

学位論文

**Integrated Analysis of Transcriptome and Histone
Modifications in Granulosa Cells During Ovulation in Female
Mice**

(マウス顆粒膜細胞の黄体化過程における遺伝子発現
とヒストン修飾の統合解析)

白蓋 雄一郎

山口大学大学院医学系研究科 医学専攻

産科婦人科学講座

令和4年1月

目次

【要旨】	3
【研究の背景と目的】	4
【方法】	5
【結果】	7
【考察】	18
【謝辞】	22
【参考文献】	23

【要旨】

(目的) 排卵期の黄体形成ホルモン (LH) サージは、顆粒膜細胞 (GCs) において、遺伝子発現や細胞機能の急激な変化を引き起こし、黄体化を誘導する。本研究では、黄体化過程の GCs における遺伝子発現の経時的変化と、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構に着目し、ゲノムワイドに黄体化過程の遺伝子発現と細胞機能変化を明らかにすること、および遺伝子発現制御や細胞機能変化とヒストン修飾 H3K4me3 変化の関連性を明らかにすることを目的とした。

(方法) 幼若雌マウスに eCG-hCG 注射による過排卵刺激を行い、hCG 投与前、投与後 4 時間、12 時間の時点で GCs を回収し、RNA シークエンスと H3K4me3 抗体を用いた ChIP シークエンスを行った。

(結果) RNA シークエンスにより、多数の発現変動遺伝子が同定され、遺伝子発現の時間的変化に応じて 8 つのパターンに分類された。多くの遺伝子は、hCG 刺激後 4 時間で一過性に発現上昇または低下していた。これらの遺伝子群に関連する細胞機能を Gene Ontology 解析で調べたところ、ステロイド産生、排卵、卵丘細胞複合体の膨化、血管新生、免疫、活性酸素代謝、炎症反応、脂質代謝、オートファジーが同定された。さらに、DNA 修復と細胞サイズの増大という 2 つの機能がこれまでに報告されていない細胞機能として同定された。ChIP シークエンスにより、黄体化過程ではゲノム全域にわたって H3K4me3 が急激に変化し、遺伝子発現に関与することが示唆された。mRNA 発現データと H3K4me3 のデータを統合解析したところ、H3K4me3 はステロイド産生、排卵、COC の拡大、血管新生、炎症反応、免疫、活性酸素代謝、脂質・糖代謝、オートファジー、細胞サイズの調節などに関与することが示唆された。

(結論) LH サージ後の黄体化過程にある GCs において、遺伝子発現はゲノムワイドに変化し、細胞機能が劇的に変化する。H3K4me3 の変化は、これらの急激な遺伝子発現制御に関与し、種々の細胞機能を調節することで GCs の黄体化に寄与する可能性が示された。

【研究の背景と目的】

黄体化とは、黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) サージを契機に卵巣の顆粒膜細胞 (granulosa cells; GCs) が黄体細胞に分化する過程である。この過程で GCs は、黄体形成と妊娠成立に不可欠なプロゲステロンの産生、卵胞破裂、卵子卵丘細胞複合体 (cumulus-oocyte complexes; COC) の膨化、血管新生、免疫などに関連する様々な細胞機能を獲得する (1-5)。LH サージ後の GCs では、黄体化に必要な種々の細胞機能を獲得するために、多くの遺伝子発現が急激に変化する (6, 7)。我々はこれまで、ラット GCs において、血管新生に関与する血管内皮成長因子 (*Vegf*) の発現が LH サージ後に徐々に増加すること (2)、プロゲステロン合成に関与する P450_{scc} (*Cyp11a1*) の発現が LH サージ後急速に増加すること (8)、ステロイド産生急性調節タンパク質 (*StAR*) の発現が LH サージの 4 時間後に一過性に増加すること (9)、エストロゲン合成に関与するアロマターゼ (*Cyp19a1*) の発現は LH サージ後に急激に減少することなど (9)、遺伝子発現の経時的変化を報告してきた。また、*Cox-2* や *Tnfrsf10b* など、排卵や COC 膨化を制御する遺伝子の発現も、LH サージ後に急激に変化する (10)。これまでのマイクロアレイ解析によって、GCs の黄体化過程において発現変化する遺伝子が多数同定されているが (6, 7, 11, 12)、いずれも LH サージ前後の 2 時点を比較した研究であり、経時的な遺伝子発現と細胞機能の変化を調べた報告はない。また、このような黄体化過程の劇的な遺伝子発現の変化がどのように制御されているのかについては、いまだ十分には明らかになっていない。

遺伝子発現調節機構の 1 つに、クロマチン構造変化によるエピジェネティックな機構が関与しており、ヒストン修飾変化はそのうちの 1 つである。ヒストン H3 上の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) は、クロマチン構造を弛緩させ転写因子が結合できるようにすることで、迅速な転写反応を可能にする (13-18)。LH サージ後の GCs では、多くの遺伝子の発現が急速に変化することから、H3K4me3 の状態も、ゲノム全域にわたって急速に変化している可能性が考えられる。我々はこれまで、LH サージ後のラット GCs において、*Vegf*、*Cyp11a1*、*StAR*、*Cyp19a1* の急激な発現変化に、ヒストン修飾とクロマチンリモデリングが関与していることを報告した (2, 8, 9, 19)。しかし、黄体化過程の GCs における

ゲノム全域のエピジェネティックな変化を調べた報告はない。

本研究では、LH サージ後の黄体化過程にある GCs において、ゲノムワイドな遺伝子発現変化を経時的に調べることで、黄体化過程の細胞機能変化を明らかにすることを目的とした。また、H3K4me3 の変化をゲノム全域にわたって調べることで、遺伝子発現制御や細胞機能変化への H3K4me3 の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. GCs の回収

21-28 日齢の C57BL/6 雌マウス (Japan SLC、Hamamatsu、Japan) を用いて、equine chorionic gonadotropin (eCG) (Aska Animal Health、Japan) 4 IU を腹腔内注射し、卵胞発育を促した。その後、human chorionic gonadotropin (hCG) (Aska Animal Health) 5 IU を腹腔内注射し、排卵刺激を行った。hCG 投与前 (0 時間)、投与後 4 および 12 時間後に卵巣を回収した。卵胞を穿刺して GCs を分離した。細胞を遠心分離し、以下の実験に供した。本研究は山口大学医学部の施設内動物実験倫理委員会の承認を得ている。

2. RNA シークエンス

RNeasy Mini Kit (QIAGEN、Chatsworth、CA、USA) を用いて、各時点 (0 時間、4 時間、12 時間) で 3 匹のマウスの GCs からそれぞれ total RNA を抽出した。LH サージ後の GCs において変化する代表的な遺伝子 (*StAR*、*Cyp11a1*、*Cyp19a1*) の messenger RNA (mRNA) の発現量が、既報と同様の経時的変化を示すことを、reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) で確認した (8、9)。各時点で 3 匹のマウスの total RNA を混合した。RNA シークエンスは、以前に報告した方法で行った (20)。遺伝子発現量は fragments per kilobase of exon unit per million mapped reads (FPKM) として算出した。FPKM 値に 1 を加えた後に、2 つの時点 (0 時間 vs 4 時間、4 時間 vs 12 時間) で FPKM 値が 1.5 倍または 0.67 倍以上上昇または低下した遺伝子を、発現変動遺伝子と定義した。そして、FPKM 値の経時的変化に応じて、発現変動遺伝子を 8 パターンに分類した。

3. クロマチン免疫沈降法によるシーケンス

RNA シーケンスに用いた GCs をクロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation; ChIP) シーケンスに供した。GCs に 1 %ホルムアルデヒドを添加し、37 °C で 10 分間インキュベーションすることで細胞を架橋した。0.125 M グリシンを添加し反応を終了させた。ChIP シーケンスは、H3K4me3 抗体 (東京工業大学、木村宏先生より供与) を用いて、過去に報告した方法で行った (20-22)。ChIP シーケンスライブラリを作成し、GAIIx プラットフォーム (Illumina、San Diego、CA、USA) でシーケンスを行った。クオリティチェックを満たしたリードを Bowtie プログラム (23) を用いて、マウスリファレンスゲノム (mm10) にマッピングした。転写開始点 (Transcription start site; TSS) から -10 kb、転写終了点 (Transcription termination site; TTS) から +10 kb の間のゲノム領域で、H3K4me3 シグナルを検索した。H3K4me3 のピークコールには Model-Based Analysis of ChIP-Sequence (MACS) (24) を用い、検出されたピークは H3K4me3 修飾領域とみなした。H3K4me3 レベルが増加または減少した H3K4me3 領域を知るために、R パッケージ「ChIPpeakAnno」(25、26) を用いて、0 時間と 4 時間、および 4 時間と 12 時間の間の重複しないピークを調べた。2 つの時点の間で新たに出現あるいは消失した H3K4me3 のピークを、H3K4me3 変化領域と定義した。次に、H3K4me3 変化領域を持つ遺伝子を同定した。TSS の上流 -10 kb から TTS の上流 +10 kb の間に H3K4me3 変化領域を持つ遺伝子を、H3K4me3 増加あるいは減少遺伝子と定義した。また、3 つの時点の遺伝子発現と H3K4me3 が同様のパターンで変化した遺伝子を H3K4me3 関連遺伝子とした。H3K4me3 変化領域の分布を、過去の報告 (20、27、28) に従って 3 つのグループ (近位プロモーター領域: TSS から 3 kb 以内、遠位上流プロモーター領域: TSS から 3 kb 以上上流、遠位下流領域: TSS から 3 kb 以上下流) に分類した。TSS 周辺における H3K4me3 のプロファイルは、各時点で「ngs.plot」により作成した (29)。

