

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14948

研究課題名(和文) Cochlinを介した難聴傷害発症メカニズム解析による新規難聴仮説の検証

研究課題名(英文) Analysis of a novel hearing loss mechanism caused by mutated Cochlin

研究代表者

山本 一夫 (Yamamoto, Kazoo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20174782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性難聴傷害DFNA9の原因遺伝子産物Cochlinは内耳に存在する主要なタンパク質である。このタンパク質がグリコサミノグリカンと結合することを明らかにし、更にリガンドの詳細な検討を加えて正常と変異体について比較検討した。またマウスCochlinに対するモノクローナル抗体の作成、内耳組織におけるCochlinおよび内在性リガンドの局在、加齢に伴う量的変化、さらにはメタロプロテアーゼによる分解について調べ、難聴発症メカニズムについて解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Several missense mutations in the gene encoding Cochlin have been identified in pedigrees afflicted with late-onset non-syndromic autosomal-dominant hearing loss 9 (DFNA9). In this study, we demonstrated that Cochlin binds to sulfated glycosaminoglycan (GAG) and compared GAG-binding ability among wild-type and mutated Cochlins. Furthermore, we established anti-Cochlin monoclonal antibodies and analyzed localization of Cochlin and Cochlin ligands in inner ear by using monoclonal antibodies and Cochlin-Fc protein. Together with the data of quantitative analysis of Cochlin ligands accompanying aging and of Cochlin proteolysis by metalloproteinase showed a possible mechanism for understanding autosomal-dominant late-onset hearing loss in DFNA9 patients.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：遺伝性疾患 難聴 cochlin グリコサミノグリカン

1. 研究開始当初の背景

Cochlin は内耳の蝸牛と三半規管に高発現しており、遺伝性難聴傷害 DFNA9 の原因遺伝子産物である。しかも、難聴傷害および平衡感覚障害の発症は 20 から 40 歳代に徐々に発症するという特徴がある。また、優性遺伝の形質を示し、いわゆる機能欠失型の変異とは異なるものと想像される。しかしながら健常人と患者に発現量に相違は認められておらず、機能やリガンドに関する情報は皆無である。

2. 研究の目的

我々は新規レクチンの探索をしている過程で、偶然にも Cochlin がグリコサミノグリカン (GAG) 鎖に結合することを見出した。この結合はヘパリンの硫酸化特異的であることから、硫酸転移酵素の発現が Cochlin を介した内耳基底膜の細胞の刺激に必須であり、延いては細胞の生存の維持に関わっているのではないかと考えた。この新規仮説を検証することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト及びマウス Cochlin レポーター細胞の作成とレポーターアッセイ

Cochlin レポーター細胞を作成するために、Cochlin の cDNA を PCR により取得、塩基配列を確認した後、発現ベクターの構築を行った。発現ベクターは、N 末端に CD8 α のシグナル配列と myc タグ、C 末端側に NKp46 のストロークと膜貫通部位、及び CD3 ζ の細胞質ドメインを繋げた上で、レトロウイルス発現ベクター pMXs に組み込んだ。このベクターをパッケージング細胞 Plat-E にリポフェクションした後、その培養上清からレトロウイルスを回収し、最終的に β -ガラクトシダーゼをレポーター遺伝子にもつ BWZ.36 細胞で発現させた。レポーターアッセイは以下の様に行った。即ち、さまざまなタンパク質あるいはアルブミンにカップリングした GAG 鎖を 96-well プレートに固相化した後、その上でレポーター細胞を一晩培養した。その後、細胞を溶解し、基質である CPRG を加えて 570nm の吸光度により発現誘導された β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

(2) Cochlin-Fc 融合タンパク質の作成

ELISA 法によるリガンドとの結合活性、および免疫染色を行う目的で、Cochlin の C 末端にヒト IgG Fc 領域を結合させた融合タンパク質を発現するように cDNA を作成し、pCAGGS ベクターに組み込んだ。作成したベクターは

HEK293 あるいは CHO-K1 細胞にリポフェクションにより形質転換し、その培養上清から Protein G カラムを用いて融合タンパク質を精製した。精製したタンパク質の活性測定は、ELISA、フローサイトメトリー、ウエスタンブロットティングにより行った。

(3) 抗マウス Cochlin モノクローナル抗体の作成

(1) で作成したレポーター細胞を免疫原として、常法に従いラットに免疫を行った。ブーストを 3 回行った後、リンパ節を摘出してリンパ球を回収、PEG を用いてラットミエローマ細胞に細胞融合させた。HAT 選択培地等で培養することによりハイブリドーマを回収し、限界希釈法によりハイブリドーマのクローン化を行った。抗マウス Cochlin 抗体産生細胞のスクリーニングは、レポーター細胞を用いたフローサイトメトリー及びレポーターアッセイを用いて選別した。

