博士論文

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

平成 25 年 3 月

山田　郁

岡山大学大学院

自然科学研究科

目次

緒論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5

第 1 章　矮小および白内障に関連する形態学的・組織学的解析

1-1　緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8

1-2　材料および方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10

1-3　結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16

1-4　考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18

1-5　図表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

第 2 章　原因遺伝子の同定に向けた塩基配列の解析

2-1　緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 26

2-2　材料および方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 28

2-3　結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38

2-4　考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 40

2-5　図表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

第 3 章　表現型異常と *Ggt1* 遺伝子突然変異との関連性について

3-1　緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 52

3-2　材料および方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54

3-3　結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 56

3-4　考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58

3-5　図表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61

第 4 章　雌雄の生殖機能異常に関する解析

4-1　緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　70

4-2　材料および方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　73

4-3　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　75

4-4　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　79

4-5　図表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　83

第 5 章　生殖制御機構における GGT1 の機能の検討

5-1　緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　94

5-2　材料および方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　97

5-3　結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　100

5-4　考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　101

5-5　図表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　106

総括　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　110

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　116

参考文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　118

緒論

この 100 年で、遺伝子情報の本質とその内容について解明するための科学的な探求が推進されてきている。遺伝子情報に関する科学的な発展は、染色体の解明、DNA の 2 重らせん構造の解明、組換え DNA を用いた解析技術の開発と段階を経てきており、1984 年にはヒトゲノムプロジェクトが提案された(International Human Genome Sequencing Consortium.,2001)。2003 年にはヒトゲノムの読了が宣言され、現在は遺伝子がもつ機能の解明へ重点が置かれている。ヒトゲノム全体に含まれる遺伝子の数は、約 2 万 6800 個であると推定されており、これらの遺伝子の機能すべてをヒトにおいてでのみ解析することはほとんど不可能である。そこで現在最も一般的なアプローチ法として用いられているのが、生物間のゲノムを比較する比較ゲノム解析である。比較ゲノム解析で汎用されているマウスのゲノムと、ヒトゲノムとの間には、シンテニーな領域が 90%以上あることが知られている。そのため、マウスゲノムにおける解析から得られた結果と、ヒトゲノムにおいて明らかになっている遺伝学的・生物医学的解析から得られた結果を総合的に解析することにより特定の遺伝子の機能についてより深い理解が得られると考えられている(Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002)。

以上のような理由から、マウスにおける遺伝子機能の解明が盛んに行われており、特に突然変異体（ミュータント動物）の解析が有効であることから、NIH ノックアウトマウス・プロジェクト(KOMP)や欧州条件変異マウス作成プログラム(EUCOMM)などによりマウスの全遺伝子の変異体を作出し、各遺伝子の機能を解析するというようなプロジェクトが組まれている(Morgan H. et al. 2009, Guan C. et al. 2010)。

ゲノム以外にも、解剖学、行動学、生理学など様々な分野においてマウスとの比較解析が行われており、これらの結果から、ヒトの病気の病態や発症機構についてより深い理解が得られ、将来、予防法や治療法の確立におおいに役立つことが期待されている。

ヒトが抱える病気には、がん、急性心筋梗塞、脳卒中といったいわゆる三大疾患から、死には至らないものの、骨粗鬆症や認知症、白内障といった、QOL(生活の質)の低下につながるような病気、また、妊娠を望んでいるカップルの約 10%が問題を抱えているとされている不妊症など様々な病気がある。これらの病気は、多くのヒトが将来患う可能性のある病気であるため、その発症機構や関連する遺伝子について解明することは医学分野においてとても重要であるといえる。

本研究で用いている dwarf grey(DWG)マウスは、アメリカ合衆国 Jackson 研究所で維持されてきた単一劣性遺伝の突然変異マウスである。このマウスは、ホモ(*dwg/dwg*)個体において身体の矮小、毛色の異常、白内障の発症、雌雄の不妊など多数の異常を呈することが明らかにされているが、これらの異常について、詳しいことは報告されていない。一方、原因遺伝子については、マウス第 10 番染色体上に存在することまでは明らかにされているが、候補領域は広く、未だ同定されていない(Harris B. and Davisson M.T. 1990)。

dwg/dwg 個体にみられる異常は、前述したようにヒトにおいてよくみられる病気であり、また、他の生物種においても発症することが知られている病気である。したがって、*dwg/dwg* 個体が呈する表現型やそれらが引き起こされるメカニズムを解明することができれば、これらの病気の予防法や治療法の確立に貢献することができると考えられる。

そこで本研究では、*dwg/dwg* 個体における表現型の詳細の解明と *dwg* の原因遺伝子の同定を目的とし、*dwg/dwg* 個体において異常が見られる組織の組織学的解析と、候補遺伝子の塩基配列の解析を行った。さらに、原因遺伝子の同定後は生殖機能における GGT1 の機能の解明を目的とした解析を行った。

第１章

矮小および白内障に関連する形態学的・組織学的解析

1-1　諸言

ヒトにおける骨系統疾患、白内障については遺伝性のものが多くあるが、その原因遺伝子についてはまだ十分に解析されていない。その要因はヒトでは同一遺伝子異常による症例を研究に用いることが困難である点にある。そのため、遺伝子機能の解明には突然変異体(ミュータント動物)の解析が有効である。

dwarf gray (DWG)マウス(Fig1-1)は、突然変異(*dwg*)をホモに持つ *dwg*/*dwg* 個体において、矮小、白内障、不妊および毛色異常が認められる常染色体劣勢遺伝の遺伝様式をとる突然変異マウスである(Harris B. and Davisson M.T. 1990)。*dwg*/*dwg* 個体に特徴的な異常はヒトの遺伝性低身長症や白内障の有用なモデルとなることが予想されるが、これまでに外観の異常以外はほとんど明らかにされておらず、原因遺伝子もマウス第 10 番染色体上に存在することまでは明らかにされているが、候補領域は広く、未だ同定されていない。DWG マウスを解析することで矮小および白内障の原因を明らかにし、骨の成長や眼球の保護における重要な知見を得ることができると考えられる。

一方で、人為的に *Ggt1* 遺伝子を欠損させた(*Ggt1*^{tm1Zuk})マウス(GGT1 欠損個体)と、化学的に変異を誘導［*N*-ethyl-*N*-nitrosourea(ENU)-induced］したマウス(*Ggt1*$^{enu1/enu1}$ 個体)がこれまでに作製されている。これらのマウスは、矮小、白内障、不妊、毛色異常、早期死亡を共通の表現型として呈しており(Lieberman M.W. et al. 1996, Harding C.O. et al. 1997, Jean J.C. et al. 1999)、矮小、白内障、不妊、毛色異常を呈する点が *dwg*/*dwg* 個体における表現型と類似している。さらに、*Ggt1* 遺伝子は *dwg* の候補遺伝子が存在するとされる領域内に位置しており、有力な候補遺伝子として考えられた。

そこで本研究では、*dwg*/*dwg* 個体の骨格の形態を調べるとともに骨および眼球の白内障の病態を組織学的に明らかにし、*dwg* 遺伝子座の原因遺伝子を同定することを目的として、候補となる遺伝子(*Ggt1* 遺伝子)との関連を調べた。

1-2　材料および方法

●系統維持

dwarf grey(*dwg*)は、アメリカ合衆国 Jackson 研究所で維持されているマウスにおいて発見された自然発生の突然変異である。同研究所より導入後、*dwg* ヘテロ（*dwg/+*）個体同士の交配を元に、以後得られた同腹の *dwg/+*個体同士を兄妹交配させることにより系統の維持を行った。

●飼育条件

飼育は、温度 23±3℃、湿度 50±10%、12 時間明暗周期(8:20～20:20)の環境下で行った。飼育密度は 1 ケージ当たり 3～6 匹とした。飼料はマウス・ラット･ハムスター用固形飼料 CE-2(日本クレア)を用い、水道水とともに自由給餌・給水で飼育維持を行った。

●遺伝子型の判別

まず、*dwg/+*個体同士を兄妹交配させることにより得られた同腹個体のうち、毛色がアグーチの個体同士を兄妹交配させ、得られた仔に毛色がグレーである *dwg/dwg* 個体が含まれていた場合に、その両親を *dwg/+*個体とした。

塩基配列の解析により *Ggt1* 遺伝子の第 7 エクソン内に 13 塩基の欠損が存在したことから、この領域を挟むようにして正常個体において 256 塩基のバンドが増幅されるプライマーを設計し、PCR 反応を行うことで遺伝子型を判別した。すなわち、256 塩基のバンドのみが検出されたものを野生型(+/+)個体、237 塩基のバンドのみが検出されたものを *dwg/dwg* 個体、両方が検出されたものを *dwg/+*個体とした。また、*dwg/dwg* 個体は毛色がグレーを示すため、外観による判別も参考にした。

●試供動物

上記の系統維持のうち *dwg/+*個体同士の兄妹交配によって得られた正常(野生型、*dwg/+*)個体、および *dwg* ホモ(*dwg/dwg*)個体を解析に用いた。

●と殺方法

実験に用いた個体を含め、実験動物のと殺は、動物にできる限り苦痛を与えないように二酸化炭素の吸入により安楽死させた。また、新生児など二酸化炭素でのと殺が困難な場合および組織学的解析を行う場合は、劇物・毒物の使用基準に基づいてジエチルエーテルを使用し、その吸入により安楽死させた。

●DNA 抽出

・フェノールを用いた方法

マウスの耳介または尾の先端を微量採取し DNA 抽出に用いた。採取した組織片に 100μl の NP-40 buffer〔140mM 塩化ナトリウム、10mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、100mM トリス塩酸(pH8.0)、0.5%ノニデット-40〕と 100μl の 2×SDS buffer〔20mM EDTA(pH8.0)、200mM 塩化ナトリウム、2%ラウリル硫酸塩〕を加えた。そこに、8μl のプロテナーゼ K(100mg/ml)と 2μl の RNase(100mg/ml)を加えて攪拌し、55℃で一晩反応させた。翌日、1/20 量(10μl)の 3M 酢酸ナトリウム溶液(pH5.5) と、等量(200μl)のフェノール/クロロホルム（飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝25：24：1）を加えて、10 分間浸透した後、12000rpm、室温で 10 分遠心した。遠心後、上清を別のチューブに回収し、2 倍量(400μl)の 100%エタノールを加えて軽く攪拌したあと、12000rpm、4℃で 5 分間遠心した。その後、上清を捨て、4℃に冷やした 70%エタノールを加え、軽く攪拌して DNA の沈殿を洗浄し、12000rpm、4℃で 5 分間遠心した。遠心後、上清を除去して自然乾燥させた後、20μl の TE 溶液〔10mM トリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)〕を加えて DNA を溶解させ、4℃で保存した。

・Ampdirect® Plus を用いた方法

フェノールを用いると、純度が高く保存性にも富んだ DNA が得られる一方で、抽出に時間がかかり安全面にも注意しなければならない。そこで、系統維持や実験に用いた動物の遺伝子型判別など、DNA の純度にさほど影響されない実験に関しては、安易かつ安全な Ampdirect® Plus (島津製作所) を使用した。

マウスの耳介または尾の先端を微量採取し、100µl の組織溶解液(SNET)〔20mM トリス塩酸(pH8.0)、5mM EDTA (pH8.0)、400mM 塩化ナトリウム、0.3% SDS〕と 2µl のプロテナーゼ K(10mg/ml) を混合した溶液中に入れ、55℃で 2 時間以上反応させた。反応後、軽く遠心して毛などの不純物を除き、残りの上清を 10 倍希釈して PCR 反応に用いた。

反応は、0.5×Ampdirect® Plus(島津製作所)、0.2µM（フォワード、リバース）プライマー、Taq DNA ポリメラーゼ(Amersham Bioscience) に DNA を加えて、10µl を調整して行った。詳しい方法に関しては株式会社島津製作所のホームページ(http://www.shimadzu-biotech.jp/index.html) を参考にした。

●骨格標本の作製

6 ヶ月齢の野生型個体および *dwg/dwg* 個体について、アルシアンブルー・アリザリンレッド染色により骨格標本を作製した。これにより、軟骨部分は青に、石灰化した骨組織は赤に染色される。

マウスを二酸化炭素により安楽死させた後、全身の皮膚、内臓、骨格筋、脂肪を除去し、95%エタノールで 1~2 日間固定した。その後、95%エタノールを除去し、アルシアンブルー染色液〔0.015% アルシアンブルー8GX (和光純薬)、80%エタノール、20%酢酸〕を加えて 1~2 日間染色した。次にアルシアンブルー染色液を除去し、95%エタノールで 2~5 時間再固定した。95%エタノールを除去し、アリザリンレッド染色液〔0.015% アリザリンレッド S(和光純薬)、1%水酸化カリウム〕で 1~3 日間染色した。その後アリザリンレッド染色液を除去し、1%水酸化カリウム水溶液/20%グリセロール溶液に標本を浸すことで脱色と透明化を開始した。溶液が汚れたら適宜液換えを行った。透明化が完了したら、50%グリセロール/PBS 溶液にて保存した。

●組織標本の作製

・組織の固定、脱灰、脱水、包埋、薄切

マウスをジエチルエーテルにより安楽死させた後、血管を傷つけないようにすばやく心

臓を剥き出した。その後、右心房につながる上大静脈を切断することで放血し、左心室から 0.9%NaCl(生理食塩水)を注入した。十分に 0.9%NaCl を注入した後、続けて 4%パラホルムアルデヒド固定液(パラホルムアルデヒド、1×PBS)を注入することにより、すばやく全身を固定した。その後、臓器を摘出し、ブアン固定液(ピルビン酸飽和水溶液：ホルマリン：酢酸=15:5:1) に 24～36 時間浸漬固定した。その後、固定液を除去し、1×PBS で 3～4 回洗浄した。その後、70%、80%、90%、95%、99.5%槽に各 1 時間ずつ浸し、硫酸銅入りの無水エタノール槽で一晩脱水処理を行った。続いて、キシレン（100%）溶液層に各 1 時間ずつ 3 回浸漬しエタノールと置換させた。その後、62℃に設定された恒温器内のキシレン溶液：パラフィン溶液＝1：1 で混合した溶液槽に移して 1 時間浸漬し、続いて 100%パラフィン溶液槽 2 槽に各 1 時間浸漬した後、サンプルをパラフィンで包埋し、ブロックを作製した。パラフィンブロック包埋したサンプルは 5μm の厚さで薄切し、スライドグラスに乗せ、37℃のパラフィン伸展器において一晩乾燥させた。

・脛骨の固定、脱灰、脱水、包埋、薄切

マウスをジエチルエーテルにより安楽死させた後、血管を傷つけないようにすばやく心臓を剥き出した。その後、右心房につながる上大静脈を切断することで放血し、左心室から 0.9%NaCl(生理食塩水)を注入した。十分に 0.9%NaCl を注入した後、続けて 4%パラホルムアルデヒド固定液(パラホルムアルデヒド、1×PBS)を注入することにより、すばやく全身を固定した。その後脛骨を摘出し、余分な皮膚や筋肉を除去して、4%パラホルムアルデヒド固定液に 24～36 時間浸漬固定した。その後固定液を除去し、1×PBS で 3～4 回洗浄し、10%EDTA（pH7.3）〔EDTA(同仁化学)、水酸化ナトリウムにて pH7.3 に調整〕により脱灰を行った。3～5 週齢個体で 2~3 週間行い、3~4 日に一度脱灰液を交換した。メスにより容易に切れる程度まで軟化したことを確認できたら、10%EDTA（pH7.3）を除去し脱灰を終えた。その後、1×PBS で 3～4 回洗浄し、70%、80%、90%、95%、99.5%槽に各 1 時間ずつ浸し、硫酸銅入りの無水エタノール槽で一晩脱水処理を行った。続いて、キシレ

ン（100%）溶液槽に各 1 時間ずつ 3 回浸漬し、最後の槽で一晩浸漬処理を続けた。その後、62℃に設定された恒温器内のキシレン溶液：パラフィン溶液＝1：1 で混合した溶液槽に移して 1 時間半～2 時間浸漬し、続いて 100%パラフィン溶液槽 2 槽に各 1 時間半～2 時間浸漬した後、サンプルをパラフィンで包埋し、ブロックを作製した。パラフィンブロック包埋したサンプルは 5μm の厚さで薄切し、スライドグラスに乗せ、37℃のパラフィン伸展器において一晩乾燥させた。

・ヘマトキシリン・エオジン（H.E.）染色

H.E.染色は、まず 3 槽のキシレン（100%）槽に各 5 分ずつ通すことで脱パラフィンを行った。次に 2 槽の 100%エタノール槽に各 3 分ずつ通し、その後 95%、90%、80%、70%エタノール槽に 3 分ずつ通すことで脱キシレンを行い、最後に蒸留水に通し、脱アルコールと洗浄を行った。続いて、ヘマトキシリン溶液〔1.0g/l ヘマトキシリン、0.2g/l ヨウ素酸ナトリウム、50.0g/l カリウムミョウバン、50.0g/l 抱水クロラール、1.0g/l 結晶性クエン酸(1 水和物)〕に 5 分浸した。染色後、10 分間流水洗浄を行い、核の調色および色だしを行った。洗浄終了後、エオジン溶液〔0.25%エオジン Y、0.05%酢酸、60%エタノール〕に 1 分間浸し、線維および間質等の染色を行った。その後、水道水及び蒸留水中で余分なエオジン溶液を洗浄した。続いて脱水とエオジンの脱色のため、70%、80%、90%、95%エタノール各槽に脱色具合を見ながら出し入れし、その後、100%エタノール 2 槽に各 1 分浸した。脱水後、透徹および封入のため 3 槽の 100%キシレン溶液槽に各 5 分ずつ浸し、エントランニューで封入した。

・TRAP 染色

破骨細胞が主に生産する酒石酸ホスファターゼを特異的に染色する方法である。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ及びアルカリホスファターゼの酵素活性染色用 TRAP/ALP 染色キット(和光純薬工業株式会社)を使用した。

まず、3 槽のキシレン(100%)槽に各 5 分ずつ通すことで脱パラフィンを行った。次に 2

槽の 100%エタノール槽に各 3 分ずつ通し、その後、95%、90%、80%、70%エタノール槽に 3 分ずつ通すことで脱キシレンを行い、最後に蒸留水に通し、脱アルコールと洗浄を行った。次に、蒸留水を含ませたペーパータオルの入った湿潤箱の中で、スライドグラスの水をよく切った上で組織を Liquid blocker で丸く囲み、組織が乾燥しないよう 1×PBS をスポイトで 1 滴ずつ組織上に滴下した。その後、染色試薬〔酒石酸溶液：酸性ホスファターゼ基質液 A：酸性ホスファターゼ基質液 B＝10：90：1〕を調整し、使用直前まで氷上に静置した。この際、酸性ホスファターゼを加えると、すぐに反応が始まるため、酸性ホスファターゼは使用直前に加えた。組織上の 1×PBS を除去し、調整した染色試薬を滴下し、室温にて 20～30 分間静置した。反応が進まない場合は、37℃インキュベータにて静置した。顕微鏡下で染色が確認できたら反応を止め、蒸留水で水洗した。その後、1×PBS で 100 倍希釈した 5%メチルグリーン染色液(武藤化学株式会社)で 5 分間カウンター染色を行い、水道水及び蒸留水中で余分なメチルグリーン染色液を洗浄した。続いて脱水のため、70%、80%、90%、95%、100%エタノール 2 槽に脱色具合を見ながら出し入れした。脱水後、透徹及び封入のため 2 層の 100%キシレン溶液槽に脱色具合を見ながら出し入れし、1 槽の 100%キシレン溶液槽に 1 分浸した後に、エントランニューで封入した。キシレンでの TRAP の脱色が激しいので、最後の 100%キシレン溶液槽も場合によっては、出し入れするのみで終了させた。また退色が激しいので、染色後すぐに写真撮影を行った。詳しい染色方法に関しては、添付の説明書を参考にした。

染色した破骨細胞数の測定法に関しては、骨梁の周囲長あたりの破骨細胞数を計測し、結果は T-TEST により統計処理を行った。

1-3　結果

*dwg/+*個体同士の兄弟交配により得られた *dwg/dwg* 個体は、生後 5 日齢において体長および身長に同腹の他の兄弟と差異はない(Fig 1-1 A)。しかし、生後 2 週齢ごろから徐々に成長の遅れが見られ始め、成体となる時期までには明らかな矮小を示すようになった(Fig 1-1 B,C)。

まず、小型化する原因と骨格における異常の有無を明らかにするために、*dwg/dwg* 個体とその同腹の野生型個体について、アルシアンブルー・アリザリンレッド染色により全身の骨格標本を作製し、比較した。軟骨は青色に、石灰化した骨は赤色へと染色されるが、その染色パターンに違いは認められず、*dwg/dwg* 個体は骨の位置や数に異常は認められなかった。しかし、*dwg/dwg* 個体は野生型個体に比べ明らかに小さく (Fig 1-2 A)、また、骨の成長不全は、椎骨だけでなく大腿骨や脛骨においても認められた(Fig 1-2 B, C)。これら以外に、*dwg/dwg* 個体の骨格の外観の異常は観察されなかった。長管骨の成長には、成長板において連続して同時に起こる、静止軟骨細胞、増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞へと進む軟骨細胞の分化過程が重要である。そこで、*dwg/dwg* 個体において骨が成長不全となる原因を明らかにするために、脛骨の近位側にある成長板の組織標本を作製し、軟骨細胞の表現型を調べた。その結果、*dwg/dwg* 個体の脛骨成長板は同腹の野生型個体に比べ、その厚みが明らかに減少していた。さらに、*dwg/dwg* 個体の増殖軟骨細胞層は薄く、肥大軟骨細胞の数も顕著に減少していた(Fig 1-2 D)。また、*dwg/dwg* 個体における破骨細胞数を評価するために TRAP 染色を行い、脛骨の骨梁上に存在する TRAP 陽性の破骨細胞数を数え、骨梁 1mm あたりの破骨細胞数を野生型個体と比較した。その結果、*dwg/dwg* 個体では破骨細胞数が野生型個体と比較して、約 1.4 倍に増加していることが明らかとなった(Fig 1-3 A-C)。

dwg/dwg 個体では、生後 3 週齢になると外観の観察から眼球が不透明になる様子が認められる(Fig 1-4 B)。そこで生後 3 週齢において組織学的解析を行ったところ、*dwg/dwg* 個

体では水晶体上皮付近に小さな空胞が形成されている様子が観察された(Fig 1-4 D)。生後 9 週齢には、水晶体の皮質領域の空胞は膨れ、ほとんどの水晶体線維は変性していた(Fig 1-4 F)。一方野生型個体および *dwg/+*個体では、このような水晶体における組織学的変化は、生後 3 週齢、9 週齢のどちらでも認められなかった(Fig 1-4 C,E)。

1-4　考察

本研究では組織学的解析により、*dwg/dwg* 個体では成長板の厚みが減少していることが明らかとなり、これはヒトやマウスにおける骨の成長不全により矮小となる病理学的特徴として良く認められる(Newman B. and Wallis G.A. 2003)。*dwg/dwg* 個体の成長板で認められた異常で増殖軟骨細胞と肥大軟骨細胞の減少があるが、これらは GGT1 欠損個体の成長板で認められた異常と類似している(Levasseur R. et al. 2003) (Fig 1-5 D, F)。さらに、*dwg/dwg* 個体では脛骨成長板の骨梁の稜線上に存在する破骨細胞数が増加していたことから、骨粗鬆症を呈していることが予想され、この病態についても GGT1 欠損個体で発症することが報告されている(Levasseur R. et al. 2003)。一方、*dwg/dwg* 個体では白内障の進行が生後 3 週齢頃から始まり、生後 9 週齢になっても *dwg/dwg* 個体における異常は水晶体の皮質繊維に限定され、皮質の空胞化のみが認められる。GGT1 欠損個体における進行性の白内障の病態は、生後 1 週齢頃には白内障の進行が始まり、異常が認められる範囲も水晶体の皮質繊維だけでなく核にまで広がっていることが報告されている。そのため、GGT1 欠損個体と比較すると *dwg/dwg* 個体の症状は軽症であることが考えられた (Chévez-Barrios et al. 2000) (Fig 1-6 C-F)。

これらのことから、進行性の白内障の重症度に違いはあるものの、骨の成長不全の原因となっていると考えられる成長板の病態および破骨細胞数の増加が GGT1 欠損個体と非常に類似しているため、*dwg* アレルでは *Ggt1* 遺伝子上に変異が起きていることが予想された。

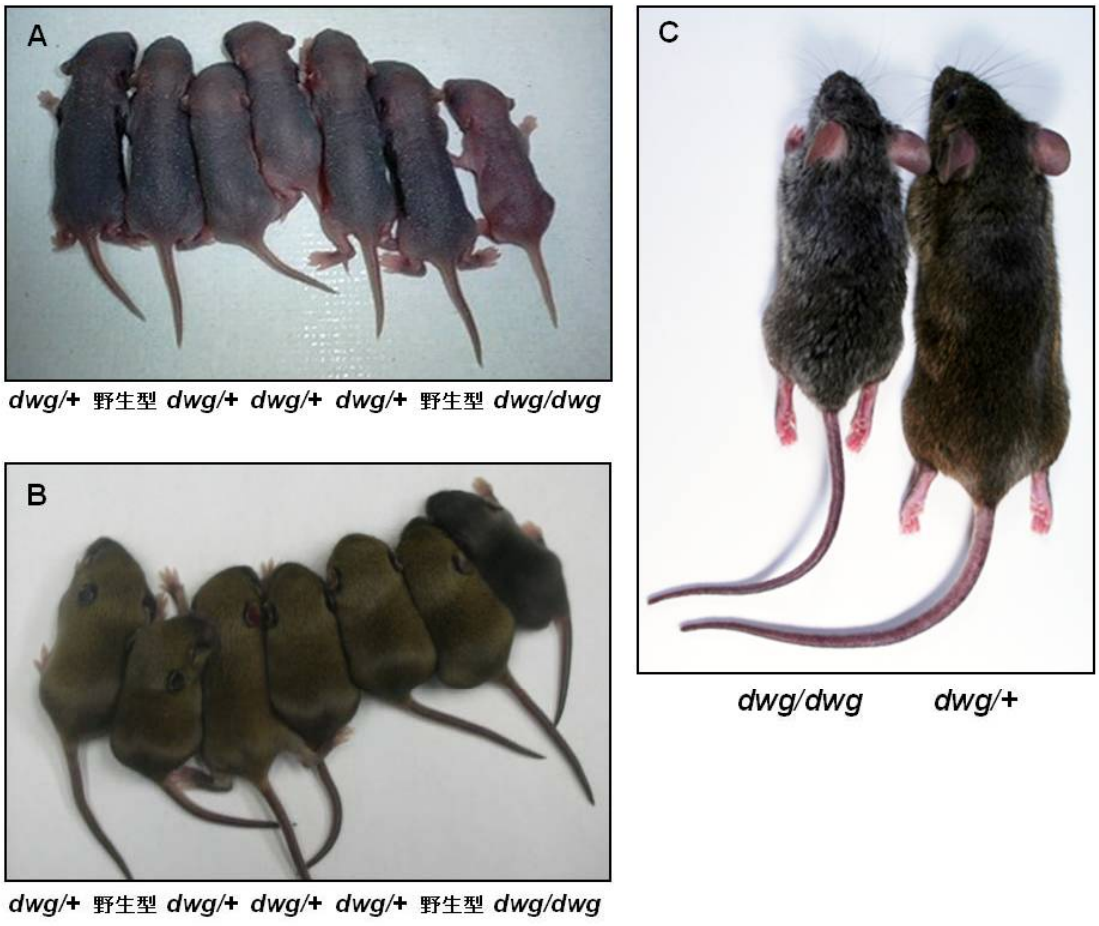


Figure 1-1. 全身の外観の比較

生後5日齢では外観の差はないが生後2週齢頃には矮小を示し始め、成体になると顕著な矮小となっている。
(A)生後5日齢、(B)生後2週齢、(C)生後6カ月齢の野生型個体、*dwg/+*個体および*dwg/dwg*個体。

