

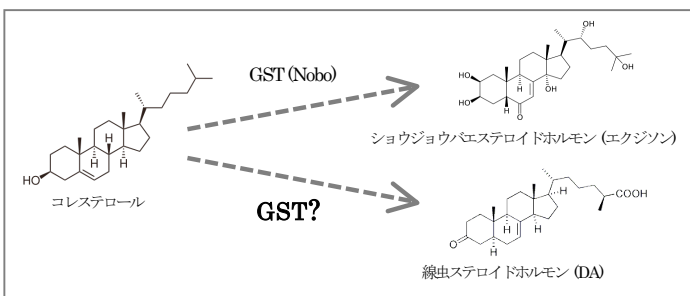
線虫 *C. elegans* の発生タイミングと寿命に関与する新規遺伝子の解析

恩田 美紀 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

## 背景・目的

ステロイドホルモンは、我々ヒトを含む多くの生物にとって、恒常性の維持、代謝調節、発生や分化といった様々な局面で重要な役割を担う。ステロイドホルモンの産生や代謝の異常は、ヒトの疾患にも密接に関連し、その調節機構を理解することは、基礎生物学のみならず医学の面からも重要である。

所属研究室の塩谷・丹羽らは、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いた研究から、ステロイドホルモン合成に必須の役割を果たすグルタチオン S-転移酵素 (GST) *noppera-bo (nobo)* を同定した<sup>[1]</sup>。 *nobo* は、昆虫ステロイドホルモンであるエクジソンの合成の原材料となるコレステロールを細胞内への取り込む、あるいは輸送する際に働く遺伝子として同定された。一方、過去10年間の研究から、ステロイドホルモン合成には動物界を通じて保存された酵素ファミリーが関与していることが明らかになってきている。ヒトにおいては、GST A3-3 が *Nobo* と同様にステロイドホルモン合成に関与することがわかっている<sup>[2]</sup>。このことから、GST ファミリーに属する遺伝子は動物界を通じてステロイドホルモン合成に関わる可能性が考えられた。この可能性を検証する目的で私は、線虫 *Caenorhabditis elegans* を研究対象として、線虫ステロイドホルモンであるダファクロン酸 (Dafachronic acid, DA) の合成経路にも GST が機能するのかを追究した。線虫ゲノムには47種の GST 遺伝子が見つかっている。しかし、昆虫 *Nobo* や哺乳類 GSTA3-3 と真にオーソログな分子は予測されておらず、線虫のいずれかの GST が DA 合成経路で機能するかどうかは未だ確認されていない。そこで、追究の第1歩として私は、DA 依存的な線虫寿命の調節に影響を与える GST 遺伝子のスクリーニングを行い、DA 合成経路に関与する GST の同定を目指した。



スクリーニングに用いた線虫 *glp-1(ts)* は、温度感受性変異体であり、制限温度下で生殖腺が正常に発生できない系統である。生殖腺の発達しない *glp-1(ts)* 突然変異株の寿命は、野生型と比べて約60%長いことが知られている<sup>[3]</sup>。つまり、線虫の寿命は生殖腺の発生と密接に関わっている。更に多くの先行研究から、DA 合成酵素をコードする *daf-9* 遺伝子や *daf-36* 遺伝子の機能を落とすと、生殖腺を失ったことによる寿命延伸の現象は打ち消されてしまうという結果も得られている<sup>[4,5]</sup>。また、*glp-1(ts);daf-9* や *glp-1(ts);daf-36* の二重変異体に DA を与えると、寿命延伸の回復が見られる。以上の結果から、DA は生殖腺がない状況下で成虫の寿命延伸に必須である。

こうした事実から、GST が DA 合成経路に関与するならば、GST の機能を落とした際に *glp-1(ts)* の寿命延伸が抑制されることが予想される。この原理に従って、以下の方法で実験を行った。

## 材料・方法

## (1) RNAi 処理

RNAi の誘導には、線虫実験で広く用いられているフィーディング RNAi 法を利用した<sup>[6]</sup>。本研究では、RNAi のターゲット遺伝子として、*gst-5*, *gst-16*, *gst-28*, *gst-29*, *gst-37*, *gst-32*, *gst-41*, *gst-42*, *gst-43*, Y53G8B.1, F56A5.4 の11種に着目した。この11種の遺伝子は、BLAST 検索をした際に哺乳類 GSTA3-3 とタンパク質の1次配列の類似性が高かったものである。これらの GST 遺伝子をターゲットにするための二重鎖 RNA 発現用プラスミドは、本学 TARA センターの深水昭吉教授から分与いただいた。二重鎖 RNA を発現させるための大腸菌株として HT115 を用いた。

## (2) 寿命測定

*glp-1(ts)* は本学 TARA センター深水研究室より分与いただいた。線虫を同調処理した後、大腸菌 OP-50 をまいた寒天培地 (NGM) プレート上で、制限温度である 25°C で 36 時間飼育し、生殖腺発達を抑制した4齢幼虫 (L4) を得た。その後、20°C で 15 時間飼育し、成虫にした。HT115 をまいたプレートに成虫を移し、20°C で飼育、2 日おきに生存数をカウントした。この際、陰門から内臓が飛び出してしまう個体や、プレートの側面に上り乾燥して死亡した線虫はカウントに含めないこととした。実験のコントロールとして、空ベクター (L4440) 発現大腸菌および *daf-9* RNAi 発現大腸菌を与えた際の寿命を測定した。

## 結果と考察

まず私は、*glp-1(ts)* 突然変異株を用いた網羅的 RNAi のための実験系を確立した。すなわち、*daf-9* 遺伝子に対する RNAi をポジティブコントロールとして、種々の飼育条件を最適化することに成功した。この見出した条件を元に、11種の GST 遺伝子 (上述) それぞれに対する RNAi を誘導した *glp-1(ts)* 突然変異株の寿命を検討中である。

ステロイドホルモンは、多くの生物に共通して存在する必須分子である。本研究を通じて、ステロイドホルモンの合成経路に関わる遺伝子の進化的共通性を明らかにすることができれば、生物発生の根本原理への理解につながるものと期待できる。

## 参考文献

- [1] 塩谷 (2011) 修士論文
- [2] Johansson et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 33061-33065
- [3] Arantes-Oliveira et al. (2002) *Science* 295: 502-505
- [4] Gerisch et al. (2001) *Dev. Cell* 1: 841-851
- [5] Rottiers et al. (2006) *Dev. Cell* 10: 473-482
- [6] Kamath et al. (2003) *Nature* 421: 231-237