

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463085

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたTMEM16E分子の機能の解明

研究課題名(英文) Function analysis of TMEM16E using TMEM16E knockout mice

研究代表者

水田 邦子 (MIZUTA, KUNIKO)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：40432679

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)：本研究は、TMEM16E遺伝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、TMEM16E関連遺伝性疾患発症の分子メカニズムを解明することを目的とした。

その結果、TMEM16Eノックアウトマウスでは明らかな表現型が認められず、他の筋ジストロフィー関連分子の代償性活性化により相殺されている可能性が予想された。さらに、ヒト筋芽細胞の*in vitro*分化の系において、TMEM16E蛋白が筋管細胞のみならず分裂期の筋芽細胞においても高発現していることを発見したことから、筋分化とは別に細胞周期依存的にその発現が調節されることが予想された。

研究成果の概要(英文)：In this study, TMEM16E knockout mice showed no phenotypic signs. The result suggested that the function of TMEM16E was compensated by other muscular dystrophy related molecules. During *in vitro* human myogenic cell differentiation, TMEM16E protein expression was up-regulated in mitotic myoblasts as well as myotubes. This finding suggests that TMEM16E protein expression is regulated in a cell cycle dependent manner.

研究分野：外科系歯学

キーワード：TMEM16E ノックアウトマウス 筋ジストロフィー GDD

1. 研究開始当初の背景

申請者ら研究グループは顎骨骨幹異形成症 (GDD) の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* 遺伝子産物の機能解析研究を行ってきた。

さらに, 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状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* の新規変異アリ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)。

これまでに申請者らは, 抗マウス *TMEM16E* ポリクローナル抗体および抗ヒト *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 (Mizuta K et al., Biochem Biophys Res Commun, 2007)。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クロライド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, カルシウム依存性クロライドチャンネル (CaCC) 機能とは異なった機能を持つことが現時点で申請者らの研究で分かっている。また, 申請者らは, *TMEM16A* との比較により *TMEM16E* 独自の特徴として, 顕著なタンパク不安定性を見出すとともに, 筋細胞特異的な *TMEM16E* タンパクの安定化を見出している。

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未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は, *TMEM16E* 遺伝子の機能および生理的役割を検討し, これら遺伝性疾患発症の分子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, 遺伝子改変マウスの表現型解析と分子細胞生物学的手法を用いた解析により検討した。

4. 研究成果

TMEM16E 遺伝子改変マウスの表現型解析
これまでに, 肢体型筋ジストロフィーの疾患モデルとして *TMEM16E* ノックアウトマウスを作製し, その解析を進めてきた。

TMEM16E ノックアウトマウスは, 通常飼育では外見上正常で, 生命機能に異常は認められなかった。このことから, *TMEM16E* 欠損による LGMD2 表現型が他の筋ジストロフィー関連分子の代償性活性化により相殺されている可能性が予想された。そこで, *TMEM16E* ノックアウトマウスから筋組織を採取しウエスタンブロッティングを行ったところ, 筋膜修復分子 *Dysferlin* が特異的プロセッシングを受け活性型がメジャープロダクトとなっていることを発見した (図 1)。

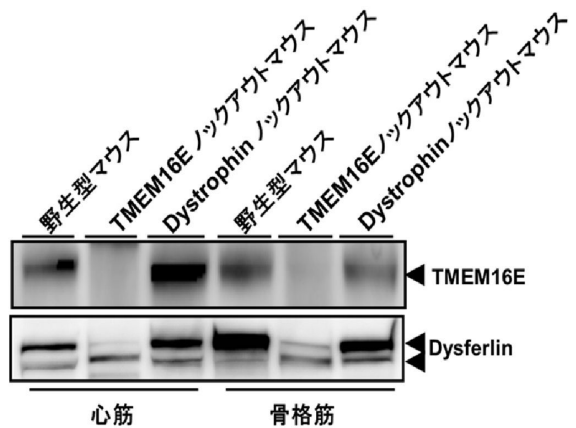


図 1. *TMEM16E* ノックアウトマウスにおける *Dysferlin* の代償的活性化

Dystrophin を欠損したマウス (筋ジストロフィーを発症) では, *Dysferlin* の活性型へのシフトが認められないため *TMEM16E* と *Dysferlin* との筋修復機構における, 強い機能的関連性が示唆された。

TMEM16E モノクローナル抗体の作製

TMEM16E ノックアウトマウスの組織学的解析を進めていくうえで, 特異的な抗体が必要不可欠であるが, 現在までに作製したポリクローナル抗体は免疫組織学的解析で使用するには非特異的シグナルが多く, 解析が困難であると判断した。そのため, DNA 免疫法による *TMEM16E* のモノクローナル抗体の作製に着手した。

マウス *TMEM16E* の C 端部分の遺伝子配列を組み込んだ免疫用プラスミドを作製し, ラットに免疫, ハイブリドーマ細胞を作製した。作製したハイブリドーマのスクリーニングを行い, 特異的な反応を示すハイブリドーマクローン (図 2) を複数個確認した。

