

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15625

研究課題名(和文)内耳有毛細胞特異的発現アイソフォームの機能を探る

研究課題名(英文)Exploring the function of an inner ear-specific myosin VI isoform

研究代表者

吉川 欣亮(KIKKAWA, Yoshiaki)

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・プロジェクトリーダー

研究者番号：20280787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒトおよびマウスの難聴原因遺伝子であるミオシン6遺伝子(Myosin VI)に9塩基のマイクロエクソンがスプライスインしたアイソフォームがマウスの内耳有毛細胞で特異的に発現することを明らかにした。そこでその機能解明を目的にゲノム編集によって9塩基のマイクロエクソンのスプライスインを抑制するモデルマウスを作製し、解析した結果、このマウスは外有毛細胞の感覚毛異常および欠失に起因する重度難聴を発症することが明らかとなった。この表現型はMyosin VI欠損マウスとは明確に異なることから、内耳特異的発現アイソフォームはMyosin VIの他のアイソフォームとは異なる役割をもつことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mutations in myosin VI gene (MYO6) contribute to hearing loss in humans. Myosin VI null mutant mice exhibit congenital defects in balance and hearing caused by the fusion of stereocilia of inner ear hair cells. We identified a splicing isoform with an alternatively spliced 9-bp micro-exon, and confirmed that this isoform is transcribed and highly expressed in the inner ear. To explore the function of this isoform, we established model mice in which the alternative splicing of the micro-exon was blocked, using CRISPR/Cas9-mediated genome editing. The behavior of the isoform-specific null mutants was normal; however, the mutants developed severe hearing loss at one month of age and exhibited stereociliary degeneration and severe loss of outer hair cells. The phenotypes of the isoform-specific null mutants differed from those of Myosin VI null mutants. Thus, our results suggest that different isoforms have distinct roles in the development and/or maintenance of outer hair cells.

研究分野：哺乳類遺伝学

キーワード：遺伝学 耳科学 Myosin VI 有毛細胞 難聴 選択的スプライシング ゲノム編集 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

これまで約 100 種の発症責任遺伝子が同定されてきたが、それら難聴発症責任遺伝子群のほとんどは、多種多様な組織・細胞に発現が認められるにもかかわらず、遺伝子変異による病態は聴覚器官のみで発症する。本研究において標的とするヒト非症候群性難聴 (DFNA22 および DFNB37) およびマウスの難聴発症の原因遺伝子、ミオシン 6 遺伝子 (Myosin VI: *Myo6*) の発現パターンも同様であり、様々な組織・細胞で発現が認められるものの、MYO6 の機能低下および欠損により障害を受けるのは内耳有毛細胞の感覚毛である不動毛のみに発現する [Self et al. *Dev Biol* 1999; Hertzano et al. *PLoS Genet* 2008; Mochizuki et al. *Exp Anim* 2010]。一方、マウス内耳においては図 1 に示すような 3 種の *Myo6* アイソフォームが転写される。我々はその 3 種のアイソフォームのうち、僅か 9 塩基からなるエクソンが選択的スプライシングを受け、モータードメインに 3 アミノ酸が挿入した *Myo6* アイソフォーム (*Myo6*-inner ear specific isoform: *Myo6*-IESI) が蝸牛・前庭組織のみに発現することを明らかにした (図 1)。

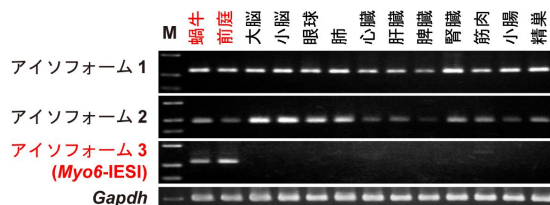


図 1. 内耳に発現する 3 種の MYO6 主要アイソフォームの主要臓器における mRNA の発現パターン。M: サイズマーカー。

2. 研究の目的

本研究は、1) *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基欠失マウスの作製、および 2) *Myo6*-IESI のみを全身性に発現するトランスジェニック (Tg) マウスの作製し、両マウスの表現型を解析することによって *Myo6*-IESI の機能を *in vivo* で実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基欠失マウスの作製

