

mouse ovary (at 12 days of pseudopregnancy)

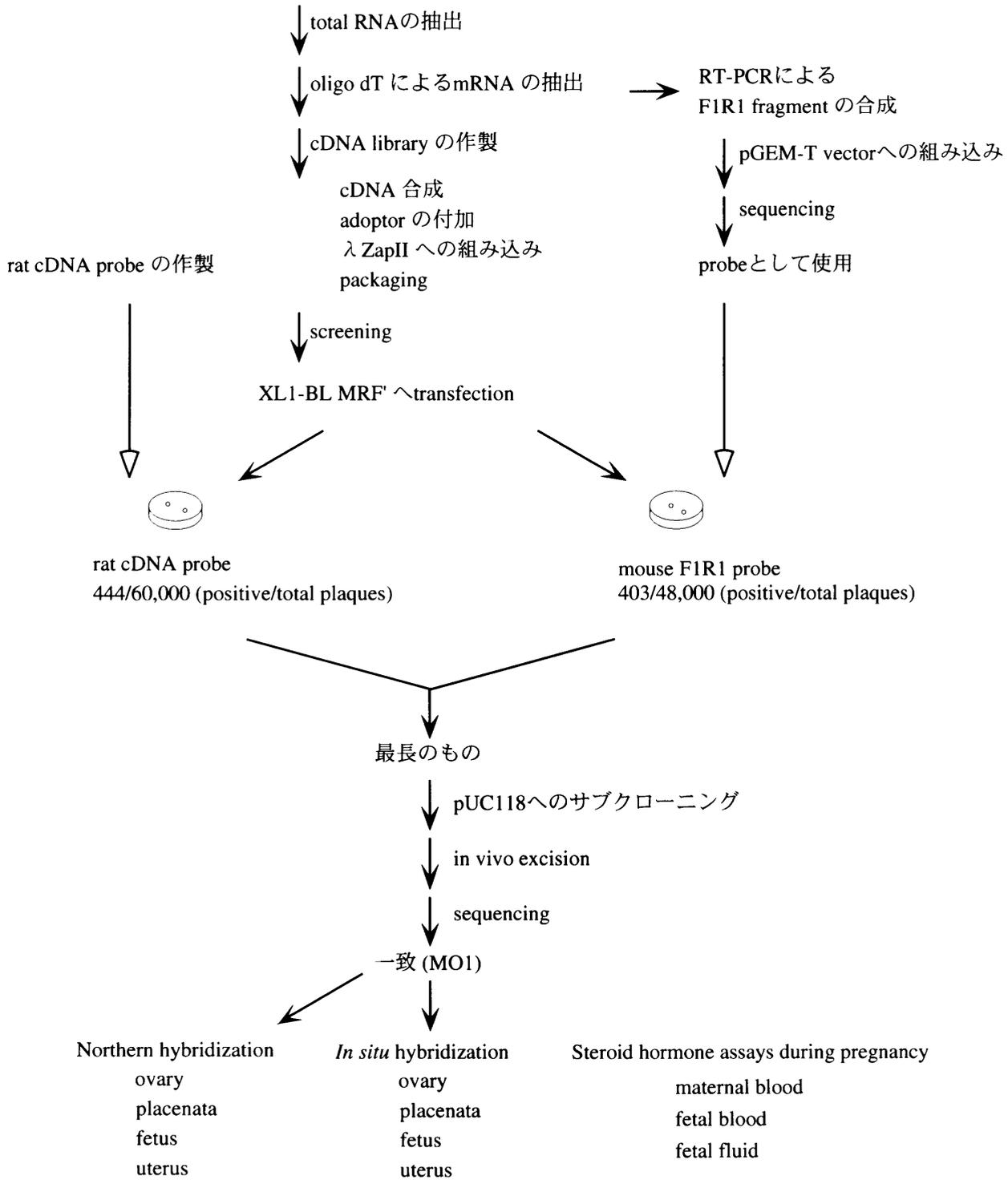
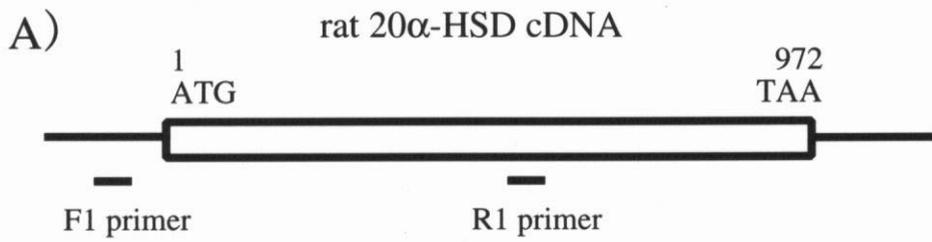


図1-1. 第一章の実験の流れ.



| | | |
|--------------------|----------------------------|-----|
| | -29 | -10 |
| Rat cDNA F1 primer | 5'-ACTCTTCTAGGGAAGAGCAG-3' | |
| | 654 | 673 |
| Rat cDNA R1 primer | 5'-TGTATCTCTGAGTCCCAGG-3' | |

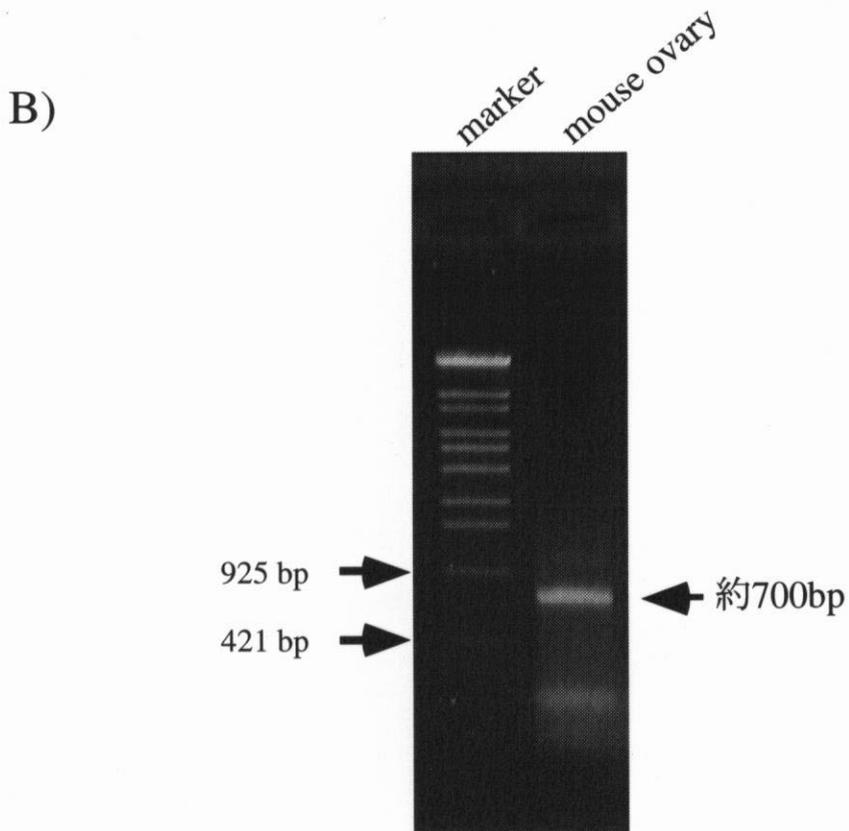


図1-2. cDNA library screening用マウスprobeの作製.

- (A) ラット20 α -HSD cDNAにおけるF1 primerとR1 primer
 (B) F1 primerとR1 primerを用いてマウス卵巣mRNAを鋳型としたRT-PCR産物は、ラット20 α -HSD cDNAのF1/R1フラグメントと93%の相同性を有していた.

