

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ゼブラフィッシュコネキシンcx36.7の心筋特異的な遺伝子発現調節機構の解析
Title(English)	
著者(和文)	宮城央子
Author(English)	Hisako Miyagi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10086号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 信大,太田 啓之,田中 幹子,中戸川 仁,梶川 正樹
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10086号, Conferred date:2016/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

平成 27 年度博士論文 要約

ゼブラフィッシュコネクシン cx36.7 の心筋特異的な

遺伝子発現調節機構の解析

東京工業大学 大学院生命理工学研究科
生体システム専攻

宮城央子

指導教員 中村信大 准教授

要旨

コネキシン 36.7 (connexin 36.7, Cx36.7) は、心筋の筋原繊維の配向が乱れて心臓形成が不全となる変異体ゼブラフィッシュ *ftk* の原因遺伝子として同定され、心筋発生初期の心臓前駆細胞に特異的に発現して筋原繊維形成の引き金となるシグナル伝達を担う分子であることが予想されている。しかしながら、*cx36.7* 遺伝子の心臓前駆細胞特異的な発現を決定する分子機序については不明である。本研究は、*cx36.7* 遺伝子の発現調節機構の解明を目的とし、*cx36.7* 遺伝子のプロモーター解析を行った。

cx36.7 遺伝子上流プロモーター領域の下流に EGFP レポーター遺伝子を連結したものを、*Tol2* トランスポゾンを用いた遺伝子トラップ法によりゼブラフィッシュゲノムに挿入し、得られたトランジェニック体における EGFP の発現について調べた。その結果、転写開始点から上流 133 bp の領域が心臓特異的なプロモーターの活性化を担っており、その領域内に存在する 2 つの GATA 結合配列 (GATA#1 および GATA#2) が重要であることが分かった。また、GATA#2 は骨格筋におけるプロモーター活性化にも働くが、この活性化は転写開始点から上流 133 bp から 316 bp の領域によって強く抑制され、この領域内に存在する 2 つの GATA 結合配列 (GATA#3 および GATA#4) が抑制効果に重要であることが分かった。発現阻害実験から *Gata4*, *Gata5*, *Gata6* タンパク質の心臓特異的なプロモーター活性化への関与が認められたが、骨格筋におけるプロモーター活性の制御には寄与していないことが示唆された。

以上の結果から、*cx36.7* 遺伝子が GATA 転写因子群 (*Gata4*, *Gata5*, *Gata6*) の下流に位置し、発生初期の心臓特異的な *cx36.7* 遺伝子の発現が GATA 結合部位を介した心臓特異的な転写活性化と骨格筋特異的な転写抑制によって調節されていることが示された。

1. 序論

心臓は、生命活動の維持に必要な血液循環の原動力を生み出す重要な臓器である。心臓拍動の原動力は、心臓を構成する心筋細胞が一方向に向かって整列して一斉に収縮弛緩を繰り返すことによって生み出される。この心筋細胞の収縮は、細胞内にある筋原繊維の収縮によって引き起こされる。筋原繊維は、アクチンとミオシンを主成分とするサルコメアを最小単位とする収縮装置が、細胞の長軸方向に向かって整列することで形成される。筋原繊維の収縮については、サルコメア内のアクチンフィラメントの上をミオシンフィラメントが Ca^{2+} イオンと ATP 依存的に移動することで起こることが分かっている (滑り説)。しかしながら、筋原繊維の形成機構、特に、筋原繊維の配向決定のしくみはほとんど明らかにされていない。

本研究の研究対象であるコネキシン 36.7 (connexin 36.7, Cx36.7) は、心臓形成が不全となる変異体ゼブラフィッシュ *ftk* の原因遺伝子として広瀬茂久教授 (東京工業大学) らの研究グループによって同定された。*ftk* の心筋細胞では、筋原繊維の配向がランダムになっていたことから、Cx36.7 が筋原繊維の配向決定に深く関わっていることが期待された (Sultana *et al.*, 2008)。コネキシンは 6 量体を形成することでコネクソンと呼ばれるチャネル様の構造をとり、細胞膜上でギャップ結合またはヘミチャネルとして細胞間または細胞内外の物質輸送に機能することが知られている (1-4 参照)。したがって、Cx36.7 は心筋細胞の分化段階において、筋原繊維形成に重要なシグナルを伝達していることが予想された。しかしながら、*cx36.7* 遺伝子の発現制御機構、シグナル伝達の分子実体、Cx36.7 シグナリングの応答分子や繊維形成に至るプロセスについては未解明のまま残されていた。本研究では、*cx36.7* 遺伝子が発生初期における心臓前駆細胞または心筋細胞に特異的に発現する分子機構について解明するため、*cx36.7* 遺伝子のプロモーター解析を行い、発現調節に関与する *cis* 因子と *trans* 因子の同定を行った。

1-1. 脊椎動物における心臓形成

心臓は脊椎動物の発生の最も早い段階で形成され始める臓器のひとつである。胚発生の初期に出現する心臓前駆細胞は、内胚葉からの bone morphogenetic protein (BMP) や fibroblast growth factor (FGF) などのシグナルの作用により中胚葉から分化する。心臓前

駆細胞は正中線を挟んだ両側に存在しているが、腸管形成に伴って正中線上へと移動し、融合して一つの原始心管が形成される。次いで、原始心管のルーピングと区画化、弁の形成が起こり、心房と心室が形成されて心臓が完成する。心臓の構造は種間で多少異なるが、上記の一連の心臓形成のプロセスは脊椎動物間で高く保持されている。また、心臓前駆細胞の分化には心筋特異的な転写因子群の作用が非常に重要であり、その作用機序も種間で保存されている。ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた遺伝学的研究により、心臓発生を制御する転写因子群が発見され (Tao and Schulz, 2007)、これらの脊椎動物におけるオースログ遺伝子として GATA-binding factor (GATA), NK2 transcription factor (NKX2), myocyte enhancer factor 2 (MEF2), T-box (TBX) ファミリーが同定されている。これらの遺伝子産物は初期心臓前駆細胞で発現し、互いに協調しながら心筋細胞分化や心臓形成に機能する遺伝子発現を制御している (Black *et al.*, 2010, Greulich *et al.*, 2011, Harvey *et al.*, 2002, He *et al.*, 2011, Peterkin *et al.*, 2005)。中でも、GATA4, NKX2-5, TBX5 は心筋細胞分化に必須な転写因子であり、これらの遺伝子に変異によって機能異常になると、心臓の構造異常とそれに伴う心不全が引き起こされる先天性心疾患 (congenital heart disease: CHD) を発症することが知られている (McCulley and Black, 2012)。

1-2. GATA 転写因子

GATA 転写因子は保持された 2 個のジンクフィンガーモチーフ (Cys-Xxx₂-Cys-Xxx₁₇-Cys-Xxx₂-Cys) から構成される DNA 結合ドメインを持ち、共通の DNA 配列(A/T)GATA(A/G) を認識する転写因子である (Merika *et al.*, 1993, Molkenkin, 2000)。脊椎動物において 6 種類の GATA 転写因子 (GATA1~GATA6) が存在し、組織発現様式から GATA1, GATA2, GATA3 と GATA4, GATA5, GATA6 の 2 つのサブファミリーに分類されている。GATA1, GATA2, GATA3 は T リンパ球, 赤血球細胞, 巨核球の分化調節に関与している (Cantor *et al.*, 2002, Ohneda *et al.*, 2002, Patient *et al.*, 2002, Rothenberg *et al.*, 2002)。一方, GATA4, GATA5, GATA6 は心臓, 肝臓, 肺を形成する中胚葉と内胚葉由来の様々な組織で発現しており, 組織特異的な遺伝子発現の調節に関与している (Peterkin *et al.*, 2007, Arceci *et al.*, 1993, Laverriere *et al.*, 1994, Morrissey *et al.*, 1996, Morrissey *et al.*, 1997)。特に, これら遺伝子のノックアウトマウスでは心臓発生の異常が確認されるなど心筋細胞分化や心臓の形態形成に重要な役割を持つことが報告

されている (Bruneau, 2002, Kuo *et al.*, 1997, Molkentin *et al.*, 1997, Koutsourakis *et al.*, 1999, Morrissey *et al.*, 1998)。例えば, GATA4 ノックアウトマウスは重篤な心臓の発生異常が生じて胚発生の途中で死んでしまう。このマウスでは心臓前駆細胞の移行に異常が生じて正中線上で融合しないまま分化が進み, 原始心管が 2 つ形成されてしまう (Kuo *et al.*, 1997, Molkentin *et al.*, 1997)。GATA5 ノックアウトマウスでは大動脈弁の形成不全が起こり血流に異常が生じる (Laforest *et al.*, 2011)。GATA6 ノックアウトマウスは, 着床後の内胚葉の分化異常を原因とする原腸形成不全により死んでしまう (Molkentin *et al.*, 2000)。さらに, GATA4 と GATA6 の二重ノックアウトマウスでは, 心臓前駆細胞は確認されるものの, 心筋への分化は見られず心臓は形成されない (Zhao *et al.*, 2008)。

