

原著

^{13}C 呼気分析法を応用した線虫 *Caenorhabditis elegans*の短鎖脂肪酸代謝能の測定

三浦紀称嗣*¹ 宮田富弘*¹

要 約

本研究では、短鎖脂肪酸であるプロピオン酸 (Propionate : PA) の ^{13}C 同位体 (^{13}C PA) を投与した線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) に ^{13}C 呼気分析法を応用することで、*C. elegans* における PA の代謝能を測定する $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を開発した。線虫に ^{13}C PA を投与し、自作の $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置に線虫を移して培養した後に装置内の空気を回収し $^{13}\text{CO}_2$ / $^{12}\text{CO}_2$ 比を測定した。装置から回収された空気からは $^{13}\text{CO}_2$ の出現が確認された。また、PA を投与した線虫において PA 代謝関連遺伝子 *acdH-1* の発現が有意に増加した。これらの結果から、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析で確認された $^{13}\text{CO}_2$ の出現は、投与した ^{13}C PA を線虫が摂取し、消化管での吸収、代謝を経て空気中に排出された CO_2 の濃度を反映していると考えられる。したがって、ヒトと類似した PA 代謝経路を有する *C. elegans* の PA 代謝能について、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いることで比較的簡便に非侵襲的かつ定量的に測定が可能であることが示唆された。本研究で開発した $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法は、短鎖脂肪酸研究において有用な分析ツールの一つになると考えられる。

1. 緒言

短鎖脂肪酸は脂肪酸の内、炭素数がおよそ6以下のものを指す。代表的な短鎖脂肪酸である酢酸・プロピオン酸 (propionate : PA) ・酪酸は、腸内細菌が食物繊維を発酵することで生成され、大腸上皮細胞から吸収された後にエネルギー源として利用される。短鎖脂肪酸は脂肪蓄積の抑制やミネラル吸収の促進などの機能性の他^{1,2)}、代謝経路や免疫系などを変化させること³⁾、生体のエピジェネティックな変化を誘導すること^{4,5)}等が明らかになっている。また、近年では大腸内で産生された短鎖脂肪酸、細胞外多糖類やテイコ酸などの細菌の構成成分が宿主の健康に寄与するとして、新たな「バイオティクス」の概念である「ポストバイオティクス」が提唱されている^{6,9)}。しかしながら、一部の短鎖脂肪酸の過剰な蓄積は人体に毒性を示すことが知られており、先天性代謝異常症であるプロピオン酸血症は指定難病に認定されている。ヒトの高プロピオン酸血症における PA 代謝経路を解析するために、ヒトと類似した

PA 代謝経路を有する線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) がモデル動物として用いられており、Watson et al. の研究^{10,12)}によって PA 分解経路に関する遺伝子の転写レベルでの発現調節が明らかにされている。

C. elegans は非寄生性の細菌食性線虫である。孵化後 L1 幼虫期 (L1), L2, L3, L4 と幼虫の期間を経て young adult, adult (産卵可能な成虫) と成長し、寿命はおよそ1ヵ月程度である。体長約1mm と多細胞生物の中でも小型であるが、他の高等動物と類似した機能をもつ組織を数多く有している¹³⁾。特に、遺伝子の約60%以上がヒトのオルソログであり¹⁴⁾、遺伝子操作が比較的容易なことから、遺伝子機能の解析のツールとして広い分野に普及している。短鎖脂肪酸代謝の研究においても、変異体または Ribonucleic acid (RNA) 干渉テクニック¹⁵⁾による代謝関連遺伝子のノックアウトあるいはノックダウン線虫を用いた毒性実験や Green Fluorescent Protein 実験が行われている^{16,17)}。しかしながら、

*1 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 健康科学専攻
(連絡先) 三浦紀称嗣 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学
E-mail : ws319003@kwmw.jp

