

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670715

研究課題名(和文) 蝸牛の回転ごとに発現する遺伝子スプライシングバリエーションの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of alternative splicing variants identified from tonotopical differences in the mouse cochlea

研究代表者

吉村 豪兼 (YOSHIMURA, Hidekane)

信州大学・医学部・助教(特定雇用)

研究者番号：10612997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛では頂回転側で低音を、基底回転側で高音を特異的に認識することが知られている。本研究では、蝸牛の回転ごとに発現する遺伝子およびスプライシング・バリエーションの網羅的解析を行い、その詳細を明らかにすることを目的にマウス蝸牛を用いた網羅的遺伝子解析を実施した。その結果、蝸牛の回転毎に異なるスプライシングバリエーションが認められるもののうち、有意水準に達する遺伝子は44種類認められた。これら44遺伝子には現在までに難聴の原因として報告されているOtogおよびStrcが含まれており、スプライシングバリエーションが難聴の聴力型に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mammalian cochlea is a spiral shaped auditory sensing organ, with the mouse cochlea forming 2.5 turns around its axis. This cochlear structure has an important role in the mechanism for distinguishing pitch (sound frequency). This mechanism were based on the synchronized vibration of the basilar membrane is thought to be caused by differences in the thickness and width of the basilar membrane. In this study, we performed exon level gene expression analysis using the previous cDNA microarray data to identify alternative splicing variants in specific regions of the cochlea. As a result, we identified cochlear turn specific alternative splicing variants in Otog, Strc, Tectb and Slc26a4 genes. This dataset will provide a valuable base for understanding the detailed mechanisms not only for specific frequency deterioration in cases of hearing loss but also those for normal hearing.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳 遺伝子発現 難聴

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、従来より日本人難聴患者の遺伝子解析を精力的に行っており、多くの原因遺伝子変異を見出し報告してきた。

非常に興味深い事に、日本人患者から同定された原因遺伝子である *WFS1* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*KCNQ4* 遺伝子 (Fukuoka et al., 2007, Iwasaki et al., 2002, Moteki et al., 2012, Akita et al., 2001) 変異による難聴では、それぞれ、低音障害型難聴、中音域障害型難聴、高音障害型難聴と特徴的な聴力像を示す。しかし、その特徴的な聴力像を呈す原因は定かになっておらず、発症メカニズムの解明が期待されている。

蝸牛では頂回転側で低音を、基底回転側で高音を特異的に認識することが知られている。しかし、*WFS1* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*KCNQ4* 遺伝子の発現に関しては、蝸牛の頂回転部分と基底回転部分において有意な差異はみられなかった (Sato et al. 2009) ことが報告されていた。したがって、特徴的な聴力像を呈するメカニズムとして遺伝子発現量が直接は関与しておらず、何らかのことなるメカニズムが関与することが示唆されていた。

2. 研究の目的

前項のように、低音障害型、中音域障害型、高温障害型の感音難聴を引き起こす原因遺伝子である、*WFS1*、*TECTA*、*KCNQ4* 遺伝子の発現が、蝸牛の回転毎に差が認められなかったことより、この違いの原因は遺伝子発現の量的な差異ではなく、オルタネイティブスプライシングバリエントなどの遺伝子の質的な違いにより生じるのではないかと考えた。そこで、本研究では、蝸牛の回転ごとのエクソンレベルでの網羅的遺伝子発現解析を行うことで、これらの特徴的な聴力型が生じるメカニズムを明らかとすることを目的とした。

特に難聴の原因遺伝子の一つである *KCNQ4* 遺伝子に関しては、マウスで4種類のスプライシング・バリエントが存在しており膜電位を維持する活性に差が認められている。また、4種類のうち最も活性の高いスプライシング・バリエントの発現が基底回転に限られることが報告されている (Xu et al., 2007; Beisel et al., 2005)。このようにスプライシング・バリエントを解析することにより、遺伝子の“質的な違い”を解析することが可能となり、原因遺伝子によって異なる聴力像を呈する難聴発症のメカニズムの解明につながるものと考え検討を行った。

3. 研究の方法

蝸牛の回転ごとに発現する遺伝子およびスプライシング・バリエントの網羅的解析を行う、特に、臨床像に特徴のある難聴の原因遺伝子 (*WFS1* 遺伝子、*TECTA* 遺伝子、*KCNQ4* 遺伝子など) に関しては詳細に検討を行うことを目的にマウス蝸牛を用いて検討を行った。具体的には、マウスを麻酔下におき、断

頭後すぐに内耳を摘出し RNA-later へ浸透させる。RNA-later 内にて蝸牛骨壁を除去し、蝸牛より回転ごとに膜迷路を取り出して、QIAGEN RNeasy Mini Kit を使用し total RNA を抽出する。Agilent 2100 bioanalyzer にて抽出した RNA のクオリティチェックを行い、SurePrint G3 Exon マイクロアレイを使用して全エクソンの発現パターンを調べることにより、網羅的スプライシング解析を行った。

さらに、蝸牛の回転毎に発現の異なるスプライシング・バリエントの存在を確認した遺伝子については、内耳における局在を明らかにすることにより、より詳細な機能が推定可能であるため、レーザーマイクロダイセクションによりその発現部位の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 蝸牛の回転毎に発現量の異なる遺伝子の同定

本研究では、まず初めにマウス蝸牛の頂回転 (低音)、中回転 (中音域)、基底回転 (高音) のサンプルより抽出した Total RNA を用いて、cDNA マイクロアレイ法により蝸牛の回転毎に発現量の異なる遺伝子の同定を試みた。また、発現量に差異が見られた遺伝子のいくつかに関しては、TaqMan 法を用いた定量 PCR を行い、遺伝子発現量の確認を行った。

その結果、24,547 遺伝子のうち 783 種類の遺伝子の発現が2倍以上変化していることが明らかとなった。

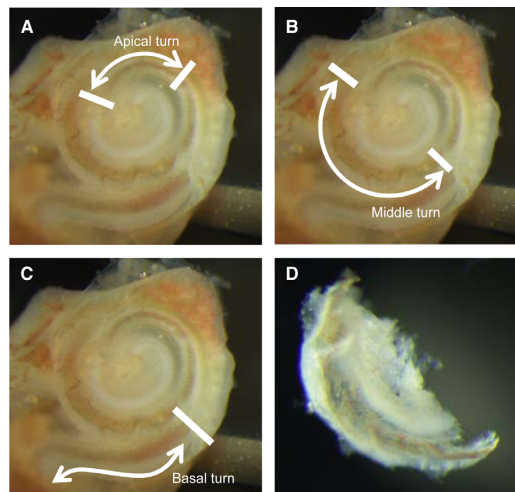


Figure 1. Microscopical image of the mouse cochlea (right ear). Bars indicate the incision points for each turn sample. A: apical turn, B: middle turn, C: basal turn, D: dissection example
doi:10.1371/journal.pone.0092547.g001

非常に興味深いことに、進行性の高音障害型の遺伝性難聴の原因遺伝子の幾つかはこれら発現量に差のある遺伝子群に含まれており、基底回転 (高音部) ほど遺伝子発現量が少ないことが明らかとなった。このことは、加齢に伴う遺伝子発現量の低下により、遺伝子産物が聴覚を維持する閾値よりも低くなり、高音部から難聴が発症し、徐々に進行していくという仮説と一致した結果であった。

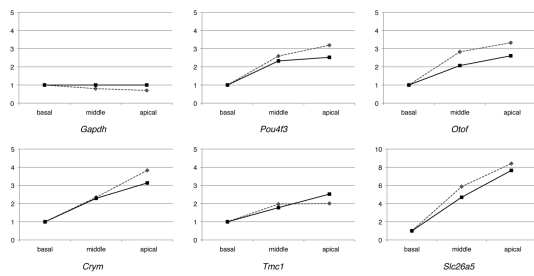


Figure 3. Gene expression patterns found by microarray analysis and quantitative RT-PCR. Values of each gene expression are indicated as a relative value to the basal turn. The expression level of each gene measured by microarray analysis (solid lines) was comparable with the level measured by quantitative RT-PCR (dotted lines). doi:10.1371/journal.pone.0092547.g003

(2) 蝸牛の回転毎に異なるスプライシングバリエーションを生じる遺伝子の同定

次に、マイクロアレイ解析で得られたデータをもとに、各エクソン毎の遺伝子発現量をzスコア化し、転写産物の中で比を算出することで、スプライシングインデックスを計算する手法を用いて、蝸牛の回転毎に異なるスプライシングバリエーションを生じる遺伝子の同定を試みた。

その結果、蝸牛の回転毎に異なるスプライシングバリエーションが認められるもののうち、有意水準に達する遺伝子は44種類認められた。

これら44遺伝子のうち、OtogおよびStrcに関しては、現在までに難聴の原因として報告されており、スプライシングバリエーションが難聴の聴力型に関与する可能性が示唆された。

