

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20239

研究課題名(和文)内耳有毛細胞の不動毛極性決定におけるスカフォールド蛋白質の機能解明

研究課題名(英文)Function of scaffold proteins in the polarization of stereocilia on inner ear hair cells

研究代表者

安田 俊平(YASUDA, Shumpei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：50534012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SansおよびWhirlinは内耳有毛細胞の不動毛形成に機能するが、両遺伝子の二重変異マウスは不動毛の極性・配向異常を示した。有毛細胞頂部の表現型解析によって両遺伝子の単一変異マウスは動毛も正常な位置に形成されていたが、二重変異マウスは不動毛のみならず動毛の明確な形成位置の異常が認められた。また、RNA-Seq解析によっても二重変異マウス特異的な発現変動遺伝子が抽出され、二重変異マウスにおいては11の蛋白質コード遺伝子および15の非コードRNA遺伝子を含む遺伝子群が大きく変動しており、その中には不動毛の極性・配向決定への関与が予測されるWnt/PCPシグナル経路のメンバーも含まれていた。

研究成果の概要(英文)：Sans and Whirlin genes encode scaffold proteins that are known to play a key role in the development of stereocilia in inner ear hair cells. We have found that Sans and Whirlin double-mutant mice showed abnormal polarization of stereocilia. To investigate the mechanisms of the abnormal polarization of stereocilia, we performed comparative phenotypic and gene expression analyses among wild-type mice as well as single- and double-mutant mice carrying mutations in Sans and Whirlin. In the phenotypic analysis, we found that Sans and Whirlin double-mutant mice developed significant mislocalization of kinocilia, although single mutants of either genes showed normal localization of the kinocilia. RNA-seq was also used to also detect specific gene expression changes in the double-mutant mice. Thirty-nine genes were significantly changed in the cochlea of the double-mutant mice. Moreover, we identified a gene associated with the Wnt/PCP signaling pathway in the protein-coding genes.

研究分野：マウス遺伝学

キーワード：Usher症候群 平面内細胞極性 不動毛

## 1. 研究開始当初の背景

内耳有毛細胞上に厳密に組織された感覚毛である Stereocilia (不動毛) は、機械的刺激である音の電気信号への変換に重要な役割をもつ。近年、不動毛の形成へ機能する数多くの分子が同定され、このうち研究代表者は、蛋白質-蛋白質相互作用を仲介するスカフォールド蛋白質である Scaffold protein including ankyrin repeats and SAM domain (SANS) および Whirlin (WHRN) に注目している。

*Sans* はヒト I 型 Usher 症候群 (USH1) および不動毛崩壊・接着異常を示す Jackson shaker (*Ush1g<sup>js</sup>*) マウスの発症原因遺伝子であり、不動毛間を繋ぐ link の一つである tip-link の上端部で Myosin VIIa, Harmonin および Cadherin 23 などの USH1 の発症原因遺伝子がコードする蛋白質からなる USH1 インターラクトーム形成を仲介し、tip-link 形成およびその張力維持に機能することが予想されている [Adato et al. 2005a; Yan et al. 2010; Vrijens et al. 2008; Grati & Kachar 2011]。

一方、*Whrn* はヒト非症候群性難聴 DFNB31 および不動毛短毛化を示す whirler (*Whrn<sup>wi</sup>*) マウスの発症原因遺伝子であり、不動毛先端部で Myosin XVa および EPS8 とインターラクトームを形成することによって不動毛伸長に重要な役割をもつ [Kikkawa et al. 2005; Belyantseva et al. 2005; Manor et al. 2011]。さらに、WHRN は II 型 Usher 症候群 (USH2) の発症原因遺伝子でもあり、不動毛形成初期に不動毛基底部を接着する Ankle link において Usherin, VLRG1 および PDZD7 など USH2 の発症に関与する遺伝子がコードする蛋白質間からなる USH2 インターラクトームを形成し、不動毛の成熟に機能することが推定されている [Adato et al. 2005b; Michalski et al. 2007; Grati et al. 2012]。また、WHRN においては short (WHRN-S) および long (WHRN-L) の 2 種のスプライシングアイソフォームが転写・翻訳されることが報告されており [Mburu et al. 2003]、WHRN-S が不動毛伸長のための、WHRN-L が不動毛成熟のための役割を担っている。

