

アクチビンによる卵胞細胞増殖制御

小川 拓哉

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座

(竹家 達夫 教授)

平成15年8月27日提出

目次

序論	4
はじめに	
卵胞発育過程の概容	
卵胞の発育を規定する因子	
細胞周期制御因子と卵巣機能	
本研究の目的および実験系の設定	
材料と方法	19
試薬	
抗体	
細胞の調製と培養条件	
cAMP アッセイ	
MTT アッセイ	
RT-PCR	
免疫染色	
フローサイトメトリー	
核抽出液の調製	
Western Blotting、IP-Western	
有意差検定	
結果	28
初代ラット顆粒膜細胞の調製と FSH 応答性の確認	
培養条件の至適化とアクチビンの増殖促進作用	
アクチビンによる pRb リン酸化の亢進	
FSH によるアクチビン刺激の増強作用と S 期進行への効果	
アクチビン刺激にともなうサイクリン D2 の誘導	
FSH・アクチビンの協同作用の分子機構	
考察	57
謝辞	71
参考文献	72

序論

はじめに

哺乳類の雌性生殖機能は、視床下部—下垂体—卵巢系と呼ばれるシステムによって巧妙に制御されている。各器官の間には種々の内分泌因子を媒体とした閉鎖回路が形成され、それらによる正負のフィードバック機構により、各器官の機能は周期的に統合、維持されている。すなわち卵巢 ovary は、卵管、子宮、膣、外陰部といった他の生殖器とは異なり、内分泌機能を営む唯一の生殖器官である。

卵巢内部には、多数の卵胞 ovarian follicle が存在する。各卵胞は卵胞膜で囲まれ、内部に多数の卵胞上皮細胞と一個の卵母細胞 oocyte をもっている。卵巢は、中枢からの内分泌因子、具体的には下垂体前葉ホルモンである性腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン gonadotropin）の指示のもと、各性周期ごとに特定数の卵胞のみを発育させながら、次第にエストロゲン estrogen の産生、分泌量を増大させる。この性ステロイドホルモンは、最終的にポジティブ・フィードバック機構により、下垂体からのゴナドトロピンの大量分泌（サージ surge）を引き起こし、このゴナドトロピン・サージが再び卵巢に返って成熟卵胞 preovulatory follicle に作用し、排卵 ovulation が引き起こされる。この一連の卵胞発育過程 folliculogenesis の中で、卵胞は機能的・形態的に劇的な変化を遂げる（参考図 1; Gougeon, 1986）。

卵胞発育過程の概容

胎生期初期に、始生殖細胞 primordial germ cell は卵巢原基へと到達後、卵祖細胞へと分化し、体細胞分裂を繰り返し、無数の卵母細胞を生産する。個々の卵母細胞は、扁平な一層の卵胞上皮細胞層を伴い、卵巢表面の白膜に接して配列し、減数分裂周期に入る。この発育段階の最も未熟な原始卵胞 primordial follicle は、その後自然にその数を減少させつつ、出生時までに第一減数分裂の前期を終えて一旦休止し、個体の性成熟を待ちながら排卵直前までの長い成長期に入る。胎生期に形成される全卵母細胞のうち、最終的に成熟・排卵されるものは 0.1%程度に過ぎず、大部分は閉鎖 atresia と呼ばれる過程を辿り、発育途上で退行変性して消失する。

出生後、原始卵胞では卵母細胞径の増大や透明帯形成とともに、その周囲を囲む一層の扁平な卵胞上皮細胞がより肥大化した顆粒膜細胞 granulosa cell へと分化し、さらにその増殖により顆粒膜細胞層の多層化が開始される。ここまでの過程は個体の性的な成熟度にあまり関係なく、出生より閉経に至るまでの永きに渡って絶え間なく繰り返されており、ゴナドトロピン非依存性である。

その後、卵胞はより血管の豊富な髄質へと移動し、ゴナドトロピンに大きく依存するようになる。この過程に先立ち、卵胞周囲には線維芽細胞と膠原性線維が集まり、莢膜細胞 theca cell 層や卵胞膜が形成される。顆粒膜細胞、莢膜細胞では、それぞれの細胞膜上に卵胞刺激ホルモン follicle stimulating hormone (FSH)、黄体形成ホルモン luteinizing hormone (LH) という、異なるゴナドトロピンに対する受容体を発現し、以後の段階におけるゴナドトロピンの作用に備える。ここまでの卵胞は、卵胞腔 follicular antrum 形成前であることから preantral follicle と呼ばれる。

血管豊富な場所に移動した卵胞は FSH の作用により、顆粒膜細胞層内に卵胞液 follicular fluid を湛えた卵胞腔を形成し、antral follicle となる。顆粒膜細胞の一部は肥厚・分化して卵丘細胞 cumulus cell となり、卵母細胞とともに卵丘 cumulus oophorus を形成する。ゴナドトロピン応答性の獲得により、卵胞は性ステロイドホルモン（アンドロゲン androgen、プロゲステロン progesteron、エストロゲン estrogen）の産生・分泌を行うようになる。具体的には、LH の作用により莢膜細胞でプロゲステロンおよびアンドロゲンが生合成され、アンドロゲンは基底膜を通過して顆粒膜細胞に取り込まれた後、FSH の作用によってエストロゲンへと代謝されるという、所謂 two cell-two gonadotropin theory により、莢膜細胞と顆粒膜細胞が互いに協調し合って様々な性ステロイドホルモンを産生している。

FSH 刺激を受けた顆粒膜細胞では、細胞の増殖や LH 受容体の誘導が起こる。卵巣で産生されたエストロゲンは、中枢への内分泌作用以外に卵巣内における傍分泌・自分泌作用も有しており、この作用によって顆粒膜細胞ではエストロゲン産生能や FSH 感受性などが加速度的に上昇する。同時にエストロゲンの内分泌作用により、下垂体へのポジティブ・フィードバック機構がはたらいて LH サージが起こり、一気に排卵へと向かう。排卵に先立ち、長く減数分裂を休止していた卵母細胞が、卵核胞崩壊 germinal vesicle breakdown (GVBD) を経てようやく第一減数分裂を完了後、第二減数分裂中期まで進行して再び停止し、以後の減数分裂は受精を以って完了することとなる。

排卵後、顆粒膜細胞は黄体細胞へと分化し、大量のプロゲステロンを分泌して、妊娠の成立・維持に必要な子宮内膜などの変化や乳腺の発達などを誘起する。黄体は受精の成否により、リラキシン relaxin を分泌する妊娠黄体へと発達を続けるか、さもなければ白体へと変性して淘汰され、新たな性周期へと移行する。

卵胞の発育を規定する因子

上記の一連の卵胞発育過程に関与する因子として、ゴナドトロピンや性ステロイドホルモン以外にも、これらの産生・分泌や応答性に影響を与える様々な因

子が同定されている。その中でも特に重要視されているのが、TGF- β (transforming growth factor- β) スーパーファミリーメンバーと IGF (insulin-like growth factor) /IGF 結合蛋白 (IGF binding proteins; IGFBPs) による制御機構である (Monget *et al.*, 2000; Khamisi *et al.*, 2001; Findlay *et al.*, 2002)。

以下に、本研究との関係から、FSH および TGF- β スーパーファミリーメンバー、特にアクチビンについて、簡単にふれておくことにする。

FSH

卵巣機能に重要なゴナドトロピンとは FSH と LH の二種類を指す。どちらも下垂体前葉の好塩基性細胞から分泌される糖タンパク質で、甲状腺刺激ホルモン thyroid-stimulating hormone (TSH)、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン human chorionic gonadotropin と構造的に近似しており、一つのファミリーを形成する。各ゴナドトロピンは共通の α サブユニットと各因子特異的な β サブユニットからなるヘテロダイマーであり、これに 15~31%の糖質が結合した構造を有する。ゴナドトロピンの分泌は視床下部から放出されるゴナドトロピン放出ホルモン gonadotropin releasing hormone (GnRH) によって制御されているが、既に述べたとおり、卵巣からの性ステロイドホルモンのフィードバック機構による間接的な分泌制御も受けている。

FSH 受容体は、卵巣内では顆粒膜細胞にのみ発現している。構造的には G タンパク質共役 7 回膜貫通型受容体であり、主に A キナーゼ (PKA) 経路を活性化することによりシグナル伝達を行っている。しかし実際は PKA 経路以外に、ホスファチジルイノシトール 3 リン酸キナーゼ (PI3K) 経路や C キナーゼ (PKC) 経路、ERK や p38 などを含む MAP キナーゼ経路、NF- κ B 経路なども活性化していることが知られている (Gonzalez-Robayna *et al.*, 2000; Seger *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002)。FSH の生理活性としては、顆粒膜細胞に作用してその増殖を促進するだけでなく、エストロゲン生合成に関わるいくつかの酵素や LH 受容体を誘導することから、顆粒膜細胞の分化にも関与していることが知られている (Richards, 1994)。なお、莖膜細胞の出現やその LH 受容体発現および下流のステロイド産生経路の代謝酵素の発現は FSH β サブユニット欠損マウスにおいても認められることから、これらは FSH の作用に依存しておらず、顆粒膜細胞特異的な作用を示すことが明らかとされている (Burns *et al.*, 2001)。

FSH β サブユニットや、その受容体の欠損マウスの卵胞は preantral follicle で発育が停止し、以降の段階に進むことが出来ないために不妊となる (Kumar *et al.*, 1997; Dierich *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 2001)。このことは、FSH の卵胞発育後期における重要性と初期段階におけるゴナドトロピン以外の因子の作用を示唆している。これらの知見は、下垂体切除ラットを用いた解析によって以前

より示唆されていたことを、より分子レベルで直接的に示している。

FSH による顆粒膜細胞の増殖促進作用には、細胞周期 G1 期の進行に重要なサイクリン D のファミリーの中でも特にサイクリン D2 が関与していることが、その遺伝子破壊マウスや野生型幼若マウスおよびラットを用いた解析により調べられている。このことについては後述する (Sicinski *et al.*, 1996; Robker *et al.*, 1998a)。

TGF- β スーパーファミリー

TGF- β スーパーファミリーとは、TGF- β と構造の類似した一群のペプチドを指し、TGF- β 、アクチビン、BMP、GDF、MIS、Nodal など、多くの因子が含まれる。200~400 アミノ酸からなる前駆体のうち、システインに富む C 末端側 110~140 アミノ酸が切り出され、ジスルフィド結合によるホモまたはヘテロ二量体を形成して生理活性を示す。なお、例外的に GDF3、GDF9 には二量体化に関与するシステインが保存されていない。

TGF- β スーパーファミリーの受容体は受容体型セリン/スレオニンキナーゼであり、I 型受容体と II 型受容体からなる。I 型および II 型受容体はリガンド刺激依存的に四量体化し、Smad と呼ばれる下流のシグナル伝達分子のリン酸化を介して細胞内にシグナルを伝える。アクチビンの場合、二種類の II 型受容体 (ActRIIA、ActRIIB) と一種類の I 型受容体 (ALK4/ActRIB) が同定されており、これらによって Smad2、Smad3 がリン酸化を受け、リン酸化依存的に Smad4 と複合体を形成して核内に移行し、転写因子として機能する。ただし、Smad の認識 DNA 配列 CAGAC は特異的な作用を示すには非常に短く、実際の転写調節には他の共役因子を必要とする。現在までに Smad と相互作用する多数の核内因子が同定されており、それらは Smad と協調的に転写制御を行うことが示されている (Moustakas *et al.*, 2001)。

ラット卵巣では、多くの種類の I 型および II 型受容体、Smad が発現しており、実際には、多くの TGF- β ファミリー因子が卵巣発育制御に関与していることが考えられる (Drummond *et al.* 2002)。中でも GDF-9 および BMP-15/GDF-9B は卵母細胞を唯一の産生細胞とし、卵巣特異的な傍分泌因子として卵巣発育制御に与ることが知られている (Dong *et al.*, 1996; Dube *et al.*, 1998)。

アクチビン

アクチビンはインヒビン β 鎖の二量体で、現在までに A、B、C、E の 4 種類の β 鎖が知られており、多様なアイソフォームが存在するが、各アイソフォームの違いについてはあまり判っていない。アクチビンに関するほとんどの研究はアクチビン A ($\beta\beta$ ホモ二量体) について行われたものである。なお、アクチビン A、B ($\beta\beta$ ホモ二量体)、AB ($\beta\beta$ ヘテロ二量体) については単離の報告があるものの、その他については、実際にどのようなアイソフォームとして生

体内に存在しているのかは不明である。アクチビンは様々な組織・細胞で産生されるが、卵巣顆粒膜細胞は中でも主たる産生細胞の一つである。

これに対しインヒビン α 鎖と β 鎖のヘテロ二量体はインヒビン *inhibin* と呼ばれ、アクチビンとは全く異なった活性を示し、その産生部位も卵巣と精巣にほぼ限局される。

そもそもアクチビンとインヒビンは、下垂体からの FSH の分泌を促進、または抑制する活性をもつ内分泌因子として同定された。その後の研究から、アクチビンは下垂体の FSH 産生細胞のみならず、様々な細胞に対して作用することが次第に明らかとなったが、中でもアフリカツメガエル初期胚における中胚葉誘導作用や臓器の左右対称性への関与は広く知られるところである。ただし初期胚におけるアクチビンの発現パターンなどから考えて、アクチビンの中胚葉誘導作用は同じ受容体を共有する Nodal など、他の TGF- β スーパーファミリー因子に対する機能的相同性に由来するものと思われる。一方、インヒビンは FSH 分泌抑制以外に目立った作用は示さないが、アクチビンの様々な活性に対して弱く拮抗することは知られている。近年、インヒビンの受容体として β -glycan や *InhBP/p120* などが同定され、アクチビンに対する受容体レベルでの拮抗作用が明らかとなったものの、インヒビンの作用機構に関しては未だ不明な点が多い (Lewis *et al.*, 2000; Chong *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2002)。

また、アクチビンには結合因子フォリスタチン *follistatin* やその近縁の *Follistatin-Related Gene (FLRG)*、*secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)*、*mac25* などが存在し、アクチビンの II 型受容体への結合を阻害することが知られている。すなわちアクチビンのシグナル伝達機構は様々な因子によって幾重にも制御されている。フォリスタチンは主に顆粒膜細胞で産生され、アクチビン以外に BMP2、BMP4、BMP7、BMP15、インヒビンなどの他の TGF- β スーパーファミリー因子とも結合することが報告されているが、その親和性はアクチビンの場合ほど高くはない (Shimonaka *et al.*, 1991; Fainsod *et al.*, 1997, Iemura *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 2001b)。FLRG、SPARC、*mac25* なども卵巣での発現が報告されているものの、その生理的役割に関する研究報告は少なく、今後の解析が待たれる。

アクチビンは上記 FSH 分泌促進作用以外に、単独、あるいは FSH と協調的に顆粒膜細胞の増殖を促進することや、顆粒膜細胞における FSH 受容体発現を誘導し、顆粒膜細胞の分化や FSH 依存的なステロイドホルモンの産生を促進することなどが知られている (Hasegawa *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995; Shimasaki *et al.*, 1999)。しかしながら、アクチビンは性成熟前の幼若ラットの卵胞径を増大させるが、成獣の卵胞には同様の作用を示さないこ

とが報告されている。逆に TGF- β の場合は幼若ラットの卵胞径を増大させない代わりに成獣の卵胞径を増大させることから、アクチビンおよび TGF- β の顆粒膜細胞に対する増殖促進作用は、個体の年齢に依存することが示唆されている (Liu *et al.*, 1999)。また別の報告によると、成獣 (56 日齢) のマウスより調製した small preantral follicle は、FSH 存在下で large preantral follicle と共培養した場合は卵胞径に増大が認められないが、large preantral follicle を除くことにより small preantral follicle は増大に転じることが見出されている。さらにフォリスタチン存在下では、同じ共培養条件下でも FSH 刺激による small preantral follicle の卵胞径増大が認められることから、成獣の卵巣では、比較的大きな preantral follicle から分泌されたアクチビンが近傍のより小さい卵胞を休止状態にとどめており、large preantral follicle の閉鎖や排卵によってこの発育抑制シグナルが解除された場合、発育を停止していた卵胞が新たに発育を開始するという機構が存在するのではないかと推察されている。すなわちアクチビンは幼若個体の卵胞発育を制御するだけでなく、成獣においても卵胞の選別に寄与しているものと考えられている (Mizunuma *et al.*, 1999)。またアクチビンおよび FSH は、顆粒膜細胞に作用してアクチビン阻害因子フォリスタチンを誘導することが知られており、この結果、卵胞発育過程の進行とともに顆粒膜細胞のアクチビン応答性が次第に減衰するという機構が提唱されている (Shintani *et al.*, 1997)。

アクチビン β A サブユニットの遺伝子破壊マウスは、ヒゲおよび下顎門歯を欠き、口蓋裂を起こして出生後 24 時間以内に死亡する (Matzuk *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1998)。一方、 β B 遺伝子欠損マウスの場合は成体まで成長し、妊娠可能であるが、眼瞼形成異常、妊娠期間の長さ、出産後の授乳行動などに異常があり、死亡率が高い (Schrewe *et al.*, 1994; Vassalli *et al.*, 1994)。またこれらの二重欠損マウスは、それぞれを個別に破壊した場合の相加的な表現型になった (Matzuk *et al.*, 1995b)。さらに β A サブユニットを β B サブユニットで置換したノックインマウスの場合、 β A 欠損時よりも生存期間は延長するが、やはり野生型に比べると生存期間は短い。このマウスは野生型よりも血中 FSH 濃度は高いものの、エストロゲンやプロゲステロンの濃度は寧ろ低い。また成熟卵胞の数が少なく、受精率は低下する (Brown *et al.*, 2000)。一方、 β C、 β E 遺伝子の欠損マウスには特に目立った異常は見られない (Lau *et al.*, 2000)。これらのことから、 β A 遺伝子の機能は β B 遺伝子によって完全に相補出来る訳ではないこと、少なくとも β B、 β C、 β E 遺伝子は卵胞発育過程に必須ではないことなどが示唆される。

ActRIIA 欠損マウスは、顎顔面形成異常、雌不妊、血中 FSH レベルの低下を示す。卵巣のサイズは小さく、顆粒膜細胞の萎縮による閉鎖卵胞の増加が見ら

れ、黄体の形成はあまり見られない (Matzuk *et al.*, 1995)。ActRIIB 欠損マウスでは、左右・前後軸の形成異常に加え、心臓、肺、脾臓、脊椎などの形成異常により、生後間もなく死亡する (Oh *et al.*, 1997)。ただし、ActRIIA、ActRIIB は BMP や Nodal に対する受容体としても機能することから、これら受容体の欠損マウスで見られる表現形は必ずしもアクチビン特異的な作用を反映したものであるとは言い切れない (Yamashita *et al.*, 1995)。

また ALK4/ActRIB を欠損させたマウスでは、原腸陥入、原始線条に異常が見られ胚性致死となるが、中胚葉形成は認められる (Gu *et al.*, 1998)。

ちなみに、アクチビン受容体下流のシグナル伝達分子として重要な Smad2, 3, 4 についても欠損マウスが作製され、研究が行われている。Smad2 欠損マウスは、原腸形成および前後軸形成の異常により胎生致死となる。野生型の胚体外組織によりさらに発生段階を進めることは可能であるが、頭部形成異常や単眼症などのために発生段階で致死となる (Heyer *et al.*, 1999)。Smad4 欠損マウスの場合も、Smad2 の場合と同様、原腸形成不全により胎生致死となる (Sirard *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998)。

Smad3 欠損マウスの場合は Smad2, 4 とは異なり、成獣までの成長は遂げるものの、野生型よりも個体が小さく、前肢の形態異常が認められ、免疫不全により生後 8 ヶ月以内に死亡する (Yang *et al.*, 1999; Datto *et al.*, 1999; Ashcroft *et al.*, 1999)。また、生後 4~6 ヶ月において大腸癌を発症するようになるとも報告されている (Zhu *et al.*, 1998)。この中で Zhu らは、Smad3 の exon 2 欠損マウスでは雌の生殖機能には異常が認められず、妊娠可能であったとしている (Zhu *et al.*, 1998)。

しかし興味深いことに最近、Tomic らによって作製された Smad3 の exon 8 欠損マウスでは、Zhu らの exon 2 欠損マウスとは異なる結果が示された。彼らの研究報告によると、Smad3 を欠損した雌のマウスは不妊であり、野生型に比べて原始卵胞の数が多く、以後の preantral~antral follicle への進行が妨げられていることが観察されており、Smad3 が卵胞発育の比較的初期段階に重要であるとする報告を行っている (Tomic *et al.*, 2002)。

顆粒膜細胞の Smad に関する最近の研究では、Smad2, 3 はともに preantral follicle には発現が認められるが large antral follicle には発現が認められないこと、Smad2 は黄体化に際して再び発現が認められるが Smad3 では発現が認められないこと、Smad2, 3 とともに TGF- β およびアクチビンの両方に応答して核内に移行すること、このうち Smad2 の方が比較的アクチビン依存性が高く、逆に Smad3 は TGF- β 刺激依存性が比較的高いことなどが報告されている (Xu *et al.*, 2002)。また、卵母細胞のみから産生される重要な卵胞発育制御因子 GDF-9 は、受容体としては II 型 BMP 受容体に結合するが、その下流では Smad1 よりも寧

る Smad2 のリン酸化を介してシグナル伝達を行っているとの報告もなされていることより、GDF-9 の I 型受容体は I 型アクチビン受容体である可能性が高い (Vitt *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2003)。

フォリスタチン欠損マウスは、口蓋裂、肋骨の部分的欠損など、骨格系の異常などにより、発育不良となり、生後数時間で死亡する (Matzuk *et al.*, 1995)。逆に、誘導性プロモーター制御下にフォリスタチンを強制発現させたトランスジェニックマウスの雌では、FSH レベルの低下が見られ、卵胞発育は antral follicle やそれ以前で停止し、卵胞閉鎖が増加するために不妊となる。この中で、血中 FSH 濃度がそれほど低下しなかった個体においても卵胞発育の早期停止が見られたことは、アクチビンの局所作用を考える上で非常に興味深い (Guo *et al.*, 1998)。

このように、アクチビンは卵胞の発育に重要な役割を果たしていることが知られているが、上記遺伝子変異マウスの卵巣に見られた異常の主要因がアクチビンによる下垂体での FSH 分泌制御の異常によるものなのか、またはアクチビンによる卵巣内での作用の異常によるものであるのか、その判別は極めて困難である。さらに TGF- β ファミリー因子からのシグナルは初期発生に重要な役割を担っているものが多く、上記の様に多くのノックアウトマウスを作製したとしても発生過程で異常を来すため、生後の臓器内での役割を解析することが困難となることがしばしばである。しかも既に述べたように、いくつかの TGF- β ファミリー因子が受容体や下流のシグナル伝達分子を共有しているため、各リガンドと I 型および II 型受容体、結合タンパク質、Smad の組み合わせの数は非常に複雑かつ多岐に渡っており、それらを一種類の組み合わせに限定することが出来ないのも解釈を混乱させる結果となっている。このような理由により、卵巣を含む特定組織でのアクチビンの作用についてより理解するためには、組織または時期特異的な欠失マウスの作製やトランスジェニックマウス間での臓器移植による実験の他、組織・細胞レベルでの培養実験などによる、より詳細な解析が要求される。

1995 年、Li らのグループは卵母細胞と数層の顆粒膜細胞層のみからなる preantral follicle を 2 週齢のラットより採取し、アクチビンを含む非常に簡単な卵胞培養系を用いて、FSH 非依存的な卵胞径の増大、FSH 依存的な卵胞腔形成やステロイド産生、LH 依存的な排卵様の卵胞崩壊、といった一連の卵胞発育過程について形態的にはあるが、*in vitro* で見事に再現してみせた (Li *et al.*, 1995)。この結果は、実際の生体内では様々な因子によって規定されている卵胞発育過程も、少なくとも preantral follicle から排卵までの過程ではアクチビンまたはアクチビン様作用を示す因子が非常に重要であり、その作用機構を理解することは、卵胞の発育を考える上で非常に重要な意味をもつものと考えられ

る。

細胞周期制御因子と卵巣機能

体細胞分裂の細胞周期は、DNA複製期であるS期と細胞分裂期であるM期に加え、間期にあたるG1およびG2期、休止期にあたるG0期からなる。細胞外からの増殖刺激を受け取った細胞は、G0期を抜けてG1期に入り、増殖を開始する。このG1期は細胞周期中で唯一細胞外シグナルによる制御を受ける時期であり、G0もしくはG1期に受け取った刺激により、分化状態の維持、増殖、分化などの細胞運命が決定される。G1/S期境界付近にあるR点を一旦通過した細胞は、以後のS→G2→Mの各細胞周期過程ではチェックポイント制御機構を働かせながら自律的に進行させて増殖を完了し、次の細胞外からの刺激による運命決定に従う。

増殖刺激を受けた細胞では、D、E、A、Bの四種のサイクリンが順に誘導される。それぞれが対応するサイクリン依存性リン酸化酵素 *cyclin-dependent kinase* (cdk) と複合体を形成して順次活性化させることにより、秩序立った細胞周期進行が成立する。G1期では、増殖刺激によって誘導されたサイクリンDがcdk4またはcdk6を、またG1期後期からS期にかけては、サイクリンEがcdk2を活性化する。両者の主たる基質の一つであるpRbは、これらのサイクリン-cdk複合体によるリン酸化を受けて高リン酸化型となる結果、S期の開始・進行に必要な因子の転写に関わるE2FがpRbから解離、活性化し、G1期からS期への移行が行われるというモデルが広く受け入れられている(参考図2; Ortega *et al.*, 2002)。

一方、細胞周期の進行を負に調節するための細胞内因子として、cdkインヒビターが存在する。cdkインヒビターは、すべてのcdkの活性を阻害しうるCip/Kipファミリー(p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2})と、cdk4/6の活性のみを阻害してG1期進行を妨げるINK4ファミリー(p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d})からなる。これらcdkインヒビターは、チェックポイント機構の活性化や接触阻止、分化刺激など、状況に応じて細胞周期の進行を減速、停止させ、場合によっては細胞周期を離脱させることにより、細胞を分化やアポトーシスに導くものと考えられる。また、Cip/Kipファミリーは当初cdkインヒビターとして見つけたが、その後の解析から、その阻害の標的は主にサイクリンE-cdk2複合体であるとされ、サイクリンD-cdk4/6に対しては複合体形成促進や核外移行阻害に働き、寧ろその活性を促進する方向に作用することを示唆する報告が数多くなされている(Sherr *et al.*, 1999)。

以下で、現在までに卵巣機能との関係で研究がなされたいくつかの因子について、簡単にふれておくことにする。

サイクリン D2

サイクリン D には D1~3 の三種類があり、それぞれ細胞特異的な役割を担っている。三種のサイクリン D の冗長性については永らく不明であったが、この点に関する最近の研究により、基本的には三種のサイクリン D は相互に補完可能であり、組織特異的発現は各サイクリン D タンパク質自体の機能的差異のためというよりも、寧ろそれぞれのサイクリン D に対する組織特異的な転写調節機構の差異に起因している、とする興味深い報告がなされた (Ciemerych *et al.*, 2002)。

三種類のサイクリン D のうち、サイクリン D2 欠損マウスでは卵巣以外の臓器における目立った異常は認められないことから、卵巣、特に顆粒膜細胞の増殖に関して、サイクリン D2 が重要な役割を果たしていることが明らかとされている (Sicinski *et al.*, 1996)。このマウスの卵巣では、preantral~early antral follicle の顆粒膜細胞層が野生型およびヘテロ体の半分以下にしか多層化しておらず、さらに FSH 応答時の増殖も著しく低下しており、サイクリン D2 は顆粒膜細胞のゴナドトロピン依存性増殖はもちろん、それ以前の非依存性増殖過程にも関与していることが示唆された。その後、実際に野生型マウスやラットを用いた実験により、FSH またはエストロゲンによるサイクリン D2 の誘導が確認されている (Sicinski *et al.*, 1996; Robker *et al.*, 1998a)。なおその際のサイクリン D2 発現量の経時変化に関し、FSH とエストロゲンの場合では異なることが報告されている (Robker *et al.*, 1998a)。

また FSH の場合とは逆に、*in vivo* で hCG 投与 (LH 刺激に相当) された下垂体切除ラットでは、顆粒膜細胞のサイクリン D2 の発現が急激に減少することも認められている (Robker *et al.*, 1998a)。

サイクリン D2 欠損マウスでは自発的排卵はもちろん、人為的ホルモン処理によっても排卵が認められず、不妊となる。ただし卵胞腔形成やエストロゲン産生、黄体化自体は誘発可能であることから、これらの FSH による卵胞の分化誘導過程にはサイクリン D2 は必須ではないものと考えられる。さらに、摘出した卵母細胞の成熟や受精、胚盤胞までの初期発生能は正常であるため、これらの制御とサイクリン D2 は無関係である。

なお上記ゴナドトロピン非依存性過程におけるサイクリン D2 の寄与は、FSH β サブユニット欠損マウスの卵巣においてサイクリン D2 の発現が認められることから支持される (Burns *et al.*, 2001)。

サイクリン D3

発生過程のマウスの卵巣では、体細胞においてのみサイクリン D3 の発現が認められるが、出生後 2.5 日の卵巣では、卵母細胞と初期卵胞の顆粒膜細胞の核においてサイクリン D3 の発現が認められる。その後卵胞の発育とともに、卵母細

胞および顆粒膜細胞におけるサイクリン D3 の発現レベルは次第に低下する。成体の卵巣では、一部の黄体細胞にサイクリン D3 の発現が認められる (Zhang *et al.*, 1999)。

p27^{Kip1}

サイクリン D3 と同様、卵成熟が進行するにつれ、マウス卵母細胞における p27^{Kip1} の発現レベルは減少する (Zhang *et al.*, 1999)。一方、顆粒膜細胞では LH 刺激により p27^{Kip1} が誘導されることが報告されている。このことより、顆粒膜細胞の黄体細胞への分化には p27^{Kip1} が重要な役割を果たしていることが予想される (Robker *et al.*, 1998a)。

p27^{Kip1} の欠損マウスでは、卵巣をはじめ、下垂体、胸腺、網膜といった種々の臓器において過形成が認められ、個体全体が巨大化し、場合によっては癌になる (Nakayama *et al.*, 1996; Kiyokawa *et al.*, 1996; Fero *et al.*, 1996)。これらの雌マウスでは、LH サージにより排卵や顆粒膜細胞の黄体化を示す遺伝子の誘導は認められるものの、不妊である。その原因は完全には解っていないが、黄体化の際、細胞周期停止を伴わずに分化が進行し、顆粒膜細胞の増殖停止時期に明らかな遅延認められている。その際、妊娠の成立に必要なとされるプロゲステロンの濃度上昇にも遅延が生じる。このことより p27^{Kip1} は、黄体細胞への分化開始よりも寧ろ黄体細胞の機能発現に必要なものと推測されるが、この機構についてはまだ不明な点が多い (Tong *et al.*, 1998)。

cdk4

マウス卵巣の場合、cdk4 は顆粒膜細胞や莖膜細胞では発現しているのに対し、卵母細胞では発現が認められないことが報告されている (Zhang *et al.*, 1999)。

cdk4 欠損マウスは二つのグループからの報告がある。どちらも生存可能であったが、個体サイズがやや小さく、いくつかの臓器で異常が認められ、雌雄とも不妊であった (Rane *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 1999)。卵巣では、臓器サイズはやや小さいが各発育段階の卵胞が認められた。しかし排卵の効率が 30~40%悪くなり、排卵せずに黄体化する卵胞も認められた (Tsutsui *et al.*, 1999; Moons *et al.*, 2002a)。これらのマウスでは血中プロゲステロン濃度が低く、また排卵された卵子の着床も悪いことから、黄体細胞の機能低下が不妊の一因であると考えられた。さらに性周期の進行にもやや遅延が認められ、通常 4~5 日で一周する性周期が、欠損マウスでは一周に 5~9 日を要した。以上より、排卵前までの卵胞の分化自体には cdk4 は必須ではないことが示唆されたが、排卵や黄体の機能には cdk4 が積極的に関与しており、この機能については cdk6 により補完可能でないことが明らかとなった。プロゲステロンが排卵後だけでなく排卵自体に重要であることは、プロゲステロン受容体遺伝子欠損マウスで排卵が認められないことなどより明らかである (Lydon *et al.*, 1995)。

また、cdk4 欠損型マウスに野生型マウスの卵巣を移植しても不妊であったが、野生型マウスに欠損型マウスの卵巣を移植した場合、非常に低い確率ながらヘテロ体の子供が産まれた。また、cdk4 欠損型マウスの血中 FSH レベルは、野生型の 50%程度であった。これらのことより、cdk4 欠損マウスが不妊である原因は、卵巣機能の低下よりも、寧ろ視床下部一下垂体系における内分泌系の機能低下の影響の方が大きいことが示唆された (Rane *et al.*, 1999)。この点に関してはその後さらに研究が進められ、cdk4 欠損マウスにおける下垂体前葉のホルモン産生細胞のうち、ゴナドトロピン産生細胞 gonadotroph には影響が認められないが、プロラクチン産生細胞 lactotroph や成長ホルモン産生細胞 somatotroph に増殖不全が認められること、cdk4 欠損マウスへのプロラクチン投与により、血中プロゲステロン濃度および排卵された卵子の着床に回復が認められることが報告されている (Moons *et al.*, 2002b)。以上の知見から、卵巣発育過程における cdk4 の役割は、基本的には cdk6 などの他の cdk により補完可能であると考えられる。

その他

黄体細胞における p15^{INK4b} および p21^{Cip1/Waf1} の発現が認められている他、下垂体切除ラットに対する *in vivo* でのホルモン投与実験により、FSH およびエストロゲンによる顆粒膜細胞でのサイクリン E の発現上昇、hCG による p21^{Cip1/Waf1} の誘導とサイクリン E の減少が報告されている (Robker *et al.*, 1998a; Robker *et al.*, 1998b; Burns *et al.*, 2001)。また、p21^{Cip1/Waf1} の欠損マウスの卵胞発育には明らかな異常は認められないが、p27^{Kip1} との二重欠損マウスでは、p27^{Kip1} の欠損によって見られた卵巣の過形成などの異常が助長されることが報告されている (Jirawatnotai *et al.*, 2003)。卵成熟と MPF (サイクリン B-cdc2 複合体) 活性との関係については非常に研究が進んでいる分野ではあるが、本研究とはあまり関係がないので、あえてここではふれない。

本研究の目的および実験系の設定

実際の生体内では、実に多くの因子が卵巣機能の維持に関与している。その中でもアクチビンは、少なくとも preantral~antral follicle における顆粒膜細胞の増殖および機能の両面に作用し、しかもその寄与は、FSH 依存性および非依存性の両方の卵胞発育段階に亘ることから、アクチビンの作用機構の研究は、卵胞発育過程を考える上で非常に大きな意義を持つと考えられる。

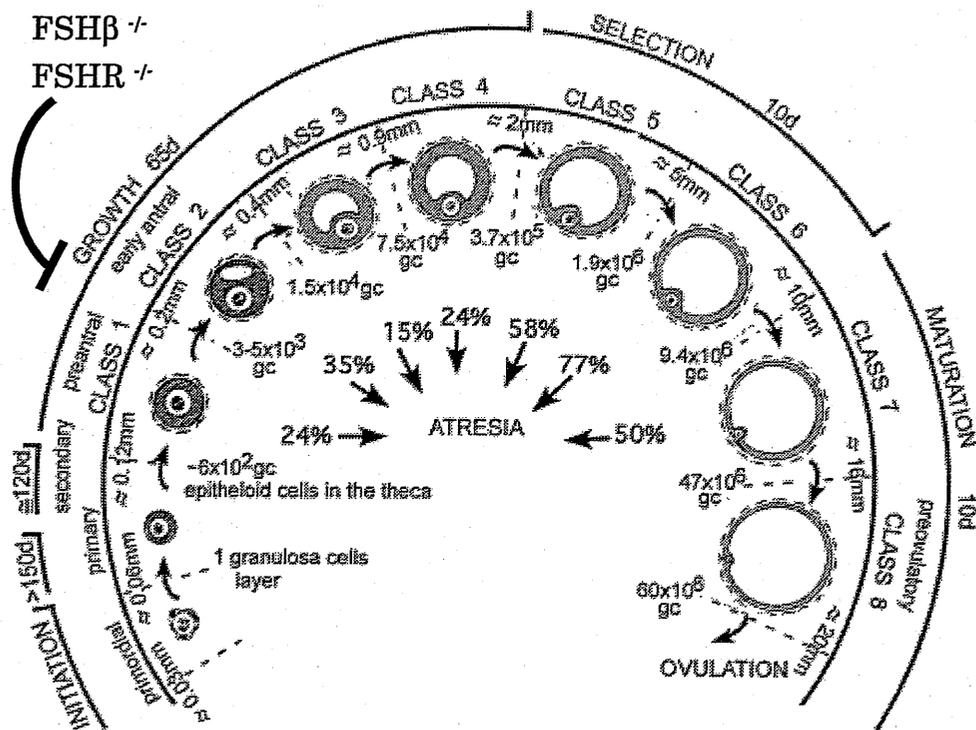
よって本研究では、細胞周期制御の面から、顆粒膜細胞に対する増殖促進因子としてのアクチビンについて、その作用機構を分子レベルで審らかにする事を目的とし、研究を行った。

最近 20 年間に数多くの顆粒膜細胞株が作製されたものの、そのうち FSH 応

答性を有するものとしては、*v-myc* 遺伝子の導入により不死化したマウス顆粒膜細胞株 GRM、ヒト顆粒膜細胞に SV40 ラージ T 抗原、Harvey-ras、FSH 受容体を共発現させた rFSHR-17、変異原性物質 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene 処理によって樹立されたラット顆粒膜細胞株 ROG、ヒト顆粒膜細胞種由来の KGN、温度感受性変異 p53 である *p53val135* 遺伝子と *Harvey-ras* 遺伝子の共発現により得られたヒト顆粒膜細胞株 HGP-53 など、樹立されている顆粒膜細胞株の総数からするとほんの一部に過ぎない (Briers *et al.*, 1993; Keren-Tal *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1997; Nishi *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2002)。このうち ROG は、アクチビン依存的に無血清培養条件下で増殖する細胞株として報告されている (Li *et al.*, 1997)。しかし、これら一見有用な細胞株も、この分野全体から見た場合、どれも中心的な実験系を構築するに至っていないのが現状である。

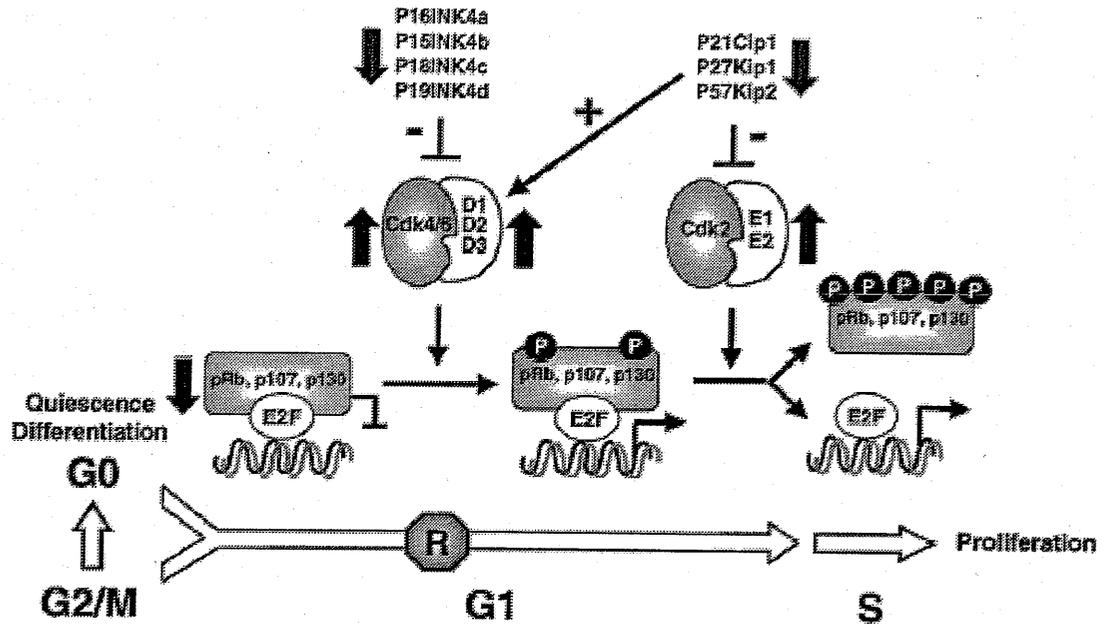
そこで本研究では実験材料として、DES 処理を行った 3 週齢ラットより卵巣を摘出し、そこから調製した顆粒膜細胞を用いた。卵胞発育制御に関する研究の多くがこの週齢のラットを用いて行われており、この時期の卵巣は主に preantral follicle で占められている。ラットは通年性繁殖動物であり、かつ多産であることから、卵胞の研究に適した動物としてよく用いられる。さらにマウスよりも個体がやや大きいことから健全な卵胞を多く得られるという点で優れている。卵巣機能の研究は畜産学の分野でも盛んに行われており、そこで用いられるウシ、ブタ、ヒツジ、ウマなどの大動物は、細胞の数の面、食用に供しない卵巣は屠場で安価に入手可能であるという面など、マウス・ラットと比べた場合にいくつかの点で大きな利を有する。しかしながら、分子生物学的研究を行う上で必要となる遺伝子やタンパク質に関する情報量、抗体などの実験材料、そして培養維持の容易さなどの面での比較となると、やはりラットやマウスに譲る部分となる。

ラットの性周期は 4~5 日と短いですが、この点に関しては、下垂体切除動物や未成熟個体を用いて適当なホルモン注射を行うことにより、卵胞の *in vivo* での発育状態をある程度人為的に同調、制御する技術が確立されているため、問題とはならない。本研究においても、一部の実験を除き、エストロゲン類縁体であるジエチルスティルベストロール diethylstilbestrol (DES) を投与することで、preantral~early antral follicle の顆粒膜細胞を *in vivo* で増殖させた上で実験に用いた。



参考図1 ヒトの卵胞発育過程の概要

卵胞は、primordial follicle、preantral follicle、antral follicle、preovulatory follicle へと発育・成熟し、各過程で特徴的な形態的变化を遂げながら排卵に至る。全発育過程を通じて顆粒膜細胞の持続的な増殖が認められる。また、卵胞の閉鎖も全発育過程を通じて認められるが、その頻度は antral follicle において最も高くなる。FSH 受容体の発現は primary~secondary follicle の段階で発現しているが、FSH β サブユニットや FSH 受容体の欠損マウスの解析より、その作用点は卵胞腔形成以降であるとされる。なお、図は Gougeon による文献から転載したものに FSH の作用点を書き足したものである (Gougeon, 1986)。gc = granulosa cell



参考図 2 G1/S 移行制御の分子機構

Ortega の総説より抜粋 (Ortega *et al.*, 2002)。細胞周期の G1 期進行は、pRb ファミリーの pRb、p107、p130 の機能調節によって制御されている。G0 期では Rb タンパク質はリン酸化されておらず、他の因子、とりわけ転写因子 E2F に結合可能な状態にあり、E2F による転写を阻害している。G1 期で見られる最初の現象の一つは、増殖因子制御下にあるサイクリン D (D1, D2, D3) の誘導を介した、cdk4 もしくは cdk6 (図中では Cdk4/6) の活性化である。サイクリン D-cdk4/6 複合体による pRb のリン酸化の結果、pRb は一部不活性化し、E2F によるサイクリン E1 などの転写誘導が開始する。cdk4/6 の活性は、cdk インヒビターの INK4 ファミリー因子によるサイクリン D との結合阻害や ATP との結合阻害などにより負の制御を受ける。またサイクリン D-cdk4/6 複合体は Cip/Kip ファミリー因子と結合することで、それらとサイクリン E-cdk2 複合体との会合による cdk2 活性の阻害を抑制し、結果的に cdk2 を活性化する。サイクリン E-cdk2 複合体による pRb の高リン酸化状態への移行は適切な G1/S 移行と S 期の開始に必要である。太い矢印はヒトの癌においてしばしば認められる変異を示し、G1/S 進行に対する促進 (↑) または抑制 (↓) 作用を表している。また、図中の R 点 restriction point (R) の位置はそれほど厳密ではないとのことである。

材料と方法

試薬

アクチビンは、味の素中央研究所の江藤譲博士より供与していただいた recombinant human EDF/activin A を用いた。FSH は、AspenBio, Inc. の human pituitary FSH を用いた。フォルスコリン forskolin および phorbol myristate acetate (PMA)、DES、sesame oil、ファイブロネクチン bovine plasma fibronectin (0.1 % solution)、bovine serum albumin (BSA)、DNase I、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)、propidium iodide (PI)、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) は Sigma-Aldrich より、Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 1:1 Mixture (D-MEM/F-12、code: 12400-024)、gentamicin sulfate、fungizone、trypsin、trypsin inhibitor、インスリン bovine insulin、トランスフェリン bovine transferrin, holo form、Superscript II、oligo-(deoxythymidine)₁₂₋₁₈ primer (oligo-dT プライマー) については、すべて Invitrogen Corp. より購入し、実験に用いた。その他の試薬および器具とその購入先については、必要と思われるものにより下記の文中に示した。

抗体

抗サイクリン D1 抗体 sc-450、抗サイクリン D2 抗体 sc-593 および sc-452、抗サイクリン D3 抗体 sc-453、抗 cdk2 抗体 sc-163、抗 cdk4 抗体 sc-260、抗 cdk6 抗体 sc-177、抗 p21 抗体 sc-397-G、抗 p27 抗体 sc-527、以上の抗体はすべて Santa Cruz Biotechnology, Inc. より購入した。また、抗 pRb マウスモノクローナル抗体 14001A、抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 RPN202 は、それぞれ BD Biosciences、Amersham Biosciences Corp. のものを用いた。抗β-アクチン マウスモノクローナル抗体 A-5316 は Sigma-Aldrich より購入した。

二次抗体として用いた抗ゴート IgG ラビット抗体、抗ラット IgG ラビット抗体は ICN Biomedicals, Inc. より購入した。また、HRP 標識抗マウス IgG 抗体、Texas Red 標識抗ラビット抗体、FITC 標識抗マウス IgG 抗体、および HRP 標識 protein A については、すべて Amersham Biosciences より購入したものを実験に用いた。

細胞の調製と培養条件

細胞の調製および培養に関しては、Nakamura らの細胞調製法および Li らの卵胞培養系を参考にした (Nakamura *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995)。実験動物として用いた 21 日齢の雌の Sprague-Dawley rat は、日本チャールズ・リバー、

日本クレア、日本エスエルシーのいずれかより購入し、飼育を行った。購入した 21 日齢ラットに対し、24 日齢までの 4 日間、連日 10 mg/ml DES/sesame oil を 0.2 ml ずつ皮下に投与した。最後の DES 投与より 48 時間後、動物実験施設内において、26 日齢に達したラットを断頭により屠殺し、放血後、開腹して卵巣を摘出した。摘出した卵巣は D-MEM/F-12 培地 (20 µg/ml gentamicin sulfate、500 ng/ml fungizone 含有) に移し、研究室に持ち帰った。なお、以上の実験動物の飼育および解剖にあたっては、奈良先端科学技術大学院大学動物実験指針に従い、これを遵守した。

研究室に持ち帰った卵巣から周囲の結合組織を除去し、高濃度 (0.2 mg/ml) の gentamicin sulfate を含む D-MEM/F-12 培地で三回洗浄した後、通常の D-MEM/F-12 培地 (20 µg/ml gentamicin sulfate、500 ng/ml fungizone) に浸した。26G 注射針で各卵巣を 200 回程度刺すことにより穴を空け、すべての卵巣を処理した後 10 分間、CO₂ インキュベーター内に放置した。培地をメッシュサイズ 40 µm のナイロンメッシュ cell strainer (BD Biosciences) により濾過し、卵巣外に放出された細胞を回収した。また、卵巣内に残った細胞についても、茶漉し上で軽く加圧して卵巣外に押し出し、同様に cell strainer による濾過を行って、先の回収液と混合した。細胞懸濁液を遠沈 (500×g、5 分) し、D-MEM/F-12 培地に再懸濁後、trypsin 処理 (0.025 %、37°C、1 分) し、続いて trypsin inhibitor および DNase I (ともに 50 µg/ml) で 37°C、1 分処理して反応を停止させた。細胞の遠沈 (500×g、5 分) と D-MEM/F-12 培地への再懸濁を 2 ないし 3 回繰り返して洗浄し、最終的にトランスフェリン (5 µg/ml)、BSA (0.1 %) を含む D-MEM/F-12 培地に浮遊させた。0.2 % trypan blue (和光純薬) /PBS 溶液で生細胞を計数し、最終的に 1×10⁶/ml の細胞密度に調製した後、ファイブロネクチン (5 µg/ml) を添加し、予め poly-D-lysine で被覆処理 (10 µg/cm²) したデイッシュまたはカバースリップに播種 (1.5×10⁵/cm²) し、培養を開始した (5 % CO₂、37°C)。デイッシュの被覆処理には BD Biosciences より購入した poly-D-lysine, hydrobromide を用い、50 µg/ml PBS 溶液を必要量加え、室温に 5 分から 1 時間放置した後、培地で二回以上洗浄することにより余分な poly-D-lysine を除き、乾燥させてから、実験に用いた。またカバースリップの場合、150 µg/ml PBS 溶液中に 12 mm カバースリップ (松浪硝子工業) を浸け、同じく室温に 1 時間程度放置して被覆し、以後同様に実験に供した。

培養開始から 24~36 時間後、インスリン (5 µg/ml)、アクチビン (50 ng/ml)、FSH (30 ng/ml) などの増殖因子や、protein kinase activator などの必要な試薬を添加した培地に交換し、アッセイを開始した。ただしその際、ファイブロネクチンの添加は行わなかった。

以上の一連の作業の流れを、本章末の参考図 3 に示した。

cAMP アッセイ

細胞内 cAMP 濃度の定量は、YAMASA Cyclic AMP Assay Kit (ヤマサ醤油) を用い、添付文書に従って行った。ラット顆粒膜細胞を 24 穴プレートで培養 ($2.5 \times 10^5/\text{cm}^2$) し、FSH (100 ng/ml) またはフォルスコリン (50 μM) を、フォスホジエステラーゼ阻害剤 IBMX (50 μM) とともに培地に添加して一定時間作用させた後、培地を除去し、氷冷 PBS で 3 回洗浄した。氷冷 0.1 M 塩酸を添加し、凍結と融解、超音波処理により細胞の破碎を行った。遠心 (17,000 \times g、4 $^\circ\text{C}$ 、10 分) 後、上清をスクシニル化反応に供した。ガラス製小試験管内で、細胞抽出液とスクシニル化剤 (0.4 M コハク酸トリエチルアミン/ジオキサン) 各 100 μl を混合し、10 分間反応させた後、イミダゾール緩衝液 (0.3 M 塩酸イミダゾール, pH 6.5) 800 μl を添加し、最終的にスクシニル化 cAMP 溶液 1 ml を得た (Cailla *et al.*, 1973)。試料 100 μl に対し $[\text{I}^{125}]$ cAMP 液 (cAMP ヨウ化チロシンメチルエステル) 100 μl を添加し、抗スクシニル化 cAMP 血清 100 μl に対するスクシニル化 cAMP 間での競合反応 (4 $^\circ\text{C}$ 、12~48 時間) を行わせた。翌日、B/F 分離剤 (デキストラン被覆活性炭懸濁液) 500 μl を添加し、遊離型 I^{125} 標識 cAMP 誘導体を活性炭に吸着 (氷水中、5~30 分) させた後、遠心分離 (2,000 \times g、4 $^\circ\text{C}$ 、5 分) した上清 500 μl の放射能をオートガンマーカウンター COBRA II AUTO-GAMMA (PACKARD) にて測定し、cAMP 濃度既知の検体を用いて作成した標準曲線から cAMP 濃度を算出した。その後、IBMX のみで処理した場合の換算値を差し引き、正味の cAMP 産生量とした。

MTT アッセイ

Roche Molecular Biochemicals より購入した MTT assay kit を用いた。細胞を 96 穴プレート (100 $\mu\text{l}/\text{well}$) で培養し、アッセイの 4 時間前に 5 mg/ml 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) PBS 溶液を 10 μl ずつ各ウェルに加えて 4 時間反応させた後、可溶化試薬 (10% SDS、0.01 M 塩酸) 100 μl を各ウェルに加え、約 16 時間可溶化を行った。その後マイクロプレートリーダー THERMOmax (Molecular Devices) および解析ソフトウェア SoftMax を利用して試料波長 570 nm と対照波長 650 nm における吸光度の差を測定し、培地のみでの測定値を差し引くことにより、細胞の生存活性を測定した。

