

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15788

研究課題名（和文）線虫における最終糖化産物（AGE）の簡易計測法の確立と食品因子による抑制機構

研究課題名（英文）The establishment of a method for measuring advanced glycation end products (AGEs) in *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

小村 智美 (Komura, Tomomi)

兵庫県立大学・環境人間学部・助教

研究者番号：10736515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、糖化ストレスで産生される最終糖化産物（AGEs）が生理的老化や加齢性疾患に関与することが報告されているものの、AGE抑制物質を評価するためのin vivo評価系は確立されていない。そこで本研究は、モデル生物の一種「*Caenorhabditis elegans*」を用いて、生体内のAGEsを間接的かつ簡易的に検出する方法の開発を行った。また本手法を用いてAGEsを抑制する物質の探索を行い、乳酸菌の一種「*Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*」を与えた線虫にて検出シグナルを抑制できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖化は糖尿病や老化だけでなく、癌、動脈硬化、骨粗鬆症、認知症、皮膚のしみなどあらゆる老化現象と関わる重要な生体反応であることが示唆されている。老化に伴い生体内で糖化反応が促進しAGEsが蓄積することから、AGEsを抑制する食品因子の探索が盛んである。本研究にて開発した手法を用いることで、生体内のAGEsを間接的に検出することができる。また一度に複数のAGEs抑制候補物質における効果を探査することも可能であり、ハイスループットなスクリーニングとしても活用できる。今後、本手法を用いることで生体内AGEsを、より深く追究し、将来的にはヒトへの応用へと進める前段階の手法として意義がある。

研究成果の概要（英文）：It has been reported in recent years that the advanced glycation products (AGEs) produced by glycation stress are involved in physiological aging and age-related diseases, but an in vivo assay system to evaluate AGEs inhibitors has not yet been established. In this study, we have developed an indirect and simple method to detect AGEs using *Caenorhabditis elegans*, a kind of model organism. Using this method, we also investigated to search for substances that inhibit AGEs, and found that detection signals could be suppressed in *Caenorhabditis elegans* fed with *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*, a type of lactic acid bacteria.

研究分野：食品微生物学

キーワード：線虫 *C. elegans* AGEs 最終糖化産物 乳酸菌 抗老化

1. 研究開始当初の背景

長寿大国のわが国では、高齢化に伴う認知症患者や癌の死亡率増加など加齢性疾患に関する課題が多い。そこで小村らは、老化や加齢性疾患を栄養学的な介入によって制御できる可能性について基礎的に研究を進めている。栄養学の研究では、実験動物としてマウスやラットを用いるのが一般的であるが、老化のモデル生物として哺乳類を用いる場合、長期の実験期間を要し動物倫理の制約も厳しい。そこで線虫 (*C. elegans*; 図1) に着目した。線虫は、腸管、神経、生殖器など生物としての基本的な構造を持ち、寿命が約3週間と短く倫理上の制約もない。そしてヒトと相同性のある長寿遺伝子が数多く同定され老化研究のモデル生物として利用されている。



図1. 線虫

これまで小村らは、線虫に乳酸菌を与えると加齢に伴う運動性低下を抑制し抗老化作用を有すること (Komura et al., Adv. Exp. Med. Biol., 2012)、ストレス応答経路の p38MAPK が寿命制御に関わること (Komura et al., Biogerontology, 2013) を見出してきた。しかし詳細な老化制御機構は未だ明らかでない。

近年、糖化ストレスが老化や生活習慣病の重要な危険因子として注目されつつある。グルコースなど還元糖と蛋白質・脂質・核酸などのアミノ基は非酵素的に糖化反応を引き起こし、最終糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) を形成する。AGEs は加齢に伴い生体内で蓄積するため、認知症や癌など加齢性疾患との関連が報告されている (Ahmed et al, Invest Ophthalmol Vis Sci., 2003)。すなわち AGEs を測定することは老化や加齢性疾患を予測する指標として期待されているものの、ヒトや哺乳動物を用いた実験は数年の期間を要するため、生体内の糖化と老化の関連性を簡便に検証できる in vivo 評価系は確立されていない。

これまで小村らは、線虫に乳酸菌を与えると加齢に伴う運動性低下を抑制し抗老化作用を有すること (Komura et al., Adv. Exp. Med. Biol., 2012)、ストレス応答経路の p38MAPK が寿命制御に関わること (Komura et al., Biogerontology, 2013) を見出してきた。しかし詳細な老化制御機構は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、老化物質の一種である AGEs に着目し、(1)線虫をモデルとした生体内 AGEs の迅速簡便な計測法を確立すること、(2)AGEs 評価系確立後、AGEs 抑制可能な食品因子の探索を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光を指標とした AGEs 計測法の確立

加齢した線虫の抽出タンパクを用いて、特定の励起・蛍光スペクトルを測定した。そして、同サンプルを用いて抗 AGEs 抗体を用いたウェスタンブロッティング法を行い、加齢に伴い自家蛍光だけでなく AGEs も上昇することを確認することとした。

蛍光を発しない若齢期の線虫タンパク抽出物をグルコースで人工糖化し、蛍光測定とウェスタンブロッティング法を行い蛍光物質と AGEs の関連を調べた。さらに若齢期と老齢期の線虫を用いて、抗 AGEs 抗体の免疫組織染色を行い、蛍光の発現部位と重なるのか否か検証した。さらに線虫を生存させたまま、同一個体を経日的に AGEs 測定可能な方法を確立することとした。

(2)乳酸菌における AGEs 抑制効果の検証

寿命延長効果を示した乳酸菌を線虫に与え、各日齢の蛍光を個体別に測定した。

4. 研究成果

まず若齢線虫 (3日齢) と老齢線虫 (17日齢) のタンパク抽出物を用いて、蛍光スペクトル解析を行ったところ、老齢線虫のタンパク抽出物において特定の青い蛍光 (励起 340nm, 蛍光 430nm) を有することを見出した。そこで本蛍光物質と AGEs の関係性を調べるために、蛍光を発しない若齢の線虫タンパク抽出物を人工的に糖化後、蛍光測定を行ったところ老齢線虫の蛍光波長と同一の波長ピークを示した。本蛍光波長は、試験管内でヒト血清アルブミンを還元糖により人工的に糖化させた際に発する蛍光波長 (励起 370 nm, 蛍光 440 nm) とも近似している。以上のことから、加齢に伴って検出される線虫体内の蛍光は、蛍光性 AGEs に由来すると推察される。

次に、線虫生体でも同様の蛍光を検出できるのか否か調べるため、個体として蛍光測定可能な手法の開発に取り組んだ。タンパク抽出物などの均一な溶液を蛍光測定する場合、キュベットやマイクロプレートに溶液を注入し、蛍光分光光度計にて測定する。一方、線虫個体を測定したい場合、線虫の体長が約 1mm と非常に小さく、キュベットやマイクロプレートの中に緩衝液と線虫を入れても蛍光ピークを検出することができなかった。様々な試行錯誤を経て、384 ウェルマイクロプレート上にラップを敷き、極微量の緩衝液を滴下し、線虫を緩衝液中に封入することで蛍光ピークの検出が可能となった。本手法を用いることで、線虫を生存させたまま蛍光測定でき、

測定後はワームピッカーで線虫を飼育培地へ戻すことも可能となり、本手法をラップドロップ法と名付けた。ラップドロップ法を用いて同一個体を経日的に追跡観察したところ、加齢に伴い蛍光値が上昇した。また本蛍光強度が、長寿命の線虫変異体や、抗糖化作用を有する既存医薬品リファンピシンを投与させた線虫において低下すること、糖の一種リボースを投与した線虫において蛍光値が顕著に上昇することも確認できた。死期の迫っている線虫（死亡数時間前）は、体内で蛍光を発するという先行報告がある（Coburn et al., PLoS Biol., 2013）。そこで死亡2日前までの線虫を用いて個体蛍光測定を行い、死亡時の蛍光を検出している可能性は低いと考えるが、確証は得れていない状況であった。死亡時に発する蛍光物質（キヌレニン）を生成する遺伝子を欠如させた変異体を用いて個体蛍光測定を実施した。その結果、蛍光値は加齢に伴って上昇し、糖負荷培地で飼育した変異体でも蛍光値の上昇が認められた。

ラップドロップ法での個体蛍光測定に加え、蛍光顕微鏡を用いて線虫を観察したところ、加齢に伴って強い蛍光を発した（図2）。

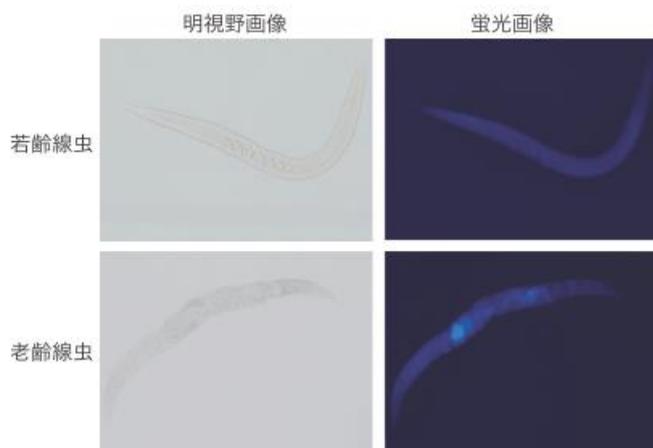


図2. 若齢線虫と老齢線虫の蛍光顕微鏡画像
(青色は蛍光部を示す)

これらの結果は、老化指標としての生体内 AGEs を非侵襲的に追跡測定する上でラップドロップ法が有用であることを示している。

今回見出した加齢に伴う生体内の蛍光上昇に、どのような体タンパクの糖化反応が関与しているのか調べたところ、卵黄形成に関与する卵黄タンパク前駆物質「ビテロジェニン」が加齢に伴って増加するとともに、検出される蛍光も増強していた。さらに、試験管内で AGEs 化されたビテロジェニンが出す蛍光は、老齢線虫から検出される蛍光と波長が一致していた。すなわち、線虫の加齢に伴う蛍光上昇には、ビテロジェニンの AGEs 化が寄与していると考えられる。

開発した個体蛍光測定法を用いて、蛍光抑制可能な食品成分の探索を実施し、乳酸菌の一種 *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris* を与えた線虫の蛍光を抑制することを見出した。

以上の研究成果から、生体から発せられる特定波長の蛍光は AGEs の一部を反映していることが示唆された。今後、本法を用いることで抗糖化作用を有する食品素材を生体レベルでハイスクリーンで探索できると期待される。

なお本研究成果は、原著論文としてまとめ、下記のジャーナルに誌上掲載した。

①手法の開発

Tomomi Komura, Mikihiro Yamanaka, Kohji Nishimura, Keita Hara, Yoshikazu Nishikawa
“Autofluorescence as a noninvasive biomarker of senescence and advanced glycation end products in *Caenorhabditis elegans*”, NPJ Aging Mech Dis. 7;7(1):12, 2021.

②乳酸菌摂取における長寿・抗老化作用

抗老化作用解明の一端として①の手法を用いて実験を行った。

Tomomi Komura, Asami Takemoto, Hideki Kosaka, Toshio Suzuki, Yoshikazu Nishikawa
“Prolonged Lifespan, Improved Perception, and Enhanced Host Defense of *Caenorhabditis elegans* by *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*”, Microbiol Spectr. 29;10(3):e0045421, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komura Tomomi, Yamanaka Mikihiro, Nishimura Kohji, Hara Keita, Nishikawa Yoshikazu	4. 巻 7
2. 論文標題 Autofluorescence as a noninvasive biomarker of senescence and advanced glycation end products in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Aging and Mechanisms of Disease	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41514-021-00061-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Komura Tomomi, Takemoto Asami, Kosaka Hideki, Suzuki Toshio, Nishikawa Yoshikazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Prolonged Lifespan, Improved Perception, and Enhanced Host Defense of <i>Caenorhabditis elegans</i> by <i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0045421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00454-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小村智美、西川禎一	4. 発行年 2022年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 5
3. 書名 月刊化学2022年2月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------