4. ChIP-Quantitative Polymerase Chain Reaction

ChIP シーケンスに使用した GCs とは異なる GCs を用いて、ChIP-Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) 実験を行った。ChIP-qPCR は、H3K4me3 の抗体 (木村

宏先生より供与) (22)を用いて、過去に報告された方法で行った(2、8、9)。ChIP-qPCR用のプライマーは、ChIP シークエンスで同定された H3K4me3 変化領域内に設計した。各標的配列の H3K4me3 の相対的定量には Real-time PCR を用い、IP DNA の INPUT DNA に対する比率を算出した。

5. Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて、GCs から Total RNA を単離した。逆転写反応および Real-time RT-PCR は過去の報告と同じ方法で行った(30-32)。内部コントロールとして *Gapdh* を用いた。

6. バイオインフォマティクス

DAVID Bioinformatics Resources v. 6. 8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて、発現変動遺伝子が関与する Gene Ontology (GO) term を調べた(33)。 $P < 0.01$ を有意判定のカットオフとした。検出された GO term は reduce and visualize gene ontology (REVIGO) を用いて集約した(34)。

7. 統計処理

3 群間の検討は、まず一元配置分散分析を行い、その後 Tukey-Kramer 検定を行った。2 群間の検討には、Mann-Whitney U 検定を用いた(図 4B、D)。カイ二乗検定を用いて、6 パターンの中で H3K4me3 関連遺伝子の割合に有意差があるかどうかを判定した(図 4)。カイ二乗検定の後の事後検定として残差解析を行い、どのグループに有意差があるか特定した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

1. GCs の黄体化過程における遺伝子発現の経時的変化

ゲノムワイドな遺伝子発現の経時的変化を調べるために、hCG 投与前(0 時間)、投与後

4 時間、12 時間の 3 つの時点で GCs の RNA シークエンスを行った。0 時間から 4 時間の間に、3519 遺伝子の発現が上昇し、3450 遺伝子が低下した。4 時間から 12 時間は、3224 遺伝子が発現上昇し、3153 遺伝子が低下した。そして、これらの発現変動遺伝子を、mRNA 発現の経時的変化に応じて、8 つのパターンに分類した (図 1)。パターン 1 と 2 は、0 時間から 4 時間の間に 1.5 倍以上に発現上昇または 0.67 倍未満に低下し、12 時間までその発現レベルを維持した遺伝子である。パターン 3 と 4 は、4 時間後に一時的に 1.5 倍以上の発現上昇または 0.67 倍未満に低下した遺伝子である。パターン 5 と 6 は、0 時間から 4 時間まで変化せず、4 時間から 12 時間にかけて 1.5 倍以上に発現上昇または 0.67 倍未満に低下した遺伝子である。パターン 7 と 8 は、12 時間まで 1.5 倍以上に発現上昇または 0.67 倍未満に低下しつづけた遺伝子である。一過性の発現上昇・低下の遺伝子 (パターン 3、4) の数が多いのに対し、発現上昇・低下しつづける遺伝子 (パターン 7、8) は少なかった。

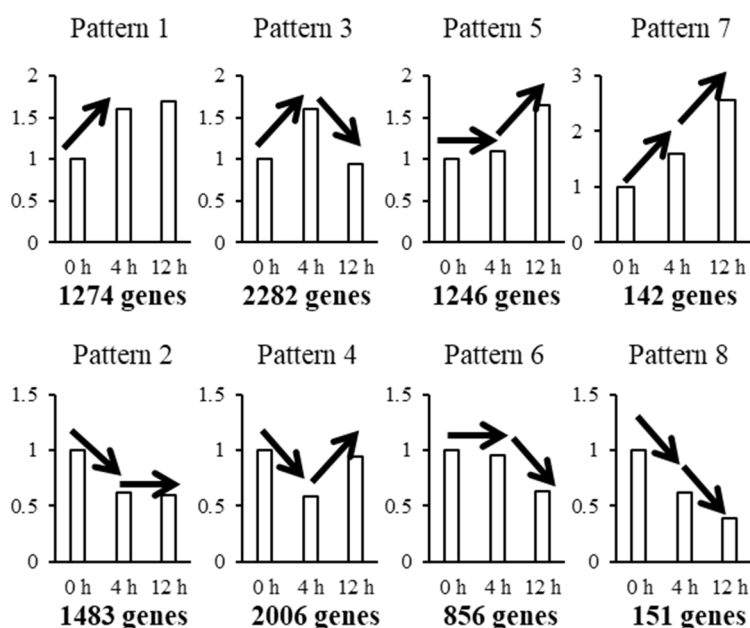


図 1. 発現変動遺伝子の経時的変化に応じた分類 遺伝子発現の経時的変化に応じて、発現上昇または低下した遺伝子を 8 つのパターンに分類した。パターン 1 と 2 は、0 時間から 4 時間の間に 1.5 倍以上に発現上昇または 0.67 倍未満に低下し、12 時間までその発現レベルを維持した遺伝子である。パターン 3 と 4 は、4 時間後に一時的に 1.5 倍以上の発現上昇または 0.67 倍未満に低下した遺伝子である。パターン 5 と 6 は、0 時間から 4 時間まで変化せず、4 時間から 12 時間にかけて 1.5 倍以上に発現上昇または 0.67 倍未満に低下した遺伝子である。パターン 7 と 8 は、12 時間まで 1.5 倍以上に発現上昇または 0.67 倍未満に低下しつづけた遺伝子である。各パターンに属する遺伝子の数を示した。

2. GCs の黄体化過程における細胞機能の経時的変化

黄体化過程における細胞機能の経時的変化を調べるために、各パターンの遺伝子群に対して Gene ontology (GO) 解析を行った。パターン 1 から 6 では多数の GO term が同定されたが (パターン 1: 715 個、パターン 2: 192 個、パターン 3: 1336 個、パターン 4: 279 個、パターン 5: 138 個、パターン 6: 340 個)、パターン 7 と 8 はそれぞれ 10 個、22 個と非常に少ない数であった。そのため、パターン 7 と 8 はその後の解析から除外した。数多くの GO term から類似した term をまとめ、それぞれのパターンの機能的特徴を捉えるために、GO 解析の結果を REVIGO 解析で集約し、各パターンにおける代表的な GO term を抽出した (表 1)。その term をさらに細胞機能ごとに分類した。パターン 3 では特に多くの GO term が抽出され、その中には、ステロイド合成、排卵、COC 膨化、血管新生、炎症反応、免疫、活性酸素 (Reactive oxygen species; ROS) 代謝など、これまでに報告されている、黄体化に必須な細胞機能が含まれていた (2-4、6、35、36)。パターン 1 には、血管新生、炎症反応、免疫、ROS 代謝といった細胞機能が含まれていた。パターン 2、3、4、5 は脂質代謝に関与していた。パターン 5 は糖代謝にも関与していた。また、パターン 3、4、6 はオートファジーと関連していた。

これらの黄体化に関連する既知の細胞機能に加えて、これまでに報告されたことのない機能も検出された。その一つはパターン 3 に見られた DNA 修復、もう一つがパターン 1 に見られた細胞の大きさを調節する機能であった。

RNA シークエンス実験により得られた結果の再現性を検証するために、6 つの遺伝子群の代表として 15 個の遺伝子を選んだ。これらの遺伝子の mRNA 発現を Real-time RT-PCR で調べたところ、RNA シークエンスで明らかになった経時的変化と同様の結果が得られた (図 2)。これらの結果から、GCs では hCG 刺激後に多くの遺伝子の発現が急速に変化し、黄体化に伴う種々の細胞機能の変化を調節していることがわかった。

