

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 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：2010～2011

課題番号：22890153

研究課題名（和文） 冠血管新生における p300/GATA4 転写経路と新規 GATA4 結合分子の機能解析

研究課題名（英文） Mechanistic study of p300/GATA4 transcriptional pathway and novel GATA4 binding proteins in angiogenesis

研究代表者

刀坂 泰史（KATANASAKA YASUFUMI）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：00583973

研究成果の概要（和文）：心肥大においてGATA4を介して遺伝子発現が活性化されている。本研究ではGATA4転写経路の分子機構解析と血管新生における役割を解明することを目的とした。新規GATA4結合分子が、GATA4活性化因子であるp300とGATA4による転写反応を抑制した。血管新生への寄与については、明らかにできていないが、同様の機構が働いている可能性が高いと考えている。この結果は、心肥大の新たな分子機構を示唆する意義深い知見であり、これまでにない心不全治療薬の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：During cardiac hypertrophy, gene transcriptions are activated through GATA4, a transcription factor expressed in cardiomyocytes. The purpose of this study is to investigate the molecular mechanism of GATA4 transcriptional pathway and the involvement in angiogenesis. A novel GATA4 binding protein PRMT5 suppressed the gene transcription induced by GATA4 and p300, a coactivator of GATA4. Although the involvement in angiogenesis is not clear, the finding suggests that PRMT5 is a novel modulator of p300/GATA4 transcriptional pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,010,000 | 303,000 | 1,313,000 |
| 2011年度 | 890,000   | 267,000 | 1,157,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |

研究分野：生物系薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：心肥大、血管新生、p300、GATA4、新規 GATA4 結合分子

## 1. 研究開始当初の背景

近年の日本の死亡原因の第2位は心疾患である。心不全は高血圧性心疾患、弁膜症、虚血性心疾患など種々の心疾患の共通最終像であるが、根本的治療法の開発には至っていない。この問題を克服することは臨床的に重

要であり、新たな薬物治療戦略が求められている。新規治療戦略の開発において重要なことは治療薬のターゲットとなりうる機能的に重要な分子や経路を解明することである。生体において、高血圧や心筋梗塞などのストレスが心臓にかかると、心臓は心肥大にて代

償しようとする。この際、個々の心筋細胞に十分な酸素や栄養を供給しようと、血管新生が行われることが知られている。近年、心筋特異的転写因子である GATA4 が血管新生因子 VEGF-A の発現調節機能を有することが報告された (J Clin Invest; 117: 3198-3210, 2007)。GATA4 は、内因性ヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300 など様々な因子によってその転写活性が複雑に制御されている。しかし、冠血管新生の誘導において、GATA4 を中心とした転写調節メカニズムは十分には解明されていない。

## 2. 研究の目的

当研究室ではこれまでに p300 が GATA4 の活性を制御していることを見出し、この p300/GATA4 転写経路を中心とした心肥大の分子機構解析を行ってきた。アドレナリン $\alpha$ 1 受容体アゴニストであるフェニレフリン刺激により、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ p300 は GATA4 をアセチル化し、その転写活性を亢進し、心肥大反応を促進することを明らかにしてきた。その過程で GATA4 と結合する複数の新規タンパク質を同定することに成功し、この新規タンパク質と GATA4 による心肥大の新たな分子機構を解析してきた (J Biol Chem. 285: 9556-9568, 2010)。そこで本研究では p300/GATA4 転写経路の詳細な分子機構の解析と心肥大時における血管新生における役割を解明するために、1) 新規 GATA4 結合分子の p300/GATA4 転写経路における役割の解明、2) その分子メカニズムの解明、3) 血管新生因子 VEGF-A の発現調節機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) 新規 GATA4 結合分子の p300/GATA4 転写経路における役割の解明

これまでの研究から新規 GATA4 結合分子として、アルギニンメチルトランスフェラーゼ PRMT5 と Nuclear Corepressor (NCoR) 複合体の構成因子である TBL1 を同定した。そこでこれら分子の p300/GATA4 転写経路における役割を検討した。具体的な方法として PRMT5 または TBL1 の過剰発現やノックダウンによって、p300/GATA4 によって誘導される心肥大マーカーである ANF や ET1 の転写活性をレポーターアッセイにて検討した。また GATA4 の活性は自身のアセチル化によって調節されている (Cardiovasc Res; 84:209-17, 2009.)。そこで GATA4 のアセチル化を免疫沈降とウエスタンブロット (IP-WB) にて検討した。さらにリコンビナントタンパク質を用いて GATA4 と新規結合タンパク質との結合を確認した。

### 2) 分子メカニズムの解明

### 2-1 PRMT5

GATA4 のアセチル化は、その転写活性化において重要である。新規結合分子の過剰発現により、p300 によって誘導された GATA4 のアセチル化が抑制されていた。こ PRMT5 はアルギニンメチル化酵素であり、メチル化を介して転写制御を行っていることが考えられたため、GATA4 と p300 のメチル化を IP-WB にて検討した。

### 2-2 TBL1

TBL1 は NCoR 複合体構成因子であり、この複合体の抑制機構で最も重要な因子はヒストン脱アセチル化酵素 3 (HDAC3) であることが報告されている。そこで、TBL1 による p300/GATA4 転写の抑制には HDAC3 による脱アセチル化反応が関与している可能性が考えられたことから、GATA4 と HDAC3 の結合量を検討した。

### 3) 血管新生因子の発現調節機構の解明

p300/GATA4 転写経路による VEGF-A をはじめとした血管新生因子の発現調節機構の解明するため p300 と GATA4 を過剰発現させ、VEGF-A の発現変化の検討を real time PCR およびレポーターアッセイにて行った

## 4. 研究成果

心肥大の過程において心筋細胞内では p300/GATA4 転写経路の活性化が起こり、転写反応が起こっている。本研究では p300/GATA4 転写経路の分子機構解析と血管新生因子の発現調節の役割を解明することを目的とした。これまでに新規 GATA4 結合タンパク質の同定に成功しており、その役割について検討を行った結果、アルギニンメチル化酵素 PRMT5 及び NCoR/SMRT 複合体構成因子 TBL1 は p300/GATA4 誘導性の転写反応に対して抑制的に働いていることを明らかにした (Fig. 1)。さらに PRMT5, TBL1 とも

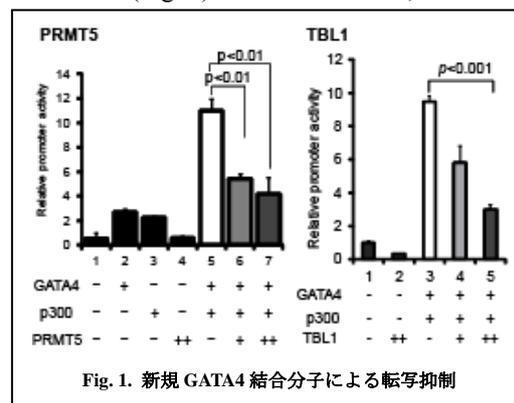
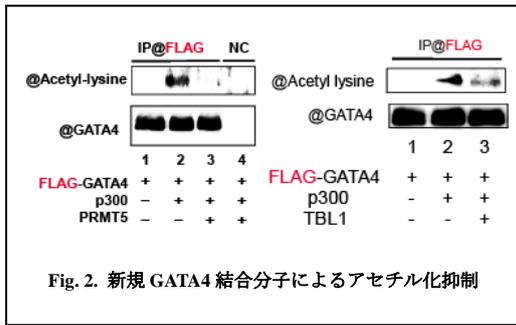


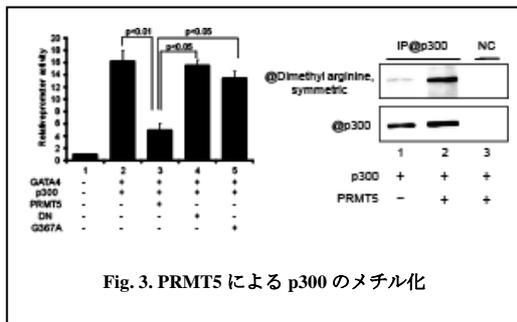
Fig. 1. 新規 GATA4 結合分子による転写抑制

に過剰発現により、GATA4 のアセチル化を抑制した (Fig. 2)。そこでそれぞれの分子についてその抑制メカニズムを検討した。



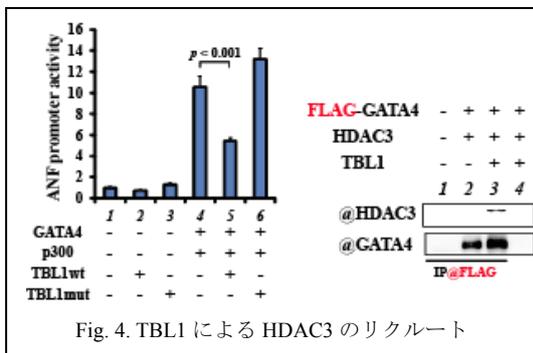
#### 4-1 PRMT5 による抑制機構

PRMT5 の過剰発現により、p300 のアルギニン残基が対照的にジメチル化されていることを明らかにした。また PRMT5 の酵素活性部位を欠如させた変異体では心肥大反応を抑制しなかった (Fig. 3)。以上の結果から、PRMT5 による抑制機構の一端として、メチル化酵素反応を介した p300 のメチル化が関与していることが示唆された。



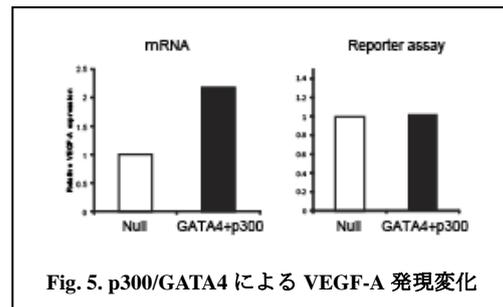
#### 4-2 TBL1 による抑制機構

TBL1 の過剰発現により、NCoR 複合体に含まれる HDAC3 を GATA4 複合体にリクルートすることを明らかにした。また HDAC3 との結合部位を遺伝子置換した TBL1 では心肥大転写反応が抑制されなかった (Fig. 4)。これら結果から、TBL1 は HDAC3 を GATA4 複合体にリクルートさせ、転写反応を抑制することが考えられた。



これらの結果から、心肥大および心不全発症における GATA4 の新規制御メカニズムであり、難治性疾患である心不全の分子機構の解明さらには治療薬やバイオマーカー開発への応用が期待できる大変に意義深い知見

であると言える。p300/GATA4 経路の血管新生因子 VEGF-A の転写反応への寄与と分子機構については、GATA4 と p300 の過剰発現により mRNA レベルで亢進するという結果は得られているものの (Fig. 5)、レポーターアッセイで結果を再現できておらず、いまだ明らかにできていないが、同様の制御機構が働いている可能性が高いと考えている。新規 GATA4 結合分子による p300/GATA4 転写経路制御機構が解明され、心肥大・心不全発症さらには血管新生への寄与を明らかできれば、GATA4 を中心とした転写反応のコントロールが可能となりうる治療標的分子の同定、治療薬の開発につながり虚血性心疾患などの疾患への応用が期待できる。



#### 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 5 件)

Sunagawa Y, Wada H, Suzuki H, Sasaki H, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Katanasaka Y, Shimatsu A, Kimura T, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T. A novel drug delivery system of oral curcumin markedly improves efficacy of treatment for heart failure after myocardial infarction in rats. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(2):139-144. DOI:JST.JSTAGE/bpb/35.139 [pii]

Sunagawa Y, Morimoto T, Wada H, Takaya T, Katanasaka Y, Kawamura T, Yanagi S, Marui A, Sakata R, Shimatsu A, Kimura T, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K. A natural p300-specific histone acetyltransferase inhibitor, curcumin, in addition to angiotensin-converting enzyme inhibitor, exerts beneficial effects on left ventricular systolic function after myocardial infarction in rats. *Circ J.* 2011;75(9):2151-2159. DOI: JST.JSTAGE/circj/CJ-10-1072 [pii]

Kodera Y, Katanasaka Y, Kitamura Y, Tsuda H, Nishio K, Tamura T, Koizumi F. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular

endothelial growth factor receptor 3. Breast Cancer Res. 2011;13(3):R66.

Sasaki H, Sunagawa Y, Takahashi K, Imaizumi A, Fukuda H, Hashimoto T, Wada H, **Katanasaka Y**, Kakeya H, Fujita M, Hasegawa K, Morimoto T. Innovative preparation of curcumin for improved oral bioavailability. Biol Pharm Bull. 2011;34(5):660-665.  
DOI: JST.JSTAGE/bpb/34.660 [pii]

Taguchi F, Koderu Y, **Katanasaka Y**, Yanagihara K, Tamura T, Koizumi F. Efficacy of RAD001 (everolimus) against advanced gastric cancer with peritoneal dissemination. Invest New Drugs. 2011 29(6):1198-205.

〔学会発表〕(計7件)

**刀坂泰史**、村井範之、砂川陽一、川口正悟、矢吹晴一郎、和田啓道、木村 剛、藤田正俊、長谷川浩二、森本達也：5-HT<sub>2A</sub>受容体拮抗薬サルボグレラートはフェニレフリンによって誘導される心筋細胞肥大を抑制する  
第1回 Molecular Cardiovascular Conference II (北海道)、Program & Abstract、p.114、2010年9月5日

**刀坂泰史**、温泉川真由、北村悠香、森本達也、小泉史明：Combination therapy of gefitinib and a novel phosphatidyl inositol-3 kinase inhibitor BGT226 in non small cell lung cancer  
第69回日本癌学会学術総会(大阪)、抄録集、p.190、2010年9月23日

**刀坂泰史**、寺田太士、砂川陽一、渡辺雄一、高谷智英、和田啓道、島津 章、木村 剛、藤田正俊、長谷川浩二、森本達也：新規GATA4結合タンパク質RbAp46、RbAp48の心筋細胞肥大への影響  
第18回日本血管生物医学学会(大阪)、抄録集、p.157、2010年12月1日

**Yasufumi Katanasaka**, Yukiko Nakagawa, Yoichi Sunagawa, Masatoshi Fujita, Hiromichi Wada, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto : Protein arginine methyltransferase 5 and methylosome protein 50 are novel component of p300/GATA4 complex involved in hypertrophic responses in cardiac myocytes.  
The 14 th Annual International Tronto Heart Summit (Tronto, Canada) PROGRAM、p.15、2011年6月9日

**Yasufumi Katanasaka**, Yukiko Nakagawa, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto : Protein arginine

methyltransferase 5 and methylosome protein 50 are novel component of p300/GATA4 complex involved in hypertrophic responses in cardiac myocytes.

American Heart Association BCVS2011(New Orleans, USA), PROGRAM、p.95、2011年7月20日

**Yasufumi Katanasaka**, Yukiko Nakagawa, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto : Protein arginine ethyltransferase 5 suppresses hypertrophic gene transcription in rat cardiomyocytes through the inhibition of p300/GATA4 pathway.  
The 7th Chica-Japan Cardiovascular Forum(Beijing, China)PROGRAM、p.58、2011年10月15日

**Yasufumi Katanasaka**, Yukiko Nakagawa, Yoichi Sunagawa, Hiromichi Wada, Akira Shimatsu, Masatoshi Fujita, Koji Hasegawa, Tatsuya Morimoto : Protein Arginine Methyltransferase 5 and Methylosome Protein 50 Suppresses Hypertrophic Responses in Cardiomyocytes by Inhibition of p300/GATA4 Pathway.  
American Heart Association Scientific sessions 2011(Orland, USA)PROGRAM、p.260、2011年11月13日

**刀坂泰史**、鈴木秀敏、並木雅俊、砂川陽一、廣田翔、和田啓道、島津 章、藤田正俊、長谷川浩二、森本達也：NCoR/SMRT複合体によるp300/GATA4転写経路抑制機構の解析  
第132回日本薬学会年会(札幌)、2012年3月29日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

刀坂 泰史 (KATANASAKA YASUFUMI)  
静岡県立大学・薬学部・分子病態学助教  
研究者番号：00583973

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：