

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07062

研究課題名(和文)モヤモヤ病タンパク質ミステリンの細胞内機能

研究課題名(英文)Cellular function of moyamoya disease-associated protein mysterin

研究代表者

森戸 大介 (MORITO, Daisuke)

京都産業大学・タンパク質動態研究所・主任研究員

研究者番号：20514251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：モヤモヤ病は日・中・韓で多い脳血管疾患である。内頸動脈分岐部周辺において進行性の動脈狭窄・閉塞を生じ、そのため脳虚血・脳梗塞を引き起こす。また、代償性の側副血行路からの出血により、患者は死に至ることがある。我々が以前にクローニングした新規遺伝子ミステリンが、モヤモヤ病の主要な遺伝因子であることは明確であったが、機能は不明であった。培養細胞を用いた検討により、ミステリンが脂質代謝制御因子であることを初めて明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Moyamoya disease is a cerebrovascular disorder mostly observed in East Asian countries. It shows progressive stenosis and occlusion at internal carotid arteries, resulting in ischemia and cerebral infarction. Moreover, collateral vessels often rupture, resulting in patient death. We isolated mysterin gene, which was strongly associated with the onset of moyamoya disease; however, its function remained unknown. We recently succeeded in demonstrating that mysterin serves as a regulator of lipid metabolism with tissue culture cell system, for the first time.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミステリン モヤモヤ病 脂肪滴 AAA+ ユビキチン

## 1. 研究開始当初の背景

モヤモヤ病は東アジア地域(日中韓)に多い原因不明かつ重篤な脳血管疾患である。頭蓋内の限られた部位(内頸動脈分岐部周辺)において、平滑筋細胞の異常増殖・内膜への浸潤・内膜肥厚・血栓形成等を生じ、進行性に動脈内腔の狭窄・閉塞が引き起こされる。そのため患者は慢性脳虚血・脳梗塞を起こす。また慢性虚血を解消するために発達した側副血行路からの出血により、患者の死をまねくことがある。しかし、何がこのような病変の限局性を規定しているのか、また何が原因となって平滑筋細胞の異常増殖が引き起こされているのかについて、解明が進んでおらず、そのため根治療法の確立にいたっていない。

京都大学(小泉昭夫教授ら)を中心としたグループによりヒト17番染色体にモヤモヤ病原因ミスセンス変異が同定された(#Liu, #Morito et al., PLOS ONE, 2011)。当該研究グループの1人として、研究代表者は自らの手によりこの変異を含む新規遺伝子ミスチリンをクローニングし、また、ミスチリンタンパク質がATPアーゼ活性、ユビキチンリガーゼ活性を示す細胞内巨大タンパク質であることを明らかにした。その後さらに、ミスチリンがタンデムAAA+型ATPアーゼであることを初めて示したが(Morito et al., Sci Rep, 2014)、生理・病態機能については未解明であった。

本研究開始時まで、ミスチリンの生理・病態機能を解明する目的で、ほ乳類培養細胞およびゼブラフィッシュを用いた検討を行い、ミスチリンが何らかの細胞内構造と結合していることや、ミスチリンがゼブラフィッシュ初期発生において、神経・筋肉形成に必須の役割を果たすこと、また、ミスチリンが脱ユビキチン化酵素 USP15 と結合することを予備的に見出ししていたが、その詳しいメカニズムや生物学的意義については未解明であった。

## 2. 研究の目的

ミスチリンは細胞内でどのような役割を果たしているのか、またその際にATPアーゼ活性とユビキチンリガーゼ活性はどのようにはたらくのかを明らかにし、ミスチリンの生理機能を解明する。

同時に、このようなミスチリンの生理機能が、モヤモヤ病変異によりどのように障害され、またそれがどのように個体における障害につながるのかを明らかにし、疾患変異ミスチリンの病態機能を解明する。

