線虫の寿命制御におけるコレステロールの役割

庵原 亜貴子

＜目次＞

・ 要旨 ……2

・ 略語 ……4

・ 序論 ……5

・ 材料と方法 ……9

・ 結果 ……13

・ 考察 ……38

・ 参考文献 ……43

・ 謝辞 ……48

＜要旨＞

コレステロールは、その血中量が死亡率に影響を与えることが知られており、寿命制御因子として注目を集めている。しかし、コレステロールが老化に直接どのような影響を与えるかについては未解明な点が多い。線虫は哺乳類と異なり体内でコレステロールを生合成できないため、培地中のコレステロール濃度を変化させることで、体内コレステロール量が寿命に与える影響を調べることができる。本研究において、私は線虫を用いてコレステロールが寿命に与える影響を調べ、コレステロールが食餌制限法の一種である断続的飢餓（IF）による寿命延長に重要な因子であることを見出だした。IF は自由摂食と飢餓を繰り返す食餌制限の方法であり、線虫からマウスに至る様々な動物で老化を遅延させ、寿命を延長させることが知られている。そこで、培地中のコレステロール濃度を増減させ、IF 下の寿命への影響を調べた。その結果、コレステロールを含まない培地で線虫を飼育することで、IF による寿命延長が著しく抑制されることを明らかにした。次に、コレステロールが飢餓による遺伝子の発現変化に及ぼす影響について、マイクロアレイを行い網羅的に調べた。その結果、転写因子 DAF-16 のターゲット遺伝子の飢餓による発現誘導に、コレステロールが必要であることを見出だした。更に、コレステロールは飢餓によって引き起こされる DAF-16 の核内移行を制御していることを明らかにした。線虫において、NAP-1 (nucleosome assembly protein-1) がコレステロールと結合し、コレステロール依存的に DAF-16 の転写活性を上昇させることが報告されていた。そこで、NAP-1 が DAF-16 の細胞内局在制御と IF による寿命延長に関与するかどうかを調べた。その結果、*nap-1* をノックダウンすることで、コレステロールの欠乏と同様に、飢餓による DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長が抑制された。さらに、コ

レステロール欠乏下において *nap-1* ノックダウンを行っても、DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長に対する更なる抑制効果は見られなかった。これらの結果から、コレステロールは少なくとも部分的には NAP-1 と同じ経路を介して、DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を制御していることが示唆された。本研究は食餌制限法の一種である IF による寿命延長においてコレステロールが重要な役割を担っていることを示し、そのコレステロールによる寿命制御メカニズムの一端を解明したものである。

＜略語＞

AL: ad libitum

DA: dafachronic acid

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

GFP: green fluorescent protein

GO: gene ontology

IF: intermittent fasting

LB: Luria Broth

NGM: nematode growth medium

PCR: polymerase chain reaction

PBS: phosphate-buffered saline

RNAi: RNA interference

sDR: solid dietary restriction

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

YA: young adult

＜序論＞

老化のメカニズムを解明し、寿命の延長を実現するために古くから様々な研究が行われてきた。これまでの研究で老化は様々なシグナル伝達経路や転写因子によって制御されることが明らかになっており、特にインスリン/IGF-1 シグナル伝達経路による老化の制御は線虫からマウスに至る様々な生物で保存されていることがよく知られている。線虫においては、1988 年に *age-1* (PI3K)変異体が長寿変異体として同定され (Friedman and Johnson 1988a; Friedman and Johnson 1988b)、更に 1993 年には 2 倍以上寿命が延長する変異体として *daf-2* (インスリン/IGF-1 受容体) 変異体が報告された (Kenyon et al., 1993)。これらの変異体の寿命延長には、インスリン/IGF-1 シグナル伝達経路のエフェクターである FOXO 転写因子 DAF-16 が必要であることが知られている(Lin et al., 1997; Ogg et al., 1997)。DAF-2 の機能低下によって DAF-16 の核内移行が促進され、DAF-16 のターゲット遺伝子の転写が誘導されることでストレス耐性の上昇や寿命の延長が起こる (Kenyon 2010; Lee et al., 2001; Lin et al., 2001; Murphy et al., 2003) (図 1)。

一方、食餌制限は遺伝子を操作することなく後天的に老化を遅延させる方法であり、様々な生物で寿命を延長させることが知られている。食餌制限には、慢性的なカロリー制限を行う方法、カロリーは変化させずにアミノ酸などの特定の栄養素のみを摂取する方法、自由摂食と飢餓を繰り返す断続的飢餓（IF）の方法などがあり、いずれの方法もマウスの寿命を延長することが知られている(Masoro 2005)。このうち IF は 2〜4 日毎に 1 日、餌を与えずに飢餓状態におく日を作る食餌制限法であり、マウスやラットにおいて寿命の延長や疾病の抑制が見られることが報告されている (Anderson et al., 2009; Anson et al., 2003; Carlson and Hoelzel 1946; Fontana and Klein 2007; Goodrick et al., 1990)。一方、線虫におけ

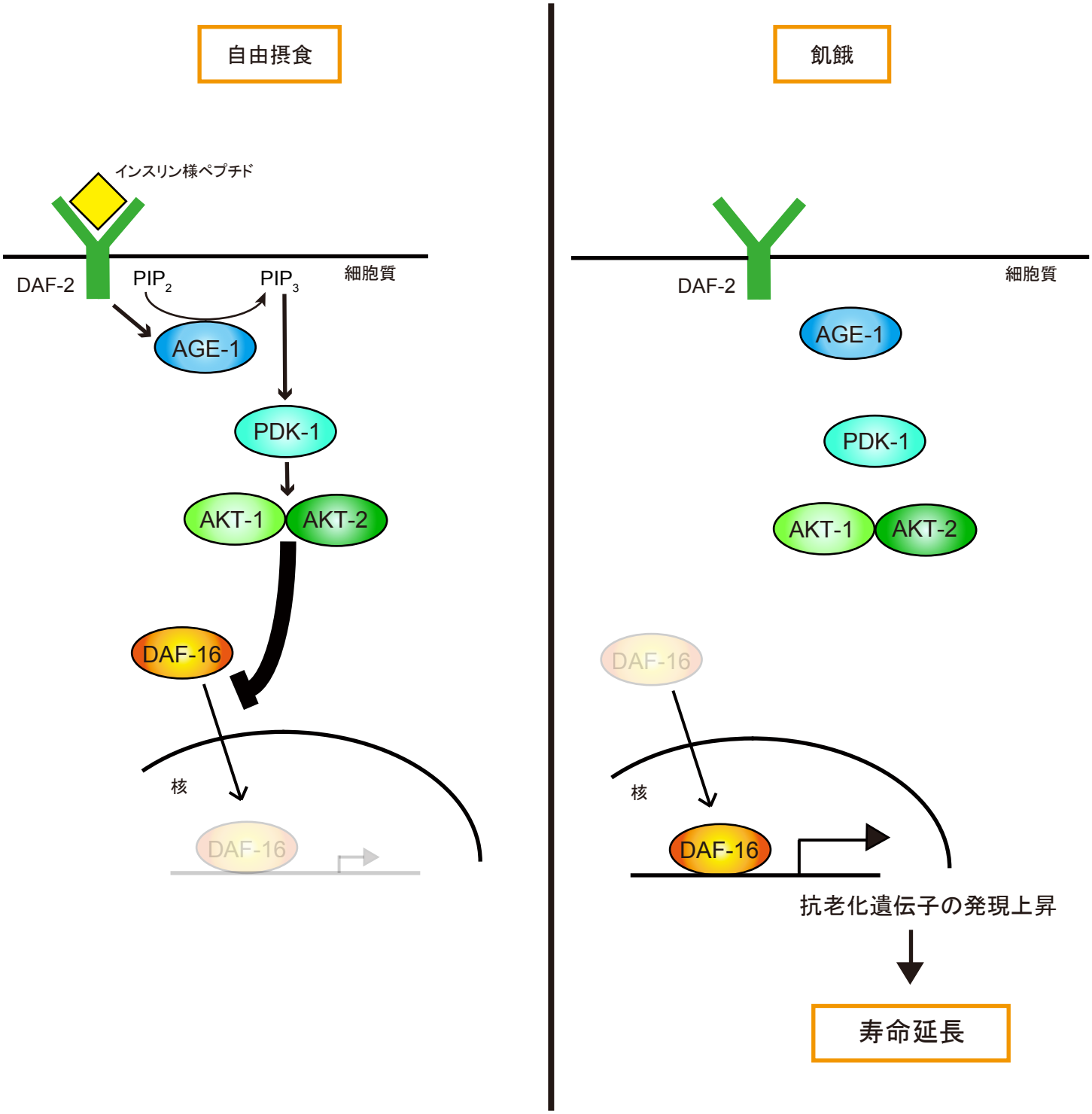

図１　インスリン /IGF-1 シグナル伝達経路は寿命を制御する

自由摂食下の線虫は、インスリン /IGF-1 受容体である DAF-2 にリガンドが結合しており、AGE-1、PDK-1、AKT-1/2 を介して転写因子 DAF-16 の核内移行が抑制される。飢餓等の環境ストレスにさらされると、DAF-16 が核内に移行し、抗老化遺伝子の発現が上昇することで、寿命の延長が促される。

る食餌制限の方法は、餌の大腸菌の摂食に異常をきたす *eat-2* 変異体を用いる方法 (Lakowski and Hekimi 1998)、餌の大腸菌を薄く希釈して用いる sDR の方法 (Greer et al., 2007)、発生完了後から死ぬまで餌の大腸菌を一切与えない方法 (Kaeberlein et al., 2006; Lee et al., 2006)、2 日間の自由摂食と 2 日間の飢餓を繰り返す IF の方法 (Honjoh et al., 2009) 等があり、いずれも線虫の寿命を延長させることが報告されている。sDR による寿命延長には AMPK や DAF-16 が必要であるが、sDR は DAF-16 の核内移行を引き起こさないという事が報告されている (Greer et al., 2007)。一方、IF は sDR よりも効果的に寿命を延長することができることが報告されている (Honjoh et al., 2009)。この IF による寿命延長には DAF-16 や RHEB-1、KGB-1 といった因子が必要であること、そして DAF-16 の核内移行が重要であることが明らかになっている (Honjoh et al., 2009; Uno et al., 2013)。

コレステロールは、細胞膜の構成物質として膜の流動性やイオン透過性を制御する働きや、ステロイドホルモンやビタミン D、オキシステロール、胆汁酸等の前駆体としての働き等の様々な生命現象を担う、生物にとって重要な物質である。線虫は哺乳類と異なりコレステロール合成酵素を持たず、コレステロールを培地等の外界から摂取する必要がある。このため、体内コレステロール量を変化させてその影響を調べるのが容易である。線虫において、コレステロールの欠乏は発生や寿命に影響を与えることが知られている。発生への影響については、コレステロールの欠乏によって生殖腺の形成や脱皮、耐性幼虫期への移行に異常が生じることが報告されており、コレステロールから合成されるステロールやステロイドホルモンが重要であることが分かっている (Matyash et al., 2004; Shim et al., 2002) 。一方、寿命への影響については、親世代からコレステロールの無い環境で育った線虫や、完全にコレステロールを抜き去った培地

で卵から育った線虫は、寿命が短縮することが報告されている (Cheong et al., 2011; Jeong et al., 2010; Magner et al., 2013; Merris et al., 2004)。また、コレステロールから合成される線虫ステロイドホルモン dafachronic acid（DA）は、生殖腺幹細胞の欠失による寿命延長に必要であることが報告されている (Shen et al., 2012; Yamawaki et al., 2010)。生殖腺幹細胞の欠失によって体内の DA 量が増加し、核内ホルモン受容体である DAF-12 を介して DAF-16 を活性化させることで寿命が延長するということが分かっている (Shen et al., 2012; Yamawaki et al., 2010)。さらに近年、線虫においてコレステロール結合タンパク質として NAP-1 (nucleosome assembly protein-1; NSBP-1 とも呼ばれる) が同定された (Cheong et al., 2013)。その研究において、NAP-1 がコレステロール依存的に DAF-16 に結合する事、*daf-2* 変異体における *nap-1* ノックダウンによって寿命、酸化ストレス耐性、DAF-16 ターゲット遺伝子の発現等が抑制される事が報告された (Cheong et al., 2013)。

本研究では、コレステロールの欠乏が線虫の寿命、特に食餌制限下での寿命にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、コレステロールが IF による寿命延長に重要な因子であることを見出だした。また、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、コレステロールがインスリン/IGF-1 シグナル伝達経路を制御していることを明らかにした。さらに、コレステロールがインスリン/IGF-1 シグナル伝達経路のエフェクターである DAF-16 の飢餓による核内移行を制御していることが分かった。加えて、コレステロールが少なくとも部分的には、NAP-1 を介して飢餓による DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を制御していることを明らかにした。

