

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792345

研究課題名（和文）

顎骨骨幹異形成症の原因遺伝子 *TMEM16E* の遺伝子改変マウスを用いた機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis using genetically modified mice of *TMEM16E*

研究代表者

水田 邦子（MIZUTA KUNIKO）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院（歯）・助教

研究者番号：40432679

研究成果の概要（和文）：

本研究において、常染色体優性遺伝する顎骨骨幹異形成症（GDD）および常染色体劣性遺伝する肢帯型筋ジストロフィー（LGMD2L）の原因遺伝子である *TMEM16E* 遺伝子の機能解析の目的で、*TMEM16E* ノックアウトマウスを作製し *TMEM16E* の生理的機能解析を行った。見たとおり、明らかな表現型は認められなかったが、成体 *TMEM16E* ノックアウトマウスの全身臓器を病理組織学的に評価した結果、心室拡張および心室壁菲薄化を認めた。また、これまでに、*TMEM16* ファミリー遺伝子である *TMEM16A*, *TMEM16B* がカルシウム依存性 Cl<sup>-</sup> チャネルとして機能することが報告されている。*in vitro* の *TMEM16E* 導入安定株の系で、*TMEM16E* 遺伝子産物はカルシウム添加の有無にかかわらず Cl<sup>-</sup> チャネル活性を認めず、他の *TMEM16* ファミリー遺伝子とは異なった独自の機能を持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, for the purpose of functional analysis of *TMEM16E* gene that is a gene responsible for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2) and autosomal dominant Gnathodiaphyseal dysplasia (GDD), I performed the physiological function analysis of *TMEM16E* using *TMEM16E* knockout mice. Visibly, obvious phenotype was not observed in *TMEM16E* knockout mice. However we evaluated the systemic organ of adult mice histopathologically and found of ventricular wall thinning and ventricular dilatation. Furthermore, it has been reported that *TMEM16A* and *TMEM16B* of *TMEM16* family genes have function as calcium-dependent chloride channel. In *TMEM16E* stable overexpressing cell line, *TMEM16E* gene products had no significant chloride channel activity. We showed that *TMEM16E* has a unique role which is different from the *TMEM16* family genes other.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：*TMEM16E*, 顎骨骨幹異形成症, 肢帯型筋ジストロフィー, ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

顎骨骨幹異形成症 (GDD) は常染色体優性の遺伝性骨系統疾患であり、顎骨の骨性異形成症、四肢の易骨折性および長管骨骨幹部皮質の肥厚を遺伝形質として認める稀な疾患である。申請者ら研究グループは疾患責任遺伝子として全 22 エキソンからなる新規遺伝子 *TMEM16E/GDD1* の同定に成功し (Tsutsumi S et al. , Am J Hum Genet, 2004), 以降 *TMEM16E/GDD1* 遺伝子産物の機能解析研究を行ってきた。

常染色体劣性遺伝する肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2) の疾患責任遺伝子がディスフェルリン遺伝子変異アレルであることは国内他研究グループより 1999 年に報告され、その後も複数の疾患責任遺伝子同定されてきた。申請者らはディスフェルリン遺伝子が正常であるにもかかわらずディスフェルリン欠損と同様の臨床的症候を示す肢帯型筋ジストロフィー罹患国外家系における疾患責任遺伝子として *TMEM16E* の新規変異アレルを同定することに成功し 2010 年に報告した (Bolduc V et al. , Am J Hum Genet).

これまでに申請者は、*TMEM16E* 遺伝子および遺伝子産物の役割を明らかにすることを目的として、抗マウス *TMEM16E* ポリクローナル抗体を作製し、*TMEM16E* 蛋白の細胞内局在、組織分布の検討を行ってきた。その結果、マウス *TMEM16E* 蛋白が膜貫通型の糖蛋白で、細胞内の低比重膜画分に多く存在することが明らかとなった。また、*TMEM16* は遺伝子ファミリー (*TMEM16A* ~ *K*) を形成しているが、*TMEM16* ファミリー遺伝子産物の機能はこれまで不明であった。2008 年に *TMEM16A* がカルシウム依存性 Cl<sup>-</sup> チャンネルとして機能する (Schroeder

BC et al. , Cell, 2008) ことが、また 2009 年には *TMEM16B* も同様の機能をする (Stöhr H et al. , J Neurosci., 2009) ことが相次いで報告された。*TMEM16E* 遺伝子産物はカルシウム添加の有無にかかわらずクロライドチャンネル活性を認めず、カルシウム依存性 Cl<sup>-</sup> チャンネル機能とは異なった機能を持つことが予想される。

*TMEM16E* は遺伝学的手法で GDD および LGMD2 の原因遺伝子として同定されたが、*TMEM16E* 遺伝子産物の生化学的機能やその発症メカニズムは、まだ全く不明である。*TMEM16E* は遺伝性の骨系統疾患と筋疾患の両方の原因遺伝子として同定され、その機能を明らかにすることは、様々な骨疾患や筋疾患の病態の理解や治療に寄与する可能性がある。

## 2. 研究の目的

近年申請者の研究グループは 8 回膜貫通分子 *TMEM16E* 遺伝子上の異なった変異が常染色体優性遺伝する顎骨骨幹異形成症 (GDD) および常染色体劣性遺伝する肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2L) の原因であることを見いだした。最初の細胞外ループの 1 アミノ酸変異をコードする変異アレルが優勢形質として GDD を発症させ、*TMEM16E* をコードできない変異アレルが劣性形質として LGMD2 を発症させる。したがって、GDD 変異アレルは機能獲得アレル (gain of function) と考えられ、LGMD2 変異アレルは機能喪失アレル (loss of function) と考えられる。*TMEM16E* 機能獲得アレルと機能喪失アレルがそれぞれ骨 (GDD) と骨格筋 (LGMD2) に限局性病変を発症させるメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) TMEM16E の生理的機能解析を行うことを目的に, TMEM16E ノックアウトマウスを作製し, その表現型解析を行った. また, 筋ジストロフィーのモデルマウスと比較検討を行った.

