

アフリカツメガエルおよびゼブラフィッシュ胚 におけるカルシウム動態

武藤 彩

【要旨】

細胞内カルシウムイオン濃度の一過的な上昇（カルシウムシグナル）は、細胞がさまざまな機能を果たす際に重要な役割を担うと考えられている。本研究では、実際に胚においてどのようなカルシウムシグナルが存在するのかを直接視覚化するために、カルシウムイメージングを中心とした観察を行った。その結果、アフリカツメガエル胚およびゼブラフィッシュ胚において、卵割期の時期の細胞質分裂と密接に関わる局所的なカルシウムシグナルが検出された。このカルシウムシグナルはイノシトール3リン酸（ IP_3 ）受容体の阻害剤により抑制された。また、 IP_3 を胚に注入すると、 IP_3 で誘導されるカルシウム濃度の上昇が局所的な細胞表層の収縮を引き起こすことを見出した。これら二つの結果は、 IP_3 による細胞内カルシウム濃度の制御が、細胞質分裂などの細胞表層の構造変化に重要な役割を果たすことを示唆するものである。

【研究の狙い】

細胞内カルシウムイオンの重要性を示す研究の歴史は長く、カルシウム依存性の酵素、細胞骨格タンパク質、などが数多く存在すること、また、カルシウムキレート剤やカルシウムイオノフォアの処理により細胞内カルシウム濃度を人為的に操作ときの細胞機能の変化の観察などから示されてきた。しかしながら、実際に生理的な状態で細胞内で生じるカルシウムシグナルを検出するという研究は、長時間の測定でも細胞毒性が少なく、感受性の高いカルシウム指示薬の開発を待って発展してきた。本研究は、自然に発生している胚において自発的に生じているカルシウムシグナルを検出することを目的として行った。

【実験の結果】

I. 細胞質分裂とカルシウムシグナル

アフリカツメガエル受精卵に Calcium Green-1 デキストラン体を注入し、第一分裂の時期から植物極側の蛍光画像を経時的に測定した。アフリカツメガエルにおいては卵割溝形成の開始は動物極で生じ、両方向に伸長しながら植物極に向う。植物極に卵割溝の形成伸長が達した後に、卵割溝に沿って局在したカルシウムシグナルが検出された（図1：2.3'-6.3'）。続く第二分裂の卵割溝でも同様にカルシウムシグナルが検出され（図1：30.3'-36.3'）、その後数回にわたり形成された分裂溝でも同様にカルシウムシグナルが検出された。

この分裂溝に局在するカルシウムシグナルは、細胞外液が $20\mu\text{M}$ EGTA/蒸留水の場合で

も観察され（図2）たことから、細胞外のカルシウムイオンに依存せず、細胞内からのカルシウム放出によるものであると考えられた。IP₃受容体の阻害剤としての作用があるヘパリン（細胞内濃度 90 μg/ml）存在下では、細胞質分裂（卵割溝の形成）は完全には抑制されないが分裂溝に局在するカルシウムシグナルの出現は完全に抑制された。このことから、ここで見出されたカルシウムシグナルは細胞質分裂の開始ではなく分裂溝形成後になんらかの役割を果たすことが示唆された。

動物極側半球に通常存在する色素顆粒を全くもたないアルビノ胚を用いて、第一分裂形成時のカルシウムイメージングを行っても、分裂溝形成と同時期にはカルシウムシグナルは見出されなかった。この結果は当初、細胞質分裂の開始や進行にカルシウムが必要であろうという予想に反するものであった。アフリカツメガエル胚は透明性が低いため、弱い蛍光シグナルが検出できていない可能性も考えられた。そこで胚が透明であり蛍光観察により適しているゼブラフィッシュ胚を用いて同様に細胞質分裂の時期のカルシウムイメージングを試みた。

ゼブラフィッシュ胚においては、第一分裂、第二分裂、第三分裂のいずれにおいても、細胞質分裂の開始とほとんど同時期に、分裂開始点において局所的なカルシウムシグナルが検出された。また卵割溝形成中も細胞内カルシウム濃度の上昇は持続した（図4）。この結果は、卵割溝形成後にしかカルシウムシグナルが検出されなかったアフリカツメガエルとは異なるものであった。

これら2つの動物種の結果から、卵割溝という領域に特異的なカルシウム放出機構が存在することが明らかになった。アフリカツメガエルでは卵割溝の形成後にカルシウムシグナルが検出された。これはゼブラフィッシュでは分裂溝形成開始期、分裂溝伸長期、分裂溝形成後にわたって存在するカルシウムシグナルのうちの、3つめの時期にに対応することが考えられる。

II. IP₃誘発カルシウム放出による細胞表層の構造変化の誘導

細胞質分裂に関係して観察されるカルシウムシグナルがIP₃受容体を介するものであることが示唆されたので、逆にIP₃受容体の活性化により細胞質分裂あるいはなんらかの変化を引き起こせるのではないかとこの予想のもとに受精後の胚にIP₃注入実験を行った。アフリカツメガエル卵は卵黄膜により構造的な安定が保たれているので、形態変化が明瞭に観察できるように卵黄膜を除去した状態でIP₃を注入し観察した。IP₃注入は、注入部位において一過的な表層の収縮を引き起こし、この構造変化は注入部位から反対側に向かって伝播した（図5）。

IP₃注入による細胞内カルシウム濃度の上昇とこの形態変化との対応を調べるためにカルシウムイメージングを行った。カルシウム波が先行しその後で表層部分の収縮がみとめられた（図6）。

IP₃受容体のアゴニストであるアデノフォスチンBの注入でも同様にカルシウム波と形態

変化が引き起こされた（図7）。このことから、ここで見られた IP_3 注入による効果は、 IP_3 代謝産物の副作用によるものではなく、 IP_3 受容体の特異的な活性化が重要であるということが示唆された。

カルシウムのキレート剤である BAPTA 存在下では IP_3 注入後のカルシウム濃度の上昇は抑制され、また形態変化も抑制されたことから、カルシウム濃度の上昇が表層の収縮に必須であることも示された（図8）。

表層の収縮を生じた胚を固定しローダミンファロジン染色したところ、収縮した部域で非常に強く陽性を示した（図9）。カルシウムシグナルに依存したF-アクチンの構造変化を伴うことが示唆された。抗チューブリン抗体による染色では収縮部位に特異的な変化は見とめられなかった。

【結語】

本研究において、卵割期の胚の細胞質分裂にカルシウムシグナルが密接に関わることをカルシウム動態の視覚化により示した。また、 IP_3 により誘発された細胞内カルシウム動員が、卵表層の収縮を引き起こす能力があることを示し、カルシウムシグナルが細胞質分裂のような膜表層の構造変化に特に重要な働きをすることを示唆した。

【今後の展望】

カルシウムシグナルは細胞分裂のみならず胚発生においても重要な役割を担う可能性がある。例えば、アフリカツメガエル胚への抗 IP_3 受容体抗体の注入により腹側へ分化予定の部域を背側化することが本プロジェクトの研究でも示された。これを受けて、胚発生に関係したカルシウムシグナルを同定できれば興味深い。

ゼブラフィッシュ胚は透明で発生も速いことから、カルシウム蛍光指示薬を受精直後に注入した胚で発生を追ってカルシウムイメージングが可能である。ただし、おそらく指示薬が徐々に細胞外に排出されることにより、十分な蛍光シグナルが得にくくなるため、カルシウムイメージングができる時期に限られる。器官形成などが起こる発生の後期に特異的な場所、細胞でのカルシウムシグナルを検出するような目的のためには、その時期、その細胞特異的にカルシウム指示薬を導入することが望まれる。そのために、タンパク質性のカルシウム蛍光指示薬であるカメレオンの遺伝子を導入したトランスジェニックゼブラフィッシュを作製した。核移行シグナルをつけたカメレオンは胞胚期以降核内に主として局在することが確認でき、今後細胞分化や遺伝子発現の変化に関わる核内カルシウム濃度の変化を捉える実験系として役立つ可能性がある。

発表文献

1. Muto, A., and K. Mikoshiba (1998) Activation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors Induces Transient Changes in Cell Shape of Fertilized Xenopus Eggs. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 39:201-208
2. Kume, S., Muto, A., Inoue, T., Suga, K., Okano, H., and K. Mikoshiba. (1997). Role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in ventral signaling in Xenopus embryos. *Science* 278:1940-1943
3. Muto, A., Kume, S., Inoue, T., Okano, H., and K. Mikoshiba. (1996) Calcium waves along the cleavage furrows in cleavage-stage Xenopus embryos and its inhibition by heparin. *Journal of Cell Biology* 135:181-190

