

論文の内容の要旨

論文題目 **A dominant negative CREB expression by Tet-On system suppressed lens differentiation during zebrafish development**

和訳 Tet-On 系による CREB の阻害はゼブラフィッシュのレンズ分化を抑制する

指導教員 三品 昌美 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成15年4月進学
医学博士課程
機能生物学専攻
竹田 恒

転写因子 CREB (cAMP-response element binding protein: CREB) は生体内に広く発現している遺伝子であり、細胞外からの様々な刺激に応じた標的遺伝子の転写を介して細胞分化、生存およびシナプス可塑性を制御していると考えられている。このような CREB 依存的な転写には標的となる遺伝子の転写制御領域に CRE (cAMP-response element: CRE) 配列が必要であることが報告されており、近年 CRE 配列を転写制御領域内にもつ遺伝子が次々と同定されている。しかしながら、その大部分の遺伝子の生物学的機能は依然不明である。本研究では発生期の様々な時期における CREB およびその標的遺伝子の生物学的機能を解析するために、遺伝子誘導発現系の一つであるテトラサイクリン誘導系を利用した2系列のトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator: rtTA) 系統は *Xenopus* 伸長因子 1 α のプロモーターにより rtTA 遺伝子を発現させる外来遺伝子が導入されており、一方のレポーター/影響因子系列は活性型 rtTA により両方向性に転写可能な TRE (Tet-responsive element: TRE) 配列の両下流に EGFP (enhanced green fluorescent protein: EGFP) と優性阻害型 CREB (dnCREB) をそれぞれ挿入した外来遺伝子が導入されている。受精後3時間のゼブラフィッシュ胚に Dox (doxycycline: Dox) を投与し続けると、投与後24時間までに両外来遺伝子導入胚において

EGFP および dnCREB 発現誘導が確認された。一方、Dox 非投与群の両外来遺伝子導入胚ではそれら二つの遺伝子発現は投与後 72 時間まで認められなかった。この時、dnCREB のレポーター遺伝子である EGFP は眼レンズにおいて強く発現が認められ、さらに誘導開始後 6 日目の EGFP を発現している稚魚は眼およびレンズの直径の著しい減少が認められた。形態学的解析により Dox を投与された EGFP シグナルを有する稚魚ではレンズ形成に不可欠な線維細胞の伸長が抑制されていることが明らかになった。さらに RT-PCR 法 (reverse transcriptase polymerase chain reaction: RT-PCR) を用いた遺伝子発現解析の結果、Dox を投与された EGFP シグナルを有する稚魚において、レンズ特異的転写因子 c-Maf および α A クリスタリン転写産物がともに検出感度以下であった。一方、Pax6 やその他のクリスタリン (α B 及び β B1) の転写産物は対照群同様に検出された。以上、本研究によりゼブラフィッシュにおけるテトラサイクリン誘導系の有効性を示すとともに、CREB による c-Maf および α A クリスタリンの転写制御がレンズ線維細胞の分化に関与していることを明らかにした。