

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460282

研究課題名(和文) TMEM16F分子のイオンチャネル機能とスクランブラーゼ機能の連関機構の解明

研究課題名(英文) Functional coupling between ion channels and scramblases in human TMEM16F-expressing cells

研究代表者

清水 貴浩 (SHIMIZU, TAKAHIRO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：40353437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、近年新たに同定されたTransmembrane protein (TMEM) 16ファミリーに属するTMEM16Fが、リン脂質スクランブラーゼとして機能するだけでなく、細胞内遊離カルシウムイオン濃度の上昇により活性化するアニオンチャネルとしても機能することが明らかとなった。またTMEM16Fのこれら両輸送活性が密接に相関していることを見出した。したがって、TMEM16Fは二つの異なる膜輸送能を有するユニークな膜蛋白質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： It has been recently identified that the transmembrane protein (TMEM) 16A functions as a calcium-activated anion channels. On the other hand, TMEM16F, a member of the TMEM16 family, is demonstrated to transport phospholipids as a scramblase. We demonstrated, in the present study, that TMEM16F functions as not only phospholipid scramblases but also calcium-activated anion channels. In addition, we clarified that both TMEM16F functions are closely related. We therefore suggested that TMEM16F is a unique membrane protein exhibiting two different membrane transports.

研究分野：細胞分子生理学

キーワード：TMEM16F イオンチャネル スクランブラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度の上昇により活性化する  $\text{Cl}^-$  チャネル ( $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channel : CaCC) は、興奮性調節や経上皮輸送など重要な生理機能を果たしている。近年、CaCC の分子実体として、Transmembrane protein (TMEM) 16A が同定されたことから、TMEM16 ファミリーに属する蛋白質の機能解析が注目されていた。とりわけ、TMEM16F については CaCC としてだけでなく、スコット症候群の原因となるリン脂質スクランブラーゼとしても機能すると報告されたことから、TMEM16F の機能解明が興味的となっていた。ヒト TMEM16F を過剰発現させた細胞を用いてイオンチャネル機能およびリン脂質スクランブラーゼ機能の予備的観測を行ったところ、ヒト TMEM16F が低い細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  感受性をもつ CaCC として機能するだけでなく、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  依存的なリン脂質スクランブラーゼとしての機能も示すことが明らかとなった。これらの結果から、ヒト TMEM16F が両機能を有している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、TMEM16F の機能解析については、世界中の研究者が参画し、注目されている研究課題の一つとなっている。したがって本研究では、ヒト TMEM16F がイオンチャネル機能およびリン脂質スクランブラーゼ機能を制御するメカニズムについて電気生理学および分子生物学的手法を駆使して検討し、その詳細な機能関連機構について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞培養および遺伝子導入

ヒト胎児腎臓 HEK293T 細胞は、10%牛胎児血清を含む DMEM 中で培養した。遺伝子導入は、Lipofectamine 2000 を用いたリポフェクション法により行った。トランスフェクション 24 時間後の細胞を実験に用いた。遺伝子発現している細胞は、緑色蛍光色素 (GFP) の発光により同定した。

### (2)電気生理学的解析

ヒト TMEM16F の野生型および各変異体を過剰発現させた HEK293T 細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度上昇により生じる  $\text{Cl}^-$  チャネル電流 (CaCC 電流) を測定した。バス溶液の組成は 110 mM CsCl, 12 mM HEPES, 7 mM Tris, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 100 mM D(-)-mannitol (pH 7.5) であり、ピペット溶液は 110 mM CsCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 15 mM Na-HEPES, 10 mM HEPES, 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM EGTA, 50 mM D(-)-mannitol (pH 7.3) であった。細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度が 10  $\mu\text{M}$  あるいは 30  $\mu\text{M}$  となるように、適量の  $\text{CaCl}_2$  をピペット溶液に添加した。細胞内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度の計算には、Ca buf ソフトウェアを用いた。

### (3)リン脂質スクランブラーゼ機能の解析

ヒト TMEM16F の野生型および各変異体を過剰発現させた HEK293T 細胞のリン脂質スクランブラーゼ機能は、Annexin V-phycoerythrin (PE) Apoptosis Detection Kit 1 を用いた Flow Cytometry 解析により観測した。実験溶液の組成は、140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM EDTA (pH 7.4) であった。Ca buf ソフトウェアを用いて算出した適量の  $\text{CaSO}_4$  を実験溶液に添加し、細胞外遊離  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度が 30  $\mu\text{M}$  となるようにした。細胞外  $\text{Cl}^-$  イオン濃度依存性を検討する際は、NaCl および KCl をそれぞれ Na-aspartate および K-aspartate に置換した。

