

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861604

研究課題名(和文)whirlinアイソフォームの機能解析に基づく不動毛形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)To elucidate the mechanism of stereocilia development based on functions of whirlin isoforms

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト難聴発症責任遺伝子であるWhirlinには、Long型およびShort型のアイソフォームが存在する。本研究は両アイソフォームおよび相互作用するタンパク質の機能を明らかにするための変異マウス樹立を目的として実施した。結果、両アイソフォーム独自のプロモーター候補領域をそれぞれ検出したが、Shortのプロモーター候補領域ノックアウトマウスの樹立には至らなかった。また、Shortの配列をBaitとして酵母2ハイブリッドを行った結果、7種のタンパク質との相互作用が認められ、そのうちLimk2のアイソフォームであるLimk2cのmRNAが脳、内耳および眼球で特異的に発現することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Whirlin is one of the responsible genes for non-syndromic deafness and Usher syndrome type 2. Two whirlin transcript variants, such as “Long” and “Short”, were reported. In this study, I attempted to establish mutant mice strains to know the functions of both isoforms and proteins interacted with whirlin. First, I tried to detect promoter candidate regions for both isoforms. Isoforms specific candidate regions were detected which implied that expressions of both isoforms were controlled independently. To establish Short specific KO mouse strain, I attempted to delete Short specific promoter candidate region. However, the strain could not be established. Second, yeast two-hybrid analysis using short isoform as bait suggested that seven proteins were interact with whirlin. Limk2, one of seven proteins, have four isoforms. In this study, I found that mRNA of Limk2c, one of four isoforms, was specifically expressed in brain, inner ear and eye.

研究分野：遺伝学

キーワード：whirlin 遺伝性難聴 マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 内耳有毛細胞の頂部に組織された Stereocilia (不動毛) は、外界から受容した音を電気信号に変換するために重要な役割をもち、不動毛に障害をもつヒトおよびマウスは重篤な難聴を発症することから我々が音を聞くために必須のオルガネラである (Gillespie & Müller, 2009)。最近の約 20 年の研究によってこの形成に關与する複数の遺伝子が同定されてきた。特に、その主要な遺伝子群は、ヒトにおいて感音性難聴、網膜色素変性症および平衡異常を併発する Usher 症候群の責任遺伝子群である。Usher 症候群はそれぞれの疾患の発症時期および重篤度から I~III 型に分類されており、これまで I 型において 6 種、II 型において 3 種、および III 型において 1 種の責任遺伝子が同定されている (Yan & Liu, 2010; Riazuddin et al., 2012)。また、これらの遺伝子は相互作用することが明らかとなっており、特に、それぞれのタイプの責任遺伝子がコードするタンパク質間でネットワークを形成することが近年の研究で実証されている (Kikkawa et al., 2012)。

(2) 我々のグループはこの Usher タンパク質複合体のメンバーのうち、Whirlin に注目して研究を進めてきた。Whirlin は難聴・行動異常のマウス突然変異体である whirler マウスから我々のグループがポジショナルクローニングによって同定し (Mburu et al., 2003)、ヒト非症候群性難聴 (DFNB31) および II 型 Usher 症候群の責任遺伝子であることも明らかとなっている (Mburu et al., 2003; Ebermann et al. 2007)。Whirlin は N 末端側に 2 つおよび C 末端側に 1 つの PDZ ドメイン、および中央部に Prolin-rich 領域といったタンパク質結合ドメインをもつ典型的なスカフォールドタンパク質であり、実際に複数のタンパク質との相互作用することが報告されてきた (Brown et al., 2008; Kikkawa et al., 2012)。特に、多くのヒト難聴発症責任遺伝子、不動毛形成に機能する遺伝子がコードするタンパク質との相互作用が報告されていることから、我々は Whirlin の主要な役割は内耳有毛細胞の不動毛形成に機能するタンパク質間ネットワーク形成の仲介であると考えている。

(3) 一方、Whirlin 遺伝子からは、オルタネイティブスプライシングによって主として "Long" および "Short" の 2 種のアイソフォームが転写・翻訳されることが明らかとなっており、これらは独立した転写制御を受け翻訳されることも示されている (Mburu et al., 2003; Yang et al., 2010)。また、両アイソフォームは共通して不動毛の形成初期に限定して不動毛に発現するものの (Kikkawa et al., 2005)、その局在は異なっており、完全長の mRNA から翻訳された Long アイソフォームは、不動毛形成初期に不動毛間に形成される

