

ミトコンドリアHSP70の抑制は線虫C.elegansにおいて早老症状を促進させる

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/3651

博 士 論 文

Knockdown of mitochondrial heat shock protein 70
promotes progeria-like phenotypes in *C. elegans*.

(邦訳)

ミトコンドリア HSP70 の抑制は線虫 *C.elegans* において早老症状を促進させる

金沢大学大学院自然科学研究科

生命科学専攻

動態生理学講座

学 籍 番 号 0423032511

氏 名 木村 健二

主任指導教員名 中村 暢宏

目 次

1. 序 論	4
1.1. ミトコンドリアと老化の関わり	4
1.2. ミトコンドリアにおける MTHSP70 の役割	5
1.3. 研究目的：発生完了後の個体における MTHSP70 の機能解析	7
2. 結 果	8
2.1. HSP-6 のミトコンドリア局在	8
2.2. RNAi による HSP-6 抑制とそのミトコンドリア機能と形態への影響	11
2.3. <i>HSP-6(RNAi)</i> による生殖腺機能の阻害	17
2.4. HSP-6 ノックダウンによる運動能力の低下と寿命短縮	20
2.5. <i>HSP-6(RNAi)</i> 線虫における寿命短縮	21
2.6. <i>HSP-6(RNAi)</i> 線虫における自家蛍光の早期蓄積	26
2.7. 加齢した線虫における HSP-6 の発現量低下	29
3. 考 察	30
3.1. <i>C.ELEGANS</i> における MTHSP70 / HSP-6	30
3.2. HSP-6 抑制によるミトコンドリア阻害効果	30
3.3. 胚発生における HSP-6 の必要性	31
3.4. HSP-6 阻害による早老症状	32
3.5. ミトコンドリア活性状態と寿命への影響	33
3.6. 死亡率の高い時期に見られる HSP-6 の減少	35
3.7. 総 括	36
4. 材料と方法	38
4.1. 線虫株と培養条件	38
4.2. 形質転換体の作製	38
4.2.1. <i>hsp-6::gfp, mts::gfp</i> レポータープラスミドの構築	38
4.2.2. マイクロインジェクション法による形質転換体の作製	39
4.3. RNAi TREATMENT	39
4.4. 抗体の作製	40
4.5. ウェスタンブロッティング法	41

4.6.	ATP LEVEL 測定	42
4.7.	産卵数の測定	42
4.8.	形態観察と運動能力測定	43
4.9.	ミトコンドリア染色	43
4.10.	自家蛍光観察	44
4.11.	寿命計測と統計解析	44
4.12.	ミトコンドリア単離	45
5.	引用文献	46
6.	略語一覧	54
謝 辞	55

1. 序 論

1.1. ミトコンドリアと老化の関わり

ミトコンドリアは真核細胞において酸化的リン酸化により ATP のほとんどを産生する主要な細胞内小器官（オルガネラ）であり、細胞の分裂と分化に重要な役割を果たしている[1-3]。さらにミトコンドリアは細胞の生存だけでなくアポトーシスのシグナル伝達においても中心的な役割を担っており[4]、細胞増殖の制御に多大な影響を及ぼしている。これらに付随して多くの研究により正常な個体発生におけるミトコンドリアの必要性が報告されている[5-8]。以上のことはミトコンドリアが細胞機能の維持に必要であり、多細胞生物の生存に不可欠であることを示している。しかしながら、ミトコンドリアは活性酸素種（Reactive Oxygen Species : ROS）の主要な発生源でもあり[9]、DNA やタンパク質など様々な生体成分に酸化傷害を与える要因となっている[10, 11]。これらの傷害は加齢に伴い蓄積していき、細胞内の恒常性を破綻させて細胞機能低下をもたらし、やがては生命活動を支える機能全体の衰退という「老化」をもたらすと考えられている。このように、ミトコンドリアは、いわゆる「老化のフリーラジカル説」に基づいて個体老化の進行に深く関与していると考えられている[12-14]。

老化の進行に関連して、様々な種におけるミトコンドリアで加齢に伴う呼吸活性の低下や ATP 産生能の低下およびミトコンドリア DNA (mtDNA) の変異蓄積が観察されている[11, 15]。これらの変化は ROS による酸化傷害が直接的な要因と考えられており、老化を促進させることが示されている。実際に、

mtDNA の修復能を低下させたマウスでは早期のミトコンドリア機能低下とアポトーシスの誘導が観察され、様々な早老症状と寿命短縮が起こる[16, 17]。これらのことから、ミトコンドリアの機能低下は細胞活動の衰えや細胞数の減少をもたらし、やがては個体レベルでの老化を生じさせると考えられている。また、老化に関連したアルツハイマー病など神経変性疾患の発症にも ROS 産生とミトコンドリアの機能低下が関わることが報告されている[18]。

ミトコンドリアと老化の関連性は老化モデル生物・線虫 *Caenorhabditis elegans* においても示されている。線虫における *mev-1* 変異体と *gas-1* 変異体では ROS 発生量の増加が観察されており、酸化ストレスに弱く寿命が短い[19-22]。*mev-1* 遺伝子と *gas-1* 遺伝子はそれぞれ呼吸鎖複合体 II のコハク酸脱水素酵素におけるシトクロム *b* と呼吸鎖複合体 I の NADH-ユビキノン酸化還元酵素における 49-kDa をコードしている。これらとは逆に、線虫における長寿命変異体 *daf-2* では抗酸化酵素 SOD (superoxide dismutase) の活性が高いため酸化ストレスに強く老化が遅い[23, 24]。

以上のことは、ミトコンドリアが細胞機能の維持において中核を成す重要な役割を担っており、老化に関連した細胞機能低下や疾患を制御する主要なオルガネラであることを示唆している。

1.2. ミトコンドリアにおける mthsp70 の役割

ミトコンドリアの機能維持において重要性が高いと考えられる因子にミトコンドリア熱ショックタンパク質70 (Mitochondrial Heat Shock Protein 70 : mthsp70) がある。mthsp70はミトコンドリアのマトリックスに局在するHSP70ファミリー

に属しており、種を超えてよく保存されている。mthsp70はミトコンドリア・マトリックス内へ輸送されてきたタンパク質を細胞質側からマトリックス側へと引き込む分子モーターとして機能しており、さらにマトリックス内で分子シャペロンとしてフォールディングの補助も行っている[25, 26]。特に、ミトコンドリアを構成するタンパク質の99%以上は核DNAにコードされているため、ミトコンドリアが正常に機能するためにはミトコンドリアへのタンパク質輸送が正常に行われる必要がある。このように、mthsp70はミトコンドリアにおけるタンパク質の品質管理に必須の役割を果たしており、ミトコンドリアの機能維持に重要である[27-29]。

哺乳類細胞におけるmthsp70であるmortalin/GRP75は細胞増殖の調節に関与することが報告されており、mortalinの発現抑制により癌細胞の増殖が阻害される[30]。出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*におけるmthsp70のオルソログSSC1の欠失変異体は致死であり、mthsp70が細胞の生存に必要不可欠であることを示している[31-33]。加えて、線虫*C.elegans*におけるmthsp70オルソログと考えられるhsp-6/hsp70F遺伝子のRNAiによる抑制は胚性致死や成長停止、不妊などの表現型をもたらし、hsp-6が個体発生にも必須であることを示唆している[34, 35]。

これらとは対照的に、ヒト繊維芽細胞においてmortalinを過剰発現させることで分裂寿命を延長させることが示されており[36]、線虫においてもhsp-6を過剰発現させることで寿命が延長することが報告されている[37]。また、mortalinを過剰発現させたPC12細胞ではROSの蓄積が抑制される[38]。

以上のことは、mthsp70が正常なミトコンドリアの機能と恒常性の維持に必要なであると同時に、細胞増殖と個体発生に重要な役割を果たす因子であることを

示唆している。

1.3. 研究目的：発生完了後の個体における mthsp70 の機能解析

しかしながら、mthsp70のノックアウトは細胞分裂の抑制をもたらす致死となることから、これまで発生過程が完了した後の多細胞生物におけるmthsp70が果たす役割は解析されていなかった。mthsp70はミトコンドリア機能の制御に深く関わるため、ミトコンドリアと老化の相互関係を明らかにする上で非常に重要な因子であると考えられる。近年、パーキンソン病患者の脳においてmortalin / mthsp70の量が減少していることが報告され[39]、個体における分裂終了細胞でmthsp70が果たす役割も重要であることが示唆されている。

そこで、本研究では発生完了後の多細胞生物におけるmthsp70の役割を解明することを目的として、線虫の成虫期から*hsp-6*の発現抑制を行い、その影響の解析を行った。成虫になった線虫は体細胞分裂を行わないため、mthsp70の発現抑制による個体レベルでの機能解析が可能である。さらに、この特徴から分裂終了細胞に加齢とともに蓄積される傷害とミトコンドリア機能の相互関係を解析するのにも適している。本研究によるmthsp70の機能解析により、ミトコンドリアがもたらす老化進行過程のメカニズムに新たな知見がもたらされることが期待される。

2. 結 果

2.1. HSP-6 のミトコンドリア局在

C.elegans の HSP-6 はアミノ酸レベルでマウスの *mthsp70/mortalin/Grp75* と 77%、酵母の *Ssc1p* と 63%の相同性を持ち、線虫における *mthsp70* オルソログと予想されている[37]。*mthsp70* は N 末端側に両親媒性の α ヘリックス構造を持ち、正電荷をもつ塩基性アミノ酸が一定間隔ごとに配置している。これは典型的なミトコンドリア移行シグナルに見られる配列であり、この特徴は HSP-6 の N 末端側にも見られた。このことから HSP-6 もミトコンドリアに局在することが予想されるが、HSP-6 の細胞内局在は今まで調べられていなかった。ここではじめに HSP-6 の線虫における細胞内局在を確認した。

HSP-6 の細胞内局在を確かめるために線虫の筋細胞で GFP 融合 HSP-6 タンパク質 (HSP-6-GFP) を発現させた。若い成虫期の形質転換体をミトコンドリア染色色素 Mito Tracker Red を用いてミトコンドリアを染色し、レーザー走査型共焦点顕微鏡下で観察した。体壁筋で発現させた HSP-6-GFP 蛍光は、楕円形の構造物が一定間隔ごとに筋繊維に沿って配置し、これが並行に整列していた (Fig. 1A 上段)。この蛍光パターンは過去の報告による線虫のミトコンドリア形態と酷似しており[40, 41]、さらに Mito Tracker Red による蛍光と共局在を示した。また、HSP-6 におけるミトコンドリア移行シグナルと予想される配列を含んだ N 末端側 38 アミノ酸と GFP の融合タンパク質を同様にして線虫で発現させ局在を観察したところ、HSP-6-GFP と同じパターンが確認された (Fig. 1A 下段)。

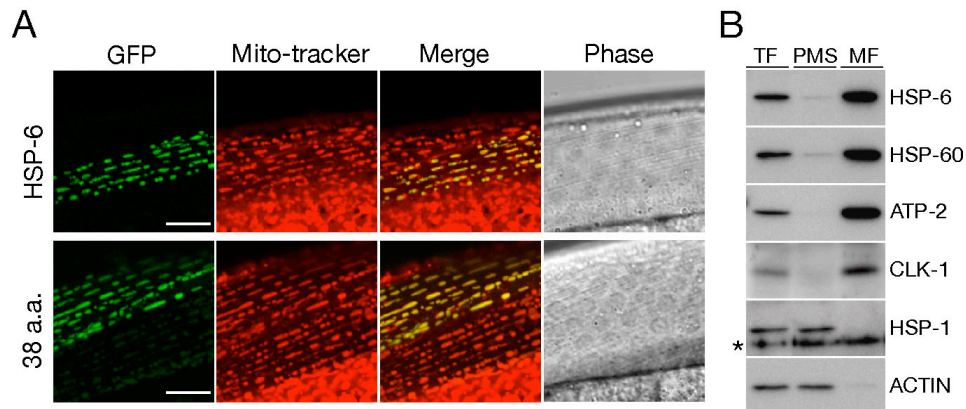


Fig. 1. HSP-6 のミトコンドリア局在

A, HSP-6 の細胞内局在を確認するために、HSP-6 全長 (HSP-6::GFP; 上段) あるいは HSP-6 の N 末端側 38 アミノ酸 (38 a.a.:GFP; 下段) と GFP の融合タンパク質を発現させた形質転換体を作製した。写真はレーザー走査型共焦点顕微鏡下で写真撮影した形質転換体の体壁筋部分を示した。上下段とも左から GFP 蛍光、ミトコンドリア染色色素 MitoTracker Red 蛍光、GFP と MitoTracker Red の merge、位相差像である。HSP-6::GFP と 38 a.a.:GFP の両方とも MitoTracker Red と共局在を示した (上下段、merge の黄色部分)。スケールバー = 10 μ m.

B, 線虫 (野生株 N2) をホモジナイズして細胞抽出液を作製し、段階的な遠心分離により細胞分画を行った。得られた全タンパク質画分 (TF; 10 μ g)、細胞質画分 (PMS; 10 μ g)、ミトコンドリア画分 (MF; 1 μ g) を用いてウエスタンブロッティングを行った。プロットは示した各ミトコンドリアマーカー (HSP-6, HSP-60, ATP-2 と CLK-1) と細胞質マーカー (HSP-1 と ACTIN) の抗体と反応させ検出を行った。非特異的に検出されたバンドにアスタリスクを付した。方法の詳細は「材料と方法」の頁に記した。

さらに生化学的手法で HSP-6 の細胞内局在を確認するため、線虫をホモジナイズして調製した線虫抽出液を段階的な遠心分離により全タンパク質画分、ミトコンドリア画分、細胞質画分に細胞分画し、HSP-6 特異抗体を用いたウエスタンブロッティングで HSP-6 の検出を行った。その結果、HSP-6 は明らかにミトコンドリア画分に濃縮されており細胞質画分にはほとんど検出されなかった (Fig. 1B)。これは他のミトコンドリアマーカーの F₁-ATPase β サブユニット ATP-2 [42, 43], ミトコンドリアにおけるシャペロニン HSP-60 [40], ユビキノン

合成酵素 CLK-1 [44]と同様の結果であった。細胞質局在が明らかなアクチンと HSP-1 は細胞質画分に検出され、ミトコンドリア画分には全く検出されなかった。この結果は細胞質画分から効率良くミトコンドリア画分が分離できていることを示している。

他生物との高い相同性と本実験で新たに明らかになったミトコンドリア局在性から、HSP-6 は線虫における mtHSP70 オルソログであると結論した。また、HSP-6 の N 末端側 38 アミノ酸がミトコンドリア移行シグナルとして機能していることが明らかになった。

2.2. RNAiによるHSP-6抑制とそのミトコンドリア機能と形態への影響

HSP-6の成虫個体における役割を調べるために、feeding RNAi法による特異的なHSP-6抑制を行った。線虫におけるHSP-6の抑制は胚性致死あるいは幼虫段階での成長停止をもたらすため[34, 35]、RNAi処理は卵孵化後3日の発生が終了した若い成虫期 (young adult stage) から行った。*hsp-6* RNAi処理 (*hsp-6(RNAi)*) 開始から2日後にタンパク質試料を回収しウエスタンブロッティングによりHSP-6のタンパク量を確認したところ、HSP-6は明らかに減少していた (Fig. 2A)。これに対し、*hsp-6*に最も高い相同性を持つ*hsp-1*遺伝子の発現は*hsp-6*のRNAiで減少しなかった (Fig. 2A)。このことは本実験における*hsp-6*のRNAiが特異的であることを示している。

HSP-6ノックダウンによるミトコンドリアへの影響を確認するため、ミトコンドリアの形態および膜電位、ATP量を調べた。まず*hsp-6(RNAi)*線虫とコントロールであるmock処理線虫のミトコンドリアをMito Trackerで染色し、その形態を観察した。mock処理2日後の体壁筋におけるミトコンドリアはHSP-6-GFP発現線虫の観察時と同様で、楕円形のミトコンドリアが筋繊維に沿って並行に整列しているといった規則的な配置をしていた (Fig. 2B)。これに対し、*hsp-6(RNAi)*2日後の線虫のミトコンドリアではコントロール線虫で見られた規則的な配置が失われ、細長く伸長し頻繁に筋繊維を越えて互いに繋がっているという異常が観察された (Fig. 2B)。また、ミトコンドリア膜電位依存的に取り込まれるMitoTrackerで染色した*hsp-6(RNAi)*線虫で観察される蛍光強度は、処理後4日の時点でコントロールに比べて明らかに弱く (Fig. 2C)、*hsp-6(RNAi)*

によりミトコンドリアの膜電位が低下していることを示唆していた。これに付随して、*hsp-6(RNAi)*線虫における ATP 量を調べたところ、処理後 2 日の時点ではコントロール線虫と差は見られなかったが、処理後 4 日の時点で *hsp-6(RNAi)* 線虫の ATP 量はコントロールの約 50%まで減少していた (Fig. 2D, Table I)。これらの結果より、HSP-6 の抑制によりミトコンドリア形態の異常や膜電位の低下、ATP 量の減少などミトコンドリアの機能障害がもたらされることがわかった。

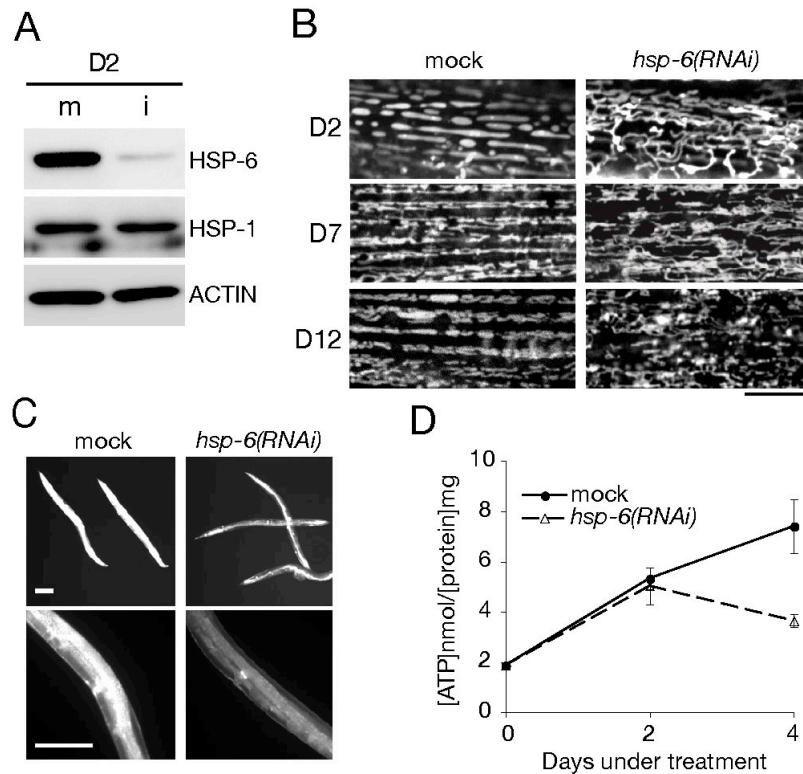


Fig. 2. HSP-6 ノックダウンによるミトコンドリアへの影響

A, 卵孵化から3日後の若い成虫 (young adult stage) をコントロールの mock (m) あるいは *hsp-6(RNAi)* (i) プレートに移し、2日間飼育した。その後、各線虫からタンパク質試料を作製し、示した各抗体 (HSP-6, HSP-1 と ACTIN) を用いたウェスタンブロッティングを行った。*hsp-6(RNAi)*により HSP-6 が特異的に減少した (D2, i)。

B, mock あるいは *hsp-6 RNAi* 処理を2、7、12日間行った線虫のミトコンドリアを染色し、焦点顕微鏡で体壁筋におけるミトコンドリア観察を行った (D2, D7, D12)。ミトコンドリア染色法の詳細は「材料と方法」の頁に記した。露光時間は明確な像を得るために調節した。スケールバー = 10 μm 。

C, mock あるいは *hsp-6 RNAi* 処理を4日間行った線虫をミトコンドリア染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。mock と RNAi の蛍光強度を比較するために同一の露光時間で蛍光撮影を行った。上段は線虫の全身像で、下段は胴体部の拡大図である。スケールバー = 200 μm 。

D, mock あるいは *hsp-6 RNAi* 処理線虫の ATP 量の測定を行った。方法の詳細は「材料と方法」の頁に記した。実験は3回行い、その平均値を用いてグラフ化した。誤差棒は SE を示す。各実験結果の値と有意差検定の結果は Table I に記した。

Table I ATP 量の測定

ATP 量 (ATP [nmol] / protein [mg]) の測定結果を示した。

Day	Genotype and Treatment	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Overall mean ^a	t-test ^b
0	N2 ^c	1.9	1.6	2.0	1.9 ± 0.2	
2	N2 mock	4.3	6.0	5.7	5.3 ± 0.7	
	N2 RNAi	3.4	6.4	5.3	5.0 ± 1.3	<i>P</i> = 0.786
4	N2 mock	7.4	9.7	5.2	7.4 ± 1.8	
	N2 RNAi	3.5	3.2	4.3	3.7 ± 0.4	<i>P</i> = 0.048

^a ATP 量の平均値 (実験 3 回分) ± SD.

^b 統計ソフトウェア Mini StatMate を用いて mock 処理と RNAi 処理間の t 検定を行った。処理 2 日の時点では有意差がないが (*P* = 0.786)、処理 4 日の時点で有意差がみられる (*P* = 0.048)。また、Microsoft Excel で二元配置分散分析 (ANOVA) を行った結果、ATP 量に対する RNAi 処理の効果は有意であった (*P* = 0.033)。ATP 量に対する加齢の効果もまた有意であった (*P* < 0.001)。さらに、RNAi 処理と加齢は相互作用があり (*P* = 0.033)、ATP 量に対して相乗効果があることを示している。

^c 未処理の線虫 (卵孵化 3 日後の young adult)

ミトコンドリアにおける ATP 産生は、呼吸鎖複合体で形成される膜電位で駆動するミトコンドリア内膜の F₀F₁-ATPase で行われている[45]。HSP-6 の抑制により ATP 量の減少が観察されたため F₀F₁-ATPase を調べたところ、F₁-ATPase の β サブユニットである ATP-2 の発現量が *hsp-6(RNAi)* 4 日目の時点で明らかに減少していることがわかった (Fig. 3, D4)。同様にミトコンドリアにおけるユビキノン合成酵素 CLK-1 およびシャペロニン HSP-60 の発現量も *hsp-6(RNAi)* により減少した (Fig. 3 下段)。HSP-6 の発現量は *hsp-6(RNAi)* 2 日目の時点で mock の 10–15% まで低下しているのに対して、ATP-2 は約 45%、HSP-60 は約 60% であった。*hsp-6(RNAi)* 4 日目ではさらに減少し、ATP-2 はコントロールの約 40%、HSP-60 は約 50%、CLK-1 は約 60% まで減少した。これらの結果は、

HSP-6 がこれらのミトコンドリアタンパク質量の維持に必要であることを示している。従って、先の実験で明らかになった *hsp-6(RNAi)* による ATP 合成阻害は、ATP-2・HSP-60・CLK-1 などのミトコンドリア局在タンパク質が減少した結果として引き起こされたと考えられる。

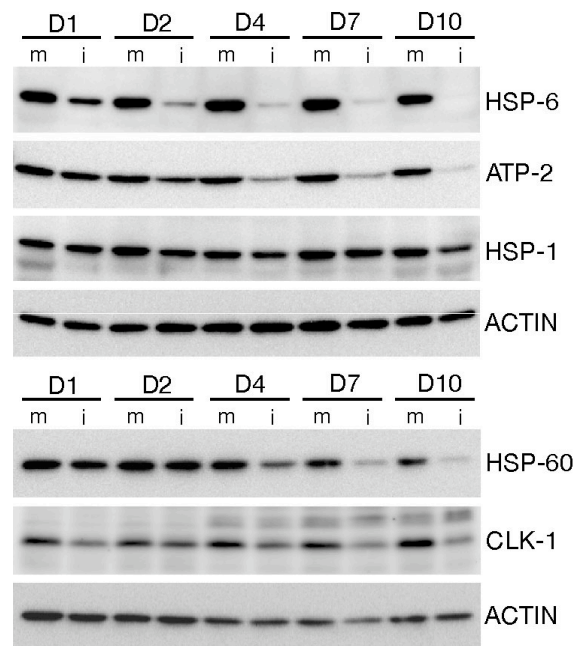


Fig. 3 HSP-6 抑制による ATP-2, CLK-1, HSP-60 の減少

mock (m) あるいは *hsp-6 RNAi* (i) 処理を 1、2、4、7、10 日間行った線虫からタンパク質試料を調整し (D1 – D10)、ウエスタンブロッティング法により示した各タンパク質の検出を行った。HSP-6, HSP-1, ATP-2, HSP-60, ACTIN の検出には 10 μ g、CLK-1 には 30 μ g のタンパク質を用いた。