また、SANS と WHRN は直接結合することが *in vitro* の実験によって明らかとなっている [Maerker et al. 2008]。研究代表者は両者の相互作用の不動毛における役割を *in vivo* で検証するため、*Ush1g<sup>js</sup>* マウスと *Whrn<sup>wi</sup>* マウス間を交配し、二重変異体 (*Ush1g<sup>js/js</sup>*, *Whrn<sup>wi/wi</sup>*) を作製し、表現型を観察した。その結果、*Ush1g<sup>js/js</sup>*, *Whrn<sup>wi/wi</sup>* マウスにおいては不動毛の配向パターンに大きな差異が認められ、この異常は有毛細胞の平面内軸に従った極性異常によって生じた結果であると推定された。

## 2. 研究の目的

本研究は研究代表者が予備実験で発見した *Ush1g<sup>js</sup>*, *Whrn<sup>wi</sup>* 二重変異マウスの不動毛配向異常および動毛局在異常の原因を明らか

にするために、野生型、*Ush1g<sup>js</sup>*、*Whrn<sup>wi</sup>* マウスおよび両者の二重変異体間の不動毛配向・極性異常の定量比較解析および遺伝子発現比較解析を行うことを目的とした。さらに、本研究では発現比較解析において得られた二重変異体マウス特異的発現変動遺伝子のノックアウト (KO) マウスをゲノム編集により作製し、配向・極性異常に関連する遺伝子を同定することも目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス系統

本研究においては、変異体の遺伝的背景である C3H/HeN (野生型: C3H/HeN-*Ush1g<sup>+/+</sup>*, *Whrn<sup>+/+</sup>*)、*Ush1g<sup>js/js</sup>*、*Whrn<sup>wi/wi</sup>* および二重変異体 *Ush1g<sup>js/js</sup>*, *Whrn<sup>wi/wi</sup>* マウスを用いた。また、*Ush1g<sup>js/js</sup>* および *Whrn<sup>wi/wi</sup>* マウスはヘテロ雌とホモ雄間交配から、*Ush1g<sup>js/js</sup>*, *Whrn<sup>wi/wi</sup>* マウスは C3H/HeN-*Ush1g<sup>js/+</sup>*, *Whrn<sup>wi/+</sup>* 二重ヘテロマウス間の交配から得た産仔を用いた。

### (2) 表現型解析

各遺伝子型のマウス不動毛配向・極性異常は、配向形成の決定に重要な胎生 15.5 日齢～生後 5 日齢の内耳蝸牛を用いた。摘出した蝸牛は不動毛をファロイジンで、kinocilia (動毛) を抗  $\beta$  チューブリン抗体でホールマウント免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡により撮影後、両者の形成位置を 350 以上の有毛細胞において調査した。

### (3) 遺伝子発現比較解析

解析用の mRNA は、自然交配により得られた胎生 16.5 日齢の野生型、*Ush1g<sup>js/js</sup>*、*Whrn<sup>wi/wi</sup>* および両者の二重変異マウスの内耳から抽出した。抽出した RNA はライブラリー化し、イルミナ社の HiSeq 2500 を用いて 100 bp ペアエンド RNA-seq 解析を行った。得られたデータは CLC Genomics Workbench および Strand NGS ソフトウェアを用いて解析し、各マウス由来の蝸牛における遺伝子発現比較を行った。

### (4) BAC トランスジェニックマウスの樹立

Bacterial artificial chromosome (BAC) トランスジェニック (BAC-tg) マウスは、*Whrn-L* アイソフォームの第 4 エクソン以降、すなわち *Whrn-S* アイソフォームの転写・翻訳配列のみを含む 2 種の BAC (RP23-351G9 および RP23-172L18) を C57BL/6J マウスの受精卵前核にマイクロインジェクションすることにより作製した。作製した tg マウスは *Whrn<sup>wi</sup>* マウスと交配後、BAC 導入領域をホモ化および C57BL/6J 由来の加齢性難聴発症アレルである Cadherin 23 の *Cdh23<sup>753A</sup>* を排除した。ホモ化した BAC-tg マウスは、内耳蝸牛および前庭を WHRN-L および-S アイソフォーム双方を認識する抗 WHRN 抗体により免疫染色を行った。また、ホモ化 BAC-tg マウスは聴性脳幹反応 (ABR) 測定および蝸牛および前

庭のファロイジン染色による形態観察により表現型を解析した。また、BAC-tg マウスは  $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  マウスとの交配によって  $Ush1g^{js}$  変異を導入した。

