

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 石 田 真 帆

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。一方、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、ジーンターゲット法により 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 のも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。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 個のアミノ酸が保存されていた。また、妊娠期子宮内組織においては、子宮内膜上皮細胞や胎盤、胎児表皮で 20 α -HSD mRNA が検出され、20 α -HSD が胎児発育環境での高濃度 progesterone の作用を緩和し、胎児の正常な発育を維持する機能を有することが示唆された。

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ットベクター構築のため、ゲノム DNA をクローニングした。その結果、20 α -HSD ゲノム DNA はエクソン 1 から 9 まで約 17.5 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、ターゲット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、キメラマウスを作製した。キメラマウスを C57BL/6J と交配し、F1 ヘテロマウスを得た。ヘテロマウスどうしを交配して誕生した KO マウスには、外見上特に異常は認められなかった。

第3章においては、得られた KO マウスにおける表現型の解析を行った。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、野生型 (WT) マウスよりも発情休止期が有意に延長していた。また偽妊娠期間は KO マウスでは 14.1 日であり、WT マウスの 11.6 日よりも有意に延長していた。これらの結果は、性周期黄体や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。妊娠期間は WT マウスと KO マウスでは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。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強い抑制的制御が働いていることを示唆している。さらに、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く、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が示唆された。

以上本研究により、 20α -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 20α -HSD による progesterone の異化と、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 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、 20α -HSD が胎子発生過程においても重要な役割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貢献するものと考えられ、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものとして認めた。