線虫において短鎖脂肪酸の代謝産物の量的な変化を確認した報告は少ない。

そこで、*C. elegans* が最終代謝産物として生成した CO_2 を拡散によって大気中に排出することに注目した。すなわち、 ^{13}C でラベルされた標識化合物 (^{13}C 標識化合物) を対象に投与して呼気中の $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比 ($\Delta^{13}\text{CO}_2\%$) を測定する ^{13}C 呼気分析法を線虫に応用することで、線虫においても代謝能を定量的に測定できると考えた。実験動物であるラットへの ^{13}C 呼気分析法の応用が検討されており、ラットに投与した ^{13}C 標識化合物由来の $^{13}\text{CO}_2$ が測定可能であることが報告されている¹⁸⁾。本研究では、*C. elegans* の代謝能を測定する新しい分析法を確立するために、 ^{13}C 呼気分析法の線虫への応用方法について検討した (以下、本研究で開発した分析方法を $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析とする)。

2. 方法

2.1 実験試薬

^{13}C 標識化合物には、 $[1-^{13}\text{C}]$ プロピオン酸ナトリウム ($[1-^{13}\text{C}]$ PA, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) および ^{13}C 重炭酸ナトリウム (^{13}C Bicarbonate: ^{13}C BA, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を滅菌生理食塩水で必要な濃度に調製して用いた。一般的な ^{12}C PA はプロピオン酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社) を用いた。

2.2 *C. elegans* の飼育方法

C. elegans および飼料である大腸菌 OP-50 は *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota) から入手した。線虫は OP-50 を塗布した線虫育成培地 (nematode growth medium: NGM) 上で 20°C のインキュベーター内で培養した。1週間ごとに線虫が存在する培地の一部を切り取り、新しい NGM 上に継代した。実験に用いる線虫は、

ライフステージを揃えるために同調化溶液 (脱イオン水 50 mL, 5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 40 mL, 5M NaOH 10 mL/100 mL) を用いて同調化を行った。

2.3 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置の構成と測定方法

135 mL 容量の小型真空デシケーター (AS ONE Co.) のチューブコネクタおよびバルブにチューブを取り付け、密閉するためにチューブコネクタ側のチューブにコックを取りつけた。6 cm シャーレに作成したペプトンフリー NGM に $[1-^{13}\text{C}]$ PA を投与した線虫を移し、直ちにデシケーター内に密閉して測定まで 20°C のインキュベーター内で培養した。バルブ側のチューブに標準ガス (95% $\text{O}_2/5\%$ CO_2) 入りバッグを取り付け、もう一方のチューブにシリンジを取りつけた。コックを開きながらシリンジでデシケーター内の空気を回収し、呼気採取バッグ (大塚製薬株式会社) に空気を約 250 mL 採取した。赤外線分光分析装置 POC one (大塚製薬株式会社) に呼気採取バッグとベースラインとして標準ガス入りバッグを接続し、デシケーター内の $\Delta^{13}\text{CO}_2\%$ を測定した (図1)。測定は $\Delta^{13}\text{CO}_2\%$ が陰性になるまで繰り返し行い、測定値の総和 ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\%$) にて各データの比較を行った。

2.4 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いた $^{13}\text{CO}_2$ の測定

6 cm シャーレ上に 75mM ^{13}C BA 100 μL と 0.5mol/L 硫酸 (和光純薬株式会社) 200 μL をそれぞれの溶液が触れないように添加した後、デシケーター内に移して密閉した。その後、デシケーターを軽く傾けてデシケーター内の溶液を混和して反応させ、デシケーター内に $^{13}\text{CO}_2$ を発生させた後、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析を行った。75 mM ^{13}C BA 100 μL のみを添加したシャーレをコントロールとした。

2.5 大腸菌 OP-50 株が $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に及ぼす影響

OP-50 を LB Broth Base (Thermo Fisher Scientific)

