

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成20年度博士課程 入学

氏名 村木 美帆

指導教員名 久和 茂

論文題目

The expression mechanism of glutathione S-transferase theta 1 (GSTT1)
as an aging marker

(老化マーカー分子 glutathione S-transferase theta 1(GSTT1)の発現機構に関する研究)

一般的にヒトにおいては 30 代後半になると生殖能力が徐々に低下することが知られている。加齢による生殖能低下の要因は、いくつか知られているが、特に老化による酸化ストレスの増大は、卵子や顆粒膜細胞の機能低下を導く重要な要因と考えられている。正常な体内では、活性酸素群とそれらを消去するスカベンジャーとのバランスが保たれているが、加齢によって抗酸化ストレス機構が正常に機能しなくなると活性酸素群が増加し、女性の生殖能力にも影響を及ぼすことが示されている。一般的に加齢にともない、抗酸化物質が減少し、細胞異常や細胞死が引き起こされるが、雌性生殖細胞の老化の分子機構は不明であり、効果的な治療法や検査法に乏しいのが現状である。そこで、臨床検査の副産物として得られる顆粒膜細胞を研究材料とし、ストレス関連遺伝子群における差別的遺伝子

発現解析による生殖細胞の老化マーカー分子の同定を試みたところ、抗酸化作用を持つことで知られている glutathione s-transferase(GST)の一つである GSTT1 は、加齢により発現亢進していることが明らかとなった。さらに過酸化水素水や FSH により発現亢進することから GSTT1 が顆粒膜細胞における老化マーカーとなりうることを示した。興味深いことに、GST theta クラスのアミノ酸配列やタンパク質の立体構造は、他の GST と比べて大きく異なり、また遺伝子毒性代謝産物を発生させる機能を有しており、GSH との結合性が非常に低いと考えられている。したがって、GSTT1 は他の GST とは異なる機能を有していると推測される。GSTP、GSTM、GSTA はよく研究が進んでおり、生体内にとって重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、GSTT1 の機能については未だ不明な点が多く残されている。そこで、本研究では加齢に伴い発現亢進する GSTT1 の特徴を解明するため、その発現機構に焦点を絞り研究を行った。

第一章 老化マーカー分子 GSTT1 と他の GST の顆粒膜細胞における発現解析

GSTT1 はヒト顆粒膜細胞において加齢にともない亢進することから、ヒトおよびマウスの顆粒膜細胞における GSTT1 と GST の発現パターンの比較検討を行った。その結果、GSTT1 とは対照的に GSTP の発現は高齢患者の顆粒膜細胞において発現が減少し、また高齢顆粒膜細胞において GSTT1 以外の GST の酵素活性は低下し、GSTT1 の酵素活性は上昇していることが示された。続いて、マウス顆粒膜細胞を用いて免疫蛍光抗体法および RT-PCR 法を用いて検討を行ったところ、ヒト顆粒膜細胞と同様の結果が得られた。以前の研究結果では GSTT1 の発現は卵丘卵子複合体成熟度と負の相関があり、アポトーシスマーカー分子である Bax と同様な発現パターンを示したことを考慮すると、GSTT1 は加齢にともなうストレスはもしくはアポトーシスによって誘導される可能性が示唆された。

GST は抗酸化作用を持つ分子群の転写因子とされる nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2) に発現制御を受け、細胞防御に働くことが知られている。これまでに、Nrf2 欠損マウスではほとんどの GST や glutamate cysteine ligase (GCLC) の触媒基質の発現が減少していることが報告されており、加齢にともなう酸化ストレス防御機能の低下と Nrf2 発現量の関連性も示唆されている。そこで、Nrf2 欠損マウスから採取した mouse embryonic fibroblasts (MEFs) における GST の発現解析を行った結果、これまでの報告のように、GSTT1 以外の GST の発現量は野生型マウスの MEFs よりも低下していたが、GSTT1 の発現に差は見られなかった。

以上の結果より、GSTT1 は他の GST とは異なるストレス反応によって発現制

御されていることが示唆された。

第二章 KGN 細胞における FSH および酸化ストレスによる GST の発現解析とストレスカスケードに関する研究

血中の FSH、LH などのホルモンや酸化ストレスは、加齢とともに増加することが知られている。以前の研究結果より FSH は GSTT1 の誘発因子であることが示されたため、FSH 刺激した KGN 細胞を用いて他の GST について、免疫蛍光抗体法および RT-PCR 法を用いて検討を行ったところ、他の GST は FSH により誘導されないことが示された。続いて、GSTT1 は他の GST と異なる挙動を示したことから、Nrf2 に転写制御を受けているか検討を行うため、Nrf2 の阻害剤である all-trans retinoic acid (ATRA)により GSTT1 の発現が抑制されるか RT-PCR 法および免疫蛍光抗体法により検討を行った。ATRA を処置した KGN 細胞において GSTA1、GSTM1 の発現は有意に抑制されたが、GSTT1 の発現は全く抑制されなかった。

Nrf2 を介した発現経路の上流に存在するシグナル経路として、いくつか知られているが、中でも p38 および JNK は酸化ストレスなど細胞外的要因に反応することが示されている。また、GSTA および GSTP は JNK と直接結合し、その働きを阻害することが様々な細胞において報告されている。そこで、p38 および JNK の阻害剤が GSTT1 の発現に影響を及ぼすか免疫蛍光抗体法を用いて検討を行なった。H₂O₂ 刺激を与えた KGN 細胞における GSTP および Nrf2 の発現は JNK の阻害剤によって抑制されたが、GSTT1 の発現は全く影響が認められなかった。一方、p38 阻害剤では、GSTT1 の発現は抑制され、GSTP や Nrf2 の発現には影響が見られなかった。KGN 細胞において p38 は FSH により活性化することが報告されていることを考慮すると、GSTT1 は JNK の制御を受けず、p38 MAPK の下流で発現制御を受けていることが示唆された。

第三章 GSTT1 の転写制御に関する研究

これまでの研究結果より、GSTT1 は第 II 層の薬物代謝酵素に分類されるが、Nrf2 を介した転写制御を受けていないことが示唆された。Nrf2 は遺伝子上のプロモーター領域に存在する antioxidant response element (ARE)に結合し、転写を促進することが知られている。そこで、GSTT1 を含める GST およびキノンリダクターゼの遺伝子上流のプロモーター領域に存在する推定上の ARE 結合領域を検索し、比較検討を行なった。ARE 配列(TMAnn RTGAYnnn GCR WWW)はヒト、マウス、ラットにおいて保存されており、GSTA1、GSTP1、GSTM1、キノンリダクターゼ

についてはすでに特定されている。これらの遺伝子と GST theta クラスの推定上の ARE 領域の配列を比較したところ、theta クラスの配列には多数の mutation が認められた。したがって GSTT1 が Nrf2 の転写制御を受けていない可能性を強める結果となった。

顆粒膜細胞における GSTT1 の発現が加齢にともなうストレスと関連することが示されているが、他の組織（体細胞）でも同様の結果が得られるか RT-PCR 法を用いて検討を行なった。老齢マウスの腎臓においても GSTT1 の発現亢進が認められた。高齢患者から採取した真皮では GSTT1 の発現が亢進していることが報告されており、UV 照射などによる増大した酸化ストレスを防御するために GSTT1 の発現が誘導されたのではないかと結論付けられており、顆粒膜細胞や腎細胞においても同様のことが起きている可能性が想定される。

一連の研究結果より、GSTT1 の発現は p38 と関連することが示唆された。GSTT1 の発現制御に関わる分子群を特定するために、GSTT1 の過剰発現および発現抑制系を作成し検討を行なった。p38 の下流には様々な転写因子が存在し、細胞の成長や分化に関わるとされる GATA ファミリーもその一つである。中でも GATA-1、GATA-4、GATA-6 は内分泌細胞において様々なステロイド産生や遺伝子発現に関与することが明らかとなっており、FSH との関連性も報告されている。NIH 3T3 細胞および HM-1 細胞における GSTT1 の過剰発現および発現抑制系を行なった結果、GATA-1、GATA-4、GATA-6 の発現の変化が認められ、さらに GATA-1 を過剰発現させることにより、GSTT1 の発現が誘導されることが明らかとなった。GATA-1 はセルトリ細胞やライディッヒ細胞などの生殖腺細胞、また造血系細胞に強く発現しており、GATA-1 はそれらの組織の機能形成に深く関与しているのではないかと考えられている。また、GATA-1 欠損マウスの巨核球では GSTT1 の mRNA はほとんど発現しておらず、この事実からも GSTT1 と GATA-1 の関連性が示唆される。しかしながら、GATA-1 の発現は精巣と比較すると卵巣内での発現は少ないため、顆粒膜細胞において GSTT1 が GATA-1 に発現制御を受けているか証明するにはさらに詳細に検討を行う必要がある。

結論として、今回我々の研究結果より、GSTT1 は他の GST とストレス反応や誘導因子が異なることが示唆され、GST の代表的な転写因子である Nrf2 に転写制御を受けている可能性が低いことが示された。ストレス反応カスケードの一つである p38 MAPK を介し、一つの転写経路として、p38 の下流に存在する GATA ファミリー分子、特に GATA-1 により発現制御を受けている可能性が示唆された。