

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689069

研究課題名(和文) アクチン構造様式に着目した難聴の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) To reveal the molecular mechanism of deafness from the point of actin cytoskeleton

研究代表者

北尻 真一郎 (Kitajiri, Shin-ichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00532970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000円、(間接経費) 6,360,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト遺伝性難聴の責任遺伝子として、アクチン動態に関わる分子“TRIOBP”同定した。このTRIOBPには、-1、-4、-5の3種のアイソフォームが存在する。蛍光ゲル濾過法によりアイソフォーム間のホモ多量体およびヘテロ多量体を形成することを見出し、TRIOBPは複合体として機能している事が示された。また抗TRIOBP抗体を用いた免疫沈降反応にて、様々な分子がTRIOBPに結合する事が示され、TRIOBP複合体により内耳が機能していると考えられる。またアイソフォーム特異的ノックアウトマウスを作成した。これによりアイソフォーム間での機能の違いが浮き彫りとなる。

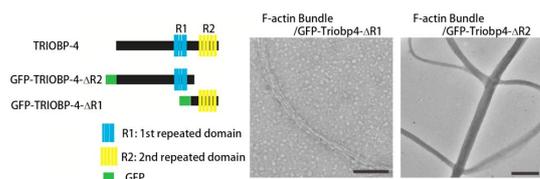
研究成果の概要(英文)：We have identified TRIOBP, a structural molecule as a response molecule to harmonize actin cytoskeleton in the hair cells of the inner ear. Especially, TRIOBP is necessary to generate rootlets of hair cell stereocilia, the actin based protrusion that detect the sound stimuli and transduce. There are three kinds of isoform of this molecule, and we are investigating of the isoform specific function. Fluorescence-detection size-exclusion chromatography and immunoprecipitation showed us the existence of TRIOBP complex on each isoform. Moreover, we have generated the isoform specific knock out mice model. We have just starting the characterization, and this would be the best model to look into the function of each isoform in vivo.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学 難聴 アクチン 不動毛 聴覚

イオン結合、R2 は疎水結合と、それぞれ異なる様式でアクチンと結合しており、R1 がアクチン束に新たなアクチンを捕捉して束を太くするのに対し、R2 はその束の中でのアクチン間接着を強めるという機構が明らかとなった(下図: T4 部位欠損変異体によるアクチン束化の電子顕微鏡像)。T4 以外のアイソフォームも可溶性に成功し同様の実験を開始している。



(3) T1 および T5 のアイソフォーム特異的な K0 マウスの作製を進めている。T1/T5 K0 マウスは胎生致死であったため、T1 K0 マウスも胎生致死であると考えられる。これはすでに内耳特異的 Cre マウスと交配中である。T5 特異的 K0 マウスはすでに得られており、高度難聴を示している。この表現形解析は T4/5 K0 と併せて、T4 および T5 の機能の違いや協働が明らかとなる。

また、GFP 融合 T4 (T4-GFP) を発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。このマウスにより生体内での局在やターンオーバーの解析が可能となった。

(4) T4/5 K0 の内耳器官培養へ T5 を導入する (T4 特異的機能の解明)、またヒト変異遺伝子を導入する (ヒト難聴の病態解明) アデノウイルスベクターの作製に成功した。これにより、より深く TRIOBP の機能にせまる事ができる。

(5) T1 はアクチン動態を制御する GEF である巨大分子 Trio(340kD)と直接結合する。これは内耳において他の分子を含む複合体を形成している可能性が高い。そこで T1 を認識する抗体を用いた内耳組織の免疫沈降を行った。その結果、複数の、アクチン結合タンパク質、細胞骨格関連分子、およびセカンドメッセンジャー (Ankycorbin、Uaca、Protein phosphatase1 regulatory subunit、Phosphodiesterase) などを同定した。本研究では、これらの内耳での機能を解析し、内耳でのアクチン動態を包括的に検証する。また、面白いことに元々不動毛の先端 (Tip) に局在するタンパク (Pcdh15, Fgfr1) が T4/T5dK0 マウスの内耳では、いずれもの不動毛の基底部分への局在に変わることが分かった。これは TRIOBP が、不動毛の先端へ局在する分子を選択している Gate Keeper である可能性を示している。

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 7 件)

1 Kumeta, M. ;Gilmore, J. L. ;Umeshima, H. ;Ishikawa, M. ;Kitajiri, S. ;I. ;Horigome, T. ;Kengaku, M. ;Takeyasu, K, Caprice/MISP is a novel F-actin bundling protein critical for actin-based cytoskeletal reorganizations, *Genes Cells*. 査読あり、2014 Apr;19(4):338-49

2 Tona, Y. ;Sakamoto, T. ;Nakagawa, T. ;Adachi, T. ;Taniguchi, M. ;Torii, H. ;Hamaguchi, K. ;Kitajiri, S. ;Ito, J. 査読あり、In vivo imaging of mouse cochlea by optical coherence tomography, *Otol Neurotol*. 査読あり、2014 Feb;35(2):e84-9.

3 Bao J, Bielski E, Bachhawat A, Taha D, Gunther LK, Thirumurugan K, Sakamoto T, Kitajiri S, R1 motif is the major actin-binding domain of TRIOBP-4, *Biochemistry*. 査読あり、2013 Aug 6;52(31):5256-64.

