

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

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

基礎生物学研究所 初期発生研究部門

宇佐美 (松川) 文子

目次

〈略号〉	4
〈序論〉	5
1. マウス卵管の機能・構造	5
2. 上皮組織における平面内細胞極性 (PCP)	7
3. 多繊毛細胞の構造・極性	9
4. 多繊毛細胞の極性制御における PCP 因子の寄与.....	11
5. 多繊毛細胞の極性制御における細胞骨格の寄与.....	12
6. 非中心体性微小管のマイナス端結合因子 CAMSAP3	15
7. 本研究の目的	16
〈第 1 章〉 マウス卵管の発生における多繊毛細胞の発達	
〈序〉	18
〈結果〉	21
1-1. 卵管上皮を構成する細胞の変遷.....	21
1-2. マウス卵管多繊毛細胞の発達過程.....	22
〈考察〉	26
1. 上皮シートの変化.....	26
2. マウス卵管多繊毛細胞における繊毛基部の増幅機構	27
3. マウス卵管多繊毛細胞における繊毛の極性決定と細胞形態の変化.....	28
〈Figure〉	29
〈第 2 章〉 細胞間で繊毛の極性を揃える機構	
〈序〉	40
〈結果〉	41
2-1. <i>Celsr1</i> ^{-/-} マウスの卵管多繊毛細胞における細胞内での繊毛極性	41
2-2. <i>Celsr1</i> ^{-/-} マウスの卵管多繊毛細胞における隣接する細胞間の繊毛極性	42
2-3. 細胞境界付近への微小管の濃縮.....	42
2-4. <i>Celsr1</i> 非依存的な微小管の濃縮と繊毛の極性.....	43
〈考察〉	44
1. マウスの卵管多繊毛細胞の繊毛の極性制御機構における <i>Celsr1</i> の機能	44
2. 細胞内で繊毛の向きを整えるための自律的なメカニズム	45
〈Figure〉	47
〈第 3 章〉 卵管多繊毛細胞における微小管の分布	
〈序〉	53
〈結果〉	53
3-1. 複数の抗 tubulin 抗体による染色像の差.....	53
3-2. BB 付近の微小管	54

3-3. 卵管多繊毛細胞の成熟過程に従った微小管の変化	55
〈考察〉	57
〈Figure〉	58
〈第4章〉 CAMSAP3によるマウス卵管多繊毛細胞の極性制御機構	
〈序〉	65
〈結果〉	65
4-1. CAMSAP3の局在	65
4-2. <i>Camsap3^{dc/dc}</i> マウスにおける繊毛の極性異常	69
4-3. CAMSAP3を介した繊毛の極性制御機構	71
4-4. <i>Camsap3^{dc/dc}</i> マウスのその他の表現型	73
4-5. <i>Celsr1</i> ^{-/-} マウスの多繊毛細胞における CAMSAP3の局在	74
4-6. <i>Celsr1</i> と <i>Camsap3</i> のダブルノックアウトマウスについて	74
4-7. BB付近における CAMSAP2の局在	75
〈考察〉	75
1. 卵管多繊毛細胞における微小管のネットワーク	75
2. BFの数と CAMSAP3	76
3. 未公開	76
4. apical面の微小管と CAMSAP3によって、細胞内で繊毛の極性を揃える機構	76
〈Figure〉	78
〈第5章〉 まとめ、マウスの卵管上皮組織で繊毛の極性を揃える機構に関する議論	
〈序〉	100
〈考察〉	100
1. <i>Celsr1</i> ^{-/-} 細胞において細胞内で繊毛の極性が揃う要因	100
2. 細胞内、細胞間で繊毛の極性を揃える機構の関係	100
〈Figure〉	103
〈材料と方法〉	105
〈謝辞〉	113
〈参考文献〉	115

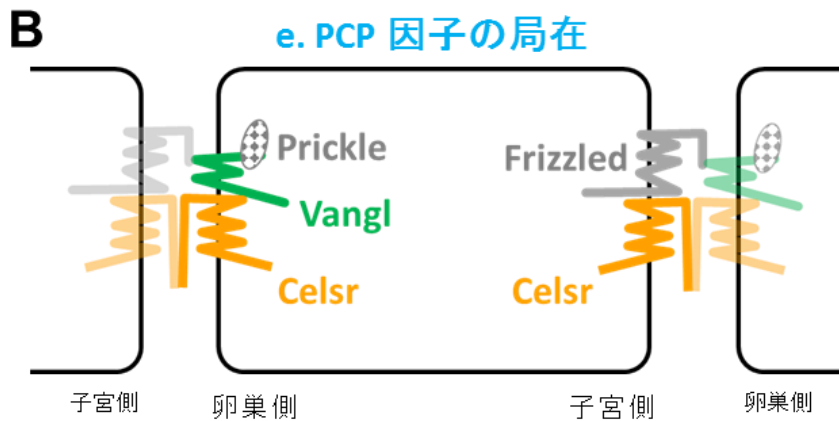
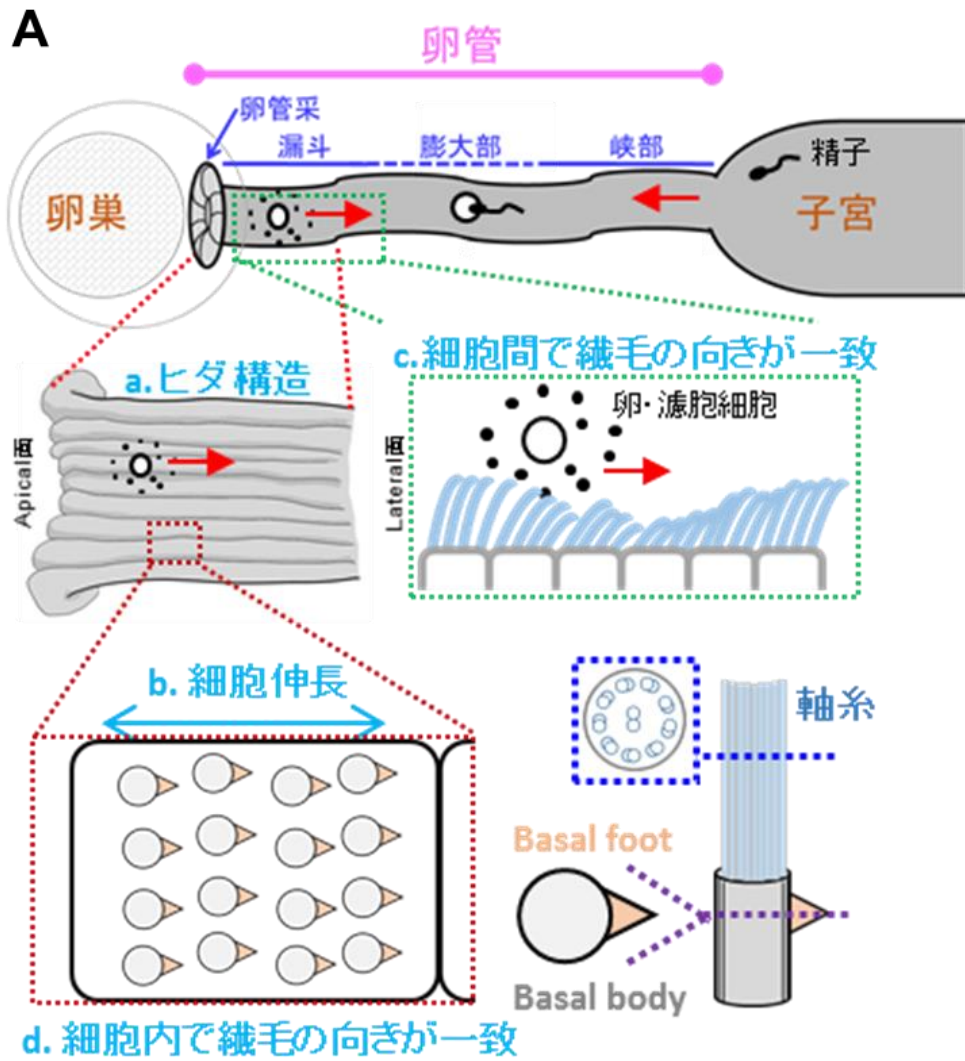
〈略号〉

PCP	planar cell polarity / 平面内細胞極性
Celsr	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor (タンパク質名)
Vangl	Van Gogh like (タンパク質名)
Fzd	Frizzled (タンパク質名)
Dvl	Dishevelled (タンパク質名)
BB	basal body / 絨毛基部
BF	basal foot、basal feet
sDAP	subdistal appendage
STED	Stimulated Emission Depletion
CV	circular variance
CAMSAP	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein (タンパク質名)
Ace	acetylated
Tyr	tyrosinated
GFP	Green Fluorescent Protein / 緑色蛍光タンパク質
Tg マウス	transgenic マウス / トランスジェニックマウス
cKO	conditional knockout
ROI	region of interest / 関心領域
MIP	maximum intensity projection / 最大輝度投影図
PBS	phosphate buffered saline / リン酸緩衝生理食塩水
TEM	transmission electron microscopy/透過型電子顕微鏡

〈序論〉

1. マウス卵管の機能・構造

卵管は、卵巣から放出された卵を子宮へと輸送する機能をもち、生殖に必須の器官である。解剖学的な特徴によって卵巣側から、上皮が外に露出している卵管采、漏斗、卵と精子が出会う膨大部、峡部に分けられる(Introduction Figure (Int. Fig.) 1 A)。管の内腔には上皮細胞、外側には筋層があり、領域によって筋層の厚さが異なる。漏斗部では、筋層は薄く、子宮に近い峡部では、筋層が厚い。また、上皮細胞には、繊毛を多数有する繊毛細胞(マウス卵管平均 200 本)と分泌液を産生する分泌細胞が存在し、本研究で扱う漏斗部は成体であれば多繊毛細胞が約 80%、分泌細胞が約 20%を占め、峡部では多繊毛細胞は少ない。近年、分泌液の産生と卵管峡部の平滑筋の収縮によって、卵管峡部から膨大部までは分泌液が子宮側から卵巣側へ向かっていると報告された (Hino and Yanagimachi, 2019)。この液流に反し、繊毛の一方方向的な運動により、卵巣側から子宮側へ卵が漏斗から膨大部へと運ばれる(Shi et al., 2011)。漏斗の内腔上皮には、繊毛が子宮側を向いて揃っており、この繊毛の極性以外にも、卵巣-子宮軸に平行に真っ直ぐ伸びるヒダ構造と細胞の伸長、卵巣-子宮軸に垂直な細胞辺に偏ってタンパク質が局在する。このように卵管には、「卵巣-子宮軸に沿って直線的なヒダ構造」、「卵巣-子宮軸に沿って伸長する細胞形態」、「細胞間で子宮側を向いて揃う繊毛」、「細胞内で子宮側を向いて揃う繊毛」、「卵巣-子宮軸に沿って局在する PCP 因子」といった多階層に渡る極性がある(多階層極性)。



Int. Fig.1 マウス卵管における多階層にわたる平面内細胞極性

(A) マウス卵管の模式図。実際の卵管は複雑に折りたたまれており、直線状に広げた際はこの図よりも長く見える。2 段目は、漏斗部を卵巣-子宮軸に沿って開き内腔上皮を露出した模式図。他は、卵管上皮細胞がもつ PCP を模式図として示した。a. 卵巣-子宮軸に沿ったヒダ構造、b. 卵巣-子宮軸に沿った細胞の伸長、c. 細胞間で繊毛の極性が子宮側を向いて一致、d. 細胞内で繊毛の極性が子宮側を向いて一致。図中の a, c は組織レベルの極性、b, d は細胞レベルの極性。e. PCP 因子の局在は、B に示した。

(B) 卵管多繊毛細胞で明らかになった PCP 因子の局在を模式的に示した(繊毛は省略)。図の左側が卵巣側、右側は子宮側である。図に記載していない Core PCP 因子については、局在方向が明らかになっていない。Core PCP 因子の詳細は表 1 に記載した。

参考文献 : Shi et al., 2014

2. 上皮組織における平面内細胞極性 (PCP)

どの生物においても、膨大な数の細胞が秩序だった器官を形成しており、秩序だった器官の形成には、方向性の情報が重要である。方向性の情報を伝える仕組みの一つとして、上皮細胞は、apico-basal 軸に直交する平面において非対称的にタンパク質を局在させ、隣接する細胞間でも協調的にタンパク質が局在する方向を揃えている。この仕組みは、平面内細胞極性(Planar Cell Polarity : PCP)と呼ばれ、寄与するタンパク質は PCP 因子と呼ばれる。PCP 因子は、*Drosophila melanogaster* の遺伝学的スクリーニングによって発見され、多くの PCP 因子が脊椎動物でも保存されている(Butler & Wallingford, 2017; Devenport, 2014; Yang & Mlodzik, 2015; Shi et al., 2014; Shi et al., 2016) (Int. table 1)。PCP 因子は、Global、Core、Readout の 3 つのモジュールにクラス分けされている。Global モジュールは、組織の軸情報に沿った勾配を形成し、その情報を読み取って Core PCP 因子が細胞内で非対称な局在を形成すると考えられている。卵管では、組織の軸に沿った Global PCP 因子の勾配があるかは不明である。Core モジュールには、Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor (Celsr)、Van Gogh like (Vangl)、Frizzled (Fzd)、Dishevelled (Dvl)、Prickle (Pk)、inversin (Invs)

が属しており、Celsr、Vangl、Fzd は膜貫通タンパク質である。Celsr の細胞外ドメインは隣接する細胞の Celsr の細胞外ドメインと、Vangl の細胞外ドメインは隣接する細胞の Fzd の細胞外ドメインと相互作用しており、隣接する細胞間で PCP 因子の極性が揃うのを促進していると考えられている(Yang et al., 2015)。Readout モジュールでは、他のモジュールで形成されたタンパク質の極性を読み取り、組織特異的に細胞小器官をこの極性に沿って形成すると考えられている。

マウスにおけるタンパク質名 (略称)	タンパク質の特徴	他のPCP因子との関係
Celsr1-3	7回膜貫通型の非典型的カドヘリン	Vangl, Fzd と結合 (co-IP)
Van Gogh-like (Vangl) 1-2	4回膜貫通型タンパク質	Celsr と結合 (co-IP)
Frizzled (Fzd) 1-7	7回膜貫通型受容体	Wnt の受容体。Celsr と結合 (co-IP)
Dishevelled (Dvl) 1-3	マルチドメイン細胞質タンパク質	Fzd によって細胞膜に集約される
Prickle (PK) 1-2	マルチドメイン細胞質タンパク質	Vangl によって細胞膜に集約される
Inversin (invs)	Ankyrin リピートを持つタンパク質	Fzd によって細胞膜に集約される

Int. table1 Celsr1 と同じく Core モジュールに属するマウス PCP 因子の特徴

参考文献 : Yang & Mlodzik, 2015

卵管では RT-PCR によって、*Celsr1*、*Celsr2*、*Vangl1*、*Vangl2*、*Dvl1*、*Dvl2*、*Pk2*、*Pk3*、*Fzd1*、*Fzd2*、*Fzd3*、*Fzd6*、*Fzd8*、*Protein tyrosine kinase 7* といった PCP 遺伝子が発現していることがわかっている(Shi et al., 2014)。マウスの卵管上皮細胞では、それらのうち *Celsr1* が卵巣側と子宮側の両方の細胞境界に、*Vangl1*、*Vangl2* が卵巣側、*Fzd6* が子宮側の細胞境界に局在している(Shi et al., 2014; Shi et al., 2016b) (Int. Fig. 1 B)。

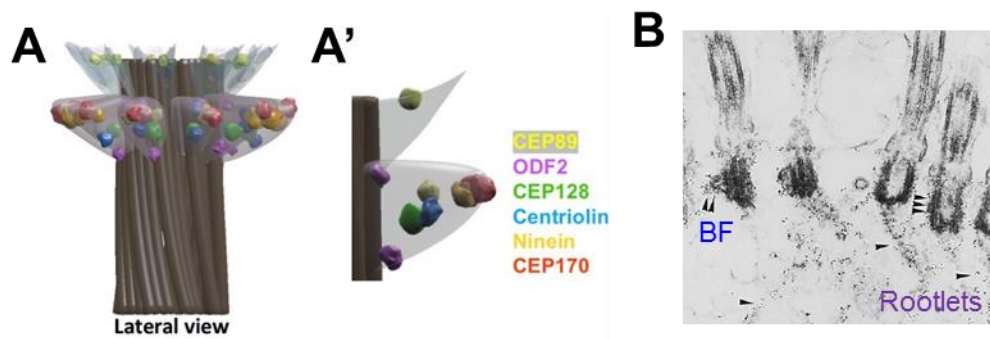
所属する研究室の先行研究によって、*Celsr1* が卵管の複数の極性(多階層極性)(Int. Fig. 1)の形成に必要であることが示された。野生型(wild type: WT)マウスと比べると *Celsr1*^{-/-}マウスの卵管は、ヒダ構造が卵巣-子宮軸に平行ではなく、たくさんの分岐を持ち、細胞があまり伸長していないことに加え、繊毛の極性も乱れている(Shi et al., 2014)。Celsr1 がどのようにして多階層極性を制御しているのか、また、Celsr1 以

外の PCP 因子がマウス卵管上皮の極性形成に寄与するのかどうかについては報告されていない。

3. 多繊毛細胞の構造・極性

多繊毛細胞は、apical 面に数百本の繊毛を有しており、卵管や気管、脳室上衣層の上皮細胞において特殊化した細胞である (Brooks & Wallingford, 2014; Meunier & Azimzadeh, 2016; Reiter & Leroux, 2017; Spassky & Meunier, 2017; Boutin & Kodjabachian, 2019)。多繊毛細胞が上皮細胞の約 80% を占める卵管の漏斗部を卵巣-子宮軸に沿って開き内腔上皮を露出させ、筋収縮の影響を受けない状態にしても、卵が子宮側へと輸送される (Li & Winuthayanon, 2017; Shi et al., 2011)。このことから、卵管の漏斗部では、繊毛運動によって卵が子宮側へと輸送されると考えられている。多繊毛細胞の繊毛軸糸は往復運動を行っており、物質が輸送される方向への有効打と反対方向への運動は回復打と呼ばれ、それらの方向は組織の軸に沿っている。運動性繊毛の軸糸は、9+2 の微小管構造を形成しており、繊毛の軸糸にある中央のペアは、有効打方向に垂直に並んでいる (Sandoz et al., 1988; Satir & Christensen, 2008) (Int. Fig. 1A)。軸糸の根元には、中心体と似た基底小体、basal body (BB) と呼ばれる構造があり、有効打方向に basal foot (BF) が突出している (Reiter et al., 2012; Clare et al., 2014)。本研究で注目しているのは、運動性の繊毛であるが、mother centriole から形成される一次繊毛 (primary cilia) というものもある。Primary cilia は、細胞増殖が休止している時期に形成され、細胞周期の制御や外環境の情報を受容すると考えられている。Primary cilia の BB には、subdistal appendage (sDAP) と呼ばれる構造が放射状に突出しており、sDAP は多繊毛細胞の BF と構成分子がよく似ている (Chong et al., 2020) (Int. Fig. 2 A-A')。また、BB から BF とは反対方向の基底膜側へ向かって伸びる rootlet という構造も知られている (Garcia & Reiter, 2016; Klotz et al., 1986; J. Yang et al., 2002; Vu et al., 2019) (Int. Fig. 2 B)。これらの構造から繊毛の運動方向が判

定できる。



Int. Fig. 2 BB 付近の構造

(A-A') Chong et al., 2020 より引用。Primary cilia の基底小体(BB)の distal appendage、subdistal appendage(BF)を構成する分子の模式図(lateral view)。

(B) Klotz et al., 1986 より引用。ウズラの卵管の多繊毛細胞を抗 CC-310 抗体で染色した免疫電顕像。金顆粒が rootlet や BF で観察されている(それぞれ 1 つの矢頭、2 つの矢頭)。BB は 3 つの矢頭で示されている。50,000 倍で撮影。

卵管や気管、脳室上衣層では、組織内で物質を効率よく輸送するために多繊毛細胞の繊毛極性が細胞内(intracellular polarity)、細胞間(intercellular polarity、rotational polarity、tissue-level polarity)で揃っている(Mirzadeh et al., 2010; Meunier & Azimzadeh, 2016)。繊毛の運動や極性の異常は、繊毛病としても知られ様々な器官で様々な異常を引き起こす(Choksi et al., 2014; Reiter and Leroux, 2017)。繊毛の極性を個々の細胞内、細胞間で揃える機構を明らかにするため、様々な動物種で研究がなされてきた。マウスにおいても気管や脳室で研究が進められてきたがまだ十分な理解が得られていない。

4. 多繊毛細胞の極性制御における PCP 因子の寄与

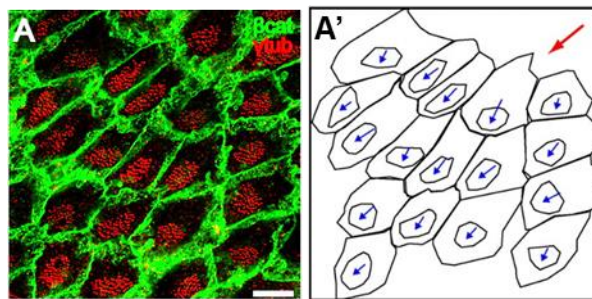
多繊毛細胞の極性制御機構は、無脊椎動物や *Xenopus laevis* の表皮、マウスの脳室上衣・気管上皮・卵管上皮等で研究が進められている。膜貫通型タンパク質の PCP 因子であり細胞境界に局在する Celsr、Fzd、Vangl に加え、膜貫通型でない PCP 因子であり細胞境界や繊毛の基部にも局在する Dvl が、繊毛の極性制御に寄与している(Hirota et al., 2010; Ohata et al., 2014; Park et al., 2008; Mitchell et al., 2009; Vu et al., 2019)。

無脊椎動物であるプラナリアの表皮では、*Dvl1*、*Dvl2* の欠損により、体表の繊毛の向きが乱れる(Vu et al., 2019)。*Xenopus laevis* の表皮では、モルフォリノアンチセンスオリゴ(morpholino oligonucleotide:MO)を用いて Dvl を阻害した個体において、BB の apical 面へのドッキングが低下すること(Park et al., 2008)、また MO を用いて Vangl2 を阻害した個体や Vangl2、Fzd3 の過剰発現によって繊毛の極性が乱れること(Mitchell et al., 2009)が示されている。

マウス脳室上衣細胞は、他の多繊毛細胞と異なり、平均 49 本の繊毛が一カ所に集まって(細胞表面積の約 16%)、細胞の重心に対して偏って存在している(Mirzadeh et al., 2010) (Int. Fig. 3)。マウス脳室上衣細胞には、細胞内・細胞間で繊毛の極性を揃える機構に加えて、繊毛集団が偏る方向を細胞間で揃える機構が存在し、PCP 因子によって、それぞれ異なる機構に寄与することが報告されている。細胞内で繊毛の極性を揃える機構には Celsr2、Celsr3、Fzd3、Vangl2、細胞間で繊毛の極性を揃える機構と細胞間で繊毛集団が偏る方向を揃える機構には Celsr1、Fzd3、Vangl2 が寄与することが示唆されている(Boutin et al., 2014; Tissir et al., 2010)。また、PDZ ドメインを欠いた *Dvl2* の発現や点変異をもつ *Vangl2^{Lp}* の発現により細胞内で繊毛の極性が乱れる(Hirota et al., 2010; Guirao et al., 2010)。気管上皮の多繊毛細胞では *Vangl1* の欠損により細胞内で繊毛の極性が乱れること(Vladar et al., 2012)、卵管上皮では *Celsr1* の欠損により細胞内で繊毛の極性が乱れること(Shi et al., 2014)が示されてい

る。

以上のように、どの PCP 因子が細胞内で繊毛の極性を揃えるのに必須であるか、細胞間で極性を揃えるのに必須であるかは組織によって異なっている。卵管では、*Celsr1* 変異体、*Celsr2* 変異体でしか繊毛の極性が調べられていない(Shi et al., 2014、*Celsr2* 変異体:小松博士(未発表データ))。



Int. Fig. 3 脳室上衣の多繊毛細胞

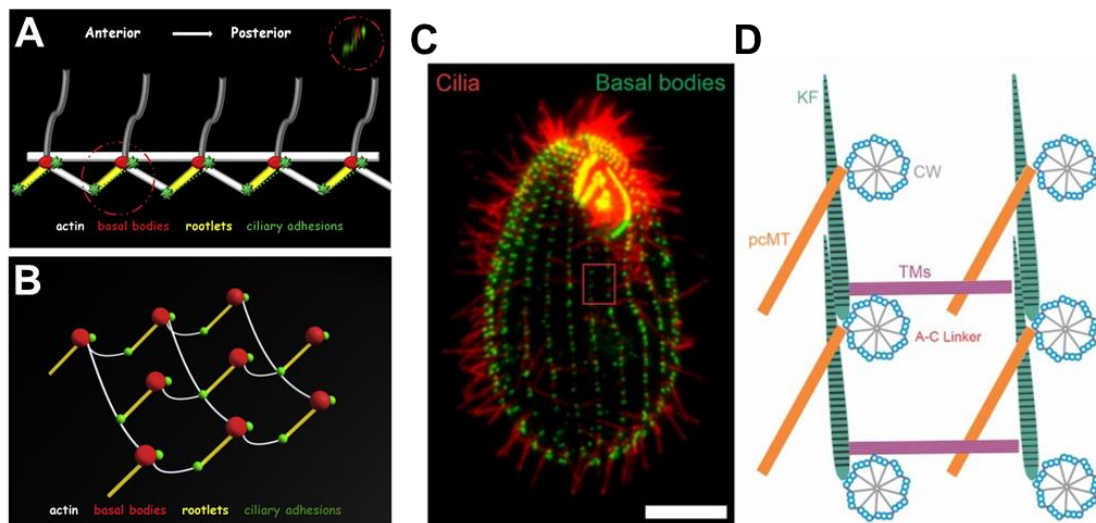
(A-A') Mirzadeh et al., 2010 より引用。脳室上衣の多繊毛細胞を抗 β -catenin 抗体 (緑、細胞形態)、抗 γ -tubulin 抗体(赤、BB)で染色した顕微鏡画像。(A')は A の画像から細胞形態と、BB 集団をトレースし、重心からの偏り(青色矢印)と角度の中央値(赤色矢印)を示している。Scale bar=10 μ m。

5. 多繊毛細胞の極性制御における細胞骨格の寄与

様々な動物種において、細胞骨格である微小管、中間径フィラメント、アクチンフィラメントが BB の周囲で観察されている(Sandoz et al., 1988; Werner et al., 2011; Clare et al., 2014; Antoniadou et al., 2014; Chevalier et al., 2015; Herawati et al., 2016; Tateishi et al., 2017)。加えて、電子顕微鏡写真によって、微小管が BF の先端に接続する可能性が示されている(Reed et al., 1984; Lemullois & Marty, 1990; Sandoz et al., 1988)。

これらの細胞骨格が繊毛の極性制御にどのように寄与しているかは、動物種によ

って異なる。*Xenopus laevis* の表皮においては、cytochalasin D によるアクチンの重合阻害によって、apical 面に広がっている繊毛の配置が不均一になり、向きが揃わなくなり、一方向的な運動も乱れる。Nocodazole による微小管の重合阻害によって、細胞内の繊毛の向きが乱れ、特に近接する繊毛間で向きが揃わなくなる(Werner et al., 2011)。繊毛の極性制御機構のモデルでは、方向性をもって形成されるアクチンフィラメントのネットワークが重要であり、BB から伸びたアクチンフィラメントは隣接する他の BB の rootlet に結合していると考えられている(Werner et al., 2011; Antoniadis et al., 2014) (Int. Fig. 4 A-B)。一方、繊毛虫の BB では、rootlet と反対方向に微小管の構造物が存在し、BB の微小管構造物に隣の BB の rootlet が接続し、rootlet と微小管が交互に並ぶような直線が形成されることによって繊毛の極性が揃えられている(Iftode & Fleury-Aubusson, 2003; Bayless et al., 2019; Soh et al., 2019; Bayless et al., 2019) (Int. Fig. 4 C-D)。



Int. Fig. 4 *Xenopus laevis* と *Tetrahymena thermophila* で考えられている繊毛の極性制御機構

(A-B) Antoniadis et al., 2014 より引用。*Xenopus laevis* 表皮の多繊毛細胞で考えられている繊

毛の極性制御機構の模式図。(A) lateral 面から繊毛の構造を示した模式図。模式図中の波線で囲まれた領域の共焦点顕微鏡画像(x-z)が右上に示されている。BB(Centrin2-RFP、赤)、BB 周囲の ciliary adhesion 複合体(GFP-FAK、緑)がみられる。(B) Apical 面のアクチンネットワークと BB、rootlet、ciliary adhesion 複合体の関係を示している。

(C-D) Bayless et al., 2019 より引用。 *Tetrahymena thermophila* を抗 Centrin 抗体(BB、緑)、抗 GT335 抗体(軸糸、赤)で染色している。Scale bar=10 μ m。(D)は、(C)の一部(赤色四角)に対して作成された BB 周囲の構造を上から見た模式図。Cartwheel(CW)、post ciliary microtubules(pcMT)、transverse microtubules(TM)、Kinetodesmal Fiber(KF)。

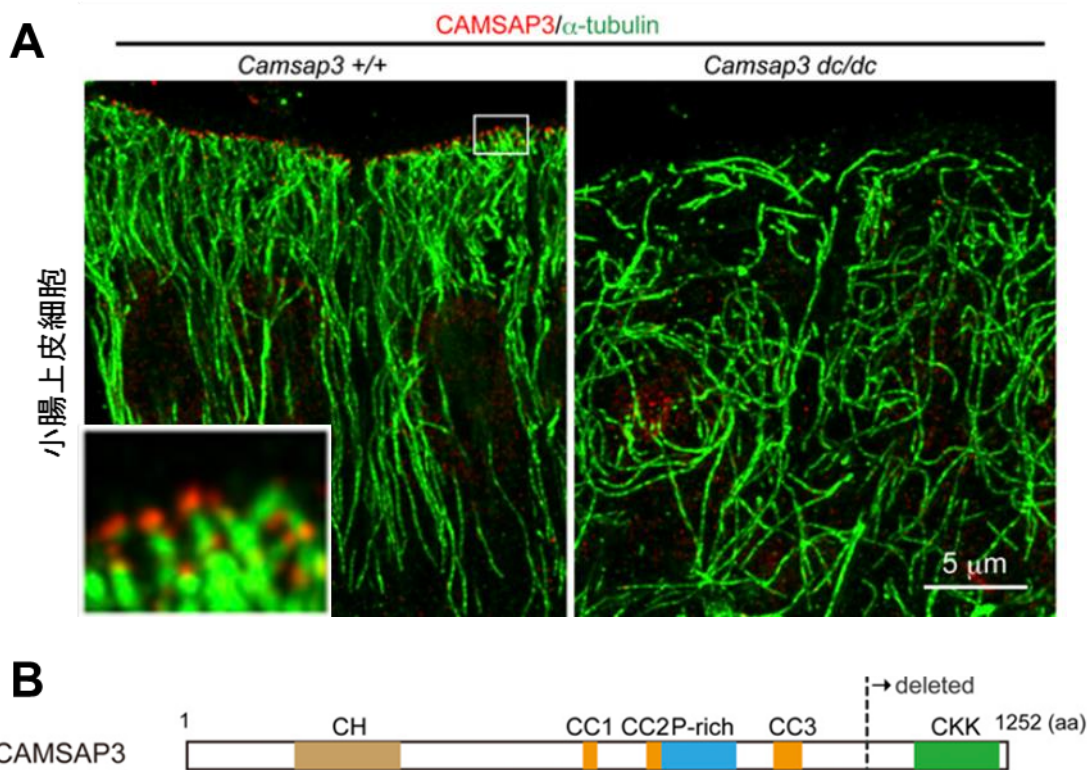
マウスの気管の多繊毛細胞において cytochalasin D によるアクチンの重合阻害によって、apical 面にドッキングしていた BB の数が減少することが示されている(Herawati et al., 2016)。また、nocodazole を用いて微小管の重合阻害を行うと細胞内で繊毛の極性が乱れ、洗い流すと再び細胞内で繊毛の極性が揃うため、細胞内で繊毛の向きを揃えるのに微小管ネットワークが必須であるということが示唆されている(Herawati et al., 2016)。マウス気管の多繊毛細胞においては、微小管やアクチンフィラメントだけでなく、中間径フィラメントの構成タンパク質である keratin8 も BB 付近でネットワークを形成している(Tateishi et al., 2017)。微小管の重合阻害により、微小管だけでなく keratin8 のネットワークにも異常(メッシュ構造の隙間が大きくなり、keratin8 の繊維太さや間隔が均一でなくなる)がみられることから、中間径フィラメントも繊毛の極性制御に寄与すると示唆されている(Herawati et al., 2016)。

マウス卵管多繊毛細胞では微小管のプラス端に結合するタンパク質である EB1 が子宮側の細胞境界に局在することや分泌細胞よりも多繊毛細胞の apical 面で F-アクチン(Phalloidin)のシグナルが強いことが報告されている(Shi et al., 2014)。しかし、BB 付近で微小管・アクチンフィラメント・中間径フィラメントがどのようなネットワークを形成しているのか、また、繊毛の極性制御機構に寄与するかどうか不明であった。

本研究では、マウス卵管多繊毛細胞の BB 付近で微小管・アクチンフィラメント・中間径フィラメントの分布を詳細に調べ、かつ、WT と繊毛の極性に異常がある *Celsr1*^{-/-}マウスと比較した。その結果、微小管の分布に顕著な差がみられたので、微小管について中心に記載する。本来、微小管は、tubulin によって形成される外径 25nm の円筒状の繊維であるが、BF を構成する γ -tubulin や主に軸糸に存在する acetylated tubulin もあり、複雑になってしまうため、便宜的に抗 α -tubulin、 β -tubulin 抗体によって可視化される細胞質の tubulin を微小管と呼ぶ。

6. 非中心体性微小管のマイナス端結合因子 CAMSAP3

CAMSAP3(Calmodulin-regulated spectrin-associated protein3、Nezha と呼ばれる (Meng et al., 2008))は、非中心体性微小管のマイナス端に結合するタンパク質であり、神経細胞や上皮細胞で分子機能が調べられてきた(Dong et al., 2017; Jiang et al., 2014; Tanaka et al., 2012; Takahashi et al., 2016; Silva & Cassimeris, 2014; Baines et al., 2009; Toya et al., 2016; Meng et al., 2008)。非繊毛細胞である小腸上皮細胞の apical 面に CAMSAP3 が分布しており、微小管の bundle が接続している(Toya et al., 2016) (Int. Fig. 7A)。微小管と結合する CKK ドメインを欠く *Camsap3*^{dc/dc} マウスの小腸上皮細胞では、微小管が apical-basal に沿って配向しなくなる(Int. Fig. 7)。このことから、微小管のマイナス端が CAMSAP3 によって apical 面にアンカーされていると考えられている(Toya et al., 2016)。一方で、多繊毛細胞における CAMSAP3 の分布や繊毛の極性制御機構への寄与については全く報告がなかった。



