

排卵期特異的な EGF like factor の発現機構とその作用

下中麻奈美¹⁾, 山下 泰尚²⁾, JoAnne S. Richards³⁾, 島田 昌之¹⁾

1) 広島大学大学院生物圏科学研究科

2) 鳥取大学農学部獣医学科

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

はじめに

脳下垂体から分泌された LH は、十分発達した胞状卵胞（排卵直前卵胞）を刺激し、卵子成熟および排卵を誘起させる。この LH に対する受容体 (LHR/LHCGR) は、卵子には全く発現せず、卵子とともに排卵される卵丘細胞にもほとんどなく、顆粒層細胞に高発現している。したがって、LH 刺激は顆粒層細胞にまず作用し、顆粒層細胞の分泌因子を介して卵丘細胞や卵子が刺激すると考えられている。

米国の Conti M 博士のグループは、顆粒層細胞が発現する生理活性因子をマイクロアレイ解析により網羅的に検出した。その結果、EGF like factor である Amphiregulin (AREG), β -cellulin (BTC), Epregrulin (EREG) が、LH 刺激により顆粒層細胞で発現すること、これら EGF like factor の添加が、卵胞培養における卵子減数分裂再開と卵丘細胞の膨潤を誘起することを明らかとした [1]。さらに、EGF 受容体の機能低下型 mutant マウス (*Egfr^{ma2}*; *waved-2*) や EGF 受容体 Tyr kinase 抑制剤が、排卵数の低下を生じさせることも示され、EGF like factor が LH 刺激を伝達する因子と考えられるようになってきた [2, 3]。

一方、排卵過程において、Prostaglandin E₂ (PGE₂) や Progesterone が合成されること、これらの合成抑制剤の投与、あるいは合成酵素、受容体の遺伝子欠損マウスが、排卵不全となることも知られている [4-6]。われわれは、PGE₂ 合成酵素である COX-2 をコードする *Ptgs2* 遺伝子欠損マウスと Progesterone 受容体 (PGR) をコードする *Nr3c3* 遺伝子欠損マウスにおいて、EGF like factor の遺伝子発現が有意に低下することを報告し

た [7]。さらに、マウス顆粒層細胞の体外培養系において、PGE₂ の添加や *Nr3c3* の過剰発現処理が、EGF like factor の発現を誘起させること、EGF like factor は、*Ptgs2* や Progesterone 合成に関わる *Star*, *Cyp11a1* の発現を上昇させることを示した [7]。この結果は、EGF like factor と PGE₂, Progesterone の間には、ポジティブフィードバック機構が存在することを示している。

これまで紹介したように、EGF like factor, PGE₂ および Progesterone は、それぞれ排卵に必須な因子であり、かつ相互作用していると考えられる。したがって、LH により誘起される排卵過程において、これらの因子が発現し、機能する仕組みを詳細に解明することが、排卵機構の解明、特にその誘起メカニズムの解明に必須であると考えられることから、排卵期におけるこれら因子の発現制御機構の解明を試みた。

Areg, *Ptgs2*, *Cyp11a1* プロモーター活性① cAMP-PKA-CREB 系による制御

Areg, *Ptgs2* および *Cyp11a1* 遺伝子のプロモーター領域を探索した結果、*Areg* 遺伝子においては、cAMP responsible element (CRE) と GC-box (SP1) が、*Ptgs2* には CRE と CCAAT 配列、*Cyp11a1* には CRE と AP1 サイトと予想される配列が認められた (図 1A)。したがって、細胞内の cAMP 量を増加させ、PKA を介して CRE binding protein (CREB) を活性化させる forskolin がいずれのプロモーター活性も上昇させると推察された。そこで、これら遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、luciferase 遺伝子を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、予想通り forskolin 刺激が、いずれのプロモーターの活性を上昇させたが、PKA 抑制剤に対する反応が異なっていた (図 1B)。すなわち、*Areg* プロモーターの活性は、PKA 抑制剤である KT5720 により有意に抑制されるが、*Ptgs2* や *Cyp11a1* では影響がな

