

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：43505

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700837

研究課題名(和文) ショウジョウバエ疾患モデルを使う食品成分の新規な評価系・探索系の構築

研究課題名(英文) Development of novel assay systems for evaluating food components and detecting their physiological effects through Drosophila disease models

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・准教授

研究者番号：90365453

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)：ショウジョウバエを食品成分の生理機能を解析するための実験動物として新規に確立させた。実際の食品成分を使い、ショウジョウバエとヒトで共通な機構である抗酸化能やエネルギー代謝系への生理活性作用を解析するとともに、成分と遺伝子との関連を調べるための遺伝子の突然変異体系群(疾患モデルショウジョウバエ)を揃えた。この体系群を活用することで、既存のマウス・ラットや培養細胞での解析で生じる短所・欠点を補い得る。食品成分が作用する遺伝子や関連経路の迅速な検出、さらには食品成分が生物個体へもたらす効用の検出を可能とした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established the novel use of Drosophila as an experimental organism for analyzing the physiological functions of food components. We analyzed the physiological effects of actual food components on antioxidative functions and energy metabolism systems, which are mechanisms Drosophila shares with humans. Furthermore, we assembled a series of mutant lineages to serve as Drosophila disease models for investigating potential relationships between food components and gene functions, which overcome many of the problems and disadvantages of the currently available assay systems that utilize mice, rats, and cultured cells. These lineages also allow for rapid detection of the genes and gene pathways affected by food components, as well as enable the detection of the effects of food components in whole organisms.

研究分野：生物学

キーワード：食情報 ショウジョウバエ 食品機能 実験動物 疾患モデル生物

1. 研究開始当初の背景

食品が持つ機能性を確かなものと結論づけるためには、信頼性の高い機能性評価技術の開発や、科学的根拠に基づく有効性・安全性の知見を一つでも多く蓄積する必要がある。しかしながら、食品成分の機能性を動物実験などで検証する方法は、ヒト試験以外ではマウス・ラットを用いた動物実験と、培養細胞・組織を用いた *in vitro* 実験の主に二通りだけであった。本研究では、*in vitro* とほ乳類の間よりシンプルな多細胞生物種による解析ツールとしてショウジョウバエを採用し、実際の食品を用いて、対象とする食品成分が三次機能を持っているか、どの生体機構に影響を与えるのか、の検出を試みた。加えて、遺伝学的解析に長けたショウジョウバエの特性を活かし、食品の機能性を調べることに適した遺伝子の突然変異体系統 (疾患モデルショウジョウバエ) の確立を試みた。

2. 研究の目的

- 1) ミツバチ産品の一つであるローヤルゼリー (RJ) の生理活性に関する解析
- 2) 「早期老化症モデルバエ」となる抗酸化関連遺伝子 *Prx3* ノックダウン個体の樹立
- 3) イミダゾールジペプチドの一種アンセリン・カルノシンの生理機能解析
- 4) 新規 II 型糖尿病モデルショウジョウバエの開発とそれを用いた食品成分の機能解析
- 5) 茶ポリフェノールの機能解析、特に脂肪蓄積の抑制作用について

3. 研究の方法

- 1) RJ の凍結乾燥品 (FDRJ) を餌に混ぜることで野生型の八工に摂取させ、表現型の変化や胚から成虫までの成長速度、成虫の寿命、雌の産卵数について、非投与群、タンパク質過剰投与群との間で違いがみられるかを測定した。各投与群の 5 日間成虫個体から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法によってインスリン様シグナル伝達関連遺伝子群に属する *dilp5*、*InR*、*TOR* 遺伝子の発現量について調べた。
- 2) *Prx3* 遺伝子の発現量を RNAi によって低下させることが出来るショウジョウバエ系統を国立遺伝学研究所より入手し、*GAL4/UAS* と呼ばれるシステムによる交配操作によって、全身で *Prx3* 遺伝子の発現量が低下する *Prx3* ノックダウン個体を作製した。通常飼育による成虫の個体寿命を調べたほか、1%寒天スクロース餌に 0.5% $H_2O_2$  を混ぜた培地で飼育することによって酸化ストレスをかけ、対照群個体との間で生存率を比較した。
- 3) 研究室における野生型系統の 1 つである *w<sup>1118</sup>* について、羽化直後の成虫を雌

雄別にし、通常餌 (SF)、通常餌 + 0.4% グリシルグリシン (GG)、通常餌 + 0.4%アンセリン・カルノシン (AC) の餌でそれぞれ 5 日間飼育後、固定して体液成分を抽出し、HPLC (L-8900: Hitachi, Tokyo) を用いて体内の遊離アミノ酸を調べた。

- 4) *InR* の遺伝子領域に P 因子と呼ばれる DNA 断片が挿入されている系統のうち、12 系統をショウジョウバエ系統保存センターより入手し、系統間で交配させた。次世代が生じた組み合わせのうち、既知のインスリン様シグナル伝達経路 (ILS) に関連する遺伝子の突然変異体に共通する表現型 (発生遅延、成虫の矮小化など) を指標にして、1 通りの交配 (系統番号: 205009 × 206164) による *InR* 新規突然変異個体を生じる組み合わせをみつけた。成虫の体長、体重、翅の大きさなどを測定し、致死性や発生速度を調べた。また、成虫個体の寿命、飢餓時における生存率についても調べた。飢餓時特有に生じる遺伝子発現やタンパク質リン酸化の変化について、定量的 RT-PCR 法やウエスタンブロット法を用いてそれぞれ解析した。
- 5) 茶カテキンのうち、テアフラビン (TF) とエピテアフラガリン (ETG) は、静岡県・静岡市地域結集型研究開発プログラムの事業によって準備されたものを用いた。エピガロカテキンガレート (EGCg) については、市販の純品を用いた。それぞれの茶カテキンを含む飼料を成虫が忌避することなく摂取することは、CAFE アッセイと呼ばれる方法を用いて確認した。それぞれの茶カテキンを含む餌作製し、投与個体における (i). 3 齢幼虫時の脂肪体の脂肪蓄積量を Oil red 染色で測定、(ii). 成虫の MDA (マロジアルデヒド: 酸化ストレスのマーカー) 量を専用キットで測定、(iii) 脂質代謝関連遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法で解析、(iv) 成虫寿命の計測、などを行った。

4. 研究成果

- 1) ショウジョウバエが食品成分の検定に使用可能かを調べるための食品成分として、健康食品としても注目されているミツバチ産品のローヤルゼリー (RJ) に着目した。RJ に含まれる機能性成分としてロイヤラクチンと呼ばれるタンパク質が単離され、機能がショウジョウバエを用いて確かめられていた (引用文献)。RJ の凍結乾燥品 (FDRJ) を餌に混ぜることで野生型の八工に摂取させたと、外見上の顕著な形態的变化はみられなかったが、成長速度や成虫の寿命、産卵数が非投与群と比較して有意に亢進することを明らかにした。

