

キイロショウジョウバエの寿命を延ばす抗酸化物質とその最適量

石川県立金沢泉丘高等学校理数科

小西 杏佳 東 史華 本田 一喜 宮下 大佑 山岸 史弥

要旨

一般に生物の寿命とストレスは関わりがあるといわれている。私たちは抗酸化物質が ROS (活性酸素種) を除去するという性質に着目し、予めキイロショウジョウバエ (以下 *Drosophila* と略) に抗酸化物質を含む食品を摂取させた後にストレス (高温) を与え、その後の生存率を測定することで、*Drosophila* のストレス耐性が抗酸化物質によってどのように変化するのかを調べた。

1. 研究背景・目的

今日、『アンチエイジング』に大きな関心が向けられているが、これは加齢現象に細胞生物学的な方法で介入できる可能性があると考えられてきたからである。私たちは、生体細胞内で起こるストレスを軽減することが、アンチエイジングにつながるのではないかと考え、酸化ストレスに着目した。

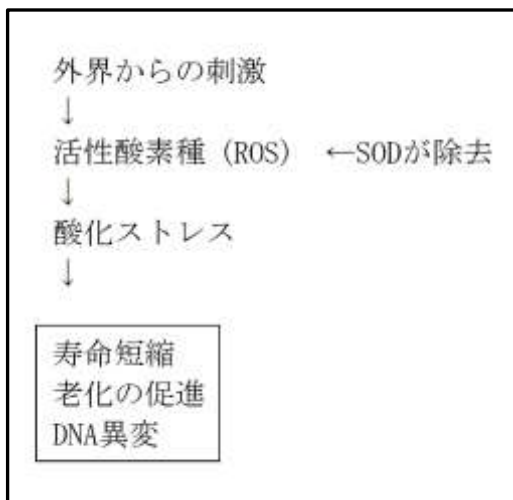


図1 酸化ストレスのメカニズム

酸化ストレスとは、酸化反応によって引き起こされる有害な作用のことであり (図 1)、活性酸素と抗酸化物質とのバランスに起因する。

この活性酸素には、細胞を老化させる「負の側面」と、その活性酸素から生じた酵素を用いることで細菌から身を守るという「正の側面」もあり、単純にこの活性酸素の量を減らせばよいというわけではない (図 2)。

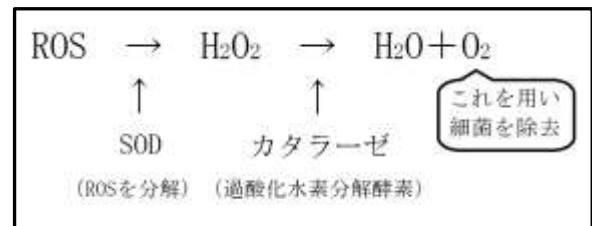


図2 ROSの代謝による無毒化のメカニズム

私たちは、生物 (特にヒト) の酸化ストレスを軽減する抗酸化物質と、その最適量を発見することを実験の目的とした。活性酸素による酸化ストレスを軽減すると共に活性酸素の持つ利点を活用することで、寿命を延ばすことができる抗酸化物質とその最適量が存在すると仮説を立てた。

ライフサイクルが短く、飼育が比較的容易であることから、*Drosophila* を実験に使用した。また、先行研究より、*Drosophila* とヒトの消化器官には類似性があるので、*Drosophila* を実験に使用することがヒトの健康の向上につながると考えた。

2. 実験方法

〈実験 1 抗酸化物質の取り込みによる生存率の変化〉

抗酸化物質としてビタミン E を多く含むオリーブオイル、または酸化ストレスを引き起こすとされる鉄を摂取させ、ストレス（高温）を与えた後の生存率の変化を調べた。

- ① 通常培地（*1）で飼育し、羽化した白眼（*White*）の *Drosophila* のバージン雄を用いた。（*2）。
- ② ア：通常培地、イ：抗酸化食品（オリーブオイル）、ウ：鉄を混入したそれぞれの培地で、*Drosophila* の♂単独 16 匹を 3 日間飼育した。
- ③ ②の後、ア・イ・ウの培地で飼育した *Drosophila* を 32℃の高温（*3）で 5 日間飼育して、生存率の変化を調べた。

*1 通常培地の組成

水	(1355ml)
グルコース	(100g)
コーンミール	(100g)
寒天	(9.375g)
ドライイースト	(50g)
プロピオン酸	(3.5ml)

*2 雄は雌より小さく、腹部の背中側の末端の 2 節の全体が黒い（雌は白っぽい）（図 3）。

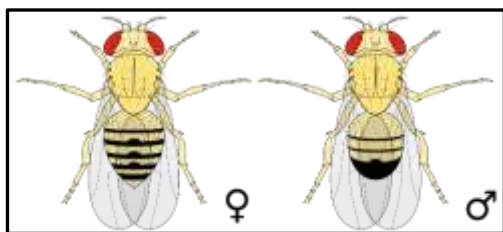


図 3 *Drosophila* の雌雄

*3 一般に *Drosophila* の寿命は 80 日と長いですが、高温（熱ストレス）で飼育すると寿命は 2 日程度になるという先行研究が

あったので、高温（32℃）で飼育して、その間の生存率を調べた。

〈実験 2 *Drosophila* の体内へ取り込まれた鉄の定量〉

先行研究より、鉄培地の鉄が *Drosophila* の体内へ取り込まれたことが確認されていたが、〈実験 1〉で観察された、*Drosophila* の個体数の著しい減少（図 4）の原因が鉄であることを調べるため、鉄のキレート試薬を用い体内に鉄が取り込まれたかどうかを調べた。

Drosophila を

ア：通常培地で 1 日

イ：5%Fe を含む培地で 1 日

ウ：10%Fe を含む培地で 1 日

エ：10%Fe を含む培地で 2 日

のそれぞれの条件で、16 匹ずつ 25℃で 2 日間飼育し、ハエ腹部からサンプルを調整し、1, 10-フェナントロリンという鉄のキレート試薬を用いて吸光度法（510nm）により *Drosophila* 体内の鉄の量を測定した。

Fe^{2+} が 1, 10-フェナントロリンと反応して金属キレートを生じる反応を利用しており、 Fe^{2+} が検出されると赤く発色する。検量線作成の標準液は硫酸アンモニウム鉄（II）を用いた。

- ① 硫酸アンモニウム鉄（II）6 水和物 7g を水に溶かし、6mol/L の塩酸 2m l を加えた後、1L に希釈した。（鉄イオン標準溶液）
- ② 1, 10-フェナントロリン塩酸塩 0.24g を水 200ml に溶かした。
- ③ 酢酸ナトリウム 0.84g を 100m l に溶かした溶液と、0.1mol/L 酢酸を同体積混ぜ合わせて溶液を調節した。（酢酸緩衝溶液）
- ④ 塩化ヒドロキシルアンモニウム 10g を 100ml の水に溶かした。
- ⑤ 鉄イオン標準溶液を 100 倍希釈し、メスフラスコ（50ml）に 5、15、25ml をそれぞれとった。

- ⑥ それぞれの溶液に塩化ヒドロキシルアンモニウム溶液 5ml を加えた。
- ⑦ さらに 1, 10-フェナントロリン溶液 8ml を加えた。
- ⑧ 酢酸緩衝溶液を 10ml 加えた。
- ⑨ 精製水で 50ml にメスアップし、よく振り混ぜた後、吸光光度計 (510nm) を用いて発色の度合いを測定した。(鉄の標準試料の作成)
- ⑩ ア～エの条件で飼育した *Drosophila* 各 16 匹を試料溶液 2ml の酢酸緩衝溶液に入れ混合して試料溶液とし、各 2ml を取り、⑥～⑨の操作を行った。
- ⑪ 同様に空試験用の試料を作成した。
- ⑫ 吸光光度計を使い、試料溶液と標準試料の吸光度を波長 510nm で測定した。

3. 結果

<実験 1 抗酸化物質の取り込みによる生存率の変化>

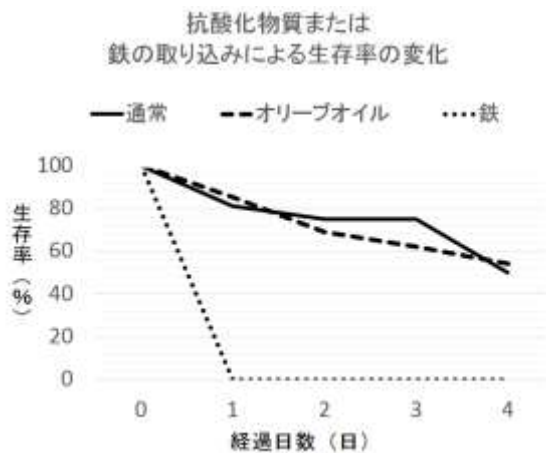


図 4

鉄入りの培地で飼育した *Drosophila* は、24 時間で生存率が 0 になり、寿命が短くなることが確認された。また、オリーブオイル入りの培地で飼育した *Drosophila* と、通常培地で飼育した *Drosophila* とでは、5 日間の間でほとんど差がなかった。

