







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第684号	氏名	Wulan Apridita Sebastian
審査委員会委員		主査氏名	井原 健二 
		副査氏名	石野 敏理 
		副査氏名	西田 欣広 
<p>論文題目</p> <p>Ankle2 deficiency-associated microcephaly and spermatogenesis defects in zebrafish are alleviated by heterozygous deletion of <i>vrk1</i> (Ankle2欠損によるゼブラフィッシュの小頭症および精子形成不全は、<i>vrk1</i>のヘテロ接合性喪失により改善される)</p> <p>論文掲載雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications</p> <p>論文要旨</p> <p>Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH) is a rare congenital disorder characterized by a below average brain volume at birth and is associated with neurodevelopmental disorders such as growth retardation and intellectual disability. Mutations in ANKLE2 have been identified as one of the causes of MCPH (MCPH16). ANKLE2 is a target molecule of the Zika virus NS4a protein that interferes with ANKLE2 function, resulting in severe microcephaly. ANKLE2 is essential for organizing the nuclear envelope and chromatin structures during the mitotic-end process via barrier to autointegration factor (BAF) dephosphorylation. However, the precise mechanism by which the loss of Ankle2 function causes the pathogenesis of microcephaly remains unclear. In this study, we generated ankle2-deficient zebrafish (<i>ankle2</i>^{-/-}) with a significant reduction in brain size compared with that of their control siblings. The <i>ankle2</i>^{-/-} brain showed a significant decrease in the number of radial glial progenitor cells, suggesting that Ankle2 deficiency in zebrafish causes neurogenesis defects. Furthermore, <i>ankle2</i>^{-/-} male zebrafish showed infertility owing to defects in spermatogenesis. Notably, microcephaly was overcome by <i>vrk1</i> morpholino knockdown or heterozygous deletion. In addition, spermatogenesis in <i>ankle2</i>^{-/-} zebrafish males was partially restored by the <i>vrk1</i> heterozygous deletion, although infertility was not resolved. These results indicate that Ankle2 and Vrk1 coordinate with each other for BAF phosphorylation to maintain normal mitosis during neurogenesis and spermatogenesis.</p> <p>本研究は、Ankle2欠損ゼブラフィッシュは小頭症および精子形成不全の表現型を呈し、それは <i>vrk1</i> のヘテロ接合性喪失により改善されることを証明し、ヒトの遺伝性小頭症やジカウイルス胎内感染による小頭症の病因解明と臨床応用に向けた重要な知見を提供した。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 (課)・論	第 684 号	氏名	Wulan Apridita Sebastian
審査委員会委員	主査氏名	井原 健二 	
	副査氏名	高野 敏理 	
	副査氏名	西田 欣太 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <p>(Introduction)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ANKLE2とVRK1の関連性について説明せよ。 2. ANKLE-2は非対称分裂より対称分裂に寄与しているのか。 3. BAFタンパク質は細胞分裂時に染色体の特異的な構造に結合しているのか。 4. ANKLE2の発現する細胞について説明せよ。 5. ANKLE2とラミンはどのように核膜内で関連しているのか。 <p>(Methods and results)</p> <ol style="list-style-type: none"> 6. ANKLE2欠損ゼブラフィッシュにおけるVRK1発現はどうか？免疫染色を行ったのか？ 7. Fig2に関して大脳の観察は臭球や延髄についての評価がないのは何故か。 8. 視蓋はそのサイズに有意差がないが何故か。 9. Fig1D and Iに関して、どのように増殖細胞数を算出したのか。 10. Morpholino oligo nucleotide の特異性(標的遺伝子以外の遺伝子のdeletion)に関する問題点をどのように克服したのか。 11. Vrk-1はリン酸化を介しBAFの活性を調節していることが知られているが、この実験でBAFのリン酸化状態は検討したのか。 12. Vrk1 inhibitorは評価したのか。 13. Vrk-1のpartial deletionにより、脳での細胞分裂の亢進に加え、分裂部位が異なっているように認められるが、どのように評価したのか？ 14. ANKLE2とvrk1のダブルKOで病理学的な評価を行っていたが、行動解析は行なわなかったのか。 <p>(Discussion)</p> <ol style="list-style-type: none"> 15. 既報では、Vrk-1のpartial knockdownにより脳の重量の減少やmotor dysfunctionが見られるとの報告がある。一方でこの論文では、Vrk-1のpartial knockdownによりANKLE-2欠損による表現型が一部rescueされるとある。この2つの論文の相違をどのように説明するのか。 16. ゼブラフィッシュを医学研究の実験材料として使用するメリット・デメリットについて述べよ。 17. Zikaウイルスの胎内感染で小頭症が起こる分子機構にANKLE2が関わるとするとvrk1の抑制など臨床応用に向けた研究についてアイデアがあれば述べてください。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 Wulan Apridita Sebastian

論 文 題 目

Ankle2 deficiency-associated microcephaly and spermatogenesis defects in zebrafish are alleviated by heterozygous deletion of *vrk1*

Ankle2 欠損によるゼブラフィッシュの小頭症および精子形成不全は、*vrk1* のヘテロ接合性喪失により改善される。

要 旨

Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH) is a rare congenital disorder characterized by a below average brain volume at birth and is associated with neurodevelopmental disorders such as growth retardation and intellectual disability. Mutations in *ANKLE2* have been identified as one of the causes of MCPH (MCPH16). *ANKLE2* is a target molecule of the Zika virus NS4a protein that interferes with *ANKLE2* function, resulting in severe microcephaly. *ANKLE2* is essential for organizing the nuclear envelope and chromatin structures during the mitotic-end process via barrier to autointegration factor (BAF) dephosphorylation. However, the precise mechanism by which the loss of *Ankle2* function causes the pathogenesis of microcephaly remains unclear. In this study, we generated *ankle2*-deficient zebrafish (*ankle2*^{-/-}) with a significant reduction in brain size compared with that of their control siblings. The

ankle2^{-/-} brain showed a significant decrease in the number of radial glial progenitor cells, suggesting that Ankle2 deficiency in zebrafish causes neurogenesis defects. Furthermore, *ankle2*^{-/-} male zebrafish showed infertility owing to defects in spermatogenesis. Notably, microcephaly was overcome by *vrk1* morpholino knockdown or heterozygous deletion. In addition, spermatogenesis in *ankle2*^{-/-} zebrafish males was partially restored by the *vrk1* heterozygous deletion, although infertility was not resolved. These results indicate that Ankle2 and Vrk1 coordinate with each other for BAF phosphorylation to maintain normal mitosis during neurogenesis and spermatogenesis.

Keywords: Ankle2, MCPH, microcephaly, zebrafish, Vrk1