

明らかとなった。具体的には、HEK293 細胞に発現させた 10 種類のミスセンス変異 Pendrin (P123S, M147V, K369E, A372V, N392Y, C565Y, S657N, S666F, T721M, H723R)のうち、8 種類の変異体(P123S, M147V, A732V, N392Y, S657N, S666F, T721M, H723R)が細胞内に蓄積されており、更に、サリチル酸により 4 種類の変異体(P123S, M147V, S657N, H723R)が細胞内から細胞膜に移行することが見出された。これらの変異株に対して、サリチル酸がどのようにしてシャペロン活性を発揮しているのか、サリチル酸の添加により膜移行する変異体において、サリチル酸はどのような作用メカニズムを持つのかを明らかにするために、細胞内イメージング可能なケミカルプローブを設計した。

ケミカルプローブの設計においては、細胞内でイメージングを行うために、“クリック反応”を用いることにした。このクリック反応は、図 1 に示すように、二つの反応基質が“クリック”するような短時間で効率の良い反応を意味する。



図 1. クリック反応の原理

いくつかのクリック反応が知られているが、その中でも特に生体内でよく用いられているヒュスゲン付加環化反応を用いた。本反応は、図 2 に示すように、アジド部位を有する基質と、アセチレン部位を有する基質を銅触媒存在下、クリック付加環化反応が進行し、1,2,3-トリアゾールが得られる反応である。そこで、この二つの基質のどちらかに蛍光発色

団を導入し、もう一方には生物親和性骨格(本研究では、サリチル酸骨格)を導入することで、生体内で本クリック反応を進行させることができる。すなわち、サリチル酸が Pendrin 等の標的タンパクと結合した後に、蛍光基質を作用させることで、細胞内におけるサリチル酸の挙動がイメージングできることになる。

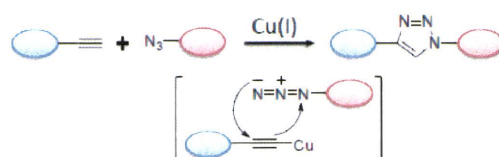


図 2. ヒュスゲン付加環化反応

そこで、図 3 に示すように、分子内にアジド部位を有するサリチル酸誘導体(1)およびアセチレン部位を有するサリチル酸誘導体(2)を分子設計した。

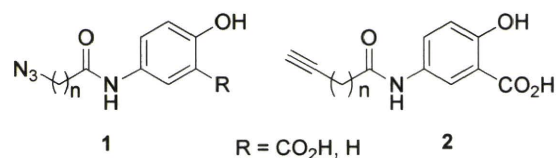


図 3. サリチル酸ケミカルプローブの分子構造

C. 研究結果

分子内にアジド部位を有するサリチル酸誘導体を図 4 に示す方法で有機合成を行った。まず、4-ニトロフェノール(3)をベンゾイル基で保護し、得られたエステル(4)のニトロ基を鉄を用いて還元しアニリン(5)とした。ブロモアセチルブロミドおよびブロモプロパノイルブロミドとアニリン(5)を反応させ、ブロモアセチルアニリド(6a)およびブロモプロパノイルアニリド(6b)とし、アジ化ナトリウムと反応させて対応するアジド化合物(7a, b)を得た。

最後にベンゾイル基の脱保護を行い、アジド誘導体(1a,b)を合成した。

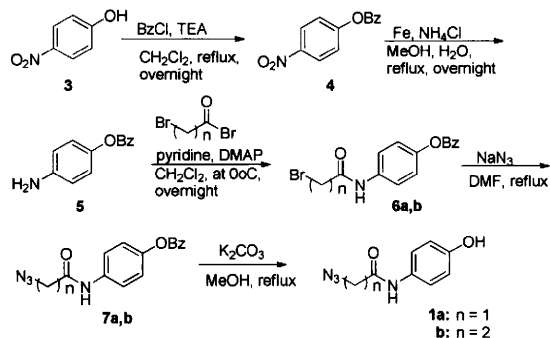


図4. アジド化合物(1a,b)の合成

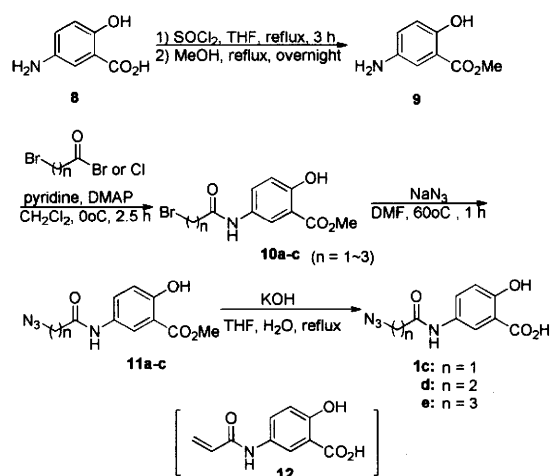


図5. アジド化合物(1c-e)の合成

アジド化合物(1a,b)の合成と同様に、図5のように化合物(1c-e)の合成を行った。4-アミノサリチル酸(8)を出発原料として、チオニルクロリドと処理し酸クロリドとした後、メタノールと反応させメチルエステル(9)へと誘導した。得られたメチルエステル(9)のアミン部位に種々の酸クロリドまたは酸プロミドを反応させアニリド(10a-c)とし、アジ化ナトリウムと反応させて、アジド誘導体(11a-c)へと変換した。最後に水酸化カリウムでけん化させることにより、対応するサリチル酸アジド(1c)および(1e)の合成に成功した。しかしな

がら、炭素鎖(n-2)のエステル(11b)からは、目的のサリチル酸アジド(1d)は得られなかった。

次に、図6に示すようにアセチレン化合物の合成について検討した。図5で合成したメチルエステル(9)に対し、5-ヘキシシン酸と EDCI カップリングを行い、アニリド(14)とした後、水酸化カリウムを用いて加水分解を行い、目的のアセチレンサリチル酸(2)の合成に成功した。

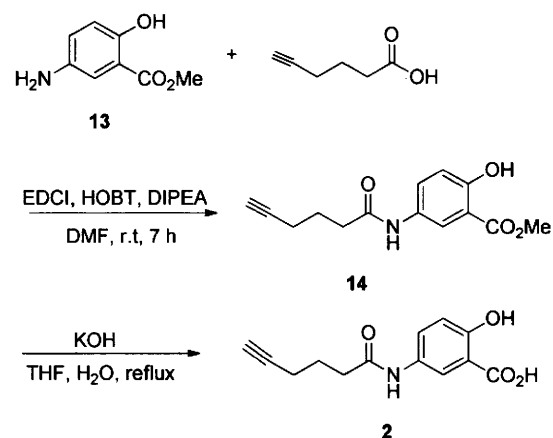


図6. アセチレン化合物(2)の合成

合成したこれらのサリチル酸ケミカルプローブを用いて、細胞内クリック反応を行った。合成したサリチル酸プローブのアジド部位と蛍光ラベルである Alexa488 のアセチレン部位との細胞内クリック反応により、サリチル酸の細胞内イメージングを行った。蛍光標識試薬である Alexa488 を加えることにより細胞内では、図8に示すような化学反応が起こり、サリチル酸プローブの局在部分が蛍光標識されると考えられる。ヒトがん細胞である HeLa 細胞を用いて、合成したサリチル酸プローブ(1a-c)の細胞内イメージを蛍光顕微鏡で観察した。図9は Alexa488 とクリック反応させた化合物の細胞内局在をみたもの、真ん中

