

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 平林 啓司

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プロゲステロンを一定期間分泌する。一方、マウスやラット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、プロゲステロンを 20α -ダイハイドロプロゲステロンに変換する 20α -水酸化ステロイド脱水素酵素 (20α -HSD) が発現するためである。これらの動物では、妊娠が成立した場合には 20α -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ゲステロン分泌相が導入される。 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、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、本論文はマウス 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、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 の上流域には、Stat6 結合部位、cAMP 応答配列 (CRE)、NF-1 結合部位、Sp1 結合部位等が見出された。次に、プロモーター活性に対するフォルスコリン (FSK) の効果をレポーターアッセイにより検討した。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。しかし、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。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たところ、それらのプロモーター活性は大きく減少した。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、PRL による 20α -HSD の発現抑制機構を検討した結果、PRL 応答配列は転写開始点近傍にあることが示唆された。また、Jak2 阻害剤およびタンパク質合成阻害剤とともに PRL の作用を阻害した。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。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。一方、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示唆された。

以上、本研究によりマウスやラットの黄体における 20 α -HSD 遺伝子の発現制御機構には Sp1 結合部位が深く関与していることが明らかになり、本配列を中心としたプロモーター領域のさらなる解析により、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にできるものと考えられた。これらの成果は、哺乳類の生殖機構に関する比較生物学的理解を深めることに大きく寄与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。