

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590332

研究課題名(和文) 新たな視点(細胞内局在制御)からアプローチした細胞機能発現機構の探究

研究課題名(英文) Investigation of cell function from the point of view of the regulatory mechanism for cellular localization of myocardin family members

研究代表者

林 謙一郎 (Hayashi, Ken'ichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90238105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は転写補助因子myocardin (Mycd)ファミリーの細胞内局在制御機構とこれらの因子が関わる細胞機能の探究を目的として遂行し、以下の成果を得た。1) Crm1を介したMycd及びMRTF-A/Bの核外移行機構の解明。2) 上皮間葉転換を阻害する低分子化合物CCG-1423によるMRTF-A/Bの核移行抑制機構の解明。3) アクチン隔離タンパク質thymosin 4によるMRTF-Aの核移行促進機構の解明。4) 平滑筋細胞形質転換とリンクしたMycdのRPEL motifsの新たな機能の解明(Actinrelated protein 5 [Arp5]によるMycd機能抑制機構の解明)。

研究成果の概要(英文)：Myocardin (Mycd), a key factor for the smooth muscle cell differentiation, is constitutively located in the nucleus, whereas myocardin-related transcription factors A and B (MRTF-A/B), mostly reside in the cytoplasm and translocate to the nucleus in response to a signaling-induced decrease in G-actin. MRTF-A/B play a critical role in induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT). Here, we investigated the regulatory mechanism for subcellular localization of Mycd family members and their related cell functions. Our studies revealed the following findings. 1) Regulatory mechanism of Crm1-mediated nuclear export of Mycd family members: critical differences in the regulation between Mycd and MRTF-A/B. 2) Inhibitory mechanism of CCG-1423 (a novel inhibitor of EMT) for the nuclear import of MRTF-A/B. 3) Activation of MRTF-A nuclear import by thymosin beta 4. 4) Novel function of Mycd RPEL motifs: actinrelated protein 5-mediated inhibition of Mycd function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：myocardin MRTF-A/B Crm1 importin / 1 CCG-1423 核移行 核外移行 上皮間葉転換

1. 研究開始当初の背景

Myocardin (Myocd)及び MRTF-A/B は SAP ドメインを持つ転写補助因子群で、serum response factor(SRF)の補助因子として SRF と複合体を形成し、SRF/CArG-box を介した転写を促進に関わる。Myocd が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する。しかしながら細胞内局在に大きな違いが認められる。Myocd が恒常的に核局在するのに対し、MRTF-A/B は細胞質に局在し、Rho シグナルの活性化(アクチン重合促進に伴う G-アクチン量の減少)に応じて一過性に核内移行する。この分子機構はすでに我々の研究グループより importin $\alpha/\beta 1$ を介して核移行が制御されることが明らかにされていた。MRTF-A/B の核内移行がアクチン重合・脱重合の影響を受けるのは MRTF-A/B の G-アクチンに対する親和性が高いため、優先的に MRTF-A/B・G-アクチンの複合体が形成され核移行に必要な MRTF-A/B・importin $\alpha/\beta 1$ 三量体形成阻害に起因する。Myocd family の核外移行に関して、Crm1 阻害剤を用いた解析から MRTF-A の核外移行が G-アクチンが優位な状況で Crm1 を介して行われることが示唆されていたが、その制御機構の詳細 (Crm1 との結合部位[核外移行シグナル・NES]の同定や相互作用に及ぼす G-アクチンの役割等)は不明であった。また、CCG-1423 は Rho シグナル阻害として開発された低分子化合物で細胞運動及び増殖を抑制することと MRTF-A の核移行を抑制すること(上皮間葉転換阻害剤)が報告されていたが、その作用機序は全く解明されていなかった。さらに、G-アクチン結合タンパク質及びアクチン関連タンパク質が Myocd ファミリー転写補助因子の機能制御に及ぼす影響についても十分な解析が成されていない状況であった。

2. 研究の目的

転写補助因子 Myocd ファミリーの細胞内局在制御機構とこれらの因子に関わる細胞機能の探究を目的として本研究を遂行した。

3. 研究の方法

1) Myocd ファミリーの核外移行シグナル(NES)の同定と制御機序の解明のため Myocd または MRTF-A/B と Crm1 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た免疫沈降法により解析した。さらに、Myocd 及び MRTF-A/B の各 domain を変異・欠失させた分子を培養細胞(COS7)で発現させ、それらの細胞内局在を免疫細胞染色法により検証した。

核内で Myocd ファミリーと結合し CArGbox を介した転写制御に関わる転写因子 SRF が Crm1 を介した核外移行に及ぼす影響を解析するため Myocd ファミリーと SRF の相互作用の相違を *in vitro* のアッセイ系で解析した。さらに、siRNA を用いて内在性

SRF をノックダウンさせた血管平滑筋細胞に tag 付き Myocd を発現させ、細胞内局在を解析した。

2) CCG-1423 による MRTF-A/B 機能阻害効果の作用機序解析は以下の方法で遂行した。MRTF-A と核移行制御タンパク質である importin $\alpha/\beta 1$ の複合体形成に対する効果を *in vitro* のアッセイ系で検証した。さらに、photoaffinity linker により CCG-1423 をカップリングした Sepharose (CCG-1423 Sepharose)を用いて MRTF-A/B タンパク質との相互作用を pull-down assay により解析し CCG-1423 と MRTF-A の直接結合を検証した。この結合解析には *in vitro* 翻訳システムにより合成・精製した tag 付き MRTF-A/B タンパク質または培養細胞内で tag 付き MRTF-A/B を強制発現させた細胞抽出液を用いた。

3) Thymosin $\alpha 4$ による MRTF-A の細胞内局在制御機構の解析及び Arp5 による Myocd 機能抑制機構の解析は培養細胞で種々の変異体を発現させて免疫沈降法または免疫細胞染色法により行った。また、MRTF-A または Myocd を介した転写制御の解析は培養細胞内でレポーター遺伝子の発現を指標とした通常のプロモーターアッセイを行った。

4. 研究成果

1) Crm1 を介した Myocd ファミリーの核外移行機構の解明

Myocd ファミリーの NES は N-末端部と glutamine-rich ドメイン(Q)の二箇所が存在する(夫々、L1, L2 と命名した)(図1)。MRTF-A/B の L1 及び L2 を変異させることで両者の核局在する傾向が著しく強くなり細胞質局在が阻害された。しかしながら、Crm1 との親和性は MRTF-A/B と比較して Myocd は極めて弱いことが判明した。これは Myocd の L1 を含む 128 アミノ酸から成る N-末領域が central basic ドメイン(CB)と分子内相互作用することで L1 及び L2 の NES が遮蔽されることによると考えられる。一方、MRTF-A/B ではこのような分子間相互作用は認められず Crm1 に対して強い親和性を示した。また、また、SRF と結合した Myocd 及び MRTF-A/B と Crm1 との結合が抑制された。この傾向は Myocd で強く、MRTF-A/B では弱い。この理由として SRF との親和性が Myocd > MRTF-A > MRTF-B の順で弱くなることに起因すると考えられる。従って、核内で SRF と結合した Myocd ファミリーは Crm1 による核外移行を受けにくくなることが示唆された。これらの Myocd ファミリー間での Crm1 を介した核外移行制御の相違が MRTF-A/B と異なり Myocd が恒常的に核集積する一因であることが示された。さらに、G-actin 存在化では MRTF-A/B と Crm1 との相互作用が拮抗的に阻害されることを見いだした。この知見は MRTF-A/B の細胞内局在がアクチンの重合・脱重合により影響される大きな要因は G-actin 存在化で核外移行が促進

されるのではなく、G-actin により importin α/β を介した核移行が阻害されることによると考えられる。これら一連の解析結果を図 1 にまとめた。

2) 上皮間葉転換を阻害する低分子化合物 CCG-1423 による MRTF-A/B の核移行抑制機構の解明

CCG-1423 存在下では、MRTF-A と核移行制御タンパク質である importin α/β の複合体形成が著明に阻害され、CCG-1423 が直接 MRTF-A の核移行を阻害することが示唆された。さらに、Photoaffinity linker により CCG-1423 を固定化した Sepharose を調製し、これを用いて MRTF-A が核移行シグナル (NLS) として機能する N-terminal basic domain (NB) を介して CCG-1423 と直接結合することを明らかにした。また、CCG-1423 は MRTF-A と単量体 G-actin の結合は阻害しないことと G-actin と結合した MRTF-A は CCG-1423 に対する親和性が低下することも明らかにした。従って、G-actin と結合していない MRTF-A がより適した CCG-1423 の標的タンパク質であることが示唆される。以上の結果から、CCG-1423 による MRTF-A の核移行阻害は CCG-1423 が MRTF-A の NLS に直接結合することで MRTF-A と importin α/β の複合体形成が阻害されるため起こるという分子機構が明らかになった (図 2)。

