

## 審査の結果の要旨

氏名 星野 潤

本研究は中枢神経系の中でも小脳の形態形成において重要な役割を演じていると考えられている遺伝子 *Zic1*、*Zic2* の関わる小脳形成における遺伝子ネットワーク解明の最初のステップとしてこれらの遺伝子の変異マウスの小脳原基で発現量に異常が見られる遺伝子の同定及びその解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 胎生 17.5 日目の *Zic1* 欠損マウスの小脳原基で発現に変化の見られる遺伝子の探索を DNA micro-array 法を用いて行い、3 遺伝子、EST clone (W54155)、*grb10*、*Zic4* の発現に異常があることが確認された。これと並行して行われた RT-PCR 法によって *Zic1* 欠損マウス及び *Zic1*、*Zic2* ダブルヘテロマウスの小脳原基で 3 遺伝子、*cyclin D1*、*Wnt7a*、*p27* の発現に変動があることが確認された。EST clone (W54155) の発現は減少し、*grb10*、*Zic4* の発現は増加していた。また、*cyclin D1* の発現は減少し、*Wnt7a*、*p27* の発現は増加していることが観察された。
2. 発現に変動の見られた遺伝子のうち EST clone (W54155) に関してはこれまで解析がほとんど行われていなかったため、*Dorz1* (down regulated gene in *Zic1* deficient cerebellar primordium) と命名し、解析を行った。まず、この遺伝子の ORF を含む cDNA 全長をライブラリーのスクリーニングにより単離し、その塩基配列を決定した。この塩基配列により予想される翻訳産物は 247 アミノ酸よりなり、 $\alpha\beta$ -hydrolase fold domain というモチーフに相同性の高い領域があることがわかり、何らかの加水分解酵素活性をもつことが示唆された。この *Dorz1* は小脳においては *Zic1* 同様、胎生 17.5 日目をピークとするような発現動態を示すことが明らかになった。このピークの見られる胎生 17.5 日目の小脳原基において *Dorz1* が *Zic1* と同じように外顆粒層で発現していることが *in situ* hybridization 法によって確認された。

3. 抗Dorz1抗体が作製された。この抗体により、NIH3T3細胞に過剰に産生されたDorz1蛋白質が細胞内に広く存在することが明らかになった。また、この抗体はウエスタンブロット法により胎生17.5日目の小脳原基のライセイト中に約30kDaの内因性のDorz1と思われるバンドを検出した。さらに、免疫組織法によりDorz1翻訳産物は小脳原基内ではその転写産物と同様、外顆粒層で産生されていた。さらに、小脳原基の分散培養を行い、Dorz1に対する抗体とZic1に対する抗体それぞれによってDorz1とZic1がその培養細胞の一部において同一の細胞で産生されていることが明らかにされた。これまでの結果は、小脳の発生過程においてDorz1の発現がZic1によって活性化されていることを示唆している。

4. 実際に内因性のDorz1の発現がNIH3T3細胞及び小脳の細胞株A40それぞれに過剰発現されたZic1によって誘導されてくることが観察された。以上の結果により、小脳の発生過程においてDorz1がZic1の作用により誘導され、小脳の形態形成に関与することが示唆された。

5. 発現量に差異の見られたその他の遺伝子に関して、小脳の発生過程におけるその発現パターンと小脳原基におけるそれらの空間的発現局在を検討した。その結果、それぞれの遺伝子が小脳の発生過程において時空間的に特長的な発現パターンを示すことがわかり、小脳の形態形成に深く関与していることが示唆された。

以上、本論文はDNA micro-array法及びRT-PCR法を用いてZic1、Zic2遺伝子の変異マウスの小脳原基内で発現量に変化の見られる遺伝子を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、Zic1及びZic2の関与する小脳形成時における遺伝子ネットワーク解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。