
研究報文

長期的な酸化脂質摂取が 線虫の生殖能力と寿命に与える影響

木村 理恵, 麻生 知子¹, 相馬 顕子¹
森 友彦^{1, 2}, 松村 康生¹, 松本 晋也

Effects of long-term uptake of oxidized lipids upon *C.elegans*
fecundity and life span

Rie Kimura, Tomoko Aso, Akiko Soma, Tomohiko Mori,
Yasuki Matsumura, Shinya Matsumoto

Summary

Fatty acids, which are biologically and functionally crucial components of triacylglycerol and phospholipid, are very sensitive to oxygen attack, and subsequently produce substances such as hydroperoxides and aliphatic long-chain aldehydes. Although these compounds, collectively called oxidized lipids, are known to be toxic to organism, long-term effects of the oxidized lipids uptake upon organism have much to be uncovered. In this study, the effects of long-term uptake of oxidized lipids upon fecundity and life-span were analyzed using model organism, *Caenorhabditis elegans*. Although oxidized lipids showed little effect on fecundity, mean life-span of the worms were shortened when they were fed with oxidized fatty acids. However, maximum life span was not affected by oxidized lipid indicating the toxic effect of the oxidized lipids were not uniform throughout the life cycle; relatively strong in the early stage of life and gradually become weak as aging proceeds. The toxic effects of oxidized lipids were diminished by addition of anti-oxidative vitamin α -tocopherol. The expression of anti-oxidative stress enzyme gene, such as superoxide dismutases and catalases, were analyzed by RT-PCR. The expression of these genes were increased upon long-term oxidized lipids exposure. This indicates that anti-oxidant protection system indeed responded to the oxidative stress caused by the oxidized lipids.

(Received September 20, 2012)

I. 緒言

ほ乳類を含む好気性生物は、酸素分子がもつ高い反応性を利用することで有機化合物から効率的にエネルギーを獲得し、これによって高い運動性、機能性を維持している¹⁾。しかし、酸化反応過程で生じる活性酸素(スーパーオキシドアニオン O_2^- 、過酸化水素 H_2O_2 、一重項酸素 1O_2 、水酸化ラジカル $OH\cdot$

など)は、核酸、脂質、タンパク質などの生体分子をランダムに攻撃し、それら生体分子の機能を損なう。「老化の活性酸素原因説」は、この酸化傷害による生体分子の機能低下が老化を引き起こすというものである^{2,4)}。不飽和脂肪酸の二重結合は酸素分子による攻撃に脆弱であり、特に複数の二重結合をもつ多価不飽和脂肪酸は容易に酸化されてヒドロペルオキシドに変化する。ヒドロペルオキシドは分解して脂肪族アルデヒド・ケトン・アルコールに変化し、これらが脂質の酸化臭、褐変の原因となる。また、ヒドロペルオキシドはランダムに重合して重合体を形成する。この重合体も脂質の褐変、沈着を引

京都女子大学家政学部食物栄養学科

¹ 京都大学大学院農学研究科農学専攻

² 畿央大学健康科学部健康栄養学科

き起こす^{5), 6)}。

ほとんどの食品は脂質を含んでいることから、脂質の酸化は食品の品質管理のうえで極めて大きな問題である。食品脂質の酸化を防ぐため酸素透過性の低い素材による包装、抗酸化剤の活用や酸化されにくい脂肪酸の利用といった対策が用いられているが、低濃度の過酸化脂質が食品中に生じることが避けられない。過酸化脂質を摂取した場合、酸化臭と腐敗味による悪心、嘔吐が引き起こされだけでなく、高濃度に摂取した場合は死に至ることが報告されている⁷⁾。一方、明確な症状を引き起こさない低レベルの過酸化脂質を長期間摂取したときに、生体にどのような影響が生じるかという視点からも考える必要がある。このような長期的スパンから考えなければならぬものとして、老化、寿命、生殖能力、生活習慣病・がん・認知症などが挙げられる。

自活性土壌線虫である *Caenorhabditis elegans* は、体長約 1 ミリ程度の線形動物である⁸⁻¹⁰⁾。48 ~ 60 時間で成虫になり、その後 2 ~ 3 週間の寿命をもつ。神経系・消化器系・上皮系・筋肉系といった動物としての基本的な体制をもっていること、全ゲノム配列と全シナプス構造が解明されていること、雌雄同体を基本として自家受精で繁殖すること、さまざまな遺伝子操作技術が確立していることなどから、多細胞動物特有の生命現象を解析するモデル生物として広く用いられている。実際、線虫で最初に見いだされたアポトーシス、RNA 干渉 (RNAi)、miRNA (microRNA) といった現象はその後植物や哺乳類でも見いだされており、線虫のモデル生物としての実績は十分に認められている。また、解糖系から電子伝達系に至るエネルギー獲得経路、脂肪酸やアミノ酸の異化・同化経路に関わる遺伝子の多くがヒトを含む哺乳類にも保存されていることから、摂食行動、寿命、エネルギー代謝、環境への適応などといった分野でもモデルとして活用されつつある^{11, 12)}。

本研究では、このような線虫の特性を利用し、長期間におよぶ過酸化脂質の摂取が線虫の生殖能力と寿命にどのような影響をあたえるのかを検討した。その結果、過酸化脂質は、線虫の寿命を短縮する効果があることが認められた。この寿命短縮効果は比較的若い線虫において認められ、老化した線虫では顕著ではなかった。また、過酸化脂質と抗酸化剤 α -トコフェロールを線虫に摂取させた場合、寿命短縮効果は消失することがわかった。さらに、過酸化脂質投与時にスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼなどの抗酸化酵素の発現が増加していること

を見いだした。

II. 実験方法

1) 試薬

試薬は生化学グレード、特級をナカライテスク (日本)、和光純薬 (日本) から購入した。

2) 線虫と飼育方法

野生型線虫株 Bristol N2 と大腸菌 OP50 は、CGC (*Caenorhabditis* Genetic Center) から分与された。線虫は OP50 をえさとして、NGM (Nematode Growth Medium) プレート上で維持した。線虫の扱い、試薬の作製は常法に従った^{13), 14)}。線虫の飼育は 20°C でおこなった。また、OP50 は LB 培地で 37°C で培養した。

3) 過酸化脂肪酸-大腸菌体残骸複合体の調製法

大腸菌膜に過酸化脂肪酸を取り込ませた過酸化脂肪酸-大腸菌体残骸複合体を作成し、これを餌として与えることで過酸化脂肪酸の経口摂取をおこなった。まず、脂肪酸 (オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)) を 50°C で 24 時間、大気中で酸化させた。過酸化脂肪酸標品 25 mg 相当を 1 ml エタノールに溶解した。この 5 種類の過酸化脂肪酸エタノール溶液を 0.2 ml ずつを混合し (計 1 ml)、氷冷した OP50 培養懸濁液 1 ml と混合した。この混合液を透析チューブ (セルロース 18/32) に入れ、純水 2L に対して 4°C で 24 時間透析した (1L × 2回)。透析により透析チューブからエタノールが除かれ、溶液の疎水性が上昇した結果、過酸化脂肪酸は大腸菌残骸に移行、取り込まれる。この過酸化脂肪酸-大腸菌体残骸複合体 (以下、過酸化脂肪酸複合体) を線虫に与えた。同様の方法で、各種脂肪酸単独の複合体も作製した。なお、脂肪酸なしで同じ操作を施して得た複合体をコントロール複合体とした。

α -トコフェロールを含む過酸化脂肪酸複合体は以下の要領で作製した。25 mg 相当の過酸化脂肪酸とモル比で等量の α -トコフェロールを 1 ml エタノール中に混合し、それを上述の通り等量の OP50 懸濁液を混合して、過酸化脂肪酸 α -トコフェロール複合体を得た。

4) 過酸化物価 (POV)、TBA 測定法

過酸化物価 (POV : peroxide value) は、脂肪酸の酸化一次生成物であるヒドロペルオキシド量を示すものであり、脂肪酸酸化初期段階の酸敗度を表す。それに対して、TBA (thiobarbituric acid) 法は、ヒドロペルオキシドが分解して生じる二次生成物、

特にmalondialdehyde (MDA) を定量する手法である。したがってTBA値は、脂肪酸酸化後期段階の酸敗度を示す。

POV測定では、700 μ lの溶媒(メタノール:ブタノール=2:1)に試験脂質が約1 mg含まれるように調製する。この試料に、2 ml溶媒、120 μ l 25 mM HCl inメタノール、120 μ l 12.5 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、80 μ l飽和KI溶液を加え、遠心分離(1500 \times g, 20 $^\circ$ C, 3分間)後、上澄みを得る。飽和KI溶液を添加して15分後636 nmの吸光度を測定する。既知量のCHP(cumenhydroperoxide)を標準ヒドロペルオキシドとして用い、検量線を得た。