興味深いことに、体壁筋におけるミトコンドリア形態は **mock** 処理 7 日目の時点で細長く伸長して成虫成熟後初期に見られる規則性が失われている傾向にあることが観察された (Fig. 2B. **mock** D7)。さらに 12 日目以後はミトコンドリアの断片化が観察された (Fig. 2B. **mock** D12)。この加齢に伴うミトコンドリア形態の変化は *hsp-6(RNAi)* 線虫でも早期に類似した傾向が観察されるが (Fig. 2B. *hsp-6(RNAi)*)、**mock** に比べてその細長い伸長と断片化の傾向が強く、ミトコンドリアの機能低下に付随した結果であると思われる。

2.3. *hsp-6(RNAi)*による生殖腺機能の阻害

分裂が終了した体細胞から成る成虫個体のHSP-6抑制はミトコンドリア機能の低下をもたらしたが、急性的な致死とはならなかった。ところが、胚発生時からのHSP-6の抑制は胚性致死や幼虫段階での成長停止、不妊などの表現型をもたらすことがわかっている[34, 35]。そこで、HSP-6の抑制により成虫の生殖腺における卵形成能が阻害されることが予想されたため、*hsp-6(RNAi)*線虫の産卵能力について調べた。

コントロールの線虫は卵を産み始める若い成虫期から約3日間正常な受精卵の産卵を行い、その後はやや不鮮明かつ茶色を呈する小さい未受精の卵母細胞を数日間に渡り産卵した。これに対して*hsp-6(RNAi)*線虫は若い成虫期から2日間産卵を行い、その後は全く産卵が観察されなかった。これらと対応して、産卵開始から10日目のコントロール線虫の子宮内には未受精の卵母細胞が大量に蓄積しているのに対して*hsp-6(RNAi)*線虫の子宮内には卵母細胞が欠失していた (Fig. 4A)。さらに*hsp-6(RNAi)*線虫の生殖腺はコントロールに比べて全体的に不透明で濃い茶色を呈するという特徴を示していた (Fig. 4B)。産卵能力を定量的に解析するために若い成虫期から3日間の総産卵数を計測したところ、*hsp-6(RNAi)*線虫の産卵数はコントロールの約36%まで減少していた (Fig. 4C, Table II)。さらに*hsp-6(RNAi)*線虫の産んだ卵の約半数は少なくとも三週間は孵化せず、発生に異常があることを示していた。これらの卵を顕微鏡下で拡大して観察した結果、様々な胚発生段階で細胞分裂が停止している様子が見られた (Fig. 4D)。

以上の結果から、*hsp-6(RNAi)*線虫の生殖腺における卵形成能は明らかに低下しており、また卵における細胞分裂を停止させることで胚性致死を引き起こすことがわかった。

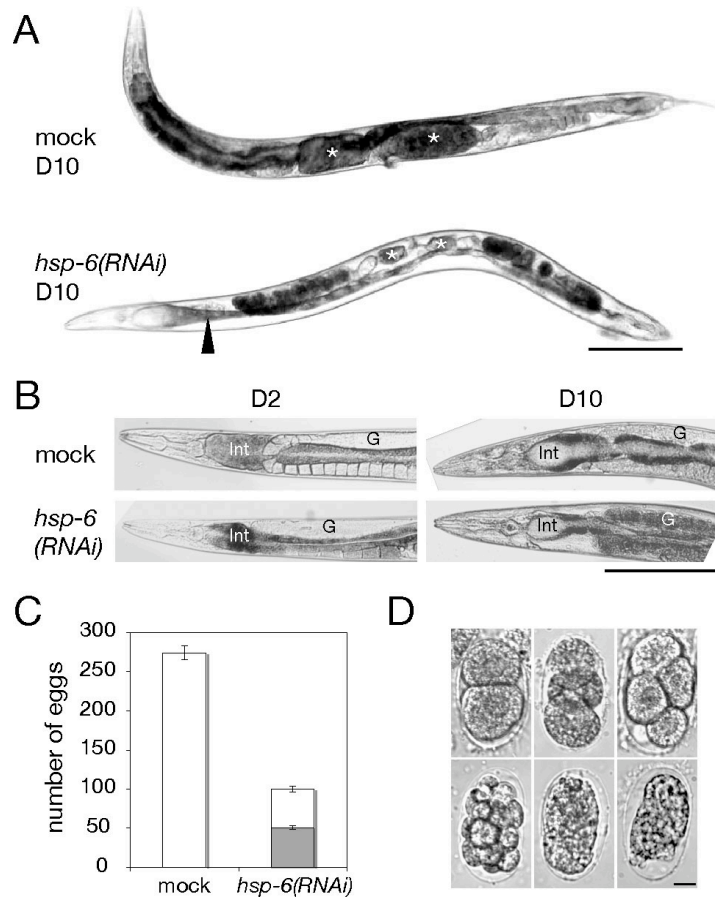


Fig. 4 *hsp-6* RNAiによる生殖腺阻害

mockあるいは*hsp-6* RNAi処理線虫における卵形成能力を調べた。D2とD10はそれぞれmock/RNAi処理を2日あるいは10日間行ったことを示す。

A, mock/RNAi処理線虫(D10)を実体顕微鏡下で透過光観察し、写真撮影を行った。写真は各処理線虫を40匹以上観察した中で典型的な個体を示した。アスタリスクは線虫の子宮を指している。スケールバー = 200 μ m.

B, mock/RNAi処理線虫(D2, D10)を位相差顕微鏡下で観察し、咽頭側の上半身を写真撮影した。Int, 腸(前部) G, 生殖腺。スケールバー = 200 μ m.

C, mock/RNAi処理線虫の産卵数を調べた。実験は3回行い、その平均値を棒グラフ化した。棒グラフ

のグレー部分は産卵されてから2日間以上経過しても孵化しなかった卵の数を示す。誤差棒はSEである。
各実験結果の値と有意差検定の結果は Table II に記した。

D, *hsp-6* RNAi 処理で産卵後2日以上孵化しなかった卵を写真撮影した。スケールバー = 10 μ m.

Table II 産卵数の測定

1匹の線虫が産んだ卵の平均数 \pm SD を示した。括弧内の数字は測定した線虫の個体数である。

Genotype and Treatment	Category	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Overall mean	t-test ^c
N2 mock	Total ^a	284 \pm 54 (10)	272 \pm 53 (11)	267 \pm 52 (10)	274 \pm 52 (31)	
N2 RNAi	Total	103 \pm 20 (10)	93 \pm 15 (11)	104 \pm 45 (11)	100 \pm 29 (32)	$P < 0.001$
	Unhatched ^b	58 \pm 12	44 \pm 11	51 \pm 14	51 \pm 13	

^a mock 処理ではすべての卵が孵化した。

^b 産卵後2日以上経過しても孵化しない卵の平均数を Unhatched に示した。

^c 統計ソフトウェア Mini StatMate を用いて mock 処理と RNAi 処理間の t 検定を行った。RNAi 処理により有意に産卵数が減少した ($P < 0.001$)。

2.4. HSP-6 ノックダウンによる運動能力の低下と寿命短縮

ミトコンドリアの機能低下はヒトや線虫における自然老化に伴う運動能力の低下と密接な関係にあることが報告されている[44, 46-49]。これまでに述べた実験結果より HSP-6 の抑制によってミトコンドリアの機能低下が起こることが明らかになった。そこで次に、*hsp-6(RNAi)*線虫の運動能力が低下しているかどうかを確認した。

第一に運動能力の指標として線虫野生株のむち打ち運動経時的に計測した。コントロール線虫の1分間あたりのむち打ち運動回数は計測を開始した若い成虫期を最高値としてその後は加齢に伴い徐々に低下していき、過去の報告に一致していた[24, 50]。一方、*hsp-6(RNAi)*線虫のむち打ち運動も加齢に伴い徐々に低下するというコントロールに類似した傾向を示したが、その加齢に伴う低下速度はコントロールよりも明らかに早いことがわかった (Fig. 5A, Table III)。計測した *hsp-6(RNAi)*線虫のむち打ち運動回数はコントロールと比べて、RNAi 開始後6日の時点で約60%、9日の時点で約35%まで低下していた。これらの傾向は長寿命変異体 *daf-2* でも同様であった (Fig. 5B, Table III)。

さらに運動能力の指標として線虫の咽頭部における咀嚼運動 (pharyngeal pumping) を経時的に計測した。その結果、むち打ち運動と同様に、コントロールと *hsp-6(RNAi)*線虫の pumping 回数は加齢に伴って減少し、その減少速度は *hsp-6(RNAi)*線虫の方がコントロールよりも早い傾向にあることがわかった (Fig. 5C, Table IV)。 *hsp-6(RNAi)*線虫の pumping 回数は RNAi 開始後5日の時点でコントロールの約80%、12日の時点で約60%まで低下していた。

これらの結果から、HSP-6 の抑制により線虫の運動能力低下が起きることがわかった。

2.5. *hsp-6(RNAi)*線虫における寿命短縮

HSP-6 の抑制によりもたらされたミトコンドリア機能障害や運動能力の低下は自然老化時にも観察される表現型であることから、HSP-6 の抑制が線虫の寿命に影響するのかどうかを解析した。寿命の計測に関して RNAi 処理はこれまでと同様に若い成虫期から開始して 2 日から 4 日毎に線虫の死亡数をカウントした。培地プレートの壁での乾燥死や生殖腺の飛び出しなどによる事故死は死亡数から除外した。寿命計測の結果、野生株において *hsp-6(RNAi)*線虫はコントロールと比較して死亡個体が観察され始める孵化後 10 日目までは大差がなかったが、それ以降の *hsp-6(RNAi)*線虫の死亡率が大きく最大寿命がコントロールよりも 8 日短かった。*hsp-6(RNAi)*線虫の平均寿命はコントロールと比較して約 15%短く、明らかな有意差があった (Fig. 5D N2, Table V)。これらの傾向は長寿命変異体 *daf-2* でも同様であり、孵化から 30 日目までは *hsp-6(RNAi)*とコントロールは差がない寿命曲線を描いたが、それ以降の *hsp-6(RNAi)*線虫の死亡率が大きく、*hsp-6(RNAi)*線虫の最大寿命はコントロールよりも 11 日短かった。平均寿命では *hsp-6(RNAi)*線虫の方がコントロールよりも約 15%短く、野生株と同様に明らかな有意差が見られた (Fig. 5D *daf-2*, Table V)。これらの結果から、線虫の成虫期から HSP-6 を抑制することで寿命が短縮することがわかった。

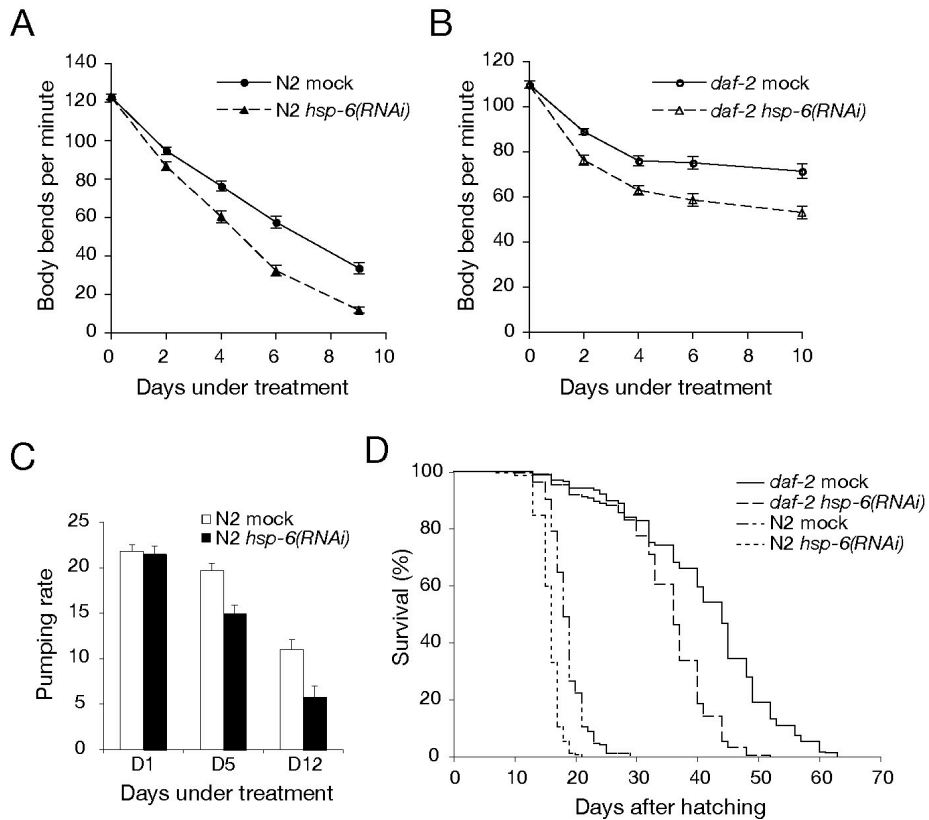


Fig. 5 *hsp-6(RNAi)*線虫における運動能力低下と寿命短縮

mockあるいは*hsp-6* RNAi処理を行い、運動能力と寿命の計測を行った。

A, B, 野生株 N2 (A) あるいは *daf-2* 変異体 (B) におけるむち打ち運動を継時的に計測し (D0–D10)、3 回行った実験の平均値を用いてグラフ化した。方法の詳細は「材料と方法」の頁に記した。誤差棒は SE を示した。各実験結果の値と有意差検定の結果は Table III に記した。

C, N2 の咽頭部における咀嚼運動 (pumping) を「材料と方法」の頁に記した方法で計測した。示した棒グラフには 3 回行った実験の平均値を用いた。誤差棒は SE である。各実験結果の値と有意差検定の結果は Table IV に記した。

D, mock / RNAi 処理を行った N2 あるいは *daf-2* の 20°C における寿命計測を行い、その結果を寿命曲線に示した。寿命曲線は 3 回行った実験の計測値を統合して作製した。各実験の計測結果と有意差検定の結果は Table V に記した。

Table III むち打ち運動の測定

測定したむち打ち運動回数の平均値 \pm SD を示した。括弧内の数字は測定した個体数である。

Day	Genotype and Treatment	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Overall mean	<i>t</i> -test ^b
0	N2 ^a	133 \pm 14 (40)	117 \pm 14 (40)	118 \pm 9 (40)	123 \pm 15 (120)	
2	N2 mock	104 \pm 8 (20)	86 \pm 13 (20)	94 \pm 15 (20)	95 \pm 14 (60)	
	N2 RNAi	104 \pm 9 (20)	78 \pm 24 (20)	82 \pm 9 (20)	87 \pm 18 (60)	<i>P</i> = 0.006
4	N2 mock	78 \pm 20 (20)	73 \pm 20 (20)	79 \pm 21 (20)	76 \pm 20 (60)	
	N2 RNAi	76 \pm 14 (20)	47 \pm 19 (20)	58 \pm 26 (20)	60 \pm 23 (60)	<i>P</i> < 0.001
6	N2 mock	59 \pm 28 (20)	49 \pm 14 (20)	64 \pm 25 (20)	58 \pm 24 (60)	
	N2 RNAi	36 \pm 25 (20)	24 \pm 15 (20)	37 \pm 20 (20)	33 \pm 21 (60)	<i>P</i> < 0.001
9	N2 mock	31 \pm 24 (20)	29 \pm 20 (20)	41 \pm 20 (20)	34 \pm 22 (60)	
	N2 RNAi	11 \pm 13 (20)	10 \pm 10 (20)	15 \pm 12 (20)	12 \pm 12 (60)	<i>P</i> < 0.001
0	<i>daf-2</i>	104 \pm 6 (40)	116 \pm 23 (40)	111 \pm 18 (40)	110 \pm 18 (120)	
2	<i>daf-2</i> mock	90 \pm 10 (20)	92 \pm 11 (20)	85 \pm 11 (20)	89 \pm 11 (60)	
	<i>daf-2</i> RNAi	83 \pm 9 (20)	78 \pm 22 (20)	68 \pm 15 (20)	76 \pm 17 (60)	<i>P</i> < 0.001
4	<i>daf-2</i> mock	82 \pm 7 (20)	73 \pm 26 (20)	73 \pm 12 (20)	76 \pm 17 (60)	
	<i>daf-2</i> RNAi	67 \pm 9 (20)	65 \pm 19 (20)	57 \pm 15 (20)	63 \pm 16 (60)	<i>P</i> < 0.001
6	<i>daf-2</i> mock	79 \pm 15 (20)	72 \pm 25 (20)	74 \pm 23 (20)	75 \pm 21 (60)	
	<i>daf-2</i> RNAi	57 \pm 9 (20)	64 \pm 25 (20)	55 \pm 25 (20)	59 \pm 21 (60)	<i>P</i> < 0.001
10	<i>daf-2</i> mock	80 \pm 8 (20)	66 \pm 33 (20)	69 \pm 26 (20)	71 \pm 25 (60)	
	<i>daf-2</i> RNAi	51 \pm 15 (20)	61 \pm 27 (20)	47 \pm 18 (20)	53 \pm 21 (60)	<i>P</i> < 0.001

^a 未処理の線虫 (卵孵化 3 日後の young adult)

^b mock 処理と RNAi 処理間の *t* 検定を処理期間 (day 0 - 10) 毎に Mini StatMate で行った。野生株 N2 と *daf-2* の両者ともすべての時点において RNAi 処理線虫のむち打ち運動回数は mock よりも有意に低かった。また、Microsoft Excel で二元配置分散分析 (ANOVA) を行った結果、むち打ち運動に対する RNAi 処理の効果は有意であることがわかった (*P* < 0.001)。むち打ち運動に対する加齢の効果もまた有意であった (*P* < 0.001)。さらに、RNAi 処理と加齢は相互作用があり (*P* < 0.001)、むち打ち運動に対して相乗効果があることを示している。

Table IV Pumping の測定

5 秒間あたりの平均 Pumping 回数 \pm SD を示した。括弧内の数字は測定した個体数である。

Day	Genotype and Treatment	Exp. I	Exp. II	Exp. III	Overall mean	Mann-Whitney ^a
1	N2 mock	26.3 \pm 1.2 (12)	19.6 \pm 2.8 (10)	18.5 \pm 3.6 (10)	21.8 \pm 4.4 (32)	<i>P</i> = 0.995
	N2 RNAi	26.5 \pm 1.0 (12)	18.7 \pm 5.3 (10)	18.1 \pm 4.2 (10)	21.4 \pm 5.5 (32)	
5	N2 mock	24.6 \pm 2.5 (11)	18.4 \pm 2.2 (11)	15.2 \pm 3.7 (10)	19.5 \pm 4.8 (32)	<i>P</i> < 0.001
	N2 RNAi	19.8 \pm 4.8 (11)	14.5 \pm 2.7 (11)	9.7 \pm 3.2 (10)	14.8 \pm 5.5 (32)	
12	N2 mock	10.1 \pm 7.6 (11)	12.2 \pm 6.3 (11)	10.7 \pm 3.9 (10)	11.0 \pm 6.0 (32)	<i>P</i> = 0.002
	N2 RNAi	10.6 \pm 8.2 (11)	3.7 \pm 4.6 (11)	2.7 \pm 5.0 (10)	5.8 \pm 7.1 (32)	

^a Mini StatMate ソフトウェアを用いた Kolmogorov-Smirnov 検定の結果、RNAi day12 のデータ群が正規分布しなかったため (*P* < 0.01)、Mann-Whitney U 検定法により mock 処理と RNAi 処理間の有意差検定を行った。その結果、day 5 と day 12 の時に mock と RNAi 間に有意差がみられた。

Table V 寿命計測

	Genotype and treatment	No. death ^a	No. censor ^b	mean lifespan (days) ^c	median (days) ^d	Log-rank test ^e
Exp. I	N2 mock	67	18	17.6 ± 0.3	18	
	N2 RNAi	64	21	16.0 ± 0.2	16	<i>P</i> < 0.0001
Exp. II	N2 mock	46	26	17.9 ± 0.4	17	
	N2 RNAi	42	30	15.9 ± 0.3	15	<i>P</i> = 0.0001
Exp. III	N2 mock	80	11	19.7 ± 0.3	19	
	N2 RNAi	74	28	15.5 ± 0.2	15	<i>P</i> < 0.0001
Overall mean	N2 mock	193	54	18.6 ± 0.2	18	
	N2 RNAi	180	79	15.7 ± 0.1	16	<i>P</i> < 0.0001
Exp. I	<i>daf-2</i> mock	89	5	41.0 ± 1.2	40	
	<i>daf-2</i> RNAi	82	11	34.6 ± 0.8	36	<i>P</i> < 0.0001
Exp. II	<i>daf-2</i> mock	63	12	38.0 ± 1.7	36	
	<i>daf-2</i> RNAi	70	5	35.6 ± 1.2	40	<i>P</i> = 0.03
Exp. III	<i>daf-2</i> mock	92	16	44.2 ± 0.8	45	
	<i>daf-2</i> RNAi	97	14	34.7 ± 0.5	33	<i>P</i> < 0.0001
Overall mean	<i>daf-2</i> mock	244	33	41.5 ± 0.7	44	
	<i>daf-2</i> RNAi	249	30	34.9 ± 0.5	36	<i>P</i> < 0.0001

^a 死亡数

^b 事故死した個体数。これらは死亡数から除外した。

^c 卵孵化時からの 20 °C における平均寿命 ± SE

^d 生存率が 50 %に達したときの日数

^e Mini StatMate を用いて Log-rank 検定を行い、mock 処理と RNAi 処理間の平均寿命の有意差を調べた。その結果、野生株 N2 と *daf-2* の両者とも有意に RNAi 処理で平均寿命が短かった。

2. 6. *hsp-6(RNAi)*線虫における自家蛍光の早期蓄積

線虫個体における HSP-6 ノックダウンの影響は加齢時の特徴であるミトコンドリア機能低下やそれに伴う運動能力の衰退をもたらし、さらに寿命を短縮させた。これは運動能力の低下と寿命の長さには相関があるという報告と一致する[24]。これらのことから、*hsp-6(RNAi)*線虫が早老症状を示している可能性が示唆された。そこで、これを検証するために老化の指標として知られている自家蛍光物質の観察を行った。自家蛍光物質は酸化したタンパク質や脂質の凝集体であり、細胞内で分解できないため、様々な種において加齢に伴った蓄積が観察されている。線虫 *C.elegans* においても自家蛍光物質が加齢に伴い次第に細胞内に蓄積してくることがわかっている[51-54]。

自家蛍光物質の蓄積を定量化するために、*hsp-6(RNAi)*線虫とコントロールの日齢毎の自家蛍光を写真撮影し (Fig. 6A)、特に自家蛍光が強い咽頭側の腸組織における平均蛍光強度を測定した (ImageJ 画像解析プログラム, National Institute of Health, USA; Fig. 6B, Table VI)。RNAi 処理 2 日の時点ではコントロールと *hsp-6(RNAi)*線虫の両方で弱い自家蛍光が検出されたが、平均蛍光強度は *hsp-6(RNAi)*線虫の方がコントロールよりも約 20 %高かった (Fig. 6A, B D2)。加齢が進み RNAi 処理 4 日の時点になると、コントロールと *hsp-6(RNAi)*線虫の両者とも明らかな自家蛍光量の増加が観察されたが、平均蛍光強度は *hsp-6(RNAi)*線虫の方がコントロールよりも約 18 %高いままであった (Fig. 6A, B D4)。この結果は HSP-6 の抑制により早老症様の表現型がもたらされるという考えを支持しており、寿命が短い *daf-16* 変異体や *mev-1* 変異体での観察結果と

類似している[22, 52]。さらに加齢が進んだ RNAi 処理 7 日の時点ではコントロールと *hsp-6(RNAi)* 線虫とで平均蛍光強度に有意差はなかった (Fig. 6A, B D7, Table VI)。

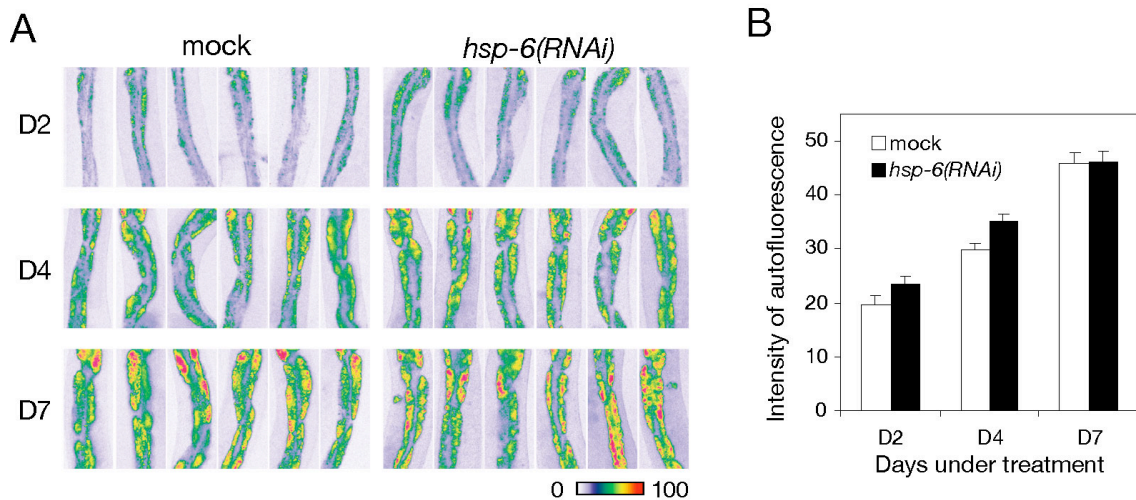


Fig. 6 HSP-6 抑制による自家蛍光物質の蓄積

mock あるいは RNAi 処理を 2, 4, 7 日間行い、自家蛍光観察を行った (D2, D4, D7)。咽頭側の上半身における腸管部分を写真撮影した。

A, 示した日数毎にランダムに 6 匹の線虫を選択し、自家蛍光の写真撮影を行った。蛍光強度の差を識別しやすくするため、擬似カラーに変換した写真を示した (赤; 強、緑; 中程度、青; 弱)。

B, 自家蛍光の平均強度を定量し、棒グラフ化した。定量化の詳細は「材料と方法」の頁に記した。グラフには 3 回行った実験の平均値を用いた。誤差棒は SE である。各実験の計測結果と有意差検定の結果は Table VI に記した。

Table VI 自家蛍光の測定

定量した自家蛍光の平均強度値 \pm SD を示した。括弧内の数字は測定した個体数である。

		Exp. I	Exp. II	Exp. III	Overall mean	<i>t</i> -test ^a
day 2	N2 mock	21.8 \pm 7.6 (6)	19.4 \pm 3.6 (7)	17.9 \pm 4.3 (7)	19.6 \pm 5.3 (20)	
	N2 RNAi	25.4 \pm 6.5 (6)	24.7 \pm 4.9 (7)	20.7 \pm 3.5 (7)	23.5 \pm 5.2 (20)	<i>P</i> = 0.023
day 4	N2 mock	31.9 \pm 5.7 (5)	27.7 \pm 6.0 (7)	30.3 \pm 3.4 (8)	29.8 \pm 5.0 (20)	
	N2 RNAi	41.1 \pm 5.8 (5)	31.9 \pm 6.5 (7)	34.2 \pm 4.2 (8)	35.1 \pm 6.2 (20)	<i>P</i> = 0.004
day 7	N2 mock	42.3 \pm 8.0 (6)	51.8 \pm 2.9 (7)	43.1 \pm 5.4 (7)	45.9 \pm 7.0 (20)	
	N2 RNAi	43.4 \pm 8.6 (6)	49.5 \pm 3.7 (7)	45.3 \pm 4.9 (7)	46.2 \pm 6.2 (20)	<i>P</i> = 0.874

^aday 2, 4, 7 の時点における mock 処理と RNAi 処理間の *t* 検定を Mini StatMate で行った。その結果、day 2 と 4 の時点で RNAi 処理線虫の平均自家蛍光強度は mock よりも有意に高かった。また、Microsoft Excel で二元配置分散分析 (ANOVA) を行った結果、平均自家蛍光強度に対する RNAi 処理の効果は有意であることがわかった (*P* = 0.004)。平均自家蛍光強度に対する加齢の効果もまた有意であった (*P* < 0.001)。RNAi 処理と加齢との間に有意な相互作用はなかった (*P* = 0.153)。

2.7. 加齢した線虫における HSP-6 の発現量低下

これまでの結果から、HSP-6 を RNAi により若齢期から減少させることで早老症に類似した表現型がもたらされ、寿命が短縮することがわかった。このことから自然老化においても HSP-6 の発現量が加齢時に減少している可能性が考えられたため、HSP-6 の加齢に伴う発現量変化を調べた。

若い時期の線虫は多数の受精卵を保持しているため、成虫の体細胞におけるタンパク質量の比較が困難になる。従って、完全に受精卵の生産が終了する卵孵化 10 日後から解析を行った。野生株と長寿命変異体 *daf-2*, 短寿命変異体 *daf-16* を通常条件で飼育し、卵孵化 10 日後から 5 日または 10 日毎に生存している 50 個体を回収してタンパク質試料を調整し、ウエスタンブロッティング法により HSP-6 の量を比較した。その結果、HSP-6 の量は野生株では孵化後 20 日、*daf-2* 株では 40 日、*daf-16* 株では 15 日と各株の平均寿命付近で明らかに減少していた (Fig. 7)。さらに野生株と *daf-16* 株において ATP-2 と HSP-60 もやや減少していることが確認された。これらの減少が見られる時期は線虫の死亡率が高い時期と一致している。

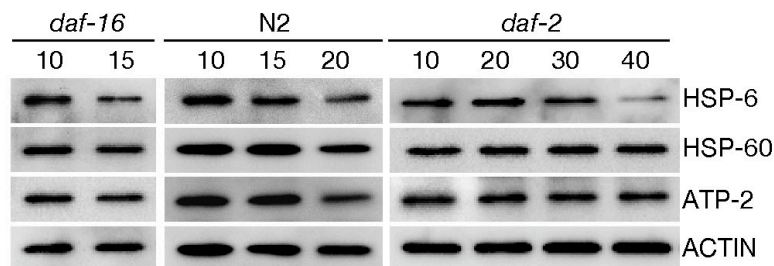


Fig. 7 加齢した線虫におけるミトコンドリアタンパク質の減少

N2, *daf-2*, *daf-16* を通常条件で飼育し、卵孵化 10 日後から 5 日あるいは 10 日毎にタンパク質試料を調整した。その後、ウエスタンブロッティング法によりこれらのタンパク質試料 (5 μ g) から HSP-6, HSP-60, ATP-2, ACTIN の検出を行った。

3. 考 察

3.1. *C.elegans* における *methsp70* / HSP-6

HSP-6 は哺乳類における mortalin/*methsp70*/Grp75[55, 56]や出芽酵母における Ssc1p[31]とアミノ酸レベルで高い相同性を持ち、線虫 *C.elegans* におけるオルソログであると予想されていた。本研究によって HSP-6 がミトコンドリアに局在することが実験的に初めて確認された (Fig. 1A, B)。さらに HSP-6 の N 末端側 38 アミノ酸のみがミトコンドリア局在に必要であったため、この領域に HSP-6 のミトコンドリア移行シグナルが含まれていることが明らかになった (Fig. 1A)。細胞分画の結果も内在性の HSP-6 が他のミトコンドリアタンパク質と同様にミトコンドリアに局在することを示していた。これらのことから HSP-6 が線虫における *methsp70* オルソログであると結論された。

3.2. HSP-6 抑制によるミトコンドリア阻害効果

本研究では発生終了後の個体における HSP-6 の機能を解析するために feeding RNAi 法による特異的な *hsp-6* 発現抑制を成虫期から行った。*hsp-6(RNAi)* から 2 日の時点で HSP-6 の明らかな減少が確認され、HSP-6 以外にもミトコンドリア機能に重要な幾つかのミトコンドリアタンパク質(ATP-2, HSP-60, CLK-1)の減少が観察された (Fig. 3)。これらの結果は HSP-6 の抑制によりミトコンドリアタンパク質のインポート効率の低下が引き起こされ、代謝によりミトコンドリアタンパク質が分解されタンパク質量が減少するためにもたらされたと考えられる。

興味深いことに、この時点と同じ *hsp-6(RNAi)* 2 日目の線虫の体壁筋細胞におけるミトコンドリア形態は細長く伸長して互いに繋がり合い融合が進んだネットワーク状の形態を示した (Fig. 2B)。この異常なミトコンドリア形態は線虫でミトコンドリアにおける電子伝達系や ATP 合成、あるいはミトコンドリアへのタンパク質の輸送装置に関わるタンパク質を抑制したときに見られる形態に非常に類似している[40, 41]。さらに、このようなミトコンドリア形態は出芽酵母の *SSC1* 変異体でも観察されている[57]。これらの事実に加えて、出芽酵母と哺乳類細胞においてミトコンドリアへのタンパク質輸送 (インポート) を阻害するとミトコンドリアの融合が誘導されることが報告されている[58, 59]。従って、今回 HSP-6 の抑制でもたらされたミトコンドリア形態の変化はタンパク質のインポート効率の低下によって引き起こされている可能性が考えられる。

また、ミトコンドリア形態は加齢によっても明らかに変化していた (Fig. 2B)。これらのミトコンドリア形態の変化がもたらす非分裂細胞への影響とその生理的意義の解析は今後の興味深い課題である。

3.3. 胚発生における HSP-6 の必要性

HSP-6 の抑制による影響は生殖腺においても早い段階でもたらされ、卵母細胞形成能力の欠損と受精卵の発生停止が観察された (Fig. 4)。これは RNAi による *hsp-6* のノックダウンが胚性致死や不妊などの表現型をもたらすという報告に一致している[34, 35]。細胞の分裂過程ではより多くのエネルギーが必要とされることが予想され、分裂を行う必要がある生殖細胞に対する HSP-6 の抑制がより重大な影響をもたらすのは当然と思われる。酵母における *Ssc1p* の欠損

や哺乳類細胞における *mortalin/mthsp70/Grp75* の抑制が細胞分裂を停止させるという報告はこの考えを支持している[30, 31]。胚発生時と異なり成虫期で HSP-6 を抑制しても急性的な致死とならなかったのは、成虫個体は分裂が終了した体細胞で構成されており、細胞分裂時のように大量のエネルギーを必要としないためと考えられる。つまり、少量の HSP-6 でも当面の体細胞の生存には十分な程度のミトコンドリア活性が保持されていたためと推測される。

3. 4. HSP-6 阻害による早老症状

HSP-6 のノックダウン効果は時間経過が長い程、成虫個体に対してより明白な表現型をもたらした。*hsp-6(RNAi)*により ATP-2, HSP-60, CLK-1 は処理 4 日目以降も徐々に減少していき、処理 10 日目の時点にはコントロールと比較して HSP-60 と CLK-1 は 30 %以下、ATP-2 は 10 %以下まで減少していた (Fig. 3; D4-D10)。これに対応して *hsp-6(RNAi)* 4 日目の時点では、明らかなミトコンドリア膜電位の減少と ATP 量の低下が確認された (Fig. 2C, D)。この時間経過に伴うミトコンドリア機能低下に一致して、*hsp-6(RNAi)*線虫の運動能力はコントロールよりも早く低下する傾向が観察された (Fig. 5A, C)。この傾向は長寿命変異体 *daf-2* でも同様であった (Fig. 5B)。一方、運動能力と寿命には相関があり、寿命の短い線虫は運動能力の維持期間も短いことが報告されている[24]。野生株と *daf-2* 株で HSP-6 を抑制することで寿命が短縮したことはこの報告に一致している (Fig. 5D)。また、筋組織で HSP-6 を過剰発現させた線虫で寿命が延長することは寿命と運動能力の相関関係を強く支持している[37]。さらに、老化の一般的なマーカーである自家蛍光物質[51-54]の早期蓄積が *hsp-6(RNAi)*線

