

ERK1/2の活性化増強システムが、 卵子成熟、卵丘細胞の膨潤、顆粒膜細胞の黄体化に必須である

川島 一公^{1,2)}, 野間 紀孝¹⁾, Heng-Yu Fan²⁾, JoAnne S. Richards²⁾, 島田 昌之¹⁾

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

脳下垂体から一過的に放出された LH (LH サージ) は、十分発育した排卵前卵胞の顆粒膜細胞に発現する LH 受容体 (LHCGR) に作用し、顆粒膜細胞の黄体化、卵丘細胞の膨潤、卵子の成熟を促し、膨化した卵丘細胞と共に卵子は卵管へと排卵される [1, 2]. 最近のマイクロアレイを用いた発現遺伝子の網羅的解析や、遺伝子欠損マウスの解析から、この LH により誘起される排卵現象に関わる生理活性因子、それにより活性化される細胞内のシグナル伝達系が明らかとなってきた [3-5]. Park et al. [6] は、顆粒膜細胞において EGF like factor である amphiregulin (AREG), β -cellulin (BTC), epiregulin (EREG) が、LH 刺激により急激に発現し、それが顆粒膜細胞と卵丘細胞に発現する EGF 受容体 (EGFR) に作用すること、この刺激が、卵丘細胞の膨潤と卵子成熟に必須であることを示した. さらに、Hsieh et al. [7] は、EGFR の機能欠失型変異マウスと *Areg* 遺伝子欠損マウスを交配し、その両変異マウスは、顆粒膜細胞における ERK1/2 のリン酸化が低下し、排卵数の減少が認められることを報告した. われわれも EGF like factor に着目し、プロスタグランジン合成酵素をコードする *Ptgs2* の遺伝子欠損マウスで、*Areg*, *Btc*, *Ereg* の発現が低下すること、これが *Ptgs2* 欠損マウスの排卵現象における機能低下の原因となっていることを示した [8]. さらに、EGF like factor が細胞膜貫通型タンパク質であること、それが ADAM17 により遊離され、標的細胞を刺激すること、その結果、顆粒膜細胞と卵丘細胞で ERK1/2 系が活性化されることも明らかとした [9]. これらの報告から、LH 刺激によりスタートする排卵現象は、顆粒膜細胞で発現・分泌される EGF like factor を介した ERK1/2 系により制御されていることが強く示唆され

た. そこで、この ERK1/2 の役割を解明するために、顆粒膜細胞と卵丘細胞特異的に両遺伝子を欠損させたマウスを作成し、その詳細を解析した [10]. さらに、ERK1/2 の活性化に関わるポジティブフィードバック機構についても新知見を得たので、本稿で紹介する.

顆粒膜細胞特異的 ERK1/2 欠損マウス

ERK1 と ERK2 は、共に成長因子受容体の下流において RAS, c-RAF, MEK1 系によりリン酸化・活性化され、その基質特異性も同様の性質を示すことから、両者は補完的に働いていると考えられる. したがって、排卵期における ERK1/2 の作用を解明するには、両者を欠損させた変異型マウスを作成する必要がある. ERK1 を欠損したマウスは、正常に発育し、妊孕性も有する [11]. しかし、ERK2 欠損マウスは胎生致死であることから [12], Cre-LoxP を用いて、*Erk1*^{-/-}; *Erk2*^{flax/flax}; *Cyp19a1* Cre マウスを作成した. これは、ヒト *Cyp19a1* 遺伝子のプロモーター領域の転写開始点 (0) から 180 bp 上流まで (-180 b) に Cre をつないだものであり、このプロモーターを用いることで顆粒膜細胞と卵丘細胞でのみ Cre が発現することから [13], 排卵前卵胞の顆粒膜細胞と卵丘細胞でのみ ERK1/2 が欠損したマウスを作成できる.

