

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：43505

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K02376

研究課題名(和文)食品成分の生理活性を疾患モデルショウジョウバエで解明する

研究課題名(英文)Elucidating the physiological activities of food components using a Drosophila disease model

研究代表者

萱嶋 泰成 (Kayashima, Yasunari)

山梨学院短期大学・その他部局等・教授(移行)

研究者番号：90365453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：食品成分や生体成分の未知な生理活性作用について、ショウジョウバエを実験動物として使い、解析を行なった。

カカオに含まれる脂肪酸トリプタミドは、老化抑制や個体寿命の延伸にはたらくサーチュンを活性化させる可能性を明らかにした。脂肪酸の代謝に関わるカルニチンの摂取により、脂肪の代謝が促進される可能性を明らかにした。また、カルニチン摂取による生理作用は運動の有無によって異なる可能性が示唆されたため、実際にヒト臨床試験を行い、運動習慣との関連を明らかにした。ジペプチド分解酵素のCNDPについて、ショウジョウバエCNDP突然変異体系を新規に樹立し、CNDPが酸化ストレス応答に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食品成分のうち、人体にどのような生理活性作用を及ぼすのかわかっていない食品成分は多数存在する。それら食品成分の機能について、ショウジョウバエを用いて解析することによって、対象とする食品成分が多細胞生物に対して生理活性作用を持つのか、ヒトに対しても生理活性を有するのか、その生理活性は多細胞生物に普遍的な作用であるのかの知見を得ることができる。ショウジョウバエに対する生理活性が老化抑制機能や脂質代謝調節機能が示唆された場合、高等動物による実験や臨床試験を経て、ヒトにおける生活習慣病の発症予防や健康長寿維持への貢献に繋がる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the unknown physiological activity of food and its biological components using *Drosophila melanogaster* as an experimental animal.

We discovered that the fatty acid tryptamide contained in cacao may activate sirtuins, which inhibit aging and extend the lifespan of the individual. The study further demonstrated that the ingestion of carnitine, which is involved in fatty acid metabolism, may promote fat metabolism. Furthermore, as the physiological effects of carnitine intake may differ depending on the level of physical activity, we conducted human clinical trials to clarify its relationship with exercise habits. We established a new *Drosophila* CNDP mutant strain for the dipeptide-degrading enzyme CNDP and demonstrated that CNDP is involved in the oxidative stress response.

研究分野：食科学

キーワード：食情報 ショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに確立させたショウジョウバエによる食品成分の生理機能解析法を進め、機能未知であった食品成分の機能を明らかにし、食品成分の機能解析に適した疾患モデルショウジョウバエの更なる拡充を行う。

寿命延伸作用分子として知られている SIRT1 について、その活性促進を指標としてカカオ抽出物よりスクリーニングを行ったところ、脂溶性画分から強い活性を示す画分が得られ、精製した結果、脂肪酸トリプタミド (FA-Trp) であった。この FA-Trp が多細胞生物においても SIRT1 の活性化による老化抑制作用、寿命延伸作用をもたらすのか、ショウジョウバエで検証できる可能性があった。

生体内に存在するアミノ酸誘導体の一種であるカルニチンは、主に骨格筋や心筋などに多く存在しており、脂肪酸の代謝である β 酸化が行われるミトコンドリア内への脂肪酸の運搬を行っている。カルニチンは食品成分でもあり、羊肉や牛肉などの動物性食品に多く含まれている。脂肪酸の代謝に関わるということから、特に脂質代謝を中心として様々な生理活性作用があることが予想されるが、カルニチンの摂取による効果についてはわかっていないことが多く、効果を知るためには動物実験や臨床試験による更なる検証が必要であった。

食品成分の機能解析に適した疾患モデルショウジョウバエの候補として、ジペプチド分解酵素 CNDP を欠く新規な突然変異体系統を 1 系統樹立していた。既存の突然変異体系統 1 系統とともに、これらの系統が食品成分の機能解析に適した疾患モデルショウジョウバエとして利用できるのかを明らかにするためには、これらの突然変異体系統を用いて CNDP の生体内での役割について調べ、特に栄養代謝や生理機能維持に関わるのかを調べる必要があった。

2. 研究の目的

サーチェイン活性化が示唆されたカカオ由来成分 FA-Trp について、ショウジョウバエでサーチェインを介した老化抑制作用や寿命延伸作用の有無を明らかにする

カルニチン摂取による生体への効果を明らかにする

ショウジョウバエ CNDP 突然変異体系統が食品成分の機能解析に適した疾患モデルショウジョウバエとなり得るか検討する

3. 研究の方法

寿命延伸作用を検証するために、羽化後 12h 以内の未交尾雄成虫を集めて 4 群 (Control [通常餌], D-Trp [通常餌+ 700 μ M Docosanoic acid tryptamide 精製品], T-Trp [通常餌+700 μ M Tetracosanoic acid tryptamide 精製品], 100 μ M Res [通常餌+100 μ M Resveratrol]) にわけ、それぞれの餌で飼育し、3-4 日に 1 回、新しいエサと交換する際に死亡個体を確認することで各群の個体寿命を調べた。老化抑制作用の検証については、FA-Trp 含有餌 (対照として非含有餌) を作製し、羽化後 12h 以内の未交尾成虫を雌雄別で飼育し、4 日後、12 日後、20 日後、1 匹を 10ml メスシリンダーに入れ、叩いて下に落としたのちに 10 秒間で何センチ何ミリ登ったかを記録した (Climbing Assay)。それぞれの日に雌雄各 3 匹、1 匹につき 5 回行った。FA-Trp 摂取による遺伝発現量の変化について、羽化後 12h 以内の未交尾成虫を集め、3 群 (Control [通常餌], D-Trp [通常餌+ 700 μ M Docosanoic acid tryptamide 精製品], T-Trp [通常餌+700 μ M Tetracosanoic acid tryptamide 精製品]) にわけて飼育し、14 日後、TotalRNA を抽出して次世代シーケンサーにかけることで調べた。

動物実験: [個体寿命への影響を調べる実験] ショウジョウバエ飼育用の普通餌にカルニチンを含む餌を作製し、羽化後 12h 以内の未交尾オスの成虫だけを選別して餌の入ったバイアルに入れ、飼育を続けることでカルニチンを摂取させた。3 日から 4 日毎に新しい餌に交換する際、死亡個体をカウントして記録した。[運動能 (筋力) への影響を調べる実験] 羽化後 12 時間以内の未交尾オス成虫を集め、普通餌と普通餌にカルニチンが入った餌で飼育した。5 日後、15 日後、28 日後のそれぞれのとき、飼育バイアルから 1 個体だけを取り出し、10mL の細いメスシリンダーに入れて封をし、叩いて底に落としたのち、一定時間 (10 秒間) にどれくらい登ってきたのかを測定した (Climbing Assay)。

臨床試験: [運動習慣のない日本人青年期後期女性] 健康状態に異常のみられない BMI 17 - 25 未満、20 歳前後の女性 12 名を被験者として選定し、実験への同意を頂いた。摂取するカルニチンは市販の錠剤化された商品で、1 日の摂取量は商品の指示通り 750mg とした。対照としては、体内に吸収されない炭水化物を主成分とする偽錠剤薬、プラセプラス 750mg とした。それぞれの錠剤は、同じ形状の袋に詰め直して外見からは判断できないようにし、被験者にランダムに割り振った (二重盲検法)。被験者は、毎日の昼食後 (12 ~ 14 時) にカプセル 5 粒 (750mg) を飲み、每晚寝る前 (22 ~ 24 時) に体組成 (BMI、筋肉量、推定骨量、体脂肪率、内臓脂肪レベル、基礎代謝量) を測定した。これを 11 月の 30 日間、連続で実施してもらった。[運動習慣のある日本人青年期後期女性] 被験者として Y 大学体育会ホッケー部女子部員に本臨床試験の趣旨を説明したところ、20 歳前後の女性 13 名が被験者として立候補があり、実験への同意を頂いた。摂取するカルニチンは、アンチドーピング検査機関にて検査・承認されている市販の錠剤化された商品とし、1 日の摂取量は商品の指示

