

別紙 1

論文内容の要旨

論文題目 アフリカツメガエル初期発生における IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達系の作用機序の解析

指導教官 御子柴克彦教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 実吉岳郎

細胞外の刺激に対しフォスファチジルイノシトール (PI) の代謝回転が活性化されるとフォスファチジルイノシトール4、5リン酸が水解され、イノシトール1, 4, 5三リン酸 (IP_3) ジアシルグリセロールが生成される。 IP_3 は細胞内小器官の小胞体膜上に存在する IP_3 受容体に作用して細胞内貯蔵庫からのカルシウム (Ca^{2+}) 放出を制御する情報伝達物質である。 IP_3 受容体は、ほぼ全ての組織、細胞に存在し多彩な生命現象に関与していると考えられている。

IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達経路は、以下のような事実から体軸形成に関与していると考えられている。(1) アフリカツメガエルにおいて中胚葉誘導の始まる時期とされる 32-64 細胞期に IP_3 含量の一過的上昇が観察される。(2) イノシトール代謝酵素の阻害剤であるリチウムをアフリカツメガエル (以下ツメガエル) やゼブラフィッシュ、ヒドラへ曝露させると胚が背側化する。なお、この現象はイノシトールの注入で見られなくなる。(3) 32-64 細胞期での IP_3 含量上昇がリチウムによって消失する。(4) 背側でイノシトール代謝を活性化すると胚が腹側化する。(5) IP_3 受容体に対する特異的な機能阻害抗体を腹側割球へ注入すると背側化が観察される。これらの結果は、 IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達経路が腹側化シグナルとして機能していることを強く示唆する。

これまでに多くの背側化因子および腹側化因子が同定されているが、

いずれも IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達経路との関連は明らかでない。そこで本研究は脊椎動物初期発生における体軸形成の分子機構を明らかにするために、 IP_3 - Ca^{2+} シグナル伝達経路の上流のシグナル、つまり IP_3 産生を誘導する分子、および下流のシグナルである、 IP_3 により上昇した細胞質 Ca^{2+} により制御され腹側化を誘導する分子の同定を試み、それぞれの作用メカニズムについての解析を行った。

Ca^{2+} シグナルは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過的上昇、持続的上昇、 Ca^{2+} 濃度の上昇と降下を繰り返す Ca^{2+} 振動など多様な濃度変化の様式を持ち、複数の転写調節因子が Ca^{2+} 振動の頻度の違いをそれぞれの活性の使い分けに利用している。このような Ca^{2+} シグナルを解読しうる転写調節因子の一つ、nuclear factor of activated T-cell (NF-AT) は Ca^{2+} /カルモデュリン (CaM) 依存性脱リン酸化酵素のカルシニューリン (Cn) の制御を受ける転写因子である。Cn/NF-AT 経路は T 細胞活性化を中心に解析されてきたが、神経系で IP_3 受容体の発現を調節しているほか、心肥大や骨格筋の分化に関与していることも報告された。このように多様な機能を持つ Cn/NF-AT 経路であるが、ツメガエルでの Cn および NF-AT 分子の存在の報告はなく、当然どのような機能を持つかは全く不明である。そこで、Cn および NF-AT のツメガエル相同遺伝子を単離し、時空間的発現、 Ca^{2+} 依存性、体軸形成に与える影響を調べることにより Cn/NF-AT 経路が腹側化シグナルとして機能するかを検討した。

Cn A subunit (CnA)のツメガエル相同遺伝子 (XCnA) をツメガエル卵母細胞 cDNA ライブラリーよりマウス EST clone (mouse CnA 断片)をプローブに用いプラークハイブリダイズ法により単離した。XCnA は、マウスやヒト CnA とアミノ酸レベルで全長では 93%以上の相同性を示し、母性因子のタンパク質として未受精卵から各発生段階で一定量発現していた。自己阻害領域を欠損させることにより Ca^{2+} 非依存的な酵素活性を示す XCnA (X Δ CnA) を作成し強制発現させたところ、背側中胚葉誘導因子であるアクチビンによる予定外胚葉外植体の伸長反応が部分的に阻害された。腹側化因子は背側での伸長運動を阻害することが知られており、このことから Cn が腹側化活性を持つことが考えられた。

次にツメガエル卵母細胞 cDNA library よりマウス NF-ATc1 Rel domain をプローブにしたプラークハイブリダイズ法によりツメガエル NF-AT 相同遺伝子 XNF-AT を単離した。XNF-AT も XCnA と同じく母性因子としてタンパク質、RNA

ともに存在し、発生段階を通じて一定量発現していた。培養細胞に発現させた XNF-AT はカルシウムイオノフォア A23187 刺激もしくは XΔCnA の共発現により脱リン酸化され、核内へ移行した。XNF-AT は Cn 活性および AP1 依存的に NF-AT 結合サイトを含むマウス IL-2 プロモーターを活性化させた。以上、XNF-AT は、1) 母性因子として存在すること、2) Ca²⁺/Cn 依存的な転写因子であることから腹側化シグナルとしての IP₃-Ca²⁺シグナルの下流で働きうる分子であることが示唆された。

