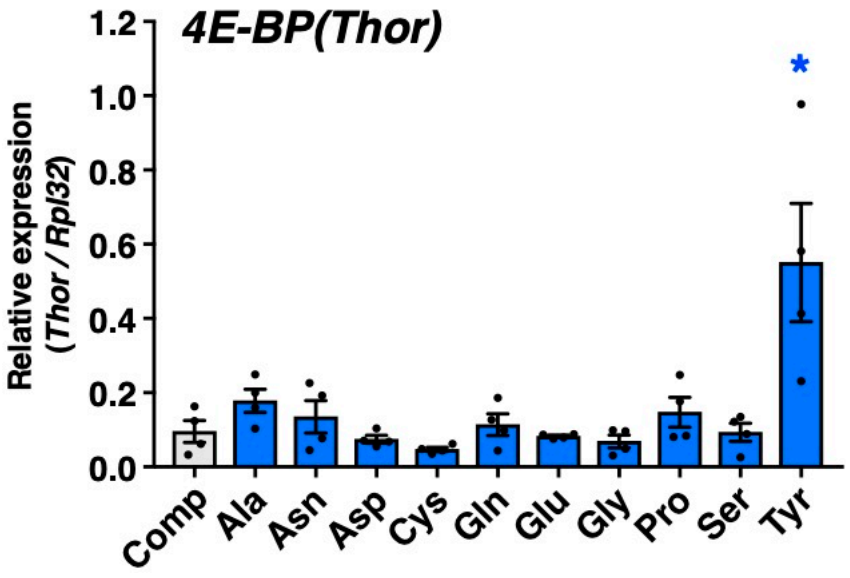
125　単一栄養素による代謝プログラミングの分子機構解明	小幡　史明

【目的】疫学的な研究から、発生・発達期の栄養環境が、成人の健康寿命に強く影響することが示唆されてきた。このような栄養プログラミングは、2 型糖尿病や心疾患などの生活習慣病の発症に強く関わる現象であり、動物実験によっても同様の現象が再現されている。しかしながら、発生期のどの栄養分子が、どのように長期的な生理応答を誘導するかについては、ほとんど不明である。興味深いことに、発生期の食餌中チロシン量を特異的に制限すると、代謝状態が再構成され、生殖能や酸化ストレス耐性が向上することが明らかになってきた。本研究の目的は、発生期のチロシン制限が個体に与える影響を解析し、その分子機構を解明することである。

【方法】40 種類の栄養素の混合物である合成培地を利用して、ショウジョウバエの成虫および幼虫の食餌からチロシンを制限した。チロシン制限下での発生スピード、個体の成長、アミノ酸プロファイルを含むメタボローム解析、腸組織、脂肪組織におけるトランスクリプトミクス解析を行い、チロシン制限によって個体に起こる変化を解明した。また、チロシン制限下におけるドーパミンの減少が、成体の生理状態を変化させる可能性を考慮して、ドーパミンの摂食、ドーパミン合成の遺伝学的操作を行った。また発生期チロシン制限による成体の記憶・学習能を調べた。

【結果】本研究により、チロシン制限を行った幼虫においては、チロシン量が半分に低下した。このようなアミノ酸制限下での当該アミノ酸の減少は、必須アミノ酸ではいずれにも顕著に見られるが、非必須アミノ酸では、チロシン、アスパラギン、セリンのみで観察された。チロシン欠乏培地における生育は、野生型においては、比較的弱い発生スピードの遅延が認められる一方、チロシン合成酵素（PAH）のノックダウンにより発生が完全に停止する。従って、チロシンは体内生合成により産生される非必須アミノ酸にも関わらず、その体内量を保つためには食餌中からの摂取が必要であることが分かった。チロシン欠乏状態においては、腸組織ではほとんど遺伝子発現に差異がないが、脂肪組織においては飢餓応答に関わる経路の特徴的な活性化が見られた。*4E-BP* の発現上昇に見られるこの飢餓応答は、非必須アミノ酸の中でもチロシン制限によってのみ誘導された。従って、このようなチロシン欠乏に起因した幼虫期の変化が成体の生理状態を規定する可能性が考えられた。一方、チロシン制限によってドーパミンの低下が認められたことから、発生期のドーパミンの低下による脳機能への影響が予想されたが、チロシン制限を経験した個体についても記憶学習のスコアには変化がなかった。また、ドーパミン量を増減した個体において、若干の生理状態の変化が認められたが、発生期チロシンとの関連性は大きく認められなかった。

