

# 学位論文

線虫の学習行動に与える活性酸素の影響と  
覚醒マウスを用いた新規イメージング  
システムに関する生理学的研究

Effect of oxygen intermediates on learning behavior  
in nematodes and physiological study on new  
optical imaging systems using awake mice

寒冷圏生命システム学専攻

西野明日香

# 目次

## 第1部 線虫の学習に与える活性酸素の影響

序論	5
使用した動物と実験準備	8
(1) 線虫と飼育	8
(2) NGMプレート	9
(3) $\alpha$ -LAを含むNGMプレート	9
(4) 実験プレート	10
(5) 実験に使用する線虫の洗浄	11

## 第1章. 線虫のジアセチル順応の持続時間に与える活性酸素の影響

1. 背景	12
2. 実験方法	13
2-1. ジアセチルの条件付け	13
2-2. 条件付け後実験までの飼育	13
2-3. 誘引反応の実験	14
2-4. 線虫の運動量の測定	14
2-5. データ解析	15
3. 結果	17
3-1. 野生型線虫のジアセチルに対する順応の持続時間	17
3-2. 活性酸素発生レベルの低い変異体線虫の順応持続時間	25
3-3. 活性酸素発生レベルの高い変異体線虫の順応持続時間	39
3-4. 抗酸化剤および酸化剤によるジアセチル順応への影響	53
3-5. 線虫の運動量	75
4. 考察	80
4-1. 運動量とジアセチル順応の持続時間	80
4-2. 野生型線虫のジアセチルに対する順応の持続時間	80
4-3. 変異体線虫のジアセチルに対する順応の持続時間	82
4-4. ジアセチル順応に対する抗酸化剤や酸化剤の影響	84
4-5. 考察のまとめ	85
5. 参考文献	87

## 第2章. 線虫の順応獲得時期に関わる活性酸素の影響

1. 背景	91
2. 実験方法	92
2-1. 各成長ステージの線虫を得るまでの飼育	92
2-2. ジアセチルに対する条件付け	93
2-3. 誘引反応の計測	93
2-4. データ解析	94
3. 結果	96
3-1. 野生型線虫のジアセチル順応成立期間	96
3-2. 活性酸素発生レベルの異なる変異体	107
3-3. 抗酸化剤による影響	131
3-4. インスリン様シグナル伝達経路に関与する変異体	139
4. 考察	154
4-1. 野生型線虫のジアセチルに対する順応の成立期間	154
4-2. 活性酸素発生レベルの異なる変異体線虫の順応の成立期間	156
4-3. 順応の成立期間におよぼす抗酸化剤の影響	158
4-4. インスリン様シグナル伝達経路に関与する変異体線虫の順応の成立期間	159
4-5. まとめと今後の課題	160
5. 参考文献	163

## 第2部 覚醒マウスを用いた血流動態および脳酸素代謝の 新規光イメージングシステムの構築

1. 序論と背景	168
2. 実験方法	171
2-1. 使用した動物	171
2-2. 実験手順	171
2-3. LSI と IOSI の同時測定	173
2-4. FAI 測定	174
2-5. LDF 測定	175
2-6. データ解析	175
3. 結果	178
3-1. LSI、IOSI、FAI によるイメージング画像	178
3-2. LSI、IOSI、FAI、LDF による時間反応率	180
4. 考察	184
4-1. LSI および IOSI 同時測定と LDF 測定の比較	184
4-2. FAI 測定と LSI 測定の比較	187
4-3. 今後の課題	190
5. 参考文献	191
謝辞	196

# 第 1 部

## 線虫の学習に与える活性酸素の影響

### 序論

線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、非寄生性の線形動物であり、本来土壌に生息している。体長は 1mm ほどで、外観は透き通っているため、体内部の構造も目視で観察することができる。寒天培地上にエサとなる大腸菌を塗布することで土壌外での飼育も容易であり、20°C の飼育下では世代交代が 3 日間と短く、多くの個体数を一度に扱うことが可能である。*C. elegans* の性別には雌雄同体と雄があり、雄は 1000 匹に 1 匹の割合で存在するといわれる。体細胞数はそれぞれで異なり、雌雄同体の成虫の体細胞は 959 個、雄の成虫の体細胞は 1031 個から成っている。体細胞数はヒトと比べて非常に少ないが、神経、筋肉、消化器官、生殖器官など動物としての基本的な構造を備えている。また、302 個の神経細胞で構成される神経ネットワークの構造も全て明らかにされている。ヒトの脳神経細胞が約 100 億個から 1000 億個であることに比べると、*C. elegans* の神経細胞数は明らかに少なく、神経ネットワークも非常に単純であるといえる。しかしながら、このわずかな神経細胞を駆使することで、味覚刺激や嗅覚刺激、物理的刺激や温度刺激といった外部環境からの刺激を感知し、行動を発現していることから、感覚受容から行動発現に至るまでの情報の流れは哺乳類にも劣らず複雑である。線虫はゲノムの塩基配列もすべて明らかとなっていることから、行動を制御している神経基盤の解析や遺伝子レベルでの解析を行うことに適したモデル生物として広く利用されている。

*C. elegans* は、頭部の左右それぞれに存在するアンフィド感覚器と呼ばれる 12

種類の感覚ニューロンによって、1000 種類以上の化学物質を識別し、反応することが知られている（桂、2000）。各感覚ニューロンの機能的役割は細胞破壊実験により明らかにされており（Bargmann et al., 1993; Mori et al., 1995）、例えば、AWA 感覚ニューロンはジアセチルやチアゾールといった揮発性の誘引物質、ASE 感覚ニューロンはナトリウムイオンやリジンなど水溶性の誘引物質を感知しており、化学走性に強く関与している。AFD 感覚ニューロンは温度を感知し、温度走性に、ASH 感覚ニューロンは化学物質や鼻先への触覚刺激に対する忌避行動に関与している。アンフィド感覚ニューロンにより感知される様々な種類の感覚情報は、いくつかの介在ニューロンによって統合され、運動ニューロンに伝達されることで行動を発現すると考えられる。このような化学走性や温度走性などの比較的単純な行動に加えて、線虫は、記憶や学習といった複雑な機能も備えている。学習には、誘引物質と食物を関連付けて記憶するような、2つ以上の刺激によって成立する連合学習と、連続した機械刺激に対する慣れのような、1種類の刺激によって成立する非連合学習が存在する。線虫はこれら両方の学習を行うことが知られている。例えば、*C. elegans* は温度や NaCl とエサの有無を結びつけて記憶や学習を行う（Tomioka et al., 2006; Wen et al., 1997）。線虫を Na イオン、または Cl イオンの存在条件下でエサを与える訓練（条件付け）を行った後、これらイオンが存在するエサのないプレートに置くと、より多くの線虫が Na イオン、または Cl イオンに誘引され（古典的条件付けの成立）、この行動は条件付け後 7 時間継続する。一方、Na イオンや Cl イオンと忌避物質の組み合わせによる条件付けは、イオンに対する誘引反応を低下させる（連合学習の成立）（Wen et al., 1997）。また、線虫は NaCl に対して誘引行動を示すが、NaCl 存在下において一定時間飢餓を経験させるとこの物質に対し忌避行動を示すようになる（Saeki et al., 2001）。これは NaCl と飢餓を関連付けた連合学習である。

線虫を飼育する上で、飼育温度は線虫の寿命に強く影響する環境要因の 1 つである。ほとんどの変温動物と同様に、線虫の寿命は飼育温度に対して反比例であり、低温下（15°C）では長寿命に、高温下（25°C）では短寿命になる。低い温度環境下での飼育は線虫の成長を遅らせ、高い温度環境下での飼育は速くさせる。低温で成長させた野生型線虫は長寿命変異体と同様に長寿となり、高温で成長させた野生型線虫は短寿命変異体と同様に短命となることから、飼育温度と線虫の寿命の関係はエネルギー代謝の増減に深く関わると考えられている（Voorhies and Ward, 1999）。エネルギー代謝にはインスリンの作用が重要な役割を担っており、全ての動物において共通である。インスリン様シグナル伝達経路は線虫のエネルギー代謝に深く関わっており、寿命にも大きく影響している。また、エネルギーを生成するミトコンドリア内の電子伝達系で発生する活性酸素種も、線虫の寿命に関与することが知られている。Matsuura らは、線虫の学習にインスリン様シグナルや活性酸素シグナルが影響している可能性を報告している（Matsuura et al., 2009）。これまでに、学習過程におけるインスリンシグナル系の関与は報告されているが、活性酸素の影響についてはほとんど明らかになっていない。

本研究では、揮発性物質ジアセチルを使用し、線虫のジアセチルに対する順応について解析を行った。揮発性物質ジアセチルは、線虫がエサである大腸菌を摂取し、分解される際にわずかに放出される揮発性物質である。これまでの研究で、野生型線虫は 0.1%のジアセチルに対して最も強い誘引反応を示すことが明らかにされており（Matsuura et al., 2004）、0.1%ジアセチルに 120 分間さらされた線虫は、この物質に対する誘引行動が低下し、ジアセチルに対する順応が誘発される。ジアセチル順応は学習の一種である。線虫の学習における活性酸素の影響について調査するため、ミトコンドリア由来のエネルギー代謝に関

わる変異体や抗酸化剤を用いて、第 1 章では、線虫におけるジアセチル順応の保持時間に対する活性酸素の影響について、第 2 章では、線虫の順応獲得時期に関わる活性酸素の影響について解析を行った。

## 使用した動物と実験準備

### (1) 線虫と飼育

線虫 *C. elegans* の野生型 Bristol N2 株と、*isp-1(qm150)*、*clk-1(qm30)*、*gas-1(fc21)*、*mev-1(kn1)*、*daf-2(m577)*、*daf-2(e1370)*、*daf-16(mu86)* 変異体はミネソタ大学 *Caenorhabditis Genetic Center* から取り寄せ、当研究室において継代飼育したものを使用した。飼育培地には、エサとなる大腸菌 (OP50 株) を十分に繁殖させた Nematode Growth Medium (NGM) プレートを使用し ((2) 参照)、20°C のインキュベーター (Fukushima, FMU-133 I) で飼育および繁殖を行った。個体数の増加による餌不足など飼育環境の悪化を防ぐため、NGM プレートへの植え継ぎは 3、4 日毎に行った。

線虫の成長段階の違いは行動実験に影響を及ぼす。実験は線虫の成長段階を揃えて行った。多くの個体数を同時期に得るため、卵をもった産卵期の成虫を 50 匹ほど選抜し、新しい NGM プレートに移動させ、野生型線虫、*isp-1* 変異体、*clk-1* 変異体の場合は 25°C のインキュベーター内で 3 時間産卵させた。活性酸素の受容レベルが高い *gas-1* 変異体と *mev-1* 変異体は酸化ストレス受容を軽減させるため、20°C のインキュベーター内に 3 時間置き、産卵させた。その後、全ての成虫を取り除き、NGM プレート上には卵のみが存在する状態にした。この NGM プレートを 20°C のインキュベーターに置き、ヤングアダルト (YA) 期まで飼育した。野生型線虫は約 75 時間で YA 期に成長する (Matsuura et al., 2004)。変異体線虫の YA 期までの成長は野生型線虫と比べて 1 日ほど遅く、目視におい



て成長段階を判別した。YA 期の前には、幼虫期の最後の段階となる L4 期がある。L4 期の線虫の体には三日月形の特徴的な構造があり、YA になると消えるため、目視による成長段階の判別が可能である。なお、線虫を掬い取る際には、ガラス管の先端に尖った白金線を取り付けたピッカーを用いており、白金線は線虫を掬い取る前にライターで滅菌を行った。