このマウスにおいては、卵胞発達に異常は認められなかったが、妊孕性は全くみられなかった. この原因を追及するために過剰排卵処理を行ったが、排卵が確認されないことから、完全不妊マウスであることが示された [10]. そこで、この顆粒膜細胞特異的に ERK1/2 が欠損したマウスの排卵刺激後における顆粒膜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 ERK1/2 のリン酸化により発現する遺伝子を網羅的に検出した. その結果、376 遺伝子が ERK1/2 依存的に排卵刺激により発現していた. そのなかには、*Ptgs2* や *Cyp11a1*, *Star* などのプロスタグランジンやプロゲステロン合成に関わる遺伝子のみでなく、エストロジェンの代謝に

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

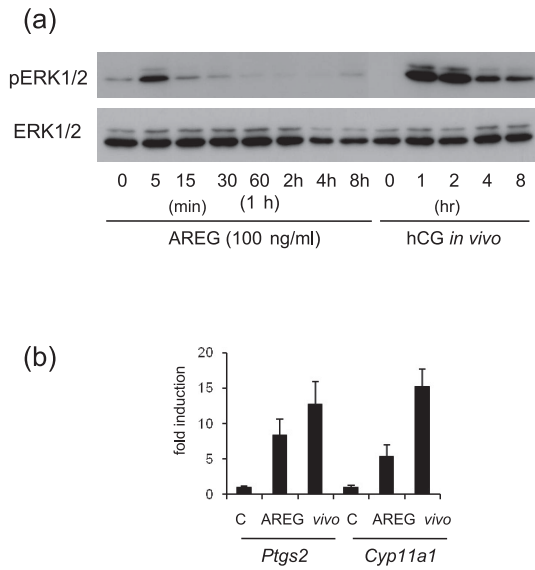


図1 顆粒膜細胞の体外培養における ERK1/2のリン酸化および遺伝子発現と体内の排卵期におけるそれらとの比較
(a) eCG 刺激マウスから回収した顆粒膜細胞を100ng/ml AREG 添加培地で培養したとき、あるいは eCG 刺激後 hCG を投与したマウスから経時的に回収した顆粒膜細胞における ERK1/2のリン酸化。
(b) 体内と体外の顆粒膜細胞における *Ptg2* と *Cyp11a1* の遺伝子発現。

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 *Snai2* 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 [10]. このマウスの解析結果から、ERK1/2が活性化することが排卵をスタートさせる必至なキーファクターであることが明確化された。

EGF like factor による ERK1/2の活性化. 体内と体外での相違

これまでの研究から、LH により発現する EGF like factor が ERK1/2をリン酸化し、それにより排卵に関わる遺伝子発現が上昇することが明らかとなったが、顆粒膜細胞の初代培養系においては EGF like factor の添加では十分に体内と同様の効果が認められない。図1は、その結果の一部であるが、ERK1/2のリン酸化は短期間で消失し、かつ最大値においてもそのレベルは低い。また、標的遺伝子の発現において、体外におけるそれは体内と比較して著しく低値である。神経細胞においては、ERK1/2の一過的な活性上昇は細胞増殖を促進し、持続的な活性化は細胞の分化を誘導すると報告されている [14]. 排卵期の顆粒膜細胞でも、この持続的な ERK1/2 のリン酸化が排卵現象の誘起に重要な役割を果たしてい

