

## 53. 聴毛が一定の長さの特徴的形態を維持する機構の解明

上山 健彦

Key words : 聴覚, 聴毛, Rho-family small GTPase, Cdc42, NADPH oxidase

神戸大学 自然科学系先端融合研究環  
バイオシグナル研究センター  
分子薬理分野

### 緒言

先天性難聴や加齢性聴覚障害（老人性難聴）で苦しむ人々が驚く程多い（本邦に限定しても 1,000~2,000 万人）にも拘わらず、現状では補聴器や人工内耳など極めて限られた対処法しかなく、難聴治療は進歩・克服が切望される対象である。蝸牛（聴覚）有毛細胞が有する聴毛（不動毛）を介して、音波という機械的刺激を電気的シグナルに変換するという複雑かつ巧妙に感受される聴覚は、注目を集める研究領域であると共に再生医療のターゲットでもある。本研究で着目する聴毛は、特殊分化を果たした filopodia/microvilli（アクチン構造体）と捉えることが出来るが、その最たる特徴は、1）一定の高さを維持した数列の階段状構造を一生涯保ち続ける事、2）基部（下半）部での特徴的な先細り形態とその維持である。

聴毛発達は生後一定期間（マウス：一週間）で完了し、その後は生涯ゆっくりとしたアクチンのターン・オーバーにより、一定の長さ形態を保つことが解って来ているが、聴毛内のアクチンのターン・オーバーのメカニズム解明は、注目を集める研究課題である。本研究において、アクチン骨格を制御する Rho-family small GTPase のメンバーの 1 つである Cdc42 に注目し、内耳有毛細胞特異的に Cdc42 が knockout (KO) されるマウスを作製し、①「Cdc42 KO マウスが、正常聴覚獲得後に多彩な聴毛の形態異常による緩徐進行性の高度難聴を呈する」、②「Cdc42 は聴毛の形成過程よりむしろ維持期に機能する」、③「Cdc42 は聴毛膜に局在し、その活性化は聴毛の上半部の方が下半部よりも強い」等の 3 つの事実を世界に先駆けて明らかにした<sup>1)</sup>。これに加え、聴毛形成・維持期に、Cdc42 の機能を補完・代償する他の Rho-family GTPase メンバーが存在するのではないか、という観点から研究を行った。

近年、活性酸素種が老人性難聴、抗癌剤やアミノグリコシド系抗生物質による難聴の発症に関与するとの報告が蓄積されるようになってきた。我々は、耳石の形成に必須であり内耳特異的に発現する活性酸素産生酵素 (NADPH oxidase (Nox)) である Nox3 は、その活性化に Rho-family GTPase メンバーの一員である Rac を必要とすることを報告していた<sup>2)</sup>。そこで、ヒトでは 7 種存在する Nox の 1 つのグループである Dual oxidase (Duox: Duox1 と Duox2 の 2 種が存在)<sup>3)</sup>の内耳における mRNA レベルでの発現を確認後、Duox による活性酸素産生機序の解明を行った<sup>4)</sup>。

### 方法

Atoh1-Cre トランスジェニックマウスと Cdc42<sup>fl/fl</sup> コンディショナルノックアウトマウスを交配することにより内耳有毛細胞特異的 Cdc42-KO マウスを作製し、内耳有毛細胞の形態学的観察（電子顕微鏡も含む）を行った。さらに、Cdc42 の一分子 FRET プローブを全身で発現する Cdc42 FRET-biosensor TG マウス由来の内耳コルチ器を用いた二光子蛍光顕微鏡下での観察により、Cdc42 が蝸牛（聴覚）有毛細胞内のどの部位で活性化しているのかを解析した。

次に、mCherry-esp1 を過剰発現させた MDCK<sup>mCherry-esp1</sup> 安定細胞株を作製し、聴毛形成・伸長作用を有する Rho-family small GTPase をスクリーニングした。

最後に、Duox (Duox1, Duox2) の細胞外ループの 1 つである A-loop に着目し、A-loop を Duox の相互間、さらには Nox1, Nox5 の相互間で置換したキメラ変異体を作製し、それらを HEK293 細胞に過剰発現し、活性酸素アッセイ (O<sub>2</sub><sup>-</sup>leaking と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を測定) を行い、Duox の特性である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の特異的分泌機序を解明した。

## 結 果

### 1. 聴毛の維持に機能する Cdc42 と聴毛形成に関与する Rho-family small GTPase (Cdc42 以外) の検索

Cdc42-KO マウスは、正常有毛細胞の発達後に緩徐進行性の高音性難聴（8 週齢において 75 dB 程度の高度難聴）を来たした。電子顕微鏡を含めての形態学的検索を行うと、有毛細胞の脱落は基底回転及び内有毛細胞優位であり、内有毛細胞の聴毛では欠損・短縮・伸長・癒合などの種々の異常が認められた（図 1）。

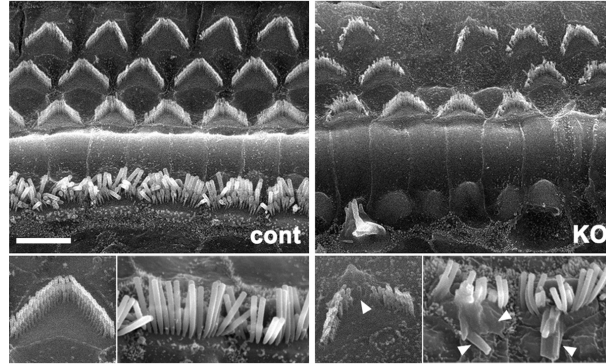


図 1. Cdc42 ノックアウトマウスにおける聴覚有毛細胞の変性・脱落<sup>1)</sup>。

Cdc42 KO では内有毛細胞優位の脱落（右弱拡大図）、外有毛細胞における聴毛のまだらな欠損（KO の左下図）、内有毛細胞における聴毛の癒合が認められる（KO の右下図）。Scale bar: 5  $\mu$ m.

形態学的な異常は、聴毛で強く 2 週齢より出現したが、遅れて（6 週齢から）軽度の頂側結合複合体 (apical junctional complexes) の異常（波打ち・アクチン裏打ち構造の菲薄化など）も出現してきた。Cdc42 の一分子 FRET プローブを全身で発現する Cdc42 FRET-biosensor TG マウス由来の内耳コルチ器を用いた二光子蛍光顕微鏡下観察により、Cdc42 が聴毛（特にその上半部）と頂側結合複合体で活性化していることを明らかにした（図 2）。

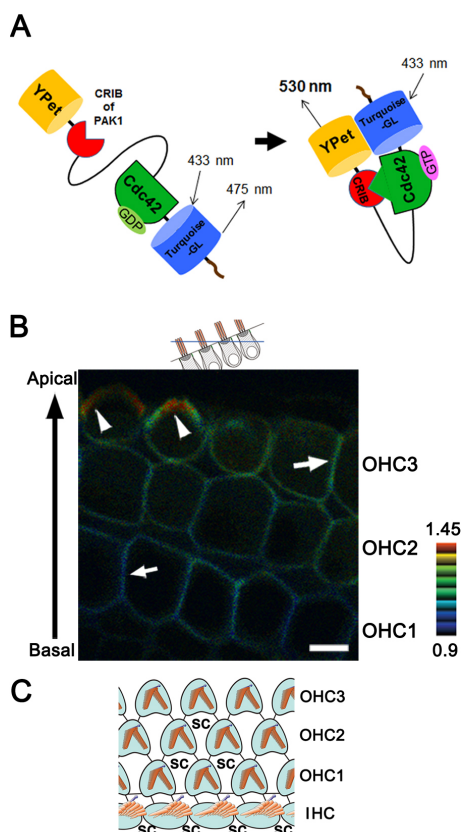


図2. Cdc42は聴覚有毛細胞内の聴毛と頂側結合複合体で活性化する<sup>1)</sup>.

A) Cdc42の一分子FRETプローブの模式図. B) 3列の外有毛細胞(OHC)のFRET画像(手前側がより基底側になる傾いた断面でのイメージング). Cdc42は聴毛上半部で最も活性化しており(矢頭),頂側結合複合体で弱く活性化している(大矢印=頂側>小矢印=基底側). C) 内耳コルチ器上面の模式図. IHC: 内有毛細胞, OHC: 外有毛細胞, SC: 支持細胞. Scale bar: 10  $\mu$ m.

