

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19686

研究課題名（和文）健康長寿実現に向けた、レトログレードシグナルに基づくカロリー制限模倣戦略の提案

研究課題名（英文）The study of retrograde signals involved in the beneficial effects of caloric restriction, aiming to an extension of the healthy lifespan

研究代表者

小林 正樹（Kobayashi, Masaki）

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・講師

研究者番号：30795612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は抗老化・寿命延伸効果を示すカロリー制限（CR: Caloric Restriction）により脂肪細胞において発現誘導されるミトコンドリア関連因子として、MIPEPとPGC-1 を同定した。本研究は、両者がミトコンドリアでの変化を起点として核内の転写制御に影響を及ぼすレトログレードシグナルを介して、CRによる脂肪細胞の質の改善に関与するという仮説に取り組み、その一部を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRによる抗老化作用は、人類にとって魅力的なものであるが、実際に実験動物で行われているような長期間のCRを実践することは難しい。それゆえ、その作用の分子メカニズムの模倣は健康寿命延伸の有効な戦略である。本研究の成果により、CR模倣の候補分子といえるMIPEPとPGC-1の脂肪細胞機能への実際の寄与を明らかにするとともに、ミトコンドリアを起点とする新たな脂肪細胞の質的制御の一端を提唱することができた。

研究成果の概要（英文）：We have previously identified MIPEP and PGC-1 as mitochondrial factors whose expression is increased in adipocytes by caloric restriction (CR), an intervention that shows anti-aging and pro-longevity effects. This study addressed and partially demonstrated the hypothesis that these factors contribute to CR-induced changes in the quality of adipocytes through retrograde signaling, which mediates between mitochondrial changes and transcriptional regulation in the nucleus.

研究分野：分子代謝学

キーワード：カロリー制限 ミトコンドリア PGC-1 MIPEP

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

適度なCRは、幅広い生物種において加齢に伴う種々の病理学的変化を抑制し、健康寿命を延伸する。このようなCRの効果は人類にとって魅力的なものであるが、実際に長期間のCRを実践することは難しい。それゆえ、CRの作用機構を理解し、これを模倣することは、効果的な抗老化、健康寿命延伸に向けた戦略となる。これまでの研究により、申請者らは、CRがWAT特異的にミトコンドリア機能を亢進することを明らかとした (Aging cell., 2017)。同時に、CRはミトコンドリア生合成を活性化する転写補助因子である peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )と、これまでほとんど注目されてこなかった、ミトコンドリアタンパク質の成熟化に関与するペプチダーゼである mitochondrial intermediate peptidase (MIPEP)の発現をWATにおいて転写レベルで誘導することを見出した (FEBS Letter., 2017)。

以上から申請者は、MIPEP, PGC-1 $\alpha$ の誘導がCRによるミトコンドリア機能改善の模倣になるのではないかと考え、両者を共過剰発現 (double overexpression: DOE) した前駆脂肪細胞株の解析を行った。その結果、非常に興味深いことに、DOE細胞では脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現が低下し、それに伴う脂肪分化の抑制も観察された (図1)。この転写レベルでの分化抑制は、転写補助因子である PGC-1 $\alpha$ の単独の過剰発現に比べてより顕著であった。それゆえ、申請者らは共過剰発現によるミトコンドリアにおける何らかの変化が、遺伝子レベルで分化に影響を及ぼしたと考察した。

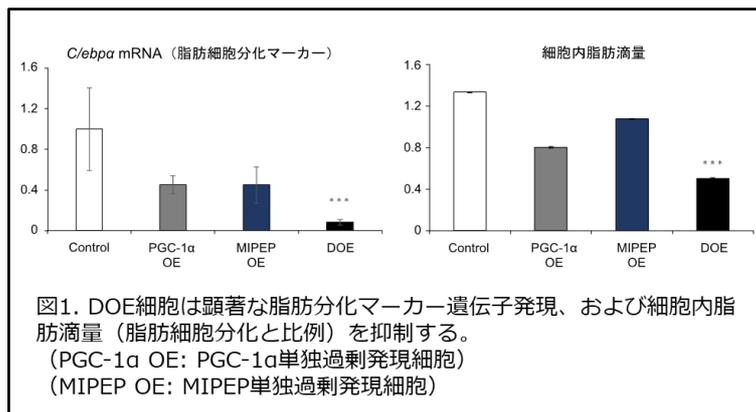


図1. DOE細胞は顕著な脂肪分化マーカー遺伝子発現、および細胞内脂肪滴量 (脂肪細胞分化と比例) を抑制する。  
(PGC-1 $\alpha$  OE: PGC-1 $\alpha$ 単独過剰発現細胞)  
(MIPEP OE: MIPEP単独過剰発現細胞)