＜材料と方法＞

【線虫 *C. elegans* の株】

線虫 *C. elegans* の各株、N2, *daf-16(mu86)* (2), *daf-12*(*m20*) (2), *daf-2*(*e1370*) (2), TJ356 *zIs356*[*daf-16::gfp; rol-6*] (2)は Caenorhabditis Genetic Center (CGC)から分与していただいた。括弧内の数字はアウトクロスの回数を示す。

【培地】

線虫は通常、NGM プレート（3 g/l NaCl、3 g/l ペプトン、20 g/l アガー、5 μg/ml コレステロール、1 mM $MgSO_4$、1 mM $CaCl_2$、25 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0)、250 μg/ml ストレプトマイシン）で、大腸菌 OP50 を餌として 20°C で飼育、継代を行った (Brenner 1974)。通常の NGM プレートは、エタノールに溶解した 5 mg/ml のコレステロールを、終濃度が 5 μg/ml になるように加えて作製するが、コレステロールを含まないプレートは、コントロールと等量のエタノールのみを加えて作製した。ただし、20 μg/ml、50 μg/ml のコレステロール濃度のプレートを用いた際は、50 μg/ml のコレステロール濃度の培地にエタノール濃度を合わせた。より厳密にコレステロールを抜いた実験（図４）の培地では、20 g/l アガーの代わりに 17 g/l アガロースを使用し、培地に加えるペプトンはエーテル抽出してコレステロールを除去した (Merris et al., 2003)。更に、線虫の餌に用いる OP50 は LB の代わりに DMEM を用いて培養した (Matyash et al., 2004)。β-エストラジオールとプレグネノロンはコレステロールと同様にエタノールに溶解した 5 mg/ml の溶液を終濃度 5 μg/ml になるように加えた。Dafachronic acid (DA) は、エタノールに溶解した 1 mM DA を PBS で 100 倍に希釈し、OP50 を撒いたプレート上に 100 μl ずつ撒いて使用した (Yamawaki et al., 2010)。コントロール

には、エタノールのみを同様に希釈したものを用いた。

【寿命測定】

200 µg/ml の 5' fluoro-2' deoxyuridine (FUDR)を含む NGM プレートに、大腸菌 OP50 もしくは HT115 (RNAi 時)を撒き、同期して 3 日後の young adult (YA) の線虫を移した。その日を 0 日とし、2 日目に線虫を自由摂食を行うグループと断続的飢餓を行うグループに分けた。自由摂食を行う線虫は、UV 処理した 5×10^9 bacteria/ml の OP50 を餌にして飼育した。断続的飢餓を行う線虫は、2 日間の飢餓と 2 日間の自由摂食を繰り返した。1 枚のプレートには約 30 匹の線虫を乗せた。2 日毎に、物理的刺激に対する反応の有無で生死判定を行い、生きていた線虫は新しいプレートに移しかえた。p 値は log-rank (Mantel-Cox) test で GraphPad Prism 6 (GraphPad Software)を用いて計算した。

【RNAi】

RNAi は大腸菌 HT115 に目的の遺伝子の dsRNA の発現を誘導し、その大腸菌を線虫に食べさせることで行った (Kamath et al., 2000)。*nap-1* の cDNA の最初の 500 ヌクレオチドを RNAi に用いた。*nap-1* cDNA をベクターに入れるためのプライマーは以下の配列のものを用いた。

nap-1 left: 5'-AAAAGATCTATGGCTGATCAAGAGCATATTG-3'

nap-1 right: 5'-AAACTGCAGGTATGGGTTGGTGGCAAAGTG-3'

【qRT-PCR】

トータル RNA は TRIzol (Invitrogen)を用いて抽出し、cDNA への逆転写は QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen)を用いて行った。リアルタイム qPCR

は FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche)を用いて、ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)を使用して解析を行った。すべての遺伝子の発現量の値は *act-1* の発現量の値でノーマライズし、cholesterol (+) fed のサンプルの発現量を 1 とした。qPCR に使用したプライマーの配列は以下に示す。

act-1 left: 5'-CCCATCAACCATGAAGATCAA-3'

act-1 right: 5'-CACATCTGTTGGAAGGTGGA-3'

aqp-1 left: 5'-AGCTAGGATGTCAGGTGGTC-3'

aqp-1 right: 5'-CCAAGAGAAGCCACGAAAG-3'

dod-6 left: 5'-GTTTACACTTCCGCTGCTTG-3'

dod-6 right: 5'-AGTCTTTGGGCACTTGGAG-3'

fat-3 left: 5'-GTATCCAGCCAATTCTCG-3'

fat-3 right: 5'-GGAACAAGTGGTGCTCGATCTG-3'

hsp-12.6 left: 5'-TCAAAAGGGAGATGGAGTTG-3'

hsp-12.6 right: 5'-GAAGTTCTCCAATGTTCTTGAC-3'

sodh-1 left: 5'-CAAAGGTTACTTTCGACACCACTCC-3'

sodh-1 right: 5'-CTTGACAATTCCGCGGGTAACG-3'

sod-3 left: 5'-AGGAATGGTCCCACTTTTTG-3'

sod-3 right: 5'-TCTTCCAGTTGGCAATCTTC-3'

【マイクロアレイ】

コレステロールの有無それぞれに対して、自由摂食もしくは飢餓にさらした、計４条件のサンプルを用意し、マイクロアレイの実験を行った。線虫は同期を行った時にコレステロール有りもしくは無しの条件に分け、更に day 2 adult のステージに自由摂食もしくは飢餓の条件に分けた。そして、day 4 adult のステー

ジで RNA 抽出のために線虫を回収した。トータル RNA は TRIzol (Invitrogen)を用いて抽出した。抽出した RNA は PureLink RNA Micro Kit (Invitrogen)を用いて精製を行い、Agilent 2100 Bioanalyzer で RNA の品質をチェックした。マイクロアレイの手順は Affymetrix のプロトコルに従って行った。データは GeneSpring 12.5 GX (Agilent Technologies)にインポートして解析を行った。2 回の独立した実験を行い、RMA アルゴリズムを使用して 2 回の実験の平均値を解析に用いた。遺伝子群の重複の統計的有意差は、超幾何分布を用いて R で計算を行った。マイクロアレイのデータは National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) にデポジットした。(accession number, GSE51046)。

【DAF-16::GFP 局在の顕微鏡観察】

同期して 3 日後の YA の線虫を 200 µg/ml FUDR を含むプレートに移した。その後 day 2 adult ステージで、線虫を無処理のコントロールと 24 時間の飢餓 （図１０，１２）もしくは 37°C 20 分の熱ストレス（図１１）の条件に分けた。それぞれの条件の線虫は固定液 (4% paraformaldehyde in PBS) に入れて 3 分静置し、M9 buffer（42.3 mM Na_2HPO_4、22.1 mM KH_2PO_4、51.7 mM NaCl、1 mM $MgSO_4$、1% Gelatin)で 3 回洗浄してスライドガラス上に置き、Mowiol で包埋した後、Axioplan 2 imaging microscope (Carl Zeiss)で観察、撮影を行った。1 条件につき、約 50 匹の線虫の観察を行った。

＜結果＞

コレステロールの欠乏は断続的飢餓による寿命延長を抑制する

線虫はコレステロールを体内で生合成できないため、通常 5 µg/ml のコレステロールを含む培地で飼育する。コレステロールが寿命に与える影響を調べるため、コレステロールを含まない培地（図２A）や、20 µg/ml もしくは 50 µg/ml（図２B）のコレステロールを含む培地上における線虫の寿命を測定した。その結果、自由摂食（AL）下では、どの濃度においても 5 µg/ml のコレステロール存在下とほとんど同じ寿命を示した（図２A, B）。次に、培地中のコレステロール濃度が、食餌制限下における寿命に影響を及ぼすかどうかを調べた。食餌制限には様々な手法があるが、まず線虫において非常に効果的に寿命を延長することが報告されていた断続的飢餓（IF）の手法を用いて実験を行った (Honjoh et al., 2009; Uno et al., 2013)。20 µg/ml と 50 µg/ml のコレステロール濃度においては、IF 下における寿命に変化は見られなかったが（図２B）、コレステロールを含まない培地で線虫を飼育することによって、IF による寿命延長が抑制されることを見出だした（図２A）。この事から、コレステロールを欠乏させることで IF による寿命延長が抑制されることが明らかになった。これまでの研究で、コレステロールは線虫の正常な発生に必要であることが報告されている (Matyash et al., 2004; Merris et al., 2003; Shim et al., 2002)。実際に、卵から孵化する時からコレステロールを欠乏させた線虫は体長が小さくなっており、コレステロールの欠乏による IF の寿命延長の抑制は、幼虫期の発生異常によって引き起こされている可能性が考えられる。そこで、発生が完了した young adult (YA) の時期からコレステロールを欠乏させ、発生に異常が生じない条件下でコレステロールの欠乏が寿命にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、YA からコレステ

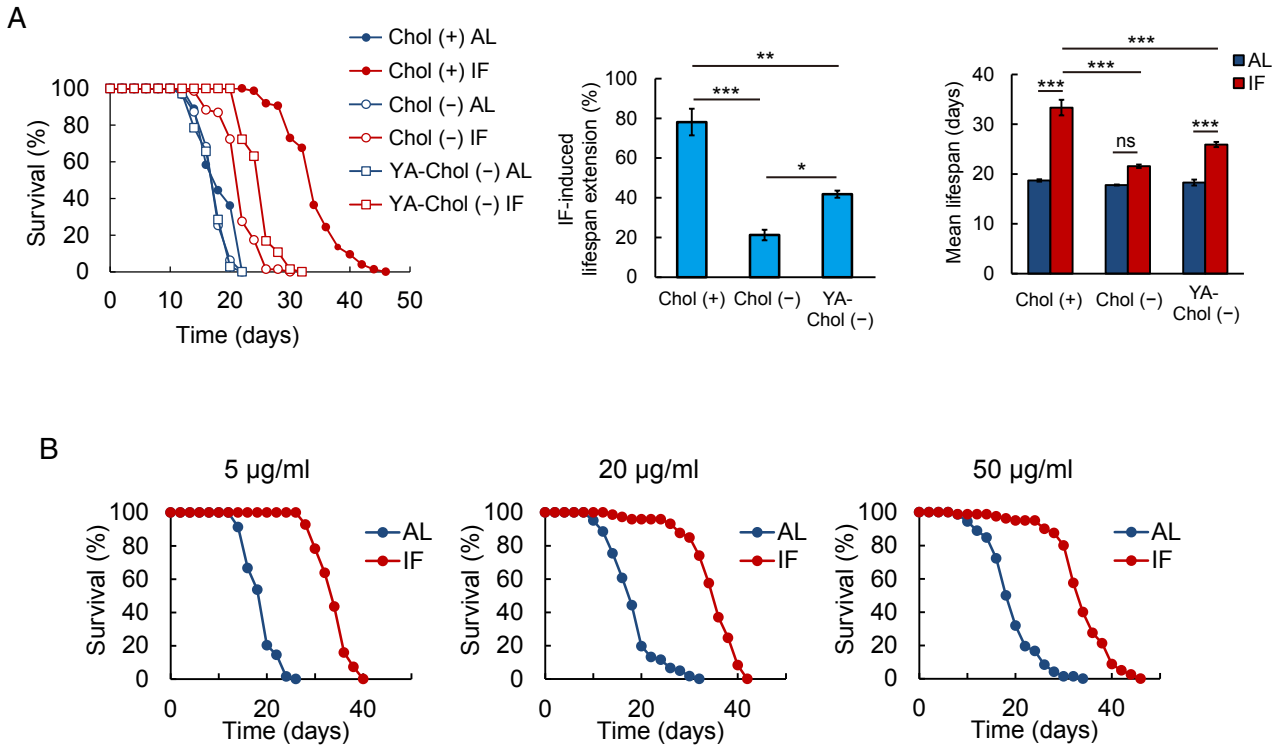

図２　コレステロールは断続的飢餓による寿命延長に必要である

(A) コレステロールの欠乏は断続的飢餓による寿命延長を抑制する。コレステロール有り（Chol (+)）、卵からコレステロール無し（Chol (−)）、YA からコレステロール無し（YA-Chol (−)）の条件における自由摂食 (AL) と断続的飢餓 (IF) 下での寿命曲線を示す（左図）。３回の独立した実験の断続的飢餓による寿命延長率（中央図）と平均寿命（右図）を示す。p 値は Tukey’ s test で計算し、ns は有意差無しを、* は $p < 0.05$ を、** は $p < 0.01$ を、*** は $p < 0.001$ を示す。エラーバーは標準誤差を示す。(B) 培地中のコレステロール濃度の増加は寿命を変化させなかった。5 μg/ml（通常濃度）、20 μg/ml、50 μg/ml における寿命曲線を示す。

