

氏 名 竹 内 雅 貴

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第726号

学位授与の日付 平成15年9月30日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 The Planar Cell Polarity Gene *Prickle* in
Vertebrates Regulates Gastrulation Cell
Movements

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	小林 悟
	教授	上野 直人
	教授	野田 昌晴
	教授	黒岩 厚 (名古屋大学)

Gastrulation is one of the most important processes during morphogenesis of early embryo, involving dynamic and coordinated cell movements that cause drastic changes in embryo shape. Although gastrulation proceeds by various types of cell movements, in *Xenopus* mesodermal cells, two cell movements known as convergence and extension in which polarized axial mesodermal cells intercalate in radial and mediolateral directions, thus elongating the dorsal marginal zone along the anterior-posterior axis^{1,2}, have been mainly studied. Recently, it was reported that a non-canonical Wnt signalling pathway, which is known to regulate planar cell polarity (PCP) in *Drosophila*^{3,4}, participates in the regulation of convergent extension movements in *Xenopus* as well as in the zebrafish embryo⁵⁻⁸. The Wnt5a/Wnt11 identified as ligands of PCP signalling are mediated by members of the seven-transmembrane receptor Frizzled (Fz) and the signal transducer Dishevelled (Dsh), through the Dsh domains that are selectively required for the PCP signal⁶⁻⁸. It has also been shown that the relocalization of Dsh to the cell membrane is required for convergent extension movements in *Xenopus* gastrulae. Although it appears that signalling via these components leads to the activation of JNK^{9,10} and rearrangement of microfilaments, the precise interplay among these intercellular components is largely unknown.

In chapter 1, he shows that *Xenopus prickles* (*Xpk*), a *Xenopus* homologue of a *Drosophila* PCP gene¹¹⁻¹³, is an essential component for gastrulation cell movement. *Xpk* encodes a protein that includes conserved PET and triple LIM domains in its N-terminal half. In gastrula, *Xpk* transcription are restricted to the marginal zone with a steep gradient from dorsal to ventral side, suggesting that *Xpk* plays a role during gastrulation. Both gain-of-function and loss-of-function of *Xpk* severely perturbed gastrulation and caused *spina bifida* embryos without affecting mesodermal differentiation. Loss-of-function of zebrafish *prickle* (*Zpk*) also disrupted the dorsal convergence, caused a phenotype similar to PCP mutants *knypeck* and *trilobite*, which have recently been found to encode a glypican and *strabismus*, respectively. The structure-activity relationship of XPK was examined by overexpression of some deletion constructs. As a result, triple LIM domain-deleted XPK mutants could act as the dominant-negative way to wild-type XPK, whereas XPK mutants containing the domain were still able to transmit signals similar to that of wild type. Although XPK alone showed no effect on the JNK activation as output of PCP signaling, XPK could enhanced the JNK activation mediated by Dsh. Importantly, he also demonstrated that XPK physically binds to *Xenopus* Dsh as well as to JNK. This suggests that XPK plays a pivotal role in connecting Dsh function to JNK activation.

In chapter 2, he discusses about the identification of *Xenopus* Ste20-like kinase as a XPK interacting protein. It has been identified by the yeast two hybrid screening with XPK as a bait, and named as *Xenopus Prickle Interacting Kinase*; XPIK. XPIK is expressed in dorsal side of early gastrula embryo overlapping with the expression domain of XPK during gastrulation, suggesting that XPIK play a role in Wnt/PCP signaling like XPK. In fact, he has found that XPIK could activate JNK via its kinase domain. Both gain-of-function and loss-of-function of XPIK interfered gastrulation movements, phenocopying XPK-disrupted embryos. In the overexpression analysis of some deletion mutants of XPIK, degree of gastrulation defects caused by each mutant was well-correlated with its activity level of JNK activation. he also designed a dominant negatively acting version of XPIK (XPIK-DN; D165A), XPIK-DN which is able

to inhibit the JNK activation mediated by wild type XPIK and found that not only it could restore the gastrulation defective phenotype of dorsally overexpressed XPIK but also it alone perturbed gastrulation suggesting that DN-XPIK inhibited the endogenous XPIK activity of JNK activation. DN-XPIK also inhibited the JNK activation mediated by Dsh. Taken these observations together, he propose that XPIK is an essential components of the Wnt/PCP signaling linking Dsh function to JNK activation, thereby regulating gastrulation cell movements.

