

氏名	山田 郁
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4784号
学位授与の日付	平成25年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	GGT1欠損モデルとしてのDWGマウスを用いた生殖機能におけるGGT1の役割に関する研究
論文審査委員	准教授 辻 岳人 教授 国枝 哲夫 教授 舟橋 弘晃

### 学位論文内容の要旨

dwarf gray (DWG)マウスは、常染色体劣性遺伝の突然変異である *dwg* をもち、*dwg/dwg* 個体において矮小・白内障を呈している。これまでの解析により *dwg/dwg* 個体では、グルタチオン(GSH)の代謝に重要な酵素である  $\gamma$ -glutamyl transferase 1 (GGT1)をコードする *Ggt1* 遺伝子上に13塩基の欠損が存在すること、さらにこの欠損によりスプライシング異常が生じることを明らかにしている。一方、*dwg/dwg* 個体におけるGGT活性の有無とGGT活性の欠損により生じるGSH濃度の変化が起きているかは不明であり、*dwg/dwg* 個体の表現型異常が *Ggt1* 遺伝子の変異に起因すると決定するには更なる解析が必要である。さらに *dwg/dwg* 個体は雌雄共に不妊であるとの報告があるがその詳細な解析はされておらず、不妊の程度や原因は不明である。そこで本研究では、*dwg/dwg* 個体の表現型異常と *Ggt1* 遺伝子の突然変異との関連性を調べるとともに、*dwg/dwg* 個体においても不妊を呈しているかを調べ生殖制御機構におけるGGT1の機能の検討を試みた。

*dwg/dwg* 個体においてGGT1が機能しているかを調べるために、腎臓のGGT活性を調べたところ、野生型個体の4.0%程度の活性しか示さなかった。また、血漿、腎臓、肝臓、眼球におけるGSH濃度を測定したところ、*dwg/dwg* 個体では血漿中および腎臓中のGSH濃度が増加し、肝臓および眼球のGSH濃度が減少していた。そこで、*dwg/dwg* 個体にNACを投与したところ矮小・白内障が改善した。以上の結果から、*dwg/dwg* 個体ではGGT1が正常に機能しないために細胞中のGSHもしくはシステイン濃度が低下し、矮小や白内障を呈しており、DWGマウスの表現型異常は *Ggt1* 遺伝子における突然変異によるGGT1タンパクの機能低下が原因であることが示された。

*dwg/dwg* 個体の雌雄どちらも正常個体と3か月以上同居させても産仔が得られず、雌雄共に不妊であることが確認された。さらに不妊の原因を明らかにするために、*dwg/dwg* 個体の生殖器の重量測定および組織学的解析を行ったところ、雄では精巣上部および精嚢の重量が低下しており、精巣および精巣上部において精子形成が進行し、精巣上部管内に精子が存在するが、精嚢内の分泌物が蓄積していないことが明らかとなった。雌では性周期が発情休止期で停止しており、卵巣および子宮のどちらも重量が減少し、卵巣では胞状卵胞は存在するが黄体は存在しなかった。一方、*dwg/dwg* 個体由来の精子および卵子を用いて体外受精を行ったところ、受精し胚盤胞期胚まで発生が進行したため、配偶子機能に不妊の原因となる異常はないことが明らかとなった。*dwg/dwg* 個体の生殖器官における異常はインスリン様成長因子1(IGF-1)ノックアウトマウスと類似しており、GSHを投与すると血漿中のIGF-1濃度が上昇することが報告されていることから、IGF-1の分泌調節にGGTが関与することが予想された。そこで *dwg/dwg* 雄個体の血漿中のIGF-1濃度を測定したところ、野生型個体の24.2%しか存在していなかったため、不妊の原因としてIGF-1濃度の低下による副生殖器の異常が考えられた。本研究の結果からGGT1はGSH濃度の調節を介して血中のIGF-1上昇をもたらす経路に関与することで、雌雄の正常な生殖組織機能の維持に貢献していることが考えられた。今後、生殖制御機構におけるGGT1の役割を詳細に解明するうえで、DWGマウスはGGT1欠損モデルとして有用であると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、グルタチオン(GSH)の代謝に関わる  $\gamma$ -glutamyl transferase1 (GGT1)に注目し、*Ggt1* 遺伝子に突然変異(*dwg*)をもつ dwarf gray (DWG)マウスの GGT1 欠損モデルとしての有用性と GGT1 による生殖機能制御に関わる分子機構を明らかにすることを目的とした研究であり、その内容は以下の通りである。

まず、*dwg* による GGT1 機能への影響を調べるために、*dwg/dwg* 個体の腎臓における GGT 活性を調べたところ、野生型個体の 4.0%程度の活性しか示さなかった。また、*dwg/dwg* 個体では血漿中および腎臓中の GSH 濃度が増加し、肝臓および眼球の GSH 濃度が減少していた。さらに、*dwg/dwg* 個体に *N*-Acetyl-*L*-cysteine を投与したところ矮小・白内障が改善した。以上の結果から、*dwg/dwg* 個体では GGT1 が正常に機能しないことで細胞中の GSH もしくはシステイン濃度低下が、DWG マウスの表現型異常の原因であると結論づけている。さらに、*dwg/dwg* 個体の生殖器の重量および組織学的解析を行ったところ、雄では精囊の重量が低下し、精囊内の分泌物が蓄積していないこと、雌では性周期の異常が観察され、卵巣および子宮の重量が減少するとともに、卵巣では胞状卵胞は存在するが黄体は存在しないことを確認した。一方、*dwg/dwg* 個体由来の精子および卵子を用いて体外受精を行い、配偶子機能に不妊の原因となる異常はないことを確認した。観察された *dwg/dwg* 個体の生殖器官における異常はインスリン様成長因子 1(IGF-1)ノックアウトマウスと類似していることから、*dwg/dwg* 雄個体の血漿中の IGF-1 濃度を測定したところ、野生型個体の 24.2%しか存在していなかった。これらの結果から、GGT1 は GSH 濃度の調節を介して血中の IGF-1 上昇をもたらす経路に関与することで、雌雄の正常な生殖組織機能の維持に貢献していると結論づけている。

これらの成果は、GGT1 の新たな機能を示す内容であり、哺乳類の生殖機能制御機構の解明に向けた重要な知見である。これらの成果は本論文で的確にまとめられており、また、国際学術誌に英語論文としても発表されている。したがって、本学位審査会において、山田郁氏により提出された本論文は、博士学位（農学）に値するものと判断した。