(4) マウス内耳切片の作成と各種染色

C57BL/6 マウス雌より内耳を採取し、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した。120 mM EDTA 中で一週間放置し脱灰したのち、エタノールで徐々に脱水した。脱水した内耳はキシレンに浸した後、パラフィンに包埋した。このブロックをマイクロトームを用いて 15 マイクロメートルの厚さに薄切し、スライドグラスに付着させた。キシレン等で脱パラフィンした切片は HE 染色、Alcian Blue 染色、抗体染色、Cochlin-Fc による染色に供した。なお、抗体並びに Cochlin-Fc による染色では、脱パラフィン後の切片を L.A.B. Solution で処理して賦活化を行った。

4. 研究成果

(1) Cochlin と相互作用する分子の特定

Cochlin は常染色体優性遺伝難聴疾患 DFNA9 の原因遺伝子 *COCH* のコードするタンパク質であり、N 末端から LCCL、vWA1、vWA2 ドメインから構成される分泌タンパク質である。COCH 遺伝子上に変異が生ずると、20 歳代から 40 歳代で進行性の難聴傷害と平衡感覚障害を呈する。現在まで、DFNA9 患者の変異は、約 20 種類のミスセンス変異が報告されており、その変異は LCCL ドメインに集中している。手始めに Cochlin が内耳組織において相互作用する分子を探索する目的で、ヒト Cochlin を細胞表面に発現させたレポーター細胞 BWZ.36 の作成をおこなった。細胞外マトリックスとして知られているコラーゲン、ラミニン、グ

リコサミノグリカンを培養プレート上に固相化し、その上でレポーター細胞を培養することでこれら分子と Cochlin との結合を評価した。その結果、コラーゲンやラミニンなどのタンパク質には結合せず、GAG 鎖であるヘパリンに対して強く結合することが見出された。GAG 鎖はアミノ糖の違いによりヘパラン硫酸/ヘパリンとデルマトン硫酸/コンドロイチン硫酸に分類されるが、この中でどの GAG と結合するかを調べた。その結果、ヘパリンに強く結合すること、また 2-O-脱硫酸、6-O-脱硫酸、N-脱硫酸化ヘパリンを比較すると、N-脱硫酸化ヘパリンで結合が大きく減少した。

内耳組織を用いた解析を考えた場合、ヒト組織は入手が難しいため、マウスを用いて解析することを考えた。そのため、マウス Cochlin がヒトのそれと同様の GAG 結合特異性を持っているか否かの検討を行った。その結果、同様の特異性を持っているほか、一部のコンドロイチン硫酸にも結合性を示した。

(2) Cochlin 変異体のリガンド結合性の相違

上記でヒト Cochlin のリガンド探索を行ない GAG 鎖のヘパリンに対して強く結合することが示された。そこで、このリガンドと DFNA9 患者由来の Cochlin 変異体との結合の相違について比較検討した。DFNA9 患者由来の変異体 8 種類について cDNA に変異を導入し、上記と同様にレトロウイルスベクター-pMXs に組み込んでレポーター細胞上に膜型 Cochlin 変異体を発現させた。これらのレポーター細胞を用いて GAG 鎖との結合性を wild-type と比較した。その結果、程度の差はあるものの、Cochlin 変異体はいずれも GAG 鎖との結合性が低下していた。

(3) マウス Cochlin に対するモノクローナル抗体の作成

マウス内耳組織における Cochlin の発現等を検証する場合、マウス Cochlin に対する抗体の取得が必須である。そこで上記で作成したマウス Cochlin を発現させたレポーター細胞をラットに免疫して、マウス Cochlin に対するモノクローナル抗体の取得を試みた。その結果、11 の陽性クローンのうち、4 つのクローンを選択しハイブリドーマ培養上清を集め、うち 3 種類のモノクローナル抗体を単離・精製した。この 3 種類の抗体のレポーター細胞への結合は相互に競合することなく、異なるエピトープを認識していることが示唆された。

(4) グリコサミノグリカン鎖及びその生合成に関与する酵素の検討

ヘパリン生合成に関わる GlcA/GlcNAc 転移酵素、またその硫酸化に関わる N-硫酸転移酵素、2-O-硫酸転移酵素、6-O-硫酸転移酵素の加齢に伴う内耳での発現量の変化を、マウス内耳の組織を用いて、定量的リアルタイム PCR によって調べた。また、週齢の異なるマウスの内耳の組織から mRNA を単離して、上記の生合成に関わる糖転移酵素及び硫酸基転移酵素 mRNA の量的な変動を検討した。7 週齢の若齢マウスと 13 ヶ月齢の老齢マウスを比較したところ、6 硫酸転移酵素 *hs6st1* と *hs6st2*、N 硫酸基転移酵素 *ndst* が老齢マウスで減少傾向にあった。

