

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

食餌制限による寿命延伸の分子機構の解明と低栄養状態の予防法開発を目指す研究
(19-15)

主任研究者 赤木 一考

国立長寿医療研究センター 組織恒常性研究 PT (プロジェクトリーダー)

研究要旨

超高齢化社会を迎えている我が国において、高齢者が陥りやすい「低栄養」は、筋肉量の低下や認知機能の低下とも密接に関係しており、健康寿命延伸のために解決しなければならない重要な課題である。低栄養状態に陥る原因としては、社会的、心理的要因など様々であるが、加齢による腸機能の低下も要因の一つであると考えられる。しかし、その分子機構についてはほとんど明らかにされていない。また、食餌制限(低栄養状態に陥らないレベル)は、寿命延伸効果だけでなくサルコペニアの予防効果が知られているが、その分子メカニズムについては不明な部分が多く残されている。

主任研究者は、これまでに老化研究における重要なモデル生物であるショウジョウバエのシステムを用いて、食餌制限によって加齢に伴う腸透過性の上昇が抑えられることが寿命延伸に寄与していることなどを明らかにしてきた(Akagi et al., *PLOS Genetics*, 2018)。その研究過程において、食餌制限下では、腸管において複数の膜貫通型トランスポーターの発現が優位に上昇していることが明らかになった。したがって、食餌制限による寿命延伸効果や筋肉量の維持に、腸管でのトランスポーターの発現が重要な役割を持つ事が考えられた。そこで、研究初年度である2019年度は、食餌制限下で発現が上昇していた複数のトランスポーターの中から、食餌制限による寿命延伸効果に寄与していると考えられる候補遺伝子の選定を行い、その役割について解析した。

主任研究者

赤木 一考 国立長寿医療研究センター 組織恒常性研究 PT (プロジェクトリーダー)

分担研究者

なし

A. 研究目的

本研究では、食餌制限に応答するトランスポーターの中から寿命の延伸および低栄養の予防・改善に働く可能性のある因子を同定し、そのパスウェイで働く特定の栄養素および代謝物を同定することを目的としている。本研究によって、加齢に伴う低栄養状態の実態について栄養吸収の観点から分子レベルで明らかにすることができるとともに、低栄養状態に付随したフレイルやサルコペニア、さらには認知症の予防法開発へ貢献できると考えられる。

B. 研究方法

(1) 食餌制限による寿命延伸効果に寄与していると考えられる候補トランスポーターの選定について

主任研究者が事前に行ったマイクロアレイ解析の結果から、食餌制限によって腸管で発現が上昇する膜貫通トランスポーターをコードする 56 遺伝子を同定していた。それらの中から、発現量が 3 倍以上上昇した遺伝子を選択し、21 遺伝子に絞り込んだ。それらの遺伝子について、加齢や栄養条件に伴う発現の変化を観察するため、高栄養 (AL) 条件 (エサ中のタンパク源 5%) および食餌制限 (DR) 条件 (エサ中のタンパク源 0.5%) で飼育した若齢または老齢ショウジョウバエの腸管を用いて qRT-PCR を行なった。

(2) 候補遺伝子 *dmGlut* の発現パターンについて

(1) の結果から、本研究で注目するトランスポーターとして、グルタミン酸トランスポーターである *dmGlut* を選定した。そこで、*dmGlut* が発現している組織を明らかにするため、AL および DR 条件下で飼育した個体を解剖し、脳、筋肉、脂肪体 (哺乳類の肝臓に相当)、腸管における *dmGlut* の発現を qRT-PCR 法を用いて調べた。

次に、腸管における *dmGlut* の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法および *dmGlut-GFP* レポーター系統を用いて調べた。

(3) 食餌制限による寿命延伸効果における *dmGlut* の重要性について

DR 条件下における腸管での *dmGlut* の発現上昇が、DR による寿命延伸効果に寄与するかどうかを明らかにするため、腸管特異的に *dmGlut* の発現を RNAi によりノックダウンし、寿命への影響を調べた。