腺毛である ankle-link に特異的に局在し (Michalski et al., 2007)。一方、N 末端側の 446 アミノ酸、すなわち 2 種の PDZ ドメインを欠損した Short アイソフォームは不動毛先端部に特異的に局在する (Kikkawa et al., 2005)。また、両者はそれぞれが異なった不動毛形成に必要なタンパク質と結合することも明らかとなっており、Long アイソフォームは主に Whirlin 同様に Usher タンパク質である VLGR1, Usherin および CIB2 と (Adato et al., 2005; Michalski et al., 2007; Riazuddin et al., 2012)。Short アイソフォームは非症候群性難聴の責任遺伝子である MYO15A および Eps8 と結合する (Belyantseva et al., 2005; Manor et al., 2011)。さらに、両者はそれぞれ特異的に機能を欠損したマウス突然変異体が樹立されており、その表現型およびその結合するタンパク質の機能から、Long アイソフォームは不動毛間接着に、Short アイソフォームは不動毛伸長に機能することが予想される。

(4) さらに、申請者のグループは、両者が不動毛形成初期に限定して発現することに注目し、胎生 15 日齢~生後 8 日齢の蝸牛における 2 種のアイソフォームの発現量、および不動毛における局在を明らかにすることを目的とし、継時的な発現解析を行ってきた。その結果、Long および Short アイソフォームには、一部のエクソンが欠失したサブタイプが存在し、それらのアイソフォームも普遍的に蝸牛で発現していることを確認した。加えて、これらサブタイプに存在または欠損するペプチド配列を抗原とした抗体を作製し、有毛細胞の免疫組織染色を行った結果、サブタイプ間で不動毛における局在が異なる可能性が見出された。従って、それらのアイソフォームに相互作用するタンパク質を明らかにすることは、不動毛形成の分子メカニズムを解明するために極めて重要である。

2. 研究の目的

(1) Whirlin の Long および Short の機能の詳細を明らかにするために、アイソフォーム特異的マウス突然変異体樹立を目指す。

(2) Whirlin の各アイソフォームと相互作用するタンパク質を同定し、その機能を明らかにするために、相互作用タンパク質のマウス突然変異体樹立を目指す。

3. 研究の方法

(1) Long アイソフォームについては、エクソン 1 をノックアウトしたマウスが Yang et al. によって既に報告されている (Yang et al., 2010)。しかしながら、Short は、Long の後半部と遺伝子配列が完全に重複しているため、エクソンをノックアウトする方法では Short のみのノックアウトマウスを作成することは不可能である。そこで、両アイソフォームのプロモーター領域を 5'-RACE、luciferase

assay および EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay) で探索し、さらに、リアルタイム PCR で両アイソフォームの発現量の変動を調べ、それぞれが独立のプロモーターで独自に発現調節をされていることを調査した後、Short のプロモーター領域のノックアウトを CRISPR/Cas9 系を用いて試みる。CRISPR/Cas9 系は、プロモーター候補領域の上流および下流をターゲット配列として sgRNA を導入すると同時に、上流および下流の配列 60 bp ずつを繋ぎ合わせた 120 bp の ssODN を sgRNA と同時に導入する。

(2) Short の配列を bait として yeast two-hybrid を行い、相互作用するタンパク質を探索する。in vitro で相互作用が認められたタンパク質について、それぞれのアイソフォームの mRNA の内耳での発現を RT-PCR で調査し、発現が認められたアイソフォームについて Western Blotting 法で内耳からのタンパク質の検出を試みる。同時に、ホールマウント免疫染色も実施し、タンパク質の局在が認められたら、CRISPR/Cas9 系を用いてノックアウトマウスの作成を試みる。

4. 研究成果

(1) Long および Short のプロモーター領域を探索するため、5'-RACE を行った。エクソン 1 の開始コドンから上流向きと、エクソン 6 に位置する Short の開始コドンと推定される領域から上流向きに実施した結果、エクソン 1 の上流に向けた RACE では結果を得ることができなかったが、エクソン 6 の上流に向けた RACE で複数の配列を得ることができた。それらは全てエクソン 6 およびその上流のイントロン 5 の 3'末端を含んでおり、また、最も多く得られた配列は、イントロン 5 の 3'末端を 108 bp 含んだ配列であった。

Long のプロモーター候補領域は、エクソン 1 の上流部に複数存在することが Forrest et al. により示唆されたので (Forrest et al., 2014) 文献情報および 5'-RACE の結果を基に luciferase assay および EMSA を行いそれぞれのプロモーター領域の推定を行った。その結果、エクソン 1 の上流 155-31 bp およびエクソンの 6 の上流 135-2 bp の位置に、プロモーター候補領域を検出した (図 1)。両アイソフォームの発現量変動調査の結果からも、両アイソフォームがそれぞれ独自に発現調節を受けていることが示唆された (図 2)。