- FDRJ を摂取したショウジョウバエでは、雌特異的に *dilp5* (ヒトのインスリンに相当) や *TOR* 遺伝子の発現量が増加していることも明らかにした (論文 : Kayashima et al. 2012)。
- 2) 所属研究室におけるヒト生活習慣病関連遺伝子の遺伝疫学的な解析によって、抗酸化関連遺伝子の 1 つである Peroxiredoxin3 (PRDX3) が肥満と関連していることが明らかとなった (引用文献)。PRDX3 のショウジョウバエにおける相同遺伝子である *Prx3* について、発現量低下個体を作製した。通常の飼育では、*Prx3* がロックダウンされていない対照群個体と比較して個体寿命に顕著な差はみられないものの、酸化ストレスをかけた状態で飼育した場合、対照群個体と比較して生存率の有意な低下が認められ、酸化ストレスに脆弱となることが明らかとなった。*Prx3* が酸化ストレス応答に重要な役割を果たすことを見いだした (論文 : Kayashima & Yamakawa-Kobayashi 2012)。老化の進行には活性酸素種が関与するとされている。そのためこの解析で用いた *Prx3* ロックダウン個体は、抗酸化能が減退した所謂「早期老化症モデルショウジョウバエ」であり、食品成分が抗酸化能を持つのかを調べる解析ツールとして利用出来ると考え、実際に茶カテキンの抗酸化能の検証が可能であることを示した (2010 年度日本動物学会にて口頭発表)。
  - 3) イミダゾールジペプチドの一種であるアンセリン・カルノシンは、抗酸化作用 (引用文献) や疲労軽減効果などが示唆されているものの、生体内における具体的な作用はよくわかっていない。ショウジョウバエで解析するにあたり、これまでわかっていなかったショウジョウバエ成虫体内における遊離アミノ酸の状態と、アンセリン・カルノシン摂取後の体内遊離アミノ酸の動態に変化があるか調べた。その結果、通常飼育下において、ショウジョウバエ成虫体内の遊離アミノ酸としてアンセリン・カルノシンは含まれていないこと、タウリン、プロリン、アラニン、アラニン、ヒスチジン、アルギニンに富むこと、GG や AC の投与によって存在量が有意に変動するアミノ酸があることを明らかにした (論文 : Shiotani et al. 2013)。
  - 4) 栄養代謝調節に関わるインスリンシグナル伝達系について、ショウジョウバエにも同様の経路 (インスリン様シグナル伝達経路 : ILS 経路) が存在し、ILS 経路に関連する遺伝子の突然変異体が多く見出されている。上記 1) にて示した FDRJ の ILS 経路への関与を調べる目的で、新規なインスリン用ホルモン受

容体 (*InR*) の突然変異個体を見いだした。この個体はインスリンシグナルの感受性が低下した所謂「II 型糖尿病モデルショウジョウバエ」といえる。RJ の生理活性は ILS 経路でなく EGFR の経路ではたらくことがわかっていたが (引用文献)、この個体を用いた FDRJ の投与実験によって、FDRJ が ILS 経路に関与しないことを改めて証明することができた (論文 : Kayashima et al. 2013)。

- 5) 茶に含まれるポリフェノール類には、抗酸化作用や血糖値調節作用など、多様な生理活性が報告されている (引用文献)。これら生理活性作用の分子メカニズムについて、特に脂肪蓄積の抑制作用の有無について、解析を行った。高脂肪食の摂取によってショウジョウバエ成虫の個体寿命は短縮し、酸化ストレスマーカーである MDA の蓄積量は増加する。しかしながら、高脂肪食と茶ポリフェノールの 1 種であるテアフラビン (TF) を同時摂取させたところ、寿命短縮の回復効果はみられなかったものの、高脂肪食の継続的な摂取によって生じる MDA の蓄積が抑制された。高脂肪食の摂取によって 3 齢幼虫の脂肪体は脂肪を多く蓄積するが、TF、ETG や EGCg の同時摂取によって蓄積が緩和される傾向がみられ、特に ETG の同時摂取では顕著であった (図 1)。

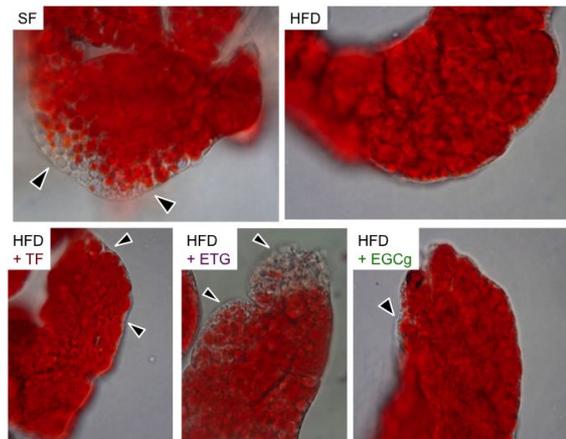


図 1. TF, ETG, EGCg は、高脂肪食 (HFD) によって起こる脂肪体の顕著な脂肪蓄積を防ぐ。矢頭 : 中性脂肪を染めるオイルレッドで染色されなかった脂肪体の部位。

同時期、同組織における脂肪代謝関連遺伝子の発現量を調べたところ、HFD の摂取による遺伝子発現量の変化が緩和される傾向が見いだされた。また、茶ポリフェノールの摂取によって、脂肪蓄積が抑制されたことに起因する成虫個体の寿命変化もみられた (論文 : Kayashima et al. 2015)。

本研究では、ショウジョウバエを用いて食品成分の機能性を検証出来ることを明らかにし、機能性の検証に適した疾患モデルショウジョウバエを数種見いだした。さらに、研究を進める過程の中で、ハエで機能が証明できそうな他の食品成分候補も有することとなった。

<引用文献>

Kamakura M (2011). Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* 473, 478-483.

Hiroi M, Nagahara Y, Miyauchi R, Misaki Y, Goda T, Kasezawa N, Sasaki S, Yamakawa-Kobayashi K (2011). The combination of genetic variations in the PRDX3 gene and dietary fat intake contribute to obesity risk. *Obesity* 19, 882-887.

Yanai N, Shiotani S, Hagiwara S, Nabetani H, Nakajima M (2008). Antioxidant combination inhibits reactive oxygen species mediated damage. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72, 3100-3106.

Riegsecker, S., Wiczynski, D., Kaplan, M.J., and Ahmed, S. (2013). Potential benefits of green tea polyphenol EGCG in the prevention and treatment of vascular inflammation in rheumatoid arthritis. *Life Sci.* 93, 307-312.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

・ **Kayashima Y.\***, Murata S., Sato M., Matsuura K., Asanuma T., Chimoto J., Ishii T., Mochizuki K., Kumazawa S., Nakayama T., Yamakawa-Kobayashi K (2015). Tea polyphenols ameliorate fat storage induced by high-fat diet in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Reports* 4, 417-424. (査読あり, \* **Corresponding author**) DOI:10.1016/j.bbrep.2015.10.013

・ **Kayashima Y.\***, Sato A., Kumazawa S., Yamakawa-Kobayashi K (2013). A heteroallelic *Drosophila* insulin-like receptor mutant and its use in validating physiological activities of food constituents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 258-262. (査読あり, \* **Corresponding author**) DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.113.

・ Shiotani S., Yanai N., Suzuki T., Tujioka S., Sakano Y., Yamakawa-Kobayashi K., **Kayashima Y.\***(2013). Effect of a

dipeptide-enriched diet on adults of a laboratory strain in *Drosophila melanogaster*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 836-838. (査読あり, \* **Corresponding author**) DOI: 10.1271/bbb.120606.

・ **Kayashima Y.\***, Yamakawa-Kobayashi K (2012). Involvement of Prx3, a *Drosophila* ortholog of the thiol-dependent peroxidase PRDX3, in age-dependent oxidative stress resistance. *Biomed. Res.*, 33, 319-322. (査読あり, \* **Corresponding author**) DOI:10.2220/biomedres.33.319

・ **Kayashima Y.\***, Yamanashi K., Sato A., Kumazawa S., Yamakawa-Kobayashi K (2012). Freeze-dried royal jelly maintains its developmental and physiological bioactivity in *Drosophila melanogaster*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 2107-2111. (査読あり, \* **Corresponding author**) DOI: 10.1271/bbb.120496.

[学会発表](計19件)

・ **萱嶋 泰成** (2015. 2. 6). モデル生物ショウジョウバエを用いた生活習慣病関連遺伝子の解析ならびに機能性食品成分の探索. 山梨学院学術報告会. **招待講演**. 「山梨学院大学(山梨・甲府)」

・ **萱嶋 泰成**, 佐藤 綾香, 熊澤 茂則, 小林 公子 (2014. 9. 11). 食品の機能性検定に向けた二型糖尿病モデルショウジョウバエの開発と利用. 公益社団法人 日本動物学会 第 85 回大会. 「東北大学(宮城・仙台)」

・ Yamakawa-Kobayashi K., Otagi E., Sakano Y., Shiotani S., Yanai N., **Kayashima Y.** (2014. 8. 7). Regulation of energy metabolism by carnosine dipeptidase (CNDP). International Congress on Carnosine and Anserine 2014 (ICCA 2014). **国際会議**. 「星薬科大学(東京・品川)」

・ **Kayashima Y.**, Shiotani S., Yanai N., Suzuki T., Tujioka S., Sakano Y., Yamakawa-Kobayashi K (2014. 8. 6). Effect of Carnosine and Anserine-Enriched Diet in Fruit Fly *Drosophila melanogaster*. International Congress on Carnosine and Anserine 2014 (ICCA 2014). **国際会議**. 「星薬科大学(東京・品川)」

・ **萱嶋 泰成**, 村田 晋一, 佐藤 美咲, 青木 あずさ, 地本 純子, 小林 公子 (2014. 3. 14). 茶ポリフェノールがもつ脂肪蓄積の抑制効果 -モデル生物ショウジョウバエによる検証-. 第 29 回茶学術研究会講演会. **招待講演**. 「ホテルアソシア静岡 (静岡・静岡)」

・ **萱嶋 泰成**, 村田 晋一, 佐藤 美咲, 地本 純子, 小林 公子 (2013. 9. 28). 茶ポリフェノールの生理機能をショウジョウバエで解析する試み. 公益社団法人日本動物学会第 84 回大会. 「岡山大学 (岡山・岡山)」

・ 地本 純子, 村田 晋一, 佐藤 美咲, **萱嶋 泰成**, 小林 公子 (2013. 3. 15). モデル動物ショウジョウバエによる茶ポリフェノールの生理機能解析. 第 28 回茶学術研究会講演会. 「ホテルアソシア静岡 (静岡・静岡)」

・ **萱嶋 泰成**, 村田 晋一, 小林 公子 (2012. 11. 10). テアフラビンとエピテアフラガリンの生理活性作用 -ショウジョウバエを用いた検証-. 第 17 回日本フードファクター学会学術集会・第 9 回日本カテキン学会総会 合同大会 2012. 「静岡県男女共同参画センター・あざれあ (静岡・静岡)」

・ 佐藤 綾香, **萱嶋 泰成**, 小林 公子 (2012. 11. 10). ショウジョウバエインスリン受容体の新規突然変異体の解析. 第 17 回日本フードファクター学会学術集会・第 9 回日本カテキン学会総会 合同大会 2012. 「静岡県男女共同参画センター・あざれあ (静岡・静岡)」

・ 村田 晋一, **萱嶋 泰成**, 小林 公子 (2012. 11. 10). キイロショウジョウバエで探る茶ポリフェノールの抗酸化、抗老化作用. 第 17 回日本フードファクター学会学術集会・第 9 回日本カテキン学会総会 合同大会 2012. 「静岡県男女共同参画センター・あざれあ (静岡・静岡)」

・ **萱嶋 泰成**, 坂野 ゆりえ, 辻岡 志穂, 塩谷 茂信, 柳内 延也, 小林 公子 (2012. 9. 15). カルノシン分解酵素 CNDP1 のショウジョウバエ相同遺伝子 *dCNDP1* の機能. 公益社団法人日本動物学会第 83 回大会. 「大阪大学 (大阪・豊中)」

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 1 件)

名称: 老化抑制剤  
発明者: **萱嶋 泰成**, 中山 勉, 片柳 悠紀, 今井 伸二郎.  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特許願 2012-122773  
出願年月日: 平成 24 年 5 月 30 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.ygjc.ac.jp/pdf/teacher\\_fan/kaya\\_shima\\_y.pdf](http://www.ygjc.ac.jp/pdf/teacher_fan/kaya_shima_y.pdf)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萱嶋 泰成 (KAYASHIMA, Yasunari)  
山梨学院短期大学・食物栄養科・准教授  
(~2014.3: 静岡県立大学・食品栄養科学部・大学院生活健康科学研究科・助教)  
研究者番号: 90365453