

令和 5 年 4 月 4 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09687

研究課題名（和文）内耳不動毛ミオシンの挙動、およびその分子輸送機能としなり調節機構の統合的解明

研究課題名（英文）Integrative elucidation of myosin molecular transport function and warping regulatory mechanism in the inner ear stereocilia

研究代表者

北尻 真一郎 (Kitajiri, Shinichiro)

信州大学・医学部・特任准教授

研究者番号：00532970

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスでは有毛細胞培養がうまくいかなかったため、モルモットへ動物種を変更した。TRIOBP-1ノックダウンモルモットを作成するため、RNA干渉システムプラスミドを作成した。これをAAVウイルスベクターで導入し、TRIOBP-1欠損有毛細胞を単離することに成功した。共同研究者より提供を受けたCy3ラベルDNAバネを有毛細胞に導入することを試みたが、実験にかかる予算が不足し、これ以上の実験はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、内耳だけに限定されない普遍的なミオシンの活性調節に新たな知見をもたらす可能性があった。

研究成果の概要（英文）：Since hair cell culture was unsuccessful in mice, the animal species was changed to guinea pigs. To generate TRIOBP-1 knockdown guinea pigs, we constructed an RNA interference system elastic body. We tried to introduce Cy3-labeled DNA springs provided by our collaborators into hair cells, but due to lack of funds for experiments, we were unable to carry out further experiments.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：TRIOBP

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「聞こえ」を感じる際、内耳蝸牛は音振動による機械ストレスを必然的に受けるため、軽減するための適切な伸縮「しなり」が備わっており、蝸牛での聴覚受容に重要であると考えられるが、その調節機構の詳細は明らかではない。代表的なものとして、有毛細胞の不動毛先端にあるメカノチャンネルの開閉に関わるチップリンクという精巧な仕組みや、音振動で前後に激しく揺れる不動毛の根の役割が挙げられる(図1)。これまで研究代表者・北尻は、アクチン束化タンパク TRIOBP が、この不動毛や基板のしなりの役割に寄与していることを剛性定量と原子間力顕微鏡により明らかとしてきた(JCI Insight 2019、Cell 2010)。

さらに研究代表者らは、TRIOBP-1 が RhoGEF である Trio とミオシン制御軽鎖 (MLC) の脱リン酸化酵素 (MYPT1 と MBS85) と複合体を形成すること、MYPT1 自身のリン酸化を制御していることを発見した(ARO winter meeting 2019)。有毛細胞不動毛には少なくとも6種類のミオシンが局在しており、これまでの研究から様々な難聴関連分子の輸送に関わっているとされている(図2A)。そこで我々は『不動毛の分子輸送としなりは、TRIOBP による MYPT family を介した複数のミオシン活性調節に起因する』との仮説をたてた。MYPT1 がミオシン 2a の活性を制御するのは知られているが、他のミオシンにおける活性調節への寄与については全くわかっていない(図2B, Annu Rev Physiol 2006)。

2. 研究の目的

本研究では、MYPT 活性低下という特性をもつ TRIOBP KO マウスと、DNA バネという最新ミオシン視覚化プローブを用いることにより、有毛細胞不動毛における複数ミオシンの活性調節機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

申請者が作製した KO マウスを用い、ミオシン活性調節の分子制御機構を解明し、研究分担者・岩城が開発した Cy3 ラベル DNA バネによるナノイメージング技術を応用して、有毛細胞不動毛内のミオシン挙動の実態を、しなりと分子輸送の2つの観点から把握・分析する。

1年目で各種 DNA バネと新規リン酸化抗体の作製とバリデーション、2年目に新規抗体を用いた種々のタンパクアッセイと wild-type マウスでのイメージング解析系の確立、最終年度で TRIOBP KO マウスならびに様々なミオシン活性調節薬の影響について解析する。

