



2001年度日中医学協会共同研究等助成事業報告書

— 在留中国人研究者研究助成 —

2002年 2月 13日

財団法人 日中医学協会
理事長 殿

研究者氏名 李麗淑  [®]
 所属機関名 日本医科大学 耳鼻咽喉科教室
 指導責任者氏名 八木 聡明  [®]
 職 名 耳鼻咽喉科教室 主任教授
 所在地 東京都文京区千駄木 1-1-5
 電話 3822 2131 内線 6746

1. 研究テーマ

COCH 遺伝子発現の2つの特異性の検討

2. 本年度の研究業績

(1) 学会・研究会等における発表 有 ・ 無 (学会名・演題)

厚生労働省特発疾患対策研究事業

前庭機能異常調査研究班 平成13年度報告書

・ 内耳プロテオーム解析—今後の展望— 八木聡明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑ら

・ COCH 遺伝子発現の異質性とプロモーター解析の有用性 八木聡明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑ら

・ 外リンパ特異的音目PLP6Kの機能解析と臨床応用 八木聡明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑ら

(2) 学会誌等に発表した論文 有 ・ 無 (雑誌名・論文名)

3. 今後の研究計画

内耳性難聴に対す 遺伝子治療が近年注目を集め、国内外で研究されている。内耳に遺伝子を発現させた細胞を治療に用いる際は、最も重要な点は、その標的の特異性にある。遺伝子が周囲組織の中枢神経系、内耳、咽頭などに発現した場合予想できない副作用が生ずる。

そこで、今回は内耳特異的に遺伝子を発現させるか、という技術の開発が不可欠である。標的の特異性は一般に2つの方法によつて行われる。一つは特定の細胞に遺伝子を発現させる方法(転写調節によるターゲティング)、一つは特定の細胞に遺伝子を導入する方法(細胞ターゲティング)である。今回我々はCCH遺伝子プロモーターを用いて転写調節による内耳ターゲティングをおこなうことを最終目標としている。

内耳特異的なプロモーターを用いた遺伝子治療用のベクターは未だ開発されていないことから本研究により内耳遺伝子治療に新たな展開がもたらされる。

李麗淑は大学院在学中の4年間に下記の研究を予定している。1. CCH遺伝子発現の2つの特異性、時期組織特異性、発現過程の時期特異性の検討。2. CCH遺伝子転写の制御エレメント、プロモーター・エンハンサーを解析する; 3. このプロモーターを内耳遺伝子治療に用いる。

4. 指導責任者の意見

李麗淑は、当教室に留学以来臨床・研究面で日々研鑽を積み重ねている。李麗淑は中国下の初期臨床研修並に本院での研修の結果、耳鼻咽喉科医として必要な知識と技術を修得しつつある。日頃の勤務態度も非常に良好で、我々医師、病院スタッフの信頼を勝ち得ている。日本語能力は卓越しており仕事上会話に支障は全く無い。

研究面の勉学意欲も非常に旺盛で、自ら実験計画を立て、指導医の意見を聞きに来る。実験技術も優秀で安定した成果を得ている。また、遺伝子に関する基礎的な知識を得るべく日文学術書、英文の論文を読んだりあり、今後の彼女の研究の発展が非常に楽しみである。

この度、日中医学協会共同研究等助成事業から研究助成金をいただくことは、我々日本医科大学耳鼻咽喉科教室として非常に名誉なことであり、改めて感謝申し上げます。

今後とも日中医学研究発展のために努力する所存である。

指導責任者氏名

八木 稔 明 

5. 研究報告書

別紙報告書作成要領により、添付の用紙で研究報告書を作成して下さい。

研究発表中または研究中の本人のスナップ写真を添付して下さい。

※研究成果を発表する場合は、発表原稿・抄録集等も添付して下さい。

※発表に当っては、日中医学協会助成金による旨を明記して下さい。

遺伝性難聴DFNA9 病因遺伝子 COCHのアイソフォーム

研究者氏名	李麗淑
中国所属機関	延辺第二人民病院
日本研究機関	日本医科大学医学部耳鼻咽喉科
指導責任者	教授 八木聡明
共同研究者名	池園哲郎、新藤晋

要旨

我々は遺伝性難聴病因遺伝子、COCH遺伝子の蛋白レベルでの研究を行っている。COCH遺伝子産物(Cochlin)のp40蛋白のN末端配列に対して作成したp40-anti-cochlin抗体を用いて、ラットの内耳と内臓における、Cochlinのアイソフォームを検討した。その結果Cochlin様反応は内耳以外では大脳、小脳、脾臓、胸腺に認められた。この結果、Cochlinはごく微量ではあるが内耳以外の組織にも発現していることが解った。又内臓でのCochlinは内耳とは異なる数種の分子量のアイソフォームであり臓器特異的選択的スプライシングにより調整されているものと推測する。内耳以外の臓器に発見するCOCH遺伝子のアイソフォームの解析は、将来COCH遺伝子のプロモーターを用いた難聴の遺伝子治療法を開発する際に非常に重要な意味を持っている。