次に、「聴毛形成・維持期に、Cdc42機能を代償する他のRho-family GTPaseメンバーやCdc42とは異なるアクチン重合因子が関与するのではないか」という観点から研究を行った。そこで注目したのが、Cdc42と比較的相同性の高いRacをはじめとするGDP-GTP変換によりシグナルを伝達する古典的Rho-family GTPaseである。これらのRho-family GTPaseの聴毛形成・伸長作用をスクリーニングするため、microvilli(聴毛のモデル)を有するMDCK細胞を用いることにした。MDCK細胞のmicrovilliは短く、通常の共焦点レーザー顕微鏡下での観察は極めて難しい。そこで、赤色蛍光蛋白質であるmCherryを標識したアクチン架橋蛋白質であるespin1を過剰発現させたMDCK<sup>mCherry-espin1</sup>安定細胞株を確立した。この細胞のmicrovilli長は、500 nmから3  $\mu$ mへ伸長した。現在、この細胞を用いて(microvilliの伸長作用を基準に)スクリーニングを行っている。

## 2. Duoxが活性酸素種の中でO<sub>2</sub><sup>-</sup>ではなくH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を特異的に産生するメカニズムの解明

ヒトにおいて7種存在する活性酸素産生酵素であるNoxの一種であるDuox(図3)が、活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)の中でもO<sub>2</sub><sup>-</sup>ではなくH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を特異的に産生することが知られていたが、その機序は不明であった<sup>3)</sup>。Duoxには2種のアイソザイム(Duox1, Duox2)が存在し、活性化にはそれぞれDuox activator 1(DuoxA1)およびDuoxA2と呼ばれる活性化因子とのヘテロ二量体形成が必須である。我々は、Duox1-DuoxA1, Duox2-DuoxA2, Duox1-DuoxA2のヘテロ二量体ペアではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>のみが分泌されるが、Duox2-DuoxA1のペアではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と共に少量のO<sub>2</sub><sup>-</sup>が分泌されることを発見し、この現象をO<sub>2</sub><sup>-</sup> leakageと名付け報告していた<sup>5)</sup>。本研究において、O<sub>2</sub><sup>-</sup> leakageが起こる機序及びDuox-DuoxA complexがO<sub>2</sub><sup>-</sup>をH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に変換する機序の解明を試みた。

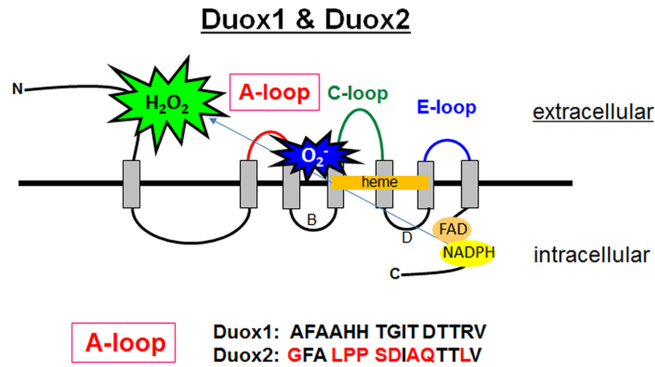


図3.  $\text{H}_2\text{O}_2$  を最終産物として細胞外に分泌する Duox の 2 次元構造と電子伝達.

Duox は  $\text{O}_2^-$  ではなく  $\text{H}_2\text{O}_2$  を最終産物として細胞外に分泌する. Duox には 3 つの細胞外ループが存在する (A-, C-, E-loop). Duox1 と Duox2 間での A-loop の配列の違いを表記.

Duox2 の細胞外ループの 1 つである A-loop を Duox1 の A-loop へと置換すると  $\text{O}_2^-$  leaking がストップし, 逆に, Duox1 の A-loop を Duox2 の A-loop に置換すると Duox2 は  $\text{O}_2^-$  leaking enzyme に変換した (図 4).

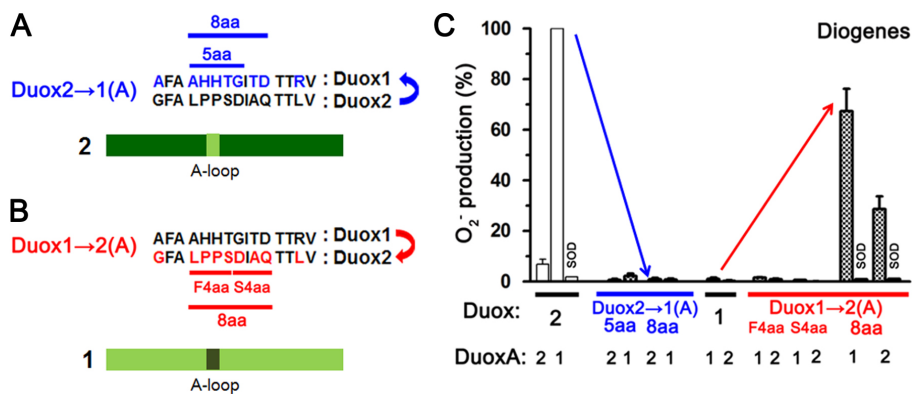


図4. Duox1 の A-loop は  $\text{O}_2^-$  から  $\text{H}_2\text{O}_2$  への変換を促進する<sup>4)</sup>.

A) Duox2 の A-loop を Duox1 の A-loop に変換したキメラ蛋白質 2 種 (Duox2→1(A:5aa), Duox2→1(A:8aa)) を作製. B) Duox1 の A-loop を Duox2 の A-loop に変換したキメラ蛋白質 Duox1→2(A:8aa) を含む 3 種を作製. C) Diogenes を用いた活性酸素アッセイ (HEK293 細胞に表記のプラスミドを過剰発現) を行うと, 2 種の Duox2→1(A) キメラでは  $\text{O}_2^-$  leaking がストップし, Duox1→2(A:8aa) では  $\text{O}_2^-$  leaking が出現する.

更に, Duox の A-loop を  $\text{O}_2^-$  産生酵素である Nox1, Nox5 の A-loop と変換すると, Duox1, Duox2 共に  $\text{O}_2^-$  leaking enzyme に変換した (図 5).

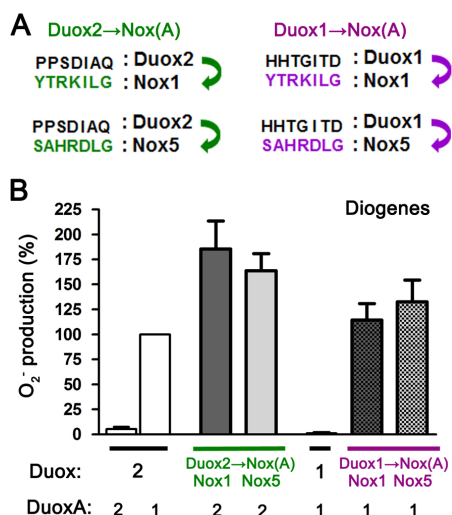


図5. Duox1 と Duox2 の A-loop は共に O<sub>2</sub><sup>-</sup> から H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> への変換を促進する<sup>4)</sup>.

A) Duox2 の A-loop を Nox1 もしくは Nox5 の A-loop に変換したキメラ蛋白質 2 種 (Duox2→Nox(A)) と同様の Duox1 キメラ蛋白質 2 種 (Duox1→Nox(A)) を作製. B) 活性酸素アッセイを行うと, Duox2→Nox(A)-DuoxA2 ペア及び Duox1→Nox(A)-DuoxA1 ペアからの O<sub>2</sub><sup>-</sup> leakage は, それぞれ Duox2-DuoxA2 及び Duox1-DuoxA1 ペアからのそれに比し劇的に増加する.

これらの結果は, Duox1 と Duox2 の A-loop のいずれもが, Duox の特性である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の特異的分泌に際し, O<sub>2</sub><sup>-</sup> の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> への変換に関与 (促進) することを意味していた<sup>4)</sup>.

