

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17816

研究課題名（和文）D型アミノ酸によるタンパク質代謝制御機構の分子基盤と生理作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms and physiological functions in regulation of protein metabolism by D-amino acids

研究代表者

矢野 敏史（Yano, Satoshi）

早稲田大学・人間科学学術院・助教

研究者番号：60936615

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：D-アミノ酸のオートファジーへの影響を腸細胞にてスクリーニング解析し、オートファジーを活性化するD-アミノ酸を数種同定した。これらD-アミノ酸のオートファジーでは、一般的な栄養飢餓シグナルとは異なるメカニズムの存在を示唆する結果が得られた。そこで、オートファジーを活性化するD-アミノ酸について、トランスクリプトーム解析を実施し、in silico解析から細胞内シグナルへの作用を解析したところ、遺伝子の発現変動から特定のシグナルへの関与が示唆された。さらに、D-アミノ酸が豊富に存在する発酵食品で検証したところ、D-アミノ酸や共存する成分の含有比がオートファジー調節に機能することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、発酵食品にはD-アミノ酸が豊富に存在することが報告されており、発酵食品の有する腸への健康機能との関連も注目されている。モデル生物では、オートファジーが腸管の恒常性維持に重要であることや、オートファジーの活性化が健康寿命の延伸に寄与することが分かっている。本研究課題では、D-アミノ酸が腸細胞のオートファジー調節に機能することを明らかにし、その健康効果の一端を解析しており、D-アミノ酸の腸への健康効果の基礎的知見になると期待される。

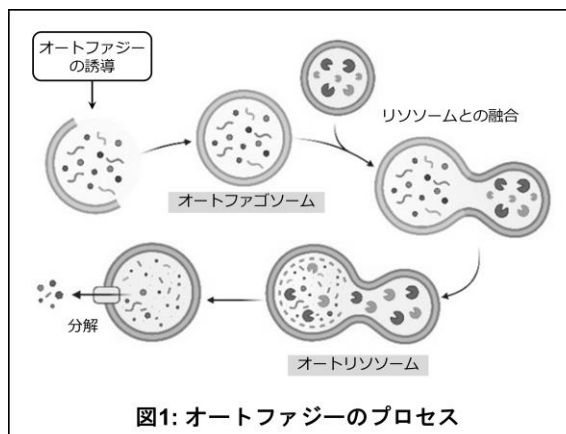
研究成果の概要（英文）：The effects of D-amino acids on autophagy were screened and analyzed in intestinal cells, and several D-amino acids that activate autophagy were identified. The autophagy activation by D-amino acids suggested the existence of a mechanism different from that of general nutrient starvation signaling. Therefore, we performed transcriptome analysis of the D-amino acids that activate autophagy and analyzed their effects on intracellular signals from in silico analysis, and the changes in gene expression suggested their involvement in specific signals. Furthermore, we verified the effect of D-amino acids on autophagy by using fermented foods rich in D-amino acids, and found that the content ratio of D-amino acids and coexisting components functioned to regulate autophagy.

研究分野：食品科学

キーワード：D-アミノ酸 発酵食品 オートファジー 腸細胞 タンパク質代謝

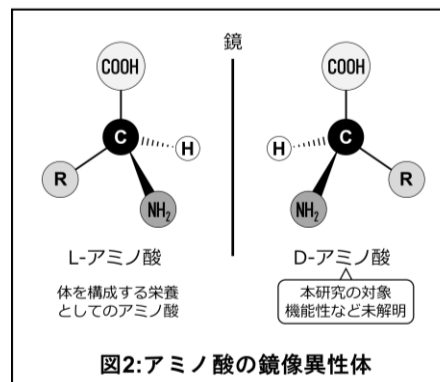
1. 研究開始当初の背景

オートファジーは、二重膜を持つ新しい構造体（オートファゴソーム）の形成とリソソームへの融合（オートリソソーム）により、細胞内の成分をリソソームで分解する細胞プロセスである（図1）。オートファジーは、細胞内成分の品質管理を担うことで細胞単位から個体全体の健康維持に機能している。実際に、人工的にオートファジー活性を高めたモデル生物では、運動機能や高次脳機能などを維持したまま寿命を延伸できることが示されている（Hansen M, et al. *Ageing Res Rev* 2018）。一方で、オートファジーの活性は加齢とともに低下することが分かっており、神経変性疾患などの加齢性疾患の発症に関連するとされている。これらのことから、オートファジーを活性化することや老化における活性低下を抑制することができれば、神経変性疾患やメタボリックシンドロームなどの予防、健康寿命の延伸など、超高齢化が進む現代社会の抱える健康、福祉、医療問題の解決に寄与することが期待される。



一般に、オートファジーは栄養飢餓によってダイナミックに活性化される。その活性はmTORC1 (mammalian target of rapamycin complex1) キナーゼを中心とした細胞内アミノ酸センシング機構によって厳密に制御されており、アミノ酸（特に、ロイシン）量がオートファジーの活性制御に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。マウスなどでは、栄養飢餓を模倣したラパマイシン (mTORC1 阻害剤) の投与やカロリー制限によって、オートファジーを介した寿命延伸効果が示唆されている。しかし、この栄養シグナルの抑制はタンパク合成や免疫抑制などに影響することから、健康面のリスクを伴うことが懸念される。そこで、疾患発症前から摂取できる食品のオートファジー誘導における役割に期待が高まっており、申請者を含めた国内外の研究グループがオートファジーを活性化する食品成分の探索を精力的に行っている。

タンパク質を構成する20種のアミノ酸は、グリシンを除いてすべてL型アミノ酸 (L-アミノ酸) であり、哺乳類の生理作用は基本的にL-アミノ酸によるものと考えられてきた。しかしながら、人の組織中に鏡像異性体であるD型アミノ酸 (D-アミノ酸) が存在することが明らかになり、D-アミノ酸にも生理的役割が存在する可能性が提唱されるようになった（図2）。実際、D-セリンが脳機能制御に関与することや、D-アスパラギン酸が生殖機能に関与する事が報告され、D-アミノ酸の生理機能研究が進展しつつある（Mothet JP, et al. *PNAS* 2000）。一方で、L-アミノ酸の研究が詳細に解析されているのに比べ、D-アミノ酸がオートファジーに与える影響についての解析はほとんど報告がないのが現状である。その理由として、上述のように哺乳類が生合成できないほとんどのD-アミノ酸は生理的に重要ではないとする考えがあり、長らく研究対象として注目されてこなかったことがある。しかしながら、食品中にはD-アミノ酸が含まれることが分かっており、発酵食品 (1-10 mM レベル) や植物中、魚介類に様々なD-アミノ酸が含まれることが示されている。また、腸内細菌が合成するD-アミノ酸が腸内での粘膜免疫制御に関わっていることも明らかになっている。つまり、D-アミノ酸が腸細胞にたいしてどのような生理作用を示すかを理解することは、安全かつ機能的な食の摂取方法や健康寿命の延伸に資する機能性食品の開発において大変重要な視点であると考えられる。



2. 研究の目的

本研究課題では、D-アミノ酸の腸細胞にたいするオートファジーの制御機構について解析し、タンパク質代謝に及ぼすD-アミノ酸の生理機能を分子レベルで理解することを目的とする。L-アミノ酸は、オートファジーを始めとした細胞内タンパク質代謝の主要な制御因子であるが、D-アミノ酸についての研究知見は乏しく、特に代謝や栄養面について多くのことが分かっていない。また、腸内には食品や腸内細菌由来のD-アミノ酸が豊富に存在することから、D-アミノ酸

が直接作用し得る腸細胞にどのような影響を与えるかについて分子レベルで研究することは重要であると考えられる。そのため、オートファジーを活性化する D-アミノ酸の作用機序の分子基盤と、その生理機能についての研究意義は大変大きいと考えられる。

3. 研究の方法

・腸細胞における D-アミノ酸のオートファジースクリーニング解析

腸細胞でオートファジー活性をモニタリング可能な蛍光プローブ (GFP-LC3-RFP) を導入したオートファジーの評価解析系を樹立した。フローサイトメトリー (SA3800, SONY) を用いて、本細胞の蛍光強度の変化を測定し、GFP/RFP 比を求めることで、オートファジー活性を解析した。同定した D-アミノ酸については、栄養シグナル mTORC1 への関与を検討した。

・RNA-seq を用いた遺伝子発現解析による生物機能のプロファイリング

オートファジーを活性化する D-アミノ酸を腸細胞に処理した後、TRIzol® 試薬 (Invitrogen) を用いて、細胞より RNA を単離した。次に、NEB Next® Ultra™ RNA Library Prep kit for Illumina® (New England Biolabs) を用い、メーカーのプロトコールに従って cDNA ライブラリーを構築した。RNA 配列決定は NovaSeq 6000 System を用いて行い、同定した発現変動遺伝子を生物学的機能の解析に供した。また、薬剤誘導による腸炎モデルを用いることで、D-アミノ酸の生理機能を検討した。

・D-アミノ酸を豊富に含む発酵食品でのオートファジー解析

主に日本で伝統的に醸造される発酵食品を数十種類選択し、水抽出物を先述の腸細胞のオートファジー評価解析系に供した。また、一部の発酵食品の成分については、メタボロミクス解析技術を応用し、低分子成分の網羅的解析も行い、オートファジー活性を比較検討した。

4. 研究成果

まず、オートファジーをモニタリング可能な蛍光プローブを導入した腸細胞にて、D-アミノ酸のオートファジーへの影響をスクリーニング解析した。その結果、オートファジーを活性化する D-アミノ酸を数種同定できた。これら D-アミノ酸のオートファジーでは、栄養飢餓とは異なり、栄養センサー mTORC1 シグナルへの関与は認められず、豊富な L-アミノ酸の存在下でも誘導された。そのため、非栄養因子としてオートファジー制御に作動する D-アミノ酸のセンシング機構の存在が想定された。そこで、オートファジーを活性化する D-アミノ酸について、RNA-seq を用いたゲノムワイドなトランスクリプトーム解析を実施し、*in silico* 解析から細胞内シグナルへの作用を解析した。その結果、遺伝子の発現変動から特定の抗酸化応答シグナルへの関与が示唆された。さらに、腸炎モデルにおいて、D-アミノ酸が抗炎症作用を有することが示された。近年、微生物の発酵作用を利用した醸造物には、D-アミノ酸が豊富に存在することが報告されており、発酵食品の有する腸への健康機能との関連も注目されている。そこで、D-アミノ酸を豊富に含む発酵食品に着目し、主に日本で伝統的に醸造される発酵食品を数十種類選択した。これら食品由来の D-アミノ酸を含めた成分が腸細胞のオートファジーに与える影響をスクリーニング解析した結果、単体の D-アミノ酸よりも強いオートファジー活性化作用を有する発酵食品を数種類見出した。含有成分の分析から、発酵食品の有する D-アミノ酸や共存する成分の含有比がオートファジー調節に機能することが示唆された。また、これら D-アミノ酸を豊富に含む発酵食品のオートファジー活性化でも、一般的な栄養飢餓シグナルとは異なるメカニズムの存在を示唆する結果が得られた。

これまでに、モデル生物では、オートファジーが腸管の恒常性維持に重要であることや、オートファジーの活性化が健康寿命の延伸に寄与することが分かっている。本研究課題では、D-アミノ酸が腸細胞のオートファジー調節に機能することを明らかにし、その健康効果の一端を解析しており、D-アミノ酸の腸への健康効果の基礎的知見になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Wang Jinyun, Yano Satoshi, Xie Kun, Ohata Yoshihisa, Hara Taichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Genome-Wide RNA Sequencing Analysis in Human Dermal Fibroblasts Exposed to Low-Dose Ultraviolet A Radiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 974 ~ 974
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes13060974	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 関根結夏子、塩田皐希、矢野敏史、原太一	4. 巻 50
2. 論文標題 シダ植物イワヒバ由来成分の表皮角化細胞に対する細胞増殖と紫外線ストレス保護作用の検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 薬理と治療	6. 最初と最後の頁 527 ~ 533
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 Satoshi Yano, Shiori Sasaki, Shengai Jin, Nanako Shibata, Kaoru Kataoka, Wakana Matsushita, Yuka Sugaya, Shota Yamakoshi, Taichi Hara	4. 巻 65
2. 論文標題 Novel function of Moringa oleifera Lam. leaf extract: cytoprotection against proteotoxic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 New Food Industry	6. 最初と最後の頁 501 ~ 513
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 Yano Satoshi, Suzuki Katsuhiko, Hara Taichi	4. 巻 49
2. 論文標題 Proteomic profiling of intestinal epithelial like cell derived exosomes regulated by epigallocatechin gallate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BioFactors	6. 最初と最後の頁 390 ~ 404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biof.1918	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15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王縉雲、KUN Xie、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 明日葉カルコンによるオートファジー制御機構の解析
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 KUN Xie、矢野敏史、山越正汰、太田智絵、宇都拓洋、坂井麻衣子、大西康太、久保田拓海、原太一
2. 発表標題 スペルミンとスペルミジンバランスによるオートファジー制御機構の解析と機能性食品の開発
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田龍、矢野敏史、山越正汰、菊地晴久、久保原禅、原太一
2. 発表標題 細胞性粘菌由来の生物活性物質DIF-1とその誘導体によるタンパク質代謝制御機構の解析
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩田皐希、関根結夏子、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 皮膚の抗老化と UV 障害保護に関するイワヒバの機能性評価
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野敏史、鈴木克彦、原太一
2. 発表標題 EGCGによって分泌される腸細胞由来エクソソーム内包タンパク質のプロファイリング解析
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩田皐希、Wang Jinyun、Xie Kun、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 フラボノイドにより誘導される新たなオートファジー制御機構の解明
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩崎なつみ、謝涼晶、宮内勇樹、原園枝、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 ヨウ化ニンニクエキスはヒト毛乳頭細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅谷侑香、謝涼晶、頼佳苗、Wang Jinyun、Xie Kun、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 オートファジーを制御する天然由来成分を基盤としたがんの治療戦略に関する研究
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松下和佳奈、佐々木詩緒理、金聖愛、柴田奈々子、片岡かおる、菅谷侑香、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 モリンガ抽出物には細胞賦活化とプロテオストレス保護に対する機能性が存在する
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野敏史、内田頌太郎、唐鎌翔大、鈴木伸、木野邦器、原太一
2. 発表標題 オートファジーを制御するジケトピペラジンのスクリーニング
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ma Sihui, Tong Yishan, Yano Satoshi, Suzuki Katsuhiko, Hara Taichi
2. 発表標題 Enhanced Metabolic Efficiency with Ketone Body Supplementation in Keto-Adaptation: Insights from Animal and Cell Culture Studies
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 宮内勇樹、謝涼晶、廣川隆彦、村上小枝子、馬思慧、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 ヒト毛乳頭細胞を用いた細胞試験による海老名市産イチゴの育毛効果の検証
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 菅谷侑香、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 オートファジー活性に及ぼす発酵食品の探索と機能性成分の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 久原麻那、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 ワサビ 6-MSITC によるオートファジー制御機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩崎なつみ、宮内勇樹、廣川隆彦、謝涼晶、矢野敏史、原太一
2. 発表標題 ヨウ化ニンニクによる細胞賦活作用の作用機序の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024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
---------	---------