

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18955

研究課題名(和文) 繊毛局在キナーゼによる繊毛形成機構とその生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying cilia formation and their physiological significance

研究代表者

茶屋 太郎 (Chaya, Taro)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：50747087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：内耳において聴覚を司る蝸牛にはコルチ器と呼ばれる感覚装置があり、外有毛細胞、内有毛細胞、支持細胞より構成される。有毛細胞頂面には1本の動毛とV字型もしくは弧状に配列した不動毛が構築されており、平面内細胞極性(planar cell polarity; PCP)を形成している。今回私たちは繊毛局在キナーゼICKが欠損したマウスと内耳特異的ICK欠損マウスの解析を行った結果、ICKは蝸牛有毛細胞の動毛や支持細胞の繊毛において蛋白質輸送を制御し、有毛細胞のPCP形成や支持細胞の繊毛形成に関与することが明らかとなった。さらにPCP障害が聴覚障害の一次的な原因となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cellular asymmetries play key roles in development and organ function. The planar cell polarity (PCP) signaling pathway is involved in the establishment of cellular asymmetry within the plane of a cell sheet. Inner ear sensory hair cells (HCs) exhibit a typical form of PCP. Although connections between cilia and PCP signaling in vertebrate development have been reported, their precise nature is not well understood. In this study, we investigated a functional role for intestinal cell kinase (Ick), which regulates intraflagellar transport (IFT) at ciliary tips, in the mouse inner ear. A lack of Ick in the developing inner ear resulted in PCP defects in the apical and middle turns of the cochlea, leading to auditory dysfunction. We also observed abnormal ciliary localization of Ift88 in both HCs and supporting cells. Our results show that Ick ciliary kinase is essential for PCP formation in inner ear HCs, suggesting that ciliary transport regulation is important for PCP signaling.

研究分野：神経科学

キーワード：繊毛 リン酸化 内耳 平面内細胞極性 聴覚 蛋白質輸送 蝸牛 マウス

1. 研究開始当初の背景

内耳における聴覚受容器官である蝸牛はコルチ器と呼ばれる感覚装置を内包する。コルチ器は3列の外有毛細胞、1列の内有毛細胞、および支持細胞より構成され、有毛細胞はその頂面に平面内細胞極性(planar cell polarity; PCP)という構造を有している。有毛細胞におけるPCPとは、V字型もしくは弧状に配列した不動毛と1本の動毛より形成される非対称性のことである。不動毛は階段状に配列しており、不動毛が一定方向に倒れることにより高感度な聴覚受容が可能となることから、有毛細胞のPCPは聴覚機能の成立に重要な意味を持つと考えられている。

2. 研究の目的

*Intestinal cell kinase(Ick)*は、ヒトの劣性遺伝性疾患であるendocrine-cerebro-osteodysplasia (EO) syndromeの原因遺伝子として同定された。以前私たちはIckが様々な組織において繊毛形成に関与すること、IckがKif3aをリン酸化し、繊毛の先端において繊毛内輸送を制御することを明らかにした。有毛細胞のPCP制御には、古典的なcore PCP蛋白質以外に、繊毛内輸送関連蛋白質Ift88やKif3aなどが関与することが知られている。以上より、Ickの内耳有毛細胞におけるPCP形成に対する役割を調べた。

3. 研究の方法

2種類のIck欠損マウスであるIckノックアウト(KO)マウスおよび内耳特異的Ickコンディショナルノックアウト(CKO)マウスを用いて、走査型電子顕微鏡や免疫染色、および聴覚機能検査によってIckの内耳における機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)Ickは蝸牛有毛細胞のPCP形成に必要なである

Ickの内耳における発現を*in situ* hybridizationを用いて調べたところ、胎生期においてIckはコルチ器の上皮細胞に高発現していたが、生後徐々に発現が低下してい