TBA測定では、試料を含む0.5 mlリン酸緩衝液(1 mM NaPi , pH7.0)に2 ml TBA試薬を加え、十分に攪拌混和したのち、95 $^\circ$ Cで15分間湯浴する。その後、水中で急速冷却し、遠心分離(1500 \times g, 20 $^\circ$ C, 15分間)後、上澄みを532 nmの吸光度を測定する。既知量のTEP(1,1,3,3-tetraethoxypropane)を標準試料として検量線を得る。

TBA試薬は、A液とB液を100:3(容量比)で混合し、調製する。A液:15 gトリクロロ酢酸、0.375 g TBA, 25 ml 1N HClを加え、100 mlにメスアップする。

B液:60 mg butylated hydroxytolueneを3 mlエタノールに溶解する。

5) 過酸化脂肪酸の投与方法

過酸化脂質複合体、コントロール複合体1.5 mlとOP50培養懸濁液0.5 mlを混和し、20枚のNGMプレートに接種した。このNGMプレートに線虫を移し、20 $^\circ$ Cで飼育した。これら酸化ストレスを受けた線虫の寿命と産仔数を測定した。

6) 産仔数計測

過酸化脂肪酸複合体、コントロール複合体を接種したNGMプレートを用意し、それぞれに成熟した線虫を移した。産卵が確認できたら卵を残して、線虫を取り除いた。翌日、卵からふ化した幼虫を1匹だけ残して他の幼虫はプレートから除いた。このように、プレートあたり1匹しかいないプレートを2枚用意した。この1匹から産み落とされたすべての仔線虫数を計測することで線虫の生殖能力とした。

7) 寿命解析

過酸化脂肪酸複合体、コントロール複合体を接種したNGMプレートを用意し、それぞれに成熟した線虫を移した(これをday 0とする)。40-50個の卵が生じたら線虫を取り除き、卵から生じた幼虫(仔線虫)が成長するまで飼育した。仔線虫が成熟した

ら、別の過酸化脂肪酸複合体プレート、またはコントロール複合体プレートに移動させる。これは、仔線虫と次世代線虫(孫線虫)との混同を避けるためである。孫線虫が生じなくなるまで、毎日仔線虫を移動させる。孫線虫が生じなくなったら、すべての仔線虫の生死観察を続ける。頭部に触れてもレスポンスしなくなった線虫を死んだものとし、day 0からの生存日数を記録した。

8) 全RNA調製, RT-PCR

IL7)の操作におけるday5時点で、S-basal緩衝液を使って線虫を回収する。回収する線虫数は35匹に統一した。RNA調製試薬Sepasol RNAI(ナカライテスク)を0.5 ml加え、ホモゲナイザーで十分に線虫を破碎する。これに100 μ lクロロホルムを加え、遠心分離(12000 \times g, 20 $^\circ$ C, 15分間)後、RNAを含む水層を回収する。これにイソプロパノールを加え、不溶化させたRNA画分を50 μ lの純水に溶かし、全RNA標品とした。

全RNA標品2 μ lを鋳型として逆転写反応をおこない、cDNAを得た(逆転写酵素は東洋紡社製RevarTraAce)。得られたcDNAを鋳型としてKOD-Plus(東洋紡)を用いてPCRをおこなった(94 $^\circ$ C, 0.5min; 60 $^\circ$ C, 0.5min; 72 $^\circ$ C, 1min; 30サイクル)。用いたプライマー配列は以下の通り。*sod-1*, 5-TGTCGAACCGTGCTGTCGCTGT-3, 5-CTGGGGAGCAGCGAGAGCAA-3; *sod-2*, 5-TGCTTCAAACACCGTTTCGCT-3, 5-TTGCTGTGCCTTTGCAAAACGCT-3; *sod-3*, 5-TGCTGCAATCTACTGCTCGCACT-3, 5-TTGTCGAGCATTTGGCAAATC-3; *sod-4*, 5-TGAAAACCTCGTGTGTTTAAATCTG-3, 5-AGACGGTACCGATAGTTCCA-3; *ctl-1*, 5TGCCAAACGATCCATCGGATAA-3, 5-AATGCTTCTTCTGGCAGAG-3; *ctl-2*, 5-TGCCAAACGATCCATCGGATAA-3, 5-AGATATGAGAGCGAGCCT-3。増幅したDNAをアガロースゲル電気泳動で解析し、抗酸化酵素遺伝子の発現量を比較、検討した。

III. 結果と考察

1) 酸化脂質が過酸化脂肪酸複合体に取り込まれていることの確認

長期間にわたり線虫に過酸化脂肪酸を摂取させる方法として、NGM培地に直接過酸化脂肪酸を添加する方法が考えられる。しかし、この方法では、添

加した過酸化脂肪酸が経口経路で摂取されているのか、体表面から体内に浸透したのかを区別することが難しい。そこで、大腸菌膜を含む菌体残骸に過酸化脂肪酸を取り込んだ複合体を作製し、これを餌とすることで経口による過酸化脂肪酸摂取をおこなった。その原理を図 1 に示した。

