

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292066

研究課題名(和文) 栄養・食品成分によるオートファジー調節シグナリング機構：その多様性と抗加齢

研究課題名(英文) Signalling Mechanism of Autophagy Regulation by Nutrients and Food Components : Its Diversity and Anti-aging.

研究代表者

門脇 基二 (Kadowaki, Motoni)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：90126029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「栄養によるオートファジー調節を通して抗加齢に貢献する」という考えに基づき、このオートファジーの調節因子について、栄養・食品成分、特にアミノ酸と抗酸化物質、米タンパク質の中に探索し、その調節機構について、オートファゴソーム形成調節、転写調節、そして寿命遺伝子SIRT1との関連をアセチル化を含めて詳細に解明し、特に高齢者に対する新たな食品機能性の根拠を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In order to contribute to anti-aging through autophagy regulation by nutrition, we searched nutrients, especially amino acids and antioxidants, and rice protein as a possible regulatory food factors of autophagy, and investigated their regulatory mechanisms, i.e., signaling mechanisms at the formation step of autophagosome, the transcription step, and the relationship with aging gene, SIRT1 including acetylation. These findings will give the evidence for food functions on elderly people.

研究分野：農芸化学・食品科学

キーワード：オートファジー シグナリング 抗加齢 アミノ酸 サーチェイン

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来は、加齢への対応を今世紀の最重要課題のひとつに押し上げている。この加齢の進行が酸化ストレスによるらしいことは近年よく知られている。また、それによる細胞内環境の劣悪化を傷害タンパク質やミトコンドリアのターンオーバーによって健全に維持するのがオートファジーの役割である。従って、オートファジーが加齢の進行に影響を与えることは容易に推測でき、特に栄養・食品成分によるオートファジー調節とその加齢への影響を解明することが期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、「栄養によるオートファジー調節を通して、抗加齢に貢献する」という考えに基づき、このオートファジーの調節因子について栄養・食品成分、特にアミノ酸と抗酸化物質、米タンパク質の中に探索し、その調節機構について、オートファゴソーム形成調節、転写調節、そして寿命遺伝子 SIRT1 との関連を詳細に解明し、特に高齢者に対する新たな食品機能性の根拠を提供するものである。

### (1) 栄養・食品成分によるオートファジー調節

#### ① アミノ酸によるオートファジー調節機構

A. アルギニン、メチオニンによる調節：一般には「アミノ酸」と一括りにされて議論されるが、細胞の種類によってもその有効なアミノ酸の種類が異なる。そこで、単独で十分な活性を持つアミノ酸を選び、ここではこれまで検討がされなかったアルギニンとメチオニンについての検討を実施する。それにより、アミノ酸のシグナリング機構の多様性を証明する。

B. 新規シグナリング調節タンパク質 Trib3 の関与：やや長期的な調節 (Autophagic Capacity) の仕組みを調べるために Atg 関連遺伝子群の DNA マイクロアレイ解析をしたところ、絶食とアミノ酸添加で際立った誘導・抑制の応答をする Trib3 が見出されたので、この Trib3 の Autophagic Capacity 調節への関与を検討する。

#### ② 抗酸化性食品成分による調節機構

当研究室で、抗酸化作用のあるビタミン C、ビタミン E でオートファジー促進作用が認められていることから、食品成分中の代表的なエピガロカテキンガレート (EGCG) とレスベラトロール (Resv) を対象として調節機構を検討する。

#### ③ 米タンパク質 (ペプチド) による調節可能性

以前ラット摂食実験で、肝臓灌流でのオートファジー測定法で、米タンパク質にオートファジー促進活性が認められたが、再現性の問題で見送られて来た。最近、当研究室の別のプロジェクトで米タンパク質が複数の生理作用が認められたため、改めて米タンパク質または米ペプチドのオートファジーへの調節可能性を検討する。

### (2) 抗加齢の調節 (SIRT1 とオートファジー調節の関係)

Atg 関連タンパク質が SIRT1 により脱アセチル化を受けることから、その一つである LC3 について調べたところ、確かに I 型、II 型共にアセチル化を受けており、そのレベルが調節を受ける可能性が示唆された。これは従来 LC3 の調節がリン脂質化の化学修飾のみによると考えられていたが、新たにアセチル化による活性調節が推定され、寿命遺伝子として知られる SIRT1 とオートファジー調節の関係を追求する。

