

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840024

研究課題名(和文)モヤモヤ病タンパク質ミステリンの構造と機能

研究課題名(英文)Structure and function of moyamoya disease-associated protein, mysterin

研究代表者

森戸 大介 (MORITO, Daisuke)

京都産業大学・総合生命科学部・研究員

研究者番号：20514251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミステリンがATPアーゼ活性のあるAAA+ドメインを含むことを明らかにし、また、ミステリンがこのドメインを介して巨大ドーナツ状オリゴマーを形成し、動的に構造を変化させていることを明らかにした。さらに、ミステリンは*in vivo*において神経・筋・血管の発生に必須であり、しかもATPアーゼ活性とユビキチンリガーゼ活性が重要であることを、ゼブラフィッシュを用いて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that mysterin contains enzymatically active AAA+ ATPase modules, forms large toroidal oligomer through these modules, and dynamically changes its structural state. Furthermore, we demonstrated that mysterin is indispensable for neuro, muscular, and vascular development *in vivo* using zebrafish model. The two enzymatic activities of mysterin are both essential for this function.

研究分野：構造生物化学

キーワード：ミステリン モヤモヤ病 AAA+タンパク質 ユビキチン

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、脳底部のウイリス動脈輪で血管が進行性に狭窄・閉塞を引き起こす。そのため、初期には意識障害など一過性の脳虚血発作を起こし、後期には脳溢血・脳梗塞などを引き起こす。日本人の発症は白人の約 10 倍程度多く、現在、国内に 1 万人を超える患者が存在する。そのうち約 15% が家族性の病歴を示すことから、長年、遺伝因子の関与が疑われてきたが、2011 年、我々を含む 2 つのグループが全ゲノム解析により初めてのモヤモヤ病感受性遺伝子を同定し、この遺伝子をミスチリン / RNF213 と名付けた (Liu, Morito, et al., 2011, *PLoS One*; Kamada et al., 2011, *J. Hum. Genet.*)

ミスチリン遺伝子は 591kDa の新規巨大タンパク質をコードしており、AAA+ ATP アーゼモジュールとユビキチンリガーゼドメインを持っていた。ミスチリン C 末端付近のミスセンス変異により、モヤモヤ病の罹患率は 100 倍以上上昇していた。研究代表者は、当初データベースに誤って 2 つの遺伝子 (5' 末端側 ALO17、3' 末端側 RNF213) として記載されていたこの遺伝子が 1 つの遺伝子であることを見出し、全エキソン構造の決定、cDNA クローニング、細胞内発現系の構築、局在や 2 つの酵素活性の同定などを行い、基本的性質について明らかにした。またゼブラフィッシュにおいてミスチリンの発現を一過的に抑制すると、血管発生の顕著な異常が見られた (Liu, Morito, et al., 2011, *PLoS One*)。従って、ミスチリンが通常の血管発身に重要な役割を果たし、その異常により脳血管疾患を引き起こしていることが考えられた。しかし、ミスチリンがどのような分子・細胞機能を持つのか、また疾患関連変異がどのような機序でモヤモヤ病を引き起こすのかについて知見がなく、重要な課題として残されていた。

2. 研究の目的

ミスチリンがどのような酵素機能を持ちどのように細胞内ではたらいているか、分子・細胞レベルでの解析を進めることで、ミスチリンの生理機能を明らかにすると共に、モヤモヤ病におけるミスチリンの病態機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

ミスチリン結合タンパク質を、MS を用いて同定・解析し、培養細胞を用いてミスチリンの細胞内局在・機能の同定を試み、精製タンパク質を用いて詳細な酵素活性・構造の同定を試みた。

4. 研究成果

MS 解析からは脱ユビキチン化酵素を含む幾つかの候補因子を得た。特に脱ユビキチン化酵素については、ミスチリンとの結合・機

能相関を確認し、現在、投稿準備中である。酵素活性・構造については、ミスチリンには当初知られていなかったもう 1 つの AAA+ ATP アーゼがあり、2 つの AAA+ ATP アーゼドメインを介して巨大なドーナツ状構造を作ると共に、これらドメインの協働により、モノマー状態とオリゴマー状態を繰り返していることを明らかにし、論文として報告した (Morito, et al., 2014, *Sci Rep*)