表 1. 各遺伝子発現パターンにおける代表的な Gene Ontology term と関連する細胞機能

	ステロイド 産生	排卵	COC 膨化	血管新生	炎症反応	免疫	ROS 代謝	脂質代謝	糖代謝	DNA 修復	オートファジー	細胞サイズの 調節
Pattern 1				blood vessel morphogenesis (<i>Vegfa, Ets1, Col4a2, Fgf1, Hspb1, Thbs1, Pdgfb, Lrg1, Nr1p, Adamts1</i>)	inflammatory response (<i>Ptgs1, Il17rc, Cxcl12, Ednra, Saa3, Tgm2, B4galnt1, Ccl17, Csf1, Fabp4</i>)	regulation of immune system process (<i>A2m, Edn1, Cfh, Slc9b2, Spon2, Sox9, Bcl6, Pglyrp1, C5ar1, Dnaj3</i>)	reactive oxygen species metabolic process (<i>Sod1, Cflar, Ptk2b, Acp5, Ager, Eif5a, Ncf1, Ncf2, Thbs1, Trp53</i>)					growth (<i>Cdc42, Ddx39b, Prdm4, Ptk2b, Smarca4, Ccr5, Cxcl12, Nppa, Nr1p, Kdm2b</i>)
Pattern 2								fatty acid oxidation (<i>Adipor1, Acat1, Acaa2, Acaa8, Acads, Dgat2, Etf, Pexl3, Plin5, Ecl3</i>)				
Pattern 3	steroid metabolic process (<i>StAR, Il1b, Hsd3b7, Hsd17b12, Cyp51, Sc5d, Lepr, Scap, Fdx1, Fabp6</i>)	ovulation cycle (<i>Pgr, Runx1, Egr, Ereg, Has1, Has2, Egr1, Bmpr1b, Piger4, Pla2g4a</i>)	hyaluronan metabolic process (<i>Cd44, Piger4, Has1, Has2, Il1b, Nfkb1, Hgf, Clc, Eg2, Tgfb1</i>)	cardiovascular system development (<i>Ptgs2, Tgfb1, Foxc1, Cited1, Epc1, S1PR1, Ctgf, Thy, Cd36, Egfl7</i>)	inflammatory response (<i>Ptgs2, Tgfb1, Cd44, Il1b, Adam8, Tnfaiip6, Nfe2l2, Cx3xl1, Spp1, Bmp2</i>)	regulation of immune system process (<i>Cblb, Arf6, Cd14, Fcgr3, Foxc1, Foxj1, Il1b, Il6, Il33, Prdm1</i>)	reactive oxygen species metabolic process (<i>Jak2, Klf2, Klf4, Mpy17, Ndufs1, Por, Ctgf, Cdkn1a, Gls2, Gadd45a</i>)	lipid metabolic process (<i>Sreb2, StAR, Dhcr7, App, Scap, Ch25h, Hmgcr, Hmgcs1, Por, Apoe</i>)	signal transduction in response to DNA damage (<i>Grb2, Kdm1a, Dcn, Hmox1, Hk2, Lrrk2, Nod1, Flcn, Zc3h12a, Kdr</i>)	regulation of autophagy (<i>Sreb2, Xbp1, Dcn, Hmox1, Hk2, Lrrk2, Nod1, Flcn, Zc3h12a, Kdr</i>)		
Pattern 4								lipid metabolic process (<i>Fbxw7, Apoc3, Nr1h4, Sirt1, Slc27a1, Bsc2, Acacb, Rab7, Hadh, Erlin1</i>)			autophagy (<i>Fbxw7, Sirt1, Slc37a4, Gata4, Pink1, Tigar, Lzts1, Poldip2, Dap, Vps13c</i>)	
Pattern 5								lipid metabolic process (<i>Pex2, Apoa1, Nr1h3, Tcf7l2, Idh1, Pla2g6, Stk11, Slc45a3, Agt, Sorbs1</i>)	single-organism carbohydrate metabolic process (<i>Aldoa, Entpd5, Eno1, Eno3, Eno4, Msc, Ogdh, Pgam, P2rx7, Tcf7l2</i>)			
Pattern 6											autophagy (<i>Dram2, Atg4d, Csnk2a2, Cldn7, Evala, Hif1a, Prkaa1, Sqstm1, Sirt2, Snca</i>)	

細胞機能（最上段）に関連する代表的な GO term と、各 term に含まれる遺伝子のうち 10 個を示す。

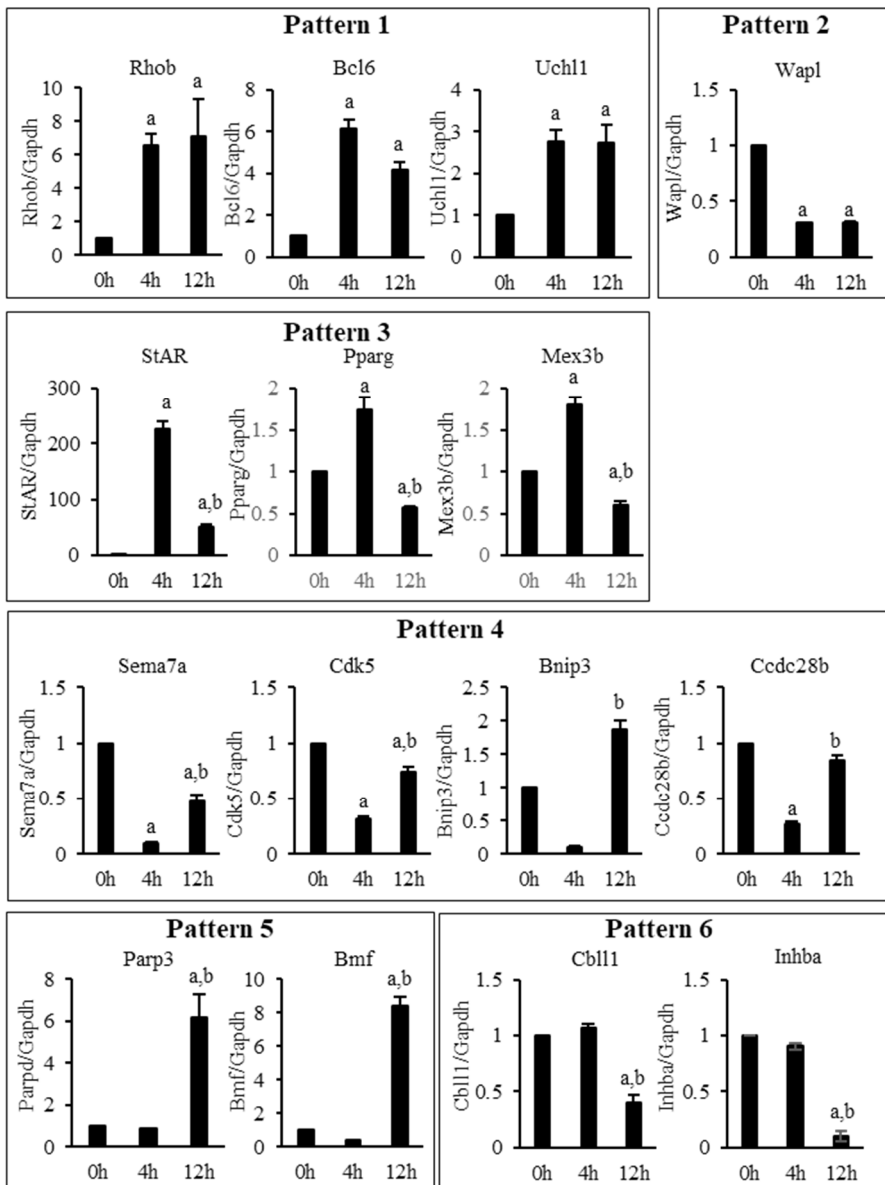


図 2. Real-time RT-PCR による RNA シークエンスデータの検証 6 パターンを代表する 15 個の遺伝子を選び、Real-time RT-PCR で mRNA レベルを定量した。内部コントロールの遺伝子として *Gapdh* を用いて補正し、0 時間のサンプルとの比を計算した。値は mean \pm SE (n=3)、a, $P < 0.05$ vs. 0 h; b, $P < 0.05$ vs. 4 h.

3. 黄体化過程の GCs における H3K4me3 修飾のゲノムワイドな変化

RNA シークエンスにより、黄体化過程の GCs では、遺伝子発現が急激に変化していることが明らかになった。遺伝子発現の急激な変化は、H3K4me3 修飾によるクロマチン構造変化によって制御されている (18)。そこで、hCG 刺激後の GCs において、ゲノム全域で H3K4me3 の状態がどのように変化するかを ChIP シークエンスを用いて調べた。0 時間から 4 時間

において、H3K4me3 増加領域が 6203 領域 (5901 遺伝子)、減少領域が 3999 領域 (4542 遺伝子) であった。4 時間から 12 時間において、H3K4me3 増加領域が 3228 領域 (3717 遺伝子)、減少領域が 6563 領域 (6414 遺伝子) であった。H3K4me3 は、0 時間から 4 時間までは増加領域が多く、4 時間から 12 時間までは減少領域が多いことがわかった。

これらの領域の分布を転写開始点 (Transcription start site; TSS) からの距離に基づいて分類したところ、0 時間から 4 時間の間に H3K4me3 が増加した領域の 43.8 % は近位プロモーター領域に位置し、44.2 % は下流の遠位領域に位置していた (図 3A)。H3K4me3 は転写活性化指標であり、TSS 近傍に分布すると報告されているが (37)、今回の結果から下流の遠位領域にも多く存在することがわかった。0 時間から 4 時間までの H3K4me3 減少領域、および 4 時間から 12 時間までの H3K4me3 変化領域でも、同様の分布が確認された (図 3A)。

