

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11596

研究課題名（和文）腸管の栄養吸収から紐解く食餌制限の作用機序

研究課題名（英文）Understanding the molecular mechanisms of dietary restriction from the view of nutrients absorption

研究代表者

赤木 一考（Akagi, Kazutaka）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：30794424

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、寿命延伸効果が知られている食餌制限の作用機序について、腸管で発現するアミノ酸トランスポーターの役割に注目し解析を進めた。その結果、腸管で発現するグルタミン酸トランスポーターであるdmGlutとEaat1が、加齢に伴いその発現を低下させること、食餌制限によりその低下を抑制できることが明らかになった。さらに、腸管におけるそれらの発現が、食餌制限による寿命延伸に寄与することがわかった。また、腸管で発現するdmGlutが脂肪体における脂質代謝の制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、加齢に伴い腸管におけるグルタミン酸トランスポーターの発現が低下することが明らかとなった。また、食餌制限による栄養介入によりその低下が抑制できることもわかった。今後、哺乳類を用いた解析が必要であるが、本研究により加齢に伴う低栄養状態の分子実態の一端が明らかにできたと考えている。この成果は、低栄養状態に付随したフレイルやサルコペニアの予防法開発へ繋がると期待している。

研究成果の概要（英文）：Dietary restriction (DR) is a robust environmental method to extend both life- and health-span in diverse organisms. However, the molecular mechanisms of DR in each tissue are not fully understood. We examined the role of amino acids transporters in the gut upon DR. We found that expression level of the glutamate transporters, dmGlut and Eaat1, are declined with age. On the other hand, DR upregulates these expressions and attenuates its age-dependent reduction. Furthermore, we found that gut-specific dmGlut as well as Eaat1 knockdown abrogates DR dependent lifespan extension. These results suggest that glutamate transporters in the gut play a crucial role for aging upon DR.

研究分野：老化

キーワード：老化 食餌制限 グルタミン酸トランスポーター ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

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「低栄養状態」は、サルコペニアやフレイル、認知機能低下とも密接に関係しており、健康長寿社会の実現のためには解決しなければならない喫緊の課題である。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。一方で、低栄養状態に陥らないレベルの食餌制限 (DR) は、寿命延伸効果だけでなくサルコペニアの予防、神経変性疾患の予防に効果があることが知られているが、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。

代表者は、キロショウジョウバエを用いて腸管における DR の作用機序を解析する過程において、DR によって複数のアミノ酸トランスポーターの発現が腸管で上昇することを明らかにしていた。さらに、高栄養条件では加齢に伴い発現が低下するが、DR では発現が高いレベルで維持されるトランスポーターが存在することがわかり、特にグルタミン酸トランスポーターに着目して研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、腸管で発現するグルタミン酸トランスポーターである *dmGlut* の役割に注目し、栄養吸収の観点から食餌制限で寿命が延伸するメカニズムの一端を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

キロショウジョウバエは、コントロール系統として *w1118* 系統を使用した。また、腸管特異的な遺伝子操作には、Gal4-UAS システムを用いて、ショウジョウバエの腸細胞 (Enterocytes) 特異的に任意の遺伝子発現を操作した。それらの個体を高栄養条件 (5% yeast) 食餌制限条件 (0.5% yeast) またはアミノ酸飢餓条件 (0% yeast) で飼育し、寿命の測定やリアルタイム PCR 法による遺伝子発現の定量を行った。腸幹細胞増殖能の定量は、リン酸化ヒストン H3 抗体を用いた免疫染色法により行った。また、Lipidye および LipidTOX を用いて、脂肪体における脂肪滴の染色を行った。脂肪体におけるオートファジーの検出には、オートファジーフラックスレポーター系統である *UAS-GFP-mCherry-Atg8a* を用いた。

細胞培養には、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 を用いた。コントロール培地として、D-MEM (高グルコース、L-グルタミン、フェノールレッド不含) 10% Newborn Calf Serum、584 mg/L L-グルタミン、110 mg/L ピルビン酸ナトリウムを用いた。また、アミノ酸飢餓培地として、D-MEM (高グルコース、ピルビン酸ナトリウム含有、アミノ酸不含) 10% Newborn Calf Serum を用いた。オートファジーの検出には、LysoTracker Deep Red を用いた。

4. 研究成果

(1) 加齢に伴う腸管グルタミン酸トランスポーターの発現変化

腸管における *dmGlut* の発現レベルを明らかにするため、*w1118* 系統を高栄養条件 (AL) および食餌制限条件 (DR) で飼育し、Day 14、28、42 の三時点で腸管を解剖した。それらのサンプルを用いて qRT-PCR を行った。その結果、腸管における *dmGlut* の発現は、AL 条件では加齢に伴い低下することがわかった。一方で、DR 条件では *dmGlut* の発現が顕著に増加しており、加齢に伴う発現の低下も抑制されることが明らかになった。また、各組織における *dmGlut* の発現を調べたところ、*dmGlut* は DR に応答して腸管で顕著に発現を上昇させる遺伝子であることがわかった。同じくグルタミン酸トランスポーターである *Eaat1* の発現について調べたところ、*Eaat1* も腸管において *dmGlut* と同様の挙動を示すことがわかった。しかし *Eaat1* は、腸管における発現レベルは高くはなく、脳、筋肉、脂肪体で有意に発現が高いことがわかった。