(4) 寿命制御における食餌由来グルタミン酸の重要性について

グルタミン酸そのものに寿命調節効果があるかどうかを検討するため、AL 条件 (エサ中のタンパク源 5%)、DR 条件 (エサ中のタンパク源 0.5%)、低栄養条件 (エサ中のタンパク源 0% または 0.1%) のエサに 1% グルタミン酸を添加し、寿命への影響を調べた。

また、同様の条件下で、認知機能・筋力の指標として用いられるクライミングアッセイを行った。クライミングアッセイとは、ショウジョウバエが飼育バイアルを登る反走地性を利用し、自発活動量を定量的に測定する手法である。

(倫理面への配慮)

本研究の研究対象はショウジョウバエであるため、人権保護や倫理面に配慮する必要のある研究は含まれていない。

C. 研究結果

(1) 食餌制限による寿命延伸効果に寄与していると考えられる候補トランスポーターの選定について

マイクロアレイ解析の結果から抽出したトランスポーターをコードする 21 遺伝子について、AL 条件および DR 条件で飼育した若齢 (day 14)、中齢 (day 28)、老齢 (day 42) 個体の腸管を用いて qRT-PCR を行った。その結果、それらの遺伝子の発現は、3つのカテゴリーに区分できることがわかった。すなわち、Class 1 : AL では加齢に伴い発現が低下するが、DR では発現が維持される、Class 2 : AL、DR 共に加齢に伴い発現が低下する、Class 3 : AL、DR 共に加齢に伴い発現が増加するという 3つである。我々は、これらの中でも特に Class 1 に区分される遺伝子に注目し、*dmGlut* (Dietary and metabolic glutamate transporter) というグルタミン酸輸送に関わるトランスポーターを本研究の候補遺伝子として見いだすことができた (図 1)。

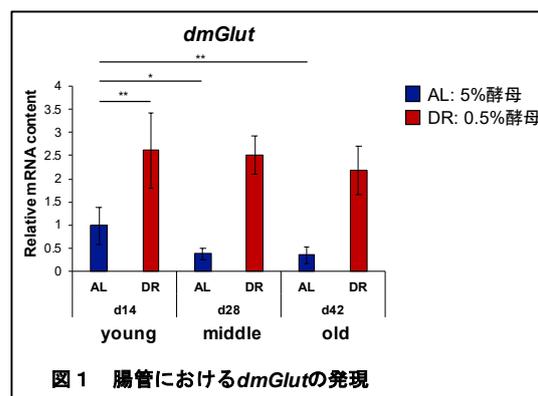


図 1 腸管における *dmGlut* の発現

(2) 候補遺伝子 *dmGlut* の発現パターンについて

本研究の候補遺伝子として同定した *dmGlut* が発現している組織を明らかにするため、AL および DR 条件下で飼育した個体を解剖し、脳、筋肉、脂肪体 (哺乳類の肝臓に相当)、腸管における発現を qRT-PCR 法を用いて調べた。その結果、*dmGlut* は、脳、筋肉、脂肪体においても低いレベルで発現していることがわかった。しかし、それらの組織においては、栄養状態の違いによる発現レベルの変化は観察さ

