

線虫を用いた食品機能性因子の探索

武藤 信吾（管理栄養学科・講師）

緒言

昨今の感染症の大流行を受けて、自己の健康を維持して感染症から身を守ることへのニーズが増大している。そのためには十分な睡眠、適度な運動などに加えて、良好な食品の摂取が必要である。食品の成分は3つの機能に分類してとらえる事ができ、すなわち栄養的機能（第一次機能）、嗜好的機能（第二次機能）および生体調節機能（第三次機能）である。特にウイルス、病原菌感染に対する免疫・生体防御機能や生活習慣病予防に関わる循環器系調節機能といった第三次機能が注目されている。そこで本研究では神奈川県産の果物を用いて比較的簡単に測定ができる酸化ストレスの指標として DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性試験、SOD (superoxide dismutase) 様活性試験を、高血圧の指標として ACE (アンジオテンシン I 変換酵素) 阻害活性試験を実施した。さらに実験モデルとして広く利用されている線虫を用いて、食品の抽出物を線虫の培地に加え、線虫の走行性を解析した。線虫は約1000個の体細胞からなり腸管、神経、生殖器など生物としての基本的な構造をもつ。線虫は遺伝子レベルではヒトと約70%の相同性がある。これらの試験の結果をもとに食品機能の解析に線虫の有用性について検討した。

実験方法

試料

試料として2022年に神奈川県藤沢市で収穫されたぶどう（品種：藤稔）、梨（品種：豊水）、柿（品種：富有柿）を用いた。それぞれの果物は皮、種を取り除き可食部位50gに対して10倍量の精製水を加えフードプロセッサーで粉碎した。粉碎液をろ過（東洋濾紙 No2）して得られた抽出液を試料とした。試料は10mL ずつ分注し、使用時まで-18℃で冷凍保存した。

DPPH ラジカル消去活性測定

DPPH は安定な合成ラジカルであり、その溶液は紫色を示す。抗酸化物質によりラジカルが消去されると透明な溶液へと変化する。DPPH ラジカル消去活性は DPPH Antioxidant Assay Kit (Dojindo) を用いて測定した。ラジカル消去活性は抗酸化物質である Trolox をポジティブコントロールとして用い、Trolox に対する相対的な活性として求めた。DPPH ラジカル消去活性は添付のマニュアルに従い求めた。

SOD 様活性試験

スーパーオキシド (O_2^-) は活性酸素種の一つであり、体内での酸化ストレスの要因となる。SOD はスーパーオキシドを過酸化水素と酸素へと不均化する酵素である。SOD 様活性は SOD Assay Kit - WST (Dojindo) を用いて測定した。実験サンプルに SOD

様活性があると、本キットに含まれるキサンチンオキシダーゼにより生成されたスーパーオキシドをサンプルが不均化する。SOD 様活性はキット添付のマニュアルに従い求めた。

ACE 阻害活性

ACE は、血圧調整において、ペプチドホルモンであるアンジオテンシン I を切断し、血圧上昇作用をもつアンジオテンシン II へ変換する酵素である。また同時に降圧ペプチドであるブラジキニンを分解する。すなわち ACE は血圧上昇に大きく関与している酵素である。ACE 阻害薬は高血圧症の治療薬にも用いられている。ACE 阻害活性は ACE 阻害活性測定キット (Dojindo) を用いて測定した。サンプルを含まないブランクの ACE 活性を 100% として、活性測定値の減少分を ACE 阻害活性とした。から ACE 阻害活性はキット添付のマニュアルに従い求めた。

線虫走行性試験

線虫は生命科学研究でよく使用されている野生型 Bristol N2 株を用いた。線虫は NGM (Nematode Growth Medium) プレートで飼育した。走行性試験は 9 cm プレートの中心から、それぞれ左右 3 cm の位置に 200 μ L のサンプルまたはコントロール (精製水) を滴下した。果実抽出サンプルを滴下した後に、線虫 20 匹をプレートの中心に配置した。60 分後に、それぞれのスポットに移動した線虫の数を測定した。線虫はバナナに含まれるイソアミルアルコールの香りを好むことから (1)、バナナの抽出液を前述の方法で調製し用いた。

サンプルに近づいて行った線虫と精製水のスポットに近づいて行った線虫を観察した。

結果

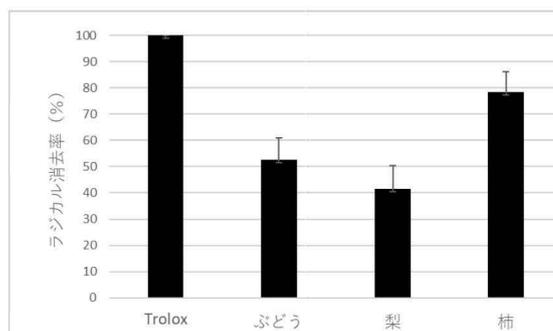


図 1 各果実の DPPH ラジカル消去活性 (Mean \pm SD、n=5)

各果実の抗酸化活性を評価するために、各果実の DPPH ラジカル消去活性を測定した。その結果を図 1 に示す。柿の抗酸化活性が最も高く Trolox に対して約 80% の活性であった。次いでぶどうで約 50%、梨では 40% であった。一般的に果実は高い抗酸化活性を持つことが知られている。本実験で得られた結果も、果実が高い抗酸化活性を持つことを示している。

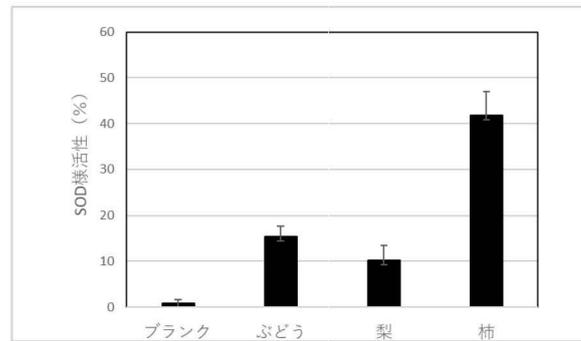


図2 各果実の SOD 様活性 (Mean \pm SD、n=5)

SOD は植物や動物で活性酸素種であるスーパーオキシドを消去する酵素として重要である。図2に示すように、各果実に含まれる SOD 様活性を測定したところ、柿が最も強い SOD 様活性を持つことが明らかとなった。またぶどうと梨の SOD 様活性では、ぶどうの方が5%高かった。

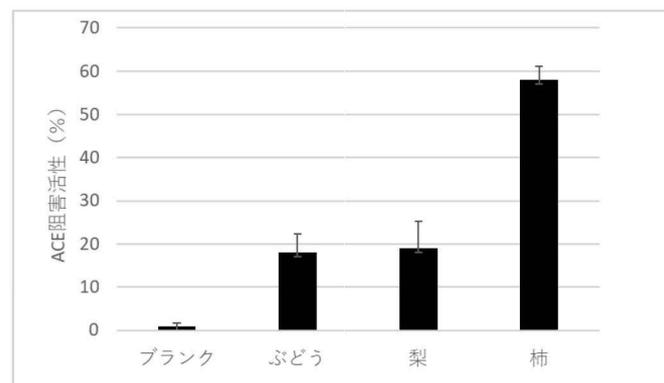


図3 各果実の ACE 阻害活性 (Mean \pm SD、n=5)

果物の健康に対する機能性として高血圧に対しての効果が期待されている。そこで実験サンプルにアンジオテンシン I を昇圧ペプチドであるアンジオテンシン II へと変換阻害を行う成分が含まれているのか評価した。その結果、図3に示すように、柿に最も高い ACE 阻害活性が認められた。またぶどうと梨の ACE 阻害活性は、柿の1/3程度であった。

線虫の果実に対する誘引および忌避効果

果実抽出液に対する線虫の走行性を検定したところ、バナナ、ぶどう、梨に対して誘引される線虫が観察された。しかしながら、何れサンプルでも誘引された個体は全体の30%以下であった。この結果は、線虫がランダムに動いたからなのかもしれない。また柿には誘引された線虫はほとんどいなかった。現状の実験では果物に対する線虫の動きがラン

ダムであるように思われた。今後はサンプルの抽出方法を検討して、より香気成分が抽出されやすい有機溶媒の使用、線虫のライフステージを揃えるための同調培養を行う、実験に用いる線虫の個体数を100程度まで増やすなどの対策を加えて実験を行う予定である。

考察

本研究では神奈川県で生産されている果物であるぶどう、梨、柿の機能性について抗酸化性および高血圧症に関する観点から実験を実施した。酸化ストレスに対しては、DPPH抗酸化性およびSOD様活性について、柿が最も高い機能性を持つことが示唆された。本研究に供した柿は甘柿の富有柿である。柿は黄色い果肉から多くのβカロテンを含んでいる。日本食品標準成分表2020年版によると可食部100gあたりのβカロテン当量は甘柿で420μg、ぶどうでは39μg、梨では0であった。果物の抗酸化性物質についてはビタミンやポリフェノール等が関係しているのでぶどうや梨でも、柿の半分から1/3程度の抗酸化性が認められる。またACE阻害活性を指標とすると、柿が最も高血圧に対しては効果的であると考えられる。柿にはポリフェノールの一種であるタンニンを多く含んでいる。タンニンなどのフェノール化合物はタンパク質に非特異的に結合しやすく、その結合したタンパク質を不溶化することが知られている⁽²⁾。本研究の実験系において、果実に含まれているポリフェノールが非特異的にACEに結合して、ACEが不溶化した結果かもしれない。またこの酵素とポリフェノールの結合は非特異的であるのであれば、ぶどうや梨で測定されたACE阻害活性についての特異性についての検討が必要であると考えられる。そのような目的のためには、抽出液から対象物質を精製し結合定数や阻害定数を求める実験が必要である。このような*in vitro*の実験系は、植物がもつ性質を検討する上で重要であると考えられる。しかしながら生体内での酸化ストレスや高血圧に対して食品成分がどのような分子機構で効果を発揮するのかを検討するには不十分である。したがって実際の生体内での食品成分の挙動を解析する必要がある。

本研究ではさらに線虫を生体モデルとして用いて食品機能成分の解析を進める。また図4で示すように線虫の走行性試験ではバナナ、ぶどう、梨の抽出物に対しては誘引行動が起こったが、柿では認められなかった。この結果から線虫は食品に対して嗜好性を示すことを示唆している。このような簡単ではあるが、食品の特性を検討する上で有用であると考えられる。

線虫は302個の神経細胞を持ち、そのネットワークは全て明らかになっている⁽³⁾。線虫には味覚神経、嗅覚神経、感覚神経を持ち、1000種類以上の化学物質を感知し、それらに対して誘引や忌避行動をする⁽¹⁾。ヒトの嗅覚受容体様遺伝子は396個であるのに対し、線虫には1200個の嗅覚受容体様遺伝子があると考えられている⁽⁴⁾。ヒトの匂い物質を受容する神経細胞は500万に対し、線虫はその中でAWA、AWB、AWC、ASH、ADLという神経細胞が2つずつ、10個の神経細胞を介して化学物質を似反応している^(5,6)。このことから、線虫はヒトより多くの匂いを識別できると考えられている。AWAとAWC神経は誘引物質を受容し、AWB、ASH神経は忌避性の物質を受容する。このような匂いに対する線虫の特性を応用して、線虫を用いた早期ガンの検出の試みが行われている⁽⁷⁾。また線虫は寿命が短いことから、個体レベルでの寿命研究が行われている。特に薬剤開発の安全性評価については、近年の動物実験を減らそうとする観点からも注目されて

いて、線虫を用いた安全性評価法の開発も進められている⁽⁸⁾。

特に線虫を用いた寿命や老化に関するでは、サーチュインなどのインスリン/IGF シグナル伝達系⁽⁹⁾、アミノ酸などの栄養のシグナル伝達に関わる TOR 経路⁽¹⁰⁾などが関わっていることが明らかとなっている。今後は、線虫の走行性や寿命に関する解析に加えて長寿遺伝子に関係する転写調節について研究を進めたい。

参考文献

- (1) Bargmann C., et. al., Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515-527 (1993)
- (2) 桜庭英剛, 一瀬肇. タンニン類による酸化酵素の不活性化とアントシアニン色素の安定化. *日本農芸化学会誌* 56, 517-524 (1982)
- (3) Hobert O., *WormBook*, 1-24 (2010)
- (4) Robertson H. M., and Thomas J. H., *WormBook*, 1-12 (2006)
- (5) Yoshida K., et. al., Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nat. Commun.*, 3, 739 (2012)
- (6) Taniguchi G., et. al., Screening of odor-receptor pairs in *Caenorhabditis elegans* reveals different receptors for high and low odor concentrations. *Sci. Signal*, 7, ra39 (2014)
- (7) Hirotsu T., et. al., A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using *Caenorhabditis elegans* Scent Detection. *PLoS One*, 10, e0118699 (2015)
- (8) Avila A., et. al., An FDA/CDER perspective on nonclinical testing strategies: Classical toxicology approaches and new approach methodologies (NAMs), *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 114, 104662, (2020)
- (9) Baur J. A., et. al., Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. N444 (7117) 337-342 (2006)
- (10) Bordone L., and Guarente L., Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 298-305 (2005)