次に、実際に若齢および老齢マウス内耳組織を単離して、そこから GAG 鎖画分を抽出・単離して蛍光標識を行い、それらの GAG 鎖の定量及び 2 糖分析を HPLC を用いて行った。その結果、老齢マウスでは若齢マウスに比較して高硫酸化ヘパラン硫酸/ヘパリンの量が減少していることが示された。

(5) マウス内耳組織の染色

マウス Cochlin の C 末端に免疫グロブリンの Fc 領域を結合させた融合タンパク質の cDNA を作成し、HEK293T 細胞で発現・分泌させたのち、その培養上清から Protein G カラムで精製した。一方、若齢マウス内耳組織のパラフィン包埋切片を作成して、この精製 Cochlin-Fc を用いて染色し、リガンドの有無を検討した。なお、Cochlin-Fc 融合タンパク質は、上記レポーター細胞と同様の GAG 鎖に対する結合性及び特異性を持っていることを ELISA により確認をした上で以下の実験に供した。また同じ連続切片を用いて、上記で作成した抗マウス Cochlin モノクローナル抗体の染色も同時に行った。Cochlin-Fc による染色では、らせん板縁、基板、らせん靱帯辺縁部、蓋膜が染色された。一方、抗マウス Cochlin 抗体による染色では蓋膜以外では同様の染色像が認められ、両者がほぼ共局在することが確認された。さらに、同じ組織切片を予めヘパリナーゼまたはコンドロイチナーゼ処理した後に Cochlin-Fc により染色を試み、その染色が減弱することが確認された。なお、これらの酵素が作用していることは、Alcian Blue による GAG の染色が著しく減少することで確認をした。さらに、Cochlin-Fc による染色の際に高硫酸化 GAG を添加すると、その染色が抑制された。このことからマウス内耳において Cochlin と相互作用するリガン

ドは高硫酸化された GAG 鎖そのものであることが示唆された。

(6) Aggrecanase-1 による Cochlin の切断

次に、Cochlin が内耳の蝸牛においてどのような生理機能を担っているかを推察する手がかりを得るために、メタルプロテイナーゼの一つである Aggrecanase-1 による切断について検討した。脾臓において Cochlin が Aggrecanase-1 により切断されることが報告されており、何らかの機能との関連があると考えた。Cochlin は LCCL ドメインと vWA ドメインを繋ぐリンカーが Aggrecanase-1 により切断されることが知られている。この切断と Cochlin と硫酸化 GAG との相互作用の関連について検討した。wild-type Cochlin は硫酸化 GAG の添加により切断が促進されたが、変異体 (G88E) はその切断は僅かであった。Aggrecanase-1 が内耳組織で発現しているか否かは抗 Aggrecanase 抗体で確認ができなかったが、この切断と難聴との間に何らかの因果関係がある可能性が考えられた。今後、X 線結晶構造解析による GAG と Cochlin の共結晶構造解析、GAG の有無による Cochlin と Aggrecanase-1 との共沈降実験などについて検討する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Abo, H., Soga, K., Tanaka, A., Tateno, H., Hirabayashi, J., Yamamoto, K. Mutated leguminous lectin containing a heparin-binding like motif in a carbohydrate-binding loop specifically binds to heparin. *PLoS ONE* 査読有、10(12)、2015、e0145834. DOI:10.1371/journal.pone.0145834

[学会発表] (計 4 件)

① 山本一夫、改変レクチンの創製と多様な糖鎖認識能の付与、第 8 回プラズマ医療・健康産業シンポジウム、2016 年 12 月 22 日、産業技術総合研究所臨海副都心センター (東京都・江東区)

② 山本一夫、GAG 鎖特異的な改変マメ科レクチンの創出、第 2 回レクチン利用技術研究会ワークショップ、2016 年 12 月 5 日、東京大学伊藤国際学術研究センター (東京都・文京

区)

③ 本田 智子、遺伝性難聴障害 DFNA9 における Cochlin 糖結合との相関、第 34 回日本糖質学会、2015 年 7 月 31 日、東京大学安田講堂 (東京都・文京区)

④ 安保 博仁、N-アセチルグルコサミン修飾の新規同定法の開発、第 34 回日本糖質学会、2015 年 7 月 31 日、東京大学安田講堂 (東京都・文京区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/iyaku/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 一夫 (YAMAMOTO, Kazuo)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：20174782

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし