

氏名（本籍）	古橋 翼		
学位の種類	博 士（ 理 学 ）		
学位記番号	博 甲 第	7322	号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Physiological Function of FoxO/DAF-16 and HSF-1 on Thermotolerance in <i>Caenorhabditis elegans</i> (線虫の熱ストレス耐性に対するFoxO/DAF-16及びHSF-1の生理機能研究)		
主査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	農学博士	宮崎 均
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治

## 論 文 の 要 旨

生体が高温に晒された際、細胞内ではタンパク質の変性や凝集などの損傷が発生する。このような熱による生体への負荷は一般的に熱ストレスとよばれ、熱中症や関連疾患の原因となる。このような熱ストレスから身を守るために、生物は熱による細胞のダメージを予防または回復するために、熱ストレス耐性の機構を備えている。これまで熱ストレス耐性の研究の多くは、線虫(*Caenorhabditis elegans*)をモデル生物に用いて行われてきた。先行研究により、熱ストレス耐性はインスリンシグナル経路と密接に関係する事が示されてきた。事実、インスリン/インスリン様成長因子受容体ホモログの *daf-2* のノックアウトにより、高温条件下における線虫の生存期間が延長する。*daf-2* のノックアウトは FoxO/DAF-16 や HSF-1 を活性化して線虫の個体寿命を延長させることから、FoxO/DAF-16 や HSF-1 が熱ストレス耐性の研究の指標として注目されるようになってきた。しかし、これまで FoxO/DAF-16 や HSF-1 を標的とした研究は数多く行なわれてきたが、これら転写因子の熱ストレス耐性に対する生理機能には未だ多くの疑問が残されている。本研究は、線虫を用いて熱ストレス耐性に対する FoxO/DAF-16 及び HSF-1 の生理機能とその分子機序を解明することを目的とした。

これまでの研究から、DAF-16 は線虫の熱ストレスの予防機能に重要な役割をもつことは知られていたが、時間経過にともなう熱ストレスからの回復機能については議論されてこなかった。本研究は、まず、線虫の全身運動(Thrashing)を指標として、熱ストレス耐性(回復)に対する DAF-16 の生理機能を解析した。発生段階の揃った野生型線虫の幼虫を大腸菌を塗布した寒天培地上で飼育し、35°Cで4時間熱ストレス刺激を与えた。通常(20°C)に戻した後、時間経過に沿って線虫の全身運動活性を測定したところ、熱ストレス刺激直後の運動回数は大きく低下したが、時間経過とともに回復した。一方、*daf-16* 欠損変異体及び *daf-16* RNAi を導入した線虫を用いたところ、熱ストレスにより低下した全身運動の回復が抑制された。次に、*daf-2* 欠損変異体に熱刺激を与えたところ、熱ストレスによる全身運動の低下が軽減され、さらに、その回復が加速された。また、*daf-2* 変異体に *daf-16* RNAi を導入して熱ストレスを与えたところ、全身運動の回復のみが抑制された。また、熱ストレスにより、DAF-16 の核内移行が促進され、さらに

DAF-16 の転写制御を受ける *hsp-12.6* の遺伝子発現が上昇することが分かった。これらの結果から、DAF-16 は熱ストレスに対する耐性（回復）機能をもつ事が示された。

次に、線虫の全身運動を指標として、熱ストレス耐性（予防）に対する HSF-1 の生理機能を解明した。発生段階の揃った野生型線虫の幼虫を 20°C で 3 日間飼育後、RNAi 導入用の大腸菌を塗布した培地に移して *hsf-1* RNAi を導入した。35°C で 4 時間の熱ストレス刺激を与え、20°C に戻してから線虫の運動活性を測定した。その結果、*hsf-1* RNAi により熱ストレスで低下した全身運動の回復が抑制された。また、HSF-1 に転写制御される *hsp-16.2* と *hsp-70* の発現が上昇したことから、熱刺激による運動性の変化は熱ショック応答と関連する可能性が示された。次に、*daf-2* 欠損変異体に *hsf-1* RNAi を導入し、熱ストレス刺激を与えた。その結果、熱刺激直後は *daf-2* 欠損による運動性低下の軽減が阻害されたが、時間経過に沿って運動活性は *hsf-1* RNAi 未導入の *daf-2* 変異体と同程度にまで回復した。さらに、*hsf-1* RNAi を導入した野生型線虫に、35°C で短時間（1 時間）の熱刺激を与えたところ、全身運動の低下がより悪化した。これらの結果から、HSF-1 は熱ストレスに対する耐性（予防）機能をもつ事が示された。

本研究により、DAF-16 は線虫の熱ストレスによる運動障害を回復し、HSF-1 は熱ストレスによる運動障害を予防する働きがあることが分かった。これまでに、DAF-16 や HSF-1 は  $\beta$  アミロイドやポリグルタミンの強制発現による線虫の運動障害を防ぐ事が知られている。従って、熱ストレスによる運動障害は、タンパク質の変性や凝集といった細胞の損傷と密接に関連する事が予想される。本研究成果は、熱ストレス耐性に対する FoxO/DAF-16 や HSF-1 の生理機能の発見という学術的意義があるばかりでなく、熱中症の予防・改善や家畜の暑熱ストレス対策法の開発などの応用研究の発展に大きく貢献したもので、その意義は極めて大きい。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、線虫をモデル生物に用いて熱ストレス耐性に対する FoxO/DAF-16 及び HSF-1 の生理機能を解析した。本研究により、（1）DAF-16 は熱ストレスによる運動障害を回復する働きがあること、さらに（2）HSF-1 は熱ストレスによる運動障害を予防する働きがある事が明らかになった。FoxO や HSF-1 は様々な動物種間で共通に保存されており、本研究結果は、ヒトを始めとする様々な動物の熱ストレス耐性の研究に応用可能であると考えられる。また、線虫の運動性を指標にして熱ストレス耐性の機能解析を実施した例は過去に無く、本研究は、独創的で新規性が高く、同研究分野の発展に大きく寄与した。今後、熱中症の予防・治療法の開発など応用研究の発展が期待でき、その意義は極めて大きい。

平成 27 年 1 月 19 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。