<実験 2 *Drosophila* の体内へ取り込まれた鉄の定量>

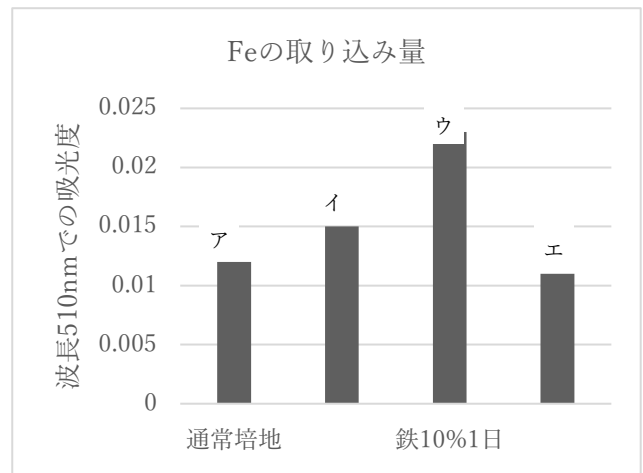


図 5

標準試料の吸光度の値の大小が、鉄濃度の大小を示すことが確認できたので、*Drosophila* 体内に取り込まれた Fe の量を波長 510nm での吸光度を測定して調べた。

通常培地アで飼育した *Drosophila* に比べ、イ、ウの条件で飼育した *Drosophila* では鉄量が多く検出されたことから、*Drosophila* がえさの摂取により体内に鉄が取り込まれていたことが確認された。イとウの比較から、鉄の濃度が高いとそれだけ多くの鉄が取り込まれていたことが確認された。ウとエの比較から、同じ 10%の鉄を含むえさで飼育した *Drosophila* は、1 日飼育したものより 2 日間飼育した *Drosophila* の体内の鉄の量が少ないことが確認された。

4. 考察

実験 1 で確認された鉄の存在下における寿命の短縮は、先行研究の結果にもあるように、*Drosophila* の体内に鉄が取り込まれることで活性酸素が増加したからであると考えられる。実験 2 によって *Drosophila* が実際に食物摂取により鉄を取り込んでいることも確認された。

実験 2 の鉄を 10%混入した培地で、2 日間飼育した *Drosophila* の体内の Fe の量が 1 日飼

育した *Drosophila* よりも少ないという結果から、鉄が体外に排出されたと考えられる。

また、通常培地と抗酸化食品の入った培地での生存率に5日間で大きな違いは見られなかった。この結果の原因として、①実験日数が短い②摂取された抗酸化物質の抗酸化作用がはたっていない③培地に入れた抗酸化物質を *Drosophila* が摂取していないという3点が挙げられる。

今回の実験では *Drosophila* の体内の鉄の量は測定することができたが、体内に摂取された抗酸化物質の量を測定することはできていないので、通常培地中の抗酸化物質を摂取していない可能性も考えられる。

5. 今後の課題

今後の実験では、抗酸化物質として緑茶や醤油、豆乳などの物質を混入した培地で *Drosophila* を飼育して、寿命を最も伸ばすことができる抗酸化食品と、その最適量をさらに調べていきたい。

また、酸化ストレスを増加するとされる鉄の取り込みとその後の経過について、培地に混入する鉄の濃度を変えたり、飼育日数を長くしたりして調べていきたい。

6. 謝辞

今回の実験を進めていくにあたり、ご指導いただいた金沢大学大学院の佐藤純先生、北陸先端科学技術大学院大学の小田和司先生をはじめとする方々や、石川県立金沢泉丘高等学校の先生方に、心より感謝いたします。ご協力ありがとうございました。

7. 参考文献

- 1) 山梨県立韮崎高等学校生物研究部. 鉄摂取により生物の酸化ストレスは増加する. 2015.
- 2) ANDREW G. CLARK & CHRISTOPHER D. FUCITO. 1998, Stress tolerance and metabolic

response to stress in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 81, 514-527

3) すぐできる!なるほどザ 化学実験室 | 日本分析化学専門学校

<http://www.bunseki.ac.jp/naruhodo/experiment/pop.php?id=155>