細胞レベルの解析については、ミスチリンの詳しい細胞内局在を同定し、現在、機能について解析を進めている。また、細胞内における機能同定と並行して、個体における機能を探索したところ、ミスチリンはゼブラフィッシュにおいて神経・筋・血管の発生に必須であり、しかも今回同定した 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ることが明らかとなった。

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 3 件)

1. Morito D, Nishikawa K, Hoseki J, Kitamura A, Kotani Y, Kiso K, Kinjo M, Fujiyoshi Y and *Nagata K. Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Sci Rep* 24: 4: 4442, 2014. (査読有)
2. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K and *Koizumi A. The moyamoya disease susceptibility variant RNF213 R4810K (rs112735431) induces genomic instability by mitotic abnormality. *Biochem Biophys Res Commun* 439(4): 419-426, 2013. (査読有)
3. Hitomi T, Habu T, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Osafune K, Taura D, Sone M, Asaka I, Ameku T, Watanabe A, Kasahara T, Sudo T, Shiota F, Hashikata H, Takagi Y, Morito D, Miyamoto S, Nakao K and *Koizumi A. Downregulation of Securin by the variant RNF213 R4810K (rs112735431, G>A) reduces angiogenic activity of induced pluripotent stem cell-derived vascular endothelial cells from moyamoya patients. *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 13-9, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 21件)

1. Morito D., Kotani Y., Yamazaki S., Yamada K., Takashima S., Hirata H., Nagata K., Physiological Function of Moyamoya Disease-Associated Gene mysterin/RNF213, The 2nd International Symposium on Neurovascular Wiring, Kyoto, 2015.1.28-29
2. Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Kenta Yamada, Seiji Takashima, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata, Mysterin, a novel hybrid AAA+ ATPase/ubiquitin ligase hybrid protein, is essential for vascular-neural and muscle development in zebrafish, 新学術領域「ユビキチン制御」若手シンポジウム、京都市、2014.11.11
3. 森戸大介、Janine Kirstein-Miles、垣花太一、杉原宗親、Mark S. Hipp、F.Ulrich Hartl、Richard Morimoto、永田和宏、老化・疾病による小胞体レドックス恒常性の低下、第9回臨床ストレス応答学会大会、岡山市、2014.11.1-2
4. Janine Kirstein, Daisuke Morito, Taichi Kakihana, Munechika Sugihara, Anita Minne, Mark S. Hipp, Carmen Nussbaum-Krammer, F. Ulrich Hartl, Kazuhiro Nagata, Richard I. Morimoto, Loss of redox homeostasis by trans-compartmental stress and ageing, Canada-Germany Neuroscience Workshop, Berlin (Germany), 2014.10.16
5. 森戸大介、モヤモヤ病タンパク質ミステリンの構造と機能、第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会 合同年会シンポジウム、奈良市、2014.9.30
6. Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Kenta Yamada, Seiji Takashima, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata, Moyamoya disease-associated gene mysterin is essential for vascular-neural and muscle development in zebrafish, 第20回小型魚類研究会、東京都、2014.9.20-21
7. Janine Kirstein, Daisuke Morito, Taichi Kakihana, Munechika Sugihara, Anita Minne, Mark S. Hipp, Carmen Nussbaum-Krammer, F. Ulrich Hartl, Kazuhiro Nagata, Richard I. Morimoto, Loss of redox homeostasis by trans-compartmental stress and ageing, Neuroscience Forum, Berlin (Germany), 2014.6.12
8. 小谷友理、森戸大介、山崎悟、山田健太、高島成二、平田普三、永田和宏、AAA+ ATPase/ユビキチンリガーゼタンパク質 mysterin/RNF213 による zebrafish の発生制御、日本細胞生物学会大会、奈良市、2014.6.11-14
9. 森戸大介、Janine Kirstein-Miles、垣花太一、杉原宗親、Mark S. Hipp、F.Ulrich Hartl、Richard Morimoto、永田和宏、老化・疾患による小胞体レドックス恒常性の低下、日本細胞生物学会大会シンポジウム、奈良市、2014.6.11-14
10. 森戸大介、西川幸希、山崎悟、宝関淳、北村朗、小谷友理、金城政孝、高島成二、藤吉好則、永田和宏、モヤモヤ病タンパク質ミステリンの構造と機能、第61回生化学会近畿支部例会、京都市、2014.5.17
11. 小谷友理、森戸大介、山崎悟、山田健太、高島成二、平田普三、永田和宏、もやもや病関連タンパク質 mysterin による zebrafish の発生制御、第61回生化学会近畿支部例会、京都市、2014.5.17
12. Daisuke Morito, Yuri Kotani, Kouki Nishikawa, Satoru Yamazaki, Kenta Yamada, Seiji Takashima, Yoshinori Fujiyoshi, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata, Structure and function of Moyamoya Disease-Associated protein mysterin/RNF213, The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, 2014.04.14-17
13. 森戸大介, Structure and Function of Moyamoya Disease Susceptibility Protein Mysterin/RNF213, 第1724回バイオロジカルシンポジウム、国立遺伝学研究所、三島市、2014.1.29
14. 森戸大介、小谷友理、西川幸希、北村朗、山崎悟、金城政孝、高島成二、平田普三、藤吉好則、永田和宏、モヤモヤ病タンパク質ミステリンの構造と機能、CREST-さがけ構造生命科学領域キックオフミーティング、守口市、2013.12.26
15. 森戸大介、西川幸希、宝関淳、北村朗、小谷友理、夏目徹、金城政孝、藤吉好則、永田和宏、モヤモヤ病タンパク質ミステリンの動的複合体形成と細胞内機能、第36回日本分子生物学会年会ワークショップ、神戸市、2013.12.3-6
16. 小谷友理、森戸大介、山崎悟、高島成二、平田普三、永田和宏、もやもや病関連タンパク質 Mysterin による zebrafish の発生制御、第8回臨床ストレス応答学会大会、松本市、2013.11.15
17. Daisuke Morito, Structure and function of moyamoya disease-associated AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin/RNF213, Max Plank

