

長寿遺伝子を介した線虫のホルミシス効果の解析

菅原 賢也 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 坂本 和一 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

細胞や生物個体は、強いストレスを受けるとタンパク質の変性や細胞死を起こすのに対し、弱いストレスに対しては生理作用の活性化が起こり、そのストレスに対しての抵抗性を得る。このような現象をホルミシス効果という。

これまでに、ホルミシスを起こした生物では、ヒートショックファクターやヒートショックプロテインなどのストレス応答性の遺伝子の活性化が報告されている。

一方、長寿遺伝子は古くは酵母、線虫、ショウジョウバエで発見され、現在では相同な遺伝子の一つである FoxO などがヒトを含む高等動物でも幅広く発見されている。この遺伝子を活性化することで様々な生理作用が活性化し、寿命が延伸することが報告されている。

モデル生物として知られる線虫 (*C. elegans*) は、通常 20°C の環境で寒天培地を用いて培養するが、35°C の強い熱ストレス環境下では 18 時間程度しか生存することができない。そこで、本研究では、ホルミシスを起こさせるストレス源として 30°C の弱い熱ストレス刺激を用いた。本研究は、線虫を弱い熱ストレスに曝すことで、長寿遺伝子を介したホルミシス効果が得られるかどうかを解析することを目的とした。

【方法】

本研究では弱い熱ストレスに曝すことを「プレトリートメント」と称した。また、いずれの実験も発生段階を揃えるため、NaClO により成虫を破碎、卵を回収した後、S-basal で 18 時間培養(同調処理)した線虫を用いた。同調処理後、96 時間経過した線虫を成虫期とした。

(1) 熱ストレス耐性の測定

30 分、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした成虫期の野生型線虫(N2)を 35°C の熱ストレスに曝し、10 時間経過後から 2 時間おきに生存個体数を測定した。また、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした欠損変異体(*daf-16*)を用いて同様の実験を行った。

(2) 運動性能維持の測定

成虫期の線虫に毎日 2 時間プレトリートメント処理をして、スラッシング運動回数を 3 日毎に測定した。また、幼虫期の線虫に対して 30 分、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした後、スラッシング運動回数を 3 日おきに測定した。

(3) 欠損変異体を用いた寿命の測定

30 分、1 時間、4 時間のプレトリートメント処理をした成虫期の線虫(N2 及び *daf-16*)を 2 日毎に観察し、生存個体数を測定した。線虫の生殖機能を阻害するために同調処理後 72 時間、96 時間後に DNA 合成阻害剤である FUDr を添加した。

【結果】

- (1) プレトリートメント処理をした線虫では生存率が上昇していた。また、4 時間プレトリートメントしたものが最も効果が高かった。欠損変異体を用いた実験でも同様に 4 時間プレトリートメントしたものが最も効果が高かった。
- (2) プレトリートメント処理をした線虫はしなかった線虫と比べてスラッシング回数の減少が抑えられた。また、幼虫期の線虫に対して行った実験では、4 時間プレトリートメントしたものが最も効果が高かった。
- (3) 野生型においてプレトリートメント処理をした線虫としなかった線虫の寿命に変化はなかった。また、欠損変異体を用いた実験でも同様に寿命に変化はなかった。

【考察と今後の予定】

本実験の結果から、弱い熱ストレス刺激は線虫の熱ストレス抵抗性を上昇させた(ホルミシス効果)。また、プレトリートメントは 30 分や 1 時間処理した場合よりも 4 時間処理した場合の方が効果が高かったことから、長時間のプレトリートメント処理の方がより効果的であると考えられる。また、線虫は老化により運動性能が減少していくが、プレトリートメント処理した線虫はその現象が抑えられていることから、プレトリートメント処理には一種の抗老化作用があると考えられる。

長寿遺伝子が活性化した線虫では、ストレス耐性の上昇、運動性能の維持、寿命の延伸などの効果が報告されていることから、プレトリートメント処理をした線虫では長寿遺伝子が活性化していることが予想される。

本実験の結果から、熱ストレス耐性が上昇していたため、熱ストレス耐性に関わる遺伝子の上位に存在する長寿遺伝子の *daf-16* に注目したが、欠損変異体を用いた実験と野生型の実験の結果に差がなかったことから、ホルミシス効果には *daf-16* は関係していないと考えられる。今後はその他の長寿遺伝子が活性化されているかどうかを確認し、更には活性化した長寿遺伝子の同定を検討している。

また、(2)の実験で幼虫期の線虫にプレトリートメント処理をしたものでも成虫段階の運動性能が維持されていたことから、幼虫期の遺伝子活性が成虫期でも維持されているか qRT-PCR を用いた測定を検討している。