

氏 名	おお ぐま さだ つぐ 大 隈 貞 嗣
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 27 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	生命科学 研究科 統合生命科学 専攻
学位論文題目	線虫 <i>C. elegans</i> における寿命制御遺伝子の同定と解析

論文調査委員 (主査) 教授 西田 栄介 教授 竹市 雅俊 教授 上村 匡

### 論 文 内 容 の 要 旨

老化,あるいは寿命といった現象は多細胞生物,特に動物においては極めて重要かつ基本的なものであるが,その分子メカニズムは長らく解明されていなかった。しかし近年,線虫 *C. elegans* において,野生型と比べ寿命が2~3倍延長する寿命変異体が発見され,遺伝学的,分子生物学的な解析が進んできた。*C. elegans* においては, *insulin/IGF-1* レセプターホモログである *DAF-2* における変異が寿命を延長することが分かっている。*DAF-2* の下流には現在, *AGE-1*, *PDK-1*, *AKT-1/2* などの分子が知られており,これらのシグナルカスケードは最終的にフォークヘッドタイプの転写因子である *DAF-16* をリン酸化し,核外に留めることによってその転写活性を抑制するとされている。最新の研究によればこのシグナル経路はショウジョウバエおよびマウスにおいても保存されており,動物全般において個体寿命の制御に関与している可能性がある。

申請者は *C. elegans* においてこの転写因子 *DAF-16* が制御する下流の遺伝子を探索,解析した。*DAF-16* は, DNA 上の DBE (*DAF-16 binding element*) と呼ばれる配列に結合することが知られており,申請者はまず *C. elegans* のゲノム上に存在する DBE をデータベースを用いて検索し,プロモーター上の位置や哺乳類遺伝子との相同性などを考慮して159の *DAF-16* 下流候補遺伝子を得た。これらの遺伝子について *daf-2*, *daf-16* の各変異体間での発現を RT-PCR 法によって比較し,発現に差が認められる20の遺伝子を得た。さらに N2 (野生型), *daf-2*, *age-1*, *daf-16* の各系統における発現を検討した結果, *DAF-16* 下流因子として既に知られていた *sod-3* に加え, *scl-1* および *bml-1* という新規の遺伝子が *daf-2*, *age-1* において常に高い発現を示し, *daf-16* において低い発現を示すことがわかった。申請者はまず *scl-1* に関する解析を行なった。*scl-1* は N 末端にシグナルペプチドを持っており,分泌性の蛋白質であることが予想された。*scl-1* は長寿変異体 *daf-2*, *age-1* で高い発現を示すだけでなく,熱や starvation といったストレスによって発現誘導されることを示した。また RNAi 法によって *scl-1* を阻害すると, *daf-2* 及び N2 の寿命が短縮し,ストレス耐性も減少することを明らかにした。*scl-1* は老化に伴って発現が高くなっており,新たな抗老化因子である可能性が高い。

次に *bml-1* に関する解析を行なった。*bml-1* は  $\beta$ -カロテンモノオキシゲナーゼの *C. elegans* ホモログである。*bml-1* は *daf-2*, *age-1* で高い発現を示し, *daf-16* では特に弱い発現しか見られなかった。*bml-1* の RNAi による阻害実験は *daf-2*, N2 の寿命を短縮し,熱やパラコートによる酸化ストレスへの耐性を減少させることを見出した。さらに, *bml-1* 過剰発現の系統 *bml-1::GFP* を作製した。GFP の蛍光の観察から, *bml-1* は腸,咽頭,神経において発現していることが明らかとなり,また *bml-1::GFP* はコントロールより寿命やストレス耐性が延長していることを見出した。これらの結果から, *bml-1* が *daf-16* の下流において寿命やストレス耐性を正に制御していることを示した。さらに, *bml-1* と  $\beta$ -カロテンとの関係を検討した。餌に  $\beta$ -カロテンを添加することで, *C. elegans* において *bml-1* の発現が増大することが明らかとなった。また *daf-16* においてはこの効果が弱かったことから,  $\beta$ -カロテンによる発現誘導は *DAF-16* を介している可能性が示唆された。また,  $\beta$ -カロテンを添加した餌を与えることで N2 の寿命が延長することを見出した。この寿命延

長は *daf-16* では観察されなかったため、 $\beta$ -カロテンの効果は *daf-16* に依拠している可能性が高い。さらに  $\beta$ -カロテン添加によって *C. elegans* において *daf-16* の転写量が上昇していること、また *bml-1* RNAi によって *daf-16* の転写が抑制されることを明らかにした。

#### 論文審査の結果の要旨

老化および寿命の制御は動物において極めて重要かつ基本的な生命現象であるが、解析の困難さにより長らくその分子メカニズムについては不明であった。だが近年線虫 *C. elegans* において野生型の2～3倍の長寿を持つ寿命変異体が発見され、遺伝学、分子生物学による解析が進んできた。*C. elegans* においては、*insulin/IGF-1* レセプターホモログである *DAF-2* における変異が寿命を延長することが分かっている。*DAF-2* の下流には現在、*AGE-1*、*PDK-1*、*AKT-1/2* などの分子が知られており、これらのシグナルカスケードは最終的にフォークヘッドタイプの転写因子である *DAF-16* をリン酸化し、核外に留めることによってその転写活性を抑制するとされている。最近の研究によればこれと同様のシグナル経路はショウジョウバエやマウスにおいても見い出されており、いずれも寿命やストレス耐性に関与していることが明らかになっている。申請者は *C. elegans* において *DAF-16* の下流を探索することで、これら寿命制御のメカニズムについて新たな知見が得られるとの見通しから以下の研究を行なった。

本論文において、申請者はまず転写因子 *DAF-16* の結合配列 DBE (*DAF-16 binding element*) に注目し、*C. elegans* ゲノムからこれを探索することで下流因子候補のスクリーニングを行なった。その結果20の下流遺伝子候補を得たが、このうち19は今回新たに見い出されたものである。また申請者はその中から *scl-1* および *bml-1* と呼ばれる遺伝子について解析を行なった。申請者は *scl-1* の発現が長寿変異体と野生型において異なることを示し、*scl-1* の RNAi によって *C. elegans* の寿命および高温や UV などのストレス耐性が減少することを明らかにし、*scl-1* が *daf-16* の下流で寿命およびストレス耐性を正に制御している因子であることを示した。*scl-1* は分泌因子様の構造を持つ初めての *DAF-16* 下流因子である。また *bml-1* に関しても、長寿変異体での高い発現、および RNAi による発現阻害での寿命とストレス耐性の減少が明らかになった。また、*bml-1* は内在性のプロモーターを用いた過剰発現によって寿命とストレス耐性を延長する効果を持つことを示した。さらに、*C. elegans* において *bml-1* は  $\beta$ -カロテンを餌に添加することで発現が上昇することを示し、 $\beta$ -カロテン摂取が寿命を延長すること、またその効果には *daf-16* が必要であることを明らかにした。さらに、通常の *daf-16* の発現にも *bml-1* が必要であることを示した。

以上のように、本論文で述べられた成果は極めて重要であり、本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認められる。さらに、平成17年1月24日、論文内容とそれに関連した口頭試問の結果、合格と認めた。