

領域略称名：シリア・中心体系
領域番号：3403

平成26年度科学研究費補助金「新学術領域研究
(研究領域提案型)」に係る中間評価報告書

「シリア・中心体系による情報フローの制御」

(領域設定期間)

平成24年度～平成28年度

平成26年6月

領域代表者

大阪大学・生命機能研究科・教授・濱田博司

目 次

研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要	2
2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況	4
3. 研究の進展状況	6
4. 若手研究者の育成に関する取組状況	9
5. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）	10
6. 総括班評価者による評価	11
7. 主な研究成果（発明及び特許を含む）	13
8. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開發表等）	17
9. 今後の研究領域の推進方策	22

研究領域全体に係る事項

1. 研究領域の目的及び概要（2ページ程度）

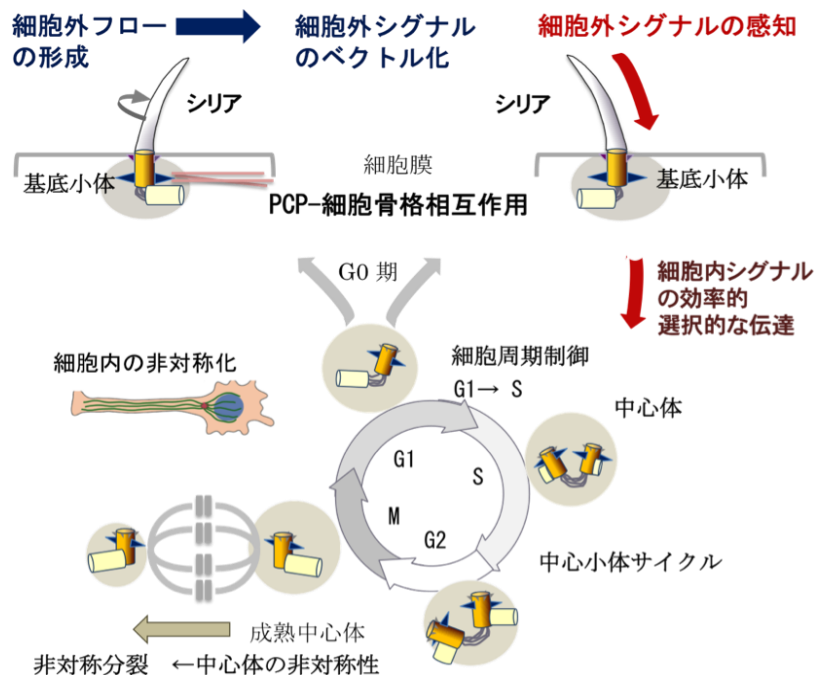
研究領域の研究目的及び全体構想について、応募時に記述した内容を簡潔に記述してください。どのような点が「我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域」であるか、研究の学術的背景（応募領域の着想に至った経緯、これまでの研究成果を進展させる場合にはその内容等）を中心に記述してください。

【概要：どのような点が我が国の学術水準の向上・強化につながる研究領域であるか】

生体の様々な営みは細胞内外の情報伝達の上に成り立っているが、細胞内で発生したシグナルは、細胞間を伝わり、再び標的細胞によって受容・解釈されるまでの間、等方的に伝わる訳ではなく、局在化、ベクトル化（方向付け）されることにより、効率的な情報伝達を達成している。しかしながら、細胞内・細胞外空間を通して、情報の流れがどのように整流され、方向付けられるのかを包括的に展望する視点はこれまで未成熟であった。本研究領域では、細胞の内外を貫くシリア（繊毛）～中心体系という密接に関連した構造を、生体情報の流れを制御するダイナミックな細胞内小器官として捉え、その構造と動態に立脚した新たな視点から、細胞内外の情報フローの制御を体系的に理解することをめざす。

シリア-中心体系を含む我が国の細胞骨格・シグナルに関する基礎研究は、長い歴史と十分な蓄積のある分野であり、細胞周期、発生学の研究も活発である。しかし、世代交代が進むにつれて、若手の育成が急務となっている。本領域に集結した先端的研究者と若手研究者層が中核となって、生体情報のフローと細胞構築の動態をリンクさせる新しい学問分野を創出することで、若い世代の研究者の分野を超えた連携と活性化が期待される。と

くに本研究領域は、生物物理学や工学など広い分野を必要とし、またそのような広域分野を吸収する力を持った内容である。また、その発展は、発生・発育・ホメオスタシス等の生理現象の理解を促進するだけでなく、シリア-中心体系を介した情報フローの破綻に由来するヒト疾患の病態解明の礎となるものである。次々と明らかにされつつあるヒト疾患への関与を考えると、基礎生物学的な意義のみならず、医学的な意義も極めて大きい。



【研究領域の学術的背景】

①シリアによる情報伝達制御とその破綻：中心体は分裂期の細胞で紡錘体の形成中心として機能する一方、静止期の細胞では、その核である中心小体がシリアの基底小体として使われ、シリア構造を形成する。しかし、近年、シリア-中心体系は様々な生化学シグナルあるいは力学的シグナルの発生・伝達・整流・応答に重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。とりわけ、これまで単なる細胞のアクセサリーと軽視されて来た一次シリアが驚くほど多様な生理作用に関与し、その破綻は多彩な疾患・症状に結びつく事が爆発的なスピードで明らかにされつつある。領域代表者の濱田らが推進する体の左右軸の決定機構の研究からは、シリアの運動によって生じた細胞外のフローが胚空間でのシグナルの伝達方向を決める実態が明らかにされ(Nature, 2002)、他方、Hedgehogなどの細胞外シグナルの受容や尿細管内の水流といった力学的シグナルの感知が一次シリアを介して行われることも判ってきた。このように、シリア-中心体

系は、細胞周期により姿を変えつつ、細胞の内から外、外から内への双方向の生体シグナルを方向付け、選択的、効率的に仲介するプラットフォームとして働く姿が浮かび上がってきている。しかしながら、これらの具体的なメカニズムの多くは未解明である。

②中心体による細胞内情報制御：他方、増殖する細胞では、中心小体は細胞周期ごとに半保存的に複製され、G1 期には一過的なシリアを形成する。このような中心体動態は、細胞の分化・発生にも重要な役割を果たすことが示唆されている。最近、組織幹細胞の非対称分裂において、新旧中心体の違いが娘細胞の運命を決定する情報の非対称化（ベクトル化）に関与することが指摘されている。また、多くの癌細胞は母細胞の分化的特質と同時にシリアを失っていることから、癌化とシリア

喪失の関連が疑われていたが、最近、シリアの形成・消失は細胞周期と分化能をコントロールすることが稲垣らによって報告されている (*J. Cell Biol.*, 2012)。さらに、広常らが明らかにしたように (*Nat. Cell Biol.*, 2009)、細胞の変形・移動にも中心体による微小管ネットワーク制御が重要な役割を果たし、その破綻が脳の形成不全をもたらすことが知られているが、これらの分子的理解は道半ばである。

③シリア-中心体系の動態と細胞骨格相互作用：このようなシリア-中心体系の機能は、中心小体サイクル、中心小体から基底小体への変換、それに引き続くシリア形成のダイナミックなプロセスに支えられているが、中心小体がアピカル膜とドッキングする仕組み、細胞周期とのカップリングを含めた両者の変換機構等の分子レベルの解明はまだ端緒に着いたばかりである。一方、気管上皮やノード細胞ではシリアが重要な機能を果たしているが、このようなシリア-中心体系のサブタイプおよび細胞表層での位置と方向性は、組織を取り巻く位置情報により決定されていると考えられる。とりわけ、シリアの方向性は平面内細胞極性 (PCP) と連動しており、PCP を制御する細胞表層骨格と細胞接着構造との相互作用がシリアの空間配置の決定に重要な役割を果たしていることが濱田、月田らによって示されているが (*Nat. Cell Biol.*, 2010; *Cell*, 2012)、その分子基盤は未解明である。

以上のように、シリアの基底構造と中心体は共通の分子基盤を持ち、ともに細胞骨格構造の中心として働き、生体情報の流れを集約・ベクトル化する機能を持つにも関わらず、互いの関連性や分子論的理解は断片的であり、生化学、構造生物学、細胞生物学、発生生物学、神経科学などの様々な分野に分散した形で、断片的に研究が進められているのが現状である。

【本領域の到達目標】

本研究申請では、シリア-中心体系という細胞内外を貫く構築を、細胞のコンテキストによってダイナミックに変化するひとつの細胞内小器官であると捉え、細胞内・組織間の情報フローを制御する場として着目する。この新しい概念を基軸に以下の3つの目標を設定する。これらの研究を推進することによって、細胞構築に立脚した新しい生体情報学として、シリア-中心体系の研究分野を確立する。

【研究項目 A01】シリア-中心体系の構造とダイナミクス、及びそれらの細胞表層骨格構築による制御を、分子レベルで明らかにする。その基盤の上に、次の研究項目が可能となる。

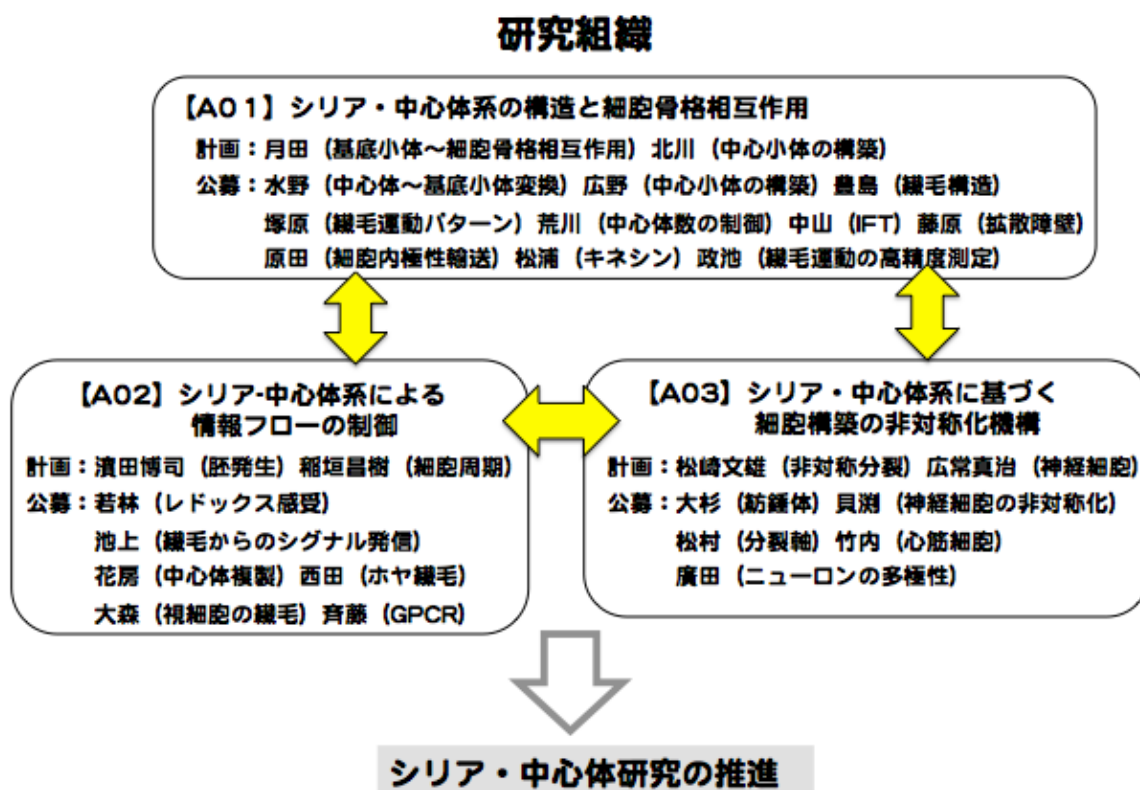
【研究項目 A02】シリア-中心体系による様々な細胞外シグナルの受容・伝達機構、及び細胞周期などの時間的制御に対するシリア-中心体系の役割を明らかにする。