(2) HEK293細胞に *TMEM16E* を遺伝子発現させた *in vitro* の系で, 機能未知である TMEM16E の生化学的解析を行い, その安定性, 局在, クロライドチャンネル活性について検討した. さらに, 他の TMEM16 ファミリー遺伝子とその発現・機能を比較検討した.

### 4. 研究成果

(1) マウス BAC クローンより *TMEM16E* 遺伝子の染色体 DNA を単離し, *TMEM16E* の Exon1 を含む領域を Neo 遺伝子と置換したターゲティングベクターを構築した. ターゲティングベクターを C57BL/6 由来の ES 細胞に遺伝子導入し, 相同組み換えをした ES 細胞を用いキメラマウスを作製し, 交配によりノックアウトマウスを樹立した.

TMEM16E の loss of function により 肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2L) の病態が引き起こされることから, 作製したノックアウトマウスが筋症状を示すことが予想されたが, TMEM16E ノックアウトマウスは正常に発育し, 体重等の形態学的な異常は認められなかった. さらに, 成体 TMEM16E ノックアウトマウスの全身臓器を病理組織学的に評価したところ, 骨格筋に筋委縮等の異常所見は認められなかったが, 心臓の心室拡張および心室壁菲薄化を認めた.

また, TMEM16E ノックアウトマウスの遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した. 得られた結果については現在検討中である.

(2) TMEM16E およびその他 TMEM16

ファミリー遺伝子を HEK293 細胞に遺伝子導入し安定発現させた細胞株を樹立し生化学的な解析を行った. TMEM16E 蛋白は他のファミリー遺伝子と比較して低い発現を示した. TMEM16E はライソゾーム阻害に比べてプロテアゾーム阻害により特異的に蓄積し, シクロヘキサミドの添加によりその蛋白レベルが速やかに減少したことから, TMEM16E は不安定な蛋白であり, プロテアゾーム経路により分解されることが示唆された.

また, 細胞内局在の検討を行ったところ, 他の TMEM16 ファミリー遺伝子が細胞膜に局在するのに対し, TMEM16E は細胞内に局在することが明らかとなった.

TMEM16 ファミリー遺伝子である TMEM16A および TMEM16B がカルシウム依存性 Cl<sup>-</sup>チャンネルとして機能することがこれまでに報告されており, TMEM16E も同様の機能を有することを予想し, ホールセルパッチクランプ法を用いて TMEM16E のクロライドイオンチャンネル活性について検討した. その結果, TMEM16E はチャンネル活性を認めず, Thr612 と周囲アミノ酸配列が TMEM16E のチャンネル活性を消失させていることを明らかにした. 以上のことから, TMEM16E は他の TMEM16 ファミリー遺伝子とは異なった独自の機能を持つことが示唆された.

### 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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. Threonine 612 defines the putative poreforming domain character of GDD1/Ano5/TMEM16E. : Tran TT, Hirono C, Fujimoto S, Mizuta K, Kubozaono K,

Sugita M, Kamata N. : 第 45 回広島大学歯  
学会総会 (2012. 6. 9 広島)

2. The tissue specific protein stabilization  
of GDD1/TMEM16E maintains muscle  
tissue. : Tran TT, Tobiume K, Fujimoto S,  
Mizuta K, Kubozaono K, Hirono C, Sugita  
M, Kamata N. : 第 66 回日本会口腔科学会学  
術集会 (2012. 5. 17 広島)

3. Molecular characterization of  
GDD1/TMEM16E : Tran TT, Tobiume K,  
Fujimoto S, Mizuta K, Hirono C, Sugita M,  
Kamata N. : 第 34 回日本分子生物学会年会  
(2011. 12. 14 横浜)

4. Degradation pathway for  
GDD1/TMEM16E : Tran TT, Tobiume K,  
Fujimoto S, Mizuta K, Hirono C, Sugita M,  
Kamata N. : 第 48 回日本口腔組織培養学会  
学術大会 (2011.11.19 浦安)

5. CaCC activity, localization and stability  
of TMEM16E: Tran TT, Fujimoto S, Mizuta  
K, Hirono C, Sugita M, Kamata N.: 4th  
Hiroshima Conference on Education and  
Science in Dentistry (2011.10.10 広島)

6. CaCC activity, localization, and stability  
of TMEM16E: Ta To Tran, 飛梅 圭, 藤本伸一,  
水田邦子, 廣野 力, 杉田 誠, 鎌田伸之.: 第 65 回  
NPO 法人日本口腔科学会学術集会  
(2011.4.22 東京)

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

水田 邦子 (MIZUTA KUNIKO)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院  
(歯)・助教  
研究者番号 : 40432679

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者  
( )

研究者番号 :