

氏名	いの うえ ち ひろ 井 上 千 尋
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2558 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	<i>Math6</i> , a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation (新規 bHLH 遺伝子 <i>Math6</i> は神経系に発現し、ニューロンとグリアの分化を調節する)
論文調査委員	(主 査) 教授 大森 治 紀 教授 金子 武 嗣 教授 柴崎 浩

論 文 内 容 の 要 旨

ほ乳動物の中樞神経系は、神経幹細胞からなる神経管より形成される。神経系の発生過程は、神経への分化決定とそれに続く分化・成熟の過程という 2 つのステップからなる。これらの過程で多くの basic helix-loop-helix (bHLH) 遺伝子が発現し、神経分化に重要な役割をになっているが、まだ多くのニューロンについてその形成機構は不明のままである。神経発生の分子機構を探る目的で、我々は新規 bHLH 遺伝子 *Math6* を単離し、その構造と機能を解析した。

Math6 はショウジョウバエ・プロニューラル遺伝子 *atonal* の相同物として同定した。bHLH ドメインを比較すると、他のほ乳類の *atonal* の相同遺伝子 (*NeuroD*, *neurogenin*, *Math1*) と 43~57%, *Acute-scute complex* 相同遺伝子 (*Mash1*) と 41% の相同性をもっていた。また、*Math6* は *Atonal* と同様、12 アミノ酸残基からなる塩基性領域をもち、9 アミノ酸残基の塩基性領域をもつ *Mash1* とは異なっていた。塩基性領域は *Atonal* の特異的活性に重要であることから、*Math6* は *Mash1* より *Atonal* と機能的に似ていると考えられた。しかし、*atonal* 相同遺伝子の翻訳領域は 1 つのエクソンからなるのに対して、*Math6* の翻訳領域は 3 つのエクソンからなるので、*Math6* は他の *atonal* 相同遺伝子とは異なる祖先から由来したことが示唆された。

次に *Math6* の発現様式をしらべたところ、神経発生初期では脳室周囲層の神経前駆細胞に発現し始め、神経発生とともに発現が減少した。しかし、海馬のニューロンや小脳プルキンエ細胞では、成熟マウスにおいても発現を認めた。小脳プルキンエ細胞は脳室周囲層で発生、増殖し、生後 3 日頃までに垂直に移動し、一列に並び成熟ニューロンになる。*Math6* は脳室周囲層のみでなく、一列に並んだ成熟ニューロンにも発現していた。これは *Math6* が小脳プルキンエ細胞の発生だけでなく、維持にも関与していることを示唆している。これまで解析されてきた bHLH 遺伝子はいずれも小脳プルキンエ細胞には発現しておらず *Math6* は小脳プルキンエ細胞に発現が認められた初めての bHLH 遺伝子である。

さらに、*Math6* の機能を明らかにするために、レトロウイルスベクターを用いて網膜器官培養系で過剰発現実験を行った。未分化網膜細胞にウイルスを感染させ、2 週間培養後に感染細胞がどの種類の細胞に分化したかを免疫組織学的に解析した。コントロールウイルスを感染させた場合は感染細胞の $77.6 \pm 4.5\%$ が網膜ニューロンの 1 つ桿体細胞に分化したのに対して、*Math6* ウイルスを感染させた場合は $87.0 \pm 3.0\%$ が桿体細胞に分化した。すなわち、*Math6* によって桿体細胞の形成は約 10% 増加した。一方、コントロールウイルスでは $5.1 \pm 0.2\%$ がミューラーグリア細胞になったのに対して、*Math6* ウイルスでは $1.2 \pm 0.4\%$ と 5 分の 1 に減少した。Ki67 (分裂増殖細胞に発現する核抗体) や TUNEL の免疫染色を行ったところ、コントロールウイルスと *Math6* ウイルス感染で細胞増殖や細胞死に差は見られなかった。すなわち、*Math6* による効果はニューロンの増殖やグリア細胞のアポトーシスによるものではなかった。以上の結果から、*Math6* は神経前駆細胞がグリア細胞に分化するのを抑制し、ニューロンに分化するのを促進すると考えられた。また、*Math6* は小脳プルキンエ細胞のような今まで分化機構のよくわかっていなかったニューロンの形成に重要な役割を担うことが強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

神経発生の分子機構を探る目的で、新規の basic helix-loop-helix (bHLH) 遺伝子 Math6 を単離し、その構造と機能を解析した。Math6 をショウジョウバエ・プロニューラル遺伝子 *atonal* の相同物として同定し、その bHLH ドメインや翻訳領域の構造から他の *atonal* 相同遺伝子とは異なる祖先から由来したことが示唆された。

また Math6 の中枢神経系での発現様式から、神経発生だけでなく、中枢神経系や小脳プルキンエ細胞の維持にも関与していることが示唆された。これまで解析されてきた bHLH 遺伝子はいずれも小脳プルキンエ細胞には発現しておらず、Math6 は小脳プルキンエ細胞に発現が認められた初めての bHLH 遺伝子である。

さらに、レトロウイルスベクターを用いた網膜器官培養系で過剰発現実験を行い、Math6 が神経分化の決定因子として機能することが示唆された。

哺乳動物の中枢神経系は神経への分化決定とそれに続く分化・成熟の過程という2つのステップからなる。これらの過程で多くの bHLH 遺伝子が発現し、神経分化に重要な役割を担っているが、まだ多くのニューロンについてその形成機構は不明のままである。Math6 は小脳プルキンエ細胞のような今まで分化機構のよくわかっていなかったニューロンの形成に重要な役割を担うことが強く示唆される。

以上の研究は神経分化の形成機構の解明に貢献し、神経内科の再生医療分野に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。