

氏 名	古性 美記
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第 879 号
学位授与の日付	平成 17 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 6 条第 1 項該当
学位論文題目	Involvement of the Olig2 transcriptional factor in the development of the ventral forebrain.
論文審査員	主 査 教授 川口 泰雄 教授 池中 一裕 教授 岡村 康司 教授 影山 龍一郎（京都大学）

論文内容の要旨

In the developing mammalian central nervous system, the basal forebrain produces various kinds of neurons as well as glial cells. It is thought that oligodendrocyte precursors and motoneurons develop from cells positive for Olig2, a basic helix-loop-helix transcriptional factor, but astrocytes develop from Olig2 negative cells. First, she examined whether astrocytes develop from Olig2 positive cells. The progenies of the cells expressing Olig2 were traced using 4-hydroxytamoxifen-induced Cre-mediated recombination. Olig2 lineage cells expressed PDGFR α (oligodendrocyte precursor marker), MAP2 (neuronal marker) and GFAP (astrocyte marker). This result suggest that Olig2 positive cells differentiate not only to OLPs but also to neurons and astrocytes in the brain for the first time. Zhou and Anderson (2002) showed that astrocyte number increased in the spinal cord of the Olig1/Olig2 double mutant mouse. Thus Olig2 is not directly involved in and is dispensable for the differentiation of astrocyte.

In the spinal cord, Olig2-expressing cells generate OLPs and motoneurons. However, the kind of the neuron developed from Olig2-expressing cells in the brain is not known.

The VZ of the basal forebrain can be regarded as a main source of subpallial cholinergic neurons. Next I examined involvement of Olig2 in the cholinergic differentiation, since areas presumed to be the sites of cholinergic neuron origin were roughly demarcated by Olig2 expression, which includes the medial ganglionic eminence, septal area, and anterior entopeduncular/preoptic area. She used choline acetyltransferase (ChAT) as a marker of cholinergic neuron. A limited number of ChAT expressing cells in the E18.5 forebrain were also labeled with Olig2. In addition, when the Olig2-expressing cells at E12.5 were permanently modified to express the *lacZ* gene by tamoxifen-induced Cre-mediated recombination, a small number of cells were double positive for

ChAT and X-gal. Therefore, some of the Olig2 expressing cells differentiate into cholinergic neurons in the basal forebrain. She counted ChAT positive cells number in the Olig2 deficient and wild type mice brains. The ChAT positive cell number was reduced to 60 % in the Olig2 knockout mouse forebrain.

Cleaved caspase-3 appears in many cases of cell death in the developing brain. The number of cleaved caspase-3 positive cell number hardly changed between wild and Olig2 deficient mice. Therefore, accelerated apoptosis was not likely to be the cause for the decreased cell number in the Olig2 deficient basal forebrain.

Nkx2.1, Mash1 and Lhx8 are involved in the development of cholinergic neuron in the forebrain (Zhao et al., 2003; Mori et al., 2004). To elucidate the relationship between Olig2 and other transcriptional factors involved in the differentiation of cholinergic neuron, she examined expression pattern of Nkx2.1, Mash1, and Lhx8 in the E12.5 basal forebrain. Transcription factors seemed to be expressed normally in the Olig2 deficient mouse brains. However, in the Mash1 deficient mouse, Olig2 expression was weakened in the VZ of basal forebrain at E11.5 and E15.5.

The present study provides first and direct evidence for involvement of the Olig2 gene in the cholinergic differentiation in the basal forebrain. It is speculated that Olig2 acts down stream of Nkx2.1 and Mash1, and possibly represents the Lhx8-independent pathway.

Mufson, E. J., S. D. Ginsberg, M. D. Ikonovic and S. T. DeKosky (2003). *J Chem Neuroanat* **26**(4): 233-42.

Zhao, Y., O. Marin, E. Hermesz, A. Powell, N. Flames, M. Palkovits, J. L. Rubenstein and H. Westphal (2003).

“*Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(15): 9005-10.

Zhou, Q. and D. J. Anderson (2002). *Cell* **109**(1): 61-73.

論文審査結果の要旨

哺乳類中枢神経系の発生では、前脳基底部からグリア細胞や、様々な種類のニューロンが産生されることが知られている。ほとんどの前脳基底部の神経系前駆細胞では、basic helix-loop-helix 型転写因子である Olig2 が発現している。脊髄では、Olig2 陽性細胞からオリゴデンドロサイトおよび運動ニューロンが分化するが、前脳における Olig2 陽性細胞の分化過程は分かっていない。本研究では、4-hydroxy tamoxifen で誘導される CreER/loxP システムを利用して、Olig2 を発現した細胞が恒常的に lacZ 遺伝子を発現するようにし、Olig2 陽性細胞由来の細胞種の同定を試みた。その結果アストロサイト、オリゴデンドロサイト、およびニューロンが Olig2 系譜細胞から分化することが示された。

次に、前脳基底部から発生する主要な細胞の一つである、コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) を発現するコリン作動性ニューロンが実際に Olig2 陽性細胞から分化するかどうか調べた。E18.5 の前脳における ChAT 弱陽性細胞が Olig2 抗体でラベルされた。さらに、E12.5 で Olig2 を発現している細胞を CreER/loxP システムを用いて恒常的に lacZ 遺伝子を発現するようにした場合、いくつかの細胞が ChAT と lacZ 両方に陽性であることが示された。

従って、コリン作動性ニューロンの分化に Olig2 が関与する可能性があるので、Olig2 ノックアウトマウスの前脳における ChAT(+)細胞数を調べたところ、約60%に減少していた。これまでに、コリン作動性ニューロンの分化には Nkx2.1, Mash1 および Lhx8 が関与することが知られているが、これらの転写因子は Olig2 ノックアウトマウスにおいても正常に発現していた。しかし、Mash1 欠損マウスでは E11.5 および E15.5 における Olig2 の発現が弱くなった。

本論文において初めて、そして直接的に前脳基底部におけるコリン作動性ニューロンの分化に Olig2 遺伝子が関与することが示された。また、コリン作動性ニューロンの分化において Olig2 は Nkx2.1 や Mash1 の下流で働き、Lhx8 非依存的な経路であることが推察された。これらから、申請者の論文は学位論文として十分ふさわしいものであると審査委員会は判断した。