

# 線虫におけるカロリー制限・断続的飢餓による 寿命延長と抗酸化能力の関係

兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2年 待鳥恵羽 伊藤真 高松和真 松浦万季

## 背景・目的

### 背景

- 線虫 *Caenorhabditis elegans* において、
  - ① カロリー制限(餌の量を減らす)を行うと寿命が延びる。
  - ② 断続的飢餓(餌を与える期間と与えない期間を作る)を行うと寿命が延びる。
- 寿命の延長の程度については、以下のようになる。

断続的飢餓 > カロリー制限 > 自由摂食

- 老化の原因
  - ① テロメアの短縮  
細胞分裂の回数に限界がある。
  - ② 損傷の蓄積 (エラーカラストロフ説)  
活性酸素によってつけられた傷がミトコンドリア遺伝子に蓄積する。
- 抗酸化能力について  
エラーカラストロフ説より活性酸素は老化の原因となる。  
→抗酸化酵素は活性酸素を無害化する。  
→抗酸化能力が上がることで寿命が延びる。

### 目的

- カロリー制限と断続的飢餓による SOD(抗酸化酵素の一種)の量の違いを測定する。
- なぜ二つの系において寿命延長の程度に違いが出るのかを、**抗酸化能力の観点から**考察する。
- ⇒本研究はエラーカラストロフ説を支持する可能性がある。

## 実験

### 仮説

SOD 濃度が以下ようになる。

断続的飢餓 > カロリー制限 > 自由摂食

#### 《仮説の理由》

- 寿命が延長される程度の大きい順が断続的飢餓、カロリー制限、自由摂食である。
- 餌の条件によるストレスが SOD 濃度に影響を与え、SOD 濃度が大きいほど寿命が延びると考えた。

### 予備実験

- SOD 測定が可能かどうかの確認

### 実験方法

#### 《線虫の飼育条件について》

- 培地は直径 8.5cm のシャーレに NGM 培地を入れたものを使用。
- FUDR(産卵阻害剤)を添加したものとしていないものの 2 種類を作成。
- 人工気象器内において 20°C前後で飼育。

#### 《線虫の飼育方法について》

- ① 線虫を生きた OP50 を含む培地で 3 日間培養する。
- ② ①に水を流し、遠心分離して OP50 を除いた後、FUDR を含む培地に移し、生きた OP50 を含む培地で 2 日間培養。
- ③ 自由摂食、カロリー制限、断続的飢餓に分けて、2 日ごとに②と同じ手法で FUDR を含む新しい培地に移し、紫外線で処理した OP50 とともにそれぞれ培養する。



#### 《SOD 測定方法 (新プロトコル)》

- ① 線虫をホモジナイズ処理により細胞破壊
- ② 酵素を加える
- ③ 吸光度を測定する
- ④ 標準曲線により SOD 濃度を定量する

※線虫の質量は非常に小さいため正確な質量の測定は困難であり、同質量の線虫について SOD 濃度を測定することは難しい。そのため線虫の総タンパク質量も並行してはかり、測定した SOD 濃度と比をとることで質量の差による SOD 量の違いの影響を排除する。

## 測定原理

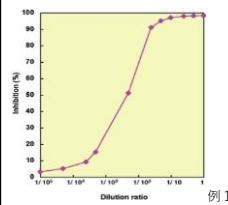
(SOD 測定について)

- ① 活性酸素を生成する酵素と、活性酸素に反応して比色反応を示す WST 試薬を試料溶液と反応させて全発色時の吸光度に対する割合を求め阻害率を導き出す。
- ② 試料溶液を希釈し各濃度における阻害率をグラフにプロットし阻害曲線を作成する。阻害率 50%における試料溶液に含まれる SOD 量を 1 U (ユニット)とし、SOD 量を測定する。混合する溶液の種類について下に示す (blank 1 は阻害なしの全発色、blank 2 はサンプルブランク、blank 3 は試薬ブランクを表す)。

(総タンパク質測定)

試料溶液の吸光度を測定し、標準タンパク質を用いて作成した標準曲線をもとにタンパク質量を測定する。下に標準曲線の例 (例 2) を示す。

$$\text{SOD 活性値 (阻害率 \%)} = \frac{[(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3}) - (\text{Asample} - \text{Ablank 2})]}{(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3})} \times 100$$



	sample	blank1	blank2	blank3
サンプル溶液	20 μl	-	20 μl	-
純水	-	20 μl	-	20 μl
WST working solution	200 μl	200 μl	200 μl	200 μl
Dilution buffer	-	-	20 μl	20 μl
Enzyme working solution	20 μl	20 μl	-	-

例 2

## 結果

### 予備実験

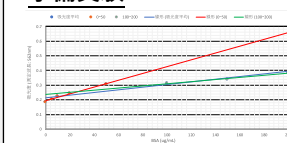


図 1

\*総タンパク質測定 (図1) では濃度 50 を境に異なる回帰直線が見られる。この測定において、タンパク質と反応し比色反応を示す反応液について、濃度 50 を境に異なるチューブのものを使用した。

ID	Sample	Blank	Blank	Blank	Inhibition
S-1	0.45317	0.43894	0.25542	0.22989	0.0229524
S-2	0.53824	0.43894	0.29353	0.22989	-15.343491
S-3	0.42519	0.43894	0.23192	0.22989	0.0462029
S-4	0.44094	0.43894	0.23329	0.22989	-1.3893463
S-5	0.42348	0.43894	0.2414	0.22989	1.1242441
S-6	0.45234	0.43894	0.26434	0.22989	11.4439297
S-7	0.46817	0.43894	0.26469	0.22989	0.2462624

ID	Sample	Blank	Blank	Blank	Inhibition
S-1	0.09733	0.19146	-0.01484	-0.0408	50.4587702
S-2	0.03645	0.19146	-0.01769	-0.0408	76.6994484
S-3	0.05597	0.19146	-0.01977	-0.0408	67.7913682
S-4	0.05547	0.19146	-0.01252	-0.0408	70.7393959
S-5	0.02971	0.19146	-0.01668	-0.0408	58.5569931
S-6	0.19146	0.19146	-0.01836	-0.0408	0.7004648

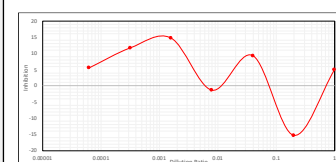


図 2

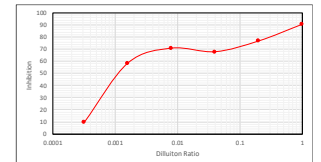


図 3

## 考察

### 予備実験

- 図1の結果で、濃度 50 を境に異なる直線が見られる
- SOD 測定値のずれ
- 使用した異なる 2 つのチューブ内の溶液の量の微小な差による影響

→ 扱う溶液量が非常に微量であるため  
少しの溶液量の違いでも結果に大きな影響が出る

→ 新プロトコルは適さない

## 今後の展望

- 本実験の開始  
自由摂食、カロリー制限、断続的飢餓に分けて飼育する。  
→ 3 グループに分けた日を基準として Day1 とし、Day2, Day18, Day22, Day28 で SOD を測定  
→ SOD 濃度のグラフを作成する。

## 参考文献

Honjoh S, Yamamoto T, Uno M, Nishida E. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C.elegans*. Nature. 2009 Feb 5;457(7230):726-30