

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業  
戦略的国際科学技術協力推進事業 (ブラジル)

(英語) International Collaborative Research Program,  
Strategic International Research Cooperative Program (SICP)

研究開発課題名：(日本語) アマゾンフルーツのナノサプリ開発：老化と健康に及ぼす栄養ゲノミクス  
および栄養遺伝学的影響

(英語) Amazon fruits nano-supplements development: nutrigenomic and  
nutrigenetic effects on aging and health

研究開発担当者 (日本語) 相垣敏郎・大学院理工学研究科・教授

所属 役職 氏名：(英語) Toshiro Aigaki, Professor, Graduate School of Science and Engineering

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

植物等に由来する天然生理活性物質の探索と作用機序の解明は、新薬やサプリメント開発につながる重要な基盤となる。本研究は、アマゾン原産の **Guarana** 果実(GF)の機能性を分子、細胞、個体レベルで解明することを目的とするものである。ショウジョウバエはゲノムや遺伝子機能の解析が最も進んでいる生物の一つであるが、これまで食品の機能性研究に利用された例はほとんどない。ショウジョウバエの利点を生かして、サプリメントの機能性を科学的に検証するモデルとして確立する。

### 1. GF の機能性評価

ショウジョウバエの培地に **GF** を添加して、酸化ストレス耐性、寿命、活動性、睡眠、メチル水銀毒性耐性への影響を解析した。**GF** を添加した培地で飼育することにより、ショウジョウバエの酸化ストレス耐性の亢進、及び寿命の延長が認められた。また、活動量が有意に上昇することが判明した。興味深いことに、活動性が上昇するのは昼間の時間帯のみで夜間の睡眠は影響を受けない。**GF** は比較的高濃度のカフェインを含むため、カフェインを単独で添加した培地で飼育したところ、昼間の活動性の上昇は **GF** の効果と一致したが、夜間に睡眠障害が認められた。このことは、**GF** 中の成分の複

合的な作用により、カフェインによる夜間の睡眠障害を抑制していることを示唆する。さらに、10uM以上のメチル水銀を含む培地ではショウジョウバエ幼虫の生存率は極めて低いが、培地に GF を添加することで、生存率が有意に上昇することがわかった。ショウジョウバエにおけるこれらの生理学的形質の変化は GF の機能性を強く示唆する。

## 2. GF 摂取による遺伝子発現の変化

GF の作用を遺伝子レベルで解明するために、マイクロアレイ法、および RNA-seq 法を用いて遺伝子発現解析を行った。GF 摂取によって発現レベルが有意に変動する遺伝子群を絞り込み、qRT-PCR 法により詳細に発現定量解析を行い、GF により誘導される変動であることを確認した。これらの遺伝子は、GF の機能性と密接に関連している可能性があり、有用な情報であるが、機能性のメカニズムを担っているかどうかは定かでない。そこで、GF によって発現が有意に変動した遺伝子の中で、比較的大きな上昇を示した 5 個の遺伝子に焦点をあて、それぞれ個別に強制発現を誘導できる遺伝子改変ショウジョウバエを作製した。強制発現を誘導した結果、遺伝子 X の強制発現により特定のストレスに対して強い抵抗性を示すことが判明した。このことは、GF の機能性に遺伝子 X が関わっていることを強く示唆する。GF の機能性に関わる遺伝子が特定されたのは初めての例である。

## 3. GF 摂取によるメタボロームの変化

GF が代謝に及ぼす影響を明らかにするために、液体クロマトグラフィー/質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて、約 5,000 の代謝物プロファイルの比較解析を行った。その結果、GF 摂取群では対照群と明らかな違いが認められた。また、カフェイン摂取群との比較では、概ね類似したプロファイルを示すものの、サンプルを採取する時間帯によっては差異を示すことがわかった。昼間の午前中の時間帯では類似のプロファイルを示すが、午後から夜間の時間帯では明らかな差異が検出された。カフェインは夜間の睡眠を抑制する作用があり、その差異が代謝レベルで検出されることを意味する。カフェインによる睡眠障害の代謝レベルの機構、そして GF による睡眠障害抑制機構を解明する上で極めて重要な足がかりになるものと期待される。

The goal of this project is to understand the functionality of the Amazonian Guaraná fruit (*Paullinia cupana*) at the molecular, cellular and organismal levels, and to develop nano-supplements that promotes health and longevity in humans. The Japanese team uses the fruit fly *Drosophila* as an experimental model system, whereas the Brazilian team works on humans and cultured cells. We exchange researchers and information between the two teams to promote the collaborative project efficiently. We made the following achievements.

### 1. Functionality of guaraná fruit (GF)

We determined the effects of GF supplemented to media on oxidative stress resistance, longevity, locomotor activity, sleep, and resistance to methyl mercury in the fruit fly *Drosophila*. We found that supplementation of GF increases oxidative stress resistance and extend longevity. Also we found that locomotor activity was significantly increased: the activity was significantly higher than control flies, which were kept on media without GF during daytime, but not nighttime. Since GF contains relatively high amount

of caffeine, we performed experiments with media supplemented with caffeine. Interestingly, caffeine disrupted nighttime sleep, whereas GF had no apparent effect on nighttime sleep. The results suggest that GF represses the caffeine-induced disruption of nighttime sleep. Furthermore, we found that GF confers resistance to methyl mercury, which is highly toxic to organisms. These results strongly support that GF has various functionalities.

## 2. Identification of genes affected by GF intake

In order to understand the mechanisms that underlie the functionality of GF, we investigated the effects of GF intake on gene expression in *Drosophila*. Flies were transferred from normal media to those supplemented with GF at an appropriate concentration and kept for 24 hours, whereas control flies were kept in standard media. Then mRNA was extracted and analyzed for gene expression with microarrays or RNA-seq. We identified 195 and 203 genes whose expression levels were up- or down-regulated, respectively. We confirmed the effects of GF on the expression level of these genes using quantitative RT-PCR. Furthermore, we selected five genes, which were clearly and stably induced by GF intake, and generated transgenic flies, in which each of them will be overexpressed. We found that overexpression of gene X confers stress resistance which is one of the functionality of GF.

## 3. Metabolomic changes associated with GF intake

In order to understand the effects of GF intake on metabolism, we performed metabolome analysis using an Liquid chromatography and Mass spectrometry system. Principal component analysis revealed that the profile of metabolites from flies kept on GF-supplemented media were clearly different from that of control flies. In general, the effect of GF on metabolome was similar to that of caffeine. However, interestingly, the profile was different from each other, if the samples were taken during nighttime. These results suggest that GF has a different functionality from that of caffeine.

## III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 12 件）

1. Sato-Miyata Y, Muramatsu K, Funakoshi M, Tsuda M, Aigaki T. Overexpression of *dilp2* causes nutrient-dependent semi-lethality in *Drosophila*. *Front Physiol*. 2014 Apr 16;5:147.
2. Nakayama M, Ishibashi T, Ishikawa HO, Sato H, Usui T, Okuda T, Yashiro H, Ishikawa H, Taikou Y, Minami A, Kato K, Taki M, Aigaki T, Gunji W, Ohtsu M, Murakami Y, Tanuma S, Tsuboi A, Adachi M, Kuroda J, Sasamura T, Yamakawa T, Matsuno K. A gain-of-function screen to identify genes that reduce lifespan in the adult of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genet*. 2014 Apr 16;15:46.
3. Akiyoshi R, Kaneuch T, Aigaki T, Suzuki H. Bioluminescence imaging to track real-time armadillo promoter activity in live *Drosophila* embryos. *Anal Bioanal Chem*. 2014 Sep;406(23):5703-13.
4. Kaneuchi T, Sartain CV, Takeo S, Horner VL, Buehner NA, Aigaki T, Wolfner MF. Calcium waves occur as *Drosophila* oocytes activate. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 2015 Jan 20;112(3):791-6.
5. Tsuda-Sakurai K, Seong KH, Horiuchi J, Aigaki T, Tsuda M. Identification of a novel role for *Drosophila* MESR4 in lipid metabolism. *Genes Cells*. 2015 Apr;20(4):358-65.
  6. Tsuda M, Peyre JB, Asano T, Aigaki T. Visualizing Molecular Functions and Cross-Species Activity of Sex-Peptide in *Drosophila*. *Genetics*. 2015 Aug;200(4):1161-9.
  7. Momiuchi Y, Kumada K, Kuraishi T, Takagaki T, Aigaki T, Oshima Y, Kurata S. The Role of the Phylogenetically Conserved Cochaperone Protein Droj2/DNAJA3 in NF- $\kappa$ B Signaling. *J Biol Chem*. 2015 Sep 25;290(39):23816-25.
  8. Seong KH, Tsuda M, Tsuda-Sakurai K, Aigaki T. The plant homeodomain finger protein MESR4 is essential for embryonic development in *Drosophila*. *Genesis*. 2015 Nov;53(11):701-8.
  9. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Borna NN, Banshoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS Genet*. 2016 Jan 7;12(1):e1005679.
  10. Tsuda M, Aigaki T. Evolution of sex-peptide in *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 2016 Oct;10(4):172-7.
  11. Tanegashima K, Sato-Miyata Y, Funakoshi M, Nishito Y, Aigaki T, Hara T. Epigenetic regulation of the glucose transporter gene *Slc2a1* by  $\beta$ -hydroxybutyrate underlies preferential glucose supply to the brain of fasted mice. *Genes Cells*. 2017 Jan;22(1):71-83.
  12. Quan X, Sato-Miyata Y, Tsuda M, Muramatsu K, Asano T, Takeo S, Aigaki T. Deficiency of succinyl-CoA synthetase  $\alpha$  subunit delays development, impairs locomotor activity and reduces survival under starvation in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 29;483(1):566-571.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 口頭, Toshiro Aigaki, Egg activation in *Drosophila*: Calcium imaging and metabolomic analysis. International Conference on Insect Reproductive Molecules. Cornell University, Ithaca, NY. USA July 7-9, 2014, 国外
2. 口頭, Toshiro Aigaki, A novel technique for live gene expression analysis in *Drosophila*: proof of concept and application to aging research. 7th Asian Aging Core for Longevity Conference in Jeju, Korea. Sep 21-23, 2014, 国外
3. ポスター, F Barbisan, T Duarte, E Ribeiro, M Duarte, M Montano, M Cattani1, T Aigaki, I da Cruz, Guarana effect on inflammatory and antiinflammatory cytokines is influenced by

- Ala16Val-SOD2 gene polymorphism. *Planta Med* 2014; 80 - P1L109, August 31 – September 4. Guimarães, Portugal, 国外
4. ポスター, F Barbisan, MF Mânica-Cattani, T Aigaki, L Trindade, T Algarve, EE Ribeiro, IB da Cruz, Guaraná supplementation in diets different macronutrient proportions affect positively *Drosophila melanogaster* survival exposed to paraquat. *Planta Med* 2014; 80 - P1L124, August 31 – September 4. Guimarães, Portugal, 国外
  5. 口頭, Toshiro Aigaki, Regulation of growth, body size and lifespan in *Drosophila* International Symposium "Asian Aging Core for Longevity (AACL) 2006- 2015, 10 years and Beyond" (Japan-Korea Joint Seminars on Aging, Brain, and Neurodegeneration). Osaka, March 10-13, 2015, 国内
  6. 口頭, Toshiro Aigaki, Molecular basis for egg activation in *Drosophila*. Gordon Research Conference, Holderness, NH, USA, July 20-24, 2015, 国外
  7. 口頭, Lucas Trindade and Toshiro Aigaki, A centenary dilemma: Is aging programmed or non-programmed? Japan *Drosophila* Research Conference 11, Kanazawa, June 4-6, 国内
  8. 口頭, Maria Fernanda Manica-Cattani, Lucas Siqueira Trindade, Thais Algarve, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Toshiro Aigaki, Guaraná confers paraquat resistance in *Drosophila*. Japan *Drosophila* Research Conference 11, Kanazawa, June 4-6, 国内
  9. 口頭, Toshiro Aigaki, Taro Kaneuchi, Keigo Muramatsu, and Masabumi Funakoshi, Cell type specific analysis of gene expression in *Drosophila*. Japan *Drosophila* Research Conference 11, Kanazawa, June 4-6, 国内
  10. 口頭, Toshiro Aigaki, Molecular evolution of the SP/SPR system in *Drosophila*. Insect Reproductive Molecules Meeting, June 28 – July 1. Westfälische Wilhelms-University, Münster, Germany, 国外
  11. 口頭, Toshiro Aigaki, Molecular basis for egg activation in *Drosophila*. Gordon Research Conference, Holderness, NH, USA, July 20-24, 2015, 国外
  12. 口頭, Yamamoto, M., Kaneuchi, T., Sato-Miyata, Y., Takeo, S. and Aigaki, T. Metabolomic analysis of egg activation in *Drosophila*. Insect Reproductive Molecules Meeting, June 28 - July 1. Münster, Germany, 国外
  13. ポスター, Nakayama, M., Cattani, M., Cruz, I., Trindade, L., Sato-Miyata, Y., and Aigaki, T., How can we avoid Caffeine-induced sleep disturbances? ~ Guarana, a highly caffeinated plant from the Amazon may help~. World Congress on Brain, Behavior and Emotions. June 12-15, Buenos Aires, Argentina, 国外
  14. ポスター, Ohnuma, K., Sato-Miyata, Y., Kishita, Y., Kohda, M., Murayama, K., Ohtake, A., Okazaki, Y. and Aigaki, T. (2016) Investigating Mitochondrial Respiratory Chain Disorders (MRCD) in *Drosophila*, The Allied Genetics Conference. July 13-17, 2016, Orlando, Florida, USA, 国外
  15. ポスター, Ohnuma, K., Sato-Miyata, Y., Kishita, Y., Nyuzuki, H., Kohda, M., Murayama, K., Ohtake, A., Okazaki, Y., and Aigaki, T. Deficiency of *ski3* gene impairs mitochondrial function and lipid metabolism, The 39th Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Nov. 30-Dec. 2, 2016, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 寿命：生命の神秘を学ぶ, 相垣敏郎, AACL 市民公開講演会「脳・老・学・入門:健やか脳を考える」, 奈良, 2015/3/11, 国内
2. 寿命を決める遺伝子と環境, 相垣敏郎, 日本基礎老化学会シンポジウム「モデル動物の多様性から探る老化現象の普遍性」, 東京, 2015/10/31, 国内
3. 栄養と寿命, 相垣敏郎, 第 9 回産経新聞シンポジウム「これからの健康を考える」, 大阪, 2016/2/2, 国内
4. 寿命遺伝子を探る, 相垣敏郎, 学習院大学第 20 回生命科学シンポジウム「高齢化社会を科学する」, 東京, 2017/12/17, 国内

(4) 特許出願

なし