

リチウムによる一次繊毛伸長効果

金子璇¹, 加藤 洋平^{2*}, 中山 和久²

¹ 兵庫県立芦屋国際中等教育学校, ² 京都大学大学院薬学研究科

要旨

一次繊毛はヒトの多くの器官の細胞表面から突き出している細胞小器官であり, 外部からのさまざまな刺激やシグナルを受容し, 伝達するアンテナのような働きを持つ。一次繊毛の長さが異常になると「繊毛病」と総称される遺伝病が引き起こされることから, 一次繊毛を適切な長さに維持することは極めて重要であると考えられる。一族のアルカリ金属であるリチウムには一次繊毛を伸長させる効果があることが知られているが, その作用機序は不明である。本研究では, リチウムによる一次繊毛伸長のメカニズムを解明するための前段階として, ヒト培養細胞における一次繊毛伸長効果が最も高いリチウム濃度および処理時間を検討した。その結果, リチウム濃度は50 mM, 処理時間は12時間が最適な条件であることが明らかになった。

重要語句: 一次繊毛, リチウム, 繊毛病

序論

繊毛には, 運動性繊毛と非運動性繊毛 (一次繊毛) の二種類がある。運動性繊毛は体内でのさまざまな流れを形成する役割を果たす。例えば, 気管上皮細胞に存在する運動性繊毛は, 体内に侵入した細菌やウイルスなどを自ら動くことで排除する。また, 精子の鞭毛も運動性繊毛の一種であり, 自身を動かすために鞭毛を用いている。このように運動性繊毛の役割は明確であるのに対して, 動かない繊毛である一次繊毛は過去長い期間にわたって痕跡器官であるとみなされていた。ところが近年になって, 一次繊毛にはさまざまな受容体やイオンチャネルが存在し, 外部からのシグナルを感知するアンテナとしての機能を持つことが明らかになった⁽¹⁾。アンテナとしての一次繊毛が正しく機能するためには, 適切な長さに維持されることが重要であり, 長さの異常は繊毛病 (主な症状: 網膜変性, 嚢胞腎, 骨形成異常, 多指など) を引き起こすことが報告されている⁽²⁾。しかし, 一次繊毛の長さが一定に維持されるためのメカニズムは分かっていない。

培養細胞にリチウムを添加すると, 一次繊毛が伸長する現象が知られている。しかし, どのようなメカニズム

によって一次繊毛が伸長するのかはわかっていない。リチウムによる一次繊毛伸長効果を調べることは, 一次繊毛が適切な長さに維持される仕組みの解明につながると考えられる。これまでに, 幾つかの細胞でリチウムによる繊毛伸長効果が報告されているが, 細胞種によって適切なリチウム濃度と処理時間は異なっている⁽³⁾。また, 一次繊毛の研究でよく用いられているヒト網膜色素上皮 (RPE1) 細胞では, 適切なリチウム処理条件はこれまでに調べられていなかった。そこで本研究ではRPE1細胞において, 一次繊毛伸長効果を示すリチウム濃度および処理時間を検討した。

試料と方法

材料

ヒト網膜色素上皮 (RPE1) 細胞 (CRL-4000; American Type Culture Collection)

DMEM/F-12 培地 (ナカライテスク)

Opti-MEM 培地 (Invitrogen)

PBS (-) (ナカライテスク)

ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco)

牛血清アルブミン (BSA) (ナカライテスク)

塩化リチウム水溶液 (ナカライテスク)

抗体: 抗ARL13Bウサギポリクローナル抗体 (17711-1-AP, Proteintech), 抗FOPマウスモノクローナル抗体 (2B1, Abnova), 抗マウス IgG Alexa-555 標識ヤギ抗体 (A21424, Invitrogen), 抗ウサギ IgG Alexa-488 標識ヤギ抗体 (A11034, Invitrogen)

Hoechst 33342 (Invitrogen)

