

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592571

研究課題名(和文)内耳組織に発現する多機能タンパク質CASKの分子機能解析

研究課題名(英文)Function of multidomain protein CASK 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・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：50443023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：難聴遺伝子であるcalcium/calmodulin-dependent serine kinase (CASK)の内耳における機能を探るため、CASKコンディショナルノックアウト (ckO) マウスを作成し、CASK欠失の内耳への影響を調べた。その結果、CASK ckOマウスでは主に、蝸牛神経の細胞数の減少が見られた。蝸牛神経において、この細胞数の減少はI型、II型の神経細胞の減少によるものと考えられた。CASK ckOマウスの聴覚機能検査においても、蝸牛神経の異常を支持する結果が得られたことから、CASKは主に蝸牛神経に発現し、神経細胞の維持に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the function of CASK in the inner ear, a CASK conditional knockout (ckO) mouse was analyzed. The analysis revealed that the number of the type I and II neuronal cells in the spiral ganglion neurons was greatly reduced. The functional analysis of the inner ear of CASK ckO mouse also supported the idea of disfunction of spiral ganglion neurons. Together with these results it is suggested that CASK expresses in the spiral ganglion neurons and has a critical role in maintaining these cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：CASK 内耳神経 有毛細胞 内耳 コンディショナルKOマウス

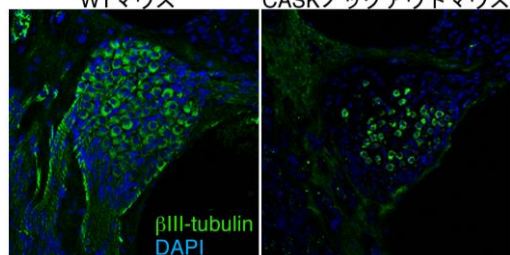
1. 研究開始当初の背景

聴覚の正常な機能は、内耳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神経細胞、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 protein kinase) は、カルモジュリンキナーゼ (CaMK)、グアニル酸キナーゼ (GK) ドメインの他に、タンパク質同士の結合モチーフである L27, PDZ, SH3 などの特徴的なドメイン構造を持つ (図1)。MAGUK は多くの場合、多タンパク質複合体を形成し、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想定されている。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。

現在までのところ、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 (J Med Genet., 2011, 48, 741-751)、マウス有毛細胞感覚毛に CASK が局在し、感覚毛形成の必須分子 Whirlin と結合すること (PNAS., 2006, 103, 10973-8) が他の研究グループから報告されており、CASK が内耳で重要な機能を果たしている可能性が示唆されているが、その具体的な機能については不明である。これまで申請者らは、ニワトリとマウス内耳組織において、CASK が有毛細胞のみならず、蝸牛神経にも発現していること、また CASK コンディショナルノックアウトマウス (CASK cKO マウス) では生後7週以内に蝸牛神経細胞数

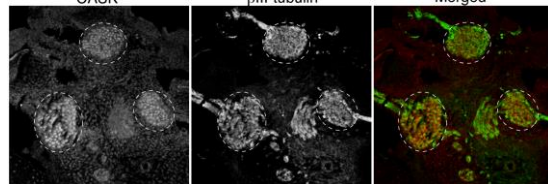
図2 CASKノックアウトマウスでは神経細胞が減少する



の顕著な減少が認められることを見いだしている (図2)。

これまでに申請者らが行った内耳切片の免疫染色実験から、CASK が内耳において広範囲でダイナミックな発現パターンをとることが明らかになった。すなわち、初期にはその発現は内耳神経に限局されるが (図3)、

図3 マウス蝸牛神経に発現するCASK (神経細胞体を点線で囲った)



内耳形成が進行するにつれ、有毛細胞、血管条へと発現領域が拡大する。以上より、CASK は内耳での聴覚機能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

これまでの申請者らの研究により、CASK が発現している可能性が高いとされた蝸牛神経細胞、血管条辺縁細胞、および有毛細胞における CASK の機能をより詳細に解析する。

3. 研究の方法

①In situ ハイブリダイゼーション法による CASK の発現時期と発現部位の特定、および  
 ②免疫染色法による細胞内局在の解析。また  
 ③CASK cKO マウスを用いた蝸牛神経と血管条および有毛細胞の形態学的な解析を行う。さらに、  
 ④CASK cKO マウスの聴覚機能検査を行なう。  
 ⑤前年度までの実験で、ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれる細胞内輸送に関与する一群のタンパク質が、マウス内耳組織を用いた CASK 免疫沈降物中から同定されている。CASK が ESCRT と複合体を形成して細胞内輸送に関与する可能性を探るため、マウス cDNA ライブラリーよりクローニングした CASK と ESCRT の発現ベクターを作成し、両者を培養細胞に発現させてその複合体形成を確認する。

