

氏 名 牧 野 初 音

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第779号

学位授与の日付 平成16年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Analysis for the information of neural cell
nuclei in the postnatal cerebral cortex
using mouse cloning technique

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 重本 隆一
教授 池中 一裕
教授 川口 泰雄
教授 八木 健 (大阪大学)
子一ム長 徳永 智之 (独立行政法人農業生物資源研究
所)

論文内容の要旨

The mature brain is composed of huge number of diversified and highly organized neural cells. Since majority of these cells are fully differentiated and do not divide, it has been difficult to analyze the genomic information at single cell level. Recent papers have postulated a hypothesis by using nuclear transfer technique that nuclei of neural cells in advanced stages of differentiation lose their developmental totipotency through neurogenesis.

To examine the developmental totipotency in the nuclei of neural cells through their development, she attempted to transfer differentiated neural cell nuclei (DNn) derived from mouse cerebral cortex at postnatal day 0-4 (P0-P4) to unfertilized oocytes without nuclei for generating cloned mice (DNnt mice). When she used NeuN-positive neurons as donor nuclei for mouse cloning, no normal pups were obtained. The DNnt fetuses carried morphological failures and abnormal localization of differentiated neurons. These data supported that nuclei of the differentiated neurons do not have enough information to produce normal neuronal tissues again.

To further examine the developmental totipotency of nuclei of differentiated neurons, she produced aggregation chimeras between DNnt embryos and wild-type embryos. To establish the condition for producing chimeras with the DNnt embryos, she introduced LacZ-positive transgenic mice for getting donor cell nuclei and the technique for cryopreserving embryos. Two chimeras and several chimeric fetuses with DNnt cells were obtained from 73 chimeric embryos. One adult chimeric mouse had agouti coat and the other chimeric pup had LacZ-positive DNnt cells in the proximal renal tubules of the kidney. However, no LacZ-stained cells were observed in the brain of this animal. In the chimeric fetuses, DNnt cells could develop into apparently normal non-neural cells but showed cell-autonomous abnormalities in the neural tissues. These data strongly support that nuclei of the differentiated neurons do not have enough information to differentiate to normal neuronal cells.

To further characterize the nuclear information of differentiated neurons, she tried to establish ES cell lines from blastocysts cloned with nuclei of NeuN-positive neurons in the male cerebral cortex at P0-P3 (DNntES cell lines). She succeeded in generating novel three ES cell lines from these blastocysts and 12 mutant DNntES lines expressing GFP reporter gene for identification of DNnt ES cells in tissues of the chimeras. In the chimeric mice obtained with these DNntES cell lines, cells derived from the DNntES cells differentiated to most tissues including germ cells but not to the brains. In the chimeric fetuses, the DNntES cells had abnormal distribution in their neural tubes. The GFP-positive cells contributed to the neural tubes but did not express markers for either differentiated neurons or neural stem cells. These data indicate that nuclei of the differentiated neurons could not regain enough information to differentiate to normal neuronal cells even after reverting back to ES cell. Interestingly, the lost information for developing neural cells did not influence development of germline cells.

In conclusion, the nuclei of the NeuN-positive neurons in the early postnatal mouse cerebral cortex did not have enough information for developing neural cells again. The lost information in the neural cell nuclei seems to be necessary for developing normal neural cells and could not be rescued in the DNntES cells. Thus, these ES cell lines will be powerful tools to explore the converted nuclear information in the processes of the neural cell differentiation.

論文の審査結果の要旨

成熟脳は、膨大な数の高度に分化した神経細胞によって構成されている。これらの神経細胞は分裂しないため単一細胞レベルでの遺伝子情報解析は困難であった。しかし最近になり核移植を用いたクローンマウスの研究により、分化した神経細胞の核の遺伝情報には神経発生のための全能性が失われている可能性が指摘されている。本博士論文は生後 0-4 日令のマウス大脳皮質の分化した神経細胞核を用いてクローンマウスを作製することによって、発達に伴う神経細胞核の遺伝情報の変化を解析しようとしたものである。これらの神経細胞核からは正常なマウス仔を得ることが出来ず、マウス胎仔神経組織には形態的な異常が認められた。そこで次に正常胚とのキメラを作製したところ 2 匹のキメラマウスを得ることができ、分化した神経細胞核由来の体毛や正常な腎臓近位尿細管細胞が認められた。しかしながら神経組織では分化した神経細胞核由来の神経細胞特異的な異常が認められ、やはり分化した神経細胞核では、再び正常な神経発生を遂行する能力が失われている可能性が高いことが明らかとなった。さらに分化した神経細胞の核の遺伝情報を解析するために、同様の神経細胞から ES 細胞を樹立しキメラマウスを作製したところ、これらの ES 細胞由来の細胞は生殖細胞を含む非神経細胞には正常に分化したものの、神経管ではやはり分化した神経細胞核由来の細胞に分布の異常や神経分化マーカーの発現異常が認められた。これらの結果は、免疫系の細胞とは異なり分化した神経細胞核では、ES 細胞を樹立した後も全能性が失われていること、遺伝情報に何らかの不可逆的な変化が生じていることを初めて示唆したもので極めて興味深い。

以上、これらの実験は大変高度な技術を駆使し、また長期にわたる粘り強い努力をもって行われており、今後の神経細胞の分化に伴う遺伝情報の変化の研究を進展させる上で、非常に重要な基盤と材料を提供するものである。従って委員会は全員一致で本論文が博士の学位論文として相応しいものであると判定した。

学位論文の内容の発表および審査委員4名との間での質疑応答を行った。発表はよくまとまっており、大変分かりやすいものであった。また、申請者は多くの質問に対して、自ら行った実験の意義、結果の解釈、関連分野における所見などを説明した。また、この学位論文が簡潔でわかりやすい英語で書かれていることから語学力も充分であると考えられた。従って、審査委員全員により申請者は学位授与に相応しい学力があると判定した。