

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591087

研究課題名（和文） ミオシン・スーパーファミリー異常症の病態解析

研究課題名（英文） Pathological analyses of myosin superfamily disorders

研究代表者

東原 正明（HIGASHIHARA MASAOKI）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：80165084

研究成果の概要：「ミオシン・スーパーファミリー」の一つである myosinVI のヒト血液細胞における発現と局在を種々の阻害剤を用いて解析した。単球・マクロファージ、巨核球及び形質細胞において myosinVI は Rab8 と complex をつくりゴルジ体から細胞膜やリソソームなどの細胞内小器官への輸送の関与が示唆された。MYH9 異常症の遺伝子解析で2つの新規の in-frame 欠失変異を発見した。また、3つ目の 20-kDa light chain isoform (MLC-2C) を同定した。MLC-2C 遺伝子導入により Jurkat 細胞は付着性および CD3 の発現強度・陽性率が増加した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：ミオシン、非古典的ミオシン、血液細胞、ミオシン軽鎖、MYH9 異常症、myosinVI

1. 研究開始当初の背景

ミオシンは、ATP の加水分解により得たエネルギーをアクチンとの相互作用によって運動に変換するモーター蛋白質である。近年、古典的ミオシン類似のミオシンが、現在までに 18 種発見され、「ミオシン・スーパーファ

ミリー」を構成する（古典的ミオシンは II 型ミオシンと呼称されている）（図 1 参照）。これらの非古典的ミオシン (unconventional myosin; 以下 UCM と略す) は、種を越えて、また、個体のほとんど全ての臓器に広く発現しており、II 型ミオシン様、細胞の形態変化、分

裂、食食、細胞内輸送、組織浸潤などに関与することが次第に明らかになっているが、各々その構造に違いが、細胞機能の特異性や多様性が発現されることが明らかとなった。

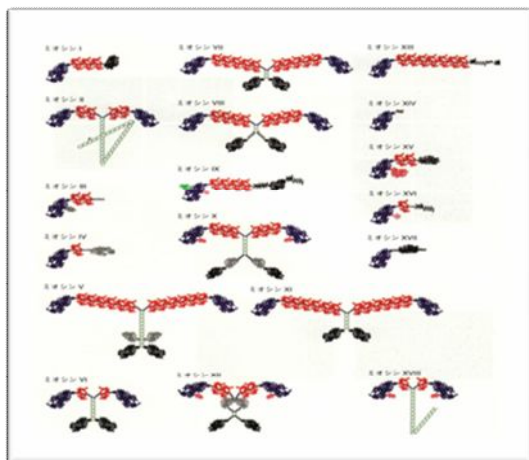


図1. ミオシン・スーパーファミリー
てきた。固型腫瘍の転移、浸潤とのかかわりが一部報告されるのみで、血液細胞においてUCMの分布や機能の解析研究はまだ始まったばかりであるが、アクチンやII型ミオシンと同様、UCMも血液細胞の機能に重要な蛋白あることは疑う余地はない。

我々は、既に8年前にヒト臍帯血やリンパ球には、UCMとしてI型、V型、VI型、IX型、X型ミオシンが存在することを確認した

(Kitasato Med 30: 414, 2000)。海外共同研究者池辺らは、UCMに関して精力的に分子生物学的解析を行ってきた。endocytosisや難聴との因果関係があるVI型ミオシンは2相性の機能を持ち(JBC 264: 5218, 2000)、さらに嚙唾にみられるmyosin VI変異(C442Y)はADPの解離を促進すること(J Biol Chem 279: 28844, 2004)を報告している。

2. 研究の目的

このような研究成果を受けて、本助成金を用いて以下の研究をおこなうことを目的とした。

(1) 我々は今回、『正常血液細胞および

血液腫瘍細胞において、UCMあるいは変異を持つUCMが、その機能や病態に関わっている』との【作業仮説—1】をたて、基礎実験を重ねてきてが、我々は18クラスの中で唯一アクチンフィラメントをマイナス端方向へ移動するmyosinVIに注目した。頭部のモータードメインにはリン酸化部位が存在し、モーター活性などへの関与し頸部ドメインはmyosinVIがマイナス端方向へ移動する事において重要な部位であり、またカルモジュリンの結合ドメインでもある、そして尾部ドメインにはDab2及びoptineurinなどのタンパク質が結合することが現在までに報告されている。そのmyosinVIの血液細胞における機能を解析するために、我々はリンパ球系、単球系及び巨核球系など13種類の白血病細胞株についてmyosinVIの発現量や細胞内局在などをRT-PCR、Western blotting、および免疫染色法を行うことで検討した。また、非分泌型骨髄腫細胞のmyosin VIの分布異常の有無を検討することにした。

