

AAA+ ATP アーゼ・ユビキチンリガーゼ *mysterin* によるゼブラフ  
イッシュの神経-筋形態制御

京都産業大学大学院  
工学研究科生物工学専攻  
博士後期課程  
学生番号 255053  
氏名 小谷 友理

## 目次

1、要旨	2
2、略語表	4
3、序論	6
4、実験方法	23
5、実験結果	29
5-1、mysterin- $\alpha$ モルファントにおける神経-筋肉の異常形態	30
5-2、速筋特異的な mysterin による神経-筋肉の形態異常緩和	47
5-3、mysterin 活性ドメインの生理的意義	65
6、考察	70
7、文献目録	78
8、謝辞	80
9、参考文献	82

## 1、要旨

**mysterin (RNF213)** は、もやもや病感受性因子として初めて報告された **591 kDa** の巨大タンパク質である。もやもや病は、ヒトの脳底部に存在する環状の中動脈（ウィリス動脈輪）が原因不明に閉塞し、虚血が起こり、煙のような異常毛細血管が観察される疾患である。**mysterin** の 4810 番目のアルギニンがリジンに変異することで、家族性もやもや病の発症率があがるとして単離された。

**mysterin** は、機能的な AAA+ ATP アーゼモチーフとユビキチンリガーゼドメインを持つ。AAA+ ATP アーゼの多くが六量体を形成し、ATP の加水分解エネルギーを用いた膜融合、輸送、タンパク質分解に関与している。ユビキチンリガーゼはタンパク質にユビキチンを付加し、基質の分解や輸送を誘導する酵素である。これまで AAA+ ATP アーゼとユビキチンリガーゼドメインを同一分子が持つ報告はなく、**mysterin** が初めての因子であった。

先行研究では、**mysterin** のノックダウンゼブラフィッシュにおける体節間血管のガイダンス異常が報告されたが、本研究では、新たに運動神経の投射不全と筋障害が引き起こされることを明らかにした。特に、素早い筋収縮に必要な速筋線維の形態が乱れ、筋繊維の減少も見られた。一方で、遅い筋収縮を示す遅筋形態には異常はなかったが、遅筋の亜集団である **muscle pioneer cells (MPCs)** の異常増殖が引き起こされていた。**Gal4-UAS** システムを用いてヒト由来の **mysterin** を速筋特異的に発現させ、**mysterin** ノックダウンによる異常表現型への影響を観察したところ、速筋線維の形態異常と神経投射不全は回復したが、**MPCs** の増殖と血管のガイダンス異常は回復しなかった。野生型 **mysterin** の代わりに、AAA+ ATP アーゼモチーフの不活性変異体、ユビキチンリガーゼドメインの欠損体を速筋特異的に発現させたところ、速筋異常は回復しなかった。

以上から、ゼブラフィッシュにおいて、**mysterin** は AAA+ ATP アーゼ、ユビキチンリガーゼとして、細胞自律的に速筋形態を、細胞非自律的に運動神経を制御している因子であることが明らかとなった。

## 2、略語表

ATP : Adenosine Triphosphate  
Ctl : Control  
dpf: Days Post Fertilization  
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic Acid  
EM : Electron Microscope  
ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation  
GFP : Green Fluorescent Protein  
HEK293 cell : Human Embryonic Kidney 293 cell  
hpf: Hours Post Fertilization  
MO : Morpholino  
Mst : mysterin  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PBS : Phosphate-Buffered Saline  
PB : Phosphate Buffer  
PFA : Paraformaldehyde  
PO : Propylene Oxide  
PVDF : Polyvinylidene Difluoride  
RFP : Red Fluorescent Protein  
RNA : Ribonucleic Acid  
RNF213 : Ring Finger Protein 213 (mysterin)  
RT-PCR : Reverse Transcriptional PCR  
SDS-PAGE : Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
UPS : Ubiquitin Proteasome System

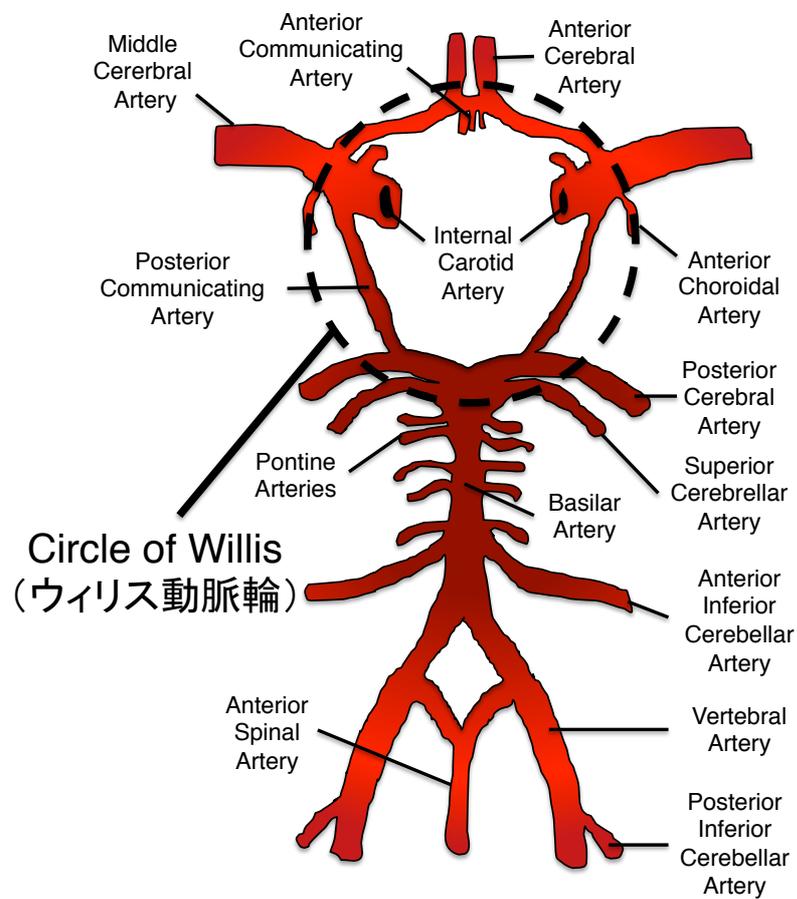
### 3、序章

mysterin (RNF213)は、もやもや病関連タンパク質として同定された新規因子である (Liu et al., 2011)。

もやもや病はウィリス動脈輪閉塞症とも呼ばれ、ヒトの脳底部に存在するウィリス動脈輪の血管平滑筋細胞が原因不明に増殖し、血管の閉塞が起こり、虚血が引き起こされる病気である (Fig. 1) (Hardy et al., 1991; Suzuki and Kodama, 1971)。動脈輪の閉塞によって滞った血流を回復させようと、毛細血管が異常に誘導され、この異常発達した毛細血管が煙のように見えることから、もやもや病と命名された (Fig. 2) (Burke et al., 2009; Suzuki and Takaku, 1969)。もやもや病は、欧米と比較すると東アジア民族に 10 倍程度多く認められる病気であり、日本で最多、次に韓国の順に多い。日本人は一人のうちの一人という発症率を示し、そのうち約 15 %が家族性であることが知られている (Burke et al., 2009)。そのため発症には何らかの遺伝的要因が関わると考えられてきたが、詳しいことは分かっていなかった。

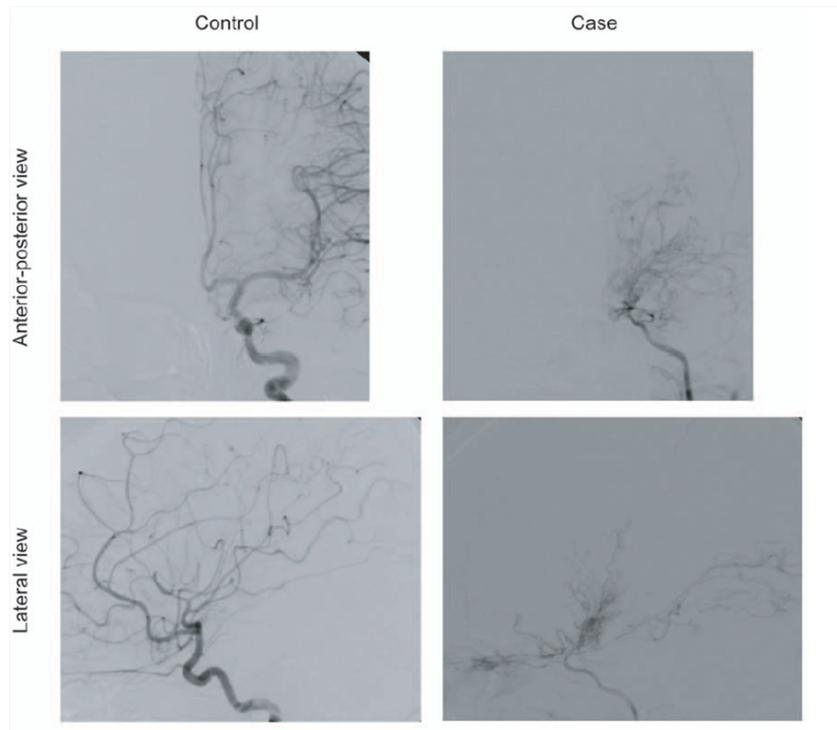
先行研究から、家族性もやもや病の遺伝解析が行われ、患者家系で共通する 17 番染色体 q25.3 領域に存在する一塩基多型が明らかとなった (Liu et al., 2011)。総人口の 98.6%が、この箇所の塩基に G を持ち、1.4%のわずかな人口が A を持つが、調べられた約 40 のもやもや病患者家系では、全員が A を持つことが判明した。この領域が A になることで、もやもや病の発症率が 100 倍以上高くなることが分かり、この領域を含む箇所には 5207 アミノ酸のポリペプチドをコードする新規遺伝子がコードされていることが報告された (Liu et al., 2011)。

この新規巨大遺伝子のクローニングが行われ、コードされたタンパク質が調べられた結果、2つの AAA+ ATPアーゼモチーフ (2397-2628、2738-2987) とユビキチンリガーゼドメイン (3997-4093) を持った巨大タンパク質であることも分かった。これまで、AAA+ ATPアーゼモチーフ、ユビキチンリガーゼモチーフを独立して持つタンパク質は数多く報告されてきたが、一分子内に両モチーフを所有するタンパク質は初めての発見であった。この新規タンパク質は、mysterin (moyamoya steno-occlusive disease-associated AAA+ ATPase and RING finger protein) と命名され、機能解析が行われている。しかし、もやもや病の発症率をあげる一塩基多型は、4810 番目のアルギニンがリジンに変わるミスセンス変異 (R4810K) であり、モチーフなどが保存されていない箇所であった。



**Figure 1** ウィリス動脈輪

脳底部に存在する血管網の模式図である。中心に存在する環状の中動脈をウィリス動脈輪 (Circle of Willis) と呼ぶ。出典: Schematic representation of the circle of Willis



**Figure 2** もやもや病における異常血管網

左内頸動脈撮影を示す。左図は8歳児の正常な左内頸動脈の例で、右図はモヤモヤ病を発症した9歳児の例である。患者の例では、正常な例に比べ異常に毛細血管が発達していることが分かる。

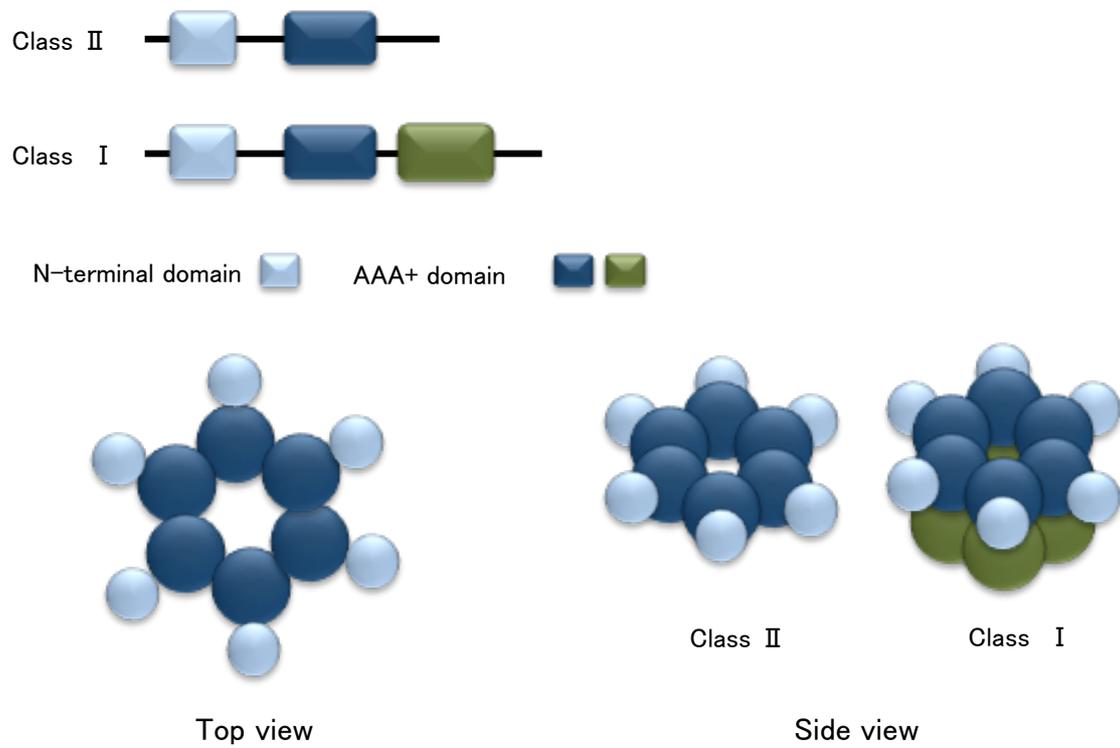
出典: Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development

AAA (ATPases associated with a variety of cellular activities) モチーフを持った AAA タンパク質は細胞内分子エンジンとも呼ばれ、細胞内の様々な場所において ATP の加水分解エネルギーを用いた物理運動を行う。例えば、DNA 二重らせんのかい離、膜の融合、輸送、タンパク質分解、脱凝集など、エネルギーを必要とする場面で働くことが知られている (Ogura and Wilkinson, 2001; White and Lauring, 2007)。また、これらの働きを行うために、多くの AAA タンパク質は機能体が六量体であることも報告されている。

AAA ファミリーに属するタンパク質は、200~250 アミノ酸から成る AAA ドメインを持ち、真核生物では 50-80 種類のメンバーが知られている (Weissman, 2001)。Walker A モチーフ、Walker B モチーフ、SRH (second region of homology) を含む AAA ドメインが保存されているタンパク質ファミリーが AAA ファミリーとして定義され、Walker A モチーフ、Walker B モチーフを有し、構造上も AAA モチーフと類似の構造を示すが、SRH が保存されていないものを AAA+ファミリーとして定義している (Hanson and Whiteheart, 2005)。

Walker A モチーフは NTP 結合モチーフであり、Walker B モチーフは  $Mg^{2+}$  と結合し、ATP 加水分解に必須のモチーフである。一般的に、AAA タンパク質は基質タンパク質と結合し、物理的な作用をするが、Walker B モチーフに変異が入ると基質の解離が行えず、結合したままになることが知られている (Hanson and Whiteheart, 2005)。mysterin の場合も、Walker B に変異を入れると基質トラップ型であることが明らかになっている。また、SRH は AAA タンパク質複合体内の協調的な ATP 加水分解に関わるモチーフである。

さらに、一つの AAA+ドメインを持つ Class II AAA タンパク質と、二つ持つ Class I AAA タンパク質に分類される (Fig. 3) (White and Lauring, 2007)。mysterin は、AAA+ドメインを連続で二つ持つため Class I に分類され、ダブルリング型の AAA+タンパク質と考えられる。先行研究から、mysterin の電子顕微鏡解析の結果、ドーナツ状の構造体が観察されており、一般的な AAA タンパク質の形態であることが明らかとなった (Morito et al., 2014)。つまり、単量体で 591 kDa の mysterin は、ATP を加水分解する際には約 3.6 MDa の六量体を形成すると予想され、原核生物のリボソームよりも巨大なタンパク質複合体が機能体である可能性が考えられた。



**Figure 3 Class I, II AAA+タンパク質**

上の図は ClassI と II の一次配列を示し、下の図は六量体形成時の立体構造図を示す。

出典: AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery

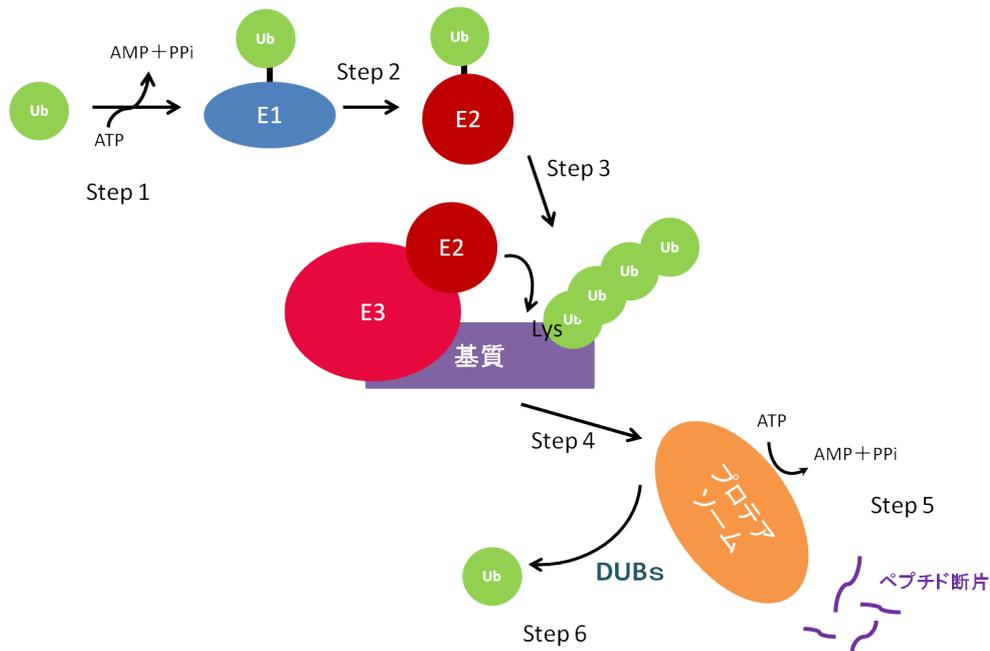
AAA+ドメインの他に、mysterin は RING (really interesting new gene) フィンガードドメインを持つタンパク質である。RING フィンガードドメインタンパク質は、ユビキチンリガーゼ (E3) と呼ばれ、基質にユビキチンを付加する働きが知られている (Weissman, 2001)。

ユビキチンは 76 アミノ酸から成る球状タンパク質であり、真核生物で高度に保存されている。ユビキチンは 7つのリジンをもち、まず基質に一つのユビキチンが付加されるとモノユビキチンとなる。このモノユビキチンの、どのリジンに次のユビキチンが付加されるかで、ポリユビキチン鎖の種類が決まる (Berndsen and Wolberger, 2014)。よく知られているポリユビキチン鎖は、リジン 48 番目 (K48) を介したものと 63 番目 (K63) を介したものである。これまでの研究から、K48 のポリユビキチン鎖を付加されたタンパク質は、プロテアソームを介して分解され、K63 のポリユビキチン鎖を付加されたタンパク質はエンドサイトーシスを介して分解されることが知られている (Galan and Haguenaer-Tsapis, 1997; Weissman, 2001)。

ユビキチンを基質に付加する経路には、ユビキチン活性化酵素 (E1) とユビキチン結合酵素 (E2) が関与する。遊離したユビキチンの C 末端を、E1 が ATP 加水分解依存的に活性化させ、E2 に受け渡す。その後、E2 とユビキチンリガーゼ (E3) が協同的に働き、ユビキチンを基質に付加する。K48 型のポリユビキチン鎖が付加された基質は、AAA タンパク質複合体であるプロテアソームで ATP 依存的な分解を受ける (ユビキチン-プロテアソーム経路 (UPS)) (Fig. 4) (Weissman, 2001; Welchman et al., 2005)。このように、ユビキチンはいくつかの酵素にリレーされた後、基質に受け渡されるが、E3 の種類によってユビキチンを基質に付加する方法が変わる。

前述したユビキチンを基質に付加する過程において、必須の酵素がユビキチンリガーゼである。ユビキチンリガーゼは、主に、RING フィンガードドメインを持ったユビキチンリガーゼと HECT (homology to E6AP C terminal) ドメインを持ったユビキチンリガーゼの二つに分けられる (Berndsen and Wolberger, 2014; Weissman, 2001)。

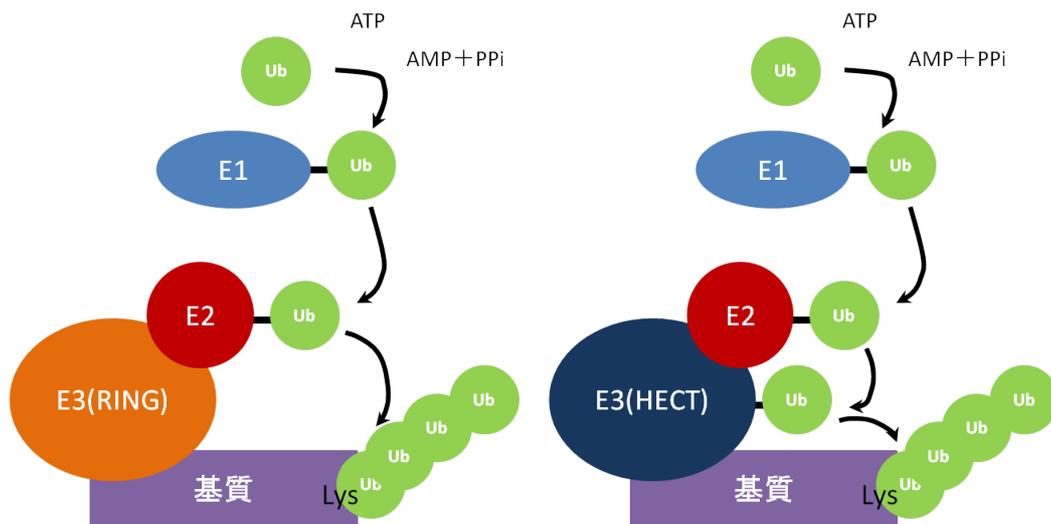
RING ドメインを持った E3 は、E2 と基質の足場のように働き、E2 が直接ユビキチンを基質に付加する (Fig. 5)。一方、HECT ドメインを持った E3 は、E2 からユビキチンを受け取り、E3 が基質にユビキチンを付加していく (Fig. 5)。HECT 型ユビキチンリガーゼは、約 30 種類、RING 型ユビキチンリガーゼは、約 600 種類が存在しており、基質への特異性を決めると考えられている (de Bie and Ciechanover, 2011; Deshaies and Joazeiro, 2009)。



**Figure 4 ユビキチン-プロテアソーム経路 (UPS)**

ユビキチン-プロテアソーム経路の模式図を示す。ユビキチンはユビキチン活性化酵素 (E1) によって活性化され (step 1)、ユビキチン結合酵素 (E2) に受け渡される (step 2)。活性化されたユビキチンは、E2 とユビキチンリガーゼ (E3) 協同的に、基質タンパク質に付加される (step 3)。分解シグナルとしてユビキチンが基質タンパク質に付加されポリユビキチン鎖が形成されると、基質タンパク質は 26S プロテアソームで分解される (step 4)。基質タンパク質は、ユビキチンを再利用するため、脱ユビキチン化酵素によってユビキチンが取り除かれ (step 6)、プロテアソームによって短いペプチド断片にまで分解される (step 5)。

出典: Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals



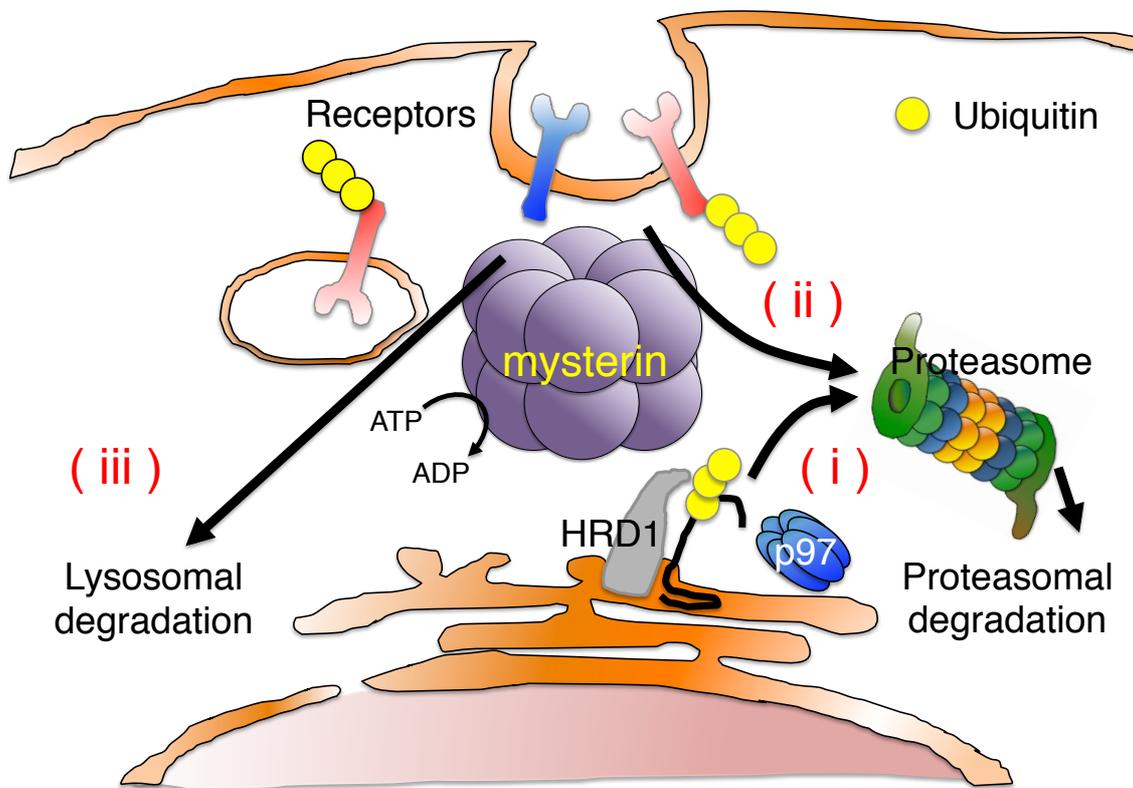
**Figure 5 RING 型、HECT 型ユビキチンリガーゼの反応機構**