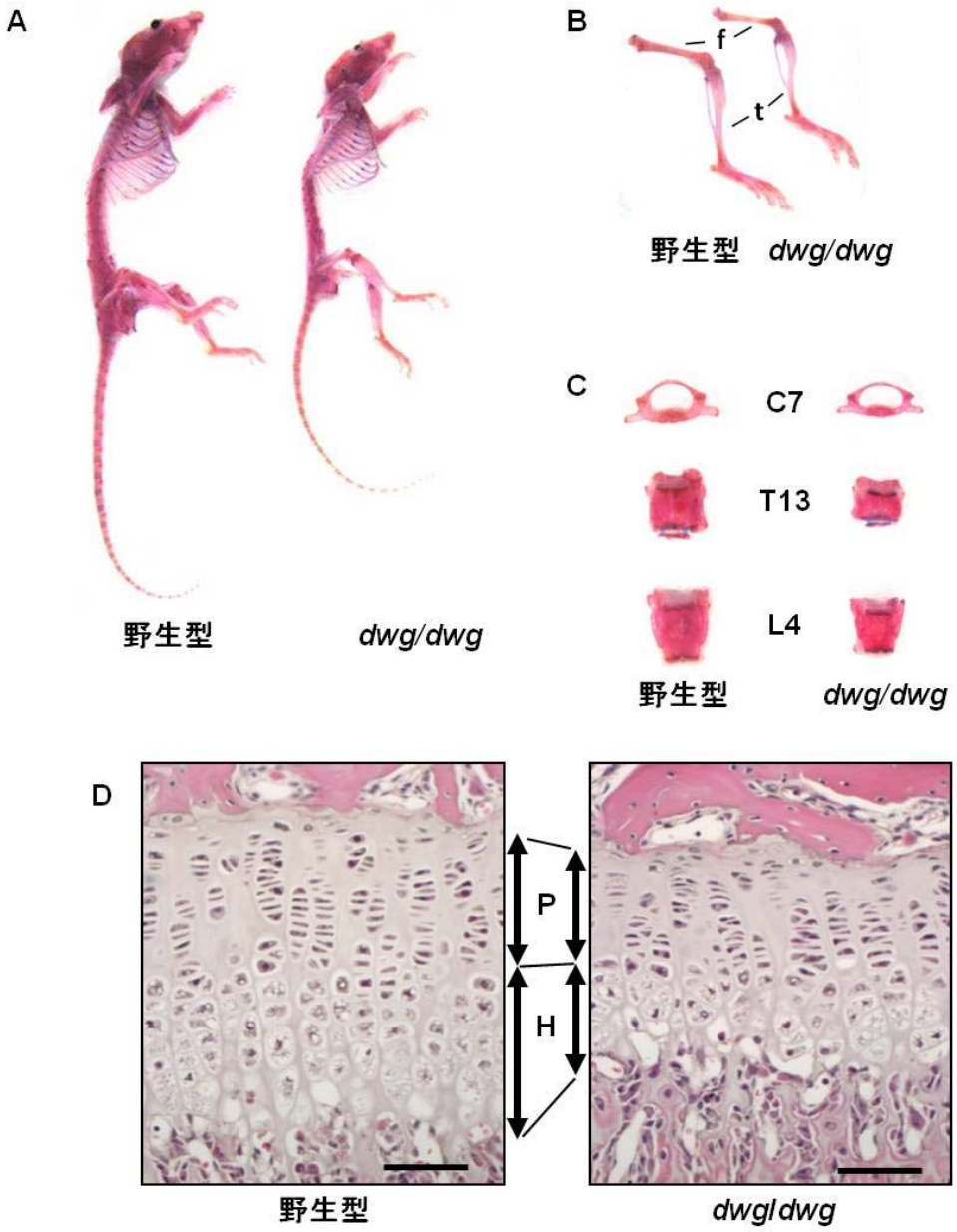
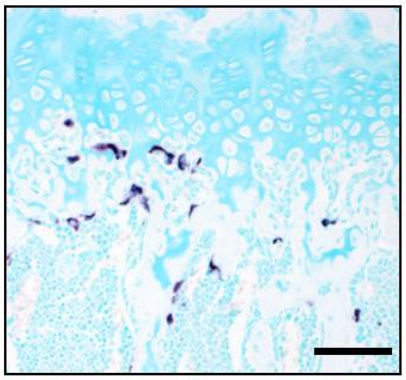


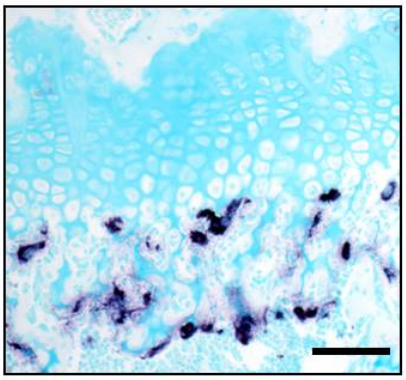
Figure 1-2. 骨格標本および脛骨成長板の組織標本(H.E.染色)

野生型個体および*dwg/dwg*個体の生後25週齢における(A)全身の骨格標本、(B)後肢、(C)椎骨、(D)生後4週齢における骨端の脛骨成長板。
f, 大腿骨; t, 脛骨; C7, 第7頸椎; T13, 第13胸椎; L4, 第4腰椎; P, 増殖軟骨細胞層; H, 肥大軟骨細胞層。Bar=50μm

A



B



C

	野生型	*dwg/dwg*
破骨細胞数(/mm)	4.31±0.08	5.89±0.61*

Figure 1-3.　TRAP染色よる脛骨成長板における破骨細胞数の測定

TRAP染色を行った組織標本(A)野生型、(B)*dwg/dwg;* Bar=100μm。
(C)野生型および*dwg/dwg*の各3個体の骨梁周囲の長さ1mmあたりの破骨細胞数を計測した。破骨細胞数の平均値±SD、*$p < 0.05$。

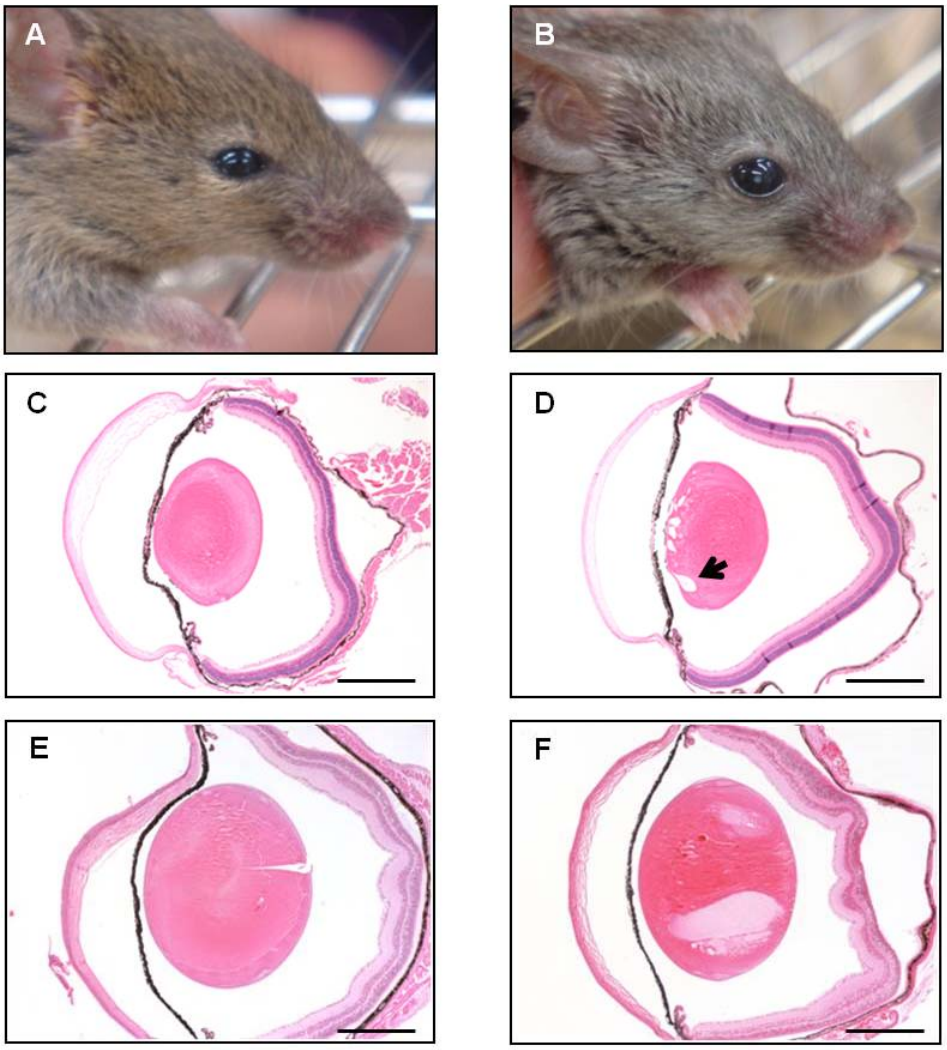


Figure 1-4. 頭部の外観と眼球の組織標本(H.E.染色)

*dwg/dwg*では生後3週齢ごろから水晶体線維内に空胞が現れ、生後9週齢以降では水晶体繊維の大半が崩壊、または、液状化する。
生後3週齢(A,B,C,D)、8週齢(E,F) 、野生型(A,C,E)、*dwg/dwg*(B,D,F)、Bar=500μm、矢印は水晶体繊維上の空胞を示す。

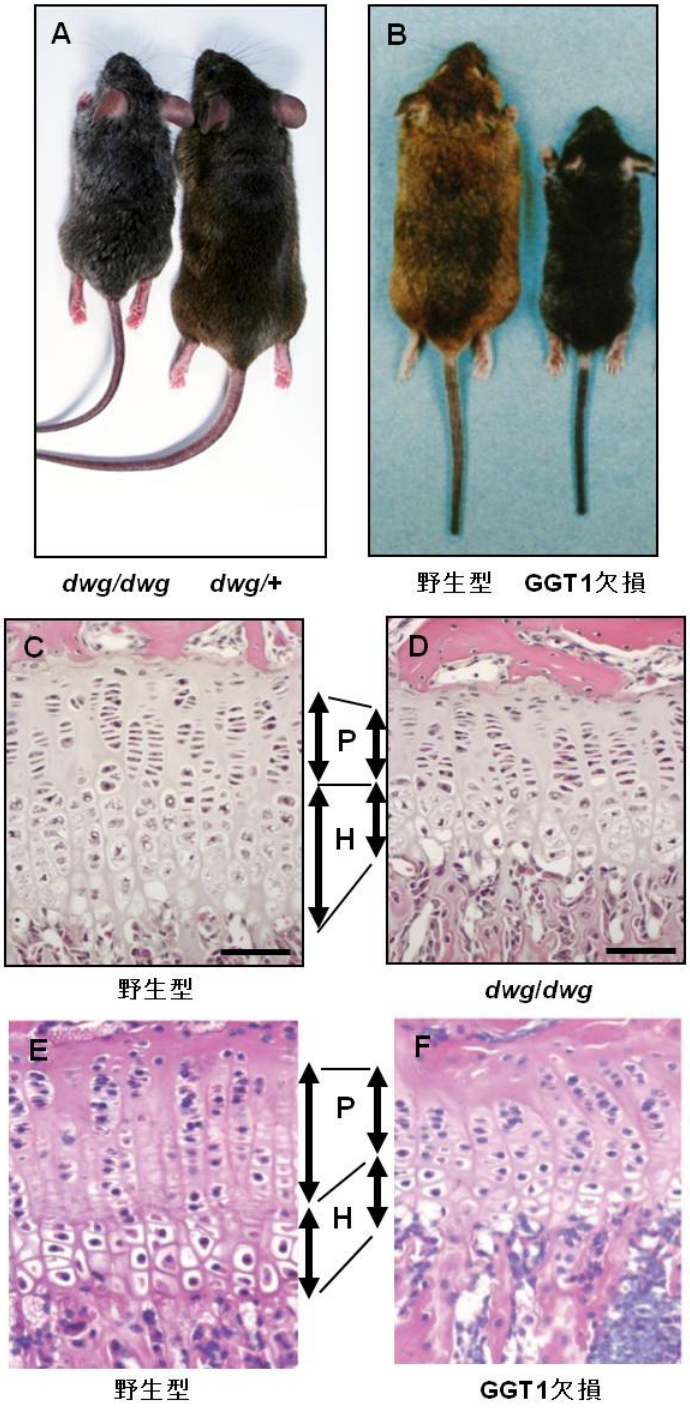


Figure 1-5. *dwg/dwg*個体とGGT1欠損個体の比較

*dwg/dwg*個体とGGT1欠損個体の脛骨成長板における異常は類似している。DWGマウス(A,C,D)とGGT1欠損マウス(B,E,F)、全身の外観(A,B)、生後4週齢の脛骨成長板(C,D)、生後6週齢の脛骨成長板(E,F)、P, 増殖軟骨細胞層; H, 肥大軟骨細胞層。Bar=50μm

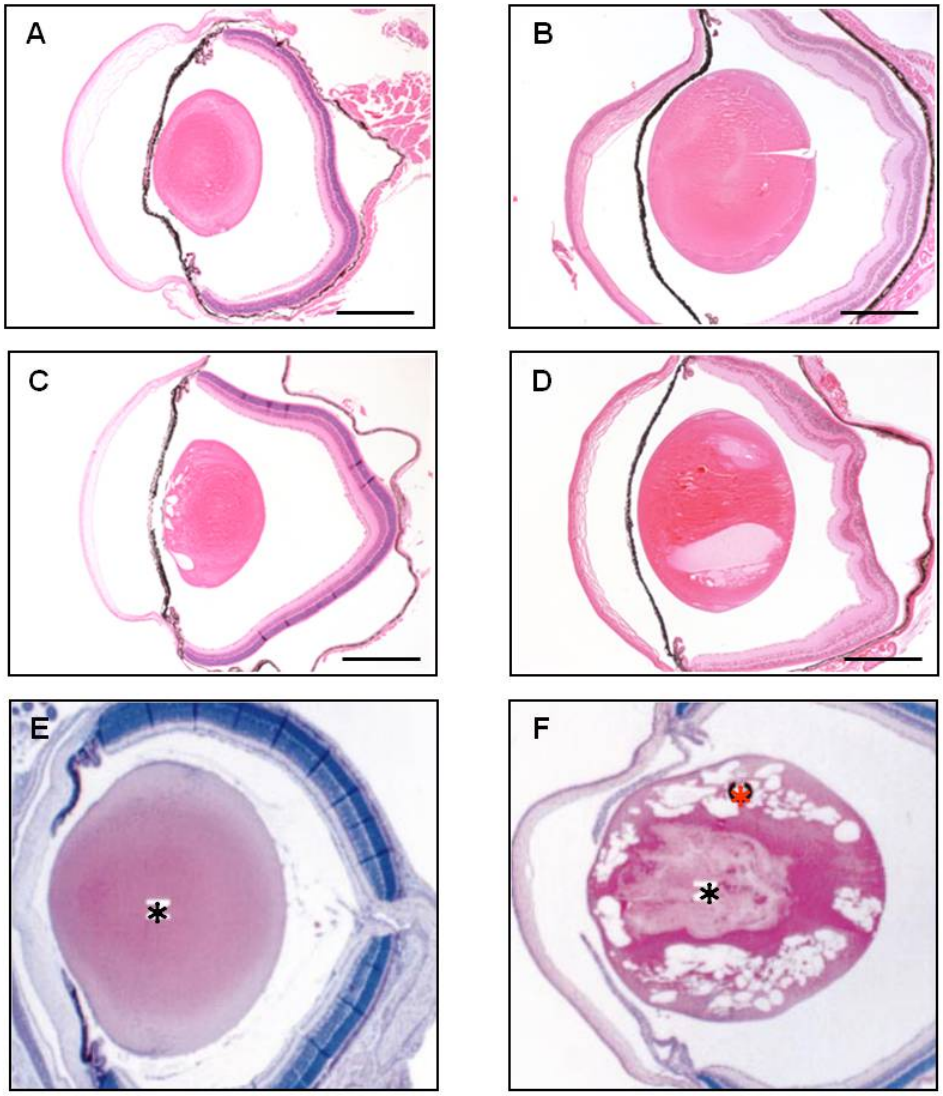


Figure 1-6.　*dwg/dwg*個体とGGT1欠損個体の比較-2

*dwg/dwg*個体とGGT1欠損個体とで白内障の重症度は異なるものの、どちらも進行性の皮質白内障と核白内障を発症する。
野生型(A,B)、*dwg/dwg*個体(C,D)、GGT1欠損個体(E,F)、生後3週齢(A,C,F)、生後9週齢(B,D)、生後1週齢(E)、Bar=500μm。＊は核の領域を、＊は皮質の領域を示す。

第 2 章

原因遺伝子の同定に向けた塩基配列の解析

2-1　諸言

Ggt1 遺伝子は *GGT* 遺伝子ファミリーの一つで、γ-glutamyl transferase 1 (GGT1) をコードしている。*GGT* 遺伝子ファミリーは少なくともマウスでは 4 遺伝子、ヒトでは 13 遺伝子がこれまでに同定されている(Heisterkamp N. et al. 2008)。GGT1 は、細胞膜へ結合する部位である heavy chain と機能部位である light chain の 2 つのドメインをもち、抗酸化作用を持つグルタチオン(GSH)の代謝に重要な酵素である。細胞外の GSH はγ-グルタミル回路において、はじめに GGT によりγ-グルタミル複合体とシステイニルグリシンへと分解され、システイニルグリシンはさらにシステインとグリシンへと分解される。これらのアミノ酸は、細胞内へと運ばれ、最終的に細胞内のγ-グルタミル回路における GSH 合成に使用される(Fig 2-1)。GSH を分解できる酵素は、マウスでは GGT1 と GGT5 しか報告されておらず、GSH の再合成において GGT1 が重要な役割を持っていると考えられている(Lieberman M.W. et al. 1995, Tate S.S. and Meister A.1981)。さらに、GGT の酵素活性は肝臓や胆嚢の病気の指標とされていることからわかるように、すでに GGT の酵素活性測定法が医療技術として定着しているため、GGT の新たな機能を明らかにすることができれば医療分野に貢献できることが期待される。

これまでにジーンタゲッティング法により *Ggt1* 遺伝子を破壊することで作成された GGT1 欠損マウスが、GSH およびシステインの恒常性の維持における GGT1 の機能を調べるために研究に用いられている(Rojas E.et al. 2000, Will Y.et al. 2000)。さらに、これらの研究成果から、ヒトにおける同様の病気との関連性も明らかにされている(Dalton T.P. et al. 2004, Lieberman M.W. et al. 1995)。*GGT* 遺伝子ファミリーの機能異常と病態との明確な

関連を示す証拠はないものの、遺伝的に GGT を欠損し、かつグルタチオン尿症やグルタチオン血漿、精神疾患などの病態を示す患者がこれまでに数例報告されている(Hammond J.W. et al. 1995, Iida M. et al. 2005)。

以上のことから、GGT1 の正確な生理学的役割を明らかにし、ヒトにおける GGT の欠損と病態との関連を解明するためには *GGT*遺伝子ファミリーに変異を持つマウスのような適切なモデル動物を用いた研究が必要である。

dwarf grey (*dwg*) は、マウスにおいて発見された突然変異であり、*dwg* をホモに持つ個体(*dwg/dwg*)では、矮小、毛色異常、進行性の白内障、雌雄不妊を発症する(Harris B. and Davisson M.T. 1990)ことが報告されている。これまでに *dwg/dwg* 個体では、長管骨の伸長に重要な成長板を構成する軟骨細胞が減少していることと、生後 3 週齢頃から進行性の白内障を発症していることを明らかにしている。興味深いことに、*dwg/dwg* 個体で認められた矮小と白内障の病態は GGT1 欠損個体および *Ggt1*$^{enu1/enu1}$ 個体で認められる異常と類似しており、さらに *dwg* の遺伝子座と *Ggt1* 遺伝子座はどちらもマウス第 10 番染色体上に存在することも明らかとなっている(http://www.informatics.jax.org/)。これらのことから、*dwg* アレルでは *Ggt1* 遺伝子上に変異が起きていることが予想された。

そこで本研究では、*dwg/dwg* 個体の *Ggt1* ゲノム DNA および *Ggt1*cDNA の塩基配列の解析を行うことで、*dwg* の原因遺伝子が *Ggt1* 遺伝子であるかを調べた。

2-2　材料および方法

●試供動物

*dwg/+*個体同士の兄妹交配によって得られた正常(野生型、*dwg/+*) 個体、および *dwg* ホモ(*dwg/dwg*)個体を解析に用いた。

■*Ggt1* ゲノム DNA の塩基配列の解析

●DNA 抽出

マウスの肝臓を採取し DNA 抽出に用いた。採取した組織片を 2 本の 1.5ml チューブに分け、それぞれに 100μl の NP-40 buffer〔140mM 塩化ナトリウム、10mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、100mM トリス塩酸(pH8.0)、0.5%ノニエッド-40〕を加え、簡易ホモジェナイザーを用いて組織をすりつぶした。すりつぶした後、各チューブに 100μl の NP-40 buffer と 200μl の 2×SDS buffer〔20mM EDTA(pH8.0)、200mM 塩化ナトリウム、2%ラウリル硫酸塩〕を加えた。その後、2 本の 1.5ml チューブに入っているサンプルを、1 本の 15ml チューブにまとめた。空になった 1.5ml チューブはそれぞれ 1ml の NP-40 buffer で共洗いをし、すでにサンプルを入れている 15ml チューブに回収した。サンプルが入っている 15ml チューブに、さらに 2ml の 2×SDS buffer と 150μl のプロテナーゼ K(100mg/ml)を加えて攪拌し、55℃で一晩反応させた。翌日、40μl のプロテナーゼ K を加えて撹拌し、55℃でもう一晩反応させた。等量(5ml)のフェノール/クロロホルム〔飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝25：24：1〕を加えて、5 分間撹拌した後、9000rpm、4℃で 10 分遠心した。遠心後、上清を別の 15ml チューブに回収し、等量(5ml)のフェノール/クロロホルムを加えて、5 分間撹拌した後、10000rpm、4℃で 10 分遠心した。遠心後、再度上清を別の 15ml チューブに回収し、2ml のクロロフォルム･イソアミルアルコール〔クロロホルム：イソアミルアルコール＝24：1〕を加え、撹拌した。撹拌後、10000rpm、4℃で 10 分遠心し、上清を 100%エタノールと 200μl の 3M 酢酸ナトリウム(pH5.5)が入った新しい 15ml チューブに移した。その後、白い沈殿物が出てくるまで軽く転倒勾配し、沈殿物

をチップですくい取り、2ml の 70%エタノールが入った新しい 15ml チューブに入れる。5 分程度軽く攪拌して DNA の沈殿物を洗浄し、再度沈殿物をチップですくい取り、空の新しい 15ml のチューブに入れ、自然乾燥させる。乾燥後、1.5~3ml の TE 溶液〔10mM トリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)〕を加えて DNA を溶解させ、4℃で保存した。

●プライマーの設計

dwg の原因遺伝子の候補として考えられた、*Ggt1* 遺伝子の全エクソンを挟むようにフォワードおよびリバース方向にそれぞれ約 500～600 塩基ごとと、それに加え必要に応じてプライマーを設計した(Table 2-1)。塩基配列情報は NCBI データベース(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)のマウスゲノム配列より取得した。

●PCR

まず PCR 反応溶液〔1×PCR buffer、0.2mM dNTP、0.2μM (フォワード、リバース)プライマー、*Taq* DNA ポリメラーゼ(Amersham Bioscience)〕に DNA を加えて、80μl を調整した。DNA を鋳型として、*dwg* の候補遺伝子である、*Ggt1* 遺伝子に設定したプライマーを用いて、PCR 反応を行い DNA が合成されていることを確認した。反応条件は、まずホットスタート、94℃、5 分の熱変性により二本鎖 DNA を解離させた。続いて 94℃熱変性 30 秒、58-60℃アニーリング 30 秒、72℃伸長反応 30-90 秒を 20 サイクル行うことにより、特異的な配列を指数関数的に増幅させた。最後に 72℃5 分の伸長反応をさせた。その後、吸光度を測定して DNA 増幅断片の濃度を測定し、1μl を滅菌水で 10μl にメスアップして 1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、DNA の増幅を確認した。保存は 4℃にて行った。

●クローニング

＊一組のプライマーセットから複数の増幅断片が得られた場合のみ行った。

・切り出し

PCR 反応により得られた DNA 増幅断片 78μl を 1%Low Melting アガロースゲルにて電気泳動し、予想されたサイズの増幅断片を切り出した。切り出した断片を小さめのピース

に切り、1.5ml チューブに入れ、65～67℃のウォーターバスで 10 分間あたため、溶かした。その後、全量が 0.5ml になるまで TE 溶液〔10mM トリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)〕でメスアップし、再度 65～67℃のウォーターバスで 10 分間あたためた。続いて、飽和フェノール 500μl を加え、よくボルテックスをした後、12000rpm、室温で 5 分遠心した。遠心後、上清を新しい 1.5ml チューブに移し、12000rpm、室温で 5 分遠心した。その後、上清を新しい 1.5ml チューブに移し、等量(500μl)のフェノール/クロロホルム（飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝25：24：1）を加え、ボルテックスをした後、12000rpm、室温で 5 分遠心した。遠心後、上清を新しい 1.5ml チューブに移し、等量(500μl)のクロロホルムを加え、ボルテックスをした後、12000rpm、室温で 5 分遠心した。その後、上清を新しい 1.5ml チューブに移し、2 倍量(1000μl)の 100%エタノールと、1/10 量(50μl)の 3M 酢酸ナトリウム溶液(pH5.5)を加えて軽く攪拌したあと、12000rpm、4℃で 20 分間遠心した。遠心後、上清を捨て、4℃に冷やした 70%エタノールを加え、軽く攪拌して DNA の沈殿を洗浄し、12000rpm、4℃で 5 分間遠心した。遠心後、上清を除去して自然乾燥させた後、10μl の TE 溶液を加えて DNA を溶解させた。その後、吸光度を測定して total DNA の濃度を測定し、0.5μl の DNA 溶液を滅菌水で 10μl にメスアップして 0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、total DNA の精製度と有無を確認した。保存は 4℃にて行った。

・ライゲーション反応(pGEM®-T)

pGEM®-T　Easy Vector を溶解させ、軽く遠心をすることで内溶液をチューブの底に集めた。また、2×Rapid Ligation Buffer をボルテックスすることでよく攪拌した。その後、ライゲーション反応液〔2×Rapid Ligation Buffer:5μl、pGEM®-T　Easy Vector:1μl(50ng)、DNA 溶液 3μl、T4 DNA Ligase(3 Weiss units/μl):1μl〕を調整し、ピペッティングにより攪拌した。攪拌後、室温にて 1 時間または、4℃にて 16 時間以上静置した。

・形質転換

LB寒天培地〔蒸留水500mlに対して、TRYPTON:5g、YEAST EXTRACT :2.5g、NaCl:5g、寒天:7.5g〕を必要枚数分用意し、恒温器(37℃)で乾燥させた。次に、Competent cellを氷上にて素早く溶かし、新しい1.5mlチューブにライゲーションサンプルと共に加えた後、氷上で30分間静置した。その後、Heat Shookを行うために、42℃のウォーターバスにて45~50秒間加熱後、直ちに氷上にて急冷し、そのまま2分間静置した。サンプルを冷却した後、400μl LB培地を加え、恒温器にて45分間静置することで、抗生物質耐性遺伝子を発現させた。この間に、恒温器で乾燥させていたLB寒天培地を取り出し、40μl Xgal(20mg/ml)と5μl IPTG(160mg/ml)の混合液を満遍なく添付した後、プレートの蓋側を下にして、再び恒温器にて乾燥させた。サンプルの抗生物質耐性遺伝子を発現させた後、Xgal、IPTGを添付したLB寒天培地に適量のサンプルを満遍なく播種した。その後、恒温器にて12~20時間培養した。コロニーが形成され十分な大きさになった後、4℃にて冷蔵保存した。

・少量培養

3mlずつ液体LB培地〔蒸留水100mlに対して、TRYPTON:1g、YEAST EXTRACT :0.5g、NaCl:1g〕を分注した試験管を必要本数分用意し、ガスバーナーの炎により起こる上昇気流により簡易の無菌状態を作った。簡易無菌状態の下で、液体LB培地が入った試験管それぞれにアンピシリンを1.5μlずつ添加した。次に、形質転換により得られた白コロニーに目印を付け、爪楊枝をガスバーナーにより加熱滅菌した。滅菌後、爪楊枝でコロニーをつつき、培地に溶かし込んだ後、試験管に蓋をした。その際、空気が入るよう少し蓋を浮かせた状態のままテープで固定した。その後、37℃の恒温器にてシェイカーで揺らしながら12~20時間培養した。液体LB培地が適度に濁ったら、培養を停止し、プラスミド抽出に用いた。保存は、4℃の冷蔵庫にて行った。

