

戦略的創造研究推進事業  
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題  
「微小管ネットワークの動的制御機構の  
解析」

研究期間：平成14年 4月 1日～  
平成19年 3月31日

月田 承一郎  
（京都大学、教授）  
代行 月田 早智子  
（京都大学、教授）

## 1. 研究課題名

微小管ネットワークの動的制御機構の解析

## 2. 研究実施の概要

### 【背景及び基本構想】

我々は、平成8年10月から平成13年9月まで、ERATO「月田細胞軸プロジェクト」において、細胞の極性形成の基本となるメカニズムに関して研究を行ってきた。このプロジェクトは、3つのグループを柱として遂行され、それぞれに大きな成果を得ることができたが、とりわけ微小管を中心に研究を行った SORST「細胞分裂軸グループ」から、極めてユニークな、将来の発展が期待できる研究成果が生まれた。本基礎的研究発展事業は、この部分、すなわち「細胞分裂軸グループ」によってもたらされた成果を大きく発展させることを目的にして計画された。

微小管は、細胞骨格を構成する主要な線維状構造物である。微小管については古くから研究が行われており、細胞の分裂、運動、形態形成等に重要な役割を果たす構造であることが知られていた。我々のプロジェクトでは細胞内の微小管ネットワーク全体の極性をもった形態形成を制御する分子メカニズムを知ることに焦点を絞って研究を開始した。すなわち、微小管はそのマイナス端で中心体に結合しており、そのプラス端を細胞膜側に向けているので、その両端における制御機構を調べようとしたのである。マイナス端側に関しては、中心体付近に集積し、中心体の複製等に重要な役割を果たしていると思われる、全く新しいオルガネラ ” Centriolar Satellite (CS)” の構成成分と機能を明らかにすることを、本発展事業の第一の目標とした。一方で、マイナス端側の重要な因子であるガンマチューブリンの解析も進めてきた。哺乳動物に2種類のガンマチューブリンが存在することを初めて明らかにし、それぞれのノックアウトマウスの作製を目指した。このユニークなマウスの系を用いてガンマチューブリンの機能を明らかにすることを本発展事業の第二の目標とした。さらに、我々は上皮細胞から中心体を単離することに成功した。上皮細胞の極性形成機構の理解の一端として、この単離中心体を用いて上皮細胞のアピカル膜と中心体を結びつける機構に迫ることを本発展事業の第三の目標とした。

プラス端側に関しても、大きな成果を得ることができた。微小管のプラス端と細胞膜の間に存在する蛋白質を追求する過程で、癌抑制遺伝子産物APCが微小管上をプラス端へ向かって運ばれ、プラス端に粒状に溜まることを「月田細胞軸プロジェクト」で見出した。その後、我々はAPCに結合する蛋白質としてEB1と呼ばれる蛋白質に注目し、この蛋白質が微小管と細胞膜の相互作用において重要な役割を果たすことを示してきた。我々は純粋に微小管の動態の観察から独自の考えでこのような研究を展開してきたが、全く異なった視点からいくつかのグループが微小管のプラス端の研究を同時に開始し

ており、この数年の間に全く新しい研究分野が急速に成長しつつある感がある。多くの情報が生まれ若干混乱している現状を、我々独自のGFP(green fluorescent protein)を用いた高分解能観察と分子生物学的手法を組み合わせることにより整理し、微小管プラス端の分子生物学を大きく発展させることを本発展事業の第四の目標とした。最終的にこれらの微小管研究を上皮細胞の細胞極性形成という観点から、もともと京都大学で行ってきたクローディンを中心とした研究と結びつけていくことを本発展事業の第五の目標とした。

#### 【実施・研究成果】

微小管ネットワークの動的制御機構の解析を進めるために、微小管のマイナス端とプラス端の2つに研究を分けて進める。

微小管のプラス端とマイナス端でとりおこなわれる事象は、それぞれに特化したものであるように思われる。一見すると関連していない事象のように思われる微小管両端で引き起こされる事象は、微小管という共通項により、細胞内で十分に時空間的にオーガナイズされた重要な事象になっていると思われる。その関連性に十分留意しつつ、下記の研究課題を遂行した。

#### (1) マイナス端研究グループ

##### 研究項目Ⅰ：Centriolar Satelliteの分子構築と機能の解明

(担当：久保亮治)

ここで注目するのは、細胞軸プロジェクトで我々が見出した新規非膜系オルガネラ Centriolar Satellites (CS) である。その構成成分として我々が同定したPCM-1を用いて、気管の繊毛上皮細胞の中心体の同時多発的な複製に先立って、CSが細胞質内に大量に出現する事を示した。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、現在までに2つの新規蛋白質を同定している。

##### 研究項目Ⅱ： $\gamma$ チューブリンの機能の解明 (担当：久保亮治)

ここで注目するのは $\gamma$ チューブリン( $\gamma$ -tubulin)である。我々は細胞軸プロジェクトにおいて哺乳動物では2種類の $\gamma$ チューブリンが存在することを初めて見出したので、それぞれの $\gamma$ チューブリン(TUBG1とTUBG2)の機能を明らかにすることを目指し、それぞれのノックアウトマウスを作製し解析してきた。

I型の $\gamma$ チューブリン(TUBG1)ノックアウトマウスは、blastocyst期までに紡錘体形成に異常をきたし、胎性致死となることを明らかにした。

II型の $\gamma$ チューブリンは、脳に限局して発現しており、TUBG2ノックアウトマウスは

正常に発生し、雌雄ともに繁殖可能であったが、遺伝的にパーキンソン病を発症するモデルマウスと言えるようであった。

#### 研究項目Ⅲ：上皮細胞のアピカル膜と中心体を繋ぐ分子機構の解明

(担当：月田早智子、田村淳)

我々は、数年前に、ニワトリの肝臓から単離した毛細胆管画分に、アピカル膜に結合した状態の中心体が濃縮していることに気付き、中心体をさらに濃縮することに成功した。この画分に濃縮する蛋白質として、精子outer dense fiberの構成成分のひとつであるOdf2を見出した。初めに、マウスF9テラトカルチノーマ細胞においてOdf2ノックアウト細胞を確立したところ間期にprimary ciliaが生えなくなっていた。そこで、Odf2のノックアウトマウスの作製をおこなってみると、conventionalノックアウトマウスの作製のためのキメラマウスは不妊であると思えた。同時に、conditionalノックアウトの系の確立を進めた。Conditionalノックアウトマウスの解析により、長いこと謎であった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の形成不全により引き起こされる病態の解明につながると思われる。

#### 研究項目Ⅳ：TMF (TATA element modulatory factor) の機能の解明

(担当：久保亮治)

我々は、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事で新規微小管マイナス端蛋白質の探索を行ってきた。その過程で同定されたTMF蛋白質は中心体ではなくゴルジ体に局在する蛋白質であった。ゴルジ体は中心体付近に局在しその形態形成および細胞内局在には微小管との相互作用が大きな役割を担っているが、その分子的基盤はほとんど不明である。培養細胞における、蛍光染色やRNAiを用いた解析から、TMFは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。

### **(2) プラス端研究グループ**

細胞軸形成における微小管のプラス端の重要性は上述した通りである。このプラス端の機能についてユニークな解析を進めたい。

#### 研究項目Ⅴ：プラス端capture siteの解明

(担当：月田承一郎 代行・月田早智子)

我々は、先の細胞軸プロジェクトにおいて、GFPテクノロジーを駆使することにより、APCさらにはEB1の微小管プラス端における、これまで想像もされていなかったようなダイナミックな不思議な挙動をビデオ像として可視化し、世界に示すこと

ができた。本研究課題において、微小管のプラス端に結合する数種のTIPsのうち、局在的特徴からCLASPsが微小管の局所安定化に重要である可能性が推測されたため、HeLa細胞を用いたRNAi干渉法により、CLASPsの機能解析を行った。CLASPsをロ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を得られず、分裂の進行が停止すると考えられた。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。

#### 研究項目VI：クローディンを中心とした接着研究との融合

(担当：月田承一郎 代行・月田早智子、梅田一彰)

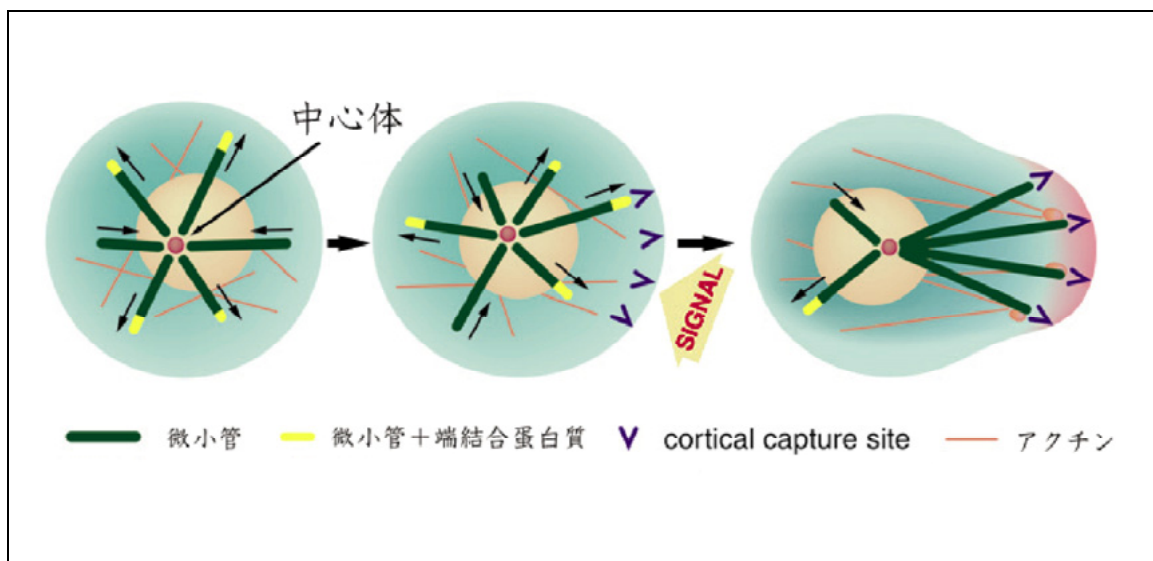
上皮細胞の極性形成において、微小管のプラス端がcaptureされる側の構造として、タイトジャンクション (TJ) を含むjunctional complexがある。このTJは、我々が初めて同定に成功したクローディンと呼ばれる一群の接着分子とその裏打ち蛋白質によって形成されている。したがって、上皮極性形成時には、微小管のプラス端が、このjunctional complexの裏側を探ってcaptureされるというステップがきわめて重要であると考えられる。このcapture過程にかかわるTJをはじめとしたジャンクションの構成蛋白質の機能解析を進めていくことにより、これまでの我々の微小管研究と細胞接着研究の接点を探りたい。ここでは、新規TJ構成蛋白質としてトリセルリンの同定を行った。また、Z0-1ロックアウトZ0-2ロックダウン培養上皮細胞を確立した。この細胞では、アドヘレンスジャンクションが形成されるが、TJの形成が認められなかった。Z0-1ロックアウトZ0-2ロックダウン細胞はTJの構築原理を明らかにする上で有用な細胞であると思われた。

### 3. 研究構想

我々のERATOプロジェクトの最も大きな目標は、細胞の極性形成の時に必要となる普遍的な「軸」は何かを探し求めるものであった。3つのグループで行った研究のうち、「細胞分裂軸グループ」の成果が最も際立っていたが、それはとりもなおさず、このグループの成果が「細胞軸とは何か？」という本質的疑問に近づくものであったということの意味している。すなわち、微小管ネットワークの動的な形態形成が、細胞軸決定の中で中心的役割を果たすものであり、そのネットワークの動的制御機構の理解が「細胞軸の本質」に迫るものであるということが明らかになってきたのである。この微小管ネットワークの構築は比較的単純で、まず、大部分の微小管は中心体と呼ばれる構造にそのマイナス

端を向けて放射状に生え出ている（下図）。一方、プラス端は細胞膜の方へ向いており、dynamic instabilityと呼ばれる、伸びたり縮んだりを繰り返す独特の挙動を示す。この挙動により微小管は細胞膜の裏側を探っていると考えられるのである。そして細胞外から位置情報（図中のSignal）が来ると、その細胞膜の裏側に、微小管のプラス端（および、伸びるフェーズのプラス端だけに結合しているEB1のような蛋白質；図中の黄色い点）と特異的に結合する蛋白質が集合し、その結合が起ると微小管が安定化し、中心体の位置が決められ、細胞の軸が決定されていくという考えである。

一方、京都大学の我々の研究室では、クローディンを中心とした細胞間の接着の解析を進めてきた。細胞の極性形成においては、この細胞間接着は上述したところの「細胞外から位置情報」（図中のSignal）に相当する。本発展研究は、我々がプロジェクトで進めてきた「微小管ネットワークの動的制御機構にかかわる研究成果」を、このような「細胞接着による位置情報の研究」と直接融合させることを最終的な目的とした。



