

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06850

研究課題名(和文)光遺伝学技術を用いた線虫の個体寿命の時間特異的な制御機構の開発

研究課題名(英文)Time-specific regulation of longevity gene in *C. elegans* using optogenetics

研究代表者

堀川 誠 (Horikawa, Makoto)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：50775997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの様々な寿命・老化研究を通じて数多くの寿命・老化遺伝子が発見されてきた。組織特異的発現プロモーターを利用する事で、それら遺伝子は組織ごとに異なる寿命への寄与を果たす事が分かってきた。しかし、寿命・老化遺伝子が加齢のどのタイミングで寿命延長・抗老化に寄与するか、よく分かっていなかった。

そこで、光刺激で遺伝子発現制御を可能にするGAVPOシステムを線虫に導入する事で任意の加齢段階での寿命・老化遺伝子の発現を試み、必要なプラスミド類の構築とそれらの導入可能性を試験した。また、ワシントン州立大との共同研究として線虫自動寿命測定装置を試験し、現状での運用上の課題を発見した。

研究成果の概要(英文)：Several studies using model organisms have identified and investigated a lot of longevity genes. By using tissue-specific expression promoters, it has been reported that the longevity genes contribute to lifespans in different manner in different tissues. However, it has not well understood at which timing of aging process the longevity genes contribute to extension of lifespan. Therefore, I tried to introduce a GAVPO system that can control gene expression by light illumination into *C. elegans* and to express longevity genes in an arbitrary timing. I constructed plasmids carrying GAVPO and its variants, and their feasibility was tested in *C. elegans*. As a collaborative research with the University of Washington, I introduced an automatic measuring machine of *C. elegans* lifespan and performed trial tests of the machine. I found that the machine required some improvement in use.

研究分野：分子生物学

キーワード：老化 光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) などモデル生物を用いた寿命・老化研究により、様々な寿命・老化遺伝子が発見・報告されてきている。これら遺伝子の機能に関して、組織特異的な発現プロモーターを利用する事で組織特異的 (空間的) な機能を調べる事が可能であり、寿命・老化遺伝子が組織ごとに異なる寿命への寄与を果たしている事が明らかになっている。例えば、線虫の代表的な寿命・老化遺伝子である *daf-16/FoxO* は、主に腸管において寿命制御を行っている事が報告されている (Libina N et al. [2003] Cell)。一方、寿命・老化遺伝子の時間的な性質・特性、すなわち加齢に伴ってその機能・役割がどのように変化するかに関しては明らかになっていない点が多い。

孵化から成虫までの発生の各段階で、時間特異的に発現を制御可能な発生段階特異のプロモーターは多数知られており、実験にも用いられているが、成虫以後の加齢過程において利用可能な、加齢段階特異的な発現プロモーターの様なものは知られておらず、成虫期以降の任意のタイミングで遺伝子発現を制御する事は難しい。既存の外因的な遺伝子発現制御システムである RNAi 法では、処理開始から遺伝子発現に変化が現れるまでにタイムラグがあるため遺伝子制御の時間解像度が悪く、また遺伝子発現の可逆的な制御も難しい。熱ショック応答や薬剤応答を利用した方法では、任意のタイミングで寿命・老化遺伝子を行う事は可能であるものの、遺伝子誘導処理自体がストレスとして寿命に多大な影響を与えるため、寿命を調べるといった目的においては不適當である。この様に、加齢過程の異なるタイミングで、寿命・老化遺伝子の機能を調べる事は困難である。

