

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82718

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05495

研究課題名（和文）モデル生物・線虫を用いた食品成分の糖化抑制評価法の開発

研究課題名（英文）Development of methods to evaluate the glycation inhibition of food ingredients using the *C.elegans*

研究代表者

瀬戸山 央（Setoyama, Ou）

地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所・化学技術部・主任研究員

研究者番号：30589693

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）：生体内における食品成分の糖化抑制作用評価法として、従来の動物を用いた方法の代替として線虫*C.elegans*を用いる方法の可能性を調べた。その結果、線虫の体内糖化はヒト同様に加齢に伴い進んでいくことを明らかにした。さらに線虫の体内糖化を簡便に測定する方法としてタンパク質抽出液中の蛍光性AGEs由来蛍光強度を測定する方法を確立した。この測定方法を用いて、線虫にin vitroにおいて抗糖化作用のある食品成分を投与し、体内糖化への影響をみることで線虫を用いた簡便な抗糖化性評価方法を確立することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、糖尿病モデルマウスを用いたさまざまな食品成分（食品機能性成分）の糖化ストレス抑制（抗糖化）作用が報告されている。しかしながら、今後動物を用いた評価方法については倫理的配慮から出来る限り少なくしていく必要がある。本研究で用いた線虫はヒトの老化研究モデルとして古くから用いられている。本研究では、老化と密接なかわりのある糖化の研究においても線虫を用いることが有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the possibility of using the nematode *C. elegans* as an alternative to conventional animal-based methods for evaluating the glycation inhibitory effects of food ingredients in vivo. As a result, we clarified that glycation in the body of nematodes progresses with age, just like in humans. Furthermore, we established a method to measure the fluorescent intensity of fluorescent AGEs in protein extracts as a simple method for measuring glycation in the body of nematodes. Using this measurement method, we administered food ingredients with anti-glycation effects to nematodes in vitro and observed the effects on glycation in the body, thereby establishing a simple method for evaluating anti-glycation properties using nematodes.

研究分野：食品科学、機能性食品学、生化学、農芸化学

キーワード：抗糖化性 糖化抑制 線虫 *C.elegans* 老化 糖化 食品成分 蛍光性AGEs

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖化は食品や生体内で起きるアミノ酸やタンパク質と還元糖の非酵素的反応のことである。生体内ではグルコースを基にして様々な経路で糖化反応が進んでいき、最終的に AGEs (Advanced Glycation Endproducts: 最終糖化産物) が生成される。ヒトの生体内においても加齢に伴い糖化中間反応体や AGEs が蓄積される。また糖尿病患者の体内では、健常者よりも多くの AGEs が生成、蓄積していることが明らかとなっている。ヒトにおいて AGEs の蓄積は糖化ストレスと呼ばれ、動脈硬化、皮膚老化、骨粗しょう症などの加齢性疾患の原因となることが報告され、老化と密接な関りがある。

近年、糖尿病モデルマウスを用い、さまざまな食品成分(食品機能性成分)の糖化ストレス抑制(抗糖化)作用が報告されている。しかし、この評価方法には以下の2つの課題がある。

動物実験の倫理的配慮や費用、時間の面から多成分の同時評価が困難である。

病態の抑制や改善が可能かを基準として評価を行っており、食品成分が糖化を原因とする疾患の予防、改善に効果があることは分かるが、抗糖化作用を介した老化抑制作用については不明である。

これらの解決方法の1つとして、我々は哺乳動物の代替としてこれまでヒトの老化研究に用いられてきた線虫(*Caenorhabditis elegans*)を用いることを出来ないかと考えた。しかしながら、線虫体内における糖化やそれに伴う老化に関しての明確なメカニズムはこれまでわかっていなかった。そこで我々はヒトでは加齢とともに体内に AGEs が生成、蓄積するが、これが線虫でも同様に起こるのかを明らかにしたいと考え、研究に着手した。