#### 4. 研究成果

(1)  $Ush1g^{js}$ 、 $Whrn^{wi}$  二重変異マウスの不動毛配向・極性異常

図 1 に示すように、 $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  二重変異マウスは、特徴的な Neural 側の不動毛の異局在、すなわち不動毛の配向パターンの異常が認められるが、*Celsr1* [Curtin et al. 2003]、*Vangl2* [Montcouquiol et al. 2003]、*Ift88* [Jones et al. 2008] などのマウス変異体が示すような典型的な有毛細胞の平面内細胞極性 (planar cell polarity: PCP) 異常を示す不動毛も検出される。これまで報告されている不動毛の PCP 異常においては動毛の形成位置の異常が認められていることから、本研究では第一に  $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  マウスの有毛細胞上の動毛の詳細な形成位置を計測した。野生型マウスの蝸牛有毛細胞の動毛の形成位置は内有毛細胞 (IHC) および外有毛細胞 (OHC) においてそれぞれ有毛細胞の平面中心部から平均  $9.9^\circ$  および  $6.6^\circ$  であり、その位置は  $Ush1g^{js/js}$  および  $Whrn^{wi/wi}$  の有毛細胞においてもほぼ同様であった。一方、 $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  マウスにおける動毛の形成位置は IHC および OHC においてそれぞれ平均  $20.8^\circ$  および  $30.2^\circ$  であった。しかし、動毛の形成位置の異常は不動毛の PCP 異常を示す有毛細胞において重度であったことから、本研究のデータからは動毛の形成異常と不動毛の配向異常との関連を明確にすることはできなかった。

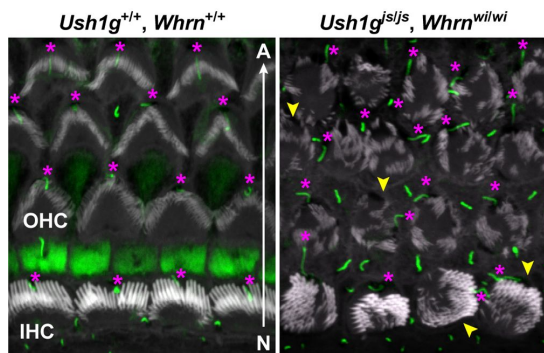


図 1. 野生型 ( $Ush1g^{+/+}$ ,  $Whrn^{+/+}$ ) および  $Ush1g$ ,  $Whrn$  の二重変異体 ( $Ush1g^{js/js}$ ,  $Whrn^{wi/wi}$ ) マウスから抽出した蝸牛有毛細胞のファロイジン (白) および抗βチューブリン抗体 (緑) による染色像。アスタリスク (マゼンタ) および矢頭 (黄) は動毛の位置および不動毛の PCP 異常を示した有毛細胞を示している。N, Neural; A, Abuneural.

(2)  $Ush1g^{js}$ 、 $Whrn^{wi}$  二重変異マウス特異的発現変動遺伝子群の同定

本研究では PCP および不動毛配向に関わる新たな遺伝子を単離するため、野生型、 $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  および  $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  二重変異マウスの蝸牛から抽出した RNA を用いて RNA-Seq 解析を実施した。また、RNA は動毛の有毛細胞の Neural 側への移動が開

始する胎生 16.5 日齢の蝸牛から抽出した [Jones and Chen 2008]。

RNA-seq を実施した結果、それぞれの遺伝子型のマウス蝸牛からは約 87,750 万 ~ 94,660 万リードが得られ、野生型マウスと  $Ush1g^{js/js}$  および  $Whrn^{wi/wi}$  マウス間でそれぞれ 37,911 および 37,950 の遺伝子が 2 倍未満 (fold change) の発現変動を示し、さらにそれらのうち 37,842 遺伝子に共通の発現変動パターン認められたことからこれらの遺伝子を野生型と  $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  マウス間で比較した (図 2)。その結果、39 の遺伝子が 2 倍以上変動しており、それらの遺伝子には 11 個の蛋白質コード遺伝子、13 個の small nuclear RNA、2 個の microRNA および 13 個の機能不明遺伝子が含まれていた。また、蛋白質コード遺伝子の中には Wnt/PCP signaling pathway との関係が示唆される遺伝子が検出され、PCP および不動毛配向に関与する新たな候補遺伝子となった。

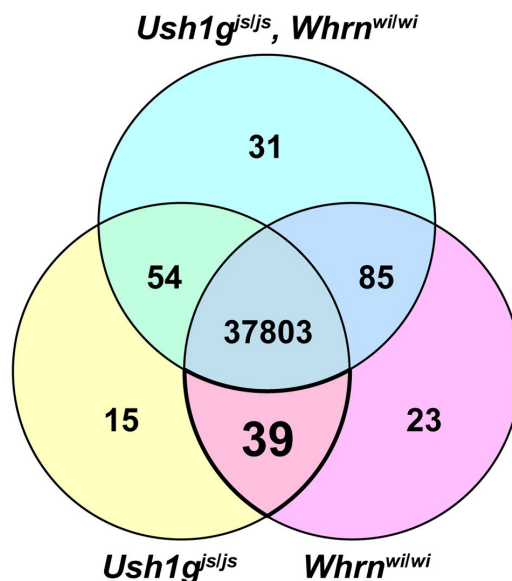


図 2. 遺伝子発現比較解析。野生型と比較して  $Ush1g^{js/js}$ 、 $Whrn^{wi/wi}$  および二重変異体 ( $Ush1g^{js/js}$ ,  $Whrn^{wi/wi}$ ) マウスで発現量の変動が 2 倍未満である遺伝子数をベン図で示した。太線で囲まれた領域は、二重変異体でのみ発現量が 2 倍以上変動していた遺伝子が 39 個見つかったことを示す。

本研究では遺伝子発現解析によって抽出した不動毛の PCP および配向への関与が予想された遺伝子の KO マウス作製し、解析することを目的として研究を進めてきた。しかし、研究期間内に本解析で同定した Wnt/PCP シグナリング関連遺伝子の KO マウスの作製には至らなかった。本研究において同定した遺伝子の有毛細胞不動毛の PCP および配向への関与を *in vitro* で実証した研究成果は報告されておらず、本遺伝子の作製は有毛細胞の形態形成の分野で大きな波及効果を生むことが予想されることから早急に KO マウスを作製し、解析を実施したい。

(3) WHRN-S の機能を回復した  $Ush1g^{js}$ ,

### Whrn<sup>wi</sup> 二重変異マウスの作製

本研究の問題点は Whrn 変異体として Whrn<sup>wi</sup> マウスを用いたことである。SANS は WHRN-S アイソフォームで欠失している PDZ ドメインと直接結合することから、SANS の結合パートナーは WHRN-L である [Maerker et al. 2008]。Whrn<sup>wi</sup> マウスは WHRN-L および-S 両アイソフォームを欠損していることから [Ebrahim et al. 2016; Mburu et al. 2003]、今後 (2) の実験結果の検証、(2) で同定した遺伝子を解析、さらに、新たに発現解析を実施する場合 WHRN-L の欠損は実験の障害となる可能性がある。そこで WHRN-S の機能を回復するため、WHRN-S 全長を含む BAC を導入した BAC-tg マウスを作製した。

本研究では 2 種の BAC トランスジェネシスに成功し、2 系統の BAC-tg マウスを樹立することができた。BAC RP23-351G9 を導入した tg マウスにおいてはマウス難聴発症の原因となる *Cdh23*<sup>c.753A</sup> 変異を野生型の *Cdh23*<sup>c.753G</sup> 変異へと置換できたため、このマウスを系統化に用いた。

樹立した BAC-tg マウスは Whrn<sup>wi</sup> マウスとの交配によって Whrn<sup>wi</sup> 変異アレルをホモで導入し、表現型を解析した。ABR による聴力測定の結果、Whrn<sup>wi/wi</sup> マウスのような完全な聴力は BAC-tg マウスでは回復していた。さらにこのマウスでは野生型に比べ、僅かに聴力が低下しており、この表現型は Whrn-L アイソフォーム単独の KO マウスの表現型と類似していた [Ebrahim et al. 2016]。また、WHRN-L および-S アイソフォームはそれぞれ不動毛の先端部および Ankle link に局在することが報告されているが [Ebrahim et al.

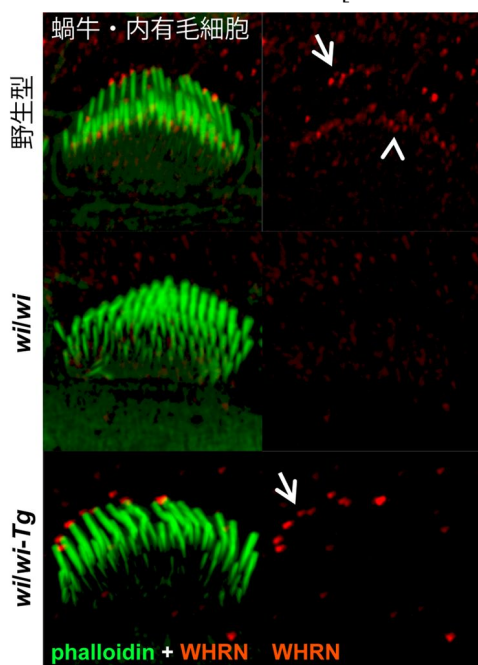


図 3. 野生型、Whrn<sup>wi/wi</sup> (wi/wi) および Whrn<sup>wi/wi-Tg</sup> (RP23-351G9) (wi/wi-Tg) の WHRN 蛋白質の不動毛上での局在。生後 8 日齢の個体を使用した。矢印は WHRN-S アイソフォームを、鏃は WHRN-L アイソフォームを示す。