の図は染色した細胞核のみをみたもの、右の図はこの2つの図をマージさせたものである。

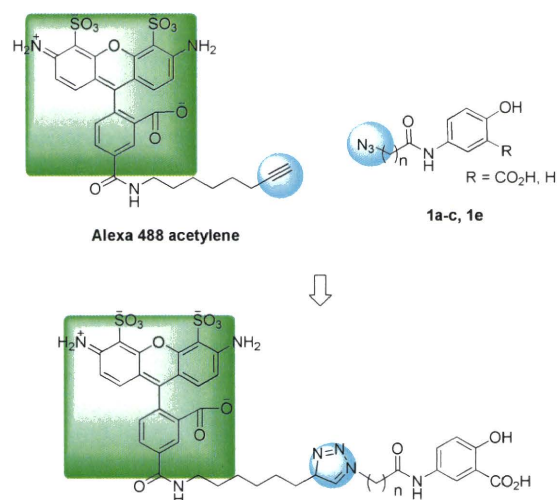


図8. 細胞内クリック反応

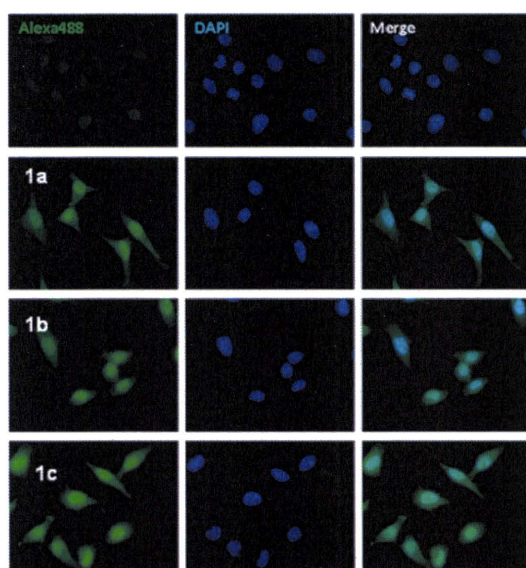


図9. サリチル酸誘導体の細胞内局在

D. 考察

ケミカルプローブの合成には、それぞれ4-ニトロフェノールおよび4-アミノサリチル酸(8)を出発原料として、目的とするアジド化合物(1a-c)および(1e)を合成することに成功した。その一方で、炭素鎖 (n-2) のエステル(11b)からは、水酸化カリウムを用いた加水分解反

応条件下では、目的のサリチル酸アジド(1d)は得られなかった。本反応の詳細を検討したところ、共役カルボニル化合物(12)が生成していることが分かった。このことから、エステル(11b)において塩基条件下ではアジド基が脱離基として働き、カルボニルの α 位のプロトンが引き抜かれることにより、脱離反応が進行していることが分かった。

細胞内クリック反応によるサリチル酸ケミカルプローブの局在イメージング実験では、ケミカルプローブの緑色蛍光と DAPI による細胞核の青色蛍光が重なっていることから、化合物(1a), (1b) とサリチル酸プローブである化合物(1c)が細胞の核内に局在していることが示唆された。

E. 結論

サリチル酸プローブの合成とそれを用いた細胞内イメージングを行った結果、合成したサリチル酸誘導体が細胞核内に局在していることがわかった。今回細胞内イメージングに用いた HeLa 細胞には、Pendrin 変異体が発現しておらず、サリチル酸が Pendrin 変異体のミスフォールディングをリフォールディングするときの挙動を観察することができなかったが、Pendrin 変異体を発現させた細胞を用いてサリチル酸誘導体の細胞内イメージングを行えば、サリチル酸の膜への局在が観察できることが期待される。23年度は、サリチル酸による Pendrin 変異体の機能回復の作用機序の解明を行うとともに、サリチル酸よりシヤペロン活性の高い薬剤開発を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

4. 難聴者（児）の現状理解と QOL 向上を指向した社会・教育学的取り組み

研究分担者 石原 研治 茨城大学 准教授

研究要旨

本分担研究は、社会・教育の面から遂行課題を研究・発展させることを目的とした。

近年、新生児を対象とした聴覚スクリーニングが行われ難聴の早期発見が可能になったことや人工内耳や補聴器の性能が向上したことから、難聴児の言語習得のレベルも向上し、難聴を抱える子どもたちは聾学校だけではなく通常学校に在籍するケースも増えてきている。すなわち、通常の学校では受け入れるための準備が必要となり、養護教諭をはじめとする教員、保護者、そこに通う健聴な児童生徒の理解が必要である。しかし、難聴者の QOL は依然として十分でなく何らかの取り組みが必要となる。そこで、本研究では、私が所属する教育学部養護教諭養成課程の学生とともに、そのような疾患を持つ人の心の痛みを理解し、健康な人が疾患を持つ人と共に明るく楽しい生活が送れる環境および社会を作ることができるような社会構築を目指すため、難聴理解のための実践を行った。具体的には、(1) 特別講義の実施、(2) 難聴を疑似体験できるソフト HearLoss を活用して「聴覚障害ってなんだろう？」という授業案を作成して教育学部学生に対して講義を行った。

A. 研究の背景と目的

聴覚障害には、生まれつき障害がある先天性聴覚障害と、生後何らかの原因で障害が生じる後天性聴覚障害がある。先天性聴覚障害は様々な先天性疾患の中でも最も頻度の高い疾患に属し、実に新生児の 1000 人に 1 人の割合で誕生している。また、近年、後天性聴覚障害の一種である騒音性難聴や突発性難聴などが注目されている。しかし、「聞こえない・聞こえにくい」という症状は健聴者にとって具体的にイメージしづらいものであり、聴覚障害に対する正しい知識や認識が未だ得られていない。また、聴覚障害者は一見してその

障害が分からず、そのため周囲の人々に気づいてもらえないばかりか、「話しかけたのに無視をされた」と誤解されてしまうことや自分の伝えたいことを周囲に正確に伝えられないという経験をしていることが多い。

聴覚障害には、聞こえにくい声や音があったり、状況によって聞き取りづらいことがあったりと、人によって様々な聞こえ方がある。聞こえの程度も軽度から重度まで様々である。昨年度に健聴者に対して質問紙調査を行ったところ、「聴覚障害を持つ人は音がどのように聞こえていると思いますか」という質問に対して、「音が小さく聞こえる」と回答した者は

全体の 65.3 %、「ぼやけて聞こえる」と回答した者は 59.8 % と過半数に達したのに対し、「途切れて聞こえる」や「雑音が入って聞こえる」と回答した者はともに 20 % 前後であり認知度が低いということが明らかになった。補聴器の効果についても質問した結果、正しい認識を持つものは少なかった。補聴器は音を大きくする機器であるため状況によっては効果を十分に発揮できないことがある。聴覚障害者は補聴器をつけていれば音が明確に聞こえていると誤解されることが多いが、健聴者は「補聴器は難聴者の支援として万能ではない」ということを理解する必要がある。