ロールを含まない培地で飼育した場合にも、IF による寿命延長が抑制されることを見出だした（図２A）。この結果から、IF による寿命延長の抑制はコレステロールの欠乏による発生異常に起因するものではなく、成虫期の寿命を制御することで IF による寿命延長を抑制している可能性が示唆された。次に、その他の食餌制限法下における寿命への影響を調べるため、希釈した大腸菌 OP50 を餌に用いる solid DR (sDR)による寿命延長に、コレステロールの欠乏が影響を及ぼすかどうかを調べた。その結果、コレステロールの欠乏は sDR による寿命延長を抑制しなかった（図３）。

次に、IF による寿命延長に必要な最低限のコレステロール量を探索した。これまで用いていた培地には、ペプトンとアガーと餌の OP50 に由来するごく少量のコレステロールが含まれていたが、より厳密に培地からコレステロールを抜くために、この実験では培地に使用していたアガーをアガロースに変更し、ペプトンをエーテル抽出してコレステロールを抜き去り (Merris et al., 2003)、更にコレステロールを含まない培地中で OP50 を培養した (Matyash et al., 2004)。この厳密にコレステロールを抜いた培地に 0, 0.5, 1, 2,5, 5 μg/ml の濃度のコレステロールを加え、寿命を測定した。0 μg/ml の条件では、5 μg/ml に比べて AL 下での寿命の短縮が見られた（図４）。0, 0.5, 1 μg/ml の濃度では IF による寿命延長は見られず、5 μg/ml の時には IF によって有意に寿命が延長した（図４）。しかし、2.5 μg/ml の濃度では IF によって有意に寿命が延長した実験回と延長しなかった実験回が存在した（表３）。 以上の結果から、IF による寿命延長には 2.5 から 5 μg/ml の濃度のコレステロールが必要であることが示唆された。

β-エストラジオール、プレグネノロン、dafachronic acid は IF による寿命延長に関与しない

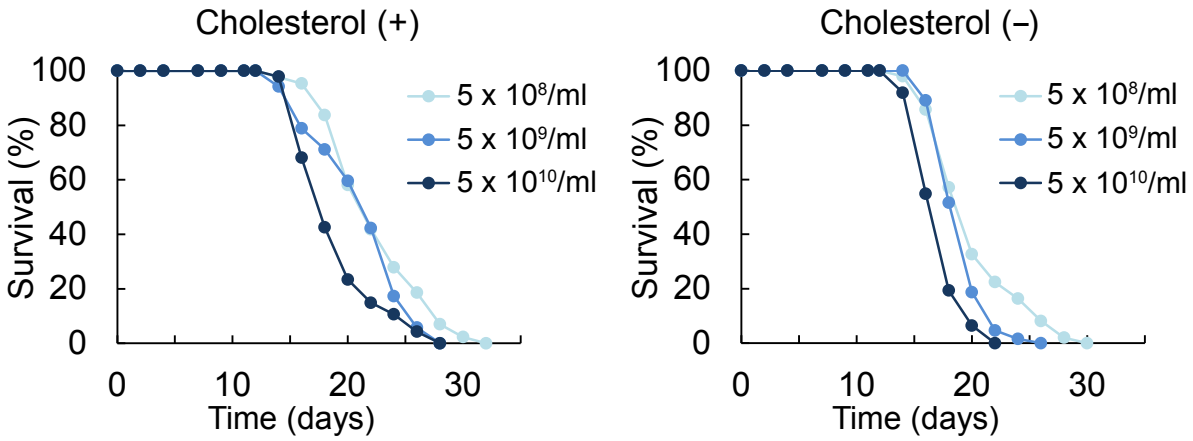

図３　コレステロールの欠乏は sDR による寿命延長には影響を与えない。

様々な濃度（5×10^8 bacteria/ml、5×10^9 bacteria/ml (通常濃度) 、5×10^{10} bacteria/ml）の OP50 でのコレステロールの有無における寿命曲線を示す。

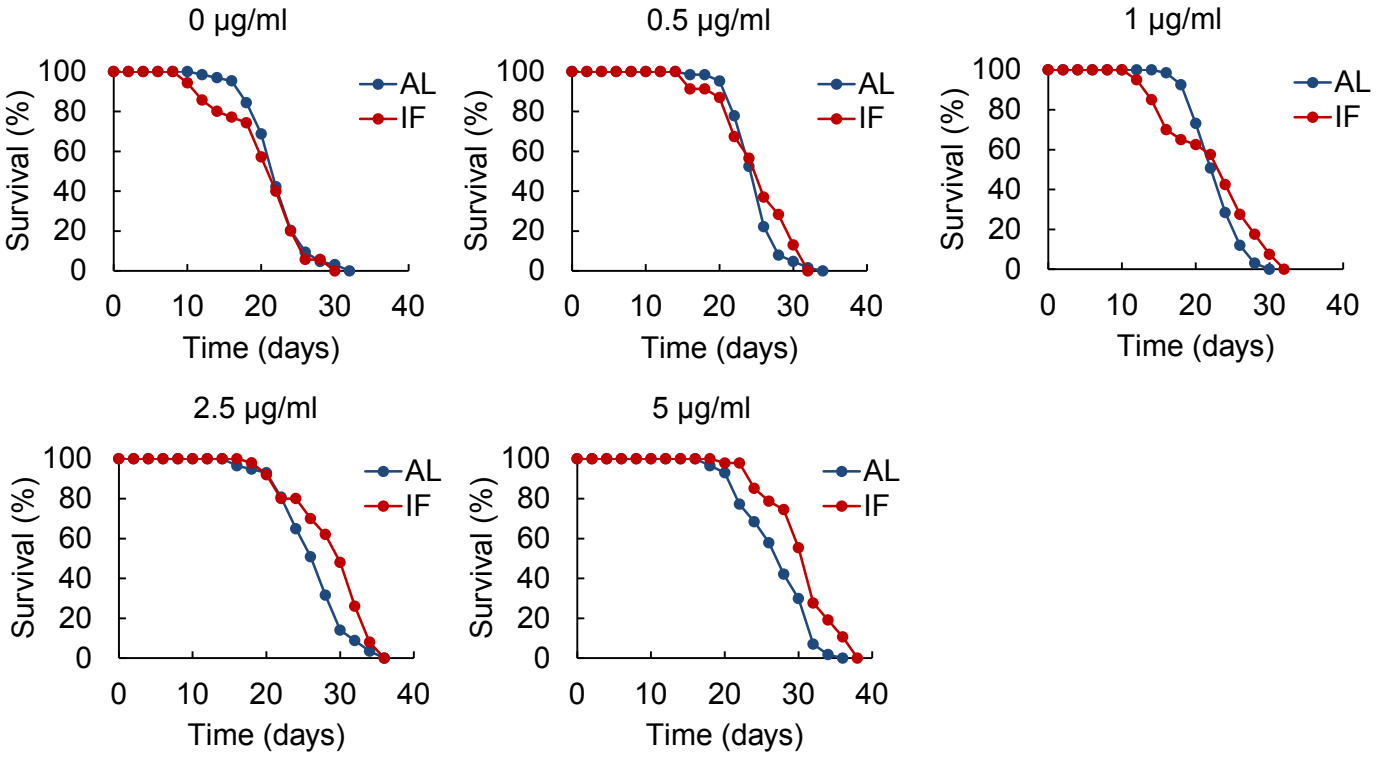

図４　IF による寿命延長に必要な最低限のコレステロール量の探索

様々なコレステロール濃度下（0, 0.5, 1, 2.5, 5 μg/ml）での寿命曲線を示す。p 値は log-rank test で計算し、以下のようになった。0 μg/ml AL 対 IF は p = 0.4002、0.5 μg/ml AL 対 IF は p = 0.2037、1 μg/ml AL 対 IF は p = 0.1298、2.5 μg/ml AL 対 IF は p = 0.0020、5 μg/ml AL 対 IF は p = 0.0001。

次に、私はコレステロールがどのようなメカニズムで IF による寿命延長を制御しているのかを調べた。過去の報告でステロイドホルモンが線虫の寿命制御に関与していることが報告されている (Broue et al., 2007)。そこで、まずコレステロールから合成されるステロイドホルモンである β-エストラジオールとプレグネノロンが IF による寿命延長に関与しているかどうかを調べるため、5 μg/ml のコレステロールの代わりに 5 μg/ml の β-エストラジオールもしくはプレグネノロンを含む培地で寿命を測定した。その結果、これらのステロイドホルモンを含む培地で飼育した線虫は、コレステロールを含まない培地で飼育した線虫とほぼ同じ IF の寿命を示した（図５）。この結果から、β-エストラジオールとプレグネノロンの２つのステロイドホルモンは IF による寿命延長には関与していないことが示唆された。

線虫ステロイドホルモンの一種である Δ^4-dafachronic acid (Δ^4-DA)とその受容体 DAF-12 は、生殖腺の欠失が引き起こす寿命延長に必要であることが知られている (Motola et al., 2006; Yamawaki et al., 2010)。そこで、Δ^4-DA が IF による寿命延長にも関与するかどうかを調べるため、コレステロールの代わりに Δ^4-DA を培地に加え、寿命を測定した。その結果、Δ^4-DA を培地に加えても IF による寿命延長は見られなかった（図６A）。また、Δ^4-DA の受容体として知られている *daf-12* の変異体で IF による寿命延長が見られるかどうかを調べた。その結果、*daf-12* 変異体においても N2 と同程度の IF による寿命延長が見られた（図６B）。これらの結果から、Δ^4-DA/DAF-12 のステロイドホルモンの経路は IF による寿命延長には関与しないことが示唆された。

コレステロールはインスリン/IGF-1 シグナル伝達経路の制御に関与している

次に、コレステロールの欠乏が飢餓による遺伝子発現の変化にどのような影

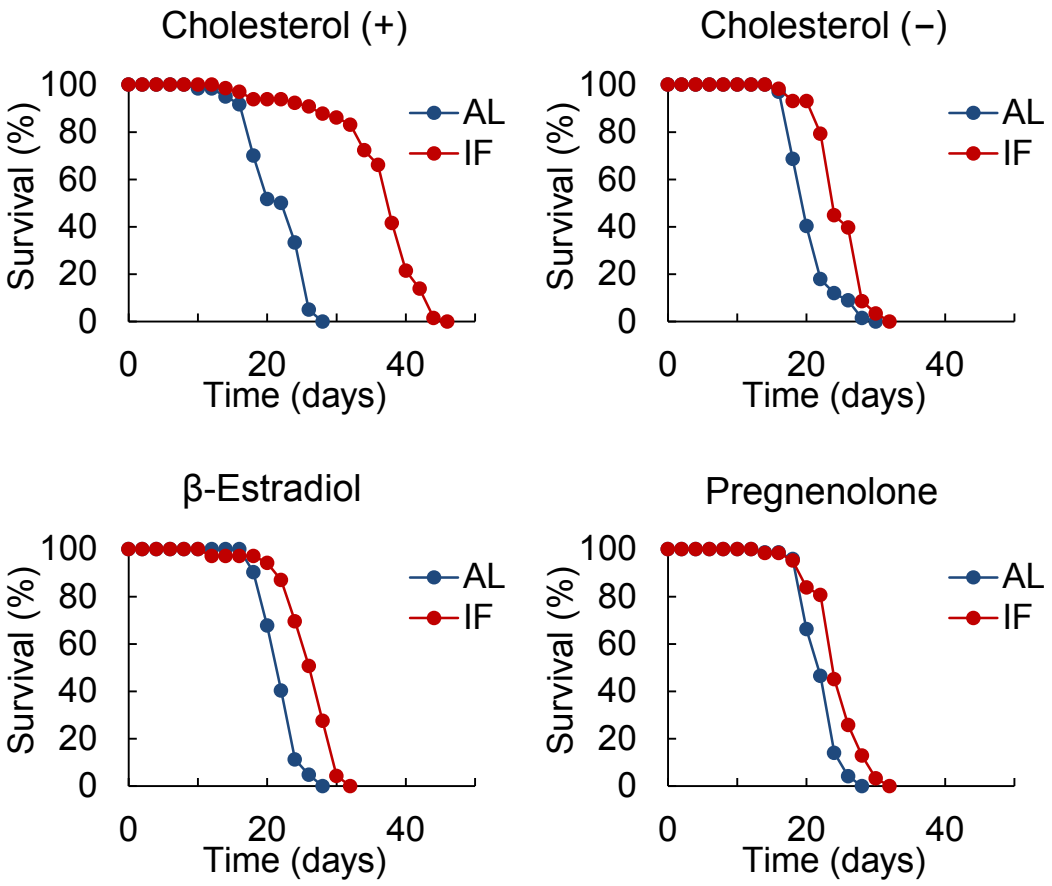

図５　ステロイドホルモン、β−エストラジオールとプレグネノロンは IF による寿命延長に関与しない
5 µg/ml コレステロールを含む培地 (Cholesterol (+))、コレステロールを含まない培地 (Cholesterol (−))、コレステロールの代わりに 5 µg/ml β−エストラジオール を含む培地 (β-Estradiol)、コレステロールの代わりに 5 µg/ml プレグネノロンを含む培地 (Pregnenolone) で飼育した線虫の寿命曲線を示す。

