

令和元年5月16日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11685

研究課題名(和文) TMEM16E蛋白分解制御機構と機能の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of TMEM16E gene and gene products

研究代表者

水田 邦子 (MIZUTA, KUNIKO)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教

研究者番号：40432679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TMEM16E関連遺伝性疾患発症の分子メカニズムを解明する手がかりとして、TMEM16Eノックアウトマウスおよびノックインマウスを作製し、疾患モデルの確立に努めてきた。さらに、マウスの表現型解析を行う上で必要不可欠な、TMEM16Eを特異的に認識するモノクローナル抗体を独自に作製し、その特異性についての評価するための解析を進めた。その結果、培養筋管細胞において、ウエスタンブロット及び免疫細胞染色を用いて強く特異シグナルを検出できるハイブリドーマクローンを同定した。またマウス筋組織を用いたウエスタンブロット及び免疫細胞染色で強いシグナルを特異的に検出することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、TMEM16E遺伝子の機能および生理的役割を解明することを目的とした。

これまでの研究成果から、TMEM16Eに機能獲得型変異がおこると蛋白の安定性獲得による生理機能発揮がGDDを発症させ、機能喪失型変異により筋疾患が発症することが予想される。

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は明らかで、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期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared gene modified mice and analyzed a phenotype as a clue to elucidate the molecular mechanism of TMEM16E-related hereditary disease onset. Furthermore, we generated a monoclonal antibody that specifically recognizes TMEM16E, which is essential for phenotype characterization of mice. As a result, hybridoma clones were identified that could detect strong specific signals using western blot and immunocyto staining of cultured myoblast cells. In addition, one of the clones was also validated to specifically detect better than commercial antibodies in western blot and immunocyto staining of mouse muscle tissues.

研究分野：口腔外科

キーワード：TMEM16E GDD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顎骨の骨性異形成症を主要症状の一つとする顎骨骨幹異形成症 (GDD) は、常染色体優性の遺伝性骨系統疾患である。東京医科歯科大学口腔外科研究グループが、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疾患として定義し、1969年に世界で初めて報告した。

申請者ら研究グループは、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* の同定に成功し、以降、*TMEM16E* 遺伝子産物の機能解析研究を行ってきた。*TMEM16E* は機能既知蛋白とホモロジーが認められない新規遺伝子として同定され、その機能は未だ解明されていない。*TMEM16E* は *TMEM16* ファミリー (*TMEM16A* ~ *K*) に属する10回膜貫通蛋白をコードしているが、*TMEM16* ファミリーの機能は長く不明であった。2008年に *TMEM16A* が史上初めて同定されたカルシウム依存性クロライドチャンネル (CaCC) として機能する報告を皮切りに、*TMEM16* ファミリーの形質膜における機能解析が次々に行われ、その機能の解明が急速に進んだ。

一方、われわれは、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家系において *TMEM16E* のミスセンス変異を同定し、その疾患責任遺伝子として報告した。この発見に先行し、*TMEM16E* 蛋白が膜貫通型の糖蛋白で、筋細胞内の低比重オルガネラ膜画分に多く存在し、筋原線維の筋細胞膜近傍に不均一かつ顆粒状に局在していることを、独自に作製したポリクローナル抗体を用いて確認してきた。さらに、*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、CaCC機能とは異なった機能を持つことが予想され、*TMEM16E* の筋細胞特異的な遺伝子発現プロファイルとともに、他のファミリー分子にない顕著な蛋白不安定性と筋細胞が *TMEM16E* 蛋白の特異的な安定化機構を供給できることを見出した。

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。*TMEM16E* の組織特異的な蛋白安定化機構、およびオルガネラ膜局在機構は、これら遺伝性疾患の発症機構に直接的に結びつくものであると予想される。

2. 研究の目的

われわれの研究グループは、世界に先駆け *TMEM16E* 遺伝子上の異なった変異が優性遺伝する骨系統疾患 GDD および劣性遺伝する筋ジストロフィー LGMD2L の疾患責任変異であることを見だし報告している。ミスセンス変異は機能獲得型変異として骨系統疾患を、ナンセンス変異は機能喪失型変異として筋ジストロフィーをそれぞれ遅延性に発症させるが、*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は明らかである。これまでに得られた研究結果から、骨と骨格筋に限局性病変を発症させるメカニズムに組織特異的な蛋白安定化機構が関与する可能性をわれわれは想定している。