虫で観察された (Fig. 6A, B)。D7 で有意差がなかったのは加齢により自家蛍光物質の蓄積が飽和状態に達したためと考えられる (Fig. 6B D7, Table VI)。以上のことから、HSP-6 の抑制で線虫に早老症様の表現型がもたらされたと考えられる。

一方で、HSP-6 を抑制した *daf-2* 変異体における運動能力と寿命が野生株の水準まで低下・短縮しなかったのは、これらを決定する要因がミトコンドリア機能以外にも存在することを示唆している。

3.5. ミトコンドリア活性状態と寿命への影響

本研究における HSP-6 のノックダウンにより ATP-2 や CLK-1 も減少し、線虫の寿命が短縮した。しかしながら、*hsp-6(RNAi)*による寿命短縮はこれまでの *atp-2* あるいは *clk-1* 機能欠失変異体の寿命が長いという報告に矛盾しているようにみえる[43, 44]。*atp-2* と *clk-1* 変異体と同様に、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の Ip サブユニットをコードする *isp-1* 遺伝子の変異体も寿命が長いことが報告されている[60]。さらに、網羅的な RNAi によって寿命延長効果がもたらされる遺伝子のスクリーニングを行った報告では、電子伝達系や ATP 合成酵素などミトコンドリア機能に必要なものが多数含まれることがわかっている[41, 61]。このようにミトコンドリアの機能低下は線虫の寿命を延長させる例が多い。これらはミトコンドリアの呼吸活性を低下させることで代謝量が低下し、ROS の発生量が減少するために寿命が延長すると考えられている。

上記の例に加えて、ミトコンドリアの鉄代謝と正常な呼吸活性に寄与するタンパク質をコードしており、フリードライヒ失調症の原因でもあるフラタキシ

ンの *C.elegans* におけるオルソログをコードする *frh-1* 遺伝子を RNAi で抑制しても線虫の寿命が延長することが報告されている[62]。しかし一方で、この報告とは逆に *frh-1* の RNAi による抑制で線虫の寿命が短縮するという矛盾した報告もある[63]。これらの *frh-1* 抑制による相反した影響は、*frh-1* の抑制度合いの差がミトコンドリア機能抑制の度合いに差をもたらしたことが原因と考えられている[64]。つまり、ミトコンドリアの機能低下により線虫の寿命が延長するためには、低レベルながらもミトコンドリア活性が一定に保持されているという条件が必要であると考えられる。

HSP-6 の抑制ではミトコンドリアタンパク質のインポート阻害が考えられ、ATP-2 と CLK-1 以外にも HSP-60 を含めた多くのミトコンドリアタンパク質の減少をもたらしていると推測される。少なくとも本研究で確認された HSP-60 の減少はフォールディングによるミトコンドリア内におけるタンパク質の品質管理に多大な悪影響を及ぼすと予想される。これらのことから、HSP-6 の抑制によるミトコンドリア機能阻害効果はより重篤であり、細胞の生存が困難なレベルにまでミトコンドリア活性が低下したために *hsp-6(RNAi)* 線虫の寿命が短縮したと考えられる。これを支持する例として、ミトコンドリアタンパク質のインポートに関わる因子を RNAi で抑制すると線虫の寿命が短縮するという報告がある[40]。注目すべきことに、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III のサブユニット CYC-1 や F1-ATPase のサブユニット ATP-3 は線虫の胚発生時から抑制すると寿命を延長させるが、成虫期から抑制を始めると寿命延長効果はないということが報告されている[61]。このことから成虫期からの HSP-6 抑制による ATP-2 や CLK-1 の減少が直接的には寿命に影響しないことは十分に考えられる

ことである。

*hsp-6(RNAi)*線虫では早期の自家蛍光物質の蓄積が観察されたが、類似した傾向を示すことが寿命の短い *mev-1(kn)* と *gas-1(fc2)* 変異体でも報告されている[19, 53, 65, 66]。従って、HSP-6 抑制による寿命短縮効果は、これらのタンパク質の減少による影響が大きいと考えられる。

また、HSF-1(Heat Shock Factor-1)の抑制も線虫の寿命を短縮させることが知られている[51, 67]。HSF-1 は HSP における熱ショック応答の主要な調節因子であり、熱ショック時に *hsp* 遺伝子のプロモーター領域に存在する HSE(Heat Shock Element)配列に結合して *hsp* を転写誘導しており *methsp70* も誘導する[68, 69]。*hsp-6* のプロモーター領域にも HSE と予想される配列部位[70]が上流 5000bp 以内に 4 カ所確認されており、実際に HSP-6 は熱ショックに対して誘導性がある[37]。従って、HSF-1 の抑制で起こる寿命短縮は HSP-6 の減少が主要な要因である可能性が考えられる。

3. 6. 死亡率の高い時期に見られる HSP-6 の減少

本研究において、HSP-6 の量は寿命期間のほとんどは一定に維持されているが死亡率が高くなる平均寿命付近で明かに減少しているという傾向が観察された (Fig. 7)。運動能力の低下や自家蛍光物質の蓄積、ミトコンドリア呼吸活性低下などの自然老化現象は HSP-6 の減少以前に観察されるため、HSP-6 の減少によって直接的に引き起こされる現象ではないと考えられる。例えば、運動能力の低下は筋繊維の状態が大きく影響している[71]。また、加齢に伴う自家蛍光物質の蓄積にミトコンドリアにおける呼吸活性が影響しているかどうかはっ

きりしていない[52]。さらに、加齢に伴うミトコンドリア呼吸活性低下は活性酸素種の影響が大きいと考えられている[11, 12, 72]。

一方、死亡率の高い平均寿命付近で HSP-6 が明らかに減少する傾向は野生株のみではなく、寿命の長さが異なる *daf-2* 変異体と *daf-16* 変異体でも確認された (Fig. 7)。さらに ATP-2 や HSP-60 もやや減少する傾向が見られた。これらの結果は線虫の死亡率が高くなる老化の最終段階ではミトコンドリア機能が著しく阻害されており、線虫に死をもたらす要因となっていることを示唆している。しかしながら、平均寿命付近に HSP-6 が減少する要因は不明であり、加齢による全体的な細胞内の恒常性破綻が影響しているという可能性も考えられる。HSP-6 の減少が起きる理由を解明することで線虫の老化における新たなメカニズムが発見されることが期待できる。

3.7. 総括

本研究により、線虫 *C.elegans* における *methsp70* オルソログである HSP-6 は発生終了後の成虫個体における正常なミトコンドリア機能維持に必要な役割を果たしていることが明らかになった。加えて、HSP-6 抑制によるミトコンドリア機能阻害は成虫における運動能力の衰退および寿命短縮といった早老症様の表現型をもたらすことがわかった。さらに、HSP-6 は平均寿命付近で減少する傾向にあり、これは *methsp70* の減少がミトコンドリア機能を著しく低下させることで線虫に死をもたらす重要な因子である可能性を示唆している。

methsp70 は多くの種を超えてその機能がよく保存されており、*methsp70* の欠損はヒトを含めて様々な生物でミトコンドリア機能欠損を原因とした疾患をもた

らす可能性がある。このことから、*hsp-6(RNAi)*線虫はミトコンドリア脳筋症や老人性神経変性疾患あるいは早老症の研究モデルとして用いることができ、これらの疾患に対する治療法の開発に役立つことが期待される。

4. 材料と方法

4.1. 線虫株と培養条件

線虫 *Caenorhabditis elegans* の Bristol N2 野生株, *daf-2(e1370)* 変異体, *daf-16(mgDf50)* 変異体は *Caenorhabditis* Genetics Center から入手した。線虫の培養は nutrient growth medium (NGM) 寒天培地 (52 mM NaCl, 1.7% Agar, 0.25% Bactopectone, 0.001% Cholesterol, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 25 mM KH₂PO₄) 上に餌として大腸菌 OP50 をまいた 3.5cm プレートを用いた。線虫の取り扱いや維持は基本的な手法を用いて 20 °C で行った[73]。同調培養は、数十匹の産卵期の線虫を飼育 NGM プレートに移して 3–6 時間の間産卵させ、その後親虫のみをプレートから除くことで行った。

4.2. 形質転換体の作製

4.2.1. *hsp-6::gfp, mts::gfp* レポータープラスミドの構築

hsp-6 遺伝子の全長 cDNA と *hsp-6* 遺伝子のミトコンドリアターゲティングシグナル (*mts*) と予想される領域を含む 5' 側の 114 bp を *C.elegans* の cDNA から特異的なプライマーセットを用いて PCR によって増幅した。プライマーは以下のものを用いた。

・ *hsp-6* 全長用と *mts* 用の 5' 側プライマー :

5'-GCTCTAGAGCATGCTTTCCGCACGAT-3'

・ *hsp-6* 全長用の 3' 側プライマー :

5'-TCCCCGCGGGGATAAGTTTTGCTCC-3'

・ *mts* 用の 3' 側プライマー :

5'-TCCCCGCGGGGAAAGATCAATTC-3'

増幅した各 DNA 断片は制限酵素 *XbaI* と *SacII* で切断し、それぞれを同じく *XbaI* と *SacII* で切断した pPD91.14-GFP プラスミドベクターへ組み込んだ。*hsp-6* cDNA 全長を組み込んだプラスミドを *hsp-6::gfp* プラスミド、*hsp-6* の 5'側 114 bp のみを組み込んだプラスミドを *mts::gfp* プラスミドとした。それぞれのプラスミドの配列は DNA シークエンス (ABI310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, CA, USA) を行い確認した。

4.2.2. マイクロインジェクション法による形質転換体の作製

精製した *hsp-6::gfp* あるいは *mts::gfp* プラスミド(100 ng / ml)と遺伝子導入マーカーである pRF-4 プラスミド(20 ng / ml)を同時に若い成虫期の線虫野生株 N2 の生殖腺に常法によりインジェクションした[74]。

4.3. RNAi treatment

RNA interference (RNAi)は Fire らの報告に従い、feeding 法により行った[75]。*hsp-6* feeding RNAi 用プラスミド構築のため、*hsp-6* の 5'側 502 bp を線虫 cDNA から以下のプライマーセットを用いた PCR で増幅した。

5' 側プライマー : 5'-GCTCTAGAGCATGCTTCCGCACGAT-3'

3' 側プライマー : 5'-CCGCTCGAGCGGCGTTGTTGAC-3'

増幅した DNA 断片は制限酵素 *XbaI* と *XhoI* で切断し、同じく *XbaI* と *XhoI* で切断した feeding RNAi 用プラスミドベクター pPD129.36 (L4440)へ組み込んだ。構

築したプラスミドの配列は DNA シークエンスを行い確認した。精製した *hsp-6* cDNA の 5'側 502 bp を含んだ pPD129.36 (*hsp-6* RNAi 用) あるいは空の pPD129.36 プラスミド (mock 用) を用いて feeding RNAi 用 *Escherichia coli* 株 HT115 (DE3) を CaCl₂ 法で形質転換した。形質転換した HT115 株のシングルコロニーを ampicillin 100 µg/ml と tetracycline 12.5 µg/ml を含んだ 2 x YT に植菌し、37°C で一晩震盪培養した。前培養した大腸菌を 2 x YT (ampicillin 100 µg/ml, tetracycline 12.5 µg/ml) で 1/100 希釈し、OD₆₀₀ = 0.4 まで培養した。そこへ Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を最終濃度 0.4 mM で加え、37 °C で 4 時間培養した。さらに ampicillin, tetracycline, IPTG をそれぞれ 2 倍の最終濃度になるように加え、dsRNA 誘導を行った大腸菌を NGM 培地へ 2 – 3 滴撒き、これを RNAi プレートとした。RNA プレートは使用まで 4 °C で保存した。RNAi 処理は卵孵化から 3 日後の若い成虫期 (young adult stage) の線虫を作製した RNAi プレートへ移すことで開始とした。RNAi 処理の最初の 10 – 12 日間は 2 日毎に新しい RNAi プレートへ継代し、それ以降は 4 日毎に継代を行った。