食品成分の糖化抑制作用評価手法として、動物の代替として線虫を用いる場合、これらの点を明らかにしておく必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、線虫を用いた生体内における食品成分の糖化抑制作用評価手法の構築を目的とした。前述の通り、糖化ストレス(AGEsの蓄積)とヒトの加齢性疾患との関連性については多くの臨床的研究がなされている。一方、糖化ストレスと老化との直接的な関連性についてヒトで報告されている例はなく、またマウス、ラットなどを用いた実験においても糖化ストレスと老化との直接的な関連性についての報告は見当たらない。そこで我々は、線虫体内における糖化と老化の関係を明らかにすることが本研究の目的達成のために必要であると考え研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 線虫の培養

線虫は N2 株を用いた。培養は NGM 培地を用いて行い餌として大腸菌 OP50 株を用いた。線虫からの卵回収はアルカリブリーチ法にて行い、回収した卵は 20 で一晩静置し孵化させ同調培養を開始した。同調培養は S-medium を用いた液体培養にて行った。

(2) 加齢に伴う線虫体内蛍光性 AGEs の測定

孵化した日を培養 1 日目とし、25000 匹の L1 幼虫を培養フラスコに入れ 20、100rpm で同調培養を開始した。培養液量は 50 mL とし、熱処理大腸菌を終濃度 10 mg / mL となるように加えた。培養 2 日目に 5-FUdR を終濃度 40 μ M となるよう加えた。その後、同一培養フラスコから経時的に 8、15、18、21 日目に 10 mL ずつ線虫を培養液ごと回収した。回収した線虫は S-buffer にて 3 回洗浄し、RIPA buffer を加えて超音波破碎によりタンパク質を抽出した。線虫抽出液中のタンパク質濃度測定は BCA 法にて行った。線虫抽出液中のタンパク質濃度が 800 μ g / mL となるように調製し、96well 黒色マイクロプレートに入れ励起波長 340 nm における蛍光波長スキャン(370~600 nm)測定、および励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm における蛍光強度測定を行った。さらに抗 AGEs 抗体を用いた ELISA 法により AGEs 量を測定した。

(3) 抗糖化作用化合物による線虫体内蛍光性 AGEs への影響

既知の抗糖化作用化合物としてリファンピシンを用いた。孵化した日を培養 1 日目とし、10000 匹の L1 幼虫を培養フラスコに入れ 20、100rpm で同調培養を開始した。培養液量は 10 mL とし、熱処理大腸菌を終濃度 10 mg / mL となるように加えた。培養 2 日目に 5-FUdR を終濃度 40 μ M となるよう加えた。さらに培養 4 日目にリファンピシンを終濃度 100 μ M となるように加えた。その後、培養 10 日目に線虫を回収した。回収した線虫は S-buffer にて 3 回洗浄し、RIPA buffer を加えて超音波破碎によりタンパク質を抽出した。線虫抽出液中のタンパク質濃度測定は BCA 法にて行った。線虫抽出液中のタンパク質濃度が 800 μ g / mL となるように調製し励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm における蛍光強度測定を行った。

(4) 食品成分による線虫体内蛍光性 AGEs への影響

既知の抗糖化性を有する食品成分としてロスマリン酸およびカルノシン酸を用いた。孵化した日を培養 1 日目とし、10000 匹の L1 幼虫を培養フラスコに入れ 20、100rpm で同調培養を開始した。培養液量は 10 mL とし、熱処理大腸菌を終濃度 10 mg/mL となるように加えた。培養 2 日目に 5-FUdR を終濃度 40 μ M となるよう加えた。さらに培養 4 日目にロスマリン酸およびカルノシン酸を終濃度 180 μ M となるよう加えた。その後、培養 15 日目に線虫を回収した。回収した線虫は S-buffer にて 3 回洗浄し、RIPA buffer を加えて超音波破碎によりタンパク質を抽出した。線虫抽出液中のタンパク質濃度測定は BCA 法にて行った。線虫抽出液中のタンパク質濃度が 800 μ g/mL となるように調製し、ペントシジン由来の蛍光強度 (励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm) 測定を行った。