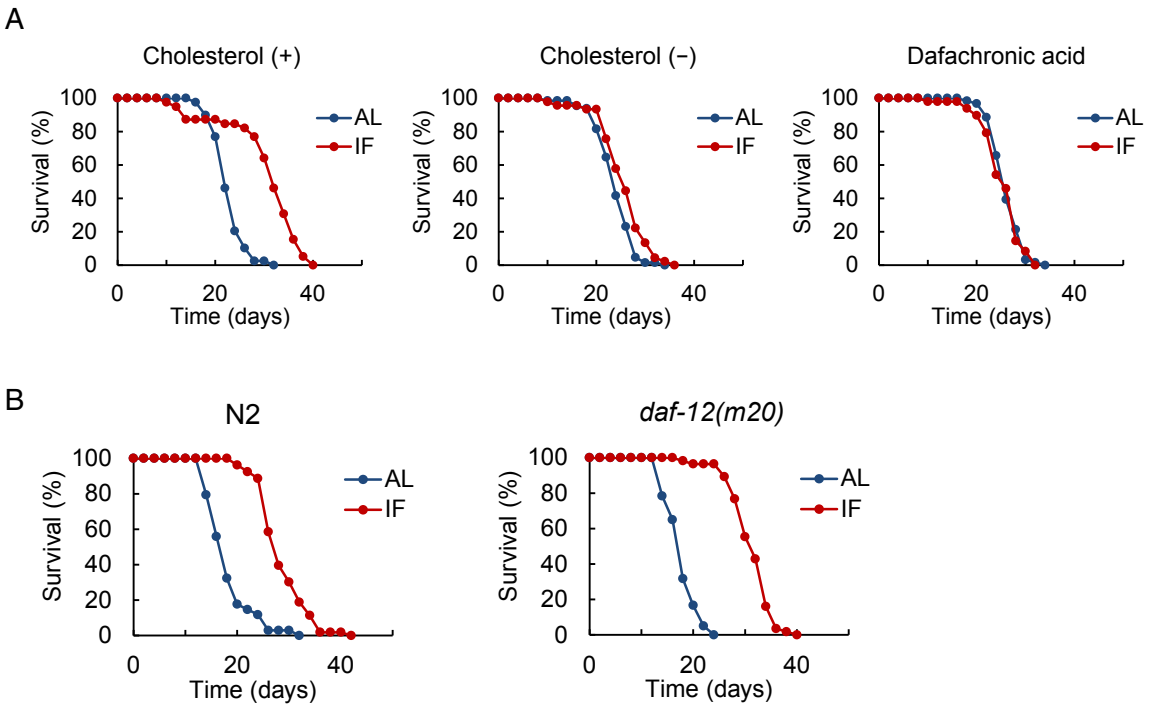

図 6　DA/DAF-12 シグナル伝達経路は IF による寿命延長に関与しない

(A) コレステロールの代わりにΔ^4-dafachronic acid を含む培地中で飼育した線虫は IF による寿命延長を示さなかった。コレステロール有り、コレステロール無し、コレステロールの代わりにΔ^4-dafachronic acid を加えた培地で飼育した線虫の寿命曲線を示す。(B) *daf-12* 変異体は IF による寿命延長を示した。野生型 N2 と *daf-12(m20)* 変異体における寿命曲線を示す。

響を及ぼすかを調べるため、コレステロール依存的に飢餓によって発現が上昇する遺伝子群の同定を試みた。「コレステロール有り・自由摂食」、「コレステロール有り・48 時間飢餓」、「コレステロール無し・自由摂食」、「コレステロール無し・48 時間飢餓」の計 4 条件においた day 4 adult の線虫から RNA を回収し、マイクロアレイを行って遺伝子発現パターンを解析した。コレステロール有りの条件では、飢餓によって 647 個のプローブが発現上昇した。そのうち、224 個のプローブはコレステロール無しの条件では発現が上昇しなかった（図 7 A）。この 224 個のプローブに対して GO 解析を行ったところ、代謝経路やテロメア維持、DNA の構造制御、酸化還元プロセスといった経路に関わる遺伝群が濃縮されていた（表１）。インスリン/IGF-1 シグナル伝達経路のエフェクターである DAF-16 は、IF によって最大限に寿命が延長するのに必要であることが報告されている(Honjoh et al., 2009; Uno et al., 2013)。そこで、DAF-16 のターゲット遺伝子の発現がコレステロールによって制御されるかを検証するため、マイクロアレイによって同定した、コレステロール依存的に飢餓によって発現が上昇する 224 個のプローブが、過去の報告で DAF-16 のターゲット遺伝子として知られている遺伝子群 (Murphy et al., 2003)と重複するかどうかを調べた。その結果、これらの２つのグループが統計的に有意に重複していることを見出だした（$p < 1.6 \times 10^{-17}$; 図 7 B）。さらに、飢餓によって発現が上昇した DAF-16 ターゲット遺伝子のプローブが 60 個存在し、そのうち 34 個がコレステロール依存的に発現が上昇していた（図 7 B、表２）。次に、DAF-16 のターゲット遺伝子の発現がコレステロールによって制御されるかを qPCR でも同様に調べた。マイクロアレイ実験でコレステロール依存的に飢餓によって発現上昇した 34 個のプローブの中から６つの遺伝子（*aqp-1, dod-6, fat-3, hsp-12.6, sodh-1, sod-3*）を選び、mRNA の発現量を調べた。その結果、これら 6 つの遺伝子の飢餓による発現上昇はコレステ

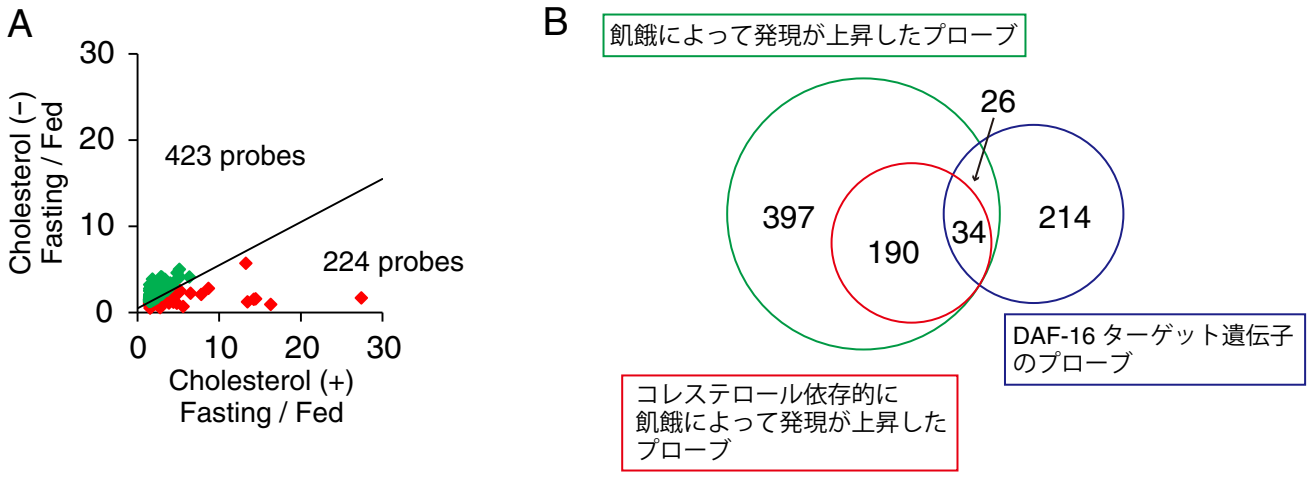

図 7　コレステロール依存的に、飢餓によって発現上昇する遺伝子群

(A) 散布図は、コレステロールの存在下で飢餓によって 1.5 倍以上発現上昇したプローブの、fold change を示す。黒線は $(Y- 1) = 0.5 \times (X - 1)$ を示す。黒線より下にあるプローブ（赤四角）をコレステロール依存的に飢餓で発現が上昇した遺伝子と定義した。(B) 飢餓によって発現が上昇したプローブ、コレステロール依存的に飢餓によって発現が上昇したプローブ、これまでに報告されていた DAF-16 ターゲット遺伝子のプローブの 3 群のベン図を示す。コレステロール依存的に飢餓によって発現が上昇したプローブと、DAF-16 ターゲット遺伝子のプローブは、統計的に有意に重複していた ($p < 1.6 \times 10^{-17}$)。

表 1

GO Term	p-value
single-organism metabolic process	3.35E-05
telomere organization	0.001435828
telomere maintenance	0.001435828
anatomical structure homeostasis	0.00507519
DNA conformation change	0.00845603
oxidation-reduction process	0.00845603
DNA helicase activity	0.00845603
oxidoreductase activity	0.00845603
DNA geometric change	0.013263658
DNA duplex unwinding	0.013263658

コレステロール依存的に飢餓で発現が上昇した 224 個のプローブの GO term を示す。

表２

Probe Set ID	Gene Symbol	Fold change	
		Cholesterol (+) Fasting/Fed	Cholesterol (-) Fasting/Fed
187910_at	fat-3 /// WBGene00001395	1.69	0.81
172218_x_at	dod-6 /// WBGene00011869	1.51	0.94
192617_at	sod-3 /// WBGene00004932	1.62	0.96
190978_at	sodh-1 /// WBGene00010790	16.32	0.95
190646_s_at	F18E3.7	2.51	1.02
173729_at	T22F3.11	13.48	1.23
184913_s_at	T22F3.11	4.83	1.08
192195_at	acs-2 /// WBGene00009221	27.43	1.70
191712_s_at	gei-7	2.67	1.06
180913_at	aqp-1	14.24	1.53
174675_at	acs-2 /// WBGene00009221	14.46	1.59
194142_x_at	gei-7	2.48	1.08
186660_s_at	F46C5.1 /// WBGene00009778	4.45	1.24
189469_at	cpr-2 /// WBGene00000782	2.17	1.08
182846_s_at	M01H9.3	2.01	1.08
173301_s_at	gei-7	2.60	1.20
182470_at	F09F7.6 /// WBGene00017303	2.87	1.23
172236_x_at	T24F1.5 /// WBGene00011997	3.71	1.34
190026_s_at	C50F7.10 /// WBGene00016848	1.54	1.08
192338_at	hsp-12.3 /// WBGene00002012	7.82	2.10
189265_at	cyp-34A2 /// WBGene00011699	2.57	1.27
192323_at	hsp-12.6 /// WBGene00002013	6.52	2.23
183652_at	far-7	8.70	2.81
193127_s_at	dao-3 /// WBGene00000929	1.59	1.20
193595_at	thn-1 /// WBGene00009213	2.38	1.47
178900_s_at	F45D3.4	2.06	1.40
191318_s_at	tps-1	1.95	1.36
177748_s_at	F54F7.3 /// WBGene00010065	1.91	1.35
180946_at	ilys-3 /// WBGene00016670	13.27	5.71
186521_at	F21C10.10 /// WBGene00017659	1.53	1.24
189334_at	cyp-33C3 /// WBGene00018262	1.65	1.30
178614_s_at	F36F2.2 /// WBGene00009476	1.90	1.42
188177_at	lipase /// WBGene00019376	2.21	1.57
173682_at	M01H9.3	1.68	1.34

