

【目的】 本研究の目的は、私たちが同定した新規難聴原因候補 *SLC12A2* 変異による難聴発症の分子機序を動物モデル・細胞モデルを用いて詳細に解析することである。聴覚は内耳蝸牛による音刺激の感知と脳への神経伝達によって行なわれ、関連する遺伝子の突然変異は遺伝性難聴を引き起こす。500~1,000 人の新生児に一人は聴力に問題があるとされ、そのうち半数以上の原因が遺伝子変異である。難聴遺伝子検査は本邦で保険収載されているが原因判明率は 3~4 割にとどまる。私たちはこの診断効率を高めるため、新規難聴遺伝子同定を目的とし、全遺伝子（エクソーム）解析その他の解析も含め、新規難聴遺伝子候補 *Slc12a2* を 4 家系で同定し、発表してきた (Mutai et al., 2020 PlosGenet)。本遺伝子は Na^+ 、 K^+ 、 2Cl^- 共輸送体として、蝸牛内リンパ液組成の恒常性維持に必須であることが知られる。4 変異はいずれも特定のエクソン領域に集中し (図)、その一つはエクソンをスキップした転写産物を発現させる変異であった。興味深いことにこのエクソンスキップ型転写産物は脳では内在性に発現するが蝸牛では強く抑制されている。また各変異を導入した変異体のイオン輸送能は有意に低下していた。本研究ではモデルマウスの聴力等の表現型解析を実施した。また、遺伝子の組織特異的スプライシング調節機構の解析実験を立案し、実験系の確立に成功したので報告する。

【方法】 第一に、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて作出した *Slc12a2* 変異導入マウスより 2 系統を選択し、聴力等の表現型を解析した。第二に、エクソン 21 組織特異的スプライシングのメカニズムの検証とエクソン 21 スキップ阻害剤の薬剤スクリーニングに有用な、ルシフェラーゼレポーターを用いたスプライシング活性アッセイ系を構築し、細胞培養系によりその有用性を検討した。

【結果】 第一に、A : エクソン 21 のスキップを引き起こすと考えられる、難聴患者と等価と予想される変異を持つマウス、および B : エクソン 21 のスキップまたは遺伝子機能消失をもたらすと考えられる、エクソン 21 中フレームシフト変異を持つマウスの計 2 系統を選択した。A マウス系統は繁殖効率が非常に低く、現在解析を続行中である。B マウスは変異ホモマウスで聴性脳幹反応の閾値の著しい上昇がみられ、また前庭機能障害に特徴的な行動異常が観察された。この表現型は従来報告されていた *Slc12a2* 欠損マウスの報告とほぼ同等であった。第二に、レポーター遺伝子ルシフェラーゼ中に人工的に *Slc12a2* のイントロン 20 全長約 2.5 kb を挿入した発現ベクターの構築に成功した。これが実際にスプライシングにより、正常ルシフェラーゼと同等な活性をもつルシフェラーゼが発現すること、難聴患者で同定された変異を持つイントロン 20 存在下ではルシフェラーゼ活性が 100 分の 1 以下に低下することを確認した。本遺伝子の組織特異的スプライシングのメカニズムを解析するための有用なツールが開発されたのみならず、当該変異を原因とする難聴の治療薬候補のハイスループット・スクリーニングアッセイ系構築への重要な進展が達成された。

SLC12A2 タンパク質模式図と病的変異のエクソン 21 への集積