#### 4. 研究実施内容

##### 4.1. 研究項目 I : Centriolar Satelliteの分子構築と機能の解明

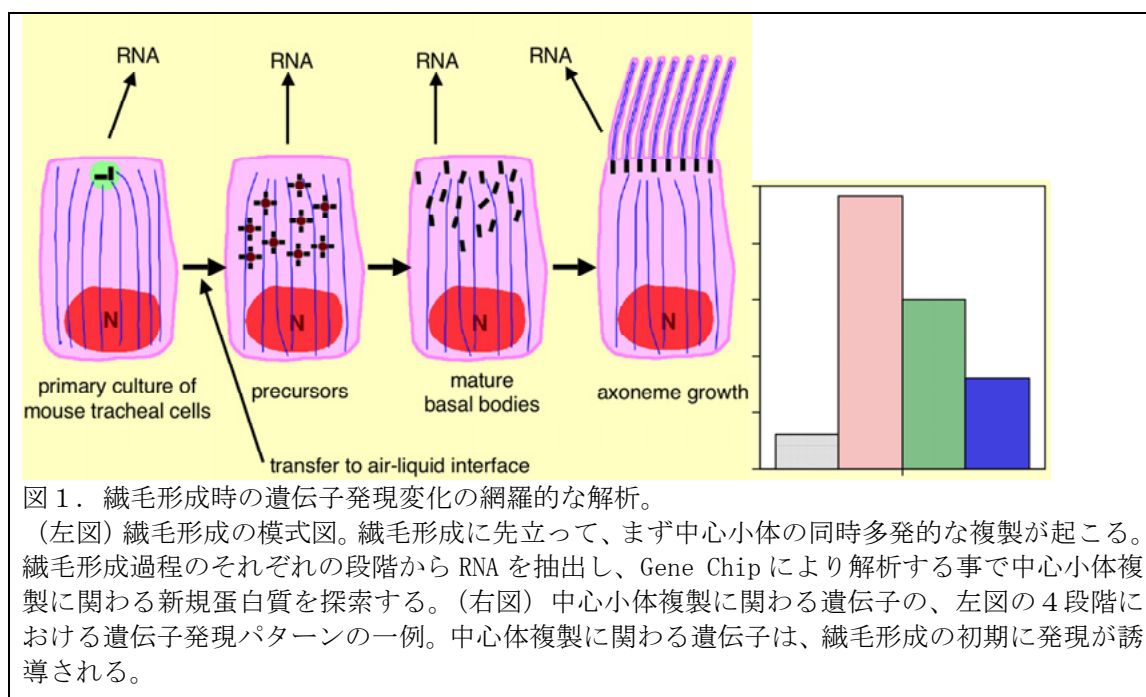
(マイナス端研究グループ (担当：久保亮治))

##### (1)実施の内容

ここで注目しているのは、細胞軸プロジェクトで我々が見出した新規非膜系オルガネラ Centriolar Satellites (CS) である。このCSは、その細胞内での分布や挙動、さらには繊毛再生時における挙動などの観察から、中心体複製・成熟において重要

な役割を果たしていると推察される。現代の細胞生物学において、このような新しくかつ普遍的なオルガネラが発見されること自体もはや珍しいことである。PCM-1と呼ばれる蛋白質がこの構造に含まれていることは分かっているが、それ以外の構成成分に関してはよく分かっていない。PCM-1を中心として解析を進めることにより、CSの分子構築と機能にアプローチすることを目指していた。

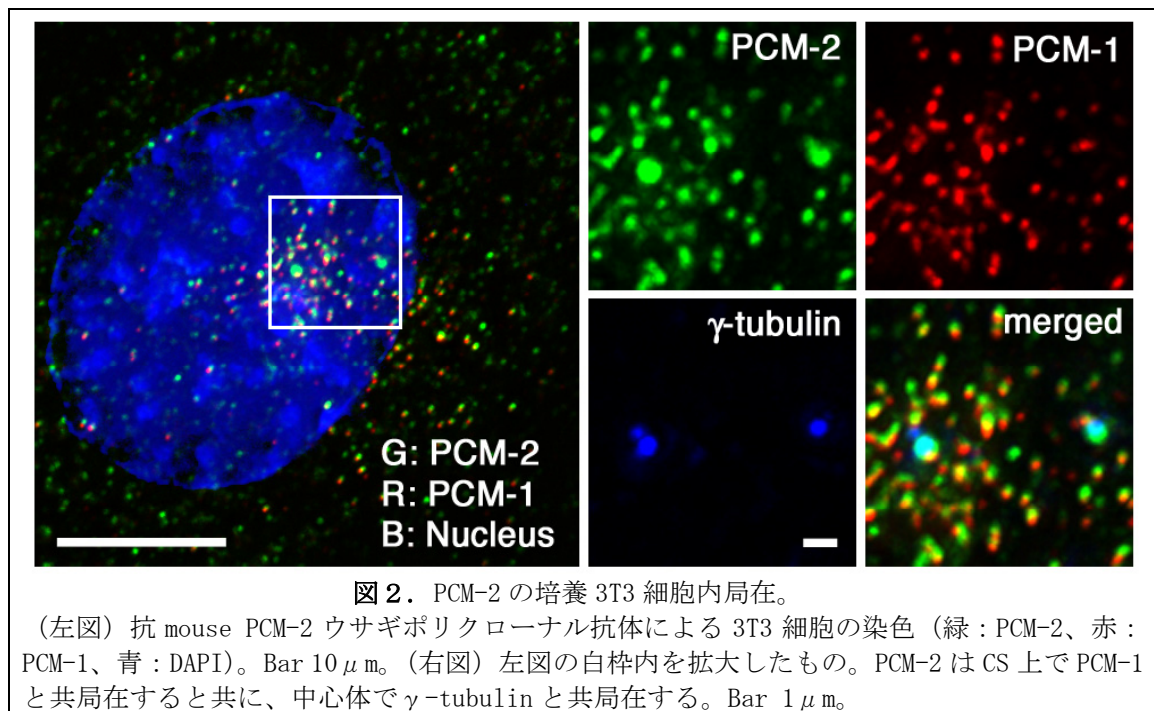
これに関連して、SORSTのプロジェクトは、繊毛形成に先立って起こる中心体からの中心小体の同時多発的複製に先立って、CSが細胞質内に大量に出現する事に注目した。SORSTのプロジェクトにおいては、まずマウスの気管を用いた繊毛細胞の初代培養系を確立し、その初代培養細胞に繊毛形成を誘発した時の遺伝子発現変化を解析した。中心体の複製・成熟に関わると考えられるCSの構成成分であるPCM-1の遺伝子発現変化を調べたところ、繊毛形成の初期に強い発現誘導がかかる事がわかった。そこで、繊毛形成時の遺伝子発現変化をGene Chipを用いて経時的網羅的に解析し、PCM-1と同じ発現変化パターンを辿る遺伝子を探索した（図1）。



## （2）得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

この手法を用いて、現在までに2つの新規蛋白質を同定している。1つは中心体とCSの双方に局在する新規蛋白質であり、我々は仮にPCM-2と命名している。PCM-2はそのN末側にCSへの局在シグナルを、C末側に中心体への局在シグナルを持っており、PCM-2をRNAiによってノックダウンするとPCM-1のCSの染色が消失する事と、PCM-1のノックダウンと同じフェノタイプ（母中心小体のdistal appendageからnineinの染色が消失する）を示す事から、PCM-2はCSの新規構成蛋白であると考えられた（図2）。つまり我々

は細胞軸プロジェクトにおいてCSの構成蛋白として初めてPCM-1を発見し、SORSTのプロジェクトにおいて2つ目の構成蛋白PCM-2を発見した事になる。繊毛上皮



においてPCM-2は、中心小体複製前はPCM-1とCS上に共局在し、中心小体が形成されると中心小体にも局在するようになる。基底小体（繊毛の根元にある状態の中心小体）でのPCM-2の染色が $\gamma$ チューブリンの染色よりbasal側に位置していることから、PCM-2は中心小体のproximal側に存在する蛋白である事が予想された（図3）。PCM-1は現在、精神分裂病発症の原因遺伝子の1つとして注目され始めており、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予定である。

もう1つの新規蛋白は繊毛の先端に局在する蛋白で、我々は仮にSentanと命名している。Sentanはmotile ciliaを持つ細胞にのみ発現しており、motile ciliaの先端に局在する蛋白は現在まで報告が無く、Sentanが初めてのものである。繊毛のaxonemeを構成する微小管は有名な9 + 2構造を取っており、繊毛先端付近において外側のdoublet microtubuleの2本の管のうち1本が先に途切れ、残る1本が繊毛“lateral spokes”と呼ばれる構造が存在する事が報告されており、Sentanは“lateral spokes”の構成蛋白であると考えられた。GFP-Sentanにより繊毛先端をラベルする事は、繊毛先端の動きを可視化するツールとして有用であると考えられる。



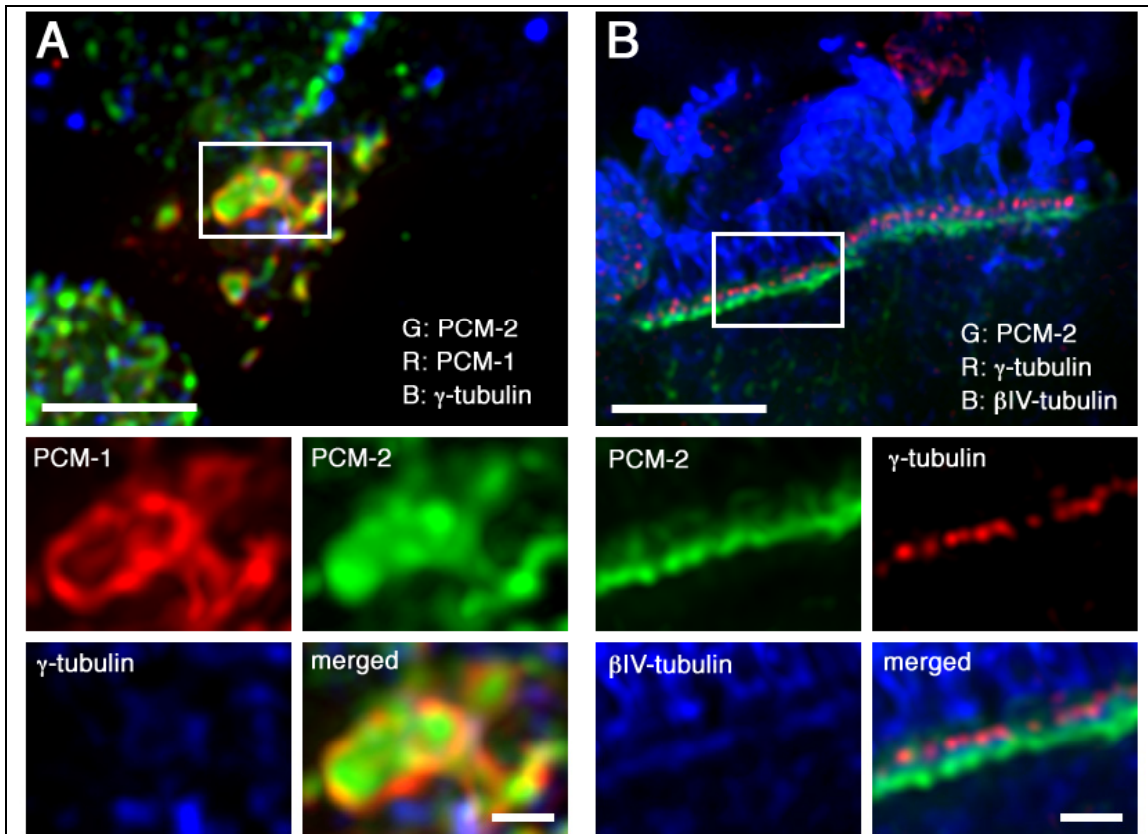


図 3. PCM-2 の繊毛細胞内局在。

抗 mouse PCM-2 ウサギポリクローナル抗体によるマウス気管繊毛上皮細胞の染色。(図A) 繊毛形成前の中心体同時多発複製期の細胞 (白枠内) では、PCM-2 は PCM-1 と CS 上で共局在する (緑: PCM-2、赤: PCM-1、青:  $\gamma$ -tubulin)。Bars, 上  $5\mu\text{m}$ 、下  $2\mu\text{m}$ 。(図B) 繊毛成熟後の細胞では、PCM-2 は、 $\gamma$ -tubulin によって示される基底小体の proximal 側 (細胞の極性で言えば basal 側) に局在する (緑: PCM-2、赤:  $\gamma$ -tubulin、青:  $\beta$  IV-tubulin)。