4. 4. 抗体の作製

抗 HSP-6 抗体は以前の報告のものを使用し[37]、抗 HSP-1 (HSP70A) 抗体は以前の報告に記した方法で用意した[37]。HSP-1 抗原は NDQGNRTTPSYVC 合成ペプチドに KLH (keyhole limpet hemocyanin) を結合させたものを購入し (Biologica, Nagoya, Japan)、これをウサギの背部に皮下注射した。得られた抗血清をウエスタンブロッティングに用いた。

4.5. ウェスタンブロッティング法

タンパク質抽出のため、50 – 100 匹の線虫を回収して M9 buffer (22 mM KH_2PO_4 , 42 mM Na_2HPO_4 , 86 mM NaCl, 1 mM MgSO_4)で洗い、lysis buffer (0.2 M Tris-HCl [pH7.5], 0.1 M EDTA, 0.04 M EGTA, 20 mM PMSF, 1 M NaCl, 1% SDS)に懸濁した。その後、25 秒間・6 回の条件で超音波破碎し、100 °C で 5 分間処理した。9,000 g で 15 分間の条件で遠心分離し、上清を- 80 °C で保存した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (Pierce Biotech Inc., Rockford, IL, USA)を用いて測定した。タンパク質サンプルは SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)膜へ転写した。膜ブロットは以下の抗体を用いて 4 °C で一晩反応させた：抗 HSP-6 抗体 (1:30000 希釈)、抗 HSP-1 抗体 (1:1000 希釈)、抗 HSP-60 抗体 (SPA-807; Stressgen Bioreagents, MI, USA) (1:30000 希釈)、抗 ACTIN モノクローナル抗体 (MAB1501R; Chemicon International, CA, USA) (1:30000 希釈)、抗 CLK-1 抗体 (sc-925; Santa Cruz Biotech Inc., CA, USA) (1:200 希釈)、抗 ATP-2 抗体 (anti-C-V- β / MS503; MitoSciences LLC, OR, USA) (1:5000 希釈)。反応させた膜は Tris-buffered saline containing Tween 20 (TBST; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 25 mM Tris-HCl [pH 7.4], 0.05% Tween 20)で洗い、二次抗体と反応させた。反応後、TBST で洗い、ブロットは Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Plus detection system (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA)を用いて化学発光させ LAS-1000 luminescence analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan)で検出を行い、Image Gauge V3.1 software (Fujifilm)で解析した。

4. 6. ATP level 測定

ATP 量の測定は過去に報告されている方法を一部変更して行った[41, 61, 76]。卵孵化から 3 日後の若い線虫 (young adult stage) 約 1,200 匹を 9 cm 径の mock あるいは *hsp-6* RNAi プレートへ移した。それぞれの培地には子虫の成長を除くために DNA 合成阻害剤である 5'-fluorodeoxyuridine (FUDR)を 20 mg/ml の濃度で加えた。mock / *hsp-6* RNAi 処理は 20 °C で 2 日あるいは 4 日間行った。その後、線虫を回収し、M9 buffer で 4 回洗い、cell lysis buffer に懸濁してから液体窒素で凍結し、- 80 °C で保存した。測定日に凍結したサンプルを 100 °C で 15 分間処理して ATP を遊離させ、dilution buffer を加えてから 15,000 g で 5 分間遠心分離した。上清をさらに dilution buffer で 1 / 100 希釈し、ATP 量の測定に用いた。ATP 量の測定には ATP Bioluminescent HSII kit (Roche Applied Science, Nonnenwald 2, Penzberg, Germany) を使用し、Lumat LB9507 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)で測定した。

4. 7. 産卵数の測定

Young adult stage の線虫を mock あるいは *hsp-6* RNAi プレートへ 1 匹のみ移し、20 °C で産卵させた。産卵中の親虫は 1 日毎に新しい RNAi プレートへ移し、古いプレートに残された卵の数をカウントした。この計測を 3 日間行った。2 日間孵化しなかった卵は”unhatched”としてカウントした。各実験で 10 – 11 匹の線虫を計測した。

4.8. 形態観察と運動能力測定

位相差顕微鏡 (Axioskop; Carl Zeiss, Jena, Germany) での観察のため、線虫を M9 buffer を垂らしたアガーパッド付きスライドガラス上に乗せてカバーガラスを被せた。実体顕微鏡 (MVX10; Olympus, Tokyo, Japan) での透過光観察は、線虫を NGM プレートに乗せた状態で行った。mock あるいは *hsp-6* RNAi 処理した線虫のむち打ち運動の計測は虫を M9 buffer を垂らした NGM プレートに乗せ、そこでのむち打ち運動を実体顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ (Camedia C-4040ZOOM; Olympus) を用いて撮影記録した。その後、線虫のむち打ち運動で見られる頭部の弧を描く往復運動の回数を 1 分間あたりでカウントした。むち打ち運動計測は、はじめ 50 匹以上の線虫から開始し、その後生存している線虫をランダムに取り上げて継時的に計測した。線虫の咽頭運動(pumping)の計測は基本的にはむち打ち運動の計測と同様で、線虫の頭部を拡大して撮影するようにした。撮影したデジタルデータは iMovie software (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) で処理し、5 秒間あたりの咽頭運動をカウントした。

4.9. ミトコンドリア染色

ミトコンドリア観察は線虫を 500 nM の MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) を加えた NGM プレートに移し、遮光した状態で 2 日間培養することで行った。染色した線虫を M9 buffer で洗い、M9 buffer を垂らしたアガーパッド付きスライドガラス上に乗せてカバーガラスを被せ、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) で観察を行った。ミトコンド

リア膜電位解析では、ミトコンドリア染色した線虫を腸内の大腸菌を消化させるために無菌 NGM プレート上で 3 時間処理してから上記の様にマウントし、蛍光顕微鏡 (Axioskop; Carl Zeiss) を用いて観察した。

4. 10. 自家蛍光観察

2 - 7 日間 mock あるいは *hsp-6* RNAi 処理した線虫を洗浄のため 15 分間無菌 NGM プレート上で処理し、M9 buffer を垂らしたアガーパッド付きスライドグラス上にのせてカバーグラスを被せ、蛍光実体顕微鏡 (MVX10; Olympus) 下で観察した。蛍光像は顕微鏡に取り付けたデジタルカメラ (Camedia C-4040ZOOM; Olympus) で写真撮影し、Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) を用いて輝度を擬似カラーに変換した。定量のため、各線虫の咽頭側の腸の一部を囲み、ImageJ 1.34s (National Institute of Health, USA) を用いて解析した。

4. 11. 寿命計測と統計解析

寿命解析は 70 匹以上の young adult stage の線虫を mock あるいは *hsp-6* RNAi プレートへ移し 20 °C で行った。2 -4 日毎に新しい RNAi プレートへ継代し、死亡数をカウントした。ガラス針でつついて刺激を与えるか、M9 buffer をかけても何ら反応を返さなかった線虫を死亡と判断した。プレートの壁での乾燥死や体内で子虫が孵化した個体、生殖腺が飛び出た個体は事故死として計測から除外した。計測は 3 回繰り返した。Kaplan-Meier 寿命曲線の作製と統計解析には Mini StatMate software (ATMS Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。

4.12. ミトコンドリア単離

ミトコンドリアを単離するため、約 12,000 匹の線虫を 9 cm 径の NGM プレートで培養した。線虫が young adult stage に達したときに子虫の繁殖を防ぐため、20 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の FUDR を加えた。その後、さらに 2 日間培養してから線虫を回収し、60 % sucrose flotation 法で大腸菌など不純物を除いた。線虫からのミトコンドリア単離は過去の報告に従った[77]。単離したミトコンドリアは 1 % SDS を含んだ lysis buffer に懸濁し、100 °C で 5 分間処理した。それから 15,000 g で 10 分間の条件で遠心分離し、得られた上清をウエスタンブロッティングによる解析まで -80 °C で保存した。

5. 引用文献

1. Collins, T.J. and M.D. Bootman, *Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 12): p. 1993-2000.
2. Farr, C.L., Y. Matsushima, A.T. Lagina, 3rd, N. Luo, and L.S. Kaguni, *Physiological and biochemical defects in functional interactions of mitochondrial DNA polymerase and DNA-binding mutants of single-stranded DNA-binding protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17047-53.
3. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. Curr Biol, 2006. **16**(14): p. R551-60.
4. Desagher, S. and J.C. Martinou, *Mitochondria as the central control point of apoptosis*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(9): p. 369-77.
5. Chan, D.C., *Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1241-52.
6. Cummins, J.M., *Mitochondria: potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(2): p. 217-28.
7. Jansen, R.P. and K. de Boer, *The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate*. Mol Cell Endocrinol, 1998. **145**(1-2): p. 81-8.
8. Chen, H., S.A. Detmer, A.J. Ewald, E.E. Griffin, S.E. Fraser, and D.C. Chan, *Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 189-200.
9. Jezek, P. and L. Hlavata, *Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(12): p. 2478-503.
10. Levine, R.L. and E.R. Stadtman, *Oxidative modification of proteins during aging*. Exp Gerontol, 2001. **36**(9): p. 1495-502.
11. Shigenaga, M.K., T.M. Hagen, and B.N. Ames, *Oxidative damage and mitochondrial decay in aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10771-8.
12. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.

13. Beckman, K.B. and B.N. Ames, *The free radical theory of aging matures*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(2): p. 547-81.
14. Boffoli, D., S.C. Scacco, R. Vergari, G. Solarino, G. Santacrose, and S. Papa, *Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1226**(1): p. 73-82.
15. Bakala, H., E. Delaval, M. Hamelin, J. Bismuth, C. Borot-Laloi, B. Corman, and B. Friguet, *Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(10): p. 2295-302.
16. Kujoth, G.C., A. Hiona, T.D. Pugh, S. Someya, K. Panzer, S.E. Wohlgemuth, T. Hofer, A.Y. Seo, R. Sullivan, W.A. Jobling, J.D. Morrow, H. Van Remmen, J.M. Sedivy, T. Yamasoba, M. Tanokura, R. Weindruch, C. Leeuwenburgh, and T.A. Prolla, *Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging*. *Science*, 2005. **309**(5733): p. 481-4.
17. Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J.N. Spelbrink, A.T. Rovio, C.E. Bruder, Y.M. Bohlooly, S. Gidlof, A. Oldfors, R. Wibom, J. Tornell, H.T. Jacobs, and N.G. Larsson, *Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase*. *Nature*, 2004. **429**(6990): p. 417-23.
18. Lin, M.T. and M.F. Beal, *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases*. *Nature*, 2006. **443**(7113): p. 787-95.
19. Hartman, P.S., N. Ishii, E.B. Kayser, P.G. Morgan, and M.M. Sedensky, *Mitochondrial mutations differentially affect aging, mutability and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans**. *Mech Ageing Dev*, 2001. **122**(11): p. 1187-201.
20. Kondo, M., N. Senoo-Matsuda, S. Yanase, T. Ishii, P.S. Hartman, and N. Ishii, *Effect of oxidative stress on translocation of DAF-16 in oxygen-sensitive mutants, mev-1 and gas-1 of *Caenorhabditis elegans**. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(6-7): p. 637-41.
21. Senoo-Matsuda, N., P.S. Hartman, A. Akatsuka, S. Yoshimura, and N. Ishii, *A complex II defect affects mitochondrial structure, leading to ced-3- and ced-4-dependent apoptosis and aging*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 22031-6.
22. Senoo-Matsuda, N., K. Yasuda, M. Tsuda, T. Ohkubo, S. Yoshimura, H. Nakazawa, P.S. Hartman, and N. Ishii, *A defect in the cytochrome b large*

- subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in Caenorhabditis elegans.* J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41553-8.
23. Honda, Y. and S. Honda, *The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in Caenorhabditis elegans.* Faseb J, 1999. **13**(11): p. 1385-93.
 24. Huang, C., C. Xiong, and K. Kornfeld, *Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of Caenorhabditis elegans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8084-9.
 25. Stuart, R.A., D.M. Cyr, and W. Neupert, *Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation.* Experientia, 1994. **50**(11-12): p. 1002-11.
 26. Voos, W. and K. Rottgers, *Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 51-62.
 27. Endo, T. and D. Kohda, *Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(1): p. 3-14.
 28. Mihara, K., *Targeting and insertion of nuclear-encoded preproteins into the mitochondrial outer membrane.* Bioessays, 2000. **22**(4): p. 364-71.
 29. Mori, M. and K. Terada, *Mitochondrial protein import in animals.* Biochim Biophys Acta, 1998. **1403**(1): p. 12-27.
 30. Wadhwa, R., S. Takano, K. Taira, and S.C. Kaul, *Reduction in mortalin level by its antisense expression causes senescence-like growth arrest in human immortalized cells.* J Gene Med, 2004. **6**(4): p. 439-44.
 31. Craig, E.A., J. Kramer, J. Shilling, M. Werner-Washburne, S. Holmes, J. Kopic-Smithers, and C.M. Nicolet, *SSCI, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein.* Mol Cell Biol, 1989. **9**(7): p. 3000-8.
 32. Strub, A., N. Zufall, and W. Voos, *The putative helical lid of the Hsp70 peptide-binding domain is required for efficient preprotein translocation into mitochondria.* J Mol Biol, 2003. **334**(5): p. 1087-99.
 33. Voisine, C., E.A. Craig, N. Zufall, O. von Ahsen, N. Pfanner, and W. Voos, *The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70.* Cell, 1999.