簡単に説明すると、過酸化脂肪酸が含まれたエタノール溶液と混合することで大腸菌は死んで大菌体残骸が生じる。これを水に対して透析すると、エタノール濃度が減少するにつれ溶液環境が親水的に変化すると考えられる。その結果、比較的疎水性の高い過酸化脂肪酸は溶液中に留まるより、大腸菌膜からなる菌体残骸と結合した方が安定となるので、過酸化脂肪酸と菌体残骸との複合体が形成される。このような複合体に脂質が取り込まれることはすでに報告されているだけでなく¹⁵⁾、コレステロールがこの方法で大腸菌残骸に取り込まれることを筆者らは確認している（データは示していない）。この方法で過酸化脂質が複合体を形成しているかを、複合体標品の POV と TBA 値で確認した（表 1）。過酸化脂肪酸を含まない複合体標品に比べ、POV, TBA 値ともに明確に高値を示したことから、複合体には過酸化脂肪酸が取り込まれていることが確認できた。したがって、この方法により調製した過酸化脂肪酸複合体を与えることにより、期待した通り過酸化脂肪酸の経口摂取が達成できると考える。

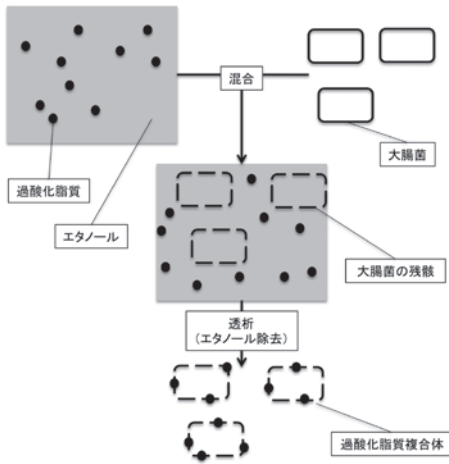


図 1 過酸化脂肪酸 - 大腸菌残骸複合体 (過酸化脂肪酸複合体) 形成の概要

エタノールの溶けている過酸化脂肪酸は大腸菌溶液と混合され、その後エタノールが溶液から除去されることで大腸菌残骸に移行する。

表 1 過酸化脂肪酸複合体の酸敗度

	POV (nmol)	TBA (nmol)
コントロール複合体	0	2.1
過酸化脂質複合体	1719	72.9

酸化反応に用いた脂肪酸 1mg あたりの POV, TBA (数値はそれぞれ CHP,TEP 当量)
いずれも酸化反応に用いた脂肪酸 1mg あたりの POV, TBA (数値はそれぞれ CHP,TEP 当量)

2) 長期にわたる過酸化脂肪酸摂取が線虫の生殖能力におよぼす影響

長期にわたる過酸化脂肪酸の摂取が生体のどのような影響を与えるかについて、まず生殖能力への影響を検討した。雌雄同体線虫は、同一個体内で卵子と精子両方を形成し、自家受精で繁殖する。卵子は生涯にわたってつくり続けるのに対して、精子はある時期に形成するだけである。したがって、1匹の雌雄同体が産生する仔線虫は精子数で決まり、ほぼ一定の値 (約 300 匹) をとる。このことを利用して線虫の生殖能力を定量的に評価できる。

ふ化以降ずっと過酸化脂肪酸複合体を餌として育った線虫が何匹の仔線虫を算出するかを計数した (図 2)。過酸化脂肪酸を摂取した線虫の産仔数が平均 333 匹だったのに対して、コントロール複合体を摂取した線虫の平均産仔数は 322 匹であり、両者に差が認められなかった。このことは、過酸化脂肪酸の長期経口摂取は線虫の生殖能力には影響を与えないことを示している。

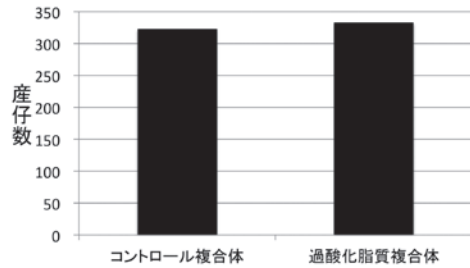


図 2 過酸化脂肪酸摂取の生殖への影響

それぞれ 4 匹の線虫が産出した仔線虫数の平均値を表している。コントロール複合体は、過酸化脂肪酸を含まない大腸菌残骸である。

3) 長期にわたる過酸化脂肪酸摂取が線虫の寿命におよぼす影響

長期にわたる過酸化脂肪酸の摂取が生体にどのような影響を与えるかについて、寿命への影響を検討した。線虫は平均寿命が 14 ~ 16 日、最大寿命が 25 ~ 30 日と比較的短いため、寿命解析には適した生

