

顆粒膜細胞の分化と黄体細胞のアポトーシスにリンクするペースメーカーの発振

吉田 薫¹⁾, 橋原佐由子¹⁾, 賀 培建¹⁾, 平田 雅美¹⁾, 山内 伸彦¹⁾,
橋本 誠一²⁾, 服部 眞彰¹⁾

1) 九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門

2) アステラス製薬分子医学研究所

はじめに

哺乳類を含むほとんどの生物の多くの生理学的・行動学的過程で昼夜のリズムがみられる。これは概日リズムといわれ、内分泌的には約24時間に自己維持されている[1]。概日リズムは入力、ペースメーカー、出力の3要素からなり、哺乳類におけるペースメーカーの中核は視床下部にある視交叉上核(SCN)である。光は中枢時計の主な同調因子であり、視神経を介した光刺激がSCNに入力し、主要な時計遺伝子の発現を伴ってペースメーカーが同期化される。ペースメーカーの分子メカニズムは、2つの転写・翻訳フィードバックループによって形成されている。bHLH-PASドメインを含むCLOCKとBMAL1の2つの転写因子はヘテロダイマーを形成し、*Period (Per)* 遺伝子や *Cryptochrome (Cry)* 遺伝子の転写を促進する。生成されたPER蛋白質とCRY蛋白質は複合体を形成して、核内に移行し、CLOCK/BMAL1の活性を抑制することで自身の転写を抑制している。このネガティブフィードバックループによって、約24時間のペースメーカーが維持されている[2, 3]。

SCNで同期化されたペースメーカーは、神経シグナルやホルモン分泌を通して末梢組織におけるペースメーカーを同期化している[4-6]。心臓や肝臓、腎臓、骨格筋などの多くの末梢組織では、同期化により時計遺伝子が振動的に発現して、時計遺伝子の下流に存在する組織特異的な時計支配遺伝子(Clock Controlled Genes)が概日的な発現を示す。その一方で、末梢組織は中枢から独立したペースメーカーをもっている。末梢組織の同期化により、睡眠や行動、脂質代謝、腫瘍形成など多岐

にわたって生物の生命現象が調節されている[7, 8]。

これまでの研究により、生殖においてもペースメーカーの関与が示唆されている。時計遺伝子 *Clock* のノックアウトによりマウスは異常な発情周期を示し、LHサーージが起らず、結果として不妊になる[9]。しかしながら、ラット卵巢の黄体では時計遺伝子 *Per1* や *Per2* の概日的な発現がみられるという報告[10]に対し、卵胞では *Bmal1* や *Per2* が振動的に発現するが黄体では否定的な報告もある[11]。このように卵巢のペースメーカーでは相反する報告があり、卵巢でのペースメーカーの存在を含めそれを制御する因子についてほとんど明らかではない。本研究では、ラット顆粒膜細胞および黄体細胞のペースメーカーを解析し、それらのペースメーカーの機能について検討することを目的とした。

顆粒膜細胞および黄体細胞におけるPER1の細胞内局在

12時間明暗周期(点灯時間0800~2000)のもとで飼育している未成熟雌ラット(4週齢)および黄体期の成熟雌ラットから、点灯後4時間(ZT4)および12時間(ZT12)に卵巢を採取して、免疫組織化学によりPER1の細胞内局在を観察した。図1に示すように、未成熟雌ラットの顆粒膜細胞では、ZT4およびZT12のいずれもPER1は細胞質で凝集して局在するのに対し、成熟雌ラットの黄体細胞ではPER1の凝集の様子はみられず、ZT4では核のみに、ZT12では核と細胞質の両方に局在することが認められた。しかも、ZT12でPER1の強い発現が認められた。免疫組織化学的所見では明確にはいえないが、少なくとも黄体細胞では時計遺伝子の振動的な発現が発生していることが考えられる。

連絡先: 吉田 薫, 九州大学大学院農学研究院動物資源科学部門

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

TEL&FAX: 092-642-2938

E-mail: kaoru.1204@hotmail.co.jp

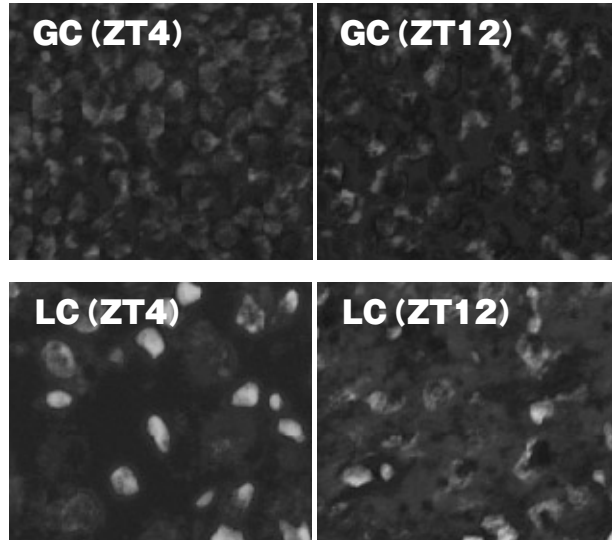


図1 顆粒膜細胞および黄体細胞における PER 1 の細胞内局在
 抗 PER 1 抗体を用いて蛍光免疫組織化学的手法により、ZT 4 と ZT12に採取した未成熟ラットおよび成熟ラットの卵巣の凍結切片を作製して免疫染色を施した。
 赤：抗 PER 1 抗体、青：核染色 (Hoechst)、上図：顆粒膜細胞、下図：黄体細胞。点灯時を ZT 0、消灯時を ZT12とする。

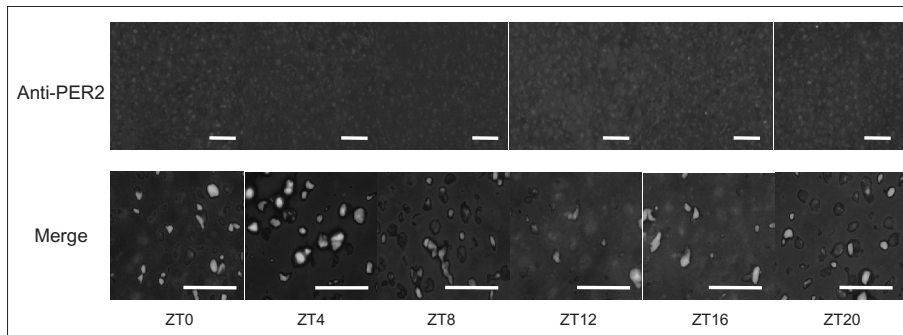


図2 黄体細胞における PER 2 の概日リズムと細胞内局在
 抗 PER 2 抗体を用いて蛍光免疫組織化学的手法により、eCG/hCG 処理した未成熟ラットから 4 時間間隔で卵巣を採取し、凍結切片を作製して免疫染色を施した。
 上図：抗 PER 2 抗体、下図：抗 PER 2 抗体 (赤)と核染色 (Hoechst, 青)をマージ。Bars=50 μ m

黄体細胞における PER 2 発現の概日リズム

未成熟ラットに eCG (50単位) を投与、その48時間後に hCG (25単位) を投与 (eCG/hCG) して5日後から4時間おきに24時間経時的に卵巣を採取し、免疫組織化学により PER 2 の細胞内局在を観察した。図2に示すように、ZT12~ZT16に PER 2 の強い発現が見られ、ZT 0~ZT 4ではその発現は低下し明らかな概日リズムが認められた。強い発現がみられた時間帯では、PER 1 と同様に PER 2 の局在が核と細胞質に認められたのに対し、低下した時間帯では核のみに PER 2 が局在した。

ペースメーカーの分子機構から考えると、時計遺伝子が振動的に発現するためには時計タンパク質 PER 2 が核と細胞質の両方に局在することになる。したがって、黄体細胞での免疫組織化学的所見はペースメーカーの駆動を示しているものと考えられる。一方、顆粒膜細胞ではペースメーカーが駆動していない。ショウジョウバエの卵巣卵胞では、*period* と *timeless* は振動的な発現を示さないことが報告されており [12]、顆粒膜細胞での所見と一致するものである。