そこで、Short 特異的ノックアウトマウスを作成するために、CRISPR/Cas9 系を用いて Short 特異的プロモーター候補領域を欠失したマウスの作成を試みた。結果、残念ながらターゲット領域を欠失したマウスの作成には至らなかったが、エクソン 6 から 42 bp 上流に 28 bp の挿入を持った個体 (c.1218-43_42insCACACTGAAATGTGAGC CATGGTAAGGC) を作成することができた。この変異体マウスには、異常は認められな

ったことから、この部位およびこの部位に結合すると予測された転写因子である EGF2 および E2F3 は Short の発現調節には機能していないと推察された。また、イントロン 5 に存在し、開始コドンとして機能する可能性のあった ATG 配列が実際には開始コドンとして機能していないことが示された。

以上の研究成果から、データベース上では同一のプロモーターで発現制御されているとされる Long と Short は、実際は独自のプロモーター領域を持ち、独立に発現をコントロールされていることが推察された。

(2) Short の配列を bait として yeast two-hybrid を実施した結果、in vitro で 7 種のタンパク質との相互作用が認められた。そのうちの 1 つである RPGR は既に in vivo での実際の相互作用が報告されているが (Wright et al., 2012)、他のタンパク質ではまだ報告がない。そのうちの 1 つである Limk2 には、タンパク質間相互作用に機能する LIM ドメインを保有し、a、b、c および t と名付けられたアイソフォームが存在するが、特に Limk2c は脳に、Limk2t は精巣に特異的に発現することが知られている (Ikebe et al., 1998)。そこで、RT-PCR を行い、それぞれのアイソフォームの mRNA の発現を Whirlin タンパク質が発現している生後 6 日齢のマウスにおいて調査したところ、Limk2c は脳だけでなく内耳および眼球にも発現が認められた (図 3)。これ

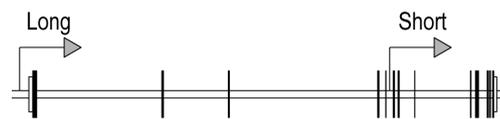


図 1 : 推定転写開始部位。

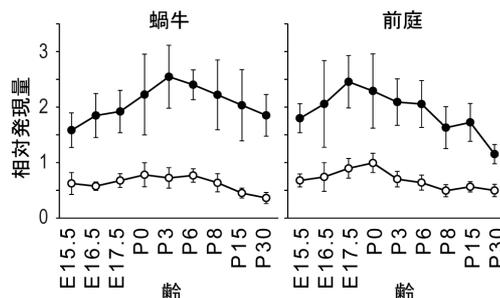


図 2 : Long および Short の発現変動。黒丸が Long、白丸が Short を示す。

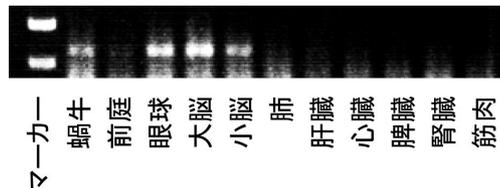


図 3 : Limk2c の mRNA の各組織での発現を RT-PCR で調査。生後 6 日齢のマウスを使用。

を踏まえて、特異的抗体を用いて Western Blotting 法およびホールマウント免疫染色で内耳でのタンパク質の発現を調査したが、現段階では内耳でのタンパク質の発現および局在は認められていない。

