OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Planar cell polarity induces local microtubule bundling for coordinated ciliary beating
Author(s)	中山, 彰吾
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85257
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	中山　彰吾
論文題名 Title	Planar cell polarity induces local microtubule bundling for coordinated ciliary beating （平面内細胞極性は局所的な微小管束化形成を介して多繊毛同調運動を制御する）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

生体の上皮組織は体表面、または体内の器官内表面を覆い、生体内と外界とを隔てている。上皮組織を構成する上皮細胞は外界の環境に応じて高度に分化する。これら高度に分化した上皮細胞の中に、多繊毛上皮細胞がある。多繊毛上皮細胞は、平面内細胞極性(PCP)を介して繊毛の配向と配置を揃えることで、多数の繊毛を同調させ、外部から侵入した感染源を生体外に排除するための気管粘液流の産生、卵子および受精卵の卵管内輸送、脳脊髄液の循環などを構築して、生体恒常性維持に重要な役割を果たす。これらのように運動性繊毛の生理学的意義に関する研究は盛んに行われてきたが、多数の繊毛が細胞内・細胞間で協調性を獲得するための分子メカニズムには不明の点が多い。

繊毛の根元には基底小体(Basal Body : BB)とBasal Foot(BF)という構造体が存在する。BFは繊毛運動の方向性の決定に関わっており、BBに対するBFの位置が肺側から口腔側へと一様に揃うことで多繊毛同調運動が生じる。気管多繊毛上皮細胞において非常に発達したアピカル細胞骨格が存在し、それらがBBやBFの空間配置の決定において重要な役割を担うことが明らかにされてきた。アピカル細胞骨格のうちのひとつであるアピカル微小管は、気管多繊毛上皮細胞において、平面内の片側に沿って微小管の密度が高くなることが知られており、この微小管の配向にはPCPが関与していると考えられている。しかしながら、このようなアピカル微小管ネットワークの形成メカニズムやその役割についてはいまだに明らかにされていない。近年、新規のPCP関連因子としてDapleが見出され、内耳有毛細胞や脳室上衣細胞において、PCPシグナルの下流で重要な働きを持つことが明らかとなった。そこで、PCPを介した気管多繊毛上皮細胞における微小管制御メカニズムを明らかにすることを目的とし、気管上皮細胞におけるDapleの解析を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

まず免疫蛍光染色により、Dapleは気管上皮細胞における口腔側の細胞膜に局在することが示された。そこで、Daple欠失マウスの気管多繊毛上皮細胞におけるBBの方向性を検討したところ、野生型と比較して、有意にBBの方向性に乱れが生じていた。次に蛍光ビーズを用いて、気管組織における粘液流を検討したところ、Daple欠失マウスにおいて気管粘液流の乱れが確認された。以上の結果から、Dapleは多数の繊毛を同様の方向にそろえることにより、気管粘液流を調節していることが示唆された。Daple欠失マウスにおけるアピカル微小管ネットワークを検討したところ、野生型マウスの気管多繊毛上皮細胞においてみられる微小管の片側への蓄積が消失していた。次に気管多繊毛上皮細胞における微小管先端結合タンパク質EB1のライブイメージング を行った。その結果、EB1が口腔側の細胞膜に沿って動く現象が観察された。そこで、Dapleが微小管と結合することで、口腔側へと微小管を留める可能性を考え、Dapleと微小管の相互作用解析を行った。Dapleを過剰発現したHEK293細胞によるα-tubulinの免疫沈降や精製Dapleタンパク質を用いた微小管共沈実験により、Dapleは微小管に直接結合することが示唆された。Dapleの微小管との結合は微小管の蓄積を引き起こすのに十分かどうかを検討するために、DapleKOの気管多繊毛上皮細胞へDaple全長とDaple C末を発現させたところ、Daple全長は微小管の蓄積を示すのに対し、Daple C末では微小管の蓄積が起こらなかった。そこで、全反射照明蛍光顕微鏡を用いて微小管の束化解析を行ったところ、DapleはN末を介して二量体化を形成し、微小管を束化させることを明らかにした。以上の結果から、Dapleは微小管を束化させ、細胞膜の片側へと蓄積させる機能を有することが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

今回、PCPを介した微小管骨格の制御メカニズムを明らかにした。近年、PCPと関連した微小管骨格は細胞内構造体の制御のみならず、細胞形態にも大きく影響を及ぼすことが知られている。そのため、この研究成果は、PCPがどのようなメカニズムを介して複雑な組織構築を可能にしているかについての理解を深めると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）	中山彰吾			
論文審査担当者		（職）	氏　名	
	主　査	大阪大学教授	岡村康司	署名
	副　査	大阪大学教授	原田彰宏	署名
	副　査	大阪大学教授	菊池章	署名

論文審査の結果の要旨

上皮の恒常性維持・生体防御機能のひとつとして、気管においてウイルスなど異物を効率よく排除するための気管上皮表層の粘液流が重要である。気管の肺側から口側へ向かう粘液流には、多繊毛上皮細胞アピカル面に存在する多数の繊毛が、上皮細胞内・細胞間で方向性の揃った協調運動を獲得し、維持することが必須である。しかしながら、そのような多繊毛同調運動を構築するメカニズムには不明の点が多い。本研究では、平面内細胞極性(Planar cell polarity: PCP) 関連蛋白質 Dapleの多繊毛同調運動構築における役割が明らかにされた。

第一に、Daple ノックアウト(KO)マウスにおいて、気管多繊毛同調運動が大幅に乱れていることが見出された。繊毛根元の基底小体の方向性が乱れるためと思われ、多繊毛上皮細胞アピカル面において、基底小体と相互作用するアピカル微小管の役割が注目された。正常の気管では、アピカル微小管は、PCPにより、Dapleが局在する上皮細胞のdistal側の細胞膜に沿って偏在するが、DapleKOマウスにおいては、そのような微小管の偏在がみられなかったためである。これらの結果を踏まえて、次に、Dapleを介したアピカル微小管の偏在の分子メカニズムが、分子細胞生物学的解析、蛍光顕微鏡によるライブイメージング解析、電子顕微鏡解析、1分子動態解析などを組み合わせることにより、多角的に明らかにされた。すなわち、(1) Daple が、distal側の細胞膜の細胞間接着部位に局在するPCPタンパク質 Frizzledと微小管とに直接結合すること、そして、(2) Daple分子が2量体を形成することで、微小管が束化され、結果として、アピカル微小管がdistal側の細胞膜に沿って偏在すること、の分子メカニズムの詳細が解明された。

以上、本研究では、これまで未知であった、PCPを介したアピカル微小管骨格による上皮機能制御メカニズムがはじめて明らかにされ、このことは、他の組織の形態形成メカニズムの解明にも繋がると期待される。単にKOマウスの表現系の形態学的記述に留まることなく、蛋白質の生物物理学的特性から、細胞内、および細胞間での上皮機能構築様式の理解まで貫いた質の高い研究である。感染の観点からも注目される多繊毛同調運動が異常を呈する疾患の、今後の理解や治療法開発の礎にもなるものである。よって、博士（医学）の学位に値すると認められる。