RING 型ユビキチンリガーゼと HECT 型ユビキチンリガーゼの反応機構を模式図に示す。E3 ユビキチンリガーゼは、基質タンパク質にユビキチンを付加する反応を行う酵素である。RING 型ユビキチンリガーゼは、E2 が基質タンパク質へユビキチンを付加するときの足場のような働きをする。一方、HECT 型ユビキチンリガーゼは、ユビキチンと結合する活性システインを持つため、E2 からユビキチンを受け取った後、基質タンパク質へユビキチンを付加する。これらのユビキチンリガーゼによって、ポリユビキチンが付加された基質タンパク質は、26S プロテアソームで分解される。

このように、AAA+ ATPアーゼとRING型ユビキチンリガーゼは数多く知られているが、両ドメインを持つタンパク質は、*mysterin* 以外報告されていない。では、どのような機能が予想されるのだろうか。*mysterin* はユビキチンリガーゼであるため、基質分解に関わっている可能性が高い。小胞体では、ユビキチンリガーゼとATPアーゼ活性を必要とする分解経路が存在することが知られている。

小胞体では、不良タンパク質を分解する経路として小胞体関連分解 (ERAD) が存在する。分解すべきタンパク質をRING型ユビキチンリガーゼHRD1に認識させ、K48型のポリユビキチン鎖を付加させる。その後、不良タンパク質をAAA+タンパク質であるp97が小胞体からATPアーゼ依存的に細胞質に引き抜き、プロテアソームによって分解させる経路である (Fig. 6i、引き抜き分解) (Jarosch et al., 2002; Meusser et al., 2005; Vembar and Brodsky, 2008; Ye et al., 2001)。*mysterin* は、HRD1やp97のような引き抜き分解が可能になるため、基質のユビキチン化とトポロジー変化を制御している可能性がある。*mysterin* の局在は主に細胞質であり、小胞体において働くことも考えられるが、可能性の一つとして、シグナル伝達に関わる膜型受容体の分解に関与する場合を予想する。

本研究において、*mysterin* のノックダウンゼブラフィッシュの表現型を解析した結果、*mysterin* は組織形態のシグナル伝達経路に関与する可能性がある。ERADのような分解経路を想定すると、細胞膜に存在する膜型受容体が基質候補の一つになる。近年、上皮細胞成長因子受容体 (EGFR)、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) などの細胞膜に局在する膜型受容体も、ユビキチン化を介して分解されることが知られている (Bruns et al., 2009; Lipkowitz, 2003; Olsson et al., 2006; Zhang et al., 2013)。そのため、*mysterin* の基質をシグナル伝達因子かつ細胞膜に存在する膜型基質と想定し、*mysterin* が、細胞膜に存在する膜型受容体を認識、ユビキチン化し、ATP加水分解依存的に細胞膜から引き抜き、プロテアソームを介して分解している経路を仮定した (Fig. 6ii)。一方で、膜タンパク質の多くは、エンドサイトーシスからのリソソームにより分解される。リソソームによる分解経路では、VPS4といったAAAタンパク質の働きも知られることから、*mysterin* によるリソソーム分解経路の触媒も考えられる (Fig. 6iii) (Dobrowolski and De Robertis, 2012)。

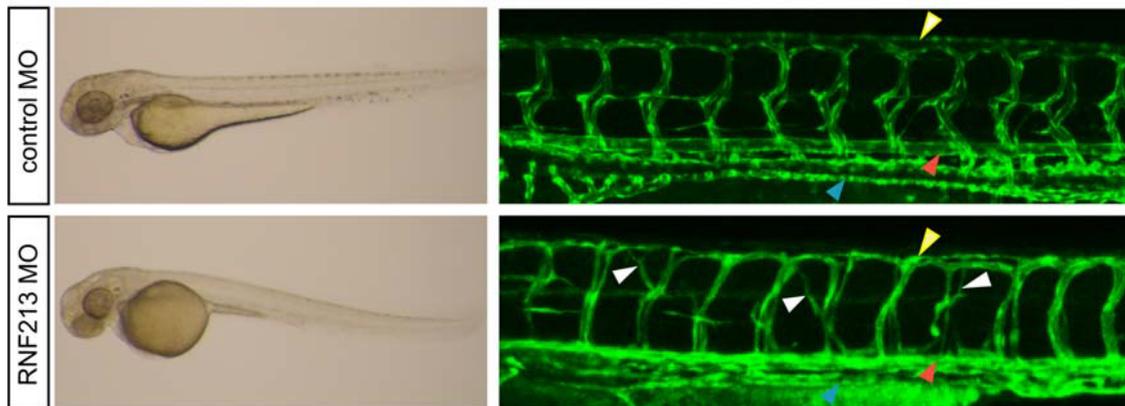


**Figure 6 mysterin の分解機構**

小胞体では、不良タンパク質を分解する際、ユビキチン化を行うユビキチンリガーゼ(HRD1)と小胞体からサイトゾルに逆行輸送させる AAA+ ATP アーゼ p97 が協同的に働き、プロテアソーム依存的な分解を誘導する ERAD の系が知られている(i)。mysterin は、基質のユビキチン化とエネルギー依存的に基質の構造を変化させる機能を持つため、新たな分解機構のモデルを提唱する。mysterin ノックダウンセブラフィシュの解析から、VEGF-VEGFR、sema-Plexin、shh などのシグナル伝達に関与する可能性がある。これらのシグナルは、受容体とリガンドの発現量や活性の均衡が重要であるため、この均衡を制御する機構に mysterin が関与しているのではないかと考えた。膜型受容体はリガンドと結合すると、シグナルのネガティブフィードバックのため、ユビキチン化され、分解されることが知られている。ERAD の機構を参考にすると、mysterin がユビキチン化を触媒し、ATP アーゼ依存的に膜から引き抜きプロテアソームで分解させる、引き抜き分解の系が考えられる(ii)。しかし、一般的に、膜型受容体は、ユビキチン化された後、エンドサイトーシスからリソソームにおいて分解される系がある。別の可能性として、mysterin が膜型受容体をユビキチン化し、エンドサイトーシスからリソソーム間の経路において、ATP アーゼ依存的な膜融合を行い、分解させる経路も仮定した (iii, Lysosomal degradation)。これらの仮説は、mysterin のもつ AAA+ ドメインと RING フィンガードメインから推測したものである。

ゼブラフィッシュにおいて *mysterin* をノックダウンすると、体節間血管のガイダンスに異常が生じることが報告されている (Liu et al., 2011)。血管新生は、背側大動脈や後主静脈を形成する脈管形成 (vasculogenesis) と、これら主体となる血管網から形成される血管新生 (angiogenesis) の二つに分けられる (Adams and Alitalo, 2007; Risau and Flamme, 1995)。*mysterin* のノックダウンでは、脈管形成には異常が見られなかったが、体節間血管の血管新生において異常分岐などの表現型が観察された (Fig. 7)。

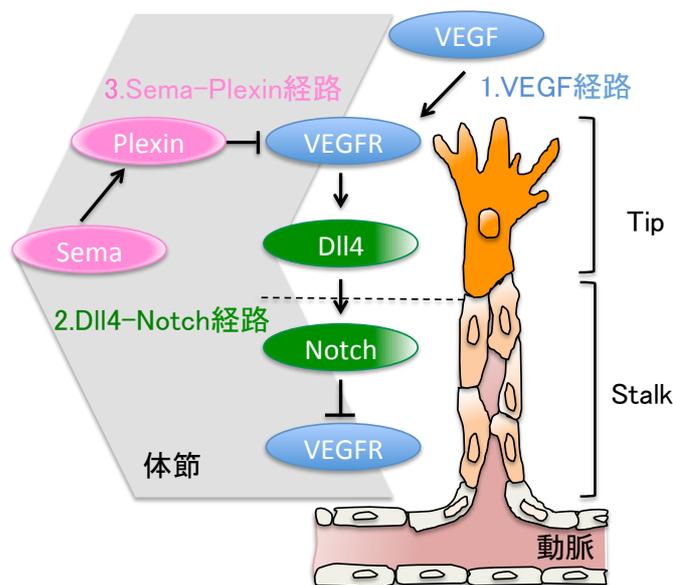
ゼブラフィッシュにおける血管新生は、体節から分泌される VEGF が、大動脈を刺激し、Tip 細胞と呼ばれる先頭の細胞が出芽することで始まる。Tip 細胞は、VEGFR2、VEGFR3 を発現し、VEGF に対し強い遊走性を示すが、後方の Stalk 細胞は、Tip 細胞における Delta like 4 (Dll4) の発現誘導により、Notch シグナルが活性化され、積極的な遊走を示さなくなる (Fig. 8-1、2) (Adams and Alitalo, 2007)。加えて、体節からは VEGF 反発因子 semaphorin (sema) が分泌され、Tip 細胞の Plexin D1 受容体と結合することで、体節への侵入が阻害される (Fig. 8-3) (Herbert and Stainier, 2011; Kim et al., 2011; Zygmunt et al., 2011)。このように、体節間血管のガイダンスは一方向に保たれるが、リガンドと受容体活性の均衡が崩れると、*mysterin* ノックダウンのような異常な血管網が生じる。先行研究から、Sema-Plexin 経路の異常では、Tip 細胞の体節への侵入を許した異常分岐が報告されており、*mysterin* ノックダウンによる異常分岐と類似していることが分かった (Weinstein, 2005)。このことから *mysterin* は、血管新生における受容体とリガンドの均衡を保つ因子であるかもしれず、可能性の一つとして、引き抜き分解を介したタンパク質安定性の制御が考えられる (Fig. 6)。



**Figure 7** **mysterin** ノックダウンゼブラフィッシュによる異常血管ガイダンス

血管内皮細胞特異的なプロモーター*fli1*によってEGFPが転写されるトランスジェニックライン Tg(*fli1*-EGFP) を用いた、体節間血管の観察結果である。受精後72時間目胚の観察結果であり、左は明視野観察、右はGFPによる蛍光観察の結果である。コントロールモルフォリノをインジェクションした胚と、*mysterin* (RNF213) モルフォリノをインジェクションし、ノックダウンした胚において、体節間血管のガイダンスを比較した。*mysterin* (RNF213) をノックダウンした胚において、体節間血管の異常分岐(白矢印)が見られた。コントロールと*mysterin* (RNF213) モルフォリノをインジェクションした胚において、背側大動脈(赤矢印)、後主静脈(青矢印)、dorsal longitudinal anastomotic vessels (黄矢印)の血管には異常が見られなかった。

出典: Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development



**Figure 8 血管走行モデル**

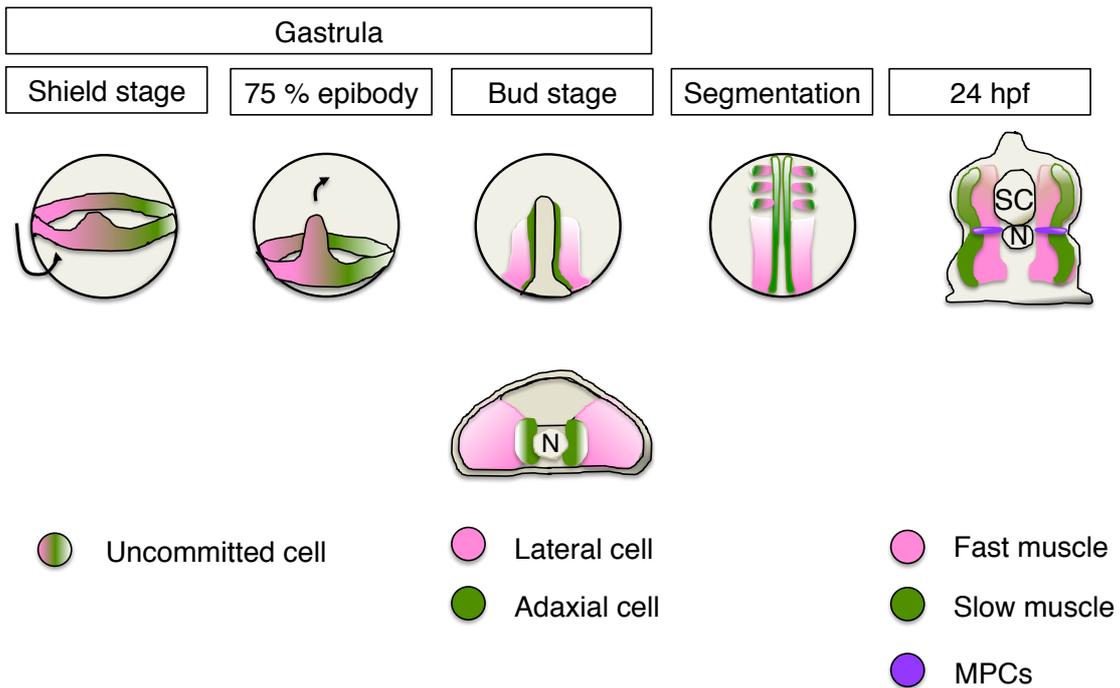
血管新生 (angiogenesis) は、Tip 細胞と Stalk 細胞における VEGF シグナルによって制御されている。ゼブラフィッシュでは、体節から分泌される VEGF が、背側大動脈からの Tip 細胞の出芽を誘導する。Tip 細胞において、VEGF-A は VEGF 受容体 2 (VEGFR2) に、VEGF-C は VEGF 受容体 3 (VEGFR3) に結合し、Delta like 4 (Dll4) の発現を誘導する (1. VEGF 経路)。Tip 細胞の Dll4 は、Stalk 細胞の Notch1、3、4 を活性化し、VEGFR3 の発現抑制、VEGFR2 の機能抑制として働く VEGF 受容体 1 (VEGFR1) の発現誘導を行う。Dll4-Notch シグナルの活性化により、Stalk 細胞は積極的な遊走性を無くし、Tip 細胞化が防がれている (2. Dll4-Notch 経路)。さらに、体節からは VEGF 経路の反発因子である semaphorin 3 (Sema 3) が分泌されており、受容体である Plexin D1 と結合すると、Tip 細胞の体節への遊走が阻害される (3. Sema-Plexin 経路)。このようなシグナル因子によって、Tip 細胞、Stalk 細胞の遊走方向が決定され、一方向に血管が形成される。

出典: Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis

本研究ではさらに、**mysterin** が新たに運動神経と筋肉の形態を制御していることが、本研究で明らかになった。**mysterin** をノックダウンしたゼブラフィッシュでは、体節間に投射される運動神経と速筋形態の異常が観察された。骨格筋は、ゆっくりとした筋収縮を行う遅筋と、素早い筋収縮を行う速筋に分けられ、ゼブラフィッシュでは、多層の速筋と単層の遅筋に分けられる (Lin, 2012; Naganawa and Hirata, 2011)。**mysterin** のノックダウンによって、遅筋の形態は正常であったが速筋は波打つような形態を示し、筋繊維、筋原繊維の数が減少していた。加えて、遅筋の亜集団であり、脊索に存在する **muscle pioneer cells (MPCs)** の数も増加していた。このことから、**mysterin** は速筋形態と遅筋の亜集団である **MPC** の増殖を制御していることが分かった。

発生初期において、速筋と遅筋の前駆細胞は同じであると考えられており、筋肉の前駆細胞から速筋、遅筋に運命決定されることが知られている。**mysterin** のノックダウンゼブラフィッシュにおいて、遅筋と速筋で別々の表現型が得られたことから、運命決定後に、**mysterin** ノックダウンの影響が生じたと考えられる。そのため、筋肉の発生過程について考える。

筋肉の発生過程において、遅筋の前駆細胞は **adaxial cell**、速筋の前駆細胞は **lateral cell** として区別されている。原腸期の初期 (Fig. 9, Shield stage) には区別されていないが、後期 (Fig. 9, Bud stage) には、脊索の近くに存在している細胞 (**adaxial cell**) と **adaxial cell** の外側に存在する細胞 (**lateral cell**) に区別される (Fig. 9) (Ochi and Westerfield, 2007)。発生が進むにつれ、脊索の近くに存在する **adaxial cell** は、脊索から分泌されるソニックヘッジホッグ (**shh**) による刺激を強く受け、脊索の近くに **muscle pioneer cells (MPCs)** としてとどまる。一方で、**shh** 刺激を強く受けない **adaxial cell** は、体の表面近くに移動し、皮膚直下に単層の遅筋線維を形成する (Fig. 6, 24 hpf) (Du et al., 1997; Ochi and Westerfield, 2007)。**Lateral cell** は、**adaxial cell** とは干渉せず、遅筋線維の内側に多層の速筋線維を形成し、身体の大部分をしめることが知られている。**mysterin** のノックダウンで見られる速筋線維の形態異常、筋繊維の減少は、**lateral cell** の細胞増殖や、融合など、後期の筋形成の過程に関与している可能性があり、**MPCs** の異常増加は、**shh** シグナルを強く受ける **adaxial cell** の増殖や分化に関与している可能性がある。つまり、**mysterin** は原腸胚後期以降において、速筋、遅筋細胞の分化、増殖などを制御している可能性が考えられる。



**Figure 9 筋肉の発生過程**

筋肉の発生過程は、原腸胚初期から始まる。運命決定されていない細胞(uncommitted cell)は、原腸胚後期である Bud stage には、速筋前駆体細胞(lateral cell、桃)と遅筋前駆体細胞(adaxial cell、緑)に決定する。脊索(notochord)の近くに存在する adaxial cell(緑)のうち、脊索からのソニックヘッジホッグシグナルを強く受けるものは、muscle pioneer cells(MPCs、紫)に分化し、その他は表層に移動し、単層の遅筋線維を形成する(slow muscle、緑)。Lateral cell は、速筋線維を遅筋の内側に形成し、身体の大部分を占める。Nは脊索(notochord)、SCは脊髄(spinal cord)を示す。受精後 24 時間目は、24 hpf と表記した。

出典: Signaling networks that regulate muscle development: lessons from zebrafish

**mysterin** は、ゼブラフィッシュ、マウスなどの脊椎動物から保存されているが、酵母や線虫には保存されていない。マウスでは、**mysterin** がユビキタスな組織で発現しているが、ゼブラフィッシュにおける組織特異性は十分に分かっていない (Liu et al., 2011)。

ノックアウトマウスを用いた **mysterin** の解析では、目立った表現型が報告されていない (Ito et al., 2015; Kobayashi et al., 2013; Sonobe et al., 2014a; Sonobe et al., 2014b)。しかし、ゼブラフィッシュを用いた本研究においては、**mysterin** ノックダウンにおける血管、神経、筋肉などへの異常な表現型が観察された。さらに、Gal4-UAS システムを用いた組織特異的な **mystrrin** の発現実験にも成功し、**mysterin** ノックダウンによる異常表現型が回復するかどうかの観察も行うことができた。その結果、**mysterin** による速筋の細胞自律的な機能と、運動神経の非細胞自律的な機能が観察され、これらの制御は AAA+ ATPアーゼとユビキチンリガーゼ活性が必須であることも明らかになった。本研究から、**mysterin** の活性ドメイン依存的な生理的意義を見出すことができ、**mysterin** の研究を行うにあたり、ゼブラフィッシュが有用なモデル生物であることを示した。

## 4、実験方法

## 動物

ゼブラフィッシュを用いた実験は、国立遺伝学研究所の平田普三教授（現、青山学院大学）との共同研究で行った。全ての動物実験は、国立遺伝学研究所の所内手続きを経た上で、実験ガイドンスの手順に従い適正に行った。

また、国立遺伝学研究所の川上浩一教授との共同研究を行い、Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子導入を行った。トランスジェニックライン Tg (gSA2AzGFF598A)には、速筋特異的な発現を示す LIM-binding 3b (Ibd3)遺伝子に、SV40 由来の poly A が融合した Gal4FF 配列を組み込み、速筋特異的に Gal4FF が誘導されるラインを用いた。Tg (UAS:RFP)と Tg (gSA2AzGFF598A)を交配させた卵を使用することで、Gal4FF の発現を RFP のシグナルによって観察し、速筋特異的な RFP のシグナルを観察した (Fig. 17)。Tg (UAS:RFP)は、UAS プロモーターのマーカースとして使用している。Tg (fli:EGFP)は、血管内皮細胞に GFP が発現するラインであり、血管形態の観察に使用した (Lawson and Weinstein, 2002)。

## モルフォリノ (MO) と reverse transcriptase (RT)-PCR

コントロールモルフォリノと *mysterin- $\alpha$* に対するモルフォリノの配列を示す。コントロールモルフォリノは、*mysterin- $\alpha$* モルフォリノの配列のうち五塩基ミスマッチさせたものを使用した。

*mysterin- $\alpha$* モルフォリノ

*RNF213- $\alpha$* -MO1-A: 5'-ACTCGTTGATGTCTGAAGTGATAAA-3'

*RNF213- $\alpha$* -MO1-D: 5'-AGCTAGGAGAAAGTCCTACCAATTT-3'

コントロールモルフォリノ

*RNF213- $\alpha$* -MO1-Ac: 5'-AGTGCTTCATGTCTGAACTGATAAA-3'

*RNF213- $\alpha$* -MO1-Dc: 5'-AGGTACGAGAACTCCTAGCAATTT-3'

野生型のゼブラフィッシュを用いた実験では、1.7 ng 低濃度のモルフォリノ、5.1 ng 高濃度モルフォリノを、トランスジェニックラインを用いる実験には、2.1 ng のモルフォリノを 1-4 細胞期の卵にインジェクションした。*mysterin* の過剰発現実験では、Tol2 トランスポザーゼの mRNA と 2.5 ng のヒト *mysterin-3 $\times$ FLAG* コンストラクトもしくは pT2MUAS のベクターを目的のモルフォリノとともに、1-4 細胞期の卵にイ

ンジェクションした。ノックダウン効率は、内在性 *mysterin-α* に対する以下のプライマーで確認した。

*RNF213-α\_2F*: 5'-GTCAGCAAAGGTGGTCATGATGGTCAAAGAGAC-3'

*RNF213-α\_2R*: 5'-CAGAAGCGTAGGCAGCTCTCCATTTTCTTACAGA-3'

*mysterin-3×FLAG* の発現を RT-PCR によって確認する実験では、ヒトの *mysterin* に対する以下のプライマーを使用した。

*mysterin F18*: 5'-TGAATGCCTTTCTCTCCAAGTCC-3'

*mysterin R5*: 5'-TTTCTCCAGCACCGTGTGATATCC-3'

受精後二日目のゼブラフィッシュ 5-20 匹を、1.5 ml チューブのホモジナイザー（バイオマッシャーII、NIP）に回収し、500 μl の RNA 抽出用液（RNA-Bee™ Reagent、ナカライテスク）を加えてホモジナイズした。その後、クロロホルムを加えてボルツェクスし、五分静置した後に、15,000 rpm、4℃、10 分間遠心し、上澄みを回収した。上澄みをイソプロパノール沈殿によって濃縮し、11 μl の滅菌水に可溶化後、各種プライマーを用いて RT-PCR を行った。

## 免疫組織化学法

用いるゼブラフィッシュは、受精後一日目でプロナーゼ（Roche）により卵膜を可溶化して、0.2 mM の PTU（Sigma Aldrich）を加えた水で飼育し、色素を透明化した。受精後一日目から二日目のゼブラフィッシュを 4% パラホルムアルデヒド

（paraformaldehyde、PFA）（ナカライテスク）を用いて固定し、4℃で一晩インキュベートした。その後、0.5% TritonX-100（Sigma）の入った PBS で、三回洗い、1 mg/mL コラゲナーゼ（Sigma Aldrich）を用いて、10 分間（受精後一日目）から 20 分間（受精後二日目）、室温で反応した。反応後は、0.5% TritonX-100 をリン酸緩衝食塩水に可溶化した PBS（phosphate-buffered saline、137 mM NaCl、2.68mM KCL、8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 7.4）で三回洗い、ブロッキング液（Blocking One、ナカライテスク）に交換し、室温 3 時間以上か 4℃で一晩インキュベートした。抗 FLAG 抗体を用いた *mysterin-3×FLAG* の免疫染色では、受精後二日目のゼブラフィッシュに対し、メタノール液（80% メタノール、20% DMSO）を用いて、4℃で一晩固定した。

