

赤ぶどう果皮抽出物による線虫の老化遅延効果の解析

永井 卓真 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

●背景・目的

「赤ぶどう」の果皮には trans-レスベラトロール(Rsv)が含まれていることが古くより知られていた。trans-レスベラトロールは、抗肥満作用や血糖値降下作用など多くの生理作用が知られているが、赤ぶどう果皮中には Rsv 以外にも多くの生理作用を持つ機能分子が含まれていると考えられている。Rsv は転写因子 FoxO を活性化し活性酸素除去酵素(SOD)などの発現を介して個体老化の遅延に働くことが知られている。線虫では FoxO のホモログとして Daf-16 が知られている。当研究室のこれまでの研究により、Rsv は DAF-16 タンパク質の核局在を促進し線虫のストレス耐性や寿命延伸作用に関わると考えられている。

本研究は、モデル生物である線虫 (*C. elegans*) とマウス前駆脂肪細胞(3T3-L1)に対する赤ぶどう抽出物(Red Grape Pericarp Extract:RGPE)の種々の生理・薬理作用の解析を目的とした。

●方法

・線虫

線虫野生株 (N2)に同調処理(成虫から卵を摘出し、幼虫の発生段階を揃える操作)を行い、L1 幼虫期に *E.coli*OP-50 株培養液と共に赤ブドウの果皮抽出物 (1 mg/ml) を個体培地 (Nematode Growth Medium:NGM) 上に添加し、20°Cで培養した。96h 培養後に線虫の体長、寿命(生存率)、運動性 (thrashing 運動)、およびストレス耐性に関わる遺伝子発現の解析を行った。

1. 体長の測定

線虫を同調処理後、NGM プレート上で各試薬 (dDW,Rsv,RGPE)とともに 72h 培養後 4 % PFA で固定し、顕微鏡で観察した。それを撮影し、その後画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて線虫の体長を測定した。

2. 寿命の測定

線虫を同調処理後、NGM プレートで各試薬と 96h 培養後、1 日おきに培地を交換した。新しい培地に線虫を移す際に線虫を生理食塩水に浮かべ、動くかどうかを指標にした。

3. 経時的な運動性の変化

線虫を同調処理後、NGM プレート上で各試薬と 96h 培養後、線虫を生理食塩水に浮かべ実顕微鏡下で観察し 15sec あたりの thrashing 運動回数を計測した。同調処理 96h 後を Day0 として 72h おきに Day9 まで測定した。

4. 遺伝子発現解析

線虫を同調処理後、NGM プレートで各試薬と 96h 培養後 wash し、乾熱滅菌した乳鉢により凍結破碎した。

そこに、RNA 抽出 kit(iso-PLUS TAKARA)を用いて RNA を抽出した。抽出した total RNA から逆転写酵素によって cDNA を合成した。qRT-PCR を用いて、daf-16 の下流に存在する od-3、hsp-12.6 の遺伝子発現を解析した。また、飢餓シグナルにより活性化する代表的転写因子 FoxA の線虫ホモログである pha-4 の下流遺伝子 elt-2、myo-2 の 2 つについても発現量を解析した。

・3T3-L1

1. 脂肪定量

RGPE による脂肪蓄積量を調べるために Oil red O 染色を行った。3T3-L1 を 4 cm dish にコンフルエントまで培養後、RGPE(0.25、0.5、0.75、1.0 mg/mL)を添加し、96h 培養した。その後 oil red O を用いて脂肪滴を染色した。

2. MTT アッセイ

RGPE による細胞生存率の変化を調べるため、ミトコンドリア内脱水素酵素の働きを指標にした MTT assay を行った。3T3-L1 を 24well プレートにコンフルエントまで培養後 RGPE(0.25、0.5、0.75、1.0 mg/mL)を添加し、さらに 96h 培養しホルマザンを抽出し比色定量した。

●結果

・線虫

1. RGPE 濃度依存的に体長は小さくなった。
2. RGPE は対照に比べ寿命延伸傾向が認められた。
3. RGPE により経時的な運動性の低下が抑制された。
4. daf-16 の下流遺伝子である、sod-3、hsp-12.6 の発現低下が見られた。

・3T3-L1

1. 濃度依存的に染色量は低下した。
2. RGPE1.0 mg/mL では細胞生存率の低下が見られ、0.5 mg/mL 以下の濃度では対照と変化なかった。

●考察

線虫の実験より、寿命を延伸する効果と運動性低下抑制が見られたが、daf-16 は関与してない可能性が示唆された。一方、体長の短縮が見られる。したがって、単に発生段階の遅延も予想できる。また、線虫・細胞共に Rsv と RGPE を比較することにより、RGPE の作用分子として Rsv に加え別の機能分子が関与する可能性が示唆された。