次に、TSS 周囲の H3K4me3 のシグナルの強さを、0 時間、4 時間、12 時間の間で比較した (図 3B)。TSS 周囲の H3K4me3 のレベルは、0 時間から 4 時間にかけて増加し、4 時間から 12 時間にかけて減少した。これらの結果より、黄体化過程の GCs では、H3K4me3 のレベルは hCG 刺激後 4 時間で最も高くなることがわかった。

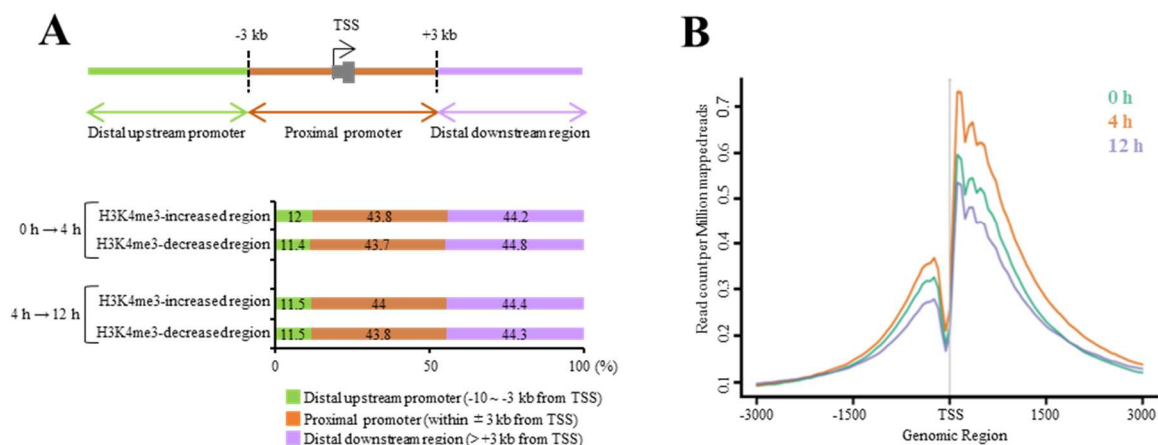


図 3. 黄体化過程の GCs における H3K4me3 のゲノムワイドな分布 A、H3K4me3 が増加した領域と減少した領域を、TSS からの距離に応じて、「proximal promoter」(TSS から ±3kb の領域内)、「distal upstream promoter」(TSS から 3kb 以上上流)、「distal downstream region」(TSS から 3kb 以上下流)の 3 つに分類した。結果は、全領域に対する割合で表した。B、3 つの時点での TSS 周囲の H3K4me3 レベルの変化を示す。0 時間後 (緑)、4 時間後 (オレンジ)、12 時間後 (紫) の全遺伝子における TSS 周囲の H3K4me3 のレベルを表す。

4. H3K4me3 の変化と遺伝子発現の制御との関連について

黄体化過程の GCs において、H3K4me3 の変化が遺伝子発現変化の制御と関連しているかを調べた。mRNA 発現変動遺伝子を、H3K4me3 の変化を伴う遺伝子と伴わない遺伝子に分類した。0 時間から 4 時間までに mRNA 発現が上昇した 3519 遺伝子のうち、H3K4me3 が増加した遺伝子は 1542 遺伝子 (43.8 %) であった (図 4A 上)。H3K4me3 の増加を伴う遺伝子と伴わない遺伝子の間で、mRNA レベルの変化量を比較したところ、H3K4me3 の増加を伴う遺伝子は、伴わない遺伝子に比べて、mRNA レベルの増加量が大きかった (図 4A 下)。一方、0 時間から 4 時間の間に発現低下した 3450 遺伝子のうち、H3K4me3 が減少した遺伝子は 1086 遺伝子 (31.5 %) であった (図 4B 上)。H3K4me3 が減少を伴う遺伝子は伴わない遺伝子に比べて、mRNA レベルの減少量が大きかった (図 4B 下)。このような H3K4me3 変化の影響は、4 時間から 12 時間までの間に発現上昇・低下した遺伝子でも観察された (図 4C および 4D)。これらの結果から、H3K4me3 の変化は、発現変動遺伝子の多くにみられ、黄体化過程の GCs の遺伝子発現調節に寄与していることがわかった。

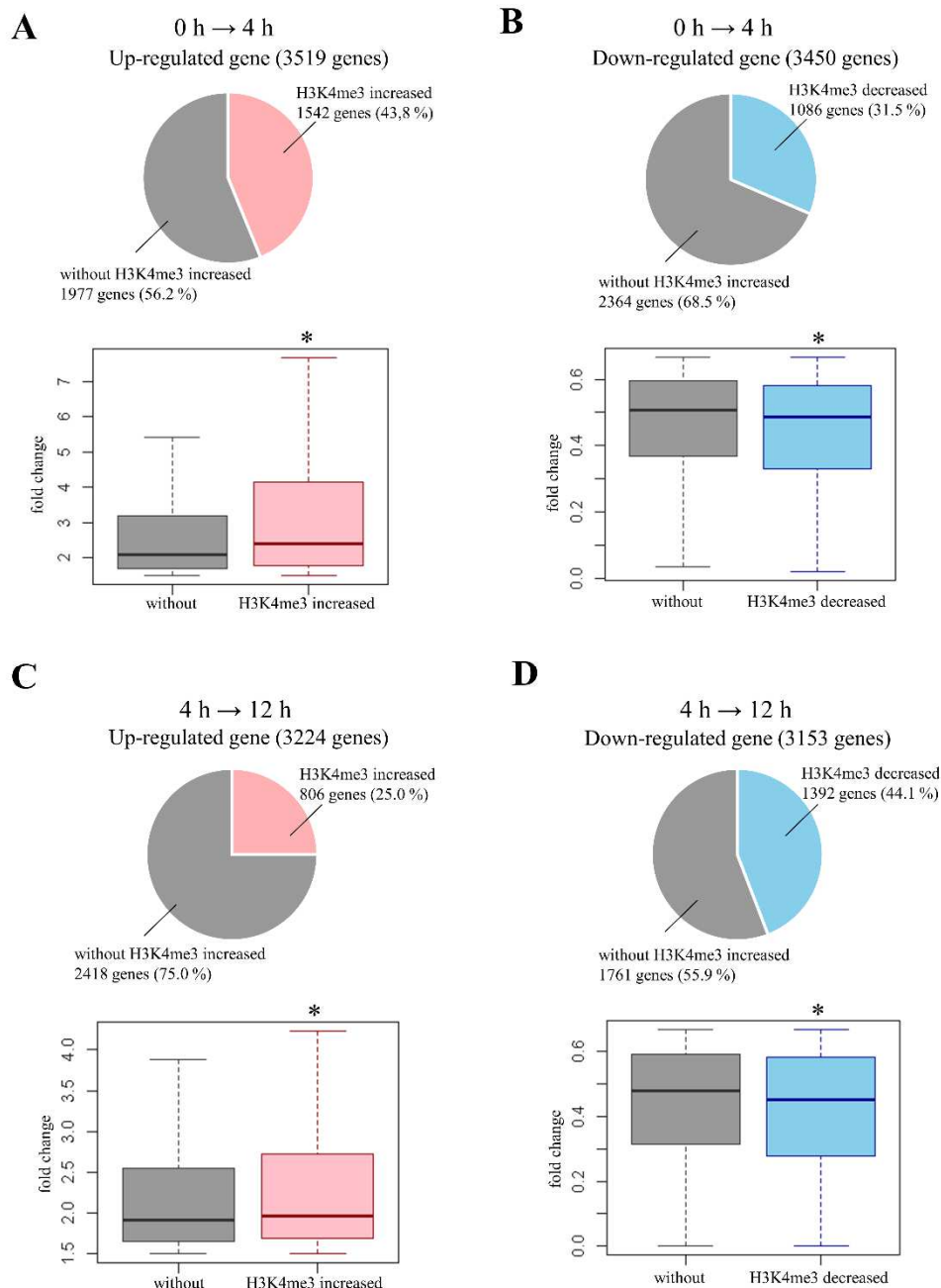


図 4. 黄体化過程の GCs における遺伝子発現と H3K4me3 の関連 A、円グラフは 0 時間から 4 時間までに発現上昇した遺伝子のうち、H3K4me3 の増加を伴う遺伝子の数と割合を示す (上)。2 つの時点の間で出現あるいは消失した H3K4me3 のピークを、H3K4me3 増加領域または減少領域と定義した。また、これらの領域が TSS の上流 10 kb から TTS の上流 10 kb の間に存在する遺伝子を、H3K4me3 増加遺伝子または減少遺伝子とした。H3K4me3 変化領域を伴う遺伝子と伴わない遺伝子の中で、発現上昇遺伝子の mRNA レベルの変化量を比較した (下)。箱ひげ図は、FPKM 値の fold change の各グループの分布を示す。箱の実線は四分位範囲 (25 %~75 %) を示し、その間の線が中央値となる。箱の外側に伸びたヒゲは、四分位値の上下から 1.5 倍の四分位間範囲内にある最低値と最高値のデータに対応する。P 値は Mann-Whitney U 検定を用いて算出した。* $P < 0.05$ 。B、0 時間から 4 時間の間に発現低下した遺伝子の解析結果。C、4 時間から 12 時間までに発現上昇した遺伝子の解析結果。D、4 時間から 12 時間までに発現低下した遺伝子の解析結果。

