

# 博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第40号

2016年3月

京都産業大学

は し が き

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 28 年 3 月 19 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

---

---

# 目 次

---

---

## 課程博士

1 . 小谷 友理	〔博士（生物工学）〕	.....	1
2 . 森 勇伍	〔博士（生物工学）〕	.....	5
3 . 吉田 亜佑美	〔博士（生物工学）〕	.....	11
4 . <small>オントン パーワレッド</small> Ontong Pawared	〔博士（生物工学）〕	.....	17
5 . 佐々木 大樹	〔博士（生物工学）〕	.....	21
6 . <small>スントンスイット ジーラワット</small> Soonthornsit Jeerawat	〔博士（生物工学）〕	.....	27

## 論文博士

1 . 上野 信洋	〔博士（生物工学）〕	.....	31
-----------	------------	-------	----



氏名（本籍）	小谷 友理（兵庫県）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第20号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	AAA+ ATP アーゼ・ユビキチンリガーゼ mysterin によるゼブラフィッシュの神経-筋形態制御
論文審査委員	主 査 永田 和宏 教授
	副 査 黒坂 光 教授
	” 近藤 寿人 教授

## 論文内容の要旨

本論文は、もやもや病感受性因子として同定された mysterin のゼブラフィッシュにおける生理的機能について検討したものである。

もやもや病は、ヒト脳底部に位置するウィリス動脈輪での動脈閉塞により、脳梗塞を引き起こす疾患である。もやもや病患者の一部は家族性であり、それら家系の遺伝解析から、もやもや病の発症リスクを上げる因子として、mysterin が同定されていた。

mysterin タンパク質は、一つの分子のなかに、AAA+ ATPase とユビキチンリガーゼを有する唯一の因子であり、単量体の分子量が 591 KDa と巨大なものである。加えて、AAA+タンパク質であるから、機能体は 3.6 MDa の巨大複合体（六量体）であることが予想される。先行研究により、ゼブラフィッシュにおける mysterin のノックダウンにより、体節間血管のミスガイダンスが観察されているが、それ以外の表現型は報告されていない。

本論文では、ゼブラフィッシュを用いて mysterin のノックダウン実験を行い、その他の表現型について検討を行った。明視野観察から、mysterin ノックダウン胚は、遊泳速度の低下と発生遅延を示すことが確認された。組織染色からは、運動神経の投射異常、速筋の形態異常、遅筋の垂集団である MPCs の異常増殖が観察された。以上から、mysterin は、体節間血管のみを制御する因子ではなく、運動神経、速筋形態にも関与することが明らかとなった。

mysterin の組織特異性を明らかにするため、速筋特異的にヒト由来の mysterin を発現させ、

mysterin ノックダウン個体で見られた表現型の回復について検討を行った。その結果、mysterin ノックダウンによる速筋形態異常は、ヒト mysterin の速筋特異的な発現によって回復した。加えて、運動神経の投射異常の一部も回復を見せた。しかし、体節間血管の異常ガイダンス、MPCs の異常増加はヒト mysterin の速筋特異的な発現によって回復しなかった。以上のことから、速筋由来の mysterin は、神経、筋肉の形態を制御するが、MPCs や体節間血管には影響せず、速筋における mysterin の細胞自律的な働きが示唆された。

mysterin の AAA+ ATPase とユビキチンリガーゼが生理機能に必須であるか、変異体、欠損体を作製し調べたところ、いずれのドメインを欠損しても野生型 mysterin の機能を代替できないことが分かった。すなわち、mysterin は、ATP ase 活性、ユビキチンリガーゼ活性依存的に神経-筋形態を制御しており、両ドメインは mysterin の *in vivo* 機能に必須であることが明らかになった。

## 論文審査結果の要旨

本博士論文は、新規因子 *mysterin* の機能解析を行い、機能の一端を明らかにしたものである。特に、これまで *mysterin* 酵素活性の生理的意義に言及した論文はなかったが、二つの酵素活性が生理的に重要であることを見出した初めての研究である。*mysterin* は、もやもや病の感受性因子として単離され、C 末端近傍の一アミノ酸変異が発症に関与すると報告されている。もやもや病の発症と *mysterin* の生理機能に関係があるのか、*mysterin* の変異による機能の獲得や消失がもやもや病の発症とどのような関係にあるのか未だ明らかでない。本論文では、*mysterin* の機能を調べるため、ゼブラフィッシュにおいて *mysterin* をノックダウンし、幅広い組織における表現型の有無が検討された。

これまで、ゼブラフィッシュにおける *mysterin* ノックダウンにより、体節間血管の異常ガイダンスが観察されていたが、それ以上の表現型は報告されていない。本研究では、*mysterin* における運動神経、速筋形態、遅筋の亜集団 MPCs の増加が新たに観察された。加えて、ヒト *mysterin* を速筋特異的に発現させる実験に成功した。ゼブラフィッシュにおいて、受精卵に mRNA をインジェクションし、発現させる実験系が知られているが、*mysterin* mRNA が巨大であるため、従来の手法で発現させることは困難であった。しかし、今回トランスポゾンを用いて、ゼブラフィッシュゲノムに *mysterin* を組み込ませることで、組織特異的な入れ戻しに成功しており、*mysterin* の生理機能についてより詳細な解析を行うことができた。本研究の結果から、速筋に発現する *mysterin* が、神経-筋肉の形態制御に細胞自律的に関与することが明らかとなった。本研究は、*mysterin* の生理的意義を明らかにするのに留まらず、今後、血管内皮細胞や神経特異的な *mysterin* の発現にも結び付く、将来につながる有意義なものであると考えられる。

*mysterin* ノックダウン胚では、MPCs の異常増殖、体節間血管のガイダンス異常が見られたが、これらの表現型に速筋 *mysterin* は影響しないことが分かった。原腸胚後期に速筋前駆体、遅筋前駆体が生じ、その後、遅筋細胞と MPCs に分化する。*mysterin* のノックダウンでは、速筋の形態異常が引き起こされるが、遅筋には影響がなく、遅筋の亜集団である MPCs の数のみを増加させた。原腸胚後期以降、速筋前駆体と遅筋前駆体に分かれた後の速筋形成過程において *mysterin* が機能し、また、遅筋前駆体と MPCs の運命が決定される段階でも関与していると考えられる。この事実は、*mysterin* の機能を考える上で重要な情報であるが、さらに、不明な点の多い速筋の分化メカニズムにも手がかりを与える研究であると考えられた。

*mysterin* タンパク質は、巨大であり、かつ AAA+ ATP アーゼドメインとユビキチンリガーゼドメインを持つことで知られている中で唯一のタンパク質である。これまで、約 80 種の AAA+ タンパク質と、約 600 種のユビキチンリガーゼが知られているが、一分子内に両ドメインを持つものは *mysterin* のみであり、いかに両ドメインを協同させているかは大きな謎である。

本論文では、この疑問にも迫り AAA+ ATP アーゼの変異体、ユビキチンリガーゼの機能欠損体をそれぞれ速筋に特異的に発現させた。しかし、どちらの機能を欠いても、野生型 *mysterin* の機

能を代替しなかった。つまり、mysterin の両ドメインは生理機能に必須であることが分かった。この結果は、mysterin の酵素活性の重要性を初めて示したものであり、今後の mysterin の解析にも役だつと考えられた。

本論文の結果は、新規性が高く、また、実験系の構築という意味でも、今後の研究に有意義であると考えられた。本研究の主要部分は *Scientific Reports* 誌に掲載され、国際的にも高い評価を得ている。

以上より、本論文は、博士(生物工学)の論文として十分な水準に達していると考えられた。