In conclusion, the analysis of Prickle function in this study confirmed that the mechanism of cell polarity establishment by PCP signaling in *Drosophila* is commonly utilized beyond animal species and adopted to the correct gastrulation cell movements in vertebrates. The action mechanism of Prickle was identified as a modulator protein of Dsh-JNK pathway. In addition, XPK Interacting Kinase (XPIK) was found to be required for activation of JNK mediated by Dsh. Accordingly, our results strongly suggest that non-canonical Wnt (PCP) pathway regulates gastrulation cell movements in vertebrate through activation of JNK mediated or modulated by Dsh, XPK and XPIK. To further understand the pathway, how Dsh, XPK and XPIK regulate each other remains to be explored.

論文の審査結果の要旨

原腸形成は生物の形づくりの根幹をなす必須の生命現象であり、ほとんどの動物に見られる細胞運動であり、この原腸形成が生物の形づくり、すなわち形態形成を進行させる原動力となっている。原腸形成はそのダイナミックで協調した細胞運動によって三胚葉をその後の形態形成のために正しく配置させ、球形の受精卵から頭尾軸、背腹軸、左右軸が顕著に見てとれる生物固有の形態へと導く。この細胞運動は収斂 (convergence) と伸長 (extension) という大きく分けて2つの細胞運動からなることが知られている。最近になってショウジョウバエにおける Wnt/PCP シグナル経路と呼ばれる経路が、脊椎動物の原腸形成時の細胞極性の確立に必要とされることが明らかにされつつある。申請者はアフリカツメガエルを用いて、ショウジョウバエの PCP 遺伝子のひとつ *prickle* の相同遺伝子 Xpk が、脊椎動物においても原腸形成時に活発な細胞運動を行う組織に発現していることを明らかにした。また、同遺伝子産物を初期胚に過剰発現させた機能獲得実験に加え、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた XPK タンパク質の翻訳阻害による機能喪失実験によって、同遺伝子が脊椎動物における原腸形成に必須であることを明らかにした。同時に XPK は Wnt/PCP シグナル伝達因子のディシエヴェルドに結合し、その結果 JNK 活性化を調節することをつきとめた。さらに、申請者は XPK の作用機序、とくに JNK の活性化機構を明らかにするために、XPK へ結合する因子を酵母2ハイブリッド法にて探索し、Ste20 kinase family に属する kinase (PIK; *Prickle-Interacting-Kinase*) を同定した。PIK は XPK 同様、初期原腸胚で背側に強く発現していること、キナーゼドメインを介して JNK を活性化することを示した。また、機能解析実験によって、PIK 機能喪失の表現型は Wnt11, Dsh, Stbm, Xpk, など Wnt/PCP シグナル因子と類似していることを示し、XPK 同様に、PIK も原腸形成において同シグナル経路の因子として必須の役割を持つこと、その機能は JNK 活性化能と相関することを明らかにした。

本研究は脊椎動物の原腸形成における細胞運動の制御に XPK や PIK など細胞内因子が相互作用し必須の役割を担っていることを示した重要な研究であり、形態形成の分子メカニズム解明に大きく貢献するものである。とくに XPIK の発見は同分野の研究をさらに発展させる手がかりとなるものと期待され、学位授与にふさわしいものであると判断した。

本研究は細胞増殖因子シグナル経路による細胞運動制御の本質的な問題に迫る研究であり、脊椎動物の原腸形成制御因子として、細胞内因子 XPK, XPIK の機能を明らかにした点は高く評価される。本学位論文は正確な英文で記述されていること、国際専門誌に本研究の一部を掲載した論文が受理されていることから、本申請者の英語能力は学位授与にふさわしいと判断した。また、審査会での質疑に対して申請者は的確に応答したことから、関連分野についても十分な知識を有し考察能力も優れており学位授与にふさわしいと判断した。

本報告に基づく学位授与に関し、平成 15 年 9 月 2 日に開催した分子生物機構論専攻委員会は、主査による審査経過概要の説明、本報告書の「論文審査結果」および「試験結果」に基づき慎重に審議した結果、審査委員会の結論を妥当なものと判断し、「可」とした。