

## 学位論文の要旨

氏名

本村 恵理子

学位論文題目

ツメガエル初期胚における Wnt シグナリングの細胞生物学的研究

本論文では、ツメガエルの初期胚に様々なWnt mRNAと注入割球トレーサー (lineage tracer) を注入し、Wntタンパク質の細胞内局在を調べた。さらに、Wnt8タンパク質による背側化が、mRNA注入細胞でのみ起こっているのかを調べる為にオーガナイザーから分泌される神経誘導因子*chordin*の発現をwhole mount *in situ* hybridizationにより検出した。本研究では、これらの実験によりWntタンパク質が、従来より考えられている細胞外ではなく、細胞内で働いている実験的証拠を示した。

第1章では、既に報告された研究、ツメガエル初期胚の背側化、canonical Wnt/ $\beta$ -catenin 経路と本研究の内容について概説した。これまでに坂井らは、オーガナイザーは細胞質デターミネントによって細胞自律的に形成されることを提唱してきた。Wnt8は $\beta$ -cateninの上流で働くことから細胞質背側決定デターミネントを代替すると考えられている。一方、従来よりWntタンパク質は細胞表面で働くと考えられてきた。しかしながら、Wnt8が背側デターミネントの代替となるのならば、Wnt8タンパク質は細胞内で自律的に働いているという仮説が正しいのではないかと考えた。

第2章では、方法と材料について詳細に記述した。

第3章では、mRNA注入胚の背側化、遺伝子発現とWntタンパク質の局在の結果に

ついて説明した。Wnt8タンパク質はWnt8 mRNAが注入された細胞の小胞体に局在することが分かった。また、小胞体貯留型Wnt8 (Wnt8-KDEL) でも背側化を誘導することが出来ることが分かった。更には、阻害因子Frzbによって背側化を阻害されたとき、Wnt8タンパク質は細胞の周辺に局在していることが分かった。その他のコンストラクト注入による結果を詳細に説明し、考察した。

第4章では、Wnt8 mRNA注入胚の*chordin*の発現について記述した。正常胚もしくは体軸を形成しない卵片にWnt8 mRNAとトレーサーとしてn $\beta$ -gal mRNAを共注入し、lacZと*chordin*の発現を調べた。*chordin*は、ほとんどの細胞でmRNA注入細胞を示すlacZの発現細胞と一致していたが、完全に重なる場合と、狭い範囲ではあるが注入領域の隣の領域(細胞)にも発現する場合とがあった。この結果により、Wnt8タンパク質がmRNAが注入された細胞とその周囲の細胞でも背側化に働き*chordin*の発現を誘導していることが分かった。Wnt8が細胞自律的に*chordin*の発現を誘導しているかは更なる検証が必要であることが示唆された。

第5章では、上記のWntタンパク質の局在と*chordin*の発現結果に基づき、本論文で提案するモデルと従来のモデルとを比較した。Wnt8タンパク質は小胞体でレセプターと結合することによって、細胞内で背側化のシグナルを核へ伝えるモデルを提案した。

## Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Cell biological analysis of Wnt signaling in early *Xenopus* embryos

Name: Eriko Motomura

In this dissertation, I performed injection of various Wnt mRNA (HA-tagged) and lineage tracer into a cleavage stage embryo to examine the analysis of the subcellular distribution of Wnt protein. In addition, I carried out histochemical analysis of lacZ (tracer) and whole-mount *in situ* hybridization for *chordin*. Here I report several lines of experimental evidence showing that Wnt8 acts not on the cell surface, but within the cell.

In the first chapter, I review previous studies of dorsalization in early *Xenopus* embryo, canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and summarized this research.

We have proposed that the cytoplasmic determinant causes formation of the organizer in a cell-autonomous manner. It is generally accepted that Wnt proteins act on the cell surface. On the other hand, Wnt8 is thought to substitute the cytoplasmic dorsal determinant since it acts upstream of  $\beta$ -catenin. However, if Wnt8 is capable of substituting for the dorsal determinant, it is reasonable to hypothesize that Wnt8 protein acts in a cell-autonomous manner within the cell.

In chapter 2, materials and methods used in this study are described in detail.

I injected mRNA into a blastomere of cleavage stage permanent blastula-type embryo (PBE) of *Xenopus*, which is animal egg fragment abated of equatorial-vegetal cytoplasm. I carried out RT-PCR, immunohistology, histochemistry and *in situ* hybridization of PBEs injected mRNA.

In chapter 3, results of dorsalization, gene expression and distribution of Wnt protein are described.

Xwnt8 protein was co-localized with an endoplasmic reticulum (ER) resident protein, Protein Disulfide Isomerase (PDI), within the Wnt8 mRNA injected domain. A mutant Wnt8 containing the ER retention signal (Wnt8-KDEL) effectively dorsalized *Xenopus* embryos. Not surprisingly, Wnt8-HA-KDEL proteins were also localized in the ER. Furthermore, when the dorsalization by Wnt8 was inhibited by co-injection of Frzb, Wnt8 protein was localized on the

cell boundary.

In chapter 4, results of expression of *chordin* in Wnt8 mRNA injected embryo.

A blastomeres of marginal zone of gastrulation nonaxial embryos (GNEs) or normal embryos at the end of the 16-32 cell stage were injected with a mixture of Wnt8 and lacZ mRNAs. Then, Histochemical analysis of lacZ and whole-mount *in situ* hybridization for *chordin* were carried out. As a result, expression of *chordin* was restricted within the cells injected with Wnt8 mRNA. These results indicate that Wnt8 protein acts only within the mRNA injected cells.

In the last chapter, based on these results and by comparison with current model and I propose a new model.

A new model for the canonical Wnt pathway in which Wnt8 binds to the receptors in the ER.