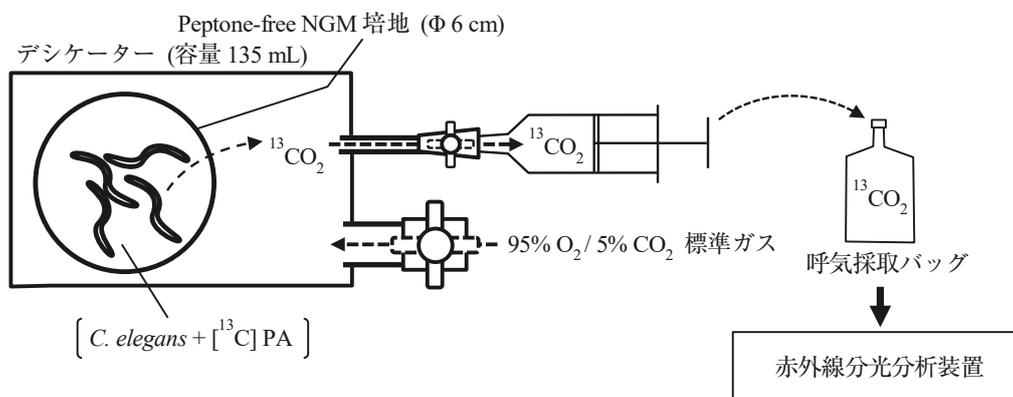


図1 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置の構成

を用いて37℃で一晩培養した。未処理の OP-50, 75℃の熱水で1時間加熱処理した OP-50 (75℃ HK OP-50), 121℃で20分間オートクレーブ処理した OP-50 (121℃ HK OP-50) をそれぞれ6cm シャーレに作成したペプトンフリー NGM に1枚当たり40μL 塗布した後, 室温で24時間乾燥させた。75mM [1-¹³C] PA 100μL をシャーレ上に投与した後, 直ちにデシケーター内に密閉した。インキュベータで20℃, 72時間培養後, ¹³CO₂ガス分析を行った。

2. 6 ¹³CO₂ガス分析を用いた *C. elegans* のプロピオン酸代謝の測定

NGM 上の線虫を M9 buffer (Na₂HPO₄ 6.0g,

KH₂PO₄ 4.0g, NaCl 5.0g/ 脱イオン水 1L) で回収して同調化した後, 2000rpm で1分間遠心分離し液量が100μL になるように上清を取り除いて L1 幼虫を含む懸濁液 (L1 懸濁液) を作成した。96well plate に1well あたり L1 懸濁液を20μL, 121℃ HK OP-50 を30μL 添加した培養液を L4 幼虫に成長するまで20℃のインキュベータで培養した。それぞれの well に最終濃度が50mM/150μL となるように75mM [1-¹³C]PA を100μL 投与した後, 6cm シャーレに作成したペプトンフリー NGM に移して直ちにデシケーター内に密閉した。デシケーターを20℃で72時間培養後, ¹³CO₂ガス分析を行った。L1 懸濁液を

表 1 プライマーの配列

PCR primers		
Gene	Forward	Reverse
<i>acdh-1</i>	AAGCTGCAATGGCGAAACTG	ACCACCGAGCCATTTTACAC
<i>alh-8</i>	TCAGCCAAAATGCCAACAGC	ATCCACAGCTTGACAGTTGG
<i>ech-6</i>	GCCGCATTTTCAAGCAAAGC	GCGCACAAAGCATTCAAAGC
<i>gob-1</i>	AATGGGCAGCTCTGTGAAC	TTCCAACCAACGCGAATTGC
<i>gsy-1</i>	TTGTGTTCGAATGCGCTTGG	ACTTCAAGCCGCCATTTTCC
<i>hach-1</i>	ACGCGTTGAACCTCGAAATG	AAAGATCGCACAACGGCAAG
<i>hphd-1</i>	TTAAAAACGCCGAGCAAGCC	GCTTCGATTGGCAAATGCG
<i>mce-1</i>	TTTCGCTGTCCACAAGAACC	ACAGCCTCGCTAACTTTTGC
<i>mmcm-1</i>	AGGAGCAATGTGCCAAGTTG	TTGCATCCAACGCCTTTTGG
<i>pcca-1</i>	TGTCGCGTGATCAAACTGC	TTTGGCAGTTGGAGCTTCTC
<i>pccb-1</i>	AAAGTTTGCTGCTGGATGCC	TGAAAGCATCGCAGAATCGG
<i>pck-1</i>	TGCACGATCCAATGGCAATG	AAGATCTTTGGCGCCTTGTG
<i>pfk-1.2</i>	TCGGCAAGAAAGTGTGCTTC	TTGCTTCAACAAGGGGATGC
<i>snb-1</i> (internal control)	TGGAGCGTGATCAGAAGTTGTC	TCCACCAATACTTGCGCTTCAG
<i>tre-1</i>	ATCCCAGCCGATTTAAACGC	TCACGCATTTCCCGTTTTTGC
<i>tre-2</i>	AAAATCCGGTGGCAAGTTGC	AAAGAGGCGAGCAGTTGAAG
<i>tre-3</i>	TATGAAACCGGCCACATGTG	TCCGTTGCTCCATCCAATC