## (2) NGM プレート

線虫の飼育培地である NGM プレートの作成方法は次の通りである。密封した容器に H<sub>2</sub>O (蒸留水) 975ml を入れ、NaCl 3g、polypeptone 2.5g、agar 17g を攪拌しながらアガー溶液を作成した。この作業は容器内に空気中のホコリなどが入らないよう手早く行った。その後、アルミホイルで容器を覆い、120°C のオートクレーブ (IWAKI、ACV-3167) で 120 分間の加圧滅菌を行った。滅菌後、50~60°C に設定したウォーターバス (IWAKI、THB-3N) に容器を移し、アガー溶液の凝固を防ぐために保温した。アガー溶液を攪拌しながら、コレステロール (5mg/ml in EtOH) 1ml、1M CaCl<sub>2</sub> 1ml、1M MgSO<sub>4</sub> 1ml、1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH6.0) 25ml をこの順序で加えた。十分に攪拌を行った後、直径 6cm のディッシュに約 5ml ずつ注ぎ、UV 照射下で約 12 時間放置した。その後、固まった寒天プレートへ大腸菌を塗布した。エサとなる大腸菌 (OP50 株) は、寒天プレートに塗布する前日から、37°C のインキュベーター (Asone、EI-300B) 内において LB 培地で培養したものである。大腸菌を塗布した NGM プレートは 20°C の室温で一晩乾燥させた後、4°C の冷蔵庫に保管した。

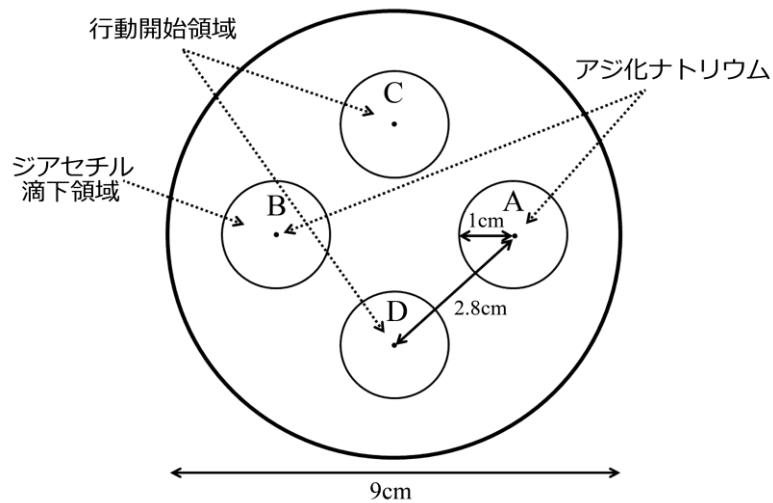
## (3) $\alpha$ -LA を含む NGM プレート

$\alpha$ -リポ酸 (LA; Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) 25mg をジメチルス

ルホキシド 1ml に溶かし溶液を作成した。NGM プレート内の最終的な  $\alpha$ -LA 濃度が 0.05% となるよう、ディッシュに注ぐ際に  $\alpha$ -LA 溶液 100 $\mu$ l と NGM 溶液 5ml を混合させた。約 12 時間後に NGM プレートの作成と同様の方法で前日から培養した大腸菌を塗布し ((2) 参照)、一晩乾燥させた後 4°C の冷蔵庫で保管した。 $\alpha$ -LA 濃度については Murakami らによって報告されたものを参考とした (Murakami and Murakami, 2005)。

#### (4) 実験プレート

実験プレートは実験を行う前日に作成した。H<sub>2</sub>O (蒸留水) 99.3ml と agar 1.7g をメスフラスコに加え、ラップで覆った後、電子レンジで加熱処理を行った。加熱後はメスフラスコ内を 50~60°C に設定したウォーターバス (IWAKI、THB-3B) に入れ保温した。攪拌しながら 1M CaCl<sub>2</sub> 0.1ml、1M MgSO<sub>4</sub> 0.1ml、1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH 6.0) 0.5ml をこの順で加えた。直径 9cm のディッシュにアガー溶液を 10ml ずつ分注し、誘引行動を観察する実験プレートとした。この分量で約 8 枚分の実験プレートを作成できる。運動量測定用の観察プレートは、直径 6cm のディッシュに前述のアガー溶液を 5ml ずつ分注した。いずれのプレートも 30 分間乾燥させ、20°C の室温で保管した。これらのプレートには大腸菌のようなエサとなる物質は含まれていない。誘引行動の観察に用いる実験プレートにはあらかじめ 4 点が印されており、それぞれを A、B、C、D 点とした。各点の間隔は 2.8cm であり、各点の周囲 1cm をそれぞれ A、B、C、D 領域と定めた (実験プレート図)。



**実験プレート図** A及びB点にはアジ化ナトリウムを、B点にはジアセチルを滴下した。それぞれの点の間隔は2.8cmとし、各点の周囲1cmをそれぞれA、B、C、D領域とした。C及びD領域は線虫の行動開始領域とした。

#### (5) 実験に使用する線虫の洗浄

NGMプレート上の線虫の体表にはエサである大腸菌が付着している。そのため、NGMプレートから実験プレートや条件付け用プレート、条件付け後に飼育するためのNGMプレートに線虫を移す際には、洗浄作業を行う必要がある。洗浄液(H<sub>2</sub>O 990ml、1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (pH6.0) 0.5ml、1/100 Tween20 0.5ml、1M CaCl<sub>2</sub> 0.1ml、1M MgSO<sub>4</sub> 0.1ml)をNGMプレートに1ml滴下し、線虫を含んだ状態の洗浄液を15mlの遠心管に移した。その後約9mlの洗浄液を加え、遠心分離(2000rpm、20sec)を行った。線虫が底に溜まっていることを確認し、上澄み液を取り除き、新たな洗浄液を遠心管に加えた。この作業を3回繰り返すことで線虫の体表に付着した大腸菌を十分に取り除くことができる。洗浄作業後、マイクロピペットを用いて遠心管の底に集められた線虫を3μlずつ吸い取り、実験プレートや条件付け用プレート、条件付け後に飼育するためのNGMプレートに移動させた。NGMプレートに線虫を移動させる場合には大腸菌が塗布されていない部分に線虫を含んだ洗浄液を滴下した。

# 第 1 章

## 線虫のジアセチル順応の持続時間に与える 活性酸素の影響

### 1. 背景

誘引性物質であるジアセチルに 120 分間さらされた線虫は、同濃度のジアセチルに対して誘引行動が低下し、ジアセチルへの順応を示すことが明らかにされている (Matsuura et al., 2004)。ジアセチルを経験させてから数時間経った後も、この物質に対する誘引行動の低下がみられ、この順応の持続時間は飼育温度の上昇にともなって延長することが報告されている (Matsuura et al., 2009)。具体的には、15°C で飼育した場合のジアセチルに対する順応の持続時間は 2 時間未満、20°C で飼育した場合は 6 時間程度、25°C で飼育した場合は 12 時間程度であり、ジアセチル順応の持続には酸化ストレスに関与する活性酸素の影響が考えられている (Matsuura et al., 2009)。これまでに、学習過程におけるインスリンシグナル系の関与は報告されているが、活性酸素の影響については調査されていない。そこで、本研究では活性酸素発生レベルの異なる *isp-1*、*clk-1*、*gas-1*、*mev-1* 変異体の 4 種類を用いて、ジアセチルに対する順応の持続時間に与える活性酸素の影響について調査した。活性酸素の発生レベルが低く、長寿命の *isp-1* 変異体はミトコンドリア電子伝達系の複合体 III に関する遺伝子に変異している変異体である (Feng et al., 2001)。*clk-1* 変異体はコエンザイム Q 合成酵素をコードする遺伝子に変異しており、ATP を産生する上で重要な酸化リン酸化反応が抑制されることで活性酸素の産生も抑制されている (Kayser et al., 2004b; Larsen and Clarke, 2002)。活性酸素発生レベルが高い短寿命の *gas-1* 変異

体と *mev-1* 変異体はそれぞれ、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I、II に変異をもち、活性酸素の生成が亢進している変異体である (Honda et al., 1993; Ishii et al., 1998; Kayser et al., 2004a; Senoo et al., 2001)。さらに、本研究では、抗酸化剤である  $\alpha$ -リポ酸 (LA) を用いて、成長速度とジアセチルに対する順応の関連性や順応時における運動量についても解析を行った。

## 2. 実験方法

### 2-1. ジアセチルの条件付け

発育段階の違いによる行動への影響を最小限にするため、実験では線虫の成長段階を揃え、ジアセチルの条件付けには YA 期まで成長した虫を用いた。線虫に対するジアセチル順応誘発のため、条件付け用の寒天プレート (直径 9cm) 上に洗浄作業を行った線虫を置き、プレートのフタの内側 5 箇所を 0.1%ジアセチルを 1.5 $\mu$ l を滴下してフタをし、120 分間放置した。ジアセチルは 99.5%エタノールで希釈を行った。条件付けと同時に、フタの内側にジアセチルを置かずに 120 分間放置した線虫をコントロールとした。

### 2-2. 条件付け後実験までの飼育

0.1%ジアセチルの条件付けを 120 分間行った後、線虫の存在する寒天プレートに洗浄液を 2ml 滴下し、線虫を含んだ洗浄液を 15ml の遠心管に移した。約 8ml の洗浄液を加え、遠心分離 (500rpm、90sec) を行った。ジアセチルの条件付けではプレート内にエサである大腸菌が塗布されていないため、洗浄作業は 1 回だけ行った。その後 NGM プレートに移し、15°C、20°C、25°C のインキュベーター内において 2、6、12、18 時間飼育した (図 1)。結果で報告している 0 時間は、条件付け後の洗浄作業後、すぐに実験を行ったことを示している。

ジアセチル順応に与える抗酸化剤  $\alpha$ -LA および酸化剤 PQ の影響を調べるための実験では、条件付け後の線虫の洗浄後、0.05%  $\alpha$ -LA または様々な濃度の PQ を含む NGM プレート上に移し、 $\alpha$ -LA の場合は 20°C のインキュベーターで 2、6 時間、25°C のインキュベーターで 6、12 時間飼育した。PQ の場合は、15°C、20°C、25°C のインキュベーター内において 2、6、12 時間飼育した。

### 2-3. 誘引反応の実験

各温度でそれぞれの時間経過後、遠心分離（500rpm、90sec）を 2 回行い、線虫の体表に付着した細菌を取り除いた。マイクロピペットを用いて遠心管の底集められた線虫を 3 $\mu$ l ずつ吸い取り、実験プレートの C、D 領域に約 15～20 個体の線虫を置いた。A および B 点には 0.5M アジ化ナトリウム 1.0 $\mu$ l を滴下し、さらに B 点には 0.1%ジアセチル 1.5 $\mu$ l を実験直前に滴下した（図 1）。ジアセチルを滴下した時を 0 分として、実験プレート上の各領域内の線虫の個体数と、それ以外に存在する線虫の個体数を目視により 10 分間隔で 60 分間カウントし、さらにその 30 分後（実験開始 90 分後）にカウントを行い線虫の誘引行動を評価した。0.1%ジアセチルに対する誘引行動は実体顕微鏡（OLYMPUS SZ40）下で観察した。

### 2-4. 線虫の運動量の測定

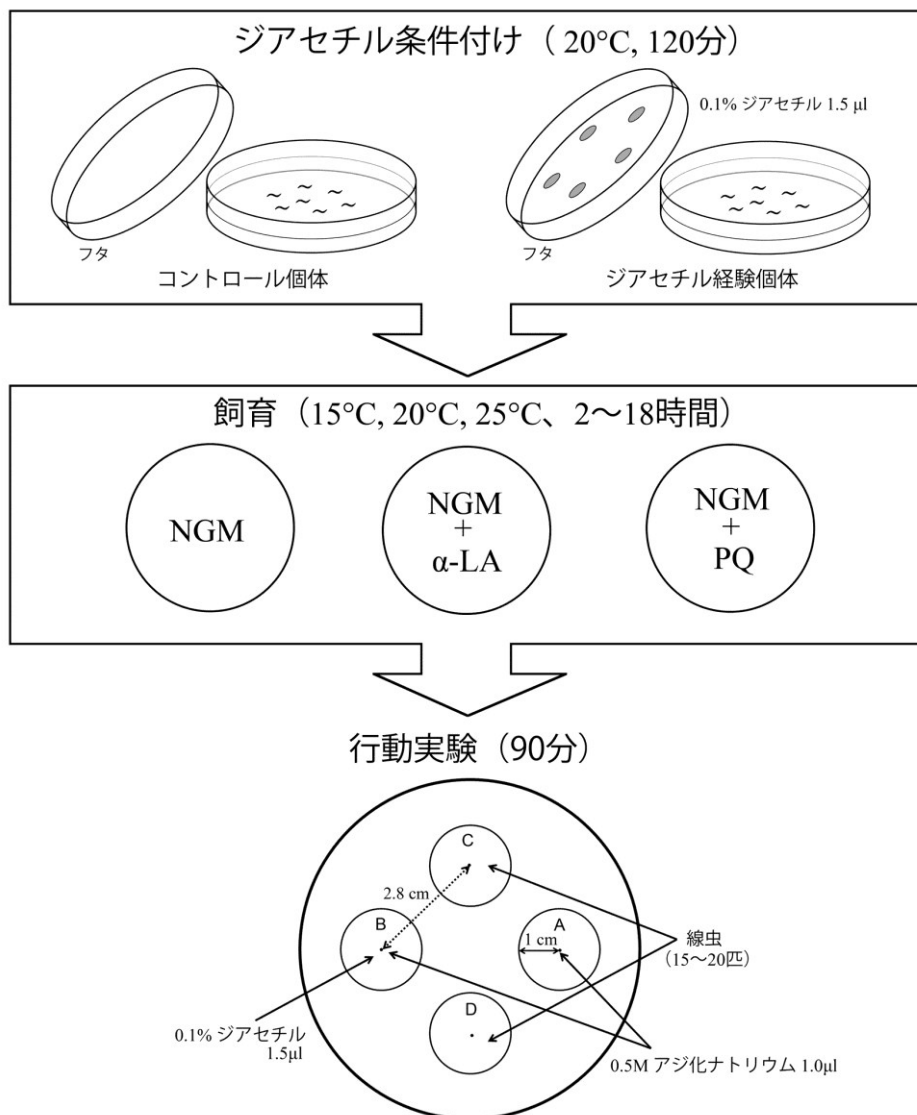
ジアセチルの条件付けが終了した線虫をそれぞれの条件下で飼育し、洗浄作業を行った。その後、遠心管の底に集められた線虫を 3 $\mu$ l ずつ吸い取り、大腸菌を塗布していない寒天プレートに移動させた。キムワイプを用いて洗浄液を吸い取り線虫を散らした後、ピッカーで線虫を一匹掬い取り、運動量計測用の実験プレート 5 枚に 1 匹ずつ移した。運動量は線虫のサインカーブとオメガター

ンの回数を 10 秒間カウントすることで求めた。1 つ目のプレート上に存在する線虫の運動量をカウントした後、次のプレートと交換し、同様に 10 秒間の運動量をカウントした。この作業を繰り返し、5 プレート目のカウントが終了後、再び 1 プレート目からカウントを始めた。線虫をプレートに置いた直後と、以降 1 分毎の運動量を 5 分間（計 6 回）カウントし、その平均値を各線虫の運動量として算出した。実験は全て 20°C の温度下で実行しており、実験中のプレートへの衝撃や、プレートのフタの開閉による線虫への刺激を避けるため、計測中は静かに取り扱った。

## 2-5. データ解析

解析はコンピュータソフト Microsoft Excel にデータを入力して行った。実験開始 0 分から 10 分毎における A、B、C、D 各領域内にいる個体数と領域外 (Other) の個体数を各時間で分けて入力し、それぞれの時間ごとの誘引率を算出した。誘引反応の評価には、Chemotaxis index (Bargmann et al., 1993) または Fraction of animals (Matsuura et al., 2004) を用いた。ジアセチルに対する誘引率 (Chemotaxis index : C.I.) は、 $(B \text{ 領域の個体数} - A \text{ 領域の個体数}) / \text{全個体数}$  より求めた  $((B-A)/\text{Total})$ 。Fraction of animals は、 $C$  および  $D$  領域の個体数 / 全個体数、領域外に存在する個体数 / 全個体数 によって算出し、それぞれを行動開始領域に存在する線虫の割合  $((C+D)/\text{Total})$ 、および各領域外に存在する線虫の割合  $(\text{Other}/\text{Total})$  とした。

運動量の解析ではサインカーブとオメガターンの回数を入力した。プレートごとの運動量の平均回数を計算後、全プレートの運動量の平均回数を算出した。平均回数を 3 倍することで、30 秒間の運動量とした。本文中の値は、平均値 ± SE を示している。有意差の検定には t-test を用いた。



**図 1. 実験のプロトコル** ジアセチルを均一にした条件付けプレート上に線虫をおき (Pre-exposed nematodes)、120 分間放置した後、野生型線虫および変異型線虫をエサの存在する NGM プレート上に置き、15°C、20°C、25°C の温度条件下で 2、6、12、18 時間飼育した。その後、実験プレート上で、0.1%ジアセチルに対する誘引行動を 90 分間解析した。ジアセチルを経験していない線虫をコントロールとして用いた。



### 3. 結果

#### 3-1. 野生型線虫のジアセチルに対する順応の持続時間

これまでの研究で、野生型線虫のジアセチルに対する順応の持続時間は、ジアセチルに対する条件付けの後の飼育温度に比例して延長することが明らかとなっている (Matsuura et al., 2009、菅野、2008)。Matsuura らの研究では、線虫の自由行動中の反応を調べる目的で実験をデザインしているため、本実験で使用する麻酔効果のあるアジ化ナトリウムは使用されていない。アジ化ナトリウムは線虫の順応研究で一般的に使用されており、本実験では線虫の誘引行動を解析するため、ジアセチルの存在領域 (図 1 の B 領域) またはコントロール領域 (図 1 の A 領域) に移動した個体数を正確にカウントする目的で用いた。ここでは、ジアセチルの条件付け後の飼育温度が、線虫のジアセチル順応の持続時間にどのような影響を与えるかについて解析を行った。

##### 3-1-1. 条件付け直後の反応

20°C の温度下において 0.1%ジアセチルの条件付けを 120 分間行った直後 (0 時間) の野生型線虫のジアセチルに対する誘引率  $((B-A)/Total)$  は、実験直後からジアセチル経験個体がコントロール個体よりもわずかに低い値を示し、実験開始 90 分後においては有意な差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 2a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.64 \pm 0.03$ 、ジアセチルを経験した個体群で  $0.53 \pm 0.04$  であった。行動開始領域に存在する割合  $((C+D)/Total)$  はどちらも同程度の低下を示し、有意差は確認されなかった (図 2b)。領域外 (Other/Total) に存在する割合は、どちらの個体群も 10 分後において最大値を示しており、両者間に有意差は認められなかった (図 2c)。

### 3-1-2. 飼育温度別の反応

#### (1) 15°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルの条件付けは 20°C の温度条件下で行った。野生型線虫の条件付け後の飼育を 15°C で行った場合、2 時間の飼育後、ジアセチルに対する誘引率はジアセチル経験個体がコントロール個体よりもわずかに高い値を示していたが有意差は認められなかった (図 3a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.61 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.61 \pm 0.04$  であった。行動開始領域に存在する割合は、実験開始からコントロールの割合がわずかに高い値を示したが、有意差は確認されなかった (図 3b)。また、領域外領域に存在する割合はどちらの個体群も実験開始 10 分に最大値を示しており、実験開始直後から線虫が移動を始めていることがわかる (図 3c)。

#### (2) 20°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルの条件付け後、20°C の温度条件下で 2 時間飼育したジアセチル経験個体のジアセチルへの誘引率は、実験開始 30 分以後からコントロール個体よりも有意に低い値を示し、90 分後ではコントロール個体で  $0.87 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.69 \pm 0.05$  を示した ( $P < 0.01$ 、図 4a)。行動開始領域に存在する割合は、実験開始 30 分以降においてジアセチル経験個体がコントロール個体よりも高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 4b)。実験開始 40 分以降はどちらの個体群も行動開始領域に存在する線虫の割合が 0.1 以下を示しており、ほとんどの線虫が行動開始領域から移動したことがわかる。領域外に存在する割合は、実験開始からジアセチル経験個体の割合が高い値を示し、10 分と 40~90 分後では有意な差が確認された ( $P < 0.01$ 、図 4c)。

ジアセチル条件付け後、20°C で 6 時間飼育した場合には、コントロール個体

と比較し、ジアセチル経験個体が実験開始 10 分以降から有意に低い値を示した ( $P < 0.01$ 、図 4d)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.91 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.84 \pm 0.02$  であった。行動開始領域に存在する割合は、実験開始からジアセチルを経験した個体の割合が上回っており、30 以後からは有意な差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 4e)。実験開始 30 分以降の行動開始領域に存在する割合はどちらの個体群も 0.1 以下であり、ほとんどの線虫が移動している。領域外に存在する割合は、ジアセチル経験個体がコントロールの割合よりも実験開始から上回り、どちらの線虫も 10 分後に最大値を示した (図 4f)。20 分以降からは両者間で有意差が認められた ( $P < 0.01$ )。

0.1%ジアセチル条件付け後、20°C で 12 時間飼育したジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体と比較してわずかに高い値を示しており、実験開始 10 分、20 分後においては有意な増加が確認されたが ( $P < 0.01$ )、30 分以降は有意差が認められなかった。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.81 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.82 \pm 0.04$  を示した (図 4g)。行動開始領域に存在する割合はコントロール個体がわずかに上回り、実験開始 10 分後で有意な差が確認された ( $P < 0.05$ )。20 分以降は同傾向の低下を示し、実験開始 30 分後以降でどちらの個体群も 0.1 以下の割合を示した (図 4h)。領域外に存在する割合についても、コントロールが高い値を示し、10 分、20 分後においては有意差が確認された ( $P < 0.01$ 、図 4i)。

### (3) 25°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、25°C の温度条件で 12 時間飼育した野生型線虫のジアセチル経験個体のジアセチルに対する誘引率は、実験中を通してコントロール個体よりも低い値を示し、実験開始 90 分後では有意な差が認めら

れた (図 5a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.87 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.79 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.01$ )。行動開始領域に存在する割合および領域外に存在する割合は、ジアセチル経験個体とコントロール個体どちらも同程度の値を示し、有意差は認められなかった (図 5b、c)。

条件付け後に  $25^{\circ}\text{C}$  で 18 時間飼育した場合では、両個体群の誘引率に有意な差は確認されなかった (図 5d)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.83 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.79 \pm 0.05$  であった。行動開始領域に存在する割合は、どちらの個体も実験開始 10 分後で 0.1 以下を示した (図 5e)。ジアセチルを経験した個体の行動開始領域に存在する割合はコントロール個体よりもわずかに高い値を示しており、実験開始後 40~60 分で有意差が確認された ( $P < 0.05$ 、図 5e)。領域外に存在する割合は、両個体とも 10 分後に最大値を示し、ジアセチル経験個体の割合が高い値を示したが有意差は確認されなかった (図 5f)。

