

グアニル酸による PC-12細胞への効果

藤岡 竜太¹⁾ 岡本 昭¹⁾ 範 駱鳴²⁾ 三浦 史郎³⁾ 柴田 弘紀²⁾

Effect of guanylic acid on PC-12 cells

Ryuta FUJIOKA¹⁾ Akira OKAMOTO¹⁾ Luoming FAN²⁾
Shiroh MIURA³⁾ Hiroki SHIBATA²⁾

【要 旨】

先行研究により乾しいたけエキスを PC-12細胞に暴露したところ神経突起伸長および細胞増殖に影響を与えている可能性があることが分かった。本研究では乾しいたけのうま味成分であるグアニル酸に着目し、グアニル酸を PC-12細胞に暴露して神経突起伸長および細胞増殖を調べた。結果として細胞体から伸びる神経突起の伸長数にわずかな変化が認められた。また、グアニル酸は濃度依存的に細胞増殖を抑制していることも分かった。別の主要うま味成分であるグルタミン酸についても同様に実施したが調整した濃度の範囲内での変化は認められなかった。

【キーワード】

グアニル酸、グルタミン酸、PC-12、神経突起、うま味

1. はじめに

神経疾患である本態性振戦（原因不明のふるえ）をきたした患者の血漿アミノ酸濃度を測定したところ興奮性アミノ酸であり、うま味成分であるグルタミン酸の濃度が高い値を示すことが分かった¹⁾⁻²⁾。うま味成分に関連のある乾しいたけエキスを神経分化の研究に用いられるラットの副腎髄質褐色細胞腫由来の PC-12細胞に暴露すると神経突起伸長に影響がある可能

性も示唆された³⁾。また、乾しいたけのうま味成分として様々な研究⁴⁾⁻⁹⁾から、グアニル酸がよく知られている。これらのことから、乾しいたけエキスに関与するうま味成分のグアニル酸やグルタミン酸の機能性を神経学的な見地から PC-12細胞への影響を調べ、明らかにすることが本研究の目的である。グアニル酸およびグルタミン酸が PC-12細胞の神経突起伸長に及ぼす効果について報告する。

本研究では PC-12細胞の細胞増殖抑制効果、神経突起伸長の変化を確認した。PC-12細胞を

¹⁾ 別府大学短期大学部食物栄養科 ²⁾ 九州大学生体防御医学研究所ゲノミクス分野

³⁾ 愛媛大学大学院医学研究科 脳神経内科・老年医学講座

使用したアミノ酸暴露による報告^{10)~11)}は以前よりされており、今回はうま味成分に絞り、なかでもグアニル酸、グルタミン酸に着目して実施した。神経突起伸長への影響が期待できれば神経疾患の作用機序にうま味成分が関与していることも示唆される。

2. 試料・試薬

○うま味成分

- ・グアニル酸 (グアノシン5'-一リン酸二ナトリウム) 東京化成工業株式会社
- ・グアニル酸 n 水和物 (グアノシン5'-一リン酸二ナトリウム n 水和物) 東京化成工業株式会社
- ・グルタミン酸 (L-グルタミン酸) 富士フィルム和光純薬株式会社

○細胞培養用試薬

※以前報告した文献³⁾に準じた。

- ・PC-12細胞 (ラット副腎髄質褐色細胞腫由来) 理研 Cell bank より購入
37°CのCO₂インキュベーター E-22(AS ONE) を使用し株化された細胞を継代培養した。
- ・細胞培養用培地の組成
MEM (Minimum Essential Medium)
Earle's Salts, L-Glutamine 含有 (Gibco)
500ml
Fetal Bovine Serum (Corning) 56.8ml
Penicilline Streptomycin (Gibco) 5.68ml
MEM Non-Essential Amino Acid (Gibco)
5.68ml

○生細胞・死細胞測定用試薬

- ・Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所)
- ・Cytotoxicity LDH Assay Kit WST (同仁化学研究所)

○細胞実験測定用器具

- ・位相差顕微鏡 Primovert (Zeiss)
- ・iMark マイクロプレートリーダー (Bio Rad)

- ・-80°C超低温フリーザー KANOU LAB -80°C (株式会社 カノウ冷機)

○神経突起伸長測定用関連試薬

- ・神経成長因子 (nerve growth factor : NGF)
神経成長因子-β (NGF-β / β-NGF, ヒト組換え体) (富士フィルム和光純薬株式会社)

3. 方法

1 × 10⁵ cells/ml になるように調整した PC-12細胞を96wellのマルチウェルプレートで12時間血清培地で培養した。培養後、培地を無血清培地に交換し、うま味成分のグアニル酸、グアニル酸 n 水和物は100 μM, 1 mM, 10 mMに、グルタミン酸は10 μM, 100 μM, 1 mMになるように、濃度を調整して暴露させ、細胞増殖抑制効果を検討した。暴露時間は24時間、48時間、72時間、96時間と変更して同一のサンプルを3つのウェルで実施した。時間経過後に、マイクロプレートリーダーによる吸光度の測定を生細胞は450 nmと630 nmの2波長、死細胞は490 nmと630 nmの2波長で行った。生細胞の評価には Cell Counting Kit-8を使用し、死細胞の評価には Cytotoxicity LDH Assay Kit WSTを使用した。また、並行して、継代培養した PC-12細胞に10 ng/mlに濃度調整した神経成長因子を暴露して、暴露後の神経突起伸長の変化を調べた。方法としては、PC-12細胞を血清培地で約12時間培養後、無血清培地に交換しグアニル酸とグアニル酸 n 水和物は10 mM、グルタミン酸は1 mMになるように濃度を調整し暴露した。併せて神経成長因子10 ng/mlを2 μl加えて、さらに24時間培養して、神経突起伸長を測定した。神経突起伸長の測定方法は Wang S ら¹²⁾、Kamata Y ら¹³⁾の方法に準じた。細胞体の最小長径より長い神経突起をもつ細胞20個を選択し、長さを測定して分化に神経突起が影響しているかを調べた。

4. 結果

うま味成分ごとにグアニル酸暴露の生細胞 (図1)、グアニル酸暴露の死細胞 (図2)、グアニル酸 n 水和物暴露の生細胞 (図3)、グアニル酸 n 水和物暴露の死細胞 (図4)、グルタミン酸暴露の生細胞 (図5)、グルタミン酸暴露の死細胞 (図6) の経時的变化をまとめた。生細胞

は波長450 nm の吸光度の値が高いほど生きている細胞が多く存在していることを示し、死細胞は波長490 nm の吸光度の値が高いほど死んでいる細胞が多いことを示している。結果としてグアニル酸、グアニル酸 n 水和物ともに高濃度になると、濃度依存的にPC-12細胞の生細胞は減少し、死細胞は増加することが分かった。また、グルタミン酸は生細胞、死細胞の濃度依存的な変化は10 μ M から 1 mM の範囲で

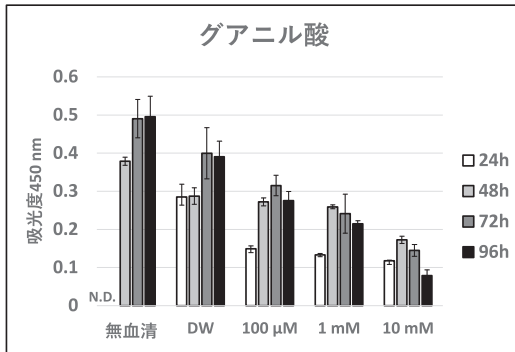


図1：グアニル酸暴露の生細胞の経時的变化

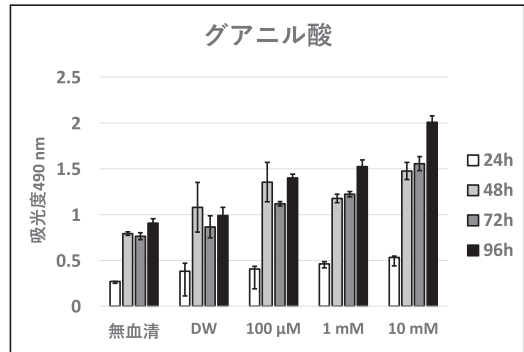


図2：グアニル酸暴露の死細胞の経時的变化

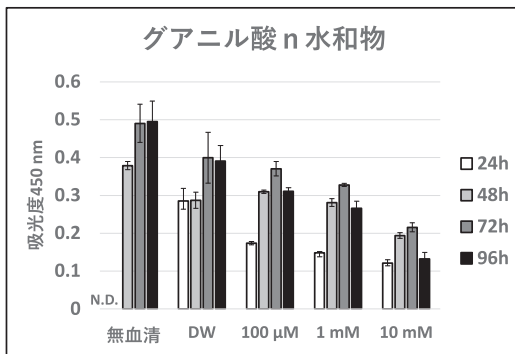


図3：グアニル酸 n 水和物暴露の生細胞の経時的变化

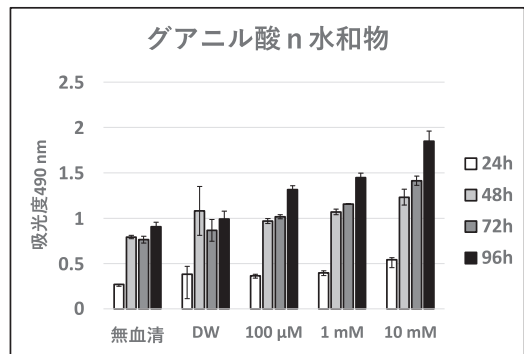


図4：グアニル酸 n 水和物暴露の死細胞の経時的变化

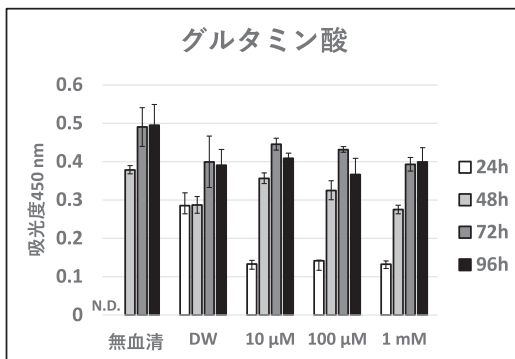


図5：グルタミン酸暴露の生細胞の経時的变化

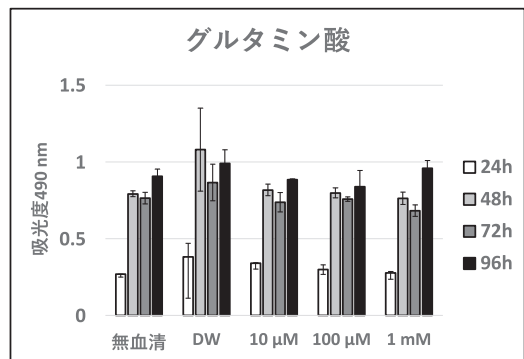


図6：グルタミン酸暴露の死細胞の経時的变化

表1：神経突起伸長の計測比較 (n=20)

	神経突起伸長数 (本)	神経突起最大長 (μm)	神経突起最短長 (μm)	細胞体最大直径 (μm)	細胞体最小直径 (μm)
グアニル酸	3.60 (1.50)	5.23 (0.84)	2.32 (0.71)	4.60 (0.83)	2.33 (0.73)
グアニル酸 n 水和物	3.40 (1.42)	6.26 (1.00)	2.56 (0.79)	4.25 (0.76)	3.46 (1.08)
グルタミン酸	2.70 (1.13)	8.58 (1.37)	3.46 (1.05)	4.85 (0.87)	3.08 (0.96)
蒸留水 (コントロール)	2.40 (1.00)	6.26 (1.00)	3.25 (1.00)	5.58 (1.00)	3.20 (1.00)
冬菇*	3.80 (1.43)	6.20 (0.93)	2.04 (1.15)	5.60 (1.09)	3.65 (1.23)
香信*	4.00 (1.51)	6.21 (0.92)	1.48 (0.83)	5.83 (1.15)	4.04 (1.36)
血清培地*	3.15 (1.19)	9.43 (1.42)	2.48 (1.39)	6.76 (1.34)	4.04 (1.36)
蒸留水 (コントロール)*	2.65 (1.00)	6.65 (1.00)	1.78 (1.00)	5.06 (1.00)	2.94 (1.00)

神経突起伸長数は、細胞体からの本数を示している。
 表中の () は蒸留水 (コントロール) を 1 とした時の割合を示している。
 *は文献³⁾からの引用。

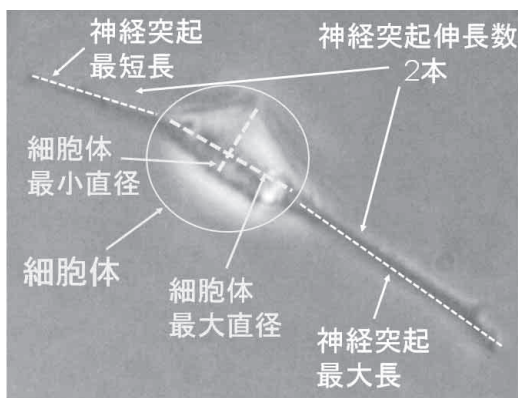


図7：PC-12細胞の神経突起伸長の計測項目

は認められなかった。

並行して、うま味成分 (グアニル酸、グルタミン酸) を暴露した PC-12細胞に神経成長因子 (NGF) を暴露し神経突起伸長の比較も行った。20個の細胞の形態 (n=20) を位相差顕微鏡で確認した。図7のように神経突起伸長数 (細胞体からの本数)、神経突起最大長 (μm)、神経突起最短長 (μm)、細胞体最大直径 (μm)、細胞体最小直径 (μm) を比較した。結果を計測値とともに蒸留水 (コントロール) を 1 とした割合を表1に示した。結果としてグアニル酸は神経突起伸長数が蒸留水の約1.5倍となり PC-12細胞に影響を与えていることが示唆された。また、グルタミン酸は、神経突起最大長、神経突起最短長がグアニル酸よりも約1.5~1.6倍長い傾向が見られた。比較のために表1に乾しいたけで実施した先行研究の結果³⁾を示し

た。神経突起伸長数は乾しいたけの冬菇の1.43倍、香信の1.51倍と比較すると、グアニル酸では1.50倍で同程度であった。

5. 考察

うま味成分が PC-12細胞の細胞増殖に影響を与えることが示唆され、グアニル酸では濃度依存的に変化することが分かった。グルタミン酸については濃度依存的な細胞増殖の変化は認められなかった。このことから10 μM 、100 μM 、1 mMの濃度では、グルタミン酸よりもグアニル酸が PC-12細胞の細胞増殖に影響を与えていることが分かった。Miura Sら¹⁾の結果では、本態性振戦患者2名の血漿のグルタミン酸濃度が Case 1 は87.6 nmol/ml、Case 2 は65.1 nmol/ml と基準値 (12.6 nmol/ml~62.5 nmol/ml) より高く、Miura Sら²⁾の別の報告でも本態性振戦の患者7名の平均値が63.84 nmol/ml と基準値より高い結果が得られている。本研究のグルタミン酸濃度と比較すると、10 μM から100 μM の範囲内に該当するが、細胞増殖の変化は確認できなかった。しかし、グルタミン酸 1 mM で暴露している神経突起伸長の計測では、神経突起の最大長、最短長がグアニル酸やコントロールよりもわずかに長い可能性が示唆された。また、グアニル酸は蒸留水 (コントロール) と比較して神経突起伸長数が1.5倍多いことから神経突起に影響している可能性もあることが分

かった。しかし、神経突起最大長、神経突起最長、細胞体最大直径、細胞体最小直径については、1.5倍以上の明らかな差は認められなかった。これらのことから、乾しいたけエキスの神経突起伸長の変化にうま味成分のグアニル酸、グルタミン酸が影響しているかは明らかにできなかった。引き続き、神経学的な観点から、うま味成分（グアニル酸、グルタミン酸）との関連について、PC-12細胞の神経突起伸長の研究をもとに、検討していきたい。

6. 謝辞

本研究は2020年度別府大学短期大学部の学長裁量経費（R1短6）により実験遂行することができました。感謝申し上げます。

7. 参考文献

- 1) Miura S, Fujioka R, Taniwaki T. Essential tremor with aspartic acidemia. *Kurume Med J.* 2016;63: 81-84.
- 2) Miura S, Kamada T, Fujioka R, Yamanishi Y. Plasma aminoacids in patients with essential tremor. *Clin Case Rep.* 2021;9(8):e04580
- 3) 藤岡竜太. 岡本昭. 永野明宏. 森川拓弥. 柴田弘紀. 乾しいたけエキスによるPC-12細胞の増殖効果の検討. 別府大学短期大学部紀要 2020;39:63-67.
- 4) 毛利威徳. 橋田度. 志賀岩雄. 寺本四郎. 食品中の核酸成分に関する研究（第8報）しいたけ子実体の核酸分解酵素系. 醗酵工學雑誌 1966;44(5): 248-258.
- 5) Morita K. and Kobayashi S. Isolation, structure, and synthesis of lenthionine and its analogs. *Chem. Pharm. Bull.* 1967;15:988-993.
- 6) Hiraide M, Miyazaki Y, Shibata Y. The smell and odorous components of dried shiitake mushroom, *Lentinula edodes* I: relationship between sensory evaluations and amounts of odorous components. *J. Wood Sci.* 2004;50:58-364.
- 7) 青柳康夫. キノコならびに植物性食品の食品学的研究. 女子栄養大紀要 2017;48:13-22.
- 8) Yang X, Zhang Y, Kong Y, Zhao J, Sun Y, and Huang M. Comparative analysis of taste compounds in shiitake mushrooms processed by hot-air drying and freeze drying. *Int. J. Food Prop.* 2019;22:1100-1111.
- 9) Kurata D, Orikasa T, Komuro M, Sasaki K and Koide S. Quality Evaluation of Shiitake Mushrooms Dried by Vacuum Microwave Treatment. *Food Sci Technol Res.* 2020;26(3):339-350.
- 10) 小島百代. 佐野愛子. 鈴木龍一郎. 白瀧義明. 坂上宏. 味噌の神経保護作用. *New Food Indust.* 2018;60(5):79-83.
- 11) Sano A, Shi H, Suzuki R, Shirataki Y and Sakagami H. Change in Amino Acid Pools During Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *in vivo.* 2018;32(6): 1403-1408.
- 12) Wang S, Watanabe T, Noritake J, Fukata M, Yoshimura T, Itoh N, Harada T, Nakagawa M, Matsuura Y, Arimura N, Kaibuchi K. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt4):567-577.
- 13) Kamata Y, Shiraga H, Tai A, Kawamoto Y, Gohda E. Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by the medium-chain fatty acid octanoic acid. *Neuroscience.* 2007;146(3):1073-1081.