

# 排卵に関する新知見，遺伝子発現を介す/介さない EGF-like factor の機能

奥田 哲司，梅原 崇，島田 昌之

広島大学大学院生物圏科学研究科

## はじめに

排卵は，脳下垂体から分泌された LH が十分発達した胞状卵胞(排卵直前卵胞)に作用することで，卵胞破裂，顆粒膜細胞の黄体化，卵丘細胞層の膨化と卵の成熟が誘起され，受精可能な第2減数分裂中期に進行した卵が，卵丘細胞層とともに卵管へと排出される現象である。この排卵を誘起する LH に対する受容体 (LHR/LHCGR) は，卵には全く発現せず，卵丘細胞にもほとんどなく，顆粒膜細胞に高発現していることから，LH の作用を顆粒膜細胞から卵や卵丘細胞に伝達する2次因子が必要である [1]。

Conti M 博士のグループは，排卵刺激前後の顆粒膜細胞で発現する遺伝子の網羅的比較解析を行い，EGF-like factor である Amphiregulin (AREG) や Epreparin (EREG) を LH の2次因子として同定した [2]。われわれは，これら EGF-like factor の発現は，プロスタグランジン E2 (PGE2) によるポジティブフィードバック機構により担保されること，EGF-like factor は EGF 受容体 (EGFR) を介して MAPK3/1 (ERK1/2) を活性化し，それが排卵に必須であることなどを明らかとしてきた [3, 4]。しかし，卵・卵丘細胞複合体の培養系において，AREG や EREG を添加したとき，体内の排卵過程における卵の減数分裂進行時間と比較して早期に減数分裂が再開し，第2減数分裂中期へと移行したことから，EGF-like factor の調節因子の存在が示唆された。本稿では，EGF-like factor の発現と機能に加えて，ネガティブ制御因子の同定とその作用機構，ならびに生理学的意義について紹介する。

## EGF-like factor の発現と作用機構

*Areg* 遺伝子のプロモーター領域には cAMP responsible

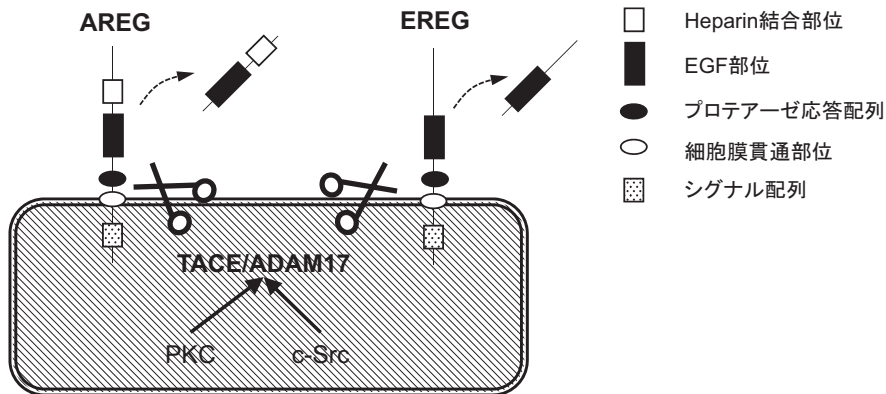
連絡先：島田昌之，広島大学大学院生物圏科学研究科  
〒739-8528 東広島市鏡山1-4-4  
TEL：082-424-7899  
FAX：082-424-7899  
E-mail：mashimad@hiroshima-u.ac.jp