Key Words 非症候性遺伝性難聴、COCH 遺伝子、ウェスタンブロッティング、アイソフォーム、内耳、スプライシング

緒言

非症候性遺伝性難聴は、先天性難聴の大多数を占めると言われている。難聴・めまいと言った内耳障害に起因する症状以外に目立った異常所見が見られない(非症候性)この種の難聴の原因遺伝子を同定するのは非常に困難であった。しかし、近年の分子生物学の発展によりこの分野はここ4年間に急速に進歩し、現在、40個以上の非症候性遺伝性難聴の遺伝子座が明らかになっており、このうち9個の原因遺伝子が同定されている(<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/oto/oto/HHihome.htm>)。一方、これらの難聴病因遺伝子の蛋白レベルでの研究はほとんどなされていない。2次元電気泳動による難聴原因蛋白の同定の報告は我々の報告が最初である。

COCH遺伝子は1998年に発見された新しい遺伝子で、その機能は十分に解明されていない。しかしCOCHのミューテーションは常染色体優性難聴の一つであるDFNA9を発症させ、さらにメニエール病の発症に関わる可能性があるかと予測されている(1, 2)。

我々はすでに2次元電気泳動法を用いた内耳蛋白のプロテオーム解析をおこない、Cochlinに関して以下のことを明らかにした(3, 4)。

1. 内耳の構成蛋白の70%を占めること
2. Cochlinは3つの異なったN末端を持ち、分子量がそれぞれ63kDa, 44kDa, 40kDaの3種類のアイソフォームp63, p44, p40に分類される(図1)
3. それらのアイソフォームはさらに等電点が異なる合計で16個の蛋白から構成されている(図1)
4. ヒトDFNA9患者にみられる突然変異部位は全てp63にのみ含まれておりp44, p40には含まれていなかった(図2)
5. さらに、この突然変異部位はCOCH遺伝子のLCCL領域のみからされている(図2)

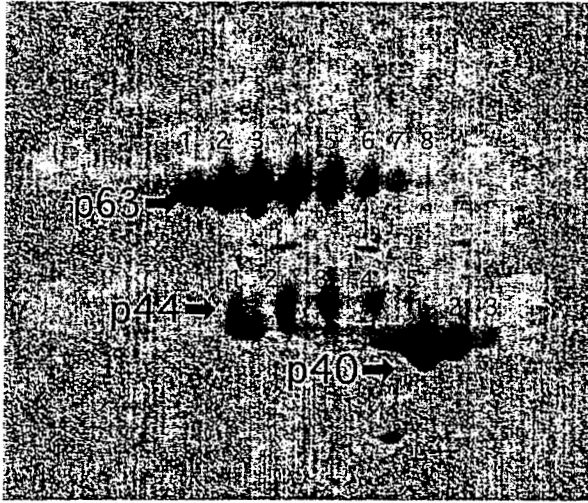
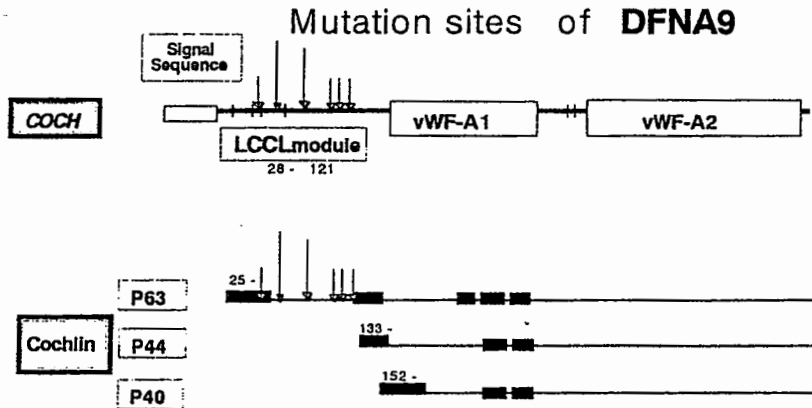


図1

ウシ内耳蛋白の2次元電気泳動結果
Cochlinのアイソフォームを表示
p 63 1-8
p 44 1-5
p 40 1-3

図2 COCH遺伝子とCochlin蛋白アイソフォームの模式図

Schematic representation of the *COCH* gene mutation and Cochlin



現在、COCH遺伝子はほぼ内耳特異的に発現していると考えられている。今回我々は、COCH蛋白のアイソフォームが内耳以外に発現しているか否かを確認する目的で実験を行った。COCH蛋白特異的抗体を作成しラット内臓のウェスタンブロッティングを行った。

対象と方法

p40蛋白のN末端の配列に対する抗ペプチドポリクローナル抗体 (p40-anti-cochlin 抗体) はあらかじめ作成した。ラットの内耳、大脳、小脳、眼球、ひ臓、肝臓、腎臓、肺、胸腺、腸から得られた組織をホモジナイズした。10% polyacrylamide slab gel を用いて SDS-PAGE を行った。27 mA、1 時間泳動した後ニトロセルロース膜へ転写した。gel の1レーンあたりに内耳組織は1.7 μg、内臓組織は1440 μg を泳動した。転写終了後、ニトロセルロース膜をブロッキング緩衝液 (5% skim milk、0.2% Tween 20、PBS) で、ブロッキングした (over night、4 度)。次に室温で2000 倍希釈の1次抗体 (p40 - anti - cochlin 抗体) と2時間反応させ、次に1000 倍希釈の2次抗体 (anti - Rabbit IgG antibody) と1時間反応させた。2次抗体の検出はDAB 染色法と ECL 染色法を用いた。

結果

- 1、Cochlin 様反応は内耳だけでなく大脳、小脳、目、脾臓、肝臓、胸腺に発見された。
- 2、Cochlin 様反応は肝臓、腎臓、肺、腸には発見されなかった。
- 3、内耳と比較して100 倍量の内臓蛋白を泳動したが、内臓の Cochlin 様反応は非常に弱く、DAB 染色法では検出できなかった。ECL 染色法で検出した内臓の Cochlin 様反応は内耳の約100分の1の強さで検出され、サンプル量が1/100であることを考えると内耳以外の臓器での発見は約1/10000 であると考えられた。
- 4、内臓では内耳の蛋白と異なる数種のアイソフォームが検出された。

大脳と小脳： 200 kda、90 kda、

脾臓： 40 kda、37 kda、34 kda、

胸腺： 40 kda、38 kda、37 kda、34 kda

- 5、脾臓と胸腺に共通して見られた40 kda、37 kda、34 kda のアイソフォームは全く同じサイズであった。

考察

COCH はヒト、マウス、ウシ、ラットでの発見が確認されており、79%から90%の高い相同性があることが明らかになった (3、4)。

今回我々は内耳と内臓各臓器の Cochlin アイソフォームを p40 - anti - cochlin 抗体を用いた western blotting で検討した。その結果 COCH 遺伝子のアイソフォームは目、肝臓、腎臓、肺、腸には存在しないことが判明した。また大脳、小脳、脾臓、胸腺の発見量は非常に微量 (1/10000) であり COCH 遺伝子は内耳にほぼ特異的に発現していた。極微量に発現している大脳、小脳、脾臓、胸腺のアイソフォームは内耳のアイソフォームとはまったく異なる分子量であった。これらは臓器別の splicing、もしくは翻訳後修飾、異なるプロモーター cap 作用により生じている可能性がある。

非症候性遺伝性難聴、DFNA9 は COCH 遺伝子の突然変異により発症する。難聴以外には明らかな異常所見は無いが、今回の我々の研究によって大脳、小脳、脾臓、胸腺には極微量ながら Cochlin が発現していた。これらの臓器における Cochlin は不明であるが、今後 DFNA9 の発症メカニズム、治療法を考える上で重要な所見である。現在我々は COCH 遺伝子のプロモーターを用いた内耳特異的遺伝子治療法を開発中である (5)。全身臓器における Cochlin 発現の検討は、COCH 遺伝子発現の制御機構、内耳における機能と突然変異による発症のメカニズム検討に非常に重要な課題である。今後、我々は COCH 遺伝子発現について、DNA、RNA レベルで検討を加えていく方針である。

文 献

1. Robertson, N.G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N. et al.
Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic sensorineural deafness with vestibular dysfunction. *Nature Genet.*, 20, 299-303. (1998)
2. Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI et al.
High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. *Hum Mol Genet* 1999 Aug;8(8):1425-9
3. Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T
Identification of the protein product of the Coch gene - hereditary deafness gene - as the major component of bovine inner ear protein. *Biochimica Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2001;1535(3):258-265
4. 内耳プロテオーム解析 ―今後の展望―
八木聰明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑、齋藤明彦、ルビーパワンカール、大久保公裕 (日本医科大学耳鼻科)、大森彬 (三菱化学生命科学研究所)、渡辺淳 (日本医科大学第2生化学) 厚生労働省特定疾患研究対策事業 前庭機能異常に関する調査研究班 平成13年度報告書
5. COCH遺伝子発現の異質性とプロモーター解析の有用性
八木聰明、池園哲郎、新藤晋、李麗淑、ルビーパワンカール (日本医科大学耳鼻科)、石崎正通 (日本医科大学第1病理)、渡辺淳 (日本医科大学第2生化学)、水田邦博 (浜松医科大学耳鼻科)、小林俊光 (東北大学耳鼻咽喉科)、ラスク・アンダーセン (ウプサラ大学)、工田昌也 (広島大学耳鼻科) 厚生労働省特定疾患研究対策事業 前庭機能異常に関する調査研究班 平成13年度報告書

作成日 平成14年3月13日