(2) 次に、遺伝性巨大血小板減少症(May-Hegglin anomalyなど)はII型ミオシン重鎖IIA(MHCCI A)の遺伝子異常症(MYH9異常症)であると報告された。我々もすでに2家系でMHCCI A E1841Kを確認しているが、ミオシン抗体や変異遺伝子導入を用いた実験で、MHCCI A変異はATPase活性やフィラメント形成の機能異常をきたすことも証明している(JBC 264: 5218, 1989; JBC 276: 30293, 2001)。またMHCCI A E1841K mutant myosinが生化学的にfilament形成異常を呈することも確認した(ASH, oral 2006; 投稿中)。巨大血小板減少症は日常診療において時々経験される。患者の同意を得て、遺伝性巨大血小板減少症のMHCCI A異常を解析を継続し、臨床所見と変異部位の関連性を検討することにした。

(3) 血液細胞では古典的ミオシンの重鎖アイソフォーム(MHC-IIA, IIB)のみならず、我々は、IIAにも2つのアイソフォームがあること(Kitasato Med 30: 414, 2000)、および20-kDa軽鎖(MLC-20)にも、少なくとも2つのアイソフォームがあることを報告していたが(J Smooth Muscle Res 23: 40, 2001)、さらに第3のアイソフォームの存在を予測して、クローニングを試みることにした。また、今回、『ミオシン重鎖、軽鎖の血液幹細胞の分化成熟に対する役割分担が存在する』という【作業仮説—2】をたてた。これらのアイソフォームの分子生物学的機能解析も行うことにした。

3. 研究の方法

(1) 白血病細胞株の培養、分化誘導、サイトカラシン、コルヒチン、BFA処理、RT-PCR、共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を用いた。概要を列記する。

① 細胞株の培養

Leukemic cell linesを10% (v/v) fetal calf serum (FCS)、100 units/ml penicillin、0.1 mg/ml streptomycinを含むRPMI1640培地で、37°C、5% CO₂下で培養した。

② 分化誘導、Cytochalasin D処理、Colchicine処理、Brefeldin A処理(略)

③ RT-PCR

詳細は文献②に記載した。mRNA発現の相対量は、コンピュータ上で、パブリックドメインソフトのNIH Imageを用いて行った。(U. S. National Institutes of Healthが開発。Internetを介して<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>から入手できる。)

④ 免疫染色

スライドガラスなどに付着させた細胞を15分間程4%ホルムアルデヒド処理を行い固定させた後、0.1% Triton X-100を用いてpermeabilization(10 min)を行った。3%

BSAを用いてブロッキング(1hr、室温)を行い、1次抗体を滴下し4°C、オーバーナイト反応させた。そして、2次抗体を滴下し2~3hr、室温で反応させた後、mount液で封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(2) MYH9異常症は、北里大学病院を紹介受診した患者で、遺伝性血小板減少症を疑い、しかも、末梢血塗末標本で好中球の封入体がみられる患者群を選択した。中には、腎障害や感音性難聴、白内障などの随伴症状を有する症例もあった。患者より文書で同意を得たのち、末梢血より単核球を分離し、mRNAを抽出し、既報の方法(論文2)に従いmyosinVIの重鎖の塩基配列を決定した。

(3) MLC-2Cのクローニングは、既報(J smooth Muscle Res 37:25-38, 2001)に従った。MLC-2A, -2B, -2Cの遺伝子構造は、computer search(NCBI)を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 血液細胞におけるmyosinVIの発現

① 各細胞株におけるmyosinVIのmRNA発現量(図2)

13種の白血病細胞株について、myosinVIのmRNA発現量をRT-PCRを用いて検討した。リンパ系細胞(Jurkat、U266)、赤芽球系細胞(K562、HEL)、単球・マクロファージ系細胞(THP-1、A-THP-1、U937)、巨核球系細胞(Meg-01)において発現していた。

