

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

MRTF によるアクチン細胞骨格制御を介した 悪性黒色腫細胞の細胞運動抑制効果に関する検討

岸 隆行^{1), 2)}

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 医歯薬総合研究所, 神経科学研究部門

²⁾ 岩手医科大学医学部, 皮膚科学講座

(Received on December 9, 2013 & Accepted on December 26, 2013)

要旨

アクチン細胞骨格は細胞の形態および運動制御において中心的役割を担い, その構成タンパク質の発現調節は細胞機能変化と密接に関連している. myocardin-related transcription factor (MRTF) は転写因子 serum response factor (SRF) と協調的にアクチン細胞骨格関連遺伝子群の発現を制御する転写調節因子として発見された. 今回, 高い遊走能・浸潤能を示す悪性黒色腫由来の B16F10 細胞を用いて, MRTF によるアクチン細胞骨格関連遺伝

子群の発現変化が細胞形態・運動能に与える影響を検討した. その結果, 活性型 MRTF の遺伝子導入により多くのアクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現が増加し, それに伴う細胞形態の著明な変化と細胞運動能の抑制が認められた. MRTF 活性化による悪性黒色腫細胞の形質変化は, 接着斑の再配置と大型化という細胞接着構造の変化による接着能亢進がその要因であることが示唆された.

Key words : *myocardin-related transcription factor (MRTF), malignant melanoma, actin cytoskeleton, migration, invasion*

I. 緒 言

癌が生命を脅かし治療を困難にする大きな要因は, 癌細胞の浸潤・転移である. これらの過程には癌細胞の運動能, 接着能, さらに細胞外マトリクス分解能といった細胞機能の変化が関与している^{1, 2)}. 細胞骨格は細胞機能の動的構造基盤として重要であり, 中でもアクチン細胞骨格は細胞形態および運動能に中心的役割を果たしている³⁾. ストレスファイバー (stress fiber) は束化した直鎖の線維状アクチン (F-アクチン) により構成される直線的な構造であり, 細胞の形態維持や収縮による運動能調節を担う⁴⁾. ストレスファイバー端と細胞外基質との接着部位を接着斑 (focal adhesion) と呼ぶ. integrin は接着斑で細胞外基質と結合し, 細胞内では vinculin, talin, paxillin, FAK (Focal

Adhesion Kinase) 等のタンパク質が複合体を形成し, 接着斑機能を制御している^{5, 6)}. また細胞周辺部で分岐した F-アクチンにより形成されるラメリポディア (葉状仮足) は細胞遊走に重要であり, ラメリポディアの伸展制御は細胞の形態・運動能を調節している⁷⁾.

myocardin-related transcription factor (MRTF) は myocardin, MRTF-A, MRTF-B より成るファミリーを形成し, 主要転写因子である serum response factor (SRF) の転写活性化を担う転写調節因子として機能する^{8, 9)}. SRF により転写制御を受ける標的遺伝子群には多くのアクチン細胞骨格や接着斑構成タンパク質が含まれる⁸⁻¹⁰⁾. 我々はこれまでに MRTF がアクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現制御を介して, アクチン細胞骨格の再編成

を伴う細胞形態変化を明らかにしてきた。運動能の乏しい上皮細胞が TGF β 刺激により高い遊走能を獲得するには、アクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現亢進と再構築が起こる¹¹⁾。一方、発癌遺伝子 Src により癌化した細胞は、caldesmon・tropomyosinなどを始めとした SRF により転写制御を受けるアクチン細胞骨格タンパク質群の発現抑制が起こり、逆に caldesmon 発現回復により Src 癌細胞の遊走能や浸潤能が抑制されることを明らかにした¹²⁾。さらに活性型 MRTF をコードする遺伝子導入により、上皮由来癌化細胞の浸潤、転移、さらには足場非依存性の増殖が抑制される事を見出した¹³⁾。これらの結果より、MRTF-SRF 経路によるアクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現調節は、癌細胞の遊走・浸潤および転移過程に関与していることが示唆されることとなった。

一方、MRTF-SRF 活性による細胞遊走・浸潤および転移能の分子機構に関しては現在のところ明らかでない。今回、我々は高い遊走能・浸潤能を有するマウス悪性黒色腫由来 B16F10 細胞を用いて解析を行った。B16F10 細胞は、SRF 標的遺伝子の1つであるアクチン細胞骨格タンパク質 caldesmon の発現が非常に低いことを見出している¹²⁾。このことから、B16F10 細胞が有する高い遊走能・浸潤能は MRTF-SRF 経路の機能低下によるアクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現低下が関与している可能性が考えられる。そこで本研究では B16F10 細胞に活性型 MRTF-A 遺伝子導入を行い、MRTF-SRF 経路を介したアクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現亢進による細胞形態、運動能および接着能の変化について解析・検討を行った。

