

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710193

研究課題名（和文） 家族性モヤモヤ病に關与する新規巨大ユビキチンリガーゼ／ATPアーゼの研究

研究課題名（英文） Functional and Structural Analysis on Familial Moyamoya Disease Associated Novel Huge Ubiquitin Ligase/ATPase

研究代表者

森戸 大介（MORITO DAISUKE）

京都産業大学・総合生命科学部・特定研究員（PD）

研究者番号：20514251

研究成果の概要（和文）：家族性モヤモヤ病の感受性遺伝子としてミステリン／RNF213を同定し、クローニングに成功した。ミステリンタンパク質の細胞内局在、ユビキチンリガーゼ活性、ATPアーゼ活性等を明らかにし、また、ミステリンが発生過程における正常血管新生に関わることを明らかにした。精製ミステリンを用いて、ミステリンの構造を明らかにし、また、ミステリンの細胞内共沈降物解析から、脱ユビキチン化酵素がミステリンと結合し機能的に相関していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We identified mysterin/RNF213 as a familial moyamoya disease susceptible gene, and succeeded to clone its cDNA. Further, we revealed its intracellular distribution, ubiquitin ligase and ATPase activities, and its participation in proper angiogenesis during normal development. Using purified mysterin protein, we revealed its structural properties. Moreover, we identified de-ubiquitinating enzyme as a mysterin binding protein through intracellular coimmunoprecipitation analysis, and revealed that the enzyme functionally associates with mysterin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：ユビキチン・ATPアーゼ・モヤモヤ病・血管新生・タンパク質複合体

1. 研究開始当初の背景 モヤモヤ病は日本人に多い原因不明の脳血管疾患である。大脳基底部のウイリス動脈輪で平滑筋細胞の異常増殖による血管壁の肥厚と、内腔の狭窄が起こることにより、血流が滞り、一過性の虚血発作、また症状の進行に従ってしばしば脳梗塞を引き起こす。現在、日本人の約1万人に1人が罹患すると見積もられており、国内

に1万人を超える患者があると概算されている。このうち15%程度が家族性の罹患歴を示すことから、遺伝的要因が疑われていた。家族性の患者では浸透率は必ずしも高くないが、常染色体優性の遺伝を示し、3番、17番染色体などに疾患と相関を示す領域のあることが示唆されていたが、これまで確からしい原因変異・遺伝子の同定までには至ってい

なかった。モヤモヤ病は発見以来 40 年以上が経過しているが、孤発性、家族性共に何が疾患を引き起こすのか、原因はほぼ全く不明のままである。一方で、日本人に多い疾患であることや、部分的に動脈硬化と類似した病態を示すことから、疾患機序の解明は非常に重要と考えられる。

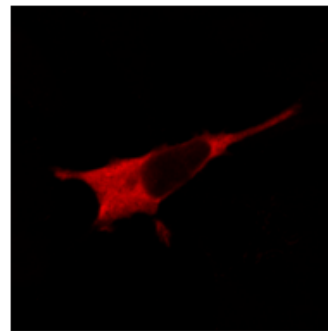
2. 研究の目的 家族性モヤモヤ病の発症と関連する多型、変異、遺伝子等を同定し、クローニングを行う。細胞生物学、生化学、発生生物学などの手法を用いて、当該遺伝子の構造・機能解析、および、疾患関連変異の解析をすることにより、モヤモヤ病発症の機序を解明すると共に、正常な血管の構造・機能・発生過程に関する新たな知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法 遺伝子マーカーを用いた連鎖解析により、疾患関連変異・遺伝子を同定する。変異・遺伝子の同定後は、遺伝子 cDNA をクローニングし、野生型・疾患関連変異型の発現コンストラクトを作成し、細胞内でのふるまいや、酵素活性、細胞内機能への関与を検討する。また、ゼブラフィッシュモデルを用いて、血管ネットワークの構造と機能にどのように当該遺伝子が関わるのか、疾患関連変異体は生体内で何を引き起こすのかについても検討を加える。