コレステロール依存的に発現が上昇していた 34 個の DAF-16 ターゲット遺伝子のプローブを示す。

ロールの欠乏によって抑制された（図８）。これらの結果から、コレステロールは飢餓による DAF-16 ターゲット遺伝子の発現上昇を制御している事が示唆された。

次に私はコレステロールの欠乏が *daf-16* 機能喪失変異体の寿命に影響を与えるかどうかを調べた。その結果、コレステロールを欠乏させても *daf-16* 変異体の IF 下の寿命は抑制されなかった（図９A）。この結果は、コレステロールが DAF-16 を介して IF による寿命延長を制御している可能性を示唆している。さらに、*daf-2* の低機能型変異体においてコレステロールが寿命に与える影響を調べた。*daf-2* 変異体は卵の時期からコレステロールの無い培地で飼育するとほぼ全ての虫が耐性幼虫期に入ってしまうため、それを防ぐために L3 幼虫期からコレステロールの無い培地で飼育した。*daf-2* 変異体は DAF-16 が恒常的に活性化しており、寿命が非常に長いことがよく知られている (Kenyon et al., 1993)。N2 の AL 下の寿命はコレステロールの欠乏によってほとんど変化しなかった一方で、*daf-2* 変異体の AL 下の寿命はコレステロールの欠乏によって顕著に短縮した（図９B）。これらの結果から、コレステロールは DAF-16 を制御して寿命を制御している可能性が示唆された。

コレステロールは DAF-16 の局在を制御している

次に、私はコレステロールがどのようにして DAF-16 を制御しているかを調べた。転写因子である DAF-16 は細胞質-核内の局在制御によってその活動が制御されており、上流にある DAF-2 の機能低下や環境ストレス（飢餓、酸化ストレス、熱ストレス）によって核内に移行してターゲット遺伝子の転写を誘導する (Henderson and Johnson 2001; Lee et al., 2001; Lin et al., 2001)。そこで、私はコレステロールが DAF-16 の局在を制御して IF による寿命延長を制御しているのでは

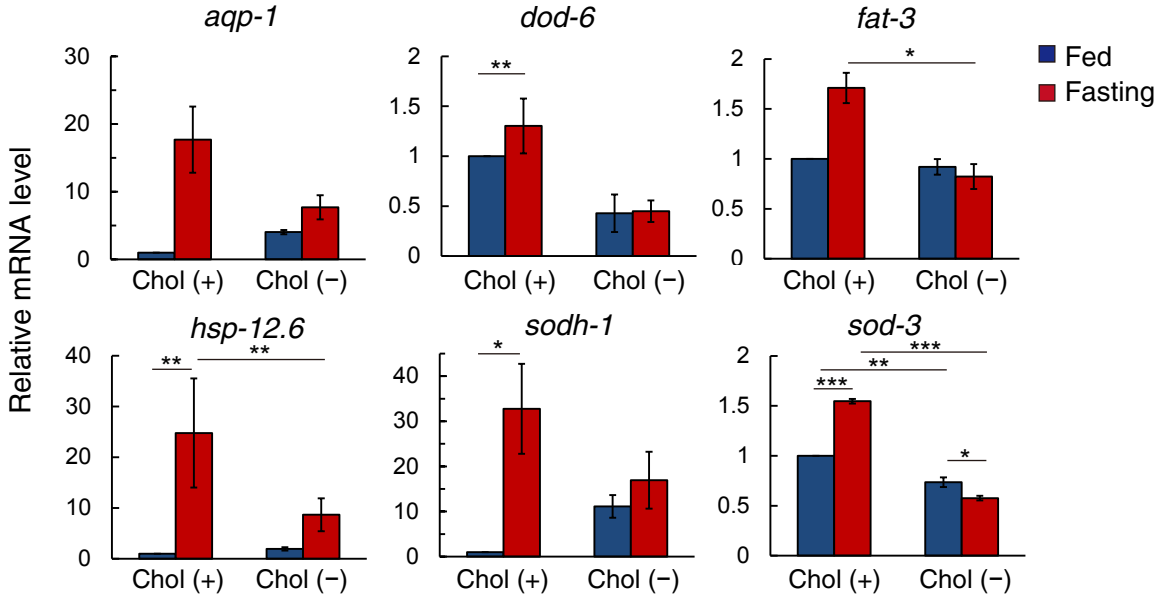

図８　飢餓によって誘導される DAF-16 ターゲット遺伝子の発現上昇は、コレステロールを欠乏させることで抑制される

aqp-1, *dod-6*, *fat-3*, *hsp-12.6*, *sodh-1*, *sod-3* のコレステロールの有無、自由摂食・飢餓時の mRNA 発現量を示す。それぞれの遺伝子の発現量は *act-1* の発現量でノーマライズした。エラーバーは標準誤差を表す。実験回数は３回で、* は p<0.05 を、** は p<0.01 を、*** は p<0.001 を示す。p 値の計算には Tukey’s test を用いた。

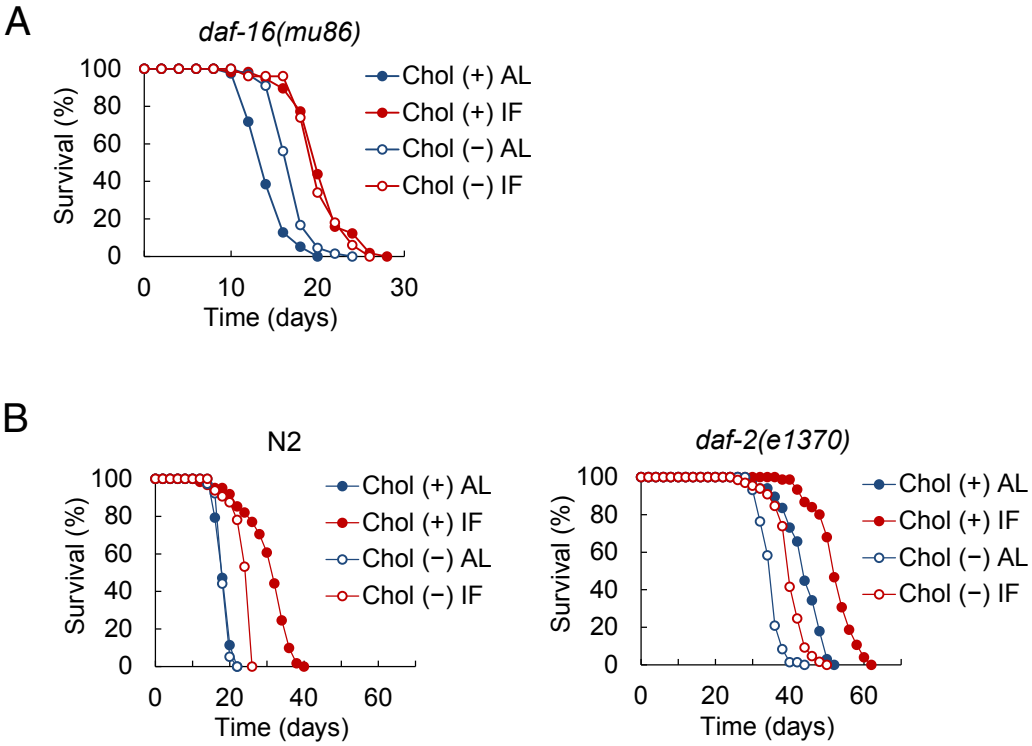

図９　コレステロールはインスリンシグナル伝達経路を介して IF による寿命延長を制御している

(A) *daf-16(mu86)* 変異体においてコレステロールの欠乏は IF による寿命延長を抑制しない。線虫は卵からコレステロール有り、もしくは無しのプレートに分けた。(B) コレステロールの欠乏は *daf-2(e1370)* 変異体において、AL 時と IF 時の両方の寿命を短縮させた。線虫は L3 幼虫のステージからコレステロール有り、もしくはコレステロール無しのプレートに分けた。

ないかと考え、コレステロールの欠乏が飢餓による DAF-16::GFP の核内移行に及ぼす影響について調べた。これまでの報告と一致して、コレステロールの存在下では 24 時間の飢餓にさらす事によって DAF-16::GFP の核内への移行が観察された（図１０）。しかし、コレステロールの非存在下では、飢餓による DAF-16::GFP の核内移行が抑制されることを見出だした（図１０）。また、自由摂食時にわずかに生じる DAF-16::GFP の核内への移行も、コレステロールの欠乏によって抑制されていた（図１０）。次に、コレステロールが熱ストレスによる DAF-16::GFP の局在制御にも関与しているかどうかを調べた。これまでの報告と同様に、コレステロール存在下では 37°C 20 分の熱ストレスによって DAF-16::GFP の核内移行が見られた（図１１）。しかし、コレステロールの非存在下では、4 回の実験中２回は熱ストレスによる DAF-16 の核内移行が有意に抑制されたが、２回は有意な差は見られなかった（図１１B）。この結果は、コレステロールが熱ストレスによる DAF-16 の核内移行にわずかに影響を及ぼす可能性を示唆している。以上の結果から、コレステロールは飢餓による DAF-16 の核内移行に重要な役割を果たしていることが示された。

nap-1 RNAi は DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を抑制する

近年、線虫においてコレステロール結合タンパク質として NAP-1 (nucleosome assembly protein-1) が同定された (Cheong et al., 2013)。NAP-1 がコレステロール依存的に DAF-16 と結合し、*daf-2* 変異体の長寿や DAF-16 の転写活性を制御しているという事が報告されている (Cheong et al., 2013)。しかし、NAP-1 が DAF-16 の細胞内局在の制御に関与しているかどうかは分かっていない。そこで、私はコレステロールが NAP-1 を介して飢餓による DAF-16 の核内移行を制御しているのではないかと考えた。そこで、コレステロールの存在下・非存在下で *nap-1*

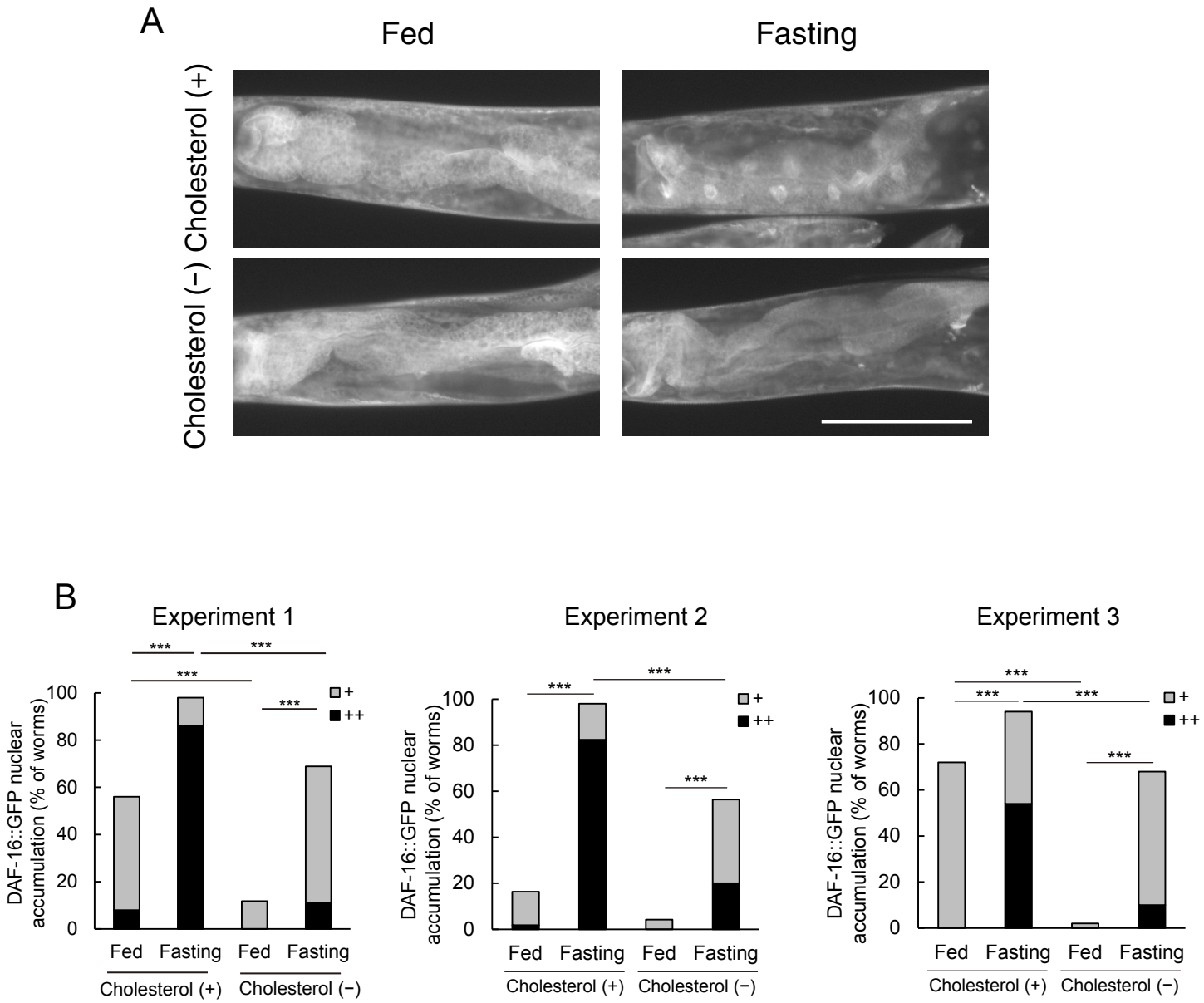

図１０　コレステロールの欠乏は飢餓による DAF-16 の核内移行を抑制する

Day 2 adult から自由摂食 (Fed) もしくは 24 時間の飢餓 (Fasting) にさらした線虫の DAF-16::GFP の局在を蛍光顕微鏡で観察した。(A) 代表的な写真を示す。スケールバーは 100 μm を示す。(B) 独立した３回の実験の腸の核内移行を示した線虫の割合をそれぞれ棒グラフに示す。++ は強い核内移行を、+ は弱い核内移行を示した虫をそれぞれ示す。p 値は Mann-Whitney U test の結果を Bonferroni 法で補正し、*** は $p < 0.001$ を示す。