本計画では、これまでに得られた知見を発展させ、骨系統疾患と筋疾患の両方に共通した発症制御機構としての *TMEM16E* 蛋白分解制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子改変モデルマウスの表現型解析と系統維持:

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 GDD の疾患モデルとして疾患変異ノックインマウス (*TMEM16Egdd* ノックインマウス) を作製している。これらマウスを用い、*TMEM16E* 分子機能及びミスセンス変異体の獲得機能を解析するとともに、LGMD2 および GDD モデルマウスとして病態の解析を行う。

新規 *TMEM16E* モノクローナル抗体の作製と評価:

マウス *TMEM16E* の遺伝子配列を組み込んだ免疫用プラスミドをラットに免疫し (DNA 免疫法)、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を同定した。*TMEM16E* ノックアウトマウス組織を絶対的な陰性対照として野生型マウスの骨格筋組織の免疫組織化学的検討を行った。

TMEM16E 蛋白の安定化調節機構の解明:

これまでの結果から、*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おり、*TMEM16E* 安定化発現させた HEK293 細胞にプロテアソーム阻害剤 (MG132) 処理をすることで *TMEM16E* 蛋白が特異的に蓄積することが分かっている。ヒト筋芽細胞株および *TMEM16E* を過剰発現させたヒト線維芽細胞株を用いた実験系で *TMEM16E* 蛋白分解制御機構を検索した。

4. 研究成果

本研究では、疾患変異ノックインマウス (*TMEM16Egdd* ノックインマウス) および *TMEM16E* ノックアウトマウスの系統維持を行い、表現型解析を続けてきた。

これまでに、*TMEM16E* ノックアウトマウスの骨格筋では、筋膜修復分子 *Dysferlin* が特異的なプロセッシングを受け活性化型がメジャープロダクトとなっていることを見出している。これは筋膜裏打により筋細胞に物理的強度を与える *Dystrophin* を欠損したマウス (筋ジストロフィーを発症) では認められないため *TMEM16E* と *Dysferlin* との筋修復機構における、強い機能的関

連性を示唆するものである。すなわち、通常飼育での LGMD2 表現型は筋ジストロフィー関連分子 Dysferlin の代償性活性化により相殺され、そのために TMEM16E ノックアウトマウスでは明らかな表現型が確認されないと考えられる。

また、TMEM16E は本来筋組織において機能を発揮しているが GDD 型ミスセンス変異 TMEM16E は野生型が本来保有していない骨系統組織での機能を獲得することで本来の機能部位である筋組織ではなく骨組織に病変を起こすことが予想されるが、今までの解析結果では TMEM16Egdd ノックインマウスにおいても明らかな表現型が確認できていない。

これら疾患モデルマウスから採取した組織標本からの免疫組織学的 TMEM16E 蛋白の検出、とりわけ罹患部位である筋肉、顎骨、長管骨における TMEM16E 蛋白の局在解析が病態の解明に大きな役割を持つ。しかしながら、われわれが保有する TMEM16E ポリクローナル抗体が免疫組織学的解析に適用できないことが判明したため、モデルマウスの表現型解析を行う上で大きな障害となっていた。このため、免疫組織化学染色においても高感度で非特異的反応がない抗体を開発することが必須であると考え、新規 TMEM16E モノクローナル抗体を作製した。

DNA 免疫法にてラットからハイブリドーマ細胞を作製し、特異的な反応を示すクローンを同定し、培養筋管細胞において、ウエスタンブロット及び免疫細胞染色を用いて強く特異シグナルを検出できるハイブリドーマクローンを同定し、これを用いてマウス筋組織を用いたウエスタンブロット (図 1) 及び免疫染色 (データ未発表) を行った。いずれの結果においても、新規 TMEM16E モノクローナル抗体は強いシグナルを特異的に検出することが確認できた。

TMEM16E-EGFP を安定化発現させた HEK293 細胞から抽出した蛋白質を抗 GFP 抗体で免疫沈降し精製した後、SDS-PAGE を行った。プロテアソーム阻害剤 (MG132) 処理で TMEM16E 蛋白が検出されただけでなく、特異的に結合する蛋白質 X の存在が確認され、ユビキチンリガーゼの結合が予想された (図 2) 。

また、ヒト筋芽細胞株 HU8 では、増殖条件でのみ筋管分化が起こらないため、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 (図 3)。このことから、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し、筋管に分化した細胞と分裂中の筋芽細胞の両方に共通するプロテアソーム分解系が存在することが想定された。

