

## プラズマローゲンによる線虫の寿命及び健康寿命の延伸作用と作用機序の解析

井上 陸 (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】

プラズマローゲンは sn-1 位にビニルエーテル結合を持つ脂肪アルコールを含み、sn-2 位に多加不飽和脂肪酸が豊富なグリセロン脂質である。哺乳類では、プラズマローゲンの含有量は膜脂質全体の最大 20% を占めており、脳に最も多い。プラズマローゲンは年齢によって量が増減しており、高齢者の血清中のプラズマローゲンの量は若い人と比較して 40% 少なく、ヒトやラットの脳でもプラズマローゲンの量は加齢に伴い減少する。また、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患でプラズマローゲン量の減少が確認されている。

本研究では、プラズマローゲンの寿命や健康寿命に対する影響を調査するために、寿命が短いことから、寿命や老化に関連したアッセイを容易に行うことが出来るモデル生物で線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* を用いて、プラズマローゲンを与えたことによる線虫の寿命、健康寿命、老化、酸化ストレス耐性、産卵数への影響を分析した。また、プラズマローゲンを与えたことによる各影響のメカニズムを解明するために内分泌レベル、細胞内 ROS レベルも解析した。

### 【材料・方法】

#### <モデル生物>

本研究で使用された線虫株は *C. elegans* N2 Bristol (wild type) である。線虫は、大腸菌 (OP50) を撒いた NGM (Nematode Growth Medium) プレート上で 20°C で培養した。

#### <方法 1>

卵を集めるために、線虫の成虫を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破砕し、この過程で線虫の成長レベルを同調させた。その後、約 18 時間培養して孵化した線虫を、OP50、DMSO、Hokkaido Scallop Oil Plasmalogen Powder の混合液を塗布した NGM プレート上または、コントロールとして OP50、DMSO のみの混合液を塗布した NGM プレート上に移した。成虫になるまで約 96 時間培養し、実験に用いた。飼育温度は 20°C である。

#### (1) 細胞内 ROS レベルの評価

DCFH-DA を用いて染色して、蛍光顕微鏡で撮影し、ImageJ で解析した。

#### (2) 酸化ストレス耐性の評価

0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に移し、この時点から 0 時間目とした。移してから 2 時間後より 1 時間ごとに生存率を測定した。

#### (3) 産卵数の評価

線虫を大腸菌 OP50 を撒いた NGM プレートに移して、24 時間後にプレート上の卵と幼虫の数をカウントした。

#### (4) 内分泌レベルの評価

線虫をホモジナイズし、遠心分離して上清を回収した。ホルモン分泌レベルをキットの製造元の指示に従って分析を実施した。

#### <方法 2>

卵を集めるために、線虫の成虫を次亜塩素酸ナトリウム溶液で破砕し、この過程で線虫の成長レベルを同調させた。その後、約 18 時間培養して孵化した線虫を、OP50 を撒いた NGM プレート上に移した。成虫になるまで 96 時間培養し、OP50、DMSO、Hokkaido Scallop Oil Plasmalogen Powder の混合液を塗布した NGM プレート上または、コントロールとして OP50、DMSO のみの混合液を塗布した NGM プレート上に移した。その後、培養を継続して、実験に用いた。飼育温度は 20°C である。また、子孫の発生を防ぐために 0.5 mg/ml FUdR をプレートに添加した。

#### (5) 線虫の運動性の評価

0、3、6、9 日後に 15 秒間のスラッシング運動の回数を測定した。

#### (6) 老化様形質の評価

18 日後に線虫を回収して蛍光顕微鏡で撮影し、ImageJ で解析した。

#### (7) 寿命の評価

2 日毎に生存個体数を計数した。

### 【結果】

- (1) プラズマローゲンは線虫の細胞内 ROS レベルを増加させた。
- (2) プラズマローゲンは線虫の酸化ストレス耐性を増加させた。
- (3) プラズマローゲンは線虫の産卵数を減少させた。
- (5) プラズマローゲンは線虫の加齢に伴う運動性の低下を抑制した。
- (6) プラズマローゲンは線虫の老化様形質を変化させた。
- (7) プラズマローゲンは線虫の寿命を延伸させた。

### 【考察・今後の展望】

本研究より、プラズマローゲンが線虫の酸化ストレス耐性の増加、寿命の延伸に寄与することが確認できた。さらに、プラズマローゲンが老化形質、健康寿命の延伸に寄与することが示唆された。内分泌レベルについては、現在解析中である。

今後は、転写因子で老化や寿命を調節することで知られる DAF-16 の欠損変異体などの変異体を用いて実験を行い、本実験で明らかになったプラズマローゲンの作用の作用機序を詳細に明らかにしていく。また、本研究で確認された、細胞内 ROS レベルの増加及び産卵数の減少と寿命延伸及び酸化ストレス耐性の増加の関係を、変異体を用いた実験などで明らかにする。