

# 「IP<sub>3</sub>-Ca シグナル伝達系と初期発生における背腹軸形成」

桑 昭苑

## IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達系は腹側のシグナルを伝達する

初期胚の形態形成において、IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達系が果たす機能を明らかにする目的に、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) をモデル系に用いて本研究を行った。中胚葉誘導の始まる時期に相当するアフリカツメガエル 32-64 細胞期胚には、初期胚の IP<sub>3</sub> 細胞内濃度が一過性的に上昇し、しかもこの胚内 IP<sub>3</sub> 濃度の上昇はリチウムによって阻害されることが示されている (1)。リチウムの注入により 2 次的な体軸 (二次軸) 胚が形成されることが知られていたが、リチウムは、イノシトールリン酸代謝系の脱リン酸化酵素を阻害し、PI 代謝の枯渇をきたす薬剤と考えられてきた。そこで、背腹軸形成における IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達系の重要性を証明するために、アフリカツメガエルをモデルで発現している IP<sub>3</sub> 受容体 (2) に対する特異的阻害活性をもつモノクローナル抗体を単離し、これを解析に用いた。

それぞれカルシウム遊離の阻害活性の程度が異なるこれら複数の IP<sub>3</sub>R モノクローナル抗体をアフリカツメガエル初期胚に微小注入したところ、4 細胞期の腹側の割球へ注入により特異的に二次軸が生成された (図 1)。これらモノクローナル抗体の IP<sub>3</sub> 依存的な Ca<sup>2+</sup> 放出 (ICR) の阻害活性は二次軸誘導能と極めてよく相関している。さらに、IP<sub>3</sub> 受容体の機能阻害抗体により、1) *in vitro* の外植体の培養系での分子マーカーの発現解析では、腹側の細胞が背側に運命転換したことが分った。また、2) 完全に腹側化された紫外線照射胚に背側構造を救出できた。以上の結果により、IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> 伝達系は腹側化シグナルを伝達することを結論つけた (3)。

## 腹側のシグナルとしての IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナルの上流に働く G タンパク質

腹側のシグナルである IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナルを活性化する上流カスケードに位置する分子はどの経路を介するかを解析するために、各種 G 蛋白質  $\alpha$  サブユニットの受容体共役部位である C 末端に対する抗体を初期胚に注入し、その効果を調べた。G $\alpha_q$  に対する抗体は、m1ACh 受容体を介する IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナルの活性化をほぼ完全に阻害する機能阻害抗体であった。ところで、この G $\alpha_q$  に対する機能阻害抗体をアフリカツメガエル初期胚に注入しても、表現型に影響を与えなかった。また、G $\alpha_{i/o}$  或いは G $\alpha_s$  に対する抗体はアデニルシクラーゼ A に対する作用を阻害する機能阻害抗体であることをまず確かめた。さらに、これらについては、アフリカツメガエル初期胚に注入した場合、IP<sub>3</sub> 受容体に対する機能阻害抗体の注入と同様に背側化の誘導が観察された。以上の結果を総合すると、IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナルの活性化は G $\alpha_q$  を介する経路ではなく、むしろ G $\alpha_s$  の活性化を介するであろうと推測された。

ところで、アデニルシクラーゼAに対する阻害剤は cAMP の上昇を抑制するにもかかわらず、背側化の誘導能を示さなかった。この結果より、 $G_{\alpha s}$  或いは  $G_{\alpha i/o}$  の  $\alpha$  サブユニットよりも、 $\beta$  サブユニットを介する作用であろうと推測された。そこで、 $\beta$  サブユニットと親和性のある  $\beta$  ARK (adrenergic receptor kinase) を強制発現させ、 $\beta$  サブユニットを compete out したときの効果を調べたところ、 $\beta$  ARK による背側化の誘導能を確認できた。すなわち、 $\beta$  サブユニットの機能を阻害することにより背側化を誘導できた。これらの結果を図2にまとめた (図2)。

これらの結果はいずれも、 $IP_3$ - $Ca^{2+}$  シグナルを活性化する上流の因子として、G蛋白の  $\beta$  サブユニットを示唆するもので、 $G_{\alpha s}$  あるいは  $G_{\alpha i/o}$  と共役する受容体の活性化を介して、 $G_{\beta\alpha}$  を活性化し、 $IP_3$ - $Ca^{2+}$  へとシグナルが伝達されるという図式が考えられる。実際  $G_{\alpha s}$  と共役する  $\beta$  アドレナリン受容体をアフリカツメガエル初期胚で発現させたとき、カルシウム測光をしたところ、リガンド依存的に  $IP_3$ - $Ca^{2+}$  シグナルが観察された。これらの結果は以上の考察を支持するものであった。

