

厚生科学研究費補助金総括研究報告書
概要版

研究費の名称=厚生科学研究費補助金

研究事業名=厚生科学特別研究事業

研究課題名=分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

国庫補助金精算所要額（円）=38,880,000

研究期間=1998-2000

研究年度=1999

主任研究者名=喜多村 健（東京医科歯科大学）

分担研究者名=川上 潔（自治医科大学）， 米川博通（東京都臨床研究所）

研究目的=感音難聴の発症機構を解明する。そのために、難聴者を対象にして、難聴遺伝子である分子モーター遺伝子と耳の発生に関与するホメオボックス遺伝子の変異の有無、難聴発症前の症例においては遺伝子診断を行う。また、実験動物モデルにおいて分子モーターならびにホメオボックス遺伝子機能を解析し、分子モーター障害による難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを解明する。

研究方法=難聴遺伝子の同定には、原因不明の感音難聴症例、遺伝性非症候群性感音難聴家系の難聴者ならびに血縁者で協力が得られる症例を対象とする。非症候群性感音難聴（特発性両側性感音難聴を含む）の臨床的所見、遺伝子解析を研究している全国の臨床医、研究者で設立された共同研究機構（平成9年度に発足）に登録された症例も対象とする。遺伝性難聴家系の症例では、その遺伝形式を検討する。

対象症例ならびに血縁者で本研究に協力が得られる全員から末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出する。抽出したゲノム DNA を PCR により増幅する。PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、画像解析装置によりマイクロサテライト多型を検出する。次いで DNA マーカーを用いて、連鎖検定のコ

ンピュータープログラムを用いて、連鎖解析を行う。さらに、連鎖を認めた領域の近傍に位置する複数のマーカーを用いて、多点連鎖解析とハプロタイプ解析を行うことにより原因遺伝子座の領域を特定する。

ミトコンドリア 3243 変異症例である MELAS の剖検時に得られた側頭骨標本において、ミトコンドリア遺伝子変異と側頭骨病理を検討する。

遺伝子変異 *wri* マウスを十分なネブタール麻酔下で断頭し、脳組織を直ちに液体窒素にて冷却し、TaKaRa RNA PCR kitにて得られた poly-A RNA より RT-PCR を行い cDNA を得る。PMCA2 の塩基配列(GenBank No. AF053471)より 19 種類の primer を作製し、PCR 産物を精製後、自動蛍光シーケンサにて全塩基配列を決定する。ホモ接合体、野生型の塩基配列を専用プログラムで比較し、ホモ接合体における変異部位を同定する。各接合体、他系統のマウスより得たゲノム DNA を PCR 増幅し、*ValI* による制限酵素解析を行う。内耳膜迷路を実体顕微鏡下に摘出し、抗 Plasma Membrane Ca-ATPase 抗体(PMCA 抗体)を用いた共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織学的観察を行う。

内耳奇形マウスのジャクソンシェーカー (Jackson shaker: js) の原因遺伝子であるキネシン様タンパク質 DAK (Deafness-Associated Kinesin) の cDNA、および遺伝子の一次構造情報をもとに、ヒト・マウス間で保存されているキネシンモータードメイン部分に PCR プライマーを作製し、ヒトの BAC ライブラリーをスクリーニングする。マウス DAK とのホモロジーサーチを行い、ヒト DAK 遺伝子のエクソン部分を同定し、RT-PCR、5' race および 3' race 法を用いて、ヒト DAK に対する完全長 cDNA クローンの単離と全一時配列の決定を試みる。

マウス DAK 特異的プローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション、および DAK ペプチド抗体の作製と免疫組織学的検索により、DAK 蛋白の組織特異的発現を検討する。

Six4 遺伝子ノックアウトマウスの胎児および成体について、形態的観察を行う。また、ABR 法を用いて聴力検査を行う。*Eya1* 遺伝子の保存領域 *Eya* ドメインをベイトにマウス 11.5 日胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングする。陽性クローンはベイトとプレイを入れ替えてその相互作用が観察されたものを、真の陽性クローンとして引き続き解析する。

結果と考察= 難聴遺伝子において変異が同定されたものは、ミトコンドリア遺伝子 3243 変異、ミトコンドリア遺伝子 1555 変異、X 連鎖遺伝の DFN3 で POU3F4 遺伝子の 6 塩基の欠失、前庭水管拡大症例において、ヨウ素と塩素輸送因子である PDS 遺伝子の変異を認めた。

MELAS 症候群の側頭骨組織からミトコンドリア遺伝子変異 3243 を検出した。病理組織学的研究では、ミトコンドリア遺伝子変異による蝸牛血管条とラセン神経節細胞の変性を証明した。蝸牛内・外有毛細胞は比較的良好に保存されて

おり、ミトコンドリア遺伝子変異 3243 変異により、主として蝸牛血管条ならびに蝸牛軸において循環障害が生じて、特異な病理形態を呈する者と想定された。

内耳奇形の実験動物モデルとして、行動異常と難聴を呈する新しい内耳奇形マウス *Wriggle Mouse Sagami* を検討し、行動異常は優性遺伝、難聴は劣性遺伝で内耳障害は *neuroepithelial degeneration* であると確認した。原因遺伝子は、*Plasma Membrane Ca-ATPase type 2 (PMCA2)* で、ホモ接合体においては 1234 位のグアニンがアデニンに置換(G1234A)されていた。G1234A 変異は制限酵素解析より他系統のマウスにはみられず、遺伝子多型でないことが確認された。G1234A によってアミノ酸は 412 位においてグルタミン酸からリジンに置換されていた。PMCA 抗体は野生型では外有毛細胞の聴毛と内有毛細胞の細胞体に強く染色されるが、ホモ接合体では聴毛の染色性はほぼ消失し、内有毛細胞の染色性も減弱または散発的に消失していた。

