

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16913

研究課題名（和文）内耳高発現ミオシン6アイソフォームの機能解析を起点した不動毛形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of stereocilia formation defined by myosin vi isoform highly expressed in the inner ear

研究代表者

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：10615636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：Myo6-miExon欠失マウスは、前庭機能は正常であるが、難聴を発症する。本研究は、Myo6-miExon欠失マウスの難聴が主に外有毛細胞の障害であり、特に、不動毛形成初期の配向パターンの異常が原因であることを明らかにした。さらに、平面内極性（PCP）タンパク質の異常局在を見出し、Myo6-miExonの欠失が有毛細胞頂部のPCPの崩壊を引き起こすことを示唆した。加えて、Myo6-K0マウスとの交配により得られたコンパウンドヘテロマウスの聴力レベルから、MYO6アイソフォームの発現不均衡が聴力レベルに影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、選択的スプライシングにより産生されるMYO6アイソフォームの機能が多様化し、不動毛形態形成に複雑に関与することをモデルマウスの解析を通じて明らかにしたものである。加えて、交配実験により作製したアレルホモ、アレルヘテロおよびコンパウンドヘテロの聴力レベルの比較によりMYO6アイソフォームの発現不均衡が聴力レベルを変化させる現象が認められ、Myo6変異によって生じる新たな難聴発症メカニズムを提唱できる可能性が推察された。

研究成果の概要（英文）：Myo6-miExon KO mice exhibit deafness caused by the impairment of outer hair cells. Particularly, we have revealed that Myo6-miExon KO mice showed misorientation of kinocilia in the early developmental stage of stereocilia. Moreover, we found that an abnormal localization of planar cell polarity marker on the apical surface of outer hair cells. These results suggested that Myo6-miExon is involved in the formation of stereocilia in outer hair cells and play an important role in regulation of hair bundle polarity.

研究分野：実験動物学

キーワード：難聴 ミオシン6 アイソフォーム モデルマウス 内耳有毛細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト/マウスの難聴原因遺伝子であるミオシン 6 (*Myo6*) は選択的スプライシングを受けた複数のアイソフォームが転写され、内耳有毛細胞で発現している。研究代表者は、内耳有毛細胞で高発現する 9 塩基のマイクロエクソン (miExon) が挿入した *Myo6* アイソフォームの存在を明らかにし、ゲノム編集によって特異的挿入配列に変異をもつマウスを樹立した。興味深いことに、樹立したマウスは既存の *Myo6*-KO で観察される首振り、旋回運動などの行動異常を生じなかったが、高～重度難聴を発症していた。さらに、不動毛間および不動毛 - 有毛細胞頂部間融合を示す既知の *Myo6* 変異体マウスと異なり、特に、外有毛細胞の障害により重度難聴を発症することが明らかとなった。これらの結果から、研究代表者は、*Myo6* の選択的スプライシングアイソフォームの機能は多様であり、不動毛形成において異なる役割をもつことを予想し、*Myo6*-miExon 欠失マウスを用いた *in vivo* 解析、およびモーター機能を調査する *in vitro* 解析により、新たな不動毛形成に関する知見が得られることを期待した。

2. 研究の目的

本研究は、樹立した *Myo6*-miExon 欠失マウスが生じる不動毛形成異常の原因を明らかにし、MYO6-miExon の特徴的な役割を解明することを主要な目的とした。また、*Myo6*-miExon のモーター機能を解析、および新たな *Myo6* スプライシングアイソフォームを同定する。

3. 研究の方法

(1) 聴覚機能の表現型解析

Myo6-miExon 欠失マウスのホモ個体の聴力レベルは、4, 8, 16 および 32 kHz の音域において聴性脳幹反応 (Auditory brainstem response : ABR) を測定し、閾値を決定することにより評価した。さらに、高音圧の刺激に対する ABR 波形の振幅および潜時を測定し野生型と比較した。また、歪成分耳音響放射 (Distortion product otoacoustic emissions : DPOAE) の 8, 11.3, 16, 22.6 および 32 kHz の各音域における多段階の音圧レベルで外有毛細胞機能を調査した。加えて、*Myo6*-miExon 欠失と *Myo6*-KO マウスの交配により得られたコンパウンドヘテロマウスの ABR 閾値および DPOAE ($L2 = 55$ および $L1 = 65$ dB) を測定した。

(2) 不動毛を含む有毛細胞頂部の形態観察

不動毛を含む有毛細胞頂部は走査型電子顕微鏡を利用して観察した。また、ファロイジン染色により可視化した不動毛、および既知の *Myo6* 変異体が不動毛形成異常を生じる発端となる有毛細胞頂部のクチクラプレート、不動毛根部および基底部の形態を観察するため、各部位特異的マーカーを用いて免疫組織染色を行った。

(3) 発現解析

内耳有毛細胞における高発現 MYO6 アイソフォームの局在を調査するため、全ての MYO6 アイソフォームにエピトープを持つ、および内耳高発現 MYO6 アイソフォーム特異的エピトープを持つ抗体を用い、胎齢期から免疫組織染色を行った。