RT-PCR

RNA の抽出には、RNA 抽出試薬 ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 抽出法により、全 RNA

画分を調製した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、ISOGEN を加えて掻き採り、27 G 注射針でゲノムを断片化した後、室温で 5 分間放置して細胞を可溶化し、クロロホルム処理、イソプロピルアルコール沈殿を行って、全 RNA 画分を得た。260 nm における吸光度により RNA を定量後、1 µg 相当の全 RNA 画分に対し、200 U の逆転写酵素 Superscript II および oligo-dT プライマー 500 ng を用い、42°C で 50 分間反応させることにより cDNA の合成を行った。その際の反応条件や操作の詳細についてはすべて Superscript II の添付文書に従ったため、その記載については割愛する。なお、LH 受容体に対する RT-PCR を行った際は 5×10^5 cells/cm² で培養を行った。

合成した cDNA を鋳型とし、PCR により明らかな指数関数的増幅が認められる鋳型量または反応サイクル数の範囲を求めた上で、定量的な増幅反応を行った。その後、2% アガロースゲルを用いて増幅産物の電気泳動を行った。以下に各プライマーの配列、アニーリング温度および予想増幅断片サイズを示す。

LH 受容体 ; 52.8°C、767 bp

sense: 5'-CTG ATT TGG CTG ATT AAT AT-3'

antisense: 5'-GGA TTG GCA CAA GAA TTG A-3'

サイクリン D2 ; 56.7°C、188 bp

sense: 5'-CAT TGA GCA CAT CCT TCG CAA-3'

antisense: 5'-CAT TCA CTT CCT CGT CCT GCT-3'

GAPDH ; 57.7°C、452 bp

sense: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'

antisense: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'

また、アクチビン受容体の発現確認とクローニングを目的とした nested PCR を行ったので、その際に用いたプライマーの配列のみ、以下に付記する。

ActRIA/ALK2 ;

first-PCR, sense: 5'-GGT TAT ACAATG GTC GAT GGA GC-3'

first-PCR, antisense: 5'-GCA TTG ACT CTC CTT CTT GAC AC-3'

second-PCR, sense: 5'-GGA TCC ACAATG GTC GAT GGA GCA-3'

second-PCR, antisense: 5'-GGA TCC CCG GTG ACAATG TCA ACA-3'

ActRIB/ALK4 ;

first-PCR, sense: 5'-GCG GTT ACT ATG GCG GA-3'

first-PCR, antisense: 5'-CAA GAG GTA GGC CTC CA-3'

second-PCR, sense: 5'-GGAATT CTT ACT ATG GCG GAG TCG G-3'

second-PCR, antisense:

5'-GGA ATT CTG CGT AGG CAG AGG AAC A-3'

免疫染色

poly-D-lysine コートカバースリップ上に培養した細胞を、PBS で 2 回洗浄し、3.7 % formaldehyde/PBS による固定を 10 分間行い、再度 PBS による洗浄を 2 回行った後、0.5 % Triton X-100/PBS で 10 分間処理した。さらに PBS で 2 回洗浄し、ブロッキング溶液 (2.5 % スキムミルク/PBS) で 15 分処理した後、ブロッキング溶液で 100 倍希釈した抗サイクリン D2 抗体 (sc-593) を 1 時間反応させた。PBS にて 2 回洗浄後、ブロッキング溶液で 100 倍希釈した Texas Red 標識抗ラビット IgG 抗体および Hoechst 33342 (10 μ g/ml、Molecular Probes, Inc.) で暗所にて 30 分間処理し、最後に PBS で 2 回洗浄後、vectashield (Vector Laboratories, Inc.) または退色防止剤 DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane、5 %) を添加した PermaFluor (Thermo Electron Corp.) を用いてスライドガラス (松浪硝子工業) 上に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM410 (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) により染色画像の解析を行った。

BrdU の取り込み率による細胞の増殖活性測定では、細胞を BrdU (100 μ M) で 30 時間標識し、PBS で 2 回洗浄後、1) acidic ethanol (70 % ethanol/glycine buffer; 50 mM glycine, pH 2.0) により -30°C で 20 分から一晩、2) 4 % paraformaldehyde/PBS により室温で 15 分、3) 3.7 % formaldehyde/PBS により室温で 10 分、のいずれかの方法により細胞を固定した。その後 PBS で 2 度洗浄し、0.5 % Triton X-100/PBS で 10 分間処理後、再度 PBS で 2 回洗浄した。ここで、方法 2) または 3) にて固定を行った場合に限り、1.5 または 4 M 塩酸で 15 分間処理して DNA を単鎖化させ、ホウ酸・ホウ砂緩衝液 (0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9.0) により塩酸を中和し、最後に PBS により 2 回洗浄した上で以後の操作を行った。ブロッキング溶液で 15 分処理した後、 37°C で抗 BrdU 抗体溶液により 1 時間抗体反応を行った。反応終了後、PBS にて 2 回洗浄し、ブロッキング溶液で軽く処理した後、ブロッキング溶液で 100 倍希釈した FITC 標識抗マウス IgG 抗体と室温で 30 分間、暗所にて反応させた。その後 PBS で 2 回洗浄し、最終的に PI/PBS (5 μ g/ml) に浸し、上記のいずれかの封入剤によりスライドガラス上に封入した。蛍光顕微鏡 Axiophot (Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) および 120es デジタルカメラシステム (Pixera) を用いて検鏡を行った。バンドパスフィルターに BP450 - 490 を使い、FITC と PI との二重染色によって黄色く染まった核の数を BrdU 陽性細胞数、PI によって赤または黄色に染まった核の数を全細胞数とし、両者の比から BrdU 陽性細胞の割合を求め、BrdU 取り込み率とした。

フローサイトメトリー

trypsin 処理により細胞を剥離させ、血清添加により反応停止後、細胞を回収

し、遠心 (400×g、4℃、10分) 後、1 mM EDTA/PBS に懸濁し、さらに遠心 (600×g、4℃、5分) し、上清を捨て、PI 染色液 (0.1 % Triton X-100, 50 µg/ml PI, 0.1 mM EDTA, 50 µg/ml RNase A in PBS) に再懸濁し、37℃で 30 分もしくは室温で一晩、暗所にて反応させ、最後に 35 mm のナイロンメッシュを通して細胞集塊を除去後、フローサイトメーター FACSscan および Cell Quest software (BD Biosciences) により、DNA 量の測定を行った。得られたヒストグラムを ModFit LT program (Verity Software House, Inc.) で処理し、カーブフィットにより S 期細胞の割合を算出した。

組換えタンパク質の作製と精製

マウスサイクリン D2 の cDNA については、本学動物分子遺伝学講座教授、加藤順也博士にご提供頂いた発現ベクター pRc/RSV-D2 より SpeI-XbaI 断片として切り出したものを用いた。得られた DNA 断片は、まず GFP 発現ベクター pCMX-SAH/Y145F (本学分子発生生物学講座より入手) の NheI 部位にサブクローニングし、サイクリン D2 全長 289 アミノ酸 (1-289) の N 末に GFP を融合させた形で発現可能なベクターを作製した。得られたベクターを BamHI 処理後、self ligation させることにより、C 末 21 アミノ酸のみ (268-289) を GFP に融合させた。また、切り出された BamHI 断片を元の pCMX-SAH/Y145F の BamHI 部位にサブクローニングし、C 末部位 20 アミノ酸を欠失した変異体 (1-269) を GFP 融合タンパク質として発現可能なベクターを得た。理由は不明であるが、これらの GFP 融合サイクリン D2 は、HEK293 細胞に導入しても発現が認められなかったため、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させることとした。各 GFP 融合タンパク質発現ベクターを EcoRV および HpaI で切断し、得られた DNA 断片を pGEX-2TK (Amersham Biosciences) の SmaI 切断部位に対し、コーディング領域の 3'側に SV40 t intron を含む形で新たにサブクローニングした。

各発現ベクターを有する大腸菌クローン (JM109) の終夜培養液を、アンピシリン (50µg/ml) 入り LB 培地に 1/10 希釈後引き続き 37℃で培養を行い、OD₆₀₀ = 0.5 となった時点より IPTG (1 mM) にて目的タンパク質の誘導を開始した。37℃で 4 時間培養後、遠心 (5,000×g、4℃、10分) により集菌し、sonication buffer (50mM Tris, pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) で菌体を洗浄後、PMSF (1 mM) を添加した NETN150 buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 % IGEPAL CA-630) に再懸濁し、超音波発生機 UD-201 (トミー精工) を用いて水上で菌体の破碎を行った (出力 5、50 % duty、5分)。遠心 (2,000×g、4℃、10分) により樹脂を沈降させ、得られた上清に 50 % slurry glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences) を添加し、4℃で

30 分以上攪拌することで、樹脂上に GST 融合タンパク質を吸着させた。NETN150 buffer で 5 回洗浄し、還元型グルタチオン (20 mM) および PMSF (1 mM) を含む sonication buffer を樹脂体積と等量添加し、4°C で 10 分以上攪拌することで各 GST 融合タンパク質を溶出させた。遠心 (2,000×g、4°C、10 分) により樹脂を沈降させ、上清中のタンパク質の量を吸光度 (280 nm) および CBB 染色により定量後、Western blotting に供した。

核抽出液の調製

核抽出液の調製に際しては、基本的には Schreiber らのミニ・エクストラクト法に基づいて行ったが、実際にはこれを元に核内サイクリン D1 を調製して実験を行った Liou らの文献や、顆粒膜細胞の核抽出液を用いて EMSA を行った文献などを参考に行った (Schreiber *et al.*, 1989; Liou *et al.*, 2002; Yazawa *et al.*, 2003)。スクレイパーにより細胞を PBS 中に懸濁させて回収し、遠心 (1,500×g、4°C、10 分) により得られた細胞のペレットを低張液 (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM Na₃VO₄, 200 KIU/ml aprotinin) に再懸濁し、氷上に 15 分保って膨潤させた。10 % IgePAL CA-630 を終濃度 0.6 % になるよう加え、10 秒間きつめに攪拌して細胞膜を破壊した後、遠心操作 (15,000×g、4°C、5 分) によって核のみを沈降させた。得られたペレットを低張液で軽く洗浄し、SDS-sample buffer に溶解し、Western Blotting に供した。

Western Blotting、IP-Western

氷冷 PBS で 3 回洗浄した細胞に、6×SDS-sample buffer を加えて総タンパク質を溶解し、さらに 90°C で 5 分間加熱した。冷却後、超音波処理によりゲノム DNA を断片化し、SDS-PAGE を行った。アクリルアミドゲルの濃度は、pRb については 7.5 %、β-アクチンについては 10 %、p21 および p27 については 15 %、その他のタンパク質については基本的に 12.5 % のものを作製し、泳動を行った。

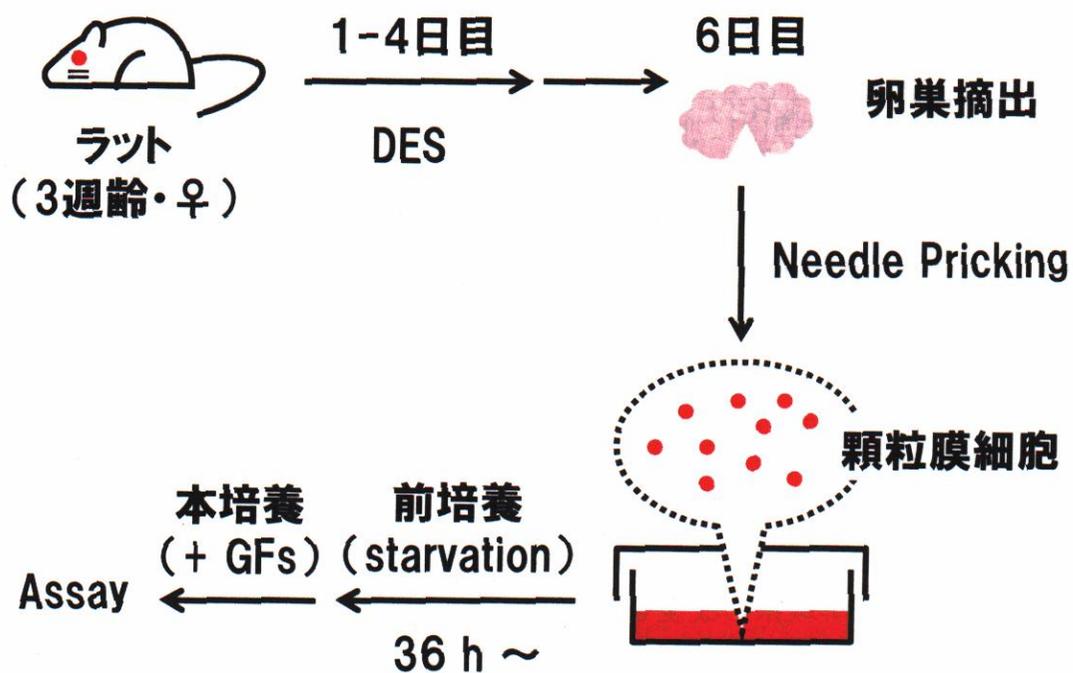
免疫沈降の場合は、細胞氷冷 PBS で 3 回洗浄した細胞を DTT (1 mM)、NaF (1 mM)、Na₃VO₄ (0.1 mM)、β-glycerophosphate (10 mM)、PMSF (0.1 mM)、および aprotinin (200 KIU/ml) を加えた Tween-IP buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 2.5 mM EGTA, 0.1 % Tween 20) に溶解させ、一旦液体窒素により凍結後、再融解した。その後 4°C で 30 分~1 時間かけてさらに細胞を溶解させ、遠心 (17,000×g、4°C、10 分) により不溶性画分を除去した後、タンパク質定量キット Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い、Bradford 法 (Bradford, 1976) による総タンパク質濃度の定量を行った。各試料の濃度を合わせた後、Tween-IP buffer により 50 % slurry と

したセファロース樹脂 protein A-Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences)、または予めこれに抗ラット IgG ラビット抗体を結合させたものを 20 μ l 加えて 30 分前処理を行い、樹脂や二次抗体への非特異的成分を吸着させた。遠心 (8,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 秒) して上清を回収し、予め 1 μ g の一次抗体を結合させた樹脂 20 μ l を新たに加え、4 $^{\circ}$ C で 2 時間攪拌し、目的とするタンパク質を吸着させた。遠心 (8,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 秒) により樹脂を沈降させ、上清を捨てて新たに Tween-IP buffer を加え、転倒させて懸濁することにより樹脂の洗浄を行った。この洗浄操作をさらに 4 回行い、最終的に上清を捨てた後、2 \times SDS-sample buffer を 20 μ l 加えて 90 $^{\circ}$ C で 3 分間加熱することにより、結合しているタンパク質を溶出させた。その後、上述した総タンパク質の電気泳動の場合と同じく SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。

泳動終了後、タンパク質を PVDF 膜 Immobilon-P membrane (Millipore Corp.) に転写し、5 % BSA/PBS-T (0.1% Tween 20/PBS)、一次抗体、5 % スキムミルク/PBS-T、二次抗体で順次処理し、最終的に HRP 標識抗体の希釈液で PVDF 膜を処理し、洗浄後、シグナルの検出を行った。シグナルの検出には化学発光検出試薬 Enhanced ChemiLuminescence reagent (Amersham Biosciences) を用い、X 線フィルムプロセッサおよび X 線フィルムにより現像を行った。また、バンド強度の定量には IS440CF および 1D image analysis software (いずれも Eastman Kodak Company) を用い、解析を行った。

有意差検定

必要に応じ、データ間の有意差検定を行った。検定では有意水準を 5 % として t-検定を行い、その差が有意とみなされたものについて asterisk (*) を付した。



参考図 3 実験過程の概要

詳細については本文中の「細胞の調製と培養条件」の項に記載したため、そちらを参照されたい。

結果

初代ラット顆粒膜細胞の調製と FSH 応答性の確認

序論の最後で述べた理由に加え、本研究の実験系ならびに研究対象としてラットを選択し、これに対するアクチビンの作用に注目した理由としては、Li らが確立した *in vitro* 卵胞培養系において、アクチビンの顆粒膜細胞の増殖や分化に対する重要性が示唆されたことに起因する (Li *et al.*, 1995)。残念ながらこの系は、形態的变化や ELISA などの実験には有効であると思われるが、タンパク質レベルや遺伝子レベルでの分子生物学的実験を行うには細胞数がやや少なく、当時 *Endocrinology* 誌の表紙を飾る程大きく取り上げられた割には、この系を活用した実験は現状ではほとんど行われていない。そこで Li らの実験系を基に、もう少し発育段階の進んだ卵胞より顆粒膜細胞を調製し、分子生物学的研究を行えるよう、彼らの用いた 14 日齢よりも発育の進んだ 3 週齢のラットに対して DES 処理を行い、実験系の改変を試みることにした。

DES 処理した 26 日齢雌ラット卵巢から、機械的操作 (needle pricking) と酵素処理 (trypsinization) により顆粒膜細胞の調製を行った。細胞調製にあたっては、旧群馬大学生体調節研究所生理活性センター助教授、現福井医科大学生化学第二講座教授、宮本薫博士にご指導いただいた。この週齢のラットは妊娠可能週齢に達する少し前であり、調製される顆粒膜細胞は比較的早期発育段階の卵胞に由来しており、FSH 受容体の発現は認められるが、LH 受容体の発現は認められない、比較的未分化な顆粒膜細胞であると考えられる。そこでまず私は、調製した細胞の FSH 応答性と LH 受容体の発現レベルを確認し、調製した細胞が顆粒膜細胞であることの確認を行った。

培養条件の設定にあたり、ラット顆粒膜細胞の初代培養に関する初期の研究において、血清培地中では FSH 応答性が損なわれるとの報告に基づき、すべての実験を無血清培養により行うこととした。また具体的な培養条件には、序章で言及した Li らの卵胞培養系と同じく、poly-D-lysine 被覆処理ディッシュ、インスリン、トランスフェリン、BSA、ファイブロネクチン、および抗生物質を含む D-MEM/F-12 培地を用い、実験を行った (Orly *et al.*, 1980; Li *et al.*, 1995)。

FSH 受容体は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であり、G タンパク質を介し、アデニル酸シクラーゼによる一過性の cAMP の産生を促すことが分かっている (Nakamura *et al.*, 1994)。そこで FSH (100 ng/ml) 刺激による細胞内 cAMP の経時的変化を測定したところ、陽性対照として用いたフォルスコリン (50 μ M) の場合と同様、刺激から 10 分後における一過性の cAMP 産生が認められた (図 1)。

また、FSH 刺激により誘導される遺伝子の一つである LH 受容体の発現についても確認を行った。培地に 100 ng/ml の FSH を添加後、24 時間培養を行い、全 RNA 画分を調製し、RT-PCR を行ったところ、未刺激区の細胞ではほとんど LH 受容体の発現が検出されなかったのに対し、FSH 刺激後 24 時間の細胞では LH 受容体が明らかに誘導されていることが確認された (図 2)。

以上の結果より、ラット卵巣より調製した細胞は顆粒膜細胞であることが確認された。これに加え、調製された細胞は既に FSH 応答性を有していること、用いた培養系がこの応答を阻害しないこと、の二点についても確認することが出来た。

培養条件の至適化とアクチビンの増殖促進作用

14 日齢ラットの卵胞培養系で示されたアクチビンの増殖促進効果が、3 週齢 DES 投与ラットより調製された顆粒膜細胞の単層培養系でも認められることを確認するため、種々の濃度のアクチビンを培地に添加し、刺激から 3 日後の細胞を計数したところ、10 ng/ml 以上の範囲において、アクチビン濃度に依存した細胞数の増加が認められた (図 3)。

ここまでの培養は、前培養の段階からすべてインスリン存在下で行った。インスリンは無血清細胞培養系でしばしば用いられる成長因子であるが、ラット顆粒膜細胞に対する増殖因子として作用するとの報告もなされている (Bley *et al.*, 1991; Bley *et al.*, 1992)。細胞増殖因子の作用解析には、前培養により細胞を休止期に同調させた上で実験を行うことが望ましいが、*in vitro* で無血清条件下におかれた顆粒膜細胞は、自発的にアポトーシスに向かう可能性があり、インスリン無添加で前培養を行えるかどうかについて把握しておく必要がある。そこで、前培養におけるインスリンの有無の影響を MTT アッセイによって調べたところ、インスリン無添加で 24 時間培養した際の細胞数は、インスリン添加時に比べてやや細胞数の減少が認められたものの、その差は 10 % 程度に過ぎなかった (小川拓哉、修士論文)。よって以後の実験では、インスリンを添加せずに前培養を行った。

顆粒膜細胞は種々の生理活性物質を分泌し、増殖・分化に対する自分泌・傍分泌制御を行っており、アクチビンもそうした因子の一つとして知られる (Woodruff *et al.*, 1993)。また、顆粒膜細胞のゴナドトロピン応答性は、細胞密度や凝集状態に影響されることも報告されている (Amsterdam *et al.*, 1981; Farookhi *et al.*, 1986; Bley *et al.*, 1992; Harandian *et al.*, 1998)。そこで、培養開始時の細胞密度によるアクチビンの増殖促進効果への影響についても調べた。96 穴プレートに顆粒膜細胞を $0.5 \sim 2.5 \times 10^5$ cells/cm² の密度になるよう播種し、インスリン (5 µg/ml)、アクチビン (0~100 µg/ml) を加えて 3 日間培

養を行い、MTT アッセイにより細胞数の変化を調べた結果、3 日間を通じてのアクチビン応答性がもっとも良好であった 1.5×10^5 cells/cm² を、以後の実験における培養開始密度とした (小川拓哉、修士論文)。またアクチビンの濃度については 50 ng/ml を至適濃度とし、以後の実験に用いた (図 3)。

また 0~20 μ g/ml のインスリンを培地に添加し、刺激から 3 日目に MTT アッセイを行い、インスリン単独での効果についても調べた。しかしながらインスリン自体の増殖促進活性はあまり高くなく、 μ g/ml という比較的高濃度での刺激を行ったにもかかわらず、アクチビン (50 ng/ml) 刺激の活性に比べると 40~60 %程度の活性しか示さず、濃度依存性もそれほど認められなかった (小川拓哉、修士論文)。よって条件の変更による培養条件改善効果がそれほど見込めないものと判断し、これまで通り 5 μ g/ml のインスリン濃度により培養を行うこととした。

細胞数の経時変化を見ると、アクチビン刺激後 24 時間後の細胞数には、インスリン刺激のみの場合と比較しても有意な差が認められなかったが、48~72 時間では明らかな差が認められた (図 4)。

MTT アッセイは、細胞の代謝活性と細胞数の比例関係を前提とした間接的細胞計数法であることから、細胞の代謝活性自体がアクチビンによって影響を受けるような場合、正確な増殖活性を測定できない可能性がある。そこで他の方法によっても MTT アッセイと同様に増殖促進活性が認められることを確認するため、アクチビン刺激による BrdU 取り込み率の変化を測定した。培地にアクチビンおよび BrdU を添加し、30 時間後の細胞に対し、抗 BrdU 抗体を用いた間接蛍光抗体法により、BrdU を取り込んだ細胞、すなわち細胞周期が G1 期から S 期に進行した細胞の割合を調べたところ、インスリンのみではその割合は 10 %以下であったが、アクチビン刺激によりその約 3 倍にあたる 25 %の細胞で BrdU の取り込みが認められた (図 5)。

なお、調製した細胞のアクチビン応答性に関しては、I 型アクチビン受容体 ALK2、ALK4 に対する RT-PCR によってもその発現を確認したことを付け加えておく (データ未掲載)

アクチビンによる pRb リン酸化の亢進

アクチビン刺激による増殖過程についてより詳細に調べるため、細胞周期 G1/S 期制御に注目し、まず pRb のリン酸化状態を調べることにした。pRb は様々な細胞外の増殖刺激による G1 期から S 期への移行を制御しており、pRb が高リン酸化状態で不活性化する結果、S 期進行に必要な因子の誘導が開始されることから、pRb のリン酸化状態は細胞周期の進行における重要な決定要素とみなされる (Taya, 1997)。

DES 未処理 3 週齢ラットから採取した顆粒膜細胞を用いて血清刺激を行った実験で、刺激後 18 時間付近において³Hチミジンの取り込みがピークを示したとする報告を元に、アクチビン刺激後 20 時間における pRb のリン酸化レベルを調べた (Miro *et al.*, 1996)。その結果、アクチビン刺激により高リン酸化状態の pRb (ppRb) の割合が増加していることが確認された (図 6)。

次に、pRb リン酸化レベルの経時的変化についても調べた。アクチビン刺激から 7 時間ごとに細胞を回収し、Western blotting により pRb のリン酸化状態を調べたところ、6 時間後ではそれほど各刺激条件での差が顕著ではなかったが、刺激後 12 時間では pRb のリン酸化状態に有意な差が認められた。また、24 時間後でもアクチビン存在下での高リン酸化型 pRb のバンドが見られ、この時点での細胞周期はまだ一周していないものと考えられた (図 7)。

FSH によるアクチビン刺激の増強作用と S 期進行への効果

FSH の顆粒膜細胞への作用に関して、単独では増殖因子としての活性はあまり高くないものの、アクチビン存在下では協同的に作用し、その増殖促進活性を増強することが過去に報告されている (Li *et al.*, 1995; Miro *et al.*, 1996)。そこで、FSH 刺激によるアクチビンの作用への影響を調べた。

まず、添加する FSH 濃度の至適化のため、種々の濃度 (0~200 ng/ml) の FSH とともに BrdU を加えて 30 時間標識し、その取り込み率を間接蛍光抗体法により調べたところ、25 から 50 ng/ml における値が最も高く、それ以上の濃度ではより低い取り込み率を示した (データ未掲載)。これにより FSH の至適濃度を 30 ng/ml に設定し、以後の実験を行った。なお、このときの BrdU 取り込み率のピークの値は、インスリンのみの場合の 2 倍程度 (約 15%) であった。

FSH (30 ng/ml) 刺激による pRb のリン酸化レベルの変化を調べたが、インスリンのみの場合とあまり差が認められなかった。一方、アクチビンとともに FSH を作用させた場合には、アクチビンによる pRb のリン酸化亢進をさらに増強していることが示唆された (図 6)。

そこでこの FSH による pRb リン酸化亢進への影響をさらに詳しくみるため、リン酸化レベルの変化を経時的に調べたところ、やはり単独ではインスリンのみの場合と同じく、あまり変化が認められなかったのに対し、アクチビン存在下では刺激後 12 時間において、顕著な増強効果を示した (図 7)。しかし、図中の標準偏差の大きさから判る通りデータのばらつきが多少大きく、今回行った 5 回の実験からでは、FSH によるアクチビンの作用増強効果を検定によって有意であると認めることは出来ず、その傾向を示すに留まった。

次にフローサイトメトリーにより、種々の刺激による S 期進行の測定を行った。その結果、刺激条件に関わらず、増殖刺激後約 12 時間から S 期細胞集団の出現

が検出されたが、アクチビン非存在下ではそのピークは非常に小さなものであった。すなわち、ほんのわずかの細胞がインスリンまたは FSH によって増殖したものの、これらの条件下では大部分の細胞は G0/G1 期にとどまっていることが示唆された。この結果は FSH 存在下でも同様であったが、アクチビン存在下では 12 時間以降も持続的な S 期進行が認められ、比較的多くの細胞が増殖期に入ったことが示唆された。さらにアクチビンと FSH を同時に作用させたところ、ピークの細胞数に明らかな差が認められ、アクチビンの作用が FSH によって著しく増強されていることが示された。また、刺激後 30 時間付近においては、アクチビン単独での値よりも寧ろ小さい値を示す結果となった (図 8)。これらの結果は図 7 で見られた pRb のリン酸化状態の変化と非常によく対応しており、ppRb の増加がラット顆粒膜細胞の S 期進行に関与していることを示唆している。また、この経時変化は既報における血清刺激後の³Hチミジンの取り込み量の変化とも非常によく対応しており、両データの整合性を示しているものと考えられる (Miro *et al.*, 1996)。さらに、インスリンのみでもわずかに S 期への進行が認められたことは、インスリンのみでも 24 時間後にわずかに細胞数の増加が認められたことと関係しているものと思われる (図 4)。

また、アクチビン存在下に FSH 刺激を行い、30 時間標識した後の BrdU の取り込み率を間接蛍光抗体法により調べたが、FSH の有無による差はほとんど認められなかった (データ未掲載)。仮にアクチビンと FSH による協同効果が、それぞれに応答した全く独立の細胞集団に由来する相加的なものであるならば、両因子による効果はそれぞれを単独で作用させた場合の和になる筈である。このことからアクチビンおよび FSH は、それぞれ独立した細胞集団に対して作用したのではなく、寧ろほぼ同じ細胞集団に対して作用したものであろうと考えられる。同様のことは ppRb/pRb 比からも言える。すなわち、もしアクチビンと FSH が独立した細胞集団に対して作用している場合、ppRb/pRb 比はアクチビンまたは FSH 単独で作用させた場合のうち、より値の高かった方以上になることはありえない。よって、アクチビンと FSH は協同的に細胞の増殖を促進するものと結論付けられた。

アクチビン刺激にともなうサイクリン D2 の誘導

ここまでの結果から、アクチビンによる顆粒膜細胞の増殖の賦活化と、それにとともなう pRb のリン酸化レベルの上昇が確認された。pRb は cdk4 または 6 の基質として知られる。細胞外から増殖刺激を受けた細胞はサイクリン D を誘導し、cdk4/6 と複合体を形成してこれを活性化するという細胞周期制御の分子機構は 90 年代前半に確立され、現在では広く受け入れられている (Hunter, 1993; Sherr, 1994)。アクチビンによる細胞周期制御機構についてより詳細に知るため、

増殖刺激から 12 時間後のサイクリン D、cdk、cdk インヒビターのタンパク質レベルでの発現状況について調べた (図 9)。

三種類のサイクリン D のうち、サイクリン D1 の発現は認められなかったが、サイクリン D2 および D3 については、増殖刺激に依存した発現レベルの変化を捉えることが出来た。サイクリン D2 については、未刺激時にも非常に弱いシグナルが検出されたが、増殖刺激により明らかな誘導が認められた。しかもその発現はアクチビン依存的であり、アクチビン存在下では、インスリンのみでの場合に比べて顕著な発現上昇を示した。一方 FSH の場合は、アクチビンの有無に関わらずサイクリン D2 の発現レベルにはほとんど影響を及ぼさなかった。サイクリン D3 に関しては、未刺激時にはまったくシグナルが検出されなかったが、インスリン刺激にともなって発現誘導が認められた。しかしサイクリン D2 の場合とは異なり、その発現はアクチビンや FSH による刺激とは無関係であった。

また、cdk2/4/6 や、cdk インヒビター p21^{Cip1}、p27^{Kip1} についても同様に発現を調べたが、これらの発現レベルはほぼ一定であった。しかし詳細に見た場合、p27^{Kip1} については非常にわずかな変化ではあったものの、サイクリン D2 とは逆にアクチビン依存的に減少していることが再現性を伴って確認された。一般に p27^{Kip1} の発現量は G₀ 期で高く、増殖刺激による G₁ 期移行に伴って急激に減少し、G₁ 期の後期より M 期を終えるまで低く保たれている。この発現量の調節は転写後レベル、特にタンパク質分解によって主に制御されていることが知られている。S 期から G₂ 期にかけての分解は Thr-187 のリン酸化に依存し、F-box タンパク質である Skp2 を含む SCF 複合体を介した、ユビキチン・プロテアソーム経路により核内での分解を受けるが、G₁ 期初期から中期にかけての分解は Skp2 とは別のユビキチン・プロテアソーム経路に依存しており、この場合は KIS という酵素による Ser-10 リン酸化と CRM1 に依存的な核外移行の結果、細胞質で分解されることが、Skp2 欠損マウスや p27^{Kip1} の T187A 変異体ノックインマウスを用いた解析などより明らかとされている (Nakayama *et al.*, 2000; Ganoth *et al.*, 2001; Hara *et al.*, 2001; Malek *et al.*, 2001; Boehm *et al.*, 2002)。これらのことから考えて、p27^{Kip1} の減少も、やはりアクチビン刺激による顆粒膜細胞の細胞周期進行を示唆するものと思われる。

次に、サイクリン D2 の経時的な発現変化を調べた。増殖刺激から 0、6、12、24 時間後の細胞を回収し、Western blotting を行ったところ、刺激後 6 から 12 時間において、サイクリン D2 がアクチビン依存的に誘導されているのが認められた。また、24 時間後にはその発現は既に認められなくなっていた (図 10 上段)。サイクリン D は増殖因子によって誘導され、時期特異的に一過性発現を示す因子であり、G₁ 期進行と S 期への移行における役割を終えたサイクリン D は、その後 S 期で核外に排出され、速やかに分解へと向かうことが知られてい

る (Baldin *et al.*, 1993; Alt *et al.*, 2000)。24 時間以内にサイクリン D が減少へと向かったことは、24 時間後には大半の細胞が S 期への移行を終えていることと符合する (図 8)。

El-Hefnawy らは DES 未処理のラットを用いた実験により、アクチビンおよび FSH は、同時に作用させた場合にのみサイクリン D2 や S 期の指標となる proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を誘導し、それぞれ単独では誘導能がないとする報告を行っており、本研究と一部矛盾する可能性がある (El-Hefnawy *et al.*, 2001)。そこで、図 9 および 10 で示されたアクチビン刺激依存的なサイクリン D2 の誘導が、DES 刺激時に特異的な現象であるか否かについて明らかにするため、DES 処理を行わずに顆粒膜細胞を調製し、同様にアクチビンの効果を調べることにした。なお、DES 処理によりラット一頭より通常約 3×10^6 個の細胞が調製可能であったのに対し、DES 処理を行わなかった場合、12 個体からわずか 1×10^6 弱の細胞しか得ることが出来なかった。こうして DES 投与を行わずに調製した細胞に対し、これまでの実験と同様に増殖刺激を行ったが、DES 処理区と同く、アクチビン依存的なサイクリン D2 の誘導が認められた (図 10 下段)。

アクチビンによるサイクリン D2 の誘導が、転写レベルで行われているかどうか調べるため、RT-PCR を行った。増殖刺激から 0、1.5、3、6、12、24 時間後の細胞から全 RNA 画分を調製し、内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて RT-PCR を行った結果、Western blotting によりタンパク質レベルで見られたのと同様にアクチビン依存的なサイクリン D2 の誘導が認められた (図 11 上段)。なお、図には 0、3、6 時間後の結果のみを示したが、12 時間後においても、依然シグナルの増幅は認められた。しかし 24 時間後ではシグナルを検出することは出来なかった (データ未掲載)。

図 1 で示したように、FSH 受容体の活性化は細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、PKA 経路やその他の様々な細胞内シグナル伝達経路を活性化する (Gonzalez-Robayna *et al.*, 2000; Seger *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002)。また、FSH およびフォルスコリン刺激によりサイクリン D2 が誘導されることを示した論文もある (Sicinski *et al.*, 1996; Robker *et al.*, 1998a)。そこで、FSH の代わりにフォルスコリン ($10 \mu\text{M}$) を用い、刺激後 12 時間におけるサイクリン D2 の発現と pRb のリン酸化レベルを調べたが、やはりフォルスコリンによるサイクリン D2 の誘導は検出されなかった (図 12 下段)。また、フォルスコリンは FSH と同様にアクチビン非存在下では pRb のリン酸化レベルにほとんど変化を及ぼさなかったが、アクチビン存在下では、ppRb のシグナルを増強することが観察された (図 12 上段)。

これらの結果から、アクチビンはサイクリン D2 を転写レベルで誘導すること、この誘導能は DES 投与の有無に依存しないこと、アクチビンはおそらくサイクリン D2 の誘導を介して pRb のリン酸化を亢進させていることが示唆された。さらに、FSH はサイクリン D2 の発現誘導とは全く別の機構により pRb のリン酸化を促進していること、その経路はフォスコリンによって活性化され得ること、の二点も推察された。

FSH・アクチビンの協同作用の分子機構

ここまでの実験から、アクチビンによる細胞周期進行への影響に関しては、おそらくサイクリン D2 の誘導が重要な役割を果たしているであろうということが示唆されたが、一方で FSH 刺激によるアクチビンとの協同効果の作用機構に関しては、pRb のリン酸化レベルに差が見られたこと以外は明らかにすることが出来なかった。そこでこの点を解明すべく、以後の研究を行った。

まず、サイクリン D2 のパートナーと考えられる cdk4 または cdk6 の活性が FSH の作用によって上昇しているのではないかと考え、サイクリン D2、cdk4、cdk6 に対する抗体を用い、GST-Rb を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイを試みた。しかしながら、陰性対照として用いた GST のみでも強いシグナルが検出されてしまい、実験系自体をうまく働かせることが出来なかった。そこで、cdk4 特異的な pRb のリン酸化部位として知られる 780 番目のセリンに対するリン酸化抗体を購入し、non-RI でのキナーゼアッセイについても同様に試みた。しかし、血清刺激した NIH3T3 から調製した抗 cdk4 抗体免疫沈降物でもほとんどシグナルを検出出来ず、抗体をうまく働かせることが出来なかった。そこでキナーゼアッセイを諦め、サイクリン D2 と cdk による複合体形成の状況について調べてみることにした。

増殖刺激から 0 および 12 時間後の細胞抽出液に対し、抗サイクリン D2 ラットモノクローナル抗体 sc-452 による IP-Western を行ったところ、免疫沈降物の量に FSH 刺激依存的な差が認められ、FSH とアクチビンの同時刺激を行った方が、アクチビンのみでの場合よりも強いシグナルが検出された (図 13 上)。この差が免疫沈降効率の差であるのか、またはサイクリン D2 タンパク質の抽出効率の差によるものであるのかについて明らかにするため、同じ細胞抽出液を用い、免疫沈降を行わずに直接 Western blotting に供した。その結果得られたサイクリン D2 のシグナルのパターンは、図 9 などで認められたパターンと同じであり、明らかに IP-Western の場合とは異なった (図 13 上段および中段)。さらに、細胞抽出液中の β -アクチンの量には全く差が認められなかった (図 13 下段)。つまり、IP-Western により見られたパターンは細胞抽出の効率によるものではなく、FSH 刺激の有無によってサイクリン D2 を含む免疫沈降物に何ら

かの変化が生じているものと推察された。また同様の傾向はインスリン刺激によってわずかに誘導されたサイクリン D2 についても認められ、インスリン刺激のみの実験区ではほとんど免疫沈降物が検出されないが、FSH 刺激により、わずかに強いシグナルが検出されるようになった (図 13 上段)。

次いでサイクリン D2 と共沈した cdk について調べるため、FSH 刺激による免疫沈降効率に差が出ないように、別の抗サイクリン D2 抗体 sc-593 に変えて IP-Western を行ったが、この場合も図 13 と同様の結果となった (図 14 上)。しかし、cdk4 および cdk6 に対する抗体を用い、共沈した cdk の量を調べたところ、サイクリン D2 と結合した cdk4 と cdk6 の量に差が認められた。cdk4 の場合は、サイクリン D2 との共沈量はサイクリン D2 の量に比例し、FSH 刺激依存的な増加を示したが、cdk6 の共沈量は FSH に依存せず一定であった (図 14 中段および下段)。

図 13、14 での免疫沈降実験に用いた二つのサイクリン D2 抗体のうち、図 13 で用いた sc-452 抗体はマウスサイクリン D2 全長を免疫して作成されたものである (Vallance *et al.*, 1994)。一方、sc-593 はサイクリン D2 の C 末 20 アミノ酸について作製されたものである、と以前の添付文書には明記されていた (現在は公表されていない)。メーカーに問い合わせたところ、sc-452 のエピトープは不明であるとのことであった。この抗体の作製に携わった、本研究室の前助教、現動物分子遺伝学講座教授である加藤順也先生にもお話を伺ったが、残念ながらこの点に関しての情報はお持ちではなかった。そこで、サイクリン D2 の全長、C 末部位欠失変異体および C 末部位のみのオリゴペプチドを組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、両抗体による認識部位の比較を行ったところ、予想通り認識部位未同定の抗体 sc-452 は sc-593 と同様にサイクリン D2 の C 末部位を認識し、C 末 20 アミノ酸を欠く欠損変異体にはシグナルを示さなかった (図 15)。

図 14 ではサイクリン D2 抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈する cdk4 および cdk6 の量を調べたが、今度は逆にそれぞれの cdk に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈するサイクリン D2 の量について調べた。しかしながら、どちらの cdk に対する抗体を用いた免疫沈降においても共沈するサイクリン D2 の量に FSH 刺激依存性は認められず、FSH はサイクリン D2 と cdk の複合体形成を促進している訳ではないことが明らかとなった (図 16)。

そこで、図 13 および 14 で見られたサイクリン D2 の免疫沈降の効率の差は、抗サイクリン D2 抗体のエピトープ部分に対する何らかの分子の会合の違いによるものであることが考えられたため、バッファーに変性剤として 0.1% の SDS を加えて同様に免疫沈降を行ったところ、FSH 刺激の有無による免疫沈降物の量の差が認められなくなった (図 17)。

サイクリン D の細胞周期促進活性は、その発現量の変化に加え、細胞内局在によっても制御を受けることがよく知られている (Baldin *et al.*, 1993; Diehl *et al.*, 1997; Diehl *et al.*, 1998; Alt *et al.*, 2000)。そこで抗サイクリン D2 抗体 sc-593 を用いて免疫染色を行い、サイクリン D2 の局在が FSH 刺激の有無により影響を受けるかどうかについても調べることにした。その結果、アクチビン刺激から 12 時間後ではサイクリン D2 は FSH 刺激の有無に関わらず核内に優位な局在を示したが、FSH 非存在下では細胞質にサイクリン D2 のシグナルを示す細胞が多数観察されたのに対し、FSH 存在下では細胞質にシグナルを示す細胞があまり認められず、より核に限局して存在するようになることが示唆された (図 18)。

しかしながらここまでの実験から、抗サイクリン D2 抗体による認識はサイクリン D2 の C 末部位の状態変化の影響を受けることが示唆されていることより、図 18 で見られた核内サイクリン D2 のシグナルが実際の核内タンパク質存在量を反映していない可能性も考えられたため、実際に培養細胞より核抽出液を調製して Western Blotting を行った。その結果、確かに核内サイクリン D2 の存在量が上昇していることが確認された (図 19)。

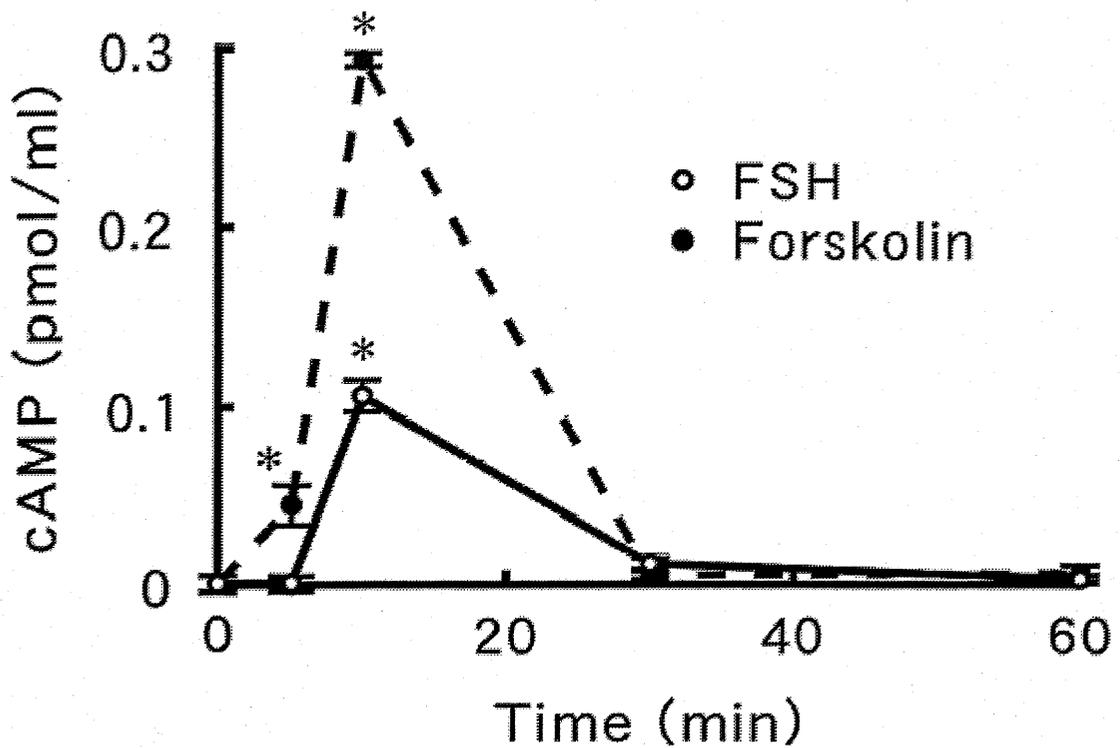


図1 FSH 応答性その1；cAMP 産生

21日齢雌ラットに4日間DES投与を行い、最終DES投与より48時間後、26日齢の時に卵巣を摘出し、顆粒膜細胞の採取を行った。2.5×10⁵ cells/cm²の密度で播種して24時間前培養を行った後、5 μg/ml インスリン、50 μM IBMXとともにFSH (100 ng/ml, —○—) またはフォルスコリン (50 μM, --●--) を添加し、0、5、10、30、60分後の細胞内cAMP濃度を、RIAにより測定した。有意差検定は、0時間での測定値に対し、有意水準5%で行った (n=3)。

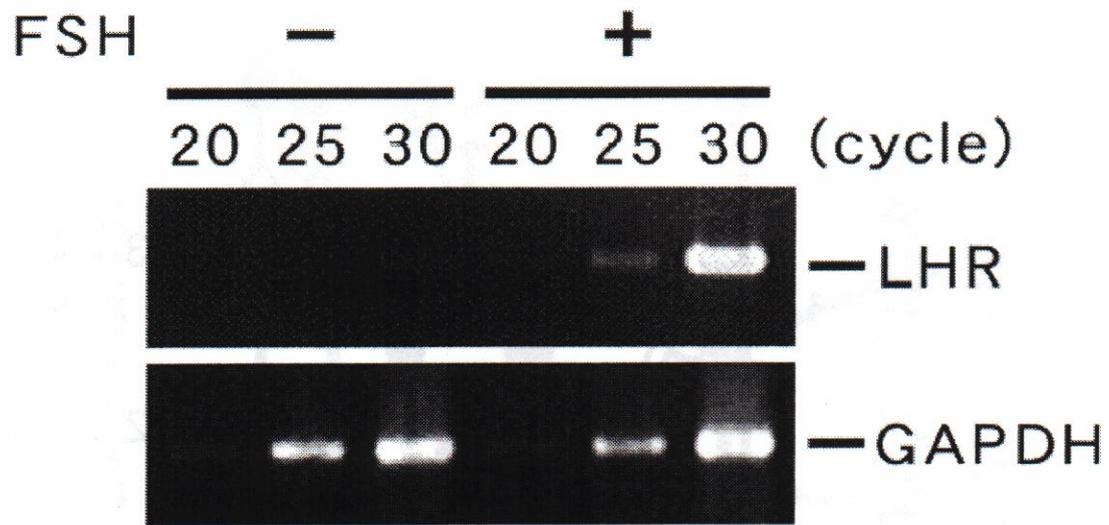


図2 FSH 応答性その2 ; LH 受容体 mRNA の発現誘導

5×10^5 cells/cm²で細胞を播種し、24時間後にインスリン (5 μg/ml) および FSH (100 ng/ml) を作用させた。刺激後24時間の細胞より全 RNA 画分を調製して cDNA を合成後、20、25、30 サイクルの PCR を行った。

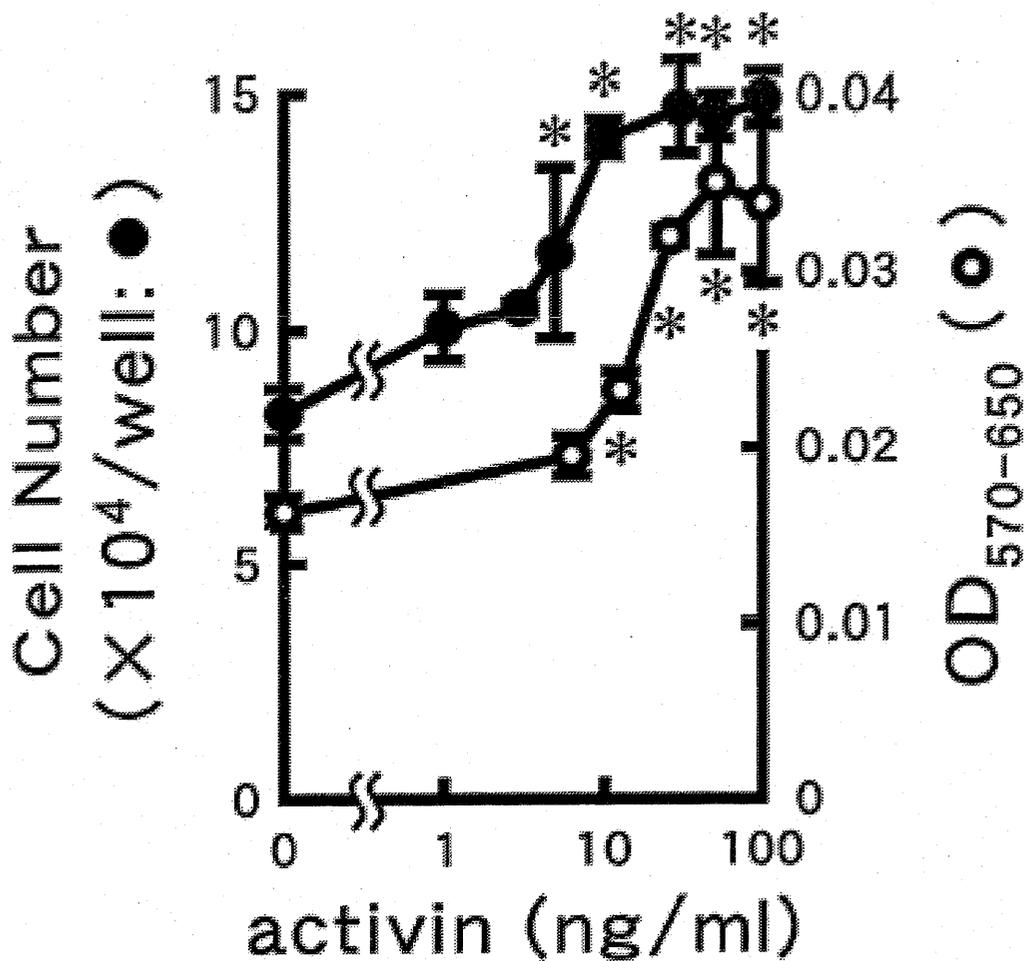


図3 アクチビンの用量依存性増殖促進作用

1.5×10⁵ cells/cm²で細胞を播種し、24時間培養後、インスリン(5 μg/ml)とともに0~100 ng/mlのアクチビンで細胞を刺激し、さらに3日間培養を行った。その後、trypan blue分染法(●、左軸、n=3)およびMTTアッセイ(○、右軸、n=5)の二種類の異なる方法により、アクチビンの細胞増殖促進作用と、その用量依存性について調べた。また、有意差検定はアクチビン無添加(0 ng/ml)時の測定値に対して行った。