element (CRE) と GC-box (SP1) があり，*Ereg* 遺伝子のそれには複数の GC-box (SP1) サイトが存在する。CRE に結合する転写因子 CRE binding protein (CREB) と GC-box に結合する SP1 は，cAMP-PKA 系によりリン酸化され，核内移行し，標的遺伝子の発現を誘起する [5]。顆粒膜細胞の培養系において，cAMP を人為的に合成させる薬剤である forskolin 処理が，*Areg* と *Ereg* それぞれのプロモーター活性を上昇させ，それらは PKA 抑制剤により有意に抑制される [6]。排卵過程では，LH の分泌は一過的であること，その強い刺激が受容体 (LHCGR) を分解することから，LH による cAMP 合成も一過的である。しかし，*Areg* や *Ereg* の発現は，排卵刺激後の一定期間持続している。この仕組みとして，AREG や EREG により発現誘導される *Ptgs2* が PGE2 合成を促進し，それが EP2 受容体を介して cAMP を合成させることで *Areg* と *Ereg* の発現を担保する「ポジティブフィードバックループ」が，*Ptgs2* 欠損マウスの解析から明らかとなった [3] (図1)。

EGF-like factor は，細胞膜貫通部位を有し，細胞質側にはシグナル配列，細胞膜外にはプロテアーゼ応答配列や EGF 部位をもち，特定のプロテアーゼの作用により EGF 部位が放出され，近傍の細胞を刺激する。AREG や EREG の EGF 部位を放出させる酵素として，TACE/ADAM17 が知られており，これらは顆粒膜細胞にも排卵期に発現し，PKC や c-Src により活性化され，EGF 部位の放出に関与している [7]。この AREG や EREG の EGF 部位は，EGF 受容体 (EGFR) に作用し，下流シグナル伝達系を活性化させる。EGF 受容体の機能低下型 mutant マウス (*Egfr<sup>wav2</sup>*; *waved-2*) は，排卵刺激後においても顆粒膜細胞の ERK1/2 のリン酸化は低値を示すことが報告されている [8]。また，顆粒膜細胞特異的 *Egfr* 欠損マウスは，排卵数の低下と卵成熟不全による低妊孕性であり，体外培養においては，LH による ERK1/2 のリン酸化は，EGF 受容体の Tyr kinase 抑制剤である AG1487 によって，ERK1/2 のリン酸化レベルは低下する [9, 10]。

われわれの研究グループは，顆粒膜細胞特異的に ERK

(A)



(B)

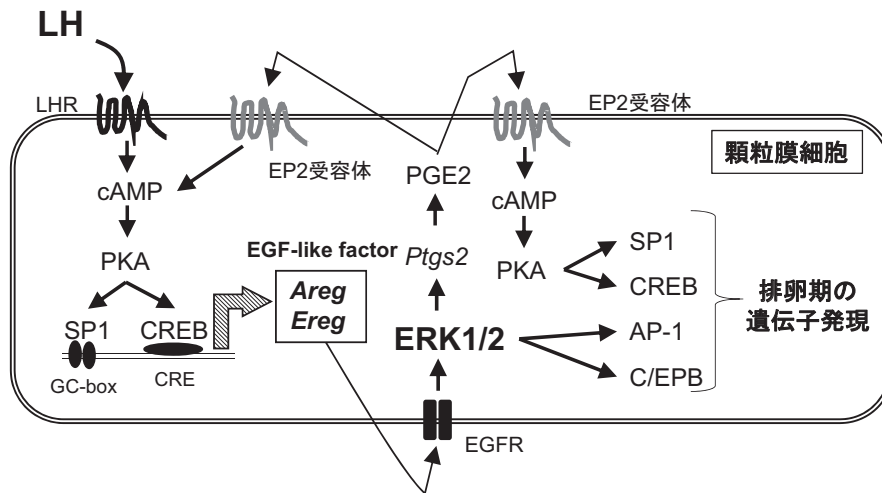


図1 排卵期に発現する EGF-like factor の構造と作用機構  
 (A) AREG と EREG の構造とその分泌機構。  
 (B) EGF-like factor-ERK1/2系を中心とした排卵制御機構。