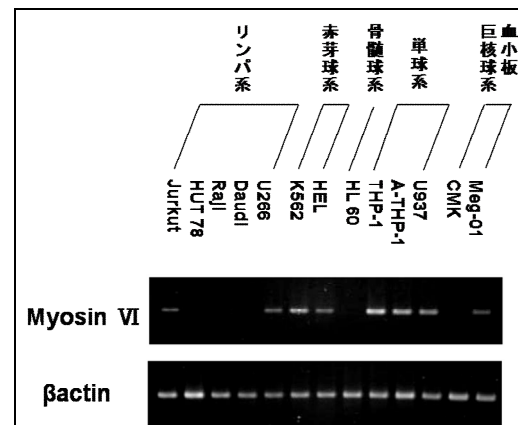


図2 細胞株におけるmyosinVI mRNA発現量

② HL60、CMK、Meg-01 における TPA 処理前後の mRNA 及びタンパク質の発現量の変化

[HL60] mRNA 及びタンパク質レベルにおいて TPA 未処理では myosinVI は発現していないが、TPA 処理をしたことで、時間及び濃度依存性に mRNA の発現量が増加し、また時間依存性にタンパク質の発現量が増加した。

[CMK]、[Meg-01] は略。

③ TPA 処理前後の HL60、CMK、Meg-01 及び U266 における myosinVI の局在の変化

[HL60] TPA 処理をすることで顆粒状に染色され、また核周辺が特に強く染色されていた。[U266] 核の周辺が特に強く染色されていた。[CMK]、[Meg-01] は略。

④ TPA 処理をした HL60、CMK、Meg-01 及び U266 における myosinVI と GM130 及び Rab8 の局在

TPA 処理をした HL60、CMK、Meg-01、及び U266 全てにおいて、共免疫染色により myosin VI とシスゴルジ区画に結合するゴルジマトリックスタンパクである GM130 及びトランスゴルジネットワーク (TGN) から細胞膜への輸送に関与する small G タンパクである Rab8 との局在を検討したところ、myosinVI と GM130 とは共存しないが、Rab8 とは大部分が共存していた。

⑤ HL60 (TPA 5days) における Cytochalasin D 処理前後の myosinVI 及び Rab8 の局在の変化

Cytochalasin D はアクチンフィラメントの重合を阻害する試薬である。HL60 (TPA 5day) において Cytochalasin D ($2\mu\text{M}$) を用いて 60 min 処理をした。処理前は myosinVI が細胞質と核の周辺が顆粒状に染色されていたが、処理後は核の周辺及び細胞質辺縁部が染色された。また、処理後も myosinVI と Rab8 は共存していた。

⑥ HL60 (TPA 5day) における Colchicine 処理前後の myosinVI 及び Rab8 の局在の変化

Colchicine は微小管の重合を阻害する試薬である。HL60 (TPA 5day) において Colchicine ($10\mu\text{g} / \text{ml}$) を用いて 60min 処理をした。処理前は myosinVI が細胞質と核の周辺が顆粒状に染色されていたが、処理後は主に核に近接した部位が染色され myosinVI と Rab8 は共存していた。

⑦ HL60 (TPA 3day) における BFA 処理前後の myosinVI と GM130 及び Rab8 の局在の変化

抗生物質である Brefeldin A (BFA) はゴルジ体を崩壊させ、トランスゴルジ、中間層、シスゴルジを小胞体へ逆輸送し、またトランスゴルジネットワーク (TGN) を中心体へ逆輸送する事が報告されている。BFA 処理前は myosinVI と Rab8 は細胞質全体、特に核の周辺を顆粒状に染色しているが、BFA 処理を施すことによって核の周辺が染色され、また細胞質が細かい点状に染色されていた。

⑧ Brefeldin A (BFA) 処理前後の myosinVI 及び Rab8 の局在の変化

Brefeldin A (BFA) は、ゴルジ体を崩壊させる試薬であり、BFA ($2.5\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いて 12 hr インキュベーションした事により、GM130 (cis Golgi) が崩壊されていた。同じ条件で BFA 処理をした事で myosinVI は細胞質に細かい点状に、また核の周辺に存在した。

⑨ 非分泌型形質細胞系細胞株における myosinVI 及び GM130 と Rab8 の局在

非分泌型骨髄腫細胞株 (p3/NSI/1-Ag4-1) は抗体を合成するが分泌しない細胞株である。その細胞株において免疫染色を行ったところ、myosinVI は核に近接した部位のみを強く染色し、また Rab8 は細胞質を瀰漫性に薄く染色し、myosinVI とは共存はしていなかった。