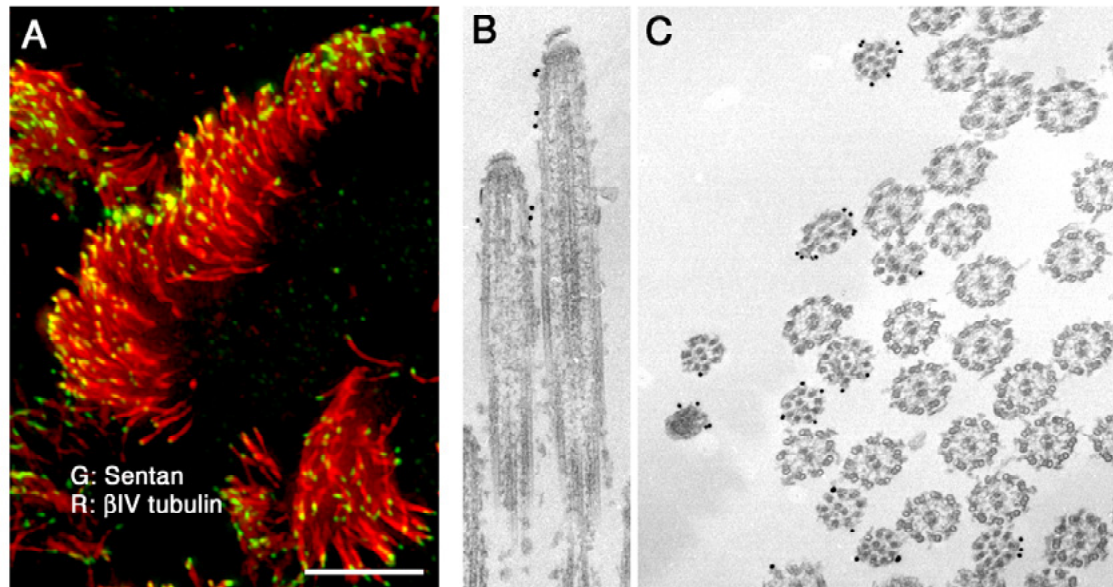


図 4. Sentan は motile cilia の先端に局在する。

(図A)。気管繊毛上皮を蛍光免疫染色。緑; Sentan、赤:  $\beta$  IV-tubulin。Sentan は繊毛の先端に局在する。Bar  $10\mu\text{m}$ 。(図B, C) マウス気管繊毛の Sentan の免疫電顕像。Sentan は cilia 先端付近で 1 本になった外側の微小管の細胞膜側に局在するが、先端付近以外の 2 本組の外側微小管には局在しない。

#### 4.2, 研究項目Ⅱ： $\gamma$ チューブリンの機能の解明

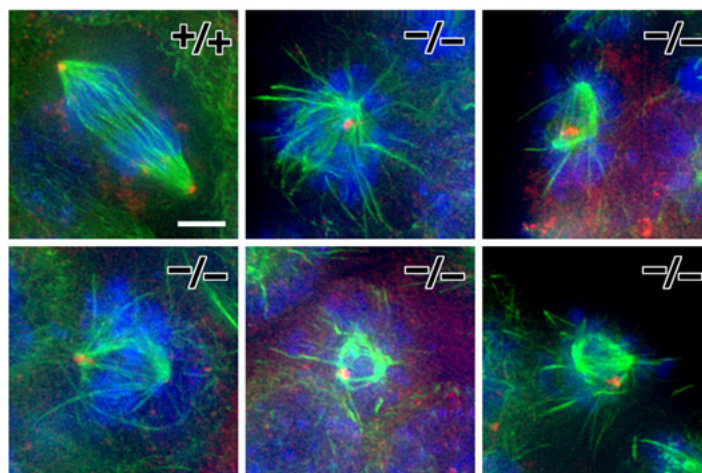
(マイナス端研究グループ (担当：久保亮治))

##### (1) 実施の内容

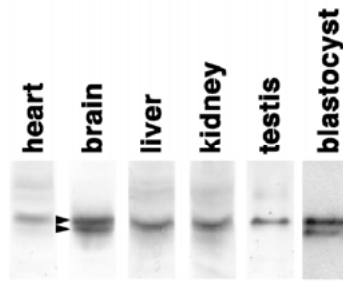
ここで注目しているのは $\gamma$ チューブリンである。 $\gamma$ チューブリンは中心体の周辺での微小管の重合によって本質的な蛋白質であることは良く知られているが、不思議なことに細胞や個体におけるその機能解析は進んでいない。我々は細胞軸プロジェクトにおいて哺乳動物では2種類の $\gamma$ チューブリンが存在することを初めて見出したので、それぞれの $\gamma$ チューブリン (TUBG1とTUBG2) の機能を明らかにすることを目指し、それぞれのノックアウトマウスを作製し解析してきた。

##### (2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

I型の $\gamma$ チューブリン (TUBG1) ノックアウトマウスは、blastocyst期までに紡錘体形成に異常をきたし、胎性致死となることを明らかにした (図A)。II型のガンマチューブリン (TUBG2) は、脳に限局して発現しており (図B)、TUBG2ノックアウトマウスは正常に発生し、雌雄ともに繁殖可能であったが、このTUBG2ノックアウトマウスは耳のパンチングの時の逃避反応や行動の俊敏性に異常があると感じられた。そこでTUBG2ノックアウトマウスの詳細な行動テストを行った。兄弟の野生型マウスを用いて同様のテストを行い、統計によりスコアを比較した。TUBG2ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて、協調運動能力が有意に劣っていることが分かった。筋力や歩行速度など、他の運動機能や活動量を測定するテスト、さらに記憶学習のテストにおいては有意な差は認められなかったので、TUBG2ノックアウトマウスは、より複雑な協調運動を要求される状況において、野生型より運動能力が劣っていることが示された (図C)。

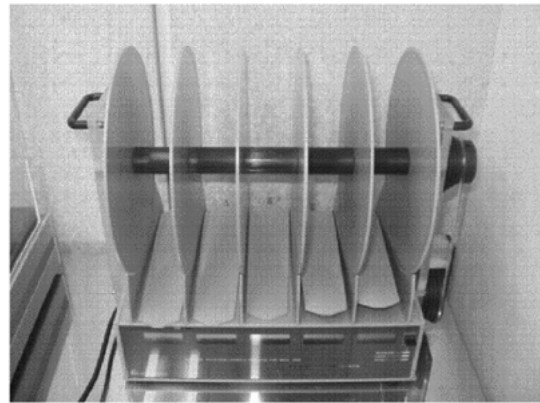
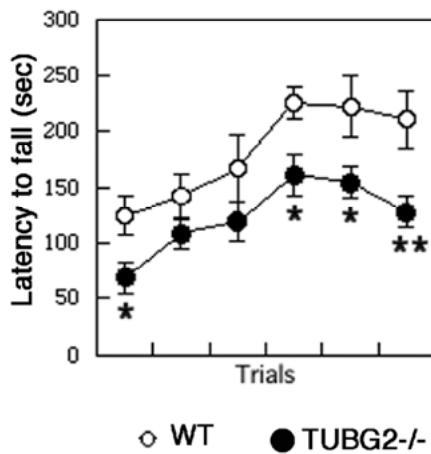


図A Green:  $\alpha$ -tubulin, Red: pericentrin, Blue: DAPI (E4.5胚の染色)



図B Western Blot anti- $\gamma$ -tubulin mAb (GTU-88 SIGMA)

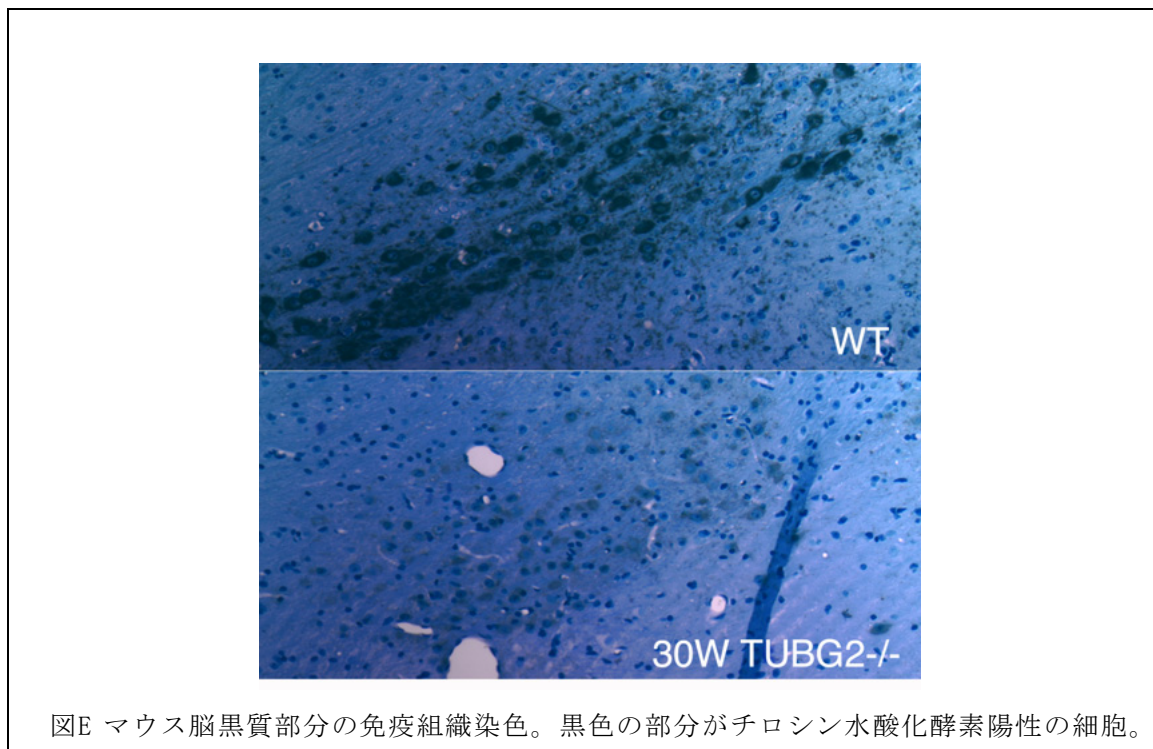
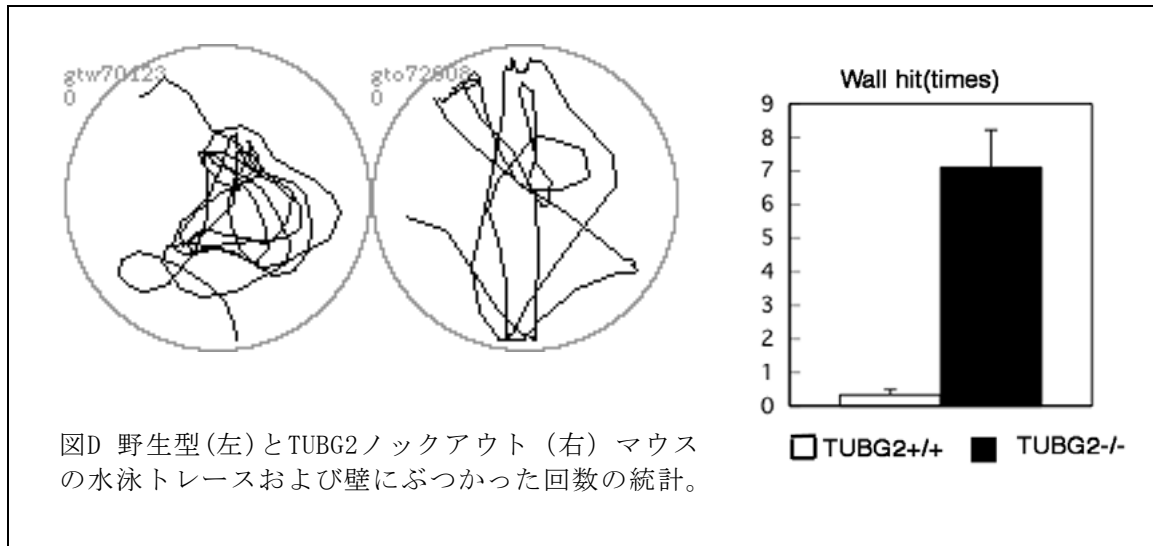
upper; TUBG1 lower; TUBG2



図C ロータロッドテストによる落下時間の比較。TUBG2ノックアウトマウスは野生型と比較して、 $P=0.0026$ で有意に早く装置から落下する。

また、モリスの水迷路試験を行うための水槽で水泳訓練を行ったが、その際、野生型マウスは壁に衝突することなく方向転換して、水面下のプラットフォームに泳ぎ着くことができたが、TUBG2ノックアウトマウスは泳ぎながら方向転換することができずにまっすぐ泳ぎ、何度も壁に衝突してしまい、プラットフォームに泳ぎ着くことができたのはまれであった (図D)。

これらの運動における表現型は、人間のパーキンソン病で観察される緩慢歩行や、前方突進現象に似ており、疾病との関係が示唆された。ヒトのパーキンソン病では黒質のドーパミン産生ニューロンが減少し、ドーパミンの生合成量が減ることが原因とされているが、TUBG2ノックアウトマウスではどのようなものであるか調べるため、野生型とTUBG2ノックアウトマウスの脳のパラフィン切片をドーパミンの生合成酵素であるチロシン水酸化酵素の抗体をもちいて免疫染色法で検出したところ、TUBG2ノックアウトマウスでは、野生型に比べて明らかにシグナルが減少し、ドーパミン産生ニューロン



が減少していることが示唆された。これらのことから、TUBG2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マウスモデルと言える(図E)。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(FTDP17: パーキンソニズムを伴う前頭葉側頭葉痴呆)があることも報告されている。



#### 4.3. 研究項目Ⅲ：上皮細胞のアピカル膜と中心体を繋ぐ分子機構の解明

(マイナス端研究グループ（担当：月田早智子、田村淳））

##### (1)実施の内容

我々は、数年前に、ニワトリの肝臓から単離した毛細胆管分画に、アピカル膜に結合した状態の中心体が濃縮していることに気づき、この分画から中心体をさらに濃縮することに成功した（図1：電子顕微鏡像）。そして中心体分画に濃縮する蛋白質を同定し、遺伝子クローニングを行った結果、精子のouterdense fiberの構成成分の一つであるOdf2であることを見出した。その後、このOdf2が、2個のcentrioleのうちmother centrioleのみに存在し、さらにそのcentrioleの一方の端(distal appendage)に濃縮することに気づいた。mother centrioleは多くの細胞で、その間期に細胞膜直下に移動しprimary ciliaを形成する。このprimary

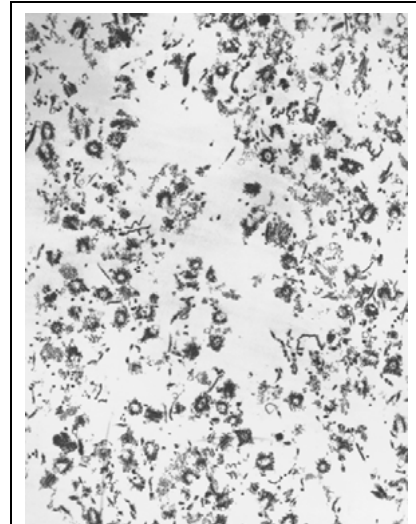


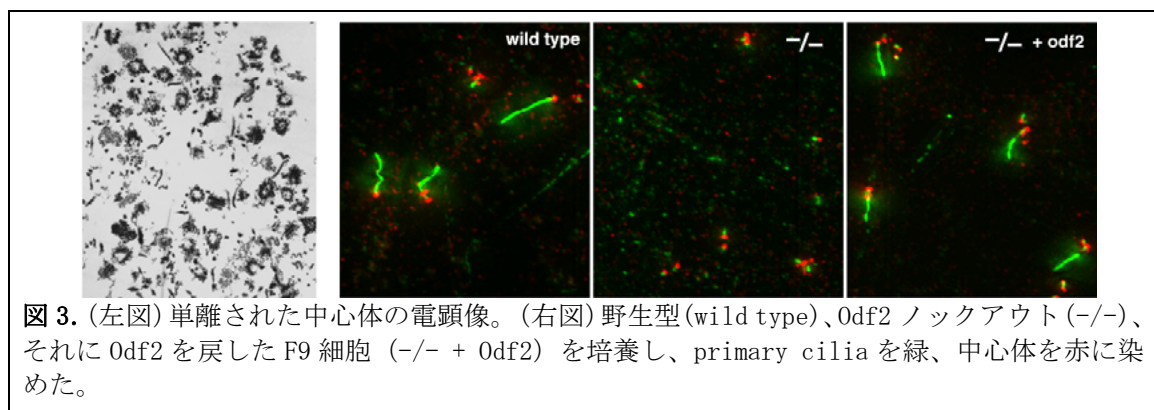
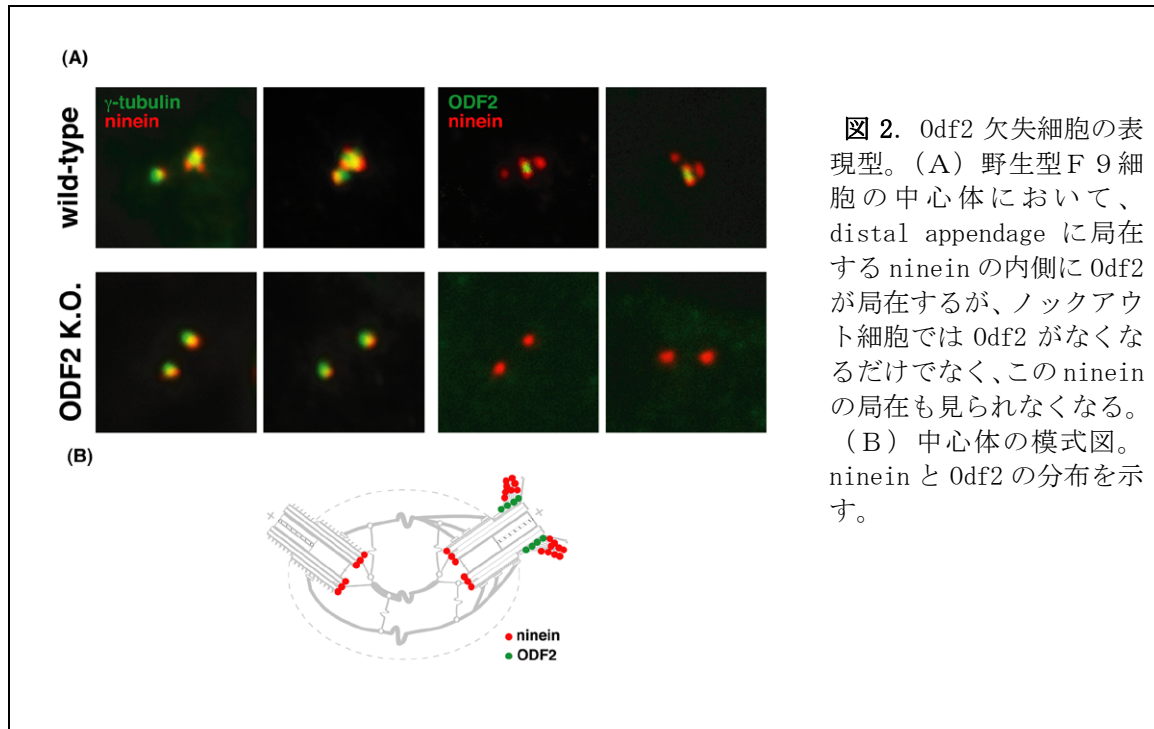
図1.中心体濃縮分画の超薄切片電子顕微鏡像

ciliaは、古くから知られており、最近、種々の重要な生理機能を担っているとして注目を集めている。しかしどのようにしてmother centrioleが細胞膜と結合するのか等不明な点も多い。我々は、その分布からOdf2がcentrioleと細胞膜の結合にかかわっているのではないかと想定した。

##### (2)得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

最初にOdf2を発現していない細胞を樹立することを試みた。我々の研究室では、マウスF9テラトカルチノーマ細胞において、種々の遺伝子を相同組み換えにより、比較的簡単にノックアウトできるようになってきていたので、この手法を用いることにした。基本的には、一度目のターゲッティングを行った後、薬剤耐性をCre-loxPシステムを用いて除き、再び同じターゲッティングベクターと同じ薬剤を用いて2度目のノックアウトを行うというノックアウトストラテジーで実験を進めた。その結果、Odf2の発現を欠いたF9細胞の複数の独立した株を得ることに成功した。これらの細胞は中心体複製を含む細胞周期等には全く異常はなかったが、1)中心体と細胞膜の相互作用が明らかに異常なように見え、2)間期にprimary ciliaが生えなくなっていた。このようにprimary ciliaの形成のみを人為的に操作する手法は初めてである。そこで、Odf2のノックアウトマウスの作製をおこなってみると、conventionalノックアウトマウスの作製のためのキメラマウスは不妊であると思えた。現在解析中である。同時に、マウス発生の任意の時期に、任意の場所でprimary cilia形成を阻害する系を作る目的のために、conditionalノックアウトの系を確立するためのtargeting vectorの作製を行い、さらにキメラマウ

スの作製を行い、現在、F1世代ヘテロマウスが得られている。このconditionalノックアウトマウスの解析により、primary ciliaの機能について深い理解が得られるとともに、primary ciliaの形成不全により引き起こされる病態の解明につながると思われる。



プライマリーシリアの異常は、多発性嚢胞腎(PKD)などの嚢胞性疾患を初めとする疾患に関与することが知られている。また最近では、成長因子などの受容体が濃縮して存在し、シグナル伝達の舞台になることも示されつつある。しかし、これらの多くは、プライマリーシリア内の輸送(Intraflagellar Transport;IFT)異常によるものであったり、完全にin vitroでの実験結果である。我々の作成してき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プライマリーシリアの無形成を来し、プライマリーシリアそのものの機能を、しかも、生体での機能を理解する為に、大きく貢献することが期待される。

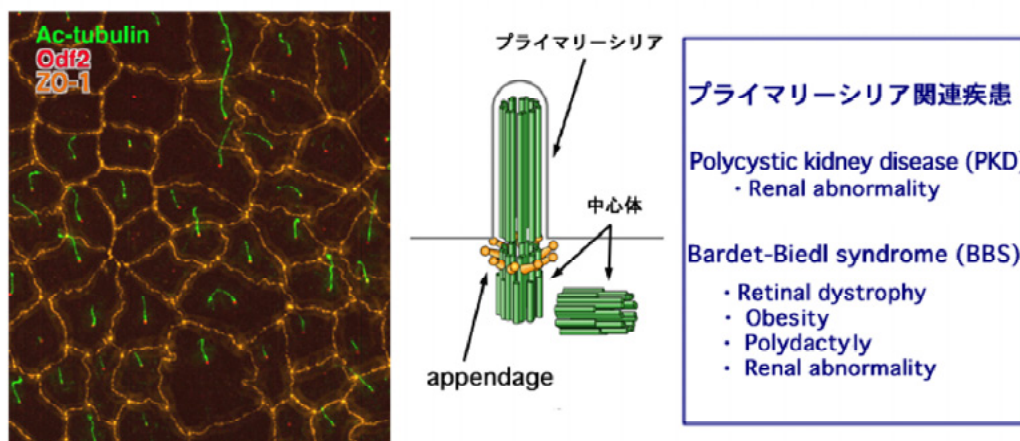


図 4. 培養 MDCK 細胞における primary cilia の染色像と模式図、および、primary cilia の形成不全により引き起こされる病気の種類を示す図。

Primary cilia はアセチル化チューブリン (Ac-tubulin) に対する抗体で染色することができる。その結果、ZO-1 (タイトジャンクションのマーカー) で示される細胞 1 個につき、1 本の primary cilia が存在することが示されている (左図)。Primary cilia の根元には Odf2 が存在するが、Odf2 は、mother centriole に付随する appendage といわれる構造を構成することが知られている (中央の図)。Primary cilia は mother centriole から伸長すること、appendage は mother centriole を細胞膜にターゲットさせ、primary cilia を形成させるために重要な構造であることが知られている (中央の図)。プライマリーシリアの形成不全は図に示されたような病態の原因となる (右図)。

#### 4. 4. 研究項目 IV : TMF の機能の解明 (マイナス端研究グループ (担当 : 久保亮治))

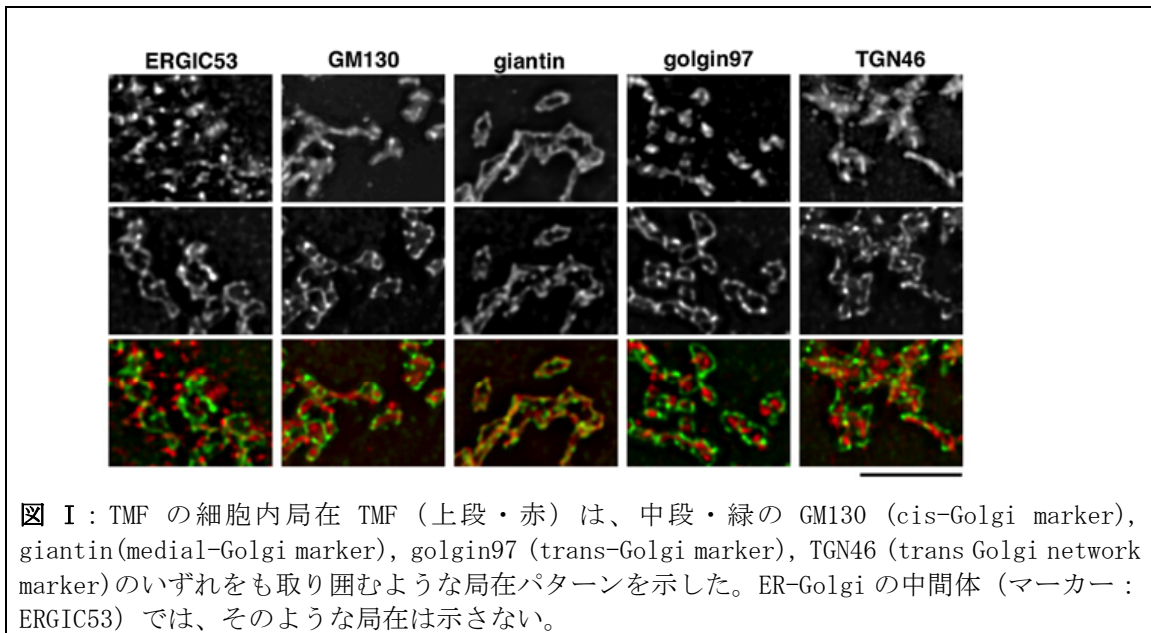
##### (1) 実施の内容

我々は、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事で新規微小管マイナス端蛋白質の探索を行ってきた。その過程で同定された TMF 蛋白質は中心体ではなくゴルジ体に局在する蛋白質であった。ゴルジ体は中心体付近に局在し、その形態形成および細胞内局在には微小管との相互作用が大きな役割を担っているが、その分子的基盤はほとんど不明である。

