

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	南田 佳孝
論文題目	FLASH 変異マウスと ES 細胞を用いた FLASH/casp8ap2 の生理機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>FLASH (FLICE associated huge protein)/casp8ap2は、caspase-8 (FLICE)に結合する分子として、1999年に同定、クローニングされた。その後、FLASHはアポトーシスの調節や転写の調節に機能することも示されてきた。また、近年になってFLASHは主に核内のHistone Locus Bodyに存在し、細胞周期S期の進行や細胞周期S期特異的ヒストンの発現制御に機能していることが明らかになり、FLASHは様々な生理機能を持つ重要な分子であることが示されてきた。</p> <p>一方、動物個体におけるFLASHの生理機能は不明であった。そこで申請者は、動物個体におけるFLASHの生理機能を解明するため、FLASH遺伝子内にtrapping vectorが挿入されたFLASH変異マウスの解析を行った。その結果、このFLASH変異マウスはFLASHのプロモーターの変異マウスであり、精巣以外のほとんど全ての組織でFLASHの発現が欠損していることを示した。また、FLASHを欠損すると、受精後3.5日の胚盤胞で栄養芽細胞が透明帯を破って増殖するハッチングが引き起こされず、この時期に胎生致死となることを見いだした。このように、FLASHは個体発生において着床前の胚盤胞期に必須であることが明らかになった。</p> <p>さらに、FLASHの発生期における機能を詳細に解析するため、申請者はgene targeting法により誘導的にFLASHをノックアウトできるES細胞株を作製し、解析を行った。その結果、これまでの報告ではFLASHの発現を抑制すると細胞周期の進行がS期でアレストすることが様々な細胞株において知られていたのに対し、ES細胞でFLASHを欠損させても増殖に変化が認められず、さらにES細胞から外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化にも変化が認められないという予想外の実験結果が明らかになった。また、胚盤胞の着床に重要な役割を担う栄養芽細胞への分化、生存にもFLASHは関与しないことが示された。一方、FLASHを欠損したES細胞では他の細胞株でFLASHを抑制した場合と同様に細胞周期依存的ヒストンH3, H4の発現が抑制されていることが明らかになった。</p> <p>本研究により、FLASHは胎児の初期発生に必要不可欠であるがES細胞の増殖と分化には必要ではないこと、またFLASHが細胞増殖に必須である細胞と必須ではない細胞の存在することを申請者は明らかにした。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

FLASH (FLICE associated huge protein)/casp8ap2は、細胞増殖、アポトーシス、転写、ヒストンの発現などを制御する多様な機能を有する分子であることが培養細胞レベルの研究で明らかになっていった。一方、個体発生や成体の恒常性維持にFLASHがどのように機能するかについての個体レベルでの解析はなされてこなかった。申請者は、FLASH遺伝子の変異マウスを解析することにより、FLASHが発現しないと受精後3.5日から8日までにおいて胚が死滅することを見いだした。さらに、受精卵や体外受精卵を培養する解析を行い、FLASHの発現が抑制されると、受精後3.5日の胚盤胞で栄養芽細胞が透明帯を破って増殖するハッチングが引き起こされず、着床前の胚盤胞期からの進行が阻害されることによって胚が死滅することを解明した。これまで細胞レベルでの解析しかなされてこなかったFLASHについて個体レベルでの機能を初めて示したこと、解析が困難である初期発生時の解析をなしとげたことは高く評価できる。また、用いたマウスはFLASH遺伝子内にtrapping vectorが挿入されたES細胞に由来するマウスである。この系では、trapping vectorは標的遺伝子の翻訳開始コドンであるATGの下流に挿入されることによって標的遺伝子の正常な発現が阻害されるように設計されている。ところが、このFLASH変異マウスではATGの上流にtrapping vectorが挿入されており、FLASHの全長タンパク質が発現可能なマウスであることが明らかとなった。申請者は、このマウスを解析し、精巣以外の臓器では変異アレルに由来するFLASHが全く発現しないことを見だし、FLASHの発現が抑制された変異マウスであることを明らかにした。FLASH遺伝子のノックアウトではないことが明らかとなったマウスを粘り強く解析し、FLASHの個体レベルでの機能の解明につなげたことは評価できる。

さらに、申請者はFLASH変異マウスが初期胚で異常になるメカニズムを明らかにすることを目的に、ES細胞をもちいてFLASH遺伝子を誘導的にノックアウトする系を構築した。このFLASHノックアウトES細胞を用いた解析により、ワイルドタイプのES細胞とFLASHがノックアウトされたES細胞で、細胞増殖や分化に何の変化も認められないことを明らかにした。FLASHの発現を抑制すると多くのがん化した細胞の増殖が停止することが報告されてきたが、FLASHノックアウトES細胞では細胞増殖に変化が認められないという予想もされなかった結果を示した。このようなFLASHが細胞増殖に関与する細胞と関与しない細胞が存在するという予想外の結果を取得したことは、今後のFLASHの生理機能やがん細胞の特性を解明する研究につながるものであり、評価できる。

このように、本論文では生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見と概念を提示している。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認められた。さらに、平成26年12月10日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： _____ 年 _____ 月