## 3. 研究の方法

当研究室での経験から、Rat Hepatoma H4-II-E 細胞が *in vivo* の状態をよく反映していることから、主にこの細胞を用いて制御機構を解析した。また、オートファジー速度は当研究室で開発した「Cytosolic LC3 Ratio 法」ですべて定量した (Karim *et al.*, Autophagy, 2007)。この方法は、オートファゴソームの形成段階に関与する LC3 タンパク質の活性化のステップを特異的に検出するものであり、オートファジーの速やかな速度調節 (Autophagic Activity) を観察するとともに、全体的な速度を反映している。

### (1) 栄養・食品成分によるオートファジー調節

#### ① アミノ酸によるオートファジー調節機構

A. アルギニン、メチオニンによる調節：これら単独のアミノ酸の効果について用量や反応時間を含めて比較検討を実施する。各種阻害剤の組み合わせの効果で観察する。

B. 新規シグナリング調節タンパク質 Trib3 の関与：ここでは Trib3 mRNA レベルでの応答がマイクロアレイ法により示されたので、個別の PCR 法と siRNA を用いたノックダウン実験により因果関係を明らかにする。

#### ② 抗酸化性食品成分による調節機構

EGCG をはじめとして、ガレート基を有するカテキン類である Epicatechin gallate (ECG), Epigallocatechin (EGC), Gallic acid gallate (GCG) についてオートファジー活性化作用の構造活性相関を検討した。また、レスベラトロール (Resv)

を同じスチルベノイドのピセアタノール (Pice) や酸化型のジヒドロレスベラトロールと比較しつつ検討した。

#### (2) 抗加齢の調節 (SIRT1 とオートファジー調節の関係) :

LC3 タンパク質のアセチル化の状況を抗アセチル化抗体 (Anti-acetyl-Lys ab 61257) を用いて検討した。細胞の摂食-絶食によるアセチル化の応答を検討し、また、細胞内分画での調節の可能性が予想されるため、オートファゴソームとサイトゾル画分とで区別して検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 栄養・食品成分によるオートファジー調節

##### ① アミノ酸によるオートファジー調節機構

A. アルギニン, メチオニンによる調節 : アルギニンでの作用機構がいわゆる ROS と mTOR 経路ではなく、NO 経路を取ることが示された。尿素回路の関連アミノ酸であるシトルリンについてもアルギニンと同様な抑制効果を示した。また、同じく ROS を介さないグループに属するメチオニンについて調べたところ、mTOR と PP2A を介する可能性が示された。

B. 新規シグナリング調節タンパク質 Trib3 の関与 : Trib3 mRNA の摂食-絶食による誘導と抑制の転写調節は見かけ上見事に応答したが、siRNA ノックダウン法による因果関係は証明されなかった。したがって、絶食によるオートファジー促進のシグナル候補としては否定された。

##### ② 抗酸化性食品成分による調節機構

EGCG とその類縁体の効果を検討したところ、至適濃度は異なるものの、共通の性質として低濃度 (20  $\mu$ M) では促進したが、高濃度 (50-100  $\mu$ M) では逆に抑制する二相性が示された。また、抗加齢に関与すると言われる SIRT1 を活性化する Resv や Pice のオートファジーに対する効果を検討したところ、やはり上記抗酸化成分と同様、低濃度での促進、高濃度での抑制の二相性が示された。ただし、ROS の産生はこの濃度範囲で濃度依存的に抑制され、オートファジー調節活性との整合性は認められなかった。また、Resv の酸化型であるジヒドロレスベラトロールも Resv と同様にオートファジー調節活性を示したことから、Resv の作用は抗酸化作用ではない経路である可能性が示された。