### (4)細胞表面ピオチン化アッセイ

V5 で標識したヒト TMEM16F の野生型およびその変異体を過剰発現した HEK293T 細胞において、細胞表面タンパク質をピオチン標識した後、アビジンで精製した。その後、SDS-PAGE およびウェスタンブロット法により野生型 TMEM16F およびその変異体の細胞表面における発現量を比較した。

## 4. 研究成果

### (1)ヒト TMEM16F の野生型および D408 変異体におけるイオンチャネル機能およびリン脂質スクランブラーゼ機能

マウス TMEM16F の 409 番目のアスパラギン酸残基をグリシンに変異 (D409G) すると、リン脂質スクランブラーゼ機能が亢進すると報告されていることから、マウス TMEM16F の D409G に相当するヒト TMEM16F の D408G 変異体を作製し、そのリン脂質スクランブラーゼ機能を解析した。その結果、マウスと同様、ヒト TMEM16F の  $\text{Ca}^{2+}$  イオン依存的なリン脂質スクランブラーゼ活性も、D408G 変異により亢進した。次に、D408N 変異体および D408E 変異体のリン脂質スクランブラーゼ機能を検討したところ、共に野生型よりも有意に亢進したが、D408E 変異体における亢進の程度は小さかった。一方、ヒト TMEM16F の各種変異体発現細胞で CaCC 電流を測定したところ、すべての変異体における CaCC 電流は、野生型と比較して増加したが、D408E 変異体における CaCC 電流の増加は小さかった。これらの結果から、ヒト TMEM16F のイオンチャネル機能/スクランブラーゼ機能制御において、第 1 細胞内ループにある負電荷アミノ酸が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

### (2)ヒト TMEM16F の野生型および R591A 変異体におけるイオンチャネル機能およびリン脂質スクランブラーゼ機能

マウス TMEM16A の推定上のポア領域である 621 番目のアルギニン残基をグルタミン酸に変異 (R621E) すると、イオン選択性が大きく変化することが報告されていることから、ヒト TMEM16F で保存されている 591 番目のア

ルギニン残基をアラニンに置換した変異体 (R591A) を作製し、そのイオンチャネル機能およびリン脂質スクランブラーゼ機能について検討した。野生型発現細胞では顕著な CaCC 電流が観測されたが、R591A 変異体発現細胞において CaCC 電流は有意に減少した。一方、R591A 変異体のリン脂質スクランブラーゼ機能についても検討したところ、R591A 変異体の Ca<sup>2+</sup>イオン依存的なリン脂質スクランブラーゼ活性は、野生型と比較して著しく減少することが明らかとなった。ヒト TMEM16F のこれら点変異によりイオンチャネル機能/リン脂質スクランブラーゼ機能が同様に変化したことから、ヒト TMEM16F の両機能が相関することが明らかとなった。

### (3) イオンチャネル機能変化によるリン脂質スクランブラーゼ機能の制御

ヒト TMEM16F のイオンチャネル活性がリン脂質スクランブラーゼ機能を制御しているのかについて検討するため、まず、TMEM16F チャンネル電流に対する CaCC の選択的阻害剤であるニフルミン酸とタンニン酸、非選択性 Cl<sup>-</sup> チャンネル阻害剤である 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB) の効果を検討した。その結果、これら阻害剤の投与により TMEM16F チャンネル電流は著しく減少した。興味深いことに、TMEM16F の Ca<sup>2+</sup>イオン依存的なリン脂質スクランブラーゼ活性もこれら阻害剤処理により有意に低下した。

さらに TMEM16F のイオン輸送能の変化がリン脂質スクランブラーゼ機能に影響を与えるのかについて検討するため、リン脂質スクランブラーゼ機能の細胞外 Cl<sup>-</sup>イオン濃度依存性を観測した。その結果、TMEM16F のリン脂質スクランブラーゼ機能は、細胞外 Cl<sup>-</sup>イオン濃度が低くなるにつれて亢進することが明らかとなった。