横断切片については、4% PFA を用いて固定した胚を 15-30% スクローズ-PBS 液で平衡化し、凍結組織切片作製用包埋剤 (Optimal Cutting Temperature Compound, SFJ) に包埋し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で作成した。切片は、クライオスタット (Leice CM3050S) を用いて、10-20 nm の薄さで切った後、ブロッキング液とインキュベートした。組織染色に用いた抗体や、試薬、希釈濃度は以下の通りであり、希釈液にはブロッキ液である Blocking One を使用した。一次抗体は、室温 3 時間以上か  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させ、phalloidin や Hoechst などの試薬は室温一時間以上の反応で行った。抗遅筋ミオシン抗体 (F59、マウスモノクローナル、1/50、Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB))、抗シナプトタグミン抗体 (Znp-1、マウスモノクローナル、1/100、DSHB)、抗 prox1 抗体 (ラビットポリクローナル、1/500、AngioBio)、抗 engrailed 抗体 (4D9、マウスモノクローナル、1/500、DSHB)、抗 FLAG 抗体 (M2、マウスモノクローナル、1/500、Sigma Aldrich)、Alexa 568-conjugated 抗ラビット IgG 抗体 (1/2000、Life Technologies)、Alexa 488-conjugated 抗マウス IgG 抗体 (1/2000、Life Technologies)、Alexa Fluor 568 phalloidin (1/1000、Life Technologies)、Alexa Fluor 488 phalloidin (1/1000、Life Technologies)、核の染色剤である Hoechst 33342 (1/1000、Life Technologies) を用いた。これらは、共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 700) を用いて観察し、二次元の画像や、それを構築して三次元の画像を取得した。

## タンパク質定量

細胞内に存在するタンパク質の濃度を、プロテインアッセイ CBB 溶液(ナカライテスク)を用いて求めた。牛血清アルブミン(BSA)をコントロールに使用し、検量線を求めた。1mg/ml BSA を希釈し、2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の BSA 溶液を用意した。このとき、希釈には PBS 溶液を使用した。これらの溶液 40  $\mu\text{l}$  に対し、プロテインアッセイ CBB 溶液を 10 $\mu\text{l}$  加え、よく混合し、15 分放置した。Gene Quant 1300 (GE ヘルスケア) を用いて、595nm の吸光度を測定し、縦軸を吸光度値、横軸を濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) のグラフを描き、検量線を求めた。この値をもとに、各実験で得られたタンパク質濃度を計算した。ゼブラフィッシュ抽出物の 1  $\mu\text{l}$  を 99  $\mu\text{l}$  の PBS で 100 倍希釈し、プロテインアッセイ CBB 溶液を 25  $\mu\text{l}$  加えた。ボルテックスを用いて混合し、15 分静置後、595nm の吸光度を測定し、検量線からタンパク質濃度を計算した。

## ウエスタンブロッティング

10-20 匹の受精後二日目のゼブラフィッシュを、マイクロホモジナイザー(アズワン)に回収し、110  $\mu$ l の 1% NP40-2 mM EGTA-プロテアーゼ阻害カクテル (1/100、ナカライテスク) -PBS を加え、ホモジナイズした。その後、15,000 rpm、4°C、10 分間遠心し、上澄みを回収し、100  $\mu$ l の抽出液に対し、50  $\mu$ l 2×Lamml buffer と 15  $\mu$ l の 1M DTT を加えた。抽出液のうち 1  $\mu$ l をタンパク質定量に用いて、各試料間でのタンパク量を合わせた。ゲルで分離したタンパク質を 0.2  $\mu$ m の PVDF 膜 (MILLIPOR) に転写した。転写するときの溶液には、トランスファーバッファー(250mM Tris、190mM Glycine、20% MetOH)を使用し、4°Cで、100 V、1 時間もしくは 50V、2 時間で転写した。転写した PVDF 膜は、Blocking One を用いたブロッキングを行い、室温一時間以上インキュベートした。一次抗体には、抗 FLAG 抗体 (1/500、Sigma Aldrich) と抗 GAPDH 抗体 (6C5、マウスモノクローナル、1/1000、Hy Test Ltd., Turku, Finland)を用い、それぞれ Solution 1 (TOYOBO) を用いて希釈したものを使用し、4°Cで一晩インキュベートした。PVDF 膜は、PBST (0.1% Tween20-PBS)で、五分間、三回洗った。二次抗体には、アルカリフォスタファアーゼが結合している抗マウス抗体 (1/1000、Jackson Immunoresearch)を Solution 2 (TOYOBO) を用いて、希釈し、室温で一時間反応した。発色剤には、SIGMAFAST (sigma) を使用した。

## 電顕微鏡観察による観察 (EM)

受精後二日目の胚を、0.2%トリカインにより麻酔し、剃刀で頭と尻尾を切り落とし、固定した。固定剤には、2% PFA-2% グルタルアルデヒドを 0.1 M のリン酸溶液 (PB、pH 7.4) で溶解したものを使用し、4°Cで一晩インキュベートした。各試料を、0.1 M PB で洗い、2% オスミウム-0.1 M PB を用いて、4°Cで一晩再固定した。各試料を、50%、70%メタノールを用いてそれぞれに対し 4°C、30 分間反応させ、90%エタノールで室温、30 分間反応させた後、100%メタノールを室温、30 分間を四回繰り返し、段階的に脱水した。試料は、プロピレンオキシド (PO) を用いて、30 分間の浸潤を二回繰り返し、70% PO と 30% レジン (Quetol-812、Nisshin EM Co) の混合液と一時間インキュベートした。そのあと、エッペンチューブの蓋を開けた状態で、一晩 PO を揮発させ、100% レジンに置換し、60°C、48 時間、重合させた。重合させたレジンは、ダイヤモンドナイフとウルトラマイクロトーム (Ultracut UCT、Leica) を用いて、70 nm の超薄型切片

にした。切片は、銅グリッドにマウントさせ、2%の酢酸ウランを用いて 15 分間、室温で染色し、蒸留水で洗った後、室温 3 分間、リード染色液 (Sigma Aldrich) により染色した。グリッドは、加速電圧 80 kV の透過型電子顕微鏡 (JEM-1400 Plus、JEOL Ltd) を用いて観察した。デジタル画像 (2048×2048) は、CCD カメラ (VELETA、Olympus Soft Imaging Solution GmbH) から取得した。

## 統計解析

結果は、標準誤差で求めた。Student's t-test は、二つのグループ間の差を分析するときに使用される。 $P < 0.01$  は、統計的に有意な差を示す。

## 5、実験結果

## 5-1、mysterin- $\alpha$ モルファントにおける神経-筋肉の異常形態

### mysterin- $\alpha$ ノックダウンゼブラフィッシュにおける運動障害

ゼブラフィッシュにおいて mysterin をノックダウンするため、ヒト mysterin とゼブラフィッシュ mysterin のアミノ酸の相同性を比較した。

ヒトの mysterin 遺伝子は一種類であるが、ゼブラフィッシュでは遺伝子重複によって二種類存在し、mysterin- $\alpha$ 、mysterin- $\beta$ として区別されている。ヒト mysterin と mysterin- $\alpha$ との全体のアミノ酸配列相同性は61%であり、mysterin- $\beta$ とのアミノ酸配列相同性は60%であった。mysterin- $\alpha$ 、mysterin- $\beta$ のアミノ酸相同性は56%であった。さらに、ヒト mysterin は活性ドメインとして、二つの AAA+モチーフと RING フィンガーモチーフを含むため、ゼブラフィッシュの mysterin に保存されているかどうかを確認した。

1<sup>st</sup> AAA+モチーフに注目した結果、ヒト mysterin と mysterin- $\alpha$ とのアミノ酸配列相同性は69%であり、mysterin- $\beta$ とのアミノ酸配列相同性は64%であった。とりわけ、AAA+ドメインの重要な構成モチーフである Walker A、Walker B のアミノ酸相同性は高く、Walker A は100%、Walker B は83%であった (Fig. 10a)。

2<sup>nd</sup> AAA+ドメインのアミノ酸を比較したところ、ヒト mysterin と mysterin- $\alpha$ との相同性は73%であり、mysterin- $\beta$ とは65%であった。また、2<sup>nd</sup> AAA+ドメインの Walker A、Walker B のアミノ酸相同性は共に100%であり、ヒトとゼブラフィッシュの mysterin で保存されていることが確認できた (Fig. 10b)。加えて、ユビキチンリガーゼ活性に重要な RING フィンガーモチーフに注目したところ、活性に必須な8つのシステインは、mysterin- $\alpha$ と mysterin- $\beta$ でどちらも88%と高い相同性を示した (Fig. 10b)。

つまり、ヒトとゼブラフィッシュの mysterin は類似しており、ヒトと機能が類似していることが期待できる。

### Mysterin 1st AAA+ domain

hmysterin	RHKKLERLCLTLGIPQAT-----DPDKTYELTTDNMLKILAIEMRFRCGI
zmysterin $\alpha$	RWEKIERLSRVLGIQWPL-----DPDETYELTTDNMLKMLAVHMRFRFCGI
zmysterin $\beta$	REDKLQKMSFVVGAEKGCCKGKFDPDPTYELTTDNVMKMLAIHMRFRCEI
	<b>Walker A</b>
hmysterin	PVIIMGETGCGKTRLIKFLSDLRRGGTNADTIKLVKVHGGTTADMIYSRV
zmysterin $\alpha$	PVIIMGETGCGKTRLIKFLCEMHRSGVATDNMMLVKVHGGTSSEMIYTKV
zmysterin $\beta$	PVIIMGETGCGKTRLVRFCLDLQREGRDVENMMLVKVHGGTTSETIYKKV
	<b>Walker B</b>
hmysterin	REAENVAFANKDQHQLDITLFFDEANTTEAISCICEVLCDHMVDGQPLAE
zmysterin $\alpha$	REAEAMALRNKLDYGFDTVLFFDEANTTEAISSIKEILCDNSAEGQNLTE
zmysterin $\beta$	REAEELAQKNRQKYKLDITLFFDEANTTEAIFAIKEVLCDKTVKGYPLKK
hmysterin	DSGLHIIAACNPYRKHSSEMICRLESAGLGYRVSMEEETADRLGSIPLRQL
zmysterin $\alpha$	NTGLKIIAACNPYRKHTDVMIKRLESAGLGYRVRAEETDEKLGSIPLRQL
zmysterin $\beta$	NSGLKIIAACNPYRRHTTKMVDRLERAGLGYRVKAEETEDRLGKVPMRQL
hmysterin	VYRVHALPPSLIPLVWDFGQLSDVAEKLYIQQIVQRLVESISLDENGTRV
zmysterin $\alpha$	VYRVQALPPSMIPLIWDVFGQLNDHTEKMYIKQIVERVAETHSIDSGYITV
zmysterin $\beta$	VYRVHPLPPSMVPLVWDFGQLSDSTELSYIRQIVKKKMRDHRLPLSCQNV
hmysterin	ITEVLCASQGFMRK
zmysterin $\alpha$	ITDVLSASQKYMRT
zmysterin $\beta$	ITNVLAASQKYMRT

### Figure 10a ヒト mysterin とゼブラフィッシュ mysterin ( $\alpha$ , $\beta$ )における活性ドメインの相同性

1<sup>st</sup> AAA+ モチーフにおけるヒト、ゼブラフィッシュのアミノ酸相同性を示す。AAA+ ドメインは、ATP 結合モチーフである walker A と、Mg<sup>2+</sup>を配位させて ATP を加水分解する walker B のモチーフが存在する。1<sup>st</sup> AAA+モチーフにおけるアミノ酸相同性は、ヒト mysterin と mysterin- $\alpha$ で 69%、ヒト mysterin と mysterin- $\beta$ で 64%であった。Walker A のアミノ酸相同性はヒト mysterin と mysterin- $\alpha$ 、mysterin- $\beta$ において 100%であり、Walker B の相同性は 83%であった。

Mysterin 2nd AAA+ domain

hmysterin	DSRLLLDEITRAQDLFLDGVPLRKTIAKNLALKENVFMMVVCIELKIPLF
zmysterin $\alpha$	PMK-VMQEISVIQDLFLGGVPMGENIARNNALKENVFMMVICIELRIPLF
zmysterin $\beta$	SEESLEQEIASCQDFLLKNIQTRETIAKNMALKENVFLMVVCIELRIPLF
	Walker A
hmysterin	LVGKPGSSKSLAKTIVADAMQGPAAYSDFRSLKQVHLVSFQCSPHSTPQ
zmysterin $\alpha$	LVGKPGSSKSLSKTLVADGMQQAHSDFRKLKQIHLVSFQCSPHSTPE
zmysterin $\beta$	LVGKPGSSKSLAKTIVADAMQROASHCDLFKKLKEVHMVSFQCSPHSSPE
	Walker B
hmysterin	GIISTFRQCARFQOGKDLQYVSVVVLEDEVGLAEDSPKMPLKTLHPLLED
zmysterin $\alpha$	GIINTFKQCARFQEGKNLSEYVSVVVLEDEIGLAEDSQKMPLKTLHPLLEE
zmysterin $\beta$	GIIGTFRNCARFQKDKNLDEYVSVVVLEDEIGLAEDSPQMPLKTLHPLLED
hmysterin	GCIE-DDPAPHKKVGFVGISNWALDPAKMNRGIFVSRGSPNETELIESAK
zmysterin $\alpha$	GCID-DQPSPHKKVGFIGISNWALDPAKMNRGIFVSRGDPDENELIESAK
zmysterin $\beta$	GCIDSDNPESYMKVGFVGISNWALDPAKMNRGIFVSRWDPSEKDLVETAE
hmysterin	GICSSDILVQDRVQGYFASFAYETVCKRQDKEFFGLRDYYSLIKMVFA
zmysterin $\alpha$	GICSSDVMILEKVRECFKPFAYLRLCKKQKGGFFGLRDYYSLIKMMFA
zmysterin $\beta$	GICSSSQPVLLKIKHLLSKLAKCFLSICKTDSEQFFGLRDYYGLIKMLFD
hmysterin	AAKASNRKPSQDIAQAVLRNFSG-KDDIQALDIFLANLP
zmysterin $\alpha$	VAKACDQKPSAEQIVKAVLRNFSG-KDDVDAVTFFTSRLN
zmysterin $\beta$	TVKCSQEPSEKELAEAVLRNFSGQRDGFDPDYFKDIFQ

Mysterin RING finger domain

	
hmysterin	FGIQPCSI <del>C</del> LGDAKDPV <del>C</del> LP <del>C</del> DHVC <del>C</del> LR <del>C</del> LRWFASEQMI-CPYCLTALP
zmysterin $\alpha$	YGLQL <del>C</del> PV <del>C</del> MGDPRDPL <del>S</del> LP <del>C</del> DHIY <del>C</del> LT <del>C</del> IRQWLVPQMH-CPLCVQEVV
zmysterin $\beta$	YGVK- <del>C</del> RV <del>C</del> LMELSEPF <del>A</del> LP <del>C</del> EHVF <del>C</del> RS <del>C</del> LRRSMEREEAQH <del>C</del> PV <del>C</del> REPLS

**Figure 10b** ヒト mysterin とゼブラフィッシュ mysterin ( $\alpha$ ,  $\beta$ )における活性ドメインの相同性

ヒトとゼブラフィッシュの mysterin における 2<sup>nd</sup> AAA+ モチーフとRING finger ドメインのアミノ酸相同性を示す。2<sup>nd</sup> AAA+モチーフににおけるアミノ酸相同性は、ヒト mysterin と mysterin- $\alpha$ で 73%、ヒト mysterin と mysterin- $\beta$ で 65%であった。Walker A、Walker B のアミノ酸相同性は、ヒト mysterin と mysterin- $\alpha$ 、mysterin- $\beta$ において 100%であった。RINGフィンガードメインを構成する 8 つのシステイン(橙矢印)の相同性は、ヒト mysterin とゼブラフィッシュ mysterin で、88%であった。

先行研究において、mysterin- $\alpha$ と mysterin- $\beta$ のノックダウンゼブラフィッシュの比較実験が行われた (Liu et al., 2011)。ゼブラフィッシュにおけるノックダウン実験には、目的の mRNA に結合させてスプライシングを阻害させる核酸、アンチセンスモルフォリノオリゴ (以下、モルフォリノ) が使用される。本研究においても、先行研究で行われたモルフォリノを使用することにし、原理を以下に示す。

mysterin の mRNA に対し、acceptor、donor モルフォリノを、それぞれエキソンとイントロンの境目に設計した。その結果、mysterin の mRNA の正確なスプライシングが阻害し、モルフォリノが結合したエキソンがイントロンとともにスプライシングされる。そして、スプライシングを終えた mRNA はエキソンの一部を失うことで、アミノ酸のフレームシフトが起こり、ストップコドンが誘発される (Fig. 11a)。このモルフォリノを用いて、mysterin のノックダウンを行った (Fig. 11a) (Liu et al., 2011)。

先行研究では、血管内皮細胞特異的に EGFP が発現するトランスジェニックライン (fli:EGFP)を用いて mysterin のノックダウン実験が行われた。その結果、mysterin- $\alpha$ モルフォリノをインジェクションした胚 (mysterin- $\alpha$ モルファント) では体節間血管のガイダンス異常や目の周辺血管に異常分岐が観察されたが、mysterin- $\beta$ では観察されなかった (Fig. 7) (Liu et al., 2011)。加えて、ゼブラフィッシュにおける mysterin- $\beta$ の発現量は mysterin- $\alpha$ に比べ低いことから (Liu et al., 2011)、mysterin- $\alpha$ が重要であるとして、本研究を行った。

モルフォリノを用いて、ゼブラフィッシュにおける mysterin- $\alpha$ のノックダウン効率を観察した (Fig. 11a)。mysterin- $\alpha$ に対する高濃度 (5.1 ng)、低濃度 (1.7 ng)モルフォリノをそれぞれ野生型ゼブラフィッシュの卵にインジェクションした。コントロールモルフォリノには、mysterin- $\alpha$ に対するモルフォリノの配列のうち、五塩基異なるものを使用し(Liu et al., 2011)、高濃度(5.1 ng)でインジェクションした。これらをインジェクションした胚を、受精後二日目に RNA の抽出を行い、mysterin- $\alpha$ に対するプライマーを用いて、RT-PCR を行った。

コントロールモルフォリノをインジェクションした胚 (コントロールモルファント) では、正常なスプライシングが起こり、目的の分子量に相当する PCR バンドが検出された (Fig. 11a、989 bp)。一方で、低濃度 mysterin- $\alpha$ モルファントでは、989 bp のバンドと目的の値より低いバンドが検出され、高濃度 mysterin- $\alpha$ モルファントでは低いバンドが優位に観察された (Fig. 11a、矢印)。つまり、mysterin- $\alpha$ に対するモルフォリノによってエキソンスキップ型のスプライシング阻害が起こり、目的の値より低い分子量のバンドが観察されたことが分かった。

以上の結果から、高濃度の mysterin- $\alpha$ モルフォリノのノックダウン効率は約 90%、

低濃度の *mysterin- $\alpha$* モルフォリノは約 50%と見積り、実験を進めた。

通常、受精後二日目にはゼブラフィッシュの孵化が始まり、三日目には完了するが、*mysterin- $\alpha$* モルファントでは、受精後三日目であってもほとんど孵化が見られなかった。このことから、野生型(Uninjected)、高濃度コントロールモルファント(Control MO)、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファント (Mysterin MO) に対し、受精後三日目の孵化効率を測定した。その結果、高濃度コントロールモルファントと野生型では、孵化効率が 100%であるのに対し、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファントは 9.68%と孵化効率の著しい低下が見られた (Fig. 11b)。

ゼブラフィッシュは、受精後一日目から卵膜の中で回転運動を行い、これによって孵化が促進されるが、*mysterin- $\alpha$* モルファントでは動きが少なかった。加えて、受精後三日目においても卵膜に包まれた胚では、身体が U 字のように固まった形態を示した。先行研究から、運動障害を持ったゼブラフィッシュは、U 字で固まる観察結果が報告されている (Stickney et al., 2000)。つまり、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンは、運動障害を引き起こしている可能性が示唆されたため、観察を行った。

受精後一日目の胚に対し、プロナーゼを用いて卵膜を取り除き、受精後 60 時間に運動能を測定した (Fig. 11c, d)。実験には、高濃度コントロールモルファント (Ctl MO、High)、低濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファント (Mst MO、Low)、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファント (Mst MO、High) を使用した。それぞれのゼブラフィッシュに対し、尻尾に物理刺激を与え、その後の逃避行動をハイスピードカメラに記録した。コントロールモルファントは、刺激に対し素早い応答性を示したが、低濃度、高濃度の *mysterin- $\alpha$* モルファントでは刺激に対する応答性が遅く、泳ぐ速度も著しく減少していた (Fig. 11c)。観察結果から、それぞれに対し速度を求めた結果、コントロールモルファントの 53.5 mm/s (n = 6)に対し、低濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファントでは 22.2 mm/s (n = 7)、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファントでは 9.8 mm/s (n = 5)となり *mysterin- $\alpha$* ノックダウンによって速度の激減が観察された (Fig. 11d)。速度の低下は、*mysterin- $\alpha$* モルフォリノの濃度依存的であり、*mysterin- $\alpha$* は運動能と関わる因子であることが分かった。

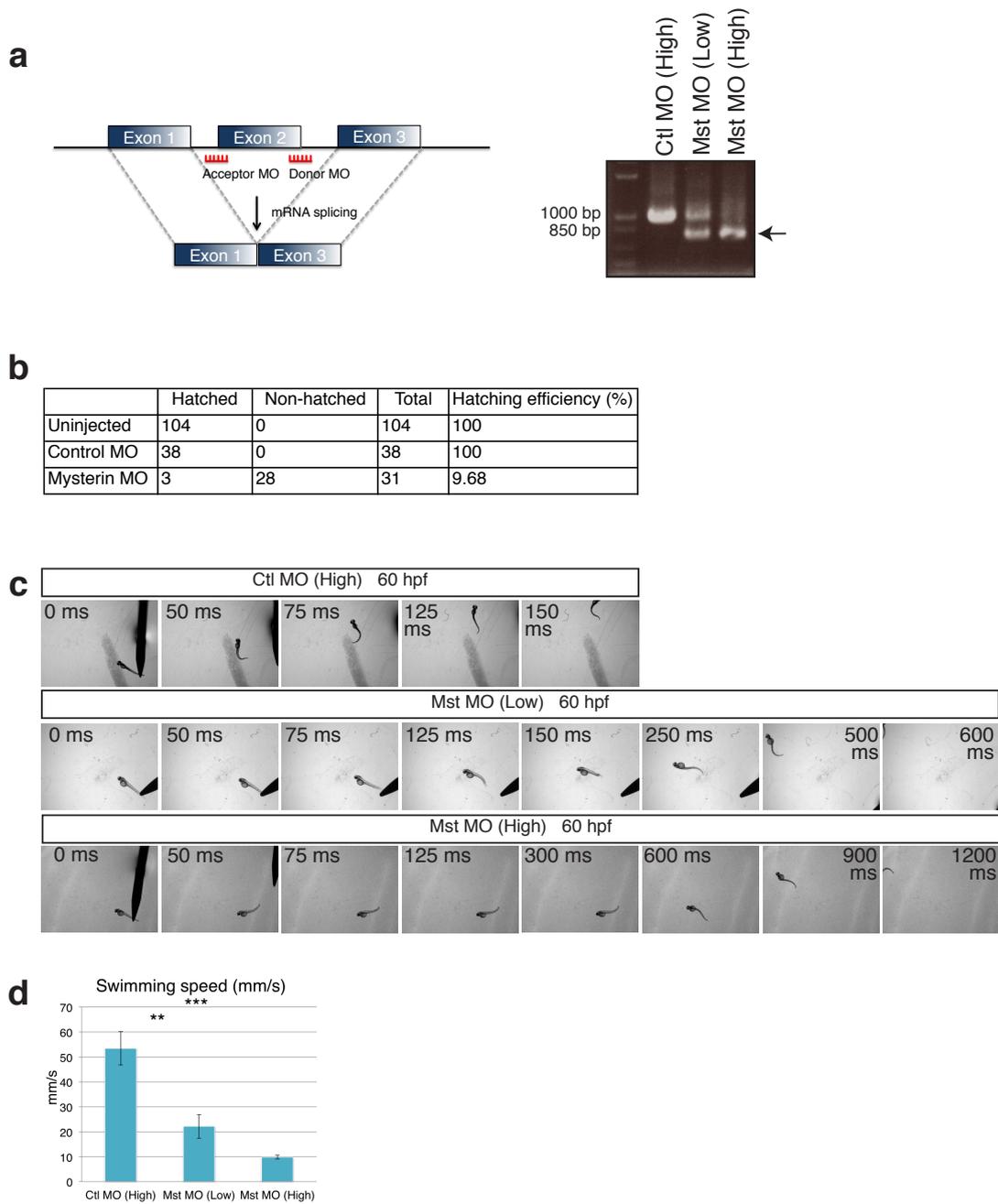
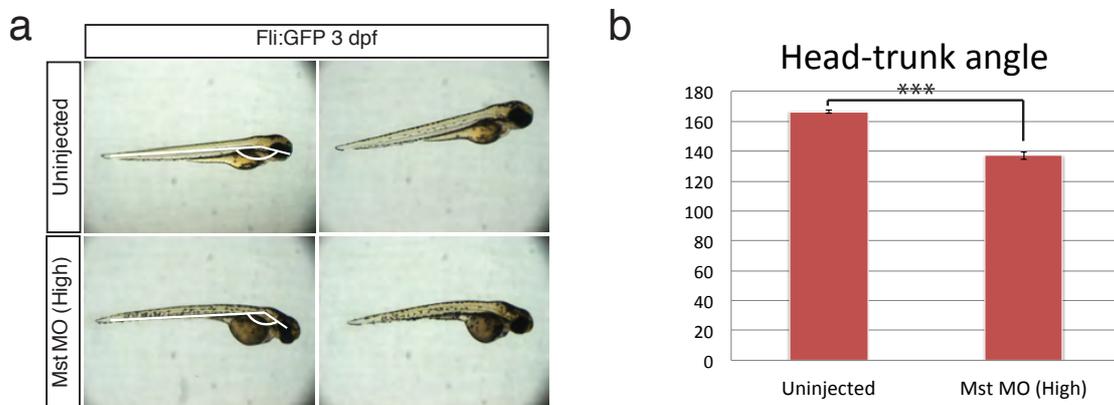


