



TITLE:

A role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Gyobu, Sayuri

---

CITATION:

Gyobu, Sayuri. A role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility. 京都大学, 2016, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19634>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016-09-01に公開

京都大学	博士 ( 医科学 )	氏 名	形部 小百合
論文題目	A role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility (スクランブリングドメインを有する膜タンパク質 TMEM16E と精子運動)		
(論文内容の要旨)			
<p>TMEM16E は 10 回膜貫通領域を持つ、TMEM16 ファミリーのメンバーの一つである。このファミリーに属する 10 個のメンバーのうち、TMEM16A と 16B は Ca<sup>2+</sup>依存性 Cl<sup>-</sup>チャンネル活性を示すことが知られている。また、TMEM16F は Ca<sup>2+</sup>依存性リン脂質スクランブラーゼ活性に必須であり、活性化血小板でのフォスファチジルセリン (PtdSer) の暴露に関与しており、16F 以外に、16C、16D、16G、16J もスクランブラーゼ活性に関与している。一方、TMEM16F と高い相同性を持つ 16E は、骨格筋や骨で特異的に発現しており、顎骨骨幹異形成症、肢帯型筋ジストロフィー、三好型ミオパチーの患者でこの遺伝子に変異が報告されている。しかし、TMEM16E の生化学的機能、生理作用は明らかになっていない。</p> <p>TMEM16E の細胞内局在を解析するため、マウス TMEM16E に対するモノクローナル抗体を作製した。ついで、マウス細胞抽出液を密度勾配遠心法によって分画後、抗 TMEM16E 抗体を用いたウェスタンブロット法により、TMEM16E は小胞体に局在していることを見出した。ところで、最近、TMEM16F の第四～五回膜貫通領域の 35 アミノ酸からなる領域 (Scrambling domain, SCRD) を TMEM16A に挿入したキメラ蛋白質がスクランブリング活性を持つことが報告されている。TMEM16E の相当するアミノ酸配列を TMEM16A、16B、16F のものと比較したところ、16F と類似していることがわかった。そこで、TMEM16E の SCRD を TMEM16A の相当する配列と置き換えたキメラ蛋白質 (TMEM16A-E SCRD) を設計し、さらに、その C-末端に EGFP 蛋白質を融合した。この分子を 293T 細胞で発現させたところ、細胞膜に局在した。一方、TMEM16A-E SCRD を TMEM16F 欠損 BaF3 細胞に発現させたところ、その細胞は Ca<sup>2+</sup>に依存して PtdSer を露出した。</p> <p>次に、TMEM16E の生理作用を明らかにすることを目的として、ノックアウトマウスを作製した。このマウスは、ヒトとは異なり、筋ジストロフィー様の表現型を示さなかった。しかし、ノックアウトマウス間の交配で生まれる仔体数が顕著に減少し、オスの生殖能力が減少していることを突き止めた。そこで、精巣での TMEM16E の発現を解析したところ、パキテン期の精原細胞から発現し始めること、その発現レベルは骨格筋と同等、あるいはそれ以上であることを見出した。さらに、精巣上体尾部から採取した精子にも発現が見られ、精子を頭部と尾部に分画したところ、尾部に局在していた。TMEM16E 欠損マウスの精巣は一見正常で、精子の形成過程、その数や形態に異常は見られなかったが、その精子を用いて体外受精をすると、透明帯を持つ卵と受精することができず、その原因は、精子の運動性の減少にあることを見出した。</p> <p>以上の結果から、TMEM16E は小胞体において SCRD を介したリン脂質スクランブリングに作用していると考えられる。また、TMEM16E は精巣、精子でも発現していること、この分子が精子の運動性、雄の生殖機能に関わっていることが明らかになった。小胞体で作用する TMEM16E の欠損がいかんして、ヒトでは骨や筋肉の異常、マウスでは精子の運動異常を引き起こすか、興味深い。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

骨格筋、骨で発現している TMEM16E は 10 回膜貫通領域を持つ TMEM16 ファミリーのメンバーであり、筋ジストロフィーや顎骨骨幹異形成症の患者で遺伝性変異が報告されている。TMEM16 ファミリーには 16A などの Cl<sup>-</sup>チャンネル活性をもつメンバーと 16F などのリン脂質スクランブラーゼ活性をもつメンバーが知られているが、TMEM16E の機能は不明である。本研究では 16E が細胞質内おそらく小胞体に局在していることを見出した。ついで、TMEM16F と相似したアミノ酸配列をもつ 16E の第 4, 5 膜貫通領域にまたがる 35 アミノ酸を 16A の対応する領域に導入したところ、そのキメラ蛋白質は細胞膜に局在し、リン脂質スクランブラーゼ活性を示した。一方、TMEM16E 欠損マウスは筋ジストロフィーの症状を示さなかったが、雄の繁殖能力が低下していた。TMEM16E はパキテン期以降の生殖細胞に強く発現していたが、16E 欠損マウスの精巣、精巣上体、精子の形態などに異常は見られなかった。しかし、精子の運動性が顕著に減少しており、体外受精では透明帯をもつ卵子への受精率が著しく低下していた。以上の結果は、小胞体での TMEM16E によるリン脂質スクランブリングが精子の運動性付与過程に関与している可能性を示唆している。

以上の研究は TMEM16E の分子機能および生理的役割の解明に貢献する。

したがって、本論文は博士 (医科学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 2 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降