

機関番号：14301

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791615

研究課題名（和文） 新規難聴遺伝子 *Triobp* の解析 ～不動毛の「根」の形成と聴覚～研究課題名（英文） *Triobp*, the novel deafness gene - stereocilia rootlet and hearing

研究代表者

北尻 真一郎 (KITAJIRI SHINICHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：00532970

研究成果の概要（和文）：

*Triobp* の各アイソフォームに対するノックアウトマウスを作成している。*Triobp-4/5* をノックアウト (KO) すると不動毛の根が形成されなくなる事、*Triobp-1/5* KO マウスは、胎生約 10 日前後で致死であることが分かった。これらは 2 種のアイソフォームが同時に欠損するモデルであるが、各アイソフォームを単独で特異的に欠損するモデルも作成中である。また、*Triobp* アイソフォームやヒト遺伝難聴の変異をミミックした *Triobp* 断片を発現するアデノウイルスベクターを作製した。各アイソフォームやドメインの機能を詳細に解析するために、様々な *Triobp* 断片のプラスミドを培養細胞に導入して局在を検討している。

研究成果の概要（英文）：

Knock out mice (KO mice) of *Triobp* isoforms are generated. It turned out that *Triobp-4/5* KO stereocilia lack rootlet, and *Triobp-1/5* KO mice are embryonic lethal. Both of these two models are deficient in two isoforms respectively, but single isoform specific KO mice are now generating. Adenovirus vector to express *Triobp* isoforms were also generated. Plasmids to express *Triobp* fragments were transfected into cultured cell to examine domain structure of *Triobp*.

交付決定額

(金額単位：円)

|          | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|----------|-----------|---------|-----------|
| 平成 21 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 平成 22 年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度       |           |         |           |
| 年度       |           |         |           |
| 年度       |           |         |           |
| 総計       | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳, 遺伝性難聴, 不動毛, アクチン

## 1. 研究開始当初の背景

難聴は最も頻度の高い障害のひとつであり、本邦では630万人以上が難聴を自覚しているとされる。しかし聴覚受容の分子機構には未だ不明な点が多く、感音難聴の治療法を開発する上での障害となっている。蝸牛有毛細胞の不動毛は音刺激を電気信号に変換する重要な構造で、細胞質内へ伸びる長い「根」を持っている。しかしこの根に特異的に局在する分子はこれまで知られておらず、ゆえに根の機能は解明されてこなかった。

## 2. 研究の目的

研究代表者はヒト難聴家系から *TRIOBP* 遺伝子変異を同定し、Triobp 蛋白は内耳不動毛の根に局在すること、*Triobp-4/5* をノックアウト (KO) すると不動毛の根が形成されなくなる事を発見した。本研究では Triobp 蛋白を詳細に解析し、「Triobp がどのようにして根を形成するのか」「根は不動毛の機能にどのように関与するのか」を明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

Triobp の各アイソフォームの機能を (1) 無細胞系 (精製蛋白) (2) 培養細胞 (3) 内耳組織 で検討する。具体的には下記の実験を行う。

- 蛋白発現、精製して、アクチンと反応させる生化学実験
- 培養細胞に過剰発現させての表現形解析

- 内耳器官培養に過剰発現させての表現形解析

- アイソフォーム特異的ノックアウトマウスの作製と表現形解析

## 4. 研究成果

Triobp 各アイソフォーム特異的ノックアウト (KO) マウスの作製を行っているが、現在までのところキメラマウスからヘテロマウスが出生してきていない。新しいキメラマウスを得るため、再度 ES 細胞をインジェクションしている。なお *Triobp-4/5* KO マウスを *Triobp-1/5* KO マウスと交配させる事で *Triobp-4* のレスキューを試みたところ、*Triobp-4/5* KO マウスに比べて軽度の難聴が認められた。この実験系では *Triobp-1* や *Triobp-4* がヘテロになってしまいが、これらが保たれる *Triobp-5* 特異的 KO マウスでも軽度難聴という独自性のある表現形が期待できる。

また、Triobp アイソフォームやヒト遺伝難聴の変異をミミックした Triobp 断片を発現するアデノウイルスベクターを作製したが、有毛細胞への感染・発現はほとんど見られなかった。ウイルスベクターの改良、感染条件の検討を行うと同時に、遺伝子銃など他の導入方法も検討している。

*Triobp-1/5* KO マウスは、胎生約 10 日前後で致死であることが分かった。致死の原因となる表現形を全身で検索している。

Triobp 各アイソフォームや断片を培養細

胞へ導入したり、蛋白を精製してアクチンと結合させる実験も進捗している。Triobp-4内にある2カ所の反復配列のみならず、その間の部分のみでもアクチンと結合しうる事が分かってきた。Triobpのアクチン結合部位には既知のアクチン結合ドメインがなく、これらがどのようにアクチンと結合し束化するのか、より詳細な構造解析を慎重に行う必要がある。現在はまず、繊維芽細胞株と上皮細胞株の双方でアクチンと共局在するかどうかを確認した上で、Triobp各アイソフォームや断片がアクチンと結合する強さを生化学的に定量している。

#### 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 Angunsri N, Taura A, Nakagawa T, Hayashi Y, Kitajiri S, Omi E, Ishikawa K, Ito J. Insulin-like growth factor 1 protects vestibular hair cells from aminoglycosides. Neuroreport, in press
- ② Yoshida A, Kitajiri S, Nakagawa T, Hashido K, Inaoka T, Ito J. Adipose tissue-derived stromal cells protect hair cells from aminoglycoside. Laryngoscope, in press

- ③ 北尻真一郎、伊藤壽一. 人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の感音難聴病態解明と治療への応用. 耳鼻咽喉科臨床 103, 1-4, 2010

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kitajiri S, Belyantseva I, Friedman T, Jones S. Rootlet Structure of Stereocilia is Necessary for Vestibular Function. Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders. 平成 22 年 11 月 16 日, 京都市
- ② 北尻真一郎、伊藤壽一. 前庭機能における、不動毛の「根」の必要性. 第 20 回日本耳科学会総会. 平成 22 年 10 月 8 日, 松山市
- ③ Kitajiri S. TRIOBP bundling of actin filaments is indispensable for hearing. ARO The 33rd Annual MidWinter Meeting. Feb 7 2010, Anaheim USA
- ④ Kitajiri S. The molecular mechanism of DFNB28 deafness. 46th Workshop on Inner Ear Biology. Sep 14 2009, Utrecht Netherlands
- ⑤ 北尻真一郎. 新規アクチン束化分子

TRIOBP の同定. 第 61 回日本細胞生物学  
会大会. 平成 21 年 6 月 3 日, 名古屋市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北尻 真一郎 (KITAJIRI SHINICHIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 00532970