### 3-1-3. 野生型線虫のジアセチルに対する順応持続時間のまとめ

実験開始後 90 分において、ジアセチル経験個体の誘引率がジアセチルを経験しなかったコントロール個体よりも有意に低い値を示したのは、 $15^{\circ}\text{C}$  の飼育では 2 時間未満、 $20^{\circ}\text{C}$  の温度条件で 6 時間、 $25^{\circ}\text{C}$  の温度条件では 12 時間であった (図 6)。ジアセチルの条件付け後、 $15^{\circ}\text{C}$  の飼育温度ではジアセチル順応の持続時間が 2 時間未満、 $20^{\circ}\text{C}$  では 6 時間程度、 $25^{\circ}\text{C}$  では 12 時間程度であると考えられる。本結果は麻酔効果のあるアジ化ナトリウムを刺激領域 (図 2 の B 領域)、コントロール領域 (図 2 の A 領域) に使用した場合のものであるが、Matsuura らによって報告されたアジ化ナトリウムを使用していない場合の結果と同様の傾向が確認された (Matsuura et al., 2009)。

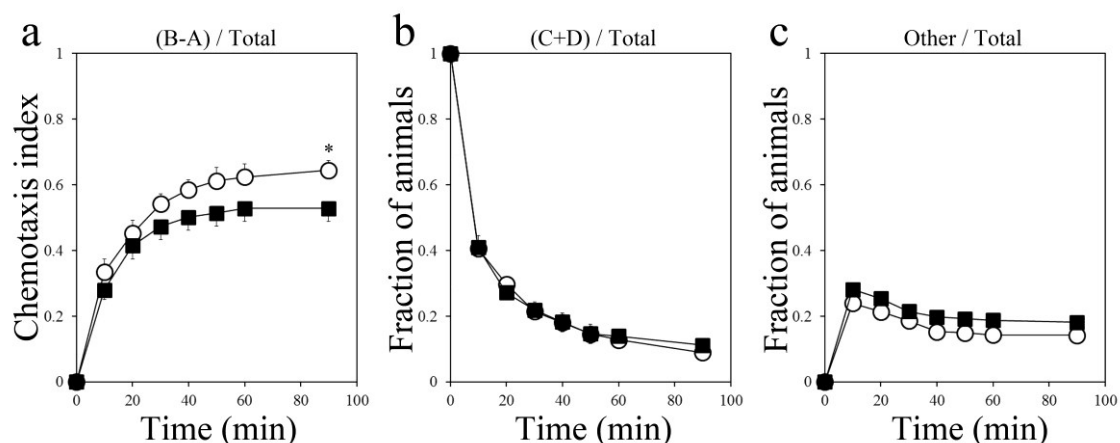


図 2. 0.1%ジアセチル経験直後 (0 時間) の野生型線虫のジアセチル誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 (a)、行動開始領域に存在する線虫の割合 (b)、領域外に存在する線虫の割合 (c) の時間ごとの反応率を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。ジアセチルに対する条件付け直後に行った実験では、ジアセチルを経験した野生型線虫の誘引率は、コントロール個体と比較して、実験開始 90 分で有意に低下した。n=23。\* :  $P < 0.05$ 。

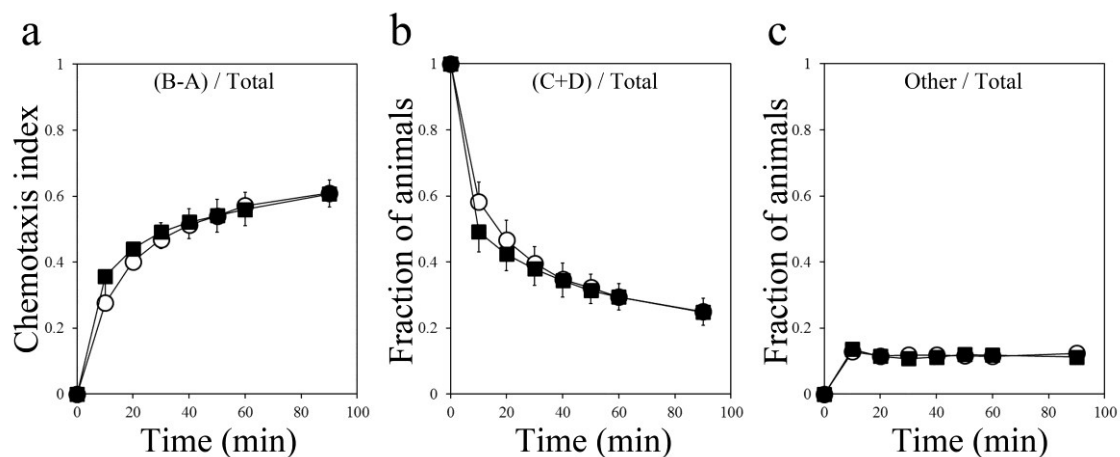


図 3. 0.1%ジアセチル経験後、15°C で 2 時間飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 (a)、行動開始領域に存在する線虫の割合 (b)、領域外に存在する線虫の割合 (c) の時間ごとの反応率を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。ジアセチルを経験した野生型線虫の誘引率は、コントロールと比較して有意な差は認められなかった。コントロール n=29、ジアセチル経験個体 n=28。

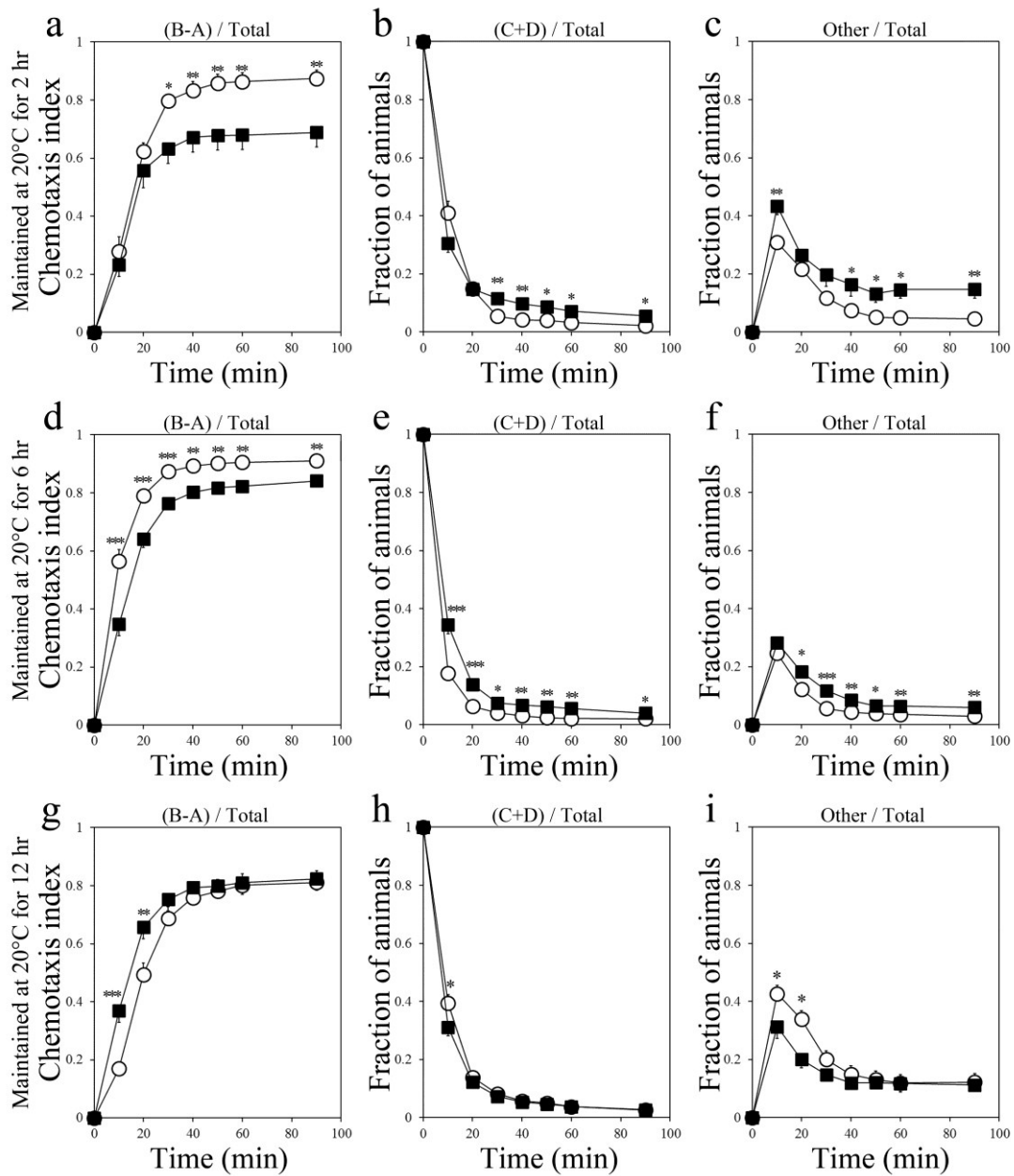


図 4. 0.1%ジアセチル経験後、20°C で飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応。ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 20°C で 2 時間、d~f は 6 時間、g~i は 12 時間飼育した線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。ジアセチル経験個体の誘引率の有意な低下は 6 時間の飼育後の実験で確認される。2 時間：コントロール n=18、ジアセチル経験個体 n=19。6 時間：n=31。12 時間：n=20。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

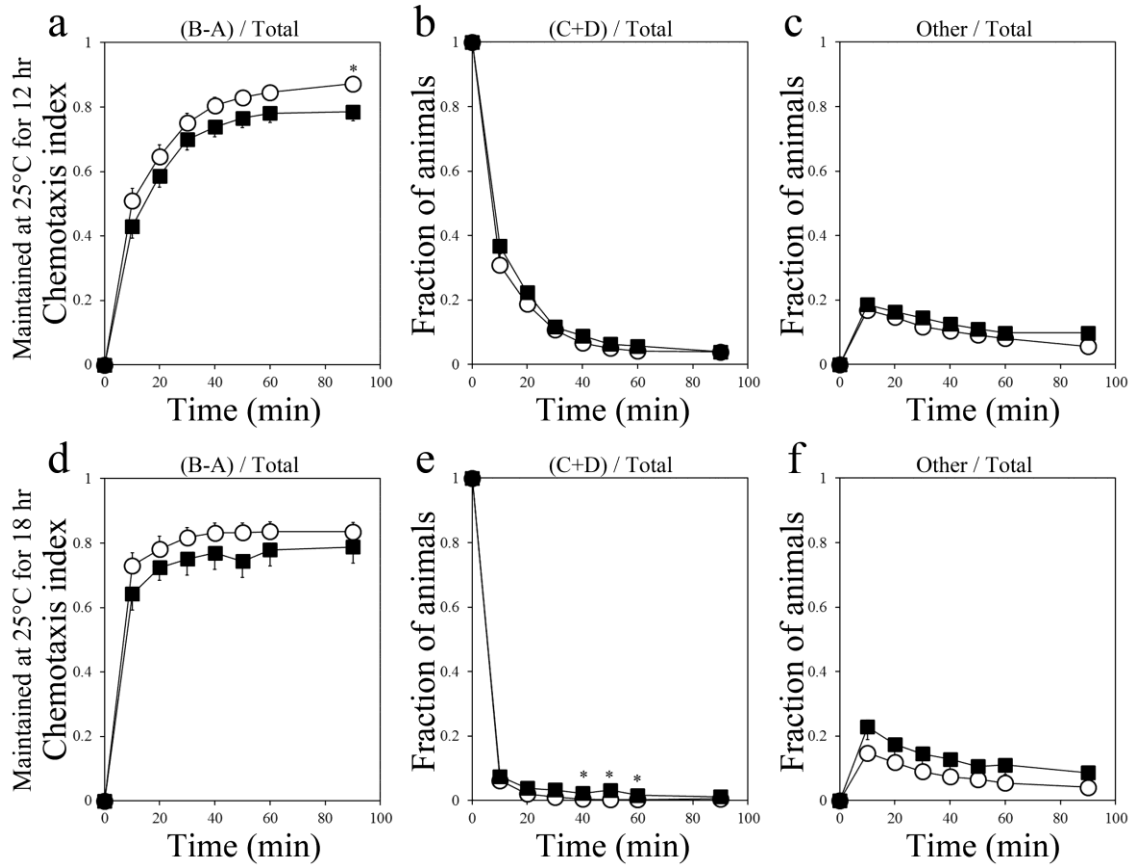


図 5. 0.1%ジアセチル経験後、25°C で飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 25°C で 12 時間、d~f は 18 時間飼育した線虫の経時変化を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群を示す。25°C で飼育した場合のジアセチル経験个体の誘引率の有意な低下が 12 時間の飼育後において確認された。12 時間 : n=43。18 時間 : n=24。\* :  $P < 0.05$ 。