5. 黄体化過程の GCs における H3K4me3 関連遺伝子の同定とその機能

H3K4me3 によって制御される H3K4me3 関連遺伝子を同定し、それらが関与する細胞機能を調べた。H3K4me3 は転写活性化指標であることから、黄体化過程の GCs において、mRNA 発現変化のパターン (図 1) と H3K4me3 変化のパターンが一致する遺伝子を H3K4me3 関連遺伝子と定義した。例えば図 5 のパターン 1 に示すように、hCG 投与後 4 時間で mRNA 発現が上昇し、12 時間まで発現レベルが維持される遺伝子 (1274 個) のうち、H3K4me3 も 4 時間でリクルートされ、12 時間まで修飾が維持される遺伝子 (240 個) が、この定義に該当する。この定義に基づき、各 mRNA 発現変化パターンにおける H3K4me3 関連遺伝子を同定したところ、パターン 3 の H3K4me3 関連遺伝子は 758/2282 個 (33.2 %) であり、占める割合が他のパターンと比べ有意に高かった。

H3K4me3 が制御すると考えられる細胞機能を調べるために、各パターンにおける H3K4me3 関連遺伝子について、GO-REVIGO 解析を行った。発現上昇または低下遺伝子に関連する細胞機能 (表 1) のうち、H3K4me3 関連遺伝子のものと共通する細胞機能を表 2 に示す。H3K4me3 関連遺伝子は、mRNA 発現変化の解析により同定された細胞機能の大部分に関与していた。

ChIP シークエンス実験により得られた結果の再現性を確認するために、mRNA レベルを確認した 6 つの遺伝子 (*Bcl16*, *Wap1*, *StAR*, *Sema7a*, *Bmf*, *Cb111*) のプロモーター領域の H3K4me3 レベルを ChIP-qPCR で調べた。これらの遺伝子の H3K4me3 レベルは、ChIP シークエンスによって観察された同様の变化パターンを示した (図 6)。

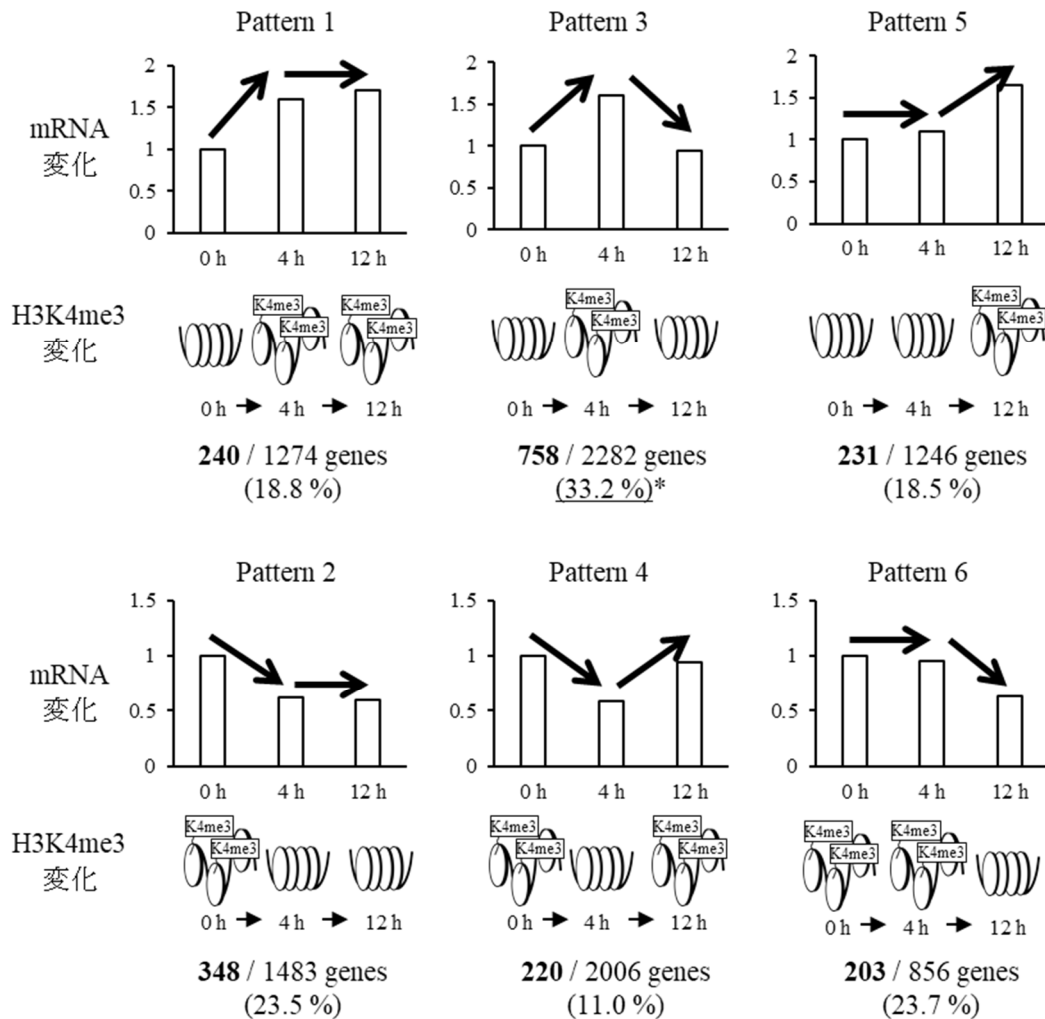


図 5. 各経時的パターンにおける H3K4me3 関連遺伝子の同定 各経時的パターンにおける H3K4me3 関連遺伝子の概略とその数を示す。2 時点の間で出現あるいは消失した H3K4me3 のピークを、H3K4me3 増加領域または減少領域と定義した。mRNA 発現のパターンと H3K4me3 の増加・減少のパターンが一致する遺伝子を H3K4me3 関連遺伝子と定義した。パターン 1 : mRNA 発現が 4 時間で上昇し、12 時間まで維持された 1274 遺伝子のうち、H3K4me3 変化が一致した遺伝子は 240 個である。パターン 2 : mRNA 発現が 4 時間で低下し、12 時間まで維持された 1483 遺伝子のうち、H3K4me3 変化が一致した遺伝子は 348 個である。パターン 3 : mRNA 発現が 4 時間で一時的に上昇した 2282 遺伝子のうち、H3K4me3 変化が一致した遺伝子は 758 個である。パターン 4 : mRNA 発現が 4 時間で一時的に低下した 2006 遺伝子のうち、H3K4me3 変化が一致した遺伝子は 220 個である。パターン 5 : mRNA 発現が 12 時間で上昇した 1246 遺伝子のうち、H3K4me3 変化が一致した遺伝子は 231 遺伝子である。パターン 6 : mRNA 発現が 12 時間で低下した 856 遺伝子のうち、H3K4me3 変化が一致した遺伝子は 203 遺伝子である。*P<0.05 vs other patterns.

表 2. 各パターンの H3K4me3 関連遺伝子が関与する代表的な Gene Ontology term と細胞機能

	ステロイド 産生	排卵	COC 膨化	血管新生	炎症反応	免疫	ROS 代謝	脂質代謝	糖代謝	DNA 修復	オート ファジー	細胞サイズ の調節
Pattern 1				venous blood vessel morphogenesis		regulation of immune system process	cellular response to reactive oxygen species					growth
Pattern 2								lipid localization				
Pattern 3	hormone metabolic process	ovulation cycle	hyaluronan metabolic process		inflammatory response	positive regulation of monocyte aggregation		lipid biosynthetic process				
Pattern 4								lipid metabolic process			autophagy	
Pattern 5								lipid metabolic process	cellular carbohydrate metabolic process			
Pattern 6												

細胞機能（最上段）に関連する代表的な GO term を示す。

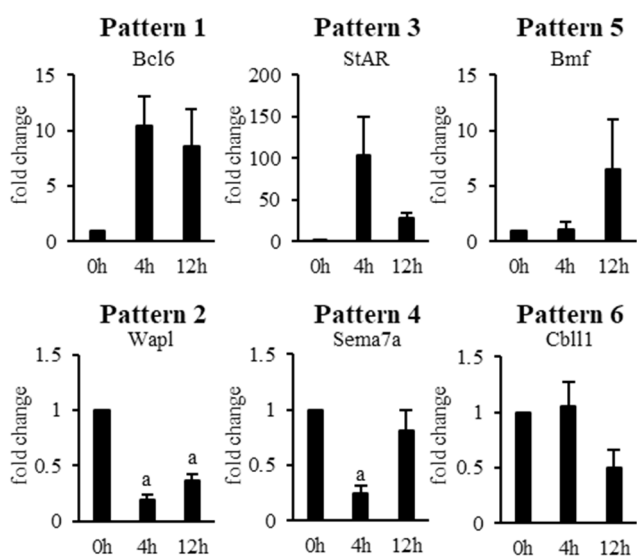


図 6. ChIP-qPCR による ChIP シークエンスデータの検証 H3K4me3 に関連する 6 遺伝子 (*Bcl6*、*Wap1*、*StAR*、*Sema7a*、*Bmf*、*Cbl11*) を選択し、H3K4me3 レベルを ChIP-qPCR で定量した。ChIP-qPCR のプライマーは、ChIP シークエンスで同定された H3K4me3 変化領域内に設計した。INPUT DNA に対する IPDNA の比を算出し、0 時間のサンプルとの比を計算した。値は mean ± SE (n=3)、a, P<0.05 vs. 0 h.