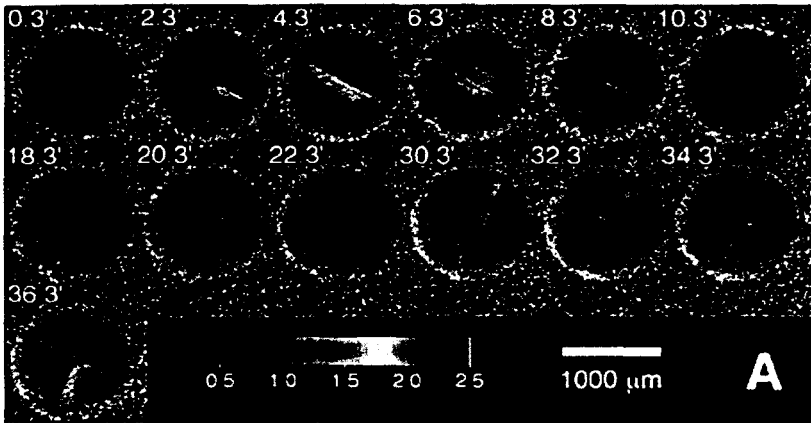


図1 アフリカツメガエル胚の卵割溝に局在するカルシウムシグナル
時刻0' (分) は測定開始時刻で卵割溝の形成が植物極に達している。

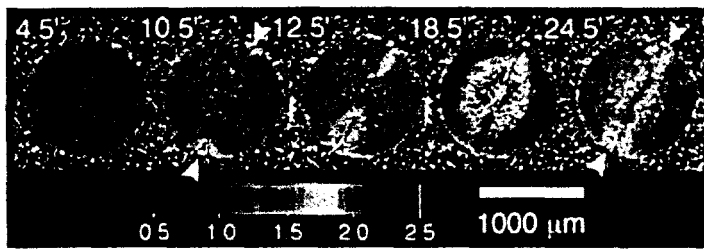


図2 細胞外液20 μM EGTAの条件下で生じるカルシウムシグナル
白い矢頭： カルシウム波の出現部位

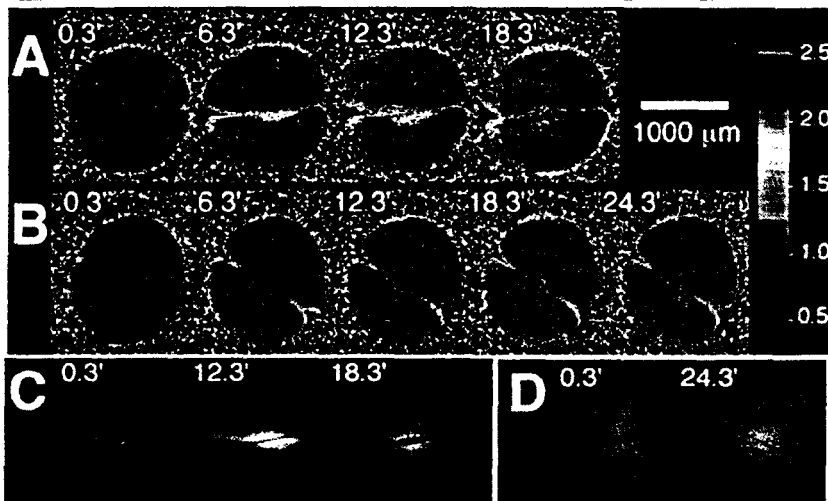


図3 ヘパリンによるカルシウムシグナルの抑制
(A) De-N-sulfated heparin
(B) heparin
(C) De-N-sulfated heparin
(D) heparin

