

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861578

研究課題名(和文)DFNB93原因遺伝子を通した有毛細胞特異的なカルシウムシグナリングの機能解析

研究課題名(英文)Analysis of calcium signaling in DFNB93 mutation in the hair cells

研究代表者

稲垣 彰(Inagaki, Akira)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70405166

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):カルモジュリン類似のカルシウム結合タンパクであるCaBP2の聴覚器における局在について、免疫組織化学法を用いて検討を行った。免疫組織化学法の結果より、内有毛細胞質に、CaBP2が発現することがわかる。また、外有毛細胞においては細胞質よりも、細胞膜に強い染色をみとめるが、内有毛細胞質ほどのシグナルではない。また、ピラー細胞など支持細胞も弱く染色されている。また、内有毛細胞においては細胞質は強い反応性を認めたが、外有毛細胞において、細胞膜が細胞質よりも強く染色された。

研究成果の概要(英文):The distribution of Calcium binding protein 2 (CaBP2) was examined by immunohistochemistry by using rabbit polyclonal antibody against mouse CaBP2. The immunoreactivities were observed in the cytosols of inner hair cells, which was proved by the co-localization with myo7a, a inner hair cell- cytosolic marker. A moderate signal was observed in the cytosols of outer hair cells, but more intense signals were seen in the membranous lesion of outer hair cells. Also supporting cells such as pillar cells, were weakly stained.

研究分野：耳科学

キーワード：耳鼻咽喉科 耳科学 カルシウム結合タンパク CaBP

1. 研究開始当初の背景

聴覚系は生物周囲の気体、ないし液体の粗密波を需要する仕組みである。有毛細胞と呼ばれる、細胞に粗密波により振動する感覚毛を有する細胞が、一次感覚ニューロンとしてその感覚を受容している。この仕組みはある程度生物の進化の過程で保存されており、カエル、ハエ、マウス、ラット、ヒトなどで共通の構造となっている。

分子生理学的には、頂部にある感覚毛の根部または中間部に分子実体は不明であるが、機械受容チャネルの存在が想定されている。音波の需要により感覚毛の振動が生じると、感覚毛に存在する機械受容チャネルが開閉し、カリウムに加えカルシウムイオンが流入し脱分極が生じる。

カルシウムチャネルはこの脱分極に応じてカルシウムイオンを細胞体に流入させ、リボンシナプスに係留されるシナプス小胞の放出のトリガーとなっている。

有毛細胞のカルシウムの主な流入経路となっている電位依存型カルシウムチャネルの9割以上はCav1.3(1D)であることがノックアウトマウスの電気生理学的解析により確認されているが(Platzner J et al. Cell 2000, Michna M et al. J physiol 2003)、実際に有毛細胞のカルシウム電流の性質を電気生理学的に検討すると、有毛細胞に発現するCav1.3は強制発現系に発現したCav1.3、あるいは中枢神経に発現するCav1.3よりも活性化速度が速く、カルシウム依存性不活性化が緩やかに生じるという特徴がある。これらはovershootによる脱分極を生じず、段階的な脱分極によりシナプス放出の程度を制御する視細胞と共通し、継続的な感覚受容を実現する、持続的なシナプス放出を実現する機構の重要な構成要素であると考えられている。

この特徴を形成するCav1.3関連の分子機構としては、シナプス関連分子の結合(Song H et al. J neurophysiol, 2003)、Cav1.3のスプライスバリエーション(Shen Y et al. J neurosci, 2006)、カルモジュリン類似分子であるCaBPの結合(Yang PS et al. J neurosci, 2006, Cui G et al. J physiol, 2007)などが想定されてきた。

カルシウム結合タンパク(CaBP)は、幅広い細胞に発現するカルモジュリンに構造的には類似したカルシウム結合蛋白であるが、主に神経系に特異的に発現する分子である。その構造から、カルモジュリン同様に他の分子のカルシウムセンサーとして機能することが推定されているが、カルモジュリンが4個のカルシウム結合部位(EFハンドモチーフ)を持つのに対して3個の結合部位、またヒンジ領域と呼ばれる2番目と3番目のEFハンドをつなぎ、他の分子を挟み込み、また、カルシウム結合に伴い立体構造を変化させる領域がやや異なる。これらのことから、カルモジュリンとは異なる