Int. Fig.7 CAMSAP3 でみられるドメインと変異体で欠損する領域

Toya et al., 2016 より引用。

(A) 超解像顕微鏡(STED)によって撮影され、デコンボリューション処理がなされた小腸上皮細胞の画像。左隅の画像は WT の右上の領域(四角)を拡大したもの。

(B) CAMSAP3 が持つドメインと変異体で欠損する領域が図示されている(Ensembl ID: ENSMUST00000171962)。CKK ドメインで微小管と結合している。

7. 本研究の目的

マウスの卵管だけでなく気管や脳室においても繊毛の極性制御機構が研究されているが、多繊毛の運動方向が組織内で揃う機構に関しては、十分に理解されていなかった。*Celsr1*^{-/-}変異体の卵管では、繊毛の運動方向が上皮シート内で揃っておらず、卵が一方向的に輸送されない。このことから、卵を子宮へ輸送するという卵管

の機能を発揮するためには、卵管内腔の上皮平面内で細胞内・細胞間で繊毛の向きが一致している必要がある。そこで、本研究では、細胞内・細胞間で繊毛の極性を揃える機構を明らかにすることを目指した。

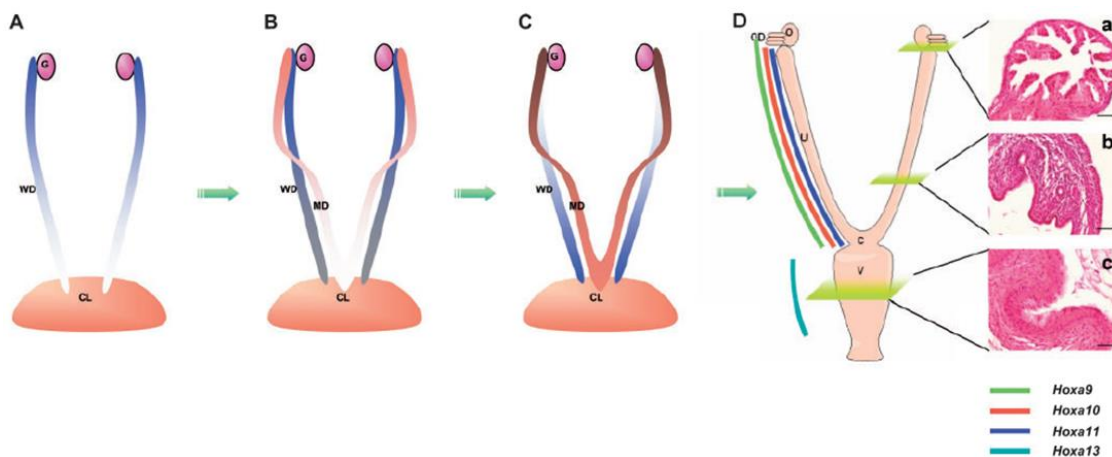
まず、卵管上皮を構成する細胞を BB の状態から type I-V に分類し、個体の発生に従った上皮の変遷を調べた。本研究では、この分類に基づいて、どのような順番で成熟するのか、どの時期(type)において細胞内で繊毛の向きが揃うのか、どの時期(type)に何がどのように分布するのか、関連付けてみていく。第 1 章は、野生型マウスを用いて卵管多繊毛細胞の発達について理解を深めた。

次に、*Celsr1*^{-/-}マウスの卵管多繊毛細胞において、細胞内で繊毛の極性が揃っている傾向にあるにも関わらず、細胞間では繊毛の極性が揃わないことを示した。加えて、WT の卵管多繊毛細胞では子宮側の細胞境界に微小管が濃縮しているが、*Celsr1*^{-/-}の卵管多繊毛細胞では微小管の濃縮方向が細胞間でランダムであることが示された。微小管が細胞境界付近に濃縮している *Celsr1*^{-/-}多繊毛細胞で繊毛の極性を調べたところ、微小管の濃縮方向と繊毛の向きに相関があることが示唆された(第 2 章)。また、WT における BB 周囲の微小管の分布を詳細に調べ(第 3 章)、微小管のマイナス端結合因子である CAMSAP3 に注目することにした。多繊毛細胞における CAMSAP3 の局在や繊毛の極性制御機構への寄与は不明であった。本研究によって、卵管多繊毛細胞において CAMSAP3 が BF 付近に局在することが示された(第 4 章)。さらに、*Camsap3* 変異体で繊毛の極性を調べた結果、CAMSAP3 が「細胞内で繊毛の極性を揃える機構」に寄与することが示唆された(第 4 章)。最後に、CAMSAP3 を介して細胞内で繊毛の極性を揃える機構と *Celsr1* を介して細胞間で繊毛の極性を揃える機構の関係について議論する(第 5 章)。

〈第1章〉マウス卵管の発生における多繊毛細胞の発達

〈序〉

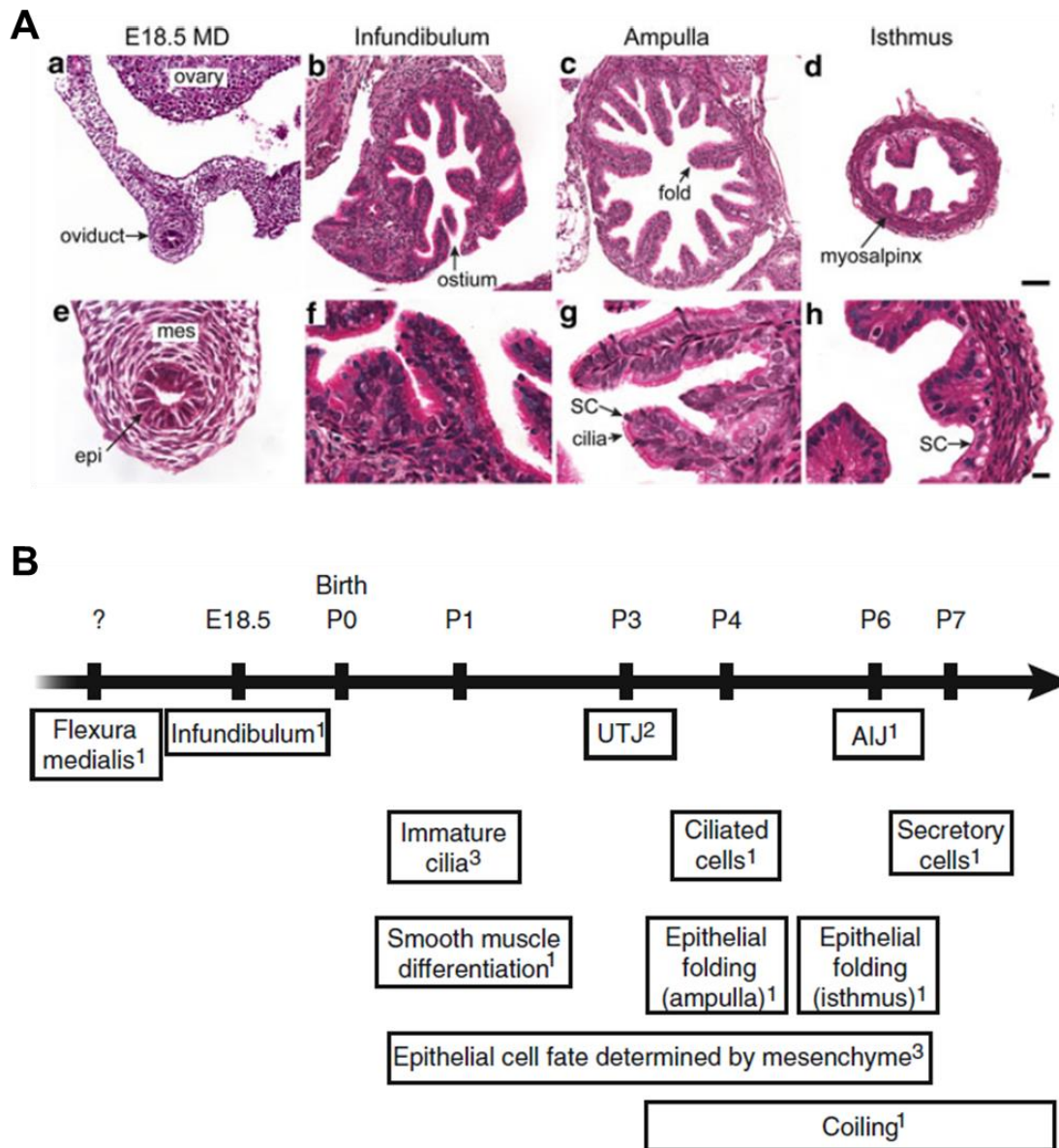
卵管の上皮細胞は、胎児期に存在するミュラー管(Müllerian duct)に由来する。卵巢付近から伸長してきた Müllerian duct が E13.5 日目ごろまでに総排泄腔に到達し、抗 Müllerian ホルモンの低下とともに分化が進む(Yin & Ma, 2005) (Int. Fig. 5)。Embryonic day(E)18.5 の卵管ではヒダ構造のない管であり(Int. Fig. 6)、生後上皮が発達し(Stewart and Behringer, 2012)、生後2週齢までに卵管、子宮、膈の上部への分化が完了する(Yin and Ma, 2005)。これらの先行研究から本研究では、出生後のマウスの発生に従って、卵管上皮を構成する細胞種の変化を調べた(結果 1-1)。また、気管の多繊毛細胞と比べ卵管の多繊毛細胞では、成熟過程への理解が進んでいなかったため、BB が可視化されたマウスを用いてタイムラプス観察を行った(結果 1-2-1)。さらに、光学顕微鏡を用いて繊毛の極性を判定する手法を開発し、多繊毛細胞の成熟過程において繊毛の極性を解析した(結果 1-2-2)。



Int. Fig. 5 マウス卵管の発生過程の模式図

Yin and Ma, 2005より引用。(A) E9.5で中腎からWolffian ductが判別でき、尾側に伸長していく。(B) E11.5付近でMüllerian ductはWolffian ductと平行に形成され、E13.5ごろまでに総

排泄腔に到達する。ここまでの過程は、遺伝学的な性別に関係なく起きる。(C) メスでは、抗Müllerianホルモンの低下により、Wolffian ductが消失しはじめ、Müllerian ductが発達する。(D) Müllerian ductが、卵管(OD: oviduct)、子宮(U: uterus)、子宮頸部(C: cervix)、膣(V: vagina)の上部に分化する。Anterior-posterior軸に沿ってHox遺伝子が発現する。ヘマトキシリン&エオジン(H&E)染色を行った卵管、子宮、膣の断面像。図中の略語、生殖腺(G: gonad)、Wolffian duct(WD)、総排泄腔(CL: cloaca)、Müllerian duct(MD)。Scale bar=50 μ m。



Int. Fig. 6 卵管の組織切片(A)とマウス卵管の発生過程を時系列にまとめた模式図(B)

ともにStewart and Behringer, 2012より引用。

(A) a、eはE18.5の卵管、b-dとf-hは成体の卵管(漏斗(infundibulum(b、f))、膨大部(ampulla(c、g))、峡部(d、h))。Epithelium(epi)、分泌細胞(SC: secretory cells)、scale bar=50 μm (a-d)、10 μm (e-h)。

(B) 参考文献(Agduhr, 1927; Dirksen, 1974; Yamanouchi et al., 2010)。

〈結果〉

1-1. 卵管上皮を構成する細胞の変遷

マウスの卵管上皮では出生後の卵管発生過程に従って多繊毛細胞の割合が増加し、成体では上皮細胞の約 80%に達することが繊毛の軸糸と apical 面の Phalloidin の観察によって示されている(Shi et al., 2014)。繊毛の極性決定時期を調べるため、気管上皮や脳室上皮細胞の先行研究(Al Jord et al., 2014; Burke et al., 2014; Jord et al., 2017)のように BB の分布や繊毛の向きに注目して繊毛の発達過程を詳細に調べる必要があると考えた。

まず、発生過程に従い卵管上皮を構成する細胞種がどのように変化するかを調べた。P5 から成体の 11w までの卵管を BB/BF マーカーである抗 γ -tubulin 抗体(Hagiwara et al., 2000)と、tight junction マーカーである抗 ZO-1 抗体(Itoh et al., 1991)で染色した(Fig. 1-1 A)。 γ -tubulin のシグナルが見られる BB の数と分布から細胞を次の 5 つの type に分類した(Fig. 1-1 B, B')。細胞の apical 面にドット状の γ -tubulin シグナルの数が 1-2 個存在する細胞を type I、核の apical 側の細胞質内に大きなリング状のシグナル(Fig. 1-1 B')が複数存在する細胞を type II、核の apical 側の細胞質内にドット状のシグナルが高密度に存在する細胞を type III、apical 面の細胞膜付近に複数のドット状のシグナルが集まった塊が存在する細胞を type IV、apical 面の細胞膜付近でドット状のシグナルが一様に広がって存在する細胞を type V とした。Type I の細胞には、apical 面がドーム状で核が apical 面近くに存在する細胞と apical 面が平坦で核が basal 側に近い部分に存在する 2 種類の細胞が含まれ、発生の時期を問わずみられた。Type II から一部の type IV では apical 面がドーム状で核が apical 面近くに存在したが、一部の type IV と type V では apical 面が平坦で核が basal 側に近い部分に存在した。Type III の細胞は、他の type と比較して核が大きく丸かった。

発生段階に従ってそれぞれの細胞タイプの割合を調べた(Fig. 1-1 C)。P5 から成体の 11w まで発生に従って、type I は減少し(P5 : 76.7%→11w : 27.6%)、type V は増加

した(P5 : 2.5%→11w : 71.8%)。性成熟後の 6w と 11w では上皮を構成する細胞の割合に顕著な差はなく、type II から type IV の細胞はごくわずかにしかみられなかった(Fig. 1-1 C)。発生過程に従った 5 つの type の細胞集団の割合変化と BB の数から、type I から type V へと順に移行していくことが予想された。

1-2. マウス卵管多繊毛細胞の発達過程

1-2-1. 多繊毛細胞の発達過程と繊毛基部を構成する分子の発現・局在

卵管多繊毛細胞の発達過程が type I から type V へと順に移行するかどうか調べるためにタイムラプス観察を行った。 γ -tubulin シグナルをライブで観察することが出来ないため、BB を構成する Centrin2 が GFP で標識された *GFP-Centrin2^{tg}*-マウス (Higginbotham et al., 2004) を用いた。まず、 γ -tubulin と GFP-Centrin2 のシグナルを比較するため、全ての type の細胞が観察できる P13 (Fig. 1-1 C) の *GFP-Centrin2^{tg}*-マウス卵管を抗 γ -tubulin 抗体で染色した。各 type において、 γ -tubulin と Centrin2 のシグナルは完全には一致しないものの、よく似たパターンであった (Fig. 1-2 A)。 γ -tubulin と Centrin2 のシグナルで大きく異なる点としては、type I において γ -tubulin の大きなドットが 1 つみられる細胞でも Centrin2 の大きなドットは複数観察されたことである。しかし、type I の Centrin2 シグナルは type II-V のものと区別できることから、 γ -tubulin と同じ type 分けが可能であると考えられる。

P13 の *GFP-Centrin2^{tg}*-マウス卵管を培養し、タイムラプス観察を行ったところ、タイプの移行を確認できた細胞は少なかったが、type I から type IV への移行がみられた (Fig. 1-2 B)。Fig. 1-2 B で示した細胞においては、約 16 時間で type I から type IV への移行がみられた。卵管になるべくダメージを与えないよう拘束せずに培養したため、繊毛運動によって観察中の卵管がずれることが多く、type I-IV まで連続して観察できたのは 2 細胞であった。Type II-IV や type IV-V のように type I-IV よりも短い範囲での移行は、多く観察でき、type I から type V に進まずに逆行するよ

うなものは観察されなかった。以上のことから、発生過程に従った卵管上皮を構成する細胞種の変化から推察された通り、タイムラプス観察の結果から、多繊毛細胞は type I から type V へと成熟することが示唆された。

次に、P13 の *GFP-Centrin2*^{fl/fl} マウスと WT マウス(ICR)の卵管を用いて、BB や BF を構成する分子が type I から type V の間でいつ発現・局在するのか調べた。*GFP-Centrin2* と *Centriolin*(BF マーカー)(Mazo et al., 2016)のシグナルを比較すると、type I-V を通して *Centriolin* が *Centrin2* の近傍で観察され、よく似たパターンであった。 γ -tubulin や *GFP-Centrin2* と同様に、*Centriolin* でも type 分けが可能であると考えられる(Fig. 1-3 A)。一方で、*Centriolin* と *Odf2* (distal / subdistal appendage マーカー)(Tateishi et al., 2013)のシグナルを比較すると、*Odf2* は type II-III と一部の type IV で観察されなかった。Type IV に属する細胞のうち 83% (183/221)と全ての type V では *Odf2* が *Centriolin* の近傍に局在していた(Fig. 1-3 B)。抗 acetylated(ace)-tubulin 抗体を用いて繊毛の軸糸を可視化し、*GFP-Centrin2* のシグナルによって type 分けを行い、軸糸が形成される時期を調べた。先行研究(Shi et al., 2014)で報告されているように type I では軸糸が 1 本もない細胞と 1 本ある細胞が観察された。Type II から type III と一部の type IV の細胞では軸糸は観察されなかったが、type IV の一部と全ての type V では軸糸が観察された(Fig. 1-3 C)。これらの結果から、BB が細胞の apical 面にドッキングし、軸糸が形成されるのは type IV の時期であると考えられる。

1-2-2. 繊毛の極性決定時期

多繊毛細胞が発達する過程で繊毛の向きがいつ決まるのかを明らかにするため、まず、その方法を検討した。電子顕微鏡観察では、BB と BF が突出する角度によって繊毛の向きが判定できる。卵管上皮が比較的平坦な成体マウスにおいても電子顕微鏡観察では観察できる視野が限られてしまう上に、若齢マウスの卵管上皮は凹凸が激しく(Fig. 1-4)、BB/BF がはっきりとみえる面を探しだし観察するのは容易では

ない。また、一部の観察面からでは細胞を type I-V に分類することは困難である。そこで、共焦点顕微鏡や超解像顕微鏡といった光学顕微鏡を用いて観察を行うことにした。

まず、脳室や気管の多繊毛細胞で繊毛の向き判定に用いられている抗体の組み合わせと、繊毛の向きが判定できる可能性のある組み合わせで成体 WT マウスの卵管を染色し、共焦点顕微鏡で観察した(Fig. 1-5)。マウス脳室では、Phosphorylated(P) β -catenin と γ -tubulin (Boutin et al., 2014)、Cep164 と γ -tubulin (Ohata et al., 2014)、気管では Odf2 と Centriolin (Herawati et al. 2016)によって、繊毛の方向が判定された。成体マウス卵管を用いて染色を行ったところ、これらの組み合わせでは繊毛間の距離が短く、密に繊毛が存在するため繊毛の向きが判定できなかった(Fig. 1-5 A-C)。P- β -catenin と γ -tubulin の組み合わせでは、両者はともにドット状のシグナルであったが、パターンが一致していなかった(Fig. 1-5 A)。Cep164 と γ -tubulin の組み合わせでは、Cep164 のシグナルがリング状であり、 γ -tubulin はドット状であった。Cep164 のシグナルは細胞のアピカル面に密に観察され、個々の BB を判別することができなかった。また、先行研究では Cep164 のシグナルはドット状に観察されており (Ohata et al., 2014)、今回得た卵管多繊毛細胞の染色像とは異なっていた。また、Cep164 に加え、FGFR1 oncogene partner (FGFR1OP) と Chibby のシグナルもリング状に観察され、この中では Chibby のリングの直径が一番小さかった(Fig. 1-5 B, F, G)。Odf2 (abcam の抗体) と Centriolin (月田 早智子博士に分与いただいた抗体 (Ishikawa et al., 2005)) の組み合わせでは、どちらのシグナルもドットが連なったようなパターンで観察され、個々の BB を判別することができなかった。他にも Centrin と γ -tubulin、Odf2 と γ -tubulin、FGFR1OP と γ -tubulin、Chibby と γ -tubulin、Centrin と Centriolin の組み合わせを検討した(Fig. 1-5 D-H)。その中では、Odf2 (月田 早智子博士に分与いただいた Tateishi et al. 2013) と γ -tubulin (Sigma) が最も繊毛の向きを判定できそうな組み合わせであったため(Fig. 1-5 D-H)、成体マウスに加え、P13 のマウス卵管でも免疫染色を行い、共焦点顕微鏡画像を用いて繊毛の向きが判定できるか

検討した。まず、手動で Odf2 のドットに対して γ -tubulin のドットがどれくらいずれているのか、その角度を調べ繊毛の向きを算出した。成体の多繊毛細胞と P13 の type IV、type V の細胞をそれぞれ 10 個ずつ解析した結果、BB の密度が低い細胞や領域においては向きの判定が可能であった。しかしながら、成熟した多繊毛細胞では、BB が細胞のアピカル面全体に密に分布しており、Odf2 のペアとなる γ -tubulin のドットが判定できず、繊毛の向き判定は困難であった。BB の密度が低い細胞や領域でしか繊毛の向きが判定できないことで、解析結果に「繊毛の向きが乱れている」という方向にバイアスがかかってしまうため、断念した。バイアスがかからないよう、機械的に γ -tubulin のドットに対して一番近い Odf2 のシグナルがある角度も調べたが、明瞭な結果が得られなかった。抗 γ -tubulin 抗体、抗 Centriolin 抗体、抗 Odf2 抗体については複数種類を検討し、二次抗体も種類をかえて複数の組み合わせを検討したが、卵管多繊毛細胞を共焦点顕微鏡で観察した際には各繊毛の BB/BF を対応付けることが困難であり、繊毛の極性を判定することはできなかった。

そこで、Herawati et al., 2016 において繊毛の向き判定に使用されていた抗 Odf2 抗体(月田 早智子博士に分与いただいた Tateishi et al. 2013)と抗 Centriolin 抗体(Santa Cruz) (Mazo et al., 2016)の組み合わせで超解像顕微鏡(Stimulated Emission Depletion; STED)で観察を行うことにした。共焦点顕微鏡(pinhole0.6AU)で撮影した際には各繊毛の BB/BF を対応付けることが困難であったが、STED 顕微鏡で観察を行ったところ、Odf2 は直径約 280nm のリング状のシグナル、Centriolin は長径が約 160 nm の楕円、もしくは近接した 2 点のシグナルとして観察され(それぞれ 10 本分計測した平均、Fig. 1-6 A, A')、各繊毛の BB/BF を対応付けることが可能であった。ゆえに、この 2 つの抗体により繊毛の向きが判定できると考え、Odf2 のリングの中心と Centriolin の 2 点の中心を結ぶ矢印をマニュアルでプロットし、それぞれの繊毛の向きを判定し、卵巣-子宮軸に対する角度を測定した(Fig. 1-6 B, B')。

P13 の卵管を用いて、type IV、type V の細胞において繊毛の極性を調べたところ、type IV の細胞では、細胞内で個々の繊毛が様々な方向を向いているように観察さ

れ、CV 値が 0.2~0.9 の間で大きくばらついていた(n=28cells、中央値 0.530)(Fig. 1-6 C-E)。一方、type V の細胞では、繊毛の向きが揃って観察され、ほとんどの細胞の CV 値が 0~0.3 の間におさまっていた(n=28cells、中央値 0.131)(Fig. 1-6 C-E)。以上の結果から、繊毛の極性が細胞内で揃うのは type V であり、type IV から type V に移行する際に徐々に繊毛の極性が揃うことが示唆された。

また、細胞内で個々の繊毛の向きを判定した結果を用いて、各細胞における“繊毛の平均角度(mean orientation)”を算出した(Fig. 1-6 D)。繊毛の平均角度は、type IV の時期には卵巣-子宮軸に平行でない細胞もあるが、type V では子宮側を向いて平行であった。したがって、子宮側を向いて細胞内で繊毛の向きが揃うのは Type V の時期であると示唆された。

〈考察〉

1. 上皮シートの変化

Apical 面の ace-tubulin(軸糸) と Phalloidin の観察から出生後の発生に従った卵管上皮細胞の推移(type 1-5)について報告されている(Shi et al., 2014)。本研究では、細胞形態(ZO1)と BB(γ -tubulin 及び GFP-Centrin2)の観察から細胞の推移(type I-V)を検討した(結果 1-1)。11w で成熟した多繊毛細胞が 80%近く存在するという点については、両者で同じ結果であった。しかし、分類の仕方が異なるため出生後から 11w までは異なる変遷がみられる。Shi et al., 2014 で type1(軸糸なし、Phalloidin の突起なし)と type2(軸糸 1 本、Phalloidin の突起なし)に分類されたものは、軸糸の本数(結果 1-2-1, Fig. 1-3 C)や Phalloidin の突起の有無から本研究で示した type I-III に相当すると考えられる。また、Shi et al., 2014 で type 3-4 に分類されたもの(短い軸糸多数、Phalloidin の突起あり)は本研究で示した type IV に相当すると考えられる。これらの点に留意して、両者の結果をみると発生過程に従った上皮細胞のタイプの推移は同様の傾向にあった。

成体(6w-11w)では、多繊毛細胞に移行中の細胞であると考えられる type II-IV がほとんどみられなかった(結果 1-1)ことから、成体のマウスでは多繊毛細胞の入れ替わりが頻繁には起きていないことが推察される。ヒトやウシの卵管には、幹細胞が存在することがわかっているが(Kessler et al., 2015; Paik et al., 2012; Snegovskikh et al., 2014)、マウス卵管ではまだ幹細胞は特定されていない。ただ、BB の数や分布から type II-V の細胞は多繊毛細胞に分化中、もしくは分化した細胞であると考えられるので、幹細胞は type I に含まれると推察している。

2. マウス卵管多繊毛細胞における繊毛基部の増幅機構

多繊毛細胞の成熟過程における繊毛基部の観察や遺伝子発現については、気管の多繊毛細胞でよく調べられている(Al Jord et al., 2014; Al Jord et al., 2017; Vladar and Brody., 2013; Zhao et al., 2013; Burke et al., 2014; Nanjundappa et al., 2019;)。卵管多繊毛細胞の成熟過程がどのような遺伝子によって制御されているのかは、まだわかっていないが、卵管多繊毛細胞の成熟過程(結果 1-2-1)は、気管の多繊毛細胞の成熟過程と非常によく似ていた。そのことから、卵管の多繊毛細胞も、気管の多繊毛細胞と同じ遺伝子群によって制御されているのではないかと考えている。

また、成熟した卵管多繊毛細胞では繊毛が平均 200 本存在する。繊毛基部を短期間で大量に増幅する方法として、mother-centriole から複数(3 個程度)の procentriole が形成される mother-centriole-dependent pathway と、mother-centriole から形成された dauter centriole から 5 個程度の procentriole が形成される deuterosome-dependent pathway が報告されている(Al Jord et al., 2014; Al Jord et al., 2017)。これらの機構については、気管の多繊毛細胞を用いてよく調べられているが、卵管の多繊毛細胞ではほとんど調べられてはいない。サルやウズラの卵管の電子顕微鏡観察によって、deuterosome(1 つの dauter centriole から 5 個程度の procentriole が放射状に存在する状態)が観察されている(Anderson and Brenner et al., 1971; Sandoz et al., 1976)ことか

ら、卵管の多繊毛細胞でも deuterosome-dependent pathway が使われていると考えている。Zhao et al., 2013 では、deuterosome を抗 Centrin 抗体で染色した際に、複数のドットからなるリング状に観察されている。その形態と、type II で観察される Centrin2、 γ -tubulin、Centriolin の大きなリング状のシグナル(結果 1-2-1)がよく似ていた。そのことから、type II では、mother-centriole-dependent pathway と deuterosome-dependent pathway を介した繊毛基部の増幅が行われていると考えている。

3. マウス卵管多繊毛細胞における繊毛の極性決定と細胞形態の変化

Type I から type V の間では BB の数だけでなく、apical 面の膨らみや核の位置(Fig. 1-1 B')が変化する。特に type IV の時期には apical 面がドーム型のものと平坦な細胞が存在し、type V の時期には、全ての細胞の apical 面が平坦であったため、細胞骨格の分布や細胞質に存在する細胞小器官の位置が変化していることが予想される。結果 1-2-2 で繊毛の極性が type IV から徐々に揃い始めることが示唆されているため、細胞の apical 面の形態変化も繊毛の極性制御に関連しているのかもしれない。

〈Figure〉

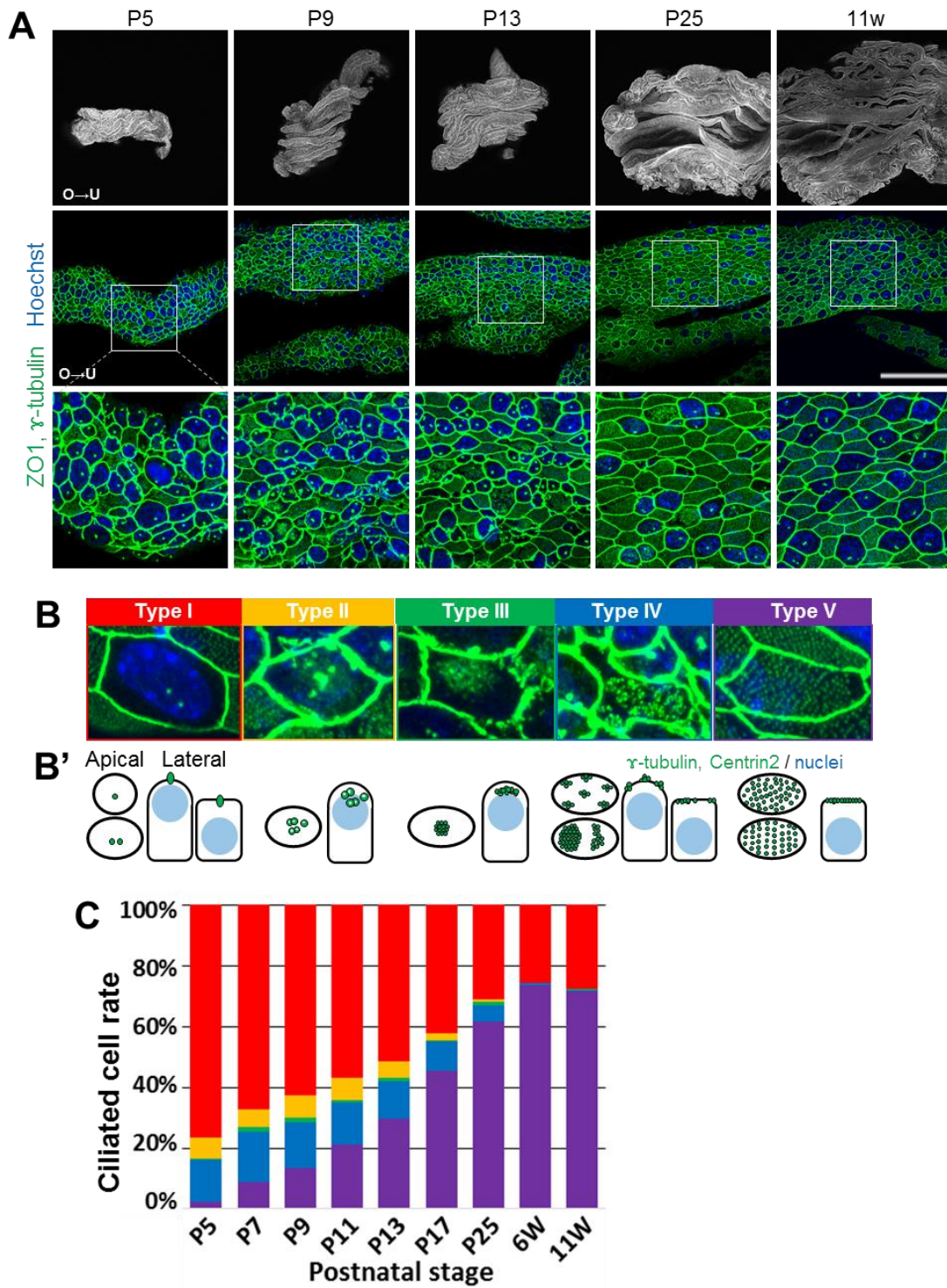


Fig. 1-1 卵管の発生過程に従った上皮シートの変化

(A) 出生 5 日目(P5)、P9、P13、P25、11 週齢(11w)までの卵管を用いて、細胞形態を抗 ZO-1 抗体(緑)、繊毛基部を抗 γ -tubulin 抗体(緑)、核を Hoechst (青)で染色した。1 段目は卵管全体がみられるように撮影し、ZO-1 と γ -tubulin のシグナルから作成した MIP 画像。2-3 段目代表的な上皮シートの一部。2 段目 scale bar=100 μ m。

(B) P13 と成体の WT マウスを抗 γ -tubulin 抗体を用いて染色した共焦点画像(最大輝度投影図(MIP: maximum intensity projection))。細胞のアピカル面の凹凸や γ -tubulin のドット状シグナルの形態や数から細胞を type I-V に分類(B'に模式図)した。Type I と type V は成体、type II-IV は P13 の卵管の MIP 画像から切り出した。

(B') (A)の中段のような共焦点画像を元に type I-V の細胞の模式図を作成した。 γ -tubulin / Centrin2 は緑、Hoechst は水色で示した。

(C) 広域を撮影した(A)のような写真を元に、出生直後から成体までの各ステージにおける卵管上皮細胞の構成を調べた。各ステージにおいて type I-V の細胞が占める割合を計測した(グラフ)。赤 : type I の細胞の割合、黄色 : type II の細胞の割合、緑 : type III の細胞の割合、青 : type IV の細胞の割合、紫 : type V の細胞の割合。各ステージ 3 個体、各 1 卵管、細胞数 P5 : 1469、P7 : 2341、P9 : 1999、P11 : 1609、P13 : 1791、P17 : 2077、P25 : 2807、6w : 2493、11w : 2870。