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

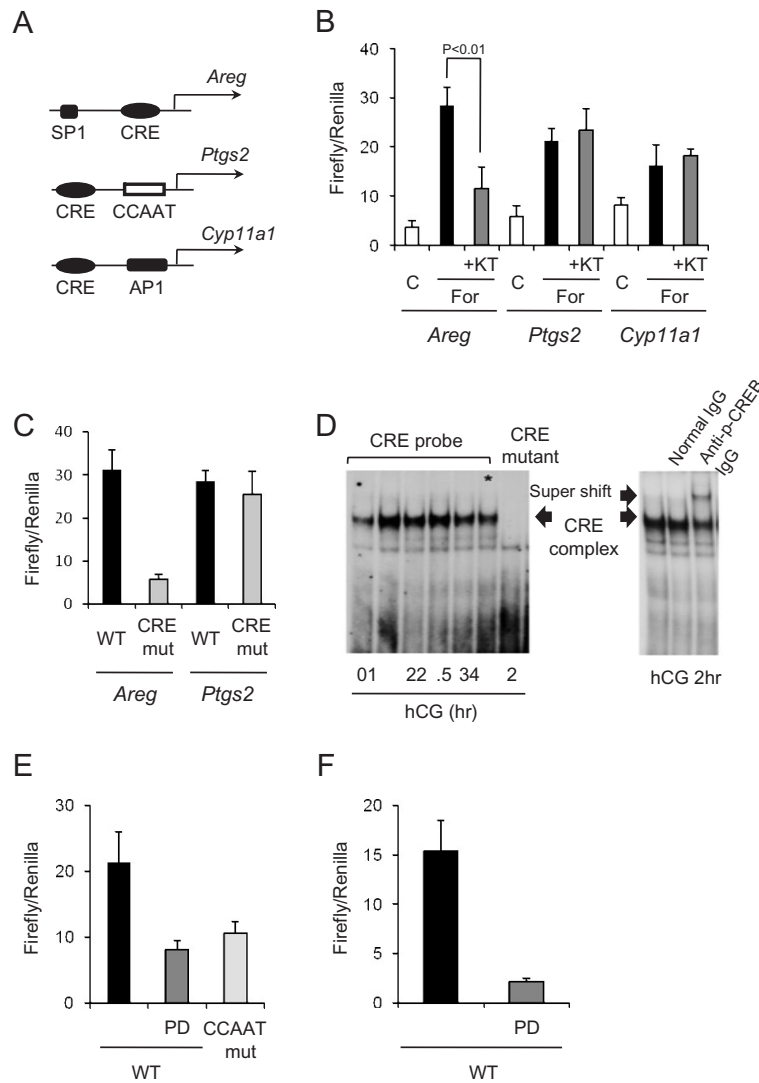


図1 マウスの排卵過程における遺伝子発現解析

- (A) *Areg*, *Ptgs2* および *Cyp11a1* 遺伝子のプロモーター領域.
- (B) マウス顆粒層細胞を Forskolin (For) と PKA 抑制剤 (KT5720, KT) で処理したときの *Areg*, *Ptgs2*, *Cyp11a1* プロモーター活性.
- (C) *Areg* および *Ptgs2* プロモーターの CRE サイトの機能欠失 (CRE mut) がその活性に及ぼす影響.
- (D) *Areg* 遺伝子のプロモーター領域における CRE 配列と排卵過程の顆粒層細胞のリン酸化 CREB の結合.
- (E) *Ptgs2* プロモーター活性に及ぼす ERK 1/2 系抑制剤 (PD98059, PD) と CCAAT 結合サイトの機能欠失 (CCAAT mut) の影響.
- (F) *Cyp11a1* プロモーター活性に及ぼす ERK 1/2 系抑制剤 (PD98059, PD) の影響.