- Institute Seminar, Martinsried (Germany), 2013.9.21
18. Kazuhiro Nagata, Daisuke Morito (Speaker), Yuri Kotani, Mysterin, the largest molecule of AAA+ ATPase family members with E3 ubiquitin ligase activity, is involved in development of zebrafish, EMBO workshop "AAA+ proteins: from mechanism and disease to targets", Neuss (Germany), 2013.9.15-19
 19. Daisuke Morito, Kouki Nishikawa, Jun Hoseki, Akira Kitamura, Yuri Kotani, Masataka Kinjo, Yoshinori Fujiyoshi and Kazuhiro Nagata, Potential dynamic equilibrium of moyamoya disease-associated AAA+ ATPase mysterin, EMBO workshop "AAA+ proteins: from mechanism and disease to targets", Neuss (Germany), 2013.9.15-19
 20. Daisuke Morito, Yuri Kotani, Kouki Nishikawa, Jun Hoseki, Satoru Yamazaki, Shun-ichiro Iemura, Toru Natsume, Seiji Takashima, Yoshinori Fujiyoshi, Kazuhiro Nagata, Structure and function of moyamoya disease-associated AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin, The 35th Naito Conference 'The Ubiquitin Proteasome System', Sapporo (Japan), 2013.7.10
 21. Shoshiro Hirayama, Shun-ichiro Iemura, Kazutaka Araki, Daisuke Morito, Toru Natsume, Shigeo Murata, Kazuhiro Nagata, A new mechanism of nuclear export of ubiquitinated proteins by the UBIN-POST system, The 35th Naito Conference 'The Ubiquitin Proteasome System', Sapporo (Japan), 2013.7.10
 22. 森戸 大介, 脳血管疾患モヤモヤ病に関与するATPアーゼ/ユビキチンリガーゼ、ミステリンの構造と機能, 日本生物物理学会北海道支部講演会, 札幌市, 2013.7.8

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・主任研究員
研究者番号：20514251