内耳奇形マウスのジャクソンシェーカー (*Jackson shaker: js*) の原因遺伝子であるキネシン様タンパク質 *DAK (Deafness-Associated Kinesin)* については、ヒト・マウス間のシテニーが保存されていることが判明した。また、この領域は、ヒトでは 17 番染色体長腕の 24-25 (17q24-25) 領域に存在することを明らかにした。DAK が含まれていると予想されるヒトゲノム由来の BAC クローンに対し、ショットガンシークエンスを行い、約 53.8kb の塩基配列を決定した。その後、マウス *DAK* とのホモロジー検索を行い、マウス *DAK* と高い相同性を示す計 10 個のエキソンを同定した。この情報をもとに、RT-PCR、5'RACE、3'RACE などを行うことによりヒト *DAK* の完全長 cDNA を単離した。ヒトの *DAK* は約 3.5kb で、908 アミノ酸をコードしており、マウス *DAK* より 1 アミノ酸残基多かった。また、ヒト *DAK* とマウス *DAK* のホモロジーは、cDNA 同士で 85.8%、アミノ酸では 88.2% と高い値を示し、特にキネシンモータードメインでは 98% と非常に高い値を示した。*DAK* の機能解析を行うための最初のステップとして RNA プロブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) および *DAK* に対するペプチド抗体を用いた免疫染色を行った。各ステージの胚を用いて ISH を行った結果、その発現は臓器非特異的であったが、そのうち特に耳胞、前肢および尾部に強い発現が認められた。また、*DAK* に対するペプチド抗体を用いた内耳蝸牛管切片の免疫染色の結果、*js* マウスにおいて異常が認められた外有毛細胞および内有毛細胞に強い発現が認められた。この発現部位は *js* マウスと同様の表現型を示す *shaker-1* マウスの原因遺伝子として単離されたミオシン VIIa 遺伝子と同位置にあり、異なった 2 種のモーター蛋白質が蝸牛管の神経上皮において相互作用する可能性が示唆された。

脳神経節や耳胞の発生過程で特異的発現のみられる *Six4* 遺伝子破壊マウスはホモ個体も生存可能であった。耳の形態や聴力については、変異がみられなか

った。Eya 蛋白質の保存領域である Eya ドメインに相互作用する蛋白質を酵母 2-ハイブリッド法にて同定した。

結論=本研究では、難聴者を対象にして、分子モーター遺伝子をはじめとする難聴遺伝子の変異を検討し、耳の発生に関与するホメオボックス遺伝子を解析した。また、実験動物モデルにおける分子モーターならびにホメオボックス遺伝子機能を解析し、分子モーター蛋白障害による難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを検討し、難聴発症の複雑なメカニズムの一端を明らかにした。

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び・免疫アレルギー等研究事業）

総括研究報告書

分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

主任研究者 喜多村 健 東京医科歯科大学教授

研究要旨 内耳奇形マウスの候補遺伝子としてキネシン遺伝子変異を同定した。耳の発生に関与する遺伝子である PDS 遺伝子変異を遺伝性難聴家系で同定し、マウスでは、耳の発生分化に重要な Six 遺伝子および Eya 遺伝子の解析を行った。

分担研究者

川上 潔 自治医科大学・教授

米川博通 東京都臨床研究所

副所長

A. 研究目的

感音難聴の発症機構を解明する。そのために、難聴者を対象にして、難聴遺伝子である分子モーター遺伝子と耳の発生に関与するホメオボックス遺伝子の変異の有無、難聴発症前の症例においては遺伝子診断を行う。また、実験動物モデルにおいて分子モーターならびにホメオボックス遺伝子機能を解析し、分子モーター障害による難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを解明する。

B. 研究方法

原因不明の感音難聴症例、遺伝性非症候群性感音難聴家系の難聴者ならびに血縁者で協力が得られる症例を対象とし難聴遺伝子の同定を行う。

ミトコンドリア 3243 変異症例である MELAS の剖検時に得られた側頭骨標本において、ミトコンドリア遺伝子変異と側頭骨病理を検討する。

遺伝子変異マウスによる内耳発生機序の解析には、側頭骨病理ならびに聴覚検査を施行し、難聴遺伝子の解析を行う。

Six4 遺伝子ノックアウトマウスの胎児および成体について、形態的観察を行う。Eya1 遺伝子の保存領域 Eya ドメインをベイトにマウス 11.5 日胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。陽性クローンはベイトとプレイを入れ替えてその相互作用が観察されたものを、真の陽性クローンとして引き続き解析した。

C. 研究結果

難聴遺伝子において変異が同定されたものは、ミトコンドリア遺伝子 3243 変異, ミトコンドリア遺伝子 1555 変異, X 連鎖遺伝の DFN3 で POU3F4 遺伝子の 6 塩基の欠失, 前庭水管拡大症例において, ヨウ素と塩素輸送因子である PDS 遺伝子の変異を認めた。

MELAS 症候群の側頭骨組織からミトコンドリア遺伝子変異 3243 を検出した。病理組織学的研究では, ミトコンドリア遺伝子変異による蝸牛血管条とラセン神経節細胞の変性を証明した。

内耳奇形マウスの研究では, 感覚毛の障害が主要病変である Jackson shaker マウスの遺伝子変異が分子モーターであるキネシンであると判明した。さらに, 内耳奇形の実験動物モデルとして, 行動異常と難聴を呈する新しい内耳奇形マウス *Wriggle Mouse Sagami* を検討し, Ca-ATPase 遺伝子変異を同定した。Six 遺伝子破壊マウスはホモ個体も生存可能であった。転写制御能についての Six と Eya との協同性が見いだされ, その分子基盤は, Eya 蛋白質の Six による細胞質から核への移行であった。