続いて恒常的活性化型 XNF-AT と顕性不活性 XNF-AT を用いた機能獲得実験および機能喪失実験により XNF-AT の背腹軸形成への関与を検討した。Cn による脱リン酸化部位および Cn 結合部位を欠損させた XNF-AT ΔSP は培養細胞において刺激の有無に関わらず核内に局在し、Cn 非依存的に IL-2 プロモーターを活性化させた。すなわち、XNF-AT ΔSP は Ca²⁺刺激に対し非感受性であり、恒常的活性化型 XNF-AT として機能することを確かめた。XNF-AT ΔSP RNA を 4 細胞期の割球へ注入すると、前頭部構造の形成阻害が観察された。さらに、XNF-AT ΔSP の発現により予定外胚葉外植体の中胚葉誘導因子アクチビンや FGF による伸長運動が阻害された。これらの結果は、XNF-AT に腹側化活性があることを示唆する。XNF-AT の DNA 結合部位を含む C 末端 Rel 相同領域を全て欠損させた XNF-AT ΔRel はツメガエルにおいて野生型 XNF-AT による IL-2 プロモーターの活性化を濃度依存的に阻害した。このことから XNF-AT ΔRel が機能喪失型 XNF-AT として機能することが確かめられた。XNF-AT ΔRel RNA を 4 細胞期腹側割球への注入すると異所性の体軸（二次軸）が生成された。さらにこの二次軸は野生型 NF-AT との共発現によってレスキューされた。XNF-AT ΔRel の効果を分子マーカーの発現で確認したところ、XNF-AT ΔRel により予定腹側帯域外植体でのオーガナイザーマーカーの *gooseoid*, *chordin* の他、*Xnr3*, *siamois* の発現が上昇、逆に腹側マーカーである *Xvent*, *Xhox3* の発現が消失していた。これらの結果は XNF-AT ΔRel が内在性の NF-AT 活性を特異的に阻害して腹から背への運命変換を起こしたと解釈できる。以上、XNF-AT は機能獲得で腹側化、機能喪失で背側化を引き起こすことから腹側化因子であると結論した。よって、IP₃-Ca²⁺シグナルの下流として Cn/NF-AT による転写調節を経て腹側化が引き起こされているものと考えられる。

XNF-AT ΔRel により誘導された *Xnr3*, *siamois* は背側化因子の一つである Wnt/β-catenin 経路特異的な標的遺伝子産物であり、NF-AT 経路の抑制が

Wnt/ β -catenin 経路を活性化したことを意味する。実際、XNF-AT Δ Rel によって β -catenin タンパク質の安定化が起きること、Xwnt8 による二次軸の形成を XNF-AT Δ SP が抑制することからも NF-AT 経路と Wnt/ β -catenin 経路のクロストークが推察された。そこで Wnt/ β -catenin 経路との作用点がどこかを XNF-AT Δ Rel と Wnt 経路の負の調節因子 (*frzb*, 顕性不活性型 Xdsh, GSK3 β , 顕性不活性型 Tcf) との共発現により解析した。XNF-AT Δ Rel による *siamois*, *Xnr3* の発現誘導は XGSK3 β および顕性不活性型 XTcf によって消失した。この結果は XNF-AT 経路は Wnt/ β -catenin 経路を少なくとも GSK3 β より上流、Xdsh より下流で負に制御していることを示唆する。

Wnt 経路は現在のところその機能から二つのグループ、背側化活性を持つ Wnt/ β -catenin、G タンパク質を介して Ca²⁺動員を起こすとされる Wnt/Ca²⁺経路の二つに分けられる。Wnt/Ca²⁺経路の機能は不明な点が多いが、その発現により 1) Wnt/ β -catenin の活性を抑制する、2) 予定外胚葉外植体のアクチビンによる伸長運動を阻害するなどの表現型を示し、それらは XNF-AT で得られた表現系と極めて一致する。従って、Wnt/Ca²⁺経路は細胞内 Ca²⁺動員を起こすことと過剰発現による表現型の相似から NF-AT 経路の上流に位置すると予想される。そこで Wnt/Ca²⁺経路が直接 Cn/NF-AT を活性化させるか否かを検討した。培養細胞において Wnt/Ca²⁺経路が NF-AT に依存的な転写を活性化したこと、予定外胚葉外植体における NF-AT の核内移行を促進したこと、さらにインビボで Xwnt5A による表現系を XNF-AT が強調したことから Wnt/Ca²⁺経路が NF-AT 経路を活性化させる上流経路であることが強く示唆された。

以上の結果より、ツメガエルにおいて背腹軸形成時に IP₃-Ca²⁺シグナル伝達系は Cn/NF-AT を介して腹側化シグナルとして働く事が示された。その作用機構は Wnt/Ca²⁺経路を上流とし、背側化シグナルである Wnt/ β -catenin の活性を阻害することで腹側化シグナルとして機能していると推察できる。