

排卵過程の顆粒層細胞における SNAP25 により制御されるホルモン分泌機構

島田 昌之¹⁾, 西松 恵子¹⁾, JoAnne S. Richards²⁾

1) 広島大学大学院生物圏科学研究科

2) Department of Molecular & Cellular Biology, Baylor College of Medicine

はじめに

哺乳動物卵子の排卵は、下垂体からの LH サージの作用により、引き起こされる。この LH に対する受容体は、卵子には全く発現せず、卵子を直接取り囲み、排卵時に共に卵管へと排出される卵丘細胞にもほとんど存在しない。これは、卵子が分泌する GDF9 がその発現を抑制するためであり、LH 受容体は、排卵直前卵胞の顆粒層細胞に発現する。したがって、排卵刺激は顆粒層細胞を介して、卵子および卵丘細胞に伝達されると考えられる。

これまでの多くの研究により、LH 刺激を受けた顆粒層細胞は、プロスタグランジン E2 (PGE2) とプロジェステロンを合成することが知られている [1]。PGE2 合成酵素である COX-2 (*Ptgs2*) の遺伝子欠損マウスは、卵丘細胞の膨潤が不十分であり、排卵数が低下し、受精が完全に認められず、不妊を呈する [2]。PGE2 の受容体である EP2 (*Pger2*) の遺伝子欠損マウスも同様の表現系を示すことから [3]、排卵および卵子成熟への PGE2 の役割が明らかとなっている。一方、プロジェステロンは、プロジェステロン合成に関わる P450_{scc} の抑制剤である aminoglutethimide や 3βHSD の抑制剤である epostatin の投与が、ラットの排卵数を低下させることが報告されている [4]。さらに、プロジェステロンに対する受容体である *Pgr* 遺伝子の欠損マウスは、排卵直前卵胞が形成されるが卵子の排卵が完全に抑制され、黄体内部に卵子がトラップされた状態を示す [5]。

われわれは、この *Ptgs 2* 遺伝子欠損マウスと *Pgr* 遺伝子欠損マウスのマイクロアレイ解析から、排卵過程において EGF like factor に属する Amphiregulin や Eprexulin の発現量が野生型マウスの顆粒層細胞におけるそれらに比較して有意に低いことを明らかとした

[6]。この Amphiregulin や Eprexulin は、Conti M 等のグループにより2004年に排卵過程の顆粒層細胞に発現することが明らかとされた因子である [7]。その後の彼らの研究により、それらの遺伝子欠損マウスでは排卵数の低下が認められることが示され、顆粒層細胞が合成・分泌し、卵丘細胞を刺激する重要な因子であると考えられている [8]。これら EGF like factor は、細胞膜貫通部位をもち、細胞外部位に EGF domain を有することから、切断酵素による修飾を経て、初めて活性型へと変化する。Shain らは、a disintegrin and metalloprotease family に属する ADAM17 が amphiregulin と eprexulin を切断することを明らかとした [9]。著者らは、この ADAM17 がブタ顆粒層細胞と卵丘細胞で FSH /LH 刺激により発現し、酵素活性も上昇すること、この ADAM17 の抑制剤が卵丘細胞と顆粒層細胞における ERK1/2 のリン酸化を阻害し、その結果卵丘細胞の膨潤が認められないことを示した [10]。さらに、ラットの顆粒層細胞において *Adam17* を siRNA によりノックダウンすると ERK1/2 のリン酸化が抑制されることも示した。これらの結果から、LH 刺激を受けた顆粒層細胞において PGE2 やプロジェステロン系を介して EGF like factor が発現され、それが ADAM17 により修飾されることで、EGF domain が卵丘細胞を刺激する結果、卵丘細胞の膨潤と卵子の成熟が誘起されることが明らかとなった。

Kawamura らは、マウス卵巣をサンプルとしたマイクロアレイ解析により、顆粒層細胞と卵丘細胞が brain-derived neurotrophic factor (BDNF) を発現すること、その受容体である TrkB receptor は卵子に発現することを認めた [11]。この BDNF あるいは TrkB receptor の抑制剤をマウスの卵胞培養系に添加する実験により、BDNF が卵子の第一極体放出を促進することが明らかとされている。さらに、排卵過程において顆粒層細胞が Interleukin (IL) 類とその受容体を発現すること、卵巣の組織培養系において IL-1 が排卵を促進し、IL-6 はプロジェステロン合成を制御することなどが報告されてい

連絡先：島田昌之、広島大学大学院生物圏科学研究科
〒739-8528 広島県東広島市鏡山1-4-4
TEL: 082-424-7899
FAL: 082-424-7899
E-mail: mashimad@hirosima-u.ac.jp

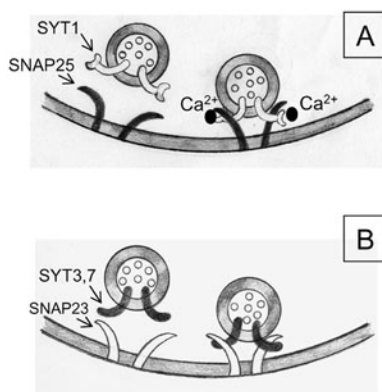


図1 神経細胞におけるエキソサイトーシス機構のモデル
 A: Ca^{2+} 依存的エキソサイトーシス, Ca^{2+} との結合依存的に分泌顆粒に存在する SYT1 が, 細胞膜状の SNAP25 と結合し, 膜融合により分泌顆粒内部のホルモンが細胞外へと放出される.
 B: Ca^{2+} 結合部位をもたない SYT3 あるいは SYT7 が SNAP23 と結合し, 分泌顆粒内部から放出される

る [12-14]. IL 類や BDNF は, 細胞膜貫通部位をもたないため, 分泌顆粒から放出されると考えられることから, エキソサイトーシスによるホルモン分泌機構も排卵に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし, これまで, 排卵過程におけるエキソサイトーシス機構は, ほとんど解明されていないのが現状であり, いつ, どのような制御機構により生理活性因子が分泌されるかは, 全く明らかとされていない。

排卵過程におけるエキソサイトーシス関連因子の発現

エキソサイトーシスは, Ca^{2+} 上昇により誘起される制御系エキソサイトーシスと Ca^{2+} 非依存的な構造系エキソサイトーシスに区分される (図 1)。これは, 分泌顆粒膜に存在する Synaptotagmin (Syt) family の構造の違いによるものである。すなわち, SYT1, 2, 4-6 は C 末端付近に Ca^{2+} 結合部位をもち, この Ca^{2+} 結合部位を有する Syt は Ca^{2+} 存在下で細胞膜に局在する Synaptosomal associated protein (SNAP)-25 と結合することにより, 分泌顆粒と細胞膜の融合が生じ, 分泌顆粒の内容物が放出される [15]。一方, SYT3 や SYT7 は Ca^{2+} 結合部位をもたないが, Ca^{2+} 非存在下においても細胞膜の SNAP-23 と結合し, 分泌顆粒の開裂が誘起される [16]。そこで, 排卵過程の顆粒層細胞における Syt family と Snap23 や Snap25 の発現変化の解析を行った。

3 週齢の C57BL/6 雌マウスに 4IU の eCG を投与して, 卵胞を発達させ, 48 時間後に hCG を投与して排卵を誘起した。hCG 投与後, 経時的に顆粒層細胞を回収し, 抽出した RNA を逆転写後, real-time PCR 解析を行っ

た。その結果, Ca^{2+} 結合部位を有する Syt1, 2, 6 とそれらと結合する Snap25 は, hCG 刺激により発現が有意に増加したが, Syt3, 4, 7 および Snap23 に有意な変化は認められなかった (図 2)。

Western blotting の結果, SYT1 と SNAP25 のタンパク質レベルでの発現上昇も確認されたことから, 免疫沈降法により両者の結合状態について検出した。その結果, hCG 投与 8 時間および 16 時間において, SYT1 と結合した SNAP25 のバンドが認められた。これらの結果から, 排卵過程において Ca^{2+} 依存的な制御系エキソサイトーシスが機能していることが初めて明らかとなった (図 3)。

Snap25 の発現制御機構

制御系エキソサイトーシスに関わる因子についてマイクロアレイ解析のデータベースを検索した結果, Snap25 の発現が Pgr 遺伝子欠損マウス (PRKO) において有意に抑制されていた。RT-PCR や western blotting による結果においても, PRKO マウスでは排卵刺激による SNAP25 の発現上昇が認められなかった (図 4 A, B)。体外培養系においても, PGR の拮抗的阻害剤である RU 486 の添加は, LH により誘導される顆粒層細胞の Snap25 発現を低下させ, 一方で PGR の過剰発現は Snap25 の発現を促進させたことから, PGR による直接的な Snap25 発現制御機構の存在が示唆された (図 4 C, D)。そこで, この PGR による Snap25 の発現制御機構を解析する目的で, Snap25 の promoter construction を作成し, プロモーター活性測定を行った。

Snap25 のプロモーター領域には, AP1 site, SP1/SP3 site, TATA box と CRE が存在することから, これらを欠損させた construction も作成し, その活性を測定した結果, -41bp から -102bp に存在する 3 つの SP1/SP3 site の欠失によりプロモーター活性が低下した (図 5)。この結果は, 同様のプロモーター活性測定を神経細胞系において行った Wilson らの結果と同様であったことから [17], 細胞種を問わず SP1/SP3 が Snap25 の発現に重要な役割を果たしていると考えられた。この promoter construction と PGR の発現ベクターを co-transfection した結果, 顆粒層細胞においてはプロモーター活性が強発現した PGR と SP1/SP3 サイトの相互作用により上昇したが, 神経細胞のモデルである PC12 細胞においては, その PGR によるポジティブな影響は検出されなかった。これらの結果から, 卵巣特異的な PGR に依存した Snap25 の発現機構が初めて明らかとなった。

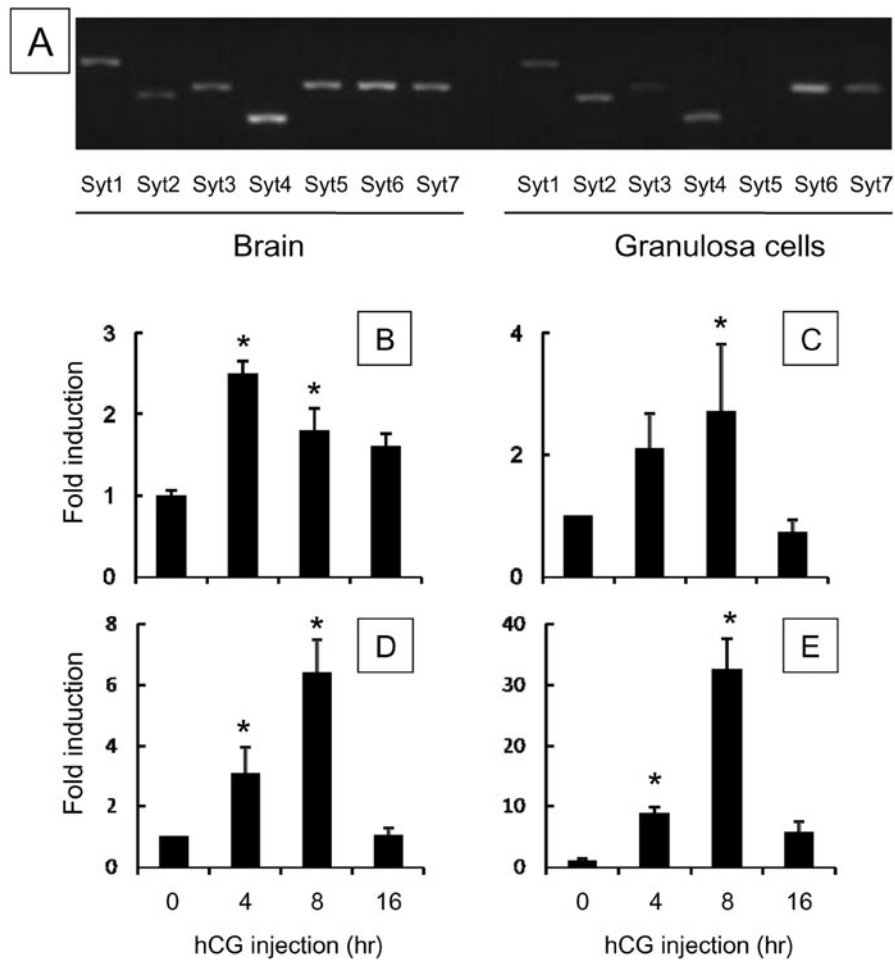


図2 排卵過程の顆粒層細胞におけるエキソサイトーシス関連因子の発現変化
A: 脳および顆粒層細胞における Syt1~7 mRNA の RT-PCR による検出
B-E: eCG 投与48時間後に hCG を投与したマウスから回収した顆粒層細胞における Syt1 (B), Syt2 (C), Syt6 (D), Snap25 (E) mRNA の発現変化
Fold induction: hCG 投与前 (0hr) を1とした相対比
*: hCG 投与前 (0hr) に比較して有意差あり (P<0.05)

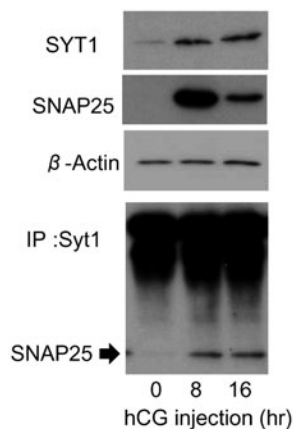


図3 排卵過程の顆粒層細胞における SYT1 および SNAP25 のタンパク質量とその相互作用

SNAP25の機能解析

排卵過程において、卵巢特異的な PGR 依存的な機構により発現し、かつ Ca^{2+} 結合部位を有する SYT family と結合する SNAP25 の機能を明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。顆粒層細胞を LH 様の作用を有する forskolin + PMA 添加培地で培養し、培養後の培地を抗体アレイによるサイトカイン類の網羅的解析に、顆粒層細胞は分泌因子の遺伝子発現解析に供試した。その結果、forskolin + PMA 処理により、11 種類のサイトカイン類の分泌が検出された。RU486 の添加により、*Snap25* の発現は抑制されたが、*Syt1* や *Snap23* などの分泌機構に関わる因子および *Il6* などの分泌因子の発現に

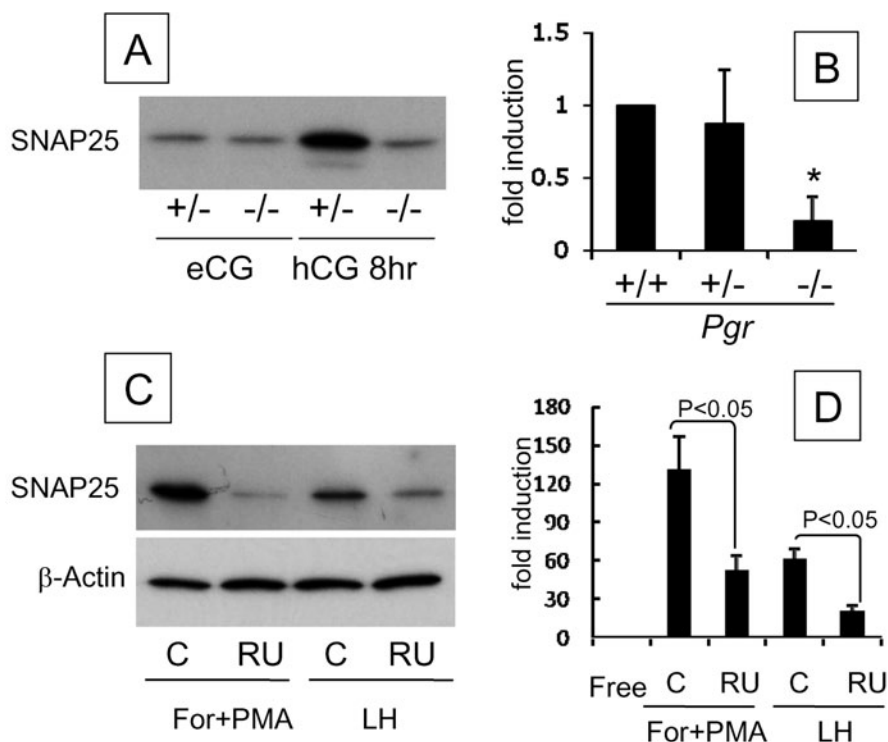


図4 顆粒層細胞の SNAP25 の発現に及ぼす PGR の役割

A, B : hCG 注入 8 時間後の Pgr knockout mice から回収した顆粒層細胞における SNAP25 のタンパク質量 (A) と mRNA 発現量 (B)
C, D : 顆粒層細胞を forskolin (For)+PMA あるいは LH 添加培地で培養した時の SNAP25 のタンパク質量 (C) および mRNA 発現 (D) に及ぼす RU486 の影響

影響はなかった。しかし、サイトカイン類の培地中への分泌は、RU486により有意に抑制されたことから、RU486による *Snap25* の発現抑制により、エキソサイトーシスが機能を低下したと考えられた。

そこで、*Snap25* siRNA により SNAP25 の発現量を特異的に低下させ、サイトカイン類の発現と分泌量に及ぼす影響を検出した。*Snap25* siRNA は、forskolin + PMA 処理による SNAP25 の発現を著しく低下させたが、*Il6* mRNA の発現に影響はなかった (図 6)。このときの培地中に分泌されたサイトカイン量は、IL-6のみでなく、他の forskolin + PMA 処理により分泌が上昇する因子すべてにおいて低下したことから (表 1)、顆粒層細胞の細胞膜貫通部位をもたない親水性ホルモンの分泌は、SNAP25と SYT family による制御系エキソサイトーシスが担っていることが初めて明らかとなった。

おわりに

著者等の研究により、排卵過程におけるエキソサイトーシス機構とその役割が明らかとなってきた。しかし、*Snap25* 遺伝子欠損マウス [18] や *Syt1* 遺伝子欠損マウス

[19] は、胚発生期に致死となることから、その体内における生殖機構に関わる役割はまだ充分には解明できていない。しかし、排卵不全を呈する PRKO マウスにおいてその発現上昇が認められないこと、PRKO マウスとは異なったメカニズムにより排卵不全となる phosphodiesterase type4D (PDE4B) 遺伝子欠損マウスにおいても、LH 刺激による *Snap25* の発現は認められないこと (Conti M., personal communication) から、重要な役割を担っていると考えている。今後、Cre-LoxP を用いた卵巣特異的欠損個体の作出により、その機能の詳細を検討していく計画である。

排卵に関わる研究は、マイクロアレイ解析により新規の生理活性因子が同定され、近年急速に発展している。この分泌因子を卵子の体外培養系の改善に応用するためには、その作用する時期の同定が重要になるが、エキソサイトーシスの制御機構に関する研究が大きく貢献すると考えている。つまり、発現した因子がいつ、どれぐらい分泌されるかを解明し、それらを制御することで、培養系は大きく発展することが期待される。

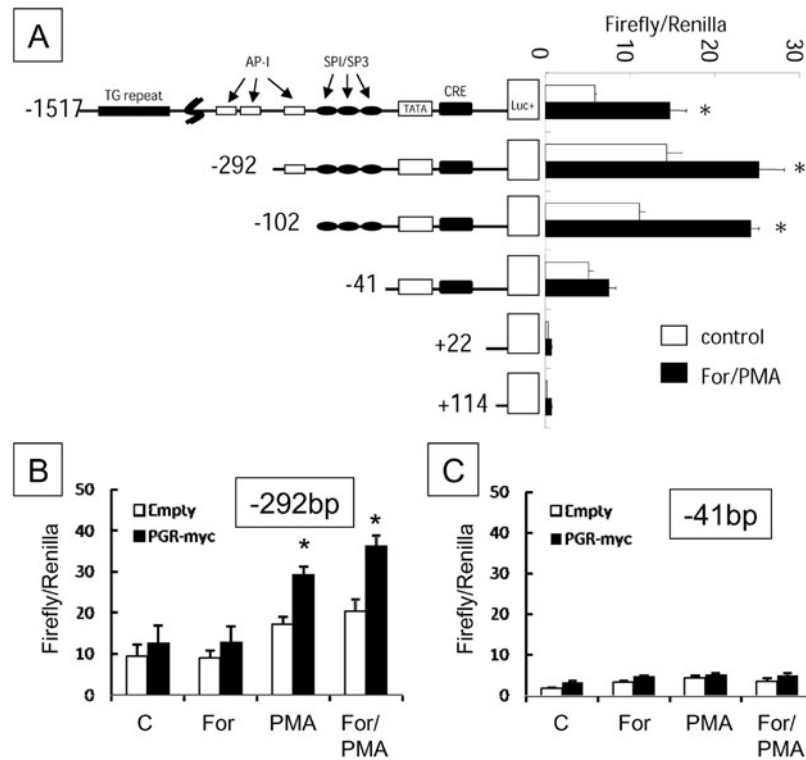


図5 顆粒層細胞の Snap25 のプロモーター活性化機構における PGR の役割
A : Snap25 プロモーター活性のレポーターアッセイ
B, C : 顆粒層細胞の Snap25 プロモーター活性に及ぼす PGR の役割

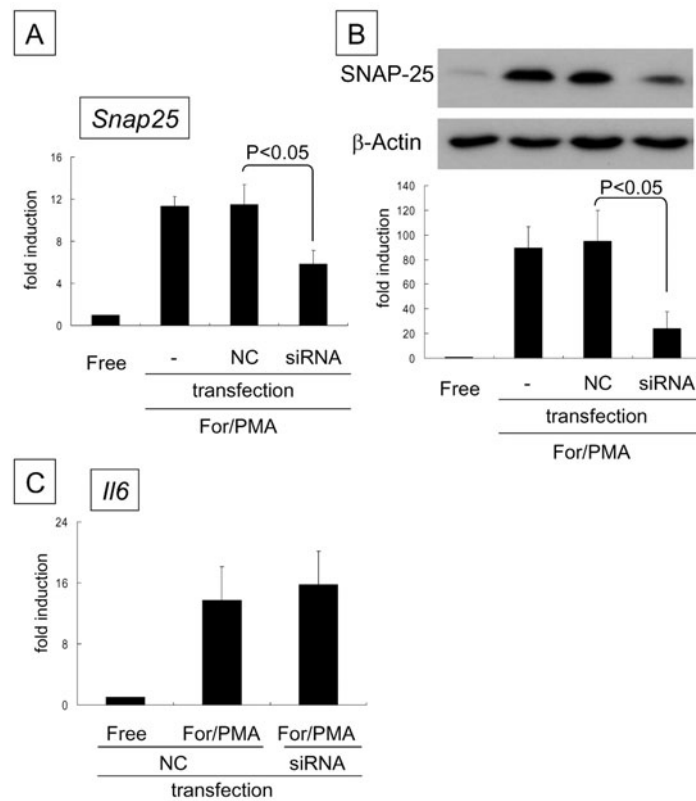


図6 顆粒層細胞の SNAP25 の mRNA (A) およびタンパク質量 (B) に及ぼす Snap25 siRNA の影響

表1 顆粒層細胞に Snap25 siRNA を導入したときのサイトカイン、ケモカイン分泌量

	Forskolin/PMA		
	free	NC	siRNA
IL-1b	1.26+/-0.57	2.48+/-0.38	1.96+/-0.33*
IL-6	35.35+/-14.69	881.38+/-176.67*	592.72+/-81.45*
IL-9	3.48+/-0.09	11.12+/-0.66*	7.05+/-0.82*
GM-CSF	0.31+/-0.08	2.68+/-0.81*	2.29+/-0.26
KC	51.12+/-13.50	173.41+/-16.19*	125.43+/-11.51*
MCP-1	6.23+/-3.78	27.00+/-4.13*	17.52+/-3.53*
MIP-1b	2.43+/-0.49	8.13+/-1.30*	4.07+/-0.48*
RANTES	22.22+/-7.98	24.82+/-1.50	20.06+/-1.51*

(pg/ml)

謝 辞

本稿は2007年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究をまとめたものである。本稿の執筆の機会を与えて下さいました日本生殖内分泌学会理事長 武谷雄二先生、第12回同学会大会長 田谷一善先生、ならびに広報理事 峰岸 敬先生に感謝いたします。本研究は、文部科学省海外先進教育研究推進プログラムにより、著者がアメリカ合衆国 Baylor College of Medicine の JoAnne S. Richards 博士とともに開始したものである。また、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（若手研究(A)）18688016により実施した。研究を遂行するに当たり、多くの補助をいただいた、JoAnne S. Richards ラボのメンバーおよび広島大学の著者の研究室のメンバーに感謝の意を表します。

引用文献

- Richards JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15, 725-751.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 17, 197-208.
- Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, Guan Y, Croffee K, Funk CD, Magnuson MA, Oates JA, Breyer MD, Breyer RM (1999) Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat Med* 5, 217-220.
- Snyder BW, Beecham GD, Schane HP (1984) Inhibition of ovulation in rats with epostane, an inhibitor of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Proc Soc Exp Biol Med* 176, 238-242.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9, 2266-2278.
- Shimada M, Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Richards JS (2006) Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 20, 1352-1365.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303, 682-684.
- Hsieh M, Lee D, Panigone S, Horner K, Chen R, Theologis A, Lee DC, Threadgill DW, Conti M (2007) Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol* 27, 1914-1924.
- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164, 769-779.
- Yamashita Y, Kawashima I, Yanai Y, Nishibori M, Richards JS, Shimada M (2007) Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 148, 6164-6175.
- Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Sollewijn Gelpke MD, Hsueh AJ (2005) Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 9206-9211.
- Peterson CM, Hales HA, Hatasaka HH, Mitchell MD, Rittenhouse L, Jones KP (1993) Interleukin-1 beta (IL-1 beta) modulates prostaglandin production and the natural IL-1 receptor antagonist inhibits ovulation in the optimally stimulated rat ovarian perfusion model. *Endocrinology* 133, 2301-2306.
- Van der Hoek KH, Woodhouse CM, Brannstrom M, Norman RJ (1998) Effects of interleukin (IL)-6 on luteinizing hormone- and IL-1beta-induced ovulation and steroidogenesis in the rat ovary. *Biol Reprod* 58, 1266-1271.
- Breard E, Benhaim A, Feral C, Leymarie P (1998) Rabbit ovarian production of interleukin-6 and its potential effects on gonadotropin-induced progesterone secretion in granulosa and theca cells. *J Endocrinol* 159, 479-487.
- Chieregatti E, Chicka MC, Chapman ER, Baldini G (2004) SNAP-23 functions in docking/fusion of granules at low Ca^{2+} . *Mol Biol Cell* 15, 1918-1930.

16. Sugita S, Han W, Butz S, Liu X, Fernández-Chacón R, Lao Y, Südhof TC (2001) Synaptotagmin VII as a Plasma Membrane Ca^{2+} Sensor in Exocytosis. *Neuron* 30, 459-473.
17. Ryabinin AE, Sato TN, Morris PJ, Latchman DS, Wilson MC (1995) Immediate upstream promoter regions required for neurospecific expression of SNAP-25. *J Mol Neurosci* 6, 201-210.
18. Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Matthews JR, Lopez-Bendito G, Molnár Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD, Wilson MC (2002) Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. *Nat Neurosci* 5, 19-26.
19. Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC (1994) Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717-727.