

論文の内容の要旨

論文題目 Localization and functional analysis of two IQGAPs
in *Xenopus laevis* cells and embryos.

(アフリカツメガエル IQGAP の細胞内及び初期胚内に
おける局在性とその機能の解析)

氏名 山城佐和子

アクチン細胞骨格の動的な再編成は、細胞運動、細胞質分裂、細胞接着など、多くの細胞現象において重要な役割を果たしている。これらの現象では低分子量 G-タンパク質の Rho ファミリーが、その標的タンパク質を介してアクチン細胞骨格の制御に関与していることが報告されている。しかし、その制御機構は未だ不明な点が多い。また、動物の初期発生の過程では細胞の移動や、形態の変化、細胞接着構造の再構築が形態形成運動において重要である。近年、ショウジョウバエやアフリカツメガエルを用いた研究から、Rho ファミリータンパク質が形態形成運動に関与することが明らかにされた (Harden et al., 1999, Choi et al., 2002, Lucas et al., 2002)。しかし、初期発生過程における標的タンパク質及びその調節機構については、ほとんどが未解明である。アクチン調節タンパク質である IQGAP は、これらの過程において、Rho ファミリータンパク質の制御によりアクチン細胞骨格の動態を調節する有力な候補である。ヒト IQGAP は F-actin 結合部位を持ち、カルモジュリン及び低分子量 G-タンパク質 Rho ファミリ

一の Cdc42、Rac と結合することから、これらの因子を介してアクチン細胞骨格の調節に関与すると考えられている。ヒト IQGAP1 は *in vitro* で F-アクチンを束化し、哺乳類培養細胞内では細胞表層や ruffling membrane において F-アクチンと共局在する。また、近年、出芽酵母、分裂酵母、細胞性粘菌で IQGAP 様タンパク質が細胞質分裂に必須であることが報告された (Lippincott and Li, 1998、Eng et al., 1998、Adachi et al., 1997)。一方、哺乳類培養細胞において、IQGAP1 は β -catenin、E-cadherin と結合して細胞間接着の調節に関与しており、その活性は Cdc42 及び Rac によって制御されることが報告された (Kuroda et al., 1998)。従って IQGAP は Rho ファミリーの制御を受けてアクチン細胞骨格の調節及び細胞間接着の調節に働き、細胞運動や細胞質分裂、及び個体の初期発生時の形態形成運動に関与していると考えられる。しかし、IQGAP が動物細胞の細胞質分裂に関わるのかどうか、また、形態形成運動に関わるのかどうかについてはわかっていない。さらに、IQGAP によるアクチン調節機構や IQGAP の活性制御機構についても未だ不明の点が多い。アフリカツメガエルは種々の点で細胞内のアクチン細胞骨格の動態及び個体の初期発生を解析する上で有利である。本研究ではアフリカツメガエルを用いて、IQGAP によるアクチン細胞骨格の調節機構とその役割を明らかにすることを目的とした。

アフリカツメガエル未受精卵 cDNA ライブラリーより IQGAP 遺伝子のクローニングを行った結果、ヒト IQGAP1、2 と高い相同性を持つ 2 つのタンパク質 (それぞれ XIQGAP1、XIQGAP2 と呼ぶ) の cDNA 断片が得られたので、全長配列を決定した。XIQGAP1 及び XIQGAP2 はそれぞれ 1,656、1,660 アミノ酸から成り、ヒト IQGAP と同様に、N 末端側に F-アクチンと結合するカルポニンホモロジドメイン、中央にカルモジュリンに結合する IQ モチーフ、C 末端側に ras-GAP 関連ドメインが存在した。

次に XIQGAP1 の N 末端断片と XIQGAP2 の C 末端断片をそれぞれ組換え体 GST 融合タンパク質として発現させ、これらを抗原としてウサギで抗 XIQGAP1 抗体及び抗 XIQGAP2 抗体を作製した。各抗体を用いて western blotting によりアフリカツメガエル成体組織での発現を解析した結果、XIQGAP1 は解析したすべての組織 (脳、胃、腎臓、肝臓、骨格筋、心筋、精巣、卵巣) において発現が検出され、XIQGAP2 は脳、