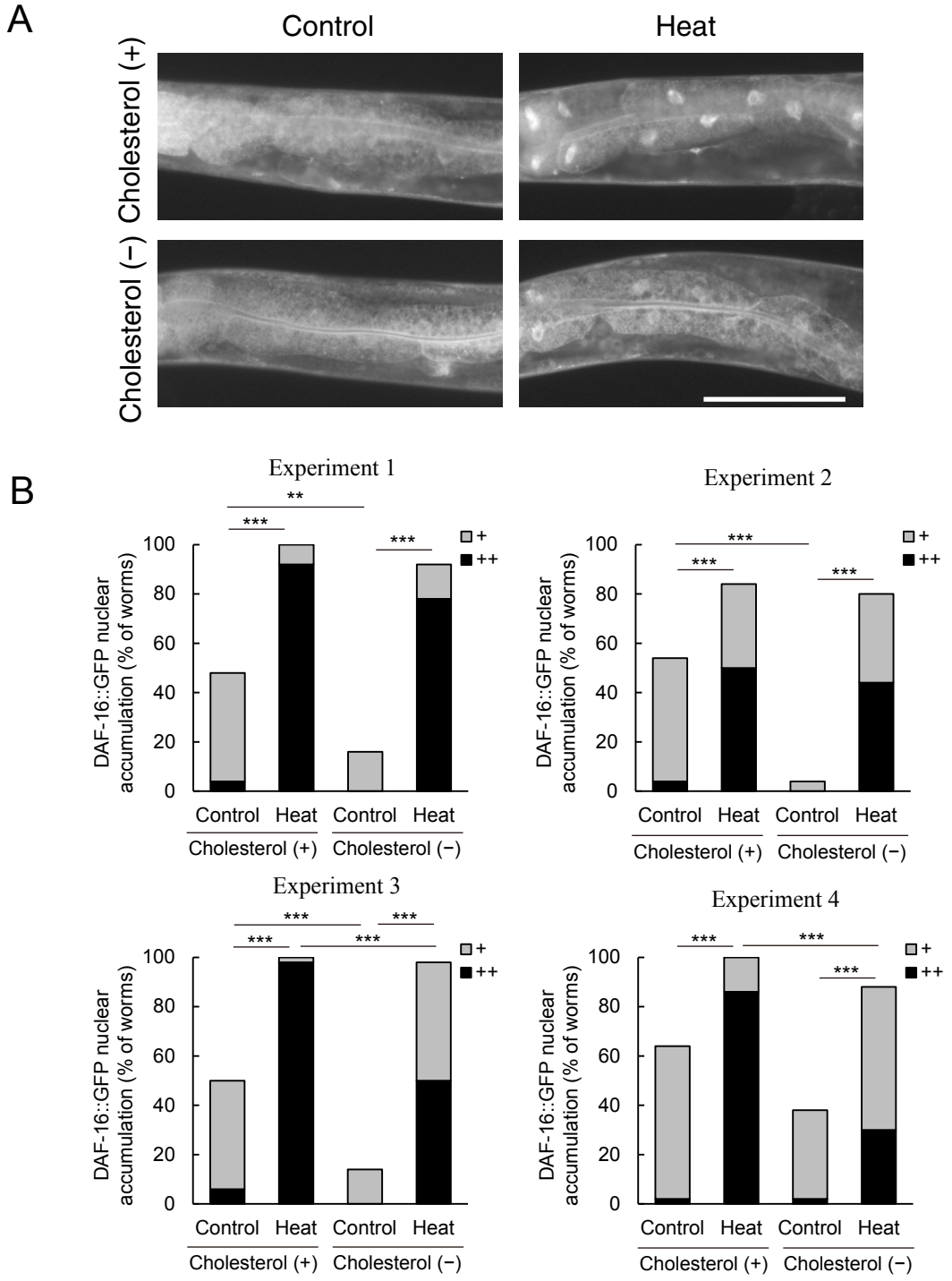

図１１　コレステロールの欠乏が、熱ストレスによる DAF-16 の核内移行に与える影響

Day 2 adult で 37℃ 20 分の熱ストレスにさらした線虫の DAF-16::GFP の局在を蛍光顕微鏡で観察した。(A) 代表的な写真を示す。スケールバーは 100 μm を示す。(B) 独立した 4 回の実験の腸の核内移行を示した線虫の割合をそれぞれ棒グラフに示す。++ は強い核内移行を、+ は弱い核内移行を示した虫をそれぞれ示す。p 値は Mann-Whitney U test の結果を Bonferroni 法で補正し、** は $p < 0.01$ を、*** は $p < 0.001$ を示す。

RNAi を行い、飢餓による DAF-16::GFP の核内移行に影響を及ぼすかを調べた。その結果、*nap-1* RNAi は飢餓による DAF-16 の核内移行を抑制することを見出だした（図１２）。更に、*nap-1* RNAi による DAF-16 の核内移行の抑制効果は、コレステロール欠乏による核内移行の抑制効果と相加的ではなかった（図１２B）。また、20 μg/ml のコレステロールの存在下でも DAF-16::GFP の局在を調べたところ、通常の 5 μg/ml のコレステロール存在下に比べて飢餓時の細胞内局在に有意な差は見られなかった（図１２）。以上の結果から、NAP-1 は DAF-16 の細胞内局在制御に関与しており、*nap-1* RNAi とコレステロールの欠乏は DAF-16 の局在制御に対して同様の表現型を示すことが示唆された。次に、コレステロールの存在下・非存在下で *nap-1* RNAi が IF による寿命延長に及ぼす影響を調べた。その結果、*nap-1* RNAi を行うことでコレステロールの欠乏と同様に、IF による寿命延長が抑制された（図１３）。さらに、コレステロール非存在下では、*nap-1* RNAi を行っても IF による寿命延長率の更なる抑制効果は見られなかった（図１３B）。これらの結果から、コレステロールの欠乏と *nap-1* RNAi は同じ経路を介して、DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を抑制している可能性が示唆された。

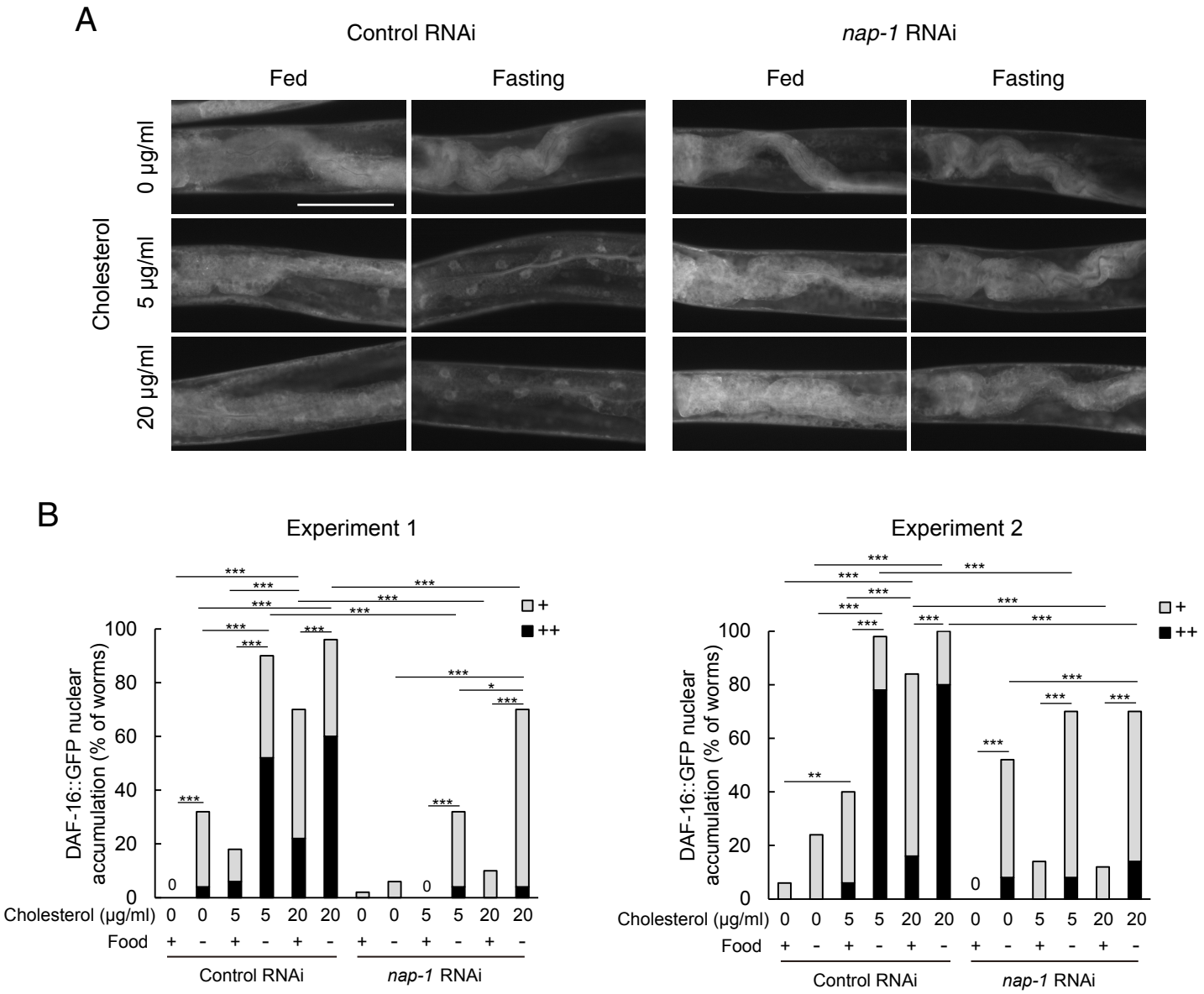

図１２　*nap-1* RNAi は飢餓による DAF-16 の核内移行を抑制する

Control もしくは *nap-1* RNAi を行い、day 2 adult から自由摂食 (Fed) もしくは 24 時間の飢餓 (Fasting) にさらした線虫の DAF-16::GFP の局在を蛍光顕微鏡で観察した。(A) 代表的な写真を示す。スケールバーは 100 µm を示す。(B) 独立した２回の実験の腸の核内移行を示した線虫の割合をそれぞれ棒グラフに示す。++ は強い核内移行を、+ は弱い核内移行を示した虫をそれぞれ示す。p 値は Mann-Whitney U test の結果を Bonferroni 法で補正し、* は $p < 0.05$ を、** は $p < 0.01$ を、*** は $p < 0.001$ を示す。