### 腹側化シグナルとしての $IP_3$ - $Ca^{2+}$ シグナルの下流で働く分子

一方、 $IP_3$ - $Ca^{2+}$  シグナルが背腹軸形成においてどのような因子を活性化し最終的にどのような遺伝子発現を誘発するのかなど具体的な分子の正体は現在までほとんど明らかにされていない。

$Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性のセリン/スレオニン脱リン酸化酵素であるカルシニューリン (Cn) は脳に全タンパク質量の約1%も存在するタンパク質である。カルシニューリンはシナプス可塑性の調節、FKBP を介して  $IP_3$  受容体と結合しその機能を調節しているほか、Nuclear Factor of Activating T-cell (NFAT) を脱リン酸化し核内へ移行させることによって  $IP_3$  受容体の発現に関与することも知られている。一方、T細胞においては NFAT を介してインターロイキン-2をはじめとするサイトカインの発現を起こしT細胞を活性化させる。これらの知見に加え近年  $Ca^{2+}$ /カルシニューリン/NFAT 情報伝達系がさらに重要な役割を広範囲で果たしている実験事実が報告されつつある。セカンドメッセンジャーである  $Ca^{2+}$  の作用は多岐に渡り、リン酸化酵素を介した情報伝達系については非常に多くの報告がある。しかし現在までのところ  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存性のセリン/スレオニン脱リン酸化酵素はカルシニューリンしか知られておらず、この酵素が  $IP_3$ - $Ca^{2+}$  シグナル伝達系の下流であることが十分に考えられる。

そこで、カルシニューリンとその標的分子の NFAT についてT細胞や神経細胞と同じくアフリカツメガエルの背腹軸形成過程においても  $IP_3$ - $Ca^{2+}$  シグナルの下流を担う分子として機能するかを検討した。

はじめに、カルシニューリン A subunit (CnA) のアフリカツメガエル相同遺伝子 (XCnA) をアフリカツメガエル卵母細胞 cDNA library より単離し時空間的発現を調べた。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、触媒領域は96.3%、カルモジュリン結合領域とカルシニューリンB サブユニット結合領域はともに100%の相同性を示した。XCnA は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。NFAT についてもアフリカツメガエル相同遺伝子 (XNFAT) をアフリカツメガエル卵母細胞 cDNA library より単離し時空間的発現変化を調べた。XNFAT はアミノ酸レベルで全長で各 NFAT サブタイプと49.2% (hNFATp)、49.1% (hNFATc)、39.5% (hNFAT3)、64.1% (hNFATx)の相同性を示した。機能ドメインであるRel 相同領域では67.4% (hNFATp)、67.5% (hNFATc)、68.3% (hNFAT3)、79.7% (hNFATx)と高い相同性を示した。Cn と同じく NFAT も母性因子として発現しており Cn-NFAT 経路が体軸形成に関与していることが示唆された。そこで、loss of function 法によって NFAT の背腹軸形成の関与を検討した。ドミナントネガティブ型 NFAT (dnNFAT) RNA をツメガエル初期胚に微量注入したところ、4細胞期の腹側の割球への注入により二次軸が生成されることが分かった (図3)。さらにこの二次軸は野生型 NFAT との共注入によってレスキューされた。すなわち NFAT 活性の低下が、腹から背への運命変換を起こしたといえる。この現象は XIP3R 機能阻害抗体の効果と一致する。XIP3R 機能阻害抗体によって出来る二次軸は頭部を含まない不完全な二次軸であるのに対し、dnNFAT によるそれは頭部を含んだ完全な二次軸であった。組織切片を作成したところ、この二次軸は発達した脊索、筋肉、神経管を持っていた。すなわち dnNFAT は IP3R 機能阻害抗体より強い二次軸誘導能を持つことが分かった。この結果より XCn-XNFAT シグナルが IP3-Ca<sup>2+</sup>シグナルの下流に位置する分子であることが強く示唆された。また、予定外胚葉域 (アニマルキャップ) において dnNFAT の強制発現により Xwnt1/8 シグナルカスケードの特異的標的遺伝子である siamois、Xnr3 の発現を誘導した。dnNFAT が Xwnt1/8 シグナルカスケードのどの段階で関与しているのか調べるため、Frzb、ドミナントネガティブ Xdsh (Xdd)、XGSK3 $\beta$  との共注入によって siamois、Xnr3 の発現に与える影響を調べた。その結果、XGSK3 $\beta$  との共注入によって誘導が消失することが分かった (図4)。これにより、IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナルと XWnt1/8 シグナルカスケードが Xdsh と XGSK3 $\beta$  の間でなんらかのクロストークをしていることが示唆された。

## 参考文献

1. Maslanski, J. A., Leshko, L. A., Busa, W. B. Science 256, 243-245 (1992).
2. Kume, S., Muto, A., Aruga, J., Nakagawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., Nakade, S., Okano, H., Mikoshiba, K., Cell 73, 555-570 (1993).
3. Kume, S., Muto, A., Inoue, T., Suga, K., Okano, H., Mikoshiba, K. Science 278, 1940-1943 (1997).
4. Kume, S., Inoue, T., and Mikoshiba, K. Dev. Biol. in press (2000)



図1、IP<sub>3</sub>受容体に対する機能阻害抗体を初期胚の腹側割球に注入すると二次軸を誘導した。矢印は誘導された2次軸を示す。

図2、腹側シグナルを担うIP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達系に関与する分子。灰色塗りの薬剤/抗体名は2次軸誘導活性のあったもの。白色塗りの薬剤/抗体名は2次軸誘導活性のなかったもの。実線矢印：促進的、破線矢印：抑制的、T字：阻害的に働く。

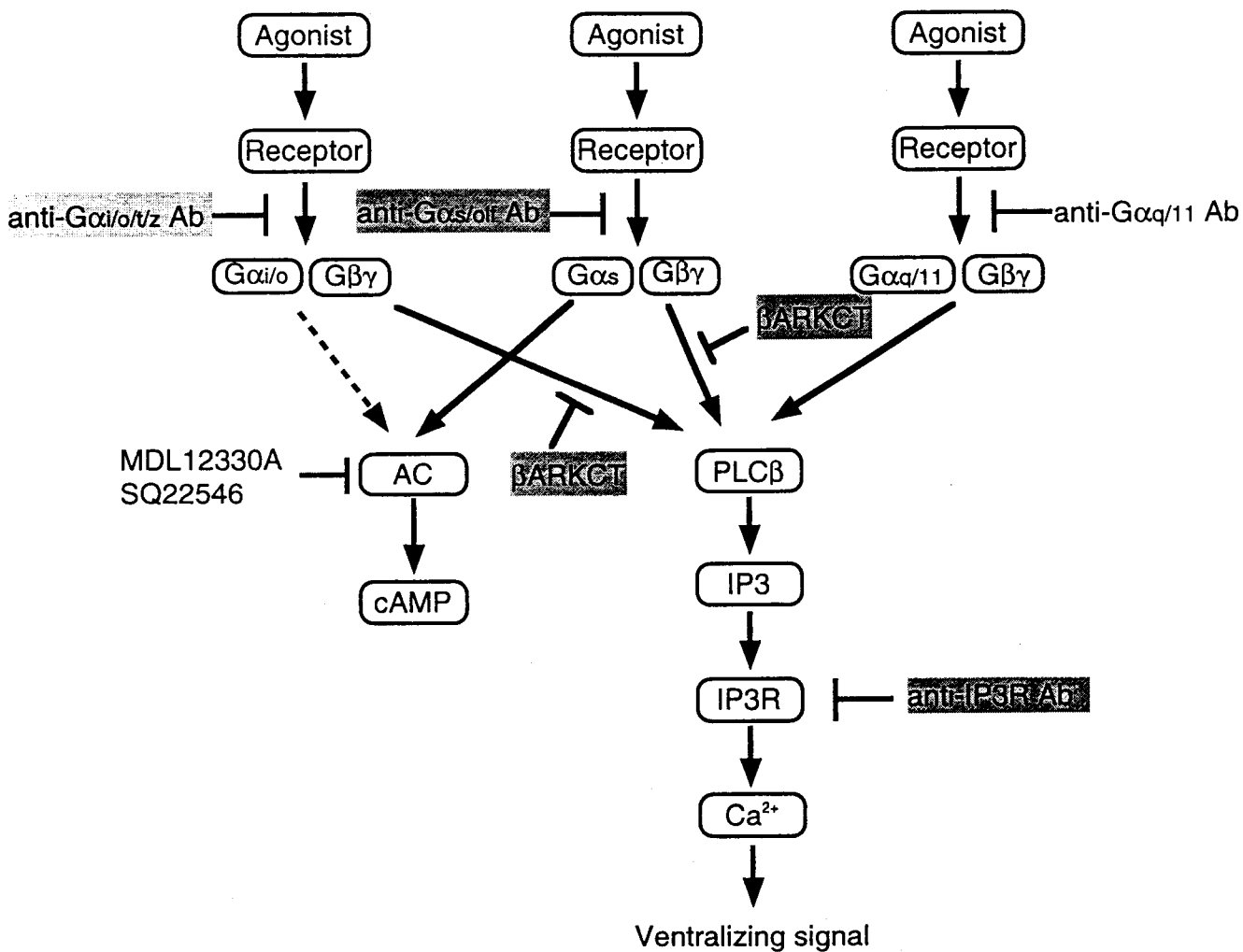


図3、dnNFAT RNAを初期胚の腹側割球に注入すると二次軸を誘導した。矢印は誘導された2次軸を示す。  
 グラフは、dnNFATによる二次軸誘導能を示した。濃度依存的に誘導される二次軸の割合が増えている。  
 Dorsalize：背側化、CG：セメント線を持つ二次軸、partial：不完全な二次軸