健聴者は、「音が聞こえづらい」という状態がどのようなものであるか想像しづらいために、その症状と派生して生じる聴覚障害者の悩みや不便に感じることを状況に応じて判断しにくいようである。健聴者と聴覚障害者はもっと歩み寄りお互いを理解しあうことができるのではないだろうか。こうした現状を踏まえ、健聴者が聴覚障害という症状や聴覚障害者の心に対して理解を深められるようにするためには、学校という場を活用して聴覚障害を知る機会を持つことが一つの手段となり得ると考えられる。健聴者が聴覚障害を理解し、より身近に感じられるようにするためには、「難聴を疑似体験する」ということが一番の近道になるのではないかと考えた。その体験をもとに、健聴者が聴覚障害者のニーズや自分自身にできる支援について考えることが重要である。そこで、本研究では、難聴を疑似体験できるソフト HearLoss を活用し、聴覚障害者の QOL 向上のために学校教育でどのような働きかけができるかについて、その授業案を考案した。

B. 研究方法

B.1. 特別講義の実施

平成 22 年 10 月 16 日に、茨城大学で特別講義 III 「難聴児の支援～発達段階に合わせて～」を実施した。

B.1.1. プログラム

日時：10 月 16 日（土）

場所：茨城大学 教育学部

対象：養護教諭養成課程の院生および学部生
および茨城県内の養護教諭および同門会の会員の方、特別支援学校に勤務されている先生。

内容：

13:00 ～ はじめに

13:10 ～ 講演 「難聴児の支援～発達段階に合わせて～」

講師 長野県難聴児支援センター 難聴児療育支援員
前田 麻貴 先生

15:00 終了

B.2. HearLoss

B.2.1. HearLoss

HearLoss は、Division of Psychology and Language Sciences, University College London で作製され Web 上で公開されているフリーソフトである。本ソフトは、聴力損失の影響を健聴者に対して示すためのパソコンプログラムである。つまり、HearLoss を用いると、健聴者が難聴を疑似体験することができる。小さい音が聞こえないとどのように聞こえるのか、高音が聞こえないとどのように聞こえるのか、音が明瞭に聞こえないとはどのような感じなのか、というようなことが体験できる。

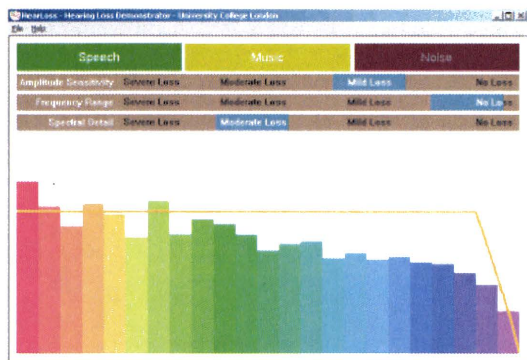


図 1 HearLoss

B. 2. 1.1. Hearloss の使用方法

HearLoss を以下からダウンロードする。プログラムは 2 つあり以下の通りである。

サンプルデータの入ったプログラム

<ftp://ftp.phon.ucl.ac.uk/pub/sfs/hearloss/hearloss100.exe>

サンプルデータの入っていないプログラム

<ftp://ftp.phon.ucl.ac.uk/pub/sfs/hearloss/hearloss.exe>

サンプルデータの入ったプログラムには、Speech・Music・Noise の音声サンプルがそれぞれ入っており、そのまま再生することができる。

一方、サンプルデータの入っていないプログラムには自身でデータを入れることができるためオリジナルのデータを再生できる。オリジナルのデータを設定するには、サウンドファイルの形式を WAV ファイルにする必要がある、変換方法の例を下記に示した。

- ① パソコンに CD 等から音源を取り込む。この時、CD から取り込んだファイルの形式は Open MG Audio となっている。この他にも、MP3、WMA のファイル形式からの変

換が可能である。

- ② Rip!AudiCO ver 4.03 フリーウェア版を <http://www.vector.co.jp/soft/win95/art/se202196.html> からダウンロードし、音源を WAV ファイルに変換する。
- ③ 変換したオーディオファイルは、HearLoss を保存しているファイルに保存する。
- ④ ファイル名を「speech」「music」「noise」のいずれかに設定する。

また、Zoom 社製録音機器「Handy Video Recorder Q3」で音声等を録音し、パソコンにデータを取り込むと、WAV ファイル形式になるため、そのまま HearLoss に用いることができる。

以上の方法でファイルを変換し、今回は以下の音源を使用した。

Speech：女子学生二人による朗読

Music：ドラマ「라이어ゲーム」より サウンドトラック

Noise：休み時間中の教室の雑音

元から入っているサンプルデータの Speech は英語であるため、日本人が使用する際に分かりやすいものとなるよう、日本語での朗読を録音し Speech に用いた。また、Music に用いた音源は、低音から高音まで音域が幅広いものを選曲し、聴力障害の影響が顕著に感じられるものにした。Noise には、聴覚障害児・生徒が普段どのような音の中で生活しているのか少しでも想像できるよう、教室の休み時間の様子を録音した音源を用いた。

B.3. 授業案の作成とミニ講義

B.3.1. 授業案の作成

健聴者が聴覚障害者に対しての支援のあり方を考えるきっかけとして、HearLoss を活用して授業例を考案した。

今回の授業例は、小学校高学年を対象としており、複雑な聴覚器の構造や音の伝わり方を簡単な言葉に置き換えて説明している。当教室で行った質問紙調査によると、聴覚障害を「知る機会があった者」と「知る機会がなかった者」では、聴覚障害や聴覚障害に関する認識に違いがあり、「知る機会があった者」の方が認識が高いということが明らかになった。そこで、できる限り早期から教育することにより、健聴者が聴覚障害を身近に感じられ、受け入れやすいものになるのではないかと考えた。今回のスライドを作成するにあたり、聴覚障害を子どもにも分かりやすく説明している絵本「ふしぎだね!? 聴覚障害のおともだち」を参考にした。聴覚器の構造や難聴の種類については、言葉だけでなくイラスト等を用いて説明するなどの工夫をし、難しい内容にも興味を持てるようにした。十分に授業時間が取れるのならば、聴覚障害者のコミュニケーション方法についての説明の中で、実際に子どもたちが手話や読話を行ってみると、それぞれの難しさなども実感でき有効である。

本授業案では HearLoss による難聴の疑似体験を通して聴覚障害者がどのような聞こえの中で生活しているのか、どのようなことに不便さや困難を感じているのか、ということ想像できるような体験にしたいと考えた。そこから、子どもたち自身が自分にできることを考えていけるよう、聴覚障害者と会話をする際に心がけることなど、関わり方につい

ての説明を中心に取り入れた。最終的には、聴覚障害は決して特別なものではなく、共に生活していくために自分にできることがまだまだあるという意識を子どもたちが持つようになることが目的である。

説明をより詳しくし、言葉遣いを変えることで、中高生や教職員にも応用できる。

作成した授業案のスライドとそれをもとに茨城大学教育学部養護教諭養成課程の学生に対してミニ講義を行った。作成した授業案とその時の様子は結果に示した。

B.3.2. 質問紙調査

ミニ講義のあと、ミニ講義に対する授業感想アンケートを行った。調査内容は、[1] 今日の授業を受けて、[2] HearLoss による難聴の疑似体験について、[3] 今日の授業全体の感想についてである。

C. 研究結果

C.1. 特別講義 III 「難聴児の支援～発達段階に合わせて～」

10 月 16 日に茨城大学教育学部で所属する養護教諭養成課程の院生および学部生や、茨城県内の養護教諭などに約 150 名に対して特別講義を実施した。本研究の共同研究者である信州大学 宇佐美真一先生に依頼して前田麻貴先生を講師としてお招きした。案内と当日の様子を下記に示す。