通常、細胞内のオルガネラは主に核内の遺伝子発現に基づき制御されている。ところが近年、オルガネラからの逆向性のシグナルにより、核における遺伝子発現が制御される機構「レトログレードシグナル」が発見された。中でも、ミトコンドリアのレトログレードシグナルは、ミトコンドリア内の情報を核に伝えるシグナルとして、細胞機能維持や代謝恒常性に大きな役割を果たすと考えられている。

以上の知見から申請者は、MIPEP, PGC-1 $\alpha$  両因子の発現誘導に伴うミトコンドリアの性質変化が、レトログレードシグナルを介して、核内で制御される脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現に影響を及ぼしたのではと想定した。そしてこの核内での転写変動が、脂肪細胞についてはWATの性質にダイナミックな変化をもたらすのではないかと仮説に至った。

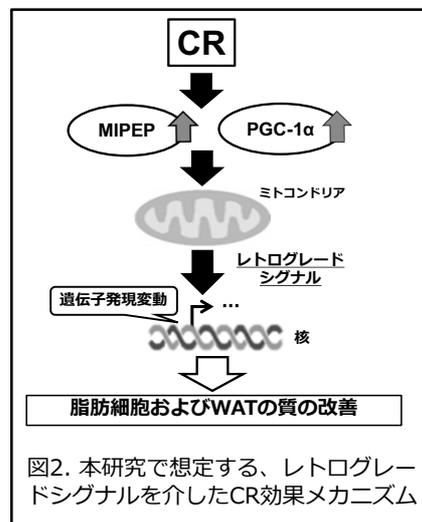


図2. 本研究で想定する、レトログレードシグナルを介したCR効果メカニズム

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、「CR→MIPEP, PGC-1 $\alpha$ の誘導→ミトコンドリア機能変化→核内転写変動→脂肪細胞およびWATの質の変化」という、レトログレードシグナルを含む一連の経路を立証することである (図2)。

### 3. 研究の方法

- (1) MIPEPとPGC-1 $\alpha$ のDOE細胞、各々の単独過剰発現およびコントロール細胞における、ミトコンドリアに関連する遺伝子発現やミトコンドリアDNA量を解析した。
- (2) 電子顕微鏡を用いて上記細胞のミトコンドリアの形態観察、およびミトコンドリアにおける好氣的呼吸能を反映する酸素消費速度を解析した。
- (3) ミトコンドリアと関連する脂肪細胞形質の大きな変化として、熱産生能を有する褐色脂肪細胞への分化転換がある。これを評価するため、上記細胞における褐色脂肪細胞マーカーや熱産生因子の遺伝子発現を解析した。

#### 4. 研究成果

- (1) ミトコンドリアに関連する遺伝子のうち、電子伝達系を構成する因子の一つである *cytochrome c oxidase subunit 4 (Cox4)* の遺伝子発現レベルは DOE 細胞においてのみ有意に増加した (図 3A)。また興味深いことに、ミトコンドリア DNA にコードされている *NADH dehydrogenase subunit 1 (Nd1)* の発現は DOE 細胞において顕著に増加した (図 3B)。一方、ミトコンドリア DNA からの転写を担う *transcription factor A, mitochondrial (Tfam)* の発現レベルに大きな変化はなかった (図 3C)。加えて、ミトコンドリア DNA 量も顕著に変化しなかった (図 3D)。これらの結果は、DOE 細胞において核からのミトコンドリア関連遺伝子の転写に加えて、ミトコンドリア DNA からの転写が活性化されていることを示唆している。