た。この結果より、Ickはコルチ器の発生段階に関与する可能性が示唆された。そこで、発生段階におけるIck欠失の影響を調べるため、胎生期におけるIck KOマウスの蝸牛およびコルチ器を観察した。するとIck KOマウスでは蝸牛管の長さが、コントロールマウスに比べて有意に短縮していた(図1a)。またコルチ器における外有毛細胞の列の数が、コントロールマウスでは3列であったのに対し、Ick KOマウスでは4から5列に増加していた(図1b)。これらの結果は、蝸牛の発生段階において、蝸牛管が長軸方向に伸長するのに必要な上皮細胞の移動を制御する過程に、Ickが関与することを示唆している。さらに、有毛細胞頂面の形態を、走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、コントロールマウスでは、動毛と最も長い不動毛が一様に蝸牛外側に位置していたのに対し、Ick KOマウスでは、動毛の位置異常や不動毛の配列異常が見られ、PCPが障害されているものと考えられた(図2)。また動毛と不動毛の位置関係に注目すると、コントロールマウスでは動毛の位置と不動毛の方向が一致していたのに対し、Ick KOマウスでは両者が解離していた。以上より、Ickは蝸牛の発生期において有毛細胞のPCP形成、とりわけ動毛と不動毛の配置を決定する段階における両者の協調的な移動に重要な役割を果たしていると考えられた。

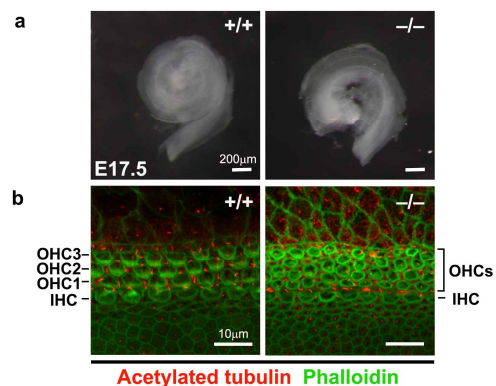


図1 Ick欠失による蝸牛管伸長への影響
a: 蝸牛管の長さの比較、b: 外有毛細胞の列数の比較、OHC: 外有毛細胞、IHC: 内
有毛細胞

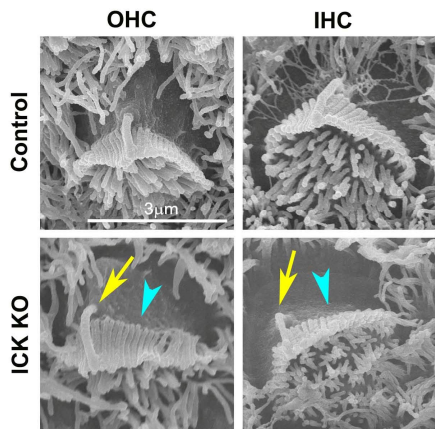
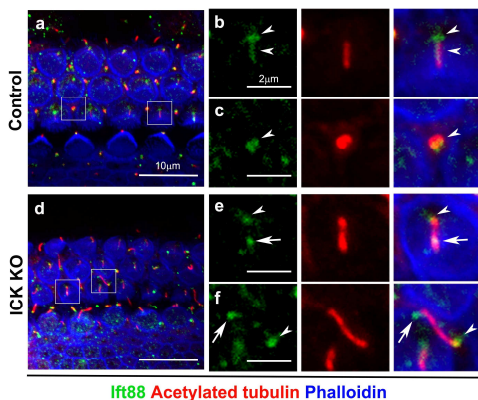


図 2 *Ick* 欠失による蝸牛有毛細胞の PCP 障害

黄矢印：動毛の位置異常、青矢頭：不動毛の配列異常

(2) *Ick* は有毛細胞の動毛と支持細胞の繊毛における蛋白質輸送制御に必要である

Ick は繊毛内輸送における蛋白質複合体の構成要素である *Ift88* の機能や局在に影響を及ぼす可能性が考えられたため、コルチ器における *Ift88* の免疫染色を行った。コントロールマウスでは有毛細胞の動毛や支持細胞の繊毛において、*Ift88* は軸糸および基部に局在していたのに対し、*Ick* KO マウスでは先端と基部に局在し、軸糸への局在は減少していた(図 3 a-f)。この結果は *Ick* が有毛細胞の動毛や支持細胞の繊毛においても、蛋白質輸送を制御することを示唆している。さらに *Ick* KO マウスでは支持細胞の繊毛が伸長しており(図 3 f)、繊毛内輸送の異常により、繊毛形成が促進されているものと考えられた。

