

氏 名 宮城 明日香

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1804 号

学位授与の日付 平成27年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Functional analysis of G protein-coupled receptors Flop1
and Flop2 in Xenopus development

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 上野 直人
教授 藤森 俊彦
教授 日比 正彦 名古屋大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Neural development and morphogenesis are accomplished through several molecular processes in which activities of growth factors are tightly regulated. The neural ectoderm induced by the inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signaling is then patterned along the anterior–posterior (A–P) axis as well as the dorsal–ventral (D–V) axis. Particularly during the A–P patterning, Wnt/ β -catenin signaling is required for the posterior specification. Although recent studies especially with *Xenopus laevis* as a model revealed that the gradient of Wnt/ β -catenin signaling formed by secreted Wnt antagonists is essential for the proper A–P patterning, the precise molecular mechanism is largely unknown. Therefore, I explored possible regulators of A–P patterning focusing on the head formation and found that seven-transmembrane receptors Flop1 and Flop2 are important regulators of head formation. In this thesis, I describe that Flop1 and Flop2 (Flop1/2) contribute to the head formation through anteriorization of the neural ectoderm by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling in *Xenopus* embryos.

First, I examined spatiotemporal expression pattern of Flop1/2 by whole-mount in situ hybridization (WISH) and found that Flop1 is expressed in neural ectoderm, endoderm, and bottle cells in early embryos and hindbrain, somites and lens in later embryos. Flop2 is expressed in similar pattern to Flop1 in early embryos and mouth primordium and somites in later embryos. Although their expression domains were relatively broad, the strong expression of Flop1/2 in the presumptive neural ectoderm of early gastrulae implied that they may play important roles in the neural development, in addition to early embryogenesis including gastrulation.

Next, I functionally characterized Flop1/2. Flop1 and Flop2 are G protein-coupled receptors (GPCRs) related to Gpr4, which is a proton-sensing receptor, and were previously identified as an FGF-responsive gene product and a regulator of cortical actin assembly, respectively. As both over- and under-expression of Flop1 or Flop2 led to gastrulation defects, these GPCRs were thought to be involved in the regulation of gastrulation cell movements. However, by the local over- and under-expression of Flop1/2 restricted to the head region, abnormal head morphology was observed with a significant reduction of head marker gene expression. These data indicated that Flop1/2 are required for the normal head development.

I then investigated how Flops regulate head formation. I confirmed that each Flop can activate RhoA and regulate cortical actin assembly, as reported previously for Flop2. Interestingly, RhoA was previously reported to have a capacity to induce head structures when BMP signal is simultaneously inhibited; the inhibition of BMP signaling at the ventral side is not sufficient to induce complete secondary dorsal axis

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

with head structures. This effect is reminiscent of secreted Wnt antagonists such as Dkk and Frzb that can induce head structures together with BMP antagonists or the inhibition of BMP signaling, and further suggested that Flops that can activate RhoA may also have a capacity to induce head structures. As expected, either Flop could induce a complete secondary axis similar to RhoA. To further address the molecular mechanism, I examined whether they serve as Wnt antagonists by performing TOP-flash assay that monitors the transcriptional activity of β -catenin triggered by Wnt. I injected an mRNA of the TOP-flash reporter and then measured the luciferase activity of excised animal caps that contribute to head structures. As a result, Flops or RhoA inhibited Wnt/ β -catenin signaling in a dose-dependent manner. Next, I examined whether Flops or RhoA inhibit Wnt/ β -catenin signaling in non-cell-autonomously by inducing secreted Wnt antagonists. However, I did not observe any suppression of Wnt signaling when Flops/RhoA and the reporter mRNAs were injected into separate blastomeres, confirming that Flops/RhoA inhibited Wnt/ β -catenin signaling cell-autonomously.

Finally, I investigated which step(s) of Wnt/ β -catenin signaling were inhibited by Flops and RhoA, and performed TOP-flash assay using the intracellular components of Wnt, Dvl and β -catenin. Flops suppressed Wnt/ β -catenin signaling enhanced by Dvl or β -catenin expression, suggesting that Flops inhibits Wnt/ β -catenin signaling downstream of β -catenin, while no suppressive activity was observed when RhoA was co-injected. I also found that Flops overexpression reduced the β -catenin protein levels and suppressed Wnt/ β -catenin signaling but failed to do against a constitutively active β -catenin, which resists to phosphorylation. These data suggested that Flops inhibited Wnt/ β -catenin signaling by promoting β -catenin's phosphorylation and degradation.

In this study, I demonstrated that Flop1 and Flop2 have essential roles in *Xenopus* head development by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling and suggested a previously unidentified pathway that triggers the G-protein coupled receptors in early development.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

脊椎動物の頭部形成は外胚葉が神経組織に分化した後に起こるダイナミックな形態形成現象であり、この一連の制御にはBMP (Bone morphogenetic protein) やWntといったさまざまな細胞増殖因子と、それら因子に対する分泌性抑制因子による阻害機構が重要であることがわかっている。しかしながら、非分泌性の新たな阻害因子も新たに発見されており、頭部形成の詳細な機構は未だ解明されたとはいえない。出願者はアフリカツメガエルを用い、頭部形成に関わる膜受容体に関する研究を行った。出願者は初期原腸胚から神経胚にかけて空間的に興味深い発現を示すものに着目して研究を進め、とくに神経胚において脳領域で高い発現を示すGタンパク質共役型受容体で、互いに一次構造が良く似ているFlop1およびFlop2に着目して詳細な機能解析を行った。出願者はまず、全胚固定 *in situ* hybridization によって、Flop1は初期胚の神経外胚葉、内胚葉、びん型細胞に、後期胚では後脳、体節、水晶体に発現することを確認し、一方、Flop2は同様に外胚葉、内胚葉、びん型細胞に発現が見られるが、後期胚では脳での発現レベルは低く、口原基や体節で発現することを見出した。次にこれら遺伝子の機能獲得および阻害実験によって、操作胚は原腸形成異常を起こすこと、また、脳領域に限定した機能阻害では、頭部で発現する遺伝子の発現の低下に伴って、眼を含む頭部構造形成の異常が見られることを見出した。出願者は、BMPを阻害した際に、アクチン重合を促進する低分子Gタンパク質RhoAを過剰発現すると分泌性のWnt阻害因子であるDkkやFrzbと同様に頭部誘導能を示すこと、Flop1およびFlop2の過剰発現によりRhoAが活性化されることなどから、同受容体がRhoAの活性化を介して頭部を誘導するものと推測した。その可能性を検証するために、Flop1およびFlop2が頭部形成に必要なWntシグナル阻害を引き起こすことを、Flop1およびFlop2遺伝子をともにWntの下流シグナル因子β-カテニンの転写促進活性をモニターするレポーター遺伝子TOP-flashと初期胚細胞に発現させることによって確認した。その結果、Flop1およびFlop2ともにβ-カテニンの転写促進活性を容量依存的に抑制することが明らかになった。また、同レポーター遺伝子をFlop受容体と異なる細胞で発現させた場合にはこのような抑制効果は見られなかったことから、FlopによるWntシグナル抑制は細胞分泌による拡散を介さない阻害機構によるものであり、DkkやFrzbとは異なるメカニズムでWntシグナルを抑制することが確認された。次に出願者はWntシグナルの抑制が細胞内のどのレベルで起こっているのかを確認するために、Wntシグナルの上流に位置するDvlおよび下流に位置するβ-カテニンの過剰発現によるレポーター遺伝子の活性化に対する抑制効果を確認した。その結果、Dvlおよびβ-カテニンによる活性化を阻害したことから、Flop1およびFlop2のシグナルはWntシグナル経路の受容体(Frizzled)、β-カテニンより下流、もしくはβ-カテニンに作用して抑制的に働くことを示し、これはFlopによってβ-カテニンのタンパク質量が減少することによるものであることを明らかにした。さらに、リン酸化を受けないアミノ酸変異を導入した構成的活性化型β-カテニンに対してはこのような効果が見られないことから、Flop受容体シグナルはβ-カ

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

テニンのリン酸化レベルを高め、その後のタンパク質分解を促進することでWntシグナルを抑制する新しい経路であることを示した。

以上のように、本研究は G タンパク質受容体が Wnt シグナル経路の抑制を介して頭部形成を促進する新しいシグナル伝達経路の存在を明らかにしたものであり、学位授与に十分値する研究であると判断した。