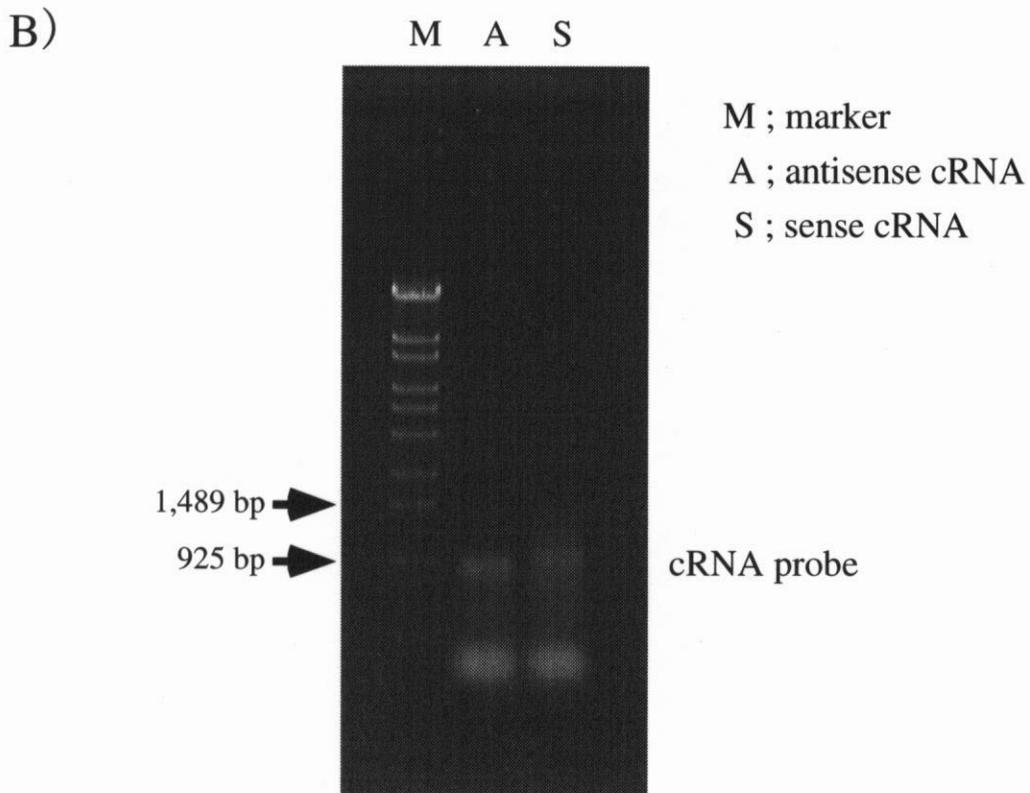
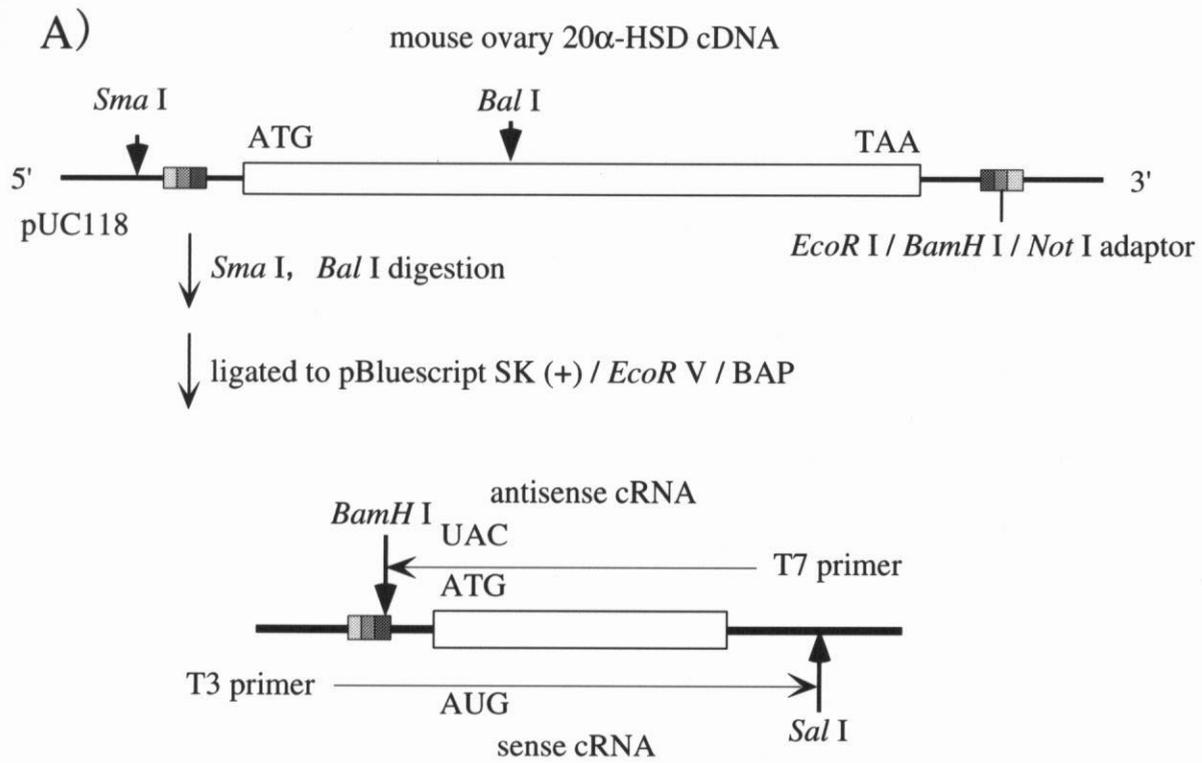


図1-3. *In situ* hybridization用 cRNA probeの作製.

- A) *In situ* hybridizationに用いるcRNA probe作製手順
B) 増幅したantisense, sense cRNA probeの電気泳動像

In situ hybridization の方法

1. パラフィン切片用

| | |
|---------------------------|--------------|
| xylene | 10 min. |
| xylene | 10 min. |
| xylene | 10 min. |
| 100 % ethanol | 3 min. |
| 90 % ethanol | 3 min. |
| 80 % ethanol | 3 min. |
| 70 % ethanol | 3 min. |
| 50 % ethanol | 3 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 0.3 % Triton X-100/PBS | 10 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 0.2 N HCl | 10 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. 37°C |
| 16 µg/ml proteinase K/PBS | 30 min. 37°C |
| 1×PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 4 % PFA/PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 2 mg/ml glycine/PBS | 10 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. |

2. 凍結切片用

| | |
|--------------------------|--------------|
| 4 % PFA/PBS | 10 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 0.3 % Triton X-100/PBS | 10 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 0.2 N HCl | 10 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. 37°C |
| 1 µg/ml proteinase K/PBS | 15 min. 37°C |
| 1×PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 4 % PFA/PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 2 mg/ml glycine/PBS | 10 min. |
| 1×PBS | 5 min. |
| 1×PBS | 5 min. |

次のページに続く

図 1-4. *In situ* hybridization 法の概略及び使用した溶液の組成.

3. 以下パラフィン切片，凍結切片共通

| | |
|---|---------|
| 0.1 M triethanolamin (TEA) | 3 min. |
| 0.1 M TEA + acetic anhydride 200 μ l/min. | 5 min. |
| continued on the above condition | 15 min. |

| | |
|---------------|---------|
| MilliQ 水 | 5 min. |
| 70 % ethanol | 30 sec. |
| 80 % ethanol | 30 sec. |
| 90 % ethanol | 30 sec. |
| 100 % ethanol | 1 min. |
| air dry | |

Prehybridization

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| 4 \times SSC | 15 min. |
| 50 % formamide/2 \times SSC | 30 min. 42 $^{\circ}$ C |

Hybridization

65 $^{\circ}$ C で 10 min 熱変性させて急冷した cRNA probe を， hybridization buffer (1 mg/ml E.coli tRNA, 1 mg/ml salmon sperm DNA, 40 mM Tris-Cl pH 8, 2.5 mM EDTA pH 8, 2 \times denhardt's reagent, 5 \times SSC, 50 % formamide, 0.05 % SDS) に 1 μ g/ml となるように加えた。

overnight 42 $^{\circ}$ C

Washing

| | |
|-------------------------------|-------------------------|
| 50 % formamide/2 \times SSC | 10 min. 42 $^{\circ}$ C |
| 50 % formamide/2 \times SSC | 10 min. 42 $^{\circ}$ C |

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| NTE buffer | 5 min. 37 $^{\circ}$ C |
| NTE buffer | 5 min. 37 $^{\circ}$ C |
| 20 μ g/ml RNase A/NTE | 30 min. 37 $^{\circ}$ C |
| NTE buffer | 5 min. 37 $^{\circ}$ C |

| | |
|------------------|-------------------------|
| 2 \times SSC | 20 min. 42 $^{\circ}$ C |
| 0.2 \times SSC | 20 min. 42 $^{\circ}$ C |
| 0.2 \times SSC | 20 min. 42 $^{\circ}$ C |

| | |
|--------------|------------------------------------|
| DIG buffer 1 | 1 min. or overnight 4 $^{\circ}$ C |
| DIG buffer 2 | 30 min. |
| DIG buffer 1 | 1 min. |