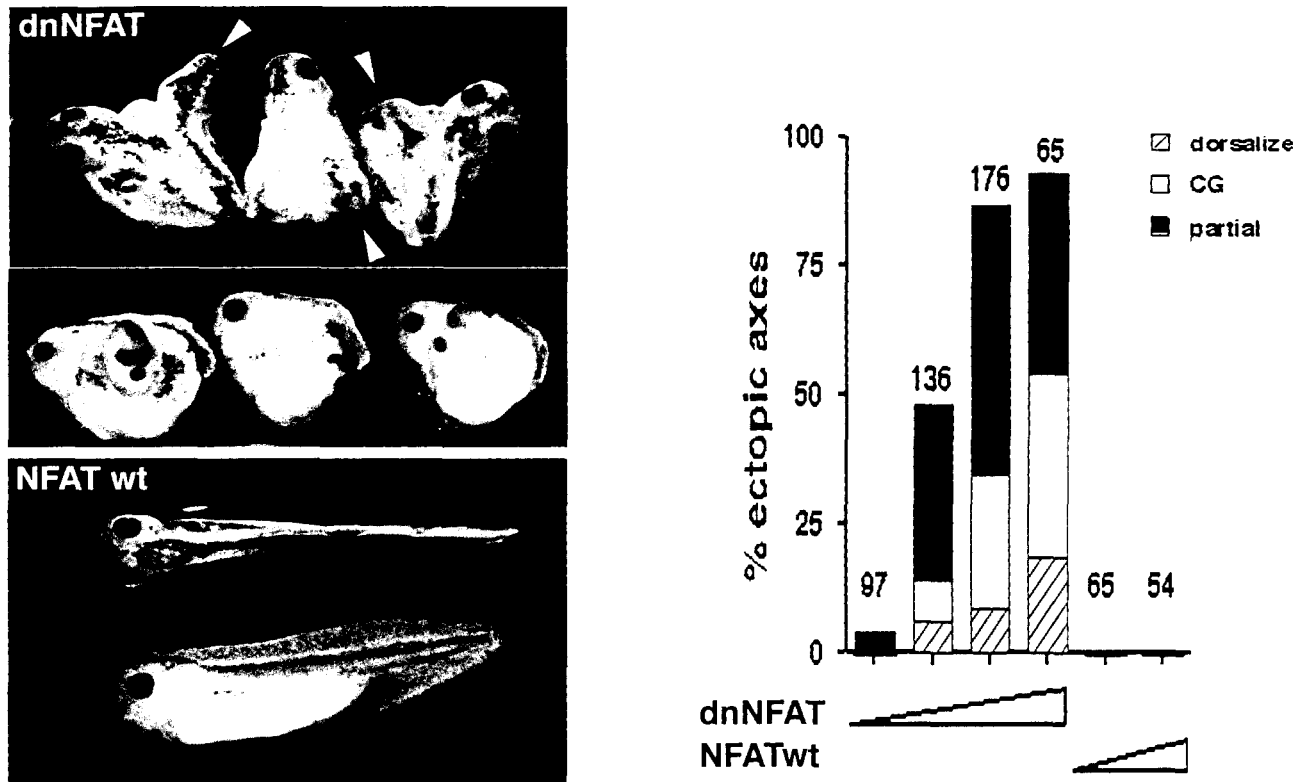


図4、dnNFATは、アニマルキャップにおいてXwnt1/8シグナルカスケードの特異的標的遺伝子である siamois、Xnr3を活性化させた。XGSK3βとの共注入によって siamois、Xnr3の誘導が減少消失する。2細胞期に各種RNAを注入し、ステージ8.5でアニマルキャップを切り取り、ステージ12まで培養した。アニマルキャップよりRNAを抽出し、RT-PCR法によって siamois、Xnr3、EF1<sub>α</sub>の発現を調べた。ΔRel：ドミナントネガティブNFAT、Xdd：ドミナントネガティブXdsh、-RT：逆転写酵素なし。