II. 研究材料および方法

1. 培養細胞

マウス悪性黒色腫細胞 B16F10 を用い、10%

ウシ胎児血清 (FCS ; Life Technologies) 添加 Dulbecco's Modified Eagle Media(DMEM, 和光純薬) 中で 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養を行った。全ての細胞の継代培養は培養フラスコ (IWAKI) に播種した細胞を 0.25% トリプシン (Nacalai) 処理によって行った。B16F10 細胞は東京大学大学院薬学系研究科 入村達郎教授 (現聖路加国際メディカルセンター) と信州大学大学院医学系研究科 谷口俊一郎教授より譲与されたものを用いた。

2. 発現プラスミド

発現プラスミドは pEGFP.N1 は Takara, pCDNA3.1(+) および pCS2+ は Life Technologies から入手した。活性型 MRTF-A 発現ベクターは、N 末に存在する RPEL ドメインを欠失したマウス由来 MRTF-A (MRTF-A Δ N) cDNA 配列の N 末側に FLAG タグ及び核移行シグナル (NLS) を付加したもの (FLAG-NLS-MRTF-A Δ N) を pCS2+ プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入することにより作製した。コントロールプラスミドとして pCS2+ を使用した。

3. 遺伝子導入

一過性遺伝子導入実験は、B16F10 細胞を 12 ウェルプレート (IWAKI) に細胞密度が約 30% になるように播種し、Lipofectamine LTX と Plus 試薬 (Life Technologies) を用いたりポフェクション法によってプラスミド DNA を細胞内に導入した。24 時間後に再度遺伝子導入を行い、その 48 時間後に実験に用いた。

4. 免疫染色

細胞をカバーガラス上に撒き直し、24 時間培養後に固定液 (4% パラホルムアルデヒド, 4% スクロース, PBS) にて 15 分間固定した。その後、PBS で洗浄し、ブロッキング液 (0.2% TritonX-100, 0.2% BSA(ウシ血清アルブミン), 2% スキムミルク, PBS) で染色前処理を 37°C で 30 分間行った。標的タンパク質に対する特異抗体、抗 vinculin 抗体 (HVIN-1 ; Sigma)

を用いて 37°C で 1 時間半の反応後、蛍光標識 (Alexa568) した二次抗体 (Life Technologies) を用いて検出した。F-アクチンは蛍光標識 (Alexa488, Alexa568) ファロイジン (Life Technologies), 細胞核は Hoechst33342 (Life Technologies) を用いて染色した。

5. ウェスタン解析

細胞は PBS で洗浄の後, SDS サンプルバッファー [125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 10 % グリセロール, 0.01 % BPB + 1 % プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai), 1% ホスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai)] を用いて細胞を溶解した。SDS サンプルはポリアクリルアミドゲル (5 ~ 11 %) を用いて SDS-PAGE を行い, PVDF 膜 (Millipore) に転写した。5% スキムミルクを含む TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.01 % Tween20) で 30 分間のブロッキング後, 抗体反応を行った。一次抗体は標的タンパク質に対する特異抗体, 抗 FLAG 抗体 (F7425; Sigma), 抗 caldesmon 抗体 (自家製)¹⁴⁾, 抗 tropomyosin 抗体 (TM311; Sigma), 抗 vinculin 抗体 (HVIN-1; Sigma), 抗 talin 抗体 (8d4; Sigma), 抗 zyxin 抗体 (C19; Santa Cruz), 抗 paxillin 抗体 (MAB3060; Chemicon), 抗 β -actin 抗体 (AC15; Sigma), 抗 α -tubulin 抗体 (DM1A; Sigma) を CanGet Signal (TOYOBO) で希釈して用い, 二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体, 抗ウサギ IgG 抗体 (GE healthcare) を用いて化学発光によって検出した。

6. RT-PCR

TRIzol plus キット (Life Technologies) によって細胞から抽出した Total RNA を鋳型として, SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した。RT-PCR は EmeraldAmp PCR Master Mix を用いて, 98°C 3分, (96°C 15秒 - 60°C 1分) × 16-31 サイクルの反応条件で行った。遺伝子特異的なプライマーは以下の配列を使用した。

