

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16138

研究課題名（和文）Toll/Irak1の新規機能：頭部を誘導する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）A role of Toll/Irak1: a novel mechanism of head induction

研究代表者

山元 孝佳（Yamamoto, Takayoshi）

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：70724699

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自然免疫応答で必須なToll様受容体経路（Toll経路）の因子、Irak1の初期発生での役割を調べた。ツメガエル胚でIrak1を異所発現させるとWntシグナル経路の標的遺伝子であるSiamoisやXnr3が発現し、頭部が誘導された。Irak1をロックダウンすると頭部形成が部分的に阻害された。またIrak1はWnt経路のGSK3 $\beta$ 発現による頭部形成抑制を回復させたが、その上流で機能するDishevelledを阻害した際には回復できなかった。すなわちIrak1は頭部形成に必要で、Wnt経路においてDishevelledあるいはその上流に作用していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではToll経路からWnt経路に至る新たな分子経路を発見した。これは、発生・自然免疫の基礎的知見として重要である。また免疫系のがん細胞ではToll経路によるWnt経路の活性化が想定されている（Ma and Hottiger, 2016）が、その全貌は未だ不明である。本研究の成果は、このような医学的に重要な現象の分子機構解明につながる可能性を併せ持っており、実用・応用面での波及効果も期待できる。

研究成果の概要（英文）：The Toll-like receptor pathway (Toll pathway) is essential in innate immune responses, but its role in early vertebrate development was unknown. In this study, we investigated the role of a Toll pathway factor, Irak1. Ectopic expression of Irak1 in *Xenopus* embryos induced expression of Siamois and Xnr3, target genes of canonical Wnt signaling pathway, and induced head formation. Consistently, Irak1 knockdown partially inhibited head formation. GSK3 $\beta$  expression, which is a component of Wnt pathway, suppressed head induction, but co-injection of Irak1 rescued the phenotype. In contrast, the phenotype when Dishevelled, which functions upstream of GSK3 $\beta$ , was inhibited was not rescued by Irak1. This suggests that Irak1 is required for head formation, and acts at or upstream of Dishevelled in the Wnt pathway.

研究分野：発生生物学

キーワード：Toll-like receptor *Xenopus* 頭部形成

1. 研究開始当初の背景

Toll 経路では、Toll 様受容体 (TLR) がリガンドを受容することで、細胞内因子の *Irak1*、*Ikkα* がこの順に活性化され、最終的に核内で *NF-κB* が標的遺伝子の転写を活性化する (図 1 右)。

Toll 関連因子は節足動物と脊椎動物のどちらでも、自然免疫系が機能し始める以前の初期胚で高発現している (Kannaki et al., 2015)。また節足動物では、背腹軸形成や細胞移動に必須の役割を担うことが知られているが、脊椎動物では、成体の海馬における神経細胞サブタイプの分化に関わることが知られる (Rolls et al., 2007)のみで、初期発生における役割は全く不明であった。

申請者は Toll 経路の細胞内因子である *Irak1* (Interleukin-receptor associated kinase 1) をアフリカツメガエル胚で異所的に発現させると、二次胚が形成されるという予備的な結果を得ていた。

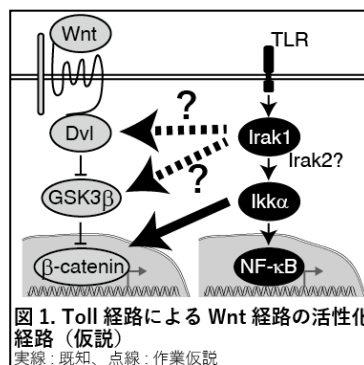


図 1. Toll 経路による Wnt 経路の活性化経路 (仮説)  
実線: 既知、点線: 作業仮説

2. 研究の目的

そこで本研究では「脊椎動物において *Irak1* が頭部・体幹部形成を制御する分子メカニズムの解明」を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Irak1* の頭部誘導能の検証

*Irak1* に二次胚の誘導能があることはわかっていたものの、頭部を誘導できるのかは不明であった。そこでまずアフリカツメガエル胚の腹側で *Irak1* を発現させ、頭部を誘導できるかを検証することとした。

これまでに免疫系において *Irak1* の kinase としての基質は、*Irak1* 自身のみであることが知られているが、頭部形成における *Irak1* の基質は不明なままであった。そこでまず、*Irak1* のリン酸化活性が二次胚誘導に必須かどうかを知るために、リン酸化活性欠失型 (kinase dead 変異型) が二次胚を誘導できるか調べた。

(2) *Irak1* の必要性の検証

通常胚の頭部形成において、*Irak1* が必要であるか、どの程度主要な役割を担っているのかは不明なままであった。そこで MO (antisense morpholino oligonucleotide) によるノックダウンを行ない、頭部形成が抑制されるかを調べた。

(3) *Irak1* はどのように Wnt 経路を活性化するのか

頭部形成に関わる代表的なシグナル経路には、Wnt や BMP 経路がある。特に (1) で眼やセメント腺を含む頭部が誘導された場合には、Wnt 経路に関わる可能性が高いと考えられる。

そこで *Irak1* 過剰発現時に Wnt の標的遺伝子である *Siamois* や *Xnr3* の発現が誘導されるかを調べ、Wnt 経路の活性化が示された場合には、その作用点を調べることにした。

Wnt 経路では、受容体の下流で Dishevelled (*Dvl*) が活性化され、これにより *GSK3β* の活性が抑制されることで、*β-catenin* の分解が抑制され、標的遺伝子の転写が活性化される (図 1 左)。*Irak1* の作用点については、この 3 因子に絞り、*Irak1* との関係性を調べることにした。研究結果に詳述したが、具体的には Wnt 経路の活性化は頭部誘導の有無によって、ツメガエル胚では容易に判別できるため、これを指標として dominant-negative *Dvl* 等と *Irak1* を共注入し、作用点を調べた。

4. 研究成果

(1) *Irak1* はオーガナイザー領域で発現し、頭部誘導能を持つ

アフリカツメガエル胚で *Irak1* が発現する場所を調べたところ、オーガナイザー遺伝子として知られる *Chordin* の発現領域を中心とした広範囲で発現していることがわかった (図 2)。

*Irak1* mRNA を腹側赤道面に顕微注入したところ、眼 (eye) ・セメント腺 (cement gland) を含む頭部およびそれに続く胸部が誘導された (図 3)。またこの誘導活性はツメガエル *Irak1* だけでなく、ヒト *Irak1* でも保存されていた。また *Irak1* の kinase dead 変異型を注入した場合には、二次胚が誘導されなかった。このことから *Irak1* による二次胚誘導は *Irak1* の kinase 活性依存的であることも明らかになった。

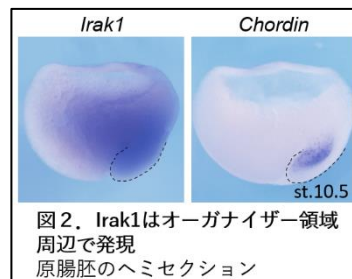


図 2. *Irak1* はオーガナイザー領域周辺で発現  
原腸胚のヘミセクション

これまで頭部誘導機構については、シュペーマン・マンゴールドのオーガナイザー移植実験を皮切りに、大変多くの研究がなされてきた。しかし Toll 経路の因子がこれに関わるという報告は全くない。これに対し上述の結果は、Toll 経路が頭部誘導活性を持つことを示唆する初めての報告である。

しかし「通常胚の頭部形成において、Toll 経路が必要であるか・どの程度主要な役割を担って

いるのか」は不明なままである。

### (2) *Irak1* の必要性の検証

そこで *Irak1* の必要性を調べるため、*Irak1* の MO を設計した。アフリカツメガエルは異質 4 倍体であるため、それぞれの遺伝子は homeolog を 2 つ持つことが多く、*Irak1* 遺伝子もその例外ではなかった。そこで、この 2 つの遺伝子に対する MO を設計した。これらの MO ターゲット配列を開始コドン周辺に含む mVenus の mRNA と *Irak1* MO を共注入したところ、*Irak1* MO で特異的に mVenus タンパク質の翻訳が減少することを mVenus の蛍光観察により定性的に、ウエスタンブロッティング法により定量的に確認した。これらの MO を用いて、*Irak1* をノックダウンさせたところ、頭部形成が部分的に抑制された。これらの結果から、*Irak1* が脊椎動物において頭部形成に必要なだと考えられる。