これらの結果から、ヒト TMEM16F のイオン輸送能がリン脂質スクランブラーゼ機能を制御していることが示唆された。

### (4) リン脂質スクランブラーゼ機能変化によるイオンチャネルゲーティングの制御

次に、ヒト TMEM16F のリン脂質スクランブラーゼ機能が亢進する変異体 (D408G および D408E) において、CaCC 電流のイオンチャネルゲーティングがどのような影響を受けているのかについて検討するため、TMEM16F の野生型およびその変異体におけるテール電流を観測した。野生型 TMEM16F 発現細胞において、細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup>イオン濃度の上昇により生じたテール電流の脱活性化過程は二次指数関数でフィットできたことから、TMEM16F チャンネルのゲーティングには開状態と閉状態だけでなく、第三の状態があることが明らかとなった。また D408G および D408E 変異体を過剰発現させた細胞において、TMEM16F テール電流の脱活性化速度は、野生

型 TMEM16F を過剰発現させた細胞におけるテール電流の脱活性化速度と比較して有意に遅くなった。これらの結果から、ヒト TMEM16F のリン脂質スクランブラーゼ活性の変化がイオンチャネルゲーティングにも影響を与えていることが明らかとなった。

### (5) ヒト TMEM16F の野生型およびその変異体の原形質膜における発現

ヒト TMEM16F の野生型およびその変異体 (D408G, D408N, D408E, R591A) の原形質膜での発現量を確認するため、細胞表面ピオチン化アッセイを行った。その結果、ヒト TMEM16F の野生型とすべての変異体は、原形質膜に同程度発現していることが明らかとなった。この結果から、ヒト TMEM16F 変異体におけるイオンチャネル機能/リン脂質スクランブラーゼ機能の変化は、原形質膜での発現量変化によるものではなく、アミノ酸変異による活性変化により生じることが明らかとなった。

### (6) 総括

本研究により、ヒト TMEM16F がイオンチャネル機能とリン脂質スクランブラーゼ機能を併せ持つユニークな蛋白質であることが示唆された。またイオンチャネル活性の変化がリン脂質スクランブラーゼ機能を制御したこと、一方でリン脂質スクランブラーゼ活性の亢進がイオンチャネルゲーティングに影響を与えたことから、TMEM16F の両機能が密接に相関していることが明らかとなった。

### 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) Fujii T, Watanabe M, Shimizu T, Takeshima H, Kushi K, Takai M, Sakai H. (2016) Positive regulation of the enzymatic activity of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by sialylation of its  $\beta$ -subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* 1228-1235. 査読有 doi: 10.1016/j.bbamem.2016.02.029.

(2) Fujii T, Takahashi Y, Takeshima H, Saitoh, C, Shimizu T, Takeguchi N, Sakai H. (2015) Inhibition of gastric H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase by 4-(2-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentylindan-1-on-5-yl)oxybutyric acid (DCPIB), an inhibitor of volume-regulated anion channel. *Eur. J. Pharmacol.* 765: 34-41. 査読有 doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.011.

(3) Shimizu T, Ohtake H, Fujii T, Tabuchi Y, Sakai H. (2015) Volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels contribute to butyrate-triggered

apoptosis of murine colonic epithelial MCE301 cells. *J. Physiol. Sci.* 65: 151-157. 査読有 doi: 10.1007/s12576-014-0352-5.

(4) Higuchi T, Shimizu T, Fujii T, Nilius B, Sakai H. (2014) Gating modulation by heat of the polycystin transient receptor potential channel PKD2L1 (TRPP3). *Pflügers Arch.* 466: 1933-1940. 査読有 doi: 10.1007/s00424-013-1439-1.

(5) Shimizu T, Fujii T, Takahashi Y, Takahashi Y, Suzuki T, Ukai M, Tauchi K, Horikawa N, Tsukada K, Sakai H. (2014) Up-regulation of Kv7.1 channels in thromboxane A<sub>2</sub>-induced colonic cancer cell proliferation. *Pflügers Arch.* 466: 541-548. 査読有 doi: 10.1007/s00424-013-1341-x.

(6) Takahashi Y, Fujii T, Fujita K, Shimizu T, Higuchi T, Tabuchi Y, Sakamoto H, Naito I, Manabe K, Uchida S, Sasaki S, Ikari A, Tsukada K, Sakai H. (2014) Functional coupling of chloride-proton exchanger CIC-5 to gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Biol. Open.* 3: 12-21. 査読有 doi: 10.1242/bio.20136205.

(7) Shimizu T, Iehara T, Sato K, Fujii T, Sakai H, Okada Y. (2013) TMEM16F is a component of a Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel but not a volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channel. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304: C748-C759. 査読有 doi: 10.1152/ajpcell.00228.2012.

(8) Fujii T, Awaka S, Takahashi Y, Fujita K, Tsuji H, Shimizu T, Gomi T, Tsukada K, Sakai H. (2013) Modulation of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity by the molecular chaperone ERp57 highly expressed in gastric parietal cells. *FEBS Lett.* 587: 3898-3905. 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2013.

〔学会発表〕(計 24 件)

(1) 清水貴造, 大竹宏尚, 藤井拓人, 岡田泰伸, 酒井秀紀. 細胞骨格による容積感受性アニオンチャネルの制御が抗癌剤耐性に寄与する. 第 93 回日本生理学会大会. 2016 年 3 月 22-24 日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

(2) Shimizu T, Ohtake H, Fujii T, Tabuchi Y, Sakai H. Properties of volume-sensitive anion channel in butyrate-triggered apoptosis of murine colonic epithelial cells. 8<sup>th</sup> Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) Congress. 2015 年 11 月 22-25 日. バンコク

(タイ)

(3) 山本翔太, 藤井拓人, 清水貴造, 田淵圭章, 竹島浩, 酒井秀紀. ナトリウムポンプと容積感受性アニオンチャネルによる癌細胞増殖抑制機構. 日本薬学会北陸支部第 127 回例会. 2015 年 11 月 15 日. 富山大学・杉谷キャンパス(富山県・富山市)

(4) 大野智恵, 樋口大河, 清水貴造, 藤井拓人, Bernd Nilius, 酒井秀紀. PKD2L1 カチオンチャネルの電位依存的不活性化機構の解析. 第 62 回中部日本生理学会大会. 2015 年 11 月 13-14 日. 富山大学・黒田講堂(富山県・富山市)

(5) 井上貴斗, 阿波加隼也, 藤田恭輔, 藤井拓人, 清水貴造, Ursula Seidler, 酒井秀紀. 胃酸分泌細胞の細胞防御機構における SLC26A7 の役割. 第 62 回中部日本生理学会大会. 2015 年 11 月 13-14 日. 富山大学・黒田講堂(富山県・富山市)

(6) 鍋島彰太, 清水貴造, 藤井拓人, 小澤茂喜, 家原貴大, 岡田泰伸, 酒井秀紀. TMEM16F が有するリン脂質スクランブラーゼ機能. 第 62 回中部日本生理学会大会. 2015 年 11 月 13-14 日. 富山大学・黒田講堂(富山県・富山市)

(7) 清水貴造, 大竹宏尚, 藤井拓人, 田淵圭章, 酒井秀紀. 容積感受性アニオンチャネルは酪酸によるアポトーシス誘導に寄与する. 日本薬学会第 135 年会. 2015 年 3 月 25-28 日. 神戸学院大学他(兵庫県・神戸市)

(8) 清水貴造, 大竹宏尚, 藤井拓人, 田淵圭章, 酒井秀紀. 容積感受性アニオンチャネルによる酪酸誘導性アポトーシスの制御. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会および第 92 回日本生理学会大会合同大会. 2015 年 3 月 21-23 日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

(9) 清水貴造, 大竹宏尚, 藤井拓人, 岡田泰伸, 酒井秀紀. アクチンフィラメント構造による容積感受性アニオンチャネル活性化の制御. 第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2014 年 11 月 20-21 日. 徳島大学・蔵本地区(徳島県・徳島市)

(10) 樋口大河, 清水貴造, 藤井拓人, Nilius Bernd, 酒井秀紀. PKD2L1 チャネルの不活性化に関わる分子構造機構. 第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2014 年 11 月 20-21 日. 徳島大学・蔵本地区(徳島県・徳島市)

(11) 阿波加隼也, 藤田恭輔, 清水貴造, 藤井拓人, 酒井秀紀. 胃酸分泌細胞における

SLC26A7 が関与する新規細胞防御機能．日本薬学会北陸支部第 126 回例会．2014 年 11 月 16 日．金沢大学・角間キャンパス（石川県・金沢市）

(12)小澤茂喜，清水貴浩，藤井拓人，家原貴大，岡田泰伸，酒井秀紀．TMEM16F におけるチャンネル機能とリン脂質スクランブル機能．日本薬学会北陸支部第 126 回例会．2014 年 11 月 16 日．金沢大学・角間キャンパス（石川県・金沢市）

(13)富井寿詠，清水貴浩，藤井拓人，岡田泰伸，酒井秀紀．容積感受性 Cl<sup>-</sup>チャンネル関連タンパク質の探索．日本薬学会北陸支部第 126 回例会．2014 年 11 月 16 日．金沢大学・角間キャンパス（石川県・金沢市）

(14)荒木美帆，清水貴浩，藤井拓人，酒井秀紀．マウス ANO5 のチャンネル機能．日本薬学会北陸支部第 126 回例会 2014 年 11 月 16 日．金沢大学・角間キャンパス（石川県・金沢市）

(15)榊原陽香，藤井拓人，清水貴浩，酒井秀紀．カプサイシンによる TRPV1 チャンネル外向き電流の性質．日本薬学会北陸支部第 126 回例会．2014 年 11 月 16 日．金沢大学・角間キャンパス（石川県・金沢市）

(16)清水貴浩，大竹宏尚，尾野純也，藤井拓人，岡田泰伸，酒井秀紀．容積感受性アニオンチャンネルの活性化におけるアクチンフィラメントの役割．第 61 回中部日本生理学会大会．2014 年 11 月 7-8 日．名古屋市立大学・桜山キャンパス（愛知県・名古屋市）

(17)樋口大河，清水貴浩，藤井拓人，Nilius Bernd，酒井秀紀．味覚に関わる PKD2L1 チャンネルの調節機構の分子構造基盤．第 13 回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム 2014．2014 年 9 月 20-21 日．富山国際会議場（富山県・富山市）

(18)清水貴浩，家原貴大，佐藤かおり，藤井拓人，岡田泰伸，酒井秀紀．TMEM16F は Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel として機能する．日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 27-30 日．熊本大学他（熊本県・熊本市）

(19)清水貴浩，家原貴大，藤井拓人，岡田泰伸，酒井秀紀．TMEM16F は Ca<sup>2+</sup>活性化型アニオンチャンネルを形成する．第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 16-18 日．鹿児島大学・郡元キャンパス（鹿児島県・鹿児島市）

(20)樋口大河，清水貴浩，藤井拓人，Nilius Bernd，酒井秀紀．TRPP3 チャンネルの電位依存性不活性化に関与する分子構造基盤．第 91 回日本生理学会大会．2014 年 3 月 16-18 日．鹿児島大学・郡元キャンパス（鹿児島県・鹿

児島市）

(21)大竹宏尚，清水貴浩，藤井拓人，尾野純也，岡田泰伸，酒井秀紀．アクチンフィラメント構造による容積感受性 Cl<sup>-</sup>チャンネルの機能制御．日本薬学会北陸支部第 125 回例会．2013 年 11 月 17 日．北陸大学・薬学キャンパス（石川県・金沢市）

(22)伊藤知洋，清水貴浩，藤井拓人，Lingueglia Eric，Lazdunski Michel，酒井秀紀．2 回膜貫通型 Brain-Liver-Intestine Na<sup>+</sup>チャンネルの機能解析．日本薬学会北陸支部第 125 回例会．2013 年 11 月 17 日．北陸大学・薬学キャンパス（石川県・金沢市）

(23)清水貴浩，大竹宏尚，藤井拓人，田淵圭章，酒井秀紀．酪酸誘導性細胞死における容積感受性 Cl<sup>-</sup>チャンネルの役割．第 60 回中部日本生理学会大会．2013 年 10 月 25-26 日．岐阜大学・医学部記念会館ホール（岐阜県・岐阜市）

(24)樋口大河，清水貴浩，藤井拓人，Nilius Bernd，酒井秀紀．温度上昇による TRPP3 チャンネルのゲーティング解析．第 60 回中部日本生理学会大会．2013 年 10 月 25-26 日．岐阜大学・医学部記念会館ホール（岐阜県・岐阜市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.u-tooyama.ac.jp/phaphy1/index-j.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

清水 貴浩（SHIMIZU, TAKAHIRO）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）  
准教授

研究者番号：40353437