2016; Yang et al. 2012]、図 3 に示すように、BAC-tg マウスでは不動毛基部での発現は検出されないが、不動毛先端部での発現が回復した。さらに、作製した BAC-tg マウスの不動毛は野生型同様に伸長することも確認され (図 3)。作製したマウスは目的とした WHRN-L アイソフォーム欠損マウスであることが強く示唆された。作製したマウスは *Ush1g*<sup>js/js</sup>、Whrn<sup>wi/wi</sup> マウスとの交配によって両遺伝子変異を導入後、系統化し、今後の実験に使用可能な状況となった。

### <引用文献>

- Adato A. et al. (2005a) Hum. Mol. Genet., 14, 347-356.  
Adato A. et al. (2005b) Hum. Mol. Genet., 14, 3921-3932.  
Belyantseva I. A. et al. (2005) Nat. Cell Biol., 7, 148-156.  
Curtin J. A., et al. (2003) Curr. Biol., 13, 1129-1133.  
Ebrahim S. et al. (2016) Cell Rep., 15, 935-943.  
Grati M. & Kachar B. (2011) PNAS, 108, 11476-11481.  
Grati M. et al. (2012) J. Neurosci., 32, 14288-14293.  
Jones C., et al. (2008) Nat. Genet., 40, 69-77.  
Jones C. & Chen P. (2008) Curr. Top. Dev. Biol., 85, 197-224.  
Kikkawa Y. et al. (2005) Mol. Genet., 14, 391-400.  
Maerker T. et al. (2008) Hum. Mol. Genet., 17, 71-86.  
Manor U. et al. (2011) Curr. Biol., 21, 167-172.  
Mburu P. et al. (2003) Nat. Genet., 34, 421-428.  
Michalski N. et al. (2007) J. Neurosci., 27, 6478-6488.  
Montcouquiol M. et al., (2003) Nature, 423, 173-177.  
Vrijens K. et al. (2008) Hum. Genet., 124, 325-348.  
Yan J. et al. (2010) PNAS, 107, 4040-4045.  
Yang J. et al. (2012) Front. Biosci., 17, 1165-1183.

### 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)

Seki Y., Miyasaka Y., Suzuki S., Wada K., Yasuda S. P., Matsuoka K., Ohshiba Y., Endo K., Ishii R., Shitara H., Kitajiri S., Nakagata N., Takebayashi H., Kikkawa Y. (2017) A novel splice site mutation of myosin VI in mice leads to stereociliary fusion caused by disruption of actin networks in the apical region of inner ear hair cells. PLoS One, 12, e0183477. DOI: 10.1371/journal.pone.0183477. (査読有り)



〔学会発表〕(計2件)

安田俊平, 宮坂勇輝, 小原央, 鈴木沙理, 関優太, 松岡邦枝, 設楽浩志, 高田豊行, 城石俊彦, 木南 凌, 吉川欣亮. 染色体・ゲノム領域置換マウスを用いた進行性難聴抑制因子の探索. TOBIRA 第5回研究交流フォーラム, 2016年.

Yasuda S. P., Obara Y., Suzuki S., Wada K., Nishito Y., Takada T., Shiroishi T., Kikkawa T. *hfh14*, a novel locus on mouse chromosome 12 affects early-onset, high frequency hearing loss. *Inner Ear Biology* 2016, 2016年.

〔図書〕(計1件)

Yasuda S. P., Miyasaka Y., Kikkawa Y. (2018) Effects of genetic background on susceptibility and the acceleration of hearing loss in mice. *In An Excursus into Hearing Loss* (Edited by: S. Hatzopoulos & A. Ciorba), pp. 3-23. DOI: 10.5772/intechopen.72469. ISBN: 978-1-78923-213-4 (査読有り)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/mammal/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 俊平 (YASUDA, Shumpei)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム  
医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：50534012

(2)研究協力者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム  
医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20280787

設楽 浩志 (SHITARA, Hiroshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技  
術研究センター・主席基盤技術研究職員

研究者番号：90321885