物である¹⁶⁻¹⁸⁾。過酸化脂肪酸を摂取した線虫の寿命を検討した。その結果、雌雄同体の場合、過酸化脂肪酸を長期間摂取させることにより平均寿命がコントロールに比べ約2日短縮することがわかった。この短縮効果は生後10～20日目あたりが顕著であったが、後期では差はほとんど認められなくなった(図3)。

線虫では、生後7-8日目までに生殖期間を終え、それ以降はいわば「老齢期」に入る。したがって、この結果は過酸化脂肪酸の影響(毒性)は、線虫の老齢期初期から中期にかけて顕著な寿命退縮を引き起こすが、老齢期後期にはその影響はほとんどないことを示唆する。このことは、過酸化脂肪酸の影響(毒性)は、全ライフステージを通じて一様に作用するのではなく、生体の状態、ステージに応じて異なる作用することを示唆しており、そのステージ特異性の原因と酸化ストレスとの関連性は興味深い。

線虫では雌雄同体の他に精子のみを産生する個体が1000匹に1匹の割合で生じる。これは高等動物の雄に相当すると見なされている。この雄線虫の寿命への影響については、雌雄同体とは異なった結果が得られた(図4)。つまり、過酸化脂肪酸を長期摂取しても雄線虫の寿命にはほとんど影響が認められなかった(平均寿命;コントロール複合体14.5日,過酸化脂肪酸複合体14.5日)。過酸化脂肪酸が線虫の性別(雌雄同体と雄性体)で異なる作用を示した原因については明確な説明はない。ただ、雄性体は

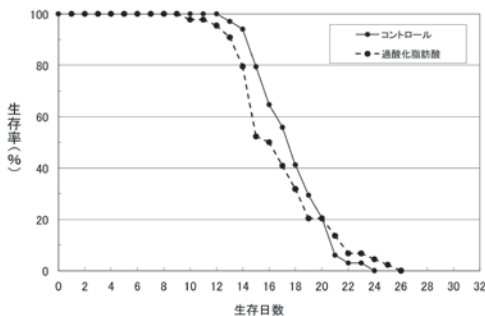


図3 過酸化脂肪酸摂取の寿命への影響
— 雌雄同体 —

過酸化脂肪酸を長期間経口摂取させた雌雄同体線虫の寿命を表している。過酸化脂肪酸複合体摂取群が破線、過酸化脂肪酸を含まないコントロール複合体を摂取した線虫群は実線で表している。寿命曲線から示された平均寿命は、過酸化脂肪酸複合体群が15.5日、コントロール複合体群が17.5日であった。用いた線虫数は、過酸化脂肪酸複合体群が44匹、コントロール複合体群が34匹であった。なお、このグラフは2回おこなった寿命解析のうち代表的なものである。

雌雄同体との交尾のために生きており、交尾以外の生命活動レベルは極めて低い。食行動は極めて不活発であり、それに対応して食餌量は雌雄同体に比べ低くなっている可能性がある。そのため、雄性体では過酸化脂肪酸複合体摂取量が低くなっており、その結果過酸化脂肪酸の毒性が表面化しなかった可能性が考えられる。

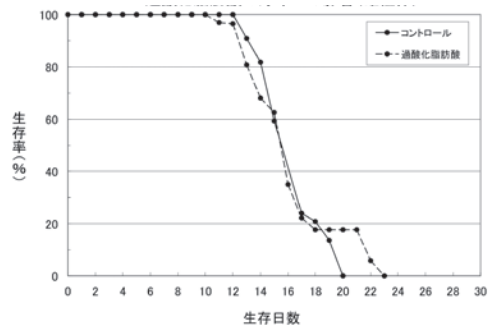


図4 過酸化脂肪酸摂取の寿命への影響— 雄性体 —
過酸化脂肪酸を長期間経口摂取させた雄性体線虫の寿命を表している。過酸化脂肪酸複合体摂取群が破線、過酸化脂肪酸を含まないコントロール複合体を摂取した線虫群は実線で表している。寿命曲線から示された平均寿命は、過酸化脂肪酸複合体群、コントロール複合体群ともに15.5日であった。用いた線虫数は、過酸化脂肪酸複合体群が43匹、コントロール複合体群が48匹であった。なお、このグラフは2回おこなった寿命解析のうち代表的なものである。