M9 buffer に置き換えた培養液をコントロールとした。

2.7 プロピオン酸投与による *C. elegans* のプロピオン酸代謝関連遺伝子発現変化の確認

OP-50を塗布したNGMに同調化したL1幼虫を添加しL4幼虫に成長するまで20°Cで培養した後、M9 bufferで回収し約1000匹となるように15mLチューブに分注した。PAを最終濃度50mMとなるように投与して20°Cで24時間培養した。PAをM9 bufferに置き換えて培養した線虫をコントロールとした。培養後、2000rpmで1分間遠心分離して上清を取り除いた。さらにM9 bufferで3回洗浄し、液体窒素を用いて線虫を凍結させ乳鉢で粉碎した後、RNeasy Plus micro kit (Qiagen)を用いて線虫からRNAを抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社)を用いて、抽出したtotal RNA 200ngを鋳型にcomplementary DNAを合成した。primerはPA代謝関連遺伝子である *pcca-1*, *pccb-1*, *mce-1*, *mmcm-1*, *acdH-1*, *ech-6*, *hach-1*, *hphd-*, *alh-8*を用いた(表1)。Emerald Amp PCR Master Mix(タカラバイオ株式会社)を12.5 μ L, 10 μ M forward primerを0.5 μ L, 10 μ M reverse primerを0.5 μ L, cDNAを3 μ L, 超純水を8.5 μ Lを混合した後、逆転写 Polymerase chain reaction (PCR)を行った。PCR条件は94°C・2分, (94°C・30秒間, 55°C・30秒間, 72°C・1分間)×30サイクル, 72°C・10分とした。PCR産物は1%アガロースゲルを用いて0.5×TBEにて電気泳動した。泳動後、WSE-5300プリントグラフCMOSI(アトー株式会社)にてゲル上のバンドを撮影し、画像解析ソフトImageJを用いてバンドの濃淡を定量化した。なお、遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である *snb-1*の発現量をもとに正規化した。

3. 結果

3.1 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いた $^{13}\text{CO}_2$ の測定

75 mM ^{13}C BAを用いた $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析の結果を図2に示した。硫酸と ^{13}C BAを添加したシャーレを密閉したデシケーターから回収した空気から $^{13}\text{CO}_2$ の出現か確認された ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\% \pm \text{SE} = 2690.5 \pm 340.3$)。

3.2 大腸菌 OP-50株が $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に及ぼす影響

OP-50に $[1-^{13}\text{C}]$ PAを投与すると、未処理のOP-50 ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\% \pm \text{SE} = 1997.4 \pm 262.4$) および75°C HK OP-50 ($\Sigma \Delta^{13}\text{CO}_2\% \pm \text{SE} = 617.3 \pm 65.4$) から $^{13}\text{CO}_2$ の出現か確認された。121°C HK OP-50では

$^{13}\text{CO}_2$ の出現が確認されなかった(図3)。

3.3 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いた *C. elegans* のプロピオン酸代謝の測定およびプロピオン酸代謝関連遺伝子発現変化の確認

$[1-^{13}\text{C}]$ PAを投与した *C. elegans* から $^{13}\text{CO}_2$ の出現が確認された(図4)。また、PA代謝関連遺伝子の発現は、コントロールと比較してPAを投与した線虫で *acdH-1*の発現が有意に増加した(図5)。

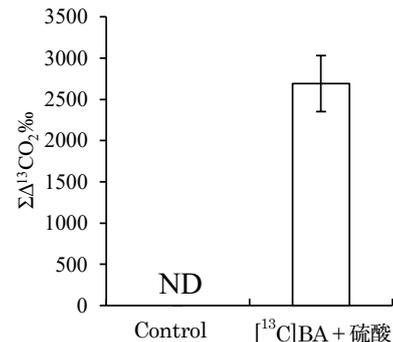


図2 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いた $^{13}\text{CO}_2$ の測定

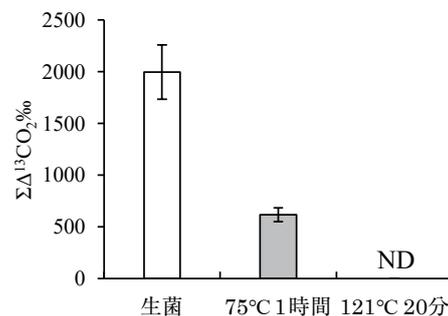


図3 大腸菌 OP-50株が $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に及ぼす影響

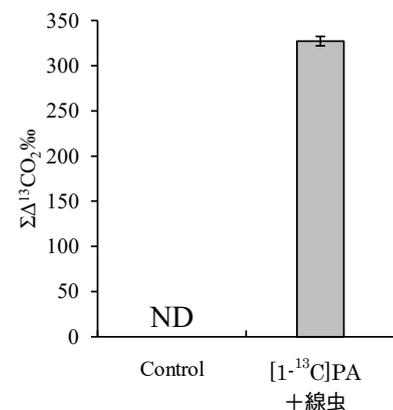


図4 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いた *C. elegans* のプロピオン酸代謝の測定

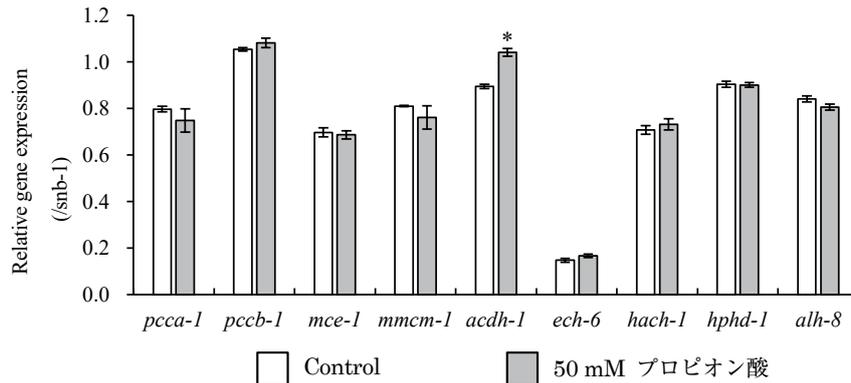


図5 プロピオン酸代謝関連遺伝子発現変化の確認

4. 考察

本研究では、*C. elegans* が排出した $^{13}\text{CO}_2$ を $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析にて測定することで、短鎖脂肪酸の代謝能を実測可能であることを証明した。まず、 $[^{13}\text{C}]\text{BA}$ と硫酸を反応させてデシケーター内に $^{13}\text{CO}_2$ を発生させ、その空気を回収して分析したところ、デシケーター内から回収した空気から高濃度の $^{13}\text{CO}_2$ が検出された。そのため、作製した $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置を用いて $^{13}\text{CO}_2$ を測定可能であることが確認された。

