

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890191

研究課題名(和文) p300/GATA4のプロテオミクス解析による新規心筋細胞肥大反応制御因子の探索

研究課題名(英文) Analysis of novel p300/GATA4 binding complex during cardiomyocyte hypertrophy by proteomics approach

研究代表者

砂川 陽一 (Sunagawa, Yoichi)

静岡県立大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：30466297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：心不全の進展にはp300/GATA4複合体の協調的作用が重要な役割を果たしている。我々は新たなGATA4結合因子であるHDAC1/2を含む転写抑制複合体構成因子であるRbAp48/46を見出した。RbAp48/46はGATA4とHDAC1/2の結合を仲介、抑制複合体を形成し、フェニレフリン誘導性GATA4のアセチル化、ANF、ET-1の転写活性、心筋細胞の肥大を抑制した。この抑制機能にはHDAC1/2が必須であった。以上の結果からRbAp48/46は心筋細胞肥大反応時にHDAC1/2とともにp300/GATA4と機能的な複合体を形成していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：A zinc finger protein GATA4 is associated with an intrinsic histone acetyltransferase p300 and regulates myocardial transcriptional activities in response to hypertrophic stimuli. We found that Retinoblastoma protein (Rb)-associated protein 48 and 46 (RbAp48/46) are novel component of the p300/GATA4 complex and form a repressor complex with HDACs in cardiomyocytes. RbAp48/46 could bind to GATA4, mediate the binding of HDAC1/2 with GATA4, and inhibited phenylephrine-induced hypertrophic responses such as acetylation of GATA4, activation of the ANF and ET-1 promoters, and increase in cell size. On the contrary, knockdown of RbAp48/46 by shRNA augmented such responses. Knockdown of HDAC1/2 augmented PE-induced hypertrophy and failed to inhibit effects by RbAp48/46. These findings demonstrate that RbAp48/46 recruit HDAC1/2 onto GATA4, suppress the binding of p300 with GATA4, and inhibit hypertrophic responses in cardiomyocytes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：心肥大 転写因子 GATA4 p300 翻訳後修飾

### 1. 研究開始当初の背景

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、新たに 73 個の新規 p300/GATA4 制御因子候補を見出した。この中には NURD や Sin3A といった Class I HDAC である HDAC1/2 を含む転写リプレッサー複合体構成因子である RbAp48/46 が含まれていた。転写リプレッサー複合体には様々な転写因子の活性を制御することが報告されており、これらが心筋特異的転写因子 GATA4 と複合体を形成し、どのように GATA4 の転写活性や心肥大反応を制御しているのか、非常に興味深い。

### 2. 研究の目的

本研究では、新規 p300/GATA4 制御因子である RbAp48/46 に着目した。RbAp48/46 はともに NURD や Sin3A の転写リプレッサー複合体の構成因子として知られている。他の構成因子には脱アセチル化酵素群 Class I HDAC の HDAC1 や HDAC2 がある。GATA4 はアセチル化によってその転写活性機能が制御されていることから、これら複合体は GATA4 の脱アセチル化に関与しているのではないかと考えた。そこで、RbAp48/46 やその転写リプレッサー構成因子 HDAC1、HDAC2 が p300/GATA4 に対してどのような制御を行っているのか、心筋細胞肥大に関与するかどうかを検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

GST もしくは HIS タグを付与したリコンビナントタンパクを大腸菌で生産した。もしくは、*in vitro* Translational system にて 35S で標

識されたりコンビナントタンパクを生産した。これらリコンビナントタンパクを用いた GST プルダウン法にて GATA4、RbAp48/46、HDAC1/2 らの因子の直接結合を検討した。また FLAG-GATA4 を発現させた HEK293T 細胞の核タンパクを抽出し、免疫沈降-WB 法にて GATA4 が RbAp48/46 や HDAC1/2 と結合を形成しているのかどうか検討した。また内在性の GATA4 が RbAp48/46 や HDAC1、HDAC2 と複合体を形成しているのかどうか、成体雌ラット心臓から抽出した核タンパクを用いて同様の検討を行った。

RbAp48/46 や HDAC1/2 を過剰発現した時の p300/GATA4 依存的な(心房性利尿ペプチド(ANF)及びエンドセリン 1(ET-1)のプロモーター活性への影響を HEK293T 細胞や初代培養にて検討した。また siRNA や shRNA を用いて RbAp48/46 をノックダウンした HEK293T 細胞及び培養心筋細胞でも同様に検討を行った。次に RbAp48/46 をレンチウイルスで過剰発現させた心筋細胞にフェニレフリン刺激を与え、48 時間後に免疫沈降-WB にて GATA4 のアセチル化を、抗 MHC 抗体による免疫染色及び細胞面積測定で心筋細胞肥大に対する作用を調べた。同様の実験を RbAp48/46 を shRNA にてノックダウンした場合においても検討した。RbAp48/46 の抑制機構に HDAC1/2 が関与しているのかどうか検討するために、HDAC1/2 をノックダウンさせた、もしくは Class I HDAC 阻害剤であるヴァルプロ酸処理を行った心筋細胞に RbAp48/46 を過剰発現させ、フェニレフリン誘導性心筋細胞肥大の変化を調べた。

### 4. 研究成果

GST プルダウンの結果、GATA4 は RbAp48/46 と直接結合するが、HDAC1/2 とは直接結合しなかった。また RbAp48/46 は HDAC1/2 双方とも直接的に強く結合した。GATA4 と RbAp48/46 の結合のドメインマップを行ったところ、GATA4 の N 末端に位置する転写活性化ドメインが RbAp48/46 との結合に、RbAp48/46 の 5 番目と 6 番目の WD40 ドメインが GATA4 との結合にそれぞれ必須であることが判明した。また、免疫沈降-WB にて、HEK293T 細胞だけでなくラット心臓核抽出物を用いた系にて GATA4 は RbAp48/46 や HDAC1/2 と複合体を形成していることが判明した。HEK293T 細胞にて RbAp48/46 をノックダウンした場合 GATA4 と HDAC1 や HDAC2 との結合が減弱し、逆に RbAp48/46 の過剰発現は GATA4 と HDAC1 や HDAC2 と

の結合が増強したことから、HDAC1 や HDAC2 は RbAp48/46 を介して GATA4 に結合していることが示唆された。

HEK293T 細胞での RbAp48/46 の過剰発現は p300/GATA4 依存的な ANF や ET-1 のプロモーター活性を用量依存的に抑制するが、HDAC1 や HDAC2 の過剰発現はあまり変化が見られなかった。しかしながら、RbAp48 や RbAp46 に加えて HDAC1 や HDAC2 を過剰発現すると RbAp48/46 による転写抑制能がさらに増強した。RbAp48/46 の過剰発現は GATA4 への HDAC1/2 のリクルートを誘導し、GATA4 の脱アセチル化を減少させた。RbAp48/46 のノックダウンは逆に HDAC1/2 のリクルートを減少させ、GATA4 のアセチル化は増加した。Class I HDAC 阻害剤であるヴァルプロ酸処理や HDAC1/2 のノックダウンは p300 による GATA4 のアセチル化をさらに増強した。またヴァルプロ酸処理は RbAp48/46 過剰発現による GATA の脱アセチル化をレスキューした。以上の結果から、RbAp48/46 による GATA4 の脱アセチル化や GATA4 依存的な転写抑制能には HDAC1 や HDAC2 が必須であることが判明した。

心筋細胞への RbAp48/46 の過剰発現はフェニレフリン刺激による GATA4 のアセチル化や ANF や ET-1 のプロモーター活性、心筋細胞肥大を抑制した。逆に心筋細胞への RbAp48/46 のノックダウンは GATA4 のアセチル化や ANF、ET-1 のプロモーター活性、心筋細胞肥大を誘導した。次に心筋細胞での HDAC1/2 のノックダウンや Class I HDAC 阻害剤であるヴァルプロ酸処理を加えたところ、フェニレフリン刺激に伴う ANF や脳性利尿ペプチド (BNP)、MHC といった mRNA の亢進や心筋細胞肥大をさらに増強し、RbAp48/46 過剰発現による心筋細胞肥大抑制を消失させた。以上の結果から、RbAp48/46 による心筋細胞肥大抑制能には HDAC1/2 が必須であることが判明した。

#### 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1件)

1. Morimoto T, Sunagawa Y, Katanasaka Y, Hirano S, Namiki M, Watanabe Y, Suzuki H, Doi O, Suzuki K, Yamauchi M, Yokoji T, Miyoshi-Morimoto E, Otsuka Y, Hamada T, Imaizumi A, Nonaka Y, Fuwa T, Teramoto T, Kakeya H, Wada H, Hasegawa K. *Biol Pharm Bull.* 2013; 36: 1708-1714.

〔学会発表〕(計7件)

国際学会(オーラルのみ)

1. Sunagawa Y, et al. Novel GATA4 Binding Proteins, RbAp48/46 Involved in Modulating Post-Translational Modification Crosstalk during Hypertrophic Responses in Cardiomyocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2013, Dallas, USA, November, 2013.
2. Sunagawa Y, et al. RbAp48/46 Inhibit GATA 4-Dependent Hypertrophic Gene Transcription By Forming A Co-repressor Complex With HDAC/2 In Cardiomyocytes Asian Pacific Society of Cardiology 2013 Congress, Pattaya, Thai. February, 2013.
3. Sunagawa Y, et al. Retinoblastoma protein (Rb)-associated protein 48 and 46 are novel components of p300/GATA4 complex and repress hypertrophic responses in cardiomyocytes. World Congress of Cardiology Scientific Sessions 2012, Dubai, UAE. April, 2012.

国内学会(オーラルのみ)

1. Sunagawa Y, et al. MEK-1-dependent phosphorylation of GATA4 Relieves Repressor Function of Novel GATA4 Binding Proteins, RbAp48/46, during Cardiomyocyte Hypertrophy, 第78回日本循環器学会学術集会、2014年3月23日
2. 砂川陽一, 他、リプレッサー複合体 RbAp48/46 による p300/GATA4 転写複合体の翻訳後調節機構の解析、第13回京滋ハートセミナー、2013年5月9日
3. Sunagawa Y, et al. RbAp48/46 form a Co-repressor Complex with HDAC1/2 and inhibit p300/GATA4-dependent Hypertrophic Responses in Cardiomyocytes, 第77回日本循環器学会学術集会、2013年3月17日
4. Sunagawa Y, et al. RbAp48 and 46 disassociate GATA4 from p300 and inhibit hypertrophy-responsive gene transcription in cardiomyocytes. 第13回日本心不全学会、2012年12月1日

〔図書〕(計4件)

1. 砂川陽一、刀坂泰史、森本達也、長谷川浩二、細胞内シグナル伝達異常と心不全、臨床心不全の基礎知識 2014; in press
2. 森本達也、鈴木秀敏、砂川陽一、刀坂泰史、和田啓道、長谷川浩二、心不全薬物療法：現

状と今後、J-ISCP 会誌 心血管薬物療法  
2013; 1: 31-37.

3. 森本達也、砂川陽一、刀坂泰史、鈴木秀敏、  
和田啓道、長谷川浩二、心臓の老化とクルク  
ミン治療、Heart View 2013; Vol17, No.4:  
61-67

4. 森本達也、鈴木秀敏、砂川陽一、刀坂泰史、  
和田啓道、長谷川浩二、甲状腺ホルモン/心不  
全を中心とした循環器への影響、日本甲状腺  
学会雑誌 2012; 3: 119-122.

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

なし

取得状況（計 件）

なし

〔その他〕

2012 年 5 月 The XVIIth INTERNATIONAL  
CONGRESS of the International Society of  
Cardiovascular Pharmacotherapy  
YIA First Prize 受賞

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

砂川 陽一 (Sunagawa Yoichi)

研究者番号：30466297