次のページに続く

| | |
|--|-------------------------|
| alkaline phosphatase-conjugated | |
| anti-digoxigenin/DIG buffer 1 ($\times 500$) | 30 min. |
| DIG buffer 1 | 15 min. |
| DIG buffer 1 | 15 min. |
| DIG buffer 3 | 5 min. |
| 2 % NBT-BCIP/DIG buffer 3 ($\times 50$) | 12-24 hrs. |
| DIG buffer 4 | 10 min. |
| 1 \times PBS | 4 $^{\circ}$ C |
| NTE buffer | DIG buffer 1 |
| 0.5 M NaCl | 100 mM Tris-Cl pH 7.5 |
| 10 mM Tris-Cl pH 8 | 150 mM NaCl |
| 1 mM EDTA | |
| DIG buffer 2 | DIG buffer 3 |
| 1 % blocking reagent | 100 mM Tris-Cl pH 9.5 |
| /DIG buffer 1 | 100 mM NaCl |
| | 50 mM MgCl ₂ |
| DIG buffer 4 | |
| 10 mM Tris-Cl pH 8 | |
| 1 mM EDTA | |

```

..TGCTGTAA GAGCTCACTC CGCCCCGTG CCATTGACTG CTGATTACTC ATTCACTTGG GGCATAATT
-50
TGCACTTGTT CGCTGCGTTG TGAAAGCAGA GGAAGAGAGA GAATCTTCTA GGTCAGACGA GTGGCTGAGA
1  ATG  AAT  TCC  AAA  ATT  CAG  AAG  ATA  GAA  TTA  AAT  GAT  GGT  CAC  TCC  ATT  CCT
   Met  Asn  Ser  Lys  Ile  Gln  Lys  Ile  Glu  Leu  Asn  Asp  Gly  His  Ser  Ile  Pro  17
52  GTC  CTG  GGC  TTT  GGC  ACC  TAT  GCA  ACT  GAA  GAG  CAT  CTC  AAG  AAA  AAG  TCT
   Val  Leu  Gly  Phe  Gly  Thr  Tyr  Ala  Thr  Glu  Glu  His  Leu  Lys  Lys  Lys  Ser  34
103 ATG  GAG  TCC  ACC  AAA  ATA  GCT  ATA  GAT  GTT  GGG  TTC  TGC  CAT  ATT  GAT  TGT
   Met  Glu  Ser  Thr  Lys  Ile  Ala  Ile  Asp  Val  Gly  Phe  Cys  His  Ile  Asp  Cys  51
154 TCT  CAC  TTG  TAC  CAG  AAT  GAA  GAA  GAG  ATA  GGC  CAG  GCC  ATT  CTA  AGC  AAG
   Ser  His  Leu  Tyr  Gln  Asn  Glu  Glu  Glu  Ile  Glu  Gln  Ala  Ile  Leu  Ser  Lys  68
205 ATT  GAA  GAT  GGC  ACT  GTG  AAA  AGG  GAA  GAT  ATA  TTC  TAT  ACT  TCG  AAG  CTT
   Ile  Glu  Asp  Gly  Thr  Val  Lys  Arg  Glu  Asp  Ile  Phe  Tyr  Thr  Ser  Lys  Leu  85
256 TGG  TCA  ACT  TCC  CAT  CGT  CCA  GAG  TTG  GTC  AGA  CCC  AGC  TTG  GAA  AAT  TCC
   Trp  Ser  Thr  Ser  His  Arg  Pro  Glu  Leu  Val  Arg  Pro  Ser  Leu  Glu  Asn  Ser  102
307 CTG  AGG  AAA  CTT  AAT  TTG  GAC  TAT  GTA  GAC  CTC  TAT  CTC  ATT  CAT  TTC  CCA
   Leu  Arg  Lys  Leu  Asn  Leu  Asp  Tyr  Val  Asp  Leu  Tyr  Leu  Ile  His  Phe  Pro  119
358 GTG  TCT  CTG  AAG  CCA  GGG  AAT  GAG  CTT  TTG  CCT  AAA  GAT  GAG  CAT  GGA  AAC
   Val  Ser  Leu  Lys  Pro  Gly  Asn  Glu  Leu  Leu  Pro  Lys  Asp  Glu  His  Gly  Asn  136
409 TTA  ATA  TTT  GAC  ACA  GTG  GAT  CTC  TGT  GAC  ACA  TGG  GAG  GCC  ATG  GAG  AAG
   Leu  Ile  Phe  Asp  Thr  Val  Asp  Leu  Cys  Asp  Thr  Trp  Glu  Ala  Met  Glu  Lys  153
460 TGT  AAG  GAT  GCA  GGG  CTG  GCC  AAG  TCC  ATC  GGG  GTG  TCT  AAC  TTT  AAC  CGT
   Cys  Lys  Asp  Ala  Gly  Leu  Ala  Lys  Ser  Ile  Gly  Val  Ser  Asn  Phe  Asn  Arg  170
511 AGA  CAA  CTG  GAG  ATG  ATC  CTG  AAC  AAG  CCA  GGG  CTC  AAG  TAC  AAG  CCT  GTG
   Arg  Gln  Leu  Glu  Met  Ile  Leu  Asn  Lys  Pro  Gly  Leu  Lys  Tyr  Lys  Pro  Val  187
562 TGC  AAC  CAG  GTA  GAA  TGC  CAT  CTT  TAT  CTC  AAC  CAG  AGC  AAG  CTG  CTG  GCC
   Cys  Asn  Gln  Val  Glu  Cys  His  Leu  Tyr  Leu  Asn  Gln  Ser  Lys  Leu  Leu  Ala  204
613 TAC  TGC  AAG  ATG  AAT  GAC  ATT  GTT  CTG  GTT  GCC  TAT  GGT  GCC  CTG  GGA  ACT
   Tyr  Cys  Lys  Met  Asn  Asp  Ile  Val  Leu  Val  Ala  Tyr  Gly  Ala  Leu  Gly  Thr  221
664 CAA  AGA  TAC  AAA  TAC  TGT  ATA  AAT  GAG  GAT  ACC  CCA  GTT  CTC  TTG  GAT  GAT
   Gln  Arg  Tyr  Lys  Tyr  Cys  Ile  Asn  Glu  Asp  Thr  Pro  Val  Leu  Leu  Asp  Asp  238
715 CCA  GTT  CTT  TGT  GCC  ATG  GCA  AAG  AAG  TAC  AAG  CGG  ACT  CCA  GCC  CTG  ATT
   Pro  Val  Leu  Cys  Ala  Met  Ala  Lys  Lys  Tyr  Lys  Arg  Thr  Pro  Ala  Leu  Ile  255
766 GCC  CTT  CGC  TAC  CAG  CTG  GAC  CGT  GGG  ATT  GTG  GCC  CTA  GCC  AAG  AGT  TTC
   Ala  Leu  Arg  Tyr  Gln  Leu  Asp  Arg  Gly  Ile  Val  Ala  Leu  Ala  Lys  Ser  Phe  272
817 AAT  GAG  GAG  AGA  ATC  AGA  GAG  AAC  ATG  CAG  GTC  TTT  GAT  TTC  CAA  TTG  GCT
   Asn  Glu  Glu  Arg  Ile  Arg  Glu  Asn  Met  Gln  Val  Phe  Asp  Phe  Gln  Leu  Ala  289
868 TCA  GAT  GAC  ATG  AAA  ATT  TTA  GAT  GGC  CTG  GAC  AGA  AAT  CTT  CGG  TAC  TTT
   Ser  Asp  Asp  Met  Lys  Ile  Leu  Asp  Gly  Leu  Asp  Arg  Asn  Leu  Arg  Tyr  Phe  306
919 CCT  GCT  GAT  ATG  TTT  AAG  GCT  CAC  CCT  AAC  TTT  CCA  TTC  TTC  GAT  GAA  TAT
   Pro  Ala  Asp  Met  Phe  Lys  Ala  His  Pro  Asn  Phe  Pro  Phe  Phe  Asp  Glu  Tyr  323
970 TAA  GATGGAGGCC CTTGCCACGA GTTCTATTAG AAGATCTTTT GTGTGATGCT GGACTCTCAG
*
ATGCCAATAA CTCGACACAC CGCCTCCAAT CACTGCTAG CAACTCACCC CCAGTTAATT CATATAATT
TGCTTCTTTT CTATAATAA ATAAAAATAT TTTGCTTTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

図1-5. マウス卵巣20α-HSD cDNA配列とアミノ酸配列.

マウス卵巣20α-HSD cDNAは、323個のアミノ酸をコードし、ラット卵巣20α-HSD cDNAと93%の相同性を示した。矢印は転写開始点を、星印は停止コドンを、下線はRat cDNA F1 primerとRat cDNA R1 primerの認識部位を示す。TATA box及びpolyadenylation signalを枠内に囲んで示した。

- ; 補酵素結合部位のアミノ酸
- ; 基質結合部位のアミノ酸

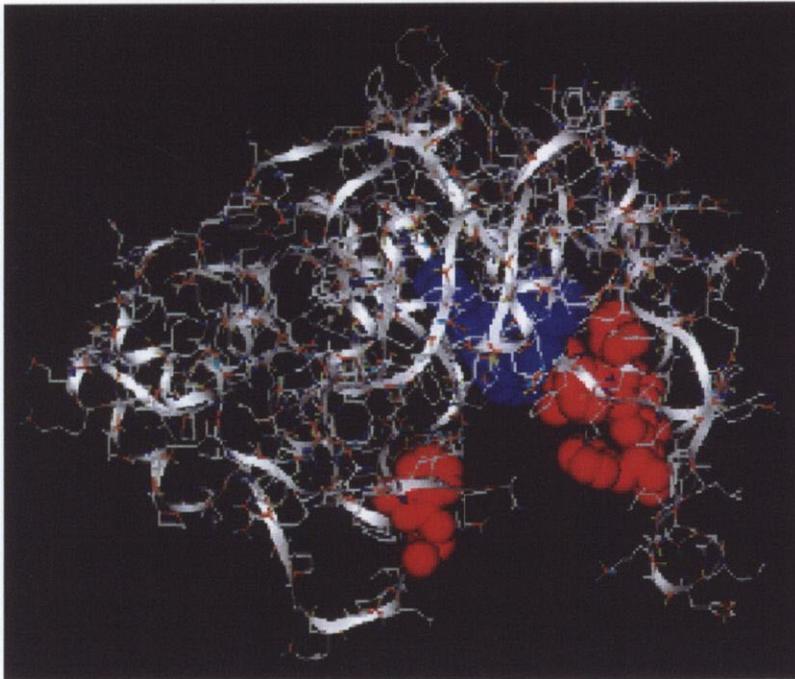
| | | | | | |
|-------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| RAT | MNSKIQKMEL | NDGHSIPVLG | FGTYATEENL | RKKSMESTKI | AIDVGFRHI |
| MOUSE |I.. | |H. | K..... |C.. |
| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| RAT | CSHLQNEEE | IGQAIVSKIE | DGTVKREDIF | YTSK WSTSH | RPELVRPSLE |
| MOUSE | |L.. | | | |
| | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| RAT | NSLRKLNLDY | VDLYLI FPV | SLKPGDELLP | QDEHGNIILD | TVDLCDTWEA |
| MOUSE | | |N.. | K.....F. | |
| | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| RAT | MEKCKDAGLA | KSIGVSNFNR | RQLEKILNKP | GLKHRPVCNQ | VECHLYLNQS |
| MOUSE | | |M.. |YK.. | |
| | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| RAT | KLLAYCKMND | IVLVAYGALG | TQRYKYCINE | DTPVLLDDPI | LCTMAKKYKR |
| MOUSE | | | |V.. | ..A..... |
| | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| RAT | TPALIALRYQ | LERGIVTLVK | SFNEERIREN | LQVFDFQLAS | DDMEILDNLD |
| MOUSE | | ..D...A.A. | | M..... | ..K...G.. |
| | 310 | 320 | | | |
| RAT | RNLRYFPANM | FKAHPNF PFS | DEY* | | |
| MOUSE |D. |F |* | | |

 補酵素結合部位のアミノ酸
 基質結合部位のアミノ酸

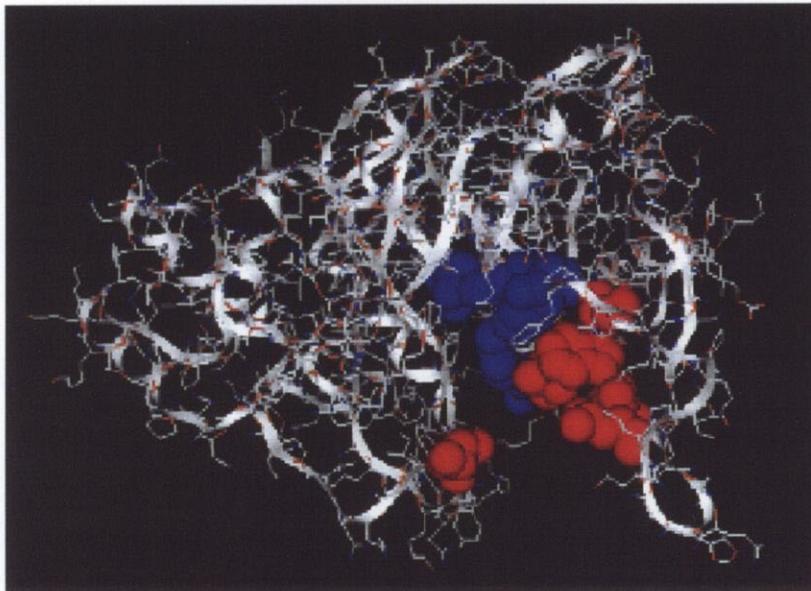
図1-6. マウスとラット卵巣20 α -HSDアミノ酸配列の比較.

ラットとマウスの20 α -HSDをアミノ酸レベルで比較したところ、互いに93%の相同性を有しており、補酵素、基質結合部位のアミノ酸は一致していた。相同なアミノ酸は・で示し、補酵素、基質結合部位のアミノ酸には色をつけて示した。

rat liver 3 α -HSD



mouse ovary 20 α -HSD

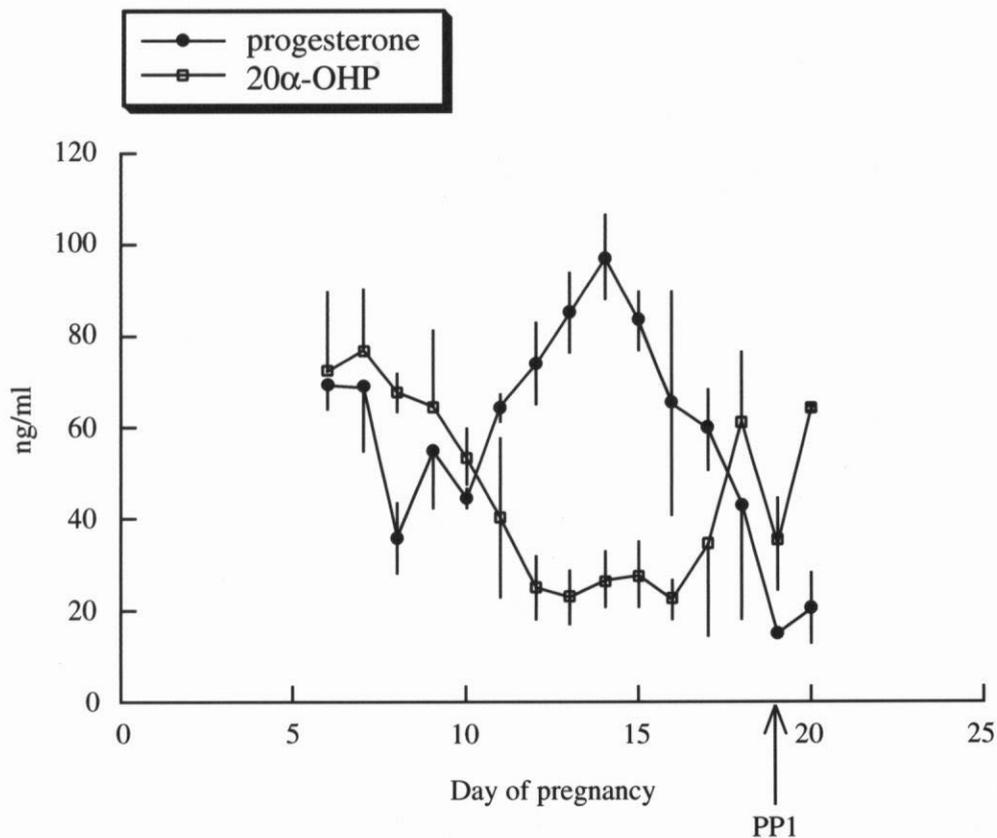


- cofactor (NADPH) binding site
- substrate (steroids) binding site

図1-7. ラット肝臓3 α -HSDとマウス卵巣20 α -HSDの三次元構造.

X線解析によりその三次元構造が決定されているラット肝臓3 α -HSDを元に、マウス卵巣20 α -HSDの三次元構造を推定した。補酵素結合部位、基質結合部位と共にポケット状構造の内部に見られる。

A)



B)

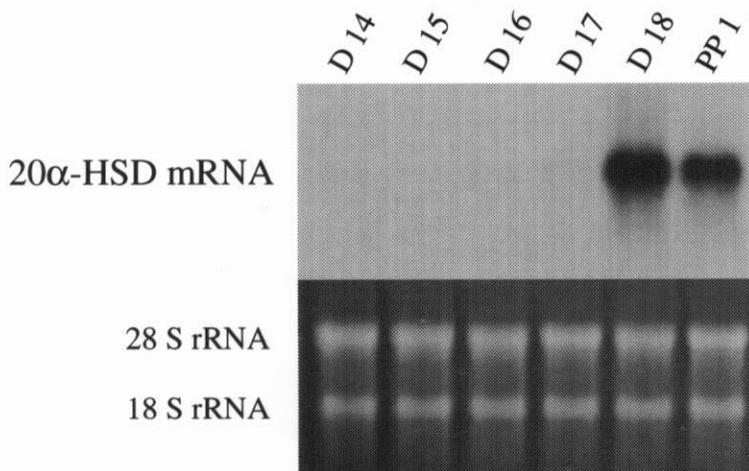


図1-8. ICRマウス妊娠期血中progesterin濃度の変化と卵巢20α-HSD mRNAの発現.

膣栓を確認した日をDay 0 (D 0) とした. 分娩は多くはDay 18の暗期に見られ, 出産を確認した日をPost Parturition day 1 (PP1) とした.

A) RIA法により測定したICRマウスを用いた妊娠期末梢血中progesteroneと 20α-OHP濃度の変化.

B) Northern hybridizationにより検出した妊娠期卵巢20α-HSD mRNA発現の変化. total RNA 5 μgを用いた.

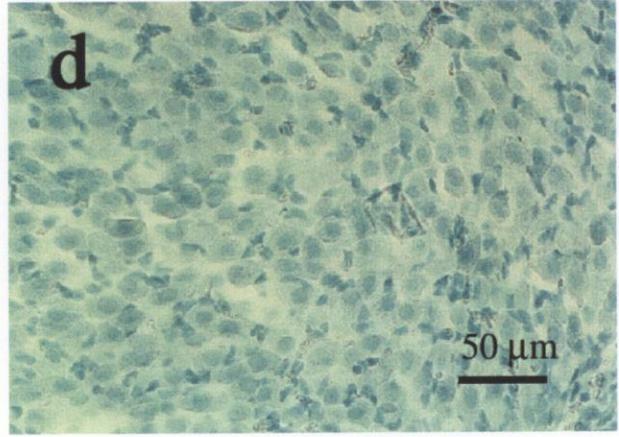
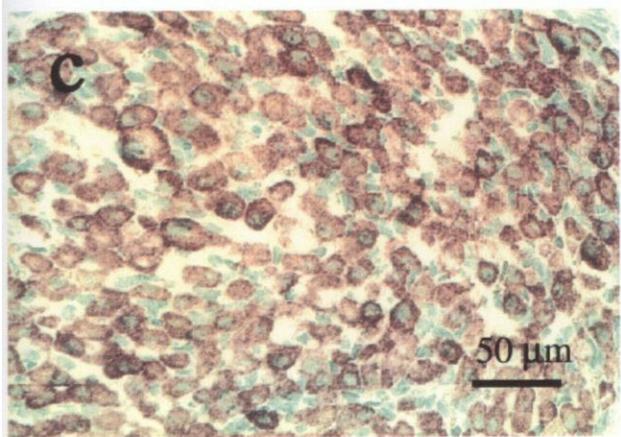
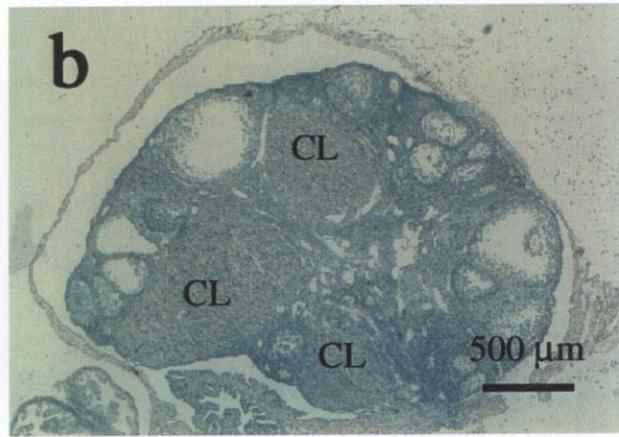
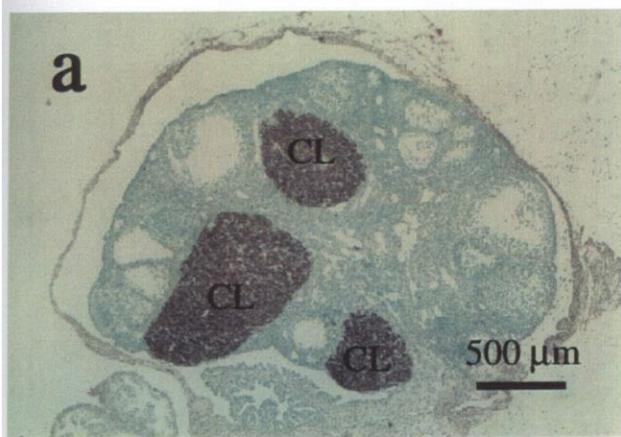


図1-9. 妊娠18日目の卵巣における20 α -HSD mRNA発現.

厚さ5 μm のパラフィン切片に対して、DIGで標識したマウス卵巣20 α -HSD cRNA probeを用いて*in situ* hybridizationを行った.

a, c : antisense probeを用いた場合.

b, d : sense probeを用いた場合.

CL : corpus luteum

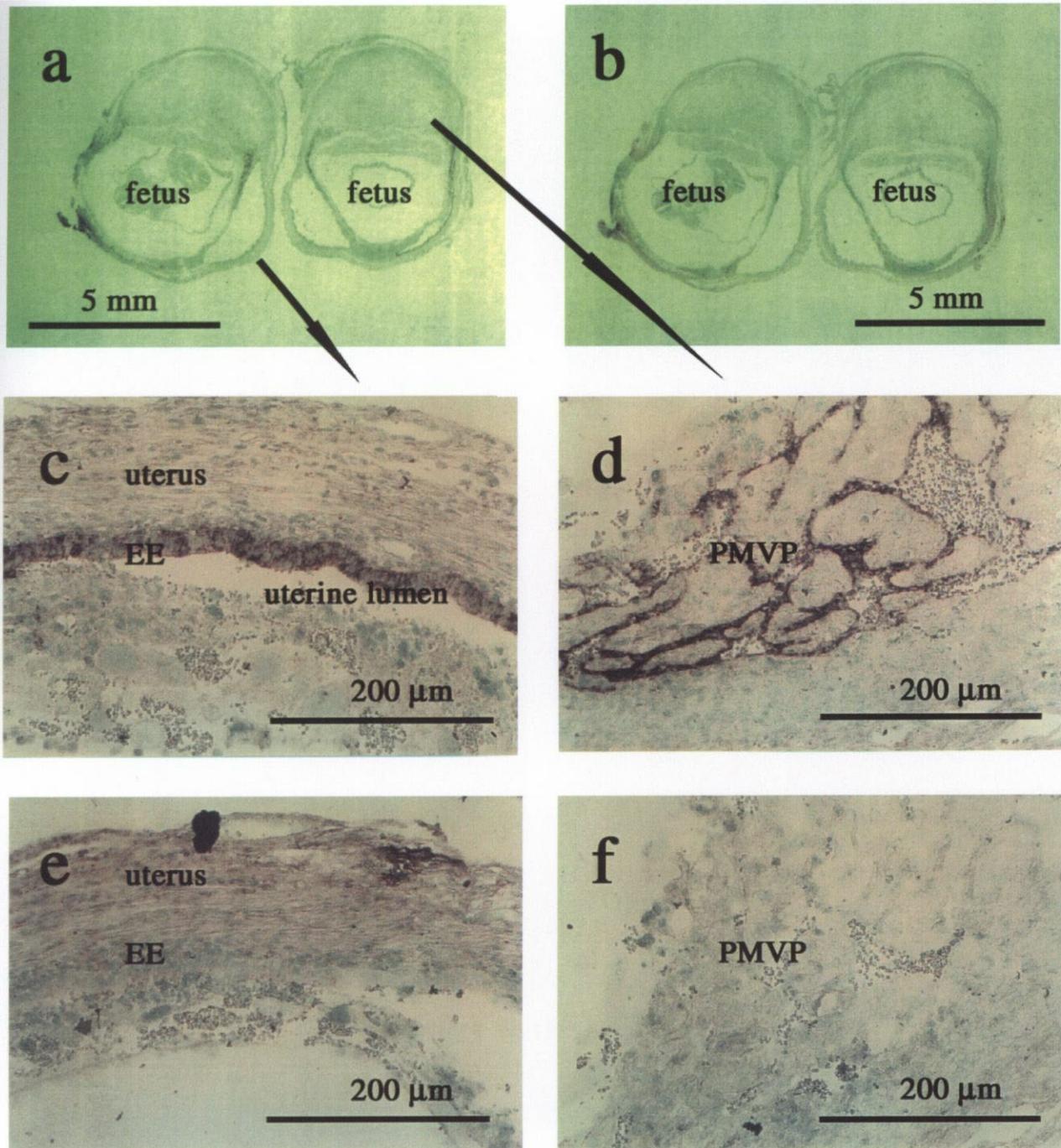


図1-10. 妊娠10日目の子宮内における 20α -HSD mRNA発現.

厚さ $5\ \mu\text{m}$ のパラフィン切片に対して、DIGで標識したマウス卵巣 20α -HSD cRNA probeを用いて *in situ* hybridizationを行った.

a, c, d : antisense probeを用いた場合.

b, e, f : sense probeを用いた場合.

EE : endometrial epithelium

PMVP : peripheral maternal venous plexus

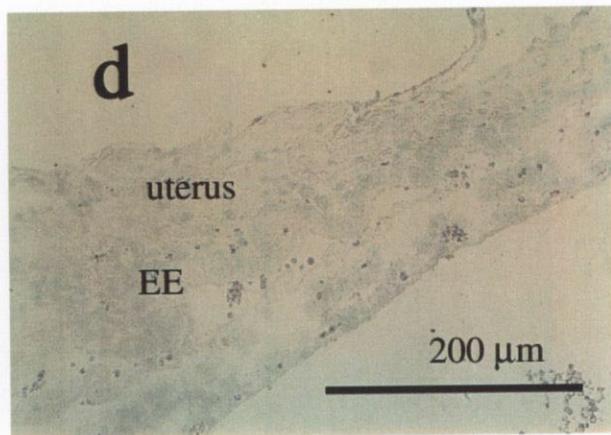
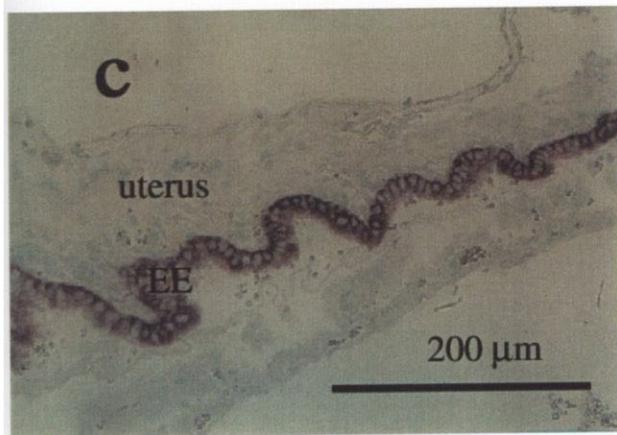
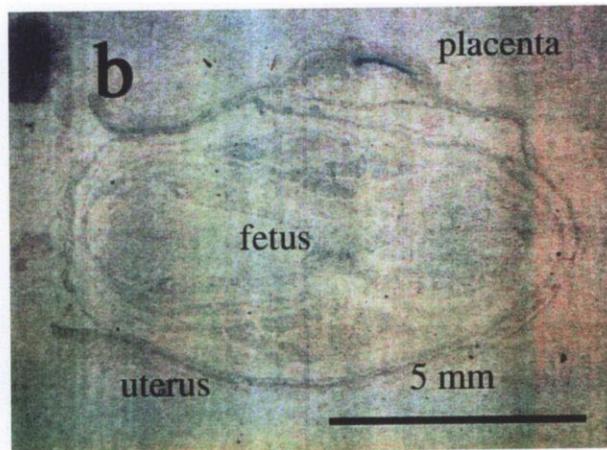
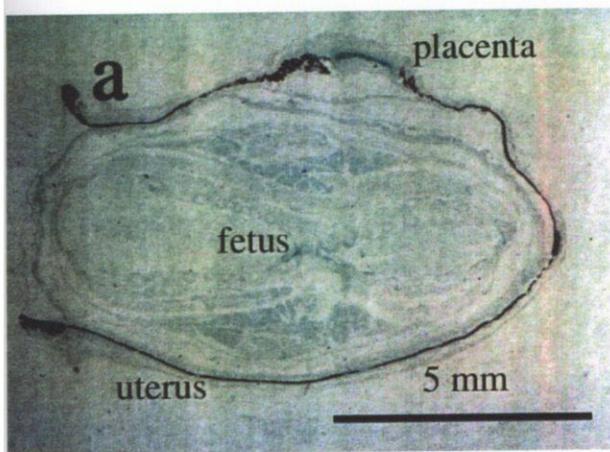


図1-11. 妊娠15日目の子宮内における20 α -HSD mRNAの発現（パラフィン切片）。

厚さ5 μ mのパラフィン切片に対して、DIGで標識したマウス卵巣20 α -HSD cRNA probeを用いて*in situ* hybridizationを行った。

a, c : antisense probeを用いた場合。

b, d : sense probeを用いた場合。

EE : endometrial epithelium

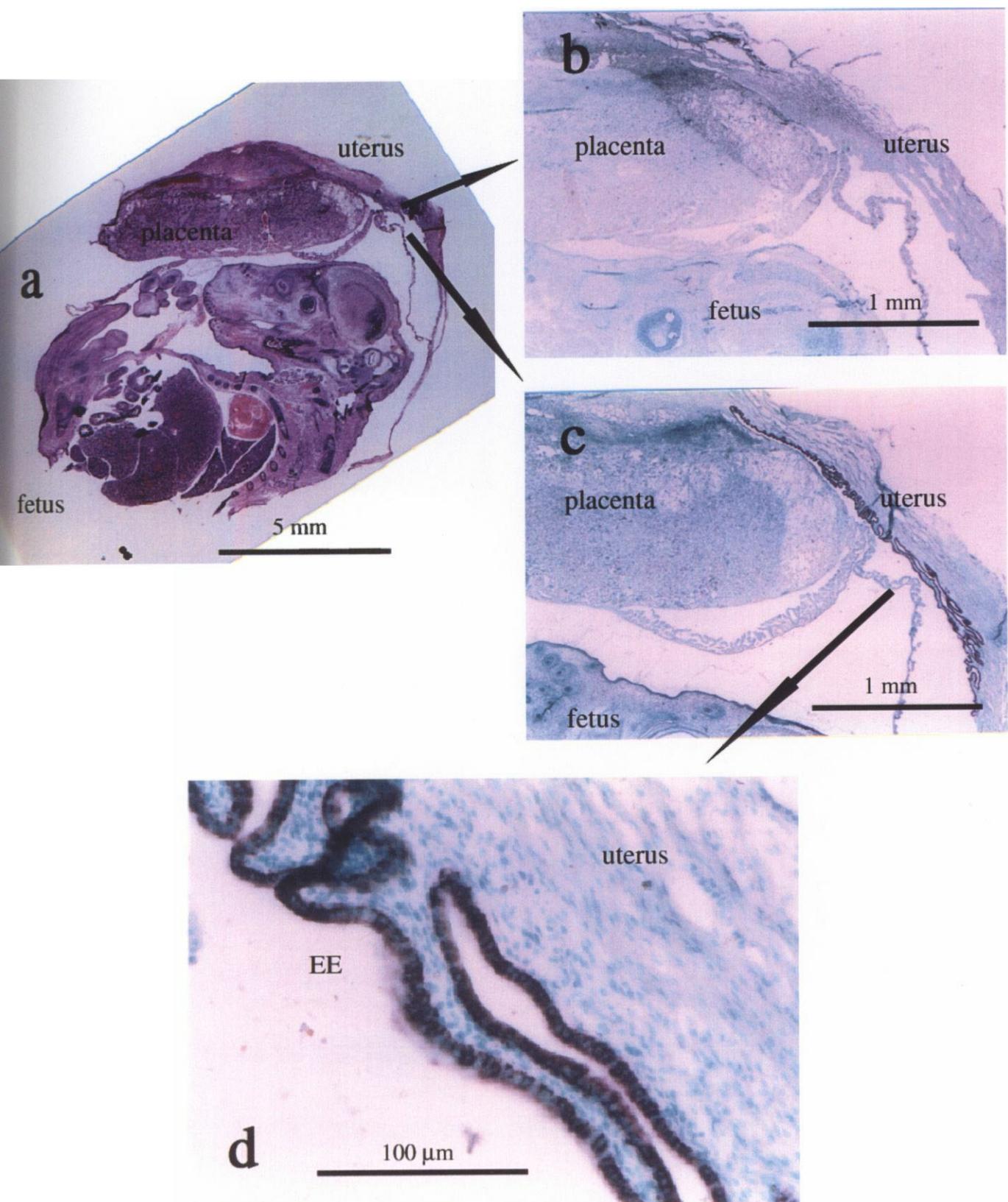


図1-12. 妊娠15日目の子宮内における 20α -HSD mRNAの発現（凍結切片）。

厚さ $5\ \mu\text{m}$ の凍結切片に対して、DIGで標識したマウス卵巣 20α -HSD cRNA probeを用いて *in situ* hybridizationを行った。

a : HE染色像. b : sense probeを用いた場合.

c, d : antisense probeを用いた場合. EE : endometrial epithelium

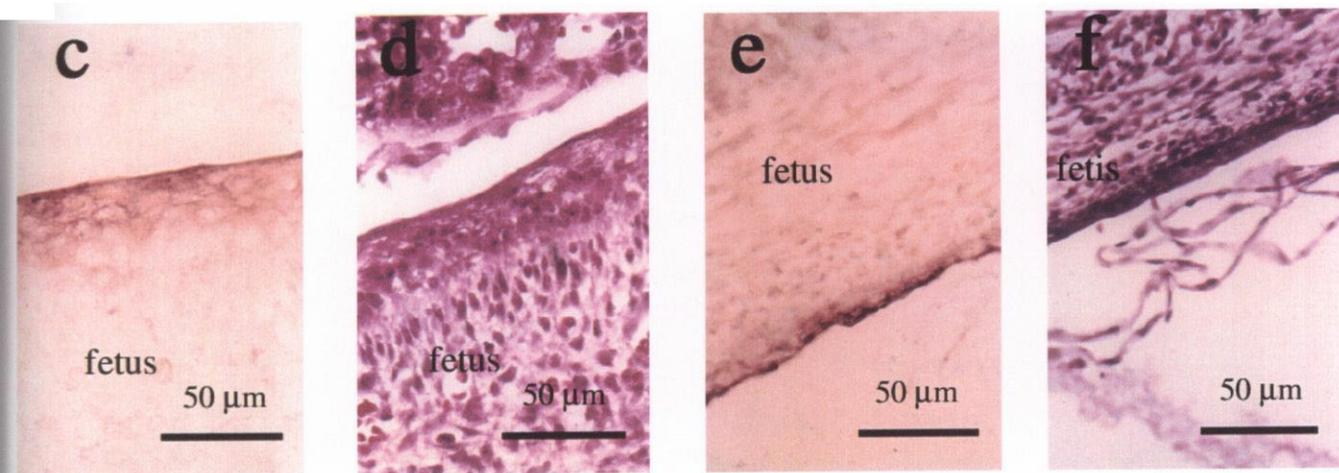
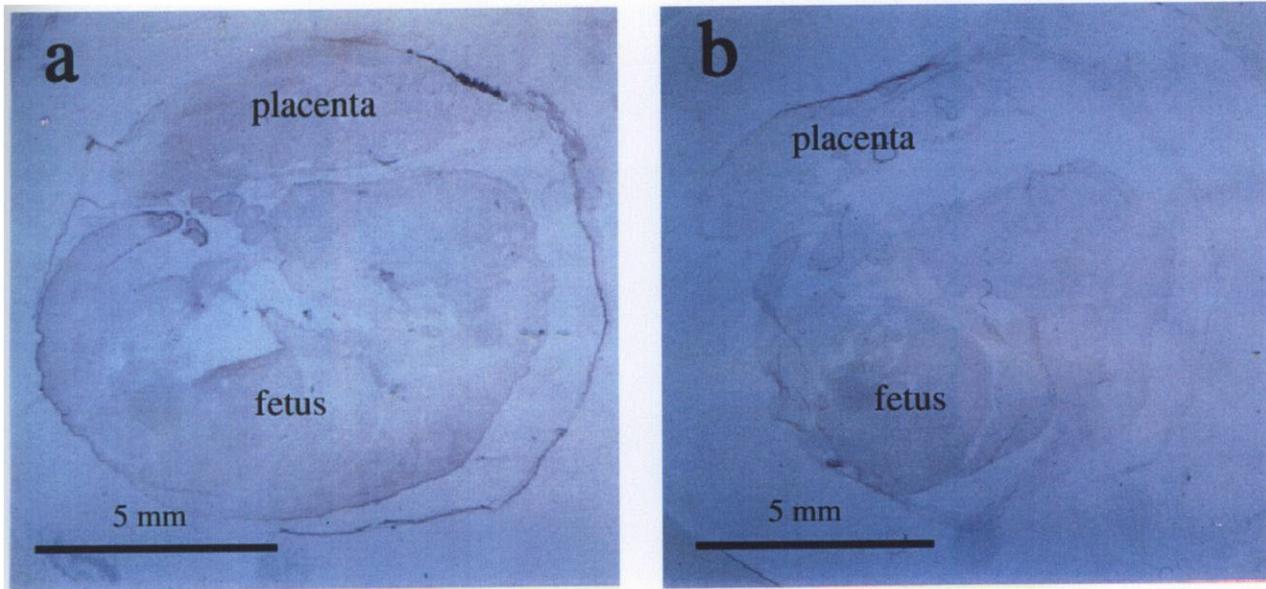


図1-13. 妊娠15日目の胎子における20 α -HSD mRNAの発現.

厚さ10 μ mの凍結切片 (c, d; 胎子尻尾部分, e, f; 胎子背部) に対して, DIGで標識したマウス卵巣20 α -HSD cRNA probeを用いて *in situ* hybridizationを行った.

a, c, e: antisense probeを用いた場合.

b: sense probeを用いた場合.

d, f: HE染色像.

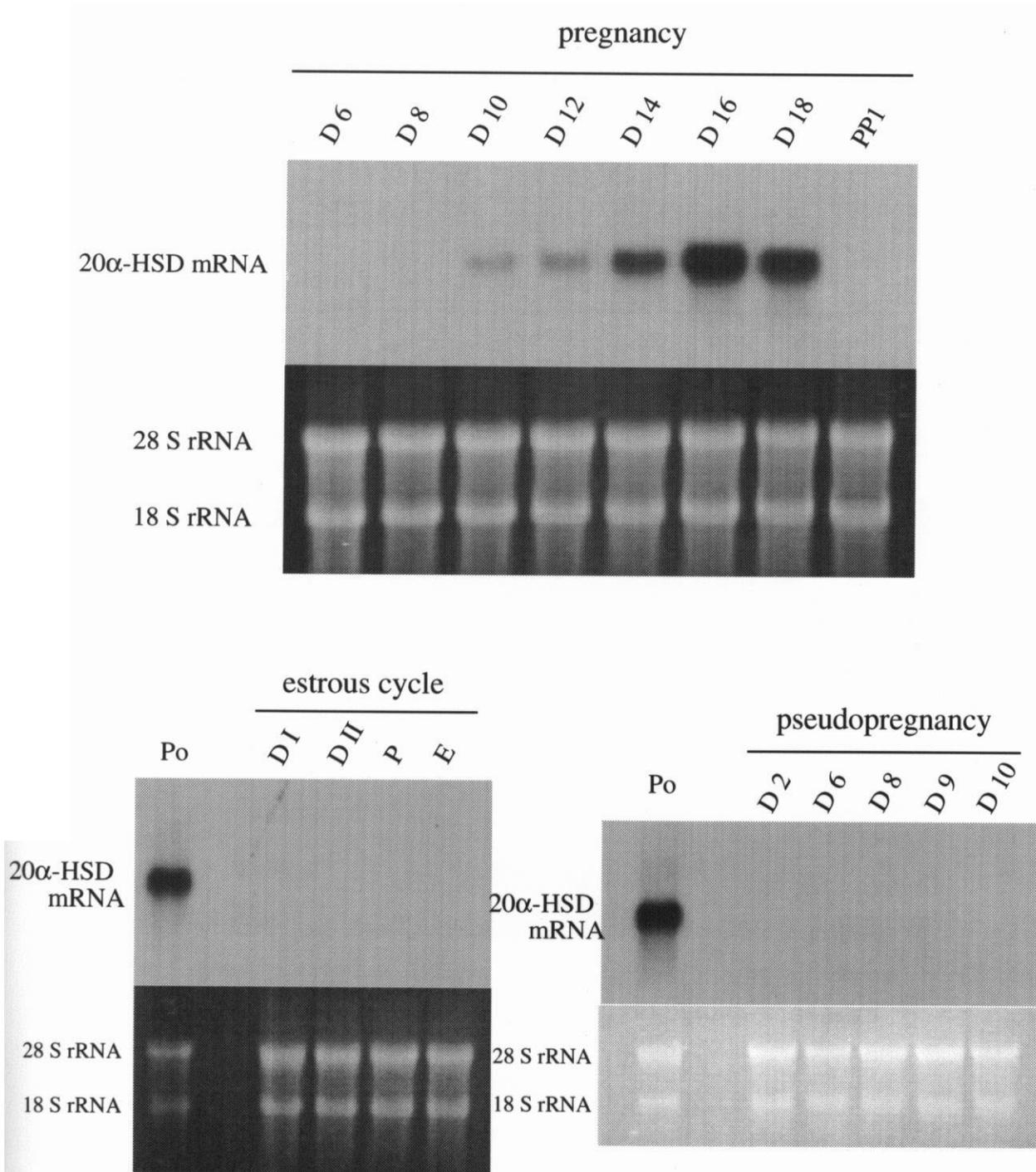


図1-14. ICRマウス妊娠期, 性周期, 偽妊娠期子宮での20α-HSD mRNA発現の変化.

膣栓を確認した日をDay 0 (D0) とした. total RNA 10 μgを用い, マウス卵巢20α-HSD cDNAをprobeにしてNorthern hybridizationを行った.

Po; ポジティブコントロール. DI; 発情休止期第1日目. DII; 発情休止期第2日目
P; 発情前期. E; 発情期.

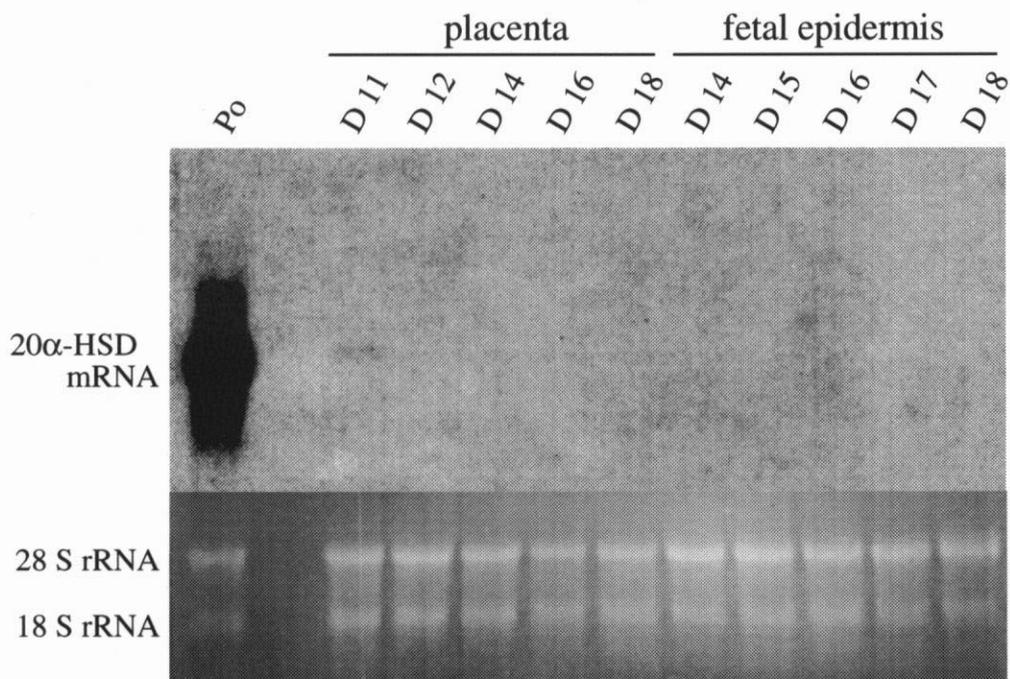


図1-15. 妊娠期胎盤，胎児背表皮における20 α -HSD mRNA発現.

臍栓を確認した日をDay 0 (D 0) とした. 10 μ gのtotal RNAを用いてNorthern hybridizationを行った. Day 11の胎盤においてのみ弱い発現が認められ，胎児背表皮には発現は認められなかった.

Po ; ポジティブコントロール

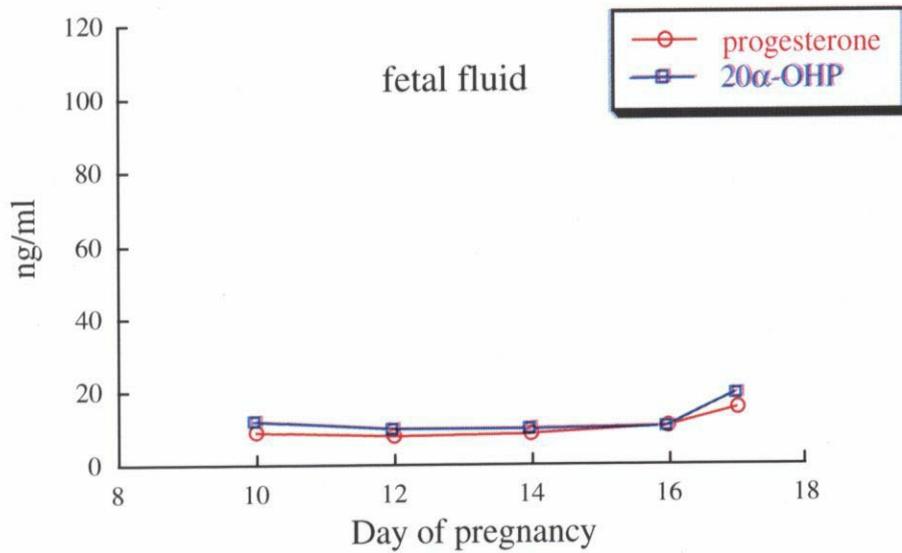
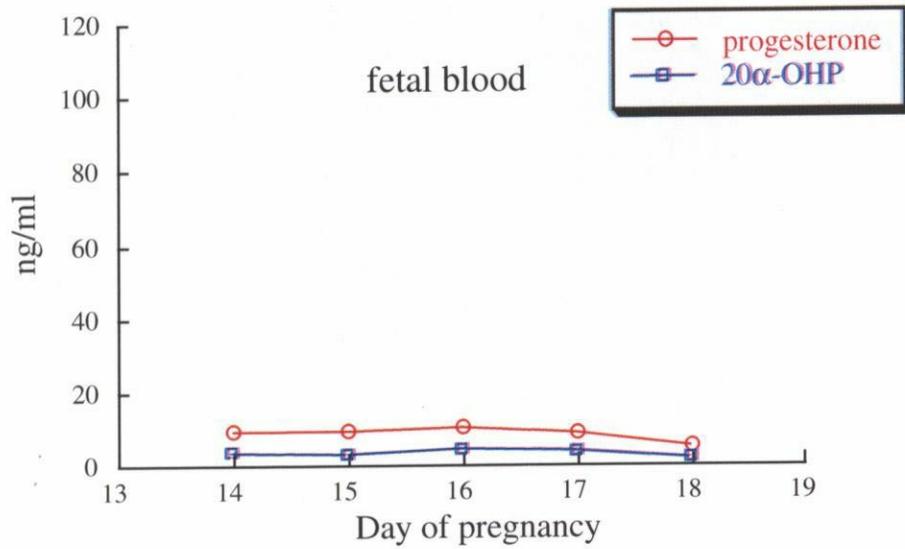
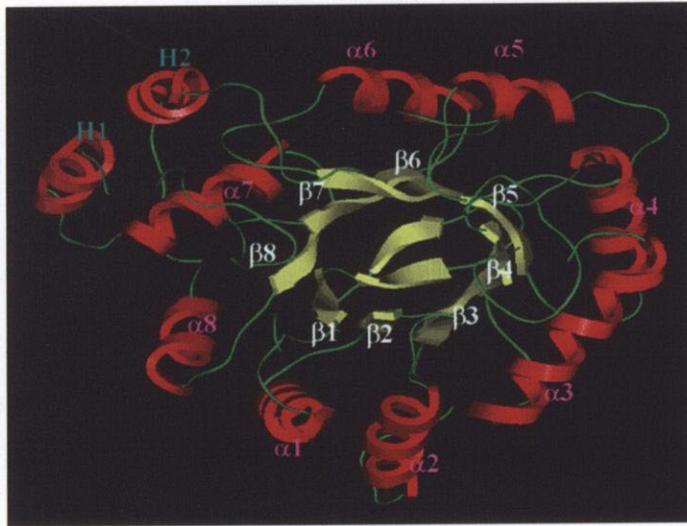


図1-16. 胎子血中及び胎水中のprogestin濃度の変化.

膣栓を確認した日をDay 0とした. 各日1から3匹のマウスを用い, 一腹分の胎子血液, 胎水をまとめて回収し, RIA法によりprogestin濃度を測定した. 1-3腹のprogestin濃度の平均を示した.



ラット肝臓3 α -HSDの三次元構造.

中心部の α/β バレルはAKR superfamilyのmemberで共通の構造である.

α : α ヘリックス. β : β シート. H: バレル外のヘリックス.

www.med.upenn.edu/akrより引用.

Aldo-Keto Reductases

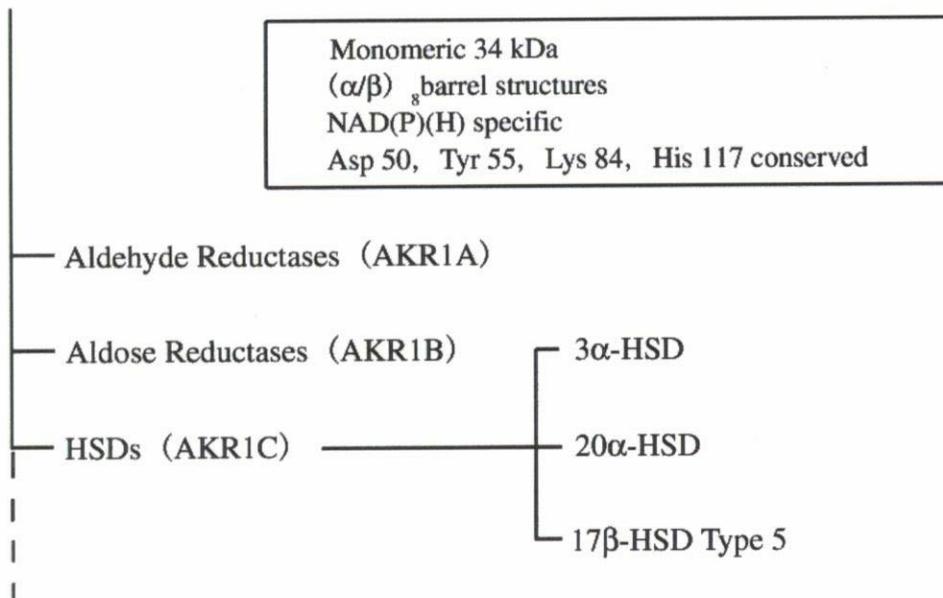


図1-17. Aldo-Keto Reductase (AKR) superfamily.