## 3. 研究の方法

ほ乳類培養細胞を用いて、ミスチリンの細胞内局在、ミスチリン過剰発現/ノックダウ

ン/ノックアウトが細胞機能に与える影響について広く探索を行い、ミスチリンの細胞内機能およびその障害の機序・影響について同定する。

また、モルフォリノ法によってゼブラフィッシュミスチリンの発現を抑制し、初期発生におけるミスチリンの役割を調べるとともに、野生型/変異型ヒトミスチリンの一過的発現による表現型回復解析を行う。その際、酵素活性変異型ミスチリンを一過的発現させることにより、ミスチリンATPアーゼおよびユビキチンリガーゼ活性の、初期発生における必要性について解明を行う。

ほ乳類培養細胞内のミスチリン結合タンパク質を、免疫沈降法およびMSを用いて探索し、ミスチリンとそのタンパク質の機能相関について培養細胞を用いて検討する。本研究開始時点において、すでにUSP15を予備的に同定していたため、USP15とミスチリンの機能相関について、ほ乳類培養細胞を用いて検討を行った。

## 4. 研究成果

本研究開始時に、ミスチリンの発現抑制によりゼブラフィッシュの神経・筋発生が障害されることを予備的に見出ししていた。またヒトミスチリンの導入により、ゼブラフィッシュミスチリンの機能を代替できること、その際、酵素活性変異体(ATPアーゼ変異体およびユビキチンリガーゼ変異体)では、機能代替が起こらないことを予備的に見出ししていた。さらに詳細な検討により、ミスチリン発現抑制による筋発生障害は速筋組織でのみ起こる現象であり、遅筋組織では起こらないこと、また、筋発生障害は、筋原線維の形成異常ではなく、筋原線維の束である筋線維の形成異常によることを明らかにした。すなわちミスチリンは速筋および遅筋の運命決定後にはたらく因子であり、速筋の形成過程に特異的に関わることを示唆された。また速筋特異的なヒトミスチリン異所性発現は速筋の表現型を回復したが、血管異常については回復を認めなかった。すなわち速筋繊維形成におけるミスチリンの機能は組織自律的に発揮されており、血管発生については、血管もしくは筋肉以外の組織で発現するミスチリンにより制御されている可能性が考えられた(Kotani, \*Morito et al., Sci Rep, 2015)。

本研究開始時、ほ乳類培養細胞から回収したミスチリン共免疫沈降物のMS解析により、ミスチリン結合タンパク質として脱ユビキチン化酵素 USP15 を同定していた。USP15によりミスチリンが脱ユビキチン化されること、またK48鎖が特異的に除去されること、それによりK48ユビキチン依存的なミスチリンのプロテアソーム分解が阻害され、ミスチリンタンパク質安定化が起こることなどを明らかにした。興味深いことにUSP15には2

つのオルタナティブスプライシングバリエーションが存在するが、ロングバリエーション USP15 のみがミステリンと結合し、脱ユビキチン化を促進し、ショートバリエーションはミステリンと結合せず、ユビキチン化、安定性にも影響しなかった。そこでロング/ショートバリエーション USP15 をベイトとして再度 MS 解析を行ったところ、この2つのバリエーションが異なる基質タンパク質群を認識することが明らかとなった。すなわち USP15 のスプライシングバリエーションは異なる生理機能を持ち、ロングバリエーションの特異的な標的タンパク質の1つがミステリンであることが明らかとなった。USP15 のオルタナティブスプライシングバリエーション毎に、異なる機能を持つことが過去の研究から示唆されていたが、その分子実態をとらえた研究はこれまでほとんどなく、進化的に保存されたオルタナティブスプライシング機構による USP15 機能調節を明確に示した初めての研究成果となった (Kotani, \*Morito et al., Sci Rep, 2017)。