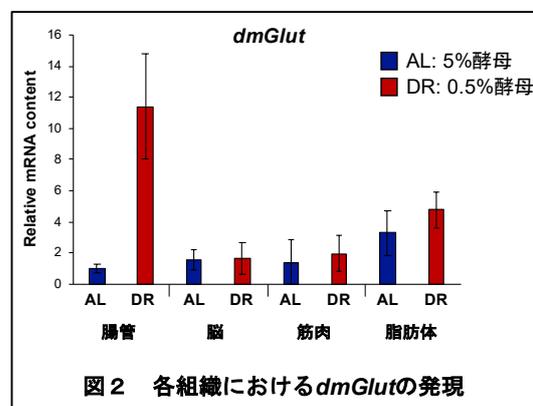


図 2 各組織における *dmGlut* の発現

れなかった。一方で、腸管においては、*dmGlut* の発現が DR 特異的に 10 倍以上も上昇することが明らかになった (図 2)。

次に、腸管における *dmGlut* の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法および *dmGlut-GFP* レポーターシステムを用いて調べた。その結果、*dmGlut* は、中腸前部 (anterior midgut) の後方、および中腸後部 (posterior midgut) 全体にわたって発現していることがわかった。同様の発現パターンが、*in situ* ハイブリダイゼーション法および *dmGlut-GFP* レポーターシステムを用いた方法それぞれで観察された。

(3) 食餌制限による寿命延伸効果における *dmGlut* の重要性について

DR 条件下における腸管での *dmGlut* の発現上昇が、DR による寿命延伸効果に寄与するかどうかを明らかにするため、腸管特異的に *dmGlut* の発現を RNAi によりノックダウンし、寿命への影響を調べた。その結果、腸管特異的な *dmGlut* のノックダウンによって、DR による寿命延伸効果が減弱することが明らかになった (図 3)。

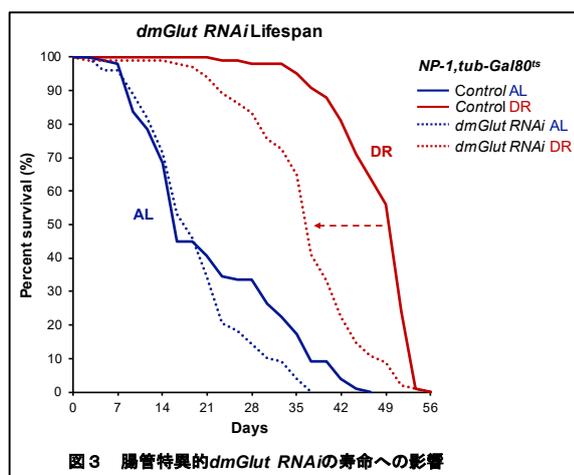


図 3 腸管特異的 *dmGlut* RNAi の寿命への影響

(4) 寿命制御における食餌由来グルタミン酸の重要性について

腸管特異的な *dmGlut* のノックダウンによって、DR による寿命延伸効果が減弱することから、食餌由来のグルタミン酸が寿命調節に関わる可能性が考えられた。そこで、AL、DR および低栄養条件のエサにグルタミン酸を添加し、寿命への影響を調べた。まず、エサ中のタンパク源がほぼ存在しない低栄養条件では、寿命の著しい短縮が観察された。次に、各条件にグルタミン酸を添加すると、DR 条件においては寿命の変化は観察されなかったものの、驚くべきことに、低栄養条件においては、グルタミン酸添加によって劇的に寿命が延伸することがわかった。

一方で、AL 条件にグルタミン酸を添加すると、寿命の短縮が観察された (図 4)。

同様の条件においてクライミングアッセイを行った結果、興味深いことに、低栄養条件のエサにグルタミン酸を添加すると、加齢に伴う自発活動量の低下が劇的に改善することがわかった。

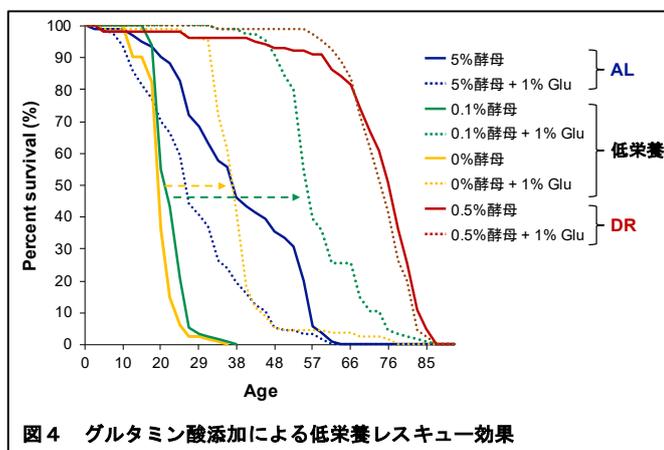


図 4 グルタミン酸添加による低栄養レスキュー効果

D. 考察と結論

2019年度の研究によって、DRにより腸管での発現が上昇した膜貫通型トランスポーター56遺伝子の中から、本研究の候補遺伝子として *dmGlut* (Dietary and metabolic glutamate transporter) というグルタミン酸トランスポーターを選出した。*dmGlut*の発現パターンの解析から、本遺伝子はDRに応答して腸管特異的に発現が上昇することがわかり、食餌制限時の栄養吸収に重要な役割を持つことが示唆された。実際に、腸管特異的に *dmGlut* の発現をRNAiによりノックダウンした結果、DRによる寿命延伸効果が減弱することから、DR条件下では、*dmGlut* を介した食餌由来グルタミン酸の吸収が寿命延伸効果に重要であることを示している。一方、腸管特異的な *dmGlut* のノックダウンにおいて、DRによる寿命延伸効果は部分的にしかキャンセルされなかった。このことは、DRによる寿命延伸効果に *dmGlut* とは別の因子も関わっていることを示唆している。そこで我々は、ショウジョウバエ腸管で発現する別のグルタミン酸トランスポーター *EAAT1* の発現をqRT-PCR法を用いて調べた。その結果、*dmGlut*と同様、*EAAT1*の発現もDRに反応して腸管で上昇することがわかった。そこで現在、腸管特異的に *dmGlut* と *EAAT1* の両方をノックダウンし、寿命への影響を調べる準備を行なっている。

本研究において我々は、食餌由来グルタミン酸に寿命延伸効果、ならびに低栄養状態の改善効果があることを示す結果を得ることができた。しかし、AL条件にグルタミン酸を添加した際には、寿命の短縮が観察された。この結果は、グルタミン酸の神経興奮毒性によるものだと考えられるが、現在解析中である。いずれにしても、これまでの結果から、食餌由来グルタミン酸の適切な利用が、寿命の延伸および低栄養状態の改善に重要であることが示唆された。したがって、2020年度は、*dmGlut* や *EAAT1* の機能解析を中心として、腸管から吸収された食餌由来のグルタミン酸がどのようにデリバリーされ、どこの組織で利用されるのか、詳細に解析していきたいと考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 赤木一考

食餌制限による腸管恒常性維持機構と老化制御

第 92 回 日本内分泌学会学術総会、2019 年 5 月 9～11 日、仙台市（招待講演）

2) 赤木一考

Understanding the Molecular Basis of Age-related Malnutrition

The 4th MORPHOMEOSTASIS MEETING、2019 年 9 月 22～23 日、札幌市

3) Kazutaka Akagi

The role of Prefoldin 6 on intestinal homeostasis and aging in *Drosophila melanogaster*

The 11th International Association of Gerontology and Geriatrics Asia/Oceania Regional Congress, October 23-27, 2019, Taipei

4) Kazutaka Akagi

Dietary restriction, tissue homeostasis and aging

第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 3～6 日、福岡市（招待講演）

5) 原田綾乃、Trindade Lucas、赤木一考

世代を超えた長期間に渡る食餌制限は、腸管恒常性維持に働く

第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 3～6 日、福岡市

6) 上田均、宮川航一、Aly Hamdy、赤木一考、影山裕二

短いペプチド Polished rice はショウジョウバエ蛹化タイミングを決める生物タイマー機構に関与する重要因子である

第 42 回日本分子生物学会年会、2019 年 12 月 3～6 日、福岡市

7) Ayano Harata, Kazutaka Akagi

Glutamate transporters contribute to the lifespan extension upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster*

第 1 回 CIBoG リトリート、2020 年 2 月 7～8 日、大府市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし