

## 長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告

### 食餌制限の寿命延伸効果におけるショウジョウバエ腸管グルタミン酸トランスポーターの役割の解明に関する研究 (20-49)

主任研究者 原田 綾乃 国立長寿医療研究センター 組織恒常性研究 PT (研究員)

#### 研究要旨

食餌制限 (Dietary restriction: DR) は、様々な動物種において寿命延伸効果をもたらすことが広く知られており、加齢に伴って生じる疾患の予防にも効果があることが知られている。DR の作用機序を理解することは、健康寿命延伸の介入に役立つことが期待されるが、詳細な分子機構については未だ未解明な点が残されている。我々は、ショウジョウバエを用いて、DR の作用機序を明らかにすることを目的として本研究を行なっている。その研究過程において、ショウジョウバエの腸管では DR 特異的に複数の膜貫通型トランスポーターの発現が上昇するという結果が得られた。したがって、DR による寿命延伸効果に腸管でのトランスポーターの発現が重要な意味を持つと考えた。本研究では、高栄養 (*Ad libitum*; AL) 条件下では加齢に伴って発現が低下するが、DR 条件下では高い発現を維持していたグルタミン酸トランスポーターの役割に注目した。これらのグルタミン酸トランスポーターについて、寿命制御への関与を調べるために腸管特異的なノックダウンを行なった。その結果、DR における寿命延伸効果が短縮され、グルタミン酸トランスポーターの DR 依存的な寿命延伸効果への関与が示唆された。また、厳しいタンパク質制限によってもたらされた低栄養状態の餌にグルタミン酸を添加することによって寿命回復効果が見られるという興味深い結果を得ている。さらに、低栄養状態によって引き起こされた運動機能の低下が、このグルタミン酸の添加によって抑えられていた。

#### 主任研究者

原田 綾乃 国立長寿医療研究センター 組織恒常性研究 PT (研究員)

#### A. 研究目的

これまでの我々の研究結果から、DR がもたらす寿命延伸効果に腸管のグルタミン酸トランスポーターが重要な役割を持つことが考えられた。現在報告されている食餌制限に関する研究においては、腸管の栄養吸収やグルタミン酸トランスポーターに注目した研究は行われていない。そこで申請者は、「腸管におけるグルタミン酸トランスポーターの生理的役割」と「腸管で吸収されたグルタミン酸の組織恒常性維持における重要性」という新し

い観点から本研究を遂行した。これらを明らかにすることで、腸管の栄養吸収から食餌制限の作用機序の解明をすすめることを本研究の目的とした。

## B. 研究方法

### 腸管グルタミン酸トランスポーターの生理的機能の解析

我々が行った先行研究では、AL 条件下では加齢に伴って発現が低下するが、DR 条件下では高い発現を維持していた複数の膜貫通型トランスポーターが示された。そのうち、寿命の制御に関与することが示唆されたグルタミン酸トランスポーターに注目して解析を行うこととした。まず、注目しているグルタミン酸トランスポーターが寿命の制御に関わるか否かを検討するために、Gal4/UAS システムを用いて標的遺伝子のノックダウンを行い寿命への影響を調べた。グルタミン酸トランスポーターは、腸管の栄養吸収を担っている腸細胞で発現することが明らかになっているため、腸細胞特異的に Gal4 を発現することのできる Np1-Gal4 システムを用い、AL 条件下、DR 条件下それぞれについて寿命への影響を調べた。次に、グルタミン酸トランスポーターのノックダウンによる影響を細胞レベルで詳しく調べ、DR における寿命延伸のメカニズムの解明を試みた。

### 腸管恒常性維持におけるグルタミン酸の重要性の解析

グルタミン酸トランスポーターの生理的役割の解明に次いで、グルタミン酸が持つ腸管恒常性維持における重要性についても解析を進めた。申請者は、厳しいタンパク質制限によってもたらされた寿命の減弱は、グルタミン酸を餌に添加することで寿命の大幅な回復がみられるという、興味深い結果を得ていた。これより、グルタミン酸が寿命の制御や腸管の恒常性の維持に寄与していることが考えられた。食餌から摂取されたグルタミン酸は、腸細胞ではトランスポーターを介して細胞内へ取り込まれ、エネルギー代謝へと利用される。低栄養条件下では、腸細胞のエネルギー源であるグルタミン酸の欠乏により、細胞は ATP 産生量が低下することが予想され、細胞死の増加が考えられる。そこで、腸細胞におけるアポトーシスの有無を調べた。さらに、腸細胞の細胞死によって引き起こされる腸幹細胞の増殖について抗リン酸化 H3 抗体を用いて調べた。

#### (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

### 腸管グルタミン酸トランスポーターの生理的機能の解析

腸細胞特異的に Gal4 を発現することのできる Np1-Gal4 システムを用いて、グルタミン酸トランスポーターのノックダウンを行い、AL、DR 条件下それぞれにおける寿命への影響を調

べた。腸細胞特異的な *dmGlu* ノックダウンを行うと、どちらの条件下においても寿命の短縮がみられており、寿命制御に関与していることが示唆された。また、*Eaat1* ノックダウンについては、DR 条件下においてのみ寿命の短縮が見られた。

次に、それぞれのグルタミン酸トランスポーターのノックダウンを行うことで引き起こされる、腸管恒常性への影響を細胞レベルで調べた。グルタミン酸が腸細胞へと取り込まれなくなることで、細胞内のエネルギー源となるグルタミン酸が減少し、細胞死が引き起こされ、それらの腸細胞からサイトカインが分泌されることで、腸幹細胞の増殖が増加し、腸管の恒常性が崩れることが考えられた。そこで、それぞれの遺伝子のノックダウンにおいて、腸幹細胞の増殖をリン酸化ヒストン H3 抗体 (pH3 抗体)を用いて調べた。その結果、AL、DR 両条件下で、pH3 陽性の腸幹細胞の増加が確認されたが、*dmGlu*、*Eaat1* それぞれのノックダウンにおいて、AL、DR 両条件下共にコントロールとの有意な差は認められなかった。さらに、*dmGlu*、*Eaat1* それぞれのノックダウンにおける腸管のアポトーシスへの影響について、SYTOX Orange によって死細胞の検出を行なった。死細胞数は、AL、DR どちらの条件下においても、ノックダウンとコントロールに有意な差はなかった。これらの結果から、グルタミン酸トランスポーターのノックダウンは、腸管恒常性へは影響を及ぼしていないことが示された。

#### 腸管恒常性維持におけるグルタミン酸の重要性の解析

グルタミン酸トランスポーターの生理的機能の解明に加え、グルタミン酸の老化制御における役割や腸管恒常性維持における重要性についても解析を進めてきた。これまでに本研究では、厳しいタンパク質制限によってもたらされた低栄養状態 (0% yeast; 0YE)の餌に、グルタミン酸を添加 (0YE+Glutamate,Glu)することで減弱した寿命が大きく回復するという結果を得ていた。さらに、他の非必須アミノ酸添加を行い、寿命の比較を行ったところ、グルタミン酸の添加が最も寿命を回復させるという興味深い結果を得ている。

まず、グルタミン酸添加による腸細胞への効果を調べるために、腸細胞における細胞死や腸幹細胞の細胞増殖を調べた。腸細胞特異的にカスパーゼ基質である PARP を発現させるプローブを用い、切断型 PARP 抗体 (cleaved PARP) で検出した。その結果、0YE、0YE+Glu 共に、1 週間以内の腸管で cPARP 陽性の細胞が検出された。どちらの条件でも腸管が著しく細くなっており、栄養素が不十分のため腸管全体で細胞死が生じ、腸管のサイズが変化することが示唆された。次に、それぞれの条件下で、7日おきに 21 日目まで調べたところ、cPARP 陽性細胞の数に大きな差はなく同程度検出された。したがって、0YE と 0YE+Glu では、cPARP 陽性細胞の数に有意な差は見られず、グルタミン酸を加えたことによる細胞死への影響は示されなかった。さらに、腸細胞の細胞死によって引き起こされる腸幹細胞の増殖について pH3 抗体を用いて調べた。pH3 陽性細胞は、どちらの条件下でも検出されたが、0YE と 0YE+Glu における有意な差は見られず、この点に関しても、グルタミン酸による効果は明らかになっていない。7 日目では、すでに腸管のサイズが著しく変化しているた

め、早い時期に生じる細胞死や腸幹細胞の増殖について、詳細に調べることで、腸管恒常性の維持におけるグルタミン酸の役割を明らかにできると考えている。

#### D. 考察と結論

腸管において AL 条件下では、加齢に伴って発現が低下するが DR 条件下では高い発現を維持していたグルタミン酸トランスポーター、*dmGlut*、*Eaat1* の DR がもたらす寿命延伸効果における役割について注目してきた。腸細胞特異的に *dmGlut* や *Eaat1* のノックダウンを行うと DR による寿命延伸効果が減弱したことから、グルタミン酸トランスポーターが食餌制限の寿命延伸効果に重要な役割を持つことが示唆された。グルタミン酸トランスポーターの生理的役割について腸管恒常性に注目し、腸細胞における細胞死や腸幹細胞の細胞増殖について調べたところ、*dmGlut* や *Eaat1* のノックダウンを行なっても、AL、DR どちらの条件下においてもコントロールとの有意な差は見られなかった。これより、グルタミン酸トランスポーターと腸管の恒常性維持には直接的な関与は示唆されなかった。*dmGlut* や *Eaat1* のノックダウンによって低下することが予想されるグルタミン酸量や腸管以外の他の組織への影響についても今後、詳細に調べる必要があると考える。

グルタミン酸の持つ老化制御における役割や腸管恒常性の維持における重要性について解析を行った結果、低栄養状態の餌にグルタミン酸を添加することで、他の非必須アミノ酸よりも減弱した寿命の回復が大きいという結果を得た。グルタミン酸がもたらす腸管組織恒常性への効果について調べたところ、グルタミン酸添加による有意な効果はみられなかった。グルタミン酸を餌に添加することによるポジティブな効果が顕著に見られたのは運動機能であった。筋・神経機能を定量する方法であるクライミングアッセイを用いて、グルタミン酸添加における運動機能への影響を調べたところ、0YE+Glu では、0YE で見られた運動機能の急速な低下が抑えられることが分かった。したがって、腸管から吸収されたグルタミン酸またはその代謝物が筋・神経機能に作用することが明らかになった。さらに、餌へのグルタミン酸添加による代謝物の変化を調べるために、メタボローム解析を行った結果、0YE+Glu と DR 条件下では、クエン酸回路において同様の代謝産物が増加することが明らかとなった。今後、腸管恒常性の維持に加えて、腸管から取り込まれたグルタミン酸の代謝物がどのように利用されているのかについて、詳細に調べることで、老化制御におけるグルタミン酸の役割を明らかにできると期待している。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sharma A.<sup>†\*</sup>, Akagi K.<sup>†\*</sup>, 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) 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日～28日、長崎市 (備考：コロナウイルス感染症対策のため、誌上開催)

### 2) 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)

### 3) 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)

## 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