

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Walimuni Samantha
Nilanthi Jayasekara

20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素 (20 α -HSD) は、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。ラットやマウスでは主として黄体に発現してその退行に関与しているが、近年、胎盤にも発現していることが示された。さらに最近、申請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していた。プロゲステロンは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いる。これらのことは、高濃度のプロゲステロンは胎子の正常な発生過程や生存を阻害しうることを示唆しており、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可能性が考えられる。本研究は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 の役割を明らかにすることを目的としたものである。

第 1 章においては、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黄体および胎盤を採取し、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 を行い、さらに 3'-RACE および 5'-RACE により全長 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、ラットの 20 α -HSD cDNA とそれぞれ 76%、74%の相同性を有していた。さらに、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、本章の研究によりクローニングされた cDNA は、シバヤギ 20 α -HSD cDNA であると判断された。

第 2 章では、まずシバヤギの胎盤における 20 α -HSD 遺伝子の発現を、ノザン・ブロットイングにより調べた。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。胎盤以外の子宮においても、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。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。一方、胎子においては肝臓では 20 α -HSD mRNA が検出されたが、他の組織では発現は認められなかった。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、145 日には低下した。母体血清中の 20 α -OHP 濃度もほぼ同様の消長を示した。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、胎児血清中 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たが、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、胎児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、すべての時期でともに 0.8 ng/ml 以下で推移した。これらの結果より、母体から胎児へ移行する段階で、あるいは胎児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が示唆された。

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、胎児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、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものとして認めた。