チロシン制限により脂肪組織で *4E-BP（Thor）* の発現誘導が起こる



125. 単一栄養素による代謝プログラミングの分子機構解明

小幡　史明

東京大学 大学院薬学系研究科

Key words：アミノ酸，栄養，代謝，飢餓応答，ショウジョウバエ

緒　言

加齢は、様々な疾患のリスクをあげる根源的な要素である。現在までに、最も普遍的な老化の遅延方法として、食餌制限が知られる。様々なモデル動物を用いた研究から、食餌制限による健康増進効果の本質は、当初考えられていたような総カロリーの制限ではなく、特定の栄養素、特にタンパク質、あるいはそれを構成するアミノ酸の制限であることが分かってきた［1］。驚くべきことに、メチオニンのみを制限するだけでも、健康増進効果が見られることが明らかとなっており、しかもその責任因子はメチオニン代謝物であることが示唆されている［2］。これらのことから、食餌に含まれる特定の単一分子（ミクロ栄養素）が、個体全体の生理状態に強烈な影響を与えることが示唆されてきた。

疫学的な研究から、発生・発達期の栄養環境が、成人の健康寿命に強く影響することが示唆されてきた。このような栄養プログラミングは、2 型糖尿病や心疾患などの生活習慣病の発症に強く関わる現象であり、動物実験によっても同様の現象が再現されるものの、その機構については解明が立ち遅れている。分子機構が極めて複雑なうえに、因果の間の長大な時間的隔離が、迅速な解析を困難にしているためである。そこで、生活環が短く、安価で大量飼育が可能な、ショウジョウバエをモデルとして、栄養プログラミングの分子機構を解析してきた。すなわち、40 種類の栄養素の混合物である合成培地を利用し、ショウジョウバエ幼虫に一つ一つの栄養素を制限した食餌条件で発生させ、その成体における生理状態を解析した。興味深いことに、発生期の食餌中チロシン量を特異的に制限すると、代謝状態が再構成され、生殖能や酸化ストレス耐性が向上することが明らかになってきた。このような生理的変化は、同じ芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンを含む、他のアミノ酸では見られない特徴的なものであった。また、チロシン制限を発生期に経験した個体は、加齢にともなう運動能の低下が抑制されていることも見出している。そこで本研究では、発生過程でのチロシンによる栄養プログラミングの分子機構を解明することを目的とする。

これまでに、チロシン欠乏食を摂取している幼虫のメタボローム解析から、チロシン制限がドーパ量やドーパミン量を低下させることが明らかとなり、発生期のドーパミンの低下による脳機能への影響が予想された。しかし、幼虫期チロシン制限を経験した個体について記憶学習のスコアには変化がなかった。また、ドーパミン量を増減した個体において、若干の生理状態の変化が認められたが、発生期チロシンとの関連性は大きく認められなかった。一方で、チロシン制限直下の幼虫における腸組織・脂肪組織でのトランスクリプトミクス解析の結果、チロシン欠乏によって脂肪組織特異的に飢餓応答が誘導されることが明らかとなった。*4E-BP* の発現上昇に見られるこの飢餓応答は、非必須アミノ酸の中でもチロシン制限によってのみ誘導された。従って、このようなチロシン欠乏に起因した幼虫期の脂肪組織での栄養応答変化が成体の生理状態を規定する可能性が考えられる。

方　法

1.　ショウジョウバエの飼育条件

ショウジョウバエは厳密に発生密度をコントロールした上で、12 時間明暗周期、温度 25℃、湿度 60%のインキュベーターで維持した。系統の維持や成虫用としてはイーストベースの飼料を用いた。栄養操作の際には、先行研究で開発されたショウジョウバエ用合成培地［3］を基に、アガーと防腐剤の量を減らした幼虫用飼料を用いた。約 40 種類の精製した材料を混合することで、完全合成培地またはアミノ酸を一種類ずつ除いた 20 種の培地を作製した。

2.　チロシン制限直下、もしくはチロシン制限経験個体（成虫）の体内代謝物量の測定

幼虫期もしくは成虫期において、チロシン制限直下による体内代謝物の網羅的解析（メタボローム解析）を LC-MS/MS（島津製作所 LCMS-8060）を用いて行った。内部標準物質を含む 80%メタノールを用いて代謝物を抽出し、アセトニトリルと 10 kDa カラムによってタンパク質を除去したのち、エバポレーターで凍結乾燥したものを水で再溶解し、分析した。分析条件は島津製作所のメソッドパッケージ一次代謝物 ver.2 に従った。

3.　表現型の解析

産卵数の計測は以下のように行った。成虫を回収したのち 2 日間交配させ、その後 1 バイアルあたりにメスを 10 匹、もしくはオスとメスを 3 匹ずつ入れて 3 日おきにエサを換えながら維持した。計測日の日中 12 時間、もしくは日中 12 時間と夜間 12 時間の二回に分けてエサの上に卵を産ませ、顕微鏡下で観察しながら数取器で卵の数を計測した。酸化ストレス耐性に関しては、20 mM のパラコートを摂取させた成虫の生存数を計測した。発生速度は、同時に播いた胚が蛹になる数を基に比較した。記憶学習に関しては、東北大学の谷本研究室と共同研究を行い、砂糖報酬記憶の 5 分及び 24 時間記憶を計測した。

4.　トランスクリプトミクス解析

チロシン制限直下の三齢幼虫における腸組織・脂肪組織から QIAzol と RNeasy plus micro kit を用いて RNA を抽出した。トランスクリプトミクス解析はマクロジェンに委託し、Illumina NovaSeq 6000 を用いて paired end シーケンスデータを取得した。低クオリティリードとアダプター配列を Trimmomatic (v0.39) を用いて除去したのち、Hisat2 (v2.1.0) を使用してショウジョウバエゲノム (BDGP6.22) に対するアライメントを行った。subread (v1.6.5) を用いてリードカウントを得たのち、発現が変化した遺伝子について DESeq2 (v1.26.0) によって二群比較を行った。

結果および考察

1. チロシン制限下においてショウジョウバエ幼虫の体内ではチロシン、ドーパ、ドーパミンの量が減少した

チロシン制限直下の幼虫の全身の代謝物を測定した結果、チロシンそのものの量が半分程度に減少することが明らかとなった。このような「制限したアミノ酸の体内量の減少」は、必須アミノ酸では全てにおいて観察されるものの、体内生合成可能な非必須アミノ酸においてはチロシンのほか、セリンとアスパラギンのみに限られる特異的な現象であった。幼虫の発生スピードはチロシン制限下でも大きく阻害されることはないが、チロシンの生合成酵素であるフェニルアラニンヒドロキシラーゼをノックダウンすると強い発生不全が観察された。このことから、個体の成長（発生スピード）は体内での盛んなチロシン生合成によって支えられているが、チロシンの体内量を完全に保つには食餌からチロシンを摂取する必要であることが明らかとなった。

チロシンは体内で代謝されてメラニンの前駆体であるドーパや、重要な神経伝達物質であるドーパミンの原料となる。チロシン制限下における幼虫全身のメタボローム解析の結果、体内チロシン量の減少は同時にドーパ、ドーパミンの減少も伴うことが明らかとなった（図 1）。一方でチロシンから生合成されるチラミンやオクトパミンといった神経伝達物質には影響がないこともわかった。これらの結果を踏まえ、チロシンによってもたらされる代謝プログラミングの中核を、ドーパミンが担う可能性を検証することとした。

