

線虫のストレス耐性と脂肪蓄積に対する乳酸の生理作用解析

寺澤 珠希 (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】

乳酸は有機酸の一種であり、ピルビン酸の嫌気性糖分解により産生する。運動により体内が無酸素状態になると乳酸が生じ、これが原因で疲労が引き起こると長い間考えられてきた。しかし実際には科学的根拠に欠けており、乳酸が体に良くないと一概に言うことはできない。乳酸が疲労の直接的原因であるという捉え方は最近否定されつつあり、乳酸は飢餓状態時に肝臓において糖新生の炭素源として用いられるほか、神経障害部位において神経保護作用を示すこともわかっている。

本研究の先行研究によって、TCA 回路に関与するピルビン酸やクエン酸を線虫に与えることで寿命延伸やストレス耐性の向上がみられた (平成 28 年度 修士論文 川木純平, 令和元年度 修士論文 太田和勇輝) ことから、乳酸でも同様の効果が期待できると考えた。そこで、本研究では乳酸が生体に与える生理的側面および老化への影響を明らかにすることを目的として、線虫での生理作用解析を行った。

【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 株を塗布した NGM (Nematode Growth Medium) プレートにて 20°C で飼育を行った。

＜同調処理＞

発生段階が揃った線虫を得るために、成虫の表皮を次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理し、得られた卵を S-basal で 18 時間培養した。その後 OP プレート上で 72 時間培養した。

＜サンプル投与＞

脂肪蓄積量の実験では乳酸との比較としてピルビン酸またはコハク酸を用いた。いずれのサンプルも同調処理後 72 時間経過した時点で OP50 と共に NGM に塗布し線虫に投与した。乳酸が OP50 に影響を及ぼす可能性を排除するために 80°C の熱で 4 時間殺菌した OP50 を用いた。

＜実験方法＞

(1) 脂肪蓄積量

(2) 体長

サンプル投与後 24 時間経過した線虫を蛍光顕微鏡で観察し、画像処理ソフトウェア Image J で解析を行った。

なお、脂肪滴の染色には Nile Red を用いた。

(3) 酸化ストレス耐性試験

サンプル投与後 24 時間経過した線虫を 0.1% H₂O₂ に移し、その時点から 0 時間として 2 時間時点から 1 時間ごとに生存率を測定した。

(4) ミトコンドリア内 ROS 量

サンプル投与時に Mitotracker を添加し培養した線虫を蛍光顕微鏡で観察した。その後、画像処理ソフトウェア Image J を用いて蛍光強度の解析を行った。

(5) 熱ストレス耐性試験 (運動性)

サンプル投与後 24 時間経過した線虫に 35°C の熱を 4 時間与えた。その時点から 0 時間としてスラッシング運動の回数を測定し、その後 20°C の培養条件に戻して 6, 12 時間後にも同様に測定を行った。

(6) ホルミシス効果誘発実験

線虫の生存上ストレスになる高濃度の乳酸を投与する 24 時間前に短時間乳酸に曝露し、ホルミシス効果が引き起こされるかどうかを酸化ストレス耐性試験によって調べた。

【結果】

(1) 乳酸、ピルビン酸、コハク酸いずれを投与した場合でも線虫の脂肪蓄積量が増加した。

(2) 100 mM の乳酸は線虫の体長を増加させた。

(3) ある濃度範囲での乳酸の投与によって酸化ストレス耐性が向上した。

(4) 乳酸の投与によってミトコンドリア内の ROS 量が上昇した。

(5, 6) 現在実施中のため、結果は発表会にて示す。

【考察・今後の展望】

本実験から、特定範囲の濃度の乳酸には脂肪蓄積量と体長の増加および酸化ストレス耐性向上の作用があることが確認できた。微量ではあるが乳酸がミトコンドリア内の ROS 量を増加させたことから、乳酸投与による線虫の酸化ストレス耐性の向上はミトホルミシスの効果である可能性が考えられる。脂肪蓄積量の増加に関しては、哺乳類で GPR81 を介した脂肪分解の抑制機構が存在する (Cai et al., 2008) ことから、線虫でも同様のメカニズムで乳酸が脂肪分解を制御する自己分泌シグナルとして作用すると考えられる。また、乳酸はラットの成長ホルモン放出を活性化させる (Salgueir et al., 2014) ため、線虫の成長ホルモンの誘導にも関与している可能性がある。

今回の結果は、運動中に産生される乳酸が個体のストレス耐性を高めるとともに体格に変化を及ぼすことを示唆する。今後は遺伝子解析および長寿因子として知られている DAF-16 の欠損変異体を用いた実験を行い、これらの生理作用のシグナル経路を明らかにする予定である。