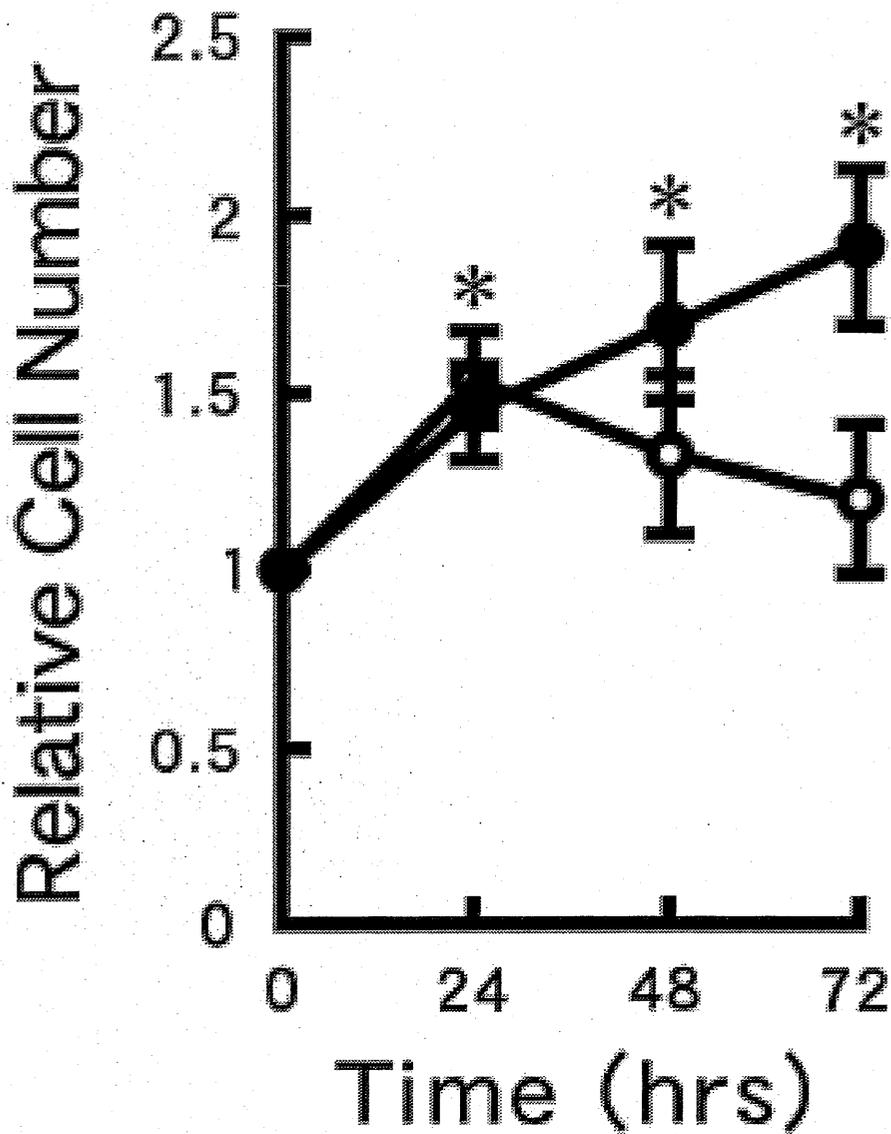


図4 アクチビン刺激時の増殖曲線

1.5×10^5 cells/cm²で細胞を播種し、24時間後にインスリン(5 µg/ml) (○)、またはインスリンおよびアクチビン(50 ng/ml) (●)による刺激を行い、刺激開始から0、24、48、72時間における細胞数の変化について、MTTアッセイにより調べた。0時間の細胞数を1とし、その測定値に対する相対値を図示した。なお、有意差検定は0時間での測定値に対して行った(n=4)。

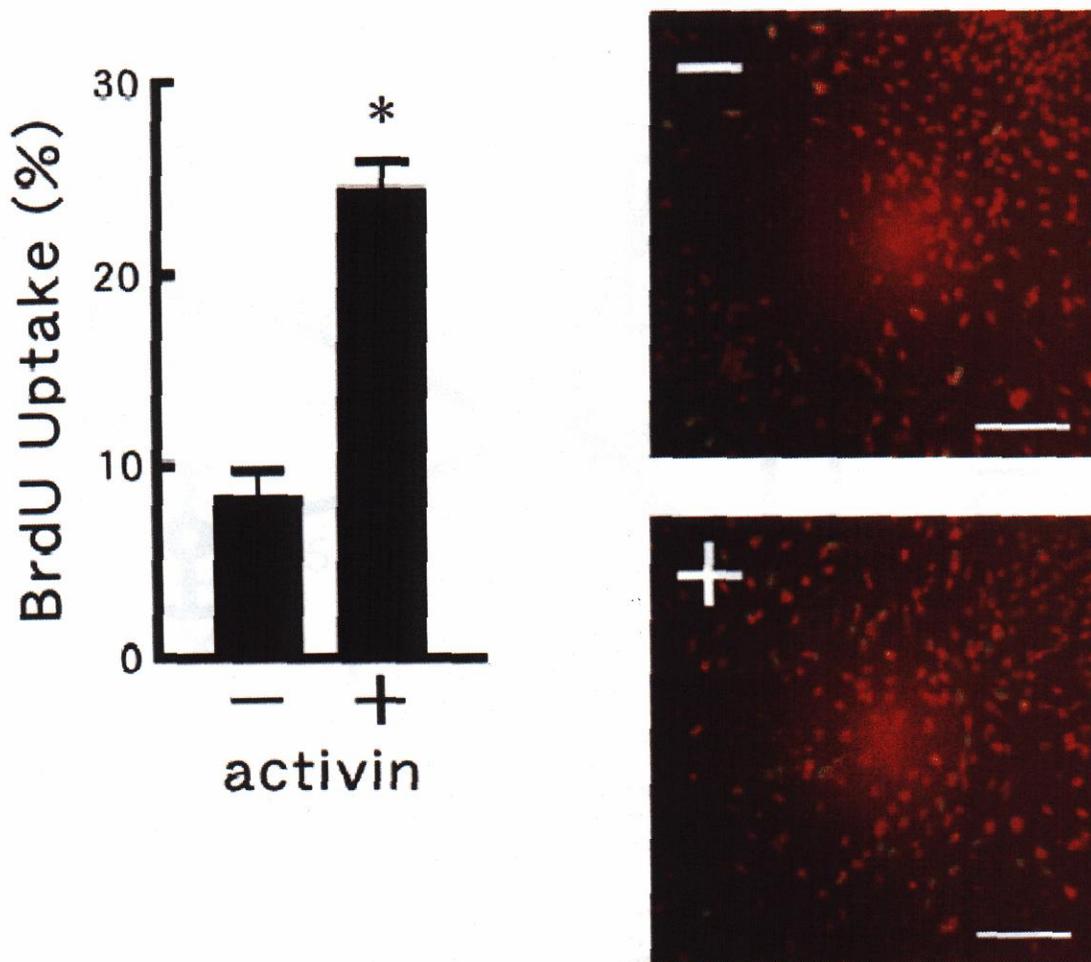


図5 アクチビン刺激時の BrdU 取り込み率

1.5×10⁵ cells/cm²で細胞を播種し、24 時間後、インスリン (5 μg/ml) および BrdU (100 μM) とともにアクチビン (50 ng/ml) を添加し、さらに 30 時間培養を行った。その後、抗 BrdU マウスモノクローナル抗体および FITC 標識抗マウス IgG 抗体を用いた間接蛍光抗体法により、BrdU を取り込んだ細胞の計数を行った。同時に全細胞の DNA を PI で染め、バンドパスフィルター BP450 - 490 を用いて励起し、FITC および PI の二重染色により黄色く染まった細胞の割合をもとめた。右側の画像は、それぞれのうちの一視野を示したもの (-; アクチビン刺激なし、+; アクチビン刺激あり) であり、左に示したのは、それらの結果をグラフ化したものである (n = 3)。なお、図中に示したスケールバーの長さは 50 μm を表す。

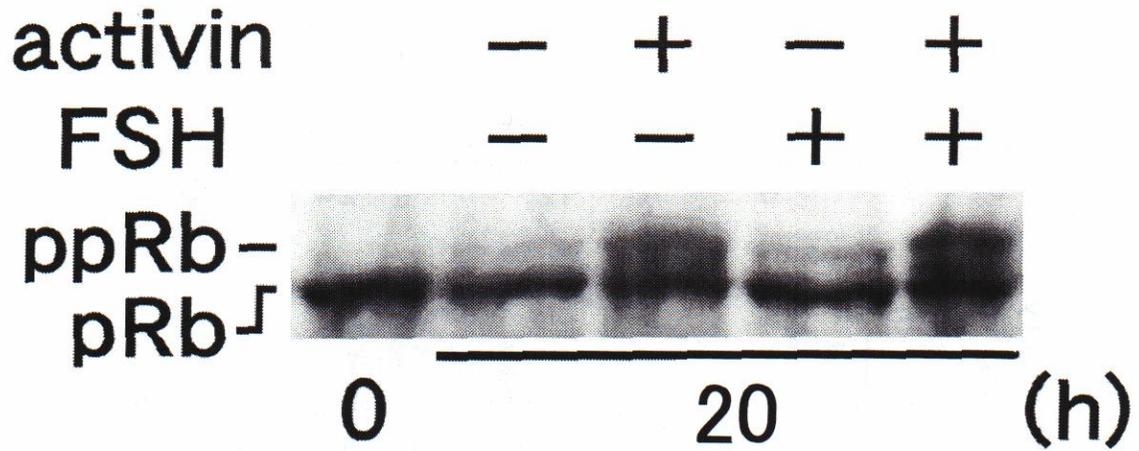


図6 増殖刺激による pRb のリン酸化状態の変化

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともに、アクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 0 および 20 時間後に細胞を回収し、抗 pRb マウスモノクローナル抗体を用いて Western blotting を行った。

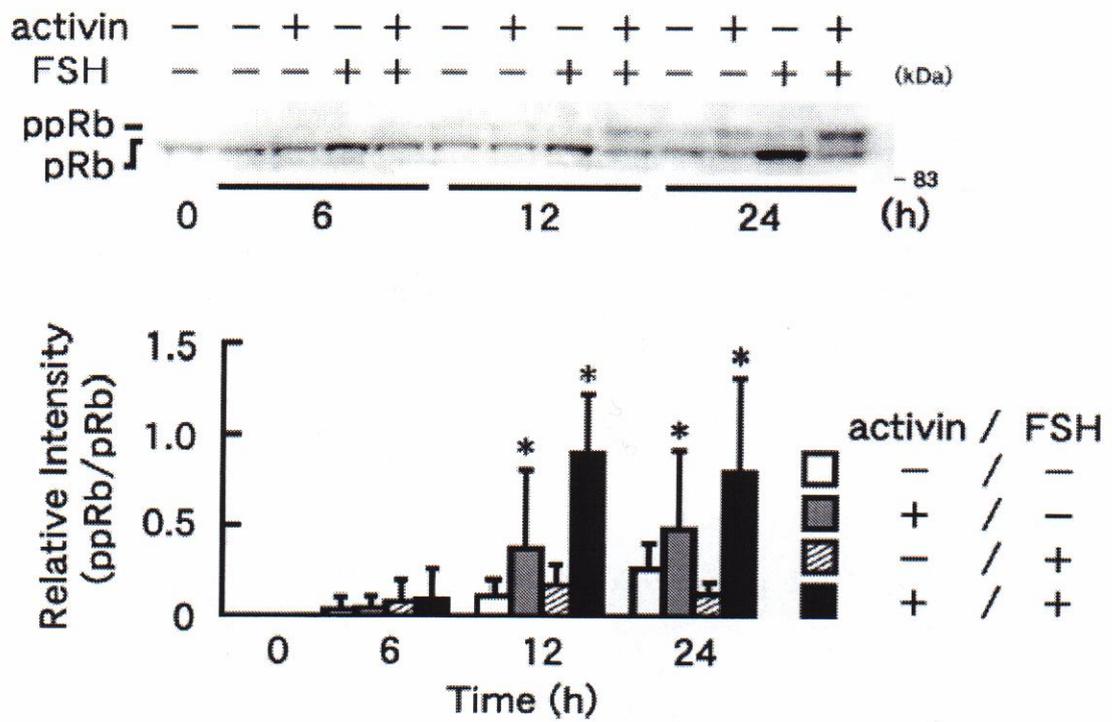


図7 pRb のリン酸化状態の経時変化

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 0、6、12、24 時間後に細胞を回収し、抗 pRb マウスモノクローナル抗体を用いて Western blotting を行った (上)。また、高リン酸化状態 (ppRb) と低リン酸化状態 (pRb) のバンド強度をもとめ、その比を計算し、図示した (下)。なお、有意差検定は 0 時間での測定値に対して行った ($n = 5$)。

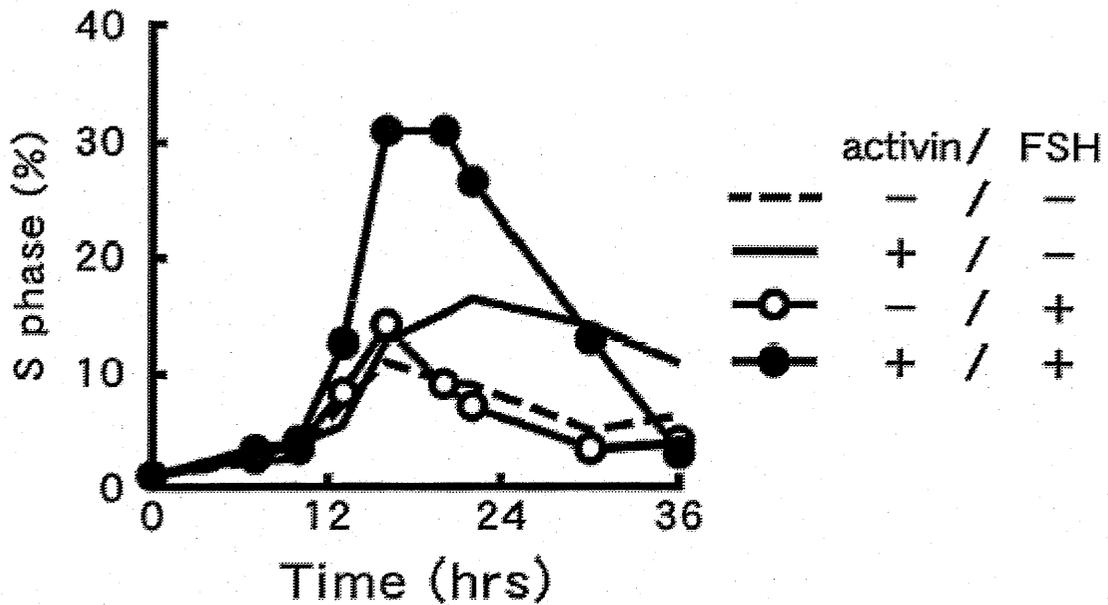


図8 フローサイトメトリーによるS期細胞の割合の経時的変化

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 0、7、10、13、16、20、22、30、36 時間後に細胞を回収して Triton 処理を行い、未固定で核内 DNA を PI 染色した。488 nm で励起し、蛍光強度に対するヒストグラムを得た後、カーブフィットにより S 期細胞の割合を計算し、その経時変化を上図に図示した。また、変動係数は $5.0 \pm 0.8\%$ であり、最大で 7.1% (アクチビン・FSH 同時刺激 36 時間後) であった。

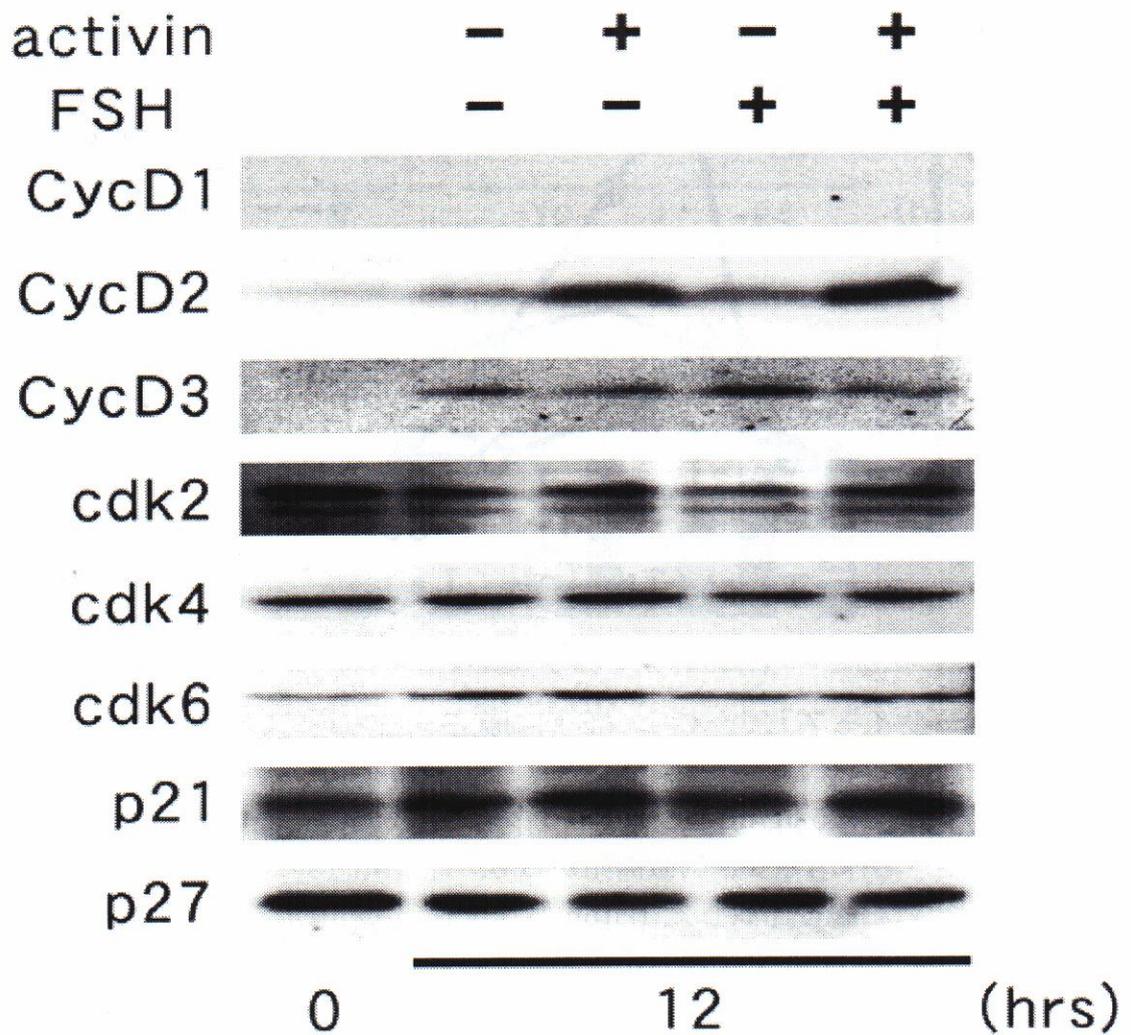


図9 増殖刺激による G1 期制御因子の発現変化

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 0 および 12 時間後に細胞を回収し、各抗体を用いて Western blotting を行った。なお、サイクリン D2 の検出にはラビットポリクローナル抗体 sc-593 を用いた。

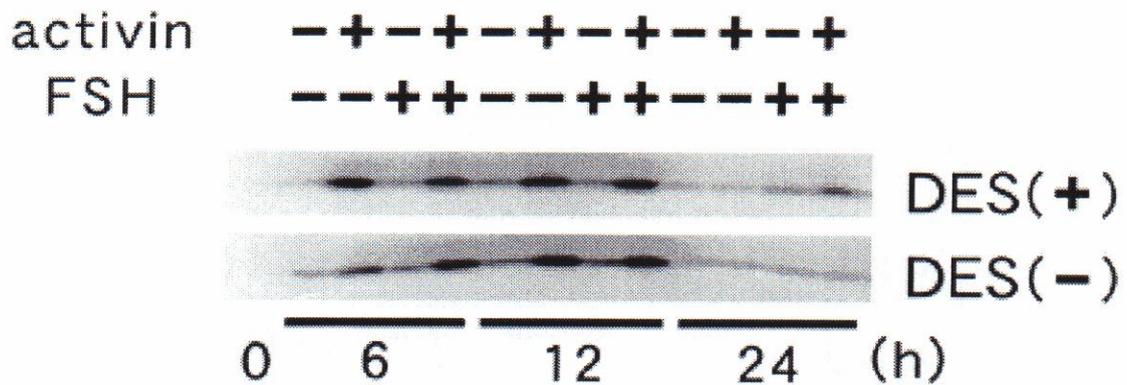


図 10 サイクリン D2 の経時的発現変化と DES 投与の影響

21 日齢ラットを購入し、うち 12 個体についてはそのまま薬剤処理を行わずに飼育を続け、残りのラットには他の実験と同様、4 日間の DES 投与を行った。DES 投与群、非投与群からの卵巣摘出と細胞の採取は同じ日（26 日齢）に行った。その後、インスリン（5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）とともにアクチビン（50 ng/ml ）または FSH（30 ng/ml ）を作用させ、刺激開始から 0、6、12、24 時間後に細胞を回収し、抗サイクリン D2 ラビットポリクローナル抗体 sc-593 を用いて Western blotting を行った。

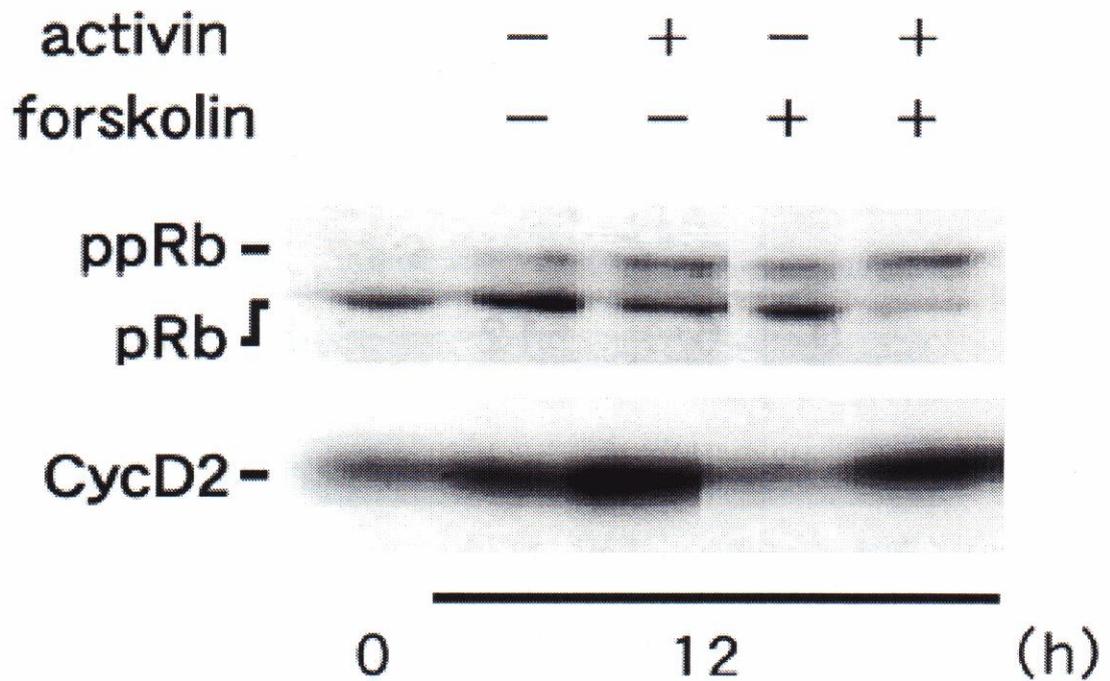


図 11 フォルスコリン刺激によるサイクリン D2 および pRb リン酸化への影響

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) またはフォルスコリン (10 μM) を作用させ、刺激開始から 0 および 12 時間後に細胞を回収した。濃縮ゲルと、7.5 %ゲルおよび 15 %ゲルから成る二段ゲルを作製し、SDS-PAGE を行った。PVDF 膜への転写後、62 kDa のマーカー付近で上下を切り離し、それぞれを抗 pRb マウスモノクローナル抗体 (上段) および抗サイクリン D2 ラビットポリクローナル抗体 sc-593 (下段) で処理し、シグナルを検出した。

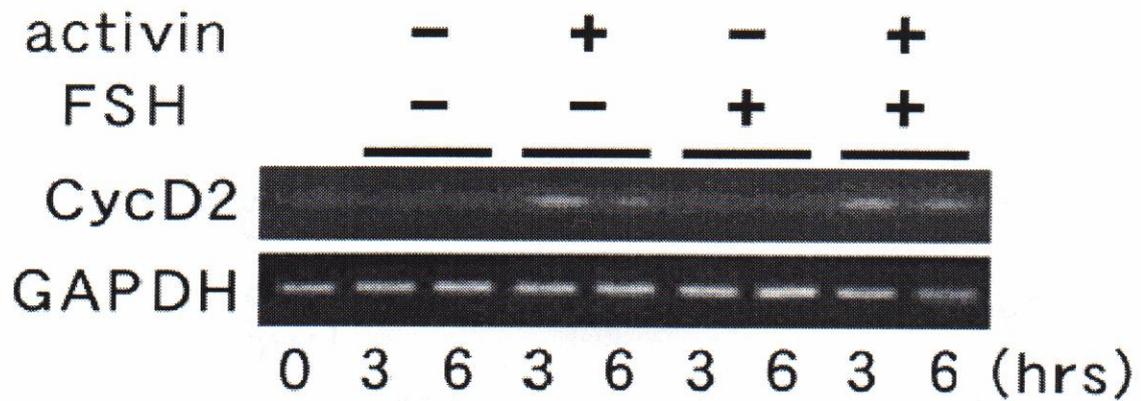


図 12 サイクリン D2mRNA の発現変化

インスリン (5 µg/ml) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 0、3、6 時間後の細胞より全 RNA 画分の調製、および cDNA 合成を行った。得られた cDNA を 1/10、1/100、1/1000 に希釈後、これらを鋳型として、サイクリン D2 (上) および GAPDH (下) に対する特異的プライマーにより、30 サイクルの PCR を行った。ここには増幅が飽和に達していない鋳型量での結果のみを示す。