今後は, この陽性クローンのクローニングを行い, ハイブリドーマ細胞株の樹立, *TMEM16E* 特異的モノクローナル抗体を作製する予定である。

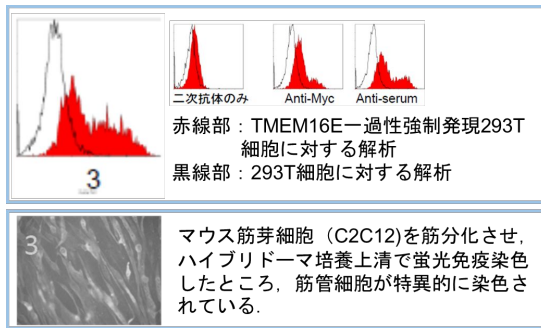


図 2. ハイブリドーマ細胞のスクリーニング
上段：フローサイトメーター解析
下段：蛍光免疫染色

TMEM16E 蛋白分解制御機構の解明

TMEM16E-GFP 遺伝子を安定発現する培養筋芽細胞株を樹立し、この細胞を *in vitro* で筋分化誘導したところ、分化を完遂した筋管細胞のみに TMEM16E が発現していることをこれまでに見出し報告している (図 3)。

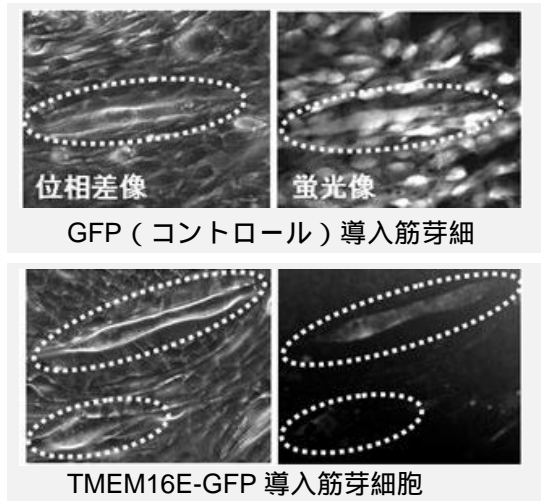


図 3. TMEM16E 蛋白は未分化筋芽細胞では分解され発現を認めず、筋管細胞のみで安定して発現 (点線囲み) する。

この結果より、TMEM16E 蛋白は分化していない筋芽細胞では恒常的に分解されていることが予想された。また、多くの培養細胞株で TMEM16E-GFP の安定導入を検討した結果、TMEM16E 蛋白は多くの細胞、組織においても恒常的に分解されていることが分かっている。

ヒト線維芽細胞株の過剰発現では、TMEM16E はプロテアソーム経路で恒常的に分解され不安定である。このためライソソーム阻害に比較してプロテアソーム阻害により特異的に蓄積することを発見した (図 4)。

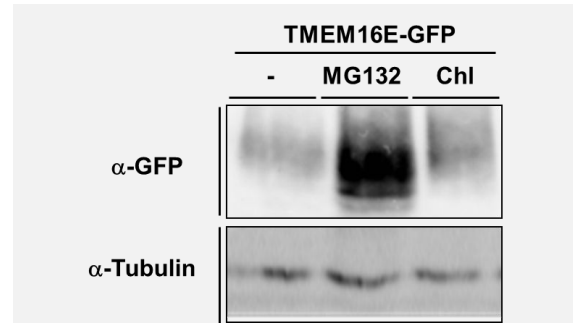


図 4. TMEM16E を安定化発現させた HEK293 細胞にプロテアソーム阻害剤 (MG132) と ライソソーム阻害剤 (Chl) を処理したところ、プロテアソーム阻害剤処理で TMEM16E 蛋白が特異的に蓄積した。(WB 法)

通常、筋芽細胞は筋分化が始まると細胞分裂せずに筋芽細胞の融合が起こり、筋管に分化し増殖が停止する。新たに入手したヒト筋芽細胞株では、増殖条件でのみ筋分化がおこらないため、筋管に分化した細胞と分裂中の筋芽細胞の両方が観察できることが分かった。このヒト筋芽細胞を TMEM16E 抗体で免疫染色したところ、筋管細胞のみならず、分裂期の筋芽細胞にも TMEM16E 蛋白の高い発現が認められた (データ未発表)。これらの結果から、細胞周期の G2-M 期に OFF となるプロテアソーム分解系の存在が判明し (図 5)、プロテアソーム分解から免れることにより TMEM16E の蛋白発現が安定化することが想定された。

