

20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素ノックアウトマウスの生殖機能

石田 真帆¹⁾, 平林 啓司²⁾, 鈴木 正寿²⁾, 山内 啓太郎²⁾, 西原 真杉²⁾

1) 山梨大学大学院医学工学総合研究部第一生理学教室

2) 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室

要 約

20 α -水酸化ステロイド脱水素酵素(20 α -HSD)は、プロゲステロンを不活性な20 α -ジヒドロプロゲステロン(20 α -OHP)に代謝する酵素である。齧歯類では主として黄体で発現し、プロゲステロン分泌を低下させることにより妊娠・偽妊娠の終了、あるいは不完全性周期(黄体相を欠く短い性周期)の成立に関与していると考えられている。また妊娠中・後期の子宮内でも発現が認められるが、その意義は不明である。本研究では、20 α -HSDの活性発現に必須なエクソン領域を欠失したノックアウト(KO)マウスを作成してその表現型を解析し、20 α -HSDの生物学的意義について検討した。性周期の回帰において、KOでは野生型(WT)よりも発情休止期が有意に延長していた。偽妊娠末期、血中プロゲステロン濃度はWTとほぼ同時期に低下したが、偽妊娠期間には有意に延長した。妊娠末期の血中プロゲステロン濃度の低下や妊娠期間にはKOとWTで差は認められなかった。しかし、KOでは生存産子数がWTに比べて有意に減少していた。以上より、マウスにおいて20 α -HSDは性周期や偽妊娠の回帰に重要な役割を果たしていることが確認されたが、プロゲステロン濃度の低下には20 α -HSD以外の因子も関与していることが示唆された。さらに、妊娠後期に子宮内で発現する20 α -HSDが胎子の生存に関与していることが示され、20 α -HSDの生殖機能制御における新たな意義が見い出された。

はじめに

プロゲステロンは妊娠の成立・維持に必須のステロイドホルモンであり、妊娠中高濃度に維持されるが、分

娩にはその濃度低下が必須である[1]。齧歯類においては、妊娠末期、黄体でプロゲステロンの不活化酵素20 α -hydroxysteroid dehydrogenase(20 α -HSD)の活性が著しく上昇し、プロゲステロン濃度が低下する。20 α -HSDはNADP(H)を補酵素とし、プロゲステロンを生物活性のない20 α -OHPに代謝する酵素である[2]。20 α -HSDの発現は黄体退行因子で分娩誘発剤として知られるプロスタグランジン(PG)F_{2 α} により促進されるが、PGF_{2 α} レセプターノックアウト(KO)マウスにおいては妊娠末期、20 α -HSDの発現上昇が見られず、プロゲステロン濃度も低下しない[3]。したがって、20 α -HSD発現こそが分娩に必須であると推測できるが、PGF_{2 α} による黄体退行作用には20 α -HSDを介さないものも知られているため、分娩の発来に20 α -HSDがどれほど貢献しているかは明らかではない。一方、ラットでは性周期中には機能的に退行した黄体由来の血中20 α -OHP濃度が高いことから[4]、20 α -HSDが性周期黄体の機能的退行因子であり、齧歯類に特徴的な不完全性周期の成立に関わると考えられている。さらに偽妊娠末期にもプロゲステロン濃度の低下に伴い発現が上昇することから[5]、20 α -HSDは齧歯類におけるプロゲステロンの不活化に大きく貢献すると考えられる。また、黄体以外にも、筆者らは妊娠中・後期の子宮内膜上皮細胞において20 α -HSD mRNAの発現を*in situ* hybridization法により検出した[6]。妊娠期子宮には妊娠維持に必須の作用を有する高濃度のプロゲステロンが作用しており、20 α -HSDのプロゲステロン不活化作用がどのような意義をもつのか興味深い。本研究は、齧歯類の生殖周期における黄体の機能的退行因子としての20 α -HSDの重要性、および高濃度のプロゲステロンの影響下にある妊娠子宮におけるプロゲステロン代謝因子としての20 α -HSDの役割を調べることを目的に、20 α -HSD KOマウスを作成し、その表現型の解析を行ったものである。