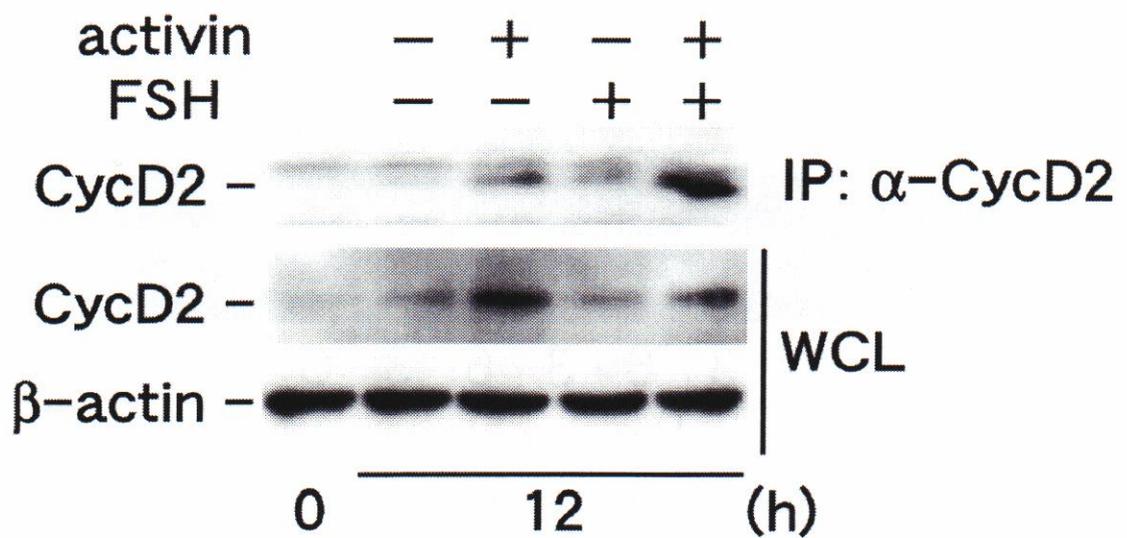


図 13 FSH に依存したサイクリン D2 の免疫沈降効率の変化

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 0 および 12 時間後に細胞を回収し、抗サイクリン D2 ラットモノクローナル抗体 sc-452 による免疫沈降を行った。その後 Western blotting を行い、免疫沈降したサイクリン D2 量の比較を行った (上)。また、同じ細胞抽出液の一部を用い、抽出液中の総サイクリン D2 量 (中) および総 β -アクチン量 (下) についても調べた。

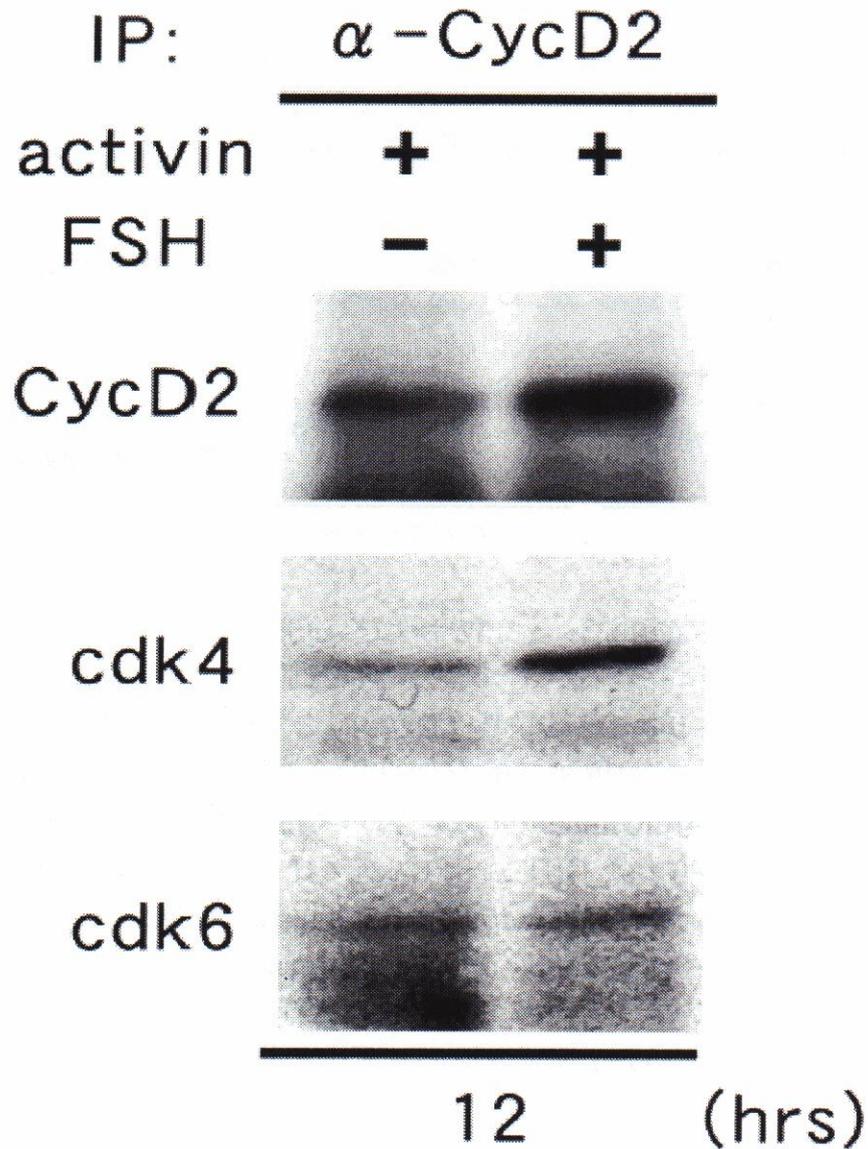


図 14 抗サイクリン D2 抗体による免疫沈降と cdk の共沈

インスリン (5 μ g/ml) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 12 時間後に細胞を回収し、抗サイクリン D2 ラビットポリクローナル抗体 sc-593 による免疫沈降を行った。その後 Western blotting を行い、免疫沈降物中のサイクリン D2 (上)、cdk4 (中)、cdk6 (下) の量について比較を行った

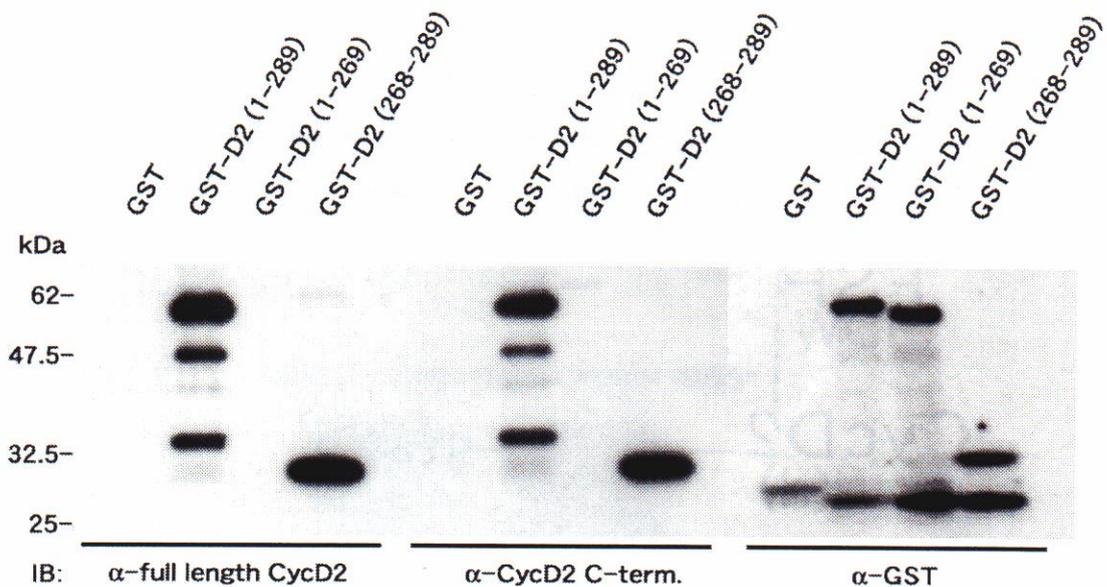


図 15 抗サイクリン D2 抗体 sc-452 および sc-593 のエピトープ部位の比較

マウスサイクリン D2 の全長 (1-289)、C 末部位欠失変異体 (1-269)、および C 末部位のみ (268-289) を GST 融合タンパク質として大腸菌 JM109 で発現させ、*glutathione*-セファロース樹脂を用いてアフィニティー精製を行った。得られた GST 融合タンパク質 (50 ng/lane) を泳動し、ラットモノクローナル抗体 sc-452 (α -full length CycD2)、ならびにウサギポリクローナル抗体 sc-593 (α -CycD2 C-term) を用いて Western blotting を行い、両抗体の認識パターンの比較を行った。また、抗 GST 抗体を用い、各レーンの GST 融合タンパク質の相対量についても確認を行った。

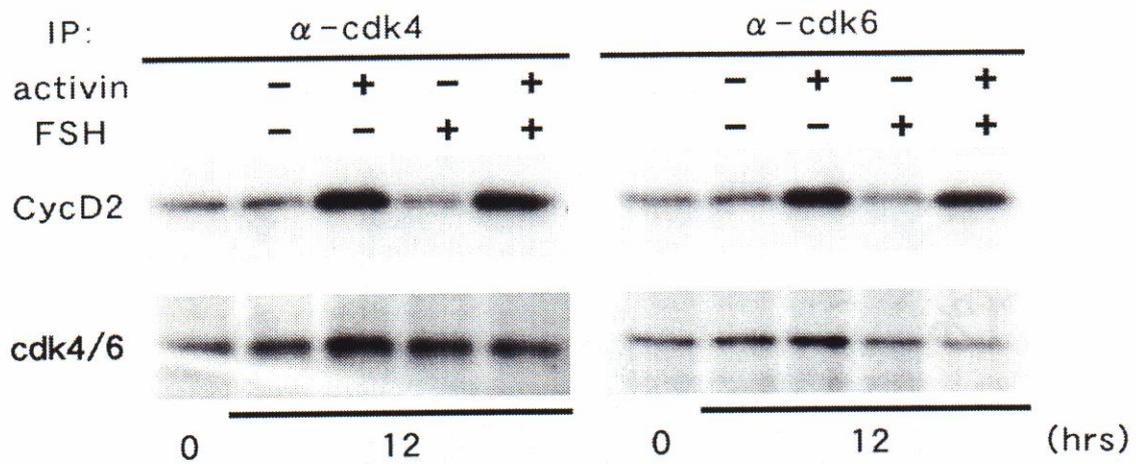


図 16 抗 cdk 抗体による免疫沈降とサイクリン D2 の共沈

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 0、12 時間後に細胞を回収し、抗 cdk4 ラビットポリクローナル抗体 (左) または抗 cdk6 ラビットポリクローナル抗体 (右) による免疫沈降を行った。その後 Western blotting を行い、免疫沈降物中のサイクリン D2 (上)、cdk4 または 6 (下) の量について比較を行った。

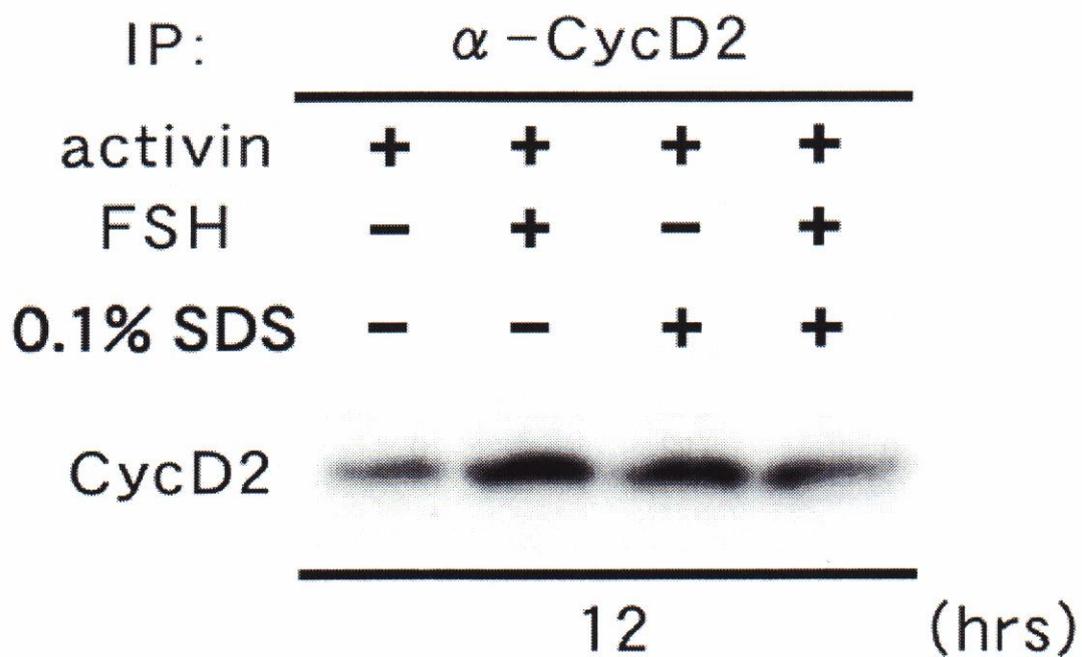


図 17 0.1 % SDS 存在下でのサイクリン D2 の免疫沈降

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 12 時間後に細胞を回収し、0.1 % SDS 存在下または非存在下で抗サイクリン D2 ラビットポリクローナル抗体 sc-593 による免疫沈降を行った。その後 Western blotting を行い、免疫沈降物中のサイクリン D2 の量について比較を行った

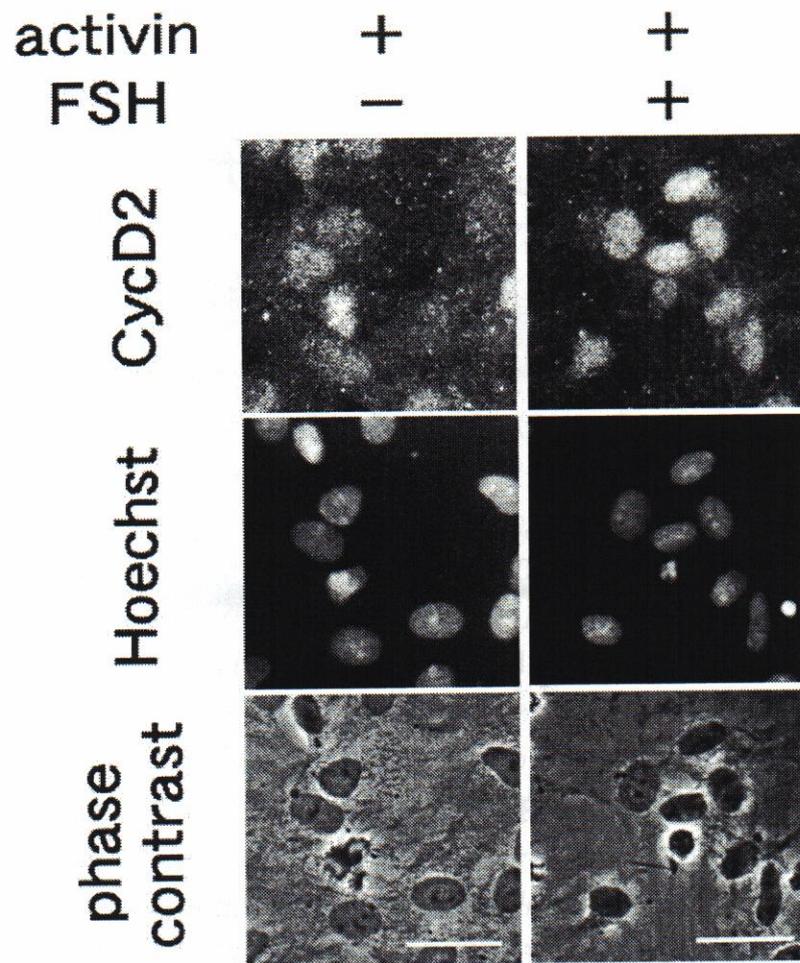


図 18 FSH 刺激にともなうサイクリン D2 の細胞内局在変化

細胞を poly-D-lysine 処理したカバースリップ上に 1.5×10^5 cells/cm² で播種し、前培養後、インスリン (5 μg/ml) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させた。刺激開始から 12 時間後に抗サイクリン D2 ラビットポリクローナル抗体 sc-593 を用いて免疫染色を行い、サイクリン D2 の細胞内局在を調べた (上)。その際、同時に Hoechst 33342 を用い、核 DNA についても染色を行った (中)。下は位相差像であり、図中に示したスケールバーの長さは 20 μm を表す (下)。

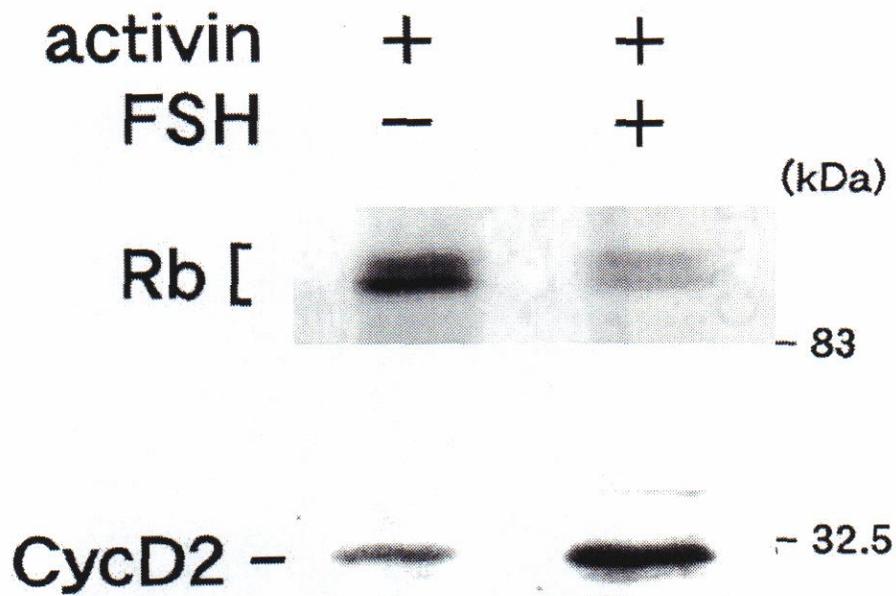


図 19 FSH 刺激にともなう核内サイクリン D2 量の上昇

インスリン (5 $\mu\text{g/ml}$) とともにアクチビン (50 ng/ml) または FSH (30 ng/ml) を作用させ、刺激開始から 12 時間後に細胞を回収し、核抽出液調製後、抗サイクリン D2 ラビットポリクローナル抗体 sc-593 を用いて Western blotting を行い、サイクリン D2 の核内存在量を調べた (下)。上は内部標準として用いた pRb である (上)。

考察

アクチビンと FSH の雌性生殖における重要性は、いくつかのトランスジェニックマウスを用いた研究から明らかとされている。しかしながら序論で述べた通り、アクチビンの卵胞発育過程における役割をより詳細に理解するためには、さらに別の系での研究が必要である。このような考えに基づき、本研究ではアクチビンの生理的作用のうち、顆粒膜細胞の増殖促進作用に注目し、この点に関する研究を初代細胞の無血清単層培養系を用いて行った。

顆粒膜細胞の増殖過程におけるサイクリン D2 の関与は、サイクリン D2 欠損マウスの解析から既に明らかとされていた (Sicinski *et al.*, 1996)。顆粒膜細胞におけるサイクリン D2 の誘導作用を持つ因子として、これまでに FSH およびエストロゲンが知られていた (Sicinski *et al.*, 1996; Robker *et al.*, 1998a)。FSH やエストロゲンは、卵胞腔形成とそれ以後の増殖過程に必要とされる重要な因子である (Kumar *et al.*, 1997; Dierich *et al.*, 1998; Burns *et al.*, 2001)。しかしながら、サイクリン D2 欠損マウスでは卵胞腔形成前の preantral follicle の顆粒膜細胞にも増殖不全が認められることや、FSH β サブユニット欠損マウスの卵巣においてもサイクリン D2 の発現が認められることから、FSH やエストロゲン以外にもサイクリン D2 を誘導し、顆粒膜細胞の増殖を賦活する因子があることが予想された (Sicinski *et al.*, 1996; Burns *et al.*, 2001)。この点に関して、本研究においてアクチビンがサイクリン D2 の誘導能を示したことは、サイクリン D2 欠損マウスや FSH β サブユニット欠損マウスで見られた表現型を解釈する上でも非常に意義のあるものと思われ、おそらく preantral follicle の顆粒膜細胞では、アクチビンか、これと類似的作用を示す TGF- β ファミリー因子が作用し、サイクリン D2 の誘導を介して細胞の増殖を促進しているものと考えている。

また本研究では、インスリン刺激によって顆粒膜細胞でサイクリン D3 が誘導されることも見出した。サイクリン D2 欠損マウスの卵巣の顆粒膜細胞は増殖能が著しく低下してはいるが、卵胞培養を行った場合、サイクリン D2 欠損マウスでも多少の増殖が認められている。また、組織切片の preantral follicle を見ても、10 層にまで多層化したヘテロ体の顆粒膜細胞には劣るものの、それでも 4 層程度までの多層化は認められている。このことより、サイクリン D2 欠損マウスで認められたわずかな顆粒膜細胞の増殖は、インスリンなどの刺激によって誘導されるサイクリン D3 によるものである可能性も考えられる (Sicinski *et al.*, 1996)。実際、サイクリン D3 は生後間もないごく初期の卵胞の顆粒膜細胞において発現しているが、その後は卵胞の発育とともに次第に発現が低下することが報告されており、サイクリン D3 は卵胞発育過程のごく初期の顆粒膜細胞の増

殖に寄与していることが推察される (Zhang *et al.*, 1999)。このことから、実際の卵巣におけるインスリンや類似作用を持つ因子の顆粒膜細胞への寄与はごく初期に限定され、その増殖促進活性自体も比較的小さいことが予想されるとともに、本研究におけるサイクリン D3 依存性増殖を示す初期卵胞由来の顆粒膜細胞の混入の影響は、サイクリン D2 依存的な増殖活性に比べた場合、比較的小さかったものと考えられる。

本研究では、アクチビンによる細胞増殖刺激効果とこれに対する FSH の協同効果によって、刺激後 12 時間付近で細胞が S 期に進行することが見出された。一方、El-Hefnawy らが DES 未処理の 3 週齢ラットを用いて行った実験によると、アクチビンおよび FSH は、同時に作用させた場合にのみサイクリン D2 や PCNA を誘導して顆粒膜細胞を増殖させるが、それぞれの因子単独ではサイクリン D2 誘導能がないとする報告を行っており、本研究と矛盾する結果を示している (El-Hefnawy *et al.*, 2001)。本研究では、アクチビンは DES 処理の有無に依らずサイクリン D2 を誘導することも示し、El-Hefnawy らとの結果の違いは実験系の違いによるものでないことが証明された。

彼らは本研究と同様に needle pricking により顆粒膜細胞調製後、10%血清を含む培地で一晩かけて細胞を培養容器に接着させ、翌日上清を除いて無血清培地に置き換え、さらに 24 時間前培養を行った後、アクチビンや FSH を含む培地に置き換え、そこから 48 時間刺激を行った細胞について解析を行っている。本研究では 24 時間以内のサイクリン D2 の発現変化について経時的に解析を行ったが、彼らの研究で調べられているのは 48 時間後の一点のみで、他の時間帯については言及していない。しかも彼らは、サイクリン D2 や PCNA という細胞周期依存的に増減する因子の発現を、ステロイド合成系の酵素や LH 受容体といった分化状態依存的に発現する因子と同列に比較しているが、この比較はあまり意味をなさない。実際、本研究においても、サイクリン D2 の発現は増殖刺激後 24 時間で消失しているのが見られており、48 時間目には細胞周期は一周以上していることが予想される。

アクチビンは顆粒膜細胞に対して FSH 受容体誘導作用を示すことが知られていることから、アクチビン刺激後 48 時間以内に FSH 応答性は著しく増強されていることが予想される (Hasegawa *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995)。一方でアクチビンや FSH は顆粒膜細胞に作用し、アクチビン阻害因子フォリスタチンを誘導することが知られている (Shintani *et al.*, 1997)。加えて顆粒膜細胞では抑制型 Smad である Smad6 および Smad7 が発現していることが知られている (Drummond *et al.* 2002)。抑制型 Smad は、I 型受容体による Smad のリン酸化を阻害する他、核内ではヒストン脱アセチル化酵素

HDAC や共役転写抑制因子 Hoxc-8 などと複合体を形成して転写抑制にも関与する因子であり、Smad 経路依存的に転写誘導されることが知られている (Moustakas *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2002)。よってアクチビン刺激を受けた顆粒膜細胞の細胞内では、Smad6, 7 を介したネガティブフィードバックループが形成されているものと考えられる。また、アクチビンや FSH を含む多くの因子がインヒビンの分泌も促進することが知られており、さらにインヒビンは β -glycan などとの結合を介し、顆粒膜細胞に対するアクチビンの作用に拮抗的に働くことも示唆されている (LaPolt *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2001)。このような知見に基づき、アクチビンの顆粒膜細胞に対する作用を抑制する機構が卵胞発育過程の進行とともに何重にも作用するようになり、次第に減弱に向かうとする考え方が提唱されている (Shintani *et al.*, 1997)。このため、48 時間後のアクチビン応答性は刺激後 24 時間以内と比べて低下しており、逆に FSH 応答性は確実に増強されているものと考えられる。よって、アクチビンによって誘導されたサイクリン D2 は刺激後 24 時間以内に分解され、48 時間後にはアクチビン応答性の低下によりサイクリン D2 の誘導が検出されないが、FSH をともに作用させた場合、アクチビンによる FSH 応答性亢進により、FSH 依存的なサイクリン D2 の誘導が検出されたのではないかと考えている。FSH 依存的なサイクリン D2 の誘導効果については後程考察する。

アクチビンのサイクリン D2 誘導の経路について考えてみたい。アクチビン受容体下流のシグナル伝達経路は、主に Smad 経路の活性化によって行われている。アクチビンは顆粒膜細胞の cAMP 産生に変化を及ぼさないことは、RIA による細胞内 cAMP の定量によって実際に確かめられている (Nakamura *et al.*, 1994)。一方、腎メサンギウム細胞において、TGF- β により cAMP 非依存的に PKA が活性化され、ファイブロネクチン産生を行うことが報告されている (Wang *et al.*, 1997)。しかしながら、本研究でフォルスコリン刺激によってもサイクリン D2 の誘導が認められなかったことから、アクチビンによるサイクリン D2 の誘導には PKA 経路の関与は否定され、Smad 経路など、PKA 経路以外のシグナル伝達経路が重要であるものと推察される。

最近、ヒト顆粒膜細胞株 KGN を用いたアクチビンシグナル経路に関する研究報告がなされた (Mukasa *et al.*, 2003)。それによると、KGN 細胞では ActRIA/ALK2 と ActRIIB の発現量が高く、ActRIB/ALK4 および ActRIIB の 8 倍の mRNA を発現しているとされている。また、KGN 細胞は TGF- β に対して応答するもののアクチビン応答性がそれほど高くはなかったが、ALK4 や Smad2 の過剰発現によりアクチビン応答性が強められ、ALK2 や Smad3 を過

