

## 乳酸菌 H61 株がゼブラフィッシュ体内で発揮する酸化ストレス防御能

佐藤 綾香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 小林 麻己人 (筑波大学 医学医療系)

### 【背景・目的】

近年、医療の発展などに伴い平均寿命や健康寿命は延伸傾向にあるが、両者の差すなわち日常生活に制限のある「不健康な期間」は大きく縮小されていないのが現状である。平均寿命と健康寿命の差の縮小は、生活の質の向上や持続可能な社会保障制度の達成を可能にするため、これまで以上に健康寿命を延ばすことが重要視されている。乳酸菌はホストの健康に役立つ「プロバイオティクス」の代表であり食品への応用が広く進んでいるが、乳酸菌の中でも特に *Lactococcus cremoris* H61 (以下 H61 株) は、加熱処理状態でマウスの老化抑制作用及びヒトの肌の乾燥予防作用があることが分かっている<sup>1)3)</sup>。しかしそのメカニズムは不明であり、候補として酸化ストレス防御能が挙げられる。酸化ストレスとは「酸化力が抗酸化力を上回った状態」のことを指し、高レベルの酸化ストレスは DNA やタンパク質の損傷を引き起こすため、がんや神経変性疾患、炎症性疾患などの発症につながる可能性がある<sup>4)</sup>。従って生体内における酸化ストレス防御能は病気の予防に重要であり、健康寿命延伸にも貢献するシステムであるといえる。

私が所属する研究室では、動物体内での酸化ストレス防御能評価を目的にゼブラフィッシュを活用しており、これまで様々な食品成分について解析が行われてきた<sup>5)</sup>。H61 株についても酸化ストレス防御能を発揮することが準備的解析で示唆された。そこで本研究はその検証を行うために、H61 株のゼブラフィッシュ体内における酸化ストレス防御能を詳細に解析することにした。

### 【方法】

#### ○生存率解析

第一段階: 酸化ストレス剤の最適濃度の決定を行った。受精後 4 日の野生型ゼブラフィッシュ稚魚に様々な濃度 (1.4~2.4 mM) の過酸化水素を処理し、その後の生存率を 12 時間毎に解析した。稚魚は受精後 3.25 日の段階で 3 cm ディッシュに 20 匹ずつ準備した。培養液には E3 medium 5 mL を用いた。過酸化水素処理の際には、ディッシュ内の溶液を 4 mL 除去した後、最終濃度の 1.5 倍の過酸化水素溶液を 4 mL 処理した。

第二段階: H61 株の毒性試験を行った。受精後 3.5 日の野生型稚魚に様々な濃度の H61 株懸濁液を処理し、その後の生存率を解析した。生存率が低下する濃度は毒性があると評価した。H61 株処理の際には、暴露したい菌濃度の 2 倍の濃度の菌懸濁液を調製し、調製した菌液をディッシュ内の E3 medium を 2.5 mL 除去した後 2.5 mL を加えた。

第三段階: H61 株の酸化ストレス防御能を調べた。受精後 3.5 日の野生型稚魚に様々な濃度の H61 株を 12 時間曝露させ、次に第一段階で決定した濃度の過酸化水素を 48 時間曝露させ、その後の生存率を 12 時間毎に解析した。H61 株懸濁液から過酸化水素溶液への交換の際には、まずディッシュ内の懸濁液 4 mL を除去した後、1.5 倍の過酸化水素溶液を 4 mL 処理し、次に最終濃度の過酸化水素溶液で再度、溶液を交換した。

第四段階: 菌の曝露時間を変化させたときの酸化ストレス防御能への影響を調べた。野生型稚魚に H61 株を処理し、その後第一

段階で決定した濃度の過酸化水素を 48 時間曝露させ、生存率の向上を 12 時間毎に解析した。

第五段階: 培養状態が異なる菌で酸化ストレス防御能に違いが生じるかを調べた。受精後 3.5 日の野生型稚魚に異なる培養時間で回収した H61 株を 12 時間曝露させ、次に第一段階で決定した濃度の過酸化水素を 48 時間曝露させ、その後の生存率を 12 時間毎に解析した。

第六段階: *myd88* 破壊システムを用いて H61 株がもつ酸化ストレス防御能と自然免疫応答の関係を調べた。酸化ストレス防御能の解析は、第三段階と同様の方法と濃度で解析した。稚魚は生死に関わらず全て回収し、抽出したゲノム DNA を用いて PCR 反応を行い、遺伝子型を判定した。

#### ○ゼブラフィッシュ

第一から第五段階では野生型 AB 系統成魚を交配させて得られた稚魚を用いた。第六段階で用いた *myd88* 破壊システムは CRISPR-Cas9 法でフレームシフト変異を導入し作製した。ジェノタイプピングは PCR 法で行った。第六段階の実験では *myd88* ヘテロ破壊成魚を交配させて得られた稚魚を用いた。

#### ○乳酸菌

MRS broth で 30°C 24 時間培養した H61 株を 0.85% NaCl で洗浄後、MilliQ 水で懸濁し OD<sub>600</sub> = 1.0 に調整した。次に 121 °C 15 分の条件でオートクレーブ滅菌を行い、死菌化した。なお第五段階では、菌の培養時間はそれぞれ 16, 24, 48 時間とした。H61 株は農研機構から提供していただいた。

### 【結果・考察】

発表会当日に紹介予定である。

### 【参考文献】

- 1) Kimoto-Nira et al. (2007). Anti-aging effect of a lactococcal strain: analysis using senescence-accelerated mice. *Br. J. Nutr.* 98: 1178-1186
- 2) Kimoto-Nira (2018). Newlactic acid bacteris for skin health via oral intake of heat-killed or live cells. *Anim. Sci. J.* 89: 835-842
- 3) Kimoto-Nira et al. (2016). Dietary intake of heat-killed *Lactococcus lactis* H61 delays age-related hearing loss in C54BL/6J. *Sci. Rep.* 6: 23556
- 4) Sies (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91: S31-S38
- 5) Ruth et al. (2009). Nitrativ and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol. Sci.* 112: 4-16
- 6) Endo et al. (2020) Evaluation of antioxidant activity of spice-derived phytochemicals using zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 1109
- 7) Watanabe et al. (2022) Soy-derived equol induces antioxidant activity in zebrafish in an Nrf2-independent manner. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 5243