かった。

この PKA 抑制剤に対する反応の違いをより詳細に解明する目的で、*Areg* と *Ptgs2* プロモーターにおける CRE サイトを (GATGTCA) から (CACGTCA) へと変異させた機能欠失型プロモーターを作出し、これらを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、*Areg* プロモーターにおいては、その活性が有意に野生型に比較して低下したが、*Ptgs2* プロモーターでは、有意な影響が認められなかった (図 1 C)。さらに、eCG 投与により卵巣発達を誘起し、hCG により排卵誘起を行ったマウスの卵巣を回収し、その溶解液を用いて *Areg* プロモーター

の CRE 配列とのゲルシフトアッセイを行った。hCG 刺激により CRE 配列への結合が増加し、このバンドはネガティブコントロールに用いたウサギ IgG では影響はなかったが、抗リン酸化 CREB 抗体によりそのバンドがシフトした (図 1 D)。これらの結果から、排卵刺激により、顆粒層細胞の LH 受容体が活性化し、cAMP が合成され、PKA を介して CREB がリン酸化されること、その結果 *Areg* プロモーターの CRE サイトに結合し、*Areg* が発現することが明らかとなった。

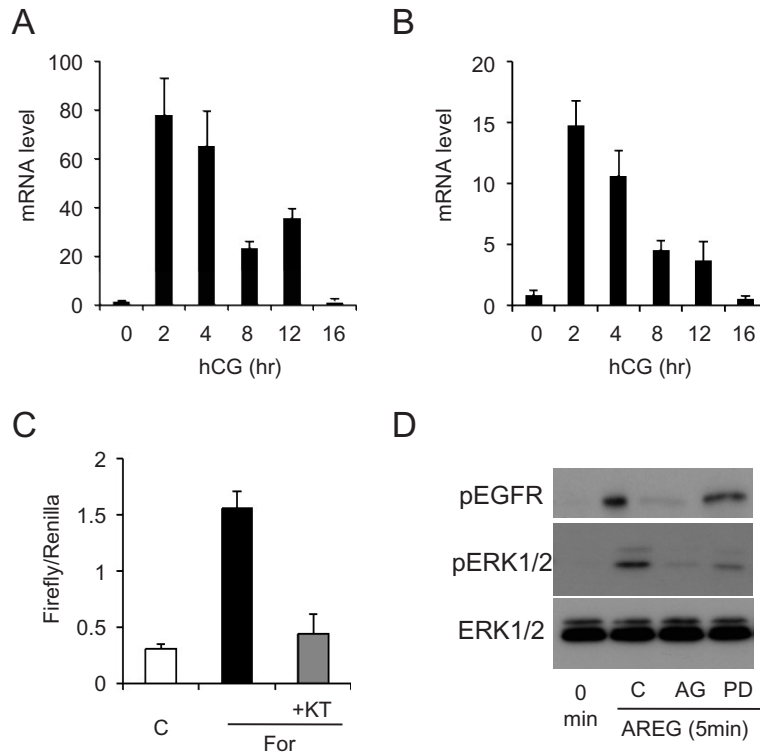


図2 マウスの排卵過程における EGF like factor の発現変化とその役割
 (A) 顆粒層細胞における *Areg* 遺伝子発現変化。
 (B) 顆粒層細胞における *Ereg* 遺伝子発現変化。
 (C) マウス顆粒層細胞を Forskolin (For) と PKA 抑制剤 (KT5720, KT) で処理したときの *Ereg* プロモーター活性。
 (D) マウス顆粒層細胞を AREG, EGF 受容体 Tyr kinase 抑制剤 (AG1487, AG), ERK 1/2 系抑制剤 (PD98059, PD) で 5 分間処理したときの ERK 1/2 のリン酸化状態。

