

独立行政法人科学技術振興機構
創造科学技術推進事業
追跡評価用資料
(追跡調査報告書)

月田細胞軸プロジェクト(1996～2001)
総括責任者 月田 承一郎

目 次

1. 研究成果の継続・発展の状況.....	3
1.1. プロジェクトのねらいとプロジェクト期間の達成度.....	3
1.1.1. 蛋白質の高次構造を解きほぐすアンフォルジンの発見.....	3
1.1.2. 癌抑制遺伝子 APC 蛋白質および EB1 蛋白質の微小管上での動態解析.....	4
1.1.3. 中心体に集積する新規非膜系オルガネラ.....	5
1.1.4. CS 等のオルガネラを分離する新しいソーターの開発.....	6
1.1.5. γ チュブリン遺伝子のノックアウトマウスの作製とその表現型の解析.....	6
1.1.6. 微小管結合蛋白質 MAP4 の機能解明と新規蛋白質 Xp105 の発見.....	7
1.1.7. ショウジョウバエの原腸陥入における細胞間接着のダイナミックスの解析.....	7
1.2. 研究期間終了後、研究はどのような形で基礎研究として継続・発展したか.....	8
1.2.1. アンフォルジン研究のその後の展開.....	8
1.2.2. 微小管ネットワーク機構研究のその後の展開.....	9
1.2.3. クローデイン研究との融合研究... ..	15
1.2.4. 微小管結合蛋白質 MAP4 関連研究のその後の展開.....	16
1.2.5. ショウジョウバエ関連研究のその後の展開.....	17
2. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的及び経済的な効果・効用及び波及効果について.....	17
2.1. 研究成果は科学技術の進歩にどのように貢献したか	17
2.2. 研究成果はどのような形で応用に向けて発展したか.....	20
2.3. 人材育成の面から参加研究者の活動状況はどうか	21
3. フロー.....	22
4. 添付資料	
4.1. 受賞リスト	23
4.2. 参考資料.....	24

1. 研究成果の継続・発展の状況

1.1. プロジェクトのねらいとプロジェクト期間の達成度

我々の体は多数の細胞が集まって構成されているが、ただ単に細胞が無方向に寄り集まっているのではない。細胞そのものが持つ方向性のことは、漠然と『細胞極性 cell polarity』と呼ばれ、細胞極性形成の分子機構の解析は、現代の分子生物学の中核をなす研究分野の一つとなっている。

一般に発生 of いろいろな場面で細胞が極性形成 (すなわち、細胞内のいろいろな部品をある方向に向かって配置) しようとする時、必ず、それぞれの細胞は基本となる座標軸を自らの中に有している筈である。この全ての細胞に普遍的な座標軸を、『細胞軸 (cellular axis)』と呼ぶ。近年の飛躍的な細胞生物学、分子生物学の進展の結果、「この細胞軸を形成するために必要な外的刺激がどのようなものであるか?」「細胞軸が決定された後、どのような細胞内反応が起こり、実際の方向性を持った細胞構造が形成されていくか?」といった点に関して、多くの情報が得られるようになった。しかし、「細胞軸の実体は何か?」という細胞極性研究にとってもっとも本質的な点は解明されていない。本プロジェクトは、この点を明らかにする手がかりを得ることを目指して研究を開始した。

具体的には幾つかの異なった方向からアプローチする必要があると考え、(1)蛋白質分泌の軸を探る方向 (蛋白輸送軸グループ)、(2)細胞骨格の極性決定や細胞の不等分裂に重要であると思われている微小管の役割を探る方向 (細胞分裂軸グループ)、および(3)発生時の細胞軸の形成・消失の機構を探る方向 (形態形成軸グループ) を取り上げて総合的に追求することとし、3グループが密接な連携を保ちながら5年間の研究を展開した。

その結果、ERATO の本来の目的である「研究の新しい芽を育てる」という観点からは、以下のような多くの「芽」が育てられた。

1.1.1. 蛋白質の高次構造を解きほぐすアンフォルジンの発見

蛋白輸送軸グループの逆瀬川(八谷)如美らは、蛋白質の高次構造を解きほぐす因子を見つける目的でトリプシン感受性を利用した試験管内のアッセイ系を独自に開発し、「アンフォルジン」(Unfoldin)と名づけた蛋白質の単離・精製に成功した[参考資料リスト 105]。この蛋白質は、分子量 58kD の単量体分子が会合したオリゴマーで、直径 10 nm の円形の中央に約 2 nm のホールを有する構造と、はさみのような形状をしている構造、の2種類の構造をもち、ATP の存在下で蛋白質の高次構造を解きほぐすアンフォールディング活性を有する。

この成果は、2000 年の米国細胞生物学会、チェコの Yeast 2001 国際シンポジウムなど、多くの学会やシンポジウムで発表されている[105]。また、この蛋白質は 2001 年に科学技術振興事業団 (JST) から特許出願され、2004 年に日本特許が成立している (特許第 3563366 号) [参考資料リスト 212]。アンフォルジンに関しては、ERATO 終了後の検討結果と合わせて 2004 年に論文発表されている[204, 205, 206]。アンフォルジンが以前に報告されているアクチン結合蛋白質 Aip2p (Actin interacting protein 2) のオリゴマーであることから、それらの論文では、Oligomeric Aip2p/Dld2p という名称が用いられていて、アンフォルジンという名前は出てこない。しかし、この蛋白質の機能をみると「アンフォルジン」(Unfoldin)という名前はそれにふさわしい名

前であるといえる。

Aip2p は 1995 年にスタンフォード大学の Amberg らによって、アクチンと結合する蛋白質を Two-hybrid 法でスクリーニングした際に最初に同定された[201]。また、1999 年および 2002 年に報告された Dld2p (D-Lactate dehydrogenase protein 2) [202,203]もこれと同じ蛋白質であるとして、八谷らの論文にも引用されている。しかし、これらの論文には Aip2p が蛋白質のアンフォールディング活性を有するという記載はなく、八谷らが最初に見つけた機能であるといえる。

ERATO の研究では酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)から単離された Aip2p が、*in vitro*, *in vivo* の両方で ATP 存在下において F-アクチンと相互作用を示し、F-アクチン環状体形成を促し、トリプシン変異体感受性を示すことが分かった。また、Aip2p が過剰に発現すると、酵母の多角発芽を誘発し、不足すると細胞分裂の際に分裂溝の形成を阻害することが分かった。この研究は将来の展開が期待される成果として、本プロジェクトの事後評価報告書でも注目された[103]。

1.1.2. 癌抑制遺伝子 APC 蛋白質および EB1 蛋白質の微小管上での動態解析

細胞分裂軸グループの清末優子らは、オワンクラゲの蛍光蛋白質 GFP(Green Fluorescent Protein)と癌抑制遺伝子 APC(Adenomatous Polyposis Coli)蛋白質の融合体を用いて、アフリカツメガエル(*Xenopus*)の生きた細胞の中で APC 蛋白質の経時的な動きを映像化することに成功した[105]。その結果、APC 蛋白質が微小管(Microtubule)に沿って移動し、その先端に不定型の複合体として局在する様子が観察され、これが微小管に沿ってプラス端に移動しその先端に局在する蛋白質であることを確かめられた[313, 315]。

また、APC 結合蛋白質のひとつである EB1(End-binding 1)の挙動も比較観察し、APC と EB1 は相互作用によって互いの局在に影響を与えることを明らかにした[314,315]。これらの蛋白質は、微小管プラス端でチューブリンが重合して新たに形成された先端部分に特異的に集積する、「微小管プラス端集積因子(+TIPs)」と呼ばれる分子群の一つである[303]。

癌抑制遺伝子 APC は、家族性腺腫性ポリポシスの原因遺伝子として最初に単離され、APC 蛋白質が微小管の先端部に局在することは知られていた[310]。また、EB1 は 1995 年に Su LK らがヒト cDNA クローンから Two-hybrid 法で最初に同定した APC 結合蛋白質で[311]、微小管サブセットの成長末端に APC と共に局在している事も知られていた。しかし、それらの蛋白質の挙動と機能の実体は未知であった。本研究は、オルガネラの輸送や配置、細胞極性の決定と維持、細胞分裂の進行に重要な役割を担っている微小管に主眼を置き、異なる環境下での微小管の挙動の詳細を観察し、微小管の非対称的な配向を形成する機構を解明する目的で行われたものである。

GFP は 1962 年に下村脩らによってオワンクラゲの発光体から最初に単離された蛍光蛋白質である。その後 30 年を経て、1994 年に GFP の遺伝子がコロンビア大学の Chalfie 等によってクローニングされ[307]、蛍光ラベル技術に革命が起こり、近年の細胞生物学に大きな転機をもたらしたといわれている[306]。当初の GFP は蛍光強度が低かったが、その後活性部位のアミノ酸を人工置換して蛍光強度と抗褪色性を向上させた改良版が普及したのが 1996 年ごろとされている[327]。1996 年の ERATO の開始時は、このように GFP 融合蛋白を用いた細胞事象の画像化技術が登場し始めた頃で、その技術をいち早く取り入れたこと、および、ツメガエルの細胞が室温・炭酸ガス非存在下で長時間培養でき、微小管局在蛋白質の経時変化を適当なインターバルで追跡

できるという特徴をうまく捉えたことが経時的映像化成功の鍵となった。

清末らの論文は 2000 年の J. Cell Biol.等に発表されたが[313,314]、1999 年の Cell にジュネーブ大学の Perez らが GFP-CLIP170 融合蛋白質を用いた同様な手法で、アフリカミドリザルのライン化した腎細胞(*Vero cell*)を用いて、CLIP170 が微小管プラス端に特異的に集積することを発表している[312]。したがって、清末らが独自に開発した手法は論文発表の点では一番手ではなかったが、GFP を用いたイメージングにより、微小管プラス端にチューブリンが重合して新たに形成された先端部分に特異的に結合する APC や EB1 といった分子群が存在することを示したことは、世界の最先端の研究成果として高く評価されている。このことは論文の被引用件数にも示されている(添付資料 4. 1 論文リスト参照)。Scripps Research Institute の Kita らが、2006 年に発表した論文の中でも、清末らの業績が詳しく紹介されている[317]。

また、清末らが開発した GFP-EB1 融合蛍光蛋白質は分子量が小さく扱いやすいことに加え、微小管が伸長するフェーズのみを検出するので、微小管の密度が高い部位において微小管一本一本を分離して検出できない場合にも、個々の先端を特定することが出来るメリットがあり、種々の細胞、モデル生物の研究に現在広く用いられている[305]。

その後、同様な手法で微小管プラス端に集積されるいくつかの蛋白質の挙動が解析され、これらの分子群はその動的特長から、Schuyler らによって「微小管プラス端集積因子(Microtubule plus-end tracking protein: +TIPs)」と命名された[316]。

1.1.3. 中心体に集積する新規非膜系オルガネラの発見

細胞分裂軸グループの久保亮治らは、アフリカツメガエルの培養細胞を用いて、分子量 230kD の中心子周辺物質 PCM-1(Pericentriolar material-1)が中心子近辺に存在する CS (Centriolar Satellite) の主要構成蛋白質であることを明らかにし、生細胞内における CS の挙動を解明した[105]。

CS は細胞の中心子付近に存在する直径 70~100 nm の球状の electron dense material として電子顕微鏡像から形態学的に記述されてきたが、その構成蛋白・機能ともそれまで全く不明であった[105]。また、PCM-1 は、1994 年に Balczon らによって中心体を認識する自己抗体を持つ自己免疫疾患患者の血清を用いて同定された蛋白質であるが、電子顕微鏡レベルでの詳しい細胞内局在や、その機能については全く明らかになっていなかった[105]。

久保らは、蛍光蛋白質 GFP と PCM-1 の融合蛋白質を発現する細胞から GFP でラベルされた CS を粗精製し、アフリカツメガエルの卵再構成系を用いて微小管に対する動きを観察した。その結果、CS は微小管に沿って ATP 依存性に微小管マイナス端方向に動き、中心子近辺に集積することが分かった。また、繊毛形成中の細胞を免疫電顕により観察し、従来形態学的に繊毛形成中に特異的に出現するとされ、中心子(Centriole)複製への関与が示唆されていた繊維状顆粒(Fibrous granules)に PCM-1 蛋白質が特異的に局在することを確認した。このことから、繊維状顆粒と CS が同一のオルガネラであり、CS が微小管に沿って輸送される新規非膜系オルガネラであることを突き止め、この新規オルガネラが細胞軸決定の重要なコンポーネントである中心子形成に関与する可能性が示唆された[318]。

1.1.4. CS 等のオルガネラを分離する新しいソーターの開発

本プロジェクトでは、早稲田大学の船津高志教授 (現在は東京大学薬学部教授) のグループと共同で、1 分子イメージング法を用いて、1 個の蛍光ラベルした蛋白質が微小管に沿って動く様子を、超高感度蛍光顕微鏡下で可視化して観察する方法を開発した[401]。この手法は清末らの研究にも用いられた。

さらに、GFP と PCM-1 の融合蛋白質を培養細胞で強制発現させると、CS のみを光らせることが出来ることに着目して、蛍光を発しているオルガネラだけをレーザーによって高感度に検出し正確に分離する装置を開発した。この装置は 2002 年に JST から特許出願され、2004 年に日本特許が成立している (特許第 3628611 号) [403]。

オルガネラの発する蛍光は弱すぎて、従来のセルソーターでは効率よく分離することが不可能であった。今回開発した方法は、GFP 技術とナノテクを結びつけた新しい手法である。具体的には、蛍光体でラベルした蛋白質を含む溶液に、温度変化によりゾルーゲル転移するゼラチンポリマーを添加して Y 字型の微小流路の入口に流す。蛍光体を通らない時は赤外線レーザー照射してゾルを局所的にゲル化させて出口の一方 (B) を塞ぎ、もう一方の出口 (C) に流体を導く。一方、ラベルした蛍光体が発出された時はゲル化させずにそのまま出口 (B) に流体を導くスイッチング操作で流れを制御して蛍光ラベルした物質だけを効率よく分離する [402]。このオルガネラソーターは CS だけでなく、一般の蛍光ラベルしたオルガネラにも適用可能で、1 分子レベルで効率よくオルガネラを分離できることから、プロテオーム解析研究の発展に寄与すると期待される。

船津高志教授は、ERATO「柳田生体運動子プロジェクト」(1992-1997) およびさがけ「形とはたらき」2 期生(1998-2001)にも参画しており[404]、これらの成果ともあわせて、「1 分子蛍光イメージング法の開発と生物物理学への展開」で日本 IBM 第 17 回科学賞(2003)を受賞している[405]。

1.1.5. γ チュブリン遺伝子のノックアウトマウスの作製とその表現型の解析

γ チュブリンは微小管のマイナス端に局在し、多種類の蛋白質からなる環状複合体として存在している。細胞分裂軸グループの久保亜紀子らは、 γ チュブリンの遺伝子が TUBG1 と TUBG2 の 2 種類あることを発見し、これらの遺伝子を同定した。この 2 つの遺伝子は相同性が高いために、これまで分離する抗体作製ができず 1 種類と考えられていたものである。

さらに、 γ チュブリンの細胞分裂における働きを明らかにする目的で、マウスの胚性幹細胞を用いて γ チュブリンをコードする遺伝子 (TUBG1 および TUBG2) それぞれを破壊した遺伝子欠損マウスを作製し、その表現型の解析を行った[105]。その結果、TUBG1 欠損マウスは胚性致死で、受精後 3.5 日目の胚では単極性の紡錘子が観察され、染色体の分配が行われない状態 (32~64 個の分裂段階) で分裂が停止していた。また、TUBG2 欠損マウスは正常に発生し、雌雄共に繁殖可能であった。この TUBG2 ノックアウトマウスは現在理化学研究所のバイオリソースセンターに寄託されている。

これらの結果から、TUBG1 のコードする γ チュブリンは初期胚の発生に不可欠の分子であり、また、TUBG2 遺伝子由来の γ チュブリンは、その機能を相補しないことが示唆された。さらに、熱

板試験法により、TUBG2 欠損マウスは痛覚が鈍磨であることが明らかになった[320]。

1.1.6. 微小管結合蛋白質 MAP4 の機能解明と新規蛋白質 Xp105 の発見

微小管は α チューブリンと β チューブリンが結合したヘテロ 2 量体であり、その両端においてチューブリン 2 量体が重合あるいは脱重合することにより、常に伸長・短縮を繰り返している。この微小管に結合してその安定性を制御する蛋白質は微小管結合蛋白質 MAP(Microtubule associated protein)と総称される。

細胞分裂軸グループの椎名伸之らは、中心体と微小管がどのような分子メカニズムで構築制御されているかを解明しようと試みた。その結果、アフリカツメガエルの微小管結合蛋白質 XMAP4(Xenopus Microtubule associated protein 4)が分裂期の微小管構築制御の鍵を握る分子であり、染色体の分配に関与することを明らかにした[105]。椎名らは、1992 年にアフリカツメガエルの微小管結合蛋白質として p220/XMAP230 という新規蛋白質を分離同定していたが、今回その全 cDNA をクローニングして解析した結果、アフリカツメガエルの MAP4 ホモログであることが分かり、XMAP4 としてその機能解析を行った[321]。MAP4 は、1979 年に HeLa 細胞 MAPs の研究から 210K と 115K の 2 つの MAP が最初に報告されて以来、全ての組織・器官に普遍的に発現しており、神経以外の細胞における微小管ネットワーク形成・維持に関与すると考えられている[304]。

また、椎名らは、この他に微小管に沿って動く蛋白質の探索を行う過程で、RNA granule に局在する XP105(後に RNG105 と改名)という新しい蛋白質を見つけた。

1.1.7. ショウジョウバエの原腸陥入における細胞間接着のダイナミックスの解析

形態形成軸グループの小田広樹らは、生きた胚の中でアドヘレンスジャンクションを可視化することに成功し、ジャンクションのダイナミックスを研究するための新しい実験系を確立した[105]。

ショウジョウバエの卵細胞形成時におけるカドヘリンの動きを、蛍光蛋白質 GFP と D α -カテニンの融合蛋白質を用いて経時的に観察し、形態形成に関与するドメインを同定し、細胞間接着のダイナミックな挙動を生きた個体の中ではじめて明らかにした。これにより、細胞極性形成に関与する接着帯 AJ (Adherence Junction) の構造や発現が、個体発生と系統発生の両面から見て、ダイナミックに変化していることを映像として具体的に示した[606, 607]。さらに、細胞外領域にある、無脊索動物 (Nonchordate) に特有の Primitive Classic Cadherin Domain (PCCD)を見出しその役割解析を行った[105, 608]。

また、小田康子らは、ショウジョウバエの初期胚で GFP-カドヘリンの融合蛋白質を発現する遺伝子導入系を用いて、形質膜が極性化する様子を可視化し観察した。その結果、GFP-カドヘリンのシグナルは分裂期に合わせて局在のパターンが変化することが分かった。これと比較するために、ショウジョウバエと同じ節足動物に属するオオヒメグモの胚発生の解析もおこない、ショウジョウバエとの違いを明らかにした[105]。

Verkhusha は GFP-アクチン融合蛋白質を用いてショウジョウバエの卵細胞形成時における細胞壁アクチンのダイナミックスを観察し解析した[611]。また、サンゴ由来の赤色蛍光蛋白質 DsRed の蛍光強度を強めた新しい変異体 DsRedSer197Tyr を開発し[105]、GFP-DsRED と

いう緑と赤が時間差をおいて 2 重に発光する新規な蛍光蛋白質を用いて、ショウジョウバエの幼生期における神経軸索(Neuronal bundles)の繊維形成過程を経時的に映像化して観察した[612]。

これらの研究成果は、細胞生物学研究のツールとして GFP 技術を使って、ショウジョウバエで形態形成のダイナミックスを追跡した意味では先駆的な研究であった。

1.2. 研究期間終了後、研究はどのような形で基礎研究として継続・発展したか

プロジェクトのねらいに記載したとおり、本プロジェクトは「細胞軸の実体は何か？」という細胞極性研究の本質的な点を解明する手がかりを得ることを目指したものであるが、ERATO 終了後に以下のように、基礎研究として継続・発展した。

1.2.1. アンフォルジン研究のその後の展開

逆瀬川(八谷)如美と逆瀬川裕二は、ERATO 終了後、2001 年 10 月から 2005 年 3 月まで、CREST「脳を守る」の研究代表者金子清俊チームの연구원として「プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療法開発への応用」の研究に従事し、ERATO で見出したアンフォルジンの機能解析とその応用研究を行った[208, 209]。その後、逆瀬川(八谷)如美は、東京医科大学神経生理学講座に移り、金子教授の下でアンフォルジン関連の研究を続けている。この間の主な研究成果は次のとおりである。

(1) アンフォルジンの詳細な機能解明とその応用

ERATO で見出したアンフォルジン(Oligomeric Aip2p)は、試験管内で強力な蛋白質解きほぐし活性を持ち、フォールディング病といわれるアルツハイマー病やプリオン病の診断・治療法の開発に利用できる可能性を示した。

アンフォルジンは 58 kD の単量体分子が、その C 末端に局在するコイルドコイル領域で 10-12 個会合したリング様構造をしており、中央に空洞 (Cavity) を有している。ATP 存在下においては開口部が開き、基質と相互作用可能になる。ATP 非存在下では閉口して器質との相互作用は起こらない[204, 211]。

アンフォルジンは、酵母細胞内ではアクチン繊維の制御および出芽に関わり、細胞周期によりその活性と局在を変化させ、厳密な活性制御が行われていることが示唆されたが、試験管内では基質特異性をもたず、ATP 存在下で極めて強い蛋白質解きほぐし活性を示した。

また、アンフォルジンは、正しくフォールディングされた蛋白質のみならず、ミスフォールドされた蛋白質に対しても同様に強い解きほぐし活性を示す。

さらに、アルツハイマー病やプリオン病等の神経変性疾患の病因蛋白質とされている、アミロイド β 、 α -シヌクレイン、 β 構造をもつプリオン蛋白質等も、アンフォルジンと ATP 存在下でインキュベートすると、わずか 200ng/ml の低濃度トリプシンで分解されることが分かった[211]。

(2) アンフォルジンを用いた難溶性蛋白質凝集体の高感度分析法の開発

難溶性の蛋白質凝集体を ATP 存在下でアンフォルジンと反応させて可溶化して高感度に分析する方法を開発した。これにより、蛋白凝集体の検出感度を従来法の 100 倍に上げることが出来るようになった[207]。

また、明視野顕微鏡に半導体加工用レーザーを搭載し、対象物を顕微鏡下に可視化し、レーザー照射で周辺組織を排除した後、目的対象物のみを切り出し、マイクロマニピレータで回収するレーザーマイクロダイセクション装置を開発した。

これらを組み合わせて、神経変性疾患に見られる 10 ミクロン以下の小さな蛋白凝集体を夾雑物なく単離し、高感度に分析することを可能にした。その一例として、ピック小体のウエスタンブロットの検出感度を 500 倍以上に向上させることが出来た。

1.2.2.微小管ネットワーク機構研究のその後の展開

ERATO 研究のうち、「微小管研究」部分はその成果がユニークで将来性があると評価され、新たに月田承一郎教授を研究代表者とする「微小管ネットワークの動的制御機構の解析」研究が、2002 年度の JST の生物分野の発展研究(SORST)に採択され研究が継続された。この研究は 2002 年 4 月から開始され、2004 年に中間評価結果が公表されている[107]。そこでは、「独自の視点から研究を行って細胞生物学の広い範囲に関連した重要な発見・成果をあげ、今後更なる発展が期待される時期にあり優先的に継続すべき」と評価された。途中 2005 年 12 月に月田承一郎教授が逝去されたため、その後月田早智子教授を研究代表者代行として、引き続き 2007 年 3 月まで実施された。この発展研究では、微小管のプラス端研究グループとマイナス端研究グループにわけて、微小管の動態を制御する蛋白質や構造に注目し、微小管ネットワークの動的な制御機構を明らかにすることを目的とした。一方、それと同時に、京都大学におけるクロードンを中心とした細胞間接着・極性研究との融合を目指した。

微小管関連の研究成果を理解する参考として、(図表 1.2.2.-1)上皮細胞の模式図、(図表 1.2.2.-2)上皮細胞の接着機構とその機能、(図表 1.2.2.-3)微小管の構造模式図、(図表 1.2.2.-4)微小管プラス端に集積する蛋白質を作製した¹。

(図表 1.2.2.-1)に示したように、極性を持った上皮細胞では細胞分裂の核となる中心子(Centriole)は管腔側(Apical)の近くに配置し、この周辺に中心子周辺物質(Pericentriolar Material: PCM)と呼ばれる物質が広範囲に分布し中心体(Centrosome)を形成している。この中心体から複数の微小管がプラス端を外側にして細胞壁に向かって放射状に伸びネットワークを形成している。中心子自体もごく短い微小管から構成されており、9対の3連微小管環状体 2 個 1 組が相互に直角に対向してL字型に配置している。

細胞が分裂するときには元の中心子が 2 つにはなれ、それぞれが母中心子と新しくできた娘中心子からなる組になって、新しい 2 つの中心子ができる。2 つになった中心子の周りには微小管構造中心(Microtubular organizing center : MTOC)ができ始め、そこから多数の微小管が伸びてくる。電子顕微鏡像では中心子の周りに直径 70—100nm の球状物質が多数観察され、これが(Centriolar Satellite : CS)と呼ばれている物質で形態学的には電子顕微鏡像として捕らえられ

¹ (図表 1.2.2.-1)は椎名伸之氏、(図表 1.2.2.-3)(図表 1.2.2.-4)は清末優子氏の助言と校閲を受けた。

ていたがその実態については ERATO 開始時点ではまったくわかっていなかった。CS を中心体に含めるかどうか異論もあるようであるが、中心子周辺に分布する物質群のひとつとしてここでは中心体に含めて示してある。

極性を持つ上皮細胞は、お互いに細胞間接着分子によって結合されており、管腔側から基底膜側(Basal)に向かってタイトジャンクション (Tight Junction: TJ), アドヘレンスジャンクション (Adherence Junction: AJ)、デスモソーム(Desmosome)の順に配置されている。

タイトジャンクションは、上皮細胞の一方側から他方へ分子が漏れ出ないように細胞間を密着させて封じるジッパーのような役目を果たしており、月田教授らが発見したクローディンが主要な接着分子として働いている。細胞間の水溶性成分の拡散を防ぐバリア機能と、基底膜側と管腔側の間の細胞成分の自由な混合を防ぐフェンス機能を持っている。最近の研究では特定の分子ないしイオンの透過性が確認されており、この機構はパラセルラー・パスウェイ(Paracellular pathway)と呼ばれている。

アドヘレンスジャンクションは、上皮細胞同士が強く接着して上皮細胞シートを形成するときに必要な強い接着構造である。竹市教授らが発見したカドヘリンが細胞内のアクチン骨格と結びついて強固な接着構造を形成し上皮細胞のシート構造を保っている。

デスモソームは、隣接する細胞の原形質膜間にある直径 $0.5\ \mu\text{m}$ の並列する小さな長円形の斑である。細胞間接着装置の一種とみられており、中間径フィラメントにより裏打ちされ細胞間に斑点状に形成される。中間径線維を細胞間でつないで、3 次元的なネットワークを構築することで、機械的ストレスに対して強い細胞層の形成に寄与する。これらの接着機構を小田の総説を参考にして(図表 1.2.2.-2)にまとめて示した。

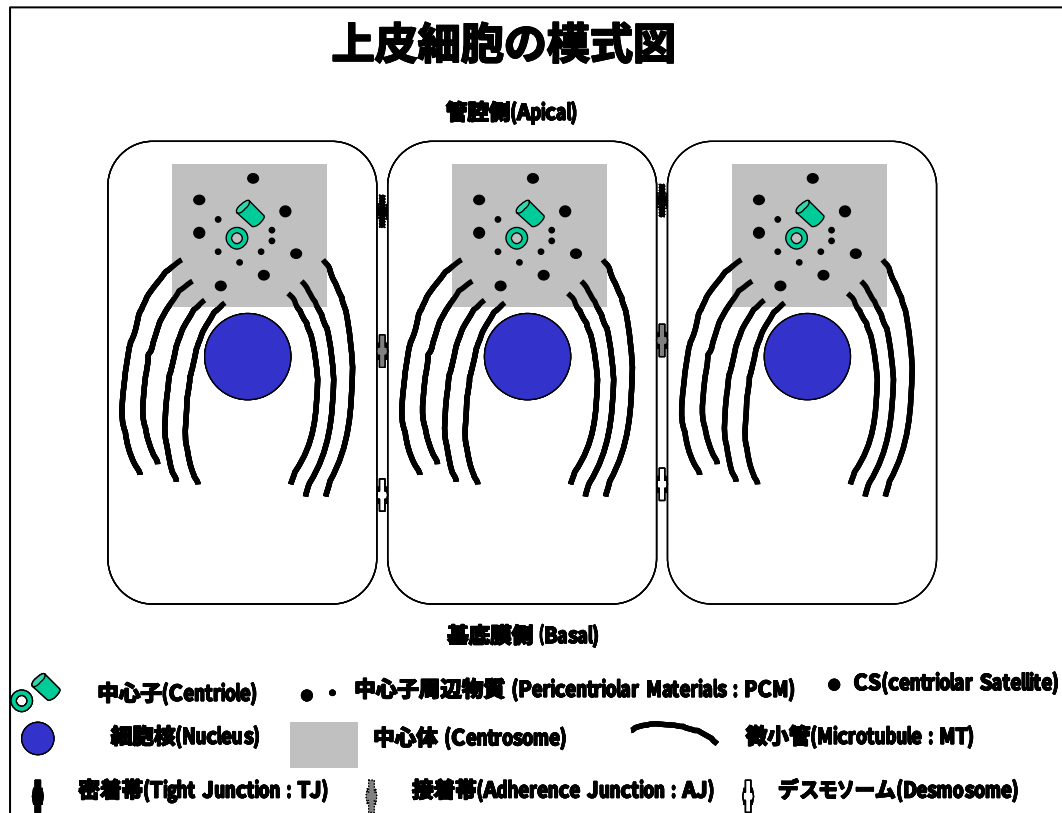
(図表 1.2.2.-3)に微小管の構造模式図を示した。微小管は直径 $25\ \text{nm}$ 前後の中空の繊維で、 α チュブリンと β チュブリンのヘテロ 2 量体がらせん状に重合して中空の管状になった繊維状分子である。微小管は中心体に繋がっているマイナス端と、反対側のプラス端を持つ極性化した分子である。マイナス端で中心体より生え出し、プラス端ではチュブリン分子の付加と解離が起こり常に伸張と短縮を繰り返して細胞膜の裏側を探り、特定の場所に捕捉され安定化される。この機能は微小管の“Search and Capture Mechanism”と呼ばれている [103]。さらに、微小管は極性に依存した物質輸送や、微小管ネットワークの再構築によって細胞内小器官の配置や小胞輸送、あるいは、細胞分裂における染色体の分配などに不可欠な多彩な役割を果たしている。

