

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592153

研究課題名（和文） 蓋膜構成タンパク遺伝子変異による難聴の解析

研究課題名（英文） Mechanisms of hearing loss caused by gene mutations encoding component proteins of tectorial membrane.

研究代表者

茂木 英明（MOTEKI HIDEAKI）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：60422698

研究成果の概要（和文）：

内耳の蝸牛蓋膜の異常による感音難聴では、それを構成するタンパクをコードする遺伝子変異が原因のひとつと考えられている。本研究では先天的感音難聴患者における、これら遺伝子の変異解析を行った。新規遺伝子変異が見いだされたことと、常染色体優性遺伝形式をとる先天性難聴において、この遺伝子変異が高頻度に認められることが明らかとなった。遺伝形式と聴力のパターンから、これら蓋膜構成タンパクの遺伝子変異を推測、解析し原因診断が可能である。

研究成果の概要（英文）：

One of the causes of sensory neural hearing loss is affected with genetic mutations of encoding proteins of inner ear cochlear components. In this study, we examined the prevalence of genetic mutations and confirmed genotype phenotype correlation in congenital hearing loss patients. In our results, the mutation of *TECTA* gene encoding tectorial membrane protein may be a high incidence in autosomal dominant hearing loss. Mutation screening can diagnose the genetic cause of hearing loss with tectorial membrane defect.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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、遺伝子、感音難聴、細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は出生児 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性障害のひとつである。近年の分子遺伝学的手法の発達に

伴い、数多くの原因遺伝子変異が同定され、報告されるようになってきた。

従来、蝸牛内のコルチ器における有毛細胞や細胞間のイオンサイクルに関連した、細胞構造や細胞間連絡に関連した遺伝子の原因

は多数報告されてきたが、蝸牛内の他の構成因子である蓋膜についての研究は比較的少なく、表現型である難聴の疾患像や難聴のメカニズムに関しては報告が限られていた。蓋膜は細胞構造を持たず、主に2種類の構造で構成されており、線維状のタンパクとシート状のタンパクとで成り立っている。これら、いわゆる細胞外マトリックスの異常による難聴がどのようなメカニズムで引き起こされるのかは未だ不明な点が多い。当研究室における検討で浅村らは、蓋膜の細胞外マトリックスのひとつで、線維状の構造をとる IX 型コラーゲンの遺伝子解析を行い、難聴の原因遺伝子変異を同定し報告してきた (Asamura et al., 2005)。また同様に、IX 型コラーゲンのノックアウトマウスでは、進行性の難聴を呈するとともに、基底回転の蓋膜の構造が光学顕微鏡レベルで変性していることを見出し報告してきた (Suzuki et al., 2005)。

蓋膜構成タンパクの異常による難聴の詳細を検討するためには、これらをコードする遺伝子を検索し難聴との関連性について明らかにする必要がある。本研究によりそれぞれの遺伝子変異の種類、頻度、難聴の程度や進行の有無などと関連づけて解析、検討することで、難聴の原因究明や治療への足がかりに大きく寄与することが期待される。

2. 研究の目的

先天性難聴は出生児 1000 人に 1 人に認められる比較的頻度の高い先天性障害のひとつである。従来、難聴の原因は不明である場合が殆どであったが、近年の分子遺伝学的手法の発達に伴い、数多くの原因遺伝子変異が同定され、報告されるようになってきた。

難聴の原因としては、内耳の有毛細胞の細胞死、血管条・ラセン靭帯などのイオンサイクルの破綻などが注目されてきたが、近年、蓋膜構成因子ネットワークの破綻による難聴が知られるようになってきた。また、我々の研究室では、蓋膜構成因子の遺伝子変異の解析を精力的に行っており、*COL9A1*、*COL9A3*、*TECTA* といった蓋膜構成因子の遺伝子変異に伴う難聴を見出し報告してきた (Asamura et al., 2005、Suzuki et al., 2005、Iwasaki et al., 2002)。しかしながら、蓋膜構成因子の遺伝子変異により難聴と成るメカニズムは不明でありより詳細な解析が必要な状況であった。

