

機関番号 : 14401

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20590279

研究課題名 (和文) Myocardin ファミリーの機能制御機構と細胞形質転換

研究課題名 (英文) Regulatory mechanism for the function of myocardin family members and its relation to cell phenotype

研究代表者

林 謙一郎 (HAYASHI KEN' ICHIRO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号 : 90238105

研究成果の概要 (和文) :

Myocardin (Mycd) ファミリー (Mycd 及び MRTF-A/B) は転写因子 serum response factor (SRF) の補助因子である。Mycd が恒常的に核局在するのに対し、MRTF-A/B は細胞質に存在し、Rho シグナルの活性化に依存して一過性に核移行する。本研究で、Mycd ファミリーの核移行制御機構を世界に先駆け明らかにした。さらに、Mycd の核移行制御因子の発現が血管平滑筋細胞の形質依存性に制御されることを見出し、細胞分化研究の新たな切り口を提示した。

研究成果の概要 (英文) :

Myocardin (Mycd), which is essential for the differentiation of the smooth-muscle cell lineage, is constitutively located in the nucleus, although its family members, myocardin-related transcription factors A and B (MRTF-A/B), mostly reside in the cytoplasm and translocate to the nucleus in response to Rho-signaling. The mechanism for their nuclear import is unclear. Here, we investigated the mechanism for the nuclear import of Mycd family members, and demonstrated any correlation between such mechanism and the phenotype of vascular smooth muscle cells (VSMCs). In cultured VSMCs, the knockdown of importin  $\beta$ 1 inhibited the nuclear import of Mycd and MRTF-A/B. Their NH<sub>2</sub>-terminal basic domain (NB) was identified as a binding site for importin  $\alpha/\beta$ 1 by in vitro analyses. However, Mycd had a higher affinity for importin  $\alpha/\beta$ 1 than MRTF-A/B did, even in the absence of G-actin, and Mycd's affinity for importin  $\alpha/\beta$ 1 was stronger than for any other importin  $\alpha/\beta$ 1 heterodimers. The binding of Mycd to importin  $\alpha/\beta$ 1 was insensitive to G-actin, whereas that of MRTF-A/B was differently inhibited by G-actin. In dedifferentiated VSMCs, the levels of importins  $\alpha$ 1 and  $\beta$ 1 were reduced concomitant with down-regulation of Mycd, serum response factor, and SMC markers. By contrast, in differentiated VSMCs, their expressions were up-regulated. Thus, the nuclear import of Mycd family members in VSMCs depends on importin  $\alpha/\beta$ 1, and their relative affinities for importin  $\alpha/\beta$ 1 heterodimers determine the Mycds' nuclear import. The expression of the Mycds' nuclear import machineries is related to the expression levels of VSMC phenotype-dependent SMC markers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：myocardin, MRTF-A/B, importin  $\alpha/\beta$ 1, G-actin, 核移行, 平滑筋細胞形質転換

1. 研究開始当初の背景

Myocardin (Mycd) ファミリーは SAP ドメインファミリーに属する転写補助因子で、Mycd 及び MRTF-A/B がこれに属する。Mycd は平滑筋細胞及び心筋細胞に特異的に発現するのに対し、MRTF-A/B は広範な組織に分布している。何れの分子もアミノ末端側に G-アクチンとの相互作用に関わる RPEL motif を持つ。Mycd の RPEL motif の G-アクチンに対する親和性が極めて低く、Rho シグナルの影響を受けず恒常的に核局在する。これに対し、G-アクチンとの親和性が高い RPEL motif を持つ MRTF-A/B は細胞質に局在し、Rho シグナルの活性化に依存して一過性に核に集積する。この分子機構に関して、MRTF-A の細胞内局在が Rho 活性に依存したアクチンダイナミクスにより制御されるモデルが提唱されていたが、その機構及び Mycd ファミリーの核移行制御に関わる因子も明らかでなかった。また、我々は本研究を立案した時点で Mycd ファミリーの核局在に塩基性アミノ酸に富んだ領域が重要な役割を果たすことを見出していたが、核移行の分子機構の解明には至っていなかった。