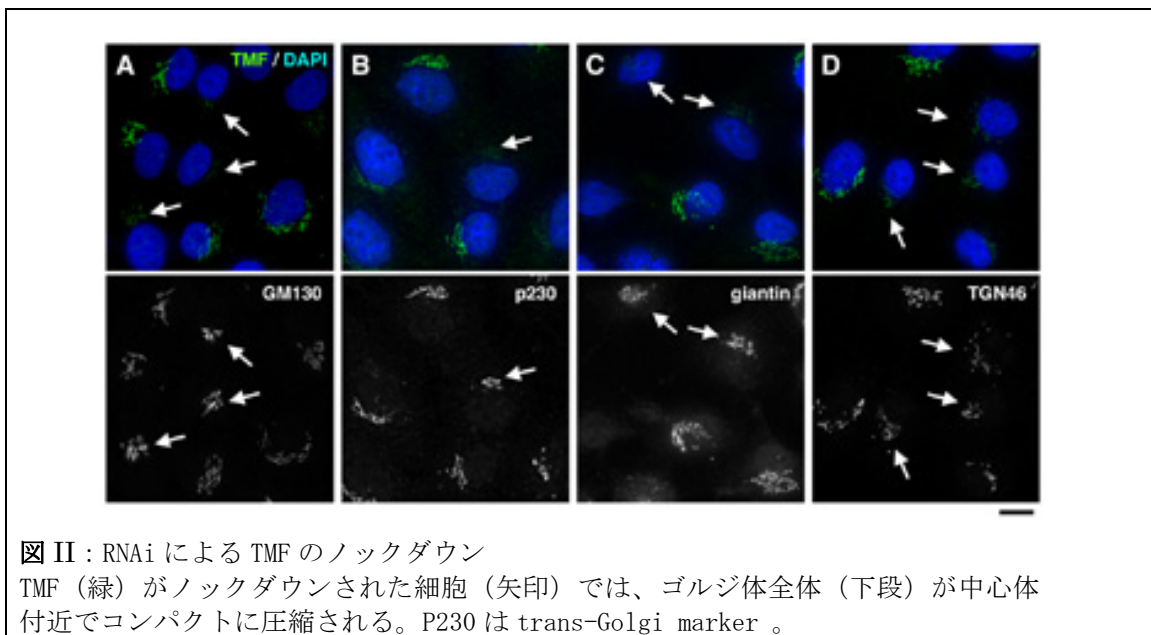
##### (2) 得られた研究効果の状況及び今後期待される効果

我々はまず TMF の詳細な細胞内局在を調べた。様々なゴルジマーカーと共染色した結果、TMF はゴルジ体の辺縁部に局在する事が示された (図 I)。また TMF を RNAi 法にてノックダウンすると、ゴルジ体がコンパクトになり中心体付近に圧縮されたように局在するようになる事がわかった (図 II)。次に、TMF ノックダウン細胞において、Golgi に局在する糖付加酵素である GalT と GalNAcT2 の局在変化を解析したところ、TMF ノックダウンにより GalT の局在は変化しないが、GalNAcT2 は Golgi から消失する事がわかった (図 III)。TMF は細胞質側に存在する蛋白質であることから、TMF と GalT または GalNAcT2 の細胞質ドメインの相互作用が存在する事が疑われたため、GalT

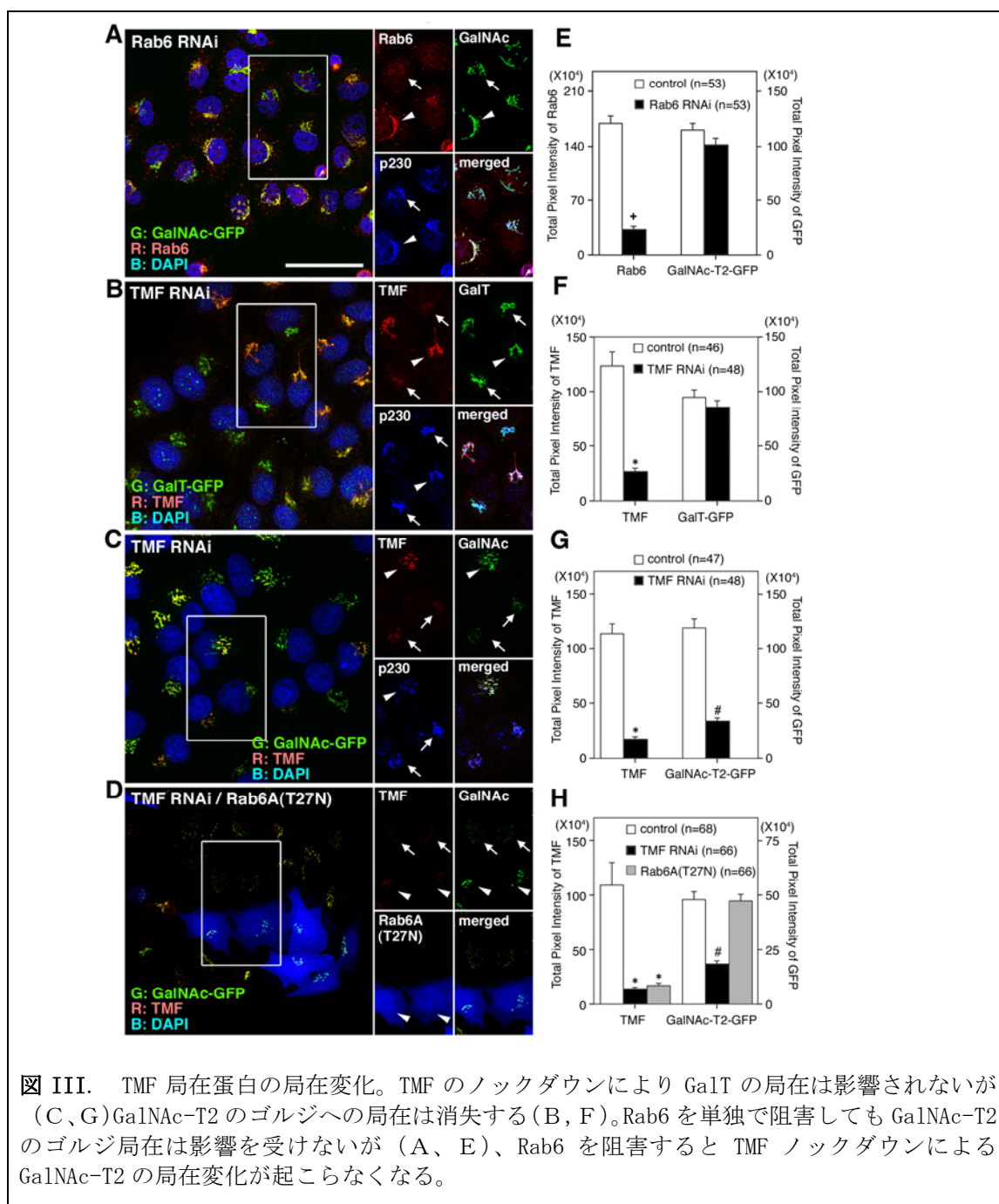
とGalNAcT2それぞれの細胞質ドメインを入れ替えたswap蛋白質を細胞に発現させてTMFノックダウンの影響を観察した。その結果、細胞質側をGalNAcT2配列とした蛋白質は



TMFノックダウンによりGolgiから消失したが、細胞質側をGalT配列としたGalNAcT2蛋白質はTMFノックダウンの影響を受けなかった。またTMFノックダウンによるGalNAcT2のGolgiからの消失は、Rab6-GDPを発現させる事によりブロックされた。以上より、GalNAcT2の細胞質ドメインがGalNAcT2のGolgi局在に重要である事、TMFはGalNAcT2がRab6依存性にGolgiからERへ逆行輸送されるのをブロックしており、その作用には







GalNAcT2の細胞質ドメインが必要である事、が示された。一方、もう1つのRab6依存性逆輸送経路であるearly endosomeからGolgiへの輸送におけるTMFの関与について解析するため、TMFノックダウンがShiga toxinの逆行輸送に及ぼす影響について精査した。TMFをノックダウンすると、細胞に取り込まれたShiga toxinが正常にGolgiへ輸送されずlysosomeに蓄積する事が示された。以上の結果より、TMFは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。

#### 4.5. 研究項目V：プラス端capture siteの解明

(プラス端研究グループ（担当：月田承一郎 代行・月田早智子）)

##### (1)実施の内容

細胞の中では、微小管は主にそのプラス端において伸長と短縮を繰り返している(図a)。細胞質中の微小管安定化・不安定化活性が均一であれば、微小管は確率的な伸縮を繰り返すのみで非対称性は生じないが、複雑な極性を持った細胞の形態を形成する際には微小管制御因子を細胞の局所で活性化する必要がある。微小管を捕捉する機能を有する構造として良く知られ研究が進んでいるのは、細胞分裂時に染色体を分離するために働く動原体である。間期にある細胞でも、微小管が細胞種に特異的なパターンに配向されていることはよく知られている。運動する細胞では細胞の進行方向にプラス端が配置され、頂底極性を形成する上皮細胞においては頂端から基底側に向けてプラス端が伸びる。しかしながら間期微小管の配向を制御する分子機構は長い間不明なままであり、我々は主に運動先端における微小管プラス端の配向制御に関与する分子機構の探索を行った。

