

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成13年度博士課程 進学

氏 名 Walimuni Samantha Nilanthi Jayasekara

(ワリムニ サマンタ ニランティ ジャヤセカラ)

指導教官名 西原真杉

論文題目 The Role of 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Maintenance
of Pregnancy in the Goat

(ヤギの妊娠維持における 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素の役割)

アルド・ケト還元化酵素ファミリー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 (プロゲステロン) を生物学的に不活性な 20 α -ジヒドロプロゲステロン (20 α -OHP) に代謝する酵素である。ラットやマウスなどの不完全性周期を回帰する齧歯類では主として黄体に発現し、黄体を早期に機能的に退行させることにより、約 4 日間という短い性周期の回帰を可能にしていると考えられている。近年、20 α -HSD がラットやマウスにおいて胎盤にも発現していることが示された。さらに最近、筆者らの研究室において 20 α -HSD 遺伝子ノックアウトマウスが作製されたが、このマウスでは総胎子数は変化しないが、生存産子数が有意に減少するという興味深い結果が得られている。プロゲステロンは子宮内膜の着床性増殖の誘起や子宮平滑筋の収縮抑制など哺乳類の妊娠維持に必須の役割を果たしているが、ある種の細胞に対してはその増殖を抑制するなど細胞毒性を有することも知られており、また妊娠マウス

の羊膜内にプロゲステロンを投与すると胎子が死亡することも報告されている。これらのことは、プロゲステロンは母体に対しては妊娠維持作用をもつ一方で、胎子に対してはむしろ正常な発生過程や生存を阻害する可能性を示唆している。筆者は、胎盤に発現する 20 α -HSD は、プロゲステロンを異化することにより胎子を保護するという役割を担っているのではないかと考えた。完全性周期を回帰する動物における生殖機能の制御に 20 α -HSD が果たす役割は未だ明らかではないが、妊娠中の高プロゲステロン環境下における胎子の保護という 20 α -HSD の作用は、一部の齧歯類にとどまらず多くの哺乳類に共通するものである可能性がある。本研究は、完全性周期を回帰する反芻動物であるシバヤギをモデル動物として、妊娠維持における 20 α -HSD の役割の解明を目指したものである。

第 1 章においては、まずシバヤギ 20 α -HSD cDNA のクローニングとその塩基配列の決定を試みた。成熟雌シバヤギより排卵後 8 日の性周期黄体、および妊娠 130 日の胎盤を採取し、RNA を抽出した。マウス 20 α -HSD cDNA の塩基配列を元に設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った結果、371 bp の cDNA 断片が得られた。塩基配列の解析の結果、両組織から得られた cDNA 断片の塩基配列は一致しており、マウスおよびラットの 20 α -HSD cDNA の対応部分とそれぞれ 81% および 80% の相同性を示したため、これをシバヤギ 20 α -HSD cDNA の断片であると判断し、3'-RACE および 5'-RACE を行い全長 cDNA を得た。クローニングされた cDNA は 323 個のアミノ酸をコードし、相同性解析の結果アルド・ケト還元化酵素ファミリーに属することが示され、マウス、ラット、ウサギ、ヒトの 20 α -HSD cDNA とそれぞれ 76%、74%、78%、82 % の相同性を有していた。また、この cDNA の塩基配列から想定されるアミノ酸配列には、アルド・ケト還元化酵素としての活性発現に必須であることが知られている 4 個のアミノ酸 (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) が保存されていた。さらに、今回得られた cDNA を用いてグルタチオン転移酵素 (GST) との融合タンパク質を大腸菌に発現させた。得られた融合タンパク質から GST を分離したタンパク質を精製し、20 α -OHP を基質に NADP から NADPH への変換を指標として酵素活性の測定を行ったところ、合成されたタンパク質は確かに 20 α -HSD 活性をもつことが示された。これらの結果より、筆者は本章の研究によりクローニングされた cDNA を、シバヤギ 20 α -HSD cDNA と確定した。

第2章では、妊娠シバヤギを用いて、母子の各組織における 20 α -HSD 遺伝子の発現、および母体血液、胎子血液、羊水中のプロゲステロン、20 α -OHP 濃度の経時的変化を解析した。まず、妊娠 40 日、90 日、130 日、145 日のシバヤギの胎盤における 20 α -HSD 遺伝子の発現を、ノザン・プロットティングにより調べた。その結果、妊娠 40 日では 20 α -HSD mRNA はほとんど検出できなかったが、90 日で大きく上昇し、以降妊娠末期まで高いレベルが維持された。In situ hybridization による解析の結果、20 α -HSD mRNA は胎盤の母体側の子宮内膜上皮に発現していることが示された。そこで、胎盤以外の子宮における 20 α -HSD mRNA の発現を検討した結果、妊娠 40 日では検出できなかったが、90 日で弱い発現が、130 日、145 日で強い発現が見られた。なお、黄体期の非妊娠シバヤギの子宮においては 20 α -HSD mRNA は検出できなかった。さらに、胎盤、子宮のサイトゾール中の 20 α -HSD 活性を測定したところ、妊娠 40 日では活性は認められなかったが 90 日、130 日では検出され、145 日では特に高い活性が検出された。また、妊娠母体の肝臓、腎臓、脾臓、副腎における 20 α -HSD mRNA の発現を RT-PCR 検討した結果、腎臓にのみ弱い発現が見られたが、その他の臓器では検出できなかった。黄体においては、性周期黄体では検出されたものの、妊娠黄体においては検出されなかった。一方、胎子においては肝臓では 20 α -HSD mRNA が検出されたが、腎臓、脾臓、副腎、および皮膚では発現は認められなかった。これらの結果より、シバヤギにおいては妊娠の中期から後期にかけて、子宮と胎盤では特異的に 20 α -HSD 遺伝子の転写が高まり、酵素活性をもつ 20 α -HSD タンパク質が発現していることが明らかとなった。

次に、妊娠 40 日、90 日、130 日、145 日の母体血液、胎子血液、および羊水中のプロゲステロンと 20 α -OHP 濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。母体の血清中プロゲステロン濃度は妊娠 40 日より 90 日、130 日で高く、分娩直前の 145 日には低下するという変化を示した。母体血清中の 20 α -OHP 濃度もほぼ同様の消長を示したが、20 α -OHP/プロゲステロン比は妊娠 40 日が最も低く、移行徐々に上昇し、妊娠 145 日で最も高くなった。両ホルモンの血清中濃度が最も高くなるのは、プロゲステロンは妊娠 90 日で 8.2 ng/ml、20 α -OHP は妊娠 130 日で 6.6 ng/ml であった。一方、胎子血液は妊娠 40 日には採取できなかったが、90 日、130 日、145 日に採取した血液で測定した結果、血清中 20 α -OHP 濃度は 90 日、130 日では

高く 145 日には低下するという消長を示し、すべての時期で母体の血清中濃度よりも高く、最高値は妊娠 130 日で 11.2 ng/ml であった。しかし、胎子の血清中プロゲステロン濃度はきわめて低く、測定したすべての時期で 0.7 ng/ml 以下であった。羊水中のプロゲステロンと 20 α -OHP 濃度もきわめて低く、妊娠末期に向けて上昇する傾向を示したがすべての時期でともに 0.8 ng/ml 以下で推移した。

以上のように、本研究によりシバヤギでは妊娠の中期から後期に胎盤と子宮において 20 α -HSD が遺伝子レベルおよび活性レベルで発現していることが示された。これらの発現は、妊娠中の母体血液には 20 α -OHP が高濃度で存在すること、また 20 α -OHP/プロゲステロン比が妊娠末期に向けて上昇していくことによく反映されていた。胎子血液にも高濃度の 20 α -OHP が存在したが、プロゲステロン濃度は母体血液中の約 10%程度と極めて低いレベルに抑えられていた。このことは、母体から胎子へ移行する段階で、あるいは胎子の体内でプロゲステロンから 20 α -OHP への異化が起こっていることを示唆している。すなわち、胎盤やあるいは胎子の肝臓に発現している 20 α -HSD が胎子を低プロゲステロン環境下に置くことに大きく貢献しているものと考えられる。また、胎子血液と羊水中のプロゲステロン濃度は妊娠期を通してほぼ同じで、プロゲステロンは胎子の体内ばかりではなく胎子を取り巻く環境においても極めて低レベルに維持されていることが明らかとなった。

ラットやマウスの 20 α -HSD 遺伝子のプロモーター領域にはプロゲステロン応答配列が存在することが知られているので、本研究においてシバヤギの胎盤や子宮内膜で観察された妊娠中期以降の 20 α -HSD の発現は、この時期の血中プロゲステロンの上昇によりが誘導されている可能性がある。また、やはり齧歯類においてはプロスタグランジン F_{2 α} (PGF_{2 α}) が 20 α -HSD 遺伝子の発現を上昇させることが示されているので、プロゲステロン濃度が低下する妊娠末期においては、子宮から放出される PGF_{2 α} により 20 α -HSD の発現が高まっていることが示唆される。ただ、非妊娠期の子宮においてはプロゲステロンレベルの高い黄体期においても 20 α -HSD の発現が見られなかったことから、子宮内膜上皮における 20 α -HSD の発現には胎子由来の因子が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

以上、本研究の結果は、従来一部の齧歯類の黄体退行に特異的に関わっていると考えられていた 20 α -HSD が、妊娠中母体より大量に分泌されるプロゲステロン

を胎盤において異化し、胎子を低プロゲステロン環境下におくことにより発生過程をその毒性から保護するという多くの哺乳類に共通する普遍的な機能を担っていることを示唆するものである。本研究で得られた知見は、哺乳類の妊娠維持機構や分娩初来機構の比較生物学的理解を深めるとともに、反芻動物の流産の防止などにも大きく貢献するものと考えられる。