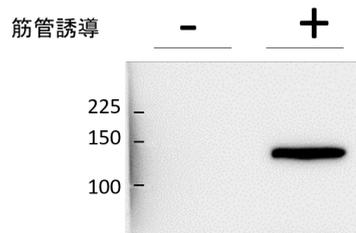
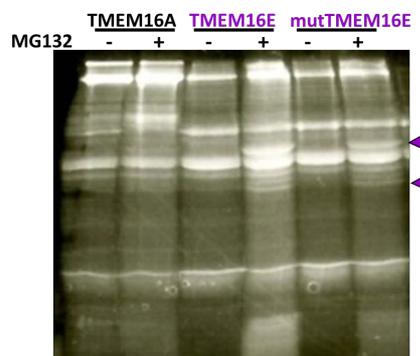


図1. 作製したTMEM16Eモノクローナル抗体を用いてWBを行った。筋管誘導させたマウス筋芽細胞でTMEM16E蛋白特異的なバンドが検出された。



▲ : specific bands for TMEM16E
▲ : ProteinX

図2. TMEM16E-EGFPを安定化発現させたHEK293細胞を抗GFP抗体で免疫沈降しSDS-PAGEしたところ、MG132処理でTMEM16E蛋白とProteinXを検出した。

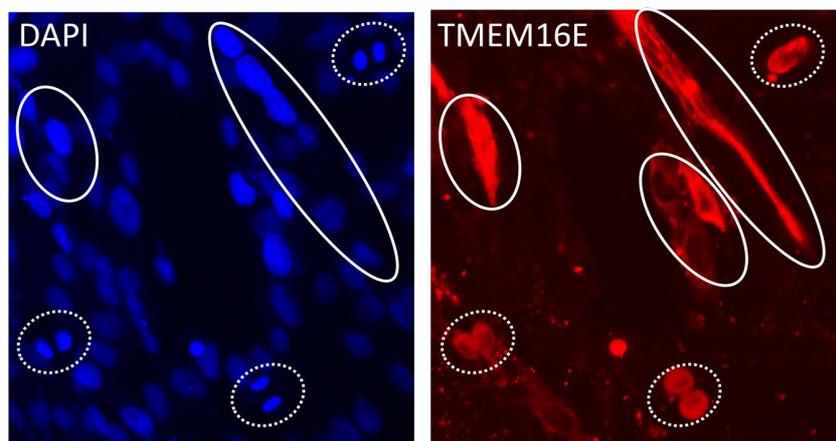


図3. 新規に用いたヒト筋芽細胞株は増殖条件でのみ筋管分化しなかったため、これまでに検討したことがなかった分裂期の筋芽細胞(点線囲い)においても筋管同様(実線囲い)の高いTMEM16E蛋白発現が起きることを発見した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Preoperative oral health care reduces postoperative inflammation and complications in oral cancer patients.

Shigeishi H, Ohta K, Fujimoto S, Nakagawa T, Mizuta K, Ono S, Shimasue H, Ninomiya Y, Higashikawa K, Tada M, Ishida F, Okui G, Okumura T, Fukui A, Kubozono K, Yamamoto K, Ishida Y, Seino S, Hashikata M, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Uetsuki R, Nimiya A, Takamoto M, Dainobu K, Tokikazu T, Nishi H, Sugiyama M, Takechi M.

Exp Ther Med. 2016 Sep;12(3):1922-1928. Epub 2016 Jul 19.

Candida albicans β -Glucan-Containing Particles Increase HO-1 Expression in Oral Keratinocytes via a Reactive Oxygen Species/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Nrf2 Pathway.

Ishida Y, Ohta K, Naruse T, Kato H, Fukui A, Shigeishi H, Nishi H, Tobiume K, Takechi M.

Infect Immun. 2018 Mar 22; 86(4). pii: e00575-17.

doi: 10.1128/IAI.00575-17.

CD44 (high) / ALDH1 (high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 β -dependent cancer stem cell properties.

Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Uetsuki R, Ishida Y, Sasaki K, Naruse T, Rahman MZ, Ono S, Shimasue H, Ohta K, Sugiyama M, Takechi M.

J Oral Pathol Med. 2016 Mar; 45(3):180-8.

doi: 10.1111/jop.12348.

〔学会発表〕(計 1件)

GDD1/ANO5/TMEM16E の細胞内分布局在

飛梅圭, 久保蘭和美, 水田邦子

第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 02 日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/k.mizuta/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：飛梅 圭

ローマ字氏名：TOBIUME Kei

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院医歯薬保健学研究院 (歯)

職名：准教授

研究者番号 (8桁): 40350037