

ニワトリ胚発生における心臓特異的遺伝子発現

およびその機能に関する研究

2003 年

学位論文：博士(農学)甲308

岐 阜 大 学 大 学 院
連 合 農 学 研 究 科
生 物 生 産 科 学
(信 州 大 学)

矢 澤 重 信

目 次

	ページ
第一章 序論	1
第二章 ニワトリ FKBP12.6 遺伝子のクローニングと ニワトリ胚の心臓形成過程における発現	8
緒論	8
材料及び方法	9
1. ニワトリ胚	9
2. ニワトリ FKBP12.6 cDNA のクローニングおよびシーケンス解析	10
3. ノーザンブロット解析	10
4. ホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション解析	11
5. RT-PCR 解析	11
結果	12
1. chFKBP12.6 cDNA の同定	12
2. ニワトリ胚における chFKBP12.6 mRNA の発現分布	13
3. ニワトリ胚における chFKBP12.6 mRNA の局在	14
4. ニワトリ初期胚における chFKBP12.6 mRNA の検出	14
考察	15
小括	18

第三章 胚発生における FKBP12.6 および

	FKBP12 の遺伝子発現と機能	28
緒論		28
材料及び方法		29
1. ニワトリ胚		29
2. プラスミド DNA およびプローブの調製		29
3. ノーザンブロットおよび ホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション解析		30
4. ニワトリ胚の <i>in vitro</i> culture および薬剤投与		30
5. 統計処理		31
結果		31
1. ニワトリ発生過程における FKBP12.6 および FKBP12 mRNA の分布		31
2. 胚発生における FK506 投与による影響		32
3. レチノイン酸投与胚における FKBP 遺伝子の発現		32
考察		33
小括		36
第四章 総括		43
謝辞		46
引用文献		47

第一章 序 論

心筋細胞は胎生早期には高度に分化し、自立拍動をしながらも活発に分裂増殖する。しかし生後まもなく最終分化し、心筋で発現しているタンパク質が胎児型から成体型へと変換すると同時に増殖を停止するとされている。機械的・内分泌的な負荷などにより病的肥大を起こした心臓では、分裂増殖はしないが胎児型のタンパク質が再発現しており、一種の脱分化が起こっている。出生後の心筋細胞には分裂能がないため、心筋梗塞などで死んだ細胞が再生されることはないと言われてきた一方で、頻度は低いものの、心筋梗塞周囲のごく一部の心筋細胞が細胞分裂すると報告されており (Anversa et al., 1998 ; Kajstura et al., 1998 ; Beltrami et al., 2001 ; Anversa et al., 2002), 既存の概念の再検証が必要となってきた。心筋細胞の分裂能の問題は心臓疾患にとって重要であるばかりでなく、広く癌や生物学全体にとっても興味のある研究対象といえる。

最終分化を遂げた心筋細胞を再び細胞分裂させる試みや、心筋梗塞などで壊死に陥った心筋を再生心筋で置換する試みがなされている。胚性幹細胞 (ES 細胞) や骨髄中の体性幹細胞が心筋細胞のツールとして用いられている (Makino et al., 1999 ; Kehat et al., 2001) が、近年心臓内にも心臓幹細胞のような SP (side population) 細胞の存在が報告されている (Jackson et al., 2001 ; Hierlihy et al., 2002)。心筋再生を利用した治療法は、幹細胞を直接壊死した心臓内に注入してその部位で心筋細胞へと分化させる方法と、*in vitro* で幹細胞を心筋細胞に分化させてそれを心臓に注入する方法の 2 つに大別される。このような既存の非心筋細胞や幹細胞から心筋細胞を分化・誘導し、機能の低下した再生能力のない心臓に新しく心筋細胞を誘導・移植するという、新たな再生医学の開発がすすめられている。しかし一方では、非心筋細胞を心筋細胞に形質転換させる方法も以前から検討されてきた。これらのためには、心筋細胞の発生・分化・誘導機構についてのメカニズムを分子レベルで解明する必要があると考えられ、骨格筋のマスター遺伝子である *myoD* (Weintraub et al., 1989 ; 1991) と同様な“心臓版 *myoD* 遺伝子”の単

離が試みられたが、*myoD* のように単一遺伝子で他の細胞を心筋細胞に形質転換できる遺伝子は現在のところ同定されていない。現在も“心臓版 *myoD*”をクローニングする研究は継続されている。その過程において心臓特異的に発現しており、心臓形成に関与している転写因子として *Nkx2.5* (Bodmer et al., 1990 ; Komuro and Izumo, 1993), *GATA4* (Kelley et al., 1993 ; Kuo et al., 1997 ; Molkenkin et al., 1997), *dHAND/eHAND* (Srivastava et al., 1995 ; 1997) など多くの遺伝子がクローニングされてきた。発生生物学的な意義だけでなく、新たな因子や新たな機能の発見から、病因の解明、さらには新しい治療法の開発につながる可能性が広がっていくものと考えられることから、正常な心筋細胞の分化・心臓発生の仕組みを解明することは非常に有意義であると考えられる。

脊椎動物の心臓は他の器官の形成に先駆けて発生段階の極めて早期に発生する。心臓機能の開始によって循環系が形成された後に他の器官の発生・成長が進展することから、心臓の分化・形成は個体発生において重要な意味がある。まさに心臓の停止が個体の死であり、心臓の発生が生命の誕生といえるのである。心臓の発生過程は複雑であり、多くの細胞系列や因子が関与している (Fishman and Chien, 1997 ; Srivastava and Olson, 2000 ; Zaffran and Frasch, 2002)。心臓前駆細胞 (心筋前駆細胞および心内膜前駆細胞) は体節の分化する中胚葉より頭側の、脊索前方板および脊索吻側の左右両側にあたる前方側板中胚葉から体節より早く発生する。左右の心臓前駆細胞群は腹側正中線上で融合し、筒状の原始心臓 (linear heart tube) を形成する。この linear heart tube は、心筋細胞層と心内膜細胞層、これらを分ける cardiac jelly から構成され、この段階ですでに心筋細胞は規則的な収縮をしている。その後、linear heart tube は右側へねじれ (looping), 心房・心室を形成し、さらに高等動物では中隔や弁構造が形成され、左右の心房・心室といった4つの部屋を持つ心臓となる。

心筋細胞の分化や予定心臓領域の決定に関する分子的なメカニズムについては、まだ不明な点が多いが、最近の研究によってずいぶん明らかにされてきた。初期発生においては、隣接する外胚葉、内胚葉から分泌される細胞増殖因子が、特異的受容体や細胞内シグナル伝達系を介して、形態形成に必要な特異的転写因子などを活性化している (Srivastava and Olson, 2000 ; Zaffran and Frasch, 2002)。心臓特異的な転写因子として *Nkx2.5* や *GATA4*, *Mef2c*, *dHAND/eHAND*,

などが挙げられる。NK ホメオドメインタンパク質と称されるホメオボックス遺伝子のうち、*Nkx2.5* はマウス胎生 7.5 日目から予定心臓領域に限局して発現し、成体期まで高い発現レベルを持続する (Komuro and Izumo, 1993 ; Lints et al., 1993)。*Nkx2.5* 欠損マウスでは左心室形成不全により linear heart tube の looping が起こらずに心臓の発生が停止し、胎生致死となることから、*Nkx2.5* が正常な心臓発生に必須の転写因子であることが示されている (Lyons et al., 1995)。

Zinc finger 型転写因子 GATA ファミリーに属する *GATA4* は *Nkx2.5* 同様にマウス胎生 7.5 日目から予定心臓領域に発現し、成体期までその発現が続く (Jiang and Evans, 1996)。*GATA4* 欠損マウスでは心筋細胞は分化し、*Nkx2.5* や *Mef2c*、収縮タンパク質の発現には変化はなかったが、左右の心臓原基が正中線上で融合できず、linear heart tube が形成されずに胎生致死となることから、心筋細胞誘導というよりも、心筋細胞が遊走して heart tube を形成する過程に関与することが示唆された (Kuo et al., 1997 ; Molkenin et al., 1997)。

MADS-box 型転写因子 MEF2 のアイソフォームの一つである *Mef2c* は、linear heart tube が形成される以前から心筋前駆細胞に発現する (Olson et al., 1995)。*Mef2c* 欠損マウスでは *dHAND* の発現が低下して、右室の形成不全により胎生致死となる (Lin et al., 1997)。

bHLH 型転写因子である *dHAND/eHAND* は、心臓が発生すると linear heart tube での発現が認められ、その後の発生に伴ってそれぞれ右室・左室に限局する (Srivastava et al., 1995)。*dHAND* 欠損マウスでは *Mef2c* 欠損マウスとよく似た右室形成不全を呈し (Srivastava et al., 1997)、*eHAND* 欠損マウスでは *Nkx2.5* 欠損マウスと類似した左心室形成不全を呈する (Firulli et al., 1998 ; Riley et al., 1998)。この他にも *Tbx5* や *Irx4*、*NF-ATc* などの転写因子群の関与が認められている。

初期心臓発生で明らかにされているシグナル伝達因子として、BMP シグナリング、FGF シグナリング、Wnt シグナリング、Notch シグナリングなどが挙げられる。TGF- β (Transforming Growth Factor- β) スーパーファミリーに属する BMP (Bone Morphogenetic Protein) 2/4 が内胚葉、外胚葉から分泌され中胚葉組織に *Nkx2.5* や *GATA4*、*eHAND* の発現を誘導し、心筋細胞の分化に関与している (Schultheiss et al., 1997)。また FGF (Fibroblast Growth Factor) ファミリーは少なくとも 18 種類の遺伝子からなるファミリーを形成しており、その中の一つであり予定心臓領域内胚葉で発現する *Fgf8* が、BMP2 の存在下で *Nkx2.5* や *Mef2c* の発現を誘導する (Aisan and

Schultheiss, 2002)。また *Fgf2/4* は、同様に BMP2/4 の存在下で非予定心臓中胚葉において *Nkx2.5* や *GATA4* の発現を誘導し、心臓への分化を誘導する (Ladd et al., 1998 ; Barron et al., 2000)。ゼブラフィッシュ *fgf8* の変異体 (*acerebellar*) が心室構造を欠失した重度の心臓形成不全を示す (Reifers et al., 2000) ことから、心臓形成に深く関与していることが示唆される。一方、胚の体軸決定に重要な役割を果たしている Wnt ファミリーについては、セキツイ動物とショウジョウバエでの役割が大きく異なる。ショウジョウバエの Wnt ファミリーに属する *segment polarity* 遺伝子である *wingless (wg)* を原腸陥入後の短時間だけ阻害すると心臓発生が障害されることから、*wg* がショウジョウバエの心臓発生に必須な因子であると考えられた (Wu et al., 1995)。またそのシグナル伝達系の変異体においても正常な心臓発生が傷害されることより、Wnt シグナル系の重要性が示唆された (Park et al., 1998)。対照的にセキツイ動物では Wnt シグナル系により心臓形成が阻害される。カエル胚における *Wnt3A* や *Wnt8* の過剰発現や、ニワトリ胚の心臓中胚葉領域における *Wnt3A* や *Wnt1* の投与より、*Nkx2.5* や *Tbx5* の発現を阻害し、心臓の分化が妨げられる (Marvin et al., 2001 ; Schneider and Mercola, 2001)。また *Wnt3A* や *Wnt8* のアンタゴニストである *Crescent* が心臓形成領域を含む胚の頭側で発現しており、*Crescent* や同じくアンタゴニストである *Dkk-1* を *Wnt3A* や *Wnt8* が発現している胚の尾方領域に投与すると、異所的に *Nkx2.5* や *Tbx5* の発現を誘導する (Marvin et al., 2001 ; Schneider and Mercola, 2001)。これらのように初期心筋細胞・心臓形成の誘導や形質発現についての知見はかなり明らかにされつつあるが、心臓マスター因子の存在など未だ不明確な点も多く、今後の解明が待たれる。

心筋細胞の分化に伴って原始心臓が形成されるとすぐに、心臓は生体内における血液循環ポンプとして、全身に十分な循環血液量を供給するという生命の維持に不可欠な役割を担うこととなる。このポンプ機能の源は、個々の心筋細胞の収縮弛緩機能である。成体では心筋細胞内カルシウムは心筋の収縮弛緩及びその調節の中心的機構であり、すべての調節は Ca^{2+} シグナルを介して達成される。心作用薬 (強心薬及び心筋収縮抑制薬) の作用も直接的または間接的に Ca^{2+} シグナルの修飾により発揮される。心筋細胞の興奮収縮連関 (excitation-contraction coupling; E-C coupling) においては、脱分極刺激によって細胞膜上の電位依存性 Ca^{2+} チャネルの開口が起こり、細胞外から流入した Ca^{2+} が筋小胞体上の 2 型/心筋型リアノジンレセプター

(ryanodine receptor-type 2; RyR2) に結合および活性化することでこの Ca^{2+} 放出チャネルを開口し、細胞内 Ca^{2+} ストアである筋小胞体からの Ca^{2+} 放出が生じる。この Ca^{2+} 誘導性 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release ; CICR) 機構により増幅された細胞内 Ca^{2+} の上昇により心筋収縮反応が起こる (Fabiato, 1985 ; Nabauer et al., 1989)。この RyR2 には FK506 結合タンパク質 (FK506-binding protein) ファミリーのうち FKBP12.6 が結合し、 Ca^{2+} 放出チャネルの安定化や調節に重要な役割を果たしている (Sewell et al., 1994 ; Timmerman et al., 1994 ; Lam et al., 1995 ; Kaftan et al., 1996 ; Timmerman et al., 1996 ; Xin et al., 1999 ; Marx et al., 2000 ; Ono et al., 2000 ; Yano et al., 2000)。

FKBP ファミリーは peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) 活性を有し、分子量の異なるファミリー (12~65 kDa) を形成している (Kay, 1996)。また FKBP は免疫抑制剤である FK506 あるいはその前駆体であるラパマイシンと結合することにより、その PPIase 活性が抑制される (Liu et al., 1991 ; Schreiber, 1991)。FKBP ファミリーのひとつである FKBP12 が免疫抑制剤 FK506 に結合する細胞内レセプターとして初めて単離され、その免疫抑制作用は T 細胞内において FK506-FKBP12 複合体が Ca^{2+} -カルモジュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンに結合し、その脱リン酸化反応を阻害することで活性化 T 細胞特異的核内転写因子 (Nuclear Factor of Activated T cell ; NF-AT) の核への移行を抑制し、T 細胞の分化・増殖因子であるサイトカインの転写が阻害されることにより発揮されるとされている (Friedman and Weissman, 1991 ; Liu et al., 1991 ; Schreiber, 1991 ; 1992)。FKBP12 は免疫系細胞で初めて単離されたが、その後様々な組織での発現が認められており、様々な機能を有していることが明らかにされてきた。FKBP12 は二つの細胞内 Ca^{2+} 放出チャネル、すなわちリアノジンレセプター (RyR1) とイノシトール三リン酸レセプター (inositol 1,4,5-triphosphate receptor ; IP_3R) のサブユニットとして細胞内 Ca^{2+} 動態に関与している (Jayaraman et al., 1992 ; Timmerman et al., 1993 ; Brillantes et al., 1994 ; Mayrleitner et al., 1994 ; Cameron et al., 1995 ; Timmerman et al., 1996 ; Marx et al., 1998 ; Qi et al., 1998 ; Carmody et al., 2001)。また TGF- β I 型受容体にも結合し、そのシグナル伝達系において阻害的に働いていることも明らかにされている (Wang et al., 1996 ; Chen et al., 1997 ; Charng et al., 1998 ; Yao et al., 2000 ; Aghdasi et al., 2001)。T 細胞における免疫抑制能の発揮において、FKBP ファミリーの

中でも FKBP12.6 や FKBP51 ではなく、FKBP12 だけが FK506 と結合することも示されている (Xu et al., 2002)。このように FKBP12 は様々なシグナル伝達系に関与するのではないかと考えられており、FKBP12 の働きは解明されていないことも含めて多岐にわたると考えられる。一方でその構造的類似性から FKBP12 とよく似た機能を有すると考えられている FKBP12.6 については、これまでのところ、心筋細胞における Ca^{2+} 放出チャネルの調節に関与していることが示されている (Sewell et al., 1994 ; Timerman et al., 1994 ; Lam et al., 1995 ; Kaftan et al., 1996 ; Timerman et al., 1996 ; Xin et al., 1999 ; Marx et al., 2000 ; Ono et al., 2000 ; Yano et al., 2000)。

臓器移植の発展に拒絶反応抑制のための免疫抑制剤が大きな貢献を果たしてきた。免疫抑制剤であるプログラフ (FK506, 一般名 : タクロリムス水和物) やシクロスポリン A (CsA) は、めざましい臓器生着率の上昇と患者の生存率の延長をもたらした。しかし、乳幼児あるいは子供への臓器移植の際に免疫抑制剤として FK506 を使用すると、その副作用として肥大型心筋症が誘発された (Atkison et al., 1995)。一方、免疫抑制剤を FK506 から CsA へ変更することで、この肥大型心筋症の発症を回避できた (Chang et al., 1998)。これら FK506 誘発性の肥大型心筋症は、発育段階にある乳幼児や子供においてのみ報告されており、FK506 の細胞内レセプターである FKBP が心臓の形成や成長に重要な役割を持つ可能性が考えられる。

近年、FKBP12 および FKBP12.6 の欠損マウスがそれぞれ報告された (Shou et al., 1998 ; Xin et al., 2002)。FKBP12 欠損マウスでは、高頻度で 14.5 日胚以降の致死もしくは生後間もない死亡が観察され、それらの特徴として骨格筋には構造的な異常は認められなかったが、拡張型心筋症様の心臓形成に伴う心重量の増加、心室中隔膜異常や心室心筋細胞の非緊密化、心室緻密壁の薄化などいくつかの心臓欠陥を示し、さらに初期胚の神経管形成の欠損が認められている (Shou et al., 1998)。また FKBP12 がニワトリ胚の心臓形成あるいは心筋細胞の増殖や細胞形態、収縮弛緩などの形質発現に重要であることが示された (Obata et al., 2001)。対照的に FKBP12.6 欠損マウスでは出生はしたが、 Ca^{2+} 放出の制御異常に対する適応症として、心室中隔膜の錯綜配列を伴った心肥大となる (Xin et al., 2002)。つまり FKBP12.6 と FKBP12 は心臓 (心筋細胞) で異なる役割を担っており、それぞれの機能を明らかにすることは心筋細胞の機能や形質の発現、すなわち心臓形成過程の解明に貢献する上で重要な点であると考えられる。

本研究ではニワトリ胚発生過程，特に心臓形成過程に着目し，FKBP12.6 の役割を検討した。ニワトリ胚は体外で発生が進行するため胚操作が簡便であり，また発生学的にも古くから研究されていることから，発生・形態形成分野における優れたモデル動物である。さらに，鳥類の心臓は哺乳類と同じ 2 心房 2 心室の 4 室を有する構造をしており，また哺乳類と同等の機能を有している。畜産学をはじめ基礎生物学から医学生物学に至る広い範囲でニワトリを実験動物として活用するため，ニワトリ生物学の基盤形成も重要である。

本研究においてはニワトリ胚発生における FKBP12.6 の関与する機構の一端を解明するために，ニワトリ FKBP12.6 の核酸及び推定アミノ酸配列を明らかにし，ニワトリ胚における FKBP12.6 の発現様式を詳細に調査し，心臓形成過程における FKBP12.6 の機能から心筋細胞の分化ならびに心臓形成機構の解明に貢献することを目的とした。FKBP ファミリーはその免疫抑制機構や生理機能において広く研究が進められているが，本研究は発生学的な見知から心臓発生・形成とこのファミリーを捉えており，FKBP に関する研究の中でも他に例を見ない。今までに様々な知見が得られてきているが，さらに基本に帰り，心臓の生理—分化・発生の機序を研究することにより全く新しい知見が得られることが期待できる。

第二章

ニワトリ FKBP12.6 遺伝子のクローニングと ニワトリ胚の心臓形成過程における発現

緒論

高等動物の発生胚において心臓は最初に機能し始める器官の一つである (Fishman and Chien, 1997)。心臓の発生は心内膜細胞や心筋細胞など複数の細胞系列の分化, さらにはその構成体の分化で完全な 4 室を有する器官が形成されていく複雑な過程である (Kelly et al., 1999; Mikawa, 1999; Mjaatvedt et al., 1999; Schultheiss and Lassar, 1999; Tam and Schoenwolf, 1999)。ニワトリでは前駆細胞が胚盤葉上層から原条を通過して胚の前方側板中胚葉領域に移動する間から移動の直後に心筋細胞の分化が起こる。この前駆細胞群が前方内胚葉から心臓性中胚葉への直接的な誘導シグナルに反応して心筋細胞系列になると考えられている。その後の胚の折りたたみによって左右の心臓原基が胚の正中線上にて融合し, 胚の腹側に筒状の心臓管 (linear heart tube) を形成すると, 続いて linear heart tube が looping と区画化を開始し, 4 室を有する心臓を形成する。この一連の過程には胚形成の初期に開始される特別な遺伝子発現のプログラムが存在し, この発現は心房中隔膜および心室中隔膜で完全に区切られた左右の室の形成によって終了する (Fishman and Chien, 1997; Srivastava and Olson, 2000)。

免疫抑制剤 FK506 はインターロイキン-2 などのリンホカイン遺伝子の発現を調節する転写因子の合成や活性化をブロックすることで, ヒト T リンパ球の活性化を阻害する (Crabtree, 1989)。FK506 の効果は FK506 結合タンパク質 (FK506-binding protein; FKBP) ファミリーによって媒介され, その結果 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性タンパク質脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを阻害する (Liu et al., 1991; Sewell et al., 1994; Lam et al., 1995)。FKBP ファミリーのひとつである FKBP12 はリアノジンレセプターの骨格筋型アイソフォーム (RyR1) および心

筋型アイソフォーム (RyR2) の両者と結合するが, FKBP12.6 は選択的に RyR2 と結合している (Lam et al., 1995 ; Timmerman et al., 1996 ; Xin et al., 1999)。FKBP12 と FKBP12.6 には構造的・機能的特性において多くの共通点がある。アミノ酸配列では 83%の相同性を示し, どちらも FK506 やラパマイシンで阻害される *cis-trans* イソメラーゼ (PPIase) 活性を有するとともに, FK506 と複合体を形成するとカルシニューリンを阻害する (Crabtree, 1989; Liu et al., 1991; Sewell et al., 1994)。骨格筋および心筋においてリアノジンレセプターは筋小胞体からの Ca^{2+} の放出を媒介し, これによって筋収縮を誘発している (Fleischer and Inui, 1989 ; McPherson and Campbell, 1993 ; Meissner, 1994)。FKBP12 は筋小胞体からの Ca^{2+} の放出を調節することで骨格筋の E-C coupling に機能していることが明らかにされている (Timmerman et al., 1993 ; Brillantes et al., 1994 ; Timmerman et al., 1995)。

FKBP12 がニワトリ胚の心筋細胞において収縮機能の制御や表現形の発現に重要であることが示されている (Obata et al., 2001)。しかし *FKBP12.6* の発現様式を始め, 胚発生における *FKBP12.6* の役割は不明である。これまでにニワトリ *FKBP12.6* に関する報告がないことから, 本研究ではまずニワトリの心臓からニワトリ *FKBP12.6* (ch*FKBP12.6*) cDNA をクローニングし, これを同定した。次にニワトリの心臓発生における *FKBP12.6* の役割の可能性を示すために, 囊胚形成段階から孵化までの ch*FKBP12.6* 遺伝子の発現を解析した。

材料および方法

1. ニワトリ胚

ニワトリ受精卵は愛知県畜産総合センター種鶏場 (愛知県安城市) より購入した白色レグホン (アイチライン系) 受精卵を用いた。孵卵器にて温度 37.5°C, 相対湿度 70%, 転卵 90°/30 min の条件で孵卵し, 得られた胚の発生ステージは Hamburger and Hamilton (1951) に従った。

2. ニワトリ *FKBP12.6* cDNA のクローニングおよびシーケンス解析

chFKBP12.6 cDNA をクローニングするため、ニワトリ 15 日胚の心臓から抽出した total RNA を用いて RT-PCR をおこなった。ヒト FKBP12.6 (GenBank accession No., NM004116) および FKBP12 (NM000801) cDNA 配列から degenerate primer (dFK; Table 2-1) を設計した。この primer を用いた RT-PCR で得られた PCR 産物 (FK) を model 373 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster, CA) で塩基配列を解読した。chFKBP12.6 cDNA の 5'- および 3'-端をそれぞれ単離するため、白色レグホン (10 日胚) 脳 cDNA ライブラリ (Clontech, Palo Alto, CA) を template に、dFK および λ gt11 primer (Table 2-1) を用いた PCR をおこない、この PCR 産物を template に、 λ gt11 および FK 断片の配列から設計した nested primer (nFK; Table 2-1) を用いた nested PCR をおこなった。この最終 PCR 産物の塩基配列を解読した。15 日胚心臓から抽出した total RNA より合成した 1st strand cDNA を用いて chFKBP12.6 cDNA を単離するため、全塩基配列を元に FK12.6-F および -R primer (Table 2-1) を設計して RT-PCR をおこなった (96°C × 1 min, 60°C × 1 min, 72°C × 90 sec を 36 サイクル, final extension 72°C × 10 min)。得られた 441 bp の chFKBP12.6 cDNA 断片を pCR2.1 クローニングベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローンし、塩基配列を確認した。これを Northern blot および *in situ* hybridization 解析に用いる特異的プローブを作成する template として用いた。

3. ノーザンブロット解析

chFKBP12.6 特異的 cDNA プローブ (441 bp) を PCR によって作成した。chFKBP12.6 cDNA 断片を template とし、FK12.6 primer (Table 2-1) を用いて digoxigenin-11-dUTP (DIG, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) で標識した。ステージ 41 ニワトリ胚の各組織あるいは各ステージニワトリ胚の心臓から total RNA を TRIzol Reagent (Invitrogen) を用いて抽出した。抽出した等量の total RNA (15 μ g) を 1.5%アガロース-ホルムアルデヒド変成ゲルによる電気泳動で分画化し、Hybond-N+ ナイロンメンブレン (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) へ転写した。ハイブリダイゼーション (50°C) およびシグナルの検出は DIG 製造元のプロトコールに従った。またインターナルコントロールとして、ニワトリグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素

酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ; G3PDH) (Panabieres et al., 1984) を用いた。

4. ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション解析

DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics) を用い、直鎖化した pCR2.1-chFKBP12.6 cDNA から T7 RNA プロモーターにより DIG 標識したセンスおよびアンチセンス RNA プローブを調整した。whole-mount *in situ* hybridization は Obuchi and Noji (2000) にもとづいておこなった。ニワトリ胚あるいは心臓組織を卵から切り出し、4% パラホルムアルデヒド/PBT (0.1% Tween-20 含有リン酸緩衝液) で一晩固定し、エタノール系列で脱水した。PBT にて水和した後、胚および縦方向に切断した心臓をプロテイナーゼ K/PBT (10 to 20 $\mu\text{g/ml}$) で 5~30 分間処理し、再固定した。ステージ 18 以降の胚は 6% H_2O_2 /PBT にて漂白した。プローブ濃度を 100~200 ng/ml とし、ハイブリダイゼーションおよびその後の洗浄は 70 $^\circ\text{C}$ にておこなった。シグナルの検出には、胚あるいは切断心臓をアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG Fab fragment (1:2,000 希釈, Roche Diagnostics) および 1.5% ブロッキング試薬 (Roche Diagnostics) 含有 TBST [100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20] にてインキュベートし、余剰抗体を 5 mM レバミゾール含有 TBST にて、引き続き 5 mM レバミゾール含有 NTMT [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 , 1% Tween-20] にて洗浄し、5 mM レバミゾール含有 AP バッファー (5% ポリビニルアルコール含有 NTMT) にてインキュベートした。NBT/BCIP stock solution (Roche Diagnostics) 含有 AP バッファー (1:50 希釈) にて 3 時間発色反応を行い、エタノール系列で脱色した。一部の胚は Sasaki and Hogan (1993) に従い、パラフィン包埋の後に厚さ 15 μm に薄切した。

5. RT-PCR 解析

TRIzol Reagent を用いてニワトリ胚 (ステージ 4~12 胚の全身) から total RNA を抽出し、RNase-free DNase I で処理した。Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いて 6 μg の total RNA から Oligo(dT) primer を用いた first-strand cDNA を調整した。得られた cDNA の 1: 40 vol. を template とし、各 primer セット (Table 2-1) を用いた PCR をおこな

い (96°C × 1 min, 55~62°C (primer により温度が異なる) × 1 min, 72°C × 1 min を 25 サイクル, final extension 72°C × 10 min), PCR 産物をエチジウムブロマイド含有 1.5%アガロースゲルにて電気泳動した。FK12, ANP, AMHC, VMHC の各 primer セット (Table 2-1) はそれぞれニワトリ FKBP12, 心房性利尿ホルモン (atrial natriuretic peptide ; ANP), 心房型ミオシン重鎖 (atrial myosin heavy chain ; AMHC), 心室型ミオシン重鎖 (ventricular myosin heavy chain ; VMHC) 遺伝子に特異的な primer である。template コントロールとして β act primer (Table 2-1) を用いた。これはニワトリ β -actin 遺伝子特異的 primer であり, forward, reverse primer がそれぞれ第 2, 第 3 エクソンを標的として設計されているため, 抽出 RNA の状態とゲノム DNA のコンタミネーションを確認できる。

結果

1. *chFKBP12.6* cDNA の同定

15日ニワトリ胚から抽出した total RNA からの RT-PCR によって cDNA 断片を単離した。195 bp の断片 (FK) の塩基配列はホ乳類 FKBP12.6 遺伝子の配列と類似していた。これを元に, ニワトリ脳 cDNA ライブラリにおける nested PCR によって *chFKBP12.6* の非翻訳領域を含む partial cDNA クローンを単離したところ, オーバーラップする 97 bp の配列は FK 断片の配列と完全に一致した。よって, このオーバーラップする cDNA クローンから全長 544 bp の *chFKBP12.6* 配列が得られた (Fig. 2-1A)。この *chFKBP12.6* cDNA (GenBank accession No., AB074887 ; 参考資料 1) は 108 アミノ酸からなる推定タンパク質をコードしており, 49 および 168 bp の 5' および 3' 非翻訳領域をそれぞれ有していた。BLAST search によって, *chFKBP12.6* cDNA の翻訳領域の塩基配列はヒト, マウス, ラットの FKBP12.6 cDNA と 85~87%, ヒト, マウス, ラットの FKBP12 cDNA と 80~82%, またニワトリ FKBP12 cDNA とは 73%の相同性を示した。

chFKBP12.6 の推定アミノ酸配列はヒト, マウス, ラット, ウシの FKBP12.6 タンパク質と

9~10 アミノ酸が異なるだけで、ヒトとは 92%、マウス、ラット、ウシとは 91%の相同性を示した (Fig. 2-1B)。ヒト FKBP12.6 タンパク質において FK506 との結合に関与するアミノ酸残基 (Tyr²⁷, Phe³⁷, Asp³⁸, Arg⁴³, Phe⁴⁷, Glu⁵⁵, Val⁵⁶, Ile⁵⁷, Trp⁶⁰, Ala⁸², Tyr⁸³, His⁸⁸, Ile⁹², and Phe¹⁰⁰) (Kay, 1996) は解析したすべての FKBP12.6 タンパク質においてよく保存されていたが、Trp⁶⁰ だけは Phe⁶⁰ に置換されていた。RyR2 との選択的結合に関与する 3 アミノ酸残基 (Glu³², Asn³³, and Phe⁶⁰) (Xin et al., 1999) もこれら 4 種のホ乳類 FKBP12.6 と chFKBP12.6 でよく保存されていた。FKBPs に特徴的な PPIase ドメイン (Standaert et al., 1990 ; Coss et al., 1995) は chFKBP12.6 にも認められた。

ニワトリ 15 日胚心臓から得た total RNA と特異的 primer FK12.6-F および-R (Fig. 2-1A, Table 2-1) による RT-PCR で 441 bp の chFKBP12.6 cDNA 断片を単離した。翻訳領域と非翻訳領域の両方を含むこの DNA 断片の塩基配列は、先の chFKBP12.6 cDNA のものと完全一致であった。この DNA 断片を Northern blot および whole-mount *in situ* hybridization 解析の特異的プローブを作成する template として用いた。

2. ニワトリ胚における chFKBP12.6 mRNA の発現分布

胚の各組織における chFKBP12.6 mRNA の発現分布および発現量を chFKBP12.6 cDNA プローブを用いた Northern blot によって解析した (Fig. 2-2)。この chFKBP12.6 cDNA プローブは chFKBP12 mRNA (Obata et al., 2001) とは交叉反応せず、ニワトリ組織において単一の~1.6 kb の転写産物を検出した。ステージ 41 ニワトリ胚において chFKBP12.6 mRNA は心臓でもっとも豊富で、脳や肺でも少量検出されたが、脚骨格筋や血管、筋胃 (平滑筋)、脾臓、胸腺では検出されなかった (Fig. 2-2A)。また心臓の発生の進展に伴う経時的な chFKBP12.6 遺伝子の発現を解析したところ (Fig. 2-2B)、その発現はステージ 27~35 で最も強く、ステージ 37 (11 日胚) でやや減少し、ステージ 41 (15 日胚) では明らかに減少した。ステージ 44 (18 日胚) および孵化直後のステージ 46 では、chFKBP12.6 mRNA は心房に限局し、心室では検出されなかった。さらにステージ 46 の心房での発現量はステージ 44 のものよりも明らかに減少した。

3. ニワトリ胚における *chFKBP12.6 mRNA* の局在

この心臓特異的な *chFKBP12.6* の発現を whole-mount *in situ* hybridization によってさらに解析した (Fig. 2-3)。コントロールであるセンスプローブによるハイブリダイゼーションでは解析したどの発生ステージにおいてもシグナルは認められなかった (Fig. 2-3, F and P)。ステージ 4~8 までの胚では *chFKBP12.6 mRNA* は検出されなかった (Fig. 2-3A) が、ステージ 8 における臓側中胚葉の左右心臓原基領域ではじめて検出され、これは壁側中胚葉や腸管内胚葉では検出されなかった (Fig. 2-3, B and G)。拍動が初めて観察されるステージ 9~10 では、*chFKBP12.6 mRNA* は融合中の心筋層全体 (Fig. 2-3, C and H) と linear heart tube 全体 (Fig. 2-3, D and I) に存在していたが、心内膜には認められなかった。ステージ 12 の looping 中の心筋層でも *chFKBP12.6* は強く発現しており (Fig. 2-3, E and J)、ステージ 21 の形成中心臓の小室でも同様に発現していた (Fig. 2-3, K and L)。ステージ 30 でも心房・心室の心筋層で *chFKBP12.6 mRNA* が発現していたが、血管では発現していなかった (Fig. 2-3, M and N)。ステージ 41 になると全体の発現量が減少するとともに、心室よりも心房に偏った発現となったが、先と同様に血管での発現は認められなかった (Fig. 2-3O)。この心房に局在した *chFKBP12.6* の発現は孵化直後 (ステージ 46) の心臓でも観察されたが、ステージ 41 と比べると発現量が極度に減少していた (データ未掲載)。

4. ニワトリ初期胚における *chFKBP12.6 mRNA* の検出

ステージ 4~14 胚における *chFKBP12.6* 遺伝子の発現誘導を、FK12.6 primer (Fig. 2-1A, Table 2-1) を用いた半定量的 RT-PCR 解析によって解析した。FK12.6 および FK12 primer は本実験条件下ではニワトリ FKBP12 cDNA (Obata et al., 2001) と交叉しなかった (Fig. 2-4, A and B)。ニワトリ β -actin 遺伝子のエクソン 2 と 3 の配列をターゲットとして設計した β act primer (Table 2-1) による PCR では、cDNA template からでは 283 bp、ゲノム DNA template からでは 804 bp の PCR 産物が得られる。今回の実験では 283 bp の産物だけが増幅されたので、抽出した total RNA が完全であり、ゲノム DNA のコンタミネーションがなかったことを示している (Fig. 2-4D)。さらに逆転写酵素を用いていない template を用いた FK12.6 primer による PCR で産物が得られて

いないことから、ゲノム DNA がコンタミネーションしていないことを確認した (Fig. 2-4C)。ステージ 4 (嚢胚形成期), ステージ 6 (頭襞期), とステージ 8 (左右中胚葉心臓原基) で微量ながら chFKBP12.6 遺伝子の発現が検出された (Fig. 2-4A)。しかし, chFKBP12.6 mRNA の発現量はステージ 12 や 14 (looping heart tube) と同様にステージ 10 (linear heart tube) で明らかに増強していた。対照的に, FKBP12 (Fig. 2-4B) および心房型ミオシン重鎖 (atrial myosin heavy chain ; AMHC) (Fig. 2-4F) 遺伝子は解析したすべての発生ステージにおいて比較的強いレベルで発現していた。心房性利尿ホルモン (atrial natriuretic peptide ; ANP) 遺伝子はステージ 4 から徐々に発現量が増加し (Fig. 2-4E), 一方で心室型ミオシン重鎖 (ventricular myosin heavy chain ; VMHC) 遺伝子の発現はステージ 4~8 では低いレベルであったが, その後ステージ 10~14 になると増強した (Fig. 2-4G)。

考察

本研究では chFKBP12.6 cDNA を単離し, その遺伝子発現が胚発生過程においてほぼ心臓に限局していることを示した。これまでに FKBP12 がニワトリ胚の発生過程において心筋細胞の表現形の発現や収縮機能の制御に重要であることが示されている (Obata et al., 2001)。胚発生において, FKBP12 遺伝子欠損マウスは心室中隔膜異常や心室心筋細胞の非緊密化, 心室緻密壁の薄化など, いくつかの心臓欠陥を示し, 14.5 日胚以降で致死であった (Shou et al., 1998)。対照的に FKBP12.6 欠損マウスでは出生はしたが, Ca^{2+} 放出の制御異常に対する適応症として, 心室中隔膜の錯綜配列を伴った心肥大となった (Xin et al., 2002)。FKBP12.6 と FKBP12 の非常によく似た構造から, FKBP12.6 ノックアウトマウスの発生過程で FKBP12 が FKBP12.6 の機能の一部を補っていた可能性もある。ヒト FKBP12 mRNA と非常に相同性の高い合成 *Xenopus* FKBP mRNA によって, カエル胚の腹側を背側化することができる (Nishinakamura et al., 1997)。さらに FKBP のひとつであり, マウス FKBP65 と非常に相同性の高いニワトリ cFKBP/SMAP

(FKBP/smooth muscle activating protein) は、発生過程の腸管で平滑筋の分化に重要な役割を担っている (Fukuda et al., 1998)。従って発生過程の心臓において *chFKBP12.6* が細胞内 Ca^{2+} 放出チャンネル (RyR2) の安定化だけでなく心臓形成にも関与している可能性も考えられる。

chFKBP12.6 cDNA の塩基配列から、FK506 結合ドメインを含むコードしているタンパク質が、その哺乳類オルソログと非常によく似ていることが明らかになった。FKBP12 と FKBP12.6 の一次構造や薬剤結合能の類似性にもかかわらず、FK506 による T 細胞活性化の阻害効果には FKBP12 だけが関与している (Xu et al., 2002)。したがってニワトリ胚並びに孵化個体の心臓で FKBP12.6 と FKBP12 遺伝子はどちらも発現しているが、心筋細胞への FK506 の投与によって FKBP12 だけが阻害されている可能性も考えられる。胚発生過程において *chFKBP12.6* mRNA は心臓に最も強く発現しており、脳や肺でも弱い発現が検出された。初期発生段階では *chFKBP12.6* は心臓全体で発現していたが、後期発生段階になるとその心室での発現が抑えられた。心房でも同様に孵化前に発現量が減少していた。ステージ 10 までに心臓は拍動を開始し、心臓の構造遺伝子は完全に発現を開始する。このときの胚の心臓では *chFKBP12.6* の発現は増強されていた。

心臓前駆細胞は胚で最初に囊胚形成に携わる細胞であり、鳥類の心筋細胞の分化はこの囊胚形成期に始まる (Schultheiss and Lassar, 1999)。*chFKBP12.6* 遺伝子の発現はステージ 4 から検出され、この時には心筋細胞の分化が始まっている。心房および心室細胞系列は、*linear heart tube* が拍動を開始するよりも早い囊胚形成期の前後には識別できるようになる (Mikawa, 1999)。本研究において、心臓マーカー遺伝子である *AMHC* および *VMHC* が囊胚形成期のステージ 4 から発現していたこともこれを裏付けている。したがって心筋前駆細胞群はステージ 4 までに心房および心室細胞系列へと分化決定しており、*FKBP12.6* の発現が心臓細胞の分化や多様化、心臓表現形の発現に付随して誘発されることを示唆している。また、*linear heart tube* はその前後軸に沿って、大動脈囊、流出路、肺および体循環性心室および心房のそれぞれの前駆体として区分化されている (Srivastava and Olson, 2000)。鳥類では、左右心臓前駆体が前方から後方へと融合していき、*linear heart tube* を形成したステージ 10 では、その部域ごとに異なる心臓マーカー遺伝子サブセットの発現を検出できるようになる (Kelly et al., 1999)。心臓前駆体が融合し拍

動を開始すると、AMHC および VMHC はそれぞれ linear heart tube の後方および前方で強く発現する (Yutzey et al., 1994)。chFKBP12.6 遺伝子はステージ 10 で著しく発現が増強しており、初期胚発生過程においては心筋細胞の多様化に関係なくその後も心房および心室での発現を継続していた。しかし後期胚 (ステージ 41) や孵化個体 (ステージ 46) では chFKBP12.6 mRNA は心房に局在していた。心筋細胞は胚発生の間だけ分裂でき、孵化後すぐに分裂を停止する (MacLellan and Schneider, 1999)。心筋細胞の多様化が chFKBP12.6 遺伝子発現の心房への局在化に影響しているわけではなさそうであり、心臓の成熟機能または心臓における時空間的発現制御によるものかもしれない。

心筋特異的遺伝子は linear heart tube 形成期では共発現する傾向にある (Kelly et al., 1999)。ニワトリ MHC (CMHC) および VMHC は初期胚 linear heart tube の心室部域で強い発現を示す (Bisaha and Bader, 1991 ; Yutzey et al., 1994 ; Croissant et al., 2000)。骨格筋型 MHC ファミリーの一つであるニワトリ新生児型骨格筋 MHC 遺伝子は、まずステージ 10 の初期心室部で発現を開始する。その後、孵化直後までに発現は心房で増強し、心室で減退する (Machida et al., 2000)。FKBP12.6 および FKBP12 もニワトリ胚の心臓で共に発現しているが、ノックアウトマウスの心臓表現形の違いから、それぞれが心筋細胞で異なる役割を担っていることを示唆している (Shou et al., 1998 ; Xin et al., 2002)。マウス胚では、RyR2 は 8.5 dpc (ニワトリ胚のステージ 10 に相当) で初めて発現が認められ、その後も心臓で強い発現を続ける (Roseblit et al., 1999)。つまり、これらの遺伝子は発生過程の心臓で共発現しているが、FKBP12.6 が RyR2 と関与して筋収縮に機能しているにもかかわらず、chFKBP12.6 遺伝子の発現制御は MHC 遺伝子群や RyR2 遺伝子のそれとは異なっているようだ。

心臓の分化や発生には *Nkx2.5* や *GATA4*, *Mef2* ファミリーのような転写因子群が重要とされている (Fishman and Chien, 1997 ; Srivastava and Olson, 2000)。これら転写因子群の mRNA は心臓原基中胚葉に局在している。さらに、T-box を有する転写因子である *Tbx5* も心臓発生に関与している (Liberatore et al., 2000)。chFKBP12.6 遺伝子の発現パターンとは異なり、*Tbx5* mRNA はニワトリ胚ステージ 16 では looping heart tube 全体に局在しているが、その後まず心房に局在し、続いてステージ 25 になると心房および左心室で発現が認められるようになる (Bruneau et al.,

1999)。他にも *NF-ATc* や *dHAND*, *eHAND* の様な転写因子が初期胚において心筋遺伝子の発現制御に関与している (Srivastava and Olson, 2000)。しかし、胚の心臓において特徴的な *chFKBP12.6* 発現を制御するメカニズムはわかっていない。

結論として、FKBP12.6 遺伝子の発現は初期胚発生過程での心筋細胞の分化や表現形の発現と連動して開始され、孵化後心房に限局するまでの胚発生の間、FKBP12.6 は心臓全体で機能していると考えられる。ニワトリ胚発生過程での FKBP12.6 発現パターンから、FKBP12.6 が心臓形成過程では独特の機能を有している可能性があることを示唆している。また本研究の結果から、FKBP12.6 mRNA が鳥類胚において初期心臓特異的心臓マーカーの一つとなりえることが示唆された。成体心筋細胞において FKBP12.6 は RyR2 と選択的に関係しているとされているが、特に心室心筋細胞における E-C coupling でのこの関係を解明しなくてはならない。

小括

ニワトリ FKBP12.6 を同定し、その核酸及びアミノ酸配列を明らかにした。ニワトリ FKBP12.6 cDNA は、FKBP12.6 の 108 アミノ酸をコードする 324 bp を含む全長 544 bp であり、その核酸及びアミノ酸 (91~92%) 配列は動物種を越えてよく保存されていた。なお、得られたニワトリ FKBP12.6 の核酸およびアミノ酸配列は、国立遺伝学研究所の遺伝子データベース (CIB-DDBJ/EBI-EMBL/NCBI-GenBank 国際塩基配列データベース) に登録し、そのアクセスナンバーは AB074887 である。Northern blot 解析の結果、ステージ 41 ニワトリ胚における FKBP12.6 mRNA は心臓で最も強く検出され、脳や肺でも微弱な発現が検出された。また心臓での発現は発生中期にピークを迎え、以降発生の進行に伴い発現量が減少し、孵化後には心房に局在した。*in situ hybridization* 解析によって、*chFKBP12.6* mRNA が原始心臓 (linear heart tube) を形成するよりも早くから心臓原基中胚葉に局在しており、心臓形成過程では心房および心室の心筋層全体に発現していたが、孵化前にはこれが心房に局在することが明らかになった。RT-

PCR 解析によって chFKBP12.6 は囊胚形成期には発現を開始しており、心筋細胞の拍動の開始に伴って発現量が増大することが示された。

本研究によって、FKBP12.6 は心筋細胞の E-C coupling に重要な役割を果たすために、心臓形成および心筋細胞の機能発現前には既に発現が開始され、その後心臓の形成・成熟に伴って心房へと局在し、機能していることが示唆された。心臓形成過程解明のためには、心筋細胞で重要な機能を有する FKBP12.6 の発現および機能の制御機構の解明が重要である。また心臓では FKBP ファミリーのひとつである FKBP12 が心筋細胞の収縮弛緩や細胞形態などの形質発現において重要な役割の一部を担っていることが示されている (Obata et al., 2001) ので、同じく心臓に存在する FKBP12.6 の役割を解明することが必須と思われる。

Table 2-1. Primers used for cloning and RT-PCR.

Primer	GenBank accession no.	Sequence	Product size (bp)
dFK (degenerate)	AB074887	F 5'-GTGGTGCCTACAC(AC)GG(AG)AT-3'	195
		R 5'-GTG(CG)CC(AC)GTGGC(AT)CCATA(GT)-3'	
nFK (nested)	AB074887	F 5'-TGGCAGGCAAGAAGTCATTA-3'	
		R 5'-ATAGGCCATCTCAGGTGTGC-3'	
λ gt11*		F 5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3'	
		R 5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3'	
FK12.6 [†] (RT-PCR)	AB074887	F 5'- <u>GAATTC</u> GCCCAGCGCCGAGATG-3'	429 + 12
		R 5'- <u>GTCGACTT</u> CCAGTGAAGATTTCCCCCGC-3'	
β act [‡] (RT-PCR)	X00182	F 5'-CACGGTATTGTCACTCAACTGGG-3'	283 (or 804)
		R 5'-AGATGGGCACAGTGTGGGTAAC-3'	
FK12 (RT-PCR)	AB055761	F 5'-GACATGGGCGTGCACGTG-3'	343
		R 5'-GCGTTGGGGTGGGTCATT-3'	
ANP (RT-PCR)	X57702	F 5'-ACTTCCCCTATTCCCAAC-3'	285
		R 5'-TTCAGCCTTCTGCTCATC-3'	
AMHC (RT-PCR)	S78540	F 5'-CAGCTGAAGGTGAAGGCCTATA-3'	264
		R 5'-GCTGAAAGCAGAGAGATCCAA-3'	
VMHC (RT-PCR)	X59552	F 5'-CAAGTTTGAGAGGCGCATAA-3'	302
		R 5'-GCCAGGACCGCACTTACT-3'	

*The λ gt11 primer sequences correspond to the *lacZ* gene of the vector. [†]The FK12.6-F and -R primers contain added sites for the restriction endonucleases *EcoRI* and *SaII*, respectively, at their 5' ends (underlines). [‡]The β act-F and -R primers are targeted to exons 2 and 3 of the chicken β -actin gene, respectively; they yield 283- or 804-bp products with cDNA and genomic DNA as a template, respectively.

