

氏名	わ だ ひろ みち 和 田 啓 道
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2447 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	A p300 as a coactivator of GATA-6 in the transcription of the smooth muscle-myosin heavy chain gene (p300 は GATA-6 のコアクチベーターとして平滑筋ミオシン重鎖の転写に 関与する)
論文調査委員	(主 査) 教授 鍋 島 陽 一 教授 西 川 伸 一 教授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋及び心筋に特異的遺伝子発現の転写調節機構の解明は、近年いくつかの重要なシスエレメントと転写因子が同定されたことにより飛躍的に発展してきたが、平滑筋特異的な遺伝子発現の制御機構には不明な点が多い。GATA 転写因子群は現在までのところ GATA-1 から GATA-6 までの 6 種類の蛋白質が知られているが、この内 GATA-4, 5, 6 が心血管系に発現しており、サブファミリーを形成している。これまでの研究から GATA-6 は血管平滑筋に発現している唯一の GATA 因子であり、増殖刺激により速やかにダウンレギュレーションを受けること、また増殖型形質の血管平滑筋に GATA-6 を過剰発現させると細胞周期が停止することが知られている。これらの結果から GATA-6 の血管平滑筋の分化型形質の維持における役割が示唆されるが、GATA-6 の下流でその標的となる平滑筋特異的な遺伝子についてはこれまで報告がなかった。最近我々は癌遺伝子蛋白の 1 つであるアデノウイルス E1A 蛋白に結合する蛋白の 1 つである p300 が転写 co-activator として GATA 因子と会合出来ることを報告した。そこで、今回 p300 と GATA-6 の平滑筋特異的転写における役割について検討した。

この目的のために我々は高分化型平滑筋に特異的なマーカーであるラットの平滑筋ミオシン重鎖プロモーター (Sm-MHC promoter) を用いた。Sm-MHC promoter の上流 1346bp 以内に GATA-like motif (WGATTR) (-810/-805) が存在する。GATA-6 を過剰発現させた COS7 細胞から抽出した核蛋白と放射標識した GATA-like motif (-810/-805) を含むオリゴヌクレオチド (Sm-MHC GATA) を用いて electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を施行したところ、GATA-6 と Sm-MHC GATA の特異的結合が認められた。この結合は、野生型 Sm-MHC GATA で競合阻害され、その GATA-like motif 内に変異のある変異型 Sm-MHC GATA では競合阻害されなかった。また、抗 GATA-6 抗体でスーパーシフトされたが抗 GATA-4 抗体と正常ラビット IgG ではスーパーシフトされなかった。

COS7 細胞を用いた transient transfection assay により、野生型または変異型 Sm-MHC promoter 活性を測定したところ、GATA-6 を共発現すると野生型 Sm-MHC promoter 活性は用量依存性に亢進したが、変異型 Sm-MHC promoter 活性は亢進しなかった。

p300 と GATA-6 を共発現した COS7 細胞から回収した核蛋白を用いて、免疫沈降後 western blot analysis を施行したところ p300 と GATA-6 の会合が認められた。COS7 細胞を用いた transient transfection assay から、この会合に一致して p300 と GATA-6 は Sm-MHC promoter を co-activate することが判明した。さらに GATA-6 と共に p300 の dominant negative 変異体を発現させた場合、GATA-6 による Sm-MHC promoter 活性の上昇は、有意に抑制された。

血管平滑筋細胞から抽出した核蛋白を用いた EMSA からは GATA-6 が p300 と複合体を形成していることが示唆された。この複合体の DNA binding activity は増殖型に比較して分化型平滑筋細胞において著明に増加していた。

分化型血管平滑筋に野生型または p300 結合部位を欠損させた変異型アデノウイルス E1A を transfection したところ野生型 E1A は内因性 Sm-MHC の発現を著明に抑制したが、変異型 E1A による抑制は軽度であった。

以上より、p300 が GATA-6 の co-activator として Sm-MHC の転写に関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

血管平滑筋細胞の増殖型から分化型への形質変換に転写因子 GATA-6 が関与していることが示唆されている。また p300 が転写コアクチベーターとして GATA 因子と会合出来ることも報告されている。そこで、申請者は p300 と GATA-6 の平滑筋特異的転写における役割を検討した。

GATA-6 は高分化型平滑筋に特異的な平滑筋ミオシン重鎖プロモーターの GATA 認識配列 (-810/-805) に結合し、このプロモーター活性を亢進した。p300 と GATA-6 は会合し、同プロモーターの活性化に協力していることが判明した。分化型血管平滑筋細胞における GATA-6 と p300 の複合体は増殖型に比較しては著明に増加していた。さらに P300 の機能を破綻する EIA による解析により分化型血管平滑筋において内因性 p300 が平滑筋ミオシン重鎖の発現に必要であることが判明した。

以上より、p300 が GATA-6 のコアクチベーターとして平滑筋ミオシン重鎖の転写に関与することが示された。

以上の研究は血管病の病態の解明に貢献し循環器病学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年12月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。