

卵巣における遺伝子発現とその調節メカニズム

水谷 哲也, 今道 力敬, 河邊 真也, 矢澤 隆志, 宮本 薫

福井大学医学部生命情報医科学講座分子生体情報学領域

はじめに

卵巣の発育・分化は、2次卵胞以降特にゴナドトロピンの影響下にある。ゴナドトロピンが卵巣に作用することによって遺伝子発現が変化し、その結果卵巣の発育・分化が促進されると考えられる。そのためゴナドトロピンによって発現量が変化する因子の同定とその発現調節メカニズムの解明は、卵巣機能を理解するうえで重要だと考えられる。卵巣でゴナドトロピンによって発現調節されている遺伝子は、すでに100以上明らかにされている[1-4]。これらの遺伝子がコードするタンパク質は、ステロイド代謝や細胞増殖に直接関与するタンパク質をはじめ、その機能は多岐にわたる。一方、転写因子 NR5A family (Steroidogenic Factor 1/Ad4 binding protein (SF-1) および Liver Receptor Homolog 1 (LRH-1)) は、卵巣を含む生殖腺や副腎の発育・分化に必須であり、ステロイド代謝を含むさまざまな機能に重要であることが明らかになっている[5-8]。また SF-1/LRH-1は、ゴナドトロピンの作用とも密接に関連している。本稿では、①筆者らがゲノムワイドな解析を用いて新たに同定した SF-1標的遺伝子について、②機能別に分類したゴナドトロピン誘導性遺伝子の転写調節メカニズムについて概説する。

ゲノムワイドな解析による SF-1標的遺伝子の同定

オーファン核受容体ファミリー NR5A (SF-1/LRH-1) は、副腎・性腺の発生・分化およびステロイドホルモン産生に重要な役割を果たしている[5-8]。そのためその標的遺伝子は、副腎・性腺の形成やステロイド産生疾患の原因遺伝子として同定されているものが多い。一方、未だに原因遺伝子が特定されない副腎低形成、性分化異常およびステロイド産生疾患も多く残されている。これ

連絡先：水谷哲也, 福井大学医学部生命情報医科学講座分子生体情報学領域

〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3

TEL : 0776-61-8316

FAX : 0776-61-8102

E-mail : mizutani@u-fukui.ac.jp

表1 幹細胞への SF-1の導入で発現量が変化した遺伝子

転写誘導因子	Fold change	転写抑制因子	Fold change
LOC692247	2683.3	RAP1A	0.01
MAP2K5	1736.8	IL26	0.01
AADAC	1502	CXCL10	0.01
OLFM1	1075.3	RSAD2	0.02
GSTA1	626.4	C13orf18	0.02
RASGEF1A	407.4	IFIT2	0.02
HSD3B2	319.5	MX1	0.02
PGBD5	292.8	ASPN	0.02
STAR	289.7	INDO	0.02
CXCL14	260.9	IFIT1	0.02
WFIKKN2	257.1	C15orf48	0.03
PLIN	255.9	CH25H	0.03
PRB1	205.3	OAS2	0.03
HSD17B6	199.7	LOXL2	0.03
DLK1	196.1	MX2	0.03
INHBB	190.3	DKK1	0.03
HPGD	185.4	KYNU	0.03
NEFH	169.5	IFI44L	0.03
GABBR2	138.8	MMP3	0.03
CYP3A7	132.4	CXCL11	0.04

誘導または抑制された遺伝子上位20の遺伝子と発現量の変化を示す。

らの原因遺伝子として、新たな SF-1/LRH-1標的遺伝子の存在も考えられる。筆者らは間葉系幹細胞に SF-1/LRH-1を導入することで、ステロイドホルモン産生細胞への分化誘導系を確立し、新たな SF-1/LRH-1標的遺伝子の同定を試みている。本研究では、DNA マイクロアレイ (表1) と ChIP-on-Chip 法 (図1) を併用したゲノムワイドな解析より、新たな SF-1標的遺伝子を同定した。Flag タグ付 SF-1を恒常的に発現させた幹細胞を用いて Promoter tiling array (ChIP-on-Chip) 法により転写開始点近傍に SF-1がリクルートされる遺伝子を検索したところ、2,986遺伝子が単離された (注: 基準値を低めに設定したため多くの遺伝子が単離されたと考えられる。実際候補となった遺伝子は、個別に ChIP をすることでその結合を確認している)。さらに幹細胞に GFP (コントロール) または SF-1を、アデノウイルスを用いて導入し SF-1によって4倍以上発現量が変化す

