

氏 名 吉田 直樹

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1765 号

学位授与の日付 平成27年3月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Roles of IP<sub>3</sub> signaling in Wnt-regulated asymmetric divisions  
of *C. elegans* epithelial stem cells

論文審査委員 主 査 教授 小林 武彦  
教授 相賀 裕美子  
准教授 宮城島 進也  
准教授 北川 大樹  
教授 新井 洋由 東京大学大学院

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

During development, asymmetric cell division is an important mechanism to generate cellular diversity and to maintain self-renewing stem cells. In *C. elegans* development, most somatic cells are polarized and divide asymmetrically to produce daughter cells with distinct fates. These asymmetric cell divisions are regulated by the Wnt/b-catenin asymmetry pathway that utilizes components similar to those of the canonical Wnt pathway. These components localize asymmetrically in the cell. For example, APR-1/APC localizes to the anterior cell cortex and regulates asymmetric nuclear localization of POP-1/TCF that localizes to the anterior daughter nucleus. Most somatic cells show the same POP-1 asymmetry and, hence, have the same polarity orientation. However, the mechanism to orient cell polarity is a mystery.

To reveal the mechanism that orients cell polarity, I focused on inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) signaling that plays roles in regulating cell polarity. In this signaling, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K) produces phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), PIP<sub>2</sub> is hydrolyzed by phospholipase C (PLC) to produce IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> binds to IP<sub>3</sub> receptor (IP<sub>3</sub>R) causing to release of Ca<sup>2+</sup> from endoplasmic reticulum (ER). This increased cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in turn activate several cellular processes, resulting in regulation of cell polarity that is required for the direction of cell migration, the formation of cellular protrusions, and cell-cell adhesion. However, the relationship between asymmetric cell division and IP<sub>3</sub> signaling has not been studied directly.

I examined the *ppk-1*/PIP5K functions in seam cells which are epithelial stem cells that repeatedly undergo self-renewing asymmetric cell divisions. Each seam cell is polarized and divides asymmetrically giving rise to an anterior daughter that is terminally differentiated to the hypodermal cell and a posterior one that remains in the seam cell fate. I found that *ppk-1(ok1411)* mutants had a defect in asymmetric cell divisions of seam cells by observing fates of daughter cells using *elt-3::GFP* (a

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

hypodermal cell marker). Their daughter cell fates were swapped with each other compare to those in wild type (reversal phenotype). Furthermore I found that the orientation of POP-1 asymmetry is also reversed in *ppk-1* mutants. These results indicate that that *ppk-1* regulates the polarity orientation of the seam cells. The reversal phenotype in *ppk-1* mutants was fully rescued by expression of PPK-1 under a seam cell specific promoter, suggesting that PPK-1 functions cell autonomously to regulate the cell polarity. I found that mCherry-tagged PPK-1 localizes symmetrically to the cell cortex and regulates the asymmetric localization of cortical APR-1/APC, judged by GFP tagged APR-1. I revealed that IP<sub>3</sub> signaling components (PLC-4/PLC and ITR-1/IP3R) act downstream of PPK-1 by analyzing genetic interactions among these components. Based on these results, I conclude PPK-1 regulates the APR-1 polarity as a component of the IP<sub>3</sub> signaling pathway.