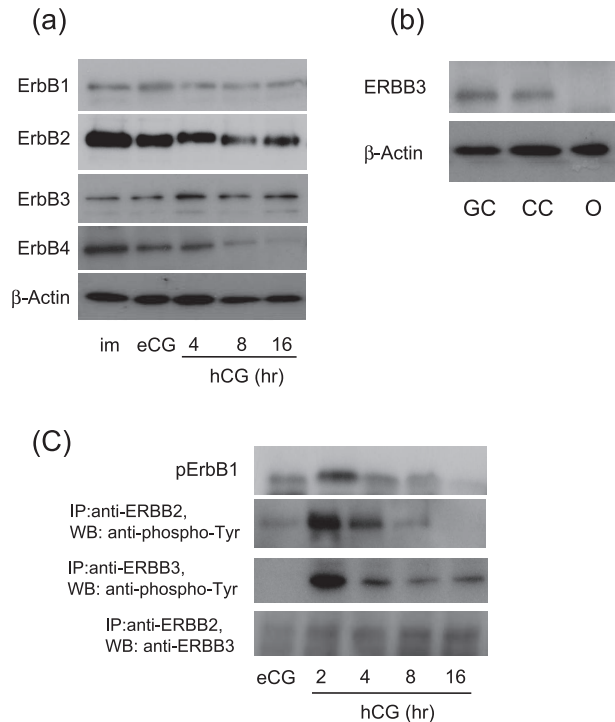


図2 卵胞発育、排卵期における ERBB family の発現、局在と活性化の経時変化
(a) eCG 刺激後 hCG を投与し、経時的に回収したマウス卵巣をサンプルとした ERBB family の発現解析。
(b) 顆粒膜細胞 (GC)、卵丘細胞 (CC) あるいは卵子 (O) における ERBB3の発現。
(c) 免疫沈降法による ERBB2と ERBB3のヘテロ二量体形成とリン酸化解析。

るのかもしれない。しかし、排卵期において ERK1/2のリン酸化を増強し、かつ持続させる因子については全く報告がない。

ERBB family の発現と活性化

EGF like factor が作用する EGFR 以外にも、IGF 受容体など、他の成長因子に対する受容体の排卵前卵胞における発現が報告されている [15, 16]. しかし、IGF-1は排卵刺激によりその発現量が低下すること、IGF-1添加は PI 3-kinase-PKB 系を活性化させるが、ERK1/2のリン酸化は誘起させないと報告されている [17]. そこで、EGFR は ERBB family に属し、ERBB1 (EGFR) 以外にも ERBB2, ERBB3, ERBB4が存在すること [18], しかしこれらの卵巣における発現と活性化についての報告はないことから、ERBB family に着目した研究を行った。

その結果、ERBB1のみでなく、ERBB2と ERBB3が卵胞発育、排卵期に恒常的に発現していた (図2 a). ERBB2と ERBB3の局在は、顆粒膜細胞、卵丘細胞に発現し、

卵子には認められなかった (図 2 b). 次に, ERBB2はリガンド結合部位を欠損しているため, 他の ERBB family とヘテロ二量体を形成すること, ERBB3に高い親和性を示すことから, 免疫沈降法により両者の結合とリン酸化の変化を解析した. 排卵刺激は, ヘテロ二量体形成を促し, その二量体はチロシン残基がリン酸化されていた (図 2 c). このリン酸化は, EGFR のリン酸化と同様に, 排卵刺激 2 時間後に最大値を示したことから, 顆粒膜細胞と卵丘細胞に発現する ERBB2と ERBB3は, 排卵刺激により機能していることが明らかとなった.

ERBB3のリガンドの探索とその発現変化

ERBB3のリガンドには, Neuregulin 1 (NRG1), Neuroglycan などが報告されている [19, 20]. われわれの行ったラット卵丘細胞のマイクロアレイ解析のデータベースから, ERBB3のリガンドの発現を探索した結果, *Nrg1* の発現が認められた (野間ら, 未発表データ). *Nrg1* 遺伝子は複数の転写開始点が存在し [21], われわれが用いた Affimetrix のラット発現解析用 DNA チップには 8 個のプロンプがセットされているが, マウスの発現解析に一般的に用いられている DNA チップには 1 つのプロンプしかなく, この認識配列は, 共通配列ではないため, マウスの排卵期の顆粒膜細胞や卵丘細胞のマイクロアレイ解析では *Nrg1* の発現上昇は検出されなかった (野間ら, 未発表データ).

そこで, 5' RACE 法により, 排卵期のマウス顆粒膜細胞で発現する *Nrg1* のタイプの同定を試みた. 共通部位を認識する reverse primer を作製し, 5' RACE を行った結果, 2 本の産物が得られ, そのシーケンス解析から Type I と Type III が発現していることが示された (図 3 a). Type I と Type III は, その転写開始点のみでなくスプライシングの違いもあることから, それぞれ特異的に認識するプライマーセットを用いた real time PCR 解析を行った. その結果, Type III が排卵刺激後 2 時間以内に発現上昇がみられ, 4 時間後に最大値を示すこと, 一方, Type I は発現の変化がみられないことが明らかとなった.

