

氏 名 宇佐美(松川) 文子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2248 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 マウス卵管における繊毛極性制御機構

論文審査委員 主 査 高田 慎治
基礎生物学専攻 教授
藤森 俊彦
基礎生物学専攻 教授
青木 一洋
基礎生物学専攻 教授
上村 匡
京都大学 大学院生命科学研究科 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Usami Matsukawa, Fumiko

論文題目 マウス卵管における繊毛極性制御機構

Coordination of cilia orientation in the mouse oviduct

In the mouse oviduct (Fallopian tube), eggs released from the ovaries are transported to the uterus side by the movement of multi-cilia. In the infundibulum region of the oviduct, about 80 % of epithelial cells are multiciliated cells (MCCs). Each cilium of the MCCs shows polarity, and cilia beat effective and recovery strokes in a coordinated orientation along the longitudinal axis of the oviduct to transport eggs in a directed manner. I studied mechanisms of how cilia orientation is coordinated within and between cells (rotational and tissue-level polarity, respectively) in the mouse oviduct.

I examined the ciliogenesis in the wild type oviduct epithelium and categorized cell types into I to V based on the number and distribution of basal bodies (BBs) during the maturation of MCCs. I also carried out time-lapse observation of ciliogenesis in vitro, and found cell type progression through type I to IV. Cilia orientation was coordinated during late ciliogenesis stages through type IV- V.

It was reported that a planar cell polarity (PCP) factor, *Celsr1* (Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1), was asymmetrically localized to the cell-cell boundary which is perpendicular to the longitudinal axis of the oviduct. The deficiency of *Celsr1* gene results in multiscale cell polarity defects including cilia misorientation. To study the mechanisms of how cilia orientation is coordinated, I focused on *Celsr1* mutant and compared with the wild type MCCs. While *Celsr1* gene inactivation

exhibits defects in cilia orientation, the intracellular cilia polarity was not severely affected but partially aligned. And I found that microtubules were asymmetrically enriched at the cell boundary on the uterus side of each MCC in the wild type oviduct. Most of *Celsr1* mutant MCCs maintained microtubule enrichment, but the direction of microtubule enrichment to the cell boundaries was not coordinated between cells, suggesting that intracellular polarities were established, but polarities between cells were not aligned. I also found that cilia orientation correlated with the direction of the microtubule enrichment in *Celsr1* mutant MCCs. These results suggest that *Celsr1* deficient MCCs retain the ability to self-organize the orientation of cilia and the distribution of microtubule within individual cells.

In addition, I found that microtubules also formed stripes that connected the BBs on the apical surface and those stripes existed with a gradient. Furthermore, the microtubules connected to the BBs run to the basal side of cells. I then focused on a microtubule minus-end binding protein, CAMSAP3 (Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3) in the oviduct multiciliated cells. I found that CAMSAP3 localized asymmetrically in BBs on the uterine side similar to γ -tubulin, which is reported to localize in basal foot. CAMSAP3 existed more apically, and stripe-shaped microtubules on the apical surface present on the same plane as CAMSAP3 exists. During MCC maturation, BB components (Centrin2, γ -tubulin, Centriolin) were observed through type I- V, but CAMSAP3 localized to BBs only in type IV and V cells. These results suggested that CAMSAP3 localized to BBs prior to the coordination of cilia orientation.

I analyzed the MCCs deficient for *Camsap3*, and found that the orientation of BBs was not aligned within each MCC, but the average cilia orientation in each cell was coordinated along the longitudinal axis of the oviduct. In the *Camsap3* mutant cells, the microtubules on the apical surface no longer formed stripes and evenly distributed

around BBs. On the other hand, the microtubules running along apico-basally remained normal, and connected to γ -tubulin. These findings suggest that CAMSAP3 and γ -tubulin regulate the distribution of microtubules differently, and apical microtubules are regulating BB orientation. PCP proteins, *Celsr1* and *Vangl1*, and microtubule enrichment at the cell-cell boundary were conserved in the *Camsap3* mutants, suggesting that cell polarity is unaffected in the *Camsap3* deficient cells. On the other hand, in *Celsr1* mutants, the localization of CAMSAP3 to BBs and the distribution of stripe-shaped microtubules on the apical surface were not disturbed.

Altogether, it was suggested that CAMSAP3 and *Celsr1* are responsible for rotational and tissue-level polarity respectively, and microtubules functionally link them, which in turn establishes the tissue-wide coordination of cilia orientation.

博士論文審査結果

Name in Full 氏 名 宇佐美 (松川) 文子

Title 論文題目 マウス卵管における繊毛極性制御機構

卵管は卵巣から放出された卵を子宮へと輸送する生殖に必須の器官である。卵巣に近い卵管の漏斗と呼ばれる領域では多繊毛細胞が上皮の約 80%を占めている。繊毛が卵管上皮内で同じ方向に運動することにより、卵巣から子宮へと卵は輸送される。気管や脳室にも多繊毛細胞があり、繊毛の方向性を持った運動により異物の除去や物質の輸送が可能となる。このような器官内の多繊毛の向きが組織全体で揃えられる機構については、十分に理解が進んでいなかった。

出願者は、繊毛基部の構造を抗体染色し超解像顕微鏡観察により卵管上皮の広い範囲でそれぞれの繊毛の向きを判定できる手法を開発した。野生型マウスでは上皮平面内で繊毛は同じ方向を向くのに対し、平面内細胞極性 (PCP) 因子である *Celsr1* を欠損したマウスでは繊毛の向きはそれぞれの細胞内においてはあまり乱れていないものの、細胞間では揃っていなかった。*Celsr1* 欠損マウスでは約 75%の細胞において野生型細胞と同様に微小管の細胞境界への濃縮が見られ、微小管が濃縮している方向に繊毛の向きが揃っている傾向がみられた。一方、微小管の濃縮方向は細胞によって異なっていた。これらの結果から、*Celsr1* が微小管の濃縮方向を子宮側に揃え、その結果細胞間で繊毛の向きが揃えられることが示唆された。また、*Celsr1* に依存せず個々の細胞内で繊毛の向きを揃える機構が存在することが示唆された。

そこで出願者は、細胞内で繊毛の向きの制御への微小管の関与を検証するため、微小管のマイナス端に結合するタンパク質である CAMSAP3 に注目した。CAMSAP3 は、多繊毛細胞において繊毛の基底小体付近で子宮側に偏って存在していた。CAMSAP3 変異体では、繊毛の向きが細胞内で一致せず、細胞の頂端面付近に存在する微小管の分布が異常であった。以上から、繊毛基部で偏って存在する CAMSAP3 が細胞の頂端面付近での微小管を制御することによって、それぞれの細胞内で繊毛の向きが整えられることが示唆された。CAMSAP3 変異マウスにおいては繊毛以外の平面内細胞極性は正常であり、CAMSAP3 は直接 PCP 制御に関わらないことが示唆された。また、*Celsr1* 変異体でも、CAMSAP3 は局在が変わらず、*Celsr1* は CAMSAP3 の制御には直接関わらないことが示唆された。以上から、CAMSAP3 と *Celsr1* によって、繊毛の向きが細胞内、細胞間でそれぞれ揃えられる機構が存在し、これらの 2 つのシステムが微小管によって連携することにより器官の上皮平面内で繊毛の向きが一致することが示唆された。

以上の出願者の研究は、組織内で多繊毛細胞の繊毛の極性を一致させる機構に関する新しい知見を与えるものであり、博士の学位を授与するに相応しいと審査委員会は評価した。