

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

食餌制限は、霊長類を含む多くの生物で疾病予防効果、寿命延伸効果があることが明らかにされている。近年では、臨床研究によってヒトにおいても同様の効果を示すことが明らかにされつつあり、食餌制限は生物の生存戦略として進化的に保存されたシグナリングパスウェイを利用した、最も頑強な介入法であると言える。しかし、後期高齢者においては、食餌制限が低栄養、サルコペニア、フレイルの進行を加速させる危険性が考えられる。したがって、ライフステージに応じた必要栄養素を効率的に摂取または利用するための医薬品開発が必要である。高齢者が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。

主任研究者は、これまでに老化研究の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。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、*dmGlut* (Dietary and metabolic glutamate transporter) というグルタミン酸トランスポーターを見出した。そして、遺伝学的な解析から *dmGlut* が食餌制限による寿命延伸に必要であることを示した。また、食餌由来グルタミン酸の寿命制御における重要性が明らかになった。2020年度は、寿命制御に関わるグルタミン酸代謝物を同定するためメタボローム解析を行なった。さらに、各組織におけるグルタミン酸量を定量したところ、食餌由来グルタミン酸は脳で優先的に利用されていることが示唆された。現在、腸と脳をつなぐシグナルについて解析を進めている。

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。具体的には、下記3つの Aim について、研究を行う。

Aim 1: 腸管におけるトランスポーターの加齢および栄養依存的な発現の変化

Aim 2: 腸管におけるグルタミン酸トランスポーターの発現と寿命の関係

Aim 3: 腸管トランスポーターを介した組織間相互作用

B. 研究方法

Aim 1: 腸管におけるトランスポーターの加齢および栄養依存的な発現の変化

1-1. 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。

Aim 2: 腸管におけるグルタミン酸トランスポーターの発現と寿命の関係

2-1. 候補遺伝子 *dmGlut* の発現パターンについて

上記の結果から、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。

2-2. 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。

2-3. 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。

Aim 3: 腸管トランスポーターを介した組織間相互作用

3-1. 食餌由来グルタミン酸の各組織における利用について

腸管から吸収されたグルタミン酸がどこの組織で利用されるのか明らかにするため、グルタミン酸測定キットを用いて、脳、筋肉、脂肪体、腸管におけるグルタミン酸存在量を測定した。

また、脳におけるグルタミン酸の利用が、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、脳特異的にグルタミン酸受容体 (*mGluR*) 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。

3-2. 寿命制御に関わるグルタミン酸中間代謝物の探索について

寿命制御に関わる食餌由来グルタミン酸中間代謝物を同定するため、CE-TOFMS によるメタボローム解析（ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ受託）を行なった。サンプルは、DR、低栄養、低栄養+グルタミン酸の条件で飼育した若齢ショウジョウバエの全身個体を用いた。

（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

Aim 1: 腸管におけるトランスポーターの加齢および栄養依存的な発現の変化

1-1. 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。

Aim 2: 腸管におけるグルタミン酸トランスポーターの発現と寿命の関係

2-1. 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。

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。

2-2. 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。

2-3. 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。

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。

Aim 3: 腸管トランスポーターを介した組織間相互作用

3-1. 食餌由来グルタミン酸の各組織における利用について

dmGluT を介して吸収される食餌由来グルタミン酸が、寿命制御や筋・神経機能の維持に重要であることが明らかになったため、腸管から吸収されたグルタミン酸がどこの組織で利用されるかについて解析した。その結果、低栄養条件で 14 日間飼育した後、一過的にグルタミン酸を給餌すると、そのグルタミン酸のほとんどが脳で利用されることがわかった。そこで、脳特異的にグルタミン酸受容体 (*mGluR*) 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、脳特異的な *mGluR* 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。

3-2. 寿命制御に関わるグルタミン酸中間代謝物の探索について

腸管から吸収されたグルタミン酸は、そのままの状態ではなく代謝されて働くことが予想される。そこで、DR、低栄養、低栄養+グルタミン酸の条件で飼育した個体を用いて、メタボローム解析を行った。その結果、低栄養+グルタミン酸の条件では、複数の代謝物が DR 条件時と同じ挙動を示すことが明らかになった。

D. 考察と結論

前年度の研究によって、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見出した。遺伝学的手法を用いた機能解析の結果、*dmGluT* を介した食餌由来グルタミン酸の吸収が DR による寿命延伸効果に重要であることが示唆された。さらに、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。

本年度は、腸管から吸収されたグルタミン酸の各組織での利用について、特に注目して解析を行なった。興味深いことに、食餌由来グルタミン酸のほとんどが脳で利用されてい

ることがわかり、グルタミン酸の吸収と輸送に関して腸と脳でネットワークを形成していることが示唆された。一方で、食餌由来グルタミン酸そのものではなく、脳でグルタミン酸を再合成している可能性も考えられる。したがって、メタボローム解析の結果も含めて今後詳細に解析していく予定である。

本研究によって、加齢に伴い腸管グルタミン酸トランスポーターの発現が低下することや、グルタミン酸およびその代謝物に低栄養の予防・改善効果がある可能性が示唆された。よって、今後はマウスモデルやヒト小腸オルガノイドモデルを用いることで、哺乳類でも同様のメカニズムが存在するのかについて検討していきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sharma A.^{†*}, Akagi K.^{†*}, Pattavina B, Wilson K.A., Nelson C., Watson M., Maksoud E., Harata A., Ortega M., Brem R.B., Kapahi P*. *Musashi* expression in intestinal stem cells attenuates radiation-induced decline in intestinal permeability and survival in *Drosophila*. ***Scientific Reports***, 10:19080, 2020 (†Co-first author, *Co-corresponding author)

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
 マー機構に關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
- 8) Ayano Harata, Kazutaka Akagi
 Glutamate transporters contribute to the lifespan extension upon dietary
 restriction in *Drosophila melanogaster*
 第 43 回日本基礎老化学会大会, 2020 年 5 月 27~28 日, 長崎市 (誌上開催)
- 9) Tada H, Yasuda K, Nakashima A, Suzuki K, Tokunaga A, Akagi K
 Paramylon, a β -1,3-Glucan from *Euglena gracilis*, extends lifespan and
 diminishes age-related neuromuscular decline
 第 43 回日本基礎老化学会大会, 2020 年 5 月 27~28 日, 長崎市 (誌上開催)
- 1 0) 多田敬典, 元井章智, 元井里奈, 赤木一考
 露地栽培アガリクス(KA21 株)の寿命、筋・神経系に対する効果の検討
 第 100 回日本獣医麻酔外科学会学術集会, 2020 年 6 月 21 日, オンライン開催
- 1 1) 多田敬典, 元井章智, 元井里奈, 赤木一考
 露地栽培アガリクス(KA21 株)の加齢性運動機能低下に対する効果の検討
 第 20 回日本抗加齢医学会総会, 2020 年 9 月 25~27, オンライン開催
- 1 2) Kazutaka Akagi, Amit Sharma, Ayano Harata, Pankaj Kapahi
Musashi expression in intestinal stem cells attenuates radiation-induced decline in intestinal
 permeability and survival in *Drosophila*
 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月 2~4 日, オンライン開催(招待講演)
- 1 3) Ayano Harata, Kazutaka Akagi
 The role of glutamate upon dietary restriction on aging in *Drosophila*
 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月 2~4 日, オンライン開催(招待講演)

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