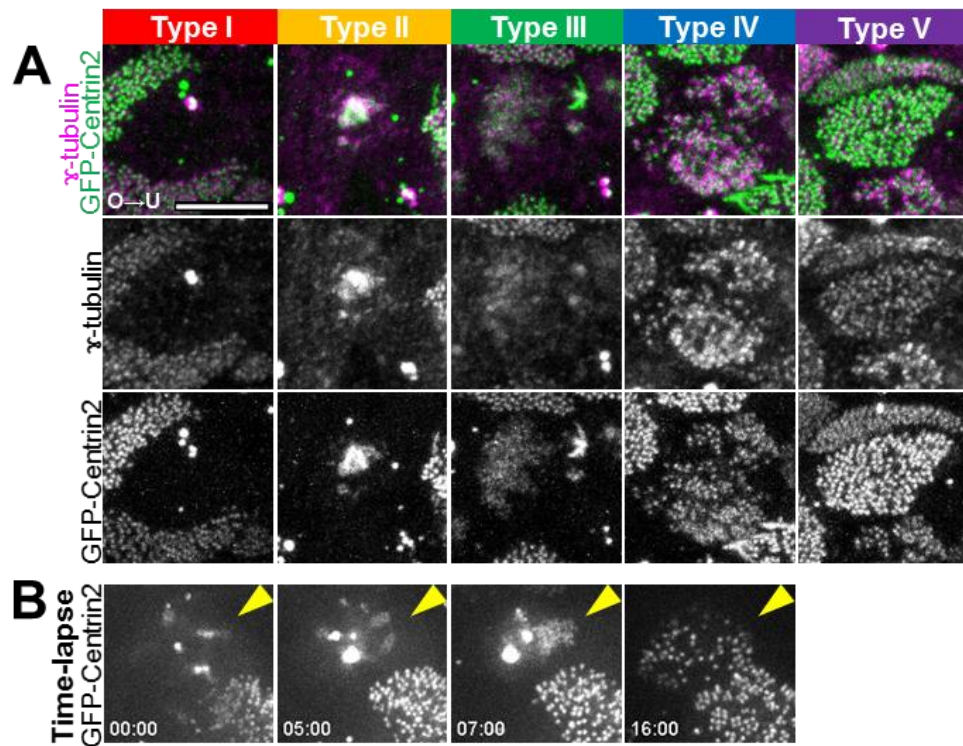


Fig. 1-2 卵管多繊毛細胞の発達過程

(A) P13 の *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス卵管を抗 γ -tubulin 抗体(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡画像。0.2 μ m step で撮影した画像 30 枚から作成した MIP 画像、 γ -tubulin のシグナルを元に同一視野から type I-V に該当する細胞を切り出した。

(B) P13 の *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウスを用いたタイムラプス画像から切り出した例。Type I-IV へと発達する多繊毛細胞(矢頭)。左下の数字は時間。

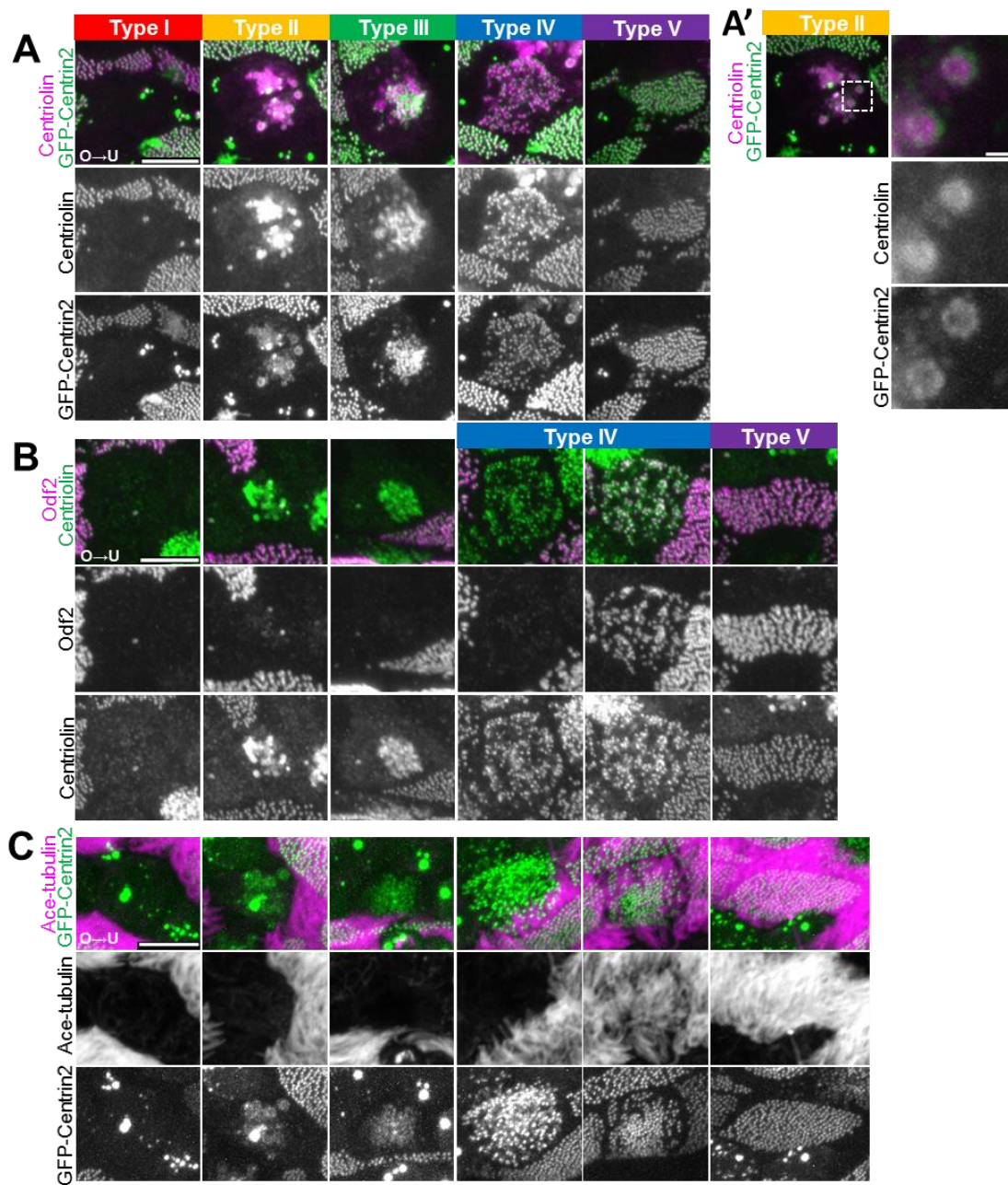


Fig. 1-3 卵管多繊毛細胞の発達過程における BB&BF 構成分子の発現・局在

(A) P13 の *GFP-Centrin2*^{tg}-マウス卵管を抗 Centriolin 抗体(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡画像。0.2μm step で撮影した画像 30 枚から作成した MIP 画像、GFP-Centrin2 のシグナルを元に同一視野から type I-V に該当する細胞を切り出した。Scale bar=5 μm。

(A') (A)と同じ細胞で LUT を下げ、type II に特徴的な GFP-Centrin2 のリング状シグナルがみられる領域を拡大した。このリング状の構造は、GFP-Centrin2、Centriolin に加え、 γ -tubulin のシグナルでも観察された。Scale bar=0.5 μ m。

(B) P13 の WT マウス卵管を抗 Centriolin 抗体(緑)、抗 Odf2 抗体(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡画像。0.2 μ m step で撮影した画像 30 枚から作成した MIP 画像、Centriolin シグナルを元に同一視野から type I-V に該当する細胞を切り出した。Type IV のうち Odf2 が BB に局在していたのは 83% (183/221) であった。Scale bar=5 μ m。

(C) P13 の *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス卵管を抗 ace-tubulin 抗体(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡画像。Type I には、抗 ace-tubulin 抗体で可視化された軸糸がない細胞と 1 本ある細胞が存在するが、前者の方が多傾向になったので、ここでは軸糸を持たない type I を示している。0.2 μ m step で撮影した画像 50 枚から作成した MIP 画像。Scale bar=5 μ m。

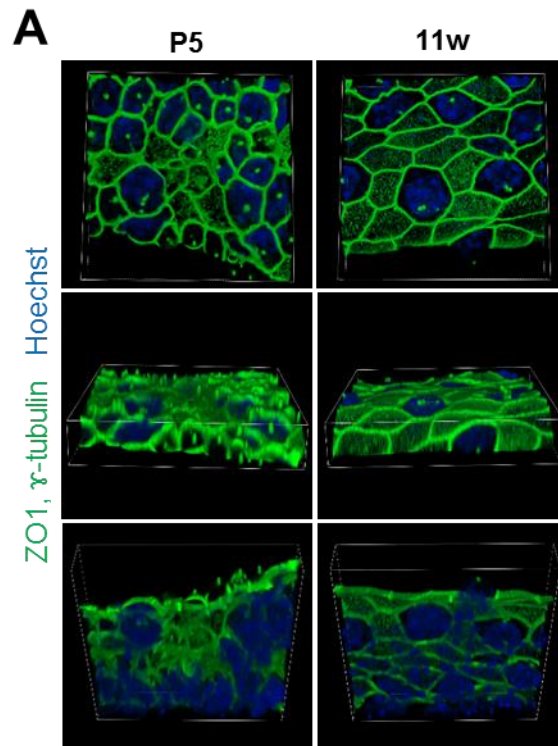
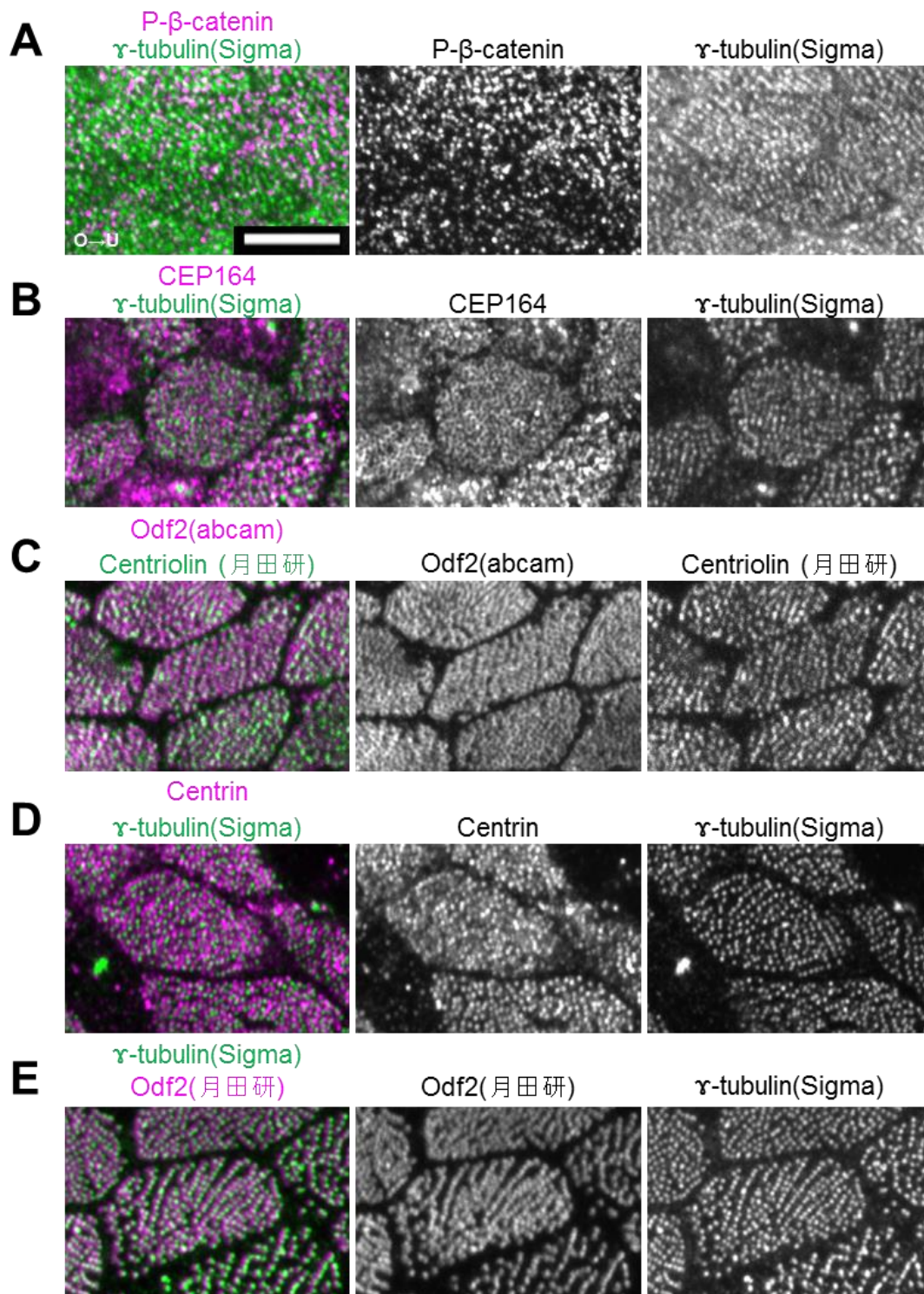
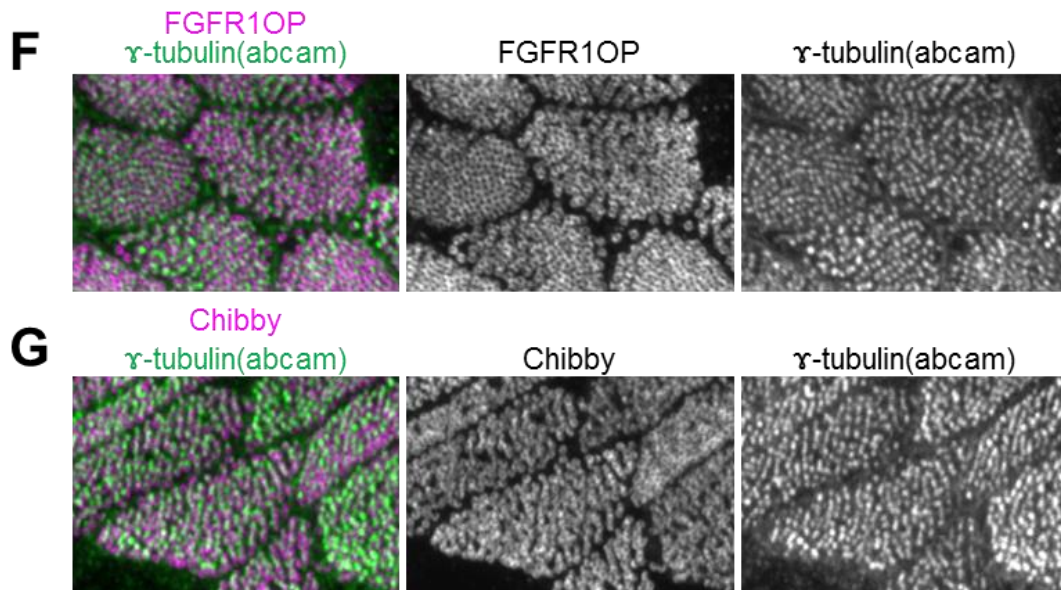


Fig. 1-4 卵管多繊毛細胞の発達過程における上皮形態の違い

(A) 出生直後 P5、11w の卵管を抗 ZO-1 抗体(緑)、抗 γ -tubulin 抗体(緑)、核を Hoechst(青)で染色した共焦点顕微鏡画像。0.3 μ m step で撮影した画像 20 枚から、NIS(画像解析ソフト)を用いて三次元構築した。





H

1	Phospho- β -catenin (CST, #9561, rabbit, Poly) - Alexa 488 anti rabbit IgG(H+L) γ -tubulin (Sigma #6557, Mouse, Mono) - Alexa 594 anti mouse IgG1
2	CEP164 (Sigma #SAB3500022, Rabbit, Poly) - Alexa 488 anti rabbit IgG(H+L) γ -tubulin (Sigma #6557, Mouse, Mono) - Alexa 594 anti mouse IgG1
3	Odf2 (abcam #ab43840, rabbit, Poly) - Alexa 488 anti rabbit IgG(H+L) Centriolin (月田研, rat, Mono) - Alexa 594 anti rat IgG(H+L)
4	γ -tubulin (Sigma #6557, Mouse, Mono) - Alexa 488 anti mouse IgG1 Centrin (Millipore #04-1624, Mouse, Mono) - Alexa 594 anti mouse IgG2a
5	γ -tubulin (Sigma #6557, Mouse, Mono) - F(ab') ₂ Alexa 488 anti mouse IgG(H+L) Odf2 (月田研, rat, Mono) - Alexa 594 anti rat IgG(H+L)
6	FGFR1OP (Abnova #H00011116-M01, Mouse, Mono) - F(ab') ₂ Alexa 488 anti mouse IgG(H+L) γ -tubulin (abcam #ab11321, Rabbit, Poly) - F(ab') ₂ Alexa 594 anti rabbit IgG(H+L)
7	Chibby (Santa Cruz #sc-101551, Mouse, Mono) - F(ab') ₂ Alexa 488 anti mouse IgG(H+L) γ -tubulin (abcam #ab11321, Rabbit, Poly) - F(ab') ₂ Alexa 594 anti rabbit IgG(H+L)
8	Centrin (Millipore #04-1624, Mouse, Mono) - F(ab') ₂ Alexa 488 anti mouse IgG(H+L) γ -tubulin (abcam #ab11321, Rabbit, Poly) - F(ab') ₂ Alexa 594 anti rabbit IgG(H+L)
9	Centrin (Millipore #04-1624, Mouse, Mono) - F(ab') ₂ Alexa 488 anti mouse IgG(H+L) Centriolin (月田研, rat, Mono) - Alexa 594 anti rat IgG(H+L)
10	Odf2 (月田研, rat, Mono) - Alexa 488 anti rat IgG(H+L) γ -tubulin (Sigma #6557, Mouse, Mono) - Alexa 594 anti mouse IgG1

Fig. 1-5 織毛の向き判定に使用する抗体の検討

(A-G) WT マウス(成体)の卵管を用いて免疫染色を行った共焦点顕微鏡画像。抗体の組み合わせの詳細は(H)の表に記載した。0.1 μ m step で撮影した画像 15 枚から作成した MIP 画像。すべての写真で卵巣側が左、子宮側が右。Scale bar=5 μ m。

(H) A-G の染色に用いた抗体の組み合わせ(表の 1-7 番)。他に 8-10 番の組み合わせでも染色

を行ったが Fig は省略した。

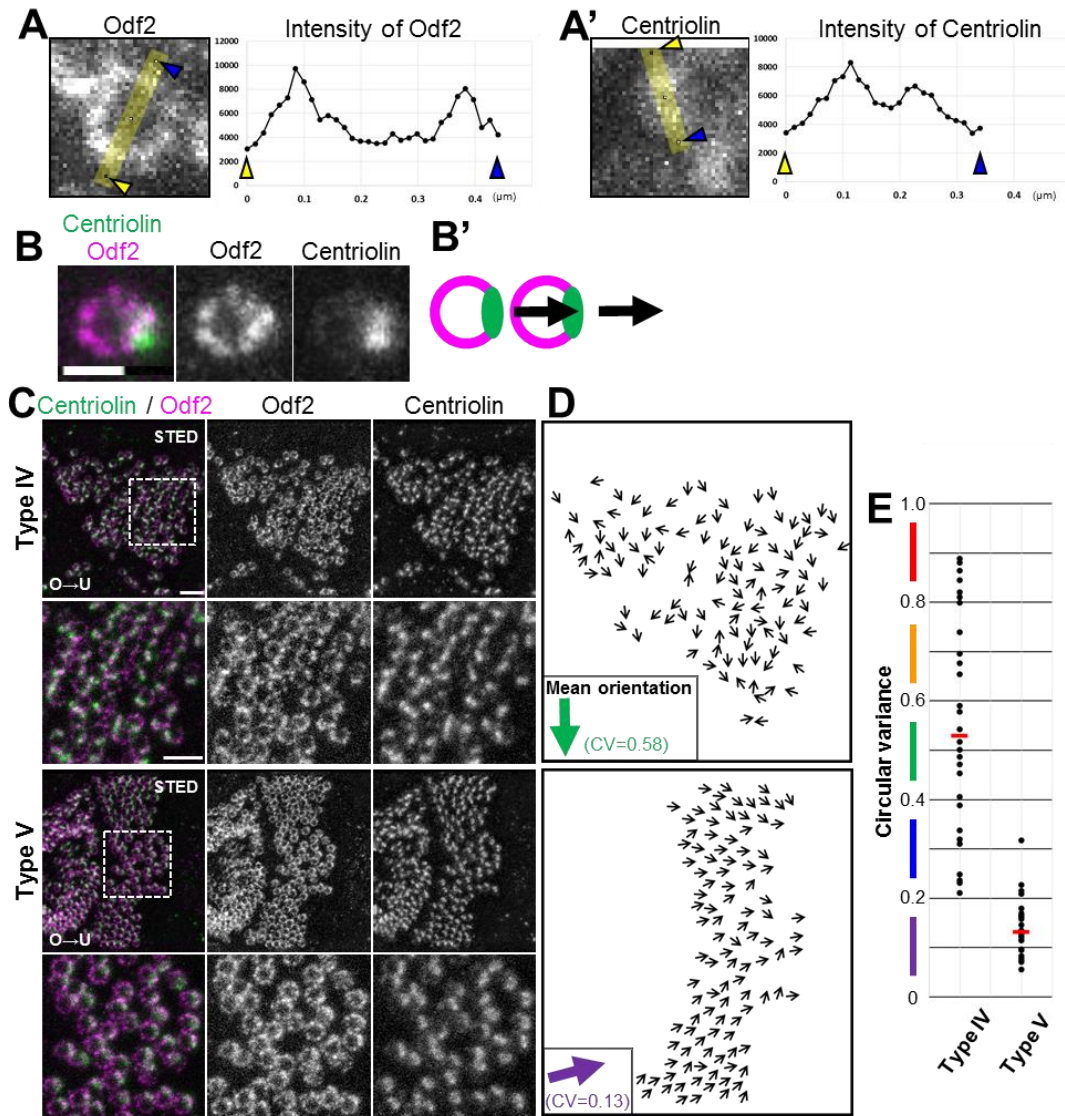


Fig. 1-6 卵管多繊毛細胞の成熟過程における繊毛の極性決定

(A, A') WT マウス(ICR, 12w)の卵管を抗 Odf2 抗体(A)、抗 Centriolin 抗体(A')で染色した超解像顕微鏡画像。(A)と(A')はそれぞれ別の繊毛基部を拡大した。Odf2 のリングの重心を通る 10pix 幅の線(黄色)(A)、Centriolin の楕円状シグナルの長軸を通る 10pix 幅の線(黄色)(A')を引き、平均輝度値のグラフを作成した。写真上の黄色の矢頭と青色の矢頭の地点は、それぞれグラフ上の点と一致する。

(B-B') P13 の WT マウス卵管を抗 Odf2 抗体(マゼンタ)、抗 Centriolin 抗体(緑)で染色した超解像顕微鏡画像から 1 つの繊毛基部を拡大した(B)。Scale bar=0.3 μ m。(B')は(B)の画像より

作成した模式図。Odf2 のリングの重心を通り、Centriolin の中央に先端が向くように矢印を重ね、角度を定量した。

(C) (B)と同様に染色した超解像顕微鏡画像。0.1 μ m step で撮影した画像から作成した MIP 画像。白色波線：拡大する領域。下段は拡大した画像。Scale bar=0.5 μ m。

(D) (C)画像の Odf2、Centriolin のシグナルから極性が判断できた繊毛。黒色の矢印の角度は繊毛の向きと一致する。大きい矢印は、「繊毛の平均角度(mean orientation)」で、色は E のグラフの circular variance(CV)値の目盛りの色と一致する。

(E) 各細胞内の繊毛極性の CV 値の分布。個体数：3、細胞数：Type IV:28 個(18, 6, 4)、Type V:28 個(18, 3, 7)。中央値：Type IV:0.53、Type V:0.13。向き判定を行った繊毛の平均の数：Type IV:96.82 本/細胞、Type V:116.11 本/細胞。

〈第 2 章〉細胞間で繊毛の極性を揃える機構

〈序〉

所属する研究室の先行研究では、*Celsr1* の欠損により、繊毛運動が上皮シート上で揃わないことが示されていた(Shi et al., 2014)。しかし、細胞間で繊毛の向きが揃っていないのか、細胞内で繊毛の向きが揃っていないのか、その両方であるか確定できていなかった。Shi et al., 2014 では、電子顕微鏡観察画像を用いて BB/BF の構造から繊毛の向きを判定し、WT と *Celsr1*^{-/-}マウスで CV 値を比較することにより、*Celsr1*^{-/-}マウスの卵管多繊毛細胞では細胞内で繊毛の向きが揃っていないことが示唆されていた。しかし、この解析では各細胞で 10 本程度の繊毛の向きしか判定できておらず(20 cells)、卵管多繊毛細胞に繊毛が平均 200 本あることを考えると、非常に狭く限られた領域しか解析できていなかった。また、*Celsr1*^{-/-}の CV 値は、ランダムな数値を与えた時に得られる CV 値と比較すると低く、細胞内で繊毛の向きが完全なランダムになっていないという指摘もなされていた。この章では、まず *Celsr1*^{-/-}マウスの卵管における繊毛異常を確定する。

次に、卵管においても繊毛の極性制御に寄与する可能性が高い微小管に注目し、分布を調べた。マウスの脳室や気管上皮の多繊毛細胞では、微小管が細胞境界付近において偏って濃縮しており、BF が向いている方向(気管上皮では proximal 側、脳室では anterior 側)と一致することが報告されている(Boutin et al., 2014; Herawati et al., 2016; Takagishi et al., 2017; Vladar et al., 2012)。マウスの卵管多繊毛細胞においては、微小管のプラス端に結合する EB1 が子宮側の細胞境界に濃縮していることが報告されている(Shi et al., 2016)。しかし、微小管の詳細な観察は行われておらず、微小管の分布や BB との関係は不明であった。そこで、卵管多繊毛細胞における微小管の分布について調べた(結果 2-3, 2-4、第 3 章)。ここには、WT マウスと *Celsr1*^{-/-}マウスで顕著な差がみられた細胞境界付近への微小管の濃縮について示し、より詳細に微小管の分布を調べた結果については第 3 章に示す。この章の最後で、微小管の濃縮と繊毛の極性について議論したい。

〈結果〉

2-1. *Celsr1*^{-/-}マウスの卵管多繊毛細胞における細胞内での繊毛極性

先行研究(Shi et al., 2014)からの課題として、電子顕微鏡画像では繊毛の向きを解析できる領域が限られてしまうということがあった。そこで、本研究では、細胞の apical 面全体を観察できる超解像顕微鏡(STED)を用い、Odf2 と Centriolin の関係から繊毛の向きを判定した(結果 1-2-2 と同様の方法)。

GFP-Centrin2^{tg/+}マウス、*GFP-Centrin2*^{tg/-}; *Celsr1*^{-/-}マウスの卵管を Phalloidin で染色し、繊毛の本数と密度を調べたところ、それぞれ成体の WT の多繊毛細胞で平均 201.1 本/細胞(n=20cells、SD=25.7)、4.3 本/ μm^2 であり、*Celsr1*^{-/-}の多繊毛細胞で平均 199.3 本/細胞(n=20cells、SD=27.68)、4.5 本/ μm^2 であった(Fig. 2-1 A-A')。Odf2 のシグナルがリング状に観察された全ての繊毛基部を解析対象としたところ、成体の WT の多繊毛細胞では平均 183.2 本/細胞(n=20cells)、*Celsr1*^{-/-}の多繊毛細胞では平均 126.6 本/細胞(n=20cells)解析できた。*Celsr1*^{-/-}の多繊毛細胞は apical 面が平坦ではないため、解析前の MIP 画像作成時に Odf2 シグナルがつぶれてしまい解析対象外となった繊毛が WT 細胞よりも多かった。電子顕微鏡観察によって *Celsr1*^{-/-}マウスの繊毛基部の構造が正常であることが確認されており(Shi et al., 2014)、超解像顕微鏡観察によっても WT マウスと同じように個々の BB では Odf2 はリング状に、Centriolin のシグナルは隣接する 2 点として観察された。

WT マウスでは、細胞の広い領域に渡って Centriolin のシグナルが Odf2 のリングの子宮側に偏って観察され、多くの繊毛が規則的に同じ方向を向いていた(Fig. 2-1 B)。解析を行った全ての細胞の CV 値は 0.2 以下(中央値 0.098)と低く、細胞内で繊毛の極性が揃っていた(Fig. 2-1 D)。*Celsr1*^{-/-}マウスでは、必ずしも Odf2 のリングの子宮側に Centriolin のシグナルが偏っているわけではなく、繊毛が異なる方向を向いていた(Fig. 2-1 B')。CV 値は 0.09 から 0.5(中央値 0.229)まで分布しており、WT マ

ウスでみられるのと同程度に CV 値が低く細胞内で繊毛の向きが揃っている細胞と CV 値が高く細胞内で繊毛の向きが乱れている細胞が存在した。完全にランダムな場合を仮定して算出した CV の中央値は 0.9 であるため(Fig. 4-4)、*Celsr1*^{-/-}マウスでは繊毛の向きが完全なランダムに比べて、明確に CV 値が低く、繊毛の向きがやや揃っていることが示唆された。この結果は、電子顕微鏡観察を用いた先行研究(Shi et al., 2014)と一致している(Fig. 2-1 D)。

2-2. *Celsr1*^{-/-}マウスの卵管多繊毛細胞における隣接する細胞間の繊毛極性

隣接する細胞間で繊毛の向きを比較するため、それぞれの細胞における繊毛の平均角度を算出した。平均角度を矢印の方向で、各細胞の CV 値を矢印の色で示した(Fig. 2-2)。WT では、細胞間でも繊毛の平均角度が揃っていた(Fig. 2-2 A)。しかし、*Celsr1*^{-/-}マウスでは、CV 値が比較的 low 細胞内で繊毛の向きが比較的揃っている細胞間でも、繊毛の平均角度は揃っていなかった(Fig. 2-2 A')。

以上の解析から *Celsr1*^{-/-}マウスではそれぞれの細胞内の繊毛の方向は完全なランダムではなく、特定の方向を向いてある程度揃っているが、細胞間では繊毛の平均角度が揃っていない。これにより、*Celsr1* を欠損する場合でも細胞内で繊毛の向きをある程度そろえる機構が存在すると示唆された。

2-3. 細胞境界付近への微小管の濃縮

抗 β -tubulin 抗体を用いて WT マウスの卵管を染色した(Fig. 2-3 A)ところ、子宮側の細胞境界付近に微小管が濃縮し、卵巣-子宮軸に沿った勾配が観察された。卵管では、繊毛の有効打が子宮側を向いているため、繊毛の向きと微小管の濃縮方向は一致していた。一方、*Celsr1*^{-/-}マウスの多繊毛細胞においては、微小管の濃縮が明瞭な細胞(約 75%)と不明瞭な細胞(約 25%)が存在した(Fig. 2-3 A')。微小管の濃縮の強

さをヒストグラムで示すと、全体としては WT と類似した分布がみられたが、*Celsr1*^{-/-} マウスでは微小管の濃縮が弱い(0~0.05 の数値を示す)細胞が WT マウスと比べて多かった(Fig. 2-3 C)。微小管の濃縮が明瞭な細胞では、濃縮の方向が細胞間で一致しておらず、卵巣-子宮軸やヒダの形態とも一致していなかった(Fig. 2-3 A')。

Celsr1^{-/-} マウスではヒダ構造が非常に複雑である(Shi et al., 2014)が、微小管の濃縮方向を定量的に比較するため、卵巣側、子宮側を確認した上で、各ヒダに沿った微小管の濃縮方向を解析することにした(Fig. 2-3 B-B')。また、微小管のシグナルは *Celsr* のような膜貫通タンパク質とは異なり、Phalloidin で標識される細胞境界よりも内側で観察されるため、従来の局在解析法(Shi et al., 2014; Arata et al., 2017)のままでは適用できず、新田 昌輝博士に改変していただいたものを利用した。各多繊毛細胞において、Phalloidin で標識される細胞境界をトレースして ROI を作成し、その ROI を 2pixel 分細胞の重心側へ縮小し、細胞境界(Phalloidin)を含まない内周 5pixel 幅で微小管の平均輝度を求め濃縮方向を定量した。180 度周期の nematic order を算出した後、各細胞の卵巣側・子宮側の領域でシグナルの比を調べることで 360 度周期のデータとした(Fig. 2-3 B-B')。ローズダイアグラムを用いて、卵管上皮のヒダに対して微小管の濃縮方向を示したところ、WT マウスでは子宮側を意味する円の右側に bin が集中していたのに対し、*Celsr1*^{-/-} マウスでは正円に近い形状をしていた。このことから、WT マウスでは、卵巣-子宮軸とヒダに沿って微小管が子宮側の細胞境界付近に濃縮しているが、*Celsr1*^{-/-} マウスでは微小管の濃縮方向がランダムであることが示唆された。

2-4. *Celsr1* 非依存的な微小管の濃縮と繊毛の極性

微小管が細胞境界付近へ濃縮していた *Celsr1*^{-/-} の多繊毛細胞を用いて、微小管の濃縮方向と繊毛の向きに相関があるのか調べた。抗 β -tubulin 抗体と抗 Odf2 抗体・抗 Centriolin 抗体では、最適な染色条件(固定法)が異なるため、それぞれのシグナル

は前述の Fig. 2-3 A-A'や Fig. 2-1B-B'と少し異なる。β-tubulin シグナルは、細胞質で微小なドット状として観察され、前述の(Fig. 2-3 A-A')で見られるような明瞭な繊維状としては観察されなかった。また、Odf2 のシグナルはリング状ではなく、中空のない丸状に、Centriolin のシグナルも 2 点のドットではなく、楕円状に観察された。

微小管の濃縮が観察された細胞において、Centriolin、Odf2 のシグナルから繊毛の向きを判定したところ、多くの繊毛が微小管の濃縮している方向を向いていた(Fig. 2-4)。また、微小管の濃縮が観察された細胞においては、各細胞の繊毛の平均角度が微小管の濃縮している方向とおおよそ一致していた(n=5cells、解析した繊毛の本数：210.2 本/cell)。また、これらの細胞の CV 値は 0.25 以下(中央値 0.143)であり、無作為に *Celsr1*^{-/-}マウスの繊毛の極性を解析した CV 値の分布(Fig. 2-1 D、中央値 0.229)と比較しても CV 値は低い部類であった。このことから、*Celsr1* を欠損していても微小管の濃縮が観察される細胞では、細胞内では繊毛の極性が揃う傾向にあることが示唆された。

以上の観察から、卵管多繊毛細胞における微小管の細胞境界付近への濃縮は *Celsr1* 非依存的にも起きるが、細胞間で微小管の濃縮方向を子宮側に揃えるには *Celsr1* が必須であることが示唆された。また、微小管の濃縮方向と各細胞内の繊毛の向きには相関があることが示唆された。

〈考察〉

1. マウスの卵管多繊毛細胞の繊毛の極性制御機構における *Celsr1* の機能

多繊毛の極性を揃える機構は、動物種や器官によって異なっている。Boutin 博士らは、PCP 因子の機能も多様であると報告している。哺乳類の脳室上衣細胞では、一部の PCP 因子(*Celsr2*、*Celsr3*、*Fzd3*、*Vangl2*)が個々の細胞内で繊毛の極性を制御するのに寄与しており、他の PCP 因子(*Celsr1*、*Fzd3*、*Vangl2*)は、細胞間で繊毛の極性を制御するのに寄与していること(Boutin et al., 2014)が示唆された。*Celsr1*^{-/-}マウ

スの脳室上衣細胞では、絨毛集団(patch)が偏る方向と微小管の濃縮方向は一致しているが、patch が偏る方向と絨毛の平均角度は一致していなかった。つまり、微小管の濃縮している方向と絨毛の平均角度が一致していない可能性がある。一方、*Celsr1*^{-/-}マウスの卵管上皮細胞では、細胞間で微小管の濃縮している方向は揃っていないが絨毛の平均角度は微小管の濃縮方向と一致していた。この点から、微小管の濃縮方向と絨毛の極性の関係は、器官によって少し異なるかもしれないと考えている。