【研究項目 A03】細胞分裂・細胞移動などの様々な細胞動態において、シリア-中心体系が細胞内情報を集約し、細胞の非対称化へと導くメカニズムを明らかにする。

2. 研究組織（公募研究を含む）と各研究項目の連携状況（2 ページ程度）

領域内の計画研究及び公募研究を含んだ研究組織と領域において設定している各研究項目との関係を記述し、研究組織間の連携状況について組織図や図表などを用いて具体的かつ明確に記述してください。

① 研究組織と各研究項目の関係



研究項目 A01：シリア-中心体系の構造と細胞骨格相互作用

1) 中心体複製を規定する、細胞周期に同調した段階的な中心小体構築の機構、2) 繊毛形成過程において中心小体が基底小体変換される機構、3) シリア-中心体構造の動態と細胞内骨格・細胞接着構造との相互作用の解明を目指す。

研究項目 A02：シリア-中心体系による情報フローの制御

1) 細胞外からの様々な物理的・化学的情報がシリア・中心体を介して受容・伝達される機構、2) シリアの運動によって細胞外フローが生じる機構、3) 細胞周期など、経時的な制御におけるシリアの形成・消失の役割を分子レベルで解明する。

研究項目 A03：シリア・中心体系に基づく細胞構築の非対称化機構

1) 細胞の非対称分裂や細胞の極性化における中心体の役割、2) 細胞分化におけるシリアの役割などを明らかにする。

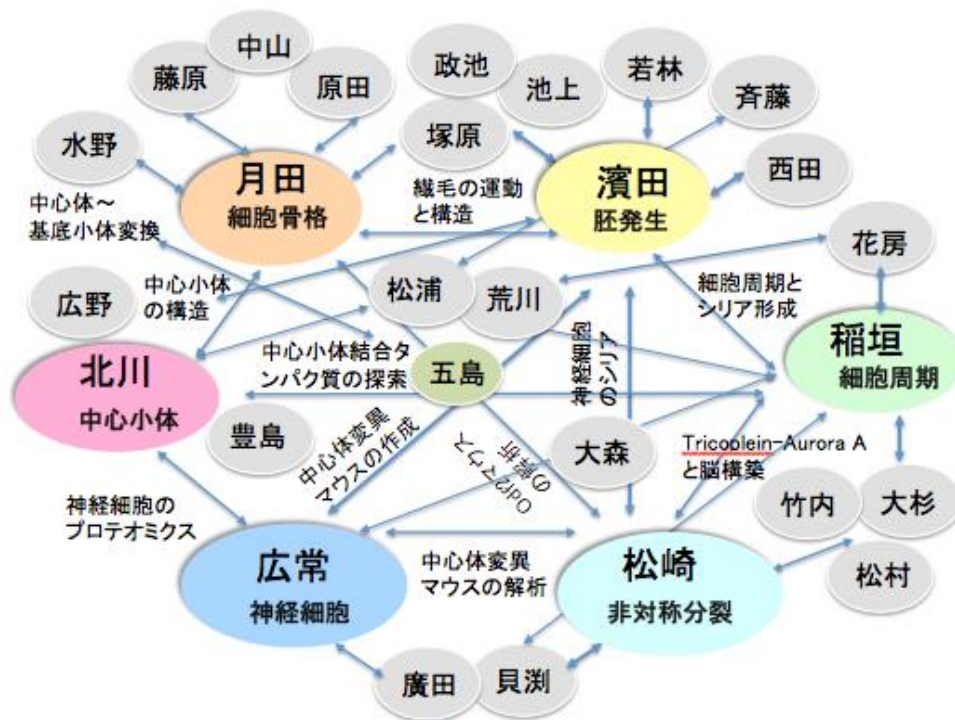
② 研究組織間の連携状況

下図に示したように、領域内で数多くの連携が進行している。ここでは、共同研究に至っている具体的な連携例の一部を挙げる。そのほとんどは発表に至っていないが、今後論文として結実するはずである。また、共同研究とまでは呼べない、技術や試料・動物に関する情報交換・アドバイスは、領域内で頻繁に行われている。

- ・ 月田～濱田：気管多繊毛運動のイメージング、中心小体構成因子の局在の解析、気管支やマウス胚の培養
- ・ 月田～松崎：Odf2 変異マウスにおける、神経細胞の分裂と中心体の解析
- ・ 月田～北川・濱田・広常：電子顕微鏡による構造解析
- ・ 北川～五島：ヒト培養細胞における中心小体構成因子の同定、中心小体因子間の網羅的インタラクトーム。

- ・ 北川～広野：中心小体構成因子のクラミドモナスを用いた構造・機能解析
- ・ 北川～稲垣：中心小体構築の *in vitro* 再構成
- ・ 北川～藤原：超解像顕微鏡を用いた中心小体構成因子の動態解析
- ・ 広野～若林・塚原：走光性に異常を示すクラミドモナス突然変異株の遺伝解析、ゼブラフィッシュホモログの機能解析
- ・ 濱田～北川・広野・広常：変異マウスの作成
- ・ 濱田～稲垣：Cluap1 の細胞周期における役割
- ・ 稲垣～五島：トリコブレインのユビキチン化酵素のスクリーニング、同定
- ・ 稲垣～広常：Ndel1 変異マウスにおける一次シリアの形成と細胞増殖
- ・ 政池～池上：気管繊毛の3次元運動解析、チューブリン翻訳後修飾が運動に与える影響
- ・ 斉藤～松浦：ヒト培養細胞の一次繊毛のタイムラプスイメージング
- ・ 貝淵～稲垣：シリア・中心体形成に関与するキナーゼの基質スクリーニングと機能解析
- ・ 中山～藤原：一次シリア形成に関わる SNARE タンパク質の超解像観察
- ・ 中山～斉藤：GPCR (SSTR5, MCHR1, 5HTR6) を安定発現する RPE1 細胞株の樹立
- ・ 花房～松村：LRRK1 による M 期スピンドル配向制御機構
- ・ 水野～貝淵：シリア形成に関わるキナーゼの基質リン酸化部位の同定
- ・ 水野～中山：シリア形成における Rabin8 の機能解析
- ・ 水野～五島：シリア形成に関わるキナーゼの基質スクリーニング
- ・ 松崎～稲垣・月田・広常：変異マウスの作成
- ・ 松崎～中山：マウス神経幹細胞の非対称分裂におけるリサイクリングエンドソームの役割

共同研究相関図



3. 計画研究ごとの進展状況（3ページ程度）

A01-1 月田班

①新規Odf2関連基底小体アペンデージ蛋白質の探索：

(1) Odf2のノックアウト(KO)F9細胞や種々の変異Odf2遺伝子を発現させた細胞を用いて中心体を単離することにより、Odf2関連アペンデージ蛋白質の同定を試みるとともに、機能ドメインを解析している。

(2) 気管からの基底小体の単離精製による検索：基底小体構成成分のプロテオミクス解析を目指して、気管からの基底小体/中心小体の単離精製を試みている。

②Odf2 関連アペンデージ蛋白質の機能解析：基底小体アペンデージに局在するCep164とOdf2の相互作用を検討している。

③Tfと細胞膜との結合の分子基盤の解析：Odf2やOdf2関連アペンデージ蛋白質が、Tfの構築にどのように関わり、基底小体の細胞膜への結合を制御するか、という課題について、基底小体側と細胞膜側から検討を行う。抗Odf2抗体やアピカル膜のビオチンラベルを用いて、免沈・共沈実験を進めている。基底小体/中心小体の単離精製の単離と質量分析の結果も動員する。

④Bfと細胞表層細胞骨格・細胞間接着系相互作用の分子基盤及び機能解析：基底小体/中心体と細胞骨格との結合や、細胞骨格の走行については、超高压トモグラフィーに加え、解像度の高い蛍光染色像の取得を進めている。①での新規蛋白質の同定結果も利用する。

⑤TfとDa、BfとSaの比較検討：Odf2 KO細胞に対してさまざまなOdf2変異遺伝子を再度導入し、繊毛形成に必須な部分として、Odf2遺伝子の exon6,7 領域を見出した。これらの細胞の基底小体の構造を透過型電子顕微鏡で観察したところ、DA, SAを欠失しているものが確認された。更に、大阪大学超高压電子顕微鏡センターの超高压電子顕微鏡を用いて基底小体を三次元的に解析すると、繊毛形成にはDAの存在が必須であることが見出された。また、SAを欠失した細胞は微小管の脱重合ストレスに対して強く反応し、SAの機能は基底小体周辺の微小管の安定化であることが示唆された。

A01-2 北川班

①ヒト中心小体構成因子群の網羅的フェノーム・インタラクトーム解析：バイオインフォマティクスを駆使して、60種のヒト中心小体構成因子を同定した。現在、これらの因子間のインタラクトーム解析を、五島と共同で進めている。ヒト培養細胞を用いたRNAiで機能解析を段階的に進めているが、既に中心小体複製に必須な因子が1つと、新たに複製される中心小体数の制御に必要な因子が1つ同定された。

