

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24113001

研究課題名（和文）シリア・中心体系による生体情報フローの制御

研究課題名（英文）Cilium-centrosome system regulating biosignal flows

研究代表者

濱田 博司（Hamada, Hiroshi）

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・チームリーダー

研究者番号：00208589

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 81,100,000円

研究成果の概要（和文）：総括班として以下の活動を行った。

1) 国際シンポジウム(Cilia and Centrosome: Current Advances and Future Directions)を、11月27-29日に理研CDB（神戸）で開催した。6名の海外からの招待者と班員を含めて約120名が参加し、繊毛や中心体に関する最新の情報を共有した。2) 第39回日本分子生物学会（横浜、11.30-12.02日）にて、繊毛に関するシンポジウムを開催し、繊毛の生理的な役割やヒト疾患への関与を紹介した。

研究成果の概要（英文）：We have performed following activities.

1) International symposium (Cilia and Centrosome: Current Advances and Future Directions) was held in RIKEN CDB (Kobe) on Nov. 27-Nov. 29. About 120 scientists including 6 invited speakers from overseas participated in this symposium, and we actively exchanged updated information on cilia and centrosome. 2) We had a symposium on cilia in the 39th Annual Meeting of Japanese Society of Molecular Biology, where we introduced the physiological role of cilia and on human genetic disorders due to ciliary dysfunction.

研究分野：発生生物学

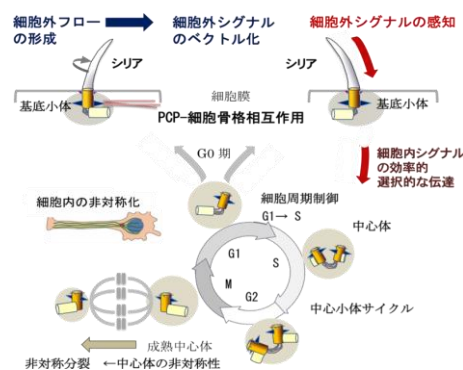
キーワード：繊毛 中心体 シグナル因子

1. 研究開始当初の背景

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。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. 研究の目的

本領域では、細胞の内外を貫くシリア-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目指す。



この目標を達成するために、総括班としては以下の活動を行う。

- (1) 研究支援活動、①電子顕微鏡観察によるシリア-中心体系の超微構造解析、②網羅的遺伝子発現解析等のゲノミクス解析、③網羅的なヒトタンパク質発現リソース、とくに N 末および C 末に蛍光タンパク質を融合したタンパク質発現クローン (約 18000 クローン) の活用、④クラミドモナスやその繊毛の提供
- (2) 新学術領域研究の最終年度に当たり、繊毛・中心体に関する国際シンポジウムを開催し、研究成果を発表するとともに、最新の情報を交換する。
- (3) 領域班会議を開催し、研究進捗状況を発表するとともに、更なる共同研究を促す。

3. 研究の方法

- (1) クラミドモナスからマウスに至る種々の

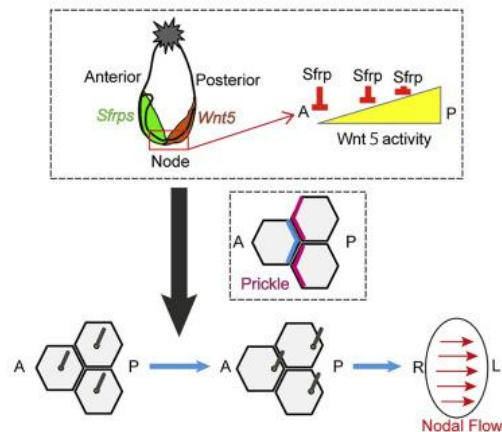
モデル生物を用いて、シリア-中心体系の構造とダイナミクス、及びそれらの細胞表層骨格構築による制御を、電子顕微鏡レベル・分子レベルで明らかにする。

(2) 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。

(3) 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。とくに神経組織に注目する。

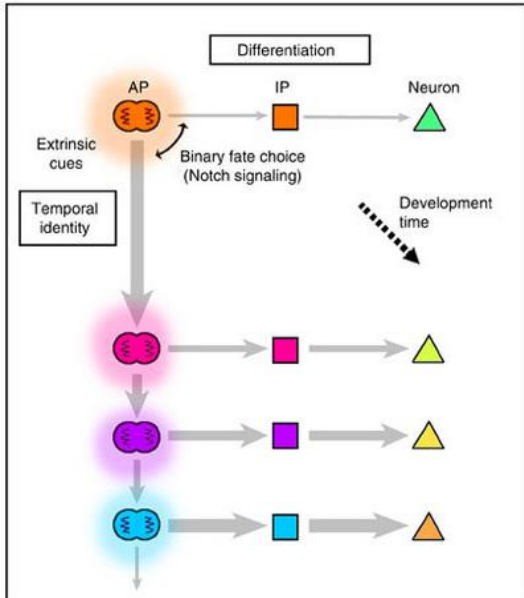
4. 研究成果

(1) 左右非対称性を決めるノード繊毛が、正しく配置される機構を明らかにした。ノード繊毛は時計方向に回転するが、回転軸が胚の後方へ向って倒れているために、左向き水流を生み、その水流が左右対称性を破る。ノード繊毛が胚の後方に倒れる原因は、繊毛を持つ細胞が何らかの前後の位置情報を感知して、基底小体が細胞の後方へ位置するためであることが知られていた。今年度は、その前後の位置情報が Wnt5a の濃度勾配であることを明らかにした。さらに、ノードにおいて Wnt5a をモザイク状に発現させたところ、周辺の正常な細胞に置いても、基底小体の位置が変化した。以上から、ノードの各細胞は、体の前後の沿った Wnt5 の勾配を感知することで極性を生じ、次に細胞間のコミュニケーションにより極性が安定化されることが示唆された (Minegishi et al., *Dev Cell* 2017)。

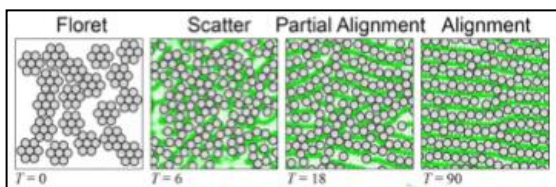


(2) 神経前駆細胞の分化は、細胞周期に依存せずに進む。神経前駆細胞は、自己複製をしつつ、娘細胞の一部は分化しニューロンを生み出すという非対称分裂を行う。非対称分裂が始まる時期やその進行は、時間の経過 (時計) によって制御されているが、その時計の実体は不明であった。しかしこれまで多くの研究者は、細胞分裂のスピードが時計の本質であろうと予想していた。今年度松崎らは、神経前駆細胞を 1 細胞レベルでトランスクリ

リプトーム解析を行い、発生の時間経過によって発現が変化する遺伝子群を同定した。そして驚いたことに、これらの遺伝子の発現の変化は、細胞周期を止めても影響なく進むことが判った。すなわち、神経前駆細胞の分化を制御する時計は細胞周期ではなく、全く別の物であることが示唆された。