NRG1は, C 末端側にシグナル配列, 膜貫通ドメインをもち, 細胞外部に EGF 部位を有する. Type III は, 他のタイプとは異なり N 末端側に疎水性のシステインに富む配列をもつことから, この配列により細胞膜を貫通することで, EGF 部位のみが細胞外につきだしたループ構造を取ると考えられている (図 3 b 参照) [22]. EGF 部位を中心として C 末端側には, ADAM19 による切断

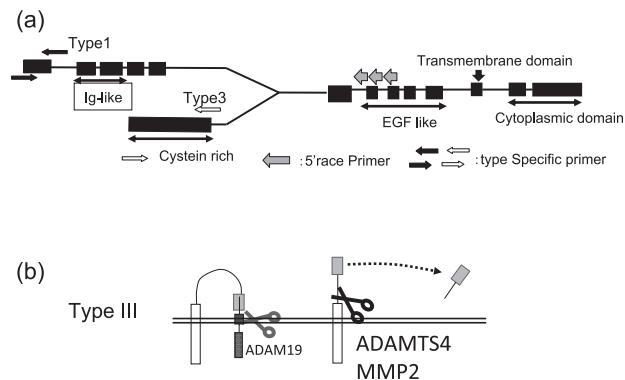


図 3 Neuregulin 1 (*Nrg1*) の発現解析
(a) 5' RACE 法による *Nrg1* の転写開始点の探索.
(b) Type I あるいは Type III を特異的に認識する primer を用いた顆粒膜細胞における遺伝子発現解析.

配列があり [23], 排卵期の顆粒膜細胞において, *Adam 19* の発現上昇が認められた. したがって, 顆粒膜細胞で発現する NRG1 は, ループ構造は壊れ N 末端側のみが細胞膜を貫通する直線構造となっていると推察される. 顆粒膜細胞をサンプルとした Western blotting により, 発現する NRG1 を検出した結果, ループ構造をとる全長型 NRG1 と思われる 110 kDa のバンドはほとんど検出されず, 排卵刺激 2 時間後において 75 kDa 付近に濃いバンドが検出された. 一方, 卵巣全体をサンプルとした Western blotting では, 75 kDa に加えて, 45 kDa 付近にも濃いバンドが検出されたことから, 75 kDa が直線・細胞膜貫通型であり, 45 kDa は卵胞液中に分泌された分泌型 NRG1 type III であると推察した. しかし, これまでに N 末端側を切断する酵素に関する情報はないことから, MEROPS the Peptidase Database (<http://merops.sanger.ac.uk>) により, 切断部位と切断酵素の推定を行った. その結果, 117 番目の Gly から Leu, Gly と並ぶ Gly-Leu-Gly 配列を排卵期に発現上昇することが報告されている ADAMTS-4 と MMP-2 [24, 25] が切断しうることがわかった. NRG1 は, 顆粒膜細胞で主に発現し, 卵丘細胞には排卵期における発現上昇がみられないこと, 一方その受容体である ERBB3/ERBB2 は, 卵丘細胞にも発現することから, 排卵期の卵胞では, 顆粒膜細胞で発現した NRG1 が ADAM19 と ADAMTS-4/MMP-2 により切り出され, オートクラインおよびパラクライン的に作用することが示唆された. 今後, その切断部の同定, ならびに ADAMTS-4 と MMP-2 を中心とした切断メカニズムの解析を行う計画である.

Ng1の Type 別発現制御機構

排卵刺激により Type III が発現上昇するのに対して、Type I は恒常的に発現するメカニズムを解明するために、両 Type の転写開始点から1,000 bp 上流までをクローニングし、転写因子の結合サイトを推定した。Type III には、cAMP responsible element, CCAAT/enhancing binding protein (C/EBP) 結合サイトがみられ、Type I には STAT や NF κ B, SP1/3の結合サイトがみつかった。そこで、両者のプロモーター領域を Luciferase 遺伝子上流に組み込んだベクターを作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、Type III では、C/EBP 結合サイトが、Type I では SP1/3結合サイトがプロモーター活性の上昇に必須であった。実際に、排卵過程の顆粒膜細胞における Ng1 type III の発現上昇に果たす C/EBP の役割を明らかにするために、顆粒膜細胞特異的 C/EBP β 遺伝子欠損マウス (*Cebpb^{lox/lox}; Cyp19a1 Cre*) [10] における発現解析を行った結果、この遺伝子欠損マウスでは、排卵刺激4時間後における発現量が半減していた。これは、顆粒膜細胞には C/EBP α も発現するために、完全な発現低下が認められないものと推察し、C/EBP α および β を活性化する ERK1/2の顆粒膜細胞特異的欠損マウスでも *Ng1* の発現解析を行った。その結果、その発現は完全に抑制されていた。以上の結果から、*Ng1* type III は、排卵刺激により活性化する ERK1/2-C/EBP 系により発現が正に制御されていることが明らかとなった。

一方、Type I のプロモーター活性の上昇に必至な SP1/3サイトは、排卵期に発現が上昇する *Pgr*, *Snai2*, *Ereg*, *Adamts1* のプロモーター活性も正に制御することが報告されている [26-30]。しかし、*Ng1* type I においては排卵期に発現上昇がみられなかった。そこで、SP1/3サイトが CG に富む配列であることから、そのメチル化修飾に着目し、顆粒膜細胞から抽出した DNA を bisulfite modification を行った。Bisulfite modification はメチル化されていないシトシン (C) をウラシル (U) へと変換し、メチル化されている C は修飾を受けないことを利用したメチル化解析法である。この処理後、シーケンス解析を行った結果、顆粒膜細胞では bisulfite modification による U への変換は全く認められなかった。つまり、メチル化修飾により SP1/3サイトが機能していないため (SP1 がこのサイトに結合できないため)、*Ng1* type I は排卵刺激後の急激な発現上昇が起きない (起こせない) と推察された。*Ng1* type I の発現が高値である組織は胎児期の脳であるが、その発現は day5

から day10と きわめて短い期間であり、その後は、脳においても Type III が主となると報告されている [31]。この結果は、構造的な発現に関わる SP1/3サイトが *Ng1* のプロモーター領域ではメチル化されていることと、Type I の発現制御との関係を強く示唆するものと考えている。

NRG1 Type III の機能解析

Ng1 の EGF 部位をコードする部位を欠損させた変異マウス (total NRG1 KO mice), type III を特異的に欠損させたマウス (NRG1 type III KO mice), あるいは受容体である *ErbB3* 欠損マウス (*ErbB3 null mice*) では、胎生期あるいは出生直後に致死となるため、性成熟した卵巣における NRG1 の機能はこれまで全く解明されていない [31-33]。そこで、われわれは、まず顆粒膜細胞と卵丘細胞卵子複合体 (COC) の体外培養系における添加実験を行った。

NRG1 の添加は、顆粒膜細胞と卵丘細胞において PKB をリン酸化したが、ERK1/2 に影響はなかった。しかし、NRG1 と EGFR に作用する AREG の複合処理を行ったとき、AREG により誘導される ERK1/2 のリン酸化が、複合処理により増強され、かつ持続することがわかった。この複合処理によるポジティブな効果は、NRG1 が Src tyrosine kinase を活性化し、この活性化された Src が ERK1/2 のリン酸化を増強し、かつ持続させていることが、Src tyrosine kinase 抑制剤を用いた実験から示された。以上の結果とプロモーター解析の結果を併せて考えると、ERK1/2 依存的に発現上昇した NRG1 が ERK1/2 の活性をさらに増強・持続させるという、NRG1 による ERK1/2 のポジティブフィードバック作用の存在がはじめて明らかとなった (図4)。