方法

(1) リチウムによる一次繊毛伸長の濃度依存性についての検討

RPE1 細胞の培養には, 10% FBS と 0.348% 炭酸水素ナトリウムを添加したDMEM/F-12培地を用いた。初めにカバースリップ (12 mm 径) を24ウェルプレート内に置き, 次にRPE1細胞を 1.0×10^5 個/ウェル で播種し, 37°C で24時間培養した。次に, カバースリップをPBS (-) で2回洗浄し, 0.2% BSA を添加したOpti-MEM培地に交換した。この状態で24時間培養し, 血清飢餓による一次繊毛形成

*内容に関する連絡先: ykatoh@pharm.kyoto-u.ac.jp

を誘導した。その後、10–100 mM (10 mM 刻み) の濃度になるように塩化リチウム水溶液を加え、さらに24時間培養した。

細胞を染色するため、カバースリップを -20°C メタノールに5分間浸漬して細胞を固定した。次に、PBS (-) で洗浄し、10% FBS/PBS (-) を用いてブロッッキングを室温で1時間行った。その後、5% FBS/PBS (-) で希釈した一次抗体を用いて、細胞を室温で1時間維持した。PBS (-) で洗浄後、希釈した二次抗体とHoechst 33342を用いて、室温で1時間染色した。PBS (-) で洗浄後、スライドガラス上にカバースリップを封入した。この実験は独立して3回行った。

染色した細胞の観察には蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss Axiovert 200M) を用いた。観察した細胞の写真をCCDカメラで撮影した。撮影した写真を使って一次繊毛を形成している細胞を数え、繊毛形成率を求めた。繊毛の長さはImage Jを用いて測定した。

(2) リチウムによる一次繊毛伸長の時間依存性についての検討

RPE1細胞の培養は(1)と同様に行った。血清飢餓状態にして24時間培養した後、50 mM 塩化リチウム溶液を加え、それぞれ0, 3, 6, 9, 12, 24時間培養した。リチウムを加えない対照群も同時に作成した。その後の免疫染色は(1)と同様に行った。

結果と考察

(1) リチウムによる一次繊毛伸長の濃度依存性についての検討

RPE1細胞の一次繊毛を伸長させるための最適ナリチウム濃度を明らかにするために、0–100 mM 塩化リチウム溶液を加えて一次繊毛長の変化を観察した。図1の写真のように、リチウムの濃度が高くなるにつれて一次繊毛が伸長する様子が観察された。一方、リチウム濃度が90 mM 以上になると繊毛が短縮することが分かった。繊毛の長さをImage Jを用いて測定し、その平均値を折れ線グラフに表した(図2)。図2に示すように、リチウム濃度が50 mM までは濃度に比例して繊毛が長くなったが、60 mM では一旦低下し、70 mM では再び上昇し、80 mM の時に最長になった。リチウム処理をしていない対照群の細胞の繊毛長と比較すると、50 mM リチウム処理では繊毛長が約2.14倍、80 mM では約2.36倍になった。

一次繊毛の観察の過程で、90 mM 以上のリチウム処理をした細胞では繊毛が短いだけでなく、繊毛形成率も顕著に低下していることに気がついた。そこで、一次繊毛の形成率を測定し、図3のグラフに表した。図3から分かるように、濃度が高くなると繊毛形成率は徐々に下がり、80 mM を超えると急激に減少することがわかった。

高濃度のリチウム処理をした細胞の核を観察したとこ

ろ、未処理の細胞では見られない斑模様が観察された。図4の4枚の写真はそれぞれ0 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM リチウムを添加した標本の細胞核の典型例である。未処理の細胞核と比べたとき、80 mM の標本ではかすかに斑模様が現れ、90 mM では模様が大きくなり、100 mM

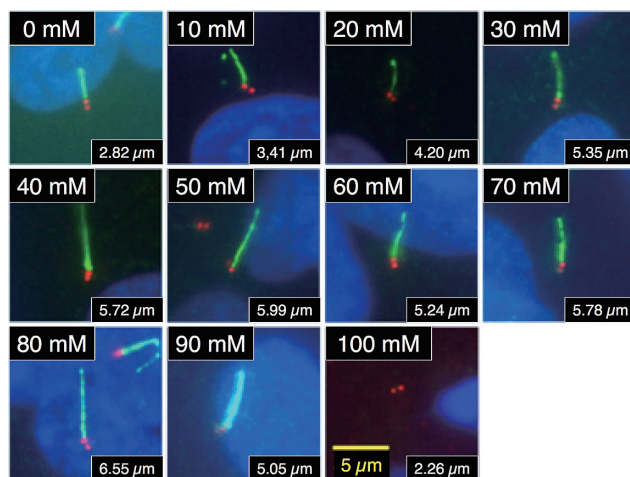


図1. リチウムによる一次繊毛伸長効果の濃度依存性. 0–100 mM リチウム処理後の繊毛の典型例を示した。抗ARL13B抗体によって一次繊毛を緑色に、抗FOP抗体によって中心小体を赤色に、Hoechstによって核を青色に蛍光染色した。各パネルの右下の数値は測定した繊毛長である。

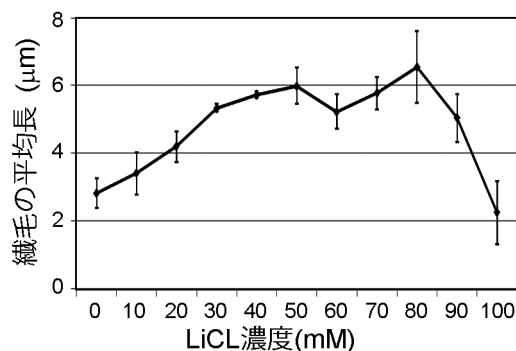


図2. リチウムによる一次繊毛伸長効果の濃度依存性実験における繊毛平均長のグラフ。それぞれの標本で30本の繊毛長を測定した。実験を3回繰り返して行い平均値と標準偏差を求めた。エラーバーは標準偏差を示している。

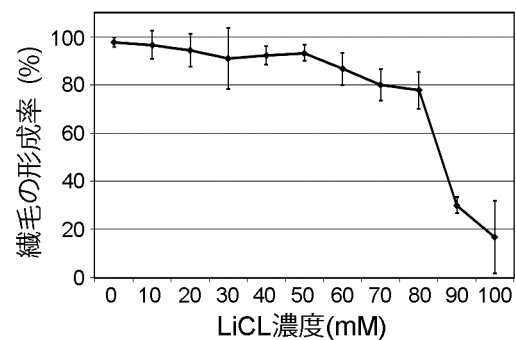


図3. リチウムによる一次繊毛伸長効果の濃度依存性実験における繊毛形成率のグラフ。それぞれの標本で30個の細胞のうち繊毛が形成している細胞を数え、繊毛形成率を求めた。実験を3回繰り返して行い平均値と標準偏差を求めた。エラーバーは標準偏差を示している。

では核が原型をとどめていないことが分かった。この結果から高濃度のリチウム処理は、細胞核に何らかの悪影響を及ぼすことが示唆された。したがって、一次繊毛の伸長効果を調べるためには、80 mM 以上のリチウム濃度は不適であると考えられる。

以上の結果から、細胞核に影響を与えずに一次繊毛を伸長できるリチウムの最適濃度は50 mMと判断した。

(2) リチウムによる一次繊毛伸長の時間依存性についての検討

これまでの実験によって判明した最適リチウム濃度(50 mM)を用いて、次に一次繊毛伸長の時間依存性についての検討を行った。50 mM リチウム処理を0, 3, 6, 9, 12, 24時間行い、繊毛長を比較した。図5にはリチウム処理群と対照群の写真を示した。図6には繊毛長の平均

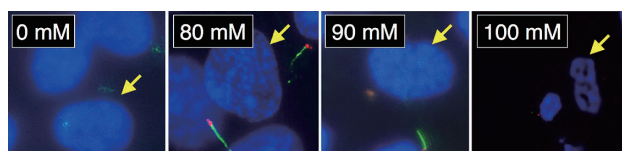


図4. 0 mM, 80 mM, 90 mM, 100 mM リチウムで処理された細胞核の様子。抗ARL13B抗体によって一次繊毛を緑色に、抗FOP抗体によって中心小体を赤色に、Hoechstによって核を青色に蛍光染色した。それぞれ黄色の矢印で核の典型例を示す。

