

ウマ妊娠期の胎子胎盤系における
ステロイド代謝に関する研究

長谷川 晃久

ウマ妊娠期の胎子胎盤系におけるステロイド代謝に関する研究

長谷川晃久

目次

第一章 緒論	2
第二章 ウマ精巢17 α -水酸化/17,20-開裂酵素遺伝子mRNAの分子クローニング	
2-1. はじめに	12
2-2. 材料と方法	16
2-3. 結果	
2-3-(1) ウマCYP17 cDNA断片のPCR増幅	19
2-3-(2) PCR増幅産物の塩基配列	19
2-3-(3) ノザンプロット	20
2-3-(4) ウマ精巢cDNAライブラリのスクリーニング	21
2-3-(5) ウマ精巢CYP17 cDNAの塩基配列	21
2-3-(6) ウマ精巢CYP17アミノ酸配列	23
2-4. 考察	25
2-5. 小括	29
第三章 哺乳類細胞に導入したウマ精巢17 α -水酸化/17,20-開裂酵素遺伝子の発現	
3-1. はじめに	31
3-2. 材料と方法	34
3-3. 結果	
3-3-(1) 遺伝子導入細胞の選択培養	38
3-3-(2) COS 1細胞におけるウマCYP17 mRNAの一過性発現	38
3-3-(3) ウマCYP17 mRNAを発現するCOS 1細胞における ステロイド代謝	39

3-4. 考察	40
3-5. 小括	45
第四章 ウマ17 α -水酸化/17,20-開裂酵素遺伝子のエキソン構築	
4-1. はじめに	47
4-2. 材料と方法	49
4-3. 結果	
4-3-(1) PCRプライマーの設計	53
4-3-(2) PCR産物の電気泳動	53
4-3-(3) ゲノムPCR産物の塩基配列	54
4-3-(4) ヒトCYP17遺伝子との比較	55
4-3-(5) MIR配列を利用したSINE-PCR	56
4-4. 考察	58
4-5. 小括	61
第五章 ウマ3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素/ Δ 5- Δ 4転換酵素遺伝子mRNAの分子クローニング	
5-1. はじめに	63
5-2. 材料と方法	65
5-3. 結果	
5-3-(1) ウマ精巣HSD3B cDNAのPCR増幅	68
5-3-(2) cDNAライブラリのスクリーニング	70
5-3-(3) ウマ3 β -HSDアミノ酸配列と種間比較	71
5-3-(4) ウマ3 β -HSDの配列比較	72
5-3-(5) HSD3Bのノザンプロット	72
5-4. 考察	73

5-5. 小括	75
第六章 ウマ精巣におけるステロイド芳香化酵素の発現に関する検討	
6-1. はじめに	77
6-2. 材料と方法	79
6-3. 結果	
6-3-(1) 精巣における <i>CYP19</i> mRNAの発現	81
6-3-(2) ウマ精巣 <i>CYP19</i> mRNAの塩基配列	81
6-4. 考察	84
6-5. 小括	86
第七章 妊娠中期以降のウマ胎子胎盤複合系におけるステロイド代謝に関する 検討	
7-1. はじめに	88
7-2. 材料と方法	90
7-3. 結果	
7-3-(1) 各組織における <i>CYP17</i> および <i>HSD3B</i> mRNAの発現	91
7-3-(2) 各組織における <i>CYP19</i> mRNAの発現	92
7-4. 考察	93
7-5. 小括	99
第八章 総括	101
謝辞	106
引用文献	107

第一章 緒論

ウマは、過去において人や物の運搬用として、また農耕馬や軍馬として、重要な家畜であった。しかし近年、わが国における家畜としてのウマの用途は大きな変革期を迎え、競馬に使用する競走用馬、馬術競技に使用する競技用馬、動物療法などの手段や愛玩用としてのウマなどが主流となるなど、第二次世界大戦以前とは全く異なった状況が現出している。また、最近のグルメ嗜好は馬肉の需要をも喚起し、食肉用のウマも国内で多数飼養されている。このような社会情勢を反映してウマに関する獣医学的、あるいは生物学的な研究目的も大きく変革しつつある。特に、競走馬の生産面に限って考えると、その年間生産頭数は一万頭余りであるが、サラブレッドの場合は血統登録の要件として人工授精は認められず、自然交配などの条件が課されている。この理由のひとつはサラブレッドの繁殖能力を重要視しているからである。すなわち、産業としての側面からサラブレッド生産をとらえれば、それ自体高価な家畜であるサラブレッドを容易に淘汰することもならず、管理上の失宜による損耗防止も含めて繁殖効率の向上、特に空胎率の低減はやはり重要な案件であることは否定できない。

また、ウマを繁殖研究の面からとらえた場合、直截的に繁殖効率を向上させる研究が必要であることは論を待たないが、ウシやブタなど他の家畜や、ヒトのモデルとして研究が進んでいる実験動物などと比較した場合、基礎的な研究が立ち遅れていることも問題である。ウマは長日性の季節繁殖動物であること、妊娠中に子宮内膜杯からウマ絨毛性ゴナドトロピン（eCGあるいはPMSG）を分泌することによって卵巣に副黄体および二次黄体を形成し、胎盤からのプロゲステロン分泌が始まるまでの間、妊娠維持に必要なプロゲステロンをこれら複数の黄体から供給するなど（Ginther, 1992）、繁殖に伴う内分泌のパターンが家畜の中では特異な動物であり、他の家畜あるいは実験動物の知見をそのままウマの繁殖効率向上につなげていくことは極めて困難であると考えられた。

その一方で、実験動物やヒトなどの知見によって哺乳動物の繁殖内分泌の基本的な

機構は共通性が高く、遺伝子発現などの分子機構自体はウマと他の哺乳動物との間で本質的に変わりがないことが徐々に解明されてきている。本研究において著者は、ウマのこのような特異な内分泌機構がどのように発現するのかを分子生物学的な手法を応用することによって解明することを最終的な目的として開始した。これによって現在は不足しているウマの繁殖内分泌に関する基礎的知識を補強するとともに、分子生物学的な取組みによってウマを季節繁殖性や内分泌機能制御に関する新たな実験モデルとしても位置づけることができると考えたからである。

一般に雌性動物における排卵周期の回帰および妊娠維持、雄性動物における副性器の維持や造精機能の維持には、性腺から分泌されるステロイドホルモンが重要な役割を演じており、ウマにおいてもそれらの基本的な作用は共通である (McKinnon and Voss, 1993)。性腺からのステロイドホルモン分泌はさらに上位の中核からの支配を受けている。哺乳動物における間脳視床下部を中核とする生殖内分泌機構は、脳下垂体前葉から分泌されるゴナドトロピンを介して性腺からのステロイド分泌および排卵、精子形成などを制御している。性腺のステロイドホルモン分泌は一般にはゴナドトロピンの刺激によって促進され、最終産物であるステロイドホルモンが性腺に直接フィードバックするか、視床下部を介して間接フィードバックすることにより抑制するとされている。ゴナドトロピンによるステロイドホルモン産生刺激は、ゴナドトロピンがステロイド産生細胞のゴナドトロピン受容体と結合してアデニル酸シクラーゼを活性化し、ステロイド合成酵素遺伝子の転写を促進することによって行われるというのが最近の定説になりつつある (Wiltbank, Belfiore *et al.*, 1993; Givens, Zhang *et al.*, 1994; Hillier, Whitelaw *et al.*, 1994; Clark, Chuzel *et al.*, 1996) が、その一方でステロイド合成酵素遺伝子の多くは、その発現制御領域にステロイド受容体と結合する塩基配列を持っており、生成物であるステロイドホルモンが産生された細胞内で直接、合成酵素の転写を制御する可能性が示唆されている (Chau, Crawford *et al.*, 1997)。いずれの場合も最終的にはステロイド産生組織 (細

胞)に発現しているステロイド代謝酵素の種類と量,そして供給される基質の種類と量によって,その組織で産生するステロイドホルモンの種類が決定されると考えることができる。

哺乳動物のステロイド合成はコレステロール (cholesterol: 5-cholesten-3 β -ol) を出発物質として,まず,コレステロール側鎖切断酵素 (CYP11A1: EC 1.14.15.6) によってC₂₁ステロイドでありプロゲステリンの一種であるプレグネロン (pregnenolone: 5-pregnen-3 β -ol-20-one) に

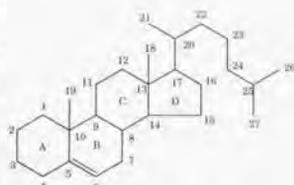


図1-1-1 コレステロール

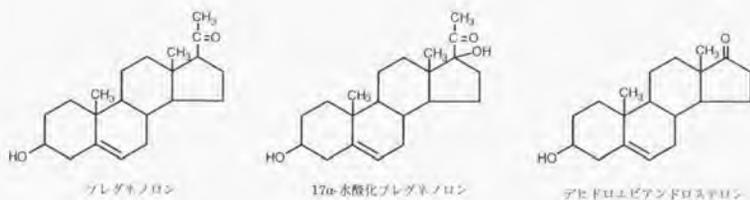


図1-1-2 Δ⁵ステロイドの例

代謝される。プレグネロンは17 α -水酸化/17,20開裂酵素 (CYP17: EC 1.14.99.9) の17 α -水酸化活性によって17 α -水酸化プレグネロン (17 α -hydroxypregnenolone: 5-pregnen-3 β ,17 α -diol-20-one) に代謝された後,同酵素の17,20開裂活性によってC₁₉ステロイドでありアンドロゲンに分類されるデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone: 5-androsten-3 β -ol-17-one) に代謝される。この代謝経路はステロイド核の二重結合の位置から Δ^5 経路と呼ばれている。

一方,プレグネロンは3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素/ Δ^5 - Δ^4 転換酵素 (3 β -HSD: EC 1.1.1.145 / EC 5.3.3.1) によって, Δ^4 ステロイドであり哺乳動物の代表的なプロゲステリンであるプロゲステロン (progesterone: 4-pregnen-3,20-dione)



図1-3 Δ⁴ステロイドの例

に代謝される。プロゲステロンはプレグネノロンと同様にCYP17の2種類の活性、すなわち 17 α -水酸化活性によって 17 α -水酸化プロゲステロン (17 α -hydroxyprogesterone: 4-pregnen-17 α -ol-3,20-dione) に、さらに 17,20 開裂活性によってアンドロステンジオン (androst-enedione: 4-androsten-3,17-dione) に代謝されるが、こちらの代謝経路は Δ^5 経路に対して Δ^4 経路と呼ばれる。3 β -HSDは Δ^5 経路のどの段階からでも Δ^5 ステロイドから Δ^4 ステロイドへの転換を触媒するので、プレグネノロンからプロゲステロンへの転換だけでなく中間体である 17 α -水酸化プレグネノロンおよびデヒドロエピアンドロステロンを、それぞれ 17 α -水酸化プロゲステロンおよびアンドロステンジオンに代謝することができる。

一般に哺乳動物の精巣において Δ^4 C₁₉アンドロゲンであるアンドロステンジオンは 17 β -水酸化ステロイド脱水素酵素 (17 β -HSD: EC 1.1.1.62) などによって主要なアンドロゲンであるテストステロン (testosterone: 4-androsten-17 β -ol-3-one) へと代謝される(稲野宏志, 中村孝

雄ら, 1977)。テストステロンは副性器などの標的器官で 5 α -還元酵素 (5 α -reductase: EC 1.3.99.5) によって還元され、活性型

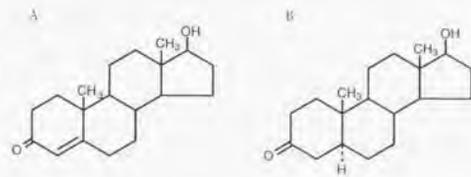


図1-4 テストステロン(A)およびジドロテストステロン(B)

アンドロゲンであるジヒドロテストステロン (5 α -dihydrotestosterone: 5 α -androstan-17 β -ol-3-one) となって作用する。

卵胞では主として卵胞顆粒層細胞においてコレステロールからプロゲステンの合成が行われ、卵胞膜内細胞においてアンドロゲンに代謝されたものが再び顆

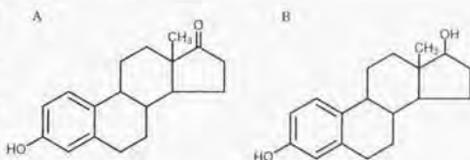


図1-1-5 エストロン(A)およびエストラジオール(B)

粒層細胞に入り、芳香化酵素 (CYP19: EC 1.14.14.1) の作用でA環を芳香化されることによってエストロゲンに代謝される。このときCYP19の基質として供給されるアンドロゲンがアンドロステンジオンであればエストロン (estrone: 1,3,5(10)-estratrien-3-ol-17-one) が、テストステロンであればエストラジオール (17 β -estradiol: 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol) が合成される(Silberzahn, Gaillard *et al.*, 1988)。すなわち、合成されるエストロゲンの種類は基質となるアンドロゲンの種類に依存しているが、17 β -HSDが存在すればエストロンからエストラジオールに転換することも可能である。また、デヒドロエピアンドロステロンはそのままではCYP19の基質とはならないが、3 β -HSDが存在すればアンドロステンジオンを経由してエストロンへと代謝される。妊娠末期のヒト胎盤ではデヒドロエピアンドロステロンが16位の水酸化を受けて16 α -水酸化デヒドロエピアンドロステロン (16 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone: 5-androsten-3 β ,16 α -diol-17-one) となり、これを基質として3 β -HSDとCYP19が協同してエストリオール (estriol: 1,3,5(10)-estratrien-3,16 α ,17 β -triol) を合成する。

ウマでは妊娠期間中母体血中および尿中に、B環に不飽和結合を持ち equine estrogens と呼ばれるウマ特有のエストロゲンであるエキリン (equilin: 1,3,5(10),7-estratetraen-3-ol-17-one) およびエキレニン (equilenin: 1,3,5(10),6,8-

estrapentaen-3-ol-17-one)あるいはそれらの抱合体の存在が知られている。これらウマに特有のエストロゲンの合成および分泌には胎子性腺の関与も考えられている(Raeside, 1995)が、B環不飽和エストロゲンの生合成はコレステロールを経由しないとする報告(Savard, Andreu *et al.*, 1958)もある。

ウマ胎子の性腺がエストロゲン合成に関与しているとの考え方の根拠として、ひとつにはウマの妊娠中期から後期にかけて母体血中エストロゲンの上昇とほぼ同じくして起る胎子性腺の肥大

化が挙げられる(Ginther, 1992)。この性腺の肥大化は胎子の性別を問わず、すなわち、卵巣であっても精巣であっても観察される(Cole, Hard *et al.*, 1933)。ウマの性腺組織

の分化は胎生期の初期に完了しており、妊娠中期以降に増大する組織は雌の胎子にあっては髄質(medulla)の間質細胞であり(Walt, Stabenfeldt *et al.*, 1979)、雄の胎子にあっては精細管の間隙にある間質細胞であること、それらはステロイド産生細胞としての特徴を有する

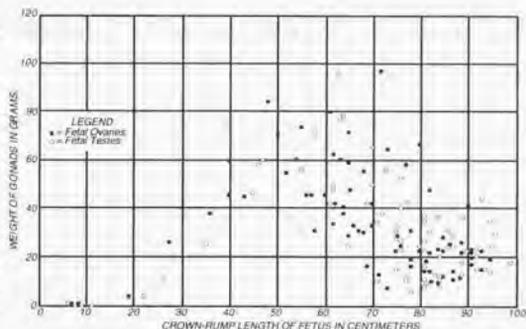


図1-1-6 ウマ胎子の体長と両側性腺重量の関係
(Cole *et al.*, 1933)

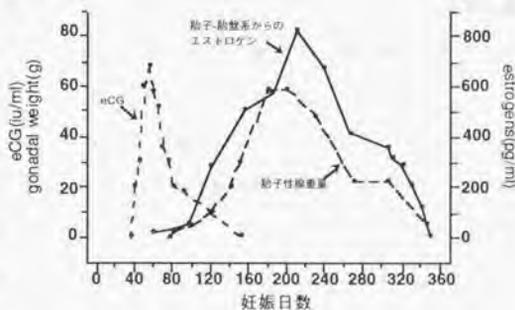


図1-1-7 妊娠日数とeCG、性腺重量、エストロゲンの関係
(Ginther 1992)

ことが示されている (González-Angulo, Hernández-Jáuregui *et al.*, 1971)。

Merchant-Larios (1979) はウマ胎子精巣と胎子卵巣におけるステロイド産生細胞の分化とその経過について形態学的に考察しており、肥大化する時期における胎子性腺のステロイド産生については卵巣においても精巣と差はないものと結論している (Merchant-Larios, 1979)。一方、ウマの胎盤はプレグネノロン、プロゲステロン、およびこれらの 17α -水酸化物、つまり C_{21} ステロイド (プロゲステン) からエストロゲンを合成することはできないとされる (Ainsworth, and Ryan, 1966)。妊娠中に胎子性腺を除去すると母体尿中のエストロゲン濃度が激減するが、シャムオペレーションおよび片側除去では変化が見られないことを示し、ヒトの胎盤におけるエストロゲン産生に胎児副腎が重要であるようにウマ胎子性腺がウマ胎盤におけるエストロゲン産生において重要であると推察した Raeside (Raeside, Liptrap *et al.*, 1973) は、その後さらに、胎子性腺に多量の C_{19} アンドロゲンが存在することを示したうえで、胎子性腺の胎盤におけるエストロゲン産生に対する役割に言及している (Raeside, 1976)。すなわち胎子性腺は C_{21} ステロイド (プロゲステン) をアンドロゲンに代謝することで胎盤におけるエストロゲン産生に関与していると推察される。

このような分業がどのように行われるかを検討するには通常、各組織における酵素蛋白質の発現状況を形態学的に調べるための方法論として、免疫組織化学的な方法または酵素組織化学的な方法が用いられる。これらは酵素蛋白質の免疫活性もしくは酵素活性を指標として、酵素蛋白質の組織内分布を明らかにすることができる利点がある。しかしながら、酵素蛋白質は動物種により構造が異なることから、今回検討の対象とするウマの酵素について、ヒトや実験動物など他種動物の相当する酵素との間での類似性あるいは相違点が不明であり、ヒトなどの酵素標品あるいはそれに対する抗体がウマにおける研究を目的として利用できる確証はない。しかし、現在ではこのように特定の動物種において未知の蛋白質であっても、分子生物学的な手法を用いてそのアミノ酸構造を調べたり、組織における遺伝子発現の分布や量

を調べることが可能となってきた(Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989)。細胞内で合成される蛋白質はその設計図とも言える遺伝子がゲノムDNA中にあり、当該蛋白質を合成している細胞中にはその遺伝子をもとに転写された伝令RNA (メッセンジャーRNA ; mRNA) が存在することから、mRNAの存在、あるいは量的な変動を調べることで蛋白質そのものの存在を調べることに代えて細胞の機能を評価することができる。また、それら遺伝子転写産物の塩基配列を調べることによって蛋白質のアミノ酸配列など、構造や機能に関する知見を得ることもできる(塩田邦郎, 長谷川晃久ら, 1990)。特にプライマーと呼ばれる小さなDNA断片を利用して行う合成酵素連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) 法(Saiki, Scharf *et al.*, 1985)は、これら遺伝子断片を得る方法として画期的かつ有効な手段である。

先に述べたように、エストロゲン産生にかかわるステロイド代謝酵素は多岐にわたるが、それらのうちC₂₁ステロイド (プロゲステロン) からC₁₉ステロイド (アンドロゲン) に変換するC17,20開裂活性を持っているCYP17, 3 β -水酸化- Δ^4 ステロイドと3-ケト- Δ^4 ステロイドを相互に変換する3 β -HSD, さらにアンドロゲンをエストロゲンに芳香化するCYP19, これら3種類の酵素について組織中の有無を確認することによって、ウマの妊娠期におけるステロイド産生機構と、そこで胎子性腺の果たす役割を明らかにすることができると考えた。すなわち、3種類の酵素がすべて胎子性腺に存在すれば、胎子性腺はプレグネロンからC₁₉- Δ^4 アンドロゲンを合成し、エストロゲンまで合成することができることになる。また、胎子性腺がCYP17の発現を欠くならば、胎子性腺はC₂₁ステロイドからC₁₉アンドロゲンの産生を行わないことが明らかとなり、同様に胎盤においてCYP19の発現が認められない場合、胎子-胎盤複合系が母体から独立してエストロゲン合成を行う系として働くためには胎子性腺もしくは胎子側の別の臓器、例えば胎子副腎などの関与についても検討する必要がある。本研究では、ウマの胎子-胎盤複合系におけるステロイド代謝機構、特にエストロゲン合成機構を解明する目的で、代表的なステロイド代謝酵素であるCYP17および

3 β -HSDについて、これらが多く発現していると考えられ、試料の入手も容易な雄ウマ精巣を用いてPCR法と入ファージを利用したcDNAライブラリのスクリーニング (Benton and Davis, 1977)を併用することによってこれら2種類の酵素遺伝子のcDNAをクローニングし、さらに、これら酵素遺伝子の精巣における発現を確認した後、胎子-胎盤複合系におけるそれら酵素遺伝子の発現を検討して、その妊娠維持における役割を解明することにした。また、胎子-胎盤複合系におけるステロイド合成の最終産物であるエストロゲンはアンドロゲンから芳香化反応を経て合成されることから、一般の哺乳類性腺あるいは胎盤において主なエストロゲンの合成にかかわっているとされるCYP19が胎子性腺あるいは胎盤を含むウマのステロイド産生組織にどのように分布するかを、CYP19遺伝子mRNAのRT-PCRを行うことによって検索した。これら3種の酵素遺伝子がウマの胎子あるいは胎盤のいずれにおいて発現しているのかを調べることにより、妊娠期のウマにおけるエストロゲン合成機構において胎子と胎盤との間でどのように機能を分担しあっているかを評価することを試みた。

第二章 ウマ精巢17 α -水酸化/17,20-開裂酵素
遺伝子mRNAの分子クローニング

はじめに

ウマを始めとする哺乳動物の生体内において多様な生理活性を持つステロイドホルモンは一部の例外を除き、すべてコレステロールを出発物質として多くの合成酵素の触媒作用によって生合成される。これらの合成酵素の中でもP450として分類される一群のヘム蛋白質が重要な働きをしている。P450のうちステロイド合成に関与しているのとされるはP450_{scc} (CYP11A1; コレステロール側鎖切断酵素), P450_{c11} (CYP11B1; 11 β -水酸化酵素), P450_{c17} (CYP17; 17 α -水酸化/17-20開裂酵素), P450_{c21} (CYP21; 21-水酸化酵素), P450_{arom} (CYP19; 芳香化酵素)の5種類であり、ステロイドホルモン合成酵素以外にもP450は薬物代謝、脂肪酸の ω 酸化、アラキドン酸代謝、ビタミンDの活性化、胆汁酸の合成など多岐にわたる内在性、外来性脂溶性物質の代謝に関係している。現在までに報告されているP450は150分子種を越え、それらはいわゆるスーパーファミリーを形成している(Nebert, Nelson *et al.*, 1991; Nelson, Koymans *et al.*, 1996)。ステロイド合成に関係する5種のP450についてみるとアミノ酸配列に基づく相互の類似性はさほど高くはない。ミトコンドリア膜に局在するCYP17とCYP21(Picado-Leonard and Miller, 1987), ミトコンドリア内膜に局在するCYP11A1とCYP11B1とはそれぞれ比較的類似性が高いが、5種の酵素はそれぞれ別のファミリーに属している(渡辺伸明, 十川和博, 1992)。これらのP450については各種の動物でタンパクの単離精製, 構造解析, 活性測定などのタンパク質生化学のほか, 遺伝子の構造解析, 基質特異性や活性を決定するドメインについて比較生物学的に検討されている(Nebert and Nelson, 1991)。こうした背景から, これらの酵素分子の構造が未だ明らかになっていない動物種の遺伝子をクローニングし, 塩基配列およびアミノ酸配列を明らかにするとともに, その基質特異性など酵素の特徴を明らかにするために使用できる組換え体を作成できれば, その動物種のP450に関して, 容易に比較生物学的議論を行うことが可能になる。

それらの酵素の中で、ステロイド17 α -水酸化酵素/C17,20開裂酵素はCYP17遺伝子(Nebert, Nelson *et al.*, 1989; Nelson, Koymans *et al.*, 1996)の産物であり、特に性ステロイドおよび糖質コルチコイドの合成に重要な酵素である。精巣、卵巣、および

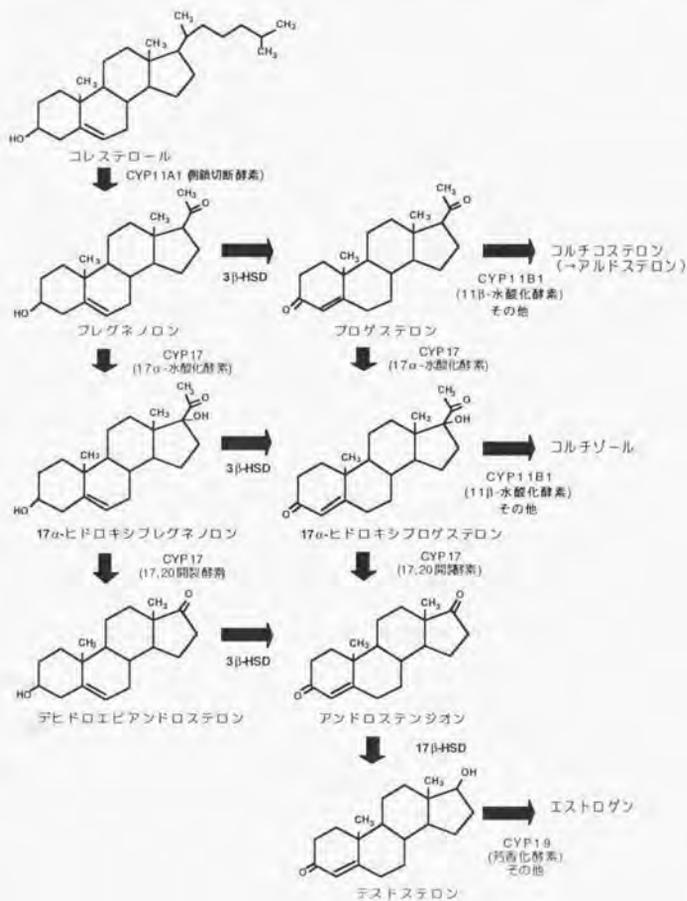


図2-1-1 哺乳動物の主なステロイド代謝経路

副腎皮質のような主要なステロイド産生組織で高レベルに発現しているCYP17は2つの反応を触媒する。最初の反応はプロゲステロンまたはプレグネノンの17位を水酸化することであり、副腎皮質においてコルチゾール (4-pregnen-11 β ,17,21-triol-3,20-dione) の前駆体を供給する。CYP17は続いて20位および21位の炭素原子からなる側鎖をステロイド核から切り離す反応 (17,20開裂反応) を触媒することにより、キ酸とアンドロステンジオンまたはデヒドロエピアンドロステロンを生成する (Nakajin and Hall, 1981; Zuber, Simpson *et al.*, 1986)。精巣および卵巣においてこれらのアンドロゲンは、テストステロンおよびエストロゲンの前駆体となる (図 2-1-1)。様々な動物種において本酵素の活性および遺伝子の発現が検討された結果、本酵素の基質特異性に種差が認められることが報告されている (Fevold and Waterman, 1988; Youngblood, Sartorius *et al.*, 1991)。

すなわち、CYP17の17,20開裂酵素としての活性において、ヒトとウシを含むいくつかの動物種では17 α -ヒドロキシプロゲステロンからアンドロステンジオンへの転換において活性が低く、17 α -ヒドロキシプレグネノロンからデヒドロエピアンドロステロンへの転換を触媒する活性が圧倒的に高い (Hosaka, Oshima *et al.*, 1980; Estabrook, Mason *et al.*, 1988)。一方、これに対して齧歯類では17 α -ヒドロキシプロゲステロンを主な基質としており、CYP17が高率に17 α -ヒドロキシプロゲステロンからアンドロステンジオンへの転換を触媒することが明らかとなっている (Youngblood and Payme, 1992)。また、酵素活性の基質特異性だけでなく本酵素の発現も動物種の間で異なっている。コルチゾール (4-pregnen-11 β ,17,21-triol-3,20-dione) を産生しているヒトおよびウシの副腎ではCYP17が発現しているが (Yamazaki, Nawa *et al.*, 1992)、主要な糖質コルチコイドとしてコルチコステロン (4-pregnen-11 β ,21-diol-3,20-dione) を産生するラットやマウスの副腎では発現が認められない (Namiki, Kitamura *et al.*, 1988)。これらの他、CYP17酵素蛋白質の構造と機能との関係を動物種間で比較するという見地、および季節繁殖動物における

CYP17の発現調節という見地から、ウマのCYP17をコードしているcDNAの全長をクローニングすることはかなり興味深い。そこで本章では、完全なウマのCYP17のアミノ酸をコードしているcDNAクローンを精巢cDNAライブラリーから同定し、塩基配列を決定して既知のものと比較するとともに、そこから推測されるウマCYP17酵素蛋白質の特徴について述べることにする。

材料と方法

mRNAの調製とcDNA合成

27か月齢のサラブレッド雄ウマを麻酔下で去勢した。白膜を除去した精巣は1cm角の立方体に切断後、直ちに液体窒素中で凍結し、RNA抽出まで-80℃で保存した。グアニジン/塩化セシウム超遠心法(Chirgwin, Przybyla *et al.*, 1979)により精巣の全RNA画分を抽出し、Oligotex dT30 (宝酒造(株), 京都)を用いて3'端にポリアデニル鎖を持つRNAを得た。cDNA合成キット(ペーリンガー・マンハイム, 東京)を用いて2本鎖のcDNAを合成した。

合成酵素連鎖反応(PCR)

cDNA断片からのPCR増幅(Saiki, Gelfand *et al.*, 1988)はDNAサーマルサイクラーおよびジーンアンプPCR試薬キット(宝酒造(株), 京都)により行なった。プライマーとして使用したオリゴヌクレオチドはラットCYP17mRNAの配列をもとに設計したが、ラット、ヒト、ウシの3種の哺乳動物でアミノ酸配列の相同性が高い部位(Fevold, Lorence *et al.*, 1989)を選定し、DNA合成装置を用いて合成した。使用したプライマーの塩基配列と相当するラットのアミノ酸配列上の位置は次のとおりである；プライマー121(フォワード)：5'-TCCCTGCCCTGGTGGGCAGT-3'(aa33-39), 122(フォワード)：5'-GGAGACATCTTTGGGGCGGGC-3'(aa296-302), 123(リバース)：5'-GCCCGCCCCAAAGATGTCTCC-3'(aa296-302), 124(リバース)：5'-GCAGGATCGGGGACCAGCTCCGAA-3'(aa434-441)。加熱のサイクルは95℃ 4min., (95℃ 1min., 55℃ 2min., 72℃ 3min.) × 30サイクル, 72℃ 7min., 反応液量100μlで行なった(Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989)。PCRにより増幅されたDNA断片の分子サイズはアガロースゲル電気泳動(1%アガロース, 1×TAE緩衝液)によって決定した。

PCR断片のクローニング

PCR増幅で得られたDNA断片はDNA精製用マトリックス樹脂 (Gene Clean II; BIO 101, Inc., La Jolla) を用いてアガロースゲルから精製し, 制限酵素 *Sma* I (宝酒造(株), 京都) で切断したプラスミドベクター pUC119 (宝酒造(株), 京都) に組み込んだ。この組換えプラスミドを用いて大腸菌 XL-1 blue (Stratagene, La Jolla) を形質転換した。形質転換した大腸菌を 50 μ g/ml のアンピシリンナトリウム (Sigma Chemical Co., St. Louis), isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; 宝酒造(株), 京都) と 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal; 宝酒造(株), 京都) を加えた LB 寒天培地上で培養し, コロニーの色によりインサートを含む組換え体を選択した。

ウマ精巢 cDNA ライブラリの構築

ウマの精巢から抽出・精製したポリ A 鎖を持つ RNA 5 μ g を diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma Chemical, Co., St. Louis) で処理 (Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989) した水に溶解し, cDNA 合成システムプラス (アマシャム(株), 東京) を用いて cDNA を合成した。2本鎖 cDNA は *Eco*RI-*Not*I-*Bam*HI アダプター (宝酒造(株), 京都) と結合させ, 5'末端をリン酸化したのちに *Eco*RI 消化し脱リン酸化した Lambda ZAP II ファージアーム (Stratagene, La Jolla) と結合させた。さらにこの DNA を市販のパッケージングエクストラクト (Gigapack II Gold; Stratagene, La Jolla) を使用してファージ粒子にパッケージングした。

ファージライブラリーのスクリーニング

ウマ精巢 cDNA の PCR クローニングからインサートを切りだし, 精製した後に放射性ラベルしてウマ精巢の cDNA ライブラリーをスクリーニングした (Benton and Davis,

1977)。PCRクローン (pETRB) を制限酵素*Kpn*I (宝酒造(株), 京都) で消化し約 1.0kbpの断片を[α -³²P]dCTPおよびマルチプライムDNAラベリングシステム (アマシャム(株), 東京) を用いて放射性ラベルした。これをプローブとして陽性クローンを選別し, M13ヘルパーファージR408 (Stratagene, La Jolla) を共感染させることによってプラスミドベクターpBluescriptのインサートとしてサブクローニングした(Short, Fernandez *et al.*, 1988)。

ノザンプロット

27か月齢のサラブレッド種雄馬から去勢時に採取した精巣および, 30か月齢のサラブレッド種雌馬から解剖時に採取した卵巣, 副腎, 肝臓および中殿筋の各組織から常法によりRNAを抽出した。各々の組織から抽出した20 μ gのトータルRNAを1.0%アガロース-MOPS-ホルムアミド-ホルマリゲル(Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989)で電気泳動した。荷電ナイロン膜 (Hybond N', アマシャム(株)) にこのRNAをトランスファーし, ファージライブラリーのスクリーニングに使用したものと同じプローブを使用してハイブリダイズした。

塩基配列の決定とコンピューター分析

プラスミドインサートの塩基配列は, Sangerのジデオキシターミネーション法 (Sanger, Nicklen *et al.*, 1989)とFITCで蛍光ラベルしたプライマーを組み合わせたA.L.F.全自動DNAシーケンサー (ファルマシア バイオテック(株), 東京) を使用して決定した。得られた配列はMacintoshパーソナル用コンピュータ用ソフトウェアパッケージDNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング(株), 横浜) を使用してデータベースを検索し, 既知の核酸配列およびアミノ酸配列と比較検討した。

結果

(1) ウマCYP17 cDNA断片のPCR増幅

ラットCYP17 mRNA塩基配列をもとに設計した哺乳類の既知のCYP17 mRNA塩基配列に特異的なプライマーを使用してウマ精巣cDNAを鋳型とするPCR増幅を行った。その結果、大きさの異なる3種の特異的な増幅産物が得られ、プライマー121および124の組合せから得られた最も大きい断片は、ラットCYP17 mRNAの塩基配列から予想された大きさであ

る1230塩基とほぼ一致する、およそ1.2kbpであった(図2-3-1, レーン1)。他にプライマー122と124, 121と123の組合せからも、ラットCYP17 mRNA塩基配列から予想されたものとはほぼ等しい増幅産物(図2-3-1, レーン2および3)が得られたが、以後の検討には最も大きい断片のみを使用した。

(2) PCR増幅産物の塩基配列

PCR増幅の結果、最も大きかった約1.2kbpのPCR増幅断片をプラスミドベクターpUC119のSmaIサイトにクローニングして塩基配列を決定した。図2-3-2には2個の独立したクローン(pETRBおよびpETRS)から別々に得て一致したPCR産物の塩基配列を示した。21塩基の上流側プライマーと24塩基の下流側プライマーの配列を除いた塩基配列の全長は1185bpであった。

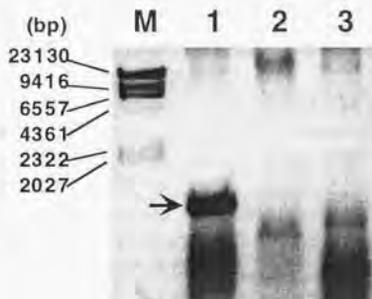


図2-3-1 PCR産物の電気泳動

M: λ /Hind IIIマーカー

1-3: ウマ精巣cDNAからの増幅産物 (→はクローニングに使用したもの)

(4) ウマ精巣cDNAライブラリーのスクリーニング

完全長のCYP17 cDNAをクローニングするためにウマ精巣の λ ZAPIIファージライブラリーをスクリーニングした。およそ 1×10^6 個のクローンをスクリーニングしたところ、少なくとも50個の強い陽性クローンがブランクハイブリダイゼーションで検出された。本酵素のアミノ酸配列をコードしている部分の全長を含み、しかも同じ配列を持つ2つのクローン (pET17-13, pET17-12) が得られるまで順番にいくつかのクローンの塩基配列を決定した。

(5) ウマ精巣CYP17 cDNAの塩基配列

このときの部分的制限酵素地図と配列決定のストラテジーを図2-3-4に示した。決定したcDNAクローンの1906bpにわたる塩基配列には37bpの5'上流側非翻訳領域、

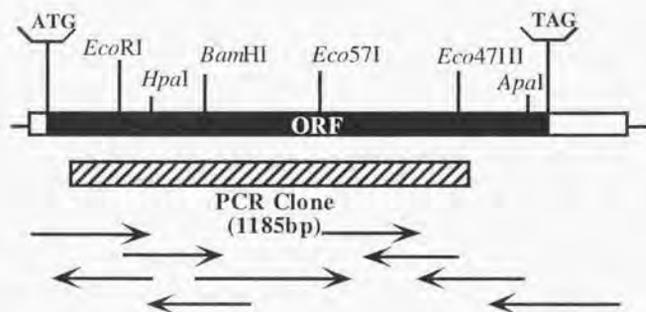


図2-3-4 ウマCYP17 cDNAの部分的制限酵素地図
矢印は塩基配列の決定に使用したクローンと方向を示す

508個のアミノ酸をコードしている1527bpのオープンリーディングフレーム、ストップコドンに続く316bpの3'下流側非翻訳領域があり、ポリA鎖付加のシグナルと考えられる【AATAAA】の配列(Chen, MacDonald *et al.*, 1995)はポリA鎖の20bp上流に

位置していた(図2-3-5)。ウマ精巢CYP17 cDNAのオープンリーディングフレームの長さはヒトCYP17 cDNAと等しかったが、ウシおよびブタよりも3塩基短く、ラットおよびマウスよりも3塩基長かった。

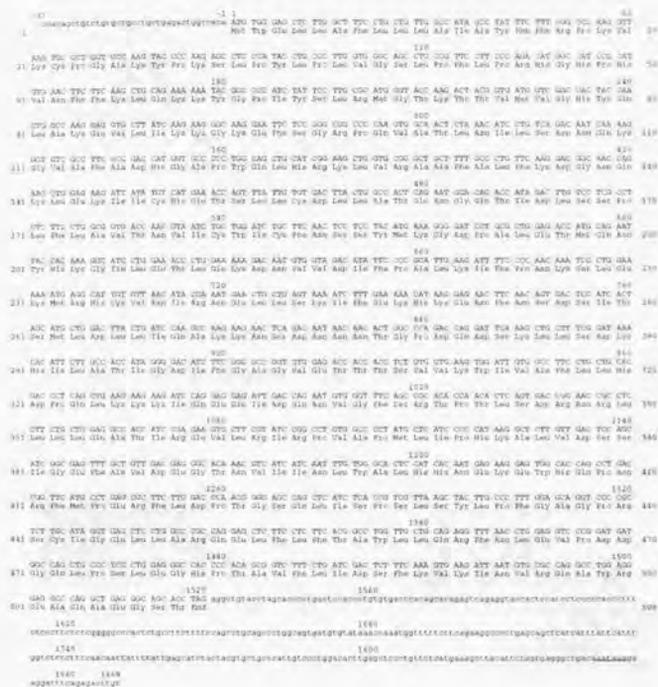


図2-3-5 ウマ精巢CYP17 cDNAの塩基配列およびアミノ酸配列

ボリA鎖付加のシグナルと思われる配列「AATAAA」を下線で示した。各行の左右の番号はアミノ酸配列を、行の上の番号は塩基の番号を示す。

(6) ウマ精巢CYP17アミノ酸配列

ウマ精巢CYP17 mRNAの塩基配列のうち1527塩基対のオープンリーディングフレームから推測されるウマ精巢CYP17のアミノ酸配列は508アミノ酸であり、その

Equine	HWELLAPILLALAYFPKPKKCPGAKYPKSLPVLPLVGLSPFLPRHGHDPHNFKFKQKYPPIYSLRMGTKTTVM	75
Human	---V-L---TL---L-N---RR---LQ---M-N---V---E	
Bovine	---L---VF---TL---L-W---T-HS---R-S---R-QQ-K---E---F-L-S---	
Porcine	---V---V-F---TLT-L-W---T-GS---R-V---V---R-Q-M---D---P-F-L-S---V	
Rat	---VGL---IL---WV-S-T---L-R---S---R-M---E---L-T---I	
Murine	---VGL---IL---W-S-T-N-F-R---P---R-M-A---E---L-T-A-I	
Equine	VGHYQLAKEVLIKKGKFSGRPQVATLNILSINQKGVAPADHGAPWOLHRRKIVRAAFALFKDGNQKLEKIICHT	150
Human	---H---D---M---D-A-N-R-I---S-H---R-AM-T---D---Q-I	
Bovine	I---H---R---L---K---D---I---H---ALN---L---NQ-A	
Porcine	I---DH---L---K-M-D---I---TS---ALST-S---GG-L---N-NQ-I	
Rat	I---R---MV-QSL---QG---A-SS-H---EST-S---L-Q-A	
Murine	---R---V---MV-GL-Q---SSSS---EST-S-R-D---M-Q-A	
Equine	SLLCDLLATQNGOTIDLSSPLAVTIVVICWICFNSSYMKGDPALETMONYHKGILETLEKDNVVDIFPAKIKFP	225
Human	---T---M---H---S---I-F-V-V---SL---T---EN---E-NVI---NE-IDN-S---SL---LV-W	
Bovine	NV---F---H-EA---E-S---I-SF---F-FKNE---KAL-VND---V-S-EVLL---V	
Porcine	KV---F---R---ES---AQ-S-M---IVSE---F-EK---QAI-V-FND---DAVG-RILY-M-GIR-L	
Rat	KG---MMLAHDKES---T-I-MS---I-A---I-E-N-K-TAIFTFTE---VDATGDR-L---W-T	
Murine	NS---IL-YD-ESR---TLI-KS-I-I-T---I-FENK---I-T-I-TFTE---VDV-GHSDL---W	
Equine	NKSLKEMHFCVNIINELLSKIFKHKNFNDSITSMLDLIIQAKNSDNRATGPDQSKLLSDKHILATIGDIF	300
Human	---T---L-KSH-K---D---N-L-NY---K-R---N---T-M-M---G-A---E---N---T	
Bovine	S-AM---RG-QT---NE-L-CQ---S---NL-HI---V-A---A---NR-M	
Porcine	SQT---N-RQ-FM---RE-L-NR---YSBN---NL-IM---T-AES-TG---HNL---R-M-VA	
Rat	---G---VINGYA-V---V-TG---CR-K-D-Q-S-LT-I---M---SCEGR-PDVF-R---V	
Murine	---N---MIKHTK---ERT-VBM-KC-K---E-LS-LT-I---M-AE---EG-PSVF---V	
Equine	GAGVETTISVVKVIVAPLLHDPOLKKKIQEEDQNVGFSRTPTLSDRNRLLLLEATIREVLRIRPVAPMLIPHA	375
Human	---TL---N-V---LY---I---L	
Bovine	---I---Y---H-S---R-DD---II-N---I---V---T	
Porcine	---SA---Y-L-R---DA---I-N-A-SI---Q-V---P-S-T	
Rat	---I---T-L---L-V-N-EV---K-Y---FN---SH-M	
Murine	---I---S-LN-L---V-N-EV-R---K-Y---SFN---TR-M	
Equine	LVDSSIGEFVDEGTNVIINLWALHNEKEWHPDRFMPERFLDPTGSQLISPLSYLPPGAGPRSCIGELLARQ	450
Human	---N---K-E---Q---N-A-T---V	
Bovine	VI---DLTI-K-E-VV---S---QH-L---T---V-M	
Porcine	IF---TI-KD-D-VV---IR-L---T---V-M	
Rat	N---T-FKD-H-VV---D-N-D-Q---H-T-TQ---A	
Murine	NI---IFKD-H---DKN-D---H-T-TF	
Equine	ELFLFTAWLQRFNLEVPDQGLPSLEGHPTAVFLIDSEKVKINVRQAMREAGQSDST	508
Human	---IM---D---I-KV---K	
Bovine	---MSR---I---K---ASL-LQ-KP---E---K---P	
Porcine	---G---D---L---C-V-N-SL-LQ---P---KE---K-HT---S	
Rat	---L---D-D-S-G---R---D-KV---P---T---MD---V	
Murine	---I-M-L---DFD-S-R---C-V-D-KV---P---T---KD---V-V	

図2-3-6 ウマCYP17と他の哺乳動物とのアミノ酸配列比較

ウマCYP17のアミノ酸配列をヒト(Bradshaw *et al.* 1987), ウシ(Zuber *et al.* 1986), ブタ(Conley *et al.* 1992), ラット(Fevold *et al.* 1989), マウス(Yumthabod *et al.* 1991)と比較した。図中、ドット(・)はアミノ酸残基の欠損を、ダッシュ()はウマと同じ残基を示す。シェドウは考察で添っているCYP17の活性にかかわる保存されたドメインを表す。

長さはヒトと等しかったが、ウシおよびブタよりもアミノ酸1残基短かく、ラットおよびマウスより1残基長かった。ヒト、ウシ、ブタ、ラットおよびマウスの5種類の哺乳動物のCYP17アミノ酸配列を今回得られたウマ精巣CYP17 mRNAの塩基配列から推測されるアミノ酸配列と並べて比較すると(図2-3-6)、ウマを基準にした場合、ウシおよびブタではカルボキシル末端がウシでプロリン、ブタでセリンがそれぞれ1残基余計に付いていた。また、ラットおよびマウスではそれぞれ139残基目のアスパラギン酸(ヒトおよびブタではアスパラギン)もしくは138残基目のグリシンのが1残基欠損していた。図2-3-6の中では、最上段に示したウマ精巣CYP17アミノ酸配列と一致する残基はダッシュ「-」で、欠けている部分はドット「・」で表示した。

(7) ウマ精巣CYP17と他種動物CYP17の相同性

ウマ精巣CYP17は塩基配列、アミノ酸配列ともにヒトの配列に対してそれぞれ83.1%、79.3%と高い相同性を示したが、ニジマスやニワトリを含む他の動物種とも50%以上の高い相同性を示したが、哺乳動物の中では齧歯類との相同性はヒトやウシと比較した場合相対的に低かった(表2-3-1)。

表2-3-1 ウマ精巣CYP17の配列と他種動物との比較

Species	% Sequence Identity	
	Amino Acid	Nucleotide
Human	79.3	83.1
Cattle	74.2	80.6
Pig	67.7	78.2
Rat	68.9	73.6
Mouse	67.1	72.8
Chicken	50.8	62.0
Rainbow Trout	50.2	56.0

考察

一般に哺乳動物のステロイド産生細胞では、ミトコンドリア内膜のコレステロールがコレステロール側鎖切断酵素 (CYP11A1) によってプレグネノロンに代謝され、プレグネノロンは小胞体に移って 3β -水酸化ステロイド脱水素酵素 (3β -HSD) およびCYP17の働きによりデヒドロエピアンドロステロンおよびアンドロステンジオンといったアンドロゲンに代謝される。CYP17はプロゲステロンおよびプレグネノロンを2種類の別の活性, すなわち17位の水酸化活性と17,20開裂活性によってそれぞれ, 17α -ヒドロキシプロゲステロンを経由してアンドロステンジオンへ, または 17α -ヒドロキシプレグネノロンを経由してデヒドロエピアンドロステロンへと代謝する。最近の報告(Fevold, Lorence *et al.*, 1989; Youngblood, Sartorius *et al.*, 1991)は, 齧歯類動物と他の動物種との間で本酵素の基質特異性と発現制御における相違について述べている。ウシおよびヒトCYP17の17,20開裂活性は 17α -ヒドロキシプレグネノロンよりも 17α -ヒドロキシプロゲステロンを基質とした場合に活性が低い(Youngblood and Payne, 1992)。そして, この活性の違いはヒトおよびウシでは副腎皮質でコルチゾールを産生するためにCYP17の水酸化活性による 17α -ヒドロキシプロゲステロンの生成を必要とし, この基質に対して17,20開裂活性とCYP21が競合するために, CYP17の17,20開裂活性が低く抑えられていることが合目的的であると理解されている(Youngblood and Payne, 1992)。一方, 齧歯類においては糖質コルチコイドとしてコルチコステロンを利用することから, CYP21の基質としてプレグネノロンおよびプロゲステロンを利用していると考えられ, 副腎におけるCYP17の発現は低いとされる(Fevold, Lorence *et al.*, 1989)。ラットおよびマウスCYP17 mRNAのアミノ酸コード領域に相当する塩基配列は3塩基短く, このことが齧歯類のアミノ酸配列をヒトやウシと比べてアミノ酸1つ分短くしている。このようなCYP17遺伝子塩基配列の種差はアミノ酸配列の種差となって基質特異性に影響していると考えられ

るほか、転写制御領域の塩基配列における種間差が組織における発現の特異性に影響していると考えられることから、ウマにおけるステロイド代謝機構を遺伝子レベルで解明するうえで重要と考えられる*CYP17* mRNAをウマ精巣組織からクローニングして塩基配列を決定した。

ラット*CYP17* mRNAの塩基配列をもとに哺乳動物*CYP17*のmRNAに共通な部分を選んでプライマーを設計してPCR増幅した。ウマ精巣の二本鎖cDNAから増幅された最も大きい(約1.2kbp) PCR断片の塩基配列はプライマー配列を除くと1185bpであり、ヒトやマウスなど、既に報告されている哺乳動物の*CYP17* mRNAの塩基配列に非常に類似していた。一方、ノザンプロット分析の結果から、ウマの精巣においてこのmRNA配列が単一のバンドとして非常に強く発現していることが確かめられた。このmRNAは18S rRNAよりわずかに分子量の大きい側に泳動され、その分子量は他の動物種の*CYP17* mRNAとはほぼ一致する約2kbpと推定された。同時に泳動した副腎と卵巣の試料からはかすかな発現が認められただけだったが、これは卵巣では排卵周期および卵胞の発育ステージが*CYP17*の発現に影響するのに対し、本研究では試料として使用した組織が凍結した卵巣組織であり、*CYP17* mRNAを発現している可能性の高い排卵前の卵胞と、*CYP17* mRNAは発現していないものステロイド産生能を有すると考えられる黄体の組織や結合組織とを識別できなかったことが挙げられる。使用した卵巣の組織がどの部分か特定できなかったことから、今回の結果のみで*CYP17* mRNAが卵巣で発現していなかったと結論することはできない。ウマではコルチゾールが糖質コルチコイドの主たる分子種とされていることから、副腎ではヒト、ウシと同様*CYP17* mRNAの発現は高いことが期待されたが、ノザン解析の結果は卵巣と同様その存在は確認されたが、発現量は低かった。本章では*CYP17*のクローニングを目的にしていたために、ノザン解析の組織試料が定量の目的のためには必ずしも万全でなかった可能性、例えば使用した副腎組織には皮質由来の組織が少なかったために検出されたシグナルが弱かった可能性が考えられ

る。さらに、後述する第七章で、本章の実験で得られたCYP17 cDNAをプローブとして用いたノザンプロット解析から、副腎組織についても強いシグナルが得られたことから、CYP17はウマ副腎においても相当量が発現していると考えられるべきと思われる。

次にプラスミドベクターにクローン化したPCR断片を再び制限酵素で切断した後、RIラベルしてプローブとし、ウマ精巣Lambda ZAP IIファージライブラリーのスクリーニングに使用した。およそ 1×10^5 個のウマ精巣Lambda ZAP IIファージクローンから強陽性のクローンが50個以上検出され、完全なアミノ酸コード部分を含む2個の独立したクローンが得られるまで塩基配列を決定した。その結果、ウマCYP17のアミノ酸配列をコードしているオープンリーディングフレームの長さはヒトと同じ1527bpであり (Chung, Picado-Leonard *et al.*, 1987; Bradshaw, Waterman *et al.*, 1987)、ラット (Fevold and Waterman, 1988) およびマウス (Youngblood, Sartorius *et al.*, 1991) より3塩基長くウシ (Zuber, John *et al.*, 1986) およびブタ (Conley, Graham-Lorence *et al.*, 1992) より3塩基短かった。ウマCYP17 mRNAの塩基配列はウシ、ブタ、マウス、ラット、ニワトリ (Ono, Iwasaki *et al.*, 1988)、ニジマス (Sakai, Tanaka *et al.*, 1992) を含む既知の配列の中ではヒトの配列と最も高い相同性 (83.1%) を示した。塩基配列から推定されたアミノ酸配列はヒト、ウシ、ブタのCYP17と大変よく似ていた。ウマCYP17のアミノ酸配列はヒトのアミノ酸配列と同様ウシおよびブタよりアミノ酸1残基短く、マウスおよびラットよりアミノ酸1残基長かった。図2-3-6ではウマCYP17のアミノ酸配列をヒト、ウシ、ブタ、ラット、マウス、ニワトリおよびニジマスと比較して示した。図にはアミノ酸配列と共にいくつかの種を越えて保存された本酵素に特異的な配列を網かけで示した。これらと比較したところ、Gotohら (Gotoh, Tagashira *et al.*, 1983) が記述しているヘム結合領域と推定される部位 (アミノ酸435-455) のほか、Onoら (Ono, Iwasaki *et al.*, 1988) が同定した種を越えて保存されたCYP17に特異的な配列 (アミノ酸297-320) も認め

られた。また、Ozols(Ozols, Heinemann *et al.*, 1981)が注目した30塩基 (アミノ酸 346-372) は基質特異性に関係しているとされ(Zuber, John *et al.*, 1986), アミノ末端の疎水性の配列 (アミノ酸1-16) は酵素の機能的発現に不可欠のものであるとみなされている(Clark and Waterman, 1992)。

核酸の塩基配列およびアミノ酸配列が示したこれらの特徴や、ノザンプロットで見られたバンドと得られたクローンの大きさがほぼ一致することなどから、ウマ精巣で発現しているCYP17の完全なアミノ酸配列をコードしているmRNAをクローンできたものと考えられる。ウマのCYP17は今回決定した塩基配列とそこから推定されたアミノ酸配列から、その活性、基質特異性とも鬚菌類のCYP17よりはむしろヒトやウシのCYP17と類似しているものと思われた。これらの推測を実証するためには、本mRNA配列を生体外で発現させ、その17 α -水酸化活性と17位20位間の開裂活性を測定する必要がある。

小括

CYP17 cDNAをウマ精巣cDNAライブラリからクローニングした。アンドロゲンおよびコルチゾールの合成に必要な*CYP17*は、基質特異性および遺伝子の発現に種特異性が認められる。ヒトおよびウシでは、*CYP17*の持つ2つの活性のうち17,20-開裂活性が $\Delta 4$ ステロイドに対して低いが、齧歯類では $\Delta 4$ ステロイドと $\Delta 5$ ステロイドとで開裂活性に差がない。ラットcDNAの塩基配列をもとにプライマーを設計して行ったPCRではヒトをはじめとする既知の*CYP17* cDNAと相同性の高い増幅産物を得た。これをプローブとしてノザンプロット分析を行ったところ、約2kbpのmRNAが精巣で強く発現しており、ウマ*CYP17* mRNAはヒトなどの既知の動物種と同様の大きさであると推察された。ウマ精巣cDNAライブラリをスクリーニングして得たクローンの全長1906bpの塩基配列は、ヒトおよび他種動物の既知の配列と高い相同性を示した。ウマの*CYP17*は既知の各種動物*CYP17*と共通な特徴を有していたが、アミノ酸配列のヒトおよびウシとの類似性（83.1, 80.6%）とラット、マウスとの類似性（73.6, 72.8%）から判断する限り、活性、基質特異性とも齧歯類の*CYP17*よりヒトやウシの*CYP17*と類似していると考えられた。

第三章 哺乳類細胞に導入したウマ精巣 17α -水酸化/ $17,20$ -開裂酵素遺伝子の発現

という問題があり、これらを単純に比較することすら難しい状況であった。これを解決する道を開いたのはZuberら(1986)(Zuber, Simpson *et al.*, 1986)による遺伝子導入実験であった。彼らはCOS 1細胞にCYP17のcDNAを導入して発現させ、二つの活性を比較することに成功した。COS 1細胞はアフリカミドリザルの腎臓由来の培養細胞株であるCV-1細胞に発癌性ウイルスSV40の複製点を欠く変異体を導入した細胞で、SV40のlarge T antigenを発現している(Gluzman, 1981)。COS 1細胞はステロイド代謝酵素を一切発現していないにもかかわらずP450の還元系を持っていること、large T antigenがSV40のプロモータを活性化させることによって導入遺伝子を発現させることができることなどから、ステロイド代謝にかかわるP450の発現実験に適している(Zuber, Simpson *et al.*, 1986; Clark and Waterman, 1991)。

COS 1細胞に導入した遺伝子の発現実験によってウシCYP17はプレグネノロンを基質とした場合には二つの活性の両方を示すが、プロゲステロンを基質とした場合には17位の水酸化活性のみを示し、17 α -水酸化プロゲステロンは開裂反応の基質としてはほとんど利用しないことがわかった。その後、ヒト(Lorence, Murry *et al.*, 1990)や齧歯類(Lorence, Naville *et al.*, 1991; Clarke, Bain *et al.*, 1993)についても同様な実験が行なわれ、ヒトCYP17はウシと同様に開裂反応の基質として17 α -水酸化プロゲステロンを利用しないが、マウスおよびラットCYP17は17 α -水酸化プロゲステロンをアンドロステンジオンに代謝することが明かとなった。これらの事実はそれぞれの動物種における副腎皮質ステロイドの種類によって決まっていることが推察された。すなわち、副腎から分泌される主要な糖質コルチコイドがコルチゾールであるヒトやウシにおいては本酵素が副腎でも発現してコルチゾール合成の基質として17 α -ヒドロキシプロゲステロンを合成するが、この17 α -ヒドロキシプロゲステロンをアンドロステンジオンに代謝してコルチゾール合成の基質を消費してしまう17位および20位の炭素原子間の開裂活性は高くない(Miller, Auchus *et al.*, 1997)。一方、主要な糖質コルチコイドとしてコルチコステロンを合成する齧歯類の副腎では

合成基質であるプロゲステロンを消費するCYP17は発現しないなど、これらの事実は各動物種における副腎機能の特徴とよく一致している(Conley and Bird, 1997)。そこで、ウマCYP17の基質特異性を明らかにするために、前章でクローニングしたウマCYP17 cDNAをCOS 1細胞に導入して発現させ、その酵素活性を確認するとともに、ヒトやウシと同様に主な糖質コルチコイドとしてコルチゾールを利用するウマにおいてもCYP17は同様な基質特異性を示すか否かを確認することを試みた。

材料と方法

発現ベクターの調製

ウマCYP17cDNAクローンpET17-12を制限酵素*Sma*Iおよび*Xho*Iで切断してインサート部分を切り出し、同じ酵素で切断した発現ベクターpSVL(図3-2-1, ファルマシアバイオテック(株), 東京)に組み込んで発現ベクターpSet#12を作製した。発現ベクターpSVLはインサート

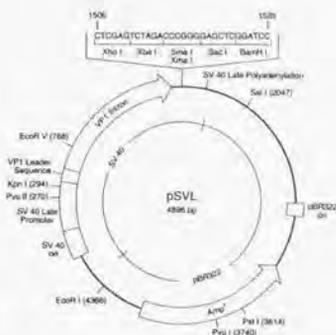


図3-2-1 発現ベクターpSVL

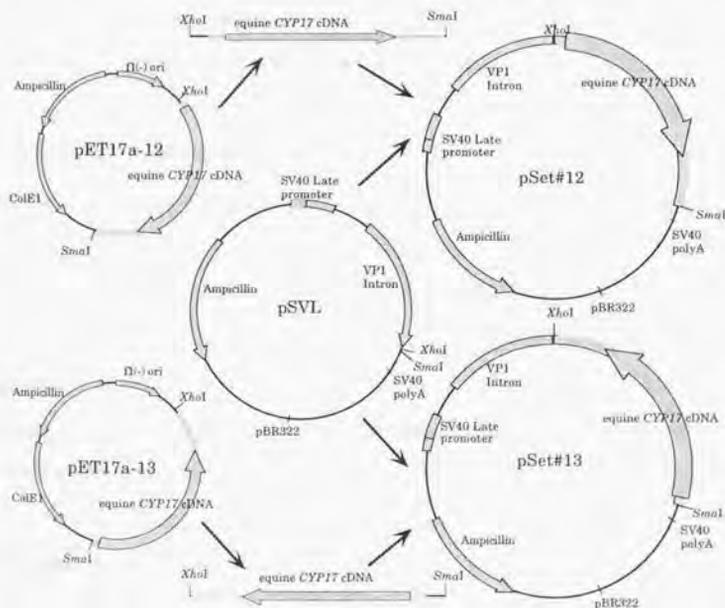


図3-2-2 発現ベクターの構築

ウマ精巣CYP17cDNAのインサートを切り出して発現ベクターpSVLに組み込んだ

部位の上流にSV-40のlate promoterを、下流に同じくSV-40のpoly Aシグナル配列を持ち、SV-40のlarge T antigenを発現しているCOS細胞で挿入遺伝子を発現することができるベクターである。このベクターから発現したmRNAは挿入遺伝子の開始コドンから翻訳される。また、対照としてpET17-12とは逆の向きにcDNAが挿入されていたクローンpET17-13から作製した発現ベクターpSet#13も同時に作製した。

(図3-2-2)

・COS 1細胞の調製と遺伝子導入

アフリカミドリサル腎臓由来の培養細胞株でSV40のLarge T抗原を発現するCOS 1細胞は特殊法人理化学研究所の細胞バンクより入手し、10%牛胎子血清添加DMEM (GIBCO BRL, Bethesda) にて5%CO₂, 37℃で培養した。COS 1細胞は導入の2~3日前に継代し、0.05% trypsinで遊離させたのち回収して、氷冷Dulbecco's PBS (GIBCO BRL, Bethesda) で2回洗浄した。氷冷Dulbecco's PBSで細胞数を10⁶/500μlに調整した細胞に100μgのDNAを加えて10分間氷冷した。これに0.25kV/0.4cm Gap, 500μFで2回バルスを加えた (Gene Pulser; 日本バイオラッドラボラトリーズ(株), 東京)。1回目と2回目のバルスの間は30分間氷冷した。2回目のバルスを加えたのち直ちに10分間氷冷し、培養液に懸濁して培養した。このような方法でCOS 1細胞にウマCYP17 cDNAクローンを組み込んだ発現ベクターpSet#12を導入した。対照として同じDNAを逆向きに挿入した発現ベクターpSet#13および純水を、同様な方法でCOS 1細胞に導入した。また、最初の実験では形質転換細胞を選別するために特殊法人理化学研究所遺伝子バンクより入手したネオマイシン耐性遺伝子を持つベクターpSV2neoを同時にCOS 1細胞に導入した。導入遺伝子が安定して発現する細胞を得るために、発現ベクターとともにpSV2neoを導入したCOS 1細胞については、培養3日目から選択用抗生物質として400μg/mlのG418 (Geneticin; GIBCO BRL, Bethesda) を培養液中加入し、10日間選択培養を

続けた。一方、トランジェントな発現をみるため、24時間培養した細胞を用いてノザンプロットおよび ^3H ラベルしたプロゲステロンを培養液に加えて代謝実験を行った。

遺伝子発現

導入した遺伝子の発現はノザンプロットによって確認した。遺伝子導入後24時間経過したCOS 1細胞を $10^6/100\text{mm dish}$ となるように培養皿に播き、さらに24時間培養した。この培養皿からTRIzolリジェント (GIBCO BRL, Bethesda) を用いて全RNAを直接抽出し、1%アガロースMOPS-ホルマリンゲルで電気泳動した。泳動後、荷電ナイロンメンブレン (Hybond N⁺, アマシャム(株), 東京) にトランスファーし、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識したウマCYP17のcDNAプローブで検出した。

培養液へのステロイド添加

COS 1細胞におけるウマCYP17 cDNAのトランジェントな発現をみるため、 ^3H ラベルしたプロゲステロン ([1.2.6.7- ^3H (N)]-progesterone, New England Nuclear) を培養液に加えて培養し、培養液中の代謝物を抽出して放射活性を測定した。遺伝子導入後24時間で 1×10^6 個/dishとなるように培養皿に分けたCOS 1細胞について、遺伝子導入後48時間から2時間ないし4時間、 ^3H ラベルしたプロゲステロンを $0.1\mu\text{M}$ 、ラベルしていないプロゲステロンを $1\mu\text{M}$ となるように添加した牛胎子血清を含まないDMEM (1% BSA加) 中で培養した。各培養皿に加えたプロゲステロン添加培養液の量は5mlとした。プロゲステロン添加後2時間ないし4時間で培養液を回収し、回収した培養液1mlに対して同量の0.2M酢酸水溶液を混和してSep-Pak C18 カートリッジ (Waters) に通じ、ステロイドを吸着濃縮した。これをメタノールで溶出し、窒素気流中で蒸発乾固させた抽出物を高性能薄層クロマトグラフィープレート (Silicagel60F₂₅₄, メルク関東, 東京), 移動相クロロホルム: 酢酸エチル:

n-ヘキサン (2:2:1) により分離後、オートラジオグラフィーで確認するとともに、紫外線吸収を指標とした非標識ステロイド標品の移動度を目安としてスポットをかき取り、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

結果

(1) 遺伝子導入細胞の選択培養

ウマCYP17 cDNAを組み込んだ発現ベクターpSet#12に加えてネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだベクターpSV2neoを同時に導入したCOS 1細胞を、抗生物質耐性をもとに選択しようとしたが、導入後3日目から抗生物質G418硫酸塩(GENETICIN; GIBCO BRL, Bethesda)を400 µg/mlとなるように添加したところ、経過日数とともに細胞は死滅し、培養10日目には1ボトル当たり数個の細胞のみが生存しているに過ぎなかった。また、生存していた細胞は分裂周期が長く増殖活性がみられないため、さらに二週間培養を継続したが、実験に必要な細胞数は得られなかった。

(2) COS 1細胞におけるウマCYP17 mRNAの一過性発現

形質転換細胞を選択培養することが困難だったことから、一過性発現を目的として再度COS 1細胞に対する遺伝子導入を行った。導入後24時間で生存細胞を計数し、90mmディッシュに1×10⁶個/dishとなるようにし、導入後48時間目からステロイドの添加を行った。サル腎臓由来の細胞に導入されたウマCYP17 cDNAは遺伝

ウマ精巣CYP17 cDNAを発現ベクターpSVLに順方向に挿入したpSet#12と、逆方向に挿入したpSet#13とを作製し、COS 1細胞を形質転換した。

○: 純水, 12: pSet#12, 13: pSet#13をそれぞれ導入した細胞のtotal RNAとT: 精巣のtotal RNAをウマ精巣CYP17 cDNAをプローブとして比較した



図3-31 形質転換細胞のノザンブロット

子が順方向に挿入されている発現ベクターpSet#12を導入した場合にはノザンプロットで完全長のmRNAを確認できたが、コントロールとして使用したウマ由来cDNAが逆向きに挿入されている発現ベクターpSet#13を導入した細胞では分子量の小さなスミアが観察されたのみだった(図3-3-1)。

(3) ウマCYP17 mRNAを発現するCOS 1細胞におけるステロイド代謝
 プロゲステロンを基質とした場合に発現ベクターpSet#12を導入した群では経時的に代謝物に相当するスポットの放射活性が増加していた(図3-3-2)

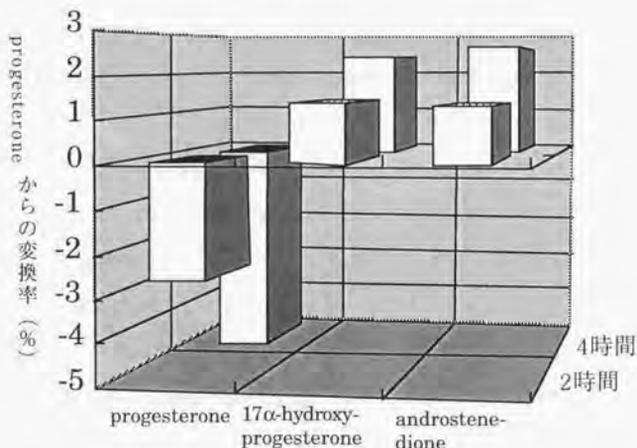


図3-3-2 組み換え体を導入したCOS 1細胞におけるプロゲステロンの代謝

考察

CYP17の持つ二つの活性、すなわちC21ステロイドの17位水酸化活性と、17,20位間の開裂活性とを評価するための系として、CYP17のcDNAとSV40のプロモータを組合せたベクターをサル腎臓由来のCOS 1細胞に最初に遺伝子購入し、発現させたのはZuberら(1986)(Zuber, Simpson *et al.*, 1986)であった。この実験により、二種類の活性を有するCYP17が一種類のcDNAから翻訳された単一の蛋白質であることが明らかとなった。さらにこの実験は、クローニングしたcDNAから翻訳された蛋白質が完全な酵素活性を有するという単なる証明にとどまらず、それまで生体試料から抽出・精製により得ていた蛋白質試料では評価しにくかった二種類の活性間の相対的な比較を可能にするとともに、複数の動物種由来の酵素を同じ系で比較することをも可能にした。事実、その後に行われたヒト、マウス、ラットのCYP17に関する研究により、ウシやヒトではプレグネノロンから17 α -水酸化プレグネノロンおよびプロゲステロンから17 α -水酸化プロゲステロンへの水酸化反応はほぼ同程度の活性を示すが、17,20開裂活性については17 α -水酸化プロゲステロンからアンドロステンジオンへの変換活性が17 α -水酸化プレグネノロンからデヒドロアンドロステロンへの変換活性よりも低いことが報告されている(Kagimoto, Winter *et al.*, 1988; Imai, Globerman *et al.*, 1993; Swart, Swart *et al.*, 1993)。その一方で、副腎でCYP17を発現しないとされる齧歯類においてはいずれの基質についてもCYP17の17,20開裂活性が高いことが報告された(Fevold, Lorence *et al.*, 1989; Youngblood and Payne, 1992)。これらの種特異性は副腎における主な糖質コルチコイドとしてコルチコステロンを生成する齧歯類では17 α -水酸化反応が不要なのに対し、副腎における主な糖質コルチコイドとしてコルチゾルを生成するヒトやウシでは17 α -水酸化プロゲステロンからシトクロムP450ステロイド21-水酸化酵素(CYP21)およびシトクロムP450ステロイド11 β -水酸化酵素(CYP11B1)が作用することによってコルチゾルを合成する

が、これらの動物種ではCYP21の21-水酸化活性と拮抗する17 α -水酸化プロゲステロンの17,20開裂活性を低くすることで副腎におけるアンドロゲン合成を抑え、糖質コルチコイドの合成基質を確保していると考えられる。ウマにおいても主要な糖質コルチコイドはコルチゾルであるとされることから、ウマCYP17は齧歯類よりはヒトやウシに近い基質特異性を示すことが予想され、前章で述べたようにウマCYP17のcDNAから推測されるアミノ酸配列はそれを一部裏付けるものだったが、発現実験を行って検証する必要がある(Hasegawa, Mukoyama *et al.*, 1995)。本章ではサル腎臓由来の培養細胞であるCV-1細胞を、癌化ウイルスSV40の増殖活性を失った変異体で形質転換することで不死化したCOS 1細胞を使用してウマCYP17遺伝子を発現させ、基質としてプロゲステロンまたはプレグネノロンを添加して培養することにより酵素活性の評価を試みた。

そこでCOS 1細胞を形質転換してウマCYP17 cDNAを発現するための発現ベクターを構築した。材料として選択した発現ベクターpSVL (GenBank Accession Number U13868, 4896 bp) は、SV40の後期プロモータおよびポリA鎖付加シグナルであるSV40 VP 1プロセッシングシグナルをマルチクローニングサイトの前後に持つ市販のベクター(Sprague, Condra *et al.*, 1983; Templeton and Eckhart, 1984)で、前章で得たウマCYP17 cDNAのpBluescriptクローンpET17a-12およびpET17a-13を二種類の制限酵素SmaIおよびXhoIで切断して組み込み、発現ベクターpSet#12およびpSet#13とした。その結果、pSet#12にはベクターのSV40後期プロモータに対してウマCYP17のアミノ酸コード領域が順方向に、また、pSet#13には逆方向に、それぞれcDNAの全長が挿入された。

当初は導入遺伝子を安定して発現する細胞株を得ることを目的として、ウマ精巢CYP17 cDNAを組み込んだpSet#12と、ネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれている発現ベクターpSV2neo (GenBank Accession Number U02434, 5729 bp) (Southern and Berg, 1982)を同時に使用して形質転換を行った。形質転換によって

細胞の増殖活性は特に落ちることはなかったが、形質転換後3日目から抗生物質 (GENETICIN) を加えた選択培地に移すと次々細胞は死滅し、培養10日目には1ボトル当りの生存細胞数は数個となった。この時点で残った細胞について GENETICIN濃度を半量の維持濃度まで低下させた200 $\mu\text{g/ml}$ とし、さらに一週間後にはGENETICINを含まない培地に移しても増殖活性は回復しなかったことから、実験の継続は困難であると判断した。GENETICINは形質転換細胞の選択培養にしばしば使われる抗生物質であり、SV40プロモータと併用されることも多いことから、SV40由来のベクターを使用したCOS 1細胞に対して直接の悪影響はないものと考えられることから、今回の検討においては形質転換効率が悪く、ネオマイシン耐性遺伝子を発現する細胞が少なかった、またはほとんどなかった可能性も考えられる。また、SV40後期プロモータと組合せたウマCYP17 cDNAの発現が、ネオマイシン耐性に影響した可能性も考えられることから、ウマCYP17 cDNAを発現する細胞を選択培養するためには、これらの条件についてさらに検討する必要がある。

これに対して過去に行われたCOS 1細胞を用いてのCYP17発現実験は、いずれも形質転換細胞の選択培養を行うことなく、一過性の遺伝子発現によってCYP17を発現させている。そこで、一過性の導入遺伝子発現を目的としてウマCYP17 cDNAを組み込んだ発現ベクターpSet#12およびpSet#13を単独で形質転換に用いた。導入翌日の生存細胞数は両者とも滅菌超純水を加えて電気穿孔したコントロールと同程度だった。導入48時間後の細胞から抽出したRNAを用いてノザンプロットを行ったところ、導入したウマCYP17 cDNAに相当するバンドのほか、それよりもやや長いバンドを含むスメア状のシグナルがpSet#12を導入した細胞にのみ認められた。ウマCYP17 cDNAをSV40後期プロモータに対して逆向きに挿入したpSet#13を導入した細胞ではシグナルは数百bp以下の部分にのみ認められたが、ベクターを加えない超純水を用いて電気穿孔を行った細胞では全く検出されなかった。用いたプローブが二本鎖DNAをランダムラベルしたDNAプローブであったことから、形質転換細胞に

においてベクターの設計通りSV40後期プロモータから転写されたRNAがプローブに使用したウマ精巢CYP17 cDNAの部分を含んでいれば転写の向きにかかわらず、すなわちpSet#12とpSet#13のいずれの発現ベクターを用いた場合にも同様な大きさの転写産物が検出される可能性は残されていた。しかし本章のノザンプロットの結果、ウマCYP17 cDNAを順方向に挿入したpSet#12を導入した細胞でのみ、挿入遺伝子に相当する約2kbpのバンドを含む比較的長いRNAが検出された。ウマCYP17 cDNAをSV40後期プロモータに対して逆方向に挿入したpSet#13を導入した細胞では、数百bp以下の小さな転写産物が検出されたのみであり、挿入したウマCYP17 cDNAに相当する約2kbpの転写産物は検出されなかった。また、今回のノザンプロットにおいて導入した発現ベクターのプラスミドDNAを検出していた可能性については、pSet#12とpSet#13はウマCYP17 cDNAの挿入部分以外共通であり同じ大きさであることから否定される。これらのことから、順方向にcDNAを挿入したベクター、すなわちpSet#12を導入した細胞においてのみ目的のRNAが転写されていたと考えられる。

基質として $[^3\text{H}]$ ラベルしたプロゲステロンを培養液に加えて培養したところ、培養液中の総放射活性に占める 17α -水酸化プロゲステロンおよびアンドロステンジオンに相当する代謝物の割合が経時的に増加することが示された。従って定性的にはウマのCYP17は 17α -水酸化活性に加えて $17,20$ 開裂活性を持つと考えられる成績であった。この結果が正しいとすれば、ウマではヒト、ウシと同様にコルチゾールが主たる糖質コルチコイドであるにもかかわらず、CYP17の開裂活性が存在する特異な動物種と考えられる。

しかし、ここで本実験の結果4時間の培養で増加したプロゲステロン代謝物の量、すなわち 17α -水酸化プロゲステロンおよびアンドロステンジオンを合わせた放射活性は検出した総放射活性の約5%であり、添加した非放射性プロゲステロンの濃度すなわち $1\mu\text{M}$ をもとに計算すると、発現した酵素による代謝は $62.5\text{ pmoles / dish / hr}$ と

計算され、これはZuberら(Zuber, Simpson *et al.*, 1986)のウシ遺伝子とCOS 1細胞でのデータと比較するとかなり低いものであった。

ノザンプロットにおいて、ウマCYP17 cDNAを順方向に挿入したベクターを導入した細胞のみでmRNAの発現が認められたことから、導入した遺伝子は発現していたものと考えられるが、本実験における転換活性の低さは培養条件などに問題があった可能性も疑われる。Zuberら(Zuber, Simpson *et al.*, 1986)は放射性基質の添加時にも10%牛胎子血清を添加したDMEMを使用していることから、牛胎子血清の添加がなんらかの影響を持つ可能性は否定できない。また、既に報告されている発現実験は発現ベクター-pcD2(Okayama and Berg, 1983)を使っており、pcD2はプロモータとしてSV40の早期プロモータを組み込んであるが、今回使用したpSVLのプロモータはSV40後期プロモータであることも影響した可能性がある。

本実験の結果からはウマのCYP17は17 α -水酸化活性と17,20開裂活性を有することが示唆されるが、この結論が正しいとすればヒト、ウシなどの結果から推論されている「コルチゾールを主な産生ホルモンとする副腎では、CYP21の基質(17 α -水酸化プロゲステロン)との競合性からCYP17の17,20開裂活性が抑制されている」との解釈は修正の要があることになる。この矛盾は、例えばウマのCYP21の17 α -水酸化プロゲステロンに対する酵素活性が、ヒト、ウシと比べて著しく高いものであれば、解消することは可能であるが、いずれにせよステロイド代謝の比較生物学から言えば極めて大きな問題をはらんでおり、この問題に決着をつけることは、本論分の結果のみからでは不十分であることは否めない。よって、本論分では、ウマのCYP17には水酸化活性と17,20位の開裂活性が共存する可能性を示唆するに止め、再度この問題に多角的に取り組むこととした。

小括

ウマCYP17 cDNAクローンを発現させて酵素活性を確認するために、cDNAクローンのインサートを市販の発現ベクターpSVLに組み込んだ二種類の組換え体を作製し、COS 1細胞に導入して形質転換した。pSV2neoを同時に導入し抗生物質G418を添加して選択培養したものは増殖活性が著しく低下し、ウマCYP17を安定して発現する形質転換体は得られなかった。そこで、導入48時間後にRNAを抽出しノザンプロットを行ったところ、ベクターのプロモータに対してウマCYP17の塩基配列が順方向となるpSet#12ではインサートの長さに相当するバンドを含む分子量範囲の広いスメアが検出されたが、逆方向のpSet#13では数百bp以下の短いRNAのみが検出された。酵素反応の基質として ^3H ラベルしたプロゲステロンをpSet#12で形質転換した細胞の培養液に加えたところ、 17α -水酸化プロゲステロンおよびアンドロステンジオンに相当する代謝物が経時的に増加し、ウマCYP17には 17α -水酸化活性と $17,20$ 開裂活性が共存している可能性が示唆された。しかし、4時間の培養で増加したプロゲステロン代謝物は総放射活性の約5%と低かったことから、さらにこの可能性を検証するためには、より高い活性を発現する形質転換体の調製が必要と考えられた。

第四章 ウマ17 α -水酸化／17,20-開裂酵素遺伝子の
エキソン構築

はじめに

メッセンジャーRNAの塩基配列はアミノ酸コード領域以外に5'および3'の非翻訳領域を含んでいるが、真核生物のゲノム中に含まれる遺伝子はこれらのほかに5'上流側には転写制御領域が、アミノ酸コード領域にはイントロンが挿入されていることが多い。特定の遺伝子がゲノムDNAからRNAへと転写されるのを制御している機構を調べるためには、当該遺伝子の5'上流側の領域をクローニングしてプロモーター、あるいはエンハンサーなどの配列を明らかにする必要がある。しかしながら予備実験としてウマのゲノムDNAライブラリー (Stratagene) を対象にウマのステロイド17 α -水酸化/17,20-開裂酵素 (CYP17) のcDNAクローンをプローブとして検索したところ、陽性クローンを得ることができなかった。

ゲノムDNAライブラリーのスクリーニングで陽性クローンが得られなかった理由としては、CYP17遺伝子がヒトの場合と同様、半数体ゲノム当たり1個しかない、いわゆるシングルローカス遺伝子であること(Kagimoto, Winter *et al.*, 1988)や、ゲノムDNAライブラリーが全ゲノムをカバーしていなかった可能性などが疑われた。

また、ヒトのCYP17遺伝子ではアミノ酸コード領域に7つのイントロンが挿入されており、サブライシングによってそれらを失っているcDNAクローンをプローブとして使用することが適当でない可能性も疑われた。

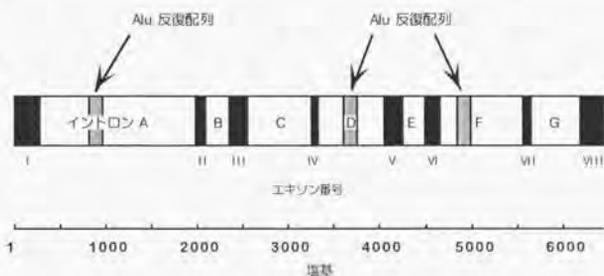


図4-1-1 ヒトCYP17遺伝子の構造

Kary Mullisらが開発したPCR法(Saiki, Scharf *et al.*, 1985)は、耐熱性DNAポリメラーゼを利用することによって特定の遺伝子断片を特異的に増幅する手法であり、遺伝子研究や診断など様々な分野で応用されている技術である。現在では使用される耐熱性DNAポリメラーゼも目的によって特性の異なる様々な酵素が単独、あるいは混合して使用されるようになってきている。これらのうちで、増幅効率のよいDNAポリメラーゼ (*Taq*ポリメラーゼ, *Tth*ポリメラーゼ等) に3'エキソヌクレアーゼ活性を併せ持つDNAポリメラーゼ (*Pfu*ポリメラーゼ, VENTポリメラーゼ等) を少量、組み合わせて使用することによって長いDNA断片を増幅することが可能であることが明かとなり、あらかじめ適量を混合したDNAポリメラーゼが市販されるようになった。これらを使用すると理想的な条件下では数十kbpのDNA断片が増幅可能とされている。

そこで、ウマゲノムDNAライブラリーのスクリーニングを繰返すかわりに、ウマ *CYP17* cDNAの塩基配列を元にプライマーを設計してイントロンを含むウマゲノムDNAの断片を増幅し、得られた増幅産物をクローニングすること、それらの全塩基配列を決定することによってウマゲノムの *CYP17* 遺伝子のエキソンとイントロンがどのような構造をとっているかを明らかにするとともに、それらをプローブとした場合、ゲノムDNAライブラリーの検索に十分使用可能であるかどうかを検討することを試みた。

材料と方法

ウマゲノムDNAの調製

3歳のサラブレッド種雄ウマの頸静脈からヘパリン血を採取し、常法(Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989)に従ってゲノムDNAを精製した。このゲノムDNAをPCR反応の鋳型として、およそ4 μ g/ μ lの水溶液となるように調製し、1回のPCRには10 μ l (40 μ g)を使用した。

PCRプライマーの設計

ウマCYP17 cDNAの塩基配列をもとに、ヒトゲノムのCYP17遺伝子のエクソン構造(Kagimoto, Winter *et al.*, 1988)を参考にしてイントロンを挟んで増幅できるように設計したオリゴヌクレオチドプライマーを数種類(図4-2-1)試作し、ウマゲノムDNAを鋳型としてPCRを行った。PCRには、市販の長鎖DNA増幅用耐熱性DNA合成酵素Taq PLUS DNA polymerase (Stratagene, La Jolla) またはGeneAmp XL II kit (パーキン・エルマー・ジャパン, 浦安) を使い、それぞれの酵素に添付されたバッファーを用いて行った。温度サイクルの条件は95 $^{\circ}$ C5分で変性後、95 $^{\circ}$ C1分、68 $^{\circ}$ C10分のサイクルを14回、さらに68 $^{\circ}$ Cの伸長反応時間を1サイクル当たり15秒ずつ延長しながら16回繰り返した。

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動はミニサブマリン電気泳動装置Mupid 2 (アドバンス, 東京) を使用し、担体として1%ないし0.8%アガロースNA (ファルマシアバイオテック(株), 東京), バッファー系は0.5 \times TAE (Tris-Acetic acid-EDTA) を用いた。DNAの分子量マーカーは λ HindIII digest (東洋紡績(株), 東京) または λ EcoT14I digest (宝酒造(株), 京都) を使用した。

PCR産物のクローニング

アガロースゲル電気泳動により増幅産物の大きさを確認した後、特異的な増幅産物が得られた場合は得られたPCR産物をゲルから切りだして精製した (GeneClean II; BIO 101)。精製したPCR産物はそのまま、あるいは末端をリン酸化 (T4ポリヌクレオチドキナーゼ; 宝酒造) したのちにプラスミドベクターpUC18のSmaIサイトに組み込んで (RTG T4 DNA Ligase with pUC18 SmaI BAP; ファルマシアバイオテック(株), 東京) 塩基配列の決定に用いた。さらに、塩基配列決定のために必要に応じてそれらのクローンを制限酵素およびプラスミドベクターpUC18 (ファルマシアバイオテック, 東京) またはpBluescript II SK(-) (Stratagene, La Jolla) を使用してサブクローニングした。

塩基配列の決定

塩基配列を決定するにはM13系のシークエンス用Fluoresceinラベルプライマー (M4 および RV-M; 宝酒造(株), 京都) と耐熱性DNAポリメラーゼ (ThermoSequenase; アマシャム(株), 東京または ΔTth ; 東洋紡績(株), 東京) を用いたジデオキシ法によるサイクルシークエンス反応を行い、A.L.F.全自動DNAシークエンサー (ファルマシアバイオテック(株), 東京) を使用して解析した。さらに各クローンの塩基配列の並べ替え、接続および他の動物種あるいは遺伝子との比較にはマッキントッシュパーソナルコンピュータ上で動作する遺伝子解析ソフトウェア (DNASIS Mac; 日立ソフトウェアエンジニアリング(株), 横浜) を用いた。

SINE-PCR

CYP17遺伝子の解析結果からイントロンCに認められたMIR様塩基配列 (Jurka, 1990) をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、ウマゲノムDNAを鋳型として単一のプライマーによるSINE-PCRを行った。反応液量50 μ l, 鋳型DNA 200ng,

プライマー100pmoleを使用し、95℃5min.で変性させたのち95℃1min., 48℃1min., 72℃1min.のサイクルを30回繰り返した。さらに同じPCRをアニールの温度を37℃に変更して行い、アガロースゲル電気泳動を行うことによってPCR産物の電気泳動パターンをMIR由来のプライマー(Jurka, Zietkiewitz *et al.*, 1995)で増幅した場合と比較した。

結果

(1) PCRプライマーの設計

ヒトゲノムの*CYP17*遺伝子は8つのエクソンと7つのイントロンからなるが、これらのエクソン/イントロン接合部をすべて調べ、ヒト*CYP17* cDNAにおける該当部位をウマ*CYP17* cDNAの塩基配列上にプロットすることで、イントロンを挟むPCRを行うためのプライマーを設計した(表4-3-1)。

(2) PCR産物の電気泳動

図4-3-1には一部のPCR産物を電気泳動した結果を示す。図中レーン2のように増幅産物が得られない場合もあった。クローニングできた組み合わせで使用したプライマーはフォワード(センス)側がエクソンIのf04, エクソンIIIのf505, エクソンIVのf701, リバース(アンチセンス)側がエクソンIIIのr603, エクソンVのr920, エクソンVIIIのr1513だった。

表4-3-1 本章で使用したPCRプライマー

プライマー	塩基配列 (5'3')
f00	GAGCTCTTGGCTTTCCTGCTGTTGGCATA
f04	CCGCATGTGAACCTTCTCAAGCTGCAGAAA
f204	CCGCATGTGAACCTTCTCAAGCTGCAGAAA
f350	TCTAAACATCTCTGCAGACAATCAAAAGGG
f505	CCAGTTTATTGTGTGACTTACTGGCCACTC
f701	GGCATTGTGTTAACATACGAAATGAACTGC
f1002	GAAGATCCAGGAGAGATTGACCAGAAATGT
r98	GCTCTTGGGTACTTGGCACCAGGGCACTT
r225	AGTCTYGGTACCATGCGCAAGAAATAGAT
r294	GCCCGGAGAATCTCTTGCCTTCTTGATAA
r303	CCCTTTTGATTGTCTGACAGGATGTTTAGA
r505	GAGTGGCAGTAAGTCACACAATAAACTGG
r603	GATGCCCTTTGTGTAAATCTGCATGGTCTC
r740	GCAATTGATTTCTGATGTTAACACAATGCC
r920	ATGTCCCCTATGTGGCAAGAATGTGTTTA
r1201	GTGATGGAGTGCCACAATAATGATGATGAC
r1513	TTCACTTGAAAGAGTCGATCAGAAAAGACC

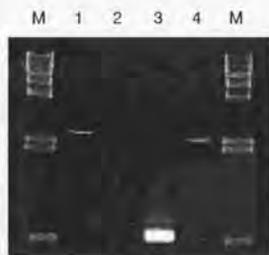


図4-3-1 PCR産物の電気泳動像

1: f04/r303, 2: f000/r303, 3: f701/r920
4: f701/r1513, M: lambda *Hind* III marker

ゲノムPCRの増幅産物について塩基配列を決定し、ウマCYP17 cDNAの塩基配列を参考にしてエクソン/イントロン構造を解析した結果、ウマゲノムCYP17遺伝子のアミノ酸コード領域では、1906塩基対からなるウマCYP17 cDNAの配列が8つのエクソンに分かれており、それらの間に7つのイントロンが挿入された構造となっていた(図4-3-2)。各エクソンからイントロン、イントロンからエクソンへの移行はヒトCYP17遺伝子と同じ位置であり、そこには必ずRNAスプライシングのシグナルとなる典型的なドナー/アクセプター配列が存在した。

(4) ヒトCYP17遺伝子との比較

図4-3-3にウマCYP17遺伝子のイントロン/エクソン構造を示すとともに、各エクソンおよびイントロンの長さを、ヒトCYP17遺伝子のエクソンおよびイントロンの長さとともに表4-3-2に示した。表には各エクソンおよびイントロンについて計算し

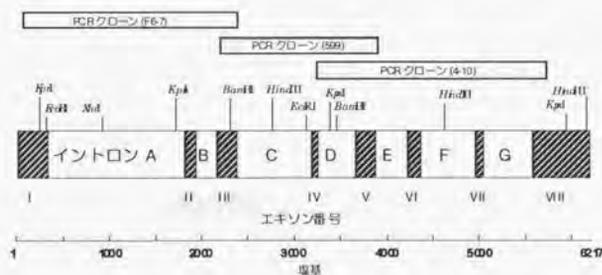


図4-3-3 ウマCYP17遺伝子の構造

た塩基配列の一致度も示した。

ウマCYP17遺伝子の蛋白コード領域はヒトCYP17遺伝子の蛋白コード領域(図4-1-1)とはほぼ同じ長さで構造であり、8つのエクソンはそれぞれヒトの対応するエクソンと全く同じ長さであった。また、エクソン部分の塩基配列はヒトの同じエキ

ソンと76.5~89.3%の高い相同性を示していた。

エキソン間に挿入されているイントロンの塩基配列はエキソンよりは低いものの、53.8% (イントロンA) ~73.7% (イントロンG) の比較的高い相同性を示した。また、ヒトのCYP17遺伝子でイントロンA、DおよびFに存在するAlu反復配列については、ウマCYP17遺伝子では他のイントロンも含めて類似の配列は存在しなかった。

7つあるイントロンのうちヒトCYP17遺伝子のイントロンと比較した場合に塩基配列の一致度が60%よりも低かったのはイントロンAおよびイントロンCだった。

表4-3-2 ウマCYP17遺伝子の各エキソン/イントロンの長さヒトとの比較

Exon		塩基配列の長さ		一致度(%)
		ウマ	ヒト	
1		297	297	86.2
2		139	139	80.6
3		230	230	76.5
4		87	87	80.5
5		216	216	84.7
6		170	170	89.3
7		104	104	87.5
8		284	284	88.7
Intron	A	1489	1668	53.8
	B	209	233	72.9
	C	791	662	57.4
	D	393	694	64.6
	E	329	232	66.1
	F	585	897	67.0
	G	515	518	73.7

(5) MIR配列を利用したSINE-PCR

ウマCYP17遺伝子の

イントロンCには、有袋目を含むすべての哺乳類動物種にわたって広く分布するとされる

SINE型反復配列、
Mammalian-wide

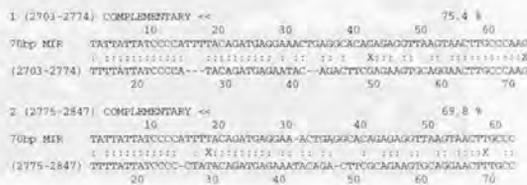


図4-3-4 イントロンCにみられた72塩基の繰り返し配列と哺乳類に共通なSINE様配列“MIR”との相同性

Interspersed Repeat (MIR) のコンセンサス配列 (70塩基) と相同性の高い72塩基の配列が制限酵素 *Hind*III の認識部位 (AAGCTT ; 2772~2777) を挟んで直列に2回繰り返している部分が認められた。今回イントロンCでMIRコンセンサス配列と相同性が認められた部分にプライマーC-20-3 (5'-ATCCCCCATAACAGATGAGAA-3') を設計し, MIRの研究者が設計したプライマー, mir17, 3'-mir17, mil17, 3'-mil17, 3'-mir19のうち3'-mir19 (5'-TCCCTCATTTTACAGATGA-3') (Jurka, Zietkewitz *et al.*, 1995) とともに合成した。図4-3-5は, これら2種類のプライマーをおのおの単独で使用するシングルプライマーPCRによってウマゲノムDNAから増幅されたPCR産物をアガロースゲル電気泳動した結果である。アニール温度37°Cおよび48°Cで双方のプライマーとも300bpから2000bp付近までの間に多数のバンドが検出された。

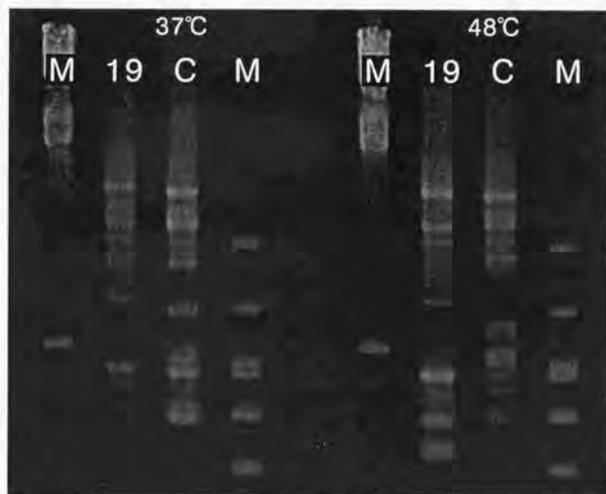


図4-3-5 SINE-PCR産物の電気泳動像

M: λ *Hind* IIIおよびBioMarker LOW (フナコシ)
 19: 3'-mir19プライマーによる増幅産物
 C: C-20-3プライマーによる増幅産物

考察

ゲノムの遺伝子をクローニングするには通常、コスミドやファージなどを用いて作製したゲノムDNAライブラリを、当該遺伝子のcDNAあるいは既にクローニングされている他種生物の遺伝子をプローブとしてブランクハイブリダイゼーション法またはコロニーハイブリダイゼーション法でスクリーニングすることによって行なわれる。しかし、単一のゲノム中に含まれる遺伝子が1個しかないような、いわゆるシングルロカスジーンでは、コスミドで10から40kbp、ファージで9から23kbpといわれるインサートサイズで約30億塩基対といわれるウマの全ゲノムをカバーして1個の陽性クローンを得るためには、少なくともおよそ7000クローン（コスミド）から300000クローン（ファージ）を一度にスクリーニングする必要がある。さらに、目的の遺伝子領域を確実にクローニングするためには、重複する複数のクローンが必要であり数倍以上のクローンが必要となる。一方、ヒトCYP17遺伝子は8つのエクソンと7つのイントロンからなり、エクソンIからエクソンVIIIまでのアミノ酸コード領域における7つのイントロンを合計した総延長は塩基数にして8つのエクソンを合計した総延長のおよそ2倍であり、エクソン部分のみの配列からなるcDNAをプローブとしてゲノムDNAライブラリをスクリーニングすることは、本遺伝子のスクリーニングにおいては効率的でない可能性が示唆された。また、ラット、マウス等、ヒト以外の動物種においてもCYP17遺伝子の構造が報告されているが、これらにおいてもイントロン部分が過半を占めている。イントロンの塩基配列は、タンパクとして発現するエクソン部分の塩基配列とは異なり、進化の過程で各動物種に特異的な変異を蓄積していることから、イントロンが過半を占めるCYP17遺伝子において他の動物種のCYP17遺伝子をプローブとしてウマCYP17遺伝子をクローニングすることはcDNAを利用する場合と変わらない困難さを伴うものと考えられた。

これらのことから、ウマゲノムのCYP17遺伝子の構造を解明する手段としてゲノ

ムDNAライブラリをスクリーニングする代わりにcDNAの塩基配列に基づいてプライマーを設計し、ウマゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅を行うことを考えた。前述のようにヒトCYP17遺伝子は8つのエクソンと7つのイントロンからなり、相互の移行部は一般にドナー、アクセプターと呼ばれるRNAスプライシングのシグナル配列となっている。既に報告されているCYP17 cDNAの塩基配列のなかで、ウマCYP17 cDNAとの間で塩基配列の相同性が最も高かったヒトのCYP17遺伝子構造に基づいて、ウマCYP17においても同じ位置にイントロンが挿入されているものと仮定して複数のプライマーを設計し、イントロンを含むウマゲノムDNAの断片を増幅しようと試みた。

得られたPCR産物をクローニングして塩基配列を決定したところ、cDNAの塩基配列をほぼカバーする数種のクローンを得ることができたので、これらの塩基配列から重複部分を除いてウマCYP17遺伝子を再構築した。再構築されたウマCYP17遺伝子はエクソンIからエクソンVIIIまで37塩基の5'-非翻訳領域を含めて6217塩基対であった。また、各エクソンからイントロンに移行する部分はヒトCYP17遺伝子と同じ位置であり、エクソン/イントロンの移行部はすべて典型的なドナー/アクセプター配列となっていた。これらのことから、ウマCYP17遺伝子は構造的にヒトCYP17遺伝子と大変よく似ていることが示された。事実、各エクソンの塩基配列は76.5から89.3%、イントロンでも53.8から73.7%の相同性が認められ、CYP17遺伝子は動物種を越えて保存性の高い遺伝子であることが示された(表4-3-2)。

ヒトではCYP17遺伝子のA、DおよびF、3つのイントロンに散在性反復DNA配列であるAlu配列(Jurka and Smith, 1988)を含むが、ウマCYP17遺伝子ではそのような構造は認められなかった。しかしながら、ウマCYP17遺伝子のイントロンCにはHindIII切断サイトの前後に72塩基の配列が直列に繰り返していた。この配列は最近発見され、すべての哺乳類に分布するとされているMIR (Mammalian-wide Interspersed Repeat) と呼ばれる繰り返し配列(Jurka, Zietkewitz *et al.*, 1995)と非

常に類似していた。MIRはヒトの*Alu*に匹敵するコピー数を持つとされることから、*Alu*-PCRのようにゲノムDNAを多元的に増幅することが可能であると考えられた (Smit and Riggs, 1995)。そこでこの部分の配列の一部をプライマーとしてゲノムDNAのPCRを試みたところ2kbp以下の比較的小さなPCR産物からなる多数のバンドが検出され、この配列がウマのゲノム中に多数存在し、散在性反復配列としてさまざまな遺伝子に含まれている可能性が示唆された。

小括

ウマ*CYP17*遺伝子のエクソン/イントロン構造と、各イントロンの塩基配列を明らかにするために、ウマゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅し、イントロンを含む複数のゲノム遺伝子の配列をPCR増幅した。塩基配列を決定したところ、*CYP17*遺伝子のエクソンの数はヒトと同じ8個であり、エクソン1から8までの長さは6217塩基対だった。また、各PCRクローンの重複部分がイントロンも含めて必ず一致したことから、ヒトの場合と同様ウマ*CYP17*遺伝子もゲノム中に一座位のみ存在することが示唆された。ウマイントロンCには72塩基対の配列が制限酵素*Hind* IIIの認識配列を挟んで直列に繰り返していた。この繰り返し配列は哺乳動物に広く存在するとされるMammalian-wide Interspersed Repeat (MIR)とよく似ていた。MIR様反復配列部分を使ってプライマーを設計しウマゲノムDNAをPCR増幅すると、多数のバンドが増幅されたことから、ウマゲノム中にはMIR類似の配列が多数含まれていることが推察された。

第五章 ウマ精巢 3β -水酸化ステロイド脱水素酵素
／ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ 異性化酵素遺伝子mRNAの分子
クローニング

はじめに

本章では、ウマ性腺組織で発現するステロイド代謝酵素mRNAをクローニングするための二つ目の試み、すなわち 3β -水酸化ステロイド脱水素酵素/ $\Delta 5 \rightarrow \Delta 4$ 異性化酵素 (3β -hydroysteroid dehydrogenase[EC 1.1.1.145] / $\Delta 5 \rightarrow \Delta 4$ isomerase[EC 5.3.3.1]: 3β -HSD, 遺伝子名の表記は*HSD3B*) 遺伝子mRNAのクローニングについて述べる。

3β -HSDは種々の哺乳動物においてステロイド産生組織に最も共通に存在する酵素であり、 $\Delta 5$ - 3β -水酸化プレグネン類および $\Delta 5$ - 3β -水酸化アンドロステンといったステロイドホルモンの前駆体をプロゲステロン, 17α -水酸化プロゲステロン, $\Delta 4$ -アンドロステンジオンおよびテストステロンといった $\Delta 4$ -3-ケトステロイドに代謝する酵素である (図5-1-1)。 3β -HSDはこのほかにも 3β - 5α -水酸化アンドロスタン類およ

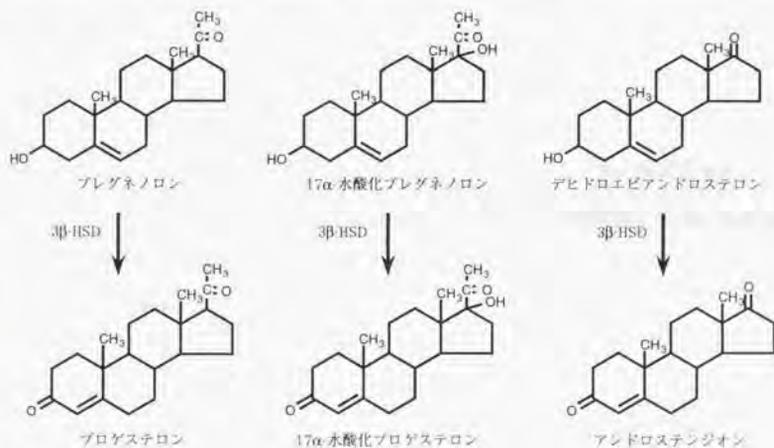


図5-1-1 3β -HSDの酵素活性

び 3 -ケト- 5α -水酸化アンドロスタン類の相互変換にも関与している(Lorence, Murry *et al.*, 1990)。哺乳動物における多くのステロイドホルモンが $\Delta 4$ -3-ケトステロイドで

あるか、またはそれを經由して合成されることから、 3β -HSDは古典的なステロイド産生組織には必ず存在すると考えられ、ステロイド産生細胞の組織化学、細胞化学的分子マーカーとして利用されている。

また、 3β -HSDの発現は非ステロイド産生組織である皮膚などを含む広い分布を示すことがわかっている。ヒトおよび齧歯類では、*HSD3B* mRNAには副腎、性腺、胎盤、肝臓および皮膚といった組織によって異なるタイプのmRNAが存在することが知られており、*HSD3B*遺伝子はmultiple gene familyを形成しているとされる。これらの 3β -HSDファミリーのうち大多数がNAD⁺依存型の 3β -水酸化/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -異性化反応を触媒するのに対し、いくつかのタイプではNADPH依存型の3-ケトステロイド還元酵素として作用する。

ウマのステロイド産生機構、特に 3β -HSDを含むウマのステロイド合成酵素に関しては、免疫組織学的な検索および抽出した酵素の活性測定などを除けば、分子生物学的な取り組みはごく限られた研究者によってのみ行われている。このため妊娠期の特徴的なステロイド産生などに関しても多くの研究課題が残されている。ウマの妊娠中期から後期にかけて、胎子の性別に関係なく胎子性腺が肥大化することが知られており、この時期の胎子性腺は高いレベルのエストロゲン前駆物質を産生しているとされている(Raesside, Liptrap *et al.*, 1973)。そこで、本章においては、この過形成期にある胎子性腺における*HSD3B* mRNAの発現を調べ、胎子性腺のステロイド合成能を評価することを試みた。

材料と方法

mRNAの調製とcDNA合成

27か月齢の雄ウマ（サラブレッド種）を麻酔下で去勢し、莖膜を除去した精巣組織を1cm角に細断して直ちに液体窒素中で急速冷凍した。冷凍した精巣組織はRNA抽出時まで-80℃で保存した。ウマ精巣からの総RNA抽出はグアニジン/塩化セシウム超遠心分離法により行った。ポリA鎖を持つRNA画分の精製にはオリゴ(dT)-セルロースタイプ3（Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes）を、二本鎖cDNAの合成にはスーパースクリプトIIプレアンプリフィケーションシステム（GIBCO BRL, Bethesda）を使用した。

合成酵素連鎖反応（PCR）

cDNA断片のPCR増幅は*Taq PLUS* DNA polymerase（Stratagene, La Jolla）を使用して行った。プライマーの設計はヒト（Luu-The, Lachance *et al.*, 1989; Rhéaume, Lachance *et al.*, 1991）およびウシ（Zhao, Simard *et al.*, 1989）*HSD3B*の塩基配列を利用して行ったが、その配列は次の通りである：

3βF2-EB 5'-GAATTCAATGTGAAAGGATCCCAGCTCCTGTTAGAGG-3'

3βR1-EB 5'-GAATTCGGATCCAGGGCCCTCAAGGCCAGAATGTGGG-3'

反応は100μlの反応液中で行い、温度サイクルは95℃4分の変性ののち、95℃1分、55℃2分、72℃3分のサイクルを30回繰返し、最後に72℃7分の伸長時間を設けた。PCR増幅産物の分子量はアガロースゲル電気泳動によって確認した。

PCR増幅断片のクローニング

PCR増幅断片の大きさを1%アガロースゲル電気泳動で確認した後、相当するバンドをアガロースゲルから切り出し、ジーン・クリーンIIキット（BIO 101, Inc., La

Jolla) を使用して精製した。精製したPCR増幅断片をプラスミドベクターpCR2.1 (Original TA cloning kit; Invitrogen, Carlsbad) に挿入し、このプラスミドDNAを用いて大腸菌XL-1 Blue MRF⁺ 株 (Stratagene, La Jolla) を形質転換した。形質転換体はIPTGおよびX-galを含むアンピシリン (50 µg/ml) を加えたLB培地上でコロニーの色によってインサートの有無を判別した。

ウマ精巢cDNAライブラリ

ウマ精巢cDNAライブラリは第二章で作製したものを使用した。すなわち、ウマ精巢から抽出したポリA鎖を持つRNA画分5µgをジエチルピロカーボネート (DEPC; Sigma Chemicals Co., St. Louis) 処理水に溶解し、これを鋳型としてcDNA Synthesis System (アマシャム(株), 東京) を用いて二本鎖のcDNAを合成した。合成した二本鎖cDNAは3つの制限酵素サイトを持つ*EcoRI*-*NotI*-*BamHI*アダプター (宝酒造(株), 京都) と結合させ、T4ポリヌクレオチドキナーゼ (ベーリンガーマンハイム(株), 東京) で5'末端のリン酸化を行ったのち、制限酵素*EcoRI*であらかじめ切断したλZAP IIファージアーム (Stratagene, La Jolla) に結合した。このDNAをGigapack II Gold Packaging Extract (Stratagene, La Jolla) を用いてλファージ粒子にパッケージした。

cDNAファージライブラリのスクリーニング

ウマ精巢cDNAライブラリのスクリーニングにはプローブとしてPCR増幅断片のプラスミドクローンを用い、Gene Images Non-Radioactive Labeling and Detection System (アマシャム(株), 東京) により非放射性標識および検出を行った。検出の結果、陽性となったクローンについては個別にプラスミドベクターpBluescriptのインサートとして切り出し、塩基配列の決定を行った。

塩基配列の決定およびコンピュータ解析

プラスミドDNAの塩基配列の決定はSangerのジデオキシ法を応用したA.L.F.全自動DNAシーケンサー (ファルマシアバイオテック(株), 東京) を用い, 蛍光標識プライマーとして宝酒造のM4およびRV-Mを, 酵素反応系としてSequiTherm Long-Read Cycle Sequencing Kit (Epicentre Technologies, Madison) を用いた。得られた塩基配列データはマッキントッシュパーソナルコンピュータ用の塩基配列ソフトウェア, DNASIS for Macintosh (日立ソフトウェアエンジニアリング(株), 横浜) を用いて統合するとともに, 他種動物などとの比較解析に使用した。

ノザン解析

前述の精巢のほか, 15歳のサラブレッド種雌馬(妊娠125日) から剖検時に副腎, 黄体, 腎臓, 肝臓および筋肉を採取し, 各組織から常法により抽出した総RNAを用いてノザンプロットを行った。各組織の総RNA 20 μ gを1.0%アガロース 3-[N-モルホリノ]-プロパンスルホン酸 (MOPS-ホルムアミド-ホルマリンゲル中で電気泳動により分離したのち, 荷電ナイロン膜 (HyBond N⁺; アマシャム(株), 東京) に転写した。検出には本章で得た*HSD3B* cDNAクローンのインサートを切り出して [α -³²P]dCTPで放射性ラベルし, これをプローブとして使用した。

結果

(1) ウマ精巢HSD3B cDNAのPCR増幅

ウマ精巢mRNAを精製し、逆転写反応によりcDNAライブラリを構築した。さらに、ヒト β -HSDの塩基配列に特異的なプライマーを用いてPCR増幅を行うことによって約430塩基対のPCR増幅断片が得られた(図5-3-1)。この断片をアガロースゲルから切り出して精製し、プラスミドベクターpCR2.1に組み込んだ。このPCRクローンの塩基配列を決定したところ437塩基対あり、塩基配列から推定されるアミノ酸配列は図

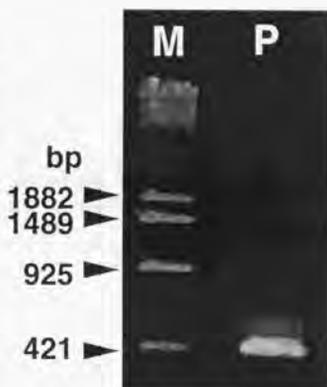


図5-3-1 PCR産物の電気泳動結果

primer 3βF2-EB→		18		27		36		45		54							
GAA	TTC	AAT	GTG	AAA	GGA	TCC	CAG	CTC	CTG	TTA	GAG	GTC	TGT	TCC	CAG	GCT	AGC
Glu	Phe	Asn	Val	Lys	Gly	Ser	Gln	Leu	Leu	Leu	Glu	Ala	Cys	Ser	Gln	Ala	Ser
		63		72		81		90		99		108					
GTG	CCA	ATC	TTC	ATC	TAC	ACC	AGC	TCC	GTA	GCG	GTG	GCT	GGG	CCC	AAC	TCC	TAC
Val	Pro	Ile	Phe	Ile	Tyr	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Gly	Pro	Asn	Ser	Tyr
		117		126		135		144		153		162					
AGG	GAG	ATC	ATC	CAG	AAT	GGC	CAT	GAA	GAA	GCA	CAT	CTC	GAA	ACA	AAA	TGG	TCC
Arg	Glu	Ile	Ile	Gln	Asn	Gly	His	Glu	Glu	Ala	His	Leu	Glu	Thr	Lys	Trp	Ser
		171		180		189		198		207		216					
TCT	CCA	TAC	CCA	TAC	AGC	AAA	AAG	CTT	GCT	GAG	AAG	GCT	GTG	CTG	GCA	GCT	AAT
Ser	Pro	Tyr	Pro	Tyr	Ser	Lys	Lys	Leu	Ala	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Ala	Ala	Asn
		225		234		243		252		261		270					
GGG	TTG	CCT	CTT	AAA	AAT	GCT	GGC	ACC	TTA	TAC	ACT	TGT	GCC	TTA	AGG	CCC	ATG
Gly	Leu	Pro	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Thr	Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Met
		279		288		297		306		315		324					
TTT	ATC	TAT	GGG	GAA	GGA	AGC	CCA	ACC	CTT	TAT	TAC	CTT	ATG	CAT	GAG	GGC	CTG
Phe	Ile	Tyr	Gly	Glu	Gly	Ser	Pro	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Met	His	Glu	Gly	Leu
		333		342		351		360		369		378					
AAC	AAC	AAT	GGC	ATC	CTG	ACA	CAC	AAC	TGC	AAG	TTC	TCC	AGA	GCC	AAC	CCA	GTC
Asn	Asn	Asn	Gly	Ile	Leu	Thr	His	Asn	Cys	Lys	Phe	Ser	Arg	Ala	Asn	Pro	Val
		387		396		405		414		423		432					
TAT	GTT	GGC	AAC	ATA	GCC	TGG	GTC	CAC	ATT	CTG	GCC	TTG	AGG	GCC	CTG	GAT	CCG
Tyr	Val	Gly	Asn	Ile	Ala	Trp	Ala	His	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Ala	Leu	Asp	Pro

AAT

← primer 3βR1-EB

図5-3-2 PCR産物の塩基配列および推定されるアミノ酸配列

5-3-2に示した。図中、プライマー部分の塩基配列および同部の色違いで示したアミノ酸配列は制限酵素認識部位を組み込んであるため翻訳と一致しないところもある。

	ctgaactacttgatctctcttttttagctctctccagggtca	41
	ctctctaataccaatetgcttgctgctgtttttctggttcctggcgagcaattcttggtactcaggtttacc	112
ATG GCT GGG TGG AGC TGC CTT GTG ACC GGA CCA GGA GGC TTT CTG GGT CAG AGG	166	
Met Ala Gly Trp Ser Cys Leu Val Thr Gly Ala Gly Gly Phe Leu Gly Gln Arg	18	
ATT GTC CGC TTG CTG GTG GAG GAG AAG GAG GTA CAG GAG ATC AGA GCA CTG GAC	220	
Ile Val Arg Leu Leu Val Glu Glu Lys Glu Val Gln Glu Ile Arg Ala Leu Asp	36	
AAA GTC TTC AGA CCA GAA TTG CGG GAA GAG TTT TCC AAA CTC CAG AGC AAG GTC	274	
Lys Val Phe Arg Pro Glu Leu Arg Glu Glu Phe Ser Lys Leu Gln Ser Lys Val	54	
AAG CTG ACC GTG CTG GAG GCA GAC ATT CTG GAT GAG CAG TTC CTG AAG AGA GCT	328	
Lys Leu Thr Val Leu Glu Gly Asp Ile Leu Asp Gln Gln Phe Leu Lys Arg Ala	72	
TGC CAG GGC GCC TGG GCT GTC ATT CAC ACC GCC TCT ATC ATC GAC GTC ACC AAC	382	
Cys Gln Gly Ala Ser Ala Val Ile His Thr Ala Ser Ile Ile Asp Val Thr Asn	90	
CTC TTT AAC CCA CAG GTC ACC ATG AAT GTC AAT GTG GAA GGT ACC CAG CTC CTA	436	
Leu Phe Asn Pro Gln Val Thr Met Asn Val Asn Val Glu Gly Thr Gln Leu Leu	108	
TTG GAG GCC TGT TCC CAG GCT AGC GTG CCA ATC TTC ATC TAC ACC AGC TTC GTA	490	
Leu Glu Ala Cys Ser Gln Ala Ser Val Pro Ile Phe Ile Tyr Thr Ser Ser Val	126	
GGG GTG GCT GGG CCC AAC TCC TAC AGG GAG ATC ATC CAG AAT GGC CAT GAA GAA	544	
Ala Val Ala Gly Pro Asn Ser Tyr Arg Glu Ile Ile Gln Asn Gly His Glu Ile	144	
GCA CAT CTC GAA ACA AAA TGG TCC TCT CCA TAC CCA TAC AGC AAA AAG CTT GCT	598	
Ala His Leu Glu Thr Lys Trp Ser Ser Pro Tyr Pro Tyr Ser Lys Lys Leu Ala	162	
GAG AAG GCT GTG CTG GCA GCT AAT GGG TTG CCT CTT AAA AAT GGT GGC ACC TTA	652	
Glu Lys Ala Val Leu Ala Ala Asn Gly Leu Pro Leu Lys Asn Gly Gly Thr Leu	180	
TAC ACT TGT GCC TTA AGG CCC ATG TTT ATC TAT GGG GAA GGA AGC CCA ACC CTT	706	
Tyr Thr Cys Ala Leu Arg Pro Met Phe Ile Tyr Gly Glu Gly Ser Pro Thr Tyr	198	
TAT TAC CTT ATG CAT GAG GGC CTG AAC AAC AAT GGC ATC CTG ACA CAC AAC TGC	760	
Tyr Tyr Leu Met His Glu Gly Leu Asn Asn Asn Gly Ile Leu Thr His Asn Cys	216	
AAG TTC TCC AGA GCC AAC CCA GTC TAT GTT GGC AAC ATG GCC TGG GCC CAC ATT	814	
Lys Phe Ser Arg Ala Asn Pro Val Tyr Val Gly Asn Ile Ala Trp Ala His Ile	234	
ATG GCC TTG AGG GCC CTG AGG GAC CCC AAG AAG GCC CCA AGC ATC CAA GGA CAG	868	
Met Ala Leu Arg Ala Leu Arg Asp Pro Lys Lys Ala Pro Ser Ile Gln Gly Gln	252	
TTX TAC TAC ATC TCA GAT GAC ACA CCT CCC CAA AGC TAT GAT GAC TTA ACT TAC	922	
Phe Tyr Tyr Ile Ser Asp Asp Thr Pro Pro Gln Ser Tyr Asp Asp Leu Thr Tyr	270	
ACT TTG AGC AAA AAG TGG GGC TTC TGC CTT GAT TCC AGA ATG AGA CTT CCC ATG	976	
Thr Leu Ser Lys Lys Trp Gly Phe Cys Leu Asp Ser Arg Met Arg Leu Pro Ile	288	
TTT CTG AAG TAC TGG CTT GCC TTC CTG CTG GAA ATA GTG AGC TTC CTG CTC AST	1030	
Phe Leu Lys Tyr Trp Leu Ala Phe Leu Leu Glu Ile Val Ser Phe Leu Leu Ser	306	
CCA ATT TAC AAA TAT CGA CCT CCC TTC GAC CGC CAC CTA GTG ACA TGG CAA AAC	1084	
Pro Ile Tyr Lys Tyr Arg Pro Pro Phe Asp Arg His Leu Val Thr Trp Gln Asn	324	
AGT GTT TTT ACC TTC TCC TAT AAG AAA GCT CAG CGA GAT ATG GGA TAT GAG CCG	1138	
Ser Val Phe Thr Phe Ser Tyr Lys Lys Ala Gln Arg Asp Met Gly Tyr Glu Pro	342	
CTC TTC AGC TGG GAG GAA GCC AAG AAG AGA ACC ACT GAG TGG ATC GGC CCC CTG	1192	
Leu Phe Ser Trp Glu Glu Ala Lys Lys Arg Thr Thr Glu Trp Ile Asp Ala Leu	360	
GTA GAA CCG CAC CAG GAG GCC CTG AAA ACA AAG ACT CTC TGA tetacaggtgacatg	1251	
Val Glu Pro His Gln Ala Leu Lys Thr Lys Thr Leu ***	373	
gatgggtagttdaggagatgctgctgagactctccctctctgtcttcaaacagcaaataccatgagcaca	1322	
gccagatcctactgcctctcttcaacaagatgccacggttatgctctctcttgccactagaaactctc	1393	
ccagtcactcgcgcagccagaatctctgcccctaccacactccagaggacagacaagatgatctcgtgca	1464	
gctgtggcaaccaagctctgagtctgctgattctgagctcttcaggcctcttttaacttagagttttgctg	1535	
ttagttcccgctctcttctgtaaatgcaaaagcaattctcatctctttaaasaattctcatctactcagacagc	1606	
tcaatgaaagaatataaatgttttactgcctaaactgctaactg	1651	

図5-3-3 ウマHSD3B cDNAの塩基配列と推定されるアミノ酸配列

(2) cDNAライブラリのスクリーニング

次に、ウマ精巢のλZAP II ファージcDNAライブラリをこの増幅断片をプローブとしてスクリーニングしたところ、約10万個のブランクから20個の強陽性クローンを検出した。これらの中から完全なアミノ酸コード領域を含むクローンが2個同定されるまで、各クローンの塩基配列を決定した。その結果、ウマ精巢で発現していた *HSD3B* cDNA のオープンリーディングフレームは、ヒト type II 3β-HSD より1残基長くヒト type I 3β-HSD やウシの3β-HSD と同じ373残基のアミノ酸配列をコードする1122塩基対からなること、オープンリーディングフレームの終止コドンから典型的なポリA鎖付加シグナル(Chen, MacDonald *et al.*, 1995)であるとされる「AATAAA」までの3'非翻訳領域は385塩基対からなること、112塩基対の5'非翻訳領域を含めたクローン全体の延長は1651塩基対であることが示された(図5-3-3)。

(3) ウマ β -HSDアミノ酸配列と種間比較

ウマHSD3B cDNAから予想されたアミノ酸配列をウシおよびヒトの β -HSDアミノ酸配列と比較した。図5-3-4にはウマ β -HSDアミノ酸配列をウシ、ヒトtype Iおよびヒトtype IIと並べて示した。ウマ β -HSDと一致するアミノ酸残基についてはダッシュ(-)で表示した。

	10	20	30	40	50	60
Equine	MAGWSCLVTG	AGGFLGQRIV	RLLVEEKEVQ	EIRALDKVFR	PELREEFSKL	QSKVKLTVLE
Bovine	-----	G-----	I C-----	-V-----	-V-----	-I-----L
Human I	-T-----	I-----	-K--LK--	-V--A-G--	-----	-N-T-----
Human II	M-----	L-----	-----	-L-----	-----	-NRT-----
	70	80	90	100	110	120
Equine	GDILDEQFLK	RACQGASAVI	HTASIIDVTN	LFNPQVTMNV	NVEGTQLLLE	ACSQASVPVF
Bovine	-----C--	G--T-V--	-----V--R-	AVPRETI--	--K-----	--V-----V-
Human I	-----P--	--DV-VI--	--C--FG	VTHRESI--	--K-----	--V-----V-
Human II	-----P--	--DV-V--	--C--FG	VTHRESI--	--K-----	--V-----V-
	130	140	150	160	170	180
Equine	IYTSSVAVAG	PNSYREIIQN	GHEEAHLETK	WSSPYPYSKK	LAEKAVLAAN	GLPLKNGGTL
Bovine	-H--TIE--	-----D	-R--E-H-SA	-----	-----	--WA-----
Human I	-----IE--	--K-----	--EP--NT	-PA--H--	-----	--WN-----
Human II	-----IE--	--K-----	--EP--NT	-PT-----	-----	--WN--D--
	190	200	210	220	230	240
Equine	YTCALRPMFI	YGEQSPTLYY	LMHEGLNNGN	ILTHNCKFSR	ANPVYVGNIA	WAHIMALRAL
Bovine	-----Y--	-----F-SA	Y--GA-----	--NH-----	V-----V--	-----L-----
Human I	-----Y--	-----RF-SA	SIN-A-----	--SSVG--T	V-----V--	-----L-----
Human II	-----TY--	-----GPF-SA	SIN-A-----	--SSVG--T	V-----V--	-----L-----
	250	260	270	280	290	300
Equine	RDPKKAPSIQ	GQFYIISDDT	PPQSYDDLTY	TLSKKKGFL	DSRMLPIFL	KYWLAFLEI
Bovine	-----V-N--	-----H--	-----N--	-----E--	-----S--	-----Q--
Human I	Q-----R	-----H--	-----N-N-	-----EF-LR-	-----WSF-LS-	M--G--
Human II	-----VR	-----H--	-----N-N-	I--EF-LR-	-----WS--LT-	M--G--V
	310	320	330	340	350	360
Equine	VSFLLSPIYK	YRPPFDRHLV	TWQNSVFTFS	YKKAQRDMGY	EPLFSWEEAK	KRTTEWIDAL
Bovine	-----R--	-----N-C-N--	-----LS--	-----L--	-----YT--	QK-K--GS-
Human I	-----R--T	-----N--I-	-----LS--	-----LA-	K--Y--	QK-V--VGS-
Human II	-----S--Q	-----N--T-	-----LS--	-----LA-	K--Y--	QK-V--VGS-
	370					
Equine	VEPHQEALKT	KTL				
Bovine	-KQ-K-T--	--IH				
Human I	-DR-K-T--S	--Q				
Human II	-DR-K-T--S	--Q				

図5-3-4 ウマ β -HSDの予想されるアミノ酸配列と活性にかかわると考えられる配列

およびヒトtype IIとともに並べて示した。ウマ β -HSDと一致するアミノ酸残基についてはダッシュ(-)で表示した。

(4) ウマ3 β -HSDの配列比較

ウマ3 β -HSDはcDNAの塩基配列、アミノ酸配列ともウシおよび他の動物種、とよく一致していた(表5-3-1)。特にウシおよびヒトの配列との相同性はラットのものと比較して5から10%程度高い数値を示した。

表5-3-1 ウマ3 β -HSDと他の動物種との配列の比較

Species	Sequence Similarity (%)	
	Amino Acid	Nucleotide
Cattle	79.8	79.7
Human type I	74.5	78.3
Human type II	74.5	77.9
Rat type I	69.6	67.9
Rat type II	68.8	68.2

(5) *HSD3B*のノザンプロット

ノザン解析の結果、*HSD3B* mRNAは18S rRNAとはほぼ一致する場所に検出された。また、副腎、精巣および黄体といった古典的なステロイド産生組織に強く発現しており、肝臓、腎臓、そして筋肉には発現が認められなかった(図5-3-5)。

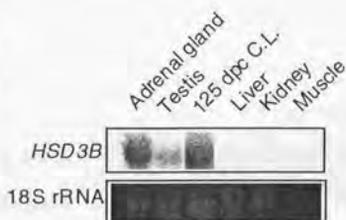


図5-3-5 ウマ*HSD3B*のノザンプロット

考察

ヒト、ラットおよびマウスにおいて*HSD3B* mRNAには複数のタイプ (isoform) が存在する。これらのcDNAは同定された順序に従いtype I, type IIのようにローマ数字で表されるが、動物種が違えば同じ数字が当てあっても発現部位あるいは基質特異性や酵素活性が同じであるとは限らない。ヒトtype I *HSD3B* cDNAはまず胎盤から分離されたが、胎盤のほかには皮膚および乳腺で発現する。これに対してヒトtype II *HSD3B*は副腎および性腺で発現する。一方、マウスtype I 3 β -HSDは副腎、性腺、胎盤で発現するのに対してマウスtype IIおよびtype III 3 β -HSDは肝臓と腎臓で発現する。これらの酵素isoformは相互に異なる組織特異的発現パターンを示すことから、multiple gene familyであると考えられている。ヒトtype Iおよびtype II 3 β -HSDの連鎖解析から、この二つのisoformに対する遺伝子は第1染色体にクラスターを形成していることが示された(McBride, Russell *et al.*, 1995)。また、細菌類における3 β -HSD isoformの中にはNAD⁺依存型3 β -脱水素/ Δ 5- Δ 4異性化酵素作用よりもNADPH依存型3-ケトステロイド還元酵素としての作用を示す一群の酵素が含まれている(Payne, Abbaszade *et al.*, 1997)。すなわち、ラットtype III, マウスtype IVおよびV, ハムスターtype III 3 β -HSDがそれに該当し、肝臓および腎臓で発現して3-ケトステロイド還元酵素として作用する(Abbaszade, Clarke *et al.*, 1995)。

本章では、ウマ精巣に発現している*HSD3B* mRNAに対するcDNAをクローニングし、塩基配列を明らかにした。ウマ精巣*HSD3B* mRNAの塩基配列はヒトtype Iおよびtype II *HSD3B*, ウシ*HSD3B*のいずれとも高い相同性を有していた。さらに、他種動物の3 β -HSDアミノ酸配列とウマ精巣*HSD3B* mRNAの塩基配列から推測されるウマ精巣3 β -HSDのアミノ酸配列を並べて比較することにより、この酵素蛋白質が他の3 β -HSDと共通の構造を有していることが明かとなった(図5-34)。すなわち、カルボキシル末端の膜貫通ドメイン(Mendonça, Russell *et al.*, 1994)と考えられる26ア

ミノ酸残基 (aa284-309), 疎水性ポケット(Scrutton, Berry *et al.*, 1990)に認められたNAD⁺結合型酵素に保存されているアミノ酸10から16のグリシンリッチな配列 (Gly-X-X-Gly-X-X-Gly) が認められた。さらに Asp36 残基は, NADH よりも NADPH との結合性が高い3-ケト還元酵素作用を示すものを除くほとんどの3 β -HSD に共通であるとされる(Morel, Mébarki *et al.*, 1997)。また, ヒト type I 3 β -HSD の放射性同位元素を用いた基質結合阻害試験によって Gly251 から Lys275 までと, Asn176 から Arg186 までのペプチドが活性部位であり, His262 と Cys183 は酵素蛋白質の立体構造上近くに位置するものと推測されている(Thomas, Strickler *et al.*, 1992)。この構造はウマ精巣3 β -HSDにも認められ, 2カ所で認めた短鎖アルコール脱水素酵素の活性部位に共通のYXXXK配列 (Tyr155 から Lys159 および Tyr270 から Lys274) の一つはこの構造に含まれている(Thomas, Nash *et al.*, 1995)。これらのことから, 今回クローニングしたウマ精巣3 β -HSDは3 β -水酸化作用と Δ 5- Δ 4異性化作用の両方の反応を触媒するが, 3-ケトステロイドの還元作用はないものと考えられた。

HSD3B cDNAクローンをプローブとしたノザンプロット解析の結果, 18SリボソームRNAとはほぼ同じ大きさのRNAが古典的なステロイド産生組織である副腎, 精巣および黄体で発現しているのが検出された。これに対して肝臓, 筋肉, 腎臓での発現は認められなかった。ステロイド産生組織以外で発現する3 β -HSDの生理作用については様々な検討がなされているが, 今回のノザンプロット解析においては精巣や黄体, 副腎など, 本酵素遺伝子を大量に発現している典型的なステロイド産生組織を基準として検出したため, ウマにおいて細菌類にみられるような肝臓や腎臓などで今回クローニングした3 β -HSDそのものや作用の異なるアイソザイムが存在していたとしても量的に少なかったために検出されなかったという可能性は残される。これらの可能性については別途検討する必要があるだろう。

小括

ウマ精巢cDNAライブラリから*HSD3B* cDNAクローンを分離した。ヒトおよびウシの*HSD3B* cDNA塩基配列に特異的なプライマーを用いたPCR法によりウマ精巢cDNA断片を増幅し、増幅断片の塩基配列を他種哺乳動物のcDNAと比較して相同性を確認した。これをプローブとしてウマ精巢cDNAライブラリをスクリーニングし、1651塩基対のウマ*HSD3B* cDNAクローンを得た。ウマ精巢*HSD3B* cDNA塩基配列および推定されたアミノ酸配列は既知の哺乳動物の3 β -HSDの配列とよく一致していたが、アミノ酸配列の解析からこのHSD3B遺伝子のコードする3 β -HSDは3 β -水酸化ステロイドの脱水素反応および異性化反応を触媒し、3-ケトステロイドの還元反応は触媒しないものと考えられた。cDNAクローンをプローブとしてノザン解析を行ったところ、精巢、黄体、副腎といったステロイド産生組織において著明な発現が認められた。

第六章 ウマ精巣ステロイド芳香化酵素 (CYP19)

遺伝子の検索と部分的クローニング

はじめに

エストロゲン合成の最終段階は C_{19} アンドロゲンを基質としたA環の芳香化反応である。生体におけるステロイドの芳香化反応に関する研究は、古くはヒトの胎盤と雄ウマの精巣で行われていたという(Oh and Tamaoki, 1971)。雄ウマの精巣を使ってこうした研究が行われた背景には、雄ウマ精巣のアルコール抽出物からエストロゲン活性が検出され(Zondek, 1934)、その後の研究(Beall, 1940)によって、このエストロゲン活性は高濃度のエストロン (360 $\mu\text{g}/\text{kg}$) およびエストラジオール (210 $\mu\text{g}/\text{kg}$) に由来することと、これらの値が他のどの組織よりも高かったことなどがあった。成熟雄ウマの尿中に排泄されるエストロンやエストラジオールといったエストロゲンおよびその抱合体の量は妊娠雌ウマの尿中よりも多く、去勢後にはそれが大きく低下するという報告がある(Pigon, Lunaas *et al.*, 1961)。また、Baggettら(1959) (Baggett, Engel *et al.*, 1959)は放射性標識したテストステロンをウマ精巣ホモゲネートに添加することで、ウマ精巣がテストステロンをエストロゲンに代謝できることを実証し、Ohら(1973)はその活性が精巣ミクロソーム分画に局在することを示すに至り(Oh and Tamaoki, 1973)、性腺でのエストロゲン産生が雌に特異的な現象であるという考え方は捨てざるをえなくなった(Armstrong and Dorrington, 1977)。当然、ヒトを含む他の哺乳類動物種においても精巣でエストロゲンを産生するが、それらは一般に卵巣で生成されるよりはるかに少量であり、多量のエストロゲンを産生する雄ウマおよび雄ブタはむしろ例外的な存在である(Velle, 1966)。

ウマにおける精巣のエストロゲン産生細胞はこの時点では明らかではなかったが、精巣の主要な体細胞であるセルトリ細胞とライディッヒ細胞、二種類の細胞がこれらの活性を有すると考えられてきた。ヒトを始めとする腫瘍細胞を用いた初期の研究ではこれら二種類の細胞とも、それらに由来する腫瘍細胞でエストロゲン合成活性が認められるとする報告が散見されるものの、セルトリ細胞についてはプレバレー

ションによって結果が異なっていた(Armstrong and Dorrington, 1977)。そこで、前章までのノザンプロット解析によりCYP17および3 β -HSDという二つの酵素が存在することが示され、さらに17 β -HSDの作用によってテストステロンを産生していると考えられるウマの精巣において、アンドロゲンのみならずエストロゲンが産生されるために必要であると考えられるステロイド芳香化酵素 (CYP19) の発現の有無をRT-PCRを用いて検討した。

材料と方法

RNAの調製

精巢のRNA試料は前章までに使用したものと同一ものを使用した。

逆転写合成酵素連鎖反応 (RT-PCR)

各RNA試料からのステロイド芳香化酵素遺伝子 (*CYP19*) 断片のPCR増幅はMMLV逆転写酵素 (SuperScript II preamplification system; GIBCO BRL, Bethesda) による一本鎖cDNAへの逆転写反応およびGeneAmp PCR System 9600およびGeneAmp PCR Reagent (パーキンエルマー・ジャパン, 浦安) を使用したPCR増幅の二段階で行った。プライマーの設計はウマ*CYP19*遺伝子の塩基配列 (Choi, Simmen *et al.*, 1996; Albrecht, MacLeod *et al.*, 1997) を利用して行ったが、その配列は次の通りである:

arom-F 5'-GGAATTCGAGAAAGGCATCATATTTAACA-3'

arom-R 5'-GGAATTCCAAGAAATCTTAAAGAAGATG-3'

arom-F11 5'-GAATTCGCCTGAGATCAAGGAGCACAAGATG-3'

arom-F2 5'-GAGAAAGGCATCATATTTAACAATAA-3'

arom-R2 5'-GGAATTCCAAGAAATCTTAAAGAAGATGTTTG-3'

反応は100 μ lの反応液中で行い、温度サイクルは95 $^{\circ}$ C4分の変性のうち、95 $^{\circ}$ C1分、55 $^{\circ}$ C2分、72 $^{\circ}$ C3分のサイクルを30回繰返し、最後に72 $^{\circ}$ C7分の伸長時間を設けた。PCR増幅産物の分子量はアガロースゲル電気泳動によって確認した。

PCR増幅断片のクローニング

PCR増幅断片の大きさを1%アガロースゲル電気泳動で確認した後、相当するバンドをアガロースゲルから切り出し、ジーン・クリーンIIキット (BIO 101, Inc., La

Jolla) を使用して精製した。精製したPCR増幅断片をプラスミドベクターpGEM-T Easy (Promega, Madison) に挿入し, このプラスミドDNAを用いて大腸菌XL-1 Blue MRF⁺ (Stratagene, La Jolla) を形質転換した。形質転換体はIPTGおよびX-galを含むLB/アンピシリン (50 µg/ml) 培地上でコロニーの色によってインサートの有無を判別した。

塩基配列の決定とコンピューター分析

プラスミドインサートの塩基配列は, Sangerのジデオキシターミネーション法 (Sanger, Nicklen *et al.*, 1989) とFITCで蛍光ラベルしたプライマーを組み合わせたA.L.F.全自動DNAシーケンサー (ファルマシアバイオテック(株), 東京) を使用して決定した。得られた配列はマッキントッシュ用コンピューターソフトウェアパッケージ (DNASIS-Mac; 日立ソフトウェアエンジニアリング(株), 横浜) を使用して解析するとともにデータベース上の登録データと比較検討した。

結果

(1) 精巣におけるCYP19 mRNAの発現

副腎および精巣から抽出した総RNAを用いてRT-PCRを行った結果、CYP19のmRNAに由来するとみられる増幅産物は、arom-F2とarom-R (約350bp) およびarom-F11とarom-R2 (約750bp) の組合せで精巣試料からのみ確認された (図6-3-1)。

(2) ウマ精巣CYP19 mRNAの塩基配列

ウマ精巣の総RNA増幅されたPCR産物の塩基配列を決定したところ、プライマーarom-F2とarom-Rの組合せから得られた約350塩基対のPCR産物は351塩基対、プ

ライマーarom-F11とarom-R2の組合せから得られた約750塩基対のPCR産物は763塩基対だった。また、arom-F2とarom-Rの組合せから得られた351塩基対はarom-F11とarom-R2の組合せから得られた763塩基対の中に完全に含まれており、両者で重複する部分については塩基配列が完全に一致した (図6-3-2)。

この塩基配列を遺伝子データベースに登録されたデータと照合したところ、前者はコーネル大学のグループが報告しているもの(Albrecht, MacLeod *et al.*, 1997)と完全に一致した。また、後者に相当する配列はプライマーの設計時点では遺伝子データベースに公開されているデータが存在しなかったが、最近公開されたCYP19のふたつのcDNAクローン、すなわちアクセション番号AF031520およびAF031521で登録されているカナダのグループのデータ(Boerboom, Kerban *et al.*, 1997)と完全に一致

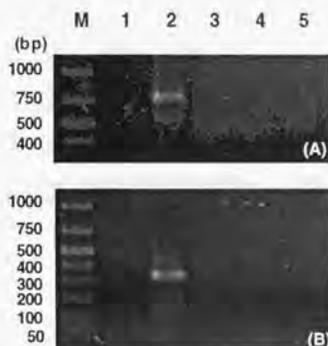


図6-3-1 CYP19 cDNAのPCR結果

M: Molecular Size Marker (50-1000 bp),

1: Adrenal Gland, 2: Testis, 3: Liver,

4: Kidney, 5: Muscle

A: arom-F11/arom-R, B: arom-F2/arom-R2

した。

AF031520	1	TTCCCTAACAG	CCGTGCTCA	TTAGCAAAAC	TCATCATCTT	CAAGAGTCCG	50
AF031520	51	GAAACTAGAA	GTGACCAGCA	GACTCAGGCC	TTTACAATTG	TTTCCCTTAG	100
aromF11/R2	1				GAA	TTCCCTTAG	13
AF031520	101	ATCAAGGAAC	ACAAGATGAT	TTTGGAAATG	CTAACCCTGA	TGCATATATA	150
aromF11/R2	14	ATCAAGGAGC	ACAAGATGAT	TTTGGAAATG	CTAACCCTGA	TGCATATATA	63
AF031520	151	CCTCACCAGC	ATGGTGCCCG	AAGTCATGCC	TGTGCGCCAC	TTGCCCATTC	200
aromF11/R2	64	CCTCACCAGC	ATGGTGCCCG	AAGTCATGCC	TGTGCGCCAC	TTGCCCATTC	113
AF031520	201	TGCTGCTCAC	TGGCTTCTTT	TTCTTTGTTT	GGAACTATGA	AGAAACATCC	250
aromF11/R2	114	TGCTGCTCAC	TGGCTTCTTT	TTCTTTGTTT	GGAACTATGA	AGAAACATCC	163
AF031520	251	TCAATACCAG	GCCCTGGCTA	TTGCAATGGA	ATCGGGCCCC	TCATTTCCCA	300
aromF11/R2	164	TCAATACCAG	GCCCTGGCTA	TTGCAATGGA	ATCGGGCCCC	TCATTTCCCA	213
AF031520	301	CCTCCGGTTC	CTGTGGATGG	GGCTTGGCAG	TGCCCTGCAAC	TACTACAAAC	350
aromF11/R2	214	CCTCCGGTTC	CTGTGGATGG	GGCTTGGCAG	TGCCCTGCAAC	TACTACAAAC	263
AF031520	351	AGATGTATGG	AGAATTCGTG	AGAGTCTGGG	TCAGTGGAGA	GGAAACCCTC	400
aromF11/R2	264	AGATGTATGG	AGAATTCGTG	AGAGTCTGGG	TCAGTGGAGA	GGAAACCCTC	313
AF031520	401	GTATTATGCA	AGTCCCTCAAG	TACCTTCCAC	ATCATGAAAC	AGCACTACTA	450
aromF11/R2	314	GTATTATGCA	AGTCCCTCAAG	TACCTTCCAC	ATCATGAAAC	AGCACTACTA	363
AF031520	451	CTCCTCCCGA	TTTGGCAGCA	CATTTGGGTT	GCAGTATATG	GGCATGCATG	500
aromF11/R2	364	CTCCTCCCGA	TTTGGCAGCA	CATTTGGGTT	GCAGTATATG	GGCATGCATG	413
aromF2/R	1					G	1
AF031520	501	AGAATGGCGT	CATATTTAAC	AATAACCAGG	CCGTCTGGAA	AGCTTTGGGG	550
aromF11/R2	414	AGAATGGCGT	CATATTTAAC	AATAACCAGG	CCGTCTGGAA	AGCTTTGGGG	463
aromF2/R	2	AGAATGGCGT	CATATTTAAC	AATAACCAGG	CCGTCTGGAA	AGCTTTGGGG	51
AF031520	551	CCTTTCTTTG	TAAAAGCTTT	GTCTGGCCCC	AGCCTTGGCC	GCATGGTGAC	600
aromF11/R2	464	CCTTTCTTTG	TAAAAGCTTT	GTCTGGCCCC	AGCCTTGGCC	GCATGGTGAC	513
aromF2/R	52	CCTTTCTTTG	TAAAAGCTTT	GTCTGGCCCC	AGCCTTGGCC	GCATGGTGAC	101
AF031520	601	AGTTTGTGTT	GAATCCGTCA	ACAAACCATCT	GGACAGGTTG	GACGAGGTCA	650
aromF11/R2	514	AGTTTGTGTT	GAATCCGTCA	ACAAACCATCT	GGACAGGTTG	GACGAGGTCA	563
aromF2/R	102	AGTTTGTGTT	GAATCCGTCA	ACAAACCATCT	GGACAGGTTG	GACGAGGTCA	151
AF031520	651	CCAATGCGTT	GGGCCATGTC	AACGTGTGTA	CCCTCATGCG	ACGTACCATG	700
aromF11/R2	564	CCAATGCGTT	GGGCCATGTC	AACGTGTGTA	CCCTCATGCG	ACGTACCATG	613
aromF2/R	152	CCAATGCGTT	GGGCCATGTC	AACGTGTGTA	CCCTCATGCG	ACGTACCATG	201
AF031520	701	CTGACGCTTT	CCAACACCTT	CTTCCCTBAGG	ATCCCTTTGG	ACGAGAAAAA	750
aromF11/R2	614	CTGACGCTTT	CCAACACCTT	CTTCCCTBAGG	ATCCCTTTGG	ACGAGAAAAA	663
aromF2/R	202	CTGACGCTTT	CCAACACCTT	CTTCCCTBAGG	ATCCCTTTGG	ACGAGAAAAA	251
AF031520	751	CATCGTGCCT	AAAATCCRAG	GTTATTTTGA	TGCATGGCAG	GCCTCTCTTA	800
aromF11/R2	664	CATCGTGCCT	AAAATCCRAG	GTTATTTTGA	TGCATGGCAG	GCCTCTCTTA	713
aromF2/R	252	CATCGTGCCT	AAAATCCRAG	GTTATTTTGA	TGCATGGCAG	GCCTCTCTTA	301
AF031520	801	TCAAACCAA	CATCTTCTTT	AAGATTCTTT	GGCTATCCAG	AAAGCETCAA	850
aromF11/R2	714	TCAAACCAA	CATCTTCTTT	AAGATTCTTT	GGAAATCC...	763
aromF2/R	302	TCAAACCAA	CATCTTCTTT	AAGATTCTTT	GGAAATCC...	351

図6-3-2 CYP19 PCR産物の塩基配列

AF031520 データベースに登録されたウマCYP19の塩基配列
aromF11/R2, aromF2/R 本章の検討で得られたPCR産物

考察

コレステロールを出発材料とするステロイドホルモンの代謝経路は多くの動物種に共通に存在し、おのおのの段階に関与する酵素の機能的、構造的な類似性は種を越えて保存されている。ステロイド産生組織ではその組織中に存在する基質と酵素の種類および発現量によって最終産物としてのステロイドホルモンが決定される。例えば、精巣のLeydig細胞においてはCYP11A1, CYP17, 3 β -HSDおよび17 β -HSDが発現しており、コレステロールを出発物質としてテストステロンを産生するすべての酵素が発現していると考えられる。著者は第二章および第五章においてウマ精巣からCYP17および3 β -HSD (HSD3B) のcDNAをクローニングしたが、さらに、ウマの精巣においてエストロゲンが合成されていることは過去の文献(Baggett, Engel *et al.*, 1959)からも明らかであり、ウマの精巣にはステロイド芳香化酵素(CYP19)が発現していると考えられてきた。実際、アンドロゲンからエストロゲンへの代謝に関する研究はウマの精巣を用いて行われてきたという経緯もある(Oh and Tamaoki, 1971)が、ウマ精巣におけるCYP19が単一の酵素蛋白質として存在することを証明されたのはここ10年ほどのことである(Silberzahn, Gaillard *et al.*, 1988; Eisenhauer, McCue *et al.*, 1994; Almadhidi, Seralini *et al.*, 1995)。

本研究の過程においても当初、RT-PCRのプライマー設計あるいは結果の評価にはAlbrechtら(1997)が報告した部分的な塩基配列を参照する以外に有効な方法はなかった(Albrecht, MacLeod *et al.*, 1997)。ところが、CYP19は発現する組織によって転写開始点が異なり、mRNAの塩基配列のうちアミノ酸配列に影響しない5'上流の塩基配列が異なる分子種が少なくとも二種類存在する(Choi, Collante *et al.*, 1997)ということも最近明らかとなっている。そこで、Albrechtら(1997)の設計した一对のプライマー配列をそのまま使用した場合と、Choiら(1997)が明らかにした二種類のクローンに共通の部分に上流側のプライマーを設計してAlbrechtら(1997)の下

流側プライマーと組合せて使用した場合の二種類の組合せでPCR増幅を行った。なお、Albrechtら(1997)の設計したプライマー対はそのまま使用するとプライマーダイマーを形成するため、プライマーの3'末端を延長したもの(arom-F2およびarom-R2)を新しく設計して使用した。

結果に示したとおり、ウマ精巣RNAからは約350塩基対(プライマーarom-F2およびarom-R2)と約750塩基対(プライマーarom-F11およびarom-R)の二種類の増幅産物が得られた。それらの塩基配列を決定したところ前者は351塩基対でAlbrechtら(1997)が報告している妊娠初期のウマの一次黄体由来のCYP19 mRNAの塩基配列データと完全に一致した。一方、後者は763塩基対で、GenBankに最近公開されたばかりのウマ卵巣由来のCYP19 mRNAの塩基配列データ(アクセシオンAF031520およびAF031521; Boerboom, Kerban *et al.*, 1997)と完全に一致した。また、333塩基の塩基配列は後者の749塩基対に完全に含まれる形で存在し、同一のmRNAについて増幅が行われたことが示された。これらのことから、特定の組織におけるウマCYP19遺伝子の発現状況を検索あるいは評価する方法として、今回設計したプライマーおよび増幅条件でRT-PCRを行うことは有効な手段であると考えられた。一方、副腎の試料からはいずれの組合せのプライマーによっても増幅産物が認められなかったことから、ウマのCYP19遺伝子は精巣では発現しているが、副腎では発現していないか、または発現していても非常に低いレベルであると考えられた。

今回のPCR増幅は二種類あるとされるCYP19 mRNA分子種についていずれについても増幅できる部位をプライマーとして選んで行ったため、精巣で発現しているCYP19 mRNAの分子種がどちらであったかを特定することはできない。二種のCYP19 mRNA分子種は他の動物種と同様、単一の遺伝子から異なる転写制御を受けて発現するとされている(Choi, Simmen *et al.*, 1996)が、今回雄ウマ精巣からPCRにより増幅された断片がいずれの分子種に属するのか、あるいは未知の分子種が存在

するのについては、転写開始点を見つけるためのCapSite PCRや5' RACEあるいはそれぞれの分子種に特異的なPCRを行うことによって、精巢で発現するCYP19 mRNA分子種を特定することが可能であると考えられる。このためのプライマー設計には本章のRT-PCRで得られた増幅産物の塩基配列が利用可能であり、さらに精巣内においてCYP19遺伝子を発現している細胞腫を特定するための*in situ*ハイブリダイゼーション用プローブとして利用することができる。この配列をプローブとして使用した場合には、前述の通り少なくとも既に報告されている二種類のCYP19 mRNA分子種のいずれも検出することが可能であり、ウマの他の組織におけるCYP19遺伝子の発現を検索するための一般的なプローブとしても利用可能であると思われる。

小括

アンドロゲンからエストロゲンへの代謝に必要な*CYP19*遺伝子が成熟雄ウマの精巣において発現していることをRT-PCR法により確認した。ウマ*CYP19*について、既報の部分的塩基配列を基にプライマーを設計し精巣の総RNAを鋳型としてRT-PCRを行った。設計通り長さの異なる二種類の組み合わせで増幅産物が得られたが、短い増幅産物は既報の塩基配列と一致した。また、設計時点で塩基配列未知の部分を含んでいた長い増幅産物は、その後に公開された完全長ウマ*CYP19* mRNAと塩基配列が一致し、同じ試料からは必ず両方の組み合わせで増幅産物が確認できた。このことから、本法によりウマの体組織における*CYP19*遺伝子の発現状況を特異的に検索することが可能であり、二種類の増幅産物を確認することで検出の信頼性が高まるものと考えられた。精巣のほか、副腎、肝臓、腎臓および筋肉からの検出も試みたが、*CYP19* mRNAの発現が検出されたのは精巣のみであった。

第七章 妊娠中期以降のウマ胎子-胎盤複合系
におけるステロイド代謝に関する検討

はじめに

妊娠期にウマの内分泌動態は極めて特異なパターンを示す(Ginther, 1992)。ひとつの特徴は妊娠初期における絨毛性の性腺刺激ホルモンであり、それに続く副黄体の形成とプロゲステロンの分泌である。さらに妊娠中期以降には胎子性腺が著しく肥大する(Cole, Hart *et al.*, 1933)とともに母体血中のエストロゲン濃度が著明に増加することが知られている(Nett, Holtan *et al.*, 1973)。また、一般に哺乳動物の妊娠中～後期において末梢血中プロゲステロン濃度は高く維持される(鎌田正晴, 青野敏博, 1995)。この循環血中のプロゲステロンは黄体および胎盤の双方またはどちらか一方から分泌されるが、妊娠後期のウマでは母体血中のプロゲステロン濃度が妊娠中～後期の長期間にわたり低い濃度で推移することが知られており(Holtan, Houghton *et al.*, 1991)、子宮静脈からも頸静脈からも検出できないレベルに低下し、胎盤側から胎子側に向かう臍帯静脈においてすら、プロゲステロン濃度は他のプロゲステンと比較して低値となることが知られている。この現象を説明するためにいくつかの仮説が提示されているが、いずれもウマの妊娠維持、特に妊娠後期においてプロゲステンが不要であるとの考え方に立ったものではない。むしろ母体血中に検出される各種の水酸化ステロイド化合物、特に5 α -プレグナン類で総称される水酸化プレグナン類の生成と、妊娠末期におけるこれらの顕著な上昇は、胎盤においてプロゲステンが活発に代謝されていることを裏付けていると考えられる(Chavatte, Holtan *et al.*, 1997)。第五章で遺伝子をクローニングした3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素(3 β -HSD)が各種水酸化プレグナン類の生成にかかわっているとする文献(Chavatte, Rossdale *et al.*, 1995)もあり、胎盤における本酵素遺伝子の発現を検討することは興味深い。

一方、ヒトを始めとするいくつかの哺乳動物では妊娠中に高い濃度のエストロゲンが血中に検出されることが知られているが、それらの生合成経路については動物種

ごとに同一ではなく、妊娠期間中のエストロゲン分泌の意義はそれぞれの動物種によって異なるものと考えられる。ウマではエストロンおよびエストラジオールに加えて、B環不飽和ステロイドであるエキリンやエキレニンといったウマに特異的なエストロゲンとその水酸化物、さらにそれらの抱合体が母体循環血中および尿中に検出されることが知られている(Ginther, 1992)。ウマにおけるこれらエストロゲンの生合成経路を明らかにすることは、ウマにおける妊娠中期以降のエストロゲン分泌の必要性および分泌されたエストロゲンの機能を考察するうえで重要である。Raeside (1978) はウマの臍帯動脈血中に高濃度のデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) およびプレグネロンが存在することから、母体血中に存在するエストロゲンの生成基質は胎子から供給されているものと推察している。この点で、ウマの妊娠中～後期におけるエストロゲン分泌機構、特にエストロンおよびエストラジオールの産生は霊長類と同様に胎児(子)と胎盤との協同作用によって行われている(Albrecht and Pepe, 1990)可能性が考えられる。また、ウマに特異的なエストロゲンであるエキリン、エキレニンの前駆体となる可能性のあるいくつかの化合物が胎子組織中に検出される(Raeside and Renaud, 1985)ことから、これらの合成および分泌についても胎子側組織の関与が疑われている。

本章では、妊娠期のウマに特徴的なステロイド分泌、すなわち高濃度のエストロゲンを産生する機構が胎子性腺と胎盤の協同的な機能分担によるものであることを確認するため、前章までの結果を応用して前章までに明かとなったウマの*CYP17*および*HSD3B*について、おのおののcDNAプローブを利用してノザンプロットを行い、同じ組織から得た試料を用いて遺伝子発現を比較するとともに、*CYP19*の遺伝子発現についてもRT-PCR法を用いて検討した。

材料と方法

RNAの調製

なんらかの理由で安楽死処置されて剖検されたウマの副腎、精巣、黄体（妊娠125日）、胎盤（妊娠125, 180, 270日）、胎子精巣、胎子卵巣、卵巣（生後3日）、腎臓、肝臓および筋肉を使用した。各試料は剖検後ただちに液体窒素中で急速冷凍し、RNA抽出時まで-80℃で凍結保存した。これらの組織からグアニジン/塩化セシウム超遠心分離法により抽出した総RNAを以後の実験に使用した。

ノザン解析

副腎、精巣、卵巣、黄体、胎盤（妊娠125, 180, 270日）、胎子精巣、胎子卵巣、腎臓、肝臓および筋肉から抽出した総RNAを用いてノザンプロットを行った。各組織の総RNA 20 μ gを1.0%アガロース 3-[N-モルホリノ]-プロパンスルホン酸 (MOPS)-ホルムアミド-ホルマリンゲル中で電気泳動により分離したのち、荷電ナイロン膜 (HyBond N⁺; アマシャム(株), 東京) に転写し、17 α -水酸化/17,20開裂酵素cDNAクローン (第二章) を制限酵素*Kpn*Iで切断したものをプローブとして[α -³²P]dCTPで放射性ラベルして検出した。

*CYP19*遺伝子の逆転写合成酵素連鎖反応 (RT-PCR)

各RNA試料からの*CYP19*遺伝子断片のPCR増幅はMMLV逆転写酵素 (SuperScript II preamplification system; GIBCO BRL, Bethesda) による一本鎖cDNAへの逆転写反応およびGeneAmp PCR System 9600およびGeneAmp PCR Reagent (パーキンエルマー・ジャパン(株), 浦安) を使用したPCR増幅の二段階で行った。プライマー配列および増幅条件は前章と同一とした。

結果

(1) 各組織におけるCYP17およびHSD3B mRNAの発現

副腎, 精巣, 黄体 (妊娠125日), 胎盤 (妊娠125, 180, 270日), 胎子精巣, 胎子卵巣, 卵巣 (生後3日), 腎臓, 肝臓および筋肉から抽出した総RNAを用いてノザンプロットを行った

結果, CYP17 mRNA

は副腎, 精巣のほか胎

子性腺でそれを上回る

強い発現が認められた

が, 胎盤での発現は極

めて低いレベルだった

(図7-3-1)。また, 図

には第五章で得たプロー

ブを使用してHSD3Bに

ついてノザンプロット

を行った結果を合せて表示している。CYP17 mRNAは胎子性腺, HSD3B mRNAは胎盤で強く発現している一方, 胎盤ではCYP17 mRNAが, 胎子性腺ではHSD3B mRNAがほとんど発現していないという対照的な結果となり, 双方の遺伝子を同時に発現していた精巣および副腎とは異なる結果となった。

胎盤のHSD3Bは妊娠125日より180日で高く, 270日では最も低かった。また, 妊娠125日の黄体では精巣を上回るHSD3Bの発現が認められたが, 妊娠125, 180, 270日の各時期における胎盤でのHSD3Bの発現は, いずれも黄体での発現を上回っていた。



図7-3-1 HSD3BおよびCYP17の発現状況

各レーンには総RNA 20 μ gを添加した

数字および略号は妊娠日数(dpc), 生後日齢(dpd)を表す

(2) 各組織におけるCYP19 mRNAの発現

副腎, 精巣, 黄体 (妊娠125日), 胎盤 (妊娠125, 180, 270日), 胎子精巣, 胎子卵巣, 卵巣 (生後3日), 腎臓, 肝臓および筋肉から抽出した総RNAを用いてRT-PCRを行った結果, CYP19 mRNAは胎盤のほかに成熟雄ウマの精巣で発現が認められたが, 胎子性腺では胎子の性別にかかわらず発現は認められなかった。また,



図7-3-2 CYP19の発現状況(RT-PCR)

M: Molecular Size Marker (50-1000 bp), 1: Adrenal Gland, 2: Testis, 3: Corpus Luteum (125 dpc), 4: Placenta (125 dpc), 5: Placenta (180 dpc), 6: Placenta (270 dpc), 7: Fetal Ovary (125 dpc), 8: Fetal Testis (155 dpc), 9: Ovary (3 dpd), 10: Liver, 11: Kidney, 12: Muscle

生後3日の卵巣および妊娠黄体 (妊娠125日) においてもCYP19 mRNAの発現は認められなかった (図7-3-2)。

考察

コレステロールを出発材料とするステロイドホルモンの代謝経路は多くの動物種に共通に存在し、おのおのの段階に関与する酵素の機能的、構造的な類似性は種を越えて保存されている。ステロイド産生組織ではその組織中に存在する基質と酵素の種類および発現量によって最終産物としてのステロイドホルモンが決定される。例えば、精巣のLeydig細胞においてはシトクロムP450側鎖切断酵素(CYP11A1)、 3β -HSD、CYP17、 17β -水酸化ステロイド脱水素酵素 (17β -HSD) が発現しており、コレステロールを出発物質としてテストステロンを産生する一連の酵素が存在する。つまり、これらの酵素蛋白質の局在を知ることによって、当該組織におけるステロイド産生の最終産物を推測することが可能となる。こうした研究の結果、卵胞の顆粒層細胞と莖膜細胞が協同してエストロゲンを合成する、いわゆるArmstrong-Dorringtonの"two-cell"モデル(Armstrong and Dorrington, 1977)として認知されている系(Hillier, Whitelaw *et al.*, 1994)のように、胎盤と胎子のような異なるステロイド代謝酵素を発現している細胞や組織が相互にステロイド基質を供給しあうことで最終産物としてのステロイドホルモンを産生することが明かとなってきた(Albrecht and Pepe, 1990)。例えば、ヒトの妊娠中後期におけるエストロゲン産生は胎子-胎盤複合系の協調作用によって行われる(Albrecht and Pepe, 1990)。これには胎盤の 3β -HSD、胎子副腎のCYP17、そして胎盤のCYP19が必要であるが、妊娠末期のヒト胎児副腎には 3β -HSDの活性も存在し、胎児副腎においてプレグネノロンあるいはさらに上流であるコレステロールからのアンドロゲン合成が行われている可能性もある(Coulter, Goldsmith *et al.*, 1996)。副腎皮質では主なステロイド代謝組織として球状層、索状層、網状層のそれぞれで発現する酵素が異なり、最終産物として球状層ではアルドステロン、索状層ではコルチゾールまたはコルチコステロンが産生されるが、網状層ではスルホキナーゼが不要となったデヒドロエビアンド

ロステロンを硫酸抱合体化する。ヒト胎児副腎で産生されたデヒドロエピアンドロステロンの硫酸抱合体は再び胎盤のスルファターゼの作用でデヒドロエピアンドロステロンに代謝されることにより、芳香化を受けることになる。すなわち霊長類においては母体副腎のほか、胎児の副腎がエストロゲン産生の基質としてのデヒドロエピアンドロステロンの主たる産生源であるとされている。

一方、ウマにおいてもエキリン、エキレニンなどのウマに特有なB環不飽和エストロゲンを始めとして、エストロンおよびエストラジオール (17 β および17 α) が母体血中ならびに尿中に高濃度で存在する。種々の前駆物質を胎盤組織とともに培養することによりエストロゲンが生成されることから、これらのエストロゲンの合成主体は胎盤と考えられてきた。ところが、妊娠中に胎子性腺を除去すると母体尿中のエストロゲン濃度が激減することから、Raesideはヒトの胎盤におけるエストロゲン産生に胎児副腎が重要であるようにウマ胎子性腺がウマ胎盤におけるエストロゲン産生において重要であると推察した(Raeside, Liptrap *et al.*, 1973)。今回、主要なステロイド代謝酵素であるCYP17, 3 β -HSDおよびCYP19の3種の酵素についてその遺伝子発現を胎子性腺および胎盤で比較することにより、ウマの妊娠維持に重要であると考えられるステロイドホルモンの代謝にこれらの組織がどのように関与するのかを検討した。その結果、CYP17は胎子性腺に顕著な発現が認められたが、胎盤にはほとんど発現していなかった。一方胎盤では、HSD3BおよびCYP19が顕著に発現しており、これらの酵素は胎子性腺ではほとんど発現が認められなかった。

Albrechtら(Albrecht, MacLeod *et al.*, 1997)は排卵周期中の黄体期、eCG分泌開始時期である妊娠29日から35日および42日から45日の黄体におけるCYP19 mRNAの発現を報告している。これによれば、黄体のHSD3B, CYP17, CYP19の発現はeCG分泌が始まるまでは一定であり、eCG分泌がCYP17の発現を促進することによって黄体からのエストロゲン産生を増大させるとしている。今回の結果ではeCG分泌が低下した後、妊娠125日の黄体においてCYP17およびCYP19の発現は認められな

かったことから、この時期の黄体はアンドロゲンおよびエストロゲンの産生に関与する役割は低いものと考えられた。また、*HSD3B*の発現も同時期の胎盤より低く、妊娠維持に必要と考えられる C_{21} ステロイド基質の供給源としても、黄体よりもはるかに大きい組織である胎盤にその主たる役割を譲ってしまっているものと考えられた。

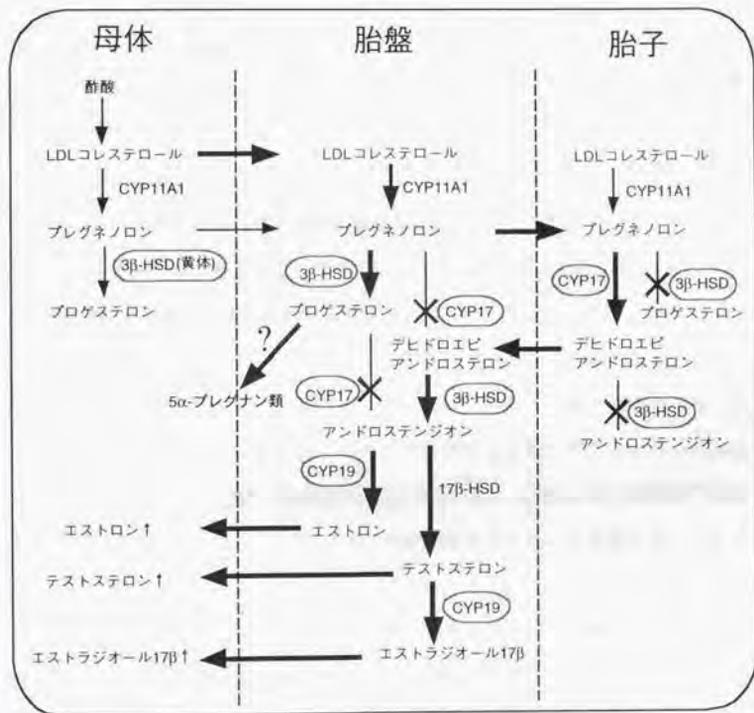


図7-4-1 妊娠中のウマ胎子-胎盤系におけるステロイド合成経路

□で囲った酵素は本研究において発現の有無を検討した酵素を示し、×印は発現が認められなかったことを示す。ヒトでは胎児のデヒドロエピアンドロステロンは胎児副腎で硫酸抱合体化されて胎盤に移行し、胎盤のスルファターゼによってデヒドロエピアンドロステロンとなってからアンドロステンジオンに代謝される。

以上のことから、妊娠期のウマ胎子と胎盤との間では、相互に基質を供給することにより、最終的な産物としてエストロゲンが合成されていることが推察された(図7-4-1)。図に示したようにウマ胎子性腺および性腺静脈血には高濃度のプレグネノロンとデヒドロエピアンドロステロンが存在する(Raesside, Gofton *et al.*, 1982)ことから、ウマ胎子性腺はプレグネノロンを基質としてCYP17によってデヒドロエピアンドロステロンを生成すると考えられる。さらに胎子性腺は 3β -HSDの発現を欠くことからプロゲステロンをはじめとする $\Delta 4$ ステロイドを生成することはできず、デヒドロエピアンドロステロンが終末産物となっている可能性が高い。従って、胎盤のCYP19によるエストロゲン合成の基質として必要な $\Delta 4$ アンドロゲンは、同じく胎盤で発現している 3β -HSDによって胎子から供給されたデヒドロエピアンドロステロンを基質として合成されることが推察された。妊娠馬の血中テストステロン濃度はエストロゲン濃度とほぼ同様な変化をすることが報告されている(Silberzahn, Zwain *et al.*, 1984)が、本研究の結果から明らかのように胎子性腺に 3β -HSDが存在しないことから、このテストステロンは胎盤で合成されているものと考えられる。ヒトでは胎児副腎皮質で生成されたデヒドロエピアンドロステロンは硫酸抱合体となって胎盤に移行し、スルファターゼによって再びデヒドロエピアンドロステロンとなってから他のステロイドに代謝される(鎌田正晴, 青野敏博, 1995)。今回の検索では胎子副腎を検討対象としなかったため、ウマの妊娠期のステロイド代謝において胎子副腎がどのように関与するのかは明らかではない。また、ウマにおいても胎子性腺あるいは胎子副腎で生成したデヒドロエピアンドロステロンが硫酸抱合体となって胎盤に移行する機構が存在するか否かについては明らかではない。しかしながら、妊娠中期から分娩までウマの胎子副腎は直線的な発育をするが(Yamauchi, 1979)、胎子性腺はいったん肥大化した後に退縮する(Cole, Hart *et al.*, 1933)。ウマでは胎子性腺の大きさと母体血中のエストロゲン濃度とがパラレルに変化することと、エストロンおよびエストラジオール産生の基質として必要なアンドロゲンの産生に欠かせ

ないCYP17の発現が胎盤ではなく胎子性腺に認められたことから、ウマの妊娠期における高濃度の血中エストロゲンを産生するために必要な合成基質であるアンドロゲンの供給源として、少なくとも胎子性腺がきわめて重要であることが明らかとなった。

ウマ胎子-胎盤系におけるエストロゲン産生の機構はヒトの妊娠中におけるエストロゲン産生機構と比較した場合、胎子側で関与する主たる臓器がヒトでは胎児副腎であるのに対しウマでは胎子性腺であるという点で異なるほかは本質的に同一であると考えられる。しかし、妊娠中に増加するエストロゲンの意義については、ヒトとウマとで異なる可能性が考えられる。ヒトの場合、母体血中のエストロゲン濃度は妊娠の経過に従い増加しつづけ、最終的には分娩につながる各種の変化を誘導する機構が考えられており(鎌田正晴, 青野敏博, 1995)、妊娠末期に増加するコルチゾールによって胎盤でのCYP17発現を誘導される反芻動物においても、これによって生じるエストロゲン濃度の上昇は分娩を促すものと考えられている。しかしながら、ウマでは母体血中のエストロゲン濃度が胎子性腺の退縮に伴って減少すること、この減少が分娩を基準に考えるとかなり早期に起こり分娩前に再び上昇することはないことから、ヒトのように高濃度のエストロゲンがウマにおいても分娩を誘起する、あるいはそのための準備であるとの考えは受け入れ難い。とすれば、妊娠中期から後期にかけて増加するエストロゲンはプロゲステロンと協同して子宮そのものあるいは子宮への供給血液量に対して作用し、また中枢に対しては性腺刺激ホルモンの分泌を抑制するなどの作用によって妊娠維持に必要な役割を担っているものと考えられた。また、ウマの妊娠維持においてこのような機構が存在し、近接する組織が相互に基質を供給することによってエストロゲンを産生することは、ステロイド産生組織間の機能補完という面ばかりでなく、他方の機能をモニターして同期するための機構として機能している可能性も考えられる。

すなわち、妊娠中期から後期にかけての胎子性腺の肥大化および縮退はウマが正常

な妊娠を全うするために必要なエストロゲンを産生するための機構であり、ヒトを始めとする霊長類における胎子副腎と胎盤とが協調して行うエストロゲン合成と機構的にはほとんど同一であるが、その機構の必要性あるいは意義についてはヒトの場合と異なるものと考えられた。

小括

妊娠中期から後期の胎盤および胎性子腺におけるステロイド代謝酵素の発現を調べるため、*CYP17*および*HSD3B*についてノザン解析を行うとともに、*CYP19*についてRT-PCRによる検出を試みた。その結果、*CYP17*は胎性子腺に、*HSD3B*は胎盤にそれぞれ強い発現が認められた。また、*CYP19*は胎盤で発現が認められたが、精巣を除く他の組織では発現が認められなかった。これらのことから、胎性子腺は*CYP17*の作用によってプロゲステロンをアンドロゲンに変換し、胎盤の*CYP19*による芳香化反応の基質を供給する。これらの作用は胎子の性別には影響されない。ヒトでは胎児副腎が胎児-胎盤複合系におけるアンドロゲンの供給源になっているとされるが、ウマでは胎性子腺の肥大化および縮小のパターンと母体血中エストロゲン濃度の推移が一致することと、各ステロイド代謝酵素遺伝子の発現分布から、胎性子腺がアンドロゲン供給源の役割を担っているものと考えられ、胎盤と協調してエストロゲンを合成する組織が副腎ではなく胎性子腺であることはウマの妊娠の特徴であると結論づけられた。ウマの妊娠期におけるエストロゲン分泌はヒトのように分娩の準備ということでは説明できず、胎子の急激な成長に伴う子宮の拡張や血流の確保など、むしろ妊娠の維持に必要な機構であると考えられる。また、ウマに特有なB環不飽和エストロゲンの合成に、今回検討した酵素群が関与するという証拠は得られていないが、各酵素遺伝子の組換え体を用いてB環不飽和ステロイドに対する基質特異性を検討することで、ウマに特異的な妊娠期のステロイド分泌についてさらに解明できるものと考えられた。

第八章 総括

雌性動物における排卵周期の回復および妊娠維持、雄性動物における副性器の維持や造精機能の維持には、性腺のステロイドホルモンが重要な役割を演じており、ウマにおいてもその基本的な作用は共通である。ステロイドホルモン分泌は中枢の支配を受けており、最終的にはステロイド産生細胞に発現しているステロイド代謝酵素の種類と量、そして供給される基質の種類と量によって産生するステロイドホルモンの種類が決定される。ウマでは妊娠期間中母体血中および尿中に、B環に不飽和結合を持つウマ特有のエストロゲンであるエキリンおよびエキレニンと、それらの抱合体が存在する。これらウマに特有のエストロゲンの合成および分泌には胎子性腺の関与も考えられているが、その合成経路はよくわかっていない。ウマの胎子性腺がエストロゲン合成に関与しているとの考えは、妊娠中期から後期にみられる母体血中エストロゲンの上昇と同時に性腺が肥大化することに由来する。肥大化は胎子の性別を問わず、胎子性腺組織はステロイド産生細胞としての特徴を有する。一方、ウマの胎盤はプロゲステロンからエストロゲンを合成することはできないとされ、妊娠中に胎子性腺を除去すると母体尿中エストロゲン濃度が激減することから、ヒト胎盤のエストロゲン産生に胎児副腎が重要なように、ウマ胎子性腺はウマ胎盤のエストロゲン産生に関与すると推察される。そこで、エストロゲン産生に関わるステロイド代謝酵素のうち、プロゲステロンからアンドロゲンに変換するCYP17、 3β -水酸化- Δ^5 ステロイドと 3 -ケト- Δ^4 ステロイドを相互変換する 3β -HSD、アンドロゲンを芳香化してエストロゲンに代謝するCYP19の3種の酵素遺伝子について母体と胎子の性腺および胎盤組織中の発現を確認し、ウマ妊娠期の胎子および胎盤におけるエストロゲン産生機構を明らかにしようとした。

最初にCYP17 cDNAをウマ精巣cDNAライブラリからクローニングした。アンドロゲンおよびコルチゾールの合成に必要なCYP17は、基質特異性および遺伝子の発現に種特異性が認められる。ヒトおよびウシでは、CYP17の持つ2つの活性のうち17,20-開裂活性が Δ^4 ステロイドに対して低いが、齧歯類では Δ^4 ステロイドと Δ^5 ステ

ロイドとで開裂活性に差がない。ラットcDNAの塩基配列をもとにプライマーを設計して行ったPCRではヒトをはじめとする既知のCYP17 cDNAと相同性の高い増幅産物を得た。これをプローブとしてノザンプロット分析を行ったところ、約2kbpのmRNAが精巣で強く発現しており、ウマCYP17 mRNAはヒトなどの既知の動物種と同様の大きさであると推察された。ウマ精巣cDNAライブラリをスクリーニングして得たクローンの全長1906bpの塩基配列は、ヒトおよび他種動物の既知の配列と高い相同性を示した。ウマのCYP17は既知の各種動物CYP17と共通な特徴を有していたが、アミノ酸配列のヒトおよびウシとの類似性(83.1, 80.6%)とラット、マウスとの類似性(73.6, 72.8%)から判断する限り、活性、基質特異性とも齧歯類のCYP17よりヒトやウシのCYP17と類似していると考えられた。

ウマCYP17 cDNAクローンを発現させて酵素活性を確認するために、cDNAクローンのインサートを市販の発現ベクターpSVLに組み込んだ二種類の組換え体を作製し、COS 1細胞に導入して形質転換した。pSV2neoを同時に導入し抗生物質G418を添加して選択培養したものは増殖活性が著しく低下し、ウマCYP17を安定して発現する形質転換体は得られなかった。そこで、導入48時間後にRNAを抽出しノザンプロットを行ったところ、ベクターのプロモータに対してウマCYP17の塩基配列が順方向となるpSet#12ではインサートの長さに相当するバンドを含む分子量範囲の広いスメアが検出されたが、逆方向のpSet#13では数百bp以下の短いRNAのみが検出された。酵素反応の基質として ^3H ラベルしたプロゲステロンをpSet#12で形質転換した細胞の培養液に加えたところ、17 α -水酸化プロゲステロンおよびアンドロステンジオンに相当する代謝物が経時的に増加し、ウマCYP17には17 α -水酸化活性と17,20開裂活性が共存している可能性が示唆された。しかし、4時間の培養で増加したプロゲステロン代謝物は総放射活性の約5%と低かったことから、さらにこの可能性を検証するためには、より高い活性を発現する形質転換体の調製が必要と考えられた。

ウマCYP17遺伝子のエキソン/イントロン構造と、各イントロンの塩基配列を明ら

かにするために、ウマゲノムDNAを鋳型としてPCR増幅し、イントロンを含む複数のゲノム遺伝子の配列をPCR増幅した。塩基配列を決定したところ、*CYP17*遺伝子のエクソンの数はヒトと同じ8個であり、エクソン1から8までの長さは6217塩基対だった。また、各PCRクローンの重複部分がイントロンも含めて必ず一致したことから、ヒトの場合と同様ウマ*CYP17*遺伝子もゲノム中に一座位のみ存在することが示唆された。ウマイントロンCには72塩基対の配列が制限酵素*Hind* IIIの認識配列を挟んで直列に繰り返していた。この繰り返し配列は哺乳動物に広く存在するとされるMammalian-wide Interspersed Repeat (MIR)とよく似ていた。MIR様反復配列部分を使ってプライマーを設計しウマゲノムDNAをPCR増幅すると、多数のバンドが増幅されたことから、ウマゲノム中にはMIR類似の配列が多数含まれていることが推察された。

続いて、ウマ精巣cDNAライブラリから*HSD3B* cDNAクローンを分離した。ヒトおよびウシの*HSD3B* cDNA塩基配列に特異的なプライマーを用いたPCR法によりウマ精巣cDNA断片を増幅し、増幅断片の塩基配列を他種哺乳動物のcDNAと比較して相同性を確認した。これをプローブとしてウマ精巣cDNAライブラリをスクリーニングし、1651塩基対のウマ*HSD3B* cDNAクローンを得た。ウマ精巣*HSD3B* cDNA塩基配列および推定されたアミノ酸配列は既知の哺乳動物の3 β -HSDの配列とよく一致していたが、アミノ酸配列の解析からこの*HSD3B*遺伝子のコードする3 β -HSDは3 β -水酸化ステロイドの脱水素反応および異性化反応を触媒し、3-ケトステロイドの還元反応は触媒しないものと考えられた。cDNAクローンをプローブとしてノザン解析を行ったところ、精巣、黄体、副腎といったステロイド産生組織において著明な発現が認められた。

次に、アンドロゲンからエストロゲンへの代謝に必要な*CYP19*遺伝子が成熟雄ウマの精巣において発現していることをRT-PCR法により確認した。ウマ*CYP19*について、既報の部分的塩基配列を基にプライマーを設計し精巣の総RNAを鋳型として

RT-PCRを行った。設計通り長さの異なる二種類の組み合わせで増幅産物が得られたが、短い増幅産物は既報の塩基配列と一致した。また、設計時点で塩基配列未知の部分を含んでいた長い増幅産物は、その後に公開された完全長ウマ*CYP19* mRNAと塩基配列が一致し、同じ試料からは必ず両方の組み合わせで増幅産物が確認できた。このことから、本法によりウマの体組織における*CYP19* 遺伝子の発現状況を特異的に検索することが可能であり、二種類の増幅産物を確認することで検出の信頼性が高まるものと考えられた。精巣のほか、副腎、肝臓、腎臓および筋肉からの検出も試みたが、*CYP19* mRNAの発現が検出されたのは精巣のみであった。

以上の結果を踏まえ、妊娠中期から後期の胎盤および胎子性腺におけるステロイド代謝酵素の発現を調べるため、*CYP17*および*HSD3B*についてノザン解析を行うとともに、*CYP19*についてRT-PCRによる検出を試みた。その結果、*CYP17*は胎子性腺に、*HSD3B*は胎盤にそれぞれ強い発現が認められた。また、*CYP19*は胎盤で発現が認められたが、精巣を除く他の組織では発現が認められなかった。これらのことから、胎子性腺は*CYP17*の作用によってプロゲステロンをアンドロゲンに変換し、胎盤の*CYP19*による芳香化反応の基質を供給する。これらの作用は胎子の性別には影響されない。ヒトでは胎児副腎が胎児-胎盤複合系におけるアンドロゲンの供給源になっているとされるが、ウマでは胎子性腺の肥大化および縮小のパターンと母体血中エストロゲン濃度の推移が一致することと、各ステロイド代謝酵素遺伝子の発現分布から、胎子性腺がアンドロゲン供給源の役割を担っているものと考えられ、胎盤と協調してエストロゲンを合成する組織が副腎ではなく胎子性腺であることはウマの妊娠の特徴であると結論づけられた。ウマの妊娠期におけるエストロゲン分泌はヒトのように分娩の準備ということでは説明できず、胎子の急激な成長に伴う子宮の拡張や血流の確保など、むしろ妊娠の維持に必要な機構であると考えられる。また、ウマに特有なB環不飽和エストロゲンの合成に、今回検討した酵素群が関与するという証拠は得られていないが、各酵素遺伝子の組換え体を用いてB環不飽和ステロ

イドに対する基質特異性を検討することで、ウマに特異的な妊娠期のステロイド分泌についてさらに解明できるものと考えられた。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始懇切かつ厳しいご指導をいただきました東京大学農学生命科学研究科獣医生理学教室 高橋迪雄教授、同 西原真杉助教授、獣医生化学教室 塩田邦郎助教授をはじめとする東京大学大学院農学生命科学研究科の各位、また、本研究の端緒となる助言と機会を与えて下さいました社団法人日本馬事協会顧問 澤崎 坦氏、財団法人馬事文化財団専務理事 吉田愷三氏、さらに、忍耐と寛容、そして叱咤をもって応援して下さいました日本中央競馬会競走馬総合研究所生命科学研究室 向山明孝室長をはじめとする日本中央競馬会競走馬総合研究所ならびに馬事部門の関係各位に深甚なる感謝の意を表します。

本論文は投稿論文の共著者として名を連ねて下さった方々は勿論のこと、枚挙にいとまがないほどの、実に多くの人々の協力を得て初めて完成したものであり、これらの方々に深く感謝いたします。

引用文献

- Abbaszade, I. G., Clarke, T. R., Park, C.-H. J., Payne, A. H. (1995). "The mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase multigene family includes two functionally distinct groups of proteins." *Molecular Endocrinology* 9(9): 1214-1222.
- Ainsworth, L. and Ryan, K. J. (1966). "Steroid hormone transformation by endocrine organs from pregnant animals. I. Estrogen biosynthesis by mammalian placental preparations *in vitro*." *Endocrinology* 79: 875-883.
- Albrecht, B. A., MacLeod, J. N. and Daels, P. F. (1997). "Differential transcription of steroidogenic enzymes in the equine primary corpus luteum during diestrus and early pregnancy." *Biology of Reproduction* 56(4): 821-829.
- Albrecht, E. D. and Pepe, G. J. (1990). "Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy." *Endocrine Reviews* 11(1): 124-150.
- Almadhidi, J., Seralini, G. E., Fresnel, J., Silberzahn, P. and Gaillard, J. L. (1995). "Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 43(6): 571-577.
- Armstrong, D. T. and Dorrington, J. H. (1977). "Estrogen biosynthesis in the ovaries and testes." *Advances in Sex Hormone Research* 3: 217-258.
- Baggett, B., Engel, L. L., Balderas, L., Lanman, G., Savard, K. and Dorfman, R. I. (1959). "Conversion of C14-Testosterone to C14-estrogenic steroids by endocrine tissues." *Endocrinology* 64: 600-608.

Beall, D. (1940). "The isolation of α -oestradiol and oestrone from horse testes." *Biochemical Journal* 34: 1293-1298.

Benton, W. D. and Davis, R. W. (1977). "Screening lgt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*." *Science* 196: 180-182.

Boerboom, D., Kerban, A. and Sirois, J. (1997). "Evidence for a molecular switching mechanism between two distinct cytochrome P450 aromatase promoters during ovulation and luteinization in mares." Published only in database. EMBL/GenBank/DDBJ.

Bradshaw, K. D., Waterman, M. R., Couch, R. T., Simpson, E. R. and Auber, M. X. (1987). "Characterization of complementary deoxyribonucleic acid for human adrenocortical 17 α -hydroxylase: A probe for analysis of 17 α -hydroxylase deficiency." *Molecular Endocrinology* 1(5): 348-354.

Chau, Y. M., Crawford, P. A., Woodson, K. G., Polish, J. A., Olson, L. M. and Sadovsky, Y. (1997). "Role of steroidogenic-factor 1 in basal and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated regulation of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the mouse." *Biology of Reproduction* 57(4): 765-771.

Chavatte, P., Holtan, D., Ousey, J. C. and Rossdale, P. D. (1997). "Biosynthesis and possible biological roles of progestagens during equine pregnancy and in the newborn foal." *Equine Veterinary Journal, Supplement* 24: 89-95.

Chavatte, P. M., Rossdale, P. D. and Tait, A. D. (1995). "Modulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) activity in the equine placenta by pregnenolone and progesterone metabolites." *Equine Veterinary Journal* 27(5): 342-347.

Chen, F., MacDonald, C. C. and Wilusz, J. (1995). "Cleavage site determinants in the

mammalian polyadenylation signal." *Nucleic Acids Research* 23(14): 2614-2620.

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. and Rutter, W. J. (1979). "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Isolation of RNA with guanidinium thiocyanate." *Biochemistry* 18: 5294-5299.

Choi, I., Collante, W. R., Simmen, R. C. M. and Simmen, F. A. (1997). "A developmental switch in expression from blastocyst to endometrial/placental-type cytochrome P450 aromatase genes in the pig and horse." *Biology of Reproduction* 56(3): 688-696.

Choi, I., Simmen, R. C. and Simmen, F. A. (1996). "Molecular cloning of cytochrome P450 aromatase complementary deoxyribonucleic acid from periimplantation porcine and equine blastocysts identifies multiple novel 5'-untranslated exons expressed in embryos, endometrium, and placenta." *Endocrinology* 137(4): 1457-1467.

Chung, B. C., Picado-Leonard, J., Haniu, M., Bienkowski, M., Hall, P. F., Shively, J. E. and Miller, W. L. (1987). "Cytochrome P450C17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNA indicate the same gene is expressed in both tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 83: 8962-8966.

Clark, A. M., Chuzel, F., Sanchez, P. and Saez, J. M. (1996). "Regulation by gonadotropins of the messenger ribonucleic acid for P450 side-chain cleavage, P45017 α -hydroxylase/C17,20-lyase, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in cultured pig Leydig cells." *Biology of Reproduction* 55: 347-354.

Clark, B. J. and Waterman, M. R. (1991). "Heterologous expression of mammalian P450 in COS cells." *Methods in Enzymology* 206: 100-108.

Clark, B. J. and Waterman, M. R. (1992). "Functional expression of bovine 17 α -hydroxylase in

COS 1 cells is dependent upon the presence of an amino-terminal signal anchor sequence." *Journal of Biological Chemistry* 267(34): 24568-24574.

Clarke, T. R., Bain, P. A., Sha, L. and Payne, A. H. (1993). "Enzyme characteristics of two distinct forms of mouse 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase complementary deoxyribonucleic acids expressed in COS-1 cells." *Endocrinology* 132(5): 1971-1976.

Cole, H. H., Hart, G. H., Lyons, W. R. and Catchpole, H. R. (1933). "The development and hormonal content of fetal horse gonads." *Anatomical Record* 56(3): 275-293.

Conley, A. J. and Bird, I. M. (1997). "The role of cytochrome P450 17 α -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the D5 and Δ 4 pathways of steroidogenesis in mammals." *Biology of Reproduction* 56: 789-799.

Conley, A. J., Graham-Lorence, S. E., Kagimoto, M., Lorence, M. C., Murry, B. A., Oka, K., Sanders, D. and Mason, J. I. (1992). "Nucleotide sequence of a cDNA encoding porcine testis 17 α -hydroxylase cytochrome P-450." *Biochimica et Biophysica Acta* 1130: 75-77.

Coulter, C. L., Goldsmith, P. C., Mesiano, S., Voytek, C. C., Martin, M. C., Mason, J. I. and Jaffe, R. B. (1996). "Functional maturation of the primate fetal adrenal *in vivo*. II. Ontogeny of corticosteroid synthesis is dependent upon specific zonal expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase." *Endocrinology* 137(11): 4953-4959.

Eisenhauer, K. M., McCue, P. M., Nayden, D. K., Osawa, Y. and Roser, J. F. (1994). "Localization of aromatase in equine Leydig cells." *Domestic Animal Endocrinology* 11(3): 291-298.

Estabrook, R. W., Mason, J. I., Martin-Wixtrom, C., Zuber, M. and Waterman, M. R., Eds. (1988). Some enzymatic vagaries of a bovine adrenal microsomal cytochrome P450 introduced

and expressed in transformed monkey kidney cells. *Oxidases and Related Redox Systems*. New York, A. R. Liss, Inc.

Fevold, H. R., Lorence, M. C., McCarthy, J. L., Trant, J. M., Kagimoto, M., Waterman, M. R. and Mason, J. I. (1989). "Rat P45017 α from testis: Characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both Δ 4- and Δ 5-steroid-17,20-lyase reactions." *Molecular Endocrinology* 3(6): 968-975.

Fevold, H. R. and Waterman, M. R. (1988). "The isolation and expression of a full-length P45017a cDNA from rat testis." *Journal of Cell Biology* 107: 197a.

Ginther, O. J. (1992). *Reproductive Biology of the Mare —Basic and Applied Aspects— 2nd ed.* Cross Plains, Equiservices.

Givens, C. R., Zhang, P., Bair, S. R. and Mellon, S. H. (1994). "Transcriptional regulation of rat cytochrome P450c17 expression in mouse Leydig MA-10 and adrenal Y-1 cells: identification of a single protein that mediates both basal and cAMP-induced activities." *DNA and Cell Biology* 13(11): 1087-1098.

Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." *Cell* 23(1): 175-182.

González-Angulo, A., Hernández-Jáuregui, P. and Márques-Monter, H. (1971). "Fine structure of gonads of the fetus of the horse (*Equus caballus*)." *American Journal of Veterinary Research* 32(11): 1665-1676.

Gotoh, O., Tagashira, Y., Iizuka, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (1983). "Structural characteristics of cytochrome P-450. Possible location of the heme-binding cysteine in determined amino acid sequences." *Journal of Biochemistry* 93: 807-817.

Hasegawa, T., Mukoyama, H., Yoshida, S. and Takahashi, M. (1995). "Molecular cloning and nucleotide sequence of equine testicular cytochrome P450 steroid 17 α -hydroxylase/C17,20-lyase messenger ribonucleic acid." *Biology of Reproduction, Monograph Series 1*: 615-622.

Hillier, S. G., Whitelaw, P. F. and Smyth, C. D. (1994). "Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited." *Molecular and Cellular Endocrinology* 100(1-2): 51-54.

Holtan, D. W., Houghton, E., Silver, M., Fowden, A. L., Ousey, J. and Rosedale, P. D. (1991). "Plasma progestagens in the mare fetus and newborn foal." *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 44*: 517-528.

Hosaka, M., Oshima, H. and Troen, P. (1980). "Studies of the human testis. XIV. Properties of C17-20 lyase." *Acta Endocrinologia (Copenh)* 94: 389-396.

Imai, T., Globerman, H., Gertner, J. M., Kagawa, N. and Waterman, M. R. (1993). "Expression and purification of functional human 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17) in *Escherichia coli*. Use of this system for study of a novel form of combined 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency." *Journal of Biological Chemistry* 268(26): 19681-19689.

Jurka, J. (1990). "Novel families of interspersed repetitive elements from the human genome." *Nucleic Acids Research* 18(1): 137-41.

Jurka, J. and Smith, T. (1988). "A fundamental division in the *Alu* family of repeated sequences." *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 85(13): 4775-4778.

Jurka, J., Zietkiewitz, E. and Labuda, D. (1995). "Ubiquitous mammalian-wide interspersed

repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era." *Nucleic Acids Research* 23(1): 170-175.

Kagimoto, M., Winter, J. S., Kagimoto, K., Simpson, E. R. and Waterman, M. R. (1988). "Structural characterization of normal and mutant human steroid 17 α -hydroxylase genes: molecular basis of one example of combined 17 α -hydroxylase/17,20 lyase deficiency." *Molecular Endocrinology* 2(6): 564-570.

Lorence, M. C., Murry, B. A., Trant, J. M. and Mason, J. I. (1990). "Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5-4-isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids." *Endocrinology* 126(5): 2493-2498.

Lorence, M. C., Naville, D., Graham-Lorence, S. E., Mack, S. O., Murry, B. A., Trant, J. M. and Mason, J. I. (1991). "3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5-4-isomerase expression in rat and characterization of the testis isoform." *Molecular and Cellular Endocrinology* 80(1-3): 21-31.

Luu-The, V., Lachance, Y., Labrie, C., Leblanc, G., Thomas, J. L., Strickler, R. C. and Labrie, F. (1989). "Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase." *Molecular Endocrinology* 3(8): 1310-1312.

McBride, M. W., Russell, A. J., Wass, K., Frank-Raue, K., Craig, N. J., Morrison, N., Boyd, E., Szpirer, C. and Sutcliffe, R. G. (1995). "The human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) gene cluster on chromosome 1p13 contains a presumptive pseudogene; 3 β -HSD and CYP17 do not segregate with dominantly inherited hirsutism." *Journal of Molecular Endocrinology* 15: 167-176.

McKinnon, A. O. and Voss, J. L. (1993). *Equine Reproduction*. Philadelphia, Lea & Febiger.

B. B. Mendonça, B. B., Russell, A. J., Vasconcelosleite, M., Arnhold, I. J. P., Bloise, W., Wajchenberg, B. L., Nicolau, W., Sutcliffe, R. G. and Wallace, A. M. (1994). "Mutation of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type II associated with pseudohermaphroditism in males and premature pubarche or cryptic expression in females." *Journal of Molecular Endocrinology* 12: 119-122

Merchant-Larios, H. (1979). "Ultrastructural events in horse gonadal morphogenesis." *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 27: 479-485.

Miller, W. L., Auchus, R. J. and Geller, D. H. (1997). "The regulation of $17,20$ lyase activity." *Steroids* 62(1): 133-142.

Morel, Y., Mébarki, F., Rhéaume, E., Sanchez, R., Forest, M. G. and Simard, J. (1997). "Structure-function relationships of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase: contribution made by the molecular genetics of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency." *Steroids* 62(1): 176-184.

Nakajin, S. and Hall, P. F. (1981). "Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis purification and properties of a C21 steroid side-chain cleavage system." *Journal of Biological Chemistry* 256: 3871-3876.

Namiki, M., Kitamura, M., Buczko, E. and Dufau, M. L. (1988). "Rat testis P-450 17α cDNA: The deduced amino acid sequence, expression and secondary structural configuration." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157(2): 705-712.

Nebert, D. W. and Nelson, D. R. (1991). "P450 gene nomenclature based on evolution." *Methods in Enzymology* 206: 3-11.

Nebert, D. W., Nelson, D. R., Adesnik, M., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Kemper, B., Levin, W., Phillips, I. R., Sato, R. and

Waterman, M. R. (1989). "The P450 superfamily: update on listing of all genes and recommended nomenclature of the chromosomal loci." *DNA* 8: 1-13.

Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R. and Waxman, D. J. (1991). "The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature." *DNA and Cell Biology* 10(1): 1-14.

Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. and Nebert, D. W. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." *Pharmacogenetics* 6(1): 1-42.

Nett, T. M., Holtan, D. W. and Estergreen, V. L. (1973). "Plasma estrogens in pregnant and postpartum mares." *Journal of Animal Science* 37(4): 962-970.

Oh, R. and Tamaoki, B.-i. (1971). "Occurrence of 19-oxoandroster-4-ene-3,17-dione in the course of oestrogen biosynthesis by equine testicular microsomes." *Acta Endocrinologia (Copenh)* 67(4): 665-676.

Oh, R. and Tamaoki, B.-i. (1973). "Intermicrosomal distribution of aromatizing enzyme system in equine testicular tissue." *Acta Endocrinologia (Copenh)* 72(2): 366-375.

Okayama, H. and Berg, P. (1983). "A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells." *Molecular and Cellular Biology* 3(2): 280-289.

Ono, H., Iwasaki, M., Sakamoto, N. and Mizuno, S. (1988). "cDNA cloning and sequence analysis of chicken gene expressed during the gonadal development and homologous to mammalian cytochrome P450C17." *Gene* 66: 77-85.

Ozols, J., Heinemann, F. S. and Johnson, E. F. (1981). "Amino acid sequence of an analogous peptide from two forms of cytochrome P-450." *The Journal of Biological Chemistry* 256: 11405-11408.

Payne, A. H., Abbaszade, I. G., Clarke, T. R. Bain, P. A. and Park, C-H. J. (1997). "The multiple murine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: Structure, function, and tissue- and developmentally specific expression." *Steroids* 62(1): 169-175.

Picado-Leonard, J. and Miller, W. L. (1987). "Cloning and sequencing of the human gene for P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21." *DNA* 6: 439-448.

Pigon, H., Lunaas, T. and Velle, W. (1961). "Urinary oestrogens in the stallion." *Acta Endocrinologia* 36: 131-140.

Raeside, J. I. (1976). "Dehydroepiandrosterone in the fetal gonads of the horse." *Journal of Reproduction and Fertility* 46: 423-425.

Raeside, J. I. (1995). "Steroid production by equine fetal gonads: a speculative view." *Equine Veterinary Journal* 27(5): 324-325.

Raeside, J. I., Gofton, N., Liptop, R. M. and Milne, F. J. (1982). "Isolation and identification of steroids from gonadal vein blood of the fetal horse." *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 32: 383-387.

Raeside, J. I., Liptop, R. M. and Milne, F. J. (1973). "Relationship of fetal gonads to urinary estrogen excretion by the pregnant mare." *American Journal of Veterinary Research* 34(6): 843-845.

Raeside, J. I. and Renaud, R. L. (1985). "Identification of 3 β -hydroxy-5,7-androstadien-17-one as a secretory product of the fetal horse gonad *in vivo* and *in vitro*." *Journal of Endocrinology* 107: 415-419.

Rh eaume, E., Lachance, Y., Zhao, H.-F., Breton, N., Dumont, M., Launoit, Y. d., Trudel, C., Lou-The, V., Simard, J. and Labrie, F. (1991). "Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase in human adrenals and gonads." *Molecular Endocrinology* 5(8): 1147-1157.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239: 487-491.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230: 1350-1354.

Sakai, N., Tanaka, M., Adachi, S., Miller, W. L. and Nagahama, Y. (1992). "Rainbow trout cytochrome P-450c17 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase). cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P-450c17 mRNA expression during oogenesis." *FEBS Letters* 301: 60-64.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1989). "DNA sequencing with chain terminating inhibitors." *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 74: 5463-5467.

Savard, K., Andrec, K., Brooksbank, B. W. L., Reyneri, C., Dorfman, R. I., Heard, R. D. H., Jacobs, R. and Solomon, S. S. (1958). "The biosynthesis of estrone and progesterone in the pregnant mare." *Journal of Biological Chemistry* 231: 765.

N. S. Scrutton, N. S., Berry, A. and Perham, R. N. (1990). "Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering." *Nature (London)* 343: 38-43

Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A. and Huse, W. (1988). "λZAP: An expression vector with *in vivo* excision properties." *Nucleic Acids Research* 16(15): 7583-7599.

Silberzahn, P., Gaillard, J. L., Quincey, D., Dintinger, T. and Al-Timimi, I. (1988). "Aromatization of testosterone and 19-nortestosterone by a single enzyme from equine testicular microsomes. Differences from human placental aromatase." *Journal of Steroid Biochemistry* 29(1): 119-125.

Silberzahn, P., Zwain, I. and Martin, B. (1984). "Concentration increase of unbound testosterone in plasma of the mare throughout pregnancy." *Endocrinology* 115(1): 416-419.

Smit, A. F. A. and Riggs, A. D. (1995). "MIRs are classic, tRNA-derived SINES that amplified before the mammalian radiation." *Nucleic Acids Research* 23(1): 98-102.

Southern, P. J. and Berg, P. (1982). "Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter." *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1(4): 327-341.

Sprague, J., Condra, J. H., Arnheiter, H. and Lazzarini, R. A. (1983). "Expression of a recombinant DNA gene coding for the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein." *Journal of Virology* 45(2): 773-781.

Swart, P., Swart, A. C., Waterman, M. R., Estabrook, R. W. and Mason, J. I. (1993). "Progesterone 16 α -hydroxylase activity is catalyzed by human cytochrome P450 17 α -hydroxylase." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77(1): 98-102.

Templeton, D. and Eckhart, W. (1984). "N-terminal amino acid sequences of the polyoma middle-size T antigen are important for protein kinase activity and cell transformation." *Molecular and Cellular Biology* 4(5): 817-821.

Thomas, J. L., Strickler, R. C., Myers, R. P. and Covey, D. F. (1992). "Affinity labeling of human placental 3 β -hydroxy- Δ 5-steroid dehydrogenase and steroid Δ -isomerase: evidence for bifunctional catalysis by a different conformation of the same protein for each enzyme activity." *Biochemistry* 31(24): 5522-5527.

Thomas, J. L., Nash, W. E. and Strickler, R. C. (1995). "Physiological 3 β -hydroxy-5-ene steroid substrates bind to 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase without the prior binding of cofactor." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 58(2): 211-216.

Velle, W. (1966). "Urinary oestrogens in the male." *Journal of Reproduction and Fertility* 12(1): 65-73.

Walt, M. L., Stabenfeldt, G. H., Hughes, J. P., Neely, D. P. and Bradbury, R. (1979). "Development of the equine ovary and ovulation fossa." *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 27: 471-477.

Wiltbank, M. C., Belfiore, C. J. and Niswender, G. D. (1993). "Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 97(1-2): 1-7.

Yamauchi, S. (1979). "Histological development of the equine fetal adrenal gland." *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement 27*: 487-491.

Yamazaki, T., Nawa, K., Kominami, S. and Takemori, S. (1992). "Cytochrome P-45017 α -lyase-mediating pathway of androgen synthesis in bovine adrenocortical cultured cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1134: 143-148.

Youngblood, G. L. and Payne, A. H. (1992). "Isolation and Characterization of the Mouse P450 17 α -Hydroxylase/C17-20-Lyase Gene (Cyp17): Transcriptional Regulation of the Gene by Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in MA-10 Leydig Cells." *Molecular Endocrinology* 6(6): 927-934.

Youngblood, G. L., Sartorius, C., Taylor, B. A. and Payne, A. H. (1991). "Isolation, characterization, and chromosomal mapping of mouse P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase." *Genomics* 10: 270-275.

Zhao, H.-F., Simard, J., Labrie, C., Breton, N., Rhéaume, E., Luu-The, V. and Labrie, F. (1989). "Molecular cloning, cDNA structure and predicted amino acid sequence of bovine 3 β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase." *FEBS Letters* 259(1): 153-157.

Zondek, B. (1934). "Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion." *Nature (London)* 133: 209-210.

Zuber, M. X., John, M. E., Okamura, T., Simpson, E. R. and Waterman, M. R. (1986). "Bovine adrenocortical cytochrome P45017 α regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence." *Journal of Biological Chemistry* 261(5): 2475-2482.

Zuber, M. X., Simpson, E. R. and Waterman, M. R. (1986). "Expression of bovine 17 α -hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells." *Science* 234(4781): 1258-1261.

鎌田正晴, 青野敏博 (1995). "胎盤におけるステロイド産生とその役割." *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 2(4): 337-344.

稲野宏志, 中村孝雄, 鈴木桂子, 玉置文一 (1977). "ステロイドホルモンの生成." ホルモンの生産と分泌
日本比較内分泌学会編. 東京, 学会出版センター. 95-138.

塩田邦郎, 長谷川晃久, 高橋迪雄 (1990). "ウマの繁殖特性と遺伝子工学的アプローチの可能性."
Japanese Journal of Equine Science 1(1): 7-12.

渡辺伸明, 十川和博 (1992). "ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の構造と誘導的発現機構." *ホルモンと臨床* 40: 1113-1119.



