

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

不完全性周期動物であるラットやマウス、ハムスターは、完全性周期動物に比べ性周期中の黄体は速やかに機能的に退行し、実質的に黄体相を持たず、最短4日の短い性周期を回帰する。ラットでは、黄体は約3周期の間残存する [Freeman et al. 2000] が、排卵後48時間で黄体に20 α -HSDが発現するため、性周期中常に progesterone 濃度の2-3倍の20 α -OHPが分泌され、progesterone 濃度は低く維持される [Matsuyama et al. 1987]。雄が不在でも規則的に4日の性周期を回帰するIVCSマウスでは、性周期中 progesterone 濃度は4日周期のラットと同様の動態を示す。すなわち発情前期の夕方 LH サージに同期した増加と、発情後期(D1)午後の新生黄体由来の増加の二峰性の動態を示す [Kosaka et al. 1988, Uchida et al. 1969]。マウスでも性周期中20 α -HSDの発現が見られるが、その詳しい動態についてはまだ明らかではない。なおICRマウスでは、尿中のPGF_{2 α} 代謝産物を測定した結果、発情休止期(D)に高まる傾向が見られ、またPGF synthaseの発現も発情休止期に認められている [Unzaki et al. 1996] が、PGF_{2 α} レセプターノックアウト(KO)マウスでは、性周期に変化は認められていない [Sugimoto et al. 1997]。マウスはラットと同じく不完全性周期動物であり、その生殖機構もほぼラットと同様であると理解されている。たしかにIVCSマウスでは性周期中 progesterone 濃度の動態はラットと一致しているが、20 α -OHP濃度の変化を示した報告は無い。マウスには、雌を集団飼育した場合に非発情期が延長するLee-Boot効果、雄の匂いにより非発情化した雌の発情を誘起し、その周期を同期させるWhitten効果などが知られており、性周期にはフェロモン効果も関わると思われる。また系統により周期性にも差が見られるため [Nelson et al. 1992]、必ずしもこれまで20 α -HSDの研究に用いてきた4日周期のWistar Imamichiラットとマウスを同列に考えることが適当であるかどうかは現在のところ定かではない。一方ハムスターはラットと異なり、形成された黄体は次の排卵時まで形態的に完全に退行する [Greenwald 1968]。倉永ら [2000] によると、

ゴールデンハムスターの性周期中では、排卵後形成された黄体は次の発情前期と発情期の間に好中球の浸潤を伴う形態的な退行を完了し、卵巣には一世代分の黄体のみ存在する。またゴールデンハムスターの新生黄体には 20 α -HSD 活性は存在しない。

ラットに於ける偽妊娠中の progesterone 濃度は、4 日目に最高値（約 75 ng/ml）に達し、6 日目に 50 ng/ml 程度に低下した後、緩やかに下降して 16 日目に 0 日目と同程度（約 40 ng/ml）にまで低下するが、総 progestin 量では 0 日目の約 180 ng/ml から 8 日目に約 125 ng/ml に低下後、16 日までその値のまま維持され、その範囲内で progesterone の低下と 20 α -OHP の増加が起こる。従ってラットでは偽妊娠後期において progesterone 合成量はほぼ一定に維持され、20 α -HSD 活性によりその濃度を制御していると考えられる [Saito et al. 1988, Matsuda et al. 1990]。CBA マウスでは、偽妊娠 3-6 日目に progesterone 濃度はピークになるが、9 日目には偽妊娠前のレベルにまで低下する [Chambers & Clarke 1979]。また IVCS マウスでは、平均的偽妊娠期間は 8 日であり、progesterone は 4-6 日目にピークを持ち 8 日目には低下する [Saito et al. 1988]。さらに、マウス偽妊娠時黄体の退行には PGF_{2 α} によるアポトーシスの関与も示唆されている。すなわち、21 日齢の未成熟 ddY マウスに PMSG と hCG を投与し、精管結紮雄と交尾させて偽妊娠を誘起した場合、6 日目から黄体の表層の細胞において PGF_{2 α} レセプターの発現がみられ、11 日目にその発現は最も高くなる。Progesterone 濃度は 10 日目に低下し、11 日目から 13 日目にかけて卵巣内黄体組織においてアポトーシスが進行することが TUNEL 法により確かめられている。 [Hasumoto et al. 1997]。

妊娠中の progesterone 濃度は、ラットでは、末梢血中で 5 日目と 12 日目にピークを迎え、19 日目以降激減する。20 α -OHP は 5 日目以降 progesterone 値と同調した動きを見せるが低く抑えられており、20 日目以降急激に増加する。総 progestin 量は 12 日目以降ゆるやかに下降して 19-20 日目頃 20 α -HSD 活性が上昇する直前に一旦低下し、分娩に向けて再上昇する [Wiest et al. 1968]。この 20 α -OHP 濃度上昇直前の総 progestin 量の低下 [Lacy et al. 1976] は、偽妊娠末期と比べて特異的である。3 β -HSD は、progesterone 合成系の中でも、直接 pregnenolone から progesterone を合成する酵素であるが、妊娠末期には、おそらくパルス頻度の増加した LH の作用により [Gallo et al. 1985]、20 α -HSD 活性上昇の少なくとも 24 時間前にはその活性が抑えられ、progesterone レベルの低下をもたらしていると考えられている。すなわち、妊娠 19 日目に LH の抗血清を投与すると、3 β -HSD 活性の減少及び 20 α -HSD 活性の増加は抑制され、血中 progesterone 濃度の減少も抑制される [Stocco & Deis 1996]。また妊娠 19 日目に ovine LH を投与すると、約 48 時間後に 20 α -HSD 活性が上昇するが、それには黄体内及び血中 progesterone 濃度の低下が先行する。この 20 α -HSD 活性の上昇を伴わない progesterone 濃度の低下は、上記総 progestin 量の低下すなわち合成系の抑制を表すと考えられ、黄体内 PGF_{2 α} 量の上昇にも先行する。PGF_{2 α} 合成阻害剤インドメタシンの投与により妊娠末期 20 α -HSD 活性が上昇しないことから、20 α -HSD 活性

上昇には $\text{PGF}_{2\alpha}$ の上昇が先行すると考えられる [Bussmann 1989]。従って妊娠末期 progesterone 濃度の低下は、LH による 3β -HSD 活性の低下、黄体細胞内 progesterone レベルの低下、黄体内 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レベルの上昇、 20α -HSD 活性の上昇という流れで進行すると考えられている [Stocco & Deis 1998]。しかしこれら progesterone 合成系の抑制は、あくまでも最終的に 20α -HSD 発現を導く trigger としてとらえられており、やはり分娩時 progesterone 濃度低下制御の主要な因子と考えられているのは 20α -HSD 活性の上昇であると思われる。Swiss マウスでは妊娠中 progesterone 濃度は、6 日目と 16 日目にピークとなり、17 日から 20 日(分娩日)にかけて低下する [McCormack et al. 1974]。ランダム交配による雑種マウスで、2 日目に上昇した progesterone 濃度は 9 日目まで維持され、10 日目に一時的に低下した後 15 日に向けてさらに上昇し、17 日目から分娩日の 19 日までに急降下することが報告されている [Murr et al. 1974]。マウスにおいても分娩時 progesterone 低下に $\text{PGF}_{2\alpha}$ が必須の因子であることが、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプターのノックアウト (KO) マウスを用いて示されている。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプター KO マウスでは、妊娠末期に黄体が退行せず、progesterone 濃度が高値に維持されて分娩が起きない。卵巣摘出により progesterone 濃度を下げると子宮において oxytocin レセプターも誘導され、分娩が起こる [Sugimoto et al. 1997, 1998]。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプター KO マウスでは 20α -HSD の発現が見られないが、野生型マウスでは 18 日目と 19 日目に 20α -HSD 発現は顕著に上昇している [Stocco et al. 2000]。従って妊娠末期 20α -HSD の発現には $\text{PGF}_{2\alpha}$ シグナルが必須と考えられるが、はたして 20α -HSD が発現しない場合に progesterone 合成系の制御のみで分娩できるかどうかは、 20α -HSD KO マウスを用いた本研究により明らかにできると考えている。

分娩誘起剤として知られる $\text{PGF}_{2\alpha}$ は、哺乳類の雌の生殖器官で生成される主要なアラキドン酸代謝産物で、子宮あるいは卵巣に由来する。ウシやヒツジでは、子宮由来の $\text{PGF}_{2\alpha}$ は対向流機構により子宮静脈から卵巣動脈に直接運ばれ、黄体血管内皮細胞に発現する $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプターを介して血管収縮作用、黄体細胞でのステロイド合成能を低下させるエンドセリン 1 を産生刺激することで、黄体からの progesterone 分泌抑制に関わる。この progesterone 分泌低下は、黄体の形態的な退行に先行する [Niswender et al. 2000]。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプターは、7 回膜貫通型 G 蛋白結合体で、Gq-phospholipase C を介して細胞内 Ca 濃度を上げると共に protein kinase C (PKC) を活性化し、ステロイド合成を可逆的に抑制する。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ のステロイド合成抑制作用は、ウシ、ヒツジ、ブタ、サル、ヒト、ラット、ウサギで見られる。そのラットに見られる作用機序には、

1. LH のシグナル伝達物質である cAMP を減少させる [Lahav et al. 1976, Leung et & Steele 1992],
2. HDL の取り込みは変化させない、3. SCP-2 (sterol carrier protein) 量を減少させることで cholesterol のミトコンドリアへの輸送を阻止する、4. 細胞骨格を破壊することでステロイド合成を抑制する、ただし長期に破壊するとむしろステロイド合成は刺激される [Smith et & Sridaran 1991], 5. StAR (steroidogenic acute regulatory protein) [Stocco & Clarke 1996] 蛋白の発現抑制

によりミトコンドリア外膜から内膜への cholesterol 輸送を抑制する [Fiedler et al. 1999], などがある [Niswender et al. 2000]. また $\text{PGF}_{2\alpha}$ は, 細胞内 Ca 濃度を上昇させることにより, Mg-Ca 依存性 endonuclease を活性化してアポトーシスも誘導する. このように, $\text{PGF}_{2\alpha}$ の progesterone 分泌低下作用には, ステロイド合成抑制とアポトーシスの 2 つの経路が考えられている. 以上のように $\text{PGF}_{2\alpha}$ は, 多くの動物において主要な黄体退行因子であり, ラットでも, 偽妊娠, 妊娠末期には黄体で $\text{PGF}_{2\alpha}$ 発現が高まる.

このように $\text{PGF}_{2\alpha}$ は黄体の退行に関して機能的, 形態的両方の作用を及ぼしうと考えられるが, これまで述べてきたように, 少なくともラットの性周期中, 偽妊娠末期においては $\text{PGF}_{2\alpha}$ による退行作用よりも $20\alpha\text{-HSD}$ による機能的退行作用がその回帰を促す主要因となっている印象がある. マウスに関してはこれまでのところ $\text{PGF}_{2\alpha}$ に対する知見は多いが, $20\alpha\text{-HSD}$ の機能についてはまだほとんど解明されていないのが実状である. IVCS マウスが性周期中 Wistar ラットと同様の progesterone 動態を示すことから, ラットと同様な生殖機構への作用も想定され, はたして $20\alpha\text{-HSD}$ の欠損がその生殖周期回帰にどのような影響を及ぼすのか興味深い. また第一章で見出した妊娠期子宮内組織において発現する $20\alpha\text{-HSD}$ についても, KO マウスを用いることにより妊娠中におけるその発現の機能解明につながると思われる. 本章では $20\alpha\text{-HSD}$ KO マウスを用いてその生殖周期回帰に対する $20\alpha\text{-HSD}$ の作用を検討すると共に, 第一章で見出した妊娠期子宮内組織での $20\alpha\text{-HSD}$ 発現の意義についても考察した.

第三章 材料と方法

試薬

Proteinase K は SIGMA (MO, USA) より、制限酵素、分子量マーカー λ EcoT14 I digest は宝酒造 (京都) より、それ以外の試薬は和光純薬工業 (大阪) より購入した。

偽妊娠及び妊娠マウスの作出と組織の採材

マウスは室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 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。

1) マウスの系統

ノックアウト (KO) マウスは、キメラマウスと C57BL/6J との交配によるヘテロ遺伝子型産子 (F1, agouti) どうしを交配して得られた産子 (FIN1) 及び、FIN1 どうしを交配して得られた産子 (FIN2) を用いた。いずれも、C57BL/6J を戻し交配の対象とし、戻し交配回数が 1 回の F1 である。

2) 偽妊娠及び妊娠マウスの作出と組織の採材

F1 雌マウスは、精管結紮した F1 雄マウスと交配し、膣栓を確認した日を 0 日として偽妊娠を誘起した。マウスの偽妊娠期間は、精管結紮雄と同居させ、膣栓を確認した日を 0 日として、次の膣栓が確認される日までとした。同様に、膣栓を確認した日を 0 日として妊娠を誘起した。分娩間隔は、分娩日を 0 日とし、雄及び産子を同居させた状態で、次の分娩日までとした。また妊娠 18 日目の子宮、分娩後 1 日目の卵巣を採取し、液体窒素内で急速凍結し、使用するまで -80°C で保存した。偽妊娠期、妊娠後半期においてマウスに diethyl ether 麻酔をかけ、長さ約 3 cm の G-1 硝子管 (NARISHIGE, 東京) を用いて一頭あたり約 250 μl の血液を眼窩採血した。

膣スメアの観察

6-8 週齢と 10 週齢以降のマウスを用いて、性周期膣スメアの観察を行った。6-8 週齢では離乳後雌のみを群飼して、10 週齢以降で用いた雌マウスは、10 頭ずつ群飼し、ケージ内に F1 雄の入った小さなケージを入れ、雄と接触程度は可能だが、交尾はできない環境をつくり、毎日観察した。

遺伝子型同定 (図 3-1)

マウスの遺伝子型は、尻尾から抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR で判定した。PCR の primer には、mutant gene 検出用に neo^r 遺伝子上に neoPGK-F primer, wild type gene 検出用に

イントロン 4 上に int4/5-F primer, mutant gene と wild type gene 共通の reverse primer として E5 上に E5 Revs-2 primer を設計した.

neoPGK-F primer ; 5'-ATCTGCACGAGACTAGTGAGACGT-3'

E5 Revs-2 primer ; 5'-CAGGATCATCTCCAGTTGTCTACG-3'

int4 / 5-F primer ; 5'-ATGCAGTCATGGTCTCTCACTAGG-3'

離乳期 (生後 26 日) 前後のマウス尻尾約 1 cm を, 400 μ l の 0.5 mg/ml の proteinase K/SET lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 0.5 % SDS) を加えて, 50-55 $^{\circ}$ C で転倒混和しながら一晩組織を溶解させた. その 5 μ l を MilliQ 水 50 μ l で希釈し, さらにその 2 μ l を PCR の鋳型としてそのまま用いた. PCR 反応組成は, 1 \times Ex Taq buffer, 0.5 μ M の 3 種の primer, 0.2 mM の dNTP とし, 全量 50 μ l に対し Ex Taq DNA polymerase を 0.125 U 加えた. PCR の反応条件は, 95 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱後, 94 $^{\circ}$ C で 1 分, 64 $^{\circ}$ C で 30 秒, 72 $^{\circ}$ C で 1 分を 1 cycle として 40 cycle 行った.

マウス肝臓ゲノム DNA を用いた Southern blotting (図 3-2)

1) マウス肝臓からのゲノム DNA の抽出

マウスの肝臓組織約 1 cm 四方を切り取り, 3.5 ml の 0.5 mg/ml の proteinase K/SET lysis buffer を加え, 一晩 50-55 $^{\circ}$ C で転倒混和しながら組織を溶解させた. 等量の phenol を加え, 10 分間転倒混和してよく懸濁し, 室温で 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上層を回収した. このような phenol 抽出を 2-3 回繰り返した後, 等量の chloroform を加えて, 10 分間転倒混和し, 4 $^{\circ}$ C, 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し, 上層を回収した. これに 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と, 等量の 2-propanol を加えて転倒混和し, 糸状のゲノム DNA を析出させた. 先端をガスバーナーで炙って閉じたパスツールピペットを用いて DNA を巻き取り, 氷冷 70 % ethanol 10 ml に浸してゲノム DNA をほぐして洗浄し, 再び巻き取った. この 70 % ethanol 洗浄を 2 回行った後, 風乾し, DNA が完全に乾ききる前に, ゲノム DNA をパスツールピペットから MilliQ 水に溶出した. これを 50-55 $^{\circ}$ C に加熱して DNA の拡散を促し, 分光光度計 Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) を用いて濃度を測定した.

