

線虫 *C. elegans* の寿命の制御におけるグルタチオン S-転移酵素ファミリーの関与の検討

諸橋 香奈 (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

我々ヒトを含むほとんどすべての動物の発生と成長、そして代謝の調節や恒常性の維持に深く関係している生理活性物質として、ステロイドホルモンがよく知られている。ステロイドホルモンは、コレステロールを出発材料として、様々な酵素による多段階反応を経て生合成される。最近、私が所属する研究室において、グルタチオン-S-転移酵素 (GST) ファミリーに属する分子 Noppera-bo が、昆虫ステロイドホルモン生合成に必須の酵素として同定された[1]。GST は、グルタチオンというトリペプチドを基質に付加する活性を持つ酵素であり、昆虫だけでなく、哺乳動物のステロイドホルモン生合成過程においても内在性中間体の生成に関与することが報告されている[2]。

一方、過去 10 年間の研究から、ステロイドホルモン生合成に関わる酵素ファミリーの多くは、動物界を通じて共通していることが明らかにされている。このことから私は、GST ファミリーも動物界で保存されており、昆虫と哺乳動物以外の動物においてもステロイドホルモン生合成過程に関与するという可能性に関心を持った。そこで私は、線虫 *Caenorhabditis elegans* を実験材料として、線虫ステロイドホルモンであるダファクロン酸 (DA) の生合成経路にも GST が関与するのかを追求した (図 1)。

先行研究において、DA は線虫の寿命に関与することが知られている。また DA による寿命の制御においては、生殖細胞系列の組織が重要な関与をすることが報告されている[3][4]。生殖細胞を失った線虫は、野生型と比較して寿命の延伸が見られるが、この延伸は DA 生合成経路で働く遺伝子を欠損させると打ち消される。こうした先行研究の結果は、生殖細胞からの寿命延伸シグナルの効果が線虫体内で生合成される DA を必要とすることを意味する。私はこの事実を踏まえ、ある特定の *gst* 遺伝子の機能を低下させたときに、生殖細胞を失った線虫の寿命の延伸が打ち消されれば、この *gst* 遺伝子が DA の生合成経路に関わる候補遺伝子と言えると考えた。そこで、制限温度下で生殖腺が正常に発生できない系統である温度感受性変異株 *glp-1(ts)* を用い、DA 依存的な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[5]。RNAi のターゲット遺伝子を選択する際に、ブートストラップ法によってショウジョウバエとヒト、そして線虫の GST タンパク質のアミノ酸配列で系統樹を作成したところ、明瞭なオーソログが存在しなかった。そこで私は、DA 生合成経路に関わる *gst* 遺伝子の候補を探索するために、すべての線虫 *gst* 遺伝子を対象とした、網羅的な表現型解析を行うことにした。線虫ゲノムに存在する 49 個の *gst* 遺伝子のうち、34 個の遺伝子に対する二重鎖 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。残り 15 個

の遺伝子のうち、12 個の遺伝子に対する二重鎖 RNA プラスミドは新たに作製した。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

線虫を同調処理した後、46 個の *gst* 遺伝子に対する二重鎖 RNA プラスミドを導入したそれぞれの HT115 を、Ampicilin と IPTG を加えた LB プレートの表面に塗り、その上で *glp-1(ts)* を 1 齢幼虫から飼育した。この際、制限温度である 25°C で 36 時間飼育した後、20°C で 15 時間飼育して成虫にし、2 日に 1 回生存数をカウントした。ネガティブコントロールとして、空ベクター (L4440) 導入大腸菌を摂食させた *glp-1(ts)* の寿命を測定した。ポジティブコントロールとしては、DA 生合成酵素遺伝子 *daf-9* に対する RNAi を誘導した *glp-1(ts)* の寿命を測定した。

結果・考察

線虫の生存経路を使った RNAi での寿命アッセイは世界でもあまり例がない。今回私は、寿命アッセイに適した条件を検証し、RNAi 処理をし始めるタイミングを 1 齢幼虫からと統一することで、非常に安定した再現性のよい寿命曲線が得られることを明らかにした。そして、線虫のゲノムに存在する独立した 49 個の *gst* 遺伝子のうち、46 個の *gst* 遺伝子に関する寿命アッセイを実施し、DA 生合成経路に関わる有力な候補遺伝子を見出した。この他に見つかった、*daf-9* の機能低下個体と挙動は異なるが、機能低下によって寿命に変化が見られた *gst* 遺伝子と共に、今後更なる検討を重ねる予定である。

今回 DA 生合成経路に関わる有力な候補遺伝子が得られたことにより、ステロイドホルモン生合成経路において、GST ファミリーも動物界を通じて進化的に保存されていることが強く期待される。また私の研究成果は、ステロイドホルモン生合成に関わる酵素ファミリーの新たな進化的保存性を明らかにし、生体内で機能するホルモンの機能と進化に対し、新たな視点を与えるものである。

参考文献

- [1] 塩谷(2012) 修士論文
- [2] Johansson et al. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 33061-33065
- [3] Hsin et al. (1999) *Nature*, 399, 362-366
- [4] Rottiers et al. (2006) *Dev. Cell*, 10, 473-482
- [5] Fraser et al. (2000) *Nature*, 408, 325-330

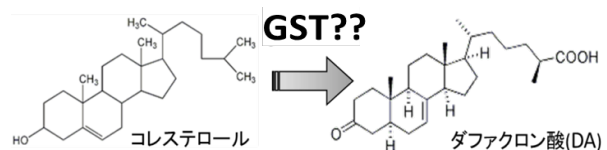


図 1. ダファクロン酸 (DA) 生合成経路