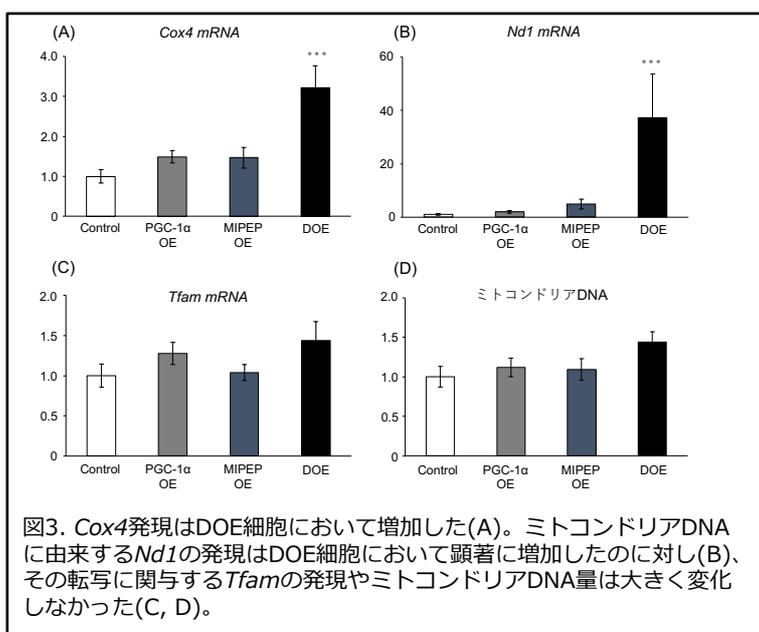


図3. *Cox4*発現はDOE細胞において増加した(A)。ミトコンドリアDNAに由来する*Nd1*の発現はDOE細胞において顕著に増加したのに対し(B)、その転写に關与する*Tfam*の発現やミトコンドリアDNA量は大きく変化しなかった(C, D)。

- (2) いずれの細胞株においても、ミトコンドリアの形態に大きな変化は観察されなかった。また、DOE 細胞の酸素消費速度は有意な変化を示さなかった。これらより、共過剰発現は直接ミトコンドリア機能の活性化には寄与しない可能性がある。
- (3) 褐色脂肪細胞マーカーであり、典型的な熱産生関連因子である *uncoupling protein 1 (Ucp1)* は DOE 細胞含めて全ての細胞群において検出されなかった。しかし興味深いことに、*Ucp1* 非依存的な熱産生への関与が報告されている *phosphoethanolamine / phosphocholine phosphatase 1 (Phospho1)* の発現レベルが DOE 細胞において増加した (図 4)。これらの結果は、共過剰発現により褐色脂肪細胞への完全な分化転換には至らないものの、一部の形質変化がもたらされることを示唆している。

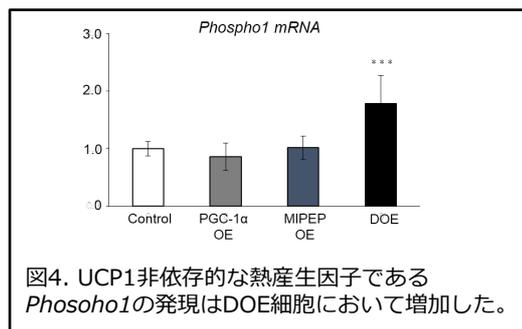


図4. UCP1非依存的な熱産生因子である *Phospho1*の発現はDOE細胞において増加した。

本研究により、PGC-1 $\alpha$  と MIPEP の共過剰発現は、ミトコンドリア DNA からの転写活性化および熱産生能の獲得をもたらすことが明らかとなった。これらは各々の単独過剰発現では示されていないことから、共過剰発現によるレトログレードシグナルがこのような形質変化に關与していることが考えられる。具体的なレトログレードシグナル因子の同定には至らなかったが、これは今後の課題としていきたい。

#### <引用文献>

- ① Namiki Fujii, Takumi Narita, Naoyuki Okita, Masaki Kobayashi, Yurika Furuta, Yoshikazu Chujo, Masahiro Sakai, Atsushi Yamada, Kanae Takeda, Tomokazu Konishi, Yuka Sudo, Isao Shimokawa, Yoshikazu Higami, Sterol regulatory element-binding protein-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction. *Aging cell*. 2017;16:508-517.
- ② Masaki Kobayashi, Kanae Takeda, Takumi Narita, Keita Nagai, Naoyuki Okita, Yuka Sudo, Yuri Miura, Hiroki Tsumoto, Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano, Yoshikazu Higami, Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction. *FEBS Lett*. 2017;591:4067-4073.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tagawa Ryoma, Kobayashi Masaki, Sakurai Misako, Yoshida Maho, Kaneko Hiroki, Mizunoe Yuhei, Nozaki Yuka, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Higami Yoshikazu	4. 巻 23
2. 論文標題 Long-Term Dietary Taurine Lowers Plasma Levels of Cholesterol and Bile Acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1793 ~ 1793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031793	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 Mizunoe Yuhei, Kobayashi Masaki, Saito Hiroki, Goto Akifumi, Migitaka Ryota, Miura Kumi, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Tagawa Ryoma, Yoshida Miki, Umemori Ai, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 154
2. 論文標題 Prolonged caloric restriction ameliorates age-related atrophy in slow and fast muscle fibers of rat soleus muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111519 ~ 111519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2021.111519	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 Kobayashi Masaki, Deguchi Yusuke, Nozaki Yuka, Higami Yoshikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Contribution of PGC-1 to Obesity- and Caloric Restriction-Related Physiological Changes in White Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6025 ~ 6025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22116025	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 水之江 雄平、小林 正樹、樋上 賀一、島野 仁	4. 巻 45
2. 論文標題 リソソームによる脂肪細胞の質の制御とミトコンドリア機能との関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 31 ~ 37
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 Kobayashi Masaki, Nezu Yuichiro, Tagawa Ryoma, Higami Yoshikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Mitochondrial Unfolded Protein Responses in White Adipose Tissue: Lipoatrophy, Whole-Body Metabolism and Lifespan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2854 ~ 2854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062854	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 Kobayashi Masaki, Yasukawa Hiromine, Arikawa Tomoya, Deguchi Yusuke, Mizushima Natsumi, Sakurai Misako, Onishi Shoichi, Tagawa Ryoma, Sudo Yuka, Okita Naoyuki, Higashi Kyohei, Higami Yoshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Trehalose induces SQSTM1/p62 expression and enhances lysosomal activity and antioxidative capacity in adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 185 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13055	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 Kobayashi Masaki, Uta Seira, Otsubo Minami, Deguchi Yusuke, Tagawa Ryoma, Mizunoe Yuhei, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Srebp-1c/Fgf21/Pgc-1 Axis Regulated by Leptin Signaling in Adipocytes? Possible Mechanism of Caloric Restriction-Associated Metabolic Remodeling of White Adipose Tissue	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2054 ~ 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12072054	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 Tomonaga Osamu, Kobayashi Masaki, Tagawa Ryoma, Higami Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 The effects of teneligliptin on lipid profile: A prospective study for comparison of biomarkers before and after a meal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 79 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14740/jem.v10i3-4.679	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 Kobayashi Masaki, Ishizaki Yuka, Owaki Mika, Matsumoto Yoko, Kakiyama Yuri, Hoshino Shunsuke, Tagawa Ryoma, Sudo Yuka, Okita Naoyuki, Akimoto Kazunori, Higami Yoshikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Nutlin-3a suppresses poly (ADP-ribose) polymerase 1 by mechanisms different from conventional PARP1 suppressors in a human breast cancer cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1653 ~ 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27581	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 田川亮真、小林正樹、樋上賀一	4. 巻 35
2. 論文標題 脂肪組織におけるオートファジー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 23 ~ 27
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 無
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 水之江 雄平、小林 正樹、樋上 賀一、島野 仁	4. 巻 45
2. 論文標題 リソソームによる脂肪細胞の質の制御とミトコンドリア機能との関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 31 ~ 37
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 無
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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林正樹、野崎優香、樋上賀一
2. 発表標題 ミトコンドリアシグナルペプチターゼMIPEPの脂肪組織特異的欠損マウスの解析
3. 学会等名 第42回日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林正樹、野崎優香、樋上賀一
2. 発表標題 ミトコンドリアシグナルペプチダーゼMIPEPの脂肪組織特異的欠損マウスの解析 -新たなミトコンドリアストレスモデルの可能性-
3. 学会等名 第20回ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 白色脂肪組織におけるカロリー制限に伴う代謝リモデリング
3. 学会等名 第94回生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Kobayashi, Takumi Narita, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Analysis of adipocyte-specific mitochondrial intermediate peptidase(MIPEP) knockout mice ~The possibility as a novel mitochondrial stress model~
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shota Ayabe, Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 A mechanism of upregulation of a mitokine GDF15 in adipose-sepecific Mipep knockout mice
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miku Yokoyama, Masaki Kobayashi, Yuhei Mizunoe, Hitoshi Shimano, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Comprehensive analysis of gene expression in mitochondrial intermediated peptidase (Mipep)-deficient white adipose tissue
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuro Hirata, Masaki Kobayashi, Ryoichi Mori, Isao Shimokawa, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Involvement of transcription factor PARIS on mitochondrial regulation in obese white adipose tissue
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanari Furuya, Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Regulation of mitochondrial intermediate peptidase (MIPEP) substrates by mitochondrial proteases
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田理緒、田川亮真、小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 Functional analysis of a novel splicing variant of mitochondrial intermediate peptidase (MIPEP)
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若沢広樹、星野駿介、小林正樹、田川亮真、樋上賀一
2. 発表標題 The influence of WWP1 on whole-body glucose metabolism and insulin signal in tissues
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角岡映、千森隆靖、坂本祐輔、土谷香穂、酒井博遥、古川実季、小林正樹、樋上賀一、長原礼宗、椎名勇、真野泰成
2. 発表標題 HPLCを用いたリダイフェン類縁体の測定法の確立ならびにラットにおける薬物動態の検討
3. 学会等名 日本薬学会140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------