胃、腎臓、肝臓、骨格筋、心筋において発現が検出された。これらの結果より、アフリカツメガエルの2つの XIQGAP は様々な組織で広く発現していることがわかった。

次に、各抗体を用いて、アフリカツメガエル培養細胞株 XTC 細胞における XIQGAP の細胞内局在を観察した。抗 XIQGAP1 抗体により、細胞間接着部位、ruffling membrane、filopodia において濃縮した染色が観察され、ruffling membrane、filopodia では F-アクチンと共局在した。一方、抗 XIQGAP2 抗体では、ruffling membrane と細胞間接着部位において弱い染色が観察され、また、核、細胞質、filopodia で強い染色が観察された。さらに、ruffling membrane について、より詳細に各 XIQGAP の局在を比較した。その結果、抗 XIQGAP1 抗体では ruffling membrane の周縁が一様に染色されるのに対し、抗 XIQGAP2 抗体では、ruffling membrane 中の F-アクチン束に特に濃縮して局在していた。これらの結果より、XIQGAP は培養細胞内で ruffling membrane 及び filopodia においてアクチン細胞骨格の再編成を調節し、細胞運動に関与している可能性が示唆された。また、分裂細胞においては、分裂期を通して XIQGAP1 は細胞表層に、XIQGAP2 は細胞質に一様に局在し、収縮環構造への局在は観察されなかった。従って、細胞内局在からは XIQGAP の細胞質分裂への関与は明らかにされなかった。

次に、初期発生における XIQGAP の関与について解析した。まず、各 XIQGAP に対する抗体を用いて western blotting によりアフリカツメガエル初期胚発生過程における XIQGAP の発現量の変化について解析した。その結果、XIQGAP1 は卵及び胞胚期では弱く検出され、原腸胚期以後発現量が増加することがわかった。XIQGAP2 については、2本のバンドが検出され、卵で多く発現していた 185KDa のバンドは原腸胚期以後、発現量が減少する。一方、175 KDa のバンドは原腸胚期以後で発現が検出された。

次に、各発生段階の初期胚における XIQGAP の局在を観察した。XIQGAP1 は発生過程を通して全ての細胞の細胞-細胞間において濃縮して局在していた。また、XIQGAP1 は原腸胚期の外胚葉及び原口背唇部、神経胚期の神経板、脊索、体節など、形態形成運動が盛んに起こる部位において特に強い染色が観察された。一方、

XIQGAP2は発生過程を通して胚に一様に分布し、全ての細胞の核において濃縮した局在が観察された。また、細胞-細胞間においても弱い局在が観察された。

次に、各 XIQGAP に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを胚に顕微注入し、生理的機能の阻害を試みた。XIQGAP1 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (XIQGAP1-AS) を顕微注入した胚では、原腸胚期以後で XIQGAP1 の発現量が低下したが、発生は正常に進行した。一方、XIQGAP2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (XIQGAP2-AS) を 2 細胞期に顕微注入した胚では、初期神経胚期以後で、抗 XIQGAP2 抗体で認識される 185KDa 成分の発現量の低下が検出された。さらに、これらの胚では神経胚期において背側の外胚葉細胞の解離が観察された。次に XIQGAP2-AS を顕微注入した胚を神経胚期に固定し、組織切片を作製して形態を観察した。これらの胚では背側の外胚葉細胞において周囲の細胞から脱接着した球形の細胞が多く観察された。従って、XIQGAP2-AS の顕微注入により誘導される外胚葉細胞の解離は、細胞間接着構造の異常によるものであり、XIQGAP2 はアフリカツメガエル初期胚において細胞間接着構造の維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、XIQGAP1-AS と XIQGAP2-AS を同時に顕微注入すると、XIQGAP2-AS のみを顕微注入した場合と比較して、背側の外胚葉細胞の解離が観察される時期が早くなることが分かった。この結果より、XIQGAP1 についても、XIQGAP2 と同様に細胞間接着構造の維持に働いている可能性が示唆された。