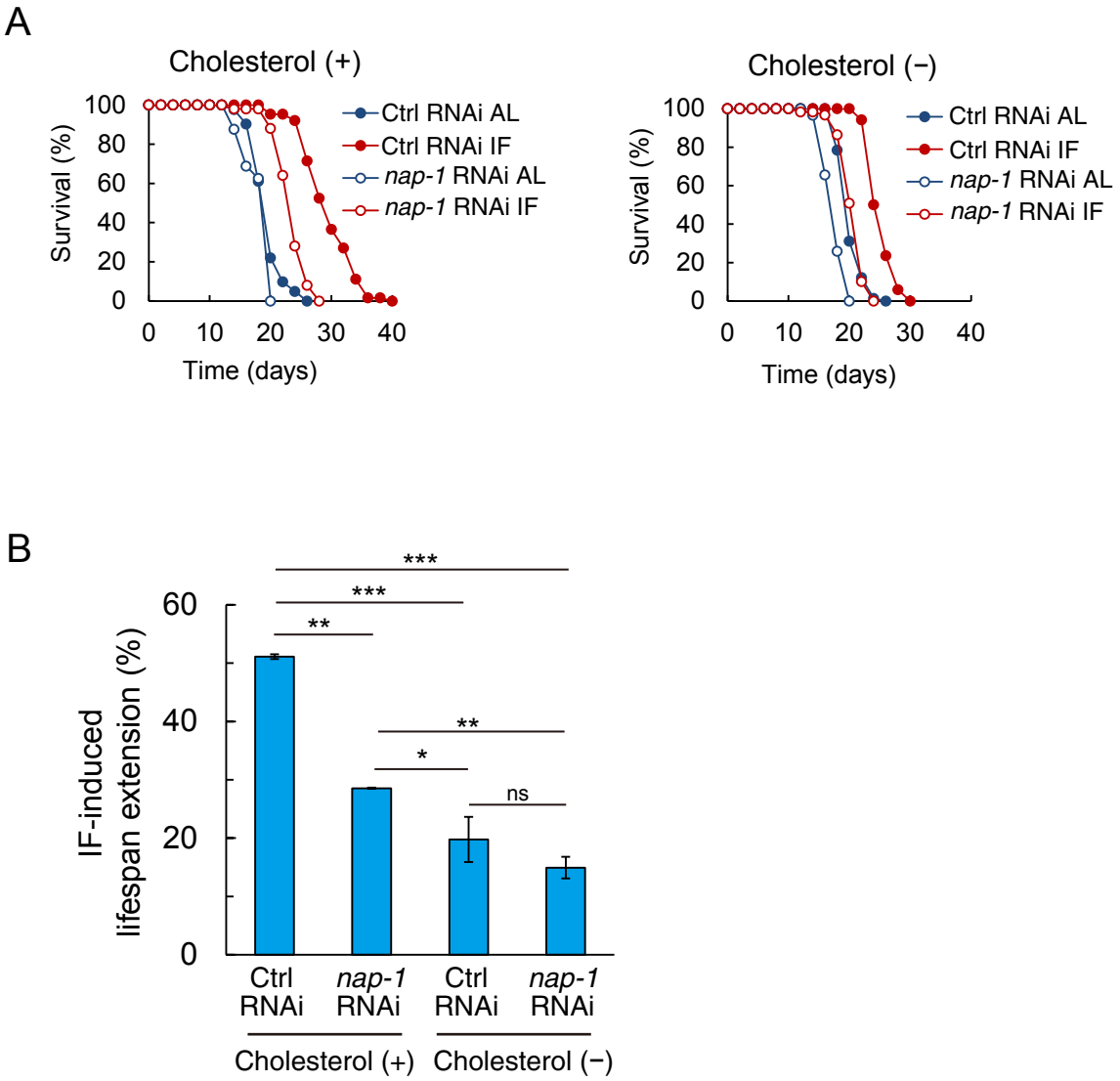

図１３　*nap-1* RNAi は断続的飢餓による寿命延長を抑制する

(A) コレステロールの存在下・非存在下で control RNAi もしくは *nap-1* RNAi を行った際の寿命曲線を示す。(B) ３回の独立した実験における断続的飢餓による寿命延長率の平均値 ± 標準誤差を示す。p 値は Tukey’s test で計算し、ns は有意差無し、* は $p < 0.05$、** は $p < 0.01$、*** は $p < 0.001$ を示す。

表３

本研究で行った寿命測定の、実験回ごとの平均寿命の結果を示す。n は線虫の数を表す。

図	実験回	ストレイン	条件	自由摂食		断続的飢餓	
				平均寿命	n	平均寿命	n
2A	1	N2	Cholesterol (+)	19.2	58	35.5	53
			Cholesterol (−)	18.0	68	20.9	58
			YA- cholesterol (−)	19.5	66	27.0	48
	2		Cholesterol (+)	18.6	36	34.2	74
			Cholesterol (−)	17.7	63	21.9	69
			YA- cholesterol (−)	17.5	70	25.3	65
	3		Cholesterol (+)	18.4	48	30.3	53
			Cholesterol (−)	19.5	71	22.0	66
			YA- cholesterol (−)	18.0	68	25.5	58
2B	1	N2	5 µg/ml Cholesterol	19.0	69	34.0	69
			20 µg/ml Cholesterol	18.4	61	34.9	73
			50 µg/ml Cholesterol	19.4	72	33.9	80
	2		5 µg/ml Cholesterol	25.0	61	37.5	103
			20 µg/ml Cholesterol	25.3	62	33.8	93
			50 µg/ml Cholesterol	23.1	59	23.1	69
4	1	N2	0 µg/ml Cholesterol	22.5	64	20.8	35
			0.5 µg/ml Cholesterol	25.2	63	25.4	46
			1 µg/ml Cholesterol	23.2	67	22.6	40
			2.5 µg/ml Cholesterol	26.8	57	29.3	50
			5 µg/ml Cholesterol	27.5	57	30.9	47
	2		0 µg/ml Cholesterol	21.6	66	21.9	58
			0.5 µg/ml Cholesterol	22.9	69	22.3	53
			1 µg/ml Cholesterol	23.6	64	21.6	51
			2.5 µg/ml Cholesterol	25.1	61	22.8	52
			5 µg/ml Cholesterol	25.0	60	26.5	49
5	1	N2	Cholesterol (+)	21.9	60	36.7	65

			Cholesterol (−)	20.9	67	25.2	58
			β-Estradiol	22.3	62	26.4	69
			Pregnenolone	22.5	71	24.9	62
	2		Cholesterol (+)	20.3	30	31.9	49
			Cholesterol (−)	21.0	65	27.3	60
			β-Estradiol	20.8	66	27.5	64
			Pregnenolone	21.7	63	25.3	55
6A	1	N2	Cholesterol (+)	22.9	39	30.6	39
			Cholesterol (−)	24.1	65	25.8	45
			Δ^4-Dafachronic acid	26.3	61	25.5	48
	2	N2	Cholesterol (+)	21.1	49	32.2	41
			Cholesterol (−)	23.9	66	24.7	46
			Δ^4-Dafachronic acid	24.4	67	27.1	45
6B	1	N2	Cholesterol (+)	21.9	60	36.7	65
		daf-12(m20)	Cholesterol (+)	21.6	62	38.2	91
	2	N2	Cholesterol (+)	18.4	34	28.8	53
		daf-12(m20)	Cholesterol (+)	17.9	60	31.5	56
9A	1	*daf-16(mu86)*	Cholesterol (+)	13.9	41	21.8	64
			Cholesterol (−)	16.8	64	21.1	63
	2		Cholesterol (+)	15.8	28	20.1	62
			Cholesterol (−)	17.4	66	22.4	54
	3		Cholesterol (+)	14.5	39	20.6	57
			Cholesterol (−)	17.3	66	20.4	50
9B	1	N2	Cholesterol (+)	20.8	48	30.3	48
			Cholesterol (−)	20.5	73	23.6	71
		daf-2(e1370)	Cholesterol (+)	41.9	64	54.0	66
			Cholesterol (−)	32.4	68	40.8	74
	2	N2	Cholesterol (+)	18.8	53	30.7	61
			Cholesterol (−)	18.8	77	24.1	32
		daf-2(e1370)	Cholesterol (+)	43.9	67	52.4	75
			Cholesterol (−)	35.2	72	40.3	65
	3	N2	Cholesterol (+)	19.8	31	25.4	61
			Cholesterol (−)	23.0	62	23.3	46

		daf-2(e1370)	Cholesterol (+)	46.3	65	53.4	61
			Cholesterol (−)	42.7	65	46.3	60
13A	1	N2	Ctrl RNAi Cholesterol (+)	19.4	44	29.4	65
			Ctrl RNAi Cholesterol (−)	22.0	74	25.3	69
			nap-1 RNAi Cholesterol (+)	18.5	25	23.7	61
			nap-1 RNAi Cholesterol (−)	18.8	63	21.2	75
	2		Ctrl RNAi Cholesterol (+)	19.7	41	29.7	63
			Ctrl RNAi Cholesterol (−)	20.5	74	25.5	34
			nap-1 RNAi Cholesterol (+)	18.4	16	23.6	50
			nap-1 RNAi Cholesterol (−)	17.8	58	20.8	59
	3		Ctrl RNAi Cholesterol (+)	21.5	35	33.5	62
			Ctrl RNAi Cholesterol (−)	22.8	69	25.8	80
			nap-1 RNAi Cholesterol (+)	16.8	19	23.2	62
			nap-1 RNAi Cholesterol (−)	18.0	64	19.7	68

図	実験回	ストレイン	条件	OP50 (/ml)	平均寿命	n
3	1	N2	Cholesterol (+)	5×10^{10}	23.5	47
				5×10^{9}	24.4	52
				5×10^{8}	27.0	43
			Cholesterol (−)	5×10^{10}	20.6	62
				5×10^{9}	20.6	64
				5×10^{8}	24.6	49
	2	N2	Cholesterol (+)	5×10^{10}	19.2	52
				5×10^{9}	21.4	48
				5×10^{8}	22.7	55
			Cholesterol (−)	5×10^{10}	17.5	58
				5×10^{9}	19.3	63
				5×10^{8}	20.4	59
	3	N2	Cholesterol (+)	5×10^{10}	22.6	48
				5×10^{9}	22.0	47
				5×10^{8}	24.1	60
			Cholesterol (−)	5×10^{10}	18.8	66

				5×10^{9}	19.9	67
				5×10^{8}	21.5	63

＜考察＞

ヒトにおいて、血中コレステロール量が過剰であることが加齢に伴う心疾患等を引き起こし、寿命の短縮に繋がるということが知られている (Lewington et al., 2007)。しかし、コレステロールが老化に直接どのような影響を与えるかについては未解明な点が多かった。本研究で私はコレステロールが IF による寿命延長に重要な働きをすることを見出だした。また、マイクロアレイの結果からコレステロールが DAF-16 のターゲット遺伝子の飢餓による発現上昇を制御していることが分かった。更に、コレステロールが飢餓による DAF-16 の核内移行を制御しており、これらのコレステロールによる DAF-16 の細胞内局在制御と IF による寿命延長の制御は、少なくとも部分的には NAP-1 を介していることを明らかにした。これらの結果から考えられるモデル図を図１４に示す。

コレステロールは線虫の寿命制御に重要な役割を果たす

以前の報告で、コレステロールを欠乏させることで AL 下においても線虫の寿命が短縮することが報告されていた (Cheong et al., 2011; Jeong et al., 2010; Magner et al., 2013; Merris et al., 2004)。本研究では、コレステロールを培地に加えないことによってコレステロールを欠乏させた際には AL の寿命の短縮はほとんど見られず、アガーをアガロースに変更し、ペプトンをエーテル抽出することでより厳密にコレステロールを抜き去った培地を使用した際には AL の寿命の短縮が見られた。このことから、プレートもしくは線虫の体内に残っているコレステロール量のわずかな差が、AL 下の寿命の違いを引き起こしている可能性が考えられる。また、より厳密にコレステロールを抜いた培地では 5 μg/ml のコレステロールを加えても完全には IF による寿命延長が再現されなかった。

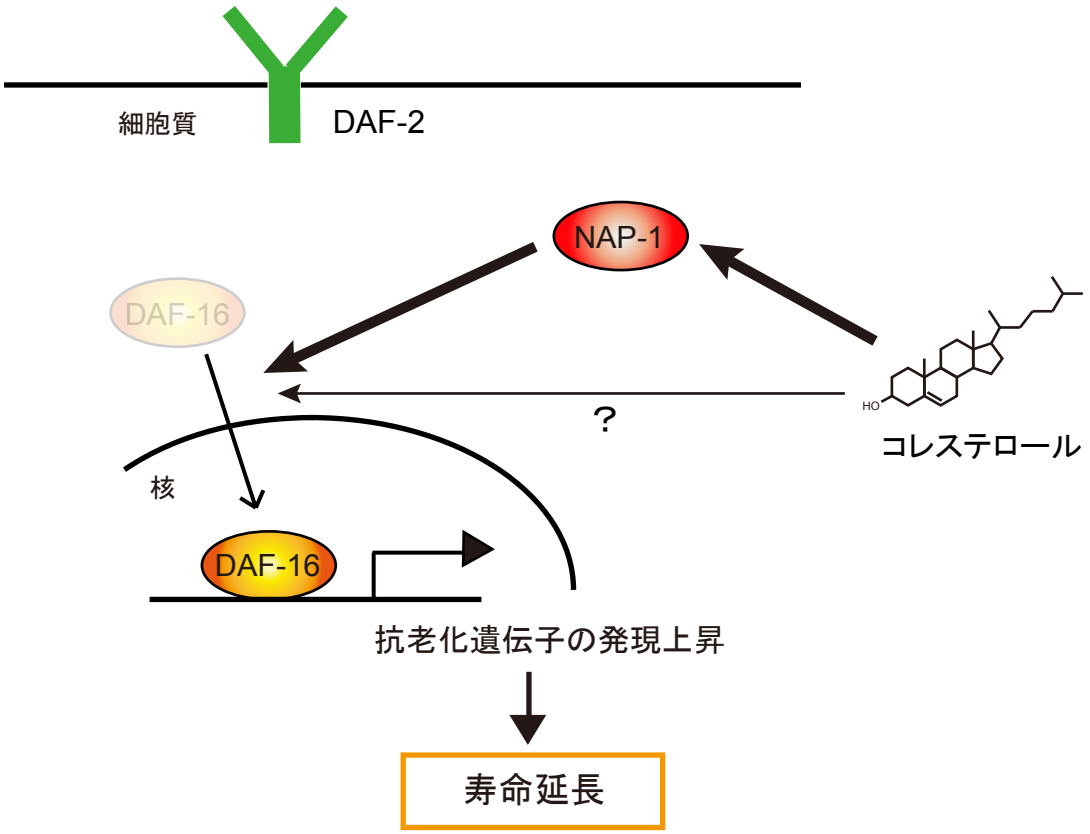

図１４　モデル図

コレステロールは、少なくとも部分的には NAP-1 を介して、飢餓による DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を制御する。

