

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 伊藤真 高松和真 待鳥惠羽 松浦万季

Summary

カロリー制限
寿命が20%延長

VS

断続的飢餓
寿命が60%延長

→なぜ寿命延長の効果に差があるのか？

→断続的飢餓の方がカロリー制限よりSOD (Superoxide Dismutase) の量が多い

∴SODの量の差が寿命延長の効果の差に影響していることが示唆された

Introduction

食餌制限…線虫 (Caenorhabditis elegans) の寿命を延長する

- ・カロリー制限 (1回の摂取量を減らす)
- ・断続的飢餓 (餌を摂取しない期間を設ける)

寿命延長の程度

カロリー制限 < 断続的飢餓

(自由摂食に比べてそれぞれ20%, 60%延長)

→なぜ差が生じるのか？

両者ともに転写因子DAF-16が核内移行する

抗酸化物質SOD(Superoxide Dismutase)と作用して寿命を延長させることが知られている

SODの量が両者で異なるから寿命延長の効果に差があるのではないのか？

《Research Question》

カロリー制限・断続的飢餓間でSODの量に差があるのか？

Method

線虫の飼育条件

- ・FUDR(産卵阻害剤)を用いて生殖を阻害
- ・NGM培地を使用し、直径8.5cmのシャーレ内で飼育

線虫の飼育方法

- ①線虫を生きたOP50とともに3日間培養
- ②FUDRを含む培地に①の線虫と生きたOP50を移し、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、紫外線で処理したOP50とともにそれぞれ培養する。Day10まではFUDRを含む培地で培養する。線虫は2日ごとに新しい培地に移す。

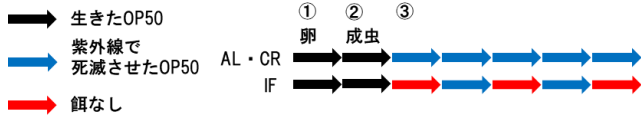


図1 線虫飼育方法 AL…自由摂食 CR…カロリー制限 IF…断続的飢餓

餌の濃度: 自由摂食… 1×10^9 cfu/ml カロリー制限… 1×10^8 cfu/ml 断続的飢餓… 1×10^9 cfu/ml

SOD量測定方法

SOD量 = SOD質量濃度(U/ug)

- ・SOD質量濃度測定(U/ml)
- ・総タンパク質測定(μ g/ml)

SOD測定手順

- ・測定物質を4段階に希釈し(sample溶液), 右上の表のように溶液を混合して4種のsample溶液それぞれについて吸光度を測定する
- ・測定結果をもとに阻害曲線を作成
- ・阻害率が50%の溶液に含まれるSOD量を1Uとして濃度を算出

表1 SOD濃度測定 溶液調整方法

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

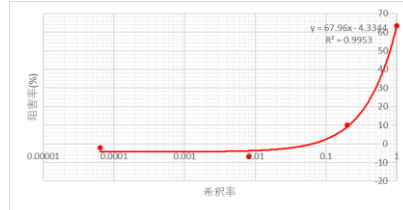


図2 SOD測定 阻害曲線

総タンパク質測定手順

- ・濃度既知のタンパク質を用いて検量線を作成
- ・測定溶液の吸光度を検量線に照らしてタンパク質濃度を算出

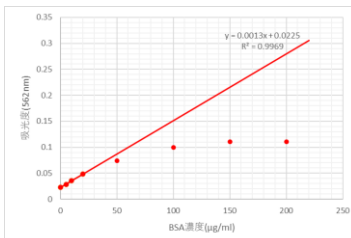


図3 総タンパク質測定 検量線

高濃度において吸光度の変化量が減少

↓
BCAが飽和

低濃度における高い直線性を示すデータを選択して検量線とした

Results & Discussion

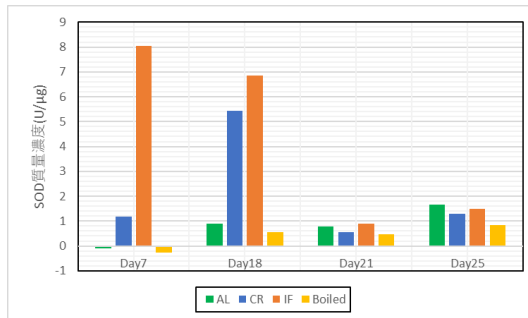


図4 SOD質量濃度測定

AL…自由摂食 CR…カロリー制限 IF…断続的飢餓 Boiled…煮沸 (Negative Control)

Day 7, 18におけるSOD量

カロリー制限 < 断続的飢餓

→SODの量の差が寿命延長の効果の差に影響していることが示唆された

※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。また、Day 21, 25においては、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Day 10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、Day 21, 25のデータは考察に値しないと判断した。

本研究に研究に協力して下さった、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、線虫を提供して下さり、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6期生の方々に感謝する。

- (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.com.jp/PDFs/t9300a_j.pdf
- (7) ISOD Assay Kit - WST https://www.dojindo.com.jp/manual/S311_100test.pdf