To further understand *ppk-1* function, I analyzed the genetic interactions between *ppk-1* and three Wnts genes. I found that the reversal phenotype in the *ppk-1* mutants is suppressed by loss-of-function mutations of *cwn-2*/Wnt. Furthermore, the reversal phenotype in *ppk-1* mutants was enhanced by the overexpression of CWN-2. These results suggest that the reversed polarity in *ppk-1* mutants is caused by *cwn-2*. In contrast, in wild type, *cwn-2* promotes the normal orientation of cell polarity, suggesting that *cwn-2* has two functions promoting both the normal polarity orientation and the reversed polarity orientation. How does *cwn-2* have the two opposite functions? To answer this question, I analyzed the genetic interactions between *ppk-1* and six Wnt receptor genes. The reversal phenotype in *ppk-1* mutants was suppressed by each of *lin-18*/Ryk and *mom-5*/Frizzled mutations, suggesting that each of *lin-18* and *mom-5* is necessary to promote the reversal phenotype in *ppk-1* mutants. From these results, I conclude that *cwn-2* has two functions promoting both the reversed polarity orientation through the Wnt receptors (LIN-18 and MOM-5) and the normal polarity orientation depending on PPK-1 activities. Based on these results, I propose *ppk-1* is a switch that determines the CWN-2 function. Since IP<sub>3</sub> signaling

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

and Wnt signaling are highly conserved among metazoans, similar mechanisms may also regulate proper cell polarity in other organisms.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

動物体は、幹細胞から非対称分裂により作り出される分化細胞によって形成される。そのため非対称分裂は発生、形態形成の要となる事象である。

線虫は発生過程において、つまり受精卵から始まって細胞が分裂し組織を形成していく過程の細胞系譜がすべて同定されている貴重なモデル生物である。吉田さんは線虫幼虫の上皮幹細胞 (Epithelial stem cell、V 細胞) に着目し、発生過程で分化を引き起こす非対称分裂のメカニズムについて研究を行った。まず遺伝的スクリーニングにより、V 細胞の分化が異常になる変異株としてホスファチジルイノシトール合成酵素をコードする PPK1 が破壊された *ppk-1* 株に注目した。*ppk-1* 株では、V 細胞の非対称分裂は阻害されないが、娘細胞の出現する方向が約半数の細胞で反対方向になる異常を見つけた。吉田さんはそのメカニズムの解明を目指し、PPK-1 が関わる小胞体からのカルシウムイオン放出経路 (IP<sub>3</sub> 経路) に着目し解析を行った。まず同経路に属する他の因子の影響を調べたところ、PLC-4 欠損は *ppk-1* 株と同様の表現型を示し、また小胞体膜上の IP<sub>3</sub> 受容体の変異は *ppk-1* の表現型を相補することを見いだした。さらに IP<sub>3</sub> 経路による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇で活性化されることが知られている PKC-2、CDC42 の欠損も V 細胞の分化極性に異常を起こすことを観察している。これらの結果から吉田さんは、IP<sub>3</sub> 経路が V 細胞の非対称分裂の方向性決定に関わっていると結論した。これは新しい発見である。加えて細胞極性との関係はまだ不明だが、確かに分化時にカルシウムイオンの「波」が個体中を駆け巡る興味深い現象も観察している。

同様に吉田さんは V 細胞の非対称分裂に関わることが知られている Wnt シグナル経路の WRM-1/β-カテニン、ARP-1/APC、POP-1/TCF の細胞内局在が *ppk-1* 株では異常になることを発見した。これは *ppk-1* が Wnt シグナル経路を介し細胞極性を変化させていることを示している。さらには、*ppk-1* との遺伝学的相互作用解析から、anterior Wnt である CWN2 の機能欠損により *ppk-1* の表現型が抑制されること、また CWN2 過剰発現により表現型が促進されることを見出した。最後に遺伝的解析により CWN2 の受容体として働く MOM-5、LIN-18 が新たに細胞極性の逆転に必要であることも発見した。これは CWN2 から細胞極性へと繋がる新しい経路である。

以上の結果より、吉田さんは PPK-1 が IP<sub>3</sub> シグナル伝達経路を介したカルシウムイオン放出によって、CWN2 が引き起こす Wnt シグナル経路による細胞極性を制御しているというモデルを提唱しており、非対称性を生み出す分子機構の理解を深めたと評価できる。

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

本研究は非対称分裂の制御機構に新たな知見を与えるものであり、発生過程の研究に貢献するものである。従って吉田さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査委員全員一致で判断した。