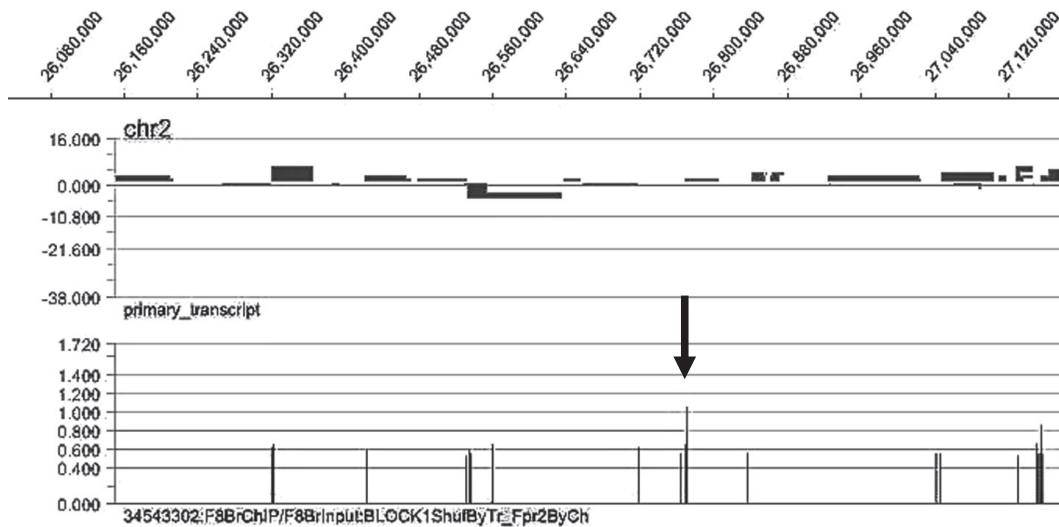


図1 ChIP-on-Chip 法によるSF-1結合領域の同定
Flag タグ付 SF-1導入幹細胞を用いて、抗 Flag 抗体によるChIPを行った後、回収されたDNAをラベルし Promoter Tiling Array により解析した。図はChIP-on-Chipの結果の一部で、矢印はKCNK3転写開始点上流に新たに同定されたSF-1結合領域を示す。

る遺伝子をDNAマイクロアレイにより検索したところ、461遺伝子が単離された（注：SF-1による直接的な作用を確認するため一過性の発現による影響をみた）。Promoter tiling arrayとDNAマイクロアレイで重複した78の遺伝子を個別に解析した結果、最終的に14のSF-1標的遺伝子を同定した。このなかには、今までSF-1の標的遺伝子とは考えられていなかった10の遺伝子が含まれていた (*ALAS1*, *CLU*, *GSTA3*, *KCNK3*, *FDXR*, *PHF10*, *RALGDS*, *ADAMTSL1*, *TAGLN*, *UPP1*)。興味深いことに、このなかにはSF-1によって発現が抑制される遺伝子 (*ADAMTSL1*, *TAGLN*, *UPP1*) も含まれており、SF-1による新たな転写調節（抑制）機構が解明されるかもしれない。現在これらの遺伝子のなかで、著者らは *ALAS1*, *GSTA3*, *FDXR* および *FDX1* (*FDX1* は上記の方法では単離されなかったが、個別の解析によりSF-1/LRH-1の標的遺伝子であることを見出した) に着目し検討している。

1. *ALAS1*, *FDX1* および *FDXR* の転写制御メカニズムとステロイド産生に対する役割

ヘム合成律速因子 *ALAS1* はさまざまな組織で発現が認められるが、特に副腎、性腺といったステロイド産生細胞や肝で発現が高い。そこでステロイド産生細胞における *ALAS1* の転写調節メカニズムについて検討したところ、転写開始点上流3.5 kb にSF-1が結合することで活性化され、さらにこの領域を介した転写の活性化には組織特異性があることが明らかとなった。