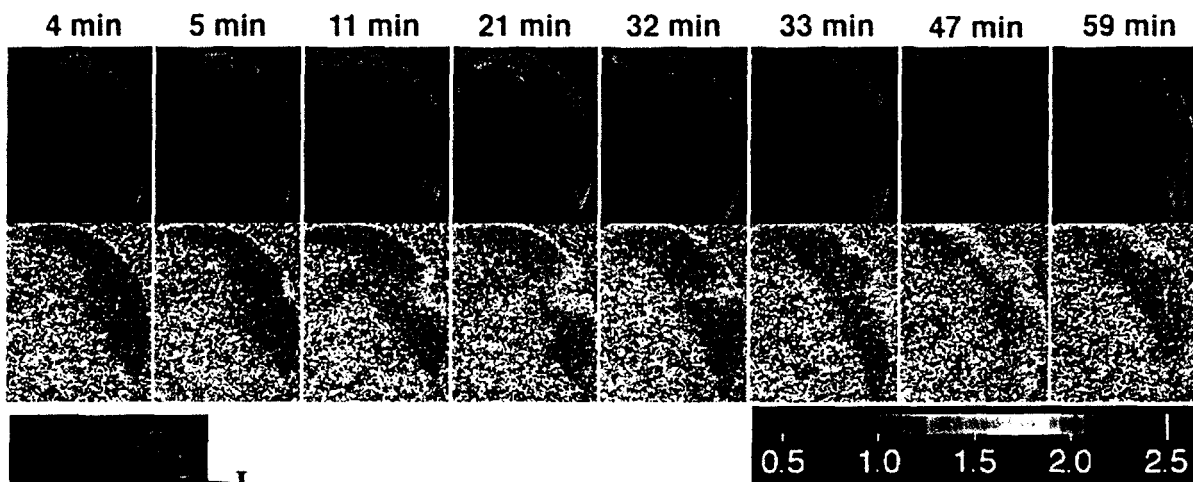


図4 ゼブラフィッシュ胚の卵割時のカルシウムシグナル
上段：ローダミンの蛍光像、下段：カルシウムグリーンの蛍光強度変化
Y: 卵黄、C: 細胞質、I: 第一卵割溝、II: 第二卵割溝

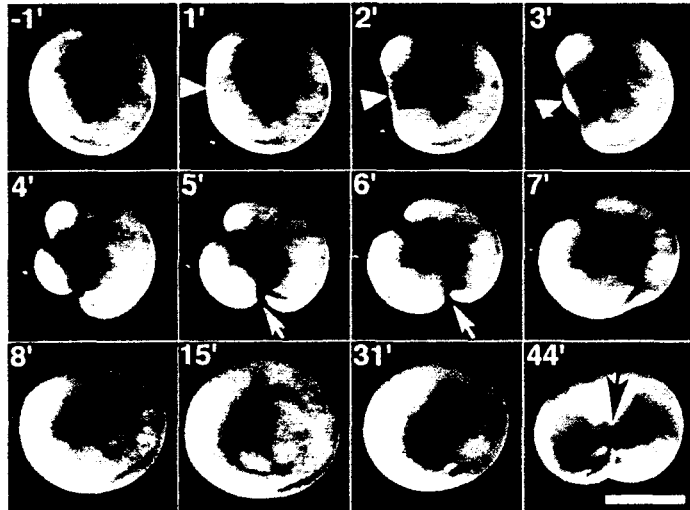


図5 IP3(4 μ M, 15 nl)注入後のアフリカツメガエル受精卵の形態変化
時刻0'(分)で注入。白い矢頭：注入部位、
白い矢印：収縮部位、黒い矢印：第一卵割溝、
バー：1000 μ m

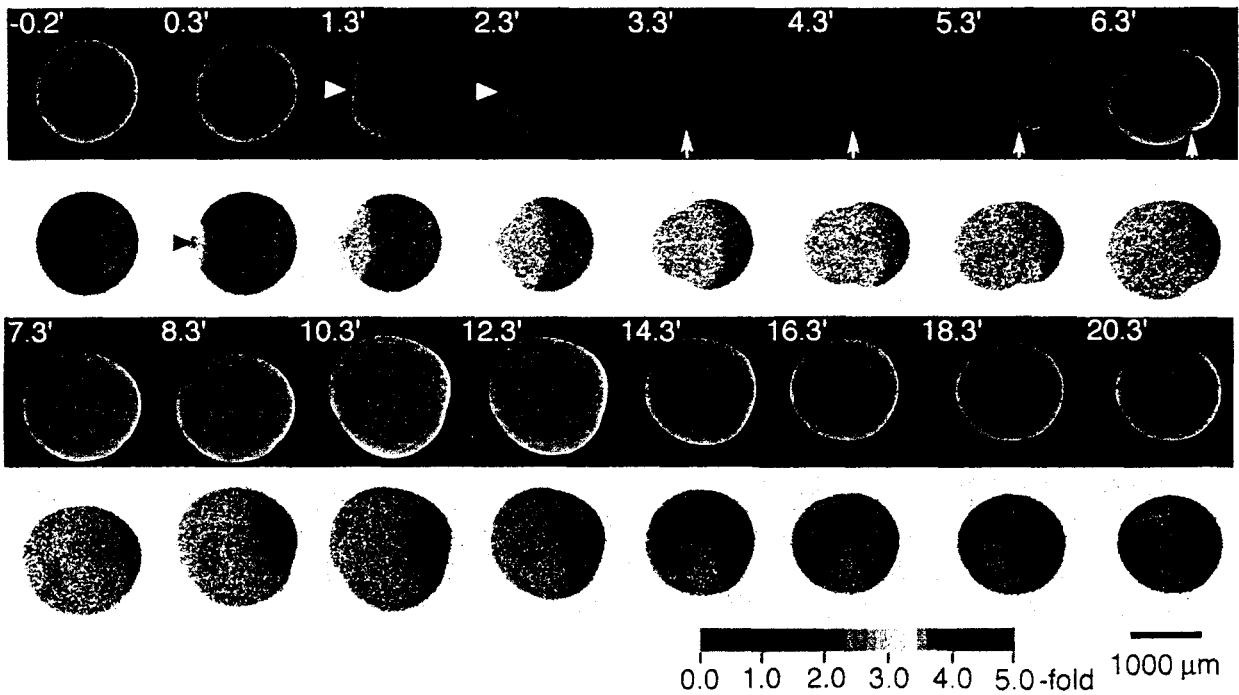


図6 IP3(100 μ M, 15 nl)注入後のカルシウム蛍光指示薬の蛍光強度変化
上段：形態変化、下段：カルシウムグリーン蛍光強度変化、白い矢頭：注入部位、
白い矢印：収縮部位、黒い矢頭：注入部位

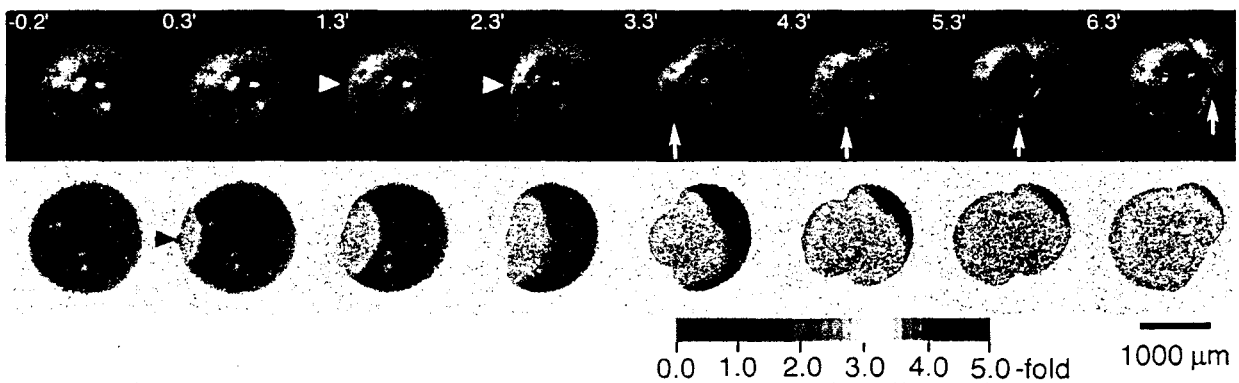


図7 アデノフォスチンB(10 μ M, 15 nl)注入後のカルシウム蛍光指示薬の蛍光強度変化
上段：形態変化、下段：カルシウムグリーン蛍光強度変化、白い矢頭：注入部位、
白い矢印収縮部位、黒い矢頭：注入部位

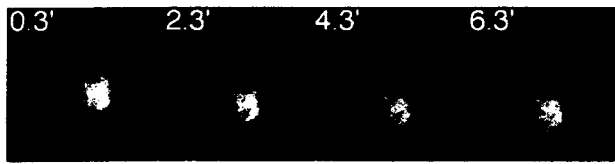


図8 BAPTA (20 nl, 20 mM) 注入卵にIP3 (100 μ M, 15 nl)を注入した効果
時刻0'(分)で注入。黒い矢頭：IP3注入部位、赤い矢印：カルシウム波の先端

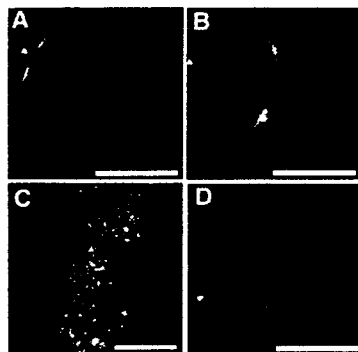
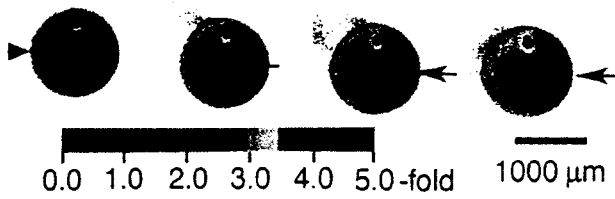


図9 IP3注入胚の細胞骨格の可視化
(A) IP3注入1分後のローダミンファロイジン染色像
(B) IP3注入7分後のローダミンファロイジン染色像
(C) (B)の強拡大像
(D) 抗チューブリン抗体による蛍光免疫細胞化学染色像
白い矢頭： IP3注入部位、バー： 1000 μ m(A,B,D)、50 μ m(C)