2) 制限酵素によるゲノム DNA の消化

Mutant gene を Southern blotting で検出する probe は, 第二章で ES 細胞の screening に用いたものと同じものを使用したもので, 肝臓ゲノム DNA の消化も, *Pst* I と *Bgl* I を使用した. 1 % agarose gel にアプライする量は, 1 well 当たり 10 μ g とした. 反応液の量は 200 μ l とし, 1 \times buffer 内で制限酵素 10 U を加えて一晩反応させ, さらに翌日 10 U の制限酵素を加えて 2 時間以上反応させた. Phenol 抽出, chloroform 抽出, ethanol 沈殿後, MilliQ 水 15 μ l に懸濁し, 10 \times loading buffer を 2 μ l 加え, *Pst* I 消化したゲノム DNA は 1 % agarose gel に, *Bgl* I 消化したゲノム DNA は 0.8 %

agarose gel にアプライした。Agarose gel の大きさは、15×13.5 cm とした。電気泳動は、30 V で行い、loading buffer 中の bromophenol blue の青色がゲル全体の 2/3 に達した時点で泳動を終了した。メンブレンへの transfer 以下シグナルの検出までは、第二章で述べた方法に従った。

マウス卵巣 RT-PCR による 20 α -HSD, EGFP 転写産物の検出 (図 3-3, 図 3-4)

1) 逆転写反応

卵巣からの total RNA の抽出は、TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA) を用い、第一章で述べた方法に従った。

抽出した total RNA を希釈して、1 μ g を 0.01 % DEPC 水 32 μ l に懸濁し、65 °C で 10 分間加熱後、すみやかに氷上に移して 2 分間静置した。全量を Ready to Go Kit (Roche, Mannheim, Germany) の first-strand beads 入り PCR チューブに移し、oligo d(T)₁₆ primer (Roche, Mannheim, Germany) を 50 pmol 加え、1 分間静置した。穏やかに混和後、37 °C で 1 時間インキュベートし、逆転写産物 cDNA を得た。

2) EIF/E9R primer を用いた 20 α -HSD mRNA 及び EGFP mRNA の検出

逆転写反応により合成された cDNA 溶液の 1 μ l を PCR に用いた。20 α -HSD の検出には表 2-1 に示した EIF primer, E9R primer を用いた。反応組成は 0.5 μ M の各 primer, 0.2 mM の dNTP, 1×Ampli Taq DNA polymerase buffer, 2.5 U の Ampli Taq DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany) とし、全量 100 μ l とした。反応条件は 95 °C で 2 分間加熱後、94 °C で 1 分、55 °C で 30 秒、72 °C で 1 分を 1 cycle として 30 cycle 行った。

EGFP の検出には primers

EGFP-F ; 5'-CGACGTAAACGGCCACAAGTT-3'

EGFP-R ; 5'-GATGCCGTTCTTCTGCTTGTC-3'

を用いた。反応組成は各 primer を 0.5 μ M, 0.2 mM の dNTP, 1×Ampli Taq DNA polymerase buffer, 2.5 U の Ampli Taq DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany) とし、全量 100 μ l とした。反応条件は 95 °C で 2 分間加熱後、94 °C で 1 分、65 °C で 1 分、72 °C で 1 分を 1 cycle として 30 cycle 行った。20 α -HSD の検出では、total RNA を素材にした逆転写産物にゲノム DNA が混入していても E1 から E9 までを増幅することは不可能であるため、PCR により得られる産物は mRNA に由来すると言える。しかし、挿入 EGFP 遺伝子にはイントロン配列が含まれないため、ゲノム DNA からの増幅が可能であり、PCR 産物が mRNA 発現を反映しない可能性がある。従って EGFP mRNA 検出用の PCR には、ネガティブコントロールとして逆転写反応のみを省いた total RNA 溶液も鋳型にして PCR を行った。

RT-PCR 産物の塩基配列決定

E1F/E9R primer を用いて RT-PCR で増幅したフラグメントは第一章の方法に従い sequencing 反応により決定した。

卵巣サイトゾール中 20 α -HSD 活性の測定

20 α -HSD の触媒反応には、NADP と NADPH によるプロトンの交換が伴う。20 α -OHP から progesterone への代謝には、NADP から NADPH の生成を伴うため、20 α -OHP を基質として加えたときの NADPH の生成量を計時的に測定することで、酵素活性を測定した。

1) 卵巣サイトゾールの回収

卵巣重量を測定し、10 倍量の buffer A (5 mM potassium phosphate buffer pH 7, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % glycerol) を加えて氷上でベッスルホモジナイザーを用いて破碎し、超遠心チューブ (Polycarbonate Centrifuge tubes 7×20 mm, BECKMAN, CA, USA) に移し、TLA 100 ローターを用いて超遠心機 (Optima™ TLX Ultracentrifuge, BECKMAN, CA, USA) 内で 4 °C, 47,000 rpm で 90 分間遠心分離し、上清の卵巣サイトゾールを回収した。

2) 蛋白濃度測定

Protein assay dye (Bio-Rad, CA, USA) を MilliQ 水で 5 倍希釈したものに、10 mg/ml の BSA を加えて 0, 2, 4, 6, 8 μ g/ml のスタンダード用試料を作製した。卵巣サイトゾール試料 1 μ l を同様に 5 倍希釈した protein assay dye 1 ml に懸濁し、分光光度計 U-2000 (日立製作所, 東京) を用いて、スタンダード用試料と卵巣サイトゾール試料の 595 nm の吸光度を測定し、描いたスタンダード直線から卵巣試料の蛋白濃度を測定した。卵巣サイトゾールは、使用するまで -80 °C に保存した。

3) 20 α -HSD 活性測定

氷冷してある基質溶液 (0.1 M Tris-Cl pH 8, 300 μ M NADP, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 60 μ M 20 α -OHP (+) or (-) in 3 % ethanol) を 500 μ l 石英マイクロセルにとり、37 °C で 1 分間プレインキュベートした。次に卵巣サイトゾール 25 μ l 加えてパラフィルムで蓋をし、3 回転倒混和後、速やかに 37 °C における NADPH 産生量を分光光度計により、340 nm の吸光度として計時的に測定した。得られた NADPH の生成量 (nmol/min. ml) を蛋白 1 mg 当たりに換算し、20 α -HSD 活性 (nmol/min. mg) とした。

蛍光顕微鏡下での凍結切片上 EGFP の検出 (図 3-4)

分娩後 1 日目のヘテロ, KO マウスの卵巣は、採材後 O.C.T.compound に包埋し、液体窒素で急速凍結し、使用するまで -80 °C で保存した。厚さ約 5 μ m の切片を cryotome (SHANDON, 東京) で作製し、速やかに風乾後、冷却 CCD カメラ (Photometrics, SenSys™, AZ, USA) 蛍光顕微

鏡 (BX 50, OLYMPUS, 東京) を用いて, 蛍光キューブ U-MWIB/GFP により観察し, ソフトウェア IP Lab により解析した.

Western blotting による 20 α -HSD protein の検出

1) 卵巣サイトゾールの回収

上記「卵巣サイトゾール中 20 α -HSD 活性の測定」の方法に従い卵巣サイトゾールを回収し, 蛋白濃度も測定した.

2) SDS-PAGE

卵巣サイトゾール蛋白 17 μ g または 30 μ g を sample buffer (62.5 mM Tris-Cl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue) に懸濁し, 100 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱後, 氷上で急冷し泳動に用いた. ポリアクリルアミドゲル電気泳動は, アクリルアミド濃度 3 % stacking gel/10 % running gel を用い, 泳動 buffer (50 mM Tris, 380 mM glycine, 0.5 % SDS, 2 mM EDTA pH 8.5) 中, 200 V で 1 時間行った (Laemmli の方法, 1970).

3) ニトロセルロースメンブレンへの transfer

電気泳動後, 濾紙に吸着させることにより stacking gel を分離除去した running gel に, 10 分間 MilliQ 水になじませたニトロセルロースメンブレン (Shleicher & Schuell, Dassel, Germany) を, 気泡を除去しながら密着させた. Blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20 % methanol) 中で, gel & メンブレンの両側に, 3MM filter paper 2 枚, スポンジシートの順に気泡を除去しながら重ね, サンドイッチ板で挟んで固定した. Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, USA) にセットし, 60 V で 4 時間, 4 $^{\circ}$ C で通電し, 負に帯電している蛋白を陽極側のメンブレンに転写した.

5) 免疫染色

免疫染色は, 西洋わさび過酸化酵素 (horseradish peroxidase, HRP) を用いた酵素抗体法により行った. Transfer 後のメンブレンを rinsing buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.2, 150 mM NaCl) で 10 分間洗浄し methanol を除いた後, blocking solution (10 mM Tris-Cl pH 7.2 150 mM NaCl, 3 % BSA) 中で軽く振とうしながら室温で 2 時間 blocking した. Blocking solution で 1:4,000 に希釈した一次抗体 (rabbit polyclonal antibody, anti rat 20 α -HSD (Dr. Gibori より分与)) を加えて 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた. 一次抗体反応後, TBST 中, 室温で 10 分間メンブレンを振とう後, さらに TBST を取り替えて室温で 5 分間 \times 2 回洗浄した. TBST で 1:6,000 に希釈した二次抗体 (anti rabbit Ig, HRP, Amersham, Buckinghamshire, England) を加えて室温で 1 時間反応させた. 一次抗体反応後と同様に洗浄した後, ECLTM (Amersham, Buckinghamshire, England) を用いて発色させ, Kodak Bio Max Film (Kodak, NY, USA) に感光させた.

統計処理

統計処理は全て Mann-Whitney 検定を用いて行った．危険率 5 %未満をもって統計的に有意であるとみなした．

第三章 結果

マウス遺伝子型の決定 (図 3-1, 図 3-2)

マウスの遺伝子型は、離乳期 (26 日齢) 前後の子マウス尻尾から proteinase K により組織を融解して得られるゲノム DNA を用いて、PCR で決定した。PCR には、野生型 (wild type, WT) gene と mutant gene を区別する forward primer を 2 種類と、WT gene と mutant gene に共通の reverse primer を用意し、同じ反応液内で同時に増幅させた。PCR 産物は、WT gene からは 889 bp, mutant gene からは 499 bp のフラグメントを検出した。3 種の primer を 0.5 μ M ずつ等量ずつ加えた場合、短いフラグメントの増幅の方が効率良く増幅されて長い方のフラグメントの増幅が減少し、ヘテロマウス遺伝子型とノックアウト (KO) マウス遺伝子型をはっきり区別できなかった。そこで、Taq DNA polymerase を、比較的長い DNA の増幅に適した Ex Taq DNA polymerase に代えて PCR を行ったところ、ヘテロマウスゲノム DNA においても 899 bp と 499 bp のフラグメントをほぼ同じくらいの量で検出することができたので、この方法で WT, ヘテロ, KO のマウスを識別した。

No.6 及び No.13 のキメラマウスと C57BL/6J の雌を交配し、F1 のヘテロマウスが得られた。さらに同じキメラマウス由来の F1 ヘテロマウスどうしを交配し、WT, ヘテロ, KO それぞれの遺伝子型を有する F1N1 子マウスを得た。各ペアにおける WT, ヘテロ, KO の割合ではメンデルの遺伝の法則が見られなかったが、No.6 由来の F1N1 全体を総合すると WT : ヘテロ : KO の数は 47:86:46 となり、さらに No.6 と No.13 の F1N1 全てを総合すると 56:117:54 となり、メンデルの法則に従っていると考えられた。

マウス肝臓からゲノム DNA を抽出し、ES 細胞の screening の時に用いた probe を用いて第二章と同様に Southern blotting を行った。Pst I 消化により置換領域の 3'側では、WT gene で約 4 kb, mutant gene で約 2.2 kb のシグナルを検出した。また置換領域の 5'側では、Bgl I 消化により、WT gene で約 20 kb, mutant gene で約 10 kb のシグナルを検出し、ゲノム DNA 上での相同組み換えをマウス個体においても確認した。

KO マウス mutant gene の遺伝子発現 (図 3-3, 図 3-4)

KO マウスでは、20 α -HSD mRNA の E3 から E9 は転写されないと予想される。これを確かめるため、E1F primer と E9R primer (第二章参照) を用いて RT-PCR を行った。まず性周期中無作為に採材した卵巣組織から、total RNA を抽出し、oligo dT を primer に用いることにより mRNA を鋳型にして逆転写酵素で cDNA を合成した。これを鋳型にして、PCR を行ったところ、WT gene では予想される 1019 bp のフラグメントが増幅されたが、mutant gene では予想に反して 707 bp

の増幅が見られた。そこで今度は KO マウスのゲノム DNA 上に配列が存在しないと思われる E2 と E4 を確かめるため、E2F primer と E4R primer (第二章参照) で PCR を行ったところ、同じサンプルでフラグメントの増幅は見られないことが確かめられた (結果は示していない)。一方 mutant gene では、20 α -HSD プロモーターの活性化により、IRES と共に EGFP 遺伝子も転写されるはずであるが、予想通り 424 bp の EGFP mRNA の一部が増幅された。ただし挿入 EGFP 遺伝子には、イントロン配列が含まれないため、ゲノム DNA 上の EGFP を PCR で増幅した場合 cDNA からの増幅と区別できない。本実験ではネガティブコントロールとして逆転写反応を省いた total RNA を用意し、同じ条件で PCR を行った。その結果このサンプルからは EGFP フラグメントの増幅は検出されないか、検出されてもごくわずかに止まり、mutant gene において EGFP 遺伝子が転写されていると考えられた。また、EGFP の蛍光は、冷却 CCD カメラを用いた蛍光顕微鏡観察によりヘテロマウスの卵巢組織切片においては確実に検出できなかった (結果は示していない) が、KO マウス卵巢組織切片では検出可能であった。すなわち、分娩後 1 日目の KO マウスの卵巢から厚さ約 5 μ m の凍結切片を作製し、観察したところ、卵巢内黄体において緑色の蛍光を観察できた。従って KO マウスの卵巢黄体で、挿入した EGFP 遺伝子が転写され、翻訳も受けていることが明らかになった。

KO マウス卵巢から E1F primer と E9R primer により RT-PCR で増幅されたフラグメントをさらに詳しく調べるため、この PCR 産物を切り出して塩基配列を決定した。その結果、このフラグメントは E1 の直後に E5 が結合し、そのまま E9 まで転写されたものであることが判明した。

KO マウス卵巢における 20 α -HSD 活性とその発現 (図 3-5, 図 3-6)

分娩後 1 日目の卵巢から total RNA を抽出し、20 α -HSD cDNA の全長を probe に用いて Northern hybridization を行ったところ、KO マウス卵巢では WT マウスに比べて短いシグナルが検出され、RT-PCR の結果と一致していた。また、ヘテロマウス卵巢では WT マウスの約 1.2 kb のシグナルと、KO マウスの約 0.8 kb のシグナルが共に検出され、両者のシグナルの強さはほぼ同程度であった。

分娩後 1 日目の KO マウス卵巢サイトゾール試料を用いて、抗ラット 20 α -HSD 抗体 [Albarracin & Gibori 1991] により Western blotting を行ったところ、WT とヘテロマウスで約 37 kDa のシグナルが検出されたのに対し、同じ分子量の位置に KO マウスではシグナルは検出されなかった。

E2-E4 (363 bp) が欠失すると分子量は約 23 kDa に減少することが予想されるが、KO マウスのレーンにおいてこの抗体で検出されるシグナルは存在しなかった。

分娩後 1 日目の卵巢サイトゾール試料を用いて 20 α -HSD 活性を測定した。卵巢サイトゾール試料に基質として 20 α -OHP を、補酵素として NADP を加え、progesterone に代謝される時に生じる NADPH の量を測定した。ただし、卵巢内には 20 α -OHP の溶媒である ethanol を基質とし、

NADP を利用して触媒反応を行って NADPH を産生する他の代謝酵素の存在も考えられるので、20 α -OHP を添加しない溶媒のみの群ももうけて NADPH 産生量を測定したところ、NADPH 産生上昇がみられたため、この値を 20 α -OHP 添加群の NADPH 産生量から差し引いて、20 α -HSD 活性を評価した。その結果、WT マウスでは約 50 nmol/min. mg の活性が見られたのに対し、KO マウス卵巢では活性は検出されなかった。一方無作為に選んだ性周期中の卵巢サイトゾール中の 20 α -HSD 活性を測定したところ、KO マウス 3 例中 1 例において 20 α -HSD の活性が検出された。また、WT やヘテロマウスにおいても活性がごくわずかであるもの (2.76 nmol/min.mg) や殆ど無いもの (0.11 nmol/min.mg) も存在した。

KO マウスにおける性周期回帰 (表 3-1, 図 3-7)

KO マウスの性周期回帰をスミア観察により検討した (表 3-1)。WT, KO マウスそれぞれ 6-8 週齢の雌 10 匹を用い、群飼して 14 日間毎日スミアを観察した結果 (図 3-7)、発情期 (E) の像を示した日数は WT マウスで 5.4 ± 0.6 日 (mean \pm SE), KO マウスで 3.9 ± 0.7 日であった。また発情休止期 (D) の日数は WT マウスで 7.7 ± 0.7 日, KO マウスで 9.8 ± 0.6 日であった。マウスでは D がしばしば連続して現れるが、D の連続日数は WT では 2.5 ± 0.3 日, KO では 4.1 ± 0.5 日であった。このうち WT に比べ KO では、D の日数 ($p < 0.05$), D の連続日数 ($p < 0.01$) は有意に増加した。マウスの性周期回帰は雄の存在により促される。WT マウスでは 14-26 週齢, KO マウスでは 10-14 週齢の雌 20 匹を用い、10 匹ずつ群飼にして同じケージ内に雄マウスを共存させ、同様に E の日数, D の日数, D の連続日数を測定した。ただし雄マウスは小さなケージに入れ、雌との接触は可能であるが交尾はできないよう二重ケージで飼育した。その結果、E の日数, D の日数, D の連続日数は WT マウスでそれぞれ 4.1 ± 0.4 日, 8.6 ± 0.4 日, 2.8 ± 0.2 日であり、KO マウスではそれぞれ 3.4 ± 0.4 日, 9.6 ± 0.4 日, 3.4 ± 0.3 日となり、両群に有意な差は見られなかった。

KO マウスの偽妊娠期間と血中 progesterin 濃度の変化 (図 3-8, 図 3-9)

20 α -HSD は、第一章の結果からも、マウスの生殖機構成立に大きく関わる分子であると考えられる。本実験で扱う 20 α -HSD 遺伝子は、偽妊娠末期、妊娠末期に発現が上昇し、ラットにおける 20 α -HSD1 に相当すると思われることから、KO マウスにおいて偽妊娠の終了に変化があるかを調べるため、精管結紮した雄と交配させて偽妊娠を誘起した。雄と同居させたまま次の膣栓を確認する日までの日数を数えたところ、WT マウスでは 11.6 ± 0.2 日 (mean \pm SE), KO マウスでは 14.1 ± 0.4 日であり、KO マウスにおいて有意な ($p < 0.01$) 延長が見られた。また膣栓を確認してからほぼ 2 日毎に眼窩採血により採血し、血中 progesterone と 20 α -OHP 濃度を測定した。その結果、WT マウスでは膣栓確認日には、その前日に比べて 20 α -OHP 濃度が

progesterone 濃度を上回ることが示された。一方 KO マウスにおいて 20 α -OHP は、終始 10 ng/ml 前後の値が維持され、膣栓形成時にも変動は見られなかった。偽妊娠中の progesterone 濃度の推移は、KO マウスの方が WT マウスよりも 4-10 日目頃は約 1.5 倍高く推移し、WT マウスに比べて progesterone 濃度の高い時期が延長し、その後は WT マウスよりもわずかに高値を維持したまま膣栓形成まで低く推移する傾向があった。

KO マウスの妊娠期間、妊娠末期血中 progestin 濃度の変化 (図 3-10)

妊娠期間は、WT マウスでは 4 例中 2 匹は 18 日目暗期に分娩を迎え、2 匹は 18 日目の明期に分娩した。KO マウスにおいては観察した 7 例中、3 匹が 18 日目暗期で、3 匹が 19 日目暗期で分娩し、20 日目に分娩した 1 例では 4 匹の死産であった。WT と KO マウス妊娠期間に有意な差は無かった。

妊娠末期の分娩前後においても血中 progesterone と 20 α -OHP 濃度を測定したところ、WT マウスの血中 20 α -OHP 濃度は、それまで 20 ng/ml 程度であったものが分娩前日から急激に上昇して 70 ng/ml 前後に達し、分娩後 1 日目も 50 ng/ml 前後の高い値が維持された。KO マウスにおいては、WT マウスのように分娩前後に 20 α -OHP 濃度の上昇は見られず、約 10 ng/ml の低い値を保ったままであった。Progesterone 濃度は、2 例の KO マウスにおいて、分娩前 3 日目には WT マウスの約 1.4 倍の高い濃度が検出された。この時期 20 α -OHP 濃度も 16 ng/ml 程度への若干の上昇が見られ、progesterone 濃度の上昇に付随した傾向が見られた。従ってこれはおそらく、血中 progesterone に濃度依存的に対応する、20 α -HSD 活性をもった他の分子の働きによるものであると推測される。また 1 例において、分娩の 2 日前に 20 α -OHP 濃度の上昇を伴わない progesterone 濃度の急激な低下が見られたが、この個体においては、分娩後 1 日目に 4 匹の子が死亡して確認された。さらに、この死産の個体以外の KO マウス 2 例では、分娩後 1 日目にも妊娠期間中と同程度の progesterone 濃度の再上昇が見られたが、WT マウスでは分娩後は妊娠期よりも低い値に抑えられていた。

KO マウスの産子数 (図 3-11)

分娩後 1 日目において生存産子数は、WT マウス (n=12) で 7.1 ± 0.6 匹 (mean \pm SE), KO マウス (n=17) では 3.5 ± 0.9 匹であった。また、死亡産子数も合わせて母体から娩出されたと思われる総産子数は、WT マウス (n=12) で 7.3 ± 0.6 匹, KO マウス (n=14) で 5.7 ± 0.8 匹で、生存産子数においてのみ WT に比べ KO マウスで有意 ($p < 0.01$) に減少していた。ラットやマウスでは分娩時の progesterone 濃度の急激な低下によりまもなく排卵し受胎可能であり、受精卵は、哺乳期間中は着床を延期する (遅延着床) が、WT マウスの分娩間隔 25 ± 1.2 日に対して、KO マウスでは 23 ± 1.7 日であり、両者に有意な差は見られなかった。

KO マウス子宮における 20 α -HSD 発現 (図 3-12)

第一章において、Northern hybridization, *in situ* hybridization により、妊娠期子宮内膜上皮細胞での 20 α -HSD mRNA の発現を検出した。KO マウスにおける子宮での発現を確かめるため、妊娠 18 日目の WT, ヘテロ, KO マウスの子宮を採材し、マウス 20 α -HSD cDNA の全長を probe にして Northern hybridization を行った。その結果、卵巣での結果と同様に、KO マウスの子宮で E2-E4 が欠損した短い転写産物が検出され、ヘテロマウスの子宮では全長 20 α -HSD mRNA と E2-E4 欠損型 20 α -HSD mRNA の両方が検出された。KO マウスにおいては WT, ヘテロマウスに比べて発現量は極めて低かった。KO マウスの子宮で E2-E4 欠損型 20 α -HSD mRNA が検出されたことで、子宮で発現している 20 α -HSD が卵巣黄体の 20 α -HSD と同一遺伝子に由来する転写産物であると考えられ、子宮においてもその働きは失われていると考えられた。

第三章 考察

本実験の結果により、Southern blotting により相同組み換えが確認されたこと、20 α -HSD の発現が上昇する分娩時において、KO マウスでは WT マウスと同じサイズの 20 α -HSD の mRNA 発現は見られず、代わりに E2 から E4 が欠失した欠損型 mRNA が転写されていたこと、置換挿入した EGFP 遺伝子翻訳産物による蛍光が黄体において検出されたこと、20 α -OHP を基質とした触媒活性が無かったこと、progesterone 濃度の低下に伴う 20 α -OHP 濃度の上昇が見られなかったことから、このマウスを 20 α -HSD KO マウスと判断した。以下、項目ごとに本章の結果を考察した。

KO マウスにおける置換領域の遺伝子発現

PCR で KO マウスと判定したマウスの卵巣では、E1 と E5 が連結し、E9 まで転写された mRNA が存在することが、E1F/E9R primer による RT-PCR、全長 20 α -HSD cDNA を probe に用いた Northern hybridization、PCR 産物の塩基配列決定により確かめられた。E5 のフレームが E2 とインフレームでつながるため、E2 から neo^r 遺伝子までの置換領域をスキップして E5 が直接 E1 の後に転写されたと思われる。しかし転写産物の中には E2 の下流に連結していた EGFP 遺伝子の発現も検出され、予定していた E2 を経由する転写も行われていることが確認できた。従って 20 α -HSD のプロモーターは E2 から E4 を欠如した欠損型 mRNA の転写と EGFP の転写との両方を兼ねていると考えられる。ヘテロマウス分娩後 1 日目の卵巣組織切片において EGFP の蛍光を確実に検出できなかったのは、KO マウスでの発現量の半分しか発現していないためと、KO マウスの分娩後 1 日目卵巣組織切片においてもプロモーターの共有により EGFP が普段の半分ほどしか発現していないことが原因として考えられる。

抗ラット 20 α -HSD 抗体により、WT マウスの分娩後 1 日目の卵巣蛋白 30 μ g から 20 α -HSD 蛋白を検出することができた。一方 KO マウスの E2-E4 欠損型 mRNA からは、翻訳されれば 23 kDa の蛋白が生じると推定される。仮にそのような翻訳産物が存在した場合、基質である progesterone と結合する能力を有し、progesterone 結合蛋白としてその活性を抑制する働きをもつ可能性もある。しかし本実験では、KO マウスでこの翻訳産物が存在すると考えられる分娩前後において、分娩直前に低下した progesterone 濃度が分娩後に妊娠中のレベルにまで再上昇したことから、progesterone 濃度がこの翻訳産物の結合により制御されているとは考えにくく、この 20 α -HSD KO マウスでは 20 α -HSD の機能のみを欠失させることができたと考えられる。さらに分娩後 1 日目の卵巣内で Western blotting により抗ラット 20 α -HSD 抗体で検出される蛋白は存在しなかったことから、E2-E4 欠損型 mRNA の翻訳産物は存在しないと考えられた。

性周期

性周期スメアは、生後 6-8 週齢 (n=10)、10-26 週齢 (n=20) のマウスにおいて、14 日間毎日観察した。6-8 週齢の群では雌のみの群飼であったが、2 週間のうちの発情休止期 (D) の日数が WT マウス (平均 7.7 日) よりも KO マウス (平均 9.8 日) で有意な増加が見られた。発情期 (E) の日数では両者に有意な差は見られなかった。また、D の連続日数を数えたところ、KO マウス (平均 4.1 日) では WT マウス (平均 2.5 日) よりも有意に長かった。しかし 10-26 週齢の群では雌を群飼したケージの中に隔離した雄を同居させ、Lee-Boot 効果や Whitten 効果などフェロモンに反応する性周期制御要因も影響する条件下、発情休止期の日数において有意な差は見られなかった。性周期スメアは、規則的な 4 日周期を示すものは少なく、WT マウスでは 30 匹中 2 匹、KO マウスでは 30 匹中 1 匹であった。また観察したスメア像では、E が連続するものや D が連続する時期が存在し、このマウスモデルでは性周期回帰の解析が困難に思われた。

ラットでは性周期中ほぼ常に 20 α -OHP 濃度が高く維持され、低 progesterone 濃度の維持に関わっていると考えられるため、単純に考えると 20 α -HSD の機能を欠損した場合、黄体の機能的退行が起こらず発情休止期が少なくとも偽妊娠期間程度には持続すると予想される。しかし 20 α -HSD KO マウスでは、発情休止期が有意に延長した例でも、WT マウスに比べて約 2 日程程度の延長しか認められなかった。性周期を正確に 4 日で回帰する IVCS マウスの性周期中 progesterin 濃度の変化を 1 例において測定した結果、発情前期、発情期、発情休止期第 2 日目には progesterone 濃度、20 α -OHP 濃度共に 15 ng/ml 前後に低く維持されていたが、排卵後黄体が progesterone を分泌開始すると思われる発情休止期第 1 日目には、25 ng/ml 程度の progesterone 濃度の上昇に伴い 45 ng/ml 程度に 20 α -OHP 濃度の上昇が見られた。従って IVCS マウスと Wistar Imamichi ラットでは性周期回帰における 20 α -HSD 活性の寄与の度合いが異なる可能性もあるが、progesterone 濃度を上回る 20 α -OHP 濃度の上昇が認められる相もあることから、IVCS マウスにおいて 20 α -HSD の機能を欠失した場合発情休止期が延長する可能性は十分考えられる。従って今後 IVCS マウスへの戻し交配による解析が急務である。ラットやマウスでは、性周期中 progesterone 濃度が低く維持されることにより、他の完全性周期動物よりも排卵間隔を短くすることができる。特にラットにおいて性周期中 progesterone を 20 α -OHP に代謝することにより progesterone 濃度を低下させているのは 20 α -HSD であり、もし 20 α -HSD 機能を欠失しても性周期中排卵間隔が短く維持されるとすれば、改めてマウス性周期回帰における 20 α -HSD の機能の位置づけを調べる必要があり、ラットとほぼ同列に解釈されているマウスの性周期回帰機構の新たな解明に繋がると考えられる。

一方、無作為に選んだ性周期卵巢サイトゾールからは、KO マウス卵巢でも 20 α -HSD 活性が検出されるものがあった。Seong ら [1992] によると、ラットでは、性周期中の卵巢では HSD1 と HSD2 の活性が同程度に存在する。本結果より、マウスの卵巢にも 20 α -HSD アイソザイムが

存在する可能性が考えられた。アイソザイムの存在を想定すると、雄と同居させて性周期の回帰を促した群ではアイソザイムの働きが活性化されたため、WT マウスと性周期回帰に差が見られなくなったのかもしれない。すなわち 6-8 週齢においては、雄の不在により性周期の回帰が促されなかったため、20 α -HSD の機能欠失の効果が現れやすかったのかもしれないと考えられる。もし、KO マウスの性周期中において 20 α -OHP 濃度の変動が検出できたなら、KO マウスの卵巣から20 α -HSD アイソザイムの遺伝子をクローニングすることも将来可能になるかもしれない。

偽妊娠期

本実験において偽妊娠中血中 progesterin 濃度を調べたのは 3 例であったが、その progesterone 値の動態はおおよそラットにおけるものと一致していた。すなわち、WT マウスでは血中 progesterone 濃度は、4 日目を過ぎるあたりで最高値（約 40 ng/ml, 0 日の約 2 倍）を示した後、徐々に低下し、10 日頃に最低値（約 18 ng/ml）となった。20 α -OHP 値は、4 日目までは progesterone 濃度をやや上回る濃度が測定されたが、これは前回偽妊娠に関わった黄体の数（排卵数）に依存して上下すると思われる。その後 progesterone 濃度が最低値を示す 10 日目から 3 ng/ml 程度 progesterone 濃度を上回り始め、膣栓確認日にはさらに増加して 10 ng/ml から 30 ng/ml まで上回った。マウスで特徴的だと思われたのは、4-10 日目までは progesterone 濃度の減少に同調して、20 α -OHP も減少し、総 progesterin 量の低下が見られたことであり、偽妊娠末期の progesterone 濃度低下を主に 20 α -OHP への代謝に依存しているラットとは異なる機構が存在すると思われた。一方 KO マウスでは、濃度の変動にかなりばらつきが見られたが、共通して、WT マウスと同様に 10 日目前後には progesterone 濃度がかなり低下した。従って偽妊娠 10 日目に progesterone 濃度を低下させる機構はおそらく 20 α -HSD の発現とは独立した制御であると思われ、progesterone 合成系自体の抑制が考えられた。マウスでは偽妊娠末期に PGF_{2 α} により黄体細胞でアポトーシスが起ることが報告されている [Hasumoto et al. 1997] が、KO マウスにおいてもおそらく時期特異的なアポトーシスの発現により progesterone 濃度が WT マウスと同じ時期に低下したと考えられる。一方 progesterone 値動態の傾向として、WT マウスよりもやや高値を取り、10 日目に低下はするものの progesterone 濃度の減少が WT マウスよりもゆるやかであった。さらに、精管結紮した雄と同居させた場合の膣栓を確認する間隔は、WT に比べて KO マウスで有意に延長した。偽妊娠末期には、progesterone 濃度の低下に伴って次の卵胞発育・排卵が起こり、発情前期の暗期に交尾し、発情期に膣栓形成が認められるはずである。スメア像を偽妊娠中、日を追って観察した結果、膣栓形成間隔がやや長めであった個体、すなわち WT マウスのうち膣栓確認間隔が最長（13 日）であったものや KO マウスにおいては、膣栓確認前に発情前期の像が連続することもあった。従って、この結果から予想されるのは、偽妊娠中 progesterone

濃度が高いと、次の卵胞発育・排卵が遅延する傾向があることであり、KO マウスにおいてはより顕著にその傾向が現れて、膣栓形成時期に差が生じたと考えられた。以上より、偽妊娠終了と次の卵胞発育・排卵を進行させるのには $\text{PGF}_{2\alpha}$ などによる progesterone 合成系の調節に加えて、 $20\alpha\text{-HSD}$ による progesterone 代謝系との協調が重要であると考えられた。

妊娠期

WT マウスでは膣栓形成を確認した日を 0 日目とすると、一般に 18 日目の暗期に分娩し、分娩前 1 日目から高い $20\alpha\text{-HSD}$ 活性が見られた。KO マウスにおいては分娩可能であったが、分娩後 1 日目に $20\alpha\text{-HSD}$ 活性は認められなかった。妊娠期間は KO マウスでやや延長している傾向がみられたが、有意な差は無かった。そこで分娩後、産子を確認した明期を 0.5 日目、その前日の明期を -0.5 日目として WT と KO マウスの血中 progestin 濃度を比べると、分娩前後の血中 progesterone 濃度は、WT マウスでは約 20-30 ng/ml にまで低下し、対照的に $20\alpha\text{-OHP}$ 濃度はそれまでの 20 ng/ml から約 60-70 ng/ml にまで急増した。KO マウスでも、progesterone 濃度は WT マウスと同レベル（約 20-30 ng/ml）に低下したが、 $20\alpha\text{-OHP}$ 濃度は 10 ng/ml 前後と低いままであった。一方妊娠中期では、やはり低濃度ではあるものの、分娩時の 1.5 倍程度の $20\alpha\text{-OHP}$ 濃度が見られ、おそらく $20\alpha\text{-HSD}$ 活性を持つ多くの分子による、血中 progesterone 濃度の上昇に応じた変化である可能性がある。KO マウス 3 例中 1 例では、-1.5 日において progesterone 濃度が激減し、この個体では死亡産子が確認されたので、この個体は除くと、妊娠末期の血中 progesterone 濃度は、WT よりも KO マウスで高めの値をとる傾向が見られた。血中総 progestin 濃度は、分娩前-1.5 日目には WT も KO マウスも同じ位のレベル（60 ng/ml 強）にまで低下するが、その後は WT マウスではさらに上昇したのに対し、KO マウスでは 40 ng/ml にまで低下し、対照的であった。このような KO マウスにおける progestin レベルの動態からは、分娩時卵巣からの progesterone 分泌の抑制により、分娩可能な程度に末梢血中 progesterone 濃度を低下させる機構が考えられる。 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプターの KO マウスでは、妊娠末期に分娩を可能にするほど progesterone 濃度が低下せず [Sugimoto et al. 1997]、 $20\alpha\text{-HSD}$ の発現も見られない [Stocco et al. 2000]。従って $20\alpha\text{-HSD}$ 活性発現の上流には $\text{PGF}_{2\alpha}$ レセプターのシグナル伝達が関係していると考えられる。実際ラットでは $\text{PGF}_{2\alpha}$ が転写因子 Nur77 を介して $20\alpha\text{-HSD}$ 発現を上昇させるという分子レベルの知見もある [Stocco et al. 2000]。また、ラットでは、妊娠末期黄体での $20\alpha\text{-HSD}$ 活性上昇、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ レベルの上昇に先行して $3\beta\text{-HSD}$ 活性の低下による progesterone 合成系の抑制が見られることから [Stocco & Deis 1998]、 $20\alpha\text{-HSD}$ KO マウスにおいて、 $3\beta\text{-HSD}$ 活性抑制も代償性に亢進している可能性も考えられる。分娩に関してはおそらくその重要性から、 $20\alpha\text{-HSD}$ 以外にも $\text{PGF}_{2\alpha}$ を含む複数の因子により progesterone 濃度が制御されていることが示唆された。

産子

分娩に際して見られる変化には、一般に progesterone 濃度の減少, estrogen 濃度の増加, 子宮内 oxytocin レセプターの増加であるが, oxytocin レセプターKO マウス [Nishimori et al. 1996] と本研究で用いた 20 α -HSD KO マウスは分娩可能であった。一方で, oxytocin レセプターKO マウスでは, 泌乳ができず子が育たない。本研究でも, 第一章において卵巣以外にも子宮, 胎盤, 胎子における 20 α -HSD mRNA の発現を検出していることから, このような発現が産子に影響を及ぼすかどうかを調べたところ, KO マウスでは, 総産子数は WT マウスと有意な差が無いのに対し, 分娩後 1 日目の生存産子数を比較すると WT に比べて有意に減少していた。すなわち, 分娩自体は可能であるが, 20 α -HSD の機能が欠損したことにより, 妊娠中子宮内において胎子発育に何らかの異常が起きていると思われる興味ある結果が得られた。

第一章では, 胎子は子宮や胎盤で発現する 20 α -HSD の働きにより低 progesterone 環境下で発育するという仮説を立てた。高濃度 progesterone が胎子発育に影響を及ぼすという決定的な確証はまだ得られていないが, 生存産子数の減少の要因の一つとして検討すべき課題である。また, 本実験では, 交配は KO マウスどうし, WT マウスどうしで行ったため, KO マウスの子宮内には KO 胎子が入っている。従って, KO マウスの雌を WT マウスの雄と交配し, 母体は KO, 胎子はヘテロの条件を作り, 生存産子に対する影響を調べることで, 胎子表皮での発現の検討も含め, 生存産子数減少の原因が母体側にあるのか, 胎子側にあるのかを検討する必要がある。

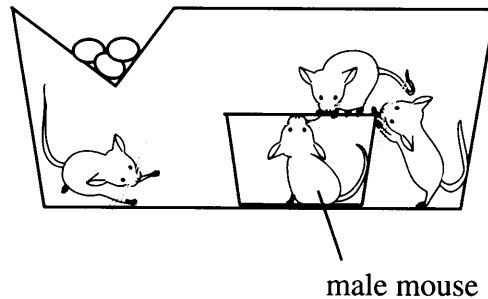
また, 20 α -HSD の妊娠期子宮内膜での発現は, 結果的に胎子への progesterone の影響を緩和するという合目的的意味を持つ発現である可能性もあるが, 単純に子宮内膜上皮細胞自体の機能発現のために progesterone を不活化する必要がある可能性もある。特に妊娠期特異的な発現は, 妊娠中 progesterone の十分な作用を必要とする子宮においてその不活化酵素が発現するという一見矛盾した現象であり, もし子宮内膜細胞自体において progesterone を抑制する必要があるとすればその因果関係に興味を持たれる。ICR マウスにおいては, 15 日目頃から胎子の急激な体成長に加えて多産であることもあり, 母体の腹部が著しく大きくなり始め, 妊娠末期にはかなり腹囲は膨らむ。解剖すると, ほぼ形態的に完成した胎子を包む子宮は, 中の胎子が透けて見えるほど薄くのびていた。子宮平滑筋はある程度の伸縮性で適応していると考えられるが, 20 α -HSD の発現する子宮内膜上皮は, 性周期中の細い子宮の径を考えるととても伸長しただけとは考えられずその面積を補うため増殖していると予想される。実際, 子宮内膜上皮細胞の増殖は, estrogen や progesterone の作用を受けて増殖を刺激されたり抑制されたりするため, 細胞増殖研究のモデルとして多用される。しかしそのほとんどが卵巣摘出して内因性のステロイド供給を絶ち, 外部からステロイドを投与する実験である。子宮内膜上皮細胞での 20 α -HSD 発現が, もし細胞増殖と関係するとすれば, 第一章において, 妊娠期 Northern hybridization で検出した 20 α -HSD mRNA 発現の上昇には, 1 細胞当たりの mRNA 発現上昇と, 発現細胞の増

殖による上昇の 2 つの可能性があり、妊娠期子宮の膨らみを考えると、発現細胞増殖による上昇が少なからず含まれていると思われる。事実、子宮内膜上皮細胞の、estrogen 作用による増殖は、progesterone により抑制されることが知られている [Yamanouchi et al. 2000, Tong et al. 1999]。この観点に立つと、KO マウスで生存産子数が減った原因は、20 α -HSD 発現を失って progesterone の作用を受け、増殖できなくなった子宮内膜上皮細胞に何らかの損傷が生じ、胎子の成長に伴い多くの胎子を維持できなくなったことによるとも考えられる。これについては組織切片上で子宮内膜上皮細胞の形態、またその増殖を検出比較するなどの検討が必要である。

子宮における発現の制御

Northern hybridization により、子宮で発現している 20 α -HSD は、卵巣で発現している 20 α -HSD と同じ遺伝子由来である可能性が示された。従って同じ制御領域を有すると考えられるが、妊娠中期、卵巣では 20 α -HSD の発現は抑制されていると考えられる時期に、子宮では 20 α -HSD の発現が高まってくる。同じ遺伝子でありながら、発現部位は異なるものの、同時期に異なる発現調節を受けている可能性がある。しかしこれは、妊娠初期に新生黄体での 20 α -HSD 発現が PRL サージによる遺伝子発現抑制を受け一方、前世代の黄体での 20 α -HSD 発現が抑制を受けないことに見られるような制御様式を考えると、意外な結果ではないのかもしれない。子宮内膜上皮での発現は、胎子を低 progesterone 環境下で発育させる可能性と、さらに胎子成長のため子宮の径を大きくするという可能性が考えられ、その発現が妊娠期に限られることから、両者は共に胎子胎盤の存在を前提としてくる。従ってその発現の制御には、胎子成長による物理的子宮拡張刺激も考えられるが、胎盤からのホルモンに支配されている可能性もある。実際ラットでは、20 α -HSD の発現は妊娠後半においては、胎盤から分泌される胎盤性ラクトジェン (PL) に感受性があり、発現は抑制される [Soares et al. 1991]。ラット胎盤からは様々な PRL 様ホルモン (rPL-I, rPL-I variant, rPL-II, PRL-like protein (PLP) A, PLPB, PLPC) が分泌されている。rPL-I と rPL-II は PRL レセプターを介して作用するが、他の作用機序は明らかではない。rPL-I は妊娠 6-13 日まで、rPL-II は 13 日から妊娠末期まで分泌され、卵巣の 20 α -HSD は少なくともこれらのホルモンにより PRL レセプターを介して発現抑制されている [Soares et al. 1991, Zhong et al. 1997]。マウスの胎盤にも、mPL-I [Colosi et al. 1987], mPL-II [Colosi et al. 1982] に加えて、プロリフェリン (PLF) [Linzer et al. 1985] の分泌が報告されている。PLF は胎子胎盤から分泌される糖蛋白であり、その mRNA 発現は 8 日目から検出され、10-12 日目にピークに達し、16 日目までに低下し、分娩まで低く推移する。PLF はいわゆる PL とは異なるが、PRL と構造が似ているため、細胞増殖作用を含めた PRL 様の作用をもつ可能性がある。また PRL レセプターは、オルタナティブスプライシングにより異なる分子が存在し、細胞質内ドメインの長さによって、ロングフォーム (PRL-R_L) とショートフォーム (PRL-R_S) に分類される [Kelly

et al. 1991]. マウスにおいてはショートフォームが3つ (PRL-R_S1, PRL-R_S2, PRL-R_S3), ロングフォームが1つ (PRL-R_L1) 報告されている [Clarke & Linzer 1993]. 一般に PRL シグナルは PRL-R_L を介して伝達されるが, ラット卵巢特異的に発現する蛋白 PRAP (PRL receptor associated protein) は PRL-R_S を介することが示唆されている [Duan et al. 1996]. このように卵巢において 20 α -HSD 発現を抑制する PL は, PL 自身の種類, また作用するレセプターの種類を使い分けることにより, 幾通りかの作用を発揮できるものと考えられるため, 妊娠後期卵巢と子宮内膜上皮での異なる 20 α -HSD 発現制御は PL に由来する現象である可能性も考えられた.



	wild type (6-8 weeks)	knock out (6-8 weeks)	wild type (14-26 weeks)	knock out (10-14 weeks)
Estrusの日数	5.4 ± 0.64	3.9 ± 0.69	4.1 ± 0.43	3.4 ± 0.36
	※ $p < 0.05$			
Diestrusの日数	7.7 ± 0.65	9.8 ± 0.57	8.6 ± 0.43	9.6 ± 0.41
	※ $p < 0.01$			
Diestrusの連続日数	2.5 ± 0.25	4.1 ± 0.47	2.8 ± 0.21	3.4 ± 0.31

表3-1. KOマウスにおける性周期回帰の変化.

6-8 週齢のWT, KOマウス (各n=10) は雌のみの群飼, 10-26週齢のWT, KOマウス (各n=20) は雌10匹ずつの群飼に雄を近接して同居させ, 14日間毎日膣スミア像を観察し, 各ステージの日数を示した (mean \pm SE). 6-8週齢の群ではKOマウスにおいては発情休止期の日数, 発情休止期の連続日数に有意な増加が見られた.

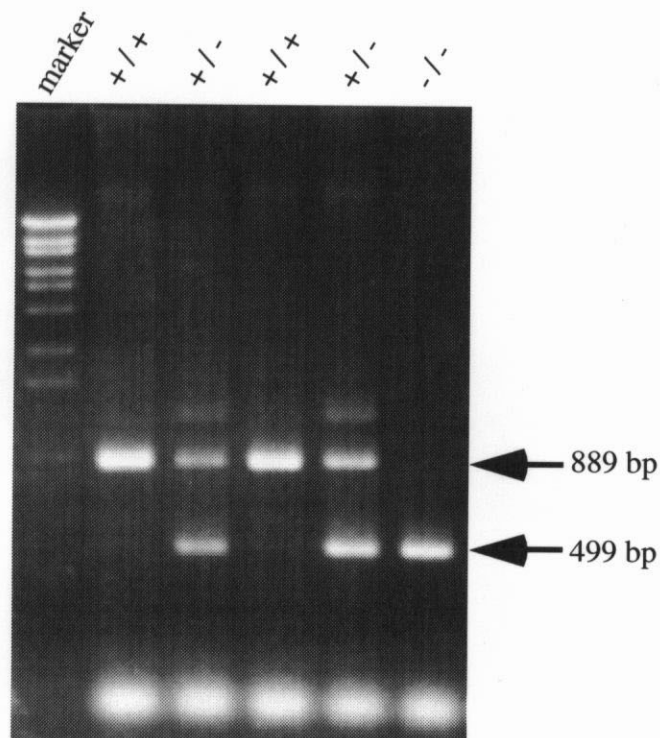
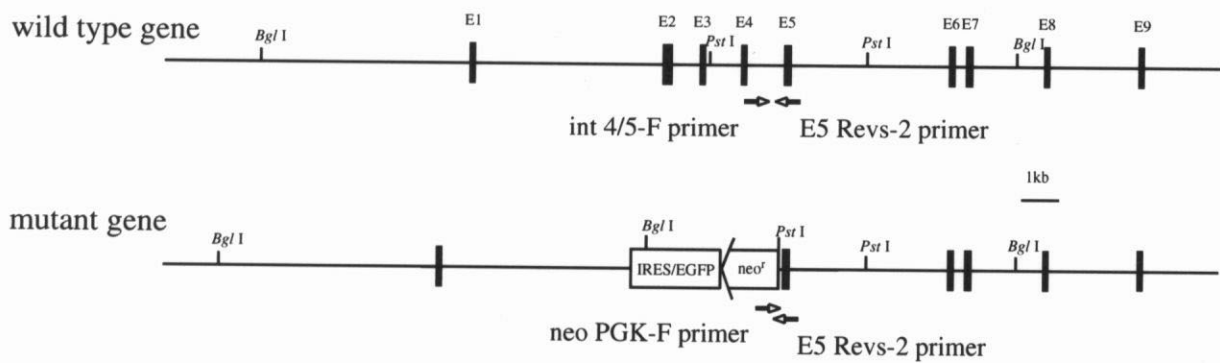
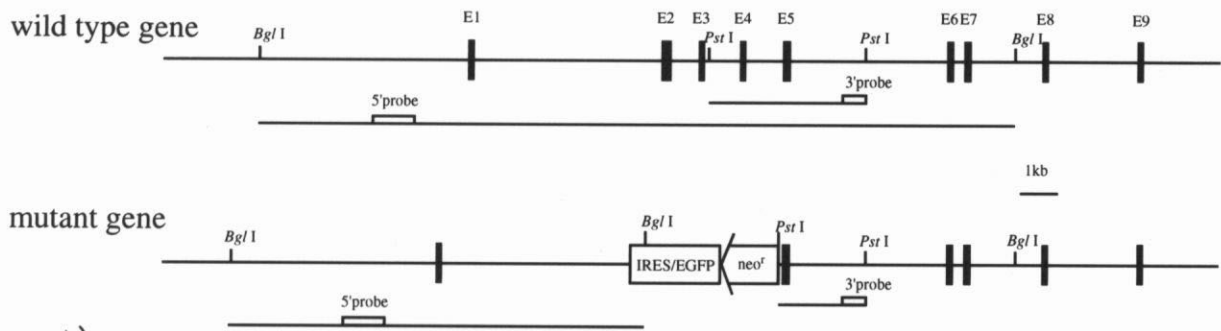
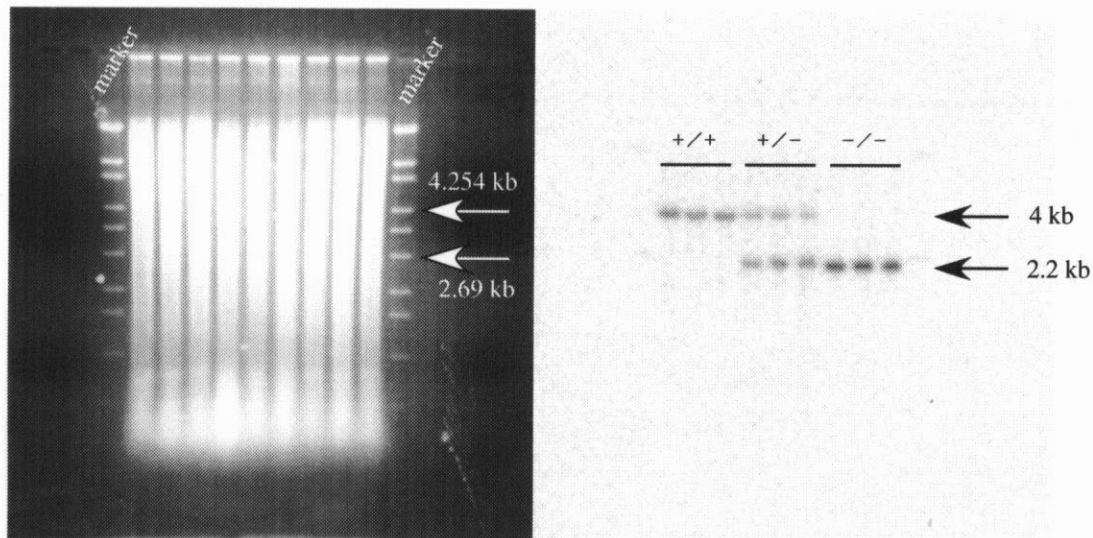


図3-1. PCRによるF1マウス尻尾から抽出したゲノムDNAを用いた遺伝子型決定.

int 4 / 5-F primerとE5 Revs-2 primerにより, wild type geneからは889 bpのフラグメントが, neo PGK-F primerとE5 Revs-2 primerにより, mutant gene からは499 bpのフラグメントを検出し, 遺伝子型を判別した.



A)



B)

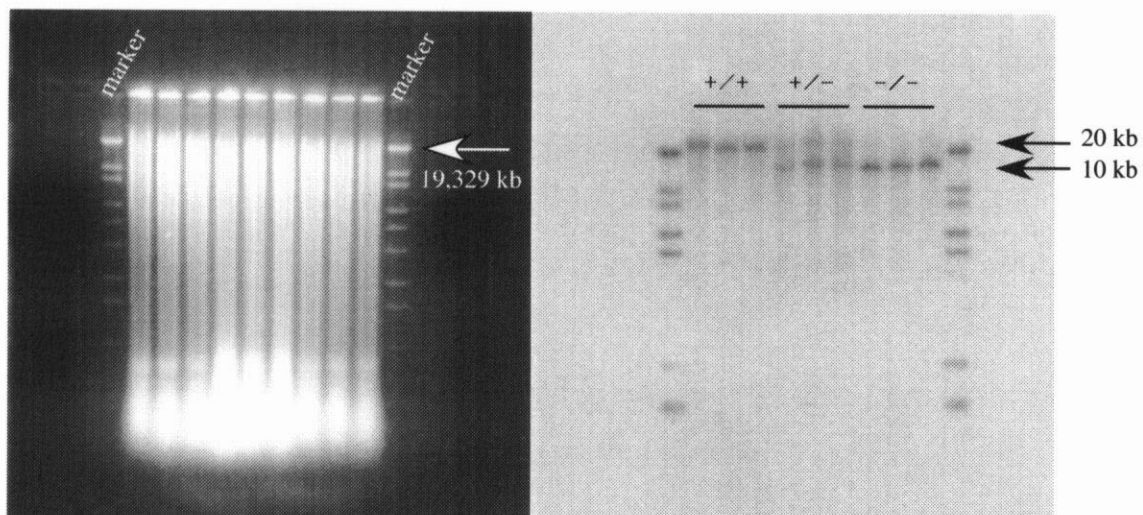


図3-2. F1マウス肝臓ゲノムDNAを用いたSouthern blottingによる遺伝子型解析.

A) WT, ヘテロ, KOマウス肝臓から抽出したゲノムDNAを*Pst* Iで消化し (左), 3' probeによりSouthern blottingを行った (右).

B) WT, ヘテロ, KOマウス肝臓から抽出したゲノムDNAを*Bgl* Iで消化し (左), 5' probeによりSouthern blottingを行った (右).

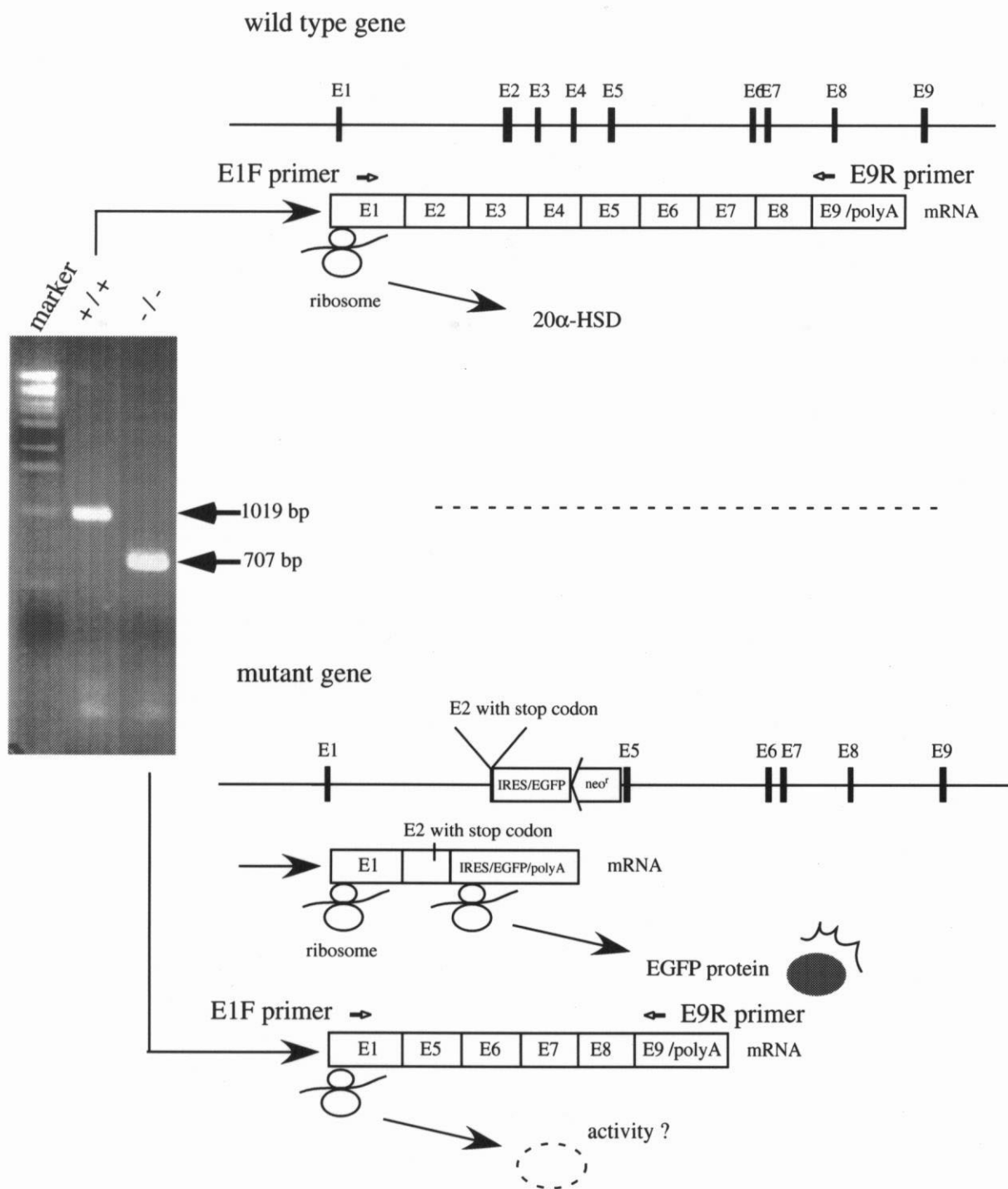


図3-3. KOマウスにおいて予想されるmutant geneの発現.

mutant gene においては, RNA polymeraseによるRNA合成は, おそらくEGFP発現カセット内のpolyadenylation signalを越え, E9下流のpolyadenylation signalにまで及び, その後スプライシングにより, E1とE2以下EGFP発現カセットをコードするmRNAと, 外来性のE2以下EGFP発現カセットをスキップしたE1から直接E5以下が連結したmRNAの2種類が生成されたと予想される.

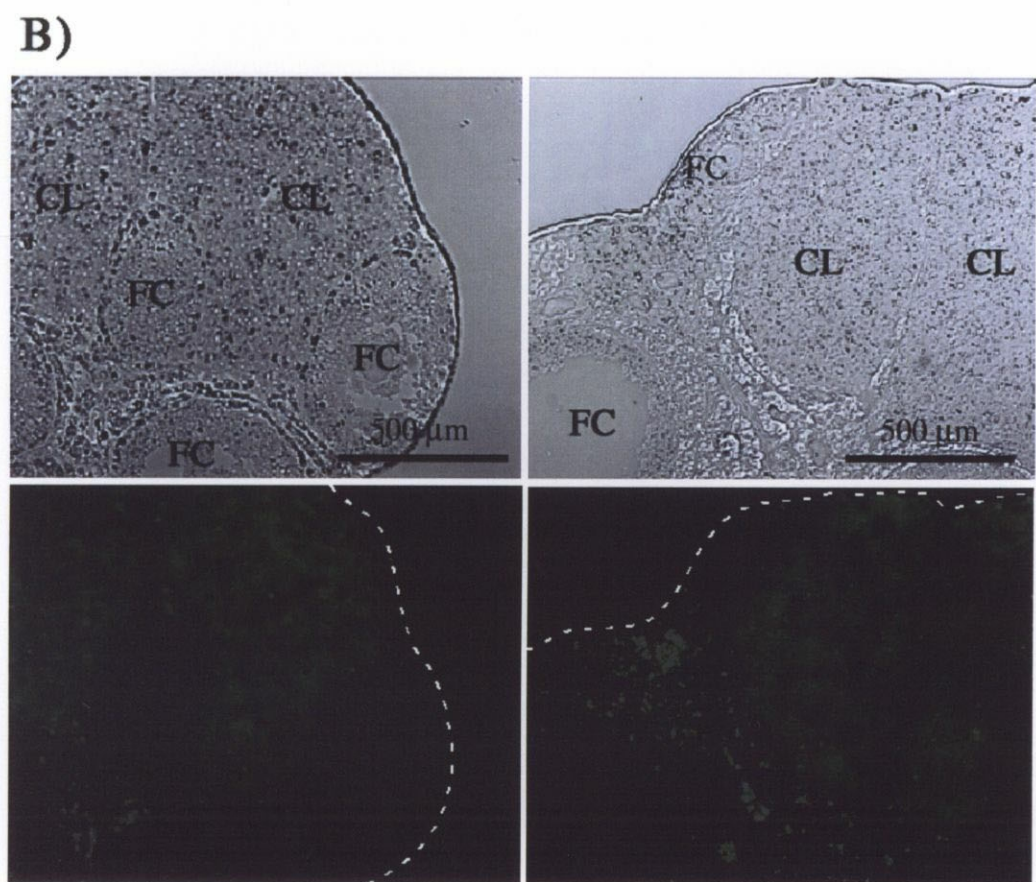
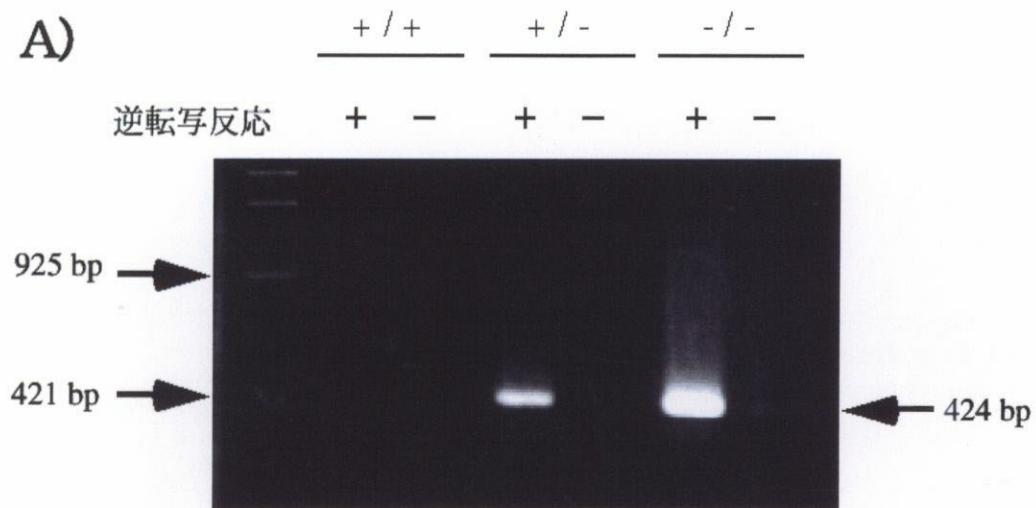


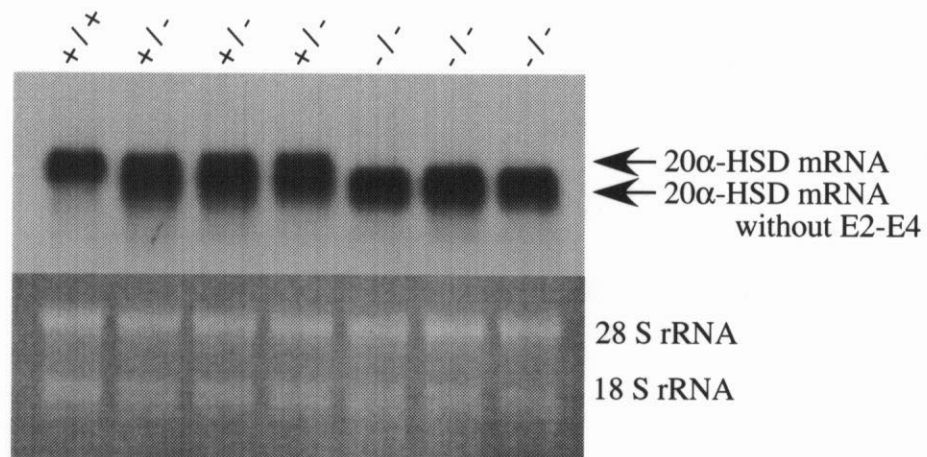
図3-4. F1マウス分娩後1日目の卵巣におけるEGFPの発現.

A) RT-PCRによるEGFP mRNA発現の検出.

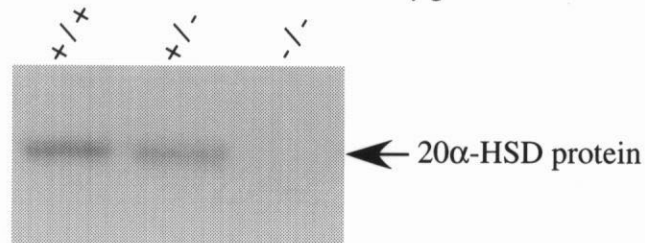
B) KOマウス黄体でのEGFP発現による蛍光の検出 (左右共).

CL: 黄体. FC: 卵胞.

A) 分娩後1日目卵巣 (total RNA 5 μ g)



B) 分娩後1日目卵巣 (サイトゾール蛋白30 μ g)



C) 分娩後1日目の卵巣サイトゾール中20 α -HSD活性

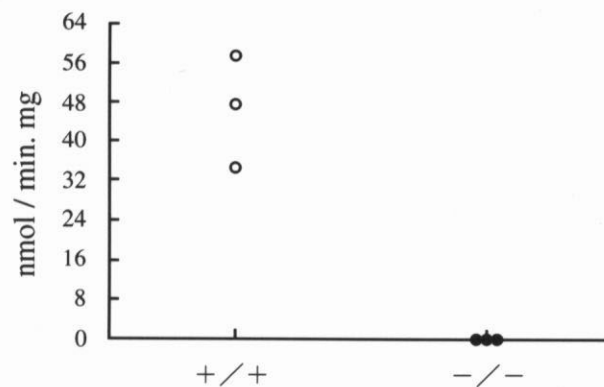


図3-5. F1マウス分娩後1日目の卵巣における20 α -HSD発現と活性.

A) WT, ヘテロ, KOマウスの, 分娩後1日目卵巣total RNAを用いて, 全長のマウス卵巣20 α -HSD cDNAをprobeとしてNorthern hybridizationを行った. KOマウスでは, E2からE4が欠失した転写産物が検出された.

B) WT, ヘテロ, KOマウス (各n=1) の, 分娩後1日目卵巣蛋白を用いて抗ラット20 α -HSD抗体によりWestern blottingを行った. KOマウスでは, シグナルは検出されなかった.

C) WTとKOマウス (各n=3) の, 分娩後1日目卵巣サイトゾールにおける20 α -HSD活性を測定した. KOマウスでは活性は見られなかった.

性周期中の卵巣サイトゾールにおける 20α -HSD活性

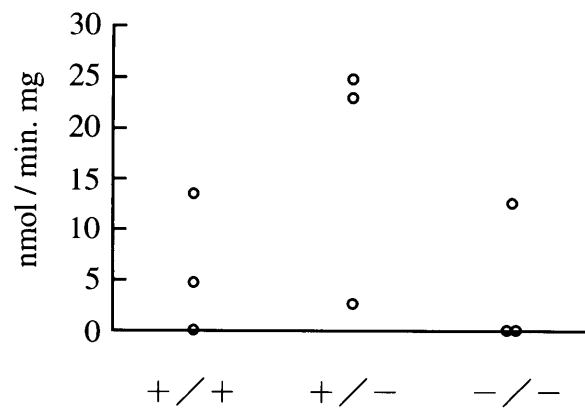
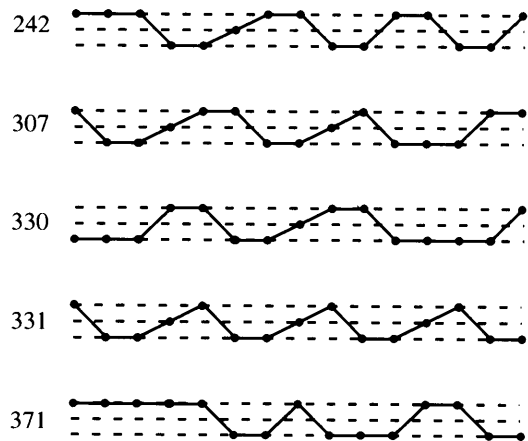


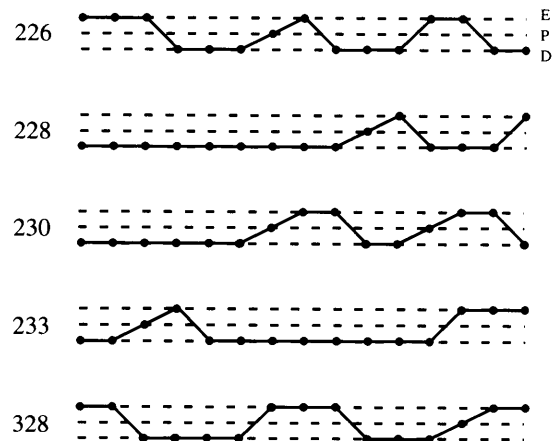
図3-6. F1マウス性周期中卵巣における 20α -HSD活性.

A) 性周期中、無作為に採材した卵巣サイトゾール中の、 20α -HSD活性をWT, ヘテロ, KOマウス (各n=3) において測定した. KOマウスでも, 活性の見られるものが存在した.

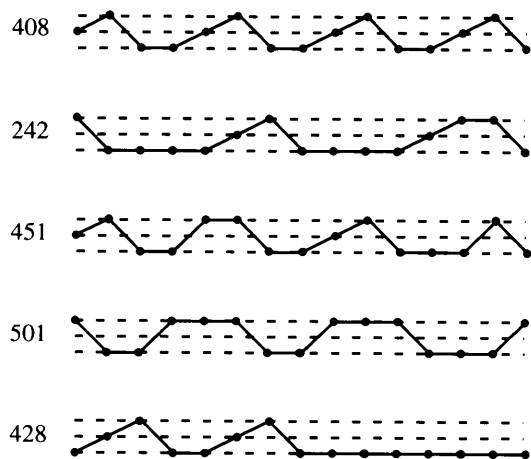
wild type (6-8 weeks)



knock out (6-8 weeks)



wild type (14-26 weeks)



knock out (10-14 weeks)

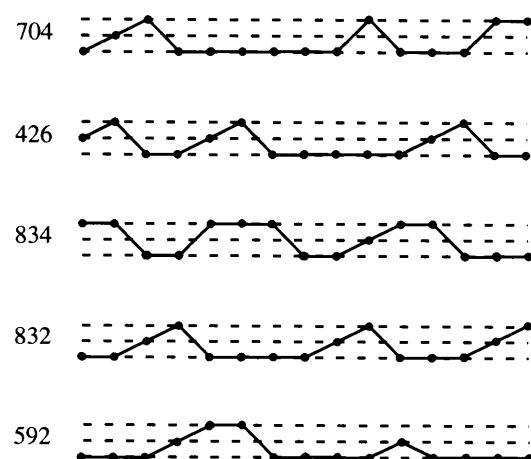


図3-7. WT, KOマウス性周期スメア像の変化.

6-8週齢のWT, KOマウス (各n=10) は雌のみの群飼, 10-26週齢のWT, KOマウス (各n=20) は10匹ずつの群飼に雄を同居させて14日間毎日膣スメア像を観察した. 6-8週齢においては発情休止期が延長している傾向が見られる. 数字はマウスの個体番号を示す.

E ; 発情期. P ; 発情前期. D ; 発情休止期. (右上に表示)

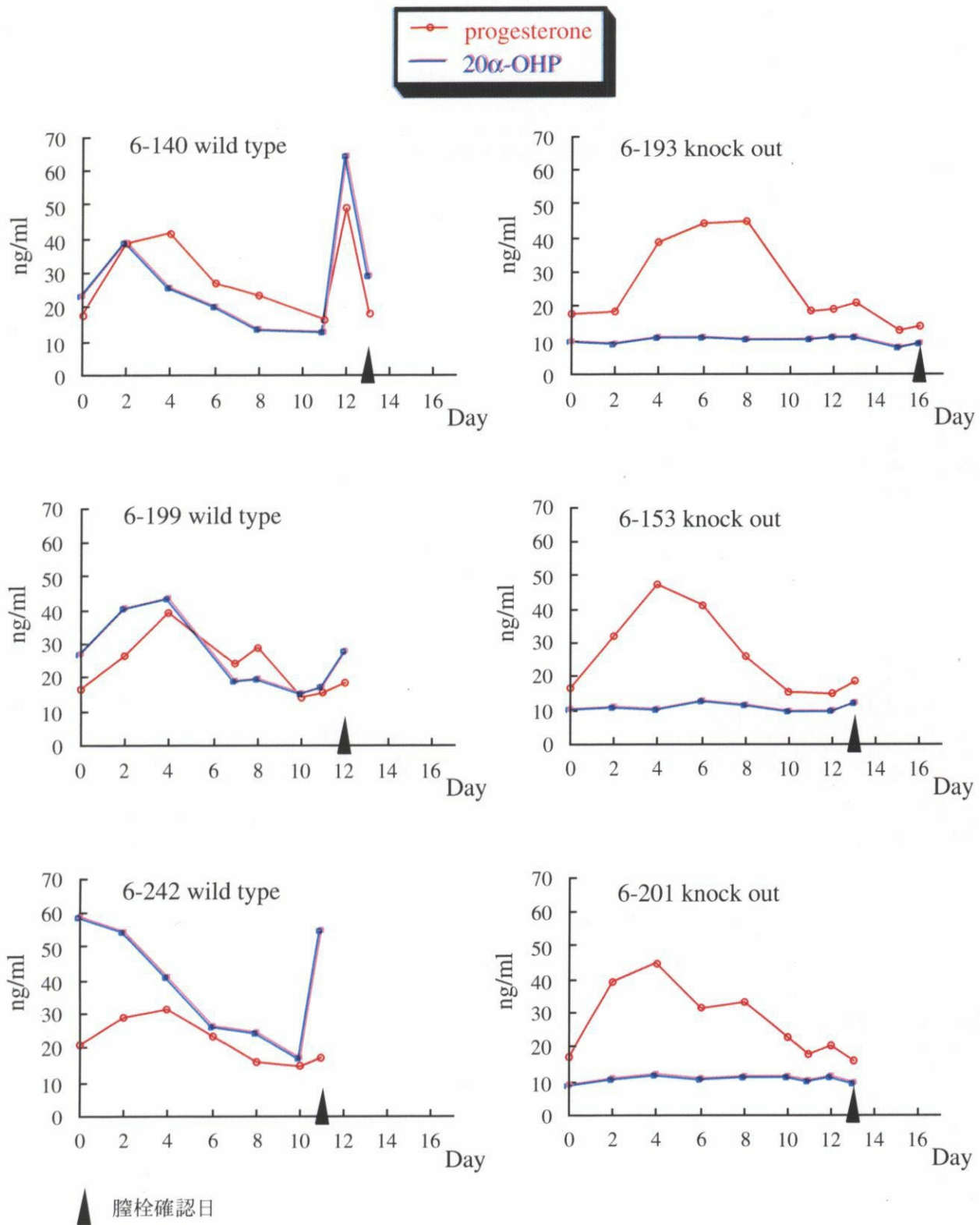


図3-9. 偽妊娠中血中progestin濃度の変化.

WT, KOマウス (各n=3)を精管結紮した雄と同居させ、膣栓を確認した日をDay 0として、次に膣栓を確認するまでの血中progestin濃度を測定した. KOでは、WTに比べて膣栓確認間隔は有意に延長したが、血中progesterone濃度は、WTもKOもほぼ同様の時期に低下した.

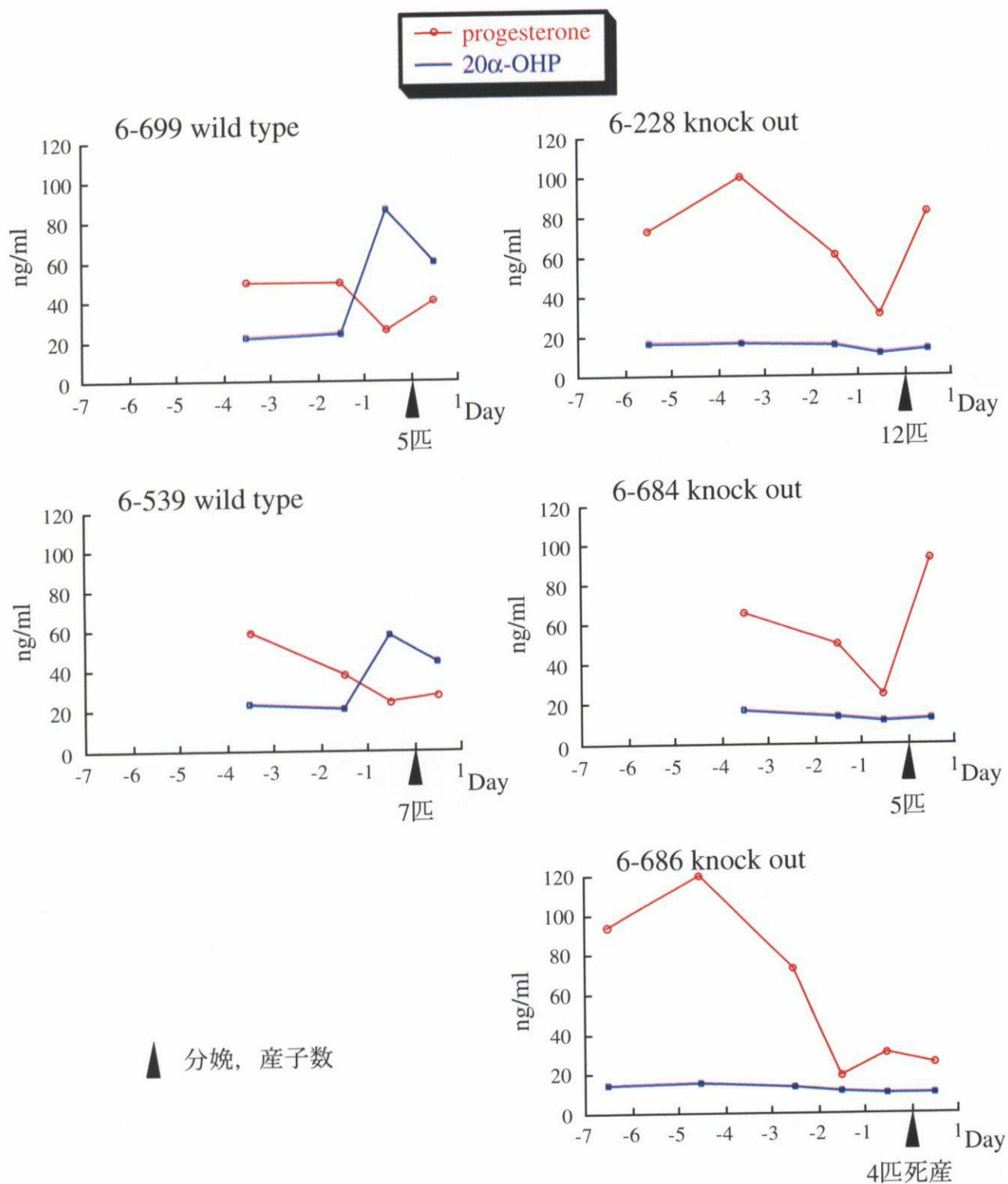


図3-10. 妊娠末期における血中progestin濃度の変化.

WT (n=2), KO (n=3) マウスにおいて, 出産を確認した日をDay 0.5として, 血中progestin濃度を測定した. KOマウスでは, 分娩時20α-OHP濃度の上昇は見られないが, 出産直前にはprogesterone濃度は著しく低下した.

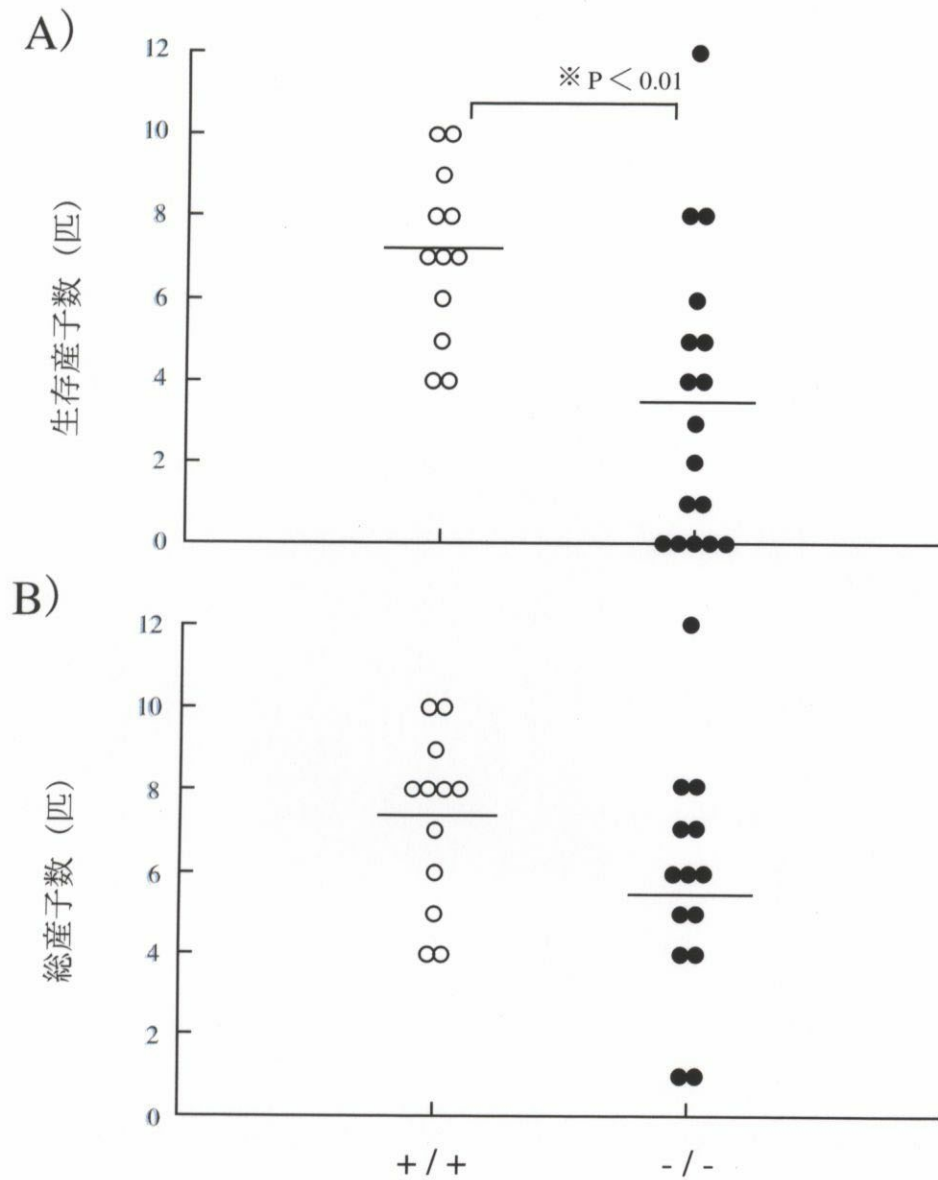


図3-11. WTとKOマウスにおいて，分娩後1日目に確認した産子数の比較.

A) 生存産子数. KO (n=17) においてWT (n=12) よりも有意に減少した.

B) 総産子数. KO (n=14) とWT (n=12) に有意な差は見られない.

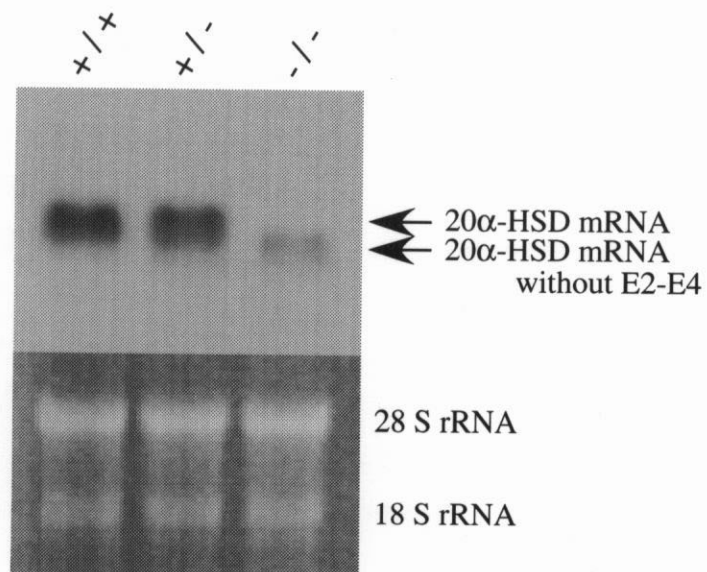


図3-12. F1マウス妊娠18日目の子宮における20 α -HSD 遺伝子転写産物の検出.

子宮から抽出したtotal RNA (10 μ g) から, マウス卵巣20 α -HSD cDNA 全長配列をprobeに用いてNorthern hybridizationを行った. 妊娠子宮においても, E2からE4を欠失した短い転写産物が検出されたことから, 20 α -HSDの機能が欠損していると考えられる.

総合考察

20 α -HSD は、NAD(P)(H)を補酵素とし、progesterone を生物学的に不活性な 20 α -OHP に代謝する酵素であるが、特に齧歯類卵巣において機能的黄体退行時に発現の高まる酵素として注目されている。これまで当研究室を含め、主にラットを用いて研究が進められ、その性周期中、偽妊娠中、妊娠中における動態 [Pupkin et al. 1966, Wiest et al. 1968, Hashimoto & Wiest 1969ab, Uchida et al. 1969, Wiest 1970, Bast & Melampy 1972, Lacy et al. 1976, Albarracin et al. 1994, Akinola et al. 1997]、発現蛋白の精製 [Noda et al. 1991]、2 種類のアイソザイム (20 α -HSD1 及び 20 α -HSD2) の同定 [Noda et al. 1992, Seong et al. 1992, Yoshida et al. 1992]、cDNA のクローニング [Miura et al. 1994]、インヒビターの合成 [Ricigliano & Penning 1986, Yoshida et al. 1997]、ゲノム DNA のクローニング [Zhong et al. 1998] と、詳細かつ丁寧に解析が進められ、知見が蓄積している。20 α -HSD は、ラットでは排卵後の黄体が progesterone を分泌し始める約 48 時間後に発現を開始し、progesterone 産生母地であり、その後も約 3 周期形態的に残存する黄体内において直接 progesterone を不活化する。従ってラットでは性周期中実質的に黄体相が欠失し、その不完全性周期の回帰に、大きく貢献することが本酵素の機能の大きな特質であると考えられる。一方黄体が機能化する必要がある場合、すなわち受精の可能性を有する交尾刺激を受けた場合には 20 α -HSD の発現は抑制される。この抑制は、神経内分泌反射的に下垂体から分泌される PRL サージによるが、交尾後妊娠に至らなかった場合には、機能化した黄体は完全性周期動物と同様約 14 日間の progesterone 分泌相を経過するため、その発現の有無が完全性周期と不完全性周期を区別する決定的因子であるという可能性がある。またラットの生殖機構においては、progesterone 濃度の低下時期に同期して、偽妊娠／妊娠末期に活性が高まるため、progesterone 作用の解除に有効に機能していると考えられる。一方黄体の機能制御には多くの因子が関与しており、一般に多くの動物で主要な黄体退行因子である PGF_{2 α} もラット黄体退行において機能的、形態的両方に作用を有すること、PGF_{2 α} のシグナルが 20 α -HSD 発現を促進すること [Stocco

et al. 2000] なども明らかになりつつある。さらに妊娠末期、 20α -HSD 発現の上昇に先行して progesterone 濃度の減少が見られることから、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 等 20α -HSD 以外の黄体退行因子の働きや、 3β -HSD 等 progesterone 合成系の抑制機構も関与していると考えられる。一方偽妊娠末期では、progesterin 量はほぼ一定に維持されているため [Saito et al. 1988, Matsuda et al. 1990]、progesterone 濃度低下には 20α -HSD による機能的退行が主に作用すると考えられる。また、偽妊娠末期 progesterone 値の低下に、 20α -HSD と共に、細胞内 cholesterol の量を負に調節する P450_{c26} が協調して働くことが示されており [Yoshida et al. 1999]、本酵素単独の作用が実際のところ齧歯類の黄体にどのように寄与しているのかに興味を持たれる。

ラットでは卵巣に止まらず胸腺 [Hirabayashi et al. 2001] や胎盤 [Shiota et al. 1993ab, 三浦ら, 1995]、微量ながら脳、肝臓、腎臓、子宮でも [三浦ら, 1995] 20α -HSD の発現が見られる。胸腺での発現は progesterone の免疫抑制作用に対する T 細胞側の制御因子としての働き [Weinstein 1977, 1981, Weinstein et al. 1977] が、胎盤では胎子・胎盤における高濃度 progesterone の緩和作用が [Shiota et al. 1993ab] 推定されており、いずれにおいても高濃度で作用する多彩な progesterone 作用の修飾因子としての側面が伺われている本酵素であるが、決定的な確証に欠けているのが現状である。

このような経緯を経て、 20α -HSD 発現の生理的意義をさらに明らかにするべく、 20α -HSD 遺伝子欠損動物の作製が視野に入れられるようになった。本研究は、 20α -HSD 遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を通して、改めて 20α -HSD 発現の意義を包括的に理解することを目的としている。

マウスはラットと同じく不完全性周期動物であり、その生殖機構もおおかたラットと同様であると考えられるが、マウスで 20α -HSD 遺伝子を欠損させる以上、マウスにおける 20α -HSD の発現動態を認識しておく必要がある。第一章では、まずマウス 20α -HSD cDNA のクローニングを行いその発現について解析した。ICR マウス卵巣の cDNA library からは、ラット卵巣の 20α -HSD と 93 %の高い相同性を有するマウス 20α -HSD cDNA が単離された。マウス卵巣 20α -HSD cDNA にコードされる 323 個のアミノ酸には、aldo-keto reductase (AKR) superfamily に属する酵素としてその活性発現に必須とされる 4 つのアミノ酸、Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117 が保存されていた。この cDNA を probe に用いた Northern hybridization, *in situ* hybridization の結果、progesterone の減少に 20α -OHP の上昇が伴う分娩前後の卵巣黄体でマウス 20α -HSD の発現は高まっていたことから、マウスでもラットと同様分娩時黄体の機能的退行に関わることが示された。さらに卵巣以外にも妊娠期特異的に 10 日目以降の子宮内膜上皮、10 日目頃の胎盤、15 日目の胎子表皮で発現が見られ、特に子宮内膜上皮での発現は 10 日目以降 16 日目にピークを迎え分娩日の 18 日目まで発現するという動態を示し、同じく妊娠 15 日目前後にピークを迎える血中 progesterone 濃度との関連が伺われた。一方胎子血中、胎水中の progesterone 濃度が、

それぞれ母体血中の 14 %以下, 25 %以下であったことから, 胎子発育環境では母体血中ほど高濃度の progesterone は存在していないと考えられ, この progesterone 値の低下に 20 α -HSD の発現に関わる可能性が示唆された。

第二章では, 20 α -HSD cDNA を元に 20 α -HSD ゲノム DNA をクローニングすると共に, ターゲティングベクターを作製してキメラマウスを誕生させた。ゲノム DNA のクローニングでは, 互いに高い相同性を有する superfamily の中から 20 α -HSD を単離することを考慮し, 20 α -HSD のイントロン配列も probe の配列に加えるという工夫を施し probe の特異性の向上を図った。単離された 5 つのゲノムクローンを統合したところ, 20 α -HSD 遺伝子はエクソン (E) 1 から E9 まで約 18 kb に渡ることが明らかになった。またエクソンの長さは全て, ラットとヒトの 20 α -HSD 遺伝子と一致しており, さらにゲノム DNA の構造もヒトの 20 α -HSD 遺伝子と類似していたことから, これらの遺伝子の種を越えた近縁性が感じられた。

20 α -HSD は 3 α -HSD, 17 β -HSD Type 5 と共に AKR superfamily に属する [Noda et al. 1993, Miura et al. 1994, Penning 1997]。AKR superfamily に属する酵素は広く哺乳類から, 両生類, 植物, 細菌においても存在し, その基質も脂肪族や芳香族アルデヒド, 単糖類, ステロイド, prostaglandin, 多環式芳香族炭化水素, イソフラボノイドなど幅広い [Jez et al. 1997]。しかしその多機能性とは対照的に, 各々の分子は約 320 アミノ酸から成り, 単量体で(α/β)₈ バレル, 2 つのヘリックス, 3 つのループを有するなど構造的に保存性が高く, アミノ酸組成の違いによりその多機能性を可能にしていると考えられる。さらにその補酵素 NAD(P)(H)結合部位は, AKR superfamily すべての分子において同一のアミノ酸 (Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117) で構成されており, 活性発現に必須である。マウス卵巢の 20 α -HSD においても, それら 4 アミノ酸は保存されており, ゲノムクローニングの結果, E2 から E4 に渡る約 2 kb という比較的短い領域にコードされていることが判明したため, ターゲティングベクターは, この領域を標的破壊部位として構築した。ターゲティングベクター上の置換領域として, ポジティブ選別用のネオマイシン耐性遺伝子 [Soriano et al. 1991] に加えて, ノックアウトマウスにおいて 20 α -HSD の遺伝子発現も検出できるよう, EGFP 遺伝子も E2 の途中から挿入した。またネガティブ選別用には, ジフテリアトキシン A 断片遺伝子 [Yagi et al. 1990] をベクターに連結した。ES 細胞 (E14.1, 129 系統) へのエレクトロポレーションの結果, 1050 個の ES クローンから, 相同組み換えの確認されたクローンを 4 個単離した。そのうち染色体数に異常の見られなかった 2 クローンから, キメラマウス 13 匹を得た。キメラマウスを C57BL/6J と交配させ, 9 匹のキメラマウスで ES 細胞の生殖系列細胞への分化が見られたため, そのうち産子全てが ES 細胞由来のゲノムを継承しており, かつ繁殖成績も良いキメラマウスを選んで, KO マウス産出用に用いた。

第三章では, キメラマウスと C57BL/6J を交配し, 得られた F1 ヘテロマウスを用いて, KO マウスを産出した。KO マウスが生まれる確率はメンデルの法則に従っていたため, ヘテロマ

ウス母体からは異常なく発生すると考えられた。KO マウスは外見上特に異常はなく、conventional な条件で飼育可能であった。以降 KO マウスの解析には、この C57BL/6J に 1 回戻し交配した 129/C57BL6J の F1 マウスを用いた。KO マウスで分娩後 1 日目の、mutant gene における遺伝子発現を調べたところ、置換挿入した EGFP はその遺伝子の発現や蛍光も認められたが、20 α -HSD 自身の配列についても、E1 の後に直接 E5 が連結した短い配列が転写されていた。その転写産物から予想される翻訳産物の分子量は 20 α -HSD の 37 kDa よりも小さい 23 kDa であったが、抗ラット 20 α -HSD 抗体を用いた Western blotting によって、KO マウスの卵巣に陽性反応は認められなかったため、翻訳産物は存在しないと考えられた。

膣スメア像観察により性周期回帰を検討した結果、KO マウスにおいても性周期は回帰したが、発情休止期の日数、発情休止期持続日数には有意な増加が認められ、黄体の退行が遅延していることが示唆された。しかしラット性周期中において高レベルに維持される 20 α -OHP 濃度から予想されるよりもその遅延の程度は小さく、マウスにおいてはラットよりも性周期回帰機構における 20 α -HSD 活性の作用の寄与の度合いが異なる可能性が考えられた。また性周期中無作為に選んだ KO マウス卵巣では 3 例中 1 例において 20 α -HSD 活性が検出されたことから、20 α -HSD 活性を有するアイソザイムが存在する可能性も浮上した。しかし、前世代の黄体が残存すると考えられる偽妊娠中や、新たな卵胞が発育すると思われる妊娠末期においても、KO マウスにおいて 20 α -OHP が常に低値に維持されることを考慮すると、アイソザイムの存在は、性周期中でもさらに時期特異的な発現を想定する必要があると思われる。また機能欠損しているはずの活性が検出されたことには、もう少し慎重な検討が望まれる。一方で、雄を同居させることでこの発情休止期の延長が認められなくなったことに、フェロモンの影響が関与する可能性が考えられた。

精管結紮雄と同居させ交配し、偽妊娠を誘起した場合、KO マウスにおいては、次の膣栓形成までの日数が平均 14.1 日であり、WT マウスの 11.6 日に比べて有意に延長した。偽妊娠中の末梢血中 progesterone と 20 α -OHP 濃度を測定したところ、KO マウスでは常に 20 α -OHP 濃度は 10 ng/ml 前後に低く維持されていたにも関わらず、偽妊娠 10 日目頃までには WT マウスと同レベルまで progesterone 濃度は低下した。KO マウスで見られる progesterone 値の低下は、黄体におけるステロイド合成の低下を反映すると考えられるため、偽妊娠末期にマウス黄体にアポトーシスを誘導するとされる PGF_{2 α} の関与が予想された。興味深いことに、ラット偽妊娠黄体は、機能的退行を完了しているにも関わらず、その形態は偽妊娠 19 日を過ぎても殆ど退行が見られない [Olofsson et al. 1990]。Yoshida ら [1999] が偽妊娠末期に 20 α -HSD 活性の阻害剤投与により、20 日目までは偽妊娠の延長を観察していることから、ラットでは偽妊娠黄体の形態的退行がかなり遅れる機構を有すると考えられ、ラットとマウスの偽妊娠終了には異なる制御機構の存在する可能性も考えられた。一方、低下前の progesterone のレベルは、WT よりも KO

マウスの方で高く維持される時期が延長している傾向があるため、おそらく KO マウスにおける膣栓形成の遅れは、卵巣内卵胞発育・排卵の遅延による交尾許容時期の遅れに起因すると考えられ、マウス偽妊娠回帰において 20 α -HSD は偽妊娠の終了に続く卵胞の発育・排卵に重要な作用をもつと考えられた。

KO マウスは分娩可能であり、その妊娠期間、分娩間隔は WT マウスと有意な差は認められなかった。周産期における 20 α -OHP 濃度は、WT マウスで分娩前後に著しく増加したのに対し、KO マウスでは 10 ng/ml 前後の低い値が維持された。分娩直前の progesterone 濃度は、やはり KO でも WT マウスと同レベルにまで低下したが、分娩直後には妊娠期と同レベルに再上昇した。この結果より、分娩時期特異的に強力なステロイド合成の抑制機構の存在が示唆されたが、妊娠末期における着実な progesterone 濃度の低下はその時期 WT マウスでの 20 α -HSD 発現、ラットでの知見を考えると以外な結果であった。ラットでは妊娠末期、LH 作用による、progesterone 合成酵素 3 β -HSD 活性の低下により黄体内 progesterone レベルが低下し、PGF_{2 α} の増加と、20 α -HSD 活性の上昇をもたらすと考えられている [Stocco & Deis 1998]。従って 3 β -HSD 活性の低下による progesterone 合成系の抑制が 20 α -HSD KO マウスで亢進している可能性が考えられる。PGF_{2 α} は、多くの動物種において主要な黄体退行因子であり、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、霊長類の黄体において産生され、またそのレセプターも、モルモット、ヒツジ、ヒト、ブタにおいて発現している [Olofsson & Leung 1994]。ラットやマウスにおいても 20 α -HSD と並んで主要な黄体退行因子であり、黄体において産生され、そのレセプターも黄体細胞膜に発現している [Olofsson et al. 1990]。PGF_{2 α} レセプター KO マウスでは、分娩時 progesterone 濃度が低下せず、分娩が起こらない。またこのマウスでは、分娩時 20 α -HSD は発現しない [Stocco et al. 2000]。従って 20 α -HSD KO マウスにおいて分娩時 progesterone 濃度の低下をもたらしたのは PGF_{2 α} シグナルである可能性もある。一方、KO マウスにおいて分娩時著しく低下した progesterone は、分娩後に急激に再上昇したため、分娩時の PGF_{2 α} の作用は一過的である可能性がある。Sprague-Dawley ラットにおいて、Wiest ら [1968] は分娩前 20 α -HSD 活性上昇前の総 progestin 量低下を観察しており、また Lacy ら [1976] も同様の結果から、ラット黄体の退行が、20 α -HSD 活性という単一の因子のみでは説明できないと示唆している。Bussmann [1989] は、分娩前の progesterone 値低下について、20 α -HSD 活性上昇前に、黄体において発現の高まった PGF_{2 α} レセプターに PGF_{2 α} が飽和することで progesterone 合成が低下することを示し、またこの合成抑制が一過的であることを、その後の PGF_{2 α} レセプターの下方向制御による PGF_{2 α} 作用の低下という形で推察している。従って KO マウスに見られた分娩時一過的な progesterone 濃度の低下は、PGF_{2 α} の作用による可能性も考えられる。このように考えると、妊娠末期における progesterone 分泌を低下させる機構は、偽妊娠末期とは異なり、ラットとマウスで共通したものである可能性がある。

KO マウスにおいて生存産子数が有意に減少していたことは興味を引いた。しかも確認できる限り総産子数自体は WT と KO マウスで有意な差が無いことから、物理的に分娩は可能でも、妊娠中何らかの影響により胎子に異常が起きている可能性がある。KO マウス 1 例において分娩直前の 18 日目に解剖したところ、左右の子宮にはそれぞれ 3 匹と 4 匹の胎子が入っていたが、4 匹入っている方の子宮において、1 匹はかなり胎子の形態が完成した状態で既に死亡し濃く茶変しており、他の胎子は生存していたが、その子宮自体がもう片方に比べ茶色く黒ずんだ色を呈していた。第一章の結果より、マウスでは、妊娠期特異的に、子宮、胎盤、胎子において 20α -HSD の発現が認められる。この生存産子数減少に、これら卵巣以外での 20α -HSD 機能欠失の効果が影響している可能性は高い。特に子宮においては KO マウスでも WT マウスよりも短い転写産物が検出されたことから、卵巣と同じ遺伝子の発現であることが確認されたため、子宮においてもその機能の欠失が考えられ、KO マウスを用いた本研究により、 20α -HSD が妊娠維持に必要な高 progesterone 環境下において、胎子の正常な発育や生存に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、Northern hybridization による KO マウス子宮におけるシグナルは、WT、ヘテロマウスのシグナルよりも著しく弱いものであった。従って、子宮内膜上皮における発現には、胎子発育環境における高 progesterone 濃度の緩和という合目的的機能に加えて、子宮内膜上皮細胞自体が 20α -HSD 機能欠失の影響を受けている可能性も考えられる。Progesterone は子宮内膜上皮細胞において、estrogen 誘導性の増殖を抑制することが知られている [Yamanouchi et al. 2000]。従ってもし KO マウスにおいて胎子発育に子宮内膜上皮細胞の増殖が伴わないことにより子宮が損傷するような現象が起こっていれば、それが生存産子数減少に関わるという可能性も考えられた。加えて、ヘテロマウス母体からの KO マウス産出率はメンデルの法則に従っていたが、生存産子数減少は KO マウス母体が子宮内に KO 遺伝子型の胎子を宿している場合に観察されたため、生存産子数減少が母体側の要因のみによるのか胎子側の要因との兼ね合いによるのかを確かめる必要があり、KO マウス子宮内でヘテロマウス胎子が発育するような条件も設定し、さらに検討を進めたい。

卵巣と子宮で発現する 20α -HSD が、同一の遺伝子に由来することが示された。しかし子宮で 20α -HSD が発現してくる妊娠後半期では、卵巣での 20α -HSD 発現は抑制されているはずであり、発現部位は異なるものの、同時期に異なる発現調節を受けている可能性が考えられ、その発現調節機構に興味を持たれる。子宮内膜上皮での発現が妊娠期特異的であることから、その発現には胎子あるいは胎盤由来の因子の関与が考えられる。ラットでは、妊娠後半は、胎盤からの胎盤性ラクトジェン (PL) により前半に引き続き 20α -HSD の発現が抑制される [Soares et al. 1991, Zhong et al. 1997]。マウスにおいても数種類の PL や PRL レセプターが存在するため、子宮内膜上皮での 20α -HSD の発現にこれら PL が関わっている可能性も考えられた。

以上本研究により、 20α -HSD の機能を欠失したマウスでも黄体の退行は起こり、生殖周期全

体としては回帰可能であることが示されたが、マウス黄体の退行には、 20α -HSD による progesterone の異化と、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ などによる progesterone 合成系の抑制の協調作用が重要であると考えられた。さらに、妊娠子宮内における progesterone の異化が阻害されると、生存産子数が減少したことから、哺乳類共通の妊娠機構において、その維持に必須である progesterone の代謝酵素として、 20α -HSD が胎子発生過程にも関与しているという重要な機能を明らかにすることができた。これらの知見は、哺乳類の性周期回帰機構や妊娠維持機構、分娩初来機構の比較生物学的理解を深めることに貢献するものと考えられる。

References

- Akinola LA, Poutanen M, Vihko R, Vihko P.** Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2, P450 aromatase, and 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in immature, mature, and pregnant rats. *Endocrinology*. 138, 2886-2892, 1997
- Albarracin CT and Gibori G.** Prolactin action on luteal protein expression in the corpus luteum. *Endocrinology*. 129, 1821-1830, 1991
- Albarracin CT, Parmer TG, Duan WR, Nelson SE, Gibori G.** Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase : coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*. 134, 2453-2460, 1994
- Baker ME.** Hydroxysteroid dehydrogenases: ancient and modern regulators of adrenal and sex steroid action. *Mol Cell Endocrinol*. 175, 1-4, 2001
- Balogh K.** A histochemical method for the demonstration of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat ovaries. *J Histochem Cytochem*. 12, 670-673, 1964
- Bast JD and Melampy RM.** Luteinizing hormone, prolactin and ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase levels during pregnancy and pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology*. 91, 1499-1505, 1972
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E.** Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*. 309, 255-256, 1984
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Seneor AW, Warren R, Palmiter RD.** Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 27, 223-231, 1981
- Bussmann LE and Deis RP.** Studies concerning the hormonal induction of lactogenesis by prostaglandin F_{2 α} in the pregnant rats. *J Steroid Biochem*. 11, 1485-1489, 1979
- Bussmann LE.** Prostaglandin F-2 α receptors in corpora lutea of pregnant rats and relationship with induction of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Reprod Fertil*. 85, 331-341, 1989
- Chambers SP and Clarke AG.** Measurement of thymus weight, lumbar node weight and progesterone levels in syngeneically pregnant, allogeneically pregnant, and pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil*. 55, 309-315, 1979
- Chen QX, Rosik LO, Nancarrow CD, Sweet F.** Fetal lamb 3 β , 20 α -hydroxysteroid oxidoreductase: dual activity at the same active site examined by affinity labeling with 16 α -(bromo [2'-14C]acetoxy) progesterone. *Biochemistry*. 28, 8856-8863, 1989
- Clarke DL and Linzer DI** Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology*. 133, 224-232, 1993
- Colosi P, Marr G, Lopez J, Haro L, Ogren L, Talamantes F.** Isolation, purification, and characterization of mouse placental lactogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79, 771-775, 1982
- Colosi P, Ogren L, Thordarson G, Talamantes F.** Purification and partial characterization of two prolactin-like glycoprotein hormone complexes from the midpregnant mouse conceptus. *Endocrinology*. 120, 2500-2511, 1987
- Duan WR, Linzer DI, Gibori G.** Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor. *J Biol Chem*. 28, 15602-15607, 1996
- Ertel RJ and Ungar F.** 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase and reductive pathways in mouse adrenal

- glands in vitro. *Endocrinology*. 82, 527-34, 1968
- Evans MJ and Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 154-156, 1981
- Fan DF, Oshima H, Troen BR, Troen P.** Studies of the human testis IV. Testicular 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase and steroid 17 α -hydroxylase. *Biochim Biophys Acta*. 360, 88-99, 1974
- Fiedler EP, Plouffe L Jr, Hales DB, Hales KH, Khan I.** Prostaglandin F_{2 α} induces a rapid decline in progesterone production and steroidogenic acute regulatory protein expression in isolated rat corpus luteum without altering messenger ribonucleic acid expression. *Biol Reprod*. 61, 643-650, 1999
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G.** Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 80, 1523-1631, 2000
- Fuchs AR, Smitasiri Y, Chantharaksri U** The effect of indomethacin on uterine contractility and luteal regression in pregnant rats at term. *J Reprod Fertil*. 48, 331-340, 1976
- Gallo RV, Devorshak-Harvey E, Bona-Gallo A.** Pulsatile luteinizing hormone release during pregnancy in the rat. *Endocrinology*. 116, 2637-2642, 1985
- Graham JD and Clarke CL.** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev*. 18, 502-519, 1997
- Greenwald GS.** Failure of hypophysectomy to affect regression of cyclic hamster corpus luteum. *J Reprod Fertil*. 16, 495-497, 1968
- Hapel AJ, Osborne JM, Fung MC, Young IG, Allan W, Hume DA.** Expression of 20- α -hydroxysteroid dehydrogenase in mouse macrophages, hemopoietic cells, and cell lines and its induction by colony-stimulating factors. *J Immunol*. 134, 2492-2497, 1985
- Hara A, Nakagawa M, Taniguchi H, Sawada H.** 3(20) α -hydroxysteroid dehydrogenase activity of monkey liver indanol dehydrogenase. *J Biochem*. 106, 900-903, 1989
- Hashimoto I and Wiest WG.** Correlation of the secretion of ovarian steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat. *Endocrinology*. 84, 873-885, 1969a
- Hashimoto I and Wiest WG.** Luteotrophic and luteolytic mechanisms in rat corpora lutea. *Endocrinology*. 84, 886-892, 1969b
- Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A.** Association of expression of mRNA encoding the PGF_{2 α} receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil*. 109, 45-51, 1997
- Hirabayashi K, Suzuki M, Takahashi M, Nishihara M.** Expression of ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in rat thymus. *Endocr J*. 48, 557-563, 2001
- Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K.** Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J*. 16, 6926-6935, 1997
- Inazu A, Sato K, Nakayama T, Deyashiki Y, Hara A, Nozawa Y.** Purification and characterization of a novel dimeric 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase from *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem J*. 297, 195-200, 1994
- Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM.** Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J*. 326, 625-636, 1997
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M.** The prolactin/growth hormone receptor family.

Endocr Rev. 12, 235-251, 1991

Khanna M, Qin KN, Wang RW and Cheng KC. Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases. *J Biol Chem.* 270, 20162-20168, 1995

Kosaka T, Saito TR, Takahashi KW. Changes in plasma progesterone levels during the estrous cycle and pregnancy in 4-day cyclic mice. *Jikken Dobutsu.* 37, 351-353, 1988

Krafft AE, Winter J, Bokkenheuser VD, Hylemon PB. Cofactor requirements of steroid-17-20-desmolase and 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activities in cell extracts of *Clostridium scindens*. *J Steroid Biochem.* 28, 49-54, 1987

倉永英里奈 ラット黄体退行過程に於けるアポトーシスの制御：Fas/Fas リガンド系の関与. 東京大学修士論文, 2000

Lacy LR, Knudson MM, Williams JJ, Richards JS, Midgley AR Jr. Progesterone metabolism by the ovary of the pregnant rat: discrepancies in the catabolic regulation model. *Endocrinology.* 99, 929-934, 1976

Lacy WR, Washenick KJ, Cook RG, Dunbar BS. Molecular cloning and expression of an abundant rabbit ovarian protein with 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Mol Endocrinol.* 7, 58-66, 1993

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685, 1970

Lahav M, Freud A, Lindner HR. Abrogation by prostaglandin F_{2 α} of LH-stimulated cyclic AMP accumulation in isolated rat corpora lutea of pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun.* 68, 1294-1300, 1976

Lamprecht SA, Lindner HR, Strauss IF 3rd Induction of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in rat corpora lutea by pharmacological blockade of pituitary prolactin secretion. *Biochim Biophys Acta.* 29, 133-143, 1969

Leung PC and Steele GL Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev.* 13, 476-498, 1992

Lin HK, Hung CF, Moore M, Penning TM. Genomic structure of rat 3 α -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase (3 α -HSD/DD, AKR1C9). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 71, 29-39, 1999

Linzer DI, Lee SJ, Ogren L, Talamantes F, Nathans D. Identification of proliferin mRNA and protein in mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 4356-4359, 1985

Mao J, Duan WR, Albarracin CT, Parmer TG, Gibori G. Isolation and characterization of a rat luteal cDNA encoding 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 30, 1289-95, 1994

Matsuda J, Noda K, Shiota K, Takahashi M. Participation of ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in luteotrophic and luteolytic process during rat pseudopregnancy. *J Reprod Fertil.* 88, 467-474, 1990

Matsuyama S, Ohta M, Takahashi M. The critical period in which splenectomy causes functional disorder of the ovary in adult rats. *Endocrinol Jpn.* 34, 849-855, 1987

Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohnishi M, Ikeda A, Nishihara M, Takahashi M. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol Reprod.* 54, 1245-1251, 1996

McCormack JT and Greenwald GS. Progesterone and oestradiol-17 β concentrations in the peripheral

- plasma during pregnancy in the mouse. *J Endocrinol.* 62, 101-107, 1974
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC.** Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev.* 79, 263-323, 1999
- Miura R, Shiota K, Noda K, Yagi S, Ogawa T, Takahashi M.** Molecular cloning of cDNA for rat ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD1). *Biochem J.* 299, 561-567, 1994
- 三浦竜一 卵巣 20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素の活性調節機構についての研究. 東京大学博士論文 1995
- Morishige WK and Rothchild I.** Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology.* 95, 260-274, 1974
- Murr SM, Stabenfeldt GH, Bradford GE, Geschwind II.** Plasma progesterone during pregnancy in the mouse. *Endocrinology.* 94, 1209-1211, 1974
- Nakajin S, Kawai Y, Ohno S, Shinoda M.** Purification and characterization of pig adrenal 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem.* 33, 1181-1189, 1989
- Nancarrow CD, Sharaf MA, Sweet F.** Purification of 20 α -hydroxysteroid oxidoreductase from bovine fetal erythrocytes. *Steroids.* 37, 539-553, 1981
- Nelson JF, Karelus K, Felicio LS, Johnson TE.** Genetic influences on oestrous cyclicity in mice: evidence that cycle length and frequency are differentially regulated. *J Reprod Fertil.* 94, 261-268, 1992
- Nishimori K, Young LJ, Guo Q, Wang Z, Insel TR, Matzuk MM.** Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93, 11699-11704, 1996
- Nishizawa M, Nakajima T, Yasuda K, Kanzaki H, Sasaguri Y, Watanabe K, Ito S.** Close kinship of human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene with three aldo-keto reductase genes. *Genes Cells.* 5, 111-125, 2000
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW.** Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 80, 1-29, 2000
- Noda K, Shiota K, Takahashi M.** Purification and characterization of rat ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 9, 112-8, 1991
- Noda K, Shiota K, Seong HH, Takahashi M.** Changes in two kinds of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase during the luteal phase in the rat. *J Reprod Dev.* 38, 49-53, 1992
- Noda K, Yagi S, Shiota K, Ogawa T, Takahashi M.** Rat ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase-1 may belong to aldo-keto reductase superfamily. *J Reprod Dev.* 39, 169-173, 1993
- Olofsson J, Norjavaara E, Selstam G.** In vivo levels of prostaglandin F_{2 α} , E₂ and prostacyclin in the corpus luteum of pregnant and pseudopregnant rats. *Biol Reprod.* 42, 792-800, 1990
- Olofsson J and Leung PC.** Auto/paracrine role of prostaglandins in corpus luteum function. *Mol Cell Endocrinol.* 100, 87-91, 1994
- Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte D, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA.** Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev.* 11, 167-178, 1997
- Palmer S and Burgoyne PS.** In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development.* 112, 265-268, 1991

- Penning TM.** Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogeases. *Endocr Rev.* 18, 281-305, 1997
- Pineda JA, Salinas ME, Warren JC.** Purification and characterization of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase from bull testis. *J Steroid Biochem.* 23, 1001-1006, 1985
- Pudy RH, Hara M, Little B.** 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity a function of human placental 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 89, 557-560, 1964
- Pupkin M, Bratt H, Weisz J, Lloyd CW, Balogh K Jr.** Dehydrogenases in the rat ovary. I. A histochemical study of Δ^5 -3 β - and 20 α -hydroxysteroid dehydrogenases and enzymes of carbohydrate oxidation during the estrous cycle. *Endocrinology.* 79, 316-327, 1966
- Rheault P, Charbonneau A, Luu-The V.** Structure and activity of the murine type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta.* 1447, 17-24, 1999
- Richter TA, Robinson JE, Evans NP.** Progesterone treatment that either blocks or augments the estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surge is associated with different patterns of hypothalamic neural activation. *Neuroendocrinology.* 73, 378-386, 2001
- Ricigliano JW and Penning TM.** Active-site directed inactivation of rat ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem J.* 240, 717-723, 1986
- Rimsay RL, Murphy GW, Martin CJ, Orr JC.** The 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase of *Streptomyces hydrogenans*. *Eur J Biochem.* 174, 437-442, 1988
- Saito S, Matsuyama S, Shiota K, Takahashi M.** Involvement of splenocytes in the control of corpus luteum function in the rat. *Endocrinol Jpn.* 35, 891-898, 1988
- Sano Y, Okinaga S, Arai K.** Metabolism of [14 C]-C₂₁ steroids in the human fetal ovaries. *J Steroid Biochem.* 16, 721-724, 1982
- Sato F, Takagi Y, Shikita M.** 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase of porcine testes. *J Biol Chem.* 247, 815-823, 1972
- Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E.** Molecular action of progesterone. *Int J Biochem.* 22, 579-594, 1990
- Seong HH, Shiota K, Noda K, Ogura A, Asano T, Takahashi M.** Expression of activities of two 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in rat corpora lutea. *J Reprod Fertil.* 96, 573-580, 1992
- Shikita M, Inano H, Tamaoki B.** Further studies on 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase of rat testes. *Biochemistry.* 6, 1760-1764, 1967
- Shiota K, Sasaki N, Hattori N, Miura R, Hasegawa T, Guang JX, Noda K, Takahashi M.** Cytosolic 20 α -hydroxysteroid dehydrogeanse activity in spontaneous neoplasms in the dog and cat. *J Vet Med Sci.* 53, 549-552, 1991
- Shiota K, Noda K, Takahashi M, Sasaki N, Ogawa T.** Expression of placental lactogen(s) and 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the rat placenta. *Proc Jpn Soc Anim Biochem.* No. 30, 1-6, 1993a
- Shiota K, Seong HH, Noda K, Hattori N, Ikeda A, Ogura A, Itagaki S, Takahashi M, Ogawa T.** 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat placenta. *Endocr J.* 40, 673-681, 1993b
- Smirnov AN.** Estrophilic 3 α , 3 β , 17 β , 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase from rabbit liver-I. Isolation and purification. *J Steroid Biochem.* 36, 609-616, 1990
- Smith CJ and Sridaran R.** Time-dependent biphasic effect of cytochalasin D on luteal progesterone release in the pregnant rat. *Life Sci.* 48, 1217-1225, 1991

- Soares MJ, Faria TN, Roby KF, Deb S.** Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary, uterine, and placental expression. *Endocr Rev.* 12, 402-423, 1991
- Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A.** Targeted disruption of the *c-src* proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell.* 64, 693-702, 1991
- Stocco CO and Deis RP.** Luteolytic effect of LH: inhibition of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and stimulation of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase luteal activities in late pregnant rats. *J Endocrinol.* 150, 423-429, 1996
- Stocco CO and Deis RP.** Participation of intraluteal progesterone and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in LH-induced luteolysis in pregnant rat. *J Endocrinol.* 156, 253-259, 1998
- Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF, Giboti G.** Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced Expression of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem.* 275, 37202-37211, 2000
- Stocco DM and Clark B.** Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroid genesis. *Biochem Pharmacol.* 51, 197-205, 1996
- Stolz A, Rahimi-Kiani M, Ameis D, Chan E, Ronk M, Shively JE.** Molecular structure of rat hepatic 3α -hydroxysteroid dehydrogenase. A member of the oxidoreductase gene family. *J Biol Chem.* 15, 15253-15257, 1991
- Strickler RC, Tobias B, Covey DF.** Human placental 17β -estradiol dehydrogenase and 20α -hydroxysteroid dehydrogenase. Two activities at a single enzyme active site. *J Biol Chem.* 256, 316-321, 1981
- Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S.** Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science.* 277, 681-683, 1997
- Sugimoto Y, Segi E, Tsuboi K, Ichikawa A, Narumiya S.** Female reproduction in mice lacking the prostaglandin F receptor. Roles of prostaglandin and oxytocin receptors in parturition. *Adv Exp Med Biol.* 449, 317-321, 1998
- Sugino N, Telleria CM, Gibori G.** Progesterone inhibits 20α -hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor. *Endocrinology.* 138, 4497-4500, 1997
- Takahashi M, Murakami N, Naito H, Suzuki Y.** Blockade of pseudopregnancy in the rat by treatment with antiprogesterone serum. *Biol Reprod.* 22, 423-429, 1980
- Tong W and Pollard JW.** Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E- and cyclin A-cdk2 kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Mol Cell Biol.* 19, 2251-2264, 1999
- Tseng L and Gurpide E.** Stimulation of various 17β - and 20α -hydroxysteroid dehydrogenase activities by progestins in human endometrium. *Endocrinology.* 104, 1745-1748, 1979
- Uchida K, Kadowaki M, Miyake T.** Ovarian secretion of progesterone and 20α -hydroxypregn-4-en-3-one during rat estrous cycle in chronological relation to pituitary release of luteinizing hormone. *Endocrinol Jpn.* 16, 227-237, 1969
- Unezaki S, Sugatani J, Masu Y, Watanabe K, Ito S.** Characterization of prostaglandin $F_{2\alpha}$ production in pregnant and cycling mice. *Biol Reprod.* 55, 889-894, 1996

- Weinstein Y.** 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase: a T lymphocyte-associated enzyme. *J Immunol.* 119, 1223-1229, 1977
- Weinstein Y, Lindner HR, Eckstein B.** Thymus metabolises progesterone-possible enzymatic marker for T lymphocytes. *Nature.* 266, 632-633, 1977
- Weinstein Y.** Expression of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse marrow cells: strain differences, thymic effect on enzymatic activity, and possible localization in pre T lymphocytes. *Thymus.* 2, 305-320, 1981
- Wiest WG.** Conversion of progesterone to 4-pregnen-20 α -ol-3-one by rat ovarian tissue in vitro. *J Biol Chem.* 234, 3115-3121, 1959
- Wiest WG.** Progesterone and 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one in plasma, ovaries and uteri during pregnancy in the rat. *Endocrinology.* 87, 43-48, 1970
- Wiest WG and Forbes TR.** Failure of 20 α -hydroxy- Δ^4 -pregnen-3-one and 20 β -hydroxy- Δ^4 -pregnen-3-one to maintain pregnancy in ovariectomized mice. *Endocrinology.* 74, 149-152, 1964
- Wiest WG, Kidwell WR, Balogh K Jr.** Progesterone catabolism in the rat ovary: a regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy. *Endocrinology.* 82, 844-859, 1968
- Wintergalen N, Thole HH, Galla HJ, Schlegel W.** Prostaglandin-E₂ 9-reductase from corpus luteum of pseudopregnant rabbit is a member of the aldo-keto reductase superfamily featuring 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Eur J Biochem.* 234, 264-270, 1995
- Yagi T, Ikawa Y, Yoshida K, Shigetani K, Takeda N, Mabuchi I, Yamamoto T, Aizawa S.** Homologous recombination at *c-fyn* locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87, 9918-9922, 1990
- Yamanouchi K, Soeta C, Naito K, Tojo H.** Progesterone pretreatment inhibits the expression of c-ski mRNA and epithelial cell proliferation induced by estrogen in the rat uterus. *J Reprod Dev.* 46, 257-263, 2000
- Yoshida S, Miura R, Noda K, Shiota K, Takahashi M.** Translation of rat ovarian mRNA to two 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in xenopus oocytes. *Endocrinol Jpn* 39, 365-369, 1992
- Yoshida S, Shiota K, Nishihara M, Takahashi M.** A novel steroid inhibitor for a rat 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase isozyme. *Biol Reprod.* 57, 1433-1437, 1997
- Yoshida S, Kubota K, Sasaki H, Hasagawa T, Nishihara M, Terada M, Takahashi M.** 26-Cholesterol hydroxylase in rat corpora lutea: a negative regulator of progesterone secretion. *Biol Reprod.* 61, 557-562, 1999
- Zhong L, Parmer TG, Robertson MC, Gibori G.** Prolactin-mediated inhibition of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosin kinase system. *Biochem. Biophys Res Commun.* 235, 587-592, 1997
- Zhong L, Ou J, Barakai U, Mao JF, Fraser J, Gibori G.** Molecular cloning and characterization of the rat ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 249, 797-803, 1998

参考図書

遺伝子ターゲティングの基礎と応用

緒方靖哉 村上浩紀 編著

コロナ社

新家畜繁殖学

鈴木義祐 高橋迪雄 堤義雄 豊田裕 入谷明 正木淳二 横山昭 森純一 古賀脩 共著

朝倉書店

新版 家畜発生学

江口保暢 著

文永堂出版

ジーンターゲティング ES細胞を用いた変異マウスの作製 バイオマニュアルシリーズ

相沢慎一 著

羊土社

哺乳類の生殖生物学

監修 高橋 迪雄

学窓社

The Mouse Its Reproduction and Development

Roberts Rugh

Walton Street, Oxford, Great Britain, Oxford University Press

謝辞

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室 西原真杉教授には、本研究の遂行にあたり素晴らしい環境を提供して頂くと共に、的確なご指導、ご鞭撻を賜り、有意義な大学院生活を送らせていただきました。ここに深い尊敬と感謝の意を表します。

魅力ある研究に触れる機会を頂き、終始親身な励まし、有意義なご指導ご鞭撻を賜りました高橋迪雄元獣医生理学研究室教授（現在味の素株式会社）に深い尊敬と感謝の意を表します。

ノックアウトマウスの作製において、genomic library, pPGK-NeobpA, pMC1DTpA, IRES 遺伝子を分与して頂き、また研究室への出向をあたたかく受け入れて頂くと共に、本研究の完成まで惜しめないご指導と励ましを賜りました東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター細胞機能研究分野 岩倉洋一郎教授に深く感謝致します。

獣医生理学教室 山内啓太郎助教授には、ノックアウトマウス解析にあたり具体的な御指導、あたたかい励ましを頂き、力強い支えとなって頂きました。深い尊敬と感謝の意を表します。

ラット 20 α -HSD ゲノム情報、抗ラット 20 α -HSD 抗体を快く分与して頂きましたイリノイ大学教授 Dr. Geula Gibori に深く感謝いたします。

細胞機能研究分野 須藤カツ子博士には、研究の経過に理解を頂き、キメラマウスを早急かつ確実に作出して頂きました。ここに深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり終始あたたかいご指導と励ましを頂きました獣医生理学教室助手 鈴木正寿博士に感謝致します。

ターゲティングベクター作製、ES 細胞の培養からノックアウトマウスの扱いに至るまで細やかかつ的確な御指導を頂き、あたたかい励ましを頂きました細胞機能研究分野助手 宝来玲子博士に感謝致します。

本研究の開始に際して多大なご指導を頂き、研究に対する真摯な姿勢を教えてくださいました張奎泰博士（現在 韓国生命工学研究院 遺伝資源センター）に感謝致します。

ゲノムの塩基配列決定において御協力を頂きました味の素（株）前川誉実博士に心より感謝いたします。

三次元構造のモデル化に快く御協力を頂きました獣医生化学研究室 服部中博士に感謝致します。

実験結果のディスカッションや、具体的な実験において惜しめない協力をいただきました当教室大学院生の平林啓司君に感謝致します。

終始有益な助言や励まし、特にターゲティングベクターの作製において大変御世話になりました細胞機能研究分野同期生の角田茂君に感謝致します。

ウエスタンプロティングの指導を始めあたたかい励ましと御協力をいただきました当教室研究員の有賀美也子博士に感謝致します。

医科学研究所中は快く実験の相談に応じて頂き、またあたたかく迎え入れてくださいました柴田進和博士，西条忍博士，崔秉日博士，中江進氏，松木大造氏，小滝逸人氏をはじめ細胞機能研究分野のみなさまに感謝致します。

当研究室において、あたたかい励ましと御協力をいただきました窪田邦宏氏，茂木一孝君，松室三重さん，Walimuni Samantha Nilanthi Jayasekara さん，池邑良太君，藤岡仁美さん，米沢智洋君をはじめとする獣医生理学教室のみなさまに感謝致します。

本研究のために尊い命を犠牲にし、またかわいらしい姿で心を和ませてくれた多くのマウス，ラットに心から感謝致します。

最後に，大学生生活 10 年間，惜しめない経済的援助とゆるぎない励ましで支え続けてくださいました父正気，母三女，兄浩に感謝致します。

2002 年 2 月

石田 真帆