役割が想定されている。

実際、強制発現系において電位依存型カルシウムチャネルと共発現すると有毛細胞のカルシウム電流と同じような、限定的なカルシウム依存性不活性化を示す。

CaBPにはいくつかのisoformが存在するが、CaBP4がnight blindnessに関与していることが報告されている他はその生理的な機能は未だ不明である。最近、常染色体劣性遺伝の非症候性難聴であるDFNB93がCaBP2の変異によって生じていることが明らかになり、本遺伝子が聴覚系に重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかしながら、その機序は大きく不明であり、検討を要した。

2. 研究の目的

遺伝子ノックアウト技術を用いてCaBP2の内耳、主に蝸牛での機能について明らかにするとともに、培養系を用いてCaBP2の細胞内の機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ノックアウト技術を用いることを目的とする(1)まずCaBP2の内耳における分布を免疫組織化学法、in situ hybridization法を用いることで組織学的に確認する。(2)ノックアウト技術によりmRNA合成、またタンパク合成が抑制されたことを確認するため、安定した免疫組織化学法、遺伝子増幅法の確立を目指す。(3)その後、shRNAを用いた遺伝子ノックアウト技術を用いることで、in vivoでCaBP2の有毛細胞における生理機能、とりわけ、イオン電流に対する影響を電気生理学的手法を用いることで明らかにすることを目的とする。

4. 研究成果

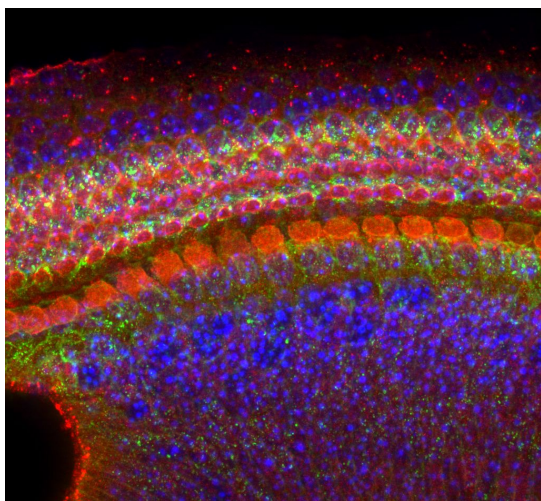
最初にCalcium binding protein 2 (CaBP2)の細胞内局在を明らかにするため、ニュージランドホワイト種のラビットを用いてポリクローナル抗体の作成を試みた。ラビットポリクローナル抗体の作成には、CaBPサブタイプ間の交叉反応を避けるため、CaBP2特異的な配列部分を大腸菌を用いて強制発現させたものを免疫に用いた。1 µg/µlのタンパク溶液50 µlを、等量のフロイントアジュバント液と混和し、皮下注射を行い免疫した。続けて、ブースター注射として半量の注射液を2週間毎に皮下注射した。

得られた血清より抗体を精製した。精製はCaBP2を結合したセファロースビーズカラムにより行った。

抗体の特異性の確認のため、マウスCaBP2をATCCより購入したHEK293T細胞に強制発現させ、CaBP2タンパクを得た。CaBPにはいくつかのサブタイプがあることから、それぞれのサブタイプに加えて、カルモジュリン

を同様に発現させたものを用いて、タンパクの強制的な合成を行い、細胞溶解した溶液よりタンパクを抽出し、Western blot 法を用いて感度・特異性の確認に用いた。上記の方法により作成されたラビットポリクローナル抗体は CaBP2 に特異的な反応を示した。