(2) 腸管における *dmGlut*、*EAAT1* の発現パターン

腸管における *dmGlut* および *EAAT1* の発現パターンを明らかにするため、*dmGlut-Gal4* 系統、*Eaat1-Gal4* 系統それぞれに *UAS-GFP* 系統をかけ合わせ、GFP の発現を観察した。その結果、*dmGlut* は腸管の R2、R4、R5 領域で発現していることがわかった。一方で、*Eaat1* は、R0、R1 領域で発現することが明らかになった。このことから、*dmGlut* と *Eaat1* が腸管の R3 領域を除くすべての領域で相補的に発現していることがわかった。また、DR 条件では、それぞれの発現が増強されていることがわかり、qRT-PCR で得られた結果が支持された。

(3) 腸管特異的な *dmGlut* および *EAAT1* ノックダウン個体を用いた解析

DR によって腸管での *dmGlut* および *EAAT1* の発現が上昇するため、その発現が寿命に与える影

響について調べた。そのために、腸細胞特異的に Gal4 を発現する *NP-1-Gal4* 系統を用いて、*dmGlut* および *Eaat1* をノックダウンした。その結果、*dmGlut* および *Eaat1* ノックダウンともに 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。また、同様の個体を用いて、加齢に伴う自発活動量の変化をクライミングアッセイにより調べた。しかし、腸管特異的なグルタミン酸トランスポーターノックダウンは、自発活動量には影響しなかった。一方で、腸幹細胞の増殖能を定量した結果、腸管特異的なグルタミン酸トランスポーターノックダウンによって、DR における腸幹細胞増殖が上昇する結果が得られた。腸幹細胞増殖の増加は、寿命の低下と密接に関係しているため、観察された寿命の低下は、腸管恒常性の破綻が関与していることが示唆された。また、腸管特異的な *dmGlut* ノックダウンが他組織に与える影響を調べるため、それらの個体の脂肪体を解剖し、脂肪滴の染色を行った。その結果、腸管特異的な *dmGlut* ノックダウン個体の脂肪体では、DR 条件において脂肪滴の蓄積異常が観察された。このことから、腸管で発現する *dmGlut* は、脂肪体と相互作用して脂質代謝に関与することが示唆された。

(4) 脂肪体におけるグルタミン代謝の役割

腸管と脂肪体におけるグルタミン代謝について調べるため、グルタミンをグルタミン酸に変換する酵素である *GLS* に着目し、腸管と脂肪体における発現レベルを qRT-PCR 法で調べた。その結果、DR 条件において、*GLS* は腸管で減少し、脂肪体で上昇することがわかった。次に、脂肪体における *GLS* の役割を明らかにするため、*GLS* 阻害剤である CB-839 をショウジョウバエに給餌した。アミノ酸飢餓および DR 条件下では、脂肪体でオートファジーが活性化することが知られているため、*GLS* を阻害した個体の脂肪体でオートファジーフラックスを観察した。そのために、全身性の *Da-Gal4* 系統と *UAS-GFP-mCherry-Atg8a* 系統を掛け合わせて用いた。その結果、*GLS* を阻害した個体では、アミノ酸飢餓により誘導されるオートファジーに障害が起きていることがわかった。この結果から、*GLS* は脂肪体においてオートファジーの制御に関与することが示唆された。

(5) マウス脂肪前駆細胞を用いた解析

GLS によるオートファジーの制御が、進化的に保存されたものかどうかを明らかにするため、マウス脂肪前駆細胞である 3T3-L1 を用いて解析を行った。その結果、アミノ酸飢餓により *Glis1* の発現が上昇することがわかった。さらに、CB-839 を用いて *Glis1* の活性を阻害した結果、アミノ酸飢餓で誘導されるオートファジーに障害が起こることがわかった。このことから、脂肪組織における *GLS* によるオートファジーの制御は進化的に保存されたものであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sharma A., Akagi K., Pattavina B, Wilson K.A., Nelson C., Watson M., Maksoud E., Harata A., Ortega M., Brem R.B., Kapahi P	4. 巻 10
2. 論文標題 Musashi expression in intestinal stem cells attenuates radiation-induced decline in intestinal permeability and survival in Drosophila	5. 発行年 2020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/s41598-020-75867-z	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 赤木一考
2. 発表標題 未病・老化研究におけるキイロシヨウジョウバエの活用
3. 学会等名 第38回老化促進モデルマウス（SAM）学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 赤木一考、小泉桂一
2. 発表標題 組織恒常性および老化におけるグルタミン代謝の寄与
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木曾田千咲、赤木一考、小泉桂一
2. 発表標題 アミノ酸飢餓応答における脂肪組織でのGLS1の役割
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 深津日向子、町田雄大、赤木一考、小泉桂一
2. 発表標題 Exploring the physiological functions of GLS using mouse and Drosophila models
3. 学会等名 15th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木一考、小泉桂一
2. 発表標題 未病の生物学的理解におけるキロショウジョウバエの活用
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazutaka Akagi
2. 発表標題 Glutamate metabolism upon dietary restriction on aging
3. 学会等名 Japan-Korea Joint Symposium on the 45th annual meeting of Japan Society for Biomedical Gerontology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤木一考
2. 発表標題 加齢による腸機能の変化と食餌制限の効果
3. 学会等名 第32回日本老年学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayano Harata, Kazutaka Akagi
2. 発表標題 Glutamate transporters contribute to the lifespan extension upon dietary restriction in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazutaka Akagi, Amit Sharma, Ayano Harata, Pankaj Kapahi
2. 発表標題 Musashi expression in intestinal stem cells attenuates radiation-induced decline in intestinal permeability and survival in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayano Harata, Kazutaka Akagi
2. 発表標題 The role of glutamate upon dietary restriction on aging in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 南野徹 (監修)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 460
3. 書名 生物の寿命延長	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------