4) 脂肪酸の種類による寿命への影響

図3、4で用いられたのは、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、EPA、DHAの過酸化脂肪酸から成る混合物であった。これら脂肪酸の種類による違いがあるのかを検討するため、それぞれの脂肪酸の酸化物のみからなる複合体を作製し、線虫に与えて寿命を解析した。その結果、すべての脂肪酸において平均寿命の短縮が認められた(各脂肪酸の平均寿命:オレイン酸,11日;EPA,DHA,13日;リノール酸,アラキドン酸,14日;酸化脂肪酸なし,17.5日)(図5)。なかでも、5種類の脂肪酸のなかで最も酸化に強いと考えられるオレイン酸の寿命短縮効果が最も大きいことは意外であった。この原因を明らかにするため、線虫に与えた各脂肪酸のPOV、TBA値を測定した。その結果、オレイン酸はPOV、TBA値ともに最も低い値を示した(POV:オレイン酸,リノール酸,アラキドン酸,EPA,DHA=0,61.3,13.3,14.8,9.6 μ M;TBA値=0.2,3.4,5.3,5.2,5.1 μ M)。したがって、オレイン酸酸化物に含まれていたヒドロペルオキシド、

マロンジアルデヒドが寿命短縮効果を引き起こしているのではない可能性が考えられた。POV 測定法、TBA 測定法では、酸化に由来する脂肪族ケトンやアルコール、または重合体の種類や量についてはなんの情報も与えてくれない。したがって、線虫の寿命短縮効果の原因がこれらヒドロペルオキシドやマロンジアルデヒド以外の酸化物による可能性は否定できず、この観点からの検討をおこなう必要がある。

5) 過酸化脂肪酸毒性 (寿命短縮効果) に対する α -トコフェロールの効果

主要なビタミンE分子である α -トコフェロールは、抗酸化作用をもつ物質である。 α -トコフェロールが過酸化脂肪酸による寿命短縮効果を抑制できるかどうかを検討するために、 α -トコフェロールと過酸化脂肪酸複合体を線虫に与え、寿命を測定した。その結果、老齢期初期から中期にかけて認められていた過酸化脂肪酸による寿命短縮効果が、 α -トコフェロールの添加により消失した(図6)。と同時に、老齢期後期には α -トコフェロール添加の方が寿命が伸びることがわかった。これは、過酸化脂肪酸のみを与えた時の結果(図3)と逆の傾向を示したともいえる。ここで、注意すべきは α -トコフェロールは、すでに酸化反応が終了した過酸化脂肪酸とともに複合体に取り込まれたのち、線虫に与えられたという点である。つまり、 α -トコフェロールは脂肪酸の酸化プロセスを抑制したのではなく、過酸化脂肪酸が線虫に作用するプロセスに影響を与えたというこ

とである。

図3, 4, 5において、いずれも過酸化脂肪酸の線虫寿命への影響を検討したが、その毒性メカニズム(寿命短縮効果)に関する情報はこの実験からは得られていない。しかし、 α -トコフェロール添加が線虫の寿命短縮効果を抑制したという結果は、過酸化脂肪酸が線虫生体内で酸化ストレスを亢進させたために寿命短縮が生じたこと、その酸化ストレスの亢進を α -トコフェロールが抑制したことを示唆する。細胞膜やミトコンドリア膜などの生体膜中の不飽和脂肪酸は活性酸素による自動酸化の標的になりやすく、 α -トコフェロールを含むビタミンEはこの生体膜中の酸化ストレスを抑制することが知られている¹⁹⁾。したがって、 α -トコフェロールの添加が過酸化脂肪酸毒性を抑制したということは、過酸化脂肪酸の毒性が生体膜中脂肪酸の自動酸化を介して発揮される可能性を示しているとも考えられる。この仮説が正しいとすれば、過酸化脂肪酸複合体を摂取した線虫のミトコンドリア膜では酸化傷害が亢進している可能性があり、それはPOV, TBA法で定量的に検出、評価できる可能性がある。また、ビタミンEによる生体膜の自動酸化抑制はビタミンCにより増強されることから、ビタミンCもビタミンE添加による過酸化脂肪酸毒性の抑制効果をさらに増強する可能性がある。過酸化脂肪酸が生体膜の自動酸化を促進することで寿命に影響を与えるのかどうかをさらに検討する必要がある。