②AIDシステムを利用した中心小体構成因子群の機能解析：ユビキチン化のターゲットとなるタグを付与することで高速に蛋白質分解を誘導できるAIDシステムシステムを利用し、中心小体構成因子が中心小体構築のどの段階で機能するかを検討している。この実験系を用いて、中心小体構築の初期過程において、キナーゼであるPlk4がまず一過的にG1/S期に中心小体に強く局在し、これに依存して中心小体の基部を構成するHsSAS-6/STILが局在することを見出している。すなわち、Plk4の中心小体への局在制御が要であることが示唆されており、細胞周期マシナリーとの相互作用に関しても今後検討する予定である。

③ *in vitro* 再構成による中心小体構築のモデリング：中心小体の複製はその基部にあたるカートホイール構造から始まる。中心小体複製に必須の蛋白質であるHsSAS-6が自己会合することで、カートホイール構造の中心部分が構築されるモデルを提唱してきた。これまでの解析から、Plk4がSTILをリン酸化することで、HsSAS-6/STIL複合体を形成することを明らかにし、さらに各因子の精製蛋白質を用いてこの過程を *in vitro* で再現することができた。現在は形成されたHsSAS-6/STIL複合体の構造生物学、生物物理学的解析を進めている。複合体の形を観察し、因子間結合定数や結合分子数比を算出することで、中心小体基部であるカートホイール構造の定量的なモデル構築を行う。

A02-1 濱田班

- ① ノード細胞へ前後の極性を与えている位置情報の実体: まずは non-canonical Wnt シグナルを考えた。ノードの後方で発現する Wnt5a, Wnt5b の欠損マウスでは、約半数において基底小体の位置がランダムになっていた。一方、Wnt の antagonist である Sfrp1,2,3 は、マウス胚においてノードの前 (頭) 側に発現している。以上より、ノードの後方で発現する Wnt5a/5b と、前方で発現する Sfrp によって作られた非対称な Wnt シグナルが、ノード細胞に極性を与えていることが示唆された。
- ② 基底小体が細胞の後側へ移動する機構: 細胞内極性(PCP)因子である Dvl はノード細胞の後側、Prickle と Vangl1 は前側に局在するが、Wnt5a/5b 二重変異マウスや Sfrp1,2,3 三重変異マウスでは極性を失っていた。Prickle1,2 二重変異マウスでは、基底小体の位置や Vangl1 の局在がランダムになっていた。
- ③ 繊毛の運動性・運動パターン・方向性が決められる機構 (月田との連携): 繊毛が運動性を失う変異マウスを2つ同定した。Pih1d3 欠損マウスでは、精子の鞭毛のみが運動性を失っていた。Pih1d3 は精巣で特異的に発現され、軸系には存在せず細胞質に局在することから、細胞質におけるダイニン複合体の形成に必須であると示唆された (JCB, 2014)。もう一方の Pcdrp 変異マウスでは、すべての motile cilia が運動性を失っていた。Pcdrp 蛋白質も細胞質に局在しており、ダイニン複合体を細胞質から軸糸への運搬に必要な因子と示唆された。Pcdrp と相互作用する蛋白質を網羅的に探索し、幾つかの因子を同定した。
- ④ センサーシリアが水流を感知する機構: ノードの脇にある不動繊毛が、繊毛に局在するカルシウムチャンネル Pkd2 を介して、左向きの水流を感知していることを明らかにした (Science 2012)。一方、不動繊毛が水流を感知すると、不動繊毛を持つ細胞内で Cerl2 と呼ばれる遺伝子の mRNA が崩壊し、それによってノードの両側で非対称性が生じることが判明した (Nat. Commun. 2012)。
- ⑤ 細胞周期に依存した基底小体・シリアの形成機構 (月田や稲垣との連携): 繊毛に局在する新規蛋白質をコードする遺伝子 (Qilin/Cluap1) を欠損するマウス胚はすべての繊毛を欠損し、その結果、左右異常を示すとともに、Hedgehog に対する応答能を失っていた。また、変異マウス胚から樹立した繊維芽細胞も、繊毛形成能を失っていた (Dev. Biol., 2013)。

A02-2 稲垣班

- ① 中心体・一次シリアからのシグナルによる細胞周期制御機構の解明: 我々が同定した一次シリア制御因子であるトリコプレイン及びその類縁蛋白質群の網羅的解析を通して、中心体・一次シリアによる細胞周期チェックポイント制御機構の解析している。これまでに、一次シリア形成が誘発される際に、トリコプレインがポリユビキチン化依存的に分解され、中心体より消失することを見出した。ユビキチン化されないトリコプレイン変異体 (K50/57R) を発現する細胞や、プロテアソーム阻害剤を処理した細胞では、一次シリアが形成されないことから、ユビキチン・プロテアソーム系によるトリコプレインの分解が一次シリア形成に必要不可欠であることを証明した。さらに、研究分担者の五島と共同で、プロテインアレイと siRNA 法を組み合わせた網羅的な E3 リガーゼスクリーニングを行い、トリコプレインをポリユビキチン化する E3 リガーゼとして KCTD17 を同定した。さらに、KCTD17 を介したトリコプレインのポリユビキチン化は、プロテアソーム依存的な分解を引き起こし、この一連のシグナルが一次シリアの形成に必要不可欠であることも明らかにした。一方、トリコプレインのもつ TPHD ドメインを有する 81 分子について hTERT-RPE-1 細胞において siRNA スクリーニングを行い、4 分子が一次シリア形成を抑制することを見出した。また、Aurora-A キナーゼと相互作用する分子を探索し、高い活性化能が認められた CCDC78 に着目し、その機能解析を行っている。
- ② 組織幹細胞における中心体・一次シリアと細胞周期の関連の解析: マウス骨髄より幹細胞マーカーを

用いて造血幹細胞をセル・ソーターで分離し、シリア形成能を検討している。

③胚性幹細胞における細胞周期チェックポイント制御機構の解明：胚性幹細胞における細胞周期を検討するため、トリコプレインの分解に関与する KCTD17 のノックアウトマウスを、A03 計画班の松崎（理研）と共同して作製中である。

A03-1 松崎班

①中心体による非対称化：神経幹細胞の維持に必要な Notch シグナルが娘細胞で非対称に活性化されるメカニズムに、中心体の非対称性が関与している可能性を検討する。この解析を行う基盤として、Notch シグナル経路伝達に重要なエンドゾーム系と Notch を始めとした Notch シグナル経路因子の動態を脳スライス培養中の神経幹細胞で可視化することを最初の目標とした。中山班（京都大学）と共同で、EGFP で標識したトランスフェリンリセプターを用いてエンドゾームの動態を観察できる系を確立した。神経幹細胞の分裂期において、エンドゾームが中心体微小管近傍に集積し、その後中心体と中央帯に多く集積する様子を観察することに成功した。

②神経幹細胞分裂期における Notch シグナル経路の動態と中心体の関連：脳スライスで Notch シグナル成分を直接観察し非対称な運命決定のメカニズムを解析するために、Notch の細胞内ドメインに EGFP を挿入したノックインマウスを作製中である。また、細胞核に移行する Notch 細胞内ドメインと、分化する細胞側でエンドゾームにトランスエンドサイトーシスされて行くものを区別するために、Notch 分子の細胞内、細胞外領域にそれぞれ光感受性蛍光タンパク質を挿入したものを作製した。この光感受性 Notch-蛍光タンパクは Notch 活性を持ち、神経幹細胞に導入しても細胞の振舞に悪影響を与えないことが判明したので、分裂の姉妹細胞の一方だけで光活性化した Notch 分子の動態を解析する手段として有効であることが確認できた。現在、この観察系を用いて、神経幹細胞の分裂時における Notch の活性化の非対称性と中心体周辺の局在を検出し、Notch シグナル系の制御因子の役割を検討中である。

③小頭症原因遺伝子の分裂モード遷移における役割：中心体局在を示す小頭症原因遺伝子の産物が、マウスに少数しか存在しない脳室帯外神経幹細胞の形成に影響を与えることを検証している。

A03-2 広常班

①中心体構成因子の機能を解明するために遺伝子改変マウスを作成し、発生における役割、機能維持における役割を解明する：細胞内物質輸送においてカーゴが細胞質ダイニンにローディングされる際に低分子量 G 蛋白質である Rab6 が重要な役割を果たしていることを明らかにした (*Nature Commun.* 2013)。また中心体特異的な脱リン酸化酵素・PP4 が細胞極性を制御していることを明らかにした (*Neuron* 2013)。また細胞質ダイニンからカーゴがアンローディングされる際には低分子量 G 蛋白質・Ar13 が重要な役割を果たした。さらに NUDC のノックアウトマウスを作成しており現在表現形を解析中である。

②神経細胞における中心体からの微小管ネットワークの制御因子の生物物理的解析：細胞質ダイニンが微小管のプラス端に運搬させる際の特別な微小管である可動性微小管の構成因子を解析し、パーキンソン病の原因遺伝子・シヌクレインファミリーのタンパク質が重要な役割を果たしていることを明らかにした。特にシヌクレインファミリーのタンパク質は微小管に対して竹の節のように結合し、本来は不安定な短い微小管の安定性を飛躍的に高めることが分かった。現在フリーズレプリカ法を用いて最後の詰めを行っている。

4. 若手研究者の育成に係る取組状況（1ページ程度）

領域内の若手研究者の育成に係る取組状況について記述してください。

研究室間の交流・共同研究への積極的な参加

領域内の共同研究を促進し、大学院生や若手研究者の積極的な参加を促すことで、モチベーションを高めた。その結果、領域内で多数の共同研究が推進され、その舞台で多くの若手研究者が研鑽を積んでいる。また、領域内の研究室間で人材交流を図った（吉場聡子：濱田班→北川班へと異動）。

領域会議への参加

学生や若手研究者の領域会議への参加を、促している。2013年の領域会議では12名の学生が参加し、領域研究者との交流を図った。今後も、積極的な参加を促す。2013年の領域が共催した国際シンポジウムでは領域から多くの学生・若手研究者が参加し、ポスターセッションなどで国外研究者も交えて活発に議論を行った。

若手研究者・RAの雇用

北川班：博士研究員2名(1名x 3ヶ月, 1名x 22ヶ月)、月田班：RA 3名、研究補助員1名、豊島班：博士研究員1名、濱田班：博士研究員2名、RA 4名、稲垣班：RA 4名、若林班：博士研究員1名