4. 研究成果

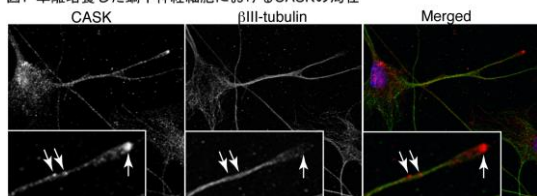
①In situ ハイブリダイゼーションの結果、マウスでは E13.5 で蝸牛神経に CASK の発現が認められ、さらに E17.5 では蝸牛神経と感覚上皮にも強い発現が見られた。両者の発現は P3 まで続いた。この結果は免疫染色法で得られた結果と矛盾無く一致する。その一方で、以前に免疫染色法で CASK が発現している可能性が高いとされた血管条辺縁細胞では、CASK mRNA の存在は確認できなかった。以上の結果から、CASK が発生段階のマウス蝸牛神経と感覚上皮 (おそらく有毛細胞) に発現し、特に蝸牛神経では、神経が形成される

かなり初期の段階からCASKが発現していることが明らかとなった。この結果から、CASKが蝸牛神経発生に参与している可能性が高いと考えられた。

②数種類の抗CASK抗体を用いて、免疫染色法により蝸牛神経細胞および有毛細胞におけるCASKの細胞内局在を調べたが、いずれも鮮明な染色像を得ることはできず、よってCASKが局在する細胞内オルガネラを特定するまでには至らなかった。

③すでに申請者らは、CASK欠失により蝸牛神経細胞の減少が見られることを見いだしている。この減少は平均して15%程度であり、蝸牛神経に占めるII型神経細胞の割合と一致することから、CASK KOマウスではII型神経細胞が特異的に減少しているのではないかと考えられた。しかしながら、II型神経細胞のマーカーであるペリフェリンに対する特異的抗体を用いてCASK KOマウスの蝸牛神経を免疫染色した結果、コントロールと比較して特にII型神経細胞が減少している結果は得られなかった。以上の結果から、I、II型の神経細胞がともにCASK欠失の影響を受けている可能性が高いと考えられる。またこれまでの申請者らの研究から、単離した蝸牛神経細胞でCASKが神経軸索に局在することが見いだされている(図1)。今回、CASK cKOマウスの蝸牛神経軸索を抗ニューロフィラメント抗体で免疫染色した結果、特に外有毛細胞へ接合する神経軸索の明らかな減少が認められた。以上の結果から、CASKが神経軸索の伸長に参与する可能性が考えられる。

図1 単離培養した蝸牛神経細胞におけるCASKの局在



CASK cKOマウスの血管条の形態をコントロールと比較した結果、CASK cKOマウスの血管条に特に異常な点は認められず、コントロールと比較しても有意な差は認められなかった。この結果と先のin situハイブリダイゼーションの結果とを合わせて考えると、以前に免疫染色法で認められた血管条辺縁細胞におけるCASKの発現は偽陽性であった可能性が高い。

CASK cKOマウスでは外有毛細胞数が減少することが明らかとなった。しかしながら、残された外有毛細胞の感覚毛に形態学的な異常は認められなかった。2013年、Knipperらのグループにより、外有毛細胞でCASKが細胞膜ジャンクションの機能に参与することが報告された(Histochem Cell Biol., 2013, 140, 119-35)。そこでCASK欠失による外有毛細胞機能障害の可能性が考えられたため、

歪成分耳音響放射を測定し、コントロールとCASK cKOマウスとで外有毛細胞の機能を調べた。予想と反し、コントロールとCASK cKOマウスの両者で有意差は認められなかった。

④CASK cKOマウスの聴覚機能検査(聴性脳幹反応検査)において、蝸牛神経を起源とするピークIに有意な異常が認められた。以上の結果から、CASKが蝸牛神経に発現すること、そして神経細胞の発生または生存維持に重要であることが明らかとなった。

⑤培養細胞にCASKとESCRTとを共発現させ、免疫沈降実験を行なった結果、両者の結合は認められなかった。

## 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 1 件)

①喜多知子、CASK function in the inner ear, Inner Ear Biology Workshop, 2014年11月3日、国立京都国際会館(京都府京都市左京区宝ヶ池)

[図書] (計 0 件)

[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：  
出願年月日：  
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

本田 晶 (HONDA, Akira)  
独立行政法人理化学研究所  
多細胞システム形成研究センター・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

発生・再生科学総合研究センター・客員研究員 (平成 24 年度)

研究者番号 : 20362519

北尻 真一郎 (KITAJIRI, Shin-ichiro)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号 : 00532970