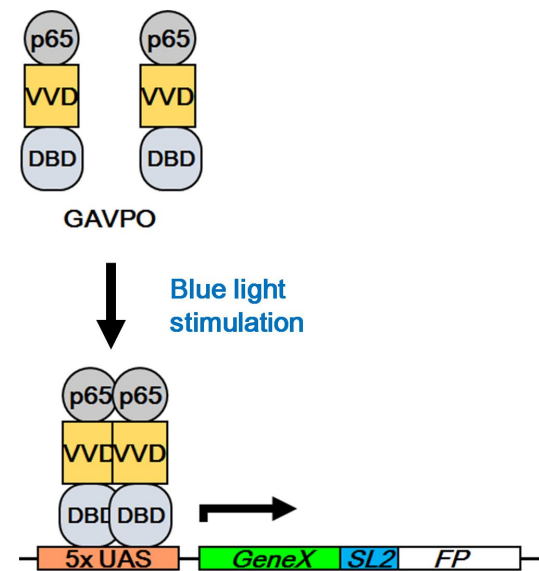
2. 研究の目的

本研究では、それぞれの寿命・老化遺伝子が加齢過程のどのタイミングで、どの様に寿命制御を行っているか調べるために、近年飛躍的な発展を遂げる光により細胞シグナルやタンパク質の機能・局在、遺伝子発現を制御可能な光遺伝学的手法を用いる事で、非侵襲的かつ高い時間解像度で、加齢過程の任意のタイミングで寿命・老化遺伝子の発現を誘導可能なシステムを構築し、寿命・老化遺伝子の時間特異的な機能を明らかにする事を目的とし、その第一段階としてシステムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(a) GAVPO システムの導入

まず、光遺伝学を利用した時間特異的な遺伝子制御システムである GAVPO の線虫への導入を試みる (Chen X et al. [2013] Curr Protoc Chem Biol)。GAVPO は、光により二量体を結合するタンパク質ドメイン LOV (light, oxygen, voltage domain) に、二量体形成時特異的に転写活性を有する転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメインおよび p65 転写活性化ドメインを結合させた人工タンパク質である。この GAVPO 遺伝子の上流に、線虫の組織特異的なプロモーター配列である *ges-1p* (腸組織), *myo-3p* (筋肉組織), *rgef-1p* (神経組織), *dpy-7p* (上皮組織) を導入した Plasmid を作成する。これらの Plasmid を Micro injection により線虫へ導入する。GAVPO の線虫への導入の成否は、蛍光タンパク質を発現する co-injection marker plasmid を同時に導入し、その蛍光で評価する。また、GAVPO の動作を確認するための Reporter plasmid として GAL4 結合配列である UAS の下流にオペロンをばさんで任意の寿命遺伝子と蛍光タンパク質をもつ Plasmid を構築し、同様 Micro injection により線虫へ導入する。



GAVPO を導入した線虫をドライバー個体とし、Reporter Plasmid を導入したレポーター個体と掛け合わせる事で、GAVPO と Reporter を同時に持つ個体を作成し、Reporter の蛍光タンパク質を遺伝子発現の指標とした、青色光による時間特異的な遺伝子発現制御の実証を行う。

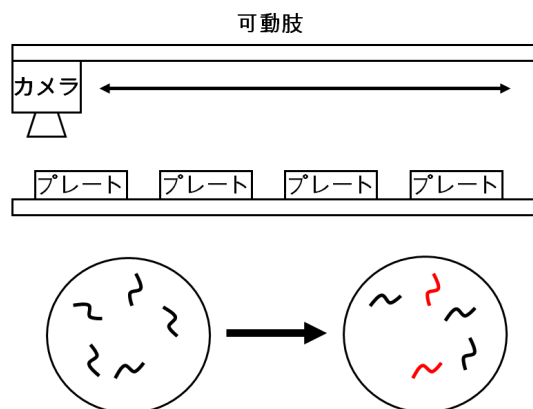
(b) GAVPO システムの改変

GAVPO システムの線虫への導入がうまく行かなかった場合や、導入できたとしても期待される動作が確認できなかった場合には、GAVPO に含まれている転写因子 GAL4 を Q シス

テムの転写因子 QF (Potter CJ et al. [2010] Cell) に置換した改変型 GAVPO を作成し、再度線虫への導入を試みる。GAVPO の改変にあわせてレポーター系のプロモーター配列を QUAS に置換した改変型レポーター系も作成する。導入および実証の方法は(a)と同様である。

(c) 効率的な寿命測定システムの構築

時間的特異的な遺伝子発現を用いた寿命測定実験では、一つの寿命・老化遺伝子に対して複数タイミングでの実験が必要になる事が想定されるため、線虫の寿命を効率的に測定する手法や装置の導入を行い、寿命測定の予備実験を行う。本研究では、ワシントン州立大学との共同研究として画像認識による線虫の寿命測定装置を導入し、試験を行う。導入予定の自動寿命測定装置の動作原理は、可動肢の先端に取り付けられたカメラにより寒天プレート上で飼育された線虫の画像を経時的に取得し、画像解析により時間経過に伴い移動が認められる個体を生存、一定時間移動しない個体を死亡と自動判定する事で、時間経過に伴う生存率の変化を出力するものである。



4. 研究成果

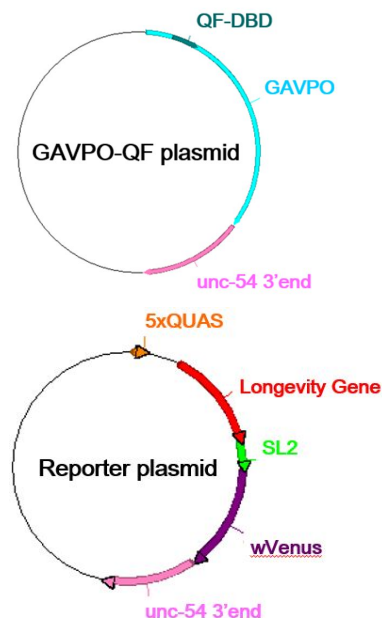
(a) GAVPO システムの導入

Micro injection による GAVPO の導入を試みたところ、複数回の試行で導入する Plasmid 濃度や比率を変えて総計 200 匹以上の線虫に injection を行ったが、co-injection marker plasmid 由来の蛍光を発現する線虫が得られなかった。GAL4/UAS システムの線虫への導入は殆ど例が無く、国内外の線虫学会でも使用例・報告が無かったことから、原因は不明だが導入困難と考え、GAVPO の改変を試みる事とした。

(b) GAVPO システムの改変

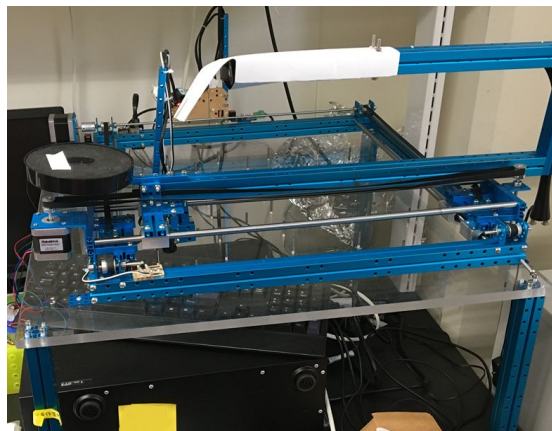
GAVPO タンパク質に含まれる GAL4 DNA 結合配列を、Q system の QF 転写因子の DNA 結合部位と置換した GAVPO-QF を作成した。また、QF 転写因子の DNA 結合部位全長を導入したも

の以外に、人工的に一部配列を変更した GAVPO-QF のバリエーションも作成した。これら GAVPO-QF 配列の上流に任意の Promoter 配列が導入可能になるよう、GAVPO-QF Plasmid の再設計も行った。レポーター系として、UAS 配列を QF 転写因子結合配列である QUAS に置換した Plasmid を作成した。これらの GAVPO-QF および改変型 Reporter plasmid の導入を Micro injection により試みた。その結果、ドライバー系ないしはレポーター系単独での遺伝子導入では GAVPO 同様に導入効率が極めて悪く、数例の co-injection marker



plasmid 由来の蛍光を発現する線虫が得られたものの、その次の世代まで継続して蛍光を発現する個体は得られず、系の樹立には至らなかった。現在、ドライバー個体とレポーター個体を個別に作成する事を断念し、co-injection marker plasmid と GAVPO-QF、reporter plasmid を同時に導入する事で遺伝子導入効率と株化の効率化を試みている。

(c) 効率的な寿命測定システムの構築



ワシントン州立大学との共同研究として上

図に示すような構造を持つ線虫自動寿命測定装置を導入した。導入後に試験したところ、長い可動肢を持つため市販の標準的なインキュベーター内で装置を運用する事が困難である事が分かった。また、画像判定に基づく生死判定プロトコルに関して、生存個体の運動により死亡個体が移動して偽陽性の判定が行われるなど事など、測定上の課題も明らかとなった。これらに関しては、生死判定プロトコルの改良を行っており、装置の小型化の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀川 誠 (Horikawa Makoto)
浜松医科大学・医学部・特任助教
研究者番号：50775997

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし