

## 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 6 月 26 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手B

研究期間：平成22年度～平成23年度

課題番号：22791641

研究課題名（和文） 立体構造予測による OTOF 遺伝子変異を原因とする先天性難聴の治療を目指す研究

研究課題名（英文） The structural study aim to elucidate congenital hearing loss caused by OTOF gene mutation

研究代表者 難波 一徳

(NAMBA KAZUNORI) 国立病院機構東京医療センター臨床研究センター・研究員

研究者番号：60425684

研究成果の概要（和文）：本研究では、培養細胞および OTOF 遺伝子欠損マウスを用いて、Otoferlin の ERK1 様構造から想定されたことに発端する、OTOF 遺伝子の関わるリン酸化シグナル経路の探索を行った。リン酸化機構が関与しているか不明であるが、同マウスにおいて Auditory Neuropathy の発症モデルとなりうる新規内耳神経奇形を発見した。

研究成果の概要（英文）： In this study, a hypothetical phosphate signaling which is predicted from molecular modeling of Erk1-like structure of Otoferlin was explored using cultured cells and OTOF gene deficient mouse. In morphological investigation of spiral ganglion neuron of OTOF gene deficient mouse cochlea, a novel hypoganglionosis like phenotype was detected. The phenotype has a potential for the first morphological model of Auditory Neuropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：耳科学

## 1. 研究開始当初の背景

OtoferlinはOTOF遺伝子の遺伝子産物で Auditory Neuropathy (AN) の原因遺伝子であり、内耳有毛細胞において、SNARE複合体を形成し、カルシウム濃度依存的にシナプス小胞分に重要な役割を呈する。本件研究室においてAN患者の血液検体からOTOF遺伝子における変異が見つかっているため、蛋白質の機能不全がANを発症することが想定された。しかし

、当初の知見ではこのOtoferlinを含め、これを介するSNARE複合体分子メカニズムとその構造情報については未知であった。

そこで、本研究室で見つかった5種類の新規 OTOF 遺伝子変異のそれぞれの病害メカニズムを調べるために、Otoferlinを構成する機能領域をバイオインフォマテックス的手法より調べたところ、このOtoferlinのアミノ酸配列がリン酸化酵素PKCファミリーに関与する機能モチーフを持つことが挙げられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、Otoferlinの有毛細胞においてシナプス小胞を分泌する際作られると考えられるSNARE複合体形成において、Otoferlinがリン酸化シグナルに関与する現象を見つけることを、細胞レベルおよび内耳組織レベルにおいて見つけることを目的とした。

## 3. 研究の方法

Otoferlinおよび、SNARE複合体形成時Otoferlinと結合する蛋白質、SNAP25およびSyntaxin1aの発現ベクターを、培養細胞に共発現させた。PKCの活性化また阻害をしたときのこれらの分子の結合パターンを見るため、上記分子の抗体を用いて免疫沈降法を行った。同時に、生体においてOTOF遺伝子の関係するリン酸化機構の存在を確認するため、PKC活性化剤およびPKC阻害剤のそれぞれ存在下、非存在下における、正常マウスおよびOTOF遺伝子欠損マウス(ENSMUSG62372)の内耳組織を用いて、PKCの発現およびリン酸化パターンの組織染色、および形態解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1)

現在、Otoferlinとリン酸化メカニズムとの相関性における知見は得られるに至っていない。しかし、ヒトOtoferlinの6つの機能ドメイン(C2A-C2F)のうちC2Aドメインの信頼性の高い分子モデリングに成功した(図1)。この構造によれば、C2AドメインはPKC様構造をとり、同時にOtoferlinのカルシウム結合部位も予測できた。当研究室で見つかった新規病的変異Asp1842Asnは、アスパラギン酸がアスパラギンに変異することにより電氣的にカルシウムを退けることが解った。これが原因でANの発症に至ったことが推察された (doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01897.x.)

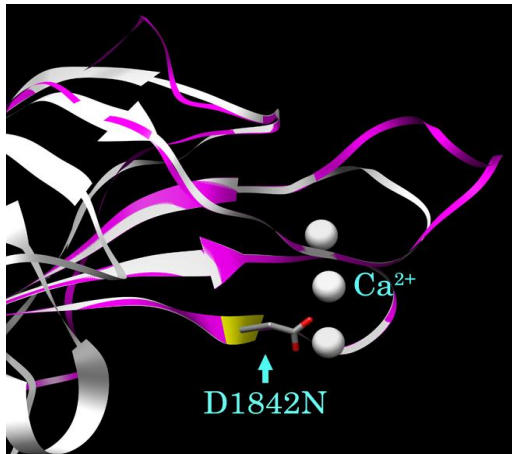


図1 OtoferlinのC2Aドメインの予測構造

### (2)

また本研究における重要な成果として、OTOF遺伝子欠損マウスを用いて、発生段階初期(胎生18日)からアダルト(12カ月齢)における内耳形態を調べてみたところ、正常マウスに比べて蝸牛神経節において神経細胞が明らかに減少しているという形態異常があることを世界に先駆けて発見した(図2)。胎生18日においても蝸牛神経節においても神経細胞の減少が観られたことから、OTOF遺伝子が発生に重要な役目を示していることが明らかとなった。本研究成果による、本マウス蝸牛神経の発生段階における形態異常の発見は、今後のAN治療のための重要なモデルとなることが期待できる。

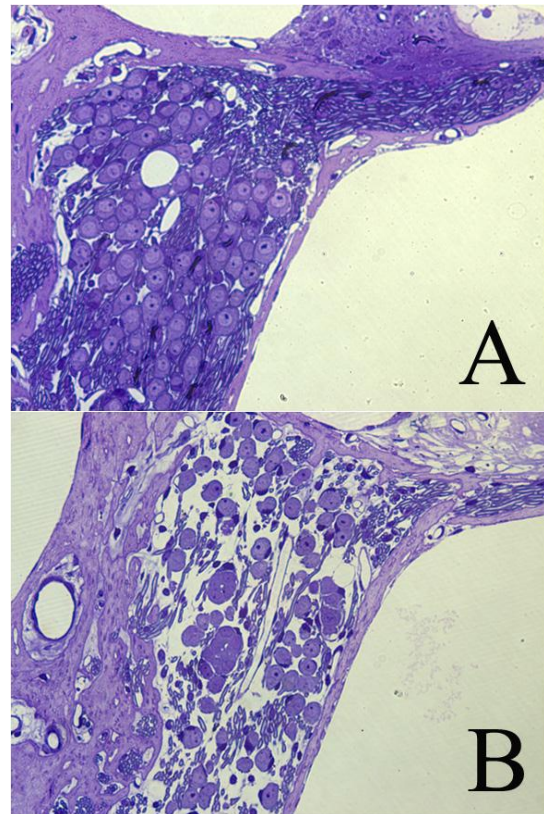


図2 蝸牛神経節における蝸牛神経の比較写真。正常な蝸牛神経節のニューロンは均等にかつ密接に配位している(A)。これに対しOTOF遺伝子欠損マウスの蝸牛神経節では、ニューロンの配位は不均等となり、かつ著しく減少する(B)。胎生18日の段階で既にこの特徴が観られるため、発生段階での障害が疑われ

た。

## 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)

Matsunaga T, Mutai H, Kunishima S, Namba K, Morimoto N, Shinjo Y, Arimoto Y, Kataoka Y, Shintani T, Morita N, Sugiuchi T, Masuda S, Nakano A, Taiji H, Kaga K.

Clin Genet. 2012 May 10. doi:  
10.1111/j.1399-0004.2012.01897.x.

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

難波 一徳 (NAMBA KAZUNORI)

国立病院機構東京医療センター臨床研究  
センター

研究員

研究者番号: 60425684

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