1/2を欠損した *Mapk3*<sup>-/-</sup>; *Mapk1*<sup>flax/flax</sup>; *Cyp19a1 Cre* マウスを作成し、排卵過程で EGF-like factor-EGFR 依存的に活性化される ERK1/2の生理的役割を解析した。交配試験や過剰排卵刺激処理の結果、排卵不全による完全不妊を呈することが明らかとなったことから、標的遺伝子の探索を行い、排卵期に有意に発現上昇する遺伝子80%以上 (376/466) が ERK1/2依存的であることを示した。さらに、これらの遺伝子発現機構の解析から、ERK1/2が C/EBP と AP-1 family を介して cAMP-PKA 系で活性化された CREB や SP1 と協調的に遺伝子発現を制御していることが明らかとなった [4]。

### Neuregulin 1 (NRG1) の発現と作用

上述のように EGF-like factor が、EGFR を介して ERK1/2 を活性化し、顆粒膜細胞や卵丘細胞の遺伝子発現を変化させることで、排卵が誘導されることが明らかとなった。しかし、AREG や EREG を添加した培養系において、顆粒膜細胞の遺伝子発現は誘起されるが、その持続時間は体内における排卵過程のそれに比較して著しく短い。さらに、卵・卵丘細胞複合体の体外成熟培養系では、AREG や EREG の添加により、卵は第2減数分裂中期に到達するが、その卵の受精後の発生能は低い。

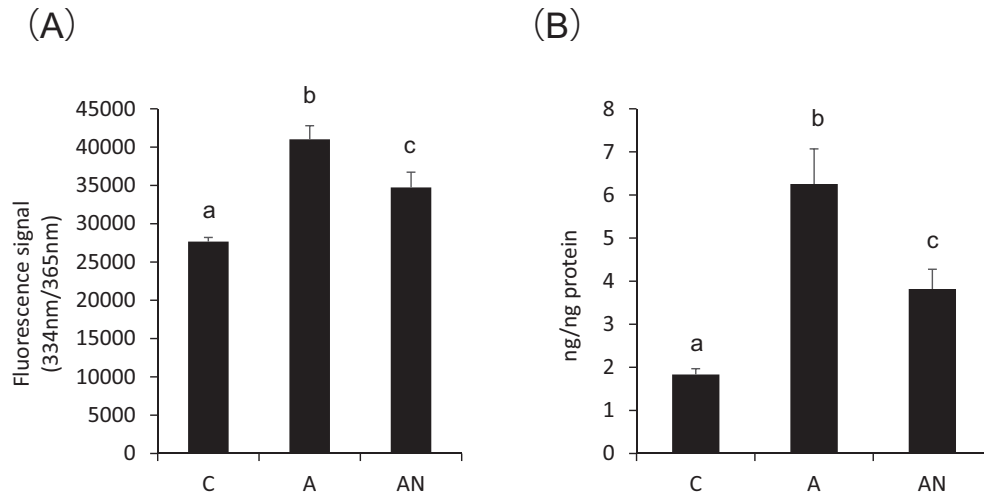


図2 排卵期に発現する Neuregulin1の構造とその役割 (C: Control a, b, c 異符号間に有意差有り)  
 (A) マウス顆粒膜細胞を AREG 単独 (A) あるいは AREG+NRG1 (AN) を添加した培地で5分間培養した時の細胞内 Calcium 濃度.  
 (B) マウス顆粒膜細胞を AREG 単独 (A) あるいは AREG+NRG1 (AN) を添加した培地で2時間培養した時の PKC 活性.

特に、卵の減数分裂再開と第2減数分裂中期への進行速度が体内の排卵過程のそれと比較して、著しく早い[11]. これらの報告は、AREGや EREGなどの既知の EGF-like factorは排卵の開始シグナルとなるが、それを持続的に誘導する因子ではなく、補完および制御する他の因子の重要性が推察された。