また、脳室上衣細胞では *Celsr2*、*Celsr 3*、*Fzd3*、*Vangl2* が個々の細胞内で絨毛の極性を制御するのに寄与している(Boutin et al., 2014)が、卵管上皮においては、*Celsr3* の発現は検出されておらず(Shi et al., 2014)、*Celsr2* 変異体マウスと *Vangl2* 変異体マウスの卵管では絨毛の極性異常がみられなかった(*Celsr2* 変異体：小松博士、*Vangl2* 変異体：宇佐美の未発表データ)。これらのことから、卵管では *Celsr* ファミリー(*Celsr1-3*)の中では、*Celsr1* が主要な機能を担っていると考えられる。さらに、*Celsr1* を欠損しても、細胞内で絨毛の極性が揃う傾向にあるが、細胞間で絨毛の極性は揃っていない。このことは、卵管においては *Celsr1* が主に細胞間で絨毛の極性を揃えることに機能していることを示唆している。

2. 細胞内で絨毛の向きを整えるための自律的なメカニズム

WT マウスの卵管多絨毛細胞では微小管が子宮側の細胞境界に濃縮していたが、絨毛の極性が乱れている *Celsr1*^{-/-}マウスでは微小管の濃縮の程度や濃縮方向に異常がみられた(結果 2-3, Fig. 2-3)。*Celsr1*^{-/-}の多絨毛細胞において、微小管の濃縮方向と絨毛の極性に相関がみられたこと(Fig. 2-4)から、*Celsr1* を欠いた細胞においても微小管の濃縮方向に沿って絨毛の極性を個々の細胞内で自律的に揃える能力を有していることが示唆された。

ウズラの卵管多絨毛細胞と哺乳類の脳室や気管の多絨毛細胞においては、apical

表面の直下に位置する微小管が BF に接続していること (Sandoz et al., 1988, Vladar *et al.*, 2012; Herawati *et al.*, 2016; Tateishi *et al.*, 2017) から、微小管の濃縮方向に沿って繊毛の極性を個々の細胞内で自律的に揃える機構には BB/BF と微小管のインターアクションが重要なのではないかと考えた。

〈Figure〉

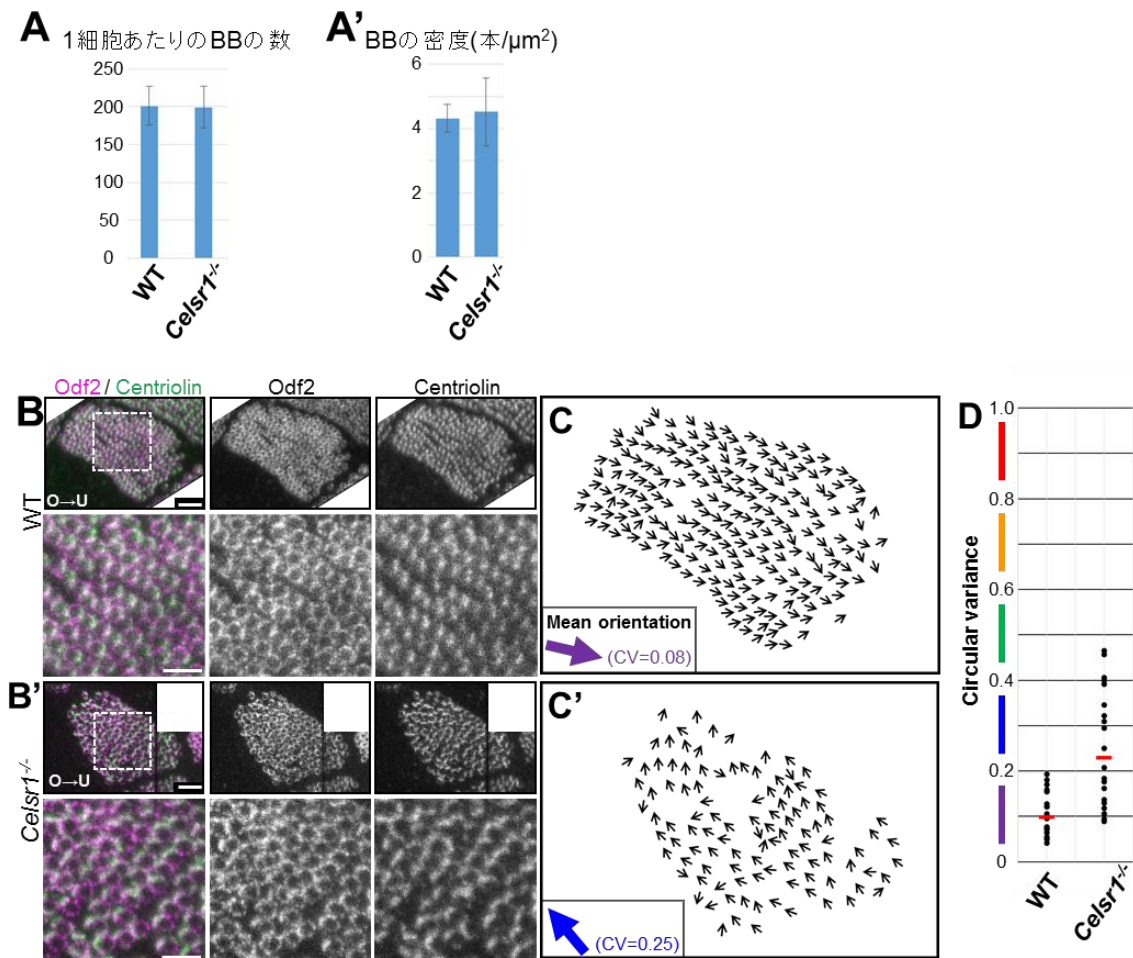


Fig. 2-1 *Celsr1*^{-/-}マウスにおける細胞内での繊毛の極性

(A-A') *Centrin2*^{tg/tg}マウス(11w)、*GFP-Centrin2*^{tg/tg}; *Celsr1*^{-/-}マウス(11w)の卵管を Phalloidin で染色し、BB の数と密度を調べた。各 2 個体、20 細胞。

(B-B') WT マウス(ICR, 12w)(B)、*Celsr1*^{-/-}マウス(12w)。CV グラフ(D)で示される中央値に近い細胞を示した。WT : CV=0.08、計測した繊毛 : 210 本、*Celsr1*^{-/-} : CV=0.25、計測した繊毛 : 121 本。0.1μm step で撮影した各画像に対してズレ補正(Fiji : correct 3D drift)を行い、作成した MIP 画像。細胞が 1 視野に収まらないものは、のりしろとなる領域を含め複数の写真に渡って撮影し、のりしろのシグナルが一致するように手動で重ねた。Scale bar = 1μm(上段)、0.5μm(下段)。

(C-C') (B, B')の画像の Odf2、Centriolin のシグナルから極性が判断された繊毛。矢印の角度

は繊毛の向きと一致している。

(D) WT マウス(ICR, 12w)、*Celsr1*^{-/-} マウス(12w)の多繊毛細胞において、各細胞での繊毛の極性を円統計における分散(circular variance)として示した。グラフ中の 1 点が 1 細胞を意味し、bar(赤)は中央値。個体数：各 2 個体、計測した細胞数 WT：20cells (12 cells, 8cells)、*Celsr1*^{-/-}：20cells (13cells, 7cells)、向き判定を行った繊毛の数 WT：平均 183.2 cilium/cell、*Celsr1*^{-/-}：平均 126.6 cilium/cell。

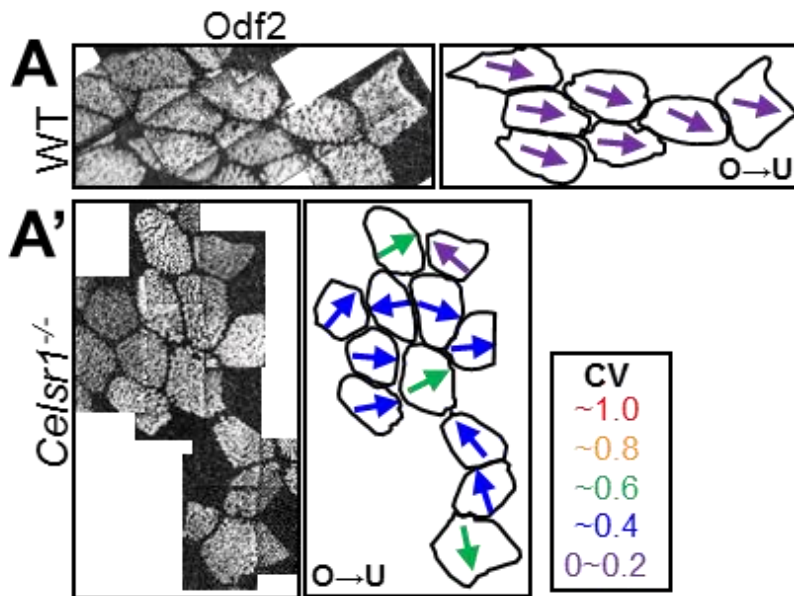


Fig. 2-2 *Celsr1*^{-/-}マウスにおける細胞間での繊毛極性

(A-A') WT マウス(ICR, 12w)(A)、*Celsr1*^{-/-}マウス(12w)(A')において、Fig. 2-1 B-D で繊毛の極性を定量した隣接する多繊毛細胞を Odf2 のシグナルを元につなぎ合わせた。Odf2 のシグナルを元に細胞形態をトレースし、各細胞の「繊毛の平均角度(mean orientation)」を矢印の角度で示した。矢印の色は CV の値に従って、紫：0~0.2、青：~0.4、緑：~0.6、黄：~0.8、赤：~1.0。

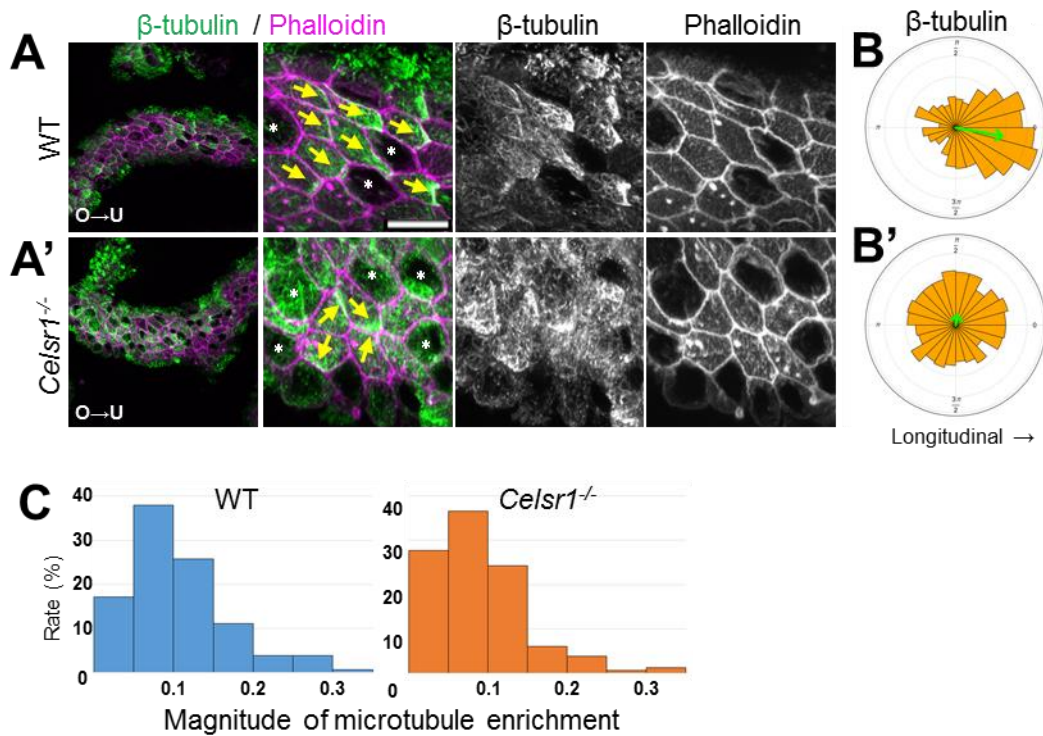


Fig. 2-3 WT マウス、*Celsr1*^{-/-}マウスの卵管における細胞境界付近への微小管の濃縮

(A-A') 成体(11w)の WT マウス(ICR)(A)、*Celsr1*^{-/-}マウス(A')の卵管を抗 β -tubulin 抗体(緑)、Phalloidin(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡像。0.2 μ m step で撮影した画像 20 枚から作成した MIP 画像。 β -tubulin の局在方向を矢印(黄色)で、分泌細胞を(*)で示した。Scale bar=10 μ m。

(B-B') (A-A')と同様の条件で染色した画像を用いて、多繊毛細胞における β -tubulin の局在方向を定量した(WT マウス(B)、*Celsr1*^{-/-}マウス(B'))。細胞境界の Phalloidin シグナルが 5 枚以内(1 μ m 厚)に収まる多繊毛細胞を対象とし、細胞境界のシグナルから細胞の輪郭をトレースし、ROI を作成した。ROI を 2pixel 分細胞の重心に縮小させ、細胞の重心側を 5pixel 幅で、細胞周囲に沿って解析した。180 度周期の nematic order を算出した後、各細胞の卵巣側・子宮側の領域でシグナルの比を調べることで 360 度周期のデータとした。ローズダイアグラムを用いて、卵管上皮のヒダに沿った(longitudinal)微小管の濃縮方向を示した。角度は 15 度幅で 24 区分に分けられている。面積は、各角度に分布する細胞数に比例している。ICR : 3 個体、各 1 卵管、細胞数 : 125, 110, 135、*Celsr1*^{-/-} : 3 個体、各 1 卵管、細胞数 : 134, 108, 106。

(C) (B-B')のデータを使用し、微小管の濃縮の強さをヒストグラムで示した。横軸の値が小さいほど微小管の濃縮が弱く一様であることを意味している。

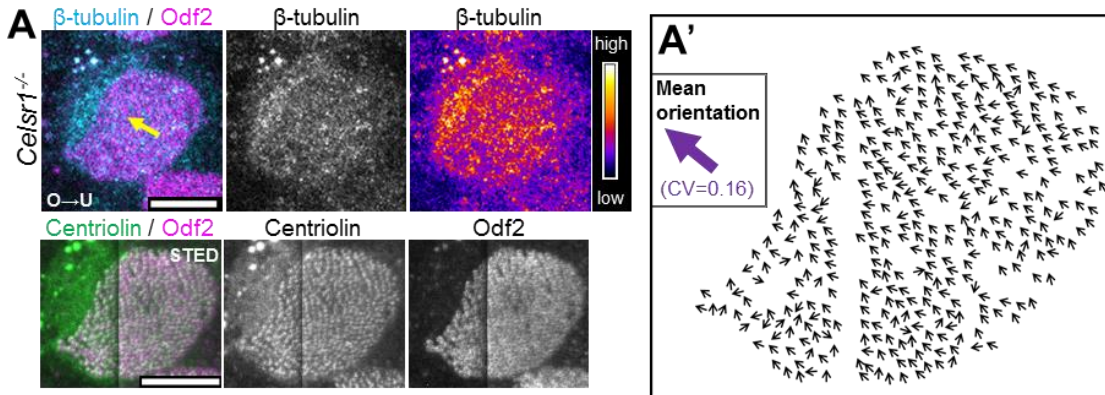


Fig. 2-4 微小管の濃縮方向と繊毛の向き

(A-A') *Celsr1*^{-/-}マウスの卵管を抗 β-tubulin 抗体(シアン)、抗 Odf2 抗体(マゼンタ)、抗 Centriolin 抗体(緑)で染色した。

(A)上段は共焦点顕微鏡画像、下段は超解像顕微鏡画像、細胞が1視野に収まらなかったものは、のりしろとなる領域を含め複数の写真に渡って撮影し、のりしろのシグナルが一致するよう手で重ねた。共焦点顕微鏡画像は 0.2μm step、超解像顕微鏡画像は 0.1μm step で撮影し、超解像顕微鏡画像においては各画像に対してズレ補正(Fiji : correct 3D drift)を行った後、作成した MIP 画像。上段の矢印は、目視で確認した β-tubulin の局在方向を示した。上段右図、β-tubulin の輝度によってカラーコードで示した。Scale bar=5μm。

(A')超解像顕微鏡画像(A 下段)を元に Fig. 1-6 と同様の方法で、各繊毛の極性を解析した。矢印の角度は繊毛の向きと一致している。この *Celsr1*^{-/-}マウスの多繊毛細胞は、CV=0.164、計測した繊毛の本数：369本である。Scale bar=5μm。

〈第3章〉卵管多繊毛細胞における微小管の分布

〈序〉

第2章で、マウスの卵管多繊毛細胞において、繊毛の極性と微小管の濃縮方向に相関があることを示した。卵管多繊毛細胞で詳細に微小管を観察したところ、他にも特徴的な分布が観察された。この章では、マウスの卵管における微小管の分布を詳細に記載する。

〈結果〉

3-1. 複数の抗 tubulin 抗体による染色像の差

微小管のタイプは複数あるため(α -tubulin、 β -tubulin、 ace-tubulin 、 $\text{tyrosinated}(\text{tyr})$ - α -tubulin)、まず WT マウスの卵管多繊毛細胞においてそれぞれを認識する抗体がどのような染色パターンを示すか調べた(Fig. 3-1 A-C)。抗 ace-tubulin 抗体では、軸糸で強いシグナルがみられる一方、細胞質の微小管は検出できなかった。固定時間や抗体の濃度、染色時間の検討も行ったが細胞質の微小管が染まることはなかった(Fig. 3-1 A)。抗 α -tubulin 抗体では、軸糸全体で輝度の高いシグナルが、細胞質で繊維状のシグナルが観察された。抗 β -tubulin 抗体は、軸糸の先端だけで輝度の弱いシグナルが、細胞質では繊維状のシグナルが観察された。細胞質の染色像は抗 α -tubulin 抗体、抗 β -tubulin 抗体で類似しており、違いは α -tubulin シグナルの方が β -tubulin シグナルよりも若干シャープにみえる程度であった(Fig. 3-1 B)。抗 $\text{tyr-}\alpha$ -tubulin 抗体は、軸糸の apical 側半分で輝度の高いシグナルが、細胞質で繊維状のシグナルが観察された(Fig. 3-1 C)。抗 $\text{tyr-}\alpha$ -tubulin 抗体も抗 β -tubulin 抗体と細胞質で類似した像が得られ、違いは $\text{tyr-}\alpha$ -tubulin シグナルの方が β -tubulin シグナルよりも若干シャープにみえる程度であった(Fig. 3-1 C)。抗 α -tubulin 抗体(Host : mouse)と抗 $\text{tyr-}\alpha$ -tubulin 抗体(Host : rat)の共染も試みたが、抗 $\text{tyr-}\alpha$ -tubulin 抗体が anti-mouse の二次抗体とも反応してしまったため、両者のシグナルは直接比較できなかった。これらの

観察に基づき、apical 側から微小管の分布を観察するには主に抗 β -tubulin 抗体、lateral 側から分布を観察するには抗 α -tubulin 抗体を用いることにした。

3-2. BB 付近の微小管

子宮側の細胞境界付近へ濃縮する微小管によって、細胞の apical 面全体に広がっている繊毛の向きがどのように揃えられているのだろうか。個々の BF の先端付近に微小管が結合しているような電子顕微鏡画像が様々な動物種が多繊毛細胞で得られている (Reed et al., 1984; Lemullois & Marty, 1990; Sandoz et al., 1988)。

まず、細胞の apical 面全体で BB 付近の微小管を観察するため、抗 β -tubulin 抗体を用いて、*GFP-Centrin2^{tg/-}*マウス(11w)の卵管を染色し、共焦点顕微鏡で観察した。0.2 μ m step で撮影したところ、1 箇所 *Centrin2* は約 3 枚に渡って観察された。*Centrin2* が観察される apical 面近傍 (約 0.6 μ m 以内) では、微小管が *Centrin2* の間を埋めるように存在し、BB が整列している領域においては、BB の並びに沿って微小管が stripe 状のパターンを形成していた(Fig. 3-2 A)。この stripe 状のパターンも、微小管の濃縮が観察される子宮側で強く、卵巣側で弱い傾向にあった。*Centrin2* のシグナルよりも basal 側には、様々な向きに配向する微小管の複雑なメッシュワーク構造が存在し、子宮側への濃縮が観察された(Fig. 3-2 A')。微小管の stripe パターンよりも 0.2~0.4 μ m 程度 basal 側では、Phalloidin の stripe パターンが観察され、両者はよく似ていた(Fig. 3-2 A)。同腹の *GFP-Centrin2^{tg/-}*マウス、*GFP-Centrin2^{tg/-}; Celsr1^{-/-}*マウス(成体)を用いて *Centrin2* と同じ Z 軸面にある微小管の分布を観察したところ、*Celsr1^{-/-}*マウスにおいても BB 間を埋めるように stripe 状の微小管が存在していた(Fig. 3-2 B, B')。

次に、lateral 面から BB と微小管を観察するため、軸糸のシグナルも強い抗 α -tubulin 抗体を用いて、*GFP-Centrin2^{tg/-}*マウス、*GFP-Centrin2^{tg/-}; Celsr1^{-/-}*マウスの卵管を染色した(Fig. 3-2 C-C')。Centrin2 のシグナルがあるところでは、 α -tubulin のシ

グナルは弱く、軸糸の α -tubulin シグナルと細胞質の α -tubulin シグナルの間には gap が存在していた。WT マウスでは、Centrin2 のドットの basal 側に微小管の bundle が接続しており、1 つの BB に対し一本の直線的な微小管の bundle がつながり、基底膜側に向かっているようであった(Fig. 3-2 C)。一方、*Celsr1*^{-/-} マウスでは WT マウスとは異なり、1 つの BB に複数の微小管の bundle が接続するように見えるものもあり、加えて、微小管の bundle の配向も基底膜側に向かう直線状ではなく複雑であった(Fig. 3-2 C')。WT マウスでも、*Celsr1*^{-/-} マウスでも、Centrin2 シグナルより 1~2 μ m basal 側ではより複雑な微小管のメッシュワーク構造が観察された。

これらの観察から、BB に結合している微小管のもう一方の端が微小管の濃縮している細胞境界(Fig. 2-3 A, A')へ向かっているのではないかと考え、微小管 bundle の角度を WT マウスと *Celsr1*^{-/-} マウスで定量的に比較した。Centrin2 よりも basal 側、核よりも apical 側の領域で卵巣側、子宮側それぞれの細胞境界付近で 50pixel² を切り出し、加藤 輝博士に微小管のシグナル抽出と角度の測定を行っていただいた(Fig. 3-2 D-E')。その結果、WT マウスにおいても微小管 bundle の角度はバラバラであり、繊維の長さごとに分けて比較も行ったが、どの角度を示す微小管が多いかはわからなかった。このことから、lateral 面でみられた BB に接続し、apica-basal に従って配向する微小管のもう一方の先端が子宮側の細胞境界付近にアンカーされている可能性は低いことが示唆された。

以上から、卵管多繊毛細胞の特徴として、微小管が細胞境界付近で濃縮していることに加え、apical 面(約 0.6 μ m 幅)において BB の周囲で stripe 状のパターンで分布すること、また BB の basal 側に微小管の bundle がつながっていることが観察された。

3-3. 卵管多繊毛細胞の成熟過程に従った微小管の変化

第 1 章の結果 1-2-2 において、卵管多繊毛細胞の成熟過程にある type IV では細

胞内で繊毛の極性が揃っておらず、type V で成体の成熟した多繊毛細胞と同程度に細胞内で繊毛の極性が揃うことが示された。また、第 2 章において、微小管が繊毛の極性制御に寄与することが示唆された。

そこで、特に type IV とその前後の時期に注目して、P13 の GFP-Centrin2 マウスの卵管を用いて多繊毛細胞の成熟過程で微小管がどのように分布するのかを調べた。

3-3-1. 子宮側の細胞境界付近へ微小管が濃縮する時期

子宮側の細胞境界付近への微小管の濃縮は type I から type III では観察されなかった。Type IV に分類される細胞においては、Fig. 3-3 A に示したように apical 面の BB が密でないものでは子宮側の細胞境界付近への微小管の濃縮がみられず、type V に近いような細胞では子宮側の細胞境界付近への微小管の濃縮がみられることもあった。Type V では、子宮側の細胞境界付近に微小管が濃縮していた。このことから、type IV から type V に移行する過程で、子宮側の細胞境界付近への微小管が濃縮すると示唆された。

3-3-2. apical 面の stripe 状微小管が形成される時期

Apical 面の微小管は、type I- IV では stripe 状ではなく、type V で stripe 状には観察された(Fig. 3-3 B)。加えて、type I- IV では stripe 状ではないが線状の微小管がみられたため、BB(Centrin2)との関係を詳細に観察した。Type II と type III では、Centrin2 のドットがアピカル面付近ではなく、核の apical 側の細胞質内に存在するため、Fig. 3-3 では Centrin2 のドットが観察される Z 軸面を比較した。Type I では、Centrin2 のドットから線状の微小管が放射状に伸びていた。Type II では、線状の微小管が Centrin2 のリングの近くに観察されることもあったが、Centrin2 のリングに重なることはなく、type I でみられた放射状のパターンとも異なっていた。Type III では、

Centrin2 のドットが密に集まっており、その集合体の最も外側にある Centrin2 のドットの近くには線状の微小管が観察されることもあったが、内側にある Centrin2 のドットの周囲には線状の微小管は観察されず、他の場所と比べ微小管のシグナルも弱かった。Type IV では、散在する Centrin2 のドット付近に線状の微小管が観察され、なかには、Centrin2 のドットと線状の微小管が重なり、複数の Centrin2 のドットを線状の微小管が繋いでいるように見えるものもあった(矢頭)。Type V では、BB の間に stripe 状の微小管が観察された。これらのことから、アピカル面で線状の微小管が BB の近傍にみられるのは type IV からであり、type IV から type V に移行する過程で微小管が stripe 状に分布するようになることが示唆された。

〈考察〉

第 1 章で *Celsr1*^{-/-} の多繊毛細胞では、細胞内で繊毛の向きが揃う傾向にあり、第 2 章で *Celsr1* 非依存的に形成される微小管の濃縮方向に沿って繊毛の極性が揃うことが示唆された。マウス卵管多繊毛細胞では、第 2 章で示した微小管の濃縮以外にも、apical 面で BB の間に stripe 状の微小管がみられ、lateral 側から観察すると BB に接続し基底膜側へ向かうような微小管もみられた。細胞境界付近に濃縮する微小管、apical 面の stripe 状の微小管、BB に接続して apico-basal にはしる微小管の関係はよくわからないが、もしかしたら、細胞境界付近に濃縮する微小管、apical 面の stripe 状の微小管、BB に接続して apico-basal にはしる微小管がそれぞれ異なる機能をもつのかもしれない。

〈Figure〉

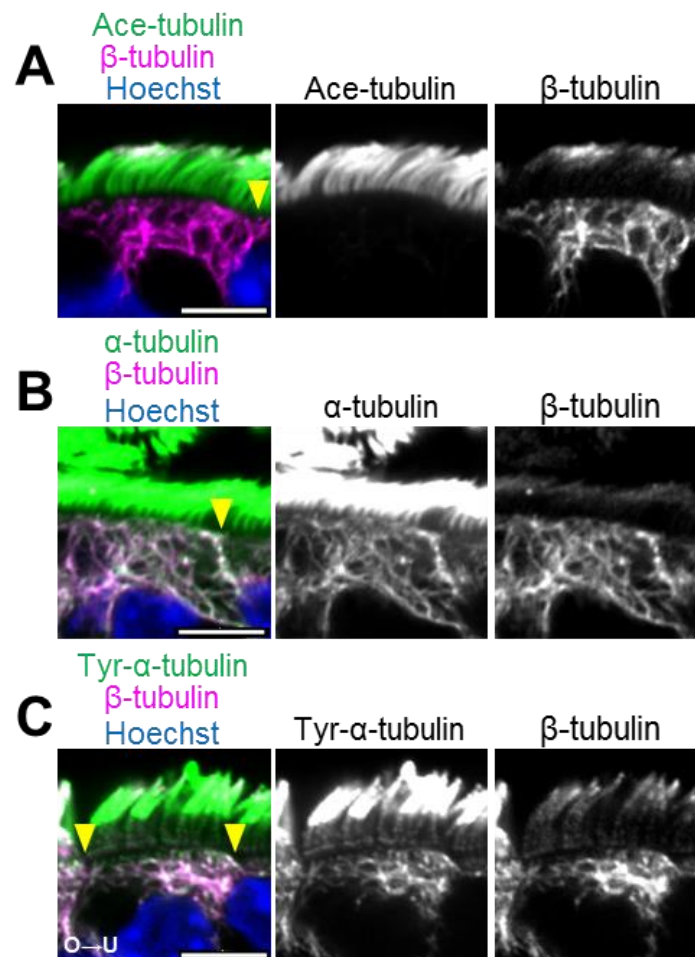
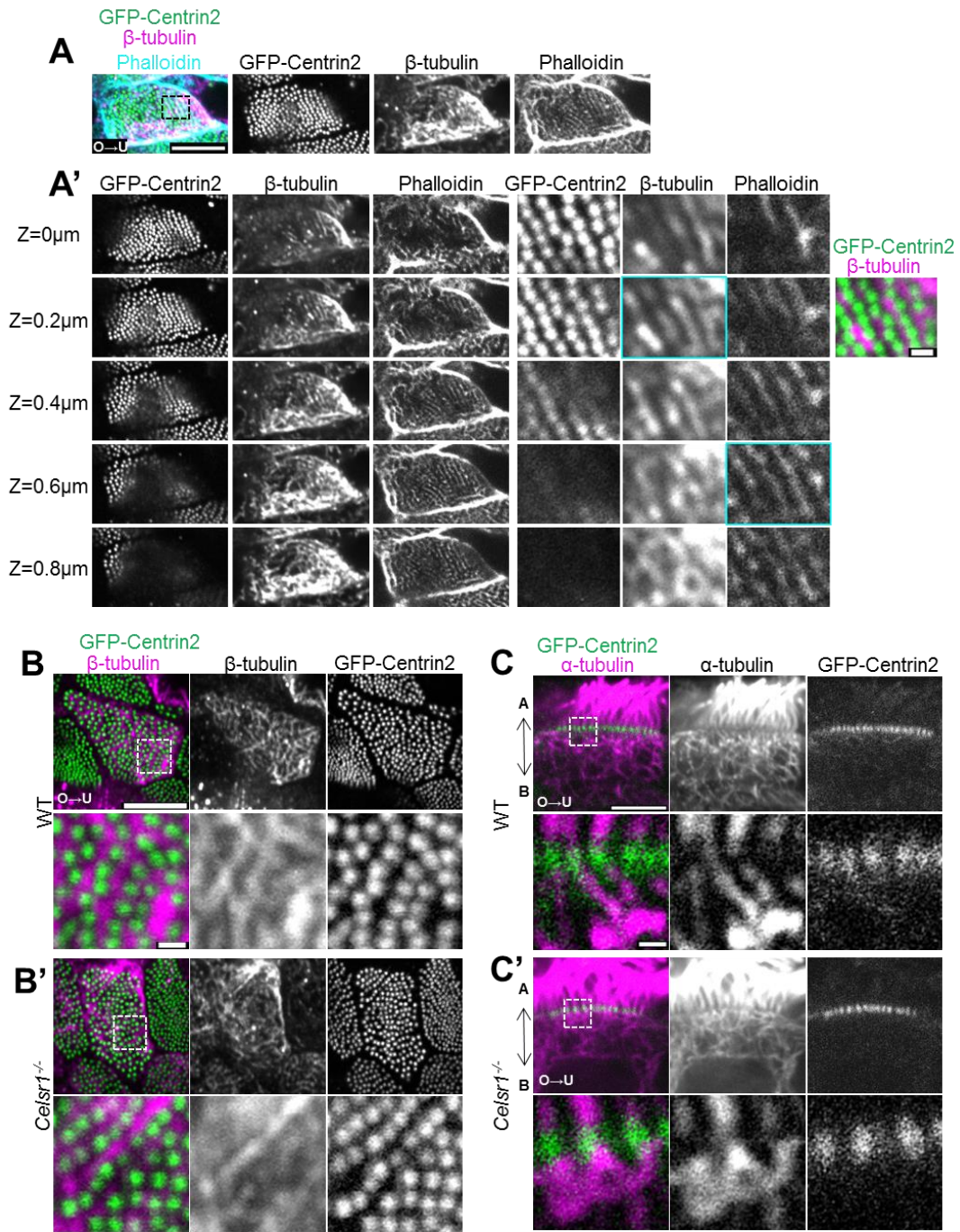


Fig. 3-1 α -tubulin, β -tubulin, acetylated-tubulin, tyrosinated- α -tubulin の分布

(A-C) 成体の WT(ICR)の卵管を抗 β -tubulin 抗体(マゼンタ)、抗 ace-tubulin 抗体(A)、抗 α -tubulin 抗体(B)、抗 tyr- α -tubulin 抗体(C)(A-C は緑)、Hoechst(青)で染色し、lateral 面から観察した共焦点顕微鏡像。Scale bar = 5 μ m。矢頭は Phalloidin シグナルで確認した細胞境界を示す。