連絡先：石田真帆，山梨大学大学院医学工学総合研究部第一生理学教室，

〒409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110

TEL & FAX: 055-273-6730

E-mail: mahoi@yamanashi.ac.jp

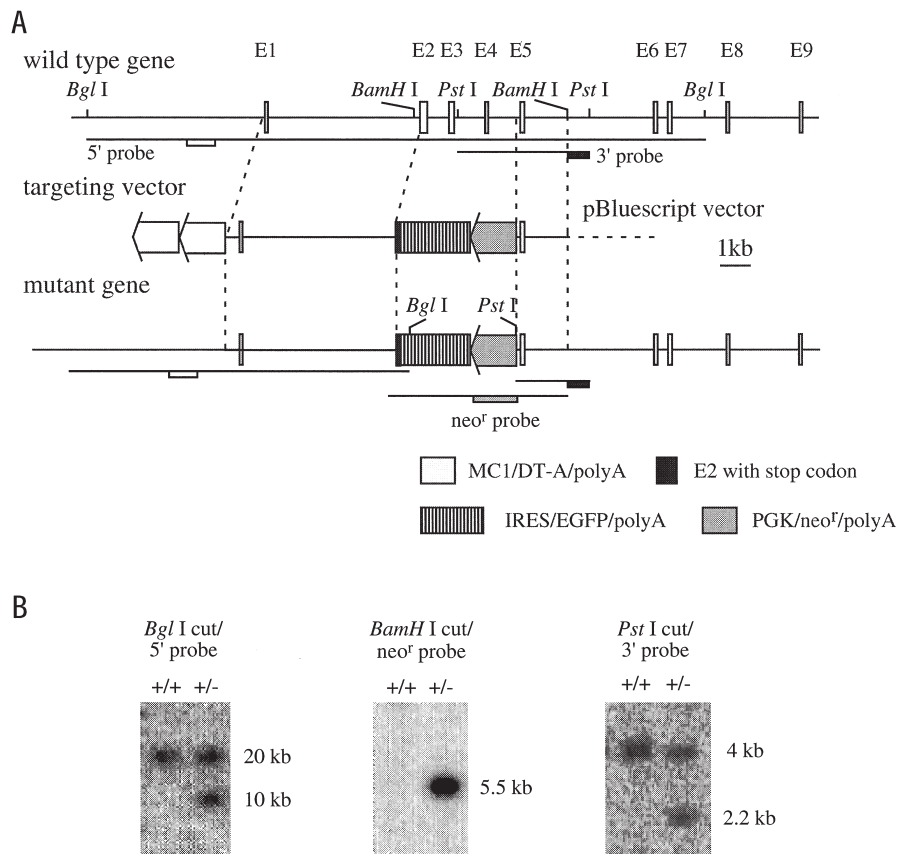


図1 20 α -HSD KOマウスの作出
 A. ターゲティングストラテジー
 B. Southern blottingによる相同組換え体の解析

20 α -HSD KOマウスの作成

全長約18kbのマウス20 α -HSD genomic DNAを129/SvJ mouse genomic libraryからクローニングし [7], ターゲティングベクターの作成に用いた。20 α -HSDが属するaldo-keto reductase superfamilyでは、触媒活性に必須のアミノ酸, Asp50, Tyr55, Lys88, His117が保存されていることから、20 α -HSDにおいてこれらアミノ酸をコードするエクソン2-4を欠失させるように、相同組換え用のターゲティングベクターを構築した(図1A)。ターゲティングベクターにはネオマイシン耐性遺伝子の他、EGFP遺伝子を組み込み、20 α -HSD promoterの活性化がEGFPの蛍光により確認できるようにした。Southern blottingにより相同組換え体を選出し(図1B)、C57BL/6Jと戻し交配した。ターゲティングの可否は、20 α -HSDの発現が高まる分娩確認日の卵巣を用いて確認した。卵巣サイトゾル中の20 α -HSD活性を、NADPHの産生を指標に測定した結果、KOにおい

てはまったく活性が認められなかったことから、KOにおいて20 α -HSDの触媒活性が欠失していることを確認した。20 α -HSD cDNAの全長をプローブとして用いたNorthern hybridizationにより、KOにおいてはWTよりも短い転写産物が検出されたが、シーケンシングにより配列を調べた結果、エクソン2-4をスキップした転写産物であった。また冷却CCDカメラを用いた卵巣の凍結切片の観察により、黄体においてEGFPの蛍光を検出したことから、ターゲティングベクターが20 α -HSDの遺伝子座で機能していることを確認した。

