



Predominant Expression of Human zic in Cerebellar Granule Cell Lineage and Medulloblastoma.

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横田, 尚樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1041

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 188号	学位授与年月日	平成 7年 3月27日
氏 名	横 田 尚 樹		
論文題目	Predominant Expression of Human zic in Cerebellar Granule Cell Lineage and Medulloblastoma. (ヒト zic 遺伝子のクローニングと小脳および髄芽腫における発現)		

博士(医学) 横田 尚 樹

論文題目

Predominant Expression of Human *zic* in Cerebellar Granule Cell Lineage and Medulloblastoma.

(ヒト *zic* 遺伝子のクローニングと小脳及び髄芽腫における発現)

論文の内容の要旨

【目的】

zic は最近我々がマウスの小脳 cDNA ライブラリーよりクローニングした新たな C2H2 タイプの zinc-finger motif を持った転写因子である。この分子はマウスの発生過程において小脳顆粒細胞系列に持続的かつ強い特異的な発現を示し、この細胞系列の形質の発現および維持に重要な役割を担うと共に、マーカー蛋白質としても有用であることが示唆されている。また、zoo blot 解析にて、*zic* はヒトを含めた脊椎動物においてひろくホモログを持つことを見いだした。そこで、*zic* や小脳顆粒細胞系列の細胞発生とヒトの神経疾患との関連を調べるため、*zic* のヒトにおけるホモログをクローニングし、その遺伝子座位をマッピングし同定すると共に、ヒトの発生過程の小脳において *zic* 蛋白質の発現を免疫組織化学的に検討した。また、その腫瘍形成過程において小脳顆粒細胞と深い関わりを持つと言われる髄芽細胞腫においてその発現を検討した。

【方法】

ヒト小脳 cDNA ライブラリーをマウス *zic* クロークンをプローブとして用いてスクリーニングし、ヒト *zic* cDNA 全長を得て全塩基配列を決定した。また、このとき得られたヒト *zic* cDNA クロークンをプローブとしてヒト成人ゲノムライブラリー (L 1018) をスクリーニングし、クロークンを得て、ゲノムの構造解析を行うと共にマッピングのプローブとして用いた。マッピングはダイレクト R-バンディング FISH 法を用いた。

Zic 蛋白質の zinc-finger 部分を除いた C 末領域との GST-Zic 融合蛋白質を用いてマウスを免疫し、抗 Zic モノクローナル抗体を作製した。小児および未熟児の剖検例より得られた小脳病理組織標本において免疫組織化学的な検索を行い、Zic 蛋白質の発現を調べた。また同様の検索をヒト脳腫瘍（髄芽細胞腫、膠芽細胞腫等）においても行った。

【結果】

ヒト *zic* cDNA 全長は約 3.2 kb、オープンリーディングフレーム (ORF) は 1344 塩基対 (477 アミノ酸)、推定分子量は 48.4 kDa であった。マウス *zic* と比べ塩基配列で 85% (ORF で 95%)、推定アミノ酸配列で 99% 以上と高度に保存されていた。中でもアミノ酸配列においては、144 番目の serine が proline へ、422 番目の methionine が leucine へ変化していたのみであった。ノザンプロット解析では、マウス小脳において 3 クラスの mRNA が存在するのに比べ、ヒト小脳では 3.2 kb に単一のバンドを認め、alternative splicing, poly A の alternative usage が存在しないことが推測された。

zic 遺伝子はヒト染色体の 3 q 24 にマップされた。近年遺伝性神経疾患においても連鎖解析により病因遺伝子の解析が進められているがこの領域およびその近傍との連鎖が推定されている疾患は存在しなかった。

小児および未熟児小脳の病理組織の免疫組織化学的検討では、Zic 蛋白質はヒト小脳外胚細胞層における胚細胞（顆粒細胞の前駆期）および内顆粒細胞層の顆粒細胞の核で継続的に強く発現しており、こ

これらの細胞の核蛋白質として機能していることが推測された。

さらにヒト脳腫瘍においては、8例中7例の髄芽細胞腫の核に発現していたが、3例の膠芽細胞腫ではいずれも発現を認めなかった。髄芽細胞腫は Zic 蛋白質の発現という点において、小脳顆粒細胞系列と共通した形質を持つことが示された。

【結論】

ヒト zic cDNA をクローニングし、全塩基配列を決定した。この zic 遺伝子の塩基配列、アミノ酸配列は、動物種を越えて高度に保存されていた。

zic 遺伝子はヒト染色体の 3 q 24 にマップされた。

Zic 蛋白質はヒト小脳の顆粒細胞系列および髄芽細胞腫の核で持続的かつ限局的な強い発現を認め、これらの細胞の核蛋白質（転写因子）として、その形質の発現および維持に重要な機能を果たしていることが推測されると共に、これらの細胞の特異的マーカーとして研究、診断への応用が期待できる。

論文の結果の要旨

申請者らはマウスの小脳 cDNA ライブラリーより zinc-finger motif を持った新たな核蛋白質（転写因子）をコードする遺伝子（zic）を単離し、その発現および機能解析を中心とした研究を進めている。そして、ヒトでの zic 遺伝子の単離、および Zic 蛋白質とヒト小脳顆粒細胞系列の細胞発生、神経疾患との関連性の究明が急がれた。

申請者はまず zoo blot 解析にて zic 遺伝子の相同遺伝子がヒトを含めた脊椎動物に広く存在している事を見だし、マウス zic 遺伝子の cDNA 断片をプローブとして用いてヒト zic 遺伝子の cDNA クローニングに成功し、その全塩基配列と遺伝子座位を決定した。さらにヒトの発生過程の小脳における

Zic 蛋白質の発現、および Zic 蛋白質をマーカーとして髄芽細胞腫の腫瘍発生過程をモノクローナル抗体を作製して追求した。

この一連の研究から次の結果を得た。

- 1) ヒト zic cDNA の全長は約 3.2 kb、オープンリーディングフレーム（ORF）は 1344 塩基対（477 アミノ酸）、推定分子量は 48.4 kDa であった。
- 2) これをマウス zic と比べてみると、塩基配列で 85%（ORF で 95%）、アミノ酸配列では 144 番目の serine が proline へ、422 番目の methionine が leucine へ変化していたのみで 99% 以上の相同性を示し、種を越えて高度に保存されていた。
- 3) ヒト zic 遺伝子の mRNA を ノザンブロット 法で解析すると、ヒト小脳においては 3.2 kb の単一のバンドしか見いだせず、マウス小脳において 3 クラスの mRNA が存在するのとは異なっていた。
- 4) ヒト zic 遺伝子は 3 q 24 にマップされた。
- 5) 小児および未熟児の小脳の病理組織での免疫組織化学的検索では、Zic 蛋白質はヒト小脳外胚細胞層における胚細胞および内顆粒細胞層の顆粒細胞の細胞核で継続的に強く発現していた。
- 6) ヒト脳腫瘍病理組織標本の検索で、Zic 蛋白質は、髄芽細胞腫の細胞核に強く発現していた（7 / 8 例）が、膠芽細胞腫では発現を認めなかった（0 / 3 例）。髄芽細胞腫は小脳顆粒細胞系列と共通した形質（Zic 蛋白質の発現）を持つことが明らかとなった。

本研究は、ヒト zic 遺伝子を初めて単離、解析し、その遺伝子産物である Zic 蛋白質が、核蛋白質（転写因子）として小脳顆粒細胞系列および髄芽細胞腫で発現しており、これらの細胞の形質・機能発

現と深くかかわり合いを持つことを示唆した。更に、マーカー分子としても臨床応用の可能性を持っているとして高く評価された。

申請者の発表に対し質疑および討論がなされた。

- 1) zinc-finger motif とはどのようなものか
- 2) zic 遺伝子の発現部位の特異性はどうか
- 3) 小脳顆粒細胞の全てが Zic 蛋白質に対するモノクローナル抗体で染色されるか
- 4) Zic 蛋白質の生物学的意義について
- 5) zic 遺伝子には単一遺伝子か、また関連遺伝子が存在するか
- 6) Zic 蛋白質の発現細胞株の検索はしたか
- 7) Zic 蛋白質が認識する塩基配列はどのようなものか
- 8) Zic 蛋白質はテント上の PNET (primitive neuroectodermal tumor) にも発現しているのか
- 9) 髄芽細胞腫と他の脳腫瘍との鑑別診断に如何に役立つか
- 10) 小脳顆粒細胞の移動、小脳の層構造の完成時期と歩行などの神経発達との関連について
- 11) マウス zic 遺伝子のクローニングが達成できた理由は何か
- 12) 小脳の顆粒細胞の障害による臨床症状は何か

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり研究内容も博士（医学）の学位論文にふさわしいものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 村 上 彰

副査 教授 植 村 研 一 副査 教授 吉 田 孝 人

副査 助教授 小 田 敏 明 副査 助教授 梶 村 春 彦