

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82609

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890253

研究課題名（和文） マウス順遺伝学的解析に基づく不動毛形成に関与する遺伝子同定と分子間相互作用の解明

研究課題名（英文） Responsible gene identification and elucidation of molecular interaction to participate in the stereocilia formation based on mouse forward genetics

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

研究成果の概要（和文）：難聴モデルマウスの研究成果はヒトの難聴原因遺伝子の同定に大きく貢献している。本研究は、行動異常および完全難聴を示す *ksw* (Kumamoto shaker/walzer) の発症原因遺伝子が Myosin VI であることを明らかにした。内耳不動毛の表現型は既知のモデルマウスと類似しているが、発現解析によって、部分的なスプライシング異常を示すこと、異なった局在および部位特異的な発現の低下・欠損を示すことが明かとなり、新たな不動毛形成メカニズムの知見を得る可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Mouse genetics research has made important contributions to the understanding of the molecular mechanisms of hearing. In this study, we have identified a missense mutation in Myosin VI in Kumamoto shaker/waltzer mouse. The mutation induced partial and incomplete splicing errors. Moreover, by immunofluorescence analysis, MYO6 was disappeared from cuticular plates and was detected the mislocalization in the fused stereocilia bundles. These results suggested possibility with observation of new stereocilia formation mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：哺乳類遺伝学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉頭科学

キーワード：遺伝学、遺伝子、ゲノム、遺伝性難聴、難聴モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

難聴はヒトにおいてありふれた感覚器障害であり、10人に約1人は生涯を通じて難聴もしくは音が聞こえにくくなる症状を示し

(Nadol, *N. Engl. J. Med.* 1993)、世界中の約2億5000万人が聴覚障害に悩まされている (Brown *et al. Nat. Rev. Genet.* 2008)。そのうち先天性難聴はヒト新生児の

1,000~2,000 人に 1 人と高頻度に出現し、特に、言語障害も併発することから重篤な遺伝子疾患として位置付けられている。また、先天性難聴の原因は環境要因である外傷、騒音、薬剤、ウイルスなど様々な要因が関与しており、中でも、その半数は聴覚系で機能する遺伝子に生じた突然変異による遺伝性難聴であることが推定されている (Bamford *et al. Health Technol. Assess.* 2007)。加えて、聴覚系器官には外耳、中耳、内耳、聴覚神経および聴覚中枢に大別されるが、そのうち、遺伝性、重度難聴の原因の多くは内耳の障害であると考えられ、特に、外界から受容した音刺激を電気信号にシグナル変換するために機能する有毛細胞の異常をもつ患者がその大半を占めている。このような先天性の有毛細胞の不動毛形成の遺伝的要因の多くは長年に渡って不明であったが、1990 年代後半から数多くの不動毛形成異常を示すヒト難聴に関連する突然変異が同定され、現在では有毛細胞障害の原因となる約 30 種の遺伝子において突然変異が同定されている (Hereditary Hearing Loss Homepage: <http://hereditaryhearingloss.org/>)。

ヒト難聴遺伝子の同定には、動物モデル、特に、聴覚障害を示す難聴モデルマウスの貢献が大きい。これまでに同定されたヒト難聴遺伝子は不動毛形成異常を示すモデルマウスを用いた先行研究に基づいて単離されたものが半数以上を占める。加えて、ヒト・マウス間の聴覚系器官構造は極めて類似しており、有毛細胞および不動毛形態も保存されていることから、モデルマウスはヒトでは困難である有毛細胞の病態を把握するためにも貴重な代替動物となっている。従って、このような感覚毛形成異常を示すモデルマウスを樹立することは今後の聴覚研究において医学的および分子生物学的にも大きな意味をもっている。我々は新たに熊本大学においてトランスジェニックマウス作成の過程で発見された、首振り、旋回運動などの *shaker/waltzer* 様行動を示すマウス突然変異体を入手した。このマウスは有毛細胞上の感覚毛が異常形態を示し、さらに脳幹刺激反応 (Auditory brainstem response: ABR) 検査を行った結果、聴力が欠損していることが明らかとなった。また、交配実験の結果、トランスジェネシスによる導入遺伝子の表現型への影響はなく、単一の劣性突然変異により行動異常・難聴を発症することが明らかとなり、現在、*Kumamoto shaker/walzer (ksv)* マウスと命名し系統化に着手した。

2. 研究の目的

本研究は、*ksv* マウスの突然変異をポジショナルクローニングにより同定し、発症原因遺伝子を明らかにすることを主要な研究目

的とした。また、*ksv* マウスの表現型解析、異なった遺伝的背景への *ksv* 変異導入および既存の不動毛形成異常マウスとの交配実験によるマウス順遺伝学的アプローチに加えて、同定した遺伝子およびコードする蛋白質の局在・発現解析およびタンパク質相互作用解析を行い、分子機能の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ポジショナルクローニング

①連鎖解析

ksv ホモ個体と遺伝的背景が大きく異なる日本産野生マウス由来である *JF1* と交配し、得られた *F1* マウスに *ksv* ホモ個体を戻し交配することにより *N2* 個体を作成した。*N2* 個体の表現型は行動異常の有無により判定し、表現型を判定した *N2* 個体から DNA を抽出し、全染色体をカバーするマイクロサテライトマーカーを配置後、DNA タイピングを実施し、連鎖解析を実施した。

②突然変異の探索

連鎖解析により得られた候補領域に存在する発現遺伝子の翻訳領域の塩基配列を野生型と *ksv* マウス間で決定・比較することにより突然変異を探索した。

③原因遺伝子の発現解析

ksv マウスの原因遺伝子の発現を RT-PCR で調査した。また、原因遺伝子をコードするタンパク質の抗体を入手または作成し、ウェスタンブロットによる発現解析および免疫組織染色により内耳有毛細胞における局在を調査した。

④不動毛形成に機能する分子間相互作用の解析

分子間相互作用の解析のファーストステップとして、同定した *ksv* マウスの原因遺伝子との相互作用が示唆されているタンパク質であり、ヒト非症候群性難聴 *DFNB84* の原因遺伝子である Protein tyrosine phosphatase receptor Q (PTPRQ) に着目し、特異的抗体を作成し、免疫組織染色でその局在性を調査した。

(2) 表現型解析

①不動毛の形態観察

ksv マウスの不動毛の形態を生後からの成熟までの発生ステージごとにファロイジン染色により視覚化および走査型電子顕微鏡による感覚毛の形態観察を実施した。

②聴力測定

B6 および *C3H* の遺伝的背景に *ksv* 変異をヘテロで導入した個体の聴力を 4, 8, 16 および 32 kHz の音域について ABR により測定

し、調査した。この測定は第8世代から開始した。

4. 研究成果

(1) ポジショナルクローニング

①連鎖解析

ksv 突然変異の表現型解析を行なった結果、内耳有毛細胞の不動毛形態異常が認められ、成熟した個体のほとんどの有毛細胞において不動毛の欠損が認められた。また、残存している不動毛の形態は、野生型と比較して、巨大化、融合および伸長が認められた。この表現型は既に報告されている Myosin VI 突然変異体の不動毛形態に極めて類似していた。

次に、*ksv* 変異の染色体マッピングを行った結果、第9番染色体にマップされ、その非組み換え領域にはヒト難聴（非症候群性難聴、DFNA22 および DFNB37）および *ksv* マウスと類似した表現型を示す Snell's waltzer (*sv*) マウスの責任遺伝子である Myosin VI が存在していた。

②突然変異の探索

ksv ホモ個体と MYO6 欠損マウスである Rinshoken Shaker/Waltzer マウスのヘテロ個体との交配によるアレイズムテストを実施した結果、21頭のF₁のうち9頭が Shaker/Waltzer 行動を示したことから *ksv* は *Myo6* 突然変異の一つのアレルである可能性が強く示唆された。次に、*ksv* マウスの *Myo6* の塩基配列を決定し、野生型と比較した結果、第13エクソンの末端にミスセンス変異 (G1381A) が検出され、この変異によってモータードメインの哺乳類から線虫まで高度に保存されたグルタミン酸がリジンに置換していた。

③原因遺伝子の発現解析

ksv 突然変異は第13エクソンのスプライシング供与部位近傍に存在しており、RT-PCR によって *Myo6^{ksv}* マウス特異的なスプライシングアイソフォームの出現が確認された (図1)。次に MYO6 の C 末端側をエ

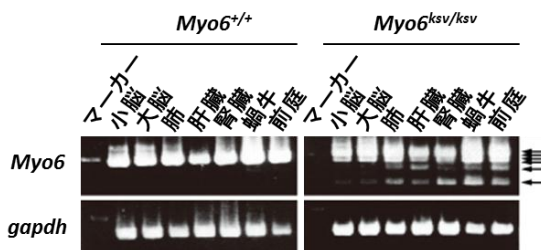


図1. RT-PCRによる各組織におけるMyo6の発現比較。*Myo6^{ksv/ksv}*は不完全で部分的なスプライシング異常を示す。

ピトープとする抗 MYO6 抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、野生型内耳の

発現と比較して、*Myo6^{ksv}* マウスにおける MYO6 発現量は 70%の減少が認められた。さらに、RT-PCR で認められた *Myo6^{ksv}* マウス特異的なスプライシングアイソフォームはタンパク質レベルでは検出できなかった。次に、同様の抗体を用いて内耳有毛細胞の免疫組織染色を実施した。野生型マウスの有毛細胞における MYO6 の局在は、有毛細胞形成過程においてユビキタスな局在を示した。さらに、不動毛と細胞体との結合部であるクチクラプレートに強く発現し、特にその周縁領域でより強い蛍光強度のシグナルが検出された。一方、*Myo6^{ksv}* マウスにおいては、MYO6 の周縁領域の局在は維持されていたが、クチクラプレートでの発現はほぼ欠損し、対照的に野生型では認められない不動毛の散在的な強いシグナルも検出された (図2)。

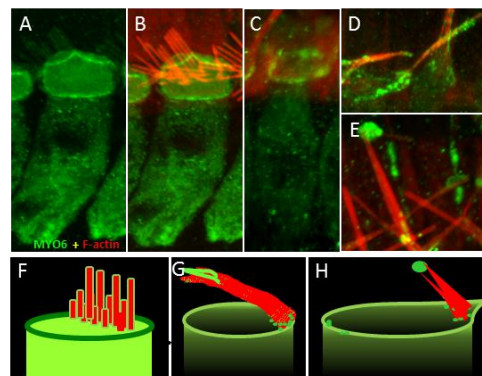


図2. 抗MYO6抗体を用いた蝸牛有毛細胞の免疫染色。A, B. *Myo6^{+/+}*. C-E. *Myo6^{ksv/ksv}*. F-H. *Myo6^{+/+}*および *Myo6^{ksv/ksv}*におけるMYO6発現分布の模式図。*Myo6^{ksv/ksv}*は散在したMYO6の発現が認められた。

これら結果から、*Myo6^{ksv}* マウスの不動毛形成異常は、アミノ酸置換よりむしろスプライシング異常によるものと推察された。また、*Myo6^{ksv}* マウスが部分的で不完全な *Myo6* のスプライシング異常を示したこと、MYO6 の発現が異なった局在および部位特異的な低下・欠損を示したことに加え、先行実験により野生型マウスにおいて複数の MYO6 アイソフォームが検出されていることから、内耳有毛細胞には、複数の MYO6 アイソフォームが局在し、*Myo6^{ksv}* マウスの変異によってクチクラプレート特異的に局在するアイソフォームの発現が低下・欠損することによって不動毛形成異常が生じることが示唆された。