1) ミオシン 2a によるしなりの制御機構の解明

TRIOBP-4/5 KO では MYPT1 調節本体の TRIOBP-1 の根での局在がなくなることから、本研究ではこの KO マウスに加えて既に作製済みの TRIOBP-1 コンディショナル KO マウス(未発表)を陽性対照とし、wild-type マウスとの比較実験を行う。しなりの分子制御機構については DNA バネによるナノイメージングを主に行う。具体的には、パキユロ系にて SNAP-tag タグ付きミオシン 2a リコンビナントタンパクを発現・精製し、ベンジルグアニンリンカーをつけたオリゴと反応させ、最終産物である DNA バネを精製する(結合効率 > 95%)。次に、蝸牛器官培養系に遺伝子導入法(エレクトロポレーション、リポフェクション)等取り込み機構を利用して DNA バネを細胞内に挿入し、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)にて観察する(図4参照)。キャピラリー水流による不動毛揺らしシステム、および筋型ミオシン 2 の挙動観察システムは既に構築し、蝸牛器官培養系でも遂行可能である。遺伝子の細胞導入については、Ashmore 教授による支援を必要に応じて得るほか、岩城が確立した phalloidin 結合 DNA バネによる細胞外ラベル法による間接的なしなり解析を行う。ミオシン 2 の活性調節についても、各種阻害剤や活性化剤の添加実験を準備しており、その挙動変化について観察も必須とする。

2) 様々なミオシンによる分子輸送の制御機構の解明

不動毛に局在する6種類のミオシンのうち、ミオシン 6 は他のミオシンとは逆方向(マイナスエンド)に進むため、DNA バネの一端にミオシン 6 を、もう一端に残りのミオシンを(Strep-tag II タグ付きタンパクとピオチンリンカーにて)結合させることにより、不動毛内でのミオシン挙動を解析する。既に岩城は、これに関して DNA バネにおける綱引き挙動を観察している(未発表)。1)と同様、実際のミオシン挙動を反映しているかどうかは、GFP 抗体-DNA バネを用いることにより、解析が可能である。

今回 TRIOBP の結合相手として見つかった MBS85 に着目し、いくつかの新規抗体を作製することにより、その分子ターゲットとなるミオシン制御軽鎖の発見ならびにリン酸化調節についてタンパクアッセイを行う。

4. 研究成果

マウスでは有毛細胞培養がうまくいかなかったため、モルモットへ動物種を変更した。TRIOBP-1 ノックダウンモルモットを作成するため、RNA 干渉システムプラスミドを作成した。これを AAV ウイルスベクターで導入し、TRIOBP-1 欠損有毛細胞を単離することに成功した。共同研究者より提供を受けた Cy3 ラベル DNA バネを有毛細胞に導入することを試みたが、実験にかかる予算

が不足し、これ以上の実験はできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyajima Hiroki, Moteki Hideaki, Day Timothy, Nishio Shin-ya, Murata Takaaki, Ikezono Tetsuo, Takeda Hidehiko, Abe Satoko, Iwasaki Satoshi, Takahashi Masahiro, Naito Yasushi, Yamazaki Hiroshi, Kanda Yukihiko, Kitajiri Shin-ichiro, Usami Shin-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel ACTG1 mutations in patients identified by massively parallel DNA sequencing cause progressive hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63690-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Yuma, Maruyama Minako, Kita Tomoko, Usami Shin-ichi, Kitajiri Shin-ichiro, Harashima Hideyoshi	4. 巻 55
2. 論文標題 The use of a MITO-Porter to deliver exogenous therapeutic RNA to a mitochondrial disease's cell with a A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA gene results in an increase in mitochondrial respiratory activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 134 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mito.2020.09.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	三輪 徹 (Miwa Toru) (70535591)	大阪公立大学・大学院医学研究科・講師 (24405)	
研究分担者	岩城 光宏 (Iwaki Mitsuhiro) (30432503)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・客員研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------