【考察】

本研究では、hCG 刺激から排卵までの黄体化過程における GCs の細胞機能の経時的変化を、RNA シークエンスによるゲノムワイドなアプローチで明らかにした。GCs は黄体化過程において、DNA 修復や細胞サイズの調節など、新たに同定された機能を含む、様々な細胞機能を獲得することが明らかになった。これらの細胞機能の多くは、遺伝子発現の急激な変化によって制御されていると考えられ、その遺伝子発現制御に H3K4me3 が関与している可能性が示された。

1. 黄体化過程の GCs におけるゲノムワイドな遺伝子発現の経時的変化

本研究は、黄体化過程の GCs の遺伝子発現を、hCG 投与後から排卵までの間の 3 時点で経時的に解析した初めての研究である。3 時点での経時的な解析により、黄体化過程における遺伝子発現が、ゲノムワイドに急激に変化していることを明らかにした。また、遺伝子発現の経時的変化は 8 パターンに分類することができ、黄体化過程では、遺伝子の発現が一方向に変化するのではなく、それぞれ適切なタイミングで適切な遺伝子が発現していることがわかった。排卵期には、LH サージにより cAMP を介して EGF-like factor (amphiregulin、epiregulin) が発現し、ERK パスウェイを活性化させる (6)。LH サージは、ERK パスウェイの活性化を速やかに誘導するが、その活性は一時的である (38-40)。このことが、一時的に発現上昇あるいは低下した遺伝子 (パターン 3、4) の数が他に比べて多かった理由と考えられる。実際、ERK パスウェイによって制御されることが報告されている遺伝子は、パターン 3 (*Ctgf*、*StAR*、*Cox-2*、*Tnfrsf10b*) やパターン 4 (*Inhbb*) に含まれていた (6、41)。また、GCs の黄体化に必要な機能としてよく知られているものは、主にパターン 3 の一時的に発現上昇する遺伝子と関連していた。このことは、黄体化過程に必要な機能の制御に ERK パスウェイが関与しているためと考えられる (2、6、7、42-44)。

排卵過程では、卵胞内のマクロファージ、好中球、血管内皮細胞から大量の ROS が産生される (45、46)。ROS は、排卵や卵子の成熟に不可欠な役割を果たしている (47、48)。しかし、過剰な ROS は卵胞内の卵子や GCs を傷害するため (49)、ROS のレベルは細胞機能を制御できる最小限の量に保たなければならない。実際、GCs は ROS レベルを調節する抗

酸化システムを有する (50)。LH サージの 4 時間後に卵胞内で ROS が増加し始めることを考慮すると (51)、hCG 投与後 4 時間から ROS 代謝に関わる遺伝子が活性化されることは妥当である (パターン 1 および 3)。つまり、黄体化過程において、GCs は過剰な ROS に反応し、除去するシステムを獲得すると考えられる。

LH サージは GCs の脂質代謝を変化させることが報告されている (52、53)。プロゲステロンはコレステロールから生成されるため、脂質代謝がステロイド産生と同様の時間経過で変化することは妥当である (パターン 3)。脂質代謝に関連する GO term は、hCG 投与 4 時間後の発現低下遺伝子にも含まれていたが (パターン 2、4)、*Adipor1* や *Fbxw7* など、脂質代謝を抑制する遺伝子も含まれていた (54、55)。総じて GCs では hCG 投与 4 時間後に脂質代謝が活性化され、ステロイド産生に寄与していると考えられる。

グルコース代謝は 12 時間で mRNA 発現上昇する遺伝子 (パターン 5) と関連しており、*Aldoa*、*Eno1*、*Pgam1* などの解糖系酵素をコードする遺伝子が含まれていた (56-58)。卵子成熟には ATP が必要であり (59)、卵丘細胞は高い解糖系活性を示し、卵母細胞に直接 ATP を供給する (60)。従って、GCs における hCG 投与 12 時間後の糖代謝の活性化は、ATP を供給することで卵子成熟に寄与していると考えられる。

4 時間で一過性に発現上昇あるいは低下した遺伝子は、オートファジーに関与していた (パターン 3、4)。オートファジーは、細胞の恒常性を維持するためにタンパク質や細胞小器官をリサイクルする異化過程であり、飢餓などのストレス条件下で活性化されるが、細胞の分化や代謝、アポトーシスなどの生理的プロセスも制御する (61)。オートファジーはアポトーシスを誘導することにより、卵胞閉鎖や黄体退縮に関与している (62、63)。さらに、最近になって、オートファジーが黄体化の制御に関係していることが報告された (64)。オートファジーは、細胞にコレステロールを供給することで脂質代謝にも関与していることから、オートファジーが黄体細胞でのプロゲステロン合成に関連していることが示唆されている。実際、オートファジー制御遺伝子 *Becn1* を GCs 特異的にノックアウトすると、妊娠中のマウスの黄体における脂質滴形成が減少し、妊娠初期のプロゲステロン産生が障害される (65)。パターン 4 には *Fbxw7* などのオートファジーを抑制する遺伝子が含

まれていたことから (66)、hCG 刺激はオートファジー関連遺伝子の一過性の発現変化を介して、オートファジーを活性化すると考えられる。また、ステロイド産生や脂質代謝がオートファジーと同じパターンに含まれることを考えると、オートファジーはコレステロール代謝を調節することでステロイド産生に寄与している可能性がある。実際、パターン 3 および 4 のオートファジーに関連する遺伝子 (*Srebf2* および *Fbxw7*) は、脂質代謝に関与している (55、66-68)。さらに、前述の ERK パスウェイがオートファジーを活性化することも報告されている (69)。以上より、黄体化過程の GCs では hCG 投与 4 時間後にオートファジーが活性化され、ステロイド産生に寄与している可能性がある。さらに、オートファジーは 12 時間で発現低下する遺伝子 (パターン 6) とも関連しており、その中には *Dram2* などのアポトーシスに関与する遺伝子も含まれていた (70、71)。従って、排卵直前のオートファジーの抑制は、GCs のアポトーシスを抑制し、黄体形成のための細胞生存に寄与していると考えられる。

興味深いことに、これまで黄体化過程の GCs では報告されたことのなかった細胞機能が活性化されていることが本研究により示唆された。1 つは、パターン 3 にある DNA 修復である。排卵期の酸化ストレスは、GCs の DNA 損傷の原因となる (72)。排卵期に生じた DNA 損傷に反応して、DNA 修復に関わる遺伝子が活性化されることは妥当である。実際、パターン 3 には、ROS で損傷した DNA を修復する遺伝子 *Grb2* が含まれていた (73)。つまり、黄体化過程において GCs は DNA 修復機構を獲得すると考えられる。

もう 1 つの新しい機能は、細胞の大きさの調節である。GCs のサイズは黄体化過程で増大するが (74)、そのメカニズムは明らかになっていない。パターン 1 に含まれる *Cdc42* は、細胞の増大を制御するのに重要な mTOR (mechanistic target of rapamycin) パスウェイを活性化する (75)。実際、黄体化過程の GC では mTOR シグナルが活性化されるといわれている (76)。これらの結果から、hCG 刺激によって mTOR 経路を介して細胞サイズの増大に関わるパスウェイが活性化され、排卵まで維持されると考えられる。

2. 黄体化に伴うヒストン修飾のゲノムワイドな変化

我々は、*StAR*、*Cyp11a1*、*Cyp19a1*、*Vegf*の制御にヒストン修飾とクロマチン構造変化が関与することを報告している（2、8、9）。本研究は、黄体化過程のGCsにおけるH3K4me3がゲノム全域にわたって変化していることを初めて明らかにした。hCG投与0時間から4時間にかけては、H3K4me3が増加した領域の方が減少した領域よりも多かったが、4時間から12時間ではH3K4me3減少領域の方が多かった。また、TSS周囲のH3K4me3レベルは4時間で最も高くなった。H3K4me3が転写活性化指標であることを考慮すると、今回の結果はhCG投与後4時間の転写活性が最も高いということを示唆している。このことは、hCG投与4時間後に多くの遺伝子が一過性に発現上昇したことと一致する結果である。また、我々は、ラットGCsの*StAR*プロモーター領域において、ERK阻害剤がhCG刺激によるH3K4me3の増加を抑制することを報告した（19）。よって、ERKパスウェイの一時的な活性化が、ゲノムワイドなH3K4me3レベルの一時的な増加に関与している可能性があると考えられた。