Myo6-IESI 挿入 9 塩基欠失マウスの作製は、CRISPR/Cas9 システムを介したノックイン (KI) ゲノム編集により実施した。KI ゲノム編集のためのガイド RNA は CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) を用いて *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基を含む配列にデザインし、Cas9 タンパク質および *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基のスプライス供与部位 GT および受容部位 AG をそれぞれ CT および AC に置換した一本鎖ドナーオリゴヌクレオチドとともに、マウス受精卵へマイクロインジェクションにより導入した。得られた産仔における変異導入の確認は *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基を含むゲノム領域の PCR ダイレクトシークエンシングにより塩基配列を決定することで行い、変異導入が確

認された個体は野生型マウスに交配後系統化した。また、*Myo6*-IESI の発現およびスプライシング抑制は RT-PCR、*Myo6*-IESI 挿入 3 アミノ酸を認識する抗体を用いたウェスタンブロットおよびホールマウント免疫染色により確認した。

(2) *Myo6*-IESI のみを全身性に発現する Tg マウスの作製

pCAGGS ベクターに完全長 *Myo6*-IESI をサブクローニングし、直鎖化したコンストラクトはマウスの受精卵へマイクロインジェクションにより導入し産仔を得た。得られた産仔は遺伝子型判定を行い、コンストラクトの導入が確認された個体は *Myo6* 全アイソフォーム欠損 (*Myo6* KO) マウスに交配し、*Myo6*-IESI のみを全身性に発現する Tg マウスの樹立をする。

(3) 表現型解析

系統化したマウスの表現型は、聴性脳幹反応 (Auditory Brain-stem Response: ABR) および歪成分耳音響放射 (Distortion product otoacoustic emissions: DPOAE) により聴力レベルを評価した。ABR は 4, 8, 16 および 32 kHz の刺激音に対する反応を、DPOAE は 8, 11.3, 16, 22.6 および 32 kHz の反射音を測定した。また、内耳有毛細胞の表現型はファロイジンによる感覚毛の可視化および複数の MYO6 抗体を用いた免疫染色により調査した。

4. 研究成果

(1) *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基欠失マウスの樹立と表現型解析

KI ゲノム編集の結果、目的とした *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基のスプライス供与部位 GT および受容部位 AG がそれぞれ CT および AC に置換された KI マウスは作製できなかった。しかし、本ゲノム編集においては *Myo6*-IESI 挿入 9 塩基の 6 塩基欠失 (2 アミノ酸欠失) スプライス供与部位のグアニンを含む 6 塩基欠失、およびスプライス受容部位のグアニンを含む 6 塩基欠失のマウス個体を得ることができた。そこで、これらのマウスを系統化した。系統化したマウスは *Myo6* KO マウスに観察される行動異常の発症は認められなかったが、遺伝子発現を調査した結果、*Myo6*-IESI 挿入 9 塩基のスプライシングは抑制されており、タンパク質発現を調査した結果、図 2 に示すように *Myo6*-IESI の発現は欠損していたことから、これらのマウスは *Myo6*-IESI を欠損しているものと推定された。

次に我々は樹立したマウスの聴力レベルを ABR 測定により調査した。その結果、図 3A に示すように、系統化した 3 系統のマウスは *Myo6* KO マウスと比較して ABR、すなわち聴力がやや残存するものの、すべてが重度難聴を発症していた。また、DPOAE の測定結果はより重篤であり、3 系統のマウスは

いずれも DPOAE がほぼ欠失していた(図 3B)

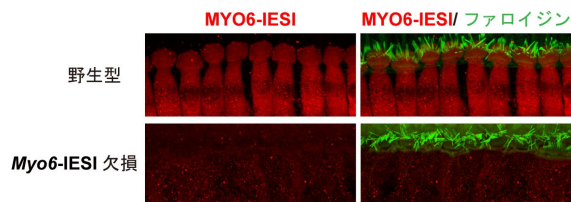


図 2. 抗 MYO6-IESI 抗体およびファロイジンによる野生型および *Myo6* 内耳特異的アイソフォーム (*Myo6-IESI*) 欠損マウスの内耳有毛細胞 (内有毛細胞) の染色像。

さらに、それらのマウスの有毛細胞の表現型を調査した結果、*Myo6-IESI* 欠損マウスは、*Myo6* KO マウスのような有毛細胞の感覚毛融合および巨大化は認められず、また、内有毛細胞 (Inner Hair Cell: IHC) の感覚毛の表現

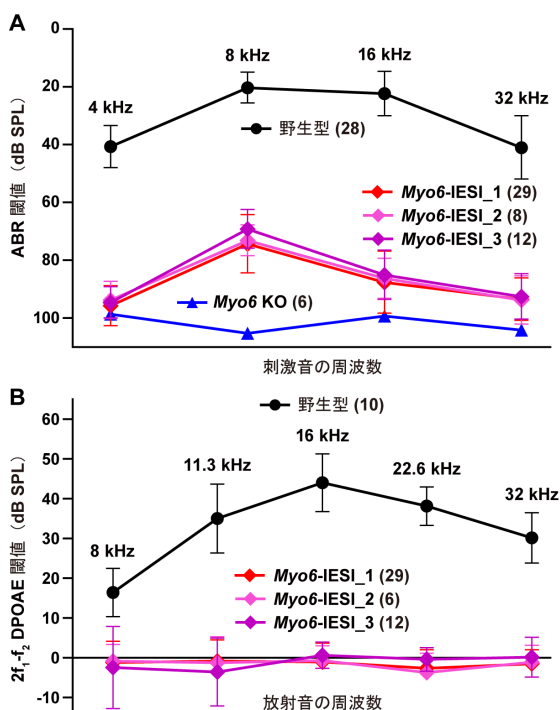


図 3. 野生型、*Myo6* 欠損、および 3 系統の *Myo6* 内耳特異的アイソフォーム欠損 (*Myo6-IESI*) マウスの ABR (A) および DPOAE (B) 閾値の比較。グラフ内の系統名の括弧内の数字は測定個体数を示している。

型は野生型マウスとほぼ同様であった。しかし、外有毛細胞 (Outer Hair Cell: OHC) において野生型および *Myo6* KO マウスとの明確な表現型の差異が認められ、*Myo6-IESI* 欠損マウスは OHC 特異的な感覚毛の崩壊が観察された(図 4)。さらに、*Myo6-IESI* 欠損マウスの OHC においては、多くの細胞の脱落が確認された。また、*Myo6-IESI* 欠損マウスにおける MYO タンパク質の発現を C 末端のアミノ酸配列を認識する抗体を用いて調査した結果、図 4 に示すようにその発現は野生型とほぼ同様であり、有毛細胞のクチクラプレートおよび細胞体に局在していた。

以上の結果から、*Myo6-IESI* の内耳有毛細胞における役割は他の *Myo6* アイソフォームとは明確に異なり、特に、OHC の感覚毛形成および OHC の維持であることが推察された。

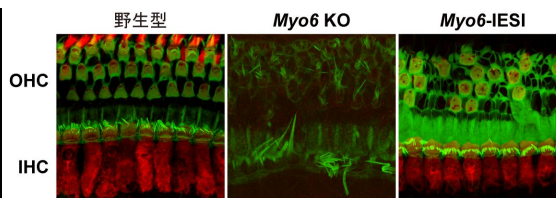


図 4. MYO6 の C 末端配列を認識する抗体および (赤) およびファロイジン (緑) による野生型、*Myo6* 全アイソフォーム欠損 (*Myo6* KO) および *Myo6* 内耳特異的アイソフォーム欠損 (*Myo6-IESI*) マウスの内耳有毛細胞 (内有毛細胞) の染色像。OHC: 外有毛細胞; IHC: 内有毛細胞。

(2) *Myo6-IESI* のみを全身性に発現する Tg マウスの作製

完全長 *Myo6-IESI* を導入した Tg マウスの作製を試みた結果、4 系統の Tg マウスが作製できた。次に、我々はそれらのマウスを野生型マウスに交配し、導入遺伝子の発現を調査することによって、1 系統を解析に用いる系統として選抜した。現在、選抜した Tg マウスは、*Myo6* KO マウスとの交配し、*Myo6-IESI* のみを発現するマウスの樹立を試みている。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

関 優太 他：マウスにおけるミオシン VI のスプライス部位変異は蝸牛有毛細胞の頂部領域におけるアクチンネットワーク破綻に起因した感覚毛融合へと導く。第 64 回日本実験動物学会総会 .2017. 5. 27, ビッグパレットふくしま (福島県郡山市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ : <http://www.igakuken.or.jp/mammal/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)
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・プロジェクトリーダー
研究者番号 : 20280787

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

関 優太 (SEKI, Yuta)

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・研究員
研究者番号：20280787

(4)研究協力者

設楽 浩志 (SHITARA, Hiroshi)
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術開発センター・主任基盤技術研究職員

安田 俊平 (YASUDA, Syumpei)
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