

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592734

研究課題名(和文)疾患責任遺伝子産物TMEM16Eタンパクの安定化による疾患オンセット機構の解明

研究課題名(英文)Protein stabilization for TMEM16E

研究代表者

飛梅 圭(Kei, Tobiume)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：40350037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では常染色体優性遺伝疾患顎骨骨幹異形成症および常染色体劣性遺伝疾患肢帯型筋ジストロフィーの責任遺伝子TMEM16E分子の機能および生理的役割を分子細胞生物学的手法により検討した。その結果TMEM16EはTMEM16ファミリーの中でも際立ったタンパク不安定性を示すことを発見した。さらに、PI3Kシグナルの抑制あるいは化学シャペロン存在によりタンパク安定性が獲得されることを見出した。このタンパク安定化の特性は骨組織あるいは骨格筋特異的なタンパク安定化システムの疾患発生への関与を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We identified TMEM16E has a constitutive susceptibility to proteasome-dependent degradation, which was compromised by PI3K inhibitors or addition of a chemical chaperon in vitro. Since TMEM16E gains protein stability in skeletal muscle tissue, our results suggested tissue-specific environments (e.g., energy metabolism and molecular chaperon) may support stabilization of TMEM16E.

研究分野：機能系基礎歯科学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：TMEM16E GDD1 LGMD2L Anoctamin

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究計画組織は、常染色体優性遺伝疾患顎骨骨幹異形成症 (GDD) の責任遺伝子座が TMEM16E 分子をコードし、同遺伝子のミスセンス変異が優勢遺伝形質として GDD 発症に連鎖することを発見した。さらに、同遺伝子のナンセンス変異が劣性(質として常染色体劣性遺伝疾患肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2) 発症に連鎖することを報告した。

2. 研究の目的

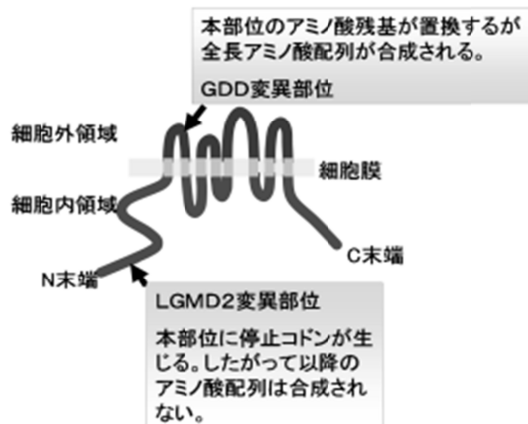
本研究では、TMEM16E 分子の機能および生理的役割を検討し、遺伝性疾患発症のメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

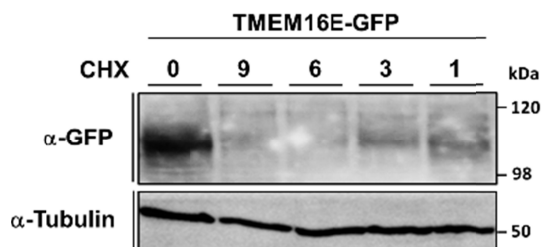
TMEM16E 分子の機能および生理的役割を分子細胞生物学的手法により検討した。

4. 研究成果

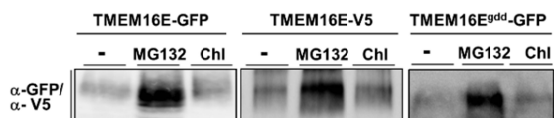
8回膜貫通分子TMEM16E模式図



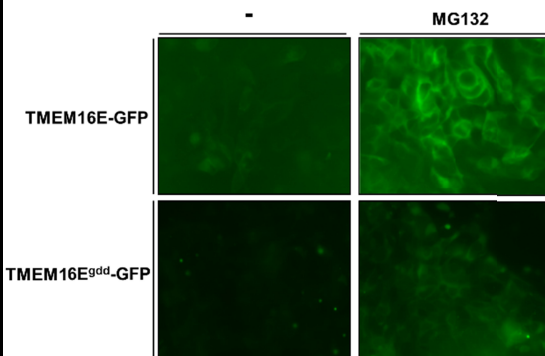
本研究では模式図に示した分子の C 末端に GFP タグあるいは V5 タグを融合したタンパクを培養細胞に強制発現することにより解析を行った。



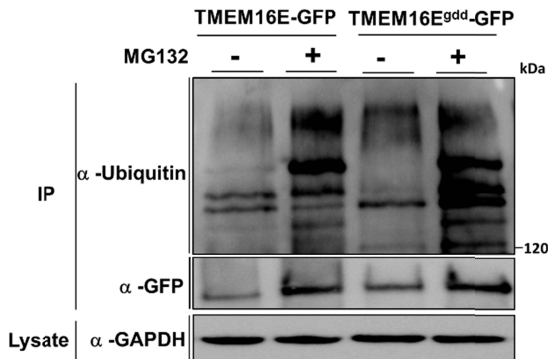
HEK293 細胞に安定発現させた TMEM16E は恒常的に分解されていることがタンパク合成阻害剤 (CHX) 処理によるタンパク安定性評価実験により判明した。



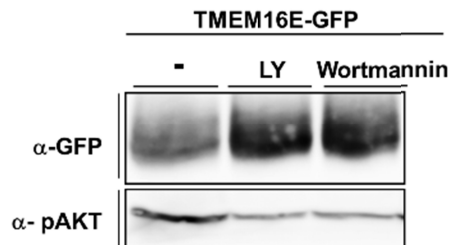
細胞内タンパク分解系であるプロテアソームおよびライソソームの TMEM16E タンパク不安定性への関与をそれぞれの阻害剤 (MG132, Chl) 処理により検討したところ、TMEM16E の恒常的分解はプロテアソームによって担われることが判明した



プロテアソーム阻害剤 (MG132) 処理による TMEM16E タンパクの分解回避は生細胞イメージングによっても確認された。

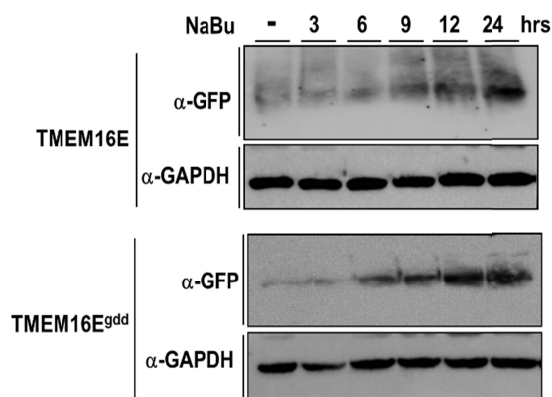


プロテアソーム阻害剤 (MG132) 処理細胞抽出液中から精製した TMEM16E タンパクはユビキチン修飾が顕著であり、TMEM16E はユビキチン付加を恒常的に受けるため、プロテアソーム依存的タンパク分解に感受性が高いことが判明した。



TMEM16E タンパク分解を制御するシグナル伝達機構を検索したところ細胞生存シグナル

系である PI3K 阻害剤 (LY, Wortmannin) によりタンパク安定化が認められたため、増殖細胞における TMEM16E 分解の必要性が示唆され



た。

さらに化学シャペロン (NaBu) 処理によって TMEM16E タンパクは安定化されたため、組織あるいは疾患部位特異的な分子シャペロン発現により、TMEM16E タンパクが安定化される可能性が示唆された。

本研究で明らかとなった TMEM16E タンパクに特徴的な不安定性回避 (安定化) の特性は、骨組織あるいは骨格筋特異的な疾患発生へのタンパク安定化制御システムの関与を示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 8 件)

1 Tran TT, Tobiume K, Hirono C, Fujimoto S, Mizuta K, Kubozono K, Inoue H, Itakura M, Sugita M, Kamata N. TMEM16E (GDD1) exhibits protein instability and distinct characteristics in chloride channel/pore forming ability. *J Cell Physiol*. 査読有
2014, 229(2):181-90.
doi: 10.1002/jcp.24431.

2 Rizqiawan A, Tobiume K, Okui G, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Takechi M, Higashikawa K, Kamata N. Autocrine galectin-1 promotes collective cell migration of squamous cell carcinoma cells through up-regulation of distinct integrins. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有
2013, 441(4):904-10.
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.152.

3 Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Higashikawa K, Kamata N. AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells.

J Cell Biochem. 査読有
2013, 114(9):2039-49.
doi: 10.1002/jcb.24545.

4 Fukui A, Ohta K, Nishi H, Shigeishi H, Tobiume K, Takechi M, Kamata N. Interleukin-8 and CXCL10 expression in oral keratinocytes and fibroblasts via Toll-like receptors.

Microbiol Immunol. 査読有
2013, 57(3):198-206.
doi: 10.1111/1348-0421.12022.

5 Tanaka F, Rizqiawan A, Higashikawa K, Tobiume K, Okui G, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Kamata N. Snail promotes Cyr61 secretion to prime collective cell migration and form invasive tumor nests in squamous cell carcinoma.

Cancer Lett. 査読有
2013, 329(2):243-52.
doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.023.

6 Hatano H, Shigeishi H, Kudo Y, Higashikawa K, Tobiume K, Takata T, Kamata N.

Overexpression of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in MC3T3-E1 cells induces proliferation and differentiation through phosphorylation of ERK1/2.

J Bone Miner Metab. 査読有
2012, 30(3):293-303.
doi: 10.1007/s00774-011-0318-0.

7 Makihira S, Nikawa H, Kajiya M, Kawai T, Mine Y, Kosaka E, Silva MJ, Tobiume K, Terada Y.

Blocking of sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase- $\alpha 1$ with ouabain and vanadate suppresses cell-cell fusion during RANKL-mediated osteoclastogenesis.

Eur J Pharmacol. 査読有
2011, 670(2-3):409-18.
doi: 10.1016/j.ejphar.2011.08.044.

8 Shigeishi H, Higashikawa K, Hatano H, Okui G, Tanaka F, Tran TT, Rizqiawan A, Ono S, Tobiume K, Kamata N.

PGE₂ targets squamous cell carcinoma cell with the activated epidermal growth factor receptor family for survival against 5-fluorouracil through NR4A2 induction.

Cancer Lett. 査読有

2011, 307(2):227-36.

doi: 10.1016/j.canlet.2011.04.008.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

飛梅 圭 (TOBIUME, Kei)

広島大学医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：40350037

(2)研究分担者

水田 邦子 (MIZUTA, Kuniko)

広島大学医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40432679

(3)連携研究者

鎌田 伸之 (KAMATA, Nobuyuki)

広島大学医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70242211