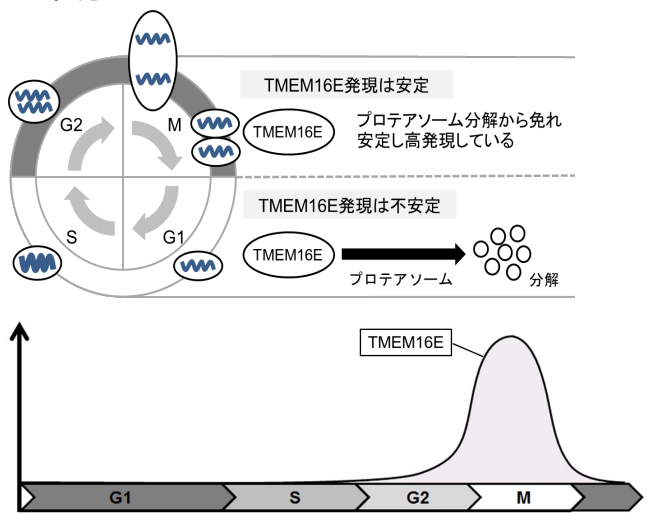


図 5. TMEM16E 蛋白の発現は、細胞周期依存的に分解制御されている。

本研究で明らかとなった TMEM16E 遺伝子および遺伝子産物の特性は、TMEM16E の活性制御が骨・筋肉の分化および代謝に重要な機能を果たしていることを示唆し、TMEM16E の機能と安定化調節機構を解明することにより、様々な骨・筋疾患の病態の理解と治療法の開発に役立つことが予想される。また、高い信頼度で TMEM16E を検出できるモノクローナル抗体を作製することは、臨床診断ツールとし

て汎用性の高い特異抗体の開発や、疾患の進行・発生を制御する治療法の開発につながる事が期待される。

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10件)

1. Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Uetsuki R, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Ono S, Simasue H, Ohta K, Sugiyama M, Takechi M: CD44high /ALDH1high head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 -dependent cancer stem cell properties.

J Oral Pathol Med, 査読有

Epub Sep 24., 2015

doi: 10.1111/jop.12348.

2. Araki K, Ebata T, Guo AK, Tobiume K, Wolf SJ, Kawachi K): p53 regulates cytoskeleton remodeling to suppress tumor progression.

Cell Mol Life Sci, 査読有

Epub Jul 24, 2015 Review

doi: 10.1007/s00018-015-1989-9.

3. 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

229, 181-190, 2014

doi: 10.1002/jcp.24431.

4. Ohta K, Fukui A, Shigeishi H, Ishida Y, Nishi H, Tobiume K, Takechi M., Kamata N: Expression and function of RIG-1 in oral keratinocytes and fibroblasts.

Cell Physiol Biochem, 査読有

34(5): 1556-1565, 2014.

doi: 10.1159/000366359.

5. Ohta K, Ishida Y, Fukui A, Mizuta K, Nishi H, Takechi M. Kamata N.: Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated interleukin-8 production by human submandibular gland epithelial cells.

Mol Med Rep, 査読有

10(5):2377-2382, 2014.

doi: 10.3892/mmr.2014.2507.

6. Rizqiawan A, Tobiume K, Okui G, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Takechi

M, Higashikawa K, Kamata N: Autocrine galectin-1 promoted collective cell migration of SCC cells through upregulation of distinct integrins.

Biochem Biophys Res Commun, 査読有

441, 904-910, 2013

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.152.

7. 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

114, 2039-2049, 2013

doi: 10.1002/jcb.24545.

8. 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

57, 198-206, 2013

doi: 10.1111/1348-0421.12022.

9. 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

329(2), 243-252, 2013

doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.023.

10. Ohta K, Taki M, Ogawa I, Ono S, Mizuta K, Fujimoto S, Takata T, Kamata N: Malignant ossifying fibromyxoid tumor of the tongue: case report and review of the literature.

Head Face Med, 査読有

9:16, 2013 Review

doi: 10.1186/1746-160X-9-16.

[学会発表](計5件)

1. Kubozono K, Mizuta K, Fujimoto S, Takechi M: Functional analysis of gene TMEM16E/GDD1 that cause Gnatho-Diaphyseal Dysplasia and Limb-girdle muscular dystrophy.

第47回広島大学歯学会総会

(2014.6.21 広島)

2. Kubozono K, Mizuta K, Fujimoto S, Takechi M: Characterization of TMEM16E/GDD1 that causes Gnatho-Diaphyseal Dysplasia and Limb-girdle muscular dystrophy through distinct gene mutations.

96th AAOMS Annual Meeting, Scientific Session and Exhibition in conjunction with the Japanese Society and Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons

(September 11, 2014, Honolulu, USA)

3. 久保 蘭和美, 水田 邦子, 藤本 伸一, 武知 正晃: 顎骨骨幹異形成症および肢帯型筋ジストロフィー原因遺伝子 TMEM16E/GDD1 の機能解析

第 59 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会

(2014.10.17 幕張)

4. 久保 蘭和美, 水田 邦子, 武知 正晃, 鎌田 伸之.: 顎骨骨幹異形成症原因遺伝子 GDD1 の機能解析

第 58 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会

(2013.10.13 福岡)

5. 飛梅 圭, 廣野 力, 杉田 誠: GDD1/TMEM16E/Anoctamin 5 遺伝子産物の機能解析

第 55 回歯科基礎医学会学術大会

(2013.9.22 岡山)

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

飛梅 圭 (TOBIUME KEI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・准教授

研究者番号: 40350037