Areg, *Ptgs2*, *Cyp11a1* プロモーター活性② ERK 1/2 による制御

Ptgs2 のプロモーター活性は、その領域に CRE サイトを有するにもかかわらず、CRE サイトの機能欠損や PKA 抑制剤による影響を受けなかったことから、プロモーター領域における他の転写因子結合領域が重要な役割を果たしていると推察された。そこで、CCAAT 配列 (TTGCGCAA) に着目し、その機能欠失型 (CCGCTCAA) を作製して、レポーターアッセイを行った結果、CCAAT 配列の変異により活性が有意に低下した (図 1 E)。CCAAT 配列には、CCAAT enhancing binding protein (C/EBP) が結合し、それは ERK 1/2 によるリン酸化により正に制御されることが知られている [8, 9]。ERK 1/2 の活性は、MEK によるリン酸化により制御されることから、MEK 抑制剤 (PD98059) の *Ptgs2* プロモーター活性に及ぼす影響を検討した。PD98059 は、野生型 *Ptgs2* プロモーターの活性を有意に低下させ、また *Cyp11a1* プロモーターにおいてもその活性が低下した

(図 1 E, F)。 *Cyp11a1* プロモーター領域には、AP 1 サイトがあり、AP 1 領域に結合する転写因子として、排卵期には Fura 2 と Jun-D が知られているが [10]、これらは ERK 1/2 によりリン酸化されることから、 *Ptgs2* と *Cyp11a1* の遺伝子発現は、ERK 1/2 により制御されていると考えられた。

EGF like factor が顆粒層細胞と卵丘細胞の ERK 1/2 をリン酸化する

Areg の発現は、PKA に依存し、これは LH による直接的な制御であり、排卵刺激後、直ちに発現が上昇可能となると考えられる。実際に、顆粒層細胞の体外培養系において、 *Areg* mRNA を real-time PCR により定量した結果、1 時間以内にその発現は有意に上昇していた [7]。また、 *in vivo* においても eCG 投与により卵胞発達を促したマウスに hCG を投与することにより、2 時間後に *Areg* mRNA の発現は最大値を示した (図 2 A)。また、 *Ereg* mRNA も排卵刺激後 2 時間以内に最大値を示し、プロモーター活性測定においても PKA 抑制剤に

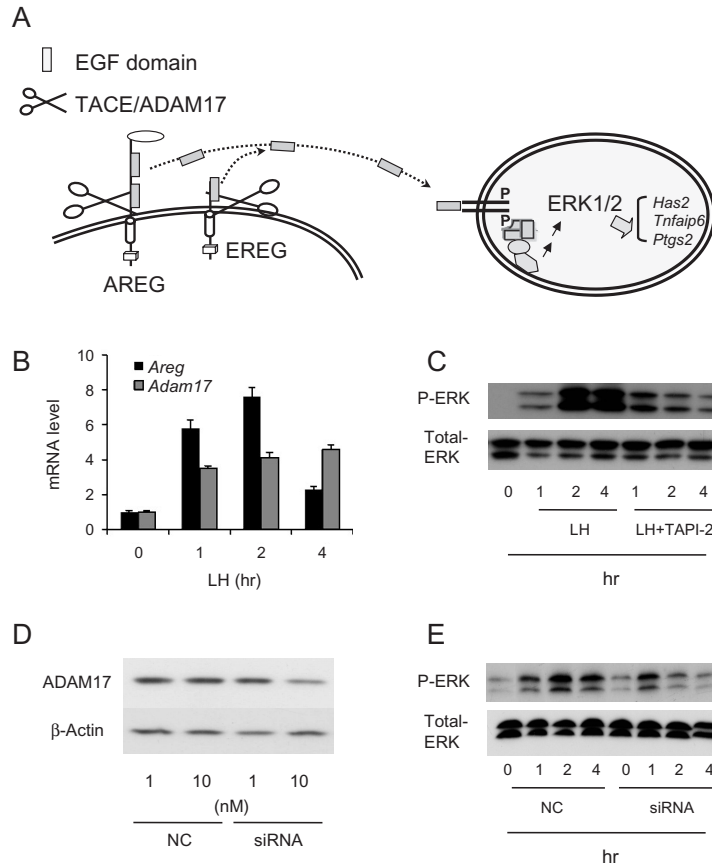


図3 EGF like factor を活性化させる ADAM17
 (A) EGF like factor の構造と活性化機構。
 (B) ラット顆粒層細胞の初代培養系における *Areg* と *Adam17* の発現変化。
 (C) ラット顆粒層細胞の ERK 1 / 2 に及ぼす ADAM17抑制剤 (TAPI-2) の影響。
 (D) *Adam17* siRNA のタンパク質レベルに及ぼす影響。
 (E) siRNA により *Adam17*発現をノックダウンしたときの ERK 1 / 2 のリン酸化への影響。

より有意にその活性が低下した (図 2 B, C). *Ereg* 遺伝子のプロモーター領域は, *Areg* とは大きく異なり, SP 1 / 3 結合領域が, その活性を制御していることが報告されている [11]. この PKA を介した系が, 排卵過程の顆粒層細胞において SP 1 を活性化するのは不明であるが, PKA が直接的リン酸化することや SP 1 が他の転写因子と結合して, プロモーター活性を調節しているのかもしれない. この点については, 今後の研究が必要である.

Areg や *Ereg* の遺伝子欠損マウスを EGF 受容体の機能低下型 mutant マウス (*Egfr^{wav2}*; *waved-2*) と交配して作出した雌マウスにおいて, 排卵刺激後においても顆粒層細胞の ERK 1 / 2 のリン酸化は低値を示すことが報告されている [3]. また, 体外培養においては, AREG の添加が, ERK 1 / 2 のリン酸化を誘起することも明らかとなった (図 2 D). さらに, LH による ERK 1 / 2 のリン酸化は, EGF 受容体の Tyr kinase 抑制剤である AG

1487により抑制されること [12], 細胞外のプロテアーゼ抑制剤である Galardin によっても ERK 1 / 2 のリン酸化レベルは低下することから [13], 排卵過程の顆粒層細胞における ERK 1 / 2 のリン酸化は, EGF 受容体を刺激する AREG の新規合成に依存していることが明確化された.

EGF like factor による ERK 1 / 2 のリン酸化は, 排卵に必須である

われわれの研究グループでは, 顆粒層細胞特異的に ERK 1 / 2 を欠損した *ERK1^{-/-}*; *ERK2^{lox/lox}*; *Cyp19a1 Cre* マウスを作出し, その解析を行った [14]. このマウスでは, *Cyp19a1* が発現する胞状卵胞以降において ERK 1 / 2 が欠損しているが, 卵胞発達に異常は認められなかった. しかし, 排卵刺激を行ったときにおいても黄体は形成されず, コンパクトな卵丘細胞層に覆われた第一

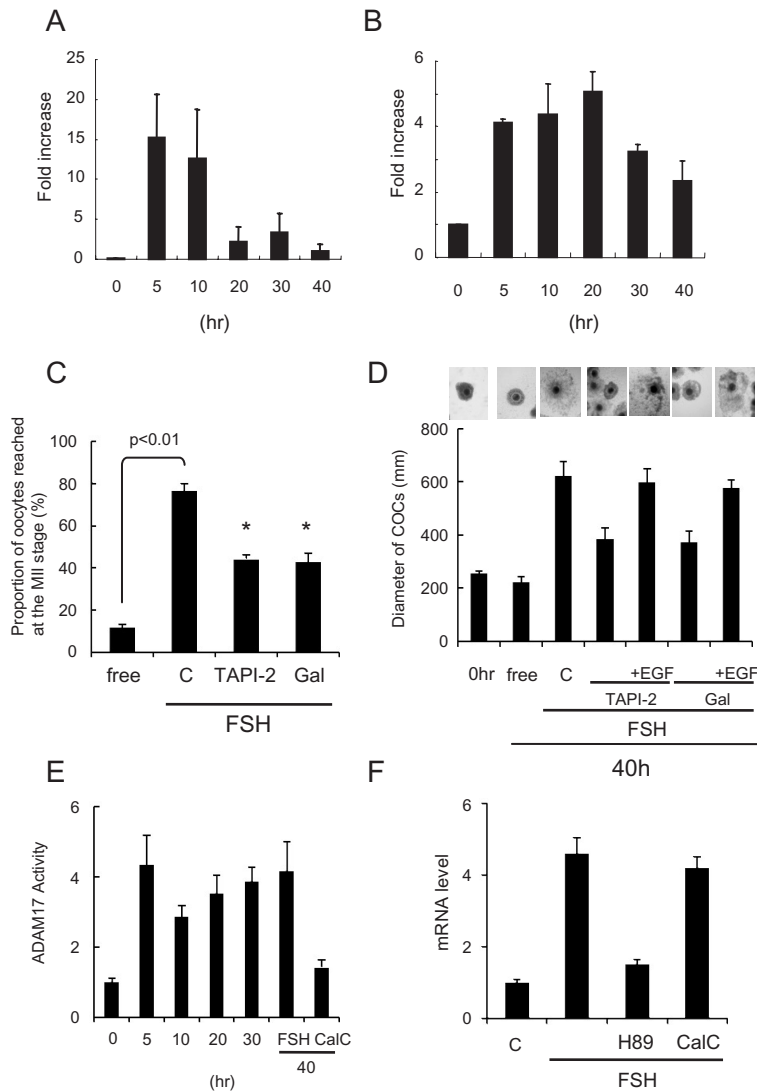


図4 プタ卵丘細胞卵子複合体の膨潤と卵子成熟に果たす ADAM17 の役割
 (A) 成熟雌ブタの排卵過程における *Areg* mRNA の発現変化。
 (B) 成熟雌ブタの排卵過程における *Ereg* mRNA の発現変化。
 (C) ADAM17 抑制剤 (TAPI-2)、非特異的 metalloprotease 抑制剤 (Galardin, Gal) がブタ卵子の第 2 減数分裂中期への進行に及ぼす影響。
 (D) TAPI-2 および Galardin (Gal) が卵丘細胞の膨潤に及ぼす影響。
 (E) ブタ卵丘細胞卵子複合体を FSH 添加培地で培養したときの ADAM17 活性の変化とそれに及ぼす PKC 抑制剤 (Calphostin C, CalC) の影響。
 (F) *Adam17* 遺伝子発現に及ぼす PKA 抑制剤 (H89) と PKC 抑制剤 (Calphostin C, CalC) の影響。

減数分裂前期の卵子を有する排卵直前卵胞が認められる、排卵不全による不妊マウスであった。おもしろいことに、発情周期が有意に長く、血中 Estrogen 濃度が有意に高く、Progesterone 濃度が有意に低いという表現系を示し、排卵期への移行が完全に抑制されていることが示唆された。そこで、この顆粒層細胞特異的に ERK 1/2 が欠損したマウスの排卵刺激後における顆粒層細胞をサンプルとしたマイクロアレイ解析を行い、排卵刺激による ERK 1/2 のリン酸化により発現する遺伝子を網羅的に検出した。

排卵期に有意に発現が上昇する遺伝子は466個認めら

れたが、そのうち376遺伝子が ERK 1/2 依存的であった。そのなかには、*Ptgs2* や *Cyp11a1*, *Star* などの Progesterone 合成に関わる遺伝子のみでなく、Estrogen の代謝に関わる *Sult1e1*, 細胞分裂を停止させる *Cdkn1b*, 制御系エキソサイトーシスにかかわる *Snap25* など、これまで排卵に必須であると報告されている遺伝子が含まれていた。つまり、排卵期に発現する EGF like factor によりリン酸化される ERK 1/2 は、その下流の転写因子を介して排卵に必須な多くの遺伝子発現を制御していることが示された。

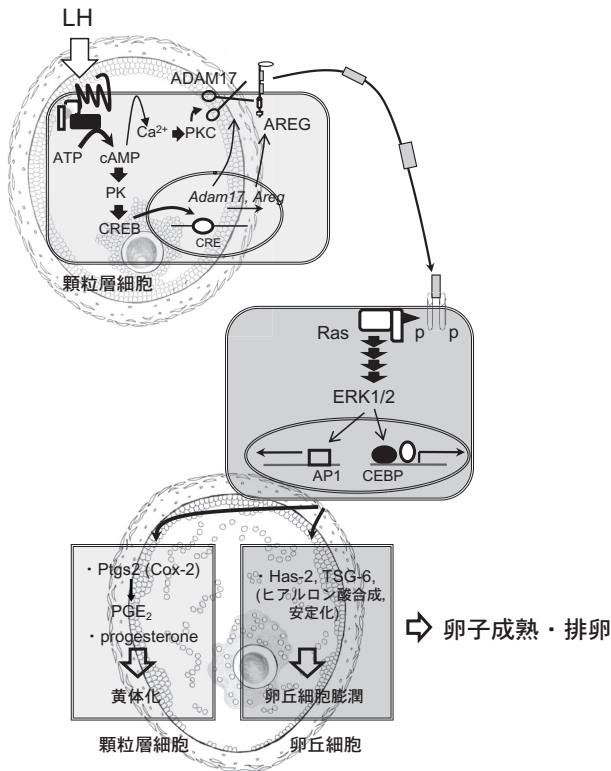


図5 EGF like factor を中心とした排卵制御機構

EGF like factor の修飾機構

これら AREG や EREG は、膜結合型タンパク質であり、ADAM17により特異的に切断され、細胞膜表面から遊離し、標的細胞に発現する EGF 受容体を刺激する [15] (図 3 A)。したがって、ADAM17が AREG や EREG の機能発現を調節していることとなることから、われわれは、ADAM17に着目し、その発現と酵素活性、生理的意義について検討を行った。

ラット顆粒層細胞の体外培養において、LH 刺激は *Areg* mRNA を 1 時間以内に発現させ、*Adam17*mRNA の発現も有意に上昇させた (図 3 B)。LH 刺激は、同時に ERK 1 / 2 のリン酸化も誘起した (図 3 C)。ADAM17 に対する抑制剤である TAPI-2 の添加により、LH により引き起こされる ERK 1 / 2 のリン酸化は抑制され (図 3 C)、*Adam17* の発現を siRNA によりノックダウンした時も抑制されたことから (図 3 D, E)、LH による一連の機能変化は、ADAM17により遊離された EGF like factor が引き起こしていることが明確化された。

EGF like factor は、オートクライン的に顆粒層細胞に作用するだけでなく、卵丘細胞に作用し、卵丘細胞の

膨潤や卵子の減数分裂再開も促進する [1]。そこで、ブタ卵丘細胞卵子複合体の体外培養系を用いて、TAPI-2 の影響を検討し、EGF like factor の修飾機構の意義を検討した。ブタ体内においては、卵胞発達を促し、そこに hCG を投与することにより *Adam17* の遺伝子発現は卵丘細胞と顆粒層細胞でともに有意に上昇した [16]。体外培養系においても、高濃度の FSH 刺激により *Areg* および *Adam17* mRNA は有意に増加した (図 4 A, B)。高濃度の FSH は、単独添加により卵丘細胞の膨潤や卵子の成熟を誘起するが、これらは TAPI-2 の添加により有意に抑制された (図 4 C, D)。この TAPI-2 による抑制は、EGF の添加により克服されたことから、卵丘細胞の変化にも EGF like factor の修飾機構が重要な役割を果たすことが明確化された。

この卵丘細胞における ADAM17 の酵素活性は、FSH 刺激により直ちに増加する (図 4 E)。この酵素活性は、PKC 抑制剤により有意に低下した (図 4 E)。しかし、PKC 抑制剤では *Adam17*mRNA レベルには影響を与えないこと、PKA 抑制剤が *Adam17* の発現を抑制することから、PKA 系が *Adam17* を直ちに発現させること、PKC がその酵素活性を上昇させることが示された (図 4 F)。

おわりに

著者等や Conti M 博士らの研究により、排卵過程において、LH 刺激を卵丘細胞に伝達し、卵丘細胞を膨潤させ、卵子の成熟を誘起する EGF like factor 系の役割が明らかとなってきた (図 5)。すなわち、LH 刺激は、cAMP-PKA-CREB 系を介して *Areg* や *Adam17* の発現を誘起する。LH は、PKC 系も活性化することが知られているが、この PKC が ADAM17 の酵素活性を上昇させ、AREG を顆粒層細胞の細胞膜表面から遊離する。活性型 AREG は顆粒層細胞と卵丘細胞に作用し、EGF 受容体を介して ERK 1 / 2 をリン酸化し、それが AP 1 因子や C/EBP を活性化する結果、*Ptgs2* や *Cyp11a1* などを発現させ、顆粒層細胞の黄体化、卵丘細胞の膨潤、卵子の成熟が誘起される。本稿で紹介した結果の多くは、レポーターアッセイによるものであり、十分に排卵期の顆粒層細胞で起こっている遺伝子発現変化を再現しているとはいえない。したがって、今後、クロマチン免疫沈降法による詳細な解明が必要である。しかし、申請者らのグループでは、C/EBP α や C/EBP β の顆粒層細胞特異的遺伝子欠損マウスが、ERK 1 / 2 欠損マウスと同様に、排卵不全を呈し、かつ *Ptgs2* の遺伝子発現が低下することを認めている [13] (Fan et al., 未発表データ)。この結

果は、上記の仮説モデルを補完するものである。しかし、卵丘細胞における直接的影響は明らかとされつつあるが、卵子成熟を誘起する仕組みは未だ不明である。卵丘細胞における EGF like factor の標的遺伝子をさらに詳細に解明することにより、卵丘細胞が発現する卵子成熟制御因子が同定されるものと考え、研究を進めているところである。

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。この因子を卵子の体外培養系の改善に応用するためには、本稿の後半で紹介した ADAM17 の作用といった修飾機構を解明し、作用時期を同定することが必要と考えている。つまり、どのような仕組みで発現し、それがいつ機能するかを解明し、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。

謝辞

本稿は2008年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究と候補演題に選出された研究とをまとめたものである。本稿の執筆の機会を与えてくださいました日本生殖内分泌学会理事長 峯岸 敬先生、第13回同学会大会長 寺川直樹先生、ならびに広報担当理事 筒井和義先生に感謝いたします。また、本研究は、アメリカ合衆国 Baylor College of Medicine の JoAnne S. Richards 博士との共同研究であり、研究の遂行に多くの補助をいただいた、JoAnne S. Richards ラボの Heng-Yu Fan 博士をはじめとするメンバーに感謝の意を表します。

引用文献

1. 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.
2. Ashkenazi H, Cao X, Motola S, Popliker M, Conti M, Tsafiriri A (2005) Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146, 77-84.
3. 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.
4. 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.
5. 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. *Gene Dev* 9, 2266-2278.
6. Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Sharma SC, Lydon JP, O'Malley BW, Espey LL, Richards JS (2000) Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids* 65, 559-570.
7. 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.
8. Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2207-2211.
9. Sebastian T, Malik R, Thomas S, Sage J, Johnson PF (2005) C/EBPbeta cooperates with RB:E2F to implement Ras (V12)-induced cellular senescence. *EMBO J* 24, 3301-3312.
10. Sharma SC, Richards JS (2000) Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. *J Biol Chem* 275, 33718-33728.
11. Sekiguchi T, Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Kawata H, Yoshino M, Kajitani T, Kameda T, Minegishi T, Miyamoto K (2002) Transcriptional regulation of the epi-regulin gene in the rat ovary. *Endocrinology* 143, 4718-4729.
12. Panigone S, Hsieh M, Fu M, Persani L, Conti M (2008) Luteinizing hormone signaling in preovulatory follicles involves early activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Mol Endocrinol* 22, 924-936.
13. 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.
14. Fan H, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS (2009) ERK1/2 in ovarian granulosa cells are critical for female fertility. *Science* 324, 938-941.
15. 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.
16. Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. (2008) Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction* 136, 9-21.