微小管には、ダイニンおよびキネシンと呼ばれるモーター蛋白質が結合して、ATP からエネルギーを得て微小管をレールとした物質輸送にあたっている。ダイニンはプラス端からマイナス端へ、キネシンはマイナス端からプラス端への物質輸送を担っている。

CS や PCM-1 等の中心子周辺物質はダイニンに結合して微小管に沿って中心体に運ばれる。中心体に接続するマイナス端には γ チュブリン複合体が集積している。中心子周辺物質の機能の解明はまだ十分に進んでいない。

一方、APC や EB1 等はキネシンに結合して微小管のプラス端に運ばれ、微小管のプラス端に集積する。微小管プラス端に集積する蛋白質はたくさん見出されており、Schuyler は、これらをまとめて「微小管プラス端集積因子」(Microtubule plus-end-tracking proteins : +TIP) と名づけている [303, 316]。これらの蛋白質群をまとめた表が清末優子の総説に掲載されているので、著者の承諾を得て(図表 1.2.2.-4)に転載した。MAP(Microtubule associated proteins)も、微小管結合蛋白質の一種で、C 末端に高度に保存された PGGG ドメインを持ちこのドメインで微小管

(図表 1.2.2.-1)

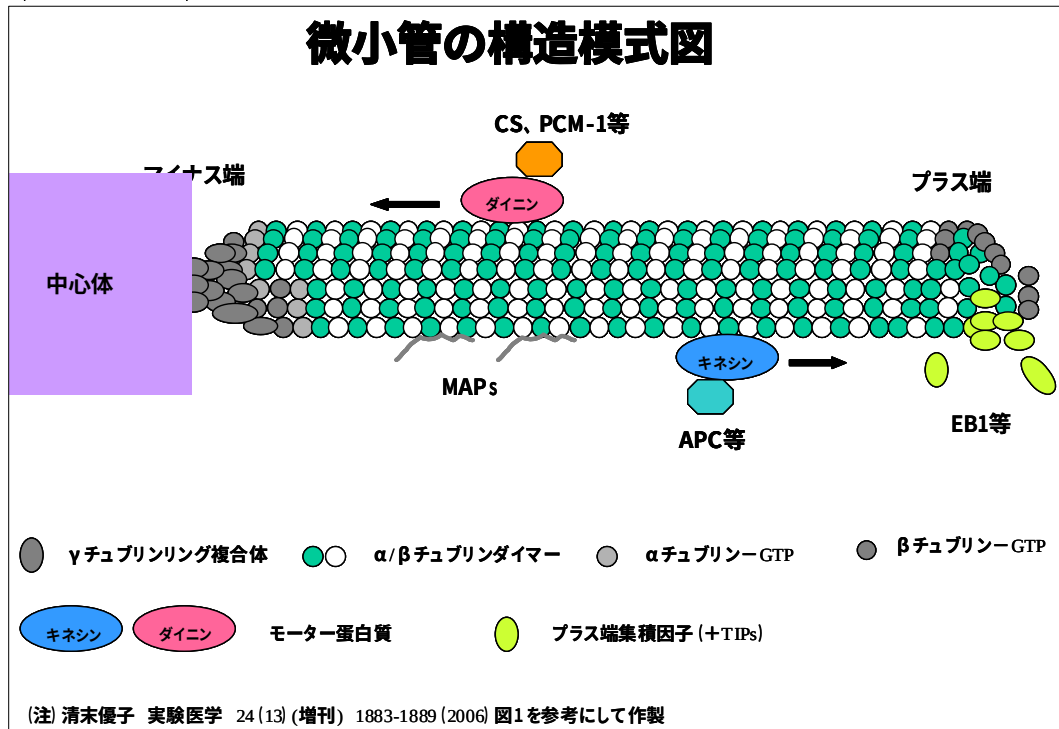


(図表 1.2.2-2)

上皮細胞の接着機構とその機能			
名称	タイトジャンクション (Tight Junction)	アドヘレンスジャンクション (Adherence Junction)	デスモソーム (Desmosome)
接 着 分子	クローディン	カドヘリン ネクチン	デスモコリン デスモグレイン
主 な 機能	1. フェンス機能 : 細胞膜内の脂質や蛋白質の拡散をブロックする。 2. バリア機能 : 細胞外に存在する分子の拡散をブロックする。	アクチン骨格との連携により、細胞の形の制御や細胞の運動に重要な役割を果たす。	中間径線維を細胞間をつないで、3 次元的なネットワークを構築することで、機械的ストレスに対して強い細胞層の形成に寄与する。
位置	アピカル側	中間	ベイスル側

小田広樹「細胞間接着分子の進化」月刊 海洋/号外 No.41 157-161 (2005)を参考にして作成

(図表 1.2.2.-3)



(図表 1.2.2.-4)

微小管プラス端に集積する蛋白質 (microtubule plus-end-tracking protein)

EB1 (end-binding 1)ファミリー : EB1, EB2, EB3, Bim1p(Sc), Mal3p(Sp)

ダイニン-ダイナクチン複合体およびその結合蛋白質 : p150, p50ダイナミチンおよびLis1を含むダイニン、ダイナクチン複合体

CLIPs (Cytoplasmic linker proteins) : CLIP-170, CLIP-115, CLIP-190(Dm), Tip1p(Sp)

CLASPs (CLIPs associating proteins) : CLASP1, CLASP2, OrbitMAST(Dm), Stu1p(Sc)

APC (Adenomatous polyposis coli) : 癌抑制遺伝子

MACF (Microtubule actin cross-linking factor) : ACF7, BPAG1ジストニン, Shotkakapo(Dm)

XMAP215(X1)ファミリー : ch-TOG, Msps(Dm), DdCP224(Dd), Stu2p(Sc)

Rhoファミリー低分子量GTP結合蛋白質 : RhoGEF2(Dm)

Neuron Navigator 1 : メラノフィリン、ミオシンVa

出典: 清末優子 実験医学 24 (13) (増刊) 1883-1887 (2006) 一部改変

下線は月田プロジェクトで検討された蛋白質

に結合して微小管の安定化に寄与しているとされている。代表的なものに MAP2、MAP4 等が知られている。椎名らは ERATO でアフリカツメガエルの MAP4 について検討した。

発展研究 (SORST) の現在までの主な研究成果は以下のとおりである。

(1) Centriolar Satellite(CS)の分子構築と機能解明

SORST マイナス端研究グループの久保亮治らは、CS が検討した全ての細胞に普遍的に存在する非膜系の新しいオルガネラであり、PCM-1 蛋白質が重合してその骨組みを作っていることを実験で証明した。また、マウス PCM-1 に対する特異性の高いポリクローナル抗体を作製し、各細胞における CS の分布を初めて観測することに成功した。その結果、調べた全ての細胞において CS が存在していることが明らかになった。また、種々の PCM-1 変異分子の発現実験から、CS が PCM-1 自身の重合により作られることを証明した[319]。さらに PCM-1 の遺伝子発現変化を調べたところ、繊毛形成の初期に強い発現誘導がかかることが分かった。そこで、繊毛形成時の遺伝子発現変化を Gene Chip を用いて経時的網羅的に解析し、PCM-1 と同じ発現変化パターンを辿る遺伝子を探索し、中心体と CS の双方に局在する新規蛋白質 PCM-2 (仮称) と、繊毛の先端に局在する新規蛋白質 Sentan (仮称) を同定した。Sentan は motile cilia を持つ細胞にのみ発現しており、motile cilia 先端に局在する蛋白として初めてのものである。PCM-1 は統合失調症発症の原因遺伝子の一つとして注目されており、今後 PCM-2 についても神経細胞における発現や機能についての解析を進めて行くことが予定されている。

(2) γ チュブリンの機能の解明

久保亜紀子らは、ERATO で分離に成功した γ チュブリンの極めてよく似た 2 つの遺伝子 TUBG1 と TUBG2 の機能を詳細に検討し、それぞれが生体内で異なる機能を担っていることを解明した。

また、TUBG1 と TUBG2 を蛋白質レベルで識別する方法を開発し、それぞれの発現様式と機能を解析した。その結果、TUBG1 は体中の細胞に発現しており、微小管の重合促進能のある従来から研究されている γ チュブリンに相当しているとみられることが分かった。また、TUBG2 は大人では中枢神経にのみ比較的大量に発現していることを確かめた[320]。前述のとおり、この TUBG2 ノックアウトマウスは現在理化学研究所のバイオリソースセンターに寄託されている。

さらに、ERATO で作製に成功した TUBG2 ノックアウトマウスを用いて、京都大学先端融合研究機構の宮川剛助教授と共同研究を行い、正常マウスとの行動比較テストと組み合わせて検討した結果、TUBG2 が正常な中枢神経機能に必須であることが分かった。TUBG2 ノックアウトマウスが遺伝的にパーキンソン病を発症するモデル動物と言える。

さらに興味深いことに、ヒトの TUBG2 遺伝子が存在する領域の変異で種々の協調運動異常をきたす遺伝病 (FTD17:パーキンソニズムを伴う前頭葉側頭葉痴呆) があることが報告されている。

(3) 上皮細胞のアピカル膜と中心体をつなぐ分子機構の解明

SORST マイナス端研究グループでは、中心体濃縮物中に存在し中心体と細胞膜をつなぐ足場蛋白質 odf2(Outer dense fiber of sperm tails 2)が、母中心体(Mother centriole)の突起(Appendage)にのみ局在することを明らかにした。さらに、odf2 ノックアウトマウスを作成し解析した結果、odf2 蛋白質は Appendage と Primary cilia 生成には必須であるが、その他の細胞周期に関連した中心体の機能には無関係であることが明らかになった[324]。また、Conditional ノックアウトマウスの解析により、長い間謎であった primary cilia の生体での機能について深い理解が得られるとともに、primary cilia 形成不全により引き起こされる疾患(多発性嚢胞腎、Bardet-Biedl syndrome など)の解明につながるものと思われる。

Odf2 は最初、精子の尻尾の細胞骨格の主要構成物質として同定された蛋白質である。その後月田研究室で、この蛋白質が中心体濃縮物中に局在し、中心体と細胞膜をつなぐ足場蛋白質であることを解明していた[325]。本研究は、その機能解明をさらに一歩進めたもので、今後さらに odf2 に結合する蛋白質を探索し、中心体とアピカル面をつなぐ分子群の全容解明を目指している。

(4)TMF (TATA element modulatory factor) の機能の解明

肝臓の上皮細胞より単離した中心体を抗原としてモノクローナル抗体を作製し、その抗原を解析することで新規微小管マイナス端蛋白質の検索を行い、TMF 蛋白質を同定した。TMF は中心体ではなく、ゴルジ体に局在する蛋白質で、early endosome-Golgi 間および Golgi-ER 間における Rab6 依存性の逆行輸送の調節因子であると考えられた。

(5) 微小管プラス端に集積する蛋白質 CLASPs の機能解析

ERATO 終了後カン研究所に異動した清末優子らは、CLIP 結合蛋白質 CLASPs(CLIP associating proteins)の機能解析を行い、これらの蛋白質が微小管プラス端を安定化することで紡錘体の形成と染色体の整列に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

微小管のプラス端には ERATO の研究で興味深い動態を示した APC や EB1 以外に、微小管-小胞結合蛋白質 CLIP (Cytoplasmic linker protein) やそれに結合する CLASPs と呼ばれるいくつかの蛋白質が局在していることが知られている。これらの蛋白質は、微小管のプラス端が細胞膜の特定部位を感知して捕捉する“Search and Capture”機能に重要な役割を果たしていると考えられていたが、その機能の実態は解明されていなかった。その後、哺乳動物の細胞に共存する CLASP1、CLASP2 という互によく似た2つの蛋白質を分離同定し、RNA 干渉法により、これらを単独、あるいは両方を同時に、発現抑制することに成功した。これらの挙動を解析し、2 つの CLASPs は EB1 をプラス端に持つ微小管を細胞膜に捕捉して安定化させる役割を果たしていることを明らかにした。さらに、CLASPs をノックダウンすると、動原体における微小管の安定性が低下して十分な張力が得られず、分裂の進行が停止すると考えられた。

また、A6 培養細胞への PDZ 結合モチーフ欠損 APC 発現実験から、APC の細胞伸展活性には、細胞表層における PDZ 結合が重要であることを明らかにした。

なお、この CLASPs に関する研究は、SORST の一環として月田教授のアドバイスをを受けて清末優子がカン研究所において実施したものである。

1.2.3. クローディン研究との融合研究

細胞間の接着機構であるタイトジャンクション (TJ) は、細胞軸形成に重要な役割を果たしている。ERATO における研究の中でも、浅野朗らは線虫の遺伝子データバンクから、種々のクローディンとのアミノ酸配列の類似性で 4 種類の線虫クローディン (CLC-1,2,3,4) を見出し、その局在と機能を調べている[106, 506]。さらに、SORST の中には、京都大学月田研究室で行われている接着分子クローディン関連研究との融合研究がテーマとして含まれている。この研究領域では多くの注目すべき成果が報告されている。これらの研究は SORST 以外の京都大学月田研究室の研究テーマと重複する部分があるが、SORST の研究の特筆すべき成果を記載する。

(1) 新規な接着蛋白質トリセルリンの発見

SORST プラス端研究グループの池ノ内順一らは、3 個の上皮細胞の交点に局在し、3 つの細胞間の接着帯 (tricellular Tight Junction : tTJ) を構成している新しい蛋白質を同定して「トリセルリン」(Tricellulin) と命名した[504]。

これまで、上皮細胞の間隙をシールする密着機構としては、隣り合った 2 つの細胞間の密着帯 (bicellular Tight Junction : bTJ) について研究が進められ、古瀬、月田らによってクローディンがその機能を果たす接着分子であることが解明されていた。しかし、3 つの細胞が集まる交点では、2 個の細胞同士 6 本の TJ ストランドでシールされた中間にセントラルチューブという空間ができる。このような 3 細胞結合点の構造は 1970 年代に電子顕微鏡観察で認められていたが、この細胞間隙からの物質の漏れを防ぐメカニズムの実態は全く分かっていなかった。

今回発見されたトリセルリンは、このような 3 つの細胞の隙間を如何にシールするかという問題を解く鍵になる蛋白質で、2 細胞間の接着帯の形成にも決定的な役割を果たす蛋白質であることが分かった[505]。この発見は上皮細胞が持つバリア機能の解明に大きな足跡を残すものとして注目されている。

生体内の全ての臓器に存在するトリセルリンは、臓器により特徴ある発現を示すクローディンと共役して、タイトジャンクション形式の全体を制御する可能性がある。

トリセルリンは最初からこのような機能を持つ蛋白質を探索する過程で発見されたものではない。上皮細胞の形態形成の過程で、細胞が形態を変えて動き回る「上皮-間充織転換」(Epithelial-Mesenchymal transition : EMT) と呼ばれる時期があるため、その時に、タイトジャンクションに局在する膜タンパク質を網羅的に探索した。その中で、機能未知の膜蛋白質について cDNA をクローニングし、GFP との融合タンパク質を細胞内で作らせて、その動きを追跡していく過程で、細胞接着分子のクローディンやオクルーディンとよく似た動きをする物質を偶然発見したものである。ERATO の GFP 融合タンパク質によるイメージングの研究過程がなかったならば、このような発見はおそらくなかったであろうといわれる。

トリセルリンに関する特許が京都大学から出願されている (発明の名称: 新規薬剤デリバリー系、出願番号: 特願 2005-230648、出願日: 2005 年 8 月 9 日、発明者: 月田承一郎、池ノ内順一、月田早智子、PCT 出願番号: JP2006/315741)。

(2) 上皮細胞間バリア形成と物質透過制御メカニズムの解明

SORST プラス端研究グループの梅田一彰らは、細胞間のバリア機能形成に特異的なクロードイン分子の重合、および、その結果生じるバリア機能が、細胞内で細胞膜近くに存在する ZO-1、ZO-2 という 2 種類の蛋白質により制御されることを解明した[501]。

ZO-1 ノックアウト ZO-2 ノックダウン上皮細胞を確立し、この細胞がアドヘレンスジャンクションの形成はほぼ正常であるが、タイトジャンクションの形成が認められず、上皮細胞のもつ大きな機能の一つである細胞間バリアーが形成されなかった。これらの研究成果は、2006 年の Cell に論文発表され[503]、科学技術振興機構報第 324 号でも紹介されている[501]。

細胞間のバリア機能を制御する機構解明は、バリア機能障害に基づく病態の理解、これらの病気の診断法および治療法の開発につながる事が期待される。また、バリアを制御できれば選択的薬物投与にも役立ち、将来の応用に対して大きな貢献が期待できる。

1.2.4. 微小管結合蛋白質 MAP4 関連研究のその後の展開

椎名伸之は ERATO の途中で、2000 年 4 月から国立遺伝学研究所に助手として移籍した。そこで、ERATO の研究過程で見出した新しい微小管結合蛋白質 Xp105 の研究を継続発展させて、下記の成果を得ている。

(1) 神経 RNA granule に局在する新規蛋白質 RNG105 の発見とその機能解析

新規 RNA 結合蛋白質 RNG105 は、もともとは ERATO のプロジェクトで微小管をレールとして中心体に集積する蛋白質をスクリーニングする過程で同定されたものである (ERATO の研究では Xp105 と呼ばれていたが、その後の研究でその機能が解明され RNG105 と改名された)。培養細胞に RNG105 を GFP 融合蛋白質として発現させると、細胞質にクラスターを形成し、その一部は中心体に、別の一部は微小管によって細胞周辺に運ばれ、アクチン依存的に細胞膜直下まで輸送されるという興味深い挙動を示すことを見出した。

脳の海馬において学習効果が長期記憶として定着するのは、神経細胞をつなぐ樹状突起側(後シナプス)に局所蛋白質が新たに合成され、樹状突起が構造的・機能的変化を受けるためであることが知られている[323]。その際に、mRNA やリボソームがパッキングされた RNG(RNA granule)と呼ばれる高次複合体が、微小管をレールにして樹状突起に輸送され、刺激依存的に活性化されて、記憶・学習における特定のシナプスを増強する仕組みのひとつとして注目されている。最近、その構成因子の分離・同定が精力的に行われており、椎名らが ERATO で新規に同定した RNG105 もそのうちのひとつであることが分かった。

さらにその機能を詳細に解析した結果、RNG105 は神経樹状突起における局所的翻訳の制御因子であることが分かった。すなわち、シナプス刺激のない状態では、RNG105 は RNA granule において mRNA に直接結合してその翻訳を抑制しているが、シナプス刺激が入ると、その RNA granule から解離し、その結果、抑制が解除されて翻訳が活性化されるというモデルである。この成果は最近論文として報告された[322]。

さらに、RNG105 のノックアウトマウスを作成して解析した結果、この蛋白質が生体内においてシ

ナプス形成や神経ネットワークの形成に実際に関与している可能性がでてきた。

これらの研究成果は、同領域の研究者から高く評価され、その後の展開が注目されている。

1.2.5. ショウジョウバエ関連研究のその後の展開

形態形成軸グループの小田広樹らが ERATO で開発した、生きた細胞内でカドヘリンの動きをダイナミックに追跡する手法はその後多くの研究者に使われている。小田は ERATO 終了後、JT 生命誌研究館ラボラトリーセクターの主任研究員として、細胞間のアドヘレンスジャンクションが蛍光を発するショウジョウバエモデルを何種類か作成した。このショウジョウバエモデルは京都工芸繊維大学の「ショウジョウバエ遺伝資源センター」に移管され、世界中の研究者から 100 件以上の提供依頼があり、同センターにおけるリクエスト No.1 となっている。

さらに、ERATO で始めたナメクジウオに対するカドヘリンの動きを追跡した研究をホヤに発展させ、従来脊椎動物に最も近い無脊椎動物と考えられていたナメクジウオよりホヤのほうが明らかに脊椎動物に近いことを突き止めた。この新しい考えは、当初あまり注目されなかったが、最近、他の研究者からその説を支持する論文が Nature (2006) などに発表され、小田らの論文が引用され注目されている。

秋山(小田)康子はさがけ「認識と形成」(研究総括:江口吾朗)の2期生に採択され、「左右相称動物の共通祖先のボディープランの究明」の課題で、2001年10月から2004年9月まで、JT生命誌研究館の奨励研究員として研究に取り組んだ。この研究は、クモの初期胚発生を分子生物学的に解析し、ショウジョウバエで蓄積した知見との比較から節足動物の祖先のボディープランを導き、動物の多様性を導く遺伝子機能の究明を目指した[601, 603]。さがけ終了後、小田夫妻は共同でオオヒメグモの研究を続けている。これは ERATO の研究テーマではないが、ERATO でショウジョウバエにおけるカドヘリンの動きを解析した研究から発展したものである[602]。クモは無脊椎動物であるが、タイトジャンクションが存在し、細胞生物学的にも、発生学的にも重要なモデル動物であり、小田らのオリジナリティのある研究は着実に成果を上げている。