2. 研究の目的

Mycd ファミリーの細胞内局在制御機構を解明し、さらにその分子機構と血管平滑筋細胞形質転換との相関を明らかにすることを目的して本研究を遂行した。

3. 研究の方法

Mycd 及び MRTF-A/B の各 domain を変異させたキメラな分子を培養血管平滑筋細胞または培養細胞に発現させ細胞内局在を調べた。この解析により核移行に必要な domain を同定した。塩基性アミノ酸に富んだ核移行シグナルを持つ分子の核移行に importin  $\beta$ 1 が普遍的に関わることが知られている。siRNA を介して内在性の importin  $\beta$ 1 の発現を抑制させた場合の Mycd の細胞内局在を生化学的手法及び免疫染色を用いて解析した。この結果、Mycd の核移行が importin  $\alpha/\beta$ 1 を介することが明らかになった。

Mycd または MRTF-A/B と importin  $\alpha/\beta$ 1 の相互作用を in vitro 翻訳システムにより合成したタンパク質を用いて解析し、Mycd ファミリー間で importin  $\alpha/\beta$ 1 との相互作用に相違があることを見出した。また、血管平滑筋細胞内で発現している importin  $\alpha$  subtype を RT-PCR により同定した。この結果、importin  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4 が主要な importin  $\alpha$  subtype であることが明らかになった。さらに、G-アクチンが Mycd または MRTF-A/B と importin  $\alpha/\beta$ 1 の相互作用に及ぼす影響を同様のアッセイ系を用いて解析した。

血管平滑筋細胞の形質と Mycd ファミリー、SRF, SMC マーカー及び importin  $\alpha/\beta$ 1 の発現との相関をイムノプロット及び定量的 RT-PCR により解析した。

#### 4. 研究成果

Mycd には塩基性アミノ酸に富んだドメイン(basic domain)がアミノ末端部 (NB 98-103aa) と中央部 (CB 243-260aa) の 2 箇所存在するが、アミノ末端に存在する NB が核移行シグナルとして働くことと importin  $\beta 1$  の発現を siRNA により抑制した場合に Mycd の核移行が阻害され、細胞質に集積することを見出した。この結果から、Mycd の核移行が importin  $\alpha/\beta 1$  を介して制御されることが明らかになった。

さらに、NB を介して Mycd・importin  $\alpha/\beta 1$  三量体が形成されることが核移行に必要なことを見出した。MRTF-A/B の核移行にも NB が必要で、Mycd と同様に NB を介して importin  $\alpha/\beta 1$  と三量体を形成するが、Mycd と比較して importin  $\alpha/\beta 1$  に対する親和性は極めて低い。親和性の序列は Mycd >> MRTF-A > MRTF-B である。Mycd は血管平滑筋細胞で発現する importin  $\alpha$  subtype の内 importin  $\alpha 1$  と最も高い親和性を示すが、MRTF-A/B にはこのような importin  $\alpha$  subtype による親和性の相違は認められなかった。

G-アクチンに対して高い親和性を持つ MRTF-A/B では G-アクチン存在下ではこの三量体形成が著明に阻害されるが、G-アクチンに対する親和性が極めて弱い Mycd ではこの阻害効果は全く認められない。これら一連の解析から、Mycd ファミリーの細胞内局在の相違が importin  $\alpha/\beta 1$  に対する親和性に依存することと MRTF-A/B の核集積がアクチンダイナミクスの影響を受けるのは G-アクチンによる MRTF-A/B・importin  $\alpha/\beta 1$  三量体形成阻害によることを明らかにした。しかしながら、このアクチンダイナミクスの効果は補助的で、MRTF-A/B が細胞質局在しやすいのは importin  $\alpha/\beta 1$  との親和性が弱いことがその主な要因である。(図 1)。

Mycd の核移行に関わる importin  $\alpha 1/\beta 1$  の発現が血管平滑筋細胞の形質依存性に制御されることを見出した。即ち、分化型平滑筋細胞では Mycd, SRF 及び平滑筋マーカーの発現が増強するのに伴い、importin  $\alpha 1/\beta 1$  の発現も亢進する。逆に、脱分化平滑筋細胞では Mycd, SRF 及び平滑筋マーカー遺伝子の発現低下を来たすが、これらと連動して importin  $\alpha 1/\beta 1$  の発現も低下

する。

本研究により Mycd ファミリーの核移行の分子機構を世界に先駆け解明した。さらに、核内移行制御因子の発現が血管平滑筋細胞の形質に依存して変化し、血管平滑筋細胞分化と密接に関わることを見出した。この知見は、細胞分化研究に新たな切り口を提示しており、今後、大きく発展する可能性がある。

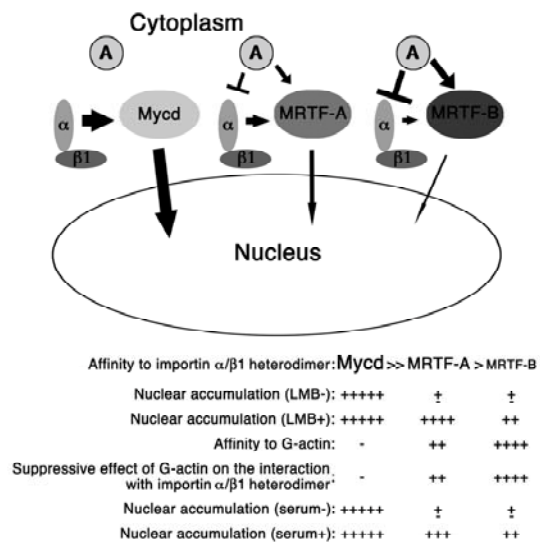


図 1 Mycd ファミリーの核移行制御機構。

Mycd ファミリーの核移行は importin  $\alpha/\beta 1$  により制御される。核局在の程度は各々の分子の importin  $\alpha/\beta 1$  に対する親和性に依存する。親和性の序列は Mycd >> MRTF-A > MRTF-B で、親和性の強い分子ほど核局在しやすい。G-アクチンとの親和性が高い MRTF-A/B は importin  $\alpha/\beta 1$  との三量体形成が G-アクチン存在下では阻害され、より核移行しにくくなる。しかしながら、このアクチンダイナミクスの効果は補助的で、importin  $\alpha/\beta 1$  との親和性が弱いことが MRTF-A/B の細胞質局在を決定している。A, G-アクチン;  $\alpha$ , importin  $\alpha$ ;  $\beta 1$ , importin  $\beta 1$ , LMB; leptomycin B.

#### 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 5 件)

1) Nakamura S, Hayashi K, Iwasaki K, Fujioka T, Egusa H, Yatani H, Sobue K.

Nuclear import mechanism for myocardin family members and their correlation with vascular smooth muscle cell phenotype. J Biol Chem 査読有 2010, 285, 37314-37323

2) Kimura Y., Morita T., Hayashi K., Miki T., and Sobue K. Myocardin functions as an effective inducer of growth arrest and differentiation in human uterine leiomyosarcoma cells. Cancer Res 査読有 2010, 70, 501-511

3) Oikawa H., Hayashi K., Maesawa C., Masuda T., and Sobue K. Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. Exp Cell Res 査読有 2010, 316, 940-950

4) Mayanagi, T., Morita, T., Hayashi, K., Fukumoto, K., and Sobue, K. Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton. J Biol Chem 査読有 2008, 283, 31183-31196

5) Iwasaki, K., Hayashi, K., Fujioka, T., and Sobue, K. Rho/ROCK signal regulates myogenic differentiation via MRTF-A/Smad-dependent transcription of the Id3 gene. J Biol Chem 査読有 2008, 283, 21230-21241

[学会発表] (計 3 件)

1) 木村泰典、森田 強、林 謙一郎、三木恒治、祖父江憲治 マイオカルディンはヒト平滑筋肉腫細胞において細胞増殖抑制と分化誘導に効果的な因子として働く 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪

2) 中村誠志、林 謙一郎、岩崎一洋、江草宏、矢谷博文、祖父江憲治 myocardin ファミリーの核内移行メカニズム 第 62 回日本細胞生物学会 2010 年 6 月 21 日 大阪

3) 中村誠志、林 謙一郎、岩崎一洋、江草宏、矢谷博文、祖父江憲治 Importin  $\alpha$  1/

$\beta$  1 により制御される転写調節因子 myocardin の核内輸送における N 末 basic domain の役割 第 61 回日本細胞生物学会 2009 年 6 月 2 日 名古屋

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 謙一郎 (HAYASHI KEN' ICHIRO)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 90238109

### (2) 研究分担者

祖父江 憲治 (SOBUE KENJI)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 20112047

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :