

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田中 英臣

脊椎動物の初期発生において、運動神経細胞の軸索がどの様に標的筋肉へと伸張するのか、また、細胞が脳内をどの様に移動するのかその詳細は不明である。この問題を解明するため、本論文では大部分の運動神経細胞、および随意筋が生体内で可視化される *Islet-1-GFP* および α -actin-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュ系統を用いて三叉運動神経後核(Vp)の軸索の投射様式および細胞移動の観察を行った。さらに、この過程に異常が認められる突然変異体を単離して解析を行った。

初めに、Vpの軸索伸張と下顎筋の発生過程を観察した。第3菱脳節(r3)の両側に発生したVpの軸索は受精後54時間目に下顎の第1鰓弓-第2鰓弓境界に到達すると方向を転じ、この境界に沿って正中線を越え停止した。受精後62時間目に、Vpの軸索は後方に方向を転じて伸張を再開し、第1鰓弓-第2鰓弓境界を越えて第2鰓弓に由来するinterhyal(ih)へと伸張した。この結果、従来第1鰓弓由来の筋肉のみに投射するとされていた三叉運動神経がゼブラフィッシュでは第2鰓弓由来の筋肉にも投射することが明らかとなった。

両側のVpの軸索は下顎の正中線上で交差した。この交差がVpの軸索の伸張に必要なかどうかを調べるため、右側のVpをレーザー照射により除去し、左側のVpの軸索走行への影響を調べた。左側のVpに由来する軸索は正常に伸張した。そこで両側のVpの軸索走行は互いに独立しており、軸索と伸張経路上に存在すると思われる因子との相互作用により誘導されると考えられた。次に、同側へ投射するVpの軸索と反対側へ投射する軸索が異なる細胞に由来する可能性を調べるため、同側のih上のVpの軸索をDiIにより逆行性に標識し、標識された軸索の分布を調べた。標識された軸索は反対側のih上にも認められた。そこで、同一の軸索が分岐し、両側のihへ投射していると考えられた。

Vpの軸索伸張に関与する分子機構を調べるため、変異原として*N-ethyl-N-nitrosourea*を用いてこの過程に異常が認められる突然変異体のスクリーニングを行い、*sidewalk(sdw)*を単離した。*sdw*では、標的筋肉の構造は正常であるが、反対側へ伸びるVpの軸索が認められなかった。*sdw*におけるVpの軸索の伸張過程を経時的に観察したところ、反体側へのVpの伸張は阻害されるが、同側への伸張は正常であることが明らかとなった。そこで、SDWはVpの軸索の反対側への伸張のみに関与しており、同側への伸張は別の分子機構で制御されている可能性が推定された。この変異がVp自身と、Vpの軸索が投射する環境のどちらの異常によるものかを細胞移植によるモザイク解析を行い調べた。正常胚に由来するVpの軸索は、*sdw*内において同側のihのみに投射することが観察された。この結果、*sdw*の変異はVpの軸索が投射する環境に異常をもたらすと考えられた。以上の結果から、下顎におけるVpの軸索の標的筋肉への誘導は、SDW遺伝子とその生産に関与する正中線近傍と、第1鰓弓-第2鰓弓境界の少なくとも2つの分子機構により制御されていることが明らかとなった。

次に、r3におけるVpの発生過程を調べた。受精後48時間目までにVpはr3の内側に発

生した。その後、受精後 60 時間目までに内側から外側へと移動し、さらに受精後 72 時間目までに腹外側へと移動した。この結果から、Vp の移動は、内側から外側、さらに外側から腹外側の 2 つの経路を経ることが明らかとなった。本論文ではさらに、r3 内における Vp の細胞移動に異常が認められる突然変異体として、*freeze frame (fzf)* を単離した。*fzf* において Vp は r3 の外側に局在した。*fzf* における Vp の発生過程を調べたところ、外側から腹外側への移動が強く阻害されることが明らかとなった。さらに、Vp の分化が阻害されている可能性を調べるため、三叉運動神経のほぼ全ての軸索を *DiI* により逆行性に標識し、r3 内における標識細胞の分布を調べた。その結果、ほとんどの Vp が標識され、後脳の外に軸索を伸張していることが明らかとなった。この結果、FZF は Vp の分化ではなく、細胞移動のみに関与している可能性が考えられ、2 つの経路は異なる分子機構で制御されている可能性が考えられた。*fzf* では、この他に、受精後 48 時間目以降に r3 の内側、視蓋の前縁部、さらに神経管の背側部に異所的に *Islet-1-GFP* 陽性細胞の誘導が観察された。そこで、FZF は Vp の細胞移動の他に、神経管内における様々な神経細胞の分化および維持にも関与していることが推定された。

以上本論文は、経時的に厳密に制御されている神経細胞分化のプログラムの 1 ステップのみを特異的に乱す突然変異を単離出来ることを示した。今後これらの突然変異の原因遺伝子を同定することによって、神経細胞が分化の分岐点においてどのような機構でその振る舞いを決定するのかを明らかにすることが出来ると期待され、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。