案内 難聴は 1000 人に 1 人の割合で生まれる頻度の高い疾患です。長野県難聴児支援センターは、きこえに問題があるかもしれないというお子さんから「難聴」の確定診断を

されたお子さんのご家族・関係する方の支援の拠点です。

本講義でお話くださる前田麻貴先生は、難聴児支援センターで療育支援員として、医療、保健、教育、福祉、行政など関連する機関と連携をとりながら、お子さんやご家族を早期からサポートする仕事をしています。



図2 特別講義の様子

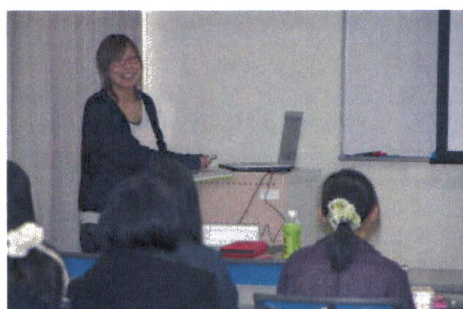


図3 ミニ講義の様子

内容

スライド①

聴覚障害とは何か？

聴覚障害は、音が聞こえない、あるいは聞こえにくいという障害です。
聞くことが難しいという意味で難聴ともいいます。
どれくらい聞こえにくいかは人によって様々です。



C.2. 授業案の作成とミニ講義

HearLoss を用いて授業案を作成し、養護教諭養成課程 2、3 年生に対して、4 年生がミニ講義「聴覚障害ってなんだろう？」を行った。

皆さんは、聴覚障害と聞いて、どのようなことをイメージしますか？聴覚障害は、音が聞こえない、あるいは聞こえにくいという障害です。聞くことが難しいという意味で、難聴とも言います。

どれくらい聞こえにくいのかというのは人によって様々ですが、聞こえないことでコミュニケーションや日常生活に困ったことがあるときに、障害と捉えます。

スライド②

コミュニケーションの方法は？

- ◆補聴器は音を大きくしてくれる
- ◆読話は口元の動きを読み取る
- ◆筆談は文字を書いて伝え合う
- ◆手話は手や顔の動きで伝える



聴覚障害者のコミュニケーションの方法はいくつかあります。

補聴器は、耳につけると音を大きくしてくれる機械です。音が大きくなるからといって、すべての音が聞こえるようになるわけではありません。また、雑音なども大きくなってしまいうるさい場所では聞き取ることが難しいです。

右の写真を見て下さい。上が耳かけ型補聴器で、下が耳穴型補聴器といいます。

読話は、口元の動きを見て、相手が何を話しているか読み取ります。正面を向いてゆっくり話していると、読話は理解の助けになります。

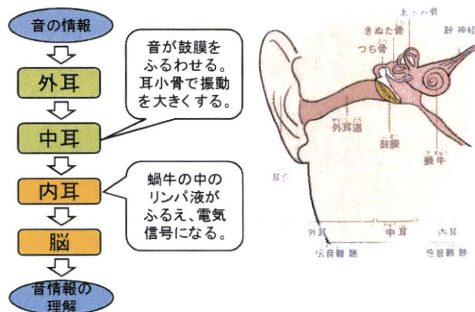
筆談は、お互いに文字を書いて言いたいことを伝え合うことです。時間はかかりますが、言いたいことを正確に伝えることができます。

手話は、手や指や腕を動かしたり、顔の動きを使ったりして、意味や思いを伝えます。

例えば「ありがとう」はこう表現します。(実際に手話を行う。)聴覚障害のある人みんなが手話を使うわけではありません。

スライド③

聞こえの仕組みを知ろう



ここで、音が聞こえる仕組みを理解しましょう。

私たちが耳と言っている、外から見えている部分は耳介といいます。音はこの耳介から入ってきて、外耳道、つまり耳の穴を通して鼓膜にぶつかります。耳介と外耳道の部分を外耳といいます。

音というのは、空気の振動です。鼓膜を震わせた振動は次に、その奥の中耳へと伝わります。中耳には、ツチ骨・キヌタ骨・アブミ骨という3つの小さな骨があり、まとめて耳小骨といいます。耳小骨は、音がよく聞こえるように振動を大きくする働きがあります。

振動はさらに奥の内耳へと伝わります。内耳は音を感じる場所で、カタツムリのような形をした蝸牛があります。中にはリンパ液が入っていて、振動はここで液体の揺れとなり、さらに電気信号となって聴神経に伝わります。聴神経から脳に信号が届くと、音が聞こえたと感じるのです。

スライド④

伝音難聴と感音難聴のちがい

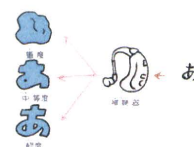
◆伝音難聴

外耳から中耳までの間の働きが上手くいかない障害。補聴器をつけて音を大きくすると、聞こえやすくなる。

◆感音難聴

内耳や聴神経の働きが上手くいかない障害。音がゆがんで聞こえるため、はっきりと聞き分けることができない。

感音難聴の聞こえ方



外耳から中耳までの間の働きが上手くいかない聴覚障害を「伝音難聴」といいます。音を伝えるのが難しくなるからです。伝音難聴の人は、耳鼻科で治療し、補聴器をつけて音が大きく聞こえるようにすると、聞こえやすくなります。

内耳や聴神経の働きが上手くいかない聴覚障害のことを「感音難聴」といいます。音を感じ取るのが難しくなるからです。感音難聴の程度が重くなると、補聴器で音を大きくするだけでは、すぐによく聞こえるようにはなりません。図のように音が歪んで聞こえてしまうからです。「あ」という言葉を補聴器で大きく聞こえるようにすると、難聴が軽い場合には「あ」と分かりますが、難聴が少し重くなると「あ」という形が崩れてしまっていますね。難聴がもっと重くなるともう「あ」だと分からなくなってしまいます。補聴器は言葉をはっきりと聞こえるようにすることはできないのです。

伝音難聴と感音難聴が合わさった「混合難聴」もあります。

スライド⑤

聞こえにくいってどういうこと？

聞こえにくさを体験してみよう。

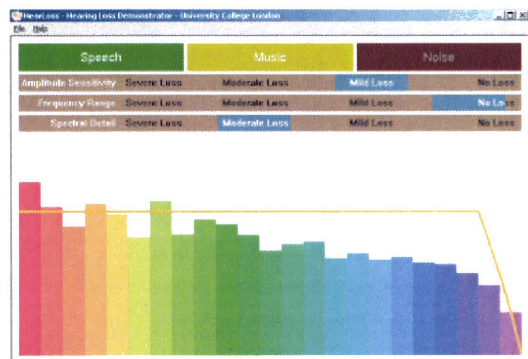
私たちにとって、「聞こえる」ということは当たり前です。身のまわりにあふれている音が聞こえにくかったら、どうでしょうか？



私たちの身の回りにはたくさんの音が溢れています。その音が聞こえなかったり、聞こえにくかったりしたらどうでしょうか。

これから、みなさんには難聴を疑似体験してもらいます。聞こえにくいということがどのようなことなのか、どのようなときに不便さを感じるのか、考えてみましょう。そして、私たちにできることは何か、それぞれ考えてみてください。

ここで一度スライドを閉じ、HearLoss を起動する。



これは HearLoss といいます。

まずは、普通に音楽を流してみます。(Music を再生する。) この音楽が、伝音難聴の人にはこう聞こえています。

(Amplitude Sensitivity を下げていく。) 音楽がどんどん聞こえなくなっていくますね。

また、高音が聞こえなくなると、このように聞こえます。(Frequency Range を下げていく。) 高音が聞こえなくなるとというのは、感音難聴の症状です。

そして、音が歪んで聞こえるというのは、このような感じになります。(Spectral Detail を下げていく。) これも感音難聴の症状です。音がぼやけて雑音のようなものが混ざって聞こえます。

(Frequency Range と Spectral Detail を下げ、音楽を流したままスライド④を開く。)

この図のように、音が歪み、はっきりと聞こえなくな

っているのが分かりますか？

音が歪んで聞こえるというのはこのような状態なのです。

それでは、難聴の人はどのような世界で生活しているのか、少しだけ体験してみましょう。

(Speech を再生し Frequency Range を下げる。)

例え大きな声で話しても、高音が聞こえないという状態では聞き取るということがとても難しいということが分かりますか？これが、聞き間違いや聞き漏らしに繋がります。きちんと内容が伝わるまで、根気強く話し、伝わったことを確認することが大切です。

では、話し声などがうるさい場所を想像してみてください。

(Speech と Noise を同時に再生する。)

みなさんなら Speech を聞き取ることが出来ますね。難聴の人はどうでしょうか。

(Frequency Range と Spectral Detail を下げる。)

難聴者にとって雑音の中で話し声を聞き取るとはとても大変です。

(この状態で Noise を消す。)

静かになると少しだけ声が聞き取りやすくなったのが分かりますか？先生が大事な話をしているときに、みなさんがざわざわしていたら、聴覚障害のある人は大事な話を聞きそびれてしまうかもしれません。「静かな環境を作る」ということは、私たちにすぐできる支援の一つです。みなさんが体験したものは、聞こえ方の一つの例です。聞こえ方や聞こえにくさは一人一人違うということを忘れないで下さい。

(HearLoss を閉じ、スライドを再開する。)

スライド⑥

聴覚障害があるとこんなことが苦手

- 後ろや横から話しかけられること
- 何かをしながら同時に聞くこと
- よく似た言葉を聞き分けること
- 二人以上の声を聞き分けること
- 子音を聞くこと、話すこと



聞こえない・聞こえにくいということが少しはイメージできましたか？聴覚障害があると、次のようなことが苦手だと感じられたでしょうか？

まず、聴覚障害がある人は、聞く準備ができていないと、なかなか人の話を正しく聞き取ることができません。そのため、後ろや横から話しかけられたり、何かをしな

がら同時に聞いたりするということが苦手です。

また、聞く準備ができていても、音をはっきりと聞こえないため、よく似た言葉を聞き分けることが難しいです。特に「さしすせそ」などの子音は聞き取りにくく、自分の声も聞こえにくいことから、子音を正しく発音することが苦手です。

次に、補聴器をつけていると、みんなの声が全部同じように聞こえてしまいます。そのため、二人以上の声を聞き分けることが苦手です。グループで話し合うときなどは、誰が話しているのかきちんと示すようにしましょう。

スライド⑦

話すときはこうしよう

◆相手の注意を向けてから

まずは相手の正面にまわってから目を合わせ、相手がこちらに気付いてから話しましょう。



◆何について話すか示してから

例えば、消しゴムを借りたいときにはその消しゴムをかかげて、目の前に見せてから「かして」と言えば伝わります。



聴覚障害の人と話すときは次のようすると、お互いに話しやすくなります。

「相手の注意を向けてから」まずは相手がこちらに気付いてから話しましょう。

「何について話すか示してから」例えば、消しゴムを借りたいときには、その消しゴムをかかげて、目の前に見せてから「かして」と言えば伝わりやすくなります。

スライド⑧

◆相手にわかるように話す

話が複雑にならないよう、短い文に区切りながら話しましょう。口を大きくあけてゆっくりめに話すと、読話がしやすくなります。



◆伝わったかどうか確認する

言ったことがちゃんと伝わったかどうか、きちんと確認するようにしましょう。



「相手にわかるように話す」話が複雑にならないよう、短い文に区切りながら話しましょう。口を大きく開けてゆっくりめに話すと、読話がしやすくなります。

「伝わったかどうか確認する」言ったことがちゃんと伝わったかどうか、きちんと確認するようにしましょう。

スライド⑨

相手の話をきちんと聞くことも大切

聴覚障害のある人の中には、ときどき言葉の発音が違っている人がいます。そのような人と話す場合でも、相手の言いたいことを分かわろうとする姿勢がとても大切です。

決してさえぎったりからかったりしないようにして下さい。こちらがきちんと聞こうとしていれば相手も気持ちよく話すことができます。



分かりやすく伝えることも大切ですが、相手の言っていることをきちんと聞くことも大切です。お互いに話をよく聞こうとすることで、会話ができるのです。

聴覚障害のある人の中には、ときどき言葉の発音が違っている人がいます。また、難しい言葉の意味を十分に理解できていない人もいます。そのような人と話す場合でも、相手の言いたいことを分かわろうとする姿勢がとても大切です。決してさえぎったりからかったりしないようにして下さい。こちらがきちんと聞きこうとしていれば、相手も気持ちよく話すことができます。

スライド⑩

特別扱いにならないように

聴覚障害のある人も、聞こえにくいということ以外は、他の人と変わりません。「聞こえないから何でもかわりにやってあげる」のではなく、一緒に参加できる方法を考えましょう。



聴覚障害のある人も、聞こえにくいということ以外は、他の人と変わりません。もちろん、聞こえにくくて困っている場合に、手助けすることは大切です。

しかし、それがいきすぎて特別扱いにならないようにしましょう。

「聞こえないから、私がなんでも代わりにやってあげるよ」というのではなく、一緒に参加できる方法を考えましょう。

C.2.1. 質問紙調査結果

1. 今日の授業を受けて、当てはまるものに○をつけて下さい。

① 耳の構造と聞こえの仕組みについて

よく分かった	42	人
まあまあ分かった	3	人
分からなかった	2	人

② 伝音難聴と感音難聴の違いについて

よく分かった	42	人
まあまあ分かった	4	人
分からなかった	1	人

③ 聴覚障害者のコミュニケーション手段について

よく分かった	42	人
まあまあ分かった	4	人
分からなかった	1	人

④ 聴覚障害者の苦手なことについて

よく分かった	41	人
まあまあ分かった	5	人
分からなかった	1	人

⑤ 聴覚障害者と会話をするときの注意点について

よく分かった	43	人
まあまあ分かった	3	人
分からなかった	1	人

2. HearLoss による難聴の疑似体験について

良かった点や疑問点・改善点等あれば具体的に書いて下さい。

○ 良かった点

- ・ 疑似体験によって聴覚障害者の聞こえを知ることができた。 18 人
- ・ 初めての体験だったので興味が持てた。 8 人
- ・ 口での説明より分かりやすかった。 7 人
- ・ 聞こえにくさだけではなく、聴覚障害者の気持ちが分かった。 6 人
- ・ 聴覚障害者と話す際に気をつけるべきことに気付けた。 3 人
- ・ 雑音がある、なしでの聞こえやすさの違いに驚いた。 3 人
- ・ 耳栓等での体験より、聴覚障害をリアルに感じることができた。 2 人

