

[別紙 2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 村木 美帆

ヒトでは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。しかしながら、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。雌性生殖細胞の老化の原因の1つとして酸化ストレスが考えられる。通常、生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、卵や顆粒膜細胞などの生殖関連細胞群に異常や細胞死が引き起こされるという仮説である。そこで、ヒトの生殖医療の臨床検査の副産物として得られる顆粒膜細胞を用いてストレス関連遺伝子群における差別的遺伝子発現解析を行ったところ、抗酸化作用を持つ glutathione S-transferase(GST) の一つである GSTT1の発現が加齢により亢進していることが明らかとなった。GST theta クラスのアミノ酸配列やタンパク質立体構造は他の GST と比べて大きく異なっており、またグルタチオンとの結合性も非常に低く、GSTT1は他の GST とは異なる機能を有していると推測されている。GSTT1に関する研究は少なく、その機能については未だ不明な点が多い。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。論文は以下の3章からなる。

第一章では、若齢と高齢のヒトおよびマウスの顆粒膜細胞における GSTT1と他の GST の発現パターンを比較検討した。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、またその酵素活性は低下していた。一方、GSTT1の酵素活性は上昇していた。マウス顆粒膜細胞でもヒト顆粒膜細胞と同様の結果が得られた。

GST は抗酸化作用を持つ分子群の転写因子である nuclear factor erythroid 2 p45-related factor 2 (Nrf2)に発現制御を受け、細胞防御に働くとされている。そこで、Nrf2欠損マウス由来胚性線維芽細胞株 (MEFs)における GST の発現を解析した。その結果、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の発現に差はなかった。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。

第二章ではヒト顆粒膜細胞株である KGN 細胞を用いて、卵胞刺激ホルモン (FSH) および過酸化水素水 ( $H_2O_2$ ) を用いた酸化ストレス刺激による GST の発現解析とストレスカスケードについて検討した。GSTT1は FSH 刺激により発現誘導されたが、他の GST は誘導されなかった。次に 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検討した。ATRA を処置した KGN 細胞では 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、p38およびJNKが知られている。実際GSTAおよびGSTPはJNKと結合し、その働きを阻害することが報告されている。そこで、p38およびJNKの阻害剤のGSTT1の発現に及ぼす影響について検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激を与えたKGN細胞におけるGSTPの発現はJNK阻害剤(SP600125)によって抑制されたが、GSTT1の発現は影響されなかった。一方、p38阻害剤(SB203850)では、GSTT1の発現は抑制され、GSTPの発現には影響がみられなかった。したがって、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。

第三章ではまず、GSTT1の転写制御に関するゲノム情報について検索した。Nrf2は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ので、各遺伝子上流のプロモーター領域に存在する推定上のARE結合領域について検索した。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などでは既に特定されている。しかし、検索の結果thetaクラスの配列には多数のmutationが認められ、GSTT1がNrf2の転写制御を受けていない可能性を支持する結果となった。

GSTT1の発現制御に関わる分子群を特定するために、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実験を行なった。その結果、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、機能形成に深く関与している。しかし、卵巣でのGATA-1の発現は少なく、顆粒膜細胞においてGSTT1がGATA-1に発現制御されているか証明するにはさらなる検討が必要である。

以上の結果より、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ない可能性が示された。また、GSTT1はストレス反応カスケードの一つであるp38 MAPKを介し、その下流に存在する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。

これらの研究成果は獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値のあるものと認めた。