一方、ミトコンドリア内のP450の電子伝達に関与する *FDX1* および *FDXR* は、それぞれ転写開始点近傍に存在するSF-1結合領域を介して、転写が活性化されることを明らかにした。また *FDX1* の転写にはSF-1のみならず、cAMP responsive element (CRE) に結合する CREB と協調して転写調節されていることを見出した。

以上の結果から、P450ファミリーへのヘム供給に関与する *ALAS1* と電子伝達を担う *FDX1*, *FDXR* がSF-1によって発現誘導されることで、P450ファミリーに属するステロイド代謝酵素の活性化に関与していることが示された。

2. *GSTA3* の転写制御メカニズムとステロイド産生に対する役割

GSTは解毒作用をもつことで知られているが、このファミリーのなかで *GSTA3* が、プロモーター領域へのSF-1結合依存的に転写調節されていることを見出した。*GSTA3* はリコンビナントタンパク質を用いた実験系では、3-ケト- Δ^5 -ステロイドを3-ケト- Δ^4 -ステロイドへと異性化する作用が報告されている [9]。そこで *GSTA3* が細胞内でステロイド合成に関与するかどうかを明らかにするために、卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて検討した。KGN 細胞にアデノウイルスを用いて *GSTA3* を強制発現させたところ、プロゲステロン（基質としてプレグネノロンを添加）およびアンドロステンジオン（基質としてDHEAを添加）の増加が認められた。以上の結果から、*GSTA3* がSF-1の新たな標的遺伝

子として、ステロイド合成において機能的にも重要な因子であることが示された。

ゴナドトロピン誘導性遺伝子の転写調節メカニズム

1. ステロイド代謝関連遺伝子

未成熟卵胞では、ゴナドトロピンは2-cell 2-gonadotropin theory に則り、LH は莢膜細胞、FSH は顆粒膜細胞に作用することで、ステロイドホルモン産生を促進する。ステロイドホルモン産生は、ペプチド・タンパク質ホルモンとは異なり、主に転写レベルで調節されている。そのためゴナドトロピンによるステロイドホルモン産生の促進は、ステロイド代謝に関与する遺伝子発現の誘導によって引き起こされると考えられる。実際、筆者らはサブトラクションクローニング法を用いて、幼若ラットでPMSG投与後早期に誘導される遺伝子を探索し、ステロイド代謝に関連する遺伝子 (StAR, SR-BI, Cyp11a1, Cyp17など) を単離している [4]。このとき誘導された遺伝子は莢膜細胞に局在していたため、PMSGのLH作用により誘導されることが示された。一方、顆粒膜細胞においてもFSHによりCyp19をはじめとしたステロイド関連遺伝子が誘導される。これらの遺伝子発現に重要な転写因子は、SF-1/LRH-1であることが明らかになっている。実際多くのステロイド関連遺伝子プロモーター領域にはNR5A family 結合領域が存在しており、この領域が転写活性に重要であることがレポーターアッセイなどにより報告されている [10]。このなかでStARの転写は、1990年代から転写開始点近傍へのSF-1/LRH-1の結合で調節されていると考えられてきたが [11, 12]、実際にはその上流3 kb付近にもSF-1結合領域が存在し、その領域を含んだクロマチン構造の変化が転写活性に重要であることが明らかとなった [13]。多くのステロイド関連遺伝子の転写もプロモーター領域へのSF-1/LRH-1の結合によって発現調節されていると考えられていたが、実際にはStARのような高次クロマチン構造の変化が転写活性に重要なものかもしれない。

ゴナドトロピン受容体のセカンドメッセンジャーは、主にcAMP/PKAであることから、その転写調節にはCREBが関与すると予想されていた。しかし実際には多くのステロイド関連遺伝子の転写にCREBの重要性はあまり示されていない。ステロイド関連遺伝子がゴナドトロピンによって早期に発現誘導されるメカニズムの1つとして、筆者らはゴナドトロピンによるSF-1/LRH-1の抑制解除が関与すると考えている。すなわち、ゴナド

トロピン刺激前ではSF-1/LRH-1はDax-1と結合しているため、その転写活性が抑制されている。しかしゴナドトロピンの刺激によりDax-1による抑制が解除し、代わりにコファクターがリクルートされることでその転写活性が促進すると考えられる [10]。

2. 転写因子 (核内受容体)

ゴナドトロピンによって発現誘導される転写因子が存在すれば、それは標的遺伝子の発現を調節することでゴナドトロピンによる生理現象を仲介する重要な因子だと考えられる。Progesterone Receptor (PR) やCCAAT/enhancer binding protein α および β (C/EBP α および β) は、Preovulatory FollicleでLHサージによって誘導される転写因子で、これらの遺伝子改変マウスの解析より排卵および黄体形成に必須であることが明らかになっている [14, 15]。このことからPRやC/EBP α および β の標的遺伝子が排卵・黄体形成に重要であることが示唆される。また、転写因子Egr-1もPreovulatory FollicleでLHサージによって誘導されることが明らかになっている [16] (莢膜細胞でもLHによって早期に発現誘導される (未発表データ))。Egr-1はLH受容体 (LHR) プロモーター領域に結合する転写因子で、LHRの転写に関与することが示されている [17]。Egr-1のノックアウトマウスでは、下垂体のLH β の発現とともに卵巣においてLHRの発現が低下する [18]。このことから、Egr-1は下垂体と性腺との間で共通して、ゴナドトロピンの作用に重要な転写因子だと考えられる。PR, C/EBP α および β , Egr-1は分化前の顆粒膜細胞 (LHRネガティブ) ではFSHによる発現誘導のレベルは低いですが、分化後の顆粒膜細胞 (LHRポジティブ) ではLHによって顕著に発現誘導される。Egr-1の発現解析では、LH, FSHのセカンドメッセンジャーであるcAMPアナログを用いた場合でも分化後の顆粒膜細胞のみ顕著な発現誘導がみられたことから、これらの転写因子が顆粒膜細胞の分化によりcAMPの反応性を獲得していると考えられる。今後、これらの発現調節メカニズムの解析より、顆粒膜細胞の分化によってどのようにcAMPの反応性を獲得できるのか、明らかにされると考えられる。これらの転写因子とは異なり、莢膜細胞、顆粒膜細胞でゴナドトロピンによって早期に発現誘導されるのがGIOT [19], CREM (ICER) [20], c-fos [21] などである。これらのプロモーター領域には共通してCREまたはCRE like elementが存在する。ゴナドトロピンによって細胞内cAMP量が増加し、これらの転写活性が促進されると考えられる。しかしGIOTのアイソフォームGIOT1は、

ICER, *c-fos* とは異なりその発現が SF-1 の局在と一致している。実際 G10T1 のプロモーター領域には CRE のみならず SF-1 結合領域が存在する。レポーターアッセイの結果からその発現が SF-1 と CREB による協調作用によることを明らかにしている [22]。これらの転写因子も、またゴナドトロピンの作用を仲介する重要な因子だと考えられる。

3. ホルモン、成長因子および受容体

LHR は、精巣 Leydig 細胞と卵巣莖膜細胞および Preovulatory follicle へと分化した顆粒膜細胞で特異的に発現する。特に顆粒膜細胞の初代培養系では、LHR の発現が全く認められない未分化細胞から FSH 処理 2 日間で、GAPDH や β -Actin など高発現な遺伝子と変わらない発現レベルにまで誘導される。顆粒膜細胞における LHR の発現には、FSH のみならず IGF-I, Activin, Estrogen など多くの因子がその発現に重要であることが明らかになっている [23-25]。また、上述のように転写因子 Egr-1 が LHR の活性に関与することが示されている。しかし、FSH をはじめとするこれらの因子がどのように作用して LHR の転写を促進しているのかは十分に明らかにされていない。実際、LHR 上流 7.4kb を含むレポーターベクターを導入したトランスジェニックマウスの解析では、この領域だけでは組織特異性や FSH の反応性を十分に説明できない [26]。おそらく、LHR 発現の組織特異性や顆粒膜細胞における FSH 誘導性は、転写開始点から離れた領域にその決定領域が存在し、ダイナミックなクロマチン構造の変化が必要だと考えられる。また興味深いことに、LHR のプロモーター領域は、非常に GC に富んでいる。一般的にプロモーター領域が GC リッチな遺伝子は、ハウスキープ遺伝子などさまざまな組織で発現する遺伝子のケースが多い。そしてこの領域が LHR の発現に重要であることを、著者らをはじめ他のグループからも報告されている [17, 27, 28]。また LHR 以外にも顆粒膜細胞で誘導される SR-BI [29], Epiregulin [30], NPPC (未発表データ) など同様に、そのプロモーターは GC リッチである。顆粒膜細胞におけるこれらの遺伝子発現には、プロモーター領域の GC リッチ領域を介した共通のメカニズムがあるのかもしれない。現在筆者らは、この GC リッチ領域とエンハンサー領域が協調することで発現の特異性を決定しているのではないかと考えている。

Preovulatory follicle では LH サージによって多くの因子の発現が誘導され、最終的に排卵される。上述の PR や C/EBP α および β とともに、EGF ファミリーである

Epiregulin, Amphiregulin, Betacellulin やプロスタグランジン合成酵素 COX-2 (PTGS2) が顆粒膜細胞で誘導されることが明らかになっている。Amphiregulin の転写には CREB が、PTGS2 の転写には C/EBP α および β が関与していることが報告されている [31]。また C/EBP α および β の活性には ERK1/2 によるリン酸化が重要であることから、(EGF ファミリーなどによってリン酸化された) ERK1/2 もまたこれらの転写に関与すると考えられる。さらに COX-2 や PR をコードする遺伝子を欠失すると EGF ファミリーの発現が低下することから、これらの発現が互いにポジティブに調節していることが示されている [32]。

おわりに

卵巣でゴナドトロピンや SF-1/LRH-1 によって発現調節されている多くの遺伝子が明らかになっており、その発現調節メカニズムについての解析も進んでいる。しかし卵巣が単一な細胞からなっていないこと、*in vivo* を反映した細胞株がほとんどないことから、他の組織に比べ未解決な部分がまだ残されている。筆者らの幹細胞誘導系は、卵巣を用いることでは困難であった網羅的な解析を行うことを可能にし、さらに ChIP-on-Chip と DNA マイクロアレイを併用することで新たな SF-1 標的遺伝子の候補を挙げた。ChIP-on-Chip (Chip-seq) や DNA マイクロアレイの解析は、今では誰でもできる実験系になってきているが、実際そのデータを見ると自分が注目すべき候補がどれなのか悩まされることが多い。これらの実験方法を併用することで、実験目的に対するアプローチを容易にできるのではないかと考えられる。今後、幹細胞の誘導系を用いて遺伝子発現のみならず、生化学的手法などさまざまなアプローチにより卵巣機能に重要な因子をピックアップしていき、最終的に *in vivo* における機能を解明するリバースディスカバリーアプローチを進めることで、卵巣機能の解明につなげたい。

引用文献

1. Sasson R, Dantes A, Tajima K, Amsterdam A (2003) Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action. *FASEB J* 17, 1256-1266.
2. Grieshaber NA, Ko CY, Grieshaber SS, Ji IH, Ji TH (2003) Follicle-stimulating hormone-responsive cytoskeletal genes in rat granulosa cells: Class I beta-tubulin, tropomyosin-4, and kinesin heavy chain. *Endocrinology* 144, 29-39.
3. Tanaka M, Hennebold JD, Miyakoshi K, Teranishi T,