○ 疑問点・改善点

- ・ よく知っている曲やボーカル入りの曲、日常生活の音なども聞いてみたい。 8 人
- ・ 「音が歪む」ということが少し分かりづかった。 3 人
- ・ 何度か聞き比べられたらもっと分かりやすかった。 3 人
- ・ スピーチの声の種類をもっと増やしてほしい。 2 人
- ・ もう少しゆっくり操作して欲しかった。 1 人
- ・ 音が流れているときに説明されると聞こえづらい。 1 人
- ・ HearLoss の表示を日本語にした方が良い。 1 人

3. 今日の授業全体の感想や疑問に思ったこと

と等あれば、自由に書いて下さい。

- ・説明が分かりやすかった。 11 人
- ・HearLoss の体験が初めてで、興味が持てた。 10 人
- ・話し方がゆっくりで聞きやすかった。 6 人
- ・実際に聴覚障害者との交流があったのか？ 2 人
- ・養護教諭として精神的ケアの必要性を感じた。 1 人
- ・多くの人に聞いてもらいたい授業だと思った。 1 人
- ・補聴器についてもっと知りたい。 1 人
- ・もっと視覚的な説明も入れたら分かりやすい。 1 人
- ・これから自分の勉強に活かしたい。 1 人

D. 考察

先天性難聴は新生児の 1000 人に 1 人の割合で誕生し、先天性疾病の中でも最も頻度の多い疾患に属する。また、近年では、騒音性難聴や突発性難聴などは後天的な疾患としても注目されている。その一方で、「聞こえない・聞こえにくい」という症状は健聴者にとって具体的にイメージしづらいものであり、聴覚障害に対する正しい知識や認識が十分に得られていないという現状がある。そのため、健聴者は聴覚障害者をどう支援したらよいのか、どのように関わればよいのかが分からないようである。そうした事実が、健聴者が聴覚障害者との関わりを積極的に持てない要因となり、聴覚障害者にとって決して生活しやすいとは言えない社会環境を作り出している。し

かし、反対に言えば、健聴者と聴覚障害者はまだまだ歩み寄ることができるということでもある。健聴者が聴覚障害者の気持ちや疾病に関する理解を深めることが出来れば、お互いが生活しやすい調和のとれた環境を実現させることができ、そのための 1 つの手段として、学校教育という場は非常に有効に活用できると考えられる。

そこで、本研究では、聴覚障害者の QOL 向上のために学校現場でどのような働きかけができるか考察することを目的とし、聴覚障害に関する文献研究を行い、難聴を疑似体験できるソフト HearLoss を用いた授業例を考案した。

聴覚障害者の聞こえ方やコミュニケーション方法は一人一人異なる。しかしながら、健聴者には「聴覚障害者のコミュニケーション方法＝手話」という認識や「補聴器を装着している＝何でも聞き取ることが出来る」などの誤った知識を持っている人も多く、第一に聴覚障害者にはそれぞれの聞こえ方・コミュニケーションの手段があるということを伝えていく必要があると思われた。特に、補聴器は単に音を大きくするものであるため、騒音下や距離がある場合など、状況によっては十分に機能しないという正しい知識を健聴者は持つべきである。また、筆談は伝えたいことを正確に伝えることができるもののやりとりで時間がかかるという点があり、一方、読話は視覚的に聞こえを補うものの相手の口元が見えづらかったり早口だったりするとあまり理解の助けにならないという点がある。このように、コミュニケーションの手段それぞれのメリット・デメリットを知り、聞き取りにくい単語や会話のキーワードのみ筆談で伝え

るなど、健聴者も状況に応じて対応していくことが必要になってくると思われる。「聞こえない・聞こえにくい」という障害は、身体的な障害、つまり聴覚障害者自身の障害だが、そこから生じるコミュニケーションの障害は、健聴者の誤った認識や誤解が生み出しており、社会が作った障害である。

健聴者が聴覚障害者の聞こえについて理解するためには、聴覚器の構造と音の伝わり方および音の構造と人間の聞こえについての正しい知識を持つ必要がある。複雑な聴覚器の構造や障害部位によって異なる難聴の特徴を健聴者にいかに分かりやすく伝えるかが重要であり、視覚的な資料を用いるなどの工夫をすることにより、健聴者の興味・関心をひくことができる。例えば、病態別のオーディオグラムを見ると、伝音難聴と感音難聴の聞こえ方の違いが視覚的に分かる。また、様々な聴力型の種類を見ることによって、「聴覚障害者の聞こえ方は1つではない」ということが健聴者にも認識できるのではないだろうか。次に、音の構造という視点から考えると、聴覚障害者がなぜ聞き間違いを起こしやすいのかということや、聞こえないからといって大きな声で話せばいいというわけではないということが分かり、健聴者が気をつけるべきことが見えてくる。聴覚障害者は音の情報の一部が欠落してしまうため、聞こえないのではなく聞き間違いが多くなる。そのことを考慮し、健聴者は分かりやすく話すことと同時に、正確に伝わるまで根気強く話すということを心がける必要がある。そうした心がけ一つで聴覚障害者は会話しやすくなるのである。他にも、相手がこちらに気付いたことを確認してから話す、何について話すか視覚的に示してから話す、出来る限り簡潔な文で話す、きち

んと伝わったことを確認する、というようなことを行うだけで、聴覚障害者と健聴者のコミュニケーションはスムーズになり、誤解も少なくなるだろう。また、聴覚障害者には言語障害のある人も多く、発音が不明瞭なことがある。そのような場合でも、健聴者は言語障害ばかりを意識するのではなく、自然体で聴覚障害者に接して話しやすい雰囲気をつくることを心がけ、苦手な発音の言葉は別の言い方で聞き直して確認したり、筆談やジェスチャーを用いたりするのも有効である。何より、発音や話し方ではなく、内容を汲み取ろうという気持ちで相手の話をよく聞くということが重要である。聴覚障害という障害そのものの治療には限界があったとしても、コミュニケーション障害は周囲の人々によっていくらかでも改善できるのである。

しかし、前述したように、健聴者にとって「聞こえない・聞こえにくい」という症状は具体的にイメージしづらいものであり、聴覚障害の症状と派生して生じる聴覚障害者の悩みや不便さになかなか気付くことができない。そこで、健聴者が難聴を疑似体験できるものとして「HearLoss」というパソコンソフトを利用することにした。HearLossは、会話(Speech)、音楽(Music)、雑音(Noise)を再生し、聴覚障害が与える聞こえ方への影響を再現することができる。例えば、小さい音が聞こえないとどのように聞こえるか、高音が聞こえないとどのように聞こえるか、音が明瞭に聞こえないとはどのような感じなのか、あるいはそのような症状を持った人が雑音の中で会話を聞くとどれくらい聞き取りづらいのか、ということはこのソフトを用いて説明することによって、健聴者は伝音難聴や感音難聴などの聴覚障害の聞こえについてイメージ

しやすくなる。ただし、気をつけなければならないのは、このソフトは「難聴の人の聞こえを完全に再現したものではない」ということである。聴力の様相、聞こえにくさというものは一人一人が異なる。そして、疑似体験の目的は「聞こえにくいことそのものを知る」ことにより、「聞こえない・聞こえにくい」ことによる不安感や困り感を健聴者が実感し、どのような支援を行うことが適切なのかを工夫したり、補聴器や人工内耳の装用をはじめとした「よりよい聞き取りへの環境整備」を目指したりすることが重要である。ただ単に音が聞こえていればいいのではなく、相手が何を言っているのかが分かって初めて「聞こえている」といえるのだということを、健聴者は理解しなくてはならない。

