



TITLE:

Cyclin-dependent kinase-9 is a component of the p300/GATA4 complex required for phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sunagawa, Yoichi

CITATION:

Sunagawa, Yoichi. Cyclin-dependent kinase-9 is a component of the p300/GATA4 complex required for phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes. 京都大学, 2012, 博士(人間健康科学)

ISSUE DATE:

2012-03-26

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/157676>

RIGHT:

京都大学	博士（人間健康科学）	氏名	砂川 陽一
論文題目	Cyclin-dependent kinase-9 is a component of the p300/GATA4 complex required for phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes (Cyclin-dependent kinase-9はp300/GATA4と機能的な複合体を形成し、心筋細胞肥大反応に必須である)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>【目的】 高血圧や心筋梗塞による心臓への負荷は、個々の心筋細胞の大きさが増大すること(肥大)によって対応される。しかし、この肥大は限界のある代償機構であり、負荷の継続によりこの代償は破綻し、心臓は収縮機能不全(心不全)に陥る。高血圧、心筋梗塞などを起因として分泌される液性因子による刺激は心筋細胞の細胞質内情報伝達を経て最終的に心筋細胞核に到達し、核内の転写調節因子を活性化、遺伝子発現パターンを変化させ、心筋細胞の肥大を引き起こす。今後の心不全治療の発展ためには、治療薬のターゲットとなる共通の核内経路を解明することが求められている。心筋細胞肥大反応にはヒストンアセチル化(HAT)活性を持つp300と心筋特異的転写因子GATA4の協調的作用が極めて重要であることが知られている。そこで、このp300/GATA4経路の詳細な制御メカニズムを解明するために、GATA4の結合蛋白を精製、プロテオミクス解析したところ、転写伸長反応を促進させるP-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b)の構成蛋白であるCyclin-dependent kinase-9 (Cdk9)を新たなGATA4結合因子として同定した。そこで本研究の目的は、Cdk9がp300/GATA4と機能的複合体を形成し、心筋細胞肥大に関与するかどうかを検討することである。</p> <p>【方法と結果】 HeLa細胞を用いた免疫沈降-western blottingやGST pull-down assayによってCdk9はGATA4だけではなくp300とも結合していることを見出した。COS細胞においてp300はCdk9によるリン酸化を受け、p300によって誘導されるGATA4のアセチル化やDNA結合能の増加は、キナーゼ活性を持たないドミナントネガティブ体のCdk9(DN-Cdk9)の発現によって有意に抑制されることがわかった。また、p300/GATA4で誘導される肥大反応遺伝子である心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANF)やエンドセリン(ET-1)のプロモーター活性はDN-Cdk9によって用量依存的に抑制された。このことからCdk9はp300のリン酸化を通してp300のHAT活性を制御していることが示唆された。培養心筋細胞において検討したところ、フェニレフリン(PE)刺激によってGATA4とCdk9の結合は増加した。ChIPアッセイでは、PE刺激でCdk9のANFプロモーター上への結合が亢進した。またChIP-reChIPアッセイにおいて、PE刺激によってCdk9はANFプロモーター上でp300/GATA4と複合体を形成していることが示された。PE刺激はp300のリン酸化、GATA4のアセチル化やANF、ET-1の転写活性の亢進を誘導した。しかしながら、Cdk9のキナーゼ阻害薬である5,6-dichloro-1-β-ribofuranosylbenzimidazole(DRB)処理を加えることでこれらの反応を抑制した。さらに、DRB処理やCdk9のノックダウンによって、PE刺激による心筋細胞肥大は有意に抑制された。以上のことから、Cdk9のキナーゼ活性はp300のHAT活性に必須であり、心肥大反応を制御していることが示された。</p>			

【考察】 以上より、Cdk9はp300をリン酸化することによりHAT活性を制御し、心筋細胞肥大に関与することが示された。これよりCdk9/p300/GATA4機能的複合体が心不全治療のターゲットとなる可能性が示された。

(論文審査の結果の要旨)

本研究では、プロテオミクス解析によって新たなGATA4結合タンパク質としてCdk9を同定し、心筋細胞肥大反応時においてp300/GATA4複合体の機能にCdk9活性が必須であることを見出した。

フェニレフリン刺激による心筋細胞肥大反応でCdk9はGATA4との結合能が増加し、ANFプロモーター上にリクルートされてくること、p300/GATA4とCdk9がプロモーター上で複合体を形成することが判明した。また、フェニレフリン刺激で活性化したCdk9はp300のリン酸化を誘導した。Cdk9インヒビターであるDBR処理を行うことによって、p300のリン酸化は阻害され、GATA4のアセチル化や肥大反応遺伝子であるANFやET-1の転写活性、心筋細胞の肥大は抑制された。Cdk9をノックダウンさせた場合でも心筋細胞の肥大は抑制された。このことから、Cdk9のキナーゼ活性はp300のリン酸化を介してp300のHAT活性やp300/GATA4複合体、しいては心筋細胞肥大反応を制御していることが示唆された。

以上の研究は心筋細胞肥大反応時におけるCdk9によるp300/GATA4複合体の制御機構の解明に貢献し、Cdk9のキナーゼ活性をターゲットとした新たな心不全治療戦略の開発に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（人間健康科学）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23年11月28日実施の論文内容とそれに関する試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降