⑩ Myosin VI の KO mouse

Myosin VI の KO mouse の造血器分化機能を解析した。KO mouse においては、WT に比較し、赤芽球系、巨核球系の比率、分化の差異はみられなかった。しかし、骨髄球系・単球マクロファージ系においては、KO mouse において、明らかな異形成が見られた。機能異常を伴うか否かについては、今後の課題とした。

(2) MYH9 異常症 7 症例の遺伝子解析

症例 1～3: E1841K 変異症例の 1 家系。母と二人の娘の末梢血塗抹標本を抗ミオン抗体にて免疫蛍光染色したところ、ほとんどの好中球に 1~2 個の大型の細胞質封入体が強く染色された。また、同時にアクチン線維を phalloidin 染色で、その封入体の中心部分が染まった。症例 4: R1165C 変異を認めた。症例 5: D1424N 変異を認めた。症例 6, 7 の詳細は、文献①に報告している。

(3) 平滑筋型 20-kDa MLC のクローニング

我々は新たに 3 番目の 20-kDa MLC をクローニングし MLC-2C と命名した。この MLC-2C は chicken gizzard 平滑筋に最も homology があり、単球・マクロファージ系細胞株および TPA 処理 HL60 に発現をみた。3 つの isoform は別の遺伝子でコードされていることも判明した。(図 3)

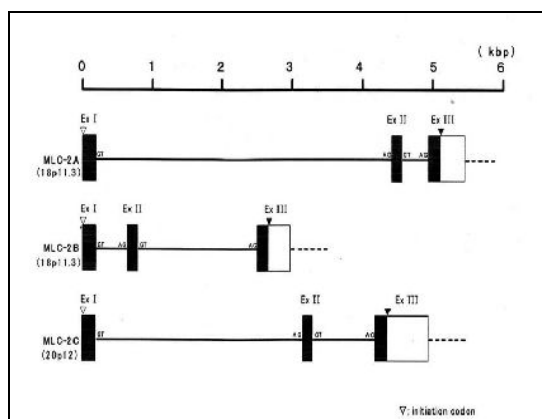


図 3 MLC-2A, -2B, -2C の遺伝子構造

MLC-2C は、平滑筋 myosin と homology が強く、Jurkat 細胞(ATL cell line)に発現をみない。そこで、MLC-2C gene を Jurkat 細胞に transfection し、wild type と形態、付着性および表面形質の差異を比較した。MLC-2C 導入 Jurkat 細胞は表面抗原である CD3 の発現陽性率が増加した。考察の詳細は、既報(論文②)に記載している。MLC-2C が血液細胞における機能解析を今後発展させていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Miyazaki K, Kunishima K, Higashihara M: Identification of three in-flame deletion mutations in MYH9 disorders suggesting an important hot spot for small rearrangements on MYH9 exon 24. European Journal of Haematology (in press) 査読有り
- ② Higashihara M, Watanabe M, Usuda S, Miyazaki K: Smooth Muscle type isoform of 20 kDa myosin light chain is expressed in monocyte/macrophage cell lineage. Journal of Smooth Muscle Research 44: 29-40, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 青木卓巳、臼田茂樹、宮崎浩二、東原正明: Myosin VI の血液細胞における発現と局在の検討。第 70 回日本血液学会総会 (2008.10) 京都
- ② 臼田茂樹、宮崎浩二、川上速人、東原正明。Myosin VI の血液細胞における発現と局在の検討。第 50 回 日本平滑筋学会 (2008.7) 弘前
- ③ Higashihara M, Usuda S, Miyazaki K, Watanabe M, Mohri H, Kawakami H.

Localization and expression of myosin VI in human haematopoietic cells including platelets. XX1st Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. (2007.7) Switzerland

- ④ 白田茂樹、宮崎浩二、川上速人、東原正明 : MyosinVIの血液細胞における発現と局在の検討。第49回 日本平滑筋学会 (2007.7) 奈良
- ⑤ 白田茂樹、宮崎浩二、東原正明、池辺光男 : ヒト血液細胞におけるミオシン・スーパーファミリー分子の発現動態の検討。第48回日本平滑筋学会 (2006.7) 岡山

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東原 正明 (HIGASHIHARA MASAOKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号 : 80165084

(2) 研究分担者

堀江 良一 (HORIE RYOUICHI)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号 : 80229228

檀原 幹生 (DANBARA MIKIO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号 : 80255348

宮崎 浩二 (MIYAZAKI KOUJI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号 : 90261966

(3) 連携研究者

池辺光男 (IKEBE MITSUO)

Massachusetts Medical School, Dept

Physiology, Professor