Hossler et al. 2002b; Wulf et al. 1979)、および  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  が暗細胞に局在している (Hossler et al. 2002a; Schneider et al. 1987)、とする報告がある。以上のことから、暗細胞の基底側膜に  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  が発現していると考えられた。哺乳類 SV では  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  は上皮細胞である辺縁細胞に強く発現していることから (Iwano et al. 1989; Schulte and Steel 1994)、TV における暗細胞は SV における辺縁細胞と同様の機能を有する可能性が示唆された。 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  および F-actin の同時標識により、光学顕微鏡レベルで暗細胞の同定が可能であることが分かった。

Kir4.1 と  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  の二重染色の結果より、Kir4.1 は明細胞を含めた暗細胞以外の細胞

に発現している可能性が高いことが示唆された。一方で、鳥類内耳には Kir4.1 は発現していないとの報告もある (Wilms et al. 2016)。哺乳類において Kir4.1 は EP 生成の直接の鍵分子であることから、今後は TV の組織構築と Kir4.1 発現部位の関係を細胞レベルで明らかにするとともに、その他の  $\text{K}^+$  チャンネルの関与を含めた解析を進めていく必要がある。

#### 5. おわりに

本研究では、これまで手付かずであった鳥類の聴覚機能維持の根幹に関わる TV について、その組織構築と複数の機能分子の局在を明らかにした。哺乳類 SV の相同組織と考えられている鳥類 TV 機能の解明に向けた第一歩となる。今後は、TV の組織構築とその生理機能に関連すると予想される膜輸送体分子の網羅的解析を進め、鳥類内耳機能の全貌の解明を目指す。同時に、研究の進んでいる哺乳類内耳との比較解剖学的・生理学的解析により聴覚器の発達に関する進化学的側面からの研究も進めていく。

#### 6. 参考文献

- Ando M, Takeuchi S (1999). Immunological identification of an inward rectifier  $\text{K}^+$  channel (Kir4.1) in the intermediate cell (melanocyte) of the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. *Cell Tissue Res*, 298, 179-183.
- Ando M, Edamatsu M, Fukuizumi S, Takeuchi S (2008). Cellular localization of facilitated glucose transporter 1 (GLUT-1) in the cochlear stria vascularis: its possible contribution to the transcellular glucose pathway. *Cell Tissue Res*, 331, 763-769.
- Gal-Garber O, Majeesh SJ, Sklan D, Uni Z (2003). Nutrient transport in the small intestine:  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  expression and activity in the small intestine of the chicken as influenced by dietary sodium. *Poult Sci*, 82, 1127-1133.
- Hossler FE, Avilia FC, Musil G (2002a).  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity and ultrastructural localization in the tegmentum vasculosum in the cochlea of the duckling. *Hear Res*, 164, 147-154.
- Hossler FE, Olson KR, Musil G, McKamey MI (2002b). Ultrastructure and blood supply of the tegmentum vasculosum in the cochlea of the duckling. *Hear Res*, 164, 155-165.
- Iwano T, Yamamoto A, Omori K, Akayama M, Kumazawa T, Tashiro Y (1989). Quantitative immunocytochemical localization of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  alpha-subunit in the lateral wall of at cochlear duct. *J Histochem Cytochem*, 37, 353-363.

- Kamisoyama H, Honda K, Saneyasu T, Sugahara K, Hasegawa S (2009). Corticotropin-releasing factor is a downstream mediator of the beta-melanocyte-stimulating hormone-induced anorexigenic pathway in chicks. *Neurosci Lett*, 458, 102–105.
- Salt AN, Melichar I, Thalmann R (1987). Mechanisms of endocochlear potential generation by stria vascularis. *Laryngoscope*, 97, 984–991.
- Schmidt RS, Fernández C (1962). Labyrinthine DC potentials in representative vertebrates. *J Cell Comp Physiol*, 59, 311–322.
- Schneider ME, Cotanche DA, Fambrough DM, Saunders JC, Matschinsky FM (1987). Immunocytochemical and quantitative studies of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase distribution in the developing chick cochlea. *Hear Res*, 31, 39–54.
- Schulte BA, Steel KP (1994). Expression of alpha and beta subunit isoforms of Na,K-ATPase in the mouse inner ear and changes with mutations at the W<sup>v</sup> or Sl<sup>d</sup> loci. *Hear Res*, 78, 65–76.
- Takeuchi S, Ando M (1998). Inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in intermediate cells in the cochlea of gerbils: a possible contribution to the endocochlear potential. *Neurosci Lett*, 247, 175–178.
- Takeuchi S, Ando M, Kakigi A (2000). Mechanism generating endocochlear potential: role played by intermediate cells in stria vascularis. *Biophys J*, 79, 2572–2582.
- Wangemann P, Schacht J (1996). Homeostatic mechanisms in the cochlea. *The cochlea*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 130–185.
- Wilms V, Köppl C, Söffgen C, Hartmann AM, Nothwang HG (2016). Molecular bases of K<sup>+</sup> secretory cells in the inner ear: shared and distinct features between birds and mammals. *Sci Rep*, 6, 34203.
- Wulf E, Deboben A, Bautz FA, Faulstich H, Wieland TH (1979). Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Cell Biol*, 76, 4498–4502.