Figure 11 mysterin- $\alpha$ ノックダウンによる運動機能障害

高濃度のコントロールモルフォリノをインジェクションした胚 (5.1 ng、Ctl MO)、低濃度 *mysterin- $\alpha$* モルフォリノ (1.7 ng)をインジェクションした胚 (Mst MO、Low)、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルフォリノ (5.1 ng)をインジェクションした胚 (Mst MO、High)を用いて運動能を観察した。(a) モルフォリノ阻害の模式図である。Acceptor MO と donor MO が目的のエキソンに結合すると、mRNA スプライシング時に MO が結合したエキソンがスキップし、アミノ酸のフレームシフトが起こり、ストップコドンが誘発される系を使用する。このような MO 阻害効率を確認するため、コントロールモルファントと *mysterin- $\alpha$* モルファントの RNA を回収し、*mysterin- $\alpha$* に対するプライマーを用いて RT-PCR を行った。コントロールモルファントでは、mRNA のスプライシングが正確に行われ 989 bp のバンドが検出されたが、*mysterin- $\alpha$* モルファントでは、エキソンスキップが起こり、低い分子量のバンドが検出された(黒矢印)。(b) 野生型 (Uninjected)、高濃度コントロールモルファント(Control MO)、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファント (Mysterin MO)において、受精後3日目における孵化効率を定量化した。野生型、コントロールモルファントが、共に孵化効率が 100%であるのに対し、*mysterin- $\alpha$* モルファントの孵化効率は、9.68%であった。(c) 高濃度コントロールモルファント(Ctl MO、High)、低濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファント (Mst MO、Low)、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファント (Mst MO、High)において、受精後一日目にプロナーゼ処理によって卵膜を除去し、受精後 60 時間 (60 hpf)の運動能を観察した。それぞれの胚に対して、尻尾に物理刺激を与え、ハイスピードカメラを用いて逃避行動を記録した。*mysterin- $\alpha$* ノックダウンによって、逃避速度が減少していることが観察された。(d) (c)を定量化し、速度(mm/s)を求めた。高濃度コントロールモルファントは 53.5 mm/s (n = 6)、低濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファントは 22.2 mm/s (n = 7)、高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファントは 9.8 mm/s (n = 5)であった。 $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ 。エラーバーは、標準偏差で求めた。

## **mysterin- $\alpha$** ノックダウンゼブラフィッシュにおける **head-trunk** アングルの狭小化

野生型ゼブラフィッシュの頭部の角度によって発生段階を見積もる方法が知られている。この方法では、ゼブラフィッシュの耳胞の中心から目の中心にかけて線を引き、次に耳胞の中心を起点として側線に平行に引いた線との角度で求める (**head-trunk** アングル、Fig. 12a) (Kimmel et al., 1995)。発生が進むにつれ、頭部が体節と平行になるため、**head-trunk** アングルの角度も広がることが知られている。明視野観察から、野生型の頭部は体節に対しほぼ平行に位置するが、**mysterin- $\alpha$** モルファントでは頭部が下がっていることが観察された (Fig. 12a)。複数の個体について角度を計測した結果、野生型は  $166.4^{\circ} \pm 1.2^{\circ}$  (n=14)、**mysterin- $\alpha$** モルファントは  $137.1^{\circ} \pm 2.6^{\circ}$  (n=10)となり、先行研究で求められた角度と発生時間の相関と照らし合わせると、**mysterin- $\alpha$** モルファントは野生型に比べて約 20 時間発生が遅延している可能性が示唆された (Fig. 12b)。しかし、真に **mysterin- $\alpha$** ノックダウンによる発生遅延かどうかは、経時的な変化を追った観察が今後の課題となる。



**Figure 12** **mysterin- $\alpha$ ノックダウンによる head-trunk アングルの狭小化**

受精後3日目の fli:EGFP トランスジェニックゼブラフィッシュを用いて形態観察を行った。野生型ゼブラフィッシュ (Uninjected) と高濃度 mysterin- $\alpha$ モルファント (Mst MO, High) において、head-trunk アングルを比較した。(a) Head-trunk アングルは、耳の中心から目の中心にかけて線を引き、次に耳の中心を起点として側線に平行に引いた線との角度で受精後の発生時間を見積もる方法である。Head-trunk の角度が大きいほど、受精後の時間が経過していることを示す。mysterin- $\alpha$ モルファントでは、野生型と比べ、頭部の下がった形態が観察された。(b) Head-trunk アングルから求めた角度を定量した。野生型は、 $166.4^{\circ} \pm 1.2^{\circ}$  (n=14) であるが、mysterin- $\alpha$ モルファントでは  $137.1^{\circ} \pm 2.6^{\circ}$  (n=10) であった。先行研究で計測された発生段階ごとの Head-trunk アングルと対照した結果、mysterin- $\alpha$ ノックダウンによって発生が約 20 時間遅延していることが分かった。\*\*\* $P < 0.001$ 。エラーバーは、標準偏差で求めた。

## mysterin- $\alpha$ ノックダウンゼブラフィッシュにおける神経投射異常

mysterin- $\alpha$ のノックダウンによって運動障害が観察されたことから、運動能に密接に関係する神経、筋肉の形態に注目した。ゼブラフィッシュの発生過程において、受精後一日以内に、感覚ニューロン、介在ニューロン、運動ニューロン、筋肉、神経筋接合部が形成される。これらがネットワークを形成し、神経と筋肉の連携がとれることで、運動能を獲得することができる。

ゼブラフィッシュにおいて、運動能は発生依存的に変化し、受精後一日目の胚は卵膜の中で回転運動を示すが、二日目になると成魚に近い運動を示す (Naganawa and Hirata, 2011)。これは、筋肉の発生過程依存的な運動形態の推移であるが、このように、運動は神経、筋肉の機能に依存していることが知られている。

mysterin- $\alpha$ のノックダウンによる神経への関与を調べるため、運動ニューロンの形態観察を行った。

ゼブラフィッシュにおける一次運動ニューロンは、各筋節に三種類存在し、それぞれ rostral primary (RoP)、 middle primary (MiP)、 caudal primary (CaP) と呼ばれる (Fig. 13a)。これらニューロンの細胞体は脊髄 (spinal cord、SP) に存在し、受精後約 20 時間から軸索の伸長を始める。三種類の神経は、脊髄から脊索 (notochord、NC) の間にある、choice point と呼ばれる共通の経路を通った後、CaP は腹側へ、MiP は背側へ投射し、受精後 48 時間目にはそれぞれ体節に沿って折り返す (Fig. 13a、青矢印)。RoP は脊索の近くであって、軸索に対して平行に投射することが報告されている (Fig. 13a) (Lewis and Eisen, 2003; Myers et al., 1986; Panzer et al., 2005)。運動ニューロンのガイダンスは、シナプトタグミンの抗体である Znp-1 で検出でき、免疫染色によって形態を観察することができる (Fig. 13b)。

受精後二日目の高濃度コントロールモルフアントでは、MiP、CaP の投射が十分に行われ、体節に沿った軸索も見られるが (Fig. 13b、白矢印)、高濃度 mysterin- $\alpha$ モルフアントでは、軸索伸長が不十分であり、体節間運動ニューロンの投射が観察されなかった (Fig. 13b、赤矢印)。また、コントロールモルフアントに比べ脊索付近の運動ニューロンも少ないことから、RoP の伸長不全も示唆された。

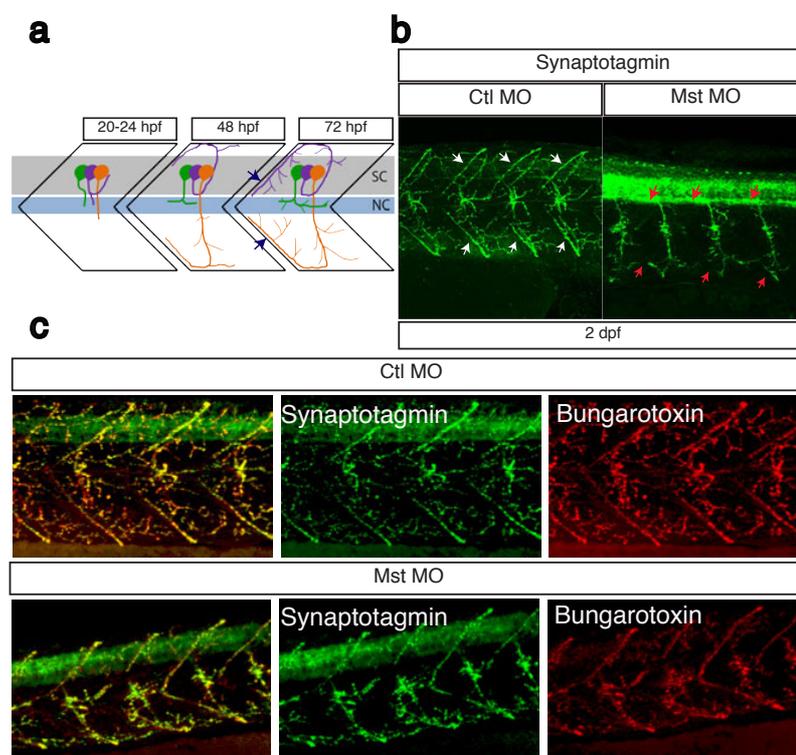
つまり、mysterin- $\alpha$ ノックダウンによる運動障がい、運動ニューロンの投射異常が原因であることが示唆された。

加えて、神経筋接合部の形態観察を行った。神経と筋肉の接合部分には神経筋接合部が形成され、これによって神経からのシグナルが筋肉に伝達される。神経筋接合部には、アセチルコリン受容体 (AChR) クラスターが形成されるが、Bungarotoxin は神経筋

接合部の AChR に結合し、阻害することが知られている (Panzer et al., 2005)。この特性を利用して、赤色の蛍光色素を結合させた Bungarotoxin と Znp-1 との共染色を行い神経筋接合部の観察を行った。

コントロールモルファントでは、Znp-1 のシグナルと Bungarotoxin のシグナルは強く共局在し、運動ニューロンに沿って神経筋接合部が形成されていることが観察できた (Fig. 13c)。mysterin- $\alpha$ モルファントにおいても、神経筋接合部の形成に、異常は確認されなかった (Fig. 13c)。

従って、mysterin- $\alpha$ ノックダウンは神経筋接合部に対し影響しないことが分かり、運動障害は運動ニューロンの形態異常によって引き起こされたことが明らかになった。



**Figure 13 mysterin- $\alpha$ ノックダウンによる神経投射異常**

(a) 一節あたりの脊髄 (spinal cord, SC) には、RoP (緑)、MiP (紫)、CaP (橙) が存在し、発生が進むにつれ軸索の投射を始める。受精後約 20 時間には、RoP、MiP、CaP は、choice point という脊索 (notochord, NT) 付近の部分を通り、別々の方向に伸長する。RoP は脊索に対して水平方向に、MiP は背側方向に、CaP は腹側方向へ伸長する。受精後 48 時間には、MiP、CaP の体節に沿った軸索伸長を行う (青矢印)。(b) 受精後二日目の高濃度コントロールモルファントと高濃度 *mysterin- $\alpha$* モルファントにおいて、シナプトタグミンの抗体である Znp-1 を用いた運動神経の免疫染色を行った。共焦点顕微鏡 LSM を用いて撮影した二次元画像を三次元に構築した図を示す。コントロールモルファントでは、MiP、CaP の体節に沿った軸索が観察されるが (白矢印)、*mysterin- $\alpha$* モルファントでは観察されなかった (赤矢印)。(c) 神経筋接合部の形態を、蛍光物質のついた Bungarotoxin と Znp-1 を用いて観察した。Bungarotoxin は、アセチルコリン受容体 (AChR) の阻害剤で、シナプスを形成したクラスターに結合することを利用し、神経筋接合部を観察した。コントロールモルファントと *mysterin- $\alpha$* モルファントで、特に違いは見られなかった。

## mysterin- $\alpha$ ノックダウンゼブラフィッシュにおける速筋の形態異常

次に、ゼブラフィッシュの運動に寄与する組織として、骨格筋の形態を観察した。一般的に、骨格筋は二種類知られており、長期運動に寄与する遅筋と短期運動に寄与する速筋に分けられる。ゼブラフィッシュでは、皮膚直下に遅筋が単層で存在し、それより深い領域を速筋が占めている (Fig. 14a) (Ochi and Westerfield, 2007)。遅筋特異的なミオシンに対する抗体 F59 を用いて、遅筋線維の形態を観察し、重合したアクチン (F-actin) に結合する phalloidin ペプチドを用いて、遅筋、速筋のアクチン線維を染色した。遅筋線維は体節に対し平行に走行することが知られており、F59 の抗体染色からも確認された (Fig. 14b、slow muscle)。一方、速筋線維は、体節に対し斜めに走行することが知られており、phalloidin を用いた観察により確認した (Fig. 14b、F-actin)。観察には共焦点顕微鏡を用い、単層の遅筋と多層の速筋は、観察深度と走行する線維の向きによって区別した。

mysterin- $\alpha$ モルファントでは、遅筋線維の形態に際立った変化は見られなかったが、速筋線維においては、著しい乱れが観察された (Fig. 14b)。加えて、モルファントの横断切片を phalloidin による F-actin 染色を行い、速筋、遅筋の配向を観察した。コントロールモルファントでは、密度の高い速筋線維が観察されたが、mysterin- $\alpha$ モルファントでは、速筋線維の占める範囲の減少が見られた (Fig. 14b)。一方で、皮膚直下の扁平状単層である遅筋に対しては、mysterin- $\alpha$ モルファントにおける影響は見られなかった (Fig. 14c、矢印)。

さらに詳しく観察するため、横断切片 (Fig. 14d-i、Cross section) と縦断切片 (Fig. 14j-o、Vertical section) における電子顕微鏡観察を行った。コントロールモルファントの横断切片では、筋原線維が密集し、太い筋線維が観察されるが (Fig. 14d、f、j、l)、mysterin- $\alpha$ モルファントでは、筋原線維の数が減少しているのが観察された (Fig. 14e、g、k、m)。しかし、アクチン-ミオシンの配向、Z-disk や M-line といったサルコメアの形態には、コントロールと mysterin- $\alpha$ モルファントの間で大きな変化は見られなかった (Fig. 14、l、n、o；Z-disk、黒矢印；M-line、赤矢印)。つまり、mysterin は筋原線維のアクチン-ミオシン束の形成には寄与しないことが示唆された。

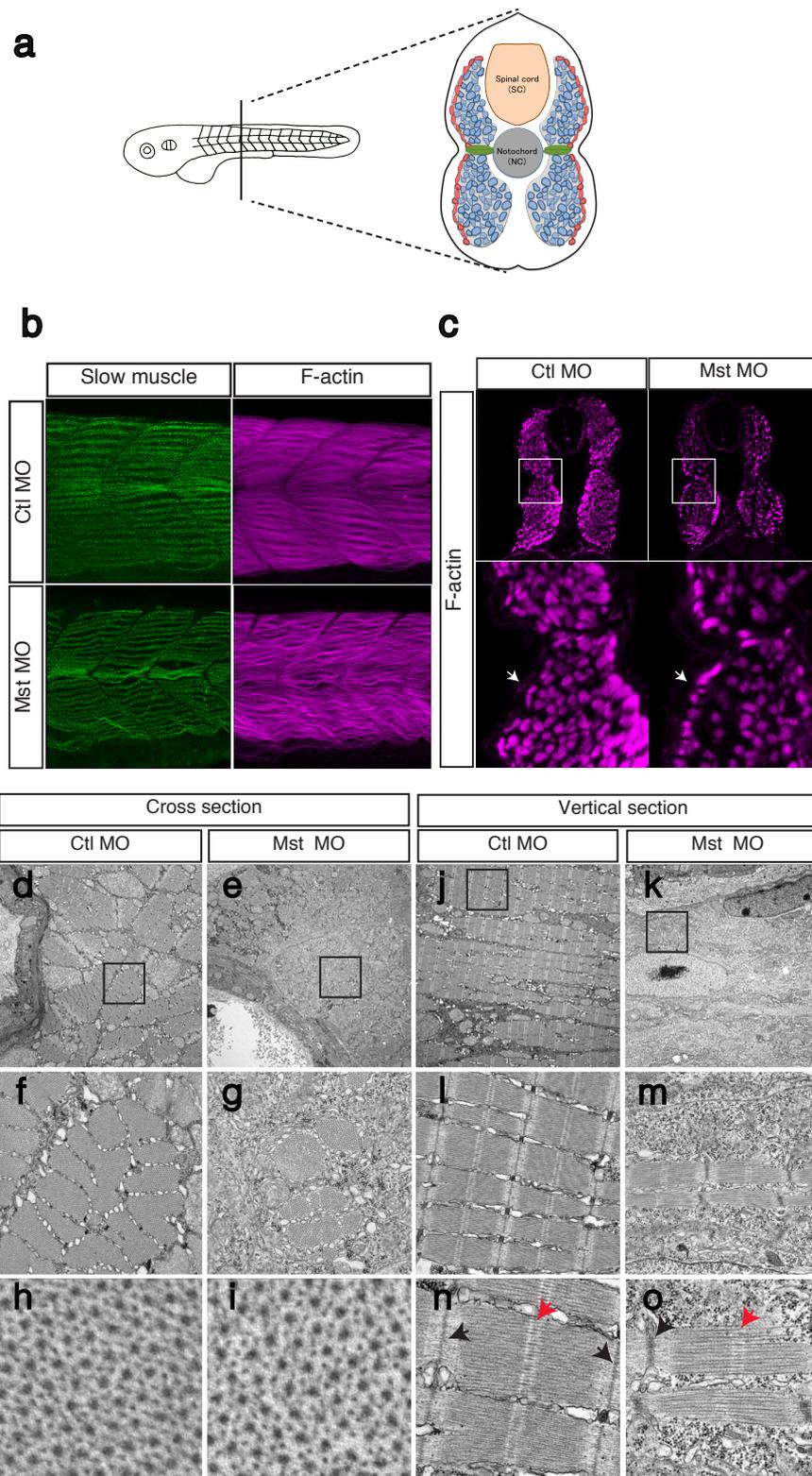


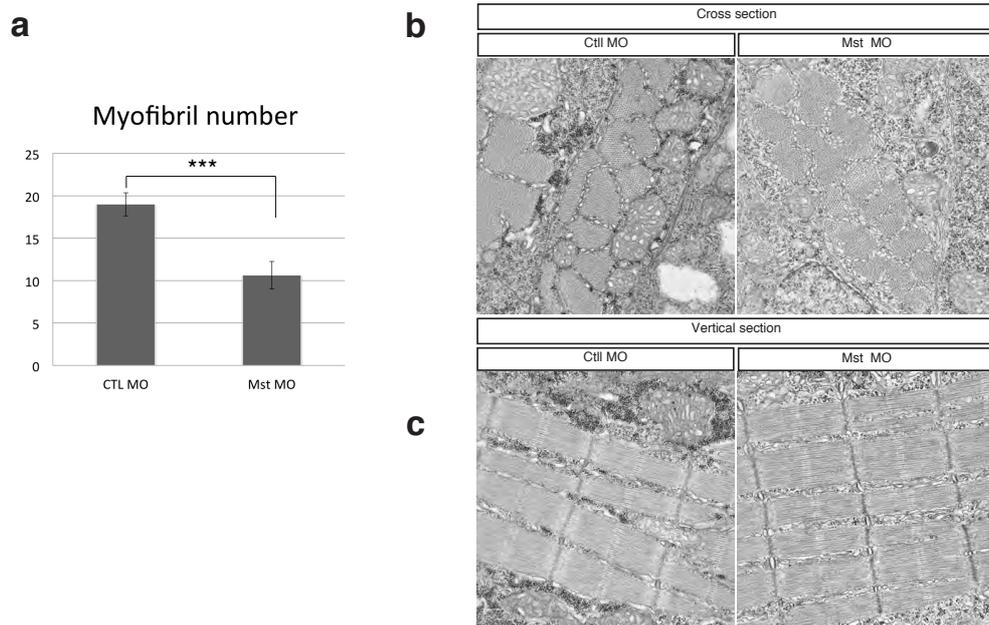
Figure 14 **mysterin- $\alpha$** ノックダウンによる速筋形態異常

(a)受精後二日目のゼブラフィッシュを横断切片したモデル図である。単層の遅筋(赤)、遅筋の亜集団である muscle pioneer cells(緑)、速筋(青)、脊髄(spinal cord、橙)、脊索(notochord、灰)を示す。(b)低濃度コントロールモルファント、低濃度 mysterin- $\alpha$ モルファントにおいて、速筋線維と遅筋線維の蛍光観察を行った。遅筋線維は、遅筋ミオシンの抗体である F59 を用いて観察し(左)、速筋線維は phalloidin を用いたアクチン繊維(F-actin)の染色により観察した。速筋線維の観察は、共焦点顕微鏡を用いた観察により、速筋線維に焦点深度を合わせて観察した(右)。F59 抗体を用いた観察からは、体節に対して平行に走行する遅筋線維が、phalloidin(F-actin)を用いた染色からは、斜めに走行する速筋線維が観察された。(c)コントロールモルファント、mysterin- $\alpha$ モルファントを横断切片にし、phalloidinを用いて組織染色を行った。単層の遅筋(白矢印)とより深い部分を占める速筋が観察された。(d-o)コントロールモルファント、mysterin- $\alpha$ モルファントにおいて、横断切片(cross section)と横断切片(vertical section)を用いて、電子顕微鏡を行った。コントロールモルファント横断切片図(d、f、h)と mysterin- $\alpha$ モルファント横断切片図(e、g、i)、コントロールモルファント縦断切片図(j、l、h)と mysterin- $\alpha$ モルファント縦断切片図(k、m、o)を示す。d、e、j、k の拡大図が f、g、l、m であり、さらにその拡大図が h、i、n、o である。アクチンミオシンの配向(h、i)とサルコメアの構造(n、o)の Z-disk(黒矢印)と M-line(赤矢印)を示す。mysterin- $\alpha$ ノックダウンにより、速筋形態は著しく乱れたが、遅筋形態に対する影響はあまり見られなかった。

mysterin- $\alpha$ モルファントで、どの程度筋原繊維が減少しているかを横断切片の観察結果 (Fig. 14) から、 $5\ \mu\text{m}^2$  四方に存在する筋原繊維の数を計測、定量化した (Fig. 15a)。その結果、コントロールモルファントの筋原繊維数は  $19.0 \pm 1.4$  (n=12) 本であったが、mysterin- $\alpha$ モルファントの筋原繊維数は  $10.6 \pm 1.6$  (n=11) 本であり、筋原繊維の減少が見られた (Fig. 15a)。

一方で、遅筋繊維に対する電子顕微鏡解析を行った結果、mysterin- $\alpha$ モルファントにおける影響は見られなかった (Fig. 15b, c)。

以上より、mysterin- $\alpha$ は速筋の筋原繊維の数、形態を制御しているが、遅筋に対しては関与しないことが分かった。このことから、mysterin- $\alpha$ は、速筋、遅筋の前駆細胞が決定される原腸胚後期より後に働く可能性があり (Fig. 9)、速筋細胞の増殖、融合などの形成過程などに寄与している可能性が示唆された。



**Figure 15** **mysterin- $\alpha$ ノックダウンによる遅筋形態への影響**

(a) Fig. 14 の横断切片の電子顕微鏡観察結果から、 $5 \mu\text{m}^2$  四方に存在する筋原繊維の数を計測、定量化した。低濃度コントロールモルファントの筋原繊維数は  $19.0 \pm 1.4$  ( $n=12$ )、低濃度 mysterin- $\alpha$ モルファントの筋原繊維数は  $10.6 \pm 1.6$  ( $n=11$ ) であり、mysterin- $\alpha$ モルファントでは筋原繊維が減少していることが分かった。\*\*\* $P < 0.001$ 。エラーバーは、標準偏差で求めた。電子顕微鏡による遅筋観察を行い、コントロールモルファント、mysterin- $\alpha$ モルファントの横断切片図(b)と縦断図(c)を示す。

## 5-2、速筋特異的に誘導された *mysterin* による神経-筋肉の形態異常の回復

### Gal4-UAS システムを用いたヒト *mysterin*-3×FLAG の速筋特異的な発現

これまでの結果から、*mysterin* が新たに運動神経の投射と速筋形態を制御していることを明らかにしたが、いかに制御しているのかは謎である。組織特異的な *mysterin* の機能を調べるため、*mysterin-α* をノックダウンした条件下でヒト *mysterin* を速筋特異的に発現させる実験を行った。

ヒト *mysterin* の C 末端に FLAG タグが三つ繋がった *mysterin*-3×FLAG (Liu et al., 2011; Morito et al., 2014) を、トランスポゾン配列と UAS プロモーターを持つ pT2MUAS ベクターにサブクローニングし、使用した (Fig. 16)。

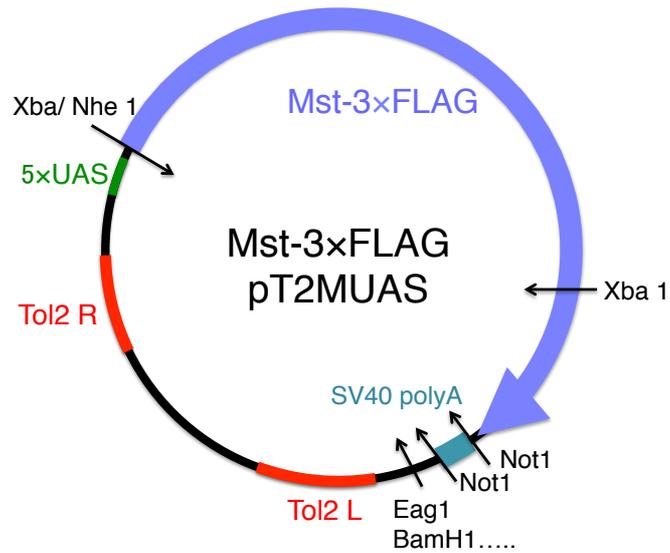
*mysterin*-3×FLAG (pT2MUAS) とトランスポザーゼの mRNA を卵の細胞質にインジェクションすることで、トランスポゾン間の配列がゼブラフィッシュのゲノムに組み込まれ、Gal4FF の発現依存的に、*mysterin*-3×FLAG が誘導される系を使用した (Asakawa et al., 2008)。

そこで、速筋にのみ Gal4FF が発現しているトランスジェニックライン (gSA2AzGFF598A) を用いて、*mysterin-α* ノックダウンに対する *mysterin* の影響を観察した。*mysterin-α* に対するモルフォリノは、mRNA のスプライシング阻害を起こすものであり、クローニングしたヒト *mysterin* の mRNA は、配列的かつ原理的に作用しない。gSA2AzGFF598A ラインは、速筋特異的に発現する LIM domain binding 3b のトラップ体として作成された。

コントロール実験として、gSA2AzGFF598A において Gal4FF が速筋に発現しているかどうかの観察を行った (Fig. 17)。Phalloidin を用いて速筋、遅筋のアクチン繊維を染色し、共焦点顕微鏡を用いて、観察深度の違いにより、皮膚直下の単層遅筋繊維と、多層の速筋繊維を観察した (Fig. 17、F-actin)。

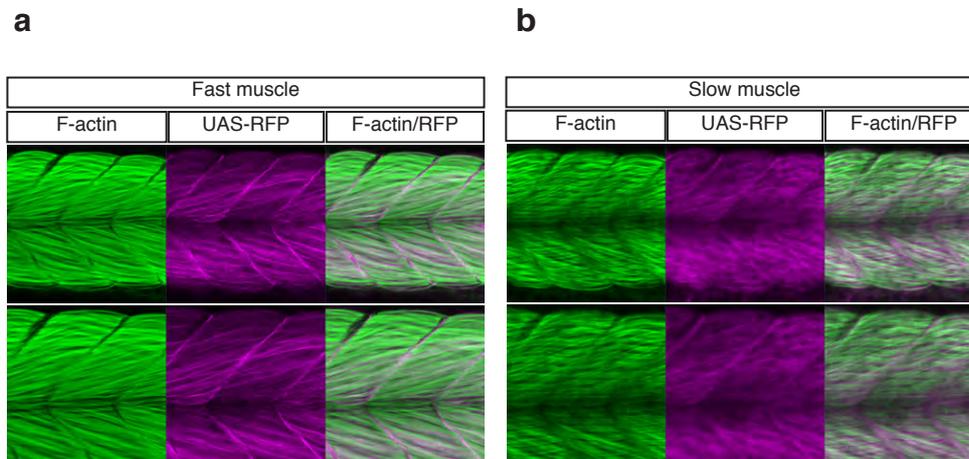
加えて、gSA2AzGFF598A において、UAS-RFP 遺伝子を持つトランスジェニックラインとあらかじめ掛け合わせたラインを使用し、RFP の蛍光が観察される組織の観察を行った。その結果、体節に対し斜めに走行する速筋繊維と、RFP シグナルの共局在が観察されたが、遅筋繊維との有意な共局在は観察されなかった (Fig. 17)

以上から、gSA2AzGFF598A ラインは、Gal4FF が速筋繊維で有意に発現していると定義した。また、今後の実験においても UAS-RFP のシグナルを、速筋特異的なポジティブマーカーとして解析を行っていく。



**Figure 16 ヒト mysterin-3xFLAG (pT2MUAS) コンストラクト**

C 末端に三つ FLAG タグの繋がった mysterin-3xFLAG を pT2MUAS ベクターにサブクローニングした。  
 pT2MUAS ベクターは 4.4 kbp であり、mysterin-3xFLAG が 15.5 kbp であるため、コンストラクトの全長は 19.9 kbp となる mysterin-3xFLAG のプロモーターには Gal4FF によって誘導される UAS が五つ繋がったものを使用している (5xUAS)。トランスポゾン配列が二箇所設置されており (Tol2 R、Tol2 L)、トランスポサナーゼの活性依存的に Tol2 R と Tol2 L 間の配列がゲノムに挿入される。



**Figure 17 gSA2AzGFF598A における Gal4FF の発現パターン**

Gal4FF の発現組織を確認するため、UAS-RFP を用いた蛍光観察を行った。Tg (gSA2AzGFF598A) と Tg (UAS: RFP) を交配させ、受精後二日目の胚に対して、RFP 観察を行った。速筋、遅筋マーカーとして、phalloidin による F-actin 染色も行った(緑)。共焦点顕微鏡を用いることで、体節に対し斜めに走行する速筋線維(a)と、平行に走行する遅筋線維(b)を区別した。Gal4FF マーカーである RFP は、速筋線維に対し強く発現したが(a)、遅筋線維に対する有意な発現は観察されなかった(b)。以上から、gSA2AzGFF598A は速筋特異的に強く Gal4FF を発現していることが分かった。

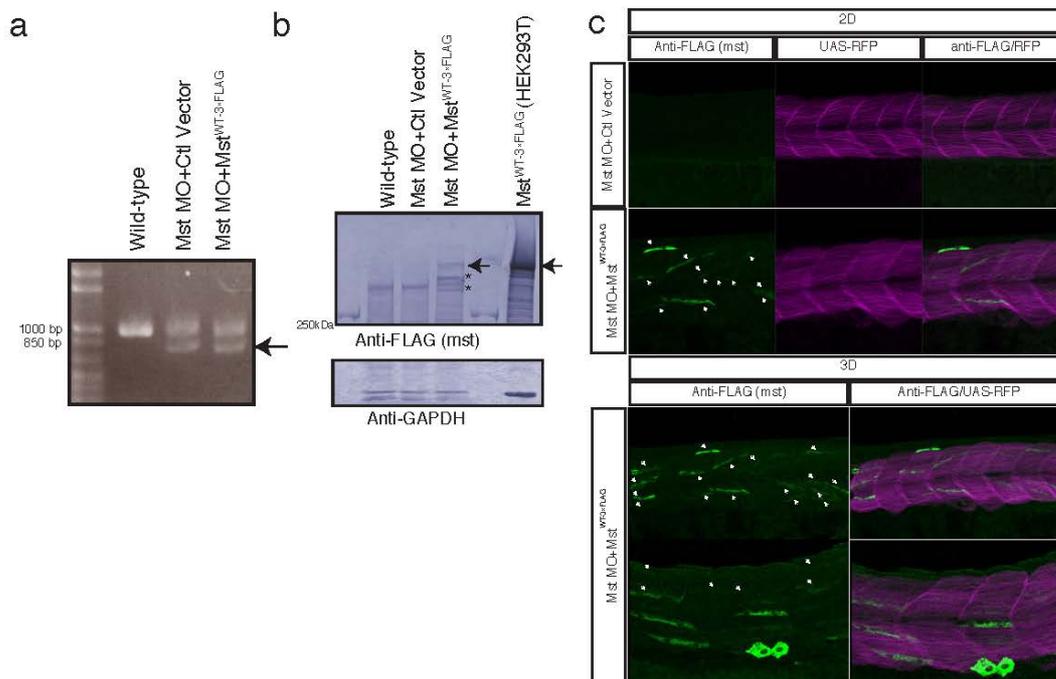
gSA2AzGFF598A を用いて、mysterin- $\alpha$ ノックダウン下における mysterin-3 $\times$ FLAG の発現を確認した (Fig. 18)。

インジェクションしていない胚をコントロールとして、低濃度の mysterin- $\alpha$ モルフォリノとコントロールベクター (pT2MUAS)、低濃度の mysterin- $\alpha$ モルフォリノと mysterin-3 $\times$ FLAG (pT2MUAS) をインジェクションした胚を用いて、発現確認の実験を行った。受精後二日目の胚において、それぞれの胚から RNA を抽出し、mysterin- $\alpha$  に対するプライマーを用いて、RT-PCR を行った。その結果、低濃度 mysterin- $\alpha$ モルフォアントでは、理論値通りのバンドと理論値より低いバンドがほぼ一対一の割合で観察された (Fig. 18a、矢印)。つまり、ノックダウン効率が約 50%であることが確認された。加えて、mysterin-3 $\times$ FLAG のインジェクションは、ノックダウン効率に干渉しないことも明らかとなった。

次に、mysterin-3 $\times$ FLAG のタンパク質発現量を、ウエスタンブロットティングを用いて観察した (Fig. 18b)。mysterin の分子量マーカーとして、HEK293T 細胞に mysterin-3 $\times$ FLAG を発現させた試料をポジティブコントロールとして用いた (Liu et al., 2011; Morito et al., 2014)。抗 FLAG 抗体を用いて検出した結果、mysterin-3 $\times$ FLAG をインジェクションしたモルフォアントでのみバンドが検出された (Fig. 18b、矢印)。よって、gSA2AzGFF598A において、mysterin-3 $\times$ FLAG の発現が確認された。

mysterin-3 $\times$ FLAG の発現が速筋繊維特異的であるかどうか、抗 FLAG 抗体による免疫染色を行った (Fig. 18c)。上の図は、共焦点顕微鏡を用いて二次元撮影した図であり、下の図は二次元写真を三次元画像としてに再構築したものである。また、Gal4FF の発現コントロールとして、RFP の蛍光観察を行った (Fig. 18c、UAS-RFP)。結果、mysterin-3 $\times$ FLAG をインジェクションした mysterin- $\alpha$ モルフォアントでのみ、速筋線維に沿った抗 FLAG 抗体由来のシグナルが観察された (Fig. 18c ; 白矢印)。

以上から、gSA2AzGFF598A における mysterin-3 $\times$ FLAG の速筋特異的な発現を確認し、この実験を基盤とし本実験を開始した。



**Figure 18 gSA2AzGFF598A における *mysterin-3xFLAG* の発現パターン**

(a) *mysterin-α* のノックダウン効率を RT-PCR によって確認した。正常なスプライシング (989 bp) は、低濃度の *mysterin-α* モルフォリノ (1.7 ng) によってスプライシング阻害され、低い分子量のバンドとして検出された (矢印)。ノックダウン効率は約 50% であった。(b) *mysterin-3xFLAG* の発現量をウェスタンブロッティングで確認した。HEK293T 細胞で *mysterin-3xFLAG* を発現させた試料を、*mysterin* の分子量マーカーとして、抗 FLAG 抗体を用いて検出した。*mysterin-3xFLAG* をインジェクションした胚において、有意なバンドが検出されたことから (矢印)、*gSA2AzGFF598A* における *mysterin-3xFLAG* が確認できた。試料間のタンパク質濃度は、抗 GAPDH 抗体を用いた、内在性 GAPDH の発現量をもって確認した。(c) 抗 FLAG 抗体を用いた *mysterin-3xFLAG* の免疫染色を行った。コントロールでは、抗 FLAG 抗体感受的な染色は見られなかったが、*mysterin-3xFLAG* インジェクション胚においては、速筋繊維に沿ったシグナルが観察された (白矢印)。Gal4FF の発現は、RFP のシグナルによって確認している。共焦点顕微鏡 LSM を用いて撮影した二次元画像 (2D) と、それを三次元に構築した図 (3D) を示す。以上から、*mysterin-3xFLAG* は、速筋線維に発現していることが分かった。

## 速筋特異的な *mysterin-3×FLAG* の発現による速筋形態異常の回復

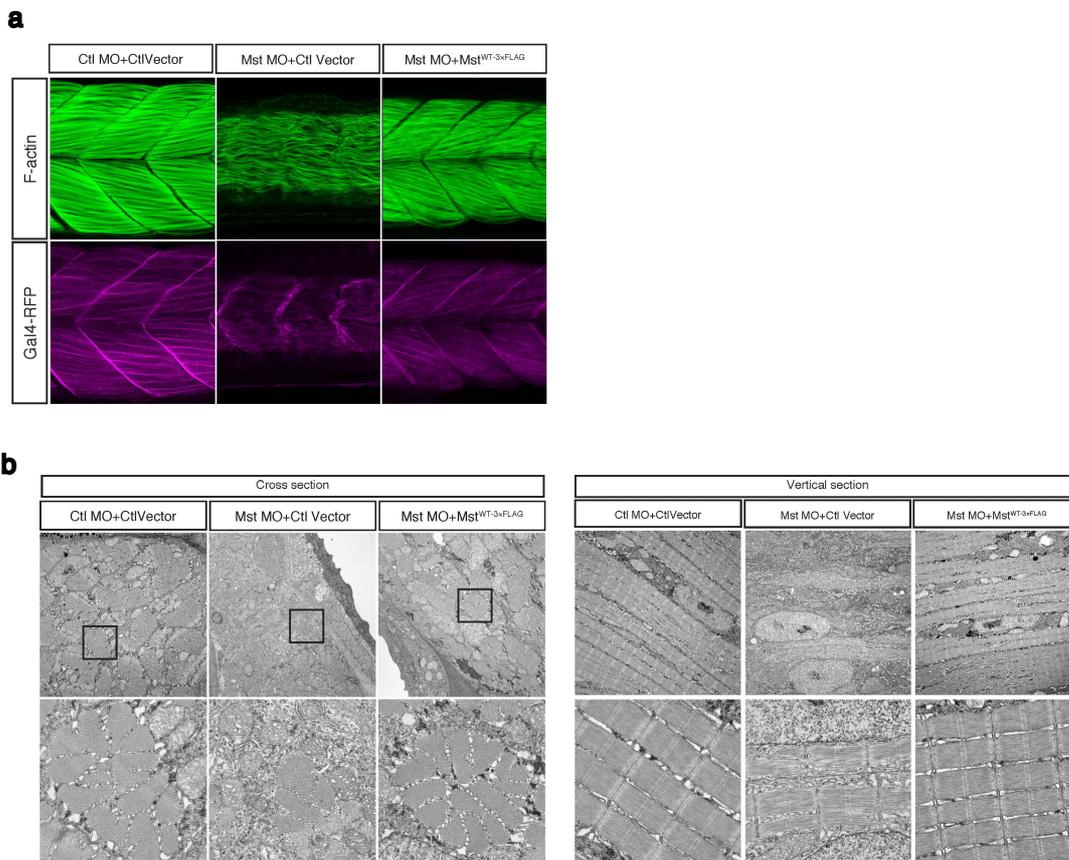
*gSA2AzGFF598A* において、*mysterin-α* ノックダウンにおける異常表現型が、*mysterin-3×FLAG* の速筋特異的な発現によって回復するかどうかを観察した。

前述した野生型ゼブラフィッシュを用いた結果と同じく、*mysterin-α* モルファント (*Mst MO+Ctl vector*) では、速筋繊維の異常形態が観察された (Fig. 19a)。しかし、速筋特異的に *mysterin-3×FLAG* を発現させると、速筋の形態異常が回復していることが観察された (Fig. 19a、*Mst MO+Mst<sup>WT-3×FLAG</sup>*)。

さらに、これらの胚の横断切片 (Cross section) と縦断切片 (Vertical section) において電子顕微鏡観察を行った結果、*mysterin-α* ノックダウンによって、減少した筋原繊維の数も *mysterin-3×FLAG* の発現によって回復していた (Fig. 19b)。

よって、*gSA2AzGFF598A* を用いた実験から、速筋特異的に *mysterin-3×FLAG* を発現させると、*mysterin-α* ノックダウンにおける速筋形態の異常が回復することが分かった。つまり、*mysterin* は細胞自律的 (cell-autonomous) に速筋繊維を制御していることが明らかとなった。

近年モルフォリノが非特異的効果を起こすことが指摘され、手法の是非における議論が活発化している (Kok et al., 2015; Rossi et al., 2015)。本実験から、*mysterin-3×FLAG* の発現によって、*mysterin-α* モルフォリノの効果が解消されたので、*mysterin* に対する特異的な現象であることが、改めて確認できた。



**Figure 19** **mysterin-3xFLAG の速筋特異的な発現による筋異常の回復**

(a) gSA2AzGFF598A トランスジェニックラインにおいて、mysterin-3xFLAG の影響を観察した。phalloidin (F-actin)を用いた速筋形態観察を行い、Gal4FF マーカーである RFP が速筋線維に発現していることをコントロールとした。コントロールモルファント(Ctl MO+Ctl vector)と比較すると、mysterin- $\alpha$ モルファント (Mst MO+Ctl vector)で見られた異常速筋形態が、mysterin-3xFLAGの発現 (Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>)によって回復していることが観察された。(b)電子顕微鏡を用いた速筋観察も行い、横断切片(Cross section)と縦断切片 (Vertical section)をそれぞれ観察した。mysterin- $\alpha$ モルファントで減少した筋繊維、筋原繊維が、mysterin-3xFLAG の発現で回復していることが分かった。以上から、mysterin- $\alpha$ モルファントにおける速筋の形態異常が、mysterin-3xFLAG の発現によって回復することが確認された。

## 速筋特異的な *mysterin-3×FLAG* の発現による運動神経投射異常の緩和

次に、*mysterin-α*ノックダウンにおける運動ニューロンの異常投射が、速筋特異的な *mysterin-3×FLAG* の発現によって回復するかどうかの観察を行った (Fig. 20)。

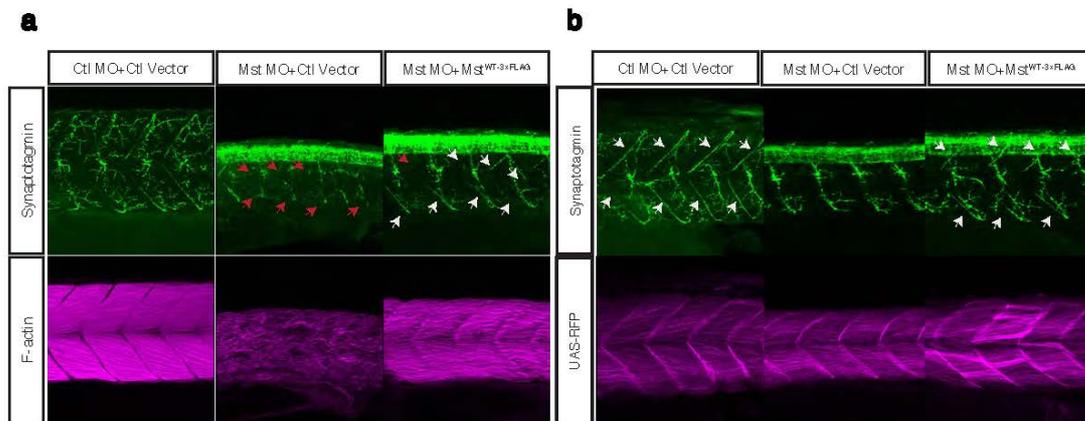
*Znp-1* を用いて運動ニューロンの免疫染色を行ったところ、*gSA2AzGFF598A* における *mysterin-α*ノックダウンでも、*Mip* や *Cap* の体節間運動神経の投射が不完全であった (Fig. 20a、赤矢印)。一方で、*mysterin-3×FLAG* を速筋特異的に発現させると、部分的に投射が回復することが分かった (Fig. 20a、白矢印)。Phalloidin 染色により、同個体における速筋形態を観察したところ、*mysterin-3×FLAG* 発現によって速筋繊維の形態回復も見られた (Fig. 20a ; F-actin)。さらに、*Gal4FF* の発現マーカーである *RFP* のシグナルが速筋特異的に発現している条件下の観察においても、同様の投射回復が見られた (Fig. 20b、白矢印)。

つまり、速筋特異的に発現している *mysterin-3×FLAG* は、細胞非自律的に運動神経の投射を制御していることが分かった。運動神経は、形成された筋肉に投射する働きがあるため、*mysterin-3×FLAG* による速筋の形態回復が、神経の投射を誘導した可能性が考えられる。

また、発生初期胚の脊髄には、運動ニューロン、介在ニューロン、一次感覚ニューロンが存在する。受精後 48 時間を境に、一次感覚ニューロンのリアレンジが起こり、*Rohn-Beard* ニューロンはアポトーシスによって消滅する (Bernhardt et al., 1990; Tanaka et al., 2012)。受精後一日目胚では、*Znp-1* 感受的なシグナルが脊髄で強く観察されるが、受精後二日目以降になると検出されない (Panzer et al., 2005)。これは、発生段階依存的にアポトーシスによる神経のリアレンジのためかと考えられる。

受精後 48 時間後の *mysterin-α*モルファントでは、コントロールと比較して、脊髄に強いシグナルが検出された (Fig. 20)。また、ヒト *mysterin-3×FLAG* を速筋特異的に発現させると、運動神経の投射異常は回復するが、脊髄のシグナルの強度に変化は見られなかった。

つまり、*mysterin-α*ノックダウンでは、一次感覚神経のアポトーシスが起こっていない可能性がある。しかし、これまでの観察結果から、*mysterin-α*モルファントは発生遅延を引き起こしている可能性があるため (Fig. 12)、発生遅延による神経発達の遅延によるものかもしれない。以上から、速筋特異的な *mysterin-3×FLAG* の入れ戻しは、発生遅延もしくは神経のリアレンジには影響しないことが分かった。



**Figure 20** **mysterin-3×FLAG の速筋特異的な発現による異常神経の回復**

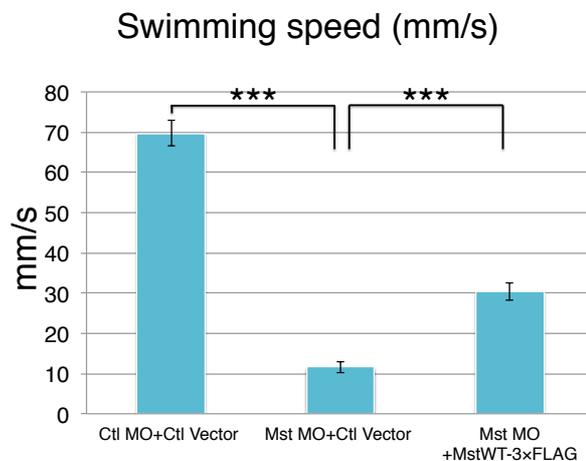
gSA2AzGFF598A において、運動神経ガイダンスにおける *mysterin-3×FLAG* の影響を観察した。運動神経は、シナプトタグミンの抗体である Znp-1 を用いて観察し (synaptotagmin)、共焦点顕微鏡を用いて三次元構築した画像を取得した。試料は、低濃度のコントロールモルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚 (Ctl MO+Ctl vector)、低濃度の *mysterin-α* モルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Ctl vector)、低濃度の *mysterin-α* モルフォリノと *mysterin-3×FLAG* の発現ベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Mst<sup>WT-3×FLAG</sup>) を用意した。(a) Znp-1 を用いた抗体染色と phalloidin を用いた F-actin 染色の図を示す。*mysterin-α* モルフォリノでは、体節に沿った Mip や Cap の運動神経ガイダンスが乱れ (赤矢印)、速筋に *mysterin-3×FLAG* を発現させると、投射の回復が見られた (白矢印)。Phalloidin による F-actin 染色から、*mysterin-3×FLAG* による速筋の形態回復も観察された。(b) Gal4FF 発現マーカである RFP シグナル下において、Znp-1 による抗体染色を行った。コントロールモルフォリノで見られる十分な神経投射 (白矢印) が、*mysterin-3×FLAG* の発現胚でも観察された (白矢印)。以上から、速筋特異的に *mysterin-3×FLAG* を発現すると、速筋線維だけでなく運動神経ガイダンスの回復も見られた。

これまでの結果から、速筋特異的な **mysterin** は、**mysterin- $\alpha$** ノックダウンによる運動神経と速筋の形態異常を回復させることが明らかになった。次に、**mysterin- $\alpha$** ノックダウンによる運動障害が、速筋特異的な **mysterin** の発現により回復するかどうか観察した (Fig. 21)。

**gSA2AzGFF598A** において、コントロールモルフアント、**mysterin- $\alpha$** モルフアント、**mysterin-3 $\times$ FLAG** を発現させた **mysterin- $\alpha$** モルフアントを用意し、ハイスピードカメラを用いて逃避行動の観察を行った。その結果、**mysterin- $\alpha$** モルフアントが 11.6 mm/s であったのに対し、**mysterin-3 $\times$ FLAG** を速筋特異的に発現させた **mysterin- $\alpha$** モルフアントでは、30.3 mm/s であった。つまり、**mysterin-3 $\times$ FLAG** の発現により、**mysterin- $\alpha$** ノックダウンによる運動障害の回復が見られた。しかし、コントロールモルフアントの速度 69.8 mm/s と比較すると、回復の効果は弱いことが分かった。

これまでの結果から、**mysterin- $\alpha$** ノックダウンによる筋障害は、速筋特異的な **mysterin-3 $\times$ FLAG** の発現によって回復したが、運動ニューロンの投射回復は弱い効果であった。加えて、発生遅延による一次感覚ニューロンのリアレンジ障害の可能性もある。

つまり、速筋特異的な **mysterin-3 $\times$ FLAG** の発現により、筋肉障害による運動能の低下は回復したが、発生過程などを伴う神経異常による運動障害は回復しないことが考えられた。



**Figure 21** **mysterin-3xFLAG の筋肉特異的な発現による運動障害の回復**

gSA2AzGFF598Aを用いて、mysterin-3xFLAG発現下における運動能を観察した。低濃度のコントロールモルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚 (Ctl MO+Ctl vector)、低濃度のmysterin- $\alpha$ モルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Ctl vector)、低濃度のmysterin- $\alpha$ モルフォリノとmysterin-3xFLAGの発現ベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>)において、受精後60時間 (60 hpf)で運動機能を観察、速度の定量化 (mm/s)を行った。Ctl MO+Ctl vectorは69.8 mm/s (n = 13)、Mst MO+Ctl vectorは11.6 mm/s (n = 10)、Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>は30.3 mm/s (n = 15)であった。\*\*\* $P < 0.001$ 。エラーバーは、標準偏差で求めた。以上から、速筋特異的なmysterin-3xFLAGによって、運動障害の回復が見られた。

## 速筋特異的な *mysterin-3×FLAG* の発現による血管ガイダンスへの影響

先行研究から、*mysterin-α*ノックダウンは、ゼブラフィッシュの体節間血管のガイダンスや眼の周辺に存在する血管ガイダンスの異常を引き起こすと報告されている (Fig. 7) (Liu et al., 2011)。これまでの結果から、筋肉に発現する *mysterin* が、速筋、運動神経の異常を回復させることが分かったので、血管ガイダンスに対して影響するかどうかを確認した。速筋に *Gal4FF* が発現する *gSA2AzGFF598A* ラインと血管内皮細胞に *GFP* が誘導される *fli:EGFP* を交配した卵を用いて、*mysterin-α*ノックダウンと *mysterin-3×FLAG* の発現誘導を組み合わせる実験を行った。

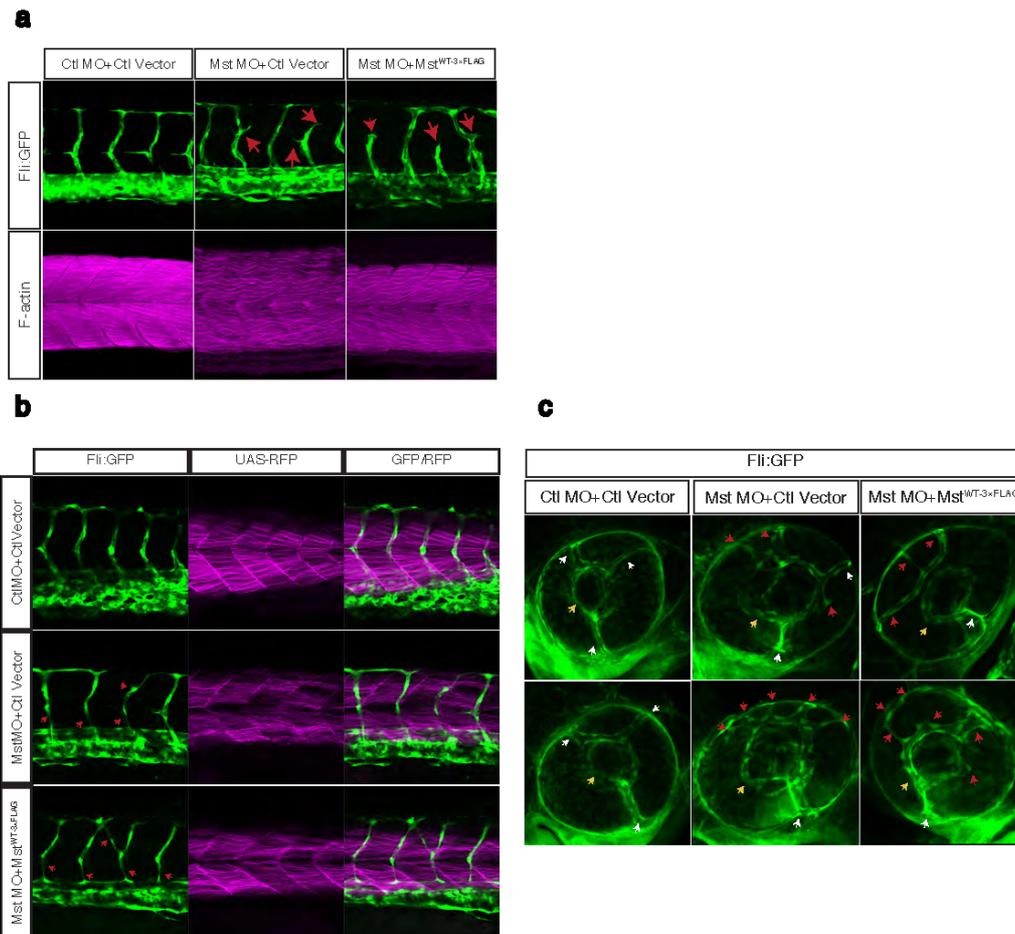
*mysterin-α*モルファントにおいて、体節間血管のガイダンスを観察したところ、コントロールモルファントにおいて、血管の異常分岐や伸長不全が確認された (Fig. 22a, b、赤矢印)。また、速筋特異的に *mysterin-3×FLAG* を発現させた胚においても、*mysterin-α*モルファントで見られた異常血管網は回復しなかった (Fig. 22a, b)。

速筋線維の観察は、*phalloidin* を用いた F-actin 染色で確認し、*mysterin-3×FLAG* の発現によって、*mysterin-α*ノックダウンによる異常速筋線維が回復していることが分かった (Fig. 22a、F-actin)。また、RFPシグナルの観察により、*Gal4FF* が速筋特異的に誘導されていることも確認している (Fig. 22b、UAS-RFP)。

つまり、速筋特異的な *mysterin* の発現は、*mysterin-α*ノックダウンによる体節間血管の異常ガイダンスに影響しないことが明らかとなった。

次に、眼の周辺血管網における形態観察を行った。ゼブラフィッシュの目の中心に、環状の血管が存在しており (inner optic circle、IOC; Fig. 22c、黄矢印)、そこから三本の分岐した血管が観察される (Fig. 22c、白矢印)。*mysterin-α*モルファントでは、三本の血管が異常分岐し、本数が増加していることがわかる (Fig. 22c、赤矢印) (Liu et al., 2011)。一方で、*mysterin-3×FLAG* を速筋特異的に発現させた系においても、*mysterin-α*ノックダウンの表現型と違いは見られなかった (Fig. 22c)。

以上のことから、速筋特異的な *mysterin-3×FLAG* は、体節間血管、眼の周辺の血管ガイダンスには影響しないことが分かり、速筋発現型の *mysterin* は、血管ガイダンスを制御しないことが明らかとなった。



**Figure 22** **mysterin-3xFLAG** の筋肉特異的な発現による血管ガイダンスへの影響

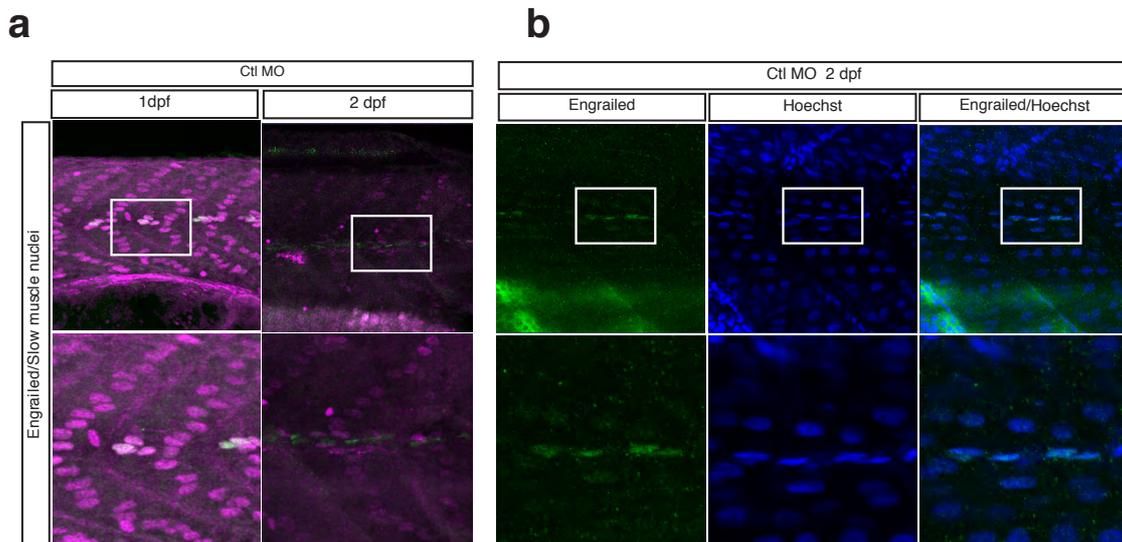
gSA2AzGFF598Aとfli:EGFPを交配し、得られた卵に、低濃度のコントロールモルフォリノとコントロールベクターをインジェクションしたもの (Ctl MO+Ctl vector)、低濃度のmysterin- $\alpha$ モルフォリノとコントロールベクターをインジェクションしたもの (Mst MO+Ctl vector)、低濃度のmysterin- $\alpha$ モルフォリノとmysterin-3xFLAGの発現ベクターをインジェクションしたもの (Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>)に分け、受精後二日目にそれぞれの胚を観察した。体節に沿った血管ガイダンスをpallodin (F-actin)による組織染色 (a)もしくは、Gal4FF発現マーカーのRFP (UAS-RFP)のシグナル下 (b、c)で観察した。(a)mysterin- $\alpha$ モルファントで見られる血管の異常分岐やミスガイダンスは、mysterin-3xFLAGの発現によって影響されなかった (赤矢印)。mysterin- $\alpha$ モルファントにおける速筋形態異常は、mysterin-3xFLAGの発現によって回復した。(b)RFPシグナル下において、体節血管の観察を行った結果、異常ガイダンスはmysterin-3xFLAGの発現によって回復しなかった。(c)コントロールモルファントでは、目の中心部に存在する環状の血管 (inner optic circle ; IOC、黄矢印)から、三本の分岐血管が観察される (白矢印)。mysterin- $\alpha$ モルファントでは、異常分岐が見られたが (Mst MO+Ctl vector、赤矢印)、mysterin-3xFLAG発現による回復は見られなかった (Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>、赤矢印)。以上から、速筋特異的なmysterin-3xFLAGは、血管ガイダンスには影響しなかった。

## 速筋特異的な *mysterin-3*×FLAG の発現による muscle pioneer cells (MPCs) への影響

筋肉には、速筋、遅筋のほか、脊索付近に存在している MPCs という遅筋の亜集団細胞が知られている (Fig. 14a、緑) (Ochi and Westerfield, 2007; Stickney et al., 2000)。原腸胚後期において、遅筋細胞の前駆体 (adaxial cell) のうち脊索の近くにいる前駆細胞がソニックヘッジホッグ (*shh*) の影響を強く受け、MPCs に分化する (Fig. 9)。これまで MPCs は、遅筋、速筋の配向や運動神経と筋肉の結合、リンパ管の形成に関与していることが報告されているが、その詳細な機能や性質は分かっていない (Cantu et al., 2013; Lim et al., 2011; Melançon et al., 1997; Sainath and Granato, 2013)。

MPCs は、転写因子である *engrailed 1*、*engrailed 2* を特異的に発現しており、これらを認識する 4D9 (抗 *engrailed* 抗体) を用いた免疫染色によって、MPCs の核を識別する方法が一般的に知られている (Hatta et al., 1991)。また、抗 Prox1 抗体は遅筋の核を認識することが報告されている (Glasgow and Tomarev, 1998; Ochi and Westerfield, 2009)。受精後一日目胚では、遅筋の亜集団である MPCs は、4D9 と抗 Prox1 抗体に感受的であり、共染色されることも知られている。

コントロールモルフアントにおいて、受精後一日目、二日目、それぞれの MPCs を 4D9 と抗 Prox1 抗体を用いて観察した (Fig. 23)。先行研究の通り、受精後一日目胚では、4D9 による特異的な核の染色と、抗 Prox1 抗体によって共染色される核が検出され、MPCs と定義した (Fig. 23a、1 dpf)。しかし、受精後二日目では抗 Prox1 抗体が認識する核と、4D9 が認識するシグナルは別々であった (Fig. 23a、2 dpf)。4D9 が認識するシグナルが、核であるか確認するため、核の染色剤である Hoechst を用いた共染色実験を行った。その結果、4D9 と共染色されたため、受精後二日目以降の MPCs は 4D9 感受的であるが、Prox1 には感受的でないことが分かった (Fig. 23b)。



**Figure 23 Muscle pioneer cells (MPCs)の検出**

野生型のゼブラフィッシュに対して、低濃度のコントロールモルフォリ(Ctl MO)をインジェクションした胚を用いて MPCsの観察を行った。(a)受精後一日目(1 dpf)、二日目(2 dpf)のゼブラフィッシュにおいて、MPCs特異的に発現する転写因子engrailed認識する4D9(抗engrailed抗体)と、遅筋の核マーカである抗Prox1抗体(Slow muscle nuclei)を用いて染色を行った。受精後一日目胚では、4D9(抗engrailed抗体)と抗Prox1抗体(Slow muscle nuclei)の共染色が観察されたが(左)、受精後二日目の胚では共染色されなかった(左)。上図の四角部分を下図に示す。(b)受精後二日目の胚において、4D9(抗engrailed抗体)と核染色(Hoechst)を行った結果、共染色が確認された。4D9は、MPCsの核に存在するengrailedを認識しているとし、受精後二日目胚ではHoechstと共染色される核をMPCsとした。上図の四角部分を下図に示す。

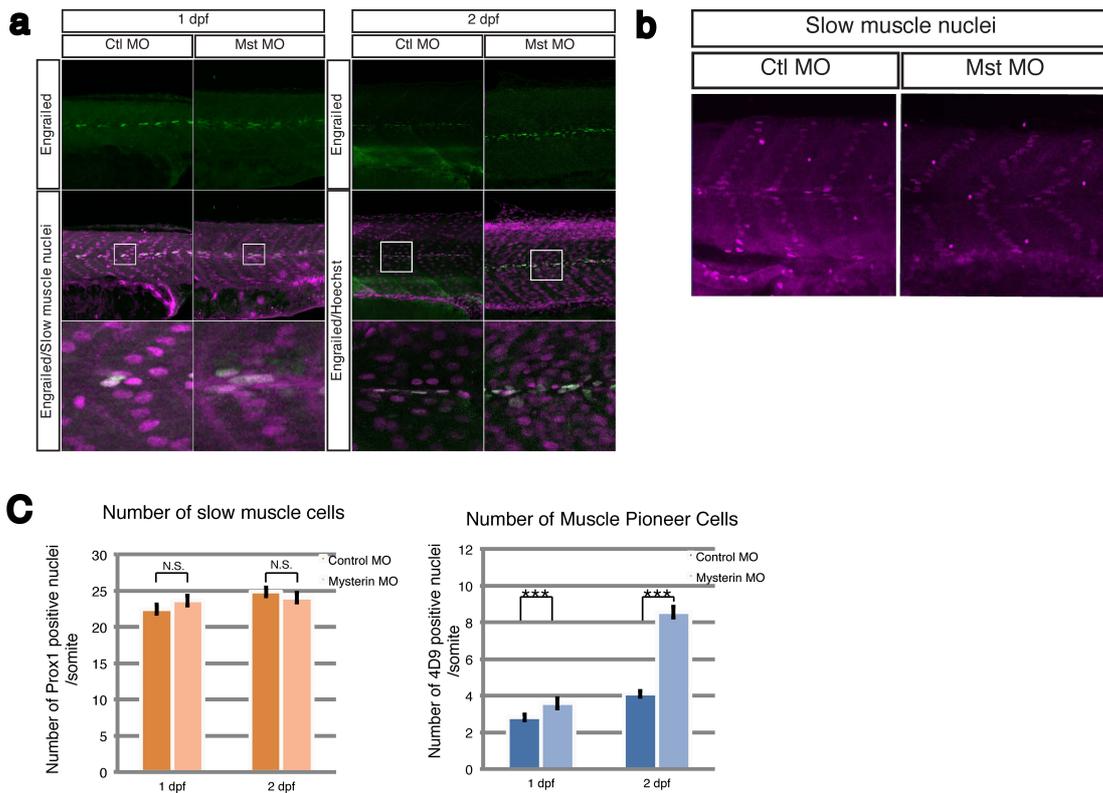
以上より MPCs の染色パターンを定義し、受精後一日目、二日目において、コントロールモルフアントと *mysterin- $\alpha$* モルフアントにおける MPCs の数を観察した (Fig. 24)。受精後一日目の MPCs では、コントロールモルフアント、*mysterin- $\alpha$* モルフアントの間で大きく差は見られなかったが (Fig. 24a, 1 dpf)、受精後二日目では *mysterin- $\alpha$* ノックダウンによって MPCs の数が増加しているように見られた (Fig. 24a, 2 dpf)。遅筋の核は Prox1 抗体によって観察し (Fig. 24b)、受精後一日目、二日目の MPCs を計測、一体節あたりの数を定量化した (Fig. 24c)。その結果、遅筋の核は、コントロールと *mysterin- $\alpha$* モルフアントの間で差が見られなかったが、受精後二日目の *mysterin- $\alpha$* モルフアントにおいて、異常増加が観察された (Fig. 24c, 2 dpf; コントロールモルフアント  $4.1 \pm 0.15$ 、*mysterin- $\alpha$* モルフアント  $8.6 \pm 0.29$ )。

以上から、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンは MPCs の異常増加を引き起こすことが分かった。

さらに、gSA2AzGFF598A を用いて速筋特異的な *mysterin-3 $\times$ FLAG* が、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンによる MPCs の異常増加を緩和するかどうかを観察した。

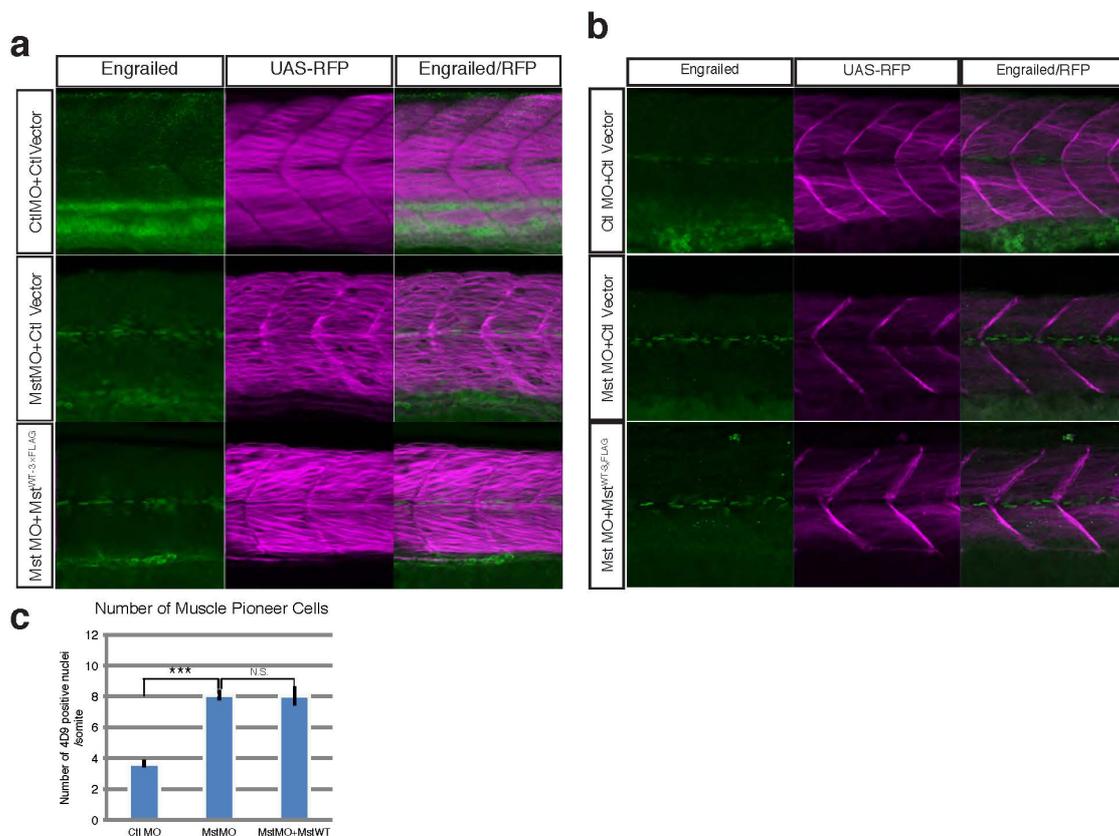
速筋特異的な *mysterin-3 $\times$ FLAG* の発現は、速筋形態の異常回復 (Fig. 25a, F-actin) と Gal4FF の発現 (Fig. 25b, UAS-RFP) によって保証している。*mysterin-3 $\times$ FLAG* を発現させた *mysterin- $\alpha$* モルフアントでも、4D9 感受的な強い核のシグナルは検出され MPCs の数を測定、定量した結果、MPCs の異常増殖は抑えられなかった (Fig. 25c, コントロールモルフアント  $3.6 \pm 0.13$ 、*mysterin- $\alpha$* モルフアント  $8.1 \pm 0.23$ 、*mysterin-3 $\times$ FLAG* を速筋特異的に発現させた *mysterin- $\alpha$* モルフアント  $8.0 \pm 0.50$ )。

よって、*mysterin- $\alpha$* は遅筋の集団である MPCs の数を制御しているが、速筋を介した制御機構ではないことが分かった。



**Figure 24** mysterin- $\alpha$ ノックダウンによる MPCs の増加

野生型のゼブラフィッシュに対して、低濃度のコントロールモルフォリン(Ctl MO)をインジェクションした胚と、低濃度mysterin- $\alpha$ モルフォリンをインジェクションした胚(Mst MO)を用いてMPCsの数を観察した。(a)受精後一日目(1 dpf)の胚は、4D9(抗engrailed抗体)と抗Prox1抗体(Slow muscle nuclei)を用いて(左)、受精後二日目(2 dpf)の胚は、4D9と核染色剤(Hoechst)の染色剤を用いて(右)、MPCsの観察を行った。受精後二日目のmysterin- $\alpha$ モルフォアトにおいて、4D9感受的な核シグナルの増強が見られた。上図の四角部分を下図で示す。(b)受精後二日目の胚において、抗Prox1抗体を用いて、遅筋の核染色を行った。(c) (a)、(b)の観察結果から、一節あたりの遅筋の核数とMPCsの核数を測定し、定量化した。MPCsの数は、コントロールモルフォアト(1 dpf  $2.8 \pm 0.12$ (体節数20)、2 dpf  $4.1 \pm 0.15$ (体節数49))に対し、mysterin- $\alpha$ モルフォアト(1 dpf  $3.6 \pm 0.12$ (体節数34)、2 dpf  $8.6 \pm 0.29$ (体節数33))では、増加が見られた。遅筋の核は、各モルフォアトで影響が見られなかった(コントロールモルフォアト(Ctl MO); 1 dpf  $22.5 \pm 0.69$ (体節数42)、2 dpf  $24.9 \pm 0.64$ (体節数28)、mysterin- $\alpha$ モルフォアト(Mst MO); 1 dpf  $23.7 \pm 0.55$ (体節数51)、2 dpf  $24.1 \pm 0.68$ (体節数21))。以上から、mysterin- $\alpha$ ノックダウンにおいて、MPCs特異的な増加が観察された。N.S.: not significant。MPCsの数はmysterin-aモルフォアトで増加傾向にあった。\*\*\* $P < 0.001$ 。エラーバーは、標準偏差で求めた。



**Figure 25 mysterin-3xFLAG の筋肉特異的な発現による MPCs への影響**

gSA2AzGFF598Aにおいて、MPCsに対するmysterin-3xFLAGの影響を観察した。低濃度のコントロールモルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚(Ctl MO+Ctl vector)、低濃度のmysterin- $\alpha$ モルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚(Mst MO+Ctl vector)、低濃度のmysterin- $\alpha$ モルフォリノとmysterin-3xFLAGの発現ベクターをインジェクションした胚(Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>)を用意し、受精後二日目において観察を行った。(a)4D9(抗 engrailed 抗体)によりMPCsを認識したところ、mysterin- $\alpha$ モルフォリノにおいて増加し、mysterin-3xFLAGの発現下でも染色図に変化は見られなかった。Pallodin(F-actin)による染色から、mysterin-3xFLAGの発現により、速筋の形態異常の回復は観察された。(b)Gal4FF発現マーカであるRFP下で観察した(UAS-RFP)。mysterin- $\alpha$ モルフォリノで見られたMPCsの増加は、mysterin-3xFLAGにおいても変化が見られなかった。(c)(a)を定量化し、一節あたりMPCs数を定量化した。コントロールモルフォリノ(Ctl MO+Ctl vector)では $3.6 \pm 0.13$ (体節数64)、mysterin- $\alpha$ モルフォリノ(Mst MO+Ctl vector)では $8.1 \pm 0.23$ (体節数29)、mysterin-3xFLAGを速筋特異的に発現させた胚(Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>)では $8.0 \pm 0.50$ (体節数25)であり、MPCsの増加はmysterin-3xFLAGによって回復しなかった。N.S.: not significant. \*\*\* $P < 0.001$ 。エラーバーは、標準偏差で求めた。

### 5-3、mysterin 活性ドメインの生理的意義

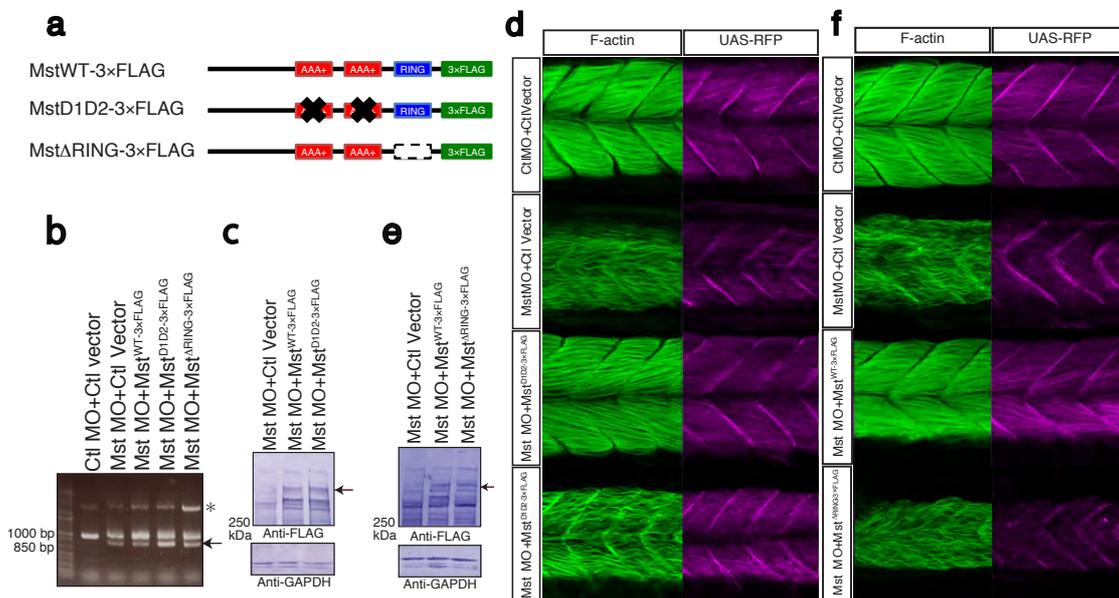
#### mysterin の活性ドメイン AAA+ ATP アーゼとユビキチンリガーゼの生理的意義

mysterin は二つの AAA+ モチーフと RING フィンガーモチーフを持つが、mysterin における生理的意義は分かっていない。そこで我々は、ATP アーゼドメインに変異を入れ不活性にした変異体 (Mst<sup>D1D2</sup>-3×FLAG)、RING フィンガードメインを欠損させた変異体 (Mst<sup>RING</sup>-3×FLAG) を用意し、野生型の代わりに gSA2AzGFF598A に発現させる実験を行った (Fig. 26a) (Liu et al., 2011; Morito et al., 2014)。

野生型もしくは変異型 mysterin-3×FLAG をインジェクションした胚において、mysterin- $\alpha$ モルフォリノのノックダウン効率を RT-PCR を用いて確認した (Fig. 26b、矢印)。mysterin-3×FLAG の発現をウエスタンブロッティングによって確認し、ATP アーゼ不活性変異体、RING フィンガー欠損体のどちらも野生型と同じくらい発現していることが分かった (Fig. 26c、e、矢印)。この条件において、速筋形態に対する影響を phalloidin 染色によって観察した (Fig. 4-16d、f、F-actin)。mysterin- $\alpha$ ノックダウンにおける速筋の形態異常は、野生型の mysterin-3×FLAG によって回復するが、ATP アーゼ不活性変異体、RING フィンガー欠損体のどちらも回復させることはできなかった (Fig. 26d、f)。

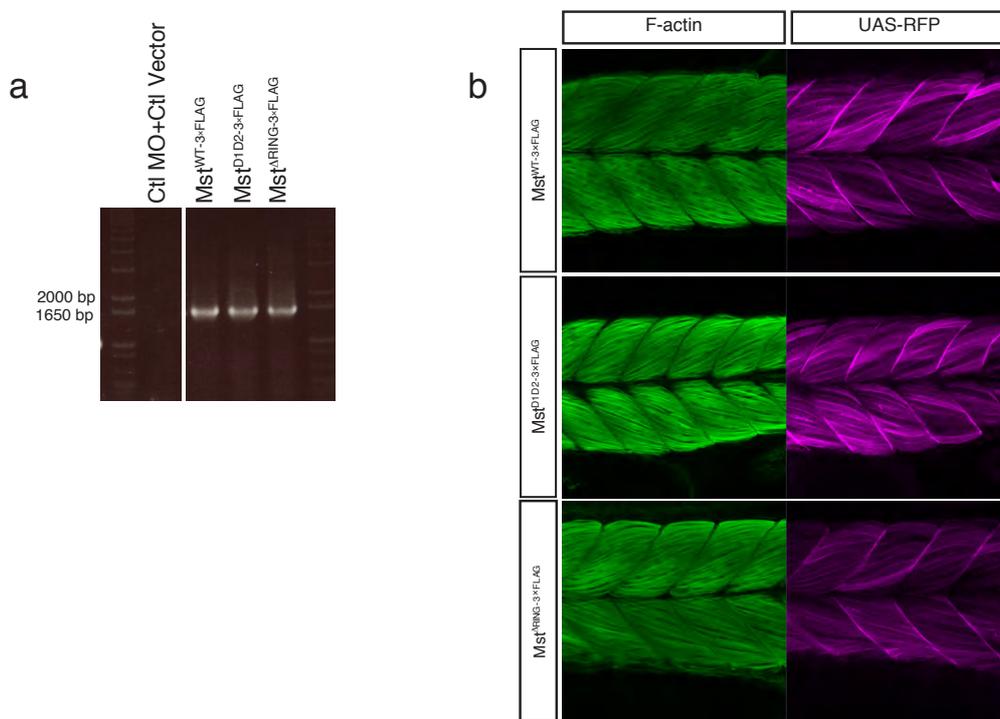
これらの変異は、野生型の mysterin の機能を代替できていない可能性と、野生型 mysterin の機能を阻害するドミナントネガティブ効果を引き起こしている可能性がある。そのため、ATP アーゼ不活性変異体、RING フィンガー欠損体を過剰発現させる実験を行った (Fig. 27)。

各種 mysterin-3×FLAG の発現は、RT-PCR を用いた mRNA の発現量をもって確認した (Fig. 27a)。速筋の形態を観察したところ、野生型 mysterin-3×FLAG の過剰発現における影響はなく、ATP アーゼ不活性変異体、RING フィンガー欠損体を過剰発現させても、影響は見られなかった (Fig. 27b)。つまり、ATP アーゼ不活性変異体、RING フィンガー欠損体が速筋の異常形態を回復しなかったのは、ドミナントネガティブ効果ではなく野生型の機能を代替できないことであった。以上から、mysterin の AAA+ ATP アーゼと RING フィンガードメインの活性は、mysterin の生理的機能に不可欠であることが分かった。



**Figure 26** mysterin の ATP アーゼ、ユビキチンリガーゼの速筋形態への影響

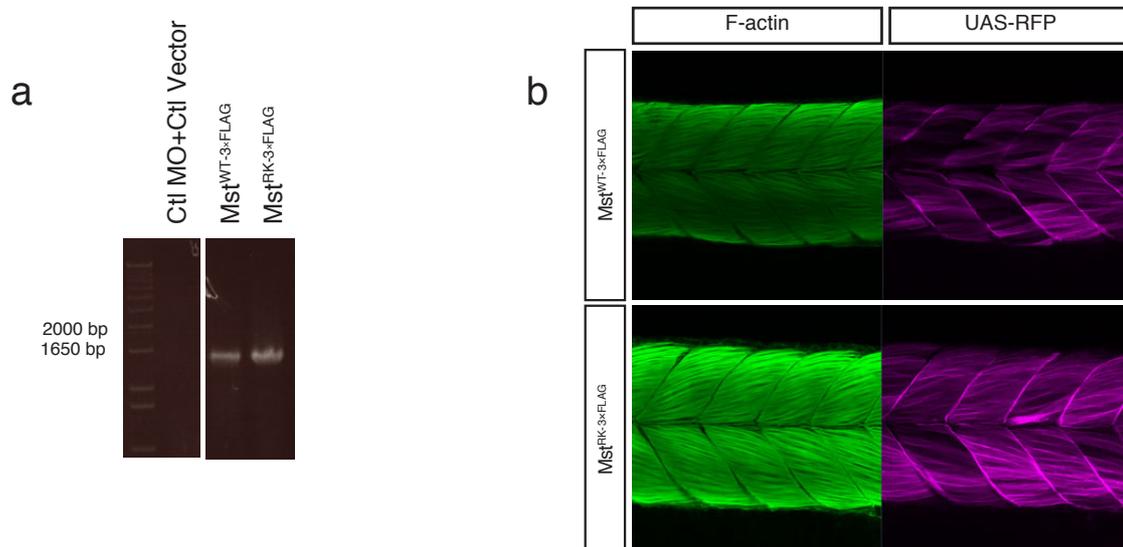
gSA2AzGFF598A のトランスジェニックラインを用いて、mysterin-3xFLAG の野生型、各種変異体を速筋特異的に発現させ、受精後二日目にて速筋の形態を観察した。(a)mysterin の一次配列のモデル図である。野生型 (MstWT-3xFLAG)は二つの AAA+ ATP アーゼと RING フィンガードメインを持つ。ATP アーゼドメインに変異を入れ不活性にした変異体 (MstD1D2-3xFLAG)、RING フィンガードメインを欠損させた変異体 (MstDRING-3xFLAG)を作成した。(b)低濃度のコントロールモルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚(Ctl MO+Ctl vector)、低濃度の mysterin- $\alpha$ モルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Ctl vector)、低濃度の mysterin- $\alpha$ モルフォリノと野生型 mysterin-3xFLAG の発現ベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Mst<sup>WT-3xFLAG</sup>)、低濃度の mysterin- $\alpha$ モルフォリノと ATP アーゼ不活性変異体の発現ベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Mst<sup>D1D2-3xFLAG</sup>)、低濃度の mysterin- $\alpha$ モルフォリノと RING フィンガー欠損体の発現ベクターをインジェクションした胚 (Mst MO+Mst<sup>DRING-3xFLAG</sup>)を用意した。mysterin- $\alpha$ ノックダウン効率を RT-PCR によって確認し、mysterin- $\alpha$ モルフォリノによるスプライシング阻害が観察された(矢印)。アスタリスクは非特異的なバンドである(\*)。mysterin-3xFLAG 野生型と ATP アーゼ不活性変異体(c)と RING フィンガー欠損体(e)の発現量をウエスタンブロットティングによって観察した。抗 FLAG 抗体により、それぞれのmysterinが検出された(矢印)。タンパク質量のコントロールとして内在性 GAPDH の検出を抗 GAPDH 抗体を用いて行った。Phalloidin(F-actin)による観察を行い、mysterin- $\alpha$ モルフォリノによる速筋形態異常を、mysterin-3xFLAG の野生型は回復させたが(d、f)、ATP アーゼ不活性変異体(d)と RING フィンガー欠損体(f)は回復させなかった。



**Figure 27 mysterin の ATP アーゼ、ユビキチンリガーゼの過剰発現結果**

gSA2AzGFF598A のトランスジェニックラインを用いて、mysterin-3xFLAG の野生型、各種変異体を速筋特異的に発現させ、受精後二日目における速筋の形態を観察した。低濃度のコントロールモルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚(Ctl MO+Ctl vector)をコントロールとして、野生型 mysterin-3xFLAG の発現ベクターをインジェクションした胚 ( $Mst^{WT-3xFLAG}$ )、ATP アーゼ不活性変異体の発現ベクターをインジェクションした胚 ( $Mst^{D1D2-3xFLAG}$ )、RING フィンガー欠損体の発現ベクターをインジェクションした胚 ( $Mst^{RING-3xFLAG}$ )を用いて、観察を行った。(a)ヒト mysterin に対するプライマーを用いて、各種 mysterin-3xFLAG の発現を RT-PCR で確認した。その結果、理論値である 1562 bp にバンドが検出されたため、発現が確認できた。(b) 各種 mysterin-3xFLAG を発現した条件下で、phalloidin(F-actin)を用いた速筋形態を観察した。Gal4FF の発現マーカーである RFP のシグナルをもって、コントロールとした。速筋の形態は、野生型、ATP アーゼ不活性変異体、RING フィンガー欠損体、いずれを過剰発現しても異常は観察されなかった。

最後に、もやもや病関連変異体である R4810K (Mst<sup>RK</sup>-3×FLAG) を用いた過剰発現を行った。もやもや病関連変異は、mysterin においてドメインの保存されていない箇所のものである。もやもや病関連変異体と野生型 mysterin の間で、AAA+ ATP アーゼやユビキチンリガーゼの活性について変化が見られなかった。そのため、変異によって、何かしらの機能を獲得した可能性があり、存在量が増えると野生型 mysterin の機能を阻害するのではないかと予想した。そこで、gSA2AzGFF598A を用いて、もやもや病関連変異体を過剰発現させたが (Fig. 28a)、速筋形態に変化は見られなかった (Fig. 28b、F-actin)。速筋においては、もやもや病関連変異体は機能を獲得したり、野生型 mysterin を阻害していないということが示唆された。



**Figure 28** mysterin のもやもや病変異体の速筋形態への影響

gSA2AzGFF598A を用いて、mysterin-3xFLAG の野生型、もやもや病変異体 (R4810K) を速筋特異的に発現させ、受精後二日目における速筋の形態を観察した。低濃度のコントロールモルフォリノとコントロールベクターをインジェクションした胚 (Ctl MO+Ctl vector) をコントロールとして、野生型 mysterin-3xFLAG の発現ベクターをインジェクションした胚 ( $Mst^{WT-3xFLAG}$ )、もやもや病変異体 (R4810K) の発現ベクターをインジェクションした胚 ( $Mst^{RK-3xFLAG}$ ) を用意した。(a) ヒト mysterin に対するプライマーを用いて、各種 mysterin-3xFLAG の発現を RT-PCR で確認した (1562 bp)。(b) 各種 mysterin-3xFLAG を発現した条件下で、速筋の形態を、phalloidin (F-actin) により観察した。Gal4FF 発現マーカーとして RFP シグナルを観察した。速筋の形態は、野生型、もやもや病変異体 (R4810K)、いずれを過剰発現しても異常は観察されなかった。

## 6、考察

mysterin は、もやもや病の発症リスクをあげる因子として、初めて単離された因子であり、モチーフの保存されていない C 末端の一アミノ酸変異 (R4810K) が、発症リスクを上昇させる機構は謎のままである(Liu et al., 2011)。さらに、mysterin は 591 kDa の巨大な AAA+ ATP アーゼ・ユビキチンリガーゼのハイブリット型酵素であった。AAA+ ATP アーゼを持つことから、mysterin はドーナツ状の多量体が機能体であり、ATP の加水分解で得たエネルギーを用いた物理的な運動を行うことが示唆されている (Morito et al., 2014)。RING フィンガーユビキチンリガーゼは、基質に対するユビキチン付加を行い、プロテアソームを介した分解系などに誘導する。mysterin ともやもや病との関連、どのように ATP アーゼとユビキチンリガーゼを協同させているかについては、大きな問題である。

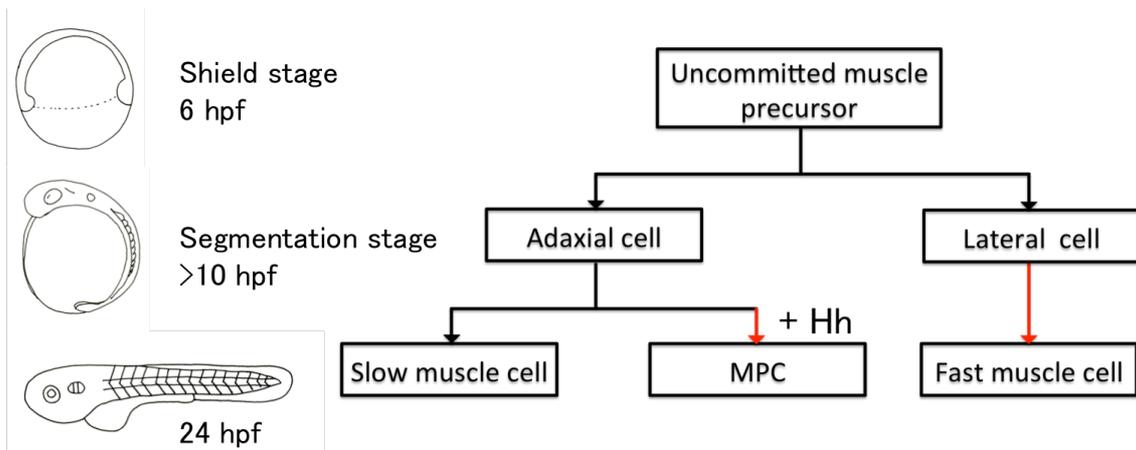
本研究では、ゼブラフィッシュの初期胚発生における mysterin の生理学的意義を見出した。mysterin- $\alpha$ は、細胞自律的に速筋繊維の形態を制御しているが、遅筋の形態には関与せず、遅筋の亜集団である MPCs の分化は制御している因子であった。加えて、mysterin- $\alpha$ は速筋繊維の形態を制御することで、運動神経の投射を制御していることも明らかとなった。最後に、mysterin による速筋繊維の制御は、AAA+ ATP アーゼ活性とユビキチンリガーゼ活性依存的であり、どちらかが欠損すると制御機構が破綻することが分かった。

mysterin- $\alpha$ のノックダウンでは、速筋の異常形態が観察と、筋原繊維の数の減少が観察された (Fig. 14)。しかし、筋原繊維の構成因子である、アクチン、ミオシンの配向やサルコメアの Z-disk と M-line の形成には変化がなかったことから、形成された筋原繊維は正常であることが分かった (Fig. 14)。遅筋繊維に異常は見られず、mysterin- $\alpha$ は速筋と遅筋の前駆細胞が運命決定された後に働き、速筋特異的な発生過程に関与していると考えられる。また、速筋の異常形態は、発生初期である受精後二日目から観察され、受精後三日目以降に異常形態が促進するようなことは観察されなかった。つまり、一度できた筋肉が破壊される筋肉破壊の現象ではなく、発生異常である可能性を示唆している (Granato et al., 1996)。

mysterin- $\alpha$ は遅筋の亜集団である MPCs の数も制御している (Fig. 24、25)。遅筋と速筋の前駆体細胞として、adaxial cell と lateral cell の二種類が知られており、原腸胚後期には、前駆細胞として運命決定される (Fig. 29、Fig. 9) (Ochi and Westerfield, 2007)。Adaxial cell の一部は脊索の近くでとどまり、ソニックヘッジホッグ (shh) シグナルを強く受けることで MPCs に分化するが、shh の影響を強く受けない adaxial cell は皮膚直下まで動き、単層の遅筋繊維を形成する (Devoto et al., 1996; Hirsinger et al., 2004; Stickney et al., 2000)。

通常、受精後一日後において、MPCs は一節あたり 2~4 個の細胞であることが知られている (Ochi and Westerfield, 2009)。本研究では、受精後二日目に MPCs を観察した結果、コントロールモルファントは  $4.1 \pm 0.15$  個であったが、*mysterin- $\alpha$* モルファントは  $8.6 \pm 0.29$  個と約二倍の増加を見せた (Fig. 24)。MPCs の細胞数は、*shh* シグナルの分泌量によって調節されており、分泌過多になると異常増殖することが知られている (Du et al., 1997)。これまでの結果から、*mysterin- $\alpha$* は遅筋の発生過程のうち、MPCs の分化にのみ寄与するので、*adaxial cell* から *shh* を受け取り MPCs に分化する間の過程に影響していると考えられる (Fig. 29、赤矢印)。つまり、*mysterin- $\alpha$* のノックダウンは *shh* シグナルの亢進を示唆し、脊索からの *shh* 分泌が過剰か、MPCs の *shh* シグナル伝達経路が亢進している可能性が考えられる。*shh* のシグナル伝達機構として、*smoothed* 受容体と、*smoothed* 受容体と直接結合し、*shh* シグナルの伝達を抑える *patched* 受容体が知られている (Ingham and McMahon, 2001)。つまり、ポジティブ受容体 (*smoothed*) とネガティブ受容体 (*patched*) であるが、*mysterin- $\alpha$* のノックダウンによって *smoothed* の機能亢進や *patched* の機能衰退が起こっていれば、下流のシグナルの活性化につながり MPCs の異常分化を誘導する可能性がある (Ochi and Westerfield, 2007)。

*Lateral cell* は、*adaxial cell* とは独立し、一般的に *shh* シグナル非依存的な経路で遅筋より下層に速筋繊維を形成すると知られている。速筋は、受精後約 10 時間後から 19 時間後の間に、*lateral cell* において速筋特異的なミオシンの発現が確認され、受精後 24 時間後には分化が完了している (Blagden et al., 1997)。この発生過程には、筋分化制御遺伝子 *myoD*、*myf5*、*myogenin*、線維芽細胞増殖因子 *fgf8* などの関与が報告されているが、詳しい機構は分かっていない (Bessarab et al., 2008; Coutelle et al., 2001; Groves et al., 2005; Hinitz et al., 2009; Roehl and Nüsslein-Volhard, 2001)。また、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンは、筋原繊維の減少を引き起こすが、筋破壊でないと考えられる。よって、*lateral cell* から速筋の発生過程に関与している可能性が高く、速筋細胞の増殖、融合、筋原繊維の集合等制御していると考えられる (Fig. 29、赤矢印)。



**Figure 29** 筋肉の発生過程における *mysterin* の関与

筋肉の発生過程モデルである。筋肉には、遅筋と速筋が存在し、遅筋には亜集団として MPCs が知られている。受精後 6 時間後 (6 hpf) の Shield stage では、速筋、遅筋の前駆細胞は区別されないが、約受精後 10 時間後 (10 hpf) から遅筋の前駆細胞 (adaxial cell) と速筋の前駆細胞 (lateral cell) に分かれ、分化が始まる。発生が進むにつれ、adaxial cell の一部は脊索にとどまりソニックヘッジホッグシグナル (shh) の影響を強く受け MPCs に分化し、その他は皮膚の真下まで動き単層の遅筋繊維を形成する。Lateral cell は、遅筋の内側に速筋繊維を形成する。*mysterin-α* のノックダウンでは、速筋の形態異常、MPCs の異常増加を引き起こし、遅筋には影響を与えないので、これらの発生過程のうち、赤矢印の部分の発生に関与している可能性がある。

先行研究から、マウスの速筋形態を制御する因子として *six1* と *six4* が知られており、これらのダブルノックアウトマウスでは、速筋が完全に欠落していることが知られている (Richard et al., 2011)。ゼブラフィッシュにおいて、*six1* は体節形成期 (12, 15 somite stage) において速筋の前駆細胞に発現し、*six1* のモルファントでは遅筋形態には影響しないが、速筋繊維は波立つような異常形態を示した (Nord et al., 2013)。先行研究から、ゼブラフィッシュの *six1* は、BMP シグナル依存的に筋芽細胞を増殖させ、速筋の形態を制御していることが報告されている (Bessarab et al., 2008; Devoto et al., 2006; Hollway et al., 2007; Nord et al., 2013)。Six1 のモルファントで見られた異常速筋繊維は、*mysterin- $\alpha$* モルファントの結果と類似していた。また、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンによる速筋の筋原繊維の減少と *six1* による筋芽細胞の増殖も関連することから、*six1* のカスケードと関わっている可能性がある。

*mysterin- $\alpha$* のノックダウンは運動神経の投射異常を引き起こすが、速筋特異的に *mysterin-3 $\times$ FLAG* を発現させると異常が回復することから、投射異常は速筋の二次的影響であると考えられる (Fig. 13, 20)。

脊髄に存在する運動神経の *Cap*、*Mip*、*Rop* は受精後 9 から 10 時間で軸索の伸長を始め、受精後 20-24 時間には筋肉とシナプスのアセチルコリン受容体 (AChR) のクラスターを介して接合し、神経筋接合部を形成する (Panzer et al., 2005)。 *mysterin- $\alpha$*  のモルファントでは、運動神経の体節間伸長を抑制するが、筋肉との神経筋接合部には影響を与えなかった (Fig. 13c)。 *Cap*、*Mip*、*Rop* は、脊索の近くでは同じ部分 (choice point) を通り、MPCs と接合することが知られている (Birely et al., 2005; Panzer et al., 2005)。MPCs の数が多いと運動神経が choice point で凝集することから (Sainath and Granato, 2013)、 *mysterin- $\alpha$*  のノックダウンによる MPCs の異常増加は、運動神経を choice point でスタックさせ、体節間伸長を抑制している可能性がある。 *mysterin- $\alpha$*  モルファントで見られた運動障害は、 *mysterin-3 $\times$ FLAG* によって緩和するが、完全な回復ではなかった (Fig. 21)。また、体節間神経の伸長不全も完全には回復しなかったことから、MPCs の異常増加と神経投射が関係している可能性もある。

加えて、 *mysterin- $\alpha$* モルファントでは、脊髄における *Znp-1* シグナルの増強が見られたが、速筋特異的な *mysterin-3 $\times$ FLAG* の発現では回復しなかった (Fig. 20)。脊髄には、受精後 48 時間後に消失する一次感覚ニューロンである Rohn-Beard ニューロンが存在するため、野生型では *Znp-1* 感受的なシグナルが観察されなかったと考えられる (Bernhardt et al., 1990; Tanaka et al., 2012)。しかし、 *mysterin- $\alpha$* モルファントでは、受精後二日目であっても、 *Znp-1* 感受的な脊髄のシグナルが観察された。形態観察

結果も踏まえると、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンによる発生遅延が、一次感覚神経のアポトーシスを遅延させたことで、脊髄に *Znp-1* 感受的なシグナルが観察された可能性がある。一方で、発生遅延などが関係なく、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンによって一次感覚神経のリアレンジが阻害された可能性もある。どちらの可能性もあるが、神経のリアレンジもしくは発生遅延に、速筋特異的な *mysterin-3 $\times$ FLAG* の発現は影響しないことが分かった (Fig. 20)。

*mysterin- $\alpha$* のモルファントでは、体節間血管のガイダンス異常や目の血管の異常分岐を引き起こす (Fig. 22) (Liu et al., 2011)。

血管新生は、背側大動脈や後主静脈を形成する脈管形成 (vasculogenesis) と、体節間血管をつくる血管新生 (angiogenesis) に分けられ (Adams and Alitalo, 2007; Risau and Flamme, 1995)、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンは脈管形成には影響しなかったため、血管新生への関与が考えられる (Fig. 22) (Liu et al., 2011)。

血管新生は、背側大動脈から Tip 細胞が出芽して始まり、Tip 細胞を積極的に遊走させる VEGF 経路、後方の Stalk 細胞が勝手に分岐しないように阻害する Dll4-Notch 経路、体節への侵入を抑える Sema-Plexin 経路に分けられる (Herbert and Stainier, 2011; Kume, 2009)。先行研究から、反発因子である Sema-Plexin 経路の異常では、Tip 細胞の体節への侵入を許し、異常分岐が起こることが知られているため (Weinstein, 2005)、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンによる分岐と関連している可能性がある。本研究において、受精後二日目の *mysterin- $\alpha$* モルファントでは、体節間血管が dorsal longitudinal anastomotic vessels と結合していない不完全なものが見られた。VEGF 経路が阻害されると、Tip 細胞の遊走不全によって体節間血管が形成されなくなることから (Goishi and Klagsbrun, 2004)、VEGF-VEGFR への関与も示唆された。受精後一日目のモルファントでは、Tip 細胞がフィロポディアを広げリガンドを探しているように観察されたことも関係するかもしれない。

速筋特異的な *mysterin-3 $\times$ FLAG* は、*mysterin- $\alpha$* モルファントによる血管のガイダンス異常は回復しなかった (Fig. 22)。ゼブラフィッシュでは、脊索から分泌される *shh* が、体節からの VEGF の分泌を促すことが知られている (Lawson et al., 2002)。つまり、*mysterin- $\alpha$* ノックダウンで生じた血管のガイダンス異常は、体節からの VEGF とは関係していないと予想され、*shh* の分泌、Tip 細胞、Stalk 細胞における受容体の発現が影響していると考えられる。

受精後 36 時間から 72 時間の間、後主静脈から脊索に沿った parachordal vessel (PAV) の形成が始まり、リンパ管となる (Geudens et al., 2010; Isogai et al., 2003)。受精後

二日目のコントロールモルファントでは部分的に観察されるが、**mysterin- $\alpha$** モルファントではほとんど観察されなかった (fig. 22)。PAV の形成は、MPCs の数に制御されており、MPCs から分泌される **Netrin** の関与が報告されている (Lim et al., 2011)。**mysterin- $\alpha$** モルファントにおける MPCs の異常増加が、PAV のガイダンスや形成に関与している可能性があり、今後検討が必要である。

**mysterin** は、初めて同定された AAA+ ATP アーゼとユビキチンリガーゼ活性を持つ因子であり、両ドメインは **mysterin** の生理活性に重要であることが分かった (Fig. 27) AAA+ ATP アーゼは膜融合、輸送、タンパク質分解等のいずれかに関与する酵素で、ユビキチンリガーゼは基質にユビキチンを付加し、分解や活性調節を行う酵素である。小胞体関連分解 (ERAD) では、ユビキチンリガーゼと ATP アーゼが協同し、小胞体内の不良タンパク質をユビキチン化、ATP アーゼ依存的な細胞質への逆行輸送を行い、分解する経路が知られている (Fig. 6)。これまでの結果から、**mysterin** は **shh** や **VEGF**、**semaphorin** のシグナル伝達に関与している可能性があり、これらの膜型受容体を引き抜き分解し、プロテアソームへの分解を制御している可能性を考えている (Fig. 6)。加えて、ATP アーゼとユビキチンリガーゼはエンドサイトーシスを介したリソソーム分解経路で働くことも知られており、上皮成長因子受容体 (EGFR) や **VEGFR2** は、ユビキチン化された後、エンドサイトーシスの系で分解される (Bruns et al., 2009; Dobrowolski and De Robertis, 2012; Lipkowitz, 2003; Olsson et al., 2006)。以上から、**mysterin** はエンドサイトーシスを介した経路に関与する可能性もあり、二つのモデルを想定した (Fig. 6)。

もやもや病は、ウイルス動脈輪の血管平滑筋細胞が異常増殖するものであり、毛細血管が煙のような形態を示す疾患である。稀に、精神疾患やてんかんを併発するが、関連は分かっておらず、筋肉への異常も報告されていない。

もやもや病から単離された **mysterin** であるが、**mysterin- $\alpha$** モルファントでは、体節間血管の異常ガイダンス、速筋形態の異常、運動神経の投射不全を示したが、もやもや病の症例とは類似していなかった。しかし注目すべき点は、もやもや病の発症率は、**mysterin** の C 末端のアルギニンがリジン (R4810K) に変化したことが原因である、ということである。

これまで、R4810K 変異体のユビキチン化活性や ATP アーゼ活性、細胞内局在や安定性は、野生型の **mysterin** と比べても特に変化は見られなかった。つまり、R4810K 変異が **mysterin** の機能を完全に失活させたとは考えにくい。よって、R4810K 変異は、

mysterin の機能を不活性化するものではなく、結合タンパク質や mysterin が受ける活性修飾などが変化するものであると考えられる。例えば、ユビキチンは基質のリジンに付加されることから、R4810K 変異ではユビキチン化サイトが一つ増えたことになる。

つまり、mysterin- $\alpha$ モルファントから得られた結果は、mysterin の本来の機能に迫るものであり、R4810K 変異体の機能とは異なる可能性がある。

また、もやもや病は、R4810K 変異をヘテロに持っても発症することが知られているため、これまでの仮説が正しければ、R4810K 変異体が発現すると、野生型に対しドミナントネガティブ効果を示す可能性があった。しかし、速筋特異的に R4810K 型 mysterin を過剰発現したところ、速筋形態には異常が観察されなかった。よって、速筋においては R4810K 変異体は野生型の mysterin に対して阻害効果を持たないことが示唆された (Fig. 28)。今後 R4810K 変異体の発現によって、ゼブラフィッシュの血管網に異常が生じる可能性があるため、引き続き実験を進める必要が有る。

これまで、mysterin のノックアウトマウスは、体が少し小さいといった表現型はあるが、目立った表現型は観察されなかった (Ito et al., 2015; Kobayashi et al., 2013; Sonobe et al., 2014a; Sonobe et al., 2014b)。そのため、表現型が明らかなゼブラフィッシュを用いることは、mysterin の研究を進めるには有意義であり、mysterin をターゲットとした薬剤スクリーニングも可能となる。

ゼブラフィッシュを用いて mysterin の研究を行うことは、将来性を期待できるものである。加えて、組織を選択して mysterin を発現させることも可能で、今後は mysterin の関与する組織を決定し、シグナル因子の発現量など観察しながら、分子に還元したいと考える。

## 7、文献目録

本論文の主部分は、以下の論文に公表した。

Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase,  
mysterin/RNF213

Yuri Kotani, Daisuke Morito, Satoru Yamazaki, Kazutoyo Ogino, Koichi Kawakami,  
Seiji Takashima, Hiromi Hirata, Kazuhiro Nagata

Scientific Reports, 04 November 2015, 16161, On line

## 8、謝辞

本研究の機会を与えてくださった、京都産業大学大学院工学研究科、永田和宏教授に心より御礼申し上げます。細胞生物学の研究室であるにも関わらず、ゼブラフィッシュを用いた発生の研究を行わせて頂きました。おかげさまで、幅広い視野で研究を行うことができ、自由に楽しく研究を行うことが出来ました。修士の頃から、多くの助言や励ましを頂き、何度も助けて頂いたことに、深く感謝申し上げます。

同分野の森戸大介博士には、本研究を続けるにあたり、数多くの助言、討論、激励を頂き、深く感謝しております。修士の頃から、ほぼ毎日討論して頂き、研究を進めて行く上で、大切なものでした。実験結果の考察の仕方、コントロールの取り方、文章の書き方や発表の仕方など、研究者としての基礎を常に教えていただきました。多大なご迷惑もおかけしましたが、深く感謝申し上げます。

青山学院大学、理工学部、化学・生命科学科、平田普三教授とは、ゼブラフィッシュの解析を通して共同研究を行わせて頂きました。発生のことが分かっていない私に対し、丁寧に正確に指導して下さり、発生の面白さを教えていただきました。平田先生の研究に対する積極的で真摯な姿勢は、研究者としてとても勉強になりました。本研究にあたり、多大なご協力を頂き、深く感謝申し上げます。

潮田亮助教は、研究内容が違っても、常に真剣に討論して頂き、大変感謝しております。論文投稿時には、経験者として何度も激励して下さりました。私が修士のころから、ERセミナーを取りまとめくださり、論文の読み方や考え方を教えて頂きました。何度もご迷惑おかけいたしましたでしたが、話しやすい先輩として接して下さり、深く感謝申し上げます。

研究室の先輩である山本洋平博士、伊藤進也研究員には、討論の仕方や考え方など、多くの議論をして頂き、感謝しております。真剣に物事に取り組まれる姿や、博識さに大変勉強させていただきました。後輩諸氏の、積極的に議論を行う様子や実験に真面目に取り組む様子から、刺激を与えていただきました。

研究室の秘書の石田さんからは、研究や進路の相談事など何度もさせていただき、技官の木曾さんや福田さんからは、丁寧な機器点検や、消耗品の発注など、精神的にも実験しやすい研究室の環境作りをして頂きました。国立遺伝学研究所の、守本さん、宮澤さん、大貫さんにも、実験的、精神的に何度も助けていただきました。

簡単ではなりますが、最後に皆様に深く感謝御礼申し上げたいと思います。

## 9、参考文献

Adams, R.H., Alitalo, K., 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 464-478.

Asakawa, K., Suster, M.L., Mizusawa, K., Nagayoshi, S., Kotani, T., Urasaki, A., Kishimoto, Y., Hibi, M., Kawakami, K., 2008. Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1255-1260.

Berndsen, C.E., Wolberger, C., 2014. New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol* 21, 301-307.

Bernhardt, R.R., Chitnis, A.B., Lindamer, L., Kuwada, J.Y., 1990. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 302, 603-616.

Bessarab, D.A., Chong, S.W., Srinivas, B.P., Korzh, V., 2008. Six1a is required for the onset of fast muscle differentiation in zebrafish. *Dev Biol* 323, 216-228.

Birely, J., Schneider, V.A., Santana, E., Dosch, R., Wagner, D.S., Mullins, M.C., Granato, M., 2005. Genetic screens for genes controlling motor nerve-muscle development and interactions. *Dev Biol* 280, 162-176.

Blagden, C.S., Currie, P.D., Ingham, P.W., Hughes, S.M., 1997. Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes Dev* 11, 2163-2175.

Bruns, A.F., Bao, L., Walker, J.H., Ponnambalam, S., 2009. VEGF-A-stimulated signalling in endothelial cells via a dual receptor tyrosine kinase system is dependent on co-ordinated trafficking and proteolysis. *Biochem Soc Trans* 37, 1193-1197.

Burke, G.M., Burke, A.M., Sherma, A.K., Hurley, M.C., Batjer, H.H., Bendok, B.R., 2009. Moyamoya disease: a summary. *Neurosurg Focus* 26, E11.

Cantu, J.A., Flowers, G.P., Topczewski, J., 2013. Notum homolog plays a novel role in primary motor innervation. *J Neurosci* 33, 2177-2187.

Coutelle, O., Blagden, C.S., Hampson, R., Halai, C., Rigby, P.W., Hughes, S.M., 2001. Hedgehog signalling is required for maintenance of *myf5* and *myoD* expression and timely terminal differentiation in zebrafish adaxial myogenesis. *Dev Biol* 236, 136-150.

de Bie, P., Ciechanover, A., 2011. Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death Differ* 18, 1393-1402.

Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A., 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434.

Devoto, S.H., Melançon, E., Eisen, J.S., Westerfield, M., 1996. Identification of separate slow and fast muscle precursor cells in vivo, prior to somite formation. *Development* 122, 3371-3380.

Devoto, S.H., Stoiber, W., Hammond, C.L., Steinbacher, P., Haslett, J.R., Barresi, M.J., Patterson, S.E., Adiarte, E.G., Hughes, S.M., 2006. Generality of vertebrate developmental patterns: evidence for a dermomyotome in fish. *Evol Dev* 8, 101-110.

Dobrowolski, R., De Robertis, E.M., 2012. Endocytic control of growth factor signalling: multivesicular bodies as signalling organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 53-60.

Du, S.J., Devoto, S.H., Westerfield, M., Moon, R.T., 1997. Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and

TGF-beta gene families. *J Cell Biol* 139, 145-156.

Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R., 1997. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J* 16, 5847-5854.

Geudens, I., Herpers, R., Hermans, K., Segura, I., Ruiz de Almodovar, C., Bussmann, J., De Smet, F., Vandeveld, W., Hogan, B.M., Siekmann, A., Claes, F., Moore, J.C., Pistocchi, A.S., Loges, S., Mazzone, M., Mariggi, G., Bruyère, F., Cotelli, F., Kerjaschki, D., Noël, A., Foidart, J.M., Gerhardt, H., Ny, A., Langenberg, T., Lawson, N.D., Duckers, H.J., Schulte-Merker, S., Carmeliet, P., Dewerchin, M., 2010. Role of delta-like-4/Notch in the formation and wiring of the lymphatic network in zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1695-1702.

Glasgow, E., Tomarev, S.I., 1998. Restricted expression of the homeobox gene *prox 1* in developing zebrafish. *Mech Dev* 76, 175-178.

Goishi, K., Klagsbrun, M., 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptors in embryonic zebrafish blood vessel development. *Curr Top Dev Biol* 62, 127-152.

Granato, M., van Eeden, F.J., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., Nüsslein-Volhard, C., 1996. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development* 123, 399-413.

Groves, J.A., Hammond, C.L., Hughes, S.M., 2005. *Fgf8* drives myogenic progression of a novel lateral fast muscle fibre population in zebrafish. *Development* 132, 4211-4222.

Hanson, P.I., Whiteheart, S.W., 2005. AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 519-529.

Hardy, R.E., Obianyo, I., Shu, H.S., Adair, L., 1991. Unilateral moyamoya disease, intracranial aneurysm, and a pituitary adenoma: a case report. *J Natl Med Assoc* 83, 827-830.

Hatta, K., Bremiller, R., Westerfield, M., Kimmel, C.B., 1991. Diversity of expression of engrailed-like antigens in zebrafish. *Development* 112, 821-832.

Herbert, S.P., Stainier, D.Y., 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 551-564.

Himits, Y., Osborn, D.P., Hughes, S.M., 2009. Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic, cranial and fin muscle fibre populations. *Development* 136, 403-414.

Hirsinger, E., Stellabotte, F., Devoto, S.H., Westerfield, M., 2004. Hedgehog signaling is required for commitment but not initial induction of slow muscle precursors. *Dev Biol* 275, 143-157.

Hollway, G.E., Bryson-Richardson, R.J., Berger, S., Cole, N.J., Hall, T.E., Currie, P.D., 2007. Whole-somite rotation generates muscle progenitor cell compartments in the developing zebrafish embryo. *Dev Cell* 12, 207-219.

Ingham, P.W., McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15, 3059-3087.

Isogai, S., Lawson, N.D., Torrealday, S., Horiguchi, M., Weinstein, B.M., 2003. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development* 130, 5281-5290.

Ito, A., Fujimura, M., Niizuma, K., Kanoke, A., Sakata, H., Morita-Fujimura, Y., Kikuchi, A., Kure, S., Tominaga, T., 2015. Enhanced post-ischemic

angiogenesis in mice lacking RNF213; a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res* 1594, 310-320.

Jarosch, E., Geiss-Friedlander, R., Meusser, B., Walter, J., Sommer, T., 2002. Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect. *Traffic* 3, 530-536.

Kim, J., Oh, W.J., Gaiano, N., Yoshida, Y., Gu, C., 2011. Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes Dev* 25, 1399-1411.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.

Kobayashi, H., Yamazaki, S., Takashima, S., Liu, W., Okuda, H., Yan, J., Fujii, Y., Hitomi, T., Harada, K.H., Habu, T., Koizumi, A., 2013. Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 432, 519-525.

Kok, F.O., Shin, M., Ni, C.W., Gupta, A., Grosse, A.S., van Impel, A., Kirchmaier, B.C., Peterson-Maduro, J., Kourkoulis, G., Male, I., DeSantis, D.F., Sheppard-Tindell, S., Ebarasi, L., Betsholtz, C., Schulte-Merker, S., Wolfe, S.A., Lawson, N.D., 2015. Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish. *Dev Cell* 32, 97-108.

Kume, T., 2009. Novel insights into the differential functions of Notch ligands in vascular formation. *J Angiogenes Res* 1, 8.

Lawson, N.D., Vogel, A.M., Weinstein, B.M., 2002. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* 3, 127-136.

Lawson, N.D., Weinstein, B.M., 2002. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 248, 307-318.

Lewis, K.E., Eisen, J.S., 2003. From cells to circuits: development of the zebrafish spinal cord. *Prog Neurobiol* 69, 419-449.

Lim, A.H., Suli, A., Yaniv, K., Weinstein, B., Li, D.Y., Chien, C.B., 2011. Motoneurons are essential for vascular pathfinding. *Development* 138, 3847-3857.

Lin, Y.Y., 2012. Muscle diseases in the zebrafish. *Neuromuscul Disord* 22, 673-684.

Lipkowitz, S., 2003. The role of the ubiquitination-proteasome pathway in breast cancer: ubiquitin mediated degradation of growth factor receptors in the pathogenesis and treatment of cancer. *Breast Cancer Res* 5, 8-15.

Liu, W., Morito, D., Takashima, S., Mineharu, Y., Kobayashi, H., Hitomi, T., Hashikata, H., Matsuura, N., Yamazaki, S., Toyoda, A., Kikuta, K., Takagi, Y., Harada, K.H., Fujiyama, A., Herzig, R., Krschek, B., Zou, L., Kim, J.E., Kitakaze, M., Miyamoto, S., Nagata, K., Hashimoto, N., Koizumi, A., 2011. Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One* 6, e22542.

Melançon, E., Liu, D.W., Westerfield, M., Eisen, J.S., 1997. Pathfinding by identified zebrafish motoneurons in the absence of muscle pioneers. *J Neurosci* 17, 7796-7804.

Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T., 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7, 766-772.

Morito, D., Nishikawa, K., Hoseki, J., Kitamura, A., Kotani, Y., Kiso, K., Kinjo, M., Fujiyoshi, Y., Nagata, K., 2014. Moyamoya disease-associated

protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Sci Rep* 4, 4442.

Myers, P.Z., Eisen, J.S., Westerfield, M., 1986. Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish. *J Neurosci* 6, 2278-2289.

Naganawa, Y., Hirata, H., 2011. Developmental transition of touch response from slow muscle-mediated coilings to fast muscle-mediated burst swimming in zebrafish. *Dev Biol* 355, 194-204.

Nord, H., Nygård Skalman, L., von Hofsten, J., 2013. Six1 regulates proliferation of Pax7-positive muscle progenitors in zebrafish. *J Cell Sci* 126, 1868-1880.

Ochi, H., Westerfield, M., 2007. Signaling networks that regulate muscle development: lessons from zebrafish. *Dev Growth Differ* 49, 1-11.

Ochi, H., Westerfield, M., 2009. Lbx2 regulates formation of myofibrils. *BMC Dev Biol* 9, 13.

Ogura, T., Wilkinson, A.J., 2001. AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 6, 575-597.

Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L., 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 359-371.

Panzer, J.A., Gibbs, S.M., Dosch, R., Wagner, D., Mullins, M.C., Granato, M., Balice-Gordon, R.J., 2005. Neuromuscular synaptogenesis in wild-type and mutant zebrafish. *Dev Biol* 285, 340-357.

Richard, A.F., Demignon, J., Sakakibara, I., Pujol, J., Favier, M., Strohlic, L., Le Grand, F., Sgarioto, N., Guerneq, A., Schmitt, A., Cagnard, N., Huang,

R., Legay, C., Guillet-Deniau, I., Maire, P., 2011. Genesis of muscle fiber-type diversity during mouse embryogenesis relies on Six1 and Six4 gene expression. *Dev Biol* 359, 303-320.

Risau, W., Flamme, I., 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 73-91.

Roehl, H., Nüsslein-Volhard, C., 2001. Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol* 11, 503-507.

Rossi, A., Kontarakis, Z., Gerri, C., Nolte, H., Hölper, S., Krüger, M., Stainier, D.Y., 2015. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524, 230-233.

Sainath, R., Granato, M., 2013. Plexin A3 and turnout regulate motor axonal branch morphogenesis in zebrafish. *PLoS One* 8, e54071.

Sonobe, S., Fujimura, M., Niizuma, K., Fujimura, T., Furudate, S., Nishijima, Y., Kure, S., Tominaga, T., 2014a. Increased vascular MMP-9 in mice lacking RNF213: moyamoya disease susceptibility gene. *Neuroreport* 25, 1442-1446.

Sonobe, S., Fujimura, M., Niizuma, K., Nishijima, Y., Ito, A., Shimizu, H., Kikuchi, A., Arai-Ichinoi, N., Kure, S., Tominaga, T., 2014b. Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-T magnetic resonance angiography and histopathological analysis in mice lacking RNF213: a susceptibility gene for moyamoya disease. *Brain Res* 1552, 64-71.

Stickney, H.L., Barresi, M.J., Devoto, S.H., 2000. Somite development in zebrafish. *Dev Dyn* 219, 287-303.

Suzuki, J., Kodama, N., 1971. Cerebrovascular "Moyamoya" disease. 2. Collateral routes to forebrain via ethmoid sinus and superior nasal meatus. *Angiology* 22, 223-236.

Suzuki, J., Takaku, A., 1969. Cerebrovascular "moyamoya" disease. Disease showing abnormal net-like vessels in base of brain. *Arch Neurol* 20, 288-299.

Tanaka, H., Morimura, R., Ohshima, T., 2012. Dpysl2 (CRMP2) and Dpysl3 (CRMP4) phosphorylation by Cdk5 and DYRK2 is required for proper positioning of Rohon-Beard neurons and neural crest cells during neurulation in zebrafish. *Dev Biol* 370, 223-236.

Vembar, S.S., Brodsky, J.L., 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 944-957.

Weinstein, B.M., 2005. Vessels and nerves: marching to the same tune. *Cell* 120, 299-302.

Weissman, A.M., 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.

Welchman, R.L., Gordon, C., Mayer, R.J., 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 599-609.

White, S.R., Lauring, B., 2007. AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* 8, 1657-1667.

Ye, Y., Meyer, H.H., Rapoport, T.A., 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414, 652-656.

Zhang, L., Xu, M., Scotti, E., Chen, Z.J., Tontonoz, P., 2013. Both K63 and K48 ubiquitin linkages signal lysosomal degradation of the LDL receptor. *J Lipid Res* 54, 1410-1420.

Zygmunt, T., Gay, C.M., Blondelle, J., Singh, M.K., Flaherty, K.M., Means, P.C., Herwig, L., Krudewig, A., Belting, H.G., Affolter, M., Epstein, J.A.,

Torres-Vázquez, J., 2011. Semaphorin-PlexinD1 signaling limits angiogenic potential via the VEGF decoy receptor sFlt1. *Dev Cell* 21, 301-314.