##### ③ 米タンパク質 (ペプチド) による調節可能性

実際に実施ができなかった。

#### (2) 抗加齢の調節 (SIRT1 とオートファジー調節の関係)

SIRT1 が脱アセチル化酵素であることから、Resv と SIRT1 の関係からオートファジー調節の重要な調節機構としての (脱) アセチル化の位置付けについてその詳細な検討を試みた。オートファゴソーム画分とサイトゾル画分での LC3 のアセチル化の分布を検討したが、検出方法が十分確立できず、成果は今後に残されることとなった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Kubota M, Watanabe R, Yamaguchi M, Hosojima M, Saito A, Fujii M, Fujimura S, Kadowaki M. (2016) Rice endosperm protein slows progression of fatty liver and diabetic nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Br J Nutr*, 査読有, **116**, 1326-1335. DOI: 10.1017/S0007114516003512
- ② Kawakami T, Fujikawa A, Ishiyama Y, Hosojima M, Saito A, Kubota M, Fujimura S, Kadowaki M. (2016) Protective effect of composite earthworm powder against diabetic complications via increased fibrinolytic function and improvement of lipid metabolism in ZDF rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, **80**, 1980-1989. DOI: 10.1080/09168451.2016.1166932
- ③ Watanabe G, Kobayashi H, Shibata M, Kubota M, Kadowaki M, Fujimura S. (2016) Reduction of dietary lysine increases free glutamate content in chicken meat and improves its taste. *Anim Sci J*, 査読有, **88**, 300-305. DOI: 10.1111/asj.12577
- ④ Hosojima M, Kaseda R, Kondo H, Fujii M, Kubota M, Watanabe R, Tanabe N, Kadowaki M, Suzuki Y, Saito A. (2016) Beneficial effects of rice endosperm protein intake in Japanese men with risk factors for metabolic syndrome: a randomized, crossover clinical trial. *BMC Nutrition*, 査読有, **2**, 25-33. DOI: 10.1186/s40795-016-0065-7
- ⑤ Cynober L, Bier DM, Kadowaki M, Morris SM Jr, Elango R, Smriga M. (2016) Proposals for upper limits of safe intake for arginine and tryptophan in young adults and an upper limit of safe intake for leucine in the elderly. *J Nutr*, 査読なし, **146**, 2652S-2654S. DOI: 10.3945/jn.115.228478
- ⑥ Ishikawa Y, Hira T, Inoue D, Harada Y, Hashimoto H, Fujii M, Kadowaki M, Hara H.

- (2015) Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. *Food Funct*, 査読有, **6**, 2525-2534.  
DOI: 10.1039/c4fo01054j
- ⑦ Watanabe G, Kobayashi H, Shibata M, Kubota M, Kadowaki M, Fujimura S. (2015) Regulation of free glutamate content in meat by dietary lysine in broilers. *Anim Sci J*, 査読有, **86**, 435-442.  
DOI: 10.1111/asj.12321
- ⑧ Kai S, Watanabe G, Kubota M, Kadowaki M, Fujimura S. (2015) Effect of dietary histidine on contents of carnosine and anserine in muscles of broilers. *Anim Sci J*, 査読有, **86**, 541-546.  
DOI: 10.1111/asj.12322
- ⑨ 渡辺賢一, ソマスンダラム アムルガム, 門脇基二, 他 12 名 (2015) 新形質米 (巨大胚芽米・発芽玄米) 配合パックスライス摂取時の血圧と血糖値への効果. 新潟医学会雑誌, 査読なし, **129**, 199-209.  
URL: <http://niigataigakukai.jp/news.php>
- ⑩ Kubota M, Saito Y, Masumura T, Watanabe R, Fujimura S, Kadowaki M. (2014) *In vivo* digestibility of rice prolamin/protein body-I particle is decreased by cooking. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 査読有, **60**, 300-304.  
URL: [http://www.jsnfs.or.jp/pub/pub\\_jnsv.html](http://www.jsnfs.or.jp/pub/pub_jnsv.html)
- ⑪ Karim MR, Kawanago H, Kadowaki M. (2014) A quick signal of starvation induced autophagy: transcription versus post-translational modification of LC3. *Anal Biochem*, 査読有, **465**, 28-34.  
DOI:10.1016/j.ab.2014.07.007
- ⑫ Perenlei G, Tojo H, Okada T, Kubota M, Kadowaki M, Fujimura S. (2014) Effect of dietary astaxanthin rich yeast, *Phaffia rhodozyma*, on meat quality of broiler chickens. *Anim Sci J*, 査読有, **85**, 895-903.  
DOI: 10.1111/asj.12221
- ⑬ Angcajas AB, Hirai N, Kaneshiro K, Karim MR, Horii Y, Kubota M, Fujimura S, Kadowaki M. (2014) Diversity of amino acid signaling pathways on autophagy regulation: a novel pathway for arginine. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, **446**, 8-14.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.117
- ⑭ 門脇基二. (2014) アミノ酸によるオートファジー制御. 生化学, 査読なし, **86**, pp.324-331  
URL: <http://www.jbsoc.or.jp/journal>
- ⑮ 門脇基二. (2014) オートファジーの歴史と栄養学. 化学と生物, 査読なし, **52**, pp.249-254.  
URL: <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/kagakutoseibutsu/-char/ja>
- 招待講演 (シンポジウム等)
- ① 門脇基二 (2017) お米に潜む新たな可能性 -米タンパク質の健康機能性の発見-. 新潟大学東京事務所講演会, TKP 田町カンファレンスセンター, 東京, 2月18日.
- ② 門脇基二 (2017) オートファジーと栄養の話. 平成28年度第3回新潟県食品技術研究会, 新潟東映ホテル, 新潟, 2月25日.
- ③ 門脇基二 (2017) お米の新しい健康機能性. 新潟県新たな米産業創出技術研究会 マッチングフォーラム, 新潟日報メディアシップ, 新潟, 3月14日.
- ④ Kadowaki M, Kubota M. (2016) Discovering new functionalities of rice protein. *Royal Golden Jubilee-Ph.D. Congress*, Bangkok, Thailand, June 10.
- ⑤ 門脇基二 (2016) 日本アミノ酸学会の10年とこれから. 日本アミノ酸学会10周年記念大会 (基調講演), 東京大学, 東京, 9月12日.
- ⑥ Kadowaki M. (2016) New functionalities of rice endosperm and bran: An approach from protein. 3<sup>rd</sup> International Conference on Rice Bran Oil (ICRBO 2016), University of Tokyo, Tokyo, October 24.
- ⑦ 門脇基二. (2016) オートファジーと栄養: 過去から未来へ. 日本食物繊維学会第21回学術集会, 静岡大学, 静岡, 11月26日.
- ⑧ 門脇基二 (2015) オートファジーと栄養: 過去から未来へ. 第54回日本栄養・食糧学会近畿支部大会, 神戸大学, 神戸, 10月10日.
- ⑨ 門脇基二 (2015) コメの新たな機能性について. 第6回栄養学を志す若手のためのフォーラム, 神戸大学百年記念館, 神戸, 10月11日.
- ⑩ 門脇基二 (2015) 米の新規生理機能の発見と新潟県食産業の活性化への貢献. 第68回新潟日報文化賞, 新潟日報本社, 新潟, 10月30日.
- ⑪ 門脇基二 (2014) 米のイノベーション: 付加価値の向上を目指して. 『大学は美味しい!!』 in 農林水産省」特別講演会, 農林水産省本館, 東京, 3月25日.
- ⑫ 門脇基二 (2014) はじめに: オートファジーと栄養学, 日本農芸化学会2014年度大会シンポジウム, 東京, 3月30日.
- ⑬ 門脇基二 (2014) アミノ酸によるオートファジー調節の多様なシグナリング. 第68回日本栄養・食糧学会大会シンポジウム, 札幌, 5月31日.
- ⑭ 門脇基二 (2014) 栄養によるタンパク質代謝調節と米の新規機能性に関する研究. 飯島藤十郎記念食品科学振興財団30周年記念講演会, 如水会館, 東京, 10月2日. (受賞講演)
- ⑮ Kadowaki M. (2014) Discovering new