20 α -HSD KOマウスにおける生殖機能の解析

性周期の回帰を、膣スメア法により14日間解析した。WTにおいても、規則的な4日周期を示す個体は多くはなかったが、KOではWTに比べて発情休止期の連続日数が約1.5日間有意に延長した(表1)。齧歯類では黄体は形成後まもなく機能的に退行し、引き続いて形態的に

表1 20 α -HSD KOマウスにおける、性周期中連続した発情休止期の日数、偽妊娠期間、妊娠期間の変化

	WT	KO
性周期中 発情休止期	2.5 \pm 0.3 (n=10)	4.1 \pm 0.5* (n=10)
偽妊娠期間	12.1 \pm 0.2 (n=16)	14.6 \pm 0.4* (n=11)
妊娠期間	19.3 \pm 0.1 (n=4)	19.9 \pm 0.4 (n=7)

mean \pm SE, *p<0.01 (Mann Whitney's U test)

も退行するため、実質的な黄体相を欠く。偽妊娠や妊娠中にみられる黄体相は、子宮頸部刺激により誘起されるプロラクチンサージにより新生黄体における20 α -HSDの発現が抑制されることにより導入されると考えられているが[8]、KOにおいて発情休止期の延長が1.5日間に止まったことから、マウス性周期黄体の退行および偽妊娠・妊娠期の導入がどのように制御されているのかは今後の興味ある課題である。

精管結紮した雄と交配し、膣栓を確認した日を0日目として、偽妊娠を誘起した。RIA法により血中ステロイド濃度を測定した結果、KOでは偽妊娠末期に特徴的な20 α -OHP濃度の上昇が認められず、常に低値を維持した。しかしKOにおいてもプロジェステロン濃度は着実に減少し、次回の膣栓形成も確認した。雄を常時同居させた場合の膣栓形成間隔は、KOではWTに比べて約2.5日間、有意に延長した(表1)。ただし延長は認められたものの、KOにおいてプロジェステロン濃度はWTと同様10日目頃には基底レベルまで低下しており、またWTにおいても20 α -OHP濃度が上昇し始めるのはプロジェステロン濃度が基底レベルにまで低下した後であった。20 α -HSD活性が欠失しているKOでも10日目以降プロジェステロン濃度は低値を維持しているため、KOで膣栓形成が遅延した理由については今後さらに検討が必要である。

妊娠末期においても、KOではWTにみられるような20 α -OHP濃度の上昇はなく、低値を推移したが、偽妊娠同様、KOにおいてもプロジェステロン濃度は低下し、分娩可能であった。妊娠期間にも、KOとWTに差はみられなかった(表1)。20 α -HSD発現は、PGF_{2 α} により転写因子Nur77を介して促進される[3]。プロジェステロン濃度が低下せず分娩に至らなかったPGF_{2 α} レセプターKOマウスの結果と本研究の結果より、分娩時プロジェステロン濃度の低下には、20 α -HSDを介さない

表2 20 α -HSD KOマウスにおける産子数の変化

	WT	KO
全産子数	7.3 \pm 0.6 (n=12)	5.7 \pm 0.8 (n=17)
生存産子数	7.1 \pm 0.6 (n=12)	3.5 \pm 0.9* (n=14)

mean \pm SE, *p<0.01 (Mann Whitney's U test)

PGF_{2 α} の黄体退行作用も重要であることが明らかになった。PGF_{2 α} の黄体退行作用には、20 α -HSDの発現誘導以外にも、steroidogenic acute regulatory protein (StAR)の抑制[9]、アポトーシス誘導[10]、LH作用の抑制[11]、endothelin-1の発現による血管収縮[12]などがあり、これらの作用が分娩時のプロジェステロン濃度低下に寄与しているものと推測される。

