

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659307

研究課題名（和文）イオンチャネルの機能増強型点変異による前庭・聴覚機能への影響

研究課題名（英文）Effect of gain-of-function mutation in ASIC on vestibular and auditory function

## 研究代表者

島田 昌一（SHIMADA SHOICHI）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20216063

研究成果の概要（和文）：酸感受性イオンチャネル（ASIC）遺伝子ファミリーは、感覚器や神経系に幅広く発現し、内耳にも発現している。我々は ASIC2a の 430 番目のグリシン残基をフェニルアラニンに置換することにより、機能増強型（gain of function）のチャネルを作成した。このチャネルは常に開いているため、培養細胞に強制発現すると、細胞死を引き起こす。この点変異を導入したトランスジェニックラットを作成した。このトランスジェニックラットには、明らかに歩行の異常が認められ、平衡感覚の障害もしくは、小脳失調の可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Members of acid sensing ion channel (ASIC) gene family are widely expressed in the central and peripheral nervous system and sensory organs including inner ear. A substitution of glycine 430 of ASIC2a by phenylalanine produced gain-of-function channel. Transfection of the mutant channel induced cell death. Transgenic rats expressing G430F-ASIC2a resulted in balance and gait disturbances.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科頸臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳、イオンチャネル、点変異、トランスジェニックマウス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 酸感受性イオンチャネル (Acid sensing ion channel: ASIC) の概説

酸感受性イオンチャネル (Acid sensing ion channel: ASIC) は、線虫の *Deg/ENaC* 遺伝子スーパーファミリーと高い相同性を有するイオンチャネルである。ASIC1a、ASIC1b、ASIC2a、ASIC3 を細胞にそれぞれ単独で発現

させると酸の刺激によって開く陽イオンチャネルを形成する。一方、ASIC2b や ASIC4 は単独では酸に応答するイオンチャネルを形成できないため、他の ASIC ファミリーメンバーとヘテロマーを形成することによって機能的なチャネルを形成したり、今だ明らかにされていないリガンドが存在する可能性が示唆されている。

(2) ASIC に関する我々の研究のこれまでの流れ

我々は以前、ラット有郭乳頭の cDNA ライブラリーから、酸味の受容に関与する遺伝子 ASIC2a を同定した (*Nature*, 395:555-556, 1998; *J Neurosci*, 23:3616-3622, 2003)。また、ASIC1a や ASIC3 は酸によって惹起される痛みの受容に関与していることを明らかにした (*J Clin Invest*, 110:1185-1190, 2002)。さらに、我々は ASIC ファミリーと相同性を有する ENaC  $\delta$  も酸感受性イオンチャネルの特性を示すことを見いだした (*J Biol Chem*, 279:12529-12534, 2004; *J Biol Chem*, 279:44483-44489, 2004; *Mol Pharmacol*, 68:1142-1147, 2005)。最近、我々は ASIC1b が内耳のコルチ器で有毛細胞やラセン神経節に発現していることを明らかにした

(*Neuroreport*, 17:1235-9, 2006)。さらに ASIC1b は浸透圧感受性を示すことを見いだした (*Biochem Biophys Res Commun*, 367:530-534, 2008)。これらの結果から、ASIC は内耳の聴覚や平衡覚機能にも関与しているものと考えられる。

(3) 線虫 *degenerin* 遺伝子と神経変性症

一方、ASIC 遺伝子ファミリーは、線虫の *degenerin* 遺伝子と高い相同性を有するが、線虫では *degenerin* 遺伝子の第二膜貫通部位のグリシンが変異することによって神経変性症を引き起こすことが報告されている。

## 2. 研究の目的

ASIC 遺伝子ファミリーの第 2 膜貫通部位の *degenerin* 変異に相当するミューテーションを人工的に作成すると、機能増強型 (gain of function) のイオンチャネルができる。本研究では、この機能増強型変異チャネルを遺伝子改変動物に導入して、前庭・聴覚系や神経系の疾患モデル動物を作製することを目的としている。

まず最初に ASIC 遺伝子ファミリーの第 2 膜貫通部位の *degenerin* 変異に相当する部位に様々な点変異を人工的に導入することにより、機能の異なるイオンチャネルを作成し、その中でチャネルが開口したまま閉じなくなるような機能増強型 (gain of function) のイオンチャネルを選出する。次に元々内耳に発現しているタイプの ASIC に機能増強型の点変異遺伝子を導入した遺伝子改変動物を作成することにより、内耳の前庭・聴覚機能にどのような影響を及ぼすかを解析する。このようなミューテーションは、実際に自然界でも起こりうると考えられ、その場合はシグナル伝達の異常や細胞死を引き起こすのでは

ないかと考えられる。また、変異するアミノ酸の種類によって、チャネルの開き具合も変わってくるため、様々な病態が考えられ興味深い。一般的にイオンチャネル遺伝子の異常が原因となる疾患では機能消失型のミューテーションによる疾患の報告がほとんどであり、機能増強型のミューテーションで発症する疾患の研究は少ない。本研究ではこの様な点に着目し、イオンチャネルの機能増強型変異が前庭・聴覚機能への影響とそれによって発症する疾患を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) ポイントミューテーションを導入した機能増強型 ASIC の作成

ASIC2a、ASIC1a の第 2 膜貫通部位に共通に存在するグリシン残基を PCR 法を用いて様々なアミノ酸に置換する。それらのミュータントクローンをアフリカツメガエルガンマグロビン cDNA の 5' 3' の非コード領域の間に挿入しベクターを作成する。このクローンから *in vitro* transcription によりキャッピングした cRNA を作成し、アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションし、1~2 日インキュベーションした後発現させて、2 電極ボルテージクランプ法により点変異イオンチャネルの特性を電気生理学的に解析する。これらの結果を基に、ミューテーションの種類によってどの程度の陽イオンのリークがこのイオンチャネルを介して生じるかを分析し、機能増強型の変化をきたす点変異を選別する。

(2) 機能増強型 ASIC を導入した遺伝子改変動物の作成

機能増強型点変異 ASIC2a G430F に 4 kb のエンハンサー/プロモーター領域を結合したコンストラクトを作成する。そのコンストラクトの DNA を受精卵にインジェクションし、トランスジェニックラットを作成する。

(3) 機能増強型 ASIC2a を導入したトランスジェニックラットを用いた生理機能の解析

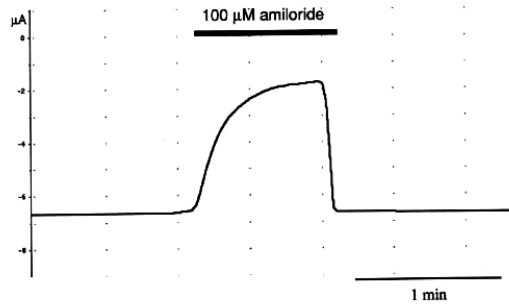
これらのトランスジェニックラットを用いて内耳の生理機能検査を行う。前庭機能を調べるために回転検査で眼振の解発を観察したり、平衡覚・協調運動を評価するロータロッド試験を行う。また聴覚機能を調べるために他覚的聴力検査を行う。

## 4. 研究成果

(1) 機能増強型 ASIC の作成と選出

ASIC2a の 430 番目のグリシン残基を PCR 法を用いて、他のアミノ酸に置換するとチャネ

ルの特性が様々なに変化した。その中でも ASIC2a の 430 番目のグリシン残基をフェニルアラニンに置換することにより、強力な機能増強型 (gain of function) のチャンネルを作成した。このチャンネルは常に開口しているため、G430F ミュータントチャンネルを培養細胞に強制発現すると、ミュータントチャンネルを介してナトリウムイオンが細胞内に常時流入する状態となり、細胞が膨化して、最終的に細胞死を引き起こすことを培養細胞を用いて示した。



