

学 位 論 文 要 旨

氏 名 鎌田 浩稔



論文題目

「Mutation in the tail region of MYH9 inhibits disassembly of
non-muscle myosin IIA」
(MYH9 末端の変異による非筋ミオシン IIA 脱重合の抑制)

指導教授承認印

鈴木隆浩



「Mutation in the tail region of *MYH9* inhibits disassembly of non-muscle myosin IIA」

(*MYH9* 末端の変異による非筋ミオシン IIA 脱重合の抑制)

鎌田浩稔

背景：*MYH9* 異常症は、末梢血塗抹標本での顆粒球細胞質内の封入体（Döhle 様小体）を認める先天性血小板減少症であり、巨大血小板症を呈する代表疾患である。この疾患は、非筋ミオシン重鎖 IIA（non-muscle myosin heavy chain IIA : NMMHC-IIA）をコードする *MYH9* 遺伝子のヘテロ接合変異が原因であり、常染色体優性遺伝するが、30%の症例では de novo 変異による孤発例も認められる。これまでにメイ・ヘグリン異常症（May-Hegglin Anomaly:MHA）、フェクトナー症候群（Fechtner syndrome: FTNS）、セバスチャン症候群（Sebastian syndrome）、エプスタイン症候群（Epstein syndrome）と様々に呼称されてきた類縁疾患は、同一の *MYH9* 遺伝子異常に起因することが判明し、これらを包括する疾患概念として *MYH9* 異常症が提唱された。

非筋ミオシン II（non-muscle myosin II）は二本ずつの重鎖(myosin heavy chain : MHC)、必須軽鎖（essential light chain : ELC）、調節軽鎖（regulatory light chain ; RLC）からなる六量体であり、二個の球状の頭部と長い棒状の尾部をもつユニークな構造を持っている。頭部は ATPase 活性部位とアクチン結合部位を含むモータードメインと軽鎖結合部位である制御ドメインからなり、アクチンフィラメントを動かすモータータンパク質としての機能を担う。また、尾部はミオシン II が会合して双極性のフィラメントを形成することに関与する。

これまで *MYH9* 変異については *N93K* 変異など N 末端側の異常についての解析は行われていたが、家族性 *MYH9* 異常症の多くに認められる C 末端側の変異（tail mutation）についてはその病的意義の解析は遅れていた。

我々は、*MYH9* 遺伝子の C 末端変異がミオシン分子に及ぼす分子メカニズムを解明する為に、バキュロウイルス遺伝子発現ベクター系を用いてミオシン六量体全長のタンパク精製を行った。

目的：NMMHC-IIAのC末端遺伝子変異による影響の分子メカニズムを解明する。

方法：バキュロウイルス遺伝子発現ベクター系を用いて、野生型と D1424H、E1841K の *MYH9* 変異を持つ機能性のミオシン六量体を精製し、Mg²⁺-ATPase

活性とフィラメント形成能を測定した。また *in vitro* の解析として、HEL 細胞（ヒト巨核球系白血病細胞株）に対して GFP 標識した野生型 *MYH9* と C 末端重鎖変異（R702C、D1424H、E1841K）を有する *MYH9* を強制発現させ、12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate（TPA）によって分化誘導される proplatelet formation（巨核球胞体突起形成）の差異を詳細に解析した。

さらに HEL 細胞に対して、RNA interference（RNAi）を用いての *MYH9* ノックダウンと、ミオシン軽鎖の T18D/S19D 変異株（T18 と S19 のリン酸化を模倣する変異）の proplatelet formation も解析した。

結果： ATPase 活性の測定では *MYH9* 変異株と野生株での差は認めず、*MYH9* 変異は非筋ミオシン IIA のモーター活性に影響を及ぼさないと考えられた。非筋ミオシンは ATP 非存在下では重合して大きな凝集を形成し、野生株では ATP を加えると脱重合し単量体となるが、*MYH9* 変異株では脱重合が抑制された。また、電子顕微鏡の観察でも同様に *MYH9* 変異株では ATP によるミオシンフィラメントの脱重合の障害と大きな凝集の形成を認めた。さらに、ロータリングシャドウィング電子顕微鏡法にて構造解析を行い、ATP 存在下では野生株のミオシン単量体は尾部で屈曲した構造を認めたが、*MYH9* 変異株では伸長した構造を優位に認めた。これらの結果は、*MYH9* 変異がミオシンフィラメントの正常な重合-脱重合のダイナミックスを妨害していると示唆され、アクトミオシンの細胞骨格再構成を妨げていると考えられる。この結果を支持する *in vitro* の実験として、HEL 細胞の *MYH9* 変異株に対して TPA 刺激を行い、正常株で認められる proplatelet formation が障害されているのが認められた。また、HEL 細胞に対して、ミオシンのフィラメント形成を誘導するミオシン軽鎖の T18D/S19D 変異を強制発現させると、著明に proplatelet formation が阻害された。これに対し、HEL 細胞の *MYH9* を RNAi にてノックダウンし TPA にて刺激するとコントロール細胞と同様に proplatelet formation が認められた。これらの結果は、*MYH9* 異常症では、C 末端の tail mutation がミオシンの脱重合を抑制することによって不活性化体として働き、proplatelet formation の抑制や、重合したミオシン-アクチンフィラメントによって Döhle 様小体を形成すると考えられる。

結論： *MYH9* の tail mutation が ATP によるミオシン脱重合を障害してミオシン凝集体を生成し、アクトミオシンの細胞骨格再構成を障害し、*MYH9* 異常症の病態生理に関与していると考えられる。