分娩後、KOにおいては死亡している産子がしばしばみられた。死亡していたものも合わせた全産子数にはKOとWTで有意な差は認められなかったが、死亡産子を除いた生存産子数を比較すると、KOの産子数はWTよりも有意に減少していた(表2)。妊娠10日目頃の胎盤内や妊娠中・後期の子宮内膜上皮細胞において20 α -HSD mRNAの発現が検出されることから[6]、今回の結果はマウスの妊娠子宮内において発現する20 α -HSDが胎子の発育・生存に重要な役割を果たしていることを示唆している。とくに子宮内膜上皮細胞において、エストロゲンによる細胞増殖促進作用をプロジェステロンが抑制することが知られている[13]ことから、妊娠後半期での子宮内膜上皮細胞の増殖、あるいは胎盤機能に20 α -HSDが関わる可能性が考えられる。

おわりに

本研究の結果からは、黄体で発現する20 α -HSDは黄体の機能的退行において、とくに偽妊娠末期と妊娠末期では必須の因子ではなかった。これは同じ齧歯類であるラットでの20 α -HSD研究に基づいた、20 α -HSDが黄体の機能的退行における重要因子であるというこれまでの見解からすると、意外な結果であった。しかし、KOでは性周期および偽妊娠期における発情休止期が有意に延長するという結果を得た。齧歯類における不完全性周期は、多産動物として進化的に獲得した繁殖戦略と考えられている。その意味で、本研究における20 α -HSD KOマウスにみられた性周期中発情休止期の期間および偽妊娠中次回交尾までの期間が延長したことは、交尾の

機会を多く獲得するという繁殖戦略において、 20α -HSDが貢献していることを示すものとなった。さらに、KOにおいて産子の数が減少していたことから、胎子の発育と生存における 20α -HSDの新たな役割を見出すことができた。これらの現象のさらに詳細なメカニズムの解明が、今後の課題である。

謝辞

第8回日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞し、またこのような執筆の機会をいただきましたことを大変光栄に存じます。学会理事長 青野敏博先生、広報担当理事 峯岸 敬先生はじめ学会役員の諸先生に感謝いたします。本研究の遂行にあたり、多大なご指導をいただきました西原真杉先生、高橋迪雄先生、山内啓太郎先生、岩倉洋一郎先生をはじめ、教室内のみなさまにこの場をお借りして心よりお礼を申し上げます。

文 献

1. 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 (1997) Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 277, 681-683.
2. Wiest WG, Forbes TR (1964) Failure of 20α -hydroxy- Δ^4 -pregnen-3-one and 20β -hydroxy- Δ^4 -pregnen-3-one to maintain pregnancy in ovariectomized mice. *Endocrinology* 74, 149-150.
3. Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF, Gibori G (2000) Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induced expression of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 275, 37202-37211.
4. Matsuyama S, Ohta M, Takahashi M (1987) The critical period in which splenectomy causes functional disorder of the ovary in adult rats. *Endocrinol Jpn* 34, 849-855.
5. Matsuda J, Noda K, Shiota K, Takahashi M (1990) Participation of ovarian 20α -hydroxysteroid dehydrogenase in luteotrophic and luteolytic process during rat pseudopregnancy. *J Reprod Fertil* 88, 467-474.
6. Ishida M, Chang K, Hirabayashi K, Nishihara M, Takahashi M (1999) Cloning of mouse 20α -hydroxysteroid dehydrogenase cDNA and its mRNA localization during pregnancy. *J Reprod Dev* 45, 321-329.
7. Ishida M, Hirabayashi K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2003) Cloning and chromosomal localization of mouse 20α -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *J Reprod Dev* 49, 79-85.
8. Albarracin CT, Parmer TG, Duan WR, Nelson SE, Gibori G (1994) Identification of a major prolactin-regulated protein as 20α -hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 134, 2453-2460.
9. Fiedler EP, Plouffe L Jr, Hales DB, Hales KH, Khan I (1999) Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 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.
10. Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A (1997) Association of expression of mRNA encoding the $PGF_{2\alpha}$ receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil* 109, 45-51.
11. Thomas JP, Dorflinger LJ, Behrman HR (1978) Mechanism of the rapid antigonadotropic action of prostaglandins in cultured luteal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 1344-1348.
12. Girsh E, Dekel N (2002) Involvement of endothelin-1 and its receptors in $PGF_{2\alpha}$ -induced luteolysis in the rat. *Mol Reprod Dev* 63, 71-78.
13. Tong W, Pollard JW (1999) 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.