

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | 心筋細胞の分化モデルにおけるGata-4遺伝子の発現制御   |
| Author(s)    | 石橋, 拓也   |
| Citation     | 大阪大学, 2009, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49668">https://hdl.handle.net/11094/49668</a>  |
| rights       |  |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | 石橋拓也  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(薬学)  |
| 学位記番号      | 第22878号   |
| 学位授与年月日    | 平成21年3月24日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科応用医療薬科学専攻                        |
| 学位論文名      | 心筋細胞の分化モデルにおける Gata-4 遺伝子の発現制御                        |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 山元 弘<br>(副査)<br>教授 八木 清仁 教授 土井 健史 教授 中川 晋作 |

## 論文内容の要旨

心臓は、脊椎動物の胚発生初期に複雑な過程を経て形成する。中胚葉の予定心臓領域より2つの心臓原基が生じ、正中線に移動して融合する。これが原始心筒で、さらに心室、心房および弁を生じ、完成する。その過程でGATA-4、TBX-5、Nkx2.5などの転写因子が筋繊維等の心機能に関与する様々な遺伝子の発現を誘導する。

GATA-4は染色体上のGATA配列に結合し、標的遺伝子の発現を制御する転写因子である。予定心臓領域に発現し、心臓の発生と分化に必要な遺伝子の発現を制御する。Gata-4の発現異常や変異が心肥大や先天性心疾患の原因であること、Gata-4のKOマウスは心臓の発生に異常を来とし、胚性致死を示すことから、Gata-4は心臓の形成に重要であると考えられる。

このように、標的遺伝子やKOマウスの表現型は比較的解析されているが、GATA-4自身の発現制御機構は未解明である。組織と発生時期に特異的に発現するGata-4遺伝子の発現メカニズムの解明は、心臓の形成や心疾患の発症メカニズムを理解する上で重要であると思われる。

そこで、私は心筋細胞分化のモデルであるP19.CL6細胞を用い、Gata-4遺伝子の発現制御メカニズムの分子レベルでの解明を目指した。

P19.CL6細胞はマウス初期胚由来の培養細胞で、培地にDMSOを添加すると、心筋様細胞に分化し、約10日後に自律拍動する。その際、心筋特異的な遺伝子を発現するため、心筋細胞分化における遺伝子発現を調べる系として利用される。

私は、このP19.CL6細胞を用いて、Gata-4遺伝子の発現を制御する染色体領域と、その領域に作用する転写因子を同定した。

まず、P19.CL6細胞をDMSO処理し、Gata-4とその他の心筋特異的な遺伝子の発現を確認した。P19.CL6細胞をDMSO入り培地で培養し、経時的に総RNAを抽出して、RT-PCRを行った。P19.CL6細胞はDMSO処理後、分裂を続け、10日後に自律拍動した。Gata-4の転写産物は、DMSO

処理前には発現せず、DMSO処理2日後には検出され、その後も存在し続けた。心臓に発現する Gata-6 や筋繊維MHC $\alpha$ の発現もDMSO処理後に検出された。このことから、P19.CL6細胞は Gata-4 遺伝子の発現メカニズムを解析する系として有用であると結論した。

そこで、Gata-4の発現を制御する染色体領域を解析することにした。様々な長さのGata-4の上流配列をルシフェラーゼ遺伝子に連結したレポーターを、DMSO未処理または処理したP19.CL6細胞に導入し、その活性を調べた。その結果、DMSO処理した細胞では、124bpの上流領域が高いルシフェラーゼ活性を示した。また、DMSO処理後における上流124bpまでを含む領域のプロモーター活性は、DMSO未処理よりも高かった。この上流124bpの領域には種間で保存されたE-boxと2つのGC-boxが存在する。これらの配列に変異を導入した場合に、上流124bpのレポーター活性が減少した。このため、Gata-4遺伝子のプロモーター活性には、上流124bpまでの領域にあるE-boxとGC-box配列が必要であると考えられる。

近年、心筋に発現する遺伝子がクロマチン構造によって転写調節されることが分かってきているので、染色体上でのGata-4のプロモーター活性に必要な領域を解析した。具体的にはGata-4の上流配列をGFP遺伝子に連結したレポーターをP19.CL6細胞の染色体に安定導入し、レポーター活性をGFPの蛍光強度から評価した。

興味深いことに、安定導入した場合、一過的に導入した場合と結果が異なった。安定導入した場合では124bpのみでは、DMSO処理前後ともわずかにGFPの蛍光を発するクローンと、発しないクローンがあった。それに対して1.3kbpの領域を含むレポーターでは、すべてのクローンで、DMSO処理後にGFPの蛍光が観察された。上流124bpの領域のみを染色体に導入した場合には、クロマチン状態によってプロモーターが活性化したりしなかったりし、安定的に活性化するにはさらに上流の配列が必要であると思われる。

また、一過的導入したレポーターに必須であったE-boxとGC-boxに変異を導入した上流1312bpのレポーターを安定導入し、活性を検討した。E-boxの変異体は蛍光が消失し、GC-boxの変異体は野生型に比べて蛍光がわずかであった。安定導入した場合でもこれらの配列がプロモーター活性に必要であった。

染色体上でのレポーター活性に必要な124bpより上流の領域には、種間で保存されたGATA配列が存在する。このGATA配列に変異を導入したレポーターを安定導入したところ、野生型より活性が減少した。

心臓ではGATA-4,5,6が発現し、GATA配列を介して、心臓の形成に必要な遺伝子の転写を制御することが知られている。これらがGata-4の上流に結合し、転写を制御すると考え、これらGATA因子のGata-4遺伝子上流配列への結合をクロマチン免疫沈降法により解析した。その結果、DMSO処理したP19.CL6細胞のクロマチンから抗GATA-6抗体でGata-4の上流配列が沈降し、GATA-6がGata-4遺伝子上流配列に結合することが分かった。さらにGata-6をP19.CL6細胞に強制発現した後、DMSO処理し、2日後のGata-4のmRNAレベルを検討したところ、対照よりGata-4 mRNAが増加した。そのため、DMSO処理の初期ではGATA-6がGata-4の転写を促進的に制御することが考えられる。

これらの結果から、Gata-4遺伝子の発現制御機構として、転写開始点のすぐ上流にあるE-box

とGC-boxがRNAポリメラーゼIIのリクルート等の基本的な転写に関与し、GATA-6がDMSOに回答してGATA配列を介して染色体内での転写活性化に寄与するメカニズムが考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

亜鉛フィンガー型DNA結合タンパク質 GATA-4 は、心臓の発生や維持に必須の転写制御因子である。GATA-4 の標的遺伝子やノックアウトの表現型を研究した報告例は多いが、Gata-4 遺伝子自身がどのような発現制御を受けているのかはこれまで解明されていなかった。組織特異的、かつ発生時期に特異的に発現する Gata-4 遺伝子の発現制御機構を解明することは、心臓の形成、および Gata-4 遺伝子の発現上昇と関係する心肥大の発症を分子レベルで理解する上にも重要である。本論文では、このような問題提起のもと、心筋細胞の分化モデルである P19.CL6 細胞を用いて、Gata-4 遺伝子の発現制御領域の役割を分子レベルで明らかにすることを目指して研究を行い、新規性のある成果を得ている。

マウス初期胚由来の P19.CL6 細胞は、培地に DMSO を添加すると心筋様の細胞に分化し、約10日後に自律拍動が始まる。Gata-4 mRNA の発現は DMSO 処理2日後に既に検出され、8日をピークとして自律拍動が見られる10日後以降にいたるまで発現が持続した。心臓に発現する Gata-6 mRNA も同様に検出された。GATA-4 の標的である筋繊維をコードする Myosin Heavy Chain  $\alpha$  (MHC  $\alpha$ ) は、自律拍動が見られる直前の DMSO 処理8日後から検出された。このような Gata-4 の発現特性を明らかにした後、一過的導入による Gata-4 遺伝子上流配列のプロモーター活性を評価した。DMSO 処理した P19.CL6 細胞では、上流 35bp までの領域を持つレポーターのルシフェラーゼ活性はほとんど検出されず、124bp 以上の上流領域を含むレポーターは、高いルシフェラーゼ活性を示した。また、DMSO 処理細胞におけるプロモーター活性は、DMSO 未処理のものよりも高かった。上流 124bp の領域にはヒト、マウス、ラットにおいて保存された1個の E-box と2個の GC-box が存在する。そこで、変異を導入したレポーターを用いた検討を合せて行い、Gata-4 遺伝子のプロモーター活性には、上流 124bp の領域で十分であり、その領域に存在する E-box と GC-box が必要であることを示した。

一方、染色体 DNA を格納しているクロマチン構造が遺伝子の転写に深く関わることも知られるようになったため、Gata-4 遺伝子上流配列を、蛍光タンパク質 GFP の遺伝子に連結したレポーターを安定に発現する P19.CL6 細胞を単離し、GFP の蛍光強度の増加からプロモーター活性を評価した。その結果、124bp 領域の E-box と GC-box に加え、上流 1kbp に存在する GATA 配列も Gata-4 遺伝子の転写に重要であることを明らかにした。さらにクロマチン免疫沈降法により、GATA 配列に GATA-6 が結合することを明らかにした。Gata-6 を強制発現させた場合にも DMSO 処理後の Gata-4 遺伝子発現が促進されるため、GATA-6 タンパク質が Gata-4 遺伝子の発現を正に制御する機構があると結論した。

今回の研究成果は、これまで明らかでなかった心筋における Gata-4 遺伝子の発現制御の分子機構解明に大きく貢献するとともに、今後の心臓疾患の医薬学研究の基礎となるものであり、博士(薬学)の学位に十分値するものである。