

京都大学	博士（医学）	氏 名	岩 渕 久 美 子
論文題目	ECAT11/L1td1 is enriched in ESCs and rapidly activated during iPSC generation, but it is dispensable for the pluripotency (ECAT11(L1td1)は ES 細胞において発現し iPS 細胞樹立過程ですみやかに発現するが、多能性維持機構には必須ではない)		
(論文内容の要旨)			
胚性幹 (ES) 細胞の特徴である多能性と増殖能力を担う主要な因子は精力的に研究されている。これら ES 細胞の根幹的な特性は Nanog・Oct3/4 などの転写因子が担っていることが分かっているが、これらを中枢とした全体的なネットワークと下流経路がどのようなものであるかについては未だに不明な部分が多い。これらの背景をふまえ、本研究では、ES 細胞特異的に発現する機能不明な因子の一つである ECAT11 (L1td1) について、ES 細胞および発生過程における機能を解析した。			
① ECAT11 の構造および発現解析			
ECAT11 はレトロトランスポゾン的一种である LINE-1 の Open Reading Frame 1 (ORF1) を由来とするモチーフをもち、マウス・ヒトに共通して存在する。一次構造解析の結果から、ECAT11 には ORF1 由来の配列が二カ所に含まれることが分かった。発現解析の結果から、ECAT11 はマウス・ヒトのいずれにおいても ES 細胞および生殖系列で発現していることが分かった。			
② ES 細胞および発生における ECAT11 の役割			
ECAT11 の機能を解析するために ECAT11 コーディング領域を EGFP およびピューロマイシン耐性遺伝子で置換したバクテリア人工染色体を構築し、これを用いて ECAT11 ヘテロ欠損型 ES 細胞を作製した。さらに、この ES 細胞をマウス胚盤胞に移植し ECAT11-EGFP ノックインマウスを作製した。ECAT11-EGFP ノックインマウス胚について受精後から胎生 13.5 日目まで観察したところ、EGFP の発現が胚盤胞形成後から胎生 9 日目までみられ、胎生 10.5 日目で一旦消失したのち、胎生 13.5 日目で指間部・下顎・生殖巣に限局した発現を呈した。発生期における特異的な発現にもかかわらず、ECAT11-EGFP ノックインマウスは外観・骨格・生殖機能に異常がみられなかった。さらに、ECAT11-EGFP ノックインマウスから ES 細胞を樹立し増殖および多能性に対する影響の有無を調べたが、増殖能力・分化能力・コロニー形態・遺伝子発現プロファイルに異常はみられなかった。			
③ 線維芽細胞からの人工多能性幹(iPS)細胞樹立における ECAT11 の発現特性			
ECAT11 は体細胞から iPS 細胞を誘導する過程で早期に発現が見られたため、体細胞初期化誘導過程における ECAT11 欠失の影響がないか調べたが、特に影響はみられなかった。しかし、初期化誘導因子導入から 24 時間で発現が確認され、また iPS 誘導が可能であるとされる Oct3/4・Sox2・Klf4 またはこれに c-Myc を加えた組み合わせでのみ発現がみられることがわかった。			
以上の結果から、ECAT11 は ES 細胞および iPS 細胞における特異的な発現がみられるにもかかわらず多能性維持・獲得に必須でないことがわかった。また、本研究で樹立した ECAT11-EGFP ノックインレポーターシステムが内在性のマーカーとして iPS 誘導の極めて初期の解析に応用できる可能性が示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)
ECAT11 (L1td1) 遺伝子は、マウス胚性幹 (ES) 細胞、初期胚および生殖細胞で特異的に発現する遺伝子の一つとして同定された。本論文の目的は、ECAT11 のマウス生体および ES 細胞における機能を調べることである。
本学位授与申請者はまず、遺伝子組み換え技術を用いて ECAT11 の代わりに蛍光タンパク質 EGFP が発現する ECAT11 遺伝子欠損マウスを作製した。しかし変異マウスは通常のマウスと同様に発生、成長し、生殖能力も有していた。また申請者は、ECAT11 遺伝子欠損 ES 細胞も作製したが、正常の ES 細胞と増殖能力や分化能力に違いは認められなかった。これらの結果は ECAT11 が個体発生や ES 細胞の多能性維持機構には必須ではないか、もしくは他の遺伝子によりその機能が補われることを示している。
申請者はさらに、人工多能性幹 (iPS) 細胞誘導過程における ECAT11 の発現誘導について解析を行った。その結果、マウス線維芽細胞に iPS 細胞誘導因子である Oct3/4, Sox2 および Klf4 を同時に発現させると、iPS 細胞誘導の極めて早い段階から ECAT11 の発現が活性化されることを明らかにした。一方、ECAT11 遺伝子欠損繊維芽細胞からも iPS 細胞は樹立可能であった。
以上の研究は、ECAT11 遺伝子はその特異的な発現様式にもかかわらず分化多能性の維持と誘導には必須ではないことを示す。一方で申請者が作製した ECAT11-EGFP 蛍光レポーターは、iPS 細胞誘導のメカニズムを解析するためのツールとして有用であり、今後の細胞核初期化機構研究の進展に寄与するところが多い。
したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、申請者は、平成 2 3 年 5 月 2 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 平成 2 3 年 5 月 2 7 日 以降