

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏 名 石田真帆

指導教官名 西原真杉

論文題目 ジーンターゲティング法を用いた
20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素機能に関する研究

アルド・ケト還元化酵素群に属するステロイド代謝酵素である 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素 (20 α -HSD) は、黄体ホルモン (progesterone) を生物学的に不活性な 20 α -dihydroprogesterone (20 α -OHP) に代謝する酵素である。ラットやマウスなどの齧歯類では主として黄体に発現し、黄体の機能的退行に中心的役割を担っていると理解されている。例えばラットにおいては排卵後黄体に 20 α -HSD が発現して血中の progesterone 濃度が低く保たれるため、黄体相が実質的に欠失して 4 日毎に排卵を繰り返すことができ、齧歯類特有の多産という繁殖戦略に大きく貢献していると想定されている。一方、交尾刺激を受けた場合には、1 日 2 回プロラクチン (PRL) のサージ状分泌が誘起され、20 α -HSD の発現が抑制されることにより、他の多くの動物の性周期と同様にラットにも約 2 週間の黄体相が導入される。そして、偽妊娠あるいは妊娠の末期には 20 α -HSD の発現が上昇することにより黄体からの progesterone 分泌が低下し、黄体の機能的退行が起こるものと考えられている。しかし、黄体の機能制御にはプロスタグランジン F_{2 α} (PGF_{2 α}) をはじめとして多くの因子が関与し、それらの作用の分子機構も明らかになりつつあり、

20 α -HSD という単独の因子が齧歯類の黄体退行にどのように寄与しているかを再評価することは重要であると考えられる。さらに, progesterone は妊娠の維持がその作用の本質であると考えられるが, 細胞増殖抑制作用など細胞毒性を有することも知られており, 20 α -HSD が黄体以外にも胎盤や胸腺など様々な器官において発現し, progesterone の作用を修飾している可能性が想定されている。本研究は, ジーンターゲティング法により 20 α -HSD 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製してその表現型の詳細な解析を行い, 20 α -HSD の持つ生物学的意義を改めて個体レベルで包括的に理解することを目的としたものである。

第1章においては, まずマウス 20 α -HSD cDNA のクローニングとその発現について解析を行った。ICR マウス卵巣の cDNA ライブラリーからクローニングされたマウス 20 α -HSD cDNA は 323 個のアミノ酸をコードし, ラット 20 α -HSD cDNA と 93 %の相同性を有していた。マウス 20 α -HSD のアミノ酸配列にはアルド・ケト還元化酵素としての活性発現に必須な補酵素結合部位を構成する 4 個のアミノ酸 (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) が保存されていた。また, マウス 20 α -HSD mRNA は progesterone 濃度の低下と 20 α -OHP 濃度の上昇が見られる分娩前後の卵巣において著しい発現の上昇が認められ, また組織学的にもこの時期の黄体細胞で発現が確認された。さらに, 妊娠期子宮内組織においては, *in situ* hybridization 法により子宮内膜上皮細胞や胎盤, 胎子表皮で 20 α -HSD mRNA が検出され, また Northern hybridization 法により胎盤では 10 日頃に, 子宮では 10 日目から分娩日の 18 日まで検出され 16 日にピークに達した。これらの結果は, 20 α -HSD が胎子発育環境での高濃度 progesterone の作用を緩和し, 胎子の正常な発育を維持する機能を有することを示唆している。

第2章においては, 20 α -HSD 遺伝子 KO マウス作製のためのターゲティングベクター構築のため, マウス 20 α -HSD cDNA をもとに 129 系統のゲノムライブラリーをスクリーニングした。得られた5つのゲノムクローンを統合した結果, 20 α -HSD ゲノム DNA は, エクソン 1 から 9 まで約 18 kb に渡り, 各エクソンのサイズがラット, ヒトの 20 α -HSD 遺伝子とよく一致するとともに, ゲノム構造もヒト 20 α -HSD 遺伝子と類似していた。また 20 α -HSD の活性発現に必須である 4 個のアミノ酸がエクソン 2 から 4 にコードされていたことから, ターゲティングベクターはこの領域を標的部位に定めてネオマイシン耐性遺伝子で置換するとともに, 20 α -HSD

の発現部位を KO マウスにおいて検出できるようにエクソン 2 の途中に internal ribosomal entry site (IRES) 配列に連結した enhanced green fluorescence protein (EGFP) 遺伝子を挿入した。エレクトロポレーションの結果、1050 クローンから 4 クローンの相同組み換え ES 細胞が得られ、このうち染色体数に異常の見られなかった 2 つのクローンを用いてキメラマウス 13 匹を得ることができた。

