

氏名	森本達也
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2210号
学位授与の日付	平成12年3月23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	GATA-5 Is Involved in Leukemia Inhibitory Factor-Responsive Transcription of the β -Myosin Heavy Chain Gene in Cardiac Myocytes (GATA-5は心筋細胞における白血病抑制因子による β -ミオシン重鎖遺伝子の転写活性に必要である)

論文調査委員 (主査) 教授 鍋島陽一 教授 米田正始 教授 篠山重威

論文内容の要旨

他の増殖可能な細胞と異なり心筋細胞は様々な刺激に反応して肥大を起し、その集合器官である心臓は拡張及び収縮機能不全に陥る。心筋細胞肥大は、蛋白合成の量的な増加だけでなく、主な収縮蛋白であるミオシン重鎖遺伝子アイソザイムの変化など、心筋遺伝子発現の質的变化によって特徴づけられる。これらの変化は心筋細胞肥大及び機能不全と密接に結び付いており、これらの遺伝子発現誘導機構の解明は心筋機能不全の分子細胞レベルでの解明に非常に有用である。最近白血病抑制因子やカルディオトロフィン-1などのサイトカインにより膜蛋白 gp 130 を活性化すると心肥大が引き起こされることが明らかになり注目を浴びている。そこで白血病抑制因子によって引き起こされた心筋細胞肥大における核内情報伝達機構を解明する為、 β -ミオシン重鎖遺伝子の発現誘導の分子生物学的機序を解析した。

(1) β -ミオシン重鎖遺伝子プロモーターにおける白血病抑制因子反応 element の同定

β -ミオシン重鎖プロモーターの種々の変異型にルンフェラーゼを結合させたプラスミッドを新生児ラット培養心筋細胞にトランスフェクションし、白血病抑制因子による β -ミオシン重鎖遺伝子の発現誘導に必要なシスエレメントを解析した。同プロモーターの転写開始点より下流 303 塩基から 197 塩基までの 107 塩基内に存在する GATA エレメントを変異させると、基礎レベルの転写は野生型と変わらないが、対照群に対する白血病抑制因子刺激群における転写活性の誘導が著明に抑制されることが見いだされた。以上より β -ミオシン重鎖プロモーター上の GATA エレメントが白血病抑制因子による発現誘導に必要であることが示された。

(2) β -ミオシン重鎖 GATA エレメント結合因子の検討

次に心臓に発現している GATA 因子群、GATA-4/5/6 の中で、どれが最も重要かを検討したところ、GATA-5 のみが強力的に β -ミオシン重鎖プロモーターを活性化することが判明した。 β -MHC プロモーター上の GATA エレメントが GATA-5 と結合するかどうかをみるために electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を施行した。プローブは β -MHC プロモーター上の GATA エレメントを含むオリゴを標識したものをを用いた。GATA-5 を発現させなかった核蛋白抽出液を用いた EMSA ではバンドは認められなかったが、GATA-5 を発現させるとバンドが認められた。このバンドは、標識していない野生型 β -MHC のオリゴヌクレオチドで競合されたことより、GATA-5 が β -MHC の GATA エレメントと配列特異的に結合することが示された。生食と白血病抑制因子で刺激した心筋細胞から抽出した核蛋白を用いて EMSA を施行したところ、プローブである β -MHC プロモーター GATA エレメントとの結合を示すバンドの活性は、生食で刺激した培養心筋細胞からの核蛋白に比べて白血病抑制因子で刺激した細胞から抽出した核蛋白において著明に亢進していた。これらのことより、白血病抑制因子は心筋細胞において GATA-5 と β -MHC プロモーター上の GATA エレメントとの結合を著明に亢進させることが判明した。生食と白血病抑制因子で刺激した心筋細胞から抽出した RNA において GATA-5 の発現を Re-

verse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法で検討した。その結果 GATA-5 の心筋細胞における発現は白血病抑制因子による刺激で著明に亢進することが判明した。以上より GATA-5 が心不全発症の細胞内情報伝達において役割を果たしている可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

心不全は種々の心疾患の共通最終像であり、この問題を解決することは臨床的に極めて重要であると考えられる。白血病抑制因子は心筋細胞を長軸方向に引き伸ばす作用があることから、心室リモデリングに関与している可能性がある。本研究では白血病抑制因子によって引き起こされた心筋細胞肥大における核内情報伝達機構を解明する為、 β -ミオシン重鎖遺伝子の発現誘導の分子生物学的機序を解析した。新生児ラット培養心筋細胞を用いた実験で β -ミオシン重鎖プロモーター上の GATA エlement が白血病抑制因子による発現誘導に必要であることが示された。次に心臓に発現している GATA 因子群 (GATA-4/5/6) の中で、どれが最も重要かを検討されたところ、GATA-5 が、 β -ミオシン重鎖プロモーターの活性化作用が最も強いことを示された。さらに、GATA-5 は β -MHC プロモーター上の GATA エlement と特異的に結合し、白血病抑制因子はその心筋細胞における DNA 結合活性を著明に亢進させることが示された。心筋細胞肥大における細胞質内情報伝達については既に多くの報告がなされているが、核内情報伝達において鍵となる転写因子については知られていなかった。本研究はそれを同定しその役割を的確に示した点で重要である。

以上の研究は心筋細胞肥大の核内情報伝達経路を解明したのみならず、GATA 転写因子が心不全治療の新たな標的となる可能性を示唆するものと考えられる。

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 12 年 1 月 26 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。