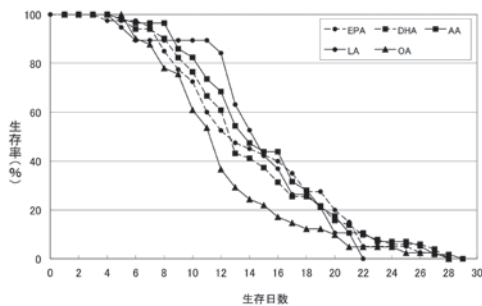


図5 脂肪酸の種類による寿命への影響

1種類の脂肪酸由来の過酸化脂肪酸を摂取させた雌雄同体線虫の寿命を表している。凡例中の略字は以下の通り：EPA, エイコサペンタエン酸；DHA, ドコサヘキサエン酸；AA, アラキドン酸；LA, リノール酸；OA, オレイン酸。寿命曲線から示された平均寿命は、オレイン酸, 11日；EPA, DHA, 13日；リノール酸, アラキドン酸, 14日。過酸化脂肪酸複合体群, コントロール複合体群ともに15.5日であった。用いた線虫数は、EPA, 40匹；DHA, 51匹；AA, 57匹；LA, 19匹；OA, 41匹であった。

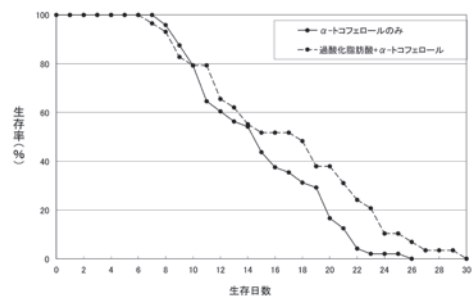


図6 過酸化脂肪酸毒性に対する α -トコフェロールの効果

過酸化脂肪酸と α -トコフェロールを含んだ複合体を摂取した雌雄同体線虫の寿命を表している。過酸化脂肪酸と α -トコフェロールを与えた群が破線、 α -トコフェロールのみを与えた群が実線で表している。過酸化脂肪酸を含まないコントロール複合体を摂取した線虫群は実線で表している。寿命曲線から示された平均寿命は、過酸化脂肪酸と α -トコフェロールを与えた群が17.5日、 α -トコフェロールのみを与えた群が14.5日であった。

6) 過酸化脂肪酸摂取による抗酸化酵素の発現変動

過酸化脂肪酸摂取が線虫内で酸化ストレスを亢進しているとしたら、抗酸化酵素群の発現が上昇している可能性が考えられる。そのため、過酸化脂肪酸の長期摂取時における抗酸化酵素遺伝子の発現変動を半定量的解析法である RT-PCR で解析した。対象とした抗酸化酵素遺伝子は、スーパーオキシドアニオンを消去するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) (*sod-1*, *sod-2*, *sod-3*, *sod-4*) と過酸化水素を消去するカタラーゼ (*ctl-1*, *ctl-2*) とした。これらの酵素は、紫外線、薬剤などによって生じる活性酸素の消去に関与している²⁰⁾。したがって、生体内酸化ストレス亢進の目安の一つになると考えられる。

過酸化脂肪酸摂取により線虫が死に始める生後 5 日目の線虫から mRNA を調製し、RT-PCR とアガロースゲル電気泳動にて mRNA の発現変動を解析した。その結果、4 つの SOD 遺伝子、2 つのカタラーゼ遺伝子のいずれも発現が上昇していることがわかった (図 7)。ただし、上昇の幅はそれぞれの遺伝子でまちまちであり、全体として SOD 遺伝子の発現上昇が大きいものに対して、カタラーゼ遺伝子の上昇幅は小さい。特に、*sod-1* と *sod-3* の発現量は顕著に増加している。*sod-1* は Cu/Zn 型 SOD であり、線虫が過酷な環境を生き抜くときの形態である dauer (耐性幼虫) において発現が誘導されることが知られており^{21) 22)}、また、*sod-3* は Fe/Mg 型 SOD であり、ミトコンドリアでの酸化ストレス軽減に寄与していることが報告されている²³⁾。これらの酵素遺伝子の発現量が上昇したことは、過酸化脂肪酸摂取により生体内ではスーパーオキシドアニ

