

## 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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592171

研究課題名（和文） 多機能タンパク質CASKの内耳における分子機能解析

研究課題名（英文） CASK function in the inner ear

研究代表者

本田 晶 (HONDA AKIRA)

独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究チーム・研究員

研究者番号：50443023

研究成果の概要（和文）：

近年、難聴の原因遺伝子として報告された calcium/calmodulin-dependent serine kinase (CASK) の内耳における機能を探るため、CASK が発現する内耳領域の特定、CASK 結合タンパクの同定、および CASK ノックアウトマウスの解析をおこなった。その結果、CASK の発現は有毛細胞、蝸牛および前庭神経、血管条で認められた。またその結合タンパク質は、核内分子から膜輸送に関わる因子など多岐にわたることが明らかとなった。またノックアウトマウスでは、内耳神経における細胞数の減少と軸索の形成異常とを見いだした。以上の結果から、内耳組織において CASK が転写制御、神経発生、さらには血管条の機能に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Calcium/calmodulin-dependent serine kinase (CASK) plays an important role in brain development, and in patients with CASK mutations sensorineural hearing loss was observed. However, there has been no comprehensive study of CASK in the inner ear. To better understand the physiological importance of CASK, we examined the expression pattern of CASK in chick and mouse inner ear. We observed the expression of CASK in the hair cell (HC), the spiral ganglion (SG) neurons, and in the stria vascularis (SV). Analysis of CASK-binding protein identified some nuclear proteins, and the molecules required for membrane trafficking events. The cochlea from CASK conditional KO mice shows a clear defect with a decrease in the number of SG neurons and the morphology is disturbed. The data suggests that CASK is required for the formation and/or function of HC, SG neurons, and SV.

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
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：内耳発生、内耳機能、有毛細胞、内耳神経、血管条

## 1. 研究開始当初の背景

聴覚の正常な機能は、内耳蝸牛の各部位に存在する多様な細胞種の連携した働きによって果たされる。例えば、音（内リンパ液）の振動を受容する有毛細胞、有毛細胞が発したシグナルを受容し、それを聴覚皮質に伝える内耳蝸牛神経、さらに内リンパ液を高電位に保つために働く血管条などが各々正常に機能して初めて、内耳が聴覚機能を有する。これら細胞のうちのいずれか機能しなくなっても、聴覚に異常を引き起こす。実際に難聴患者ではこれらの細胞に何らかの異常をきたしている場合が多い。

MAGUK (membrane-associated guanylate kinase)ファミリーに属する CASK (calcium/calmodulin-dependent serine kinase)は、カルモジュリンキナーゼドメイン、グアニル酸キナーゼドメインの他に、タンパク質同士の特徴的なドメイン構造を持つ。MAGUK は、多タンパク質複合体を形成することにより、細胞間結合における分子構造の維持と、細胞接着に伴う情報伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、CASK は脳神経シナプスに強く発現して神経伝達物質の放出に関与する他、モーター分子や転写因子など多様な分子と複合体を形成することが知られているが、その正確な機能についてはいまだ不明な点が多い。これまでに、ヒトで CASK 遺伝子の変異が先天性難聴と関連していること、またマウス蝸牛の有毛細胞の感覚毛 (stereocilia)に CASK が局在し、感覚毛形成の必須分子 Whirlin と結合することが報告されていることから、内耳機能における CASK の重要性が示唆されている。

これまでに申請者らが行ったニワトリ内耳切片の CASK 免疫染色実験から、この分子が内耳において広範囲な発現パターンをとることが明らかになった。すなわち、有毛細胞では CASK が感覚毛だけでなく核外の細胞質にも発現し、小胞様の局在を示した。CASK は支持細胞や内耳神経

細胞にも発現していたが、その局在は有毛細胞と異なり、特に神経細胞では核内のみ認められた。以上より、CASK は内耳での聴覚機能の調節に何らかの寄与をしており、しかもそれは複数の細胞種の多様な機構に基づいていると考えられた。

## 2. 研究の目的

本計画では、近年になって難聴との関係が報告された多機能タンパク質 CASK の内耳における機能解明を目的に研究を進める。既に我々は、CASK が聴覚に関わる複数の細胞種に発現することを見いだしている。このことから、CASK を研究することで内耳機能の包括的な理解を深めることを最終的な目標とする。

## 3. 研究の方法

### ①CASK の発現時期と細胞内局在の解析

さまざまな発生段階のニワトリおよびマウス内耳（もしくは頭部）凍結切片を用いて、CASK が内耳に発現する時期を特定する。この実験では、主に抗 CASK 抗体による免疫染色を行って CASK の発現領域を調査する。また同時に CASK の細胞内局在を解析する。初期胚から成獣期まで、①CASK がどの時期に発現し、内耳の発生が進むにつれてその局在がどのように変化するのか、②内耳の各部でその発現や局在に違いはあるのか、③有毛細胞ではどの時期に感覚毛へと輸送されるのか、について詳細に検討する。

またニワトリとマウスで CASK の発現時期、発現部位、細胞内局在について比較検討を行う。

### ②CASK ノックアウトマウスの解析

CASK ノックアウトマウスは生後直ちに死亡することが分かっているため、コンディショナルノックアウト (Cre/LoxP システム) の手法を用いて内耳特異的にノックアウトを行う。Jackson laboratory より購入する CASK floxed マウス (X 染色体上に存在する CASK 遺伝子内に LoxP 配列をノックインしている) を内耳特異的なプロモータ

一の制御下で Cre タンパクを発現するマウスと掛け合わせるにより、コンディショナルノックアウトマウス (CASK cKO マウス) を得る。まず得られた仔マウスの表現型を観察する。次に、この cKO マウスから内耳凍結切片を作製し、内在の CASK が欠失していることを確認した上で、①で明らかとなった CASK 発現細胞種が正常に形成されているか、形態学的な解析を行う。内耳有毛細胞では、感覚毛の形態の他、神経終末が基底部に正しく付着しているかについて観察する。

### ③CASK 結合タンパク質の解析

CASK はその分子内にいくつかのタンパク質結合ドメインをもつことから、さまざまな分子が CASK と結合すると予想される。そこで CASK の内耳における機能を探るため、マウス内耳組織から抗 CASK 抗体を用いた免疫沈降法により CASK タンパクを沈降させ、これにより共沈する分子を質量分析により同定する。

## 4. 研究成果

### ①CASK の発現時期と細胞内局在

ニワトリ - 免疫染色の結果、CASK が内耳原基(otic placode)の細胞質に小胞様に発現しており、その発現が感覚上皮の形成期まで維持されていることが明らかとなった。内耳形成後期では、有毛細胞の他、その周囲の支持細胞、また内耳神経にも CASK の発現が見られた。有毛細胞では、感覚毛が伸長する前に細胞頭頂部に CASK を含んだ小胞が集積しており、その小胞から CASK 分子が感覚毛へと移行している可能性が示唆された。この結果から、感覚毛における CASK の機能について少なくとも2つの可能性が考えられる。1つは CASK が感覚毛の構成成分であり、輸送小胞によって能動的に感覚毛へと運ばれている可能性である。もう1つは、CASK が感覚毛へと向かう輸送小胞の構成成分であり、小胞内で感覚毛の構成分子を特異的に認識し、その分子を感覚毛へと送り届けている可能性が考えられる。

マウス - マウス組織では抗 CASK 抗体の

反応性が悪く、そのため in situ ハイブリダイゼーションと免疫染色を並行して行うことによりデータの信頼性を高めることにした。マウス内耳原基における CASK の発現は、in situ、免疫染色の両方で確認されなかった。In situ ハイブリダイゼーションの結果から、E13.5 のマウス胚で内耳神経に CASK の発現が認められ、その後 E15.5 で有毛細胞にも発現が見られた。また免疫染色の結果、E13.5 では神経細胞の核内に、E15.5 で有毛細胞の細胞質と核にその発現が見られた。しかしながら、ニワトリ有毛細胞で見られた小胞様の局在を確認することは出来なかった。神経細胞における CASK の核局在は出生直後(P0)でも認められたが、その後 CASK の局在は神経軸索へと移り、ニューロフィラメントと呼ばれる中間径フィラメントと同局在を示すことが明らかとなった。また生後一週間では CASK は軸索の先端部に集積した。また同時期に血管条に抗 CASK 抗体の強い反応性が認められた。