剰発現した場合では同様の効果は認められなかったとされている。アクチビンは幼若個体の顆粒膜細胞の増殖を惹起するが、成熟個体に対しては同様の効果を示さないことは既に述べたとおりである。KGN細胞は成体由来の細胞であることから、アクチビンの年齢依存的な顆粒膜細胞増殖促進作用は受容体の発現レベルで調節を受けており、下流のシグナル伝達では Smad2 が中心的役割を担っていることが示唆されたが、生体内でも同様の機構が作用しているのか、初代培養細胞や *in vivo* での解析によって整合性を確認する必要性がある。

遺伝子破壊マウスの研究では、Smad2 および Smad4 の欠損マウスは発生過程で致死となるため、生後の卵巣における機能については別の手段による解析が待たれるが、Smad3 の exon 8 欠損マウスは不妊であり、卵巣内の原始卵胞の数が野生型に比べて多く、卵胞発育の初期過程に遅延が認められることが報告されている (Tomic *et al.*, 2002)。Smad は CAGAC という DNA 配列を認識して結合し、標的遺伝子の転写を正または負に関与することが知られている。そこで、ラット (U87099)、マウス (AF015788)、ヒト (U47284) のサイクリン D2 プロモーターについて、CAGAC 配列を検索してみた結果、いずれのサイクリン D2 プロモーター上においても同様の配列を見出すことが出来たのに加え、この周辺の配列は種間で非常によく保存されていた。このことは Smad によるサイクリン D2 の転写制御機構が種を超えて存在していることを示唆しているのかも知れない。しかしながら、CAGAC という短い配列はゲノム上のいたる所に存在しており、実際の Smad による転写制御には、Smad と複合体を形成し得る様々な転写因子との共役が重要とされる (Moustakas *et al.*, 2001)。

卵胞発育過程における TGF- β ファミリーの重要性については数多くの研究が行われているにも関わらず、その際の Smad に関する研究はあまり進んでいない。そのため現在までに同定されている多くの Smad との共役因子に関しても、「卵胞発育における Smad との共役作用」という観点から研究が行われた例はない。しかしながら、最近報告された一連のフォークヘッドファミリー転写調節因子 (FKHR/FOXO1, FKHL1/FOXO3, AFX/FOXO4, FOXL2) の顆粒膜細胞における発現は、同じフォークヘッド因子 FAST-1 や FAST-2 が代表的な Smad の共役因子であることや、顆粒膜細胞に対する TGF- β ファミリー因子の作用などから考えると、非常に興味深い報告である (Crisponi *et al.*, 2001; Richards *et al.*, 2002)。

FOXO1, 3, 4 については、その発現やリン酸化が FSH やエストロゲンなどによる制御を受けていることが報告されている (Richards *et al.*, 2002)。また最近、FOXO3a 遺伝子欠損マウスが作成され、このマウスが異常な卵胞発育亢進の結果、早期卵胞閉鎖が頻発して加齢依存的に不妊に陥ることが見出され、卵胞発育の開始・進行に抑制的に作用していることが報告された (Castrillon *et al.*,

2003)。

これら FOXO サブファミリーの研究報告に加え、他のフォークヘッド因子サブファミリーに属す FOXL2 についても興味深い報告がなされている。FOXL2 は BPES 症候群 blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome の原因遺伝子として同定されたが、その発現は発生過程では眼瞼に、そして出生後では顆粒膜細胞に限局していることが報告されている。BPES 症候群では眼瞼異常が認められるが、アクチビン β B 欠損マウスが眼瞼形成異常を呈することを考え合わせると、FOXL2 がアクチビンのシグナル伝達に関与している可能性も推察される (Vassalli *et al.*, 1994)。また FOXL2 は、インヒビン α や FSH 受容体、LH 受容体などとともに、早期卵巣機能廃絶症 premature ovarian failure という卵巣発育不全による不妊症の原因遺伝子の一つであることが報告されている (Harris *et al.*, 2002)。これらの知見より、出生後に卵巣特異的な発現パターンを示す FOXL2 は、Smad とともにアクチビンや他の TGF- β ファミリーのシグナル伝達に関与して卵巣発育過程に重要な役割を担っていることが予想されることから、卵巣内における FOXL2 の機能解析が待たれる (Prueitt *et al.*, 2001)。

一方、顆粒膜細胞におけるサイクリン D2 の転写調節に関しては、当初 FSH 刺激やフォルスコリン刺激による誘導が Richards らのグループにより報告されており、PKA 経路依存的であるとされていた (Sicinski *et al.*, 1996; Robker *et al.*, 1998a)。本研究で用いた実験系において、cAMP 産生や LH 応答性、アクチビンとの協同的な細胞増殖促進、さらにはコネクシン 43 のリン酸化制御など、多くの面から FSH 応答性が確認されていることより、細胞の FSH 応答性自体に問題があった訳ではないと言える (Yogo *et al.*, 2002)。にも関わらず、本研究では FSH 刺激でもフォルスコリン刺激でも、サイクリン D2 の誘導は認められなかった。

本研究が既報の FSH 依存的なサイクリン D2 の転写調節と食い違う結果となった原因について、現時点では正確にはよく判らないものの、いくつかの可能性は挙げられる。最も考えられる原因として、解析を行った時間の問題がある。Robker らは、FSH 以外にエストロゲンにも顆粒膜細胞に対するサイクリン D2 誘導作用があることを報告しているが、その際、誘導されるサイクリン D2 発現量の経時的変化が異なることを見出している (Robker *et al.*, 1998a)。彼らの報告によれば、サイクリン D2 は *in vivo* での FSH 刺激後 2 時間で速やかにピークに達するが、12 時間後では再び基底レベル近くにまで減少するのに対し、エストロゲンは 2 時間後以降にピークがあり、発現レベルの経時的変化は FSH の場合よりも緩やかであり、本研究でのアクチビンの場合に近い。*in vitro* では、Robker らの他にもいくつかのグループが、FSH 刺激後速やかにサイクリン D2

mRNA の発現レベルが上昇することが報告されているが、タンパク質レベルでの報告はなされていない。本研究では 2 時間後のタンパク質量の変化は調べていないが、仮にこの時点で既報と同様のサイクリン D2 の発現誘導が検出されたとしても、フローサイトメトリーや BrdU 取り込み率の変化から FSH 単独では細胞増殖がそれほど顕著でなかったことより、FSH 刺激後 2 時間で誘導されるサイクリン D2 は、細胞増殖促進とは別の機能を担っている可能性がある。細胞増殖に寄与しないサイクリン D2 の誘導に関しては、リポポリサッカリドやインターフェロニン γ などで刺激されたマクロファージの系などで報告があるが、その生理的意義についてはよく解っていない (Vadiveloo *et al.*, 1998; Dey *et al.*, 2000)。他の可能性として、用いた FSH の濃度や非活性の差も考えられる。Robker らは顆粒膜細胞に 100 ng/ml の FSH を作用させているのに対し、本研究では 30 ng/ml で実験を行った。このため、FSH が用量依存的にサイクリン D2 の誘導を行っており、30 ng/ml ではサイクリン D2 誘導能が極めて低く、本研究では検出されなかったのかも知れない。この他の可能性として、実際には FSH による誘導が多少起こっていたとしても、アクチビンのサイクリン D2 誘導作用が FSH の作用よりもはるかに強かったため、相対的に見て有意とは認められなかったことも考えられる。

上述した通り、FSH 以外にエストロゲンにもサイクリン D2 誘導作用があることが報告されているが、エストロゲン産生を行うアロマターゼの発現は FSH の制御下にあること、エストロゲン受容体 (ER) α および ER β の二重欠損マウスでは顆粒膜細胞の増殖能が低下することなどから考えて、エストロゲンは FSH 刺激によるサイクリン D2 の誘導に関与し、結果的に顆粒膜細胞の増殖にも重要な役割を果たしていることが推察されるが、それ以前の FSH 非依存性増殖過程でのサイクリン D2 の発現制御に重要であるとは考えにくく、そこで見られるサイクリン D2 の誘導は他の増殖因子によるものであることが考えられる (Dupont *et al.*, 2000)。しかしながら、現在までにそのような他の増殖因子によるサイクリン D2 の誘導に関しては、本研究以外では報告されていない。また本実験ではエストロゲンの前駆体となるアンドロゲンなどのステロイドを培地に添加していないことより、仮に本研究で用いた実験系においてエストロゲン合成経路が活性化していたとしても、アクチビンのサイクリン D2 誘導作用にエストロゲンが関与する可能性は低い。

いずれにせよ顆粒膜細胞におけるサイクリン D2 の転写調節機構については、アクチビンや PKA 経路による制御を含め、プロモーターアッセイなどによるより詳細な解析を行う必要がある。

三種のサイクリン D の冗長性については永らく不明であったが、最近の研究で Ciemerych らは、三種のサイクリンのうち二つを欠失させて一種類のサイク

リン D のみしか発現出来ないようにしたマウスを D1、D2、D3 それぞれについて作成し、解析した結果を報告している (Ciemerych *et al.*, 2002)。それによれば、本来の発現部位ではない臓器においても残されたサイクリン D が異所的に誘導されるため、どの単一サイクリン D 発現マウスでも発生過程は進行して生まれるところまでは来ることが報告されている。これらのマウスでは生後の発育には問題が生ずるが、単一サイクリン D のみの異所性発現によって発生過程が進行し、生後の死因となる特定臓器の発育不全はサイクリン D の異所的発現レベルが不十分であったためであることも示されており、三種のサイクリン D は機能的には相互に補完可能であることが示唆された。すなわち、組織特異的な各サイクリン D の役割を理解するためには、サイクリン D のタンパク質レベルでの解析よりも組織特異的な転写調節機構を理解することが重要であると考えられ、今後のサイクリン D に関する研究の多くは、組織特異的発現制御機構の解析が主流となるものと思われる。こうした点からも、顆粒膜細胞におけるサイクリン D2 の転写制御機構は、発育段階特異的な顆粒膜細胞の増殖制御機構を理解する上で、今後の最も重要な課題と言える。

cdk4 欠損マウスの雌では生殖機能の低下が認められるが、成熟卵胞の形成までの卵胞発育過程自体にはあまり影響が見られない (Rane *et al.*, 1999; Tsutsui *et al.*, 1999; Moons *et al.*, 2002a)。また本研究で、サイクリン D2 が cdk4 と cdk6 とも複合体を形成していることが明らかとなった。これらの知見より、顆粒膜細胞の増殖過程には cdk4, 6 の両方が関与しているものの、少なくとも cdk4 の機能は cdk6 で代償可能であるものと考えられる。

しかしながら、本研究では FSH のサイクリン D2-cdk 複合体に対する作用はサイクリン D2/cdk4 複合体に優位に認められたことより、cdk4 は顆粒膜細胞の FSH 依存的な増殖過程において、cdk6 よりも重要であることが推察される。この点に関しては、cdk4 欠損マウスの卵巣は野生型に比べて 20%ほど小さいことや、PMSG 処理 (*in vivo*での FSH 刺激に相当) によって卵胞の発育は進むが、形成される preovulatory follicle の数は野生型に比べて 30%ほど少なく、その大きさも小さいことが報告されている (Moons *et al.*, 2002a)。このことより、顆粒膜細胞の FSH 依存性増殖過程においては cdk4 が cdk6 よりも優位に機能しているものと思われる。図 19 で、FSH 未刺激時の核画分に検出された弱いサイクリン D2 のシグナルは、そのほとんどが cdk6 との複合体なのかも知れない。なお、cdk4 と cdk6 の機能的差異についてはあまり多くは知られていないが、一般にキナーゼ活性の測定時、cdk4 と cdk6 は界面活性剤に対する感受性に異なることが知られていることから、やはり何らかの機能的差異が存在するのであろう。また、C/EBP α が cdk4 および cdk2 の活性を阻害するのに対し、

cdk6 の活性は阻害しないとする報告は、C/EBP α および C/EBP β の卵胞発育制御への関与を示唆する報告も過去になされている点から考えると興味深い (Piontkewitz *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001)

BrdU の取り込み率の測定やフローサイトメトリーから、アクチビンによる顆粒膜細胞の増殖は 30%程度の細胞でしか認められなかった。卵胞内には様々な発育段階の卵胞が存在している。本研究で用いたラットの卵巣が preantral~antral follicle を多く含むことは、本研究と同様の DES 投与 3 週齢ラットの卵巣を用いた実験系で行われた研究の組織切片像などからも明らかであり、ある程度は同調的に発育を進行しているものと考えられる (Li *et al.*, 1998)。しかし、全ての卵胞を完全に同調させることは困難であると思われ、ある程度の幅での発育段階のばらつきは止むを得ない。また、個々の卵胞内においても顆粒膜細胞の分化状態は内層と外層では異なっていることが予想される。この点に関して言えば、例えば卵母細胞から分泌される GDF9 や BMP15 は顆粒膜細胞の FSH 応答を抑制して分化を阻害する作用があるため、卵母細胞に近い内層側と外層側の顆粒膜細胞では FSH 応答性に差が生じ、この差が結果的に卵丘細胞や他の顆粒膜細胞の機能的な差となり、それぞれを特徴付けていることが示唆されている (Vitt *et al.*, 2000; Otsuka *et al.*, 2001a)。よって、本研究において細胞の増殖が一部の細胞でしか見られなかった理由は、おそらくアクチビンや FSH に対する応答性に個々の細胞で差があったためであり、また、このことが結果的に倍化時間に 3 日を要したことにつながったのではないかと考えている。一方、卵巣の ALK4 発現量は日齢が進むに従って低下することや、DES 処理により II 型アクチビン受容体の低下が認められたことなどが報告されており、これらも増殖刺激に対する応答性の低さと関係があるのかも知れない (Findlay *et al.*, 2001; Drummond *et al.* 2002)。

抗サイクリン D2 抗体を用いた免疫沈降実験より、サイクリン D2 に相互作用する何らかの因子の FSH 刺激依存的な解離、もしくは FSH 刺激依存的な間接的なサイクリン D2 の構造変化が示唆された (図 20A)。図 13 で用いた sc-452 抗体はサイクリン D2 全長を免疫して作成されたものであるが、図 15 より、その認識部位としては C 末 21 アミノ酸領域のみで十分であった。このことより、FSH によってサイクリン D2 から解離すると考えられる因子は、sc-452 および sc-593 の認識部位であるサイクリン D2 の C 末 20 アミノ酸部分に結合していることが推察される。サイクリン D2 の C 末 20 アミノ酸部分は、サイクリン D1 では細胞内局在および分解に重要とされる部位に相当する (図 20B)。この部分に位置するサイクリン D1 の 286 番目のスレオニン (Thr-286) は、glycogen

synthase kinase-3 β (GSK-3 β) によって S 期に核内でリン酸化されることが知られており、Thr-286 のリン酸化を受けたサイクリン D1 は CRM1 依存的に核外に移行し、細胞質で 26S プロテアソーム依存的に分解を受けることが明らかとされている (Baldin *et al.*, 1993; Diehl *et al.*, 1997; Diehl *et al.*, 1998; Alt *et al.*, 2000)。この GSK-3 β による Thr-286 リン酸化依存的なサイクリン D1 の分解は、cdk と複合体形成していない単量体サイクリン D1 と GSK-3 β との反応性の低さから cdk との複合体に特異的な経路であり、単量体サイクリン D1 のユビキチン化と分解には別の経路が関与している模様である (Germain *et al.*, 2000)。また、リン酸化セリン/スレオニン依存性プロリルイソメラーゼ Pin1 も Thr-286 リン酸化サイクリン D1 と結合し、核局在の促進や分解の阻害に作用することが知られている (Liou *et al.*, 2002)。この他、cdk インヒビター p21^{Cip1} および p27^{Kip1} などは、GSK-3 β によるサイクリン D1 のリン酸化には影響しないが、CRM1 とリン酸化サイクリン D1 との相互作用を阻害するため、結果的にサイクリン D1 の核局在に寄与していることが示唆されている (Alt *et al.*, 2002)。サイクリン D1 の GSK-3 β リン酸化部位はサイクリン D2 においてもよく保存されていることから、サイクリン D2 の場合も同様の分子機構により核局在や分解の制御を受けている可能性は十分に考えられる。ただし Pin1 欠損マウスの表現型は、個体サイズの減少、精巣の萎縮、網膜の退行、乳腺の増殖不全などを示し、これらの異常はサイクリン D1 欠損マウスのそれに類似していることから、サイクリン D1 の機能発現に関わっていることが報告されているが、その異常は 3 ヶ月以上経ってから顕在化してくるものであることや、卵巣には明らかな異常が認められなかったと報告されていることなどから考えて、サイクリン D2 の機能発現には Pin1 はそれほど寄与していないかも知れない (Liou *et al.*, 2002)。

GSK-3 β は PKB/Akt の主要な基質の一つであり、PI-3K 経路依存的にリン酸化されて不活性化する (Cross *et al.*, 1995; Dudek *et al.*, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 1997)。他方、phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate の 3 位脱リン酸化酵素であり、PI-3K 経路に拮抗する形で働く PTEN を過剰発現させた細胞では、サイクリン D1 の発現量と核局在が減少する結果、細胞を増殖停止させることから、やはり PI-3K から GSK-3 β に至る経路がサイクリン D1 の機能発現に重要であることが報告されている (Radu *et al.*, 2003)。FSH 受容体は cAMP 産生により PKA 経路を活性化させるだけでなく、cAMP-GEF/Epac の活性化をも介し、最終的に Akt を活性化することが知られていることから、この経路が顆粒膜細胞内での FSH 依存的なサイクリン D2 の C 末端会合因子の制御に関与している可能性も考えられる (Gonzalez-Robayna *et al.*, 2000)。この他にも、Akt によるタンパク質翻訳後レベルでの細胞周期制御機構が存在するとの報告

が近年相次いでなされている。p21^{Cip1} の 145 番目のスレオニンは Akt または PKA によってリン酸化されるが、このリン酸化の結果、p21^{Cip1} の核移行や cdk4、PCNA との会合が抑制されることが報告されている (Scott *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Rossig *et al.*, 2001)。同様に p27^{Kip1} も Akt の標的タンパク質の一つであることが同定され、その 157 番目のスレオニンのリン酸化により、やはり核局在が抑制されることが明らかとされた (Shin *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2002; Viglietto *et al.*, 2002)。ただし、p27^{Kip1} のリン酸化は、サイクリン D1 の核局在には影響を及ぼさず、p27^{Kip1} のサイクリン E/cdk2 に対する阻害活性の抑制に寄与していると報告されているが、すべての組織で同様の機構が作用している可能性を保証するものではない (Shin *et al.*, 2002)。いずれにせよこれらのことより、アクチビンによって誘導されたサイクリン D2 の C 末端に相互作用し、その免疫沈降を阻害した因子の候補として GSK-3 β 、Pin1、CRM1、p21^{Cip1}、p27^{Kip1} が考えられ、その相互作用の制御には、FSH による Akt または PKA 経路の活性化が関与していることも十分に考えられる。

一方、別の可能性として、何らかの因子が cdk4 との相互作用を介して間接的にサイクリン D2 の C 末端部位の構造に変化をもたらしたという機構も考えられる。Cip/Kip ファミリーの他に、サイクリン/cdk 複合体と相互作用し、その活性を抑制し得る因子として、INK4 ファミリー因子が考えられる。INK4 ファミリーの cdk インヒビターは、一般に cdk4/6 に結合し、サイクリン D との結合を競合的に阻害する因子と考えられているが、既に形成されたサイクリン D/cdk4/6 複合体にも作用し、ヘテロ三量体化した状態でも存在し得ることも報告されている (Reynisdottir *et al.*, 1997)。構造解析の結果、INK4 は cdk6 の触媒溝の ATP 結合部位の隣に結合し、その反対側に活性化サイクリンサブユニットが結合すること、INK4 は cdk6 のリン酸化触媒溝をゆがめて ATP 結合を妨げることなどが明らかとされている (Russo *et al.*, 1998; Jeffrey *et al.*, 2000)。よって、おそらくサイクリンと INK4 が直接結合することはなく、また INK4 と cdk との結合が間接的にサイクリン D の、しかもその C 末部位に構造変化を引き起こし得る可能性は、全く否定するという事はできないものの、そのような機構は現在までに知られている構造解析の結果から見るとやや考えにくい。

いずれにせよ、サイクリン D2 の C 末部位への抗体親和性変化の詳細な分子機構については、サイクリン D2 の C 末端のリン酸化状態や会合因子について調べ、cdk4 と cdk6 で違いが認められた原因も含め、今後実験的に明らかにする必要があるだろう。具体的な手法としては、サイクリン D2 の C 末以外の部位に対する抗体による免疫沈降物の解析や、細胞膜透過性タグ配列及び免疫沈降用タグ配列を付加した種々の組み換えサイクリン D2 タンパク質を細胞内に導入後、免疫沈降物を解析する方法、抗 cdk4 および cdk6 抗体による免疫沈降物の

構成因子について、FSH 刺激依存的に解離する分子を同定するなどの方法により可能となるものと考えられるが、これは今後の課題である。

実際の卵胞内にはアクチビン以外にも、TGF- β 、GDF9、BMP4、BMP6、BMP7、BMP15、MIS、インヒビンなど、数多くの TGF- β ファミリー因子が存在し、顆粒膜細胞の増殖および分化を制御しているが、それらの中には活性化する受容体や Smad といった分子機構においても、また顆粒膜細胞に対する作用の面でも、機能的に重複する部分が多い (Findlay *et al.*, 2002)。

このような多種類の因子が存在するのは、おそらくそれぞれの卵胞発育段階や卵胞内での部位に対し、各因子が特異的に作用する必要があるからであろう。フォリスタチンはアクチビン以外にもいくつかの TGF- β ファミリー因子の作用を阻害する。卵胞中ではアクチビンとフォリスタチンがともに合成・分泌されるが、割合的にはフォリスタチンがやや過剰に存在するため、ほとんどのアクチビンはフォリスタチンと複合体を形成し、見かけ上アクチビン活性は阻害されていると考えられている。しかも上述した抑制性 Smad やインヒビン産生によるネガティブフィードバックループの存在が想定されることより、リガンドの活性は次第に減弱する方向に向かうものと思われる。この様な理由から、あくまで仮説に過ぎないのだが、卵胞発育過程の進行は一組の TGF- β ファミリー因子および受容体に依存するのではなく、あるリガンドおよび受容体が一過的に活性化して発育を促進した後、別の新たなリガンドにその作用を委ねることにより、幾重にも張り巡らされたネガティブフィードバックを回避しながら卵胞発育過程を進行させるために、上記のように多種のリガンドが発育段階特異的に順次必要とされるのではないだろうか。

FSH やアクチビンはフォリスタチンの分泌を促進することから、上記の様なアクチビン阻害機構はFSH応答性の亢進とともに顕著になることが予想される。一方、アクチビンはFSH受容体の発現を誘導することにより顆粒膜細胞のFSH応答性獲得に寄与し、FSH依存性の卵胞発育段階へと移行させる。本研究で示したアクチビンとFSHの協同的増殖促進により、ある時点で一気に顆粒膜細胞の増殖が加速された卵胞は、同時に大量のフォリスタチンやインヒビンを分泌して周辺の卵胞の発育を抑制しつつ、自身はアクチビン非依存的かつFSH依存的に発育過程を進行させ、結果的に特定少数の主席卵胞 dominant follicle として選別され、排卵まで辿り着くという機構が考えられる。すなわちアクチビンがFSHと協同効果を示す時期はほんの短い期間のみで、その後不活性化されてしまうものの、この短い間に行われているFSHとの協同的な作用こそ、FSH非依存性過程から依存性過程への橋渡しに相当し、さらには主席卵胞の選別にも繋がる重要な作用であるとは考えられないだろうか。

近年、ヒト口腔扁平上皮細胞（角化細胞）の株化に関する研究で、サイクリン D1 または優性不能型 p53 を用い、いずれか一方の過剰発現のみでは株化は行えなかったが、両方を共発現させることにより、telomerase 活性に非依存的にテロメア長を維持する機構が活性化し、細胞の不死化が可能となったとの報告を行っている (Opitz *et al.*, 2001)。一方、本研究からアクチビンによる細胞増殖促進作用におけるサイクリン D2 の誘導が見出され、サイクリン D2 が FSH 非依存性増殖にも重要であることが示唆された。アクチビンは顆粒膜細胞に対して FSH 受容体を誘導する作用があることは既に述べた通りである。このことから考えて、サイクリン D2、もしくは恒常的活性化型 ALK4 を不活性化型の p53 とともに過剰発現するなどの方策により、卵胞発育過程の研究に有用な顆粒膜細胞株を樹立することが可能となるかも知れない。特に ALK4 の恒常的活性化体は、樹立細胞株に FSH 応答性を与える可能性がある。角化細胞において奏効したサイクリン D と p53 変異体の共発現による不死化が、顆粒膜細胞の場合においても有効であるかどうかの保証は今のところ全くないものの、樹立されれば雌性生殖の研究分野において非常に有用な研究材料となり得るものと期待される。

本研究では、アクチビン刺激後の顆粒膜細胞の細胞周期進行とその際の G1 期制御因子の変化について調べることにより、アクチビン刺激によるサイクリン D2 の一過的発現上昇と、pRb のリン酸化レベルの亢進を見出した。また FSH はアクチビンによる pRb のリン酸化を亢進し、サイクリン D2 の細胞内局在に影響を及ぼした。つまり、FSH とアクチビンの両因子共通の作用点はサイクリン D2 であり、FSH はアクチビンと協同的に細胞の増殖を促進することが示唆された (図 21)。

また考察の結果、1) 顆粒膜細胞におけるサイクリン D2 の転写制御機構、2) サイクリン D2 の誘導に対する FSH の用量依存性、3) サイクリン D2 の C 末端領域に結合すると予想される因子の同定とその細胞周期制御機構、などが未解明の課題として残された。しかしながら、FSH の作用点はこれまで考えられていたサイクリン D2 の誘導ではないことを示し、FSH の顆粒膜細胞増殖促進作用について再考を促すことが出来たこと、FSH 以外の因子によってもサイクリン D2 を介した顆粒膜細胞の増殖制御が行われていることを示し、これまであまり分かっていなかった FSH 非依存性卵胞発育過程を理解する上で有用な知見を見出したことの二点については、卵胞発育制御機構を理解する上で非常に意義ある現象の発見であったと自負している。

