

# パラコート処理が線虫の体内活性酸素および抗酸化酵素活性に与える影響

瀬戸山 央 (地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所, setoyama@kistec.jp)

## Effect of paraquat treatment on reactive oxygen species and antioxidant enzyme activity in *Caenorhabditis elegans*

Ou Setoyama (Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, Japan)

### 要約

ヒトの体内で過剰に生じた活性酸素 (ROS) は酸化ストレスとして作用し、老化の要因となることが明らかになっている。モデル生物である線虫においても、ROSと老化に深い関わりがあることが明らかとなっている。線虫に対して、体内でROSを生産させるための化合物としてパラコートが用いられている。高濃度パラコート (100 mM) は、線虫に対して体内のROSを増加させ致命的に働くが、低濃度パラコート (0.1~0.2 mM) は、線虫に対して体内抗酸化酵素活性を上昇させ、寿命を延長させる。一方、数mM~数十mMのパラコートが線虫に与える影響についての報告は少ない。そこで、本研究では2.5~10 mMのパラコート処理が線虫に与える影響について、体内のROS生成及び抗酸化酵素 (SOD、CAT) 活性に着目して解析を行った。その結果、パラコート処理の期間が長いほど、またパラコート濃度が高いほど体内ROS生成量が増加し、SOD活性が上昇することを明らかにした。

### Abstract

Reactive oxygen species (ROS) act as oxidative stress and become a factor of aging, and ROS are deeply related to aging in *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). Paraquat is used as a compound that produces ROS in *C.elegans*. High-concentration paraquat (100 mM) increases the ROS level and produces a lethal action. In contrast, low-concentration paraquat (0.1-0.2 mM) increases antioxidant enzyme activity and extends the lifespan in *C.elegans*. On the other hand, there are few reports on the effects of paraquats of several mM to several tens of mM on *C.elegans*. In this study, we clarify the effects of paraquat treatment (2.5-10 mM) on ROS and antioxidant enzyme (SOD, CAT) activity in *C.elegans*. We revealed that the longer the paraquat treatment period, and the higher the paraquat concentration, the higher the increased levels of ROS and increased SOD activity.

### キーワード

*Caenorhabditis elegans*, ROS, SOD, CAT, paraquat

### 1. はじめに

線虫 *Caenorhabditis elegans* は、非寄生性の線形動物で通常は土壤中に生育している。その特長として、体が透明で構造観察が容易であること、卵から孵化し産卵可能な成虫となるまでのライフサイクルが約4日と非常に短いこと、動物としての必要最低限の構成器官を持っていること、実験室レベルで大腸菌を餌として大量に培養可能なこと、遺伝的に同一な個体を大量に得られることなどが挙げられる (瀬戸山, 2018)。このような特徴から線虫はモデル生物として古くから用いられてきた。また線虫は、ヒトとの間に類似の機能を持つと考えられる遺伝子が多数存在し、寿命が約20日と短いことから老化研究のモデル生物としても用いられている (石井, 2017)。

老化の要因の1つとして酸化ストレスがある。酸化ストレスは、ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝の副産物として生じた活性酸素 (ROS) が、生体の除去機能を超えた場合に引き起こされる。その結果、生体内のタンパク質や脂質、遺伝子などが損傷し老化を促進させる (今田他, 1999; 吉川・谷川, 1999)。線虫においても、体内で発生した活性酸素が寿命に影響を及ぼすことが報告されている (Back et al., 2012)。

パラコート (paraquat) は、古くから農薬として使用されており、現在も除草剤として世界的に広く使用されている (Dinis-Oliveira et al., 2006)。またパラコートは生物に対しても毒性を示し、細胞内においてROSを生産させる (Drechsel and Patel, 2009)。線虫においても高濃度パラコート (100 mM) は、体内のROSを増加させ致命的に働く。一方、低濃度パラコート (0.1~0.2 mM) は、線虫に対して体内抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性やカタラーゼ (CAT) 活性を上昇させ、寿命を延長させることが報告されている (Yang and Hekimi, 2010)。このようにパラコートが線虫に与える影響については、低濃度および高濃度のパラコートでは詳細な解析がされているが、数mM~数十mMのパラコートが線虫に与える影響についての報告は少ない。そこで、本研究では2.5~10 mMのパラコート処理が線虫に与える影響について、体内のROS生成及び抗酸化酵素 (SOD、CAT) 活性に着目して解析を行ったので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 線虫の培養

線虫の培養は、Brenner (1974) の方法を参考にし、*C.elegans* (Wild N2, *Caenorhabditis Genetics Center*) はNGM培地を用い、大腸菌 (*Escherichia coli* OP50, *Caenorhabditis Genetics Center*) を餌として20℃で培養を行った。

## 2.2 線虫の同調培養

線虫の同調培養は、Setoyama (2020) の方法に従って行った。すなわち、NGM培地で線虫を成虫まで培養後、S-bufferにて洗浄、回収しアルカリ・ブリーチ法により線虫の体を溶解し卵のみを回収した。回収した卵は20℃で一晩培養後、孵化後の幼虫をS-bufferにて洗浄後、S-complete mediumに懸濁し実験に用いた。卵を回収した日を培養0日目とした。

## 2.3 大腸菌の死菌体調製

大腸菌の死菌体調製はCouillault and Ewbank (2002)、Setoyama (2020) の方法に従って行った。すなわち、大腸菌をLB液体培地で37℃、一晩培養後、遠心分離により回収した菌体ペレットを100 mg/mlとなるようにS-complete mediumに懸濁し、75℃で1時間処理を行ったものを大腸菌熱処理死菌体とした。

## 2.4 線虫に対するパラコート処理

培養1日目に12ウェル細胞培養プレート (VTC-P12、アズワン株式会社) に線虫約5,000匹、大腸菌熱処理死菌体 (終濃度5 mg/ml) およびS-complete mediumを加え総液量2.125 mlとし、100 rpm、20℃で培養した。培養3日目に800  $\mu$ M 2'-Deoxy-5-fluorouridineを各ウェルに0.125 ml添加した (終濃度40  $\mu$ M)。さらに25, 50, 100 mMに調製したパラコートを各ウェル0.25 ml添加 (終濃度2.5, 5, 10 mM) し、最終総液量2.5 mlとした。その後、100 rpm、20℃で培養した。

## 2.5 線虫の破碎

線虫の破碎は、Setoyama (2020) の方法を一部改変して行った。すなわち、培養5日目および8日目 (パラコート処理2日間および5日間) に、線虫をウェル毎にマイクロチューブに回収し、あらかじめ氷冷しておいたS-bufferにて洗浄後、PBS (pH7.4) を加え、氷冷しながら超音波破碎機 (Bioruptor、UC100-D、OLYMPUS株式会社) で破碎 (Level4、30秒間のサイクルを5回) した。その後、遠心分離 (15,000 rpm、30分間、4℃) 後、上清を回収したものを線虫抽出液とし各測定まで-80℃で保管した。

## 2.6 タンパク質量

線虫抽出液のタンパク質量はTaKaRa BCA Protein Assay Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて行った。

## 2.7 体内ROS測定

各線虫抽出液のタンパク質濃度を500  $\mu$ g/mlに調製し、Sarasija and Norman (2018) の方法に従ってCM-H<sub>2</sub>DCFDA (C6827、Invitrogen™) を用いて行った。測定は、マルチモードプレートリーダー (Infinite 200 PRO、テカンジャパン株式会社) を用いて励起波長485 nm、蛍光波長535 nmにて行った。

## 2.8 SOD活性測定

SOD活性測定は、瀬戸山ら (2016) の方法に従ってSOD Assay Kit-WST (S311、株式会社同仁化学研究所) を用いて測定した。測定結果はSOD活性 (U/mg protein) とし、WST還元50%阻害を示すサンプル溶液20  $\mu$ lに含まれるSOD量を1 Uとした。

## 2.9 CAT活性測定

CAT活性測定は、瀬戸山ら (2016) の方法に従って行った。すなわち、過酸化水素を基質として、240 nmの吸光度の減少値から過酸化水素の分子吸光係数を用いて算出した。測定結果はCAT活性 (U/mg protein) とし、25℃、pH7.0、1分間に1  $\mu$ molの過酸化水素を分解するCAT量を1 Uとした。

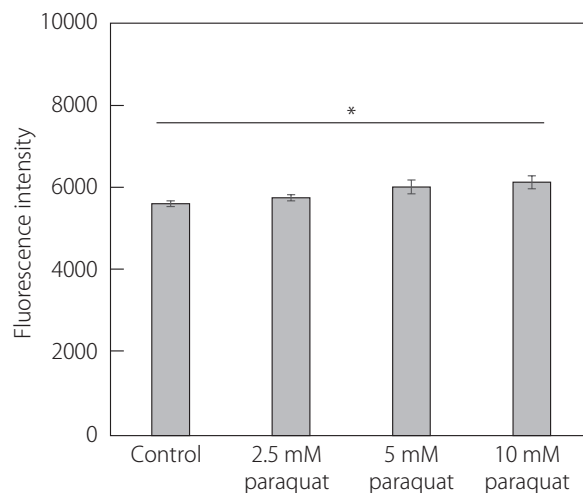
## 2.10 統計処理

結果は平均値±標準偏差として表示した。Student's *t*-testにより $p < 0.05$ を有意とした。統計ソフトは、4Stepsエクセル統計第3版 (オーエムエス出版、2011) 付属エクセルアドインソフトStatcel3を用いた。

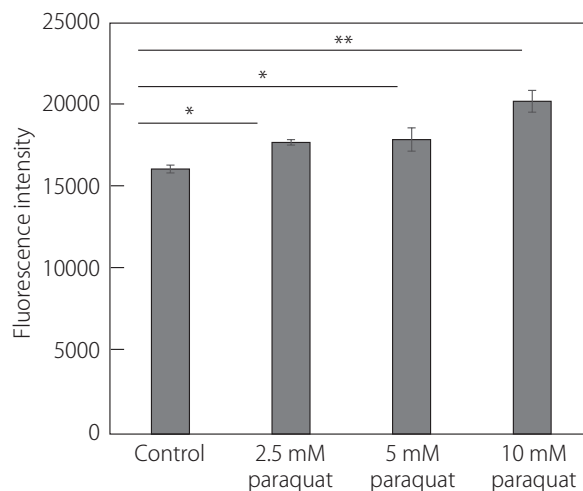
## 3. 結果および考察

### 3.1 パラコートが体内ROS量に与える影響

線虫に対してパラコートを終濃度2.5, 5, 10 mMとなるように2日間および5日間処理し、体内ROS測定を行った結果を図1に示す。2日間処理では、パラコートの濃度依存的に



(a) パラコート2日間処理



(b) パラコート5日間処理

図1: 線虫体内のROS量

注: \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  (Student's *t*-test,  $n = 3$ ).

体内ROS量が増加する傾向が認められ、5 mMおよび10 mMでコントロールに対して、有意に体内ROS量の増加が認められた。また5日間処理では、パラコートの濃度依存的に体内ROS量が増加する傾向が認められ、すべての濃度でコントロールに対して、有意に体内ROS量の増加が認められた。2日間処理と5日間処理を比較すると、10 mMにおいてROS量の増加はコントロールに対してそれぞれ約9%および約26%となっており、同じパラコート濃度においては処理時間が長いほどROS量が顕著に増加することが示唆された。

### 3.2 パラコートがSOD活性に与える影響

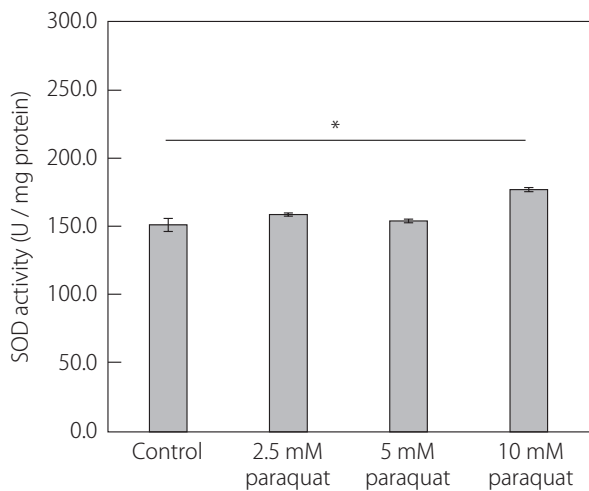
線虫に対してパラコートを終濃度2.5, 5, 10 mMとなるように2日間および5日間処理し、SOD活性測定を行った結果を図2に示す。2日間処理では、10 mMでコントロールに対して有意にSOD活性が上昇した。一方、5日間処理では、パラコートの濃度依存的にSOD活性が上昇する傾向が認められ、すべての濃度でコントロールに対して有意にSOD活性が上昇した。

SODは体内で発生した活性酸素のうち、 $O_2^-$ （スーパーオキシドアニオンラジカル）を $O_2$ （酸素）と $H_2O_2$ （過酸化水素）に不均化する酵素であり、体内の活性酸素を除去する重要な役割を果たしている（佐野他, 1992）。SOD活性の結果および体内ROS量の結果から、5日間処理では、パラコート濃度依存的に体内ROS量が増加し、増加したROSを除去する為にSOD活性が上昇したと考えられる。

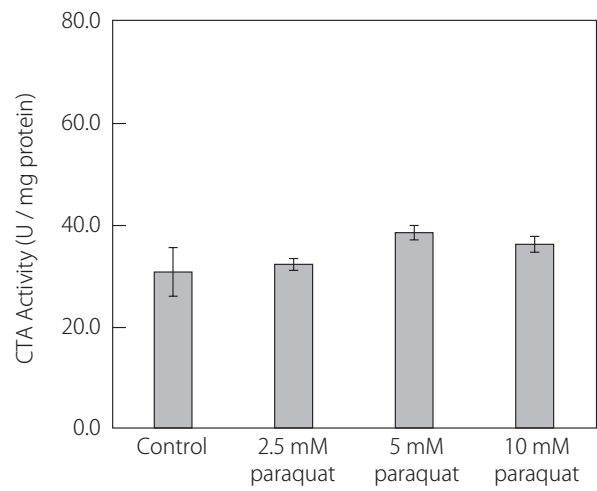
### 3.3 パラコートがCAT活性に与える影響

線虫に対してパラコートを終濃度2.5, 5, 10 mMとなるように2日間および5日間処理し、CAT活性測定を行った結果を図3に示す。2日間処理では、5, 10 mMでコントロールに対してCAT活性が上昇する傾向が認められた。一方、5日間処理では、10 mMでコントロールに対してCAT活性が有意に低下した。

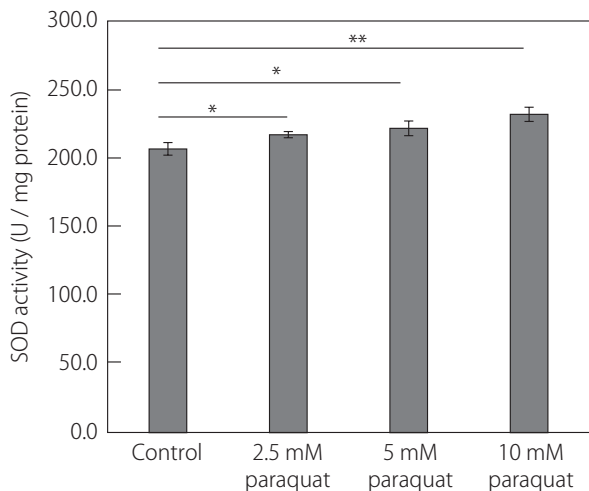
CATは過酸化水素を消去する酵素であり、体内でSODの働きにより生成した過酸化水素を除去することで活性酸素から生体を防御している（中村, 2013）。SOD活性の結果から、5



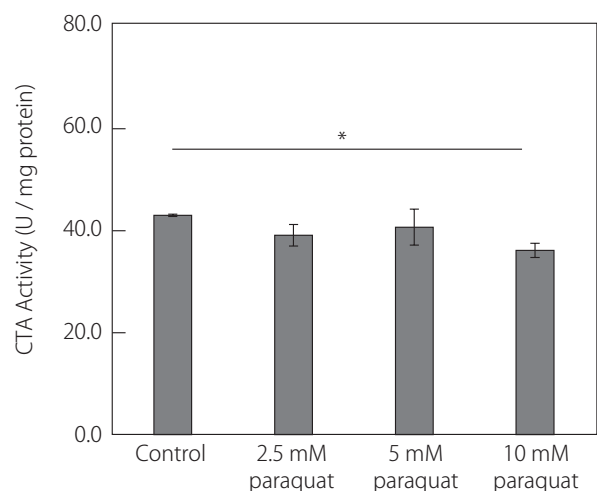
(a)パラコート2日間処理



(a)パラコート2日間処理



(b)パラコート5日間処理



(b)パラコート5日間処理

図2：線虫抽出液のSOD活性

注：\*  $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test,  $n = 3$ ).

図3：線虫抽出液のCAT活性

注：\*  $p < 0.05$  (Student's  $t$ -test,  $n = 3$ ).

