

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested	博士 (理学) Doctor of
学生氏名： Student's Name	宮城 央子		指導教員 (主)： Academic Advisor(main)	中村 信大
			指導教員 (副)： Academic Advisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

【背景・目的】

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。心臓の拍動は、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ている。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ことが知られている。しかし、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 *fik* の原因遺伝子として同定された (Sultana *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008)。Cx36.7 は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っていることが予想されている。しかし、*cx36.7* 遺伝子の心臓前駆細胞特異的な発現とそのタイミングを決定する分子機序については未だ明らかにされていない。先行研究により、ゼブラフィッシュ *cx36.7* 遺伝子上流プロモーター領域に存在する GATA 結合配列と Gata4 転写因子が心筋特異的な発現制御に重要であることを見出したことから、本研究ではより詳細なプロモーター解析を行うことで *cx36.7* 遺伝子の発現調節に関与する *cis* 因子と *trans* 因子の同定を行うことを目的とした。

【結果・考察】

Tol2 トランスポゾンを用いた遺伝子トラップ法を用いて、*cx36.7* 遺伝子上流プロモーター領域と EGFP レポーター遺伝子を連結したものをゼブラフィッシュゲノムに挿入した。得られたトランジェニック体の初期胚における EGFP の発現を調べることで、プロモーター活性を評価した。段階的な 5'末端欠失プロモーターを用いた解析から、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活性に必要であることが分かった。興味深いことに、受精後 2 日 (2 days post fertilization, dpf) 以降では心臓以外にも体幹部の骨格筋にも EGFP の発現が認められた。この骨格筋におけるプロモーター活性は、転写開始点より 316 bp 以上の長さのプロモーター領域のコンストラクトを用いた場合では確認されなかったことから、転写開始点より 133 bp から 316 bp の領域内に骨格筋でのプロモーター活性を抑制する仕組みが

あるものと予想した。

次に、316 bp の上流プロモーター領域内に存在する転写因子結合予想配列に点変異を導入し、プロモーター活性への影響についてを調べた。その結果、転写開始点より 133 bp までの上流配列内に存在する 2 つの GATA 結合配列 (GATA#1 および GATA#2) が協調的に心臓特異的な発現に関与していることが明らかとなった。また、GATA#2 は 2 dpf 以降の骨格筋におけるプロモーター活性化にも働くことも分かった。この骨格筋特異的な活性化は、転写開始点から上流 133 bp から 316 bp までの領域内に存在する 2 つの GATA 結合配列 (GATA#3 および GATA#4) によって抑制されていることを明らかにした。これら 2 つ GATA 配列ほど強い効果はないものの A/T-rich 配列も転写抑制に関与していることが分かった。

続いて、*cx36.7* 遺伝子のプロモーター活性調節における GATA 転写因子の関与について発現阻害実験により解析した。まず、心筋前駆細胞に発現して心臓形成への関与が報告されている *Gata4*, *Gata5*, *Gata6* について、これらの遺伝子発現が認められる初期胚の細胞群に *cx36.7* も発現していることを *in situ hybridization* により確認した。モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて *gata4*, *gata5*, *gata6* の発現阻害を行ったところ、*cx36.7* 遺伝子の心筋特異的なプロモーター活性が顕著に減少することを認め、これら 3 種の転写因子が相乗的に機能していることが明らかとなった。一方、骨格筋特異的なプロモーター活性の活性化と抑制については、発現阻害を行っても影響は見られなかった。また、*in vitro pull down* 解析によって *Gata4* が GATA#1 および GATA#2 に直接結合することを明らかにした。

以上の結果から、*Gata4*, *Gata5*, *Gata6* がプロモーター内の GATA#1 および GATA#2 を介して発生初期の心臓特異的な *cx36.7* 遺伝子の発現誘導を行っていることが示唆された。GATA#2 を介した骨格筋におけるプロモーター活性化能はあるものの、GATA#3, GATA#4 および A/T-rich 配列を介した未同定の因子の働きによって強く抑制されて *cx36.7* 遺伝子の心筋特異的な発現を保障していることが考えられる。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	生体システム	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 (理学)	Doctor of
学生氏名 : Student's Name	宮城 央子		指導教員 (主) : Academic Advisor(main)	中村 信大	
			指導教員 (副) : Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Zebrafish connexin 36.7 (cx36.7) is a member of the connexin protein family that is specifically expressed in the cardiomyocytes during early heart development. Its dysfunction causes loss of *nkx2.5* expression, thereby leading to severe abnormalities in heart development, such as disorganization of cardiac myofibrils. Cx36.7 is therefore thought to be a critical regulator of myofibril formation. However, it is not known how the cardiac-restricted expression of *cx36.7* is regulated. To elucidate the regulatory mechanism of *cx36.7* gene expression, in this study I isolated the 5'-flanking promoter region of zebrafish *cx36.7* gene and characterized its promoter activity in zebrafish embryos. *In situ* hybridization showed that *cx36.7* mRNA is expressed in the embryonic heart where *gata4*, *gata5*, and *gata6* are expressed. When the expression of *gata4*, *gata5*, and *gata6* was depleted by Morpholino antisense oligonucleotides, the promoter activity was significantly decreased. Deletion and mutational analyses showed that a 133-bp upstream region of the *cx36.7* gene is essential for cardiac-restricted expression. This region contains two GATA elements (GATA#1 and GATA#2), which serve as binding sites for Gata4 and are responsible for promoter activation in the embryonic heart. Moreover, the region between -316 bp and -133 bp suppresses the promoter activity in trunk skeletal muscle, which is driven under the control of the GATA#2 element. Two GATA (GATA#3 and GATA#4) and A/T-rich elements in this region act as repressors of promoter activity in skeletal muscle. However, knockdown of *gata4*, *gata5*, and *gata6* had no or less effect on the suppression. These results suggest that cardiac-restricted expression of *cx36.7* is regulated by cardiac promoter activation via the two proximal GATA elements (GATA#1 and GATA#2) and Gata4/5/6 as well as by skeletal muscle-specific promoter repression via the two distal GATA (GATA#3 and GATA#4) and A/T-rich elements.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).