

**平成28年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書**  
**〔追跡評価用〕**

平成28年4月22日現在

<b>研究代表者 氏名</b>	成宮 周	<b>所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)</b>	京都大学大学院・医学研究科・教授
<b>研究課題名</b>	R h o G T P a s e s を介する細胞機能の時空間特異的制御と個体での役割		
<b>課題番号</b>	18002015		
<b>研究組織 (研究期間終了時)</b>	研究代表者 成宮 周（京都大学大学院・医学研究科・教授）		

**【補助金交付額】**

年度	直接経費
平成18年度	105,100 千円
平成19年度	110,600 千円
平成20年度	105,100 千円
平成21年度	87,600 千円
平成22年度	84,800 千円
総計	493,200 千円

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

### (1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

本特別推進研究は、「Rho 下流のエフェクター分子、とくに、ROCK と mDia による細胞骨格制御とシグナル伝達機能を解析して、Rho が果たす細胞機能の時空間特異的制御機構 (①) とこれら経路の個体での組織構築、生理、病態での役割 (②) を明らかにする」目的で実施され、①については、mDia のアクチン重合と活性制御機序の解明、Rho シグナル経路の細胞周期、細胞質分裂、細胞移動での時空間特異的働きの解明を行った。また、②では、mDia の各 isoform の遺伝子欠損マウスを作出し、mDial の T 細胞生体内移動と v-*Src* によるがん化での役割を解明した。研究終了後は、上記 mDia 各 isoform 欠損マウスを用い、Rho-mDia 経路の個体の組織構築、生理、病態での役割の解明を進展させている。以下、これまで得られた成果を示す。

#### (1) 神経系の組織構築と恒常性での mDia の役割

① **mDial1/3 による神経上皮の極性維持**：神経上皮は、神経幹細胞として中枢神経系の各種細胞の前駆体を産み出す。神経幹細胞のこの働きは時間空間的に厳密に制御されているが、これを保障しているのが神経上皮の極性であり、これは頭頂部の細胞間接着で保持されている。mDial1/3 二重欠損(DKO)マウスの脳では、この細胞間接着とそれを連ねるアクチンベルトが消失、この結果極性が破綻して神経幹細胞の増殖制御が外れ、脳室内へ向かっての異常増殖が起こった。これは、Rho-mDia 経路が神経上皮で誘導するアクチン骨格が細胞間接着の形成と維持を介して幹細胞制御に必須の働きを行っていることを示したものである(発表論文1)。

② **mDial1/3 による抑制性神経前駆細胞の tangential migration の制御**：脳の発生過程で興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の前駆細胞は、radial migration と tangential migration という異なる移動様式を示し脳構造の形成に預かっている。mDial1/3 DKO マウス脳では、興奮性神経細胞の radial migration とそれに伴う大脳皮質層形成は正常に起こるが、抑制性神経細胞の tangential migration は有意に減少し、成体で顆粒細胞の減少による嗅球低形成が見られた。脳組織培養系での神経前駆細胞移動の観察により、mDial1/3 はアクチン細胞骨格を介して中心体の移動とそれを追いかける細胞体の移動の両方に関与していることが明らかとなった。これらの結果から、抑制性神経細胞の tangential migration とその結果としての脳構造の形成において Rho-mDia 経路によるアクチン形成が必須であることが明らかとなった(発表論文3)。

③ **mDial1/3 による大脳皮質脊髄路の軸索ガイダンスの制御**：動物の運動制御は、脳の運動皮質に発する皮質脊髄路の軸索が起始部と反対側の脊髄前角の運動ニューロンに投射して行われる。mDial1/3-DKO は、左右両肢が同時に動く「miffy 型」の歩行を呈し、大脳皮質脊髄路の軸索が反対側だけでなく同側の脊髄前角にも投射しているのが見られ、in vitro の神経培養系で mDial1/3-DKO 神経細胞は反発ガイダンス分子である Ephrin に対する反応性を欠くことが見られた。これらの結果は、mDial1/3 によるアクチン細胞骨格が脊髄の正常な神経細胞の軸索ガイダンスに不可欠なことを示したものである(発表論文8)。

#### (2) mDia2 欠損マウスの作出と mDia2 の赤芽球細胞質分裂での役割の解明

mDia2 ホモ欠損マウスは、胎生 11.5 日まで生存するが、多核赤芽球を主徴とする強度の貧血を示し、全例が胎生 12.5 日までに死亡する。In vitro の実験で、mDia2 欠損赤芽球は、正常に分化するが、前赤芽球の段階で、分裂溝にアクチン線維が集積せず、細胞質分裂が起こらないことが明らかになった。これは培養細胞で見いだした mDia2 の細胞質分裂での働きが個体レベルでも働いていることを証明したものである(発表論文9)。