Verkhusha は ERATO 終了後米国に渡り、ERATO で開発した新しい蛍光蛋白質 GFP-DsRED をさらに発展させて、各種の新規蛍光蛋白質を開発し精力的な研究を続けている。

2. 研究成果から生み出された科学技術的、社会的及び経済的な効果・効用及び波及効果について

2.1. 研究成果は科学技術の進歩にどのように貢献したか

本プロジェクトは「細胞軸の実体は何か?」と言う点を明らかにする手がかりを得ることを目指して研究を開始したもので、現段階では、新たな科学技術の潮流を生み出したとは必ずしもいえないが、そこで得られた成果は、その後の細胞生物学の進歩に大きく貢献したといえる。

(1) アンフォルジン関連の研究

八谷如美らのアンフォルジン関連の研究成果は共同通信社の取材を受け、「異常プリオン解く分子:BSE 治療に期待」の表題で、2004年9月21日の日経新聞はじめ多くの新聞に報道されて

いる。その中に、桑田一夫岐阜大学人獣感染防御研究センター長の「これまで蛋白質の立体構造を作るプロセスを助けるたんぱく質は多く見つかったが、ほぐす蛋白質は見つかっておらず、存在も予測されていなかった。制御機構を解明して狙ったものだけに作用するように出来れば、素晴らしい応用価値がある」というコメントが載せられている[210]。

プリオンについては世界的に、①どのようにして凝集を抑えるか、②できた凝集体をどのようにしてほぐすか、③凝集体を丸ごと食べてしまうオートファジーの3つの方向で研究が進められている。

ミスフォールドされた蛋白質が凝集することは細胞の自己防御機能の一つであって、凝集体それ自体が病態を引き起こすわけではなく、凝集の前段階のミスフォールドされた蛋白質自体が問題だと最近いわれている。それから見ると、凝集体を単に解きほぐせばそれでよいというわけではない。しかし、アンフォルジンが蛋白質凝集体を解きほぐす能力があることがはっきりし、蛋白質の品質管理にかかわってくると大変面白く応用価値は高い。

アンフォルジンの本体である Aip2p は名前のとおりF-アクチンに働く蛋白質である。アクチンに対する作用はプリオンに対する作用とはまったく異なるので、プリオンを解きほぐす作用があるのなら、応用に走る前に Aip2p の作用メカニズムにもっと焦点を当てて、学問的に詳しく解析しておく必要がある。アンフォルジンの機能実体を究明する学術的な研究は未完成であり、その実体と機能を詳細に検討して学術的な業績として完成させ、もっとレベルの高い論文誌に論文を投稿してほしいという意見もある。プリオンの高感度分析法とあわせて、アンフォルジンがプリオン病の診断・治療法の開発に新しい道を開くかどうかは、今後の研究成果にかかっている。

(2) 微小管および中心体関連の研究

微小管は細胞内で蛋白質の輸送ルートとして重要な役割を果たしている。神経細胞における働き、細胞分裂時における役割、細胞形成と極性決定にかかわる働きなどに、基礎的な情報を提供する細胞生物学分野の重要な研究課題であり、世界的に注目を集めている。特に清末優子らの GFP と融合蛋白質を用いて、微小管プラス端に集積する蛋白質 APC、EB1 の挙動を追跡した論文(4.1 論文リスト No.11,12)は、2007 年 12 月 10 日における累積被引用件数がそれぞれ 145,140 であり、本プロジェクトのなかで最も被引用件数の多い論文である。微小管は絶えず伸長・短縮を繰り返しており、このレールに沿って運ばれ細胞内に配置される多くの蛋白質の挙動は常に動的なものである。GFP との融合蛋白質を巧みに用いて、細胞内蛋白質の動的挙動を映像化して見せた形態学的研究成果は、この分野の学問の最先端を行くものとして、本プロジェクトの一つの大きな特色となっている。

中心体は、細胞分裂時に、①中心体の成熟過程、②中心体周辺で新たな化学反応が起こる過程、③細胞機能に必要なさまざまな蛋白質が中心体に集まってくる過程の3つの過程をたどる。生きた細胞内ではこの過程が繰り返されて細胞分裂が起こり、新しい細胞が生成している。中心体に関しては、これまで第1段階の中心体の成熟に関する研究が主体であった。

癌細胞では中心体増幅時に中心体だけが不規則に何回も分裂して増えている。これに関する研究論文は多数出ているが、そのメカニズムを解いた論文はまだない。細胞極性形成時に中心体にどのような分子がいかにして集まり、どのような役割を果たしているのか、本プロジェクトはこの問題の解明に挑戦したものである。細胞分裂の起点が中心体であり、細胞分裂時に中心体に集まってくるさまざまな蛋白質の運搬のためのレールの役割を果たすのが微小管であり、中心体を基点と

して細胞内に広く張り巡らされてネットワークを形成している。抗癌剤パクリタキセルは、この微小管の合成過程をブロックして細胞分裂を阻止することで抗癌作用を示すといわれている。このことは、パクリタキセルが中心体に直接作用していることを示唆しており、もし、正常細胞にはなくて、癌細胞になる過程の中心体に特有の現象が発見できれば、制癌剤開発の研究に大きく貢献すると考えられる。

本プロジェクトの中心体の極性形成にかかわる研究はまだ完成していない。中心体において何が正常な細胞極性形成のシグナルになっているかを分析した研究がまだない現状において、研究途中で月田教授が逝去された損失は大きい。本プロジェクトの成果が今後後継者に引き継がれ、将来発展して中心体を取り巻く環境に関するデータが蓄積されていけば、科学技術の進歩に大きな貢献ができると考えられる。

(3) 形態形成の動きを追跡した研究

ショウジョウバエは遺伝学、発生学のモデル動物として盛んに研究されていたが、細胞接着等の細胞生物学分野の研究はあまりなかった。ERATO の形態形成軸グループの研究成果は、細胞生物学のツールとして GFP 技術を使って、ショウジョウバエで形態形成のダイナミクスを追跡した意味では先駆的な研究であった。小田らが作製した GFP-カドヘリンを使ってアドヘレンスジャンクションが蛍光を発するショウジョウバエモデルは広く世界中の研究者に提供されて利用されている。小田らはこの研究を発展させて、多細胞動物の多様性を生み出した普遍的な原理を見出すべく研究を続けている。

(4) 月田教授の目指した「バリオロジー」と「パラセルラーパスウエー」の世界[111]

月田教授は 2004 年の国際会議の特別講演で“Barriology”という概念を提唱し、細胞間のタイトジャンクションは、細胞と細胞の間をつないで物質の透過を封鎖する「バリア」機能を持ち、クローディン・ファミリーがその“Key Player”であると位置づけている。

現在クローディン・ファミリーには 24 種類の蛋白質が知られているが、それぞれ単独でもタイトジャンクションストランドを形成できるのに、24 種類ものクローディンが存在する意味について、月田教授は、「その TJ に含まれるクローディンの種類と混合割合によって TJ ストランド間につくる“穴”の数と性質を変えて、TJ のバリア機能を巧みに調節している」という仮説を提出しており、それをサポートする論文がアメリカのグループなどからも発表されている。

上皮細胞において、細胞の内部を通して行われる物質輸送ルートの「トランスセルラーパスウエー：Transcellular pathway」のほかに、細胞間を通して行われる「パラセルラーパスウエー：Paracellular pathway」と呼ばれる物質輸送ルートがあることが前から予想されていたが、最近その実体がクローディンそのものであることがわかってきた。バリオロジーとパラセルラーパスウエーの 2 つの機能は相互に矛盾する機能であるが、タイトジャンクションの穴の大きさと性質を変えて物質の選択的透過性を制御するのに、24 種類のクローディン・ファミリー蛋白質や、SORST で新たに発見されたトリセルリンが重要な働きをしている。

また、SORST で梅田らは、TJ の裏打ち蛋白質である ZO-1,2 を欠く培養細胞では一見立派な上皮細胞が形成され、極性形成もまったく正常に見えるにもかかわらず、タイトジャンクションが存

在しないことを見出した。これがないとクローデインの重合が起こらず、クローデインの重合に裏打ち蛋白質が必須であることを示唆している。

このように、新しい知見が着々と蓄積されてきている状況において、バリオロジーとパラセルラーパスウェイの2つの機能をうまく調節している分子機構が今後の研究で詳細に解明されれば、タイトジャンクションと浮腫等の病態とのかかわり、脳血管障壁 (BBB) を選択的に透過させる薬剤投与方法の開発など、科学技術の新しい潮流に大きく貢献するものと期待される。

2.2. 研究成果はどのような形で応用に向けて発展したか

(1) アンフォルジン関連の研究

アンフォルジンをプリオン病の診断・治療法の開発に利用しようという試みが八谷如美らによってなされている。アンフォルジンは ERATO で八谷らが見出した蛋白質の高次構造を解きほぐすアンフォルディング活性を有する蛋白質であり、2004 年にその日本特許が成立している。現在、プリオン蛋白質の高感度分析法の試薬として利用するためのアンフォルジン製造法の検討が試薬会社と共同で進められている。

プリオン病は、ヒトおよび動物における一種の神経変異性疾患の呼称であり、クロイツフェルトヤコブ病(CJD)、牛の海綿状脳症(BSE)、羊のスクレイピー等もその中に含まれる。プリオン病は「正常型プリオン蛋白質」が間違った高次構造をもつ「異常感染型プリオン蛋白質」と相互作用して、正常型から異常型へ高次構造変換することで病原性のプリオンとなり、プリオン病が発症すると考えられている。

プリオン蛋白質の解析における一番の問題点は、「異常感染型プリオン蛋白質」の凝集体が不溶性であるために高次構造の解析や診断が困難なことである。八谷らは難溶性の蛋白質凝集体を ATP 存在下でアンフォルジンと反応させて可溶化して高感度に分析する方法を開発した(1.2.1.(2)アンフォルジンを用いた難溶性蛋白質凝集体の高感度分析法の開発 参照)。

アンフォルジンの製造法が開発されれば、アンフォルジンが試薬として広く用いられ、蛋白質凝集体の解析や、プリオンの高感度分析装置と組み合わせてプリオン病、さらにピック病、アルツハイマー病等の診断・病態解明・治療法の開発に利用される可能性がある。