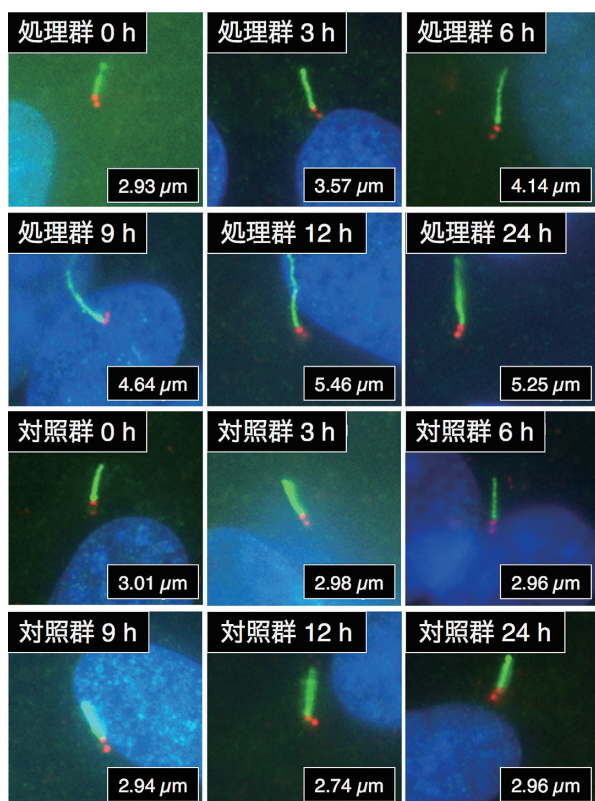


図5. リチウムによる一次繊毛伸長効果の時間依存性。それぞれの時間リチウム処理された繊毛と対照群の典型例を示す。抗ARL13B抗体によって一次繊毛を緑色に、抗FOP抗体によって中心小体を赤色に、Hoechstによって核を青色に蛍光染色した。各パネル右下の数値は測定された繊毛長である。

値のグラフを示した。これらの写真とグラフから分かるように、リチウム処理時間に比例して、一次繊毛が伸長した。リチウム処理12時間と24時間の繊毛長に差がほとんど見られないことから、およそ12時間で伸長効果が定常状態に達したと考えられる。それに対して対照群の標本の繊毛長は常に約3 μmで変化しなかった。

また、繊毛形成率を調べて図7のグラフに表した。リチウム処理群の繊毛形成率は時間が経つにつれて若干の低下が見られたが、対照群と比べて大きな差はなかった。

結論

本研究で得られた結果をまとめると、RPE1細胞において、一次繊毛の伸長効果が最もよく現れるリチウムの最適濃度は50 mM、最適処理時間は12時間であると判断した。

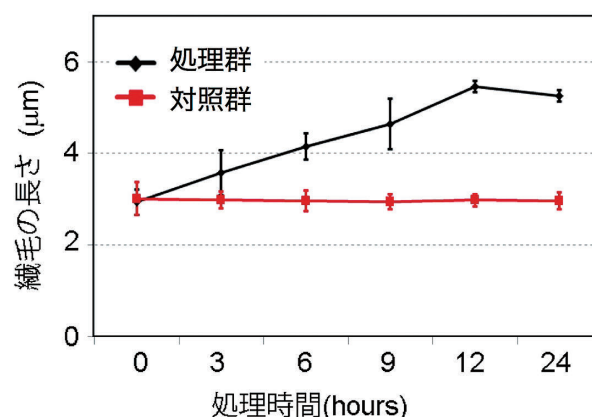


図6. リチウムによる一次繊毛伸長効果の時間依存性実験における繊毛長のグラフ。黒線がリチウム処理された繊毛のグラフ、赤線が対照群のグラフである。それぞれの標本で30本の繊毛長を測定した。実験を3回繰り返して行い平均値と標準偏差を求めた。エラーバーは標準偏差を示している。

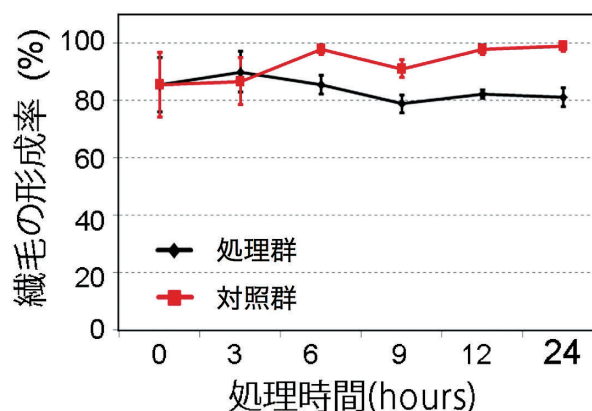


図7. リチウムによる一次繊毛伸長効果の時間依存性実験における繊毛形成率のグラフ。黒線がリチウム処理された繊毛のグラフ、赤線が対照群のグラフである。それぞれの標本で30個の細胞のうち繊毛が形成している細胞を数え、繊毛形成率を求めた。実験を3回繰り返して行い平均値と標準偏差を求めた。エラーバーは標準偏差を示している。

展望

本研究によって、RPE1細胞の一次繊毛を伸長させるための最適な条件が判明したが、どのようなメカニズムによって繊毛が伸長するのかは解明できていない。私たちはリチウム処理によって繊毛内輸送装置に何らかの変化が起きているのではないかと予想している。例えば、繊毛内輸送装置の数の増加、輸送速度の上昇などの可能性が考えられる。これらを検証するために今後は、リチウムを添加した状態での一次繊毛をライブ観察し、繊毛内輸送装置にどのような変化が起きているかを調べる必要がある。今後の研究によって、なぜリチウムが一次繊毛伸長効果を持つのか、また一次繊毛が一定の長さに保たれるメカニズムがどのようなものなのかを解明することが期待される。

将来的に、一次繊毛の伸縮を制御できるようになれば、繊毛病に対する治療薬を開発でき、重篤な病に苦しむ患者を救える可能性がある。

謝辞

本研究を行うにあたって、京都大学薬学研究科生体情報制御学分野の船橋さん、岡崎さんにはTAとして多くのご指導、ご助力を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また、ELCAS事務局の皆さまにはたくさんのサポートをしていただき、誠にありがとうございます。

参考文献

1. 神谷律. 太古からの9+2構造—繊毛のふしぎ. 岩波書店. (2012).
2. Reiter, J. F., & M. R. Leroux. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 194: 165. (2017).
3. Miyoshi, K., Kasahara, K., Miyazaki, I., & M. Asanuma. Lithium treatment elongates primary cilia in the mouse brain and in cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 757–762. (2009).

The elongation of primary cilia by lithium

ZIXUAN JIN¹, YOHEI KATOH^{2*} & KAZUHISA NAKAYAMA²

¹Ashiya International Secondary School, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Abstract

Primary cilia are found in virtually all types of cells in humans. The function of primary cilia resembles an antenna that senses and transmits various external stimuli and signals. It is believed that maintaining the primary cilia at an appropriate length is crucial since the abnormal length of cilia causes genetic disorders, collectively called ciliopathies. Lithium, an alkali metal, is known to have the effect of elongating primary cilia. However, the mechanism related to the elongation effect of lithium on primary cilia has not been clarified. In this study, as the preliminary step in elucidating the mechanism of primary cilia elongation by lithium, the lithium concentration and treatment time with the highest primary cilia elongation effect on human cultured cells were examined. As a result, we concluded that the optimum condition for cilia elongation is the lithium concentration of 50 mM and the treatment time of 12 hours.

Key words: primary cilia, lithium, ciliopathies

*Corresponding Researcher: ykatoh@pharm.kyoto-u.ac.jp