学生の学位所得

月田班：博士課程1名、修士課程2名

濱田班：博士課程3名：（吉場聡子、Yanick Botilde, Fenlang Dong）

松浦班：博士研究員4名、

若手メンバーの受賞

- ・ A01-01 今里光伸（月田班）2012年12月16日、第85回日本生化学会、鈴木紘一メモリアル賞
- ・ A01-02 北川大樹（北川班）2013年4月8日、文部科学大臣若手科学者賞
- ・ A01-02 白土玄（北川班）2013年6月21日、第65回日本細胞生物学会、プログラム委員長賞
- ・ A01 加藤洋平助教（中山班）、第60回日本生化学会近畿支部例会（2013年5月18日）で優秀発表者賞
- ・ A01 中山班 高津、加藤ら、彼らの論文（*Cell Struct. Funct.*誌の2013年）が最優秀論文賞
- ・ A01 Ekaterina Royba（松浦班）2014年2月16日、フェニックスリーダー育成プログラム国際シンポジウム、優秀ポスター賞
- ・ A02-2 笠原広介（稲垣班）2014年2月14日、第6回NAGOYAグローバルリトリート（愛知・大府）、最優秀口演賞
- ・ A02 表迫竜也（西田班）2013年5月17日、阪大-台湾精華大生命ジョイントミーティング、ベストプレゼンテーション賞
- ・ 荒川聡子（荒川班）第22回日本 Cell death 学会学術集会(平成25年7月20日)、ポスター優秀演題賞受賞（荒川聡子）
- ・ A03 大橋翼（大杉班）2014年4月26日 東京大学生命科学シンポジウム、優秀ポスター賞、

若手メンバーのステップアップ

- ・ 宮本達雄（松浦班の連携研究者）が助教から講師に昇任
- ・ 政池知子（公募班員）学習院大学理学部物理学科・助教から東京理科大学理工学部・応用生物科学科・講師へ昇任
- ・ 花房洋（公募班員）助教から講師へと昇任、2013年12月
- ・ 安島理恵子（濱田班）、特任研究員から、国立遺伝学研究所の助教へ昇進

5. 研究費の使用状況（設備の有効活用、研究費の効果的使用を含む）（1 ページ程度）

領域研究を行う上で設備等（研究領域内で共有する設備・装置の購入・開発・運用・実験資料・資材の提供など）の活用状況や研究費の効果的使用について総括班研究課題の活動状況と併せて記述してください。

設備の活用状況

本領域研究では、細胞やマウス胚（固定したあるいた生きた）で、繊毛や中心体を観察するためのイメージング技術が不可欠であった。そのために計画研究では、初年度に下記の顕微鏡機器を購入することで、研究の促進を図った。これらの機器は各計画班に設置されたが、領域内で共有されている。

月田班は、「高解像度 3D イメージングシステム（英国 GE Healthcare 社製）」を導入した。本機は、それまで長い間蛍光観察に使用していた Delta Vision の新型機で、中心体に局在して存在する Odf2 などの像を得るために、Deconvolution 機能のある本機は必須であった。導入により、種々の中心体構成因子やシリアの鮮明な画像の獲得と論文作成に威力を発揮した。また本機は、領域間（例えば濱田班と月田班）や領域外との共同研究の推進にも、大きな力を発揮した。北川班は、中心小体における各構成因子の詳細な局在を解析するために高感度ハイブリッド検出器を搭載した最新型の共焦点顕微鏡（Leica TCS SP8）を導入した。さらに、インタラクティブ解析に使用する化学発光検出器を導入した。稲垣班は、中心体・シリア蛋白質の局在を高精細度で観察するため、高解像度 3D 蛍光イメージングシステムを導入した。さらに、増加する動物飼育に対応して、SPF 動物飼育装置を導入した。また、インビトロシェーカー、ゲル乾燥機、オートクレーブ、微量高速遠心機なども設備備品として購入した。松崎班は、Notch 分子やエンドゾームを高時間分解で観察できる共焦点顕微鏡（Yokokawa CS-W1）を導入した。これは、中山班らとの共同研究に効果を発揮している。

技術や実験資材の支援

総括班経費を利用して、以下のような技術支援を行っている。本領域研究には、中心体や繊毛の構造解析が不可欠である。そこで月田班に、電子顕微鏡関連の技術支援をする研究員を 1 名雇用し、領域研究内における共同研究を推進した。北川・濱田・広常班のみならず、公募班に対しても、技術的なアドバイスを与えている。松崎班は、理研 CDB の協力のもと、中心体や繊毛形成に関与すると思われる因子の変異マウスを作成し、班員に供給している（費用の一部は総括班から）。濱田が維持しているマウス（種々の Cre マウスなど）は、他の班員にも有用であり、リクエストに応じて供給している。稲垣班の分担研究者である五島氏は、中心体や繊毛の構成因子をコードするヒト遺伝子を班員に供給することで、領域内の研究推進に大きく貢献している。現在は、稲垣班、北川班、広常班との共同研究が進んでいるが、今後より多くの共同研究が開始すると考える（リソースの維持・発送費用の一部は総括班から支援した）。今後も、これらの技術支援を継続する必要がある。

班会議・国際シンポジウム

領域内の研究交流のために、年 1 回の班会議を開催している。第 1 回の班会議により、公募班員を含めた共同研究が飛躍的に推進された。4 人の研究協力者（吉川雅英・澤本和延・杉本亜砂子・豊島文子各氏）が班会議に出席してくださり、班員の研究に対して貴重なアドバイスを与えた（研究協力者の出張旅費は、総括班経費で賄った）。また、H25 年 6 月 17～18 日に、“Cilia and Centrosomes: from Fertilization to Cancer”と題した国際会議を開催し、総括班経費を利用して、5 人の海外研究者と国内の中心体・シリア研究者を招いた。領域の班会議は、今後も年 1 回の予定である。国際シンポジウムは最終年度にも開催し、本領域研究の成果を世界に発信する。また、領域研究のホームページの作成・維持・更新を、総括班経費で委託した（株式会社 ZENIS）。

6. 総括班評価者による評価（2ページ程度）

総括班評価者による評価体制や研究領域に対する評価コメントを記述してください。

（50音順）

後藤由季子（東京大学・薬学研究科・教授）

本領域では、生体情報の流れを制御するダイナミックな細胞内小器官としてシリア（繊毛）～中心体系を捉え、その構造と動態に立脚した視点から、細胞内外の情報フローの制御を、体系的に理解することを目指すものである。この取り組みはユニークなものであり、広い生物学的視野からのアプローチとして注目される。メンバーも、必ずしもシリアのみの対象ばかりではなく、発生や細胞生物学広範にわたった見識を保有し、一般の細胞生物学諸現象の動作原理の一環としての情報フローとして、シリア～中心体系の研究が推進されることは、十分に意味にあることである。

計画班は、各々の研究室のこれまでの研究を地盤に、堅実な解析を積み上げている印象である。「情報のフローの制御」について、新しい取り組みとして具体像ができつつあるように思われる。また、研究室間の共同研究も推進されており、新学術研究が立ちあがったことによる連携が構築されていることは、理にかなったことであると思われる。今後の連携による研究の質の向上と、人材育成などがさらに期待される。

公募班では、テーマも幅広く、若手や女性研究者を含め応募が取り入れられている。多様な成果が期待できる一方で、研究室間の成果の融合という点で、今後の進展が望まれる。

総じて、細胞周期、細胞内シグナル伝達、細胞骨格、細胞運動と、細胞生物学の源流が多くとりこまれた上で、シリア～中心体動態メカニズムを捉える事は、シリア関連疾患(ciliopathy)のメカニズム解析という面からも注目される。シリア関連疾患の幅の広さは、多様な症状との関連で捉えられるが、基礎研究の充実が疾患対策に結びつく事例として注目され、この分野のさらなる発展が望まれるところである。

竹市雅俊（理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター・センター長）

当新学術研究領域は、シリアと中心体という細胞動態を支える構造を基軸に、細胞内外の生体情報の伝達を総合的に捉えるという視点に立脚している。ともすれば、伝統あるシリア研究、細胞生物学、シグナル研究に分離しがちな研究領域の連携を幅広く進め、新しい分野の創造を目指していることは日本の生命科学の発展にとって価値ある試みである。

中核となる計画班は若手を組み込んだ推進力のあるメンバー構成からなり、新しい領域を組み立てて行く基盤としてふさわしい。公募班には多様な人材を採用し、研究領域に多様性をもたらしている。研究期間の中間点で、すでにいくつかの創造的な研究が研究成果として発表されているが、多くの研究が独創的な展開をめざしていると見受けられる。班員間の連携はスムーズに進行しているようであり、構造生物学、細胞生物学、発生生物学、神経科学などの多様なアプローチの連携が計られつつある。領域内の技術的支援の体制も有効に機能し、これまでのところ、新学術領域として新しい分野の構築に向けて順調に進んでおり、5年の研究期間に成熟した研究成果が期待される。

今後、この領域がさらに充実した成果をもたらすには、シリアや中心体の動態研究と組織・個体レベルの研究の橋渡しを進める理論的なアプローチおよび計測工学的な研究を主体にした研究者を公募班に加えることが望ましい。また、経験豊かな研究者と若手研究者の連携を深めることにより人材の育成を計るだけでなく、若手研究者間の活発な交流が必須であり、それに向けた活動を活性化することが期待される。

竹縄忠臣 (神戸大学大学院医学研究科・特命教授)

全体的に見て、2年を経過した時点で順調に研究を進めてきていると言える。まず、これまでに得られた研究成果について見てみると、濱田らの *Science* に掲載された論文をはじめとして、世界をリードするいくつかの成果が一流誌に発表されており、高く評価できると考えられる。本新学術領域が研究するシリア・中心体のバイオロジーは、最近、非常に注目を集めており、その解明により、個体の発生・発達、細胞周期、がん生物学などの幅広い研究分野の進展に大きな貢献ができると考えられる。現在、研究競争も激しくなっていると想像されるが、この新学術領域からさらに独創的な研究成果が出て、日本がシリア・中心体研究の世界的拠点となっていくことを大いに期待している。また、領域全体としての研究活動の面では、当初の研究計画どおり、班員間の共同研究が、研究項目内のみならず、研究項目間でも活発に行われているように思われる。共同研究は、互いの弱点を補完しあったり、新しい発想の研究を生みだすきっかけとなることもあるので、本領域において活発な共同研究がなされていることは非常に望ましいことである。一方、公募班の構成についてみると、公募の研究者も、かなり優れた研究者を採用しているようである。今後の公募班員の選定においても、現班員の研究進捗状況や若手人材の将来性などを考慮した厳格な選択をして頂きたい。

