

魚類のコレステロール側鎖切断酵素(P450scc) cDNAの

クローニングと卵形成過程における発現の解析

高 橋 美 佳

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究所

分子生物機構論専攻

平成 4 年 度

( 1 9 9 2 )

## 目次

序論	1
略語	4
実験動物	5
培養液の組成	5
I. P450scc遺伝子のクローニング	6
1. 方法	6
A. ニジマスP450scc遺伝子のクローニング	6
a. 材料	6
b. mRNAの抽出	6
c. Northern hybridization	6
d. 莢膜細胞層cDNAライブラリー	7
e. スクリーニング	7
f. シークエンシング	8
g. COS-1細胞へのトランスフェクション	8
h. ラジオイムノアッセイ法 (RIA)	9
B. メダカP450scc遺伝子のクローニング	9
a. 材料	9
b. mRNAの調製	9
c. Northern hybridization	9
d. cDNAライブラリーの作製	9
e. スクリーニング及びシークエンシング	10
2. 結果	11
a. ノーザンプロット解析	11
b. ニジマスP450scc様cDNAの塩基配列	11
c. メダカP450scc様cDNAの塩基配列	11
d. ニジマスP450scc様cDNAのCOS-1細胞へのトランスフェクション	11
e. アミノ酸配列の比較	12
3. 考察	13
II. 卵形成過程におけるP450scc mRNAの発現	16
1. 方法	16
A. ニジマスP450scc mRNAの発現	16
a. ニジマス卵の培養	16
b. ステロイドの定量	16
c. RNA抽出用のサンプルの調製	17
d. RNAの調製	17
e. デイゴキシゲニンラベルRNAプローブの作製	17

f. Northern hybridization-----	17
B. メダカP450scc mRNAの発現-----	18
a. total RNAの抽出-----	18
b. Northern hybridization-----	18
2. 結果-----	19
a. ニジマス血中プレグネノロン量の変化-----	19
b. ノーザンプロット解析-----	19
A. ニジマスP450scc mRNAの発現-----	19
B. メダカP450scc mRNAの発現-----	19
3. 考察-----	20
III. ホルモンによるニジマス卵濾胞細胞層でのP450sccの発現-----	22
1. 方法-----	22
a. 卵濾胞組織の培養-----	22
b. mRNAの抽出-----	22
c. Northern hybridization-----	22
d. whole mount <i>in situ</i> hybridization-----	22
2. 結果-----	23
a. ノーザンプロット解析-----	23
b. whole mount <i>in situ</i> hybridization-----	23
3. 考察-----	24
IV. まとめ (要旨) -----	28
謝辞-----	30
参考文献-----	31
図及び表-----	36

## 序論

多細胞動物の発生において、始原生殖細胞は生殖腺（卵巣）に入り、卵原細胞となり、卵原細胞は卵巣内で有糸分裂による増殖期の後、有糸分裂を止め、減数分裂を開始して卵母細胞となる。脊椎動物では減数分裂の第一分裂前期で分裂は停止した状態にあり、核及び細胞質の容積を著しく増加させる成長期にはいる。十分に成長した卵母細胞は卵成熟誘起ホルモンの作用により、減数分裂を再開させ、卵核胞の崩壊に始まる卵成熟過程を経て受精可能な卵となる。この卵原細胞から成熟卵が形成されるまでの一連の過程が卵形成と呼ばれる過程である。

脊椎動物の卵巣では、体細胞性の莢膜細胞と顆粒膜細胞からなる濾胞組織が個々の卵母細胞を取り囲む (Nagahama, 1983; Martin, 1985)。卵母細胞の成長や成熟はこれら2種類の濾胞細胞で生成される種々の物質、とくに性ステロイドホルモンにより制御されている。濾胞細胞における性ホルモンの生成は、脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) により巧妙に調節されている。卵形成のホルモン調節機構に関する研究は、とくに哺乳類を用いて活発になされてきたが、その多くは生理学的、形態学的研究 (Martin, 1985, Richards, 1979, Richards, et al., 1987) であり、卵形成過程を制御するホルモン諸因子を単離して、それらを化学的に同定するような研究はほとんどなされていない。哺乳類でこの分野の研究が困難である主な理由は、適当な実験系や材料が欠如していることがあげられる。

魚類の卵は、脊椎動物における卵の成長や成熟のホルモン制御機構を解析する系としていくつかの利点がある。とくに、多くのサケ科魚類の生殖周期は一生に一度であるため、卵巣や精巣の生殖細胞の形成がほぼ完全に同調しており、生殖細胞の成長や成熟の制御因子を単離し、同定するような研究には非常に適している (Nagahama, 1987a)。

このような利点を生かして、これまでにサケ科魚類を実験材料として明らかにされたことは、以下の通りである。まず、卵形成を制御する第一次ホルモン因子は脳下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモン (GTH) であることが明らかにされ、その化学構造が決定された (Kawauchi, et al., 1986; Nagahama, 1987a)。また、GTHは卵母細胞を取り囲む体細胞性の濾胞細胞層に作用し、性ステロイドホルモンの生成を促進し、このホルモンが卵の成長や成熟を制御することが明らかにされた。さらに、卵の成長 ( $17\beta$ -

Estradiol) と成熟 ( $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one;  $17\alpha, 20\beta$ -DP) を誘起させるホルモンが単離され、それらが同定されている (Nagahama, 1987a)。なお  $17\alpha, 20\beta$ -DP は、脊椎動物で唯一同定された卵成熟誘起ホルモンである (Nagahama, and Adachi, 1985, Nagahama, 1987b)。また、卵濾胞組織を莢膜細胞層と顆粒膜細胞層とに分離して培養し、GTH の存在下でのステロイド産生について調べた結果より、図1に示すような2細胞型モデルが提唱されている (Nagahama et al., 1985, 1987b; Young et al., 1986; Yoshikuni et al., 1989)。 $17\beta$ -Estradiol は肝臓に作用し、卵黄の材料となるタンパク質であるビテログニンの産生を促し、卵母細胞の卵黄蓄積をもたらす (卵黄形成) (Wallace, 1981)。卵黄形成の完了に引き続き、脳下垂体からGTHの急激な分泌が起こり、卵濾胞細胞はこれに反応して卵成熟誘起ホルモンである  $17\alpha, 20\beta$ -DP を産生するようになり、このホルモンの働きで卵は成熟する (卵成熟) (Nagahama, 1987b, Kanamori et al., 1988)。

図1にあるように、卵黄形成促進ホルモンの  $17\beta$ -Estradiol、及び卵成熟誘起ホルモンの  $17\alpha, 20\beta$ -DP は、いずれもコレステロールから始まる一連の代謝経路を経て生成されと考えられる (図2)。一般に、ステロイド代謝経路の律速段階はコレステロールからプレグネノロンへの変換の反応であると言われている。この反応を触媒する酵素はコレステロール側鎖切断酵素 (cholesterol side chain cleavage cytochrome: P450scc) である。この酵素はチトクロームP450系に属するヘムタンパク質である。魚類でもP450sccは卵濾胞細胞における  $17\beta$ -Estradiol や  $17\alpha, 20\beta$ -DP の生成に重要な働きをしていると推察されるが、これまでこの酵素の卵形成過程における機能については哺乳類を含めてほとんどなされていない。

そこで本研究は、魚類のP450sccの構造と卵形成過程における発現を分子レベルで明らかにする目的で行なった。研究材料として生殖様式の異なる二種の魚を用いた。ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) はサケ科魚類に属し、年に一回産卵するため、卵巣内の卵は同調的に生育しており、各時期にサンプリングを行なうことにより同じ発達段階の卵胞を一度に多数得ることができる。また、卵胞が大型であるため莢膜細胞層と顆粒膜細胞層との分離培養が可能である。一方、メダカ (*Oryzias latipes*) は、温度と光条件を調節することにより、毎日一定時刻に産卵させることができる。また、卵巣内には

さまざま発達段階の卵が存在しており、一日の各時間で各段階の卵を得ることができるという利点がある。

本研究はまず、ニジマス及びメダカよりP450scc cDNAをクローニングし、ニジマスについては全長を含むと思われるcDNAを得、その活性をCOS-1細胞へのトランスフェクション実験により調べ、このcDNAがP450sccであることを確かめた。さらに、このcDNAから推測されるアミノ酸配列をすでにcDNAがクローニングされている4種の哺乳類のものと比較した。次に、種々の発達段階にある卵胞からmRNAを調製し、ノーザンブロット解析により、卵形成に伴う卵濾胞細胞層でのmRNAの発現を調べた。さらに、分離した莢膜細胞層と顆粒膜細胞層をGTHの存在、非存在下で培養し、培養後の各々の細胞層におけるP450scc mRNAの発現を、ノーザンブロット解析により調べた。最後に、whole mount *in situ* hybridization法により、ニジマス卵胞におけるP450scc遺伝子の発現量及び部位を解析した。

略語

17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -DP	17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one
17 $\alpha$ -OH Prog	17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GTH	gonadotropic hormone
HSD	hydroxysteroid dehydrogenase
Hepes	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
P450arom	aromatase
P450c17	17 $\alpha$ -hydroxylase/17, 20-lyase
P450scc	cholesterol side-chain cleavage enzyme
PBS	phosphate buffered saline
PFA	paraformaldehyde
SDS	sodium lauryl sulfate
SGA	chum salmon partially purified gonadotropin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 実験動物

ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) は約2～4年魚(雌)を滋賀県立醒ヶ井養鱒場及び天竜川漁業協同組合(長野県)より購入した。購入後、水温 $10 \pm 2^\circ\text{C}$ の水槽で保持し、1週間以内に実験に用いた。

メダカ (*Oryzias latipes*) は水温 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、14時間明期、10時間暗期条件下で飼育し、毎日産卵を行なうようになった個体を実験に用いた。

## 培養液の組成

### ニジマスRinger液の組成 (pH 7.8)

150mM	NaCl
3mM	KCl
0.3mM	MgSO <sub>4</sub>
1mM	MgCl <sub>2</sub>
3mM	CaCl <sub>2</sub>
4mM	Hepes
6mM	glucose

pHは、1N HClでpH 7.8に調整  
0.1g/l 硫酸ストレプトマイシン, 10万単位/l 結晶ペニシリンGカリウムを加えた。

### メダカRinger液の組成 (pH 7.3)

111mM	NaCl
5.4mM	KCl
1mM	CaCl <sub>2</sub>

pHは、0.1N NaHCO<sub>3</sub>でpH 7.3に調整  
0.1g/l 硫酸ストレプトマイシン, 10万単位/l 結晶ペニシリンGカリウムを加えた。



## I. P450scc遺伝子のクローニング

### 1. 方法

#### A. ニジマスP450scc遺伝子のクローニング

##### a. 材料

濾胞卵の単離: ニジマス頭部を殴打し、尾部から採血を行なった後、開腹して卵巣を摘出した。卵巣をニジマスRinger液中で時計用ピンセットを使用し、濾胞卵を卵巣膜から一個ずつ単離した。

莢膜細胞層と顆粒膜細胞層の単離: 単離した濾胞卵を氷冷したニジマスRinger液中に入れ、時計用ピンセットで濾胞卵に穴を開け、卵黄を除去し、ピンセットで莢膜細胞層と顆粒膜細胞層とを単離した。

mRNAの抽出用サンプル: 単離した濾胞卵をニジマスRinger液中に浸し、50 mlチューブに移し軽く遠心した後上清を除去した。沈澱にニジマスRinger液を加え、上清の濁りがなくなるまで数回繰り返し卵黄を除去した後、液体窒素で急速凍結し、-80℃に保存した。

##### b. mRNAの抽出

凍結保存されたサンプルをFastTrack mRNA Isolation Kit (Invitrogen)を用い、kitの方法に従いpoly A<sup>+</sup> RNAを調製した。

##### c. Northern hybridization

RNAの電気泳動は1%アガロース/MOPS/ホルムアルデヒド変性ゲルで行なった。Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) ナイロンメンブレンへvacuum blot装置 (VacuGene XL, Pharmacia LKB) でプロットティングを行なった。プロットティング後、メンブレンを80℃オーブンで30分乾熱処理した。プローブを含まないhybridization溶液 [5 x SSC (0.75M NaCl/0.075M sodium citrate), 20%または30% formamide, 200  $\mu$ g/ml変性herring sperm DNA, 5 x Denhardt's (0.1% polyvinylpyrrolidone/0.1% ficoll type 400/0.1% bovine serum albumin fraction V), 0.2% SDS, 10% dextran sulfate] で42℃, 1~2時間のprehybridizationの後、ラベルしたプローブを煮沸後急冷させてからhybridization溶

液に添加し、42℃で16～18時間hybridizationを行なった。プローブはヒトP450scc cDNA 1.8 kbをM13mp19に組み込み、M13シーケンスキット（宝酒造）を使用し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPを取り込ませcDNAをラベルした後、切り出し、プローブとして使用した。

hybridization後、6 x SSCで軽くすすいだ後、2 x SSC/1% SDS溶液中で42℃、30分の洗浄を2回繰り返した。洗浄後、プラスチックバックにメンブレンを入れ、イメージングプレート（富士写真フィルム）に密着させてカセットに入れ、露光を行なった。解析は、バイオイメージアナライザー BAS 2000（富士写真フィルム）を使用した。

#### d. 莢膜細胞層cDNAライブラリー

単離された莢膜細胞層より調製されたpoly A<sup>+</sup> RNAを用い、cDNAクローニングシステム  $\lambda$ gt10、アダプター法（Amersham）を使用し作製されたcDNAライブラリーを用いた。

#### e. スクリーニング

プローブ：ヒトP450scc cDNAは、以下のような制限酵素切断部位を持っている。



このcDNAをPvuIIとSau3AIで切断し、上図\*印で示した285bpからなる断片を取り、それをHincIIとBamHIで切断したM13mp19に組み込んだ。M13シーケンスキット（宝酒造）を用い $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPを取り込ませcDNAをラベルした後、HindIIIとBamHIで切り出し、プローブとして使用した。

スクリーニング：ニジマス莢膜細胞層cDNAライブラリーより総計約 $2.4 \times 10^5$ プラークをHybond N<sup>+</sup> ナイロンメンブレン（Amersham）にプロットした。hybridization溶液は[5 x SSC (0.75M NaCl/0.075M sodium citrate), 35% formamide, 200  $\mu$ g/ml変性 herring sperm DNA, 5 x Denhardt's (0.1% polyvinylpyrrolidone/0.1% ficoll type 400/0.1% bovine serum albumin fraction V), 0.2% SDS, 10% dextran sulfate] で42℃、1時間のprehybridizationの後、ラベルしたプローブを煮沸後急冷させてからhybridization溶液に添加し、42℃で16～18時間 hybridizationを行なった。洗浄は、1 x SSC/0.2% SDSで42℃、1時間行なった。positiveプラーク（4個）を単離し、EcoRI

でinsertを切り出し、約1.8 kbの長さのinsertをpBluescript KS(+)に組み込んだ。  
ExoIII/Mung bean nuclease deletion系を用いdeletion cloneを作製し、次にM13K07  
helper phageを使いsingle strand DNAを調製した。

#### f. シークエンシング

DNAのシークエンシングは、ダイデオキシシークエンス法に従い、M13 Sequencing  
Kit, 7-DEAZA Sequencing Kit及びBca BEST Dideoxy Sequencing Kit（宝酒造）を使用  
して行なった。塩基配列の決定方針は図3.Aに示した。

データの解析は GENETYX（SDCソフトウェア株式会社）を使用した。

#### g. COS-1細胞へのトランスフェクション

プライマーの合成：合成オリゴヌクレオチドを DNA Synthesizer（MODEL 391,  
Applied Biosystems）により合成後、アンモニアで切り出し55℃、6時間の脱保護処理  
の後、エタノール沈殿を行ない回収した。プライマーの5'末端側には XhoI site を、  
3'末端側には SacI site を付加させた。

ニジマスP450scc様cDNAを鋳型とし、PCR法により目的の長さのDNAを増幅させた（図  
7）。反応は DNA Thermal Cycler 480（PERKIN ELMER CETUS）を使用した。次にそれ  
らDNAをXhoI及びSacIで切断し、同様の制限酵素で切断したpSVL発現ベクターに組み込  
んだ。トランスフェクションの前日に $2.2 \times 10^5$  cells/plate（6cmシャーレ）となる  
ようにCOS-1細胞を準備した。COS-1細胞の培養液は Dulbecco's Modified EAGLE  
MEDIUM（Nissui）を炭酸水素ナトリウムでpH7.5に調製して使用した。20時間後、 $14$   
 $\mu\text{g/plate}$  DNA,  $50 \mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $500 \mu\text{l}$  2 x BES (50mM BES/280mM NaCl/1.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
pH 6.96), D.D.Wを混合した $500 \mu\text{l}$ の溶液を各プレートに加え、室温に20分間静置した  
後、37℃、5% $\text{CO}_2$ 条件下で培養した。各処理につきプレートは2枚ずつ用意した。24時間  
後、培地を交換し、さらに24時間培養した後、25-hydroxycholesterolを2 nmol/mlとな  
るように加え培養を続けた。48時間後に培養液を1mlずつ採取し、さらに培養を続け、  
120時間後、培養液を全て採取した。採取した培養液は凍結保存した。

#### h. ラジオイムノアッセイ法 (RIA)

凍結したサンプル（培養液）を溶かし、2倍容のジエチルエーテルで2回抽出を行なった。ジエチルエーテルを揮発させた後、Abrahamらの方法(1973)に従い、BSA-PBS、抗体（帝国臓器）、 $[^3\text{H}]$ -pregnenolone (NEN) を加え十分に混合した後、4℃で18時間抗原抗体反応を行なった。反応後、デキストランチャコールを添加し十分に混合させた後、4℃で1時間静置した。遠心でデキストランチャコールを沈澱させ、その上清をバイアルビンに移し、液体シンチレーターを加え強く混和した後、液体シンチレーションカウンターで測定を行なった。

### B. メダカP450scc遺伝子のクローニング

#### a. 材料

メダカを頭部破壊し、開腹して卵巣を摘出した。卵巣を氷冷したメダカ Ringer液に入れ、時計用ピンセットで単離し、卵を大きさごとに分別した。それぞれ1.5mlチューブに入れ専用乳棒でつぶし軽く遠心した後、上清を除去した。沈澱にメダカRinger液を加え、上清の濁りが少なくなるまで数回繰り返し卵黄を除去した後、液体窒素で急速凍結し、-80℃に保存した。

#### b. mRNAの調製

-80℃凍結保存した試料より、FastTrack mRNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いてpoly A<sup>+</sup> RNA を調製した。

#### c. Northern hybridization

前述 (1.A.c) と同様の方法で行なった。ただし、hybridization 溶液の formamide は35%で行なった。プローブはニジマスP450scc cDNAをRandom Primer Extention Labeling System (NEN) により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ でラベルして用いた。

d. cDNAライブラリーの作製

メダカ卵巣より抽出したpoly A<sup>+</sup> RNAから、cDNAクローニングシステム  $\lambda$ gt10, アダプター法 (Amersham) に従い、cDNAライブラリーの作製を行なった。

e. スクリーニング及びシークエンシング

プローブはニジマスP450scc cDNAを前述 (B. c) と同様の方法で、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTPでラベルしたものをを用いた。cDNAライブラリーより総計約1 x 10<sup>6</sup> プラークをHybond N<sup>+</sup> ナイロンメンブレン (Amersham) にプロットし、ニジマスの場合と同様にしてスクリーニングを行なった。

シークエンシングは、Bca BEST Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造) を用い、kitの方法に従った。塩基配列の決定方針は図3.Bに示した。

データの解析はGENETYX (SDCソフトウェア株式会社) を使用した。

## 2. 結果

### a. ノーザンブロット解析

ヒトP450scc cDNAをプローブとしたノーザンブロット解析より、ニジマスP450scc mRNAの全長は約1.6～1.8 kbであることが推測された (図4.A)。

また、ニジマスP450scc cDNAをプローブとしたノーザンブロット解析より、メダカP450scc mRNAの全長は約1.7～2.2 kbであると推測された (図4.B)。

### b. ニジマスP450scc様cDNAの塩基配列

図5にニジマスP450scc cDNAの塩基配列を示した。全長は1789 bpで、open reading frameは1542 bpから成り、514個のアミノ酸をコードしていると推定された。3'末端側、図中下線で示した部分に“AATAAA”のポリアデニル化シグナルがあった。

また、終止コドンの3塩基上流から31bp (CAGTGATATCATGAAGCCTCTACACAGCAGA) から成るダイレトリピート配列が見い出された。この配列は4回繰り返されており、3回目と4回目は6番目のTがCに替わっており、4回目は後部の9個の配列はかなり崩れていた。この配列に関して、homology検索を行なったが相当するものは見つからなかった。

### c. メダカP450scc様cDNAの塩基配列

図6にメダカP450scc様cDNAの塩基配列を示した。得られたcDNAの全長は1204 bpであった。図4.Bのノーザンブロット解析から推定された全長は1.7 kb以上であり、得られたcDNAはfull-lengthではないと考えられる。

3'末端側、図中下線で示した部分に“AATAAA”のポリアデニル化シグナルがあった。

メダカP450scc様cDNAに関しては3'末端側にダイレトリピート配列は見つからなかった。

### d. ニジマスP450scc様cDNAのCOS-1細胞へのトランスフェクション

ニジマスP450scc cDNAのcoding region全て含むもの (P) と、bovineの延長ペプチド (Kumamoto et al., 1989) に相当するN末39個をコードする領域を含まないもの (M) との、2種のcDNAをPCR法で合成し、発現ベクターpSVLに組み込み、COS-1細胞へトランス

フェクションさせた。coding region全てを持つPをトランスフェクションさせたCOS-1細胞での25-hydroxycholesterolを基質とした時のプレグネロン産生量は、ベクターのみをトランスフェクションさせたcontrolと比較して著しく高く、得られたcDNAがニジマスのP450scc cDNAであると同定された（表1）。次に、N末39個のアミノ酸をコードする領域を含まないMをトランスフェクションさせたCOS-1細胞では、ベクターのみのcontrolとほぼ同じ値を示した。

図8にニジマスP450sccのN末側アミノ酸配列と、4種の哺乳類でのP450sccの延長ペプチドといわれている領域のアミノ酸配列を示したが、両者の相同性は約13%（5/39）と低かった。

この実験では、基質としてcholesterolではなく25-hydroxycholesterolを用いたが、この理由はcholesterolを基質として培養液に添加した場合に比較して、25-hydroxycholesterolの方がCOS1-細胞への取り込みが良いことによる。

#### e. アミノ酸配列の比較

ニジマスとメダカのP450sccのcDNAより推定されるアミノ酸配列を、これまでに報告されている4種の哺乳類のP450sccアミノ酸配列と比較した結果を図9に示す。なお、メダカに関しては、得られたP450scc様cDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列について比較した。

### 3. 考察

すでに述べたように、P450sccはステロイドホルモンの生合成経路の第一段階であるコレステロールをプレグネノロンに転換させる酵素であり、卵巣、精巣、副腎などのステロイドホルモン産生細胞に局在する。これまで、P450sccのcDNAはヒト (Chung et al., 1986)、ウシ (Morohashi et al., 1984)、ブタ (Mulheron et al., 1989)、ラット (Oonk et al., 1990) の4種の哺乳類の生殖腺や副腎からクローニングされているが、哺乳類以外の脊椎動物ではこの酵素の遺伝子はまったくクローニングされていない。本研究では、ニジマスとメダカの卵濾胞細胞層cDNAライブラリーから、P450scc cDNAをクローニングした。そのうち、ニジマスでは哺乳類以外の脊椎動物ではじめてP450sccのcDNAの塩基配列が明らかにされた。得られたニジマスのcDNAがP450sccであることは、このcDNAを哺乳類のCOS-1細胞にトランスフェクションし、この細胞が基質として培養液に添加された25-hydroxycholesterolをプレグネノロンに転換する活性を示すことから確認された。

これまでに明らかにされている4種の哺乳類のP450sccのアミノ酸配列には70%以上の相同性がある (表2)。しかし、本研究で得られたニジマスP450sccは、ヒトとは48%、ウシ、ラット、ブタとはいずれも46%の相同性しか示さなかった。一方、部分塩基配列が決定されたメダカのP450scc様cDNAから推定されるアミノ酸配列とニジマスP450sccアミノ酸配列とでは約82%の相同性が認められ、哺乳類との相同性よりも著しく高かった。

P450に属するタンパク質の遺伝子は遺伝子ファミリーを形成し (Gotoh and Fujii-Kuriyama, 1988, Waterman and Simpson, 1989)、哺乳類ではこれに属するステロイドホルモン代謝酵素の遺伝子が現在までにいくつか報告されている。しかし、哺乳類以外の動物での報告はこれまでニワトリP450c17 (Ono et al., 1988)、ニジマスP450c17 (Sakai et al., 1992)、ニワトリP450arom (McPhaul et al., 1988)、ニジマスP450arom (Tanaka et al., 1992) とがあるのみである。P450遺伝子ファミリーには、アミノ酸配列の上でいくつかの共通点があることが知られている (Gotoh and Fujii-Kuriyama, 1988) ので、ニジマスのP450sccがそれらの条件を満たすかを調べた。

(1) ヘムへの結合に関与していると考えられている塩基性アミノ酸が3ヶ所にある → ニジマスP450sccアミノ酸の149、394、456番目 (図中①) は Arg であった。



(2)電子伝達に関与するアミノ酸が3ヶ所にあり、これは現在までに報告されているすべてのP450系タンパク質で一致している → ニジマスP450sccアミノ酸配列の381、384、437番目(図中②)がそれぞれ Glu、Arg、Argで一致した。

(3) ミトコンドリアに局在するP450系タンパク質ですべて一致するアミノ酸 (Trp) がある → ニジマスP450sccの相当する位置 (438; 図中③) のアミノ酸も Trp で一致した。

また、P450scc間で比較をすると、ステロイド結合領域と考えられている (Picado-Leonard et al., 1988) 領域 (371-393; 図中I) では70% (16/23)、ヘム結合領域と考えられている (Gotoh et al, 1983) 領域 (448-467; 図中II) では71% (15/21) と、いずれも他の領域より高い相同性を示し、種間での保存性がより高い領域であると考えられる。

これらの領域とは別に、ニジマスP450sccの84-90番目の7個のアミノ酸 (GPIYREK) は他の4種の動物においても一致していた。この領域の相同性は、ニジマスのP450sccのアミノ酸配列が解明されたことにより、より鮮明になった領域であり、この配列がP450sccに共通な何らかの機能を担っている可能性が考えられる。

P450sccタンパク質は、副腎や魚類の精巣に存在する11 $\beta$ -水酸化酵素 (11 $\beta$ -hydroxylase P450<sub>11 $\beta$</sub> ) とともに、ミトコンドリア内膜に局在するタンパク質である (Waterman and Simpson, 1989)。これらのタンパク質は、未成熟型として細胞質のリボゾームで合成された後、N末側のアミノ酸 (extension peptide: 延長ペプチドと呼ばれる) をシグナルとして、ミトコンドリアへ移行する。移行後、延長ペプチドはミトコンドリア内で切断され、成熟型タンパク質になると考えられている (Kumamoto et al., 1989)。

前述したように、延長ペプチドを含むニジマスP450scc (pSVL/P) をCOS-1細胞にトランスフェクションさせた場合には、25-hydroxycholesterolを基質として加えた時のプレグネロン産生量から推測されるP450scc活性は著しく高い。しかし、N末39個のアミノ酸をコードする領域を欠くP450scc (pSVL/M) をトランスフェクションさせた場合にはcontrolとの差は認められなかった。これらの結果は、ニジマスのP450sccのN末39個のアミノ酸は哺乳類のP450sccと同様に細胞内のP450scc活性の発現に重要な役割を果していると推察される。しかし、図8に示されるようにN末39個のアミノ酸は哺乳類間の

P450<sub>scc</sub>同士ではよく保存されているが、ニジマスP450<sub>scc</sub>とは5個のアミノ酸のみが共通である。この5個のアミノ酸がどのような意味を持つのか、今のところ不明である。現在、ニジマスP450<sub>scc</sub>とそのN末18個のペプチドを合成し、それぞれの抗体を作製中であるので、今後これらの抗体を用いることができれば、P450のミトコンドリアへの移行についての解析が可能である。

## II. 卵形成過程におけるP450scc mRNAの発現

### 1. 方法

#### A. ニジマスP450scc mRNAの発現

##### a. ニジマス卵の培養

前述の手順 (I.1.A.a) でニジマス卵巣より濾胞卵及び莢膜細胞層、顆粒膜細胞層を準備した。12穴細胞培養用マルチプレート (Costar) に、ニジマスRinger液を3 mlずつ入れ、そこへそれぞれの組織を各5個ずつ入れた。培養は各試薬を添加後 $10 \pm 2^\circ\text{C}$ で行なった。培養開始後一定時間ごとに培養液を一部採取し、RIA及びEIA用のサンプルとした。

添加した試薬の最終濃度は以下の通りである。

forskolin:  $1 \mu\text{M}$ ,  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone: 10 ng/ml

##### b. ステロイドの定量

ラジオイムノアッセイ (RIA) によるプレグネノロン、及び $17\alpha, 20\beta$ -DPの定量:

Abrahamら (1973)、及びYoungら (1983) の方法に従い、試験管にサンプル (培養液)、BSA-PBS、それぞれの抗体 (帝国臓器)、 $[^3\text{H}]$ pregnenoloneまたは $[^3\text{H}]17\alpha, 20\beta$ -DPを加え充分に混合し、 $4^\circ\text{C}$ で16~20時間反応を行なった。反応後、デキストランチャコールを添加し十分に混合させた後、 $4^\circ\text{C}$ で1時間静置した。遠心でデキストランチャコールを沈澱させ、その上清をバイアルビンに移し、液体シンチレーターを加え強く混和した後液体シンチレーションカウンターで測定を行なった。

エンザイムイムノアッセイ (EIA) による $17\alpha, 20\beta$ -DPの定量:

第2抗体 (抗ウサギIgGヤギIgG; ZYMED) を固着化した自製のマイクロタイタープレート (Maxisorp; Nunc) に、サンプル、希釈標識抗原、希釈抗体の順に加え、 $4^\circ\text{C}$ で6~8時間反応を行なった。反応後、反応液を捨て、生理食塩水で3回洗浄した後、発色液 (使用直前に、0.5 mg/mlとなるようにo-phenyldiamineを0.008%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /0.2M citrate bufferに溶解する) を加え、室温で30分~1時間反応させ、6N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ を加え、反応を停止させた。マイクロプレートリーダー (MTP-120; CORONA ELECTRIC) を用い、492 nmでの吸光を測定した。

#### c. RNA抽出用のサンプルの調製

濾胞卵を遠心管に詰め、20,000 rpm (30,000x g) 30分遠心し、濾胞細胞層を含む画分(図16)を取り、ニジマスRinger液中で3~4回洗浄した後、軽く遠心し液体窒素で急速凍結し-80℃で保存した。

#### d. RNAの調製

total RNAは、凍結保存したサンプルよりTotal RNA Extraction Kit (Invitrogen) を用いることにより、kitの方法に従ってtotal RNAを抽出した。poly A<sup>+</sup> RNAは、FastTrack mRNA Isolation Kit (Invitrogen) を用いてkitの方法に従い凍結保存した組織から直接抽出するか、またはtotal RNAより精製を行なった。

#### e. デイゴキシゲニンラベルRNAプロローブの作製

プローブとして使用するDNAをpBluescriptII KS(+)に組み込み、抽出後、CsCl密度平衡遠心で精製した。プラスミドDNAを制限酵素で切断し、フェノール、クロロフォルム抽出を行なった後、エタノール沈澱により回収した。

RNAプロローブの合成はDIG RNA Labeling Kit (Boehringer) を用い、kitの方法に従った。ただし、RNA polymerase はT3 RNA polymerase (Stratagene) を使用した。合成後、DNase IでテンプレートDNAを除去した後、エタノール沈澱によりデイゴキシゲニンラベルRNAを回収し、未反応の基質を除去した。得られたデイゴキシゲニンラベルRNAを5 mM DTT/40 mM NaHCO<sub>3</sub>/60 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液中で60℃で加熱し、アルカリ処理を行なった。加熱時間は以下の式に従った (Cox et al., 1984)。

$$T = (L_0 - L_f) / K \times L_0 \times L_f$$

T:処理時間 (分), L<sub>0</sub>:処理前のRNAの長さ (kb), L<sub>f</sub>:最終のRNAの長さ (kb), K=0.11  
アルカリ処理後エタノール沈澱で回収し、30% formamide溶液に溶解させ、-20℃に保存した。

#### f. Northern hybridization

電気泳動は前述 (I.1.A.c) と同様の方法で行なった。プローブを含まない hybridization溶液 [50% formamide, 10 mM Tris-Cl(pH 7.6), 200 μg/ml tRNA, 1 x

Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, 0.6 M NaCl, 0.25% SDS] 中で65℃、3時間のprehybridizaionの後、煮沸し急冷させたディゴキシゲニンラベルRNAプローブを加え、65℃、16～18時間、hybridizationを行なった。hybridization後、2 x SSC、室温で5分の洗浄を2回、0.2 x SSC/0.2% SDS溶液中で65℃、15分の洗浄を2回繰り返した。洗浄後、DIG Detection Kit (Boehringer) を用い、kitの方法に従い、検出を行なった。

## B. メダカP450scc mRNAの発現

### a. total RNAの抽出

各時刻にメダカから卵巣を摘出し、卵巣から時計用ピンセットで濾胞卵を1個ずつ単離し、大きさごとに分別した。濾胞卵に穴をあけ、メダカRinger液で数回洗浄することにより卵黄を除去してから、グアニジン酸溶液を加えてhomogenizeし、フェノール、クロロフォルム処理の後、イソプロパノール沈澱によりtotal RNAを回収した。

### b. Northern hybridization

ニジマスの場合 (II.1.A.f) と同様にして行なった。

## 2. 結果

### a. ニジマス血中プレグネノロン量の変化

ニジマス血清100  $\mu$ lよりステロイドを抽出し、プレグネノロン量をRIA法により測定した。また、それぞれの個体について、何も添加せずに卵をニジマスRinger液中で培養 (Control)、及び17  $\alpha$ , 20  $\beta$ -DPの前駆物質である17  $\alpha$ -hydroxyprogesterone (17  $\alpha$ -OH Prog)を添加して培養したものの17  $\alpha$ , 20  $\beta$ -DP量を測定し、17  $\alpha$ , 20  $\beta$ -DP産生が検出されたか否かを表3に示した。

表3より、卵形成過程が進み、卵径の増大とともにプレグネノロン量も増加する傾向にあり、卵成熟中の個体での血中プレグネノロン量が最も高いことが明らかとなった。また、プレグネノロン量は17  $\alpha$ , 20  $\beta$ -DP産生が検出されるような、つまり、20  $\beta$ -HSDがあると考えられる卵成熟中、もしくは卵成熟に近い時期の個体で増大することが予想された。

### b. ノーザンプロット解析

#### A. ニジマスP450scc mRNAの発現

各大きさの卵より、poly A<sup>+</sup> RNAを調製し、ノーザンプロット解析を行なった (図10)。プローブはニジマスP450scc cDNA (1.8 kb) を鋳型として合成したディゴキシゲニンラベルRNAプローブを使用した。

この結果より、卵濾胞細胞層のP450scc mRNA量は卵径が小さいもので少なく、卵径が大きくなるに従いその発現量が増加する傾向にあることが明らかになった。

#### B. メダカP450scc mRNAの発現

各時刻にtotal RNAを調製し、ノーザンプロット解析を行なった (図11)。プローブはメダカP450scc cDNA (1.2 kb) を鋳型として合成したディゴキシゲニンラベルRNAプローブを使用した。

この結果より、産卵17時間前にP450scc mRNAの発現は最も多く、ついで産卵14~11時間前でも発現は検出されるがその量は少なかった。その他の時刻では検出できず、メダカP450scc mRNAは発現の増加する時期が限られていることが示唆された。

### 3. 考察

卵母細胞における卵黄形成や卵成熟は、それを取り囲む体細胞性の卵濾胞細胞で生成されるステロイドホルモンの働きで起こる (Nagahama, 1987a)。サケ科魚類では卵黄形成促進ホルモンは $17\beta$ -Estradiol、卵成熟誘起ホルモンは $17\alpha, 20\beta$ -DPと同一とされている (Nagahama, 1987a)。これら2種のホルモンはいずれも卵濾胞細胞内に蓄えられていると考えられるコレステロールから生合成される。P450sccはコレステロールをプレグネノロンに転換させる酵素であり、 $17\beta$ -Estradiolや $17\alpha, 20\beta$ -DPの生合成の鍵となるものである。しかし、この酵素が卵形成過程でどのような機能を果たすのか、特にサケ科魚類の場合の卵濾胞細胞にみられる $17\beta$ -Estradiolから $17\alpha, 20\beta$ -DPのステロイド合成系の転換にP450sccがどのような役割を果たすのか極めて興味ある問題である。しかし、このような点に関しては3種 (ヒト、ウシ、ラット) でP450sccのcDNAがクローニングされている哺乳類でもほとんど解析されていないというのが現状である。

ニジマスのP450sccをプローブとして用いたノーザンブロット解析により、ニジマスの卵形成過程における卵濾胞細胞層のP450scc mRNA量の変動がはじめて明らかにされてきた。P450scc mRNAは卵黄形成初期から排卵後の卵濾胞組織まで量的変動はみられるものの、常に存在していた。このことは $17\beta$ -Estradiolや $17\alpha, 20\beta$ -DPがいずれもコレステロールから生成されることから当然といえる。

ここで興味あるのは、卵形成過程のニジマス卵濾胞細胞層にみられたP450scc mRNA量の変動パターンである。すなわち、P450scc mRNA量は卵黄形成初期に低く、卵形成の進行に伴ってその量が上昇し、卵成熟期に最大となった。前述したように、ニジマスの卵形成過程は卵黄形成期と卵成熟期とに大別することができ、各々の時期に関連するステロイドホルモンも異なる (Kagawa et al., 1983; Kanamori et al., 1988)。本研究では、この二つの卵形成過程を、卵胞における $20\beta$ -HSD (卵成熟誘起ホルモンである、 $17\alpha, 20\beta$ -DPの産生を触媒する酵素) の存在の有無を指標として区別した。 $20\beta$ -HSD活性の有無は、いろいろな卵形成過程にある卵胞から顆粒膜細胞層を分離し、 $17\alpha, 20\beta$ -DPの前駆体である $17\alpha$ -hydroxyprogesterone ( $17\alpha$ -OH Prog) の存在、非存在下で培養して、培養液に放出された $17\alpha, 20\beta$ -DP量をRIAで測定することにより次のように判定した。(1)培養液に前駆体の $17\alpha$ -OH Progを添加しなくても、 $17\alpha, 20\beta$ -DP産生が検出

される卵胞 →  $20\beta$ -HSDが存在しており、その基質も存在する。(2)  $17\alpha$ -OH Progを添加した時にのみ  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DPが検出される卵胞 →  $20\beta$ -HSDはすでに存在しているが、基質が不足している。

このことから卵成熟時直前から卵成熟が完了するまでの卵濾胞では、前駆体  $17\alpha$ -OH Progを  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DPに転換する  $20\beta$ -HSDは存在するものの、前駆体の供給が十分でないために  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DPの生成は起こらないと推察される。すなわち、表3の卵径3.8と4.0 mmの卵胞で、 $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DPの生成が  $17\alpha$ -OH Prog無添加群で起こらず、添加群で起こるのは、この時期の顆粒膜細胞層には前駆体ステロイド量が十分でないと考えられる。

卵濾胞細胞層におけるP450scc mRNA量は卵形成に伴い増加した。また、血中のプレグネノロン量も卵形成が進むのに伴い増加したことから、P450sccタンパク質もmRNAの増加に呼応して発現していると考えられる。従って、卵形成期後期にみられる卵濾胞細胞層でのP450scc mRNA量の急上昇は、卵成熟期に急激に上昇する  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DPの生成に必要とされる前駆物質の供給に重要な役割を果たすものと考えられる。

メダカは光周期と水温を調節することにより、卵形成過程を正確に制御することができる。このことは卵形成のホルモン制御機構を解析するための優れた実験系となる。メダカ卵胞を産卵（点灯）前2時間から23時間前まで3時間間隔で集め、各々の卵濾胞細胞層のP450scc mRNA量をメダカのP450sccをプローブとして用いたノーザンブロット解析を行ない、卵成熟過程における卵濾胞細胞層でのP450scc mRNAの発現を調べた。その結果、P450scc mRNAが検出されたのは産卵11～17時間に得られた卵胞のみであった。メダカ卵胞でも産卵前26時間ではすでに  $17\beta$ -Estradiolの生成は起こっており (Sakai et al., 1988)、20～26時間の卵胞でP450scc mRNAが認められなかったのは、用いたtotal RNAの量とノーザンブロットの検出感度の問題であると考えられる。いずれにしても産卵11～17時間前のメダカ卵胞にP450scc mRNAが特異的に検出されたのは非常に興味深い。図12に示すように (Nagahama et al., 1990)、メダカ卵で産卵前11～17時間の卵胞は濾胞組織で卵成熟誘起ホルモンである  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DPを生成する時期にあたる。したがって、メダカの場合もニジマスの場合と同様に、卵成熟期における卵成熟誘起ホルモンの多量生成のために、P450scc mRNAの発現が必須であるものと考えられる。



### III. ホルモンによるニジマス卵濾胞細胞層でのP450sccの発現

#### 1. 方法

##### a. 卵濾胞組織の培養

卵径が約3mmの濾胞卵から莢膜細胞層と顆粒膜細胞層を分離し、それぞれの組織を別々にニジマスRinger液中に入れ、 $1\mu\text{g/ml}$ の部分精製されたシロザケ生殖腺刺激ホルモン (partially purified chum salmon gonadotropin, SGA; Syndel社、Canada) を添加し、16時間、 $12\pm 2^\circ\text{C}$ で培養を行なった。SGAは培養液に直接溶かした。培養後、組織を回収し、液体窒素で急速凍結し $-80^\circ\text{C}$ で保存した。

##### b. mRNAの抽出

凍結保存された組織（莢膜細胞層と顆粒膜細胞層）から、FastTrack mRNA Isolation Kit (Invitrogen) を用い、mRNAを抽出した。

##### c. Northern hybridization

前述 (I.1.A.c) と同様の方法で行なった。ただし、hybridization 溶液は [5 x SSC, 5 x Denhardt's solution,  $200\mu\text{g/ml}$ 変性herring sperm DNA, 50% formamide, 1% SDS] を用いた。プローブはニジマスP450scc cDNAをRandom Primer Extension Labeling System (NEN) により [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]dCTPでラベルして用いた。

##### d. whole mount *in situ* hybridization

ニジマス濾胞卵をニジマスRinger液中に入れ、forskolin添加、無添加の条件下で培養を行なった。培養後、卵を氷冷した4% PFA/0.75 x PBSに移し、 $4^\circ\text{C}$ で固定し、固定後、培養用ディッシュに卵を移し、図14に示した手順でニジマスP450scc cDNAを鋳型として合成したディゴキシゲニンラベルRNAプローブを用いて、whole mount *in situ* hybridizationを行なった。また、ニジマス $3\beta\text{-HSD}$  (Sakai et al., 1993) についても同様の実験を行なった。

## 2. 結果

### a. ノーザンブロット解析

ノーザンブロット解析により、卵黄形成期のニジマス卵胞におけるGTH (SGA) によるP450scc mRNAの発現を調べた(図13)。分離した莢膜細胞層と顆粒膜細胞層を、それぞれGTHの添加群、無添加群の2群に分け培養を行ない、培養後に各実験群の組織からmRNAを抽出した。図13に示すように、GTH無添加群では、莢膜細胞層にはP450scc mRNAの発現がみられたが、顆粒膜細胞層ではほとんどみられなかった。一方、GTH添加群では、P450scc mRNAの発現は莢膜細胞層、顆粒膜細胞層の両方で認められた。

対照として、ニジマスのactin mRNAの発現について同じメンブレンを用いてノーザンブロット解析を行なったが、actin mRNAの発現量はGTHによる変動は示さなかった。(図13)。

### b. whole mount *in situ* hybridization

卵黄形成期のニジマス卵胞におけるP450scc mRNAの発現をwhole mount *in situ* hybridizationにより解析した結果を図15に示した。forskolin 無添加の卵胞では、表層に強いシグナルが斑点状に観察された。一方forskolin 添加群では、そのシグナルは全体としては弱く、シグナルの存在を示す斑点の大きさも小さかった。また、同様の実験をニジマス3 $\beta$ -HSD mRNAについても行なった結果、forskolin の添加によりシグナルは非常に強くなることが観察された。

### 3. 考察

これまで第I章ではP450sccのcDNAのクローニング、第II章では得られたcDNAを用いたノーザンブロット解析による卵形成過程における卵濾胞細胞層のP450scc mRNA量の発現量の変動について考察した。第III章では、卵濾胞細胞層におけるステロイド代謝酵素活性を制御すると考えられているGTHとforskolinを用いて、これらの薬剤によるP450scc mRNAの発現促進効果をノーザンブロット解析とwhole mount *in situ* hybridizationで解析した。

卵黄形成期のアマゴ卵胞を、GTHや濾胞細胞内のサイクリックAMP (cAMP) 量を上昇させるような薬剤とともに培養すると、卵黄形成促進ホルモンである $17\beta$ -Estradiol生成量が増加する(Kagawa et al., 1983; Kanamori and Nagahama, 1988; Kanamori et al., 1988)。GTHの作用で、サケ科魚類の卵胞で $17\beta$ -Estradiol生成される際には、まずGTHは莢膜細胞層に働いて前駆体のテストステロンの生成を促進し、このテストステロンが顆粒膜細胞層に移り、この細胞層に局在すると考えられる芳香化酵素 (P450arom) により $17\beta$ -Estradiolに転換される。卵胞における $17\beta$ -Estradiolのこのような生成機構は2細胞型モデルと呼ばれ(Adachi et al., 1990; Kagawa et al., 1982, 1985; Shulz, 1986)、成長期の哺乳類の卵胞でもこれと同様な2細胞型モデルが提唱されている(Falck, 1959; Dorrington and Armstrong, 1979; Gore-Langton and Armstrong, 1988)。卵黄形成期のニジマス卵濾胞細胞層を用いたノーザンブロット解析からも、GTH無添加の実験群では、P450scc mRNAは莢膜細胞層には認められたが、顆粒膜細胞層にはみられず、これまでのP450sccは莢膜細胞層にあるという考え(Kagawa et al., 1983)を支持する結果であった。しかし、GTHを添加すると莢膜細胞層でのP450sccの発現にはほとんど変化が認められないが、顆粒膜細胞層で明らかに発現が認められた。すなわち、GTHによって顆粒膜細胞層でのP450 mRNAの発現が促進されたことになる。

これまでになされた卵黄形成期のサケ科魚類の分離顆粒膜細胞層の単独培養実験では、培養液中にGTHを添加しても $17\beta$ -Estradiolが生成されることはなかった。しかし、培養液中に前駆体ステロイド (テストステロン) を添加して顆粒膜細胞層を培養すると、 $17\beta$ -Estradiolが生成される。このような結果から、サケ科魚類の顆粒膜細胞層には前駆体ステロイドの生成に必要なP450sccが欠如しているのではないかと考えられた。し

かし、本研究で示されたGTHによる顆粒膜細胞層でのP450scc mRNAの発現促進結果は、この仮説を支持するものではない。魚類の卵胞を材料としたこれまでの実験はすべて、分離した莢膜細胞層や顆粒膜細胞層をホルモンなどとともに培養した後の細胞や培養液中のホルモン量をRIAで測定したもの(Kagawa et al., 1983)である。この種の実験ではステロイドホルモン代謝酵素の活性を測定しており、従って、本研究でもP450sccタンパク質がGTHを添加した顆粒膜細胞層に存在するのかを調べる必要があるのは言うまでもないことで、この点に関しては現在作製中のニジマスP450sccの抗体を用いて解析する必要がある。

もし、GTH処理した顆粒膜細胞層でP450scc mRNAの発現に続き、酵素タンパク質が新しく生成され、その酵素活性も発現しているとした場合には、どのようなことが考えられるのであろうか。一つの可能性として、顆粒膜細胞層への基質の供給の問題が考えられる。GTH処理により顆粒膜細胞層でのP450sccの酵素活性の発現が誘起されているが、基質となるコレステロールが充分量供給されないためにステロイドホルモンの生成が起らないと考えることができる。

すでに述べたように、これまでのサケ科魚類の分離莢膜細胞層と顆粒膜細胞層を用いた培養実験からは、顆粒膜細胞層ではP450aromと $20\beta$ -HSDが局在すると考えられてきたが(Nagahama, 1987a, b)、本研究でGTHの刺激で他のステロイドホルモン代謝酵素の発現が起こる可能性が強く示唆され、今後はP450sccばかりでなく、遺伝子のクローニングがすでに完了している $3\beta$ -HSDやP450c17、P450aromなどの発現についても同様な方法を用いての解析を行なう必要がある。

サケ科魚類の卵胞は、卵形成過程の高い同調性、外科的手術による濾胞細胞層の分離など、卵巣における体細胞と生殖細胞との相互作用を解析するためにはきわめて優れた実験系を提供する(Nagahama, 1983, 1987a)。しかしその反面、卵が大型であるため細胞内に多量の卵黄が蓄積されており、このことが卵胞での遺伝子の発現を切片上で解析しようとする時に大きな障害となる。そこで本研究では、魚の卵胞ではじめてwhole mount *in situ* hybridizationを試みたところ、良好な結果を得ることができた。しかし、実体顕微鏡下で観察する限りではシグナルが外側の莢膜細胞層にあるのか顆粒膜細胞層にあるのかについては判別できないという欠点があった(図15)。これを克服する

ために、発色反応後、水溶性樹脂による包埋を試みたが、包埋過程に若干退色したうえ、薄切した状態ではシグナルを観察することはできなかった。

このような技術的困難性があることを前提として、whole mount *in situ* hybridizationの結果を考察する。図15に示すように、卵黄形成期の卵胞ではforskolinを添加することによってニジマスP450scc mRNAの発現の増加は認められなかった。シグナルの1つ1つの点が小さいことによる可能性もあるが、むしろ全体としてみると減少しているように見えた。この結果は、すでに述べたノーザンブロット解析によるGTHの結果とは明らかに異なる。

ここで2つの問題がある。第1に、これらの2つの実験では、mRNAの発現誘導のためにGTHとforskolinという異なる薬剤を用いていることである。第2には、ノーザンブロット解析で用いたmRNAは培養16時間の各組織から抽出したものであるが、whole mount *in situ* hybridizationでは36時間の培養後のもので行なっている。上記実験結果の相違が、これら2つの違いに起因するのか現時点ではわからない。ただ、実体顕微鏡による観察の際に、焦点を卵胞の表面から内側に変えることにより、シグナルの点が大きく斑状になっていたものと、細かい粒状になっていたものとがあり、粒状のシグナルは斑状のものとは比べやや内側に存在しているように見られた。もちろん、莢膜細胞層と顆粒膜細胞層とは密着しているので実体顕微鏡では明確に判別することができない。しかし、もし粒状にみられるシグナルが顆粒膜細胞層にあるとするならば、粒状のシグナルはforskolin無添加群で少なく、添加群では1つ1つのシグナルは小さいがはっきりと検出されたため、forskolinにより顆粒膜細胞層でP450scc mRNAの発現が誘導されたと考えることができる。また、莢膜細胞層での発現量の減少は培養時間が36時間であることに起因しているのかも知れない。

これらの可能性についての検証は、まずmRNAのシグナルが莢膜細胞層と顆粒膜細胞層のどちらに局在するのかを正確に決定することが先決であり、この点に関して、引き続きwhole mount *in situ* hybridization法を改良するとともに、通常の組織切片や電顕による観察も併せて検討したいと考えている。

本研究で新しく開発された卵胞の遺伝子発現を解析するためのwhole mount *in situ* hybridizationは、卵胞全体における遺伝子・タンパク質発現の分布を知るという意味

で非常に優れた方法であり、今後種々ステロイドホルモン代謝酵素遺伝子・タンパク質の卵形成過程での発現の変動を解析する際の有力なアプローチとなるものと考えられる。

#### IV. まとめ (要旨)

本研究は、魚類卵巣における卵形成促進ホルモン ( $17\beta$ -Estradiol) と卵成熟誘起ホルモン ( $17\alpha$ 、 $20\beta$ -DP) の生合成に共通に関わるステロイド代謝酵素であるP450scc (コレステロールから各種ステロイドが生合成されるための最初の反応を触媒する酵素) に注目して、その遺伝子のクローニング及び卵形成過程での卵濾胞細胞層における発現を明らかにする目的で行われた。得られた結果を以下にまとめる。

(1) ニジマスとメダカの卵濾胞細胞層cDNAライブラリーを作製し、そこからニジマスはヒトP450scc cDNAをプローブとして、メダカはニジマスP450scc cDNAをプローブとしてスクリーニングを行ない、両種のP450sccのcDNAをクローニングした。このうちニジマスのcDNAは全長を含み、アミノ酸レベルで哺乳類のP450sccとは46~48%、メダカとは約80%の相同性がみられた。

(2) このニジマスP450scc様cDNAを、哺乳類のCOS-1細胞にトランスフェクションさせると、COS-1細胞に25-hydroxycholesterolをプレグネノロンに転換させるP450scc酵素活性が発現した。このことから、ここで得られたcDNAをニジマスP450sccのcDNAと同定した。

(3) P450sccのN末39個のアミノ酸をコードする領域を欠くcDNAを作製し、これをCOS-1細胞にトランスフェクションさせると、全長を遺伝子導入した場合とは異なり、この細胞にP450scc活性は発現しなかった。これらの結果より、P450sccの活性発現にN末アミノ酸が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(4) ニジマス卵濾胞細胞層には、1.8 kbのmRNAが認められた。このmRNAは、卵形成の期間を通してニジマス卵胞に常に発現していたが、その発現量は卵形成の進行に伴って増加し、卵成熟期に最大となった。また、メダカ卵濾胞細胞層でのP450scc mRNAの発現は、卵成熟期直前の産卵前11~17時間の卵胞に限られた。このような卵成熟時におけるP450scc mRNAの発現量の増大は、卵成熟時にみられる卵成熟誘起ホルモンの生成に必要なステロイド前駆体の供給に深く関わっていると推察される。

(5) 卵黄形成期のニジマスの莢膜細胞層には、ホルモン (GTH) 刺激の有無に関係なく常にP450scc mRNAの発現がみられた。一方、顆粒膜細胞層ではGTHの刺激を加えた場合にP450scc mRNAの発現が起こった。この顆粒膜細胞でのGTHによるP450scc mRNAの新たな

発現は、卵成熟期における $17\alpha$ 、 $20\beta$ -DP生成量の急激な増大に必要とされるステロイド前駆体の供給に、P450scc mRNAが重要な役割を果たしていると推察される。

(6) whole mount *in situ* hybridization法を、卵胞での遺伝子発現の研究にはじめて応用することにより、卵黄形成期のニジマス卵濾胞細胞にP450scc mRNAが斑点状に発現することが明らかとなった。この手法は卵胞でのステロイド代謝酵素遺伝子発現の研究にきわめて有効であると考えられる。

以上、本研究により、魚類のP450sccのcDNAをクローニングすることができ、そのcDNAを用いて卵濾胞細胞層P450sccのmRNAの発現量の卵形成過程での変動を明らかにすることができた。さらに、その遺伝子の卵濾胞組織における局在、ホルモンによる発現調節に関しても、いくつかの興味ある知見が得られた。これらの研究は、今後卵巣における性ホルモンの生成機構や卵形成での役割を遺伝子レベルで解明するための糸口となるだろう。



## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始懇切な指導を賜りました長濱嘉孝教授ならびに技術的な指導と助言を賜りました田中実博士に深く感謝致します。

ニジマスcDNAライブラリーの作製、ニジマス $3\beta$ -HSDの供与、及び種々の指摘を下さいました酒井則良博士、メダカRNAサンプルとヒトのP450sccのcDNAクローンをそれぞれ快く提供して下さいました深田幸子技官と松山倫也博士、及びWalter L. Miller教授（カリフォルニア大学、サンフランシスコ）、有益な討論を頂きました山下正兼博士、吉国通庸博士、及び基礎生物学研究所・生殖研究部門の皆様に感謝致します。

## 参考文献

- Abraham,G.E., Buster,J.E., Kyle,F.W., Corrales,P.C. and Teller,R.C. (1973) Radioimmunoassay of plasma pregnenolone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 37, 40-45.
- Adachi,S., Kajiura,H., Kagawa,H. and Nagahama,Y. (1990) Identification of aromatizable androgens secreted by isolated thecal cell layers from vitellogenic ovarian follicles of a teleost, amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biomed.Res.*, 11, 359-373.
- Chung,B.C., Matteson,K.J., Voutilainen,R., Mohandas,T.K. and Miller,W.L. (1986) Human cholesterol side-chain cleavage enzyme,P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83, 8962-8966.
- Cox,K.H., DeLeon,D.V., Angerer,L.M. and Angerer,R.C. (1984) Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev.Biol.*, 101, 485-502.
- Dorrington,J.H., and Armstrong,D.T. (1979) Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Prog.Horm.Res.*, 35, 301-342.
- Falck,B. (1959) Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol.Scand.*, 47, Suppl. 163, 1-101.
- Gore-Langton,R.E. and Armstrong,D.T. (1988) Follicular steroidogenesis and its control. *The Physiology of Reproduction.*, pp331-385 Raven Press, Ltd., New York.
- Gotoh,O. and Fujii-Kuriyama,Y. (1988) Evolution, structure, and gene regulation of cytochrome P-450. "In *Frontier in Biotransformation*" (ed by Ruckpaul,K.) pp195-243 Akademie-Verlag, Berlin.
- Gotoh,O., Tagashira,Y., Iizuka,T. and Fujii-Kuriyama,Y. (1983) Structural characteristics of cytochrome P-450. Possible location of the heme-binding cysteine in determined amino-acid sequences. *J.Biochem.*, 93, 807-817.
- Honda,S., Morohashi,K. and Omura,T. (1991) Novel cAMP regulatory elements in the promoter region of bovine P-450(11 $\beta$ ) gene. *J.Biochem.*, 108, 1042-1049.
- Inoue,H., Watanabe,N., Higashi,Y. and Fujii-Kuriyama,Y. (1991) Structures of regulatory regions in the human cytochrome P450-scc (desmolase) gene. *Eur.J.Biochem.*, 195, 563-569.
- Kagawa,H., Young,G. and Nagahama,Y. (1983) Relationship between seasonal plasma estradiol-17 $\beta$  and testosterone levels and In vitro production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biol.Reprod.*, 29, 301-309.

- Kagawa,H., Young,G. and Nagahama,Y. (1984) In vitro estradiol-17 $\beta$  and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 54, 139-143.
- Kagawa,H., Young,G., Adachi,S. and Nagahama,Y. (1982) Estradiol-17 $\beta$  production in amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: role of the thecal and granulosa cells. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 47, 440-448.
- Kagawa,H., Young,G., Adachi,S. and Nagahama,Y. (1985) Estrogen synthesis in the teleost ovarian follicle: the two-cell type model in salmonids. In "Salmonid Reproduction" (R.N.Iwamoto and S.Sower, eds.), pp20-25 Washington Sea Grant Program, University of Washington, Seattle.
- McPhaul,M.J., Noble,J.F., Simpson,E.R., Mendelson,C.R. and Wilson,J.D. (1988) *J.Biol.Chem.*, 263, 16358-16363
- Kanamori,A. and Nagahama,Y. (1988) Involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate in the control of follicular steroidogenesis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Gen.Comp.Endocrinol.*, 72, 39-53.
- Kanamori,A., Adachi,S. and Nagahama,Y. (1988) Development changes in steroidogenic responses of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 72, 13-24.
- Kawauchi,H., Suzuki,K., Nagahama,Y., Adachi,S. and Naito,N. (1986) Occurrence of two distinct gonadotropins in chum salmon pituitary. In "Symp. on Pituitary Gland-Structure, Function and Regulation" (Yoshimura,F. and Gorbman,A. eds.), pp383-390 Elsevier Sci.Pub.BV, Amsterdam.
- Kumamoto,T., Ito,A. and Omura T. (1989) Critical region in the extension peptide for the import of cytochrome P-450(SCC) precursor into mitochondria. *J.Biochem.*, 105, 72-78.
- Lindner,H.R., Bar-Ami,S., and Tsafiriri,A. (1980) Model systems for studying oocyte maturation. "Animal Models in Human Reproduction" pp65-85 Raven Press, New York.
- Martin,C.R. (1985) "*Endocrine Physiology*" Oxford University Press, New York.
- Moore,C.C.D., Brentano,S.T. and Miller W.L. (1990) Human P450scc gene transcription is induced by cyclic AMP and repressed by 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate and A23187 through independent *cis* elements. *Mol.Cell.Biol.*, 10, 6013-6023.
- Morohashi,K., Fujii-Kuriyama,Y., Okada,Y., Sogawa,K., Hirose,T. and Inayama,S. (1984) Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for mRNA of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) of bovine adrenal cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81, 4647-4651.

Mulheron,G.W., Stone,R.T., Miller,W.L. and Wise,T. (1989) Nucleotide sequence of cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage cDNA isolated from porcine testis. *Nucleic Acids Res.*, 17, 1773.

Nagahama,Y.(1983) The functional morphology of teleost gonads. In "Fish Physiology" (W.S.Hoar, D.J.Randall and E.M.Donaldson,eds.), Vol.IXA, pp223-275 Academic Press, New York.

Nagahama,Y.(1986) Testis.In "Vertebrate Endocrinology: Applications to implications" (P.K.T.Pang and M.P.Schreibman, eds.), vol.1, pp399-437 Academic Press, New York

Nagahama, Y.(1987a) Gonadotropin action on gametogenesis in teleost gonads. *Zool.Sci.*, 4, 209-222.

Nagahama,Y. (1987b) 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: A teleost maturation-inducing hormone. *Dev.Growth Differ.*, 29, 1-12.

Nagahama,Y., and Adachi,S. (1985) Identification of a maturation-inducing steroid on a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Biol.*, 109, 428-435.

Nagahama,Y., Young,G. and Kagawa,H. (1985) Steroidogenesis in the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) ovarian follicles: a two cell -type model. In "Current Trends in Comparative Endocrinology" (B.Lofts and W.N.Holmes, eds.), pp239-241 Hong Kong University Press, Hong Kong.

長濱嘉孝, 酒井則良, 深田幸子 (1990) 卵細胞の成熟 "メダカの生物学", pp46-58

Ono,H., Iwasaki,M., Sakamoto,N.and Mizuno,S. (1988) cDNA cloning and sequence analysis of a chicken gene expressed during the gonadal development and homologous to mammalian cytochrome P-450c17. *Gene*, 66, 77-85

Oonk,R.B., Parker,K.L., Gibson,F.L. and Richards,J.S. (1990) Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450(P-450scc) gene. *J.Biol.Chem.*, 265, 22392-22401.

Picado-Leonard,J. and Miller,W.L.(1988) Homologous sequences in steroidogenic enzymes, steroid receptors and a steroid binding protein suggest a consensus steroid-binding sequence. *Mol.Endocrinol.*, 2, 1145-1150.

Rice,D.A., Mouw,A.R., Bogerd,A.M. and Parker,K.L. (1991) A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol.Endocrinol.*, 5, 1552-1561.

Richards,J.S. (1979) Hormonal control of ovarian follicular development. *Recent Progress in Hormone Research*, 35, 343-373.

- Richards,J.S., Jahnsen,T., Hedin,L., Lifka,J., Ratoosh,S., Durica,J.M. and Goldring, N.B. (1987) Ovarian follicular development: From physiology to molecular biology. Recent Progress in Hormone Research, 43, 231-276.
- Sakai,N., Iwamatsu,T., Yamauchi,K., Suzuki,N. and Nagahama,Y. (1988) Influence of follicular development of steroid production in the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicles on response to exogenous substances. Gen.Comp.Endocrinol., 72, 13-24.
- Sakai,N., Tanaka,M., Adachi,S., Miller,W.L. and Nagahama,Y. (1992) Rainbow trout cytochrome P-450c17(17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase) cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P-450c17 mRNA expression during oogenesis. FEBS Letters, 301, 60-64.
- Sakai,N., Tanaka,M., Takahashi,M., Adachi,S. and Nagahama,Y. (1993) Isolation and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian cDNA encoding 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase /  $\Delta^5$ -4-isomerase. Fish Physiol.Biochem. (in press)
- Schulz,R. (1986) Immunohistological localization of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone in the ovary of the rainbow trout (*Salmo Gairdneri* Richardson) during the preovulatory period. Cell Tissue Res., 245, 629-633.
- Stevens,V.L., Xu,T. and Lambeth,D. (1992) Cholesterol pools in rat adrenal mitochondria: Use of cholesterol oxidase to infer a complex pool structure. Endocrinol., 130, 1557-1563.
- Tanaka,M., Telecky,T.M., Fukada,S., Adachi,S., Chen,S. and Nagahama,Y. (1992) Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 $\beta$ . J.Mol.Endocrinol., 8, 53-61.
- Wallace,R.A. (1981) Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer.Zool., 21, 325-343.
- Waterman,M.R., and Simpson,E.R. (1989) Regulation of steroid hydroxylase gene expression is multifactorial in nature. Recent Progress in Hormone Research, 45, 533-566.
- 吉国通庸, 山下正兼, 長濱嘉孝 (1989) 卵成熟の分子機構. 細胞工学, 8, 878-890
- Young,G., Ueda,H. and Nagahama,Y. (1983) Estradiol-17 $\beta$  and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one production by isolated ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) in response to mammalian pituitary and placental hormones and salmon gonadotropin. Gen.Comp.Endocrinol., 52, 329-335.

Young,G., Kagawa,H. and Nagahama,Y. (1984) Role of the thecal and granulosa cells in the production of maturation-inducing steroid by ovarian follicles of salmonid fishes. *Gen.Comp.Endocrinol.*, 53, 455

Young,G., Adachi,S. and Nagahama,Y. (1986) Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing substance ( $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one). *Dev.Biol.*, 118, 1-8.

## 図及び表

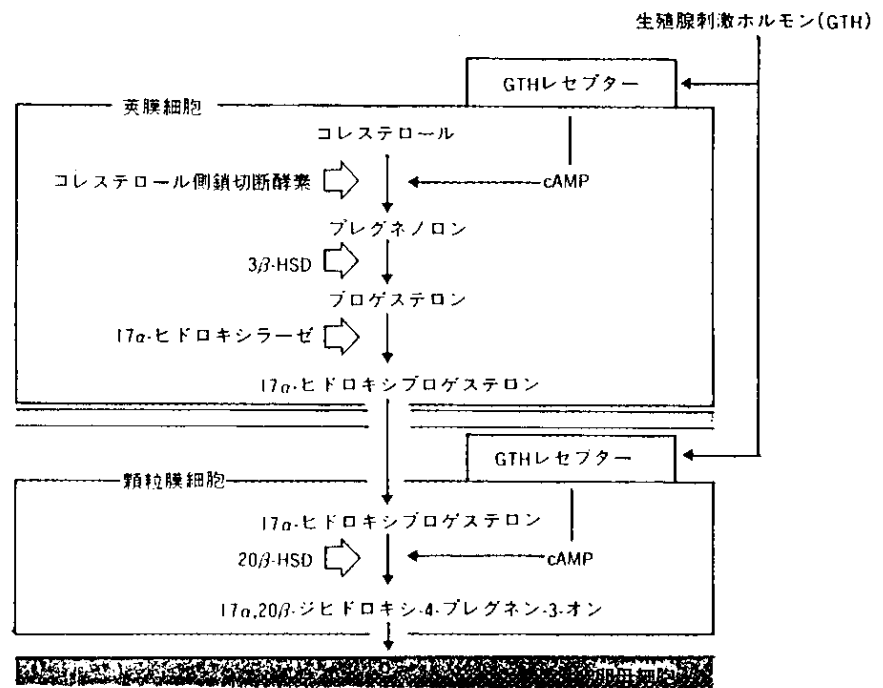


図1. サケ科魚のMIS産生における2細胞型モデル

3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase

20 $\beta$ -HSD: 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase

MIS: maturation-inducing substance 卵成熟誘起物質



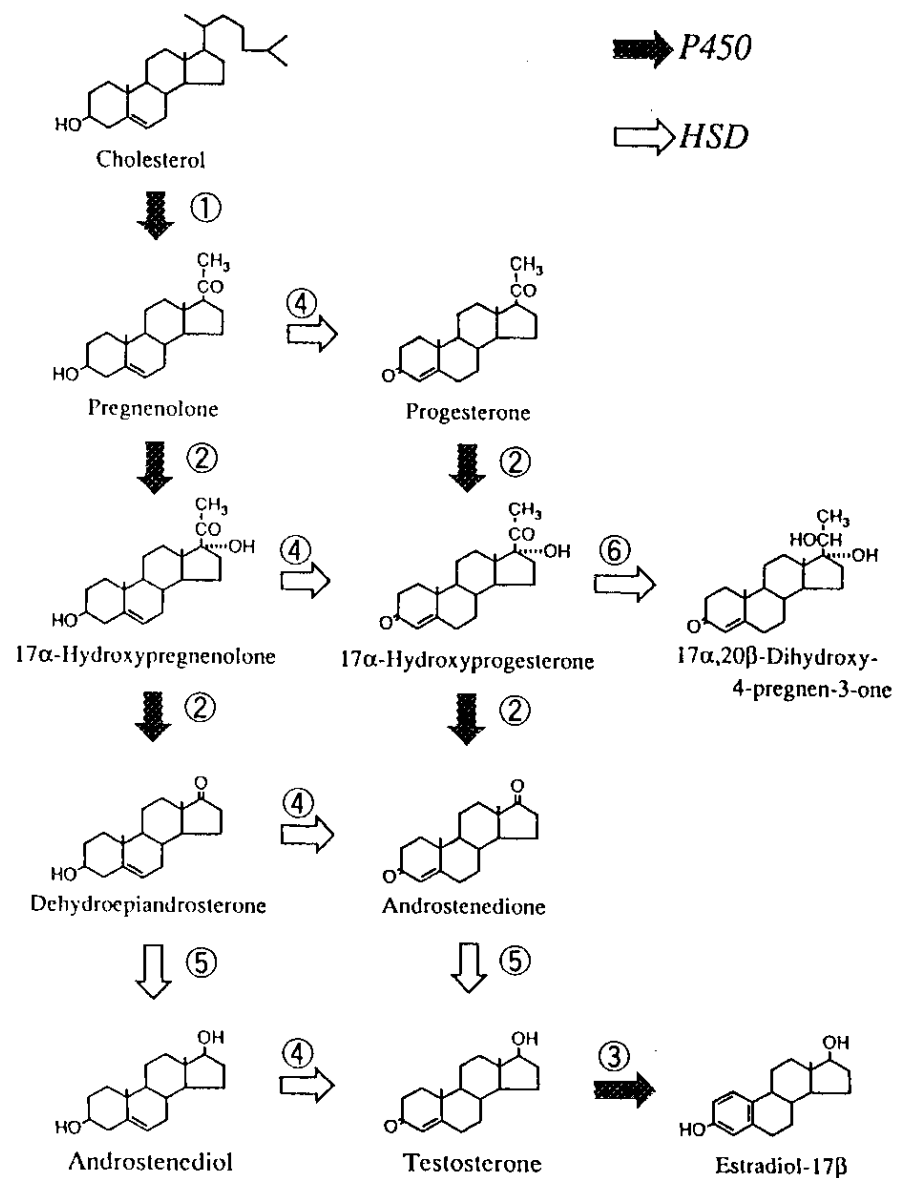


図2. 卵濾胞細胞におけるステロイド代謝経路

①P450scc, ②P450c17, ③P450arom, ④3 $\beta$ -HSD, ⑤17 $\beta$ -HSD, ⑥20 $\beta$ -HSD

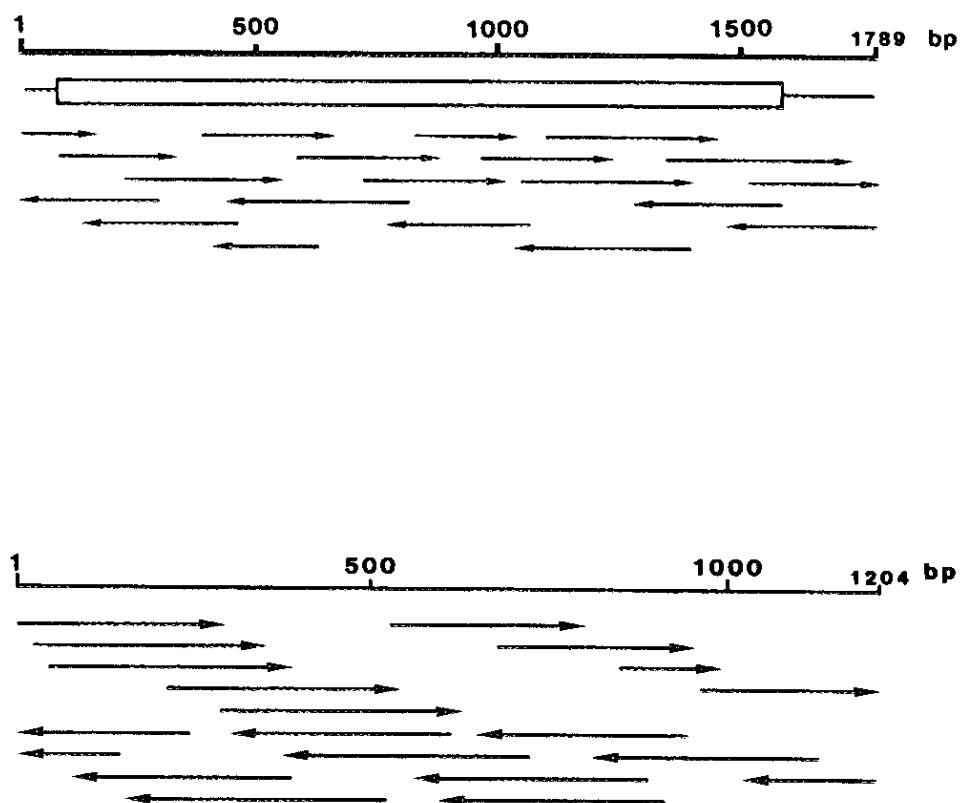
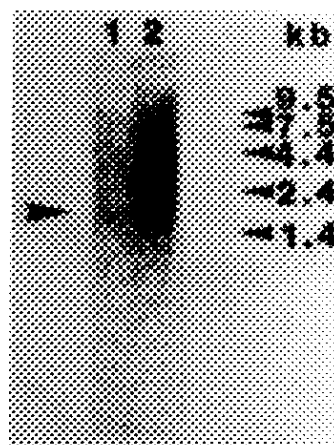


図3. cDNAの塩基配列決定方針

- A. ニジマス莖膜細胞層cDNAライブラリーより単離した約1.8kb cDNAの塩基配列決定方針  
枠内は、open reading frame を示す。水平方向の矢印は塩基配列を決定した範囲を示す。
- B. メダカ卵濾胞細胞層cDNAライブラリーより単離した約1.2kb cDNAの塩基配列決定方針  
水平方向の矢印は塩基配列を決定した範囲を示す。

A. Trout mRNA



B. Medaka mRNA

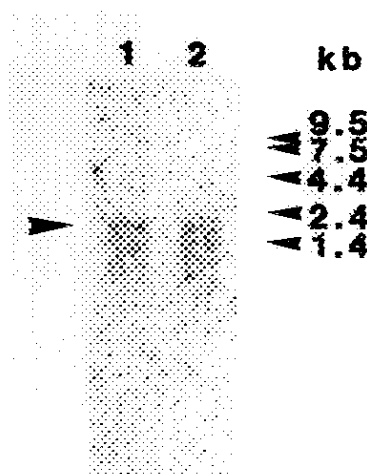


図4. ノーザンブロット解析

A. ヒトP450<sub>scc</sub> cDNAを<sup>32</sup>Pラベルし、プローブとして用いた。各レーンには、ニジマス卵濾胞細胞層より抽出した1 $\mu$ gのpoly A<sup>+</sup> RNAを泳動した。hybridization溶液中のformamide濃度を20%と30%の2種について行なった。

1: formamide 20%, 2: formamide 30%

B. ニジマスP450<sub>scc</sub> cDNAを<sup>32</sup>Pラベルし、プローブとして用いた。各レーンには、メダカ卵濾胞細胞層より抽出した1 $\mu$ gのpoly A<sup>+</sup> RNAを泳動した。hybridization溶液中のformamide濃度を20%と30%の2種について行なった。

1: formamide 20%, 2: formamide 30%

10	20	30	40	50	60
AAAAGAAACAGACAGAAGAAGAGTTGGAAGAAGTGAGGTAGGATAGAGACGCTGCTATGA					
					M M
70	80	90	100	110	120
TGGTGAGCTGGAGTGTGTGTCGCAGTTCCCTGGCTCTGCCAGCATGTGGACTACCCAGTG					
V S W S V C R S S L A L P A C G L P S A					
130	140	150	160	170	180
CCCCGCAAACTCCAGTATGCCGGTGGTGCGCCAGGCTCTGTCCCCAGACAACAGCAGTA					
R H N S S M P V V R Q A L S P D N S S T					
190	200	210	220	230	240
CGGTCCAGAACTTCAGTGAGATCCCAGGTCTCTGGAGAAACGGACTCGCCAACCTCTACA					
V Q N F S E I P G L W R N G L A N L Y S					
250	260	270	280	290	300
GTTTCTGGAACTAGACGGATTCAGGAACATCCACAGAGTCATGGTGCACAACTTCAACA					
F W K L D G F R N I H R V M V H N F N T					
310	320	330	340	350	360
CCTTCGGTCCAATATACAGGGAGAAGATAGGCTACTATGATAGTGTAACATTATAAAGC					
F G P I Y R E K I G Y Y D S V N I I K P					
370	380	390	400	410	420
CGGAGATGCCAGCCATCTTGTTCAGGACAGAAAGGACACTACCCCAAGAGGTAAACGGTGG					
E M P A I L F K A E G H Y P K R L T V E					
430	440	450	460	470	480
AGGCATGGACCTCATAACAGAGACTACAGGAACAGGAAATATGGAGTCCTGCTCAAGAATG					
A W T S Y R D Y R N R K Y G V L L K N G					
490	500	510	520	530	540
GGGAGGACTGGCGGTCCAACAGGGTGATTCTGAATAGAGAGGTGATCTCTCCCAAGGTGT					
E D W R S N R V I L N R E V I S P K V L					
550	560	570	580	590	600
TGGGGAACCTTTGTTCTCTGTTGGATGAGGTTGGGCAGGACTTTGTGGCCCGAGTACATA					
G N F V P L L D E V G Q D F V A R V H K					
610	620	630	640	650	660
AGAAGATAGAAAGGAGTGACAGGACAAATGGACCACCGATCTTTCTCAAGAACTCTTCA					
K I E R S G Q D K W T T D L S Q E L F K					
670	680	690	700	710	720
AATACGCTCTGGAATCGGTGGGTTTCAGTTCTGTATGGGGAACGTCTGGGCCTGATGTTGG					
Y A L E S V G S V L Y G E R L G L M L D					
730	740	750	760	770	780
ACTACATCAACCCTGAGGCCCAACACTTCATTGACTGCATCTCTCTGATGTTCAAGACTA					
Y I N P E A Q H F I D C I S L M F K T T					
790	800	810	820	830	840
CCTCTCCCATGCTGTACATCCCCCGCCATGCTGAGGAGGGTAGGAGCCAAGATCTGGA					
S P M L Y I P P A M L R R V G A K I W R					
850	860	870	880	890	900
GAGATCACGTAGAGGCCTGGGATGGCATCTTCAACCAGGCGGACCGCTGCATCCAGAACA					
D H V E A W D G I F N Q A D R C I Q N I					
910	920	930	940	950	960
TCTACAGGACGATGCGTCAGGACACTAACACCCACGGGAAGTATCCAGGAGTCCTGGCCA					
Y R T M R Q D T N T H G K Y P G V L A S					
970	980	990	1000	1010	1020
GCCTTCTGATGTTAGACAAGCTGTCTATAGAGGATATCAAGGCCAGCGTCACTGAACTGA					
L L M L D K L S I E D I K A S V T E L M					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TGGCTGGAGGGGTAGACACGACATCTATACCCTGCTGTGGACTCTATATGAGCTTGCCA					
A G G V D T T S I T L L W T L Y E L A R					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GACACCCTGACCTCCAGGAAGAGTTGAGGGCTGAGGTGGCTGTAGCCAGACAGTCTACCC					
H P D L Q E E L R A E V A V A R Q S T Q					

```

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
AGGGAGACATGCTACAGATGCTGAAGATGATACCGCTGGTCAAAGGAGCGCTGAAGGAAA
  G  D  M  L  Q  M  L  K  M  I  P  L  V  K  G  A  L  K  E  T
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
CGCTGAGGCTTCATCCAGTTGCAGTCAGTTTACAGAGATACATTACAGAGGAAATCGTCA
  L  R  L  H  P  V  A  V  S  L  Q  R  Y  I  T  E  E  I  V  I
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
TTCAGAACTATCACATACCTTGTGGGACTCTGGTCCAGTTGGGTCTCTATGCGATGGGTA
  Q  N  Y  H  I  P  C  G  T  L  V  Q  L  G  L  Y  A  M  G  R
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
GAGACCCAGATGTGTTCCCCAGACCTGAGAAGTACCTCCCGTCCCGCTGGCTGCGGACAG
  D  P  D  V  F  P  R  P  E  K  Y  L  P  S  R  W  L  R  T  E
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
AGAACCAGTACTTCAGGAGCTTGGGCTTCGGATTGACCCAGACAGTGTCTTGGACGGC
  N  Q  Y  F  R  S  L  G  F  G  F  G  P  R  Q  C  L  G  R  R
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
GCATAGCTGAGACGGAGATGCAGCTCTTCCTTATACATATGCTGGAGAACTTCAGAGTAG
  I  A  E  T  E  M  Q  L  F  L  I  H  M  L  E  N  F  R  V  D
      1510      1520      1530      1540      1550      1560
ATAAACAGCGTCAGGTGGAGGTGCACAGTACCTTCGAGTTGATCTTGTGTCAGAGAAAC
  K  Q  R  Q  V  E  V  H  S  T  F  E  L  I  L  L  P  E  K  P
      1570      1580      1590      1600      1610      1620
CCATTCTTCTGACCCTGAAGCCTCTAAAGAGCGGCCAGTGATATCATGAAGCCTCTACAC
  I  L  L  T  L  K  P  L  K  S  G  Q  *
      1630      1640      1650      1660      1670      1680
AGCAGACAGTGATATCATGAAGCCTCTACACAGCAGACAGTGACATCATGAAGCCTCTAC
      1690      1700      1710      1720      1730      1740
ACAGCAGACAGTGACATCATGAAGCCTCTACTCTGTAAGGTCAAAGCGTAAGAAAATTC
      1750      1760      1770      1780
TAACATTGTTTTAATAAACAATAATAACTTGAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図5. ニジマスP450scc様cDNAの塩基配列と推定されるアミノ酸配列

open reading frameから推定されるアミノ酸の配列を塩基配列の下（コドンの最初の塩基の下）に示した。

ポリアデニル化シグナル"AATAAA"は下線で示した。

```

      10      20      30      40      50      60
GAGACAGGAACCTCTGAGAAATACCCAGGAGTCTGGCTAGCCTCCTGATGTTGGACAAG
E T G T S E K Y P G V L A S L L M L D K
      70      80      90     100     110     120
CTGTCCATTGAAGACATTAAGGCCAGCATCACTGAGCTAATGGCTGGAGGAGTAGATACA
L S I E D I K A S I T E L M A G G V D T
      130     140     150     160     170     180
ACTTCCATAACACTCCTATGGACTTTGTATGAATTAGCCAGACACCCCAGCCTCCAGGAG
T S I T L L W T L Y E L A R H P S L Q E
      190     200     210     220     230     240
GAACTGAGGTTGGAGGTGGCTGCAGCTCGAGCTGCAAGTCAGGGAGACATGATGGAGATG
E L R L E V A A A R A A S Q G D M M E M
      250     260     270     280     290     300
CTGAAGCGGGTTCCTTTGATCAAAGGGGCTATAAAAGAAACATTAAGGTTACATCCTGTT
L K R V P L I K G A I K E T L R L H P V
      310     320     330     340     350     360
GCCGTGAGTCTGCAAAGATACATTACAGAGGATATAGTGATTCAAAACTACCACATCCCG
A V S L Q R Y I T E D I V I Q N Y H I P
      370     380     390     400     410     420
GCTGGGACTTTGGTCCAGTTGGGATTGTATGCAATGGGAAGGGACCCTAAGGTGTTCTTT
A G T L V Q L G L Y A M G R D P K V F F
      430     440     450     460     470     480
CGTCCAGAGCAGTATCAGCCCTCCCGCTGGCTGAGGACAGAGACACACTACTTCAGAAGC
R P E Q Y Q P S R W L R T E T H Y F R S
      490     500     510     520     530     540
TTAGGATTCGGCTTTGGCCCTCGCCAGTGTTTAGGACGCAGAATAGCTGAGACAGAGATG
L G F G F G P R Q C L G R R I A E T E M
      550     560     570     580     590     600
CAGATCTTCCTCATCCACATGCTTGAGAACTTCAGAGTGGAGAAACAGCGACACATTGAA
Q I F L I H M L E N F R V E K Q R H I E
      610     620     630     640     650     660
GTGCAGAGTACCTTTGAGCTTATTCTCTTACCAGACAAACCAATAATACTGACTTTGAAA
V Q S T F E L I L L P D K P I I L T L K
      670     680     690     700     710     720
CCACTACAAGCTAATCCCTAGCATCAAGCTGGAAGATTTGTGGTGTGCGGTAAGTAAAGA
P L Q A N P *
      730     740     750     760     770     780
TGAATTCTGTTGCCCTGTTTCCCTCCCATTCAATTGTAAAGGGCTTACCAAACACCACTT
      790     800     810     820     830     840
TAAAAAGGTTGGAATCTTCCAAAACGTCAACAGGGAGTGACAAAACATTAGGAAAGGA
      850     860     870     880     890     900
AAAAAGAGCTGCAATGGACATCAAGGACCTCATTGATTGACTATCTAATTTAGAAAGCAC
      910     920     930     940     950     960
TTATATATACTGTACATACTTTATTTAGAGATTTGACTAGCTTTAAAAAGTGTAATGTACA
      970     980     990    1000    1010    1020
ATGTGTTGAAAAAAGTGAATGTACATGCAGATAAAAAAGATGTATTTATATAAGCTTAAT
      1030    1040    1050    1060    1070    1080
AAAGAATAGAAATGATGTTAAAAATGTAATTATTTTGCATTTTATATGAAAATTAAGACAG
      1090    1100    1110    1120    1130    1140
TTTTGTTTATCAAGAATGACTGTGAAGGTTCTGACGCTTACTCCGTTTGCAAAAAACATT
      1150    1160    1170    1180    1190    1200
TTTTTCCCCATTAGAATTTATTTTGACATGAACAA AATAAAGGCATGTTCCCTAAAAACAAA
AAAA

```

図6. メダカP450scc様cDNAの塩基配列と推定されるアミノ酸配列

推定されるアミノ酸の配列を塩基配列の下（コドンの最初の塩基の下）に示した。  
ポリアデニル化シグナル"AATAAA"は下線で示した。

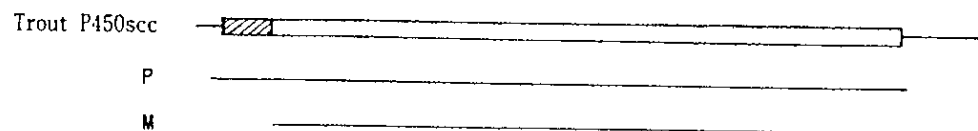


図7. COS-1細胞へのトランスフェクションに用いたDNAの領域

Trout P450scc cDNAのopen reading frameをboxで示した。bovineの延長ペプチドをコードする領域に相当する領域を斜線で示した。

Bovine:	MLARGLP	RSAL	VKAC	PPIL	STV	GEGW	GHRV	GTGEGAG
Human :	MLAKGL	PPRSV	LVKGY	QTFL	SAP	REGL	GRLR	VP
Rat :	MLAKGL	CLRSV	LVKSC	QPFL	SPV	WQGP	GLA---	TGNGAG
Pig :	MLARGL	ALRSV	LVKGC	QPFL	SAP	RECP	PGHP	RV
Trout :	MMVSW	SVCR	SSIAL	P-ACGL	PSAR	HNSS	MPVV	RQALSPD

図8. P450sccN末端側アミノ酸の比較

延長ペプチドとして報告されている領域を示す。  
動物種間で一致するアミノ酸を枠で囲んだ。







図10. ニジマス卵形成過程におけるノーザンブロット解析

ニジマスP450scc cDNAを鋳型として合成されたディゴキシゲニンラベルRNAをプローブとして用いた。

各レーンには以下に示すそれぞれの卵径の卵の卵濾胞細胞層より抽出したpoly A<sup>+</sup> RNAを1.5  $\mu$ g泳動した。

1:卵径1.8mm, 2:卵径2.8mm, 3:卵径3.5mm, 4:卵径4.7mm, 5:排卵後濾胞

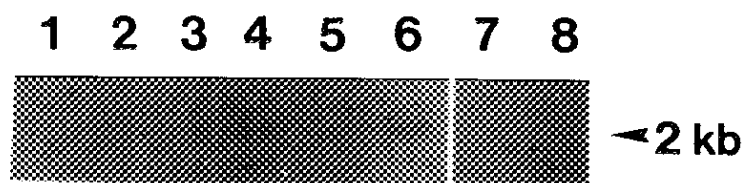


図11. メダカ卵形成過程におけるノーザンブロット解析

メダカP450scc cDNAを鋳型として合成されたディゴキシゲニンラベルRNAをプローブとして用いた。

各レーンには、それぞれの時間に卵濾胞細胞層から抽出したtotal RNAを6 $\mu$ g泳動した。時間は、産卵前の時間を示した。

1; 2時間, 2; 5時間, 3; 8時間, 4; 11時間, 5; 14時間, 6; 17時間, 7; 20時間, 8; 23時間,

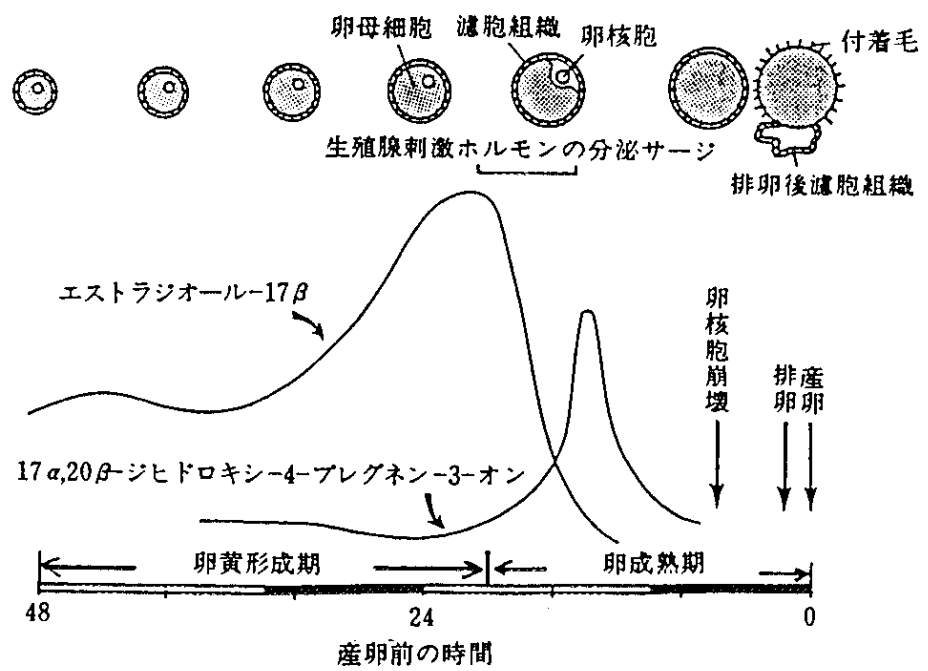


図12. メダカ卵濾胞における卵黄形成・卵成熟・産卵の時間経過とステロイドホルモンの生成

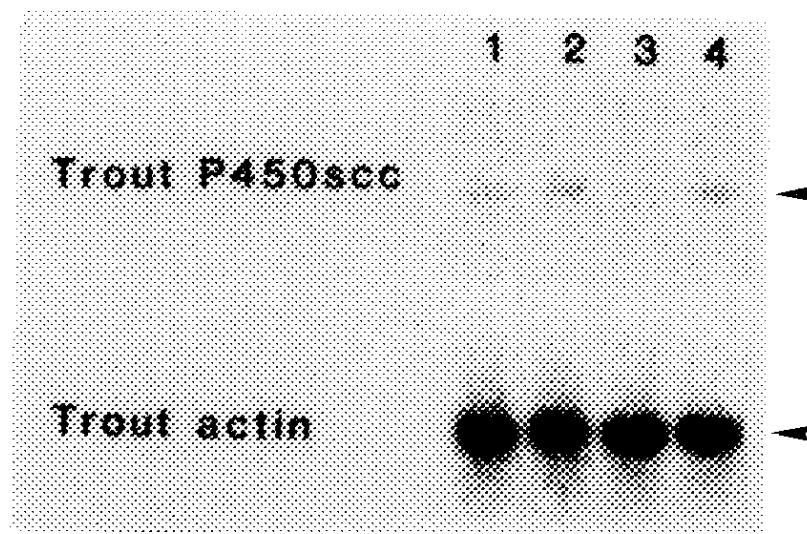


図13. ニジマス莢膜細胞層、顆粒膜細胞層分離培養における  
P450scc mRNAのGTHによる誘導

ニジマスの卵濾胞細胞層を莢膜細胞層と顆粒膜細胞層とに分離し、それぞれをGTH (SGA) 無添加及び添加で12℃、16時間培養した。

培養後の各組織からmRNAを抽出し、各レーンは、1.5  $\mu$ gのpoly A<sup>+</sup> RNAを泳動した。

上段は、プローブとして、ニジマスP450scc cDNAを<sup>32</sup>Pでラベルして用いた。下段は、同じメンブレンを使用し、プローブとしてニジマスactin cDNAを<sup>32</sup>Pでラベルして用いた。P450scc、actinのそれぞれの矢印はともに約1.8 kbを示す。

1: 莢膜細胞層 GTH(-), 2: 莢膜細胞層 GTH(+),  
3: 顆粒膜細胞層 GTH(-), 4: 顆粒膜細胞層 GTH(+)

#### 図14. Whole mount *in situ* hybridizationの方法

組織を当日に調製し、氷冷した4% PFA/0.75x PBSに入れ、4℃一晩以上固定した。

↓  
0.75x PBSで洗浄

↓  
Methanol, 5分, 2回

↓  
PBST (0.75x PBS+0.1% Tween) , 室温, 5分, 2回

↓  
4% PFA/0.75xPBS, 室温, 20分

↓  
PBSTで洗浄

↓  
1.25% triethanolamine/0.27% acetic anhydride, 室温, 10分

↓  
PBSTで洗浄

↓  
prehybridization, 室温, 1~4時間

↓  
hybridization, 65℃, 12~18時間

↓  
5x SSCですすぐ

↓  
2x SSC/50% formamide, 65℃, 1時間

↓  
2x SSC, 37℃, 10分, 3回

↓  
RNase処理: 20  $\mu$ g/ml RNase A, 37℃, 1時間

↓  
2x SSC, 37℃, 10分, 3回

↓  
2x SSC/50% formamide, 65℃, 1時間

↓  
2x SSC, 55℃, 15分

↓  
2x SSC, 55℃, 15分

↓  
0.2x SSC, 55℃, 15分

↓  
PBSTで洗浄

↓  
Blocking solution, 室温, 1時間

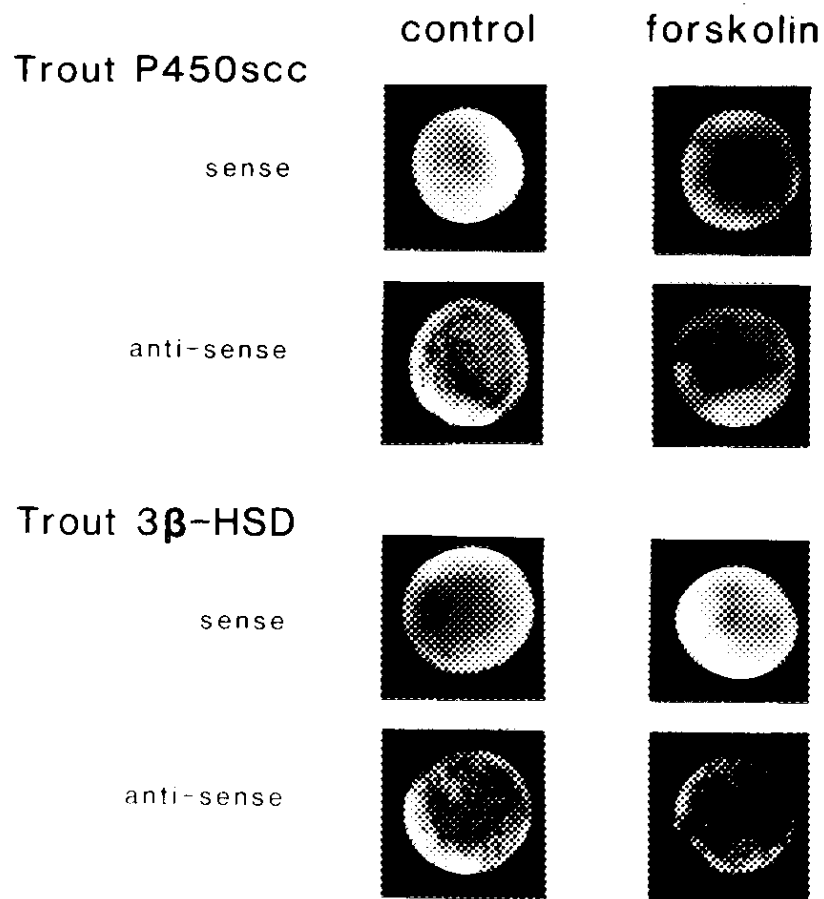
↓  
anti-DIG antibody, 4℃, overnight

↓  
Blocking solution, 室温, 30分, 3回

↓  
0.1 M Tris-Cl(pH 9.5)/0.05M MgCl<sub>2</sub>/0.1M NaCl/0.1% Tween 20, 室温, 10分, 3回

↓  
発色反応

↓  
TE Bufferで発色を停止



### 図15. whole mount *in situ* hybridization

図14に述べた手順でwhole mount *in situ* hybridizationを行なった。

上2段はニジマスP450scc cDNAを鋳型として合成されたディゴキシゲニンラベルRNAをプローブとして用いた。下2段はニジマス3 $\beta$ -HSD cDNAを鋳型として合成されたディゴキシゲニンラベルRNAをプローブとして用いた。

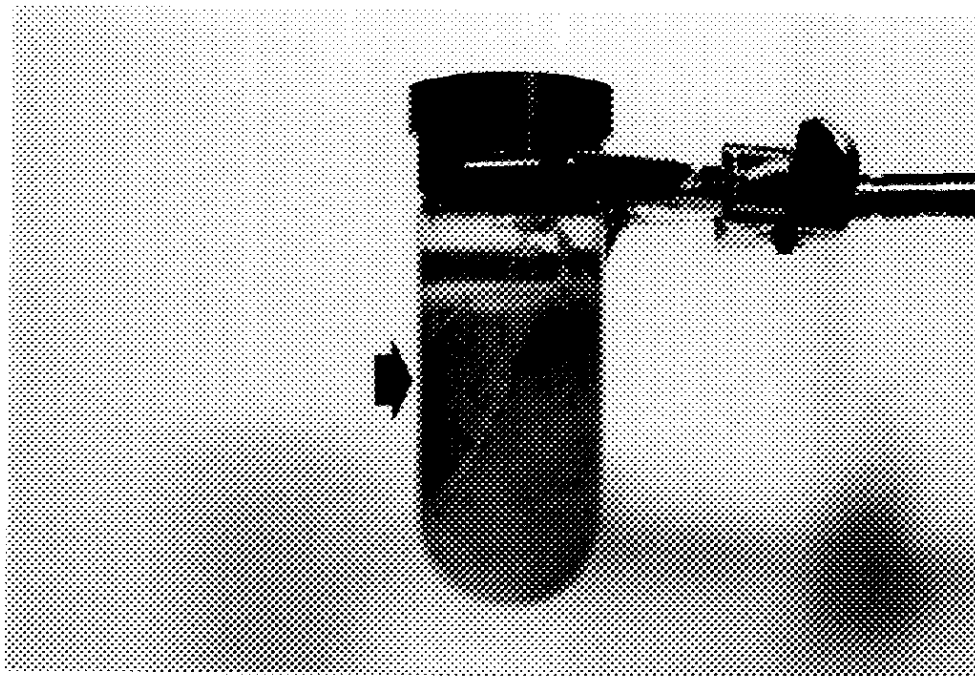


図16. 遠心による卵濾胞細胞層の調製

単離した濾胞卵を遠心管に詰め、20,000rpm (30,000 $\times$ g) , 30分遠心した。矢印で示した白色の画分を分取し、ニジマスRinger液中で洗浄した後、軽く遠心して集め、液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。

表1. COS-1細胞におけるニジマスP450sccの活性

	Pregnenolone ( ng/plate )	
	48h	120h
pSVL	2.8	3.0
pSVL/P	12.9	23.2
pSVL/M	2.5	3.1

ニジマスP450scc様cDNAをpSVLに組み込み、COS-1細胞にトランスフェクションさせたときのP450sccの活性を示す。

pSVL/P:ニジマスP450scc様cDNAのP（図参照）の領域をpSVLに組み込んだもの

pSVL/M:ニジマスP450scc様cDNAのM（図参照）の領域をpSVLに組み込んだもの

pSVL:ベクターのみ

それぞれをCOS-1細胞へトランスフェクションさせ、基質として25-hydroxycholesterolを加え、P450sccの代謝産物であるプレグネノロンの産生量をRIA法で測定し、P450sccの活性を調べた。



表2. P450scc アミノ酸配列の相同性

	human	bovine	rat	pig	trout	medaka
human						
bovine	72					
rat	77	70				
pig	79	83	75			
trout	48	46	46	46		
medaka	57	55	57	56	82	

各動物種間でのアミノ酸の相同性を%で示す。  
 数値は、一致したアミノ酸の[個数÷比較したアミノ酸の個数×100]（%）として算出した。メダカは現在推定されている226個について比較した結果を示す。

表3. ニジマス血中プレグネノロン量と  
顆粒膜細胞層における $17\alpha, 20\beta$ -DP産生

卵径(mm)		pregnenolone (pg/ml)	$17\alpha, 20\beta$ -DP産生	
			control	$17\alpha$ -OH Prog
0.9	未成熟	186	—	—
1.5	未成熟	101	—	—
2.5	未成熟	306	—	—
3.4	未成熟	390	—	—
3.8	未成熟	630	—	+
4.0	核移動	770	—	+
4.5	成熟	703	+	+

血中プレグネノロン量はRIA法により測定した。

顆粒膜細胞層を単離し、ニジマスRinger液中に何も加えない(control)、 $17\alpha$ -OH Prog添加の条件下、顆粒膜細胞を $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ で36時間培養した後、培養液中の $17\alpha, 20\beta$ -DPの量をEIA法で測定し、産生の有無を表に示した。

参考論文

FEBS Letters, 319, 45-48, (1993)

Rainbow trout ovarian cholesterol side-chain cleavage cytochrome  
P450(P450scc): cDNA cloning and mRNA expression during oogenesis

Mika Takahashi, Minoru Tanaka, Noriyoshi Sakai, Shinji Adachi,  
Walter L. Miller, and Yoshitaka Nagahama

# Rainbow trout ovarian cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450scc)

## cDNA cloning and mRNA expression during oogenesis

Mika Takahashi<sup>a,b</sup>, Minoru Tanaka<sup>b</sup>, Noriyoshi Sakai<sup>b</sup>, Shinji Adachi<sup>b</sup>, Walter L. Miller<sup>c</sup> and Yoshitaka Nagahama<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Molecular Biomechanics, The Graduate University for Advanced Studies, Okazaki 444, Japan, <sup>b</sup>Laboratory of Reproductive Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki 444, Japan and <sup>c</sup>Department of Pediatrics and the Metabolic Research Unit, University of California, San Francisco, CA 94143, USA

Received 30 November 1992

A cDNA clone encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450scc) was isolated from a rainbow trout ovarian follicle cDNA library. The cDNA contains an open reading frame of 1,542 nucleotides encoding a protein of 514 amino acids. The predicted amino acid sequence of trout P450scc shows 48% homology with that of human, and 46% homology with that of rat, bovine and pig. P450scc activity was confirmed by transfected COS-1 monkey kidney tumour cells with an expression vector for trout P450scc cDNA and subsequent detection of conversion from 25-hydroxycholesterol to pregnenolone by radioimmunoassay. The cDNA only hybridized to a single 1.8 kb RNA transcript. The transcript was not found in early vitellogenic follicles, barely detected in postvitellogenic follicles, and abundant in postovulatory follicles.

Rainbow trout; Cytochrome P450scc; Expression in COS-1 cells; Steroidogenesis

### 1. INTRODUCTION

In vertebrates, oocyte growth and maturation are regulated by pituitary gonadotropins and ovarian steroid hormones. In salmonid fishes, two steroidal mediators of oocyte growth and maturation are  $17\beta$ -estradiol and  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha,20\beta$ -DP), respectively [1]. Two major somatic cell types in the ovary, the thecal cells and granulosa cells, participate in the synthesis of these two steroids [2,3]. During oocyte growth, the ovarian follicle layer predominantly produces  $17\beta$ -estradiol. Immediately prior to or during final oocyte maturation, there is a drastic increase in  $17\alpha,20\beta$ -DP production by the follicle layer in response to the ovulatory surge of plasma gonadotropin [1].

One of the important steroidogenic enzymes involved in the synthesis of these two steroids is cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450scc). This enzyme catalyzes the conversion of cholesterol to pregnenolone, which is the initial and rate-limiting reaction in the synthesis of steroid hormones. However, the role of P450scc in differential production of  $17\beta$ -estradiol and  $17\alpha,20\beta$ -DP during oocyte growth and maturation has not been determined.

Correspondence address: Y. Nagahama, Laboratory of Reproductive Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki 444, Japan. Fax: (81) (564) 53-7400.

As a first step to analyze this question in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), we have isolated and cloned a full-length cDNA encoding P450scc from a rainbow trout ovarian thecal cell layer cDNA library. Comparisons have been made between the deduced amino acid sequences of rainbow trout and four species of mammals. Identification of rainbow trout P450scc was based on expression of the cDNA in transfected nonsteroidogenic COS-1 monkey kidney tumour cells. We also analyzed the expression of P450scc transcripts from rainbow trout ovarian follicles during oocyte growth and final maturation by Northern hybridization.

### 2. MATERIALS AND METHODS

#### 2.1. Cloning and sequencing

Three-year-old rainbow trout were obtained from Samegai Trout Hatchery (Shiga Prefecture, Japan). Thecal cell layers were isolated from ovarian follicles at the mid-vitellogenic stage (oocyte diameter, 3.54 mm) with fine watchmaker's forceps. A cDNA library from rainbow trout ovarian thecal cell layer poly(A)<sup>+</sup> RNA was constructed as described previously [4]. A human P450scc cDNA [5] was digested at nucleotide position 1,158 and 1,442 with *Pvu*II and *Sau*3AI to yield a 285 bp fragment which encompasses the highly conserved steroid-binding and heme-binding sites. This 284 bp fragment was subcloned into M13mp19 and labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP as a probe. About  $2.4 \times 10^5$  plaques were blotted onto Hybond N<sup>+</sup> membranes, were prehybridized for 1 h in 5 $\times$  SSC (0.75 M NaCl/0.075 M sodium citrate), 35% (v/v) formamide, 200  $\mu$ g/ml of denatured herring sperm

DNA, 5× Denhardt's solution (0.1% polyvinylpyrrolidone/0.1% Ficoll type 400/0.1% bovine serum albumin fraction V), 0.2% SDS, 10% dextran sulfate at 42°C, and then hybridized with 5 × 10<sup>5</sup> cpm of the probe at 42°C overnight. The inserts from positive plaques were isolated and digested with *Eco*RI. The resultant 1.8 kb DNA insert was subcloned into *Eco*RI site of pBluescript KS(+). Deletion clones were obtained by using *Exo*III/Mung bean nuclease deletion system and the single-stranded DNA were prepared using M13K07 an helper phage [6]. DNA sequencing was carried out by dideoxy chain-termination method using an M13 sequencing kit (Takara Shuzo Co.), a 7-DEAZA sequencing kit (Takara Shuzo Co.) or a *Bca* BEST Dideoxy Sequencing kit (Takara Shuzo Co.).

## 2.2. COS-1 cell expression

A 1,580 bp cDNA containing the entire codon region (nucleotide position 30–1609:P) and a 1,433 bp cDNA lacking the 5' region encoding the putative extension (mitochondrial leader) peptide (nucleotide position 177–1609:M) were amplified by Polymerase Chain Reaction using synthetic primers with *Xho*I and *Sac*I sites. The amplified DNA fragments were cloned into an expression vector, pSVL (Pharmacia LKB) at *Xho*I and *Sac*I sites. The two recombinant plasmids, pSVL/P and pSVL/M, and pSVL (no insert) were transfected to 2.2 × 10<sup>5</sup> COS-1 cells as previously described [4]. On the next day, 25-hydroxycholesterol (Sigma) was added to the medium to 2 nmol/ml. The cells were cultured for 48 or 120 h. Pregnenolone was extracted from the culture medium with diethylether. P450scc activity was deduced by measuring levels of pregnenolone by radioimmunoassay as described previously [7]. The anti-pregnenolone-3-Succ-BSA serum (Teikoku Zoki Co.) crossreacts with pregnenolone, progesterone, and deoxycorticosterone at 100%, 15.6% and 0.1%, respectively. This antiserum crossreacts less than 0.1% with most of ovarian steroids and corticosteroids tested, such as 17α-hydroxypregnenolone, 17α-hydroxyprogesterone, 17β-estradiol, and cortisol.

## 2.3. Northern blot analysis

Northern blot analysis was carried out as described previously [4]. The 1,789 bp cDNA fragment was labelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP using the Random Primer Plus Extension Labelling System (NEN) as a probe, and hybridized in 5× SSC, 5× Denhardt's solution, 0.2% SDS, 200 μg/ml denatured sperm DNA with 5 × 10<sup>5</sup> cpm of the probe at 45°C overnight.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

To isolate the cDNA encoding P450scc, we used a cDNA library that was constructed from rainbow trout ovarian thecal cell poly(A)<sup>+</sup> RNA. Four positive clones were found by screening approximately 2.4 × 10<sup>5</sup> plaques using a human 284 bp *Pvu*II/*Sau*3AI fragment as a probe. The longest of these clones, 1.8 kb-long insert, was chosen and sequenced by the strategy shown in Fig. 1. The nucleotide sequence of rainbow trout P450scc 1.8 kb-long insert contains an 1,542 bp open reading frame starting from the first ATG codon and terminating at

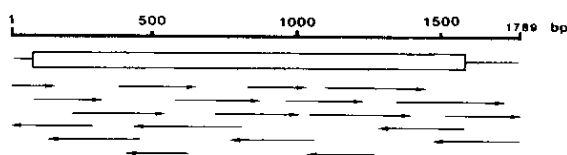


Fig. 1. Sequencing strategy for the 1.8 kb insert. Location of the open reading frame is shown by an open box. Each arrow indicates the direction and extent of sequencing.

a TGA stop codon. The predicted protein contains 514 amino acids (Fig. 2). There are direct repeats (4 times, core sequence: CAGTGATATCATGAAGCCTCTACACAGCAGA) starting from 3 bp upstream from the

AAAAGAAACAGACAGAAAGAGTTTGAAGAACTCAGCTAGGATAGAGACGCTGCTATGA	60
TTGTTGAGCTGGAGTGTGTGTCAGTTCCCTGGCTTCCAGCATGTGGACTACCCAGTG	120
CCCGCCACAACTCAGTATGCGGGTGGTCCGCGAGGCTCTGTCCTCCAGACAACAGCAGTA	180
CGGTCCAGAACTTCAGTGAATCCAGGTTCTGGAGAAACGAGTCCGCAACCTCTACA	240
GTTCCTGGAACTAGACGGATTACAGAACATCCACAGAGTATGGTCACAACTTCAACA	300
CTTCGGTCCAAATATACAGGAGAGATAGGCTACTATGATAGTGTAAACATTATAAGC	360
CGGAGATGCCAGCTATCTTGTTCAGGCAAGGACATCCCAAGAGGTTAAGCGTGG	420
AGGCATGGACCTCATACAGAGACTACAGAACAGGAAATATGGAGTCTCTCTCAAGATG	480
GGGAGGACTGGCGGTCCAAAGGGTGAATTCGAATAGAGAGGTGATCTCTCCAAAGGTG	540
TGGGGAAGCTTTGTCCTCTGTTGGATGAGTTGGGAGGAGCTTGTGGCCGAGCTACATA	600
AGAAGATAGAAAGGATCGACAGGACAATGGACACCGATCTTCTCAAGAACTCTTCA	660
AATAGCTCTGGAATTCGCTGGTTCAGTTCTGTATGGGAACTCTGGGCTGATGTTGG	720
ACTATGTAACCTGAGGCGCAAGACCTTCATTGACTGATCTCTCTGATGTTCAAGACTA	780
CTCTCCCATGCTGATACATCCCCCGGCCATGCTGAGGAGGCTAGGAGCCAGATCTGGA	840
GAGATCACGTAGAGGCTTGGATGCTATCTCAACAGGCGGACCGCTGATCCAGAAACA	900
TCTACAGGACGATCGCTCAGGACACTAACCCCAAGGAGTATCCAGGAGCTCTGGCCA	960
GCCTTGTGATGTTAGACAAGCTGCTATAGAGGATATCAAGGCCAGGCTGCTGAACTGA	1020
TGGCTGGAGGGTAGACACGACATCTATACCCCTGCTTGGAGCTCTATAGAGCTTGCCA	1080
GACACCTGACCTCCAGGAAGAGTTGAGGCTGAGGTGGCTTAGCCAGAGCTTACCC	1140
AGGGAGACATGCTACAGATGCTGAAGATGATACCGCTGCTCAAGAGCGCTGAAGGAAA	1200
CGCTGAGGCTTCATTCAGTTGACAGTTCAGTTTACAGAGATACATTACAGAGAAATCGTCA	1260
TTACAGACTATCAGATACCTTGTGGAGCTTGGTCCAGTTGGGCTCTATGCGATGGTA	1320
GAGACCCAGATGCTTCCCGAGACCTGAGAGTACCTCCGCTCCGCTGGCTGGGACAG	1380
AGAACCAGTACTTCAGGAGCTTGGGCTTGGATTGGACCCAGACAGTCTCTTGACGGC	1440
GCATAGCTGAGACGGAGATGACGCTCTCTTATACATATGCTGGAGAACTTCAGAGTAG	1500
ATAAAGAGGCTCAGTGGAGGTGCACAGTACCTTCAGTTGATCTTTGTCAGAGAAAC	1560
CCATCTCTGACCTGAAGCCTCTAAAGCGGCGCAGTATATCATGAGGCTCTACAC	1620
ACCAGACAGTATATCATGAAGCCTCTACACAGCAGACAGTGACATCATGAAGCCTCTAC	1680
ACAGCAGACAGTGACATCATGAAGCCTCTACTCTGTAAGGCTCAAGGCTTAAGAAAATTC	1740
TAACATTTGTTTAAATAACAATAATAACTTGAAGAAAAA	1789

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of rainbow trout P450scc. Amino acid sequence deduced from an open reading frame is shown below the nucleotide sequence. The AATAAA polyadenylation signal is underlined.

Trout	MVSVSVQSSALP-ACGLPSARHNSSMPVVRQALSPDSS--STVQNPSEIPGLWRNGLANLYEFWKLGQFRNIRRVMVHNPNTGPIY	87
Human	MLAKGLPRSLVKGQYTHLSAPREGLGLRVPTGEGAGIS-TRSPRPFNELPSPGDNGWLNLYHFWREIGTHKVLHHVQNFQKYGPIY	89
Bovine	MLARGLPRLSLVKGQYTHLSAPREGLGLRVPTGEGAGIS-TKTFRPYSEIPSPGDNGWLNLYHFWREIGTHKVLHHVQNFQKYGPIY	89
Pig	MLARGLAIRSLVKGQYTHLSAPREGLGLRVPTGEGAGIS-TKTFRPFSEIPSPGDNGWLNLYHFWREIGTHKVLHHVQNFQKYGPIY	89
Rat	MLAKGLCIRSLVKGQYTHLSAPREGLGLRVPTGEGAGIS--LATGNGAGISSTNSPRSFNEIPSPGDNGWLNLYHFWREIGTHKVLHHVQNFQKYGPIY	87
Trout	REKLYYSVNIINPEMHALEKAFCHYPRRLTVEAMTSYRDYRNKGVLLKNGELNRSNRVILNHEVTSEKVLQNEPLLEDEVSQDFV	177
Human	REKLYYSVNIINPEMHALEKAFCHYPRRLTVEAMTSYRDYRNKGVLLKNGELNRSNRVILNHEVTSEKVLQNEPLLEDEVSQDFV	179
Bovine	REKLYYSVNIINPEMHALEKAFCHYPRRLTVEAMTSYRDYRNKGVLLKNGELNRSNRVILNHEVTSEKVLQNEPLLEDEVSQDFV	179
Pig	REKLYYSVNIINPEMHALEKAFCHYPRRLTVEAMTSYRDYRNKGVLLKNGELNRSNRVILNHEVTSEKVLQNEPLLEDEVSQDFV	179
Rat	REKLYYSVNIINPEMHALEKAFCHYPRRLTVEAMTSYRDYRNKGVLLKNGELNRSNRVILNHEVTSEKVLQNEPLLEDEVSQDFV	177
Trout	ARVKKTERSCQDKWTETLSQELFKYALSVGVSVLGERGLMLDYINPEKFFILCISUMFHTSPMLYIPPMILPRVGAKLNDHVA	267
Human	SVLPRRIKAGSGNYSQDLSDDLRFAPESITNVIHGERGLMLEEVNPEKQFIDAIYQMFHTSPMLNLPDLRLFRITKIDHVA	269
Bovine	SVLPRRIKAGSGNYSQDLSDDLRFAPESITNVIHGERGLMLEEVNPEKQFIDAIYQMFHTSPMLNLPDLRLFRITKIDHVA	269
Pig	SVLPRRIKAGSGNYSQDLSDDLRFAPESITNVIHGERGLMLEEVNPEKQFIDAIYQMFHTSPMLNLPDLRLFRITKIDHVA	269
Rat	KVLPRRIKAGSGNYSQDLSDDLRFAPESITNVIHGERGLMLEEVNPEKQFIDAIYQMFHTSPMLNLPDLRLFRITKIDHVA	267
Trout	WDIIFVQDRICQNIYRTMDTNTGKVEGLASLLMLLSIEDINASVTELMAGGVITTSITLWILYEJARRHPDLEELRNEVAA	357
Human	WDIIFVQDRICQNIYRTMDTNTGKVEGLASLLMLLSIEDINASVTELMAGGVITTSITLWILYEJARRHPDLEELRNEVAA	359
Bovine	WDIIFVQDRICQNIYRTMDTNTGKVEGLASLLMLLSIEDINASVTELMAGGVITTSITLWILYEJARRHPDLEELRNEVAA	358
Pig	WDIIFVQDRICQNIYRTMDTNTGKVEGLASLLMLLSIEDINASVTELMAGGVITTSITLWILYEJARRHPDLEELRNEVAA	358
Rat	WDIIFVQDRICQNIYRTMDTNTGKVEGLASLLMLLSIEDINASVTELMAGGVITTSITLWILYEJARRHPDLEELRNEVAA	356
Trout	PRQAGCDLMLQVPLPKASIKETLRRLHPSVILQRYVNDIVLRYNIPAKTLVQVAVYANGROPAPFESSPKDFPRWLKSKDKNITY	447
Human	PRQAGCDLMLQVPLPKASIKETLRRLHPSVILQRYVNDIVLRYNIPAKTLVQVAVYANGROPAPFESSPKDFPRWLKSKDKNITY	449
Bovine	PRQAGCDLMLQVPLPKASIKETLRRLHPSVILQRYVNDIVLRYNIPAKTLVQVAVYANGROPAPFESSPKDFPRWLKSKDKNITY	448
Pig	PRQAGCDLMLQVPLPKASIKETLRRLHPSVILQRYVNDIVLRYNIPAKTLVQVAVYANGROPAPFESSPKDFPRWLKSKDKNITY	448
Rat	PRQAGCDLMLQVPLPKASIKETLRRLHPSVILQRYVNDIVLRYNIPAKTLVQVAVYANGROPAPFESSPKDFPRWLKSKDKNITY	446
Trout	--SLGFGAGVROCGRRIAELEMIFLIMLENFRVDEKQVVEHSTFELILPEKPIILTLKPKSGQ-----	514
Human	FRNLGFGAGVROCGRRIAELEMIFLIMLENFRVEIQHLSVGTTFELILPEKPIISFTFPPNQ-----ATQQ-----	521
Bovine	FRNLGFGAGVROCGRRIAELEMIFLIMLENFRVEMHIGVDTTFELILPEKPIIFVFPFNQ-----PPQA-----	520
Pig	FRNLGFGAGVROCGRRIAELEMIFLIMLENFRVEMHIGVDTTFELILPEKPIIFVFPFNQ-----PLQA-----	520
Rat	FRNLGFGAGVROCGRRIAELEMIFLIMLENFRVEMHIGVDTTFELILPEKPIIFVFPFNQ-----PLQA-----	526

Fig. 3. Comparison of deduced amino acid sequence of rainbow trout (Trout), human, bovine, pig and rat P450<sub>sc</sub>. Alignment was made using Gene Works (IntelliGenetics, Inc.). Identical amino acids between five species are indicated as a box.

stop codon. A polyadenylation signal, AATAAA, was found 16 bp upstream from the poly(A)<sup>+</sup> track.

This is the first cDNA cloning of P450<sub>sc</sub> in a non-mammalian vertebrate. Therefore, we compared the deduced amino acid sequence of rainbow trout P450<sub>sc</sub> with that known from four species of mammals (human, rat, bovine and pig) (Fig. 3). An overall homology of 48% was found between the amino acid sequence of rainbow trout and that of human P450<sub>sc</sub> [5]. The rat [8], bovine [9] and pig [10] P450<sub>sc</sub> amino acid sequences share 46% homology with that of rainbow trout. A similar degree of amino acid sequence homology between rainbow trout and mammals was found in cytochrome P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase cytochrome, 46–48%) and in cytochrome P450arom (aromatase, 52%) [4,11]. The regions of greatest similarity between rainbow trout and mammalian P450<sub>sc</sub> were in the heme-binding region [12] at residues 451–471 (71%, 15 identical/21 amino acids), and in the steroid-binding region [13] at residues 373–395 (70%, 16 identical/23 amino acids).

Since the deduced amino acid sequence had a low homology compared with that of four mammalian cytochrome P450<sub>sc</sub> sequences, a recombinant expression vector containing either pSVL/P or pSVL/M was intro-

duced into COS-1 cells to confirm that the cloned sequence encodes a polypeptide having the ability to convert 25-hydroxycholesterol to pregnenolone. The 1,580 bp sequence contains the entire open reading frame of rainbow trout P450<sub>sc</sub> cDNA, while the 1,433 bp cDNA lacks 5' region containing N-terminal 39 amino acids. COS-1 cells transfected with the pSVL/P produced significantly more pregnenolone (23 ng/plate) than did pSVL/M (2.6 ng/plate), pSVL (no insert, 3.0 ng/plate) or no vector (2.6 ng/plate) (Table I). This re-

Table I  
Activities of rainbow trout P450<sub>sc</sub> in COS-1 cells

	Pregnenolone (ng/plate)	
	48 h	120 h
pSVL	2.8	3.0
pSVL/P	12.9	23.2
pSVL/M	2.5	3.1

The recombinant plasmids, pSVL/P, pSVL/M, pSVL (no insert) were transfected to  $2.2 \times 10^5$  COS-1 cells. After 24 h, 2 nmol/ml of 25-hydroxycholesterol was added and 48 or 120 h later, pregnenolone was extracted. P450<sub>sc</sub> activity was deduced by measuring levels of pregnenolone by radioimmunoassay.

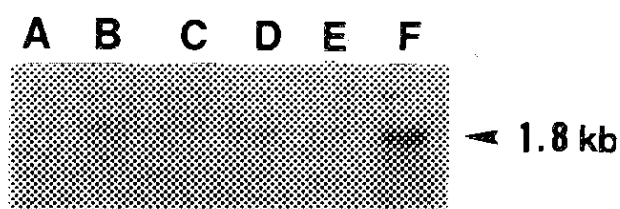


Fig. 4. Northern hybridization of poly(A)<sup>+</sup> RNA (2 µg) from various stages of follicles. (A) 1.8 mm diameter follicle; (B) 2.4 mm diameter follicle; (C) 2.9 mm diameter follicle; (D) 4.7 mm diameter follicle (immature); (E) 4.8 mm diameter follicle (immature); (F) postovulatory follicle.

sult clearly indicates that the 1,580 bp insert codes for rainbow trout P450scc.

pSVL/M did not significantly convert exogenous 25-hydroxycholesterol into pregnenolone in COS-1 cells (Table I), indicating that N-terminal 39 amino acids play an important part in expression of activity of trout P450scc. It is likely that the N-terminal region functions as a mitochondrial targeting peptide, although no significant homology could not be found between the trout N-terminal 39 amino acid sequence and the corresponding sequences of four mammalian P450scc enzymes (Fig. 3).

Northern hybridization analysis showed a single 1.8 kb long transcript. The 1.8 kb transcript was not found in early vitellogenic follicles, barely detected in post-vitellogenic follicles and abundant in postovulatory follicles (Fig. 4). The increased amounts of P450scc transcript during final oocyte maturation may be responsible for the rapid increase in the follicular production of maturation-inducing hormone of this species, 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -DP. The factors involved in increasing the abundance of P450scc transcript remain to be determined, although cAMP and several nuclear proteins have been implicated in mammalian systems [14–19].

**Acknowledgements:** We gratefully acknowledge Dr. S. Fushiki, Mr. T. Kobayashi and the Director and staff of the Samegai Trout Hatchery for providing the fish. COS-1 cells were provided by the Japanese Cancer Research Bank. This work was supported by Grant-in-Aid (0120210) to Y.N. for scientific research from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan.

## REFERENCES

- [1] Nagahama, Y. (1987) *Zool. Sci.* 4, 209–222.
- [2] Kagawa, H., Young, G., Adachi, S. and Nagahama, Y. (1992) *Gen. Comp. Endocrinol.* 47, 440–448.
- [3] Young, G., Adachi, S. and Nagahama, Y. (1986) *Dev. Biol.* 118, 1–8.
- [4] Tanaka, M., Telecky, T.M., Fukada, S., Adachi, S., Chen, S. and Nagahama, Y. (1992) *J. Mol. Endocrinol.* 8, 53–61.
- [5] Chung, B., Matteson, K.J., Voutilainen, R., Mohandas, T.K. and Miller, W.L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8962–8966.
- [6] Henikoff, S. (1984) *Gene* 28, 351–359.
- [7] Abraham, G.E., Buster, J.E., Kyle, F.W., Corrales, P.C. and Teller, R.C. (1973) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 40–45.
- [8] Oonk, B.R., Parker, K.L., Gibson, F.L. and Richards, J.S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 22392–22401.
- [9] Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Okada, Y., Sogawa, K., Hirose, T. and Inayama, S. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4647–4651.
- [10] Mulheron, G.W., Stone, R.T., Miller, W.L. and Wise, T. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 1773.
- [11] Sakai, N., Tanaka, M., Adachi, S., Miller, W.L. and Nagahama, Y. (1992) *FEBS Lett.* 301, 60–64.
- [12] Gotoh, O., Tagashira, Y., Iizuka, T. and Fujii-Kuriyama, Y. (1983) *J. Biochem.* 93, 807–817.
- [13] Picado-Leonard, J. and Miller, W.L. (1988) *Mol. Endocrinol.* 2, 1145–1150.
- [14] Moore, C.C.D., Brentano, S.T. and Miller, W.L. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 6013–6023.
- [15] Inoue, H., Watanabe, N., Higashi, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 563–569.
- [16] Rice, D.A., Mouw, A.R., Bogerd, A.M. and Parker, K.L. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5, 1552–1561.
- [17] Honda, S.I., Morohashi, K.I. and Omura, T. (1991) *J. Biochem.* 108, 1042–1049.
- [18] Lala, D.S., Rice, D.A. and Parker, K.L. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 1244–1258.
- [19] Moore, C.C.D., Hum, D.W. and Miller, W.L. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 2045–2058.

## 参考論文

Fish Physiol. Biochem. (in press)

Isolation and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)  
ovarian cDNA encoding 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/  $\Delta^{5-4}$ -isomerase

Noriyoshi Sakai, Minoru Tanaka, Mika Takahashi, Shinji Adachi, and  
Yoshitaka Nagahama



**Isolation and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian cDNA encoding  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$ -isomerase**

Noriyoshi Sakai\*, Minoru Tanaka, Mika Takahashi, Shinji Adachi, and Yoshitaka Nagahama

Laboratory of Reproductive Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki 444, Japan;

\*Department of Marine Bioscience, Faculty of Biotechnology, Fukui Prefectural University, Matsuoka, Fukui 910-10, Japan

**Keywords:** Rainbow trout; Ovarian steroidogenesis;  $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$ -Isomerase; cDNA cloning; Expression in COS-1 cell

Address for correspondence: Yoshitaka Nagahama, Laboratory of Reproductive Biology, National Institute for Basic Biology, Okazaki 444, Japan. TEL 0564-55-7550. FAX 0564-53-7400

## ABSTRACT

A distinct shift in steroidogenesis from testosterone to 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone occurs in the salmonid ovarian thecal cell layers immediately prior to oocyte maturation, and is a prerequisite for the production of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing hormone of salmonid fishes) by granulosa cells during oocyte maturation. 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P-450 (P-450<sub>17 $\alpha$</sub> ) and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase (3 $\beta$ -HSD) are the two major steroidogenic enzymes involved in the production of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and testosterone. Using mammalian cDNA probes, we isolated and characterized full-length cDNAs encoding these two enzymes from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovarian thecal cell cDNA library. The cloning of 2.4-kilobase cDNA encoding P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and transient expression of this clone in nonsteroidogenic monkey kidney tumor COS-1 cells have recently been reported (Sakai *et al.* 1992). We have isolated a 1.4-kilobase cDNA which is hybridized to the mammalian 3 $\beta$ -HSD cDNAs. Expression of this cDNA in COS-1 cells led to the production of an enzyme which is capable of converting dehydroepiandrosterone to androstenedione. In this study, enzymatic activities and expression of rainbow trout ovarian P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD are discussed in relation of the steroidogenic shift occurring in the ovarian follicle layers.

## 1. INTRODUCTION

Oocyte growth and meiotic maturation in teleosts, like those in other vertebrates, are regulated by gonadotropins (Nagahama *et al.* 1992). However, these actions of gonadotropins are considered to be mediated predominantly by ovarian steroid hormones. In salmonid fishes, two ovarian steroid hormones have been implicated in the regulation of these two important processes of oogenesis: estradiol-17 $\beta$  for oocyte growth and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -DP) for oocyte maturation (Nagahama and Adachi 1985; Nagahama 1987b). It is now established that ovarian granulosa cells are the site of production of these two steroidal mediators, but production by the ovarian follicle depends on the provision of precursor steroids by the thecal cells (two-cell type model) (Nagahama 1987a)(Fig. 1). During oocyte growth, the thecal cell layers synthesize testosterone, which is converted into estradiol-17 $\beta$  by aromatase activity in the granulosa cell layers. During oocyte maturation, however, the thecal cell layers synthesize 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, which is converted into 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -DP by 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in the granulosa cell layers. Thus, a distinct shift in the salmonid steroidogenesis from testosterone to 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone occurs only in the thecal cell layers immediately prior to oocyte maturation, and is a prerequisite for the growing oocytes to enter the final stage of maturation (Kanamori *et al.* 1988; Nagahama 1987a).

Ovarian steroidogenesis is regulated through changes in the relative activity of individual steroidogenic enzymes. 17 $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P-450 (P-450<sub>17 $\alpha$</sub> ) and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase (3 $\beta$ -HSD) are the two major steroidogenic enzymes involved in the production of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and testosterone. Thus, it is most likely that the steroidogenic shift in the salmonid thecal cell layers occurring prior to oocyte maturation is regulated by changes in the relative activity of these two enzymes. As a first step to address this question at the molecular level, we have utilized the techniques of molecular genetics to first isolate and characterize the cDNAs specific for salmonid ovarian P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD. We have previously reported the trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  cDNA cloning and enzymatic properties in nonsteroidogenic monkey kidney tumour COS-1 cells (Sakai *et al.* 1992). However, the cloning of cDNA encoding 3 $\beta$ -HSD has not been reported for nonmammalian

vertebrates. This article describes the isolation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 3 $\beta$ -HSD cDNA and expression of the cDNA in COS-1 cell. These results, together with our earlier findings on the molecular cloning of rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  cDNA, are discussed in relation to the steroidogenic shift occurring in the ovarian follicle layer prior to oocyte maturation.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Mammalian 3 $\beta$ -HSD cDNA probes were kindly provided by Dr. J.I. Mason (U.S.A.) (rat testis 3 $\beta$ -HSD, Lorence *et al.* 1991; rat liver 3 $\beta$ -HSD, Naville *et al.* 1991; human placental 3 $\beta$ -HSD, Lorence *et al.* 1990). Three cDNA fragments containing the majority of the open reading frame encoding 3 $\beta$ -HSD were prepared: 1.1-kilobase cDNA fragment from rat testis 3 $\beta$ -HSD cDNA by digestion of *Eco*RI and *Hind*III, 1.1-kilobase cDNA fragment from rat liver 3 $\beta$ -HSD by digestion of *Eco*RI and *Hind*III, and 1.0-kilobase cDNA fragment from human 3 $\beta$ -HSD by digestion of *Eco*RI and *Pvu*II. Each cDNA fragment was labeled by Multiprime DNA labeling systems (Amersham) and used to screen the ovarian thecal cell cDNA library of rainbow trout under the same conditions as described by Sakai *et al.* (1992). cDNA inserts were isolated from positively hybridizing clones, and digested with *Eco*RI or *Kpn*I, then cloned into pBluescript KS(-). DNA sequencing was performed using a 373A DNA sequencer with Dye primer thermal circular sequencing systems (Applied Biosystems Co.).

Expression of the cDNA in nonsteroidogenic monkey kidney tumour COS-1 cells was performed according to Tanaka *et al.* (1992). Metabolites from <sup>14</sup>C-labeled dehydroepiandrosterone by the cDNA transfected COS-1 cells were separated by thin layer chromatography and identified by recrystallization (Sakai *et al.* 1989). Northern blot analysis was carried out as described previously (Sakai *et al.* 1992).

## 3. RESULTS

Approximately 1.0 X 10<sup>5</sup> plaques from the ovarian thecal cell cDNA library of rainbow trout were screened with each of the mammalian 3 $\beta$ -HSD cDNA probes. Sixty-four positive clones

from rat testis 3 $\beta$ -HSD, 49 positive clones from rat liver 3 $\beta$ -HSD, and 71 positive clones from human placental 3 $\beta$ -HSD were identified. Twelve positive clones were randomly selected from 184 positive clones, the cDNA inserts were identified by southern blot analysis using rat testis 3 $\beta$ -HSD cDNA probe. Three different cDNA inserts in length (1.4-kilobase, 1.7-kilobase, and 2.2-kilobase) were found. Restriction maps of three cDNA inserts are different as shown in Fig. 2. The cDNA inserts were ligated into pBluescript KS(-) and partially sequenced from each end. The nucleotide sequence of 300 base from 5'-end in three cDNA inserts were almost the same, but that from 3'-end in three cDNA inserts were different (data not shown). Poly (A)<sup>+</sup> RNA was not found in the 1.7-kilobase cDNA insert. By northern blot analysis using 5'-end cDNA fragment (*KpnI*-*HincII* fragment) and 3'-end cDNA fragment (*EcoRI*-*KpnI* fragment) of the 2.2-kilobase cDNA insert, two different transcripts were found in poly (A)<sup>+</sup> RNA of trout post-ovulatory follicles. Therefore, it appears that the 2.2-kilobase cDNA insert is an artifact of two different cDNA connected when the cDNA library was constructed. The second cDNA in 2.2-kilobase cDNA did not bear any resemblance to 3 $\beta$ -HSD in partial sequence analysis (data not shown). The 1.4-kilobase cDNA insert, designated 3Bth2-10, was selected for further characterization. The complete nucleotide sequence of 3Bth2-10 and its deduced amino acid sequence will be described elsewhere.

To determine whether the 3Bth2-10 cDNA clone encodes a protein exhibiting 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$ -isomerase activity, the insert ligated into pSVL was used to transfect COS-1 cells. When <sup>14</sup>C-labeled dehydroepiandrosterone was used as substrate and the products were analyzed by thin layer chromatography, the major product identified as androstenedione by recrystallization (Table 1) was found in the COS-1 cell cultures with the recombinant trout 3 $\beta$ -HSD expression vector, but not in the cultures with pSVL only (Fig. 3).

Northern blot analysis of ovarian follicular poly (A)<sup>+</sup> RNA at three stages of oogenesis with the trout 3 $\beta$ -HSD cDNA probe revealed the presence of a 1.4-kilobase mRNA species. To compare changes in the 2.4-kilobase transcript of P450<sub>17 $\alpha$</sub> , rainbow trout P450<sub>17 $\alpha$</sub>  cDNA also hybridized (Fig. 4). We confirmed the mRNA specific for rainbow trout 3 $\beta$ -HSD to be a single species in another experiment. Signals of the 1.4-kilobase transcripts were barely detected

during vitellogenesis, markedly increased during oocyte maturation, and decreased after ovulation.

#### 4. DISCUSSION

Using the corresponding mammalian  $3\beta$ -HSD cDNA probes, we have isolated and expressed, for the first time in any nonmammalian vertebrates, cDNAs specific for rainbow trout  $3\beta$ -HSD. In our laboratory, three more cDNAs encoding rainbow trout ovarian steroidogenic enzymes, P-450<sub>17 $\alpha$</sub> , aromatase cytochrome P-450 (P-450<sub>Arom</sub>) (Tanaka *et al.* 1992) and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450<sub>SCC</sub>) (Takahashi *et al.* 1993) have also been characterized. Comparison of the nucleotide sequences of these three P-450 enzymes of rainbow trout with those of mammals indicates that the fish enzymes are approximately 55% homologous to those of mammals. It is of interest to know whether a similar sequence homology also exists between fish HSDs and mammalian HSDs. We are currently determining the complete nucleotide sequence of the rainbow trout  $3\beta$ -HSD cDNA clone. Our observations demonstrate that mammalian cDNA probes can be used to clone gonadal and adrenal steroidogenic enzymes of various nonmammalian species.

We have used a eukaryotic expression vector system to transfect COS-1 monkey kidney tumor cells and thereby characterized the rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  (Sakai *et al.* 1992) and  $3\beta$ -HSD and their associated activities in cells that normally do not exhibit these steroidogenic functions. We also expressed the rainbow trout P-450<sub>Arom</sub> (Tanaka *et al.* 1992) and P-450<sub>SCC</sub> (Takahashi *et al.* 1993). Thus, these studies have also shown that the mammalian COS-1 cell system is useful for enzymatic studies of various fish steroidogenic enzymes.

Biosynthesis of testosterone requires both  $17\alpha$ -hydroxylase and  $17,20$ -lyase activities, whereas that of  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone requires only  $17\alpha$ -hydroxylase activity. It has long been thought from many physiological studies that  $17\alpha$ -hydroxylase and  $17,20$ -lyase are distinct enzymes. However, purification of mammalian testis and adrenal P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  showed that a single protein mediated both activities (Nakajin and Hall, 1981; Kominami *et al.* 1982; Nakajin *et al.* 1983). This was confirmed by recent findings that expression of mammalian P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  cDNAs

in COS-1 cells (Zuber *et al.* 1986a; Namiki *et al.*, 1988; Fovold *et al.* 1989; Lin *et al.* 1991), bacteria (Barnes *et al.* 1991) and yeast (Sakaki *et al.* 1989) led to production of a steroid hydroxylase which had both 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase activities. Thus, one important question is whether the fish 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase activities are catalyzed by the same protein. Molecular cloning and characterization of rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  cDNA shows that the 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase activities reside within the same rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  polypeptide chain (Sakai *et al.* 1992). Expression of trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  in COS-1 cells indicates that the trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  has more 17,20-lyase activity catalyzing 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone to dehydroepiandrosterone than that catalyzing 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to androstenedione. This characteristic may be important to explain for the synthesis of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in trout ovarian thecal cells. Further studies on the substrate specificity of trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  will be necessary using trout ovarian follicle homogenates.

The enzyme, 3 $\beta$ -HSD is a key enzyme which regulates the formation of  $\Delta^4$ -3-ketosteroids from  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroids, *i.e.*, the synthesis of the potent steroid hormones progesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, and androstenedione from their much less hormonally active precursors, pregnenolone, 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone, and dehydroepiandrosterone, respectively. It has not yet been determined whether the synthesis of testosterone during oocyte growth and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone during oocyte maturation by the salmonid ovarian thecal cell layers involves either the  $\Delta^4$ -steroid or the  $\Delta^5$ -steroid pathway. This question is important in relation to the difference in substrate preference observed in rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  (Sakai *et al.* 1992). It is possible that 3 $\beta$ -HSD may play a critical role in determining the steroidogenic pathway in the salmonid thecal cell layers. In this study, we demonstrated that the rainbow trout 3 $\beta$ -HSD cDNA was capable of converting dehydroepiandrosterone to androstenedione. We are currently determining whether the recombinant rainbow trout 3 $\beta$ -HSD can also catalyze the conversion of other  $\Delta^5$ -steroids pregnenolone and 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone to their corresponding  $\Delta^4$ -steroids, progesterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, respectively.

Isolation of cDNA clones specific for rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD has made it possible to determine changes in mRNA levels during follicular development and maturation in rain-

bow trout. The levels of P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD were barely detectable during vitellogenesis, dramatically increased during oocyte maturation, and decreased markedly after ovulation. The dramatic increases in ovarian P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD mRNA levels may be directly associated with the increased production of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -DP during oocyte maturation. The hormonal factor(s) responsible for the increased expression of P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD during oocyte maturation remained to be determined. It is also interesting to determine whether other forms of P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD mRNAs are expressed in the ovaries during vitellogenesis, a stage when testosterone and estradiol-17 $\beta$  are the major steroid hormones produced by ovaries.

The isolation and characterization of rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  and 3 $\beta$ -HSD cDNAs will greatly facilitate further investigations of the molecular basis of the steroidogenic shift in the salmonid thecal cell layers. Resolution of the molecular events regulating this shift may provide new insight into the intracellular events regulating follicular development and maturation. Furthermore, the availability of cDNA clones specific for rainbow trout ovarian steroidogenic enzymes also provides the necessary probes for identification of steroidogenic enzyme genes of other fish species and for subsequent investigations on the molecular evolution of vertebrate steroidogenic enzymes.

## ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Reynaldo Patiño for reading the manuscript, Mr. Toru Kobayashi and Dr. Syozo Fushiki of Samegai Trout Farm for providing us with rainbow trout. This work has been supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (63640001 and 0120210 to Y.N.), by the Naito Foundation, and by the Japan Health Sciences Foundation.



## REFERENCES

- Barnes, H.J., Arlotto, M.P. and Waterman, M.R. 1991. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5597-5601.
- Fevold, H.R., Lorence, M.C., McCarthy, J.L., Trant, J.M., Kagimoto, M., Waterman, M.R. and Mason, J.I. 1989. Rat P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  from testis: Characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both  $\Delta^4$ - and  $\Delta^5$ -steroid-17,20-lyase reactions. Mol. Endocrinol. 3: 968-975.
- Kanamori, A., Adachi, S. and Nagahama, Y. 1988. Developmental changes in steroidogenic response of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 72, 13-24.
- Kominami, S., Shinzawa, K. and Takemori, S. 1982. Purification and some properties of cytochrome P-450 specific for steroid 17 $\alpha$ -hydroxylation and C<sub>17</sub>-C<sub>20</sub> bond cleavage from guinea pig adrenal microsomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 109: 916-921.
- Lin, D., Harikrishna, J.A., Moore, C.C.D., Jones, K.L. and Miller, W.L. 1991. Missense mutation serine<sup>106</sup>-proline causes 17 $\alpha$ -hydroxylase deficiency. J. Biol. Chem. 266: 15992-15998.
- Lorence, M.C., Murry, B.A., Trant, J.M. and Mason, J.I. 1990. Human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase from placenta: Expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. Endocrinology 126: 2493-2498.
- Lorence, M.C., Naville, D., Graham-Lorence, S.E., Mack, S.O., Murry, B.A., Trant, J.M. and Mason J.I. 1991. 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -isomerase expression in rat and characterization of the testis isoform. Mol. Cell. Endocrinol. 80: 21-31.
- Nagahama, Y. 1987a. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. Zool. Sci. 4: 209-222.
- Nagahama, Y. 1987b. 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: A teleost maturation-inducing hormone. Develop. Growth Differ. 29: 1-12.
- Nagahama, Y. and Adachi, S. 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the

- amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Dev. Biol. 109: 428-435.
- Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Sakai, N., Tanaka, M. and Shibata, N. 1992. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. Fish Phys. Biochem. (in press).
- Nakajin, S. and Hall, P.F. 1981. Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis. J. Biol. Chem. 256: 3871-3876.
- Nakajin, S., Shinoda, M. and Hall, P.F. 1983. Purification and properties of 17 $\alpha$ -hydroxylase from microsomes of pig adrenal: A second C<sub>21</sub>-side-chain cleavage system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 111: 512-517.
- Namiki, M., Kitamura, M., Buczko, E. and Dufau, M.L. 1988. Rat testis P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  cDNA: The deduced amino acid sequence, expression and secondary structural configuration. Biochem. Biophys. Res. Commun. 157: 705-712.
- Naville, D., Keeney, D.S., Jenkin, G., Murry B.A., Head, J.R. and Mason, J.I. 1991. Regulation of expression of male-specific rat liver microsomal 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. Mol. Endocrinol. 5: 1090-1100.
- Sakaki, T., Shibata, M., Yabusaki, Y., Murakami, H. and Ohakwa, H. 1989. Expression of bovine cytochrome P450c17 cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. DNA 8: 409-418.
- Sakai, N., Tanaka, M., Adachi, S., Miller, W.L. and Nagahama, Y. 1992. Rainbow trout cytochrome P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase): cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P450c17 mRNA expression during oogenesis. FEBS Letters 301: 60-64.
- Sakai, N., Ueda, H., Suzuki, N. and Nagahama, Y. 1989. Involvement of sperm in the production of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the testis of spermiating rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Biomedical Res. 10: 131-138.
- Tanaka, M., Telecky, T.M., Fukada, S., Adachi, S., Chen, S. and Nagahama, Y. 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the

- production of oestradiol-17 $\beta$  in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 8: 53-61.
- Takahashi, M., Tanaka, M., Sakai, N., Adachi, S., Miller, W. L. and Nagahama, Y. 1993. Rainbow trout ovarian cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450<sub>scc</sub>): cDNA cloning and mRNA expression during oogenesis. (Submitted).
- Zuber, M.X., Simpson, E.R. and Waterman, M.R. 1986a. Expression of bovine 17 $\alpha$ -hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science* 234: 1258-1261.

## FIGURE LEGEND

**Figure 1.** Two-cell type model and possible pathways for ovarian steroidogenesis of rainbow trout. : P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase),  $\rightleftharpoons$  : 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^{5-4}$ -isomerase (3 $\beta$ -HSD),  $\Rightarrow$  : 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD),  $\dashrightarrow$  : 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (20 $\beta$ -HSD),  $\rightarrow$  : P-450<sub>Aromatase</sub>  $\rightarrow$

**Figure 2.** Restriction map of the 1.4-kilobase cDNA insert, 1.7-kilobase cDNA insert and 2.2-kilobase cDNA insert. Restriction sites of *KpnI* shown in 2.2-kilobase cDNA insert are in adaptor ligated into 2.2-kilobase cDNA insert, and were used for the preparation of *KpnI-HincII* fragment and *EcoRI-KpnI* fragment.

**Figure 3.** Thin layer chromatographs showing 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) activity in COS-1 cells transfected with pSVL only (A) and the rainbow trout 3 $\beta$ -HSD expression vector (B). <sup>14</sup>C-Labeled dehydroepiandrosterone (1.0 X 10<sup>5</sup> cpm) was added to a COS-1 cell culture, and metabolites were extracted and separated on TLC. The bands corresponding to dehydroepiandrosterone (1) and androstenedione (2) are indicated.

**Figure 4.** Northern hybridization of rainbow trout P-450<sub>17 $\alpha$</sub>  (2.4-kilobase) and 3 $\beta$ -HSD (1.5-kilobase) to poly (A)<sup>+</sup> RNA (2  $\mu$ g) from three stages of ovarian follicles (V, vitellogenic follicles; M, follicles at the migrated nucleus stage; P, post-ovulatory follicles).

Table 1. Recrystallization of the radioactive metabolite with the authentic androstenedione for identification

-----		
Specific activity before crystallization (cpm/mg)		101
-----		
Specific activity of crystal (cpm/mg)	1st	97
	2nd	102
	3rd	98
-----		

Fig. 1 (Sakai et al.)

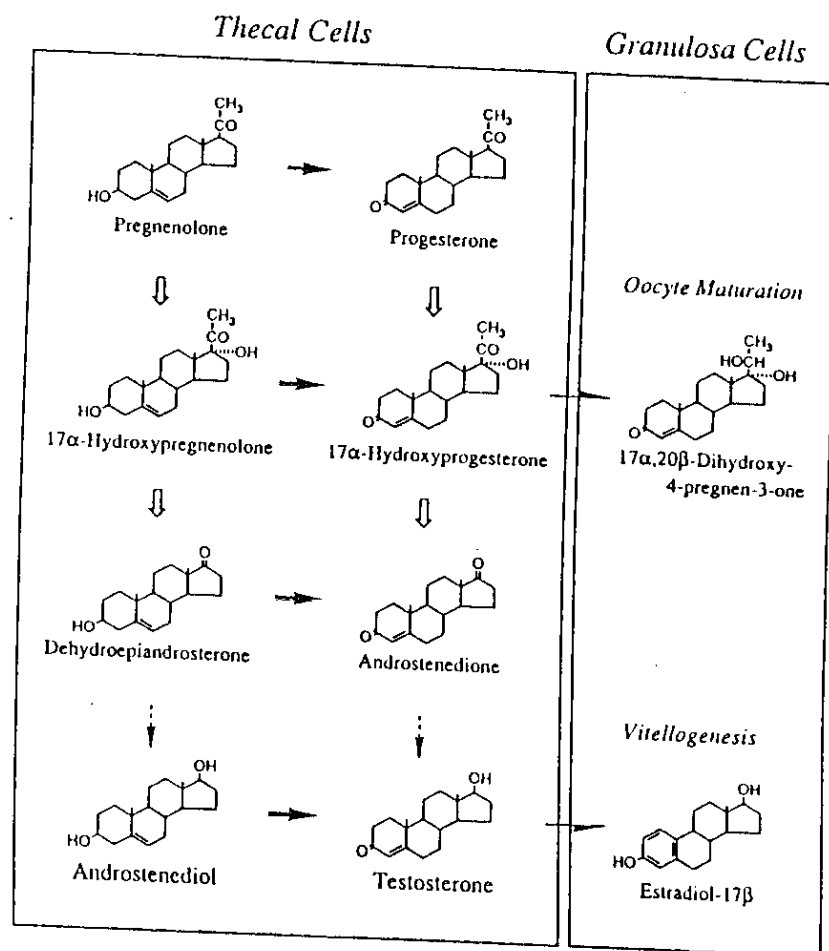


Fig. 2 (Sakai et al.)

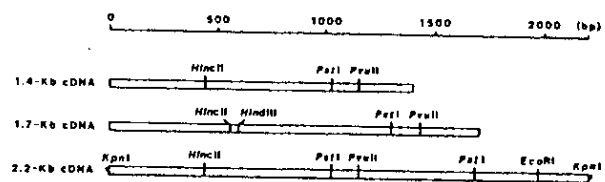


Fig. 3. (Sakai et al.)

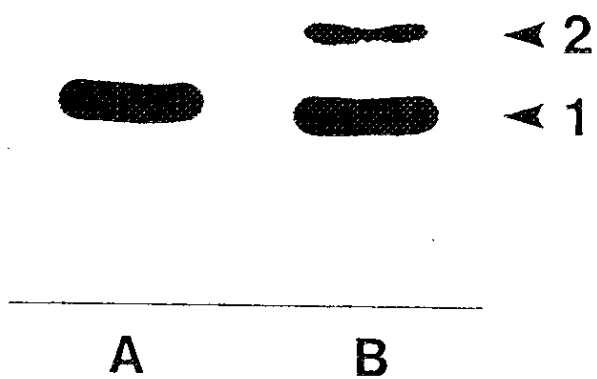




Fig. 4. (Sakai et al.)