通り 4 粒 (カルニチン 500mg) とした。対照としては、体内に吸収されない炭水化物を主成分とする偽錠剤、プラセプラス 4 粒 (炭水化物 768mg) とした。それぞれの錠剤は、同じ形状の袋に詰め直して外見からは判断できないようにし、被験者にランダムに割り振った (二重盲検法)。被験者は毎日 1 回、錠剤 4 粒を飲み、毎日 1 回、体組成 (BMI、筋肉量、推定骨量、体脂肪率、内臓脂肪レベル、基礎代謝量) の測定を 11 月 23 日から 12 月 21 日までの 29 日間、連続で実施してもらった。摂取開始前日の 11 月 22 日は、錠剤を摂取せずに体組成測定のみを行ってもらい、この値を 0 日目とした。

得られた全データについての集計と統計解析 (t 検定: $p < 0.01$ を有意差ありと判定) は、Microsoft Excel で行った。研究については、山梨学院短期大学研究倫理委員会の承認のもとに行われた (承認番号: 2021008)。

CNDP 遺伝子の DNA 領域を特異的に認識するプライマーを作製し、定量的 RT-PCR 法にてショウジョウバエ *CNDP* 遺伝子の発現領域を調べた。新規な *CNDP* 突然変異体系統の樹立には、*CRISPR/Cas9* システムを用いた。個体寿命を調べる実験では、羽化後 24h 以内の雄成虫個体を普通餌の含むバイアルに入れて飼育し、2 日ごとに死亡個体をカウントして記録し、4 日毎に新しい餌に交換した。*CNDP* 突然変異体系統の酸化ストレス応答への関与を調べる実験として、パラコートや過酸化水素水を含むスクロース寒天餌で飼育し、12h ごとに死亡個体をカウントして記録した。

4. 研究成果

FA-Trp 含有餌での飼育群は、普通餌飼育群と比べて平均生存率が有意に延長したことから、脂肪酸トリプタミドには、摂取によってショウジョウバエ成虫の個体寿命を延伸させる生理活性作用を有している可能性を明らかにした (図 1)。クライミングアッセイという方法

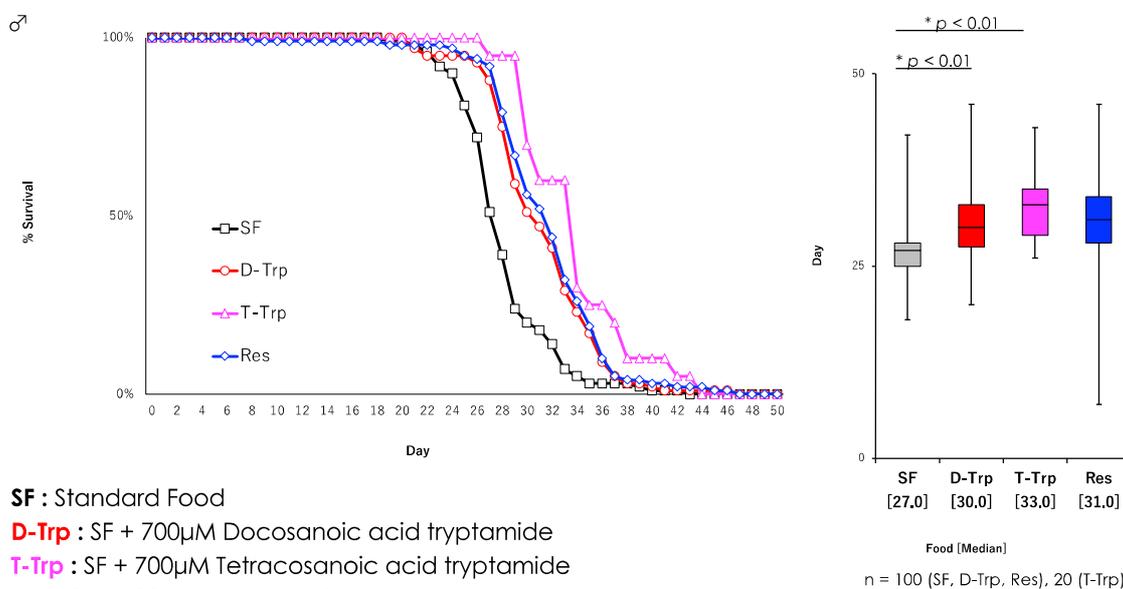


図 1. FA-Trp 摂取によるショウジョウバエの個体寿命延伸

で FA-Trp 摂取による老化抑制の有無を調べたところ、FA-Trp 摂取個体において加齢に伴った筋力低下が抑制されたことから、FA-Trp には、ショウジョウバエ成虫の個体老化を抑制させる生理活性作用を有している可能性を明らかにした (図 2)。網羅的解析で FA-Trp 摂取によって特異的に発現量が変動する遺伝子があるのかを調べたところ、サーチェイン遺伝子のほか、抗酸化関連遺伝子群、ヒートショックタンパク質群が FA-Trp 含有餌での飼育群特異的に発現量の有意な増加がみられたことから、FA-Trp 摂取により、ショウジョウバエ成虫はサーチェインに係る寿命関連遺伝子群が活性化されることで、老化抑制や寿命延伸が生じる可能性を明らかにした。

ショウジョウバエ成虫のカルニチン摂取による個体寿命への影響を調べた結果、カルニチン高含有餌での飼育群は、普通餌の飼育群と比べて平均生存率が有意に低下した (図 3)。この結果より、カルニチンには何らかの生理活性作用を有している可能性があることが判明した。羽根を動かして飛ぶ昆虫にとって、脂肪は貴重なエネルギー源である。カルニチンが脂肪酸の酸化に関わるということから、脂肪酸の酸化が促進されたことによる生存率低下が考えられた。Climbing Assay の結果より、カルニチン摂取と運動との間で関連が示唆される結果が得られたため、ショウジョウバエからヒトへと展開し、ヒト臨床試験によって運動との関連について調べた。運動習慣のない日本人青年期後期女性 12 名、運動習慣のある日本人青年期後期女性 13 名を被験者とし、二重盲検法による継続摂取と体組成の状態 (BMI、筋肉量、推定骨量、体脂肪率、内臓脂肪レベル、基礎代謝量) を測定した結果、

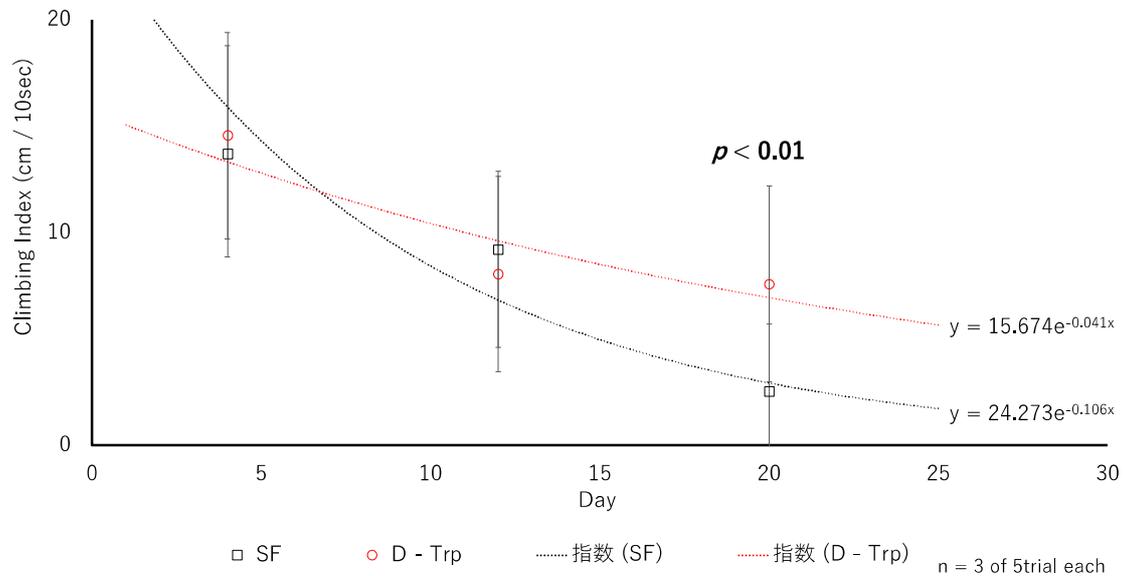


図 2. FA-Trp 摂取によるショウジョウバエの老化抑制

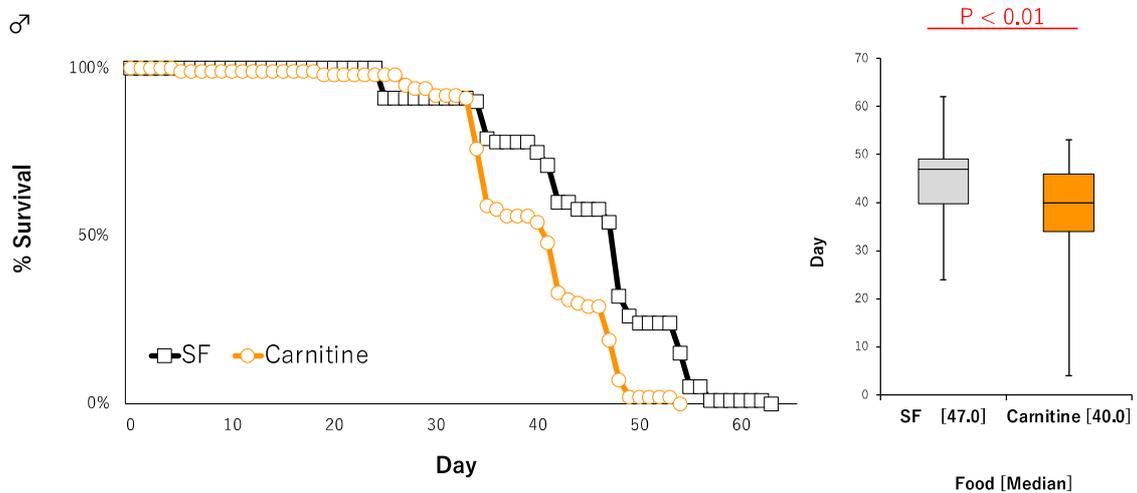


図 3 カルニチン摂取による脂肪酸代謝の促進に起因すると考えられるショウジョウバエの生存率低下

解析した 6 つ全ての項目について、運動習慣の有無に関わらずプラセボ摂取群、カルニチン摂取群との間で摂取後に有意な増加や減少がみられた項目はみられなかった。開始時の値を 0 として摂取後の増減変化をカルニチン摂取群とプラセボ摂取群との間で比較したところ、カルニチン摂取群について、運動習慣のない群では体脂肪率や内臓脂肪の低下抑制がみられ、運動習慣のある群では筋肉量、推定骨量、基礎代謝量の増加抑制と内臓脂肪レベルの顕著な低下がみられた。運動習慣の違いによって BMI 以外の 5 項目については、変化した項目が異なっていたことから、改めてカルニチン摂取による体組成への影響は運動と関連していることが示唆され、特に内臓脂肪レベルについては、運動習慣の有無で全く異なる効果が得られる可能性があることがわかった。

CNDP の生体での役割を調べる目的で、既存の CNDP 突然変異体系統 (*dcndp^D*) に加え、CRISPR/Cas9 システムを用いて新規な CNDP 突然変異体系統 (*dcndp^{A35bp}*) を樹立した。*dcndp* 遺伝子の発現領域を調べたところ、全身にわたって広範囲に発現しているが、特に哺乳類の腎臓に相当するマルピーギ管で高発現していることを明らかにした。マルピーギ管は、浸透圧調節や水溶性不要物の排泄に関与するだけでなく、酸化ストレスなどのストレスを感知して個体全体のホメオスタシスを制御している。CNDP 突然変異体系統に酸化ストレスを与えたところ、研究室における野生型系統と比較して生存率の有意な短縮が見られた。結果より、CNDP は個体の生理機能維持に関わっていることが示唆され、CNDP 突然変異体系統は食品成分の機能解析に適した疾患モデルショウジョウバエとして利用できる可能性があることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kiko Kanno, Yasunari Kayashima, Kazuji Tamura, Takako Miyara, Kento Baba, Megumi Koganei, Midori Natsume, Shinjiro Imai	4. 巻 12(1):12080
2. 論文標題 Fatty acid tryptamide from cacao elongates Drosophila melanogaster lifespan with sirtuin-dependent heat shock protein expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16471-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 萱嶋 泰成	4. 巻 1月号 Vol.6 (1)
2. 論文標題 疾患モデルショウジョウバエを用いた食品成分の生理機能解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 47 - 51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 萱嶋 泰成	4. 巻 12月臨時増刊号 Vol.4 (14)
2. 論文標題 疾患モデルショウジョウバエを用いた食品成分の生理機能解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 54 - 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimiko Yamakawa-Kobayashi, Yuya Ohhara, Takumi Kawashima, Yoshitatsu Ohishi, Yasunari Kayashima	4. 巻 41
2. 論文標題 Loss of CNBP causes a shorter lifespan and higher sensitivity to oxidative stress in Drosophila melanogaster	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 131-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.41.131.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 萱嶋 泰成	4. 巻 4
2. 論文標題 疾患モデルショウジョウバエを用いた食品成分の生理機能解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ 12月臨時増刊号	6. 最初と最後の頁 47 - 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 萱嶋 泰成	4. 巻 52
2. 論文標題 疾患モデルショウジョウバエを用いた食品成分の生理機能解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊 細胞	6. 最初と最後の頁 62 - 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 萱嶋泰成
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いた食品成分の生理機能解析
3. 学会等名 第76回日本栄養食糧学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萱嶋泰成, 駒田安美, 山本ゆめ, 平川望美
2. 発表標題 カテキンの生理活性作用について: 体組成計を用いた検証
3. 学会等名 日本栄養改善学会 第8回関東・甲信越支部学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野美咲, 平川望美, 三科槇子, 六車睦美, 関戸元絵, 青木慎悟, 萱嶋泰成
2. 発表標題 19, 20 歳の日本人女性における肥満関連遺伝子の多型と BMI との関連について
3. 学会等名 第68回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮野貴女, 田村一二, 宮良孝子, 馬場研斗, 小金井恵, 夏目みどり, 萱嶋泰成, 今井伸二郎
2. 発表標題 カカオ含有脂肪酸トリプタミドによる SIRT1 活性化作用の研究
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川望美, 坂田未羽, 藤田史歩, 田村一二, 宮良孝子, 馬場研斗, 小金井恵, 夏目みどり, 今井伸二郎, 萱嶋泰成
2. 発表標題 ショウジョウバエを用いたカカオ含有成分脂肪酸トリプタミドの老化抑制効果に関する研究
3. 学会等名 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木睦代, 平川望美, 浅川友香, 清水柊, 横倉葉奈, 坂本萌, 内藤菜緒, 和田美里, 萱嶋泰成
2. 発表標題 日本人女性におけるカルニチン摂取による体組成変化と運動習慣との関連について
3. 学会等名 日本栄養改善学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨学院短期大学プレスリリース
http://www.yguppr.net/220805ygc/C2C22.08.02.pdf

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	今井 伸二郎 (Imai Shinjiro) (50629152)	東京工科大学・応用生物学部・教授 (32692)	
研究 分 担 者	小林 公子 (Yamakawa-Kobayashi Kimiko) (90215319)	静岡県立大学・食品栄養科学部・教授 (23803)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------