

線虫(*C. elegans*)を用いたコメペプチドの生理活性作用の解析

池田 瑞輝 (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】

近年、レスベラトロールやイソフラボンといった様々な機能性分子の生理活性作用について多くの研究がなされており、アミノ酸が2~100個結合した物質であるペプチドもまた、その研究対象として大きな注目を集めている。ある種のペプチドは抗酸化作用や脂肪蓄積の抑制、寿命延伸といった様々な生理活性作用を示すことが判明しており、現在に至るまで、多くの植物や動物の抽出タンパク質から精製されるペプチドの生理学的効果が明らかとなってきた。しかし、我々日本人が普段よく口にする白米および、玄米を精白する過程で生じる米糠から精製されたペプチドの生理作用については、未だ明らかとなっていない部分が多い。そこで本研究では、モデル生物である線虫を用いて、白米または米糠から作られたペプチド混合物の生理活性作用およびその強度の差について明らかにすることを目的とした。本研究に線虫(*Caenorhabditis elegans*)を用いた理由として、卵から孵化してから成虫へと成長するまで約4日しかかからず、寿命も短いため老化や寿命の解析を容易に行う事が可能であるという点がまず挙げられる。また、多くの遺伝子変異体が存在するため、遺伝子解析を行うことが容易であるという点も理由として挙げられる。線虫はまた、我々ヒトと同様に食物を口から摂取・消化し、腸から吸収するという性質をもつことが知られており、吸収された物質は体液により全身を巡ることでその生理活性作用が発揮されるため、ヒトにおけるコメペプチドの生理活性作用について解析するうえで、線虫は理想的なモデル生物である。本研究では、白米および米糠から調製したペプチドの水溶液を線虫に経口投与し、各種実験を行うことで2種類のコメペプチドの生理活性作用の解析を行った。

## 【材料】

## &lt;コメペプチド&gt;

白米または米糠に含まれるタンパク質成分を抽出し、プロテアーゼで分解することによりペプチド混合物を作成した。実験を行う際は両ペプチドについて50mg/ml水溶液をマザーストックとして作成し、DDWを用いて複数種類の濃度のサンプルを調製した。

## &lt;線虫&gt;

線虫(*Caenorhabditis elegans*)の野生型(N<sub>2</sub>)個体を用いて全ての実験を実施した。

## 【実験方法】

## (1)脂肪蓄積解析実験

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫体内の脂肪分を「Nile red」と呼ばれる試薬を用いて染色し、蛍光顕微鏡で赤色蛍光を測

定後、「ImageJ」という解析ソフトを用いて各サンプルの蛍光量の定量化・比較を行った。

## (2)老化に伴う運動性の測定

日数経過とともに線虫の運動性が低下していくことを利用し、各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫について3日ごとに首振り運動の回数を測定することにより、各サンプルにおける老化の進行度を測定した。

## (3)細胞内ROS測定

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫の細胞内ROSを、50 $\mu$ M DCF-DA溶液を用いて染色し、蛍光顕微鏡で緑色蛍光を計測後、「ImageJ」を用いて蛍光量の定量化・比較を行った。

## (4)産卵数測定

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫3匹についてそれぞれの卵の数および幼虫の数を測定した。

## (5)産卵率測定

産卵数測定を行った翌日に孵化していない卵の数を数え、産卵数測定の数を用いて産卵率を算出した。

## (6)酸化ストレス耐性試験

各濃度のサンプルで4日間飼育した線虫を0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で満たしたウェルに入れ、1時間ごとに線虫の身体をピッカーで刺激することにより生存率を測定した。

## 【結果】

白米ペプチド、米糠ペプチドのいずれにおいても、脂肪蓄積の抑制、細胞内ROSの減少が有意にみられ、その効果はサンプル濃度に依存することが分かった。また、両ペプチドともに線虫の産卵数・孵化率には影響を及ぼさず、生殖機能に対する毒性が無いということも明らかとなった。なお、各実験結果の詳細については報告会で述べるとする。