本研究では、内耳における蓋膜を構成するタンパクに注目し、蓋膜構成因子の細胞内局在から難聴のメカニズムについて検討すること、また蓋膜構成成分の遺伝子変異による

難聴の探索を行ない新規遺伝子変異の探索を行い、その頻度、難聴の程度や進行性などに関連した解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 日本人難聴患者を対象に、蓋膜構成タンパクをコードする遺伝子解析を行い、新規遺伝子変異の探索を行なうとともに、(2) 培養細胞系を用いた、難聴原因遺伝子変異の機能解析を行った。

(1) 日本人難聴患者に認められる蓋膜構成タンパクをコードする遺伝子解析の新規原因遺伝子変異の探索

当研究室が保有する難聴遺伝子バンクより、常染色体優性遺伝形式をとる家系を選出し、解析対象とした。解析遺伝子としては、蓋膜のシート状の構成因子である α -テクトリンをコードする *TECTA* 遺伝子と、 α -テクトリンと重合し、蓋膜の形態維持に重要な働きを持つことが推測されている β -テクトリンをコードする、*TECTB* 遺伝子を候補とした。

常染色体優性遺伝形式をとる 139 家系に対して *TECTA* 遺伝子の全エクソンおよびスプライシング領域を PCR 法で増幅した。増幅された PCR 産物を電気泳動で確認後、ABI PRISM model 3100 genetic analyser を用いて、直接シーケンス法により配列を決定した。*TECTB* 遺伝子についても同様な手技で行い、常染色体優性遺伝形式 96 家系を対象に解析を行った。

(2) 蓋膜構成タンパクをコードする遺伝子変異による難聴のメカニズムの解析

蓋膜構成因子の遺伝子変異により難聴となるメカニズムを推定するため、従来より報告があり、ドメイン構造がはっきりしている *TECTA* 遺伝子の機能解析を行った。*TECTA* 遺伝子のうち、難聴の原因として多くの変異が報告されている ZP ドメインを含む C 末端領域を Human fetal brain cDNA (Biochain) より、クローニングした。クローニングした *TECTA* 遺伝子 ZP ドメインに、従来報告のあった 3 種類の変異 (スペイン家系: C1837G、オーストリア家系: Y1870C、日本人家系 R2021H) を、変異導入プライマーを用いた部位特異的変異導入法により導入した。変異を導入した *TECTA* 遺伝子 ZP ドメインを、pEGFP-C2 ベクター (Clontech) に導入し、GFP との融合タンパクを発現するプラスミ

ドを構築した。

これらは、細胞内で合成され分泌された結果、重合して蓋膜を構成するタンパクとなるため、C末端領域に細胞膜移行因子（TMD）を付加して強制的に細胞膜へ移行するプラスミドも構築した。

これら構築した GFP 融合型 *TECTA* プラスミドをリポフェクトアミン LX (invitrogen) を用いたリポフェクション法により COS7 細胞、Hela 細胞に導入して、細胞膜への移行など、細胞内の局在をレーザー励起蛍光顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) 日本人難聴患者に認められる蓋膜構成タンパクをコードする遺伝子解析の新規原因遺伝子変異の探索

優性遺伝形式をとる遺伝性難聴患者 139 家系を対象に、蓋膜構成タンパクの遺伝子について変異の検索を行なうとともに、臨床情報との比較検討を行い、遺伝子変異と難聴との関連性について詳細に検討した。その結果、内耳に発現する *TECTA* 遺伝子の新規変異を 3 家系より見出した。1 家系は ZA ドメイン領域における変異であり、高音障害型の感音難聴を呈していた。2 家系はいずれも ZP ドメイン領域の変異であり、中音域の難聴になることが明らかとなった。*TECTA* 遺伝子の変異の部位により表現型が異なることが明らかとなった。これは他の人種からの報告とも合致しており、日本人においても変異部位により難聴のパターンが異なることが確認された。

