

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21279

研究課題名(和文)心肥大・心不全時におけるGATA4ホモ二量体形成の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of GATA4 dimerization during hypertrophic responses

研究代表者

砂川 陽一 (SUNAGAWA, YOICHI)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30466297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞肥大や心不全の発症・進展には心臓特異的転写因子GATA4が重要な役割を担っている。今回、GATA4が二量体を形成することで心筋細胞肥大反応を制御していることを見出した。GATA4の二量体化形成にはC末端側のジンクフィンガードメイン近傍部にある、p300によるアセチル化修飾を受ける部位が必須であることが判明した。GATA4の二量体化形成を抑制すると心筋細胞肥大反応が優位に阻害された。以上のことより、GATA4の二量体化形成を標的とした新規心不全治療薬の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：A zinc finger protein, GATA4, associates with an intrinsic histone acetyltransferase (HAT), p300, and regulates myocardial transcriptional activities in response to hypertrophic stimuli. In this study, we demonstrated whether GATA4 formed a homo-dimer and its functional mechanism. Chemical cross-linking assay using nuclear extract from HEK293T cells showed that GATA4 homo-dimer was increased by co-expression of p300. IP-WB assay demonstrated that co-expression of GATA4 with p300 increased the formation of its homo-dimer as well as its acetylation. HAT-deficient mutant of p300 and acetyl-deficient mutant of GATA4 did not increase this homo-dimerization as well as GATA4-acetylation. These results suggest that acetylation of GATA4 is required for the formation of GATA4 dimerization. Thus, this dimerization may regulate hypertrophy-response gene activations and the development of heart failure.

研究分野：分子生物学

キーワード：GATA4 心肥大反応 二量体形成

1. 研究開始当初の背景

我が国でも生活習慣の欧米化に伴い、高血圧などの生活習慣病の発症頻度が年々増加し、社会的な問題となっている。これらを基盤として発症する心筋梗塞の発症頻度も増加している。現在までにβ-交感神経遮断薬やACE阻害剤、アンジオテンシン拮抗薬が心不全薬物治療の基本として確立しているものの、心不全発症後の生存率は依然として低いままであり、その後の薬物療法の著明な進展はみられていない。21世紀の高齢化社会の到来と共にこれからますます増加する高血圧性心疾患や虚血性心疾患による心不全に対して、その発症と進展を抑制する新たな治療法を確立することは社会的、医療経済的急務である。

申請者らは、心不全発症メカニズムを解明するために、心筋細胞肥大の情報伝達経路を詳細に検討し、p300による心筋特異的転写因子GATA4のアセチル化が心筋細胞肥大に対し重要な役割を果たしていること(p300/GATA4経路)、さらにp300特異的阻害剤であるクルクミンがGATA4のアセチル化阻害を介して心肥大を抑制し、心不全の進展を抑制することを見出した。しかしながらGATA4のアセチル化がどのような肥大反応を活性化する詳細なメカニズムは不明である。申請者らは、p300/GATA4経路を詳細に解明していった過程において、GATA4が二量体化形成していることを見出した。多くの転写因子は多量体を形成してDNAと結合し、転写活性を調節することが知られていることからGATA4も同様と考えた。そこで本研究の目的は、①心肥大・心不全時におけるGATA4ホモ二量体化形成による転写活性化及びその制御機構の解明、②GATA4二量体化をターゲットとしたより根本的な特異性の高い新しい心不全の治療戦略を模索することである。

2. 研究の目的

心不全の発症・進展には心臓特異的転写因子GATA4が重要な役割を担っている。GATA4の二量体形成やDNA結合に重要な部位について検討した。また二量体形成メカニズムやDNA認識機構を詳細に検討するためにGATA4の結晶化・X線回折実験を行った。これらの結果を総合的に判断し、GATA4の二量体化形成が新たな心不全治療の標的となりうるかどうか検討した。

3. 研究の方法

GATA4全長並びに部位欠損変異体を用いたGST Pull-down法、GATA4配列をもつET-1プローブを用いたDNA Pull-down法により、二量体形成やDNA結合に必要な部位を同定した。また、リコンビナントGATA4を化学架橋反応させ、WBに供することでGATA4の二量体化形成を検討した。さらに、HEK293T細胞によるIP-WB法にて、GATA4の二量体化形成やGATA4の翻訳後修飾による二量体形成の変化を検討した。同