この NRG1 による ERK1/2 の増強作用は、顆粒膜細胞の初代培養系において、AREG 単独区に比較して AREG + NRG1 複合処理区でプロジェステロン合成に関わる *Star* の発現が上昇し、プロジェステロンの分泌量も有意に増加することから、黄体化促進に関わることがわかった。また、卵丘細胞におけるヒアルロン酸結合タンパク質である *Tnfrsf6* の発現も複合処理により上昇し、卵丘細胞の膨潤も促進された。さらに、体外成熟培養した卵子の受精後の発生能が、複合処理により向上したことから、卵丘細胞を介して NRG1 は卵子成熟にも関与する因子であることが明らかとなった。この卵子成熟制御機構として、NRG1 が卵丘細胞における sphingosine 1 phosphate (S1P) の産生が関与している可能性が示さ

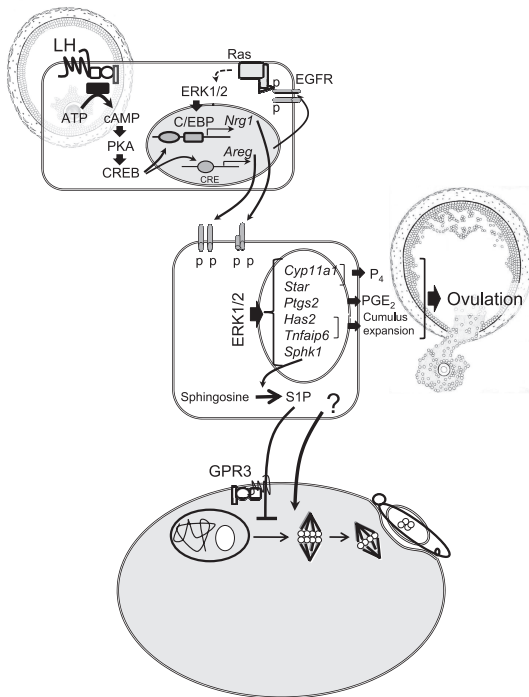


図4 排卵期の顆粒膜細胞における *Nrg1* の発現メカニズムとその卵子成熟、黄体化、卵丘細胞の膨潤に果たす役割

れたが、この S1P が卵子に及ぼす影響については、今後の検討が必要である。

以上の結果から、NRG1が ERK1/2活性化増強システムの中核を担い、排卵期に起こる顆粒膜細胞の黄体化、卵丘細胞の膨潤、卵子の成熟を制御するという、きわめて重要な役割を有する新規因子であることが示された(図4)。現在、この *in vitro* で明らかとなった NRG1の役割について、顆粒膜細胞特異的な *Nrg1* 遺伝子欠損マウス (*Nrg1^{flx/flx}; Cyp19a1 Cre*) を用いて、体内の排卵卵胞における重要性を検証しているところである。

まとめ

排卵卵胞では、ERK1/2-C/EBPにより *Nrg1* type III が発現し、それが ADAM19と ADAMTS-4/MMPにより切り出され、卵胞液中に放出されること、その EGF 部位が顆粒膜細胞と卵丘細胞に発現する ERBB3/ERBB2 にオートクライン、パラクライン的に作用し、ERK1/2 のリン酸化による活性化を増強、かつ持続させ、黄体化、卵丘細胞の膨潤および卵子成熟を誘起し、完結させる因子であることが示された(図4)。われわれは、ブタ COC を用いた体外成熟培養 (IVM) において、培養24時間以降に NRG1を添加することが、卵成熟時の培養48時間後における卵丘細胞の生存率を上昇させ、卵子の体外受精後の発生能も向上させるという結果を得ている [34]。

また、ヒトの高度生殖医療において、卵巣刺激周期の採卵時における顆粒膜細胞にも *Nrg1* が発現していることから、ヒト IVM にも NRG1添加が卵成熟を向上させると推察し、検討を行っている。

謝辞

本稿は2009年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究内容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 峰岸 敬先生、第14回同学会大会長 倉智博久先生、並びに広報理事 筒井和義先生に感謝いたします。なお本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (No. 21688019, No. 21028014, No. 21248032) と特別研究員奨励費 (No. 09J04118) により実施しています。

引用文献

- Richards JS (1994) Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 15, 725-751.
- Richard, JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN (1998) Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol* 145, 47-54.
- Richards JS (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol* 15, 209-218.
- Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ (2006) Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715-723.
- Dekel N (2009) Master regulators of female fertility. *N Engl J Med* 361, 718-719.
- 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.
- 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.
- 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.
- Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS (2009) MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324, 938-941.

11. Page G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, Auberger P, Pouyssegur J (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk1) knockout mice. *Science* 286, 1374-1377.
12. Aouadi M, Binetruy B, Caron L, Le Marchand-Brustel Y, Bost F (2006) Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88, 1091-1098.
13. Fan HY, Shimada M, Liu Z, Cahill N, Noma N, Wu Y, Gossen J, Richards JS (2008) Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development* 135, 2127-2137.
14. York RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJ (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392, 622-626.
15. Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA, Clayton RN (1989) Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 124, 2671-2679.
16. Zhou J, Chin E, Bondy C (1991) Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 129, 3281-3288.
17. Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Lee EJ, Ashcroft M, Hunzicker-Dunn M (2009) Role of the phosphatidylinositol-3-kinase and extracellular regulated kinase pathways in the induction of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target vascular endothelial growth factor in ovarian granulosa cells in response to follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 150, 915-928.
18. Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 505-516.
19. Kita YA, Barff J, Luo Y, Wen D, Brankow D, Hu S, Liu N, Prigent SA, Gullick WJ, Nicolson M (1994) NDF/hereregulin stimulates the phosphorylation of Her3/erbB3. *FEBS Lett* 349, 139-143.
20. Rahmatullah M, Schroering A, Rothblum K, Stahl R C, Urban B, Carey D J (1998) Synergistic regulation of Schwann cell proliferation by heregulin and forskolin. *Mol Cell Biol* 18, 6245-6252.
21. Meyer D, Yamaai T, Garratt A, Riethmacher-Sonnenberg E, Kane D, Theill LE, Birchmeier C (1997) Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* 124, 3575-3586.
22. Falls DL (2003) Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp Cell Res* 284, 14-30.
23. Shirakabe K, Wakatsuki S, Kurisaki T, Fujisawa-Sehara A (2001) Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem* 276, 9352-9358.
24. Curry TE Jr, Osteen KG (2003) The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 24, 428-465.
25. Richards JS (2005) Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization. *Mol Cell Endocrinol* 234, 75-79.
26. 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 epiregulin gene in the rat ovary. *Endocrinology* 143, 4718-4729.
27. Sriraman V, Sharma SC, Richards JS (2003) Transactivation of the progesterone receptor gene in granulosa cells: evidence that Sp1/Sp3 binding sites in the proximal promoter play a key role in luteinizing hormone inducibility. *Mol Endocrinol* 17, 436-449.
28. Sriraman V, Richards JS (2004) Cathepsin L gene expression and promoter activation in rodent granulosa cells. *Endocrinology* 145, 582-591.
29. Doyle KM, Russell DL, Sriraman V, Richards JS (2004) Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 18, 2463-2478.
30. Shimada M, Yanai Y, Okazaki T, Yamashita Y, Sriraman V, Wilson MC, Richards JS (2007) Synaptosomal-associated protein 25 gene expression is hormonally regulated during ovulation and is involved in cytokine/chemokine exocytosis from granulosa cells. *Mol Endocrinol* 21, 2487-2502.
31. Meyer D, Birchmeier C (1995) Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386-390.
32. Erickson SL, O'Shea KS, Ghaboosi N, Loverro L, Frantz G, Bauer M, Lu LH, Moore MW (1997) ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2- and heregulin-deficient mice. *Development* 124, 4999-5011.
33. Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW (2000) Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* 25, 79-91.
34. Kawashima I, Tabata K, Okazaki T, Shimada M (2009) The cumulus cell-secreted factor Neuregulin 1 maintains the cumulus cell function in ovulated COCs to enhance fertilization and developmental competence porcine oocytes. *Biol Reprod (Supplement)* 164.