日間処理では、パラコートの濃度依存的にSOD活性が上昇し、それに伴う過酸化水素の生成量の増加、さらに増加した過酸化水素を除去するためにCAT活性も上昇することが予想された。しかし、予想に反してCAT活性は、パラコート濃度が高まるにつれ低下する傾向がみられた。このことから、今回処理したパラコート濃度（終濃度2.5～10 mM）において、パラコートがCAT活性に与える影響は、SOD活性に与える影響とは異なることが示唆された。

#### 4. まとめ

2.5～10 mMのパラコート処理が線虫に与える影響について、線虫体内のROS生成及び抗酸化酵素（SOD、CAT）活性に着目して解析を行った。その結果、処理期間が長いほど、またパラコート濃度が高いほど体内ROS生成量が増加することが分かった。また、抗酸化酵素活性に与える影響については、処理期間が長いほど、またパラコートの濃度が高いほどSOD活性が顕著に上昇することが分かった。一方、CAT活性は処理期間が長くてもパラコート濃度が高まるにつれて低下する傾向がみられた。

パラコートは、細胞内に入るとNADPHから電子を奪いパラコートラジカルとなり、パラコートラジカルはO<sub>2</sub>を還元しO<sub>2</sub><sup>-</sup>を生じさせる（田中, 2011）ことから、O<sub>2</sub><sup>-</sup>を選択的に除去するSOD活性の上昇が顕著であったと考えられる。

SODは細胞内において細胞質基質に存在するCu/Zn-SODとミトコンドリアに存在するFe-SODがある。一方、CATは細胞内のペルオキシソームに存在する（佐野・富田, 1992）。本研究においては、SODおよびCAT活性測定とも線虫の破碎抽出液（粗抽出液）をそのまま用いており、ミトコンドリア画分や細胞質画分などの特定の画分を調製していない。そのため、2.5～10 mMのパラコート処理が線虫のSOD、CAT活性に与える影響をより正確に把握する為には、今後、線虫抽出液の画分を調製し、活性測定をしていく必要がある。

#### 引用文献

- Back, P., Braeckman, B. P., and Matthijssens, F. (2012). ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: Damage or signaling? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1-14.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, Vol. 77, 71-94.
- Couillault, C. and Ewbank, J. J. (2002). Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, Vol. 70, 4705-4707.
- Dinis-Oliveira, R. J., Remiao, F., Carmo, H., Duarte, J. A., Navarro, A. S., Bastos, M. L., and Carvalho, F. (2006). Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, Vol. 27, 1110-1122.
- Drechsel, D. A. and Patel, M. (2009). Differential contribution of the mitochondrial respiratory chain complexes to reactive oxygen species production by redox cycling agents implicated in parkinsonism. *Toxicological Sciences*, Vol. 112, 427-434.
- 今田伊助・佐藤英介・井上正康 (1999). 生体における活性酸素・

フリーラジカルの産生と消去. 化学と生物, Vol. 37, No. 6, 411-419.

石井直明 (2017). 老化研究のモデル動物としての *Caenorhabditis elegans* (総説). 東海大学先進生命科学研究紀要, Vol. 1, 28-32.

中村成夫 (2013). 活性酸素と抗酸化物質の化学. 日本医科大学医学会雑誌, Vol. 9, No. 3, 164-169.

佐野満昭・富田勲 (1992). 抗酸化酵素の測定. 化学と生物, Vol. 30, No. 11, 743-747.

Sarasija, S. and Norman, K. R. (2018). Measurement of ROS in *Caenorhabditis elegans* using a reduced form of fluorescein. *Bio-protocol*, Vol. 8, No. 7, e2800.

瀬戸山央・廣川隆彦・青木信義 (2016). 線虫 *C.elegans* の寿命延長を指標としたフラボン類の機能性評価. 神奈川県産業技術センター研究報告, No. 22, 83-84.

瀬戸山央 (2018). 線虫に良い食べ物には人にも良い? 生物工学, Vol. 96, No. 7, 412.

Setoyama, O. (2020). Effect of high glucose concentration on aging and glycation in *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Analytical Bio-Science*, Vol. 8, No. 3, 59-64.

田中英彦 (2011). パラコート毒性の機構とアスコルビン酸誘導体による抑制. 福岡大学理学集報, Vol. 41, No. 1, 103-114.

Yang, W. and Hekimi, S. (2010). A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biology*, Vol. 8, e1000556.

吉川敏一・谷川徹 (1999). 活性酸素・フリーラジカルと疾患. 化学と生物, Vol. 37, No. 7, 475-481.

(受稿：2021年5月14日 受理：2021年6月1日)