・プラスミド抽出

少量培養で得られた大腸菌を、培養した培養液ごと新しい1.5mlチューブに直接流し入

れ、12000rpm、4℃で 30 秒遠心した後、上清を除去した。上清を除去したチューブに、残りの培養液を入れ、同様に 12000rpm、4℃で 30 秒遠心した後、上清を除去した。上清を完全に除去した後、100μl の氷冷していた Solution Ⅰ〔1N NaCl:20μl、10%SDS:10μl、蒸留水:70μl〕を加え、約 5 分間沈殿物が溶解するまで念入りにボルテックスした。続いて、200μl の SolutionⅡ〔1N NaOH：40μl、10%SDS：20μl、滅菌水：140μl〕を加え、軽く手で攪拌した。さらに、150μl の氷冷していた SolutionⅢ〔5M 酢酸カリウム:60μl、酢酸:11.5μl、脱イオン水:28.5μl〕を加え、手で上下に数回攪拌した後、氷上にて 5 分間静置した。静置後、12000rpm、4℃で 5 分間遠心し、上清を別の新しい 1.5ml チューブに回収した。その後、400μl のフェノール/クロロホルム（飽和フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール＝25：24：1）を加え、ボルテックスし、12000rpm、室温にて 5 分間遠心した。遠心後、上清を別の新しい 1.5ml チューブに回収し、2 倍量(800μl)の 100%エタノールを加えて軽く攪拌した後、室温にて 5 分間静置した。その後、12000rpm、4℃で 5 分間遠心し、上清を捨てた。残ったプラスミドの沈殿物を、4℃に冷やした 70%エタノールを加え軽く攪拌することにより洗浄し、12000rpm、4℃で 5 分間遠心した。遠心後、上清を除去して自然乾燥させた後、20μl の RNase 溶液〔20ng/μl RNase A、TE 溶液：10mM トリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)〕を加えてピペッティングし、プラスミドを溶解させ、37℃の恒温器にて、2 時間反応させた。その後、1μl のプラスミド溶液を滅菌水で 10μl にメスアップして 0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、プラスミドの精製度と有無を確認した。保存は 4℃の冷蔵庫にて行った。また、形質転換により目的のサイズのインサートが入っているかを調べるために、Nco I 溶液〔Nco Ⅰ：2U、Nco I 用 buffer：1μl、滅菌水で 10μl にメスアップ〕を作製し、RNase 溶液に溶かしたプラスミドを 1μl 加え、37℃の恒温器にて 1 時間反応させた。その後、反応液を 1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、インサートの有無とサイズを確認した。

●PEG による精製

プラスミド抽出により得られたプラスミド溶液に、等量(18μl)の 20% PEG/2.5M NaCl を加え、ゆっくりとピペッティングにより混ぜ合わせた後、30~60 分間氷上または 4℃にて静置した。静置後、12000rpm、4℃で 20 分間遠心し、上清を捨て、4℃に冷やした 70%エタノールを加え、軽く攪拌することで沈殿物を洗浄し、12000rpm、4℃で 10 分間遠心した。遠心後、再び上清を捨て、4℃に冷やした 70%エタノールを加え、洗浄し、12000rpm、4℃で 10 分間遠心した。遠心後、上清を除去して自然乾燥させた後、20μl の TE 溶液〔10mM トリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)〕を加えてプラスミドを溶解させた。その後、プラスミドの濃度を測定し、1μl のプラスミド溶液を滅菌水で 10μl にメスアップして 0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、プラスミドの精製度と有無を確認した。保存は 4℃の冷蔵庫にて行った。

●塩基配列の決定

塩基配列の決定は、ABI PRISM Big Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用いて行った。

●Big Dye 反応

まず、Big Dye 反応液〔プライマー(2μlM) ※フォワードまたはリバースのどちらか 1 種類：0.5μl、プレミクス Big Dye terminator：0.5μl、5×Sequencing buffer：1.5μl、滅菌水で 10μl にメスアップ〕に、250ng の精製したプラスミド DNA を加え、調整した。プラスミド DNA を鋳型として、*dwg* の候補遺伝子である、*Ggt1* 遺伝子の DNA 上に設定したプライマー(Table 2-1)を用いて、サーマルサイクラーにて Big Dye 反応を行った。反応条件は、まずホットスタート、96℃、3 分の熱変性により二本鎖 DNA を解離させた。続いて 96℃熱変性 30 秒、60℃アニーリング 30 秒、60℃伸長反応 3 分を 35 サイクル行うことにより、特異的な配列を指数関数的に増幅させた。最後に 60℃4 分の伸長反応を行った。反応後、PCR 産物は 4℃にて冷蔵保存した。

●PCR 産物の精製

PCR 産物 : 10μl、3M 酢酸ナトリウム(pH4.6) : 1.5μl、100%エタノール : 30μl、滅菌水 : 9μl を 1.5ml チューブに入れ、ボルテックスした後、室温にて 15 分間静置した。その後、12000rpm、室温で 20 分間遠心し、上清を除去した後、4℃に冷やした 70%エタノールを加えた。軽く攪拌することで洗浄し、12000rpm、4℃で 5 分間遠心し、遠心後、上清を除去して自然乾燥させた。乾燥後、10μl の Hi-Di ホルムアミドに溶解し、4℃で冷蔵保存した。

●塩基配列の決定と解析

Hi-Di ホルムアミドに溶解したサンプルを、0.5ml チューブに移し、ゴム製の専用キャップで密閉した。その後、サーマルサイクラーにて 95℃で 2~3 分加熱した後、氷水にて急冷した。水分をきれいにふき取ったサンプル入りのチューブをシークエンサー(ABI 310)にセットし、塩基配列を決定した。その後、ABI のフリーダウンロードソフト sequence scanner v1.0 lnk.により解析を行った。

●*dwg*アレル上の変異の検出

塩基配列の解析により *Ggt1* 遺伝子の第 7 エクソン内に 13 塩基の欠損が同定されたことから、この領域を挟むようにして野生型アレルにおいて 256 塩基、*dwg* アレルにおいて 237 塩基のバンドが増幅されるプライマーを設計し、PCR 反応を行うことで遺伝子型を判別した(Fig 2-2 C)。PCR 反応溶液〔1×PCR buffer、0.2mM dNTP、0.2μM (フォワード、リバース)プライマー、*Taq* DNA ポリメラーゼ(Amersham Bioscience)〕に DNA を加えて、10μl を調整した。反応条件は、まずホットスタート、94℃、5 分の熱変性により二本鎖 DNA を解離させた。続いて 94℃熱変性 30 秒、66℃アニーリング 30 秒、72℃伸長反応 30 秒を 35 サイクル行うことにより、特異的な配列を指数関数的に増幅させた。最後に 72℃5 分の伸長反応をさせた。その後 3%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅を確認した。

■*Ggt1* cDNA の塩基配列の解析

●RNA からの cDNA 合成

・total RNA の抽出(TRLzol®Reagent)

dwg/dwg 個体および野生型個体を安楽死させ、腎臓を採取し PBS にて洗浄後、液体窒素により凍結し、使用するまで-80℃にて保存した。1.5ml チューブに入れた 50-100mg の組織片に、500μl の TRIzol 試薬を加え、簡易ホモジェナイザーにより組織をすりつぶした後、さらに 500μl の TRIzol 試薬を加え、ピペッティングによりチューブ内の組織をバラバラにし、室温にて 5 分静置した。続いて、200μl のクロロホルムを添加し、手で軽く攪拌した後、2-3 分室温にて静置した。その後、12000rpm、4℃で 15 分遠心した。遠心後、上清を新しい 1.5ml チューブに移し、500μl の 2-プロパノールを加えて手で攪拌し、10 分室温にて静置した。その後、12000rpm、4℃で 10 分遠心した。遠心後、上清を除去し、1ml の 75%エタノールを加え、手で軽く攪拌した後、12000rpm、4℃で 5 分遠心した。その後、上清を除去して 30μl の DEPC 水を加え、沈殿物を完全に溶かした。その後、吸光度を測定して total RNA の濃度を測定した。100ng~300ng 量の RNA を DEPC 水で 10μl にメスアップして 0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、total RNA の精製度と有無を確認した。保存は-80℃で凍結保存した。

・DNase 処理

Total RNA：20~50ng、10×DNase Ⅰバッファー(TaKaRa)：：5μl、10U DNase Ⅰ(TaKaRa)： 2μl を 1.5ml チューブに入れ、DEPC 水で 50μl にメスアップしたものを 37℃の恒温器にて 30 分間反応させた。処理後、150μl の DEPC 水と 100μl のフェノール、100μl のクロロホルム/イソアミルアルコール(クロロホルム：イソアミルアルコール＝24：1)を加えて混合し、10000rpm、室温で 5 分間遠心した。遠心後、新しい 1.5ml チューブに上清を入れ、200μl のクロロホルムを加えて混合し、10000rpm、室温で 5 分間遠心した。その後、上清を新しいチューブに移し、15μl の 3M 酢酸ナトリウムと 500μl の 100%エタノールを加えて-80℃の冷凍庫にて 20 分間静置した。静置後、12000rpm、4℃で 5 分間遠心して上清を除去し、沈殿物を乾燥させた。乾燥後、DEPC 水を 10μl 加え沈殿物を溶解させた。そ

の後、吸光度を測定して RNA の濃度を測定し、100～300ng 量の RNA を DEPC 水で 10μl にメスアップして 0.7%アガロースゲルにて電気泳動し、DNA の消化を確認した。保存は -80℃で凍結保存した。

・逆転写酵素による cDNA 合成

cDNA 合成は PrimeScript™ Reverse Transcriptase (TaKaRa)を用いて行った。DNase 処理をした Total RNA、オリゴ dT プライマー (TaKaRa)、dNTP 混合液(TaKaRa)を混合し、10μl となるように DEPC 水で調整した。それを 65℃で 5 分間処理することで RNA を伸展し、処理後直ちに氷上にて急冷させることで反応を停止させた。続いて 1× PrimeScript™ バッファー (TaKaRa)、PrimeScript™ Reverse Transcriptase (TaKaRa) を加え、20μl となるように DEPC 水で調整した。これを軽く攪拌し、30℃で 10 分間反応させた後、さらに 42℃で 30～60 分間反応させた。その後、70℃で 15 分間処理を行い、逆転写酵素を失活させた。合成した cDNA は-20℃で凍結保存した。

●プライマーの設計

dwg の原因遺伝子の候補として考えられた *Ggt1* 遺伝子の cDNA 上に、フォワードおよびリバース方向にそれぞれ約 500～600 塩基ごとと、さらに必要に応じてプライマーを設計した(Table 2-2)。塩基配列情報は NCBI データベース(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)のマウスゲノム配列より取得した。

●RT-PCR

まず、RT-PCR 反応溶液〔1×PCR buffer、0.2mM dNTP、0.2μM (フォワード、リバース)プライマー、*Taq* DNA ポリメラーゼ(Amersham Bioscience)〕に cDNA を加えて、80μl を調整した。cDNA を鋳型として、*dwg* の候補遺伝子である、*Ggt1*cDNA の領域に設定したプライマーを用いて、RT-PCR 反応を行い cDNA が合成されていることを確認した。反応条件は、まずホットスタート、94℃、5 分の熱変性により二本鎖 cDNA を解離させた。続いて 94℃熱変性 30 秒、66℃アニーリング 30 秒、72℃伸長反応 30 秒を 20 サイクル行

うことにより、特異的な配列を指数関数的に増幅させた。最後に 72℃5 分の伸長反応をさせた。その後、吸光度を測定して cDNA 増幅断片の濃度を測定し、1μl を滅菌水で 10μl にメスアップして 1%アガロースゲルにて電気泳動し、cDNA の増幅を確認した。保存は 4℃にて行った。

●クローニング

DNA の塩基配列の解析と同様の方法で行った。

●塩基配列の決定

塩基配列の決定は、DNA の塩基配列の解析と同様の方法で行った。

2-3　結果

表現型の解析から、*Ggt1* 遺伝子が *dwg* の原因となる遺伝子の候補として考えられたため、*Ggt1* 遺伝子のエクソン領域とエクソンおよびイントロンの境界について *dwg/dwg* 個体のゲノム DNA の塩基配列の解析を行った。データベース上の *Ggt1* 遺伝子の塩基配列と比較したところ、*dwg/dwg* 個体において *Ggt1* 遺伝子の第 7 エクソン内に 13 塩基の欠損が同定された(Fig 2-2 A)。一方で、*dwg/dwg* 個体では *Ggt1* 遺伝子上には、この欠損以外にデータベース上の塩基配列との違いは同定されず、野生型(+/+)個体でも変異は同定されなかった。さらに、この 13 塩基の欠損が *dwg* に特異的なものであるかを確認するために、*dwg/dwg* 個体とその同腹の野生型個体および *dwg/+*個体、さらに 5 種類の近交系マウスのゲノム DNA について 13 塩基の欠損を含む第 7 エクソンの領域を PCR 法により増幅した。その結果、野生型個体と 5 種類の近交系のゲノム DNA では予想された 244 塩基の増幅断片が得られたのに対し、*dwg/dwg* 個体では 13 塩基短い 231 塩基の増幅断片のみが、*dwg/+*個体では 244 塩基と 231 塩基の両方の増幅断片が得られた(Fig 2-2 B)。これらのことから、*Ggt1* 遺伝子上の 13 塩基の欠損は *dwg* の変異に特異的であることが示された。さらに、この 13 塩基の欠損が表現型の異常と一致するかを調べるために、ゲノム DNA のタイピングにより *dwg* をヘテロに持つことが明らかとなった個体同士を交配したところ、151 個体の産仔を得ることができ、そのうち 32 個体が *dwg* をホモに持ち、83 個体が *dwg* をヘテロに持ち、残りの 36 個体は *dwg* を持たない野生型(+/+)であった(Table 2-3)。すべての *dwg* をホモにもつ個体が、矮小、毛色異常、白内障といった *dwg/dwg* 個体に特徴的な異常を示し、*dwg* をヘテロにもつ個体と *dwg* を持たない個体(+/+)では、表現型の異常は観察されなかった。これらの結果から、*Ggt1* 遺伝子上の 13 塩基の欠損が、*dwg/dwg* 個体における表現型の異常と関連していることが示唆された。

次に、cDNA においても *Ggt1* 遺伝子上にゲノム DNA と同様の 13 塩基の欠損が存在するかを調べるために、*dwg/dwg* 個体および野生型個体の cDNA について RT-PCR により

Ggt1 遺伝子のコーディング領域を増幅した。*dwg*/*dwg* 個体の cDNA 由来の 31 個のクローンのうち、ゲノム DNA の塩基配列から予想された 13 塩基のみを欠損した転写産物(type 1)とそれとは異なる 3 種類の転写産物(type 2, 3, 4)が同定された(Fig 2-3)。同定された転写産物それぞれの数は、表に示す(Table 2-4)。Type 2 の転写産物は、ゲノム DNA で同定された 13 塩基の欠損領域を含む 75 塩基の欠損を持ち、これにより GGT1 の 270-294 残基に相当する 25 アミノ酸を欠損している。Type 3 の転写産物はゲノム DNA で同定された 13 塩基の欠損に加え、第 3 エクソンを完全に欠損しており、Type 4 の転写産物は同様の 13 塩基の欠損に加え、第 3 および第 4 エクソンを完全に欠損している。エクソンの欠損に加え、Type 1, 3, 4 の転写産物では、第 9 または第 10 イントロンを一部または、完全に保存しているものもあった。Type 1, 3, 4 の転写産物では、その塩基配列から、各欠損によりフレームシフトが起き、Type 1 では 281 残基目、Type 3 では 57 残基目、Type 4 では 63 残基目において早期にストップコドンが出現することが予想された。野生型個体の cDNA 由来のクローンからは異常なスプライシングは認められず、全て正常な転写産物が同定された。

2-4　考察

第 1 章における表現型の解析から、*dwg* が *Ggt1* 遺伝子上に変異が起きたものであることが予想されたため、*dwg* の *Ggt1* 遺伝子上の変異の有無を解析した。*dwg* アレルでは、*Ggt1* 遺伝子の第 7 エクソン内に 13 塩基の欠損が同定され、この欠損は早期のストップコドン出現や、一部のアミノ酸残基を欠損するような異常な転写産物の合成を引き起こすことが明らかとなった。さらに、*dwg/dwg* 個体の表現型は GGT1 欠損個体と類似していることから、*dwg* では *Ggt1* 遺伝子上に変異が起きており、この変異が *dwg/dwg* 個体で認められる表現型の異常を引き起こしていることが示唆された。

dwg/dwg 個体では、4 種類の異常な *Ggt1* 転写産物が同定された。これらのうち、3 つの転写産物(tyoe 2, 3, 4)では、13 塩基の欠損により正常なスプライシングが行われず、エクソンを読み飛ばす現象であるエクソンスキッピングが引き起こされていることが予想された。一方、75 塩基の欠損のみを持つ転写産物は 13 塩基の欠損により crypitic splicing が引き起こされていることが予想された。splice-site prediction program (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) によると、第 7 エクソンにおける通常のスプライシングサイトでのスプライシングを受ける確率が 0.89 であるのに対して、13 塩基の欠損領域の切断点に接する塩基配列は、0.99 となり通常のスプライシングサイトよりも確率が高くなるために type 2 では 13 塩基の欠損ではなく 75 塩基の異所性のスプライシング(cryptic splicing)が起きることが予想された。他の転写産物において 13 塩基の欠損の他に存在するエクソン 3 のみ、またはエクソン 3 および 4 の欠損が起こる原因は不明である。スプライシングの供与部位または受容部位に変異が起こることにより、近接する複数のエクソンがスキップされる事例は報告されているが(Aoshima M. et al. 1996)、変異のあったエクソンと離れたエクソンがスキップされる例は珍しい。エクソン 3 および 4 のスキップは、エクソンが欠損することにより起こる、エクソンのスプライシングエンハンサーの欠損が原因であることが考えられる(Tazi J. et al. 2009)。さらに、ESEfinder program によ

ると、エクソンのスプライシングエンハンサーサイトが欠損した 13 塩基内に存在することが予想されている(http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home)。さらに、スプライシング機構において、エクソンからイントロンを含むゲノム領域間で、スプライシングを制御している因子を介した、ネットワークの重要性が明らかにされている(Baralle M. et al. 2006)。これらのことから、13 塩基の欠損により、エクソンのスプライシングエンハンサーが欠損し、その遠隔効果により *Ggt1* 遺伝子のエクソン 3 と 4 が欠損したと予想される。

Ggt1 の転写産物のうち、13 塩基のみが欠損したもの(type 1)、エクソン 3 を完全に欠損したもの(type 3)、エクソン 3 と 4 を完全に欠損したもの(type 4)は、フレームシフトが起こり、ストップコドンが早期に出現する。その結果、細胞膜と結合するアンカー配列である heavy chain ドメインは保存しているが、GGT1 の酵素活性に重要な light chain ドメインを欠損し、短くなった GGT1 が産生される。したがって、これらの早期にストップコドンが出現した転写産物から産生されるタンパクは GGT1 の酵素活性を失っていることが予想される。一方で、第 7 エクソン内に 75 塩基の欠損を持つもの(type 2)では、インフレームの 25 アミノ酸の欠損が heavy chain に存在しており、light chain は完全に保存されている。heavy chain は主に細胞膜表面に GGT1 を固定する働きをしていることがこれまでに明らかにされているが、heavy chain 内のいくつかのアミノ酸残基は、GGT1 の酵素活性に重要であることも示されている(Ikeda Y. et al. 1993)。さらに、欠損した 25 アミノ酸残基のうち、12 残基は、哺乳類、ニワトリ、ゼブラフィッシュで保存されているため、GGT1 の機能に重要なアミノ酸配列であることが予想される。そのため、この 25 アミノ酸残基の欠損は、GGT1 の酵素活性にネガティブに働いていることが予想される。これらのことから、*dwg/dwg* 個体で発現している *Ggt1* の転写産物は、GGT1 としての機能を完全に失っているか、一部機能を損なっていることが予想され、13 塩基の欠損により引き起こされるこれらの異常な転写産物は、*dwg/dwg* 個体で認められる表現型の異常の原因となりうるこ

とが推測された。

ヒトにおける GGT の欠損は、珍しい常染色体劣性遺伝であり、血漿と尿中のグルタチオン濃度が上昇することと GGT 活性が低下していることを基準に診断される(Iida M. et al. 2005)。今までに、7 つの GGT 欠損患者の症例が報告されており、7 人の患者すべてがグルタチオン尿症を呈していた(Ristoff E. and Larsson A. 2007)。この病気における *GGT* 遺伝子ファミリーの関与は、まだ明らかにされていない。血漿および尿中のグルタチオン濃度の上昇は、GGT1 欠損個体においても報告されており(Lieberman M.W. et al.1996)、これらのマウスは、ヒトにおけるグルタチオン尿症のモデル動物として用いることが可能である。しかし、GGT1 欠損個体は、10-18 週齢において、高い死亡率を示すため Lieberman M.W. et al.1996)、モデル動物として用いるには不便な面もある。一方で、*dwg* の変異個体では、死亡率が増加することはなく、1 年以上生存することが明らかとなっている。この違いは、*Ggt1* 遺伝子における変異のパターンが異なるためか、マウスの系統の遺伝的背景が異なるために生じていると考えられる。

以上の結果から、*dwg/dwg* 個体における表現型の異常が *Ggt1* 遺伝子内の 13 塩基の欠損に起因していることが考えられるが、決定するためには、*dwg/dwg* 個体における GGT の酵素活性や血漿および組織中の GSH 濃度などを明らかするといった、さらなる解析が必要である。

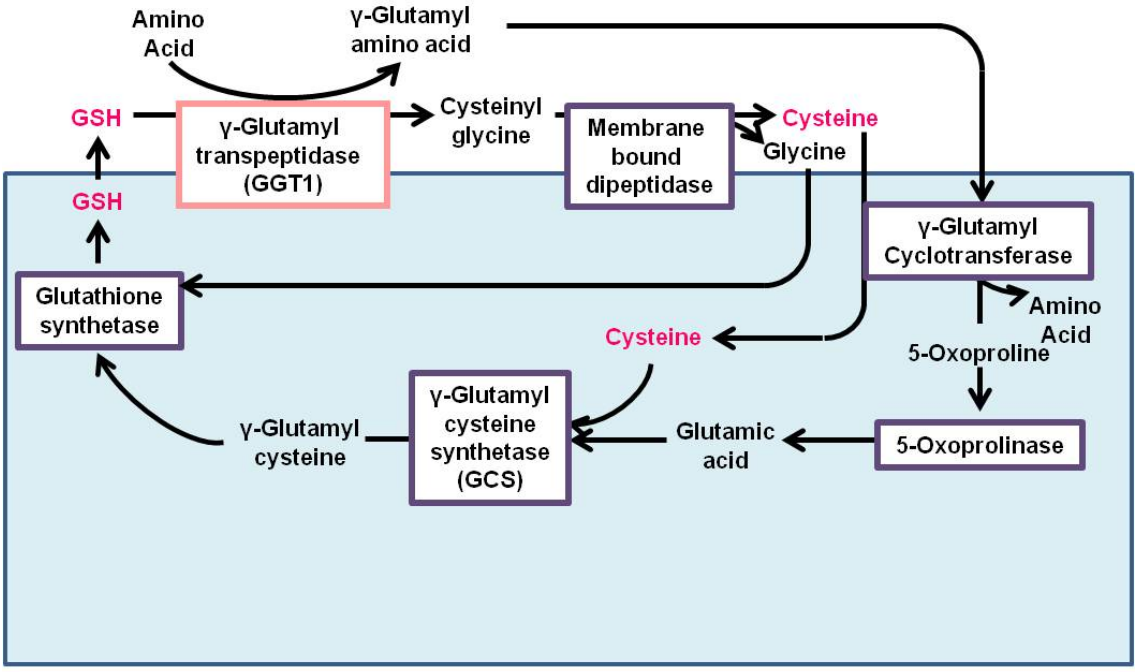
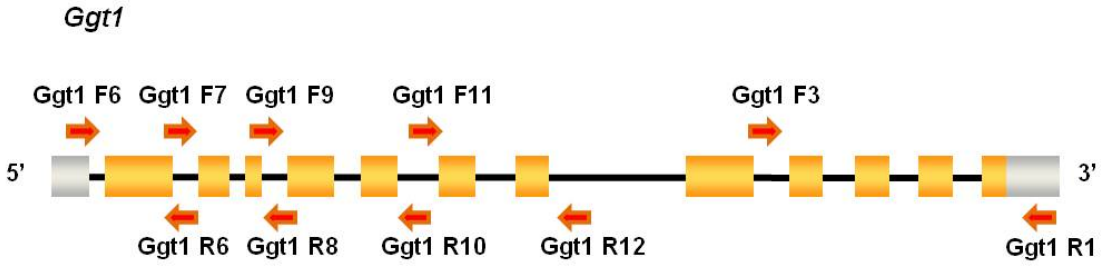


Figure 2-1. γ-グルタミル回路におけるγ-Glutamyl transferase (GGT) の役割

γ-Glutamyl transferase(GGT)は、細胞外のグルタチオン(GSH)をシステイニルグリシンとγ-グルタミルアミノ酸へと分解する酵素で、これらの分子はアミノ酸として細胞内に取り込まれ、細胞内でのGSHの再合成に利用される。

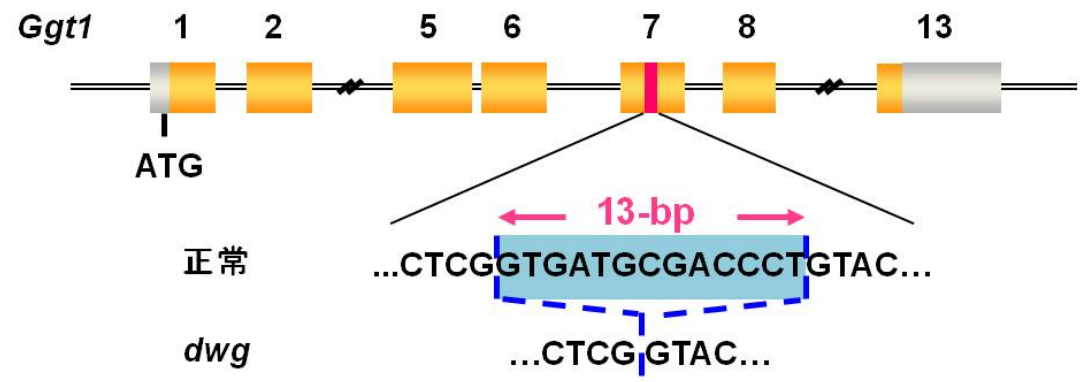


Primer	Forward 5'→3'	Primer	Reverse 3'→ 5'
Ggt1 F6	gactgtgcccagttggg	Ggt1 R6	atgcccgagctcactgg
Ggt1 F7	ggtgtagggtctcgcttc	Ggt1 R7	gggtgtcctgggtaccag
Ggt1 F8	cactgcccagctctgtc	Ggt1 R8	ggacccagaggtcagcca
Ggt1 F9	gtcccacgtgatacagcc	Ggt1 R9	atgaggctggtggggtg
Ggt1 F10	gctggggcttcctaagacc	Ggt1 R10	tggtctgctgcctgcct
Ggt1 F11	accaggtggggaatggc	Ggt1 R11	tagcccaggagcaaggg
Ggt1 F12	gccctttcctgctcctg	Ggt1 R12	ccaacgtcccactcttgc

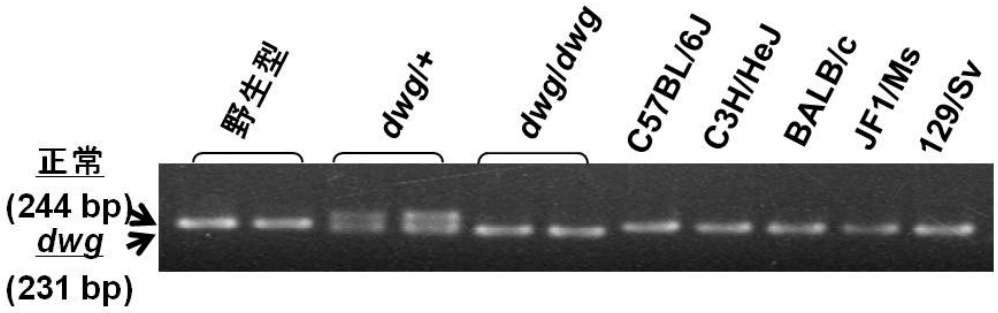
Table 2-1. *Ggt1*ゲノムDNAの塩基配列の解析に用いたプライマー

上の図の四角はエクソンを、線はイントロンをそれぞれ示す。

A



B

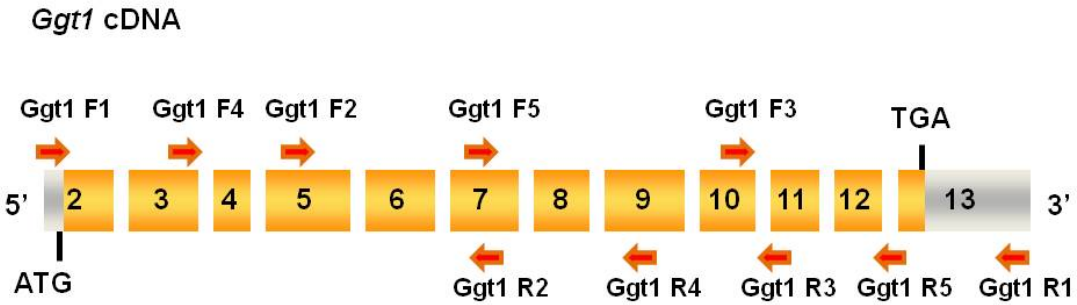


C

Primer	Forward 5'→3'	Primer	Reverse 3'→ 5'
Ggt1 F	accccataccgtgcccaatg	Ggt1 R	gatgagaatcagcacgggcc

Figure 2-2. *dwg/dwg*個体における*Ggt1*遺伝子の13塩基の欠損の同定

(A)*dwg/dwg*個体の*Ggt1*ゲノムDNAの第7エクソン内に13塩基の欠損が同定された。
図の四角はエクソンを、線はイントロンをそれぞれ示す。
(B)*Ggt1*遺伝子内の、*dwg*タイプの変異のPCRによる検出した。正常(野生型のアレル)では244bpの増幅断片が、変異(*dwg*タイプのアレル)では231bpの増幅断片を得ることができる。
(C)*dwg*タイプのアレルの検出に用いたPCRプライマー