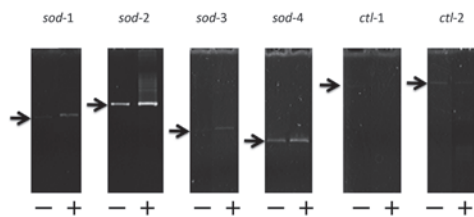


図 7 過酸化脂肪酸摂取による抗酸化酵素の発現変動

過酸化脂肪酸を摂取した線虫内における抗酸化酵素 SOD (スーパーオキシドジスムターゼ)、CTL (カタラーゼ) 遺伝子の発現変動を RT-PCR で解析した。図中の矢印は、増幅された DNA バンドの位置を表しており、すべて予想されたサイズを示している。それぞれのパネル下部のプラスとマイナスは、それぞれ過酸化脂肪酸複合体を与えたもの、コントロール複合体をあたえたものを示している。

オンの脅威が高まっていることが示唆される。

V. 要約

本実験では、脂肪酸の酸化物を経口摂取させた時、生体にどのような影響が生じるのかを線虫をモデル生物として検討した。その結果、過酸化脂肪酸は線虫の寿命を短縮する効果があることが見いだされた。また、その短縮効果は老齢期初期から中期にかけて認められるものの、後期にはほぼ消失することがわかった。これは、過酸化脂肪酸の影響が全ライフサイクルを通じて一様に作用するのではなく、ステージによって異なることを示唆する。今後の課題として、どの臓器がもっとも影響を受けているのか、酸化脂肪酸のどの成分が最も毒性が強いのかを検討する必要がある。さらに、線虫で得られた知見がヒトをはじめとするほ乳類でも成り立つのかどうか検討できればおもしろい。

VI. 引用文献

1. レーニンジャーの新生化学(第4版)川崎敏祐ら(編) 廣川書店 pp.695-740 (2008) .
2. Research of Aging: The end of the beginning. *Science* 299, pp1339-1359 (2003) .
3. Regulation of the gene expression by reactive oxygen. TP Dalton, HG Shertzer, A Puga, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 pp.67-101 (1999)
4. The genetics of Aging. CE Finch, G Ruvkun. *Annu. Rev. Hum. Genet.* 2 pp.435-462 (2001)
5. 食品化学 佐々木隆造ら(編) 文永堂出版 pp.68-76 (2005)
6. 酸化ストレス・レドックス 谷口直之, 淀井淳司 共立出版 pp.101-189 (2002)
7. 栄養機能化学(第2版) 栄養機能化学研究会(編) 朝倉書店 pp.164-185 (2005)
8. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?. JG Wallis, JAL Watts, J Browse. *Trends in Biol Sci* 27 (9) pp.467-473 (2002)
9. Reproduction and Longevity: Secrets revealed by *C.elegans*. A Mukhopadhyay, HA Tissenbaum. *Trends in Cell Biology* 17 (2) pp.65-71 (2006)
10. Model Organisms as a Guide to Mammalian Aging. HA Tissenbaum, L Gaudente. *Dev Cell* 1pp.9-19 (2002)
11. Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*. K Houthoofd, JR Vanfleteren. *Genomics* 277 pp.601-617 (2007)

12. Extension of life span in *Caenorhabditis elegans* by diet lacking Coenzym Q. P Larsen, CF Clarke. *Science* 295 pp.120-123 (2002)
13. The nematode *Caenorhabditis elegans*. WB Wood (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)
14. The *C.elegans* II. DL Riddle (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press) 1997)
15. Distribution and transport of cholesterol in *Caenorhabditis elegans*. V Matyach et al. *Molecular Biology of the Cell* 12 pp.1725-1736 (2001)
16. Insulin worms its way into the spotlight. DW Nelson, RE Padgett. *Genes Dev* 17 pp.813-818 (2003)
17. Type 2 diabetes mellitus and worm longevity: transcriptional link to cure?. I Habeos, AG Papavassiliou. *Trends in Endocrinol Metab* 12 (4) pp.139-140 (2001)
18. Metabolism, ubiquione synthesis and longevity. H Aguilaniu J Durieux, A Dillin. *Genes Dev* 19 pp.2399-2406 (2005)
19. 栄養機能化学(第2版) 栄養機能化学研究会(編) 朝倉書店 p185 (2005)
20. コーンスタンプ生化学(第5版) 田宮信雄ら(編) 東京化学同人 pp413-414 (1988)
21. 栄養機能化学(第2版) 栄養機能化学研究会(編) 朝倉書店 pp.177-179 (2005)
22. Activation of Cu/Zn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. LT Jensen, VCCulotta. *J Biol Chem*, 280, pp.41373-41379 (2005)
23. Adaptive responses to oxidative damage in three mutants of *Caenorhabditis elegans* (*age-1*, *mev-1* and *daf-16*) that affect life span. S Yanase, K Yasuda, N Ishii. *Mech Ageing Dev*, 123, pp.1579-1587 (2002)