

氏 名	フ 付 ヨウ キン 陽 昕
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2298 号
学位授与の日付	平 成 13 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 博 士 課 程 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Knockout of Cellular Glutathione Peroxidase Gene Renders Mice Susceptible to Diquat-Induced Oxidative Stress (細胞性グルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子のノックアウトマウスはマウスの Diquat による酸化ストレスに対する感受性を亢進させる)
論文調査委員	(主 査) 教 授 淀 井 淳 司 教 授 武 藤 誠 教 授 伊 藤 嘉 明

### 論 文 内 容 の 要 旨

過酸化物質、過酸化水素、水酸化ラジカルのような反応性酸素 (reactive oxygen species, ROS) は好気性代謝時に産生される。その ROS がすみやかに除去されなければ、ほ乳類細胞は高分子の破壊と機能異常をもたらす酸化ストレスに遭遇し得る。

細胞内グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX1) は初めて同定されたセレン依存性タンパク質である。GPX1 が過酸化水素を除去する機能を有することはよく知られているにもかかわらず、生理学的機能、酸化ストレス下での役割はあまり知られていない。そこで申請者は GPX1 の役割を明らかにするために、GPX1 ノックアウトマウスと Diquat を用い、以下に示す実験を行った。Diquat は酸素を使用し、活性酸素と過酸化水素を産生する除草剤である。Diquat の主要な標的組織は肝臓であり、肝臓では GPX1 が大量に発現していることから、Diquat の GPX1 ノックアウトマウスへの投与は、GPX1 の *in vivo* での抗酸化作用とその生化学的作用を解明する上で理想のモデルとなる。Diquat による致死急性酸化ストレスに対する保護とその基本的メカニズムを同定するために、2つの実験を行った。

実験 1. GPX1 の Diquat 死における保護的役割と、他のセレン蛋白の相対的役割を決定するために、ノックアウト (以下 KO)、コントロールマウス (以下 WT) をセレン投与群と非投与群に分類し計 4 群とし、それぞれに経腹腔的に Diquat を 24mg/kg 投与し、死亡率と生存期間を比較した。その結果、セレン投与 WT 群を除いた他の 3 群はすべて死亡した。セレン非投与 WT 群とセレン投与 KO 群では、生存期間に有意な差はなく (4.1時間および3.9時間)、またこれらはセレン非投与 KO 群のそれ (2.4時間) と比較して有意に ( $p < 0.05$ ) 長かった。

実験 2. 酸化反応の時間的経緯を明確にするために上記の 4 群に Diquat を 24mg/kg 投与し、投与後 0, 1, 2, 3 時間後に安楽死させ、生化学的手法を用いてこれらのマウスを観察した。セレン投与 WT 群を除く 3 群で肝実質の F2-isoprostane と炭酸含有量、及び血清 alanine aminotransferase (ALT) 活性の上昇が有意に ( $p < 0.05$ ) 高かった。F2-isoprostane の形成は Diquat 投与後 1 時間でピークに達し、セレン投与 KO 群では血清 ALT 活性の上昇に先立って認められた。

これらのことにより GPX1 の欠失は Diquat による蛋白の酸化、脂質の過酸化および血清 ALT 活性の上昇を増幅することが示された。これらの結果はマウスの生存と反比例しており、これは GPX1 の Diquat 死に対する保護を生化学的手法によって裏付けた。また、セレン投与 KO および WT 群において、Diquat によって GPX 蛋白のアイソフォームの GPX4 の活性をわずかに誘導したことも示された。GPX4 は GPX1 と比べ特異な機能を有するため、この環境下において GPX4 の活性上昇が GPXs の共同作業として認められた。さらにセレン投与 WT 群を除く他の 3 群で Diquat による肝の SOD 活性が 10% 上昇していた。

以前に Burk らはセレン欠乏ラットを用いた実験で、GPX1 は相対的に低容量の Diquat に対する保護作用は認められなると報告した。それによると Diquat 投与前のセレン投与が Diquat による脂質の過酸化と死を有意に保護するが、肝、腎、肺、血清中の GPX 活性を高めるものではないとされている。しかし、このセレン欠乏モデルにおいては複数のセレン蛋白

の混同した作用の可能性を否定できず、詳細なデータの裏付けが必要とされている。

この GPX1 ノックアウトマウスを用いた研究で、申請者は GPX1 は Diquat による酸化ストレスからマウスを保護する主要なセレン蛋白であり、その保護作用は Diquat による蛋白の酸化、脂質の過酸化および血清 ALT 活性の上昇と反比例していた。また、これらのデータは GPX1 の抗酸化作用を *in vivo* で直接示したものであり、現在、この保護作用の分子学的メカニズムをこの GPX1 ノックアウトマウス由来の肝初代培養細胞を用いて研究中である。

#### 論文審査の結果の要旨

反応性酸素が体内で除去されなければ哺乳類細胞は DNA 損傷等の酸化ストレスを受ける。グルタチオンペルオキシターゼ、GPX1 は最初に同定されたセレン依存性蛋白質で過酸化水素を除去することは知られているが生理的機能は不明である。申請者等は GPX1 ノックアウトマウス（以下 KO）及び対照マウス（以下 WT）に、酸素を使用し活性酸素と過酸化水素を産生する diquat を投与し GPX1 の機能を解析した。KO 及び WT それぞれをセレン投与群、非投与群に分け diquat を投与したところセレン投与 WT 群は殆ど影響を受けなかったが、他 3 群はすべて約 4 時間後に死亡した。更に上記 4 群に diquat を投与し肝実質の F2-イソプロステイン、炭素含有量及び血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）量を経時的に調べた。そしてセレン投与 WT 群を除く 3 群でいずれも優位に上昇する事を観察した。これらの結果は、GPX1 が diquat による致死作用に対しセレンウムを介してマウスを防御する際の主役を担うものである事を示す。更に GPX1 は diquat が誘導するマウス肝内の脂質の過酸化反応を抑制する事を明らかにしたが、この脂質の過酸化反応が GPX1 (—/—) マウスにおいて ALT が上昇する原因である可能性を示唆した。この研究は GPX1 の抗酸化作用を *in vivo* で直接明らかにし、酸化ストレス防御機構の解明に寄与するところが多い。従って本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

尚、本学位授与申請者は、平成12年10月19日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。