シンポジウムや班会議に参加した何人かの若手研究者から感想を聞く機会があったが、非常に若手研究者を刺激する内容であったとの感想であった。この若手研究者の支援・育成については、本領域推進にあたってのビジョンとして挙げられているが、積極的に若手研究者の研究課題を採択している点は評価できる。しかし、これ以外の若手研究者の育成に係る取り組み状況はやや少ない印象をもったので、今後、より具体的・積極的な若手支援策を実施して、さらなる若手支援の充実をお願いしたい。

研究費の使用状況については全く問題がなく、その運用は妥当なものである。また、研究組織についても、このままの継続で良いと考える。研究期間後半も、計画班員および公募班員が、有機的な連携をとり、互いの情報をフィードバックし合って、研究の活性化を図ってほしい。

以上、本新学術領域研究は、ほぼ順調に進捗していると評価し、今後、さらに画期的な研究成果を出して頂けることを大いに期待している。

7. 主な研究成果（発明及び特許を含む）[研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理する]

(3 ページ程度)

現在実施している新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（発明及び特許を含む）について、現在から順に発表年次をさかのぼり、図表などを用いて研究項目毎に計画研究・公募研究の順に整理し、具体的に記述してください。なお、領域内の共同研究等による研究成果についてはその旨を記述してください。

紙面の都合上、一部の班員の代表的な成果のみを記載する。

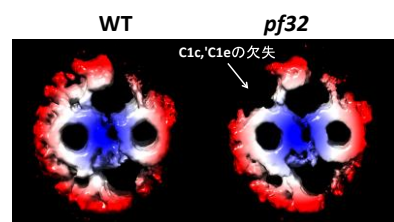
A01 計画（月田班）

アペンデージ構成蛋白質の1つである Odf2 の視点からみたシリア・中心体解析では、基底小体アペンデージの Tf、Bf、中心小体アペンデージの Sa、Da の機能・構造的役割を示すことができた(Tateishi et al., *JCB*, 2013)。また、基底小体の足場となる、上皮細胞アピカル微小管格子について、タイトジャンクションを起点とした新しい構造体として、同定することができた (Yano et al., *JCB*, 2013)。

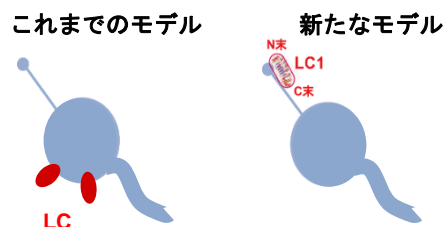
A01 公募（水野班）TTBK2 キナーゼが母中心小体に集積する機構を調べた結果、EB1 や Cep164 の関与が判明した。また、NDR2 キナーゼの基質として Rabin8 や PI4KIIIβを同定し、NDR2 によるこれらのリン酸化が一次繊毛形成に必要であることを明らかにした。また、NDR キナーゼの活性化因子である Furry が双極性紡錘体の形成及び紡錘体微小管のアセチル化に関与することが判明した。

A01公募（広野班）繊毛の運動性に異常をもつ新規クラミドモナス突然変異株 pf32を単離・解析した結果、繊毛の波動運動の周期が乱れていた。中心対構造をクライオ電子線トモグラフィー解析（吉川研究協力者との共同研究）で調べると、pf32中心対はC1c、C1eという突起構造を欠失していた。さらに、Pf32pはゼブラフィッシュにおいても繊毛の運動性に必要であった（塚原班との共同研究）。

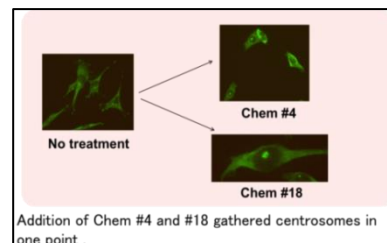
野生型、pf32繊毛軸系の中心対構造



A01 公募（豊島班）テトラヒメナの組換え体ダイニンを精製し電子顕微鏡観察したところ、これまでのモデルと異なり、外腕ダイニン軽鎖 LC1 がダイニン複合体のα重鎖のストーク上に存在することが明らかになった。

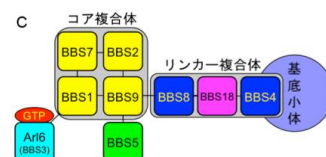


A01 公募（塚原班）軸系ダイニンの複合体形成の機構を知るため、ゼブラフィッシュにおける4種のPIHタンパク質全ての発現・機能解析を行った。その結果、4種全てが様々な運動性繊毛組織で発現し、少なくともクッペル胞においては全てのPIHタンパク質が繊毛の運動性に関わることを見出した。



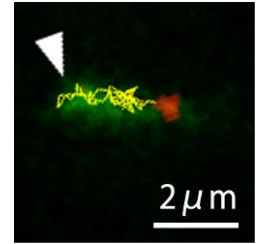
A01 公募（荒川班）中心体数の制御機構を理解するため、ケミカルバイオロジーの手法を用いて低分子化合物ライブラリーをスクリーニングし、中心体を制御できる化合物を同定した。この化合物を投与すると、複数の中心体が1カ所に集約される。また癌細胞に投与すると細胞分裂が停止し細胞死が惹起された。

A01 公募（中山班）新たに開発した方法を用いて、すべてのBBSomeサブユニット間の相互作用を解析した。その結果、BBS1,2,7,9がコア複合体を、BBS4,18,8が基底小体とコア複合体をつなぐリンカー複合体を形成し、BBS9がBBSome

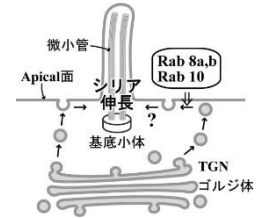


複合体の形成のハブになるというモデルを構築した。

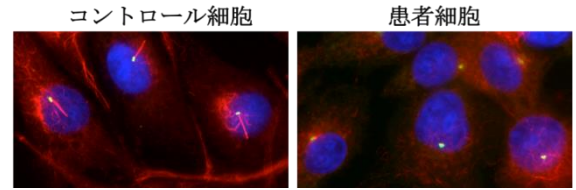
01 公募 (藤原班) 一次シリアと、脂質の蛍光アナログ 1 分子との 2 色同時観察をおこなったところ、一次シリア基部には、1 分子の脂質分子でも通り抜けられない拡散障壁が存在することが示唆された。また、拡散障壁マーカー分子の生細胞超解像観察と、一次シリアへの分子の出入りの 1 分子同時観察ができる顕微鏡システムを構築した。



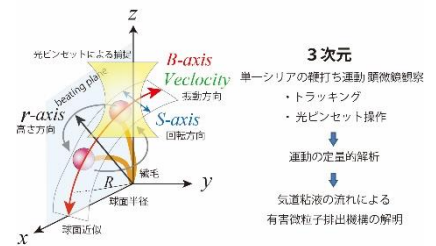
A01 公募 (原田班) シリアの形成や伸長に重要といわれる Rab8a と Rab8b を共に欠損したマウスを作製し、そこから採取したマウス胎児繊維芽細胞にさらに Rab8 の類縁分子である Rab10 をノックダウンしたところ、シリアを持つ細胞数が減少した。このことからシリアの形成や伸長には Rab8a,b と共に Rab10 が必要であることが明らかとなった。



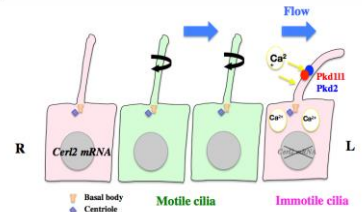
A01 公募 (松浦班) シリア形成不全を示すヒト遺伝性疾患の PCS 症候群の原因遺伝子である BUBR1 を、独自に開発した一塩基編集法を利用して解析した所、BUBR1 遺伝子の転写調節領域に、発現低下の原因となる変異を同定した (PNAS 2014)。



A01 公募 (政池班) 光ピンセットで捕捉した単一シリアを観察した所、繊毛が変形するときの力と内部の分子モーター由来の力の両方が鞭打ち運動に寄与し、弓を引いて矢をとばすような鞭打ち運動が起こっていることが判った。また、Ca²⁺濃度が振幅・鞭打ち速度・回転方向に影響した (池上班との共同研究)。

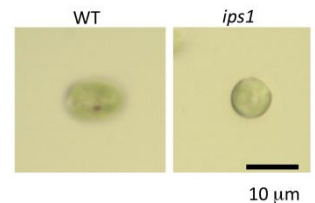


A02 計画 (濱田班) 動かない繊毛が、繊毛に局在するカルシウムチャネル Pkd2 を介して、左向き水流を感知していることを明らかにした (Science 2012)。また、不動繊毛が水流を感知すると Cer12 mRNA が崩壊し、それによりノードの両側で非対称性が生じることが判明した (Nat. Commun. 2012)。



A02 計画 (稲垣班) Plk1 の Ser99 は、PI3K-Akt キナーゼカスケードによってリン酸化され、このリン酸化を阻害すると染色体の整列/分離が強く障害された。さらに、Plk1 を強くノックダウンすると全ての Plk1 機能が障害されるが、不完全にノックダウンした場合には染色体の整列/分離が障害された。すなわち、染色体の整列/分離には、より高い Plk1 活性が必要であると示唆された (Nat. Commun., 2013)。

A02 公募 (若林班) クラミドモナスで走光性のレドックス調節に異常をもつ新規変異株 *ips1* 株では、野生株と逆に、細胞内が酸化になったときに負の走光性を、還元的の時に正の走光性を示す。A01 廣野雅文班との共同研究による遺伝子解析により、カロテノイド合成経路の遺伝子に点変異が存在することを解明した (廣野班との共同研究)。



A02 公募 (花房班) 中心体に局在する ROCO ファミリーキナーゼ LRRK1 は、PLK1 の下流で M 期スピンドル配向を制御し (松村班との共同研究)、間期シリアの形成に必須である。LRRK1 は母中心小体で特異的に活性化しており、中心体因子 NDE1 をリン酸化する。LRRK1 による NDE1 のリン酸

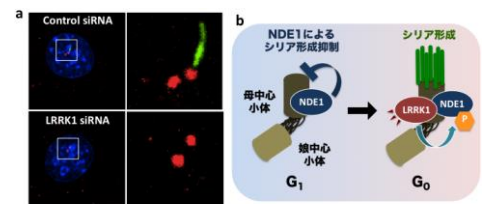
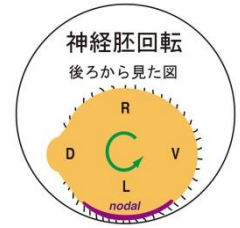


