

論文の要旨

氏名 小川 貴裕

論文題目

Studies on the antioxidant effects of aged garlic extract (AGE) using a model organism *Caenorhabditis elegans*

(モデル生物・線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた熟成ニンニク抽出液 (aged garlic extract : AGE) の抗酸化作用解明研究)

緒言

ニンニク (*Allium Sativum* L) は、ネギ科アリウム属の多年草で、古代メソポタミアやエジプトなどの文明において栽培された記録が残っており、食用、医療用として世界各国で普及してきた。紀元前 1,500 年以前の医学書にも、疲労、衰弱、神経系疾患、心循環系疾患、および腫瘍の治療の用途として、ニンニクを含む複数の処方が記載されており、これらの薬効は現代の科学においても確かめられている。熟成ニンニク抽出液 (aged garlic extract:以下 AGE) は、ニンニクをタンクに漬けて約 2 年間熟成させたもので、熟成の過程で硫化アリルアミノ酸類 (*S*-アリルシステイン (SAC)、*S*-アリルメルカプトシステイン (SAMC) など) や、サポニン、有機セレンウム化合物、多糖類、糖タンパク質など様々な化合物が生成される。これまでの研究で、SAC, SAMC には、抗酸化、抗動脈硬化、肝保護、抗腫瘍、免疫賦活化作用など様々な生理活性を持つことが報告されている。このうち、抗酸化作用については、活性酸素種の直接消去作用に加えて、抗酸化酵素の活性化やグルタチオンの増加などの間接的な作用も報告されているが、いずれも *in vitro* での評価によるもので、個体レベルにおける作用機序についてはこれまで調べられていない。

そこで、本研究では、酸化ストレス応答メカニズムが詳細に解明されている真核モデル生物線虫 (*C. elegans*) を用いて、個体レベルでの SAC, SAMC の抗酸化作用機序を明らかにすることを試みた。具体的には、第 1 章では、SAC, SAMC が線虫の寿命および酸化ストレス応答経路に及ぼす影響について調べた。第 2 章では、ニンニクおよび AGE に含まれる様々な硫黄含有化合物を用いて、化合物の構造と線虫の抗酸化遺伝子 (*gst-4*) の発現との間に相関が認められるかどうか調べた。

第 1 章 モデル生物線虫 (*C. elegans*) を用いた *S*-アリルシステイン (SAC) および *S*-アリルメルカプトシステイン (SAMC) の抗酸化作用メカニズムの解明研究

C. elegans は、平均寿命が約 20 日と短いため、寿命や老化に関する研究例が豊富で、これまでに複数の長寿命および短寿命変異体とその原因遺伝子が同定さ

れている。また、寿命関連遺伝子のいくつかは、酸化ストレス応答に関連することも明らかにされている。

そこで、本章では、はじめに線虫の飼育培地に、諸濃度の SAC, SAMC を投与して寿命に及ぼす影響を調べた。その結果、10 および 100 μM の SAC または SAMC 投与群では、平均生存日数が約 15~20%延長することが分かった。次に、10 μM の SAC および SAMC を 48 時間投与した後、致死条件の酸化ストレス (250 μM Juglone, 2 hr) および熱ストレス (35°C, 7 hr) を負荷して生存率および細胞内の活性酸素種の蓄積量を調べた。その結果、SAC, SAMC は有意な生存率の上昇と、活性酸素種の蓄積の低下を認めた。続いて、線虫において酸化ストレスと寿命の制御に関わる DAF-16 転写因子への関与を調べたところ、SAC, SAMC は、DAF-16 の核移行およびその標的遺伝子の発現レベルには影響しないことが分かった。さらに SAC, SAMC は、*daf-16* 機能欠損株の寿命を有意に延長させたことから、DAF-16 経路には関与しないことが示唆された。

次に、線虫において寿命、酸化ストレス応答、小胞体ストレス応答、タンパク質恒常性維持などの中心的役割を担う SKN-1 転写因子への関与について調べた。その結果、SAC, SAMC は、SKN-1 標的遺伝子のうち *gst-4* (glutathione *S*-transferase) など酸化ストレス応答に関わる遺伝子の発現を促し、*skn-1* 欠損株ではこれらの遺伝子発現誘導は認められなかった。また、SAC, SAMC は *skn-1* 欠損株の寿命を延長しないことから、これらの化合物が SKN-1 を介して寿命延長などの効果をもたらすと考えられた。さらに解析を進めた結果、SAC, SAMC は、SKN-1 の一部のアイソタイプの細胞内タンパク質量を増加させ、酸化ストレス負荷時に腸管における SKN-1 の核移行を促進させることを見出した。SKN-1 に相互作用して機能を制御する WDR-23 の発現を RNAi 法により抑制すると *gst-4* の発現が強く誘導されるが、SAC, SAMC はさらなる *gst-4* の発現上昇をもたらさないことから、SAC, SAMC は SKN-1 あるいは WDR-23 に作用して細胞内の SKN-1 タンパク質量を調節することで、酸化ストレス耐性の向上や寿命の延長に寄与すると考えられた。

カロリー制限は、線虫を含め多くのモデル生物で寿命延長との関連が報告されている。さらに、線虫ではカロリー制限によって体長の短縮、産卵数低下、産卵期間の短縮などが認められる。そこで、SAC, SAMC 投与によってこれらのパラメーターへの影響を調べた結果、いずれも対照群と比べて有意な差異は認められなかったことから、SAC, SAMC が線虫にカロリー制限様の状態を引き起こして寿命延長を促している可能性は低いと考えられた。

第2章 ニンニク由来硫黄含有化合物およびその類縁体を用いた SKN-1 経路活性化能の評価研究 (構造活性相関解析)

AGE には SAC や SAMC 以外にも様々な硫黄化合物が含まれており、*S*-メチルシステインや *S*-1-プロペニルシステインなどいくつかの化合物は、抗酸化作用を有することが報告されている。したがって、AGE の抗酸化作用にはこれらの化合物が相互に関連していることが予想される。

そこで、本章では、ニンニクおよび AGE 由来の 23 種の硫黄含有化合物について、*gst-4p::GFP* レポーター遺伝子の発現を指標として、酸化ストレス応答経路

の活性化が見られるかどうか、さらには、硫黄化合物の構造と酸化ストレス応答経路の活性化の間に何らかの相関が認められるかどうか調べた。その結果、評価した化合物のうち硫化アリル基を有する化合物（SAC, SAMC など 5 化合物）のみが有意にレポーター遺伝子の発現を誘導した。また、化合物中のジスルフィド結合の数とレポーター遺伝子の発現量が相関することを見出した。さらに、硫化アリル基の硫黄原子が活性に必須であること、硫化アリル基近傍の構造も活性に寄与することを明らかにした。

総括

本研究では、真核モデル生物線虫を用いて AGE に特徴的な硫化アリルアミノ酸である SAC と SAMC の抗酸化作用の詳細な作用機序の解明に取り組んだ。第 1 章では、SAC と SAMC が、酸化ストレス応答の中心的役割を担う SKN-1 経路を活性化させることで、線虫の寿命延長ならびに酸化ストレス耐性の向上をもたらすことを明らかにした。第 2 章では、ニンニクに含まれる多様な硫黄化合物のうち、硫化アリル化合物が特異的に SKN-1 経路の活性化に寄与する可能性を見出した。これらの結果は、SAC と SAMC がこれまでに報告されている AGE の抗酸化作用の活性成分であることを裏付けるものであり、今後、酸化ストレスに起因する様々な病態を改善する医薬品の開発に有用な知見を与えるものと考えられる。