

博士論文

ジーンターゲット法を用いた
20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素機能に関する研究

東京大学大学院農学生命科学研究科
獣医学専攻博士課程
平成 10 年度入学

石田 真帆

指導教官
東京大学教授

西原 真杉

目次

序論	1
図 0-1. 黄体細胞におけるステロイド合成経路	5
図 0-2. ラットの卵巢各ステージにおける血中 progesterin 濃度の変化と 20 α -HSD 活性の動態	6
第一章 マウス 20 α -HSD cDNA のクローニングとその妊娠期子宮内組織における発現	
緒言	7
材料と方法	10
結果	23
考察	26
図表	30
図 1-1. 第一章の実験の流れ	30
図 1-2. cDNA library screening 用マウス probe の作製	31
図 1-3. <i>In situ</i> hybridization 用 cRNA probe の作製	32
図 1-4. <i>In situ</i> hybridization 法の概略及び使用した溶液の組成	33
図 1-5. マウス卵巢 20 α -HSD cDNA 配列とアミノ酸配列	36
図 1-6. マウスとラット卵巢 20 α -HSD アミノ酸配列の比較	37
図 1-7. ラット肝臓 3 α -HSD とマウス卵巢 20 α -HSD の三次元構造	38
図 1-8. ICR マウス妊娠期血中 progesterin 濃度の変化と卵巢 20 α -HSD mRNA の発現	39
図 1-9. 妊娠 18 日目の卵巢における 20 α -HSD mRNA 発現	40
図 1-10. 妊娠 10 日目の子宮内における 20 α -HSD mRNA 発現	41
図 1-11. 妊娠 15 日目の子宮内における 20 α -HSD mRNA の発現 (パラフィン切片)	42
図 1-12. 妊娠 15 日目の子宮内における 20 α -HSD mRNA の発現 (凍結切片)	43
図 1-13. 妊娠 15 日目の胎子における 20 α -HSD mRNA の発現	44
図 1-14. ICR マウス妊娠期, 性周期, 偽妊娠期子宮での 20 α -HSD mRNA 発現の変化	45
図 1-15. 妊娠期胎盤, 胎子背表皮における 20 α -HSD mRNA 発現	46
図 1-16. 胎子血中及び胎水中の progesterin 濃度の変化	47
図 1-17. Aldo-Keto Reductase (AKR) superfamily	48

第二章 マウス 20 α -HSD ゲノム DNA のクローニングとノックアウトマウスの作製

緒言	49
材料と方法	53
結果	69
マウス 20 α -HSD ゲノム DNA のクローニング	69
ターゲティングベクターの構築	69
相同組み換え ES 細胞の単離	70
キメラマウスの作製	71
考察	73
図表	78
表 2-1. ゲノムクローニングに用いた PCR primer	78
表 2-2. 20 α -HSD ゲノム DNA におけるエクソンとイントロンの結合部位の配列	79
表 2-3. 約 3 ヶ月間におけるキメラマウスの繁殖成績	80
図 2-1. PCR を用いた 129 SvJ mouse genomic library からの λ 2431 単離の概略	81
図 2-2. 20 α -HSD ゲノムクローンと全長ゲノム構造	82
図 2-3. ターゲティングベクターの作製	83
図 2-4. エレクトロポレーションからポジティブ ES クローンの単離までの流れ	84
図 2-5. ターゲティングストラテジーと, Southern blotting による ES 細胞の screening	85
図 2-6. 相同組み換え体の染色体分析結果	86
図 2-7. 集合キメラ法によるキメラマウス作製の流れ	87
図 2-8. キメラマウスと F1 agouti マウスの写真	88
図 2-9. AKR1C のゲノム構造比較	89

第三章 20 α -HSD ノックアウトマウスにおける表現型の解析

緒言	90
材料と方法	94
結果	100
マウス遺伝子型の決定	100
KO マウス mutant gene の遺伝子発現	100
KO マウス卵巣における 20 α -HSD 活性とその発現	101
KO マウスにおける性周期回帰	102
KO マウスの偽妊娠期間と血中 progestin 濃度の変化	102
KO マウスの妊娠期間, 妊娠末期血中 progestin 濃度の変化	103
KO マウスの産子数	103
KO マウス子宮における 20 α -HSD 発現	104

考察	KO マウスにおける置換領域の遺伝子発現	105
	性周期	106
	偽妊娠期	107
	妊娠期	108
	産子	109
	子宮における発現の制御	110
図表	表 3-1. KO マウスにおける性周期回帰の変化	112
	図 3-1. PCR による F1 マウス尻尾から抽出したゲノム DNA を用いた遺伝子型決定	113
	図 3-2. F1 マウス肝臓ゲノム DNA を用いた Southern blotting による遺伝子型解析	114
	図 3-3. KO マウスにおいて予想される mutant gene の発現	115
	図 3-4. F1 マウス分娩後 1 日目の卵巣における EGFP の発現	116
	図 3-5. F1 マウス分娩後 1 日目の卵巣における 20 α -HSD 発現と活性	117
	図 3-6. F1 マウス性周期中卵巣における 20 α -HSD 活性	118
	図 3-7. WT, KO マウス性周期スミア像の変化	119
	図 3-8. 偽妊娠期膣栓確認間隔日数の比較	120
	図 3-9. 偽妊娠中血中 progestin 濃度の変化	121
	図 3-10. 妊娠末期における血中 progestin 濃度の変化	122
	図 3-11. WT と KO マウスにおいて, 分娩後 1 日目に確認した産子数の比較	123
	図 3-12. F1 マウス妊娠 18 日目の子宮における 20 α -HSD 遺伝子転写産物の検出	124
総合考察		125
References		132
参考図書		139
謝辞		140

序論

動物の寿命は限られているが、生殖によりその子孫を後世に残すことができる。有性生殖で誕生する子孫は、減数分裂により形成される配偶子の合体により全く新しい遺伝子の組み合わせを持つ。また世代を重ねることにより遺伝子に起きる突然変異も加わり、子孫のゲノムは親の世代とは変化していく。多くの動物においてその変化は、長い目で見た場合、食物から天敵に及ぶ周りの環境に適応する方向に進んでいく。実際は変化していくというよりは、偶然誕生した変異が環境に有利に適応する場合、子孫にその変異が伝えられると考える方が妥当であり、この流れは進化と呼ばれる。現在地球上に存在する動物は、果てしない進化の過程を経た結果として、様々な環境因子に適応していると考えられる。本研究の対象である齧歯類黄体での 20α -水酸化ステロイド脱水素酵素 (20α -hydroxysteroid dehydrogenase ; 20α -HSD) の発現もまた、生殖という生物に必須の機構において、まさにそのような見方を可能にする特性の一つであった。

哺乳類の生殖機構の特徴は、雌の子宮で受精卵から一定期間を過ごす妊娠と、その名の通り、産まれた子を自立できるまで栄養補給するための哺乳である。さらに、子が自立した後は、再び次の妊娠に備えることが可能で、一生のうちに妊娠を何度も繰り返すことができる。従ってこの生殖活動は、卵胞発育、発情・交尾、排卵、妊娠、分娩、哺乳の各相を繰り返す周期的活動（完全生殖周期）といえる。しかし実際は、妊娠に至る前の段階ですでに卵胞発育、発情、排卵を繰り返す周期（性周期）が存在し、妊娠はこの性周期回帰という基盤の上に成り立つものである。卵巣内で発育した卵胞は、やがて成熟して排卵する。排卵した卵子は受精の場である卵管へ放出されるが、残った卵巣では卵子を送り出した後も、将来受精した卵子の子宮への着床、発育を支えるホルモン（progesterone）を分泌するようになる。卵胞は、卵子と、それを囲む顆粒層細胞、その外側に基底膜を挟んで内卵胞膜細胞とにより構成される。排卵によりその構造は破壊され、卵子が去った組織には血管が新生し、顆粒層細胞、内卵胞膜細胞は黄体細胞へと分化し、progesterone を合成・分泌するようになる。ヒトを含めた多くの動物では、妊娠

が成立しなくても約 2 週間 progesterone が分泌される。この progesterone 分泌相、即ち黄体相では progesterone の作用により卵胞は発育しても排卵には至らない [Graham & Clarke 1997, Richter et al. 2001]。従って黄体相を性周期中に経過する動物（完全性周期動物）は、排卵前の卵胞発育相即ち卵胞期の長さを含めて排卵間隔を約 20 日前後とするさまざまな長さの性周期を回帰する。一方ラット、マウス、ハムスターなどの齧歯類では、排卵後黄体からは実質的に progesterone が分泌されず、最短 4 日後に次の卵胞が排卵に至る（不完全性周期） [McCracken et al. 1999]。ラットやマウスでこの頻回の排卵を可能にするのが黄体細胞で発現するステロイド代謝酵素 20 α -HSD であると考えられている。20 α -HSD は、progesterone を炭素骨格の 20 位で還元し、progesterone 作用のない 20 α -OHP に代謝する酵素である（図 0-1）。20 α -HSD の性周期黄体での発現、頻回の排卵をもたらす性周期中 progesterone 濃度の低下を考え合わせると、おそらく 20 α -HSD の働きにより、ラットやマウスでは、4 日毎に交尾の機会を得、生殖において多産という戦略をとっていると考えられる。

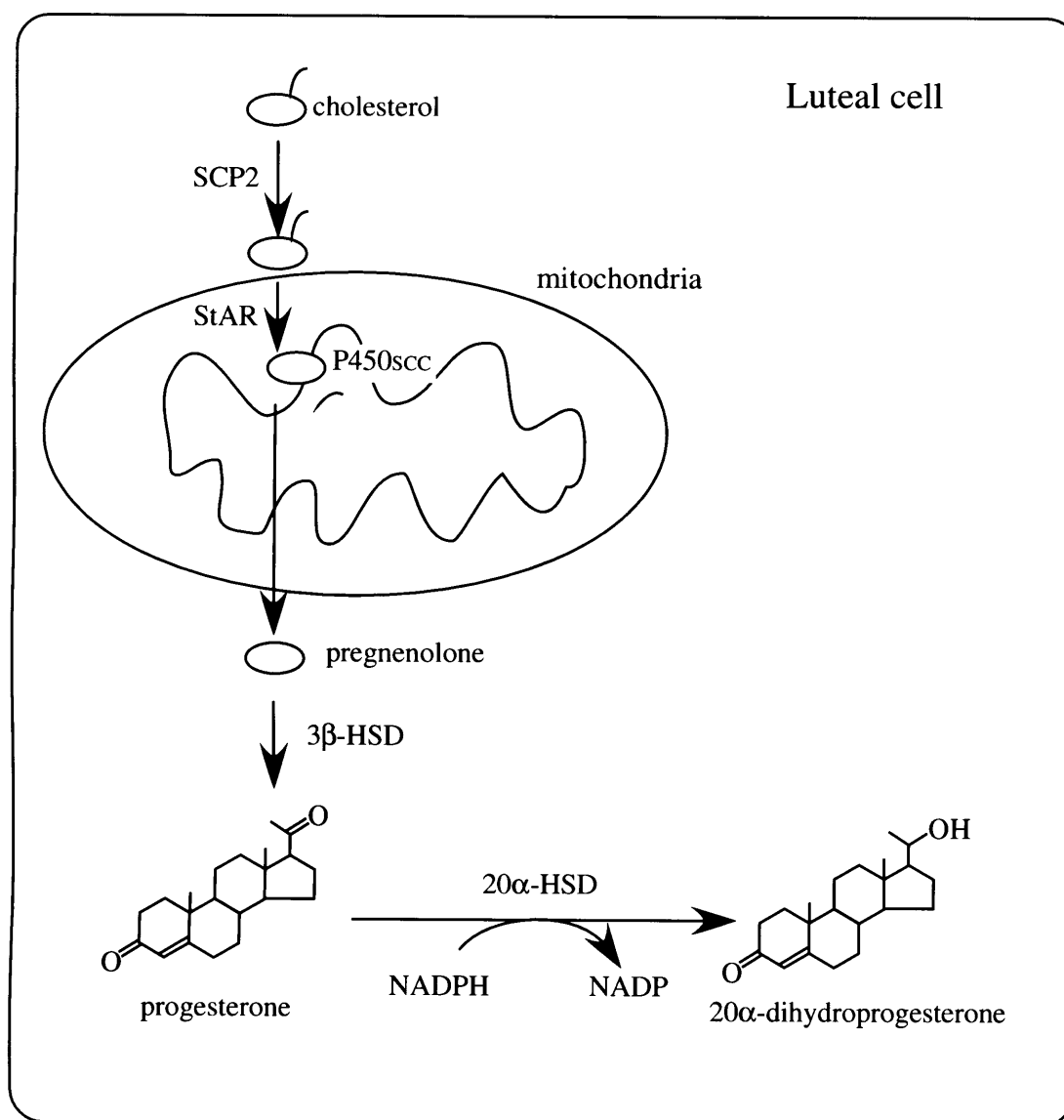
卵巣は精巣、副腎と並んで主要なステロイド産生器官である。ステロイドホルモンは、ステロイド産生細胞に取り込まれた cholesterol から、各種ステロイド代謝酵素により合成される。cholesterol はステロール担体蛋白質（sterol carrier protein ; SCP2）に結合してミトコンドリアへ運ばれ、さらに steroidogenic acute regulatory (StAR) 蛋白質によりミトコンドリア外膜から内膜へ運ばれる。内膜では cholesterol 側鎖切断酵素 (P450_{SCC}) により、側鎖が切り離されて pregnenolone となる。Pregnenolone は、滑面小胞体へ運ばれ各種ステロイドホルモンの前駆物質として利用される。Pregnenolone 以降は、炭素数の多いものを前駆体として C21 (gestagens) - C19 (androgens) - C18 (estrogens) の流れで合成カスケードが形成されている。C21-C19 のカスケードには、progesterone を経由する系 (Δ^4 経路) と、17 α -hydroxypregnenolone を経由する系 (Δ^5 経路) があるが、黄体細胞では Δ^4 経路のみが存在し、かつ排卵に伴い、progesterone を C19 に向けて代謝する 17 α -hydroxylase と C17, C20-lyase 活性が低下するので、基本的に黄体からは progesterone が分泌されるようになる。従って黄体細胞における progesterone の分泌制御は、pregnenolone から progesterone を合成する 3 β -HSD を含むその合成系の制御に委ねられる（図 0-1）。合成系の制御に働いて progesterone 分泌を抑制する因子としては、多くの動物で主要な黄体退行因子として知られるプロスタグランジン F_{2 α} (prostaglandin F_{2 α} ; PGF_{2 α}) がある [Niswender et al. 2000] が、ラットやマウスの黄体においては 20 α -HSD の発現により、合成された progesterone を 20 α -OHP に代謝してステロイド合成カスケード外へはずすことによっても、その分泌を抑制している。また黄体形成ホルモン (luteinizing hormone ; LH) [Hashimoto & Wiest 1969b, Morishige & Rothchild 1974, Stocco & Deis 1996] とプロラクチン (prolactin ; PRL) [Freeman et al. 2000] は、条件により progesterone 分泌の刺激、抑制どちらの作用も有する。

ラットでは、成熟卵胞が排卵により失われることで一時的にインヒビンが低下し、卵胞刺激

ホルモン (follicle stimulating hormone ; FSH) の大量放出によって次の卵胞群の発育が開始する。しかしこの卵胞群は次に発情前期に至る前日までに閉鎖退行するため、その後発情後期から発育を開始する第二卵胞群が次に排卵する。この排卵は、前回排卵の約 48 時間後、黄体が progesterone を分泌し始める頃に、同じ黄体細胞において、 20α -HSD が発現し、progesterone を不活性化することにより可能になると考えられる。その後黄体は、交尾刺激が無い場合には、発情前期午後 (15:00-18:00) の PRL サージを受けて、アポトーシスにより約 3 周期かけて退行する [Matsuyama et al. 1996]。一方、排卵後交尾刺激が加わると、神経内分泌反射的に下垂体前葉から 1 日 2 回サージ状に分泌される PRL により 20α -HSD の発現は抑制される [Lamprecht et al. 1969]。その結果妊娠が成立しない場合でも約 2 週間の黄体相が導入される (偽妊娠) [Matsuda et al. 1990] ため、 20α -HSD 発現の有無は不完全性周期と完全性周期を分ける決定的因子であると考えられる。一方妊娠が成立した場合は、前期においては偽妊娠同様下垂体からの PRL サージによって 20α -HSD 発現は抑制されるが、後期では胎盤からの胎盤性ラクトジェン (placental lactogen ; PL) により抑制される。ラット胎盤からは様々な PRL 様ホルモンが分泌されている (rPL-1, rPL-1 variant, rPL-2, PRL-like protein (PLP) A, PLPB, PLPC) [Soares et al. 1991, Shiota et al. 1993a] が、rPL-1 と rPL-2 のみが PRL レセプターを介して作用することが判っており、他の作用機序は明らかではない。rPL-1 は妊娠 13 日まで、rPL-2 は 13 日から妊娠末期まで分泌され、卵巣の 20α -HSD は PRL レセプターを介して発現抑制されている [Zhong et al. 1997]。偽妊娠、妊娠の末期には progesterone 濃度の低下と共に 20α -HSD の発現が見られる (図 0-2)。

Progesterone は免疫系細胞や癌細胞の細胞増殖を抑制するが [Savouret et al. 1990, Graham & Clarke 1997]、これらの増殖過程の細胞に 20α -HSD が発現することが報告されている [Hapel et al. 1985, Weinstein 1977, 1981, Weinstein et al. 1977, Shiota et al. 1991]。従って、 20α -HSD は、卵巣における機能だけでなく、広く細胞増殖の過程にも関わっている可能性が高い。 20α -HSD の組織特異的発現についても既に多く報告されており、複数のアイソザイムが存在することがわかってきている。ラット卵巣、ブタ副腎では同じ物質を基質とする 2 種類の 20α -HSD 分子が知られている [Noda et al. 1992, Nakajin et al. 1989] が、ラット卵巣の 20α -HSD とラット精巣の 20α -HSD [Shikita et al. 1967] は、基質が異なるため、異なる分子である可能性がある。従って、先に述べた細胞増殖に関わると考えられる 20α -HSD もまた、卵巣で発現している 20α -HSD とは異なる分子である可能性もある。 20α -HSD は、aldo-keto reductase (AKR) superfamily に分類される [Miura et al. 1994] が、AKR superfamily は種を越えて保存性の高い酵素群から構成されており、一つの分子が複数の代謝活性を持つ例もある。 20α -HSD が AKR superfamily に属し、かつ卵巣以外にも免疫系細胞をはじめとして様々な組織で発現、機能している可能性を考えると、この酵素について調べることは、大きな生物学的意味を持つと思われる。

本研究は、これまでラットを用いて研究がすすめられてきた 20 α -HSD について、さらに個体レベルでその機能を探ることを目的に、20 α -HSD 遺伝子欠損マウスの作製を試みた。ラットからマウスへの対象の変換はあるが、マウスは実験動物として広く用いられ、また最近の発生工学の進歩に伴い、受精卵へのマイクロインジェクションによる DNA の注入といった技術や、胚からの多能性幹細胞の樹立なども、すでにマウスを用いた系で確立されている。さらに PRL [Horseman et al. 1997] , PRL レセプター [Ormandy et al. 1997] , オキシトシン (oxytocin) [Nishimori et al. 1996], PGF_{2 α} レセプター [Sugimoto et al. 1997] など生殖機構に関するノックアウトマウスも既に存在しており、20 α -HSD に関して、マウスを用いてさらに遺伝子レベルで解析を進めることは、哺乳類が母体内で発生を進行させるというシナリオの成り立ち、またその意義について、内分泌学的立場から知見を得ることにつながると考えられる。本論文においては、第一章ではマウス卵巣の 20 α -HSD cDNA のクローニングを行い、その三次元構造を推定して活性部位について考察した。さらに *in situ* hybridization 法を用いて、卵巣以外にも妊娠期子宮内組織における 20 α -HSD mRNA の発現を調べ、その働きについて考察した。第二章では、第一章で得られたマウス 20 α -HSD cDNA を元に 20 α -HSD ゲノム DNA をクローニングし、そのゲノム構造をヒト 20 α -HSD ゲノム構造と比較して、その進化について考察した。次にターゲティングベクターを作製し、さらに相同組み換えを起こした 20 α -HSD 遺伝子変異 ES 細胞を単離し、キメラマウスを作製した。第三章では、20 α -HSD ノックアウトマウスを作製して、その表現型を詳細に解析し、20 α -HSD が担っている生理的役割について考察した。



- SCP2 ; sterol carrier protein 2
 StAR ; steroidogenic acute regulatory protein
 P450_{scc} ; cholesterol side-chain cleavage enzyme
 3β-HSD ; 3β-hydroxysteroid dehydrogenase
 20α-HSD ; 20α-hydroxysteroid dehydrogenase

図0-1. 黄体細胞におけるステロイド合成経路

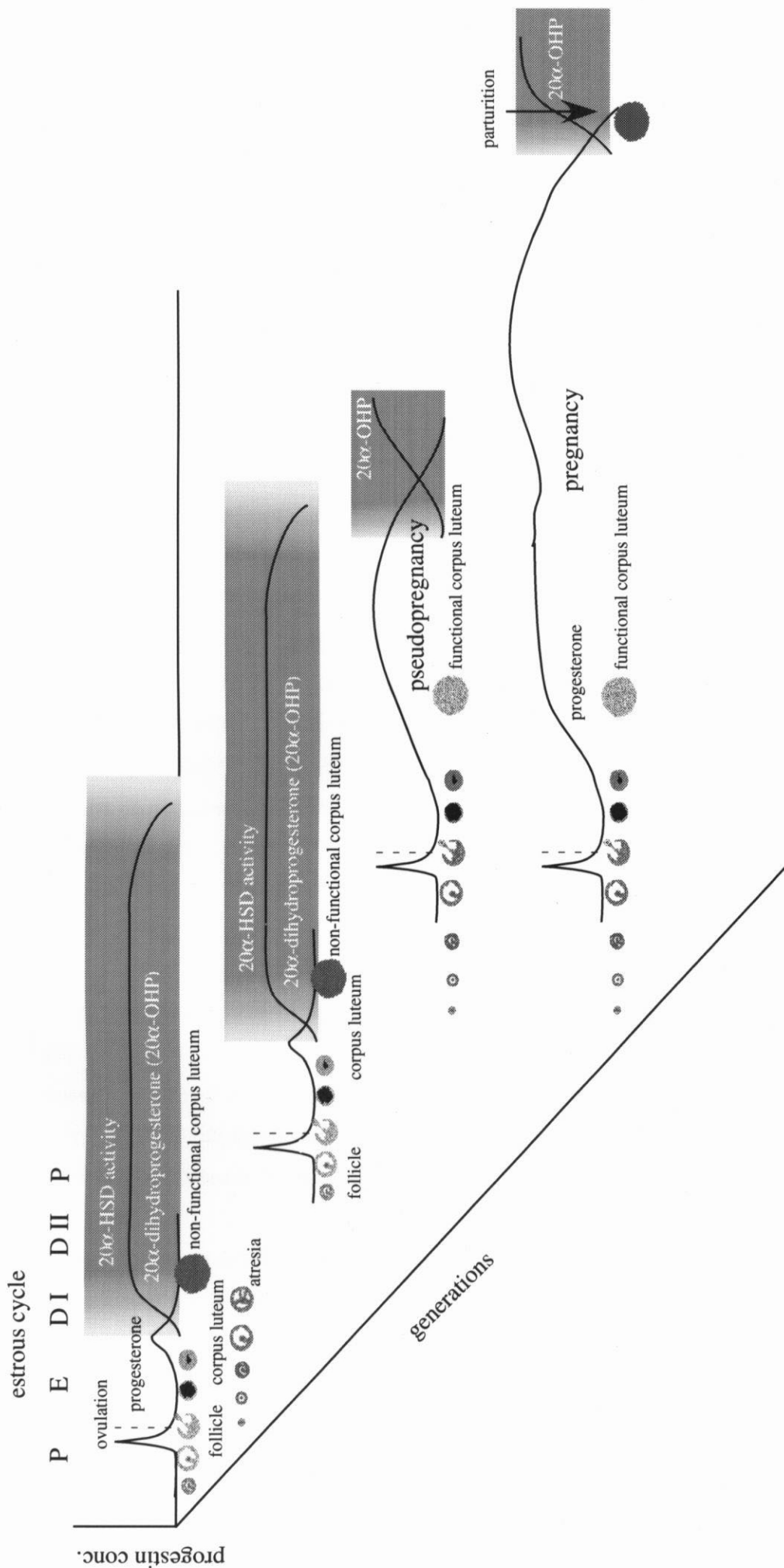


図0-2. ラットの卵巢各ステージにおける血中progesterin濃度の変化と20α-HSD活性の動態
P : Proestrus, 発情前期. E : Estrus, 発情期. DI : Diestrus I, 発情休止期第1日 (発情後期).
D II : Diestrus II, 発情休止期第2日 (発情休止期).

第一章

マウス 20 α -HSD cDNA のクローニングとその妊娠期子宮内組織における発現

緒言

Progesterone は卵巣の黄体で合成，分泌され，妊娠維持に必須のホルモンであるが，多くの動物では排卵後形成された黄体から，性周期中においても約 2 週間分泌される．持続的な progesterone の分泌には，1. LH サージの抑制，2. prolactin (PRL) 分泌の促進，3. 運動活性の抑制，4. 交尾許容性の抑制，5. 食欲の促進，6. 熱損失の抑制といった視床下部を介した作用，また末梢においては，7. 子宮内膜の着床性増殖，8. 子宮運動の抑制，9. 乳腺胞の形成，10. その他 estrogen に対する協同あるいは拮抗作用，といった作用がある．従って，排卵後に持続的な progesterone 分泌期間（黄体相）を有する動物では，約 2 週間は雄との交配は起こらない．黄体相の終了時には，多くの動物では子宮由来の prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) により黄体が退行し，次の卵胞発育・排卵がおり，再び黄体が形成されるという「完全性周期」を回帰する．

20 α -Hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD) は，ステロイド骨格の 20 位でプロトンを加あるいは除去することにより，progesterone と 20 α -dihydroprogesterone (20 α -hydroxypregn-4-en-3-one, 20 α -OHP) の間の可逆的変換を触媒する酵素である．卵巣摘出した妊娠マウスに 20 α -OHP を大量投与しても妊娠が維持されないことから，20 α -OHP には progesterone 活性が無いことが示されており [Wiest & Forbes 1964]，20 α -HSD は progesterone の不活化酵素としてとらえられる．

20 α -HSD は，ラット黄体で発現し [Balogh 1964]，この動物では progesterone をその産生母地において直接不活化できる．従ってラットでは，排卵後黄体が完成して progesterone を分泌し始める 48 時間後、ほぼ同時に黄体細胞で発現する 20 α -HSD の，progesterone 不活化作用（黄体の機能的退行）により交配活動停止期間を短縮できると考えられる．72 時間後には progesterone 濃度は低く抑えられ，次の卵胞発育・排卵が可能になるため，排卵ひいては交尾の機会を最短

4 日毎に迎えている。このような仕組みで実質的に黄体相を持たないラットは、「完全性周期動物」に対し「不完全性周期動物」に分類される。ただし妊娠成立の場合には、 20α -HSD の発現は抑制され（黄体の機能化）、約 21-22 日間 progesterone の妊娠維持作用が発揮される。交尾刺激を受けて受精・着床に至らなかった場合（偽妊娠時）には、妊娠期より早く黄体相が終了し（約 15 日間）、次の卵胞発育・排卵を迎える。妊娠期では 21 日目に [Albarracin et al. 1994]、偽妊娠期でも 12 日目を過ぎてから [Matsuda et al. 1990] 20α -HSD 発現は高まり、分娩や次の卵胞発育・排卵に必要な progesterone 濃度の低下に寄与していると考えられる。

1950 年代、ラット卵巣から progesterone と 20α -OHP が検出された [Wiest 1959] ことで 20α -HSD が発見されて以来、生物学研究の進歩に従って様々な解析がなされてきた。 20α -OHP に生物学的活性が無いこと [Wiest & Forbes 1964]、 20α -HSD は卵巣の黄体で発現していること [Balogh 1964]、PRL 分泌を阻害すると妊娠中黄体で 20α -HSD が発現上昇すること [Lamprecht et al. 1969]、妊娠 20 日目から 1 日 2 回 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 合成阻害剤であるインドメタシンをラットに投与すると 21 日目に発現するはずの 20α -HSD 活性が見られず黄体退行が遅延すること [Fuchs et al. 1976]、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 投与によりラットで 20α -HSD 活性が誘導されること [Bussmann et al. 1979] など、すでに 1960-70 年代に 20α -HSD の発現制御因子としての PRL と $\text{PGF}_{2\alpha}$ が着目されている。その後分子・遺伝子レベルでの解析が進み、1991 年には遂にラット 20α -HSD 蛋白が完全精製され [Noda et al. 1991]、その結果 20α -HSD は、細胞質に存在し、分子量約 37 kDa の単量体であり、2 つのアイソザイム 20α -HSD1 と 20α -HSD2 が存在することがわかった。また蛋白精製の過程で活性上昇が見られたことから、内因性の活性抑制因子の存在が示唆された。 20α -HSD1 と 20α -HSD2 は互いに基質親和性、アミノ酸組成がわずかに異なり、偽妊娠末期に発現が上昇するのは 20α -HSD1 のみで [Noda et al. 1992, Seong et al. 1992]、各々が異なる制御により異なる mRNA から翻訳される可能性が示されている [Yoshida et al. 1992]。さらに 1994 年には 20α -HSD1 のアミノ酸配列を元にラットでその cDNA がクローニングされた [Miura et al. 1994, Mao et al. 1994]。ラット 20α -HSD cDNA は、全長約 1.2 kb で 323 個のアミノ酸をコードしており、aldo-keto reductase (AKR) superfamily に属することが明らかになった。またその発現制御に、progesterone がグルココルチコイドレセプターを介して抑制的に働くことがわかり [Sugino et al. 1997]、1998 年にはラット 20α -HSD ゲノム DNA がクローニングされた [Zhong et al. 1998]。生物学の進歩は速く、その研究手法においても、ある遺伝子の働きを調べるのにその遺伝子を欠損させたマウスを作製して解析するというジーンターゲット法が応用されては久しい。 20α -HSD についても、その生物学的意義について語るには、やはり遺伝子欠損動物の解析が望まれる。

ステロイド代謝酵素の発現部位には、ステロイド産生細胞やステロイドの標的組織、あるいはステロイドを排泄する器官などが考えられる。 20α -HSD の発現及び活性は、各種動物組織で報告され、ラット、ウサギ、ヒト、ヒト胎児の卵巣 [Wiest 1959, Lacy et al. 1993, Wintergalen et

al. 1995, Nishizawa et al. 2000, Sano et al. 1982], ラット, ヒト, ウシ, ブタの精巣 [Shikita et al. 1967, Fan et al. 1974, Pineda et al. 1985, Sato et al. 1972], マウス, ブタの副腎 [Ertel et & Unger 1968, Nakajin et al. 1989], ヒト, ラットの胎盤 [Pudy et al. 1964, Strickler et al. 1981, Shiota et al. 1993ab], ステロイド非産生器官であるイヌとネコの腫瘍 [Shiota et al. 1991], ヒト子宮内膜 [Tseng et al. 1979], ヒト, サル, ウサギの肝臓 [Nishizawa et al. 2000, Hara et al. 1989, Smirnov 1990], ウシとヒツジの胎子赤血球 [Nancarrow et al. 1981, Chen et al. 1989], マウス胸腺 T 細胞, 骨髄細胞, マクロファージ [Weinstein 1977, 1981, Weinstein et al. 1977, Hapel et al. 1985], 各種細菌 [Inazu et al. 1994, Krafft et al. 1987, Rimsay et al. 1988] でも報告がある.

20 α -HSD 活性はステロイドの 20 位における酸化還元反応であり, これらの活性は全て同一の分子によるものとは限らず, 基質も progesterone に限らない. 例えば, ラット精巣, ブタとウシの副腎では 17 α -hydroxyprogesterone と 17 α , 20 α -dihydroxypregn-4-en-3-one の変換を行い, ラットでは卵巣と精巣で基質が異なるため, 異なる分子の働きである可能性がある. またヒト精巣の 20 α -HSD は progesterone, pregnenolone, 17 α -hydroxyprogesterone を基質とし, その代謝産物 20 α -OHP, 20 α -dihydropregnenolone は, progesterone と pregnenolone に対する酵素 17 α -hydroxylase のインヒビターとして作用するため, androgen 合成調節を担っていると考えられている [Fan et al. 1974]. またマウス胸腺 T 細胞では, インターロイキン 3 (IL-3) により誘導される 20 α -HSD の発現が分化マーカーとして認識されている. Progesterone は高濃度では T 細胞の増殖を抑制し, 20 α -OHP には増殖抑制作用がないことから, 胎子期胸腺において 20 α -HSD は progesterone の増殖抑制作用から胸腺を保護していると考えられている [Weinstein 1977]. 従って 20 α -HSD の機能は, 単なる黄体における progesterone 分泌の調節に留まらず, progesterone がステロイド合成経路の上流に位置することからその下流のステロイド, すなわち estrogen や androgen 合成を調節するという機能, また progesterone の細胞増殖抑制作用の阻害因子としての機能などを有する可能性がある.

第一章では, 第二章以下, ジーンターゲット法を用いる前段階として, マウス卵巣 20 α -HSD cDNA のクローニングを行った. またラットで胎盤において 20 α -HSD が発現し [Shiota et al. 1993ab], 胎子発育環境において高濃度の progesterone の作用を緩和している可能性をふまえ, クローニングしたマウス卵巣 20 α -HSD cDNA を元に cRNA probe を合成し, 卵巣以外にも, 妊娠期高濃度の progesterone 環境下にある子宮, 胎盤, 胎子におけるその mRNA 発現を調べた.

第一章 材料と方法

第一章の概略は、図 1-1 に示した。

動物

8 週齢の ICR マウス（日本チャールズリバー株式会社，横浜）は，室温 22 ± 1 °C，7:00-19:00 明期の光条件で飼育し，餌（ラボ MR ストック，日本農産工業，神奈川）および水は自由に摂取させた。

試薬

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) は Fuji Chemical Industries（富山）より，hCG (GONATROPIN) と eCG (SEROTROPIN) は帝国臓器製薬株式会社（東京）より．オルガノシランは信越化学（東京）より購入した．また，gel からの DNA の切り出しは，QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン，東京）を用いて行った．Diethyl pyrocarbonate は SIGMA (MO, USA)，sodium lauryl sarcosinate, sodium dextran sulfate, clear sol II は nacalai tesque（京都），O.C.T. (ornithine carbamyl transferase) compound は SAKURA（東京）より，blocking reagent は Roche (Mannheim, Germany) より，分子量マーカー λ EcoT14 I digest，各種制限酵素，T4 DNA ligase，alkaline phosphatase は宝酒造（京都）より，その他特記しない限り和光純薬工業（大阪）より購入した試薬を用いた。

偽妊娠マウスの作出と組織の採材

未成熟マウス (21-day-old) に 5 IU の PMSG と，その 48 時間後に 5 IU の hCG を投与し，交尾刺激を与えて偽妊娠を誘起すると，偽妊娠 10 日目から血清中の progesterone が減少することがわかっている [Hasumoto et al. 1997]．本実験では，17 週齢の ICR マウスを用い，排卵を同期化するため $PGF_{2\alpha}$ を 5 IU 投与して，もし，黄体が存在した場合にはその黄体をすべて退行させる処置を行った 48 時間後に，eCG を 10 IU，その 48 時間後に hCG を 5 IU 腹腔内投与し， 20α -HSD の活性が上昇していると予想される 12 日後にマウスを断頭放血し，卵巣を摘出し，氷冷 1×phosphate buffer saline (PBS) に回収して直ちに RNA 抽出に使用した。

15 週から 19 週齢の ICR マウスの雌を精管結紮した雄と交配させ膣栓を確認した日を 0 日目として，2, 6, 8, 9, 10 日目の子宮を摘出し，RNA の抽出まで -80 °C で保存し，Northern hybridization に用いた。

妊娠マウスの作出と組織の採材

15 週から 19 週齢の ICR マウスの雄と雌を交配させ、午後 1 時から 6 時の間に血液と卵巣を採取し、卵巣は直ちに液体窒素中で凍らせ、-80 °C で保存した。また陰栓を確認した日を 0 日目と数え、14, 15, 16, 17, 18 日目の胎子血液、10, 12, 14, 16, 17 日目の胎水を採取した。胎子血液と胎水は、一腹分を合わせて回収した。また、10, 15, 18 日目の子宮、胎子、胎盤を採材し、*in situ* hybridization に用いた。Northern hybridization に用いた 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 分娩後 1 日目 (PPI) の子宮、11, 12, 14, 16, 18 日目の胎盤、14, 15, 16, 17, 18 日目の胎子背中の表皮は摘出後、RNA の抽出まで -80 °C で保存した。

グアニジン-塩化セシウム超遠心法による偽妊娠マウス卵巣 total RNA の抽出

卵巣組織に 5 ml の homogenization buffer (4 M guanidium thiocyanate, 0.1 M Tris-Cl pH 7.5, 2 % 2-mercaptoethanol) を加えて、ウルトラタラックス T 25 ホモジナイザー (IKA, 東京) を用いて室温で組織が細かく均一になるまで破碎した。次に、sodium lauryl sarcosinate を 0.5 % になるように加え、よく攪拌し、20 °C, 5,000 rpm で 10 分間遠心した。得られた上清 2.5 ml 当たり 1 g の CsCl を加えてよく攪拌し、ベックマン SW 41 ローター用超遠心チューブ (g-Max Quick-Seal tube, Beckman, CA, USA) 中の CsCl/EDTA cushion (5.7 M CsCl, 10 mM EDTA pH 8, 0.1 % diethyl pyrocarbonate (DEPC)) 1.4 ml の上に重層した。これを、ベックマン L-60 超遠心機 (Beckman, CA, USA) を用いて 20 °C, 30,000 rpm で 19 時間超遠心した。遠心後、上清を吸引除去し、得られた RNA ペレットを 70 % ethanol で洗浄後、風乾して 0.01 % DEPC 水に溶解させた。Ethanol 沈殿により得られた RNA ペレットを 70 % ethanol で洗浄後、風乾して 0.01 % DEPC 水に溶かし、分光光度計 Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) を用いて 260 nm の吸光度を測定した。1 OD 当たりを 40 µg/ml として RNA の濃度を算出し、使用するまで -80 °C で保存した。

偽妊娠マウス卵巣 mRNA の抽出

乾燥した偽妊娠マウス卵巣 total RNA のペレットを、1 mg/ml となるように elution buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS) に溶解させ、等量の oligotex-dT30<Super> (Roche, Mannheim, Germany) を加えて攪拌した。その混合液を 65 °C で 5 分間加熱後、すぐに氷冷し、1/10 量の 5 M NaCl を加えて攪拌した。これを 37 °C で 10 分間加温後、20 °C, 15,000 rpm で 3 分間遠心し、ペレットに wash buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 0.5 M NaCl) を 1 ml 加えて懸濁し、65 °C で 5 分間加熱後、すぐに 20 °C, 15,000 rpm で 3 分間遠心した。上清を回収して ethanol 沈殿により得られた mRNA ペレットを 70 % ethanol で洗浄し、さらに 4 °C, 15,000 rpm で 20 分間遠心し、上清を除去して 0.01 % DEPC 水に溶解させた。より純度の高い

mRNA を得るため、さらにもう一度 elution buffer を加えるところから繰り返し、oligotex-dT30 <Super> による精製を合計 2 回行った。

Probe 作製用ラット cDNA の調整

既に当教室で調整されている、pBluescript SK (+) (STRATAGENE, CA, USA) に組み込まれているラット 20 α -HSD cDNA [Miura et al. 1994] を用いた。この plasmid を *EcoR* I と *Xho* I を用いて切断し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて 1.2 kb の長さのフラグメントを 1 % agarose gel から回収した。得られた DNA フラグメントは精製水 (MilliQ 水) に溶解し、分光光度計を用いて 260 nm の吸光度を測定した。1 OD 当たりを 50 μ g/ml として DNA の濃度を算出し、使用するまで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

偽妊娠マウス卵巣 mRNA を用いた RT-PCR による probe の作製 (図 1-2)

RT-PCR は、マウス卵巣から抽出した mRNA を鋳型にして、ラットの 20 α -HSD cDNA [Miura et al. 1994] の配列をもとに合成した primers,

Rat cDNA F1 primer ; 5'-ACTCTTCTAGGGAAGAGCAG-3' (-29 bp から -10 bp)

Rat cDNA R1 primer ; 5'-TGTATCTCTGAGTTCCCAGG-3' (654 bp から 673 bp)

(開始コドンのアデニンを 1 と数える)

により、GeneAmpTM RNA PCR Kit (宝酒造, 京都) を用いて行った。mRNA 100 ng に master mix (5 mM MgCl₂, 1 \times PCR buffer II, 1 mM each dNTPs, RNase inhibitor 1 U), 2.5 μ M の random hexamers primer, 2.5 U の reverse transcriptase を加えて全量を 20 μ l にし、まず 42 $^{\circ}$ C で 1 時間加温して cDNA を合成し、99 $^{\circ}$ C で 5 分間、5 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベート後、chloroform 抽出を行って reverse transcriptase を除去した後に PCR 反応に移った。PCR 反応では、さらに buffer の組成を 2 mM の MgCl₂, 1 \times PCR buffer II, 0.25 mM dNTP となるように調整した。F1 primer, R1 primer 各々 50 pmol ずつ加えた後に 100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱、急冷して熱変性させ、Ampli Taq DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany) を 5 U 加えて全量を 100 μ l とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C で 1 分、63 $^{\circ}$ C で 1 分、72 $^{\circ}$ C で 1.5 分を 1 cycle とし、40 cycle 行った後、72 $^{\circ}$ C で 10 分加温した。PCR 産物は、2 % agarose gel で電気泳動し、約 0.7 kb のフラグメントを gel から切り出し回収した。

偽妊娠マウス卵巣 mRNA を用いた RT-PCR 産物の sequencing

1) サンプル調整

偽妊娠マウス卵巣 mRNA を用いて得られた RT-PCR 産物を、pGEM-T ベクター (Promega, 東京) に T4 DNA ligase を用いて組み込み、QIAGEN Plasmid Midi Kit (キアゲン, 東京) を用

いて plasmid を精製し, sequencing 反応に用いた.

2) Sequencing

Sequencing 反応は, ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Roche, Mannheim, Germany) により行った. 500 ng の鋳型 DNA に, Terminator Ready Reaction Mix を 8 µl, 3.2 pmol の primers

M-13 universal forward primer; 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M-13 reverse primer; 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

を加えて全量 20 µl にし, PCR 反応を行った. PCR の条件は, 96 °C で 30 秒, 50 °C で 15 秒, 60 °C で 4 分を 1 cycle とし, 25 cycle 行った. 得られた PCR 産物を, あらかじめ 2 時間以上 MilliQ 水になじませた Spin Column (PRINCETON SEPARATIONS, Adelphia, USA) で精製した. Spin Column は, 2,500 rpm で 1 分間の遠心を 2 回行って予め MilliQ 水を排出し, PCR 産物を添加して 2,500 rpm で 1 分間遠心して精製した. Spin Column で精製された PCR 産物は, 真空条件下水分を蒸発乾固させ, 8 µl の loading buffer に懸濁し, 100 °C で 5 分間加熱後, 氷上で急冷してから, 4 分の 1 量 (2 µl) を泳動に用いた. Sequencing に用いた gel は, Gelux (Roche, Mannheim, Germany) を用いて, 0.2 mm の厚さの gel を作製し, 1×TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2.2 mM EDTA, pH 8.3) により 1,680 V で 7 時間, ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer (Roche, Mannheim, Germany) を用いて電気泳動した. 検出された蛍光は, ソフトウェア 377-18 Sequencer Data Collection により解析し, 得られた塩基配列は, ソフトウェア DNASIS Mac を用いて解析した.

偽妊娠マウス卵巣 cDNA library の作製

1) 偽妊娠マウス卵巣 cDNA の合成

cDNA synthesis module RPN 1256 (Amersham LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, England) を用いて, 偽妊娠マウス卵巣 mRNA を鋳型にして cDNA を合成した. 偽妊娠マウス卵巣から抽出精製した mRNA 5 µg を, 65 °C で 5 分間加熱し, 急冷して熱変性させてから, 1×first strand synthesis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.3, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂), 4 mM sodium pyrophosphate solution, human placental ribonuclease inhibitor (HPRI) 5 U, 1 mM each dATP, dGTP, dTTP, 0.5 mM dCTP, 1 pmol の anchored dT primer, avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase 100 U を加え, 全量を 50 µl にして 42 °C で 1 時間反応させて first strand cDNA を合成した. 次に 1×second strand synthesis buffer (32 mM Tris-Cl pH 7.5, 80 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.52 mg/ml BSA), E. coli ribonuclease H を 4 U, E. coli DNA polymerase I を 115 U 加え, 12 °C で 1 時間 10 分, 22 °C で 1 時間 20 分反応させて鋳型 mRNA を破壊しかつ second strand cDNA を合成し, 70 °C で 10 分間加熱して酵素を失活させた. さらに T4 DNA polymerase を 10 U 加えて 37 °C で 15 分間加温し,

3'-5' exonuclease 活性により 3'突出部分を除去した。0.5 M EDTA (pH 8) を加えた後、phenol 抽出、chloroform 抽出、ethanol 沈殿を行って cDNA を精製した後に、T4 DNA ligase により、*EcoR* I/*Not* I/*Bam*H I adaptor (宝酒造, 京都) を連結させた。得られた cDNA を 1 % agarose gel で電気泳動して分離し、0.5 kb から 2.7 kb までの長さの cDNA を gel から切り出し回収した。

2) λ ZapII ベクターへの cDNA の組み込み

回収した偽妊娠マウス卵巣 cDNA 50 ng に λ ZapII ベクター (PREDIGESTED LAMBDA ZAPII/*EcoR* I/CIAP CLONING KIT, STRATAGENE, CA, USA) 1 μ g, T4 DNA ligase を加えて全量を 10 μ l とし、13 $^{\circ}$ C で 48 時間反応させて cDNA を λ ZapII ベクターに組み込んだ。これを Gigapack II Packaging Extracts (STRATAGENE, CA, USA) を用いてパッケージングし、得られた cDNA library は、chloroform を 2 滴加えて軽く混ぜ、使用するまで 4 $^{\circ}$ C で保存した。

偽妊娠マウス卵巣 cDNA library の screening

1) Host cell の調整

XL1-Blue MRF'1 コロニーを、20 ml の LB 培地 (0.2 % maltose, 10 mM MgSO_4 を添加) で 37 $^{\circ}$ C で 8 時間培養した。次に 3,000 rpm で 10 分間遠心して大腸菌を沈殿させて集め、上清を除去した後 10 mM MgSO_4 で $\text{OD}_{600} = 1$ になるように希釈して用いた。

2) λ ZapII phage の host cell への感染

cDNA library は軽く遠心して chloroform を沈めた後、上清 2 μ l (約 6,000 プラーク分) を 1) で調整した大腸菌液 600 μ l に加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間加温した。50 $^{\circ}$ C の NZY top agarose に加え、37 $^{\circ}$ C に温めておいた NZY プレートの上に流し混ぜ、37 $^{\circ}$ C で 9 時間培養し、直径約 1 mm のプラークを得た。

3) Phage DNA のナイロンメンブレンへの transfer

プラークのできたプレートの上に、直径 15 cm のナイロンメンブレン (HybondTM-N+; Positively Charged Nylon Membrane, Amersham, Buckinghamshire, England) を載せ、1 分間静置して phage DNA をメンブレンに移し取った。同時にメンブレンの上からプレートに針で非対称に 3 ヶ所穴を開けて位置確認の目印とした。次に phage DNA の付着した面を上にして、アルカリ変性液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) をしみこませた濾紙の上に載せ、15 分間静置して phage DNA を 1 本鎖に変性させた。その後同様にして中和液 (0.5 M Tris, 3 M NaCl, pH 7.0) をしみこませた濾紙の上にメンブレンを載せて 15 分間静置した。得られたメンブレンを風乾し、GS GENE LINKERTM UV CHAMBER (Bio-Rad, CA, USA) 内で 150 mJoule の UV を 2 回照射し、さらに 80 $^{\circ}$ C で 30 分間乾熱して phage DNA をメンブレンに固定した。また、非特異的なシグナルを見分けるため、同じプレートでもう一度 3) の操作を繰り返し、1 枚のプレートにつき 2 枚のメンブレンでシグナルを検討できるようにした。ただし、2 枚目のメンブレンには 1 分 30 秒をかけて phage DNA

を移し取った.

4) Prehybridization

メンブレンを washing buffer (55 °C, 2×SSC, 0.1 % SDS) 中で1時間振とうさせ, メンブレンに付着している余分な agarose や大腸菌蛋白を洗い落とした. メンブレンは, prehybridization buffer が十分に行き渡るように, phage DNA 付着面にナイロンメッシュを挟み, メンブレン 5 枚につき, prehybridization buffer (2.5×denhardt's reagent, 5×SSC, 5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 100 µg/ml salmon sperm DNA) 15 ml を加えて 42 °C で一晩加温した.

5) ラット cDNA probe とマウス F1/R1 probe の ³²P labeling

ラット cDNA probe とマウス F1/R1 probe の ³²P labeling には, Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Mannheim, Germany) を用いた. 25 ng の probe 用 DNA に, α-³²P-dCTP (Amersham, Buckinghamshire, England) を 50 µCi, dCTP 以外の 0.5 mM dNTP, hexanucleotide mixture 入り 1 × reaction buffer, klenow enzyme を 2 U 加え, 37 °C で 30 分間加温した. 得られた反応液を, 3,000 rpm で 2 分間遠心して buffer を排出済みのカラム (TE SELECT-D-50, 5 prime→3 prime, USA) に通し, 3,000 rpm で 4 分間遠心して放射性標識されたオリゴヌクレオチドを精製した. 100 °C で 5 分間加熱, 急冷して熱変性させた後, 10 万 cpm/ml 以上の活性を有するように hybridization buffer に加えた.

6) Hybridization

Prehybridization buffer を除去し, hybridization buffer (2.5×denhardt's reagent, 5×SSC, 5 mM EDTA, 0.1 % SDS, 10 % sodium dextran sulfate, 100 µg/ml salmon sperm DNA) 15 ml で置換し, ³²P で標識したラット cDNA probe を混ぜ加えて, 42 °C で 12 時間加温した. マウス F1/R1 probe を用いる場合も同様にして hybridization を行った.

7) Washing

Hybridization buffer を除去し, washing buffer (55 °C, 0.5×SSC/0.1 % SDS で 10 分間, 55 °C, 0.1×SSC/0.1 % SDS で 10 分間, 65 °C, 0.1×SSC/0.1 % SDS で 30 分間) で wash した. 次に, メンブレンを X 線フィルム (Kodak, NY, USA) に -80 °C で 24 時間感光させた. 得られた X 線フィルムを現像し, ラット cDNA probe を用いたものでは 60,000 プラーク中 402 個の, マウス F1/R1 probe を用いたものでは 48,000 プラーク中 444 個の陽性シグナルを示すプラークを得た.

8) PCR による陽性プラークの選択

陽性を示したプラークを培地ごと取り出し, 500 µl の SM buffer (0.1 M NaCl, 8 mM Mg SO₄, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.01 % gelatin) に回収し, chloroform 50 µl を加えて軽く混ぜてから 4 °C で一晩放置し, SM buffer 中に phage を溶出させた. 軽く遠心して chloroform を沈めた後, 上清 10 µl を用いて, 100 °C で 10 分間加熱後, 急冷してから Rat cDNA F1 primer と Rat cDNA R1 primer に

よる PCR を行った.

9) Second screening

PCR の結果, 強い単一の陽性のバンドを示したもののなかからいくつかの phage クローンを選び, 再度 XL1-Blue MRF' に感染させるところから繰り返し, 陽性シグナルを示すプラークを得た. 予め, プレート上のプラークどうしの間隔を広めに取りることによりコンタミネーションを避けながら, 各々のプラークから phage を回収した.

10) In vivo excision

それぞれのクローンについて, PREDIGESTED LAMBDA ZAPII/*EcoR* I/CIAP CLONING KIT (STRATAGENE, CA, USA) を用いて in vivo excision 法により phagemid DNA を plasmid DNA に変換した. Phage の溶出している SM buffer を 200 μ l 取り, 37 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して chloroform を揮発させた. 次に 200 μ l の XL1-Blue MRF' solution ($OD_{600} = 1$) と 1 μ l の exassist helper phage を加え, 37 $^{\circ}$ C で 15 分間保温して λ ZapII phage を共感染させた. 得られた大腸菌液を 37 $^{\circ}$ C に温めておいた 3 ml の 2 \times YT 培地に加え, 37 $^{\circ}$ C で 3 時間振とう培養した. その後 70 $^{\circ}$ C で 20 分間加熱して大腸菌蛋白を変性させ, 4 $^{\circ}$ C, 3,000 rpm で 20 分間遠心して上清中の phagemid を回収し, 4 $^{\circ}$ C で保存した. 150 ml の phagemid で 1.5 ml の大腸菌 SOLR solution ($OD_{600} = 1$) を 37 $^{\circ}$ C で 15 分間保温して形質転換し, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) と IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) を加えた LB プレート (50 μ g/ml ampicillin を添加, 以下 LB/Amp プレート) 上で 37 $^{\circ}$ C で一晩培養し, blue-white color selection により, 陽性クローンの入った大腸菌の白いコロニーを得た.

Phagemid から pUC118 ベクターへのサブクローニング

陽性クローンの入った大腸菌から phagemid を small scale 法の alkali lysis 法 (Sambrook et al. 1989) で抽出し, *Bam*H I により, *EcoR* I/*Not* I/*Bam*H I adaptor の *Bam*H I サイトからマウス卵巣 cDNA のインサートを切り出した. 次にインサートとベクターのモル比が 3:1 となるように調整して加えあわせ, T4 DNA ligase により, pUC118/*Bam*H I/BAP (大腸菌由来 alkaline phosphatase) ベクター (宝酒造, 京都) に組み込んだ. JM109 competent cells (宝酒造, 京都) を得られた plasmid で形質転換して X-gal と IPTG を加えた LB/Amp プレート上で 37 $^{\circ}$ C で一晩培養し, blue-white color selection により白いコロニーを得た. これらをいくつか回収し, 少量培養を行った後 plasmid を抽出し, *Bam*H I によりインサートを切り出して, その長さにより正しいクローンを推定した.

Sequencing

1) Plasmid の調整

*Bam*H I により切り出された cDNA は, 約 1.2 kb の長さを持っていた. そこで, pUC118 のマ

ルチクロニングサイトとインサート内の *Hinc* II サイトにより約 300 bp と約 900 bp に分割した。また、pUC118 のマルチクロニングサイトの *Sma* I サイトとインサート内の *Bal* I サイトにより約 500 bp と約 700 bp に分割した DNA を pUC118/*Hinc* II/BAP ベクターに組み込み、sequencing に使用した。Sequencing 用の plasmid は、QIAGEN Plasmid Midi Kit (キアゲン, 東京) を用いて精製し、sequencing 反応に用いた。

2) Sequencing

Sequencing は、前記「偽妊娠マウス卵巣 mRNA を用いた RT-PCR 産物の sequencing」の方法に従った。

マウス卵巣 20 α -HSD 三次元構造の解析

既に X 線結晶解析法により三次元構造が決定されているラット肝臓 3 α -HSD の構造を元に、SWISS MODEL データベース (<http://expasy.hcuge.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) によりマウス 20 α -HSD の三次元構造を推定した。

Radioimmunoassay (RIA)法による血中 progesterone, 20 α -OHP 濃度の測定

1) 血清からのステロイドホルモンの抽出

マウス血液は、採血後 3 時間以上静置し凝血させた後、4 °C, 3,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清を回収し、測定まで -20 °C で保存した。

マウス血清 50 μ l に、MilliQ 水を加えて 1 ml とし、さらに特級 diethyl ether を 2 ml 加えて 200 回激しく振とうした。軽く遠心後、-80 °C で 5 分間下層の水層を凍結させ、ステロイドの抽出された上層の diethyl ether 層をガラスチューブに回収した。残った水層に再度特級 diethyl ether を 2 ml 加えるところから繰り返し、diethyl ether 層を回収した。ガラスチューブは、恒温槽で 55 °C に加温しながら窒素ガスを吹きかけて diethyl ether を蒸発乾固させた。これに氷冷した特級 acetone を 1 ml 加え、5 秒間 vortex した後、100 μ l (血清 5 μ l 分に相当) ずつ progesterone 測定用と 20 α -OHP 測定用のガラスチューブに分注した。

2) ステロイドホルモンの RIA

各ガラスチューブの acetone を恒温槽で 55 °C に加温しながら窒素ガスを吹きかけて蒸発させ、assay buffer (0.1 M sodium phosphate buffer pH 7, 0.9 % NaCl, 0.1 % NaN₃, 0.1 % gelatin) を 500 μ l, ³H 標識された各ステロイドホルモン (PROGESTERONE [1, 2-³H(N)]-, HYDROXYPREGN-4-ENE-3-ONE 20 α [1, 2-³H(N)]-, NEN, MA, USA) を 100 μ l, assay buffer で希釈した各ステロイドに対する抗ステロイド抗体を 100 μ l 加えて混和し、4 °C で一晩インキュベートした。次にデキストランチャコール液 (0.625 % norit A, 0.0625 % dextran T-70) を 200 μ l 加えて混和し、4 °C で 20 分間インキュベートした後、4 °C, 3,000 rpm, 20 分間遠心分離して、遊離ステロイドが

結合したデキストランチャコールを沈殿させた。上清をバイアルに回収し、3 ml の clear-sol II と混和して室温で一晩静置し、放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。ステロイドホルモン量は、各ステロイド純品 50–1,600 pg を用いて作製した標準曲線と、各サンプルの放射線量から算出した。

なお、抗ステロイド抗体はそれぞれ progesterone 11 α -hemisuccinate-BSA（抗 progesterone 抗体用）、20 α -dihydroprogesterone-3-CMO-BSA（抗 20 α -OHP 抗体用）（共に Steraloid, NH, USA）を Freund's complete adjuvant（Difco laboratories, MI, USA）と混合したもので家兎を免疫して当教室で作製した。この抗 progesterone 抗体、抗 20 α -OHP 抗体共に、他の主なステロイドとほとんど交叉反応を示さないことが確認されている [Takahashi et al. 1980]。

TRIzol reagent を用いた妊娠マウス卵巣、妊娠子宮、偽妊娠子宮、性周期子宮、胎盤、胎子表皮からの total RNA の抽出

妊娠マウスの卵巣からの total RNA の抽出は、TRIzol reagent（Invitrogen, CA, USA）を用いた。凍結組織の重量をはかり、組織重量 100 mg 当たり 1 ml の TRIzol reagent を加え、100 mg に満たない組織には 1 ml の TRIzol reagent を加えた。卵巣はテフロンホモジナイザー（Digital Homogenizer, IUCHI, 大阪）を用いて、それ以外の組織はウルトララックス T25 ホモジナイザー（IKA, 東京）を用いて破碎した。次に、TRIzol reagent の 1/5 量の chloroform を加えて vortex し、室温で 2-3 分静置した。12,000 rpm で 5 分間遠心し、上層を回収した。これに TRIzol reagent の 1/2 量の 2-propanol を加え、室温で 10 分間静置後、12,000 rpm で 10 分間遠心した。ペレットを 75 % ethanol で洗浄し、5 分間風乾後、0.01 % DEPC 水に懸濁し、分光光度計で濃度を測定した。

妊娠マウス卵巣 total RNA、妊娠期・偽妊娠期・性周期子宮 total RNA の Northern hybridization

1) サンプル調整

Northern hybridization には、卵巣では 5 μ g、卵巣以外の組織では 10 μ g の total RNA を用いた。6 μ l の 0.01 % DEPC 水に溶かした total RNA に、20 \times MOPS (0.4 M 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid, 100 mM sodium acetate, 20 mM EDTA, pH 7) を 0.5 μ l, formaldehyde solution を 3.5 μ l, formamid を 10 μ l 加えて全量 20 μ l にし、65 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性し、氷上で急冷した。

2) 1 % 変性 agarose gel の作製と電気泳動

100 ml あたり 1 g の agarose, 5 ml の 20 \times MOPS, 77 ml の 0.01 % DEPC 水を加え、電子レンジで agarose を融解させた後、60 $^{\circ}$ C まで冷却した。これに formaldehyde solution を 18 ml 加え、ゲル型（6 \times 11 cm）に流し固めた。これに上記サンプルに 2 μ l の 10 \times loading buffer を加えてアプライし、50 V で 1 時間泳動した。

3) メンブレンへの transfer

泳動の終わった gel を 2 µg/ml の ethidium bromide (EtBr) 溶液に 15 分間浸して RNA を染色し、蒸留水で洗浄後、UV 下で RNA が壊れていないかどうかを確認した。さらに蒸留水で 1 時間以上 gel を洗浄後、予め MilliQ 水になじませたメンブレン (Gene Screen Plus, NEN, MA, USA) を gel の背面にのせ、20×SSC を用いてキャピラリー法により gel 中の RNA をメンブレンに transfer した。メンブレンは GS GENE LINKER™ UV CHAMBER (Bio-Rad, CA, USA) 内で 150 mJoule の UV を照射し、RNA をメンブレンに固定後、風乾して 4 °C で保存した。

4) Probe の作製

Northern hybridization の probe には、*BamH* I 切断により、pUC118 に組み込まれているマウス卵巣 20α-HSD cDNA インサートの全長約 1.2 kb を切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit で 1 % agarose gel から回収して用いた。

5) Probe の ³²P labeling 及び精製

Probe の ³²P labeling には、RANDOM PRIMER EXTENSION LABELING SYSTEM (NEN, MA, USA) を用いた。Probe 用 DNA 30 ng に、1×random primer extension buffer, 1×deoxynucleotide triphosphate mixture, 50 µCi の α-³²P-dCTP, 1 U の klenow enzyme を加えて全量 30 µl とし、37°C で 1-3 時間加温した。反応後 70 µl の TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) を加えて全量 100 µl としたものを、予め TE buffer を通した NICK™ Column (NEN, MA, USA) で精製した。Column には、probe 反応液 100 µl を含む TE 溶液 400 µl を一度通した後、400 µl の TE buffer を通して回収したものを用いた。2 µl の probe 精製溶液の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、10 万 cpm/ml 以上となるように hybridization buffer に加えた。Probe は使用直前に 100 °C で 10 分間加熱後、急冷して用いた。

6) Hybridization

メンブレンを 2×SSC になじませてから、10 ml の prehybridization buffer (50 % formamide, 5 ×denhardt's reagent, 5×SSCP (750 mM NaCl, 85 mM C₆H₅N₃O₇, 52 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 5 mM EDTA), 1 % SDS, 200 µg/ml salmon sperm DNA) を入れた DNA ボトル L (KURABO, 大阪) に入れ、42 °C で一晩インキュベートした後、³²P 標識された probe を加えてさらに 42 °C で一晩インキュベートした。

7) シグナルの検出

Hybridization buffer を除去後 DNA ボトルに 2×SSC/0.1 % SDS を入れ、42 °C で 15 分間の洗浄を 2 回行った。次にタッパー内で 0.5×SSC/0.1 % SDS に浸して振とうしながら 55 °C で 30 分間の洗浄を行った。メンブレンはハイブリバック内に密封し、X 線フィルムに -80 °C で一晩感光させた。

***In situ hybridization* による卵巣, 妊娠期子宮, 胎子胎盤における 20 α -HSD mRNA の検出**

1) 凍結切片の作製

採材組織を 4 % paraformaldehyde (PFA) -PBS で固定して 10 %, 20 %, 30 % の sucrose-PBS に順次置換後, O.C.T. compound に包埋し, 凍結切片作製に用いるまで -80 °C で保存した. 凍結切片は, cryotome (SHANDON, 東京) に取り付けて, -25 °C から -27 °C で 5-10 μ m の厚さに切り出し, 2 % オルガノシランで処理したスライドグラス上に伸展した.

2) パラフィン切片の作製

採材組織を 4 % PFA で固定後, 1 \times PBS で一晩洗浄し, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % ethanol に順次置換して脱水した. Xylene に置換後, パラフィン (Fisher Scientific, NJ, USA) に包埋し, 5 μ m の厚さの切片を切り出した. パラフィン切片は, 4) *in situ hybridization* の前に, xylene に 10 分間 \times 3 回浸して置換し, さらに 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 % ethanol に順次 3 分間ずつ浸して置換後, hybridization に用いた.

3) cRNA probe の作製 (図 1-3)

pUC118 に組み込まれた全長 cDNA インサートを, マルチクローニングサイトの *Sma* I サイトと, cDNA 内の *Bal* I サイトで切断することにより前半約 500 bp を切り出した. 得られた断片を pBluescript SK(+)/*EcoR* V/BAP ベクターに組み込み, 鋳型 DNA として, sense cRNA 用に T3 RNA polymerase で増幅する断片を *Sal* I で, antisense cRNA 用に T7 RNA polymerase で増幅する断片を *Bam*H I で切断した. Ethanol 沈殿後, 鋳型 DNA を TE buffer に溶かし, proteinase K を 100 μ g/ml となるように添加した 0.1 % SDS の溶液中で 37 °C で 30 分間反応させて RNase を失活させた後, phenol 抽出と chloroform 抽出で蛋白を除去し, ethanol 沈殿後, 0.01 % DEPC 水に 1 μ g/ μ l となるように溶かした. 得られた鋳型 DNA 1 μ g を用いて, DIG RNA Labeling Kit (Roche, Mannheim, Germany) により, 10 \times dNTP labeling mixture (10 mM dNTP, ただし dUTP は 6.5 mM の dUTP と 3.5 mM の DIG (digoxigenin) -dUTP), 10 \times transcription buffer, RNase inhibitor 20 U, T3 or T7 RNA polymerase 40 U を加え, 0.01 % DEPC 水で全量 20 μ l に調整して 37 °C で 3 時間反応させた. 続いて DNase I を 20 U 加えて 37 °C で 15 分間加温して鋳型 DNA を消化した後, 400 μ l の 0.01 % DEPC 水を加え, 40 μ g の E.coli の tRNA, 0.1 倍量の 3 M LiCl, 2.5 倍量の 100 % ethanol を加えて -80 °C で 15 分間放置し, 4 °C, 15,000 rpm で 15 分間遠心した. cRNA ペレットは, 70 % ethanol で洗浄後, 風乾して 0.01 % DEPC 水に溶かし, もう一度 0.1 倍量の 3 M LiCl, 2.5 倍量の 100 % ethanol を加えて -80 °C で 15 分間放置し, 4 °C, 15,000 rpm で 15 分間遠心して未反応の dNTP labeling mixture を除去し, cRNA のペレットを得た. これを, 0.01 % DEPC 水に溶かし, 使用するまで -80 °C で保存した.

4) *in situ hybridization*

Digoxigenin (DIG) で標識した cRNA probe を使用して *in situ hybridization* を行った.

Hybridization の手順は、図 1-4 に示した。Hybridization の終了した切片は、alkaline phosphatase (ALP) で標識した抗 DIG 抗体 (anti-digoxigenin-POD, Fab fragments, Roche, Mannheim, Germany) を反応させ、NBT/BCIP stock solution (Roche, Mannheim, Germany) を用いて発色させた。

5) 切片の封入

室温に戻した切片に CRYSTAL/MOUNT™ (Biomed, CA, USA) をのせて封入し、70 °C で 30 分間加熱し乾燥させた後、ゆっくり室温まで戻して封入した。得られた切片は、遮光して室温で保存した。

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色

切片を蒸留水に 5 分間浸して O.C.T. compound を落とした後、ヘマトキシリン (MAYER'S hemalum solution, MERCK, Darmstadt, Germany) で 2 分間染色し、流水に 15 分間さらした。次に 80 % ethanol に浸して溶媒を置換した後、エオジン (EOSIN Y, SIGMA, MO, USA) で 20 分間染色した。得られた切片を 80%, 90%, 100 % の順に ethanol 溶液に浸して脱水した後、xylene : ethanol (1:1) と xylene に浸して溶媒を xylene に置換し、合成封入剤 (DIATEX, 松浪硝子工業, 大阪) で封入した。

メチルグリーン染色

In situ hybridization に用いたものと同じ切片をメチルグリーンで染色し、POD (peroxidase) のシグナルと共に核染色も行った。切片を蒸留水に 5 分間浸して O.C.T. compound を落とした後、メチルグリーンで 10 分間染色し、軽く蒸留水ですすいだ後に顕微鏡で観察した。

5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

5'-RACE は、5'-RACE System (Gibco BRL, CA, USA) を用いて行った。性周期中ランダムに採材した ICR マウス卵巣から TRIzol reagent (Gibco BRL, CA, USA) を用いて total RNA を抽出した。Total RNA 5 µg に、2.5 pmol の gene-specific antisense oligonucleotide (GSP1) primer

GSP1 primer; 5'-GGCAACCAGAACAAATGTCAT-3'

を 2.5 pmol 加えて全量を 15.5 µl とし、70 °C で 10 分間加熱後急冷した。次に 20 mM Tris-Cl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 mM dNTPs, 10 mM DDT を加えて全量 24 µl とし、42 °C で 1 分間加温した。これに SUPERSRIPT™ II reverse transcriptase 200 U を加え、42 °C で 50 分間加温した。70 °C で 15 分間加熱して反応を停止させ、37 °C に置き換えた。これに RNase mix を 1 µl 加え、37 °C で 30 分間加温した後、氷上に回収した。室温の binding solution (6 M NaI) を 120 µl 反応液に加え、GLASSMAX spin cartridge に入れて 13,000 rpm で 20 秒間遠心した。次に 400 µl の氷冷 1×wash buffer を cartridge に添加し 13,000 rpm で 20 秒間の遠心を 3 回繰り返した。さら

に 400 μ l の氷冷 70 % ethanol で 2 回洗浄し, 13,000 rpm で 1 分間遠心した. 最後に cartridge から 65 $^{\circ}$ C の MillQ 水 50 μ l により 13,000 rpm で 20 秒間遠心して cDNA を溶出した. 溶出した cDNA 10 μ l に, 10 mM Tris-Cl pH 8.4, 25 mM KCl, 1.5 mM Mg Cl₂, 200 μ M dCTP を加え, 94 $^{\circ}$ C で 2-3 分間加熱後, 急冷した. これに terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) を 1 μ l 加え, 37 $^{\circ}$ C で 10 分間加温した. 65 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して TdT を失活させた後, 氷冷した. 5' 端に dC を付加した cDNA 5 μ l に, 20 mM Tris-Cl pH 8.4, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 400 nM nested GSP2 primer, 400 nM abridged anchor primer, 200 μ M each dNTPs, 2.5 U の Taq DNA polymerase を加えて, 94 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱後, 94 $^{\circ}$ C で 1 分, 55 $^{\circ}$ C で 1 分, 72 $^{\circ}$ C で 1 分を 1 cycle として, 35 cycle 行った後, 72 $^{\circ}$ C で 5 分間加温した. primers は,

GSP2 primer; 5'-GATGGCATTCTACCTGGTTG-3'

Abridged anchor primer; 5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG-3'

を用いた. PCR 産物は, pGEM-T ベクター (Promega, 東京) に組み込んで, 上記「偽妊娠マウス卵巣 mRNA を用いた RT-PCR 産物の sequencing」の方法に従って sequencing した.

第一章 結果

マウス卵巣 cDNA library の screening に用いる probe として、ラット cDNA 以外に、マウスの mRNA 自身から PCR により probe を合成することを試みた。ラットとマウスの 20 α -HSD mRNA の配列の間に高い相同性が期待できると考え、ラットの cDNA の配列をもとに forward primer として開始コドンの前-29 から-10 bp の 20 base (Rat cDNA F1 primer), reverse primer として 654 から 673 bp の 20 base (Rat cDNA R1 primer) を選択した。マウスの卵巣から抽出した mRNA を鋳型にして RT-PCR を行ったところ、ラットの cDNA で予想される長さ (702 bp) とほぼ同じ長さをもつフラグメントが増幅された (F1/R1 probe) (図 1-2)。得られたフラグメントの sequencing により、ラット 20 α -HSD の cDNA と 93 %の相同性を持つことがわかった。

マウスの卵巣から作製した cDNA library のうち、ラット cDNA を probe に用いた場合には 60,000 プラーク中 444 個、上述の F1/R1 probe を用いた場合には 48,000 プラーク中 403 個の陽性プラークが検出された。その内任意に各々 10 プラークを選び、F1/R1 primer を用いて phage に組み込まれたマウス由来の cDNA インサートを鋳型にして PCR を行ったところ、最長の約 700 bp のフラグメントが増幅されるものと、それより少し短いフラグメントが増幅されるものがみられた。最長のものと、短いものをいくつか選び、さらに second screening を行って、最長のものの 4 個と、短いもの 3 個の合計 7 個の陽性クローンを回収した。陽性クローン中の cDNA インサートを、phagemid ベクターから pUC 118 ベクターに組み換えて sequencing を行ったところ、最長 (1,193 bp) の 4 個の cDNA クローンの塩基配列は一致し、短いものではその 5'末端の配列が欠けていることがわかった。これは、cDNA library の作製時、oligo dT primer を用いて poly (A) tail 側から逆転写したため、最長配列の 5'端まで十分に逆転写しきれなかったものが混在した結果と考えられた。

マウス卵巣 cDNA library の screening により得られた最長 (1,193bp) の cDNA クローンを MO1 と名付け、その塩基配列からアミノ酸配列を推定したところ、MO1 は 323 個のアミノ酸をコードする 969 塩基の蛋白翻訳領域 (ORF) と、5'側の非翻訳領域として 33 bp の塩基配列、3'側の非翻訳領域として poly adenylation signal (AATAAA) と poly (A) tail を含む 187 bp の塩基配列からなっていた。転写開始点は、マウス卵巣の total RNA を用いて 5'-RACE により、開始コドンの 50 bp 上流に一カ所のみ認めた。MO1 の予想される分子量は 37 kDa であり、そのアミノ酸配列は、ラット卵巣 20 α -HSD アミノ酸配列と 93 %の相同性を示した (図 1-5, 6)。

GENBANK データベースを用いて、MO1 の塩基配列 (ORF) およびアミノ酸配列 (開始コドンから停止コドン) と類似した配列をもつ分子を検索した。検索の結果探し出された分子は、ラット卵巣 20 α -HSD (93 %), ウサギ卵巣 20 α -HSD (72 %), ヒト肝臓 20 α -HSD (72 %), ラッ

ト肝臓 3 α -HSD (69 %), その他ヒト・ウシ・ヒツジの prostaglandin F synthase や, ヒト dihydrodiol dehydrogenase, bile acid binding protein, chlordecone reductase など高い相同性を有していた. これらの分子は, 哺乳類の aldo-keto reductase (AKR) superfamily のメンバーであり, MO1 もラット卵巣 20 α -HSD と同様 AKR superfamily に属することが示唆された.

さらに, 既に X 線解析がなされているラット肝臓 3 α -HSD の 3 次元構造を参考に, MO1 の三次元構造を推定した. 補酵素との反応部位と思われるアミノ酸 (3 α -HSD, MO1 とともに, Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) を赤色で, 基質との反応部位と思われるアミノ酸 (3 α -HSD における Leu 54, Trp 86, Phe 128, Phe 129, Trp 227, MO1 における Leu 54, Trp 86, Leu 128, Leu 129, Cys 227) を青色で表現した結果, とともに 3 α -HSD, MO1 の 2 分子に共通のポケット状構造に位置することがわかり, この構造が触媒反応において重要なものであると思われた (図 1-7).

次に MO1 が目的とするラット 20 α -HSD 1 に対応する遺伝子であるかどうかを確かめるため, MO1 cDNA を probe に用いて, Northern hybridization 法により妊娠期卵巣での mRNA 発現を調べると共に, 血中 progesterone と 20 α -OHP 濃度を測定した. ICR マウス (15-19 週齢) を交配させ, 膣栓を確認した日を妊娠 0 日目と数え, 14, 15, 16, 17, 18, 分娩後 1 日目の卵巣 total RNA 5 μ g を用いて Northern hybridization を行った. ICR マウスでは, 一般に妊娠 18 日目の暗期に分娩するが, 分娩直前の 18 日目から強い 20 α -HSD mRNA 発現を検出した (図 1-8). 妊娠期血清中のステロイドホルモンの量を RIA 法により測定したところ, 分娩日において progesterone と 20 α -OHP 濃度に逆転が見られ, progesterone が 20 α -OHP に代謝されていることがわかった (図 1-8).

以上の結果より, MO1 を, マウス卵巣 20 α -HSD cDNA と決定した. マウス卵巣 20 α -HSD cDNA の塩基配列は GenBank/EMBL/DDBJ に, Entry ID : 20010329104401.41483 として登録した (ACCESSION # AB059565).

妊娠期卵巣, 子宮, 胎子, 胎盤の凍結切片あるいはパラフィン切片を作製し, *in situ* hybridization によりマウス卵巣 20 α -HSD mRNA の発現部位を調べた. その結果, 妊娠 18 日目の黄体 (図 1-9) と, 10 日目の胚の基底脱着膜の母体側の血管内皮細胞 (図 1-10, peripheral maternal venous plexus 内), 10, 15, 18 日目の子宮内膜上皮細胞 (図 1-10, 11, 12. 18 日目の結果は示していない.), 15 日目の胎子表皮 (図 1-13) で mRNA の発現が見られた. 黄体を拡大して見ると, 黄体細胞には染色性の強い細胞と弱い細胞が混在していることがわかった (図 1-9). 15 日目と 18 日目の胎盤においては 20 α -HSD mRNA の発現は見られなかった (結果は示していない).

さらに, 子宮, 胎盤, 胎子での発現の意味を探るため, 全長 20 α -HSD cDNA 配列を probe に用いた Northern hybridization により, 妊娠中その経過を追って発現を調べると共に, 偽妊娠中, 性周期中での発現の有無も確かめた (図 1-14, 15). その結果, 妊娠期子宮では 10 日目から発現が見られ, 12 日目, 14 日目と発現は増加し, 16 日目で最大になり, 18 日目にはわずかに減

少しした。分娩後 1 日目の子宮ではその発現は検出されなかった。このような発現の傾向を示す結果を 2 例の Northern hybridization で得た。一方偽妊娠中の子宮では発現は見られず、性周期中でも発現は確認されなかった。胎盤においては、11 日目のみにわずかな発現が検出されたが、12 日目以降では発現は見られなかった。また胎子の背中の表皮でも 14 日目から 18 日目まで発現は見られなかった。14 日から 18 日の胎子血中、10 日から 17 日の胎水中 progesterone と 20 α -OHP 濃度は、いずれも 20 ng/ml 以下と母体血中に比べて低く維持され、progesterone と 20 α -OHP 濃度は同調して推移した（図 1-16）。

第一章 考察

マウス卵巣 20 α -HSD cDNA のクローニングを行った結果、クローン MO1 が得られた。このクローンに挿入されている蛋白翻訳領域 (ORF) の塩基配列とそのコードするアミノ酸配列は、ラット卵巣 20 α -HSD (EC.1.1.1.149) のそれら [Miura et al. 1994] と、共に 93 %の相同性を示した。ラットの卵巣には、等電点とアミノ酸組成の異なる 2 つの 20 α -HSD アイソザイム (20 α -HSD1 と 20 α -HSD2) が存在する [Noda et al. 1991]。20 α -HSD2 は偽妊娠中ほとんどその活性が低く保たれる一方で、20 α -HSD1 の活性は偽妊娠後期に大きく上昇し、偽妊娠末期の progesterone 濃度の低下時に主に貢献していると考えられている [Noda et al. 1992, Seong et al. 1992]。マウスの卵巣における 20 α -HSD のアイソザイムの存在はまだ確認されていないが、クローン MO1 については、cDNA library の由来が偽妊娠 12 日目の卵巣であり、任意に選択した 7 つのクローン全てが同じ配列であったこと、ラット卵巣 20 α -HSD1 と 93 %の高い相同性を有すること、分娩直前の妊娠 18 日目からその mRNA 発現が著しく上昇すること、妊娠 18 日目の黄体組織で遺伝子発現が認められたこと、またこの時期血中 progesterone 濃度の低下に伴う 20 α -OHP 濃度の上昇が認められることから、cDNA クローン MO1 はラット卵巣の 20 α -HSD1 に相当すると考えられる。

本実験では、screening の時、非常に多くのポジティブシグナルが得られた。これは、マウスに偽妊娠を誘起し、20 α -HSD が比較的高く発現していると思われる 12 日目に時期を特定して卵巣から RNA を抽出したことに加え、cDNA library 作成時、ラットの mRNA の長さが約 1.2 kb であることをふまえて、 λ ZapII phage にパッケージングする cDNA の長さを約 1.2 kb 付近に特定したため、screening の効率が高まったためと考えられる。

マウス卵巣 20 α -HSD cDNA は、AKR superfamily に保存されている NADPH 結合部位 [Penning 1997] をコードしており、ラット卵巣 20 α -HSD、ウサギ卵巣 20 α -HSD、ヒト肝臓 chlordecone reductase (CDR)、ウシ肺 PGF synthase、ラット肝臓 3 α -HSD、カエルレンズ rho-crystallin などと相同性が高かったことから、AKR superfamily に属することが示された。AKR superfamily には、aldehyde reductases, aldose reductases, そして hydroxysteroid dehydrogenases などが含まれる。ヒトでは主に肝臓に発現が見られ、一般に体内ステロイドホルモンや prostaglandin の代謝、生体異物である薬物や変異原性物質の代謝に関わる。生体の防御という面で重要な役割を担うため、古くから遺伝子重複を繰り返して多くのメンバーを有する superfamily として進化したと考えられる。その内ラット肝臓 3 α -HSD は、ステロイドホルモンや多環式芳香族炭化水素化合物を代謝する多機能性の還元酵素であり、glutathione S-transferase, fatty acid-binding protein と共に、胆汁酸の輸送にも関わっている。胆汁酸は、肝臓から分泌され、グリシンやタウリンと結合した胆汁酸塩として胆汁中に存在し、脂肪を乳化する他、肝臓から排泄される老廃代謝物や重金属など有害物質の排泄に関わる。また 3 α -HSD は、dihydrodiol dehydrogenase 活性により、

発癌性物質の変異原性を低下させる働きを持ち、外来異物からの防御機構において重要な働きをもつと考えられる。ラット肝臓の 3 α -HSD は X 線解析により、そのアポ酵素と酵素/NADP 複合体の三次元構造も明らかにされている (図 1-17) [Stolz et al. 1991, Penning 1997]。即ち、ラット肝臓 3 α -HSD は、その中心に 8 つの α/β バレル構造を持ち、周りに 2 つのヘリックス構造と 3 つのループを形成し、内部がポケット状の構造をしている。触媒時ニコチンアミドリングはバレルの芯に位置し、ステロイドの酸化還元に使われる水素原子は、4 つのアミノ酸 Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117 から成るテトラ構造近くに位置する。このテトラ構造は、ステロイドホルモン (基質) 結合部位と思われる無極性のポケット状構造の深部に見られるもので、AKR superfamily のメンバーに保存されている。そして、無極性のポケット状構造は無極性のアミノ酸 Leu 54, Trp 86, Phe 128, Phe 129 から成り、それに対峙して Trp 227 を含む可動性のループが存在する。基質は α 面を Trp 86 側に向けて酸化還元反応がおこる [Penning 1997]。マウス卵巣 20 α -HSD のアミノ酸配列は、AKR superfamily に共通のテトラ構造 (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) を有していた。ラット肝臓 3 α -HSD の X 線解析像をもとに、マウス卵巣 20 α -HSD の三次元構造を推定して画像化したところ、マウス卵巣 20 α -HSD もラット肝臓 3 α -HSD と同様のポケット状構造をもつことがわかった。さらに NADP (H) 結合部位のアミノ酸 (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) を赤色で、ステロイド結合部位と思われるアミノ酸 (Leu 54, Trp 86, Leu 128, Leu 129, Cys 227) を青色で表示したところ、共にポケット状構造に存在することがわかった。特に Cys 227 は、可動ループ上に存在し、ポケット状構造とで基質をはさむようにして触媒反応を行っていると考えられた。マウス卵巣の 20 α -HSD では、ステロイドホルモンとの反応部位と思われるアミノ酸は、3 α -HSD に比べると、128 番目と 129 番目の Phe が Leu に、227 番目の Trp が Cys になり異なっているが、これは 3 α -HSD と 20 α -HSD それぞれが親和性を示す基質の違いを反映していると思われる。

Northern hybridization の結果、妊娠期間中、卵巣では分娩直前の妊娠 18 日目に強く 20 α -HSD が発現していた。In situ hybridization の結果からも、18 日目の卵巣において強い 20 α -HSD mRNA を発現しているのは、組織学的に黄体細胞であることが確認された。この 18 日目の卵巣 20 α -HSD mRNA の上昇は、18 日目における血中 20 α -OHP の濃度の上昇をもたらしているものであると考えられる。この分娩直前の著しい発現上昇は、ラットと共通する現象である。18 日目以外にも、データには示していないが、妊娠 1 日目と 4 日目にも強いシグナルが観察され、発現は 9 日目の卵巣まで確認された。性周期を回帰しているラットでは、性周期黄体は約 3 周期かけて形態的に退行して行くことが知られており [Matsuyama et al.1996]、その間は、残存している黄体が 20 α -OHP を分泌していることが知られているが、この場合マウスでも同様なことが起こっていると考えられる。つまり、妊娠成立直後には、その前に形成された性周期黄体が残存していると考えられ、妊娠 1 日目と 4 日目に見られる 20 α -HSD mRNA の強い発現は、この残存性周期黄体に由来するものと推測される。交尾刺激による発情期以降の、神経内分泌反射による下垂体からの 1 日 2 回の prolactin (PRL) サージにより、妊娠黄体では 20 α -HSD の発現が抑制

され、機能化されるが、残存性周期黄体ではすでに発情前期の LH サージに付随する PRL サージにより不可逆的な退行を開始しており、その後交尾刺激による PRL サージを受けても機能化しない。この機能化と退行の運命は、新生黄体が PRL サージを受けるタイミングにより決定づけられると考えられている [Freeman et al. 2000]。

妊娠期卵巣以外での 20 α -HSD 発現については、ラットでは妊娠 8-10 日目の子宮間膜側の子宮内膜で、14-21 日目の内臓卵黄嚢で、21 日目の絨毛尿膜胎盤で [Shiota et al. 1993b] 活性が、ヒツジやウシでは胎子赤血球での発現が報告されている [Chen et al. 1989, Nancarrow et al. 1981]。一般に妊娠中は母体血中の progesterone 濃度は高く保たれ、排卵の抑制、子宮筋運動の抑制などにより、安全な着床・胎子発育の環境が維持される。一方、こういった胎子を取り巻く組織での 20 α -HSD 発現からは、妊娠中母体血中で高く保たれている progesterone が 20 α -OHP に代謝されることで、胎子が低 progesterone 環境下で発育してくるという仮説が導かれる。実際、ラットにおいては、羊水中の progesterone 濃度は、母体血中の 3-4 % しかなく [Shiota et al. 1993b]、progesterone のある種の細胞に対する増殖抑制作用を考えると [Savouret et al. 1990, Graham & Clarke 1997]、活発に増殖中であると思われる胎子組織に対して何らかの抑制的影響を持つ可能性もある。この観点に立つと、ステロイドホルモンである progesterone は、理論上細胞膜を自由に通過できるため、高濃度 progesterone にさらされるだけの何らかの適応システムが発育胎子にはまだ完成してないために、20 α -HSD の発現を利用しているのかもしれない。

本実験の結果では、妊娠 10, 15, 18 日目のマウスの子宮内膜上皮細胞と 10 日目の胚の基底脱落膜の母体側血管内皮細胞、15 日目の胎子表皮において 20 α -HSD mRNA の発現が検出された。また子宮内膜上皮では、妊娠 16 日目にピークを迎える発現動態を示し、母体血中 progesterone 濃度の変化に追随する傾向を見せた。15 日目、18 日目では、ラットで 21 日目に確認されている胎盤の細胞での発現を認めることはできなかった。しかし、14 日から 18 日の胎子血中、10 日から 17 日の胎水中 progesterone 濃度は母体血中濃度よりも常に低く維持されていた。従って上記の仮説に基づくと、10 日目の胚では基底脱落膜の母体血管内皮細胞に 20 α -HSD mRNA が発現していたことから、これが蛋白質に翻訳されていれば、この時期母体血由来の progesterone は代謝され、胎子への progesterone 移行が低く保たれる可能性がある。さらに Northern hybridization により、11 日目において、*in situ* hybridization の結果を裏付けるわずかな mRNA 発現も検出された。マウスの胚では、妊娠 8.5-9 日目に器官形成の速さが著しく速まると同時に胚の外形も変化し、おそらく最も重要で複雑な変化がおこる [Rugh 1994]。本実験では 10 日以前の組織は調べていないが、もし 8.5-10 日目にかけて 20 α -HSD の発現が見られたなら、20 α -HSD がこの時期胎子の器官形成に大きな意味を持つ可能性が生じる。15 日目、18 日目には progesterone は母体血中から胎盤を通り胎子側へ移行可能と考えられるが、胎盤は、母体にとって異物ともいえる胎子と母体を繋ぐ特別な組織であり、15 日目や 18 日目といった完成した胎盤では、20 α -HSD 以外に何らかの progesterone 代謝酵素が発現するなど元々 progesterone を排除するバリアがある可能性も考えられる。そう考えると 10 日頃の胎盤については、まだ脱落膜の

性質を維持しており胎盤に発達できていないために、また胚の器官形成に重要な時期であるため特に progesterone を代謝する必要があると 20 α -HSD 発現が動員されているとも考えられる。また 15 日目と 18 日目において発現の見られた子宮内膜上皮は、胎子組織を取り囲んでおり、脈管系を介さない子宮側から胎子への progesterone の移行は制限され、子宮での progesterone 作用は維持されるという局所的な機能を持つ可能性がある。また、子宮組織は胎盤のような複雑で多機能化した組織ではないため、progesterone のバリアとして 20 α -HSD 発現が利用されているのかもしれない。一方、胎子表皮では、尻尾の先と、背中の表皮で発現が観察された。尻尾の先はまだまだ盛んに伸長している途中と考えられ、20 α -HSD が progesterone の細胞増殖抑制作用に対して、分裂途中の表皮細胞で発現して増殖を助けている可能性も考えられた。ラットでは、胎子の全組織を用いた RT-PCR/Southern blot の解析から、妊娠 12-20 日目にかけて微量ながら 20 α -HSD 遺伝子の発現が確認されている [三浦ら 1994]。これらの起源は胎子の表皮であったのかも知れない。発生学的に表皮は、外胚葉に由来する。体表の外胚葉からは、単層立方上皮、その表層にさらに一層の扁平な細胞（周皮）が形成される。その後、基底層の立方上皮細胞が分裂増殖し、有棘層や果粒層を形成する。最表層の周皮は脱落し、果粒層細胞が死んで、密に圧縮された角質層が形成される。角質層は、胎生期中も絶えず剥離して、羊水中に遊離する（江口 保暢 著 新版 家畜発生学）。本実験で観察された表皮細胞は、妊娠 14 日目頃から生じる周皮 [Rugh 1994] に相当すると考えられる。周皮はいずれはがれてしまうため、この 20 α -HSD 遺伝子の発現の役割は一過的なものと思われる。また、周皮の下層では、これから皮膚を形成する基底層の細胞が分裂増殖を始めるため、ここでも胎子の細胞増殖と progesterone の作用に 20 α -HSD が一役かっている可能性が考えられた。Northern hybridization により、胎子背中の表皮ではシグナルを検出できなかったが、周皮で発現しているとする、この時期おそらく剥がれやすくなっているということが検出できなかった原因であるかもしれない。あるいは背中の表皮では Northern hybridization では検出できないような微量なものである可能性もある。但し、マウスにおいても羊水中の progesterone 濃度は低く保たれていること、また胎子の体表の全てにおいて発現がみられたわけではなかったことから、その意味するところは今後のさらに詳しい解析に待たなければならない。

ラット胎盤では、20 α -HSD1 の活性が主である卵巣とは異なり、20 α -HSD1 と 20 α -HSD2 が同じくらいの高い活性を示すことが報告されている。そのため、胎盤や子宮では、卵巣とは異なる発現機構が存在する可能性がある [Shiota et al. 1993b]。20 α -HSD1 と 20 α -HSD2 は、分離カラム上での溶出等電点が異なることから、アミノ酸組成が若干異なると推定されており、当然それらの cDNA 配列も異なると考えられる。もし、20 α -HSD1 の cRNA probe で 20 α -HSD2 の mRNA が検出できないとしたら、胎盤や子宮や胎子にも本実験でクローニングした 20 α -HSD に対する probe を用いては検出できない、他のアイソザイムの分子種が発現している可能性も否定できない。また、これら子宮、胎盤、胎子組織で発現している 20 α -HSD がどのような機能を有するのか、20 α -HSD の遺伝子を欠損したマウスがどのように妊娠を経過するかに興味をもたれる。