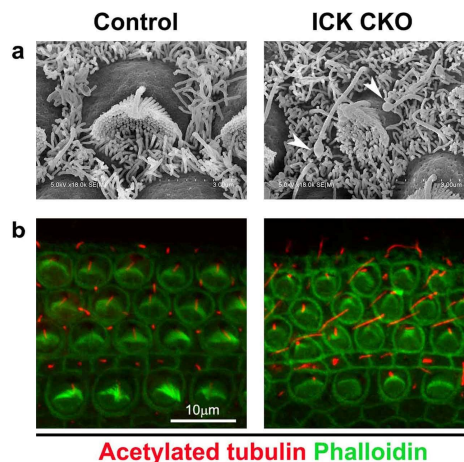


Ift88 Acetylated tubulin Phalloidin

図 3 *Ick* 欠失による *Ift88* の局在変化
a : コントロールマウスのコルチ器、b : コントロールマウスにおける有毛細胞の動毛、c : コントロールマウスにおける支持細胞の繊毛、d : *Ick* KO マウスのコルチ器、e : *Ick* KO マウスにおける有毛細胞の動毛、f : *Ick* KO マウスにおける支持細胞の繊毛

(3) *Ick* は聴覚機能に必要である

Ick KO マウスは新生児致死であるため、*Pax2-Cre* マウスを用いて内耳特異的 *Ick* CKO マウスを作製し、PCP 障害が聴覚機能に及ぼす影響を調べた。生直後の *Ick* CKO マウスでは、*Ick* KO マウスと同様に有毛細胞の PCP 障害が認められた(図 4 a)。PCP 障害の程度は蝸牛頂部に近いほど高度であり、基部になるほど軽度であった。また支持細胞の繊毛の先端は膨張し、かつ繊毛の伸長が認められ(図 4 a、b)、繊毛内輸送の機能異常によるものと考えられた。続いて、聴性脳幹反応 (auditory brainstem response; ABR) および歪成分耳音響放射 (distortion product otoacoustic emission; DPOAE) を用いて成体マウスの聴覚機能評価を行ったところ、いずれの検査においても *Ick* CKO マウスでは 24kHz 未満の低音域に難聴が認められた(図 5 a-c)。難聴を認めたマウスにおけるコルチ器の免疫染色を行ったところ、頂回転から中回転にかけて基底小体の位置異常や不動毛の配列異常が見られ、PCP が障害されていた(図 5 d)。蝸牛の周波数特性より、聴覚が障害される周波数と PCP の障害される領域が一致することが明らかになった。



Acetylated tubulin Phalloidin

図 4 生直後の内耳特異的 *Ick* CKO マウスにおける蝸牛有毛細胞の PCP 障害と繊毛異常
a : 蝸牛有毛細胞と支持細胞の走査型電子顕微鏡写真、矢頭：支持細胞の繊毛先端の膨張、
b : コルチ器の免疫染色

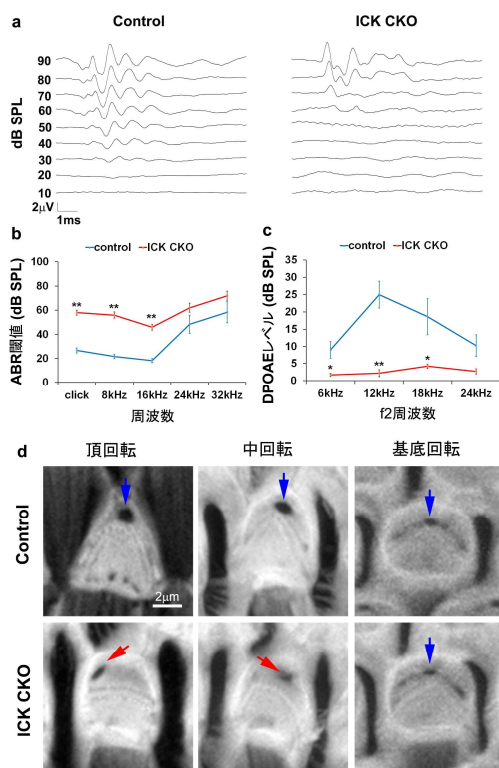


図 5 成体の内耳特異的 *Ick* CKO マウスにおける聴覚障害と蝸牛有毛細胞の PCP 障害
a : ABR 波形、b : ABR 閾値、c : DPOAE レベル、
d : 蝸牛有毛細胞の免疫染色、青矢印：正常な基底小体の位置、赤矢印：PCP 障害による基底小体の位置異常