全ての写真の卵巣側が左、子宮側が右になるよう配置した。



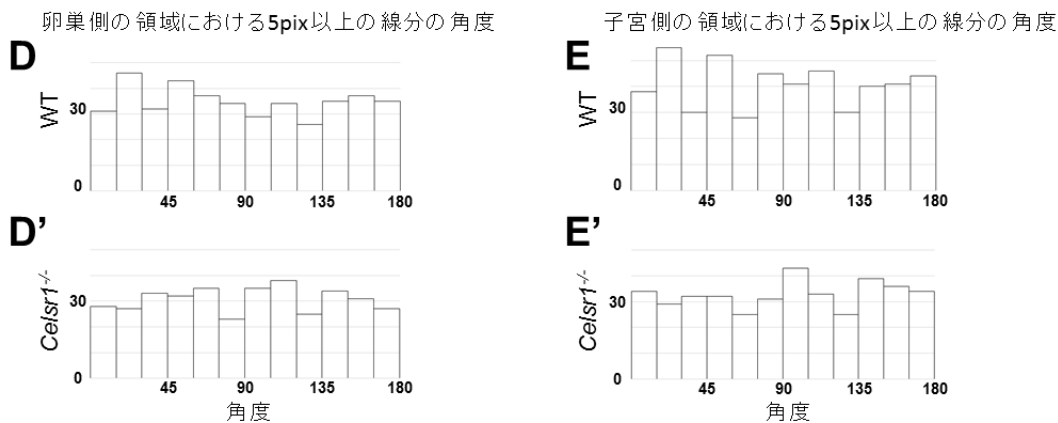


Fig. 3-2 BB 付近の微小管

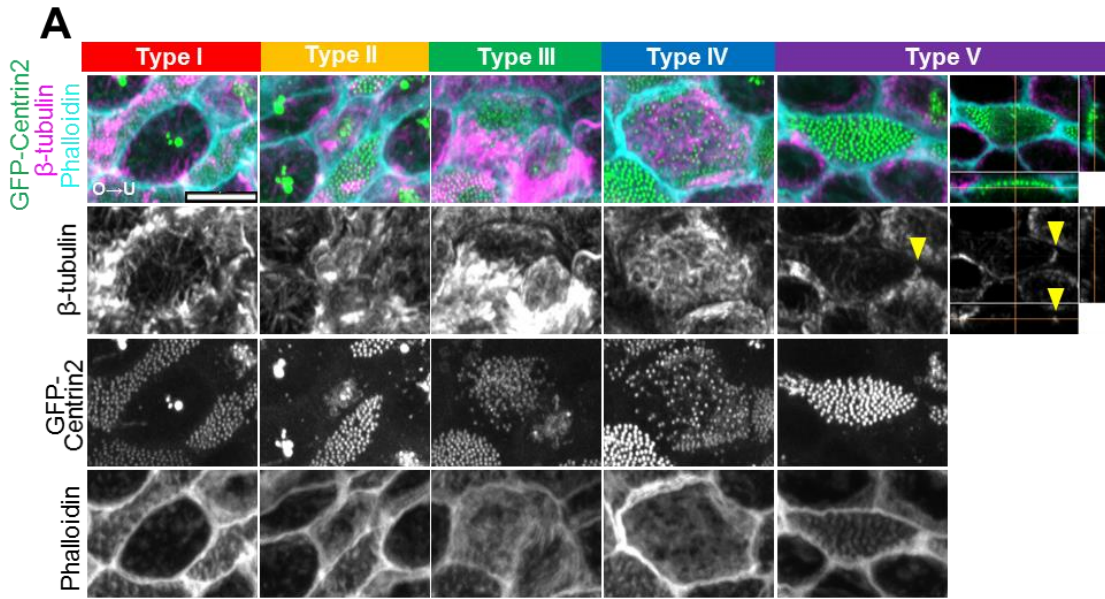
(A-A') *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(成体)の卵管を抗 β -tubulin 抗体、Phalloidin で染色した多繊毛細胞の共焦点顕微鏡像。(A)は、0.2 μ m step で撮影した画像 3 枚から作成した MIP 画像(β -tubulin : マゼンタ、Phalloidin : シアン)。(A')は、(A)と同じ細胞の single plane 画像で、細胞のアピカル面から basal 側へと 0.2 μ m step で観察したものを Z に従って縦に並べた。右側の画像は、細胞の一部(A の左端にある四角の領域)を拡大したもので Z の情報は左端のものと同じである。微小管の stripe 状のパターンがはっきりとみえる(Z=0.2)において、GFP-Centrin2(緑)と β -tubulin(マゼンタ)のシグナルを重ねた。微小管の stripe 状のパターンとアクチン(Phalloidin)の stripe 状のパターンがはっきりとみえた画像(それぞれ Z=0.2、Z=0.6)にシアンの枠をつけた。Scale bar=5 μ m、scale bar=0.5 μ m。

(B-B') 成体の *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(B)、*GFP-Centrin2^{tg/-}; Celsr1^{-/-}* マウス(B)の卵管を抗 β -tubulin 抗体(マゼンタ)で染色した多繊毛細胞の共焦点顕微鏡像。0.2 μ m step で撮影した画像 5 枚から作成した MIP 画像。上段 scale bar=5 μ m。下段は上段の一部を拡大した図、scale bar=0.5 μ m。

(C-C') 成体(11w)の *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(C)、*GFP-Centrin2^{tg/-}; Celsr1^{-/-}* マウス(C')の卵管を抗 α -tubulin 抗体(マゼンタ)で染色し、多繊毛細胞を lateral 側から観察した共焦点顕微鏡像。Scale bar=5 μ m。2 段目は、拡大画像で、subtract background 50pixel 処理を行った画像。Scale bar=0.5 μ m。

(D-E') (C-C')と同じ条件で多繊毛細胞の lateral 面を撮影し、BB の直下で卵巣側(D, D')、子宮側(E, E')の細胞境界付近の領域を 50pixel 平方きりだし、 α -tubulin の線分の長さや角度を

調べた。WT(D, E)、*Celsr1*^{-/-}(D', E')の多繊毛細胞をそれぞれ 20 細胞、各 1 視野から得た結果をヒストグラムにまとめた。



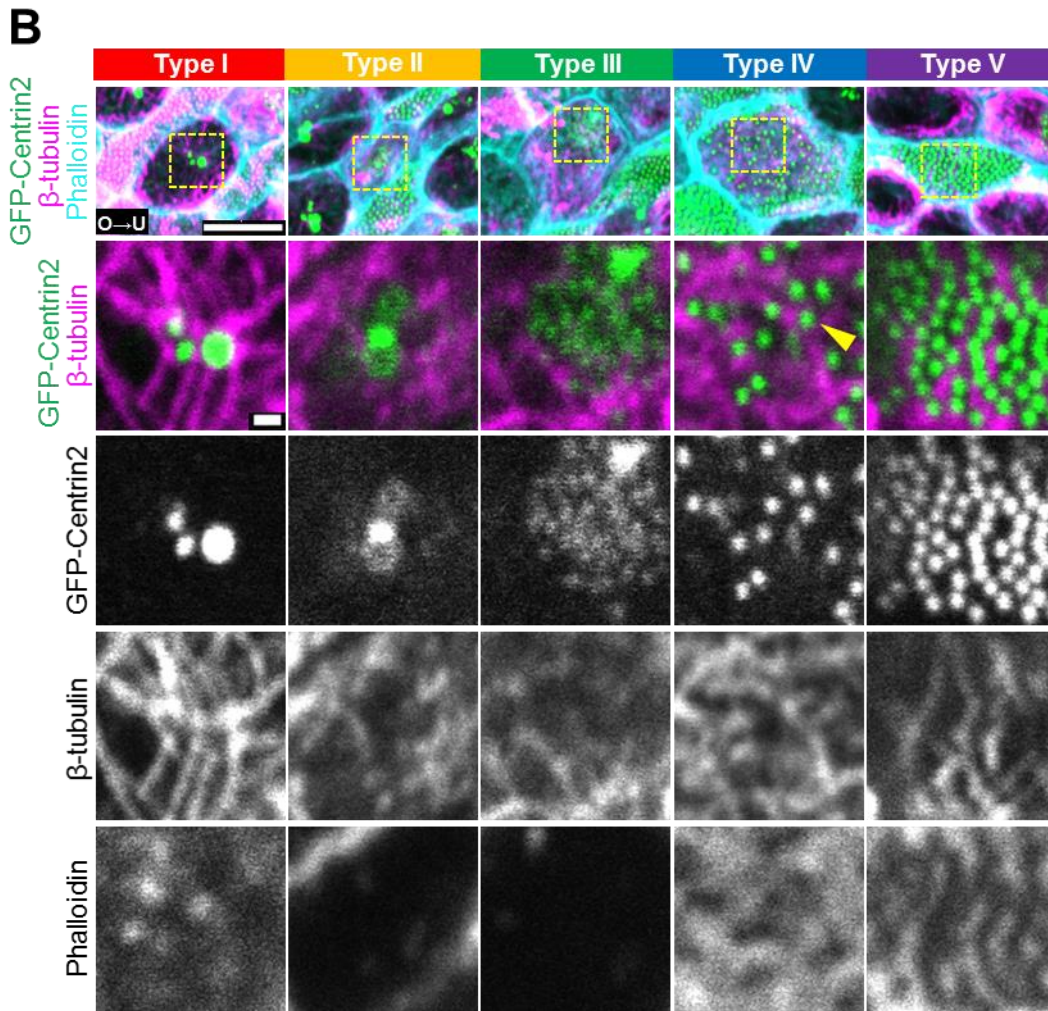


Fig. 3-3 卵管多繊毛細胞の発達過程における微小管の変化

(A) P13 の *GFP-Centrin2*^{+/+} マウス卵管を抗 β -tubulin 抗体(マゼンタ)、Phalloidin(シアン)で染色した共焦点顕微鏡画像。GFP-Centrin2 のシグナルを元に同一視野から type I- V に該当する細胞を切り出した。0.2 μ m step で撮影した画像 15 枚から作成した MIP 画像(左から 5 列)と最も右の列はニコンの画像解析ソフトウェアを利用して作成した xz、yz 画像。xz、yz 画像とセットになっている apical 面の画像は single plane。細胞境界付近に濃縮している微小管を矢頭で示した。Scale bar=5 μ m。

(B) (A)と同様にして切り出した type I- V に該当する細胞、type III 以外は(A)と同じ細胞。最上段の画像は、0.2 μ m step で撮影した画像 20 枚から作成した MIP 画像。他の 4 段は、single plane で、各 type の細胞において主要な分布パターンを示す GFP-Centrin2 シグナルの

焦点面を拡大して示した。拡大した領域は、1 段目の画像の四角の領域。線状の微小管の上に BB が重なる部分を矢頭で示した。Scale bar=5 μ m、0.5 μ m。

〈第4章〉 CAMSAP3 によるマウス卵管多繊毛細胞の極性制御機構

〈序〉

第1章では、卵管多繊毛細胞の成熟過程の type IV-V で徐々に繊毛の極性が決まることを示した。第2章では、微小管が子宮側の細胞境界付近に濃縮しており、微小管の濃縮方向を *Celsr1* が子宮側に揃えていることが示唆された。また、*Celsr1* 非依存的に微小管が細胞境界付近に濃縮し、微小管が濃縮する方向と繊毛の向きにも相関がみられた。第3章では、BB 付近に stripe 状の微小管(apical)と apico-basal にはしる微小管がみられることを示した。これらのことから、BB と微小管のインターアクションが重要であると考え、BB と微小管を繋ぐ分子の探索を行い、候補分子の染色像から CAMSAP3 に注目して研究を進めた。この章の最後で、細胞内で繊毛の向きを揃える機構について議論したい。

〈結果〉

4-1. CAMSAP3 の局在

4-1-1. 多繊毛細胞における CAMSAP3 の局在

マウスの卵管多繊毛細胞を lateral 面から観察したところ BB の basal 側に微小管が結合し、apical-basal に沿うような配向をしていた(Fig. 3-2 C)。このような微小管の配向は、非繊毛細胞である小腸上皮細胞でも観察されている apical-basal に配向する微小管のパターンと(Toya et al., 2016)とよく似ていた。これらのことから、多繊毛細胞においても CAMSAP3 が apical 面に広がっている BB 付近に局在し、微小管と共に繊毛の極性を整える機能をもっているのではないかと推測した。

多繊毛細胞では、CAMSAP3 の局在に関する知見がなかったため、繊毛基部を構成する分子との共染色を行った。まず、*GFP-Centrin2^{tg}*-マウスの卵管を抗 CAMSAP3 抗体(Tanaka et al., 2012)で染色し、BB と CAMSAP3 の位置関係を比較した(Fig. 4-1 A-A')。Apical 面から観察を行ったところ、多繊毛細胞においては CAMSAP3 のドッ

ト状のシグナルが細胞の apical 面と細胞境界付近にみられた。Apical 面の CAMSAP3 の焦点面は、Centrin2 の焦点面よりも 0.2 μ m 程度 apical 側にあった。高さの異なるそれぞれの焦点面同士を比較すると、CAMSAP3 シグナルは Centrin2 のシグナルと同程度の大きさのドット状であり、よく似た分布パターンを示していた。両者を重ねたところ、CAMSAP3 シグナルが Centrin2 シグナルよりも子宮側に存在する傾向にあり、対を成していた。この関係性は、Centriolin シグナルと Centrin2 シグナルのものと似ていた(Fig. 4-1 B)。また、lateral 面から観察したところ、CAMSAP3 の強いシグナルは Centrin2 のドットの apical 側に存在し、一部重なっていた(Fig. 4-1 A')。一方、Centriolin は Centrin2 の basal 側半分かつ子宮側よりに重なっており(Fig. 4-1 B')、lateral 面から観察すると、CAMSAP3 & Centrin2 の位置関係と Centriolin & Centrin2 の位置関係は異なっていた。

次に、CAMSAP3 と γ -tubulin の位置関係を調べた(Fig. 4-1 C-D')。 γ -tubulin は、中心体性微小管のマイナス端に結合する分子であり、繊毛では、BF と BB の basal 側に局在することが報告されている(Hagiwara et al, 2000)。 Apical 面からみた際には、 γ -tubulin は Centrin2 と対になるようなドット状のパターンを示し、Centrin2 よりも子宮側に分布していた(Fig. 4-1 C)。 Lateral 側からみた際には、 γ -tubulin が Centrin2 の basal 側半分かつ子宮側よりに重なっていた(Fig. 4-1 C')。抗 CAMSAP3 抗体と抗 γ -tubulin 抗体を用いて染色し、apical 面から観察したところ、CAMSAP3 と γ -tubulin の位置関係は一定ではなかった(Fig. 4-1 D)。 CAMSAP3 の焦点面は γ -tubulin の焦点面よりも 0.4 μ m 程度 apical 側にあり、lateral 面から観察したところ CAMSAP3 と γ -tubulin のシグナルは重ならず両者のはやや離れて存在し、「！」のような対を成していた(Fig. 4-1 D')。 Apical 面からの観察像において、CAMSAP3 と γ -tubulin の位置関係が一定ではない原因として、apico-basal に沿って CAMSAP3 と γ -tubulin シグナルの間に距離があり、細胞の apical 面に対して BB と軸糸が常に垂直ではないことが原因であるかもしれない。抗 CAMSAP3 抗体と抗 ace-tubulin 抗体で染色すると、CAMSAP3 が ace-tubulin シグナル(繊毛軸糸)のすぐ basal 側に局在しており(Fig. 4-1

E)、CAMSAP3 シグナルの細胞表面に対する角度は同じ細胞内、同じ視野内であっても異なっていた。このことから、繊毛運動による軸糸の傾きと関連して、軸糸の根元に存在する CAMSAP3 の角度も変化している可能性があると考えられる。

さらに、詳細な CAMSAP3 の局在位置を調べるため、抗 CAMSAP3 抗体と抗 Centriolin 抗体、抗 Odf2 抗体のシグナルを比較した(Fig. 4-1 F-G')。共焦点顕微鏡による観察では、CAMSAP3 シグナルはドット状で大きいため、Centriolin や Odf2 との位置関係を正確に把握することが難しいと考え、CAMSAP3 を優先的に超解像顕微鏡で観察することにした。使用した二次抗体の特性から CAMSAP3 の観察像を超解像顕微鏡モードで、Centriolin の観察像を共焦点顕微鏡モードで取得した(Fig. 4-1 F)。CAMSAP3 シグナルは Centriolin シグナルよりも子宮側に偏っている傾向にあり、CAMSAP3 シグナルの方が Centriolin シグナルよりも apical 側から観察された(Fig. 4-1 F')。また、CAMSAP3 と Odf2 の観察像をともに超解像顕微鏡モードで取得したことで、apico-basal に沿って部分的に CAMSAP3 と Odf2 が重なって観察された(Fig. 4-1 G-G')。

以上の結果から、apical 面からの観察では、CAMSAP3 が BF とよく似た位置に局在するが、BF マーカーである Centriolin や γ -tubulin よりも apical 側に存在していることが明らかになった。CAMSAP3 が BB に対して非対称に局在し、Odf2 で染色される distal appendage の少し apical 側から Centriolin で染色される BF までの間に存在することが示唆された。

共焦点顕微鏡、超解像顕微鏡を用いて得た画像(Fig. 4-1 A-G')を元にそれぞれ模式図を作成した(Fig. 4-1 H)。Centrin2、 γ -tubulin、Centriolin、Odf2 はそれぞれ CAMSAP3 とシグナルを直接的に比較した。 γ -tubulin と Centriolin の位置関係については、直接的に調べることができなかつたため、それぞれ Centrin2 との位置関係を調べ間接的に比較した。

4-1-2. 多繊毛細胞の発達過程における CAMSAP3 の発現と局在

繊毛細胞の成熟過程において、CAMSAP3 がいつ BB への局在するのか、また、それは繊毛の極性が揃う時期(type IV-V)とどのような関係にあるのか調べるため、P13 の *GFP-Centrin2^{tg}*-マウスの卵管を抗 CAMSAP3 抗体で染色し、同一視野にある type I-V で CAMSAP3 の発現を比較した (Fig. 4-2)。CAMSAP3 は、type I-V を通して細胞表面付近でドット様のシグナルとして観察された。Type I-III では、Centrin2 と CAMSAP3 のシグナルは共局在しない傾向にあったが、type IV-V では、Centrin2 の近傍に CAMSAP3 が観察された。CAMSAP3 シグナルの輝度は、type V よりも type IV の方が強かった。また、type IV では、Centrin2 のドットがクラスターを形成しているが、CAMSAP3 は細胞表面全体に広がっていた。Type V では、Centrin2 と CAMSAP3 のシグナルは分布パターンが類似しているが、成体(Fig. 4-1 A)と比べると、CAMSAP3 のドットの大きさは不均一であり、ドットが不明瞭な領域も多かった。これらのことから、繊毛細胞の成熟過程に従って、CAMSAP3 が常に BB ともにあるわけではなく、type IV の時期から BB の近傍に局在するようになることが示唆された。

また、Fig. 1-2 や Fig. 1-3 と比較して、BF マーカーとして知られ、type I-V を通して観察される Centriolin、 γ -tubulin とは、CAMSAP3 の局在パターンが大きく異なった。このことから、CAMSAP3 は、BF に初めから存在するものではなく、繊毛の極性決定時期に先行して BB 付近に局在することが示唆された。さらに、type IV の時期に Odf2 が観察されるものとされないものがある一方で、CAMSAP3 は全ての type IV において Centrin2 の近傍に観察されたことから、type IV の時期に BB が apical 面へドッキングし、直後に CAMSAP3 が BB 付近に局在、そして subdistal appendage(Odf2)が形成されるという時系列が存在する可能性も考えられる。

4-2. *Camsap3^{dc/dc}* マウスにおける繊毛の極性異常

4-2-1. 卵管多繊毛の運動による輸送

CAMSAP3 が BB に対して非対称に局在し、また多繊毛細胞の成熟過程において繊毛の極性決定時期に先行して CAMSAP3 が BB 付近に局在した。CAMSAP3 が繊毛の極性制御に寄与するかどうか明らかにするため、*Camsap3^{dc/dc}* マウス(Toya et al., 2016) の卵管多繊毛細胞で繊毛の極性を調べた。この変異体マウスは、微小管と結合する領域である CKK ドメインを欠損している(Int. Fig. 7)。

まず、卵巣-子宮軸に沿って開いた卵管の内腔上皮細胞に蛍光ビーズを滴下し、ビーズの動きを観察した(Fig. 4-3 A-A' 未公開データ)。

4-2-2. *Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管多繊毛細胞における細胞内での繊毛の極性

GFP-Centrin2^{tg/-}; Camsap3^{dc/dc} マウスの卵管を Phalloidin で染色し、BB の数と密度を調べたところ、BB の数は 220.7 BBs/cell(SD=33.3, n=20 cells, 2 animals)、4.7 本/ μm^2 であった(Fig. 4-3 B-B')。WT マウス(平均 201.1 BBs/cell, n=20cells, SD=25.7)と比べると、*Camsap3^{dc/dc}* マウスの方が少し BB の数が多く密度は高い傾向にあった(t 検定の結果 p=0.0493 であり p<0.05 で有意であった)。また、抗 α -tubulin 抗体や抗 ace-tubulin 抗体による免疫染色により、繊毛の軸糸は形成されており、軸糸の長さは WT と同程度であった(Fig. 4-6 F, F')。

繊毛の極性を調べるため、*Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管を抗 Odf2 抗体・抗 Centriolin 抗体を用いて染色し、結果 1-2-2 や 2-2-1 と同様の方法により繊毛の向きを解析した(Fig. 4-3 C-E)。*Camsap3^{dc/dc}* マウスの BB/BF の電子顕微鏡観察によって、複数の BF を持つ BB が一部(1 視野 BB/BF 24 個中 2 個)みられた (Fig. 4-3 H)。そのため、超解像顕微鏡画像を用いて解析する際に、1 つの Odf2 シグナルに対して、複数の Centriolin シグナルが観察された BB は、解析対象から除外した(1 細胞当たり平均 4.7 個)。個々の細胞内で観察すると BB の向きが揃っていなかった。CV を同腹

WT(CVの中央値0.11、n = 20 cells、平均199.7 BBs/cell解析した)と比較すると、*Camsap3^{dc/dc}*マウスの方が高かった(CVの中央値0.44、n = 20 cells、平均182 BBs/cell解析した)。*Camsap3^{dc/dc}*マウスのCV値は0.1~0.9とばらついており、*Celsr1^{-/-}*マウスよりも高いCVを示す細胞が多い傾向にあった。*Camsap3^{dc/dc}*マウスのCV値の分布は、WTマウスの多繊毛細胞の成熟過程にあるtype IVのCVの分布と似ていた(Fig. 4-4)。150個のランダムな角度から算出した20セットのCV値は、0.8~1の間に分布した(CVの中央値0.92)(Fig. 4-4)。*Camsap3^{dc/dc}*マウスでは、完全にランダムな状態のCVに近い値を示す細胞もあり、それらの細胞では繊毛の極性がランダムであることが示唆された。電子顕微鏡による観察でも、*Camsap3^{dc/dc}*マウスの多繊毛細胞で繊毛の極性が揃っておらず、超解像顕微鏡観察から得た結果と一致していた(Fig. 4-3 C-G)。これらのことから、CAMSP3は細胞内で繊毛の極性を揃えることに重要であることが示唆された。

4-2-3. *Camsap3^{dc/dc}*マウスの隣接する細胞間の繊毛極性

結果2-2と同様に隣接する細胞間で繊毛の極性を比較するため、それぞれの細胞における繊毛の平均角度を算出した(Fig. 4-5)。*Camsap3^{dc/dc}*マウスでは、CVが低い細胞だけでなく、CVが比較的高い細胞においても各細胞における繊毛の平均角度は細胞間で揃っていた。また、*Camsap3^{dc/dc}*マウスの各細胞における繊毛の平均角度は、WTと同様、卵巣-子宮軸とヒダ構造に沿って平行であった。

このことから、CAMSP3は細胞内で繊毛の極性を揃えることに重要である(結果4-2-2)が、*Camsap3*を欠損しても細胞がおおよそその繊毛の極性を組織の軸に合わせる機構は維持されていることが示唆された。

4-3. CAMSAP3 を介した繊毛の極性制御機構

4-3-1. *Camsap3^{dc/dc}* マウスにおける微小管の異常

CAMSAP3 が繊毛の極性を揃えている機構を明らかにするため、まず、結果 2-3(Fig. 2-3 A-A')と同様の方法で、細胞境界付近への微小管の濃縮の有無と濃縮方向を調べた。*Camsap3^{dc/dc}* マウスの多繊毛細胞においては、WT と同様に微小管が子宮側の細胞境界付近に濃縮していた(Fig. 4-6 A-B)。

次に、BB の周囲(Centrin2 が存在する apical 面の表層約 0.6 μ m 厚)の微小管の分布を調べるため、*GFP-Centrin2^{tg/-}; Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管を抗 α -tubulin 抗体で染色した(Fig. 4-6 C-D')。結果 3-1(Fig. 3-2 A)で示したように WT では、BB 周辺で微小管(α -tubulin)とアクチンはよく似た stripe 状の分布を示し、stripe 状のアクチンは stripe 状の微小管よりも少し basal 側で観察された(Fig. 4-6 C)。*GFP-Centrin2^{tg/-}; Camsap3^{dc/dc}* の多繊毛細胞では、apical 面の α -tubulin のシグナルは、同腹コントロール個体のようなはっきりとした stripe 状ではなく、一様に塗りつぶされたようになっており、Centrin2 のシグナルがある部分だけが抜けている蜂の巣模様であった(Fig. 4-6 C')。WT と *Camsap3^{dc/dc}* の細胞において、同じような幅で BB が列を成している周囲(Fig. 4-6 C-C'点線)においても、*Camsap3^{dc/dc}* の細胞では WT 細胞のように α -tubulin が細い線状にはなっていなかった。そのことから、WT と *Camsap3^{dc/dc}* マウスで apical 面における微小管の分布に差があることの原因が BB の配置の違いだけによるものではないことが示唆された。また、*Camsap3^{dc/dc}* マウスでは、Centrin2 が存在する apical 面の表層(約 0.6 μ m 厚)で卵巣-子宮軸に沿った α -tubulin の濃度勾配が消失していた(Fig. 4-6 D-D')。

CAMSAP3 は微小管のマイナス端に結合するだけでなく、ACF7 を介してアクチンと結合する (Noordstra et al., 2016; Ning et al., 2016)ため、ACF7 とアクチンの分布も調べた(Fig. 4-6 C-C', E-E' 未公開データ)。

Phalloidin 染色によってアクチンの分布を観察すると、WT において α -tubulin の stripe 状シグナルの 0.2~0.4 μ m basal 側で、 α -tubulin のシグナルとよく似た stripe 状

の Phalloidin のシグナルが観察された。一方で、*Camsap3^{dc/dc}* マウスでは α -tubulin シグナルの 0.2~0.4 μ m basal 側では、 α -tubulin と Phalloidin シグナルパターンが WT 程には一致していなかった(Fig. 4-6 C-C'矢頭)。また、*Camsap3^{dc/dc}* マウスの多繊毛細胞の表面には、Phalloidin で染色される突起物が観察される頻度が高い傾向にあった(Fig. 4-6 F-F')。 *Camsap3^{dc/dc}* マウスの Phalloidin で染色される突起物は、シスト状の構造をしていた。電子顕微鏡観察では、複数の軸糸を含む突起物が観察された(Fig. 4-6 G)。

次に、*Camsap3^{dc/dc}* マウスにおいても、BB の basal 側に微小管の bundle が結合し、apico-basal に沿って配向するのかどうか調べるため、lateral 側からの観察を行った(Fig. 4-6 H-H')。抗 α -tubulin 抗体、抗 γ -tubulin 抗体で染色したところ、*Camsap3^{dc/dc}* マウスにおいても、同腹 WT マウスと同様、細胞質の微小管 bundle が γ -tubulin に接続していた。また、神経細胞では *Camsap3* の欠損により細胞質の acetylated-tubulin が増加するという報告がある(Tanaka et al., 2012)ため、*Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管を抗 ace-tubulin 抗体で染色したが、*Camsap3^{dc/dc}* マウスと WT 個体の多繊毛細胞の間で顕著な差はみられなかった(Fig. 4-6 I-I')。

以上のことから、卵管多繊毛細胞において CAMSAP3 は、BB 付近で stripe 構造を形成している微小管とアクチンの分布の制御に寄与することが示唆された。

4-3-2. *Camsap3^{dc/dc}* マウスにおける平面内細胞極性

Camsap3^{dc/dc} マウスにおいて、細胞間で繊毛の平均角度が一致している傾向にあったことから、卵管の多階層に渡る極性がどの程度維持されているのか調べた。細胞形態は Phalloidin による染色後に細胞の伸長度および方向、PCP 因子の局在は、抗 *Celsr1* 抗体、抗 *Vangl1* 抗体を用いて染色した後に、それぞれのタンパク質の局在方向を定量的に解析した。*Camsap3^{dc/dc}* マウスでも、WT マウスのようにヒダ形態は直線的であり、卵巣-子宮軸対して平行に細胞が伸長していた(Fig. 4-7 A, B)。

Celsr1、Vangl1 のシグナルも、WT マウスと同様、卵巣-子宮軸に対して垂直な細胞辺に局在しており、組織全体で一様なパターンが観察された(Fig. 4-7 C-C')。各多繊毛細胞における Celsr1・Vangl1 の局在方向を定量し、ローズダイアグラムで示した(Fig. 4-7 D, D')。その結果、WT と比べた際にも *Camsap3^{dc/dc}* で顕著な差はみられず、*Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管においても PCP 因子が正常に局在していることが示唆された。

以上の観察から、*Camsap3^{dc/dc}* マウスにおいては、隣接する細胞間における繊毛の平均角度や微小管の細胞境界付近への濃縮方向、PCP 因子の局在といった極性が維持されていた。これらの結果から、*Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管多繊毛細胞の極性異常は、上記の平面内細胞極性を消失したことが原因ではないことが示唆された。

4-4. *Camsap3^{dc/dc}* マウスのその他の表現型

4-4-1. *Camsap3^{dc/dc}* マウス多繊毛細胞の軸糸の構造

Camsap3 の exon6 以降の転写が損なわれている *Camsap3^{tm1a/tm1a}* マウスの鼻粘膜上皮では、繊毛の極性異常に加え、64.1%の繊毛軸糸で 9+2 の中心対微小管が欠損し(9+0 となっていた)、8+1 や 9+1 となっているものも含めると 128 本のうち 89.1%の繊毛軸糸で異常がみられることが最近報告された(Robinson et al., 2020)。そこで、卵管多繊毛細胞の軸糸においても同様の中心対微小管の欠損がみられるか、電子顕微鏡画像を用いて調べた。卵管の多繊毛細胞ではほとんどの軸糸で中心対微小管が見られ(Fig. 4-8 A)、中心対微小管が見られない割合は鼻粘膜上皮と比べ低かった。5 視野 100 本以上の軸糸を観察した際には中心対微小管を欠く軸糸は観察されなかった。9+0 の軸糸が卵管多繊毛細胞にも存在するのか調べるために、異なる個体由来のサンプルを用いて大谷哲久博士に電子顕微鏡観察をしていただいたところ、鼻粘膜上皮で 9+0 が観察される割合 64.1% (Robinson et al., 2020)よりはかなり低いが、9+0 の軸糸も存在した(Fig. 4-8 B)。

以上のことから、鼻粘膜上皮の多繊毛細胞と比べると卵管多繊毛細胞では *Camsap3* を欠損しても中心対微小管の消失が引き起こされにくいと推測される。

4-5. *Celsr1*^{-/-}マウスの多繊毛細胞における CAMSAP3 の局在

Celsr1 と CAMSAP3 の関係を理解するため、*Celsr1*^{-/-}マウスの卵管多繊毛細胞における CAMSAP3 の局在を調べた(Fig. 4-9 A')。その結果、*Celsr1*^{-/-}の多繊毛細胞においても WT の多繊毛細胞と同様に CAMSAP3 が BB 付近に局在していた。加えて、*Camsap3*^{dc/dc} マウスの卵管においても WT マウスの卵管と同様に PCP 因子が卵巣-子宮軸に沿って局在すること(結果 4-3-2)から、*Celsr1* と CAMSAP3 の局在については、非依存的な関係であることが示唆された。また、*Camsap3*^{dc/dc} マウスでは apical 面の微小管の stripe 構造と濃度勾配に異常がみられた(結果 4-3-1)ので、*Celsr1*^{-/-}マウスにおいても Fig. 4-6 D-D' と同様の方法で調べた。*Celsr1*^{-/-}マウスの卵管多繊毛細胞では、微小管の stripe 構造が観察できた。Apical 面の微小管の濃度勾配は、卵巣-子宮軸ではなく微小管の濃縮ができていた方向に従っていた。このことから、*Celsr1* を欠く細胞においても、apical 面の微小管の stripe 構造と濃度勾配を形成する機構は維持されていると示唆された。

4-6. *Celsr1* と *Camsap3* のダブルノックアウトマウスについて

Celsr1 と CAMSAP3 の遺伝学的上下関係を調べるため、ダブルノックアウトマウスの作成を試みたが、得られた数が非常に少なかった。また、雌雄に関係なくダブルノックアウトマウスは体が非常に小さく、痩せており長くても生後 2 週間ほどで死んでしまい、成体を得ることができず、卵管の観察はできなかった。

4-7. BB 付近における CAMSAP2 の局在

未公開データ。

〈考察〉

1. 卵管多繊毛細胞における微小管のネットワーク

中心体性微小管のマイナス端結合タンパク質である γ -tubulin が繊毛基部に局在すること(Clare *et al.*, 2014)に加えて、私は、非中心体性微小管のマイナス端結合タンパク質である CAMSAP3 も多繊毛細胞の繊毛基部に局在していることを発見した(結果 4-1)。最近、鼻粘膜上皮の多繊毛細胞においても CAMSAP3 が繊毛基部付近への局在することが示された(Robinson *et al.*, 2020)。微小管が BF に結合して繊毛の極性を制御しているという一般的な見解とは違って、BF(γ -tubulin、Centriolin)よりも少し apical 側に局在している CAMSAP3 に微小管が結合して繊毛の極性を揃えていると考えている。 γ -tubulin は BF に局在していることが報告されており、各 BB に対して、CAMSAP3 が γ -tubulin と同じ子宮側に局在する傾向にあった。Apical 面の stripe 状の微小管と CAMSAP3 は同じ高さにあり、そこで CAMSAP3 が微小管とインターアクションしていると想像している。多繊毛細胞の成熟過程を通して、 γ -tubulin、Centrin2、Centriolin はどのステージの細胞でも BB に存在していた(Fig. 1-2 A, 1-7 A)が、CAMSAP3 が BB に局在するのは BB が細胞の apical 面にドッキングする type IV からであった(Fig. 4-2)。以上のことから、多繊毛細胞において γ -tubulin と CAMSAP3 は微小管に対して異なる機能を持っている可能性がある。

小腸上皮細胞においては *Camsap3* の欠損が apico-basal に従って配向する微小管に異常を引き起こすが、卵管上皮細胞においては、apico-basal に従って配向する微小管は維持されていた。一方で、BB 周辺の apical 面に分布する微小管には異常があった。それらのことから、多繊毛細胞においては、 γ -tubulin が apico-basal に従って配向する微小管のマイナス端に結合し、apical 面にマイナス端を繋ぎとめている

と予想している。多繊毛細胞の BB 付近において CAMSAP3 と γ -tubulin が異なる分布を示す微小管の制御に寄与しているのかについては、複雑なネットワークを形成している微小管の機能を理解する上でも今後明らかにされる必要がある。

2. BF の数と CAMSAP3

Camsap3^{dc/dc} マウスの卵管上皮細胞では、PCP 因子が局在し、微小管も細胞境界付近に濃縮しており、ヒダ構造も卵管の長軸に沿って形成されていたため、繊毛の極性を除く他の平面内細胞極性は獲得できていることが示唆された。多繊毛細胞の成熟過程において、CAMSAP3 が BB に局在した後に Odf2 が BB に局在した。*Odf2* 変異体の気管の多繊毛細胞では、BF の構造が欠損しており、Odf2 が BB の非対称性(BF の形成)に必須であることが示されている(Kunimoto et al., 2012)。一方で、*Camsap3* を欠いている細胞でも、BB の構成分子(Centrin2、ODF2、Centriolin、 γ -tubulin)は、BB に局在しており、ほとんどの繊毛で BB、BF は正常に形成されていた。このことから、Odf2 と CAMSAP3 は BB に局在する時期はよく似ているが、CAMSAP3 は BF の形成に必須ではない。

Camsap3^{dc/dc} マウスでは、複数の BF を持つ BB がいくつか観察された(Fig. 4-3 H)。複数の BF を持つ BB が mother centriole 由来の物であること(Liu et al., 2020)を否定はできないが、CAMSAP3 が BF を 1 つに制限することに寄与している可能性もある。

3. 未公開

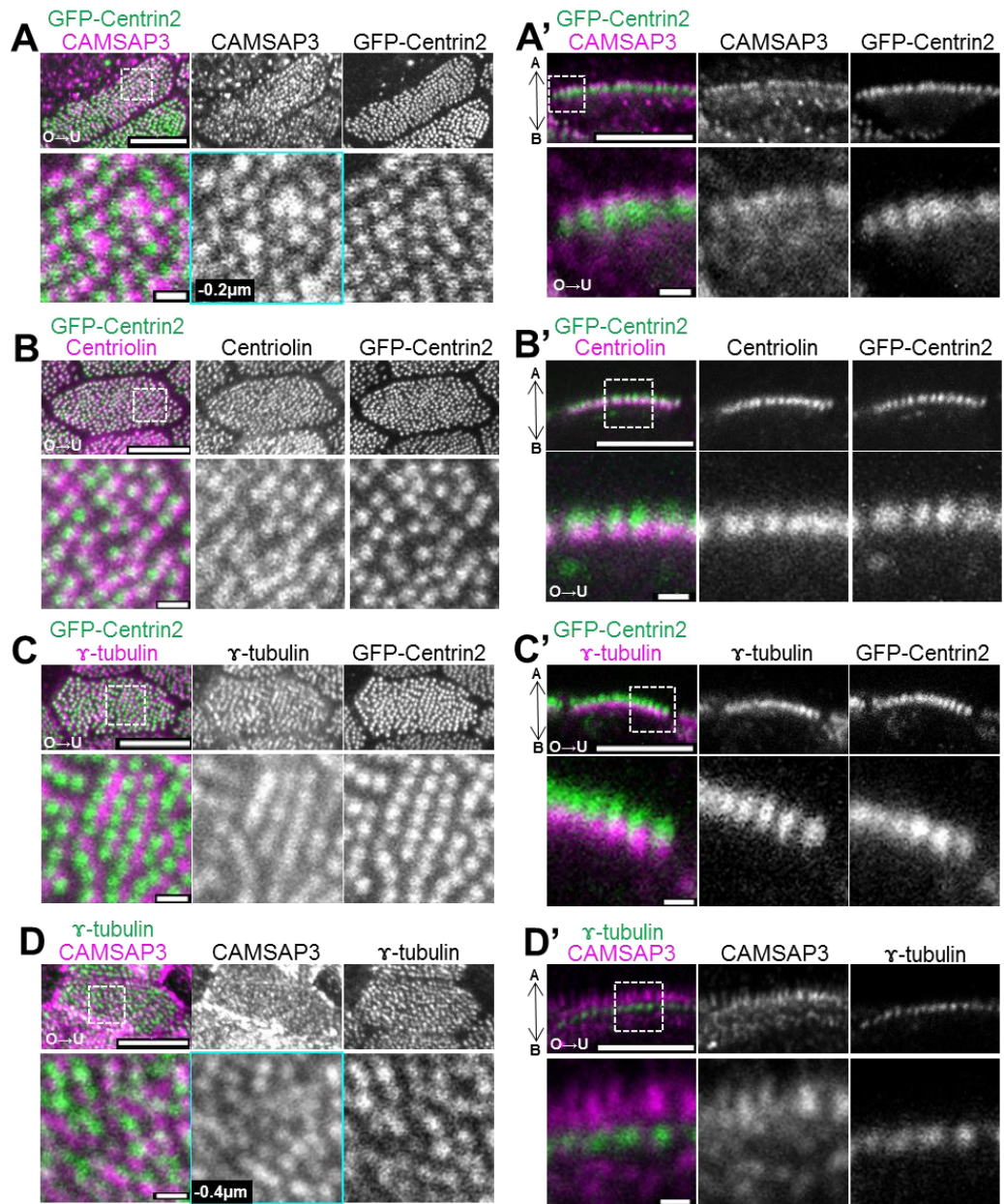
4. apical 面の微小管と CAMSAP3 によって、細胞内で繊毛の極性を揃える

機構

結果 1-2-2 からマウス卵管の多繊毛細胞の成熟過程において、細胞内で繊毛の向きが徐々に揃っていくのは type IV の時期であることが示された。Type IV の細胞では、既に CAMSAP3 が BB 付近に局在している(結果 4-1-2, Fig. 4-2)。また、CAMSAP3 が apical 面に局在しており、*Camsap3^{dc/dc}* の多繊毛細胞では apical 面の微小管の分布に異常がみられた(微小管が stripe 状でない、卵巢側・子宮側の細胞境界付近で微小管の量に差がない)(結果 4-3-1)。また、結果 3-3 において、type IV の時期に複数の BB が apical 面にある線状の微小管に重なっており、BB と微小管が接続していると考えられた。これらの現象を時系列にそって相対的に考えると、type IV の時期に BF 付近に CAMSAP3 が局在し、apical 面の微小管と接続し、徐々に微小管が stripe 状になり、徐々に細胞内で繊毛の向きが揃えられるのではないかと考えた(Fig. 4-11)。

また、子宮側の細胞辺とおおよそ平行な stripe 状の微小管によって、繊毛の向きが揃えられる仕組みについて議論する。隣接する繊毛の BF 同士を微小管が結ぶことによって、複数の繊毛基部を 1 つの構造物として動かしたり、動きを制限動させることが可能であると考えている。それに加え、細胞内で繊毛の向きが揃っていない type IV の時期から、軸糸が形成されており、その時期から繊毛運動が起きていると考えられる。Fig. 3-1 A からわかるように軸糸は長く、運動方向が乱れていれば周囲の繊毛の軸糸とぶつかり合う可能性が高い。つまり、BF 同士を微小管で繋がれ、繊毛運動により軸糸がぶつかり合うことにより、自律的に細胞内で繊毛の向きが揃っていくのではないだろうか？ 加えて、気管の多繊毛細胞では、微小管が BF から細胞境界へとつながって見える電子顕微鏡画像が得られている(Vladar et al., 2012)。そのため、卵管の多繊毛細胞においても、最も子宮側の細胞辺に近い BB の BF は、微小管によって子宮側の細胞境界に直接つながられている可能性があり、これらの繊毛が「繊毛運動により軸糸がぶつかり合う」際に、卵巢-子宮軸の情報を持つ重要な Cue となっているのではないかと考えている。

⟨Figure⟩



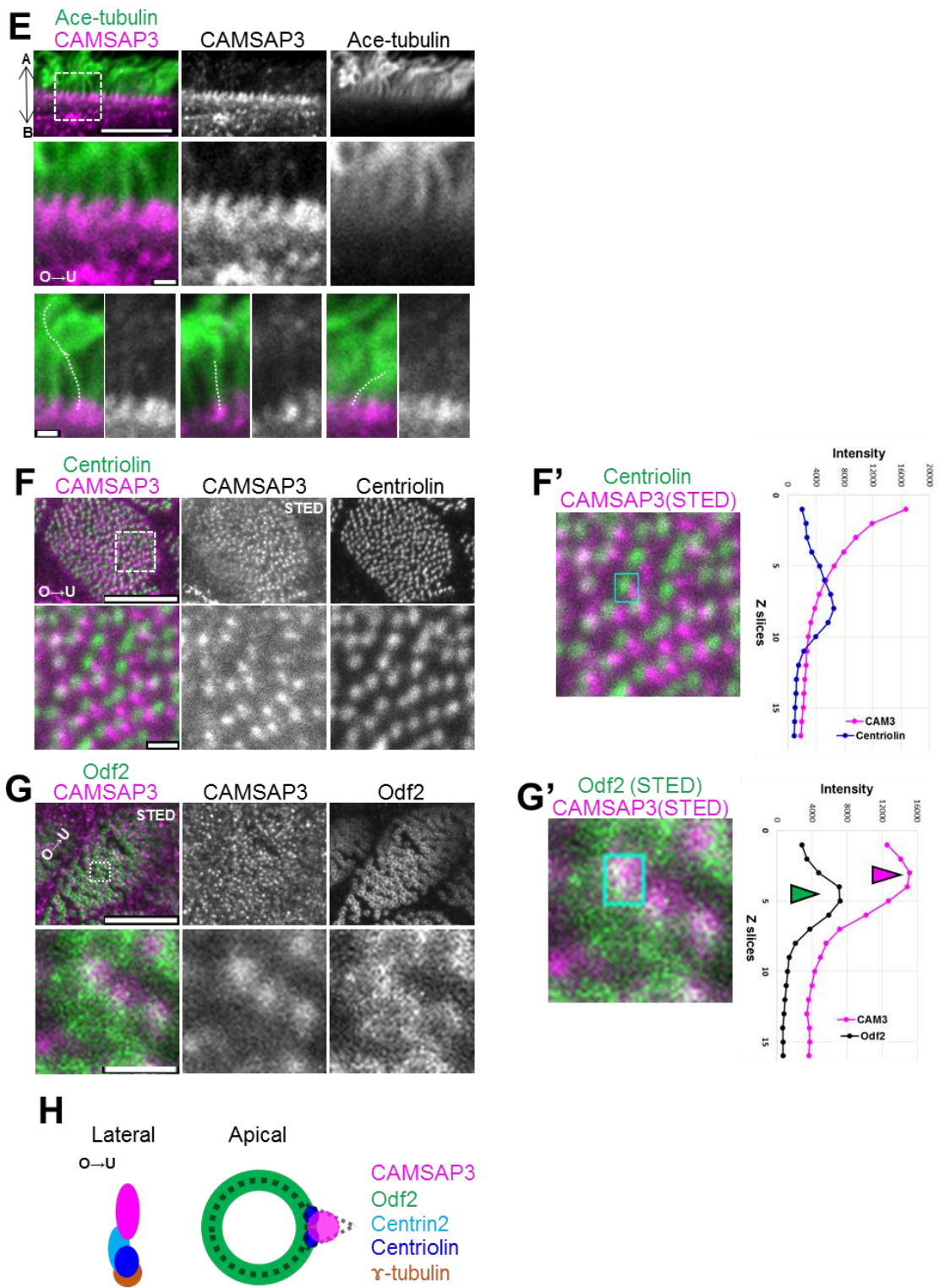


Fig. 4-1 多繊毛細胞における CAMSAP3 の局在

(G)以外の写真は卵巣側が左、子宮側が右になるよう配置した。

(A-A') *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(成体)の卵管を抗 CAMSAP3 抗体(マゼンタ)で染色し、apical 面(A)と lateral 側(A')から観察した共焦点顕微鏡画像。(A)0.2 μ m step で撮影した画像 2 枚から作成した MIP 画像。CAMSAP3 の焦点面(シアンの枠)は GFP-Centrin2 の焦点面よりも約 0.2 μ m apical 側にずれていたため、Centrin2 を基準とし CAMSAP3 の焦点面の画像には -0.2 μ m と記載した。最下段では、同じ領域(四角)でそれぞれの焦点面(Z の異なる)の画像を拡大した。(A')下段は上段の一部(四角)を拡大したもの。上段 scale bar=5 μ m、下段 scale bar=0.5 μ m。

(B-B') *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(成体)の卵管を抗 Centriolin 抗体(マゼンタ)で染色し、apical 面(B)と lateral 側(B')から観察した共焦点顕微鏡画像。(B)0.2 μ m step で撮影した画像 5 枚から作成した MIP 画像。(B')single plane。下段は上段の一部(四角)を拡大したもの。上段 scale bar=5 μ m、下段 scale bar=0.5 μ m。

(C-C') *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(成体)の卵管を抗 γ -tubulin 抗体(マゼンタ)で染色し、apical 面(C)と lateral 側(C')から観察した共焦点顕微鏡画像。下段は上段の一部(四角)を拡大したもの。(C)0.2 μ m step で撮影した画像 8 枚から作成した MIP 画像。上段 scale bar=5 μ m、下段 scale bar=0.5 μ m。

(D-D') WT マウス(成体)の卵管を抗 CAMSAP3 抗体(マゼンタ)、抗 γ -tubulin 抗体(緑)で染色し、apical 面(D)と lateral 側(D')から観察した共焦点顕微鏡画像。(D)0.2 μ m step で撮影した画像 6 枚から作成した MIP 画像。CAMSAP3 と γ -tubulin の焦点面(シアンの枠)が 0.4 μ m ずれていたため、 γ -tubulin を基準とし CAMSAP3 の焦点面の画像には -0.4 μ m と記載した。下段ではそれぞれの焦点面の画像を一部(四角)拡大して重ねた。(D')下段は上段の一部(四角)を拡大したもの。上段 scale bar=5 μ m、下段 scale bar=0.5 μ m。

(E) WT マウス(成体)の卵管を抗 CAMSAP3 抗体(マゼンタ)、抗 ace-tubulin 抗体(緑)で染色し、lateral 側から観察した共焦点顕微鏡画像。中段は上段の一部(四角)を拡大した。最下段は、異なる角度の繊毛軸系と CAMSAP3 を含む領域を拡大した(single plane)。2 段目は、1 段目の一部を拡大した。3 段目は、異なる角度の軸系を並べた。上段 scale bar=5 μ m、下段 scale bar=0.5 μ m。

(F-F') WT マウス(7w 同腹コントロール個体)の卵管を抗 Centriolin 抗体(緑)、抗 CAMSAP3

抗体(マゼンタ)で染色した。CAMSAP3(Alexa594)のシグナルは超解像顕微鏡画像、Centriolin(Alexa488)のシグナルは共焦点顕微鏡画像。0.2 μ m step で撮影した画像 13 枚から作成した MIP 画像。下段は、上段の一部(破線内)を拡大したもの。上段 scale bar=5 μ m、下段 scale bar=0.5 μ m。(F)Fig.3D の下段と同程度の視野。CAMSAP3(マゼンタ)、Centriolin(緑)のドット状のシグナル 1 対を含む領域内(四角(シアン))の Z 軸に従った平均輝度値のグラフを作成した。

(G-G') WT マウス(成体)の卵管を抗 CAMSAP3 抗体(マゼンタ)、抗 Odf2 抗体(緑)で染色した超解像顕微鏡画像。0.2 μ m step で撮影した画像 3 枚から作成した MIP 画像。1 段目の一部(四角)を拡大し、2 段目に示した。CAMSAP3 のシグナルは、子宮側に偏っている傾向にある。上段 scale bar=5 μ m、下段 scale bar=0.5 μ m。(G') CAMSAP3(マゼンタ)と重なる Odf2(緑)を含む領域内(四角(シアン))の Z 軸に従った平均輝度値のグラフを作成した。

(H) Fig. 4-1 A-G' の染色像から作成した CAMSAP3 の局在についての模式図。Lateral 側からの模式図は共焦点顕微鏡画像を元に、apical 側からの模式図は超解像顕微鏡画像を元に作成した。両者の大きさは異なっており、lateral 側からの模式図よりも apical 面からの模式図は 3 倍拡大している。

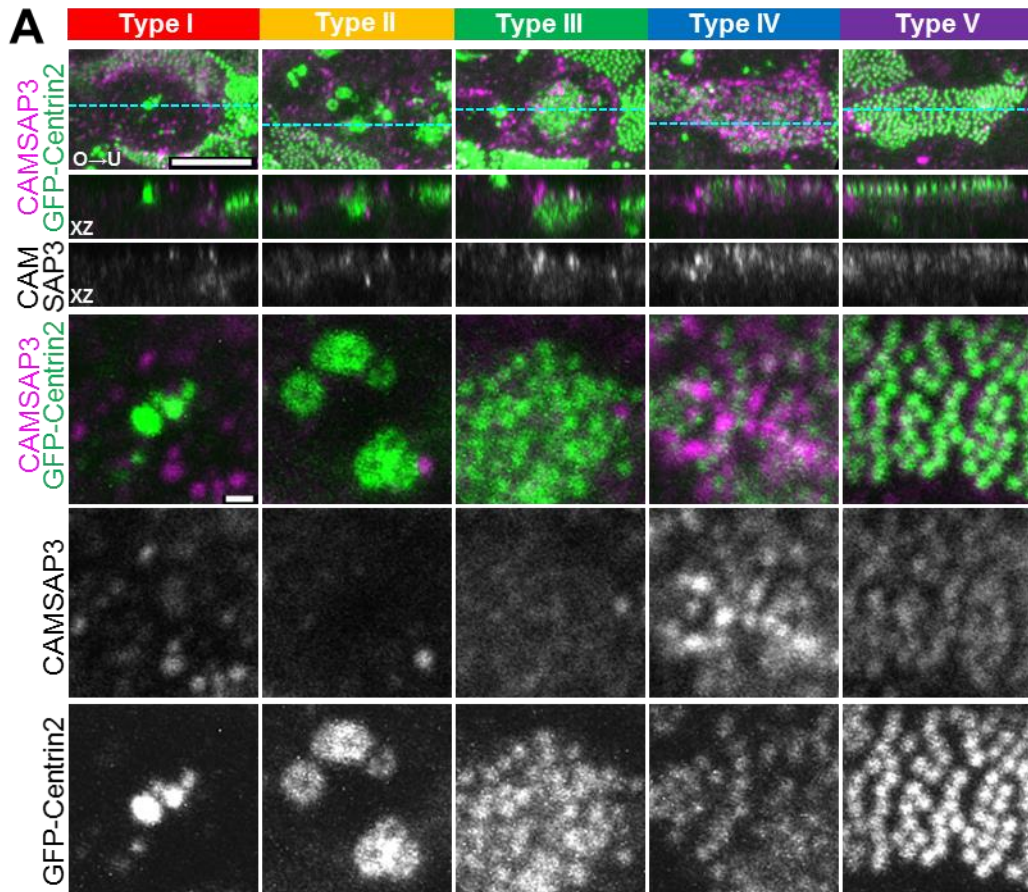
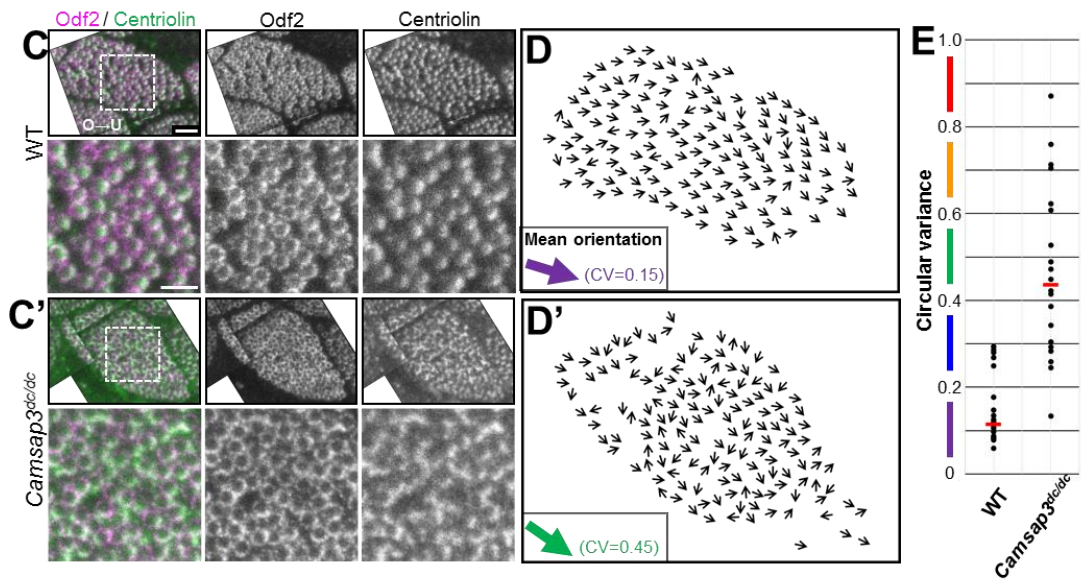
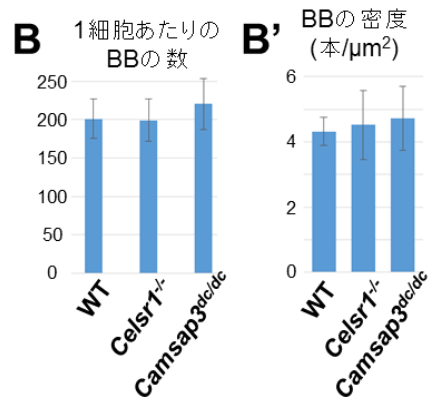


Fig. 4-2 多繊毛細胞の発達過程における CAMSAP3 の発現時期

(A) P13 の *GFP-Centrin2*^{tg/tg} マウス卵管を抗 CAMSAP3 抗体(マゼンタ)で染色した共焦点画像。1 段目の各写真は、0.2 μ m step で撮影した画像 20 枚から作成した MIP 画像。同一視野から切り出した細胞で、撮影条件や画像の処理条件(LUT など)は全ての写真で一致する。2 段目は、1 段目と同じ領域の XZ 断面。3 段目は、1 段目と同じ領域の single plane。Centrin2 シグナルの焦点面で、一部の領域を拡大した。3 段目以降は、CAMSAP3、Centrin2 シグナルの単色画像。Scale bar=5 μ m、0.5 μ m。



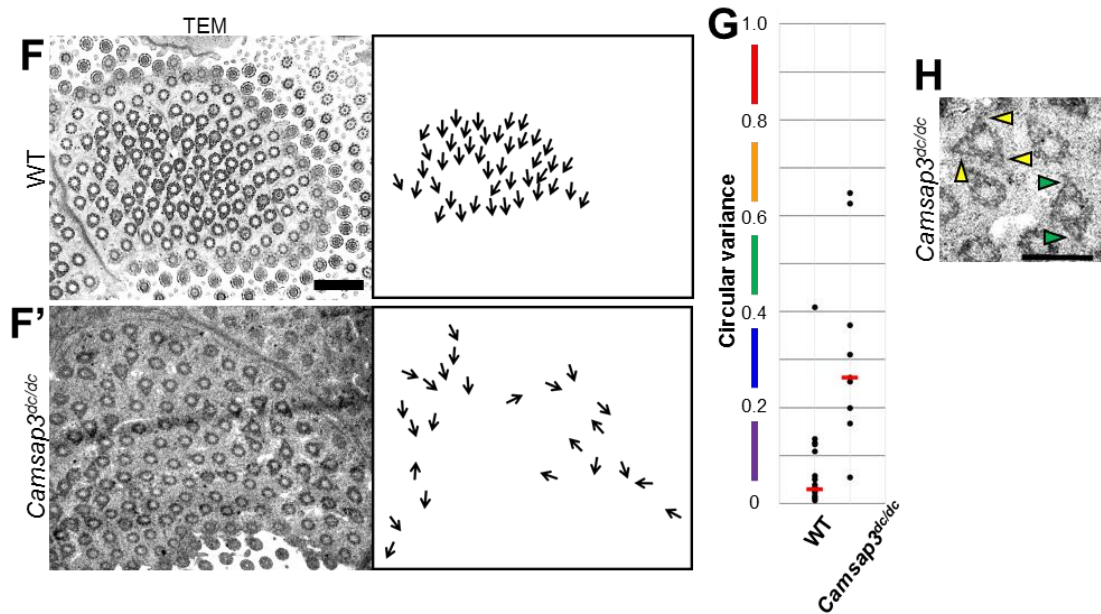


Fig. 4-3 *Camsap3^{dc/dc}* マウスにおける繊毛の極性異常

(A-A') 未公開データ

(B-B') *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(11w)、*GFP-Centrin2^{tg/-}; Celsr1^{-/-}* マウス(11w)、*GFP-Centrin2^{tg/-}; Camsap3^{dc/dc}* マウス(11w)の卵管を Phalloidin で染色し、繊毛の本数と密度を調べた。それぞれ平均 201.1 本/細胞(SD=25.7)、平均 199.3 本/細胞(SD=27.7)、平均 220.7 本/細胞(SD=33.3)、密度は 4.3 本/ μm^2 (SD=0.43)、4.5 本/ μm^2 (SD=1.06)、4.7 本/ μm^2 (SD=0.97)。各 2 個体、20 細胞。T 検定の結果(0.0493) $p < 0.05$ で *Camsap3^{dc/dc}* マウスでは、有意に WT よりも BB の数が多い。

(C-C') 写真の卵巣側が左、子宮側が右になるよう配置した。WT マウス(17w、14w の個体 (n=2)) (C)と同腹の *Camsap3^{dc/dc}* マウス(C') の多繊毛細胞を抗 Odf2 抗体(マゼンタ)、抗 Centriolin 抗体(緑)で染色した超解像顕微鏡画像。WT : CV=0.15、計測した繊毛 : 148 本、*Camsap3^{dc/dc}* : CV=0.45、計測した繊毛 : 148 本。0.1 μm step で撮影した各画像に対してズレ補正(Fiji : correct 3D drift)を行い、作成した MIP 画像。Scale bar=1 μm (上段)、0.5 μm (下段)。

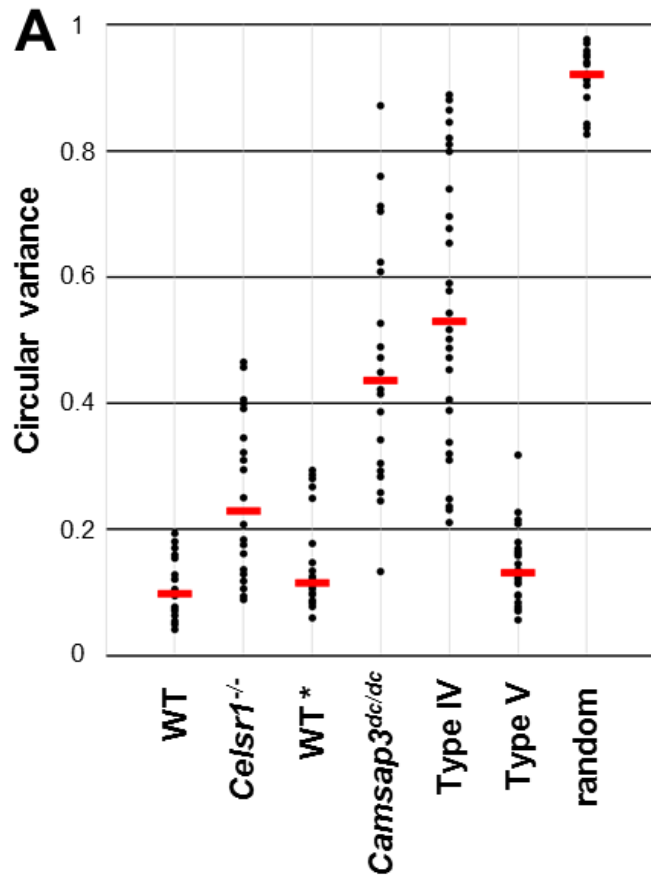
(D-D') (C, C')の画像の Odf2、Centriolin のシグナルから極性が判断できた繊毛。矢印の角度は繊毛の向きと一致している。大きい矢印は各細胞の「繊毛の平均角度(mean orientation)」を示し、矢印の色は CV の値に従って紫 : 0~0.2、青 : ~0.4、緑 : ~0.6、黄 : ~0.8、赤 : ~1.0。

(E) WT マウス、*Camsap3^{dc/dc}* マウスの多繊毛細胞において、各細胞での繊毛の極性を円統計における分散(Circular Variance)として示した。グラフ中の 1 点が 1 細胞を意味し、bar は中央値。個体数 2、計測した細胞数 WT : 20cells(10cells, 10cells)、*Camsap3^{dc/dc}* : 20cells(10cells, 10cells)、向き判定を行った繊毛の平均の数、WT : 195.4cilium/cell、*Camsap3^{dc/dc}* : 182.3 cilium/cell。

(F-F') WT マウス(11w) (花市電子顕微鏡技術研究所撮影、Shi et al., 2014)(F)と私が観察した *Camsap3^{dc/dc}* マウス(成体)(F')の多繊毛細胞の透過型電子顕微鏡画像と電子顕微鏡画像の basal body/basal foot から繊毛の向きをトレースした模式図。矢印は BB/BF より判定した繊毛の向き。Scale bar=1 μ m。

(G) (F-F')のような画像を元に 10 本以上 BB/BF の構造が観察され、向き判定ができた細胞について CV 値を算出しグラフ化した。細胞数は WT : 21、*Camsap3^{dc/dc}* : 9、中央値(赤い bar)は WT : 0.03、*Camsap3^{dc/dc}* : 0.26

(H) *Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管多繊毛細胞で、複数の BF を持つ BB の透過型電子顕微鏡画像。矢頭はそれぞれの BB の BF を指す。Scale bar=500nm。



A'

	WT	<i>Celsr1</i> ^{-/-}	WT*	<i>Camsap3</i> ^{dc/dc}	Type IV	Type V	random
WT							
<i>Celsr1</i> ^{-/-}	0.002						
WT*	0.503	0.046					
<i>Camsap3</i> ^{dc/dc}	2.77E-06	0.015	2.32E-05				
Type IV	9.98E-08	2.00E-04	1.13E-06	0.844			
Type V	0.298	0.039	1	1.01E-06	5.88E-09		
random	1.32E-06	1.32E-06	1.32E-06	2.07E-06	4.94E-07	9.98E-08	

Fig. 4-4 成体 WT、*Celsr1*^{-/-}、*Camsap3*^{dc/dc} マウスの多繊毛細胞と P13 マウスの type IV-V の多繊毛細胞における細胞内の繊毛極性(CV)のまとめ

(A) Fig. 1-6 E, 2-1 D, 4-3 E のデータをまとめた。グラフ内の 1 つのドットは 1 つの細胞にお

ける CV 値を意味し、赤色の bar は各カテゴリーの CV の中央値である。それぞれの中央値は WT: 0.098, *Celsr1*^{-/-}: 0.23, WT*: 0.11, *Camsap3*^{dc/dc}: 0.44, Type IV: 0.53, Type V: 0.13, random: 0.92。“WT” と “*Celsr1*^{-/-}” は Fig. 2-1 D と同じ(12w、2 個体、n = 20 細胞)、“WT*” と “*Camsap3*^{dc/dc}” は Fig. 4-3 E (同腹の成体マウス 17w、14w、2 個体、n = 20 細胞)、“Type IV” と “Type V” は Fig. 1-6 E と同じ(P13、3 個体、n = 28 細胞)、“random” は 150 個のランダムな角度から算出した CV 値(20 細胞分)

(B) Steel-Dwass 法を用いて行ったノンパラメトリック多重検定の *p* 値を表に示した。 *p* 値が 0.05 以下の部分をオレンジで表した。

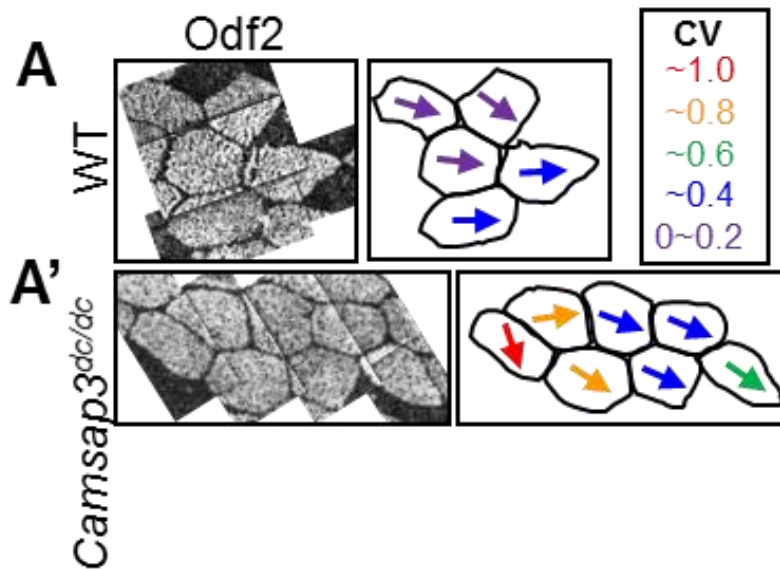
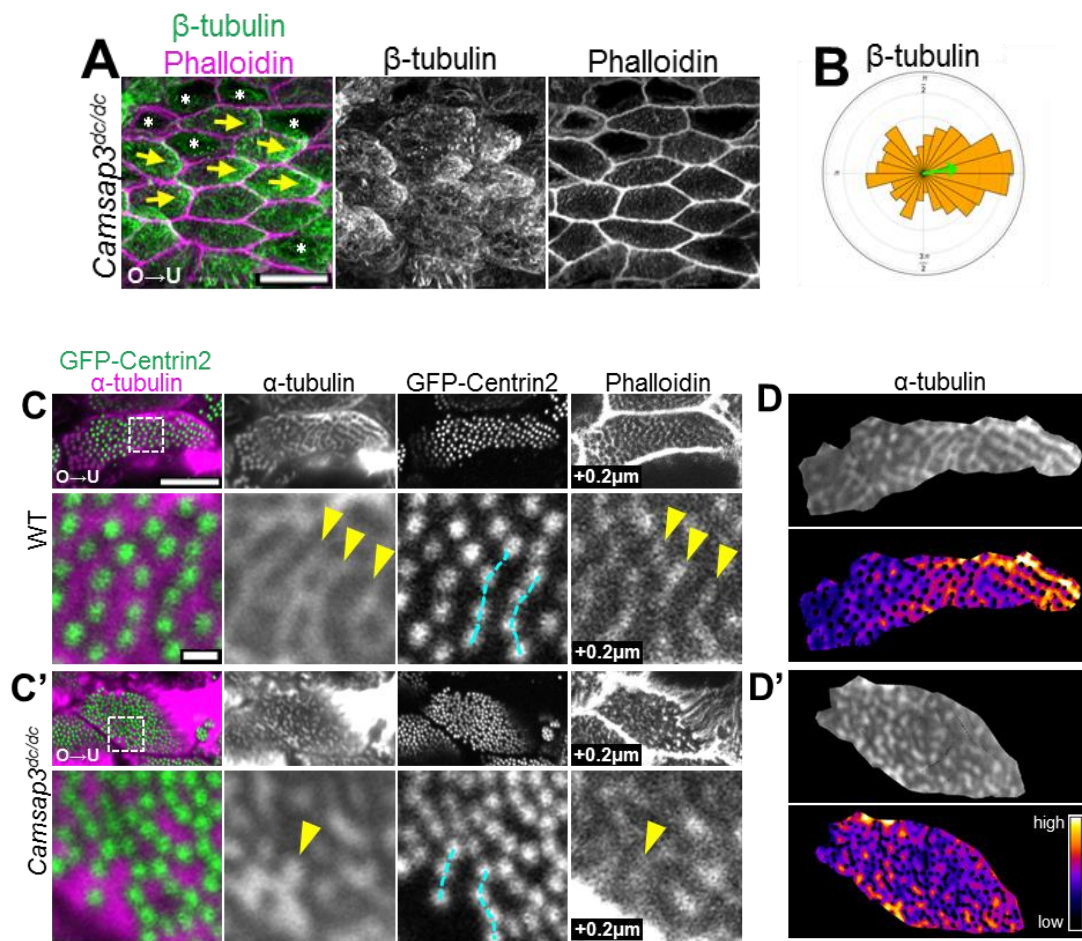
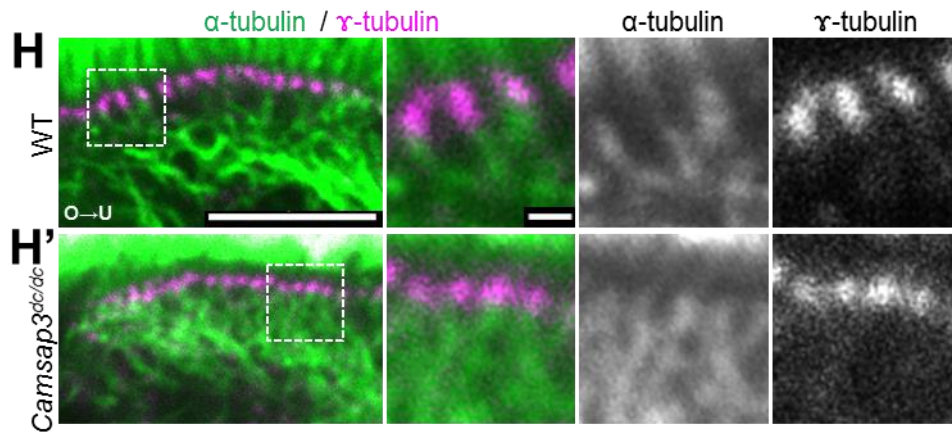
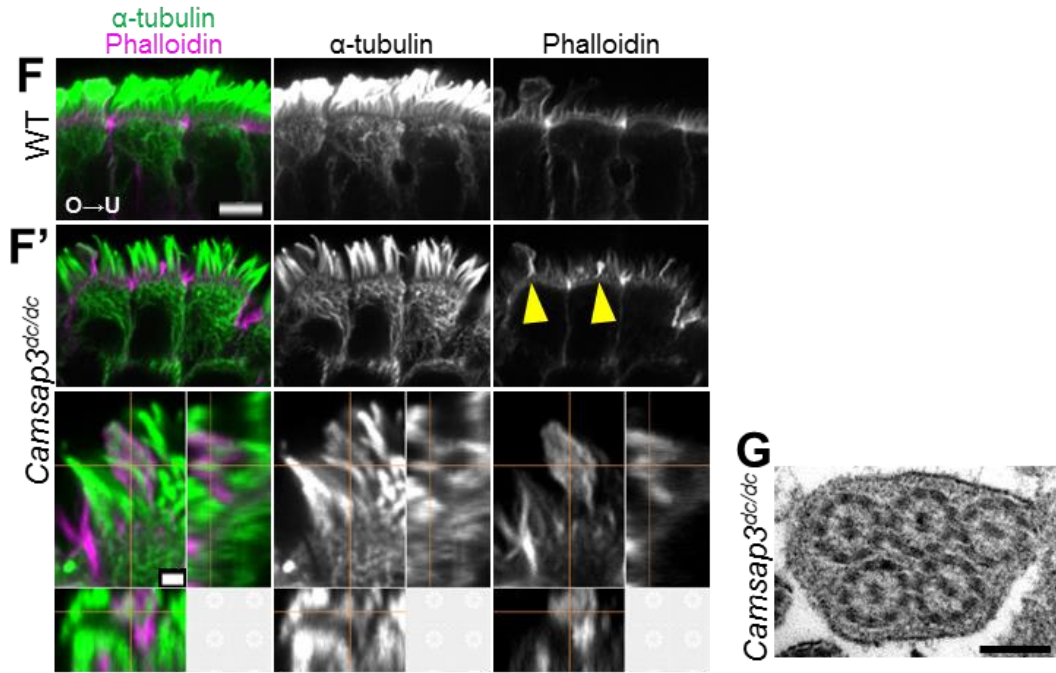


Fig. 4-5 *Camsap3^{dc/dc}* マウスにおける細胞間での繊毛極性

(A-A') 同腹 WT マウス(A)、 *Camsap3^{dc/dc}* マウス(A')において、繊毛の極性を定量した多繊毛細胞を Odf2 のシグナルを元に超解像顕微鏡画像をつなぎ合わせたもの。全ての写真は同じヒダを構成していた。Odf2 のシグナルを元に細胞形態をトレースし、各細胞の「繊毛の平均角度(mean orientation)」を矢印の角度で示した。矢印の色は CV の値に従って、紫:0~0.2、青:~0.4、緑:~0.6、黄:~0.8、赤:~1.0。





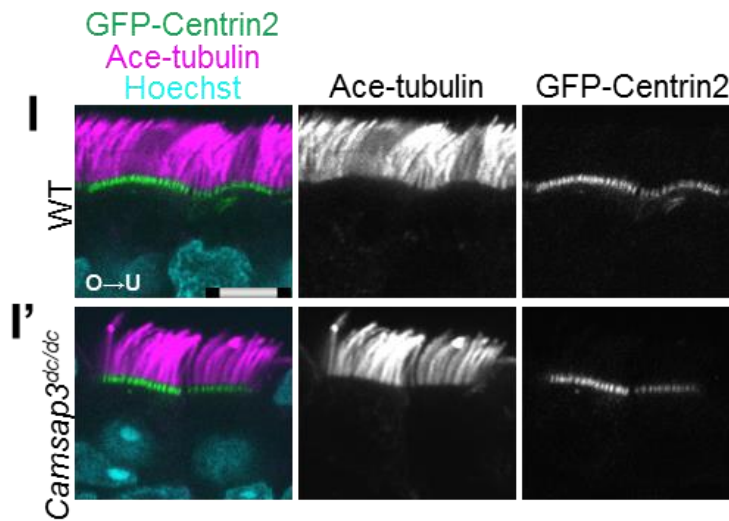


Fig. 4-6 *Camsap3^{dc/dc}* マウスにおける微小管の異常

(A) *Camsap3^{dc/dc}* マウス(14w)卵管を抗 β -tubulin 抗体(緑)、Phalloidin(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡像。0.2 μ m step で撮影した画像 20 枚から作成した MIP 画像。Scale bar = 10 μ m。 β -tubulin の局在方向を矢印で示した。

(B) (A)のように染色・顕微鏡観察した *Camsap3^{dc/dc}* マウス(14w)の卵管画像を元に Fig. 2-3 B と同じ方法で解析した。0.2 μ m step で撮影した共焦点顕微鏡画像 20 枚から作成した MIP 画像を用いて、各多繊毛細胞で β -tubulin の局在方向を定量し、角度を算出した。

Phalloidin で標識される細胞境界のシグナルから細胞の輪郭をトレースし、2pixel 細胞の重心に ROI を縮小させ、細胞の重心側を 5pixel 幅で、細胞周囲に沿って解析した。180 度周期の nematic order を算出した後、各細胞の卵巣側・子宮側の領域でシグナルの比を調べることで 360 度周期のデータとした。ローズダイアグラムを用いて、卵管上皮のヒダに沿った(longitudinal)角度の分布を示した。角度は 15 度幅で 24 区分に分けられている。面積は、各角度に分布する細胞数に比例している。ICR : 3 個体、各 1 卵管、細胞数 : 125, 110, 135、 *Camsap3^{dc/dc}* : 2 個体、各 1 卵管、細胞数 : 111, 61。

(C-C') 同腹 *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(C)と *GFP-Centrin2^{tg/-}; Camsap3^{dc/dc}* マウス(C')の卵管を抗 α -tubulin 抗体、Phalloidin で染色した共焦点顕微鏡像(single plane)。WT と *Camsap3^{dc/dc}* マウスにおいて、BB の列の間隔が同じように空いているところ(破線)においても、 α -tubulin の stripe 構造は観察されなかった。上段左の写真の一部(四角)を 2 段目に拡大した。 α -

tubulin の stripe 構造の 0.2 μ m basal 側でみられる Phalloidin シグナルを切り出した。WT では、 α -tubulin の stripe 構造と類似のパターンが Phalloidin シグナルでもみられたが、*Camsap3^{dc/dc}* マウスでは α -tubulin と phalloidin の一致する箇所が少ない(矢頭)。Scale bar=5 μ m、0.5 μ m。

(D-D') (C-C')の画像から、Centrin2 のドットが明瞭に見える高さにおいて、ROI を作成し、その ROI 情報を元に Centrin2 と同じ高さにある α -tubulin シグナルを再構築した。平均輝度値でノーマライズした後、輝度値に従ってカラーで示し(Fiji の Fire 使用)、Centrin2 のシグナルをマスクした。

(E-E') 未公開データ。

(F-F') 同腹 WT マウス(F)と *Camsap3^{dc/dc}* マウス(F')(成体)の卵管を抗 α -tubulin 抗体(緑)、Phalloidin(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡画像。矢頭は、細胞の apical 面にみられる Phalloidin シグナルの強い突起物を示した。(F') *Camsap3^{dc/dc}* マウス(成体)で観察された Phalloidin シグナルの強い突起物を三次元的に示した。上段とは別の視野。Scale bar=5 μ m、0.5 μ m。

(G) *Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管多繊毛細胞で、1 つの ciliary membren 中に複数の軸糸が入っていることを観察した透過型電子顕微鏡画像。Scale bar=200nm。

(H-H')同腹 WT マウス(D)と *Camsap3^{dc/dc}* マウス(D') (成体)の卵管を抗 α -tubulin 抗体(緑)、抗 γ -tubulin 抗体で染色し、latera 側から観察した共焦点顕微鏡画像。左の画像の一部を拡大した。Scale bar=5 μ m、0.5 μ m。

(I-I') 同腹 *GFP-Centrin2^{tg/-}* マウス(I)と *GFP-Centrin2^{tg/-}; Camsap3^{dc/dc}* マウス(I')の卵管を抗 α -tubulin 抗体(マゼンタ)、Hoechst(シアン)で染色した。Scale bar=5 μ m。

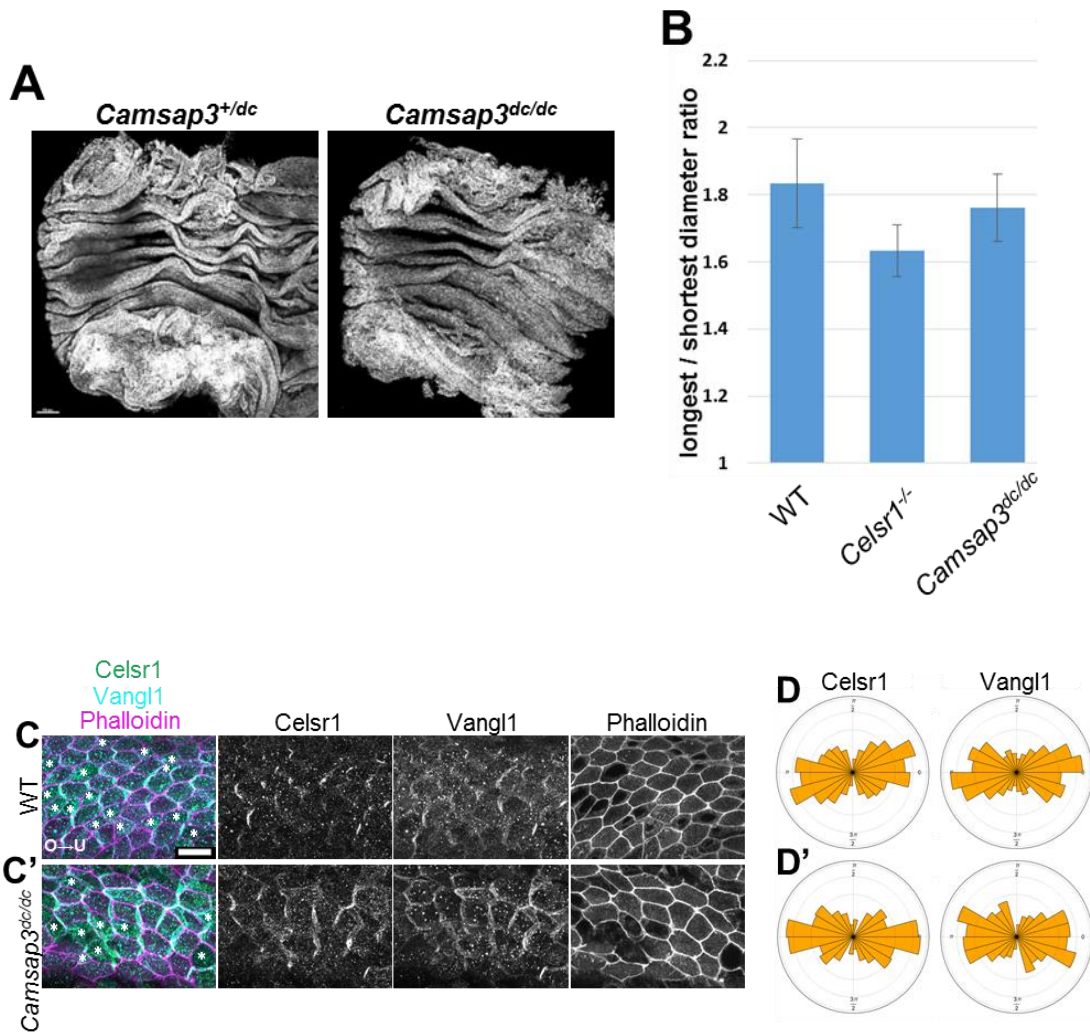


Fig. 4-7 *Camsap3*^{dc/dc} マウスにおける PCP 因子の局在

(A) 同腹 *Camsap3* ヘテロマウスと *Camsap3*^{dc/dc} マウス(成体)の卵管を Hoechst で染色し、取得した共焦点顕微鏡画像の MIP 画像。

(B) Phalloidin シグナルから細胞境界の ROI を作成し、細胞の最長径、最短径を算出し、細胞伸長(最長径 / 最短径)を調べた。Error bar は、標準誤差。

(C-C') 同腹 WT(C)と *Camsap3*^{dc/dc} マウス(7w)(C')の卵管を抗 Celsr1 抗体(緑)、抗 Vangl1 抗体(シアン)、Phalloidin(マゼンタ)で染色した共焦点顕微鏡像。0.2 μ m step で撮影した画像 15 枚から作成した MIP 画像。分泌細胞を*で示した。Scale bar=10 μ m。

(D) 多繊毛細胞における Celsr1、Vangl1 の局在方向を定量し、角度を算出した。ローズダ

イアグラムを用いて、卵巣-子宮軸に沿った管の方向(longitudinal axis)に対する角度(1-180度)の分布を示した。角度は15度幅で12区分に分けられている。面積は、各角度に分布する細胞数に比例している。WT: 1 個体、1 卵管、細胞数: 99、*Camsap3^{dc/dc}*: 1 個体、1 卵管、細胞数: 119。

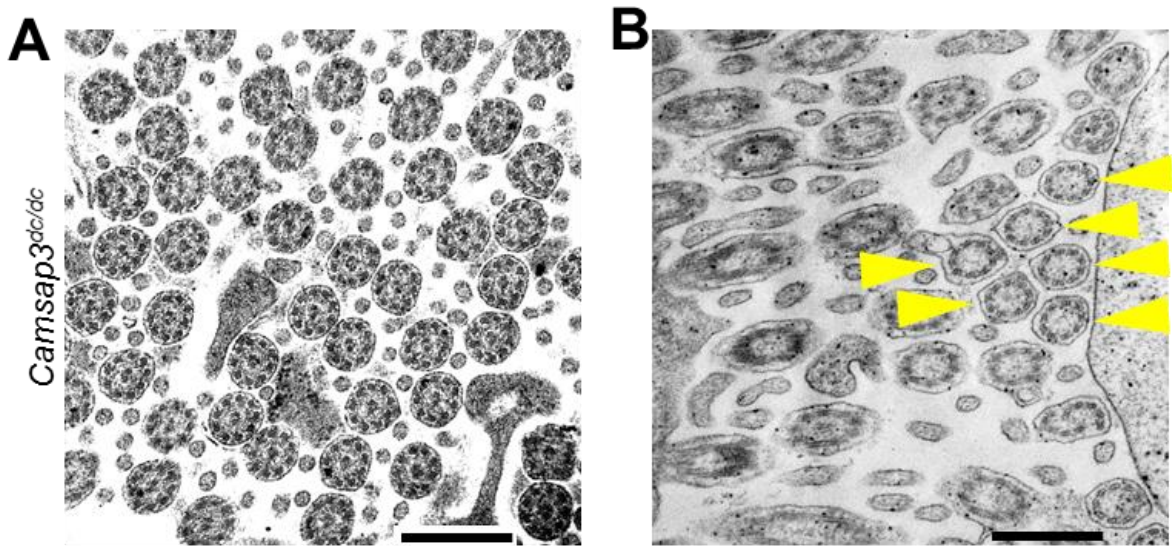


Fig. 4-8 *Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管多繊毛細胞の軸糸

(A) *Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管多繊毛細胞の軸糸の電子顕微鏡像。中心対微小管が観察された。Scale bar=0.5 μ m。

(B) 大谷哲久博士に撮影していただいた *Camsap3^{dc/dc}* マウスの卵管多繊毛細胞の軸糸の電子顕微鏡像。中心対微小管を欠く 軸糸が観察される(矢頭)。

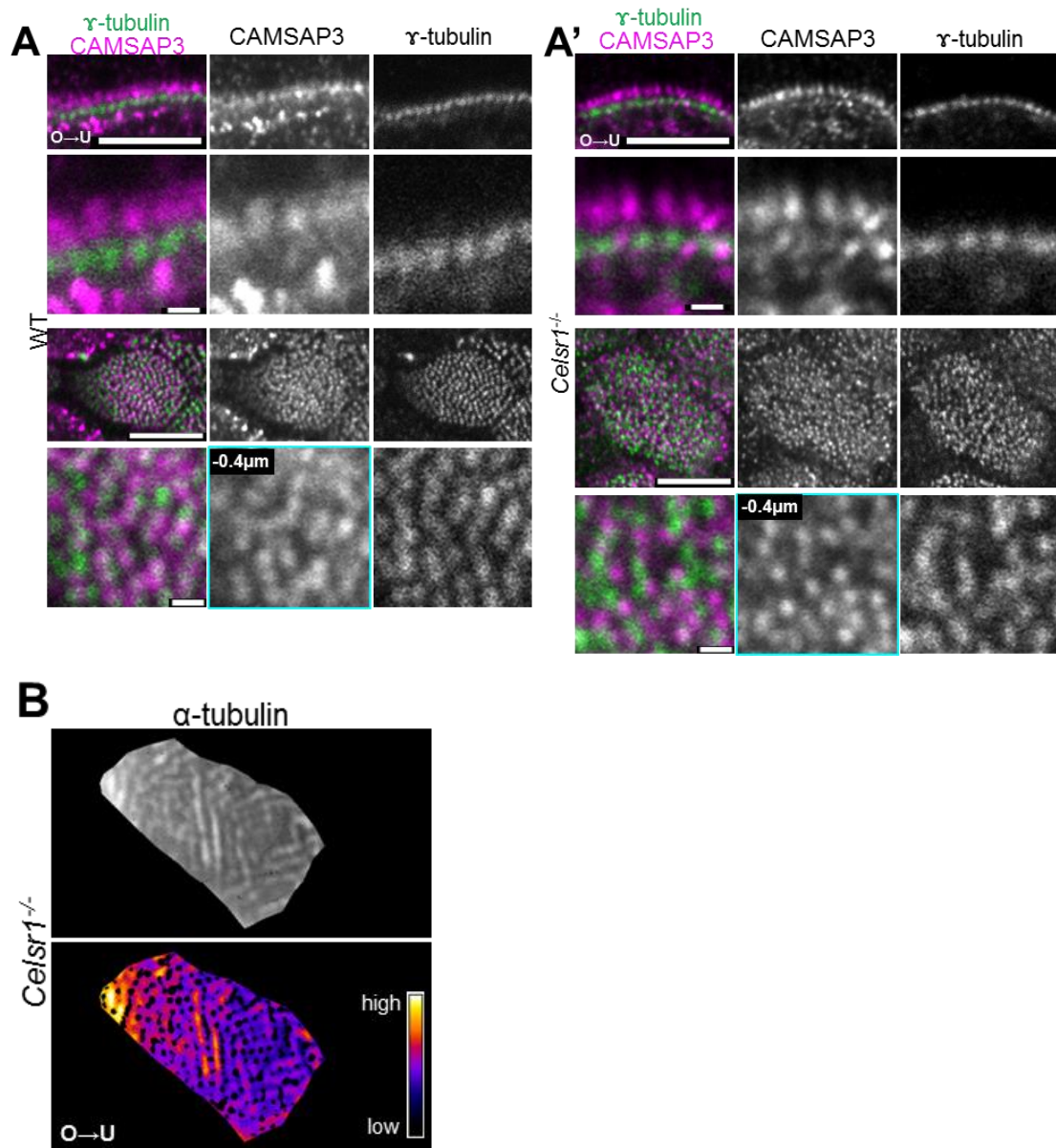
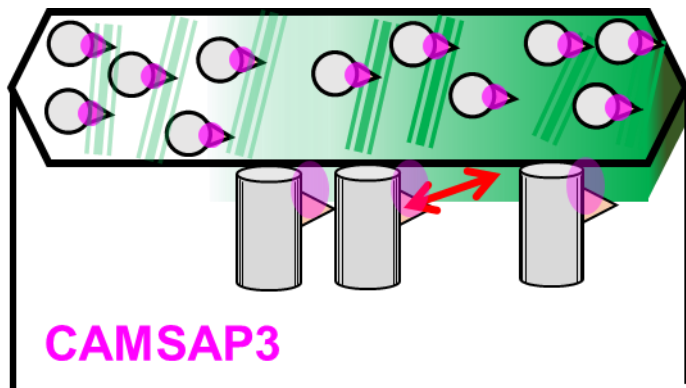


Fig. 4-9 *Celsr1*^{-/-}マウスにおける CAMSAP3 の局在

(A-A') WT と *Celsr1*^{-/-}マウスの多繊毛細胞を抗 CAMSAP3 抗体(マゼンタ)と抗 γ -tubulin 抗体(緑)で染色した。上2段は lateral 面から、下2段は apical 面からの共焦点顕微鏡画像で、それぞれ細胞の apical 面全体が観察できる広域画像と拡大画像を示している。全ての写真は single plane であり、 γ -tubulin の焦点面よりも 0.4 μ m 側に CAMSAP3 の焦点面があった。焦点面の差はシヤンの枠と左上の数字で示した。最下段の左端はそれぞれの焦点面の画像を重ねたもの。Scale bar=5 μ m、0.5 μ m。

(B) Fig. 4-6 D-D'と同様の方法で作成した画像。Centrin2 のドットが明瞭に見える高さにおいて、ROI を作成し、その ROI 情報を元に Centrin2 と同じ高さにある α -tubulin シグナルを再構築した。平均輝度値でノーマライズした後、輝度値に従ってカラーで示し(Fiji の Fire 使用)、Centrin2 のシグナルをマスクした。

Fig. 4-10 卵管多繊毛細胞における CAMSAP2 の局在
(A-A') 未公開データ。



CAMSAP3

アピカル面の微小管

Fig. 4-11 CAMSAP3 を介して細胞内で繊毛の極性を揃える機構

赤い矢印で BF 付近に局在する CAMSAP3(ピンク)とアピカル面の微小管(緑)のインターラクションを示した。

〈第5章〉まとめ、マウスの卵管上皮組織で繊毛の極性を揃える機構に関する議論 〈序〉

第1章でマウス卵管における繊毛の成熟過程を、第2章で *Celsr1* を介して細胞間で繊毛の極性を揃える機構を、第3章で微小管の分布について、さらに、第4章で *CAMSAP3* を介して細胞内で繊毛の極性を揃える機構について議論した。この章では、マウスの卵管上皮組織全体にわたって繊毛の極性を揃える機構について議論したい。

〈考察〉

1. *Celsr1*^{-/-}細胞において細胞内で繊毛の極性が揃う要因

結果 2-2 から *Celsr1*^{-/-}マウスの卵管においても、多くの多繊毛細胞で微小管の濃縮が起きており、微小管の濃縮方向に沿って繊毛の極性を個々の細胞内で自律的に揃える能力を有していることが示唆された。結果 4-5 で示したように、*Celsr1*^{-/-}マウスの多繊毛細胞においても WT の多繊毛細胞と同様 *CAMSAP3* が BB 付近に局在していた。それに加え、apical 面に stripe 状の微小管があり、微小管の濃縮方向に沿って BB と同じ高さの apical 面においても微小管の濃度勾配が形成されていた。それらのことから、*Celsr1*^{-/-}マウスでも *CAMSAP3* を介した BB/BF と apical 面の微小管のインターアクションが可能であり、それによって繊毛の向きが細胞内で揃う傾向にあるのではないかと考えている。

2. 細胞内、細胞間で繊毛の極性を揃える機構の関係

Fig. 5-1 に WT と各変異体マウスの結果を模式的にまとめた。WT マウスでは、細胞内で微小管が濃縮し、BF 付近に *CAMSAP3* が局在しており、微小管の濃縮方向を向いて細胞内で繊毛が揃っている。隣接する細胞間で微小管の濃縮方向が揃っており、各細胞における繊毛の平均角度は微小管の濃縮方向を向いて細胞間で揃って

いる。*Celsr1*^{-/-}マウスでは、細胞内で微小管が濃縮し、BF 付近に CAMSAP3 が局在しており、微小管の濃縮方向を向いて細胞内で繊毛が揃っている。微小管の濃縮方向は卵巣-子宮軸に関係なく、隣接する細胞間でも異なっているため、各細胞における繊毛の平均角度は微小管の濃縮方向を向いて細胞間で異なっている。*Camsap3*^{dc/dc} マウスでは、細胞内で微小管が濃縮しているが、細胞内で繊毛の向きが揃っていない。隣接する細胞間で微小管の濃縮方向が揃っており、各細胞における繊毛の平均角度は微小管の濃縮方向を向いて細胞間で揃っている。

Celsr1^{-/-}マウスでは、CAMSAP3 が BF 付近に局在しており、apical 面に stripe 状の微小管と微小管の濃度勾配がみられる。また、*Camsap3*^{dc/dc} マウスでは、WT マウスと同じように *Celsr1* が卵巣側・子宮側の細胞境界に局在しており、微小管の濃縮方向が子宮側の細胞境界付近に揃っている。これらのことから、*Celsr1* 非依存的に CAMSAP3 を介して細胞内で繊毛の極性を揃える機構が、CAMSAP3 非依存的に細胞間で微小管の濃縮方向を揃える機構が機能すると考えている。

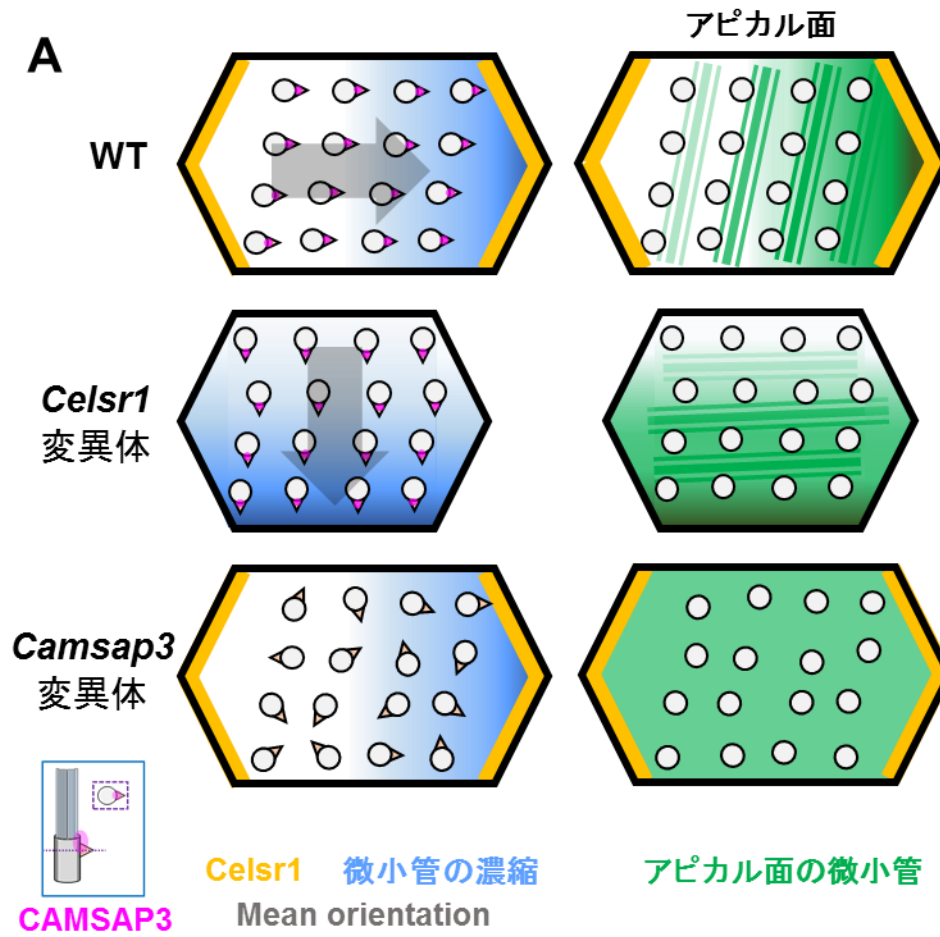
一方で、2 つの機構において微小管が重要な役割を担っている。本研究では、*Camsap3*^{dc/dc} マウスで異常がみられた apical 面の微小管(0.6 μ m 厚)と WT と同様であった微小管の濃縮(apical 面から 4 μ m 厚)を分けて議論してきた。しかし、apical 面の微小管と微小管の濃縮は完全に切り分けられるものではなく、インターアクションしている、もしくは、分布の制御や安定化に寄与する分子が一部異なるだけなのではないかとも考えている。

細胞内で繊毛の極性を揃える機構と細胞間で繊毛の極性を揃える機構がどのように関連しあって、組織全体で繊毛の向きを揃えているのかということは、本研究では明らかにすることができなかった。本研究によってわかってきたことと、先行研究から得られる情報を元に考えた仮説をここに記す。先行研究では、P2 の卵管で既に *Celsr1* が卵巣-子宮軸に垂直な細胞辺に偏って局在することが示されている(Shi et al., 2014)。P2 の卵管上皮において、長い繊毛軸糸を多数持つ多繊毛細胞は、おおよそ 5%程度である(Shi et al., 2014)ことに加え、本研究において P5 の卵管上皮

を調べたところ type V の細胞は 2.5% しかなかったことから、P2 の卵管上皮のほとんどの細胞では細胞内、細胞間で繊毛の極性が揃っていないと考えられる。これらことから、ごく早い段階で形成される Celsr1 の局在に従って、微小管の濃縮が起こり、そちらの方向を向いて繊毛の向きが揃うと考えられる。CAMSAP3 は、個々の細胞が type IV になる時期から BB 付近に局在し、apical 面の微小管と相互作用しながら徐々に細胞内で繊毛の向きを揃えていると考えている。加えて、apical 面の微小管は、子宮側の細胞境界付近に濃縮する微小管とのインターアクションによって、勾配を形成しているのではないかと考えている。つまり、Celsr1 によって細胞間で繊毛の極性を揃える機構が先に動き始め、その機構と並行して、個々の細胞が type IV に達したころから CAMSAP3 による細胞内で繊毛の極性を揃える機構が動き始めるのではないかと考えている。

以上の結果から、本研究では、Celsr1 を介して細胞間で繊毛の極性を揃える機構と CAMSAP3 を介して細胞内で繊毛の極性を揃える機構を提唱する。

〈Figure〉



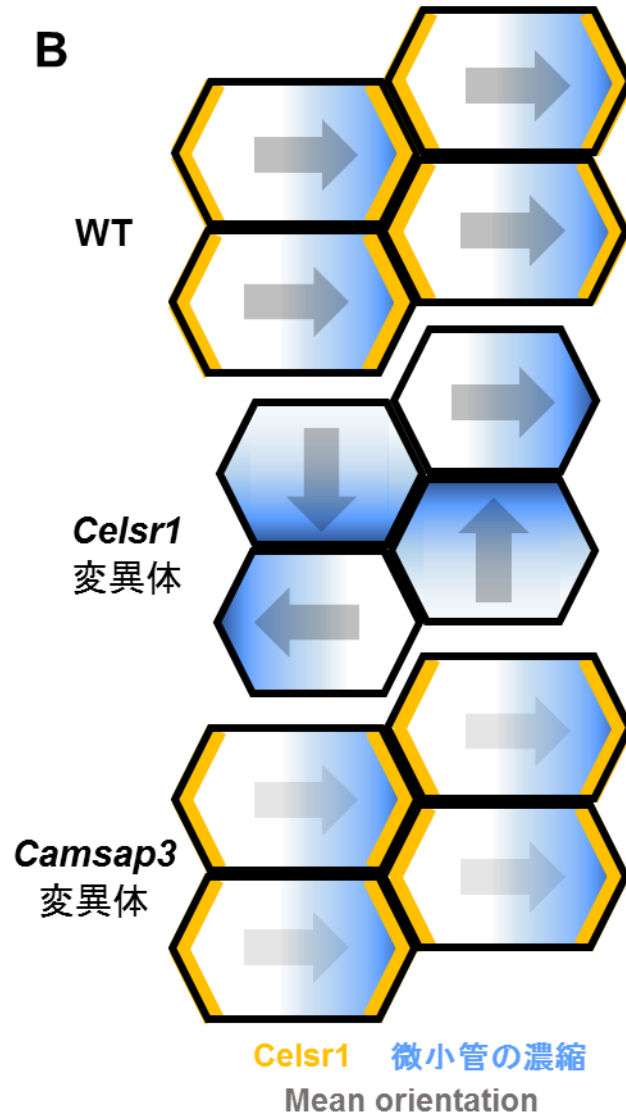


Fig. 5-1 WT マウス、*Celsr1*^{-/-} マウス、*Camsap3*^{dc/dc} マウスの表現型の模式図

(A) 細胞内の表現型をまとめた模式図。左の列では apical 面から 4 μ m 程の厚みを持った範囲に形成される微小管の濃縮と CAMSAP3 の局在、繊毛の向き、各細胞の繊毛の平均角度を表した。右の列では apical 面の微小管(0.6 μ m 厚)の stripe 状の分布と濃度勾配について表した。

(B) 細胞間の表現型をまとめた模式図。微小管の濃縮方向と繊毛の平均角度を表した。

〈材料と方法〉

1. 動物

Slc:ICR (日本エスエルシー株式会社)を用い、成体(11w)は購入したものを、若齢のマウスについてはモデル生物研究センターより供給されたものを使用した。すべてのマウスの飼育・実験は、大学共同利用機関法人自然科学研究機構動物実験規程に沿って行い、自然科学研究機構動物実験委員会より承認されたものである。動物は基礎生物学研究所モデル生物研究センターの飼育室で、明期 12 時間・暗期 12 時間の光条件下で約 23±2°C、SPF(Specific Pathogen Free)環境で飼育された。一部の *Camsap3^{dc/dc}* マウスと同腹 WT マウスは、理化学研究所 多細胞システム形成研究センター 器官創成プログラム高次構造形成研究チームで飼育されており、実験も理化学研究所の動物実験ガイドラインに従って行った。

本研究に用いたマウスの各系統を以下に記す。

STRAINS	SOURCE
ICR (female)	Japan SLC
B6C3F1 (genetic background of <i>Celsr1</i> mutant and <i>Camsap3^{dc/dc}</i> mutant mice)	Japan SLC
<i>Celsr1^{-/-}</i> mutant mice (female)	Ravni et al., 2009
<i>Camsap3^{dc/dc}</i> mutant mice (female)	Toya et al., 2016
<i>GFP-Centrin2 Tg</i> mice	Higginbotham et al., 2004

2. 免疫染色

安楽死させたマウスの卵巣-子宮上部を切り出し、実体顕微鏡下で PBS(-)中の卵管采から 2 番目のターンまでの卵管を取り出した。ピンセットで卵巣-子宮軸に沿って 1 ターン目まで開いた。子宮側を明瞭に判別するため、子宮側は管の状態のままにした。その後、各抗体に適した固定法(下記の表に記載)で固定し、PBS(-) 室温 10 分で 1 回洗浄し、PFA 固定の場合は透過処理を室温で 1 時間行った(微小管を染める場合は 0.1%triton/PBS、その他は 0.5%triton/PBS)。MetOH 固定の場合は、triton

処理はしていない。固定したサンプルを PBS(-)室温 10 分で 1 回洗浄し、Blocking One(ナカライテスク 03953-95)で室温 1 時間ブロッキングした。Blocking One に下記の濃度で一次抗体を入れ、微小管を染める場合は 4°C36 時間、その他は 4°C12 時間で染色した。PBS(-)室温 10 分で 3 回洗浄し、Blocking One に下記の濃度で二次抗体を入れ、微小管を染める場合は 4°C24 時間、その他は 4°C12 時間で染色した。PBS(-)室温 10 分で 3 回洗浄し、封入を行った。
下記の表に、一次抗体と固定条件等を記載した。

- ・一次抗体

1nd Antibodies	SOURCE	IDENTIFIER	FIX	CONCENTRATION
Guinea pig polyclonal anti-Celsr1	Shi et al., 2014	N/A	4%PFA (4°C o/n)	(1 : 100)
Rabbit polyclonal anti-Vangl1	Sigma-Aldrich	Cat# HPA025235	4%PFA (4°C o/n)	(1:500 or 1: 100)
Rabbit polyclonal anti-Vangl2	Sigma-Aldrich	Cat#HPA027043	4%PFA (4°C o/n)	(1:500 or 1: 100)
Goat polyclonal anti-Fzd6	R&D	Cat#AF1526	4%PFA (4°C o/n)	(1: 500 or 1: 100)
Rat monoclonal anti-E-cadherin	Shirayoshi et al., 1986	N/A	4%PFA (4°C o/n)	(1 : 2)
Mouse monoclonal anti- α -Tubulin (clone DM1A)	Sigma-Aldrich	Cat#T6199	4%PFA (37°C 1h + 4°C 23h)	(1 : 100)
Rabbit monoclonal anti- β -Tubulin (clone 9F3)	Cell Signaling Technology	Cat#2128s	4%PFA (37°C 1h + 4°C 23h)	(1 : 100)
Mouse monoclonal anti-Acetylated-Tubulin (Acetylated- α -Tubulin)	Sigma-Aldrich	Cat#T7451	4%PFA (37°C 1h + 4°C 23h)	(1 : 100)
Rat monoclonal anti-Tyrosinated-Tubulin(YL1/2)	Abcam	Cat#ab6160	4%PFA (37°C 1h + 4°C 23h)	(1 : 100)
Mouse polyclonal anti-MACF1(ACF7)	Abnova	H00023499-A01	4%PFA (37°C 1h + 4°C 23h)	(1 : 100)
Mouse monoclonal anti-ZO1 (T8-754)	Itoh et al. 1991	N/A	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 2)
Mouse monoclonal anti- γ -Tubulin	Sigma-Aldrich	Cat#T6557	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Rabbit polyclonal anti- γ -Tubulin	Abcam	Cat#ab11321	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Rat monoclonal anti-Odf2	Tateishi et al. 2013	N/A	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 2)
Rabbit polyclonal anti-Odf2	Abcam	#ab43840	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Rat monoclonal anti-Centriolin	Ishikawa et al., 2005	N/A	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 20)
Mouse monoclonal anti-Centriolin (C-9)	Santa Cruz	Cat#sc-365521	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Mouse monoclonal anti-Centrin	Millipore	#04-1624	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Mouse monoclonal anti-Chibby	Santa Cruz	#sc-101551	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Rabbit polyclonal anti-CEP164	Sigma-Aldrich	#SAB3500022	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Mouse monoclonal anti-FGFR1OP	Abnova	#H00011116-M01	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Rabbit polyclonal anti-Phospho- β -catenin	Cell Signaling Technology	#9561	MetOH (-20°C 45min) + Acetone (-20°C 1min)	(1 : 100)
Rabbit polyclonal anti-CAMSAP2	Proteintech	17880-1-AP	MetOH (-20°C 20min)	(1 : 500)
Rabbit polyclonal anti-CAMSAP3	Tanaka et al., 2012	N/A 107	MetOH (-20°C 20min)	(1 : 500)

・二次抗体

2nd Antibodies	SOURCE	IDENTIFIER
Goat Alexa488 anti-mouse IgG1	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21121
Goat Alexa488 anti-mouse IgG(H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11029
F(ab') ₂ -Goat Alexa488 anti-Mouse IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11017
Goat Alexa488 anti-rabbit IgG(H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11034
Goat Alexa488 anti-rat IgG(H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11006
Goat Alexa488 anti-guinea pig IgG(H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11073
Goat Alexa594 anti-mouse IgG1	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21125
Goat Alexa 594 anti mouse IgG2a	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-21135
F(ab') ₂ -Goat Alexa 594 anti-Rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11072
Goat Alexa594 anti-rabbit(H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11037
Goat Alexa594 anti-rat IgG(H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11007
Goat Alexa594 anti-guinea pig IgG(H+L)	Thermo Fisher Scientific	Cat#A-11076
Goat STAR580 anti-mouse IgG	Abberior	Cat#2-0002-005-1
Goat STAR635P anti-rat IgG	Abberior	Cat#2-0132-007-5
Goat STAR RED anti-rabbit IgG	Abberior	Cat#2-0012-011-9

・その他の色素等

NAME	SOURCE	IDENTIFIER
Phalloidin Alexa594	Thermo Fisher Scientific	Cat#A12381; RRID: AB_2315633
Phalloidin Alexa647	Thermo Fisher Scientific	Cat#A22287; RRID: AB_2620155
CF@405M Phalloidin	Biotium	Cat#00034; RRID: N/A
Hoechst33258	Thermo Fisher Scientific	Cat#H3569; RRID: AB_2651133

3. 封入・観察

スライドグラスにパンチラベル(ニチバン ML-250)を3枚貼り(厚さ各 70 μ m)、パンチラベルの穴の中を封入剤(共焦点顕微鏡 : Fluoromount-G, Southern Biotech0100-01、超解像顕微鏡 : ProLong Diamond, Thermo FisherP36961)で満たした。そこに試料を入れ、観察面をカバーグラス(共焦点顕微鏡 : マツナミ C022321、超解像顕微鏡 : マツナミ No.1S)側に向けて封入した。

ProLong Diamond を使用した場合は、遮光の箱に入れ 4 $^{\circ}$ C24 時間で硬化した(*推

獎は室温 24 時間だが、退色したため 4°C)。共焦点顕微鏡観察は、Nikon A1、を用いて行った。超解像顕微鏡観察は、Leica TCS SP8 STED(Leica)を用いて行った。下記の表に撮影条件を記した。

	1st antibody	2nd antibody	Excitation	Laser power	Emission	STED	STED laser power	Gate	
1	Centriolin	STAR580	580nm	10%	590-620nm	775nm	100%	/	STAR635P → STAR580 (Between frames)
	Odf2	STAR635P	635nm	10%	655-750nm	775nm	100%		
2	Centriolin	Alexa488	499nm	10%	504-593nm	OFF	0%	/	Alexa594 → Alexa488 (Between frames)
	CAMSAP3	Alexa594	594nm	10%	603-750nm	660nm	20%		
3	CAMSAP3	Alexa594	585nm	10%	590-620nm	775nm	20%	/	STAR635P → Alexa594 (Between frames)
	Odf2	STAR635P	635nm	10%	655-750nm	775nm	100%		

4. 定量

- ・タンパク質の局在定量

PCP 因子の局在の定量: 本研究室の先行研究でも使用されている“nematic order”(Shi *et al.*, 2014; Aigouy *et al.*, 2010)を使用した。0.2 μ m step で撮影した共焦点顕微鏡画像 5 枚(1 μ m 厚)から作成した MIP 画像を用いた。Phalloidin シグナルから細胞境界をトレースし、ROI を作成した(支援員の樋口陽子さん)。この ROI を用い、nematic order(ROI 上でシグナルの輝度が高い方向)を測定した。

微小管の濃縮方向の定量: 微小管のシグナルが Phalloidin で染色される細胞境界の内側でみられるので、既に報告されている細胞境界上でのタンパク質の定量法“nematic order”を改良した。Phalloidin シグナルから細胞境界をトレースし、ROI を作成した(支援員の樋口陽子さんに 3 分の 2 程度手伝っていただいた)。ImageJ の erode 処理を利用して作成した ROI を 5pixel 細胞の重心に寄せた。この ROI を用い、nematic order(ROI 上でシグナルの輝度が高い方向)を測定した。“nematic order”は、1 つの軸と極性の強さを定義するものであるため、ROI を画像に直交する線によって二等分し、微小管の輝度を比較することで、微小管の極性を示すベクトルを決定した。軸糸を含まないアピカル面から 0.2 μ m step で撮影した共焦点顕微鏡画像

20 枚から作成した MIP 画像を用いた。

***注意点:** PCP 因子の局在の定量においても、微小管の濃縮方向の定量においても、細胞の傾きが定量結果に影響する可能性があるため、細胞境界の強い Phalloidin シグナルが 0.2 μm step で撮影した画像 5 枚に収まる細胞を解析対象とした。

・ 絨毛の極性

絨毛の極性は、TCS SP8 STED (Leica) で撮影した超解像顕微鏡画像の Odf2、Centriolin シグナルから判定した。全ての写真は、0.1 μm step で撮影し、撮影時のわずかなズレを補正するため、Fiji のマクロ“correct 3D drift”で処理した。まず、比較的大きい観察対象である Odf2 画像のズレ補正を行い、その際に取得した Log を用いて、Centriolin 画像のズレを補正した。これにより、2 種類の画像は完全に同じようにズレが補正された。全く同じ枚数のそれぞれの画像から MIP 画像を作成した。各画像の輝度を調整し、merge 画像を作成した。絨毛の判別、角度判定には単色の MIP 画像と merge した MIP 画像の 3 つをパワーポイントに貼り付け、比較しながら解析を行った。絨毛の角度を Fiji の shape descriptor Map(BioVoxel_Toolbox)で算出させるため、パワーポイントで円と円の重心を通る矢印を重ね合わせたオブジェクトを作成した。このオブジェクトを Odf2 の単色画像のリング構造に重ね、Centriolin の MIP 画像と Merge 画像と比較し、オブジェクトの矢印の先端が Centriolin シグナルの中央に重なるよう角度の調整を行った。このパワーポイント上のスライドを白黒の PDF へと変換し、高解像度の TIF 画像とするためイラストレーターで TIF 画像への変換を行った(500ppx)。この TIF 画像を二値化し、Fiji の shape descriptor Map をかけて、各オブジェクトの角度を算出した。算出された角度が 180 度周期であるため、TIF 画像と比較し、手動でオブジェクトの角度を 360 度周期に補正した。得られた絨毛の角度情報をもとに、各細胞の絨毛の向きのばらつき“circular variance”を、R を用いて算出した。“circular variance”については先行研究で報告されているものを利用した(Shi *et al.*, 2014 and Zar, 2010)。

5. 電子顕微鏡観察

卵管の漏斗から 2 ループ目までを 0.1M リン酸緩衝液(pH=7.4)中で切り出し、管状のまま固定液(2%グルタルアルデヒド(和光 072-02262)、2%PFA(ナカライ 26126-25)を含む 0.1M リン酸緩衝液)に入れ、4°C over night で固定した。さらに、2%オスミウムを含む 0.1M リン酸緩衝液に置換し、4°C 2 時間で後固定を行った。段階的なエタノール・プロピレンオキサイト(QY-1)での処理により試料を脱水し、段階的な酸化プロピレンオキサイト/エポキシ樹脂混合液、エポキシ樹脂処理により置換した。エポキシ樹脂を入れたビームカプセルに包埋し、37°C 12 時間、45°C 24 時間、60°C 24 時間で段階的に重合化させた。ウルトラマイクロトーム(Leica EM UC7)を用いて超薄切片(50-70nm)を作成し、グリッド (応研商事 150-D、75-A メッシュ)に貼り付けて回収した。風乾後、2%酢酸ウラニルで 15 分間、クエン酸鉛染色液で 5 分間染色し、50%エタノール、純水で洗浄した。風乾後、透過型電子顕微鏡(JEOLJEM1010)を用いて観察、2kx2k CCD カメラ(Olympus Soft Imaging Solutions)した。2%酢酸ウラニル、クエン酸鉛染色液は自然科学研究機構 生理学研究所 電子顕微鏡室の山田元さんによって作成された。

6. タイムラプス観察 (多繊毛細胞の成熟過程)

P13 の *GFP-Centrin2^{tg}*-マウスマウスの卵管を卵管の長軸に沿って開き、ガラスボトムディッシュ(MatTek P35G-1.5-10-C)の中央に作成した Dulbecco's modified eagle's medium high glucose (Gibco#31053)+10% FBS のドロップ内に入れた。内腔上皮がガラス面を向くように調節し、蒸発を防ぐため、ドロップを流動パラフィン(128-04375, Wako)で覆った。Spinning disc confocal system (Cell voyager CV1000;

Yokogawa)にディッシュをセットし、37°C 5% CO₂で培養し、1時間おきに撮影した。

〈謝辞〉

本研究は、基礎生物学研究所 初期発生研究部門において、藤森俊彦教授の下、約7年にわたって行われました。非常に長い期間でしたが、一瞬で終わったように感じる7年でもありました。長きに渡り、ご指導いただいた藤森先生には心から感謝いたします。特に、何事にも疑問をもち、明らかにしようという姿勢を教えていただいたように思います。まだ投稿論文としての準備ができていない、「卵管上皮の平面内細胞極性制御機構における *Celsr1*、*Vangl1*、*Vangl2* の役割の違い」、「ニワトリ卵管における平面内細胞極性」についても、取得済みのデータをまとめ論文投稿を目指します。藤森研では非常にたくさんの方をさせていただきました。助教である小山宏史博士、野々村恵子博士にも心から感謝いたします。小山博士からは論理的な思考、野々村博士からは常に論文を出すことを考えて研究を進めていく姿勢を学ばせていただきました。どちらも私が最も苦手とするところで、今後もお二人にいただいた助言を反復し、身に着けたいと思っています。研究員の石東博博士、新田昌輝博士は、出来が悪い私を丁寧に、時間をかけて指導してくださり、本当に感謝しております。また、研究員の岸香苗博士、技術支援員の岡早苗さん、加藤あづささん、樋口陽子さん、中川真美さん、蟹江朱美さんには、実験だけでなく、精神的に支えていただきました。本当に、ありがとうございました。私が一番ダークな時期にラボに来られた学生の勝田紘基さん、櫻井隼くん、片桐沙紀さん、御子柴誠也くんからも元気を分けていただいたり、たくさんの方を学ばせていただいたりしました。ありがとうございました。

本研究を進めるにあたり、多くの方より貴重な材料を分与・提供していただきました。竹市 雅俊博士、竹市研究室の斉藤 弘子様(*Camsap3^{dc/dc}* マウス)、Holden Higginbotham 博士、濱田博司博士(*GFP-Centrin2* マウス)、月田早智子博士((抗 Centriolin 抗体、抗 *Odf2* 抗体とハイブリドーマ)、伊藤雅彦博士、古瀬 幹夫博士(抗 *ZO1* 抗体)、佐藤良勝博士、東山哲也博士(*ABiS*、*STED* の技術指導)、山田元さ

ん(生理学研究所電顕室、実験指導)、ディスカッション等してくださった大谷哲久博士、加藤輝博士、木森義隆博士、生命科学プログラムの担当教員であった高田慎治先生、青木一洋先生、鈴木誠先生、四宮愛先生、そして超解像顕微鏡を使わせてくださった ExCELLS、ニコン A1 を使わせてくださった光学解析室の皆さまにも感謝申し上げます。

この数年、きつい日々が続きましたが、鼓舞激励し続けてくださった山本真理子さん、戸田拓弥さん、篠塚琢磨さん、大橋りえさん本当にありがとうございました。

最後に、常に応援し続け、支え続けてくれていた家族(宇佐美家)と7年も岡山で待ち続けてくれた夫 松川直人さんと松川家の皆さまには、感謝してもきれません。本当にありがとうございました。

たくさんの方々に支えていただいたことを胸に、今後も研究の世界で活躍できるよう努力いたします。

〈参考文献〉

- R G Anderson, R M Brenner (1971) The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct. *Journal of Cell Biology*. DOI: 10.1083/jcb.50.1.10
- Agduhr, E. (1927). Studies on the structure and development of the Bursa ovarica and the Tuba uterina in the mouse. *Acta Zoologica*. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1927.tb00649.x>
- Al Jord, A., Lemaître, A. I., Delgehyr, N., Faucourt, M., Spassky, N., & Meunier, A. (2014). Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature*, *516*(7529), 104–107. <https://doi.org/10.1038/nature13770>
- Antoniades, I., Stylianou, P., & Skourides, P. A. (2014). Making the Connection: Ciliary Adhesion Complexes Anchor Basal Bodies to the Actin Cytoskeleton. *Developmental Cell*, *28*(1), 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.003>
- Arata, M., Sugimura, K., & Uemura, T. (2017). Difference in Dachous Levels between Migrating Cells Coordinates the Direction of Collective Cell Migration. *Developmental Cell*, *42*(5), 479-497.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.001>
- Baines, A. J., Bignone, P. A., King, M. D. A., Maggs, A. M., Bennett, P. M., Pinder, J. C., & Phillips, G. W. (2009). The CKK domain (DUF1781) binds microtubules and defines the CAMSAP/ssp4 family of animal proteins. *Molecular Biology and Evolution*, *26*(9), 2005–2014. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp115>
- Bayless, B. A., Navarro, F. M., & Winey, M. (2019). Motile Cilia: Innovation and Insight From Ciliate Model Organisms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00265>
- Boutin, C., Labedan, P., Dimidschstein, J., Richard, F., Cremer, H., Andre, P., ... Tissir, F. (2014). A dual role for planar cell polarity genes in ciliated cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(30), E3129–E3138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404988111>
- Boutin, Camille, & Kodjabachian, L. (2019). Biology of multiciliated cells. *Current Opinion in Genetics and Development*, *56*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2019.04.006>

- Brooks, E. R., & Wallingford, J. B. (2014). Multiciliated Cells: a review. *Curr Biol.*, 24(19), 973–982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.047>.Multiciliated
- Burke, M. C., Li, F. Q., Cyge, B., Arashiro, T., Brechbuhl, H. M., Chen, X., ... Takemaru, K. I. (2014). Chibby promotes ciliary vesicle formation and basal body docking during airway cell differentiation. *Journal of Cell Biology*, 207(1), 123–137. <https://doi.org/10.1083/jcb.201406140>
- Butler, M. T., & Wallingford, J. B. (2017). Planar cell polarity in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(6), 375–388. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.11>
- Chevalier, B., Adamiok, A., Mercey, O., Revinski, D. R., Zaragosi, L. E., Pasini, A., ... Marcet, B. (2015). MiR-34/449 control apical actin network formation during multiciliogenesis through small GTPase pathways. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9386>
- Choksi, S. P., Lauter, G., Swoboda, P., & Roy, S. (2014). Switching on cilia: Transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development (Cambridge)*, 141(7), 1427–1441. <https://doi.org/10.1242/dev.074666>
- Chong, W. M., Wang, W. J., Lo, C. H., Chiu, T. Y., Chang, T. J., Liu, Y. P., ... Liao, J. C. (2020). Super-resolution microscopy reveals coupling between mammalian centriole subdistal appendages and distal appendages. *ELife*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.7554/eLife.53580>
- Clare, D. K., Magescas, J., Piolot, T., Dumoux, M., Vesque, C., Pichard, E., ... Delacour, D. (2014). Basal foot MTOC organizes pillar MTs required for coordination of beating cilia. *Nature Communications*, 5, 4888. <https://doi.org/10.1038/ncomms5888>
- Devenport, D. (2014). The cell biology of planar cell polarity. *Journal of Cell Biology*, 207(2), 171–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408039>
- Dong, C., Xu, H., Zhang, R., Tanaka, N., Takeichi, M., & Meng, W. (2017). CAMSAP3 accumulates in the pericentrosomal area and accompanies microtubule release from the centrosome via katanin. *Journal of Cell Science*, 130(10), 1709–1715. <https://doi.org/10.1242/jcs.198010>

- Garcia, G., & Reiter, J. F. (2016). A primer on the mouse basal body. *Cilia*, 5(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s13630-016-0038-0>
- Guirao, B., Meunier, A., Mortaud, S., Aguilar, A., Corsi, J. M., Strehl, L., ... Spassky, N. (2010). Coupling between hydrodynamic forces and planar cell polarity orients mammalian motile cilia. *Nature Cell Biology*, 12(4), 341–350.
<https://doi.org/10.1038/ncb2040>
- Hagiwara, H., Kano, A., Aoki, T., Ohwada, N., & Takata, K. (2000). Localization of γ -tubulin to the basal foot associated with the basal body extending a cilium. *Histochemical Journal*, 32(11), 669–671. <https://doi.org/10.1023/A:1004163315822>
- Herawati, E., Taniguchi, D., Kanoh, H., Tateishi, K., Ishihara, S., & Tsukita, S. (2016). Multiciliated cell basal bodies align in stereotypical patterns coordinated by the apical cytoskeleton. *Journal of Cell Biology*, 214(5), 571–586.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201601023>
- Higginbotham, H., Bielas, S., Tanaka, T., & Gleeson, J. G. (2004). Transgenic mouse line with green-fluorescent protein-labeled Centrin 2 allows visualization of the centrosome in living cells. *Transgenic Research*, 13(2), 155–164.
<https://doi.org/10.1023/B:TRAG.0000026071.41735.8e>
- Hirota, Y., Meunier, A., Huang, S., Shimozawa, T., Yamada, O., Kida, Y. S., ... Sawamoto, K. (2010). Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. *Development*, 137(18), 3037–3046. <https://doi.org/10.1242/dev.050120>
- Iftode, F., & Fleury-Aubusson, A. (2003). Structural inheritance in Paramecium: Ultrastructural evidence for basal body and associated rootlets polarity transmission through binary fission. *Biology of the Cell*, 95(1), 39–51.
[https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00005-4](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00005-4)
- Ishikawa, H., Kubo, A., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2005). Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia. *Nature Cell Biology*, 7(5), 517–524. <https://doi.org/10.1038/ncb1251>
- Itoh, M., Yonemura, S., Nagafuchi, A., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1991). A 220-kD

- undercoat-constitutive protein: Its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *Journal of Cell Biology*, 115(5), 1449–1462.
<https://doi.org/10.1083/jcb.115.5.1449>
- Jiang, K., Hua, S., Mohan, R., Grigoriev, I., Yau, K. W., Liu, Q., ... Akhmanova, A. (2014). Microtubule Minus-End Stabilization by Polymerization-Driven CAMSAP Deposition. *Developmental Cell*, 28(3), 295–309.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.001>
- Jord, A. Al, Shihavuddin, A., Servignat, R., Faucourt, M., Genovesio, A., Karaïskou, A., ... Meunier, A. (2017). Calibrated mitotic oscillator drives motile ciliogenesis, (November), 1–5.
- Kessler, M., Hoffmann, K., Brinkmann, V., Thieck, O., Jackisch, S., Toelle, B., ... Meyer, T. F. (2015). The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nature Communications*, 6(May), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9989>
- Klotz, C., Bordes, N., Laine, M. C., Sandoz, D., & Bornens, M. (1986). A protein of 175,000 daltons associated with striated rootlets in ciliated epithelia, as revealed by a monoclonal antibody. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 6(1), 56–67.
<https://doi.org/10.1002/cm.970060108>
- Kunimoto, K., Yamazaki, Y., Nishida, T., Shinohara, K., Ishikawa, H., Hasegawa, T., ... Tsukita, S. (2012). Coordinated ciliary beating requires Odf2-mediated polarization of basal bodies via basal feet. *Cell*, 148(1–2), 189–200.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.052>
- Lemullois, M., & Marty, M. C. (1990). Immunocytochemical study of the formation of striated rootlets during ciliogenesis in quail oviduct. *Journal of Cell Science*, 95 (Pt 3)(1986), 423–432. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2384522>
- Li, S., & Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Journal of Endocrinology*, 232(1), R1–R26.
<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0302>
- Liu, Z., Nguyen, Q. P. H., Nanjundappa, R., Delgehyr, N., Megherbi, A., Doherty, R., ...

- Mennella, V. (2020). Super-Resolution Microscopy and FIB-SEM Imaging Reveal Parental Centriole-Derived, Hybrid Cilium in Mammalian Multiciliated Cells. *Developmental Cell*, 55(2), 224–236.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.09.016>
- Mazo, G., Soplop, N., Wang, W. J., Uryu, K., & Tsou, M. F. B. (2016). Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia. *Developmental Cell*, 39(4), 424–437. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.006>
- Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., & Takeichi, M. (2008). Anchorage of Microtubule Minus Ends to Adherens Junctions Regulates Epithelial Cell-Cell Contacts. *Cell*, 135(5), 948–959. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.040>
- Meunier, A., & Azimzadeh, J. (2016). Multiciliated cells in animals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(12), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028233>
- Mirzadeh, Z., Doetsch, F., Sawamoto, K., Wichterle, H., & Alvarez-Buylla, A. (2010). The Subventricular Zone En-face: Wholemount Staining and Ependymal Flow. *Journal of Visualized Experiments*, (39), 1–8. <https://doi.org/10.3791/1938>
- Mitchell, B., Stubbs, J. L., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C., & Kintner, C. (2009). The PCP Pathway Instructs the Planar Orientation of Ciliated Cells in the *Xenopus* Larval Skin. *Current Biology*, 19(11), 924–929. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.04.018>
- Nanjundappa, R., Kong, D., Shim, K., Stearns, T., Brody, S. L., Loncarek, J., & Mahjoub, M. R. (2018). Regulation of Cilia Abundance in Multiciliated Cells. *BioRxiv*, 1–23. <https://doi.org/10.1101/478297>
- Noordstra, I., Liu, Q., Nijenhuis, W., Hua, S., Jiang, K., Baars, M., ... Akhmanova, A. (2016). Control of apico-basal epithelial polarity by the microtubule minus-end-binding protein CAMSAP3 and spectraplakins ACF7. *Journal of Cell Science*, 129(22), 4278–4288. <https://doi.org/10.1242/jcs.194878>
- Ohata, S., Nakatani, J., Herranz-Pérez, V., Cheng, J. G., Belinson, H., Inubushi, T., ... Álvarez-Buylla, A. (2014). Loss of Dishevelleds Disrupts Planar Polarity in Ependymal Motile Cilia and Results in Hydrocephalus. *Neuron*, 83(3), 558–571. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.022>

- Paik, D. Y., Janzen, D. M., Schafenacker, A. M., Velasco, V. S., Shung, M. S., Cheng, D., ... Memarzadeh, S. (2012). Stem-like epithelial cells are concentrated in the distal end of the fallopian tube: A site for injury and serous cancer initiation. *Stem Cells*, *30*(11), 2487–2497. <https://doi.org/10.1002/stem.1207>
- Park, T. J., Mitchell, B. J., Abitua, P. B., Kintner, C., & Wallingford, J. B. (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nature Genetics*, *40*(7), 871–879. <https://doi.org/10.1038/ng.104>
- Reed, W., Avolio, J., & Satir, P. (1984). The cytoskeleton of the apical border of the lateral cells of freshwater mussel gill: structural integration of microtubule and actin filament-based organelles. *Journal of Cell Science*, *68*, 1–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6541655>
- Reiter, J. F., Blacque, O. E., & Leroux, M. R. (2012). The base of the cilium: Roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Reports*, *13*(7), 608–618. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.73>
- Reiter, J. F., & Leroux, M. R. (2017). Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(9), 533–547. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60>
- Robinson, A. M., Takahashi, S., Brotslaw, E. J., Ahmad, A., Ferrer, E., Procissi, D., ... Zheng, J. (2020). CAMSAP3 facilitates basal body polarity and the formation of the central pair of microtubules in motile cilia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(24), 13571–13579. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907335117>
- Sandoz, D., Chailley, B., Boisvieux-Ulrich, E., Lemullois, M., Laine, M. C., & Bautista-Harris, G. (1988). Organization and functions of cytoskeleton in metazoan ciliated cells. *Biology of the Cell*, *63*(2), 183–193. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(88\)90057-3](https://doi.org/10.1016/0248-4900(88)90057-3)
- Satir, P., & Christensen, S. T. (2008). Structure and function of mammalian cilia. *Histochemistry and Cell Biology*, *129*(6), 687–693. <https://doi.org/10.1007/s00418->

008-0416-9

- September, P. (1974). Ciliogenesis in the mouse oviduct, *62*, 899–904.
- Shi, D., Komatsu, K., Hirao, M., Toyooka, Y., Koyama, H., Tissir, F., ... Fujimori, T. (2014). Celsr1 is required for the generation of polarity at multiple levels of the mouse oviduct. *Development*, *141*(23), 4558–4568. <https://doi.org/10.1242/dev.115659>
- Shi, Dongbo, Komatsu, K., Uemura, T., & Fujimori, T. (2011). Analysis of ciliary beat frequency and ovum transport ability in the mouse oviduct. *Genes to Cells*, *16*(3), 282–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01484.x>
- Shi, Dongbo, Usami, F., Komatsu, K., Oka, S., Abe, T., Uemura, T., & Fujimori, T. (2016). Dynamics of planar cell polarity protein Vangl2 in the mouse oviduct epithelium. *Mechanisms of Development*, *141*, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2016.05.002>
- Silva, V. C., & Cassimeris, L. (2014). CAMSAPs Add to the Growing Microtubule Minus-End Story. *Developmental Cell*, *28*(3), 221–222. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.025>
- Snegovskikh, V., Mutlu, L., Massasa, E., & Taylor, H. S. (2014). Identification of putative fallopian tube stem cells. *Reproductive Sciences*, *21*(12), 1460–1464. <https://doi.org/10.1177/1933719114553448>
- Soh, A. W. J., van Dam, T. J. P., Stemm-Wolf, A. J., Pham, A. T., Morgan, G. P., O'Toole, E. T., & Pearson, C. G. (2020). Ciliary force-responsive striated fibers promote basal body connections and cortical interactions. *The Journal of Cell Biology*, *219*(1). <https://doi.org/10.1083/jcb.201904091>
- Spassky, N., & Meunier, A. (2017). The development and functions of multiciliated epithelia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(7), 423–436. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.21>
- Takagishi, M., Sawada, M., Ohata, S., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, K., ... Takahashi, M. (2017). Daple Coordinates Planar Polarized Microtubule Dynamics in Ependymal Cells and Contributes to Hydrocephalus. *Cell Reports*, *20*(4), 960–972. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.089>
- Takahashi, S., Mui, V. J., Rosenberg, S. K., Homma, K., Cheatham, M. A., & Zheng, J.

- (2016). Cadherin 23-C Regulates Microtubule Networks by Modifying CAMSAP3's Function. *Scientific Reports*, 6(March), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep28706>
- Tanaka, N., Meng, W., Nagae, S., & Takeichi, M. (2012). Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(49), 20029–20034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218017109>
- Tanaka, Nobutoshi, Meng, W., Nagae, S., & Takeichi, M. (2012). Nezha/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of noncentrosomal microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), 20029–20034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218017109>
- Tateishi, K., Nishida, T., Inoue, K., & Tsukita, S. (2017). Three-dimensional Organization of Layered Apical Cytoskeletal Networks Associated with Mouse Airway Tissue Development. *Scientific Reports*, 7(January), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep43783>
- Tateishi, K., Yamazaki, Y., Nishida, T., Watanabe, S., Kunimoto, K., Ishikawa, H., & Tsukita, S. (2013). Two appendages homologous between basal bodies and centrioles are formed using distinct Odf2 domains. *Journal of Cell Biology*, 203(3), 417–425. <https://doi.org/10.1083/jcb.201303071>
- Tissir, F., Qu, Y., Montcouquiol, M., Zhou, L., Komatsu, K., Shi, D., ... Goffinet, A. M. (2010). Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nature Neuroscience*, 13(6), 700–707. <https://doi.org/10.1038/nn.2555>
- Toya, M., Kobayashi, S., Kawasaki, M., Shioi, G., Kaneko, M., Ishiuchi, T., ... Takeichi, M. (2016). CAMSAP3 orients the apical-to-basal polarity of microtubule arrays in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(2), 332–337. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520638113>
- Vladar, E. K., Bayly, R. D., Sangoram, A. M., Scott, M. P., & Axelrod, J. D. (2012). Microtubules enable the planar cell polarity of airway cilia. *Current Biology*, 22(23), 2203–2212. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.046>
- Vu, H. T. K., Mansour, S., Kücken, M., Blasse, C., Basquin, C., Azimzadeh, J., ... Rink, J.

- C. (2019). Dynamic Polarization of the Multiciliated Planarian Epidermis between Body Plan Landmarks. *Developmental Cell*, 51(4), 526-542.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.022>
- Werner, M. E., Hwang, P., Huisman, F., Taborek, P., Yu, C. C., & Mitchell, B. J. (2011). Actin and microtubules drive differential aspects of planar cell polarity in multiciliated cells. *Journal of Cell Biology*, 195(1), 19–26. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106110>
- Yamanouchi, H., Umezu, T., & Tomooka, Y. (2010). Reconstruction of Oviduct and Demonstration of Epithelial Fate Determination in Mice¹. *Biology of Reproduction*, 82(3), 528–533. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078329>
- Yang, J., Liu, X., Yue, G., Adamian, M., Bulgakov, O., & Li, T. (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *Journal of Cell Biology*, 159(3), 431–440. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207153>
- Yang, Y., & Mlodzik, M. (2015). Wnt-Frizzled/Planar Cell Polarity Signaling: Cellular Orientation by Facing the Wind (Wnt). *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 31, 623–646. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125315>
- Yin, Y., & Ma, L. (2005). Development of the mammalian female reproductive tract. *Journal of Biochemistry*, 137(6), 677–683. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi087>
- Zhao, H., Zhu, L., Zhu, Y., Cao, J., Li, S., Huang, Q., ... Zhu, X. (2013). The cep63 paralogue deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. *Nature Cell Biology*, 15(12), 1434–1444.
<https://doi.org/10.1038/ncb2880>