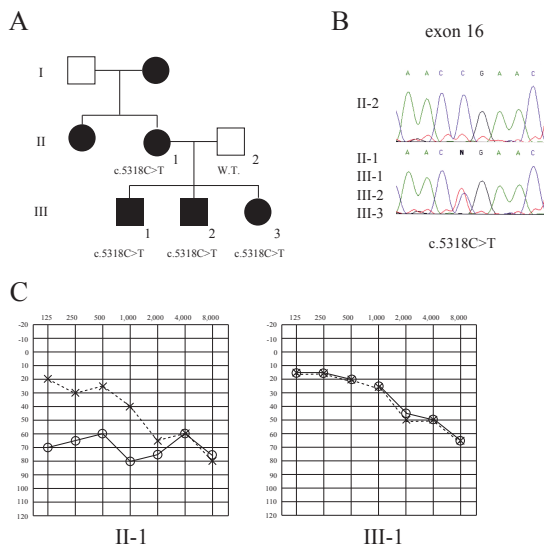


図1 新たに日本人家系から見出された *TECTA* 遺伝子変異 (5318C>T) と家系図

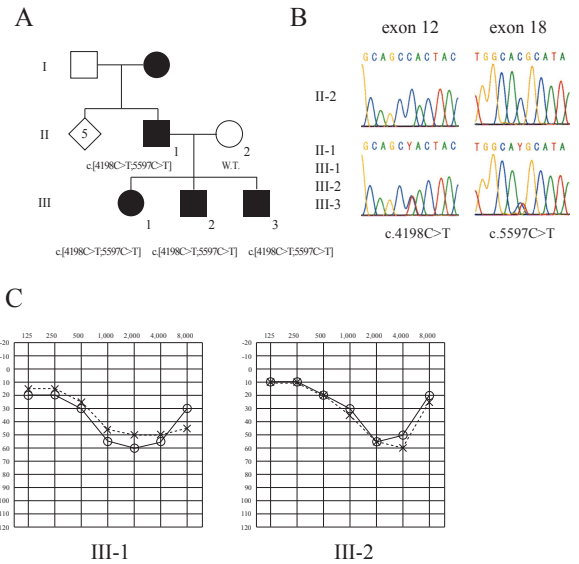


図2 新たに日本人家系から見出された *TECTA* 遺伝子変異 (5597C>T) と家系図
ZP ドメイン変異により中音域難聴を示した。

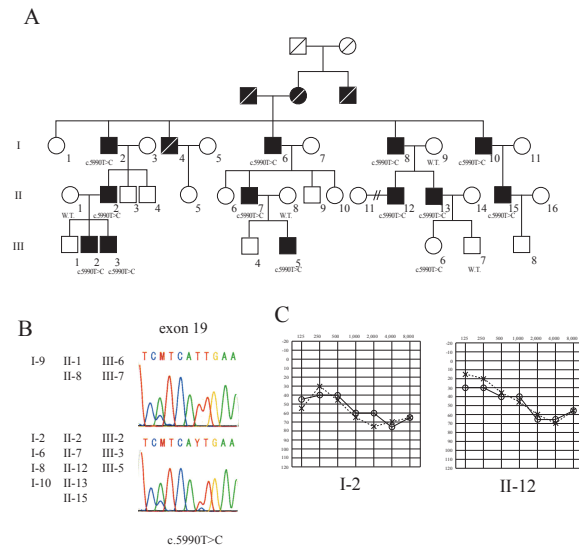


図3 新たに日本人家系から見出された *TECTA* 遺伝子変異 (5990C>T) と家系図
ZP ドメイン変異により中音域難聴を示した。

また、図3の家系において、変異を有する女性は難聴が軽度であり、性差による表現型、すなわち聴力レベルが異なる可能性が示唆された。

本研究により、既報告 (Iwasaki et al., 2002) の家系も含め、139 家系から 5 変異を同定した。日本人における頻度としては 3.6% (5/139 家系) であった。さらに聴力別に解析を行ったところ、中等度難聴 (41-70dB) では 9.6% (5/52 家系) と非常に高頻度に認められることから、常染色体優性家系の中等度難聴では本遺伝子の関与が

強く疑われることが示唆された。また聴力レベル以外にも、高音域、中音域の難聴のパターンによっても推測できる可能性があると思われた (Moteki et al., in press)。