FLAG : 5'-GGACTACAAGGACGACGATGA-3' (forward), 5'-TCGAAGGAGGAAGTGTCTGC-3' (reverse), caldesmon : 5'-CACTCCTAAAGGCTCGTCTCTC-3' (forward), 5'-ATCCGATGCTGCTGGCTTC-3' (reverse), tropomyosin1 : 5'-GCTGGTTGAGGAGGAGTTGG-3' (forward), 5'-GGCTCGGCTTCAATGACTTTC-3' (reverse), vinculin : 5'-GGCTGTGGCTGGAAACATCTC-3' (forward), 5'-TCAGGCAGAGGTGGCTTAGG-3' (reverse), talin1 : 5'-GCTATTGCGGACATGCTTCG-3' (forward), 5'-TGCTTCAGGTCTGGTTTGG-3' (reverse), zyxin : 5'-TGAAGGAGGTAGAGGAGTTGGAG-3' (forward), 5'-GCTGCTGCTGACACTGATGG-3' (reverse), paxillin : 5'-GGACTACCACAGCCTCTTCTC-3' (forward), 5'-ATCTTTACGACAGTACGCTTGC-3' (reverse), β -actin : 5'-CGTGCGTGACATCAAAGAGAAG-3' (forward), 5'-ATGCCACAGGATTCCATACCC-3' (reverse), α 1-tubulin : 5'-TGTCACAAGGTGCTGCTTCC-3' (forward), 5'-GCTTGGGTCTCTGTCAAATCAATC-3' (reverse), 18S rRNA : 5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGGTT-3' (forward), 5'-GGACATCTAAGGGCATCACAG-3' (reverse). 18S rRNA の mRNA 発現量を内在性コントロールとして各 mRNA 発現量を標準化した。

7. 活性型 MRTF-A 恒常性発現 B16F10 細胞クローンの樹立

恒常的に活性型 MRTF-A を発現する細胞クローンを樹立するため, 活性型 MRTF-A 発現プラスミドを pCDNA3.1(+) 由来のネオマイシン耐性遺伝子カセットと共にリポフェクション法により B16F10 に共導入後, Geneticin (G418 硫酸塩, Life Technologies) を用いて薬剤耐性クローンを行った。それら薬剤耐性クローンの中から RT-PCR によって外因性の活性型 MRTF-A を発現する陽性クローンを特定し, 発現の強い 2 クローンを解析に用いた。

8. 経時的細胞観察

pEGFP.N1 プラスミドの遺伝子導入によってEGFPを発現させた細胞を新たなプレート上に撒き直し、5% CO₂ 非依存培地 (Life Technologies) 中で24時間培養した後に In Cell Analyzer (GE healthcare) を用いて1時間毎に24時間、経時的に細胞運動を撮影した。取得画像から細胞の輪郭を検出し、細胞面積、移動距離および移動速度を算出した。

9. 細胞接着アッセイ

細胞接着アッセイではトリプシン処理によって細胞を剥がした後、 5×10^4 細胞を10% FCS-DMEM 中で新たな24ウェルプレートに静置した。30分後にPBSで非接着細胞を除き、接着細胞を固定液で固定、クリスタルバイオレット染色の後、接着細胞数を顕微鏡下で計測した。

10. 統計学的解析

それぞれの実験は独立の実験として3回以上の試行を実施した。実験結果の統計処理には両側分布の Student's t-test を用い、 $p < 0.01$ を有意差ありと見なした。

III. 結 果

1. アクチン細胞骨格 / 細胞接着関連遺伝子及びタンパク質の発現変化

マウス悪性黒色腫由来 B16F10 細胞を用いて活性型 MRTF-A 遺伝子導入を行い、アクチン細胞骨格 / 接着斑構成遺伝子発現変化を検討した。MRTF-A はアミノ末端に存在する RPEL ドメインによって単量体アクチンと結合し、核移行阻害を受ける⁹⁾。恒常活性型 MRTF-A として、アミノ末端を欠失させ、さらに核移行シグナル (NLS) を付加して恒常的に核移行するよう改変した MRTF-A (活性型 MRTF-A : FLAG-NLS-MRTF-A Δ N) 発現ベクターを用い、まず B16F10 細胞に対して活性型 MRTF-A を一過性に導入した際の影響を確認した。転写制御領域に CArG 配列と