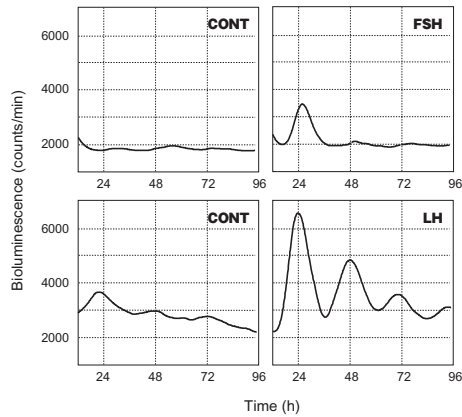


図3 *Per2*-プロモーター連結 *dLuc* 遺伝子導入ラットから採取した顆粒膜細胞におけるペースメーカーの振動
DES 処理 (上図) あるいは eCG 処理 (下図) のラットから採取した卵巣の顆粒膜細胞を分離して、35-mm コラーゲンコートディッシュに播種して2日間培養、0.1mM ルシフェリン存在下で生じる発光を連続的に4日間計測した。発光計測直前に、100ng/ml の FSH あるいは LH を含む培地と交換した。

FSH/LH による顆粒膜細胞ペースメーカーの制御

多くの時計遺伝子はグルココルチコイド、フォルスコリン (FSK) あるいは血清などによって誘導される [13-15]。顆粒膜細胞の増殖・分化には FSH や LH が大きく関わっており、これまでに FSH と LH が *in vitro* で *Per1* の発現を刺激することが報告されている [19, 20]。時計遺伝子 *Per2* の発現に対しても、FSH や LH が影響を及ぼすことが考えられることから、*Per2* のプロモーター領域と *dLuc* 遺伝子を融合させて (*Per2 promoter-dLuc*) 組み込んだトランスジェニックラット (TG ラット) を用いて、顆粒膜細胞における *Per2* の発現をリアルタイムに計測した (図3)。合成エストロゲン (DES) 投与ラットから分離した LH 受容体が発現していない未成熟顆粒膜細胞では、*Per2* の発現は低く、FSH の刺激で1回の発現を示すものの連続的な振動を示さなかった。一方、eCG 投与ラットから分離した LH 受容体が発現している成熟顆粒膜細胞では、未成熟顆粒細胞よりも高いレベルの *Per2* の一定発現がみられたが、明確な振動的な発現を示さなかった。しかし、成熟顆粒膜細胞を LH で刺激すると連続的な振動が発生した。これらの結果から、成熟した顆粒膜細胞には内因性のペースメーカー機構が存在しているが、その機構は停止しており、LH 刺激によりペースメーカーが発振されることが考えられる。

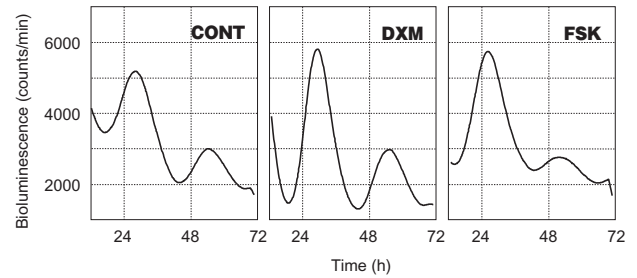


図4 *Per2*-プロモーター連結 *dLuc* 遺伝子導入ラットから採取した黄体細胞におけるペースメーカーの振動
eCG/hCG 処理のラットから採取した卵巣の黄体細胞を分離して、35-mm コラーゲンコートディッシュに播種して3日間培養、0.1mM ルシフェリン存在下で生じる発光を連続的に3日間計測した。発光計測直前に、0.1 μ M DXM あるいは 1 μ M FSK を含む培地と交換した。コントロールには vehicle (0.01% エタノール) を添加した。

黄体細胞におけるペースメーカーの発振

顆粒膜細胞が分化した黄体細胞での *Per2* の振動的発現について解析するために、eCG/hCG で処理した TG ラットから黄体細胞を分離・培養した。前述した顆粒膜細胞とは対照的に、ホルモン等を添加しない場合でも黄体細胞は *Per2* の連続的な振動的発現を示した (図4)。また、一般的にペースメーカーの同期化因子として知られているデキサメサゾン (DXM) や FSK を添加すると、他の細胞でみられているように *Per2* の振動的発現が増幅した。このことから、黄体細胞ではペースメーカー機構が存在し、しかも自己振動していることを示している。精巣の精子形成過程では時計遺伝子が振動的に発現していないこと [17, 18]、脱落膜化を誘導させた子宮内間質細胞や精巣ライディッヒ細胞および胸腺細胞では、*Per2* の振動的発現が消失していること [20] など、これまで報告がある。神経系の細胞 (PC12) で分化を誘導すると、停止していた *Per1* と *Per2* の振動的な発現が再開する [21]。これらのことを考え合わせると、細胞周期や分化過程によっては時計遺伝子の振動的発現にスイッチが入ることが考えられる。卵胞を構成する顆粒膜細胞は LH サージの刺激により、卵子を放出した後機能的な黄体細胞へと分化する。顆粒膜細胞での時計遺伝子の振動的発現の入力因子が LH サージであることが考えられ、LH の新たな機能が浮かび上がってきた。この顆粒膜細胞の増殖と黄体細胞への分化という時間の流れ

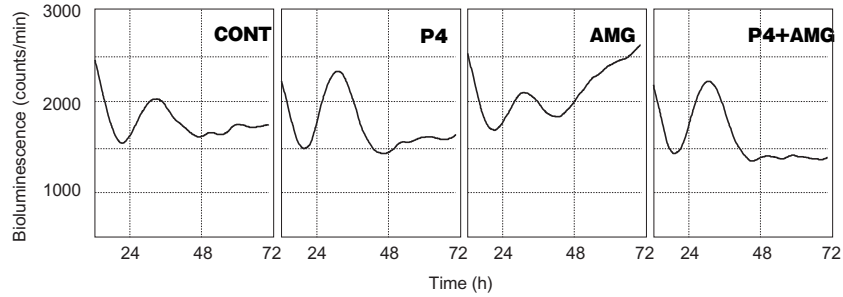


図5 黄体細胞のペースメーカーの振動に及ぼすP4およびP4合成阻害剤添加の影響
eCG/hCG処理のラットから採取した卵巣の黄体細胞を分離して、35-mm コラーゲンコートディッシュに播種して3日間培養後、0.1mM ルシフェリン存在下で生じる発光を連続的に3日間計測した。発光計測直前に、0.1μM P4、1μM AMGあるいはP4+AMGを含む培地と交換した。コントロールにはvehicle (0.01%エタノール)を添加した。

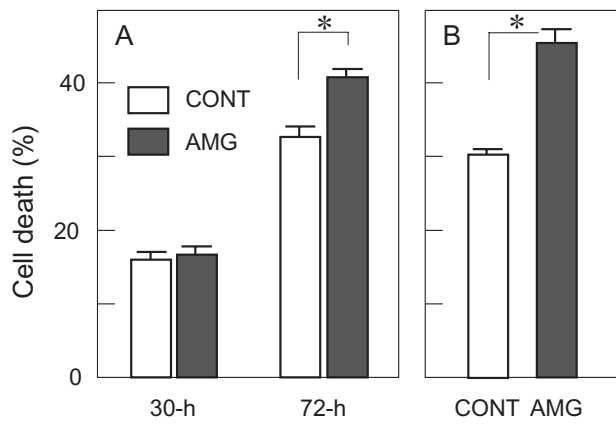


図6 黄体細胞における細胞死の判定
AMG添加から30時間後(Per2過剰発現前)および72時間後(Per2過剰発現時)に、死細胞率をPI染色(A)およびAO/EB染色(B)により判定した。AO/EB染色ではAMG添加から72時間後の細胞について判定した。平均値±SE (n=3)で示す。*P<0.05

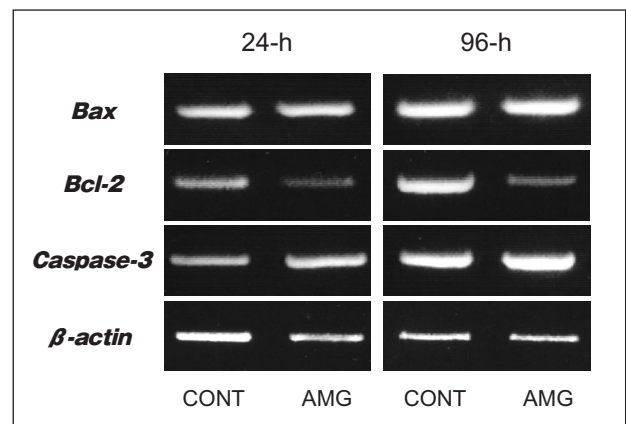


図7 黄体細胞でのPer2過剰発現に伴うアポトーシス関連遺伝子の発現
AMG添加から24時間後(Per2過剰発現前)および96時間後(Per2過剰発現時)の黄体細胞から総RNAを分離して、アポトーシス関連遺伝子(Bax, Bcl2, Caspase-3)の発現を以下に示すプライマーを用いてRT-PCRによって調べた。
Bax (センス: 5'-AGG ATC GAG CAG AGA GGA TG-3'; アンチセンス: 5'-GAG GAC TCC AGC CAC AAA GA-3'), Bcl2 (センス: 5'-GGT GGT GGA GGA ACT CTT CA-3'; アンチセンス: 5'-TGA TTT GAC CAT TTG CCT GA-3'), Caspase-3 (センス: 5'-GCT ACG ATC CAC CAG CAT TT-3'; アンチセンス: 5'-AGT CTG CAG CTC CTC CAC AT-3').

に、ペースメーカーが深く関わっていることが示唆される。

黄体細胞におけるペースメーカーとアポトーシス

黄体細胞の生存にはプロゲステロン(P4)が重要であり、P4はLHの刺激によって産生・分泌が始まる。前述したように顆粒膜細胞が黄体細胞に分化することによりペースメーカーが発振したことから、P4が黄体細胞のペースメーカーの発振に重要な役割を担っていることが考えられる。そこで、培養黄体細胞にP4およびP4合成阻害剤であるアミノグルテタマイド(AMG)を添加して、P4合成阻害がPer2の振動的発現に及ぼす影

響を解析した。P4の添加によりペースメーカーの振幅や周期に大きな変化をもたらさなかったが、興味あることにAMGの添加によって48時間以降にPer2の過剰な発現が認められた(図5)。この過剰発現はP4の添加により抑制された。

培養している黄体細胞中のP4濃度が減少すると、黄体細胞のアポトーシスが誘導される[22, 23]。そこで、PI染色およびAO/EB染色を用いて黄体細胞での死細胞率を判定した。Per2の過剰発現が発生する前では(AMG添加後30時間)、AMGの添加および無添加に関わらずPI染色による死細胞率に有意な変化は認められなかった(P>0.05)(図6)。これに対して、Per2の過剰発現が発生している時期(AMG添加後72時間)では、AMG

添加によって死細胞率が有意に増加した ($P < 0.05$)。同様の結果は AO/EB 染色によっても確認された。また、アポトーシス関連遺伝子の発現を RT-PCR によって解析したところ、アポトーシス促進遺伝子 *Bax* および *Caspase-3* の発現は変化しないが、*Per2* の過剰発現の前にすでにアポトーシス抑制遺伝子である *Bcl-2* の発現が低下することが認められた (図 7)。すなわち、アポトーシスのシグナルが入力された後、細胞ではペースメーカーは本来の振動を示さなくなり、*Per2* の過剰発現にシフトすることを強く示唆している。しかも、P4 が黄体細胞の連続的な *Per2* の振動的発現の制御に重要な役割を担っていることが考えられる。

肝臓における *Wee1* や *TGF β* など多くの細胞増殖関連遺伝子がペースメーカーの制御下にあること [24]、また *Wee1* や *VEGF* は E-Box を介して *Per2* や *Cry* のペースメーカーの制御を受けていること [25] など、細胞周期や細胞分化とペースメーカーの関連性が報告されている。さらに、*Per2* の過剰発現と肺がん・乳がんのアポトーシスの誘導 [26]、*Per2* の発現抑制による乳がん成長の促進 [27] など、時計遺伝子とアポトーシスの関係についても報告がある。これらの報告を考え合わせると、卵巣の黄体細胞におけるアポトーシスもペースメーカーと深くリンクしていることが示唆される。

おわりに

本研究では、卵胞を構成する顆粒膜細胞や排卵後の黄体細胞にみられる増殖・分化に伴って、ペースメーカーの振動が変化することを紹介した。排卵する前の増殖期にある顆粒膜細胞ではペースメーカーは停止しているが、排卵後黄体細胞へと分化することによりペースメーカーが発振し始めることが明らかとなった。ペースメーカーの停止から発振へと切り替えるスイッチとなるのが LH であるなら、P4 が黄体細胞のペースメーカーを維持するのに重要な役割を担っている可能性がある。このように、生殖組織における細胞増殖・分化およびアポトーシスはペースメーカーと密接にリンクしていることは明らかとなったが、これらの関わりの詳細な分子メカニズムを解明していくことが今後必要である。

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をまとめたものである。執筆の機会を与えていただきました日本生殖内分泌学会理事長 峯岸 敬教授、第 13 回日本生殖内分泌学会学術集会会長 寺川直樹教授に御礼申し上げます。

引用文献

1. Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-941.
2. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, Horst GT, Hastings MH, Reppert SM (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288, 1013-1019.
3. Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, Iino M, Hashimoto S (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nature* 37, 187-192.
4. Tsuchiya Y, Minami I, Kadotani H, Nishida E (2005) Resetting of peripheral circadian clock by prostaglandin E2. *EMBO Rep* 6, 256-261.
5. Hinoi E, Ueshima T, Hojo H, Iemata M, Takarada T, Yoneda Y (2006) Up-regulation of *per* mRNA expression by parathyroid hormone through a protein kinase A-CREB-dependent mechanism in chondrocytes. *J Biol Chem* 281, 23632-23642.
6. Nakahata Y, Akashi M, Trcka D, Yasuda A, Takumi T (2006) The in vitro real-time oscillation monitoring system identifies potential entrainment factors for circadian clocks. *BMC Mol Biol* 7, 5.
7. Gery S, Gombart AF, Yi WS, Koeffler C, Hofmann WK, Koeffler HP (2005) Transcription profiling of C/EBP targets identifies *Per2* as a gene implicated in myeloid leukemia. *Blood* 106, 2827-2836.
8. Chappell PE, White RS, Mellon PL (2003) Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *J Neurosci* 23, 11202-11213.
9. Low-Zeddies SS, Takahashi JS (2001) Chimera analysis of the Clock mutation in mice shows that complex cellular integration determines circadian behavior. *Cell* 105, 25-42.
10. Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gras S (2006) Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology* 147, 3769-3776.
11. Karman BN, Tischkau SA (2006) Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 75, 624-632.
12. Beaver LM, Rush BL, Gvakharia BO, Giebultowicz JM (2003) Noncircadian regulation and function of clock genes *period* and *timeless* in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Rhythms* 18, 463-472.
13. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U (2000a) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347.
14. Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cell. *Cell* 93, 929-937.
15. Yagita K, Okamura H (2000) Forskolin induces circadian gene expression of *rper1*, *rper2* and *dbp* in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett* 465, 79-82.
16. Richards JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15, 725-751.

17. Alvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A (2003) Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol Reprod* 69, 81-91.
18. Alvarez JD, Sehgal A (2005) The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *J Biol Rhythms* 20, 111-121.
19. He P-J, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori M-A (2007a) Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. *Mol Cell Biochem* 302, 111-118.
20. He PJ, Hirata M, Yamauchi N, Hashimoto S, Hattori MA (2007b) The disruption of circadian clockwork in differentiating cells from rat reproductive tissues as identified by in vitro real-time monitoring system. *J Endocrinol* 193, 413-420.
21. Pretzmann CP, Fahrenkrug J, Georg B (2008) Differentiation of PC12 cells results in enhanced VIP expression and prolonged rhythmic expression of clock genes. *J Mol Neurosci* 36, 132-140.
22. Rueda BR, Hendry IR, Hendry IW, Stormshak F, Slayden OD, Davis JS (2000) Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 62, 269-276.
23. Liszewska E, Rekawiecki R, Kotwica J (2005) Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 78, 67-81.
24. Miller BH, McDearmon EL, Panda S, Hayes KR, Zhang J, Andrews JL, Antoch MP, Walker JR, Esser KA, Hogenesch JB, Takahashi JS (2007) Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 3342-3347.
25. Koyanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H, Aramaki H, Ohdo S, Soeda S, Shimeno H (2003) A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer Res* 63, 7277-7283.
26. Hua H, Wang Y, Wan C, Liu Y, Zhu B, Yang C, Wang X, Wang Z, Cornelissen-Guillaume G, Halberg, F (2006) Circadian gene mPer 2 overexpression induces cancer cell apoptosis. *Cancer Sci* 97, 589-596.
27. Yang X, Wood PA, Oh EY, Du-Quiton J, Ansell CM, Hrushesky WJ (2008) Down regulation of circadian clock gene Period 2 accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm. *Breast Cancer Res Treat* (WEB 公開)