[学会発表] (計 16 件)

physiological functionalities of rice protein.  
*East Asia Conference on Standardization of  
rice function*, Kyoto, Dec. 11.

- ⑯ 門脇基二 (2014) 米の新しい健康機能性.  
第12回日本機能性食品医用学会, 京都国  
際会館, 京都, 12月14日.

○一般講演  
省略

[図書] (計2件)

- ① 久保田真敏, 門脇基二 (2016) 日本食お  
よびその素材の健康機能性開発. 監修:  
矢澤一良, 260p, 第III編, 第5章, 米.  
シーエムシー出版, pp.169-175.
- ② 門脇基二 (2014) アミノ酸科学の最前  
線-基礎研究を活かした応用戦略-. 監  
修: 鳥居邦夫・門脇基二, 281p, 第2章,  
8. アミノ酸とタンパク質分解調節, シー  
エムシー出版, pp. 106-111.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)  
名称: 糖尿病による脂肪肝及び腎肥大を抑制  
する組成物及びその製造方法.  
発明者: 門脇基二, 久保田真敏, 近藤 堯,  
川上智子  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-70644.  
出願年月日: 平成 26 年 3 月 31 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)  
名称: 糖尿病による脂肪肝及び腎肥大を抑制  
する組成物及びその製造方法.  
発明者: 門脇基二, 久保田真敏, 近藤 堯,  
川上智子  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 第 6047609 号  
取得年月日: 平成 28 年 11 月 25 日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

門脇 基二 (Kadowaki, Motoni)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号: 9 0 1 2 6 0 2 9

### (2) 研究分担者

藤村 忍 (Fujimura, Shinobu)  
新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号: 2 0 2 8 2 9 9 9