## 考 察

我々は, 本研究により「Cdc42 は聴毛の形成過程よりむしろ維持に重要な役割を果たす」, 「Cdc42 の活性化は聴毛下半部よりも上半部で強い」という新発見をした<sup>1)</sup>. 我々は, 内耳有毛細胞特異的 Cdc42 KO マウスを作製し上記の新事実を解明したが, 内耳コルチ器を形成するのに重要な構成細胞の一つである内・外支持細胞で Cdc42 が特異的に KO されたマウスは, 頂側結合複合体 (apical junctional complexes) の障害のみを呈することが報告されている<sup>6)</sup>. これら 2 つの報告を総合すると, Cdc42 は蝸牛内・外有毛細胞 (特に内有毛細胞) の聴毛で特異的に機能する特性を有していることが明らかとなった. これらの新事実の発見に加えて, 本研究は「聴毛形成・維持期に, Cdc42 機能を代償する他の Rho-family small GTPase メンバーや Cdc42 とは異なるアクチン重合因子が機能・関与するのではないか」, 「聴毛基部での Cdc42 の活性低下と聴毛特徴的な先細り形態には相関があり, その両者を制御する分子が存在するのではないか」という新たな仮説をも惹起させた. 本研究において, Cdc42 の KO が聴毛の形態異常及び難聴をきたす原因として, N-WASP の活性化不全によるアクチン重合障害と cofilin の不活性化 (リン酸化) によるアクチン断片化・脱重合障害の両者の併発によるアクチン代謝障害を証明したが, この機序に加えて Cdc42 KO により RhoA の活性化亢進が起きている可能性が示唆された. これら上述の仮説及び推測の証明は, 今後の研究により行っていきたい. 今後の研究により, 「聴毛の維持メカニズム」の解明が出来れば, その障害により発症すると予測される加齢性聴覚障害 (老人性難聴) の新規治療法の開発に繋がる可能性があり, 更なる研究の発展を期している.

Duox に関する研究においては, 本研究により, Duox が O<sub>2</sub><sup>-</sup> ではなく H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を最終産物として分泌する機序に A-loop が重要な機能を果たすことを解明した. さらに, Duox の中でも Duox2 は Duox1 に比し O<sub>2</sub><sup>-</sup> を leaking しやすい性質を持っており, 生理的な条件でも少量の O<sub>2</sub><sup>-</sup> leaking が起きていることが示唆された. Duox2 の遺伝子変異により, 甲状腺ホルモンの生合成不全が起こり先天性甲状腺機能低下症が発症することが解かっており, KO マウスの作製により, Duox2-KO マウスは甲状腺機能低下症を呈するが, Duox1-KO マウスは呈さないことが明らかになって来ている<sup>3)</sup>. 今後の研究課題としては, Duox2 のみが O<sub>2</sub><sup>-</sup> leaking する機能を保持する生理的意義及びその役割の解明を行っていく予定である.

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸大学自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター分子薬理分野の齋藤尚亮教授と京都府立医科大学耳鼻咽喉科頭頸部部外科学教室の坂口博史准教授である。

## 文 献

- 1) Ueyama, T., Sakaguchi, H., Nakamura, T., Goto, A., Morioka, S., Shimizu, A., Nakao, K., Hishikawa, Y., Ninoyu, Y., Kassai, H., Suetsugu, S., Koji, T., Fritzsche, B., Yonemura, S., Hisa, Y., Matsuda, M., Aiba, A. & Saito, N. : Maintenance of stereocilia and apical junctional complexes by Cdc42 in cochlear hair cells. *J. Cell Sci.*, **127** : 2040-2052, 2014.
- 2) Ueyama, T., Geiszt, M. & Leto, T. L. : Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol. Cell Biol.*, **26** : 2160-2174, 2006.
- 3) Leto, T. L., Morand, S., Hurt, D. & Ueyama, T. : Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid. Redox Signal.*, **11** : 2607-2619, 2009.
- 4) Ueyama, T., Sakuma, M., Ninoyu, Y., Hamada, T., Dupuy, C., Geiszt, M., Leto, T. L. & Saito, N. : The extracellular A-loop of dual oxidases affects the specificity of reactive oxygen species release. *J. Biol. Chem.*, **290** : 6495-6506, 2015.
- 5) Morand, S., Ueyama, T., Tsujibe, S., Saito, N., Korzeniowska, A. & Leto, T. L. : Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation. *Faseb J.*, **23** : 1205-1218, 2009.
- 6) Anttonen, T., Kirjavainen, A., Belevich, I., Laos, M., Richardson, W. D., Jokitalo, E., Brakebusch, C. & Pirvola, U. : Cdc42-dependent structural development of auditory supporting cells is required for wound healing at adulthood. *Sci. Rep.*, **2** : 978, 2012.