

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	高 谷 智 英
論文題目	Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes (心筋細胞肥大において p300 によりアセチル化される GATA4 リジン残基の同定)		
(論文内容の要旨)			
G A T A 転写因子群は、ヒストンアセチル化酵素である p 3 0 0 や C B P によってアセチル化され、その D N A 結合能や転写活性が亢進する。G A T A 1 や G A T A 3 では既に修飾部位が同定されており、赤血球分化やヘモグロビン合成には G A T A 1 の、T 細胞の生存や誘導には G A T A 3 のアセチル化が必要であることが報告されている。 G A T A 4 は、心筋細胞肥大の過程において p 3 0 0 によるアセチル化を受けることが知られているが、その修飾部位はまだ同定されていない。 マウス G A T A 4 には 1 1 残基のリジンが存在し、その内の 9 残基は 2 つの Z n フィンガードメインの C 末端尾部に集中している（2 4 1 ～ 2 6 7 番アミノ酸の N モチーフに 2 残基、2 9 5 ～ 3 2 9 番の C モチーフに 7 残基）。G A T A 4 の N 及び C モチーフのアミノ酸配列はヒトとマウスで 1 0 0 % 一致しており、G A T A 1 , G A T A 3 とも高い相同性を示す。 p 3 0 0 によりアセチル化される G A T A 4 のリジン残基を同定するため、両モチーフのリジンをそれぞれアラニンに置換した変異 G A T A 4 を作成し、その転写活性を測定した。N モチーフの変異は、心筋特異的遺伝子である心房性ナトリウム利尿因子（A N F）及びエンドセリン（E T）－ 1 遺伝子のプロモーターの転写活性に影響を与えなかった。一方、C モチーフの 3 1 1、3 1 8、3 2 0 及び 3 2 2 番のリジン残基を置換すると、p 3 0 0 依存的な転写活性が有意に抑制された。そこで、上記 4 つのアミノ酸置換を同時に持つ変異 M 4 5 6 を G A T A 4 に導入し、詳細な解析を行った。 M 4 5 6 変異により、G A T A 4 の p 3 0 0 依存的な A N F 及び E T－ 1 プロモーター転写活性は完全に失われた。また、p 3 0 0 と共発現させた野生型 G A T A 4 で観察される、抗アセチル化リジン残基抗体との反応、酢酸ナトリウムの取り込みが変異 G A T A 4 では検出されなかった。変異 G A T A 4 も野生型と同様に p 3 0 0 と結合できることから、M 4 5 6 変異によって置換されたリジン残基が p 3 0 0 によってアセチル化されることが考えられた。 また M 4 5 6 変異は、p 3 0 0 依存的な G A T A 4 の D N A 結合能を阻害したが、F O G－ 2 および G A T A 6 といった G A T A 4 結合タンパク質との複合体形成や、核への移行は阻害しなかった。以上のことから、G A T A 4 のアセチル化は、主に D N A との結合に関係していることが明らかになった。 レンチウイルスを用い、新生仔ラット培養心筋細胞に変異 G A T A 4 を発現させ、フェニレフリンによって肥大反応を誘導した。変異 G A T A 4 を発現する心筋細胞では、対照群に比べ、フェニレフリン投与後の細胞表面積、アミノ酸の取り込み、肥大応答遺伝子である A N F 及びミオシン重鎖の m R N A 発現量が有意に低下していた。変異 G A T A 4 は内因性の G A T A 4 に対して優性			

阻害型として機能し、心筋細胞肥大反応を抑制することが考えられた。			
以上の結果から、G A T A 4 の 3 1 1、3 1 8、3 2 0 ないし 3 2 2 番のリジン残基が p 3 0 0 によってアセチル化され得ること、G A T A 4 のアセチル化は D N A との結合に必須であることが示された。また、p 3 0 0 によるアセチル化を受けない変異 G A T A 4 も転写（調節）因子と結合できることから、野生型と変異型 G A T A 4 との間で結合タンパク質の競合が起こり、それにより心筋細胞内で変異型 G A T A 4 が優性阻害型として機能し、肥大反応を抑制することが考えられた。p 3 0 0 による G A T A 4 のアセチル化を特異的に阻害することができれば、新たな心不全治療戦略の確立に貢献することが期待できる。			
(論文審査の結果の要旨)			
本研究では、心筋細胞肥大において転写調節因子 p 3 0 0 によってアセチル化される、転写因子 G A T A 4 のリジン残基が同定された。			
G A T A 4 の 3 1 1、3 1 8、3 2 0 および 3 2 2 番のリジン残基を同時にアラニンに置換した変異 G A T A 4 では、心筋特異的遺伝子の p 3 0 0 依存的なプロモーター転写活性が著明に低下していた。また変異 G A T A 4 は、p 3 0 0 を含む G A T A 4 結合因子と複合体を形成することができたが、p 3 0 0 依存的な D N A 結合能およびアセチル基の取り込みが失っていた。ラット培養心筋細胞に変異 G A T A 4 を発現させると、フェニレフリンによって誘導される肥大反応遺伝子の発現、アミノ酸の取り込み、および細胞肥大が抑制された。これらのことから、心筋細胞肥大において、G A T A 4 の 3 1 1、3 1 8、3 2 0 ないし 3 2 2 番目のリジン残基が p 3 0 0 によってアセチル化され、p 3 0 0 ／ G A T A 4 依存的な肥大反応遺伝子の転写が活性化し、細胞肥大反応が誘導されることが示唆された。			
同定した G A T A 4 のアセチル化リジン残基の情報を利用し、p 3 0 0 による G A T A 4 のアセチル化を特異的に阻害することができれば、新たな心不全治療戦略の確立に貢献することが期待できる。			
以上の研究は、心筋細胞肥大における p 3 0 0 ／ G A T A 4 転写機構の解明に貢献し、心肥大をはじめとする心疾患の理解と治療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 2 3 年 1 月 5 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。			

要旨公開可能日： 年 月 日 以降