

氏 名 臼井 紀好

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1526 号

学位授与の日付 平成 24 年 3 月 23 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 Multiple functions of Olig2 transcription factor in
neural development and possible mechanism underlying
generation of diversity in Olig2 function

論文審査委員 主 査 教授 深田 正紀
教授 池中 一裕
准教授 東島 眞一
教授 宮田 卓樹 名古屋大学

論文内容の要旨

Ultimate aim of this study is to understand the human brain function and development. For that purpose, the author investigated neural cell development, neuron-glia specification and neural circuit formation in the brain development using mouse central nervous system. Nervous system is composed of neurons and glial cells, which are generated from common neural stem/progenitor cells during development and adulthood. To investigate the mechanisms underlying generation of neurons and glial cells, he focused on Olig2 transcription factor.

Olig2 is a basic helix-loop-helix transcription factor, which is essential for motoneuron and oligodendrocyte (OL) development. In addition, Olig2-positive progenitor cells in the embryonic spinal cord give rise not only to motoneurons and OLs, but also to a subset of astrocytes and ependymal cells, indicating that Olig2-positive progenitor cells have a multipotency; however molecular mechanisms generating the selection among these multiple cell lineage choice is not well understood. Accordingly, the aim of this study is to understand the function of Olig2 transcription factor in neural development and mechanism underlying generation of diversity in Olig2 function.

To understand these, he investigated Olig2 function at the molecular level focusing on phosphorylation. He first identified Olig2 at Ser14 as a functional phospho-site by using *NetPhosK 1.0* and *NetPhos 2.0* phospho-site searching and point mutagenesis study (mutating serine to alanine). In addition, JNK, Cdk5 and GSK3 β were identified as novel kinases for phosphorylation of Olig2 at Ser14 by *in vitro* assays. To investigate the role and function of this phosphorylation in OL development, *in ovo* electroporation experiment was carried out using chick embryo. Olig2 nonphospho-form (S14A; mimicing Olig2 dephospho-form at Ser14) was electroporated at E3 (HH stage 18-20), and analyzed at E5 (HH stage 25-26). Ectopic expression of *myelin basic protein (MBP)* gene expression was observed only in nonphospho-form of Olig2 (S14A)-electroporated chick embryonic spinal cord at E5, but not in Olig2 (wildtype; normal Olig2). Interestingly *MBP* promoter was activated *in vivo* only by nonphospho-form of Olig2 (S14A). Inhibition of GSK3 β and Cdk5 kinase activities also induced ectopic *MBP* expression in chick embryo at E5. Depending on the phospho-state of Olig2 at Ser14, Olig2-interacting molecules dramatically changed their activities for binding to Olig2. Sox10, E2.5 (E47), Hes5 and Zfp488 bound to phospho-state of Olig2 at Ser14. On the other hand, Ngn2, Id1/2/3/4, Hes1, p300 and Mash1 bound to nonphospho-state of Olig2 at Ser14. These data suggest that OL development-promoting effecters, such as Sox10 and Zfp488, are inhibited by binding with phospho-state of Olig2. After dephosphorylation inhibitory effecters, such as Hes1 and Ids, on OL differentiation are repressed by binding with dephospho-state of Olig2 during OL development. Among them, Hes1 and Hes5 are novel Olig2-binding molecules, which were identified by Olig2 proteomic analysis. These data suggests that Olig2-interacting molecules regulate OL differentiation by binding to either phospho or dephospho-state of Olig2.

Next, he analyzed Olig2 function *in vivo* using *Olig2* knockout mouse. He found the novel phenotype of *Olig2* knockout mouse, which shows increased number of apoptotic cells in the dorsal root ganglia at early developmental stage (E10.5). Since motoneuron is absent in *Olig2* knockout mouse, this is a good model to understand the role of motoneuron on sensory neuron development.

In order to investigate the role of motoneuron on early sensory neuron development, he analyzed sensory neuron phenotypes in the dorsal root ganglia of *Olig2* knockout embryos. Here, he report abnormal phenotypes in the sensory neurons of *Olig2* knockout mouse. Decreased number of *TrkB*-positive mechanoreceptive, *TrkC*-positive and *Runx3*-positive proprioceptive neurons at E13.5 and the increased number of apoptotic cells at E10.5 were observed in the dorsal root ganglia of *Olig2* knockout mice. Abnormal axonal projections of peripheral and central branches of dorsal root ganglia neurons were also observed in *Olig2* knockout mice at E10.5 and E15.5 respectively. To understand the motoneuron-derived factor, which regulates sensory neuron development, he focused on neurotrophin-3 (NT-3), because *NT-3* and its receptors (*Trk*) are strongly expressed in motoneurons and sensory neurons respectively. The significance of motoneuron-derived NT-3 was analyzed using *NT-3* conditional knockout embryo, in which he observed decreased number of *TrkC*-positive and *Runx3*-positive proprioceptive neurons at E13.5, increased apoptotic cells in the dorsal root ganglia at E10.5 and abnormal axonal projection of the central branch at E15.5 in *NT-3* conditional knockout mice. These phenotypes were comparable to that of *Olig2* knockout embryo. Taken together, he show that motoneuron is a functional source of NT-3, and motoneuron-derived NT-3 is an essential neurotrophin for survival and axonal projection of sensory neurons. This demonstrates that *Olig2* indirectly regulates neural circuit formation. Taken together, this study shows the importance of a motoneuron-derived factor in the sensory-motor circuit formation.

博士論文の審査結果の要旨

中枢神経系を構成するニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトは、共通の神経幹細胞に由来する。この発生・分化は、様々な分泌因子や転写因子により制御されている。出願者はオリゴデンドロサイトや運動ニューロンの発生・分化に必須である転写因子 *olig2* に焦点を当て、1) *olig2* のリン酸化がオリゴデンドロサイトの発生・分化に果たす役割、および 2) 運動神経由来の神経栄養因子 NT-3 が感覚神経の生存、軸索伸長に果たす役割をそれぞれニワトリ胚とノックアウトマウスを用いて明らかにした。

(1) まず、出願者はリン酸化部位予測プログラムにより転写因子・*olig2* の Ser6, 10, 14 がリン酸化されることを予測し、細胞内でリン酸化されることを証明した。続いて、*olig2* の Ser14 をリン酸化する酵素として GSK3 β を、そのプライミング酵素として JNK と Cdk5 を同定した。次に *olig2* のこれらリン酸化修飾の生理機能を明らかにするために、ニワトリ胚の脊髄に脱リン酸化型 *olig2* を異所性発現させた。その結果、脱リン酸化型 *olig2* は成熟オリゴデンドロサイトのマーカー分子である MBP を誘導した。また、GSK3 β 、Cdk5 の不活性化によっても MBP が誘導されたことから、*olig2* の Ser14 の脱リン酸化が成熟オリゴデンドロサイトへの分化誘導を引き起こすことが明らかとなった。次に出願者はその分子機構を明らかにするために、*olig2* 結合蛋白質が Ser14 のリン酸化状態によって変化するかどうかを検討した。その結果、Sox10, E2.5, Hes5 および Zfp488 はリン酸化型 *olig2* に強く結合するのに対し、Ngn2, Hes1, Id1, Id2, Id3, Id4, p300 および Mash1 は脱リン酸化型 *olig2* に強く結合することを見出した。このように、出願者は *olig2* が Ser14 のリン酸化状態の変化に応じて標的蛋白質を変え、オリゴデンドロサイトへの分化誘導に重要な役割を果たすことを見出した。

(2) 次に、出願者は *olig2* のマウス個体における機能を明らかにするために、*olig2* ノックアウトマウスを解析し、発生段階 (E10.5) の脊髄後根神経節 (DRG) において感覚神経細胞のアポトーシスが增加していること、およびその軸索投射が異常であることを見出した。*olig2* ノックアウトマウスは運動ニューロンが完全に欠落していることから感覚神経細胞の細胞死に運動ニューロンが関与しているのではないかと推測した。出願者は運動ニューロンカラムに神経栄養因子 NT-3 が特異的に強く発現していることに着目し、運動神経由来の NT-3 が感覚神経のアポトーシスを抑制し、軸索誘導に重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立てた。本仮説を証明するために、NT-3 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し、運動神経が存在する脊髄前角特異的に NT-3 を欠損させた。その結果、*olig2* ノックアウトマウスで見られた“感覚神経のアポトーシス”および“感覚神経の異常な軸索投射”が認められた。以上の結果から、運動神経由来の NT-3 が感覚神経の生存、および軸索投射 (神経回路形成) に重要な役割を果たすことが初めて明らかになった (Usui et al, Development in press)。

本研究は、転写因子 *olig2* の機能解析をテーマに掲げ、分子レベル (蛋白質のリン酸化修飾)、細胞生物学、組織学、in ovo 解析、マウス遺伝学等、多彩な手法を駆使して行われたものである。すでに本研究内容 (2) は国際誌に発表されており、(1) の研究内容も投稿準備中である。以上のことを鑑みて、本研究が学位論文としてふさわしいものであることに、審査委員全員の意見が一致した。