

クエン酸による線虫のストレス耐性作用の解析

太田和 勇輝 (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]

クエン酸は有機酸の一種であり、TCA 回路の中間生成物でもある。代謝の過程で作られる有機酸にはクエン酸を含めていくつかの種類があり、それらを外部から与える研究は細胞においては行われているが、個体を用いてのストレス耐性や寿命等への作用はほとんど知られていない。本研究の先行研究から、TCA 回路を駆動させるエネルギー源にあたる有機酸の一種であるピルビン酸を線虫に与えることによって寿命延伸、ストレス耐性向上が見られたことから、TCA 回路に関わる有機酸も同様に寿命延伸効果やストレス耐性の向上が期待できると考えられる。

そこで本研究では TCA 回路内に含まれる有機酸であるクエン酸に着目して線虫での生理作用の解析を行った。

[材料・方法]

<モデル生物>

本研究では線虫 *C.elegans* Bristol(N2 株)を用いた。線虫は大腸菌 OP50 株を播種した NGM(Nematode Growth Medium)プレートで飼育した。飼育は 20°Cで行った。

<同調処理>

発生段階を揃えるために、成虫になった線虫の表皮を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破碎し、得られた卵を S-basal で 18 時間培養した。その後、幼虫を OP プレートで 72 時間培養した。

<サンプル投与>

クエン酸は同調処理後 72 時間経過したのちに OP50 と共に線虫に与えた。この時、クエン酸が餌である OP50 に影響を与えることを防ぐため、OP50 は熱によって殺菌したものをを用いた。

<実験方法>

(1) 酸化ストレス耐性試験

クエン酸投与後 24 時間経過した線虫を 0.3% H₂O₂に移し、1 時間ごとに生存率を測定した。

(2) 熱ストレス耐性試験(生存率)

クエン酸投与後 24 時間経過した線虫を、OP50 を塗布したアンピシリンプレートに移し、35°Cの熱ストレスを与えた。10 時間目から 18 時間目まで、2 時間毎に生存率を測定した。

(3) 熱ストレス耐性試験(運動性)

クエン酸投与後 24 時間経過した線虫を無菌 NGM プレートに移し、35°Cの熱ストレスを 4 時間与えた。その後 OP プレートに移し、0,6,12 時間後に線虫のスラッシング運動(15 秒間)の回数を測定した。

(4) 寿命測定

クエン酸を投与した線虫の生存率を 2~4 日毎に測定した。

[結果]

(1) クエン酸の投与によって線虫の酸化ストレス耐性の向上が確認された。

(2) 現在実施中のため、結果及び考察は発表会にて口頭で発表する。

(3) クエン酸の投与によって線虫の熱ストレス後の運動性の回復が見られた。

(4) クエン酸の投与によって線虫の寿命延伸が確認された。

[考察・今後の展望]

本実験から、クエン酸には線虫のストレス耐性の向上、寿命延伸作用があることが確認された。これらの生理作用は長寿遺伝子の活性化によって起こることが報告されていることから、長寿遺伝子の一つである *daf-16* 等が関与していることが予想される。この結果は先行研究であるピルビン酸の結果と同様であるため、TCA 回路内の他の有機酸においても同様の結果が期待できる。また、ストレス耐性と寿命がどちらも向上したことから健康寿命の延伸にも役立つ可能性があることが示唆された。

今後は各種長寿遺伝子の変異体を用いた解析、及び遺伝子発現解析などを行い作用メカニズムの解明を行う予定である。