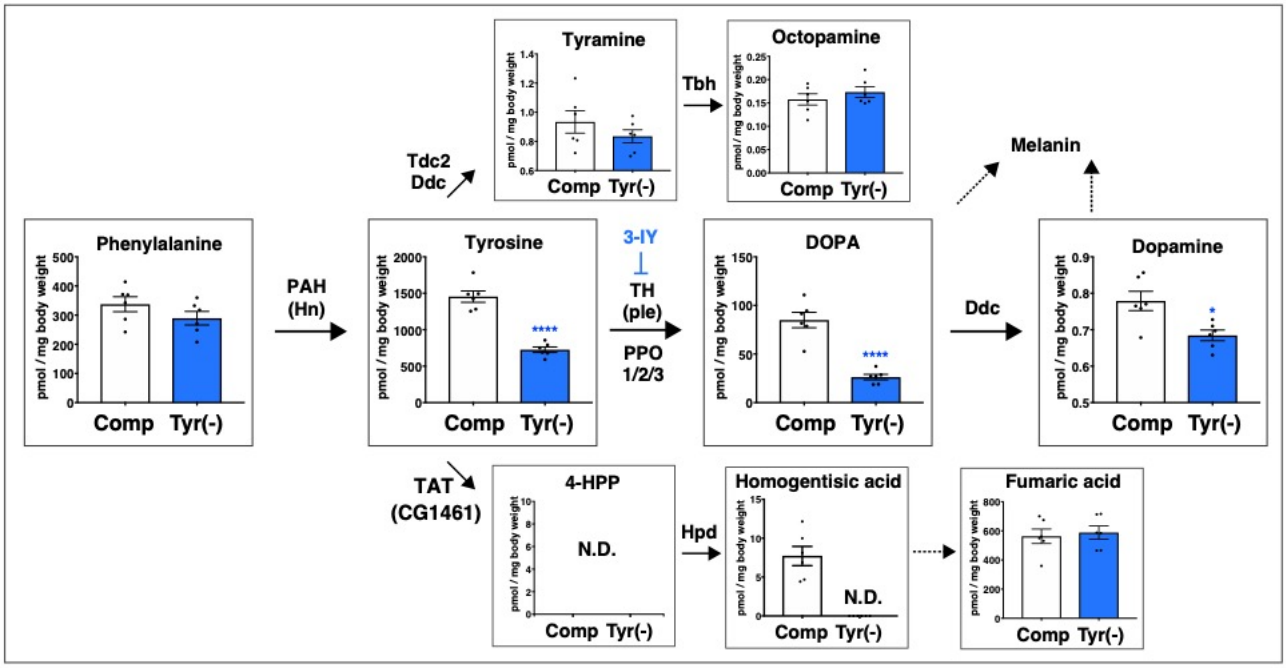


図 1. チロシン制限下においてチロシン、ドーパ、ドーパミンの減少が観察された
LC-MS/MS によって測定した幼虫全身の代謝物量。統計処理は student *t*-test。
p*<0.05、**p*<0.001、*****p*<0.0001。

2. チロシン制限経験個体の代謝プログラミングは幼虫期ドーパミン量の減少と相関しなかった

これまでの研究から、チロシン制限経験個体は生殖能や酸化ストレス耐性が増強していることが明らかとなってきた。これらの表現型がドーパミン神経によって制御されうることと、チロシン制限によって体内ドーパミン量が減少することから、幼虫期における一過的なドーパミン量の減少が代謝プログラミングを担う可能性が想定された。そこでドーパミンの生合成の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ（TH）を幼虫期のみ遺伝学的に全身でノックダウンし、成虫の産卵数を測定したが、その増加は認められなかった。また、TH の阻害剤ヨードチロシンを幼虫期に摂取させた場合にも、成虫の生殖能は向上しなかった。ドーパミンによって制御されるより特異的な表現型を観察するため、砂糖報酬系を用いた記憶学習アッセイを行ったが、幼虫期チロシン制限による成虫の記憶学習スコアの変化はみられなかった。

3. チロシン制限直下の幼虫では脂肪組織において特異的な飢餓応答が観察された

代謝プログラミングの発端は、チロシン制限下にある幼虫体内で起こる栄養応答にあることが想定される。そこで、幼虫で大部分の代謝反応を担うと考えられる腸組織と脂肪組織が、チロシン制限にどのように応答するのかを網羅的に記述するため、トランスクリプトミクス解析を行った。その結果、腸組織ではほとんどの遺伝子発現に変化がなかった（$p<0.01$ の遺伝子が 4 つのみ）一方で、脂肪組織では 51 の遺伝子に発現変動がみられた。その上位発現変動遺伝子の中に、飢餓時に誘導されることが知られる eukaryotic initiation factor 4E-binding protein（4E-BP/Thor）が含まれていることがわかった（表 1）。興味深いことに、この脂肪組織での 4E-BP 発現上昇は、体内で減少しうるアミノ酸、アスパラギンやセリン含め、どの他の非必須アミノ酸を食餌から制限しても誘導されず、チロシン制限に特異的な現象であることが明らかになった（図 2）。4E-BP は翻訳抑制因子であり、この遺伝子発現は寿命制御に関わることがよく知られる。幼虫期チロシン制限による代謝プログラミングが脂肪組織での特異的な 4E-BP 発現上昇によるものであるのか、今後さらなる検証が必要である。

表 1. チロシン制限直下の幼虫脂肪組織において発現上昇していた上位遺伝子に 4E-BP があった

Fat body FC>1.5

Symbol	Name	Read count	Fold change
CNMa	CNMamide	120	7.523
Thor	**Thor(4E-BP)**	**4281**	**4.800**
CG43236		200	4.370
AsnS	Asparagine synthetase	2891	2.840
AttA	Attacin-A	798	2.490
CG31886		184	2.145
Alas	Aminolevulinate synthase	815	1.944
Gs2	Glutamine synthetase 2	398	1.865
scyl	scylla	1680	1.857
Obp83cd	Odorant-binding protein 83cd	454	1.839
CG16898		2181	1.818
Vha 100-2	Vacuolar H+ ATPase 100kD subunit 2	1609	1.785
prc	pericardin	1273	1.712
zormin	zormin	1031	1.693
Mrp4	Multidrug resistance protein 4	1241	1.637
Cp1	Cysteine proteinase-1	1612	1.549
Odc1	Ornithine decarboxylase 1	2704	1.519
CG10621	Homocysteine S-methyltransferase	16733	1.510

幼虫脂肪組織におけるトランスクリプトミクスの結果。Read countが100以上、Fold changeが1.5以上のものを抽出している。

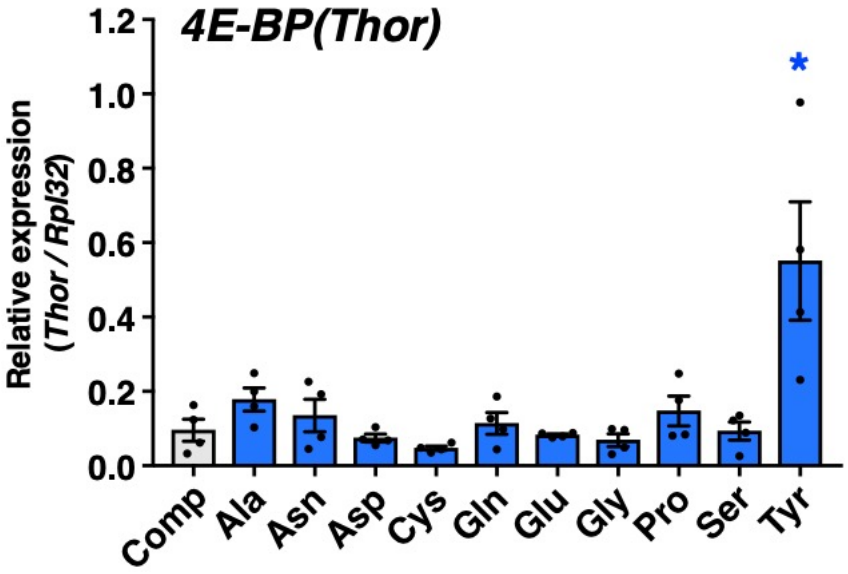


図 2. 幼虫脂肪組織においてチロシン制限特異的に *4E-BP* の発現上昇が見られた
単一非必須アミノ酸制限下での幼虫脂肪組織における *4E-BP* の発現。
統計処理は One-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test による。*p<0.05。

共同研究者・謝辞

ショウジョウバエ成虫の記憶学習に関する解析は、東北大学大学院生命科学研究科の谷本拓博士、市之瀬敏晴博士と共に行った。感謝申し上げたい。

文　献

1) Grandison, R. C., Piper, M. D. W. & Partridge, L. Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in Drosophila. Nature, 462 (7276), 1061-4. 2009 Dec 24. PMID: 19956092 DOI: 10.1038/nature08619

2) Obata, F. & Miura, M. Enhancing S-adenosyl-methionine catabolism extends Drosophila lifespan. Nat Commun, 6, 8332. 2015 Sep 18. PMID: 26383889 DOI: 10.1038/ncomms9332

3) Piper, M. D. W. et al. A holidic medium for Drosophila melanogaster. Nat Methods, 11 (1), 100-5. Jan 2014. PMID: 24240321 DOI: 10.1038/nmeth.2731