

モヤモヤ病遺伝子の病態機能解明

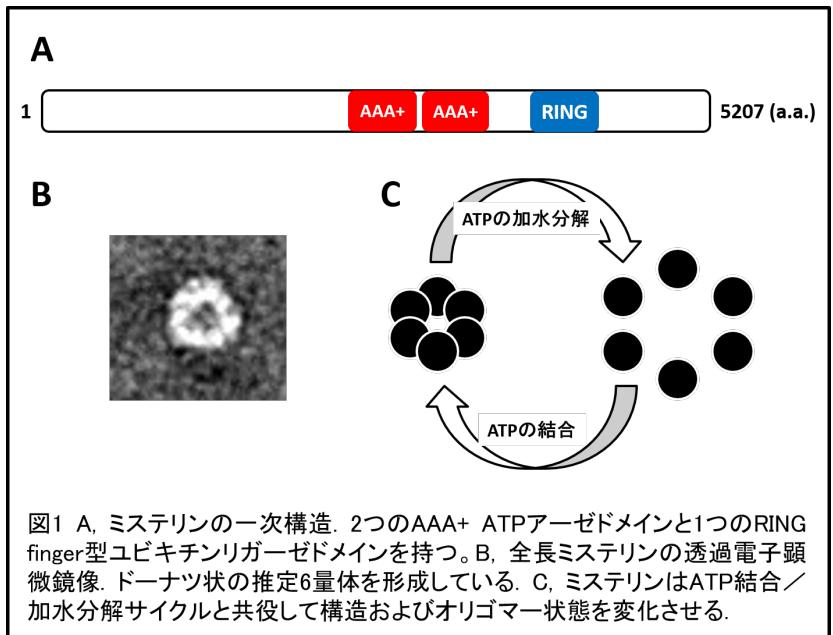
昭和大学医学部生化学講座

森戸 大介

1. はじめに

もやもや病は日本を含む東アジア地域の小児に多い重篤な脳血管疾患であり、我が国においては難病指定されている。脳底の限局された領域（内頸動脈終末部周辺）において動脈が進行性に狭窄、閉塞することで脳血流が障害され、脱力など一過性の虚血発作に始まりやがて脳梗塞またそれによる精神発達遅延などを生じる。慢性的な低酸素状態により血管新生が誘導され血流は一定程度回復するが、この新生毛細血管網（もやもや血管）がしばしば破れ脳出血によりさらに症状を増悪させる。病因、病変形成メカニズムなどほとんど不明であり根治療法も確立されていない。対症療法として開頭をともなう頭蓋内外血管バイパス形成が行われるが再発により複数回の手術が必要となる場合も多く、患者の負担はきわめて重い。東アジアでの高い有病率や一部に家族例を認めることから民族性／家族性遺伝要因の探索が行われ、17 番染色体長腕末端領域に責任変異が同定された。この変異は新規遺伝子のミスセンス変異であったため研究代表者の手により当該遺伝子の初めての分子クローニングを行い、ミステリンと命名した（別名 RNF213; 研究代表者ら, 特許 5854423, PLOS ONE, 2011）。

ミステリンは原索動物および脊椎動物に保存され、ヒト、マウスにおける発現はユビキタスである。ミステリン遺伝子には推定 591 kDa の巨大な ATP アーゼ／ユビキチンリガーゼがコードされており、ATP アーゼドメインを介して推定 3.5 MDa の巨大なドーナツ状複合体を形成し、ATP 加水分解にともなって構造を変化させるが（図 1, 研究代表者ら, Sci Rep, 2014, 2015, 2017）、このような酵素活性を利用してどのような生理機能および病態機能を発揮するのか明らかでなかった。



2. 結果と考察

ミステリンを HeLa 細胞などに過剰発現すると、細胞播種後、培地が貧栄養化する前の比較的早い時間帯に直径 1 μm 程度の粒子状構造を無数に形成するのが観察される。デコンボリューション処理や高倍率対物レンズを用いた共焦点レーザー顕微鏡観察によりこれらの構造は中空であることがわかった。すなわちミステリンは何らかの小胞、粒子状構造を取り囲むように局在することが示唆された。そこでリソソーム、エンドソーム、ペルオキシソームあるいはストレス顆粒などの小胞、粒子状構造との共局在を検討したところ、思いがけないことにミステリンは細胞内の脂肪貯蔵サイトである脂肪滴に表在していた（図 2A）。脂肪滴はほとんどすべての組織・細胞において形成される細胞内構造で中性脂肪、コレステロールエステル、脂溶性ビ

タミンなどの貯蔵に働く。小胞体膜上で合成された中性脂肪やコレステロールエステルは高度に水不溶性であり、小胞体脂質二重膜の疎水面に蓄積する。蓄積が少量である間はレンズ状の形態をとり蓄積が増大するに従って安定な球状構造に移行し、やがて小胞体膜から切り離されて細胞質ゾル中に放出される。したがって脂肪滴の表面は小胞体膜由来の脂質一重膜に覆われているが、その表面に脂肪合成酵素、分解酵素、制御因子などが結合してインスリン、カテコールアミンなどの刺激や細胞の貧、富栄養状態に応じて、活発に脂質の出し入れ（分解と合成）を行う。分解されて生じた代謝物（脂肪酸など）はミトコンドリアでの酸化的リン酸化に用いられる他リン脂質を含む各種脂質関連分子の合成ソースとしても重要だと考えられている。

HeLa 細胞などにおいてミスチリンを過剰発現したとき脂肪滴の数、量は著明に増大し、逆にミスチリンの発現抑制、ノックアウトによって減少する。このことからミスチリンは脂肪合成を促進するか、あるいは脂肪分解を抑制することが考えられた。脂肪合成の阻害剤（トリアクシン C）および脂肪分解の阻害剤（オーリスタット）を用いた実験から、ミスチリンは脂肪合成経路ではなく脂肪分解経路を調節することで脂肪滴量の増大に働くことが示唆された。脂肪滴の主成分である中性脂肪（トリグリセリド）は3種のリパーゼ ATGL、HSL、MGL により段階的に分解されるが、このうちトリグリセリドから最初の脂肪酸鎖を切り離す ATGL が律速酵素であり最も影響が大きい。ATGL について検討したところミスチリンの過剰発現により脂肪滴上から ATGL が消失し、逆にミスチリンの発現抑制、ノックアウトにより ATGL の脂肪滴局在は著明に増大していた。すなわちミスチリンは ATGL を脂肪滴から排除することで脂肪分解を止め脂肪滴安定化に働く因子であった。

ミスチリンの脂肪滴局在には ATP アーゼサイクルが重要な役割を果たしていた。ミスチリン ATP アーゼドメイン内の ATP 結合モチーフおよび ATP 加水分解に必須の Mg^{2+} 結合モチーフに変異を導入することでそれぞれミスチリンを単量体優位および複合体優位の状態に固定することができる。いずれの変異導入によってもミスチリンは脂肪滴に局在しなくなり細胞質ゾルにおいて拡散性の局在を示すようになった。すなわちミスチリンの脂肪滴局在化には ATP アーゼサイクル（と同調した複合体形成サイクル）の進行が重要であると考えられた（図 2B）。ミスチリンと類似の複合体形成サイクルを示すカタニン、Vps4 はそれぞれ基質である微小管、ESCRT-III 複合体上に集合してそれら複合体の構成因子高次構造の解離に働く。脂肪滴におけるミスチリンの直接の標的は同定されていないが（ATGL との結合は検出されない）、脂肪滴タンパク質複合体の解離に働くことで間接的に ATGL を排除する可能性が考えられた。また興味深いことにユビキチンリガーゼ活性も重要であった。白人もやも病患者においてミスチリンユビキチンリガーゼドメイン内に疾患原因変異が複数同定されているが、これら変異によってミスチリンの脂肪滴局在は著明に障害され、凝集様の構造体を形成するようになった。多くの場合ユビキチンリガーゼは基質タンパク質をユビキチン化し、活性・安定性などの制御に関わるが、ミスチリンユビキチンリガーゼドメインの変異によりミスチリン自身の挙動が変化したことから、自己ユビキチン化によって自己の挙動を制御している可能性が考えられた。今後、自己を含むミスチリンユビキチン化活性基質の同定、またミスチリンの自己ユビキチン化の様式（鎖型、位置、機能など）の検証が重要である。

以上の結果について研究期間内に J Cell Biology 誌に発表すると共にミスチリンの病態機能についてさらに解析を進め、進捗があった（未発表）。

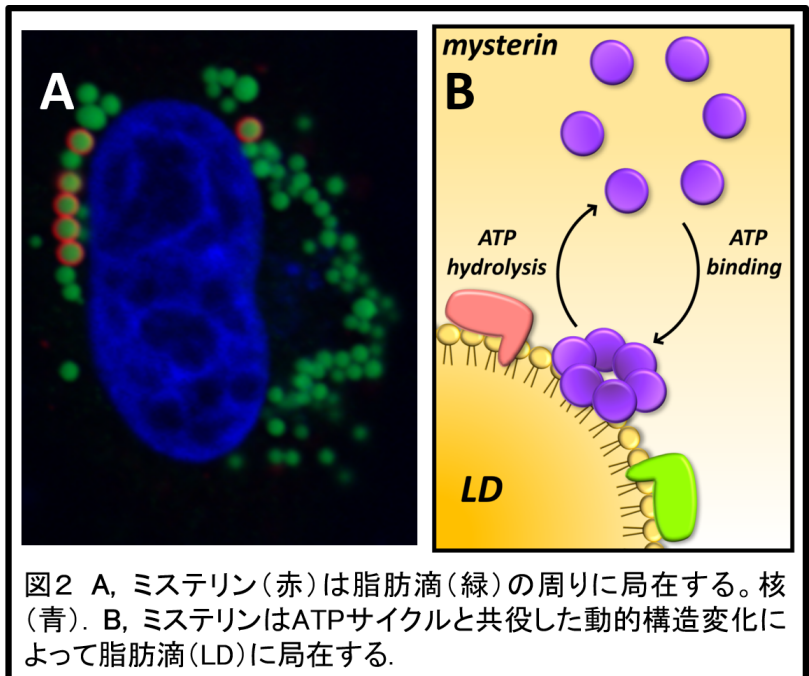


図2 A, ミスチリン（赤）は脂肪滴（緑）の周りに局在する。核（青）。B, ミスチリンはATPサイクルと共役した動的構造変化によって脂肪滴(LD)に局在する。

3. 発表文献

Sugihara M., Morito D. (corresponding), Ainuki S., Hirano Y., Ogino K., Kitamura A., Hirata H., Nagata K. (2019) The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin stabilizes cytoplasmic lipid droplets. J Cell Biol. 218(3):949-960.