

氏 名	ごしまわたり なつ こ 五 島(渡 利) 夏 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2679 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Hoxa3 の鰓弓神経発生過程における役割

論文調査委員	(主 査) 教 授 平 野 丈 夫	教 授 上 村 匡	教 授 藤 吉 好 則
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

鰓弓神経は、脊椎動物の後脳部より生じる第Ⅴ, Ⅶ, Ⅸ, X脳神経の総称である。鰓弓神経はいずれも神経堤細胞に由来する上神経節とプラコードに由来する下神経節を持ち、運動神経もこれら二つの神経節を経由して末梢へと軸索を投射する。鰓弓神経の発生過程では、神経堤細胞は背側から腹側へ、プラコード由来神経前駆細胞は腹側から背側へと移動し、相互作用しつつ、3種類の神経細胞がひとつの軸索束を形成する。このような神経の発生がどのように制御されているのか、興味深い問題であるが、ほとんど明らかにされていない。

Hox 遺伝子のひとつ、*Hoxa3*は第Ⅸ, X神経において発現しており、*Hoxa3*ノックアウトマウスを neurofilament 抗体で染色したところ、第Ⅸ, X神経に異常が観察された。*Hoxa3*が第Ⅸ, X神経の発生においてどのような役割を担っているのか明らかにする目的で、*Hoxa3*ノックアウトマウスの表現型の解析を行った。その結果、*Hoxa3*ノックアウトマウスにおいては、第Ⅸ神経の発生する領域のグリア前駆細胞と思われる神経堤細胞の移動および、プラコード由来神経前駆細胞の移動に異常があることがわかった。また、プラコード由来細胞の移動パターンによって、下神経節神経細胞と神経管との連絡が途切れたり、第Ⅸ, X神経が融合してひとつの異常な軸索束を作ることがわかった。その他、*Hoxa3*は、第Ⅸ運動神経の神経節への軸索ガイダンスや第Ⅸ神経下神経節細胞の束形成などにも必要であり、第Ⅸ, X神経の発生過程で多くの役割を担っていることが明らかにされた。

*Hoxa3*は、プラコード由来細胞の移動制御に必要であるが、ノックアウトマウスでは、全ての組織において *Hoxa3*が機能しないため、どの細胞における *Hoxa3*の機能が、プラコード由来細胞の移動に必要であるか、わからなかった。そこで、ニワトリ胚にエレクトロポレーション法でアンチセンスモルフォリノオリゴを導入して、*Hoxa3*の機能を局所的に阻害する実験を行った。ニワトリ胚のプラコードにおいて *Hoxa3*の機能を阻害することにより、プラコード由来細胞の移動に異常が見られた。*Hoxa3*は、プラコード由来細胞自身で cell autonomous に細胞の移動の制御を行っていることが明らかにされた。

また、*Hox* 遺伝子は、従来ロンボメア2と第二鰓弓より後方で発現のみが知られており、それより前方の組織の発生に関わることは知られていなかったが、マウス胚において第一鰓弓の神経堤細胞で *Hoxa3*が弱く発現していることがわかった。*Hoxa3*はこれまで、ロンボメア4/5境界より後方で発現するとされていたが、マウスおよびニワトリ胚において、*Hoxa3*に対するプライマーを用いて RT-PCR を行うとロンボメア4/5より前方の組織からも *Hoxa3* mRNA に由来する増幅産物が得られた。*Hoxa3*の他にも、近年いくつかの *Hox* 遺伝子の脳前方部における発現が報告されており、*Hox* 遺伝子が脳前方部においてどのような役割を担っているのか、今後明らかになることが期待される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、まず、*Hox* 遺伝子のひとつである *Hoxa3*の鰓弓神経発生過程における役割を、*Hoxa3*ノックアウトマウ

スの表現型解析により、明らかにしている。鰓弓神経を構成する細胞のうち、グリア前駆細胞と上神経節神経細胞は神経堤細胞に由来し、下神経節神経細胞はプラコードに由来することが知られていたが、マウス胚におけるこれらの細胞の移動の制御メカニズムは全く明らかにされていなかった。本研究ではまず、*Hoxa3*が第IX、X神経の発生する領域において、神経管のみならず、移動中の神経堤細胞、プラコードおよびプラコードに由来する細胞においても発現していることを示した。そして、*Hoxa3*ノックアウトマウスにおいてグリア前駆細胞の分布が異常であること、また、プラコード由来細胞の移動開始前に神経堤細胞の分布がすでに異常であることから、*Hoxa3*が第IX神経の発生する領域における神経堤細胞の移動の制御に必要であることを明らかにした。また、*Hoxa3*ノックアウトマウスにおいては、第IX神経下神経節神経細胞の移動も異常であり、下神経節神経細胞の移動が上下神経節間を経由する軸索伸長にも影響を与えることが示された。さらに、*Hoxa3*は、第IX運動神経の軸索が第IX感覚神経節へ向かって伸長するために必要であり、その他第IX神経下神経節神経細胞の束形成など、末梢神経発生の多くの場面において必要であることが示された。

プラコードに由来する細胞の移動はその後の末梢神経発生全体に影響を与える重要な過程であることが明らかになり、さらにプラコード由来細胞の移動の制御には*Hoxa3*が必要であることが示されたので、次にどの細胞における*Hoxa3*の発現が、プラコード由来細胞の移動制御に必要であるか調べるために、ニワトリ胚における局所的な*Hoxa3*の阻害実験を行った。まず、ニワトリ*Hoxa3*は、マウスの場合と同様に第IX、X神経の発生過程で、神経管、神経堤細胞、プラコードにおいて発現していることを確認した。次に、*Hoxa3*に対するアンチセンスモルフォリノオリゴをエレクトロポレーション法によってプラコードを含む表皮に導入すると、プラコード由来細胞の移動に異常が見られたことから、*Hoxa3*はプラコード由来細胞において cell autonomous に細胞の移動を制御していると考えられる。

また、本論文では、これまでに明らかにされていなかった*Hoxa3*の頭部における発現についても記述している。*Hoxa3*に対する in situ ハイブリダイゼーションにより、マウス胚では第二鰓弓より前方の神経堤細胞において、ニワトリ胚においては間充細胞において発現が認められ、従来発現の知られていなかった領域から抽出したRNAを用いてRT-PCRを行うと*Hoxa3*のmRNAに由来する増幅産物が得られることを確認した。*Hox*遺伝子による制御領域は、ロンボメア2と第二鰓弓より後方のみであると考えられてきたので、第一鰓弓における*Hoxa3*の発現が確認された意義は大きく、今後、機能が明らかにされることが期待される。

本論文は、*Hoxa3*の鰓弓神経発生におけるはたらきを明らかにしたもので*Hox*遺伝子の役割の解明に大きな寄与をしており、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。また、主論文に報告されている研究業績を中心に関連研究分野について試問を行い、合格と認めた。