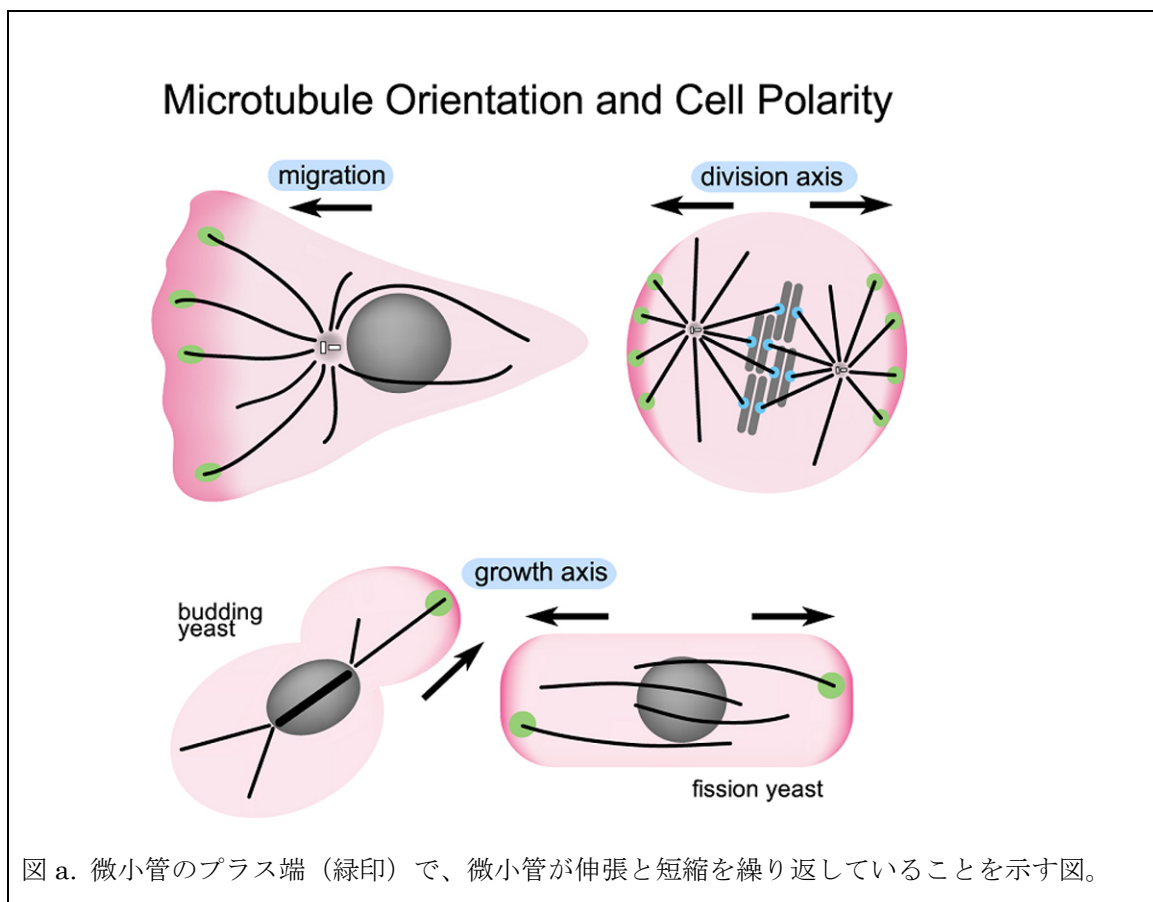


図 a. 微小管のプラス端（緑印）で、微小管が伸張と短縮を繰り返していることを示す図。

##### (2)得られた研究効果の状況及び今後期待される効果

本研究以前の成果において、GFP可視化技術を用いた微小管のイメージングにより、運動先端においては微小管の短縮頻度が減少して先端端に向けて伸長

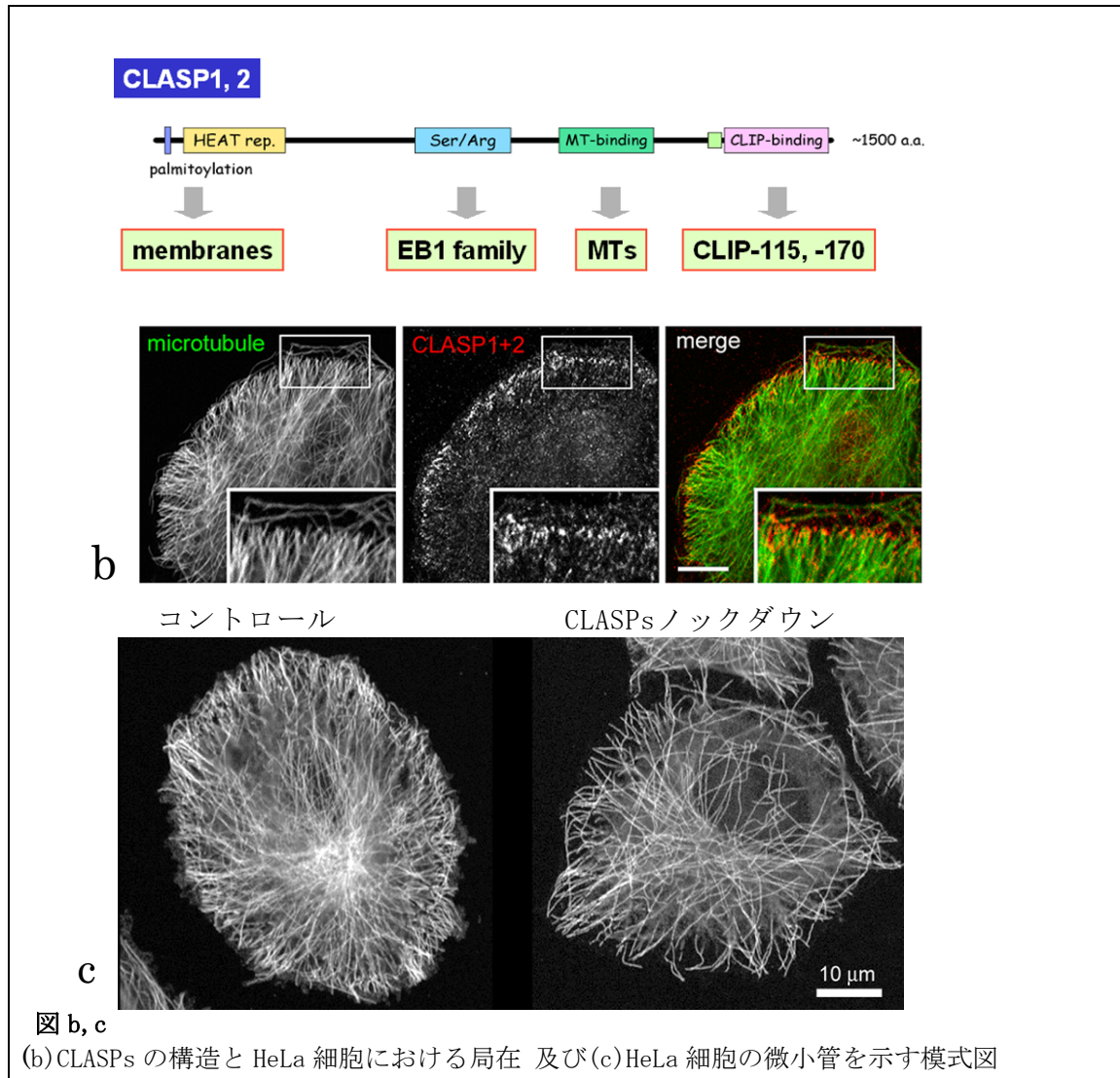
し続けるという動的特長を示すことを明らかにした。そのような微小管の動態を制御する分子の候補として、運動先端に集積することが知られていた微小管結合蛋白質APC (adenomatous polyposis coli)、微小管プラス端集積因子 (microtubuleplus-end-binding proteins; +TIPs) であるCLASPsの解析を行った。

#### ①CLASPsの機能解析

APCは微小管の局所安定化因子の一つと考えられるが、新たに見出された+TIPs分子の多くはAPCとは局在を共にせず、APCとは独立して微小管配向制御に関与する可能性が考えられた。局在的特徴からCLASPs (CLIP-associating proteins, CLASP1及びCLASP2) が微小管の局所安定化に重要である可能性が推測されたことから本研究では、CLASPsをCLIP結合蛋白質として同定したオランダのグループとの共同研究によりCLASPsが微小管ダイナミクスに与える作用を調べた (図b、c)。

HeLa細胞は運動性が低く、その細胞辺縁部で恒常的に微小管が強く安定化され、そこにCLASPsが局在する。微小管安定化活性を再現性良く解析するために有用であることから、HeLa細胞をモデルシステムとして、RNA干渉法 (RNAi) を用いてCLASPsの機能解析を行った。RNAiによりCLASP1あるいはCLASP2を単独でノックダウンした場合には微小管への影響は顕著に現れないが、同時にノックダウンすると微小管密度が顕著に減少し、細胞辺縁部における微小管捕捉/安定化活性が顕著に減少した。CLASPの領域解析により、CLASPはC末端部分で微小管非依存的に細胞表層に結合し、中央の領域で微小管及びEB1に直接結合することを明らかにした。CLASPsノックダウン後に、全長CLASP、C末端を欠くCLASPコンストラクト、あるいはEB1結合領域を欠くコンストラクトを発現させることにより微小管捕捉/安定化活性が回復されるかどうかレスキュー実験を行ったところ、微小管を細胞表層に捕捉/安定化するためにはCLASPの細胞表層結合は必要であり、EB1との結合も関与していることが明らかになった。運動するNIH細胞においてもCLASPsは運動先端に集積しており、CLASPの微小管配向への関与は普遍的な現象であると考えられた。この結果により、微小管を細胞表層に結合させ安定化するためには、細胞表層と微小管に同時に結合する分子が重要に機能することが明らかになり、そのような分子と微小管に同時に結合することでEB1が何らかの役割を果たしていることが予測された。

CLASPsは細胞分裂時には動原体に局在する。RNAi法によりCLASP1とCLASP2を同時にノックダウンすると細胞分裂が阻害された。GFP- $\alpha$ -tubulinあるいはEB1-GFPを用いて細胞分裂の進行をイメージングすると、CLASPsノックダウン時、紡錘体は形成されるものの微小管の長さが短く、中期において長時間停止した後に紡錘体が壊れて細胞分裂が正常に終了できないことが明らかになった。RFP-AuroraBを用いて動原体を可視化したところ、正常細胞では中期において動原体が赤道面に整列されて動きが少ないのに対し、CLASPsをノックダウンすると動原体位置が不安定になっていることが明らかになった。



細胞分裂中期においては、微小管に十分な張力がかかり動原体が静止することがチェックポイント機構を解除して分裂後期に移行することが必要であると考えられているので、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を得ることができず、分裂の進行が停止すると考えられた。

## ②APCの機能解析

本研究では、一般に外来的発現が難しいAPC遺伝子が、アフリカツメガエルA6培養細胞株でならば安定的発現が可能であることを見出し、APCの過剰発現の実験系においてAPCの機能解析を行った。APCのC末端にはPDZ結合モチーフがあり、癌抑制因子DLG1をはじめとしたPDZ蛋白質に結合することが知られている。APCのPDZ蛋白質への結合意義を調べるため、GFPを融合した全長APC (GFP-fAPC) 及びPDZ結合モチーフを欠失させたコンストラクトGFP-APC( $\Delta$ TSV)を安定的に発現するA6細胞株を樹立し、GFP融合APCの細胞内動態と細胞の運動特性、及び形態変化の観察により、APCの機能を解析した。いずれのGFP融合コンストラクトとも同様に細胞先端に局在したが、GFP-fAPCは細胞表層にも結合して

DLG1と共局在するのに対し、GFP-APC( $\Delta$ TSV)は細胞表層に結合しなかった。GFP-fAPCが集積した細胞先端は長時間にわたって安定な伸展を続けるのに対し、GFP-APC( $\Delta$ TSV)は突起伸展を安定化しなかった。基質への細胞伸展アッセイでは、GFP-fAPCは細胞伸展を促進したがGFP-APC( $\Delta$ TSV)はしなかったことから、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が明らかになった。さらに、細胞が極性化し上皮様形態を形成したときに、GFP-APC( $\Delta$ TSV)の過剰発現は細胞の重層化を誘導したことから、上皮細胞の形態形成においてもAPCのPDZ結合が関与していると考えられた。

APCは本来、 $\beta$ -catenin、Axin、GSK3 $\beta$ と複合体を形成し、 $\beta$ -cateninの分解を促進することでWntシグナル伝達系を負に制御する因子として良く知られた分子である。しかしながらAPCの細胞内局在からは、一見しては、細胞先端へのAPCの局在と $\beta$ -catenin分解活性との関連が想像し難い。本研究では、APCのAxin結合ドメイン、SAMPリピートがAPCの細胞先端への局在に関与していることを見出し、AxinのAPC局在化への関与を検証した。A6細胞にAxinや野生型及び安定型変異 $\beta$ -cateninを強制発現した細胞を用いた実験から、Axinの過剰発現はAPCの局在を阻害すると同時にAPCの分解を促進して存在量を減らすことが明らかになった。一方、 $\beta$ -cateninはAPCを安定化する作用を持ち、AxinによるAPC分解促進を阻止した。HeLa細胞でRNAi法によりAxinをノックダウンすると、APCと $\beta$ -cateninが基底側細胞表層の辺縁ではなく中央部にも集積した。これらの知見から、APC/ $\beta$ -catenin/Axin複合体は相互に安定性と局在を制御しあっていることが明らかになった。

#### 4.6 研究項目VI: クローディンを中心とした接着研究との融合

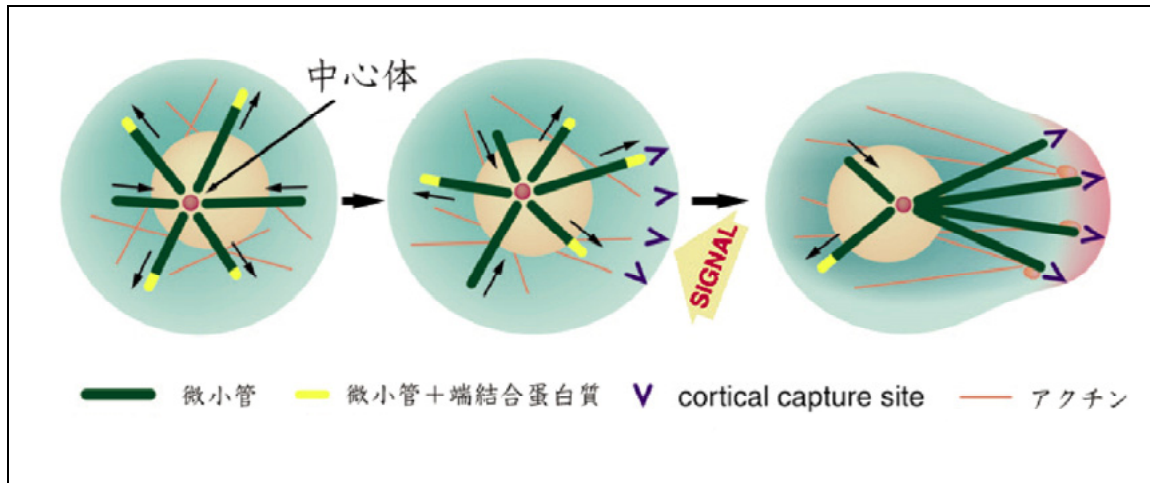
(プラス端研究グループ (担当: 月田承一郎 代行・月田早智子、梅田和彰) )

##### (1) 実施の内容

京都大学の我々の研究室では、クローディンを中心とした細胞間の接着の解析を進めてきた。細胞の極性形成においては、この細胞間接着は上述したところの「細胞外から位置情報」(図中のSignal)に相当する。本発展研究は、我々がプロジェクトで進めてきた「微小管ネットワークの動的制御機構にかかわる研究成果」を、このような「細胞接着による位置情報の研究」と直接融合させることを最終的な目的とする。

上皮細胞の極性形成において、微小管のプラス端がcaptureされる側の構造として、タイトジャンクション(TJ)を含むjunctional complexがある。このTJは、我々が初めて同定に成功したクローディンと呼ばれる一群の接着分子とその裏打ち蛋白質によって形成されている。したがって、上皮極性形成時には、微小管のプラス端が、この





junctional complexの裏側を探ってcaptureされるというステップがきわめて重要であると考えられる。このcapture過程にかかわるTJをはじめとしたジャンクションの構成蛋白質の同定を進めていくことにより、これまでの我々の微小管研究と細胞接着研究の接点を探りたい。

#### a. トリセルリンの同定

細胞間バリアーの実体としてのタイトジャンクションは、通常、2細胞間に形成されるものであるが、3つの細胞の交点に存在するトリセルラージャンクション(tricellular junction)もタイトジャンクションの延長にあるものと考えられる。トリセルラージャンクションの形成部位は、細胞間バリアーの形成上補強が必要と考えられる部位であるが、この部位に特異的に存在する接着分子としてトリセルリンを同定した。

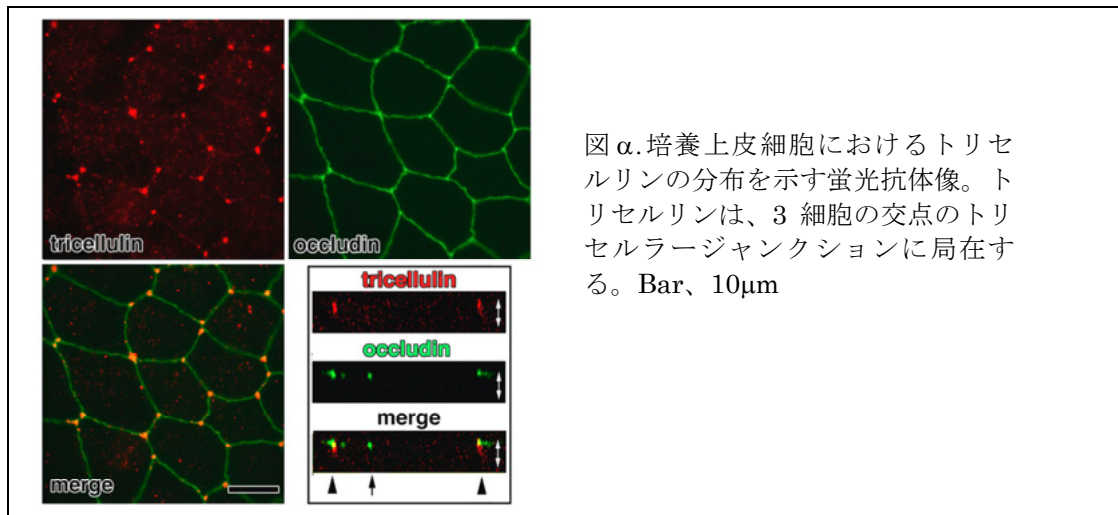
#### b. ZO-1/2の機能解析

細胞接着装置を構成するタイトジャンクションとアドヘレンスジャンクションに局在するPDZ-蛋白質としていまや著名なZO-1は、そもそも我々の研究室で見いだされたものであるが、ZO-1及び近縁のZO-2の発現を抑制した上皮細胞の作製に7年を要した。我々は、マウス乳腺由来上皮細胞Eph細胞を用いたノックアウト細胞の作製法により、タイトジャンクションの裏打ち蛋白質であるZO-1ノックアウト細胞を作製した。さらに、plasmidを用いたRNAi法により、ZO-2ノックダウンをおこない、ZO-1ノックアウトZO-2ノックダウン上皮細胞を確立した。この細胞の解析により、タイトジャンクションの構築原理に迫ることができた。同時にアドヘレンスジャンクションの構築の制御様式にも影響があることがごく最近判明した。ジャンクションの形成に微小管の正常な形成が必要であることは、他のグループにより明らかにされているが、この細胞は微小管によるジャンクションの構築原理にせまりうる可能性を秘めている。

#### (2) 得られた研究効果の状況及び今後期待される効果

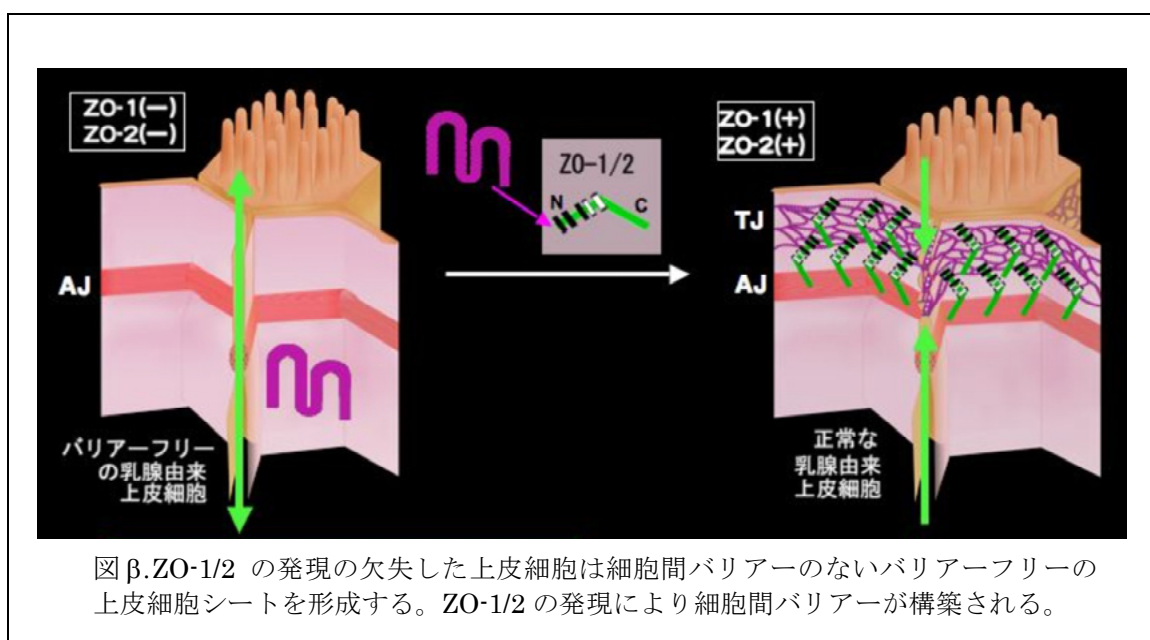
#### a. トリセルリンの同定

本研究により同定されたトリセルリンは、トリセルラージェンクシヨンの補強のみならず、細胞内のタイトジャンクシヨン全体の構築を制御するように思われた。従って、生体内のすべ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、タイトジャンクシヨン形成の全体を制御する可能性がある（図α）。



#### b. ZO-1/2の機能解析

上述したように、我々は、マウステラトカルチノーマF9細胞を用いたノックアウト細胞の作製法により、タイトジャンクシヨンの裏打ち蛋白質であるZO-1ノックアウトF9細胞を作製した。さらに、plasmidを用いたRNAi法により、ZO-2ノックダウンをお



こない、ZO-1ノックアウトZO-2ノックダウン細胞を確立した(図β)。

このZO-1ノックアウトZO-2ノックダウン細胞では、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ひとつである細胞間バリアーが形成されなかった。いわゆるバリアーフリーのZO-1ノックアウトZO-2ノックダウン細胞は、細胞間バリアー形成の分子的基盤にせまるとともに、アドヘレンスジャンクションがいかに上皮細胞アピカル側に集束し帯状に形成されるかという上皮細胞の根源的本質に迫るためにも有用であった。

#### 5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

微小管研究そのものは、現代細胞生物学において、もっとも大きな研究分野の一つで、毎日のように新しい成果が報告されている。逆に言うと上皮細胞の極性形成の分子機構を考える上で、避けられない分野でもある。我々は、このような状況の中で、何とかユニークな立場を築くために、日々努力をしている。

我々は、上皮細胞の極性形成を理解するためには、微小管のプラス端のダイナミクスを観察し、それを制御する分子を解析するべきだと、ERATOプロジェクトの時に単純に考えた。ただ、当時、微小管の端に分布する蛋白質として観察されていたものは少数で、癌抑制遺伝子産物APCもそのような分布がJames Nelsonのグループから報告されてはいたが、ほとんど無視されていた。我々は当時発展してきたGFPテクノロジーを用いて、以前、このAPCの動態を生細胞において観察したところ、驚いたことに、APCが微小管にそってドロドロと流れており、プラス端に水滴のように溜まることを見出したが、さらに、APCの結合蛋白質として当時同定されたEB1やCLASPsの動態を、同様に生細胞で観察したところ、この分子は伸張中のプラス端にだけ濃縮するという極めて特徴的な動態を示すことが分かった。同時に、幾つかの方向から、微小管プラス端で機能する蛋白質が注目を集めて、特にDavid Pellmanらのグループが中心となって発展させた出芽酵母を用いた遺伝学的研究は強力で、+TIPsの細胞生物学が急速に発展してきた。我々の研究は、このような発展に対する起爆剤の一つとして世界的に広く認められている。しかし、今や、本発展研究のプラス端研究グループで我々が解析しているCLASPsの研究も、重要な貢献であることは間違いないが、大きなうねりの中の一つの研究という位置づけになりかねず、そのユニークさを発揮するには、さらなる工夫と努力が必要である。もちろん、上皮細胞の形態形成を追求していく上では、ますます避けられない研究分野になりつつあることは事実である。

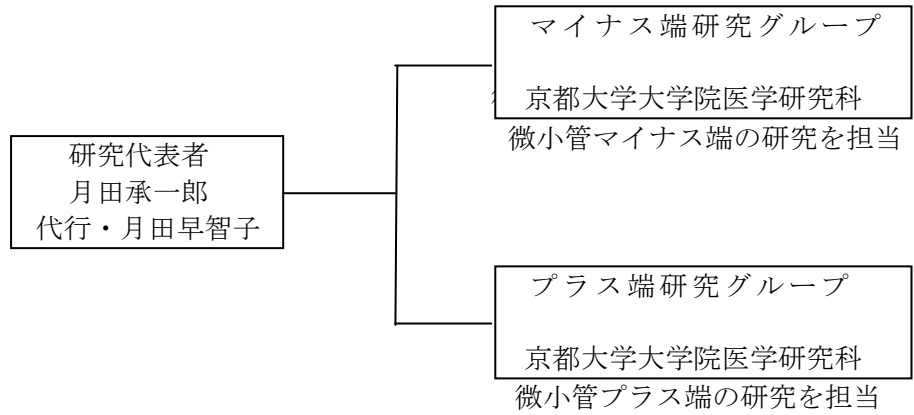
一方で、マイナス端の研究は世界的に遅れている。もちろん、中心子そのものの研究は盛んであるが、その周辺は不明な点が多い。微小管の重合における核形成に中心的役割を果たすγチューブリンなどはその典型で、細胞や個体における機能は意外なほど研究されていない。その意味で、我々のTUBG1と2の同定や、ノックアウトマウス作製によるそれぞれの機能解析の研究はユニークで、特にTUBG2と脳機能との関係は、全く意外な方向の展開で、人

の病気とも関係しそうで興味深い展開だと思う。もちろん、新しいオルガネラであるCSの研究も、他に類例を見ない研究で、今後、オルガネラソーターの開発という側面もあり、全くユニークな展開を見せる可能性が高い。さらに、上皮細胞における中心子とアピカル膜の相互作用の分子機構に迫るOdf2の研究も他に類例を見ない。この研究を通してprimary cilia形成の分子機構と結びつき、さらには、primary ciliaの形成を自由に制御できるマウスの産出へとつながれば、大きな展開が生まれると思う。

我々のグループは、クロードインの研究により国際的に独自の立場を築くことができた。その経験を生かして、微小管研究でも同じようなユニークな展開ができないかと模索しているし、また、その研究が、最終的にクロードインを中心とした接着研究と結びつくことを夢見て研究を展開している。トリセルラーのタイトジャンクションを構築するトリセルリンの発見や、タイトジャンクションの構築原理にせまることのできるZO-1/2の発現のない上皮細胞の創出など、ユニークな展開を行うことができ、これらを基盤にさらに将来のユニークな研究を構築できると考えている

6. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

# (1) マイナス端研究グループ

## ①研究者名

| 氏 名   | 所 属          | 役 職     | 参加時期                         |
|-------|--------------|---------|------------------------------|
| 久保亮治  | 京都大学大学院医学研究科 | 助手      | 平成 14 年 3 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 久保重紀子 | 京都大学大学院医学研究科 | JST 研究員 | 平成 14 年 4 月～<br>平成 17 年 3 月  |
| 月田早智子 | 京都大学医学部保健学科  | 教授      | 平成 14 年 3 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 田村淳   | 京都大学大学院医学研究科 | JST 研究員 | 平成 17 年 4 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 藤原千草  | 京都大学大学院医学研究科 | JST 技術員 | 平成 14 年 4 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 土居博美  | 京都大学大学院医学研究科 | JST 技術員 | 平成 14 年 10 月～<br>平成 19 年 3 月 |
| 北尻慎一郎 | 京都大学大学院医学研究科 | 大学院生    | 平成 14 年 3 月～<br>平成 17 年 3 月  |
| 福井千穂  | 京都大学大学院医学研究科 | JST 事務員 | 平成 14 年 5 月～<br>平成 19 年 3 月  |

## ②研究項目Ⅰ：Centriolar Satelliteの分子構築と機能の解明

Ⅱ： $\gamma$ チューブリンの機能の解明

Ⅲ：上皮細胞のアピカル膜と中心体を繋ぐ分子機構の解明

Ⅳ：TMFの機能の解明

# (2) プラス端研究グループ

## ①研究者名

| 氏 名   | 所 属          | 役 職     | 参加時期                         |
|-------|--------------|---------|------------------------------|
| 月田承一郎 | 京都大学大学院医学研究科 | 教授      | 平成 14 年 3 月～<br>平成 17 年 11 月 |
| 月田早智子 | 京都大学医学部保健学科  | 教授      | 平成 14 年 3 月～<br>平成 19 年 3 月  |
| 梅田一彰  | 京都大学大学院医学研究科 | JST 研究員 | 平成 17 年 4 月～<br>平成 18 年 6 月  |



|       |              |         |                             |
|-------|--------------|---------|-----------------------------|
| 井上千代美 | 京都大学大学院医学研究科 | JST 研究員 | 平成 14 年 5 月～<br>平成 17 年 8 月 |
| 古賀織絵  | 京都大学大学院医学研究科 | JST 研究員 | 平成 14 年 6 月～<br>平成 19 年 3 月 |
| 石川裕章  | 京都大学大学院医学研究科 | 大学院生    | 平成 14 年 3 月～<br>平成 18 年 3 月 |
| 山根順子  | 京都大学大学院医学研究科 | 大学院生    | 平成 14 年 4 月～<br>平成 18 年 3 月 |
| 池ノ内順一 | 京都大学大学院医学研究科 | 大学院生    | 平成 17 年 4 月～<br>平成 19 年 3 月 |

②研究項目 V：プラス端capture siteの解明

VI：クロロディンを中心とした接着研究との融合

## 7. 研究期間中の主な活動

ワークショップなど特になし。

## 8. 発展研究による主な研究成果

(1)論文発表 (国内 0件、海外19件)

Kubo,A., and Tsukita,Sh.

Non-membranous granular organelle consisting of PCM-1:

Subcellular distribution and cell cycle-dependent assembly/disassembly

**J.Cell Sci.** 116:919-928 (2003)

Sasaki,H., Matsui,C., Furuse,K., Mimori-Kiyosue,Y., Furuse,M. and Tsukita,Sh.

Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes

**Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 100:3971-3976 (2003)

Asano,A., Asano,K., Sasaki,H., Furuse,M. and Tsukita,Sh.

Claudins in *Caenorhabditis elegans*: their distribution and barrier function in the epithelium

**Curr. Biol.** 13:1042-1046 (2003)

Mimori-Kiyosue,Y., Tsukita,Sh.

"Search-and-capture" of microtubules through plus-end-binding proteins (+TIPs)

**J. Biochem.** 134:321-326 (2003)

Kitajiri,S., Fukumoto,K., Hata,M., Sasaki,H., Katsuno,T., Nakagawa,T., Ito,J., Tsukita,Sh. and Tsukita,Sa.

Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia.

**J. Cell Biol.** 166: 559-570 (2004)

Kitajiri,S., Miyamoto,T., Mineharu,A., Sonoda,N., Furuse,K., Hata,M., Sasaki,H., Mori,Y., Kubota,T., Ito,J., Furuse,M., and Tsukita,Sh.

Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential.

**J. Cell Sci.** 117:5087-5096 (2004)

Hachiya, N.S., Sakasegawa, Y., Jozuka, A., Tsukita, Sh., and Kaneko, K.

- Interaction of D-lactate dehydrogenase protein 2 (Dld2p) with F-actin: Implication for an alternative function of Dld2p.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 319:78-82 (2004)
- Hachiya, N.S., Sakasegawa, Y., Sasaki, H., Jozuka, A., Tsukita, Sh. and Kaneko, K.  
 Oligomeric Aip2p/Dld2p has an unusual ATP-dependent protein conformation modifying activity in vitro.  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 320:1271-1276 (2004)
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, Sa., and Tsukita, Sh.  
 Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells.  
**J. Cell Biol.** 171:939-945 (2005)
- Schulzke, J.D., Gitter, A.H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seider, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, Sh., and Fromm, M.  
 Epithelial transport and barrier function in occludin-deficient mice.  
**Biochem. Biophys. Acta** 1669:34-42 (2005)
- Miyamoto, T., Morita, K., Takemoto, D., Takeuchi, K., Kitano, Y., Miyakawa, T., Nakayama, K., Okamura, Y., Sasaki, H., Miyachi, Y., Furuse, M., and Tsukita, Sh.  
 Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice.  
**J. Cell Biol.** 169:527-538 (2005)
- Yuba-Kubo, A., Kubo, A., Hata, M., and Tsukita, Sh.  
 Gene-knockout analysis of two gamma-tubulin isoforms in mice.  
**Dev. Biol.** 282:361-373 (2005)
- Ishikawa, H., Kubo, A., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa.  
 Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia.  
**Nat. Cell Biol.** 7:517-524 (2005)
- Tamura, A., Kikuchi, S., Hata, M., Katsuno, T., Matsui, T., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa.  
 Achlorhydria by ezrin knockdown: defects in the formation/expansion of apical canaliculi in gastric parietal cells.  
**J. Cell Biol.** 169:21-28 (2005)
- Mimori-Kiyosue, Y., Grigoriev, I., Lansbergen, G., Sasaki, H., Matsui, C., Severin, F., Galijart, N., Grosveld, F., Vorobjev, I., Tsukita, Sh., and Akhmanova, A.  
 CLASP1 and CLASP2 bind to EB1 and regulate microtubule plus-end dynamics at the cell cortex.  
**J. Cell Biol.** 168:141-153 (2005)
- Mimori-Kiyosue Y, Grigoriev I, Sasaki H, Matsui C, Akhmanova A, Tsukita S, Vorobjev I.  
 "Mammalian CLASPs are required for mitotic spindle organization and kinetochore alignment."  
**Genes Cells.** 11(8):845-857 (2006)
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita Sa, Furuse M, Tsukita Sh.  
 ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation.  
**Cell.** 126(4):741-754 (2006)
- Mimori-Kiyosue Y, Matsui C, Sasaki H, Tsukita Sh.  
 Adenomatous polyposis coli (APC) protein regulates epithelial cell migration and morphogenesis via PDZ domain-based interactions with plasma membranes.

*Genes Cells.* 12(2):219-233 (2007)

○Ikenouchi,J., Umeda K., Furuse,K., Tsukita,Sa.,Furuse,M and Tsukita,Sh.

Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junction during epithelial cell polarization.

*J.Cell Biol.* 176:779-786 (2007)

## (2)口頭発表

### ①学会（国内 4 件、海外 5件）

月田承一郎 “The claudin family: A key player in the barrier function in multicellular organisms” 第6回日米合同組織細胞化学会 米国・シアトル 平成14年7月20日

月田承一郎 “The claudin family: A key player for the compartmentalization in multicellular organisms” 第12回国際分化学会 フランス・リヨン 平成14年9月16日

月田承一郎 “Tight junctions and barrier” ゴードン会議 米国・ニューハンプシャー 平成15年7月16日

月田承一郎 “Barrier functions of claudins: Lessons from knock-out mice” ハワイ大学がん研究所セミナー 米国・ホノルル 平成15年7月22日

月田承一郎 “Claudins and compartmentalisation in vertebrates” European Life Scientist Organization” フランス・ニース 平成16年9月4日～8日

月田早智子 “アクチンフィラメントと細胞膜のインターフェースとしての ERM 蛋白質” 第16回高遠・分子細胞生物学シンポジウム 長野県上伊那郡 平成16年8月19日20日

池ノ内 順一

3つの細胞の隙間をいかにしてシールするか:再確認された上皮細胞が持つバリア機能の解明 第28回日本分子生物学会年会 福岡 平成17年12月7日～10日

月田早智子

毛細胆管画分から発展した細胞生物学

第2回京都肝セルバイオロジー研究会 京都 平成18年7月15日

月田早智子

肝毛細胆管画分から展開した細胞生物学

大阪大学大学院生命機能研究科研究交流会 大阪 平成18年10月11日

### ②その他（国内 0件、海外 0件）

特になし。

## (3)特許出願（国内 1件、海外 1件）

### ①国内

新規薬剤デリバリー系 日本出願番号：特願2005-230648(2005/08/09)

### ②海外

新規薬剤デリバリー系 国際出願番号：PCT/JP2006/315741(2006/08/09)

#### (4) その他の特記事項

##### ①新聞報道

Odf2(平成17年4月、京都新聞)

##### ②受賞

平成14年上原賞(「細胞間接着装置の分子構築に関する研究」)

平成16年日本学士院賞(「上皮細胞間バリアーの分子基盤の解明」)

平成16年日産科学賞(「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」)

##### ③その他

特記なし

## 9. 結び

月田承一郎が、ERATOの「月田細胞軸プロジェクト」でめざした、研究の新しい芽を育てるという方向性は、3つのグループを柱として遂行されたが、それぞれの目的は、ERATOの満期終了時にある程度達成されたように思えた。その中で、「細胞分裂軸グループ」から、極めてユニークな、将来の発展が期待できる研究成果が生まれたため、その成果を大きく発展させることを目的にして、このSORSTの研究課題が計画された。この時点で、一方で月田承一郎が京都大学で主催してきた細胞接着研究との融合を目指すと掲げたことにより、実際に研究の場も京都大学に移行したSORSTの「微小管ネットワークの動的制御機構の解析」は、ちがう側面をもちつつさらに展開することができたように思う。微小管のマイナス端の研究から生まれた、centriolar satelliteの発見と動態研究は地味ではあるがよく考えると新しいオルガネラの提唱を行っているわけであるし、ガンマチューブリンのsubtypeの問題も、当面は決して他の研究室ではいきあたることのなかった課題であり、そのノックアウトがパーキンソンの病態を示すことも意外性を含みつつ進行した課題であると思われる。また、プライマリーシリアの形成に特化した因子であるOdf2の同定も、さしあたり決して他の研究室では行きあたることのなかった課題であろう。また、プラス端のsearch&captureの機構の解析も、その先駆性が大きく評価されると思われる。そして、これらの課題が、細胞接着研究と融合していくことは、生物学的に大きな意味を秘めていると思われる。上皮細胞において、微小管のマイナス端はどうもアピカル膜の構築にかかわり、そのアピカル膜の位置決めにおける細胞接着装置の役割は大きいものであるし、また、プラス端の機能はよりダイレクトに細胞接着と関連するであろう。SORSTの課題に融合した細胞接着研究のなかで、トリセルリンの同定とZO-1/2欠失細胞によるバリアーフリー細胞の形成は、大きく評価されるものと確信している。

これらの多くは、月田承一郎の直感におうところが大きく、一見のびのびとした運営法の

なかからこそ生まれうる成果であったと思われる。ERATO、SORSTの研究者、外部の研究者の参加、テクニカルスタッフ、そして、事務サイドの協力体制と、全体的に実にゆったりとそして協調性よく、研究を最大限に楽しむことを考えての運営法が功を奏したと思われる。というと、月田承一郎が何の苦もなく、このような体制をとり得たという印象を与えるが、私の立場からみるとこれは誤解のように思える。いまのサイエンスをとりまく状況を考えると、時代の流れに逆行するような運営法であったし、この中で新しい視点をみいだす長期的な研究に取り組むことに勇気がある。そのようなことのできる環境の維持にも大変な苦労を伴うと月田承一郎自身は深く感じていたように思う。いまから10年前の状況と当時の自由度の比較的高いERATOのプロジェクトであるという背景があっただけで初めて可能であった形であったように思う。そしてそのもくろみは、優秀な構成員の努力の産物としてはっきりと形に残る形で、成果として残ったように思う。一部はSORSTとして研究課題が継続されたわけであるが、それに関してもさらに独自の路線を築けたという意味で、十分継続された意味がある形になってほっとするものがある。そして、SORSTの課題の成果として大きく評されるべきところは、その課題の大部分に今後の将来展望が開けていることである。微小管マイナス端としては、II型のガンマチューブリンの問題、そのノックマウスの病態の問題、Centriolar Satellite(CS)という構造、そしてOdf2のコンディショナルノックアウトマウスの解析を通して期待されるprimary ciliaの生体での機能解析の問題、がある。微小管プラス端の課題からは、細胞接着／細胞極性形成の問題との融合が成立して、その後の問題としてさらに細胞接着の結果おこる形態形成や細胞間バリアー形成という大きな問題へアプローチする糸口がいくつかはっきりとした形で得られていると思われる。

SORSTの途中から、月田承一郎が病に倒れ、月田早智子が代行する形になったが、病气療養中からの、SORSTのメンバー、および、JSTからの有形無形の励ましにより、課題の継続が行えたことに心から感謝したい。それから、病床にあった月田承一郎の純粋で優しい配慮に感謝したい。サイエンス、優しさ、純粋さを実感した日々であった。それから何よりも、月田承一郎がまいた研究上の種が結実する方向を示しつつ、さらに、発展展開していく可能性も示した形で、SORSTの終了報告書を提出できるという状況に感謝するとともに、この基盤のうえにさらに研究が発展していくことをこころから願ってやまない。



SORST 発足時のメンバーと京都大学のメンバーとのスナップ写真