D. 考察

今回の研究では, 難聴発症のメカニズムを解明することに主眼がある。すなわち, 難聴の原因遺伝子に注目し, 内耳形成や内耳機能に果たす役割を分子レベルで検討した。また, 聴覚障害モデル動物を用いる感音難

聴の病態解明の有用性が証明された。今後は, 感音難聴発症のメカニズムを明らかにし, 難聴の遺伝子治療への基礎的データを集積し, 難聴発症のメカニズムからの, より本質的な難聴の予防, 治療の方策の検討が可能となると期待される。

E. 結論

本研究では, 難聴者を対象にして, 分子モーター遺伝子をはじめとする難聴遺伝子の変異を検討し, 耳の発生に関与するホメオボックス遺伝子を解析した。また, 実験動物モデルにおける分子モーターならびにホメオボックス遺伝子機能を解析し, 分子モーター蛋白障害による難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを検討し, 難聴発症の複雑なメカニズムの一端を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi K, Kitamura K : A point mutation in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene causes deafness in *Wriggle Mouse Sagami*. *Biochem Biophys Res Commun* 261:773-778, 1999

2. Takahashi K, Kitamura K, Takizawa T: Detection of mRNA of Kinesin Superfamily 3A in the Cerebrum and Cerebellum: Biotin-Tyramine-Catalyzed Signal Amplification for In Situ Hybridization: *Acta Histochem Cytochem* 32 :275-280, 1999

3. Takahashi K, Yamaguchi T, Tamagawa Y, Kitamura K : Quantitative analysis of mitochondrial 3243 mutation in the inner ear of MELAS : Hereditary Deafness Newsletter 16 :38, 1999
 4. Takahashi K, Osawa N, Ohmura M, Kitamura K: Evaluation of inner ear histology and auditory brainstem response in *Wriggle Mouse Sagami*. Acta Otolaryngol(Stockh) 119:767-772, 1999
 5. 玉川雄也, 喜多村 健 : ミトコンドリア脳筋症と聴覚障害 JOHNS 15:311-313, 1999
 6. Ohto, H., Kamada, S., Tago, K., Tominaga, S., Ozaki, H., Sato, S. Kawakami, K.: Cooperation of Eya and Six in transactivation of their target genes through nuclear trans-location of Eya. Mol. Cell. Biol. 19, 6815-6824 , 1999
 7. Ozaki, H., Yamada, K., Kobayashi, M., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Kajitani, M., Kawakami, K. : Structure and chromosomal mapping of human *SIX4* and mouse *Six4* genes. Cytogenet. Cell Genet. 87, 108-122 , 1999
 8. 吉川欣亮・米川博通 : ヒト聴覚障害モデル、ジャクソンシェーカーから原因遺伝子のポジショナルクローニング. 第46回日本実験動物学会総会 シンポジウム「疾患の遺伝子を獲る」1999. 5. 20 - 22. 市川
 9. 和田匡史・若林雄一・牛木辰男・米川博通・木南 凌 : 先天性聴覚障害モデルマウス (ns) の遺伝解析. 第22回日本分子生物学会年会 1999.12.7 - 10. 福岡
 10. Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, and Ikeda, K. "Six family genes-Structure and function as transcription factors and their roles in development." BioEssays in press (2000)
 11. Kitamura K, Takahashi K, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Tamagawa Y, Ishikawa K, Ichimura K, Hagiwara H : Mutations of the Pendred syndrome gene(*PDS*) in patients with large vestibular aqueduct Acta Otolaryngol(Stockh) (in press)
2. 学会発表
1. 芳賀雅志, 瀬嶋尊之, 高野澤美奈子, 喜多村 健, 玉川雅也 : ミトコンドリア DNA3243 変異症例における前庭機能について. 第 58 回日本平衡神経科学会 1999 年 11 月 25-26 日
 2. Kitamura, K, Takahashi K, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Tamagawa Y, Ishikawa K, Ichimura K, Hagiwara H. Mutations of the Pendred Syndrome gene(PDS) in patients with large vestibular aqueduct 9th Asia-Oceania Congress Feb 7-12, 2000 City of Mandaluyong
 3. Kitamura, K, Takahashi K, Tamagawa Y, Kakoi H, Ichimura K, Nakano I, Saito K, Iino Y, Miyazawa T, Murakami Y, Kouda H, Noguchi Y. Temporal bone histopathology associated with mitochondrial 3243 mutation Association for Research in Otolaryngology Feb 20-24, 2000 St. Petersburg Beach
 4. Kitamura K, Noguchi Y, Tamagawa Y, Takahashi K, Ishikawa K. : Mutations of

the Pendred syndrome gene(PDS) in patients with large vestibular aqueduct. COLLEGIUM OTO-RHINO-LARYNGOLOGICUM AMICITIAE SACRUM. Lyon 22-25 August 1999.

5. Kitamura K, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Gotsu K, Sugimoto T: Symposium I Otology Update:DEAFNESS GENE-RECENT PROGRESS-

5thJAPAN-TAIWAN CONFERENCE IN OTOLARYNGOLOGY HEAD 6 NECK SURGERY.