第 3 章においては、得られたキメラマウスを C57BL/6J と交配し、F1 ヘテロマウスを作製した。ヘテロマウスどうしを交配して誕生した野生型 (WT) : ヘテロ : KO マウスの割合はメンデルの法則に従っていた。KO マウスには外見上特に異常は認められなかった。KO マウスの遺伝子発現について調べたところ、置換領域であるエクソン 2 から 4 の転写は見られず EGFP も黄体に発現していたが、エクソン 1 の後に直接エクソン 5 が連結した短い配列も転写されていた。しかし、KO マウスでは抗ラット 20 α -HSD 抗体を用いた Western blotting によって陽性反応は検出できなかったため、その短い配列は翻訳されていないと考えられた。

膣スメア像により性周期を検討した結果、KO マウスにおいても性周期が回帰することが明らかとなったが、WT マウスよりも発情休止期が有意に延長していた。このことは、性周期黄体の退行は 20 α -HSD がなくても起こるが、遅延することを示している。一方、雄を同居させるとこのような発情休止期の延長は認められなくなり、性周期回帰機構にフェロモンが強く影響することが示唆された。

精管結紮雄と交配して誘起した偽妊娠期間は KO マウスでは 14.1 日であり、WT マウスの 11.6 日より有意に延長していた。この結果も、偽妊娠黄体の退行は 20 α -HSD がなくても起こるが、遅延することを示している。偽妊娠中の血中 progesterone と 20 α -OHP を測定したところ、KO マウスでは WT マウスよりも progesterone 濃度が高く、またその低下が遅れることが明らかとなった。一方、20 α -OHP 濃度は WT マウスでは progesterone 濃度とほぼ同様の消長を示したが、KO マウスでは偽妊娠期間を通じて極めて低値であった。

妊娠期間は WT マウスでは 18.5 日、KO マウスでは 19.6 日で、有意差は認められなかった。WT マウスでは、周産期には progesterone 濃度の低下と 20 α -OHP 濃度の上昇が特徴的であったが、KO マウスでは progesterone 濃度の低下のみが認められた。このような偽妊娠末期、妊娠末期における 20 α -OHP 濃度の上昇を伴わない progesterone 濃度の低下は、従来の知見を考えると以外な結果であった。KO マ

ウスに見られた progesterone 濃度の低下は、この時期の黄体細胞におけるステロイド合成系に顕著な抑制的制御が働いていることを示唆している。この抑制的制御因子の候補の一つとして、多くの動物において主要な黄体退行因子として progesterone 合成の抑制や形態的退行をもたらす $\text{PGF}_{2\alpha}$ が考えられる。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプターのノックアウトマウスでは分娩予定日になっても progesterone 濃度が十分下がらず分娩できないことや、 ddY マウスで $\text{PGF}_{2\alpha}$ による黄体でのアポトーシス発現が報告されており、 KO マウスにおける偽妊娠/妊娠末期の progesterone 濃度低下にも $\text{PGF}_{2\alpha}$ による progesterone 合成系の抑制が寄与していることが考えられた。

KO マウスと WT マウスの総産子数には差はなかったが、生存産子数は前者が 3.5 匹、後者が 7.1 匹と KO マウスでは有意に少なかった。このことは、 KO マウスは正常な妊娠期間で分娩可能ではあっても、胎子の発育には異常があることを示唆している。さらに、 KO の子宮においてもエクソン 2 から 4 の欠損した短い転写産物が検出されたことから、 WT マウスの子宮では卵巣と同じ分子種の $20\alpha\text{-HSD}$ が発現していることが改めて示された。これらの結果と、第 1 章における妊娠子宮や胎盤、胎子表皮での $20\alpha\text{-HSD}$ 遺伝子の発現を併せて考えると、 $20\alpha\text{-HSD}$ は妊娠の維持に必要な高 progesterone 環境下における胎子の正常な発育や生存に必須の役割を果たしていることが示唆された。

以上本研究により、ジーンターゲティング法によって $20\alpha\text{-HSD}$ 遺伝子を欠損させたマウスにおいても、性周期黄体や偽妊娠/妊娠黄体は寿命の延長は認められるものの退行は起こることが明らかとなり、黄体の退行は $20\alpha\text{-HSD}$ による progesterone の異化と、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ などによる progesterone 合成系の抑制の協調的作用が重要であることが示唆された。さらに、妊娠子宮内における progesterone の異化が阻害されると生存産子数が減少することが明らかとなり、 $20\alpha\text{-HSD}$ が胎子発生過程においても重要な機能を担っていることが示唆された。これらの知見は、哺乳類の性周期回帰機構や妊娠維持機構、分娩初来機構の比較生物学的理解を深めることにも貢献するものと考えられる。