

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23770225  
 研究課題名（和文） アクチン細胞骨格マスター制御因子 MRTF の新規活性制御メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Investigation of the novel activation mechanism of MRTF, a master transcriptional regulator of the actin cytoskeleton.  
 研究代表者  
 森田 強 (MORITA TSUYOSHI)  
 大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：80403195

研究成果の概要（和文）：本研究では、myocardin 及び同ファミリータンパク質である MRTF の活性制御メカニズムの解析を行った。MRTF の活性は actin との結合により抑制されることが知られているが、MRTF と actin との結合を阻害し MRTF を活性化する因子として Tb4 タンパク質を見出した。また、myocardin は actin との結合力が弱い、代わりに actin-related protein 5 (Arp5) と強く結合しており、Arp5 が myocardin の活性を著しく抑制していることが明らかになった。平滑筋細胞では Arp5 の発現量が低く、それにより myocardin の活性が高く保たれていた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the novel activation mechanism of myocardin family proteins, myocardin and MRTF. The activity of MRTF is suppressed by interaction with actin. I identified Tb4 protein as an inhibitory factor of MRTF/actin interaction. myocardin also interacts with actin, but its affinity for actin is rather low. I demonstrated that actin-related protein 5 (Arp5), instead of actin, tightly bound to myocardin and suppressed its activity. In smooth muscle cells, Arp5 expression level is very low, resulting in high activity of myocardin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞骨格・運動、転写因子、ガン、平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

myocardin ファミリータンパク質は転写因子 SRF の活性を強力に促進する共役因子として単離された。同ファミリーには心筋及び平滑筋特異的に発現している myocardin と、

様々な組織において広く発現が確認される myocardin-related transcription factor (MRTF) が存在する。その特異的な発現が示すように、myocardin は平滑筋・心筋分化において重要な役割を果たしており、主に筋収

縮関連遺伝子の発現を制御している。一方、**MRTF** に関しても当初は筋分化における役割が注目されていたが、私は非筋肉系の細胞における機能に着目し、**MRTF** がアクチン細胞骨格タンパク質の発現を包括的に制御するマスター制御因子であることを明らかにしてきた。特に最近、**MRTF** によるアクチン細胞骨格制御がガン細胞の転移や浸潤などの悪性化過程において重要な役割を果たしていることが報告されており、**MRTF** の詳細な機能や活性制御機構の解明に注目が集まっている。

**myocardin** ファミリータンパク質には、その N 末端に **RPEL** モチーフと呼ばれる単量体 **actin** (**G-actin**) 結合配列が存在する。ファミリータンパク質のうち **MRTF** はこの **RPEL** モチーフを介して **G-actin** と結合することで核移行が抑制されている。**Rho** シグナルの活性化などにより **actin** 重合が促進されると、細胞内 **G-actin** の存在量が減少し、**G-actin** から解離した **MRTF** が核へと移行して **SRF** の活性化を引き起こすと考えられている。一方、**myocardin** の **RPEL** モチーフは **G-actin** との結合力が非常に弱く、細胞質中においてほとんど **G-actin** と結合していない。その為、**myocardin** は常に核に局在しており、**MRTF** とは異なる活性制御を受けてと考えられているが、その詳細は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

上記のように **MRTF** の活性は **G-actin** との結合により制御されており、アクチンの重合・脱重合による細胞質中 **G-actin** の量的な変化が **MRTF** の活性化・不活性化を引き起こしていると考えられてきた。しかし、転写調節因子である **MRTF** に対して **actin** の存在量は桁違いに多く、アクチンダイナミクスの変化だけでは **MRTF** から **G-actin** が解離するほどに細胞質中の **G-actin** 量が枯渇するとは考えにくい。そこで、**G-actin** の量的な変化以外に **MRTF** の活性を制御する因子の探索を本研究の目的とした。

また、**myocardin** の活性制御機構に関してはこれまでほとんど解明されていなかったが、**MRTF** 同様 **RPEL** モチーフを介した活性制

御機構が存在するのではないかという予想のもとに、新たな制御機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

1) まず、**MRTF** と **G-actin** との結合を制御する第 3 の因子の存在を仮定し、その単離を試みた。これまで、**MRTF** と結合する因子に注目した解析は行われていたが、**G-actin** と結合する因子に関してはほとんど報告がなかった。そこで、これまで知られている様々な **G-actin** 結合タンパク質のなかで、**MRTF** との結合に影響を与える因子の探索を行った。

2) これまでの研究により **MRTF** の核移行には **importin** との結合が必要であることが知られていた。一方、核へと移行した **MRTF** は速やかに核外へと汲み出されることが知られており、むしろ核外排出機構こそが活性制御に重要であると考えられていた。そこで、**MRTF** の核外輸送に必要である **exportin** との結合部位や結合状態の変化を詳細に解析した。