6. Kawakami, K., Niiya, A., Ohto, H. and Araki, M. : Localization of Six4/AREC3 in the develop-ing mouse retina. Keystone Symposia, Colorado, February 5-10, 1999. (Ocular Cell and Molecular Biology, p28)

7. Sato, S., Ohto, H., Kamada, S., Ozaki H, Kawakami, K. : Synergy of Six and Eya in gene transcription. Second Inter-national Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC) Confer-ence, North Carolina, April 21-23, 1999. (Program p.24)

8. Kawakami, K., Ohto, H., Kamada, S., Ozaki, H., Sato, S. : Cooperative Activation of The Myogenin Promoter by Six and Eya. The 1999 Meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription. Cold Spring Harbor, NewYork, September 1-5, 1999. (Abstracts p.130)

9.大戸裕美、鎌田さやか、多胡憲治 富永真一、尾崎秀徳、佐藤滋、川上 潔 : Six と Eya との協同作用が標 遺伝子の活性化に必要である。第 7 回日本生化学会、横浜、1999年1 月6-9日。(発表抄録集 p.949)

10. 川上潔、大戸裕美、鎌田さやか 尾崎秀徳、佐藤滋、池田啓子 : Si および Eya 遺伝子群による発生の 制御。第 22 回日本分子生物学会年会 博多、1999年12月7日~10日。(演要旨集 p.466)

11. 尾崎秀徳、浅野雅秀、岩倉洋 郎 川上潔 : ホメオボックス遺伝 子 Six の発現パターンおよび生体機 能。

22 回日本分子生物学会年会、博多 1999年12月7日~10日。(講演 旨集 p.467)

12. 大戸裕美、鎌田さやか、多胡憲 治、富永真一、尾崎秀徳、佐藤滋、 川上潔 : Myogenin 遺伝子プロモータ ーの Six および Eya による活性化。第 22 回日本分子生物学会年会、博多、 1999年12月7日~10日。(講演要 旨集 1)

13. 吉川欣亮・米川博通 : ヒト聴覚 障害モデル、ジャクソンシェーカー からの原因遺伝子のポジショナルク ローニング。 第 46 回日本実験動 物学会総会シンポジウム「疾患の遺 伝子を獲る」 1999. 5. 20 - 22. 市川

14. 和田匡史・若林雄一・牛木辰男・ 米川博通・木南 凌 : 先天性聴覚障 害モデルマウス(ns)の遺伝解析。第 22 回日本分子生物学会年会 1999.12.7 - 10. 福岡

G. 知的所有権の取得状況
なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び・免疫アレルギー等研究事業）

分担研究報告書

分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

主任研究者 喜多村 健 東京医科歯科大学教授

研究要旨 耳の発生に関与する遺伝子である PDS 遺伝子変異を、遺伝性難聴家系で同定した。MELAS 症候群の側頭骨組織からミトコンドリア遺伝子変異 3243 を検出し、組織検査にて高度の血管条萎縮とラセン神経節細胞の消失を認めた。内耳奇形マウスでは、Ca-ATPase 遺伝子変異を同定した。

A. 研究目的

感音難聴の発症機構を解明する。そのために、難聴者を対象にして、難聴遺伝子である分子モーター遺伝子と耳の発生に関与するホメオボックス遺伝子の変異の有無、難聴発症前の症例においては遺伝子診断を行う。また、既知の難聴遺伝子による側頭骨病理の検索を行う。実験動物モデルにおいて、難聴遺伝子の同定を行い、難聴発症とホメオボックス遺伝子による耳の発生・形成のメカニズムを解明する。

B. 研究方法

原因不明の感音難聴症例、遺伝性非症候群性感音難聴家系の難聴者ならびに血縁者で協力が得られる症例を対象とし難聴遺伝子の同定を行う。

ミトコンドリア 3243 変異症例である MELAS の剖検時に得られた側頭骨標本において、ミトコンドリア遺伝子変異と側頭骨病理を検討する。

内耳奇形マウスである *wri* マウスを十分なネブタール麻酔下で断頭し、脳組織を直ちに液体窒素にて冷却する。TaKaRa RNA PCR kit にて得られた poly-A RNA より RT-PCR を行い cDNA を得る。PMCA2 の塩基配列 (GenBank No. AF053471) より 19 種類の primer を作製し、PCR 産物を精製後、自動蛍光シーケンサにて全塩基配列を決定する。内耳迷路を実体顕微鏡下に摘出し、抗 Plasma Membrane Ca-ATPase 抗体 (PMCA 抗体) を用いた免疫組織学的観察を行う。

C. 研究結果

難聴遺伝子において変異が同定されたものは、ミトコンドリア遺伝子 3243 変異、ミトコンドリア遺伝子 1555 変異、X 連鎖遺伝の DFN3 で POU3F4 遺伝子の 6 塩基の欠失、前庭水管拡大症例において、PDS 遺伝子変異を認めた。

MELAS症候群の側頭骨組織からミトコンドリア遺伝子変異 3243 を検出した。病理組織学的研究では、ミトコンドリア遺伝子変異による蝸牛血管条とラセン神経節細胞の変性を証明した。

内耳奇形マウスの研究ではホモ接合体においては PMCA2 遺伝子 1234 位のグアニンがアデニンに置換 (G1234A) されていた。G1234A 変異は制限酵素解析より他系統のマウスにはみられず、遺伝子多型でないことが確認された。G1234A によってアミノ酸は 412 位においてグルタミン酸からリジンに置換されていた。PMCA 抗体は野生型では外有毛細胞の聴毛と内有毛細胞の細胞体に強く染色されるが、ホモ接合体では聴毛の染色性はほぼ消失し、内有毛細胞の染色性も減弱または散発的に消失していた。

D. 考察

前庭水管拡大症例で同定された PDS 遺伝子変異は、内耳発生時期に多くの転写因子と協同発現すると予想されている。したがって、転写ならびにホメオボックス遺伝子と共に内耳発生、分化に深く関与していると予想される。

また、今回対象とした内耳奇形マウスの原因遺伝子は、カルシウム代謝に深く関連している。カルシウムは細胞のシグナル伝達に重要な役割を担っており、内耳有毛細胞においても聴毛が刺激されることによって細胞は興奮し、機械的刺激受容体チャネル・膜電位感受性チャネルを介してカルシウムが細胞内に流入する。また細胞内

に存在するカルシウムストア (滑面小胞体) からカルシウムが放出される。したがって、wri では PMCA2 遺伝子異常によってカルシウム排出に異常が生じ、難聴ひいては内耳の形態異常をきたすと推測される。

E. 結論

内耳奇形マウスの研究から、聴覚障害モデル動物を用いる感音難聴の病態解明の有用性が証明され、Ca-ATPase 遺伝子変異を同定した。側頭骨標本より世界で初めてのミトコンドリア遺伝子変異 3243 による病理所見を検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi K, Kitamura K : A point mutation in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase gene causes deafness in *Wriggle Mouse Sagami*. *Biochem Biophys Res Commun* 261:773-778, 1999
2. Takahashi K, Kitamura K, Takizawa T: Detection of mRNA of Kinesin Superfamily 3A in the Cerebrum and Cerebellum. *Biotin-Tyramine-Catalyzed Signal Amplification for In Situ Hybridization: Acta Histochem Cytochem* 32 :275-280, 1999
3. Takahashi K, Yamaguchi T, Tamagawa Y, Kitamura K : Quantitative analysis of mitochondrial 3243 mutation in the inner ear of MELAS : Hereditary Deafness Newsletter 16 :38, 1999
4. Takahashi K, Osawa N, Ohmura M, Kitamura K: Evaluation of inner ear histology and auditory brainstem

response in *Wriggle Mouse Sagami*. Acta Otolaryngol(Stockh) 119:767-772, 1999

5. 玉川雄也, 喜多村 健: ミトコンドリア脳筋症と聴覚障害 JOHNS 15:311-313, 1999

2. 学会発表

1. 芳賀雅志, 瀬嶋尊之, 高野澤美奈子, 喜多村 健, 玉川雅也: ミトコンドリア DNA3243 変異症例における前庭機能について. 第58回日本平衡神経科学会 1999年11月25-26日

2. Kitamura, K, Takahashi K, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Tamagawa Y, Ishikawa K, Ichimura K, Hagiwara H. Mutations of the Pendred Syndrome gene(PDS) in patients with large vestibular aqueduct 9th Asia-Oceania Congress Feb 7-12, 2000 City of Mandaluyong

3. Kitamura, K, Takahashi K, Tamagawa Y, Kakoi H, Ichimura K, Nakano I, Saito K, Iino Y, Miyazawa T, Murakami Y, Kouda H, Noguchi Y. Temporal bone histopathology associated with mitochondrial 3243 mutation Association for Research in Otolaryngology Feb 20-24, 2000 St. Petersburg Beach

4. Kitamura K, Noguchi Y, Tamagawa Y, Takahashi K, Ishikawa K. : Mutations of the Pendred syndrome gene(PDS) in patients with large vestibular aqueduct. COLLEGIUM OTO-RHINO-LARYNGOLOGICUM AMICITIAE SACRUM. Lyon 22-25 August 1999.

5. Kitamura K, Noguchi Y, Kuroishikawa

Y, Gotsu K, Sugimoto T: Symposium I Otology Update: DEAFNESS GENE-RECENT PROGRESS-

5th JAPAN-TAIWAN CONFERENCE IN OTOLARYNGOLOGY HEAD & NECK SURGERY.

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

分子モーター，耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

分担研究者 川上 潔 自治医科大学教授

研究要旨 耳の発生分化に重要な Six 遺伝子の生体機能および BOR 症候群の原因遺伝子産物 Eya1 蛋白質に相互作用する因子の探索を行った。

A 研究目的

Six 遺伝子および Eya 遺伝子の耳の発生における役割とその分子機能を明らかにする為に、Six 遺伝子の破壊マウスの解析と、Eya1 遺伝子の共同作用因子のレパートリーを明らかにする。

B 研究方法

Six4 遺伝子ノックアウトマウスの胎児および成体について、形態的観察を行った。また、ABR 法を用いて聴力検査を行った。Eya1 遺伝子の保存領域 Eya ドメインをベイトにマウス 11.5 日胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。陽性クローンはベイトとプレイを入れ替えてその相互作用が観察されたものを、真の陽性クローンとして引き続き解析した。

C 研究成果

脳神経節や耳胞の発生過程で特異的発現のみられる Six4 遺伝子破壊マウスはホモ個体も生存可能であった。耳の形態や聴力については、変異がみられなかった。Eya 蛋白質の保存領域である Eya ドメインに相互作用する蛋白質を酵母 2-ハイブリッド法にて同定した。複数の未同定のクローンが単離され、現在全長クローンの単離と解

析を行っている。

D 考察

Six4 遺伝子の遺伝子破壊マウスに表現型が見られないのは、ほかの Six 遺伝子 Six1、Six2、Six5 などとの機能重複が原因である可能性が高い。それらを検証するために、Six1/Six4 および Six4/Six5 の二重変異マウスを作成することとした。Eya1 と特異的に相互作用する蛋白質の同定によって耳の形成過程での遺伝子ネットワークの解明に道が開ける。

E 結論

Six 遺伝子群には機能重複の存在が示唆された。耳の形成に必須な Eya1 遺伝子には特異的に相互作用する因子が複数存在し遺伝子ネットワークを形成していることが考えられる。