EGF-like factorの作用は、上述したとおり ERK1/2の活性化であるが、それだけでなく EGFRの下流シグナルとして PI-3kinase-PKB系や PLC-PKC系なども排卵過程の顆粒膜細胞で活性化すると推察できる。そこで、これらの因子の活性変化を検討した結果、EGF-like factorの添加は PKBをリン酸化するだけでなく、PKC活性も著しく上昇させた。しかし、排卵過程の顆粒膜細胞では PKCの活性上昇は限定的であったことから、EGF-like factor-EGFRによる PKC活性化を抑制する因子があると仮説立て、その探索を以下のように行った。まず、遺伝子発現データベースを用いて顆粒膜細胞で発現し、卵丘細胞に作用する因子の組み合わせを候補化し、それが AREGにより誘導される  $Ca^{2+}$ 流入を抑制するか否かをスクリーニングした。その結果、Neuregulin 1 (NRG1)が選択され、その詳細な解析から排卵過程で EGF-like factor-EGFR-ERK1/2依存的に発現し、ERK1/2リン酸化を増強する作用と、 $Ca^{2+}$ 流入を抑制する作用をもつことが明らかとなった(図2)。つまり、NRG1が EGF-like factorのバランサーであることが明らかとなった [12].

### 顆粒膜細胞特異的 *Nrg1*欠損マウスの解析

顆粒膜細胞特異的に *Nrg1*の機能部位を欠損する *Nrg1<sup>flax/flax</sup>; Cyp19Cre* マウスは、排卵数は正常であるが、1腹産子数が有意に少なく、分娩間隔が有意にばらつく低妊孕性を示した。この産子数の低下は、排卵後の時間経過により *Nrg1*欠損マウス卵の受精能が著しく低下することで、精子侵入タイミングが遅い卵が異常受精を呈することに起因していた。また、交尾のタイミングが遅い場合、すべての排卵された卵が受精能を消失するため、妊娠が成立しにくいことから、分娩間隔の延長も生じていた。卵には NRG1の受容体である ErbB3は発現していないことから、この卵の異常は卵丘細胞と顆粒膜細胞に起因していると考えられた。そこで、両細胞における NRG1による  $Ca^{2+}$ 流入抑制の意義の解明を試みた。

$Ca^{2+}$ の標的の1つに PKCがあり、野生型マウスと比較して *Nrg1*欠損マウスでは排卵刺激後の卵丘細胞と顆粒膜細胞で PKC活性が有意に高い値を示した。その高い PKC活性が CREBと SP1をリン酸化することで、CREサイトあるいは GC-boxをプロモーター領域に有する遺伝子の発現が非生理的水準に一過的に高められていた。さらに、この異常な  $Ca^{2+}$ -PKC系の活性化により、ギャップジャンクション構成因子である connexin-43 (Cx43)のリン酸化が亢進され、ギャップジャンクションの閉鎖が早期化していた。この結果、減数分裂再開と第2減数分裂中期へ到達する時間が野生型マウスのそれと比較し

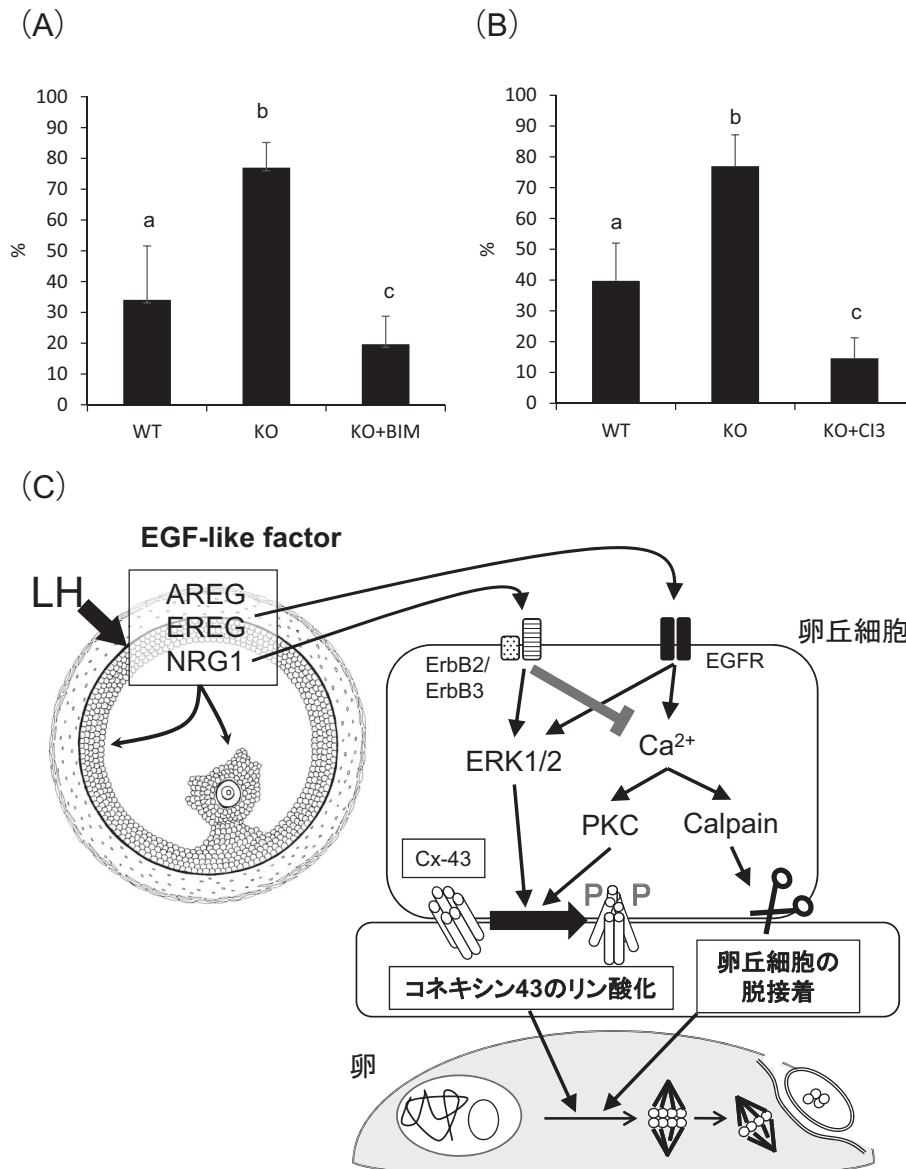


図3 *Nrg1<sup>flax/flax</sup>; Cyp19Cre* マウス (KO) を用いた減数分裂再開メカニズムの解析 (a, b, c 異符号間に有意差有り)  
 (A) *Nrg1<sup>flax/flax</sup>; Cyp19Cre* マウスに PKC 抑制剤である Bisindolylmaleimide (BIM) を LH 刺激と同時に投与した 3 時間後における核膜崩壊した卵の割合。  
 (B) *Nrg1<sup>flax/flax</sup>; Cyp19Cre* マウスに Calpain 抑制剤である Calpain inhibitor 3 (CI3) を LH 刺激と同時に投与した 3 時間後における核膜崩壊した卵の割合。  
 (C) NRG1 が制御する卵の減数分裂再開メカニズム。

て 2 時間程度早まっていた。また、予想しなかったことにギャップジャンクションの閉鎖は Cx-43 のリン酸化による立体構造変化に起因する一過的なものだけでなく、Cx-43 の分解による不可逆的な変化であった。このことは、ギャップジャンクションによる物質輸送が遮断されただけでなく、卵丘細胞間の細胞間接着の剥離も早期に誘導されていることを意味している [13]。

われわれは、卵丘細胞間の細胞接着は、Ca<sup>2+</sup> 依存的な

calpain family により引き起こされ、それが細胞間へのヒアルロン酸を主成分とする細胞外マトリクスの蓄積に必須であることを報告している [14]。そこで、*Nrg1* 欠損マウスの calpain 酵素活性を測定した結果、野生型マウスの卵丘細胞における活性に比較して有意に高い値を示した。そして、*Nrg1* 欠損マウスに calpain 抑制剤あるいは PKC 抑制剤を投与することで、卵の減数分裂再開時間が正常化した (図 3)。したがって、NRG1 は、EGF

-like factor による遺伝子発現誘導だけでなく, 遺伝子発現を伴わない機能変化である細胞の脱接着をも調節する因子であることが明らかとなった。

## おわりに

*Nrg1*欠損マウスの解析結果から, NRG1はEGF-like factor-EGFR-ERK1/2依存的に発現し,  $Ca^{2+}$ -PKC系を抑制し, ERK1/2系を活性化することで排卵過程の時期特異的な卵丘細胞と顆粒膜細胞の機能変化を遺伝子発現依存的および非依存的に制御することが明らかとなった(図3)。さらに, NRG1がEGF-like factorの機能を選択的に発揮させる仕組みが, 卵の減数分裂進行速度を調節し, それが卵の受精能保持時間を決定するという雌の妊孕性を司る重要な役割も示された*Nrg1*欠損マウスは, 妊娠が成立しにくいために同月齢でも野生型マウスと比較して発情周期の回転サイクルが早く, そのことが加齢による卵巣機能低下が若年期から認められる。今後は, マウスをモデルとした*Nrg1*の研究成果を高年齢女性の妊孕性低下などの不妊症, ならびに家畜の繁殖障害の研究に展開していきたいと考えている。

## 謝辞

本稿は2017年度日本生殖内分泌学会学術奨励賞を受賞した研究の一部を含めて, これまでの研究室での研究成果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 緒方 勤先生, 第22回同学会大会長 前多敬一郎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, Richards 博士と Richards 研究室のメンバーに感謝の意を表します。

## 引用文献

1. Peng XR, Hsueh JW, Lapolt PS, Bjersing L, Ny T (1991) Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *endocrinology*. 129, 3200-3207.
2. 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.
3. 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.
4. 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, 938-41.
5. Richards JS, Liu Z, Kawai T, Tabata K, Watanabe H, Suresh D, Margareta F, Pisarska D, Shimada M (2012) Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility, and early embryo development in the mouse and human. *Fertility and Sterility* 98, 471-479.
6. Fan HY, O'Connor A, Shitanaka M, Shimada M, Liu Z, Richards JS. (2010)  $\beta$ -Catenin (CTNNB1) Promotes Preovulatory Follicular Development but Represses LH-Mediated Ovulation and Luteinization. *Molecular Endocrinology* 24, 1529-1542.
7. Yamashita Y, Okamoto M, Ikeda M, Okamoto A, Sakai M, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma M, Shimada M (2014) Protein kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and Oocyte maturation. *Endocrinology* 155, 1080-1090.
8. 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.
9. Hsieh M, Thao K, Conti M (2011) Genetic dissection of epidermal growth factor receptor signaling during luteinizing hormone-induced oocyte maturation. *PLoS One* 6, e21574.
10. 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.
11. Downs SM, Chen J (2008) EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 75, 105-114.
12. Noma N, Kawashima I, Fan HY, Fujita Y, Kawai T, Tomoda Y, Mihara T, Richards JS, and Shimada M (2011) LH-Induced Neuregulin 1 (NRG1) Type III Transcripts Control Granulosa Cell Differentiation and Oocyte Maturation. *Mol. Endocrinol* 25, 104-116.
13. Kawashima I, Umehara T, Noma N, Kawai T, Shitanaka M, Richards JS, Shimada M (2014) Targeted Disruption of *Nrg1* in Granulosa Cells Alters the Temporal Progression of Oocyte Maturation. *Mol. Endocrinol* 28, 706-721.
14. Kawashima I, Liu Z, Mullany LK, Mihara T, Richards JS, Shimada M (2012) EGF-like factors induce expansion of the cumulus cell-oocyte complexes by activating calpain-mediated cell movement. *Endocrinology* 153, 3949-59.