

氏 名 周 林燕

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1103 号

学位授与の日付 平成 19 年 9 月 28 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 Two Types of Cytochrome P450c17s (Steroid
17 α -hydroxylase/17, 20 lyase) in the Gonads and Head
Kidney of Fish: Their Characterization and Possible
Functions

論文審査委員	主 査 教授	井口 泰泉
	教授	長濱 嘉孝
	教授	小林 悟
	教授	諸橋 憲一郎（九州大学）
	教授	筒井 和義（早稲田大学）

Cytochrome P450c17 (17 α -hydroxylase/C17, 20 lyase, CYP17) is a steroidogenic enzyme, having a central role in the biosynthesis of steroid hormones in both the gonads and adrenal tissue. Its 17 α -hydroxylase and C17, 20 lyase activities mediate the synthesis of C18 steroids, while only 17 α -hydroxylase activity is required for the synthesis of C21 steroids. However, the mechanism underlying its dual action continues to be a controversy in the field of steroidogenesis in vertebrates including mammals and fish. In an attempt to resolve this issue, she identified a novel type of *P450c17* (*P450c17-II*) by an *in silico* analysis from the genomes of five fish species (fugu, medaka, stickleback, tetraodon, and zebrafish). Further, she cloned the novel type of P450c17 from tilapia and medaka, and compared it with the conventional type of P450c17-I. They possess totally different gene structures and enzymatic activities.

Enzymatic assays by Thin Layer Chromatography (TLC) using both tilapia (*Oreochromis niloticus*) and medaka (*Oryzias latipes*) P450c17-I and -II revealed that P450c17-II possesses a unique 17 α -hydroxylase activity, without any C17, 20 lyase activity, in contrast to P450c17-I, which has both the 17 α -hydroxylase and C17, 20-lyase activities. Tissue distribution analysis by RT-PCR revealed that *P450c17-I* is predominantly expressed in the ovary and testis, while the expression of *P450c17-II* is detectable not only in the ovary and testis, but also in several other tissues including the head kidney. *In situ* hybridization (ISH) analysis further showed that in the ovary, *P450c17-I* is expressed in the theca and granulosa cells, whereas *P450c17-II* is expressed in the theca cells only until the oocyte maturation stage. In the head kidney, only the expression of *P450c17-II*, but not *P450c17-I*, is detected in the interrenal cells. Both types of *P450c17* are found in the interstitial cells of the testis. Similarly pattern of expression is exhibited by the medaka *P450c17-I* and -II also.

Expression analysis during different developmental stages revealed that the expression of tilapia *P450c17-I* starts from 5 days after hatching (dah) in both XX and XY gonads and continues to adult stage with a comparatively higher expression in the XX gonad than in the XY gonad. Unlike *P450c17-I*, the expression of tilapia *P450c17-II* initiated at around 10 dah in the XX gonad and even more delayed in the XY gonad, starting only at around 70 dah. On the other hand, the exclusive expression of *P450c17-II* is maintained in the interrenal cells of the head kidney throughout the whole life. The remarkable differences in the expression patterns of the two types of *P450c17* in the tilapia ovary and head kidney during various stages of development strongly suggest that P450c17-I is responsible for the estradiol-17 β (E2) synthesis in the ovary, while P450c17-II is required for the production of cortisol in the head kidney. In addition, the initiation of *P450c17-II* expression in the XX and XY gonads is temporally coincident with the initiation of meiosis in these gonads, suggesting P450c17-II to have a plausible role in meiosis.

During the reproductive cycle, the expression of tilapia *P450c17-I* peaks between days 3-5, tapers off by day 8, and completely disappears by day 14 of the spawning cycle. On the contrary, though present in the theca cells throughout the spawning cycle, *P450c17-II* starts to express in the granulosa cells also from day 8, culminates by day 12, and then completely disappears by day 14. Consistent with the ISH results, a temporally controlled switching is observed by real time PCR also in the expression

of these two genes during the steroidogenic shift from E2 to $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha, 20\beta$ -DP; maturation-inducing hormone (MIH) of fish oocytes) in the fish ovary. Moreover, the peak in the expression pattern of *Cyp19a1* on day 5 of the reproductive cycle of tilapia parallels with that of *P450c17-I*. Similarly, the peaks observable in the expression of *20 β -HSD* at day 5 and 12 partly comply with the expression pattern of *P450c17-II*. These data strongly suggest that tilapia *P450c17-I* and *-II* are critical for the production of E2 during oocyte growth and $17\alpha, 20\beta$ -DP during oocyte maturation, respectively. Similar expression patterns for medaka *P450c17-I* and *-II* are also detected by real time PCR during 48 hours before spawning (hbs). Expression of *P450c17-I* increases rapidly from 32 hbs and reaches a peak at 26 hbs, finally decreasing to the basal level just before oocyte maturation (17 hbs). Medaka *P450c17-II* shows two peaks (23 hbs and 17 hbs) before the initiation of $17\alpha, 20\beta$ -DP production. Therefore, in the medaka ovary also *P450c17-I* is responsible for the production of E2, while *P450c17-II* is closely related to the production of $17\alpha, 20\beta$ -DP. Taken together, the switching in the expression pattern of these two genes just before the oocytes enter into the maturation stage, at least in part, might account for the steroidogenic shift from E2 to $17\alpha, 20\beta$ -DP in the fish ovarian follicles.

Promoter analysis of medaka *P450c17-I* and *-II* by luciferase assays revealed similar modes of transcriptional regulation by several transcription factors. Ad4BP/SF-1 and Lrh-1 alone induced the transcription of *P450c17-I*, and *Foxl2* further enhances the Ad4BP/SF-1- and Lrh-1-induced *P450c17-I* transcription. On the contrary, *Dmrt1*, *DMY*, and *Dax1* repressed the Ad4BP/SF-1- and Lrh-1- induced *P450c17-I* transcription to the basal levels. Furthermore, the expression profiles of these transcription factors were also examined during the reproductive cycle by real time PCR. Two peaks are apparent in the expression profiles of *Ad4BP/SF1*, *Lrh-1* and *Foxl2*, at days 5 and 12, during the reproductive cycle of tilapia. Taken together, these findings suggest that expression of *P450c17-I* and *-II* can be regulated by these transcription factors. However, only one peak is observable at day 5 of the spawning cycle in the case of *Dax1* expression profile. *Dmrt1* expression is too low to be detected in the ovary, ruling out it to have a role in the regulation of *P450c17-I* and *-II* in the ovary of tilapia.

論文の審査結果の要旨

ステロイドホルモンは生殖や代謝などを含めいろいろな生理現象を制御する重要な因子であり、種々のステロイド代謝酵素の働きにより合成される。中でも、チトクロームP450c17は生殖腺（アンドロゲン、エストロゲン、プロゲステロン）や副腎（コルチゾル、アルドステロン等）の合成に関わる重要なステロイド代謝酵素である。興味あることに、このP450c17遺伝子がコードする蛋白質は、これまでの主に哺乳類を対象とした多くの研究により、17 α -水酸化酵素活性とC17, 20ライエース（ライエース）活性の2つの酵素活性を有する非常にユニークなステロイド代謝酵素であることが知られている。しかし、これら2つの酵素活性がどのような仕組みで調節されているのかは未だに明らかにされていない。Zhou, Linyan（周林燕）さんは、魚類の生殖腺と頭腎（副腎）から、これまで種々の脊椎動物で見つかっているP450c17遺伝子に加えて、新規のP450c17遺伝子をクローニングすることに成功し、それらをコードする2種の酵素の活性の違いを明らかにするとともに、両酵素の機能についても新知見を得た。

まず、すでに公表されている魚類のゲノム情報を検索することにより、これまで報告されているチトクロームP450c17（*P450c17-I型*）に加えて、新規のP450c17

（*P450c17-II型*）をメダカ、ゼブラフィッシュ、ティラピア、フグをはじめ6種の魚類で発見した。次に、これら2種のP450c17のリコンビナント蛋白質の酵素活性を薄層クロマトグラフィーで解析することにより、P450c17-I型は17 α -水酸化酵素活性とライエース活性の両方を有すること、P450c17-II型は17 α -水酸化酵素活性のみを有することを示した。さらに、これら2種の*P450c17*の組織分布を*in situ hybridization*等で解析することにより、*P450c17-I型*は卵巣と精巣にのみ特異的に発現すること、*P450c17-II型*は生殖腺のみならず、頭腎を含む数種の組織で発現することを見出した。

次に、これら2種の*P450c17*の生殖腺と頭腎の発生に伴う発現変動を調べ、*P450c17-I型*は性分化に先立ち孵化直後の雌雄生殖腺ですでに発現がみられること、*P450c17-II型*については、遺伝的雌雄に関係なく、減数分裂が開始する直前の生殖腺（XX生殖腺で孵化10日後、XY生殖腺で孵化70日後）で最初の発現が観察されることを示した。一方、頭腎においては*P450c17-I型*の発現はどの時期にも認められず、*P450c17-II型*のみが孵化直後から一生を通して発現することを示した。また、メダカ（毎日産卵）とティラピア（15日の生殖周期で産卵を繰り返す）の卵巣における2種のP450c17遺伝子の発現を解析することにより、*P450c17-I型*はエストラジオール-17 β （E2）の生成が高い卵形成期に、*P450c17-II型*は卵成熟誘起ホルモン（17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 17 α , 20 β -DP）の生成が高い卵成熟期に強い発現を示すことを見出した。さらに、2種のP450c17遺伝子について、哺乳類の培養細胞を用いたプロモーター解析と配偶子形成期における発現解析を行い、P450c17-I型遺伝子の発現はAd4BP/SF-1とDax1により、P450c17-II型遺伝子の発現はFoxl2により主として制御されていることを示唆した。

以上の結果により、魚類では、1) P450c17-I型は卵巣におけるE2の生成に、

P450c17-II型は卵巣における卵成熟誘起ホルモン (17α , 20β -DP) と頭腎におけるコルチゾルの生成に重要な役割を果たすこと、2) これら2種のP450c17遺伝子の性・時期・細胞特異的な発現は、Ad4BP/SF-1、Foxl2、Dax1により主に調節されていること、3) P450c17-II型は雌雄生殖細胞の減数分裂の開始、及び最終成熟期の卵巣でみられるE2から 17α , 20β -DPへのステロイド生合成系のシフトに重要な役割を果たすことが明らかになった。脊椎動物のステロイド代謝酵素の構造と機能、さらにはステロイドホルモンの機能と生成機構に関して新知見を提供した本研究は独創的であり、博士論文として十分な内容を有していると判断した。