4. 研究成果

(1) 線虫の加齢と体内蛍光性 AGEs の関係

線虫の加齢に伴う体内蛍光性 AGEs の変化を把握する為に、線虫を培養中に経時的に回収して抽出液の蛍光スペクトル測定を行った。その結果を図 1 に示した。

励起波長 340 nm における蛍光スペクトルのピークトップは 420~440 nm 付近となり、蛍光性 AGEs 由来の蛍光スペクトルを示していると考えられた。さらに、培養 8~21 日目にかけてピークトップの蛍光強度は培養日数の経過とともに増加する傾向が認められた。とくに 8 日目から 15 日目までの蛍光強度の上昇は顕著であった。このことから線虫は加齢に伴い体内の蛍光性 AGEs が増加していることが示された。特に培養初期 (8 日目) では蛍光性 AGEs 由来の蛍光強度が低いが培養 15 日目以降は蛍光強度が大きく上昇していることから、線虫における体内蛍光性 AGEs の把握には培養後期 (15 日目以降) が適していると考えられた。

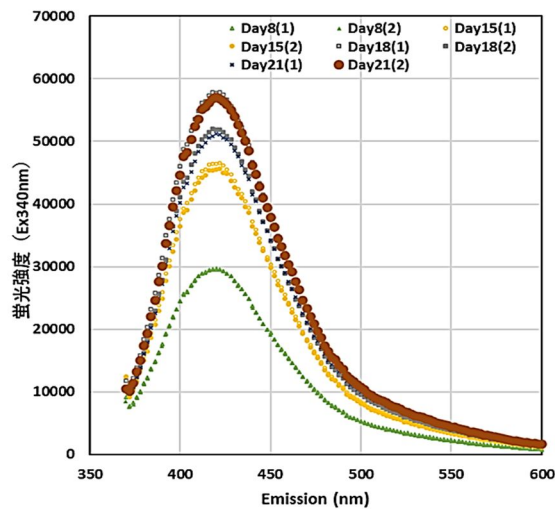


図 1 加齢に伴う線虫抽出液の蛍光スペクトル変化

また蛍光性 AGEs 由来の蛍光強度測定としてよく用いられている励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm における蛍光強度測定を行った結果を図 2 に示した。この結果から培養 8 日目から 21 日目にかけて線虫体内の蛍光性 AGEs 由来蛍光強度は経時的に増加していくことが分かった。

蛍光性 AGEs 由来の蛍光強度測定における結果が蛍光性 AGEs 量を表していることを確認する為に、抗 AGEs 抗体を用いた ELISA 法により線虫体内の AGEs 量を測定した結果を図 3 に示した。ELISA 法の結果からも培養 8 日目から 21 日目にかけて線虫体内の AGEs 量は増加していくことが分かった。培養 8 日目、15 日目で ELISA 法では AGEs 量の増加があまり認められなかったが、概ね蛍光強度測定における結果と ELISA 法における結果は同様の傾向を示した。このことから、線虫体内の AGEs 量の把握は、抽出液中の蛍光性 AGEs 由来蛍光強度の測定で可能であることが推察された。

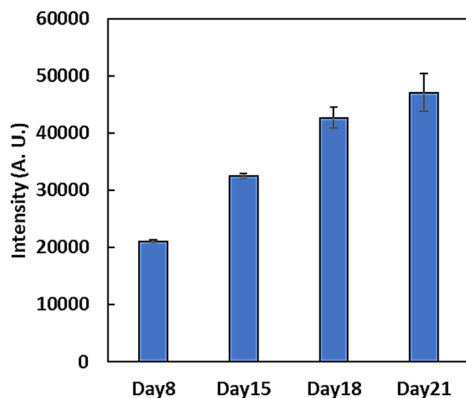


図 2 加齢に伴う線虫抽出液の蛍光性 AGEs 由来蛍光強度の変化

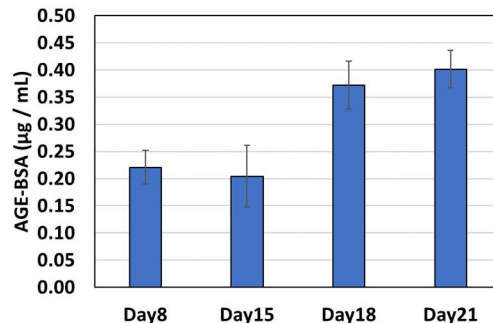


図 3 加齢に伴う線虫抽出液の AGEs 量の変化

(2) リファンピシンが線虫体内蛍光性 AGEs に及ぼす影響

既知の抗糖化作用を有する化合物であるリファンピシンが線虫体内の糖化に与える影響を調べるため、リファンピシンを培地に添加し培養した線虫の抽出液について蛍光性 AGEs 由来蛍光強度測定を行った。その結果を図 4 に示した。励起波長 340 nm、蛍光波長 440 nm における蛍光強度はコントロールに比べてリファンピシリン添加で低下することが認められた。このことから抗糖化作用を持つ化合物を培地に添加して線虫を培養した場合、線虫の体内糖化が抑制されることが示唆された。リファンピシリン以外の抗糖化性を有する食品成分についても線虫を用いることでその体内糖化抑制作用を評価することが可能であると考えられた。

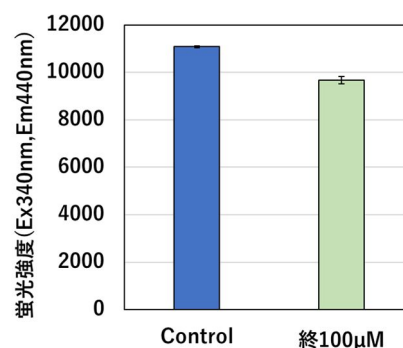


図 4 リファンピシリンによる線虫体内 AGEs の変化

(3) カルノシン酸、ロスマリン酸が線虫体内蛍光性 AGEs に及ぼす影響

in vitro において抗糖化性を有する食品成分として知られるカルノシン酸、ロスマリン酸が線虫体内の糖化に与える影響を調べるため、カルノシン酸、ロスマリン酸を培地に添加し培養した線虫の抽出液について蛍光性 AGEs の一つであるペントシジン由来の蛍光強度測定を行った。その結果を図 5 および図 6 に示した。励起波長 335 nm、蛍光波長 385 nm における蛍光強度はカルノシン酸、ロスマリン酸ともにコントロールに比べて低下することが認められた。このことから、in vitro で抗糖化作用を有する食品成分について、線虫の体内糖化への影響を見ることで生体内における糖化抑制作用についても評価することが可能であると考えられた。

