

香気成分の iPS 細胞の神経分化とオートファジーに 及ぼす影響

笹沼 いづみ^{*1}, 鈴木 のどか^{*1}, 齋藤 香澄^{*1}

Aromas stimulate neural differentiation and autophagy in iPS cells

Izumi SASANUMA, Nodoka SUZUKI, Kasumi SAITOH

Lysosomes of stem cells are essential for maintaining cellular homeostasis, and dysfunction of the organelles has been observed in multiple cranial nerve diseases. Stem cells of olfactory bulb are highly dynamic and undergo fission and differentiation to maintain a functional nerve network. Here we have identified the formation and regulation of glycosylation of protein using zymogram, filter retardation assay and PA-staining. Glycosylation of protein formed in aromas untreated cells and were distinct from damaged protein that were targeted into lysosomes for degradation. Glycosylation was promoted in active 100kD receptor, and glycosylation untethering was mediated by recruitment of β -glucosidase to extracellular by geraniol to drive sugar chain hydrolysis and thereby inactivates the receptor. Functionally, glycosylation marks sites proliferation and differentiation of stem cells, allowing regulation of neural networks by stem cells, whereas conversely, glycosylation regulates receptor activity via β -glucosidase. Glycosylation thus allows directional regulation of receptor dynamics, and may explain the dysfunction observed in lysosome in various human diseases.

KEYWORDS: iPS cells, Aromas, Autophagy.

1. 緒言

嗅覚は、香気成分が鼻の奥にある嗅細胞によって受容され、その情報が脳の入り口の嗅球、さらには高次の嗅覚中枢へと伝わり、脳が認識・識別して生み出される感覚である。よって、香気成分は脳の活動に直接的な影響を与える。

iPS 細胞は様々な組織や臓器の細胞に分化する能力とほぼ無限に増殖する能力をもつ。iPS 細胞などの幹細胞は、再生医療や創薬への応用が期待されているが、神経幹細胞の制御については報告が数少ない。脳神経における幹細胞は嗅球と海馬に存在し、これら幹細胞は加齢とともに機能が低下し、脳機能に大きな影響を及ぼす。

本研究では植物由来の香気成分が iPS 細胞から誘導した神経幹細胞に及ぼす影響について検討した。

2. 材料及び方法

供試細胞：iPS 細胞 (PBRC-HPS003)。

成分抽出：減圧蒸留で精製した。

iPS 細胞の培養：modified DMEM/F12 SUBSER-ESrP を用いて培養した。

細胞数の測定：MTT 法で行った。

β -グルコシダーゼ (GBA) 活性：サリシンまたは X-Glc を基質として測定した。

プロテアーゼ活性：ゼラチンザイモグラムで検出した。

糖鎖の検出：PAS 染色で検出した。

タンパク質の分析：SDS-PAGE で行った。

成分分析：吸収波長分析と TLC で行った。

受容体の検出：フィルターリタゼーションアッセイで行った。

*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: sasaki@oyama-ct.ac.jp

3. 結果

3. 1 香気成分の抽出と分析

以前の研究より、ES 細胞の分化増殖に影響をあたえたバラとレモンについて、香気成分の抽出と分析を行った。その結果、シトラールの吸収波長は 236nm であり、レモン抽出物の吸収波長(239nm)と Rf 値(0.03)がほぼ一致した。ゲラニオールの吸収波長は 236nm であり、バラの吸収波長(205nm, 305nm, 976nm) と Rf 値(0.44)とは一致しなかった (Fig. 1)。

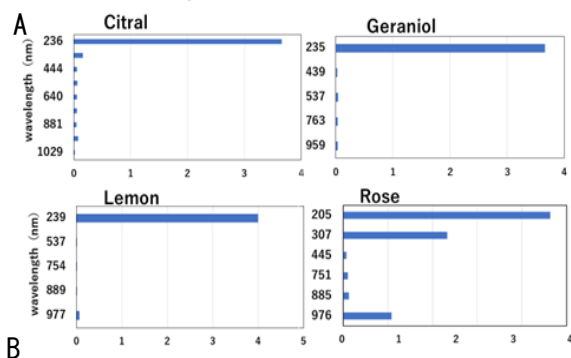


Fig. 1 Spectroscopic analysis of aromas. The absorption spectra of each aroma component were measured (A). Rf values of each aroma component in TLC (B).

3. 2 香気成分の増殖への影響

レモン香気成分、バラ香気成分、シトラール、ゲラニオールをそれぞれ神経誘導 iPS の培地に添加して培養を行ったところ、コントロール培養のエタノールと比較してすべての培養で細胞の増加が認められた。特に、ゲラニオールは濃度依存的に細胞を増加させた (Fig. 2-A)。

ゲラニオールで著しい細胞の増殖が認められたので、ゲラニオールとゲラニオールを多く含むダマスクローズの精油を用いて、細胞の量の変化を経時的に測定した。その結果、1 週目ではゲラ

ニオール、ダマスクローズ精油の両方で細胞の増殖率が上昇することが明らかとなった。2 週目ではダマスクローズ精油が細胞の増殖率を上昇させた (Fig. 2-B)。

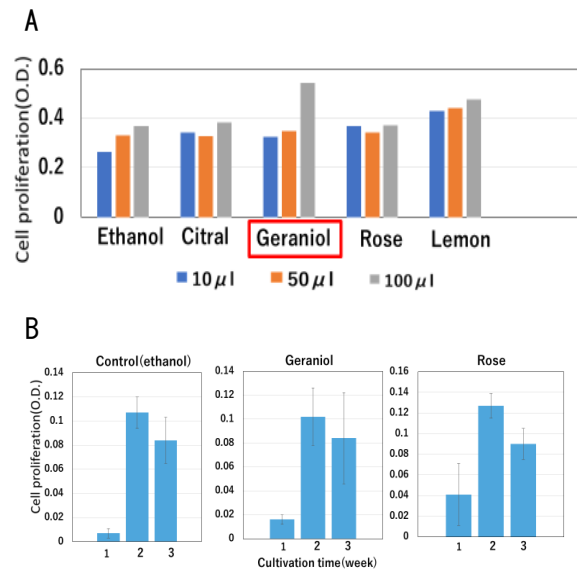


Fig. 2 Proliferative effects of aromas on the iPS cells. A, Each of the aromas (10µl; blue bars, 50µl; orange bars, 100µl; gray bars) was added to the culture media of iPS cell. B, Growth.

3. 3 β - グルコシダーゼ活性への影響

レモン香気成分、バラ香気成分、シトラール、ゲラニオールをそれぞれ神経誘導 iPS の培地に添加して神経誘導 iPS 細胞のβ-グルコシダーゼ活性を測定したところ、シトラールでは細胞外の分解活性が濃度依存的に低下し、細胞内では糖転移反応が起こった。ゲラニオールでは細胞外で分解活性が高くなり、細胞内では分解活性が低下することが認められた。バラ香気成分では細胞内外で濃度依存的に分解活性が高くなった。レモン香気成分では分解活性が細胞内外で低下した (Fig. 3-A)。

ゲラニオールで著しい分解活性の上昇が認められたので、ゲラニオールとゲラニオールを多く含むダマスクローズの精油を用いて、β-グルコシダーゼ活性の変化を経時的に測定した。その結果、1 週目ではゲラニオール、ダマスクローズ精油の

両方でβ-グルコシダーゼ活性が上昇することが明らかとなった。2週目、3週目ではダマスクローズ精油がβ-グルコシダーゼ活性を上昇させた (Fig. 3-B)。

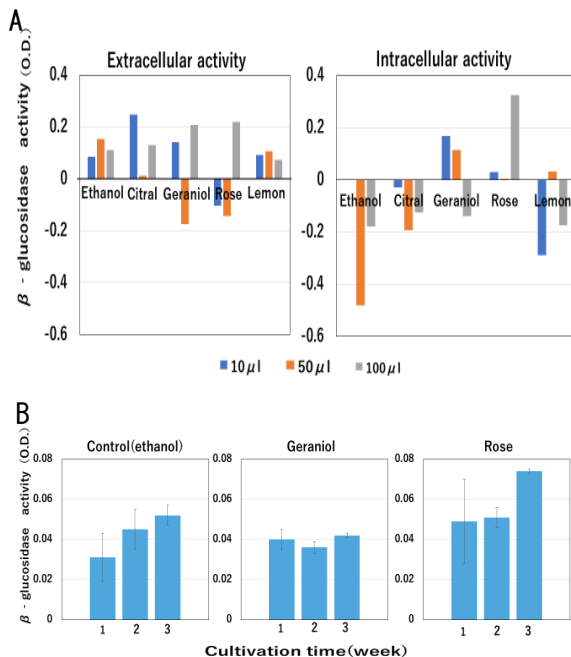


Fig. 3 Each of the aromas (10μl; blue bars, 50μl; orange bars, 100μl; gray bars) were added to the culture media of iPS cell, and the extracellular (left) and intracellular (right) β-glucosidase activities were measured(A). Time course of β-glucosidase activities in iPS cells treated by aromas(B).

3. 4 香気成分のオートファジーに及ぼす影響

レモン香気成分、バラ香気成分、シトラール、ゲラニオール、シトロネールの神経誘導 iPS 細胞のオートファジーに及ぼす影響を検討した。

10μl 添加の培地では、50kDa の糖鎖が少なくなり、特にシトラールとレモンではほとんど糖鎖が認められなかった。

50μl 添加培地では、シトラールで 240 kDa と 75kDa の糖鎖が減少したが、240 kDa に関してはゲラニオール、バラ香気成分、レモン香気成分で増加した。シトラール、ゲラニオール、バラ香気成分では 60kDa の糖鎖が増加した (Fig. 4-B)。

100μl 添加の培地では、コントロールと比較して 60kDa の糖鎖が増加したものはシトラール、ゲラニオール、バラ香気成分であった。一方、これ

らでは 75kDa の糖鎖は減少した。100kDa の糖鎖が増加したものはゲラニオール、バラ香気成分であった (Fig. 4-B)。

すべての培養においてタンパク質分解酵素の活性化は認められなかった (Fig. 4-C)。

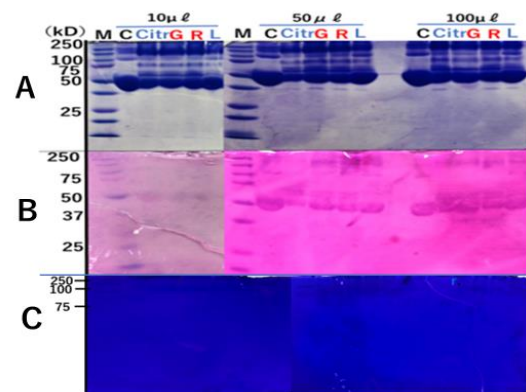


Fig. 4 Purification and identification of polyphenol from the kanpyo extract. A, Spectroscopic analysis of the crude extract (A-1) and the purified(A-2) extract. B, Thin-layer chromatography for the extract and Rf value.

3. 5 香気成分の受容体の活性化への影響

香気成分の神経誘導 iPS 細胞の受容体活性化に及ぼす影響を検討した。100μl 添加の培地では、シトラール、ゲラニオール、バラ香気成分を添加した培養では、60kDa と 100kDa のタンパク質が活性化、コントロールでは 60kDa と 100kDa のタンパク質が不活性化していた。75kDa のタンパク質はバラ香気成分で活性化した (Fig. 5)。

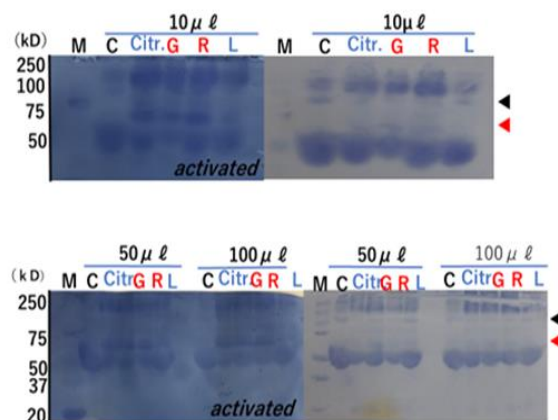


Fig. 5 Receptor activation in iPS cells treated by the aromas. The aromas by which iPS cells were treated; see

Fig. 2. The proteins fractionated by semi SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose (activated receptor; left) and PVDF inactive receptors; right) membranes.

3. 6 香気成分の細胞内 GBA 活性化への影響

コントロールの細胞では細胞内のリソソームに活性が確認された。ゲラニオールでは細胞内リソソーム及び表面近くで活性が認められ、突起の形成が観察された。バラでは、最も多くのリソソームで活性が認められ、細胞表面で活性が認められる細胞では、神経突起の形成が確認できた (Fig. 6)。

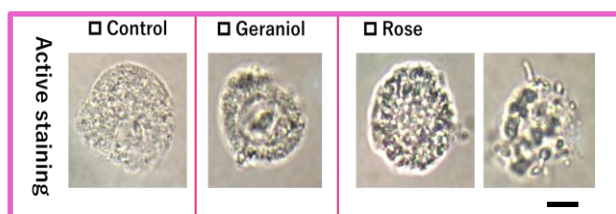


Fig. 6 Representative images of active staining of β -glucosidase in iPS cells treated by the aromas. Scale bar, 10 μ m.

4. 考察

4. 1 香気成分の抽出と分析

バラ香気成分は、ゲラニオール、フェニルエチルアルコール、リナロール、ネロール等が主要な成分である。レモンの香気成分はシトラール、リモネン、 β -ピネン、 γ -テルピネン等がある。

本実験で用いられた主要な香気成分は、吸収波長からバラはフェニルエチルアルコール、リナロール、ネロール、レモンはシトラールとリモネンと推察された。

4. 2 香気成分の増殖への影響

細胞を最も増殖させたものはバラ香気成分であった。バラの主要成分であるゲラニオールは抗酸化状態の増強によって、ミトコンドリア機能を

維持することが報告されている。さらに、ゲラニオールは小胞体ストレスを減少させ、オートファジーの流れを改善するという報告がある。よって、ゲラニオールの抗酸化力とオートファジー改善で、細胞が増殖したと考えられた¹⁾。

4. 3 β -グルコシダーゼ活性への影響

β -グルコシダーゼ活性を最も上昇させたものはバラ香気成分であった。バラ香気成分シトロネロール、ゲラニオールは COX-2 発現抑制および PPAR (ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor) 活性化の効果をもつ成分として知られている。核内受容体 PPAR α はオートファジーを引き起こす²⁾。このオートファジー活性化に伴い β -グルコシダーゼ活性が上昇したと考えられた。

4. 4 香気成分の神経幹細胞分化に及ぼす影響

COX-2 発現抑制および PPAR 活性化の効果をもつ成分として、植物精油成分のカルバクロール、シトラール、シトロネロール、ゲラニオールが報告されている。また、ゲラニオールはシトロネロールと比較してシクロオキシゲナーゼ抑制効果が低いことが認められている^{1,2)}。シクロオキシゲナーゼ (COX) によって生産されるプロスタグランジンは細胞の分化に関与する³⁾。ゲラニオールはこの COX の抑制効果が低く、PPAR α は活性化させるため、プロスタグランジンを生産し細胞を分化させたと考えられた。

ゲラニオール、シトラール、バラ香気成分では 60kDa で糖鎖付加し、75kDa で糖鎖が減少した。受容体活性では、ゲラニオール、バラ、シトラールで 60kDa と 100kDa の両方で受容体が活性化した。よって、シトラール、ゲラニオール、バラ香気成分では、TGF- β が活性化していることから細胞の神経分化に関与していると考えられる。また、バラ香気成分では 75kDa の受容体も活性化したので、PPAR のようなステロイド受容体の関与も考えられた。TGF- β は膜結合性の受容体であり、糖鎖の修飾によってその活性を変化させる。よって、神経分化に関わる膜結合性受容体は糖鎖の修飾が必要であることが推察された。また、バラ香気成分では、GBA 活性がリソソームでみとめられ、さらに神経突起が確認された。バラ香気成分で最も

神経分化が促進された理由は、TGF- β と PPAR が同時に活性化したためと考えられた。

参考文献

- 1) M.Hotta et al.: Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression, J. Lipid Res. 51(1), pp. 132-139 (2010)
- 2) C. Settembre, A. Ballabio: Autophagy transcribed, Nature 516, pp. 40-41 (2014)
- 3) C.Yao et al.: Prostaglandin E2 promotes Th1 differentiation via synergistic amplification of IL-12 signalling by cAMP and PI3-kinase, Nature Com. 4, Article number 1685 (2013)

【受理年月日 2019年9月13日】