上図は ASIC2a の G430F 点変異イオンチャンネルをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた後に、電気生理学的にこのイオンチャンネルを流れる電流を解析した図である。この陽イオンチャンネルを介して内向き電流が常時流れており、ASIC の阻害剤である 100  $\mu$ M のアミロライドがこのイオンチャンネルを介した電流を阻害することによって、常時流れている電流を計測することができる。

## (2) 機能増強型 ASIC を導入した遺伝子改変動物

この 430 番目のグリシン残基をフェニルアラニンに置換した点変異イオンチャンネルを導入した ASIC2a イオンチャンネルの上流に ASIC2a 自身のエンハンサー/プロモーター領域を含んだコンストラクトを構築し、トランスジェニックラットを作成した。このトランスジェニックラットは繁殖能力が低く、かつ生直後もしくは胎児の間の死亡例が多い。そのため、成獣において生理実験を行うに十分な匹数がまだ確保できていない。しかし、成獣までの生存例を用いた実験で、ロータロッドによる試験では、落下するまでの時間が大幅に短くなっていった。また、歩行についても顕著なふらつき歩行が認められた。

## (3) 今後の展望

機能増強型 ASIC を導入したトランスジェニックラットの生理機能実験におけるロータロッド試験の結果や歩行障害の原因が、平衡感覚機能障害なのか、小脳機能障害なのかはまだ明らかにしていない。今後さらに病理

組織学的な検討、回転検査で眼振の解発や ABR や DPOAE の他覚的聴力検査などの詳細な解析により、ASIC の機能増強型点変異による生理機能障害の解析を進めて行く予定である。

## 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 5 件)

- ① Nakamura Y, Ishida Y, Yamada T, Shimada S. Anticancer drug irinotecan inhibits homomeric 5-HT (3A) and heteromeric 5-HT (3AB) receptor responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有り 2011: 415:416-420.
- ② 島田昌一、石田雄介、中村雪子、山田貴博、植田高史、鶴川眞也 ASICs について何がわかっているか 分子消化器病 (総説) 査読無し 2011, 8(4):322-327.
- ③ Yamada T, Ueda T, Shibata Y, Ikegami Y, Saito M, Ishida Y, Ugawa S, Kohri K, Shimada S. TRPV2 activation induces apoptotic cell death in human T24 bladder cancer cells: a potential therapeutic target for bladder cancer. *Urology*. 査読有り 2010: 76(2):509. e1-7.
- ④ Hondoh A, Ishida Y, Ugawa S, Ueda T, Shibata Y, Yamada T, Shikano M, Murakami S, Shimada S. Distinct expression of cold receptors (TRPM8 and TRPA1) in the rat nodose-petrosal ganglion complex. *Brain Res* 査読有り 2010, 1319:60-9.
- ⑤ Yamada T, Ueda T, Ugawa S, Ishida Y, Imayasu M, Koyama S, Shimada S. Functional expression of transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) in corneal epithelial cells: Involvement in thermosensation and wound healing. *Exp Eye Res*. 査読有り 2010, 90(1):121-9.

[学会発表] (計 1 件)

- ① 鶴川眞也、佐久間英輔、植田高史、木山博資、島田昌一 ディジェネリン (線虫神経変性原因遺伝子) の哺乳類ホモログが引き起こす病態の解明 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (2012 年 3 月 27 日) 山梨

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島田 昌一 (SHIMADA SHOICHI)  
大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20216063

### (2) 研究分担者

八木田 和弘 (YAGITA KAZUHIRO)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90324920  
(平成22年まで分担者として参画)

石田 雄介 (ISHIDA YUSUKE)  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：30381809

### (3) 連携研究者

鵜川 眞也 (UGAWA SHINYA)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20326135