

## 놀래기에서의 에스트로겐 수용체 및 에스트로겐 합성효소 유전자 발현

박 지 권<sup>1</sup>, 최 진 영<sup>2</sup>, 정 형 복<sup>2</sup>, 김 세 재<sup>1,2</sup>

제주대학교 생명과학지역기술혁신센터<sup>1</sup>, 제주대학교 생명과학과<sup>2</sup>

### 요 약

에스트로겐은 주요한 자성 성 호르몬으로서 생식에 관련된 많은 표적 유전자에 영향을 미친다. 에스트로겐의 작용은 핵 수용체의 일원인 에스트로겐 수용체 (ER)에 의해 증개된다. cytochrome P450의 일원인 aromatase는 C19 안드로겐에서 C18 에스트로겐의 전환을 촉매한다. 이런 전환은 aromatase와 reductase로 구성된 복합체에 의해 조정된다. 이전 연구에서 우리는 자성선숙어인 놀래기에서 두 종류의 ER과 aromatase 유전자를 분리하였다. 성숙 및 산란시기 동안 에스트로겐의 작용을 이해하기 위해 놀래기의 다양한 조직에서 ER과 aromatase subtype의 발현을 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 산란시기가 다가옴에 따라 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 의 발현은 간과 난소에서 증가하였다. 이런 결과는 E<sub>2</sub>의 조절 하에 ER이 난소 성장에 관한 표적 유전자의 전사를 조절함을 제시한다. 자성에서 산란주기 동안 점진적인 혈장 내 E<sub>2</sub> 농도 증가는 난소의 ER 발현이 증가하는 결과와 일치함을 보였다. 산란 초기에 정소에서 ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 의 발현은 정소 분화에도 특정 역할을 할 것으로 사료된다.

CYP19 (aromatase)의 발현 수준 또한 산란주기 동안 난소와 뇌에서 분석하였다. CYP19 유전자의 발현 수준 차이와 변화는 산란주기 동안 에스트로겐의 생리적, 생식적 기능과 상호 관련되어 있다고 여겨진다. 또한, 다양한 조직에서 두 CYP19 subtype의 발현을 분석하였다. CYP19a의 발현은 난소와 신장에서 높은 수준으로 발현되었고, 소장을 제외한 다른 조직에서도 발현되었다. CYP19b는 뇌에서 높은 수준으로 발현되었고, 다른 조직에서 모두 발현되었다. 이런 결과는 CYP19 유전자가 에스트로겐의 생식에 대한 기능 이외에도 다양한 유형의 조직에서도 특정 기능을 나타내리라는 것을 추론케 한다.

### 서 론

에스트로겐은 자성 스테로이드 호르몬으로 난소의 여포세포 발생, 정자형성과정, 골 항상성 등 다양한 생리적 기능을 조절한다 (Lubann *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1994). 또한 자성과 용성 모두에서 뇌-뇌하수체-생식소로 전달되는 신호 경로에서 중요한 매개체로 작용한다. 에스트로겐의 작용은 핵 수용체의 일원인 에스트로겐 수용체(ER)에 의해 매개된다 (Krust *et al.*, 1986). 핵 수용체는 A-F라고 불리는 공통된 6개의 영역으로 구성된 구

조를 갖는데, 이들 영역 중 DNA 결합 부위인 C 영역과 호르몬 결합 부위인 E 영역은 종간에 매우 보존되어 있다 (Green *et al.*, 1986). 어류에서 에스트로겐 수용체는 무지개 송어 등에서 ER $\alpha$ 가 먼저 분리되었으며 (Pakdel *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1999; Touhata *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002). 최근 ER $\beta$ 가 여러 경골어류에서 분리되었다 (Socorro *et al.*, 2000; Hawkins *et al.*, 2000; Bardet *et al.*, 2002). 또한 Atlantic croaker에서는 3번째 subtype인 ER $\gamma$ 가 분리되었다 (Hawkins *et al.*, 2000).

CYP19 유전자에 의해 암호화되는 aromatase (P450arom)는 C19 androgen에서 C18 estrogen으로의

전환을 촉매하는 heme-binding 단백질이다. 이런 전환은 NADPH 의존성 cytochrome P450 reductase와 복합체를 형성하여 수행된다 (Gelinis *et al.*, 1998; Conley와 Hinshelwood, 2001). 경골어류에서 난소와 뇌에서 발현되는 CYP19a, CYP19b로 불리는 적어도 두 종류의 aromatase가 존재한다. 현재까지, P450arom 유전자 혹은 cDNA가 여러 종의 어류에서 보고되었다 (Trant, 1995; Tanaka *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1997; Tchoudakova and Callard, 1998). 포유동물의 aromatase는 다양한 프로모터를 갖는 하나의 P450arom 유전자에 의해 암호화되는 반면에, goldfish, tilapia, zebrafish 등의 어류는 여러 P450arom 유전자를 가지고 있고, 이들 각 유전자들은 서로 다르게 조절되며 다른 효소적 특성을 갖는 단백질을 암호화한다 (Tchoudakova와 Callard, 1998).

자성선속어인 놀래기는 1차 자성, 1차 웅성, 그리고 자성이 웅성으로 성전환된 2차 웅성 개체로 구성되어 있다 (Warner 1984). 경골어류에서 에스트로젠은 간에서의 난황단백질 합성과 난소에서의 난자 발생에 필수적인 호르몬이다. 뇌에서 안드로젠의 aromatization에 의해 합성된 에스트로젠은 신경내분비, 성적 행동, 신경계 분화의 기능과 관련된 것으로 추정된다 (Kishida and Callard, 2001; Kwon *et al.*, 2001). 놀래기의 자연적 성전환에 대한 정확한 기작은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않지만, 스테로이드 호르몬이 생식소 퇴화와 생식소 재형성에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다 (Chang *et al.*, 1998; Kitano *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001). 에스트로젠의 작용은 에스트로젠 합성을 촉매하는 aromatase의 발현 및 에스트로젠 작용을 매개하는 ER의 발현과 밀접하게 관련되어 있다고 여겨진다. 이전 연구에서 놀래기의 ER과 aromatase 유전자가 분리되었기 때문에, 본 연구는 생식소 분화에 미치는 에스트로젠의 작용에 대한 분자적 기작을 해명하기 위해 기초 연구로서 놀래기의 다양한 조직에서 산란 주기 동안의 두 유전자 발현에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 동물

제주 연안에 서식하는 놀래기는 5월에서 8월 동안 낚시에 의해 채집하였다. 채집된 놀래기는 얼음에서 마취하여 혈액을 채취한 후, 다양한 조직들을 적출하였다. 혈액은 1,500 g, 4 °C에서 15분 간 원심 분리하여 혈장을 분리하였으며, 분리된 혈장은 호르몬 분석 전까지 -70 °C에 보관하였다. 또한, 적출된 조직은 DEPC-H<sub>2</sub>O에 세척한 후 RNA 분리 전까지 액체질소에 보관하였다.

### 2. 혈장내 estradiol-17β (E<sub>2</sub>) 측정

혈장내 E<sub>2</sub>의 함량은 Asahina *et al.* (1995)의 방법에 의해 효소 면역분석법 (EIA)을 이용하여 측정하였다. 100 μl의 혈장 시료에 diethyl ether 1 ml를 첨가하여 혼합한 후 상등액을 새로운 튜브로 옮겼다. 위 과정을 3회 반복하여 얻어진 상등액을 evaporator를 이용하여 호르몬을 추출하였다. 여기에 분석 용액 (50 mM borate buffer, pH 7.8, 1 % bovine serum albumin) 200 μl을 첨가하여 1분간 혼합하여 호르몬을 용해하였다. 96 well microplate는 4 °C에서 12시간 동안 100 μl의 affinitive goat anti-rabbit IgG (Jackson Immunoresearch)를 처리한 후, PBST로 3회 세척하여 코팅하였다. 분석은 50 μl의 표준물질 (12.8 to 0.025 ng/ml) 또는 혈장 추출액과 50 μl의 희석된 호르몬을 혼합하여 전체 부피가 150 μl 되게 한 후, 실온에서 2시간 동안 반응하였다. PBST로 3회 세척 후, 효소 반응은 100 μl의 citrate 용액 (100 mM citrate buffer, pH 4.5, 0.01 % o-phenylenediamine dihydrochloride, 0.04 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 각 well에 첨가하여 암조건하에서 30분간 유지하였다. 효소반응은 25 μl의 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 첨가하여 중지시킨 후, microplate reader (SLT)을 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. RNA 분리 및 cDNA 합성

Total RNA는 놀래기의 각 조직에서 TRI REAGENT (MRC)를 이용하여 분리하였다. 조직 100 mg에 Tri reagent 1 ml를 가하여 균질화한 후, 0.1 ml의 클로로포름을 넣어 혼합하였다. 실온에서 15분간 반응시킨 후, 12,000 g, 4 °C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 새로운 튜브로 옮겼다. 얻어진 상등액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 실온에

서 10분간 RNA를 침전시킨 후, 12,000 g, 4 °C에서 8분 간 원심분리하여 상등액을 제거하고 80 % DEPC-EtOH을 가하여 RNA를 세척하였다. 7,500 g, 4 °C에서 5분 간 원심분리하여 상등액을 버리고 실온에서 건조시킨 후, 적당량의 DEPC-H<sub>2</sub>O에 녹였다. RNA 정량은 분광광도계를 이용하여 260 nm과 280 nm에서 측정 한 후, A260/A280 비율이 1.6-2.0을 갖는 RNA만 cDNA 합성에 사용하였다. cDNA 합성은 total RNA 1 µg으로 cDNA 합성 kit (Clontech)을 이용하여 합성하였다. cDNA 합성 반응이 끝난 후, 80 µl의 DEPC-H<sub>2</sub>O를 첨가하여 최종 부피 100 µl으로 희석하였고, 5 µl의 cDNA를 PCR 반응에 이용하였다.

4. RT-PCR

PCR에 사용된 primer는 이미 분리된 ER subtype인 ERα, ERβ와 두 종류의 aromatase인 CYP19a, CYP19b의 염기서열을 참조하여 각 subtype 특이적인 서열 부분에서 GC 함량이 50% 이상이 되도록 고안하였다 (Table 1). PCR 반응은 다음 조건에 의해 DNA thermal cycler (Perkim elmer 2700)에서 수행하였다 : 5 µl의 10×PCR buffer[(10 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 20°C), 50 mM KCl and Triton X-100)], 3 µl의 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl의 dNTP mix (각 10mM: Promega), 1 µl의 각 primer 쌍 (10 µM), 2 units의 Taq DNA polymerase (Promega). 증폭반응은 94 °C에서 45초, 60 °C에서

45초, 72 °C에서 1분30초 동안 30회를 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1 % 아가로오스 겔에서 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 gel documentation system (Serlin)을 이용하여 정량하였다.

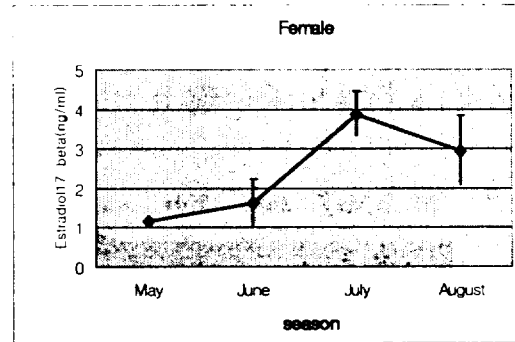


Fig. 1. Plasma concentration of estradiol-17β of female wrasse during mature and spawning seasons. The bars represent average values ± SD of 3-5 samples from three separate experiments.

결과 및 고찰

1. 산란주기 동안 에스트로겐 수용체(ER)의 발현

놀래기에서 산란주기 동안의 다양한 조직 내 에스트로겐 수용체 발현 양상을 분석하기 위해 RT-PCR을 수행하였다 (Fig. 2 and 3). 난소에서 ER의 발현은 ERα와 ERβ 모두 산란시기가 진행됨

Table. Primer sets used for RT-PCR of wrasse ER and aromatase genes

Primer	Sequence	Product size
ERα	5'- TGCAGTGA CTATGCCTCTGG -3'	350bp
	5'- TGAGGTGGCACTGTTCTCTG -3'	
ERβ	5'- CATGGAGGAGCAGAAGAAGC -3'	500bp
	5'- ACAAGCCCAGTTTGGAGATG -3'	
CYP19a	5'- TGGATCAACGGAGAGGAAAC -3'	400bp
	5'- TGGATCAACGGAGAGGAAAC -3'	
CYP19b	5'- TGTGGATAAGCGGAGAGGAGAC -3'	380bp
	5'- AGGCTGATGGACAGAGTGTC -3'	
β-actin	5'- ACTACCTCATGAGAGTCCTG -3'	400bp
	5'- TTGCTGATCGACATCTGCTG -3'	

에 따라 높은 수준으로 증가되는 양상을 보였다. 간에서의 ER 발현 또한, ER $\alpha$ 와 ER $\beta$ 간의 발현 양상에 다소 차이가 있으나, 난소에서 발현 양상과 마찬가지로 생식소 성숙기에서 산란시기로 진행됨에 따라 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 2 and 3). 특히, 난소의 ER mRNA 발현 양상은 혈장 내 E<sub>2</sub>의 농도가 산란주기가 진행됨에 따라 점진적으로 증가되는 결과와 일치하였다 (Fig. 1). 이런 결과는

난소 분화 및 성숙과정에서 에스트로젠이 간에서의 vitellogenin 합성과 난자 성숙을 조절한다는 보고와 일치한다 (Kwon *et al.*, 1993; Nagler *et al.*, 2000). 그러므로 놀래기에서 산란주기 동안 난소의 성숙과정은 ER에 의한 표적 유전자 전사의 조절을 통해 작용하는 것으로 생각된다. 반면, 정소에서의 발현은 성숙기에 높게 나타났으나, 산란 시기로 진행됨에 따라 점차적으로 감소하는 경향을 보였다 (Fig.

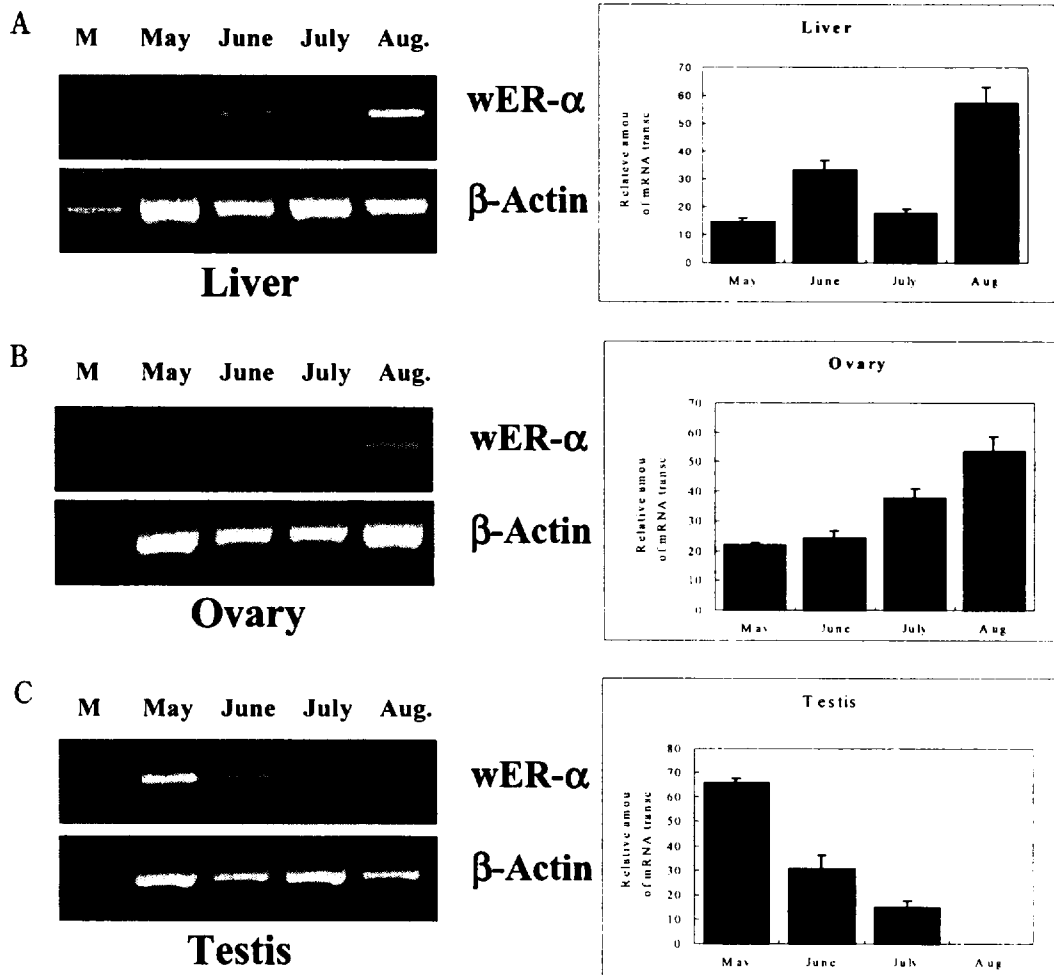


Fig. 2. The expression pattern of wrasse ER $\alpha$  in liver and gonads during mature and spawning seasons. The bands of transcripts were identified using agarose gel electrophoresis (left panels) and quantified the relative amounts of transcripts using the imaging analysis system (right panels) in liver (A), ovary (B) and testis (C) from May to August. The  $\beta$ -actin transcripts was used as a internal control for the RNA extraction and for subsequent RT-PCR. The bars represent average values  $\pm$  SD of samples from three separate experiments.

2 and 3). 경골어류의 일종인 channel catfish에서 ER subtype (ER $\alpha$ , ER $\beta$ )가 성숙한 정소에서 모두 발현된다는 보고는 있으나 (Wu *et al.*, 2001), 산란시기 동안의 발현 감소에 대한 보고는 없다. 정소의 성숙 및 정자형성과정은 안드로겐 수용체의 매개를 통한 testosterone (T)이나 11-KT의 작용에 의해 진행될 것으로 여겨지나, 에스트로겐이 정자형성과정에 관련되어 있다는 보고 (Lubann *et al.*, 1993)에

비추어 볼 때, 에스트로겐과 testosterone (T) 또는 11-KT가 함께 작용할 것으로 추정된다. 그러므로, 산란주기 동안 ER의 발현 감소에 대한 영향은 좀더 연구가 필요한 것으로 사료된다. 한편, 결과를 제시하지는 않았지만, 비록 steroidogenic 조직에 비해 약한 발현을 나타내었으나, non-steroidogenic 조직에서의 ER 발현 역시 산란주기 동안 전체적으로 고루 발현되었다. 이는 다양한 조직들이 E $_2$ 의 영향으로

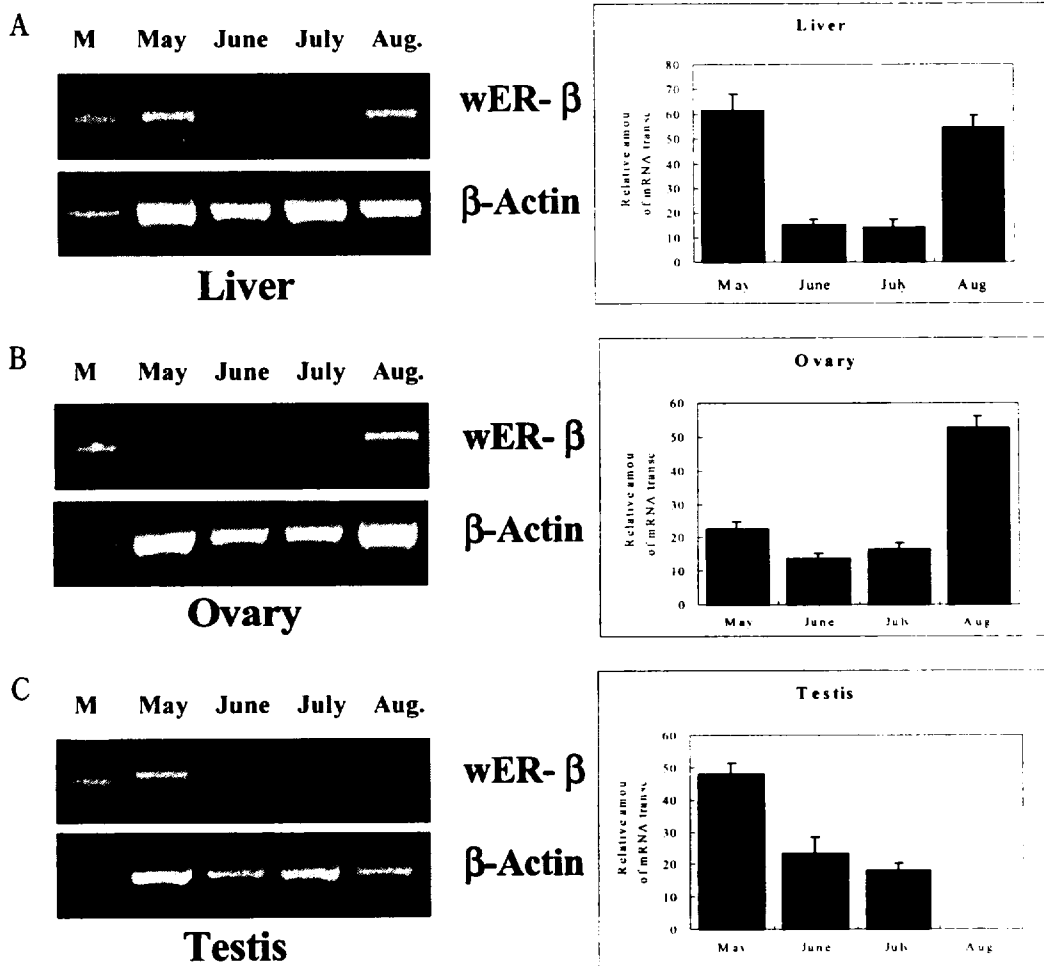


Fig. 3. The expression of wrasse ER $\beta$  in liver and gonads during mature and spawning seasons. The bands of transcripts were identified using agarose gel electrophoresis (left panels) and quantified the relative amounts of transcripts using the imaging analysis system (right panels) in liver (A), ovary (B) and testis (C) from May to August. The  $\beta$ -actin transcripts was used as a internal control for the RNA extraction and for subsequent RT-PCR. The bars represent average values  $\pm$  SD of samples from three separate experiments.

인해 그 생리적 기능이 조절됨을 시사한다.

## 2. 산란주기 동안 aromatase의 발현

난소에서 CYP19a의 발현은 성숙기에서 산란시기로 진행됨에 따라 증가함을 보였다. CYP19b의 발현 또한, 산란시기에 도달함에 따라 증가하는 발현양상을 나타내었다(Fig. 4A). 난소에서 CYP19a의 점진적인 발현 증가는 산란주기 동안의 혈장 내 E<sub>2</sub> 농도의 증가 (Fig. 1) 및 자성 놀래기의 GSI 값이 증가하는 것과 (data not shown) 일치한 결과를 나타내었다. 그러므로 red sea bream (Gen *et al.*, 2001)의 보고에서처럼, aromatase의 발현은 에스트로겐의 합성과 난소의 발생에서 중요한 기능을 할 것으로 사료된다. 뇌에서 CYP19b의 발현은 난소에서의 발현 양상과 유사하게 산란시기에 진행됨에 따라 증가됨을 보였으나, CYP19a는 산란시기동안에 거의 발현되지 않았다 (Fig. 4B). 특히, 산란 최고조

시기에 나타나는 CYP19b의 강한 발현은 생식주기에서 성적 행동과 연관이 있음을 시사한다. 또한, 다양한 조직에서의 aromatase 발현 양상을 분석하였는데, CYP19a는 다른 조직에 비해 신장에서 높게 발현된 반면, 소장에서는 거의 발현되지 않았다. 대조적으로 CYP19b는 모든 조직에서 비교적 유사한 정도의 발현을 나타내었다 (Fig. 5).

자성선숙어인 놀래기에서 산란주기 동안 난소의 성숙 및 난자형성과정은 에스트로겐의 조절에 의해 일어난다. 그러므로 산란주기가 진행됨에 따라 aromatase의 발현이 증가하는 결과로 미루어볼 때, 에스트로겐의 합성에 관련된 aromatase와 에스트로겐 작용을 증대하는 ER은 난소의 성숙과정에서 서로 상호 의존적으로 작용하는 것으로 사료된다. 산란 후, 일부 개체가 성전환이 일어나는 놀래기는 성전환 과정에도 에스트로겐이 밀접하게 연관되어 있다. 그러므로, 성전환 과정에 작용하는 에스트로겐에

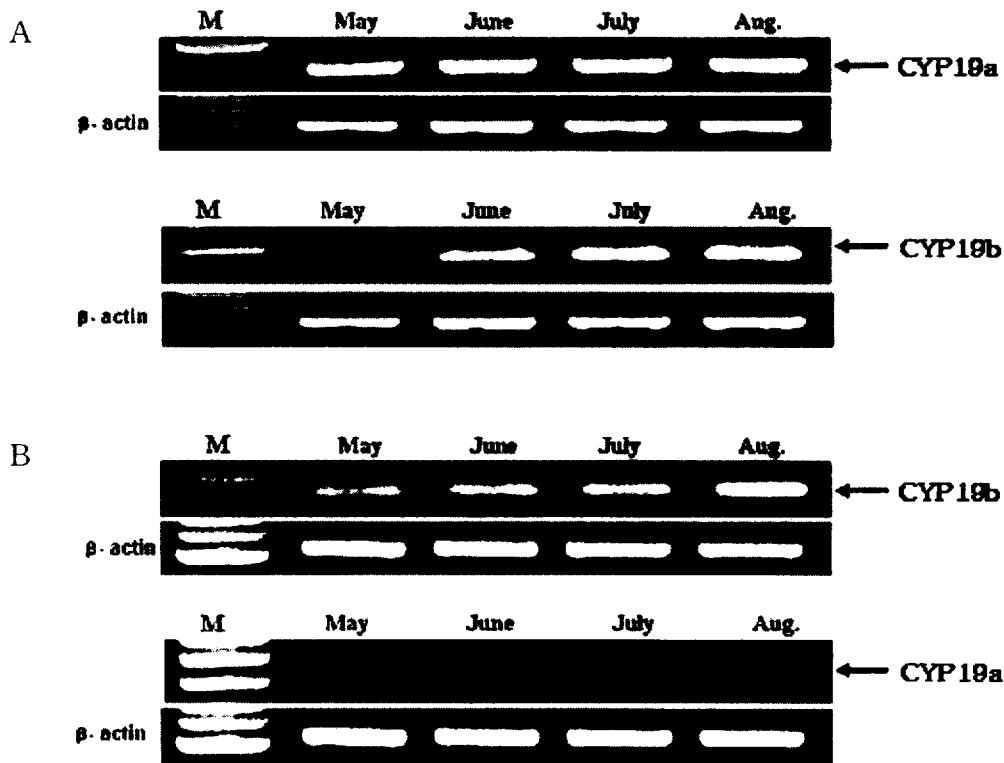


Fig. 4. The expression of CYP19a and CYP19b in the ovary (A) and brain (B) during mature and spawning seasons.

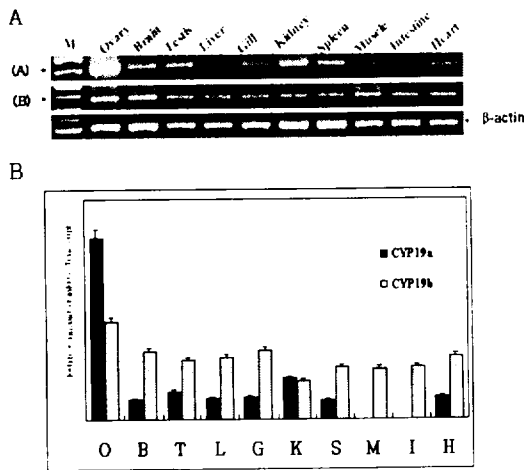


Fig. 5. Tissue-specific expression of CYP19a and CYP19b of adult wrasse by RT-PCR analysis. A (A): CYP19a. (B): CYP19b. B the relative expression level of CYP19a and b, which were normalized with that of  $\beta$ -actin. O, ovary: B, brain: T, testis: L, liver: G, gill: K, kidney: S, spleen: M, muscle: I, intestine: H, heart: M. 100 bp DNA ladder marker.

대한 연구를 수행하기 위해서는 ER과 aromatase의 대한 발현 및 기능에 대한 비교연구가 수반되어야 한다.

### 참고 문헌

- Asahina, K., A. Kambegawa and T. Higashi. 1995. Development of a microtiter plate enzyme-linked immunosorbent assay for  $17\alpha, 20\beta, 21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost gonadal steroid. *Fisheries Sci.* 61: 491-494.
- Bardet, P. L., B. Horard, M. Robinson-Rechavi, V. Laudet and J. M. Vanacker. 2002. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Mol. Endocrinol.* 28: 153-163.
- Chang, C. F., Lin, B. Y., 1998. Estradiol- $17\beta$  stimulates aromatase activity and reversible sex change in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *J. Exp. Zool.* 280: 165-178.
- Chang, X., Kobayashi, T., Kajjura, H., Nakamura, M., Nagahama, Y., 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* 18: 57-66.
- Chang, X., T., Kobayashi, T., Todo, T., Ikeuchi, M., Yoshiura, H., Kajjura-Kobayashi, C., Morry and Y. Nagahama. 1999. Molecular cloning of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zool. science* 16: 653-658.
- Conley, A., Hinshelwood, M., 2001. Mammalian aromatase. *Reproduction* 121, 685-695.
- Gelinas, D., Pitoc, G. A., Callard, G. V., 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 138: 81-93.
- Gen, K., Okuzawa, K., Kumakura, N., Yamaguchi, S., Kagawa, H., 2001. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biol. Reprod.* 65, 1186-1194.
- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J. M. Bornert, P. Argos and P. Chambon. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to *v-erb-A*. *Nature* 320: 134-139.
- Hawkins, M. B., J. W. Thornton, J. K. Skipper, A. Dotte and P. Thomas. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Biochemistry* 20: 10751-10756.
- Huang, Y., W. Yueh, J. Huang, J. Du, L. Sun, Y. Nagahama and C. Chang. 2002. Cloning and expression of estrogen receptors in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*): implications of sex change mechanism. *Mar. Biotechnol.* 4:

- 236-246.
- Kishida, M., Callard, G. V., 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 142: 740-750.
- Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Abe, S. I., 1999. Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J. Mol. Endocrinol.* 23: 167-176.
- Krust, A., S. Green, P. Argos, V. Kumar, P. Walter, J. M. Bornert and P. Chambon, 1986. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with *v-erbA* and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5:891-897.
- Kwon, H. C., S. Hayashi and Y. Mugiya, 1993. Vitellogenin induction by estradiol-17 beta in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 104: 381-386.
- Kwon, J. Y., McAndrew, B. J., Penman, D. J., 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 359-370.
- Lee, Y. H., Du, J. L., Yueh, W. S., Lin, B. Y., Huang, J. D., Lee, C. Y., Lee, M. F., E. L. Lau, Lee, F. Y., Morrey, C., Nagahama, Y., Chang, C. F., 2001. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *J. Exp. Zool.* 290: 715-726.
- Lubann, D. B., J. S. Moyer, T. S. Golding, J. F. Couse, K. S. Korach and O. Simithies, 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11162-11165.
- Nagler, J. J., M. Krisfalusi and D. G. Cyr, 2000. Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor- $\alpha$  messenger RNA and its expression in the ovary during the reproductive cycle. *J. Mol. Endocrinol.* 25: 243-351.
- Pakdel, F., C. Le Guellec, C. Vaillant, M. G. Le Roux and Y. Valotaire, 1989. Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs. *Mol. Endocrinol.* 3: 44-51.
- Socorro, S., D. Power, P. -E. Olsson and A. V. M. Canario, 2000. Two estrogen receptors expression in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *J. Endocrinol.* 166: 293-306.
- Touhata, K., M. Kinoshita, Y. Tokuda, H. Toyohara, M. Sakaguchi, Y. Yokoyama and S. Yamashita, 1999. Sequence and expression of a cDNA encoding the red sea bream androgen receptor. *Biochem. Biophys. Acta.* 1449: 199-202.
- Tanaka, M., Fukada, S., Matsuyama, M., Nagahama, Y., 1995. Structure and promoter analysis of the cytochrome P450 aromatase gene of the teleost fish, Medaka, *Oryzias latipes*. *J. Biochem.* 117: 719-725.
- Tchoudakova, A., Callard, G. V., 1998. Identification of multiple *CYP19* genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 139: 2179-2189.
- Trant, J. M., Lehrter, J., Gregory, T., Nunez, S., Wunder, J., 1997. Expression of cytochrome P450 aromatase in the Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 61: 393-397.
- Turner, R. T., B. L. Riggs and T. C. Spelsberg, 1994. Skeletal effects of estrogen. *Endocr. Rev.* 15: 275-300.
- Warner, R. R., 1984. The evolution of hermaphroditism and unisexuality in aquatic and terrestrial



- vertebrates. In : Reese, E. S., Lighter, F. (Eds.),  
Contrasts in behavior. Wiley Interscience, New  
York, pp. 77-101.
- Wu, C., R. Patino, K. B. Davis and X. Chang.  
2001. Localization of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$   
RNA in germinal and nongerminal epithelia of  
the channel catfish testis. *Gen. Comp. Endocrinol.*  
124: 12-320.