

線虫(*Caenorhabditis elegans*)を用いた

ロスマリン酸の抗糖化作用評価

瀬戸山 央 (化学技術部環境安全・バイオグループ)

1. はじめに

線虫(*Caenorhabditis elegans*)はモデル実験生物の1つであり、ヒト遺伝子と相同性が高いことが知られている。また近年、哺乳動物の代替として様々な評価系に用いられてきている。KISTECにおいても線虫を用いて食品成分などの抗酸化、抗老化作用評価をこれまで行ってきた。

糖化はアミノ酸やタンパク質と還元糖の非酵素的な反応のことであり、この反応により終末糖化産物(AGEs: Advanced Glycation End Products)が生成する。ヒトの体内ではAGEsが加齢に伴い蓄積し加齢性疾患の一因となることが知られている。糖化による身体へのストレスは糖化ストレスと呼ばれており、近年、糖化ストレスを軽減する作用(抗糖化作用)を有する食品の探索が広く行われている。本研究ではすでに*in vitro*における強い抗糖化作用が報告されているロスマリン酸²⁾に注目し、ロスマリン酸の*in vivo*における抗糖化作用について線虫を用いて評価を行ったので報告する。

2. 実験方法

ロスマリン酸の*in vitro*抗糖化作用は蛍光性AGEs生成抑制作用測定を行い評価した。タンパク質としてウシ血清アルブミン、還元糖としてグルコースを用いた。ポジティブコントロールとして塩酸アミノグアニジンを用いた。ロスマリン酸および塩酸アミノグアニジンはDMSOに溶解させたものを試料溶液とした。蛍光性AGEs生成抑制作用測定は既報³⁾のとおり行った。

線虫は大腸菌(OP50株)を餌としてNGM培地にて前培養を行った。その後、アルカリブリーチ法により卵を回収した。卵回収日を培養0日目とし、1日目に孵化したL1幼虫を培養フラスコに入れ同調培養を開始した。2日目に次世代の発生を抑制する為、2'-Deoxy-5-fluorouridineを終濃度80 μ Mとなるよう培地に添加した。さらに4日目にロスマリン酸を終濃度180 μ Mとなるよう培地に添加し培養を継続した。培養は20 $^{\circ}$ C、100rpmにて行った。15日目に線虫を回収し、PBSにて洗浄後、RIPA Buffer(ナカライテスク株式会社)を用いて超音波抽出(UR-21P、株式会社トミー精工)を行った。その後、遠心分離を行い回収した上清を線虫抽出液とした。線虫抽出液中のタンパク質濃度測定はBCA法により行った。線虫抽出液中の蛍光性AGEsは励起波長370nm、蛍光波長440nmにおける蛍光強度にて測定した。また線虫抽出液中のAGEsはOxiSelect Advanced Glycation End Product(AGE) Competitive ELISA Kit(CELL

BIOLABS)を用いて測定した。さらに線虫抽出液中の活性酸素種(ROS: Reactive Oxygenspecies)の測定はCM-H₂DCFDA(Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。線虫抽出液の蛍光性AGEs、AGEsおよびROSの測定の際は、すべての抽出液のタンパク質濃度が500 μ g/mLとなるように調製した。

3. 結果及び考察

*in vitro*抗糖化作用の測定結果を図1および図2に示す。蛍光性AGEs生成抑制率が50%になるときの試料濃度をIC₅₀値として算出したときロスマリン酸のIC₅₀値は210.8 μ g/mL、塩酸アミノグアニジンのIC₅₀値は544.8 μ g/mLとなった。このことからロスマリン酸はポジティブコントロールである塩酸アミノグアニジンよりも蛍光性AGEs生成抑制作用が強く、高い抗糖化作用を有していることが分かった。

線虫抽出液中の蛍光性AGEsの測定結果を図3に示す。蛍光性AGEs由来の蛍光強度(励起波長370nm、蛍光波長440nm)は、コントロールに比べてロスマリン酸処理で低下する傾向が見られた。このことから、ロスマリン酸は線虫体内の蛍光性AGEsの生成を抑制する可能性が示唆された。さらにELISAを用いた線虫抽出液中のAGEsの測定結果を図4に示す。

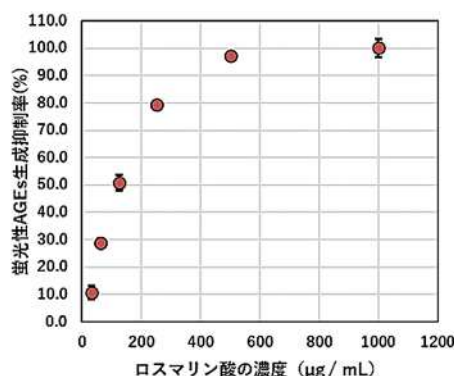


図1 ロスマリン酸の*in vitro*抗糖化作用の結果

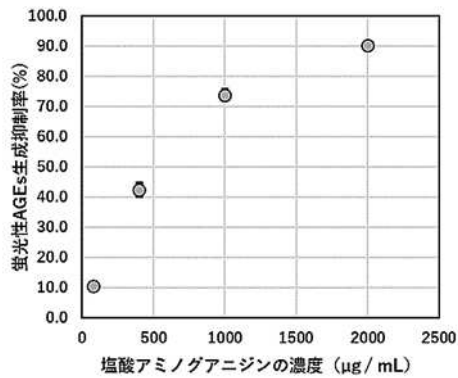


図2 塩酸アミノグアニジンの in vitro 抗糖化作用の結果

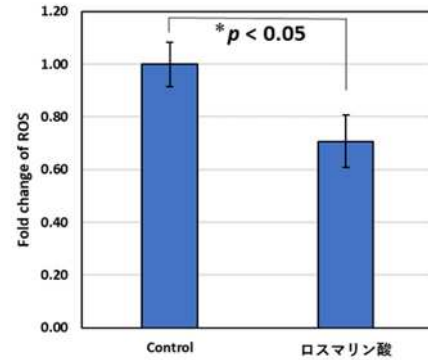


図5 線虫体内の ROS 生成量測定の結果

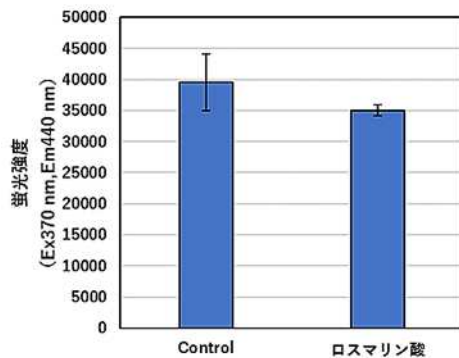


図3 線虫体内の蛍光性 AGEs 測定の結果

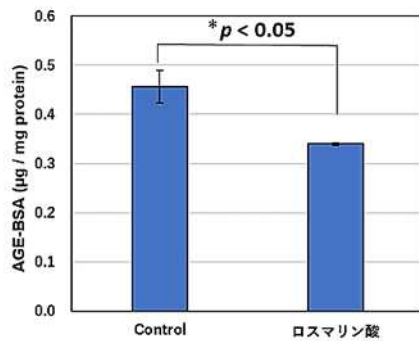


図4 ELISA による線虫体内の AGEs 測定の結果

ELISAにて測定した AGEs 量はコントロールに比べてロスマリン酸処理で有意に低下していることが分かった ($p < 0.05$, t-test)。これらのことからロスマリン酸は線虫体内の蛍光性 AGEs だけでなく非蛍光性 AGEs の生成も抑制することが示唆された。

線虫抽出液中の ROS の測定結果を図5に示す。結果はコントロールの ROS 生成量を1としたときロスマリン酸処理により ROS 生成量は約0.7となり、約30% ROS の生成が有意に抑制された ($p < 0.05$, t-test)。このことからロスマリン酸は線虫体内で ROS 生成を抑制していることが示唆された。

生体内における AGEs の生成には ROS が深くかかわっていることが知られている。今回の結果から、ロスマリン酸は線虫体内の ROS 生成の抑制を介して体内の AGEs の生成を抑制したことが考えられた。

このように本研究ではロスマリン酸を例として線虫を用いた抗糖化作用評価を行ったが、この方法は動物実験をすることなく生体内における抗糖化作用評価が可能な方法である。今後、様々な食品や食品に含まれる生理活性物質についても線虫を用いた抗糖化作用評価を行っていく予定である。

なお本研究は JSPS 科研費 JP21K05495 の助成を受けたものです。

【参考文献】

1. 瀬戸山央, *生物工学会誌*, 96(7), 412 (2018).
2. Ou J, Huang J, Wang M, Ou S, *Food Chem*, 221, 1057-1061 (2017).
3. 瀬戸山央, *食生活研究*, 41(6), 338-346 (2021).

【外部発表】 口頭発表 1件