(2) オルガネラソーターの開発

本プロジェクトでは、早稲田大学船津教授グループとの共同研究により、新規オルガネラソーターを開発し、特許を取得したが、この特許を用いて、タイテック (株) が申請した「マイクロシステムとゲルバルブを用いた分子・オルガネラソーターの開発」が JST の平成13年度独創的研究成果共同育成事業課題に採択された。その結果、このソーターシステムを試作し、生物試料を用いた評価として、蛍光標識した大腸菌を作成し、それを回収した生物試料の解析に影響するダメージがないことを確認した。今後は他の生物試料による評価と、システム安定性のための最適化の検討を実施していくとのことである。

(3) TUBG2 ノックアウトマウス

γ チュブリンの細胞分裂における働きの研究の一環として作製した TUBG2 ノックアウトマウスは、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託されている。このノックアウトマウスは遺伝的にパ

ーキンソン病を発症するモデル動物と言える。ヒトの TUBG2 遺伝子が存在する領域の変異で種々の協調運動異常をきたす遺伝病 (FTDP17; パーキンソニズムを伴う前頭葉側頭葉痴呆) があることが知られている。

(4)コンディショナル Odf2 ノックアウトマウス

SORST で作製されたコンディショナル Odf2 ノックアウトマウスは、ターゲット臓器での primary cilia の無形成を来し、primary cilia 形成不全によって引き起こされる多発性嚢胞腎、Bardet-Biedl syndrome などの病態解明につながるものと思われる。

(5)ショウジョウバエモデル

ERATO 終了後に JT 生命誌研究館で、研究を続けている小田広樹は、アドヘレンスジャンクションが蛍光を発するショウジョウバエモデルを作製し、現在、京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センターで維持・管理している。

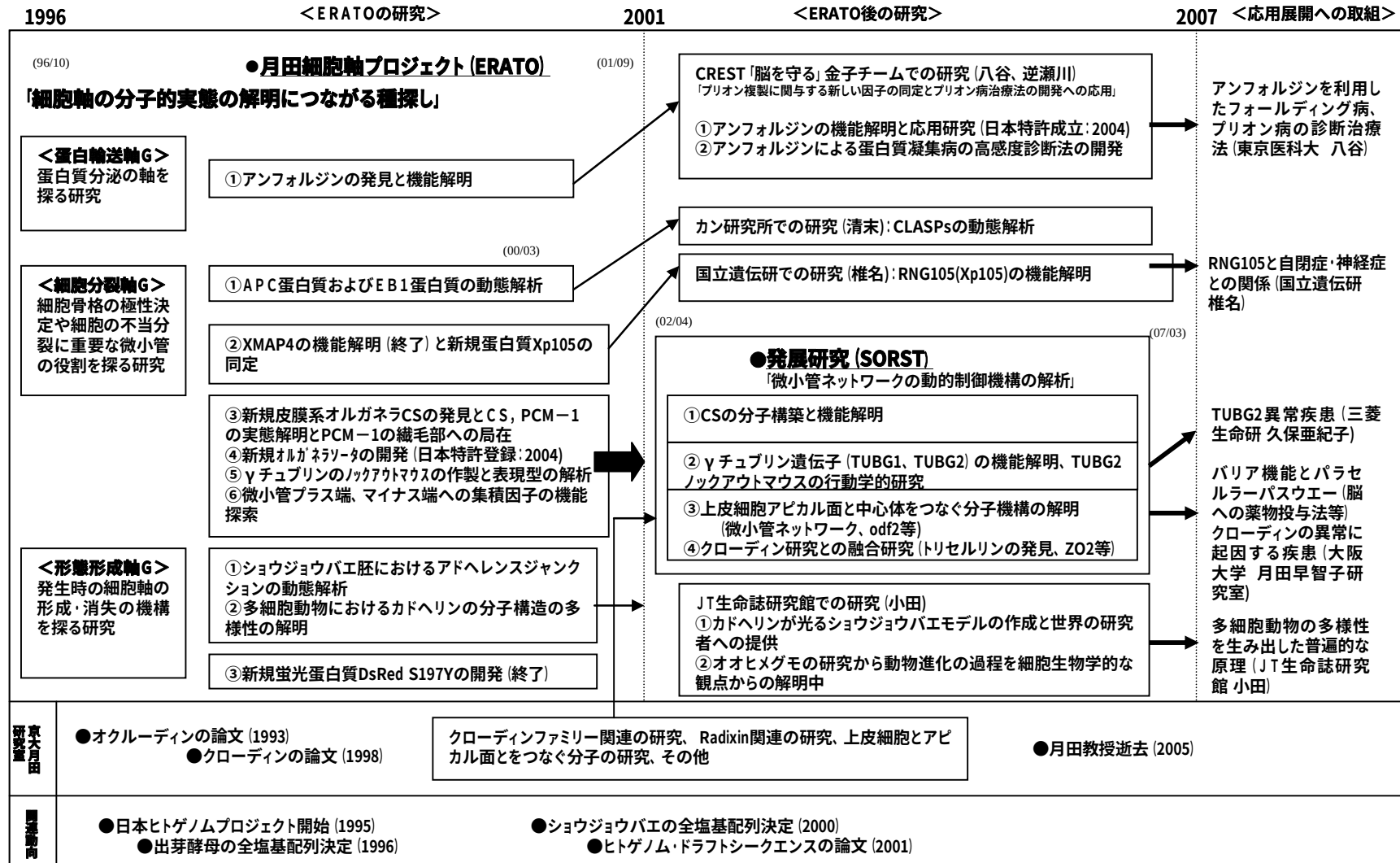
2.3. 人材育成の面から参加研究者の活動状況はどうか

本プロジェクトは、若い研究者を集めた新しい種探しのプロジェクトであったが、それぞれの研究者がその期待にこたえて、新しいポジションでその種を育てる研究で成果をあげている。

久保亮治はもともと皮膚科の臨床医であったが、ERATO の研究成果をもとにした「Centriolar Satellites 構成蛋白質の同定、ATP 依存性の中心体方向への運動と繊毛形成への関与の可能性」の学位論文で、2000 年 3 月 24 日に大阪大学から博士 (医学) 号を取得している。現在は、慶応大学医学部付属病院皮膚科助教として、患者の治療に当たるとともに、慶応大学のリサーチパークでアトピー性皮膚炎関連の新しい研究テーマに取り組んでいる。アトピー性皮膚炎は皮膚のバリア機能が弱いことが原因とされていて、クローデインの機能不全と密接な関係があるといわれている。ERATO や SORST で培った細胞生物学の知見から新しい発展が期待される。

3. フロー図

月田細胞軸プロジェクトのフロー図



4. 添付資料

4.1 受賞リスト

受賞者	受賞名	授賞機関名	受賞年月	受賞理由
月田承一郎	第15回井上学位賞	(財) 井上科学振興財団	1998年度	細胞間をシールする分子機構に関する研究
月田承一郎	マイエンブルグ賞(ドイツ)		2001年	
月田承一郎	上原賞	(財) 上原記念生命科学財団	2002年度	細胞間接着装置の分子構築に関する研究
月田承一郎	第11回日産科学賞	(財) 日産科学振興財団	2003年度	バリアーの分子生物学的研究: クローディン遺伝子群の解析
月田承一郎	日本学士院賞		2004年6月	上皮細胞間バリアーの分子基盤の解明
八谷如美	第31回内藤記念特定助成金	(財) 内藤記念科学振興財団	2002年度	新しい分子アンフォルジンの発見と機能解析
八谷如美	The First Prize for the poster presentation in the International Symposium of Prion Disease for Food and Drug Safety		2004年11月	
八谷如美	Keystone Symposium Scholarship Award	Keystone Symposia	2005年1月	Purification and characterization of a novel ATP-dependent robust protein-unfoldase, Unfoldin
八谷如美	公益信託今井きみ記念神経筋難病研究基金	公益信託今井きみ記念神経筋難病研究基金	2005年10月	分子シャペロン Unfoldinを用いた神経筋難病に対する診断・治療法の開発
八谷如美	(財)日本脳神経財団 一般研究助成	(財)日本脳神経財団	2005年12月	プリオン病発症機構の解明と治療法開発に関する研究

4.2 参考資料

4.2.1 月田細胞軸プロジェクト全般に関する主な参考資料

101. 評価委員「月田細胞軸プロジェクト中間評価報告書」(2000.05.12)
<http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/20000512-1/besshi2-4.html>
102. 月田承一郎「月田細胞軸プロジェクト終了報告」(2002.11.05)
<http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/20020930-2/prj4.html>
103. 評価委員「月田細胞軸プロジェクト事後評価報告書」(updated 2002.11.05)
<http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/20020930-2/02-prj4.html>
104. 科学技術振興機構 ERATO「終了プロジェクトの紹介: 月田細胞軸プロジェクト」

http://www.jst.go.jp/erato/project/ts_P/ts_P-j.html

105. 科学技術振興事業団 創造科学推進事業「月田細胞軸プロジェクト研究終了報告書」(Ⅰ)(Ⅱ) (2002.03)
106. 科学技術振興事業団「月田細胞軸プロジェクト シンポジウム要旨集」(2002.09.14)
107. 科学技術振興機構「研究課題別中間評価結果:微小管ネットワークの動的制御機構の解析」(2004)
http://www.jst.go.jp/kisoken/sorst/hyouka/2004/pdf_documents/2004c_08.pdf
108. 京都大学大学院医学研究科 分子細胞情報学 月田研究室ホームページ
<http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>
109. 月田承一郎「小さな小さなクローディン発見物語ー若い研究者へ遺すメッセージ」(羊土社) (2006)

4.2.2 アンフォルジンに関する主な参考資料

- 201 Amberg DC, et al. "Defining protein interactions with yeast actin in vivo" Nat. Struct.Biol. 2(1) 28-35 (1995) [PubMed Abstract]
- 202 Chelstwska A, et al. "Signalling between Mitochondria and the Nucleus Regulates the Expression of a New D-Lactate Dehydrogenase Activity in Yeast" Yeast 15(13) 1377-1391 (1999)
- 203 Flick Mj, et al. "Identification of putative mammalian D-lactate dehydrogenase enzymes" Biochem. Biophys. Res. Comm. 295(4) 910-916 (2002)
- 204 Hachiya NS, et al. "Interaction of d-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: implication for an alternative function of Dld2p." Biochem. Biophys.Res.Comm. 319(1) 78-82 (2004)
- 205 Hachiya NS, et al. "Oligomeric Aip2p/Dld2p forms a novel grapple-like structure and has an ATP-dependent F-actin conformation modifying activity in vitro." Biochem. Biophys. Res. Comm. 320(4) 1271-1276 (2004)
- 206 Hachiya NS, et al. "Oligomeric Aip2p/Dld2p modifies the protein conformation of both properly-folded and misfolded substrates in vitro." Biochem. Biophys.Res.Comm. 323(1) 339-344 (2004)
- 207 Hachiya NS, et al. "More than a 100-fold increase in immunoblot signals of laser - microdissected inclusion bodies with an excessive aggregation property by oligomeric actin interacting protein 2/d-lactate dehydrogenase protein 2." Anal. Biochem. 347(1) 106-11 (2005)
- 208 平成 15 年度戦略的創造研究推進事業 (公募型) チーム型研究(CREST タイプ)研究年報
「脳を守る」平成11年度採択研究代表者 金子清俊 「プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療法の開発への応用」
http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/report/heisei15/pdf/pdf16/16_2/003.pdf
- 209 研究課題別中間評価結果 金子清俊 「プリオン複製に関与する新しい因子の同定とプリオン病治療法の開発への応用」
http://www.jst.go.jp/kisoken/crest/eval/chukan/20030912/5_brain2/brain2_03.html
- 210 「異常プリオン解く分子 BSE 治療に期待」 日本経済新聞 2004 年 9 月 21 日(13 版)p34
- 211 八谷如美,「プリオン病解明へのアプローチ」 東京医科大学雑誌 64 (2) 113-122 (2006)
- 212 科学技術振興機構、特許第 3563366 号 (2004.06.11)「蛋白質高次構造に対してアンフォールド活性を有する蛋白質多量体」 発明者:逆瀬川如美、佐々木博之、月田承一郎

- 213 永田和宏監修 特集「階層別にみるタンパク質のフォールディングと品質管理: *in vitro* から細胞・個体レベルまで」細胞工学 23 (12) 1362-1399 (2004)

4.2.3 中心体、微小管関連の主な参考資料

301. 月田承一郎、米村重信、椎名伸之 岩波講座現代医学の基礎「分子・細胞の生物学Ⅱ」 p119-134 細胞骨格と細胞運動 (2000) (岩波書店)
302. 清末優子 「微小管ダイナミクスと配向を制御する分子機構」 実験医学 24 (13) (増刊)1883-1889 (2006)
303. 清末優子 「微小管プラス端集積因子(+TIPs)」 蛋白質 核酸 酵素 51 (6) 543-550 (2006)
304. 小谷亨、松島一幸、久永眞市 「微小管結合蛋白質の構造と機能」 蛋白質 核酸 酵素 51 (6) 535-542 (2006)
305. 清末優子 「バイオイメージング:生命機能の統合的理解に向けて」 Pharma VISION NEWS No.7 2-8 (Feb. 2006) 日本薬学会 薬学研究ビジョン部会
306. 宮脇敦史、「細胞内現象の時間的・空間的パターンを蛍光イメージングで解く」 実験医学 23 (2) 241-246 (2005)
307. Chalfie M, et al. "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science 263(5148) 802-805 (1994) [PubMed Abstract]
308. ERATO 月田細胞軸プロジェクト研究成果集「Centriolar Satellites は微小管依存性に輸送される新規非膜系オルガネラである」 http://www.jst.go.jp/erato/project/ts_P/ts_P/ts01.html
309. 科学技術振興機構 研究成果展開総合データベース (J-STORE)、久保亮治「中心体周辺物質の構成蛋白質の同定と中心子複製への関与」 http://jstore.jst.go.jp/cgi-bin/research/advanced/detail.cgi?data_id=1929
310. "Adenomatous Polyposis of the colon :APC" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=175100>
311. Su LK, et al. "APC binds to the novel protein EB1" Cancer Res. 55(14) 2972-2977 (1995) [PubMed Abstract]
312. Perez F, et al. "CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo." Cell 96(4) 517-527 (1999)
313. Mimori-Kiyosue Y, et al. "Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells." J Cell Biol. 148(3):505-18. (2000)
314. Mimori-Kiyosue Y, et al. "The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules" Curr Biol 10(14):865-8.(2000)
315. Mimori-Kiyosue Y, Tsukita S, "Where is APC going" J. Cell Biol. 154(6) 1105-1109 (2001) (Mini-Review)
316. Schuyler S.C. et al. "Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning" Cell 105(4) 421-424 (2001) (Review) [PubMed Abstract]
317. Kita K, et al. "Adenomatous Polyposis Coli on Microtubule Plus Ends in Cell Extensions Can Promote Microtubule Net Growth with or without EB1" Mol. Biol. Cell 17(5) 2331-2345 (2006)
318. Kubo A, et al. "Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward

- centrioles and possible involvement in ciliogenesis.” J Cell Biol. 147 (5) 969-80 (1999)
319. Kubo A, Tsukita S. “Non-membranous granular organelle consisting of PCM-1 : subcellular distribution and cell-cycle-dependent assembly/disassembly”. J. Cell Sci 116 (Pt5) 919-28 (2003)
320. Yuba-Kubo A, et al. “Gene knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice”. Dev Biol. 282(2) 361-73 (2005)
321. Shiina N, et al. “Mutations at phosphorylation sites of Xenopus microtubule-associated protein 4 affect its microtubule-binding ability and chromosome movement during mitosis” Mol Biol Cell 10(3) 597-608 (1999)
322. Shiina N, et al. “A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: Regulatory machinery for local translation.” J. Neurosci. 25, 4420-4434 (2005)
323. 椎名伸之、徳永万喜洋、「神経シナプス可塑性における局所的翻訳の制御機構」蛋白質 核酸 酵素 51 (8) 943-949 (2006)
324. Ishikawa H, et al. “Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia.” Nat Cell Biol 7(5) 517-524 (2005)
325. Nakagawa Y, et al. “Outerdense fiber 2 is a widespread centrosome scaffold component preferentially associated with mother centrioles: its identification from isolated centrosomes.” Mol Biol Cell 12(6) 1687-1697 (2001)
326. Mimori-Kiyosue Y, et al. “CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex.” J Cell Biol. 168(1) 141-53 (2005)
327. 東京大学分子細胞生物学研究所 高次構造研究分野研究室ホームページ 伊藤啓助教授、遠藤啓太 研究員 <http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/lab/staining2.html>

4.2.4 オルガネラソータに関する主な参考資料

401. Yamaguchi J et al. "Rapid functional analysis of protein-protein interactions by fluorescent C-terminal labeling and single-molecule imaging.", FEBS Lett 502(3):79-83. (2001)
402. Shirasaki Y, et al. On-chip cell sorting system using laser-induced heating of a thermoreversible gelation polymer to control flow. Anal Chem. 78(3):695-701.(2006) [PubMed Abstract]
403. 科学技術振興事業団、特許第 3628611 号 (2004.12.17) 「マイクロシステムにおける流れの制御方法」 発明者: 月田承一郎、船津高志、庄子習一
404. 科学技術振興機構 研究成果展開総合データベース (J-STORE) R030000185、船津高志、「細胞内情報伝達機構の 1 分子イメージング」
http://jstore.jst.go.jp/cgi-bin/research/advanced/detail.cgi?data_id=2491

4.2.5 クローデインとの融合研究関連の主な参考資料

501. 「上皮細胞間バリア形成と物質透過制御メカニズムを分子レベルで解明」 科学技術振興機構報 第 324 号 (2006.08.25) <http://www.jst.go.jp/pr/info/info324/index.html>

502. Umeda K, et al. "Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1." *J Biol Chem*. 279(43) 44785-94 (2004). Epub 2004 Jul 30.
503. Umeda K, et al. "ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation." *Cell*. 126(4) 741-754 (2006). [PubMed Abstract]
504. Ikenouchi J, et al. "Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells." *J Cell Biol*. 171(6):939-45. (2005)
505. 池ノ内順一、古瀬幹夫、月田承一郎 「タイトジャンクションを構成する膜蛋白質の最近の話題」 *実験医学* 24(13)(増刊) 1984-1990 (2006)
506. Asano A. et al. "Claudins in *Caenorhabditis elegans*: Their Distribution and Barrier Function in the Epithelium" *Curr Biol* 13 1042-1049 (2003)

4.2.6 形態形成軸 G 関連の主な参考資料

601. 生命誌研究館 小田広樹ホームページ <http://www.brh.co.jp/kenkyu/labo04/>
602. 小田康子、小田広樹、「なぜ今、クモなのか？ 胚発生が描く進化の道すじ」 *生命誌ジャーナル* 42 号, 2004 年秋 http://www.brh.co.jp/seimeishi/journal/42/research_21.html
603. 小田広樹、「ジャンクションの多様性と進化」
<http://www.brh.co.jp/kenkyu/5-oda.private/hp2/junction.htm>
604. 小田広樹、秋山(小田)康子、「ショウジョウバエ初期胚における上皮細胞極性と非対称分裂」 *細胞工学* 19 (12) 1757-1762 (2000)
605. 宮脇敦史、「蛍光イメージング革命：第17回 蛍光蛋白質ナビ(その1)」 *細胞工学* 24 (3) 277-279 (2005)
606. Oda H, et al. "Dynamic behavior of the Cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation" *Dev Biol* 203(2) 435-450 (1998)
607. Oda H, et al. "Dynamic feature of adherence junctions during *Drosophila* embryonic epithelial morphogenesis revealed by a Δ catenin-GFP fusion protein." *Dev Genet Evol* 209(4) 218-225 (1999)
608. Oda H, et al. "Nonchordate classic cadherin have a structurally and functionally unique domain that is absent from chordate classic cadherins." *Dev Biol* 216(1) 406-422 (1999)
609. Akiyama-Oda Y, et al. "Mechanism of glia-neuron cell-fate switch in the *Drosophila* thoracic neuroblast 6-4 lineage" *Development* 127(16) 3513-3522 (2000) [PubMed Abstract]
610. Akiyama-Oda Y, et al. "Distinct mechanisms triggering glial differentiation in *Drosophila* thoracic and abdominal neuroblasts 6-4" *Dev Biol* 222(2) 429-439 (2000) [PubMed Abstract]
611. Verkhusha VV, et al. "Actin dynamics in lamellipodia of migrating border cells in the *Drosophila* ovary revealed by a GFP-actin fusion protein" *FEBS Lett* 445(2-3) 395-401 (1999)
612. Verkhusha VV, et al. "An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation" *J Biol Chem* 276(32) 29621-29624 (2001)
613. 小田広樹 「細胞接着分子の進化—ナメクジウオの特殊性から普遍性を知る」 *月刊海洋/号外* No. 41 157-164 (