- Ueno K, Adashi EY (2003) The generation and characterization of an ovary-selective cDNA library. *Mol Cell Endocrinol* 202, 67-69.
4. Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, Wakabayashi K, Miyamoto K (1997) Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SRBI) in the ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 499-505.
 5. Morohashi KI, Omura T (1996) Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J* 10, 1569-1577.
 6. Parker KL, Schimmer BP (1997) Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18, 361-377.
 7. Duggavathi R, Volle DH, Matak C, Antal MC, Messaddeq N, Auwerx J, Murphy BD, Schoonjans K (2008) Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev* 22, 1871-1876.
 8. Hinshelwood MM, Repa JJ, Shelton JM, Richardson JA, Mangelsdorf DJ, Mendelson CR (2003) Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function. *Mol Cell Endocrinol* 207, 39-45.
 9. Johansson AS, Mannervik B (2001) Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J Biol Chem* 276, 33061-33065.
 10. 矢澤隆志, 梅澤明弘, 宮本 薫 (2011) 卵巣におけるステロイドホルモン合成に関わる遺伝子群の転写調節機構. *日生殖内分泌会誌* 16, 5-8.
 11. Manna PR, Wang XJ, Stocco DM (2003) Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Steroids* 68, 1125-1134.
 12. Reinhart AJ, Williams SC, Stocco DM (1999) Transcriptional regulation of the StAR gene. *Mol Cell Endocrinol* 151, 161-169.
 13. Mizutani T, Yazawa T, Ju Y, Imamichi Y, Uesaka M, Inaoka Y, Matsuura K, Kamiki Y, Oki M, Umezawa A, Miyamoto K (2010) Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J Biol Chem* 285, 28240-28251.
 14. Fan H-Y, Liu Z, Johnson PF, Richards JS (2011) CCAAT/Enhancer-Binding Proteins (C/EBP) -alpha and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol* 25, 253-268.
 15. Lydon JP, Demayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely OM, Omalley BW (1995) Mice lacking progesterone-receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9, 2266-2278.
 16. Espey LL, Ujioka T, Russell DL, Skelsey M, Vladu B, Robker RL, Okamura H, Richards JS (2000) Induction of early growth response protein-1 gene expression in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 141, 2385-2391.
 17. Yoshino M, Mizutani T, Yamada K, Tsuchiya M, Minegishi T, Yazawa T, Kawata H, Sekiguchi T, Kajitani T, Miyamoto K (2002) Early growth response gene-1 regulates the expression of the rat luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod* 66, 1813-1819.
 18. Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavrilina G, Milbrandt J (1996) Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). *Science* 273, 1219-1221.
 19. Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Okada T, Minegishi T, Miyamoto K (2001) Cloning and characterization of Gonadotropin-inducible ovarian transcription factors (GIOT 1 and 2) that are novel members of the (Cys) (2) - (His) (2) -type zinc finger protein family. *Mol Endocrinol* 15, 1693-1705.
 20. Kameda T, Mizutani T, Minegishi T, Ibuki Y, Miyamoto K (1999) Regulation of cAMP responsive element binding modulator isoforms in cultured rat ovarian granulosa cells. *Biochim Biophys Acta* 1445, 31-38.
 21. Ness JM, Kasson BG (1992) Gonadotropin regulation of c-fos and c-jun messenger ribonucleic acids in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 90, 17-25.
 22. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Miyamoto K (2003) Involvement of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein, steroidogenic factor 1, and Dax-1 in the regulation of gonadotropin-inducible ovarian transcription factor 1 gene expression by follicle-stimulating hormone in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 144, 1920-1930.
 23. Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, Kishi H, Ibuki Y, Miyamoto K (1999) A role of insulin-like growth factor I in luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells. *Endocrinology* 140, 4965-4971.
 24. Ikeda S, Nakamura K, Kogure K, Omori Y, Yamashita S, Kubota K, Mizutani T, Miyamoto K, Minegishi T (2008) Effect of estrogen on the expression of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 149, 1524-1533.
 25. Nakamura K, Nakamura M, Igarashi S, Miyamoto K, Eto Y, Ibuki Y, Minegishi T (1994) Effect of activin on luteinizing hormone-human chorionic-gonadotropin receptor messenger-ribonucleic-acid in granulosa-cells. *Endocrinology* 134, 2329-2335.
 26. Hamalainen T, Kero J, Poutanen M, Huhtaniemi I (2002) Transgenic mice harboring murine luteinizing hormone receptor promoter/beta-galactosidase fusion genes: Different structural and hormonal requirements of expression in the testis, ovary, and adrenal gland. *Endocrinology* 143, 4096-4103.
 27. Chen SY, Shi H, Liu XB, Segaloff DL (1999) Multiple elements and protein factors coordinate the basal and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-induced transcription of the lutropin receptor gene in rat granulosa cells. *Endocrinology* 140, 2100-2109.
 28. Geng Y, Tsai-Morris CH, Zhang Y, Dufau ML (1999) The human luteinizing hormone receptor gene promoter: Activation by Sp1 and Sp3 and inhibitory regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 366-371.
 29. Mizutani T, Yamada K, Minegishi T, Miyamoto K (2000)

- Transcriptional regulation of rat scavenger receptor class B type I gene. *J Biol Chem* 275, 22512-22519.
30. 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.
31. 下中麻奈美, 山下泰尚, Richards JS, 鳥田昌之 (2009) 排卵期特異的な EGF like factor の発現機構とその作用. *日生殖内分泌会誌* 14, 21-27.
32. 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.