

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462813

研究課題名(和文) ストレス応答性TMEM16E安定化と局在化による迅速な膜修復機構の解明

研究課題名(英文) functional analysis of TMEM16E through its subcellular localization.

研究代表者

飛梅 圭 (Tobiume, Kei)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・准教授

研究者番号：40350037

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)：TMEM16E遺伝子の1アミノ酸変異は骨系統組織に遅発性の硬化性病変を伴う顎骨骨幹異形成症GDDに連鎖する。また、ノックアウト変異は上下肢帯部の遅発性筋ジストロフィーLGMD2Lに連鎖する。本研究ではDysferlin機能が欠損したマウス由来培養筋管でTMEM16EとCaveolin3が同一の細胞内顆粒構造物に局在することを発見した。さらに、Dysferlin欠損培養筋管ではこのTMEM16E/Caveolin3局在顆粒が形質膜近傍への顕著な集積を見せたことから、TMEM16Eの筋組織における機能はCaveolin3と協調しており、これにDysferlin機能は必要ないことを示した。

研究成果の概要(英文)：We developed a validated immunocytochemistry protocol for rabbit polyclonal TMEM16E antibody in this study. Essentially, a special cell fixation reagent with a suitable detergent in a reaction buffer to erase non-specific reactions. By this sophisticated protocol, We identified TMEM16E/Caveolin3-carrying vesicle like structures in cultured myotube, which translocated just beneath plasma membrane in dysferlin-defect myotubes.

研究分野：分子生物学

キーワード：TMEM16E Ano5 LGMD2L GDD1

1. 研究開始当初の背景

TMEM16E 遺伝子の 1 アミノ酸変異は骨系統組織、特に上下顎に遅発性の硬化性病変を伴う顎骨骨幹異形成症に連鎖する。また、ノックアウト変異は上下肢帯部の骨格筋組織に特徴的な恒常性筋組織修復機構の不全が原因となる遅発性の筋ジストロフィーに連鎖する。

2. 研究の目的

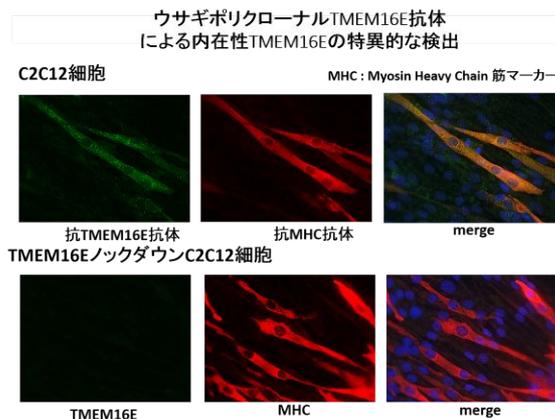
本研究では、TMEM16E およびミスセンス変異型 TMEM16E の機能を検討し、これら遺伝性疾患発症の分子メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

TMEM16E 分子の機能を知るために内在性分子の検出が可能なることを申請者らにより確認した筋芽細胞株を用い、TMEM16E の細胞内器官 (構造物) への局在を免疫細胞生物学的手法で解析した。

4. 研究成果

(1) 申請者らが作製したウサギポリクローナル TMEM16E 抗体による免疫細胞染色法の確立

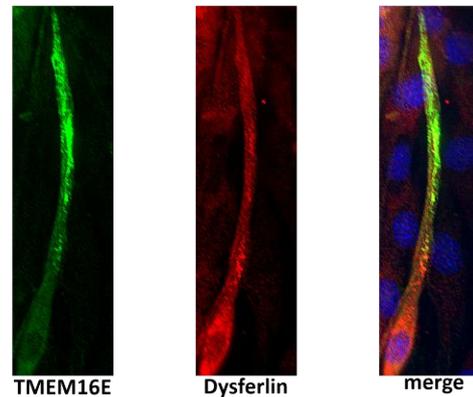


細胞の固定試薬 (電子顕微鏡グレードが必須であった) 固定条件および抗体反応溶液中に添加する界面活性剤、使用条件を最適化した結果、従来法はで強かった非特異シグナルを激減させることに成功した。上図

のように筋芽細胞株 C2C12 細胞が分化し出現した筋管のみに内在性 TMEM16E 特異シグナルを検出できた。TMEM16E が局在する細胞内小顆粒は細胞内に不均一に分布していた。