以上のことを踏まえて、HearLoss を用いて健聴者が聴覚障害者のニーズ、そして自分にできることについて考えるきっかけとなる授業例を提案した。授業のメインは HearLoss による難聴の疑似体験を通して聴覚障害に関する知識、特に聴覚障害者の聞こえや日常生活の中の困難等を説明することで、健聴者の聴覚障害理解に繋げたいと考えた。その上で、聴覚障害者も聞こえにくいこと以外は健聴者と何も変わらないということを伝えていくことが重要である。聴覚障害者の障害にばかり目がいき、特別扱いになってしまうことのないように支援の方法には注意がいる。すなわち、「聞こえないからできない」、「聞こえないから代わりにやってあげる」のではなく、聴覚障害者をどのように支援すれば健聴者と共に活動することができるのか考え適切な支援を行えるようにする必要がある。教育の現場においては、教師はもちろん、周囲の子どもたちの理解と支援があれば、聴覚障害児・生

徒の負担は減り、活動の制限もなくなるはずである。支援方法は聴覚障害の程度やその子ども自身の希望も踏まえて考えていくことが望ましいため、学級や学年に聴覚障害児・生徒がいるならば、その子どもに合ったものを考え、学校全体で共有していくべきである。例えば、座席は先生や他の児童・生徒の声がか聞こえやすい前列にすることや、話し合いのときには机をコの字型に並べて全員の顔が見えるようにすること、そして屋外で教師等と距離が生じる体育の授業では目で見て分かる合図を用いるなど、すぐに実践できることも多い。何よりも、静かで聞き取りやすい環境と、聴覚障害者が話しやすい環境を作ることが必要であり、子どもたち自身が常にそうした意識を持つような指導が必要である。そのような環境は聴覚障害者だけでなく、健聴者にとっても生活しやすい環境でもある。健聴者と聴覚障害者が共に生活していく中で、健聴者と聴覚障害者という垣根を越えて、自然とお互いを思いやり、尊重し合う心が育まれていくことが望ましい。聴覚障害が二次的なコミュニケーション障害を生み出しているという問題は、一刻も早く解決しなくてはならない。

今回の授業例に用いた方法以外にも HearLoss は様々な使い方があり、どのような話し方が聞きやすいか聞き比べてみたり、一度に複数の人が話すと聞き分けにくいことや、作業をしながら聞き取ることの難しさを体験したりするなど、いくらでも応用できる。実際に HearLoss で難聴を疑似体験することで、健聴者の聴覚障害に対する認識はどれほど変化するのか調査し、より興味・関心をひく授業を考案していくことが今後の課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishihara K, Okuyama S, Kumano S, Iida K, Hamana H, Murakoshi M, Kobayashi T, Usami S, Ikeda K, Haga Y, Tsumoto K, Nakamura H, Hirasawa N, Wada H, Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutation. *Hearing Research*, **270**, 110-118, (2010).

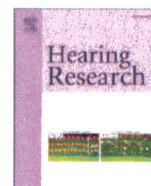
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Ishihara K</u> , Okuyama S, Kumano S, Iida K, Hamana H, Murakoshi M, <u>Kobayashi T</u> , <u>Usami</u> <u>S</u> , <u>Ikeda K</u> , <u>Haga Y</u> , <u>Tsumoto K</u> , <u>Nakamura H</u> , <u>Hirasawa N</u> , <u>Wada H</u>	Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutation	Hearing Research	270	110-118	2010



Research paper

Salicylate restores transport function and anion exchanger activity of missense pendrin mutations

Kenji Ishihara^{a,b}, Shuhei Okuyama^a, Shun Kumano^a, Koji Iida^a, Hiroshi Hamana^a, Michio Murakoshi^a, Toshimitsu Kobayashi^c, Shinichi Usami^d, Katsuhisa Ikeda^e, Yoichi Haga^f, Kohei Tsumoto^g, Hiroyuki Nakamura^h, Noriyasu Hirasawaⁱ, Hiroshi Wada^{a,*}

^a Department of Bioengineering and Robotics, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 6-6-01, Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8579, Japan

^b Laboratory of Medical Science, Course for School Nurse Teacher, Faculty of Education, Ibaraki University, 310-8512, Japan

^c Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Graduate School of Medicine, Tohoku University, 980-8575, Japan

^d Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine, 390-8621, Japan

^e Department of Otorhinolaryngology, Juntendo University School of Medicine, 113-8421, Japan

^f Department of Biomedical Engineering, Graduate School of Biomedical Engineering, Tohoku University, 980-8579, Japan

^g Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 277-8562, Japan

^h Department of Chemistry, Faculty of Science, Gakushuin University, 171-8588, Japan

ⁱ Laboratory of Pharmacotherapy of Life-Style Related Diseases, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 980-8578, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2010

Received in revised form

26 August 2010

Accepted 30 August 2010

Available online 6 September 2010

ABSTRACT

The *SLC26A4* gene encodes the transmembrane protein pendrin, which is involved in the homeostasis of the ion concentration of the endolymph of the inner ear, most likely by acting as a chloride/bicarbonate transporter. Mutations in the *SLC26A4* gene cause sensorineuronal hearing loss. However, the mechanisms responsible for such loss have remained unknown. Therefore, in this study, we focused on the function of ten missense pendrin mutations (p.P123S (Pendred syndrome), p.M147V (NSEVA), p.K369E (NSEVA), p.A372V (Pendred syndrome/NSEVA), p.N392Y (Pendred syndrome), p.C565Y (NSEVA), p.S657N (NSEVA), p.S666F (NSEVA), p.T721M (NSEVA) and p.H723R (Pendred syndrome/NSEVA)) reported in Japanese patients, and analyzed their cellular localization and anion exchanger activity using HEK293 cells transfected with each mutant gene. Immunofluorescent staining of the cellular localization of the pendrin mutants revealed that p.K369E and p.C565Y, as well as wild-type pendrin, were transported to the plasma membrane, while 8 other mutants were retained in the cytoplasm. Furthermore, we analyzed whether salicylate, as a pharmacological chaperone, restores normal plasma membrane localization of 8 pendrin mutants retained in the cytoplasm to the plasma membrane. Incubation with 10 mM of salicylate of the cells transfected with the mutants induced the transport of 4 pendrin mutants (p.P123S, p.M147V, p.S657Y and p.H723R) from the cytoplasm to the plasma membrane and restored the anion exchanger activity. These findings suggest that salicylate might contribute to development of a new method of medical treatment for sensorineuronal hearing loss caused by the mutation of the deafness-related proteins, including pendrin.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The auditory system consists of three parts: the outer ear, middle ear and inner ear. Pendrin, which is encoded by the *PDS* (*SLC26A4*) gene, is a 780 amino acid, an 85.7 kDa membrane protein

having 12 putative transmembrane domains, and is mainly expressed in the inner ear, thyroid gland and kidney (Everett et al., 1997). In the inner ear, pendrin is detected in the apical membrane of the endolymphatic duct, endolymphatic sac and various cells which compose the cochlea (Yoshino et al., 2004). Pendrin belongs to the *solute carrier 26A* (*SLC26A*) family, which is a group of proteins acting as multifunctional anion exchangers, and transports anions of Cl^- , I^- , HCO_3^- and formate (Scott et al., 1999; Mount and Romero, 2004; Wangemann et al., 2007; Kopp et al., 2008). Pendrin is thought to play an important role in the inner ear as a $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

Abbreviations: 7-AAD, 7-amino-actinomycin D; NASEVA, non-syndromic hearing loss with enlarged vestibular aqueduct; *SLC26A*, solute carrier 26A.