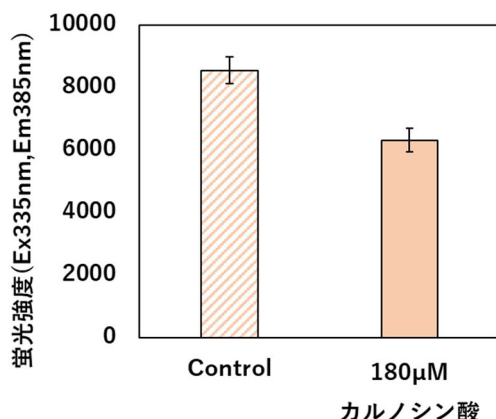


図 5 カルノシン酸による線虫体内 AGEs の変化

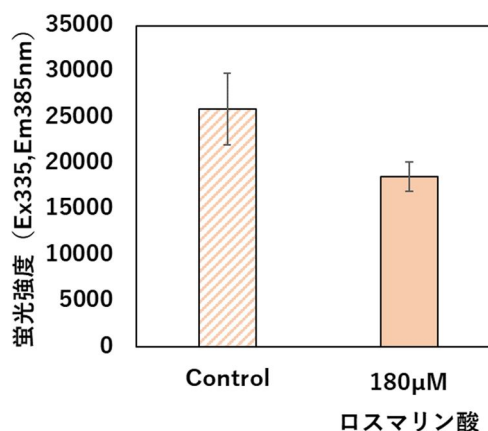


図 6 ロスマリン酸による線虫体内 AGEs の変化

以上のように、我々は本研究において線虫の体内糖化はヒト同様に加齢に伴い進んでいくことを明らかにした。さらに線虫の体内糖化を簡便に測定する方法としてタンパク質抽出液中の蛍光性 AGEs 由来蛍光強度を測定する方法を確立した。この測定方法を用いて、線虫に in vitro において抗糖化作用のある食品成分を投与し、体内糖化への影響をみることで線虫を用いた簡便な抗糖化性評価方法を確立することが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yokoyama Issei, Setoyama Ou, Jia Yaqi, Fujita Nana, Waki Akane, Komiya Yusuke, Nagasao Jun, Arihara Keizo | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Effects of the dipeptides comprising leucine and lysine on lifespan and age related stress in <i>Caenorhabditis elegans</i> | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Food Science & Nutrition | 6. 最初と最後の頁 2776 ~ 2786 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/fsn3.3256 | 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 瀬戸山央 | 4. 巻 41(6) |
| 2. 論文標題 ボイセンベリーおよびボイセンベリー含有アントシアニン類の抗糖化作用 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 食生活研究 | 6. 最初と最後の頁 41 ~ 44 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yokoyama Issei, Setoyama Ou, Urakawa Ayumi, Sugawara Momo, Jia Yaqi, Komiya Yusuke, Nagasao Jun, Arihara Keizo | 4. 巻 87 |
| 2. 論文標題 Lysine-glucose Maillard reaction products promote longevity and stress tolerance in <i>Caenorhabditis elegans</i> via the insulin/IGF-1 signaling pathway | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Functional Foods | 6. 最初と最後の頁 104750 ~ 104750 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jff.2021.104750 | 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 瀬戸山央、橋本知子 | 4. 巻 43(4) |
| 2. 論文標題 市販味噌の抗糖化性と関与成分の推定 | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 食生活研究 | 6. 最初と最後の頁 56 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬戸山央 |
| 2. 発表標題 食品の糖化抑制作用評価とその関与成分 |
| 3. 学会等名 第20回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬戸山央 |
| 2. 発表標題 モデル生物・線虫を用いた生体内糖化と食品の抗糖化作用評価方法の検討 |
| 3. 学会等名 第20回産総研・産技連LS-BT合同研究発表会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 横山壱成、瀬戸山央、大畑素子、長田和実 |
| 2. 発表標題 線虫（ <i>C. elegans</i> ）は嗅覚系を介してメイラード反応生成香気に誘引される |
| 3. 学会等名 日本メイラード学会第32回年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 瀬戸山央 |
| 2. 発表標題 ポイセンベリー抽出物は線虫の糖化および酸化を抑制する |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度広島大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 横山 啓成、瀬戸山 央、大畑 素子、長田 和実 |
| 2. 発表標題 メイラード反応生成香気が線虫 <i>C. elegans</i> の走化性行動および寿命に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度広島大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 瀬戸山 央 |
| 2. 発表標題 モデル生物・線虫を用いた生体内メイラード反応の解析と食品の抗糖化作用評価 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬戸山 央、橋本 知子 |
| 2. 発表標題 モデル生物・線虫(<i>Caenorhabditis elegans</i>)を用いた ロスマリン酸およびカルノシン酸の抗糖化作用評価 |
| 3. 学会等名 日本食品化学学会第29回学術大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 瀬戸山 央 |
| 2. 発表標題 カルノシン酸による線虫 <i>C. elegans</i> のGL01活性化と糖化抑制作用 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横山 啓成、瀬戸山 央、大畑 素子、長田 和実 |
| 2. 発表標題 メイラード反応生成香気による線虫C. elegansの寿命延長に対する熱ショック因子の関与 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会 |
| 4. 発表年 2024年 |

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|