Primer	Forward 5'→3'	Primer	Reverse 3'→ 5'
Ggt1 F1	gtgtggagagagttcctgcc	Ggt1 R1	ctcctgttcccattctcgtc
Ggt1 F2	ctgccttgtgcgaggtg	Ggt1 R2	ccagcttcggcatagtc
Ggt1 F3	gatggcagtgctgtggc	Ggt1 R3	cactgacccgagacagg
Ggt1 F4	cccaggttggccaatacc	Ggt1 R4	tggtacgagccactggg
Ggt1 F5	tcgtggaggcctttcgg	Ggt1 R5	gccggtccaagcgtacc

Table 2-2. *Ggt1*cDNAの塩基配列の解析に用いたプライマー

上の図の四角はエクソンを、その上の番号はエクソンの番号を、オレンジの領域はコーディング領域をそれぞれ示す。

遺伝子型	産仔数(♀)
dwg/dwg	32 (13)
dwg/+	83 (37)
野生型	36 (19)

Table 2-3. DWGマウスにおける*dwg*タイプのアレルの検出

括弧内は、雌の個体数を示す。

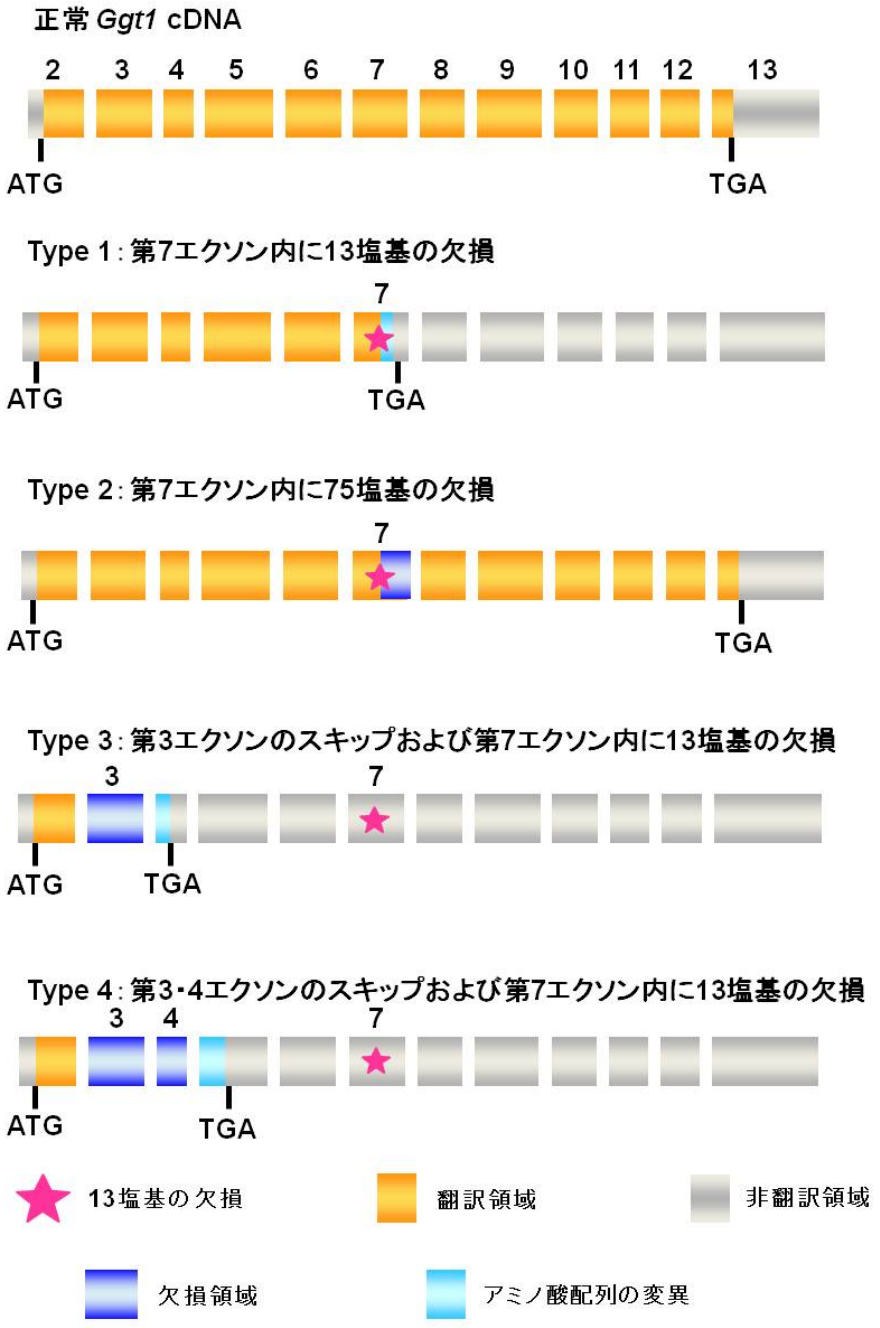


Figure 2-3. *dwg/dwg*個体における*Ggt1*cDNAの構造

*dwg/dwg*個体の*Ggt1*cDNAからは4種類の異常な転写産物が合成されることが予想された。

クローン番号	exon3	exon4	966-978 (13bp)	966-1040 (75bp)	その他1	その他2	その他3	アミノ酸配列	備考
1	○		○		1493-gtgcagg			55番目以降変化 →57番目stop	その他1はExon10から続くintron
2				○				270～295番アミノ酸欠損	
3				○				270～295番アミノ酸欠損	
4				○				270～295番アミノ酸欠損	
5			○		1177-22bp			270番目以降変化 →281番目stop	その他1はExon9の直前から続くintron
6	○		○		1493-gtgcagg			55番目以降変化 →57番目stop	その他1はExon10から続くintron
7	○		○		521:t→c			55番目以降変化 →57番目stop	
8	○	○	○		1168:t→c			55番目以降変化 →63番目stop	
9	○		○		649:t→c	1493-101bp		55番目以降変化 →57番目stop	その他2はExon10から11のintron全長
10	○		○		312:a→g	1594:a→g	1653:t→c	55番目以降変化 →57番目stop	
11	○		○					55番目以降変化 →57番目stop	
12			○		703:g→a			270番目以降変化 →281番目stop	
13			○		1493-gtgcagg			270番目以降変化 →281番目stop	その他1はExon10から11のintron全長
14			○					270番目以降変化 →281番目stop	
15			○		1493-gtgcagg			270番目以降変化 →281番目stop	その他1はExon10から11のintron全長
16	○		○		1493-gtgcagg			55番目以降変化 →57番目stop	その他1はExon10から11のintron全長
17				○				270～295番アミノ酸欠損	
18			○					270番目以降変化 →281番目stop	
19			○		1177-21bp			270番目以降変化 →281番目stop	その他1はExon9の直前から続くintron
20			○		1177-22bp	985:g→a		270番目以降変化 →281番目stop	その他1はExon9の直前から続くintron
21				○				270～295番アミノ酸欠損	
22			○		1177-22bp	1493-gtgcagg		270番目以降変化 →281番目stop	その他1はExon9の直前から続くintron その他2はExon10から11のintron全長
23				○				270～295番アミノ酸欠損	
24	○		○		1177-21bp	1493-gtgcagg	675:g→a	55番目以降変化 →57番目stop	その他1はExon9の直前から続くintron、 その他2はExon10から11のintron全長
25			○		1177-22bp			270番目以降変化 →281番目stop	その他1はExon9の直前から続くintron
26				○	1160:t→c	1255:c→t	1404:t→c	270～295番アミノ酸欠損	
27				○				270～296番アミノ酸欠損	
28			○					270番目以降変化 →281番目stop	
29				○	830:g→a	1493-gtgcagg		270～296番アミノ酸欠損	その他2はExon10から11のintron全長
30				○				270～297番アミノ酸欠損	
31	○		○					55番目以降変化 →57番目stop	

■:Type1、■:Type2、■:Type3、 □:Type4

○:欠損あり、その他1～3:欠損領域の詳細;赤文字:欠損領域の長さ;正常配列→変異配列

Table 2-4. *dwg/dwg*個体で同定された*Ggt1*遺伝子の異常な転写産物の詳細

第 3 章

表現型異常と *Ggt1* 遺伝子突然変異との関連性について

3-1　緒言

γ-Glutamyl transferase(GGT)は、細胞表面に存在するヘテロ 2 量体の糖タンパク質であり、細胞表面に固定する役割を持つ heavy chain ドメインとグルタチオン(GSH)または GSH-複合体を、標的の受容体に適切な基質へと移行させる酵素活性をもつ light chain ドメインで構成されている(Tate S.S and Meister A. 1981, Lieberman M.W. et al. 1995)。GGT は、腎臓の近位尿細管の管腔側にもっとも多く存在しており(Hanigan M.H. and Frierson H.F.Jr. 1996)、腎臓において、尿中の GSH からシステインを回収する際に重要な役割を果たしている(Lieberman M.W. et al. 1995)。細胞外の GSH は、GGT によって γ-グルタミル複合体とシステイニルグリシンへと分解される。システイニルグリシンは、さらにシステインとグリシンへと分解され、細胞内へと運ばれたのち、γ-グルタミル回路において GSH の再合成に利用される。GSH は、酸化ストレスや細胞傷害性、または発がん性のある生体異物などの細胞傷害から細胞を防御するために重要である。GGT は、GSH の恒常性の維持に寄与することから、抗酸化作用や解毒作用機構において不可欠な因子であると考えられている。

GGT 遺伝子ファミリーは、ヒトでは 13 種類の、マウスおよびラットでは 4 種類の GGT によって構成されており、そのうちマウスでは GGT1 と GGT5 の 2 つだけが γ-グルタミル複合体を分解できることが確認されている(Heisterkamp N. et al. 2008, Wickham S. et al. 2011)。*Ggt1* 遺伝子を遺伝的に改変したマウスが作成されているため、*GGT* 遺伝子ファミリーの中では、GGT1 がもっともよく研究されている。人為的に *Ggt1* 遺伝子を欠損させた(*Ggt1*^{tm1Zuk})マウス(GGT1 欠損個体)と、*N*-ethyl-*N*-nitrosourea(ENU)で化学的に変異を誘

導したマウス(*Ggt1*$^{enu1/enu1}$ 個体)がこれまでに作製されている。これらのマウスは、矮小、白内障、不妊、早期死亡を共通の表現型として呈しており(Lieberman M.W. et al. 1996, Harding C.O. et al. 1997, Jean J.C. et al. 1999)、さらに、グルタチオン尿症、グルタチオン血漿、細胞内の GSH 濃度の低下、さらに酸化ストレスに対する感受性の上昇が起きていることも GGT1 欠損個体および *Ggt1*$^{enu1/enu1}$ 個体の両方のマウスにおいて報告されている(Lieberman M.W. et al. 1996, Harding C.O. et al. 1997, Barrios R. et al. 2001)。さらに、これらの異常は GSH 合成の前駆体である、*N*-acetyl-*L*-cysteine(NAC)を投与することで回復することが報告されている(Levasseur R. et al. 2003, Kumar T.R. et al. 2000, Chévez-Barrios P. et al. 2000, Lieberman M.W. et al. 1996)。これらの結果は、GGT1 が GSH の恒常性の維持に重要であることと、細胞内の抗酸化作用の制御に関与していることを示す。

dwg/dwg 個体は、矮小、白内障、毛色異常、雌雄共に不妊、破骨細胞数の増加を示すことが報告されており(Harris B. and Davisson M.T. 1990)、矮小の原因は成長板の軟骨細胞の減少であること、白内障は生後 3 週齢頃から発症する進行性の白内障であることを明らかにしている(第 3 章)。これらの表現型の異常は GGT1 欠損個体と類似しており、さらに *dwg* の *Ggt1* 遺伝子上に 13 塩基の欠損があることから、*dwg* の原因遺伝子が *Ggt1* 遺伝子であることが予想される。しかし、*dwg/dwg* 個体で産生される GGT1 の転写産物の中には GGT 活性を有していると予想される転写産物もあるため、*dwg/dwg* 個体の表現型の異常の原因が *Ggt1* 遺伝子内の 13 塩基の欠損に起因していると決定するためにはさらなる解析が必要である。

そこで本研究では、腎臓における GGT の酵素活性および血漿・組織中の GSH 濃度の測定を行うとともに、*dwg/dwg* 個体における NAC の効果を明らかにすることで、*dwg/dwg* 個体で認められる表現型の異常と *Ggt1* 遺伝子の欠損の関連を検討する。

3-2　材料及び方法

●試供動物

*dwg/+*個体同士の兄妹交配によって得られた正常(野生型、*dwg/+*) 個体、および *dwg* ホモ(*dwg/dwg*)個体を解析に用いた。

●生存曲線の作製

出生時の各遺伝子型の個体数と、各週齢での生存数を記録し、Kaplan-Meier の生存曲線を作製した。検定は log-rank test により行い、$P < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

●*N*-Acety-L- cysteine(NAC)添加水の給餌

粉末 NAC(Sigma)を水道水に 10g/L の割合で溶かし、給水ビンに入れて自由摂取させた。期間は、離乳期にあたる生後 3 週齢から 6 週間とし、その間は単飼いとした。

●血漿中のグルタチオン(GSH)の濃度測定

生後 10-11 週齢の野生型個体および *dwg/dwg* 個体から血液を採取した。まず、CO_2 により安楽死させた後、すばやく開腹し、背側大動脈を露出したのち、ヘパリン 10μl を事前に吸入しておいたシリンジを用いて 500-1000μl の血液を採取した。得られた試料は、4℃、1000rcf にて 15 分間遠心後、上清を新しいチューブへ移し、液体窒素にて瞬間冷凍した後に-80℃にて冷凍保存した。

代表的な抗酸化物質である GSH の濃度測定は酸化ストレス測定用バイオマーカーとして有用であるため、簡易に測定することができるキットが多数販売されている。そこで、そのキットの 1 種である Cuvette Assay for GSH/GSSG (Ocford Biomedical Research)を使用して血漿中の GSH 濃度を測定した。まず、冷凍していたサンプルを素早く溶かし、350μl の氷冷した 5%MPA を加えボルテックスした後、1000rcf、4℃で 10 分間遠心した。遠心後、25μl の上清を 1.5ml の Assay Buffer を入れた別のチューブに移し、使用するまで氷上に静置した。次に、吸光度計で定量できるようにするために、酸化型グルタチオンである GSSG から還元型グルタチオンである GSH への還元反応を 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic

acid(DTNB)により誘起した。調整したサンプルに 200µl の DTNB Solution を加え、すぐに Reductase Solution 加えた後、室温にて 5 分間静置した。その後、200µl の NADPH Solution を加え、直後から 412nm で 1 分毎、10 分間吸光度を測定した。吸光度計で測定された値を元に、検量線を引き、計算を行った。詳しい方法に関しては、キットに添付されていた資料を参考にした。

●GGT の酵素活性の測定

GGT の酵素活性の測定は、10-11 週齢の雄マウスを用いて Orlwski と Meister の方法で行った(Orlowski M. and Meister A.1963) 。安楽死させてすぐに腎臓を採取し、PBS で洗浄した後、10% w/v の 0.1M Tris-HCl (pH 9.0)に入れ簡易ホモジェナイザーですりつぶした。ホモジェナイズした試料は、測定するまで氷上または-20℃にて保存した。GGT の酵素活性は、*p*-nitroaniline の 410nm(ε =8.8 mM^{-1} cm^{-1})における吸光度の値から算出し、*p*-nitroaniline produced/ min / mg of protein の単位で示した。タンパク質量は、bicinchoninic acid 法により測定した(Sigma-Aldrech, St. Louis, Missouri, USA)。

●ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色

H.E.染色に関しては、第 1 章と同様の方法で行った。

●TRAP 染色

TRAP 染色に関しては、第 1 章と同様の方法で行った。

●検定

検定には、独立した 2 群の *t* 検定を行い、*p* 値が 0.05 より小さいものを統計的に有意であるとした。

3-3　結果

dwg の *Ggt1* 遺伝子上の変異が GGT1 の機能に与える影響を明らかにするために、*dwg/dwg*、*dwg/+*、野生型個体の腎臓における GGT の酵素活性を測定した。野生型個体ではこれまでの研究報告と同様に 1012.96 nmol p-nitroaniline produced / mg protein / min と、高い GGT の酵素活性が検出された(Ikeda Y. and Taniguchi N. 2005, Lieberman M.W. 1996)。一方で、*dwg/+*個体では野生型個体の 72.5%、*dwg/dwg* 個体ではさらに低く野生型個体の 4.0%の活性をしか示さなかった(Table 3-1)。

次に GSH の恒常性の維持において GGT の酵素活性の低下が与える影響を明らかにするために、血漿、腎臓、肝臓および眼球における GSH 濃度を *dwg/dwg* 個体および野生型個体で測定した。その結果、*dwg/dwg* 個体における血漿中の GSH 濃度は野生型個体の約 2.6 倍に増加していた(Table 3-2)。また、肝臓および眼球の GSH 濃度は *dwg/dwg* 個体で減少しており、それぞれ野生型個体の 27%、15%となっていた(Table 3-2)。一方で、*dwg/dwg* 個体の腎臓の GSH 濃度は野生型個体に比べ顕著に増加していた(Table 3-2)。

dwg/dwg 個体で認められる表現型の異常が、*Ggt1* 遺伝子の変異によって引き起こされる GSH の欠乏が原因であるかを明らかにするために、GSH 合成の前駆体である NAC を投与することで *dwg/dwg* 個体の表現型の異常が回復するかを調べた。その結果、生後 9 週齢に至っても NAC 投与 *dwg/dwg* 個体の体重・体長のどちらも野生型個体には及ばないものの、NAC 投与 *dwg/dwg* 個体では、不投与 *dwg/dwg* 個体と比較して、体重は生後 6 週齢頃から、体長は生後 7 週齢頃から有意に増加し、生後 9 週齢には体長では 7%、体重では 27%の増加が認められた (Fig 3-1 3-2)。また、脛骨成長板の組織学的解析から、成長板の増殖軟骨細胞層および肥大軟骨細胞層の厚みについて NAC 投与 *dwg/dwg* 個体と野生型個体とで差は認められなかった(Fig 3-3)。さらに *dwg/dwg* 個体における破骨細胞数の増加は、NAC の投与により抑制された(Fig 3-4; Table 3-3)。進行性の白内障に対する効果については、NAC を投与した *dwg/dwg* 個体では、3 個体のうち 1 個体は水晶体線維の変性が認められたもの

の、NAC を投与していない *dwg/dwg* 個体と比較するとその重症度は低く、残りの 2 個体については異常が認められなかった(Fig 3-5)。

また、GGT1 欠損個体では、生存率が著しく低下し、生後 25 週齢頃には生存率が 10%になっているのに対して(Lieberman M.W. et al. 1996)、*dwg/dwg* 個体では成体になった時点での、メンデル比から予想される *dwg/dwg* 個体の数から大きく外れていなかった。そこで Kaplan-Meier の生存曲線を作製し、log-rank test により検定を行ったところ、予想通り *dwg/dwg* 個体と、野生型個体または *dwg/+*個体との間に生存率に有意な差は認められなかった(Fig 3-6)。

3-4　考察

dwg は、*Ggt1* 遺伝子の第 7 エクソン内に 13 塩基の欠損を生じている突然変異である。これまでに *dwg/dwg* 個体について組織学的解析を行っており、GGT1 欠損個体と表現型を比較することで GGT1 との関連を検討してきたが、GGT1 の欠損とそれにより引き起こされると予想される GSH 濃度の変化は不明であった。*dwg/dwg* 個体における GGT1 には活性部位を保存しているものがあるため、*Ggt1* 遺伝子上にある変異と表現型の異常との関連を明らかにすることを目的とした研究を行った。

腎臓における GGT の酵素活性の測定により、*dwg* の変異をホモまたはヘテロに持つと、GGT の活性が低下することが明らかとなった。特に *dwg/dwg* 個体では、野生型個体の 4.0% と顕著に低い値を示した(Table 3-1)。GGT1 欠損個体と異なり、*dwg/dwg* 個体は GGT の酵素活性を残していることから、*dwg* は部分的に機能を失った *Ggt1* 遺伝子の低形質アレルであることが示唆された。*dwg/dwg* 個体では、GGT1 の酵素活性に重要な領域である light chain ドメインを欠損している転写産物が 3 種類産生されている一方で、膜に結合する役割を担う heavy chain ドメインを一部欠損するものの、light chain ドメインを完全に保存している転写産物が生産されている。そのため *dwg/dwg* 個体では light chain を完全に保存している転写産物が存在するために、GGT の酵素活性が残存していると考えられた。

dwg/dwg 個体では血漿中の GSH 濃度が上昇することと、肝臓および眼球の GSH 濃度が減少することを明らかにした(Table 3-2)。この GSH 濃度の異常は、これまでに報告のある GGT1 欠損個体および $Ggt1^{enu1/enu1}$ 個体とほとんど同じであった(Lieberman M.W. et al. 1996, Harding C.O. et al. 1997)。しかし、*dwg/dwg* 個体における腎臓の GSH 濃度は、GGT1 欠損個体とは異なり、GGT の酵素活性が低下しているにもかかわらず、増加していた。この正反対の結果は GGT1 の酵素活性が残っている $Ggt1^{enu1/enu1}$ 個体でも認められることから、*dwg/dwg* 個体において GGT1 の酵素活性が残存していることが関連していると考えられるが、このような違いが生じる原因は不明である(Harding C.O. et al. 1997)。

これらの結果から、*dwg/dwg* 個体では、GGT1 が正常に機能しないために GSH が代謝されず、血漿中の GSH の上昇と、腎臓を除く各組織細胞中の GSH 濃度の低下が生じていることが予想された。

表現型の解析から、*dwg/dwg* 個体は成長遅延、水晶体線維の空胞化による変性、破骨細胞数の増加を呈することが明らかとなっている。これらの変化は GGT1 欠損個体でも報告されており、それぞれが矮小、白内障、骨粗鬆症の原因となっていると考えられている (Chévez-Barrios P. et al. 2000, Levasseur R. et al 2003)。さらに、これらの異常は NAC の経口投与により回復することが GGT1 欠損個体で報告されており、*dwg/dwg* 個体でも GGT1 欠損個体と同様に、NAC の経口投与により回復することが示された。このことから *dwg/dwg* 個体と GGT1 欠損個体で認められる表現型の異常の組織学的特徴と発症機構は非常に類似していることが明らかとなった。

しかし、GSH またはシステインの欠乏による白内障の重症度、生存率、破骨細胞数の変化については、*dwg/dwg* 個体と GGT1 欠損個体で異なる。白内障の進行が *dwg/dwg* 個体では 3 週齢頃に始まり、水晶体皮質の空胞化は 9 週齢でしか認められない(Fig 3-5)。それに対して、同時期に GGT1 欠損個体ではすでに水晶体皮質の空胞化を発症し、生後 6 週齢には水晶体核にも異常が認められることから *dwg/dwg* 個体と比較して重度の症状を示していることが考えられる(Chévez-Barrios P. et al. 2000)。したがって、*dwg/dwg* 個体では GGT1 欠損個体と比較して病態の進行は遅れ、重症度は低くなっていると考えられる。これまでの研究から、水晶体中の GSH 濃度と白内障発症の関連が報告されている(Mårtensson J. et al. 1989)。*dwg/dwg* 個体における GSH 濃度は、GGT1 欠損個体と比較して高いことから(それぞれ野生型個体の 15%と 5.5%) (Chévez-Barrios P. et al. 2000)、白内障の進行と重症度の違いは、細胞内の GSH 濃度の違いにより生じたと考えられる。

さらに、細胞内 GSH 濃度の違いにより生存率の違いも説明することができる。GGT1 欠損個体を用いた研究で、肝臓の細胞内の GSH 濃度の変化は、DNA 損傷の誘発と、ミトコ

ンドリアが正常に機能しないために起こる細胞機能の障害を引き起こし、細胞傷害につながりうることが示されている(Rojas E. et al. 2000, Will Y. et al. 2000)。したがって、細胞内 GSH 濃度の低下の度合いが異なることにより、細胞傷害の広がりが異なり、それが生存率の違いにつながると考えられる。細胞内 GSH 濃度の低下が少しであるため、細胞内 GSH 濃度の低下により引き起こされる細胞傷害の症状が軽くなり、その結果 GGT1 欠損個体および *Ggt1*$^{enu1/enu1}$ 個体と異なり生存期間は減少しなかったことが予想された(Fig 3-6)。したがって、GGT1 の酵素活性に依存している細胞内の GSH 濃度は、いくつかの表現型の異常の進行や重症度に重要であると考えられた。

以上のことから、*dwg/dwg* 個体では、GGT1 が正常に機能していないために細胞中の GSH 濃度が変化し、それにより矮小や白内障を呈していることが明らかとなり、*dwg/dwg* 個体における表現型の異常は *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。

Table 3-1. 腎臓におけるGGTの酵素活性の測定値

野生型	*dwg/+*	*dwg/dwg*
1012.96±52.81[a]	733.95±47.66[b]	40.96±12.20[c]
(n=4)	(n=4)	(n=3)

酵素活性は、nmol *p*-nitroaniline produced / mg protein / min で示してあり、データは、平均値± SDで示す。[abc] 異なる文字間で有意差あり($p < 0.05$).

Table 3-2. GSH濃度の測定値

	野生型	*dwg/dwg*	野生型に対する *dwg/dwg*の割合(%)
血漿, μM	151 ± 92.3	399±37.2[*]	264
腎臓, μmol /g tissue	0.17 ± 0.06	17.3 ± 3.00[**]	10176
肝臓, μmol /g tissue	27.4 ± 3.49	7.47±1.01[***]	27
眼球, μmol /g tissue	8.85±0.57	1.35±0.18[***]	15

各グループ3個体使用し、データは平均値± SDで示す.
[*]$p < 0.05$, [**]$p < 0.01$, [***]$p < 0.001$.

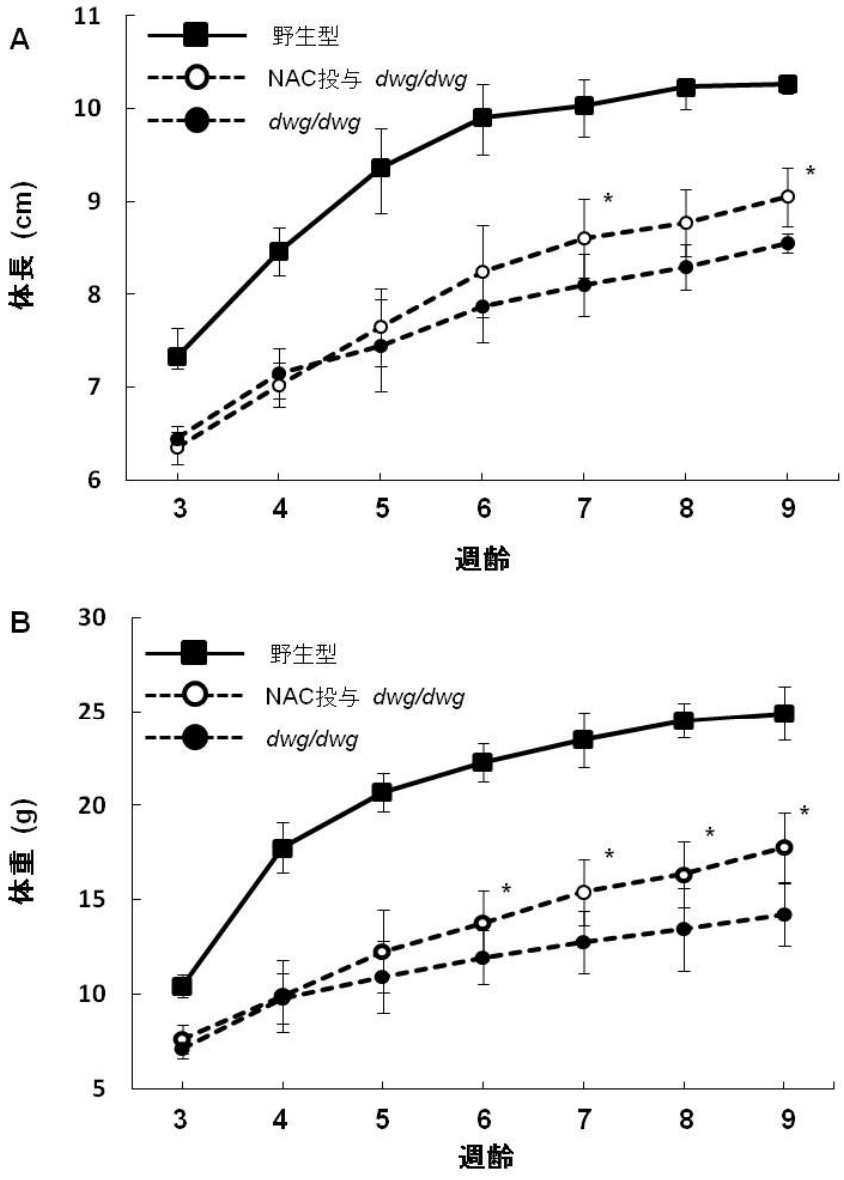


Figure 3-1.　NAC投与による体長および体重の変化

(A) 野生型、*dwg/dwg* およびNAC投与*dwg/dwg*の生後3週齢から9週齢の体長。
(B) 野生型、*dwg/dwg* およびNAC投与*dwg/dwg*の生後3週齢から9週齢の体重。
A、Bどちらのグラフも平均値 ± SD (n=3)で示す。*$p < 0.05$ は、*dwg/dwg* のグループとの比較結果を示す。

Figure 3-2. NAC投与による体格の変化

生後9週齢における、野生型(左)、*dwg/dwg*(中央)、NAC投与*dwg/dwg*(右)の全身の外観。

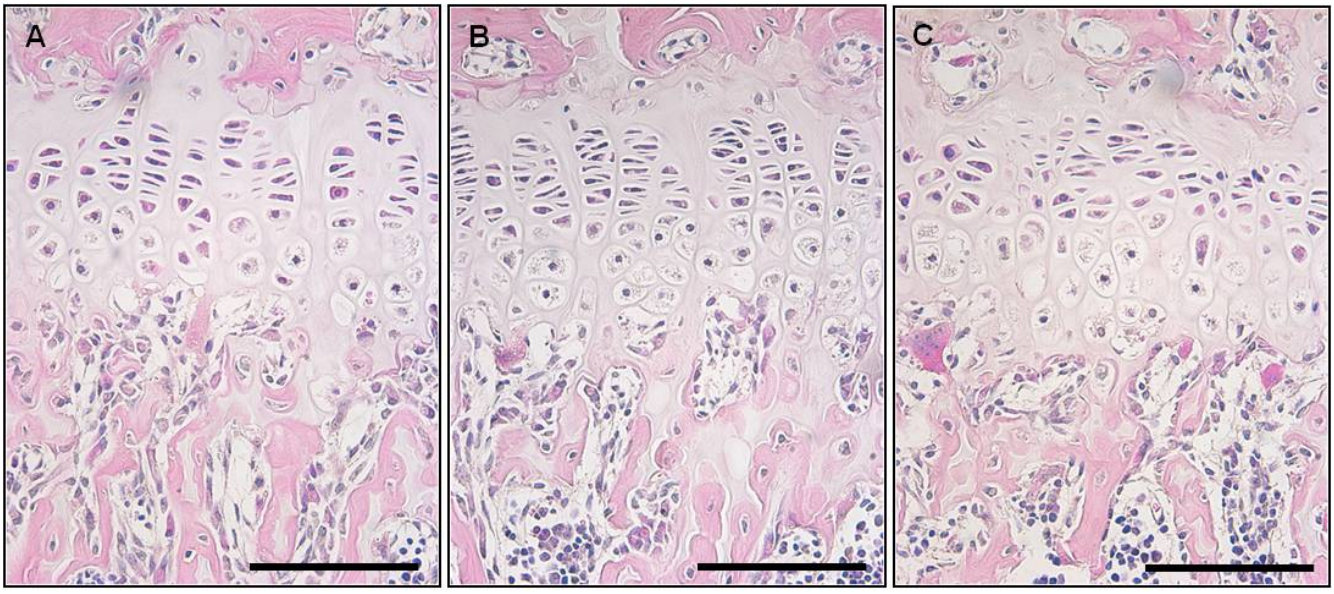


Figure 3-3. NAC投与による脛骨成長板への効果 (H.E.染色)

生後9週齢における、野生型(A)、NAC投与*dwg/dwg*(B)、*dwg/dwg*(C)の脛骨成長板の組織標本。Bar=100μm。

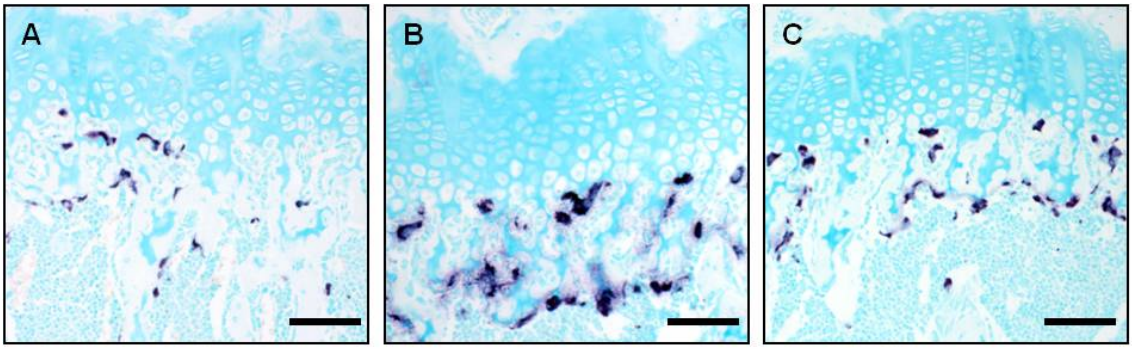


Figure 3-4. NAC投与による脛骨成長板における破骨細胞数の変化 (TRAP染色)

生後9週齢においてTRAP染色を行った組織標本。野生型(A)、*dwg/dwg*(B)、NAC投与*dwg/dwg*(C)、Bar=100μm。

Table 3-3. NAC投与による脛骨成長板における破骨細胞数の変化

	野生型	*dwg/dwg*	NAC投与 *dwg/dwg*
破骨細胞数 (/mm)	4.31±0.08[a]	5.89±0.61[b]	2.18±0.23[c]

各3個体の骨梁周囲の長さ1mmあたりの破骨細胞数を計測した。破骨細胞数の平均値 ± SD、[abc]異なる文字間に有意差あり($p<0.05$).

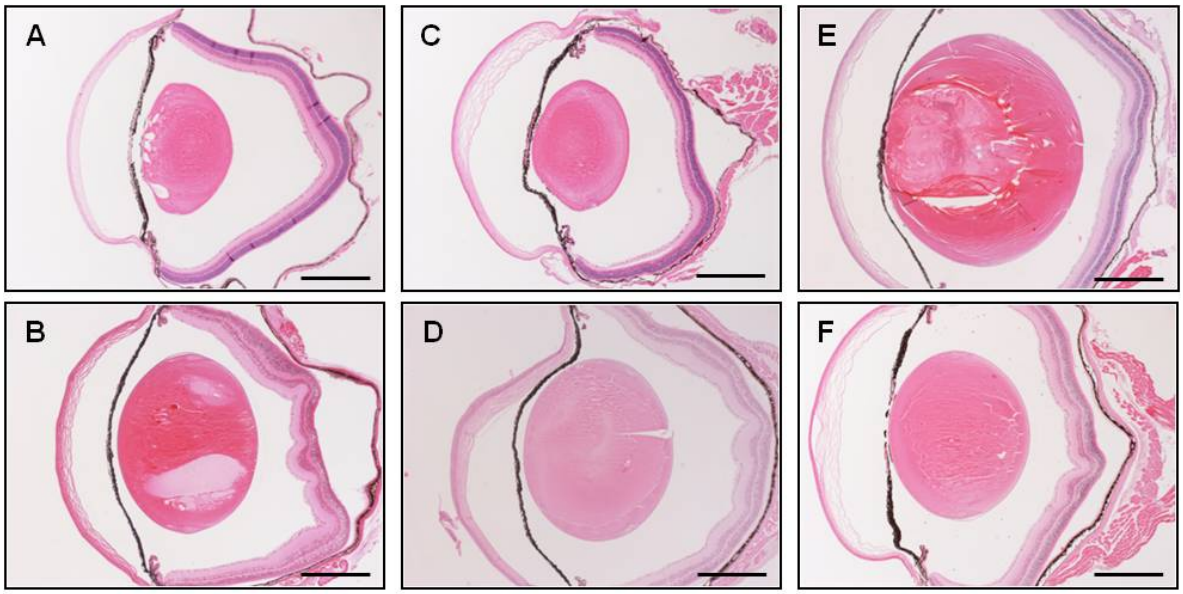


Figure 3-5. NAC投与による白内障への効果 (H.E.染色)

dwgldwg (A,B)、野生型(C,D)、NAC投与*dwgldwg* (E,F)、生後3週齢(A,C)、生後9週齢(B,D)、生後9週齢のNAC投与*dwgldwg* (E,F)。Bar=500μm。

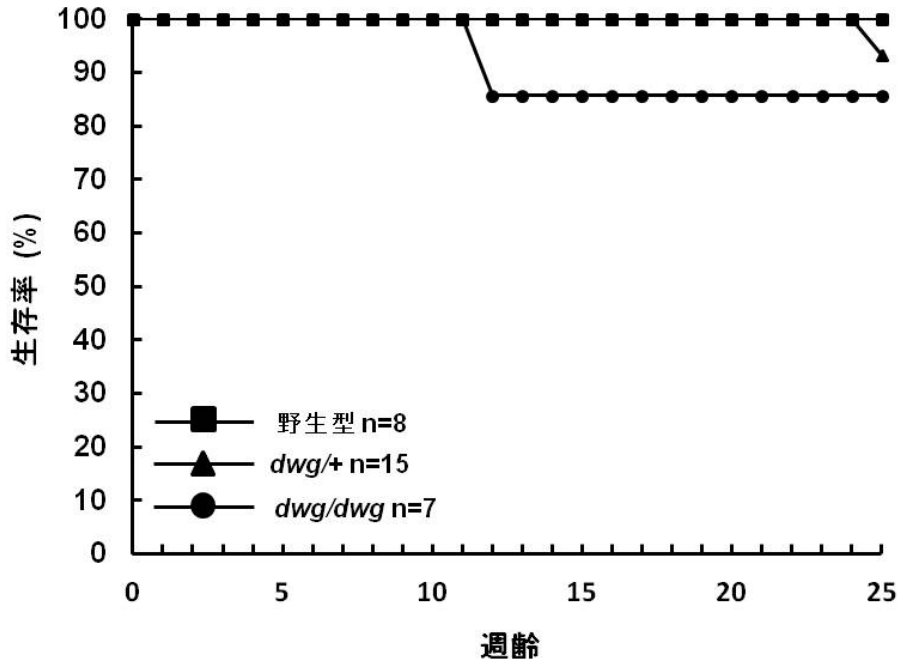


Figure 3-6. 生後25週齢までの生存曲線 (Kaplan-Meier survival plot)

野生型、*dwg/+*、*dwg/dwg*の生存曲線(Kaplan-Meier survival plot)を示す。累積的な生存率は各週齢ごとにプロットした。*dwg/dwg*と他の2つのグループとの間に有意な差は認められなかった。log-rank test、$p > 0.05$。

第 4 章

雌雄の生殖機能異常に関する解析

4-1　緒言

健康上の問題はないが重要なライフイベントの一つである「妊娠・出産」に至ることができない不妊症は主に先進国で深刻な問題となっている。現在、様々な生殖補助医療が開発され不妊治療に広く貢献しているが、不妊となる原因が不明な場合も多く、根本的な治療法はほとんど確立されていない。さらに畜産分野においても、人口増加に伴う食糧問題に対応するため、効率的な家畜生産技術の開発が求められている。家畜生産の現場において、受精胚の作出技術や出産時期の調節技術が飛躍的に進んでいる一方で、その出産率が低いことや排卵誘起剤の効果に個体差があることなどが問題となっている。そのため、人の不妊症の治療法・予防法の開発を含め、多くの研究機関で生殖制御機構の解明を目的とした研究が盛んに行われているが、関与する因子が生殖器官、配偶子、ホルモン、環境要因と多岐にわたるため、いまだに不明な点が多い。

雄が正常な繁殖能力を得るためには、まず雄性生殖器官が形成されることが必要である。雄性生殖器官は精巣、精巣上体および精管と、副生殖腺である精嚢、前立腺および尿道球腺と、尿道および陰茎からなり、精子の産生、貯蔵、輸送が主な機能である。また、雄性配偶子である精子の形成は精巣の精細管内で進行し、完成された精子は精巣を出て精巣上体管へと至る。この精子は精巣上体で運動性を獲得するほか、受精可能な状態に成熟する。精子は精巣上体管からさらに精管へと移送され、精嚢で分泌される成分を多く含む精漿と合わさり精液として体外へ放出される。

一方、雌が正常な繁殖能力を得るためには、雌性生殖器官である卵巣、卵管、子宮が

形成されることが必要である。雌性配偶子である卵母細胞は、卵母細胞とそれを取り囲む卵胞上皮細胞及びその周囲の間質から構成される卵胞として卵巣に存在している。卵胞は、その発育段階によって原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞に分けられる。性成熟後、ホルモンの影響によって性周期ごとに一定数の原始卵胞が発育を開始し、排卵にいたる。排卵された、卵母細胞は卵管采にとらえられて卵管に導かれ、ここで受精する。受精した卵は子宮まで下降して、着床し、胎盤を形成する。

これらの過程において、雄または雌のどちらかで、1 つでも異常が生じると不妊となるか、繁殖能力の低下につながる。そのため、不妊となった場合さまざまな要因が考えられ、その原因を明らかにすることは難しい。不妊を呈するマウスを用いてその原因を明らかにしていくことで、ヒトや家畜において同様な病態を示し、不妊となっている場合の治療や予防に貢献できることが期待される。

GSH は、生殖機能を含めた多くの生理学的プロセスにおいて重要な役割を果たしていることが知られている(Knapen M.F. et al. 1999)。細胞内の GSH 濃度の制御に重要な酵素の一つとして GGT が知られており(Lieberman M.W. et al. 1995)、この GGT は多くの生物種において精巣、精嚢、精巣上体を含む雄の生殖器官において広く発現していることが明らかとなっている(Hanigan M.H. and Frierson H.F.Jr. 1996, Chikhi N. et al. 1999)。一方で、精巣、精巣上体および精子において、酸化ストレスによる損傷からの保護に GSH が重要であることが知られているが(Li TK. 1975, Evenson D.P. et al. 1993, Knapen M.F. et al. 1999)、これらの効果に GGT が関与しているかは不明である。さらに GGT はヒトにおいて卵巣、卵管、子宮内膜など、雌の生殖器官においても広く発現していることが明らかとなっている(Hanigan M.H. and Frierson H.F.Jr. 1996)。しかし、卵巣内の卵胞や間質細胞などにおける GSH の分布と GGT の発現については、不明な部分が多く、卵巣における役割は不明である。

これまでに、*dwg/dwg* 個体では雌雄どちらも不妊となるとされているが、詳細な報告はないため、不妊の程度やその原因は不明である(Harris B. and Davisson M.T. 1990)。一方 GGT1 欠損個体の解析から、GGT1 を欠損すると雌雄共に不妊を呈することが明らかにされている。これまでに GGT1 欠損雄個体では、精巣、精巣上体、精嚢が小さく、精巣上体の組織学的解析から、精子が形成されているものの野生型個体と比較して減少していることが報告されている。また、精子は運動能を持たないことも明らかにされているが、受精能の有無は不明である(Kumar T.R. et al. 2000)。一方、GGT1 欠損雌個体では卵巣および子宮が低形成となっており、10-11 週齢の卵巣の組織学的解析から、胞状卵胞および黄体が形成されていないことと、性周期が停止していることが報告されている(Kumar T.R. et al. 2000)。さらに、GGT1 欠損雌個体では血清中の FSH 濃度が低下し、過排卵処理に対する感受性もないことから、GGT1 欠損雌個体における不妊の原因のひとつは、卵巣における異常である考えられている。*dwg/dwg* 個体では GGT タンパクが正常に機能していないことから雌雄どちらも GGT1 欠損個体と同様の原因で不妊となっていることが予想される。しかし、これまでの研究から残存している GGT の酵素活性の違いにより、GSH 濃度の変化を含め、白内障の重症度や生存率にも GGT1 欠損個体と *dwg/dwg* 個体とで違いが生じていることから(第 3 章、Liberman M.W. et al. 1996, Chévez-Barrios P. et al. 2000)、生殖機能においても GGT1 欠損個体と *dwg/dwg* 個体で重症度が異なることが予想された。

そこで本研究では、生殖器の重量の測定および組織標本の作製と体外受精を行うことで *dwg/dwg* 個体の不妊の原因解明を試みた。

4-2　材料及び方法

●試供動物

*dwg/+*個体同士の兄妹交配によって得られた正常(野生型、*dwg/+*) 個体、および *dwg* ホモ(*dwg/dwg*)個体を解析に用いた。

●*N*-Acety-L- cysteine(NAC)添加水の給餌

粉末 NAC(Sigma)を水道水に 10g/L の割合で溶かし、給水ビンに入れて自由摂取させた。給餌期間は、離乳期にあたる生後 3 週齢から開始し、6 週間は単飼いし、その後繁殖試験を行うために NAC を与えていた *dwg/dwg* 雄個体と正常雌個体を同居させ、妊娠、出産、離乳まで NAC を継続して与えた。

●ヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色

H.E.染色は、第 1 章と同様の方法で行った。

●組織重量の測定

雄マウスについては生後 10-11 週齢を用いて、安楽死させてすぐに精巣、精巣上体、精嚢を採取し、phosphate-buffered saline (PBS)で洗浄した後、キムワイプで軽く水分をとり、電子天秤にて定量した。雌マウスでは生後 10-11 週齢を用いて、安楽死させてすぐに卵巣および子宮を採取し、PBS で洗浄した後、キムワイプで軽く水分をとり、電子天秤にて定量した。子宮は卵管采から膣口までを採取し、膣口から約 2mm を切断することで体毛を除去した状態で計量した。

●膣スメアの検査

性周期は、単飼いしている生後 8-12 週齢の雌個体において、Champlin A.K らの評価方法に則って行った(Champlin A.K. et al. 1973)。膣スメアは毎日午前中の同時刻(10-11 時の間)に 14 日以上連続で採取した。まず、スポイトに約 50μl の PBS を取り、膣の中へ入れた後に再び吸い出し、スライドガラスに乗せた。その後、一度室温で乾燥させ、4%ギムザ液にて 30 分染色後、流水で洗浄、室温にて乾燥させた。

●体外受精

生後 10 週齢の未交尾の雌個体に対して、まず妊馬血清性ゴナドトロピン(PMSG: ASKA Pharmaceutical. Co., Ltd) を 5IU 投与し、その 48 時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG; Takeda Pharmaceutical. Co., Ltd.)を 5IU 投与することにより過排卵を誘起した。hCG 投与 16 時間後に、卵管を採取し、35mm ペトリデイッシュ上に用意していた流動パラフィンで覆った 200μl TYH 培地(Mitsubishi Chemical Medience Co.)へ移した。その後、卵管を針刺し、卵を回収した。

精子は、精巣上体尾部から回収し、35mm ペトリデイッシュ上に用意していた流動パラフィンで覆った 100μl の TYH 培地に懸濁後、5%CO_2、37℃の条件下で 1-1.5 時間インキュベートした。終濃度 2.0×10^6 個/ml の精子を、卵を培養している 200μl TYH 培地へ入れ、受精させた。受精後、5%CO_2、37℃の条件下で 5-6 時間インキュベートし、35mm ペトリデイッシュ上に用意していた流動パラフィンで覆った 100μl M16 培地のドロップ 3 つの中で順に洗浄した。新しい 100μl M16 培地へ移した後、卵の数を数え、5%CO_2、37℃の条件下で 20 時間インキュベートした。次に、35mm ペトリデイッシュ上に用意していた流動パラフィンで覆った 100μl KSOM 培地(ARK resource Co., Ltd.)のドロップを 3 つ用意し、そのうち 2 つの中で順に洗浄し、最後に 3 つ目の新しい KSOM 培地に移した。卵の数を数えたのち、5%CO_2、37℃の条件下でインキュベートし胚盤胞期胚へと到達するまで 24 時間ごとに各ステージの卵の数を数えた。

●検定

検定には、独立した 2 群の *t* 検定を行い、*p* 値が 0.05 より小さいものを統計的に有意であるとした。また、体外受精ではχ^2 検定を行い、*p* 値が 0.05 より小さいものを統計的に有意であるとした。

4-3　結果

dwg/dwg 個体の生殖に関する表現型を明らかにするために、まず *dwg/dwg* 個体の繁殖能力を調べた。4 組の野生型同士の交配では、10 週齢において 1 産あたり約 6 匹(6.0 ± 1.6 匹 / 1 産あたり ；n=24) の仔が得られたが、*dwg/dwg* 雄個体と正常雌個体または正常雄個体と *dwg/dwg* 雌個体とを用いた場合には、どちらの組み合わせでも 3 か月以上同居させても産仔を得ることができなかった。さらに、同様の組み合わせで雌個体に対して PMSG/hCG による排卵を誘起させた後、同居させても *dwg/dwg* 個体の雌雄どちらを用いた場合もプラグの形成が認められなかった(各 3 回)。

次に、*dwg/dwg* 雄個体における不妊の原因を明らかにするために、精巣、精巣上体、精嚢の重量測定と組織学的解析を行った。その結果 *dwg/dwg* 雄個体では、生後 9-10 週齢の精嚢および精巣上体の重量がそれぞれ野生型雄個体の 28.9%、66.1%であった。一方、精巣の重量は *dwg/dwg* 雄個体と野生型雄個体とで差が認められなかった(Fig 4-1 A, B)。次に精巣および精巣上体の組織学的解析を行ったところ、精子形成が正常に進み、精子が形成され、精巣上体管内に精子が存在する様子が観察された(Fig 4-2 B,D; 4-3)。しかし、精嚢の組織学的解析から、*dwg/dwg* 雄個体では精嚢内の分泌物がほとんど蓄積されていない様子が観察された(Fig 4-4 C,D)。

次に、*dwg/dwg* 雄個体由来の精子に受精能および初期発生能があるかを明らかにするために、体外受精を行った。*dwg/dwg* 雄個体由来の精子は、正常雌個体(野生型または *dwg/+*)由来の卵子と受精することはできるものの、2 細胞期への発生率が正常個体由来の精子および卵子を用いた場合に比べ、減少することが明らかとなった。しかし、その後の 2 細胞期から胚盤胞期への発生率に異常は認められなかった(Table 4-1)。

次に、*dwg/dwg* 雌個体が不妊となる原因を明らかにするための解析を行った。雌には性周期がありマウスにおけるその期間は 4-5 日である。さらにその期間を発情前期、発情期、発情後期、発情休止期の 4 つのステージに分けることができ、マウスやラットではこの性

周期を膣内のスメアを採取することに判別することが可能である(Champlin A.K. et al. 1973, Caligioni C.S. 2009)。そこでまず、性周期が正常に進行しているかを明らかにするために、14 日間、同時刻にスメアを採取し観察した。その結果、正常雌個体では周期的に変化する 4 つのすべてのステージを確認することができたが、*dwg/dwg* 雌個体では発情休止期のスメア像しか観察されず、正常に性周期が進行していないことが明らかとなった (Fig 4-5)。

性周期が正常に進行していない場合、卵巣や子宮の重量が減少するミュータントマウスが報告されているため(d'Anglemont de Tassigny X. et al. 2007)、*dwg/dwg* 雌個体においても卵巣および子宮の重量が低下していることが予想された。そこで正常雌個体では性周期の各ステージで、*dwg/dwg* 雌個体では発情休止期に、生後 9-10 週齢において卵巣および子宮を採取し重量の測定を行った。正常雌個体では、卵巣および子宮の重量が性周期に伴って変化し、卵巣では発情後期に、子宮では発情期にその重量は最も大きくなり、卵巣および子宮のどちらも発情休止期でその重量は最も小さくなった。一方、*dwg/dwg* 雌個体では、卵巣および子宮のどちらも正常雌個体の発情休止期よりも重量が小さく、低形成であることが明らかとなった(Fig 4-6)。

子宮は、主に外膜・筋層・内膜から構成されており、内腔側は単層円柱上皮細胞におおわれている。さらに内膜はエストロゲンやプロゲステロンといった卵巣から分泌されるホルモンに依存してその構造が変化しており、正常な場合、休止期では高さの低い単層円柱上皮細胞が整然と並んでいる様子が、発情期には単層円柱上皮細胞に空胞が多数形成される様子が観察される(Fig 4-7 A,C)。一方、*dwg/dwg* 雌個体では、単層円柱上皮細胞が発達した様子は観察されず、休止期様の低い単層円柱上皮細胞が並んだ様子のみが観察された(Fig 4-7 B,D)。

卵巣が低形成となる原因には、卵胞形成が前胞状卵胞で停止している(Kumar T.R. et al. 2000, d'Anglemont de Tassigny X. et al. 2007)、胞状卵胞の腔洞が十分に発達していな

い(Dierich A. et al. 1998)、排卵直前まで卵胞形成が進行するが排卵が起きないために黄体が形成されない(Baker J. et al. 1996)など、卵胞形成や排卵に関連するものが多くある。そこで、*dwg/dwg* 雌個体の卵巣では卵胞形成が正常に進行しているかを明らかにするために、卵巣の組織標本を作製し、観察した。その結果、原始卵胞から胞状卵胞が形成されていることと、閉鎖卵胞を確認することはできたが、黄体の形成は確認できなかった(Fig 4-8 B,C)。

そこで次に、排卵が正常に起きるかを明らかにするために生後 10-12 週齢の正常雌個体および *dwg/dwg* 雌個体に対して PMSG/hCG 投与により排卵を誘起させた後、卵管膨大部内の卵を回収し、排卵数を計測した。その結果、*dwg/dwg* 雌個体と正常雌個体とで排卵数に有意な差は認められなかった(Fig 4-9)。

次に、*dwg/dwg* 雌個体由来の卵が受精能および初期発生能を持つかを明らかにするために、体外受精を行った。その結果、*dwg/dwg* 雄個体由来の精子を用いた場合と同様に、受精はできるものの、2 細胞期への発生率は正常個体同士を用いた場合に比べ低かった。一方で 2 細胞期から胚盤胞期への発生率は正常であった(Table 4-1)。

次に、繁殖能力や生殖器の低形成に対する NAC の効果を調べるために、生後 3 週齢から NAC を投与し、生後 10 週齢から NAC 投与 *dwg/dwg* 雄個体と正常雌個体または正常雄個体と NAC 投与 *dwg/dwg* 雌個体の組み合わせで同居させた。その際、NAC は継続的に与えた。その結果、NAC を投与した *dwg/dwg* 雄個体では、3 個体中 1 個体から産仔を得ることができた(8 匹)。さらに各生殖器重量を測定したところ、*dwg/dwg* 雄個体では生後 10 週齢における精巣上体および精嚢の重量が正常個体と同程度になり(Fig 4-1 B)、さらに精嚢では正常雄個体と同様に精嚢内に分泌物が満たされている様子が観察された(Fig 4-4 E,F)。一方、NAC を投与した *dwg/dwg* 雌個体では、周期性は安定しないものの、性周期の 4 つのステージを確認することができ、4 個体中 2 個体から産仔を得ることができた(5 匹 / 1 産あたり;n=10)。さらに休止期様のスメア像が観察される時の子宮および卵巣重量が正常雌個体と

同程度になった(Fig 4-5)。

4-4　考察

dwg/dwg 雄個体では不妊を呈しており、精巣、精巣上体、精嚢の重量の測定から、精巣上体、精嚢が低形成となっており、精子は形成されるものの、精嚢内の分泌物がほとんど蓄積していないことが明らかとなった。さらに、NAC を投与することにより *dwg/dwg* 雄個体で認められた生殖器の異常は改善され、産仔も得られた。

精嚢は雄の生殖器であり精漿に必要なタンパクを合成する機能を持つ。この精漿は、精子の移送や精子のエネルギー源として重要なだけでなく、マウスでは射精後のプラグの形成にも必要であり、精嚢を除去すると繁殖能力が低下することが報告されている(de Lamirande E. 2007, Peitz B. and Olds-Clarke P. 1986, Pang S.F. et al. 1979) 。さらに、精嚢の分泌機能はアンドロゲンの作用に依存しており、精嚢の機能および構造を正常に保つためには､アンドロゲンが必要であることが明らかにされている(Welsh M. et al. 2010)。*dwg/dwg* 雄個体では、精嚢重量が正常雄個体の 30.3%しかなく、精嚢内に分泌物が蓄積されないために、精子の成熟や受精能の獲得などに異常が生じ、不妊となっている可能性が考えられた。一方、GGT1 欠損雄個体では *dwg/dwg* 雄個体と異なり精巣上体および精嚢だけでなく、精巣も重量が低下しており、さらに精子の量が減少し、運動能も失っていることが報告されている。また、精巣上体、精嚢などの雄性副生殖器の形成に重要なアンドロゲンの一種である血清中のテストステロン濃度が GGT1 欠損雄個体では低下しているため(Kumar T.R. et al. 2000)、*dwg/dwg* 雄個体においてもテストステロンが低下していることが予想される。一方で、一般的にテストステロンを欠乏すると GGT1 欠損雄個体と同様に精巣も低形成となることが報告されていることから、*dwg/dwg* 雄個体では他の要因によって低形成が生じている可能性も考えられるため、テストステロンだけでなく他の因子についても検討する必要がある。

一方､*dwg/dwg* 雌個体においても不妊を呈しており､卵巣および子宮の重量の測定から、その両方が低形成となっていることが明らかとなった。また、子宮の組織学的解析から

dwg/dwg 雌個体では、発情休止期様の内膜しか観察されなかったことから、子宮が正常に機能しないために、膣スメアも子宮内膜と同様に休止期のみが観察されることが考えられた。また、性周期に伴った子宮の内膜の構造の変化は、卵巣から分泌されるホルモンの作用に依存しているため、卵巣の機能異常が起きていることも予測されたが、卵巣の組織学的解析の結果から、*dwg/dwg* 雌個体では卵胞形成が進行し胞状卵胞が形成されていることが明らかとなり、卵巣に卵胞形成の進行に必要な機能が残存していることが考えられた。

dwg/dwg 雌個体のように、卵巣や子宮が低形成となる原因に卵胞刺激ホルモン(FSH)の減少がある。しかし、FSH を欠損すると、雌では卵巣で卵胞腔が形成されなくなり、雄では精巣が低形成となる一方で、精子形成は進行し、その数は減少するものの運動能を有すること、さらに精巣上体および精嚢は正常個体と顕著な差はないことが報告されている(Kumar T.R. et al. 1997)。GGT1 欠損雄個体において血清中の FSH が減少することが報告されているため(Kumar T.R. et al. 2000)、*dwg/dwg* 雌個体においても FSH 濃度が減少し、それにより卵巣や子宮の低形成が引き起こされている可能性も予想されるが、FSH を欠損しても精巣上体および精嚢に異常が生じないことから、*dwg/dwg* 個体における不妊の原因としての FSH の欠乏の関与は低いことが考えられる。また、FSH の他に排卵刺激ホルモン(LH)が減少した場合にも卵巣や子宮が低形成となることが知られている。しかし LH の場合も、欠損すると雌では卵巣で卵胞腔が形成されなくなり、雄では精巣が低形成となり、精子形成も円形精子細胞の時点で停止してしまうことが報告されており(Ma X. et al. 2004)、*dwg/dwg* 個体において LH 濃度の低下が起きていることは考えにくく、不妊の直接的な原因ではないことが考えられる。

さらに *dwg/dwg* 雌個体では PMSG/hCG 処理による排卵刺激に対する感受性があったことから、卵巣の機能に異常はなく、FSH や LH の分泌に異常はないが、排卵刺激である LH サージやそれに関連するその他の因子に異常が生じ、排卵が起きていない可能性が考えられる。特に排卵が起こるために必要であると考えられている、卵丘細胞の膨潤/膨化は LH

サージにより誘発されるが、この卵丘細胞の膨潤/膨化には活性酸素(ROS)が関与していることが知られており、ROS は抗酸化物質である NAC や GSH により消失または減少することも報告されていることから(Shkolnik K. et al. 2011)、*dwg/dwg* 雌個体では細胞内の GSH 濃度が正常に保たれていないために卵丘細胞の膨潤/膨化が起きず、排卵が起きていない可能性が考えられる。

また、*dwg/dwg* 雌個体においても、GGT1 欠損雌個体と同様に NAC を投与することにより、生殖器の異常は改善され、産仔が得られたことから、*dwg/dwg* 雌個体における不妊の原因は GGT1 欠損雌個体と類似していることが予想される。しかし一方で、GGT1 欠損雌個体における不妊の原因は、卵胞形成の進行が停止し、卵胞腔が形成されないことから、卵巣の機能異常であると考えられており(Kumar T.R. et al. 2000)、*dwg/dwg* 雌個体とは表現型が異なるため、*dwg/dwg* 雌個体における不妊の原因も GGT1 欠損雌個体とは異なるか、*dwg/dwg* 雌個体で認められる異常が重症化した場合に、GGT1 欠損雌個体と同様の異常が発症することが考えられる。

以上の結果から *dwg/dwg* 雌個体では、GGT1 欠損雌個体とは異なり卵巣の機能異常ではなく、排卵の誘起が起きないこと、子宮が低形成となり正常に機能していないことが不妊の原因として考えられるが、その直接の原因が FSH または LH の機能異常である可能性は低いことが考えられた。

卵胞形成の進行には必要不可欠ではないが、排卵の過程で重要な役割をもつ因子としてインスリン様成長因子の一つである IGF-1 がある。IGF-1 を欠損すると、卵巣中の卵胞は小さく、排卵は起きないものの、卵胞腔が形成され、卵胞の発生が排卵直前まで進行することが確認されている(Baker J. et al. 1996)。さらに、卵巣、子宮が低形成となり、性周期が停止することも報告されている。IGF-1 を欠損した雄においても精巣、精巣上体、精嚢が低形成となり、精嚢内の分泌物が蓄積されないことが報告されていることから、*dwg/dwg* 個体では、IGF-1 が低下しているか機能していないことが予想された。

一方、体外受精の結果から、雌雄どちらの配偶子も受精することができ、2 細胞期への発生率は低下するものの、2 細胞期から胚盤胞期への発生率に異常が認められず、半数以上の卵が胚盤胞期まで達した(*dwg/dwg* 雄個体を用いた場合; 52.8%、 *dwg/dwg* 雌個体を用いた場合; 69.6%)ことから(Table 4-1)、*dwg/dwg* 個体における不妊の原因は、配偶子の形成不全また機能不全によるものではないことが考えられた。

これまでにブタの精子および卵子を用いた研究で、体外受精後に受精卵内で GSH 濃度が低下することが報告されていること(Funahashi H. et al. 1995)、さらにラットの精子および卵子を用いた研究においても体外受精後に受精卵内の GSH 濃度が低下することと、さらにその GSH 濃度の低下は受精後に受精卵内で起こる、精子核のクロマチンの脱凝縮と雄性前核形成が起きる期間に生じることと、同じ期間に GGT の酵素活性が上昇することが報告されている(Funahashi H. et al. 1999)。そのため、受精卵における雄性前核の形成に GSH の濃度の低下が重要であり、その GSH 濃度の低下に GGT が関与していると考えられている(Funahashi H. et al. 1999)。これらのことから、*dwg/dwg* 個体由来卵子または精子を用いた場合、受精卵内の GSH 濃度変化の調節が正常に行われないために 2 細胞期胚への発生率が低下することが予想される。さらに、ブタ精子の先体部および中部において GGT が発現していることが報告されていることから(Funahashi H. et al. 1996)、*dwg/dwg* 個体由来精子を用いた場合については卵への侵入ができない精子が増加している可能性も予想される。

以上の結果から、GGT1 の機能低下による組織中の GSH またはシステイン濃度の低下により雄では精巣上体および精嚢の低形成と精嚢の分泌物の欠如が、雌では排卵過程の異常と子宮の機能異常が引き起こされ、不妊となることが考えられた。

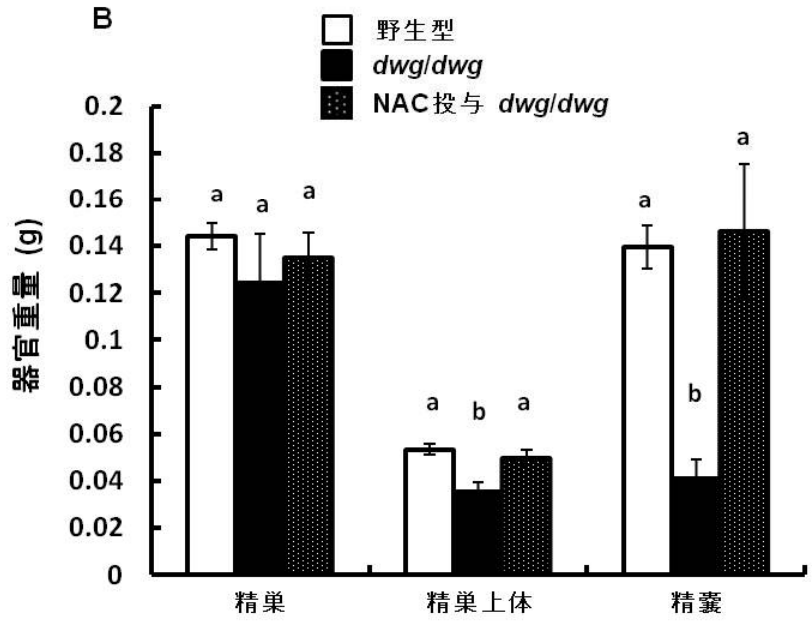


Figure 4-1. 雄性生殖器の形態学的解析

(A) 生後10週齢における雄性生殖器の形態。
(B) 9-10週齢における野生型、*dwg/dwg*、NAC投与*dwg/dwg*の精巣、精巣上体、精嚢の重量とNAC投与による変化。データは、平均値±SD (n=3-5)で示す。^{abc}異なる文字間で有意差あり ($p< 0.05$)。

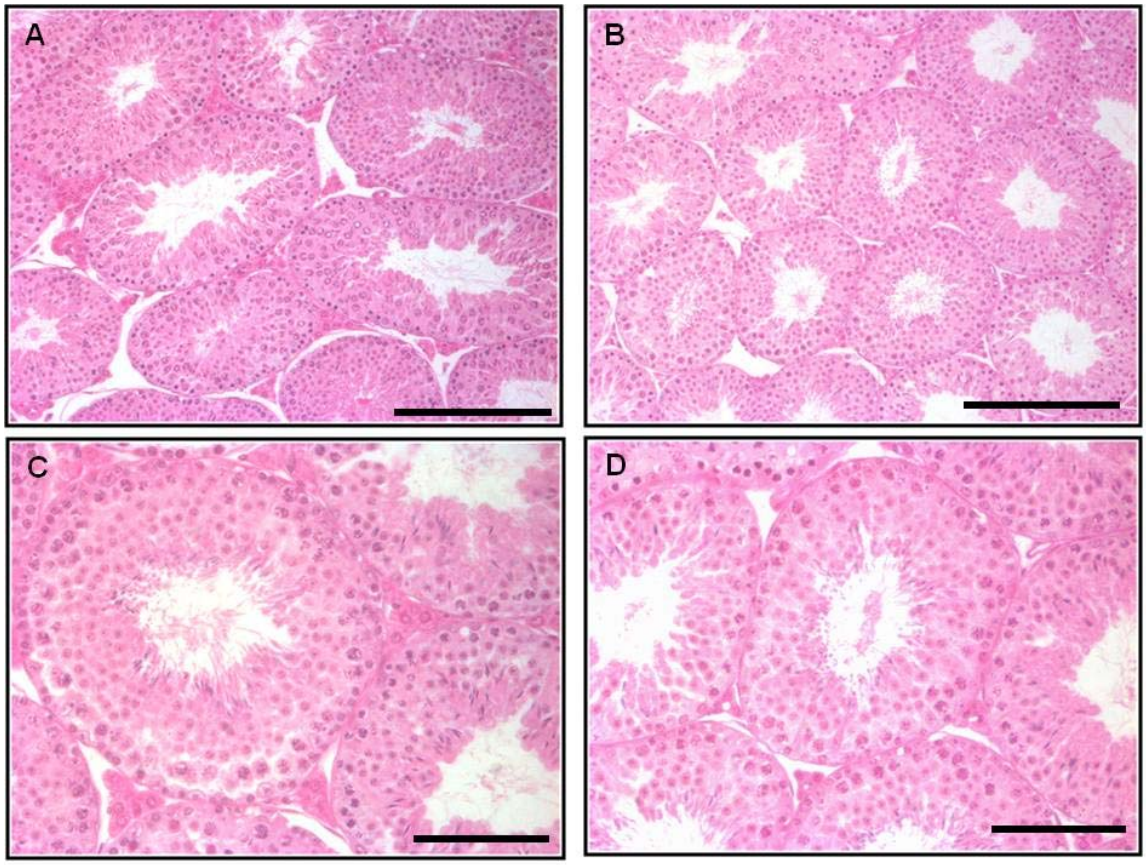


Figure 4-2. 精巣の組織学的解析 (H.E.染色)

生後10週齢における、野生型(A,C)および*dwg/dwg*(B,D)の精巣の組織標本。
Bar=200μm (A,B),100μm(C,D)

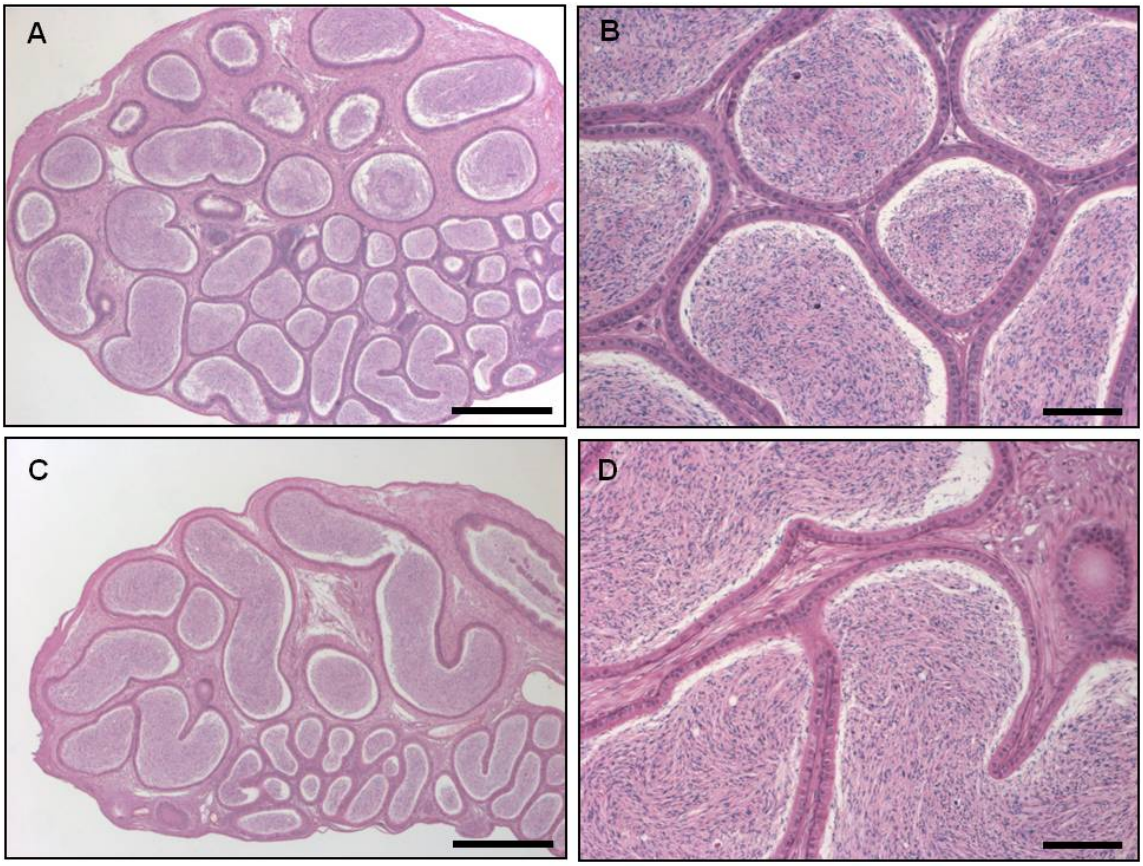


Figure 4-3. 精巣上体の組織標本 (H.E.染色)

生後9週齢における、野生型(A,B)および*dwg/dwg*(C,D)の精巣上体の組織標本。
Bar=500μm (A,C),200μm(B,D)

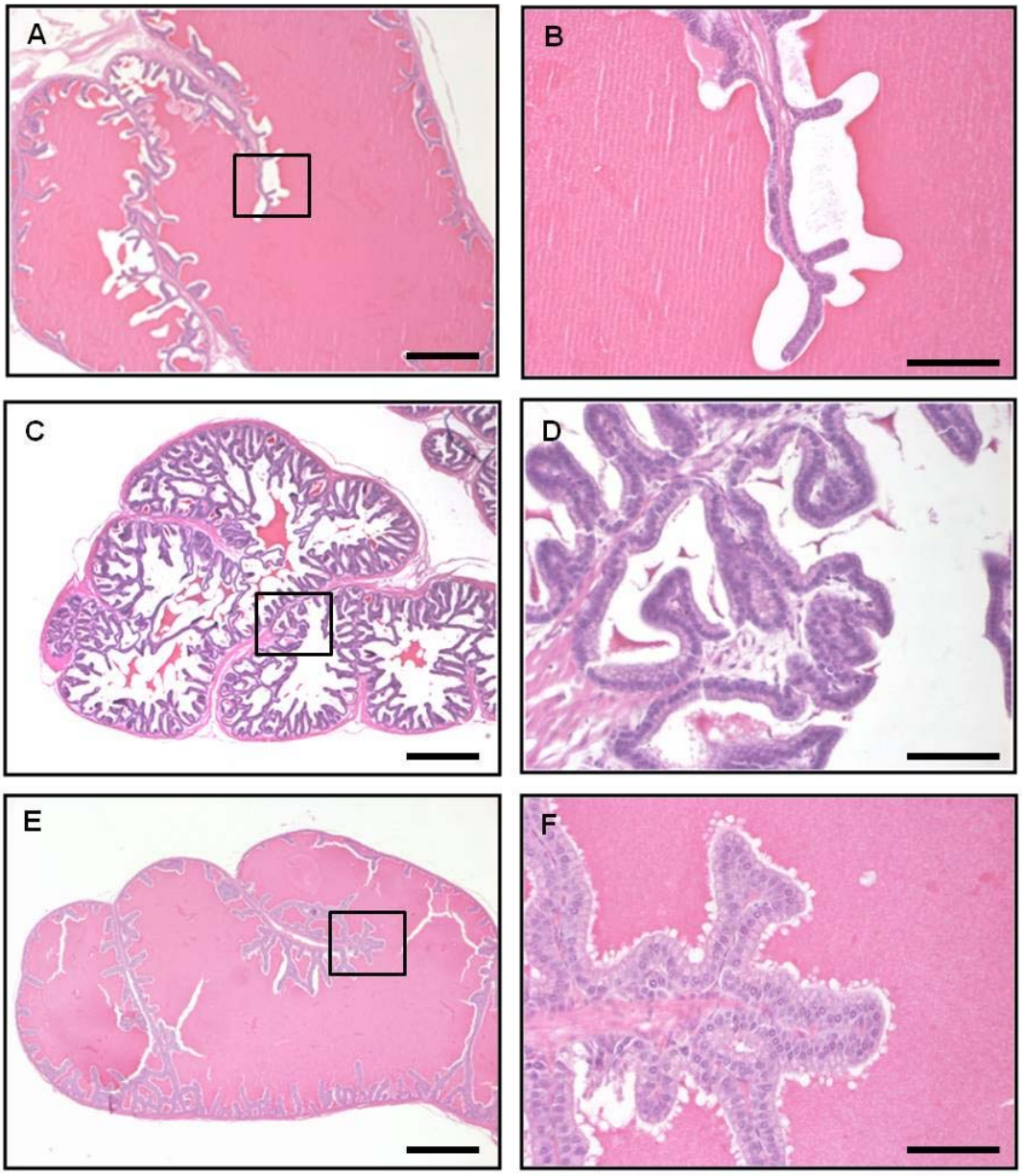


Figure 4-4. 精嚢の組織標本 (H.E.染色)

生後9週齢における野生型(A,B)、*dwg/dwg*(C,D)およびNAC投与*dwg/dwg*(E,F)の精嚢の組織標本。
Bar=500μm (A,C,E),50μm(B,D,F)

Table 4-1. 体外受精による受精能および初期発生能の検討

	供試した卵の数(個体数)	受精卵の数(%)		
		2細胞期胚[a]	胚盤胞期胚[b]	2細胞期から胚盤胞期胚[c]
正常 ♂ × 正常 ♀	179 (n=6)	125 (69.8)	100 (55.9)	100 (80.0)
dwg/*dwg* ♂ × 正常 ♀	103 (n=4)	53 (51.5)*	28 (27.2)*	28 (52.8)
正常 ♂ × *dwg*/*dwg* ♀	129 (n=5)	56 (43.4)*	39 (30.1)**	39 (69.6)

IVFは正常(野生型または*dwg*/+)と*dwg*/*dwg*の組み合わせで行った。
a : 精子と共に培養して、2細胞期胚まで発生が進行した卵の数と、( )内は供試した卵に対する、発生が進行した卵の割合。
b : 精子と共に培養して、胚盤胞期胚まで発生が進行した卵の数と、( )内は供試した卵に対する、発生が進行した卵の割合。
c : 精子と共に培養して、胚盤胞期胚まで発生が進行した卵の数と、( )内は2細胞期まで発生が進行した卵に対する、胚盤胞期まで発生が進行した卵の割合。
*$p < 0.01$, **$p < 0.001$ は、正常個体由来精子および卵子を用いた場合との比較結果を示す。

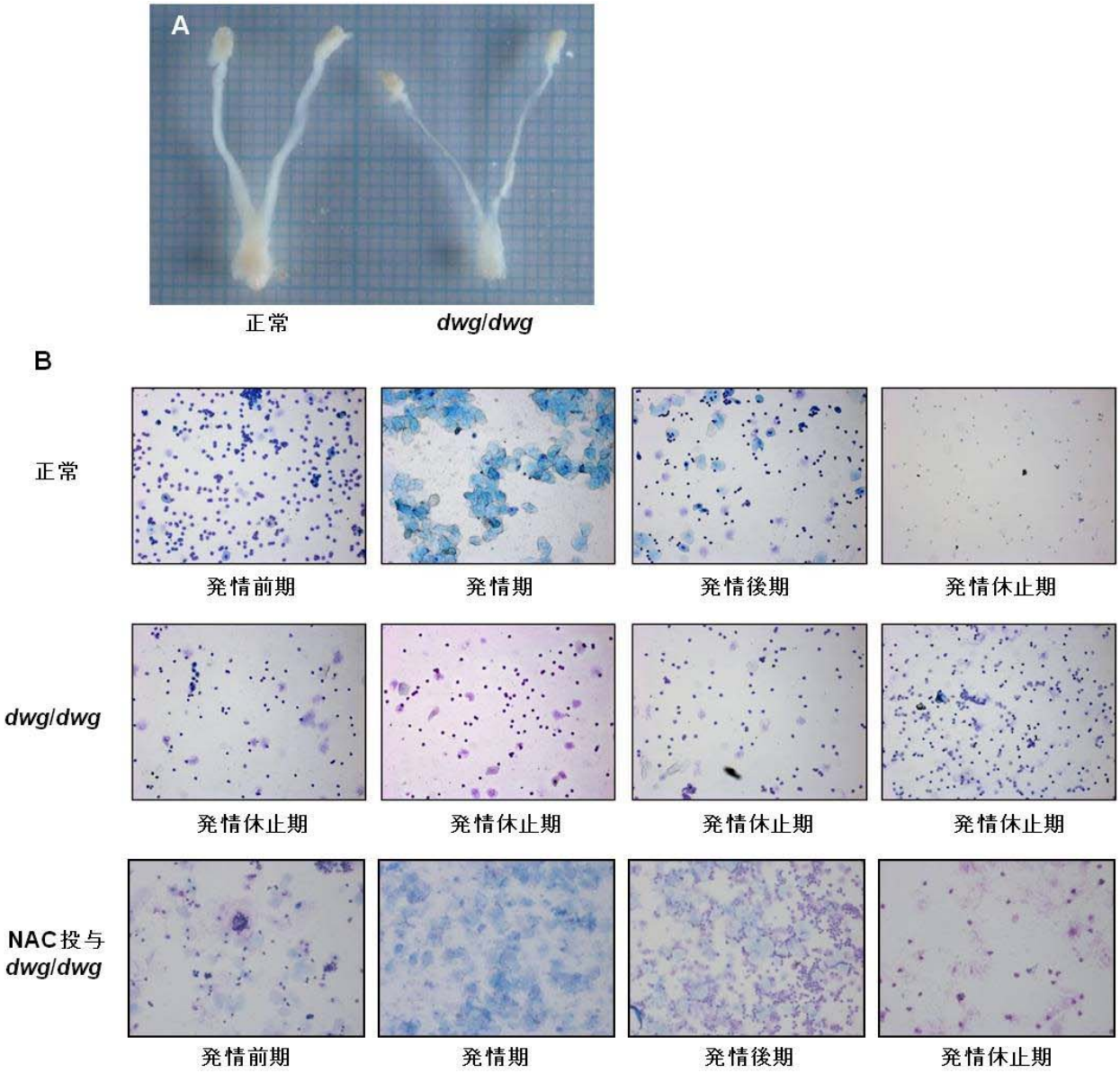


Figure 4-5. 雌性生殖器の形態学的解析および性周期の解析

(A)生後10週齢における雌性生殖器の形態
(B)生後10-12週齢における正常、*dwg/dwg*、NAC投与*dwg/dwg*の性周期の各ステージのスメア像。

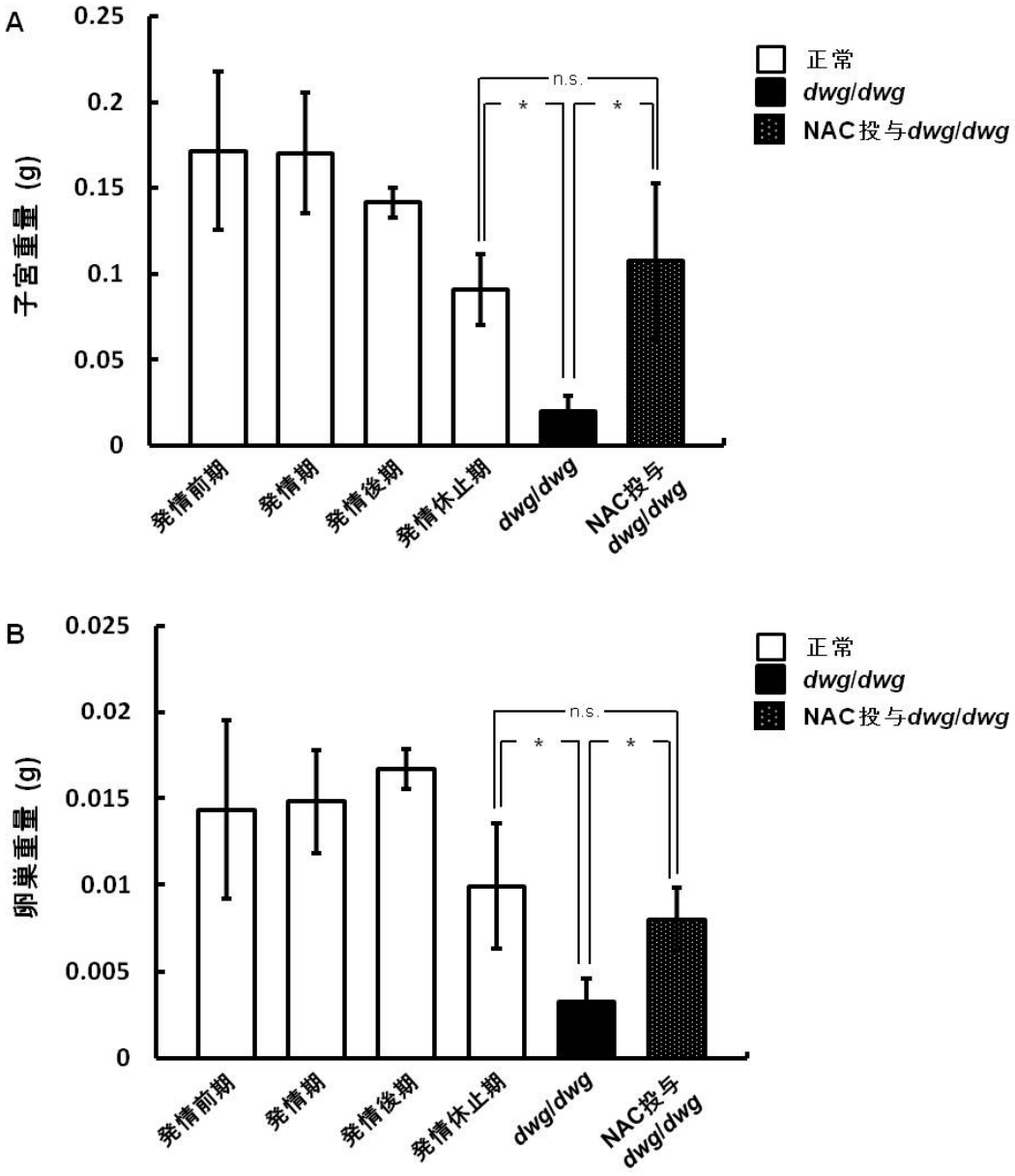


Figure 4-6. 子宮および卵巣重量の解析

生後9-12週齢の正常、*dwg/dwg*、NAC投与*dwg/dwg*の子宮(A)および卵巣(B)重量。
*p<0.05, n.s. :有意差なし。

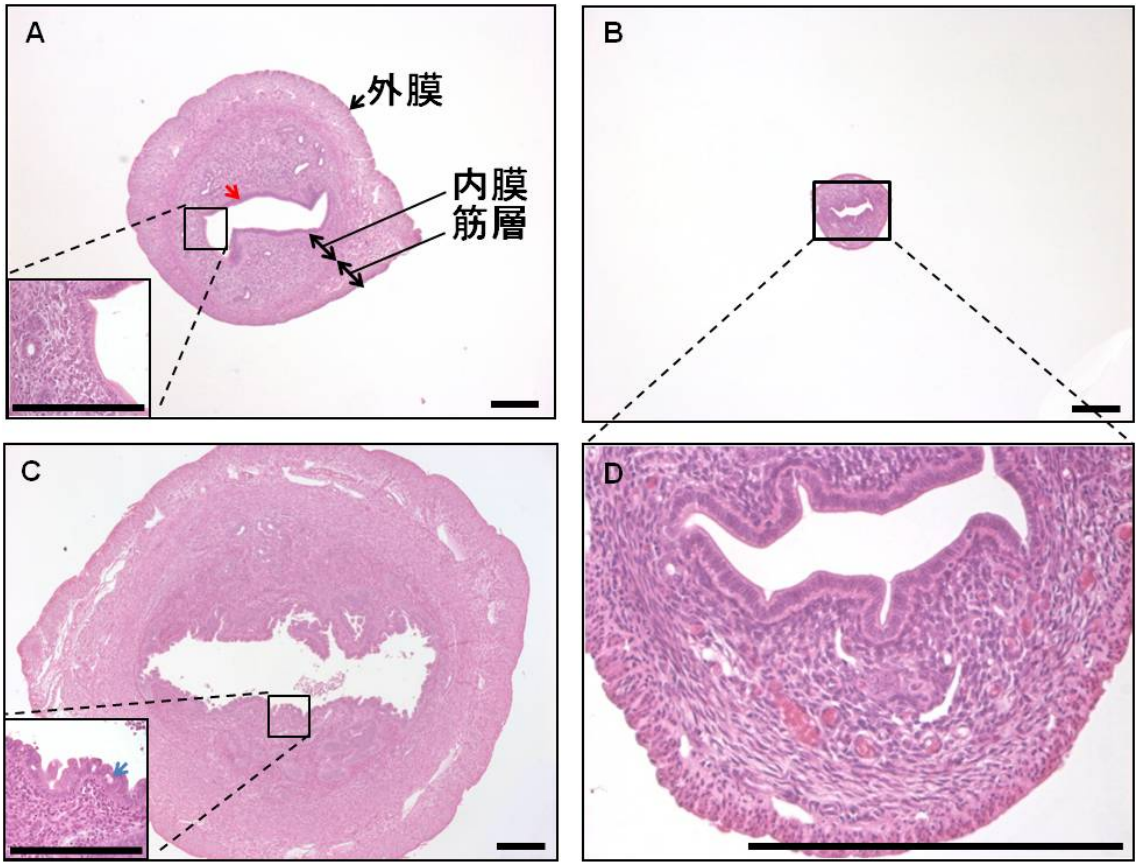


Figure 4-7. 子宮の組織学的解析 (H.E.染色)

生後9-12週齢における発情休止期正常(A)、発情期正常(C)、*dwg/dwg*(B,D)の子宮の組織標本。
↙: 単層円柱上皮、↙: 空胞、Bar=250μm

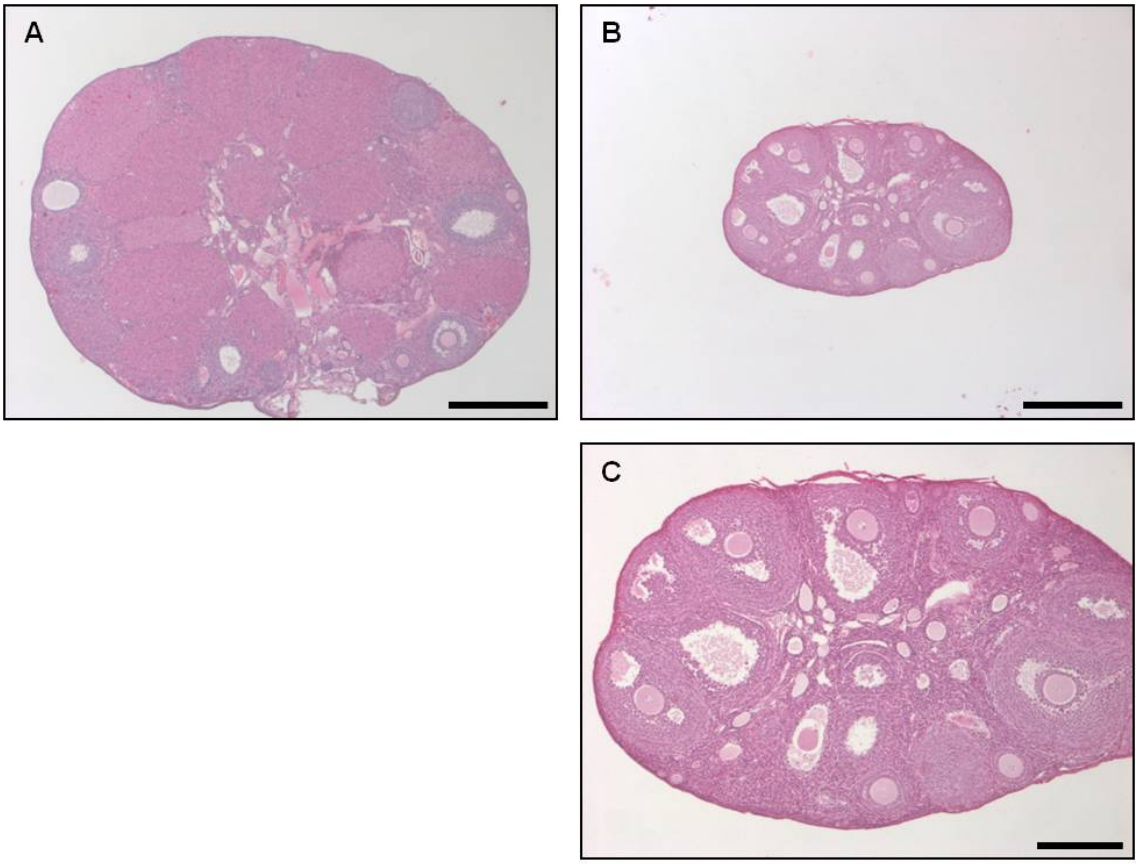


Figure 4-8. 卵巣の組織学的解析 (H.E.染色)

生後9-12週齢における発情休止期正常(A)、*dwg/dwg*(B,C)の卵巣の組織標本。
Bar=500μm (A, B),200μm(C)

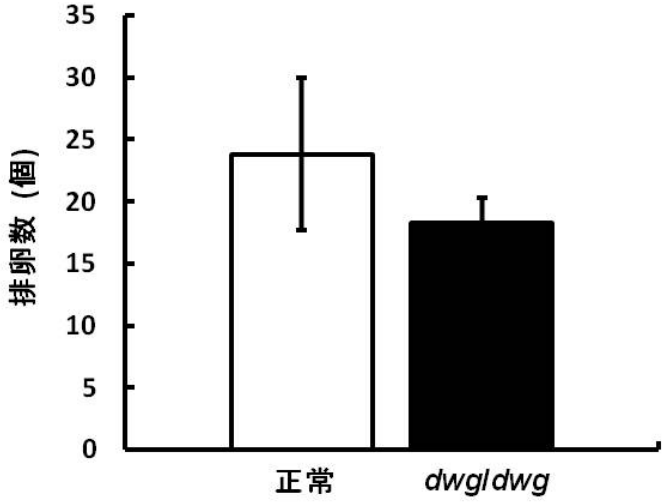


Figure 4-9. 過排卵処理による排卵数の計測

生後9-12週齢におけるPMSG/hCG投与による排卵誘起に対する感受性の検討。正常と*dwg/dwg*との間に有意な差はない。($p > 0.05$).

第 5 章

生殖制御機構における GGT1 の機能の検討

5-1　緒言

哺乳動物をはじめとする高等動物は、神経系、内分泌系そして免疫機構が 3 つの重要な柱として働くことで、体内の環境を安定に保って個体の秩序を維持している。内分泌系は繰り返し引き起こされる生体の内外における環境の変化に対応し、生体内の環境を一定に保つほかに、動物の行動様式を定めたり、発生の様々な段階で特定の器官の形態形成を誘導したりするなどの働きもする。内分泌とは、血液中に分泌されたホルモンが血流を介して標的器官に到達して作用する生体の調節系を示している。ホルモンは、動物の特定器官または細胞で産生される生理活性物質で、特に動物では内分泌腺や特定の神経細胞から分泌されており、産生部位から作用部位までの関係から、内分泌(エンドクライン)、傍分泌(パラクライン)、自己分泌(オートクライン)に分類される。

内分泌系は、生体が血流により主な細胞に科学的信号を送る機構と言える。ホルモンは一定以上の濃度(閾刺激：閾値)においてのみ作用し、また、その濃度が維持される時間だけ作用する。ホルモンがその特異的作用を発揮する端には、生体が必要とするときに、必要な量だけ存在しなけらばならない。そのために、生体には巧妙な分泌調節機構が備わっている。

生殖機能制御の中軸は、視床下部-下垂体-性腺軸と呼ばれる内分泌系にある。視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)は、下垂体前葉からの性腺刺激ホルモン分泌(GH)を調節しており、性腺における生殖細胞の分化およびホルモン分泌は、この GH による調節を受けている。そのため、最も下流にある性ホルモン分泌機能に異常がない場合にも、GH または GnRH を欠損すると、性ホルモン濃度が正常に保たれなくなることが

ある。

性腺刺激ホルモンによる刺激を受けて生成促進されるホルモンの一つにアンドロジェンの 1 種であるテストステロンがある。テストステロンは、排卵刺激ホルモン(LH)の刺激を受けた精巣のライディッヒ細胞において血漿中の低密度リポタンパク質(LDL)に由来するコレステロールから合成される。このコレステロールからテストステロンを合成する過程に、ライディッヒ細胞特異的に発現している酵素である 3*β*-hydroxysteroid dehydrogenase (3*β*HSD)が関与しており、ライディッヒ細胞のマーカーとして用いられている。テストステロンを欠乏すると精子形成が停止することや、テストステロンが減少すると雄性生殖器が低形成となることなどが報告されており、雄性生殖機能の維持にテストステロンは重要である。これらのテストステロンの機能から、*dwg/dwg* 個体ではテストステロン分泌に異常が生じていることが予想された。

一方、生殖機能の維持に重要な因子の一つに、インスリン様成長因子である IGF-1 がある。内分泌性の IGF-1 は、下垂体の GH により制御されて肝臓から分泌されているが、肝臓以外の組織では GH とそれ以外の組織特異的な因子により制御されている。正常な場合では下垂体から分泌された GH により、肝臓における IGF-1 の転写および分泌が促進され、この IGF-1 は標的組織に対しては特異的なレセプターに結合することで作用する。さらに肝臓から分泌される IGF-1 は下垂体にも作用しており、GH の合成および分泌を抑制している(Yakar S. et al.2005, Derek Le Roith. 1997)。そのため、循環性の IGF-1 が減少すると、GH の分泌が増加することが報告されている(Yakar S. et al., 2005, Yakar S. et al., 1999)。また、IGF-1 を欠損すると、雄では、精巣、精巣上体、精嚢の低形成と精嚢内の分泌物の欠如、さらにテストステロン濃度の低下を生じることが、雌では卵巣及び子宮の低形成を生じることが報告されている(Baker J. et al. 1996)。

これまでの研究から *dwg/dwg* 個体では、雌雄共に不妊を呈するが配偶子形成に不妊の原因となる異常はないことが明らかとなっている(第 4 章)。一方で、雄では精巣上体、精嚢が

低形成となっており、精嚢内の分泌物が欠如していることが明らかとなっている。雌では、性周期が停止しており、卵胞形成は進行しているものの排卵が起きていないことが予測されている。これらの *dwg/dwg* 個体で認められる異常は、IGF-1 欠損個体で報告されているものと非常に類似しているため、*dwg/dwg* 個体では IGF-1 が正常に機能していないことが予想された。

また、これまでの研究から、ヒトまたはマウスにおいて、精巣、精巣上体、精嚢で GGT が発現していることが明らかにされていることから(Hanigan M.H. and Frierson H.F.Jr. 1996, Lieberman M.W. et al. 1995)、GGT が生殖制御機構において何らかの役割を担っていることが考えられている。さらに GGT1 は転写開始位置の決定に関与するプロモーターが組織によって異なるために選択的スプライシングが起こることが知られており(Chikhi N. et al. 1999)、*dwg/dwg* 個体では IGF-1 欠損個体とは異なり精巣重量が変化していないことからも、各組織における GGT の酵素活性の変化の有無が *dwg/dwg* 個体の表現型に関与していることが予想された。

そこで本研究では、*dwg/dwg* 個体において精巣のライディッヒ細胞を免疫組織化学的方法で染色するとともに、血漿中のテストステロンおよび IGF-1 の濃度の測定と、NAC の IGF-1 濃度への効果の検討、さらに雄性生殖器における GGT の酵素活性を測定することで、GSH および GGT の生殖制御機構への関与を検討する。

5-2　材料及び方法

●試供動物

*dwg/+*個体同士の兄妹交配によって得られた正常(野生型、*dwg/+*) 個体、および *dwg* ホモ(*dwg/dwg*)個体を解析に用いた。

●*N*-Acety-L- cysteine(NAC)添加水の給餌

粉末 NAC(Sigma)を水道水に 10g/L の割合で溶かし、給水ビンに入れて自由摂取させた。給餌期間は、離乳期にあたる生後 3 週齢から開始し、6 週間は単飼いした。

●抗 3*β*hydroxysteroid dehydrogenase (3*β*HSD)抗体による免疫染色

まず 3 槽のキシレン（100%）槽に各 5 分ずつ通すことで脱パラフィンを行った。次に 2 槽の 100%エタノール槽に各 3 分ずつ通し、その後 95%、90%、80%、70%エタノール槽に 3 分ずつ通すことで脱キシレンを行い、最後に蒸留水に通し、脱アルコールと洗浄を行った。次に、蒸留水を含ませたペーパータオルの入った湿潤箱の中で、スライドグラスの水をよく切った上で組織を Liquid blocker で丸く囲み、組織が乾燥しないよう 1×PBS をスポイトで 1 滴ずつ組織上に滴下した。1×PBS を組織にのせ 5 分間、室温にて静置したのち、1×PBS を除去し、この工程を 3 回繰り返した。その後、1×PBS で希釈した 0.3%H_2O_2 を組織にのせ 20 分間、室温にて静置し、内因性ペルオキシダーゼを除去した。再度 1×PBS を組織にのせ 5 分間、室温にて静置したのち、1×PBS を除去する工程を 3 回繰り返した後、1×PBS で希釈した 1%正常血清(BSA)を組織にのせ 30-60 分、室温にて静置し、ブロッキングを行った。1%BSA を除去した後、一次抗体として抗 3*β*HSD 抗体を 3%BSA で 500 倍に希釈したものを組織にのせ、4℃で 24 時間静置した。一次抗体を除去し、再度 1×PBS を組織にのせ 5 分間、室温にて静置したのち、1×PBS を除去する工程を 3 回繰り返した後、horseradish peroxidase(HRP)標識二次抗体(rabbit)を 3%BSA で 400 倍に希釈したものを組織にのせ、室温にて 1 時間静置した。その後、1×PBS を組織にのせ 5 分間、室温にて静置したのち、1×PBS を除去する工程を 3 回繰り返した。DAB(20μl/ml、Dako)を組織にの

せ、室温にて静置し、発色具合を顕微鏡にて観察しながら反応時間を調節した。適当な色に発色したら、1×PBS または蒸留水にてしっかりと洗浄した。その後、ヘマトキシリン溶液〔1.0g/l ヘマトキシリン、0.2g/l ヨウ素酸ナトリウム、50.0g/l カリウムミョウバン、50.0g/l 抱水クロラール、1.0g/l 結晶性クエン酸(1 水和物)〕に 1 分間浸した。染色後、10 分間流水洗浄を行い、核の調色および色だしを行った。続いて脱水のため、70%、80%、90%、95%エタノール各槽に脱色具合を見ながら出し入れし、その後、100%エタノール 2 槽に各 1 分浸した。脱水後、透徹および封入のため 3 槽の 100%キシレン溶液槽に各 5 分ずつ浸し、エントランニューで封入した。

●血漿中の Testosterone 濃度測定

生後 10-11 週齢の野生型個体および *dwg/dwg* 個体から 16 :00~19:00 の間で血液を採取した。また、テストステロンの濃度の測定には、Testosterone EIA kit (Cayman Chemical Company, U.S.A) を使用した。

まず、CO_2 により安楽死させた後、すばやく開腹し、背側大動脈を露出させ、ヘパリン 10μl を事前に吸入しておいたシリンジをもちいて 500-1000μl の血液を採取した。得られた試料は、 4 ℃、1000rcf にて 15 分間遠心液後、上精を新しいチューブへ移し、液体窒素にて瞬間冷凍した後に-80℃にて冷凍保存した。

一定量の血漿(50μl)に対して、5 倍量(250μl)のジエチルエーテルを加え、4 分間ボルテックスをし、その後室温にて 15 分間静置した。上清を新しいチューブに移し、残渣にジエチルエーテルを加えた後、再び同じ操作を繰り返し、その上清を 1 回目の操作で上清を移していたチューブに加えた。チューブのフタを開け、濃縮乾燥遠心機に設置し、30℃で 20 分間遠心を行った。サンプルが完全に乾燥したことを確認した後、0.2ml の EIA Buffer を入れ、2 分間ボルテックスを行い、溶解させた。これを測定用サンプルとして用い、Testosterone EIA kit のプロトコールに則って測定を行った。

●血漿中の IGF-1 濃度測定

生後 10-11 週齢の野生型個体および *dwg/dwg* 個体から 16 :00~19:00 の間で血液を採取した。まず、CO_2 により安楽死させた後、すばやく開腹し、背側大動脈を露出させ、ヘパリン 10μl を事前に吸入しておいたシリンジをもちいて 500-1000μl の血液を採取した。得られた試料は、4℃、1000rcf にて 15 分間遠心液後、上清を新しいチューブへ移し、液体窒素にて瞬間冷凍した後に-80℃にて冷凍保存した。これを測定用サンプルとして用い、Assay Max Mouse Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) ELISA Kit (Assaypro LLC, MO, USA) のプロトコールに則って測定を行った。

●GGT の酵素活性の測定

GGT の酵素活性の測定については、第 3 章と同様の方法で行った。

●検定

検定には、独立した 2 群の *t* 検定を行い、*p* 値が 0.05 より小さいものを統計的に有意であるとした。

5-3　結果

ライディッヒ細胞で特異的に発現するステロイド産生に重要な酵素である3*β*hydroxysteroid dehydrogenase (3*β*HSD)を標識する3*β*HSD抗体で免疫染色を行ったところ、野生型個体と *dwg/dwg* 個体とで顕著な違いは認められなかった(Fig 5-1)。さらに、血漿中のテストステロン濃度を測定したところ、野生型個体と比較して *dwg/dwg* 個体では減少傾向が認められるものの、有意な差は認められなかった(Fig 5-2 A)。さらに、野生型個体および *dwg/dwg* 個体に対して NAC を投与し、そのテストステロン濃度への効果を調べた。その結果、NAC 投与 *dwg/dwg* 個体は NAC 不投与 *dwg/dwg* 個体と比較してテストステロン濃度は増加傾向が認められるものの、有意な差は認められなかった。一方で、NAC 投与野生型個体では NAC 不投与野生型と比較して、減少傾向が認められるものの、有意差は認められなかった(Fig 5-2 A)。

次に、血漿中の IGF-1 濃度を測定した。その結果、*dwg/dwg* 個体では野生型個体と比較して IGF-1 濃度が減少していることが明らかとなった(Fig 5-2 B)。さらに、IGF-1 濃度の低下に GSH またはシステインの濃度の低下が関与しているかを調べるために、野生型個体よび *dwg/dwg* 個体に対して NAC を投与し、その効果を調べた。その結果、血漿中の IGF-1 濃度が NAC 投与野生型個体では NAC 不投与野生型個体に比べ、約 2 倍に増加した(Fig 5-2 B)。一方、NAC 投与 *dwg/dwg* 個体では NAC 不投与 *dwg/dwg* 個体と比較して、IGF-1 濃度は増加傾向を示すものの、有意な差は認められなかった(Fig 5-2 B)。

そこで次に、精巣、精巣上体、精嚢の *dwg/dwg* 個体における GGT の酵素活性を測定した。その結果、*dwg/dwg* 個体の精巣上体および精嚢では GGT の酵素活性が低下していることが明らかとなった。一方、精巣における GGT の酵素活性は野生型個体と差は認められなかった(Table 5-1)。

5-4　考察

精巣上体、輸精管および精嚢などの副生殖器の発達は、精巣のライディッヒ細胞から分泌されるテストステロンの作用に依存していることが報告されていることから、GGT1 の機能低下による雄性副生殖器の発達不全とテストステロンとの関連について解析を行った。ライディッヒ細胞のマーカーである 3*β*hydroxysteroid dehydrogenase (3*β*HSD)の発現の免疫組織化学的解析から、野生型個体と *dwg/dwg* 個体との間で顕著な差違は観察されず、テストステロンの血漿中の濃度についても、野生型個体と *dwg/dwg* 個体の間で有意な差は認められなかった。これらのことから、*dwg/dwg* 個体にみられる雄の副生殖器の異常におけるテストステロンの関与は低いことが予想された。

これまでに IGF-1 を欠損したマウス(IGF-1 欠損個体)が作製されており、IGF-1 欠損個体の雄では精巣、精巣上体、精嚢の重量低下と精嚢内の分泌物の減少を呈し、雌では卵巣および子宮の重量低下を呈し、卵巣では黄体が観察されないことがこれまでに報告されている(Baker J. et al. 1996)。これらの異常は本研究で明らかにした *dwg/dwg* 個体の副生殖器での異常と類似していることから、*dwg/dwg* 個体では IGF-1 濃度が低下しているか正常に機能していないことが予想された。そこで、雄個体を用いて血漿中の IGF-1 濃度を測定したところ、*dwg/dwg* 個体では野生型個体の 24.2%しか存在していなかったことから、*dwg/dwg* 個体の副生殖器での異常は IGF-1 濃度の低下によるものである可能性が考えられた。さらに、野生型個体に対して NAC を投与し、その効果を調べたところ、血漿中の IGF-1 濃度が NAC を投与していない野生型個体と比較して約 2 倍に増加したことから、血漿中の IGF-1 濃度の上昇に GSH が関与することが考えられた。

dwg/dwg 雄個体では、血漿中の IGF-1 濃度が野生型個体と比較して低下していることから、*dwg/dwg* 雌個体においても血漿中の IGF-1 濃度が低下していることが予想され、そのために IGF-1 欠損雌個体と同様に排卵が起きていないことが予想された。さらに IGF-1 が子宮の子宮内膜間質細胞および子宮筋層において発現しており、子宮の発達において重要

な働きを担っていることが明らかにされているため(Baker J. et al. 1996)、*dwg/dwg* 雌個体における子宮の低形成も血漿中の IGF-1 濃度の低下によるものであることが考えられた。

一方 GGT1 欠損雌個体では、排卵誘起の刺激である PMSG/hCG 処理を行った後、正常個体と同居させてもプラグが形成されず、卵管内の受精卵数も増加しないことから、外因性の性腺刺激ホルモンの投与に対する感受性がないこと、さらに血清中の IGF-1 濃度が正常個体の 18.7%以下となっていることが報告されている(Kumar T.R. et al. 2000)。IGF-1 欠損個体においても、外因性の性腺刺激ホルモンの投与に対する感受性がないことが明らかにされていることから(Baker J. et al. 1996)、外因性の性腺刺激ホルモンの投与に対する感受性の獲得には、血漿中の IGF-1 濃度が正常個体の 24%程度は必要であることが考えられた。

IGF-1 欠損個体の雄では精巣、精巣上体、精嚢の重量が低下し、精嚢では分泌物が蓄積しないことが明らかにされているだけでなく、精子形成が正常に進行し、IGF-1 欠損雄個体由来精子を用いて体外受精を行うと、胚盤胞期胚まで発生することも明らかにされている(Baker J. et al. 1996)。一方 *dwg/dwg* 雄個体では、IGF-1 欠損個体と同様に精巣上体および精嚢の重量が低下し、精嚢では分泌物が蓄積せず、精子形成も正常に進行し、その精子を用いて体外受精を行うと胚盤胞期胚まで進行することが明らかとなっているが、IGF-1 欠損個体と異なり、精巣の重量は低下しない。この精巣が低形成とならず、ライディッヒ細胞にも顕著な異常が生じない理由として、*dwg/dwg* 雄個体における精巣の GGT の酵素活性が正常であることが挙げられる。*dwg/dwg* 雄個体では、低形成となっている精巣上体および精嚢において、それらの組織中の GGT の酵素活性が低下しているが、精巣における GGT の酵素活性には野生型個体と差はないことが明らかとなった。精巣における GGT の酵素活性は野生型個体においても低いため、正常な場合においても精巣では GGT1 がほとんど機能していないことが予想される。しかし、精巣においても GGT1 が GSH の恒常性の維持に貢献しているとすると、*dwg/dwg* 雄個体では精巣上体および精嚢における組織中

の GSH 濃度は低下しているが、精巣における組織中の GSH 濃度は正常に保たれていることが予想された。さらに、肝臓における IGF-1 濃度の調節に GSH の濃度が関連することが明らかとなっていることから、精巣においても IGF-1 の濃度調節に GSH の濃度が関与している可能性が予想される。これらのことから *dwg/dwg* 雄個体では、精巣における GGT の酵素活性が正常であるために、精巣中の GSH 濃度が正常に保たれ、精巣の形態と機能を維持するために十分な IGF-1 が精巣において分泌され、その結果、精巣では顕著な異常が生じなかった可能性が考えられた。

血漿中の IGF-1 濃度の減少が *dwg/dwg* 個体の不妊の原因である場合、IGF-1 欠損雄個体でテストステロン濃度が低下することが報告されていることから、*dwg/dwg* 個体においてもテストステロン濃度が低下することが予想される。しかし、*dwg/dwg* 個体では減少傾向は認められるものの、野生型個体と比較して有意な差は認められなかった。これは本研究では、野生型個体のテストステロン値が大きく変動していることが関連していると予想されるため、採血の時間をテストステロン値の変動が小さいといわれる午前中に行うなどの改良が必要であり、その変動が小さくなれば *dwg/dwg* 個体におけるテストステロン濃度の、より正確な評価が行えることが期待される。

IGF-1 には、主に肝臓で合成され全身を回る循環性IGF-1 と卵巣や精巣などの組織で合成、分泌される局所性IGF-1 がある。これまでに、肝臓のみでIGF-1 を欠損したマウス(LID個体)では、血清中のGH濃度の上昇およびIGF-1 濃度の低下が生じることが知られている。これによりLID個体と野生型個体とに体重の差は現れないが、LID個体では野生型個体と比較して身長が 6%低下し、骨密度も低下することが報告されている(Yakar S. et al. 1999)。さらに、血清中のIGF-1 濃度の安定化に重要なacis labile subunit (ALS)とLIDのダブルミュータントであるLID/ALS欠損個体では、IGF-1 濃度がLID個体よりもさらに低下するものの、体重の減少は野生型個体の 30%程度であることが明らかにされている(Yakar S. et al 2002)。

さらに、全ての組織でIGF-1 を欠損し、肝臓でのみIGF-1 を過剰発現させたマウス(KO-HIT個体)では、血清中のIGF-1 濃度が約 3 倍になるにもかかわらず、体長および体重が過剰に増加することはなく野生型個体と同じであることが報告されている(Wu Y. et al. 2009)。これらのことから、骨の伸長および体重の増加には、循環性のIGF-1 ではなく、むしろ局所性のIGF-1 発現が重要であると考えられている(Wu Y. et al. 2009)。またKO-HIT雄個体では、IGF-1 を完全に欠損した場合に認められる雄の生殖器の異常は回復し、産仔が得られることが報告されている。一方KO-HIT雌個体では、過排卵処理により排卵が誘起されるようになるものの、産仔が得られず、卵巣は低形成で成熟した卵胞が少ないこと、子宮も低形成で子宮腺が発達しないこと、性周期が安定しないことが報告されている(Wu Y. et al. 2009)。*dwg/dwg*個体ではNACを投与することにより矮小や白内障だけでなく、不妊も改善したことから、循環性のIGF-1 濃度は低下しているものの、局所性のIGF-1 の分泌機構に異常はなく、局所性のIGF-1 濃度が低下していたとしても、NAC投与により改善されることが予想された。

さらに、GH を欠損した Ames マウス(GH 欠損個体)を用いた研究から、GH を欠損すると腎臓における GGT の酵素活性が低下し(Brown-Borg H.M. and Rakocay S.G. 2005)、GH を投与すると GGT の酵素活性が増加することから(Brown-Borg H.M. et al. 2005)、GH は GSH の分解調節に GGT の活性調節を介して関与していると考えられている(Brown-Borg H.M. et al. 2005)。さらに、ニワトリおよびヒツジにおいて GSH を投与すると組織中の *Igf-1*mRNA および血清中の IGF-1 濃度が上昇することが報告されている(Li L. et al. 2008, Ning J. et al. 2009)。これらのことから、少なくとも循環性の IGF-1 濃度の調節には GSH が関与することが考えられ、さらにその GSH の濃度調節に GGT1 が関与している可能性と、GH による IGF-1 濃度の調節に GGT1 が関与している可能性が考えられる。