<引用文献>

- Adato A., Michel V., Kikkawa Y., Reiners J., Alagramam K. N., Weil D. et al. (2005) Interactions in the network of Usher syndrome type 1 proteins. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 347-356.
- Belyantseva I. A., Boger E. T., Naz S., Frolenkov G. I., Sellers J. R., Ahmed Z. M. et al. (2005) Myosin-XVa is required for tip localization of whirlin and differential elongation of hair-cell stereocilia. *Nat. Cell Biol.*, 7, 148-156.
- Brown S. D. M., Hardisty-Hughes R. E., Mburu P. (2008) Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat. Rev. Genet.*, 9, 277-290.
- Ebermann I., Scholl H. P. N., Issa P. C., Becirovic E., Lamprecht J., Jurklics B. et al. (2007) A novel gene for Usher syndrome type 2: mutations in the long isoform of whirlin are associated with retinitis pigmentosa and sensorineural hearing loss. *Hum. Genet.*, 121, 203-211.
- Forrest A. R. R., Kawaji H., Rehli M., Baillie J. K., de Hoon M. J. L., Haberle V. et al. (2014) A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, 507, 462-470.
- Gillespie P. G., Müller U. (2009) Mechanotransduction by Hair Cells: Models, Molecules, and Mechanisms. *Cell*, 139, 33-44.
- Ikebe C., Ohashi K., Mizuno K. (1998) Identification of testis-specific (Limk2t) and brain-specific (Limk2c) isoforms of mouse LIM-Kinase 2 gene transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 246, 307-312.
- Kikkawa Y., Mburu P., Morse S., Kominami R., Townsend S., Brown S. D. M. (2005) Mutant analysis reveals whirlin as a dynamic organizer in the growing hair cell stereocilium. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 391-400.
- Kikkawa Y., Seki Y., Okumura K., Ohshiba Y., Miyasaka Y., Suzuki S. et al., (2012) Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp. Anim.*, 61, 85-98.
- Manor U., Disanza A., Grati M., Andrade L., Lin H., Fiore P. P. D. et al. (2011) Regulation of Stereocilia Length by Myosin XVa and Whirlin Depends on the Actin-Regulatory Protein Eps8. *Curr. Biol.*, 21, 167-172.
- Mburu P., Mustapha M., Varela A., Weil D., El-Amraoui A., Holme R. et al. (2003) Defects in whirlin, a PDZ domain molecule involved in stereocilia elongation, cause in the whirler mouse and families with DFNB31. *Nat. Genet.*, 34, 421-428.
- Michalski N., Michel V., Bahloul A., Lefèvre G., Barral J., Yagi H. et al. (2007) Molecular characterization of the ankle-link complex in cochlear hair cells and its role in the hair bundle functioning. *J. Neurosci.*, 27, 6478-6488.
- Riazuddin S., Belyantseva I. A., Giese A. P. J., Lee K., Indzhukulian A. A., Nandamuri S. P. et al., (2012) Alterations of the CIB2 calcium- and integrin-binding protein cause Usher syndrome type 1J and nonsyndromic deafness DFNB48. *Nat. Genet.*, 44, 1265-1271.
- Wright R. N., Hong D. H., Perkins B. (2012) Rpg^{ORF15} connects to the Usher protein network through direct interactions with multiple Whirlin isoforms. *Biochem. Mol. Biol.*, 53, 1519-1529.
- Yan D., Liu X. Z. (2010) Genetics and pathological mechanisms of Usher syndrome. *J. Hum. Genet.*, 55, 327-335.
- Yang J., Liu X., Zhao Y., Adamian M., Pawlyk B., Sun X. et al. (2010) Ablation of Whirlin Long Isoform Disrupts the USH2 Protein Complex and Causes Vision and Hearing Loss. *PLoS Genet.*, 6, e1000955.

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 8 件)

Yuki Miyasaka, Sari Suzuki, Yasuhiro Ohshiba, Kei Watanabe, Yoshihiko Sagara, Shumpei P. Yasuda, Kunie Matsuoka, Hiroshi Shitara, Hiromichi Yonekawa, Ryo Kominami, Yoshiaki Kikkawa, Compound heterozygosity of the functionally null *Cdh23^{v-ngt}* and hypomorphic *Cdh23^{ahl}* allelic leads to early-onset progressive hearing loss in mice, *Experimental Animals*, Vol. 62, 2013, pp. 333-346, DOI: 10.1538/expanim.62.333. (査読有り)

〔学会発表〕(計 14 件)

Shumpei P. Yasuda, Yoshiaki Kikkawa, Characterization of Expression and Transcriptional Regulation in Short Isoform of the Deafness Gene *Whirlin* in Mice, Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto, 2014年11月3日、国立京都国際会館(京都府・京都市)
安田俊平、吉川欣亮、難聴責任遺伝子 *Whirlin* アイソフォームの発現解析と選択的プロモーターの同定、第11回北海道実験動物研究会(HALAS)学術集会、2014年7月26日、北海道大学大学院獣医学研究科(北海道・札幌市)

安田俊平、吉川欣亮、難聴責任遺伝子 *Whirlin* の short アイソフォームの組織特異的発現プロセスと転写制御、2014年5月17日、

第 61 回日本実験動物学会総会、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

安田俊平、吉川欣亮、難聴責任遺伝子 *Whirlin* の long および short 型アイソフォームの異なった発現制御、2013 年 12 月 4 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル（兵庫県・神戸市）

安田俊平、吉川欣亮、難聴責任遺伝子 *Whirlin* の long および short 型アイソフォームの異なった発現制御、日本遺伝学会第 85 回大会、2013 年 9 月 21 日、慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川県・横浜市）

安田俊平、Steve Brown、吉川欣亮、難聴責任遺伝子 *Whirlin* の 2 つのアイソフォームの異なった発現制御、第 60 回日本実験動物学会総会、2013 年 5 月 15 日、つくば国際会議場（茨城県・つくば市）

〔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：5 0 5 3 4 0 1 2