F 研究発表

1. 論文発表

1. "Cooperation of Eya and Six in transactivation of their target genes through nuclear trans-location of Eya." Mol. Cell. Biol. 19, 6815-6824 (1999) Ohto, H., Kamada, S., Tago, K., Tominaga, S., Ozaki, H.,

- Sato, S. and Kawakami, K.
2. "Structure and chromosomal mapping of human *SIX4* and mouse *Six4* genes." *Cytogenet. Cell Genet.* 87, 108-122 (1999) Ozaki, H., Yamada, K., Kobayashi, M., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Kajitani, M., and Kawakami, K.
 3. "Six family genes-Structure and function as transcription factors and their roles in development." *BioEssays in press* (2000) Kawakami, K., Sato, S., Ozaki, and Ikeda, K.
2. 学会発表
1. Kawakami, K., Niiya, A., Ohto, H. and Araki, M. : Localization of Six4/AREC3 in the developing mouse retina. Keystone Symposia, Colorado, February 5-10, 1999. (*Ocular Cell and Molecular Biology*, p28)
 2. Sato, S., Ohto, H., Kamada, S., Ozaki, H., Kawakami, K. : Synergy of Six and Eya in gene transcription. Second Inter-national Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC) Conference, North Carolina, April 21-23, 1999. (Program p.24)
 3. Kawakami, K., Ohto, H., Kamada, S., Ozaki, H., Sato, S. : Cooperative Activation of The Myogenin Promoter by Six and Eya. The 1999 Meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription. Cold Spring Harbor, NewYork, September 1-5, 1999. (Abstracts p.130)
 4. 大戸裕美、鎌田さやか、多胡憲治、富永真一、尾崎秀徳、佐藤滋、川上潔 : Six と Eya との協同作用が標的遺伝子の活性化に必要である。第 72 回日本生化学会、横浜、1999 年 10 月 6-9 日。(発表抄録集 p.949)
 5. 川上潔、大戸裕美、鎌田さやか、尾崎秀徳、佐藤滋、池田啓子 : Six および Eya 遺伝子群による発生の制御。第 22 回日本分子生物学会年会、博多、1999 年 12 月 7 日~10 日。(講演要旨集 p.466)
 6. 尾崎秀徳、浅野雅秀、岩倉洋一郎、川上潔 : ホメオボックス遺伝子 Six4 の発現パターンおよび生体機能。第 22 回日本分子生物学会年会、博多、1999 年 12 月 7 日~10 日。(講演要旨集 p.467)
 7. 大戸裕美、鎌田さやか、多胡憲治、富永真一、尾崎秀徳、佐藤滋、川上潔 : Myogenin 遺伝子プロモーターの Six および Eya による活性化。第 22 回日本分子生物学会年会、博多、1999 年 12 月 7 日~10 日。(講演要旨集 p.467)
- G 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

分子モーター、耳の発生からみた難聴発症機構に関する研究

分担研究者 米川博通 （財）東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所副所長

研究要旨 本研究は、マウスで同定された聴覚障害の原因遺伝子の情報をヒトに応用し、聴覚障害発症の原因究明、および聴覚障害児に対する遺伝子診断法の開発などに利用することを目的とした。我々が用いたジャクソンシェーカー（Jackson shaker: js）と呼ばれるマウスは、内耳コルチ器に存在する外有毛細胞の感覚毛が形成不全を起こすことによって、聴覚に障害を生じた突然変異マウスである。我々はこれまでに、この js マウスから聴覚障害に関わる遺伝子のポジショナルクローニングを行い、その候補遺伝子としてキネシン様タンパク質 DAK（Deafness-Associated Kinesin）を同定し、その cDNA、および遺伝子の一次構造を明らかにした。そこで、この情報をヒトの聴覚障害に応用するため、DAK のヒトホモログの単離を試みた。その結果、ヒト DAK の完全長 cDNA が単離でき、ヒト DAK の一次構造が明らかになった。また、この DAK 遺伝子座が、ヒトでは 17 番染色体長腕の 24-25 (17q24-25) 領域に存在することを明らかにした。今後これらの情報をもとに、DAK の異常がヒトの聴覚障害にどの程度関わるかということ明らかにすると共に、もし関わる場合には DAK 遺伝子情報に基づく新生児等の遺伝子診断法の確立などを行う予定にしている。

A. 研究目的

ヒトの遺伝性聴覚障害は、新生児の約 1,000~2,000 人に 1 人と高頻度に出現する重要な遺伝性疾患である。ヒトの場合、このような遺伝性疾患の原因遺伝子の同定には、その遺伝性疾患が集積されている家系と染色体特異的 DNA 多型マーカーとを用いた連鎖解析が用いられてきた。実際、本研究の

標的疾患である遺伝性聴覚障害においても、この方法により数多くの成果が報告されてきた。一方、遺伝性聴覚障害には数多くの非症候群性のものが存在し、そのため集積家系の収集にかなりの困難さを伴うことや、聴覚障害者同士での婚姻例の多さが原因となり、単一家系において類似の表現型を示す複数の原因遺伝子の混在す

ることなどは、ヒトでの連鎖解析を行う上での大きな障害となっている。本研究は、ヒト聴覚障害モデルマウスの研究成果をヒトに応用することで、これらの障害を克服するための1つの手段として有効であることを明らかにするため行った。

我々はこれまで、ヒト聴覚障害モデルの1つである、ジャクソンシェーカー (Jackson shaker: js) マウスの聴覚障害の原因となる遺伝子のポジショナルクローニングを行ってきた。その結果、候補遺伝子としてキネシン様タンパク質 DAK (Deafness-Associated Kinesin) を単離した。マウス DAK の cDNA、および遺伝子の構造をもとに、ヒトホモログの単離を試みた結果、ヒト DAK の完全長 cDNA が単離できた。また、この結果得られたヒト DAK の cDNA、およびその遺伝子の一次構造の情報をもとに、今後 DAK の異常とヒト聴覚障害発症との関わりについて解析を行うことにした。

B. 研究方法

1) ヒトにおける js 遺伝子座シンテニック領域での BAC コンティグの構築

マウスで単離された DAK の cDNA、および遺伝子の一次構造情報をもとに、ヒト・マウス間で保存されているキネシンモータードメイン部分に PCR プライマーを作製し、ヒトの BAC ライブラリーをスクリーニングした。この BAC クローンを起点とし、

BAC end rescue 法等を用いた染色体歩行により、BAC コンティグを構築を試みた。

2) DAK のヒトホモログに対する完全長 cDNA クローンの単離と一次構造解析

上記で起点となったヒトゲノム由来の BAC クローンをを用い、ショットガンシークエンシングを行った。得られた塩基配列をもとに、マウス DAK とのホモロジーサーチを行い、ヒト DAK 遺伝子のエクソン部分を同定した。この情報をもとに、RT-PCR、5' race および 3' race 法を用いて、ヒト DAK に対する完全長 cDNA クローンの単離と全一時配列の決定を試みた。

3) マウス DAK 特異的プローブによる in situ ハイブリダイゼーション、および DAK ペプチド抗体の作製と免疫組織学的検索

1. 単離したマウス DAK に対する cDNA の特異的配列部分に対して RNA プローブを作製した。また、そのプローブとマウス胎仔を材料にして、初期発生における DAK の組織特異的発現を whole mount in situ hybridization により検討した。

2. DAK に特異的なアミノ酸配列部分を標的にペプチド抗体を作製し、免疫化学的染色により、DAK 蛋白の組織特異的発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト由来の材料についてはその全てに市販品を使用した。このため、倫理面での問題は無いと考え、特段の配慮は行わなかった。また、マ

ウス等の動物実験に関しては、財団法人東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所の実験動物委員会で承認と所長からの許可を受けた後、実施した。

C. 研究結果

1) ヒトにおける js 遺伝子座シンテニク領域での BAC コンティグの構築と発現遺伝子の同定

マウスの js 領域に対するヒトのシンテニク領域の物理地図を構築するため、ヒト BAC ライブラリーを用いて該当する BAC クローンをスクリーニングした。また、それらの BAC を用いて、染色体歩行を行い、このヒトのシンテニク領域をカバーする 8 クローンからなる BAC コンティグを構築した。カバーした領域は約 1.2Mb であった。また、インターネットによる検索の結果、マウスで発現している遺伝子のうち、少なくとも 5 種類が同じ領域に存在し、ヒト・マウス間のシンテニーが保存されていることが判明した。また、この領域は、ヒトでは 17 番染色体長腕の 24-25 (17q24-25) 領域に存在することを明らかにした。

2) DAK のヒトホモログに対する完全長 cDNA クローンの単離と一次構造解析

DAK が含まれていると予想されるヒトゲノム由来の BAC クローンに対し、ショットガンシーケンシングを行い、約 53.8kb の塩基配列を決定した。その後、マウス DAK とのホモロジー検

索を行い、マウス DAK と高い相同性を示す計 10 個のエキソンを同定した。この情報をもとに、RT-PCR、5'RACE、3'RACE などを行うことによりヒト DAK の完全長 cDNA を単離した。ヒトの DAK は約 3.5kb で、908 アミノ酸をコードしており、マウス DAK より 1 アミノ酸残基多かった。また、ヒト DAK とマウス DAK のホモロジーは、cDNA 同士で 85.8%、アミノ酸では 88.2% と高い値を示し、特にキネシンモータードメインでは 98% と非常に高い値を示した。

3) マウス DAK 特異的プローブによる in situ ハイブリダイゼーション、および DAK ペプチド抗体の作成と免疫組織学的検索

DAK の機能解析を行うための最初のステップとして RNA プローブを用いた in situ ハイブリダイゼーション (ISH) および DAK に対するペプチド抗体を用いた免疫染色を行った。各ステージの胚を用いて ISH を行った結果、その発現は臓器非特異的であったが、そのうち特に耳胞、前肢および尾部に強い発現が認められた。また、DAK に対するペプチド抗体を用いた内耳蝸牛管切片の免疫染色の結果、js マウスにおいて異常が認められた外有毛細胞および内有毛細胞に強い発現が認められた。この発現部位は js マウスと同様の表現型を示す shaker-1 マウスの原因遺伝子として単離されたミオシン VIIa 遺伝子と同位置にあり、異なった 2 種のモーター蛋白質が蝸牛管の神経上皮において

相互作用する可能性が示唆された。現在、両者の相互作用について検討中である（英国 MRC 研究所・S. Brown 博士および東京都臨床医学総合研究所・金井正美博士との共同研究）。

D. 考察

これまで行ってきたマウスの聴覚障害候補遺伝子の 1 つ DAK の cDNA、ゲノムの構造をもとに、DAK のヒトホモログの単離を試みた。その結果、ヒト DAK の完全長 cDNA の単離に成功すると共に、ヒト DAK のアミノ酸一次構造を決定した。ヒト DAK はマウス DAK より 1 アミノ酸残基多い、908 個のアミノ酸残基より成り立っていることが判明した。また、ヒト DAK はマウス DAK と高い相同性を示し、核酸レベルで 85.8%、アミノ酸レベルでは 88.2% と高い値を示し、特にキネシンモータードメインでは 98% と非常に高い値を示した。しかしながら、この様なマウス DAK の情報を直接ヒトに応用するには、種特異性などいくつかの問題の起こることが危惧された。今回、ヒト DAK の cDNA の一次構造が完全に決定されたことにより、ヒト DAK のみに特異的なペプチド抗体、あるいはヒト DAK、マウス DAK の何れにも交差性を持つペプチド抗体など、何れの場合においても抗体の作製が可能になり、ヒト組織、マウス組織での広い応用性が期待できた。現在、ヒト DAK、およびマウス DAK にそれぞれ特異的なペプチド抗体の作製を手がけており、来年度は、これ

らの抗体を使用したマウス、およびヒトの組織を用いた聴覚障害に対する免疫分子組織学的研究が着手できると期待している。

また、それと共に、DAK 抗体によるアフィニティークロマトグラフィーなどを用い、聴覚障害の原因となる蛋白同士の相互作用を研究する系の開発が可能となった。この分野は世界的に未着手の状態にあるが、聴覚障害を通じた聴覚機能の分子生物学的解明という点では、世界中の研究者がしのぎを削り合っている分野でもある。特に我々はすでに、もう 1 種類の聴覚機能に関わる 7a 型ミオシンが DAK と相互作用をするという実験的証拠を得ており、今後この方面での大きな発展が期待できる。また、この系を敷衍することにより、7a 型ミオシン以外の蛋白の同定なども可能になり、DAK を中心とした聴覚障害にどの程度の数の蛋白が関わり、どの様な相互作用をしているのかを明らかにする実験系が開発できると期待している。

一方、我々はヒト DAK の cDNA、および遺伝子のエキソン・イントロン隣接部分の一次構造も明らかにした。この情報を利用すれば、今後 DAK を中心とした cDNA 情報上の単塩基置換、いわゆるスニップ (cSNP) 情報の効率的収集が期待できる。来年度には、この cSNP 系の立ち上げを行いつつ、主任研究者喜多村 健教授がこれまで収集した聴覚障害を持つヒト集団に対して、ヒト DAK 遺伝子 cDNA を標的としたスニップ解析などを行

うべく検討を始めたところである。

E. 結論

ヒト聴覚障害モデルであるジャクソンシェーカー(Jackson shaker: js)マウスの聴覚障害の原因となる候補遺伝子として DAK(Deafness-Associated Kinesin)を同定した。このマウス DAK の情報をもとにヒト DAK のホモログを単離し、cDNA および遺伝子の構造を明らかにした。この結果は、DAK の異常によって引き起こされるヒト聴覚障害の発症機構を研究する上で重要な情報となる。また、ヒト DAK に対する cSNP 系を開発することにより、聴覚障害を持つ新生児の遺伝子診断への利用も期待できる様になった。

F. 研究発表

2. 学会発表

1) 吉川欣亮・米川博通：ヒト聴覚障害モデル、ジャクソンシェーカーからの原因遺伝子のポジショナルクローニング。 第46回日本実験動物学会総会シンポジウム「疾患の遺伝子を獲る」 1999.5.20-22. 市川

2) 和田匡史・若林雄一・牛木辰男・米川博通・木南 凌：先天性聴覚障害モデルマウス (ns) の遺伝解析。 第22回日本分子生物学会年会 1999.12.7-10. 福岡

G. 知的所有権の取得状況

なし

刊行書籍又は雑誌名(雑誌のときは雑誌名,巻号数,論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
A point mutation in a plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase gene causes deafness in <i>Wriggle Mouse Sagami</i> . Biochem Biophys Res Commun 261:773-778, 1999			Takahashi K, Kitamura K
Detection of mRNA of Kinesin Superfamily 3A in the Cerebrum and Cerebellum Biotin-Tyramine-Catalyzed Signal Amplification for In Situ Hybridization Acta Histochem Cytochem 32:275-280,1999			Takahashi K, Kitamura K, Takizawa T
Quantitative analysis of mitochondrial 3243 mutation in the inner ear of MELAS Hereditary Deafness Newsletter 16 :38, 1999			Takahashi K, Yamaguchi T, Tamagawa Y, Kitamura K
Evaluation of inner ear histology and auditory brainstem response in <i>Wriggle Mouse Sagami</i> , Acta Otolaryngol(Stockh) 119:767-772, 1999			Takahashi K, Osawa N, Ohmura M, Kitamura K
ミトコンドリア脳筋症と聴覚障害 JOHNS 15:311-313, 1999			玉川雄也, 喜多村 健
Cooperation of Eya and Six in transactivation of their target genes through nuclear trans-location of Eya. Mol. Cell. Biol. 19, 6815-6824 , 1999			Ohto,H., Kamada, S., Tago, K., Tominaga, S., Ozaki,H., Sato,S. Kawakami, K.
Structure and chromosomal mapping of human <i>SLX4</i> and mouse <i>Six4</i> genes. Cytogenet. Cell Genet. 87, 108-122 , 1999			Ozaki, H., Yamada, K., Kobayashi, M., Asakawa S., Minoshima S., Shimizu N., Kajitani, M., Kawakami, K.
ヒト聴覚障害モデル、ジャクソンシェーカーからの原因遺伝子のポジショナルクローニング 第46回日本実験動物学会総会シンポジウム「疾患の遺伝子を獲る」 1999.5. 20 - 22. 市川			吉川欣亮, 米川博通
先天性聴覚障害モデルマウス (ns) の遺伝解析 第22回日本分子生物学会年会 1999.12.7 - 10. 福岡			和田匡史, 若林雄一, 牛木辰男, 米川博通, 木南 凌