本研究の結果からは、循環性の IGF-1 濃度の調節を行う過程で GGT1 が、合成の調節に関与しているのか、それとも分泌の調節に関与しているのかは明らかになっておらず、循

環性の IGF-1 濃度の調節における GGT1 の役割を明確にするためにも、今後腎臓や雄性生殖器(精巣・精巣上体・精嚢)における *Igf-1*mRNA の発現量を調べて行く必要がある。さらに、これまでの研究から GGT1 欠損個体において血清中の GH 濃度が増加することが報告されていることから、GGT1 の機能異常により、IGF-1 の合成または分泌に異常が生じているのではなく、GH 受容体に異常が生じることで IGF-1 合成または分泌の調節が正常に行われていない可能性も予想される。これらのことから、GH 受容体の組織中における発現量や血液中の濃度測定を行うことで GGT1 の機能より詳しく明らかにすることが可能であると考える。

以上のことから、GGT1 は肝臓において GSH の濃度調節を介して IGF-1 合成を促進し、血漿中の IGF-1 濃度の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機能の制御に貢献していることが考えられた。

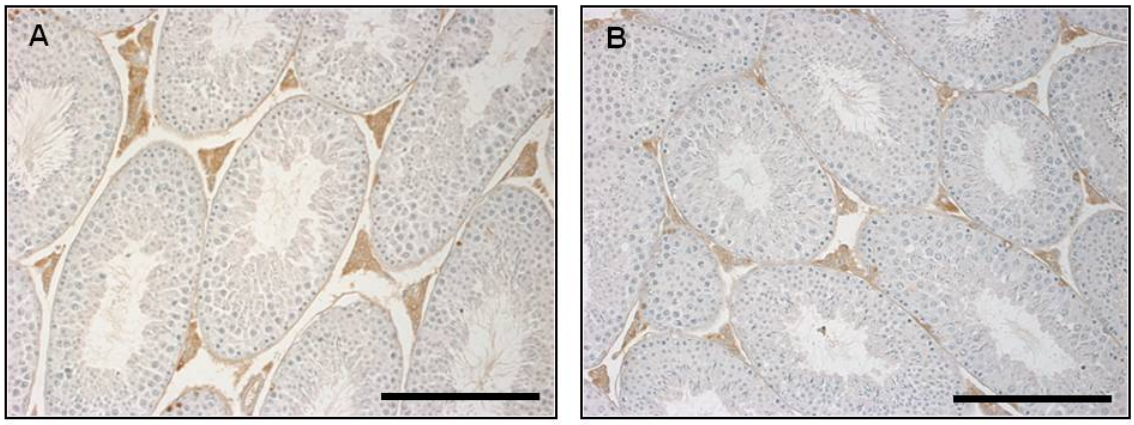


Figure 5-1. 抗3βHSD 抗体を用いた免疫染色

ライディッヒ細胞のマーカーである3βHSD の発現を生後10週齢の精巣組織標本をもちいて免疫組織化学的方法により調べた。陽性細胞は茶色に染色される。カウンター染色はヘマトキシリンにより行った。
野生型(A)、*dwg/dwg*(B)、Bar=200μm。

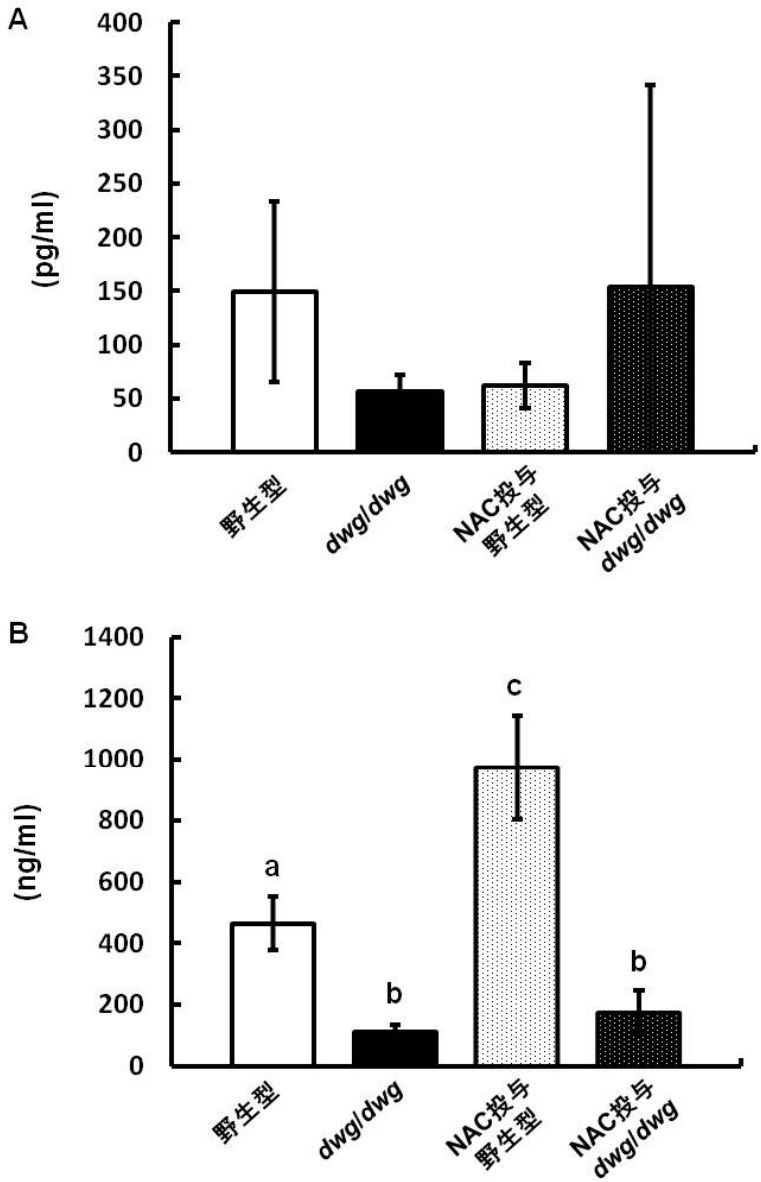


Figure 5-2.　血漿中のホルモン濃度の測定

(A) EIA法による血漿中のテストステロン濃度の測定
生後10週齢における雄を各グループ3-5個体使用し、データはその平均値±SDで示す。
各グループ間で有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。
(B) ELISA法による血漿中のIGF-1濃度の測定
生後10週齢における雄を各グループ3-5個体使用し、データはその平均値±SDで示す。
^{abcd}異なる文字間で有意差あり($p<0.05$) 。

Table 5-1. 雄性生殖器におけるGGTの酵素活性の測定値

	野生型	*dwg/+*	*dwg/dwg*
精巣	42.17 ±5.27[a]	35.15 ± 3.56[a]	35.97 ±6.05[a]
精巣上体	408.15 ± 96.31[a]	209.42 ±76.94[b]	131.89±32.81[c]
精嚢	100.33 ± 29.64[a]	49.01 ± 16.41[b]	28.69 ± 4.54[c]

酵素活性は、nmol *p*-nitroaniline produced / mg protein / min で示してあり、各グループで3-4個体使用し、データは平均値± SDで示す。[abc] 異なる文字間で有意差あり($p < 0.05$).

総括

DNA 解析技術の進歩に伴い、様々な生物のゲノム DNA の塩基配列が解析されている。これらの膨大な量の情報はインターネット上で簡単に検索することができ、研究以外にも医療や畜産などの分野にも応用されている。研究に用いられる様々な実験動物の中でもマウスは、飼育・材料調整の容易さやライフサイクルの早さなどの利点から、ヒトのモデル動物として古くから用いられてきた生物であり、マウスゲノムの解読はその有用性をさらに上げることとなったと言える。また、マウスにおいて特定の遺伝子を人為的に破壊できるノックアウトマウス作成法の確立は、効率的に標的遺伝子を欠損させることができるため、遺伝子の機能を解析する上で欠かせない技術となっている。しかし、ノックアウトマウス作製には膨大な資金がかかるため、自然発症した突然変異マウスを解析していくことも重要である。

dwarf gray(*dwg*)は、マウスにおいて見つかった自然発生の突然変異であり、ホモ(*dwg/dwg*)の個体では矮小、白内障、不妊、毛色異常など複数の異常を呈することが知られているが、その表現型の詳細や原因遺伝子は明らかにされていない。そこで、異常が見られる組織の解析と原因遺伝子の染色体上の位置を特定する連鎖解析と変異を同定する塩基配列の解析を行うことで、*dwg* マウスの原因遺伝子の同定と表現型の詳細を明らかにすることを目的として研究を開始した。

*dwg/dwg*個体では生後2週間ごろから矮小を示し、その矮小は成長とともに顕著になる。*dwg/dwg* 個体では骨の位置や数に違いは認められないものの、全身の矮小を呈しており、骨伸長が活発に行われている、脛骨の成長板軟骨において軟骨配列の乱れや骨梁の減少が観察された。また、*dwg/dwg* 個体では生後 2-3 週齢頃から白内障が観察されはじめ、その白濁の度合いは成長とともに強くなっていく。水晶体の組織標本の観察から *dwg/dwg* 個体では、皮質白内障を呈し、成長するにつれて水晶体を構成する水晶体繊維の構造が崩壊し

ていくことが明らかとなった。

これらの矮小や白内障といった *dwg/dwg* 個体でみられる異常が、生体内での抗酸化や解毒に関わるグルタチオン(GSH)の代謝に関与する酵素であるγ-glutamyl transferase 1 をコードする遺伝子(*Ggt1*遺伝子) を人為的に欠損させたノックアウトマウス(GGT1 欠損個体)と類似していることが明らかとなった。さらに GGT1 欠損個体では、*dwg/dwg* 個体と同様に毛色異常や不妊などの表現型も示すことも報告されていること、また、*Ggt1* 遺伝子と *dwg* は同一染色体上に位置することから、*dwg* の原因遺伝子が、*Ggt1* 遺伝子であることが予想された。そこで、ゲノム DNA および cDNA の塩基配列の解析を行った。その結果、*Ggt1* 遺伝子の第 7 エクソン上に 13 塩基の欠損が同定され、この欠損は早期のストップコドン出現や、一部のアミノ酸残基を欠損するような異常な転写産物の合成を引き起こすことが明らかとなった。

GGT1 は、抗酸化作用をもつグルタチオン(GSH)の代謝と生成を担っているγ-グルタミル回路に関与する酵素の一つである。GGT1 はこの回路に関与する酵素群の中で、唯一細胞外で作用する酵素であり、GSH の代謝にとても重要である。γ-グルタミル回路が正常に機能しないことにより、体内の GSH やシステインの濃度が変化し、グルタチオン尿症やグルタチオン血漿など様々な病気がもたらされることが報告されていることから、*dwg/dwg* 個体においても体内のGSHおよびシステイン濃度に何らかの異常が生じていることが考えられた。　そこで、GGT の酵素活性および血漿、腎臓、肝臓、眼球中の GSH 濃度の測定と、GSH の前駆体である *N*-Acety-*L*-cysteine (NAC)の経口投与を行うことにより表現型の異常が回復するかを調べることで、*dwg/dwg* 個体の表現型異常と *Ggt1* 遺伝子の突然変異との関係性を検討した。

dwg/dwg 個体において GGT1 が機能しているかを調べるために、GGT1 の発現が高い腎臓における GGT の酵素活性を測定したところ、*dwg/dwg* 個体では野生型(+/+)個体の 4.0%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 濃度が野生型個体と比較してどちら

も有意に増加していた。一方、肝臓および眼球の GSH 濃度は *dwg/dwg* 個体では野生型個体と比較して有意に低下していた。これらの結果は、*dwg/dwg* 個体では、GGT1 が正常に機能しないために GSH が代謝されずに血漿中の GSH の上昇と、腎臓を除く各組織細胞中の GSH 濃度の低下が生じていることが予想された。

GGT1 欠損個体を用いた研究から、GGT1 を欠損すると組織中の GSH およびシステインの減少が起き、それにより矮小、白内障、不妊を発症するが、GSH の前駆体である *N*-Acetyl-*L*-cysteine(NAC)を投与することにより改善することが報告されている。そこで、*dwg/dwg* 個体に NAC を投与し、その効果について解析を行ったところ、NAC を投与した *dwg/dwg* 個体では NAC 不投与の *dwg/dwg* 個体と比較して、6~7 週齢において体長および体重が有意に増加し、さらに *dwg/dwg* 個体における破骨細胞数の異常や白内障に対しても改善効果が認められたことから、GGT1 欠損個体での NAC による効果と一致した。

以上の結果より、*dwg/dwg* 個体では、GGT1 が正常に機能してい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、それにより矮小や白内障を呈していることが明らかとなり、*dwg/dwg* 個体における表現型異常は *Ggt1* 遺伝子における突然変異による GGT1 の機能低下が原因であることが示された。

一方、これまでに *dwg/dwg* 個体は雌雄共に不妊であると報告されているがその詳細な解析はなされておらず、不妊の程度や原因は不明である。そこでまず *dwg/dwg* 個体の雄における生殖機能異常について明らかにするために、生殖器の重量を測定するとともに組織標本を作製して組織学的解析を行った。*dwg/dwg* 個体では野生型個体と比較して精巣の重量に差は認められなかったが、精巣上体および精嚢の重量が有意に低下していた。また、精巣および精巣上体の組織標本では *dwg/dwg* 個体において精子形成が正常に進み、精子が形成され、精巣上体管内に精子が存在したが、精嚢の組織標本では精子の運動能の調節や受精能の獲得に重要な精嚢内の分泌物がほとんど蓄積されていなかった。次に、*dwg/dwg* 個

体の雌における生殖機能異常について解析を行うため、まず、膣スメアによる性周期の進行を調べたところ、*dwg/dwg* 個体では性周期が発情休止期のみが観察され、性周期が正常に進行していないことが明らかとなった。さらに、*dwg/dwg* 個体では卵巣および子宮重量が正常個体の発情休止期より明らかに小さいことが認められ、*dwg/dwg* 個体の子宮ではその内膜の構造が休止期様のものしか観察されず、卵巣では胞状卵胞と閉鎖卵胞は存在するが、黄体は存在しなかった。一方で PMSG/hCG 投与により排卵を誘起させると正常に排卵が起きた。さらに配偶子に受精能および初期発生能があるかを調べるために、体外受精を行ったところ、*dwg/dwg* 個体由来の精子および卵子のどちらを用いた場合でも受精し、胚盤胞期胚まで発生が進行することが確認され、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。これらのことから、*dwg/dwg* 個体における不妊は、雄では精巣上体および精嚢の低形成と、精嚢の分泌物の欠如が、雌では卵巣および子宮の低形成と、排卵の刺激が正常に起きないことが原因となっている可能性が考えられた。さらに、NAC を投与すると *dwg/dwg* 個体の雄で認められた精嚢の分泌物の欠如を含め、雌雄の副生殖器の低形成は改善され、雌雄どちらも産仔を得ることができたため、GGT1 の機能異常による GSH またはシステイン濃度の変化が不妊の原因となり、表現型を引き起こしていることが考えられた。

一方 IGF-1 欠損個体の雄では、精巣、精巣上体、精嚢の重量低下と精嚢内の分泌物の減少を呈し、雌では卵巣および子宮の重量低下を呈し、卵巣では黄体が観察されないことがこれまでに報告されている。これらの異常は本研究で明らかにした *dwg/dwg* 個体の副生殖器での異常と類似していたため、血漿中の IGF-1 濃度を測定したところ、*dwg/dwg* 雄個体では野生型個体の 24.2%しか存在していなかった。そのため *dwg/dwg* 個体の副生殖器での異常は IGF-1 濃度の低下によるものである可能性が考えられた。さらに、野生型個体に対して NAC を投与すると血漿中の IGF-1 濃度が上昇したことから、GGT1 は GSH の濃度調節を介して IGF-1 濃度の上昇をもたらす経路に関与することで雌雄の生殖組織機能に影響

していることが考えられた。

本研究では、*dwg/dwg* 個体の矮小、白内障および雌雄の不妊は GSH またはシステインの欠乏により起きており、その原因は GGT の酵素活性の低下であることを示し、*dwg/dwg* 個体における異常は *Ggt1* 遺伝子における突然変異であることを証明した。さらに、*dwg/dwg* 個体における生殖機能異常を明らかにし、GGT1 は GSH を介して、生殖組織の機能に重要な IGF-1 濃度の調節に関与している可能性を示した。

今後本研究が、矮小、白内障、不妊の発生機構の新たな発見にむけて役立ち、GGT1 に関する疾患の予防および治療の一助となることを期待する。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき多大なる御指導と深いご理解を賜った岡山大学農学部　動物遺伝学研究室　辻岳人准教授、国枝哲夫教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、有益な御指導と御助言を頂いた岡山大学農学部　家畜育種学研究室　揖斐隆之准教授に深く感謝の意を表します。さらに、多大な協力と暖かいご支援を頂いた岡山大学農学部動物遺伝学・遺伝育種学研究室の諸氏および卒業生に対して心より感謝いたします。

最後に、私が学生生活を送る上で、暖かく見守り、援助をしていただいた両親に心より感謝いたします。

平成 25 年 3 月

参考文献

1. Aoshima M., Nunoi H., Shimazu M., Shimizu S., Tatsuzawa O., Kenney R.T., Kanegasaki S. 1996. Two-exon skipping due to a point mutation in p67-phoxdeficientchronic granulomatous disease. *Blood.* 88:1841–1845
2. Baker J., Hardy M.P., Zhou J., Bondy C., Lupu F., Bellvé A.R., Efstratiadis A. 1996. Effects of an *Igf1* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol.* 10(7):903-18.
3. Barrios R., Shi Z.Z., Kala S.V., Wiseman A.L., Welty S.E., Kala G., Bahler A.A., Ou C.N. and Lieberman M.W. 2001. Oxygen-induced pulmonary injury in γ-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Lung.* 179: 319-330.
4. Baralle M., Skoko N., Knezevich A., De Conti L., Motti D., Bhuvanagiri M., Baralle D., Buratti E., Baralle F.E. 2006. *NF1* mRNA biogenesis: effect of the genomic milieu in splicing regulation of the *NF1* exon 37 region. *FEBS Lett.* 580:4449–4456
5. Brown-Borg H.M., and Rakoczy S.G., 2005. Glutathione metabolism in long-living Ames dwarf mice. *Exp Gerontol.* 40(1-2):115-20.
6. Brown-Borg H.M., Rakoczy S.G., Uthus EO. 2005. Growth hormone alters methionine and glutathione metabolism in Ames dwarf mice. *Mech Ageing Dev.* 126(3):389-98.
7. Caligioni C.S. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*. DOI: 10.1002/0471142301.nsa04is48.
8. Champlin A.K., Dorr D.L., Gates A.H. 1973. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod.* 8(4):491-4.
9. Chévez-Barrios P., Wiseman A.L., Rojas E., Ou C.N. and Lieberman M.W. 2000.

Cataract development in γ-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Exp. Eye Res.* 71: 575-582.

10. Chikhi N., Holic N., Guellaen G., Laperche Y. 1999. Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 122(4):367-80.
11. Dalton T.P., Chen Y., Schneider S.N., Nebert D.W., Shertzer H.G. 2004. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis inhealth and disease. *Free Radic Biol Med.* 37:1511–1526
12. d'Anglemont de Tassigny X., Fagg L.A., Dixon J.P., Day K., Leitch H.G., Hendrick A.G., Zahn D., Franceschini I., Caraty A., Carlton M.B., Aparicio S.A., Colledge W.H. 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional *Kiss1* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19;104(25):10714-9.
13. de Lamirande E. 2007. Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin Thromb Hemost.* 33(1):60-8.
14. Derek Le Roith. 1997. Insulin-like glowth factors. *Seminars in medicine of the beth Israel deaconess medicall center.* 336(9):633-640
15. Dierich A., Sairam M.R., Monaco L., Fimia G.M., Gansmuller A., Le Meur M., Sassone-Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 10;95(23):13612-7.
16. Evenson D.P., Jost L.K., Gandy J. 1993 Glutathione depletion potentiates ethyl methanesulfonate-induced damage to sperm chromatin structure. *Reprod Toxicol.* 7(4):297-304.

17. Guan C., Ye C., Yang X., Gao J. 2010. A Review of Current Large-Scale Mouse Knockout Efforts. *genesis*. 00:1-13.

18. Funahashi H., Bandoh N., Nakahira S., Oh S.H., Tsuboi S. 1999. Changes in intracellular content of glutathione and thiols associated with γ-glutamyl cycle during sperm penetration and pronuclear formation in rat oocytes. *Zygote*. 7(4):301-305

19. Funahashi H., Machaty Z., Prather R.S., Day B.N. 1996. γ-Glutamyl transpeptidase of spermatozoa may decrease oocyte glutathione content at fertilization in pigs. *Mol Reprod Dev*. 45(4):485-490

20. Funahashi H., Stumpf T.T., Cantley T.C., Kim N.H., Day B.N. 1995. Pronuclear formation and intracellular glutathione content of in vitro-matured porcine oocytes following in vitro fertilisation and/or electrical activation. *Zygote*. 3(3):273-281

21. Hammond J.W., Potter M., Wilcken B. and Truscott R. 1995. Siblings with γ-glutamyltransferase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis*. 18: 82-83.

22. Hanigan, M.H., and Frierson, H.F.Jr. 1996 Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J.Histochem. Cytochem.* 44: 1101-1108

23. Harding C.O., Williams P., Wagner E., Chang D.S., Wild K., Colwell R.E. and Wolff J.A. 1997. Mice with genetic γ-glutamyl transpeptidase deficiency exhibit glutathionuria, severe growth failure, reduced life spans, and infertility. *J. Biol. Chem*. 272: 12560-12567.

24. Harris B. and Davisson M.T. 1990. Dwarf grey (dwg). *Mouse Genome*. 86: 238.

25. Heisterkamp N., Groffen J., Warburton D. and Sneddon T.P. 2008. The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Hum. Genet*. 123, 321-332.

26. Iida M., Yasuhara T., Mochizuki H., Takakura H., Yanagisawa T. and Kubo H. 2005. Two Japanese brothers with hereditary γ-glutamyl transpeptidase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis*. 28: 49-55.

27. Ikeda Y. and Taniguchi N. 2005. Gene expression of γ-glutamyltranspeptidase. *Methods Enzymol*. 401: 408-425.

28. Ikeda Y., Fujii J., Taniguchi N. 1993. Significance of Arg-107 and Glu-108 in the catalytic mechanism of human c-glutamyl transpeptidase.Identification by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*. 268:3980–3985

29. International Human Genome Sequencing Consortium. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 15;409(6822):860-921.

30. Jean J.C., Harding C.O., Oakes S.M., Yu Q., Held P.K. and Joyce-Brady M. 1999. γ-Glutamyl transferase(GGT) deficiency in the *GGT^{enu1}* mouse results from a single point mutation that leads to a stop codon in the first coding exon of GGT mRNA. *Mutagenesis.* 14: 31-36.

31. Knapen M.F., Zusterzeel P.L., Peters W.H., Steegers E.A. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 82(2):171-84.

32. Kumar T.R., Wang Y., Lu N., Matzuk M.M. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 15(2):201-4.

33. Kumar T.R., Wiseman A.L., Kala G., Kala S.V., Matzuk M.M., Lieberman M.W. 2000. Reproductive defects in γ-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology*. 141: 4270-4277.

34. Levasseur R., Barrios R., Elefteriou F., Glass D.A. II., Lieberman M.W. and

Karsenty G. 2003. Reversible skeletal abnormalities in γ-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology* 144: 2761-2764.

35. Lieberman M.W., Barrios R., Carter B.Z., Habib G.M., Lebovitz R.M., Rajagopalan S., Sepulveda A.R., Shi Z.Z., Wan D.F. 1995. γ-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? *Am. J. Pathol.* 147: 1175-1185.
36. Lieberman M.W., Wiseman A.L., Shi Z.Z., Carter B.Z., Barrios R., Ou C.N., Chévez-Barrios P., Wang Y., Habib G.M., Goodman J.C., Huang S.L., Lebovitz R.M. and Matzuk M.M. 1996. Growth retardation and cysteine deficiency in γ-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 7923-7926.
37. Li T.K. 1975. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol Reprod.* 12(5):641-6.
38. Li L., Jian-fu W., Wei-long F., Jue-wen W., Hui G., Jing C. 2008. Effects of dietary supplementation of reduced glutathione on growth and IGF-1 level in serum and IGF-1 mRNA expression in tissues of broilers. *Chinese Journal of Veterinary Science*. 2008-08.
39. Mårtensson J., Steinherz R., Jain A. and Meister A. 1989. Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine-induced cataracts and lens epithelial cell damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 8727-8731.
40. Ma X., Dong Y., Matzuk M.M, Kumar T.R. 2004. Targeted disruption of luteinizing hormone ß-subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(49):17294-9
41. Morgan H., Beck T., Blake A., Gates H., Adams N., Debouzy G., Leblanc S., Lengger C., Maier H., Melvin D., Meziane H., Richardson D., Wells S., White J., Wood

J; EUMODIC Consortium, de Angelis MH, Brown SD, Hancock JM, Mallon AM. 2009. EuroPhenome: a repository for high-throughput mouse phenotyping data. *Nucleic Acids Res.* 38:D577-85.

42. Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420(6915):520-62.
43. Newman B., Wallis G.A. 2003. Skeletal dysplasias caused by adisruption of skeletal patterning and endochondral ossification. *Clin Genet* 63:241–251
44. Ning J., AiZhong Z., Ting S.Z., YanFa S., GuoPing Y. 2009. Manipulation of glutathione on growth performance and growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in fattening sheep. *Chinese Journal of Animal Nutrition.* Vol. 21 No. 3 pp. 312-318.
45. Orlowski M. and Meister A. 1963. γ-Glutamyl-*p*-nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of L- and D-γ-glutamyltranspeptidase activites. *Biochim. Biophys. Acta.* 73: 679-681.
46. Pang S.F., Chow P.H., Wong T.M. 1979. The role of the seminal vesicles, coagulating glands and prostate glands on the fertility and fecundity of mice. *J Reprod Fertil.* 56(1):129-32.
47. Peitz B. and Olds-Clarke P. 1986. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. *Biol Reprod*. 35(3):608-17.
48. Ristoff E. and Larsson A. 2007. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J Rare Dis* 2:16
49. Rojas E., Valverde M., Kala S.V., Kala G. and Lieberman M.W. 2000. Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in γ-glutamyltranspeptidase. *Mutat .Res*. 447: 305-316.

50. Shkolnik K., Tadmor A., Ben-Dor S., Nevo N., Galiani D., Dekel N. 2011. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(4):1462-7

51. Tate S.S. and Meister A. 1981. γ-Glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. *Mol. Cell. Biochem*. 39: 357-368.

52. Tazi J., Bakkour N., Stamm S. 2009. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792:14–26

53. Yakar S., Kim H., Zhao H., Toyoshima Y., Pennisi P., Gavrilova O., Leroith D. 2005. The growth hormone-insulin like growth factor axis revisited: lessons from IGF-1 and IGF-1 receptor gene targeting. *Pediatr Nephrol*. 20(3):251-4

54. Yakar S., Liu J.L., Stannard B., Butler A., Accili D., Sauer B., LeRoith D. 1999. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(13):7324-9

55. Yakar S., Rosen C.J., Beamer W.G., Ackert-Bicknell C.L., Wu Y, Liu J.L., Ooi G.T., Setser J., Frystyk J., Boisclair Y.R., LeRoith D. 2002. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest*. 110(6):771-81.

56. Welsh M., Moffat L., Jack L., McNeilly A., Brownstein D., Saunders P.T., Sharpe R.M., Smith L.B. 2010. Deletion of androgen receptor in the smooth muscle of the seminal vesicles impairs secretory function and alters its responsiveness to exogenous testosterone and estradiol. *Endocrinology*. 151(7):3374-85.

57. Wickham S., West M.B., Cook P.F. and Hanigan M.H. 2011. Gamma-glutamyl compounds: substrate specificity of gamma-glutamyl transpeptidase enzymes. *Anal. Biochem*. 414: 208-214.

58. Will Y., Fischer K.A., Horton R.A., Kaetzel R.S., Brown M.K., Hedstrom O.

Lieberman M.W. and Reed D.J. 2000. γ-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial function, and cellular function. *Hepatology* 32: 740-749.

59. Wu Y., Sun H., Yakar S., LeRoith D. 2009. Elevated levels of insulin-like growth factor (IGF)-I in serum rescue the severe growth retardation of IGF-I null mice. *Endocrinology*. 150(9):4395-403

参考図書

Endocrine Physiology 3rd Edition　Patricia E. Molina　Mc Graw Hill

哺乳類の生殖生物学　監修　高橋迪雄　学窓社

新編　精子学　毛利秀雄　星元紀　監修　森沢正昭　星和彦　岡部勝編　東京大学出版会