- 97(5): p. 565-74.
34. Kamath, R.S., A.G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D.P. Welchman, P. Zipperlen, and J. Ahringer, *Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi*. Nature, 2003. **421**(6920): p. 231-7.
 35. Simmer, F., C. Moorman, A.M. van der Linden, E. Kuijk, P.V. van den Berghe, R.S. Kamath, A.G. Fraser, J. Ahringer, and R.H. Plasterk, *Genome-wide RNAi of C. elegans using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions*. PLoS Biol, 2003. **1**(1): p. E12.
 36. Kaul, S.C., T. Yaguchi, K. Taira, R.R. Reddel, and R. Wadhwa, *Overexpressed mortalin (mot-2)/mthsp70/GRP75 and hTERT cooperate to extend the in vitro lifespan of human fibroblasts*. Exp Cell Res, 2003. **286**(1): p. 96-101.
 37. Yokoyama, K., K. Fukumoto, T. Murakami, S. Harada, R. Hosono, R. Wadhwa, Y. Mitsui, and S. Ohkuma, *Extended longevity of Caenorhabditis elegans by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75*. FEBS Lett, 2002. **516**(1-3): p. 53-7.
 38. Liu, Y., W. Liu, X.D. Song, and J. Zuo, *Effect of GRP75/mthsp70/PBP74/mortalin overexpression on intracellular ATP level, mitochondrial membrane potential and ROS accumulation following glucose deprivation in PC12 cells*. Mol Cell Biochem, 2005. **268**(1-2): p. 45-51.
 39. Jin, J., C. Hulette, Y. Wang, T. Zhang, C. Pan, R. Wadhwa, and J. Zhang, *Proteomic identification of a stress protein, mortalin/mthsp70/GRP75: relevance to Parkinson disease*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(7): p. 1193-204.
 40. Curran, S.P., E.P. Leverich, C.M. Koehler, and P.L. Larsen, *Defective mitochondrial protein translocation precludes normal Caenorhabditis elegans development*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54655-62.
 41. Lee, S.S., R.Y. Lee, A.G. Fraser, R.S. Kamath, J. Ahringer, and G. Ruvkun, *A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in C. elegans longevity*. Nat Genet, 2003. **33**(1): p. 40-8.
 42. Tsang, W.Y. and B.D. Lemire, *Mitochondrial ATP synthase controls larval development cell nonautonomously in Caenorhabditis elegans*. Dev Dyn, 2003. **226**(4): p. 719-26.
 43. Tsang, W.Y., L.C. Sayles, L.I. Grad, D.B. Pilgrim, and B.D. Lemire,

- Mitochondrial respiratory chain deficiency in Caenorhabditis elegans results in developmental arrest and increased life span.* J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 32240-6.
44. Lakowski, B. and S. Hekimi, *Determination of life-span in Caenorhabditis elegans by four clock genes.* Science, 1996. **272**(5264): p. 1010-3.
 45. Senior, A.E., S. Nadanaciva, and J. Weber, *The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1553**(3): p. 188-211.
 46. Chaturvedi, S., K. Bala, R. Thakur, and V. Suri, *Mitochondrial encephalomyopathies: advances in understanding.* Med Sci Monit, 2005. **11**(7): p. RA238-46.
 47. Enns, G.M., C.L. Hoppel, S.J. DeArmond, S. Schelley, N. Bass, K. Weisiger, D. Horoupian, and S. Packman, *Relationship of primary mitochondrial respiratory chain dysfunction to fiber type abnormalities in skeletal muscle.* Clin Genet, 2005. **68**(4): p. 337-48.
 48. Ostergaard, E., F. Wibrand, M.C. Orngreen, J. Vissing, and N. Horn, *Impaired energy metabolism and abnormal muscle histology in mut- methylmalonic aciduria.* Neurology, 2005. **65**(6): p. 931-3.
 49. Trockel, U., H.R. Scholte, K.V. Toyka, H.F. Busch, I.E. Luyt-Houwen, and J.A. Berden, *Myopathy with abnormal mitochondria, transient low electron transport capacity in the respiratory chain, and absence of energy transduction at sites 1 and 2 in vitro.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1986. **49**(6): p. 645-50.
 50. Hosono, R., Y. Sato, S.I. Aizawa, and Y. Mitsui, *Age-dependent changes in mobility and separation of the nematode Caenorhabditis elegans.* Exp Gerontol, 1980. **15**(4): p. 285-9.
 51. Garigan, D., A.L. Hsu, A.G. Fraser, R.S. Kamath, J. Ahringer, and C. Kenyon, *Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation.* Genetics, 2002. **161**(3): p. 1101-12.
 52. Gerstbrein, B., G. Stamatias, N. Kollias, and M. Driscoll, *In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in Caenorhabditis elegans.* Aging Cell, 2005. **4**(3): p. 127-37.

53. Hosokawa, H., N. Ishii, H. Ishida, K. Ichimori, H. Nakazawa, and K. Suzuki, *Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant mev-1 of Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 1994. **74**(3): p. 161-70.
54. Klass, M.R., *Aging in the nematode Caenorhabditis elegans: major biological and environmental factors influencing life span*. Mech Ageing Dev, 1977. **6**(6): p. 413-29.
55. Ran, Q., R. Wadhwa, R. Kawai, S.C. Kaul, R.N. Sifers, R.J. Bick, J.R. Smith, and O.M. Pereira-Smith, *Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(1): p. 174-9.
56. Wadhwa, R., S.C. Kaul, Y. Mitsui, and Y. Sugimoto, *Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts*. Exp Cell Res, 1993. **207**(2): p. 442-8.
57. Kawai, A., S. Nishikawa, A. Hirata, and T. Endo, *Loss of the mitochondrial Hsp70 functions causes aggregation of mitochondria in yeast cells*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 19): p. 3565-74.
58. Herlan, M., C. Bornhovd, K. Hell, W. Neupert, and A.S. Reichert, *Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor*. J Cell Biol, 2004. **165**(2): p. 167-73.
59. Ishihara, N., Y. Fujita, T. Oka, and K. Mihara, *Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1*. Embo J, 2006. **25**(13): p. 2966-77.
60. Feng, J., F. Bussiere, and S. Hekimi, *Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in Caenorhabditis elegans*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 633-44.
61. Dillin, A., A.L. Hsu, N. Arantes-Oliveira, J. Lehrer-Graiwer, H. Hsin, A.G. Fraser, R.S. Kamath, J. Ahringer, and C. Kenyon, *Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development*. Science, 2002. **298**(5602): p. 2398-401.
62. Ventura, N., S. Rea, S.T. Henderson, I. Condo, T.E. Johnson, and R. Testi, *Reduced expression of frataxin extends the lifespan of Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2005. **4**(2): p. 109-12.

63. Vazquez-Manrique, R.P., P. Gonzalez-Cabo, S. Ros, H. Aziz, H.A. Baylis, and F. Palau, *Reduction of Caenorhabditis elegans frataxin increases sensitivity to oxidative stress, reduces lifespan, and causes lethality in a mitochondrial complex II mutant*. *Faseb J*, 2006. **20**(1): p. 172-4.
64. Ventura, N., S.L. Rea, and R. Testi, *Long-lived C. elegans Mitochondrial mutants as a model for human mitochondrial-associated diseases*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(10): p. 974-91.
65. Ishii, N., M. Fujii, P.S. Hartman, M. Tsuda, K. Yasuda, N. Senoo-Matsuda, S. Yanase, D. Ayusawa, and K. Suzuki, *A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes*. *Nature*, 1998. **394**(6694): p. 694-7.
66. Ishii, N., K. Takahashi, S. Tomita, T. Keino, S. Honda, K. Yoshino, and K. Suzuki, *A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Mutat Res*, 1990. **237**(3-4): p. 165-71.
67. Morley, J.F. and R.I. Morimoto, *Regulation of longevity in Caenorhabditis elegans by heat shock factor and molecular chaperones*. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(2): p. 657-64.
68. Morimoto, R.I., *Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators*. *Genes Dev*, 1998. **12**(24): p. 3788-96.
69. Wu, C., *Heat shock transcription factors: structure and regulation*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 441-69.
70. GuhaThakurta, D., L. Palomar, G.D. Stormo, P. Tedesco, T.E. Johnson, D.W. Walker, G. Lithgow, S. Kim, and C.D. Link, *Identification of a novel cis-regulatory element involved in the heat shock response in Caenorhabditis elegans using microarray gene expression and computational methods*. *Genome Res*, 2002. **12**(5): p. 701-12.
71. Herndon, L.A., P.J. Schmeissner, J.M. Dudaronek, P.A. Brown, K.M. Listner, Y. Sakano, M.C. Paupard, D.H. Hall, and M. Driscoll, *Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing C. elegans*. *Nature*, 2002. **419**(6909): p. 808-14.
72. Landis, G.N. and J. Tower, *Superoxide dismutase evolution and life span regulation*. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(3): p. 365-79.

73. Wood, W.B. and Cold Spring Harbor Laboratory., *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor monograph series ; 17. 1988, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 667.
74. Mello, C.C., J.M. Kramer, D. Stinchcomb, and V. Ambros, *Efficient gene transfer in C.elegans: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences*. Embo J, 1991. **10**(12): p. 3959-70.
75. Timmons, L., D.L. Court, and A. Fire, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.
76. Braeckman, B.P., K. Houthoofd, A. De Vreese, and J.R. Vanfleteren, *Assaying metabolic activity in ageing Caenorhabditis elegans*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(2-3): p. 105-19.
77. Jonassen, T., B.N. Marbois, K.F. Faull, C.F. Clarke, and P.L. Larsen, *Development and fertility in Caenorhabditis elegans clk-1 mutants depend upon transport of dietary coenzyme Q8 to mitochondria*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45020-7.

6. 略語一覽

mthsp70, mitochondrial heat shock protein 70

Grp75, glucose regulated protein 75

RNAi, RNA interference

ROS, reactive oxygen species

SOD, superoxide dismutase

mtDNA, mitochondrial DNA

GFP, green fluorescent protein

dsRNA, double stranded RNA

PCR, polymerase chain reaction

PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride

SD, standard deviation

SE, standard error of the mean.

謝 辞

本研究の遂行における直接的な御指導を通して多大なる御尽力を頂いた、金沢大学薬学部生化学研究室 高野秀一助手（現テキサス大学ヘルスサイエンスセンター・サンアントニオ校研究員）に深く感謝致します。

本研究に関する実験を積極的にサポートして頂いた金沢大学薬学部生化学研究室 田中望学士に大いに感謝致します。

また、本研究への建設的な御助言と御指導、ならびに論文作製において惜しめない御助力を頂きました金沢大学薬学部生化学研究室 中村暢宏助教授に厚く感謝致します。

さらに、平成 18 年 11 月 5 日に急逝された金沢大学薬学部生化学研究室 大熊勝治教授には修士から 5 年間、研究内容の御指導のみならず、研究に対する姿勢・考え方を学ばせて頂きました。今まで本当に有り難うございました。今後とも大熊先生の教えを励みに研究に取り組んでいきたいと思えます。

最後に、本研究を行うにあたり有難い御協力をして頂いた金沢大学薬学部生化学研究室の皆様、大学生活における素晴らしい思い出を与えて下さった友人、先輩、後輩、そして精神的・経済的支援をして頂いた両親に心から感謝致します。