定した二量体形成部位を3つタンデムに繋げた3xG4Dを過剰発現するプラスミド及びレンチウイルスを作成した。HEK293T細胞にANFやET-1レポーターコンストラクトとともにp300、GATA4、3xG4Dを導入し、レポーターアッセイを行うことで、3xG3Dのp300/GATA4経路への影響を検討した。

培養心筋細胞にANFやET-1レポーターコンストラクトと3xG4Dを導入、フェニレフリン刺激により心筋細胞肥大を誘導した。48時間培養後、レポーターアッセイを行うことで、心筋細胞肥大反応に対する3xG3Dの効果を検討した。また、レンチウイルスを用いて3xG4Dを過剰発現させ、フェニレフリン刺激を48時間行った。その後、抗β-MHC抗体を用いた免疫染色と細胞面積測定にて、心筋細胞肥大を評価した。

最後に、同定した二量体形成部位とDNA結合部位を含むGATA4部位欠損変異体にGSTタグを付加させたタンパク質を大腸菌にて大量発現させた。得られた菌を溶菌後、GS4BにてAffinity精製を行い、HRV3Cを用いGSTタグの切断を行った。その後、陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて精製を行った。得られた精製タンパク溶液とGATA4配列を含むDNAを混合後、結晶化スクリーニング、結晶化条件の最適化を行った。得られた結晶を用いて、Photon Factory BL17AにてX線回折実験を行い、回折データを取得した。

4. 研究成果

GATA4の二量体形成には308-326部位が、DNA結合にはこれに加えてC末端側のZinc Finger domainが必要であることが判明した(Fig.1)。IP-WBの結果、GATA4は二量体を

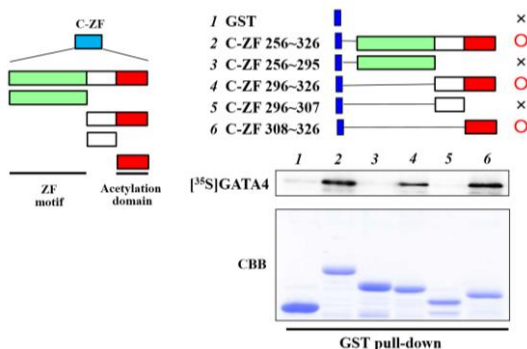


Fig.1 GATA4 二量体部位の同定

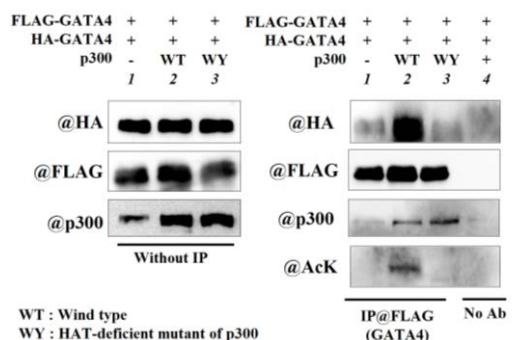


Fig.2 GATA4のアセチル化はGATA4の二量体形成を増加させる

形成しており、p300 共発現により GATA4 のアセチル化を増加させると、それとともに GATA4 の二量体化形成も増加した。また、GATA4 のアセチル化部位置換変異体や p300 の HAT 活性欠損変異体の場合、GATA4 のアセチル化が見られないと同時に二量体化形成も減少していた(Fig.2)。3xG4D を過剰発現は、p300 による GATA4 のアセチル化レベルを変化させずに、GATA4 の二量体化形成を抑制し、ANF や ET-1 といった p300/GATA4 依存的なプロモーター活性を有意に抑制した(Fig3)。また、心筋細胞への 3xG4D の過

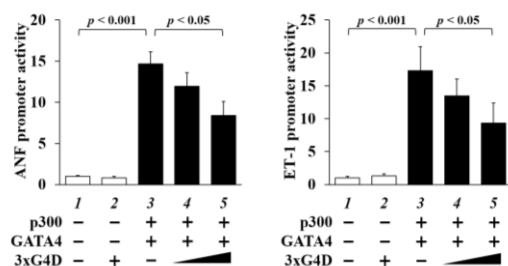


Fig.3 3xG4D は p300/GATA4 による ANF、ET-1 のプロモーター活性の増加を有意に抑制した。

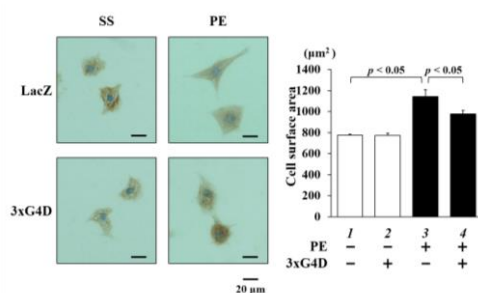


Fig.4 3xG4D はフェニレフリン刺激によって増加する培養心筋細胞の面積を有意に抑制した

剰発現は、フェニレフリン刺激による ANF や ET-1 のプロモーターの増加や心筋細胞の肥大を有意に抑制させた(Fig.4)。最後に、GATA4 の二量体化形成に必要な部位を含むペ

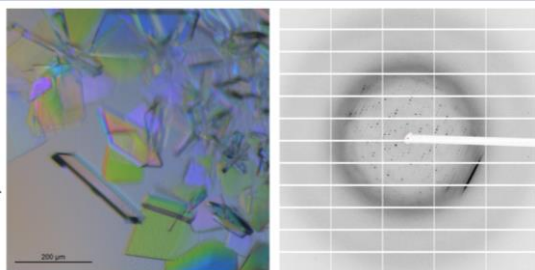


Fig.5 GATA4 の二量体化ドメインの結晶化及び X 線解析実験

プチドを大腸菌にて作成し、各種カラムに供することで結晶化に適した高純度の最終精製品を得た。さらに結晶化スクリーニングと結晶化条件の最適化をしたところ X 線回折実験に適した結晶を得ることに成功し、X 線回折実験の結果タンパク結晶特有の回折像を得ることができた(Fig.5)。現在、データの解析中である。

以上の結果より、GATA4 は二量体化形成する

転写因子であり、p300 によるアセチル化によって二量体化形成が制御していることが判明した。また、二量体化形成を阻害すると心筋細胞肥大反応が抑えられたことから、GATA4 の二量体化が新たな心不全治療の標的因子となることが示唆された。今後、GATA4 の二量体化形成、DNA 認識メカニズムが解明することで、この部位をターゲットとした新規心不全治療薬の開発につながると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Sunagawa Y, Katanasaka Y, Wada H, Hasegawa K, Morimoto T. Functional Analysis of GATA4 Complex, a Cardiac Hypertrophy-response Transcriptional Factor, Using a Proteomics Approach. *Yakugaku Zasshi*. 2016;136(2):151-6.

Katanasaka Y, Suzuki H, Sunagawa Y, Hasegawa K, Morimoto T. Regulation of Cardiac Transcription Factor GATA4 by Post-Translational Modification in Cardiomyocyte Hypertrophy and Heart Failure. *Int Heart J*. 2016 Dec 2;57(6):672-675.

[学会発表] (計 23 件)

国際学会 (3 件)

Homo-dimerization domain of GATA4 is Formed through C-terminal Zinc Finger Domain. International Society of Cardiomyopathies and Heart Failure Congress 2016. 2016.12.2

Overexpression of GATA4 dimerization domain inhibited p300/GATA4-dependent hypertrophic genes transcription. The 3rd International Conference on Pharma-Food. 2016.11.18

Acetylation of GATA4 is required for the formation of GATA4 Homo-dimerization. The 3rd International Conference on Pharma-Food. 2016.11.18

国内学会 (20 件)

- 心筋特異的転写因子 GATA4 の二量体化形成阻害を標的とした新規心不全治療薬の開発、第 27 回日本循環薬理学会、2017.12.1
- 心肥大応答を司る転写因子 GATA4 の結晶構造解析、第三回 J-ISCP 学術集会、2017.6.17
- 心筋特異的転写因子 GATA4 はホモ二量体を形成し心筋細胞肥大に関与する、第三回 J-ISCP 学術集会、2017.6.17
- 心筋特異的転写因子 GATA4 の二量体化形成には C 末の ZF ドメインが重要である、日本薬学会第 137 回年会、2017.3.25

他 16 件

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

砂川 陽一 (Sunagawa Yoichi)

研究者番号：30466297