

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成11年度博士過程入学

氏名 平林 啓司

指導教官 西原 真杉

論文題目 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素遺伝子の発現調節機構に関する研究

哺乳類の生殖系には視床下部-下垂体-性腺を中心とした基本的な神経内分泌調節系が共有されているが、その表現型には種によって様々な変異が見られる。一般に哺乳類の性周期は卵胞期、排卵期、黄体期からなり、排卵後に形成される黄体は哺乳類の生殖に必須のホルモンであるプロジェステロンを一定期間分泌する。一方、マウスやラットは交尾刺激がない場合には黄体期を持たない不完全性周期を回帰する。これは排卵後形成された黄体において、プロジェステロンを生物活性のない 20 α -ダイヒドロプロジェステロンに変換する 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素 (20 α -HSD) が発現するためである。この黄体における 20 α -HSD 発現の生物学的意義は 20 α -HSD 遺伝子欠損マウスを用いて解析され、20 α -HSD は性周期の短縮や不妊交尾による偽妊娠から性周期への早期の移行といった繁殖戦略上重要な役割を果たしていることが示唆されている。これらの動物では、妊娠が成立した場合には 20 α -HSD の発現がプロラクチン (PRL) によって抑制されることによりプロジェステロン分泌相が

導入され、また妊娠末期にはプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) によってその発現が促進されて黄体が退行するという合目的な調節を受けている。 20α -HSD はアルドケト還元酵素 (AKR) スーパーファミリーと呼ばれるグループに属し、AKR は単量体で約 320 個のアミノ酸からなる酵素群である。マウスやラットにも複数のメンバーが存在し、基質特異性や発現臓器などによって多彩な機能を有している。マウスやラットで 20α -HSD が生殖系において機能を持つに至った背景には、その基質特異性ととも黄体細胞特異的な発現調節機構を獲得したことが重要であると考えられ、 20α -HSD の発現調節機構は遺伝子発現調節の一モデルに留まらず、遺伝子の分子進化という観点からも極めて興味深い。このような背景から、本研究はマウス 20α -HSD 遺伝子の黄体における発現調節機構を解析するとともに、その分子進化に関して検討を加えたものである。

第一章においては、 20α -HSD 遺伝子の発現調節機構を解析する手段として、まずマウス 20α -HSD ゲノムクローンから遺伝子の 5' 上流領域を単離して塩基配列及び転写開始点を決定し、転写因子結合部位の検索を行った。塩基配列を決定した約 4.3 kb の上流配列について検索を行った結果、Stat6 結合部位、グルココルチコイド応答配列 (GRE)、プロジェステロン応答配列 (PRE)、cAMP 応答配列 (CRE)、NF-1 結合部位、Sp1 結合部位等が見出された。また、既に報告されているラット 20α -HSD 遺伝子 5' 上流配列との間で検索結果の比較を行ったところ、両種に共通に見出されたのは転写開始点近傍の GRE、NF-1 結合部位、Sp1 結合部位のみであった。ラット 20α -HSD 遺伝子 5' 上流配列を単離したグループが独自に行った検索によると、本実験で行った検索には見出されない AP-1 結合部位、CRE、PRE、PRL 応答配列 (PRLRE)、NUR77 結合部位が報告されている。これらの配列をマウスにおいて対応する配列と比較すると、PRE、PRLRE、NUR77 結合部位に比較的保存性が認められた。NUR77 結合部位はラットにおいて $PGF_{2\alpha}$ による 20α -HSD の発現刺激作用を仲介することが報告されており、この配列が両種で保存されていることなどから、 20α -HSD 遺伝子に関して共通の調節機構が存在すると思われる。両種の 20α -HSD 遺伝子 5' 上流配列の間には約 75% の相同性が認められ、その他の調節機構も種間でよく保存されていることが示唆された。

次に、単離されたマウス 20α -HSD 遺伝子 5' 上流配列を用い、ラット黄体細胞及び黄体化顆粒層細胞という 2 種類の初代培養系を用いて、プロモーター

活性に対するフォルスコリン (FSK) 及び $\text{PGF}_{2\alpha}$ の効果をレポーターアッセイにより検討した。FSK は細胞内 cAMP を上昇させる試薬であり、ラット 20α -HSD プロモーター活性を減少させることが報告されている。均一な細胞集団である黄体化顆粒層細胞の初代培養系においては FSK はプロモーター活性、内因性 mRNA とともに減少させた。一方、黄体組織を構成する種々の細胞からなる不均一な細胞集団である黄体細胞の初代培養系では、FSK は内因性 mRNA 量を減少させたが、プロモーター活性は大幅に上昇させた。この矛盾は、黄体細胞の初代培養系に含まれる非ステロイド産生細胞に導入された外来性遺伝子の発現パターンによるものと考えられ、 20α -HSD 遺伝子発現の特異性は塩基配列のみではなく、細胞内環境や DNA の状態、例えばクロマチン構造などにも大きく依存していると考えられた。一方、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ はどちらの培養系においてもプロモーター活性と内因性 mRNA 量を上昇させた。以上の結果から、以後の実験ではプロモーターアッセイの結果が内因性 mRNA 発現の変化を反映していることが示されたラット黄体化顆粒層細胞を用いた。

第二章ではまず、黄体細胞において 20α -HSD 遺伝子の転写活性化に必要なシスエレメントの同定を目的として、黄体化顆粒層細胞の初代培養系において 5' 欠失変異体コンストラクトを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、上流-83~-60 の領域を欠失させたところでプロモーター活性が顕著に減少することが明らかとなった。第一章における解析でこの領域には Sp1 配列が見出されていたので、Sp1 配列の欠失変異体又は塩基置換変異体を作製してレポーターアッセイを行ったところ、それらのプロモーター活性は野生型コンストラクトに比べて大きく減少した。さらにゲルシフト法による解析からこの配列に Sp1 が結合することが示された。以上の結果より、黄体における本遺伝子の自発的な発現には Sp1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、黄体の機能化に必須な PRL による 20α -HSD の発現抑制機構を検討した。レポーターアッセイにおいて PRL 応答性が再現されたことから、PRL は 20α -HSD 遺伝子の 5' 上流配列を介して作用することが示された。また種々の 5' 欠失変異体を用いた解析において、上流-100 塩基まで欠失しても PRL 応答性は失われなかったことから、PRL 応答配列は転写開始点近傍にあることが示唆された。しかし、この領域に PRLRE は見出されなかったことから、PRL 受容体の下流にあることが知られている Jak2/Stat5 の役割を検討するために、Jak2 阻害剤を用いて 20α -HSD mRNA の発現量を解析した結果、Jak2 の活性

化が PRL 作用に必要であることが示唆された。また、タンパク質合成阻害剤であるサイクロヘキシミドも PRL の作用を阻害したことから、PRL による 20 α -HSD の発現抑制作用は新規タンパク質合成に仲介されていることが示唆された。さらにゲルシフト法を用いて PRL が Sp1 による転写活性を抑制している可能性を検討したところ、PRL によってシフトバンドの減少が認められた。これらの結果は、PRL は Jak2 の活性化を介して何らかのタンパク質合成を促進し、そのタンパク質が Sp1 による転写活性を抑制することで 20 α -HSD 遺伝子の発現を抑制していることを示唆している。

第 3 章においてはマウス 20 α -HSD 遺伝子の分子進化に関して理解を深めることを目的に蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法を用いた解析を行った結果、マウス 20 α -HSD 遺伝子は 13 番染色体の A1 領域に存在することが明らかになった。公開されているマウスゲノム情報の検索により、この領域には AKR スーパーファミリー遺伝子クラスターが存在し、重複によってこの遺伝子ファミリーが形成されたものと考えられた。これらの遺伝子は一部の組み合わせを除いて一様に 75%前後の相同性を示したことから、比較的短期間に遺伝子重複が繰り返されて現在のレパートリーが構成された後に変異が起こり、個々の遺伝子が別々の機能を持つに至ったことが想像される。一方、ヒトゲノム情報から、ヒト 10 番染色体 p15-14 領域に少なくとも 4 つの AKR スーパーファミリー遺伝子、すなわち AKR1C1 (20 α -HSD に相当) ~AKR1C4 が見出され、この領域とマウス 13 番染色体 A1 領域との相同関係が改めて確認された。ヒトではこれらの AKR メンバーが主に肝臓で発現する一方でマウス 20 α -HSD は卵巣に最も多く発現することから、マウス 20 α -HSD 遺伝子の特にプロモーター領域の分子進化における特殊性が伺われた。

以上、本研究によりマウス 20 α -HSD 遺伝子 5' 上流塩基配列が決定され、Sp1 配列を含む転写因子結合部位の存在が明らかとなった。遺伝子発現の組織特異性はその配列のみでは決定されないものの、黄体細胞における 20 α -HSD 遺伝子の転写の活性化には、Sp1 配列が必須の役割を果たしていることが示唆された。さらに、PRL は Jak2 の活性化を介して何らかのタンパク質の合成を誘導し、Sp1 の作用を抑制することにより黄体を機能化することが考えられた。このように、マウスやラットの黄体において特異的に見られる 20 α -HSD 遺伝子の発現制御機構には Sp1 が深く関与していることが明らかとなり、本配列を中心としたプロモーター領域のさらなる比較生物学的な解析により、20 α -HSD

遺伝子の分子進化に対する理解が深まるとともに、哺乳類の生殖系に見られる多様性の一端を分子レベルで明らかできるものと考えられる。