また、ゲノムワイドのmRNA発現データとH3K4me3データを統合することで、H3K4me3の変化が遺伝子発現の急激な変化とどのように関連しているのかを調べた。発現変化した遺伝子のうち、H3K4me3変化を伴う遺伝子はH3K4me3変化を伴わない遺伝子に比べて、mRNA発現の変化量が大きかった（図4）。このことは、H3K4me3の変化がGCsにおける遺伝子発現の急激な変化を制御している可能性を示唆している。さらに、パターン3のH3K4me3関連遺伝子が最も多かったことから、特にH3K4me3の一過性の増加が、遺伝子発現の一過性上昇に寄与していることが示唆された。

G0解析の結果、H3K4me3関連遺伝子は、黄体化過程において既知の細胞機能（ステロイド産生、排卵、COC膨化、血管新生、炎症反応、免疫、ROS代謝、脂質・糖代謝、オートファジー）や新たな細胞機能（細胞サイズの調節）に関与していることがわかった。つまり、hCG刺激によるゲノムワイドなH3K4me3の変化は、急激な遺伝子発現変化と細胞機能の変化を制御し、GCsの黄体化に寄与していると考えられる。

図7に本研究結果により得られた黄体化過程における細胞機能変化のまとめを示す。本

研究は、マウス GCs の黄体化過程における遺伝子発現と H3K4me3 の変化を、ゲノムワイドかつ経時的に解析し報告した初めての研究である。H3K4me3 の劇的な変化は、LH サージ後のゲノムワイドな遺伝子発現の急激な変化と関連しており、GCs の黄体化に必要な機能的変化に寄与することが明らかになった。

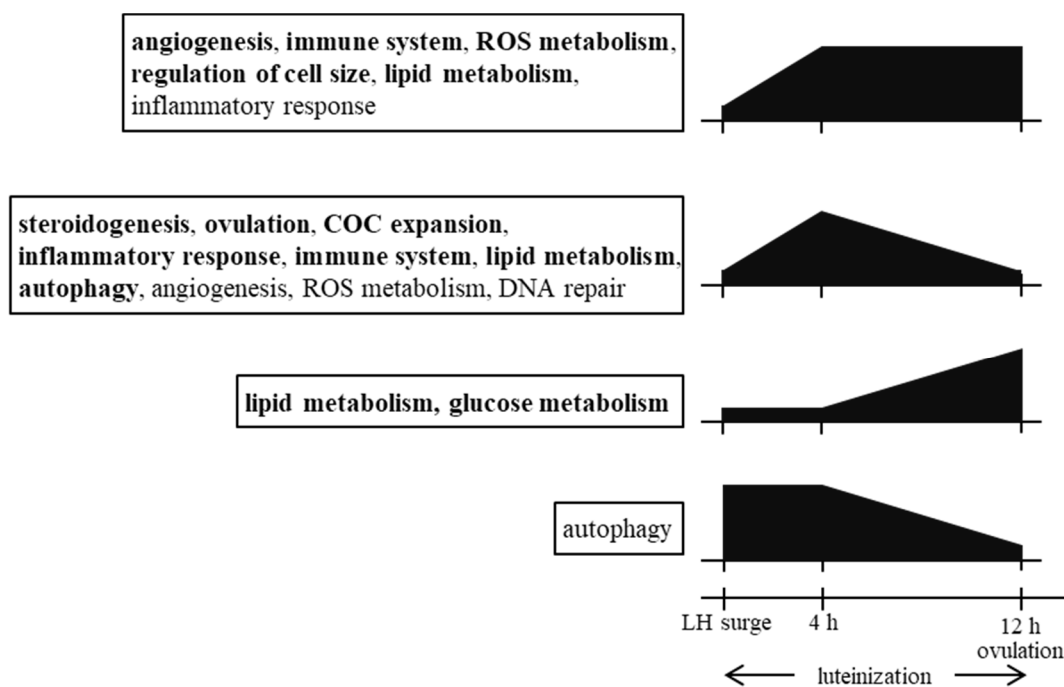


図7. 黄体化過程のGCsにおける細胞機能の変化のまとめ LHサージ後のGCsにおける細胞機能の経時的变化を示す。H3K4me3の変化に関連する細胞機能を太字で示した。

【謝辞】

本研究は文部科学省の科学研究費（16K20191、17K11239、18K09230、20K09645、20K18191、20H03825）によって資金提供されている。本論文は Endocrinology 162: 1-17, 2021 の論文の和訳であり、学位論文として投稿することを許可されている。

【参考文献】

1. Prochazka R, Blaha M, Nemcová L. Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes. *Biol. Reprod.* 2017;97(4):537-549.
2. Shinagawa M, Tamura I, Maekawa R, Sato S, Shirafuta Y, Mihara Y, Okada-Matsumoto M, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N. C/EBP β regulates Vegf gene expression in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in female rats. *Sci. Rep.* 2019;9(1):714.
3. Kizuka F, Tokuda N, Takagi K, Adachi Y, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Tamura H, Suzuki T, Owada Y, Sugino N. Involvement of bone marrow-derived vascular progenitor cells in neovascularization during formation of the corpus luteum in mice. *Biol. Reprod.* 2012;87(3):55.
4. Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. Ovulation: Parallels With Inflammatory Processes. *Endocr. Rev.* 2019;40(2):369-416.
5. Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod. Med. Biol.* 2020;19(1):13-23.
6. Fan H-Y, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 2009;324(5929):938-941.
7. Fan H-Y, Liu Z, Johnson PF, Richards JS. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- α and - β are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol. Endocrinol.* 2011;25(2):253-268.
8. Okada M, Lee L, Maekawa R, Sato S, Kajimura T, Shinagawa M, Tamura I, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N. Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing Luteinization During Ovulation in Female Rats. *Endocrinology* 2016;157(9):3344-3354.
9. Lee L, Asada H, Kizuka F, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology* 2013;154(1):458-470.
10. Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology* 2005;146(8):3247-3262.

11. Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Høst T, Borup R, Grøndahl ML. Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Hum. Reprod.* 2014;29(5):997-1010.
12. Carletti MZ, Christenson LK. Rapid effects of LH on gene expression in the mural granulosa cells of mouse periovulatory follicles. *Reproduction* 2009;137(5):843-855.
13. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007;128(4):707-719.
14. Tamura I, Taketani T, Lee L, Kizuka F, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Tamura H, Sugino N. Differential effects of progesterone on COX-2 and Mn-SOD expressions are associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011;96(7):E1073-82.
15. Tamura I, Asada H, Maekawa R, Tanabe M, Lee L, Taketani T, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Induction of IGFBP-1 expression by cAMP is associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2012;153(11):5612-5621.
16. Tamura I, Sato S, Okada M, Tanabe M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Importance of C/EBP β binding and histone acetylation status in the promoter regions for induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 2014;155(1):275-286.
17. Tamura I, Jozaki K, Sato S, Shirafuta Y, Shinagawa M, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Tamura H, Sugino N. The distal upstream region of insulin-like growth factor-binding protein-1 enhances its expression in endometrial stromal cells during decidualization. *J. Biol. Chem.* 2018;293(14):5270-5280.
18. Lauberth SM, Nakayama T, Wu X, Ferris AL, Tang Z, Hughes SH, Roeder RG. H3K4me3 interactions with TAF3 regulate preinitiation complex assembly and selective gene activation. *Cell* 2013;152(5):1021-1036.
19. Maekawa R, Lee L, Okada M, Asada H, Shinagawa M, Tamura I, Sato S, Tamura H, Sugino N. Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J. Ovarian Res.* 2016;9:15.

20. Tamura I, Ohkawa Y, Sato T, Suyama M, Jozaki K, Okada M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N. Genome-wide analysis of histone modifications in human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol.* 2014;28(10):1656-1669.
21. Maekawa R, Tamura I, Shinagawa M, Mihara Y, Sato S, Okada M, Taketani T, Tamura H, Sugino N. Genome-wide DNA methylation analysis revealed stable DNA methylation status during decidualization in human endometrial stromal cells. *BMC Genomics* 2019;20(1):324.
22. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Goto Y, Takizawa N, Nozaki N. The organization of histone H3 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Cell Struct. Funct.* 2008;33(1):61-73.
23. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25.
24. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 2008;9(9):R137.
25. Zhu LJ, Gazin C, Lawson ND, Pagès H, Lin SM, Lapointe DS, Green MR. ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics* 2010;11:237.
26. Zhu LJ. Integrative analysis of ChIP-chip and ChIP-seq dataset. *Methods Mol. Biol.* 2013;1067:105-124.
27. Pham T-H, Benner C, Lichtinger M, Schwarzfischer L, Hu Y, Andreesen R, Chen W, Rehli M. Dynamic epigenetic enhancer signatures reveal key transcription factors associated with monocytic differentiation states. *Blood* 2012;119(24):e161-71.
28. Tamura I, Maekawa R, Jozaki K, Ohkawa Y, Takagi H, Doi-Tanaka Y, Shirafuta Y, Mihara Y, Taketani T, Sato S, Tamura H, Sugino N. Transcription factor C/EBP β induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2021;520:111085.
29. Shen L, Shao N, Liu X, Nestler E. ngs.plot: Quick mining and visualization of next-generation sequencing data by integrating genomic databases. *BMC*

Genomics 2014;15:284.