図 LRRK1はNDE1を介してシリア形成を制御する
(a) LRRK1をノックダウンしたNIH3T3細胞。中心小体(赤)から伸びるシリア(緑)の形成が阻害されている。
(b) LRRK1によるシリア形成制御モデル。

化が、NDE1 によるシリア形成阻害を解除することになる (図 b)。

A02 公募 (西田班) ホヤの幼生は尾の曲がり方や脳の構造に左右非対称性を持っている。神経胚の表面にはシリアが生えており、胚は後ろから見て反時計回りに回転し、左側面を下にしたところで停止する。この神経胚回転により左側表皮と卵膜が接し、そこに *Nodal* が発現する。ダイニンの阻害剤によって神経胚回転が起こらないことがわかったので、繊毛の動きによって胚が回転していることが確定した。

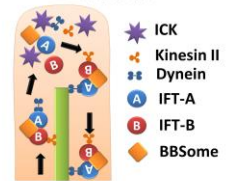


A02 公募 (齊藤班)

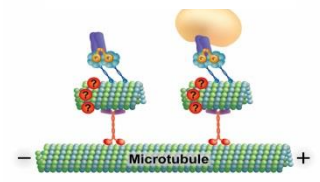
メラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1) が 1 次繊毛に局所するために必要な 2 アミノ酸を決定した。中枢に豊富な MCHR1 結合分子を見出し、その遺伝子改変動物を作製した。

A02 公募 (大森班) ゼブラフィッシュでは、IFT 複合体 A の構成要素の変異が進行性視細胞脱落を引き起こした。また、シリア局在キナーゼ ICK が網膜神経上皮の繊毛形成に重要であり、ICK がキネシンをリン酸化することで、シリア先端部分における IFT 複合体 BBSome の折り返し機構を制御することを解明した (*EMBO J*, in press)。

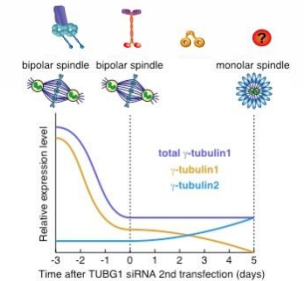
シリア局在キナーゼICKはシリアの先端においてIFTの方向転換を制御する



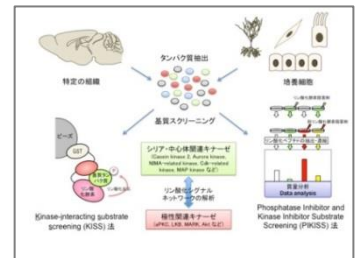
A03-2 計画 (広常班) 細胞内物質輸送においてカーゴが細胞質ダイニンにローディングされる際には、低分子量 G 蛋白質である Rab6 が重要な役割を果たす (*Nature Commun.* 2013)。また中心体特異的な脱リン酸化酵素・PP4 は細胞極性を制御する (*Neuron* 2013)。



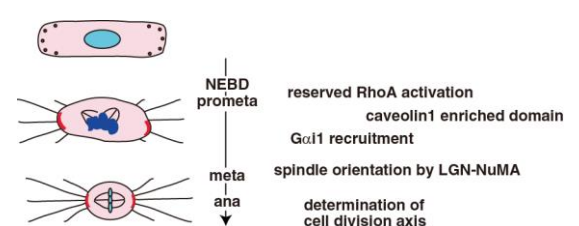
A03公募 (大杉班) 哺乳動物には2つの γ tubulin 遺伝子がある。複数のヒトがん細胞株においては主に γ tubulin2 が発現しており、その発現を抑制すると増殖速度が低下した。 γ tubulin 1 をノックダウンすると γ tubulin 総量はほぼ一定に保たれたが、単極紡錘体の形成と分裂期停止が引き起こされたことから、紡錘体局形成において2つの γ tubulin の機能が異なることが示唆された。



A03 公募 (貝渕班) 我々が開発した新規のリン酸化基質スクリーニング法を用いて、シリア・中心体形成に関与するキナーゼ (Cdk-related kinase, MAP-kinase など) や極性形成に関与するキナーゼ (aPKC, Akt, GSK3beta など) について基質のスクリーニングを行い、多数の基質候補蛋白質を得た。基質候補蛋白質のパスウェイ解析を行ったところ、細胞極性に関連する蛋白質群が得られた一方で、シリア・中心体の構成・制御蛋白質は少数であった。

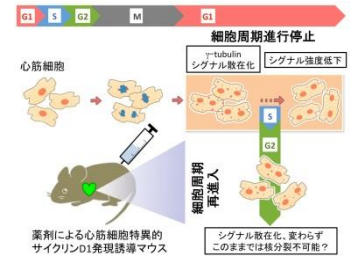


A03 公募 (松村班) 間期の細胞 - 細胞外基質間接着が、核膜崩壊のタイミングを機に分裂軸を決める可能性を検討した。核膜崩壊時の局所的な変形がトリガーとなり caveolin1 が場を形成し活性型インテグリン、src、RhoA シグナルが働く。呼応して $G\alpha i1$ がリクルートされ、続いて LGN、NuMA がリクルートされ紡錘体軸の方向が制御された。



つまり、caveolin1 が細胞外からの情報と内部の分裂軸制御因子とのリンクを行っていることが明らかとなった。

A03 公募（竹内班）哺乳類の心筋細胞は生後に増殖を停止し、二度と増殖しない。この増殖停止における中心体動態の関与を検討した結果、生後に二核化した心筋細胞は通常を中心体形成が妨げられること、また、その阻害は細胞周期進入でも救済できないことが示唆された。これらの結果から、中心体の動態変化により、増殖停止した心筋細胞の再分裂を阻害する機構が考えられた。



A03 公募（廣田班）脳室帯で誕生したニューロンは、多数の神経突起を有する多極性細胞として緩やかに移動したのちに、双極性細胞に変換し放射状移動を行う。リーリン受容体 ApoER2 をノックダウンすると、多極性細胞内における中心体の分布の変化と神経突起数の減少がみられ、これらの表現型はリーリン下流分子である N-カドヘリンにより部分的にレスキューされた。以上より、ApoER2 による N-カドヘリン制御が正常な多極性細胞移動に必要であることが示唆された。

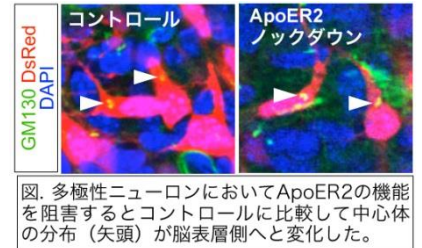


図. 多極性ニューロンにおいてApoER2の機能を阻害するとコントロールに比較して中心体の分布（矢頭）が脳表層側へと変化した。

8. 研究成果の公表の状況（主な論文等一覧、ホームページ、公開発表等）（5 ページ程度）

現在実施している新学術領域研究（公募研究含む）の研究課題を元に発表した研究成果（主な論文、書籍、ホームページ、主催シンポジウム等の状況）について具体的に記述してください。論文の場合、現在から順に発表年次をさかのぼり、計画研究・公募研究毎に順に記載し、研究代表者には二重下線、研究分担者には一重下線、連携研究者には点線の下線を付し、corresponding author には左に*印を付してください。また、一般向けのアウトリーチ活動を行った場合はその内容についても記述してください。

論文業績

2012年5月～2014年6月までに発表された計画研究班6班の総原著論文数は35編、総説5編で、公募研究班21班の総原著論文数は45編、総説4編である。*Nature*, *Science*, *Nature Medicine*, *Neuron*, *Developmental Cell*, *J. Cell Biol.* など国際的に評価の高い雑誌に着実に採択されている。全てを記述することはできないので、以下に代表的論文を掲載した。（）内は英文原著論文と英文総説の総数を示す。

<計画研究>

月田早智子 (12) 「中心体・シリア系のダイナミズムにおける基底小体細胞骨格相互作用の役割」

Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., *Tsukita, S., Nureki, O., and Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science*. 344:304-307.

Yano, T., Matsui, T., Tamura, A., Uji, M., and *Tsukita, S. (2013). The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol.* 203:605-614.

Tateishi, K., Yamazaki, Y., Nishida, T., Watanabe, S., Kunimoto, K., Ishikawa, H., and Tsukita, S. (2013). Two appendages homologous between basal bodies and centrioles are formed using distinct Odf2 domains. *J Cell Biol.* 203:417-425.

Suzuki, H., Ito, Y., Yamazaki, Y., Mineta, K., Uji, M., Abe, K., Tani, K., Fujiyoshi, Y., and *Tsukita, S. (2013). The four-transmembrane protein IP39 of EuglenTforms strands by a trimeric unit repeat. *Nat Commun.* 4:1766.

Wada, M., Tamura, A., Takahashi, N., and *Tsukita, S. (2013). Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. *Gastroenterology*. 144:369-380.

Tamura, A., Yamazaki, Y., Hayashi, D., Suzuki, K., Sentani, K., Yasui, W., *Tsukita, S. (2012). Claudin-based paracellular proton barrier in the stomach. *Ann N Y Acad Sci.* 21258:108-114.

濱田博司 (合計 13) 「中心体・シリアを介する情報のフローによる体の左右の決定」

Dong, F., Shinohara, K., Nabeshima, R., Botilde, Y., Asai, Y., Fukumoto, A., Hasegawa, T., Matsuo, M., Takeda, H., Shiratori, H., Nakamura T., and *Hamada, H. (2014). Pih1d3 is required for cytoplasmic preassembly of axonemal dynein in mouse sperm. *J. Cell Biol.* 204:203-213.

*Yoshiba, S. and *Hamada, H. (2014). Cilia, fluid flow, and Ca²⁺ signal in left-right symmetry breaking. (Review). *Trends in Genetics.* 30(1):10-17.

*Takamatsu, A., Shinohara, K., Ishikawa, T. and Hamada, H. (2013). Hydrodynamic phase synchronization in mouse node cilia. *Physical Review Letters.* 110:248107.

Botilde, Y., Yoshiba, S., Shinohara, K., Hasegawa, T., Nishimura, H., Shiratori, H. and Hamada, H. (2013). Cluap1 localizes preferentially to the base and tip of cilia and is required for ciliogenesis in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 381(1):203-12.

*Nakamura, T., Saito, D., Kawasumi, A., Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Dong, F., Takamatsu, A., Belo, J.A., Mochizuki, A., and Hamada, H. (2012). Fluid flow and interlinked feedback loops establish left-right asymmetric decay of *Cerl2* mRNA in the mouse embryo. *Nat. Commun.* 3:1322.

Yoshiba, S., Shiratori, H., Kawasumi, A., Shinohara, K., Sasaki, G., Belo, J.A., Nonaka, S., Sasaki, H., Kuo, I., Ehrlich, B., Pennekamp, P., Dworniczak, B., and *Hamada, H. (2012). Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow

for left-right determination via Pkd2. *Science*. 338:226-231.

稲垣昌樹 (合計 5) 「中心体・一次シリアと細胞周期」

Ikawa, K., Satou, A., Fukuhara, M., Matsumura, S., Sugiyama, N., Goto, H., Fukuda, M., Inagaki, M., *Ishihama, Y., and *Toyoshima, F. (2014). Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle* 13:126-137.

Kitagawa, M., Fung, S.Y.S., Hameed, U.F.S., Goto, H., Inagaki, M., and *Lee, S.H. (2014) Cdk1 coordinates timely activation of MKlp2 kinesin with relocation of the chromosome passenger complex for cytokinesis. *Cell Rep*. 7:166-179.

Kasahara, K., Goto, H., Izawa, I., Kiyono, T., Watanabe, N., Elowe, S., Nigg, E.A., and *Inagaki, M. (2013). PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3 γ and is required for metaphase-anaphase transition. *Nat. Commun.* 4:1882, doi: 10.1038/ncomms2879.

Goto, H., Inoko, A., and *Inagaki, M. (2013). Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:3893-3905.

Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., Izawa, I., and *Inagaki, M. (2012). Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J. Cell Biol.* 197:391-405.

松崎文雄 (合計 4) 「シリア・中心体系による神経幹細胞分裂の非対称化機構」

Pilz, G.A., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., Ninkovic, J., Snippert, H.J., Clevers, H., Godinho, L., Guillemot, F., Borrell, V., Matsuzaki, F., *Götz, M. (2013) Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nat Commun.* 4:2125. doi: 10.1038/ncomms3125.

*Matsuzaki, F., and Shitamukai, A. Cell division modes and cleavage planes of neural progenitors during mammalian cortical development. *Cold Spring Harb Perspect Biol. Mammalian Develop.* in press.

Moon, W., and *Matsuzaki, F. (2013) Aurora A kinase negatively regulates Rho-kinase by phosphorylation in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 435(4): 610-615.

Shimozawa, T., Yamagata, K., Kondo, T., Hayashi, S., Shitamukai, A., Konno, D., Matsuzaki, F., Takayama, J., Onami, S., Nakayama, H., Kosugi, Y., Watanabe, M., Fujita, K., and Mimori-*Kiyosue, Y. (2013) Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 3399-3404.

広常真治 (合計 5) 「神経発生、ネットワーク形成に果たす中心体の役割の解明」

Xie, Y., Jueschke, C., Esk, C., Hirotsune S. and *Knoblich, Y. (2013) The phosphatase PP4c controls spindle orientation to maintain proliferative symmetric divisions in the developing neocortex. *Neuron* 24, 254-265

Yamada, M., Kumamoto, K., Mikuni S., Arai Y., Kinjo M., Nagai T., Tsukasaki Y., M. Watanabe T., Toba S. and *Hirotsune S. (2013) Rab6a releases LIS1 from a dynein idling complex and activates dynein for retrograde movement. *Nature Communication* 4, 2033

Yan J., Chao D.L., Toba S., Koyasako K., Yasunaga T., Hirotsune S. and *Shen K. (2013) Kinesin-1 regulates dendrite microtubule polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 2:e00133.

Toba S, Tamura Y, Kumamoto K, Yamada M, Takao K, Hattori S, Miyakawa T, Kataoka Y, Azuma M, Hayasaka K, Amamoto M, Tominaga K, Wynshaw-Boris A, Wanibuchi H, Oka Y, Sato M, Kato M, *Hirotsune S. (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective function in lissencephaly. *Sci Rep.* 3:1224.

Takitoh, T., Kumamoto, K., Wang, C. C., Sato, M., Toba, S., Wynshaw-Boris, A., and *Hirotsune S. (2012) Activation of Aurora-A is essential for neuronal migration via modulation of microtubule organization. *J Neurosci* 32, 11050-11066

<公募研究>

水野健作 (合計 2) 「細胞増殖抑制シグナルによる中心体—基底小体変換機構」

Nagai, T., Ikeda, M., Chiba, S., Kanno, S., and * Mizuno, K. (2013). Furry promotes acetylation of microtubules in the mitotic spindle by inhibition of SIRT2 tubulin deacetylase. *J. Cell Sci.* 126:4369-4380.

Nagai, T., and * Mizuno, K. (2014). Multifaceted roles of Furry proteins in invertebrates and vertebrates. *J. Biochem.* 155:137-146.

広野雅文 (8) 「新規クラミドモナス突然変異株を用いた中心子構築機構の解明」

Hirono, M.* (2014). Cartwheel assembly. *Philosophical Transactions B "Centrosome Renaissance"* in press.

Yanagisawa, H.A., Mathis, G., Oda, T., Hirono, M., Richey, E.A., Ishikawa, H., Marshall, W.F., Kikkawa, M., Qin, H. (2014). FAP20 is an inner junction protein of doublet microtubules essential for both the planar asymmetrical waveform and stability of flagella in *Chlamydomonas*. *Mol. Biol. Cell.* 25:1472-1783.

Kubo, T., Yanagisawa, H.A., Liu, Z., Shibuya, R., Hirono, M., Kamiya, R. (2014). A conserved flagella-associated protein in *Chlamydomonas*, FAP234, is essential for axonemal localization of tubulin polyglutamylase TTL9. *Mol. Biol. Cell* 25:107-117.

Yamamoto, R., Song, K., Yanagisawa, H., Fox, L., Yagi, T., Wirschell, M., Hirono, M., Kamiya, R., Nicastro, D., and Sale, W. S. (2013). The MIA complex is a conserved and novel dynein regulator essential for normal ciliary motility. *J. Cell Biol.* 201:263-278.

Engel, B. D., Ishikawa, H., Wemmer, K. A., Geimer, S., Wakabayashi, K., Hirono, M., Craige, B., Pazour, G. j., Witman, G. B., Kamiya, R., Marshall, W. F. (2012). .The role of retrograde intraflagellar transport in flagellar assembly and function. *J. Cell Biol.* 199:151-167.

豊島陽子 (合計 4) 「繊毛構造とその形成に関わるタンパク質の分子構築の解明」

Furuta, K., Furuta, A., *Toyoshima, Y. Y., Amino, M., Oiwa, K., and Kojima, H. (2013). Measuring collective transport by defined numbers of processive and nonprocessive kinesin motors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:501-506.

Obinata, T., Amemiya, S., Takai, R., Sato, N., Ichikawa, M. & Toyoshima, Y.Y. (2014). Sea lily muscle lacks a troponin-regulatory system, while it contains paramyosin. *Zool. Sci.* 31:122-128.

荒川聡子 (合計 2) 「中心体数の制御機構の解明」

Honda S, Arakawa S., Nishida Y, Yamaguchi H, Ishii E, and Shimizu S. (2014). Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nature Commun.* in press.

Mizushima T, Arakawa S. Sanada Y, Yoshino I, Miyazaki D, Urushima H, Tsujimoto Y, Ito T, and Shimizu S. (2013). Inhibition of epithelial cell death by Bcl-2 improved chronic colitis in IL-10 KO mice. *Am J Pathol.* 183(6) :1936-1944.

中山和久 (合計 2) 「生細胞でのイメージングを基盤とするシリアの形成とタンパク質輸送機構の解明」

Ueda, T., Hanai, A., Takei, T., Kubo, K., Ohgi, M., Sakagami, H., Takahashi, S., Shin, H.-W., and *Nakayama, K. (2013) EFA6 activates Arf6 and participates in its targeting to the Flemming body during cytokinesis. *FEBS Lett.* 587:1617-1623.

Takatsu, H., Katoh, Y., Ueda, T., Waguri, S., Murayama, T., Takahashi, S., Shin, H.-W., and *Nakayama, K. (2013) Mitosis-coupled, microtubule-dependent clustering of endosomal vesicles around centrosomes. *Cell Struct. Funct.* 38:31-41.

藤原敬宏 (2) 「一次シリア基底部分における選択的拡散障壁・分子フィルター機構の解明」

*Kalay, Z., Fujiwara, T.K., Otaka, A., and Kusumi, A. (2014). Lateral diffusion in a discrete fluid membrane with immobile particles. *Phys. Rev. E.* 89: 022724.

- Hiramoto-Yamaki, N., Tanaka, K.A.K., Suzuki, K.G.N., Hirosawa, K.M., Miyahara, M.S.H., Kalay, Z., Tanaka, K., Kasai, R.S., *Kusumi, A., and *Fujiwara, T.K. (2014) Ultrafast diffusion of a fluorescent cholesterol analog in compartmentalized plasma membranes. *Traffic*. 15: 583-612.
- 原田彰宏 (1) 「シリア形成時の膜供給における細胞内極性輸送の役割の解明」
Sato, T., Iwano, T., Kunii, M., Matsuda, S., Mizuguchi, R., Jung, Y., Hagiwara, H., Yoshihara, Y., Yuzaki, M., Harada, R., and *Harada, A. (2014). Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *J Cell Sci*. 127:422-431.
- 松浦伸也 (5) 「キネシン分子が制御するシリア形成と中心小体接着の分子機構」
Ochiai, H., Miyamoto, T., Kanai, A., Hosoba, K., Sakuma, T., Kudo, Y., Asami, K., Ogawa, A., Watanabe, A., Kajii, T., Yamamoto, T., and * Matsuura, S. (2014) TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of BUB1B as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:1461-1466.
- 政池知子 (2) 「光学顕微鏡技術を駆使した単一シリアの動きと力の高精度測定」
Kikuchi, Y., Naka, Y., Osakabe, H., Okamoto, T., Masaike, T., Ueno, H., Toyabe, S., and *Muneyuki, E.. (2013). Thermodynamic analyses of nucleotide binding to an isolated monomeric b subunit and the a3b3g subcomplex of F1-ATPase. *Biophys. J*. 105:2541-2548.
- Unitary step of gliding machinery in *Mycoplasma mobile*. Kinoshita, Y., Nakane, D., Sugawa, M., Masaike, T., Mizutani, K., Miyata, M., and Nishizaka, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (early edition).
- 若林憲一 (1) 「運動性鞭毛・繊毛のレドックス・シグナリング感受メカニズム」
Ide, T., Owa, M., King, S.M., Kamiya, R., Wakabayashi, K. (2013) Protein-Protein Interactions between Intermediate Chains and the Docking Complex of Chlamydomonas Flagellar Outer Arm Dynein. *FEBS Letters*. 587:2143-9.
- 池上浩司 (1) 「一次シリアからの情報発信」
Berezniuk, I., Lyons, P.J., Sironi, J.J., Xiao, H., Setou, M., Angeletti, R.H., Ikegami, K., and *Fricker, L.D. (2013). Cytosolic carboxypeptidase 5 removes α - and γ -linked glutamates from tubulin. *J Biol Chem*. 288:30445-30453.
- 西田宏記 (4) 「シリアによる神経胚の回転が関わるホヤ胚左右非対称性の決定機構」
*Kumano, G., Negoro, N., and Nishida, H. (2014). Transcription factor Tbx6 plays a central role in fate determination between mesenchyme and muscle in embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Growth Differ.* in press.
- Kuwajima, M., Kumano, G., and * Nishida, H. (2014) Regulation of the number of cell division rounds by tissue-specific transcription factors and Cdk inhibitor during ascidian embryogenesis. *PLOS ONE* 9: e90188.
- *Omotezako, T., Nishino, A., Onuma T. A., and Nishida, H. (2013). RNA interference in the appendicularian *Oikopleura dioica* reveals the function of the *Brachyury* gene. *Dev. Genes Evol.* 223: 261–267.
- 大森義裕 (1) 「視細胞におけるシリア・中心体を介した光情報感知システム形成機構の解明」
Chaya, T., Omori, Y., Kuwahara, R., and *Furukawa, T., (2014). ICK is essential for cell type-specific ciliogenesis and the regulation of ciliary transport. *EMBO J* in press.
- 斉藤祐見子 (3) 「シリアに局在する摂食関連 G 蛋白質共役型受容体の情報制御機構」
Nagata A, Hamamoto A, Horikawa M, Yoshimura K, Takeda S, *Saito Y. (2013) Characterization of ciliary targeting sequence of rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *Gen Comp Endocrinol*. 188:159-165.
- 貝渕弘三 (3) 「シリア・中心体系に基づく細胞構築の非対称化機構」
Kakeno, M., Matsuzawa, K., Matsui, T., Akita, H., Sugiyama, I., Ishidate, F., Nakano, A., Takashima, S., Goto, H., Inagaki, M., Kaibuchi, K., *Watanabe, T. (2014) Plk1 Phosphorylates CLIP-170 and Regulates Its Binding to Microtubules for Chromosome Alignment. *Cell Struct Funct*. 39:45-59.
- Funahashi, Y., Namba, T., Fujisue, S., Itoh, N., Nakamuta, S., Kato, K., Shimada, A., Xu, C., Shan, W., Nishioka, T.,

*Kaibuchi, K. (2013) ERK2-mediated phosphorylation of Par3 regulates neuronal polarization. *J Neurosci.* 33:13270-85.

Kimura, T., Yamaoka, M., Taniguchi, S., Okamoto, M., Takei, M., Ando, T., Iwamatsu, A., Watanabe, T., Kaibuchi, K., Ishizaki, T., *Niki, I. (2013) Activated Cdc42-Bound IQGAP1 Determines the Cellular Endocytic Site. *Mol Cell Biol.* 33:4834-43.

竹内 隆 (5) 「心筋細胞の核型と増殖の運命決定機構と中心体制御」

Tane, S., Kubota, M., Okayama, H., Ikenishi, A., Yoshitome, S., Iwamoto, N., Satoh, Y., Kusakabe, A., Ogawa, S., Kanai, A., Molkenstein, J. D., Nakamura, K., Ohbayashi, T., and *Takeuchi, T. (2014) Repression of *cyclin D1* expression is necessary for the maintenance of cell cycle exit in adult mammalian cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, in press.

Tane, S., Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Nakayama, I. K., and *Takeuchi, T. (2014) CDK inhibitors, p21^{Cip1} and p27^{Kip1}, participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443, 1105-1109.

一般向けアウトリーチ活動

竹内隆、米子東高校生命科学コース2年生の研究室見学、模擬講義、簡単な実習（マウス胚、トランスジェニックイモリの観察、神経生物学研究）の企画と実施、2013年12月14日 鳥取大学医学部生命科学棟

竹内隆、市民公開講座「ノーベル賞・iPS細胞・再生医療」2013年6月29日 鳥取大学医学部記念講堂

西田宏記、福井県 SHH 高校生対象「ホヤ胚発生の実習と講義」、大阪大学、2013年12月21-23日

豊島陽子、研究室公開（一般市民に向けて、研究室の見学と研究内容の紹介）2013年6月7日、東京大学

政池知子 第22回日本バイオイメーキング学会学術集会・公開講座、「蛋白質の動きとはたらきを直接見て調べる」、東京大学・薬学部講堂、2013年9月14日

大杉美穂 第15回学習院大学生命科学シンポジウム～生命の秘密を解く鍵をもとめて～ において講演。平成26年5月31日（土）学習院大学

9. 今後の研究領域の推進方策（2ページ程度）

今後どのように領域研究を推進していく予定であるか、研究領域の推進方策について記述してください。また、領域研究を推進する上での問題点がある場合は、その問題点と今後の対応策についても記述してください。また、目標達成に向け、不足していると考えているスキルを有する研究者の公募班での重点的な補充や国内外の研究者との連携による組織の強化についても記述してください。

研究領域の推進方策

繊毛に関する研究は、国際的にも爆発的な進展を見ている。国内を見ると組織的な連携が立ち遅れており、全国的な研究推進体制を構築するために、繊毛と中心体を一連のオルガネラとして捉えるという視点から、本新学術領域を立ち上げた。しかし、繊毛・中心体に関する研究は、本領域研究が終了した後も益々重要性が高まり拡大するから、5年間の本領域研究に留まらず、将来への礎になるように、長期的な視点で研究内容や人材を考えたい。

今後の研究内容の方向性

海外のトレンドに惑わされずに、地に足を付けた我が国独自の研究を進めたい。それぞれの研究班は、得られた研究結果の中から独自に方向を考えれば良いが、強いて言えば、例えば以下のような方向性が候補であろう。

1. 中心小体の複製の制御機構：なぜ1copyだけ複製されるか？（A01 北川ら）
2. 細胞周期に従った、中心体と基底小体の相互変換機構（A01 月田、A02 稲垣ら）
3. 中心体と基底小体の構造の特異性、細胞骨格との相互作用（A01 月田ら）
4. 繊毛形成に必須なユニークな機構（A02 濱田、A01 月田ら）
5. 繊毛による機械的な刺激の関知機構（A02 濱田ら）
6. 非対称分裂における中心体の役割（A03 松崎ら）
7. 脳の生理機能と中心体～微小管ネットワーク（A03 広常ら）

今後も引き続き、これらの問題に取り組んで行きたい。

将来への人材を育成しておく＝不足しているスキルを有する研究者の、公募班での補充

適切な公募班員を組み入れることで、この研究分野の将来を担う人材を育成しておきたい。

当初は、細胞生物学・細胞周期の研究者を広く公募すると同時に、本学術領域の計画研究と相補う構造解析、数理解析、臨床研究も含めた多面的なアプローチの研究を公募した。現状を考えると、以下の分野をカバーする研究者を公募で補充したい。

1. ヒト疾患に密接する研究者

シリア-中心体系を介した情報フローの破綻に由来するヒト疾患の病態解明の礎となるものである。次々と明らかにされつつあるヒト疾患への関与を考えると、基礎生物学的な意義のみならず、医学的な意義も極めて大きい。例えば世界的には、遺伝性の繊毛病をスクリーニングする研究グループが存在する（例：ドイツの Heymut Omran ら）。その点ではこの領域がスタートした時から、直接ヒト疾患（例えば嚢胞腎）と関連した研究者を班員に加えたかったが、当初の公募では残念ながら適当な応募者がいなかった。次回の公募では、是非組み入れたい。

2. 構造生物学者

中心体や繊毛の機能を理解するためには、それらのオルガネラの超微細構造を知る必要がある。遺伝学や生化学と組み合わせると、大きな力を発揮するであろう。計画研究には月田、研究協力者には吉川という強力なメンバーがいるが、公募班にも若手を是非追加したい。これも残念ながら、前回の公募申請者の中に適切な候補者がいなかった。

3. 一次繊毛のセンサーとしての機能に興味を持つ研究者

一次繊毛の機能は種々のシグナルを感知することであるが、本領域研究にはこの観点での研究が極めて少ない (A02 濱田のみ)。すでに世界的に多くが知られている Hedgehog シグナルの感知機構のようなトレンドを後追いすべきではないが、一次繊毛は機械的な刺激を含めて多彩なシグナルをキャッチしているはずである。未開拓～新たなシグナルの感知機構を研究する人材が欲しい。

国内外研究者との連携

シリア-中心体系を含む我が国の細胞骨格・シグナルに関する基礎研究は、長い歴史と十分な蓄積のある分野であり、関連した研究会が存在する: 例えば繊毛研究会 (http://www.geocities.jp/cilia_club/meeting.html) など。本領域研究のメンバーの多くは、それらの研究会の一員として運営に貢献しているが、今後も引き続きそれらの研究会に積極的に参加し、国内研究者との連携を図る。本領域に集結した若手研究者層が中核となって、生体情報のフローと細胞構築の動態をリンクさせる新しい学問分野を創出し、若い世代の研究者の分野を超えた連携と活性化が期待される。国外研究者との連携に関しては、個々の研究者に任さざるを得ないが、H25年度の第1回に続き、最終年度には第2回の国際会議を開催し、国際的なプレゼンスを高める。

総括班の活動方針

今後も班員に対して、1) 電子顕微鏡技術・観察、技術、2) 遺伝子改変マウスの作成と供給、3) 中心体や繊毛の構成因子をコードするヒト遺伝子の供給、などの研究技術や資材の支援を継続する。とくに、遺伝子改変マウスに関しては、すでに松崎班や濱田班が CRISPR 法を取り入れているが、技術の更なる改良を目指す。現状では、単純なノックアウトマウスの作成は迅速かつ高効率であるが、正確なノックインや loxP 配列の挿入については効率が低く、改良が必要である。必要があれば、技術講習会を開催して技術の伝搬と改良を図る。