

# 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

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

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) において、食餌制限を施すと寿命が延長されるということが分かっている。食餌制限の方法には主に2種類あり、摂取カロリーを減らす方法（以下、カロリー制限）と、餌を摂取しない期間を設ける方法（以下、断続的飢餓）がある。両者ともに寿命が延長されることが分かっているが、断続的飢餓の方が、カロリー制限よりも寿命が長く延びることが知られている<sup>(1)(2)</sup>。我々は、両者の間の寿命延長の程度の差は、抗酸化物質であるSODの量の差によるものだと考え、両者におけるSODの量を比較した。実験の結果、飼育開始から7、18日目においては、カロリー制限よりも断続的飢餓の方がSODの量が多いことが分かった。この結果は、両者における寿命延長の程度の差は、SODの量の差によって生じることを示唆している。

### 1. 研究背景・目的

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) において、食餌制限をすると寿命が延長することが報告されている。食餌制限の方法には主に2種類あり、1回に摂取する餌の量を減らすカロリー制限と呼ばれる方法と、1回に摂取する量は減らさないが、途中で餌を摂取しない期間を何回か設ける断続的飢餓と呼ばれる方法である。両者ともに線虫の寿命を延長することが報告されているが、カロリー制限では、自由摂食の個体と比べて約20%寿命が延長するのに対して、断続的飢餓では、約60%寿命が延長することが報告されている<sup>(1)(2)</sup>。

その差が生じる理由として、カロリー制限、断続的飢餓間で、食餌制限に対する応答の様式が異なることが挙げられる。線虫にカロリー制限を施すと、低分子量GTPaseであるRheb (Ras homologue enriched in brain) の活性が低下し、その下流のTOR (target of rapamycin) 経路の活性が低下する。その結果、転写因子DAF-16が、細胞質から核内へ移行できるようになる。一方、断続的飢餓を施すと、Rhebによってインスリン用シグナルが低下し、その結果、DAF-16が細胞質から核内に移行できるようになる<sup>(1)(2)(3)</sup>。つまり、カロリー制限、断続的飢餓においては、途中の経路は違うが、最終的にはDAF-16の核内移行に帰着する。

しかし、DAF-16が核内に移行した後にどのような現象が起きるかについての詳細な理解は欠けている。DAF-16は抗酸化物質であるSOD (Superoxide

Dismutase) と作用することによって、寿命が延長されることが知られている<sup>(4)(5)</sup>。そこで、カロリー制限と断続的飢餓間で寿命延長の効果に差が出る理由は、SODの量の差にあるという仮説を立て、両者におけるSOD量を比較した。

### 2. 方法

#### 2.1. SOD質量濃度測定

SODの量はU(ユニット)という酵素活性の単位を用いる。本研究ではSODの測定に要求される線虫数が多く、一匹ずつ数えて測定することが困難である。そのためSOD測定とは別に線虫のタンパク質量の測定をし、総タンパク質量で総SOD量を割って線虫単位質量あたりのSOD量(U/ug)を算出することで比較可能にする。

#### (1)測定前処理

- ① シャーレに蒸留水を加えて線虫を培地から分離させ、ピペットで1.5mlチューブに移す
- ② ホモジナイザーを用いてホモジナイズする
- ③ ホモジナイズ後の溶液を遠心する(10,000×gで15分間遠心)
- ④ 上澄みを測定溶液(sample溶液)とする

#### (2)SOD測定

- 使用する溶液
- ① WST working solution :  
活性酸素と反応して色を呈する物質(WST-1)を含む
- ② Enzyme working solution :  
活性酸素を生成する酵素(キサンチンオキシダーゼ)

ーゼ)を含む

③ Sample solution :

sample 溶液を4段階に希釈して得る

● 測定原理

WST-1 を利用した比色分析である。sample solution に Enzyme working solution と WST working solution を添加し、インキュベート後、吸光度を測定する(結果1とする)。sample solution を蒸留水に変えた溶液についても同じ操作で吸光度を測定する(結果2とする)。結果2と結果1の差はサンプル溶液中のSODにより阻害された活性酸素の量を表す。これを結果2の値で割ったものが、SODによる活性酸素の阻害率である。

● 吸光度測定

① 下の表の通りに溶液を混合しインキュベートする(37°Cで20分間)

② 分光光度計で450nmにおける吸光度を測定する

表1 溶液混合の詳細

	sample	blank1	blank2	blank3
サンプル溶液	20 $\mu$ L	-	20 $\mu$ L	-
純水	-	20 $\mu$ L	-	20 $\mu$ L
WST working solution	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L
Dilution buffer	-	-	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Enzyme working solution	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L	-	-

blank 1: 阻害なしの全発色、blank 2: sample blank、blank 3: 試薬 blank

● 分析

① 4種の倍率で希釈した各 sample 溶液について、以下の式を用いて阻害率を算出する

$$\text{SOD 活性値 (阻害率 \%)} = \frac{\{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})\}}{\{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})\}} \times 100$$

② ①の結果を、縦軸に阻害率、横軸に希釈率を配したグラフにプロットし、阻害曲線を作成する。

③ 阻害曲線から、阻害率が50%の希釈率に含まれるSOD量を1Uとしてsample溶液のSOD濃度を算出する。

(3)総タンパク質測定

① 濃度が既知のBSA(タンパク質)溶液とBCA溶液を混合して吸光度を測定して、濃度と吸光度の関係を図1のような検量線として出す

② sample 溶液についても同様の操作を行って吸光度を測定し、①の検量線に照らしてタンパク質濃度を算出する

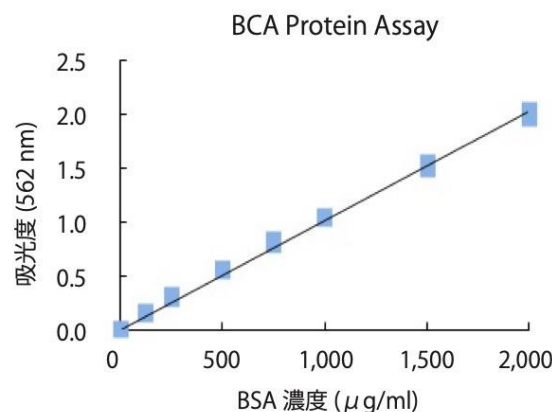


図1 総タンパク質測定 検量線の例

2.2. 線虫の飼育

線虫はC. elegans, 餌は大腸菌(OP50)を用い、直径7.5cmのシャーレ内においてNGM培地上で飼育した。その条件で、以下の操作を行った。

① 線虫を生きた大腸菌とともに3日間培養する

② FUDRを含む培地(※)に線虫を移し、生きた大腸菌とともに2日間培養する

※FUDRとは産卵阻害剤であり、線虫の繁殖を防ぐことで同世代の線虫のSOD量を測れるようにする。NGM培地1mLに対し100 $\mu$ g添加する

③ その後、自由摂食、カロリー制限、断続的飢餓に分けてそれぞれ飼育する。Day10まではFUDRを含む培地を用いた。断続的飢餓は2日ごとに摂食、断食を行い、すべての対照群において、2日ごとに新しい培地へ植え継ぎした

①②では生きた大腸菌を用いることで餌が枯渇しないようにし、③では紫外線で殺菌した大腸菌を用いて餌の濃度を調節できるようにした。

2.3. 大腸菌濃度調整

餌の濃度は、自由摂食 $1 \times 10^9$  cfu/ml、カロリー制限は $1 \times 10^8$  cfu/ml、断続的飢餓は $1 \times 10^9$  cfu/mlとした。

大腸菌の調整方法は以下の通り。

① ある濃度の大腸菌をLB液体培地に入れて攪拌し、それを2倍、4倍、8倍、16倍、32倍のそれぞれの濃度に希釈する

② それぞれの濃度におけるOD600を測定する

③ ①で使用したものと種類の大腸菌を1,000,000倍に希釈する

④ ③で作成した液を、2倍、4倍、8倍、16倍、32倍のそれぞれの濃度に希釈する

⑤ それぞれの液をNGM培地に400 $\mu$ L入れて、37°Cインキュベーターで1日放置する

⑥ それぞれにおけるcfu(colony forming unit)を測定し、②で求めたOD600とcfuの関係を、

グラフにプロットし、回帰直線を引く

- ⑦ そのグラフを用いて、目的の濃度の<sup>⑦</sup>大腸菌を調整する

### 3. 結果

#### 3.1. SOD 濃度測定

##### (1) SOD 測定

測定の結果、溶液混合操作のミスにより、阻害曲線の形が理論通りのものと異なる（下に示す）ものが見られたため、実験で得られたデータを有効性の低いものと高いものに分類した（ここで「理想通りのものと異なる」というのは、希釈率が大きい溶液ほど減少するはずの阻害率が増加しているということである）。有効性が低かったのは Day7, Day21 の自由摂食である。

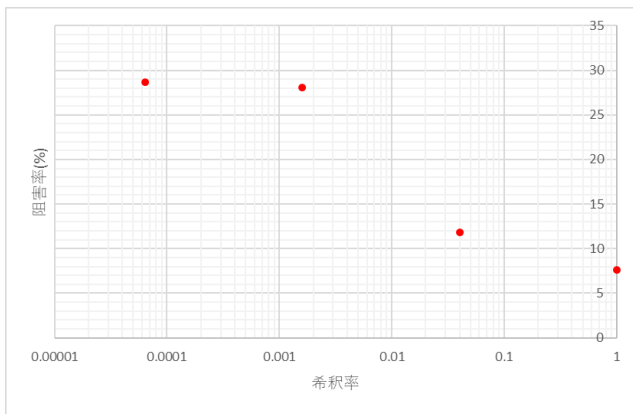


図2 有効性の低い阻害曲線の例

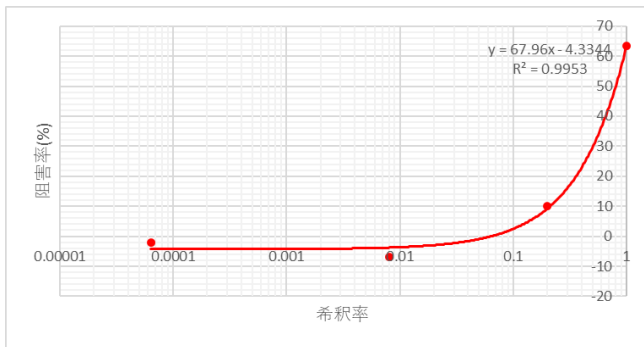


図3 有効性の高い阻害曲線の例

##### (2) 総タンパク質測定

Day7 から Day25 全ての BSA 溶液の測定に共通して、図4に見られるように BSA 濃度が大きくなるにつれて吸光度の変化率が減少するデータが得られた。この原因として、タンパク質と反応する BCA の溶液量が BSA に比べて小さく、高濃度の溶液において、BCA が飽和してしまったことが考えられる。そのため検量線の作成に際して、飽和の影響が少ないと考えられる低濃度の値におけるデータから検量線を作成した。

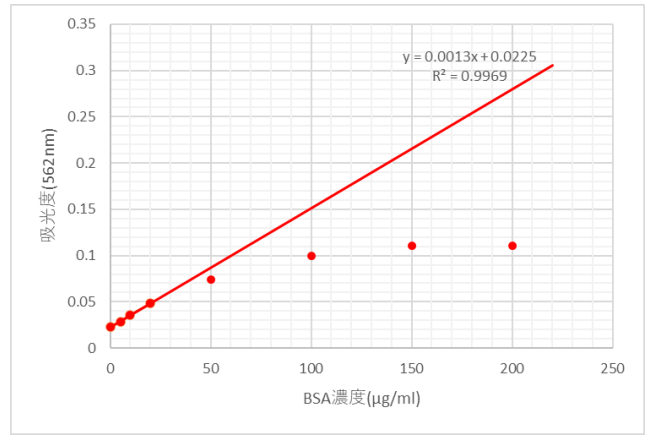


図4 総タンパク質測定 検量線

点が実際のデータ、直線が使用した回帰直線

#### 3.2. 大腸菌濃度調整

得られた結果を線形回帰し、実験1日目から10日目まで、カロリー制限には OD600 が 0.1527 であるもの、自由摂食、断続的飢餓には OD600 が 1.37362 であるものを使用した。途中で大腸菌の量が足りなくなったため、実験11日目から、自由摂食、断続的飢餓には、吸光度が 1.28 であるものを使用した。

この値から、カロリー制限における大腸菌濃度は約 1.4 cfu/ml、自由摂食、断続的飢餓における大腸菌濃度は約 11.3 cfu/ml、約 10.5 cfu/ml と算出されるが、使用した分光光度計の精度を考慮して、それぞれの大腸菌濃度の有効数字を1桁とし、カロリー制限における濃度を  $1 \times 10^8$  cfu/ml、自由摂食、断続的飢餓における濃度を  $1 \times 10^9$  cfu/ml とした。

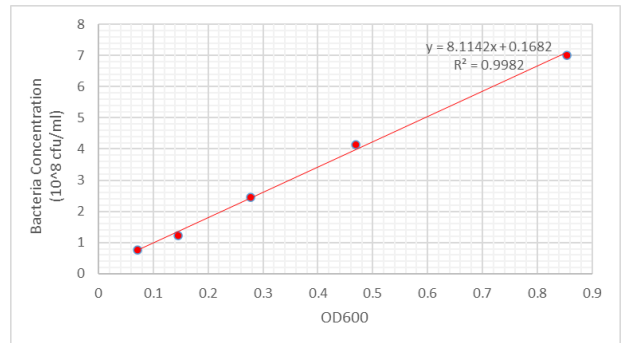


図5 大腸菌調整 検量線

#### 3.3. SOD 測定

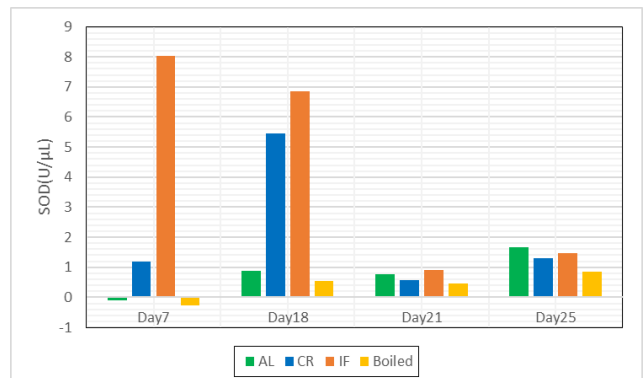


図6 SOD質量濃度測定結果

ALは自由摂食、CRはカロリー制限、IFは断続的飢餓、BoiledはNegative Controlとして、線虫を煮沸して測定したものを示す。

Boiledと自由摂食間では目立った差が観測されないが、これは実験の際に煮沸が不十分だったことが考えられる。これ以降、Boiledのデータについては言及しない。

Day7において、自由摂食とBoiledではSOD量が負の値となったが、これは先述の通り、阻害曲線の形が理想的なものでなかったために、負の値をとった。

グラフの形から、断続的飢餓とカロリー制限について、結果をDay18以前とDay21以降で期間①、②に分ける。期間①では自由摂食に比べて断続的飢餓、カロリー制限のSOD量が顕著に大きく、また、断続的飢餓の方がカロリー制限よりもSOD量が大きいことが分かる。

一方、期間②では、対照群のSOD量がほぼすべて同じであるが、顕微鏡でシャーレを観察した結果、この時点から線虫の増殖が見られた。そのためDay10まで使用したFUDRの効果が切れた可能性が高く、線虫の代替わりが起こったと推測される。したがってデータの信頼性が低いと考え、期間②のデータは考察に値しないと判断した。

#### 4. 考察

図6より、Day7、Day18では、自由摂食に比べて断続的飢餓、カロリー制限のSOD量が大きく、その上に、断続的飢餓の方がカロリー制限よりSOD量が大きくなっていることがわかる。このことから、食餌制限によって寿命が延長される理由はSODの量にあり、また、カロリー制限、断続的飢餓間ではSOD量が異なるために、両者間で寿命延長の程度に差があるということが示唆される。

また、食餌制限によって寿命が延長される理由として、食物を得る機会を増やすためだという理由が考えられる。この場合、摂食が止まる断続的飢餓の方がより寿命を延長させる必要があるため、より多くのSODを生成しなければならない。これに見合う量のSODを生成するには、カロリー制限時と同じ経路では不十分なため、両者間で応答経路が異なるのではないかと考えられる。

#### 5. 結論・展望

本研究での問い「カロリー制限・断続的飢餓間でSODの量に差があるのか」に対して、「断続的飢餓の方がカロリー制限よりSOD量が多い」という結論に至った。また、寿命延長の程度の大きい断続的飢餓

の方がSODの量が多いという結果から、SODの量の差がカロリー制限・断続的飢餓の寿命の差に影響しているということが示唆された。

今後の研究では、FUDRの使用を見直し、Day21とDay25の正確なデータを得ることで、SODの量の経時変化を調べることや、断続的飢餓、カロリー制限における飢餓への応答経路とSOD量変化の関係を解明すること、そして、SODが寿命延長に作用する機構を突き止める必要がある。

#### 6. 謝辞

研究に協力してくださった、本校西畑佳代子教諭をはじめとする多くの先生方、研究についてご助言頂いたサイエンスアドバイザーの方々、線虫を提供してくださり、飼育、研究についてアドバイスしていただいた、川野武弘博士をはじめとする理化学研究所生命機能科学研究センターの方々、そして、線虫の飼育に協力して下さった、本校総合理学科16期生の方々に感謝する。

#### 7. 参考文献

- (1) Honjoh S et al. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans* (2009) *Nature*, 457, 726-730
- (2) Honjoh et al. 食餌制限による寿命延長のメカニズム (2010) *生化学* 第82巻 第5号 388-393
- (3) Dae-Sung Hwangbo et al. Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms (2020) *Nutrients* 12, 1194
- (4) An Zhu et al. Oxidation and Antioxidation of Natural Products in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* (2022) *Antioxidants* 11(4), 705
- (5) Filipe Cabreiro et al. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage (2011) *Free Radical Biology & Medicine* 51 1575-1582
- (6) TaKaRa BCA Protein Assay Kit [https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/t9300a\\_j.pdf](https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/t9300a_j.pdf)
- (7) SOD Assay Kit - WST [https://www.dojindo.co.jp/manual/S311\\_100t\\_test.pdf](https://www.dojindo.co.jp/manual/S311_100t_test.pdf)