1-3. モデル生物としてのゼブラフィッシュの意義

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) はコイ目コイ科ラスボラ亜科に属するインド原産の小型熱帯魚で (成魚の体長は約 3~5 cm) 発生生物学分野で広く利用される脊椎動物のモデル生物の一つであり, 以下のようなモデル生物としての利点が挙げられる。①多産で一組の雌雄が一度に 200~300 個の受精卵を産む (解析数を増やせる)。②生後 3 ヶ月ほどで成魚となり生殖が可能となる (世代交代が早い)。③発生が早く, 受精後数日でほぼ全ての器官形成が完了する。④胚が透明なため, 器官形成の様子など体内の細胞を顕微鏡下で観察できる。⑤ゲノム塩基配列が決定されている。⑥遺伝学的手法が確立されており, 遺伝子導入やトランスジェニック体の作製が容易に行え, 遺伝子の機能解析ができる。さらに, ⑦心臓発生における形態形成や遺伝子制御の仕組みがヒトとの間で保存性が高い。また, ⑧ゼブラフィッシュの胚は哺乳動物とは異なり, 受動拡散により体表から酸素を吸収して得ることができる (Pelster and Burggren, 1996)。つまり, ゼブラフィッシュは胚発生において循環器系に依存せず, たとえ心臓形成や心機能に異常が生じてもしばらくの間は生存を続けることが可能なのである。このような特徴から, ゼブラフィッシュは近年, 心臓発生や心臓病の分子機構の解析の有用なモデル生物として利用されている。

1-4. コネキシン

コネキシンは膜 4 回貫通型のタンパク質であり, その遺伝子はヒトでは 21 種類, ゼ

ブラフィッシュでは 38 種類が存在することが確認されている。コネキシンはホモまたはヘテロ 6 量体を形成してチャネル様のコネクソンとして細胞表面に局在し、隣接する細胞のコネクソンと結合してギャップ結合を形成するか、そのままヘミチャネルとして機能する。ギャップ結合は、隣接する細胞同士をつなぎ、分子量約 1,000 以下の物質を双方向に輸送する。一方、ヘミチャネルは細胞内と細胞外の間の物質輸送を行う。コネキシンは慣例的にコネキシンを表す “Cx” の後ろに分子量を表す数字を付して呼ばれる。例えば、分子量が 36.7 kDa ならば Cx36.7 と表記される。しかし、オーソログ分子が異なる分子量をもつと名称が種間で異なり混乱を引き起こしやすいため、この問題を避けるために GJ (Gap junction) 法に基づく命名法もある。

コネキシンは、心臓、血管、神経系、内耳、肝臓など様々な臓器や組織で発現が確認されている (Dale, 2006)。哺乳動物の心臓では Cx40, Cx43, Cx45 の発現が確認されており、心臓の拍動収縮に必要な刺激伝導系 (電気刺激伝播) の作動に重要な役割を果たしている (Lo, 2000)。これらのコネキシン分子は、心臓において洞房結節、心房筋、房室結節、ヒス束、プルキンエ繊維、心室筋など部位特異的に発現し、ギャップ結合を形成することで隣接細胞に速やかに電気信号を伝えて心房と心室のリズミカルで協調的な拍動を生み出している。まず、洞房結節 (ペースメーカー細胞) において発生する Ca^{2+} イオンに依存した電気刺激を、電位依存性が高く伝導性が低い Cx45 が心房筋へと伝える。次に、安定した伝導性を有する Cx43 を介して電気刺激が心房筋全体に伝播して、伝導性が低い Cx45 が存在する房室結節へと収束する。伝導性が非常に高い Cx40 が発現するヒス束を経て一気に電気刺激は心室筋全体へと伝えられる。Cx40, Cx43, Cx45 の発現は胚発生時から確認されており、ノックアウトマウスの解析により心臓拍動だけでなく心臓形成への関与も確認されている。Cx40 のノックアウトマウスでは、刺激伝導の障害が生じて不整脈を生じるだけでなく、血管が形成されないなどの表現型が見られる (Kirchhoff *et al.*, 1998, Simon *et al.*, 1998, Simon and McWhorter, 2002)。Cx40 と血管内皮細胞に発現する Cx37 の二重ノックアウトマウスでは、血管の形態形成異常に伴う血管拡張や臓器出血などが生じて出生前後に死に至る (Simon *et al.*, 2002)。Cx43 ノックアウトマウスは、血液を肺に送る心臓の右室流出路の形成異常による肺呼吸不全により生後まもなく死んでしまう (Reaume *et al.*, 1995)。Cx45 ノックアウトマウスでは、刺激を伝える伝導路の形成がうまく行われない (Kumai *et al.*, 2000)。心臓の刺激の伝導路は、発生過程で心内膜細胞と呼ばれる細胞から作られるが、Cx45 のノックアウトマウスでは Cx45 のギャップ結合の欠損により、心内膜細胞の分化誘導に必要なシグナル伝

達が起こらないため、刺激伝導系の形成不全によって心臓が機能せず、血液循環の異状が原因で出生前に死んでしまう (de la Pompa *et al.*, 1998, Ranger *et al.*, 1998, Nishii *et al.*, 2001)。このように、心臓に特異的に発現するコネキシンは電気刺激の伝達によって心臓の拍動を生み出すだけでなく、胚発生過程での正常な心臓の分化誘導と形態形成にも深く関わっている。

1-5. ゼブラフィッシュ Cx36.7 の発見と機能

Cx36.7 は心臓に重篤な表現型を呈する変異体ゼブラフィッシュ *ftk* から同定されたコネキシンである (Sultana *et al.*, 2008)。*ftk* では、心筋細胞の筋原繊維の配向がランダムになり心臓拍動が不規則になっている。その結果、血液循環に障害が生じてやがて心臓は拡張し、心臓壁が破れて血液が漏れて死に至る (Sultana *et al.*, 2008)。*ftk* では、Cx36.7 の N 末細胞内領域にアミノ酸置換 (Asp12Val) があり、この変異によって Cx36.7 タンパク質輸送に障害が生じて細胞膜に局在できなくなる。また、*cx36.7* 遺伝子の発現は受精後約 5 時間 [5 hours post-fertilization (hpf); 50% epiboly] の心臓前駆細胞に特異的に誘導され始め、心臓のループ形成と弁形成が生じる 48 hpf ではその発現はほぼ消失する (Sultana *et al.*, 2008)。さらに、*ftk* では、心臓前駆細胞の分化に必須な転写因子で心筋型 α アクチンや心室型ミオシン軽鎖などの心筋細胞特異的な構造蛋白質の発現誘導に機能する *nkx2.5* 遺伝子の発現が著しく低下しており、この発現低下が筋原繊維形成や心臓の形態形成異状を引き起こす原因であることが明らかにされている (Sultana *et al.*, 2008)。したがって、*cx36.7* 遺伝子が胚発生の初期に一過性に発現し、筋原線維形成と *nkx2.5* 遺伝子の発現維持に必要なシグナル伝達を仲介している可能性が考えられた。また、ヒト NKX2.5 の不活性化は先天性心疾患の発症に繋がることが知られていることから (Benson *et al.*, 1999)、*ftk* は心臓発生だけでなく先天性心疾患の発症メカニズムを研究する上でも有用なモデル動物であると考えられる。

Nkx2.5 は発生初期から発現が確認されている心筋細胞分化に重要な転写因子であり、その働きはあらゆる脊椎動物で共通している。*cx36.7* 遺伝子は *nkx2.5* 遺伝子の上流に存在し、*nkx2.5* の発現調節に関与していることから、*cx36.7* 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることは、筋繊維形成に必要なシグナルのタイミング決定の分子機構を明らかにする手掛かりとなると考えられる。

1-6. cx36.7 遺伝子発現調節機構に関する先行研究

筆者の修士論文研究では cx36.7 遺伝子のプロモーター解析を行い、心臓特異的な cx36.7 遺伝子の発現に重要な領域と転写因子の特定を試みた。プロモーター領域の部位欠失および点変異解析を行った結果, cx36.7 遺伝子の転写開始点から上流 133 bp までの領域内に存在する 2 つの GATA 結合配列が, ゼブラフィッシュ初期胚における心臓特異的な発現に重要であることが明らかにした。また, モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (Morpholino Antisense Oligonucleotide: MO) を用いて *gata4* 転写因子を特異的にノックダウンした結果, cx36.7 遺伝子の心臓特異的なプロモーター活性が著しく低下することを見出した。以上の結果から, Gata4 が cx36.7 遺伝子の発現誘導を担う転写因子である可能性が示唆された。しかし, この先行研究では Gata4 の関与しか検討しておらず, Gata4 と並んで心臓発生に関与することが知られている Gata5 と Gata6 については解析を行っていなかった。また, cx36.7 遺伝子プロモーター領域内には他の転写因子の結合予測部位も存在し, Nkx2.5 などの結合予測部位も確認できることから, 遺伝子発現調節が Gata4 だけでなく, いくつかの転写因子と協調して行われている可能性も考えられた。より詳しい cx36.7 遺伝子プロモーターの活性調節機構の解析が必要である。

2. 材料と方法

2-1. ゼブラフィッシュの系統と飼育

川上厚志准教授 (東京工業大学) より譲与していただいた AB 系統と TL 系統を掛け合わせたゼブラフィッシュ系統 (TL/AB line) を使用した。また, “The Zebrafish Book” (Westerfield, 1995) を参考に 0.006% の Ocean pure salt (Rohtomarine) を蒸留水に溶解した飼育水 (Fish Water) を作製し, 受精卵の培養に用いた。Fish Water に含まれる主なイオンは $686 \mu\text{M Na}^+$, $14.6 \mu\text{M K}^+$, $16.2 \mu\text{M Ca}^{2+}$, $78.3 \mu\text{M Mg}^{2+}$, $804 \mu\text{M Cl}^-$, $42.6 \mu\text{M MgSO}_4^{2-}$, $1.25 \mu\text{M Br}^-$ である。受精卵の培養は 28.5 度で行い, 受精後 1 日目 (day post fertilization: dpf) までは Fish Water に 10 mg/ml メチレンブルーを溶解した溶液 (0.002% メチレンブルー) を用い, 2 dpf 以降は Fish Water を用いた。7 dpf より粉餌 (初期飼料協和 N250, 協和発酵株式会社) を与え, 14 dpf 以降は Brine Shrimp (A&A MARINE LLC) を与えた。ゼブラフィッシュの生育および実験は, 学内の「遺伝子組換え実験等安全委員会」の承認を得ており, 「国立大学法人 東京工業大学 動物実験等管理規則」を遵守して行った。