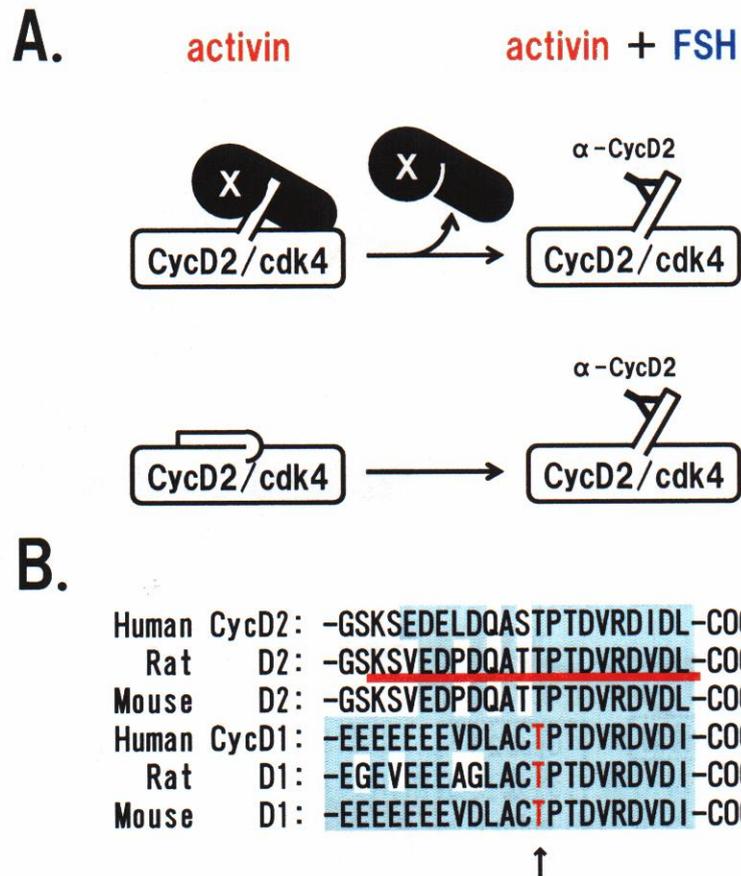


図 20 アクチビンと FSH によるサイクリン D2 への協同作用

(A)免疫沈降実験よりアクチビンによって誘導されたサイクリン D2 は、FSH 処理による抗体親和性の亢進が見られた。この事実から類推される FSH のサイクリン D2 への作用機構として、何らかの因子 X の解離 (上) もしくはサイクリン D2/cdk4 複合体自体の構造変化 (下) によるエピソードマスクの解除が考えられる。(B) 哺乳類サイクリン D1 および D2 の C 末端部位のアミノ酸配列。ラットサイクリン D2 の下線を施した箇所が、今回用いた抗体のエピトープ部位にあたる C 末側 20 アミノ酸部位である。また、矢印 (↑) で示した部分が、サイクリン D1 の GSK-3β によるリン酸化部位の Thr-286 である。

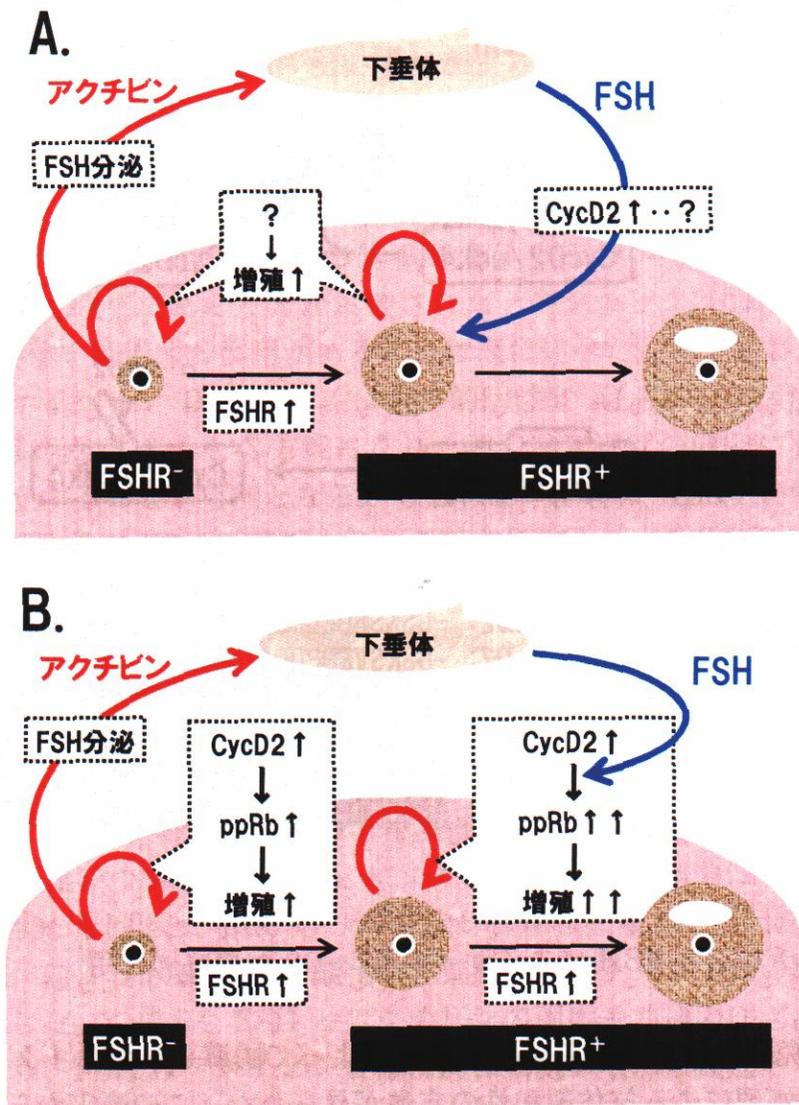


図 21 アクチビンおよび FSH による顆粒膜細胞の増殖制御

(A) 本研究以前、アクチビンの作用として、顆粒膜細胞の FSH 受容体発現誘導と増殖促進の他、下垂体からの FSH の分泌促進作用などが知られていた。一方、FSH については、顆粒膜細胞にサイクリン D2 を誘導し、増殖を促進するとされていた。(B) 本研究から、FSH による顆粒膜細胞の増殖促進にはアクチビンのようなサイクリン D2 誘導因子の存在が前提であり、FSH はサイクリン D2 の核局在亢進などの、サイクリン D2 複合体形成から pRb のリン酸化に至る過程において作用し、アクチビンと協調的に顆粒膜細胞の増殖を促進していることが示唆された。

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さり、遂行にあたっては貴重なご指導および数々のご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞増殖学講座教授、竹家達夫博士に対しまして、謹んで感謝致します。

また、厳しくも価値ある多くのご意見等を賜りました細胞増殖学講座助教授、宍戸知行博士に対しまして、心より御礼申し上げます。

そして、入学時より細部に渡り、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました細胞増殖学講座助手、石田教弘先生に対しまして、深く御礼申し上げます。

また博士後期課程の大半におきまして、ともにラット顆粒膜細胞の研究に勤しんだ同輩であり、また同じ東北大学の先輩でもあります細胞増殖学講座助手、与語圭一郎博士に対しまして、深く感謝致します。

さらに、本研究の遂行にお力添えを賜りました、味の素株式会社中央研究所応用研究所主席研究員、江崎讓博士、並びに福井医科大学生化学第二講座教授の宮本薫博士に対しまして、厚く御礼申し上げます。

そして、種々の有益なるご助言を賜り、学位論文審査もお引き受け頂きました動物分子遺伝学講座教授、加藤順也博士、同じく学位論文審査をお引き受け下さいました、動物遺伝子機能学講座の川市正史教授、並びに石田靖雅助教授、さらに様々なご指導を賜りました、東京工業大学大学院生命理工学研究科生体システム専攻細胞・発生生物学講座助手、田中利明博士の諸先生方に対しまして、深く感謝致します。

最後に、常日頃ご厚情を賜りました細胞増殖学講座、動物分子遺伝学講座、植物遺伝子機能学講座の皆様、そして何より私を愛し、励まし、援助し続けてくれた私の両親ならびに妻に対しまして、心より感謝致します。

平成 15 年 8 月 27 日

参考文献

1. Alt JR, Cleveland JL, Hannink M, Diehl JA. (2000). Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 14 (24), 3102-14.
2. Alt JR, Gladden AB, Diehl JA. (2002). p21^{Cip1} Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem.* 277 (10), 8517-23.
3. Amsterdam A, Knecht M, Catt KJ. (1981). Hormonal regulation of cytodifferentiation and intercellular communication in cultured granulosa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78 (5), 3000-4.
4. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, Mizel DE, Anzano M, Greenwell-Wild T, Wahl SM, Deng C, Roberts AB. (1999). Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol.* 1 (5), 260-6.
5. Bai S, Cao X. (2002). A nuclear antagonistic mechanism of inhibitory Smads in transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem.* 277 (6), 4176-82.
6. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 7 (5), 812-21.
7. Bernard DJ, Chapman SC, Woodruff TK. (2002). Inhibin binding protein (InhBP/p120), β -glycan, and the continuing search for the inhibin receptor. *Mol Endocrinol.* 16 (2), 207-12.
8. Bley MA, Simon JC, Saragueta PE, Baranao JL. (1991). Hormonal regulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis: effects of estrogens. *Biol Reprod.* 44 (5), 880-8.
9. Bley MA, Simon JC, Estevez AG, de Asua LJ, Baranao JL. (1992). Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology.* 131 (3), 1223-9.
10. Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, Nallamshetty S, True A, Nabel GJ, Nabel EG. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27^{Kip1} and regulates cell cycle progression. *EMBO J.* 21(13), 3390-401.

11. Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
12. Briers TW, van de Voorde A, Vanderstichele H. (1993). Characterization of immortalized mouse granulosa cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 29A (11), 847-54.
13. Brown CW, Houston-Hawkins DE, Woodruff TK, Matzuk MM. (2000). Insertion of *InhβB* into the *InhβA* locus rescues the *InhβA*-null phenotype and reveals new activin functions. *Nat Genet.* 25 (4), 453-7.
14. Burns KH, Yan C, Kumar TR, Matzuk MM. (2001). Analysis of ovarian gene expression in follicle-stimulating hormone β knockout mice. *Endocrinology.* 142 (7), 2742-51.
15. Caillia, HL, Racine-Weisbuch MS, Delaage MA. (1973). Adenosine 3',5' cyclic monophosphate assay at 10^{-15} mole level. *Anal Biochem.* 56 (2), 394-406.
16. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor *Foxo3a*. *Science.* 301(5630), 215-8.
17. Chapman SC, Woodruff TK. (2001). Modulation of activin signal transduction by inhibin B and inhibin-binding protein (INhBP). *Mol Endocrinol.* 15 (4), 668-79.
18. Chong H, Pangas SA, Bernard DJ, Wang E, Gitch J, Chen W, Draper LB, Cox ET, Woodruff TK. (2000). Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system. *Endocrinology.* 141 (7), 2600-7.
19. Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczynska I, Bronson RT, Rowitch DH, Gardner H, Sicinski P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev.* 16 (24), 3277-89.
20. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G. (2001). The putative forkhead transcription factor *FOXL2* is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet.* 27 (2), 159-66.
21. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378 (6559), 785-9.

22. Datto MB, Frederick JP, Pan L, Borton AJ, Zhuang Y, Wang XF. (1999). Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor β -mediated signal transduction. *Mol Cell Biol.* 19 (4), 2495-504.
23. Dey A, Li W. (2000). Cell cycle-independent induction of D1 and D2 cyclin expression, but not cyclin-Cdk complex formation or Rb phosphorylation, by IFN γ in macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1497 (1), 135-47.
24. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. (1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11 (8), 957-72.
25. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12 (22), 3499-511.
26. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (23), 13612-7.
27. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383 (6600), 531-5.
28. Drummond AE, Le MT, Ethier JF, Dyson M, Findlay JK. (2002). Expression and localization of activin receptors, Smads, and β glycan to the postnatal rat ovary. *Endocrinology.* 143 (4), 1423-33.
29. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol.* 12 (12), 1809-17.
30. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* 275 (5300), 661-5.
31. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development.* 127 (19), 4277-91.
32. El-Hefnawy T, Zeleznik AJ. (2001). Synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cyclin

- D2 expression in rat granulosa cells. *Endocrinology*. (2001). 142 (10), 4357-62.
33. Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, Steinbeisser H, Blum M. (1997). The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. *Mech Dev*. 63 (1), 39-50.
 34. Farookhi R, Desjardins J. (1986). Luteinizing hormone receptor induction in dispersed granulosa cells requires estrogen. *Mol Cell Endocrinol*. 47 (1-2), 13-24.
 35. Ferguson CA, Tucker AS, Christensen L, Lau AL, Matzuk MM, Sharpe PT. (1998). Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes Dev*. 12 (16), 2636-49.
 36. Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27^{Kip1}-deficient mice. *Cell*. 85 (5), 733-44.
 37. Findlay JK, Drummond AE, Dyson M, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. (2001). Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat. *Mol Cell Endocrinol*. 180 (1-2), 139-44.
 38. Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. (2002). Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- β superfamily. *Mol Cell Endocrinol*. 191 (1), 35-43.
 39. Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Hershko A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF^{Skp2}-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol*. 3 (3), 321-4.
 40. Germain, D., A. Russell, A. Thompson, and J. Hendley. (2000). Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286. *J. Biol. Chem*. 275 (16), 12074-12079.
 41. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS. (2000). Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for a kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol*. 14 (8), 1283-300.

42. Gougeon A. (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1 (2), 81-7.
43. Gu Z, Nomura M, Simpson BB, Lei H, Feijen A, van den Eijnden-van Raaij J, Donahoe PK, Li E. (1998). The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. *Genes Dev.* 12 (6), 844-57.
44. Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo FJ, Matzuk MM. (1998). Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol.* 12 (1), 96-106.
45. Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S, Nakayama K. (2001). Degradation of p27^{Kip1} at the G₀-G₁ transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J Biol Chem.* 276 (52), 48937-43.
46. Harandian F, Farookhi R. (1998). Contact-dependent cell interactions determine hormone responsiveness and desensitization in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 139 (4), 1700-7.
47. Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomaki K, Shelling AN. (2002). Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod.* 8 (8), 729-33.
48. Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. (1988). Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 156 (2), 668-74.
49. Heyer J, Escalante-Alcalde D, Lia M, Boettinger E, Edelmann W, Stewart CL, Kucherlapati R. (1999). Postgastrulation Smad2-deficient embryos show defects in embryo turning and anterior morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (22), 12595-600.
50. Hunter T. (1993). Braking the cycle. *Cell.* 75 (5), 839-41.
51. Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, Sugino H, Ueno N. (1998). Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (16), 9337-42.
52. Jeffrey PD, Tong L, Pavletich NP. (2000). Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors. *Genes Dev.* 14 (24), 3115-25.

53. Jirawatnotai S, Moons DS, Stocco CO, Franks R, Hales DB, Gibori G, Kiyokawa H. (2003). The cyclin-dependent kinase inhibitors p27^{Kip1} and p21^{Cip1} cooperate to restrict proliferative life span in differentiating ovarian cells. *J Biol Chem.* 278 (19), 17021-7.
54. Keren-Tal I, Dantes A, Sprengel R, Amsterdam A. (1993). Establishment of steroidogenic granulosa cell lines expressing follicle stimulating hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 95 (1-2), R1-10.
55. Khamsi F, Roberge S, Yavas Y, Lacanna IC, Zhu X, Wong J. (2001). Recent discoveries in physiology of insulin-like growth factor-1 and its interaction with gonadotropins in folliculogenesis. *Endocrine.* 16 (3), 151-65.
56. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA, Koff A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27^{Kip1}. *Cell.* 85 (5), 721-32.
57. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15 (2), 201-4.
58. LaPolt PS, Soto D, Su JG, Campen CA, Vaughan J, Vale W, Hsueh AJ. (1989). Activin stimulation of inhibin secretion and messenger RNA levels in cultured granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 3 (10), 1666-73.
59. Lau AL, Kumar TR, Nishimori K, Bonadio J, Matzuk MM. (2000). Activin β C and β E genes are not essential for mouse liver growth, differentiation, and regeneration. *Mol Cell Biol.* 20 (16), 6127-37.
60. Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W. (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature.* 404 (6776), 411-4.
61. Li J, Kim JM, Liston P, Li M, Miyazaki T, Mackenzie AE, Korneluk RG, Tsang BK. (1998). Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology.* 139 (3), 1321-8.
62. Li R, Phillips DM, Mather JP. (1995). Activin promotes ovarian follicle development in vitro. *Endocrinology.* 136 (3), 849-56.
63. Li R, Phillips DM, Moore A, Mather JP. (1997). Follicle-stimulating hormone induces terminal differentiation in a predifferentiated rat granulosa cell line (ROG). *Endocrinology.* 138 (7), 2648-57.

64. Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med.* 8 (10), 1153-60.
65. Liou YC, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, Fujimori F, Uchida T, Hunter T, Lu KP. (2002). Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (3), 1335-40.
66. Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. (1999). A comparative study on transforming growth factor- β and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology.* 140 (6), 2480-5.
67. 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. *Genes Dev.* 9 (18), 2266-78.
68. Malek NP, Sundberg H, McGrew S, Nakayama K, Kyriakides TR, Roberts JM, Kyriakidis TR. (2001). A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature.* 413 (6853), 323-7. Erratum in: *Nature* (2001). 413 (6856), 652.
69. Matzuk MM, Kumar TR, Vassalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, Bradley A. (1995). Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature.* 374 (6520), 354-6.
70. Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. (1995b). Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature.* 374 (6520), 356-60.
71. Miro F, Hillier SG. (1996). Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology.* 137 (2), 464-8.
72. Mizunuma H, Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Yokota H, Ibuki Y, Hasegawa Y. (1999). Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology.* 140 (1), 37-42.
73. Monget P, Bondy C. (2000). Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 163 (1-2), 89-93.

74. Moons DS, Jirawatnotai S, Tsutsui T, Franks R, Parlow AF, Hales DB, Gibori G, Fazleabas AT, Kiyokawa H. (2002a). Intact follicular maturation and defective luteal function in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology*. 143 (2), 647-54.
75. Moons DS, Jirawatnotai S, Parlow AF, Gibori G, Kineman RD, Kiyokawa H. (2002b). Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4. *Endocrinology*. 143 (8), 3001-8.
76. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. (2001). Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci*. 114(Pt 24):4359-69.
77. Nakamura M, Minegishi T, Hasegawa Y, Nakamura K, Igarashi S, Ito I, Shinozaki H, Miyamoto K, Eto Y, Ibuki Y. (1993). Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 133 (2), 538-44.
78. 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 (6), 2329-2335.
79. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K. (1996). Mice lacking p27^{Kip1} display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 85 (5), 707-20.
80. Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama K, Hatakeyama S. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27^{Kip1}, polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J*. 19 (9), 2069-81.
81. Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H. (2001). Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology*. 142 (1), 437-45.
82. Oh SP, Li E. (1997). The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev*. 11 (14), 1812-26.

83. Opitz OG, Suliman Y, Hahn WC, Harada H, Blum HE, Rustgi AK. (2001). Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J Clin Invest.* 108 (5), 725-32.
84. Orly J, Sato G, Erickson GF. (1980). Serum suppresses the expression of hormonally induced functions in cultured granulosa cells. *Cell.* 20 (3), 817-27.
85. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1602 (1), 73-87.
86. Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. (2001a). Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem.* 276 (14), 11387-92.
87. Otsuka F, Moore RK, Iemura S, Ueno N, Shimasaki S. (2001b). Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun.* 289 (5), 961-6.
88. Piontekewitz Y, Enerback S, Hedin L. (1996). Expression of CCAAT enhancer binding protein-alpha (C/EBP alpha) in the rat ovary: implications for follicular development and ovulation. *Dev Biol.* 179 (1), 288-96.
89. Prueitt RL, Zinn AR. (2001). A fork in the road to fertility. *Nat Genet.* 27 (2), 132-4.
90. Radu A, Neubauer V, Akagi T, Hanafusa H, Georgescu MM. (2003). PTEN Induces Cell Cycle Arrest by Decreasing the Level and Nuclear Localization of Cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 23 (17), 6139-6149.
91. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat Genet* 22 (1), 44-52.
92. Reynisdottir I, Massague J. (1997). The subcellular locations of p15^{Ink4b} and p27^{Kip1} coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev.* 11 (4), 492-503.
93. Richards JS. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev.* 15 (6), 725-51.

94. Richards JS, Sharma SC, Falender AE, Lo YH. (2002). Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Mol Endocrinol.* 16 (3), 580-99.
95. Robker RL, Richards JS. (1998a). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27^{Kip1}. *Mol Endocrinol.* 12 (7), 924-40.
96. Robker RL, Richards JS. (1998b). Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod.* 59 (3), 476-82.
97. Roh JS, Bondestam J, Mazerbourg S, Kaivo-Oja N, Groome N, Ritvos O, Hsueh AJ. (2003). Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates smad2 in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 144 (1), 172-8.
98. Rossig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21^{Cip1} regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 21 (16), 5644-57.
99. Russo AA, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Pavletich NP. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16^{INK4a}. *Nature.* 395(6699):237-43.
100. Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF 3rd, Amsterdam A. (2001). The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem.* 276 (17), 13957-64.
101. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts,' prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17 (15), 6419.
102. Schrewe H, Gendron-Maguire M, Harbison ML, Gridley T. (1994). Mice homozygous for a null mutation of activin β B are viable and fertile. *Mech Dev.* 47 (1), 43-51.
103. Scott MT, Morrice N, Ball KL. (2000). Reversible phosphorylation at the C-terminal regulatory domain of p21^{Waf1/Cip1} modulates proliferating cell nuclear antigen binding. *J Biol Chem.* 275 (15), 11529-37.
104. Sherr CJ. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell.* 79 (4), 551-5.

105. Sherr CJ, Roberts JM. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13 (12), 1501-12.
106. Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. (1999). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (13), 7282-7.
107. Shimonaka M, Inouye S, Shimasaki S, Ling N. (1991). Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology.* 128 (6), 3313-5.
108. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27^{Kip1} at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med.* 8 (10), 1145-52.
109. Shintani Y, Dyson M, Drummond AE, Findlay JK. (1997). Regulation of follistatin production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology.* 138 (6), 2544-51.
110. Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature.* 384 (6608), 470-4.
111. Sirard C, de la Pompa JL, Elia A, Itie A, Mirtsos C, Cheung A, Hahn S, Wakeham A, Schwartz L, Kern SE, Rossant J, Mak TW. (1998). The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev.* 12 (1), 107-19.
112. Tajima K, Hosokawa K, Yoshida Y, Dantes A, Sasson R, Kotsuji F, Amsterdam A. (2002). Establishment of FSH-responsive cell lines by transfection of pre-ovulatory human granulosa cells with mutated p53 (*p53val135*) and *Ha-ras* genes. *Mol. Hum. Reprod.* 8 (1), 48 - 57.
113. Taya Y. (1997). RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem Sci.* 22 (1), 14-7.
114. Tomic D, Brodie SG, Deng C, Hickey RJ, Babus JK, Malkas LH, Flaws JA. (2002). Smad 3 may regulate follicular growth in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 66 (4), 917-23.
115. Tong W, Kiyokawa H, Soos TJ, Park MS, Soares VC, Manova K, Pollard JW, Koff A. (1998). The absence of p27^{Kip1}, an inhibitor of G1

- cyclin-dependent kinases, uncouples differentiation and growth arrest during the granulosa->luteal transition. *Cell Growth Differ.* 9 (9), 787-94.
116. Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, Pandolfi PP, Hansel KS, Koff A, Kiyokawa H. (1999). Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27^{Kip1} activity. *Mol Cell Biol.* (10), 7011-9.
 117. Vadiveloo PK, Vairo G, Royston AK, Novak U, Hamilton JA. (1998). Proliferation-independent induction of macrophage cyclin D2, and repression of cyclin D1, by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.* 273 (36), 23104-9.
 118. Vallance SJ, Lee HM, Roussel MF, Shurtleff SA, Kato JY, Strom DK, Sherr CJ. (1994). Monoclonal antibodies to mammalian D-type G1 cyclins. *Hybridoma.* 13 (1), 37-44.
 119. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.* 22 (7), 267-72.
 120. Vassalli A, Matzuk MM, Gardner HA, Lee KF, Jaenisch R. (1994). Activin/inhibin β B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Dev.* 8 (4), 414-27.
 121. Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tsiichlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med.* 8 (10), 1136-44.
 122. Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJ. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod.* 62 (2), 370-7.
 123. Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ. (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod.* 67 (2), 473-80.
 124. Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, Timchenko NA. (2001). C/EBP α arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell.* 8 (4), 817-28.

125. Wang L, Zhu Y, Sharma K. (1998). Transforming growth factor- β 1 stimulates protein kinase A in mesangial cells. *J Biol Chem.* 273 (14), 8522-7.
126. Wang Y, Chan S, Tsang BK. (2002). Involvement of inhibitory nuclear factor- κ B (NF κ B)-independent NF κ B activation in the gonadotropic regulation of X-linked inhibitor of apoptosis expression during ovarian follicular development in vitro. *Endocrinology.* 143 (7), 2732-40.
127. Woodruff TK, Krummen L, McCray G, Mather JP. (1993). In situ ligand binding of recombinant human [125 I] activin-A and recombinant human [125 I] inhibin-A to the adult rat ovary. *Endocrinology.* 133 (6), 2998-3006.
128. Xu J, Oakley J, McGee EA. (2002). Stage-specific expression of Smad2 and Smad3 during folliculogenesis. *Biol Reprod.* 66 (6), 1571-8.
129. Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K. (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol.* 130 (1), 217-26.
130. Yang X, Li C, Xu X, Deng C. (1998). The tumor suppressor SMAD4/DPC4 is essential for epiblast proliferation and mesoderm induction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (7), 3667-72.
131. Yang X, Letterio JJ, Lechleider RJ, Chen L, Hayman R, Gu H, Roberts AB, Deng C. (1999). Targeted disruption of SMAD3 results in impaired mucosal immunity and diminished T cell responsiveness to TGF- β . *EMBO J.* 18 (5), 1280-91.
132. 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 (5), 1920-30.
133. Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, Ishida N, Takeya T. (2002). Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. *FEBS Lett.* 531 (2), 132-6.
134. Zhang Q, Wang X, Wolgemuth DJ. (1999). Developmentally regulated expression of cyclin D3 and its potential in vivo interacting proteins during murine gametogenesis. *Endocrinology.* 140 (6), 2790-800.

135. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B, Lee MH, Hung MC. (2001).
Cytoplasmic localization of p21^{Cip1/WAF1} by Akt-induced phosphorylation
in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol.* 3 (3), 245-52.
136. Zhu Y, Richardson JA, Parada LF, Graff JM. (1998). S mad3 mutant
mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* 94 (6), 703-14.