TECTB 遺伝子に関しても常染色体優性遺伝形式をとる難聴家系、96 家系に対して直接法でシーケンスを行ったが、多型以外の病的な遺伝子変異は認められなかった。

蓋膜を構成するタンパクとして α テクトリンと、これと相互作用する β テクトリンをコードするそれぞれの遺伝子解析を行ったが、蓋膜において、より病的な変化を来す可能性としては α テクトリン、すなわち **TECTA** 遺伝子が重要であることが示唆された。

(2) 蓋膜構成タンパクをコードする遺伝子変異による難聴のメカニズムの解析

野生型 (Wild type) と難聴を示す病的変異を持つ変異型 (Mutations) のタンパクの挙動を調べるため、細胞内に強制発現させる実験系を構築した。難聴を示さない野生型と、従来難聴を示すと報告されている 3 種類の変異 (スペイン家系: C1837G、オーストリア家系: Y1870C、日本人家系 R2021H) を導入したタンパクを作成、オワンクラゲ緑色蛍光タンパク (GFP) との融合タンパクとして作成した。また、これらは本来細胞外マトリックスとして細胞外に分泌、重合してその機能を果たすと考えられているため、細胞膜移行因子 (TMD) を付加した。

また、野生型に赤の蛍光色素タンパクを融合したプラスミドと、緑色の変異型を HeLa 細胞に共発現させ、優性阻害効果について検討を行った。

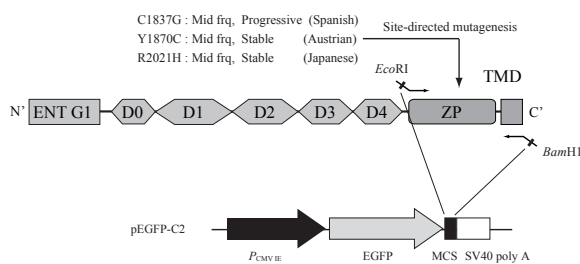
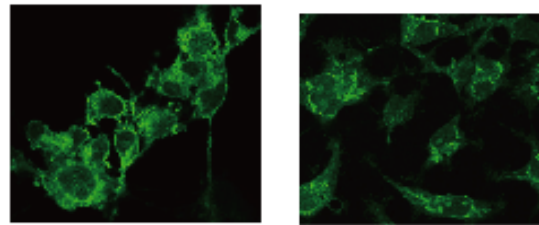


図4 構築した融合タンパクのシェーマ

COS7 培養細胞に導入し細胞内の局在の解析を行った。

その結果、野生型の **TECTA** 遺伝子は細胞質に局在するのに対して、難聴患者より見出された変異では、細胞質に凝集した状態で局在

し、細胞膜に移行しないことが明らかとなった。従って、細胞外に分泌されないことにより、蓋膜の構成成分が減少、これにより蓋膜の本来の機能が損なわれるために難聴となることが推測された。



W.T.

Y1870C

図5 GFP 融合型 **TECTA** 遺伝子の細胞局在の変化 (左が野生型、右が変異型を示す)

野生型では、細胞膜で GFP の蛍光が認められるのに対して、変異型では細胞質内で凝集を形成しているように見える。(Moteki et al., in press)

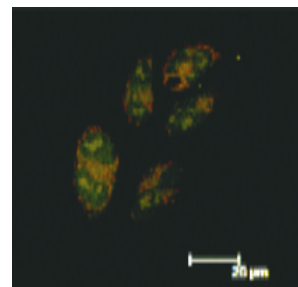


図6 赤が野生型、緑が変異型を示す。両者が一部重合しオレンジ色を呈していると思われる所見がある。優性阻害効果の可能性があるとされた。

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)

[学会発表] (計 1 件)

① 茂木英明、西尾信哉、橋本繁成、工 穰、宇佐美真一 **TECTA** 遺伝子変異による難聴患者の遺伝子解析と臨床像 「優性遺伝形式をとる遺伝性難聴に関する調査研究班」 研究成果報告会 2010 年 2 月 28 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 英明 (MOTEKI HIDEAKI)
信州大学・医学部・助教
研究者番号: 60422698

(3) 連携研究者

宇佐美 真一 (USAMI SHIN-ICHI)
信州大学・医学部・教授
研究者番号：10184996

西尾 信哉 (NISHIO SHIN-YA)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：70467166