4. 研究成果 モヤモヤ病の感受性因子として 17 番染色体 q25.3 領域に非常に稀な一塩基多型を見出した。この一塩基多型は新規遺伝子の読み枠の中に存在し、この遺伝子の翻訳産物の C 末端付近のアルギニンをリジンに変えていた。この一塩基多型はコントロール群の中では非常に稀 (1.4%) であったにも関わらず、調べられた全ての家族性患者の中では全員がこれを保持していたので、疾患との強い相関があると考えた。この一塩基多型を含む遺伝子を、新たにミステリン/RNF213 と名付け、全長 cDNA の遺伝子クローニングを行った。

ミステリンは 591kDa の巨大なタンパク質で、2 つの特徴的なドメインを持っていた。1 つは RING finger domain であり、ユビキチンリガーゼの共通ドメインである。もう 1 つは AAA+ ATP アーゼドメインであり、ATP の加水分解と共役して、構造変化を起こし、物理的な仕事をする事が知られているドメインである。AAA+ ATP アーゼには、ダイニンやプロテアソーム、DNA ヘリカーゼなどが知られており、細胞内において、多岐にわたる物理的機能を果たしている。これまでの検索からミステリンは脊椎動物以上で保存された遺伝子であることが推定された。ミステリンタンパク質の組織内局在はユビキタスで、発

現は血管に限局されていなかった。また細胞内発現は、核を除くサイトゾルに広く分布し



ておりまた、一部は細胞膜、細胞内オルガネラ、細胞骨格と結合していると思われる (図 1)。

図 1: ミステリンはサイトゾルに局在する

細胞に強制発現したミステリンを用いて自己ユビキチン化アッセイを行ったところ、ミステリンの内在性の RING finger domain は酵素活性を有することが認められた (図 2)。

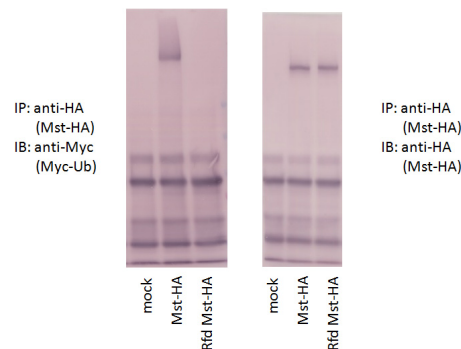


図 2: ミステリンの自己ユビキチン化活性

またミステリンの AAA+ ATPase domain 部分をリコンビナントタンパク質として大腸菌に発現させた後、精製した産物を用いて ATP アーゼ活性を計測したところ、有意な ATP の加水分解を認められた。すなわちミステリンの AAA+ ATP アーゼドメインは酵素活性を持っていた。RING finger と AAA+ ATP アーゼを同時に持つタンパク質はこれまで知られておらず、この点からミステリンは特異な細胞内機能を持つものと予想された。

次にミステリンの生体内での機能を検討する目的で、ゼブラフィッシュの遺伝子発現抑制システムを用いた実験を行った。ゼブラフィッシュには 2 つのミステリン遺伝子が保存されており、強く発現しているミステリン  $\alpha$  と弱い発現のミステリン  $\beta$  と名付けた。ミステリン  $\alpha$  をモルフォリノアンチセンスオリゴ RNA を用いて発現抑制すると、受精 72 時間後の血管形成の著しい乱れを観察することができた。脈管形成によって作られる背側大動脈と後主静脈にはまったく異常は認められなかったが、その後に血管新生で形成される体節に沿った血管ネットワークに顕著な異常が観察された (図 3)。この異常とは