3) Thymosin 4 による MRTF-A の細胞内局在制御

G-actin 結合タンパク質 thymosin 4 は G-actin と優先的に複合体を形成し、G-actin が MRTF-A に結合することを拮抗的に阻害し、MRTF-A の核移行及び CArGbox/SRF を介した転写を促進させることを見いだした。

4) Mycd RPEL motifs の新たな機能の解明 MRTF-A/B と異なり、G-actin との親和性が極めて弱いため、Mycd の核移行は G-actin の影響を受けず恒常的に核局在する。これまで Mycd の RPEL motifs の機能は全く解明されていなかった。この Mycd RPEL motifs にアクチン関連タンパク質 (Arp5) が結合し Mycd の SRF 転写補助因子としての機能を阻害する分子機構を明らかにした。

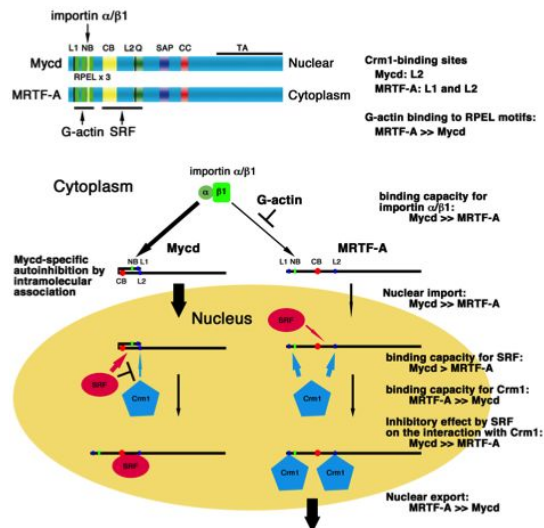


図 1 : Mycd ファミリーの細胞内局在制御機構の概略

Nuclear import process of MRTF-A after serum stimulation in the presence of CCG-1423

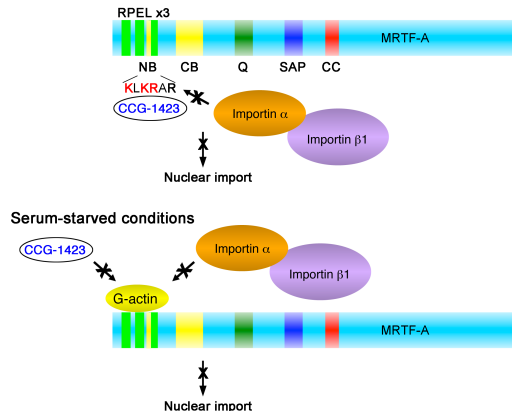


図 2 : CCG-1423 による MRTF-A の核移行阻害機構の概略

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 6 件)

Hayashi, K., Watanabe, B., Nakagawa, Y., Minami, S., and Morita, T. (2014) RPEL proteins are the molecular targets for CCG-1423, an inhibitor of Rho signaling. PLOS ONE 9, e89016. doi:10.1371/journal.pone.0089016

Morita, T., and Hayashi, K. (2013) G-actin sequestering protein thymosin-4 regulates the activity of myocardin-related transcription factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 437, 331-335.

Hayashi, K., and Morita, T. (2013) Importance of dimer formation of myocardin family members in the regulation of their

nuclear export. Cell Struct. Funct. 38, 123-134.

Hayashi, K., and Morita, T. (2013) Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and myocardin-related transcription factors A. J. Biol. Chem. 288, 5743-5755.

Tanokashira, D., Morita, T., Hayashi, K., Mayanagi, T., Fukumoto, K., Kubota, Y., Yamashita, T., and Sobue, K. (2012) Glucocorticoid suppresses dendritic spine development mediated by down-regulation of caldesmon expression. J. Neurosci. 32, 14583-14591.

〔学会発表〕(計 3件)

林 謙一郎、渡辺 文太、中川 好秋、南沙紀、森田強

Myocardin-related transcription factor A and B (MRTF-A/B) are the molecular targets for CCG-1423, an inhibitor of Rho signaling

第 66 回日本細胞生物学会大会 2014 6-11
奈良県新公会堂

林 謙一郎、森田 強

Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and MRTF-A
第 85 回日本生化学会大会 2012 12-16
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

林 謙一郎、森田 強

Inhibitory mechanism of Crm1-mediated nuclear export of myocardin
第 45 回日本細胞生物学会 2012 5-30
神戸国際会議場

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

中川 好秋 (NAKAGAWA YOSHIAKI)
京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80155689