#### (3) mDia 活性の細胞内での制御機構の研究

① **Liprin- $\alpha$  による mDia の細胞膜局在の制御**：mDia は Rho エフェクターであり、Rho による活性制御を受けるが、この分子がその他にどういった制御を受けるかは不明であった。本研究では、mDia の DID-DD domain に結合する蛋白質として Liprin- $\alpha$  を同定し、この過剰発現が mDia の膜移行を抑制して stress fiber を減弱させ、反対に Liprin- $\alpha$  の RNAi は mDia の膜集積と stress fiber 形成を促進した。このことから、Liprin- $\alpha$  が活性化 mDia の細胞膜への移行を制御することにより mDia のアクチン核化・重合活性を負に制御していることが明らかになった(発表論文4)。

② **mechanosensor としての mDia の働き**：生体内で細胞は絶え間なく機械刺激を受け形態を変換する。これは、細胞には張力を感知してアクチン骨格の再編成に結ぶ mechanosensing 機構が存在するからである。本研究では、培養細胞に張力を加えた時に起こるアクチン線維形成機構を解析し、これが mDia によること、この場合の mDia の活性化は張力解除時におこるアクチン繊維崩壊によるアクチンモノマーの局所濃度増加によることを明らかにした。これは、mDia の mechanosensor としての働きを明らかにしたものである(発表論文7)。

#### (4) ROCK の血管発生での役割の同定。

ROCK は mDia と並ぶ主要な Rho エフェクターで、ROCK-I と ROCK-II の 2 つのアイソフォームからなる。本研究では、ROCK-I/ROCK-II の 2 重ヘテロ欠損マウスを交配して表現型を解析した、その結果、ROCK-I/ROCK-II の 2 重ホモ欠損マウスは、胎生 9.5 日以前にすべて死亡すること、ROCK-I/ROCK-II のヘテロ・ホモ、ホモ・ヘテロ欠損マウスでは卵黄嚢の血管形成不全と body turning の異常を呈し、胎生 12.5 日までに死亡することが明らかになった。これまで、同様の表現型が、リゾフォスファチジン酸(LPA)合成酵素である autotaxin と LPA 受容体刺激を Rho の活性化に繋ぐ G $\alpha$ 13 の遺伝子欠損マウスで見られており、以上の結果は LPA→LPA 受容体→G $\alpha$ 13→Rho→ROCK というシグナル伝達経路が血管形成に働いていることを示したものである(発表論文2)。

#### (5) Citron-Kinase の細胞質分裂での働きの同定。

Citron-kinase は Rho エフェクターの一つで、活性化体の発現が細胞質分裂を失敗させることから、細胞質分裂での Rho エフェクターと考えられてきた。本研究では、RNAi と変異体発現により Citron-K の働きを解析し、Citron-K が細胞質分裂時に分裂溝に局在したのちに細胞間橋の midbody で ring 状の安定構造をつくること、この ring 構造は KIF14 や PRC-1 などの微小管結合分子の midbody 局在に必要なこと、Citron-K を枯渇させると midbody/細胞間橋は不安定化し分裂が reverse されることを見出した。このことは、Citron-K が細胞質分裂で分裂溝の収縮と細胞間橋の切断を繋ぎ分裂の完了に働く分子であることを明らかにしたものである(発表論文6)。

#### (6) mDia 欠損マウスを用いた未発表の結果(いずれも論文準備中)

上記に加え、mDial1/3 二重欠損マウスを用い、mDia が、①シナプス終末をアクトミオシン依存性に収縮して神経可塑性に関与すること、②抗原による T 細胞活性化時にアクチンリングを形成して TCR シグナリングに関与すること、③精巣セルトリ細胞で精子細胞との接着を制御して精子の形態形成に関与すること、また、mDial1 欠損マウスを用いて、④ Ras による細胞悪性化と皮膚腫瘍発生に関与すること、を明らかにしている。