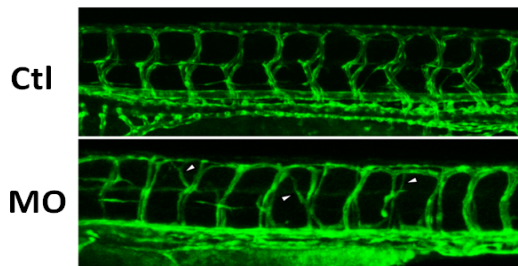


図 3: ミステリンの抑制による血管走行異常

1 つは血管ガイダンスの乱れであると考えられ、もう 1 つは過剰な血管分岐であると考えられた。この時点での血管新生は Notch や Dll4、VEGF 経路によって厳密に制御されているが、ミステリンの遺伝子発現を抑制した動物では、何らかの理由により、これらのシグナル経路に異常が起こり、このような血管形成異常につながったと考えられた。ヒトの血管疾患から見つかったミステリンが、ゼブラフィッシュの血管形成においても重要な役割を果たしていたことは、たしかにミステリンの血管での機能を通じて、ヒトのモヤモヤ病が引き起こされていることを強く示唆しており、重要な結果と考えている。

AAA+ ATPアーゼは特異な多量体を形成し、物理的機能を果たすことが知られていることから、このような多量体形成がミステリンについても起こるのかを検討するため、培養細胞に発現させたタグ付ミステリンを用いて、精製を行った。精製ミステリンを用いて電子顕微鏡観察を行ったところ、全体のうち少ない比率ではあるが、明確なリング状多量体形成が認められた(図 4)。このような多量体がダイナミックに構造変化を起こすことで、物理的な仕事をするのが考えられたが、ミステリンが ATP の加水分解と共役して、どのように形態を変化させ、どのように血管の構造と機能に関わるのか、今後の課題である。

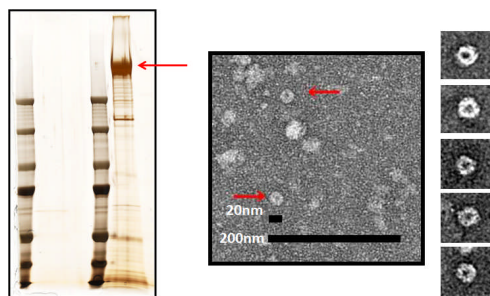


図 4: ミステリンの精製と電子顕微鏡像

また、ミステリンの機能を探る目的で行った共沈降物解析から、ミステリンの基質、共役因子候補を得た。中でも脱ユビキチン化酵素とミステリンの物理的・機能的相関に着目し、解析を行っている。

## 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 2 件)

- 1) Morito D. and Nagata K., ER stress proteins in autoimmune and inflammatory diseases, *Front. Immunol.*, 2012; 3:12, 査読有
- 2) Liu W., Morito D., Takashima S., (以下 20 名省略), Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development, *PLoS One*, 2011, 6(7), 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- 1) Morito D., Nishikawa K., (10 名省略), Nagata K., Structure and function of novel AAA+/ubiquitin ligase mysterin, 9<sup>th</sup> International Conference on AAA Proteins, Kumamoto(Japan), 2011. 11. 6-10
- 2) Hirayama S., Morito D., Araki K., Iemura S., Natsume T. and Nagata K., Novel Ubin/Post complex mediate nuclear export associated degradation (NEAD), Cold Spring Harbor Asia Conference, "Protein Homeostasis in Health & Disease", Suzhou(China), 2011. 9. 26-30
- 3) Morito D., Nishikawa K., (10 名省略), Nagata K., Structure and function of novel AAA+/ubiquitin ligase mysterin, Cold Spring Harbor Asia Conference, "Protein Homeostasis in Health & Disease", Suzhou(China), 2011. 9. 26-30
- 4) Morito D., (10 名省略), Nagata K. and Koizumi A., Novel ATPase/ubiquitin ligase Mysterin is responsible for familial Moyamoya disease and is involved in proper angiogenesis, The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Protein Community, Nara(Japan), 2010. 9. 13-16
- 5) 森戸大介、(11 名省略)、永田和宏、新規巨大 ATP アーゼ/ユビキチンリガーゼ Mysterin は血管新生を制御し、モヤモヤ病(ウイリス動脈輪閉塞症)に関与する、第 62 回日本細胞生物学会大会、大阪市 2010. 5. 19-21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森戸 大介 (MORITO DAISUKE)  
京都産業大学・総合生命科学部・  
特定研究員 (PD)  
研究者番号：20514251