これまでミステリンタンパク質が細胞内においてドット状の局在パターンを形成することを見出していた。高解像度の光学顕微鏡観察により、これらドット状構造の内部に細胞質ゾルから隔離された空間が認められたことから、これらが何らかの細胞内小胞構造である可能性が考えられた。各種の細胞内構造マーカーと共染色を行ったところ、これらの中空構造のほとんどは、細胞内の中性脂肪貯蔵サイト、脂肪滴 (LDs) であることを同定した。ミステリンは脂肪滴を囲む脂質一重膜の表面に結合し、脂肪滴上のリパーゼを負に制御することで脂肪分解を抑制し、細胞内中性脂肪蓄積を安定化するにはたらきを持つ因子であった。ミステリンのこのような機能には、AAA+ ATPアーゼ活性とユビキチンリガーゼ活性の両方が重要であった。近年、白人モヤモヤ病家系の遺伝解析により、ミステリンユビキチンリガーゼドメイン内の保存されたアミノ酸部位に、複数の変異が同定されている。これらの変異によりミステリンの脂肪滴局在および中性脂肪安定化機能は顕著に障害された。すなわち、白人モヤモヤ病患者においては、ミステリンの細胞内局在障害および中性脂肪代謝障害が生じている可能性が示唆された。一方で、東アジア人変異によるミステリンの局在・機能障害はまったく観察できなかった。東アジア人モヤモヤ病では、ミステリンの R4810K 変異のみではなく、追加的な遺伝・環境要因の寄与が想定されているが、そのような追加要因が存在する場合にのみ、白人変異と同等の機能障害が生じる可能性が考えられた。以上の観察より、モヤモヤ病原因遺伝子産物ミステリンが中性脂肪代謝を負に制御する因子であり、白人モヤモヤ病の原因変異により、このような機能が顕著に障害されることを初めて明らかにした。

## 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 5 件)

1. Hirayama S, Sugihara M, Morito D, Iemura SI, Natsume T, Murata S, Nagata K. Nuclear export of ubiquitinated proteins via the UBIN-POST system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 1;115(18):E4199-E4208. doi: 10.1073/pnas.1711017115. 査読有
2. Kotani Y, Morito D (責任著者), Sakata K, Ainuki S, Sugihara M, Hatta T, Iemura SI, Takashima S, Natsume T, Nagata K. Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor. *Sci Rep*. 2017 Mar 9;7:44293. doi: 10.1038/srep44293. 査読有
3. Kotani Y, Morito D (責任著者), Yamazaki S, Ogino K, Kawakami K, Takashima S, Hirata H, Nagata K. Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213. *Sci Rep*. 2015 Nov 4;5:16161. doi: 10.1038/srep16161. 査読有
4. Kirstein J, Morito D (共筆頭著者), Kakahana T, Sugihara M, Minnen A, Hipp MS, Nussbaum-Krammer C, Hartl FU, Nagata K, Morimoto RI. Proteotoxic stress and ageing triggers the loss of redox homeostasis across cellular compartments. *EMBO J*. 2015 Sep 14;34(18):2334-49. 査読有
5. Morito D, Nagata K. Pathogenic Hijacking of ER-Associated Degradation: Is ERAD Flexible? *Mol Cell*. 2015 Aug, 59(3):335-44. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

〔図書〕(計 2 件)

1. Morito D (co-corresponding) and Nagata K. Molecular Biology of Mysterin/RNF213. *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine*, Part III, pp45-57 (2017) Springer

2. Morito D (co-corresponding) and Nagata K. Physiological Role of Mysterin/RNF213 in Zebrafish. **Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine**, Part III, pp59-67 (2017) Springer

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森戸 大介 (MORITO, Daisuke)  
京都産業大学・タンパク質動態研究所・主任研究員  
研究者番号：20514251

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

永田 和宏 (NAGATA, Kazuhiro)  
小谷 友理 (KOTANI, Yuri)  
杉原 宗親 (SUGIHARA, Munechika)  
會退 詩央莉 (AINUKI, Shiori)