3) **MRTF** と比較して **myocardin** は **G-actin** との結合力が弱いため、常に核内に局在する。しかし **G-actin** との結合モチーフ (**RPEL** モチーフ) は **MRTF** と同様に存在することから、この配列が **myocardin** においてもなんらかの機能を果たしているものと考えた。そこで **G-actin** に代わる **RPEL** モチーフ結合因子の単離を試み、**myocardin** 活性制御に対する機能を検証した。

## 4. 研究成果

1) **G-actin** の存在状態には主に **ATP** 結合型と **ADP** 結合型があるが、これまでの報告により **MRTF** はどちらのタイプにも等しく結合することが知られていた。しかし、私は **ATP**・**Mg<sup>2+</sup>** 存在下では **MRTF** と **G-actin** 結合が弱まることに気づき、**ATP-actin** と結合して **MRTF/G-actin** 複合体形成を阻害する因子が存在するのではないかと考えた。そこで、これまでに報告のある **ATP-actin** 結合因子の中から **MRTF** の細胞内局在に影響を与える因子の探索を行い、**Tb4** タンパク質を見出した。**Actin** の **Tb4** 結合部位と **MRTF** 結合部

位は重複していおり、Tb4がG-actinと結合することでMRTF/G-actinの複合体形成は著しく阻害された。また、Tb4を過剰発現することで細胞内におけるMRTF/SRFシグナルの活性化を引き起こすことが可能であった。

2) MRTL および myocardin における exportin 結合部位を特定した。その結果、myocardin では一カ所、MRTL では二カ所のロイシンリッチ部位に exportin が結合した。また、exportin と MRTL/myocardin との結合が SRF により拮抗的に阻害されること、MRTL と比べ myocardin にはより強く SRF が結合することが明らかとなり、これらの違いが両者の細胞内局在の違いに影響を与えていることが示された。

3) myocardin の RPEL モチーフと結合する新規因子として actin-related protein 5 (Arp5)を見出した。Arp5はactinとの相同性が30%前後と比較的高いが、actinとは異なり常に核内に局在している。Arp5は核内においてmyocardinと結合しmyocardin/SRF複合体の形成を阻害した。さらに、myocardinが心筋および平滑筋特異的な発現を見せることから様々な組織におけるArp5の発現を観察したところ、平滑筋において特異的な splicing variant が発現していた。また、この mRNA は翻訳レベルで強く発現抑制を受けている為、平滑筋におけるArp5タンパク質の発現量は他の組織に比べて著しく低く抑えられており、その為に平滑筋細胞ではmyocardinの活性が常に高い状態で保たれていることが明らかになった。

以上のように、本研究により myocardin ファミリータンパク質の新たな活性制御機構が明らかになった。今後は、ガン細胞の悪性化過程や腎臓・肺などの繊維化における、これら新たに単離された制御因子(Tb4, Arp5)の関与を検討していきたい。

## 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4件)

林謙一郎、森田強  
Importance of dimer formation of myocardin family members in the regulation their nuclear export.  
Cell Structure and Function (査読有)  
38(1), (2013) pp123-134.  
doi: 10.1247/csf.13001

林謙一郎、森田強  
Differences in the nuclear export mechanism between myocardin and myocardin-related transcription factor A.  
Journal of Biological Chemistry (査読有)  
288(8), (2013), pp5743-5755  
doi: 10.1074/jbc.M112.408120.

森田強、真柳平、祖父江憲治  
Caldesmon regulates axon extension through interaction with myosin II.  
Journal of Biological Chemistry (査読有)  
287(5), (2012), pp3349-3356  
doi: 10.1074/jbc.M111.295618.

\*田之頭大輔、\*森田強、\*林謙一郎、真柳平、福本健太郎、久保田美子、山下俊英、祖父江憲治 \*equal contribution  
Glucocorticoid suppresses dendritic spine development mediated by down-regulation of caldesmon expression.  
Journal of Neuroscience (査読有)  
32(42), (2012), pp14583-14591  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2380-12.2012.

[学会発表] (計2件)

森田強、田之頭大輔、林謙一郎、真柳平、祖父江憲治  
神経発過程におけるアクチン制御タンパク質 caldesmon の機能解析  
第85回日本生化学会大会  
2012年12月14日~16日  
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

森田強、真柳平、祖父江憲治

Caldesmon promotes axon extension  
through inhibition of myosin II activity.

第 45 回日本発生生物学会 第 64 回日本細胞  
生物学会 合同大会

2012 年 05 月 28 日~31 日

神戸国際会議場・神戸商工会議所

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森田 強 (MORITA TSUYOSHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 80403195

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :