

氏 名	かき 垣 田 つよし 剛
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2342 号
学位授与の日付	平 成 13 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	p300 protein as a coactivator of GATA-5 in the transcription of cardiac-restricted atrial natriuretic factor gene (p300 は GATA-5 のコアクチベーターとして心筋特異的心房性ナトリウム利尿因子の転写に関与する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 尾 一 和 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 篠 山 重 威

論 文 内 容 の 要 旨

心筋細胞は胎生期には活発に増殖・分裂を繰り返すが出生とともにその分裂能を失う。出生後心筋細胞は様々な刺激に対し肥大を起こすが、肥大は蛋白合成の量的な増加だけでなく、心房性ナトリウム利尿因子 (ANF) の心室における発現など、心筋遺伝子発現の質的变化によって特徴づけられる。この過程は心筋機能不全と密接に関連し、この過程の解明は心不全の分子生物学レベルでの解明に有用である。心肥大における遺伝子発現調節に GATA 転写因子群が中心的な役割を果たしていることが明らかになり、さらに癌遺伝子蛋白のひとつであるアデノウイルス E1A が細胞内 p300 及びそのファミリーと結合し、それらの役割を破綻させ心筋特異的な遺伝子発現を抑制する事が報告されている。そこで心筋特異的な遺伝子である ANF 遺伝子プロモーターの転写調節機構における GATA 転写因子と p300 の相互作用について検討した。GATA 転写因子群の中で GATA-4,5,6 が心血管系に発現していることが報告されている。NIH3T3 細胞を用い transient transfection assay により ANF 遺伝子のプロモーター活性を求めたところ、GATA-4, 5,6 中で GATA-5 の強制発現が ANF プロモーター活性を最も強く亢進した。また ANF プロモーター領域の GATA エlement を変異させると、この活性亢進は減弱し GATA 配列に依存していた。ANF プロモーター領域の GATA エlement が GATA-5 と結合するかどうかをみるために electrophoretic mobility shift assay を施行した。プローブは ANF プロモーター上の GATA エlement 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 ANF のオリゴヌクレオチドで競合され、GATA-5 の抗体でスーパーシフトしたことより、GATA-5 が ANF の GATA エlement と配列特異的に結合することが示された。次に野生型 E1A を NIH3T3 細胞に強制発現したところ GATA-5 依存性の ANF プロモーター活性亢進は有意に抑制された。p300 との結合部位を欠く変異体 E1A を強制発現するとこの抑制は一部解除された。また野生型 E1A の強制発現による ANF プロモーター活性抑制は野生型 p300 の強制発現では解除されないが、E1A との結合部位を欠く変異体 p300 を強制発現させることで活性抑制が一部解除された。p300 と GATA-5 を共発現した COS7 細胞から核蛋白を回収し、免疫沈降後ウエスタンブロット法を施行したところ p300 と GATA-5 の会合が認められたが、野生型 E1A を強制発現させるとこの結合は阻害された。心筋細胞における ANF mRNA の発現をみると野生型アデノウイルス E1A 蛋白の強制発現で ANF の発現は強く抑制されたが、p300 との結合部位を欠く変異体 E1A の発現では抑制効果は減弱された。また GATA-5 と結合するものの転写亢進部位を欠く dominant negative 変異体を発現させたところ、GATA-5 依存性の ANF プロモーター活性亢進は用量依存的に抑制された。COS7 細胞を用いて ANF プロモーター活性を求めたところ、p300 と GATA-5 を共発現させると ANF プロモーターを co-activate することが判明した。以上より、p300 は GATA-5 のコアクチベーターとして ANF の転写活性に関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

心筋細胞肥大は蛋白合成の量的な増加だけでなく心筋遺伝子発現の質的变化によって特徴づけられる。例えば心筋細胞肥大に伴って、心筋細胞内での心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANF)、エンドセリン-1 (ET-1) の発現は著明に亢進する。心筋での ET-1 発現亢進は ET-1 拮抗薬が心不全の死亡率を改善することから心不全進展に重要な役割を持っていると考えられる。プロモーター解析により GATA 因子は ANF プロモーター活性を亢進した。GATA 因子と p300 は結合することを示し共同作用により ANF プロモーター活性を亢進した。すなわち、p300 は GATA 因子のコアクチベーターとして ANF 遺伝子の転写に関与することを見出した。同様の結果を ET-1 プロモーターについても明らかにした。今までに心筋細胞肥大の転写に GATA 因子が関わっていることはいくつか報告されているが、転写コアクチベーターである p300 が GATA 因子と共同作用し ANF 転写に関わっていることは新たな発見である。以上の研究は、心筋細胞肥大における転写メカニズム解明の可能性を示した。心筋細胞は出生後その分裂能を失うため様々な刺激に対し肥大により代償作用を示すが、その破綻が心不全を来すと考えられる。心筋細胞肥大における転写メカニズムの解明は心不全発症の分子生物学的機序の解明に貢献するものと考えられ、心不全の根本的治療の可能性につなが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。尚、本学位授与申請者は、平成13年2月15日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。