30. Tamura I, Shirafuta Y, Jozaki K, Kajimura T, Shinagawa M, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Sato S, Tamura H, Sugino N. Novel Function of a Transcription Factor WT1 in Regulating Decidualization in Human Endometrial Stromal Cells and Its Molecular Mechanism. *Endocrinology* 2017;158(10):3696-3707.
31. Tamura I, Takagi H, Doi-Tanaka Y, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, Maekawa R, Taketani T, Sato S, Tamura H, Sugino N. Wilms tumor 1 regulates lipid accumulation in human endometrial stromal cells during decidualization. *J. Biol. Chem.* 2020;295(14):4673-4683.
32. Mihara Y, Maekawa R, Sato S, Shimizu N, Doi-Tanaka Y, Takagi H, Shirafuta Y, Shinagawa M, Tamura I, Taketani T, Tamura H, Abe T, Asai Y, Sugino N. An Integrated Genomic Approach Identifies HOXC8 as an Upstream Regulator in Ovarian Endometrioma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020;105(12). doi:10.1210/clinem/dgaa618.
33. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009;4(1):44-57.
34. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 2011;6(7):e21800.
35. Robker RL, Hennebold JD, Russell DL. Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. *Endocrinology* 2018;159(9):3209-3218.
36. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005;3:28.
37. Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 2007;130(1):77-88.
38. Shimada M, Umehara T, Hoshino Y. Roles of epidermal growth factor (EGF)-like factor in the ovulation process. *Reprod. Med. Biol.* 2016;15(4):201-216.
39. Park J-Y, Su Y-Q, Ariga M, Law E, Jin S-LC, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*

2004;303(5658):682-684.

40. Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum. Reprod. Update* 2007;13(3):289-312.
41. Cheng J-C, Chang H-M, Fang L, Sun Y-P, Leung PCK. TGF- β 1 Up-Regulates Connective Tissue Growth Factor Expression in Human Granulosa Cells through Smad and ERK1/2 Signaling Pathways. *PLoS One* 2015;10(5):e0126532.
42. Fang L, Cheng J-C, Chang H-M, Sun Y-P, Leung PCK. EGF-like growth factors induce COX-2-derived PGE2 production through ERK1/2 in human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(12):4932-4941.
43. Yang M, Wang X, Wang L, Wang X, Li J, Yang Z. IL-1 α Up-Regulates IL-6 Expression in Bovine Granulosa Cells via MAPKs and NF- κ B Signaling Pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017;41(1):265-273.
44. Kwong E, Li Y, Hylemon PB, Zhou H. Bile acids and sphingosine-1-phosphate receptor 2 in hepatic lipid metabolism. *Acta Pharm Sin B* 2015;5(2):151-157.
45. Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reprod. Med. Biol.* 2005;4(1):31-44.
46. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr. J.* 2013;60(1):1-13.
47. Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108(4):1462-1467.
48. Abdelnour SA, Swelum AA, Abd El-Hack ME, Khafaga AF, Taha AE, Abdo M. Cellular and functional adaptation to thermal stress in ovarian granulosa cells in mammals. *J. Therm. Biol.* 2020;92:102688.
49. Tamura H, Jozaki M, Tanabe M, Shirafuta Y, Mihara Y, Shinagawa M, Tamura I, Maekawa R, Sato S, Taketani T, Takasaki A, Reiter RJ, Sugino N. Importance of Melatonin in Assisted Reproductive Technology and Ovarian Aging. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(3). doi:10.3390/ijms21031135.
50. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Aasada H, Yamagata Y, Sugino N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J. Ovarian Res.* 2012;5:5.

51. Kodaman PH, Behrman HR. Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 2001;142(2):687-693.
52. Brogan RS, MacGibeny M, Mix S, Thompson C, Puttabyatappa M, VandeVoort CA, Chaffin CL. Dynamics of intra-follicular glucose during luteinization of macaque ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011;332(1-2):189-195.
53. Dunning KR, Russell DL, Robker RL. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. *Reproduction* 2014;148(1):R15-27.
54. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J. Mol. Cell Biol.* 2016;8(2):101-109.
55. Li L, Yang J, Li F, Zhu L, Hao J. FBXW7 mediates high glucose-induced SREBP-1 expression in renal tubular cells of diabetic nephropathy under PI3K/Akt pathway regulation. *Mol. Med. Rep.* 2021;23(4). doi:10.3892/mmr.2021.11872.
56. Chang Y-C, Yang Y-C, Tien C-P, Yang C-J, Hsiao M. Roles of Aldolase Family Genes in Human Cancers and Diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* 2018;29(8):549-559.
57. Ji H, Wang J, Guo J, Li Y, Lian S, Guo W, Yang H, Kong F, Zhen L, Guo L, Liu Y. Progress in the biological function of alpha-enolase. *Anim Nutr* 2016;2(1):12-17.
58. Li N, Liu X. Phosphoglycerate Mutase 1: Its Glycolytic and Non-Glycolytic Roles in Tumor Malignant Behaviors and Potential Therapeutic Significance. *Onco. Targets. Ther.* 2020;13:1787-1795.
59. Zeng H-T, Ren Z, Yeung WSB, Shu Y-M, Xu Y-W, Zhuang G-L, Liang X-Y. Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes. *Hum. Reprod.* 2007;22(6):1681-1686.
60. Dalton CM, Szabadkai G, Carroll J. Measurement of ATP in single oocytes: impact of maturation and cumulus cells on levels and consumption. *J. Cell. Physiol.* 2014;229(3):353-361.
61. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*

2008;132(1):27-42.

62. Zhou J, Peng X, Mei S. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *Int. J. Biol. Sci.* 2019;15(4):726-737.
63. Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. The role of autophagy in corpus luteum regression in the rat. *Biol. Reprod.* 2011;85(3):465-472.
64. Tang Z, Zhang Z, Lin Q, Xu R, Chen J, Wang Y, Zhang Y, Tang Y, Shi C, Liu Y, Yang H, Wang Z. HIF-1 α /BNIP3-Mediated Autophagy Contributes to the Luteinization of Granulosa Cells During the Formation of Corpus Luteum. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:619924.
65. Gawriluk TR, Ko C, Hong X, Christenson LK, Rucker EB 3rd. Beclin-1 deficiency in the murine ovary results in the reduction of progesterone production to promote preterm labor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014;111(40):E4194-203.
66. Xie C-M, Tan M, Lin X-T, Wu D, Jiang Y, Tan Y, Li H, Ma Y, Xiong X, Sun Y. The FBXW7-SHOC2-Raptor Axis Controls the Cross-Talks between the RAS-ERK and mTORC1 Signaling Pathways. *Cell Rep.* 2019;26(11):3037-3050. e4.
67. Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 2004;86(11):839-848.
68. Seo Y-K, Jeon T-I, Chong HK, Biesinger J, Xie X, Osborne TF. Genome-wide localization of SREBP-2 in hepatic chromatin predicts a role in autophagy. *Cell Metab.* 2011;13(4):367-375.
69. Wang H, Liu Y, Wang D, Xu Y, Dong R, Yang Y, Lv Q, Chen X, Zhang Z. The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. *Cells* 2019;8(12). doi:10.3390/cells8121597.
70. Yoon J-H, Her S, Kim M, Jang I-S, Park J. The expression of damage-regulated autophagy modulator 2 (DRAM2) contributes to autophagy induction. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39(2):1087-1093.
71. Park S-M, Kim K, Lee E-J, Kim B-K, Lee TJ, Seo T, Jang I-S, Lee S-H, Kim S, Lee J-H, Park J. Reduced expression of DRAM2/TMEM77 in tumor cells interferes with cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;390(4):1340-1344.

72. Park CJ, Lin P-C, Zhou S, Barakat R, Bashir ST, Choi JM, Cacioppo JA, Oakley OR, Duffy DM, Lydon JP, Ko CJ. Progesterone Receptor Serves the Ovary as a Trigger of Ovulation and a Terminator of Inflammation. *Cell Rep.* 2020;31(2):107496.
73. Hou B, Xu S, Xu Y, Gao Q, Zhang C, Liu L, Yang H, Jiang X, Che Y. Grb2 binds to PTEN and regulates its nuclear translocation to maintain the genomic stability in DNA damage response. *Cell Death Dis.* 2019;10(8):546.
74. Bender HR, Trau HA, Duffy DM. Placental Growth Factor Is Required for Ovulation, Luteinization, and Angiogenesis in Primate Ovulatory Follicles. *Endocrinology* 2018;159(2):710-722.
75. Fang Y, Park I-H, Wu A-L, Du G, Huang P, Frohman MA, Walker SJ, Brown HA, Chen J. PLD1 regulates mTOR signaling and mediates Cdc42 activation of S6K1. *Curr. Biol.* 2003;13(23):2037-2044.
76. da Rosa P, Dau A, De Cesaro MP, Dos Santos JT, Gasperin BG, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves P. Mechanistic target of rapamycin is activated in bovine granulosa cells after LH surge but is not essential for ovulation. *Reprod. Domest. Anim.* 2016;51(5):766-773.