

審査の結果の要旨

氏名 実吉岳郎

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ことを目的とし、アフリカツメガエルをモデル系に用い腹側化シグナルである inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)-Ca²⁺シグナル伝達経路の上流のシグナル、つまり IP₃ 産生を引き起こし細胞内 Ca²⁺上昇を誘導する分子の同定、および下流のシグナルである、細胞質 Ca²⁺により制御され腹側化を誘導する分子の同定を試み、下記の結果を得ている。

1. Ca²⁺/カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素 calcineurin とその基質の転写因子 nuclear factor of activated T-cell (NF-AT) が腹側化シグナルを担う分子であるかを検討した。はじめに calcineurin および NF-AT のアフリカツメガエル相同遺伝子を単離し、時空間的発現変化を検討した。ノーザンブロット法およびウェスタンブロット法により両分子とも未受精卵から発生段階を通じて一定量発現が認められ母性因子として存在している事が示された。培養細胞およびアフリカツメガエルに発現させた XNF-AT は calcineurin の活性により NF-AT 依存的な転写を活性化させたことから calcineurin/NF-AT は、Ca²⁺シグナルによって活性化する分子であることを示した。さらにカルシウムキレート剤である BAPTA の微量注入によりカルシウムイオンを枯渇させた場合、および calcineurin 阻害剤である FK506 によって calcineurin を不活性化させた場合に内在性 XNF-AT タンパク質がリン酸化型に変化したことから、XNF-AT タンパク質は定常状態がリン酸化型でありカルシウムによって積極的に脱リン酸化されている分子であることが示された。

2. 初期発生期における XNF-AT の機能を知るため、loss-of-function および gain-of-function 変異体を作成し XNF-ATΔRel、XNF-ATΔSP とそれぞれ命名した。XNF-ATΔRel は、腹側に発現させると異所性の体軸すなわち二次軸を誘導した。この結果は、腹側の細胞運命を背側に変換したことを意味し XNF-AT が腹側化活性を持つことを示唆する。XNF-ATΔSP を背側で発現させると、一次軸の形成を阻害し腹側化させた。これらの結果は XNF-AT が腹側化に必要な十分な分子であることを意味する。また、XNF-ATΔSP はアフリカツメガエル IP₃ 受容体(IP3R)に対する機能阻害抗体の微量注入による背側化を救出した。すなわち、XNF-AT が IP₃-Ca²⁺シグナルの下流で腹側化活性として機能する分子であることが示唆された。

3. IP_3 産生を介し細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こすことが報告されていることと胚に与える影響の相似から、Wnt/ Ca^{2+} 経路が腹側化シグナルとしての IP_3 - Ca^{2+} , calcineurin/NF-AT の上流の候補の一つとして考えられた。そこで、Wnt/ Ca^{2+} 経路が calcineurin/NF-AT を直接活性化させるかを検討した。具体的には培養細胞による転写活性、予定外胚葉外植体における NF-AT の核内移行、初期発生に及ぼす影響を解析した。培養細胞では Wnt/ Ca^{2+} 経路の活性化は NF-AT 依存的な転写を活性化した。予定外胚葉外植体内において XNF-AT 分子は、単独では細胞質に局在しているが、Xwnt5A/Rfz2 と共発現させると核内にも局在が観察された。さらに、Xwnt5A による表現型が XNF-AT の共発現によって強調された。これらの結果は、Wnt/ Ca^{2+} 経路が calcineurin/NF-AT を活性化したと考えられる。すなわち、calcineurin/NF-AT の上流に Wnt/ Ca^{2+} 経路が機能する可能性が示唆された。

4. XNF-AT 変異体の及ぼす影響を RT-PCR 法により各種マーカー遺伝子の発現動態について検討したところ、XNF-AT Δ Rel の強制発現は予定腹側域外植体のみならず予定外胚葉外植体でも Wnt/ β -catenin 経路を活性化した。この作用点を、Wnt/ β -catenin 経路の陰性調節因子である Xfrzb, dominant negative Dsh, XGSK3 β , dominant negative Xtcf3 とそれぞれ共発現させて検討し、 β -catenin より上流、GSK3 β よりも下流であることを示した。また、Xwnt8 による二次軸誘導を XNF-AT Δ SP の共発現によって救出できた。すなわち、XNF-AT Δ Rel により Wnt/ β -catenin 経路を活性化、XNF-AT Δ SP が抑制したことから、NF-AT は初期発生時に Wnt/ β -catenin 経路を抑制することで、腹側化シグナルとして機能していることが考えられた。

以上、本論文はアフリカツメガエルにおいて calcineurin/NF-AT が腹側化活性を持つ分子カスケードであること、および Wnt/ β -catenin 経路と Wnt/ Ca^{2+} 経路との接点に calcineurin/NF-AT が機能している可能性を示した。本研究は初期発生時のみならず、器官形成等の複雑なシグナル伝達系経路のクロストークの理解に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。