* Corresponding author. Tel.: +81 22 795 6938; fax: +81 22 795 6939.

E-mail address: wada@cc.mech.tohoku.ac.jp (H. Wada).

transporter involved in the conditioning of ion concentration of the endolymphatic fluid (Mount and Romero, 2004; Wangemann et al., 2007). The loss of pendrin in *Slc26A4*^{−/−} mice, which is a model for Pendred syndrome, results in failure of HCO₃[−] secretion into endolymph, leading to hearing loss via acidification of endolymph and inhibition of Ca²⁺ reabsorption (Royaux et al., 2001; Wangemann et al., 2007).

More than 150 different mutations of the *PDS* gene have been found in humans so far. These mutations are responsible for Pendred syndrome, which is an autosomal recessive disorder characterized by sensorineuronal hearing loss, goiter and a partial defect in iodide organification, and for non-syndromic hearing loss with an enlarged vestibular aqueduct (NSEVA) (Everett et al., 1997; Kopp, 1999; Dossena et al., 2009). In Japanese, 18 point mutations of the *PDS* gene, i.e., 10 missense mutations, one stop mutation, four frameshift mutations, and three splice site mutations, are reported to lead to these disorders (Tsukamoto et al., 2003). Although Pendred syndrome is thought to account for up to 10% of all cases of syndromic hearing loss, no effective therapy for this syndrome has been established.

Abnormal protein folding or trafficking is associated with various diseases (Thomas et al., 1995; Taubes, 1996; Welch and Brown, 1996). Although, in general, newly synthesized membrane-associated and secreted proteins are translocated to the endoplasmic reticulum, where folding is facilitated by interaction of various endogenous chaperons, abnormal proteins produced by missense mutations are retained in the endoplasmic reticulum by misfolding (Ulloa-Aguirre et al., 2004). It is suggested that such retention and defective plasma membrane targeting of pendrin mutants play a key role in the pathogenesis of Pendred syndrome (Rotman-Pikielny et al., 2002; Dossena et al., 2009). Pharmacological rescue is one method of salvaging these defective proteins by low molecular compounds such as IN3 as chaperones (Conn et al., 2002; Ulloa-Aguirre et al., 2004). Pharmacological chaperones correct errors in folding and restore activity by reestablishing correct protein routing (Ulloa-Aguirre et al., 2004). It has been reported that the misfolded mutants of membrane proteins such as V2 vasopressin receptor, P-glycoprotein and GnRH receptor can be rescued by this method (Loo and Clarke, 1997; Morello et al., 2000; Janovick et al., 2002). Therefore, it is possible that recovery of pendrin mutants by some compounds could improve the condition of Pendred syndrome and NSEVA.

Recently, we have reported that salicylate, which binds to prestin with high affinity (Tunstall et al., 1995; Kakehata and

Santos-Sacchi, 1996), induces the translocation of prestin mutants to the plasma membrane from the cytoplasm (Kumano et al., 2010). Prestin is a member of the *SLC26A* gene family including pendrin, and there is approximately a 45% similarity between these proteins in amino acid sequences. Therefore, we hypothesized that pendrin mutants retained in the cytoplasm are induced to translocate to the plasma membrane by salicylate and the function is restored.

In this study, we focused on the 10 missense pendrin mutations (p.P123S (Pendred syndrome), p.M147V (NSEVA), p.K369E (NSEVA), p.A372V (Pendred syndrome/NSEVA), p.N392Y (Pendred syndrome), p.C565Y (NSEVA), p.S657N (NSEVA), p.S666F (NSEVA), p.T721M (NSEVA) and p.H723R (Pendred syndrome/NSEVA)) found in Japanese patients (Tsukamoto et al., 2003) and analyzed the localization and anion transporter activity of these mutant proteins *in vitro* and the effects of salicylate as a pharmacological chaperone for the rescue of the pendrin mutants.

2. Methods

2.1. Construction of expression vectors

The sequences encoding an N-terminal FLAG tag were added by PCR amplification to the cDNA for human wild-type pendrin (Accession No. NM_000441.1) and the resulting insert was cloned into pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). *E. coli* JM109 was transformed with the constructed expression vector (pcDNA3.1/pendrin-FLAG). Mutational studies targeted the genes of pendrin missense mutations reported in Japanese patients (Tsukamoto et al., 2003). To express 10 pendrin mutants, the mutations were introduced into the pcDNA3.1/pendrin-FLAG using the primer sets shown in Table 1 and QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's protocol. The constructs were verified by DNA sequence analysis.

2.2. Cell culture

HEK293 cells (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan) were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. For the experiments, HEK293 cells were seeded in each well of 6-well plate at a density of 5×10^5 cells in 2 ml of 10% FBS-RPMI-1640 medium. After 12 h, each expression vector (2 µg) was transfected into HEK293 cells using FuGENE HD Transfection

Table 1
The sequences of primer sets for site-directed mutagenesis.

Primers	Sequences	
p.P123S	Forward	5' GGATATGGTCTCTACTCTGCTTTTCTCCATCTGACAT AC 3'
	Reverse	5' GTATGTCAGGATGGAGAAAAAGCAGAGTAGAGACCATATCC 3'
p.M147V	Forward	5' CTTTCCAGTGGTGAGTTAGTGGTGGGACTCTGTTGTTT 3'
	Reverse	5' GAACAACAGATCCCACTAACTCACTGGAAG 3'
p.K369E	Forward	5' CTATTGCAGTGTCACTAGGAGAAGTATATGCCACCAAGTATG 3'
	Reverse	5' CATACCTGGTGGCATATCTCTCTACTGACACTGCAATAG 3'
p.A372V	Forward	5' GTGTCAGTAGGAAAAGTATATGTCACCAAGTATGATTACACC 3'
	Reverse	5' GGTGTAATCATCTTGGTGACATATACTTTCTACTGACAC 3'
p.N392Y	Forward	5' GCCTTTGGGATCAGCTACATCTCTCAGGATTCTTC 3'
	Reverse	5' GAAGAATCCTGAGAAAGTGTAGCTGATCCCAAGGC 3'
p.C565Y	Forward	5' CGATGGTTTTAAAAATATATCAAGTCCACAGTTGGATTGATGCC 3'
	Reverse	5' GGCATCAATCCAACTGTGGACTTGATATATTTTAAACCATCG 3'
p.S657N	Forward	5' CAAAGTGCCAATCCAACTTGTGCTTGACTGTG 3'
	Reverse	5' CACAGTCAAGCACAAGTTATGGATTGGCACTTTG 3'
p.S666F	Forward	5' CTTGACTGTGGAGCTATATTTTCTGGACGTTGTTG 3'
	Reverse	5' CAACAACGTCCAGGAAAAATAGCTCCACAGTCAAG 3'
p.T721M	Forward	5' CAACATTAGAAAGGACACATCTTTTGTGTTGTCATGATGC 3'
	Reverse	5' GCATCATGGACCATCAAAAGAATGTGCTTTCTAATGTTG 3'
p.H723R	Forward	5' CTTTGTGACGGTCCGTGATGCTATCTCTATCTACAG 3'
	Reverse	5' C TGTAGATAGAGTATAGCATCACGGACCGTCAAAAAG 3'