2-2. cx36.7 遺伝子のプロモーター解析用の EGFP レポータープラスミドの作製

cx36.7 遺伝子の転写開始点より上流 1.6 kb, 500 bp, 316 bp, 133 bp, 110 bp の領域を, ゼブラフィッシュゲノム DNA を鋳型とするポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により増幅した。PCR は KOD-PLUS-NEO (ToYoBo) を用い, 付属の説明書の条件に従って以下に示すプライマー (Forward primer と Reverse primer) を使用して反応を行った。

Forward primer:

–1600 bp: 5'-gaactcgagtggtaggtatttcagaaac-3'

–500 bp: 5'-gaactcgagctataattttgagccatgcaa-3'

–316 bp: 5'-gaactcgagatccatttagcagacttttgcc-3'

–133 bp: 5'-gaactcgaggaatctgccgacgctatcag-3'

–110 bp: 5'-gaactcgagcctgctttctaaatgcactcg-3'

Reverse primer: 5'-gaagtcgaccactgctcccagccatg-3'

各 PCR 産物を pT2KXIG Δ in ベクター (Kawakami and Shima, 1999) の SalI/XhoI サイトに挿入することで cx36.7 遺伝子上流配列と EGFP レポーター遺伝子を連結した Tol2 トラ

ンスポゾンプラスミドを得た。転写開始点から上流 15 bp の領域は、以下の 2 つの DNA オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド (5'-gagggccctggctgggagcagtggtcgacag-3' と 5'-ctgtcgaccactgctcccagccagggccctc-3') をアニーリングした後、pT2KXIGΔin ベクターの ApaI/SalI 部位に挿入した。上流配列内の転写因子結合予測配列への点変異の導入は、PCR 法を用いた部位特異的突然変異によって行った。以下に導入した変異の核酸配列を示す (下線部)。

GATA#1: TATC → TGGA

GATA#2: TATC → TGGA

GATA#3: TATC → CGGG

GATA#4: TATC → GATC

NKE: TGAAGTG → TGATGCG

E-box: CACGTG → CCGGGG

A/T-rich: ATATTTTAA → ATATTTGCGA

作製した EGFP レポーターコンストラクトの配列は全て DNA シーケンスによって確認した。

2-3. EGFP レポーター解析

Tol2 transposase mRNA は、メダカ *Tol2* transposase を含む pCS2+ ベクター (Kawakami and Shima, 1999) を NotI 処理して直鎖状にした後、SP6 mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion) を用いて転写合成した。1×Danieau buffer [58 mM NaCl, 0.7 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄, 0.6 mM Ca(NO₃)₂ and 5 mM HEPES, pH7.6], 250 ng *Tol2* transposase mRNA, 250 ng *Tol2* transposon プラスミド (EGFP レポーターコンストラクト) および phenol red (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を endotoxin free water で 10 μl に調整し、1 細胞期のゼブラフィッシュ受精卵に 3~5 pl 注入した。30 hpf 以降の胚における EGFP のシグナルを蛍光顕微鏡 Leica MZ16F (Leica) と Zeiss Axio Zoom.V16 (Carl Zeiss) を用いて観察した。

2-4. トランスジェニックゼブラフィッシュの作製

転写開始点から上流 316 bp および 500 bp の領域を含む EGFP レポーターコンストラ

クトをゼブラフィッシュ受精卵に注入して成魚まで成長させ (F0 世代), wild type ゼブラフィッシュと交配させた。得られた次世代のうち, 1 dpf において心臓特異的な EGFP の発現があるものを選出して F1 世代として成魚まで成長させた。次に, F1 世代と wild type ゼブラフィッシュを交配させて, 1 dpf において心臓特異的な EGFP の発現を示す個体 (F2 世代) を得て, F2 世代同士を交配することでホモ接合体のトランスジェニック系統 [*Tg(-316Pcx36.7:EGFP)*と *Tg(-500Pcx36.7:EGFP)*] を得た。

2-5. モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を用いたノックダウン解析

Morpholino antisense oligo nucleotide (MO) は Gene Tools 社が作製した。標的配列は既に報告がありノックダウン効果が確認してあるものを用いた。以下に標的配列を示す。

gata4 MO: 5'-tccaggtgagcgattattgctcc-3' (Holtzinger and Evans, 2005)

gata5 MO: 5'-tgtaagattttacatactgga-3' (Holtzinger and Evans, 2005)

gata6 MO: 5'-agctgttatcaccaggtccatcca-3' (Tseng *et al.*, 2011)

nkx2.5 MO: 5'-catttgctagagaacattgccatg-3' (Sultana *et al.*, 2008)

Control MO: 5'-cctcttacctcagttacaattata-3' (Gene Tool)

Control MO はヒトβグロビン遺伝子のイントロンの変異体を標的とする配列で, negative control として広く用いられている。MO は 2 ng/μl に調整したものを 1 μl 分取して 1×Danieau buffer に懸濁後, トレーサーとして phenol red (0.5% in D-PBS) を 1 μl 加えて endotoxin free water で 10 μl に調整し, 1 細胞期のゼブラフィッシュ受精卵に 10 pg 注入した。レスキュー実験は, *gata4*, *gata5*, *gata6* 遺伝子の mRNA (30 pg) を 10 pg の MO と共に注入することで行った。各遺伝子の全長 cDNA は以下に示すプライマーとゼブラフィッシュ cDNA を用いて KOD-PLUS-NEO により増幅した。

*gata4*_Forward: 5'-gaggatccggagaataatcgctcacctgtg-3'

*gata4*_Reverse: 5'-aactcgagttatgccagaatcaggctgttc-3'

*gata5*_Forward: 5'-gcgaattctcgaaatctagcttattcactg-3'

*gata5*_Reverse: 5'-aactcgagatcacgcttgagacaga-3'

*gata6*_Forward: 5'-aaggatcctggatggacctgggtgataaca-3'

*gata6*_Reverse: 5'-tactcgagttaggccaaggccatgggg-3'

gata4 および *gata5* の PCR 産物は BamHI/XhoI を, *gata6* の PCR 産物は XhoI を用いて制

限酵素処理した後、pCS2+ ベクターに挿入した。作製したプラスミドを NotI により切断して直鎖状にしたものを鋳型として mMESSAGE mMACHINE SP6 transcription kit を用いて mRNA を合成した。

2-6. *In situ* hybridization

ゼブラフィッシュ *cx36.7*, *gata4*, *gata5*, *gata6* および *nkx2.5* 遺伝子の翻訳領域の一部を PCR 法で増幅して pBlueScript SK⁻ ベクター (Stratagene) に挿入した。以下に各遺伝子の挿入した領域を示す (ここでは翻訳開始コドンの 1 番目の塩基を+1 とする)。

cx36.7: +1~+500 bp

gata4: +1~+500 bp

gata5: +1~+580 bp

gata6: +1~+540 bp

nkx2.5: +1~+540 bp

cx36.7 および *gata4* のプラスミドは ApaI, *gata5* および *gata6* のプラスミドは XhoI, *nkx2.5* のプラスミドは SalI でそれぞれ処理して直鎖状にしたものを鋳型として, T3 または T7 RNA polymerases (Stratagene) と DIG RNA labeling Mix (Roche) を用いて DIG 標識をしたアンチセンス RNA プローブを合成した。ゼブラフィッシュ受精卵の殻をピンセットで剥いた後, 16 hpf または 24 hpf まで培養した胚を 4% paraformaldehyde (PFA) と 0.1% Tween 20 を含む PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ and 2 mM KhPO₄, pH7.4) を用いて 4 度で一晩固定した。PBS で 3 回洗浄後, 50% メタノールを含む Ptw [10 × PBS (50 ml), 20% Tween 20 (2.5 ml), H₂O (447.5 ml)] に置換して 4 度で 30 分振とうした。100% メタノールで 1 回洗浄後, 使用するまで 100% メタノールに置換して -20 度で保存した。プローブの hybridization は以下の手順で行った。

一日目

固定したサンプルを 50% メタノール/Ptw で 1 回, Ptw で 3 回, 各 5 分間ずつ室温で振とうした。その後, 10 µg/ml Proteinase K (Roche)/Ptw を加えた溶液中で 16 hpf のサンプルは 1 分, 24 hpf のサンプルは 15 分室温で静置した。Ptw で 2 回洗浄後, 4% PFA/PBT 溶液中にて 45 分間室温で静置して再固定した。その後, Ptw で 4 回 5 分洗浄を行い, hybridization buffer (50% formamide, 5× SSC, 500 µg/ml yeast RNA, 50 µg/ml heparin, 0.1% Tween20, pH6.0) に置き換え, 68 度で 5 時間前処理反応 (pre-hybridization) を行った。

68 度の hybridization buffer (1 ml) で 1 回洗浄後, 1 ng/μl になるように hybridization buffer で調整した RNA probe を 100 μl 入れて 68 度で 16 時間以上反応を行った。

二日目

サンプルの洗浄を以下の手順で行った。

1. 75% hybridization buffer/2×SSCT [20×SSC (50 ml), 20% Tween 20 (2.5 ml), H₂O (447.5 ml)] 10 分, 68 度, 静置
2. 50% hybridization buffer/2×SSCT, 10 分, 68 度, 静置
3. 25% hybridization buffer/2×SSCT, 10 分, 68 度, 静置
4. 2×SSCT, 10 分, 68 度, 静置
5. 0.2×SSCT, 30 分×2 回, 68 度, 静置
6. 75% 0.2×SSCT/25% Ptw, 5 分, 室温, 静置
7. 50% 0.2×SSCT/50% Ptw, 5 分, 室温, 静置
8. 25% 0.2×SSCT/75% Ptw, 5 分, 室温, 静置
9. Ptw, 5 分, 室温, 静置
10. Ptw/BSA [10×PBS (50 ml), BSA (1 g), 20% Tween 20 (2.5 ml), H₂O (447.5 ml)], 5 分, 室温, 静置

次に, 10% heart inactivated sheep serum (Sigma) in Ptw/BSA 溶液 (10% ΔSS/Ptw/BSA; 1 ml) で 2 時間以上遮光してブロッキングを行った。ブロッキング後, アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシンゲン (DIG) 抗体 (Roche) を 10%ΔSS/Ptw/BSA で 4,000 倍希釈した溶液中で, 室温 5 分間遮光した状態で静置した。静置後, 溶液は交換せずに遮光したまま 4 度で 12 時間以上静置して抗体反応を行った。

三日目

サンプルを 1 ml Ptw/BSA で 2 回洗浄した後, 1 ml の Ptw/BSA 溶液で 15 分 6 回遮光して室温で静置することで洗浄を行った。次に, 1 ml の alkaline phosphatase reaction buffer (AP buffer: 100 mM Tris-HCl, pH9.5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20) で 5 分 3 回遮光して室温で静置した。サンプルの静置中に nitro blue tetrazolium (NBT, 50 mg/ml in 70% DMF) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP, 50 mg/ml in 100% N,N-ジメチルホルムアミド) を AP buffer で希釈したシグナル検出液 NBT/BCIP in AP buffer (NBT:BCIP:AP buffer = 7:12:2,000) を作製した。静置後, サンプルを 900 μl

NBT/BCIP in AP buffer 中に室温で静置して発色反応を行った。シグナルの確認ができた
ら、1 ml の Ptw で 5 分 2 回洗浄後、1 ml の 4% PFA/Ptw 溶液中で遮光して 4 度で 1 時間
以上固定を行った。

2-7. *In vivo* pull down assay

cx36.7 遺伝子上流配列のうち、-133 bp ~ -73 bp と -73 bp ~ -1 bp の領域に相当する
ビオチン標識 DNA オリゴヌクレオチドとその相補鎖を合成して、アニーリングするこ
とによりプローブを作製した。変異体プローブは、各プローブ内の GATA#1 および
GATA#2 配列に点変異 (TATC → GATC) を導入したものを用いた。各プローブを 10
pM の濃度で streptavidin agarose beads (Pierce) 20 μ l と共に PBS 中でインキュベートして、
プローブと streptavidin agarose beads を結合させた probe-bound beads を得た。³⁵S 標識し
たゼブラフィッシュ Gata4 タンパク質は、Gata4 全長 cDNA を含むプラスミドを鋳型に
して [³⁵S]methionine および [³⁵S]cysteine (PerkinElmer) と TNT T7 Quick Coupled
Transcription/Translation System (Promega) を用いて転写翻訳合成を行うことで得た。³⁵S
標識 Gata4 タンパク質 (5 μ l) と probe-bound beads を 500 μ l PBS 中で 4 度一晩反応させた。
PBS で 4 回洗浄後、probe-bound beads に Laemmli buffer (60 mM Tris-HCl, pH6.8, 2% SDS,
8% glycerol, 0.005% bromophenol blue) を加えて SDS-PAGE を行った。シグナルは
FLA7000 (Fujifilm) を用いて検出した。

2-8. EGFP 蛍光強度の定量および統計解析

EGFP の蛍光強度は、ZEN lite software (Carl Zeiss) を用いて定量した。統計解析は
Tukey's *post hoc* test または Student's *t*-test を用いて有意差を確認した。有意確立 $p < 0.05$
を統計的に有意であるとみなした。

3. 結果

3-1. ゼブラフィッシュ *cx36.7* 遺伝子の心臓特異的な発現に必要なプロモーター領域の同定

先行研究において、ゼブラフィッシュの *cx36.7* 遺伝子の転写開始点を 5'RACE (RLM-RACE) 法により決定した。データベース [NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>)] の情報を参考にしてプライマーを設計し、ゼブラフィッシュゲノム DNA を鋳型とした PCR 法により 1.6 kbp の上流配列を増幅した。この上流配列の PCR 産物を EGFP 遺伝子上流に連結させたものを、*Tol2* トランスポゾンを用いた遺伝子トラップ法によりゼブラフィッシュゲノムに挿入して、上流配列がプロモーター活性を有することを EGFP の発現を観察することで確認した。このプロモーター解析の方法は、本論文の多くの実験で使用されているので以下に説明をする。① メダカ *Tol2* 因子を有する pT2KXIGΔin ベクターに *cx36.7* 遺伝子上流配列と EGFP 遺伝子を連結したものを挿入し、受精直後 (1 細胞期) のゼブラフィッシュ胚に転移酵素 (transposase) の mRNA と共に注入する。② 発現した転移酵素の働きにより、*Tol2* 因子に挟まれた上流配列と EGFP の領域がゲノム中にランダムに転移する。③ 上流配列にプロモーター活性があるならば、EGFP の転写・翻訳が行われる。*Tol2* トランスポゾンシステムを用いたプロモーター解析を行った結果、受精後 1 日 (1 dpf) の胚の心臓に特異的に EGFP の発現を認め、実際の *cx36.7* mRNA の発現パターンと一致することを確認した。さらに、この上流配列を 5'側から段階的に欠失させると、転写開始点から 133 bp まで欠失させた場合では心臓特異的な EGFP 発現には影響は認められなかったのに対して、110 bp まで欠失させると EGFP の発現を失った個体が増加することを見出しており、*cx36.7* 遺伝子の転写開始点から上流 133 bp までの領域が心臓特異的な遺伝子発現に重要であることが示唆されていた (Miyagi, 2012 修士論文)。本研究では、同様の解析を先行研究で用いたゼブラフィッシュ系統 (TL line) とは異なる TL/AB line を用いて繰り返し行い、上述の先行研究の結果が再現することを確認した。さらに、EGFP を発現している胚について、EGFP の蛍光強度 (発現量) を定量したところ、上流 1.6 kb, 500 bp, 316 bp, 133 bp までそれぞれ欠失させたコンストラクトの場合と比較して、110 bp まで欠失した場合では EGFP の心臓における蛍光強度が有意に低下していた。また、転写開始点より上流 15 bp まで欠失させたところ、解析に用いた全

での胚において EGFP の発現が消失しプロモーター活性は認められなかった。以上の結果から、転写開始点から上流 133 bp までの領域が発生初期における *cx36.7* 遺伝子の心臓特異的な発現に重要であることが示唆された。

3-2. 心臓特異的にプロモーター活性を促進する領域の同定

cx36.7 遺伝子の心臓特異的な発現調節に関与している *cis* 因子を特定するために、TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) を用いて *cx36.7* 遺伝子の転写開始点より 316 bp 上流の領域 (以後 *-316Pcx36.7* とする) における転写因子結合予測部位を調べた。その結果、AT-rich 配列 (ATATTTTAA), GATA 結合配列 (TATC), E-box (CANNTG), Nkx2.5 結合配列 (NKE; TNAAGTG) および Sp1 結合配列 (GGCTGGG) が存在していることが分かった。転写開始点近傍に存在して転写開始に機能することが知られている TATA-box および CAAT-box は、この領域内には認められなかった。これらの転写因子結合予測部位が *cx36.7* 遺伝子の心臓特異的な発現制御に関与しているかを調べるために、それぞれの転写因子結合予測部位に点変異を導入した *-316Pcx36.7* を EGFP レポーター遺伝子と連結したものを pT2KXIGΔin ベクターに挿入して、初期胚における心臓特異的な EGFP の発現への影響について検討した。先行研究では、転写開始点に近い 2 つの GATA 結合配列 (GATA#1 と GATA#2) に変異を導入すると EGFP を発現する個体数が顕著に低下することを認めていたが (Miyagi, 2012 修士論文), 本研究において TL/AB 系統を用いた場合でも同様の結果が得られた。1 dpf において心臓特異的な EGFP の発現を示す初期胚の個体の割合は、wild type *-316Pcx36.7* を用いた場合では約 90%であったのに対して、GATA#1 変異体では約 40%, GATA#2 変異体では約 35%まで減少した。また、GATA#1 と GATA#2 の両方に点変異を導入すると、その割合が 18.8%まで減少した。本研究ではさらに他の転写因子結合予測部位への変異導入による影響について解析したが、同じ GATA 結合配列であっても転写開始点から遠位にある GATA#3 と GATA#4 については、その一方または両方に点変異を導入してもプロモーター活性への影響は認められなかった。同様に、A/T-rich 配列、E-box、NKE にそれぞれ点変異を導入した場合でも 1 dpf における心臓特異的な EGFP 発現に影響は認められず wild type *-316Pcx36.7* と同様の結果を得た。また、心臓において EGFP の発現を示す個体について、その蛍光強度の定量解析を行った結果、GATA#1 と GATA#2 にそれぞれ点変異を導入した場合は wild type *-316Pcx36.7* の場合と比較して EGFP の蛍光強度はほぼ半減し、

両方に変異を導入した場合ではさらに減少した。同様の結果は、転写開始点より 133 bp 上流の配列 (以後 -133Pcx36.7 とする) を用いた場合でも得られた。このような EGFP の蛍光強度の低下は、他の転写因子結合予測部位への変異導入では認められなかった。以上の結果から、転写開始点に近い 2 つの GATA 結合配列 GATA#1 と GATA#2 が協調して発生初期における cx36.7 遺伝子の心臓特異的な発現を制御していることが示唆された。

3-3. Gata4, Gata5, Gata6 による心筋特異的な cx36.7 遺伝子プロモーター活性化への関与

ゼブラフィッシュでは Gata4, Gata5 および Gata6 の 3 種類の GATA 転写因子が初期胚の心臓前駆体に発現し、心筋細胞分化と心臓発生に関与する遺伝子の発現調節において重要な役割を担うことが知られている (Serbedzija *et al.*, 1998, Reiter *et al.*, 1999, Reiter *et al.*, 2001, Peterkin *et al.*, 2003, Trinh *et al.*, 2005)。cx36.7 遺伝子の GATA#1 と GATA#2 が心臓特異的なプロモーター活性に重要であるという結果から、これら 3 種類の GATA 転写因子が cx36.7 遺伝子の発現に関与している可能性が考えられた。先行研究では, Gata4 の発現阻害によって cx36.7 遺伝子プロモーター活性が低下することを見出していた (Miyagi, 2012 修士論文)。cx36.7 遺伝子プロモーター活性への GATA 転写因子の関与をより詳細に調べるため、まずゼブラフィッシュ初期胚を用いて *in situ* hybridization を行い、cx36.7, *gata4*, *gata5* および *gata6* の遺伝子の発現パターンを比較した。発生初期のゼブラフィッシュ胚において、正中線の両側付近に心臓前駆体細胞群が確認できる 16 hpf と、胸部において発生途中の心臓 (心筒ループ) が確認できる 24 hpf の 2 つのタイミングで *in situ* hybridization を行ったところ、cx36.7, *gata4*, *gata5* および *gata6* の遺伝子の mRNA 発現が心臓前駆体細胞群および心臓領域で認められた。

次に、これらの GATA 転写因子が cx36.7 遺伝子プロモーターの *trans* 因子であるか検討するため、Gata4, Gata5, Gata6 のタンパク質発現をそれぞれノックダウンした場合のゼブラフィッシュ初期胚における EGFP の心臓特異的な発現への影響を調べた。1 細胞期の受精卵に、-316Pcx36.7:EGFP コンストラクトと *gata4*, *gata5* または *gata6* に特異的なモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (Morpholino antisense oligonucleotide: MO) を同時に注入した後、1 dpf において EGFP の発現を観察した。対照実験としてノックダウン効果が認められない control MO を用いた場合では、解析に

用いた初期胚の 77.3%の個体で心臓特異的な EGFP の発現が確認された。一方, *gata4*, *gata5* または *gata6* に特異的な MO を用いた場合では, それぞれ 39.3%, 38.0%, 34.7% の個体で心臓特異的な EGFP の発現が認められ, ノックダウンによってプロモーター活性が消失する個体が有意に増加することが分かった。使用した MO の特異性は, *gata4*, *gata5* および *gata6* の mRNA を各 MO と同時に注入することにより心臓特異的な EGFP の発現が回復するかというレスキュー実験により確認した。いずれの場合も, 約 70~75%の個体で心臓特異的な EGFP の発現が認められた。*gata4*, *gata5* および *gata6* は心臓形成などにおいて相補的に機能することが知られているため (Holtzinger and Evans, 2007, Peterkin et al., 2007), これらの GATA 転写因子を複数同時にノックダウンした場合のプロモーター活性への影響について調べた。まず, 3 種類の GATA 転写因子のうち 2 種類の発現を同時にノックダウンした場合, 心臓特異的な EGFP の発現を示す胚の割合は 2.3~10.3%まで減少した。さらに, 3 種類の GATA 転写因子の発現を同時にノックダウンすると 1.3%まで減少した。しかしながら, EGFP の発現消失は心臓特異的な GATA 転写因子を全て失ったために生じた心臓発生の異常による影響である可能性がないとは言いきれない。また, *in situ hybridization* によって GATA 転写因子と同様に心臓形成に重要な転写因子である *nkx2.5* も *cx36.7* が存在する領域に発現していることが確認されたが, *nkx2.5* 特異的な MO を注入しても心臓特異的な EGFP の発現を示す個体の割合は 80.7%であり, プロモーター活性への影響は認められなかった。

ノックダウンおよびレスキュー実験の結果から, *Gata4*, *Gata5* および *Gata6* が *cx36.7* 遺伝子プロモーター内の GATA#1 と GATA#2 に結合して心臓特異的なプロモーター活性を調節している可能性が高いことが予想された。そこで, *Gata4* が GATA#1 と GATA#2 に相互作用するかを *in vitro pull down* 実験により調べた。³⁵S 標識をした *Gata4* タンパク質を *in vitro* 合成し, GATA#1 を含む -73 bp~-1 bp の領域または GATA#2 を含む -133 bp~-74 bp の領域に相当するビオチン標識オリゴヌクレオチド DNA プローブと反応させた。その後, DNA プローブをストレプトアビジンビーズで回収し, SDS-PAGE 後にオートラジオグラフィによって *Gata4* タンパク質が検出されるか調べた。その結果, *Gata4* タンパク質が用いた 2 種類の DNA プローブの両方に結合することを確認した。この結合は GATA #1 と GATA#2 に点変異を導入すると認められなかった。同様の結果はゲルシフト解析でも確認された (data not shown)。

以上の結果から, *cx36.7* 遺伝子の心臓特異的な発現には, 転写開始点より上流 133 bp のプロモーター領域内にある GATA#1 および GATA#2 が *cis* 因子として働き, *Gata4*,

Gata5 および Gata6 が *trans* 因子として機能することが示唆された。また、これら 3 つの GATA 転写因子の内、少なくとも Gata4 タンパク質は GATA#1 と GATA#2 に結合することが確認された。

3-4. 骨格筋特異的にプロモーター活性を抑制する領域の同定

プロモーター領域の部位欠失解析実験において 3 dpf まで胚の観察を続けたところ、316 bp, 500 bp, 1.6 kbp のプロモーターコンストラクトを導入した場合には心臓特異的な EGFP の発現が確認された。興味深いことに、*-133Pcx36.7* を用いた場合、2 dpf の胚の 25.3% の個体において心臓の他に骨格筋でも EGFP の発現が認められた。さらに、3 dpf では骨格筋に EGFP 発現を示す個体の割合が約 40% まで増加した。この骨格筋での EGFP 発現が一過性の発現系によるアーティファクトの可能性も考えられたので、500 bp および 133 bp の 2 種類のプロモーターコンストラクトを有するトランスジェニックゼブラフィッシュライン [*Tg(-500Pcx36.7:EGFP)* および *Tg(-133Pcx36.7:EGFP)*] を作製して EGFP の発現を観察した。その結果、*Tg(-500Pcx36.7:EGFP)* では一過性の発現解析の結果と同様に心臓特異的な EGFP 発現が確認されたのに対して、*Tg(-133Pcx36.7:EGFP)* では 2 dpf 以降に心臓および骨格筋での EGFP の発現を確認した。以上の結果から、*cx36.7* 遺伝子の転写開始点から上流 133 bp から 316 bp までの間の領域が骨格筋におけるプロモーター活性を抑制していることが示唆された。この遺伝子発現の抑制を担っている部位を特定するために、*-316Pcx36.7* の -316 bp から -133 bp までの領域にある GATA 結合配列 (GATA#3 と GATA#4) および AT-rich 配列に点変異を導入して、骨格筋における EGFP の発現に影響がないか検討した。Wild type の *-316Pcx36.7* を用いた胚では、2 dpf および 3 dpf において骨格筋に EGFP 発現を示す個体は認められなかったのに対して、GATA#3 と GATA#4 の一方または両方に変異を導入した場合、2 dpf 以降に骨格筋での EGFP 発現を示す胚の個体数の割合は著しく増加した (22.7~52.3%)。AT-rich 配列に点変異を導入した場合、3 dpf において骨格筋での EGFP の発現が確認されたが、GATA #3 および GATA#4 への変異と比較するとその効果は低いように見えた。また、GATA#3, GATA#4 および AT-rich 配列の全てに変異を導入した場合でも相乗的な EGFP の骨格筋発現は認められず、GATA#3 または GATA#4 に単独で変異を導入した場合と同様の結果が得られた (23.6~53%)。さらに、認識配列が同じ GATA 結合配列でも転写開始点に近い GATA#1 と GATA#2 に点変異を導入しても骨格筋における EGFP

発現はほとんど誘導されなかった (0~6.3%)。次に、この骨格筋における発現抑制に Gata4, Gata5, Gata6 の関与がないか検討するために、*gata4*, *gata5*, *gata6* のダブル及びトリプルノックダウンを行い-316Pcx36.7 コンストラクトの 2 dpf および 3 dpf におけるプロモーター活性について調べた。その結果、*gata4* と *gata5* のダブルノックダウンでは 3 dpf に、*gata4* と *gata6* のダブルノックダウンでは 2 dpf に観察した胚のわずか 2% で骨格筋における EGFP の発現が観察されたが、ダブルノックダウンおよびトリプルノックダウンを行った 98%~100%の胚で骨格筋での EGFP の発現は観察されなかった。以上の結果から、GATA#3 および GATA#4 がゼブラフィッシュ胚の骨格筋でのプロモーター活性の抑制に重要であることが示唆され、また AT-rich 配列もこの抑制調節に関与していることが分かった。また、この抑制効果には Gata4, Gata5, Gata6 が寄与している可能性が低いことが示唆された。

3-5. 骨格筋における cx36.7 遺伝子プロモーター活性は GATA#2 に依存している

骨格筋におけるプロモーター活性の活性化メカニズムを調べるために、骨格筋におけるプロモーター活性の抑制に関わる領域を除いてある -133Pcx36.7 コンストラクトの GATA#1 と GATA#2 に点変異を導入し、胚における EGFP の発現解析を行った。転写開始点に一番近い GATA 結合配列である GATA#1 に点変異を導入した場合、EGFP 発現を示す個体数の割合は著しく減少するものの、変異を導入していないプロモーターコンストラクトと同様に 2 dpf 以降に骨格筋での EGFP の発現を認めた。一方、GATA#2 に点変異を導入した場合、骨格筋における EGFP の発現がほぼ全ての胚で認められなかった。同様の効果は、GATA#1 と GATA#2 の両方に点変異を導入した場合でも認められた。以上の結果から、GATA#2 が骨格筋におけるプロモーター活性の促進に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、Gata4, Gata5 および Gata6 が骨格筋におけるプロモーター活性に関与しているかを調べるため、GATA#1 に点変異を導入した -133Pcx36.7 コンストラクトと *gata4*, *gata5* および *gata6* に特異的な 3 種類の MO を 1 細胞期の受精卵に同時に注入して、Gata4, Gata5 および Gata6 のトリプルノックダウンを行い、胚の骨格筋における EGFP 発現への影響について調べた。その結果、2 dpf において骨格筋での EGFP 発現が確認された胚の個体数の割合は、control MO を用いた場合と比較して同程度であった。3 dpf ではトリプルノックダウンを行った胚の多くが奇形を有して死んでしまったため、解析を行

うことができなかった。以上の結果から、骨格筋におけるプロモーター活性が Gata4, Gata5 および Gata6 に依存していない可能性が示唆された。

4. 考察

本研究では、ゼブラフィッシュ *cx36.7* 遺伝子の発生初期における心臓特異的な発現を制御する分子機構を解明するために、EGFP レポーター遺伝子を用いた *in vivo* における *cx36.7* 遺伝子プロモーターの解析を行った。上流プロモーター領域の部位欠失解析実験の結果から、転写開始点より上流 133 bp の領域が初期胚の心臓におけるプロモーター活性に十分かつ必要であることが分かった。さらに、この領域内に存在する 2 つの GATA 結合配列 (GATA #1 と GATA #2) が協調的に働くことが心臓における転写活性の活性化に重要であることを認めた。これらの配列に Gata4 が直接結合することを *in vitro* プルダウン実験によって確認し、MO を用いたノックダウン解析から Gata4, Gata5, Gata6 が心臓特異的なプロモーターの活性化に関与していることが分かった。以上の結果から、心臓発生に重要なこれらの転写因子が *trans* 因子として機能することが強く示唆された。また、上流プロモーター領域には、基本転写因子の結合部位で RNA ポリメラーゼ II の足場を提供する TATA box や CAAT box が存在しないが、転写開始点付近に転写因子 Sp1 結合配列 (GGCTGG) が存在する。いくつかのコネキシン遺伝子において、TATA-less であるが転写開始点付近の Sp1 結合配列 (GC box) が転写活性に重要であることが報告されている (Gabriel *et al.*, 2001)。しかし、*cx36.7* 遺伝子プロモーターの活性は転写開始点より上流 15 bp まで欠失させると完全に失われてしまうことから、この Sp1 結合配列だけでは心臓特異的な遺伝子発現ができないことが考えられる。

ゼブラフィッシュ Gata4, Gata5, Gata6 は、哺乳動物における心筋細胞分化や心臓発生に重要な GATA4, GATA5, GATA6 のオースログであり、いずれも同じ DNA 配列 [(A/T)GATA(A/G)] を認識することが知られている (Laverriere *et al.*, 1994)。GATA4, GATA5, GATA6 は非常によく似た発現パターンや転写調節メカニズムを有しており、このような特徴が生理機能の重複や補完性を生み出している。GATA 転写因子の認識配列である GATA 結合配列は、心筋トロポミン C (Ip *et al.*, 1994), ミオシン軽鎖 I (Rotter *et al.*, 1991), Na⁺/Ca²⁺ 交換輸送体 NCX1 (Koban *et al.*, 2001) や A 型および B 型ナトリウム利尿ペプチド (ANP と BNP) (Grepin *et al.*, 1994) などの多くの心臓特異的な遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域に存在しており、これらの配列を介して GATA4, GATA5, GATA6 による転写活性制御が行われていることが多数報告されている (McGrew *et al.*, 1996, Lisi *et al.*, 1998, Cheng *et al.*, 1999, Peterkin *et al.*, 2005)。同様に、発生初期の心臓における *cx36.7* 遺伝子のプロモーター活性も Gata4, Gata5, Gata6 によ

る GATA#1 と GATA#2 への結合を介して調節を受けている可能性が十分に考えられる。cx36.7 遺伝子のプロモーター領域は GATA 結合配列以外にも、Mef2 (A/T-rich 配列), Nkx2.5 (NKE) およびベーシックヘリックスループヘリックス (bHLH) 因子 (E-box) などの心筋細胞分化に機能する調節因子の結合配列を有しているものの、点変異体解析から A/T-rich 配列, NKE および E-box は心臓特異的なプロモーター活性に寄与していない可能性が示唆された。しかしながら、GATA#1 と GATA#2 の両方に変異を導入した場合、プロモーター活性が完全には失われず心臓特異的な EGFP 発現を表す胚が確認されている。この結果は、GATA#1 と GATA#2 以外にも心臓特異的な発現調節を担う領域があることを示唆しているといえるが、本研究ではこの調節部位の特定には至っていない。本研究では A/T-rich 配列, NKE, E-box のそれぞれ一つずつに点変異を導入してプロモーター活性への影響について解析を行った。転写調節の多くが複数の転写因子によって複雑に制御されている事実を考慮に入れると、A/T-rich 配列, NKE, E-box または未同定の配列に同時に点変異導入をしたり、A/T-rich 配列, NKE, E-box に結合する転写因子 Nkx2.5, Nkx2.7, Tbx5 等と GATA 転写因子のノックダウンを同時に行ってプロモーター活性への影響を調べる必要があるといえる。しかし、初期胚での心臓形成に重要な転写因子を複数ノックダウンすると、発生の非常に早い段階で心筋細胞分化や心形成に異常が生じて解析が困難となる可能性が高い。

本研究における予期しない発見として、-133Pcx36.7 のコンストラクトを注入した胚では、2 dpf 以降に心臓に加えて骨格筋においても EGFP が発現することがわかった。すなわち、① 転写開始点から上流 -133 bp までの領域内に骨格筋発現を誘導する機構があり、② 転写開始点から上流 -316 bp から -133 bp の領域内に骨格筋での発現を抑制する機構があると考えられる。骨格筋における EGFP の発現は、GATA#2 に変異を導入した場合にほぼ消滅することから、GATA#2 に依存することが示された。しかし、心臓の場合とは異なり *gata4*, *gata5*, *gata6* をノックダウンしても骨格筋における EGFP の発現に影響が無かったことからこれらの転写因子が骨格筋におけるプロモーター活性の活性化に関与している可能性は低いといえる。ゼブラフィッシュ胚において GATA 調節因子が骨格筋で発現しているという報告は無く、本研究でも骨格筋での *gata4*, *gata5*, *gata6* の mRNA 発現を *in situ* hybridization で検出することはできなかった (data not shown)。しかし、ラットの骨格筋細胞において GATA2 タンパク質および *Gata3* と *Gata4* の mRNA の発現が確認されている (Sakuma *et al.*, 2003, Lisi *et al.*, 2007, Downie *et al.*, 2008)。このことから、ゼブラフィッシュの骨格筋における cx36.7 遺伝子プロモーター

の活性化が、① *in situ* hybridization では検出できないものの非常に低いレベルで発現している GATA 調節因子によって行われている、または、② GATA#2 に Gata4, Gata5, Gata6 以外の *trans* 因子が結合することより行われている、という 2 つの可能性が考えられる。

骨格筋での *cx36.7* 遺伝子プロモーター活性の抑制作用は、-316 bp から -133 bp の領域内に存在する GATA #3 と GATA #4 に大きく依存し、A/T-rich 配列も関与していることが分かった。このことから、GATA#3, GATA#4, A/T-rich 配列に結合する *trans* 因子が骨格筋でのリプレッサー活性を担っていると考えられる。しかし、本研究ではこれらの配列に結合する転写因子の同定には至らなかった。GATA 結合配列を介した骨格筋での遺伝子発現抑制については、マウスおよびラットの心筋トロポミオシン I (cardiac troponin I: cTnI) 遺伝子の骨格筋細胞におけるプロモーター活性が GATA 結合配列依存的に抑制されるという Lisi ら (2007) の報告以外は無く、その抑制メカニズムは不明である。この報告では骨格筋に発現が確認されている GATA2, GATA3, GATA4 が抑制作用に関与せず、未同定の *trans* 因子によって抑制されていると予想している (Lisi *et al.* 2007)。*cx36.7* 遺伝子発現調節も cTnI 遺伝子の場合と非常によく似ていることから、骨格筋における発現抑制によって心筋特異的な発現を保障する仕組みは種間で保存されている可能性が十分に考えられる。加えて、*gata4*, *gata5*, *gata6* のダブルおよびトリプルノックダウンによって-316P*cx36.7* コンストラクトのプロモーター活性が骨格筋で確認できなかったことから、本研究では同定には至らなかったが他の GATA 転写因子を含めた GATA 配列を認識する分子が発現抑制調節に関与していることが考えられる。

最近、GATA 転写因子が哺乳動物の組織特異的または細胞特異的な遺伝子発現のリプレッサーとして働くことが報告されている。例えば、マウスでは低酸素状態 (hypoxia) になると腎臓の尿細管間質細胞から赤血球産生促進ホルモンであるエリスロポエチンを産生分泌する。一方、尿細管上皮細胞ではエリスロポエチン遺伝子のプロモーター領域に GATA2 と GATA3 が結合することによりその発現が恒常的に抑制されている (Obara *et al.*, 2008)。また、GATA2 と GATA3 は前駆脂肪細胞に発現して脂肪細胞分化の誘導に関与する転写因子 PPAR γ の遺伝子プロモーター活性を抑制する役割を担い、脂肪細胞分化の引き金役として機能している (Tong *et al.*, 2000)。GATA 転写因子を介した遺伝子発現抑制のメカニズムとして補助因子 Friend of GATA (FOG)-1 および FOG-2 との相互作用が重要であることが報告されている。GATA1 は造血関連遺伝子の発現調節を通して赤血球の分化に関与しているが、この転写調節では FOG-1 との相互作用が

重要であることが知られている。GATA1 または FOG-1 を欠失させたマウスは胚発生 10.5 日目で赤血球分化が起こらず重度の貧血により死に至ってしまう (Fujiwara *et al.*, 1996, Tsang *et al.*, 1998)。FOG-1 はそれ自身が DNA に結合することはないが, GATA1 との結合を介してコリプレッサー因子の C-terminal binding protein (CtBP) や nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) と相互作用して複合体を形成し, クロマチン構造変換による転写抑制または転写活性化を促すことが知られている (Bresnick *et al.*, 2005)。一方, FOG-2 は GATA4 との相互作用を介して, 心臓における遺伝子発現の活性化および抑制に機能しているという報告がある (Lu *et al.*, 1999)。また, NIH 3T3 細胞と初代ラット心筋細胞で FOG-2 を過剰発現させると, GATA4 によって転写調節を受ける複数の心臓特異的な遺伝子のプロモーター活性が抑制されることが確認されている (Svensson *et al.*, 1999)。これらの報告から, cx36.7 遺伝子プロモーターの骨格筋での活性抑制機構に FOG 分子が関与している可能性も考えられる。

ゼブラフィッシュの初期胚の心臓における cx36.7 遺伝子の発現調節は, 転写開始点より上流 133 bp にある GATA #1 と GATA #2 に Gata4, Gata5 および Gata6 が結合することによって活性化される。GATA#2 は骨格筋における cx36.7 遺伝子プロモーターの活性化にも関与しているが, 骨格筋では転写開始点より上流 316 bp から 133 bp の間にある GATA#3, GATA#4 および A/T-rich 配列によってプロモーター活性が抑制されている。

本研究により, cx36.7 遺伝子が心臓発現型の GATA 転写因子群の下流に位置し, 発生初期の心臓特異的な cx36.7 遺伝子の発現が GATA 結合配列と GATA 転写因子群による転写活性化と転写抑制によって調節されていることが示された。得られた結果は, 筋細胞における遺伝子発現の調節メカニズムの解明の助けとなる新たな知見を提供するものである。今後は, cx36.7 遺伝子プロモーターの心臓特異的な転写活性化だけでなく, 骨格筋特異的な転写抑制に関与する *trans* 因子の同定と作用機構の解明を行うことが必要である。

5. 参考文献

- R.J. Arceci, A.A. King, M.C. Simon, S.H. Orkin, D.B. Wilson **Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart.** *Mol Cell Biol*, 13 (1993), pp. 2235-2246
- J. Bakkers **Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease.** *Cardiovasc Res*, 91 (2011), pp. 279-288
- D.W. Benson, G.M. Silberbach, A. Kavanaugh-McHugh, C. Cottrill, Y. Zhang, S. Riggs, O. Smalls, M.C. Johnson, M.S. Watson, J.S. Seidman **Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways.** *J. Clin. Invest*, 104 (1999), pp. 1567–1573
- E.H. Bresnick, M.L. Martowicz, S. Pal, K.D. Johnson **Developmental control via GATA factor interplay at chromatin domains.** *J Cell Physiol*, 205 (2005), pp. 1-9
- B.G. Bruneau **Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis.** *Circ Res*, 90 (2002), pp. 509–519
- B.L. Black, R.M. Cripps **Myocyte Enhancer Factor 2 Transcription Factors in Heart development and Disease.** In: Rosenthal N, Harvey RP, editors. *Heart Development and Regeneration*. Academic Press; Oxford (2010), pp. 673–699
- A.B. Cantor, S.H. Orkin **Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners.** *Oncogene*, 21 (2002), pp. 3368-3376
- G. Cheng, T.P. Hagen, M.L. Dawson, K.V. Barnes, D.R. Menick **The role of GATA, CArG, E-box, and a novel element in the regulation of cardiac expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger gene.** *J Biol Chem*, 274 (1999), pp. 12819-12826
- S.T. Chou, E. Khandros, L.C. Bailey, K.E. Nichols, C.R. Vakoc, Y. Yao, Z. Huang, J.D. Crispino, R.C. Hardison, G.A. Blobel, M.J. Weiss **Graded repression of PU.1/Sfp1 gene transcription by GATA factors regulates hematopoietic cell fate.** *Blood*, 114 (2009),

pp. 983-994

J.L. de la Pompa, L.A. Timmerman, H. Takimoto, H. Yoshida, A.J. Elia, E. Samper, J. Potter, A. Wakeham, L. Marengere, B.L. Langille, G.R. Crabtree and T.W. Mak **Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum.** Nature, 392 (1998), pp. 182-186

D. Downie, M.I. Delday, C.A. Maltin, A.A. Sneddon **Clenbuterol increases muscle fiber size and GATA-2 protein in rat skeletal muscle in utero.** Mol Reprod Dev, 75 (2008), pp. 785-794

M. Esaki, K. Hoshijima, N. Nakamura, K. Munakata, M. Tanaka, K. Ookata, K. Asakawa, K. Kawakami, W. Wang, E.S. Weinberg, S. Hirose **Mechanism of development of ionocytes rich in vacuolar-type H⁺-ATPase in the skin of zebrafish larvae.** Dev Biol, 329 (2009), pp. 116-129

Y. Fujiwara, C.P. Browne, K. Cunniff, S.C. Goff, S.H. Orkin **Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1.** Proc Natl Acad Sci USA, 93 (1996), pp. 12355-12358

H.D. Gabriel, B. Strobl, P. Hellmann, R. Buettner, E. Winterhager **Organization and regulation of the rat Cx31 gene. Implication for a crucial role of the intron region.** Eur J Biochem., 268 (2001), pp. 1749-1759

F. Greulich, C. Rudat, A. Kispert **Mechanisms of T-box gene function in the developing heart.** Cardiovasc Res, 99 (2011), pp. 212-222

J.A. Grass, M.E. Boyer, S. Pal, J. Wu, M.J. Weiss, E.H. Bresnick **GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling.** Proc Natl Acad Sci U S A, 100 (2003), pp. 8811-8816

C. Grepin, L. Dagnino, L. Robitaille, L. Haberstroh, T. Antakly, M. Nemer **A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription.** Mol Cell Biol, 14 (1994), pp. 3115-3129

- D.E. Gutstein, G.E. Morley, H. Tamaddon, D. Vaidya, M.D. Schneider, J. Chen, K.R. Chien, H. Stuhlmann, G.I. Fishman **Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43**. *Circ Res*, 88 (2001), pp. 333-339
- R.P. Harvey, D. Lai, D. Elliott, C. Biben, M. Solloway, O. Prall, F. Stennard, A. Schindeler, N. Groves, L. Lavulo, C. Hyun, T. Yeoh, M. Costa, M. Furtado, E. Kirk **Homeodomain factor Nkx2-5 in heart development and disease**. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 67 (2002), pp. 107–114
- A. He, S.W. Kong, Q. Ma, W.T. Pu **Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (2011), pp. 5632–5637
- A. Holtzinger, T. Evans **Gata4 regulates the formation of multiple organs**. *Development*, 132 (2005), pp. 4005-4014
- A. Holtzinger, T. Evans **Gata5 and Gata6 are functionally redundant in zebrafish for specification of cardiomyocytes**. *Dev Biol*, 312 (2007), pp. 613-622
- H.S. Ip, D.B. Wilson, M. Heikinheimo, Z. Tang, C.N. Ting, M.C. Simon, J.M. Leiden, M.S. Parmacek **The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells**. *Mol Cell Biol*, 14 (1994), pp. 7517-7526
- H. Jing, C.R. Vakoc, L. Ying, S. Mandat, H. Wang, X. Zheng, G.A. Blobel **Exchange of GATA factors mediates transitions in looped chromatin organization at a developmentally regulated gene locus**. *Mol Cell*, 29 (2008), pp. 232-242
- K. Kawakami, A. Shima **Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio***. *Gene*, 240 (1999), pp. 239-244
- S. Kirchhoff, E. Nelles, A. Hagendorff, O. Krüger, O. Traub and K. Willecke **Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient**

- mice. *Curr Biol*, 8 (1998), pp. 299-302
- M.U. Koban, S.A. Brugh, D.R. Riordon, K.A. Dellow, H.T. Yang, D. Tweedie, K.R. Boheler **A distant upstream region of the rat multipartite Na⁺-Ca²⁺ exchanger NCX1 gene promoter is sufficient to confer cardiac-specific expression.** *Mech Dev*, 109 (2001), pp. 267-279
- M. Kumai, K. Nishii, K. Nakamura, N. Takeda, M. Suzuki & Y. Shibata: **Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis.** *Development*, 127 (2000), pp. 3501-3512
- C.T. Kuo, E.E. Morrissey, R. Anandappa, K. Sigrist, M.M. Lu, M.S. Parmacek, C. Soudais, J.M. Leiden **GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation.** *Genes Dev*, 11(1997), pp. 1048-1060
- M. Koutsourakis, A. Langeveld, R. Patient, R. Beddington, F. Grosveld **The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development.** *Development*, 126 (1999), pp. 723–732
- B. Laforest, G. Andelfinger, M. Nemer **Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve.** *J Clin Invest*, 121 (2011), pp. 2876-2887
- A.C. Laverriere, C. MacNeill, C. Mueller, R.E. Poelmann, J.B. Burch, T. Evans **GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut.** *J Biol Chem*, 269 (1994), pp. 23177-23184
- R.D. Lisi., C. Millino, E. Calabria, F. Altruda, S. Schiaffino, S. Ausoni **Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo.** *J Biol Chem*, 273 (1998), pp. 25371-25380
- R. D. Lisi, A. Picard, S. Ausoni, S. Schiaffino **GATA elements control repression of cardiac troponin I promoter activity in skeletal muscle cells.** *BMC Mol Biol*, 8 (2007), pp. 78
- J.R. Lu, T.A. McKinsey, H. Xu, D.Z. Wang, J.A. Richardson, E.N. Olson **FOG-2, a heart- and**

brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. Mol Cell Biol, 19 (1999), pp. 4495-4502

C.W. Lo **Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice.** Circ Res, 87 (2000), pp. 346-348.

D.J. McCulley, B.L. Black **Transcription factor pathways and congenital heart disease.** Curr Top Dev Biol, 100 (2012), pp. 253-277

J.D. Molkentin **The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression.** J Biol Chem, 275 (2000), pp. 38949-38952

M.J. McGrew, N. Bogdanova, K. Hasegawa, S.H. Hughes, R.N. Kitsis, N. Rosenthal **Distinct gene expression patterns in skeletal and cardiac muscle are dependent on common regulatory sequences in the MLC1/3 locus.** Mol Cell Biol, 16 (1996), pp. 4524-4534

M. Merika, S.H. Orkin **DNA-binding specificity of GATA family transcription factors.** Mol Cell Biol, 13 (1993), pp. 3999-4010

J.D. Molkentin **The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression.** J Biol Chem, 275 (2000), pp. 38949-38952

J.D. Molkentin, Q. Lin, S.A. Duncan, E.N. Olson **Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis.** Genes Dev, 11 (1997), pp. 1061-1072

E.E. Morrisey, H.S. Ip, M.M. Lu, M.S. Parmacek **GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm.** Dev Biol, 177 (1996), pp. 309-322

E.E. Morrisey, H.S. Ip, Z. Tang, M.M. Lu, M.S. Parmacek **GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development.** Dev Biol, 183 (1997), pp. 21-36

- E.E. Morrisey, Z. Tang, K. Sigrist **GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo.** *Genes Dev*, 12 (1998), pp. 3579–3590
- V. Munugalavadla, L.C. Dore, B.L. Tan, L. Hong, M. Vishnu, M.J. Weiss, R. Kapur **Repression of c-kit and its downstream substrates by GATA-1 inhibits cell proliferation during erythroid maturation.** *Mol Cell Biol*, 25 (2005), pp. 6747-6759
- K. Nishii, M. Kumai and Y. Shibata **Regulation of the epithelial-mesenchymal transformation through gap junction channels in heart development.** *Trends Cardiovasc Med*, 11 (2001), pp. 213-218
- N. Obara, N. Suzuki, K. Kim, T. Nagasawa, S. Imagawa, M. Yamamoto **Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression.** *Blood*, 111 (2008), pp. 5223-5232
- K. Ohneda, M. Yamamoto **Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage.** *Acta Haematol*, 108 (2002), pp. 237-245
- S.H. Orkin **Transcription factors and hematopoietic development.** *J Biol Chem*, 270 (1995), pp. 4955-4958
- R.K. Patient, J.D. McGhee **The GATA family (vertebrates and invertebrates).** *Curr Opin Genet Dev*, 12 (2002), pp.416-422
- B. Pelster, W.W. Burggren **Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebra fish (*Danio rerio*).** *Circ Res*, 79 (1996), pp. 358-362
- T. Peterkin, A. Gibson, M. Loose, R. Patient **The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development.** *Semin Cell Dev Biol*, 16 (2005), pp. 83-94
- T. Peterkin, A. Gibson, R. Patient **GATA-6 maintains BMP-4 and Nkx2 expression during cardiomyocyte precursor maturation.** *EMBO J*, 22 (2003), pp. 4260-4273

- T. Peterkin, A. Gibson, R. Patient **Redundancy and evolution of GATA factor requirements in development of the myocardium.** Dev Biol, 311 (2007), pp. 623-635
- A.M. Ranger, M.J. Grusby, M.R. Hodge, E.M. Gravallesse, F.C. de la Brousse, T. Hoey, C. Mickanin, H.S. Baldwin and L.H. Glimcher **The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation.** Nature, 392 (1998), pp. 186-190
- A.G. Reaume, P.A. de Sousa, S. Kulkarni, B.L. Langille, D. Zhu, T.C. Davies, S.C. Juneja, G.M. Kidder and J. Rossant **Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43.** Science, 267 (1995), pp. 1831-1834
- J.F. Reiter, J. Alexander, A. Rodaway, D. Yelon, R. Patient, N. Holder, D.Y. Stainier **Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish.** Genes Dev, 13 (1999), pp. 2983-2995
- J.F. Reiter, Y. Kikuchi, D.Y. Stainier **Multiple roles for Gata5 in zebrafish endoderm formation.** Development, 128 (2001), pp. 125-135
- P. Rodriguez, E. Bonte, J. Krijgsveld, K.E. Kolodziej, B. Guyot, A.J. Heck, P. Vyas, E. de Boer, F. Grosveld, J. Strouboulis **GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells.** EMBO J, 24 (2005), pp. 2354-2366
- E.V. Rothenberg **T-lineage specification and commitment: a gene regulation perspective.** Semin Immunol, 14 (2002), pp. 431-440
- M. Rotter, K. Zimmerman, A. Poustka, N. Soussi-Yanicostas, A. Starzinski-Powitz **The human embryonic myosin alkali light chain gene: use of alternative promoters and 3' non-coding regions.** Nucleic Acids Res, 19 (1991), pp. 1497-1504
- M. Rylski, J.J. Welch, Y.Y. Chen, D.L. Letting, J.A. Diehl, L.A. Chodosh, G.A. Blobel, M.J. Weiss **GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation.** Mol Cell Biol, 23 (2003), pp. 5031-5042
- K. Saito, N. Nakamura, Y. Ito, K. Hoshijima, M. Esaki, B. Zhao, S. Hirose **Identification of zebrafish Fxyd11a protein that is highly expressed in ion-transporting epithelium**

of the gill and skin and its possible role in ion homeostasis. Front Physiol, 1 (2010), 129

K. Sakuma, J. Nishikawa, R. Nakao, K. Watanabe, T. Totsuka, H. Nakano, M. Sano, M. Yasuhara **Calcineurin is a potent regulator for skeletal muscle regeneration by association with NFATc1 and GATA-2.** Acta Neuropathol, 105 (2003), pp. 271-280

G.N. Serbedzija, J.N. Chen, M.C. Fishman **Regulation in the heart field of zebrafish.** Development, 125 (1998), pp. 1095-1101

A.M. Simon, D.A. Goodenough and D.L. Paul **Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block.** Curr. Biol, 8 (1998), pp. 295-298

A.M. Simon, A.R. McWhorter **Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40.** Dev Biol, 251 (2002), pp. 206-20

A.M. Simon, A.R. McWhorter **Role of connexin37 and connexin40 in vascular development.** Cell Commun Adhes, 10 (2003), pp. 379-85

N. Sultana, K. Nag, K. Hoshijima, D.W. Laird, A. Kawakami, S. Hirose **Zebrafish early cardiac connexin, Cx36.7/Ecx, regulates myofibril orientation and heart morphogenesis by establishing Nkx2.5 expression.** Proc Natl Acad Sci U S A, 105 (2008), pp. 4763-4768

E.C. Svensson, R.L. Tufts, C.E. Polk, J.M. Leiden **Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes.** Proc Natl Acad Sci U S A, 96 (1999), pp. 956-961

Y. Tao, R.A. Schulz **Heart development in Drosophila.** Semin Cell Dev Biol, 18 (2007), pp. 3-15

Q. Tong, G. Dalgin, H. Xu, C.N. Ting, J.M. Leiden, G.S. Hotamisligil **Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition.** Science, 290 (2000), pp. 134-138

L.A. Trinh, D. Yelon, D.Y. Stainier **Hand2 regulates epithelial formation during myocardial differentiation.** Curr Biol, 15 (2005), pp. 441-446

T. Tripic, W. Deng, Y. Cheng, Y. Zhang, C.R. Vakoc, G.D. Gregory, R.C. Hardison, G.A. Blobel **SCL and associated proteins distinguish active from repressive GATA transcription factor complexes.** Blood, 113 (2009), pp. 2191-2201

A.P. Tsang, Y. Fujiwara, D.B. Hom, S.H. Orkin **Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG.** Genes Dev, 12 (1998), pp. 1176-1188

W.F. Tseng, T.H. Jang, C.B. Huang, C.H. Yuh **An evolutionarily conserved kernel of gata5, gata6, otx2 and prdm1a operates in the formation of endoderm in zebrafish.** Dev Biol, 357 (2011), pp. 541-557

J.J. Welch, J.A. Watts, C.R. Vakoc, Y. Yao, H. Wang, R.C. Hardison, G.A. Blobel, L.A. Chodosh, M.J. Weiss **Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1.** Blood, 104 (2004), pp. 3136-3147

R. Zhao, A.J. Watt, M.A. Battle **Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia in mice.** Dev Biol, 317 (2008), pp. 614-619