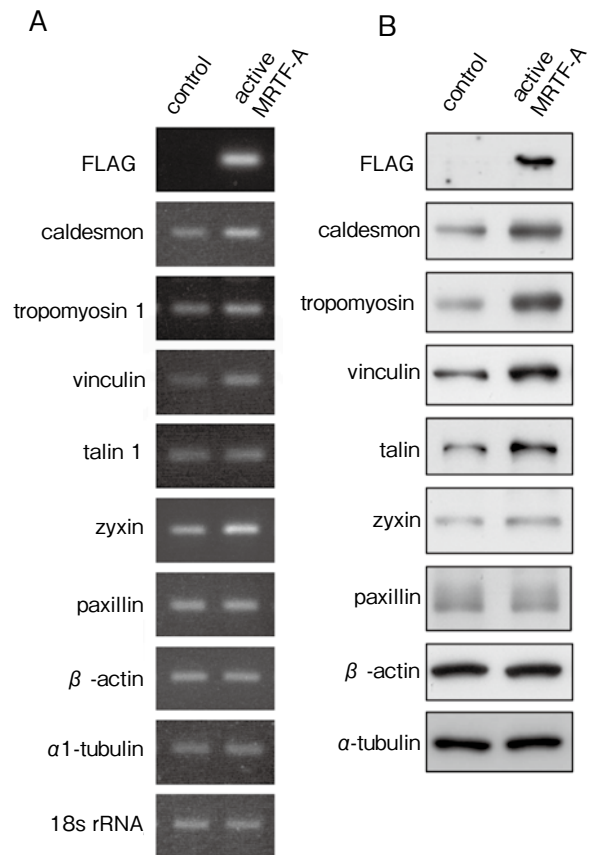


図1. 活性型 MRTF-A 遺伝子導入によるアクチン細胞骨格、細胞接着関連遺伝子及びタンパク質の発現変化

細胞に活性型 MRTF-A (FLAG-NLS-MRTF-A Δ N) あるいはコントロールプラスミドを遺伝子導入してから48時間後にサンプル化し、それぞれ RT-PCR 法、Western ブロット法により解析した。

A. mRNA の発現変化

18S rRNA により補正。

B. タンパク質レベルの発現変化

α -tubulin にてタンパク質量を補正。

呼ばれる SRF 結合認識配列 CC(A/T)₆GG を有する MRTF-SRF 経路の標的遺伝子に注目して mRNA およびタンパク質レベルでの発現を確認した。RT-PCR によって mRNA の発現変化を確認した結果、アクチン細胞骨格関連タンパク質をコードする caldesmon, tropomyosin 1 および接着斑構成タンパク質をコードする vinculin, talin1, zyxin の発現増加を認めた (図1A)。これらはいずれも転写調節領域に CArG

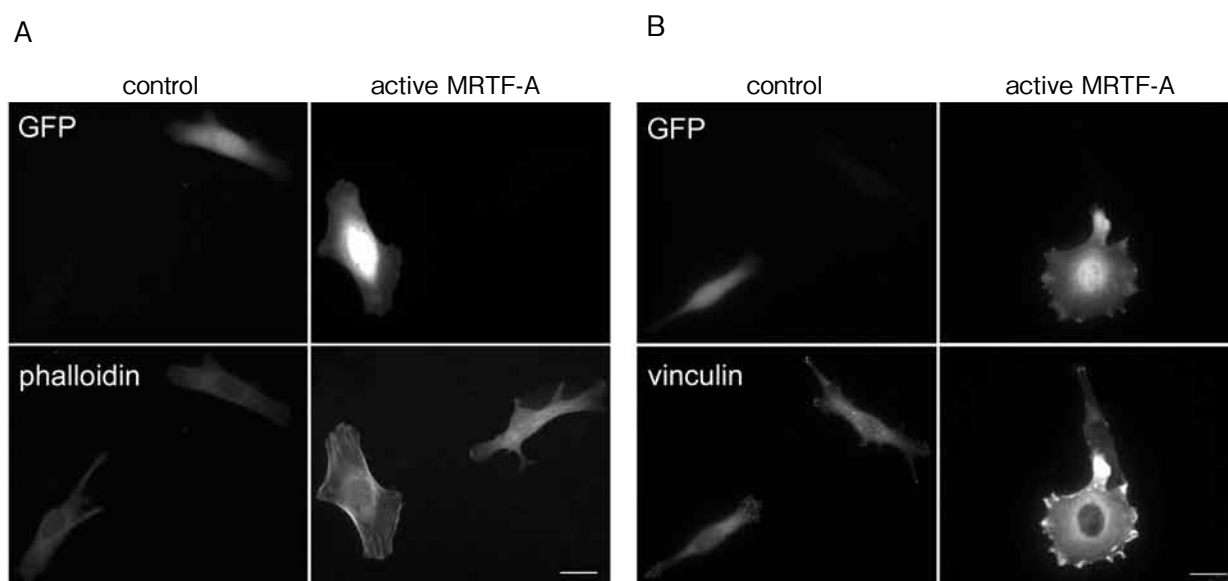


図 2. 活性型 MRTF-A 遺伝子導入による細胞形態の変化

B16F10 細胞に GFP とともに活性型 MRTF-A あるいはコントロールプラスミドを共遺伝子導入し、48 時間後に固定、染色した。GFP 陽性細胞に遺伝子導入が成立している。

