

メダカ FTZ-F1 による P-450
アロマトラーゼ遺伝子の転写調節

渡辺正忠
博士 (理学)

総合研究大学院大学
生命科学研究科
分子生物機構論専攻

平成 10 年度
(1998)

序論.....	1
略語.....	5
実験動物.....	6
第I章 メダカ卵濾胞細胞からの <i>Ftz-F1</i> 様 cDNA のクローニング.....	7
1. はじめに.....	7
2. 方法.....	7
A. orphan nuclear receptor 遺伝子断片のクローニング.....	7
a. メダカ卵濾胞細胞からの RNA の抽出.....	7
b. RT-PCR による orphan nuclear receptor 断片のクローニング.....	8
B. orphan nuclear receptor 遺伝子発現変化の解析.....	8
RNase protection assay.....	8
C. <i>Ftz-F1</i> 様 cDNA のスクリーニングと塩基配列決定.....	9
D. アミノ酸配列の相同性解析.....	10
E. 組織特異性.....	10
a. 各組織からの RNA の抽出.....	10
b. RNase protection assay.....	10
3. 結果.....	11
A. RT-PCR フラグメントの相同性解析.....	11
B. 各 orphan nuclear receptor の卵形成過程における発現パターン.....	11
C. メダカ FTZ-F1 様タンパク質 (mdFTZ-F1) cDNA 及びアミノ酸配列.....	12
D. 既知 FTZ-F1 と mdFTZ-F1 の相同性.....	12
E. 組織特異性.....	13
4. 考察.....	15
第II章 mdFTZ-F1 の機能解析.....	18
1. はじめに.....	18
2. 方法.....	18
A. DNA 結合能の解析.....	18
a. オリゴ DNA プローブの調製.....	18
b. メダカ P-450arom TATA Box 近傍プローブの調製.....	18
c. メダカ卵濾胞細胞からの核抽出液の調製.....	18
d. <i>Ad4BP</i> と <i>mdFtz-F1</i> の in vitro 発現.....	19
e. gel shift assay.....	19
B. mdFtz-F1 遺伝子発現変化の解析.....	20
a. メダカ卵濾胞細胞からの RNA の抽出.....	20
b. RNase protection assay.....	20
C. 細胞へのトランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ.....	20

a. メダカ <i>P</i> -450arom プロモータ - ルシフェラーゼレポーターベクタの調製...	20
b. CV-1 細胞の培養.....	21
c. トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ.....	21
3. 結果.....	22
A. メダカ <i>P</i> -450arom プロモータ中の Ad4 配列への mdFTZ-F1 の結合.....	22
a. <i>In vitro</i> で発現した <i>mdFtz-F1</i> について.....	22
b. メダカ卵濾胞細胞核抽出液について.....	22
B. <i>mdFtz-F1</i> 遺伝子発現変化の解析.....	23
C. メダカ <i>P</i> -450arom プロモータに対する mdFTZ-F1 の効果.....	23
D. メダカ <i>P</i> -450arom プロモータ中の mdFTZ-F1 応答領域.....	23
4. 考察.....	25
まとめ.....	28
謝辞.....	31
参考文献.....	32

図

序論

卵原細胞から成熟卵が形成されるまでの一連の過程を卵形成と呼ぶ。脊椎動物の卵巢では、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んでいる (Nagahama, 1983)。卵母細胞の成長や成熟はこれら2種類の濾胞細胞で合成される種々の物質、特に性ステロイドホルモンにより制御されている (Nagahama, 1994)。哺乳類の卵巢では生殖腺刺激ホルモンの作用で主として発情ホルモンとして知られているエストロゲン (主として estradiol-17 β) と妊娠維持に必要なプロゲステロンが生成される。一方、魚類を含む卵生の脊椎動物でも哺乳類と同じようにエストロゲンと種々のプロゲスチン (特に魚類では 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one が脊椎動物で唯一卵成熟誘起ホルモンとして単離、同定されている) が生殖腺刺激ホルモンの作用のもとに作られる (Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995)。このうち estradiol-17 β は卵生の脊椎動物では卵黄形成を促進する重要なホルモンである。なお、魚類ではこれまで 1 種類の生殖腺刺激ホルモンのみが存在し、これが生殖腺の種々の機能を制御すると考えられてきた。しかし、最近になり魚類でも FSH (濾胞刺激ホルモン) 様活性 (魚類では GTH-I) と LH (黄体形成ホルモン) 様活性 (魚類では GTH-II) を持つ 2 種類の生殖腺刺激ホルモンが数種の硬骨魚類の脳下垂体から単離、精製され、また、各々の遺伝子も明らかにされている (Kawauchi *et al.*, 1989; Swanson, 1991)。このうち、GTH-I は卵や精子の成長に、また、GTH-II はこれら配偶子の最終成熟に関わるホルモンであると考えられている。したがって、卵成長期の卵濾胞組織における estradiol-17 β の生成に重要な役割を果たす生殖腺刺激ホルモンは GTH-I (FSH 様生殖腺刺激ホルモン) と推察される。

遺伝的雌の個体において始原生殖細胞は生殖隆起に入り、卵巢形成とともに卵原細胞となる。そこで卵原細胞は有糸分裂を行い増殖した後、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入る。卵生脊椎動物では卵巢の成長期において、

脳下垂体から分泌された生殖腺刺激ホルモンに応答して卵濾胞組織中の顆粒膜細胞でエストロゲンが合成される。合成されたエストロゲンは血流に乗って肝臓に到達し、そこではこのシグナルに応答して卵黄の主成分である vitellogenin が合成される。vitellogenin は血流に乗って卵巣に到達し、卵母細胞に取り込まれる。以上のようにして、卵母細胞中に卵黄が蓄積し、卵母細胞の径が増大する(図 1)。このような現象を卵母細胞の卵黄蓄積過程といい、卵形成において卵黄形成の起こるステージを卵黄形成期と呼ぶ(図2)。そして、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。

前述したように卵生の脊椎動物では、エストロゲンは卵黄形成期における中心的なステロイドホルモンである。卵黄形成以外にもエストロゲンは生殖腺の卵巣への分化にも関与することが示唆されている。メダカ胚や幼生にエストロゲンを投与すると遺伝形質としてはオスである個体が表現型としてメスとなっただけでなく、精巣中に濾胞卵に似た構造を生じたことが報告されている(Yamamoto, 1965; Shibata and Hamaguchi, 1988)。脊椎動物における主要なエストロゲンは estradiol-17 β で卵巣中では卵濾胞細胞中の酵素 Cytochrome P-450 aromatase (P-450arom)によって前駆体 testosterone から合成される。

メダカ(*Oryzias latipes*)の卵形成における P-450arom 活性の変化についてはいくつかの研究報告がある。メダカは水温 26°C、明期 14 時間、暗期 10 時間の条件で飼育すると毎日点灯してから 1 時間以内に産卵する。卵黄形成、卵成熟そして排卵の各ステージは点灯時刻からの正確な時系列にそって同定可能である(Sakai *et al.*, 1987)。卵黄形成期の主な部分と卵成熟は点灯前 48 時間以内に起こり、卵成熟に伴う卵核胞崩壊と排卵はそれぞれ産卵の 6 時間前と 1 時間前に起こる(図 2)。以上のことから、メダカを実験動物として使用することにより、卵形成の各段階にある卵濾胞組織を正確に入手することができる。

更には、メダカでは点灯前の各時間ごとの異なるステージの卵濾胞を単離して *in vitro* で培養することが可能である。我々の以前の研究より、点灯 28-20 時間前の卵黄蓄積が最も盛ん

な卵濾胞では estradiol-17 β 産生能が顕著に増加し、卵成熟期に入るとこの活性が低下することが明らかにされた(図2 赤色の線)(Fukada *et al.*, 1994)。この分子機構を更に詳しく調べるため、メダカ卵濾胞ライブラリから P-450arom の cDNA が単離され、これを用いて P-450arom 遺伝子転写産物の量を調べたところ、メダカ卵濾胞の estradiol-17 β の産生能と一致した増減が見られた。更に、この産生能および P-450arom 遺伝子転写産物は転写阻害剤である actinomycin D によって完全に阻害されることが明らかとなった(Nagahama *et al.*, 1991, Fukada *et al.*, 1996., Tanaka 未発表)。これらのことは、メダカ卵濾胞における P-450arom による estradiol-17 β 産生は転写レベルで制御されていることを示唆している。また、*in vitro* 培養メダカ卵濾胞に妊馬血清生殖腺刺激ホルモン(PMSG)を加えると、P-450arom 遺伝子転写産物および estradiol-17 β 産生能は上昇し、この上昇は細胞内 cAMP 量を増加させる forskolin や dbcAMP 投与によっても再現された。このことは P-450arom の活性制御には生殖腺刺激ホルモンを介した protein kinase A の経路があることを示唆している。

以上の結果により、estradiol-17 β 産生機構には P-450arom 遺伝子の転写制御が重要であることが示唆されたため、更にこの転写制御を明らかにする目的で、まず P-450arom の遺伝子構造が明らかにされた(Tanaka *et al.*, 1995)。メダカ P-450arom 遺伝子のプロモータ領域の塩基配列を図3に示す。メダカ P-450arom プロモータ領域中には、転写調節因子である核内レセプターの中でも orphan nuclear receptor と呼ばれるものが結合することが知られている塩基配列(Ad4-1, Ad4-2)と、エストロゲンレセプターが結合する塩基配列に似た塩基配列(ERE-like)とが存在することが分かった。このことはメダカ P-450arom 遺伝子の転写調節に核内レセプターが関与している可能性を示唆している。

以上のことを踏まえて、本研究では、メダカ卵濾胞においてメダカ P-450arom 遺伝子の転写調節に orphan nuclear receptor が関与する可能性を検討した。まずメダカ卵濾胞で発現している orphan nuclear receptor を単離、部分塩基配列の決定を行い、7つの orphan nuclear receptor の部分塩基配列を得た。その中でも卵形成過程における遺伝子発現パターンが P-

450aromと良い一致を示している FTZ-F1 様タンパク質(mdFTZ-F1)について全長 cDNA のクローニングを行い、ゲルシフトアッセイ、細胞へのトランスフェクション実験などによって mdFTZ-F1 の *P*-450arom プロモータに対する働きを調べた。これらの実験により、得られた結果から、mdFTZ-F1 がメダカ卵形成過程において卵濾胞細胞中での *P*-450arom 遺伝子の時期特異的な転写調節に深く関与することが明らかとなった。

略語

Ad4BP	Adrenal 4 binding protein
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
FSH	Follicle stimulating hormone
FTF	Fetoprotein transcription factor
FTZ-F1	Fushitarazu factor 1
LH	Luteinizing hormone
LRH-1	Liver receptor homologue 1
mdFTZ-F1	Medaka FTZ-F1
P-450arom	Cytochrome P-450 aromatase
P-450scc	Cytochrome P-450 side-chain-cleavage enzyme
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
RXR	Retinoid X receptor
SF-1	Steroidogenic factor 1

実験動物

メダカ(ヒメダカ)は愛知県弥富町の佐藤養魚場より購入した。購入したメダカを水槽中でメス12匹、オス8匹を水温 26℃、明期 14 時間、暗期 10 時間の環境下で飼育した。

メダカ Ringer 液の組成 (pH 7.3)

111 mM	NaCl
5.4 mM	KCl
1 mM	CaCl ₂

pH は NaHCO₂ で pH7.3 に調整

第I章 メダカ卵濾胞細胞からの *Ftz-F1* 様 cDNA のクローニング

1. はじめに

本研究に先立って行われたプロモータ解析 (Tanaka *et al.*, 1995)により、メダカ *P-450arom* 遺伝子のプロモータ領域に orphan nuclear receptor と呼ばれる一群の転写因子によって認識される塩基配列が存在することが明らかにされたことから、*P-450arom* の転写調節に orphan nuclear receptor が関与する可能性が示唆されていた。ここではメダカ卵濾胞に発現している orphan nuclear receptor について RT-PCR によって部分塩基配列を単離することを試み、どの orphan nuclear receptor が発現しているかを調べた。同時に、その部分塩基配列をプローブとしてメダカ卵形成過程における卵濾胞中での遺伝子転写産物量の推移を RNase プロテクションアッセイによって検討した。その結果、*P-450arom* 遺伝子転写産物の推移と良い一致を示すもの (フラグメント B) が1つ見出された。そこで、メダカ卵濾胞より構築された cDNA ライブラリからこの部分塩基配列をプローブとして全長塩基配列のクローニングを試み、その結果として FTZ-F1 と高い相同性を持つものを得た。また、今回単離したクローンの遺伝子転写産物の組織特異性も検討した。

2. 方法

A. orphan nuclear receptor 遺伝子断片のクローニング

a. メダカ卵濾胞細胞からの RNA の抽出

メダカの延髄を切断したのちに開腹し、ピンセットを使って卵巣を摘出した。摘出した卵巣を 90%、pH 7.3 の medium 199 (Gibco BRL) 中に移し、この中で、時計用ピンセットを使って卵巣を開き、卵濾胞を摘出した。摘出した卵濾胞が卵形成のどのステージにあるかは、卵巣を摘出した時刻と卵濾胞の径をもとに判断した。次に medium 199 を Buffer A (50 mM Tris-Cl, pH 7.8, 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂) に完全に置換し、プラスチックホモジナイザを使って、卵母細胞より卵黄を漏出させ、数回 Buffer A を交換することによって卵黄を完全に除去

した。以上のようにして、卵濾胞組織と基底膜からなるサンプルを調製した。このサンプルより、total RNA を ISOGEN (ニッポンジーン) を使って抽出した。

b. RT-PCR による orphan nuclear receptor 断片のクローニング

orphan nuclear receptor の DNA 結合ドメインのアミノ酸配列のよく保存されている部分をもとに、以下のような degenerate primer を調製した。

ORPH1 : 5'-TT(AGT)TGT(AC)(AC)(AGT)GT(AGTC)TG(TC)GG(AGTC)GA-3'

ORPH2 : 5'-TGTGA(AG)(AGT)(GC)(AGT)TGTAAG(AG)GG(AGTC)TT(TC)TT-3'

ORPH3C : 5'-TT(TG)(AG)AA(AGT)C(GT)(AG)CA(AG)(AT)A(AGT)(TG)G(AG)CA-3'

ORPH4C : 5'-CAT(AGT)CC(AGT)ACTT(GC)(AGTC)A(AG)(AG)CA(TC)TT-3'

卵濾胞 total RNA を鋳型として Superscript II (Gibco BRL) を用いて cDNA を合成し、この cDNA 1 μ l と 100 ng ORPH1、100 ng ORPH4C、0.5 U AmpliTaq (Perkin Elmer) そして AmpliTaq に添付のバッファーを用いて、94°C 1 min、54°C 1 min、72°C 2 min で 40 サイクルの PCR を行った。次にこの反応液を 100 倍希釈したもの 1 μ l を鋳型とし、100 ng ORPH2、100 ng ORPH3C を用いて 1 回目と同じ温度およびサイクルの PCR を行った。約 130 bp に相当するフラグメントを回収し、Original TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、TA クローニングを行った。フラグメントの相同解析は BLAST によって行った。

B. orphan nuclear receptor 遺伝子発現変化の解析

RNase プロテクションアッセイ

RT-PCR によって得られたそれぞれの orphan nuclear receptor フラグメントに対する cRNA プローブを [α -³²P]-CTP の存在下で T7 または SP6 RNA polymerase を用いて調製した。PCR によって増幅し、TA クローニングしたメダカ *P*-450arom cDNA (GENBANK accession No. D82968) の 821base から 1054base に相当する部分とメダカ 18S ribosomal RNA の部分塩

基配列に対する cRNA プローブも同様にして調製した。RNase プロテクションアッセイは Davis ら(1994)の方法をもとに行った。メダカ卵濾胞の total RNA、10,000 cpm の RT-PCR フラグメントまたは *P*-450arom に対する cRNA プローブ、50 cpm の 18S ribosomal RNA に対する cRNA プローブを 50 μ l の hybridization buffer (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 0.5 M NaCl, 2 mM EDTA) 中で 80°C で 3 分間加熱した後に 45°C で 16 時間インキュベートした。その後、20 μ g の RNase A と 1 μ g の RNase T1 を含む緩衝液 (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA) を 350 μ l 加えて 30°C で 1 時間インキュベートした。20 μ l の 10% SDS と 5 μ l の 10 mg/ml proteinase K 溶液を加えて 37°C で 15 分間インキュベートすることによって RNase の反応を止め、1 μ l の yeast tRNA 溶液 (10 mg/ml)、45 μ l の 5 M NaCl そして 1 ml のエタノールを加え、-20°C で 10 分インキュベートすることによってエタノール沈殿を行った。エタノール沈殿によって生じた沈殿を 2 μ l の loading buffer (85% formamide, 90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, 0.5% xylene cyanol, 5% water saturated with bromophenol blue) に溶解し、8 M の尿素を含んだ 6% ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。電気泳動の結果は BAS2000 (富士フィルム) によって画像化した。18S ribosomal RNA に対する cRNA プローブは電気泳動の際のゲルへの試料導入のばらつきの補正のために反応液中に加えた。

C. *Ftz-FI* 様 cDNA のスクリーニングと塩基配列決定

フラグメント B を鋳型として [α -³²P]-dCTP の存在下で PCR 法によって放射性プローブを調製した。これを用いてメダカ卵濾胞細胞から ZAP Express (Stratagene) を用いて構築した cDNA ライブラリ (480,000 phages) をスクリーニングした。3 度にわたるスクリーニングの後、*in vivo* excision によって、約 2 kbp のインサートを持ったクローンを得た。このクローンの塩基配列を解析した結果、このクローンが ORF の 5' 側を欠失している可能性が示唆されたので、T3 プライマ (5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGAA-3')、FP2C プライマ (5'-

GCCGTGCTCTCCAGCTTGAACCCG-3') として FP3C プライマ (5'-CGTGTGCAGGGTGCCAGTGAAGC-3')を用いてメダカ卵濾胞 cDNA ライブラリ全体を鋳型として PCR を行うことによって ORF の 5'領域の塩基配列情報を得た。

D. アミノ酸配列の相同性解析

今回得られたクローンのアミノ酸配列と既知の FTZ-F1 タンパク質のアミノ酸配列との相同性解析は CLUSTAL W によって行った。分子系統樹は neighbor-joining 法によって、ブートストラップ値 100 にて行った。

E. 組織特異性

a. 各組織からの RNA の抽出

延髄を切断することによってメダカを殺して、メダカ用 Ringer 液中で時計用ピンセット等を用いて各組織を摘出した。各組織からの total RNA は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて抽出した。

b. RNase プロテクションアッセイ

mdFTZ-F1 の第 136 アミノ酸残基から第 180 アミノ酸残基に相当する部分をもとに調製した cRNA プローブと前述 (I. 1. B.) と同様に調製した *P*-150arom cRNA を用い、各組織 total RNA について前述 (I. 1. B.) の方法に基づき RNase プロテクションアッセイを行った。

3. 結果

A. RT-PCR フラグメントの相同性解析

orphan nuclear receptor の DNA 結合ドメイン間で良く保存されているアミノ酸配列をもとにして設計したプライマを用いた RT-PCR によってメダカ卵濾胞の RNA から 7 種類の orphan nuclear receptor の部分 cDNA をクローニングすることができた。それぞれフラグメント A、B、C、D、E、F、G と名づける。プライマーの配列を除くと、どれも約 80 bp の長さであった。それぞれのフラグメントをアミノ酸配列に翻訳し、BLAST による相同解析を行った結果、フラグメント A はマウスの RXR α (Mangelsdorf *et al.*, 1992) に対して 88% の相同性を持ち、フラグメント B はマウスの Ad4BP/SF-1 (Ikeda *et al.*, 1993) に対して 85% の相同性、フラグメント C はマウスの TAK1 (Hirose *et al.*, 1995) に対して 92% の相同性、フラグメント D はヒトの PPAR γ (Okazawa *et al.*, 1997) に対して 88% の相同性、フラグメント E はヒトの COUP-TF (Miyajima *et al.*, 1998) に対して 85% の相同性、フラグメント F はヒトの PPAR β (Schmidt *et al.*, 1992) に対して 88% の相同性、フラグメント G はマウスの Rev-erb β (Forman *et al.*, 1994) に対して 87% の相同性をそれぞれ持っていることがわかった。各フラグメントと orphan nuclear receptor の部分シーケンスとの比較を図 4 に示す。

B. 各 orphan nuclear receptor の卵形成過程における発現パターン

今回得られた RT-PCR フラグメントを鋳型として cRNA プローブを調製し、それぞれの orphan nuclear receptor の卵形成過程における遺伝子転写産物量の推移を RNase プロテクションアッセイによって調べた。卵黄形成期前と点灯 35、29、23、11、8、5 時間前の卵濾胞から得た total RNA 中の各 orphan nuclear receptor 遺伝子転写産物量を測定した。*P*-450arom とフラグメント B について電気泳動の画像と定量結果を図 5 に示す。点灯 35、29、23 時間前はメダカ濾胞卵の卵黄形成期に当たり、点灯 11、8、5 時間前は卵成熟期に当たる。図 5 に示すようにメダカ *P*-450arom の遺伝子転写産物量は卵黄形成が進行するにつれ

て増加し、卵成熟期に入ると急激に減少する。各 RT-PCR フラグメントについて RNase プロテクションアッセイを行った結果、フラグメント A、E では明瞭な遺伝子発現が認められたが、それらの遺伝子転写産物量の推移は見られなかった。一方、フラグメント B では卵黄形成期に発現量がかなり多く、卵成熟期に少ないという明瞭な推移が見られ、また、この推移はメダカ *P-450arom* の遺伝子転写産物量の推移とほとんど一致している。しかし、フラグメント C、D、F、G については遺伝子発現を示す明瞭なバンドが検出されなかった。

C. メダカ FTZ-F1 様タンパク質 (mdFTZ-F1) cDNA 及びアミノ酸配列

メダカ卵濾胞 cDNA ライブラリよりフラグメント B をプローブとして全長 2,168 塩基の長さの cDNA をクローニングすることができた。この cDNA は 486 アミノ酸よりなるタンパク質をコードする ORF を持っている。BLAST による相同性検索の結果、このクローンは既に哺乳類などでクローニングが報告されている FTZ-F1 タンパク質と相同性を持つことが分かった。このことより、今回メダカ卵濾胞よりクローニングした cDNA をメダカ FTZ-F1 様タンパク質 cDNA (*mdFtz-F1*) と名づけた。*mdFtz-F1* の全塩基配列及び翻訳されたタンパク質(mdFTZ-F1) の全アミノ酸配列を図 6 に示す。

D. 既知 FTZ-F1 と mdFTZ-F1 の相同性

mdFTZ-F1 アミノ酸配列とゼブラフィッシュ zFF1A (Liu *et al.*, 1997)、アフリカツメガエル xFF1rA と xFF1B (Ellinger-Zeigelbauer *et al.*, 1994)、ニワトリ LRH-1 (Kudo and Sutou, 1997)、マウス LRH-1 (GENBANK accession No. M81385)、ヒト FTF (GENBANK accession No. U93553)、ニワトリ SF-1 (Kudo and Sutou, 1997)、マウス SF-1 (Lala *et al.*, 1992)、ウシ Ad4BP (Honda *et al.*, 1993) そして、ニジマス tFZR1 (Ito *et al.*, 1998) のそれぞれのアミノ酸配列の CLUSTAL W によるアラインメントの結果を図 7 に示す。

mdFTZ-F1 は既知 FTZ-F1 と同様核内レセプターに共通の Region I、Region II、

Region III (Wang *et al.*, 1989)、AF-2 (Crawford *et al.*, 1997) を持っていた。また、FTZ-F1 に特徴的な FTZ-F1 Box (Ueda *et al.*, 1992) も mdFTZ-F1 に存在していた。各 FTZ-F1 のドメインごとの相同性比較の結果を図 8 に示す。DNA 結合ドメインである Region I では既知 FTZ-F1 のものと約 90%の相同性を持っており、図 7 によると zinc-finger 構造の形成に重要なシステイン残基の位置は完璧に保存されている。核内レセプターで一般的にリガンドの結合や転写活性化の働きを持つとされているドメインの一部である Region IIと Region III はニジマス由来のもの以外の既知の FTZ-F1 のものとそれぞれ高い相同性を示している。核内レセプターの転写活性化に特に重要であるとされている AF-2 はニジマス以外の既知 FTZ-F1 のものと 100%一致した。Neighbor-joining 法による各 FTZ-F1 の分子系統樹を図 9 に示す。FTZ-F1 ファミリーは LRH-1 グループ (マウス LRH-1、ヒト FTF、ニワトリ LRH-1、アフリカツメガエル FF1rA、FF1rB、ゼブラフィッシュ FF1A) と、Ad4BP/SF-1 グループ (マウス SF-1、ラット Ad4BP、ウシ Ad4BP、ニワトリ SF-1)、そしてその他の FTZ-F1 グループ (ショウジョウバエ FTZ-F1、カイコ FTZ-F1) の 3 つのグループに大きく分かれることがわかる。mdFTZ-F1 はこの分子系統樹では、ブートストラップ値 54 で脊椎動物 FTZ-F1 のグループに属しているが、そのサブグループである LRH-1 のグループにも SF-1 のグループにも明確に属していないように見える。このことからその一次構造のみでは mdFTZ-F1 が LRH-1 のグループに属するのか、SF-1 のグループに属するのかの断定は難しい。

E. 組織特異性

RNase プロテクションアッセイによってメダカの脳、心臓、脾臓、筋肉、腸、肝臓、腎臓、精巣、卵濾胞組織、卵母細胞の total RNA について *P-450arom* と *mdFtz-F1* の遺伝子転写産物の有無を調べた結果を図 10 に示す。*mdFtz-F1* 遺伝子転写産物の存在を示すバンドは 1 μ g の精巣と卵濾胞組織の total RNA について明瞭に見られる。卵母細胞にも弱いシグナルが見られる。腎臓、脾臓そして 30 μ g の脳の total RNA についてかすかなシグナル

が見られる。ほかの組織由来の total RNA についてはシグナルは見られない。P-450arom
の発現を示すシグナルは卵濾胞組織 RNA についてのみ見られた。

4. 考察

RT-PCR フラグメントとして 7 種類の orphan nuclear receptor の部分塩基配列をメダカ卵濾胞から得ることができた。これを用いて RNase プロテクションアッセイを行い、発現の確認を行った。その結果、フラグメント A、フラグメント B そしてフラグメント E の 3 つについては卵濾胞に発現していることが明らかとなった。また、その他のフラグメントについては遺伝子転写産物の存在を示す明瞭なバンドが見られなかった。この原因としては、PCR を行った際に濾胞細胞中の有意でないごく微量の RNA の塩基配列が増幅された可能性やゲノムの塩基配列が増幅された可能性が考えられる。

今回部分塩基配列として得られた orphan nuclear receptor の中でフラグメント B の発現パターンはかなり興味深いといえる。一般的に転写因子の発現量が標的遺伝子の発現と一致する必要はないが、今回得られたフラグメント B の発現パターンはこの塩基配列を含む転写因子がメダカ *P-450arom* の遺伝子発現の調節に関与する可能性を強く示唆するものである。このことから、本研究ではフラグメント B を含む転写因子のメダカ *P-450arom* の遺伝子発現への関与を調べることに集中することにし、メダカ卵濾胞から構築された cDNA ライブラリより、FTZ-F1 と高い相同性もつ cDNA (*mdFtz-F1*) をクローニングした。

CLUSTAL W による解析 (図9) では FTZ-F1 タンパク質は大きく分けて 3 つのグループ(脊椎動物 Ad4BP/SF-1 のグループ、脊椎動物 LRH-1 のグループそして昆虫 FTZ-F1 のグループ) に分かれる。図9は FTZ-F1 の祖先遺伝子は共通であり、脊椎動物が適応放散化した段階ですでに FTZ-F1 の祖先であるタンパク質が LRH-1 のグループと Ad4BP/SF-1 のグループの少なくとも 2 つ存在したことを示唆している。ブートストラップの値 54 から判断すると、*mdFTZ-F1* は脊椎動物 FTZ-F1 のグループに属する可能性が高いと判断されるが、その中のサブグループである LRH-1 のグループと Ad4BP/SF-1 のグループのどちらに属するのかは明確ではない。

脊椎動物の LRH-1 グループと Ad4BP/SF-1 グループではその発現の組織特異性に明

確な違いがある。LRH-1 と高い相同性を持ち、分子系統樹においても LRH-1 と同じグループに属するラットの FTF は主に肝臓に発現し、発生における α -fetoprotein の時期特異的な発現調節に関与することが報告されている (Galarneau *et al.*, 1996)。それに対して Ad4BP/SF-1 は生殖腺、副腎、脳そして脾臓に発現し、ステロイドホルモンの生合成に関与する P-450 酵素遺伝子の転写調節因子として報告されている (Morohashi *et al.*, 1992; Lala *et al.*, 1992)。Ad4BP/SF-1 のノックアウトマウスでは副腎と生殖腺の形成が認められず、また、脳下垂体や視床下部腹内側核に異常が見られることが報告されている (Luo *et al.*, 1994; Shinoda *et al.*, 1995; Sadovsky *et al.*, 1995)。この結果から Ad4BP/SF-1 はこれら組織の構築過程にも重要な役割を果たしていることが分かる。LRH-1 と Ad4BP/SF-1 はそれぞれの DNA 結合ドメインなどが互いに高度に保存されており、どちらも同じ DNA モチーフに結合することが知られている。また、マウスの胚幹細胞に遺伝子導入を行うとどちらを導入した場合でも P-450sc α の発現が見られるようになる (Crawford *et al.*, 1997) ことから、LRH-1、Ad4BP/SF-1 それぞれの機能はどの組織にいつ発現するかということに大きく依存するとも考えられる。そこで、*mdFtz-F1* 遺伝子転写産物の組織特異性を調べた。今回の RNase プロテクションアッセイによる組織特異性の検討の結果では mdFTZ-F1 は Ad4BP/SF-1 のグループの発現様式を示している。即ち、一次構造からは LRH-1 か Ad4BP/SF-1 いずれのグループとして機能するか断定は困難であったが、この発現様式は、mdFTZ-F1 が Ad4BP/SF-1 様機能を持つことを示唆している。

また、図11に示すように、*mdFtz-F1* と P-450arom は卵濾胞においてのみ共に発現していることがわかる。哺乳類において Ad4BP/SF-1 グループがステロイド産生酵素の転写調節に関わっているという知見を考えあわせると、mdFTZ-F1 も、P-450arom プロモータに働きかけることが十分期待される。

今回の RNase プロテクションアッセイの結果、*mdFtz-F1* の遺伝子転写産物は卵巣、精巣、脳、脾臓 そして腎臓に検出された。この組織特異性のパターンは Ad4BP/SF-1 のグル

ープに属する FTZ-F1 に特徴的なものである。本研究では卵母細胞でも *mdFtz-F1* のシグナルが弱いながらも検出されたが、他の動物についての発現の報告がないことから、卵濾胞細胞 RNA が混入したために生じた可能性も否定できない。腎臓における弱いシグナルは腎臓頭部（頭腎）の組織中に散在する哺乳類では副腎に相当する細胞に由来するものであろうと思われる。脳では *mdFtz-F1* の発現はごく微量であり、*P-450arom* の発現も明瞭ではない。これは脳内におけるステロイド産生細胞はごく少量に限られた場所に局在しているためであると思われる。

メダカ以外の魚類ではニジマスとゼブラフィッシュからの *Ftz-F1* のクローニングが報告されている (Liu *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1998)。ニジマス *Ftz-F1* (tFZR1) は図9の分子系統樹において明らかにどのグループにも属していない。tFZR1 は DNA 結合ドメインと FTZ-F1 Box がほかの既知 FTZ-F1 と高い相同性を持つのみで、ほかの部分の相同性はかなり低い。また、FTZ-F1 による転写活性化に必須であると言われる AF-2 の相同性もかなり低い。tFZR1 の遺伝子転写産物は脳、心臓、肝臓、精巣、卵巣のすべてにその存在が見られることから、tFZR1 は従来の FTZ-F1 とは異なる機能を有している可能性がある。ゼブラフィッシュ FTZ-F1 は胚から他の FTZ-F1 と高い相同性を持つもの (zFF1A) と、その AF2 領域を含む C 末端領域を欠失したおそらく zFF1A 遺伝子転写産物の選択的スプライシングによって生じたと思われるもの (zFF1B) との二つの存在が報告されている。zFF1A 遺伝子転写産物は脳、肝臓、卵巣、精巣のすべてに発現しているが、zFF1B は卵巣と精巣には発現が見られず、脳での発現量もかなり低い。また、zFF1B は zFF1A の競合阻害因子であることが明らかとなっており、これら二つのタンパク質の発現比によって Ad4BP/SF-1 活性を持っていると考えられている。メダカでは LRH-1 様の組織特異性を示すものやオルタナティブスプライシングによると思われるものの存在は未だ明らかにされていないが、それらの存在は強く示唆されるものである。

第 II 章 mdFTZ-F1 の機能解析

1. はじめに

第 I 章で明らかになった *mdFtz-F1* 遺伝子転写産物の組織特異性は、この転写因子がメダカ卵濾胞において *P-450arom* の転写調節に関与する可能性を示唆している。ここでは mdFTZ-F1 が実際に *P-450arom* プロモータ中の orphan nuclear receptor 認識配列と思われる塩基配列を特異的に認識することができるかどうか、細胞中で *P-450arom* プロモータを活性化することができるかどうかを検討した。また、メダカ卵濾胞中に orphan nuclear receptor 認識配列と思われる塩基配列を特異的に認識する因子が存在するかどうかをあわせて検討した。

2. 方法

A. DNA 結合能の解析

a. オリゴ DNA プロープの調製

図 10 に示すような二重鎖オリゴ DNA を調製し、5'突出端に Klenow フラグメントによって [α - 32 P]-dCTP を取込ませることによって標識し、ゲルシフトアッセイのプロープとして用いた。

b. メダカ *P-450arom* TATA Box 近傍プロープの調製

メダカ *P-450arom* プロモータ領域の-81 base から-19 base にかけての領域を PCR によって増幅し、pGEM-T Easy vector (Promega) に TA クローニングしたものを *EcoR* I 処理して増幅したプロモータ部分塩基配列を含むフラグメントを精製し、これの 5'突出端に Klenow フラグメントによって [α - 32 P]-dATP を取込ませることによって標識し、ゲルシフトアッセイのプロープとして用いた。

c. メダカ卵濾胞細胞からの核抽出液の調製

メダカ卵濾胞細胞からの核抽出液の調製は Bres と Eales (1988)の方法をもとに行った。前述(1. 2. A. a)の方法に基づき調製したメダカ卵濾胞組織を核単離バッファー (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM spermidin, 1 mM dithiothreitol, 0.25 M sucrose, 0.1 % Triton X-100, 50 μ M (p-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride hydrochloride, pH 7.4)に懸濁し、dounce tissue grinder を使ってホモジナイズした。ホモジネートを金網またはナイロンメッシュによって濾過し、濾液について 3,000 X g の遠心分離を行い、ペレットを核保存バッファー (0.32 M sucrose, 3 mM MgCl₂, 3 mM DDT, 25 mM KCl, 2 mM EGTA, 0.5 mM spermidine, 20 mM Tris-HCl pH 7.2, 5% glycerol)に懸濁し、液体窒素によって急速凍結し、-80°Cにて保存した。これを解凍し、15,000 rpm、4°C、10 分の遠心分離を行い、沈殿を 0.25% Triton-X 100 を含む核保存バッファーに懸濁し、10 分間氷上にてインキュベートの後、15,000 rpm、4°C、5 分の遠心分離を行い、沈殿を核抽出バッファ(0.4 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanol, 10% glycerol)に懸濁し、2 分間攪拌を行った後、5 分ごとに 15 秒間攪拌しながら 45 分間氷上にてインキュベートした。15,000 rpm、4°C、15 分の遠心分離を行い、上清に同体積の TEM buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 5 mM mercaptoethanol, 10% glycerol)を加え、液体窒素によって急速凍結し、-80°Cにて保存した。

d. *Ad4BP*と *mdFtz-F1* の *in vitro* 発現

ウシ *Ad4BP* cDNA と pSG5 ベクター中に組み込んだ *mdFtz-F1* cDNA について、TNT T7-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega)を用いて *in vitro* 発現を行った。

e. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは Morohashi と Omura (1990)の方法をもとに行った。タンパク試料とブ

ローブを含む 20 μ l の反応液 (15 mM HEPES (pH 7.9)、1 mM EDTA、4% Ficoll 400、1 mM DTT、4 mg/ml BSA、50 mM KCl、2 μ g poly(dI-dC)-poly(dI-dC))を氷上で 1 時間 インキュベートし、これについて、5%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。電気泳動の結果は BAS2000 によって画像化した。

B. *mdFtz-F1* 遺伝子発現変化の解析

a. メダカ卵濾胞細胞からの RNA の抽出

前述(1. 2. A. a)の方法に基づき、メダカ卵濾胞細胞より、total RNA を抽出した。

b. RNase プロテクションアッセイ

前述(1. 2. B)の方法に基づき、mdFTZ-F1 の第 136 アミノ酸残基から第 180 アミノ酸残基に相当する部分をもとに調製した cRNA プローブとメダカ 18S ribosomal RNA の部分塩基配列に対するcRNAプローブを用いて、卵黄形成期以前の卵濾胞、点灯 35、29、23、11、5 時間前の卵濾胞からそれぞれ得られた total RNA について RNase プロテクションアッセイを行った。

C. 細胞へのトランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ

a. メダカ *P-450arom* プロモーター - ルシフェラーゼレポーターベクターの調製

メダカ *P-450arom* プロモーターの全長および、5'領域を様々な長さで欠失させたものを PCR 法によって増幅し、ピッカジーンベシクベクタ 2 (ニッポンジーン)のホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込むことによってメダカ *P-450arom* プロモーター - ルシフェラーゼレポーターベクタを調製した。Ad4-1、Ad4-2 に変異を加えたレポーターベクタは図 10 に示す Ad4-1 mut、Ad4-2 mut のような変異を導入した *P-450arom* をピッカジーンベシクベクタ 2 に組み込むことによって調製されたものを使用した。

b. CV-1 細胞の培養

CV-1 細胞は 10%子牛血清アルブミンを含むダルベッコ変法イーグル培地中で 10%の二酸化炭素中で 37°Cで培養した。

c. トランスフェクションとルシフェラーゼアッセイ

CV-1 細胞を 12 穴ディッシュの1穴あたり 5×10^5 個の割合で培養をはじめ、24 時間培養後 Lipofectamine (Gibco BRL)を用いてメダカ *P-450arom* プロモーター - ルシフェラーゼレポーターベクタ、ピッカジーン TK コントロールベクタ(ニッポンジーン)、pSG5 に *mdFtz-F1* を組み込んだ発現ベクタを細胞内に導入し、48 時間培養後、セルスクレイバを用いて細胞を集め、Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega)と Microumat LB96P (EG & G BERTHOLD)を用いてホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定し、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を内部コントロールとして、レポータ活性を測定した。

3. 結果

A. メダカ *P*-450arom プロモータ中の Ad4 配列への mdFTZ-F1 の結合

a. *In vitro* で発現した *mdFtz-F1* について

ウサギ網状赤血球より調製された *in vitro* 発現系によって発現した *mdFtz-F1* の核オリゴヌクレオチドプローブへの結合能をゲルシフトアッセイによって調べた結果を図 12 に示す。MS4 はウシ Ad4BP が高い結合活性を示す配列であり、MS4d はウシ Ad4BP が結合できない配列である (Morohashi *et al.*, 1992)。Ad4-1、Ad4-2、ERE-like は図12の B に示したようなメダカ *P*-450arom プロモータ中に見出されるモチーフを持つオリゴヌクレオチドプローブである(図 10 を参照)。図12の A によると、mdFTZ-F1 は MS4 に結合し、50倍量の非標識プローブを標識プローブに対する競合剤として加えたときに結合を示すバンドが消失する(レーン6)。また、mdFTZ-F1 は MS4d に結合することができない(レーン 7)。これらのことから、この結合は MS4 に対して特異的なものであり、mdFTZ-F1 の塩基認識特異性はウシ Ad4BP のもの(レーン1、2、3)と同様であることが示唆される。mdFTZ-F1 は Ad4-1、Ad4-2 に特異的に結合することも明らかとなった(レーン8、9、10、11、12、13)。mdFTZ-F1 は ERE-like に結合できない(レーン 14、15、16)。

b. メダカ卵濾胞細胞核抽出液について

点灯 23 時間前のメダカ卵濾胞細胞より得た核抽出液をタンパク試料としてゲルシフトアッセイを行った結果を図13に示す。MS4をプローブとすると、3つのバンドが検出された(レーン3)。メダカプロモータ中の配列 Ad4-1、Ad4-2 をプローブとすると MS4 と同様な泳動位置に3つのバンドが現れ(レーン6、9)、これらのバンドは 50 倍量の非標識プローブによる競合を受けて消失する(レーン4、8、11)ことから、mdFTZ-F1 は特異的にこれらのプローブの塩基配列を認識して結合したと考えられる。3 つのバンドのうち、もっとも上に現れたバンドは reticulocyte で発現させた *mdFtz-F1* の結合によって生ずるバンドと同じ泳動距離に位置す

る。

メダカ卵形成の各段階にある卵濾胞から得た核抽出液中の Ad4-1、Ad4-2 への結合活性を調べた結果を図14に示す。点灯 35、29、23、11 時間前の卵濾胞核抽出液中には Ad4-1、Ad4-2 に特異的に結合する活性が存在するが、点灯5時間前の核抽出液中には Ad4-1、Ad4-2 への結合活性が全く存在しないことが分かる。それぞれの核抽出液中の DNA 結合活性が失活していないことを示すために、メダカ *P-450arom* プロモータの TATA 近傍をもとに調製したプローブを用いたゲルシフトアッセイの結果を図15に示す。どの時間の卵濾胞核抽出液を用いても矢頭で示した位置に特異的な結合を示すバンドが現れている。

B. *mdFtz-F1* 遺伝子発現変化の解析

mdFtz-F1 の部分塩基配列の中で既知のタンパク質 cDNA と相同性の低い部分をもとに調製した cRNA プローブを用いて、メダカ卵形成の各段階にある卵濾胞からの total RNA 中の *mdFtz-F1* 遺伝子転写産物量の推移を RNase プロテクションアッセイで調べた結果を図 16 に示す。*mdFtz-F1* の発現パターンはフラグメント B のものとほぼ同じで、卵黄形成期である点灯 35、29、23 時間前には発現が高く、卵成熟期に入ると発現が低いという傾向が見られた。

C. メダカ *P-450arom* プロモータに対する *mdFTZ-F1* の効果

CV-1 細胞へのトランスフェクションによって *mdFTZ-F1* のメダカ *P-450arom* プロモータに対する活性を調べた結果を図 17 に示す。メダカ *P-450arom* プロモータの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子をつなぎ、レポーターベクターとした。*mdFtz-F1* 発現ベクターを細胞へトランスフェクトすることによってレポーター活性が増加し、この効果は *mdFtz-F1* 発現ベクターの量の増加にしたがって増加していくことが分かる。

D. メダカ *P-450arom* プロモータ中の *mdFTZ-F1* 応答領域

さまざまな長さの 5'欠失プロモータを組み込んだレポータベクタを用いたトランスフェクション実験の結果を図18に示す。mdFtz-F1 発現ベクタと共トランスフェクションさせた状態で2つの Ad4 モチーフの直前までプロモータを欠失させるとレポータ活性は全長プロモータを使ったときに比べて60%になった。更に 2 つの Ad4-1 モチーフを欠失させると全長プロモータのときの20%にまで落ち込んだ。

次に Ad4 モチーフに変異を導入したレポータベクタを用いたトランスフェクション実験を行った。まず、図10に示すような変異を導入した Ad4-1 と Ad4-2 (Ad4-1 mut, Ad4-2 mut)の標識プローブを用いたゲルシフトアッセイを行い、これら二つの変異プローブには mdFTZ-F1 が特異的に結合できないことを確認した(図 19)。次に、Ad4-1 mut, Ad4-2 mut の変異を導入した P-450arom プロモータ塩基配列を持つレポータベクタを用いて実験を行った(図 20)。その結果、Ad4-1、Ad4-2 のそれぞれを単独に変異導入したものでも、両方に変異導入したものでも同じようにレポータ活性の低下が見られた。

4. 考察

本研究により、mdFTZ-F1 の塩基配列認識については既知の FTZ-F1 と同様であることが示唆された。すなわち、mdFTZ-F1 は FTZ-F1 の共通認識配列の1つである MS4 を特異的に認識し、共通認識配列に当てはまらない MS4d には結合できないことが明らかとなった。また、メダカ卵濾胞細胞から得られた核抽出液中にメダカ *P*-450arom プロモータ中の Ad4-1 と Ad4-2 に特異的に結合する活性を持つ因子が存在することも明らかになった。核抽出液を用いたゲルシフトアッセイにおいて現れた 3 本のバンドに対応するタンパク質の正体は現時点では不明である。最も泳動度の遅いバンドが reticulocyte で発現させた mdFtz-F1 の結合によって生じたバンドと同じ泳動度であることからこのバンドが核抽出液中の mdFTZ-F1 の結合によるものである可能性が考えられる。しかしながら、ゲルシフトアッセイではかなりタンパク質の分子量が違ってそれが泳動度の違いとして明瞭に現われにくい。実際、様々な長さに部分欠失させたウシ Ad4BP を用いたゲルシフトアッセイが行われているが、半分以上のアミノ酸を欠失させても泳動度はほとんど変わっていない (Honda *et al.*, 1993)。実際にメダカ卵濾胞核抽出液中に mdFTZ-F1 が存在し、Ad4-1、Ad4-2 モチーフに結合しうることを証明するためには mdFTZ-F1 特異的抗体を調製し、この抗体を混入させたゲルシフトアッセイにおいてバンドの消失やいわゆるスーパーシフトが起こるかどうかなどということの検討が必要と考える。

卵形成の各時間における卵濾胞の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイでは、点灯11時間前までは Ad4-1 と Ad4-2 への特異的結合活性の存在が見られ、点灯 5 時間前になると特異的活性はほぼ完全に消失している。卵成熟期に入っている点灯 11 時間前では *P*-450arom 転写産物はほとんど検出されないが、一方、Ad4-1、Ad4-2 への結合因子はこの時間においてもまだ検出される。これまでの研究から点灯 11 時間前のメダカ卵濾胞組織では生殖腺刺激ホルモンの刺激に対して、メダカの卵成熟誘起ホルモンである $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one が生成されることがわかっている。したがって、もし上記結合因

子が mdFTZ-F1 であるとすれば、mdFTZ-F1 は 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one の生成に関与している可能性が考えられ、特に前駆体 17α -hydroxyprogesterone を 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one に転換させるステロイド代謝酵素である 20β -ステロイド水酸基脱水素酵素の転写調節への関与が注目される。

mdFtz-F1 遺伝子転写産物量はメダカの卵形成過程においてフラグメント B とほぼ同じ推移を示した。ある転写因子が標的遺伝子の発現を調節する機構としてその転写因子自体の発現量が標的遺伝子と同じパターンで変化するというものは最も単純な形式であろうと思われる。哺乳類の卵巣における *P-450arom* の転写調節の研究において、濾胞刺激ホルモン (FSH) の刺激に応答して顆粒膜細胞中の *P-450arom* 転写産物量は上昇し、黄体形成ホルモン (LH) の刺激に応答して急激に減少することが *in vivo* (Hickey *et al.*, 1988) および *in vitro* (Fitzpatrick *et al.*, 1997) の実験の結果として報告されている。これらの知見をもとに、LH サージ後のラットの顆粒膜細胞中の Ad4BP/SF-1 がサージ前に比べて変化しているかどうかを検討した研究では、DNA モチーフへの結合活性の量、ウェスタンブロットによって調べたタンパク量共に LH サージ後の減少が観察されている (Carlone *et al.*, 1997)。ヒト *P-450arom* の近接プロモータ(卵巣での転写に特異的なプロモータ)による cAMP 依存的な転写上昇において Ad4BP/SF-1 が関与しており、細胞内 cAMP 量の上昇に伴って Ad4BP/SF-1 自体の発現量も上昇するということが報告されている (Michael *et al.*, 1995)。Ad4BP/SF-1 が *P-450arom* 遺伝子の転写調節に直接関与しているとすれば、Ad4BP/SF-1 をコードする遺伝子の転写調節を行う転写因子を検索することも重要であると考えられる。

CV-1 細胞へのトランスフェクション実験の結果、mdFTZ-F1 は細胞中で *P-450arom* プロモータを活性化することができることが分かった。また、5'欠失プロモータや Ad4 モチーフを不活性化するような変異を導入したプロモータを用いた実験により、mdFTZ-F1 による *P-450arom* プロモータの活性化には二つの Ad4 モチーフが重要であることが分かった。二つある Ad4 モチーフのうちどちらか一つに変異を導入しただけで、プロモータの活性は劇的に

低下した。このことは Ad4 モチーフが二つ存在するということが mdFTZ-F1 によるプロモータ活性化において必須であることを示唆している。

まとめ

遺伝子が適切な組織において適切な時期に発現することは発生過程における形態形成や成体の生理的機能維持にとって最も重要なことであると言える。本研究では、メダカの卵形成過程における卵濾胞での *P-450arom* 遺伝子の時期特異的な転写調節機構の中で orphan nuclear receptor が関与する可能性を検討するために一連の実験を行った。以下に本研究で得られた結果をまとめる。

1. メダカ卵濾胞細胞から得られた total RNA について RT-PCR を行うことによって orphan nuclear receptor の部分塩基配列をクローニングした。RNase プロテクションアッセイで卵濾胞における発現を調べたところ、RXR、Ad4BP/SF-1、COUP-TF に相同性を持つものが発現していることが改めて確認された。それぞれの卵形成過程における遺伝子転写産物量の推移を検討したところ、Ad4BP/SF-1 に相同性を持つものが *P-450arom* 転写産物量の推移と良い一致を示すことがわかった。
2. この部分塩基配列をプローブとしてメダカ卵濾胞の cDNA ライブラリより FTZ-F1 様タンパク質(mdFTZ-F1)をコードする 2,168 塩基の長さの cDNA をクローニングした。mdFTZ-F1 一次構造は既知の FTZ-F1 と高い相同性を示した。*mdFtz-F1* 遺伝子転写産物の組織特異性の結果から、mdFTZ-F1 はメダカにおいて FTZ-F1 遺伝子群の中でも Ad4BP/SF-1 様の機能を有することが示唆された。
3. メダカ卵形成過程におけるmdFtz-F1 の遺伝子転写産物量の推移は *P-450arom* 遺伝子転写産物量の推移と良い一致を示した。この結果は、mdFTZ-F1 が *P-450arom* の転写調節に関与することを示唆するものである。
4. ゲルシフトアッセイによって mdFTZ-F1 は Ad4BP/SF-1 と同じ DNA 塩基配列を認識しうること、メダカ *P-450arom* 遺伝子プロモータ領域中の orphan nuclear receptor 結合モチーフと思われる二つの塩基配列(Ad4-1、Ad4-2)に特異的に結合できることが分かった。また、メダカ卵濾胞細胞核抽出液中に実際に Ad4-1 と Ad4-2 に特異的に結合

する活性を持つ因子が存在することが分かった。

5. CV-1 細胞へのトランスフェクション実験の結果から、mdFTZ-F1 は細胞中でメダカ *P*-450arom プロモータを活性化する機能を有することが分かった。また、5'欠失プロモータや変異導入プロモータを用いた実験により、mdFTZ-F1 によるメダカ *P*-450arom プロモータの活性化には Ad4-1 と Ad4-2 の存在が必須であることが明らかとなった。

以上の結果から、mdFTZ-F1 がメダカ卵形成過程において卵濾胞細胞中での *P*-450arom 遺伝子の時期特異的な転写調節に関与することが示唆される。本研究の成果は卵形成（卵黄形成）過程の詳細な時間軸に沿った *P*-450arom 遺伝子転写調節の機構における FTZ-F1 の関与の可能性を明らかにしたのものとしては初めてのものである。

P-450arom 転写調節の機構については、遺伝子構造、ホルモン応答や細胞内 cAMP 量依存性、組織特異性などの観点から研究がなされている。ヒトの *P*-450arom 遺伝子では各組織に特異的なプロモータ領域を 5'にもつ第一エクソンが複数存在し、その選択によって *P*-450arom の組織特異的発現調節がなされることが知られている。メダカ *P*-450arom の遺伝子構造は哺乳類のものに比べて小さく、そのプロモータは一種類しか存在しないことが明らかとなっている (Tanaka *et al.*, 1995)。メダカ *P*-450arom 遺伝子の発現様式は哺乳類の *P*-450arom の発現様式のプロトタイプであることが考えられ、高等動物における性分化や疾患における *P*-450arom の遺伝子発現調節研究の有益なモデル系をメダカ *P*-450arom が提供することが期待される (Simpson *et al.*, 1997)。

また、メダカ卵濾胞は厳密な時間軸に沿った変化を観察できる実験系としてその変化の過程におけるホルモン応答や使われる細胞内シグナル伝達系の変化などについて興味深いデータを提供することが期待される。

本研究の今後の展開としては、mdFTZ-F1 のリン酸化などによる修飾の詳細を明らかにすること、*P*-450arom 遺伝子発現において協奏的に働く転写因子を検索すること、いわゆるコ

ファクターの同定とその *P*-450_{arom} 遺伝子発現調節における役割を明らかにすることなどが考えられる。Ad4BP/SF-1 のリン酸化については、これまでその一次構造中にタンパク質リン酸化酵素によるリン酸化部位が存在することや顆粒膜細胞内での FSH に応答したリン酸化が報告されている(Carlone *et al.*, 1997)。また、Ad4BP/SF-1 と協奏的に働く転写因子として CREB、WT-1、Dax-1 などが報告されている(Carlone *et al.*, 1997; Nachtigal *et al.*, 1998)。本研究では遺伝子転写産物量の推移を根拠に、フラグメント B に集中して研究を進めてきたが、他の orphan nuclear receptor が *P*-450_{arom} 転写調節に関与する可能性も否定できない。実際、本研究において得られた部分塩基配列に相同性を持つ orphan nuclear receptor の中には、COUP-TF、RXR、PPAR β と PPAR γ が認識する塩基配列のハーフサイト(AGGTCA) (Mangelsdorf *et al.*, 1995) がメダカ *P*-450_{arom} プロモータ中に存在する。mdFTZ-F1 も含めて、これらの転写因子が協奏的に機能して *P*-450_{arom} 転写調節に関与する可能性は大きい。また、カイコ FTZ-F1 のコファクターとして最初に発見された MBF1(Takemaru *et al.*, 1997)についてはそのホモログがヒトでもクローニングされ、ヒト MBF1 が Ad4BP/SF-1 と TATA Box 結合タンパク質の間に介在することによって転写活性化に関与するコアクチベータとして機能することが報告されている。これらの知見をもとに、外部からのホルモン応答、細胞間シグナル伝達、細胞内シグナル伝達などの機構と *P*-450_{arom} 転写機構との関わりを明らかにしていきたいと考えている。

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田中実博士に深く感謝致します。また、学位審査委員会の諸橋憲一郎教授、野田昌晴教授、上野直人教授に感謝いたします。

メダカの飼育や卵濾胞サンプルの調製などご協力いただき、また、種々のご指摘をくださいました小林大介博士、大場裕一博士、吉浦康壽博士、東藤孝博士、山口明彦博士、勝義直博士、池内俊貴博士、田中幸子技官、住川直美技官、高木千賀子さん、また、ウシ Ad4BP cDNA の供与及び様々な技術的議論に応じていただきました諸橋憲一郎教授、河辺顕医師、岡早苗技官、坪井久恵さん、有益な討論をいただきました基礎生物学研究所・生殖研究部門ならびに細胞分化研究部門の皆様にご心より感謝いたします。

参考文献

- Bres. O., and Eales, J.G. (1988). High-affinity, limited-capacity triiodothyronine-binding sites in nuclei from various tissues of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 69, 71-97.
- Carlone, D.L., and Richards, J.S. (1997). Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Mol. Endocrinol.* 11, 292-304.
- Crawford, P.A., Polish, J.A., Ganpule, G., and Sadovsky, Y. (1997): The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1. *Mol. Endocrinol.* 11, 1626-1635.
- Crawford, P.A., Sadovsky, Y., and Milbrandt, J. (1997). Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic lineage. *Mol. Cell Biol.* 17, 3997-4006.
- Davis, L.G., Kuehl, W.M., and Battey, J.F. (1994). RNase プロテクションアッセイ for analyzing mRNA with cRNA probes. In: *Basic methods in molecular biology*. Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, pp. 369-377.
- Ellinger Ziegelbauer H, Glaser B, and Dreyer C. (1995). A naturally occurring short variant of the FTZ-F1-related nuclear orphan receptor xFF1rA and interactions between domains of xFF1rA. *Mol. Endocrinol.* 9, 872-886.
- Fitzpatrick, S.L., Carlone, D.L., Robker, R.L., and Richards, J.S. (1997). Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids* 62, 197-206.
- Forman, B.M., Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S.A., Henshaw, R., Ong, E.S., and Evans, R.M. (1994). Cross-talk among ROR alpha 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol. Endocrinol.* 8, 1253-1261.

- Fukada, S., Sakai, N., Adachi, S., and Nagahama, Y. (1994). Steroidogenesis in the ovarian follicle of medaka (*Oryzias latipes*, a daily spawner) during oocyte maturation. *Develop. Growth Differ.* 36, 81-88.
- Fukada, S., Tanaka, M., Matsuyama, M., Kobayashi, D., and Nagahama, Y. (1996). Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 285-290.
- Galarneau, L., Pare, J.F., Allard, D., Hamel, D., Levesque, L., Tugwood, J.D., Green, S., and Belanger, L. (1996). The alpha-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the *Drosophila* FTZ-F1 family. *Mol. Cell Biol.* 16, 3853-3865.
- Hickey, G.J., Chen, S.A., Besman, M.J., Shively, J.E., Hall, P.F., Gaddy Kurten, D., and Richards, J.S. (1998). Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology* 122, 1426-1436.
- Hirose, T., O'Brien, D.A., and Jetten, A.M. (1995). Cloning of the gene encoding the murine orphan receptor TAK1 and cell-type-specific expression in testis. *Gene* 163, 239-242.
- Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M., and Omura T. (1993). Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J. Biol. Chem.* 268, 7494-7502.
- Ikeda, Y., Lala, D.S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M.P., and Parker, K.L. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 7, 852-860.
- Ito, M., Masuda, A., Yumoto, K., Otomo, A., Takahashi, Y., Takamatsu, N., Kanda, H., Yamashita, S., and Shiba, T. (1998). cDNA cloning of a new member of the FTZ-F1 subfamily from a rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta* 1395, 271-174.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., Nakai, Y., and Itoh, S. (1998). The duality of teleost gonadotropins. *Fish. Physiol. Biochem.* 7, 29-38.
- Kudo, T., and Sutou, S. (1997). Molecular cloning of chicken FTZ-F1-related orphan receptors.

Gene 197, 261-268.

- Lala, D.S., Rice, D.A., and Parker, K.L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol. Endocrinol.* 6, 1249-1258.
- Liu, D., Le Drean, Y., Ekker, M., Xiong, F., and Hew, C.L. (1997). Teleost FTZ-FI homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin IIbeta subunit gene. *Mol. Endocrinol.* 11, 877-890.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490.
- Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev.* 6, 329-344.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al: The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Michael, M.D., Kilgore, M.W., Morohashi, K., and Simpson, E.R. (1995). Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. *J. Biol. Chem.* 270, 13561-13566.
- Miyajima, N., Kadowaki, Y., Fukushige, S., Shimizu, S., Semba, K., Yamanashi, Y., Matsubara, K., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1988). Identification of two novel members of erbA superfamily by molecular cloning: the gene products of the two are highly related to each other. *Nucleic Acids Res.* 16, 11057-11074.
- Morohashi, K., and Omura, T. (1990). Tissue-specific transcription of P-450(11 beta) gene *in vitro*. *J. Biochem. (Tokyo)* 108, 1050-1056.
- Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., and Omura, T. (1992). A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J. Biol. Chem.* 267, 17913-17919.

- Nachtigal, M.W., Hirokawa, Y., Enyeart VanHouten, D.L., Flanagan, J.N., Hammer, G.D., and Ingraham, H.A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93, 445-454.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (eds.), *Fish Physiology*, Vol. IXA. Academic Press, New York, pp. 223-275
- Nagahama, Y., (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 217-229.
- Nagahama, Y., Yamashita, M., Tokumoto, T., and Katsu, Y. (1995). Regulation of oocyte maturation in fish. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30, 103-145.
- Nagahama, Y., Matsuhisa, A., Iwamatsu, T., Sakai, N., and Fukada, S. (1991). A mechanism for the action of pregnant mare serum gonadotropin on aromatase activity in the ovarian follicle of the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* 259, 53-58.
- Okazawa, H., Mori, H., Tamori, Y., Araki, S., Niki, T., Masugi, J., Kawanishi, M., Kubota, T., Shinoda, H., and Kasuga, M. (1997). No coding mutations are detected in the peroxisome proliferator- activated receptor-gamma gene in Japanese patients with lipotrophic diabetes. *Diabetes* 46, 1904-1906.
- Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., and Milbrandt, J. (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 92, 10939-10943
- Sakai, N., Iwamatsu, T., Yamauchi, K., and Nagahama, Y. (1987). Development of the steroidogenic capacity of medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicles during vitellogenesis and oocyte maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 66, 333-342.
- Schmidt, A., Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Shinar, D., and Rodan, G.A. (1992). Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol. Endocrinol.* 6, 1634-1641.

- Shibata, N., and Hamaguchi, S. (1988). Evidence for the sexual hipotentiality of spermatogonia in the fish, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* 245, 71-77.
- Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Sasaki, H., Osawa, Y., Ninomiya, Y., Niwa, O., Morohashi, K., and Li, E.(1995). Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the *Ftz-F1* disrupted mice. *Dev. Dyn.* 204, 22-29.
- Simpson, E.R., Michael, M.D., Agarwal, V.R., Hinshelwood, M.M., Bulun, S.E., and Zhao, Y. (1977). Cytochromes P450 11: expression of the CYP19 (aromatase) gene: an unusual case of alternative promoter usage. *FASEB J.* 11, 29-36.
- Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (eds.), *Proceedings of the IV International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Fish Symp 91, Sheffield*, pp. 2-7.
- Takemaru, K., Li, F.Q., Ueda, H., and Hirose, S: Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 7251-7256.
- Tanaka, M., Fukada, S., Matsuyama, M., and Nagahama, Y. (1995). Structure and promoter analysis of the cytochrome *P*-450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *J. Biochem. (Tokyo)* 117, 719-725.
- Ueda, H., Sun, G.C., Murata, T., and Hirose, S. (1992). A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 12, 5667-5672.
- Wang, L.H., Tsai, S.Y., Cook, R.G., Beattie, W.G., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1989). COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily. *Nature* 340, 163-166.
- Yamamoto, T.O. (1965). Estriol-induced XY females of the medaka (*Oryzias latipes*) and their progenies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 5, 527-533.

図1:卵黄形成の内分泌制御機構

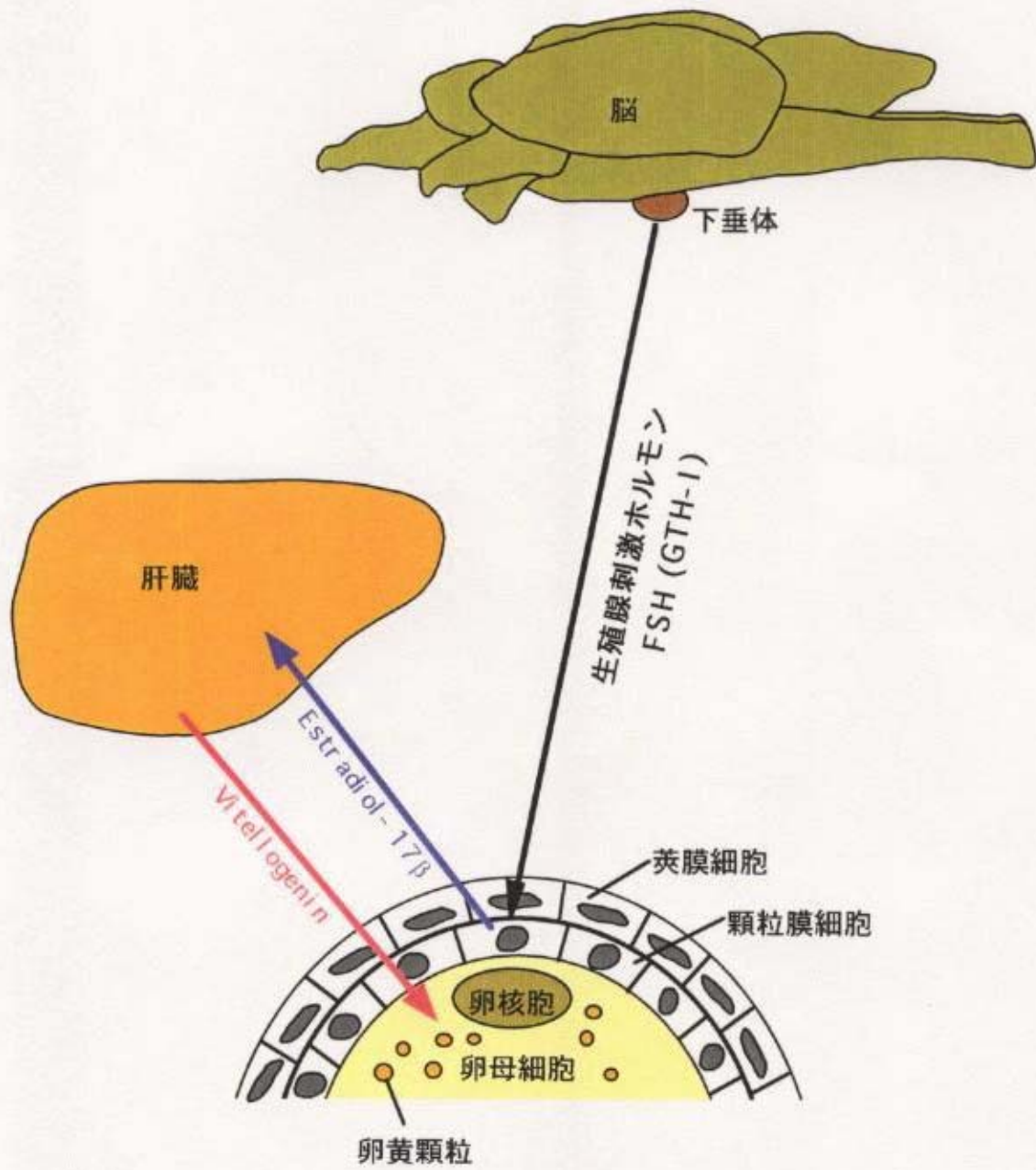
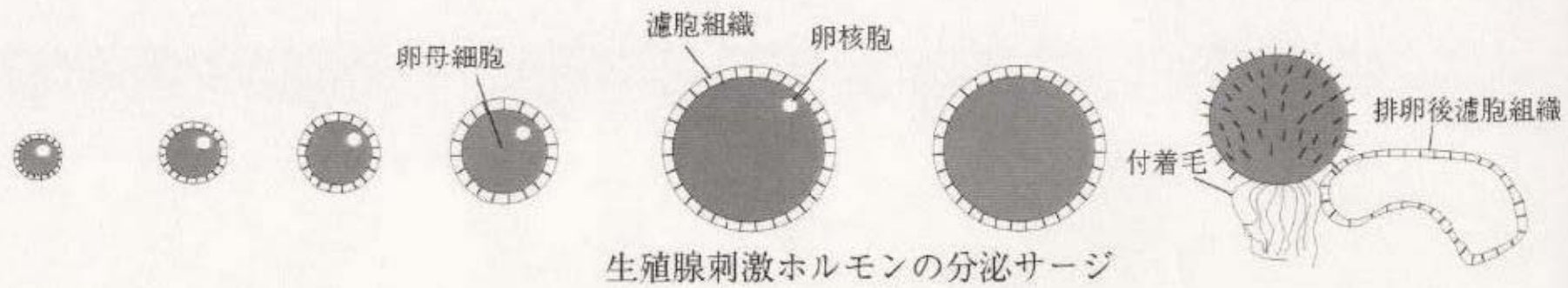


図2:メダカ卵濾胞における卵黄形成、卵成熟、産卵の時間経過とステロイドホルモン及び P-450arom 遺伝子転写産物量の変化



生殖腺刺激ホルモンの分泌サージ

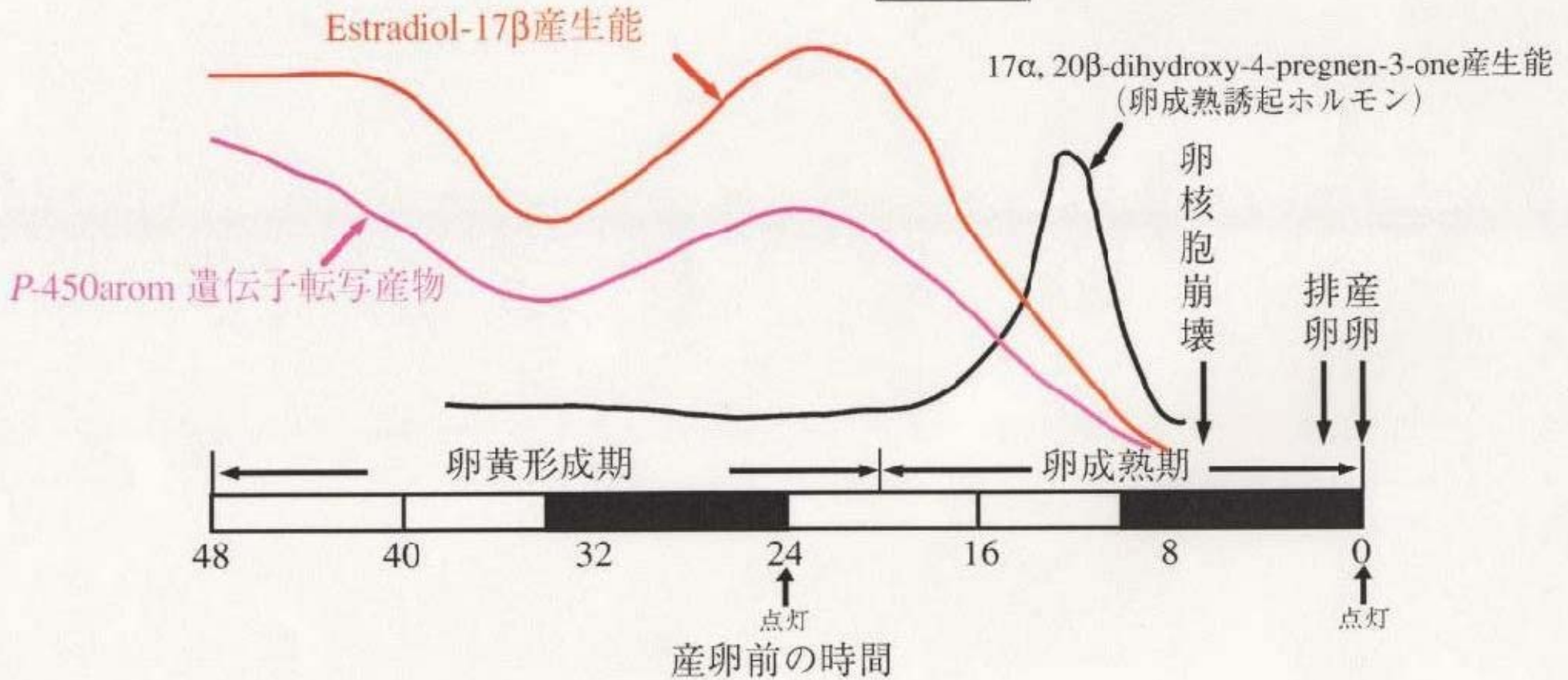


図3:メダカ *P*-450arom 遺伝子プロモータ領域の塩基配列。転写開始点を+1で示す。Ad4-1, Ad4-2, ERE-like, TATA の位置を陰影によって示す。

図4:RT-PCRによって単離された orphan nuclear receptor 断片塩基配列より予想されるアミノ酸配列と既知 orphan nuclear receptor との相同性。共通なアミノ酸はドットで示す。

Fragment A KRTVRKDLSYTCRDNKECLVDKRQQRN
mouse RXR α T D . . I

Fragment B KRTVQNNKRYTCAENQECKIDKTQRKR
mouse Ad4BP/SF1 H . . . T . S . S

Fragment C KRSVRKNLTYSCRSKQDCVINKHHRNR
mouse TAK1 S . . . I

Fragment D RRRTIRLKLVDHCDLHCRIHKKSRNK
human PPAR γ

Fragment E KRSVRRNLSYTCRSNRECQIDQHHRNQ
human COUP-TF T A . . N . P

Fragment F RRTVRMKLEYERCECCKIQKKNRKNK
human PPAR β . . I K . . R

Fragment G RRSIQQNIQYKKCLKNDSCPIMRVNRNRCQQ
mouse Rev-erb β EN . S . . . M

図5: *P*-450arom とフラグメントBのメダカ卵形成過程における遺伝子転写産物量の推移。RNase プロテクションアッセイの電気泳動画像とバンドの強度より算出した遺伝子転写産物量を示す。

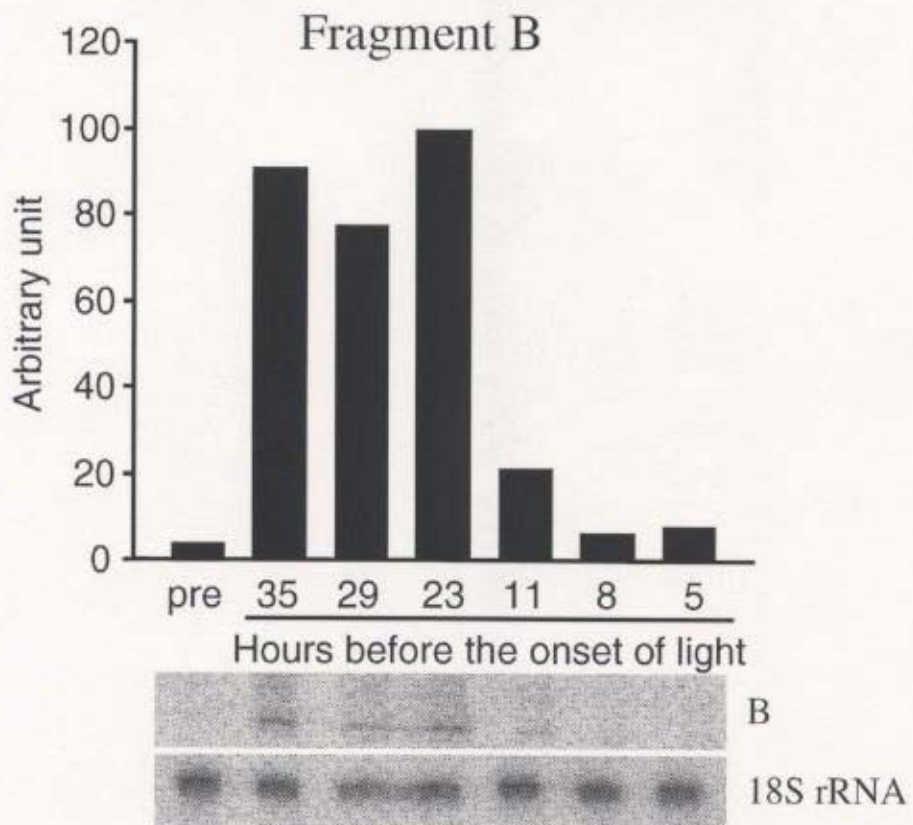
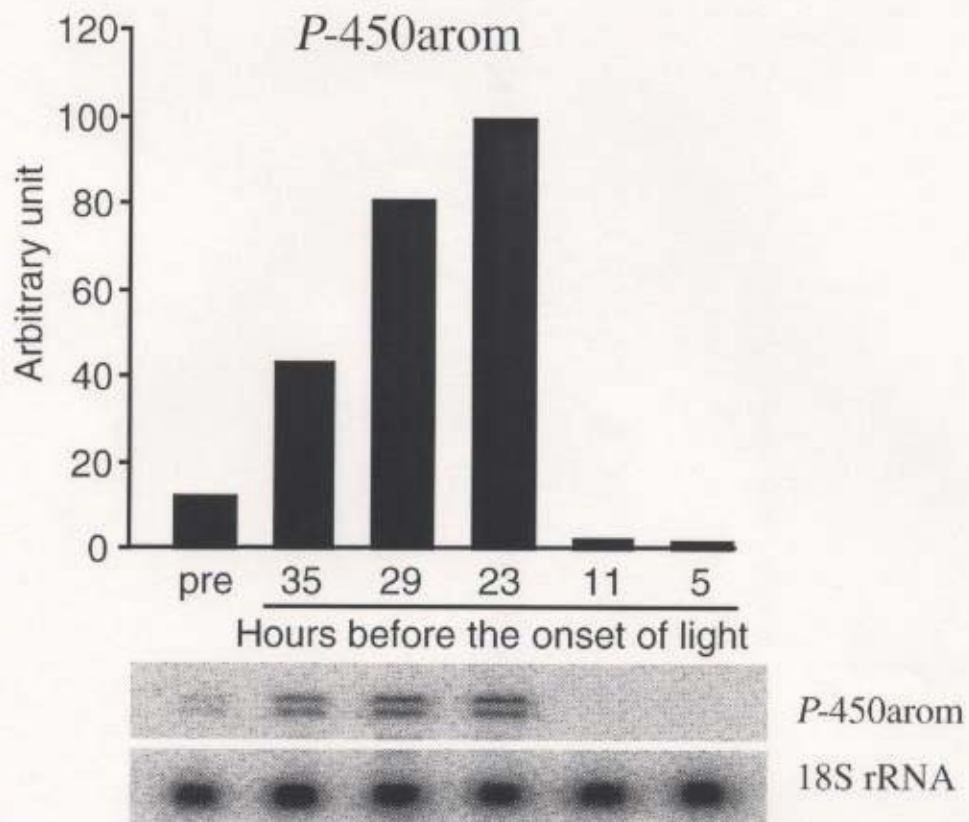


図6: *mdFtz-F1* cDNA の全塩基配列と、予想されるアミノ酸配列。

Region I, Region II, Region III, AF-2 の位置を下線で示す。

GCCCGTFCGGCTCCAGACGACCCGGCTGCAGACGGCGTCTATGGGAAGCTCTTATCTGCGCTCTGGTGCAGCAGCGCATGCGAGGCTGCAGCAACGGC 100
 AGCAGTAAATCCAGGCTCATATCAGACTGCCTCCACTGACAGGCTGTGCGCAAAATGTTGGGAGACAAAGCTCACGGCGTACTTTGAAGGTGATGGAGT 200
 M L G D K A H G V T L K V M E Y 16

ACACGTATGATGAAGACTTGAAGAGCTGTGTCCGGTGTGCGGTGACAAAGTGTGCGGTTACCACTACGGCTGCTGACCTGCGAGAGCTGCAAGGGCTT 300
 T Y D E D L E E L C P V C G D K V S G Y H Y G L L T C E S C K G F 49

CTTCAGAGGACGGTGCAGAACAAAGAGGTACACGTGCGCTGAGAACCAGGAGTGC AAAATAGACAAGACACAGAGGAAGCGATGCCCTTTTGGCCG 400
 F K R T V Q N N K R Y T C A E N Q E C K I D K T Q R K R C P F C R 82

Region I

TTCCAGAAGTGTCTCAACGTTGGCATGCGATTAGAAGCGGTGCGCGCAGATCGCATGCGTGGGGGGAGAAATAAATTTGGCCCAATGTACAAGAGAGACA 500
 F Q K C L N V G M I R L E A V R A D F M R G G R N K F G P M Y K R D R 116

FTZ-F1 Box

GGGCCTTGAAGCAGCAGAAGAAGGCTTTGATACGATCCAAGGGGTTCAAGCTGGAGAGCAGCGCTCTGCGCTCAGCCTCCCACTGCAGACTGACTACAG 600
 A L K Q Q K K A L I R S N G F K L E S T A L P S A S P L Q T D Y S 149

CTTCACTGGCACCCTGCACAGCTGCCACCATTCCAAAAGTCTGCTTCTCCACCACAAGCTCTGTCACCCCTACAGACTACGAAGCCAACTATAT 700
 F T G T L H T L P T I S K S L L P S T T S S V T P T D Y E A N L Y 182

GGACCTACATCCCTGGGCATGGCCATGCACTCTCACGTGCCCTCAACCCGCACTACAGTACAGCGCTTTCCAGCAGGGCAATCAAAGCCGAGTGGC 800
 G P T S L G M A M Q S H V P L N P Q Y Q Y T A F P S R A I K A E C P 216

CTGACTACACCAGCTCCCGGAGTCCCTGACTGGATACCCGTAACCCAGATGTGTATCCGTGGGCTCAACCGCAGCCCCCAGCCTGCCTCCGCTGGTGT 900
 D Y T S S P E S L T G Y P Y P D V Y P S A S P Q P P S L P P L V L 249

EGAGCTGTACGCTGCGACCCGACGAGCTGGTGGTGCAGAACAGATTGTGTCTCATTTCAGCAGGAGCAGAGCAACAGGGGGCGGTGGACAAGCCG 1000
 E L L R C D P D E L V V Q N K I V A H L Q Q E Q S N R G R L D K P 282

AGCACCTTCAGCTCATGTGCGCATGGCAGACCAGACCTTGTCTCCATCGTGGAGTGGGCTCGGAGCTGCATTTTTTCAAGGAGTAAAGGTGGGG 1100
 S T F S L M C R M A D Q T L F S I V E W A R S C I F F K E L R V G D 316

Region II

ATCAATGAAGTGTCTTCAACTGCTGGTCTGAACTTCTGGTCTGGATCATATTTTCAGACAAGTCCAGCACGGAAAGGACAGCATCTCTGCTGGT 1200
 Q M K L L H N C W S E L L V L D H I F R Q V Q H G K E D S I L L V 349

GACCGGCCAGGAGTCCAGCTGTATCCATCCATCTCAAGSAGAGGCCACCCTGTGCACTGTGGTCCAAAGAGGTCCAGGAGCTGGCAGCAAGGTTGAGG 1300
 T G Q E V Q L S S I L S Q G E A T L C S L V Q R G Q E L A A R L R 382

GCGTGCAGGTTGACCGCAGAGAGATCGCTGTCTGAAGTTCCTTCTACTGTTCACCCCAATGTAAAGCTGCTGGAGAACCAGGCCTTCGTGGAGGGTG 1400
 A L Q V D R R E I A C L K F L L L F N F N V K L L E N Q A F V E G V 416

Region III

TCCAGGAGCAGGTGAACGGCGCTCTGCTGGAGTACACCCTACCACGTACCCTCAGTTCAGGAGAAATTCAGCCAGCTGGTGGTGGCGCTGCCTGAGCT 1500
 Q E Q V N G A L L E Y T L T T Y P Q F Q E K F S Q L V V R L P E L 449

GCGTCCCTCAGCACGCAGGCTGAGGACTACCTGTGCTACATGCATCTGAGTGGAGAGGTGCCCTGCAATAATCTGCTCATCGAGATGCTGCACGCTAAG 1600
 R S L S T Q A E D Y L C Y M H L S G E V P C N N L L L I E M L H A K 482

AF-2

AGAGCGTGGTGTGAGGGACACACAAGAGTTGTCGTCATGTGTTGTTGGTGGAGATGACTGTGTGGAAAAGATGGAAAACCTTAGATTGACAGGTTT 1700
 R A C V * 486

ACACTGGATTGCCTTTATTGGGGCTTTTGCTTTGGGTGGACGTGAGAAAATCTGTTTAGAGTTTGAATATAAAAAGAAAGATAATTTAATATTGGACT 1800
 GCTACTGTTTTCATATCCGCAAAGCTACTTTAATGTGACCTTTATAAACTGGATTTCTACCCGATTTTCAAACGCTAAAATTTAGATTTGGGGTGG 1900
 GTTGTCTGTGTTCTTTTACTAAATATGCTTCAATCTGTCAATACAAATCCATTCCTCCGAGCTGCCAAATGACTTAAAATTCAGGAAAGAGACTCC 2000
 ACCTTAGCCAAATGCTACCAAGTCACTCAAATCTGGTCCCGAGTTACCCAGTCCCATGTAGCTGCTTGTGTTGAAATTTTCTCAGCTGTTCTTTATG 2100
 CCACGTACAGGACTTTGTAAAAAATAAAATCCAGTGTAAACTAAAAAATAAAAAA 2168

図 7: mdFTZ-F1 と既知 FTZ-F1 アミノ酸配列の CLUSTAL W による相
同解析の結果

mdFTZ-F1	323	N	C	W	S	E	L	L	V	L	D	H	I	F	R	O	V	Q	H	G	K	E	D	S	I	L	L	V	T	G	O	E	V	O	L	S	I	L	S	O	G	E	A	T	L	C	S	L	V	O	R	-	-	-	G	O	E	L	A	A	379	
zFF1A	355	K	C	W	R	E	L	L	I	L	D	H	V	F	R	O	V	M	H	A	K	E	G	S	I	L	L	V	T	G	O	Q	V	D	Y	A	L	I	A	S	O	A	G	A	T	L	N	N	L	L	S	H	-	-	-	A	Q	E	L	V	S	411
xFF1A	340	N	C	W	S	E	L	L	I	L	D	H	I	F	R	O	V	L	H	G	K	E	G	S	I	L	L	V	T	G	O	Q	V	D	Y	S	V	I	V	T	O	A	G	A	T	L	N	N	L	M	S	H	-	-	-	A	Q	D	L	V	A	396
xFF1B	307	N	C	W	S	E	L	L	I	L	D	H	I	F	R	O	V	L	H	G	K	E	G	S	I	L	L	V	T	G	O	Q	V	D	Y	S	V	I	V	T	O	A	G	A	T	L	N	N	L	M	S	H	-	-	-	A	Q	D	L	V	A	363
chicken LRH-1	340	N	C	W	S	E	L	L	I	L	D	H	I	F	R	O	V	L	H	G	K	E	G	S	I	L	L	V	T	G	O	Q	V	D	Y	S	V	I	V	T	O	A	G	A	T	L	N	N	L	M	S	H	-	-	-	A	Q	E	L	V	A	396
mouse LRH-1	399	N	C	W	S	E	L	L	I	L	D	H	I	F	R	O	V	A	H	G	K	E	G	S	I	L	L	V	T	G	O	Q	V	D	Y	S	T	I	I	S	H	T	E	V	A	F	N	N	L	L	S	L	-	-	-	A	Q	E	L	V	V	455
human FTF	339	N	C	W	S	E	L	L	I	L	D	H	I	F	R	O	V	V	H	G	K	E	G	S	I	L	L	V	T	G	O	Q	V	D	Y	S	I	I	A	S	O	A	G	A	T	L	N	N	L	M	S	H	-	-	-	A	Q	E	L	V	A	395
chicken SF-1	305	N	C	W	S	E	L	L	V	L	D	H	V	F	R	O	L	Q	H	G	K	E	H	B	V	L	L	V	T	G	O	E	V	D	L	S	A	V	A	A	O	A	G	S	I	L	H	S	L	V	L	R	-	-	-	A	Q	E	L	V	L	361
mouse SF-1	301	N	C	W	S	E	L	L	V	L	D	H	I	F	R	O	V	Q	Y	G	K	E	D	S	I	L	L	V	T	G	O	E	V	L	S	T	V	A	A	O	A	G	S	L	L	H	S	L	V	L	R	-	-	-	A	Q	E	L	V	L	356	
bovine Ad4BP	300	N	C	W	S	E	L	L	V	L	D	H	I	F	R	O	V	Q	H	G	K	E	D	S	I	L	L	V	T	G	O	E	V	L	S	T	V	A	A	O	A	G	S	L	L	H	S	L	V	L	R	-	-	-	A	Q	E	L	V	L	357	
IF2R1	278	K	E	K	G	E	K	R	K	A	D	T	A	A	W	F	D	V	E	T	D	K	N	T	N	V	Y	V	S	G	L	P	P	D	I	T	T	E	E	F	V	E	V	M	S	K	C	G	I	V	M	R	D	P	I	S	E	E	Y	K	V	337

Region III

mdFTZ-F1	380	R	L	R	-	A	L	G	V	D	R	R	-	E	I	A	C	L	K	F	L	L	F	N	P	N	V	K	L	L	E	N	F	H	I	V	E	G	V	O	E	O	V	N	G	A	L	L	E	Y	T	L	T	I	Y	P	O	F	O	E	437		
zFF1A	412	K	L	R	-	S	L	Q	L	D	Q	R	-	E	F	V	C	L	K	F	L	V	L	F	S	L	D	V	K	N	L	E	N	F	H	I	V	E	S	V	O	E	O	V	N	A	A	L	L	D	Y	V	M	C	H	Y	P	Q	T	D	469		
xFF1A	397	K	L	R	-	S	L	Q	F	D	L	R	-	E	F	V	C	L	K	F	L	V	L	F	S	L	D	V	K	N	L	E	N	F	H	I	V	E	G	V	O	E	O	V	N	A	A	L	L	D	Y	T	M	C	H	Y	P	Q	T	D	454		
xFF1B	364	K	L	R	-	S	L	Q	F	D	L	R	-	E	F	V	C	L	K	F	L	V	L	F	S	L	D	V	K	N	L	E	N	F	H	I	V	E	G	V	O	E	O	V	N	A	A	L	L	D	Y	T	M	C	H	Y	P	Q	T	D	421		
chicken LRH-1	397	K	L	R	-	S	L	Q	F	D	L	R	-	E	F	V	C	L	K	F	L	V	L	F	S	L	D	V	K	N	L	E	N	F	H	I	V	E	G	V	O	E	O	V	N	A	A	L	L	D	Y	T	M	C	H	Y	P	Q	T	D	454		
mouse LRH-1	456	R	L	R	-	S	L	Q	F	D	Q	R	-	E	F	V	C	L	K	F	L	V	L	F	S	S	D	D	V	K	N	L	E	N	F	H	I	V	E	G	V	O	E	O	V	N	A	A	L	L	D	Y	T	V	C	H	Y	P	Q	T	D	513	
human FTF	396	K	L	R	-	S	L	Q	F	D	Q	R	-	E	F	V	C	L	K	F	L	V	L	F	S	L	D	V	K	N	L	E	N	F	H	I	V	E	G	V	O	E	O	V	N	A	A	L	L	D	Y	T	M	C	H	Y	P	Q	T	D	453		
chicken SF-1	362	H	L	H	-	S	P	O	V	D	R	Q	-	E	F	V	C	L	K	F	L	I	L	F	S	L	D	V	K	Y	L	E	N	H	A	L	I	V	K	D	A	Q	E	K	A	N	A	A	L	L	D	Y	T	V	C	H	Y	P	H	C	T	D	419
mouse SF-1	358	Q	L	H	-	A	L	Q	L	D	R	Q	-	E	F	V	C	L	K	F	L	I	L	F	S	L	D	V	K	F	L	N	N	H	S	I	V	K	D	A	Q	E	K	A	N	A	A	L	L	D	Y	T	L	C	H	Y	P	H	C	G	D	415	
bovine Ad4BP	357	Q	L	H	-	A	L	Q	L	D	R	Q	-	E	F	V	C	L	K	F	L	I	L	F	S	L	D	V	K	F	L	N	N	H	S	I	V	K	D	A	Q	E	K	A	N	A	A	L	L	D	Y	T	L	C	H	Y	P	H	C	G	D	414	
IF2R1	338	K	L	Y	R	D	G	D	G	H	O	K	G	D	G	L	C	C	Y	L	K	K	E	S	V	A	L	A	E	R	L	I	D	E	S	E	I	R	G	Y	Q	L	H	V	E	A	A	R	F	E	L	K	G	Q	Y	D	A	S	K	K	K	397	

AF-2

mdFTZ-F1	438	K	F	S	G	L	V	V	R	L	P	E	L	R	S	L	S	T	Q	A	E	D	Y	L	C	Y	M	H	L	S	G	E	V	P	C	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	A	C	V	-	-	-	486
zFF1A	470	K	F	G	Q	L	L	L	R	L	P	E	I	R	A	I	S	L	Q	A	E	E	Y	L	Y	Y	K	H	L	N	G	D	V	P	C	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	A	-	-	-	516		
xFF1A	455	K	F	G	Q	L	L	L	R	L	P	E	I	R	A	I	S	L	Q	A	E	E	Y	L	Y	Y	K	H	L	N	G	D	V	P	C	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	A	-	-	-	501		
xFF1B	422	K	F	G	Q	L	L	L	R	L	P	E	I	R	A	I	S	L	Q	A	E	E	Y	L	Y	Y	K	H	L	N	G	D	V	P	C	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	A	-	-	-	468		
chicken LRH-1	455	K	F	G	Q	L	L	L	R	L	P	E	I	R	A	I	S	M	Q	A	E	E	Y	L	Y	Y	K	H	L	N	G	D	V	P	C	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	A	-	-	-	501		
mouse LRH-1	514	K	F	G	Q	L	L	L	R	L	P	E	I	R	A	I	S	K	Q	A	E	E	Y	L	Y	Y	K	H	V	N	G	D	V	P	Y	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	A	-	-	-	560		
human FTF	454	K	F	G	Q	L	L	L	R	L	P	E	I	R	A	I	S	M	Q	A	E	E	Y	L	Y	Y	K	H	L	N	G	D	V	P	Y	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	A	-	-	-	500		
chicken SF-1	420	K	F	R	Q	L	L	L	R	L	T	E	V	R	A	L	S	M	Q	A	E	E	Y	L	Y	Y	K	H	L	S	G	E	V	P	C	N	N	L	L	I	E	-	M	L	H	A	K	R	T	-	-	-	466		
mouse SF-1	416	K	F	Q	Q	L	L	L	C	L	V	E	V	R	A	L	S	M	Q	A	K	E	Y	L	Y	H	K	H	L	G	N	E	M	P	R	N	N	L	L	I	E	-	M	L	O	A	K	Q	T	-	-	-	462		
bovine Ad4BP	415	K	F	Q	Q	L	L	L	C	L	V	E	V	R	A	L	S	M	Q	A	K	E	Y	L	Y	H	K	H	L	G	N	E	M	P	R	N	N	L	L	I	E	-	M	L	O	A	K	Q	T	-	-	-	461		
IF2R1	398	K	K	S	K	D	Y	R	K	R	-	M	K	A	O	Q	K	Q	L	D	W	R	P	E	K	K	G	E	A	R	K	R	H	E	P	V	L	I	Q	N	M	F	H	P	S	D	F	E	F	V	447				

図8:mdFTZ-F1 と既知 FTZ-F1 の各ドメインの相同性比較

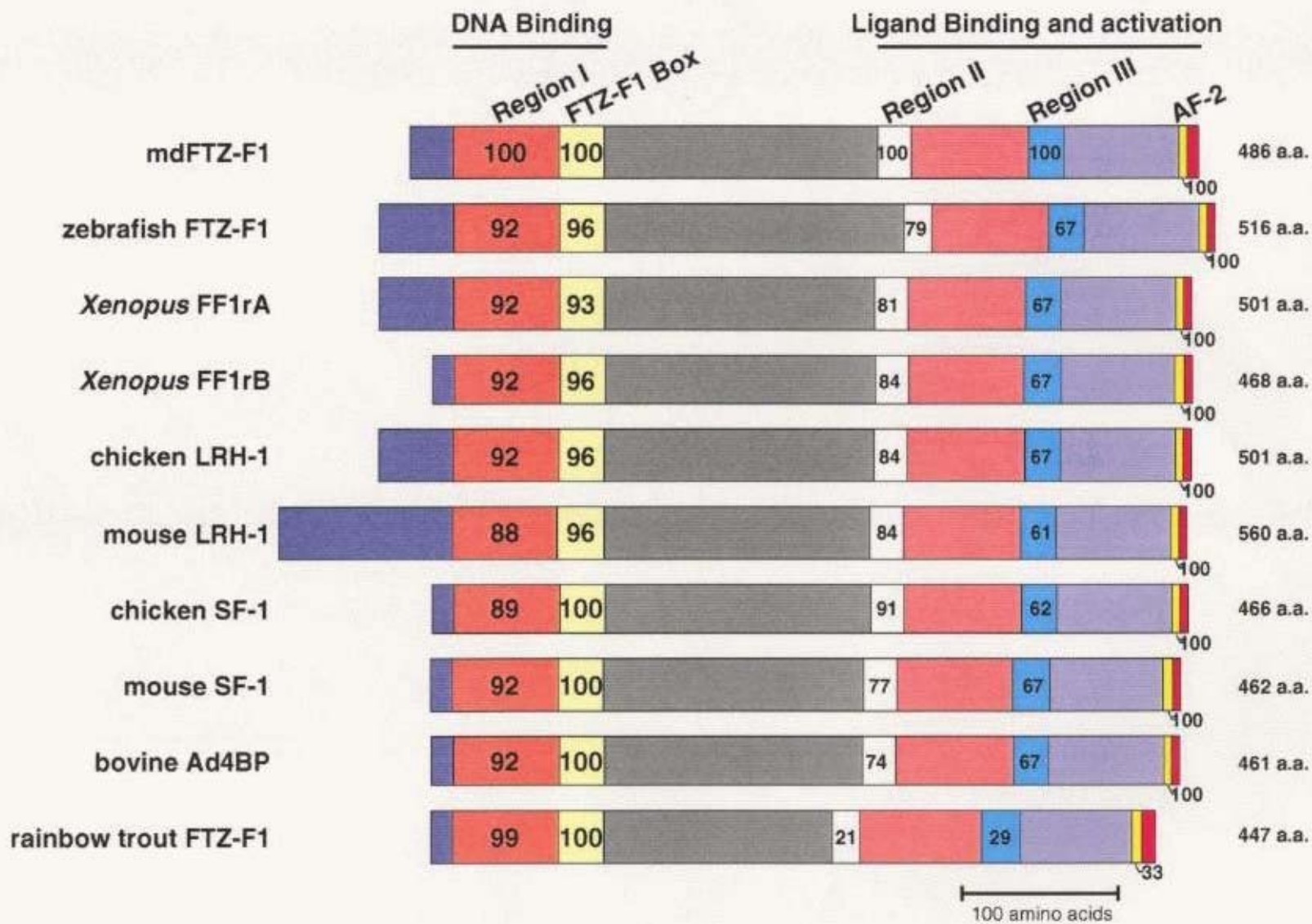


図9： mdFTZ-F1 と既知 FTZ-F1 の全長アミノ酸配列をもとに neighbor-joining 法によって作製した分子系統樹。アウトグループとして、メダカエストロゲンレセプタのアミノ酸配列を用いた。数字はブートストラップ値を示す。

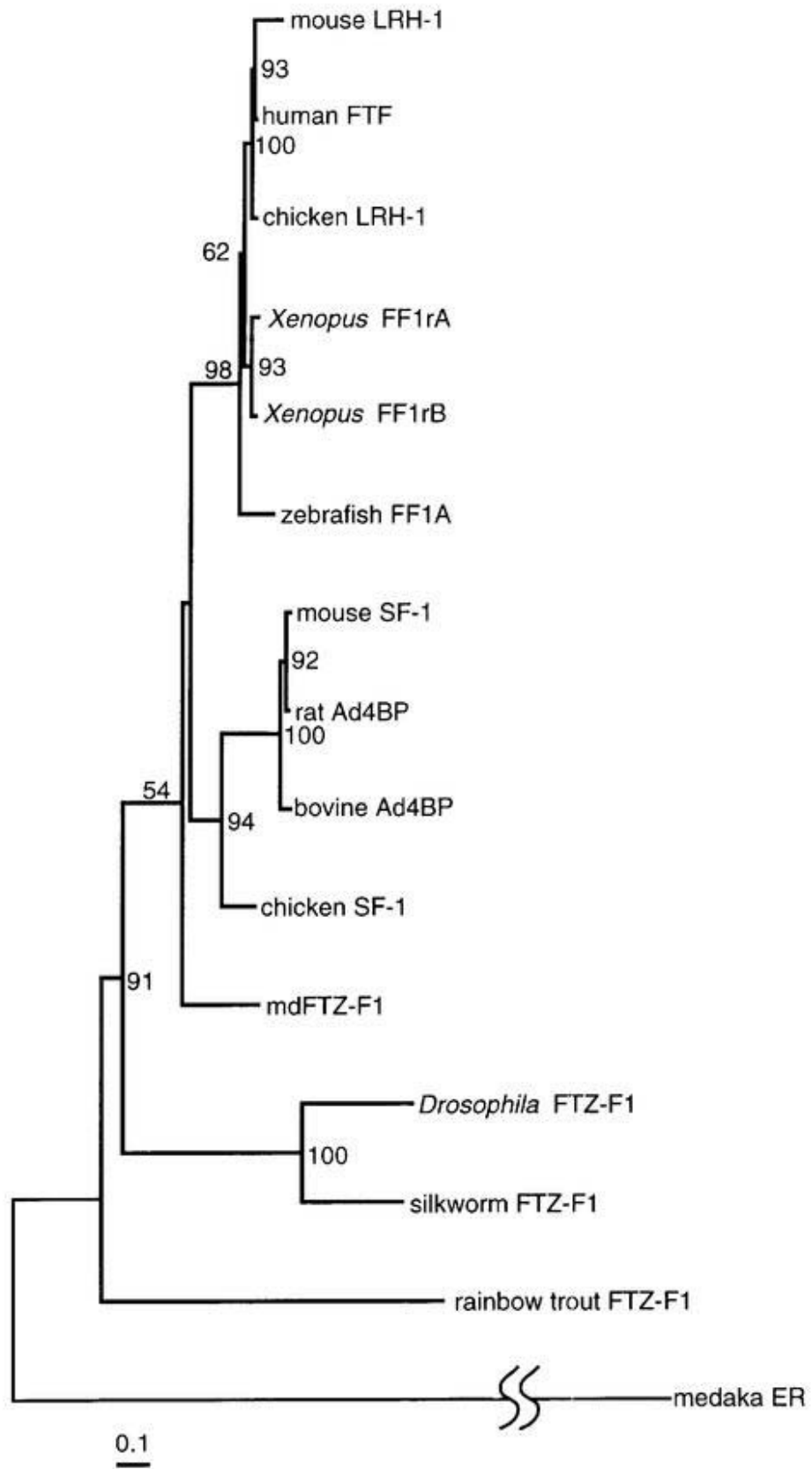


図11:ゲルシフトアッセイ で使用されたプローブの配列。転写因子の認識塩基配列として重要と思われる部分を陰影で示す。

MS4 5'-GTGCATCCAAGGTCCTGATAG-3'
3'-ACGTAGGTTCCAGTGACTATCG-5'

MS4d 5'-GTGCATATCAGGTCCTGATAG-3'
3'-ACGTATAGTCCAGTGACTATCG-5'

Ad4-1 5'-GTTTCATTC AAGGCCATAGGCAA-3'
3'-AAGTAAGTTCCGGTATCCGTTG-5'

Ad4-2 5'-GACCCTCCAAGGTCCTCAGTGT-3'
3'-TGGGAGGTTCCAGAAGTCACAG-5'

ERE-like 5'-GTACCC TGACCTGGCTTGTGACCAGCTC-3'
3'-ATGGGACTGGACCGAACACTGGTCGAGG-5'

Ad4-1 mut 5'-CCTGTTTCATATCAGGCCATAGGCAAGAACTCAAC-3'
3'-GACAAGTATAGTCCGGTATCCGTTCTTGAGTTGGG-5'

Ad4-2 mut 5'-CCTATCAGGTCCTCAGTGTATTGTTTAC-3'
3'-GGATAGTCCAGAAGTCACATAACAAATGGG-5'

図10: *mdFtz-F1* 遺伝子転写産物の組織特異性。RNase プロテクション
アッセイ の電気泳動像を示す。

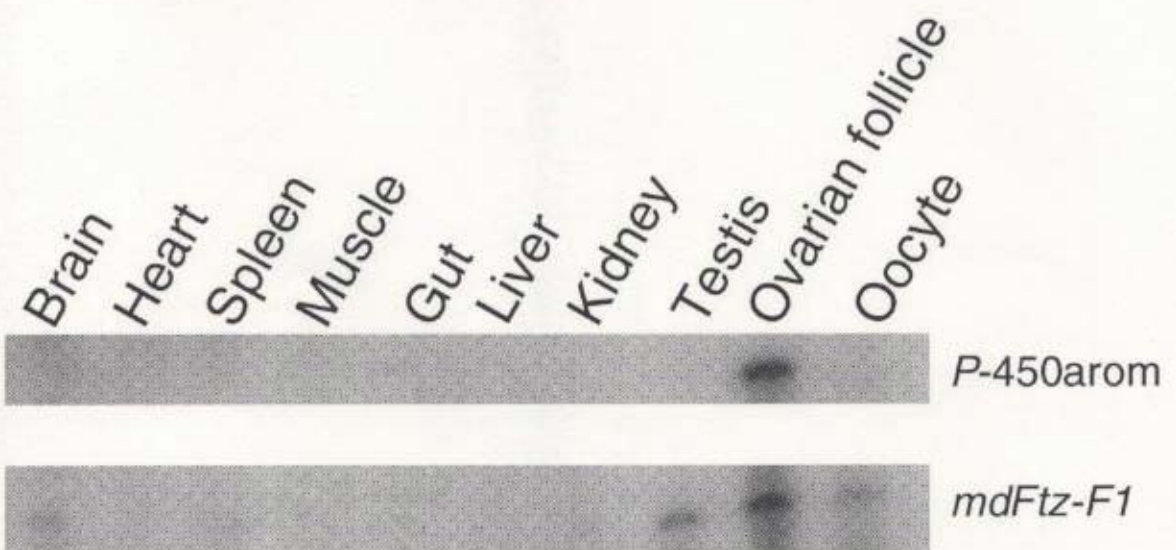


図12: *in vitro* 発現させた *mdFtz-F1* による DNA 塩基配列認識。

Reticulocyte で発現させたウシ Ad4BP と *mdFtz-F1* について放射性標識した MS4, MS4d, Ad4-1, Ad4-2, そして ERE-like の各プロンプトに対する特異的結合をゲルシフトアッセイによって検討した。

A.ゲルシフトアッセイの電気泳動像。

B. Ad4-1, Ad4-2, ERE-like の *P-450arom* プロモータ上での位置関係。

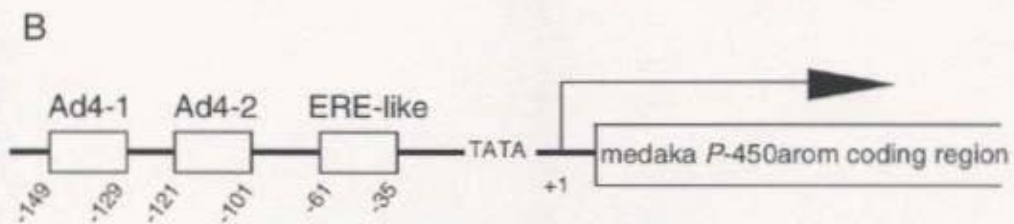
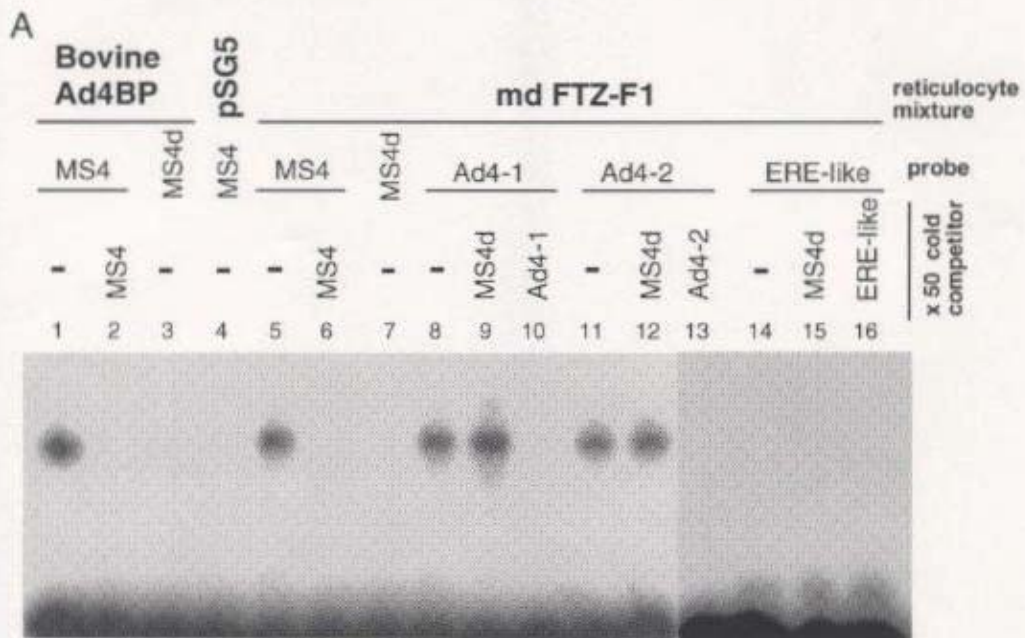


図13: 点灯 23 時間前のメダカ卵濾胞細胞核抽出液中には Ad4-1, Ad4-2 を認識する因子が存在する。ゲルシフトアッセイの電気泳動像を示す。ローマ数字と矢頭は核抽出液とプローブの結合によって生じた3本のバンドの泳動位置を示す。

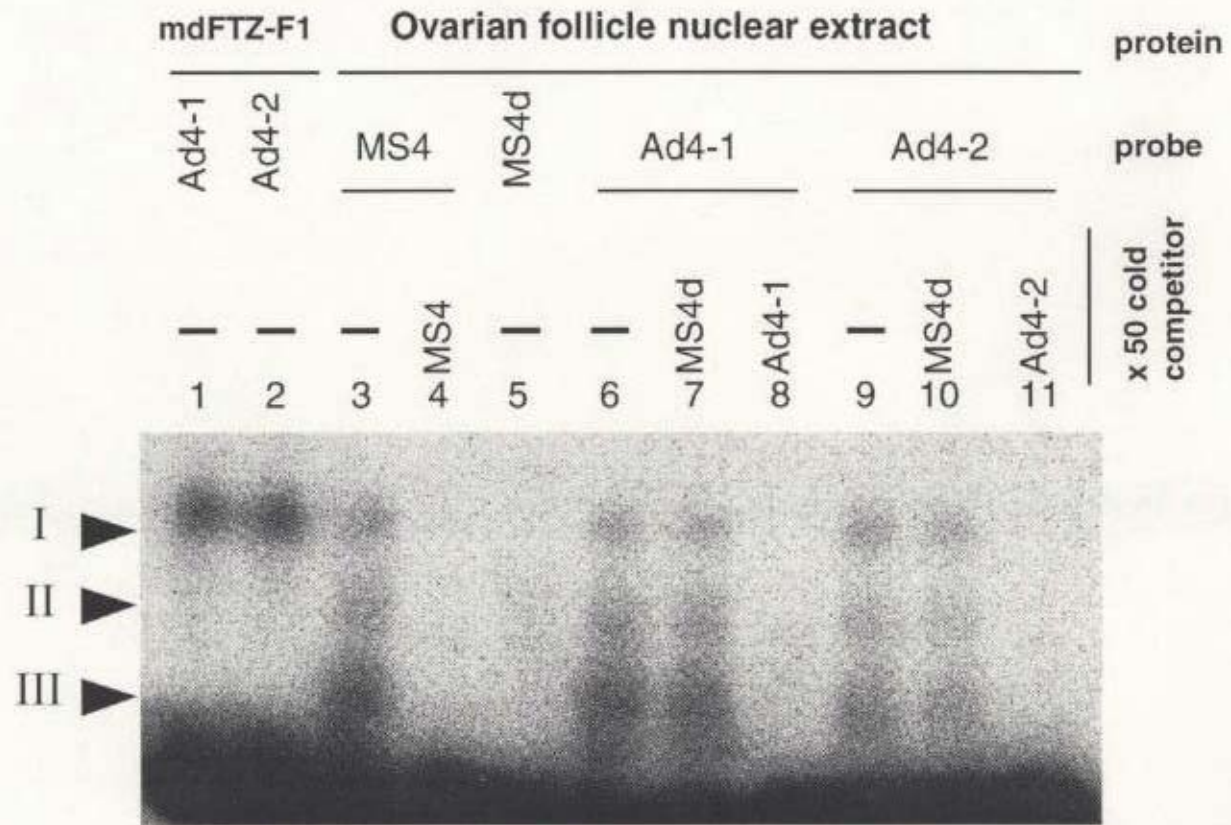


図 14:卵形成の各段階にあるメダカ卵濾胞細胞から得られた核抽出液中の Ad4-1, Ad4-2 認識因子の存在。ゲルシフトアッセイの電気泳動像を示す。

Hours before the onset of light

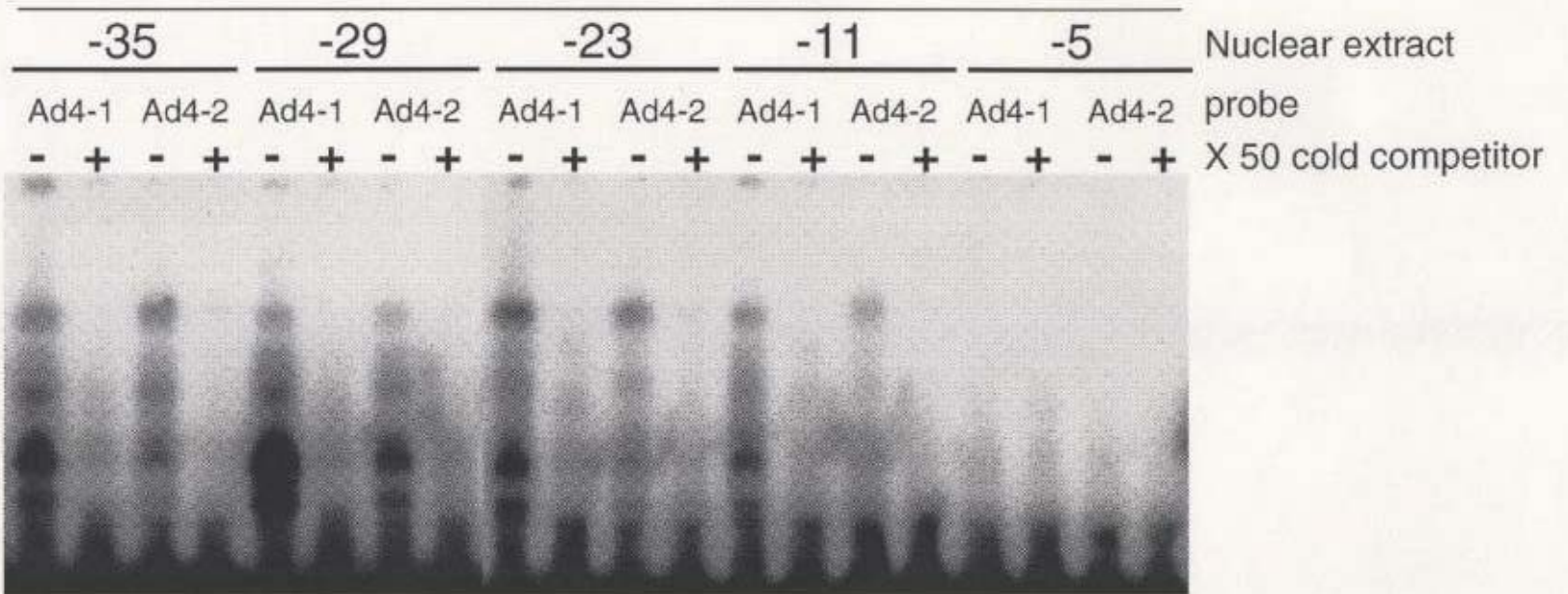


図15:卵形成の各段階にあるメダカ卵濾胞細胞から得られた核抽出液
について、*P*-450arom 遺伝子プロモータの TATA 近傍をもとにした
プローブを使用したゲルシフトアッセイの結果。

Hours before the onset of light

<u>-35</u>		<u>-29</u>		<u>-23</u>		<u>-11</u>		<u>-5</u>		
-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	Nuclear extract
										X 50 cold competitor

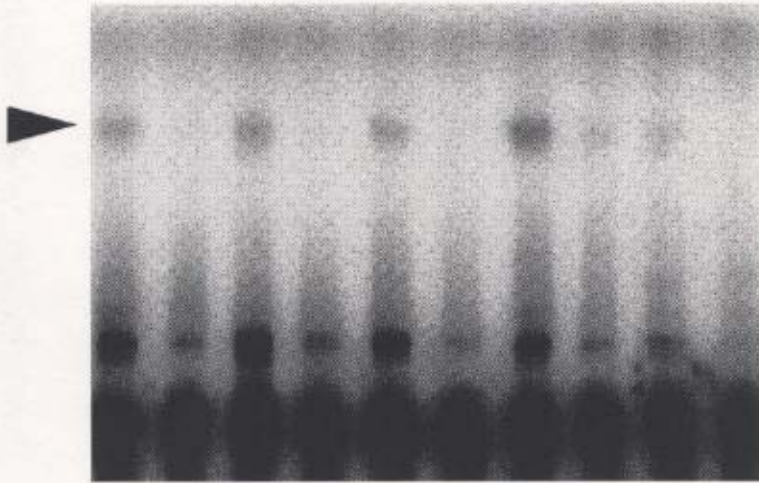
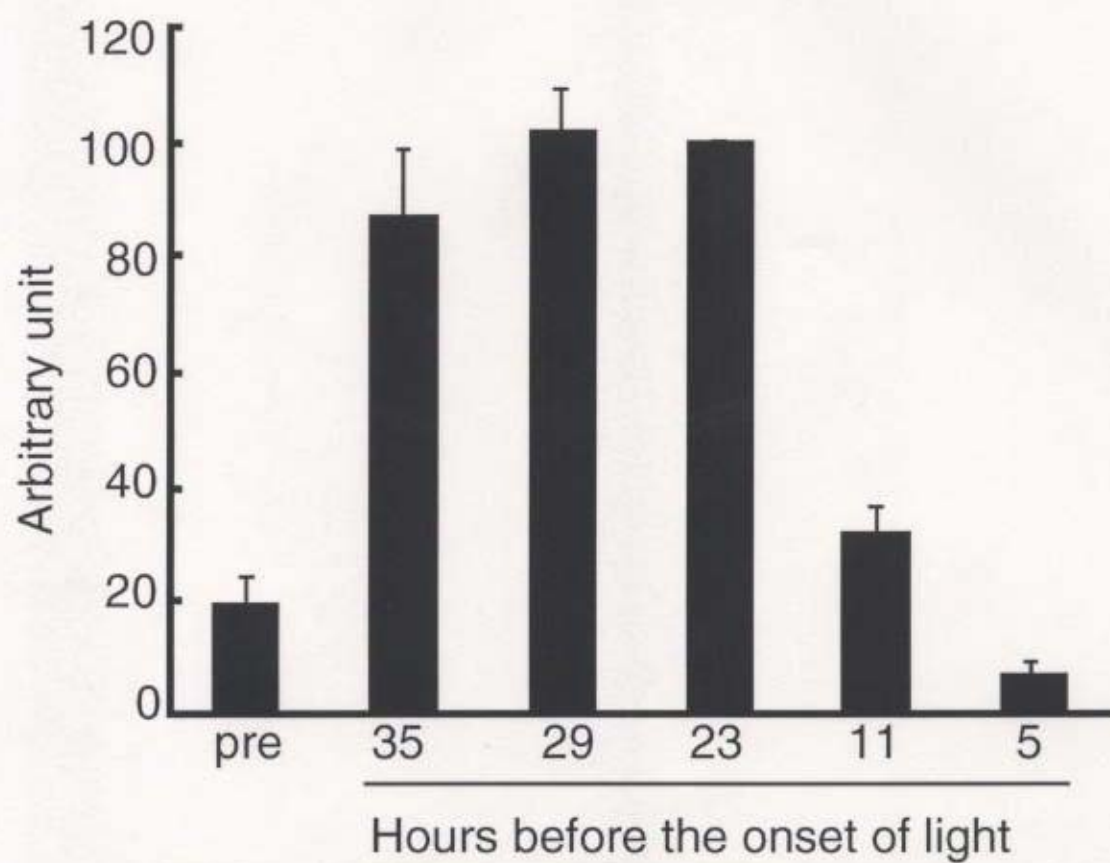


図 16 : *mdFtz-F1* 遺伝子転写産物量の卵形成過程における推移。

RNase プロテクションアッセイの電気泳動像と、バンドの強度から算出した遺伝子転写産物量を示す。3つの独立したサンプルについて実験を行った。エラーバーは標準誤差を示す。



mdFtz-F1

18S rRNA

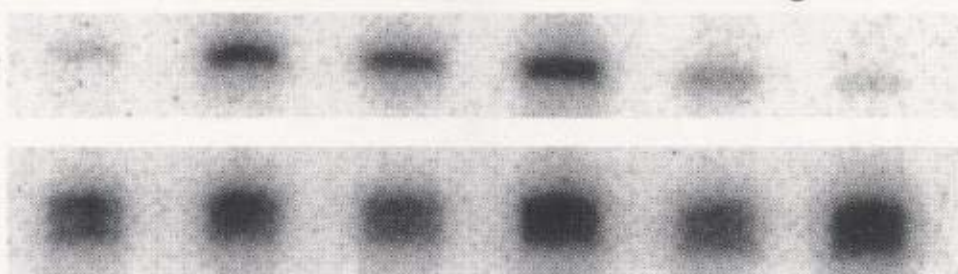


図 17:細胞中での mdFTZ-F1 による *P*-450arom プロモータの活性化。

CV-1 細胞にメダカ *P*-450arom プロモータの全長をホタルルシフェラーゼの上流に組み込んだレポーターベクタを 0.25 μ g、内部コントロールベクタを 0.1 μ g、そして SV40 プロモータを上流に持つ *mdFtz-F1* 発現ベクタを 0、0.05、0.25 そして 1.0 μ g トランスフェクトし、レポーター活性を測定した。エラーバーは 3 つの独立した実験値の標準誤差を示す。

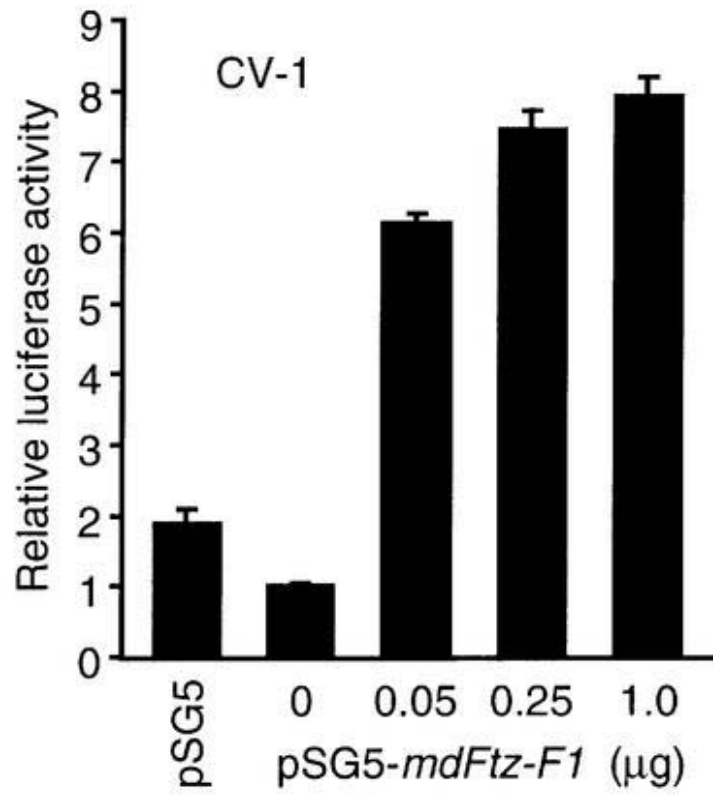


図 18:5' 欠失した *P*-450arom プロモータに対する mdFTZ-F1 の効果。

P-450arom プロモータの全長、-289塩基まで欠失したもの、-82 塩基まで欠失したもの、そして-39 塩基まで欠失したものを持つレポータベクタを 0.25 μ g、内部コントロールベクタを 0.1 μ g、そして 0.25 μ g の *mdFtz-F1* 発現ベクタを CV-1 細胞にトランスフェクトし、レポータ活性を測定した。エラーバーは 3 つの独立した実験値の標準誤差を示す。

CV1

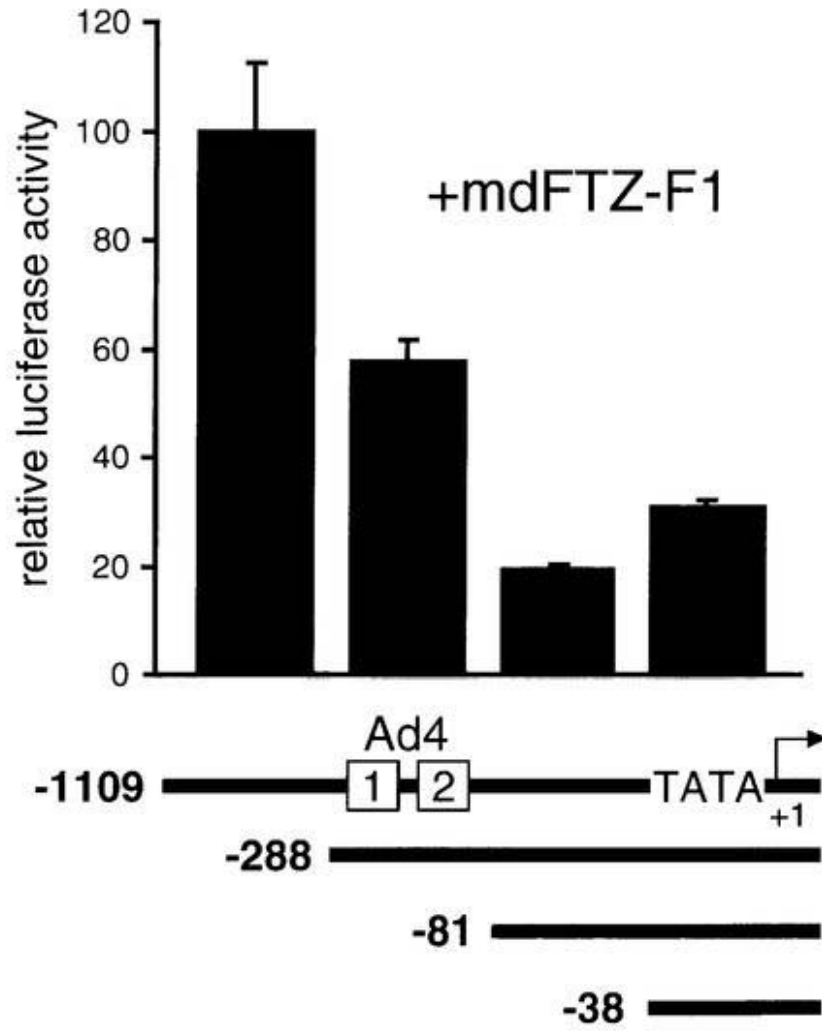


図 19:mdFTZ-F1 は変異導入された Ad4 モチーフに特異的に結合できない。図10に示すような変異 Ad4-1, Ad4-2 の配列を持つ放射性標識プローブ(Ad4-1 mut, Ad4-2mut)とreticulocyte発現した *mdFtz-F1*を用いてゲルシフトアッセイを行った。

Ad4-1 Ad4-2 Ad4-1 Ad4-2 probe
 - + - + mut mut - + x 50 cold competitor

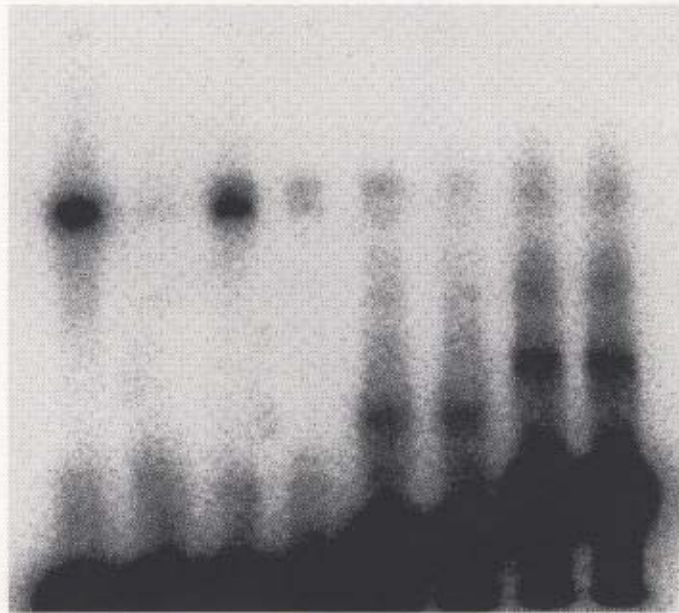


図 20: Ad4 モチーフの変異と mdFTZ-F1 による *P*-450arom プロモータ活性化との関係。*P*-450arom プロモータの-288 塩基以下の配列を持つレポータベクタ、Ad4-1 と Ad4-2 のどちらか一方または両方に変異を持つレポータベクタ、-81 塩基以下のプロモータ配列を持つレポータベクタをそれぞれ内部コントロールベクタ 0.1 μ g、*mdFtz-F1* 発現ベクタ 0.25 μ gとともに CV-1 細胞にトランスフェクトし、レポータ活性を測定した。エラーバーは 3 つの独立した実験値の標準誤差を示す。

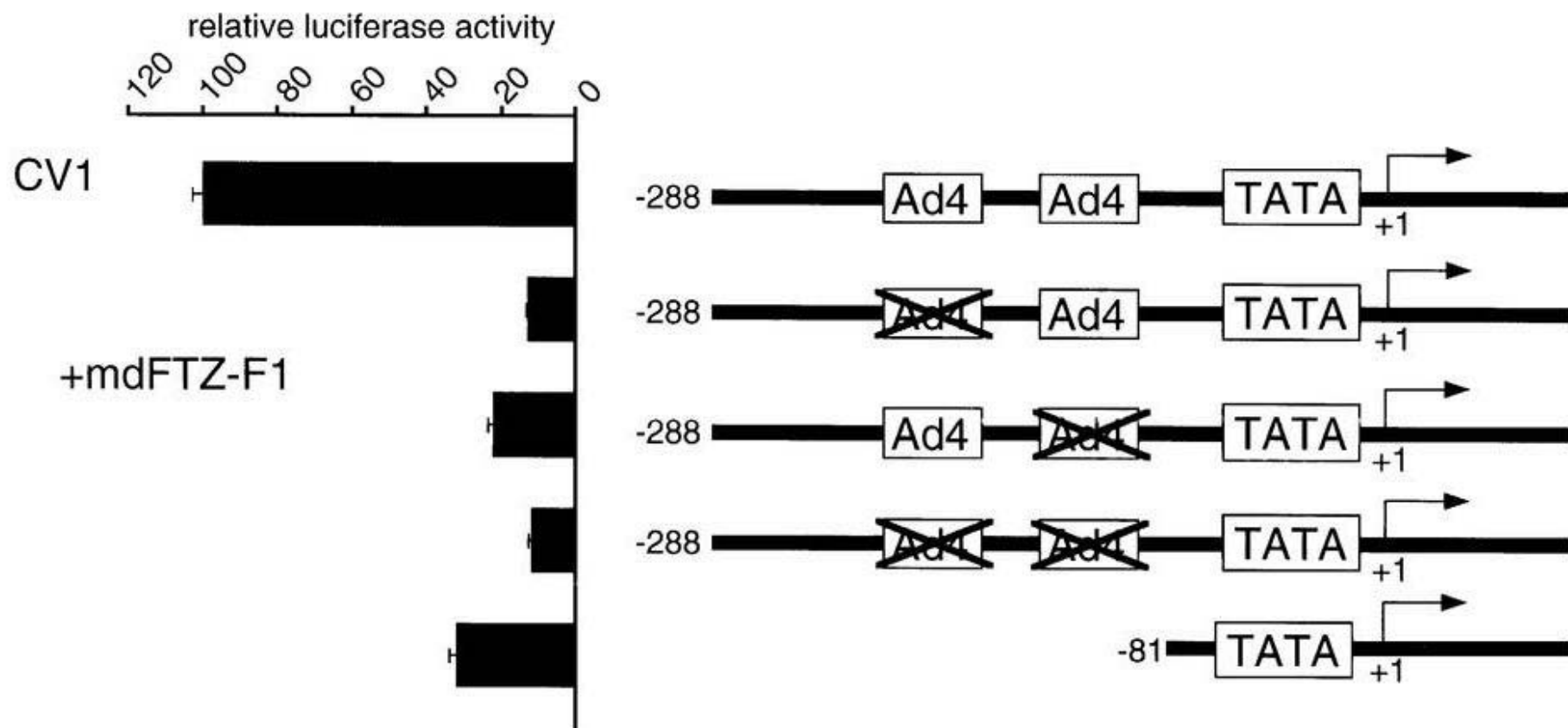


図 21:メダカ顆粒膜細胞中での *P*-450_{arom} 遺伝子転写調節機構の仮説 (詳細は本文を参照)

生殖腺刺激ホルモン

他のシグナル伝達系



顆粒膜細胞

二次メッセンジャー系の活性化
(cAMP濃度上昇など)

転写因子のリン酸化、アセチル化など
転写因子そのものの発現量変化
コファクタのリクルート

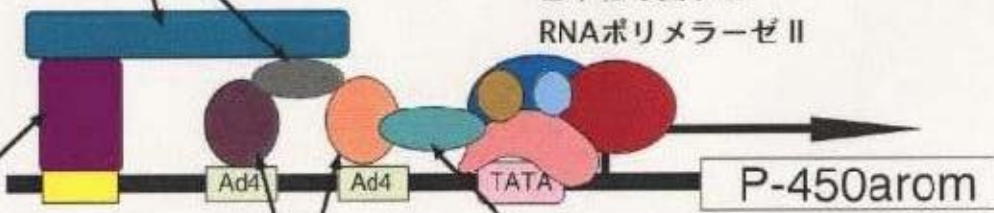
転写調節因子間の橋渡しとなるコファクタ

基本転写因子と
RNAポリメラーゼ II

協奏的に機能する転写調節因子

orphan nuclear receptor
(FTZ-F1, PPAR等)

基本転写因子との橋渡し
となるコファクタ



博士論文の要旨

平成 11年 1月 8日

出願者

生命科学研究科 分子生物機構論専攻

氏名 渡辺正忠

(学籍番号: 953206)

In nonmammalian vertebrates, estradiol-17 β , a major estrogen in all vertebrates, is responsible for the enormous growth of oocytes, vitellogenesis. The cytochrome P-450 aromatase (P-450arom) is an important steroidogenic enzyme which converts testosterone to estradiol-17 β . In contrast to well-known physiological functions of estradiol-17 β , very little is known about the molecular mechanisms of P-450arom activation in ovarian follicles during oocyte growth.

The medaka, *Oryzias latipes*, under the conditions of 26°C, 14 hours light and 10 hours dark, usually spawn within 1 hour of the onset of light for several consecutive days. The majority of vitellogenesis and meiotic maturation of individual oocytes occurs within 48 hours; germinal vesicle breakdown and ovulation being completed at 6 and 1 hour before spawning, respectively. Thus, medaka follicles provide an excellent model for understanding the hormonal regulation of follicular growth and maturation. Previous studies in our laboratory involving incubations of isolated medaka ovarian follicles with gonadotropins, forskolin and dbcAMP which are known to raise the cellular level of cAMP, and/or actinomycin D suggest that P-450arom activity is transcriptionally regulated. The aim of this study is to elucidate the regulatory mechanism of time-specific P-450arom transcription responsible for estradiol-17 β production by medaka ovarian follicles during active vitellogenesis.

Promoter analysis of the medaka P-450arom gene identified putative orphan nuclear receptor binding sites (Ad4-1, Ad4-2). To clone orphan nuclear receptors from medaka ovarian follicle, RT-PCR was performed using degenerate primers designed against highly conserved amino acid sequences in the DNA binding region of orphan nuclear receptors.

Seven distinct fragments encoding putative RXR, Ad4BP/SF-1, TAK1, PPAR α , PPAR γ , COUP-TF and Rev-erb were amplified. RNA protection assays using cRNA probes prepared against these seven fragments were used to investigate the expression profile of each fragment in medaka ovarian follicles during various stages of oogenesis; total RNAs from follicles collected at 35, 29, 23, 11 and 5 hours before the onset of light as well as the previtellogenic stage were used. The results showed that only the Ad4BP/SF-1 homologue gave a clear expression profile which correlated well with *P-450arom* expression.

Based upon these data, an attempt was made to clone a full length cDNA encoding the Ad4BP/SF-1 homologue by library screening and 5' RACE. The 1,458 bp open reading frame of this cDNA is predicted to encode a 486 amino acid polypeptide. Sequence analysis showed high homology of this cDNA clone to *Ad4BP/sf-1* and *Ftz-F1s* from various species. The DNA binding region, FTZ-F1 box, and AF-2 domain showed almost 100% homology with Ad4BP/SF-1 and LRH-1/FTF. Therefore, we designated the medaka clone as medaka *Ftz-F1* cDNA (*mdFtz-F1*).

There are two groups of FTZ-F1 family proteins. One, the Ad4BP/SF-1 group, is mainly expressed in steroidogenic tissues. The other is the LRH-1/FTF group which is expressed in liver. Despite a close similarity of the primary structure of mdFTZ-F1 to that of either FTZ-F1 group, tissue distribution analysis indicating that *mdFtz-F1* transcripts are highly expressed in ovary and testis with weak signals in brain, spleen and kidney, suggest that mdFTZ-F1 functions similar to Ad4BP/SF1.

To investigate whether mdFTZ-F1 can specifically bind to putative orphan nuclear receptor binding sites of *P-450arom* gene, gel shift assays were performed. mdFTZ-F1 translated in reticulocyte lysate bound the Ad4-1 and Ad4-2 sites. The band disappeared in the presence of 50 times excess cold competitor, demonstrating the ability of mdFTZ-F1 to specifically bind to the Ad4-1 and Ad4-2 sites on the *P-450arom* promoter.

A series of transfection experiments were performed to investigate the mdFTZ-F1 function the *P-450arom* promoter in living cells. In these experiments, *P-450arom* promoter-reporter constructs having the *P-450arom* promoter region upstream of firefly luciferase and an *mdFtz-F1* expression vector which is driven by the SV40 promoter in CV-1 mammalian cells were used. Luciferase activity increased when the *mdFtz-F1* expression vector were co-transfected. I also prepared deletion reporter constructs to identify the essential region for the transcriptional activation by mdFTZ-F1. Luciferase activity dropped

when the Ad4-1 and Ad4-2 sites were deleted. To further investigate the importance of the Ad4-1 and Ad4-2 sites, these sites were mutated such that mdFTZ-F1 could not bind to them. Single or double mutation of the Ad4-1 and Ad4-2 sites caused decreased reporter activity. These results suggest that the *P*-450arom promoter can be positively regulated by specific binding of mdFTZ-F1 to the Ad4-1 and Ad4-2 sites.

The expression profile of *mdFtz-F1* transcripts during oogenesis was analyzed by RNase protection assay. The expression profile of *mdFtz-F1* correlated with the *P*-450arom expression profile which also supports the hypothesis that mdFTZ-F1 may regulate *P*-450arom.

To investigate whether there is specific binding activity to the Ad4-1 and Ad4-2 in medaka ovarian follicles, gel shift assays using nuclear extracts prepared from medaka ovarian follicles at the time (23 hours before the onset of light) when the transcript level of *mdFtz-F1* peaks were performed. Three bands appeared when the nuclear extracts were incubated with the radio-labeled Ad4-1 or Ad4-2. One of these bands appeared at the same position as the band which appeared when reticulocyte-expressed *mdFtz-F1* was incubated with Ad4-1 or Ad4-2. These three bands disappeared simultaneously in the presence of 50 times excess of cold competitor. When a nuclear extract from medaka ovarian follicles at the time of oocyte maturation was incubated with the radio-labeled Ad4-1 or Ad4-2, no specific band appeared. These results suggest that there is specific binding activity to the Ad4-1 and Ad4-2 *in vivo* at the time of vitellogenesis. Furthermore, this binding activity disappears concomitant with oocyte maturation.

In summary, the results of this study suggest a potential role of mdFTZ-F1 on the time-specific transcriptional regulation of *P*-450arom in medaka ovarian follicles. This is the first investigation with respect to the transcriptional regulation of *P*-450arom in ovarian follicles during oogenesis. Further study of other transcription factors which synergistically act with mdFTZ-F1 or modifications of mdFTZ-F1 such as phosphorylation will reveal the molecular detail of the intracellular signaling pathways which regulate *P*-450arom transcription in response to gonadotropin.