④不動毛形成に機能する分子間相互作用の解析

我々が着目した PTPRQ は内耳有毛細胞における基底部に局在し、不動毛維持に貢献している。一方で *Myo6^{sv}* マウスにおいては不動毛全体に局在することが報告されている。そこで *Myo6^{ksv}* マウスでの局在を調査した結果、*Myo6^{sv}* マウスと同様の結果が得られた

(図3)。これらの結果は我々が示唆したMYO6

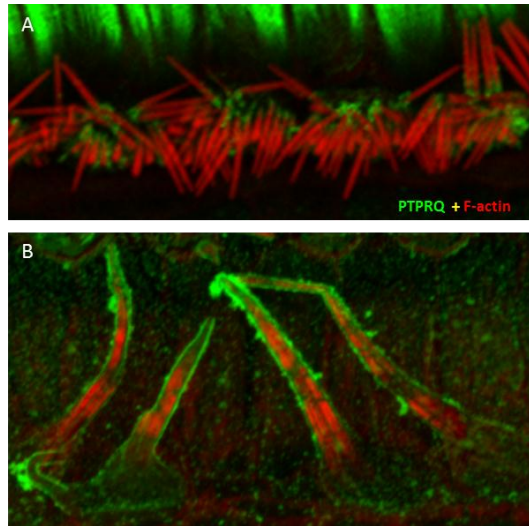


図3. 抗PTPRQ抗体を用いた蝸牛有毛細胞の免疫染色。
A. *Myo6*^{+/+}. 不動毛基底部分での局在を示す。
B. *Myo6*^{ksv/ksv}. 不動毛を覆うような局在を示す。

アイソフォームの存在を裏付ける結果となる可能性を示唆しており、現在、直接的な相互作用の有無、もしくは両者を繋ぐバインディングパートナーとなる分子を探索中である。また、PTPRQにおいてもスプライシングアイソフォームの存在が報告されており、内耳蝸牛において発現するPTPRQアイソフォームの詳細な解析の必要性も示唆した。

(2) 表現型解析

① 不動毛の形態観察

Myo6^{ksv} マウスの不動毛は巨大化、融合および伸長を示す。そこで、その表現型を発生初期から成熟期まで観察した結果、生後0日齢において正常な形成を示しており、その後進行的に不動毛が融合し、成熟に伴って伸長および脱落が認められた。従って、*Myo6*^{ksv} マウスの突然変異は不動毛形態の維持に必要な機能をもつことが示唆された。

② *Myo6*^{ksv/+} マウスの聴力測定

第8世代のB6遺伝的背景における*Myo6*^{ksv/+}マウスの聴力をABRで調査した結果、興味深いことに、調査した4, 8, 16および32 kHzのすべての音域で早発性の難聴を示し、特に、4および32kHzについては4ヶ月齢でほぼ完全難聴を示すことが明らかとなり、現在、C3H遺伝的背景における*Myo6*^{ksv/+}の聴力に与える影響を調査している。

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)

[学会発表] (計3件)

① 関 優太：内耳有毛細胞の stereocilia 形成・維持に異常を示す2つの Myosin VI 突然変異アレルの同定. 第26回モロシヌス研究会. 2012. 6.15, 東京大学

② 関 優太：内耳有毛細胞の不動毛形成・維持に必要な Myosin VI アイソフォームの存在.

日本実験動物科学・技術九州2012(第59回日本実験動物学会総会、第46回日本実験動物技術者協会総会). 2012. 5. 24, 別府国際コンベンションセンター

③ 関 優太：行動異常および難聴を示す新規マウス突然変異体の原因遺伝子の同定. 北海道実験動物研究会・日本実験動物技術者協会北海道支部 合同学術集会 2011.7.9, 北海道大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/mammal/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし