

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月17日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592379

研究課題名（和文）酵母から発見した新規 NAD の神経細胞分化誘導・保護作用に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the induction and protective effect of nerve cell differentiation by a newly synthesized NAD discovered in the yeast *Candida*.

研究代表者 上西 秀則 (HIDENORI KAMINISHI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90084300

研究成果の概要（和文）：

*Candida*の生育形態を酵母形から菌糸形に変化させる能力を有する物質を *Candida*の菌体から発見した。その組成分析と構造解析の結果に基づいて物質を化学合成し、NADの類似体である L-RibNADを化学合成した。得られた合成標品の神経細胞に対する作用について、in vitroでの試験を行った。試験結果は以下のとおりである。

(L-RibNAD：NADのニコチン酸に結合するリボースがL-リボースになっている。分子量：663)

1) ラット胎児脳神経細胞（初代培養細胞）に対する効果。

①合成標品の添加量（0.01~1  $\mu\text{g/ml}$ ）に比例して神経突起が対照と比較して約1.5倍の長さに伸長することが観察された。また、神経突起の分岐数も増加することが分かった。さらに、伸長した神経突起の表面には多数のバイコシティーが形成され、シナプス形成の体制が整っていることも伺われた。

②ラット胎児脳神経幹細胞を分化誘導培地で培養し、これに合成標品を添加して培養した結果、合成標品は神経幹細胞をニューロンあるいはグリア細胞へと特定の細胞に分化させることはなく、神経突起の伸長をもたらすことが分かった。

2) ヒト由来神経芽腫細胞（NB-1）に対する効果。

①NB-1を飢餓環境で培養し、細胞の形態、特に神経突起の伸長とサバイバルについて合成標品の効果を調べた。この結果、合成標品を0.5~1  $\mu\text{g/ml}$ 添加すると、神経突起は顕著に伸長し、神経突起によるネットワークが形成されることが観察された。また、合成標品添加例では細胞の生存日数が約、1.7倍延長され、サバイバル効果も確認された。

3) DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析。

ラット胎児脳神経細胞およびNB-1に合成標品を添加して培養し、培養2~4日にRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。この結果、いずれの細胞においてもNervous System Development and Functionに関与する一連の遺伝子群が顕著に発現することを認めた。

4) この研究で神経細胞の突起を伸長させ、飢餓環境においてはサバイバル効果を発揮する物質を合成することができた。この成果は神経疾患治療薬の創製に新たな進展をもたらすものであり、今後、高齢者社会を襲う脳神経疾患の対応に重要なメッセージになると考える。

研究成果の概要（英文）：

Since it discovered that the substance which expands the projection of a nerve cell from *Candida* yeast, and supports growth existed, chemical synthesis was performed based on the composition and structure (with the similar object of NAD, a molecular weight is 663), and synthetic compound was obtained. The obtained compound expanded notably the projection of the rat central-nerves cell and the human origin nerve cell (NB-1). Moreover, it was checked that a series of gene clusters which participate in extension of a nerve projection of any cell, substance transportation, microtubule stability, etc.

are revealed strongly.

Compound which is proposed in this research differs from any which are reported so far completely, peptide and the lipid is not included, it is possible to synthesize easily. The synthetic compound brought about extension of a projection of a nerve cell, and extension of survival of the cells which is in a starvation situation. As for this result, protection of the nerve cell which has a synthetic compound under various diseases of the nervous system, especially an ischemia situation, restoration, reproduction, etc. are expected to demonstrate an effect, and leading to creation of a new diseases-of-the-nervous-system curative medicine is suggested.

Patent application No.2010-154279 PCT: PCT/JP2011/002319

The applicable field of the compound proposed by this research is as follows. Diseases-of-the-nervous-system medical treatment, medicine development, regenerative medicine, a cell technology, neuronal physiology, neuroscience, etc.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：酵母、*Candida*、NAD、神経細胞、分化誘導

#### 1. 研究開始当初の背景

申請者は長年に亘り真核生物の一種である真菌 *Candida albicans* (以下 *C. albicans* と略) の二形性に関する研究に取り組んできた。この菌はその形態が生育環境を認識して酵母型から菌糸型へ、あるいは菌糸型から酵母型と変化して増殖する。生物の細胞や組織が生育、増殖にともなって形態を変化させる現象すなわち「分化」は多く知られているが、研究を進める過程で *C. albicans* 菌体の形態変化は「分化」そのものであり、真核生物の細胞分化を研究する上での有用なモデルとなりうるのではないかと考えてきた。さらに、*C. albicans* 菌体内に細胞分化を制御する物質の存在がうかがわれたので、大量培養して得た菌体から物質の分離に取り掛かり、目的物質の検索・分離を行ってきた。分離された物質を NMR、LC/MS・MS などにより分析した結果、それは NAD の新規誘導体であることがわかった。本研究を通してこの物質の化学合成を行い、その精度と構造の確認ならびに生

物活性を確認する予定にある。

一方、神経細胞は「分化」が完了しているとの考え方が一般的であるが、神経突起の伸長や神経再生は「分化」そのものであり、近年、神経の再生技術や再生医療が注目される中、*C. albicans* 菌体から発見した新規物質の分化誘導能はきわめて興味深い。なぜならば、ヒトの細胞も真菌 *C. albicans* もいずれも真核細胞に属する生物で、生理、代謝など細胞生物学的に共通する部分が多く、新規物質が神経細胞に対して分化をもたらす可能性が極めて高いからである。この作用は神経疾患治療のための新薬創製にも繋がると考えている。

#### 2. 研究の目的

以下の項目を遂行することを目的として本研究を行う。

- 1) *C. albicans* 菌体から発見した新規物質を化学合成する。
- 2) 合成標品の神経細胞に対する効果として、形態変化とサバイバル効果について調べる。

- (1) ラット神経細胞の神経突起伸長効果を形態変化観察で確認する。
- (2) 培養神経細胞の神経突起伸長効果を調べる。
- (3) 飢餓環境における神経細胞の生存延長効果を調べる。
- (4) 合成標品添加により、神経細胞の形態変化に伴う遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析により確認する。

### 3. 研究の方法

#### 平成 21 年度

菌体から分離された新規物質はNMR および LC/MS 分析の結果、C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>14</sub>P<sub>2</sub>, MW : 663 と決定されたので、素材として、ニコチンアミドやアデノシン、リボースなどを用い、レトロ合成方法により化学合成標品を得る。

#### 1) 化学合成と手順

1. アデノシン及びニコチンアミドのモノヌクレオチドのリボースそれぞれのD・L 体や  $\alpha$ ・ $\beta$  体を合成する。
2. アデニン及びニコチンアミドのアミノ基をBOC 基により保護する。
3. リボース 5 位のアセチル基の選択的脱保護を行う。
4. それぞれのリボース 5 位のモノリン酸化を行う。
5. DCC で縮合し、アセチル基及びBOC 基の脱保護を行う。

#### 2) 合成標品の精製

1. 酸処理活性炭顆粒に合成標品を吸着させたのち、30~50%アセトンで溶出させ、純度を検定する。
2. 限外ろ過用メンブランフィルター（排除分子量：1,000）に合成標品を通過させて、ろ液あるいは上清のUV 吸収を測定し、純度を検定する。
3. 高純度の標品を得る手段を決定したのちに、NMR およびLC/MS にて分析する。

#### 平成 22 年度

22 年度は、化学合成によって得られた標品を用いて神経細胞の形態変化とサバイバル効果について試験を行う。

#### 平成 23 年度

1) 前年度に引き続き、合成標品による神経細胞の形態におよぼす効果と形態変化、特に神経突起の伸長に関する遺伝子群の発現を DNA マイクロアレイにより解析する。

2) 研究の総括を行う。

### 4. 研究成果

*Candida* の生育形態を酵母形から菌糸形に変化させる能力を有する物質を *Candida* の菌体から発見した。その組成分析と構造解析の

結果に基づいて物質を化学合成し、NAD の類似体である L-RibNAD を化学合成した。合成手順を図 1 に示している。(L-RibNAD : NAD のニコチン酸に結合するリボースが L-リボースになっている。分子量 : 663)

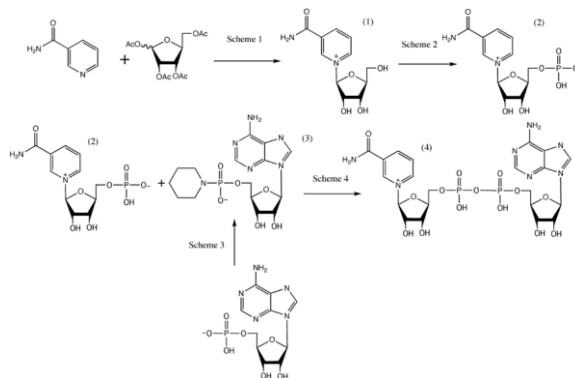


図 1 L-RibNAD の合成手順

得られた合成標品の神経細胞に対する作用について、in vitro での試験を行った。試験

結果は以下のとおりである。

1) ラット胎児脳神経細胞（初代培養細胞）に対する効果。

① 合成標品の添加量 (0.01~1  $\mu$ g/ml) に比例して神経突起が対照と比較して約 1.5 倍の長さには伸長することが観察された。また、神経突起の分岐数も増加することが分かった。さらに、伸長した神経突起の表面には多数のバヨシティーが形成され、シナプス形成の体制が整っていることも伺われた。(図 2)

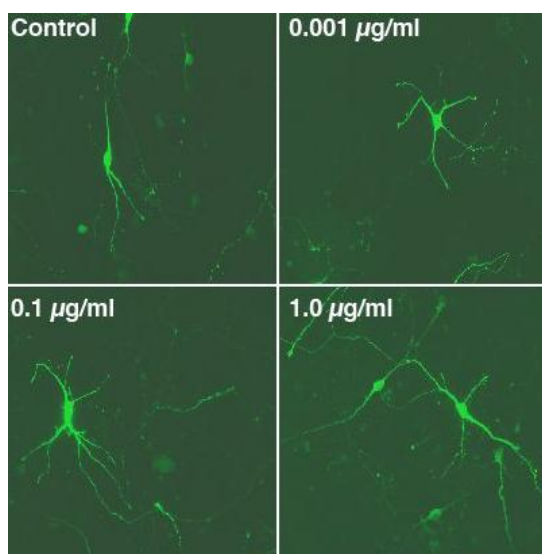


図 2 ラット胎児脳神経細胞に対する効果

②ラット胎児脳神経幹細胞を分化誘導培地で培養し、これに合成標品を添加して培養した結果、合成標品は神経幹細胞をニューロンあるいはグリア細胞へと特定の細胞に分化させることはなく、神経突起の伸長をもたらすことが分かった。

2) ヒト由来神経芽腫細胞 (NB-1) に対する効果。

①NB-1を飢餓環境で培養し、細胞の形態、特に神経突起の伸長とサバイバルについて合成標品の効果を調べた。この結果、合成標品を0.5~1 μg/ml添加すると、神経突起は顕著に伸長し、神経突起によるネットワークが形成されることが観察された。また、合成標品添加例では細胞の生存日数が約、1.7倍延長され、サバイバル効果も確認された。(図2)

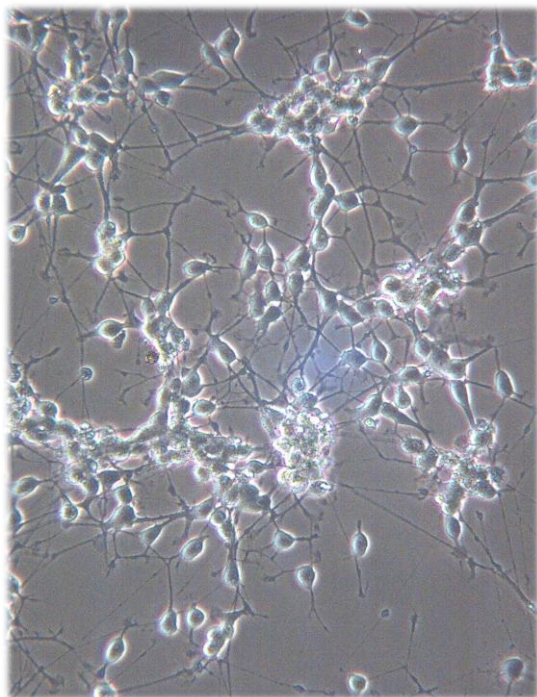


図2 ヒト由来神経芽腫細胞に対する効果

3) DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析  
ラット胎児脳神経細胞およびNB-1に合成標品を添加して培養し、培養2~4日にRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った。この結果、いずれの細胞においてもNervous System Development and Functionに関与する一連の遺伝子群 (Kinesin、Dhx 9、KIF5 c、MAP2、tau Proteinなど) が顕著に発現することを認めた。

4) この研究で神経細胞の突起を伸長させ、飢餓環境においてはサバイバル効果を発揮

する物質を合成することができた。この成果は神経疾患治療薬の創製に新たな進展をもたらすものであり、今後、高齢者社会を襲う脳神経疾患の対応に重要なメッセージになると考える。

新規合成 NAD 類似体、L-RibNAD、の研究結果を要約すると、以下のとおりである。

- 1) L-RibNAD は容易に合成できる。
- 2) 細胞毒性は極めて低い。
- 3) 神経細胞の突起を顕著に伸長させる。
- 4) 神経細胞の突起の分岐数を増加させる。
- 5) 神経組織・細胞のネットワーク形成を促進させる。
- 6) 培養脳神経細胞に対して Nervous System Development and Function に関与する一連の遺伝子群を顕著に発現させる。
- 7) 栄養を極度に制限し、飢餓状況下で培養した神経細胞の突起を顕著に伸長させる。
- 8) 栄養を極度に制限し、飢餓状況下で培養した神経細胞の生存を延長させる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

長 環、上西秀則 7. 口腔内真菌と全身疾患 化学療法領域 査読なし Vol. 27、2011、81-85

[学会発表] (計0件)

[図書] (計1件)

上西秀則、井上雅博、山中武志  
クインテッセンス出版株式会社  
Microbiology 微生物学 2012、181

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 神経突起伸長剤

発明者: 上西秀則

権利者: 上西秀則

種類: 特許

番号: 特願 2010-154279

出願年月日: 平成 22 年 7 月 6 日

国内外の別: 国内

名称: Neurite Outgrowth Agent

発明者: Hidenori KAMINISHI

権利者: Hidenori KAMINISHI

種類: 特許

番号: PCT/JP2011/002319

出願年月日: 平成 23 年 4 月 20 日

国内外の別: 国外

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上西秀則 (HIDENORI KAMINISHI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：90084300

### (2) 研究分担者

今吉 理恵子 (RIEKO IMAYOSHI)  
福岡歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：80320331  
長 環 (TAMAKI CHO)  
福岡歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：90131870

### (3) 連携研究者

金城 順英 (JYUNEI KINJYOU)  
福岡大学・薬学部・教授  
研究者番号：00161612  
土橋 良太 (RYOUTA TSUCHIHASI)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号：00369026  
池田 剛 (TSUYOSHI IKEDA)  
熊本大学・薬学部・准教授  
研究者番号：80295138