次に、聴覚器における CaBP2 の局在を免疫組織化学法を用いて検討した。一次抗体としては上記で調整したものを、2 次抗体としては抗ラビットテキサスレッドを用いた。また、細胞の同定の補助とするため、核染色として DAPI を、有毛細胞の同定のためマウスモノクローナル抗ミオシン 7a 抗体(抗 myo7a 抗体)を Alexa 488(Alexa fluor 488, Life technologies)を 3 重染色し使用した。細胞質内の局在をより詳細に検討すること、脱灰ステップによるタンパク変性の影響を避けるため、ホールマウントの蝸牛を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス FV1000)を用いて観察を行った。



聴覚発生前のマウスとして生後 7~8 日の、また、聴覚発後のマウスとして生後 1 ヶ月、3 ヶ月の C57b16 マウスを用いて実験を行った。動物実験プロトコールに従い、急速にマウス側頭骨を採取し、速やかに氷冷 4%パラホルムアルデヒド溶液ないし、冷蔵メタノール液を用いて固定した。採取した蝸牛を用いて染色を行った。上記の写真は生後 5 日目のマウスを PFA 固定し、免疫染色に供した際の写真である。内有毛細胞、外有毛細胞の全長が含まれるように Z stack を行い、XY 方向の図を Z 平面へ投射を行い得た図である。内有毛細胞に強く発現が見られ、内有毛細胞細胞質を染色する myo7a (alexa488) と共存が見られることから、内有毛細胞質に、CaBP2 が発現することがわかる。また、外有毛細胞においては細胞質よりも、細胞膜に強い染色をみとめるが、内有毛細胞質ほどのシグナルではない。また、ピラー細胞など支持細胞も弱く染色されている。また、内有毛細胞においては細胞質は強い反応性を認めたが、外有毛細胞において、細胞膜が細胞質よりも強く染色された。

ホールマウント蝸牛を用いてチャンネル複合体との局在関係を確認するため CtBP2/Ribeye との 2 重染色を行ったが、細胞内全体が均一に染まり、期待したチャンネルクラスターを始め、細胞内の特定の領域との関連を見いだせなかった。そのため、crude の血清を用いて染色をおこなったが、ピラー細胞が強く染色され、特異的な反応ではないように思われた。

これらのことから、CaBP2 はカルモジュリンと同じく、免疫組織化学法からは細胞質に均質に発現するものと考えられたが、染色条件が確立できたとはいえ、ノックダウンへの評価は困難であると結論された。

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 3 件)

- (1). DFNB93 におけるカルシウムチャンネルの異常 稲垣彰, 村上信五、耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 28 巻 52 -56 頁、2014 年、査読有
- (2). Pharmacological correction of gating defects in the voltage-gated Ca(v)2.1 Ca²⁺ channel due to a familial hemiplegic migraine mutation. Inagaki A, Frank CA, Usachev YM, Benveniste M, Lee A. *Neuron*. 2014 Jan;81(1):91-102.doi:10.1016/j.neuron.2013.10.056.査読有
- (3). Developmental alterations in the biophysical properties of Ca(v) 1.3 Ca(2+) channels in mouse inner hair cells. Inagaki A, Lee A. *Channels (Austin)*. 2013 May-Jun;7(3):171-81. doi:10.4161/chan.24104.査読有

[学会発表](計 2 件)

- (1). 第 37 回日本神経科学学会大会、シンポジウム 難聴の解明を目指して有毛細胞特異的なカルシウムシグナリング~最近の知見~, 稲垣彰 2014 年 9 月 29 日~2014 年 10 月 1 日 奈良県新公会堂(奈良県奈良市)
- (2). 第 57 回日本神経化学学会大会 Pharmacological correction of gating defects in the voltage gated Ca(v)2.1 channel due to a Familial migraine mutation, Akira Inagaki, Amy Lee 2014 年 7 月 9 日~2014 年 7 月 11 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/oto.dir/ikyoku/>

6．研究組織

(1)研究代表者

稲垣 彰 (INAGAKI AKIRA)

名古屋市立大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：70405166