

氏 名 大室 有紀

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 907 号

学位授与の日付 平成 17 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Transcriptional Regulation of Brain and Ovarian Forms  
of Aromatase in the Medaka, *Oryzias latipes*

論文審査委員 主 査 教授 諸橋 憲一郎  
教授 長濱 嘉孝  
教授 井口 泰泉  
教授 筒井 和義（広島大学）

## 論文内容の要旨

Estrogens, especially estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), are key sex steroid hormones involved in various physiological events including early development, onset of puberty, and adult reproductive cycles. The biosynthesis of estrogens appears to occur throughout the entire vertebrate phylum including teleost fishes. Cytochrome P450 aromatase (CYP19) is the critical steroidogenic enzyme responsible for aromatization of androgens to estrogens. In most vertebrate species that have been examined, aromatase expression occurs in the gonads and in the brain.

Most mammals have only a single copy of the *CYP19* gene. It is expressed in extra-gonadal tissues such as brain, liver, skin and adipose tissues as well as gonadal tissue of ovary and placenta. *CYP19* expression is regulated in a tissue-specific manner, and the regulation is determined by the alternative use of multiple promoters present in a single gene. In contrast, most bony fish possess two structurally distinct aromatases, which share only 60% identity, and are the products of different *cyp19* gene loci, named *cyp19a1* and *cyp19a2*. *Cyp19a1* is predominantly expressed in the ovary and testis, whereas the expression of *cyp19a2* is restricted to neural tissues such as the brain and pituitary. Thus, this unique feature of fish in terms of aromatase gene structures provides an excellent experimental model to investigate the molecular mechanisms involved in the tissue-specific expression of aromatase in vertebrates.

The major objective of this thesis has been to investigate the transcriptional regulation of two different forms of aromatase, brain and ovarian aromatases in teleost fishes. For this purpose, I have used a teleost fish, the medaka, *Oryzias latipes*, since this fish is available in large numbers year round and are readily maintained in the laboratory and manipulated experimentally.

In Chapter II, the transcriptional regulation of the brain type of aromatase (*cyp19a2*) was investigated especially in relation to a transcriptional factor, *lrh-1*, which belongs nuclear receptor 5A (NR5A). Firstly, I isolated medaka NR5A members and found that only *lrh-1* was expressed in the brain of adult medaka. *In situ* hybridization study demonstrated that the region where *lrh-1* mRNA was expressed covered that where *cyp19a2* was expressed in the hypothalamus. I then hypothesized that *lrh-1* plays a role in regulating *cyp19a2* expression in the brain. *In vitro* promoter assays revealed that the medaka *cyp19a2* promoter was up-regulated by *lrh-1*. Furthermore, deletion and mutated reporter gene assays were used to determine the *lrh-1*-responsive site in the *cyp19a2* promoter. Thus, I provided evidence that *lrh-1* is a major transcriptional factor which up-regulates *cyp19a2* expression in the medaka

hypothalamus. The present study is the first to demonstrate the mechanism for the transcriptional regulation of brain aromatase in vertebrate brain.

In Chapter III, I investigated the roles of two transcription factors, *lrh-1* and/or *ad4bp/sf-1*,

in the regulation of the gonadal type of aromatase (*cyp19a1*) using ovarian follicles at various stages of development. I first showed that using transient transfection assays, medaka *lrh-1* as well as *ad4bp/sf-1* up-regulates *cyp19a1* transcription. *Ad4bp/sf-1* signals, but not those of *lrh-1*, were detected by *in situ* hybridization techniques; the signals were found to be restricted to two cell layers of ovarian follicles, theca and granulosa cell layers. RT-PCR analyses revealed that the pattern of increase in *ad4bp/sf-1* transcripts was almost parallel to that of *cyp19a1* with the highest levels during active vitellogenesis. The levels of *lrh-1* transcripts were elevated in follicles during active vitellogenesis. Based on these findings, it is concluded that during vitellogenesis *ad4bp/sf-1* is a key transcription factor for controlling *cyp19a1* expression in medaka ovarian follicles. My findings also suggest that during active vitellogenesis *lrh-1* may play a role as an additional transcription factor for the maximum production of estradiol-17 $\beta$ .

In Chapter IV, I investigated the *in vivo* and *in vitro* effects of estradiol-17 $\beta$  treatment on the expression of two forms of aromatase (*cyp19a1* and *cyp19a2*) and two kinds of transcription factors (*ad4bp/sf-1* and *lrh-1*) in the ovary and brain from medaka embryos and sexually mature medaka females. Although 24 hr E<sub>2</sub> treatment did not affect *cyp19a2* expression in the brain, E<sub>2</sub> treatment for 5 days upregulated the level of *cyp19a2* transcripts several-fold. In embryos 24 hr E<sub>2</sub> treatment drastically stimulated *cyp19a2* expression. In contrast, E<sub>2</sub> had no effect on *lrh-1* expression levels in the brain of either adult fish or embryos. These results suggest that E<sub>2</sub>-induced *cyp19a2* expression in the brain is not mediated by an *lrh-1* pathway.

Up-regulation of *cyp19a1* expression was not observed when medaka females with ovaries containing ovarian follicles at different stages of development were treated with E<sub>2</sub>. Instead, 24 hr E<sub>2</sub> treatment *in vivo* caused a rapid decrease in *cyp19a1*, *ad4bp/sf-1* expression in stage 8 ovarian follicles, although this treatment did not drastically affect the follicular level of *lrh-1*. However, *in vitro*, 24 hr incubation of isolated stage 8 ovarian follicles with E<sub>2</sub> revealed that E<sub>2</sub> did not affect either *cyp19a1* or *ad4bp/sf-1* expression. Taken together, these results suggest that E<sub>2</sub> down-regulates *cyp19a1* expression most likely through the down-regulation of *ad4bp/sf-1*, but the action of E<sub>2</sub> on the down-regulation of *ad4bp/sf-1* transcripts does not seem to be direct, but is mediated by other factors derived from extra-ovarian tissue.

Fig. 23 summarizes the regulation of *cyp19a2* and *cyp19a1* gene expression by two transcription factors and estradiol-17 $\beta$  based on my findings obtained from the present studies using medaka. The expression of *cyp19a2* in the brain is mainly regulated by *lrh-1*. Estrogens may influence *cyp19a2* expression in the brain, but the mechanisms involved in this effect are unclear. *Ad4bp/sf-1* does not appear to be involved in *cyp19a2* expression in the brain.

*Ad4bp/sf-1* is the major factor regulating ovarian *cyp19a1* expression in ovarian follicles, while *Lrh-1* is an additional factor in the follicles during active vitellogenesis. Unlike *cyp19a2* regulation by estrogen, ovarian *cyp19a1* transcripts are drastically down-regulated by estrogen stimulus. This action of estrogen is most likely mediated by a rapid decrease in *ad4bp/sf-1*. Although the down-regulation of *cyp19a1* expression is closely related to that of

*ad4bp/sf-1*, estrogen action on the down-regulation of *ad4bp/sf-1* may not be direct, but mediated by factors derived from other extra-ovarian tissues.

Thus, the studies described in this thesis have laid the groundwork for more comprehensive analyses of cis-acting elements and transcription factors that mediate differential expression of two forms of aromatase, *cyp19a1* and *cyp19a2*, in gonads and brain of teleost fishes.

## 論文の審査結果の要旨

性ステロイドホルモンは脊椎動物を通して生殖活動の要であるが、なかでもエストロゲンは生殖腺や脳の活動を制御する重要な因子である。芳香化酵素 (Cyp19) はアンドロゲンをエストロゲンに転換させる最重要酵素である。この酵素は哺乳類などでは1種類の遺伝子によりコードされているが、その遺伝子発現制御機構は不明な点が多い。魚類でもエストロゲンは生殖腺の性分化、卵の成長、性行動などに深く関わる。魚類の芳香化酵素は生殖腺、特に卵巣 (Cyp19a1) と脳 (Cyp19a2) に強く発現する2種類の異なる遺伝子が存在し、両者は約60%の相同性を示す。申請者は、このような特徴を示す魚類が、芳香化酵素遺伝子の組織、細胞特異的発現機構を研究する優れたモデルとなると考え、メダカを用いて2種の芳香化酵素遺伝子の発現に及ぼす転写因子 (NR5A群) とエストロゲンの役割を解析した。

先ず申請者は、脳型芳香化酵素 (Cyp19a2) がメダカの視床下部の第3脳室周辺の細胞に強く発現すること、さらに同じ細胞に NR5A 転写因子の一つである *lrh-1* が強く発現することを見出した。さらに、*lrh-1* は *Cyp19a2* の転写を促進することを示すとともに、*Cyp19a2* 遺伝子上流の *lrh-1* 結合領域を決定した。一方、メダカの視床下部には *ad4bp/sf-1* の発現は認められないことを示した。以上の結果より、メダカ視床下部における *Cyp19a2* 遺伝子の中心的発現制御因子は *lrh-1* であることを明らかにした。

次に、生殖腺型芳香化酵素 (Cyp19a1) の卵巣での局在細胞が卵母細胞を取り囲む2層の濾胞細胞 (莢膜細胞と顆粒膜細胞) であること、*ad4bp/sf-1* と *lrh-1* も同じ細胞層に共局在することを示した。*Cyp19a1* と *ad4bp/sf-1* の発現パターンはよく一致し、いずれも卵胞の発達とともに増加し、卵成熟とともに急減した。一方、*lrh-1* の発現は卵胞成長期を通して高く、発現量の変動はほとんどみられなかった。これらの結果から、*Cyp19a1* 遺伝子の発現は主に *ad4bp/sf-1* により制御されていること、また *lrh-1* はエストロゲン合成盛期に付加的役割を果たすことを推察した。

また、これら2種の芳香化酵素遺伝子と転写因子の発現に及ぼすエストロゲン (エストラジオール-17 $\beta$ ) の役割を検討した。成魚の脳における *Cyp19a2* の発現は、短期間 (24時間) のエストロゲン処理では影響されなかったが、5日間の処理では増加した。一方、孵化直前のメダカ胚での *Cyp19a2* の発現はエストロゲン処理で数千倍にも上昇した。しかし、いずれの場合にも *lrh-1* の発現量に変動は認められなかった。従って、エストロゲンは脳型芳香化酵素の発現を促進するが、その作用は *lrh-1* の発現量の変動を伴わないメカニズムにより制御されていると結論した。

卵胞における *Cyp19a1* 遺伝子の発現は、卵形成期のどの時期においてもエストロゲン処理により上昇しなかった。逆に、卵形成後期の卵胞 (Stage 8) では24時間のエストロゲン処理 (in vivo) により *Cyp19a1* と *ad4bp/sf-1* の発現が著しく減少したが、*lrh-1* の発現には変動はみられなかった。しかし、Stage 8 の分離卵胞をエストロゲンと培養しても *Cyp19a1* と *ad4bp/sf-1* の発現には変動は認められなかった。一方、Stage 8 の分離卵胞を生殖腺刺激ホルモンと培養すると *Cyp19a1* と *ad4bp/sf-1* の発現が上昇した。従って、in vivo で観察されたエストロゲンによる *Cyp19a1* の発現抑制は、負のフィードバックによる脳下垂体の生殖腺刺激ホルモンの分泌抑制を介した *ad4bp/sf-1* 遺伝子の発現抑制によるものと推察した。

本研究により、メダカの2種類の芳香化酵素遺伝子の発現が、異なる2種類の転写因子（ad4bp/sf-1 と lrh-1）によって制御されること、さらに、両者はエストロゲンによっても異なる影響（抑制と促進）を受けることが明らかにされた。これらの新知見は、脊椎動物における芳香化酵素の活性調節メカニズムに関する今後の研究に大きく寄与すると考えられる。また、孵化直前のメダカの脳がエストロゲンに対してきわめて高い感受性を有することが示されたことは、臨界期の脊椎動物が化学物質に暴露された場合の影響を考える上で特に重要である。以上のことから、申請者の研究は、博士論文として十分な内容を有していると判断された。