このことから、通常条件下における IF と同程度に寿命が延長するには、5 μg/ml より多くのコレステロールが必要か、もしくはエーテル抽出によってペプトンから失われた物質が必要である可能性が考えられる。

私は、コレステロールが IF 以外の食餌制限法による寿命延長にも重要であるかどうかを調べるため、餌の大腸菌の濃度を薄めて食餌を制限する手法である sDR による寿命延長にコレステロールが必要かどうかを調べた。その結果、コレステロールは sDR による寿命延長には必要でないことを見出だした。過去の研究で、sDR による寿命延長は DAF-16 を必要とするが、sDR は飢餓とは異なり DAF-16 の核内移行を誘導しないことが報告されている (Greer et al., 2007)。よって、本研究におけるコレステロールが IF による寿命延長に重要である一方で sDR による寿命延長には必要でないという結果は、コレステロールが DAF-16 の核内移行を制御するという結果と合致している。

コレステロールはインスリン/IGF-1 シグナル伝達経路を制御している

これまでの報告で、IF による寿命延長には DAF-16 が重要であることが分かっていた (Honjoh et al., 2009; Uno et al., 2013)。本研究において、コレステロールは飢餓による DAF-16 の核内移行を制御している事を明らかにした。しかし、IF による寿命延長には DAF-16 だけでなく、RHEB-1 や KGB-1/AP-1 といった因子も必要であることが明らかになっている (Honjoh et al., 2009; Uno et al., 2013)。実際に、*daf-16* 変異体や DAF-16 が恒常的に活性化されている *daf-2* 変異体において IF による寿命の延長が観察されており、この寿命延長は DAF-16 以外の因子によって引き起こされていると考えられる。*daf-16* 変異体においては、コレステロールの欠乏は IF による寿命延長を抑制しなかった。この結果は、DAF-16 以外の因子が IF による寿命延長に寄与する部分に、コレステロールの欠乏が影響

を与えない事を示唆している。また、N2 の AL 下の寿命はコレステロールの欠乏によってほとんど変化しなかった一方で、*daf-2* 変異体の AL 下の寿命はコレステロールの欠乏によって顕著に短縮した。以上の結果は、コレステロールが DAF-16 特異的にその細胞内局在を制御する事で、IF による寿命延長を制御している可能性を示唆している。

コレステロールは、少なくとも部分的には NAP-1 を介して DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を制御している

nap-1 RNAi は、DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長に対して、コレステロールの欠乏と同様の抑制効果を及ぼすことを明らかにした。加えて、コレステロールを欠乏させた虫に *nap-1* RNAi を行っても、DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長に対する更なる抑制効果は得られなかった。これらの結果は、コレステロールが少なくとも部分的には NAP-1 を介して、DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を制御していることを示唆している。NAP-1 がコレステロールと結合し、コレステロール依存的に DAF-16 と結合するという過去の報告(Cheong et al., 2013)から、飢餓時に NAP-1 がコレステロール依存的に DAF-16 と結合し、DAF-16 の核内への移行を助けているという可能性が考えられる。また、DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長に対する *nap-1* RNAi の抑制効果は、コレステロールの欠乏による抑制効果に比べて小さかった。このことは、コレステロールが DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長を制御するのに、NAP-1 以外の因子も介していることを示唆している。β-エストラジオール、プレグネノロン、Δ^4-DA といったステロイドホルモンは IF による寿命延長には必要でないことが示されたが、線虫が代謝するステロールやステロイドホルモンは他にも

多数報告されているので (Broue et al., 2007; Matyash et al., 2004; Merris et al., 2003)、それらが IF による寿命延長に関与している可能性も考えられる。

本研究により、コレステロールは DAF-16 の核内移行と IF による寿命延長に重要な役割を持つことを明らかにした。DAF-16/FOXO、NAP-1/NAP1、IF による寿命延長は哺乳類にも保存されていることを考慮すると、哺乳類においてもコレステロールは NAP1 と協同して FOXO の核内移行と IF による寿命制御を担っている可能性が考えられる。

＜参考文献＞

Anderson, R.M., Shanmuganayagam, D., Weindruch, R., 2009. Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys. Toxicol. Pathol. 37, 47-51

Anson, R.M., Guo, Z., de Cabo, R., Iyun, T., Rios, M., Hagepanos, A., Ingram, D.K., Lane, M.A., Mattson, M.P., 2003. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 6216-6220

Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77, 71-94

Broue, F., Liere, P., Kenyon, C., Baulieu, E.E., 2007. A steroid hormone that extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Aging cell. 6, 87-94

Carlson, A.J., Hoelzel, F., 1946. Apparent prolongation of the life span of rats by intermittent fasting. J. Nutr. 31, 363-375

Cheong, M.C., Lee, H.J., Na, K., Joo, H.J., Avery, L., You, Y.J., Paik, Y.K., 2013. NSBP-1 mediates the effects of cholesterol on insulin/IGF-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*. Cell. Mol. Life Sci. 70, 1623-1636

Cheong, M.C., Na, K., Kim, H., Jeong, S.K., Joo, H.J., Chitwood, D.J., Paik, Y.K., 2011. A potential biochemical mechanism underlying the influence of sterol deprivation stress on *Caenorhabditis elegans* longevity. J. Biol. Chem. 286, 7248-7256

Fontana, L., Klein, S., 2007. Aging, adiposity, and calorie restriction. JAMA. 297, 986-994

Friedman, D.B., Johnson, T.E., 1988a. A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. Genetics. 118, 75-86

Friedman, D.B., Johnson, T.E., 1988b. Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the *age-1* gene. J. Gerontol. 43, B102-109

Goodrick, C.L., Ingram, D.K., Reynolds, M.A., Freeman, J.R., Cider, N., 1990. Effects of intermittent feeding upon body weight and lifespan in inbred mice: interaction of genotype and age. Mech. Ageing Dev. 55, 69-87

Greer, E.L., Dowlatshahi, D., Banko, M.R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S.P., Brunet, A., 2007. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. Curr. Biol. 17, 1646-1656

Henderson, S.T., Johnson, T.E., 2001. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Curr. Biol. 11, 1975-1980

Honjoh, S., Yamamoto, T., Uno, M., Nishida, E., 2009. Signalling through RHEB-1 mediates intermittent fasting-induced longevity in *C. elegans*. Nature. 457, 726-730

Jeong, M.H., Kawasaki, I., Shim, Y.H., 2010. A circulatory transcriptional regulation among *daf-9*, *daf-12*, and *daf-16* mediates larval development upon cholesterol starvation in *Caenorhabditis elegans*. Dev. Dyn. 239, 1931-1940

Kaeberlein, T.L., Smith, E.D., Tsuchiya, M., Welton, K.L., Thomas, J.H., Fields, S., Kennedy, B.K., Kaeberlein, M., 2006. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by complete removal of food. Aging cell. 5, 487-494

Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., Ahringer, J., 2000. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Genome Biol. 2,

research0002.0001 - research0002.0010

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., Tabtiang, R., 1993. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. Nature. 366, 461-464

Kenyon, C.J., 2010. The genetics of ageing. Nature. 464, 504-512

Lakowski, B., Hekimi, S., 1998. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 13091-13096

Lee, G.D., Wilson, M.A., Zhu, M., Wolkow, C.A., de Cabo, R., Ingram, D.K., Zou, S., 2006. Dietary deprivation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Aging cell. 5, 515-524

Lee, R.Y., Hench, J., Ruvkun, G., 2001. Regulation of *C. elegans* DAF-16 and its human ortholog FKHRL1 by the *daf-2* insulin-like signaling pathway. Curr. Biol. 11, 1950-1957

Lewington, S., Whitlock, G., Clarke, R., Sherliker, P., Emberson, J., Halsey, J., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R., 2007. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. Lancet. 370, 1829-1839

Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., Kenyon, C., 1997. *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. Science. 278, 1319-1322

Lin, K., Hsin, H., Libina, N., Kenyon, C., 2001. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. Nat. Genet. 28, 139-145

Magner, D.B., Wollam, J., Shen, Y., Hoppe, C., Li, D., Latza, C., Rottiers, V., Hutter, H.,

Antebi, A., 2013. The NHR-8 Nuclear Receptor Regulates Cholesterol and Bile Acid Homeostasis in *C. elegans*. Cell Metab. 18, 212-224

Masoro, E.J., 2005. Overview of caloric restriction and ageing. Mech. Ageing Dev. 126, 913-922

Matyash, V., Entchev, E.V., Mende, F., Wilsch-Brauninger, M., Thiele, C., Schmidt, A.W., Knolker, H.J., Ward, S., Kurzchalia, T.V., 2004. Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16. PLoS Biol. 2, e280

Merris, M., Kraeft, J., Tint, G.S., Lenard, J., 2004. Long-term effects of sterol depletion in *C. elegans*: sterol content of synchronized wild-type and mutant populations. J. Lipid Res. 45, 2044-2051

Merris, M., Wadsworth, W.G., Khamrai, U., Bittman, R., Chitwood, D.J., Lenard, J., 2003. Sterol effects and sites of sterol accumulation in *Caenorhabditis elegans*: developmental requirement for 4alpha-methyl sterols. J. Lipid Res. 44, 172-181

Motola, D.L., Cummins, C.L., Rottiers, V., Sharma, K.K., Li, T., Li, Y., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Auchus, R.J., Antebi, A., Mangelsdorf, D.J., 2006. Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. Cell. 124, 1209-1223

Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C., 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Nature. 424, 277-283

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G., 1997. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. Nature. 389, 994-999

Shen, Y., Wollam, J., Magner, D., Karalay, O., Antebi, A., 2012. A steroid receptor-microRNA switch regulates life span in response to signals from the gonad. Science. 338, 1472-1476

Shim, Y.H., Chun, J.H., Lee, E.Y., Paik, Y.K., 2002. Role of cholesterol in germ-line development of *Caenorhabditis elegans*. Mol. Reprod. Dev. 61, 358-366

Uno, M., Honjoh, S., Matsuda, M., Hoshikawa, H., Kishimoto, S., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Yamamoto, T., Matsumoto, K., Nishida, E., 2013. A fasting-responsive signaling pathway that extends life span in *C. elegans*. Cell Rep. 3, 79-91

Yamawaki, T.M., Berman, J.R., Suchanek-Kavipurapu, M., McCormick, M., Gaglia, M.M., Lee, S.J., Kenyon, C., 2010. The somatic reproductive tissues of *C. elegans* promote longevity through steroid hormone signaling. PLoS Biol. 8, e1000468

＜謝辞＞

本研究を進めるにあたって、これまで７年間ご指導くださった西田栄介教授に厚く御礼申し上げます。こうして研究を形にすることができたのも、ひとえに西田先生の温かいご支援・ご指導のお陰です。本城咲季子博士には、実験の方法、研究の進め方、研究者としての心構え等、様々なことを一から教えていただき、深く感謝しております。研究者として活躍されている本城博士の存在は、私にとって大きな励みとなりました。宮竹功一博士には研究の事のみならず様々な面において大いに助けて頂きました。心より感謝しております。宇野雅晴博士には同じ線虫グループの先輩として研究の進め方について助言を頂き、大変感謝しております。また、特別研究員として採用して頂き、ご支援して頂いた日本学術振興会に御礼申し上げます。最後に、いつも温かく見守ってくれた両親に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Akiko Ihara, Masaharu Uno, Koichi Miyatake, Sakiko Honjoh, Eisuke Nishida

Cholesterol regulates DAF-16 nuclear localization and fasting-induced longevity in *C. elegans*

Experimental Gerontology, 87, 40-47, 2017