図 Otog 遺伝子のスプライシングパターン

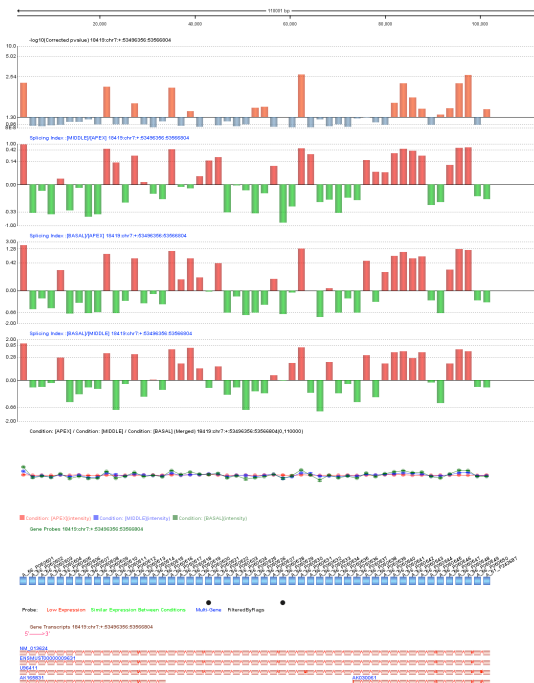
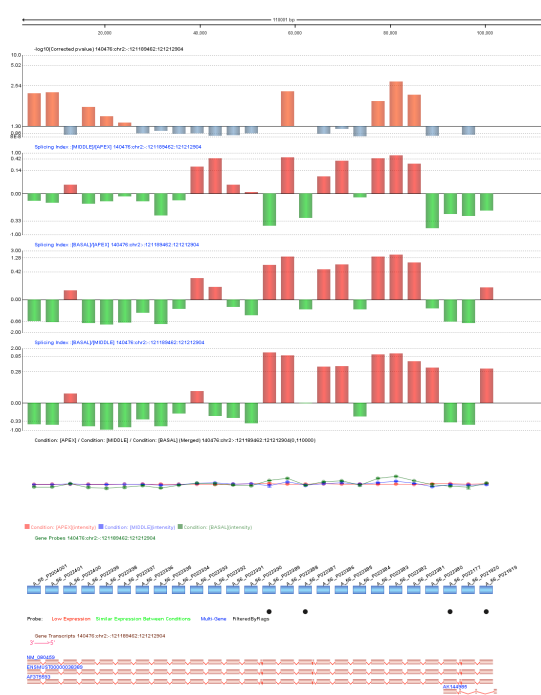


図 Strc 遺伝子のスプライシングパターン



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 Yoshimura H, Miyagawa M, Kumakawa K, Nishio SY, Usami S. Frequency of Usher syndrome type 1 in deaf children by massively parallel DNA sequencing. J Hum Genet. 2016;61(5):419-22. 査読有 doi: 10.1038/jhg.2015.168.

② Nishio SY, Hattori M, Moteki H, Tsukada K, Miyagawa M, Naito T, Yoshimura H, Iwasa Y, Mori K, Shima Y, Sakuma N, Usami S. Gene expression profiles of the cochlea and vestibular endorgans: localization and function of genes causing deafness. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2015;124 Suppl 1:6S-48S. 査読有 doi: 10.1177/0003489415575549.

③ Yoshimura H, Hashimoto T, Murata T, Fukushima K, Sugaya A, Nishio SY, Usami S. Novel *ABHD12* mutations in PHARC patients: the differential diagnosis of deaf-blindness. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2015;124 Suppl 1:77S-83S. 査読有 doi: 10.1177/0003489415574513.

④ Moteki H, Yoshimura H, Azaiez H, Booth KT, Shearer AE, Sloan CM, Kolbe DL, Murata T, Smith RJ, Usami S. *USH2* caused by *GPR98* mutation diagnosed by massively parallel sequencing in

advance of the occurrence of visual symptoms. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:123S-8S. 査読有 doi: 10.1177/0003489415574070.

⑤ Yoshimura H, Oshikawa C, Nakayama J, Moteki H, Usami S. Identification of a novel *CLRN1* gene mutation in Usher syndrome type 3: two case reports. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124 Suppl 1:94S-9S. 査読有 doi: 10.1177/0003489415574069.

⑥ Yoshimura H, Takumi Y, Nishio SY, Suzuki N, Iwasa Y, Usami S. Deafness gene expression patterns in the mouse cochlea found by microarray analysis. *PLoS One*. 2014 Mar 27;9(3):e92547. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0092547.

⑦ Yoshimura H, Iwasaki S, Nishio SY, Kumakawa K, Tono T, Kobayashi Y, Sato H, Nagai K, Ishikawa K, Ikezono T, Naito Y, Fukushima K, Oshikawa C, Kimitsuki T, Nakanishi H, Usami S. Massively parallel DNA sequencing facilitates diagnosis of patients with Usher syndrome type 1. *PLoS One*. 2014;9(3):e90688. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0090688.

[学会発表] (計 3 件)

① Nishio S, Takumi Y, Usami S. Laser-capture micro dissection combined with next-generation sequencing analysis of cell type-specific deafness gene expression in the mouse cochlea. ARO 39th MidWinter Meeting. 2016. 2. 20-24. San Diego, California, USA

② 工 穰、西尾信哉、宇佐美真一. マウス蝸牛組織における難聴遺伝子の細胞特異的発現:レーザーキャプチャーと次世代シーケンサーによる解析. 第25回日本耳科学会. 2015. 10. 7-10. 長崎ブリックホール

③ Yoshimura H, Nishio S, Takumi Y, Iwasa Y, Usami S. Microarray Analysis of Tonotopic Gene Expression Patterns in the Mouse Cochlea. Inner Ear Biology Workshop. 2014. 11. 1-4. Kyoto, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 豪兼 (YOSHIMURA, Hidekane)
信州大学・医学部・助教 (特定雇用)
研究者番号: 10612997

(2) 連携研究者

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 70467166

宇佐美 真一 (USAMI, Shin-ichi)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 10184996