(4) MYO6 タンパク質の精製

MYO6 タンパク質を精製するため、Bac-to-Bac Baculovirus expression system を用いたタンパク質発現を行った。

(5) 不動毛形成に関与する新規 *Myo6* アイソフォームの探索

不動毛形成に関与するマイクロエクソンを有する新規 *Myo6* アイソフォームを探索するため、エクソン間に設置したプライマーセットを用いて RT-PCR を行った。

4. 研究成果

(1) *Myo6*-miExon 欠失マウスの表現型解析

Myo6-miExon 欠失マウスは生後 1 ヶ月齢において、高～重度難聴を生じ、DPOAE が欠失しているが、詳細な聴覚表現型は不明のままであった。本研究では、さらに詳細な聴覚表現型を調査するため、90dB の音刺激に対する ABR 波形を取得し、波形の振幅および潜時を野生型と比較した。その結果、全ての周波数で振幅の減少および潜時の遅延が予想通り認められた。次に、DPOAE の閾値を調査した結果、*Myo6*-miExon 欠失マウスは外有毛細胞の不動毛の崩壊および欠失を生じるにも関わらず (図 1)、高音圧の音刺激に対する反応が得られ、外有毛細胞機能をわずかに有することが判明した (図 2)。

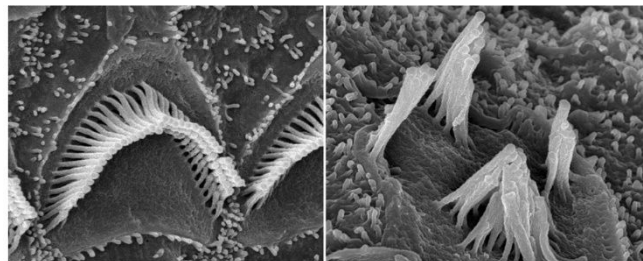


図1. 野生型(左)および*Myo6*-miExon欠失マウス(右)の外有毛細胞不動毛の電子顕微鏡観察。*Myo6*-miExon欠失マウスは不動毛の形態異常を生じる。

(2) *Myo6*-miExon 欠失マウスにおける外有毛細胞の形態観察

Myo6-miExon 欠失マウスが生じる外有毛細胞の不動毛形態異常を調査するため、走査型電子顕微鏡を用いて不動毛の形態観察を行い、*Myo6*-KO マウスと比較した。*Myo6*-KO マウスは不動毛間の融合、不動毛基底部の消失および不動毛の配向パターンの異常が認められるが、面白いことに、*Myo6*-miExon 欠失マウスは外有毛細胞の不動毛

の配向パターンに限定して異常が認められた。さらに、不動毛根部および基底部のマーカーを用いて免疫組織染色を実施した。その結果、MYO6-KO マウスで認められる各部位におけるマーカーの異局在は認められず、走査型電子顕微鏡のデータをサポートするデータを得た。

(3) *Myo6*-miExon 欠失マウスの不動毛配向パターンおよび線毛の極性異常

不動毛の配向パターンおよび極性決定に重要な役割を持つ線毛の形成位置を調査した結果、野生型の線毛は一律に Lateral 側に移動するのに対し、*Myo6*-miExon 欠失マウスからは Medial 側への移動、または中心部での固定を示唆するデータが得られた。さらに、数種の PCP マーカーの局在を調査した結果、1 部の PCP マーカーにおいて *Myo6*-miExon 欠失マウスの有毛細胞頂部において野生型では認められない局在が認められた。一方、全 MYO6 および MYO6-miExon の局在を野生型で調査した結果、発現パターンに明確な差異は認められなかった。しかしながら、*Myo6*-miExon 欠失マウスにおいて MYO6 の局在を調査した結果、PCP マーカーで認められた異常局在と類似したシグナルが検出された(図3)。これらの結果から、*Myo6*-miExon 欠失マウスが生じる外有毛細胞の配向異常は PCP に関与するタンパク質ネットワークが崩壊することであり、その原因は *Myo6*-miExon 欠失マウスにおいて MYO6 が発現することが原因である可能性も推察された。

(4) MYO6 アイソフォームの発現不均衡がもたらす聴力レベルの変化

Myo6-miExon 欠失マウスおよび *Myo6*-KO マウスの交配により作製したコンパウンドヘテロ個体の聴力を測定した結果、*Myo6*-miExon 欠失マウスの聴覚レベルと比較して表現型は軽減されたものの、野生型よりも低い聴力レベルを示した。興味深いことに、進行性難聴を生じる *Myo6*-KO マウスのヘテロ個体よりも聴力レベルは重篤であった(図4)。これらの結果は、MYO6 アイソフォームの発現不均衡が聴力レベルの変化させる可能性を示唆しており、*Myo6* 変異によって生じる新たな難聴発症メカニズムを提唱できる可能性が示唆された。

(5) MYO6 タンパク質の精製

本研究で着目した MYO6 アイソフォームはモータードメインにマイクロエクソンが挿入されるため、モーター機能の変化が予想されたことから、Bac-to-Bac Baculovirus expression system を用いたタンパク質発現を行い、大量発現後、ウエスタンブロットによる発現を確認した。これらの結果は、MYO6 タンパク質精製の成功を示し、モーター機能を調査するためのキネティクス解析が可能となった。

(6) 不動毛形成に関与する新規 *Myo6* アイソフォームの探索

Myo6 のエクソン間に設置したプライマーセットを用いて RT-PCR を行った結果、蝸牛由来のサンプルから新たなマイクロエクソンの挿入および欠失を示唆するデータは現在までに得られていない。

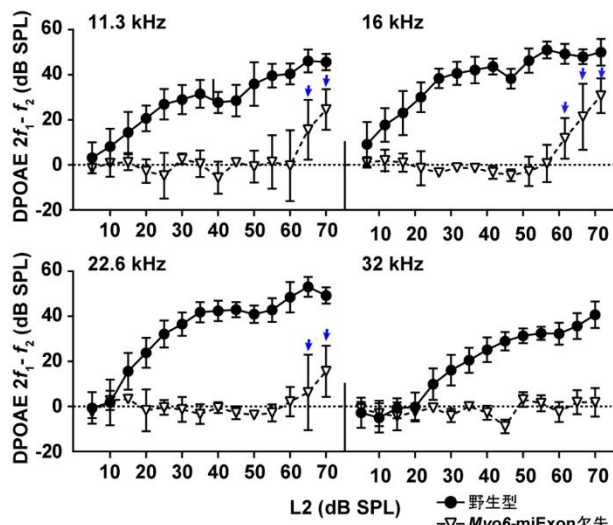


図2. 野生型および *Myo6*-miExon 欠失マウスにおける各周波数の多段階での音圧における DPOAE 値の比較。 *Myo6*-miExon 欠失マウスは僅かに外有毛細胞機能を有する(矢印)。

1 部の PCP マーカーにおいて *Myo6*-miExon 欠失マウスの有毛細胞頂部において野生型では認められない局在が認められた。一方、全 MYO6 および MYO6-miExon の局在を野生型で調査した結果、発現パターンに明確な差異は認められなかった。しかしながら、*Myo6*-miExon 欠失マウスにおいて MYO6 の局在を調査した結果、PCP

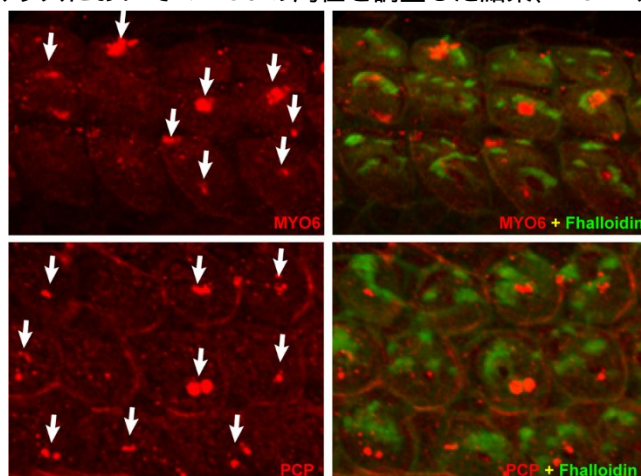


図3. *Myo6*-miExon 欠失マウスにおける MYO6 および PCP マーカーの異局在。矢印は有毛細胞頂部における濃縮した各タンパク質のシグナルを示す。

興味深いことに、進行性難聴を生じる *Myo6*-KO マウスのヘテロ個体よりも聴力レベルは重篤であった(図4)。これらの結果は、MYO6 アイソフォームの発現不均衡が聴力レベル

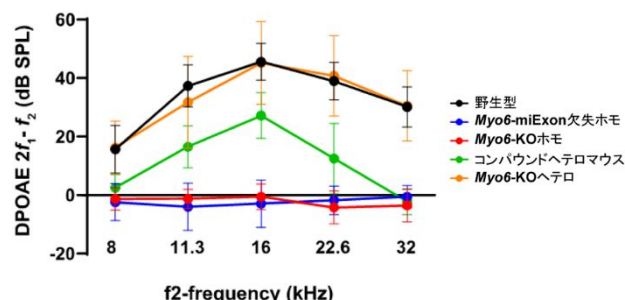


図4. 野生型、*Myo6*-miExon 欠失ホモ、*Myo6*-KO ホモ、*Myo6*-KO ヘテロおよびコンパウンドヘテロマウスの DPOAE 値の比較。

大量発現後、ウエスタンブロットによる発現を確認した。これらの結果は、MYO6 タンパク質精製の成功を示し、モーター機能を調査するためのキネティクス解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関 優太, 設樂浩志, 吉川欣亮
2. 発表標題 3残基挿入ミオシンVIの蝸牛有毛細胞における特徴的な役割
3. 学会等名 モロシヌス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

哺乳類遺伝プロジェクトホームページ http://www.igakuken.or.jp/mammal/index.html
--

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
---------------------------	-----------------------	----