ニワトリ、マウスの CASK 発現パターンの比較 - 両者の共通点は、ともに内耳形成期に神経と有毛細胞にその発現が認められることである。この結果から、両細胞種の形成に CASK が関与する可能性が示唆された。しかしながらマウス有毛細胞では、CASK の核局在が見られたのに対し、ニワトリでは CASK は主に細胞質に存在していた。

### ②CASK ノックアウトマウスの解析

CASK floxed マウスを、内耳特異的な *Six1* のプロモーター制御下で Cre タンパクを発現するマウスと掛け合わせるにより、CASK cKO マウスを得た。この cKO マウスは発育不良で、体格が他のマウスより小さめであった。また歩行中のふらつきがあり、trunk curl や limb grasping などの平衡感覚異常が見られた。一方、プライエル反射は良好であった。

次にマウスから得た内耳組織のウエスタンブロッティングを行い、内在の CASK が CASK cKO マウスでは欠失していることを確認した。その上で内耳組織の形態学的な解析を行った。その結果、CASK cKO マウ

スでは有毛細胞の数に変化は見られなかった。また感覚毛の形態にも異常は認められず、神経終末は有毛細胞基底部に接合していたことから、有毛細胞については形態学的な異常は見られなかった。一方、内耳神経においては細胞数の減少 (active Caspase3 陽性細胞の増加) と軸索の形態異常が認められた。この結果から、CASK が神経細胞の分化あるいは維持に関与する可能性が示唆された。

CASK が神経軸索においてニューロフィラメントと同局在を示すことから、両者が共に機能している可能性が考えられる。ニューロフィラメントを含む中間径フィラメントは、一般的に細胞の形を決定する上で重要な機能を果たすとされているが、ニューロフィラメントの神経細胞における機能にはまだ不明な点が多い。これまで、GSK3β や CDK5 によるニューロフィラメントのリン酸化が神経軸索の正常な形成に重要であることが報告されている。これらの知見から、内耳神経においては CASK がニューロフィラメントのリン酸化酵素として働き、軸索の成長や軸索内の物資輸送に関わっている可能性が考えられる。

### ③CASK 結合タンパク質の解析

マウス内耳組織を用いた免疫沈降実験により同定された CASK 結合タンパク質は、以下の2種に大別される。

ESCRT - 共沈物中からは、細胞内輸送に関与する数種の ESCRT 分子(VTA1, CHMP2a, CHMP4b, CHMP5)が検出された。これらは複合体を形成して機能すると推測されており、このことから CASK が ESCRT 複合体の一部として機能する可能性が考えられる。

CASK が細胞膜受容体のエンドサイトーシスに関与するとの報告はあるが、ESCRT との関係はこれまでに報告がなく、CASK が未知の膜輸送に関与し、結果として内耳機能に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

核内タンパク質 - SAF-B1, SP120, MOV10, hnRNP M, ASF/SF2 といった核内分子を共沈物中に検出した。これまでに CASK が核内において転写活性の調節に関与するとの

報告があり、また申請者らは CASK が内耳神経の核内に発現していることを見いだしていることから、CASK がこれらの分子と複合体を形成し、転写制御などの機能を有する可能性が考えられる。これまでのところ、SP120については免疫染色法により、マウス内耳神経の核内に発現していることが認められた。これらの結果から、内耳神経で CASK が SP120 の機能に関与する可能性が示唆された。

### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 本田晶 「CASK function in the inner ear」日本分子生物学会、2011年12月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

2. 喜多知子 「多機能タンパク質 CASK の内耳における分子機能解析」日本耳科学会年会、2011年11月24日、沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

本田 晶 (HONDA AKIRA)  
独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究チーム・研究員  
研究者番号：50443023

#### (2) 研究分担者

喜多 知子 (KITA TOMOKO)  
独立行政法人理化学研究所・感覚器官発生研究チーム・研究員  
研究者番号：20362519

#### (3) 連携研究者

なし