



Title	Progressive alignment of basal bodies in multiciliated cell : Dynamic motion of basal bodies revealed by long-term live imaging
Author(s)	Herawati, Elisa
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/61872">https://doi.org/10.18910/61872</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## Abstract of Thesis

Name: Elisa Herawati

## Title

Progressive alignment of basal bodies in multiciliated cell: Dynamic motion of basal bodies revealed by long-term live imaging

(多繊毛細胞における繊毛基底小体の配列形成：長時間ライブイメージングによるダイナミクス解析)

**Introduction**

Multiciliated cells (MCCs) are uniquely polarized to drive fluid transport in tissues by the synchronous beating and metachronal waves of hundreds of motile cilia on the apical membrane. A differentiating MCC contains hundreds of basal bodies (BBs), which are short cylindrical structures at the base of mature cilia, and are docked at the apical membrane. In most types of MCCs, the orientation of the BBs, identified by their asymmetrically associated basal feet (BFs), is precisely coordinated to support efficient mucociliary transport.

The positional distribution of BBs (BB array) in the apical plane of MCCs depends on the cell type. For example, the BBs of ependymal MCCs in the brain exhibit unipolar clustering in the apical plane while those of *Xenopus* larval skin MCCs are evenly distributed throughout the entire apical region. Cytoskeletons are involved in regulating these systems, in which microtubules (MTs) are thought to synchronize BB orientation downstream of the planar cell polarity (PCP) core-protein functions. Sub-apical actin is required for the proper distance between neighboring BBs, and myosin II activity plays a role in the unipolar migration of BB clusters. However, the mechanisms involved in correctly assembling and maintaining the proper distribution of BBs on the cell surface remain to be fully elucidated.

**Objective**

How multiciliated basal bodies are highly polarized after docking to the apical membrane needs further clarification. Especially, the spatiotemporal information on the cellular process remains largely unknown. In the present study, mouse tracheal MCCs was examined in which the BBs are linearly aligned, a pattern also found in oviduct MCCs. This striking pattern prompted me to address the mechanism by which these BBs become regularly aligned in the apical membrane. By employing a newly developed long-term live imaging method, this study focuses on the cellular process how basal bodies of multiciliated cell achieve their alignment pattern. This study is also aimed at elucidating the underlying mechanism of basal body alignment.

**Results**

The dynamics, sequential changes in ciliary patterns that occurred during the maturation of mouse tracheal MCCs were quantified in this study. The process occurred through four stereotypical changes in the BB array. These changes in BB patterns were positively correlated with the refinement of ciliary orientation, indicating that ciliary alignment may have stabilized the unidirectionality of the BBs, to enhance the function of MCCs. Furthermore, this study demonstrated that the genetic loss of BFs in *Odf2*<sup>ΔEx6,7ΔEx6,7</sup> MTECs prevented BBs from achieving the “Alignment” pattern, and drug-induced apical MT disruption caused the “Alignment” pattern to change to a “Floret-like” pattern, suggesting that a self-organization mechanism involving the associated apical cytoskeleton could give rise to these patterns.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( ELISA HERAWATI )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教 授
	副 査	教 授
	副 査	教 授

## 論文審査の結果の要旨

上皮細胞シートは、生体器官により特異的な生体システムを構築する。気管においては、呼吸とともに気道に取り込まれた異物を口腔へと運搬する粘液の流れがあることが知られているが、このような粘液の流れは、気管や気管支の多繊毛上皮細胞 (Multi ciliated cells: MCCs) によってつくられる。この細胞では、繊毛の根元のBasal body(BB)が、細胞膜直下の細胞質領域 (アピカル領域) に配置することにより、繊毛は気管上皮細胞アピカル表面に配置する。整然と配置された数百本の繊毛の協調運動は、BBの規則正しい配列による。Herawati氏は、BBの配列機構を明らかにする目的で、GFP標識セントリン2のトランスジェニックマウス由来のMCCsより、従来の初代培養系を活用して、BB配列の規則性の高い気管MCCsの培養方法を樹立した。スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いたイメージングシステムを適応し発展させることで、長期間の高解像度ライブイメージングを成功させた。その結果、MCCs分化の初期にアピカル細胞膜上で不規則な “floret” 様の配列を示したBB配列が、“scatter” “partial alignment” “alignment” の配列変化により、最終的には直線状に規則的な配列に変化することを見出した。さらに、BBから一方向に突出する構造であるBasal foot (BF)を同時に可視化することで、BBの規則的配列が、繊毛間で協調したBFの方向性の確立と相関することを見出した。こうした規則正しいBB配列は、nocodazoleによる微小管脱重合や、Odf2の遺伝子変異導入によるBFの欠損により、障害されることも見出した。これらの結果に基づいて、アピカル細胞骨格が粘弾性液のように働く結果、BBが自己組織化して適切に並ぶ機構を示唆する数理モデルについて、数理生物学者との共同研究で示し、アピカル細胞骨格がBBsの配列を決定する重要な因子であることを示した。

これまでのシンプルなモデル生物解析に比べ、多細胞生物の発生について、精微なライブイメージングを開発し、数理モデルをも創成した本研究は、気管MCCsの分化について新しい視点を開拓した点でも評価される。博士の学位授与に相応しい内容と判断される。