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

## 発表論文等

1. Thumkeo, D., Shinohara, R., Watanabe, K., Takebayashi, H., Toyoda, Y., Tohyama, K., Ishizaki, T., Furuyashiki, T., & Narumiya, S. (2011) Deficiency of mDia, an Actin Nucleator, Disrupts Integrity of Neuroepithelium and Causes Periventricular Dysplasia. *PLoS One*, **6**, e25465.
2. Kamijo, H., Matsumura, Y., Thumkeo, D., Koike, S., Masu, M., Shimizu, Y., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (2011) Impaired vascular remodeling in the yolk sac of embryos deficient in ROCK-I and ROCK-II. *Genes Cells*, **16**, 1012-1021.
3. Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Kaneko, N., Sawamoto, K., Watanabe, K., Takebayashi, H., Kiyonari, H., Ishizaki, T., Furuyashiki, T., & Narumiya, S. (2012) A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nature Neurosci.*, **15**, 373-380.
4. Sakamoto, S., Ishizaki, T., Okawa, K., Watanabe, S., Arakawa, T., Watanabe, N., & Narumiya, S. (2012) Liprin- $\alpha$  controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization. *J. Cell Sci.*, **125**, 108-120.
5. Hirata, T., Nomachi, A., Tohya, K., Miyasaka, M., Tsukita, S., Watanabe, T., & Narumiya, S. (2012) Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis. *Int. Immunol.*, **24**, 705-717.
6. Watanabe, S., De Zan, T., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (2013) Citron kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain. *J. Cell Sci.*, **126**, 1773-1784.
7. Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K., & Watanabe, N. (2013) F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nature Cell Biol.*, **15**, 395-405.
8. Toyoda, Y., Shinohara, R., Thumkeo, D., Kamijo, H., Nishimaru, H., Hioki, H., Kaneko, T., Ishizaki, T., Furuyashiki, T., & Narumiya, S. (2013) EphA4-dependent axon retraction and midline localization of Ephrin-B3 are disrupted in the spinal cord of mice lacking mDia1 and mDia3 in combination. *Genes Cells*, **18**, 873-885.
9. Watanabe, S., De Zan, T., Ishizaki, T., Yasuda, S., Kamijo, H., Yamada, D., Aoki, T., Kiyonari, H., Kaneko, H., Shimizu, R., Yamamoto, M., Goshima, G., & Narumiya, S. (2013) Loss of a Rho-Regulated Actin Nucleator, mDia2, Impairs Cytokinesis during Mouse Fetal Erythropoiesis. *Cell Rep.*, **5**, 926-932.
10. Nomachi, A., Yoshinaga, M., Liu, J., Kanchanawong, P., Tohyama, K., Thumkeo, D., Watanabe, T., Narumiya, S., & Hirata, T. (2013) Moesin Controls Clathrin-Mediated S1PR1 Internalization in T Cells. *PLoS One*, **28**, e82590.
11. Pan, J., Lordier, L., Meyran, D., Rameau, P., Lecluse, Y., Kitchen-Goosen, S., Badirou, I., Mokrani, H., Narumiya, S., Alberts, A.S., Vainchenker, W., & Chang, Y. (2014) The formin DIAPH1 (mDia1) regulates megakaryocyte proplatelet formation by remodeling the actin and microtubule cytoskeletons. *Blood*, **124**, 3967-3977.
12. Sakamoto, S., Narumiya, S., & Ishizaki, T. (2012) A new role of multi scaffold protein Liprin- $\alpha$ : Liprin- $\alpha$  suppresses Rho-mDia mediated stress fiber formation. *Bioarchitecture* **2**, 43-49.
13. Thumkeo, D., Watanabe, S., & Narumiya, S. (2013) Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur. J. Cell Biol.*, **92**, 303-315.
14. Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2014) Molecular structures, cellular functions and physiological roles of Rho effector. In "Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms" (Wittinghofer, A., ed.), vol. 1, pp. 373-394, Springer.

## 招待講演

1. Narumiya, S.: Phenotype analysis of mDia-deficient mice; impaired neuroblast migration and disordered proliferation of neural stem cells. Gordon Research Conference on Mechanism of Cell Signaling, August 1, 2011, Maine, U.S.A.
2. Narumiya, S.: Rho-mDia signaling; regulation and actions in cells and tissues. The 2<sup>nd</sup> International Meeting of the German Society for Cell Biology on "Actin Dynamics", September 12-15, 2012, Regensburg, Germany.
3. Narumiya, S.: Rho-mDia pathway in the cell, the tissue and the body. The Cold Spring Harbor Asia Conference on "Small GTPases at Different Scales: proteins, membranes, cells", September 24-28, 2012, Suzhou, China.
4. Narumiya, S.: mDia1 and mDia3, Formin Family Actin Nucleators and Rho Effectors, Mediate TCR Microcluster Dynamics and Signaling and Are Critical for Positive Selection of Thymocytes. The CSH-Asia Conference on GTPases; Mechanisms, Interaction and Applications, September 22-6, 2014, Suzhou, China.

## 1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

### (3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）

平成23-25年度 科学研究費補助金 23229003 基盤研究S（代表）  
「個体での組織構築・恒常性における Rho-mDia 経路の役割」  
44,000 千円 (H23)、41,000 千円 (H24)、41,000 千円 (H25) 総額 126,000 千円

平成26-28年度 科学研究費補助金 26221302 基盤研究S（代表）  
「mDia が紡ぐアクチン細胞骨格の個体生理での役割と分子メカニズムの解析」  
56,400 千円 (H26)、38,000 千円 (H27)、38,000 千円 (H28) 総額 132,400 千円

平成23-27年度 CREST 研究領域「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基板技術の創出」  
研究課題「プロスタグランジンを引き金とする炎症慢性化機構の解明」  
76,039 千円 (H23)、88,355 千円 (H24)、79,275 千円 (H25)、86,857 千円 (H26)、80,844 千円 (H27)  
総額 411,370 千円

### (4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

Rho のシグナリングと働きの研究、特に、Rho が mDia を介して産生するアクチン線維の意義、は、これまで、その殆どが培養細胞で研究され、生体での働きは不明であった。特別推進研究以来、mDia にフォーカスしたのは、同じ Rho の下流シグナルでも ROCK の研究は、我々が発見した ROCK 阻害薬 Y-27632 を用いて個体での意義が検証されているからである。この意味で、mDia の遺伝子欠損マウスを用いた解析で得られた知見はすべて新たな発見であり知見である。とくに、神経極性の維持や精子の形態形成での mDia の働きは、神経上皮細胞間やセルトリ細胞-精子細胞間などの細胞間接着の制御を行っているもので、mDia の働きとして培養細胞ではハッキリ同定できていないものであった。また、抑制性神経前駆細胞の tangential migration での働きは、Rho シグナル経路が生体内組織で具体的な細胞移動を行っている例として注目される。また、mDia2 欠損マウスの赤芽球での細胞分裂阻害は個体内の細胞でも mDia2 が実際に収縮環形成を介して細胞質分裂に関与していることを示したものとして重要であると考え。一方、この例では赤芽球の分裂阻害は見られるものの、そこにいたる発生の過程での細胞分裂は概ね正常に起こっていることを意味しており、実際の個体発生の細胞質分裂過程では、mDia2 と redundant に働く、或は、これに代わりうるアクチン核化・重合因子が働いていることを示唆するもので、その本体を含め興味深い問題提起を行っているものと思う。この状況は、上記の細胞間接着や細胞移動、あるいは、軸索ガイダンスでも同じであり、組織により細胞によりエフェクターの使い分けが行われていることが実験的に明らかにされたと考えている。このような redundancy と対照的に T 細胞では抗原提示時の免疫シナプスにおいてシナプス周囲にアクチン・リングを形成することで TCR のシグナル伝達に必須の役割をしている。これまで、T 細胞活性化での formin 蛋白質の関与は明らかにされておらず、これは新たな知見である。アクチンリング形成は既存のアクチン骨格をシナプス周囲に束ねることでなされる。このことは、mDia のアクチン制御系とその他の分子によるアクチン制御系のクロストークの存在を意味するものである。また、この系はこの発見をもとに、アクチン細胞骨格がいかにしてシグナル伝達を制御しているかという未解決の課題の解明への端緒となりうると考えている。さらに、mDia が神経終末の形態を制御して神経可塑性に関与しているという発見は、これまで、樹状突起スパインなどシナプス後部での構造変化による可塑性にくらべ遅れていたシナプス前部の可塑性の研究に新しい手がかりを与えるものと評価している。これらについては、只今、論文の改訂中であり、出来るだけ早く出版して評価を聞きたい。

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

### (1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

本研究の貢献は主として細胞生物学に対するものであるが、以下に述べるように、これを介して、一部免疫学や再生医学へも貢献している。

本研究で行った Rho が果たす細胞機能の時空間特異的制御機構の解析は、まず、細胞移動での Rho-mDia1 経路の研究がある。ここでは、Rho-mDia1 経路が rat glioma 細胞で移動の前後軸の極性形成と細胞接着斑の代謝回転に関与する事を示した論文（発表論文②、2-(2)）、Rho-mDia1 経路が T 細胞の移動に関係することを示した論文（6）などがある。前者は、Rho は接着に働き、細胞移動は Rac と CDC42 が行うという paradigm が信じられていた時代に Rho の細胞移動への関与を示したもので、*Nature Cell Biology*, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *Journal of Cell Science*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* などの総説に取り上げられ、これに適合する現象を記述した論文が *Nature* に発表される (Machacel et al., 461:90-103, 2009) などの効果があった。また、後者の論文は、リンパ球移出の細胞メカニズムが不明であったときに発表されたもので、mDia の機能と移出メカニズムの両面から評価され *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *Nature Immunology*, *Nature Reviews Immunology* などの総説に取り上げられている。

本研究で行った Rho が果たす細胞機能の時空間特異的制御機構の解析のもう一つの対象は、細胞質分裂での Rho-mDia2 経路の研究で、ここでは NIH3T3 細胞を用い、収縮環でのアクチン線維形成を担う分子が mDia2 であること、Rho と anilin が mDia2 の分裂溝への局在を決定することを明らかにした（発表論文 5 と Watanabe, S. et al. *Mol. Biol. Cell*, 21: 3193-3204, 2010）。これらの論文は、これまで動物細胞で不明であった細胞質分裂でのアクチン核化因子を同定したのものとして *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *Current Opinion in Cell Biology*, *Ann. Rev. Cell and Developmental Biol.*, *Nature Cell Biology* などの総説で取り上げられた。

また、mDia のアクチン重合の作用様式を示した発表論文 10 および生細胞内でのアクチン動態を解析した発表論文 7、及び、生細胞で G-アクチンが mDia によるアクチン重合の引き金になることを示した論文 (*J. Cell Sci.*, 121: 3403-3412, 2008) は、*Physiological Reviews*, *Nature Cell Biology*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* などの総説で取り上げられた。

さらに、本研究では、京都大学高橋惇研究室、理化学研究所故笹井研究室との共同研究で、ヒト ES 細胞や ES 細胞から分化させた神経細胞前駆細胞の分散培養による細胞死に Rho-ROCK 経路が関与していることを示し、これが ROCK 阻害薬で阻止できることを示した（発表論文 2 と 4）。これは、iPS 細胞やその他の幹細胞にも応用可能な技術で、これら幹細胞の実用化を促進する成果である。

これらに加え、本研究では、Rho 経路の個体の組織での役割の解明を目指し、既出の ROCK 遺伝子欠損マウスに加え、mDia の各アイソフォームの遺伝子欠損マウスの作出を行った。この成果の一部は、本研究期間中に発表できた（論文 5）が、本研究で明らかになったことは mDia1 と mDia3 が redundant に働いていることで、そのため、mDia1 と 3 の二重欠損で初めて表現型が明らかになったことが多く、これと KO マウスの解析が時間がかかることが相俟って、大半の研究が本研究期間をこえ一部は現在迄の持ち越しになっている。1-(1)の研究の概要にも述べたが、これにより、様々な個体の過程で Rho-mDia/ROCK 経路が働いていることが明らかになると同時に、これによって説明できない事象も多くあることが分かって来ている。これらの研究がどのように学界へ貢献するかを評価できるのはもう少し時間が必要と思われる。

本研究期間中に、Rho シグナル伝達経路とがんの関わりについて我々の研究成果をもとにその時点での知見をまとめた総説（発表論文 1）は、高被引用文献になっているが、これは、Rho 経路が臨床がん働いていることが明らかになって来たことが反映していると思われ、我々の知見がその理解のための基礎として役立っていることを示すものと考えている。

最後に、関連領域にインパクトを与えた本研究の成果の一つに mDia2 の細胞核への輸送の研究がある (Miki, T. et al. mDia2 Shuttles between the Nucleus and the Cytoplasm through the Importin- $\alpha/\beta$ - and CRM1-mediated Nuclear Transport Mechanism. *J. Biol. Chem.* 284: 5753-5762, 2009)。これは CRM1 阻害薬である leptomycin B で細胞を処理すると mDia isoform のうち mDia2 が特異的に核に集積することから明らかになったものであるが、この論文を契機に細胞核でのアクチン産生が見直され、細胞刺激直後に細胞核でアクチン産生がおこるという Grosse らの *Science* の論文 (341: 864-867, 2013) に繋がった。

## 2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

## 【研究期間中に発表した論文】

No	論文名・著者名・発行年・ページ数等	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion (Narumiya, S. <i>et al. Cancer Metastasis Rev.</i> , <b>28</b> : 65-76, 2009)	Rho GTPases なかでも Rho は、様々ながんで活性化が報告されている。本論文では、細胞のがん化、がんの転移・浸潤における Rho の働きとそこで想定されるシグナル伝達について総説した	227
2	Molecular Pathway and Cell State Responsible for Dissociation-Induced Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells (Ohgushi, M. <i>et al., Cell Stem Cell</i> , <b>7</b> : 225-239, 2010)	ヒトの ES 細胞は分散すると細胞死を起こし、これが応用の障害となっている。本論文では、この現象を解析し、これが Rho-ROCK 経路によるアクチオシンの過剰収縮によること、これが E-カドヘリンによる細胞間接着の消失によりもたらされ、Abr という Rho 活性化因子/Rac 不活化因子を介することを明らかにした。	153
3	The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src (Yamana, N. <i>et al., Mol. Cell. Biol.</i> , <b>26</b> : 6844-6858, 2006)	ラット C6 グリオーマ細胞で mDia を RNAi で枯渇すると細胞の極性形成と移動が障害されることを見出し、mDia が細胞先端へ Apc の輸送を行うことで細胞の前後極性の形成に、また、細胞接着斑への c-Src の集積を促進しその turnover を亢進して移動に働くことを明らかにした。	111
4	Inhibition of the Rho/ROCK pathway reduces apoptosis during transplantation of embryonic stem cell-derived neural precursors (Koyanagi, M. <i>et al., J. Neurosci. Res.</i> , <b>86</b> : 270-280, 2008)	ES 細胞由来の神経前駆細胞の apoptosis での Rho の役割を解析し、分散培養による <i>in vitro</i> の apoptosis も移植後の <i>in vivo</i> の apoptosis も ROCK 阻害薬 Y-27632 で防止できることを示した。	90
5	mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells (Watanabe, S. <i>et al., Mol. Biol. Cell</i> , <b>19</b> : 2328-2338, 2008)	哺乳類細胞の細胞質分裂の収縮環形成は Rho の下流で起こるが、そこに働くアクチン重合因子は不明であった。本論文では、mDia1, 2, 3 の各 isoform の RNAi を行い、mDia2 が収縮環に集積してアクチン線維形成を行うこと、これが無いと細胞は異常収縮を起こし細胞質分裂に失敗することを明らかにした。	83
6	Impaired T lymphocyte trafficking in mice deficient in an actin-nucleating protein, mDia1 (Sakata, D. <i>et al., J. Exp. Med.</i> , <b>204</b> : 2031-2038, 2007)	mDia1 の遺伝子欠損マウスを作成し、T リンパ球の胸腺からの移出や二次リンパ組織への移動に障害があること、これが走化刺激に対するアクチン増生や極性形成の障害にあることを示し、T 細胞移動での mDia1 機能の重要性を明らかにした。	70
7	Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing (Miyoshi, T. <i>et al., J. Cell Biol.</i> , <b>175</b> : 947-955, 2006)	生細胞でのアクチン動態を解析するため、capping protein (CP) と GFP の融合蛋白を発現し 1 分子 speckle 解析を行なった。この結果、CP は生細胞ではアクチン繊維より極めて早い解離を呈し、これは cofilin によるアクチン切断によるものであることが示された。	63
8	Rho-Associated Kinase II (ROCKII) Limits Axonal Growth after Trauma within the Adult Mouse Spinal Cord (Duffy, P. <i>et al., J. Neurosci.</i> , <b>29</b> :15266-15276, 2009)	ROCK は <i>in vitro</i> で軸索退縮を起こすことから、ROCK 阻害薬が脊髄損傷の際の軸索再生に働くことが期待されている。本論文は、神経組織に rich である ROCK-II の遺伝子欠損マウスを用いて軸索再生での ROCK-II の貢献度について検討したもので、 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> の両方で ROCK-II の欠損が軸索再生を促進することが示された。	63
9	The mammalian formin FHOD1 is activated through phosphorylation by ROCK and mediates thrombin-induced stress fibre formation in endothelial cells (Takeya, R. <i>et al., EMBO J.</i> , <b>27</b> : 618-628, 2008)	FHOD1 は血管内皮に高発現している formin であるが、Rho 結合部位を持たず、その活性化機構は不明であった。本研究では、FHOD1 が ROCK によって C 末端がリン酸化され、活性化、アクチン線維形成を行うことが明らかになった。	57
10	Rotational Movement of the Formin mDia1 Along the Double Helical Strand of an Actin Filament (Mizuno, H. <i>et al., Science</i> , <b>331</b> : 80-83, 2011)	ロダミンで標識したアクチンモノマーを単分子蛍光偏光法で観察することにより、mDia がアクチン線維の矢尻端に結合したままその螺旋にそって回転しながらモノマー添加を行い、重合を触媒していることが示された。	40

## 【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors (Shinohara, R. <i>et al.</i> , <i>Nature Neurosci.</i> , <b>15</b> : 373-380, 2012)	本論文では、mDia1/3 2重欠損(DKO)マウスの脳構造を解析し、抑制性神経細胞の tangential migration が低下していること、これにより嗅球の低形成が起こること、これは mDia1/3 によるアクチン線維を介した神経前駆細胞の移動の低下によることを明らかにした。これにより脳構造形成に Rho-mDia 経路によるアクチン形成が不可欠であることが明らかとなった。	34
2	Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals (Thumkeo, D. <i>et al.</i> , <i>Eur. J. Cell Biol.</i> , <b>92</b> : 303-315, 2013)	これまで Rho の作用は培養細胞で解析されることが殆どで、総説も Rho の細胞内作用を概説するものが殆どであった。本総説は、我々の Rho effectors の解析を含め Rho シグナル系の個体の発生、生理、病態生理での役割について現時点での報告をまとめたものである。	33
3	F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins (Higashida, C. <i>et al.</i> , <i>Nature Cell Biol.</i> , <b>15</b> : 395-405, 2013)	細胞には張力を感知してアクチン骨格の再編成に結ぶ mechanosensing 機構が存在する。本研究では、培養細胞に加えた張力を解除した時に起こるアクチン線維形成機構を解析し、これが mDia によること、この活性化は張力解除時におこる線維崩壊によるアクチンモノマーの局所濃度増加によることを明らかにした。これは、mDia の mechanosensor としての働きを示したものである。	24
4	Moesin-deficient mice reveal a non-redundant role for moesin in lymphocyte homeostasis (Hirata, T. <i>et al.</i> , <i>Int. Immunol.</i> , <b>24</b> : 705-711, 2012)	Moesin は細胞膜をアクチン骨格に繋ぐ ERM 蛋白質の一つである。本論文では、moesin 欠損マウスで見出されたリンパ球減少を解析し、これが、T 細胞の胸腺から、B 細胞の骨髄からの移出障害によること、moesin 欠損リンパ球が SIP や CXCL12 などの走化刺激に対してアクチン産生の障害と反応低下を示すことを明らかにした。	14
5	Deficiency of mDia, an Actin Nucleator, Disrupts Integrity of Neuroepithelium and Causes Periventricular Dysplasia (Thumkeo, D. <i>et al.</i> , <i>PLOS ONE</i> <b>6</b> : e25465, 2011)	本論文では、mDia1/3 二重欠損(DKO)マウス脳で見られた heterotopia を解析し、これが神経上皮の apical adherens junction とそれを連ねるアクチンベルトの消失によること、これにより神経上皮極性が破綻して神経幹細胞の異常増殖が起こった結果であることを明らかにした。これは、Rho-mDia 経路が神経上皮極性と幹細胞制御に必須の働きを行っていることを示したものである。	12
6	Loss of a Rho-Regulated Actin Nucleator, mDia2, Impairs Cytokinesis during Mouse Fetal Erythropoiesis (Watanabe, S. <i>et al.</i> , <i>Cell Reports</i> , <b>5</b> : 926-932, 2013)	本論文では、mDia2 欠損マウスを解析し、ホモ欠損マウスが強度の貧血を示し全例が胎生 12.5 日までに死亡すること、これが mDia2 欠損赤芽球の分裂溝にアクチン線維が集積せず、細胞質分裂に失敗するためであることを明らかにした。これは培養細胞で見いだした mDia2 の細胞質分裂での働きが個体レベルでも働いていることを証明したものである。	10
7	Impaired vascular remodeling in the yolk sac of embryos deficient in ROCK-I and ROCK-II (Kamijo H. <i>et al.</i> , <i>Genes to Cells</i> , <b>16</b> : 1012-1021, 2011)	本研究では、ROCK-I/ROCK-II のヘテロ・ホモ、ホモ・ヘテロ欠損マウスを解析し、これらが卵黄嚢の血管形成不全を呈し胎生 12.5 日までに死亡することを明らかにした。この結果は、これまでの研究結果と合わせ、LPA->LPA2 受容体->G13->Rho->ROCK というシグナル伝達経路が胎生期の血管発生に働いていることを示したものである。	9
8	Citron kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain (Watanabe, S. <i>et al.</i> , <i>J. Cell Sci.</i> , <b>126</b> : 1773-1784, 2013)	本研究では、Citron-K の細胞質分裂での働きを解析し、これが細胞質分裂終了時に midbody でリング状の安定構造をつくること、この構造は微小管結合分子の局在に必要なこと、Citron-K を枯渇させると midbody は不安定化し分裂が逆戻りすることを見出した。これにより、Citron-K が細胞分裂の完了に働く分子であることが明らかになった。	8
9	Liprin-alpha controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization (Sakamoto, S. <i>et al.</i> , <i>J/ Cell Sci.</i> , <b>125</b> : 108-120, 2012)	本研究では、mDia の新規結合蛋白質として Liprin- $\alpha$ を同定し、Liprin- $\alpha$ が mDia の膜移行を調節して mDia のアクチン核化・重合活性を負に制御し、stress fiber など細胞内アクチン細胞骨格の調節を行っていることを示した。	7
10	The formin DIAPH1 (mDia1) regulates megakaryocyte proplatelet formation by remodeling the actin and microtubule cytoskeletons (Pan, J. <i>et al.</i> , <i>Blood</i> , <b>124</b> : 3967-3977, 2014)	血小板形成は巨核球からの proplatelet という突起形成によって担われている。本論文では、この突起形成における Rho 経路の役割を解析し、mDia1 と ROCK がアクチン形成を促進することで突起形成を抑制すること、この一部の作用はこれら分子の微小管に対する作用によることを明らかにした。	5

### 3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

#### (1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

本特別推進研究で、ヒト ES 細胞やこれ由来の神経前駆細胞が分散培養下ではアクチオシン依存性にアポトーシスし、これを ROCK 阻害薬 Y-27632 が阻害することが示された (2-(2). 発表論文 2 と 4)。この他にも、サルの角膜内皮細胞でも同様の分散による細胞収縮とアポトーシスが起これ、これが Y-27632 で阻害されることが報告されている (Okumura *et al.*, *IOVS*, 50: 3080-3687, 2009)。また、Y-27632 はウサギの外傷による角膜傷害モデルで点眼で角膜内皮の再生を促進することも報告されている (Okumura *et al.*, *IOVS*, 56:6067-6074, 2015)。一昨年、ROCK 阻害薬 Ripasudil が我々の研究成果 (Honjo *et al.*, *IOVS*, 42:137-144, 2001) をもとにグラナテックの名前で緑内障治療薬として上市された。この上市は必然的に上記研究で見出された ES 細胞や角膜内皮細胞の移植・再生、さらには、脊髄損傷での軸索再生 (発表論文 8) での臨床応用に向かうものと思われる。

### 3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）

#### (2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポストク等の研究終了後の動向を記述してください。）

本研究遂行中、教室に在籍し、アカデミアに進んだもののキャリア形成の状況は以下である。

渡邊直樹（当時、准教授）は、東北大学生命科学研究科・教授を経て現在、京都大学医学研究科・教授である。

石崎敏理（助教）は、京都大学医学研究科准教授を経て現在、大分大学医学研究科・教授である。

古屋敷智之（助教）は、京都大学医学研究科特定准教授を経て現在、神戸大学医学研究科・教授である。

平田多佳子（特定准教授）は、現在、滋賀医科大学教授である。

青木友浩（博士研究員）は、現在、京都大学医学研究科特定准教授である。

Dean Tumkeo（博士研究員）は、京都大学医学研究科・特定助教を経て、現在、同准教授である。

水野裕昭（博士研究員）は、現在、京都大学生命科学研究科助教である。

圓岡真宏（博士研究員）は、現在、神戸大学医学研究科助教である。

出口雄一（博士研究員）は、現在、長崎大学医歯薬学総合研究科・准教授である。

三木貴司（博士研究員）は、現在スイス Friedrich Miescher Institute の研究員である。

姚成燦（博士研究員）は、現在、英国 University of Edinburgh の Developing Principal Investigator である。

小賀徹（博士研究員）は、現在、京都大学医学研究科・准教授である。

James Monypenny（博士研究員）は、現在、英国 King's College の研究員である。

東田知陽（博士研究員）は、現在英国 University of Edinburgh の研究員である。

藤田伴子（博士研究員）は、現在、京都大学医学研究科特定准教授である。

大林邦衣（博士研究員）は、現在、産業医科大学助教である。

北岡志保（大学院生）は、博士研究員を経て、現在、神戸大学医学研究科・助教である。

坂田大治（大学院生）は、現在、九州大学医学系研究科の助教である。

Kitipong Soontrapa（大学院生）は、現在、タイ王国 Mahidol 大学准教授である。

篠原亮太（大学院生）は、現在、神戸大学医学研究科・助教である。

丹治正太（大学院生）は、現在、京都大学医学研究科・助教である。

渡邊定則（学部生）は、大学院修了後、名古屋大学理学研究科・助教となり、現在、留学中である。

坂本智子（大学院生）は、現在、博士研究員である。

Aliza Ehrlich（大学院生）は、現在、カナダ McGill 大学の博士研究員である。