

薬剤による調節可能なキメラ転写因子トランスジェニック マウスの作製

Transgenic mouse with the drug-induced transcription factor

萩原正敏 Hagiwara Masatoshi

東京医科歯科大学難治疾患研究所、教授 Medical Research Institute, Tokyo
Medical and Dental University, Professor

We constructed a retroviral vector that has an autoregulatory cassette and express the gene of interest in response to oral administration of doxycycline (dox) *in vivo*. The cassette contains the all components of the reverse tetracycline-regulated (rtTA) system (Gossen M. et al. 1995), a drug selectable marker (BSD) with the internal ribosome entry site (IRES) and the gene of interest (GFP). The retroviral long term repeat enhancer and promoter elements driven expression of the transactivator (rtTetR-VP16) and BSD, but the translation was terminated at the 3'-site of BSD. The expression of GFP was controlled under the tandem tet operator sequences and the cytomegalovirus minimal promoter in a dose-dependent manner to dox. FACS analyses showed that GFP-fluorescence was induced in two-order magnitude in the retrovirus-infected 208F cells dependent on the amount of dox. Furthermore oral administration of dox could induce GFP protein in the transplanted 208F cells in the peritoneal cavity of a nude mouse. Thus, this reverse tetracycline-regulated retroviral vector (RTRRV) system allows easy delivery of controllable genes to cultured cells and transgenic animals. Thus, we tried to establish a transgenic mouse expressing an inducible dominant negative ATF1. Although the dominant negative ATF1 suppressed CREB-mediated transcription in PC12 cells, the transgenic mice showed no obvious difference from wild animals.

4-1. 研究目的

本研究の目的は、神経系で転写因子 CREB のドミナントネガティブとして機能する ATF1RL 分子を、a. 個体レベルで、b. 任意の時点で、c. 可逆的に制御できる、遺伝子改変マウ

スのモデル実験系を創出することである。これを実現できれば、全く形態的異常の無いマウスを使って、CREB が神経系のどのような高次機能に、どのように関わっているかを、行動テスト等との組合せによって

次々と明らかにして行くことができるはずである。本研究において我々は、内因性のホルモン等の影響を受けず、しかも合成化合物の投与によって活性制御が可能で、人為的に導入したプロモーターにのみ結合するキメラ転写因子を発現するマウスを作ることを目指した。具体的には転写調節可能なキメラ転写装置 rTet と、その結合配列をプロモーター領域に組み込んだドミナントネガティブ分子の組み合わせによって、これまでの遺伝子ターゲティングでは解析できなかった、redundant な遺伝子や逆に lethal な遺伝子の機能を解析できるはずであると期待して本研究を開始した。

4-2. 研究経過

申請書には RU38486 による発現誘導ベクターのプロジェクトも記入したが、RU38486 が高濃度では内因性のプロゲステロン受容体に結合し阻害作用を示すという弱点を考慮し、rTet の系に絞って研究を行った。RTet で薬剤無しでも leaky な発現が認められるという短所があったが、これも強力な repressor をプロモーター領域に組み込むことで、克服のメドが立った。テトラサイクリンの誘導體 Doxy-cycline によって活性化され E.Coli の Tet repressor DNA 結合ドメインを有する転写因子 rTet とその結合配列 TetO をプロモーター領域に組み込んだベクターを構築した。培養細胞レベルではこの発現ベクターを導入することにより、期待通りの薬物依存的発現誘導が可能となった。また、この細胞をマウス腹腔内に移植し個体レベルで Doxycyclin の経口投与による誘導が可能なることも確かめられた。

一方、塩基性領域の中の保存された Arg を Leu に変えることによって、2 量体を形成能を有するが DNA 結合の無い ATF1 ドミナントネガティブ分子 (ATF1RL) を構築することができた。この ATF1RL は *in vitro* では CREB とヘテロ 2 量体を形成し、ATF1RL 発現ベクターを PC12 細胞に導入し過剰発現させると、cAMP によって誘導される神経突起の伸長が選択的に阻害されることが判明した。そこで、この ATF1 ドミナントネガティブを上記の薬剤による発現調節ベクターの下流に繋ぎ、トランスジェニックマウスを作成しようと計画した。

4-3. 研究成果

まず、ATF1RL を常時全身に発現しているトランスジェニックマウスを作製した。ATF1RL の発現は蛋白レベルでも確認できたにも関わらず、驚いたことに、行動にも形態にも何ら変化は認められなかった。そこで、実際に、*in vivo* で CREB が活性化することを確認する方法はないかと考え、リン酸化 CREB 抗体を用いて zebra finch の脳内の歌中枢で小鳥の歌に反応して活性化する様子を観察できた (論文 9)。さらに、生きた細胞内での CREB の活性化を可視化する方法を考案し、CREB のリン酸化を GFP 蛍光の変化として観察できるキメラ蛋白 ART (cAMP responsive tracer) の開発に成功した (論文 7)。

4-4. 今後の課題と発展

哺乳類の ATF1/CREB 制御系は当初予想したより複雑で、単純に ATF1RL のようなドミナントネガティブ分子を発現させただけでは何も起きなかった。そこで、我々は CREB

の活性化機構を再検討する必要があると考え、ART を使って個体レベルで CREB のリン酸化を経時的に観察できるような遺伝子改変動物を準備中である。また、CREB の遺伝子破壊をマウスで行うと致死で行動解析は不可能だったが、最近線虫の CREB 相同遺伝子の存在に気付き (ゲノムプロジェクトでは線虫に CREB は無いとされていた)、その遺伝子破壊を行った。CREB 遺伝子欠損の線虫には一見形態異常は認められず、致死的でもないことから現在、さまざまな行動テストを行っている。線虫のようなモデル生物と上記のモニター系を用いて、個体レベルでの CREB の機能を、今後解明していく予定である。

4-5. 発表論文リスト

1. Aratani, S., Fujii, R., Ohishi, T., Fujita, H., Amano, T., Ohshima, T., **Hagiwara, M.**, Fukamizu, A. & Nakajima, T. (2001) Dual roles of RNA helicase A on CREB-dependent transcription. *Mol. Cell Biol.*, in press.
2. Ueda, H.R., **Hagiwara, M.** & Kitano, H. (2001) Robust oscillations within the interlocked feedback model of *Drosophila* circadian rhythm. *J. Theo. Biol.*, in press.
3. Kuroyanagi, H., Kimura, T., Wada, K., Hisamoto, N., Matsumoto, K. & **Hagiwara, M.** (2000) SPK-1, a *C. elegans* SR proteins kinase homologue, is essential for embryogenesis and required for germ line development. *Mech. Dev.* 99, 51-64.
4. Muro, Y., Kamimoto, T., Tomita, Y., and **Hagiwara, M.** (2000) Spectrum of autoantibodies against a dynamin-related protein, dymple. *Arthritis Rheumatism* 43, 7, 1516-1519.
5. Inoue, K., Mizuno, T., Wada, K. & **Hagiwara, M.** (2000) Novel RING finger proteins, Air1p and 2p interact with Hmt1p and inhibit the arginine methylation of Np13p. *J. Biol. Chem.* 275, 32793-32799.
6. Usukura, J., Nishizawa, Y., Shimomura, A., Kobayashi, K., Nagatsu, T. & **Hagiwara, M.** (2000) Direct imaging of phosphorylation dependent conformational change and DNA binding of CREB by electron microscopy. *Genes to Cells* 5, 515-522.
7. Nagai, Y., Miyazaki, M., Aoki, R., Zama, T., Inoue, S., Hirose, K., Iino, M. & **Hagiwara, M.** (2000) A fluorescent indicator for visualizing cAMP-induced phosphorylation in vivo. *Nat. Biotechnol.* 18, 313-316.
8. Kawahara, K., Watanabe, S., Ohshima, T., Soejima, Y., Oishi, T., Aratani, S., Nakata, M., Shibata, M., Inoue, K., Amano, T., Fujii, R., Yanai, K., **Hagiwara, M.**, Fukamizu, A., Maruyama, I. & Nakajima, T. (1999) Hypernuclear acetylation in atherosclerotic lesions and activated vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 266, 417-424.
9. Sakaguchi, H., Wada, K., Maekawa, M., Watsuji, T. & **Hagiwara, M.** (1999) Song-induced phosphorylation of cAMP response element binding protein in the

- songbird brain. **J. Neuroscience** 19, 3973-3981.
10. Koizumi, J., Okamoto, Y., Onogi, H., Mayeda, A., and Krainer, A. & **Hagiwara, M.** (1999) The subcellular localization of SF2/ASF is regulated by the direct interaction with SR protein kinases (SRPKs). **J. Biol. Chem.** 274, 11125-11131.
 11. Okamoto, Y., Onogi, H., Honda, R., Yasuda, H., Wakabayashi, T., Nimura, Y. & **Hagiwara, M.** (1998) cdc2 kinase-mediated phosphorylation of splicing factor SF2/ASF. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 249, 872-878
 12. Yoshida, K., Imaki, J., Okamoto, Y., Iwakabe, H., Fujisawa, H., Matsuda, A., Nakanishi, S., Matsuda, H. & **Hagiwara, M.** (1998) CREB-induced transcriptional activation depends on mGluR6 in rod bipolar cells. **Mol. Brain Res.** 57, 241-247.
 13. Shimomura, A., Okamoto, Y., Hirata, Y., Kobayashi, M., Kawakami, K., Kiuchi, K., Wakabayashi, T. & **Hagiwara, M.** (1998) Dominant negative ATF1 blocks cyclic AMP-induced neurite outgrowth in PC12D Cells. **J. Neurochem.** 70, 1029-1034.
 14. Muro, Y., Ogawa, Y., Kato, Y. & **Hagiwara, M.** (1998) Autoantibody to thioredoxin reductase in an ovarian cancer patient. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 242, 267-271.
 15. Kuroyanagi, N., Onogi, H., Wakabayashi, T. & **Hagiwara, M.** (1998) Novel SR-protein-specific kinase, SRPK2, disassembles nuclear speckles. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 242, 357-364.
 16. Kamimoto, T., Nagai, Y., Onogi, H., Muro, Y., Wakabayashi, T. & **Hagiwara, M.** (1998) Dymple, a novel dynamin-like high molecular weight GTPase lacking a proline-rich carboxyl-terminal domain in mammalian cells. **J. Biol. Chem.** 273, 1044-1051