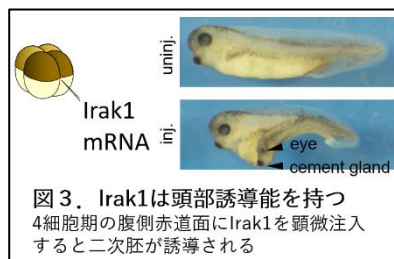


図 3. *Irak1* は頭部誘導能を持つ  
4細胞期の腹側赤道面に *Irak1* を顕微注入すると二次胚が誘導される

### (3) *Irak1* はどのように Wnt 経路を活性化するのか

前述の通り、頭部形成に関わる代表的なシグナル経路には、Wnt や BMP 経路があるが、(1) で眼やセメント腺を含む頭部が誘導されたため、*Irak1* は Wnt 経路の活性化に関わる可能性が高いと考えられた。

そこで *Irak1* が Wnt の標的遺伝子である *Siamois* や *Xnr3* を発現誘導するかを調べた。生体内で *Irak1* を過剰発現させた場合には、種々のシグナル経路が関与して、その結果として間接的に Wnt の標的遺伝子の発現が誘導される可能性を否定できない。そこで、出来るだけ他のシグナル経路の関与を排除するため、アフリカツメガエル胚の外胚葉片 (アニマルキャップ) を用いて、これを調べることにした。具体的には *Irak1* mRNA を 4 細胞期に注入した胚の外胚葉片を切り出し、これを培養し、*Siamois* や *Xnr3* の発現を RT-PCR 法で調べた。その結果、*Irak1* がこれらの標的遺伝子の発現を誘導することがわかった (図 4)。

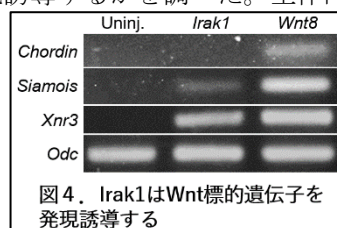


図 4. *Irak1* は Wnt 標的の遺伝子を発現誘導する

これらにより *Irak1* が Wnt 経路を活性化することはわかったが、*Irak1* は Wnt 経路のどの因子を制御しているのだろうか。自然免疫がはたらく際には、Toll 経路の *Ikka* (*Irak1* よりも下流ではたらく因子) が  $\beta$ -catenin の分解を抑制することが知られている (図 1; Ma and Hottiger, 2016)。よって *Irak1* による頭部誘導時の Wnt 経路の活性化も、*Irak1* の下流因子 *Ikka* を介したものである可能性をまず考えた。しかし予想外なことに、*Irak1* が *Dvl* や *GSK3 $\beta$*  と直接結合するという結果を得た。また *Ikka* の過剰発現では頭部を誘導できなかった。これらのことから、初期発生における *Irak1* による Wnt 経路への活性化経路は、既知の *Ikka* による  $\beta$ -catenin の安定化ではないと考えられたため、新たな経路を探索することにした。

具体的には種々の Wnt 経路の因子を過剰発現させ、その作用が *Irak1* を増減させた際にどのように変化するかについて、頭部誘導を指標に探索した。Wnt 経路の転写制御因子である  $\beta$ -catenin を注入すると頭部が異所的に誘導されるが、このとき *Irak1* をノックダウンしても顕著な変化は観察されなかった。一方で  $\beta$ -catenin を抑制する *GSK3 $\beta$*  を注入した際には、頭部誘導が抑制されたが、*Irak1* の共注入によりその表現型が回復した (図 5)。これらの結果により、*Irak1* が Wnt 経路で *GSK3 $\beta$*  よりも上流に作用することが示唆された。次に *GSK3 $\beta$*  よりも上流で作用する *Dvl* に着目した。dominant-negative *Dvl* を頭部予定領域に注入すると頭部誘導が抑制される。このとき *Irak1* を共注入したところ、その表現型は回復しなかった。これらの結果から、*Irak1* は *Dvl*、あるいはその上流に作用することが明らかになった。

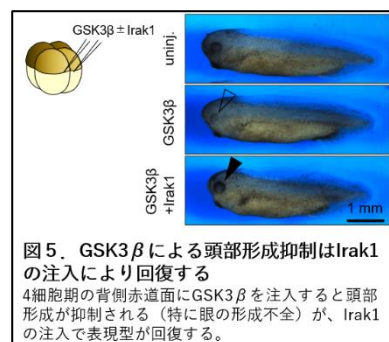


図 5. *GSK3 $\beta$*  による頭部形成抑制は *Irak1* の注入により回復する  
4細胞期の背側赤道面に *GSK3 $\beta$*  を注入すると頭部形成が抑制される (特に眼の形成不全) が、*Irak1* の注入で表現型が回復する。

また *Irak1* はツメガエル胚でリン酸化されていること、*Irak1* の kinase dead 変異体ではこのリン酸化レベルが低いことを明らかにした。*Dvl* のリン酸化レベルやタンパク質量は *Irak1* の注入によって顕著な変化は見られなかった。これらのことから、*Irak1* は他のタンパク質をリン酸化するのではなく、自己リン酸化によって、*Dvl* あるいはその上流に作用し、Wnt 経路を活性化している可能性が考えられる。

Wnt 経路は初期胚において、胚の後方化にも作用する。そこで *Irak1* を胚の後方領域に顕微注入したところ、胚が後方化した。このことから *Irak1* は初期発生過程において、頭部誘導および後方化を制御する Wnt 経路の活性化に作用し得ることが明らかになった。

本研究による、Toll 経路から Wnt 経路に至る新たな分子経路の発見は、発生・自然免疫の基礎的知見として重要である。また免疫系のがん細胞では Toll 経路による Wnt 経路の活性化が想定されている (Ma and Hottiger, 2016) が、その全貌は未だ不明である。本研究の成果は、このような医学的に重要な現象の分子機構解明につながる可能性を併せ持っており、実用・応用面での波及効果も期待できる。

さらに本研究により、節足動物に限らず脊椎動物においても Toll 経路が免疫系と発生系の両

方で機能すること、が明らかになった。なぜ「免疫」と「発生」という一見まったく異なる現象に、後生動物の複数系統で共通して Toll 経路が用いられるのか、その意義や進化的必然性の解明については今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukano Kohei, Yamamoto Takayoshi, Watanabe Tomoko, Michiue Tatsuo	4. 巻 488
2. 論文標題 Xenopus Dusp6 modulates FGF signaling to precisely pattern pre-placodal ectoderm	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 81-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2022.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horikawa Ayumi, Mizuno Keiko, Tsuda Kyoko, Yamamoto Takayoshi, Michiue Tatsuo	4. 巻 16
2. 論文標題 A simple method of hiPSCs differentiation into insulin-producing cells is improved with vitamin C and RepSox	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0254373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Takayoshi, Kambayashi Yuta, Afouda Boni, Otsuka Yuta, Giuraniuc Claudiu, Michiue Tatsuo, Hoppler Stefan	4. 巻 NA
2. 論文標題 Positive Feedback Regulation of Fzd7 Expression Robustly Shapes Wnt Signaling Range in Early Heart Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.09.12.458649	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takayoshi Yamamoto
2. 発表標題 Positive Feedback Regulation of Fzd7 Expression Shapes Wnt6 Signal Range in Early Heart Development
3. 学会等名 Wnt meeting 2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上林勇太、塚野皓平、山元孝佳、道上達男
2. 発表標題 Ndst1はヘパラン硫酸の修飾を介して神経堤分化を促進する
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 名古屋由夏、金島時、山元孝佳、道上達男
2. 発表標題 頭部ブラコード形成におけるBMPシグナル伝達経路の活性制御機構の解明
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第73回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三村 恭弘, 乾 雅子, 山元 孝佳, 大坪 孝平, 平良 眞規, 日笠 弘基
2. 発表標題 Toll様受容体/IL-1受容体経路構成因子であるヒトIRAK1はWnt/ -カテニン経路を活性化する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北村 和輝, 山元 孝佳, 越智 陽城, 道上 達男
2. 発表標題 CRISPR/Cas9法を用いた、ツメガエル胚におけるがん形成に必要な遺伝子の組み合わせの探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上林 勇太, Boni Afouda, Stefan Hoppler, 道上 達男, 山元 孝佳
2. 発表標題 アフリカツメガエルの心臓形成におけるWnt経路を介したFrizzled7の発現誘導
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 貴史, 山元 孝佳, 平良 真規, 武田 洋幸
2. 発表標題 脊椎動物胚の左右非対称性を生み出すNodalシグナル長距離伝達機構とその進化過程
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金島 時, 山元 孝佳, 道上 達男
2. 発表標題 ツメガエル胚において機械的刺激が予定プラコード分化を亢進する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 道上 達男, 金島 時, 中桐 悠一郎, 山元 孝佳
2. 発表標題 ツメガエル初期胚の外胚葉パターンニングにおける物理的な力の関与
3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Aberdeen			