

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293369

研究課題名(和文) 内耳におけるアクチン構造様式とその制御の包括的解析

研究課題名(英文) Actin cytoskeleton regulation in the inner ear

研究代表者

北尻 真一郎 (Kitajiri, Shin-ichiro)

信州大学・医学部・特任講師

研究者番号：00532970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：TRIOBP-4(T4)とTRIOBP-5(T5)の2つのアイソフォームを欠損したマウスでは不動毛の根が欠損していた。本研究ではTRIOBPのアイソフォーム毎の機能、およびアクチン構造や機能を解析した。根は高い密度を保ったまま不動毛内に進展するが、この部位にT4は局在し、T5は根に局在していた。そこでT5特異的KOマウスを作製し、根の低形成と進行性難聴を見出した。低形成の根は周囲のアクチンとの結合がそがれて剛性が低下し、さらに支持細胞を含めコルチ器全体の剛性も低下していることをAtomic Force Microscopyを用いて示せた。

研究成果の概要(英文)：Mice lacking both TRIOBP-4 and TRIOBP-5 are profoundly congenitally deaf by loss of rootlets. In transgenic Triobp-4GFP mice, GFP-TRIOBP-4 localizes to rootlet segments within stereocilia. TRIOBP-5 homo-multimerizes and concentrates in rootlet segments embedded in the cuticular plate. Strikingly, TRIOBP-5 specific deficient mutants (TRIOBP-5 KO) show progressive hearing loss and develop dysmorphic, fragile stereocilia rootlets. During fluid-jet stimulation of increasing intensity, Triobp-5 KO stereocilia bundles of hair cells show increased pivotal-flexibility and susceptibility to damage. Atomic Force Microscopy detected a two-fold decreased apical surface stiffness in live TRIOBP-5 KO supporting cells. Thus, stereocilia rootlet formation requires TRIOBP-4, while TRIOBP-5 reinforces rootlets for life-long acoustical stimulation and also provides force-homeostasis across the sensory epithelium.

研究分野：耳科学

キーワード：アクチン 不動毛 根 聴力

1. 研究開始当初の背景

感音難聴は20%にのぼる有病率の、最も頻度の高い身体障害であるが未だ根本的な治療法はなく、この分野の研究は強く求められている。内耳で音を受容する不動毛を構成する細胞骨格はアクチンであるが、我々はヒト遺伝性難聴家系から新規アクチン束化分子”TRIOBP”を同定した。このTRIOBPには、-1, -4, -5の3種のアイソフォーム(以下 T1, T4, T5)が存在し、T4, T5の2種のアイソフォームの欠損がヒト遺伝性難聴の原因であり、これを模したノックアウトマウス(T4/T5dK0)では不動毛の根が形成されず完全な聾となっていた。さらに、精製したT4タンパク質とアクチンを用いた生化学的解析によって、T4のアクチン束化活性が明らかとなった。このTRIOBPを切口として、内耳機能にとって本質的なアクチン構造の様式制御を解明すべく本課題を申請した。

2. 研究の目的

有毛細胞の傷害は様々な原因(強大暴音、耳毒性薬剤、遺伝性難聴など)により生じるが、多くの場合不動毛の脱落から始まる。その不動毛に機械的な強度をもたらしている「根」の形成に必須なTRIOBPには、構造の全く異なる複数のアイソフォームが存在し、これまでの研究から、それぞれがアクチン制御のみならず様々な機能を持つ可能性が示唆されている。不動毛が正常に機能するためにはアクチンの束化だけでなく、重合や網目構造、架橋といった様々な制御が必要である。本課題ではTRIOBPの各アイソフォームを詳細に解析することによって、有毛細胞におけるTRIOBPのアクチン制御機構を解明し、その聴覚への影響を検証する。

3. 研究の方法

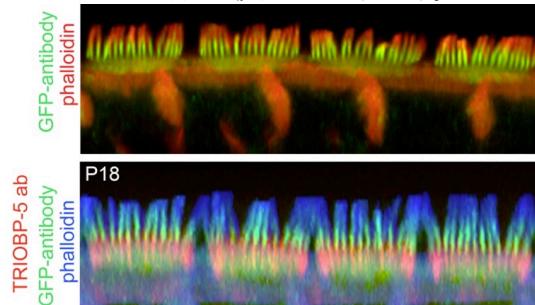
TRIOBP各アイソフォームのアクチンに対する機能を見るため、各種TRIOBP変異マウスを作製する。既報のT4/T5dK0マウスはT4とT5の両方をノックアウトするものであるため、T4とT5の機能の違いは検証できない。そこでT5特異的なエクソン9-10を欠損させたマウス(*Triobp*^{ΔEx9-10}、T5K0)を作製する(なおT4配列はT5の一部であるためT4特異的K0マウスを得ることができない)。また同じ理由でT4特異的抗体も作製できないため、T4の局在および機能を講じる目的でGFP-T4のトランスジェニックマウスも作製する。

得られたマウスは聴力を測定するとともに、アクチンという構造蛋白に関わるため電子顕微鏡レベルでの形態学的解析を行う。GFP-T4マウスに加えて、各種TRIOBPのタグ付き発現ベクターを内耳器官培養に導入して局在および機能を検証する。

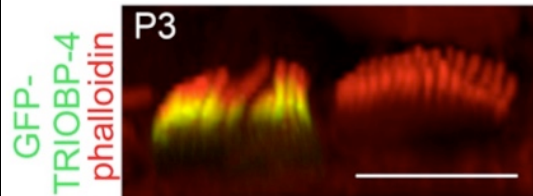
我々はT4のアクチン束化活性を示したが、T4と同じ配列を持たないT1の内耳での機能は不明である。このT1もアクチンに関与することは培養細胞で報告されており、TrioというGEFと結合することからもアクチン構造様式を上流で制御している可能性が高い。そこでこのT1に結合し協同する分子を免疫沈降で探索し、それらの内耳機能を検証する。

4. 研究成果

GFP-T4マウスの内耳を、さらに抗体GFP抗体で緑色のT4信号を強調させ、T5の局在はその特異的抗体で標識する事でT4とT5の各々の局在を検証した(下図)。

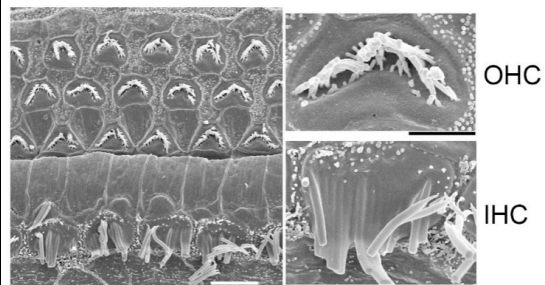


その結果、T5は根に特異的に局在するのに対してT4は不動毛内で根と同様に高いアクチン密度を示す部位(コア)に局在していた。このT4のコアへの局在は、内耳器官培養へのGFP-T4遺伝子導入でも確認できた(下図)。



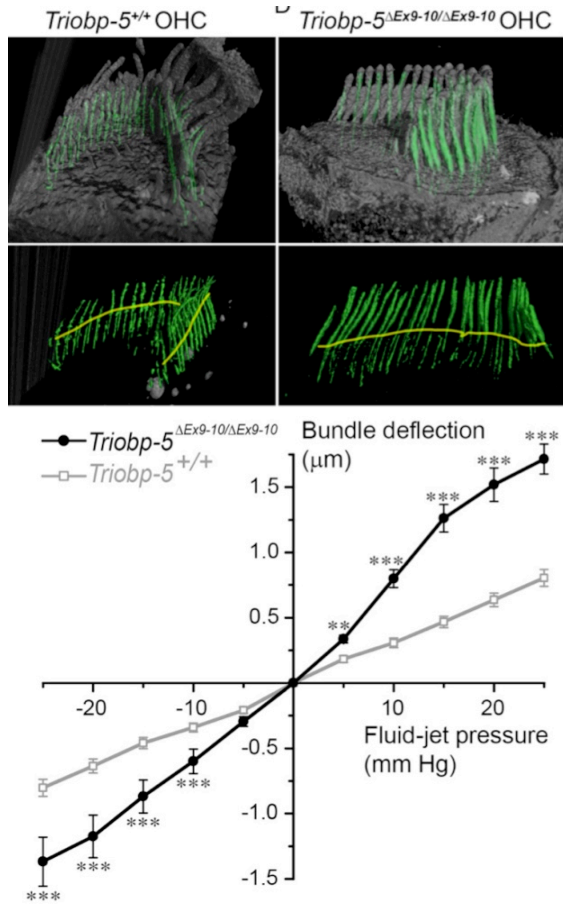
T5K0マウスは順調に得られ、これは進行性難聴であることが聴性脳幹反応で確認された。

走査型電子顕微鏡で不動毛の形態を検証したところ、やはり進行性に不動毛が変性しており、難聴の原因と考えられた(下図、生後40日目)。



この不動毛での根の有無を透過型電子顕微鏡で観察した。T4/T5dK0では根が完全に消失しているのに対して、このT5特異的K0では低形成ながら一部のみ見られた。これはFIB-SEM (focused ion beam -

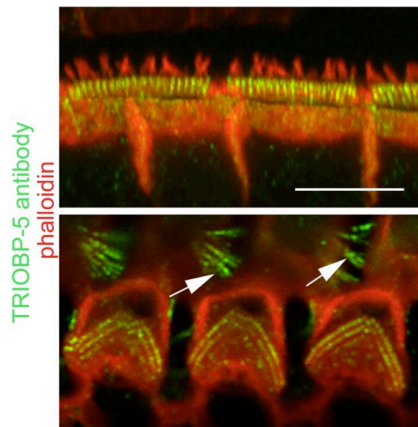
scanning electron macrograph)で詳しく検証された(下図)。



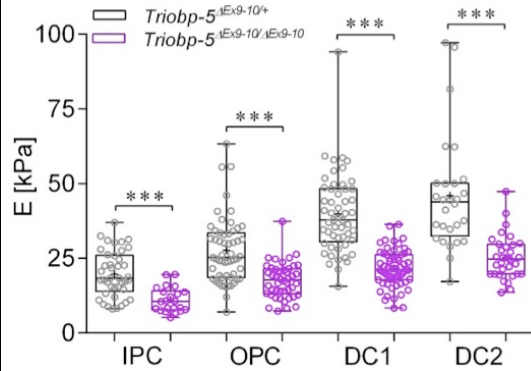
(上グラフ) この根が低形成である T5KO の不動毛束 (bundle) の剛性を計測した。すると野生型より明らかに低下していた。しかし、この剛性低下は T4/5dKO マウスに比べると緩やかなものであった。すなわち低形成であっても根はある程度の剛性を持つことが示された。これは T4/5dKO マウスが生下時より聴覚を全く獲得しない事に対して T5KO マウスは一定の聴覚を得たのちに進行性難聴を示すことと一致する。

以上の結果は、T4 が根の発生に関わること、T5 が根を維持するのに必要であることを示している。

予想していなかったことであるが、T5 は有毛細胞の不動毛のみならず、支持細胞の phalangeal processes にも発現していた(下図、白矢印)。



phalangeal processes とは、有毛細胞の存在するコルチ器を支える構造である。これを構成する分子として T5 が同定できた。そこで、T5 がコルチ器全体の剛性に及ぼす影響を atomic force microscopy で検証したところ、T5KO では内耳の支持細胞全体で剛性が低下していることが解明された(下グラフ、IPC:内柱細胞、OPC:外柱細胞、DC1:内から1列目のダイテルス細胞、DC2:2列目のダイテルス細胞)。



これら T4 と T5 に関する詳細な機能は、アクチンという内耳で本質的な構造を精密に制御する機構として全く新しいものである。音刺激という物理刺激で不動毛が振動するのは音受容の根本であり、これを支える根の機能を制御する機構は聴覚を理解する上で必須である。

また左グラフにある不動毛の剛性を定量計測する実験系は、根の機能を解析する上で重要なものであり、様々な環境下での根を検証する重要な系である。

T1 に結合する分子としては、Beta-actin, Ankyrbin, NDP1, Ttc15, MYPT1, Dnahc1, UACA など多数同定された。これらに対する抗体を作製、発現ベクターでの内耳器官培養での検証などを進めている。これらによって、より広く内耳でのアクチン構造制御が明らかにできると見込まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Seki Y, Miyasaka Y, Suzuki S, Wada K, Yasuda SP, Matsuoka K, Ohshiba Y, Endo K, Ishii R, Shitara H, Kitajiri S, Nakagata N, Takebayashi H, Kikkawa Y.: A novel splice site mutation of myosin VI in mice leads to stereociliary fusion caused by disruption of actin networks in the apical region of inner ear hair cells. PLoS One 12:e0183477, 2017 (査読あり)
2. Ueyama T., Ninoyu Y., Nishio SY., Miyoshi T., Torii T., Nishimura K., Sugahara K, Sakata H., Thumkeo D., Sakaguchi H., Watanabe N., Usami SI., Saito

- N., & Kitajiri S.: Constitutive activation of DIA1 (DIAPH1) via C-terminal truncation causes human sensorineural hearing loss. *EMBO Mol Med* 8: 1310-1324, 2016 (査読あり)
3. Higashi T., Katsuno T., Kitajiri S., Furuse M.: Deficiency of Angulin-2/ILDR1, a Tricellular Tight Junction-Associated Membrane Protein, Causes Deafness with Cochlear Hair Cell Degeneration in Mice. *PLoS One* 30: 10(3), 2015 (査読あり)
 4. Bao J., Wang S., Gunther L., Kitajiri S., Li C. and Sakamoto T.: The actin-bundling protein TRIOBP-4 and -5 promotes the motility of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 28: 367-373, 2015 (査読あり)
 5. Kitajiri S., Katsuno T., Sasaki H., Ito J., Furuse. and Tsukita S.: Deafness in occludin-deficient mice with dislocation of tricellulin and progressive apoptosis of the hair cells. *Biol Open* 25: 759-766, 2014 (査読あり)
- [学会発表] (計 12 件)
1. Tomoko Kita, Raj K Ladher, Shin-ichi Usami, Shin-ichiro Kitajiri: Regulation of the localization of molecules in hair cell stereocilia by TRIOBP. ARO The 41st Annual MidWinter Meeting. 2018.
 2. Hiroe Ohnishi, Shin-ichiro Kitajiri, Xiangxin Lou, Akiko Taura, Mirei Taniguchi, Fumi Ebisu, Tatsunori Sakamoto, Norio Yamamoto, Juichi Ito, Koichi Omori, Takayuki Nakagawa: Making tool for analysis of TRIOBP function using induced pluripotent stem cells. ARO The 41st Annual MidWinter Meeting. 2018.
 3. Tatsuya Katsuno, Keisuke Ohta, Makoto Ikeya, Kazuya Ono, Koichi Omori, Juichi Ito, Shin-ichiro Kitajiri: 内耳感覚毛の「根」の形成および維持における TRIOBP アイソフォームの役割. 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会). 2017 年
 4. 北尻真一郎, 伊藤壽一: 不動毛の「根」の低形成と難聴. 第 27 回日本耳科学会. 2017 年
 5. Hiroe Ohnishi, Shin-ichiro Kitajiri, Xiangxin Lou, Akiko Taura, Mirei Taniguchi, Fumi Ebisu, Tatsunori Sakamoto, Norio Yamamoto, Juichi Ito, Koichi Omori, Takayuki Nakagawa: An Attempt to Establish In Vitro Model Using TRIOBP KO Induced Pluripotent Stem Cells. 1st International Symposium on Inner Ear Therapies, 2017.
 6. Tatsuya Katsuno, Inna A. Belyantseva, Ronald S. Petralia, Ya-Xian Wang, Keisuke Ohta, Kazuya Ono, Makoto Ikeya, Gavin P. Riordan, Joseph Duda, Elizabeth Wilson, Tracy Fitzgerald, Atteeq U. Rehman, Ayesha Intiaz, Juichi Ito, Thomas B. Friedman, Shin-ichiro Kitajiri: The development and maintenance of hair cell stereocilia rootlets by isoform specific functions of TRIOBP. 54th workshop on Inner Ear Biology and Symposium, 2017
 7. Tatsuya Katsuno; Inna A. Belyantseva; Makoto Ikeya; Kazuya Ono; Kohei Segawa Juichi Ito; Shin-ichiro Kitajiri; Thomas B. Friedman; Ronald Petralia; YaXian Wang. Triobp Isoform Distribution Affects Stereocilia Rootlet Structure and Function. ARO The 40th Annual MidWinter Meeting. 2017.
 8. Inna A. Belyantseva, Tatsuya Katsuno, Gavin Riordan, Atteeq Rehman, Ayesha Intiaz, Erich Boger, Eva Morozko, Joesh Duda, Elizabeth Wilson, Tracy Fitzgerald, Thomas B. Friedman, Shin-ichiro Kitajiri: TRIOBP5 Deficient Mouse is Deaf But Hair Cells Develop Stereocilia Rootlets. ARO The 40th Annual MidWinter Meeting. 2017.
 9. 勝野達也, 北尻真一郎: 内耳蝸牛有毛細胞不動毛の「根」における TRIOBP アイソフォームの役割. 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年
 10. Hiroe Ohnishi, Shin-ichiro Kitajiri, Xiangxin Lou, Akiko Taura, Mirei Taniguchi, Fumi Ebisu, Tatsunori Sakamoto, Norio Yamamoto, Juichi Ito, Koichi Omori, Takayuki Nakagawa: A Trial of Establishment for TRIOBP KO In Vitro Model Using Induced Pluripotent Stem Cells. 53rd Inner Ear Biology Workshops, 2016
 11. Shin-ichiro Kitajiri: Regulation of cytoskeleton in hair cells by TRIOBP. The 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Symposium "Basic Science of Otology and Neurotology", 2015
 12. Tatsuya Katsuno, Kohei Yamahara, Tomoko Kita, Takeshi Sakamoto, Kazuya

Ono, Kohei Segawa, Juichi Ito, Shin-ichiro Kitajiri: The Role of TRIOBP in Stereocilia Rootlets Formation. Inner Ear Biology Workshop 2014 in Kyoto.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北尻 真一郎 (KITAJIRI, Shin-ichiro)
信州大学・医学部・特任講師
研究者番号：00532970

(2) 研究分担者

伊藤 壽一 (ITO, Jyuichi)
京都大学・大学院医学研究科・名誉教授
研究者番号：90176339