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7件)

- Okamoto S, Chaya T, Omori Y, Kuwahara R, Kubo S, Sakaguchi H, Furukawa T, *Ick* Ciliary Kinase Is Essential for Planar Cell Polarity Formation in Inner Ear Hair Cells and Hearing Function, *J Neurosci*, 査読有, 37, 2017, 2073-2085 doi: 10.1523/JNEUROSCI.3067-16.2017
- Boubakri M, Chaya T, Hirata H, Kajimura N, Kuwahara R, Ueno A, Malicki J, Furukawa T, Omori Y, Loss of *ift122*, a Retrograde Intraflagellar Transport (IFT)

Complex Component, Leads to Slow, Progressive Photoreceptor Degeneration Due to Inefficient Opsin Transport, *J Biol Chem.*, 査読有, 291, 2016, 24465-24474

- Shibata S, Kawanai T, Hara T, Yamamoto A, Chaya T, Tokuhara Y, Tsuji C, Sakai M, Tachibana T, Inagaki S, ARHGEF10 directs the localization of Rab8 to Rab6-positive executive vesicles, *J Cell Sci.*, 査読有, 129, 2016, 3620-3634
- Mizunashi K, Chaya T, Kanamoto T, Omori Y, Furukawa T, Obif, a Transmembrane Protein, Is Required for Bone Mineralization and Spermatogenesis in Mice, *PLoS One.*, 査読有, 10, 2015, e0133704 doi: 10.1371/journal.pone.0133704
- Omori Y, Chaya T, Yoshida S, Irie S, Tsujii T, Furukawa T, Identification of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) in Primary Cilia and Their Possible Involvement in Body Weight Control, *PLoS One.*, 査読有, 10, 2015, e0128422 doi: 10.1371/journal.pone.0128422
- Irie S, Sanuki R, Muranishi Y, Kato K, Chaya T, Furukawa T, Rax Homeoprotein Regulates Photoreceptor Cell Maturation and Survival in Association with Crx in the Postnatal Mouse Retina, *Mol Cell Biol.*, 査読有, 35, 2015, 2583-2596 doi: 10.1128/MCB.00048-15
- Sugita Y, Araki F, Chaya T, Kawano K, Furukawa T, Miura K, Role of the mouse retinal photoreceptor ribbon synapse in visual motion processing for optokinetic responses, *PLoS One.*, 査読有, 10, 2015, e0124132 doi: 10.1371/journal.pone.0124132

[学会発表](計4件)

- 茶屋太郎, 松本彰弘, 杉田祐子, 栗原隆亮, 立花政夫, 古川貴久, 網膜神経回路における水平細胞の生理機能の解析、第9回 Retina Research Meeting、2016年12月10日、JPタワーホール&カンファレンス(東京都千代田区)
- Taro Chaya, Akihiro Matsumoto, Yuko Sugita, Satoshi Watanabe, Ryusuke Kuwahara, Masao Tachibana, Takahisa Furukawa, Unexpected functional roles of horizontal cells in the retinal circuit, ARVO2016, 2016年5月1日、ワシントン州立コンベンションセンター(アメリカ、シアトル)
- 茶屋太郎, 岡本志央, 大森義裕, 栗原隆亮, 坂口博史, 古川貴久, 内耳における

織毛局在キナーゼ ICK の機能解析、「包括脳ネットワーク」冬のシンポジウム、2015年12月18日、一橋大学一橋講堂 学術総合センター（東京都千代田区）

4. Taro Chaya, Shoichi Irie, Rikako Sanuki, Yuki Muranishi, Kimiko Katoh, Takahisa Furukawa, Cooperative role for Rax and Crx in photoreceptor cell maturation and survival、BMB2015、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計1件)

1. 茶屋太郎、大森義裕、古川貴久、公益財団法人日本農芸化学会、化学と生物、2016年、451-453

〔その他〕

大阪大学蛋白質研究所 分子発生学研究室ホームページ

http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab

6. 研究組織

(1)研究代表者

茶屋 太郎 (CHAYA, Taro)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：50747087