4 Tomohito Higashi, Shinsaku Tokuda, Shin-ichiro Kitajiri, Sayuri Masuda, Hiroki Nakamura, Yukako Oda, Mikio Furuse, Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis *J Cell Sci*. 査読あり、2013 Feb 15;126(Pt 4):966-977.

5 北尻真一郎、伊藤壽一、アクチン構造様式に着目した、難聴の分子メカニズム解明、*日本耳科学会誌*、査読なし(依頼原稿) 2012年12月 第22巻 5号:905-910頁

6 Atsuhiko Yoshida, Shin-ichiro Kitajiri, Takayuki Nakagawa, Kento Hashido, Takatoshi Inaoka, Juichi Ito, Adipose tissue-derived stromal cells protect hair cells from aminoglycoside, *Laryngoscope*, 査読あり、2011 Jun;121(6):1281-6.

7 Nakin Angunsri, Akiko Taura, Takayuki Nakagawa, Yushi Hayashi, Shin-ichiro Kitajiri, Eigo Omi, Kazuo Ishikawa, Juichi Ito, Insulin-like growth factor 1 protects vestibular hair cells from aminoglycosides, *Neuroreport*. 査読あり、2011 Jan 5;22(1):38-43.

[学会発表](計 8 件)

1 Tatsuya Katsuno, Shin-ichiro Kitajiri,

Kazuya Ono, Kohei Segawa, Juichi Ito,
TRIOBP-5 (T5) Knockout Mouse Generation
and Initial Characterization of Its
Phenotype, ARO The 37th Annual MidWinter
Meeting. Feb 22 - Feb 26, 2014. USA, San
Diego, California (Manchester Grand
Hyll)

2 Shohei Ochi, Akiko Taura, Shin-ichiro
Kitajiri, Takayuki Nakagawa, Juichi Ito,
Hair Cell-Like Cells Induced from IPS
Cells Using Mouse Utricle Tissues, ARO The
37th Annual MidWinter Meeting. Feb 22 -
Feb 26, 2014. USA, San Diego, California
(Manchester Grand Hyall)

3 中國 正祥、北尻 真一郎、谷口 美玲、岡
野 高之、村上 裕美、関根 章博、柴田 有花、
土屋 未央、小杉 眞司、先天性難聴の遺伝子
診断における症例調査、日本人類遺伝学会第
58 回大会。平成 25 年 11 月 20 日~23 日。
宮城県仙台市。(江陽グランドホテル)

4 小杉眞司、村上裕美、鳥嶋雅子、三宅秀彦、
和田敬仁、北尻真一郎、山田重人、平家俊男、
遺伝子診療情報の電子カルテ上での共有に
ついて、日本人類遺伝学会第 58 回大会。平
成 25 年 11 月 20 日~23 日。宮城県仙台市。
(江陽グランドホテル)

5 渡辺智子、中山健夫、沼部博直、北尻真一
郎、柴田有花、土屋実央、中國正祥、黄瀬恵
美子、袴田しのぶ、鳥嶋雅子、村上裕美、小
杉眞司、新生児聴覚スクリーニングの有効性
評価：分析的枠組み (Analytic Framework)
に基づく文献的検討、第 37 回日本遺伝カウ
ンセリング学会学術集会。平成 25 年 6 月 20
日-23 日。神奈川県川崎市。(川崎市産業
振興会館)

6 北尻真一郎、伊藤壽一、ヒト遺伝性難聴の
原因遺伝子 ILDR1 および近類遺伝子 ILDR2 と
LSR の内耳での局在、第 114 回日本耳鼻咽喉
科学会総会・学術講演会。平成 25 年 5 月 16
日-18 日。札幌市。(ロイトン札幌)

7 北尻真一郎、内耳でのアクチン骨格形態制
御と聴覚への関与、第 85 回日本生化学会大
会。シンポジウム「細胞形態形成の分子メカ
ニズム」(招待講演)。平成 24 年 12 月 14 日
-16 日。福岡市。(福岡国際会議場)

8 Tomohito Higashi, Shin-ichiro Kitajiri,
Mikio Furuse, ILDR1 and ILDR2 recruit
tricellulin to tricellular tight
junctions, Joint Meeting of The 45th Annual
Meeting of the Japanese Society of
Developmental Biologists & The 64th Annual

Meeting of the Japan Society for Cell
Biology, May 28 - 31, 2012. Kobe.
(Kobe International Conference Center)

〔図書〕(計 2 件)

1 Koji Nishimura, Shin-ichiro Kitajiri,
et al, Nova Science Publishers, Inner Ear
Development and Hearing Loss. 2013 年 1 月:
p183-188.

2 北尻真一郎 他、メディカル ドゥ、遺伝
子医学 MOOK 22 号、2012 年 7 月 25 日:
p121-126.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
北尻 真一郎 (KITAJIRI, Shin-ichiro)
京都大学大学院・医学研究科・助教
研究者番号:00532970

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
伊藤 壽一 (ITO, Juichi)
京都大学大学院・医学研究科・教授
研究者番号:90176339

勝野 達也 (KATSUNO, Tatsuya)
京都大学大学院・医学研究科・特定研究員
研究者番号:90527665