

氏 名	おお さわ りょう すけ 大 澤 亮 介
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 51 号
学位授与の日付	平 成 17 年 9 月 26 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	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	マウス後脳の運動ニューロンの発生における <i>Mash1</i> と <i>Math3</i> の機能解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 下 遠 野 邦 忠	教 授 竹 市 雅 俊	教 授 上 村 匡
--------	------------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳類後脳の運動ニューロンは体性運動ニューロン、鰓運動性ニューロン、内臓性運動ニューロンの3つに分類される。体性運動ニューロンの発生はベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 型転写因子 *Olig2* により制御され、鰓運動性ニューロンと内臓性運動ニューロンはホメオボックス型転写因子 *Phox2b* により制御されている。*Phox2b* は *Mash1* および *Math3* の発現を制御しており、*Mash1* と *Math3* は鰓運動性ニューロンの前駆細胞と分化しつつあるニューロンに共発現している。したがって、*Phox2b* により形成される鰓運動性ニューロンの神経分化は *Mash1* と *Math3* の活性に依存していることが示唆された。そこで、今回、*Mash1* と *Math3* の各々のシングルノックアウトマウスおよびダブルノックアウトマウスの表現型の解析を行った。*Mash1* ノックアウトマウスでは鰓運動性ニューロンの発生に目立った異常は認められなかったが、*Math3* ノックアウトマウスでは、三叉神経鰓運動性ニューロンおよび顔面神経鰓運動性ニューロンの移動が正常と異なる経路をとっており、*Math3* は分化した鰓運動性ニューロンの移動の制御に重要であることがわかった。更に、*Mash1*; *Math3* ダブルノックアウトマウスでは、三叉神経鰓運動性ニューロンと顔面神経鰓運動性ニューロンが著しく減少しており、このニューロンの減少は細胞死によるものであった。さらに発生が進むと後脳のロンボメア4の領域で左右の鰓運動性ニューロンが底板の上を通り越して融合していた。未分化な細胞は神経管の構造の維持にはたらくており、*Mash1*; *Math3* ダブルノックアウトマウスの神経管が融合している領域では未分化な細胞が失われていた。さらに解析をすすめると、この領域では *Delta-like1*, *Delta-like3*, *Hes5* の発現が失われていた。*Delta* は Notch レセプターのリガンドとして作用し、Notch を活性化して下流因子であるリプレッサー型の bHLH 型転写因子 *Hes* の発現を誘導することで細胞の未分化性を維持する活性がある。従って、*Mash1* と *Math3* は *Delta* の発現を誘導することで神経前駆細胞の維持に細胞非自律的に効いていることが示唆された。そこで、*Mash1*; *Math3* ダブルノックアウトマウスのロンボメア4の腹側領域を調べたところ、細胞の増殖が低下していた。更に、その所見と合致するように、*PDGFRα* をマーカーに用いて鰓運動性ニューロン産生後に始まるオリゴデンドロサイトの前駆細胞の数を調べてみたところ、オリゴデンドロサイトの発生開始直後はその数が野生型と比較して著しく減少していることがわかった。

以上の所見から、*Mash1* と *Math3* は三叉神経及び顔面神経鰓運動性ニューロンの分化に必要であるだけでなく、*Delta-like1* 及び *Delta-like3* の発現を介して Notch シグナル経路を活性化することで未分化な前駆細胞の維持にも働いていることが明らかになった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

マウス後脳の鰓運動性ニューロンの発生はホメオボックス型転写因子 *Phox2b* によって制御されていることが知られていたが、その過程の分子の実態は不明の点が多かった。申請者は、神経分化を促進する basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子が鰓運動性ニューロンの神経分化を制御していると考えその可能性を検討した。特に、鰓運動性ニューロンの発

生過程で発現しているもののこれまでその機能が全く不明であった bHLH 型転写因子 *Mash1* と *Math3* に注目し、これらの遺伝子のノックアウトマウスの表現型を解析した。

申請者は *in situ* ハイブリダイゼーションを行い後脳全体における遺伝子発現のパターンを観察することにより、*Math3* ノックアウトマウスで三叉神経鰓運動性ニューロンの神経核が小さくなることを見出した。また顔面神経鰓運動性ニューロンはロンボメア (r) 4 で発生した後、後方へと移動し r6 にて背側方向へと遊走することが知られているが、*Math3* ノックアウトマウスではこの遊走経路と異なる移動様式をとる運動ニューロンが多数認められ、神経核が異常な形態をとることを明らかにした。さらに、*Math3* ノックアウトマウスでは顔面神経鰓運動性ニューロンが、*c-Ret* および *Sim1* を異所性に発現していることも見出した。

また、申請者は *Mash1* および *Math3* のそれぞれのシングルノックアウトマウスでは鰓運動性ニューロンの産生そのものには異常が認められないのに対し、*Mash1*; *Math3* ダブルノックアウトマウスでは分化途中の一部のニューロンが細胞死を起こし、ニューロンが減少することを発見した。さらに、産生されたニューロンでは、本来発現するはずの Notch リガンド *Delta-like1/3* の発現レベルが著しく低下し、それに伴い Notch シグナルのエフェクター分子 *Hes5* の発現低下、未分化な神経前駆細胞の維持不全、神経管構造の崩壊などの表現型が引き起こされることを明らかにした。これらの結果により、申請者は *Mash1* と *Math3* は細胞自律的にニューロン産生にはたらくだけでなく、細胞非自律的に前駆細胞の未分化性の維持にも関わっているという結論に達した。

以上の結果は後脳のニューロン産生のメカニズムの解明に大きな貢献をなすものであり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。また申請者は、平成17年7月11日、論文内容とそれに関連した口頭試問を受け合格と認められたものである。