A

```

      10      20      30      40      50      60      70
CGCCGAGCCGAGCCGTGCCAGGGCTGCCAGCGGAGCCAGCGCCGAGATGGGGGTGGAGATCGAGACC
                                     M G V E I E T
      80      90      100     110     120     130     140
ATCTCTCCGGGAGACGGACGGACGTTTCCGAAGAAGGGGCAGACGTGTGTGGTGCACCTACACAGGAATGC
I S P G D G R T F P K K G Q T C V V H Y T G M L
      150     160     170     180     190     200     210
TACAGAATGGAAAGAAGTTTGATTCCTCCAGAGACAGAAACAAGCCTTTCAGGTTCAAGATTGGCAGGCA
Q N G K K F D S S R D R N K P F R F K I G R Q
      220     230     240     250     260     270     280
AGAAGTCATTAAAGGATTTGAAGAAGGTGTTACACAGATGAGCTTAGGACAAAGAGCAAAGCTGACCTGC
E V I K G F E E G V T Q M S L G Q R A K L T C
      290     300     310     320     330     340     350
ACACCTGAGATGGCCTACGGAGCCACGGGCCACCCGGGGTCCATCCCTCCCAATGCCACGCTCCTCTTTG
T P E M A Y G A T G H P G V I P P N A T L L F D
      360     370     380     390     400     410     420
ATGTGGAGCTTCTCAGGTTGGAGTGAGTCTTCTTGGGGGAGCTGGCTGGAGGCATCTCTCCATAACCATC
V E L L R L E *
      430     440     450     460     470     480     490
CCTTCTTTCTCACCTCCAGCAGCGGGGAAATCTTCACTGGAATCCCAATCTTCTGCTCAAGCTGTC
      500     510     520     530     540
ATATCAGTAGCGCCTGCCCTTAGGTTCTTAAGCCTTCTTTCTCCTTTCTTCT

```

B

chick	1:MGVEIETISPGDGRTPFKK	GQTCVVHYTGMLQNGKKFD	SSRD	RNKPF	FRFKIGRQ	EVIKGF	60
human	1:.....				.K.R.K.	60
mouse	1:.....	I.....			.K.R.K.	60
rat	1:.....	I.....			.K.R.K.	60
bovine	1:.....K.R.K.	59
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
chick	61:EEGVTQMSLQRAKLTCTPEMAYGATGHPGVIPPNATLLFDV	ELLRLE					108
human	61:..AA.....DV.....I.....N..						108
mouse	61:..TA.....DV.....I.....S..						108
rat	61:..AA.....DV.....I.....N..						108
bovine	60:..AA.....DV.....I.....N..						107
	***	*****	*****	*****	*****	*****	

Fig. 2-1. Characterization of chFKBP12.6 cDNA. (A) The nucleotide and deduced amino acid sequences of chFKBP12.6 cDNA. The nucleotide sequences corresponding to those of the specific primers FK12.6F and FK12.6R are boxed. The asterisk indicates the termination codon. (B) Comparison of the deduced amino acid sequences of chicken, human (GenBank accession no., NM004116), mouse (NM016863), rat (D86642), and bovine (A53924) FKBP12.6 proteins. Residues that are identical in all five species are indicated by asterisks. Residues implicated in anchoring FK506 or in selective binding to RyR2 are boxed and shaded, respectively. The PPIase domain is indicated by a horizontal line.

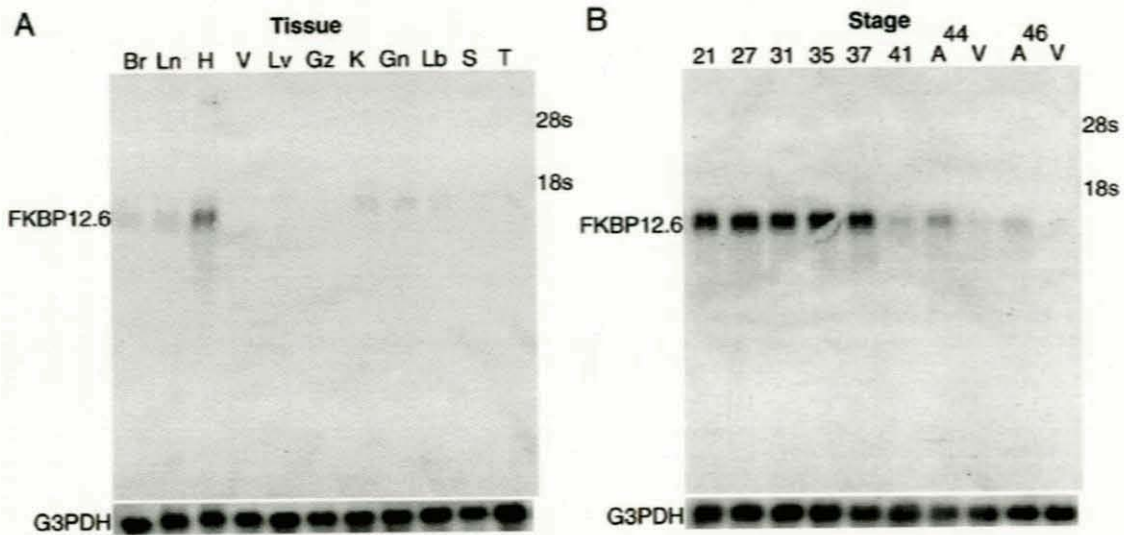


Fig. 2-2. Northern blot analysis of the spatial and temporal distribution of chFKBP12.6 mRNA during embryonic development. **(A)** Tissue distribution of FKBP12.6 mRNA in the chick embryo at stage 41 (day 15). Total RNA was hybridized with a digoxigenin-labeled chFKBP12.6 cDNA probe. The positions of 28S and 18S rRNA and of chFKBP12.6 mRNA are indicated. The lower panel shows hybridization with a chicken glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) cDNA probe as a control. Lanes: Br, brain; Ln, lung; H, heart; V, vasculature; Lv, liver; Gz, gizzard; K, kidney; Gn, gonad; Lb, skeletal muscle (limb); S, spleen; and T, thymus. **(B)** Time course of the abundance of chFKBP12.6 mRNA in the heart during embryonic development. Lanes: 21 to 46, stages 21 to 46; A, atrium; and V, ventricle.

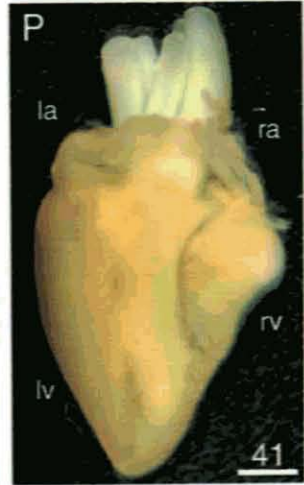
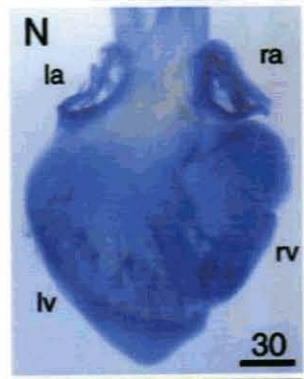
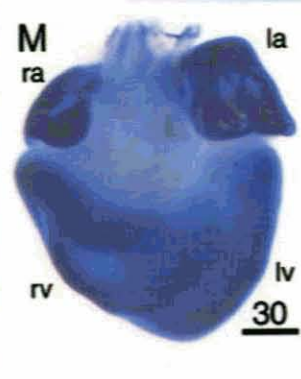
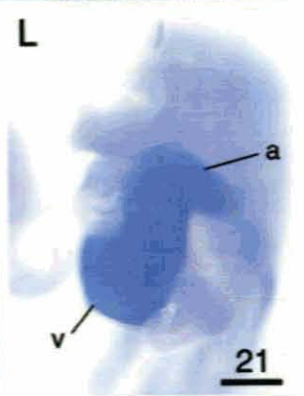
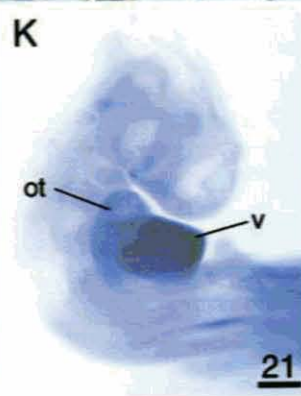
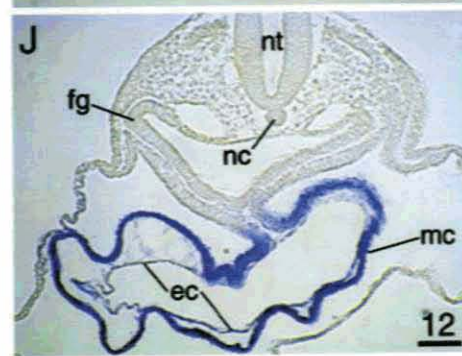
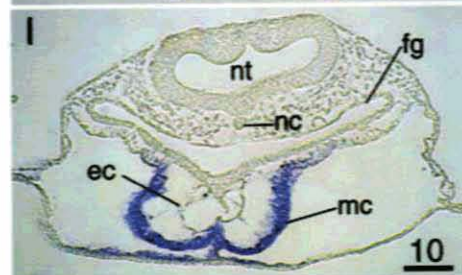
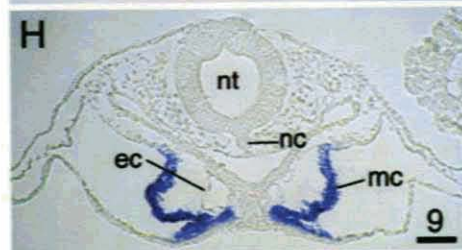
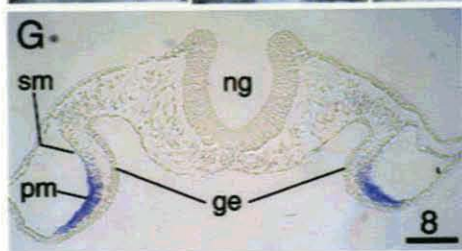
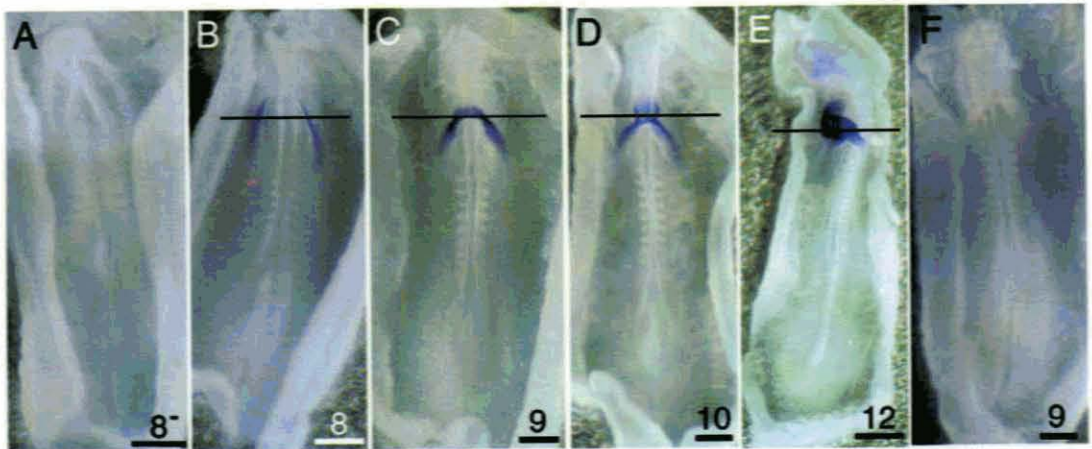


Fig. 2-3. Whole-mount *in situ* hybridization analysis of the localization of chFKBP12.6 mRNA during embryogenesis. Embryos or hearts, with the exception of those shown in (F) and (P), were subjected to hybridization with a chFKBP12.6 antisense RNA probe. The developmental stage of each embryo is indicated at the bottom right of each panel. Panels show ventral views of embryos (A–F), transverse sections prepared after hybridization (G–J), the right (K) and left (L) side views of an embryo, a ventral view of the heart (M), and dorsal views of the longitudinal cut surface of the heart (N–P). The lines in (B) to (E) represent the levels of the transverse sections shown in (G) to (J), respectively. The chFKBP12.6 mRNA was not detected at stage 8⁻ (A), being first apparent in the precardiac bilateral mesoderm at stage 8 (B and G) and continuing in the fusing myocardium at stage 9 (C and H). Expression of the FKBP12.6 gene was observed in the myocardium, from anterior (ventricle) to posterior (atrium), of the linear heart tube and in the sinoatrial tissues at stage 10 (D and I). Myocardial expression was also apparent in the looping heart tube at stage 12 (E and J) and in the developing heart at stage 21 (K and L). Expression in atrial and ventricular myocardium was observed in the multichambered heart at stage 30 (M and N), with reduced expression remaining in the atria at stage 41 (O). The embryo in (F) and heart in (P) were subjected to hybridization with a chFKBP12.6 sense RNA probe and showed no reactivity. a, atrium; ec, endocardium; fg, foregut; ge, gut endoderm; la, left atrium; lv, left ventricle; mc, myocardium; nc, notochord; ng, neural groove; nt, neural tube; ot, outflow tract; pm, precardiac mesoderm; ra, right atrium; rv, right ventricle; sm, somatic mesoderm; v, ventricle. Scale bars, 400 μ m (A–F, K–N), 50 μ m (G–J), or 1 mm (O and P).

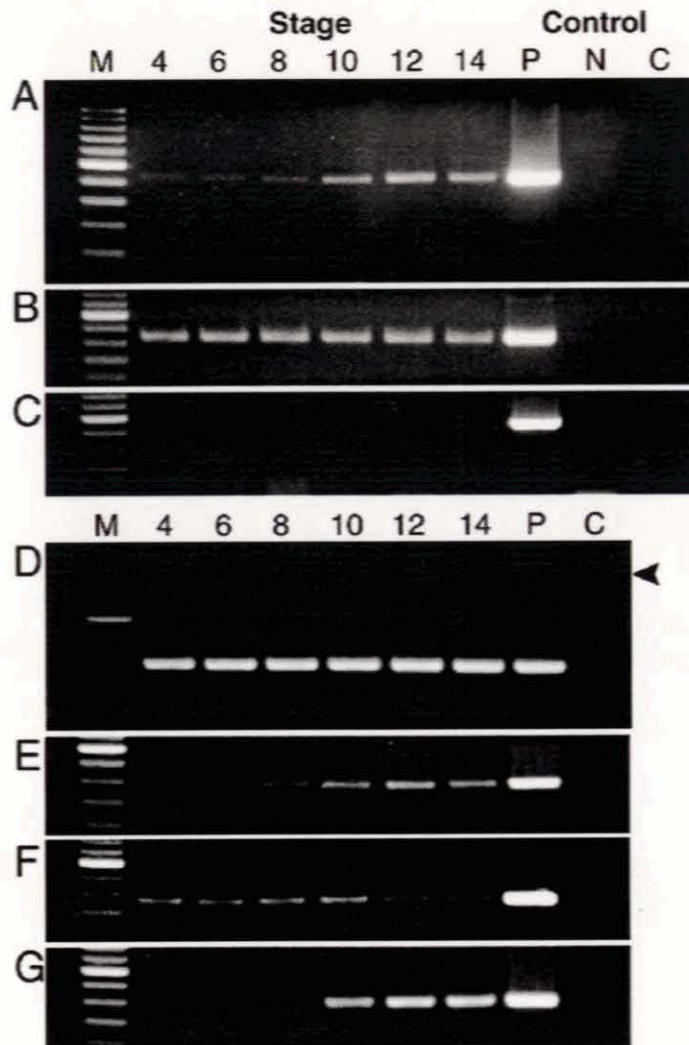


Fig. 2-4. RT-PCR analysis of FKBP12.6 gene expression in chick embryos at stages 4 to 14. Total RNA extracted from chick embryos at the indicated stages of development was subjected to RT-PCR with the FK12.6 primers specific for the chFKBP12.6 gene (A) or with primers specific for the chicken FKBP12 (B), β -actin (D), ANP (E), AMHC (F), or VMHC (G) genes. Analysis was also performed with the FK12.6 primers and RNA samples not incubated with reverse transcriptase (C). RT-PCR analysis of all embryonic RNA preparations with the β -actin primers yielded a single 283-bp product derived from the β -actin mRNA; an 804-bp product (arrowhead) derived from the β -actin gene was not detected, verifying that the RNA preparations were not contaminated with genomic DNA (D). Lanes M, molecular size markers (100-bp ladder). Lanes P, positive controls in which chicken FKBP12.6, FKBP12, β -actin, ANP, AMHC, or VMHC cDNAs were used as templates. Lanes C, negative controls in which template was omitted. Lanes N, negative controls in which chFKBP12 (A and C) or chFKBP12.6 (B) cDNAs were used as templates to demonstrate the lack of cross-reactivity of the chFKBP12.6 and chFKBP12 primers, respectively. Sizes of the various PCR products are shown in Table 2-1.

参考資料 1. chFKBP12.6 cDNA 塩基配列情報 (NCBI-GenBank 国際塩基配列データベース)



□1: AB074887. Gallus gallus FKB...[gi:20160385]

LOCUS AB074887 544 bp mRNA linear VRT 15-JAN-2003

DEFINITION Gallus gallus FKBP12.6 mRNA for FK506 binding protein 12.6, complete cds.

ACCESSION AB074887

VERSION AB074887.1 GI:20160385

KEYWORDS .

SOURCE Gallus gallus (chicken)

ORGANISM *Gallus gallus*

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Archosauria; Aves; Neognathae; Galliformes; Phasianidae; Phasianinae; Gallus.

REFERENCE 1

AUTHORS Yazawa,S., Obata,K., Iio,A., Koide,M., Yokota,M., Sasaki,S., Kagami,H. and Ono,T.

TITLE Heart-selective expression of the chicken FK506-binding protein (FKBP) 12.6 gene during embryonic development

JOURNAL Dev. Dyn. 226 (1), 33-41 (2003)

MEDLINE 22395905

PUBMED 12508222

REFERENCE 2 (bases 1 to 544)

AUTHORS Yazawa,S., Koji,O., Iio,A., Koide,M. and Ono,T.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (27-NOV-2001) Shigenobu Yazawa, Shinshu University, Faculty of Agriculture; Minamiminowa 8304, Kamiina, Nagano 399-4598, Japan (E-mail:chimera@gipmc.shinshu-u.ac.jp, Tel:81-265-77-1434, Fax:81-265-77-1434)

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..544
/organism="Gallus gallus"
/mol_type="mRNA"
/strain="Leghorn"
/db_xref="taxon:9031"
/clone="FKBP12.6"
/tissue_type="brain"

```

                /clone_lib="Clonetech chicken Brain cDNA library"
                /dev_stage="adult"
gene           1..544
                /gene="FKBP12.6"
CDS            50..376
                /gene="FKBP12.6"
                /codon_start=1
                /product="FK506 binding protein 12.6"
                /protein_id="BAB89371.1"
                /db_xref="GI:20160386"
                /translation="MGVEIETISPGDGRTFPKKGQTCVVHYTGMLQNGKKFDSSRDRN
                KPFRFKIGRQEVIKGFEEGVTQMSLGQRAKLTCTPEMAYGATGHPGVIPPNATLLFDV
                ELLRLE"

```

BASE COUNT 125 a 148 c 150 g 121 t

ORIGIN

```

    1 cgccgagccg agccgtgccc agggctgccg agcggagccc agcgcgaga tgggggtgga
   61 gatcgagacc atctctcgg gagacggacg gacgtttccg aagaaggggc agacgtgtgt
  121 ggtgcactac acaggaatgc tacagaatgg aaagaagttt gattcctcca gagacagaaa
  181 caagcctttc aggttcaaga ttggcaggca agaagtcatt aaaggatttg aagaagggtg
  241 tacacagatg agcttaggac aaagagcaaa gctgacctgc acacctgaga tggcctacgg
  301 agccacgggc caccctgggg tcacccctcc caatgccacg ctctctttg atgtggagct
  361 tctcaggttg gagtgagtct tcttggggga gctggctgga ggcatctctc cataaccatc
  421 ccttctttct caccctccca gcagcggggg aaatcttcac tggaatccca atcttctgac
  481 tcaagctgac atatcagtag cgctgccct taggtttctt aagcctttct ttctccttc
  541 ttct

```

//

Disclaimer | Write to the Help Desk

NCBI | NLM | NIH

Web URL

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=20160385&dopt=GenBank

第三章

胚発生における FKBP12.6 および FKBP12 の遺伝子発現と機能

緒論

FKBP は免疫抑制剤 FK506 およびラパマイシンと結合するイムノフィリンである (Schreiber, 1991)。FKBP-FK506 の複合体によって、T 細胞において細胞内シグナル伝達系で機能する Ca^{2+} -カルモジュリン依存性セリン/スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを阻害することで、FK506 の免疫抑制作用が発揮される (Liu et al., 1991; Sewell et al., 1994; Lam et al., 1995)。カルシニューリンの阻害によって、インターロイキン-2 のようなリンホカイン遺伝子の発現を促進する転写因子 (NF-AT, AP3, NF- κ B) が不活化される (Crabtree, 1989)。FKBP のアイソフォームである FKBP12 と FKBP12.6 はそれぞれ 12 および 12.6 kDa の細胞質内タンパク質である。これらのタンパク質はヒトで 85% の相同性を示し、三次構造もよく似ている (Deivanayagam et al., 2000)。どちらも FK506 やラパマイシンと効率的に結合することから、よく似た薬理学的作用を示すことが示唆されている (Xu et al., 2002)。

FKBP には peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) 活性があり (Harding et al., 1989)、細胞タイプによって様々な機能を有する (Wang et al., 1994; Okadome et al., 1996; Barg et al., 1997; Yao et al., 2000; Aghdasi et al., 2001)。細胞内での FKBP の生理学的なターゲットは、心筋型および骨格筋型 RyRs や IP₃R のような Ca^{2+} 放出チャンネルである (Brillantes et al., 1994; Cameron et al., 1995)。RyRs は小胞体からの Ca^{2+} 放出を調節しており、これによって E-C coupling に重要な役割を担っている。骨格筋型リアノジン受容体 (RyR1) は FKBP12 と結合しているが、心筋型リアノジン受容体 (RyR2) は FKBP12.6 と結合している (Lam et al., 1995; Timerman et al., 1996; Xin et al., 1999; Carmody et al., 2001)。FKBP は RyRs の活性化および安定化に関与しているとされている (Timerman et al., 1993; Brillantes et al., 1994; Mayrleitner et al., 1994; Marx et al., 1998;

Marx et al., 2000 ; Yano et al., 2000)。

FKBP12 ノックアウトマウスでは骨格筋には構造的な異常は認められなかったが、胚発生過程で心臓形成に異常を来し、出生前に死亡した (Shou et al., 1998)。対照的に、*FKBP12.6* ノックアウトマウスでは新生児が得られたが、 Ca^{2+} 放出の異常に対する適応症として心室中隔膜の錯綜配列を伴った心肥大となった (Xin et al., 2002)。近年、*FKBP12* がニワトリ胚の心筋細胞において収縮機能と表現型の発現の制御に重要であることが示された (Obata et al., 2001)。

第二章で *chFKBP12.6* が発生初期から選択的にニワトリ胚の心臓領域で特異的に発現しており、発生の進行に伴い心臓全体で発現していた *chFKBP12.6* が孵化直前に心房に局在することを明らかにした。第三章ではニワトリ胚における *FKBP* の役割を明らかにするため、まず発生過程および孵化後の *FKBP12.6* と *FKBP12* 遺伝子の発現を比較解析した。そして初期胚における胚発生や心臓形成に対する *FK506* の影響と、*FKBP* 遺伝子の発現に対するレチノイン酸の効果を解析した。

材料および方法

1. ニワトリ胚

ニワトリ受精卵は愛知県畜産総合センター種鶏場 (愛知県安城市) より購入した白色レグホン (アイチライン系) 受精卵を用いた。孵卵器にて温度 37.5°C 、相対湿度 70%、転卵 $90^{\circ}/30\text{ min}$ の条件で孵卵し、得られた胚の発生ステージは Hamburger and Hamilton (1951) に従った。

2. プラスミド DNA およびプローブの調製

ニワトリ *FKBP12.6* (*chFKBP12.6*) cDNA (GenBank accession no. AB074887) は第二章でクローニングしたものを、ニワトリ (*chFKBP12*) cDNA (AB055761) は Obata et al., (2001) でクローニングされた全長 cDNA (635 bp) を用いた。Northern blot 解析用の cDNA プローブは以下のプライマーを用いた PCR により、DIG (Roche Diagnostics) で標識した。*chFKBP12.6* (441

bp); forward: 5'-GAATTCGCCAGCGCCGAGATG-3', reverse: 5'-GTCGACTTCCAGTGAAGATTC
CCCCGC-3' (Table 2-1, Fig. 2-1A)。chFKBP12 (343 bp); forward: 5'-GA CATGGGCGTGCACGTG-3',
reverse: 5'-GCGTTGGGGTGGGTCATT-3'。chFKBP12 cDNA プローブはほぼ open reading frame (324
bp) で構成される。in situ hybridization には、DIG RNA labeling kit (Roche Diagnostics) を用い
た in vitro transcription によって、DIG 標識 chFKBP12.6 および chFKBP12 RNA プローブ (セン
スおよびアンチセンス) を調製した。

3. ノーザンブロットおよびホールマウント in situ ハイブリダイゼーション解析

Northern blot および whole-mount in situ hybridization 解析は第二章で行った方法に従った。
Northern blot 解析では、ステージ 34 (孵卵 8 日), ステージ 41 (孵卵 15 日) 胚, および孵化 1
日齢, 孵化 3 週齢のヒナから各組織の total RNA を TRIZOL reagent (Invitrogen) を用いて抽出
した。これら等量 (15 µg) を 1.5%アガロース-ホルムアルデヒド変成ゲルによる電気泳動で分
画し、Hybond-N+ナイロンメンブレン (Amersham Bioscience) に転写し、DIG 標識 cDNA プロ
ーブによるハイブリダイゼーション (50°C) に供した。whole-mount in situ hybridization 解析で
は、ステージ 4~12 の胚を卵黄から切り出し、4%パラホルムアルデヒド/PBT で固定した。RNA
プローブ濃度 100~200 ng/ml とし、ハイブリダイゼーションは 70°C でおこなった。

4. ニワトリ胚の in vitro culture および薬剤投与

10% ウシ胎児血清 (Tissue Culture Biologicals, Tulare, CA), 5 U/ml ペニシリン, 5 µg/ml ス
トレプトマイシンを添加したMedium 199 Hank's (Invitrogen) を culture medium とした。FK506 (藤
沢薬品, 吹田市) を 100% EtOH に溶解し, これを culture medium で濃度 0.01~1 mM になるように
希釈し, EtOH の最終濃度は 1% とした。All-trans レチノイン酸 (RA; Sigma, St. Louis, MO) を Osmond
et al., (1991) に従って dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma) に溶解し, culture medium で濃度 1~100
µM になるように希釈し, DMSO の最終濃度は 1% とした。1% EtOH または 1% DMSO 入り culture
medium をコントロールとして用いた。

in vitro culture は Chapman et al., (2001) の培養法に従い, ステージ 3~9 のニワトリ胚を濾紙

キャリアーにて卵黄から切り出し、35 mmディッシュで培養した。この方法ではディッシュ中の agar-albumen substrate 上で胚の腹側を表面に向け培養する。FK506含有、RA含有もしくはコントロール culture medium (100 μ l) を添加した胚を38°Cで24時間培養し、発生状況を観察した後、4%パラホルムアルデヒド/PBTで固定して whole-mount *in situ* hybridization に供した。

5. 統計処理

実験結果をMicrosoft Excelのadd-inプログラム Statcel (柳井, 1998) を用い、スピアマン順位相関係数の検定によって統計的に解析した。 $P < 0.05$ で統計的に有意差ありとした。

結果

1. ニワトリ発生過程における FKBP12.6 および FKBP12 mRNA の分布

chFKBP12.6 と chFKBP12 の遺伝子発現の発生過程におけるプロファイルを Northern blot 解析で比較した (Fig. 3-1)。chFKBP12.6 と chFKBP12 それぞれの特異的 cDNA プローブは互いに交叉反応せず、第二章並びに Obata et al., (2001) と同様に、ニワトリ胚組織においてそれぞれ~1.6 kb の単一バンドと~1.5 および 1.8 kb の2本のバンドを検出した (Fig. 3-1)。chFKBP12.6 遺伝子の発現は、胚発生の過程 (ステージ 34 および 41) ではほぼ心房および心室に局在していた (Fig. 3-1, A and B)。第二章でも示したように、心房での chFKBP12.6 発現量は発生に伴い徐々に減少したが、一方で心室の発現は急速に down-regulation され、孵化後では心室での発現は検出できなかった (Fig. 3-1C)。孵化後では脳や脚 (骨格筋) での発現も認められるようになり (Fig. 3-1C), 3 週齢になると心房での発現量はさらに脳や骨格筋のものと同等にまで減少していた (Fig. 3-1D)。対照的に、chFKBP12 遺伝子の発現はステージ 34 および 41 で解析したすべての組織で検出された (Fig. 3-1, A and B)。すべての組織で chFKBP12 の発現量は3週齢まで減少を続けたが、脳や心臓 (心房・心室)、筋胃 (平滑筋)、脚 (骨格筋) では比較的強い発現

のままであった (Fig. 3-1D)。

ステージ 4~12 までのニワトリ胚における *chFKBP12.6* および *chFKBP12* mRNA の時空間的な局在を whole-mount *in situ* hybridization によって解析した (Fig. 3-2)。どのステージでもセンスプローブによるコントロール解析ではシグナルは認められなかった (データ未掲載)。*chFKBP12.6* 遺伝子の発現はステージ 8 の左右心臓原基領域 (Fig. 3-2B), ステージ 9 および 10 の融合中の linear heart tube (Fig. 3-2, C and D), ステージ 12 の looping heart tube (Fig. 3-2E) でそれぞれ認められた。*chFKBP12.6* よりも *chFKBP12* の発現量が多かった。*chFKBP12* は *chFKBP12.6* の発現領域も含めた胚の全域で発現していたが、特に神経褶や神経管での発現が顕著であった (Fig. 3-2, F-J)。

2. 胚発生における FKBP 投与による影響

初期胚形成における FKBP の役割を解析するため、FKBP の PPIase 活性を阻害する免疫抑制剤 FK506 を様々な濃度で添加したステージ 3~8 のニワトリ胚を *in vitro* で培養した。FK506 処理した胚の死亡は観察されなかった (Table 3-1)。24 時間培養後 (ステージ 11~12) に FK506 処理群 (3/27, 11%) およびコントロール群 (1/7, 14%) で逆向きの胚 (心臓の looping 方向および頭部の屈曲方向が左向き) が観察された。しかし、投与濃度 ($r_s = 0.349809$) および投与したステージ ($r_s = 0.4331551$) と異常発生には統計的な関連性は認められなかった。

3. レチノイン酸投与胚における FKBP 遺伝子の発現

モルフォゲンとしての過剰レチノイドによる *chFKBP12.6* および *chFKBP12* 遺伝子の発現に対する影響を、*in vitro* でステージ 3~9 から 24 時間培養したニワトリ初期胚形成過程において解析した (Table 3-2, Fig. 3-3)。この培養期間中に心臓原基は融合して linear heart tube を形成し、拍動を開始する (ステージ 10~12)。コントロール群 (1% DMSO) の心臓の全体構造 (Fig. 3-3, A and F) は、無処理胚 (コントロール群) のもの (Fig. 3-2, E and J) と違いは認められなかった。RA の添加による心臓の異形成は RA 濃度依存的であった ($P < 0.05$, $r_s = -0.37566867$) が、添加したステージには統計的な関連性は認められなかった ($r_s = 0.0589467$) (Table 3-2)。

高濃度 RA (100 μ M) では、完全な心臓欠損を含む重度の形成不全や心臓の異形成を示した (逆向き胚以外で 27/36, 75.0%)。RA 濃度 10 μ M でも心臓の異形成がいくつか認められた (2/26, 7.7%) が、ほとんどの胚で拍動する heart tube が形成されていた (24/26, 92.3%)。最低濃度 RA (1 μ M) では心臓形成にほとんど影響はなかった (2/21, 9.5%) が、DMSO 含有 medium で処理したコントロール胚ではその様な異形成は観察されなかった。

1 μ M RA 処理した胚 (データ未掲載) でも同様に、DMSO 含有 medium で処理したコントロール胚における心筋細胞系列の分化や *chFKBP12.6* および *chFKBP12* の発現パターンは正常であった (Fig. 3-3, A and F)。10 μ M RA で処理した胚では、心臓の looping が逆方向になった胚でも、心臓特異的な *chFKBP12.6* および全身で発現している *chFKBP12* の発現パターンに変化はなかった (Table 3-2, Fig. 3-3, B and G)。100 μ M RA で処理した胚のほとんどで様々な心臓の異形成が認められたが、*chFKBP12* 遺伝子の発現は胚の全身で認められており (Fig. 3-3, H-J), また *chFKBP12.6* 遺伝子の心臓への局在については、二叉心臓のような異形成心臓においても維持されていたが、心臓を欠損している胚では認められなかった (Fig. 3-3, C-E)。

考察

ニワトリ FKBP12.6 (GeneBank accession no. AB074887) と FKBP12 (AB055761) タンパク質の間ではアミノ酸配列で 78%の相同性を示す (Fig. 2-1B ; Obata et al., 2001) が、哺乳類の FKBP12.6 (ヒト, NM004116 ; マウス, NM016863 ; ウシ, A53924) と FKBP12 (ヒト, NM000801 ; マウス, NM008019 ; ウシ, P18203) の間ではそれぞれ 82~86%の相同性を示す。FKBP12.6 および FKBP12 タンパク質には機能的、構造的にいくつかの類似点がある。これには RyRs への作用や、FK506 やラパマイシンで阻害される PPIase 活性などがあるが、FKBP12 は RyR1 に結合するので、FKBP12.6 の RyR2 への選択的結合に関与しているアミノ酸残基は FKBP12 とは異なっている。第二章および Obata et al., (2001, 2002) で示したように、ニワトリ胚発生過程

でのこれらの遺伝子発現は互いに大きく異なっている。本研究において FKBP12.6 および FKBP12 の発生過程における役割を解析するために、まずこれらの胚発生後期から孵化後にかけての発現分布と発現量をさらに詳細に比較解析したところ、第二章 (Fig. 2-2) や Obata et al., (2001, 2002) の結果を支持するとともに補完するものであった。

ニワトリ FKBP12.6 および FKBP12 mRNA は孵化後も明らかに心房に共存しており、心室では FKBP12 だけが検出された。哺乳類では FKBP12.6 が心臓の主要なFKBP アイソフォームであるにもかかわらず (Lam et al., 1995 ; Timerman et al., 1996), FKBP12.6 mRNA の発現量は孵化後のヒナの心臓においても FKBP12 mRNA よりも少ない。動物種によって分布や役割が異なるのだろうか。解析したそれぞれの組織での FKBP の発現分布や発現量が異なっていたこと、そして FKBP がそれぞれの細胞タイプで様々な機能を有するからも (Wang et al., 1994 ; Okadome et al., 1996 ; Barg et al., 1997 ; Yao et al., 2000 ; Aghdasi et al., 2001), これらのタンパク質の分布を解析することが重要であり、また成体心臓における FKBP12.6 と FKBP12 の役割や成体骨格筋における FKBP12.6 の役割を明らかにする必要があるだろう。3 週齢ヒナにおける脳での *chFKBP12.6* 遺伝子の発現と同様に、以前にもウエスタン法でウサギ成体の脳において FKBP12.6 の発現が検出されている (Carmody et al., 2001)。マウス脳における RyR2 の検出 (Rosembliit et al., 1999) を考慮すると、FKBP12.6 は成体の脳内における細胞内 Ca^{2+} 放出の調節にも関与しているのかもしれない。

chFKBP12.6 遺伝子の発現は初期発生過程で心臓領域に限局されているが、*chFKBP12* 遺伝子の発現は心臓領域を含む胚の全身で検出された。これらの結果は、それぞれの役割と同様に、発生過程における FKBP12.6 の発現制御機構が FKBP12 のものとは異なっていることを示唆している。初期胚で心臓中胚葉領域に限局して発現する FKBP12.6 (Fig. 2-3) は、心臓型転写因子の制御下にあると推察される。そこで、これらの遺伝子発現に対するモルフォゲンとしての過剰 RA の影響を初期ニワトリ胚で解析した。レチノイドの添加によって、ニワトリ胚の心臓発生や心臓特異的遺伝子の発現に異常が誘発される (Osmond et al., 1991 ; Yutzey et al., 1994 ; Liberatore et al., 2000)。*chFKBP* の発現パターンは異常形成胚においてもほとんど影響されず、*chFKBP12.6* 遺伝子の発現は心筋細胞の分化に従っていた。ニワトリ胚の RA 処理によって転写

因子 *Tbx5* や *GATA4* の発現領域は後方側方領域にまで拡張化される (Liberatore et al., 2000)。従って今回の結果から, *chFKBP12.6* 遺伝子の発現は少なくともこれらの転写因子による制御を受けていないことが示唆された。初期胚発生過程における FKBP の発現開始や発現制御についてはさらなる解析を進めなければならない。

FKBP の FK506 への結合によって, FKBP の PPIase 活性が阻害される (Schreiber, 1991)。FK506 投与では初期胚発生に何も影響がなかったため, FKBP は初期胚発生には必要ないのかもしれない。FK506 の孵卵 5 日 (ステージ 27) 胚への投与によって胚が死んでしまったことや, 孵卵 7 日 (ステージ 31) 胚への投与により心不全を引き起こしたこと (Obata et al., 2001) を考慮すると, むしろ FKBP は発生のより後期段階で機能しているのかもしれない。加えて, *FKBP12* または *FKBP12.6* 欠損マウスは少なくとも発生中期までは正常に発生している; 前者は重度の心臓形成不全により 14.5 dpc で死亡, 後者は出生後に心臓の肥大化が起きている (Shou et al., 1998; Xin et al., 2002)。また, 0.01~1 mM 濃度の FK506 を投与して 54 時間 (ステージ 14~17) まで培養を継続しても, その胚発生や拍動の開始に影響はなかった (データ未掲載)。FK506 が FKBP に結合すると, 心臓型および骨格筋型 RyRs から FKBP を解離する (Timerman et al., 1993; Lam et al., 1995; Timerman et al., 1995)。しかしイヌの心筋では, 細胞質に FKBP12 と FKBP12.6 の両者が存在するにもかかわらず, *in vitro* で FK506 処理しても Ca^{2+} 放出チャンネルのゲート開閉特性に影響を及ぼさない (Timerman et al., 1996)。従って, FKBP12 と FKBP12.6 が初期胚ではともに RyRs による Ca^{2+} 放出の調節には関与していない, もしくはニワトリ初期胚発生過程では FK506 が FKBP の活性を阻害できないことが示唆された。FKBP12 は TGF- β タイプ I 受容体に結合することで TGF- β シグナル伝達系の働きを抑制することが示されている (Yao et al., 2000; Aghdasi et al., 2001)。つまり FK506 の投与によって FKBP12 の活性が阻害された場合, TGF- β シグナル伝達系の働きは抑制が解かれるために活性化されると仮定できる。初期ニワトリ胚発生において FKBP12 は全身で豊富に発現しており, また FK506 を投与された初期ニワトリ胚が正常に胚発生を進行したことから, 初期胚発生過程においては FKBP12 が細胞の増殖や成長・分化に重要な TGF- β ファミリーポリペプチドシグナル伝達系には関与していないのかもしれない。実際, FKBP12 欠損マウスの線維芽細胞において検出可能な TGF- β シグナル伝達系

の促進効果は認められていない (Bassing et al., 1998 ; Shou et al., 1998)。

結論として、FKBP12.6 および FKBP12 両遺伝子はニワトリ胚において強い発現があるが、その発現領域が異なっていることが示された。心臓における *chFKBP12.6* 遺伝子の発現は発生の進行に伴って *down-regulation* され、心房に限局されるとともに脳や骨格筋での発現と同等なものとなった。初期胚発生および心臓形成における FKBP の役割はまだ明らかにしなければならぬ。しかし、特異的阻害剤である FK506 は初期胚発生になにも影響をおよぼさなかった。T 細胞において FKBP12 だけが FK506 作用を伝達できる (Xu et al., 2002) ことから、心臓細胞系列における FKBP の FK506 への親和性が発生段階に依存しているという可能性も残されている。

小括

ニワトリ胚発生において、FKBP12.6 と FKBP12 の発現パターンの比較解析を行った。ニワトリ FKBP12.6 と FKBP12 はアミノ酸配列がよく保存されていることから、性質的・機能的によく似ていることが推察される。Northern blot 解析によって、発生中期以降から孵化後 3 週齢では、*chFKBP12* は様々な組織で広く発現しており、発生の進行に伴ってそれぞれの発現量が減少すること、また *chFKBP12.6* は発生過程では心臓で発現しているが、発生の進行に伴って発現量が減少するとともにそれが心房に局在し、孵化後もこの局在が維持されていることが明らかにされた。また FKBP12.6 は心臓型とされているにもかかわらず、孵化後の心臓での発現量は発生過程から孵化後を通じて FKBP12 よりも少なかった。FKBP12 は発生過程の様々な細胞の生存または機能に必要な役割を担っており、心臓においては FKBP12 と心臓型である FKBP12.6 がそれぞれの機能を有していると推察された。*chFKBP12* は発生初期から全身で発現しているが、*chFKBP12.6* は心臓特異的に発現する。発生初期胚における両者の発現制御および機能を解析するため、初期ニワトリ胚に FK506 を投与したが、その影響は観察されず、囊胚期

ではすでに両者が発現しているにもかかわらず FK506 に阻害されない, もしくは初期胚段階ではこれらが機能していないことが示唆された。一方, RA の初期胚への添加により胚ならびに心臓の異形成を誘発したが, *chFKBP12.6* の発現パターンに変化は観察されなかった。従って *chFKBP12.6* は過剰 RA の影響を受ける転写因子の下流にはなく, 他のシグナル因子などによる心臓形成パターンニングに従っている可能性が示唆された。

Table 3-1. Lack of effect of FK506 on the development of chick embryos cultured *in vitro*.

FK506 (mM)	Stage at treated	No. of embryos	Embryonic development (%)		
			Normal	Abnormalities	
				Inverted ^a	Other ^b
1	5-6	3	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0)
	7-8	5	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0)
0.1	3-4	3	3 (100)	0 (0)	0 (0)
	5-6	6	6 (100)	0 (0)	0 (0)
	7-8	3	3 (100)	0 (0)	0 (0)
0.01	3-4	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)
	5-6	3	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0)
	7-8	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)
0	3-4	3	3 (100)	0 (0)	0 (0)
	5-6	2	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0)
	7-8	2	2 (100)	0 (0)	0 (0)

Embryos were cultured for 24 h at 38°C in the presence of the indicated concentrations of FK506 (zero concentration represents 1% ethanol vehicle), after which they were examined for developmental abnormalities. ^aEmbryos exhibited inverted looping of the heart and cranial flexures. ^bEmbryos were malformed or exhibited termination of morphogenesis. The incidence of abnormal development was not significantly affected by the dose of FK506 or the developmental stage at treatment.

Table 3-2. Effects of RA on heart development in chick embryos cultured *in vitro*.

RA (μ M)	Stage at treated	No. of embryos	Heart morphogenesis (%)		
			Normal	Abnormalities	
				Inverted ^a	Other ^b
100	3-4	16	1 (6.2)	2 (12.5)	13 (81.3)
	5-6	11	2 (18.2)	0 (0.0)	9 (81.8)
	7-9	9	4 (44.4)	0 (0.0)	5 (55.6)
10	3-4	11	7 (63.6)	4 (36.4)	0 (0.0)
	5-6	9	6 (66.7)	2 (22.2)	1 (11.1)
	7-9	6	5 (83.3)	0 (0.0)	1 (16.7)
1	3-4	8	6 (75.0)	1 (12.5)	1 (12.5)
	5-6	7	4 (57.1)	2 (28.6)	1 (14.3)
	7-9	6	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0.0)
0	3-4	9	8 (88.9)	1 (11.1)	0 (0.0)
	5-6	9	7 (77.8)	2 (22.2)	0 (0.0)
	7-9	4	4 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)

Embryos were cultured for 24 h at 38°C in the presence of the indicated concentrations of RA (zero concentration represents 1% DMSO vehicle), after which they were examined for developmental abnormalities. ^aEmbryos exhibited inverted looping of the heart and cranial flexures. ^bEmbryos exhibited other heart malformations including complete or partial cardia bifida, situs inversus, or the complete absence of the heart. The incidence of heart abnormalities was increased by treatment with RA in a dose-dependent manner ($P < 0.05$) but was not significantly affected by developmental stage at treatment.

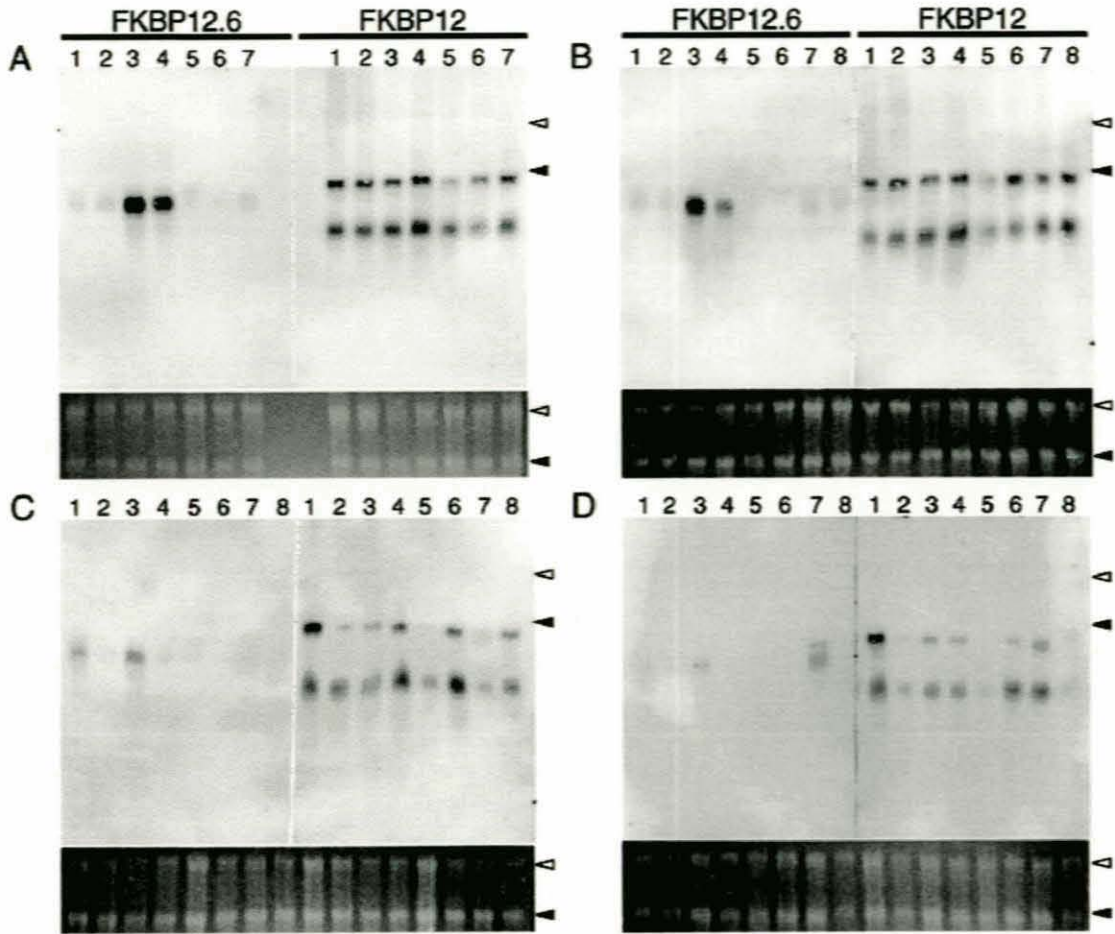


Fig. 3-1. Northern blot analysis of the tissue distribution of FKBP12.6 and FKBP12 mRNAs during chick development. Total RNA (15 μ g) from various tissues was subjected to hybridization with digoxigenin-labeled chFKBP12.6 or chFKBP12 cDNA probes, as indicated (upper panels); the gels were also stained with ethidium bromide (lower panels). The positions of 28S and 18S rRNAs are indicated by open and closed arrowheads, respectively. The RNA samples were derived from embryos at stage 34 (A) and stage 41 (B) as well as from 1-day-old (C) and 3-week-old (D) chicks. Lanes: 1, brain; 2, lung; 3, atrium; 4, ventricle; 5, liver; 6, gizzard; 7, skeletal muscle (limb); and 8, spleen.

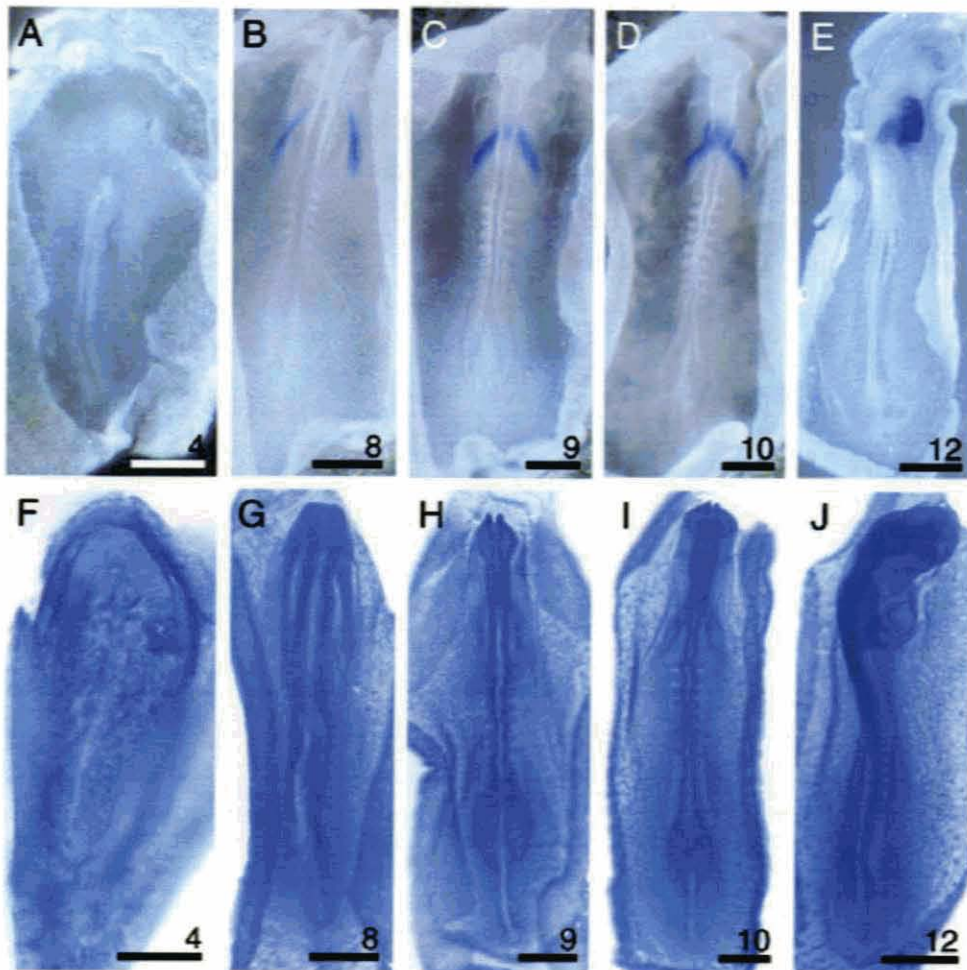


Fig. 3-2. Whole-mount *in situ* hybridization analysis of the localization of chFKBP12.6 and chFKBP12 mRNAs during early embryogenesis. Embryos were subjected to hybridization with antisense RNA probes and dorsal views are shown. The developmental stage of each embryo is indicated at the bottom right of each panel. The chFKBP12.6 mRNA was not detected at stage 4 (A) but was apparent in the bilateral precardiac mesoderm at stage 8 (B), in the fusing myocardium at stages 9 (C) and 10 (D), and in the looping heart tube at stage 12 (E). Expression of the chFKBP12 gene was detected throughout the embryonic body, including the cardiac region, and in extraembryonic tissue at all stages examined (F-J). Scale bars, 0.5 mm.

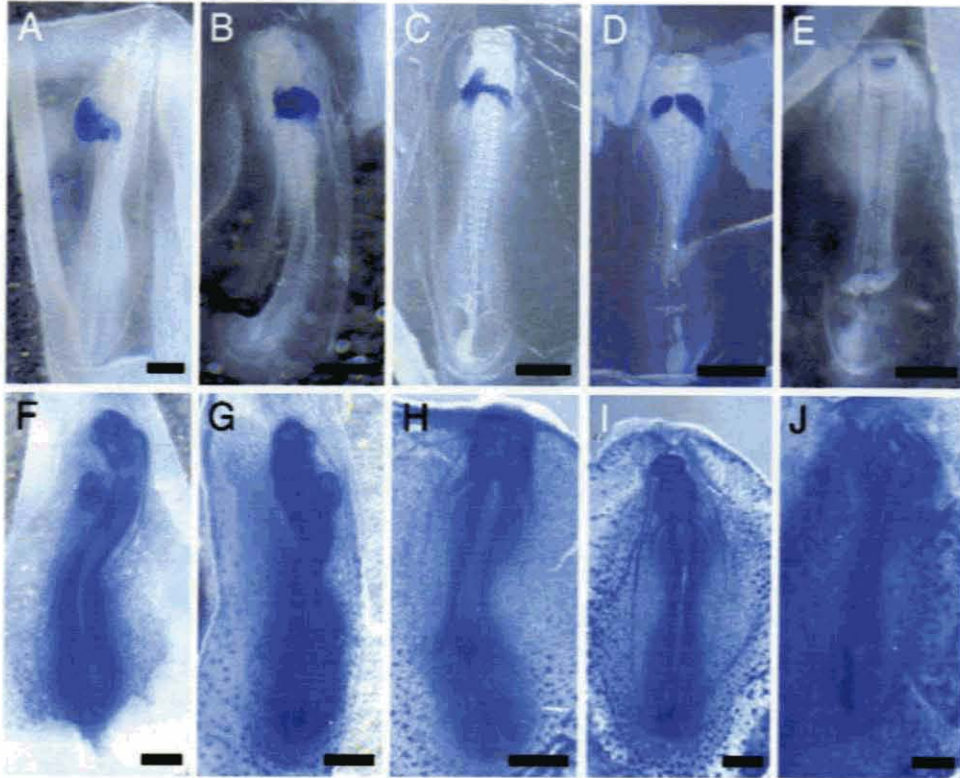


Fig. 3-3. Whole-mount *in situ* hybridization analysis of FKBP12.6 and FKBP12 gene expression in RA-treated chick embryos. Embryos were cultured *in vitro* for 24 h at 38°C in the presence of various concentrations of RA; they were then fixed and subjected to *in situ* hybridization with antisense RNA probes specific for chFKBP12.6 (A–E) or chFKBP12 (F–J) mRNAs. Panels show ventral views of embryos. Control embryos treated with 1% DMSO at stage 8 (A and F) exhibited normal patterns of gene expression. Some embryos treated with 10 μM RA at stages 4 or 8 developed heart tubes that looped to the left instead of to the right, although they showed normal distributions of FKBP12.6 and FKBP12 mRNAs, respectively (B and G). In contrast, almost all embryos treated with 100 μM RA at stage 4 (C, H, and J) or stage 5 (D, E, and I) manifested complete (D) or partial (C, H, and I) cardia bifida or a complete absence of the heart (E and J). Scale bars, 0.5 mm.

第四章 総括

高等動物の複雑な心臓形態形成は、時間的・空間的に秩序だった多くの過程、すなわち、由来の異なる細胞集団の移動・増殖・分化・プログラム細胞死・相互作用によって成り立つ。心臓の発生に関与する多くの遺伝子が報告されているが、いまだ胚発生期における細胞の可能性もしくは可塑性を網羅するには至っていない。心臓に限局して発現する転写因子による心筋遺伝子発現の調節や隣接した細胞・組織間の情報伝達を担う細胞増殖因子シグナル伝達系を中心として、心臓発生の機構を完全に理解するにはまだしばらくの時間が必要であろう。

本研究では心臓特異的に機能するとされてきた FKBP12.6 について、その胚発生過程における遺伝子発現と機能について解析をおこなった。FKBP ファミリーは、FKBP12 が免疫抑制剤 FK506 の細胞内リガンドとして初めて単離されたことから免疫系における機能が重要とされたが、様々な組織・細胞に広く存在しており、また様々な機能を有することから、タンパク質間の相互作用を調節する分子の一つであると考えられるようになった (Kay, 1996)。実際に、FKBP12 が細胞周期を調節していることも明らかにされている (Aghdasi et al., 2001)。FKBP12.6 もその PPIase 活性により心筋細胞の収縮に関与する Ca^{2+} 動態に重要な RyR2 を調節しているとされている。FKBP12.6 ノックアウトマウスではその Ca^{2+} 調節の破綻から心肥大が引き起こされる (Xin et al., 2002)。さらには Ca^{2+} オーバーロードによる心疾患に対する新しい治療法として、FKBP12.6 を介して心筋 RyR2 を安定化する方法も報告されている (Yano et al., 2003)。つまり心筋細胞が正常に機能するためには FKBP12.6 は必要不可欠な分子であると考えられ、今後の心筋再生療法や ES 細胞などの幹細胞系を用いた心筋細胞置換療法のためにも、発生過程における FKBP12.6 の役割や制御機構の解明には重要な意義がある。

そこでまず第二章において、これまでに報告のないニワトリ FKBP12.6 ホモログの核酸およびアミノ酸配列を明らかにし、*chFKBP12.6* の発生過程における発現様式を解析した。心臓型とされる FKBP12.6 は予想通り心臓で豊富に発現していたが、発生中期にその心臓での発現の

ピークを迎え、その後は発生に伴って down-regulation されるとともに、孵化後は心房へと局在した。これは第三章でもさらに詳細に解析している (Fig. 3-1)。FKBP12.6 の関与する Ca^{2+} 動態の解析に成体の心室筋標本を用いている報告もあるので、動物種によってその分布が異なるのかもしれない。FKBP12.6 ノックアウトマウスが発生途中までは正常に形態形成を進行すること (Xin et al., 2002) や、発生中期に FK506 を投与されたニワトリ胚が死んでしまうこと (Obata et al., 2001) も、この発生過程に特有の発現様式に関係があるのかもしれない。また興味深いことに、心筋の収縮機能に関与しているとされていたにもかかわらず、心臓原基中胚葉で局所的に、収縮が開始されるよりも早くから *chFKBP12.6* は発現を開始しており、心筋細胞の分化開始とほぼ時を同じくして *chFKBP12.6* の発現が開始されることが明らかになった。第三章で RA の投与によって心臓の異形成を誘発しても、心筋層特異的な *chFKBP12.6* の発現は維持されていた。つまり *chFKBP12.6* の発現制御は過剰 RA の影響を受けず、また心臓 (心筋細胞) の分化に従って制御されているようである。しかし、発生過程に伴って変化するこの発現制御は心筋細胞の多様化とは関係なく、むしろ心筋細胞の成熟もしくは孵化による形質の最終分化に関係していると考えられる。

第三章で発生初期ニワトリ胚における FKBP の機能を調べるために、特異的阻害剤である FK506 を投与したところ、胚の発生にはなんの影響も観察されなかった。FK506 は FKBP12.6 および FKBP12 と結合してその PPIase 活性を阻害する。どちらも初期胚での mRNA 発現は認められた (Fig. 2-4, Fig. 3-2) だけでなく、心臓の拍動開始によって FKBP12.6 の発現量が増大するにもかかわらず、それらの機能を阻害しても胚発生や心臓形成に影響は認められなかった。投与量は Obata et al., (2001) が発生中期胚に用いた量 (胚の死亡または心臓肥大を誘発) よりも過剰であった。FKBP12 または FKBP12.6 ノックアウトマウスが発生途中までは正常に発生を進行する (Shou et al., 1998 ; Xin et al., 2002) こととも一致する。したがって FKBP は初期発生には必ずしも必要ではなく、この時点では以降の発生過程での機能に備えて準備されているのかもしれない。もしくは FK506 では阻害できない別の役割に携わっているのかもしれない。しかし現時点では、FKBP12.6 の機能については RyR2 の安定化や調節に関する報告のみを確認するにとどまっており、今後の研究の進展に期待がもたれる。

これらの知見は、今後 FKBP12.6 に関する機能的タンパク質レベルでの役割の解析だけでなく、心臓形成・心臓表現型発現などに関わる機能解明への不可欠な基盤となるであろう。正常な心筋細胞の分化の仕組みを解明することによって、新たな因子や新たな機能が発見され、病因の解明、さらには新しい治療法の開発につながる可能性が広がっていくものと考えられる。

謝 辞

本研究を終わるにあたり、信州大学農学部動物発生遺伝学研究室に在籍した長い間、御指導、御鞭撻、御助言を賜り、学外で研究するチャンスを与えてくださり、終始温かく見守っていただいた、信州大学農学部 小野珠乙教授に謹んで謝意を捧げます。

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導をいただきました、国立中部病院循環器科医長（現常滑市民病院副院長） 小出正文博士、信州大学農学部 佐々木晋一教授に深く感謝申し上げます。

実験に関する御助言、さらに論文作成に御指導くださった、名古屋大学大学院医学研究科 横田充弘助教授、姫路工業大学理学部 餅井真助教授、信州大学農学部 鏡味裕助教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験の基礎から直接御指導いただき、研究の厳しさと喜びを教えていただいた、国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 飯尾明生博士、名古屋大学大学院医学研究科 小畑孝二博士、研究成果活用プラザ東海 小松弘幸博士に心よりお礼申し上げます。

そして、本研究を遂行するにあたり、様々な面で支えていただきました、信州大学農学部動物発生遺伝学研究室の皆様にお礼を申し上げます。

最後に、長期にわたり支援をいただき、励まし勇気づけていただいた父母姉妹、そして妻に心から感謝の意を表したいと思います。

引用文献

- Aghdasi, B., Ye, K., Resnick, A., Huang, A., Ha, H.C., Guo, X., Dawson, T.M., Dawson, V.L. and Snyder, S.H. (2001). FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2425-2430.
- Alsan, B.H. and Schultheiss, T.M. (2002). Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development* 129, 1935-1943.
- Anversa, P. and Kajstura, J. (1998). Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ. Res.* 83, 1-14.
- Anversa, P. and Nadal-Ginard, B. (2002). Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 415, 240-243.
- Atkison, P., Joubert, G., Barron, A., Grant, D., Paradis, K., Seidman, E., Wall, W., Rosenberg, H., Howard, J., Williams, S. and Stiller, C. (1995). Hypertrophic cardiomyopathy associated with tacrolimus in paediatric transplant patients. *Lancet* 345, 894-896.
- Barg, S., Copello, J.A. and Fleischer, S. (1997). Different interactions of cardiac and skeletal muscle ryanodine receptors with FK-506 binding protein isoforms. *Am. J. Physiol.* 272, C1726-1733.
- Barron, M., Gao, M. and Lough, J. (2000). Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev. Dyn.* 218, 383-393.
- Bassing, C.H., Shou, W., Muir, S., Heitman, J., Matzuk, M.M. and Wang, X.F. (1998). FKBP12 is not

- required for the modulation of transforming growth factor β receptor I signaling activity in embryonic fibroblasts and thymocytes. *Cell Growth Differ.* 9, 223-228.
- Beltrami, A.P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S.M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, C.A. and Anversa, P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 344, 1750-1757.
- Bisaha, J.G. and Bader, D. (1991). Identification and characterization of ventricular-specific avian myosin heavy chain, VMHC1: Expression in differentiating cardiac and skeletal muscle. *Dev. Biol.* 148, 355-364.
- Bodmer, R., Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1990). A new homeobox-containing gene, *msh-2*, is transiently expressed early during mesoderm formation of *Drosophila*. *Development* 110, 661-669.
- Brillantes, A.B., Ondrias, K., Scott, A., Kobrinisky, E., Ondriasova, E., Moschella, M.C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B.E. and Marks, A.R. (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77, 513-523.
- Bruneau, B.G., Logan, M., Davis, N., Levi, T., Tabin, C.J., Seidman, J.G. and Seidman, C.E. (1999). Chamber-specific cardiac expression of *Tbx5* and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev. Biol.* 211, 100-108.
- Cameron, A.M., Steiner, J.P., Roskams, A.J., Ali, S.M., Ronnett, G.V. and Snyder, S.H. (1995). Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca^{2+} flux. *Cell* 83, 463-472.
- Carmody, M., Mackrill, J.J., Sorrentino, V. and O'Neill, C. (2001). FKBP12 associates tightly with the skeletal muscle type 1 ryanodine receptor, but not with other intracellular calcium release channels. *FEBS Lett.* 505, 97-102.

- Chang, R.K., Alzona, M., Alejos, J., Jue, K. and McDiarmid, S.V. (1998). Marked left ventricular hypertrophy in children on tacrolimus (FK506) after orthotopic liver transplantation. *Am. J. Cardiol.* 81, 1277-1280.
- Chapman, S.C., Collignon, J., Schoenwolf, G.C. and Lumsden, A. (2001). Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev. Dyn.* 220, 284-289.
- Chang, M.J., Zhang, D., Kinnunen, P. and Schneider, M.D. (1998). A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor β receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 9365-9368.
- Chen, Y.G., Liu, F. and Massague, J. (1997). Mechanism of TGF β receptor inhibition by FKBP12. *Embo J.* 16, 3866-3876.
- Coss, M.C., Winterstein, D., Sowder, R.C., Jr. and Simek, S.L. (1995). Molecular cloning, DNA sequence analysis, and biochemical characterization of a novel 65-kDa FK506-binding protein (FKBP65). *J. Biol. Chem.* 270, 29336-29341.
- Crabtree, G.R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* 243, 355-361.
- Croissant, J.D., Carpenter, S. and Bader, D. (2000). Identification and genomic cloning of CMHC1. A unique myosin heavy chain expressed exclusively in the developing chicken heart. *J. Biol. Chem.* 275, 1944-1951.
- Deivanayagam, C.C., Carson, M., Thotakura, A., Narayana, S.V. and Chodavarapu, R.S. (2000). Structure of FKBP12.6 in complex with rapamycin. *Acta Cryst. D* 56, 266-271.
- Fabiato, A. (1985). Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.*

85, 291-320.

Firulli, A.B., McFadden, D.G., Lin, Q., Srivastava, D. and Olson, E.N. (1998). Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat. Genet.* 18, 266-270.

Fishman, M.C. and Chien, K.R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 124, 2099-2117.

Fleischer, S. and Inui, M. (1989). Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18, 333-364.

Friedman, J. and Weissman, I. (1991). Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell* 66, 799-806.

Fukuda, K., Tanigawa, Y., Fujii, G., Yasugi, S. and Hirohashi, S. (1998). cFKBP/SMAP; a novel molecule involved in the regulation of smooth muscle differentiation. *Development* 125, 3535-3542.

Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-67.

Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E. and Schreiber, S.L. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* 341, 758-760.

Hierlihy, A.M., Seale, P., Lobe, C.G., Rudnicki, M.A. and Megeney, L.A. (2002). The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett.* 530, 239-243.

Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael,

- L.H., Hirschi, K.K. and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 107, 1395-1402.
- Jayaraman, T., Brillantes, A.M., Timerman, A.P., Fleischer, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Marks, A.R. (1992). FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* 267, 9474-9477.
- Jiang, Y. and Evans, T. (1996). The Xenopus GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Dev. Biol.* 174, 258-270.
- Kaftan, E., Marks, A.R. and Ehrlich, B.E. (1996). Effects of rapamycin on ryanodine receptor/Ca²⁺-release channels from cardiac muscle. *Circ. Res.* 78, 990-997.
- Kajstura, J., Leri, A., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A. and Anversa, P. (1998). Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8801-8805.
- Kay, J.E. (1996). Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem. J.* 314, 361-385.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 108, 407-414.
- Kelley, C., Blumberg, H., Zon, L.I. and Evans, T. (1993). GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development* 118, 817-827.
- Kelly, R.G., Franco, D., Moorman, A.F.M. and Buckingham, M. (1999). Regionalization of transcriptional potential in the myocardium. *In: Harvey, R.P. and Rosenthal, N. [eds.] Heart development.* pp. 333-355. Academic Press, London.

- Komuro, I. and Izumo, S. (1993). *Csx*: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8145-8149.
- Kuo, C.T., Morrisey, E.E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C. and Leiden, J.M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 11, 1048-1060.
- Ladd, A.N., Yatskiyevych, T.A. and Antin, P.B. (1998). Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGF β and bone morphogenetic proteins. *Dev. Biol.* 204, 407-419.
- Lam, E., Martin, M.M., Timerman, A.P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukasi, T., Abraham, R.T., O'Keefe, S.J., O'Neill, E.A. and Wiederrecht, G.J. (1995). A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 270, 26511-26522.
- Liberatore, C.M., Searcy-Schrick, R.D. and Yutzey, K.E. (2000). Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev. Biol.* 223, 169-180.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C. and Olson, E.N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276, 1404-1407.
- Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I. and Harvey, R.P. (1993). *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 419-431.
- Liu, J., Farmer, J.D., Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L. and Harvey, R.P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene

- Nkx2-5. *Genes Dev.* 9, 1654-1666.
- Machida, S., Matsuoka, R., Noda, S., Hiratsuka, E., Takagaki, Y., Oana, S., Furutani, Y., Nakajima, H., Takao, A. and Momma K. (2000). Evidence for the expression of neonatal skeletal myosin heavy chain in primary myocardium and cardiac conduction tissue in the developing chick heart. *Dev. Dyn.* 217, 37-49.
- MacLellan, W.R. and Schneider, M.D. (1999). The cardiac cell cycle. *In: Harvey, R.P. and Rosenthal, N. [eds.] Heart development.* pp. 405-427. Academic Press, London.
- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A. and Ogawa, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 103, 697-705.
- Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M. and Lassar, A.B. (2001). Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* 15, 316-327.
- Marx, S.O., Ondrias, K. and Marks, A.R. (1998). Coupled gating between individual skeletal muscle Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors). *Science* 281, 818-821.
- Marx, S.O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N. and Marks, A.R. (2000). PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101, 365-376.
- Mayrleitner, M., Timmerman, A.P., Wiederrecht, G. and Fleischer, S. (1994). The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506 binding protein: effect of FKBP-12 on single channel activity of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Cell Calcium* 15, 99-108.
- McPherson, P.S. and Campbell, K.P. (1993). The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.* 268, 13765-13768.

- Meissner, G. (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 485-508.
- Mikawa, T. (1999). Cardiac lineages. *In: Harvey, R.P. and Rosenthal, N. [eds.] Heart development.* pp. 19-33. Academic Press, London.
- Mjaatvedt, C.H., Yamamura, H., Wessels, A., Ramsdell, A., Turner, D. and Markwald, R. (1999). Mechanisms of segmentation, septation, and remodeling of the tubular heart: Endocardial cushion fate and cardiac looping. *In: Harvey, R.P. and Rosenthal, N. [eds.] Heart development.* pp. 159-177. Academic Press, London.
- Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A. and Olson, E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 11, 1061-1072.
- Nabauer, M., Callewaert, G., Cleemann, L. and Morad, M. (1989). Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* 244, 800-803.
- Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Uochi, T., Asashima, M. and Yokota, T. (1997). Xenopus FK 506-binding protein homolog induces a secondary axis in frog embryos, which is inhibited by coexisting BMP 4 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 585-591.
- Obata, K., Koide, M., Nagata, K., Iio, A., Yazawa, S., Ono, T., Yamada, Y., Tuan, R.S. and Yokota, M. (2001). Role of FK506-binding protein 12 in development of the chick embryonic heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 613-620.
- Obata, K., Koide, M., Nagata, K., Iio, A., Yazawa, S., Ono, T., Sasaki, S., Yamada, Y., Tuan, R.S. and Yokota, M. (2002). Effects of FK506 and rapamycin on formation of the neural tube in chick embryos. *Anim. Sci. J.* 73, 229-234.
- Ohuchi, H. and Noji, S. (2000). Whole mount in situ hybridization for mRNA detection in chick embryos.

- In: Koji, T. [ed.] Molecular histochemical techniques. pp. 222-234. Springer-Verlag, Tokyo.*
- Okadome, T., Oeda, E., Saitoh, M., Ichijo, H., Moses, H.L., Miyazono, K. and Kawabata, M. (1996). Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor- β type I receptor in vivo. *J. Biol. Chem.* 271, 21687-21690.
- Olson, E.N., Perry, M. and Schulz, R.A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* 172, 2-14.
- Ono, K., Yano, M., Ohkusa, T., Kohno, M., Hisaoka, T., Tanigawa, T., Kobayashi, S. and Matsuzaki, M. (2000). Altered interaction of FKBP12.6 with ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} release in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 48, 323-331.
- Osmond, M.K., Butler, A.J., Voon, F.C. and Bellairs, R. (1991). The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development* 113, 1405-1417.
- Panabieres, F., Piechaczyk, M., Rainer, B., Dani, C., Fort, P., Riaad, S., Marty, L., Imbach, J.L., Jeanteur, P. and Blanchard, J.M.M. (1984). Complete nucleotide sequence of the messenger RNA coding for chicken muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 767-773.
- Park, M., Venkatesh, T.V. and Bodmer, R. (1998). Dual role for the zeste-white3/shaggy-encoded kinase in mesoderm and heart development of *Drosophila*. *Dev. Genet.* 22, 201-211.
- Qi, Y., Ogunbunmi, E.M., Freund, E.A., Timerman, A.P. and Fleischer, S. (1998). FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *J. Biol. Chem.* 273, 34813-34819.
- Reifers, F., Walsh, E.C., Leger, S., Stainier, D.Y. and Brand, M. (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (*fgf8/acerebellar*). *Development* 127, 225-

- Riley, P., Anson-Cartwright, L. and Cross, J.C. (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat. Genet.* 18, 271-275.
- Rosemblit, N., Moschella, M.C., Ondriasa, E., Gutstein, D.E., Ondrias, K. and Marks, A.R. (1999). Intracellular calcium release channel expression during embryogenesis. *Dev. Biol.* 206, 163-177.
- Sasaki, H. and Hogan, B.L. (1993). Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* 118, 47-59.
- Schneider, V.A. and Mercola, M. (2001). Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* 15, 304-315.
- Schreiber, S.L. (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 251, 283-287.
- Schreiber, S.L. (1992). Immunophilin-sensitive protein phosphatase action in cell signaling pathways. *Cell* 70, 365-368.
- Schultheiss, T.M., Burch, J.B. and Lassar, A.B. (1997). A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 11, 451-462.
- Schultheiss, T.M. and Lassar, A.B. (1999). Vertebrate heart induction. *In: Harvey, R.P. and Rosenthal, N. [eds.] Heart development.* pp. 51-62. Academic Press, London.
- Sewell, T.J., Lam, E., Martin, M.M., Leszyk, J., Weidner, J., Calaycay, J., Griffin, P., Williams, H., Hung, S., Cryan, J., Sigal, N.H. and Wiederrecht, G.J. (1994). Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J. Biol. Chem.* 269, 21094-21102.
- Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D.L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M.J., Mathews, L.M., Schneider,

- M.D., Hamilton, S.L. and Matzuk, M.M. (1998). Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391, 489-492.
- Srivastava, D., Cserjesi, P. and Olson, E.N. (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 270, 1995-1999.
- Srivastava, D., Thomas, T., Lin, Q., Kirby, M.L., Brown, D. and Olson, E.N. (1997). Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat. Genet.* 16, 154-160.
- Srivastava, D. and Olson, E.N. (2000). A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* 407, 221-226.
- Standaert, R.F., Galat, A., Verdine, G.L. and Schreiber, S.L. (1990). Molecular cloning and overexpression of the human FK506-binding protein FKBP. *Nature* 346, 671-674.
- Tam, P.P.L. and Schoenwolf, G.C. (1999). Cardiac fate maps: Lineage allocation, morphogenetic movement, and cell commitment. *In: Harvey, R.P. and Rosenthal, N. [eds.] Heart development.* pp. 3-18. Academic Press, London.
- Timerman, A.P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederrecht, G., Marks, A.R. and Fleischer, S. (1993). The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK-506-binding protein. Dissociation and reconstitution of FKBP-12 to the calcium release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 268, 22992-22999.
- Timerman, A.P., Jayaraman, T., Wiederrecht, G., Onoue, H., Marks, A.R. and Fleischer, S. (1994). The ryanodine receptor from canine heart sarcoplasmic reticulum is associated with a novel FK-506 binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 701-106.
- Timerman, A.P., Wiederrecht, G., Marcy, A. and Fleischer, S. (1995). Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP-ryanodine receptor complex. Modulation by

- FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J. Biol. Chem.* 270, 2451-2459.
- Timmerman, A.P., Onoue, H., Xin, H.B., Barg, S., Copello, J., Wiederrecht, G. and Fleischer, S. (1996).
Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 20385-20391.
- Wang, T., Donahoe, P.K. and Zervos, A.S. (1994). Specific interaction of type I receptors of the TGF- β family with the immunophilin FKBP-12. *Science* 265, 674-676.
- Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B. and Miller, A.D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 5434-5438.
- Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S. and Zhuang, Y. and Lassar, A. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251, 761-766.
- Wu, X., Golden, K. and Bodmer, R. (1995). Heart development in *Drosophila* requires the segment polarity gene wingless. *Dev. Biol.* 169, 619-628.
- Xin, H.B., Rogers, K., Qi, Y., Kanematsu, T. and Fleischer, S. (1999). Three amino acid residues determine selective binding of FK506-binding protein 12.6 to the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 274, 15315-15319.
- Xin, H.B., Senbonmatsu, T., Cheng, D.S., Wang, Y.X., Copello, J.A., Ji, G.J., Collier, M.L., Deng, K.Y., Jeyakumar, L.H., Magnuson, M.A., Inagami, T., Kotlikoff, M.I. and Fleischer, S. (2002). Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* 416, 334-338.
- Xu, X., Su, B., Barndt, R.J., Chen, H., Xin, H., Yan, G., Chen, L., Cheng, D., Heitman, J., Zhuang, Y., Fleischer, S. and Shou, W. (2002). FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell

inhibition by the immunosuppressant FK506. *Transplantation* 73, 1835-1838.

柳井久江 (1998). 4 Steps エクセル統計. pp. 241-244. オーエムエス出版, 所沢.

Yano, M., Ono, K., Ohkusa, T., Suetsugu, M., Kohno, M., Hisaoka, T., Kobayashi, S., Hisamatsu, Y., Yamamoto, T., Noguchi, N., Takasawa, S., Okamoto, H. and Matsuzaki, M. (2000). Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation* 102, 2131-2136.

Yano, M., Kobayashi, S., Kohno, M., Doi, M., Tokuhisa, T., Okuda, S., Suetsugu, M., Hisaoka, T., Obayashi, M., Ohkusa, T. and Matsuzaki, M. (2003). FKBP12.6-mediated stabilization of calcium-release channel (ryanodine receptor) as a novel therapeutic strategy against heart failure. *Circulation* 107, 477-484.

Yao, D., Dore, J.J., Jr. and Leof, E.B. (2000). FKBP12 is a negative regulator of transforming growth factor- β receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 275, 13149-13154.

Yutzey, K.E., Rhee, J.T. and Bader, D. (1994). Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development* 120, 871-883.