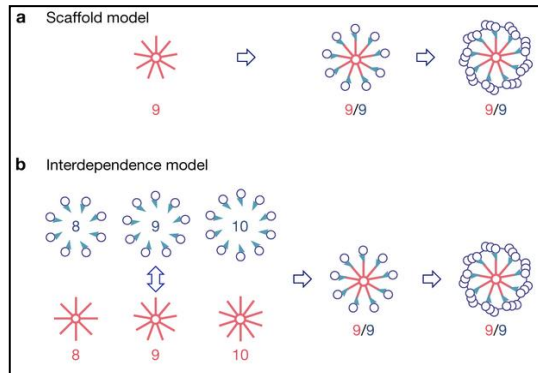
(3) 気管上皮の多繊毛が、整然とした位置に配置される機構を明らかにした。気管上皮の細胞にある多繊毛は、effective stroke と recovery stroke を繰り返す運動をすることで、外部からの異物を末梢方向へ運搬する。多数の繊毛が同調した運動をするためには、繊毛の基部にある基底小体が整然と配置される必要がある。今年度月田らは、生きた気管を培養しつつ、基底小体の位置の変化をライブイメージングしたところ、最初はバラバラに配置されていた基底小体が、Floret→Scatter→Partial Alignment という状態を経て（下図を参照）、整然と配置されること、そして基底小体の位置の変化を再現する数理モデルを構築し、基底小体の位置の変化には細胞のアピカル側に存在する微小管ネットワークが必要であることを見出した（Herawiti et al., *JCB*, 2016）。



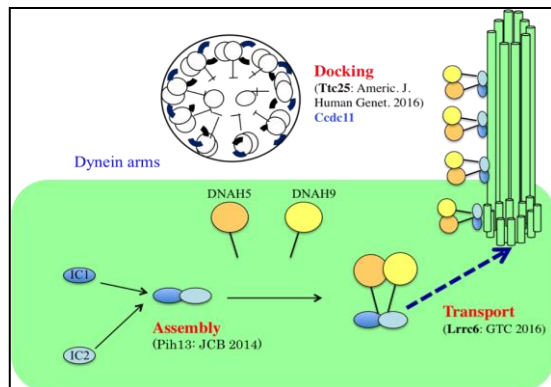
(○は基底小体、緑の線は微小管)

(4) 中心小体の基本構造が形成される機構：中心小体は、中心体や繊毛を構成する構造体である。中心小体は、Sas-6 と呼ばれる蛋白

質が 9-fold の円対称に self-assemble することで、cart-wheel 構造ができ、その円周上に微小管などが追加されて出来上がる。広野らは、クラミドモナスの Sas-6 から種々の変異蛋白質を作成し、それがどのような car-wheel 構造を作るかを調べたところ、Sas-6 の self-assemble する能力が cart-wheel 構造を引き起こしていること、また cart-wheel の構築と微小管の構築は、関連しながら進むことで、最終的に 9-fold の円対称な cart-wheel ができることを明らかにした（下図の Interdependent Model）。



(5) 繊毛が運動性を獲得するしくみ：繊毛に運動性をもたらすのは、ダイニンと呼ばれるモーター蛋白質複合体である。多数の蛋白質から構成される複合体であるが、それらは細胞質中で少しずつ大きな複合体へと assemble された後、繊毛基部へと運搬され、軸糸内に入り、微小管にドッキングされることで、正しく配置される。濱田らは、この過程に必要な因子を、新たに2つ同定した。すなわち、Ttc25 はダイニン複合体が微小管にドッキングするために必要であり、ヒトにおける TTC25 の変異は、繊毛が動かなくなる遺伝病 (Primary Ciliary Dyskinesia) の原因遺伝子の1つであった (Wallmeier et al., 2016)。一方で Lrrc6 は、ダイニン複合体を繊毛基部へと運搬するために必要な因子と考えられた (Inaba et al., 2016)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

①Minegishi K., Hashimoto, M., Ajima, R., Takaoka, K., Shinohara, K., Ikawa, Y., Nishimura, H., McMahan, A., Willert, K., Okada, Y., Sasaki, H., Shi, D., Fijimori, T., Otsuka, T., Igarashi, Y., Yamaguchi, T., Shimono, A., Shiratori, H. and Hamada, H. (2017). A Wnt5 activity asymmetry and intercellular signaling polarize node cells for breaking left-right symmetry in the mouse embryo. *Dev. Cell* 40,439-452. doi: 10.1016/j.devcel.2017.02.010.

②Okamoto M, Miyata T, Konno D, Ueda HR, Kasukawa T, Hashimoto M, Matsuzaki F, Kawaguchi A. (2016). Cell-cycle-independent transitions in temporal identity of mammalian neural progenitor cells. *Nat Commun.* 7:11349. doi: 10.1038/ncomms11349.