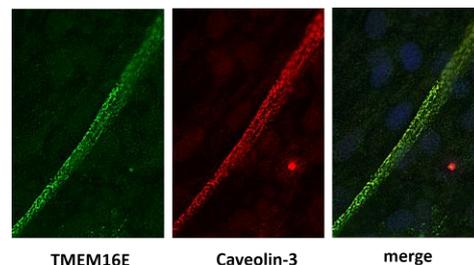
(2) 筋ジストロフィー原因遺伝子 Dysferlin 遺伝子欠損は、TMEM16E 遺伝子欠損と同様の臨床所見をとり、また筋管特異的な細胞内小顆粒に局在する分子である。(1)の結果から TMEM16E は、Dysferlin と同一小顆粒に局在してその動態を制御すると想定された。

筋管におけるTMEM16EおよびDysferlin局在する細胞内顆粒は異なる



しかし上図に示した各分子の免疫細胞染色では TMEM16E 局在顆粒は Dysferlin 局在顆粒とは異なり、筋管内での分布も異なった。

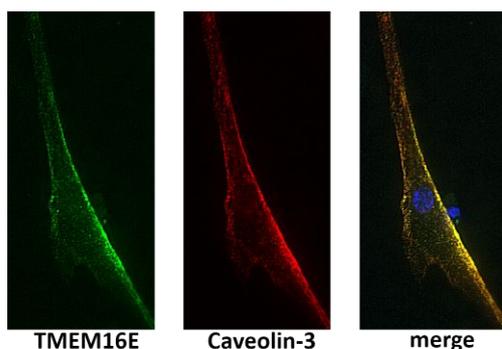
(3) カベオラと呼ばれる細胞膜陥入構造に特異的に局在する Caveolin ファミリーのなかで筋特異的な分子 Caveolin3 はその遺伝子欠損やドミナントネガティブ変異により臨床所見は異なるものの筋ジストロフィーを発症させる。



上図に示す各分子の免疫細胞染色では Caveolin3 が筋管では細胞内顆粒構造に局在して検出されたが、驚いたことに TMEM16E は同一顆粒に局在していた。また Caveolin3 は筋管内に均一分布していたが、TMEM16E は不均一に分布していたため TMEM16E が不在の Caveolin3 顆粒を多く認めた。

(4) Caveolin3 は筋組織では筋小胞体と T 管のコンタクト部位に局在し小胞体 RyR、形質膜 DHPR が同部位に局在する。培養筋管の TMEM16E 局在顆粒はこれらの分子が局在する構造物とは一致していなかった。

(5) Dysferlin 欠損マウス由来の筋芽細胞株 GREG 細胞は筋管形成過程に問題はないが、筋管内小顆粒の形質膜損傷部への貯留が認められた。下図に示すように Caveolin3, TMEM16E の局在する筋管内顆粒は GREG 細胞では形質膜下に集積していた。



まとめ

本研究では Dysferlin 機能が欠損したマウス由来培養筋管で TMEM16E と Caveolin3 が同一の細胞内構造に局在し、Dysferlin 野生型の筋管に比較し形質膜近傍への顕著な集積を見せたことから、TMEM16E の筋組織における機能は Caveolin3 と協調しており、これに Dysferlin 機能は必要ないことを示した。

展望

本研究ではウサギポリクローナル TMEM16E 抗体の非特異反応を抑えることができたのは培養筋管細胞の免疫細胞染色のみであり、マウスの組織染色はこの方法が適用できなかった。これによりマウスにおける組織化学的解析は遅滞した。現在新規の抗体を開発しており引き続き培養細胞で得られた知見の確証を行いたい。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Hashikata M, Shigeishi H, Okui G, Yamamoto K, Tobiume K, Seino S, Uetsuki R, Kato H, Ishioka Y, Ono S, Ohta K, Higashikawa K, Sugiyama M, Takechi M
Snail-induced CD44^{high} cells in HNSCC with high ABC transporter capacity exhibit potent resistance to cisplatin and docetaxel. *Int J Clin Exp Pathol* 査読有 9, 7908-7918, 2016
ISSN:1936-2625
- (2) 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.
CD44^(high) /ALDH1^(high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 β -dependent cancer stem cell properties. *J Oral Pathol Med.* 査読有 45:180-188, 2016
DOI:10.1111/jop.12348
- (3) Araki K, Ebata T, Guo AK, Tobiume K, Wolf SJ, Kawauchi K.
p53 regulates cytoskeleton remodeling to suppress tumor progression. *Cell Mol Life Sci.* 査読有 72:4077-4094, 2015
DOI:10.1007/s00018-015-1989-9

(4) Ohta K, Fukui A, Shigeishi H,
Ishida Y, Nishi H, Tobiume K, Takechi
M, Kamata N.

Expression and function of RIG-I in
oral keratinocytes and fibroblasts.

Cell Physiol Biochem. 査読有

34:1556-1565, 2014

DOI:10.1159/000366359

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