A. phalloidin 染色像

B. vinculin 染色像

左側：control 群，右側：活性型 MRTF 導入群

スケールバー：20 μm

配列を有する SRF の標的遺伝子である。一方、接着斑構成タンパク質で CArG 配列を有しない paxillin については mRNA 発現量に変化はなかった。ウエスタン解析により caldesmon, tropomyosin, vinculin, talin, zyxin 各タンパク質の発現量は顕著に増加するが、paxillin は発現量変化を認めなかった (図 1 B)。

2. 細胞形態の変化

次に、アクチン細胞骨格の形態的变化についてファロイジンを用いた F-アクチン染色により観察を行った。GFP 陽性の細胞は遺伝子導入が成立した細胞である。対照の B16F10 細胞は明瞭な F-アクチンの構造が乏しく、周辺部はラメリポディアに富んだ伸長した形態を示し、GFP とコントロールプラスミドの導入だけでは特に変化を生じない。これに対して、活性型 MRTF-A を遺伝子導入した細胞はファロイジン染色性が高く著明なストレスファイバー

が形成され、ラメリポディアは消失して扁平に伸展した形態へと変化した (図 2A)。

さらに、主要な接着斑構成因子である vinculin の免疫染色による局在を観察した。対照の B16F10 細胞では細胞全体に小さな接着斑が散在しているのに対し、活性型 MRTF-A を遺伝子導入した細胞は vinculin 発現増加に伴い、細胞内部の接着斑は消失し扁平に伸展した細胞辺縁に大きな接着構造を形成することが確認された (図 2B)。

3. 活性型 MRTF-A 恒常性発現細胞の樹立

一過性の活性型 MRTF-A 遺伝子導入により SRF により転写制御を受けるアクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現増加と、それに伴う著明なアクチン細胞骨格系と接着斑の再構築が認められた。この様な細胞形態および接着構造の変化は細胞の運動能に影響することが示唆される。一過性の遺伝子導入では、遺伝子

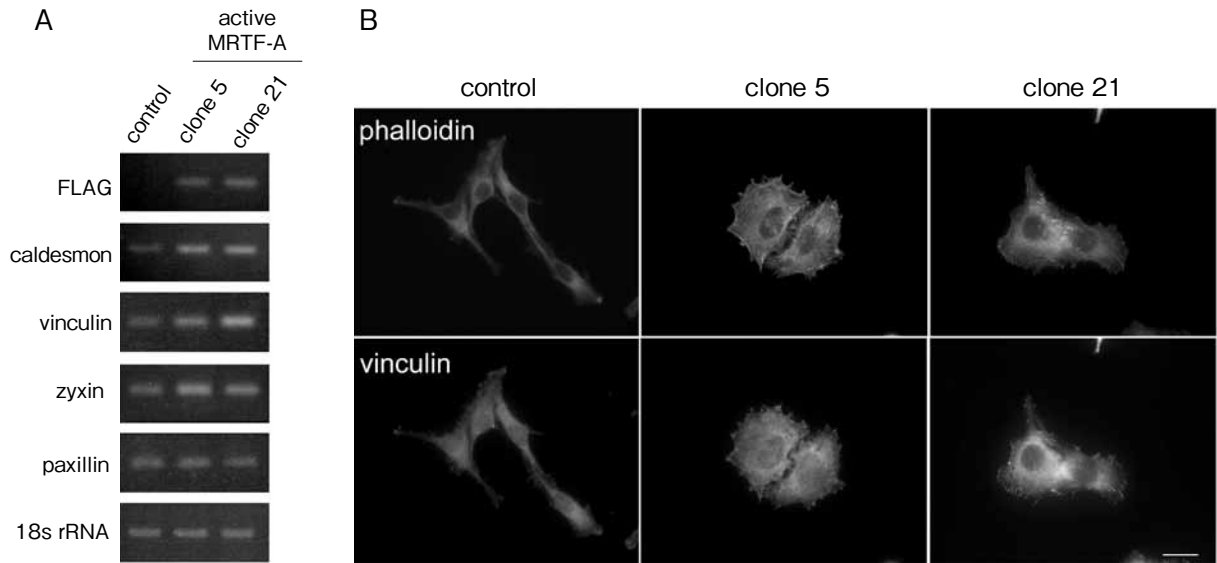


図 3. 活性型 MRTF-A 恒常発現細胞の樹立

細胞の運動性及び接着性を確認するために活性型 MRTF-A 恒常発現細胞を樹立し、mRNA の発現変化を RT-PCR 法、細胞形態の変化を免疫染色法により確認した。

A. mRNA の発現変化

B. 細胞形態の変化

上段：phalloidin 染色像

下段：vinculin 染色像

スケールバー：20 μm

導入が成立した細胞で強い効果が認められるものの遺伝子導入が成立しなかった細胞が多数混在し、また導入細胞ごとに発現量にばらつきが認められる。そのため、細胞の運動能を確認するために発現ベクターがゲノムに安定に組み込まれた恒常性発現株を G418 により選別し、クローン化した。

外因性の活性型 MRTF-A の発現が確認された 2 クローンの活性型 MRTF-A 恒常性発現細胞においても、caldesmon, vinculin, zyxin など SRF 標的遺伝子の発現増加が認められた (図 3A)。活性型 MRTF-A 恒常性発現細胞は対照 B16F10 細胞に比べて扁平に伸展した形態を示し、一過性に活性型 MRTF-A を遺伝子導入した細胞に比べるとその程度はやや弱くなるものの、いずれもストレスファイバーの形成および細胞辺縁部の大きな接着斑の再配置が観察された (図 3B, C)。

4. 細胞運動性の変化

活性型 MRTF-A 恒常性発現細胞を用いて経時的な細胞運動の様子を観察した。観察および細胞運動解析には In Cell Analyzer を用いた。対照 B16F10 細胞は盛んにラメリポディアを展開し、伸長しながら大きく細胞移動する様子が観察された。これに対し活性型 MRTF-A 恒常発現細胞では伸展した細胞辺縁の運動性は低く、細胞の移動が抑制されている様子が確認された。この画像を解析・数値化したところ、活性型 MRTF-A 恒常性発現細胞では対照 B16F10 細胞に比して移動速度はいずれも約 60% 抑制されていた (図 4)。

5. 細胞接着性の変化

経時的な細胞観察において、活性型 MRTF-A 恒常性発現細胞では細胞は伸展して辺縁の動きに乏しく、運動能の低下が認められた。これは、著明な接着斑の大型化および細胞

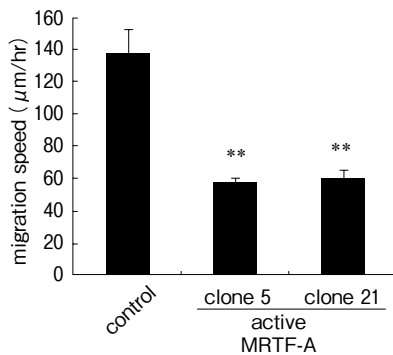


図4. 活性型 MRTF-A 遺伝子導入による細胞運動速度の変化

活性型 MRTF-A 恒常発現細胞を用いて経時的な細胞運動の様子を観察し、その画像を解析し速度を算出した。

各数値は平均値と標準誤差で表し、有意差検定は両側分布の Student's t-test を用い、control との有意差を * で示した (** p < 0.01)。

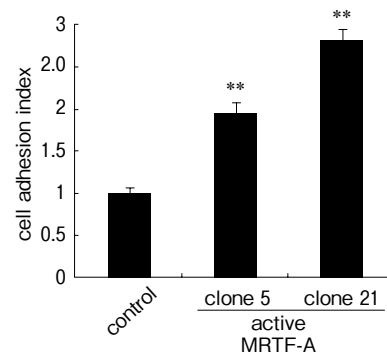


図5. 活性型 MRTF-A 遺伝子導入による細胞接着性の変化

活性型 MRTF-A 恒常発現細胞を用いて細胞接着アッセイを行った。control での接着細胞数を 1 とし、その相対値を cell adhesion index として示した。

各数値は平均値と標準誤差で表し、有意差検定は両側分布の Student's t-test を用い、control との有意差を * で示した (** p < 0.01)。

辺縁への再配置している結果との関連が示唆された。細胞の接着能の変化が運動能の抑制に影響していることが考えられたため、細胞接着アッセイによって細胞接着能の変化について観察した。この結果、活性型 MRTF-A 恒常性発現細胞は対照 B16F10 細胞と比較して接着能が亢進し、単位時間あたりに接着が認められた細胞数は対照に比してそれぞれ 1.94 倍、2.81 倍だった (図5)。

IV. 考 察

癌化した細胞は形態変化とともに細胞間接着能が低下し、遊走能・浸潤能の亢進を獲得することが知られている^{1, 2)}。また、細胞外マトリクスへの接着要求性の低下は足場非依存性増殖および癌転移にも関わる。これら細胞の癌化における細胞形態および運動能の変化にはアクチン細胞骨格構成タンパク質の発現量や活性制御の変化が深く関与している^{15, 16)}。アクチン細胞骨格関連タンパク質 caldesmon, tropomyosin, vinculin, zyxin などは癌化した細胞で発現減少が認められ、遺伝子導入によってこれらの発

現を回復させると細胞浸潤能や足場非依存性増殖などの癌形質が抑制されることが明らかにされている^{12, 15, 17, 18)}。そのためこれらの遺伝子は cytoskeletal tumor suppressor と呼ばれる。我々はこれらの遺伝子が MRTF-SRF 経路の転写制御を受けることに注目し、MRTF 活性と癌形質に関する解析を進めてきた¹³⁾。発癌遺伝子 Src により癌化した細胞では MRTF の核移行阻害により活性が低下しているため、MRTF-SRF 転写下流のアクチン細胞骨格/接着斑構成タンパク質の発現減少が認められる。今回用いた悪性黒色腫由来 B16F10 細胞においても caldesmon, tropomyosin, vinculin などの MRTF-SRF 経路標的遺伝子群の発現が他の細胞に比べて非常に低く、アクチン細胞骨格が脆弱であり接着斑も小さいものが分散されて存在していた (図1, 2)¹²⁾。この B16F10 細胞では内在性の MRTF-A および MRTF-B のいずれもが核に局在せず、細胞質への局在が観察された (data not shown)。このことは B16F10 細胞においても、転写調節因子 MRTF の核移行が阻害されていることにより標的遺伝子の発

現が減少していると考えられる。

今回、活性型 MRTF-A 遺伝子導入によって MRTF-SRF 活性を回復させることで B16F10 細胞のアクチン細胞骨格および接着斑の配置は著明な変化を引き起こした (図 2)。高い遊走能と関連している細胞辺縁部のラメリポディアは消失し、著明な太いストレスファイバーが形成された。これに伴い、細胞辺縁部のストレスファイバーの底面接着部位の接着斑は大型化していた (図 2, 4)。MRTF 活性化によって発現増加した caldesmon, tropomyosin は F-アクチンの強力な安定化因子であり、協調的に束化した直鎖 F-アクチンよりなるストレスファイバーの形成に寄与していると考えられる (図 1)¹⁹⁾。また、vinculin, talin, zyxin は接着斑の細胞内複合体を構成し、接着斑の動態を制御するタンパク質である (図 1, 2)。それら一連の構成要素が発現増加することで安定化した大きな接着構造が形成したと考えられる。実際に活性型 MRTF-A を発現した B16F10 細胞は高い接着能を持つことが明らかとなり、細胞形態変化と関連した接着斑再構築が機能的に細胞接着能に影響していることが確認された (図 6)。

接着斑を起点にして細胞内を横断する太いストレスファイバーは、収縮および張力を発生させる筋細胞におけるサルコメア類似構造と考えられている⁴⁾。活性型 MRTF-A を遺伝子導入した B16F10 細胞でも、アクチン細胞骨格の再構築により張力が生じた扁平な形態へと変化が見られた。活性型 MRTF-A 遺伝子導入によって形成された直鎖 F-アクチンからなるストレ

スファイバーと、強固で安定な接着斑の形成が細胞遊走を抑制している可能性が強く示唆される (図 5)。

我々が作製した活性型 MRTF-A 恒常性発現 B16F10 細胞は、一過的な遺伝子導入で問題となる導入効率などに影響されることなく、均一に MRTF 活性を回復・充進させた細胞集団である。今回はこれを用いることによって MRTF 活性が細胞の接着能と運動能に与える影響を明らかにすることが出来た。この細胞はさらに細胞遊走・浸潤能の解析や in vivo モデルでの転移実験などに用いることが可能であり、癌細胞の浸潤・転移の解析に有用なツールとなる。今後、癌細胞の浸潤・転移において MRTF 活性を介したアクチン細胞骨格制御が果たすさらなる役割について解明できることが期待される。

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、御指導・御校閲を賜りました岩手医科大学医歯薬総合研究所神経科学研究部門・祖父江憲治副学長と岩手医科大学皮膚科学講座・赤坂俊英教授に深く御礼申し上げます。

また、本研究の研究方針ならびに実験手技、論文作成等に一贯して熱心な御指導を頂きました岩手医科大学医歯薬総合研究所神経科学研究部門・真柳平講師に心から御礼申し上げます。

利益相反：著者は開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Kedrin D, van Rheenen J, Hernandez L, et al.**: Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**, 143-152, 2007.
- 2) **Friedl P and Alexander S**: Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* **147**, 992-1009, 2011.
- 3) **Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al.**: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709, 2003.
- 4) **Hotulainen P and Lappalainen P**: Stress-fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* **173**, 383-394, 2006.
- 5) **Danen EH**: Integrin proteomes reveal a new guide for cell motility. *Sci Signal* **2**, 58, 2009.
- 6) **Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, et al.**: Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 103-119, 2004.
- 7) **Mogilner A and Keren K**: The shape of motile cells. *Curr Biol* **19**, 762-771, 2009.
- 8) **Cen B, Selvaraj A, Burgess RC, et al.**: Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol* **23**, 6597-6608, 2003.
- 9) **Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, et al.**: Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329-342, 2003.
- 10) **Schratt G, Philippar U, Berger J, et al.**: Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol* **156**, 737-750, 2002.
- 11) **Morita T, Mayanagi T and Sobue K**: Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* **179**, 1027-1042, 2007.
- 12) **Yoshio T, Morita T, Kimura Y, et al.**: Caldesmon suppresses cancer cell invasion by regulating podosome/invadopodium formation. *FEBS Lett* **581**, 3777-3782, 2007.
- 13) **Yoshio T, Morita T, Tsujii M, et al.**: MRTF-A/B suppress the oncogenic properties of v-ras- and v-src-mediated transformants. *Carcinogenesis* **31**, 1185-1193, 2010.
- 14) **Tanaka J, Watanabe T, Nakamura N, et al.**: Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and tropomyosin) in normal and transformed cells. *J Cell Sci* **104**, 595-606, 1993.
- 15) **Fernandez JLR, Geiger B, Salomon D, et al.**: Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol* **119**, 427-438, 1992.
- 16) **Leonardi CL, Warren RH and Rubin RW**: Lack of tropomyosin correlates with the absence of stress fibers in transformed rat kidney cells. *Biochim Biophys Acta* **720**, 154-162, 1982.
- 17) **Varga AE, Stourman NV, Zheng Q, et al.**: Silencing of the Tropomyosin-1 gene by DNA methylation alters tumor suppressor function of TGF-beta. *Oncogene* **24**, 5043-5052, 2005.
- 18) **Amsellem V, Kryszke MH, Hervy M, et al.**: The actin cytoskeleton-associated protein zyxin acts as a tumor suppressor in Ewing tumor cells. *Exp Cell Res* **304**, 443-456, 2005.
- 19) **Ishikawa R, Yamashiro S and Matsumura F**: Annealing of gelsolin-severed actin fragments by tropomyosin in the presence of Ca²⁺. Potentiation of the annealing process by caldesmon. *J Biol Chem* **264**, 16764-16770, 1989.

Active-MRTF suppresses cell motility via regulation of the actin cytoskeleton in malignant melanoma cells

Takayuki KISHI^{1), 2)}

¹⁾ Department of Neuroscience, Institute of Biomedical Sciences, School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾ Department of Dermatology, School of Medicine, Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on December 9, 2013 & Accepted on December 26, 2013)

Abstract

The actin cytoskeleton plays a key role in control of cell morphology and motility. The regulation of the actin cytoskeletal proteins is involved in cell phenotypic alteration. Myocardin-related transcription factors (MRTFs) function as transcriptional co-regulators for serum response factor (SRF) and enhance the expression of the actin cytoskeletal/focal adhesion genes. Here, we examined the effects of constitutive active-form of MRTF-A on cell morphology in a highly invasive mouse melanoma cell line, B16F10 cells. Expression of active-MRTF-A induced increase

in actin cytoskeletal proteins and changes in cell morphology of B16F10 cells. Furthermore, active-MRTF-A expressing cells exhibited enhanced cell adhesion and migration in association with reorganization and enhancement of focal adhesions. The results presented here suggest that MRTF/SRF-dependent up-regulation of cytoskeletal/focal adhesion proteins in invasive mouse melanoma cells causes repression of cell migration and adhesion via the activation and reorganization of focal adhesions.
