

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04347

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた聴覚・平衡覚受容チャネル候補ASICの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive investigations of physiological roles of putative mechanosensory cation channels ASICs expressed in mouse auditory and vestibular hair cells

研究代表者

鶴川 眞也 (Ugawa, Shinya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：20326135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸感受性イオンチャネル(ASIC: acid-sensing ion channel)は、哺乳類機械刺激受容チャネルの有力候補分子である。我々は、本研究において、サブタイプ1a、1b、4の3種類がマウスの内耳有毛細胞に発現していることを見出した。また、ASIC1bが感覚毛の先端付近に局在していることを示唆する形態学的知見が得られ、これらのサブタイプが、何らかの形で、機械刺激電流の惹起に関与していると思われた。それぞれの遺伝子欠損(KO)マウスにABR(聴性脳幹反応)検査を施行したところ、ASIC1bおよびASIC4 KOマウスに、軽度から中等度の難聴を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有毛細胞に発現するメカノセンサー分子(METチャネル)の同定は、有毛細胞の機能異常が耳鳴やめまいの一因であることから、耳科学にとって極めて重要な研究テーマである。本研究において、ASIC1a、ASIC1b、ASIC4がMETチャネルを形成している可能性が示唆された。世界的に待望されている「METチャネル遺伝子の同定」に一步近づいたわけであり、その学術的価値は計り知れない。さらに研究を進める必要があるものの、本研究で得られた成果は、ASICを標的としたMETチャネル活性調節剤の開発を可能にし、将来的に、様々な内耳疾患に対する新たな治療法の確立に結びつくと思われる。

研究成果の概要(英文)：ASICs (acid-sensing ion channels) are putative mechano-gated cation channels in mammals. In the present study, we discovered that at least ASIC1a, ASIC1b, and ASIC4 are expressed in mouse auditory and vestibular hair cells. In particular, transmission electron microscopy revealed that ASIC1b proteins were located at the stereociliary tips, suggesting that all the three ASIC subtypes are somehow involved in the generation of mechano-electrical transduction (MET) currents. ABR (auditory brainstem response) tests demonstrated the slight-to-moderate degree of deafness in ASIC1b or ASIC4 knockout mice. Further investigations are needed to assess the physiological roles of ASICs in mouse inner ear MET.

研究分野：耳科学、神経科学、解剖学

キーワード：内耳 有毛細胞 メカノセンサー 機械刺激電気変換 イオンチャネル ASIC マウス 難聴

1. 研究開始当初の背景

内耳有毛細胞の感覚毛には、聴覚・平衡覚の刺激（機械刺激）を電気信号に変換（MET: mechano-electrical transduction）するメカノセンサー（MET チャンネル）が存在する。MET チャンネルは、チップリンク（感覚毛をその先端付近で束ねる線維状構造物）の下端に位置し、感覚毛の屈曲に応じて増減するチップリンクの張力を介して、機械的に開閉される。近年の分子遺伝学の進展に伴い、チップリンクと MET チャンネルとの結合を介在する TMIE（transmembrane inner ear）や LHFPL5（lipoma HMGIC fusion partner-like 5, also known as TMHS）などの因子は同定されたが、MET チャンネルの分子実体は不明であった（文献¹）。

酸感受性イオンチャンネル（ASIC: acid-sensing ion channel）は、水素イオンで開く陽イオンチャンネルであり、線虫デジェネリン触覚受容チャンネルとの高い相同性から、機械刺激でも開くと考えられている。少なくとも 6 種類のサブタイプ（1a、1b、2a、2b、3、4）が存在し、互いにサブユニットとして、ホモあるいはヘテロ 3 量体を形成している。以前、我々は、ASIC が MET チャンネルであるという仮説を立て、形態学的手法を用いて、マウス蝸牛有毛細胞の感覚毛基部に ASIC1b が発現していること（文献²）、ASIC1b を KO（ノックアウト）すると、外有毛細胞の MET 電流（感覚毛が屈曲する際に生じる機械刺激電流）が減弱することを見出した。ただし、局在部位の違いから、ASIC1b が MET チャンネルを構成しているとは言えなかった。ところが、MET チャンネルの前駆体が感覚毛基部に稽留していることが報告され（文献³）、我々は、感覚毛基部の ASIC1b は前駆体であり、その一部が先端に運ばれて MET チャンネルになるという新たな仮説を立てた。そして、分布を再検討し、チップリンク下端に ASIC1b の発現を認めた。

以上の知見は、ASIC1b が MET チャンネル構成サブユニットの一つであることを強く示唆するものであった。しかし、ASIC1b を欠損させても、完全難聴にはならない。そこで、別のサブタイプも有毛細胞に存在すると考え、生化学的手法を用いて全サブタイプを検索したが、ASIC1b 以外は見つからなかった。ところが、（偶々）ASIC4 レポーターマウスを所持していたので、内耳での発現・分布を調べたところ、蝸牛と前庭器官（球形嚢・卵形嚢・膨大部稜）の両有毛細胞に強い発現を認めた。ASIC4 のチャンネル特性を解析したところ、ASIC4 は Zn^{2+} 感受性のリークチャンネルであり、その電流は機械刺激で増大することがわかった。想定されている MET チャンネルもリーク型であることから、ASIC4 が他のサブタイプと共に MET チャンネル複合体を形成していると考えられた。そこで、マウスの有毛細胞に発現する ASIC の全サブタイプを同定し、聴覚・平衡覚受容に果たす役割を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

本研究の究極目標は、MET チャンネルの分子実体が ASIC であることを、有毛細胞レベルおよび個体レベルで証明することであった。その前提として、ASIC が機械刺激で開く陽イオンチャンネルであることを、強制発現系を用いて示す必要があった。そこで、期間内の具体的な研究目標を下記の 5 項目に設定し、実験系を組んだ。

- (1) 強制発現させた ASIC4 ホモマーおよびヘテロマーの機械刺激感受性の証明
ASIC4 は、全サブタイプの中で唯一、強制発現系で機械刺激に感受性を示す。したがって、ヘテロマーを作ることで、他のサブタイプに機械刺激感受性を賦与できる可能性が高い。これを証明する。
- (2) 有毛細胞に発現するサブタイプの決定と細胞内局在の解析
ノックイン（KI）マウス等を利用して、感覚毛に発現する ASIC のサブタイプを網羅的に同定する。
- (3) 免疫沈降法を用いたヘテロマー形成の証明
蝸牛・前庭器官の感覚上皮から蛋白質を抽出し、ASIC ヘテロマーの存在を生化学的に示す。
- (4) ASIC KO マウスを対象とした機械刺激電流の測定
感覚毛を屈曲させた際に生じる MET 電流を測定し、KO マウスでの減弱を確認する。
- (5) ASIC KO マウスを対象とした聴力検査・平衡機能検査
KO マウスの難聴と平衡機能障害を、ABR・DPOAE・VOR 検査を使って証明する。

3. 研究の方法

2で述べた研究目的は、以下の(1)～(5)の様に、「ASICが機械刺激で開く陽イオンチャンネルであることを *in vitro* で示し(下記1)、遺伝子改変マウスを利用して、METチャンネルの分子実体がASICであることを、有毛細胞レベル(下記2と3)及び個体レベル(下記4と5)で証明する。」と簡略化できる。

- (1) 強制発現させた ASIC4 ホモマーおよびヘテロマーの機械刺激感受性の証明
- (2) 有毛細胞に発現する ASIC サブタイプの決定と細胞内局在の解析
- (3) 免疫沈降法を用いたヘテロマー形成の証明
- (4) ASIC KO マウスを対象とした機械刺激電流の測定
MET 電流を測定し、減弱を確認
- (5) ASIC KO マウスを対象とした聴力検査・平衡機能検査
ABR・VOR 等にて障害を確認

上記目的を達成するための研究方法を、順次、記載した。

- (1) 強制発現させた ASIC4 ホモマーおよびヘテロマーの機械刺激感受性の証明
二電極膜電位固定法を用いた ASIC4 の電気生理学的解析
アフリカツメガエル卵母細胞に ASIC4 ホモマーを強制発現させ、ASIC4 電流のアミノグリコシド系抗生物質 (MET チャンネルの阻害剤として有名) やアミロライド (ASIC の阻害剤) に対する薬剤感受性 (50% 阻害濃度: IC₅₀) を調べる。浸透圧変化などの機械刺激を加え、電流量の変化を記録する。さらに、ASIC4 ヘテロマーの機械刺激感受性を、同様の手法を用いて証明する。実際 (*in vivo*) の MET チャンネルのサブユニット構成を反映させるため、有毛細胞で同定されたサブタイプ (ASIC1b、ASIC4 など) を対象とする。

機械刺激による ASIC4 活性の増強

CHO-K1 などの培養細胞に ASIC4 を単独で、あるいは、と同じ組合せで強制発現させ、シリコン膜上で培養する。次に、Fura-2 などの蛍光 Ca²⁺ 指示薬を細胞内導入し、シリコン膜を伸展させる。この機械刺激により増大する ASIC4 電流 (蛍光強度) を、顕微鏡下で観察する。

- (2) 有毛細胞に発現する ASIC サブタイプの決定と細胞内局在の解析
レポーターマウスを用いた有毛細胞に発現するサブタイプの決定
未確定の ASIC1a、ASIC2a、ASIC2b、ASIC3 について、ASIC4 レポーターマウスと同様のレポーターマウス (各プロモーターの下流に lacZ を導入) を準備し、有毛細胞における発現の有無を決定する。シグナルの検出には、抗 lacZ 抗体あるいは X-Gal 染色を用いる。

ノックインマウスを用いた有毛細胞における細胞内局在の解析

各野生型の ASIC を、ASIC とタグ配列との融合蛋白質に置換したノックイン (KI) マウスを作出し、抗タグ抗体を用いて免疫染色を行う。ASIC1a、ASIC1b、ASIC3 の KI マウスは所持しているため、ASIC4 KI マウス (タグ配列: AU1-3xFLAG-AU1) を作出する。

- (3) 免疫沈降法を用いたヘテロマー形成の証明
multiple KI マウスの作出
免疫沈降には、有毛細胞に発現する ASIC の全サブタイプを KI (タグ配列との融合蛋白質) に置き換えた multiple KI マウスが必要なので、可能なものから交配を開始 (継続) する。

multiple KI マウスを用いたヘテロマーMET チャンネル形成の証明

multiple KI マウスの内耳から蛋白質を抽出し、抗タグ抗体を用いて免疫沈降を行う。ASIC1b KI マウス (N 末端に HA タグを挿入) のコルチ器から抗 HA 抗体を使って蛋白質を回収し、ウェスタンブロット解析を行い、ASIC1b とヘテロマーを構成しているサブタイプを同定する。

- (4) ASIC KO マウスを対象とした機械刺激電流の測定
有毛細胞パッチクランプ
ASIC KO マウスを対象に、外有毛細胞の機械刺激電流をパッチクランプにて測定し、その減弱を確認する。圧電素子を利用して、周期的 (45 Hz) に前後するジェット水流を作り、これを当てることで感覚毛を屈曲させる。ASIC の発現を確認するため、水素イオンに対する応答も調べておく。有毛細胞の成熟度を評価するため、電位依存性カリウム電流も測定する。

- (5) ASIC KO マウスを対象とした聴力検査・平衡機能検査

聴覚検査

聴性脳幹反応 (ABR) 検査を行う。刺激音として、NIH プロトコールに準じて、8、16、32 kHz の tone burst (あるいは pip) 音を用いる。4、8、12、16 週齢で記録し、進行性の有無を確かめる。さらに、外有毛細胞の機能を調べるため、歪成分耳音響放射 (DPOAE) を測定する。

平衡機能検査

平衡覚への関与を証明するため、ASIC KO マウスを対象に、前庭動眼反射 (VOR) 検査を行う。視運動性眼球運動 (OKR) 検査も行い、眼運動機能自体は正常であることを示す。

4. 研究成果

実験計画ごとに結果の概要を記し、最後に「総括」した。

二電極膜電位固定法を用いた ASIC4 の電気生理学的解析

(ア) ASIC4 ヘテロマーに関する解析

マウス ASIC4 の mRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に微量注入したところ、注入後約 6 時間でガドリニウムイオン (Gd^{3+}) 感受性の漏れ電流 (ASIC4 電流) が記録され始めた。IC₅₀ は、約 100 μ M であった。 Gd^{3+} を一度投与すると、投与を中止しても元の状態には戻らず、ASIC4 と Gd^{3+} との反応は不可逆性と考えられた (Gd^{3+} が ASIC4 から離れない)。 Gd^{3+} は、機械刺激感受性イオンチャネルの普遍的な阻害剤として使われており、この結果は、ASIC4 の機械刺激感受性を示唆するものである。アミロライドも投与したが、ASIC4 は、全く感受性を示さなかった。ストレプトマイシンにも反応しなかった。

(イ) ASIC4 ヘテロマーに関する解析

確実に、有毛細胞に発現していると考えられる ASIC1b と ASIC4 とを卵母細胞に共発現させ、アミロライド感受性を調べた。ASIC1b ホモマーの IC₅₀ 値は約 50 μ M であるが、共発現させた場合は約 100 μ M に上昇した。IC₅₀ 値の変化から、強制発現系では、両サブユニットがヘテロマーを形成できることが明らかとなった。また、細胞外液のスクロース濃度・ナトリウムイオン濃度を調整して、様々な浸透圧刺激を加えたが、電流値に変化は認められなかった。したがって、ASIC1b/ASIC4 ヘテロマーに機械刺激感受性があるとは、断定できなかった。

機械刺激による ASIC4 活性の増強

CHO-K1 細胞に ASIC4 を単独で発現させたが、合成された ASIC4 蛋白質は細胞膜に到達することなく、カルシウムイメージング解析を行うことはできなかった。

レポーターマウスを用いた有毛細胞に発現するサブタイプの決定

ASIC1a レポーターマウスを作出し、有毛細胞における発現の有無を調べたところ、内有毛細胞、外有毛細胞、前庭器官 (卵形嚢、球形嚢、膨大部稜) の有毛細胞に、ごく僅かの陽性反応を認めた。ASIC1a も有毛細胞に発現していると考えられたが、反応は微弱であり、他のアプローチによる解析も必要と思われた。ASIC2a については、ASIC2a 陽性細胞が自動的に死滅してしまうトランスジェニックラットを作出し、その内耳を観察したが、形態学的に正常であった。この結果から、ASIC2a は有毛細胞には発現していないと思われた (文献 4)。

ノックインマウスを用いた有毛細胞における細胞内局在の解析

ASIC1a、ASIC3、ASIC4 KI マウスから内耳を採取し、それぞれのタグに対する抗体を用いて免疫染色を行った。抗 V5 抗体 (ASIC1a KI 用)、抗 FLAG 抗体 (ASIC3 KI 用) では陽性反応は検出されなかったが、抗 AU1 抗体 (ASIC4 KI 用) では、幼若期、成熟期を問わず、全ての蝸牛有毛細胞、および、前庭器官有毛細胞の一部 (フラスコ型有毛細胞) に反応を認めた。以上より、ASIC1b と同様に、ASIC4 も内耳有毛細胞の一部に発現していると思われた。

multiple KI マウスの作出

ASIC1a/ASIC3/ASIC4 KI マウス、及び、ASIC1b/ASIC3/ASIC4 KI マウスの繁殖に成功した。

multiple KI マウスを用いたヘテロマー-MET チャネル形成の証明

ASIC1b/ASIC3/ASIC4 KI マウス 200 匹の内耳を集め、蛋白質を抽出し、抗 HA 抗体 (ASIC1b 用) を用いて、ASIC1b との複合体構成因子を回収した。次に、質量分析法を用いて、具体的な分子種を決める必要があるが、本学に最新の解析装置が導入されることになり、それまで待つことにした。

有毛細胞パッチクランプ

ASIC4 KO マウスの内有毛細胞、外有毛細胞を対象に、電気生理学的解析を行った。水素イオンに対する応答であるが、幼若期の野生型内・外、両有毛細胞で記録される二相性内向き電流が、KO マウスでは、後半の持続性電流が消滅し、一相性になっていた。この結果は、両有毛細胞において、実際に ASIC1b が ASIC4 と複合体を形成していることを、強く示唆するものである。機械刺激電流であるが、予想に反して、野生型マウスと KO マウスとの間で電流値の大きさに違いは認められなかった。電位依存性カリウム電流であるが、KO マウスでも正常に記録され、両有毛細胞の成熟に ASIC4 は必ずしも必要では無いことが明らかになった。

聴覚検査

ASIC4 KO マウスの聴性脳幹反応 (ABR) を調べた。5 週齢から徐々に悪化し始め、8 週齢では、蝸牛の全領域に渡って、約 30dB の聴力低下が認められた。12、16 週齢でも調べたが、聴力障害の進行は認められなかった。歪成分耳音響放射 (DPOAE) は、正常であり、外有毛細胞機能に異常は認められなかった。

平衡機能検査

前庭動眼反射 (VOR) 検査、視運動性眼球運動 (OKR) 検査とも、コロナ禍でマウスの輸送に制限があり、検査自体 (大阪大学で施行) を実施できなかった。

<総括>

ASIC の全サブタイプ 7 種類の内、マウス内耳の有毛細胞には、ASIC1a、ASIC1b、ASIC4 が発現していると考えられた。有毛細胞の細胞質を回収してから行う single RT-PCR 解析の結果では、ASIC2b と ASIC3 も発現していると思われるが、*in situ* hybridization 法、免疫組織化学法では、それらの発現を示唆する知見は得られなかった。ASIC2a は、トランスジェニックラットを使った解析から、有毛細胞には発現していないと考えられた。ただし、これは、マウスではなくラットでの結果である。ASIC2a と ASIC2b に関しては、それぞれのノックインマウスとノックアウトマウスを用意し、発現の有無について、さらに検討を重ねる必要がある。

有毛細胞パッチクランプ法による電気生理学的解析実験において、ASIC1a、ASIC1b、ASIC4 KO マウスで、水素イオンに対する応答 (波形) に変化が観察されたことから、これら 3 つのサブタイプは、有毛細胞に発現していると考えられる。ASIC1b と ASIC4 に関しては、それらの発現を示す形態学的証拠が存在するが、ASIC1a に関しては、電気生理のデータ以外、single RT-PCR 解析で同定されているに過ぎず、更なる検討が必要と思われる。本研究の最重要テーマである有毛細胞の機械刺激電流 (MET 電流) であるが、ASIC1a、ASIC1b、ASIC4 のそれぞれを欠損させても、特に変化は生じず、これらのサブタイプが MET 電流を惹起しているとは言えなかった。その一方で、ASIC の阻害剤の 1 つであるナファモスタットによって野生型マウスの MET 電流が完全に抑制されることが分かり、ASIC の関与が示唆された。矛盾した結果が得られたことになり、より詳細な解析が必要と考えられた。

コロナの大流行により、動物実験が制限され、計画通りには進まなかった部分がある。しかし、どのサブタイプが有毛細胞に発現しているのか、大まかではあるが、明らかになってきた。今後、ASIC1a、ASIC1b、ASIC4 を中心として、質量分析などの生化学的解析を加えながら、MET チャネルの全貌を明らかにしていきたい。

<引用文献>

1. *Neuron* **84**, 954-67 (2014).
2. *Neuroreport* **17**,1235-9 (2006).
3. *J Neurosci* **34**, 5505-14 (2014).
4. *Biochem Biophys Res Commun* **610**, 77-84 (2022). (我々の原著論文)

<その他>

論文投稿・特許申請の時期を考慮し、本研究の実績報告書では、ASIC4 を ASIC-X として記載した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yasuhiro Shibata, Natsuko Kumamoto, Eisuke Sakuma, Yusuke Ishida, Takashi Ueda, Shoichi Shimada, Shinya Ugawa	4. 巻 610
2. 論文標題 A gain-of-function mutation in the acid-sensing ion channel 2a induces marked cerebellar maldevelopment in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 77-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.04.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 マウス味蕾における酸感受性イオンチャネルの発現
3. 学会等名 NEURO2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横井雄斗、柴田泰宏、熊本奈都子、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 酸感受性イオンチャネル3（ASIC3）の痒みへの関与
3. 学会等名 第79回日本解剖学会中部支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本奈都子、柴田泰宏、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 成体脳海馬神経新生における酸感受性イオンチャネルASIC1aの役割
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田泰宏、熊本奈都子、佐久間英輔、植田高史、鶴川眞也
2. 発表標題 内耳有毛細胞におけるASIC4の発現分布
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宇佐美 真一 (Usami Shinichi) (10184996)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	
研究分担者	柴田 泰宏 (Shibata Yasuhiro) (10534745)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教 (23903)	
研究分担者	島田 昌一 (Shimada Shoichi) (20216063)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	熊本 奈都子 (Kumamoto Natsuko) (30467584)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	野口 佳裕 (Noguchi Yoshihiro) (50282752)	信州大学・医学部・特任教授 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 信五 (Murakami Shingo) (80157750)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	植田 高史 (Ueda Takashi) (90244540)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Kros Lab	School of Life Sciences	University of Sussex	