

審査の結果の要旨

氏名 竹田 恒

本研究は様々な生物学的機能を担っていると考えられている転写因子 CREB およびその標的遺伝子が生体内のどのような時期に関与しているのかを明らかにするため、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導入した二系統のトランスジェニックゼブラフィッシュをそれぞれ作成し、テトラサイクリン誘導系の有効性を示すとともに両外来遺伝子導入（ダブルトランスジェニック）胚を用いてゼブラフィッシュ発生期の眼レンズ分化における CREB の役割を解析したものであり、以下のような結果を得ている。

1. rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator: rtTA)系統として *Xenopus* 伸長因子 1 α のプロモーターに rtTA 遺伝子をつなげた外来遺伝子を、レポーター／影響因子系列として活性型 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) をそれぞれつなげた外来遺伝子を導入した二系統のトランスジェニックゼブラフィッシュを作成した。二系統の交配によって生じた受精後 3 時間のダブルトランスジェニック胚にドキシサイクリンを投与し続けた場合、dnCREB mRNA および EGFP タンパクの発現シグナルは投与後 2 4 時間までに認められた。一方、ドキシサイクリン非投与群のダブルトランスジェニック胚では二つの遺伝子の発現は認められなかった。さらに dnCREB タンパクは EGFP 発現個体でのみ検出された。EGFP の発現シグナルは眼レンズおよび体節に強く認められた。
2. 受精後 1 4 4 時間のドキシサイクリン投与群の EGFP 発現個体は、同時期の対照群の個体と比較して、眼大きさが著しく小さくなっていた。組織学的解析からこの減少は受精後 2 4 時間以降のレンズ発達異常が主な原因であることが分かった。ドキシサイクリン投与群 EGFP 発現個体の網膜の発達については、層構造は形成されているものの、その大きさは小さかった。
3. 免疫組織学的解析からドキシサイクリン投与群の EGFP 発現個体における

網膜の各細胞の分化は少なくとも確認されたが、未分化細胞の存在は否定できない。

4. ドキシサイクリン投与群の EGFP 発現個体のレンズでは、受精後 30 時間以降で対照群に観察されるようなレンズ線維細胞の伸長が観察されなかった。
5. RT-PCR 法による遺伝子解析により、ドキシサイクリン投与群の EGFP 発現個体では転写因子 c-Maf および α A クリスタリン遺伝子の発現が検出されなかった。
6. 受精後 27 時間からドキシサイクリンを投与した場合、受精後 144 時間のドキシサイクリン投与群の EGFP 発現個体のレンズには伸長していない未分化のレンズ細胞が認められ、レンズの成長が著しく抑制されていた。

以上、本論文はテトラサイクリン誘導系を導入したトランスジェニック胚を用いて、レンズ線維細胞の分化における CREB およびその標的遺伝子の関与を明らかにした。本研究はこれまでゼブラフィッシュにおいて報告例のなかったテトラサイクリン誘導系を確立し、これまで未知であったレンズ分化における CREB の転写調節の関与を明らかにしたとともにテトラサイクリン誘導系の有効性を示したと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。