③Herawati E, Taniguchi D, Kanoh H, Tateishi K, Ishihara S, Tsukita S. Multiciliated cell basal bodies align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2016 214:571-86. doi: 10.1083/jcb.201601023.

④Hilbert M, Noga A, Frey D, Hamel V, Guichard P, Kraatz SH, Pfreundschuh M, Hosner S, Fluckiger J, Jaussi R, Wieser MM, Thielges KM, Deupi X, Muller DJ, Kammerer RA, Goncy P, Hirono M, Steinmetz MO. (2016). SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriolar architecture. *Nat. Cell Biol.* 18, 393-403. doi: 10.1038/ncb3329.

⑤Wallmeier, J., Shiratori, H., Dougherty, G.W., Edelbusch, C., Hjeij, R., Loges, N.T., Menchen, T., Olbrich, H., Pennekamp, P., Raidt, J., Werner, C., Minegishi, K., Shinohara, K., Asai, Y., Takaoka, K., Griese, M., Memari, Y., Durbin, R., Kolb-Kokocinski, A., Sauer, S., Hamada, H. and Omran, H. (2016). TTC25 deficiency results in defects of the outer dynein arm associated machinery and primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry. *Am. J. Hum. Genet.* 99 (2):460-469. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.06.014.

⑥Inaba Y., Shinohara, K., Botilde, Y., Nabeshima, R., Takaoka, K., Ajima, R., Lamri, L., Takeda, H., Saga, Y., Nakamura, T. and Hamada, H. (2016) Transport of outer dynein proteins to ciliary axoneme requires a cytoplasmic protein Lrre6.

Genes to Cells. 21: 728-739.
doi: 10.1111/gtc.12380.

〔学会発表〕 (計 4 件)

①Hiroshi Hamada, The Role of Immotile Cilia in Sensing the Fluid Flow for Left-Right Patterning, Gordon Research Conference (Cilia, Mucus and Mucociliary interaction), 2017.2.15, Galveston, USA

②Hiroshi Hamada, Role of cilia and fluid flow in left-right asymmetry, CDB-KAIST-IGDB Joint Symposium, 2016.10.28, Daejeon, South Korea

③Hiroshi Hamada, Nodal cilia and left-right asymmetry, Cilia 2016 Meeting, 2016.10.7, Amsterdam, The Netherlands

④ Hiroshi Hamada, Role of cilia and fluid flow in left-right symmetry breaking, The 2016 Santa Cruz Developmental Biology Meeting, 2016.8.13, Santa Cruz, USA

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：

<https://www.nig.ac.jp/labs/NigPrjct/cilia-centrosome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 博司 (Hamada Hiroshi)
国立研究開発法人理化学研究所・
多細胞システム形成研究センター・
チームリーダー
研究者番号：00208589

(2) 研究分担者

月田 早智子 (Tsukita Sachiko)
大阪大学・生命機能研究科・教授
研究者番号：00188517

松崎 文雄 (Matsuzaki Fumio)
国立研究開発法人理化学研究所・
多細胞システム形成研究センター・
チームリーダー
研究者番号：10173824

広野 雅文 (Hirono Masafumi)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号：10212177

稲垣 昌樹 (Inagaki Masaki)
三重大学・医学研究科・教授
研究者番号：30183007

五島 直樹 (Goshima Naoki)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
創薬分子プロファイリング研究センター
チーム長
研究者番号：70215482

(3)連携研究者：

北川 大樹 (KITAGAWA, Daiju)
国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授
研究者番号：80605725

広常 真治 (HIROTSUNE, Shinji)
大阪市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：80337526

(4)研究協力者：

吉川 雅英 (KIKKAWA, Masahide)
杉本亜砂子 (SUGIMOTO, Asako)
豊島 文子 (TOYOSHIMA, Fumiko)