C. elegans の培養には一般的に非病原性大腸菌 OP-50株が飼料として用いられており、飼料である OP-50が $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析結果に影響を及ぼす可能性が示唆された。実際に、OP-50の生菌に $[^{13}\text{C}]\text{PA}$ を投与したところ高濃度の $^{13}\text{CO}_2$ が検出された。 $[^{13}\text{C}]\text{BA}$ の結果が発生した $^{13}\text{CO}_2$ を100%回収した場合の値と仮定すると、OP-50から出現した $^{13}\text{CO}_2$ の回収率は約74%となることから、投与した $[^{13}\text{C}]\text{PA}$ の大部分を OP-50が代謝することが確認された。OP-50を75℃で1時間処理した OP-50においても $[^{13}\text{C}]\text{PA}$ の代謝が確認されたことから、本研究ではオートクレーブで滅菌した OP-50を飼料として用いた。121℃ HK OP-50で培養した *C. elegans* は実験終了後も活動していたことから、加熱処理された飼料が *C. elegans* の活動に及ぼす負の影響は少ないと考えられる。しかしながら、過剰な殺菌処理は OP-50の栄養価を低下させる可能性があるため、OP-50の適切な殺菌条件については今後検討する必要がある。また、線虫の培養に必要な栄養素成分を含む液体培地によって無菌的に培養する方法があり^{19,20)}、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析のより適切な条件を設定するために今後検討する必要がある。

C. elegans に $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析を適用するにあたり、60mM 以上の高濃度では線虫の生存率が急激に低下することから¹¹⁾、本研究では PA 濃度を50mM に

設定して実験を行った。*C. elegans* は PA の代謝経路について、ビタミン B₁₂ に依存した代謝経路とビタミン B₁₂ に依存しない代謝経路（シャント経路）の2つを有しており（図6）、PA が豊富な環境下ではシャント経路での PA 代謝が優勢となる¹²⁾。シャント経路ではマロン酸セミアルデヒドからアセチル-CoA に代謝される段階で CO₂ が生成される。さらにアセチル-CoA は TCA 回路で完全に代謝されるため、最終的に PA を構成する炭素はすべて CO₂ となって体外に排出される。50mM PA 溶液で24時間培養培養した線虫の遺伝子発現を確認すると、プロピオニル-CoA をアクリリル-CoA に変換するアシル CoA デヒドロゲナーゼをコードする *acdh-1* の発現がコントロールと比較しておよそ1.2倍誘導された。また、*C. elegans* に $[^{13}\text{C}]\text{PA}$ を投与したところ $^{13}\text{CO}_2$ の出現が確認された。*C. elegans* は PA を消化管細胞で代謝することから¹⁷⁾、 $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析装置内で確認された $^{13}\text{CO}_2$ は、投与した $[^{13}\text{C}]\text{PA}$ を *C. elegans* が摂取し、消化管で吸収、代謝した結果を反映していると考えられる。これらの結果より、本研究で開発した $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法を用いることで、*C. elegans* の短鎖脂肪酸代謝能の測定が可能であることが示唆された。近年は動物愛護の観点から実験動物の使用規制が強まっており、動物実験の対象に含まれない *C. elegans* において比較的簡便かつ定量的な代謝変化の検出を可能にする $^{13}\text{CO}_2$ ガス分析法は、短鎖脂肪酸研究において有用な分析ツールの一つになると考えられる。また、この分析法は短鎖脂肪酸のみならず最終的に CO₂ に代謝される物質であれば適用可能なことから、代謝関連遺伝子発現の変化が表現型（実際の代謝変化）に及ぼす影響を調べるためのスクリーニングとしても有用であると考えられる。

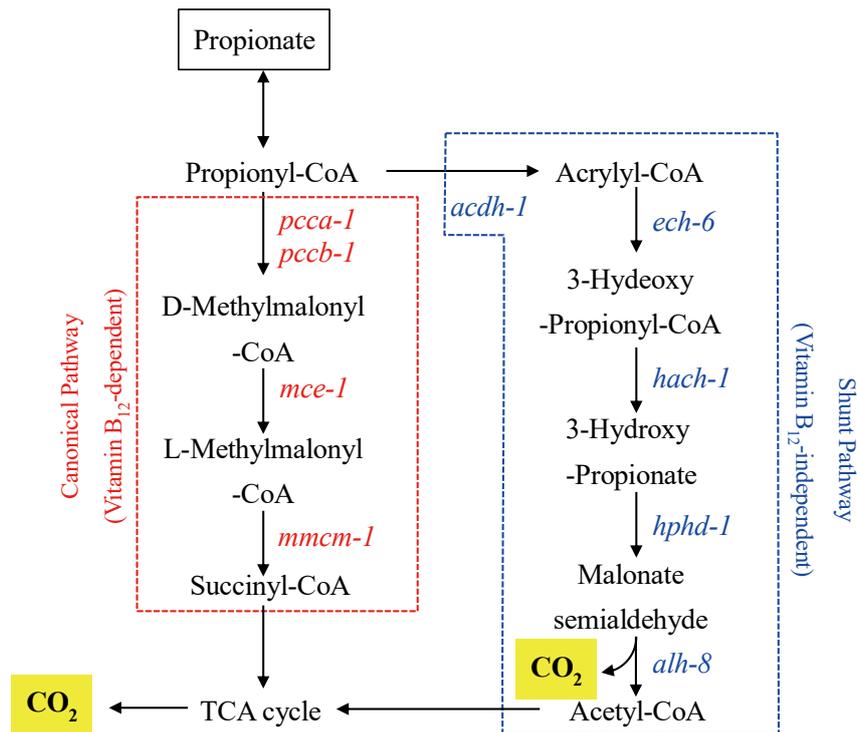


図6 *C. elegans* のプロピオン酸代謝経路

文 献

- 1) Hara H, Suzuki T, Kasai T, Aoyama Y and Ohta A : Ingestion of guar-gum hydrolysate partially restores calcium absorption in the large intestine lowered by suppression of gastric acid secretion in rats. *British Journal of Nutrition*, 81(4), 315-321, 1999.
- 2) Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, ...Tsumimoto G: The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature Communications*, 4(1), 1-12, 2013.
- 3) Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M and Vidal A : Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: A study with relevance to inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 13(20), 2826-2832, 2007.
- 4) Silva LG, Ferguson BS, Avila AS and Faciola AP : Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Animal Science*, 96(12), 5244, 2018.
- 5) Luu M, Pautz S, Kohl V, Singh R, Romero R, Lucas S, Hofmann J, Raifer H, Vachharajani N, ...Visekruna A : The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes. *Nature Communications*, 10(1), 2019.
- 6) Revtovich AV, Lee R and Kirienko NV : Interplay between mitochondria and diet mediates pathogen and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 15(3), 1-27, 2019.
- 7) Malagón-rojas JN, Mantziari A, Salminen S and Szajewska H : Postbiotics for preventing and treating common infectious diseases in children: A systematic review. *Nutrients*, 12, 389-403, 2020.
- 8) Żółkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M and Feleszko W : Postbiotics: A step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*, 12(8), 1-17, 2020.
- 9) Nataraj BH, Ali SA, Behare PV and Yadav H : Postbiotics-parabiotics: The new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 168-190, 2020.
- 10) Watson E, MacNeil LT, Arda HE, Zhu LJ and Walhout AJM : Integration of metabolic and gene regulatory networks modulates the *C. elegans* dietary response. *Cell*, 153(1), 253-266, 2013.

- 11) Watson E, Macneil LT, Ritter AD, Yilmaz LS, Rosebrock AP, Caudy AA and Walhout AJM : Interspecies systems biology uncovers metabolites affecting *C. elegans* gene expression and life history traits. *Cell*, 156(4), 759-770, 2014.
- 12) Watson E, Olin-Sandoval V, Hoy MJ, Li CH, Louisse T, Yao V, Mori A, Holdorf AD, Troyanskaya OG, ...Walhout AJM : Metabolic network rewiring of propionate flux compensates vitamin B₁₂ deficiency in *C. elegans*. *eLife*, 5, e17670, 2016, <https://doi.org/10.7554/eLife.17670>.
- 13) Sulston JE and Horvitz HR : Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56(1), 110-156, 1977.
- 14) Harris TW, Chen N, Cunningham F, Tello-Ruiz M, Antoshechkin I, Bastiani C, Bieri T, Blasiar D, Bradnam K, ...Stein LD : WormBase: A multi-species resource for nematode biology and genomics. *Nucleic Acids Research*, 32, D411-D417, 2004.
- 15) Conte D, Jr, MacNeil LT, Walhout AJM and Mello CC : RNA Interference in *Caenorhabditis Elegans*. *Current protocols in molecular biology*, 109, 1-39, 2015.
- 16) Chandler RJ, Aswani V, Tsai MS, Falk M, Wehrli N, Stabler S, Allen R, Sedensky M, Kazazian HH and Venditti CP : Propionyl-CoA and adenosylcobalamin metabolism in *C. elegans* : Evidence for a role of methylmalonyl-CoA epimerase in intermediary metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, 89(1-2), 64-73, 2006.
- 17) Bulcha JT, Giese GE, Ali MZ, Lee YU, Walker MD, Holdorf AD, Yilmaz LS, Brewster RC and Walhout AJM : A persistence detector for metabolic network rewiring in an animal. *Cell reports*, 26(2), 460-468, 2019.
- 18) Uchida M and Kimiko S : ^{13}C -acetic acid is more sensitive than ^{13}C -octanoic acid for evaluating gastric emptying of liquid enteral nutrient formula by breath test in conscious rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(3), 487-489, 2007.
- 19) Szewczyk NJ, Kozak E and Conley CA : Chemically defined medium and *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biotechnology*, 3(1), 1-7, 2003.
- 20) Nass R and Hamza I : The nematode *C. elegans* as an animal model to explore toxicology in vivo: Solid and axenic growth culture conditions and compound exposure parameters. *Current Protocols in Toxicology*, 31(1), 1.9.1-1.9.18, 2007.

(2022年5月19日受理)

Measurement of Short-Chain Fatty Acid Metabolism of *Caenorhabditis elegans* Using ^{13}C Breath Test

Kiyoshi MIURA and Tomihiro MIYADA

(Accepted May 19, 2022)

Key words : *Caenorhabditis elegans*, short-chain fatty acid, propionate metabolism, $^{13}\text{CO}_2$ gas analysis

Abstract

In this study, we developed $^{13}\text{CO}_2$ gas analysis to measure the metabolic capacity of propionate (PA) in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) using ^{13}C breath analysis. ^{13}C -labeled PA (^{13}C PA) was administered to the worms, and after transferring to a $^{13}\text{CO}_2$ gas analyzer and culturing, the air in the analyzer was collected and the $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ ratio was measured. The appearance of $^{13}\text{CO}_2$ was confirmed in the air collected from the analyzer. In addition, the expression of the PA metabolism-related gene *acdH-1* was significantly increased from the *C. elegans* to which PA was administered. These results suggest that the appearance of $^{13}\text{CO}_2$ confirmed using $^{13}\text{CO}_2$ gas analysis reflects the concentration of CO_2 excreted into the air through absorption and metabolism in the gastrointestinal tract after ingesting the administered [^{13}C] PA by worms. Therefore, it was suggested that the PA metabolic capacity of *C. elegans*, which has a PA metabolic pathway similar to that of humans, can be measured by using the $^{13}\text{CO}_2$ gas analysis. This analysis can contribute to further understanding of the physiological effects of short-chain fatty acids.

Correspondence to : Kiyoshi MIURA

Doctoral Program in Health Science

Graduate School of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

288 Matsushima, Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : ws319003@kwmw.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.32, No.1, 2022 91 – 98)