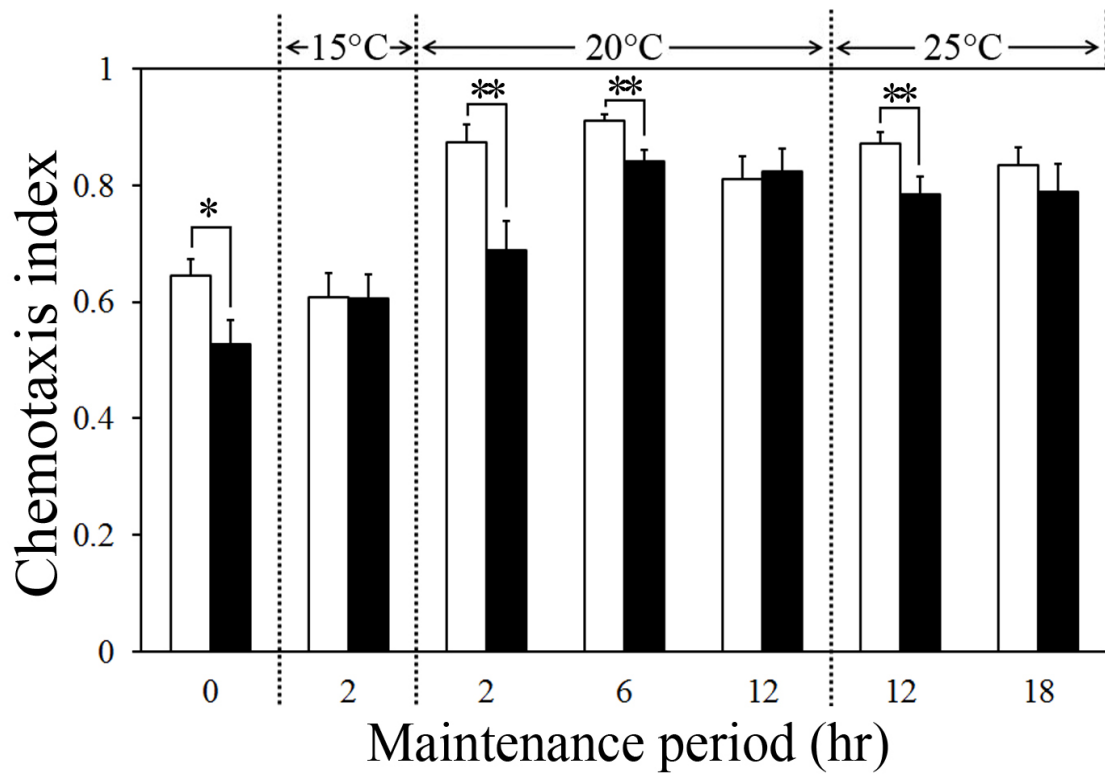


図 6. ジアセチル経験後、15°C、20°C、25°C で飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引率 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率の値を示している。横軸はジアセチル条件付け後の飼育時間を示す。0 は条件付け直後に行った実験の結果である。ジアセチルを経験した野生型線虫のジアセチル順応の持続時間は、条件付け後、15°C では 2 時間未満、20°C では 6 時間程度、25°C では 12 時間程度であることが明らかとなった。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。Nishino et al., 2013 より引用改変。



### 3-2. 活性酸素発生レベルの低い変異体線虫の順応持続時間

野生型線虫をジアセチル経験後に 15°C、20°C、25°C 飼育すると、0.1%ジアセチルに対する嗅覚順応の持続時間が飼育温度に比例して延長することが確認された。飼育温度の上昇は線虫の成長速度を加速させる。線虫の成長速度にはインスリン様シグナルや酸化ストレスに関与する活性酸素の影響が考えられる。ジアセチル順応における活性酸素の影響について調査するため、活性酸素の発生レベルが異なる変異体を用いて 0.1%ジアセチルに対する順応の持続時間を解析した。ここでは、活性酸素発生レベルの低い *isp-1* 変異体と *clk-1* 変異体を使用した。ジアセチル条件付けの時間経過後、あらかじめ 0.1%ジアセチルを経験した個体と、経験していないコントロール個体を 15°C、20°C、25°C の温度条件下で 2 時間、6 時間、12 時間、18 時間飼育し、その後のジアセチルに対する誘引反応を比較した。*isp-1* 変異体、*clk-1* 変異体はそれぞれミトコンドリア内、細胞内の活性酸素の産生を抑制しており (Hekimi and Guarente, 2003)、長寿命の変異体として知られる。

#### 3-2-1. 条件付け直後の反応

*isp-1* は電子伝達系の複合体 III にコードされており、変異体は酸素消費量が低下した長寿命変異体である (Feng et al., 2001)。0.1%ジアセチルに対する条件付け直後 (0 時間) の *isp-1* 変異体のジアセチルに対する誘引率は、実験開始からジアセチル経験個体が有意に低い値を示した (図 7a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.82 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.73 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.05$ )。行動開始領域に存在する割合は実験開始 10 分から 30 分において、ジアセチル経験個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 7b)。実験開始 40 分以降の両者の割合は 0.1 以下となり、ほとんどの線虫が移動したことを意味する (図 7b)。

領域外に存在する割合は、実験開始 20 分以降にジアセチル経験個体がコントロール個体よりも上回っており、60 分後においては有意差が認められた (図 7c)。

*clk-1* 変異体は電子伝達系を通じた活性酸素種の発生低下がみられる長寿命変異体である (Larsen and Clarke, 2002)。条件付け直後 (0 時間) の *clk-1* 変異体のジアセチルに対する誘引率は、実験中を通してジアセチル経験個体がコントロール個体よりも有意に低い値を示しており、90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.82 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.65 \pm 0.03$  を示した ( $P < 0.001$ 、図 7d)。行動開始領域に存在する割合は実験中を通してジアセチル経験個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 7e)。領域外に存在する割合の最大値は、コントロール個体が実験開始 10 分後、ジアセチル経験個体が 20 分後に最大値を示した (図 7f)。20 分以降からはジアセチル経験個体がコントロール個体よりもわずかに上回り、実験開始 90 分後で有意差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 7f)。

### 3-2-2. *isp-1* 変異体の飼育温度別の反応

#### (1) 15°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、15°C の温度条件下で 2 時間飼育した *isp-1* 変異体のジアセチルを経験した個体群の誘引率は、コントロールと比較して実験開始 20~40 分の間で有意に低い値を示したが、90 分後においてはコントロール個体で  $0.86 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.80 \pm 0.03$  を示し、有意な差は確認されなかった (図 8a)。ジアセチル経験個体の行動開始領域に存在する割合は、コントロール個体よりも高い値を示しており、20 分以降からは有意な差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 8b)。このことから、ジアセチル経験個体はコントロール個体と比較して行動開始領域から移動していないことがわかる。領域外に存在する割合はどちらの個体群も実験開始 10 分後に最大値を示した (図 8c)。

## (2) 20°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、20°C で 2 時間飼育した *isp-1* 変異体のジアセチルの対する誘引率は、両個体群の間に有意な差は認められず、90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.77 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.77 \pm 0.04$  を示した (図 9a)。行動開始領域に存在する割合はどちらも実験開始 40 分以後で 0.1 程度となり、ほとんどの個体が移動したことがわかる (図 9b)。領域外に存在する割合は、いずれの個体数も実験開始 10 分に最大を記録し、両者間に有意な差は確認されなかった (図 9c)。

## (3) 25°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、25°C で 2 時間飼育した *isp-1* 変異体のジアセチルの対する誘引率は、実験中を通してジアセチル経験個体が有意に低い値を示した (図 10a)。90 分後の誘引率は、コントロールで  $0.78 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.67 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.01$ )。行動開始領域に存在する割合は、実験開始 10 分以降からジアセチル経験個体が有意に高い値を示し、実験開始 90 分後のコントロール個体の割合は  $0.03 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体の割合は  $0.09 \pm 0.02$  であったことから、コントロールと比較してあまり移動していないことが確認された ( $P < 0.01$ 、図 10b)。領域外に存在する割合に有意な差は認められなかったが、コントロール個体では実験開始 10 分後、ジアセチル経験個体では 30 分後に最大値を示した (図 10c)。

ジアセチル条件付け後、25°C で 6 時間飼育した場合のジアセチル経験個体の誘引率は、実験開始 20 分、30 分後でコントロールよりも有意な低下が確認されたが ( $P < 0.05$ )、40 分以降有意差は認められず、90 分後ではコントロールで 0.88

±0.02、ジアセチル経験個体で  $0.82 \pm 0.02$  であった (図 10d)。行動開始領域に存在する割合は、ジアセチル経験個体がコントロール個体よりも高い値を示し、実験開始から 60 分後の間で有意な差が認められたが ( $P < 0.05$ )、90 分後では有意差は認められなかった (図 10e)。また、領域外に存在する割合は、どちらも実験開始 10 分後に最大値を示した (図 10f)。

### 3-2-3. *clk-1* 変異体の飼育温度別の反応

#### (1) 15°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付けを行った後、15°C の温度条件下で 2 時間飼育した *clk-1* 変異体のジアセチルの対する誘引率は、実験開始からジアセチル経験個体が有意に低い値を示した (図 11a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.79 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.66 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.05$ )。行動開始領域に存在する割合は、どちらの個体群も同様の低下傾向を示しており、実験開始 40 分後ではコントロール個体が  $0.04 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体が  $0.08 \pm 0.01$  であった (図 11b)。領域外に存在する割合は、実験開始からジアセチル経験個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ 、図 11c)。

ジアセチル条件付け後、15°C で 6 時間飼育した場合では、両個体群に有意な差は認められず、90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.65 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.66 \pm 0.04$  であった (図 11d)。行動開始領域に存在する割合は、どちらも同様の低下傾向を示しており、有意差は認められなかった (図 11e)。領域外に存在する割合においても実験中を通して有意差は確認されなかった (図 11f)。

## (2) 20°C で飼育した場合の順応の持続時間

ジアセチル条件付け後、20°C で 2 時間飼育した *clk-1* 変異体のジアセチルの対する誘引率は、実験中を通してジアセチル経験個体が有意に低い値を示した (図 12a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.88 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.80 \pm 0.02$  を示した ( $P < 0.01$ )。行動開始領域に存在する割合は、どちらの個体群も実験開始 40 分以降に 0.1 以下の値を示し、ほとんどの線虫が移動したことを示している (図 12b)。また、40 分後まではジアセチル経験個体が有意に高い値を示したが、50 分以後は有意差が確認されなかった (図 12b)。領域外に存在する割合はどちらも実験開始 10 分で最大値を示し、実験中を通してジアセチル経験個体がコントロール個体よりも有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 12c)。

0.1%ジアセチルに対する条件付けの後、20°C で 6 時間飼育した場合では、実験開始 10 分と 30 分でジアセチル経験個体がコントロール個体よりも有意に低い値を示したが ( $P < 0.05$ )、それ以外では有意差は確認されなかった (図 12d)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.71 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.70 \pm 0.03$  であった。行動開始領域に存在する割合は、ジアセチル経験個体が実験開始 10 分後に有意に高い値を示しており ( $P < 0.05$ )、移動の開始した個体がコントロール個体よりも少ないことを示したが、20 分以降からは有意差は確認されなかった (図 12e)。領域外に存在する割合は、実験開始 30 分後ジアセチル経験個体が有意に高い値を示すが ( $P < 0.05$ )、それ以降で有意差は確認されなかった (図 12f)。

## (3) 25°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルの条件付け後、25°C の温度条件下で 2 時間飼育した *clk-1* 変異体のジアセチル経験個体の誘引率は、計測中を通して有意に低い値を示し、90

分後のコントロール個体では  $0.85 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体では  $0.75 \pm 0.02$  を示した ( $P < 0.001$ 、図 13a)。行動開始領域に存在する割合は、実験開始 50 分まではジアセチル経験個体が有意に高い値を示したが、それ以降では有意な差は確認されなかった (図 13b)。また、領域外に存在する割合は、どちらの個体群も実験開始 10 分に最大値を示し、50 分以後からはジアセチル経験個体がコントロール個体よりも有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ 、図 13c)。

条件付け後、 $25^{\circ}\text{C}$  で 6 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体は実験開始からコントロール個体よりも有意に低い値を示した (図 13d)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.93 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.88 \pm 0.02$  であった ( $P < 0.05$ 、図 13d)。行動開始領域に存在する割合は、実験中ジアセチル経験個体の割合が有意に高い値を示した (図 13 e)。領域外に存在する割合はどちらも実験開始 10 分に最大値を示し、両個体群とも同程度の値を示した (図 13f)。

$25^{\circ}\text{C}$  で 12 時間飼育した場合のジアセチル経験個体の誘引率は、実験開始以降 40 分後まで有意に低い値を示したが、50 分以後は有意な差は確認されなかった。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.86 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.82 \pm 0.03$  であった (図 13g)。行動開始領域に存在する割合は、実験開始 50 分後まではジアセチル経験個体が有意に高い値を示したが、60 分以降は有意な差は確認されなかった (図 13h)。領域外に存在する割合は、どちらも実験開始 10 分後に最大値を示した (図 13i)。

#### 3-2-4. 活性酸素発生レベルの低い変異体線虫の順応持続時間のまとめ

0.1%ジアセチルの条件付け後、各温度条件下での飼育後における活性酸素発生レベルの低い変異体線虫のジアセチルに対する誘引率を解析し、実験開始 90 分後の誘引率をそれぞれ比較した。*isp-1* 変異体において、ジアセチル経験個体

の誘引率がコントロール個体と比較して有意に低下したのは、20°C では条件付け直後 (0 時間)、25°C では 2 時間であった。なお、15°C では 2 時間後においても両者の誘引率に有意差は認められなかった。このことから、*isp-1* 変異体の 0.1% ジアセチルに対する順応の持続時間は、条件付け後 15°C と 20°C の飼育では 2 時間未満、25°C の飼育においては約 2 時間であることが示される (図 14、*isp-1*)。 *clk-1* 変異体では 15°C、20°C では 2 時間、25°C では 6 時間であった。*clk-1* 変異体 0.1%ジアセチルに対する順応の持続時間は、ジアセチルの条件付け後、15°C と 20°C の飼育では 2 時間程度、25°C の飼育では約 6 時間であると考えられる (図 14、*clk-1*)。さらに、活性酸素の発生レベルの低い変異体線虫は、20°C と 25°C の温度で飼育した場合に、野生型線虫と比較して順応の持続時間が短縮することが明らかとなった (図 6、図 14)。

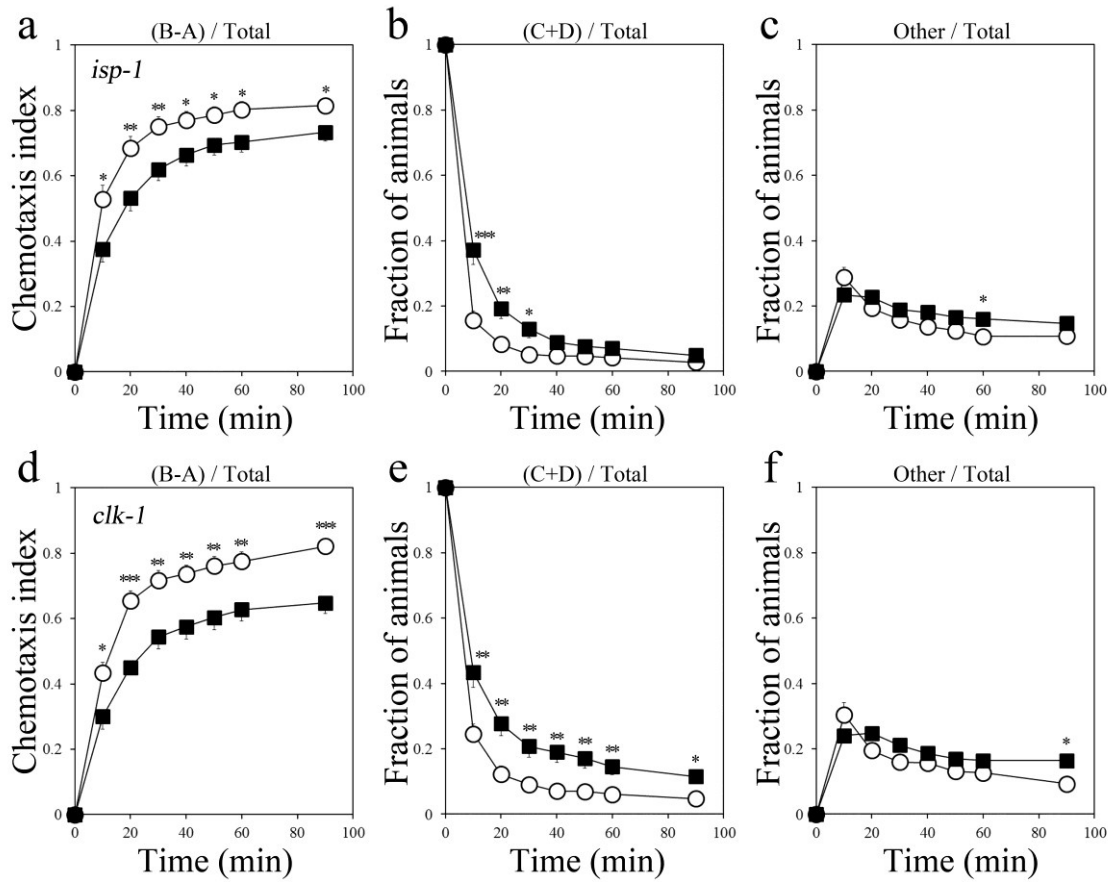


図 7. 0.1%ジアセチル経験直後 (0 時間) の *isp-1*、*clk-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other / Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は *isp-1* 変異体、d~f は *clk-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。活性酸素発生レベルの低い、長寿命変異体の条件付け直後における誘引率は、ジアセチル経験個体がコントロールよりも有意に低い値を示しており、ジアセチル順応の成立が確認された。*isp-1* : n=27、*clk-1* : n=22。  
\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。



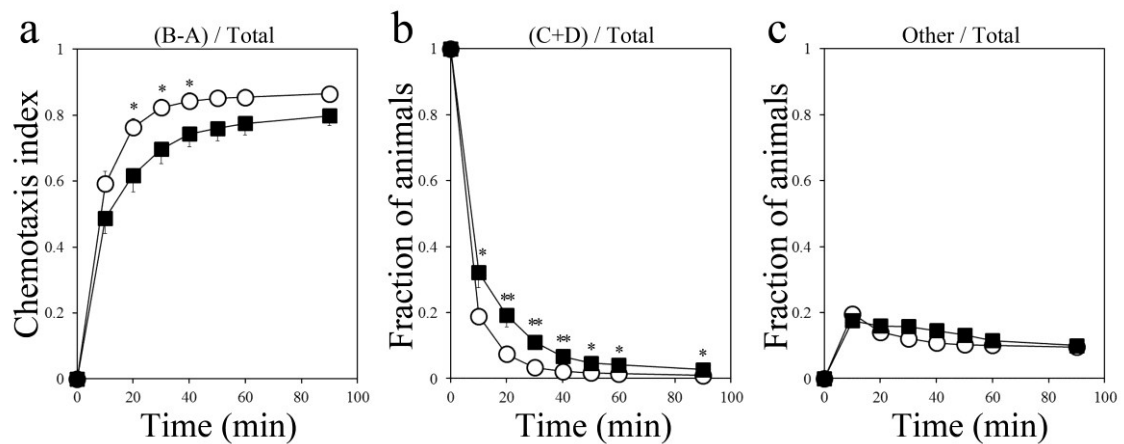


図 8. 0.1%ジアセチル経験後 15°C で 2 時間飼育した *isp-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 (a)、行動開始領域に存在する線虫の割合 (b)、領域外に存在する線虫の割合 (c) の時間ごとの反応率を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールと比較して低い値を示したが、90 分後において有意な低下は認められなかった。コントロール n=29、ジアセチル経験個体 n=28。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

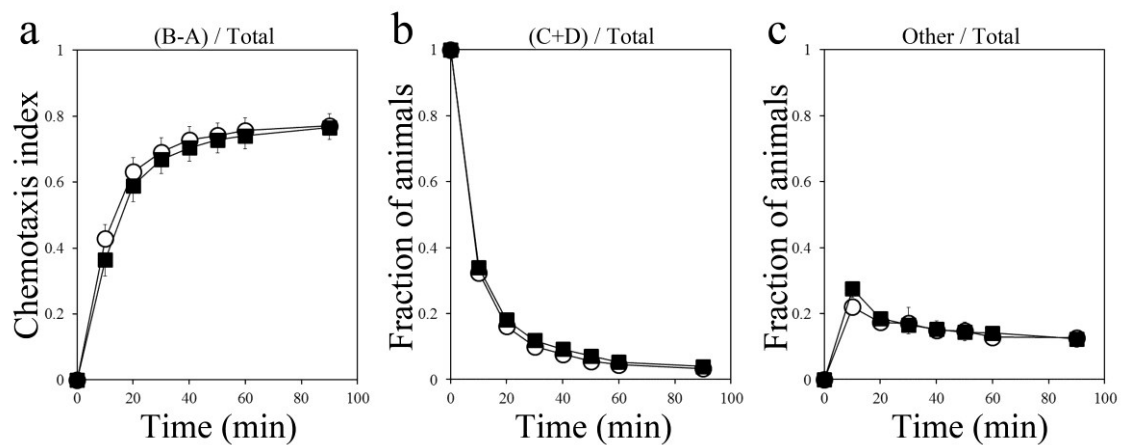


図 9. 0.1%ジアセチル経験後 20°C で 2 時間飼育した *isp-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 (a)、行動開始領域に存在する線虫の割合 (b)、領域外に存在する線虫の割合 (c) の時間ごとの反応率を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。実験中を通して、両個体群の誘引率および行動開始領域に存在する割合、領域外に存在する割合に有意な差は確認されなかった。n=23。

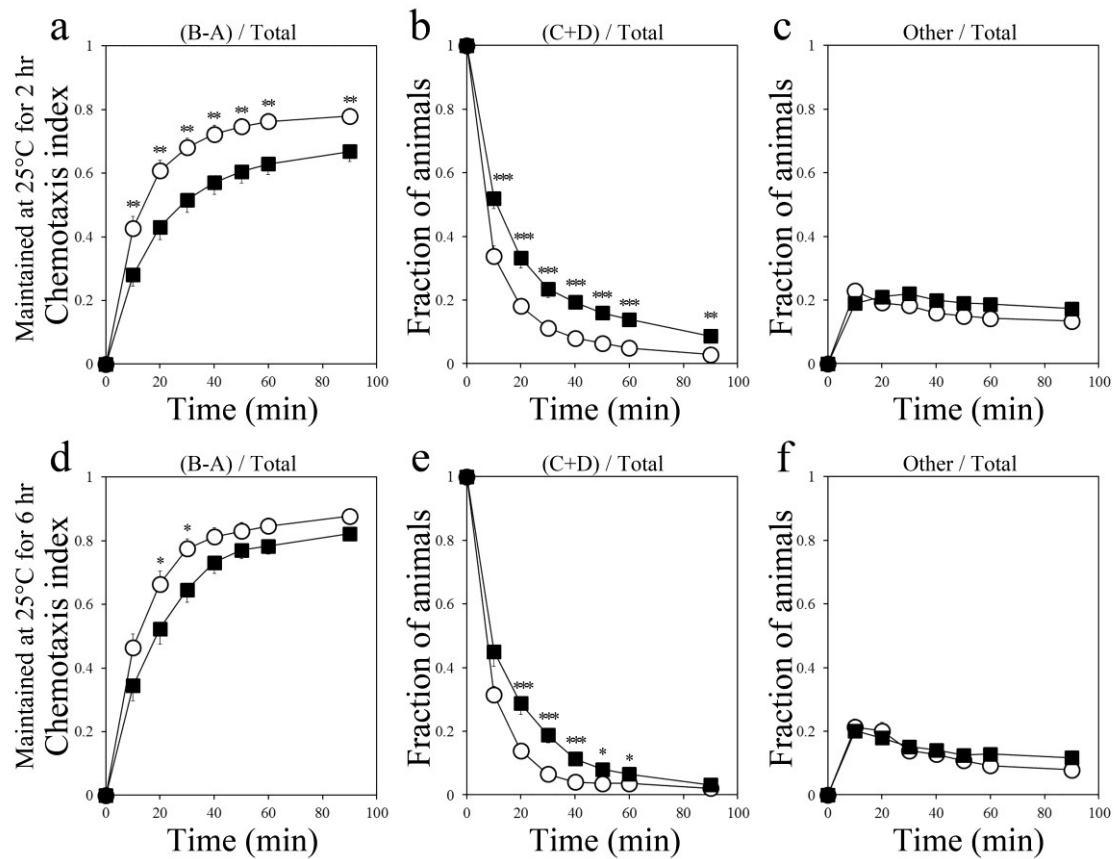


図 10. 0.1%ジアセチル経験後 25°C で飼育した *isp-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other / Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 25°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した *isp-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°C の高温で 2 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールと比較し有意に低下しており、ジアセチル順応が確認される。6 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールよりもわずかに低い値を示すが、有意な差は確認されなかった。2 時間：コントロール n=35、ジアセチル経験個体 n=40。6 時間：コントロール n=22、ジアセチル経験個体 n=21。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

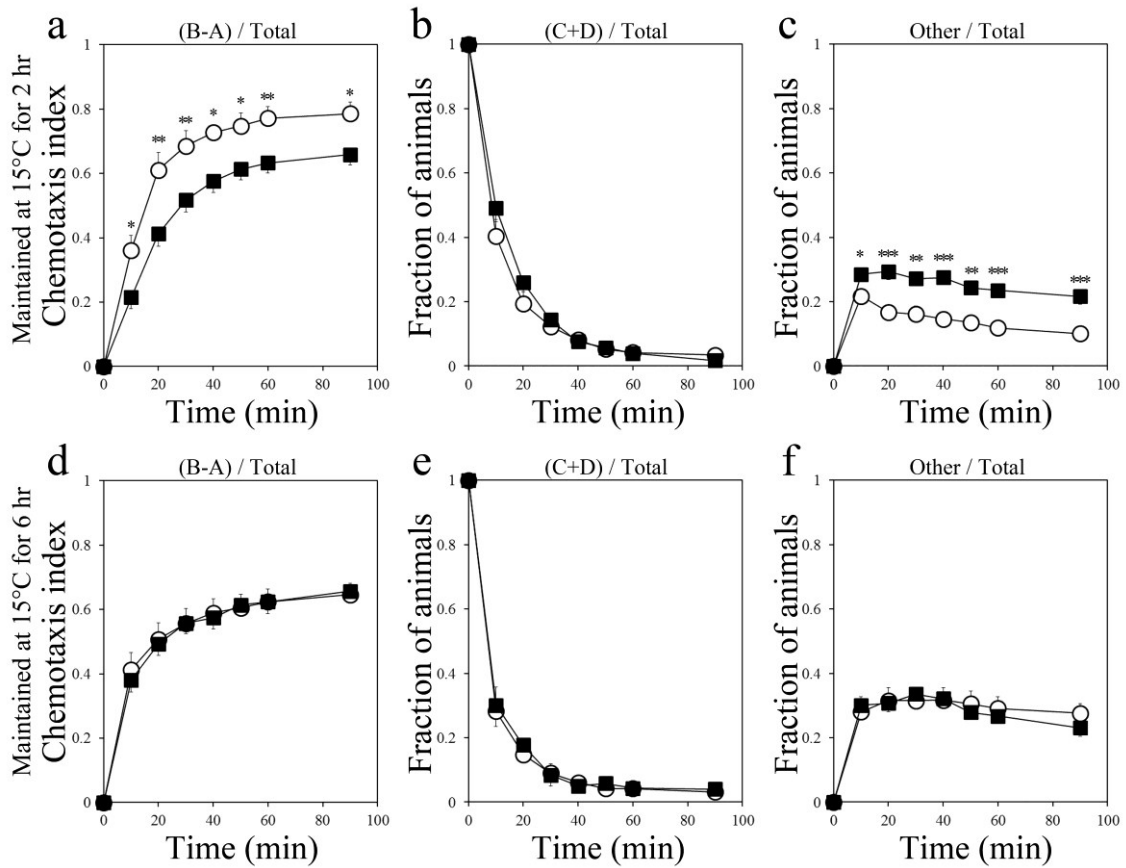


図 11. 0.1%ジアセチル経験後 15°C で飼育した *clk-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other / Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 15°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した *clk-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群を示す。2 時間飼育した場合、ジアセチル経験个体の誘引率はコントロールと比較し有意に低い値を示しており、領域外に存在する个体の割合も有意に高い。6 時間飼育した場合には、両个体群に有意な差は確認されなかった。2 時間：コントロール n=21、ジアセチル経験个体 n=20。6 時間：コントロール n=15、ジアセチル経験个体 n=12。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

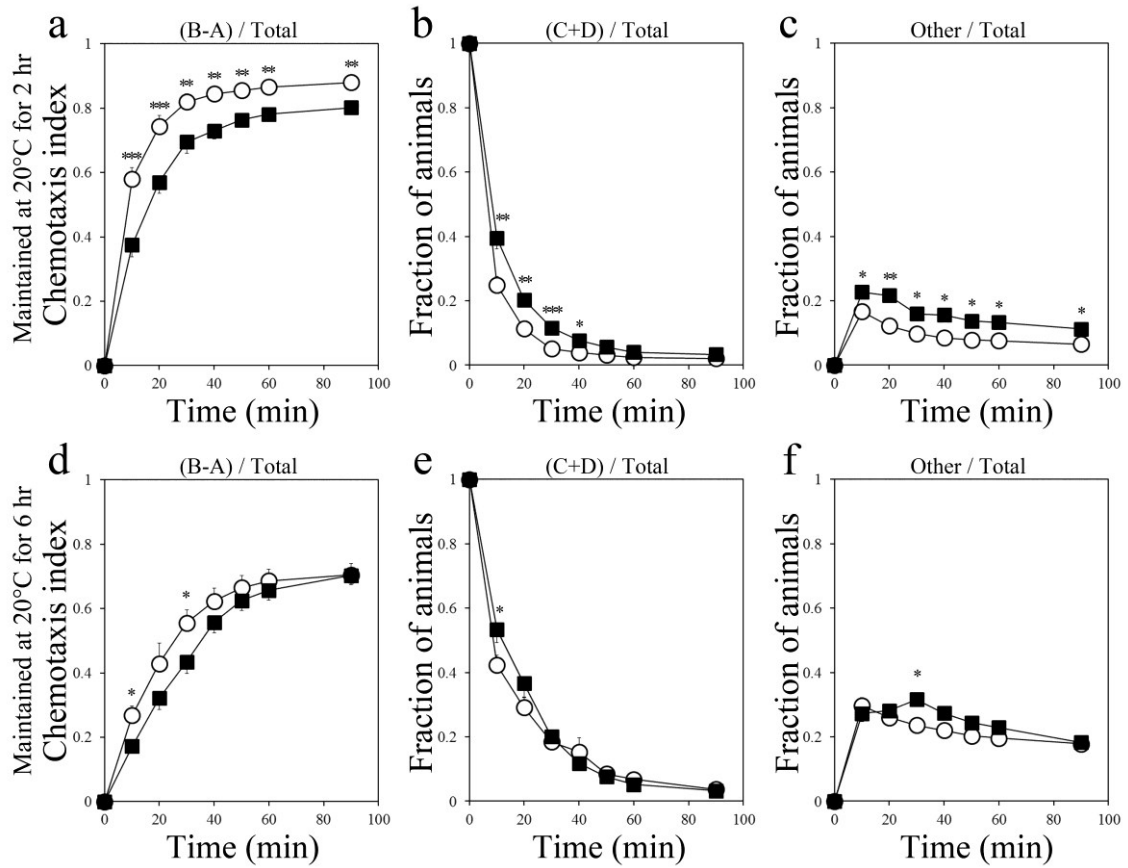


図 12. 0.1%ジアセチル経験後 20°C で飼育した *clk-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other / Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 20°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した *clk-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。2 時間飼育した場合のジアセチルに対する誘引反応は、ジアセチル経験個体がコントロールよりも有意に低い値を示した。6 時間飼育した場合では、実験開始 40 分以降両個体群に有意差は確認されなかった。2 時間：コントロール n=25、ジアセチル経験個体 n=24。6 時間：コントロール n=20、ジアセチル経験個体 n=20。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$ 、\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

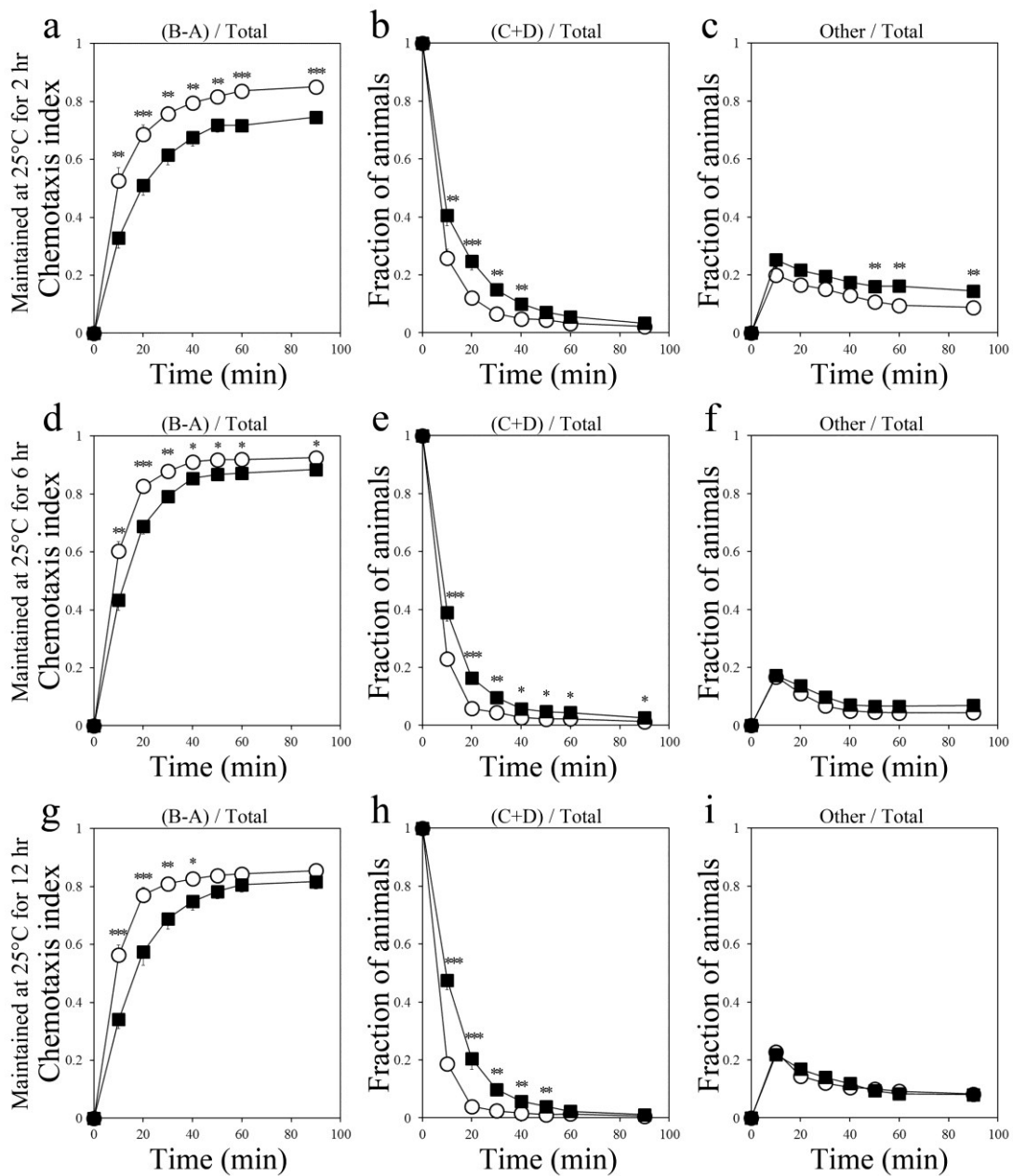


図 13. 0.1%ジアセチル経験後 25°C で飼育した *clk-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other / Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 25°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育、g~i は 12 時間飼育したものを示す。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。6 時間飼育までは、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールより有意に低く、ジアセチル順応が確認されたが、12 時間の飼育を行った場合には、有意差は確認されなかった。2 時間：コントロール n=28、ジアセチル経験個体 n=29。6 時間：コントロール n=24、ジアセチル経験個体 n=23。12 時間：n=23。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

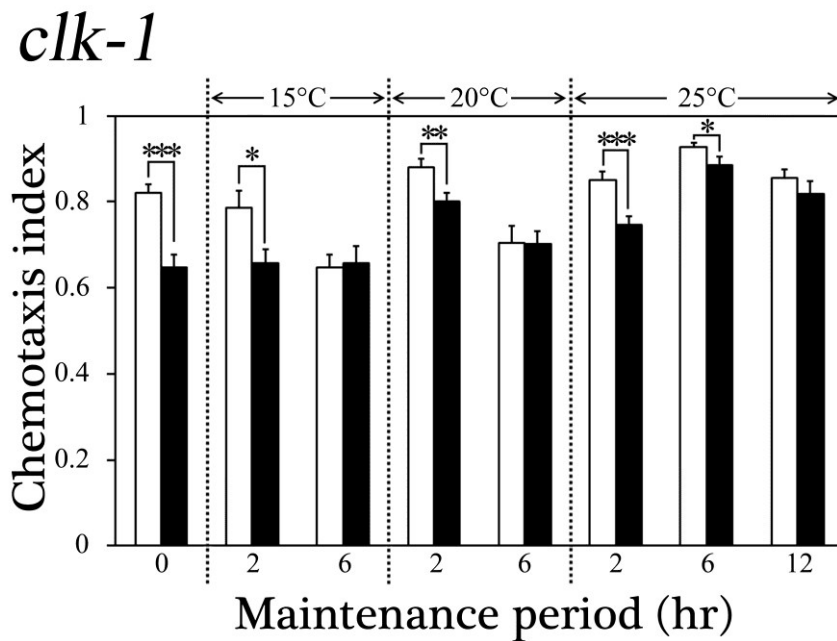
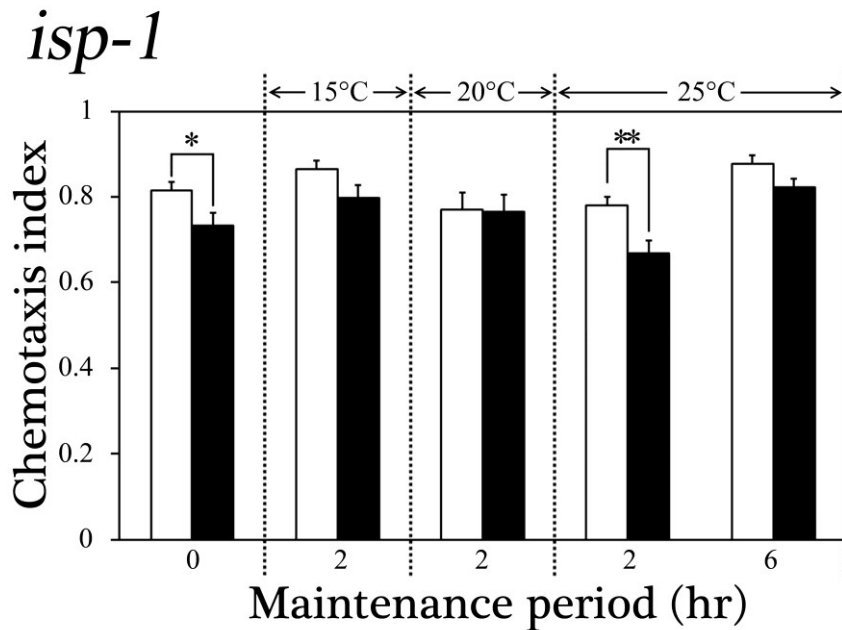


図 14. ジアセチル経験後、15°C、20°C、25°C で飼育した *isp-1* 変異体と *clk-1* 変異体のジアセチルに対する誘引率 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率の値を示している。ジアセチルを経験した *isp-1* 変異体のジアセチルに対する順応の持続時間は条件付け後の飼育温度 15°C で 2 時間未満、20°C と 25°C では 2 時間程度であることが明らかとなった。*clk-1* 変異体の嗅覚順応の持続時間は 15°C と 20°C では 2 時間程度、25°C では 6 時間程度であった。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。Nishino et al., 2013 より引用改変。

### 3-3. 活性酸素発生レベルの高い変異体線虫の順応持続時間

次に活性酸素の発生レベルが高い *gas-1* 変異体と *mev-1* 変異体を用いて順応の持続時間を解析した。*gas-1* 遺伝子はミトコンドリア電子伝達系の呼吸鎖複合体 I の 49 kDa のサブユニットを、*mev-1* 遺伝子は複合体 II のコハク酸脱水素酵素におけるシトクロム b をそれぞれコードしている。これらの変異体は野生型線虫と比べ、活性酸素種の発生や細胞内の酸化ダメージが増加しており、短寿命の変異体として知られている (Honda et al., 1993; Ishii et al., 1998; Kayser et al., 2004a; Senoo-Matsuda et al., 2001)。

#### 3-3-1. *gas-1* 変異体の飼育温度別の反応

##### (1) 15°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付けの後、15°C の温度条件で 2 時間飼育した *gas-1* 変異体のジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体と比較して実験開始 40 分以降において有意に低い値を示しており、90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.62 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.47 \pm 0.05$  であった ( $P < 0.05$ 、図 15a)。行動開始領域に存在する割合は、ジアセチル経験個体が高い値を示しており、実験開始後 10 分、20 分、40 分で有意差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 15b)。領域外に存在する割合はどちらも実験開始 30 分後に最大値を示し、それぞれの時間で有意差は認められなかった (図 15c)。

0.1%ジアセチルに対する条件付けの後、15°C で 6 時間飼育した場合には、実験開始 20 分までジアセチル経験個体が有意に低い値を示したが ( $P < 0.05$ )、30 分以降では有意差が認められなかった。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.64 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.61 \pm 0.04$  であった (図 15d)。行動開始領域に存在する割合は、ジアセチル経験個体が実験開始 10 分後において有意に

高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 15e)。領域外に存在するジアセチル経験個体の割合は実験開始 20 分後にコントロール個体よりも高い値を示したが ( $P < 0.05$ )、30 分以降では有意差は認められなかった (図 15f)。

## (2) 20°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、20°C の温度条件下で 6 時間飼育した *gas-1* 変異体では、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロール個体よりも有意に低い値を示し、実験開始 90 分後ではコントロール個体で  $0.75 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.61 \pm 0.04$  を示した ( $P < 0.05$ 、図 16a)。行動開始領域に存在する割合に有意差は確認されず (図 16b)、領域外に存在する割合は、実験開始 90 分後でジアセチル経験個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ 、図 16c)。

条件付け後、20°C で 12 時間飼育した場合の誘引率は、ジアセチル経験個体が有意に低い値を示し、90 分後の値はコントロール個体で  $0.78 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.68 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.05$ 、図 16d)。行動開始領域に存在する割合はジアセチル経験個体が高い値を示しており、コントロール個体よりも移動した個体が少ないことがわかる (図 16e)。実験開始 10~30 分、60 分後においては有意な差が確認された (図 16e)。領域外に存在する割合は、実験開始 20 分後にジアセチル経験個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 17f)。コントロール個体では実験開始 10 分後に、ジアセチル経験個体では 30 分後に最大値を示した (図 16f)。

ジアセチル条件付け後に 20°C で 18 時間飼育した場合の *gas-1* 変異体のジアセチルに対する両個体群の誘引率は、実験中を通して有意な差は認められなかった (図 16g)。90 分後における誘引率は、コントロール個体で  $0.52 \pm 0.05$ 、ジアセチル経験個体で  $0.51 \pm 0.05$  を示した。行動開始領域に存在する割合および



領域外に存在する割合はどちらも同程度の値を示しており、有意な差は確認されなかった（図 16h、図 16i）。

## (2) 25°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、25°Cの温度条件で6時間飼育した *gas-1* 変異体のジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体の誘引率と比較して、実験開始から有意に低い値を示した（図 17a）。90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.87 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.76 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.01$ )。行動開始領域に存在する割合は、実験中を通してジアセチル経験個体が有意に高い値を示したが、90 分後の行動開始領域に存在する割合はコントロール個体で  $0.01 \pm 0.004$ 、ジアセチル経験個体で  $0.04 \pm 0.01$  を示したことから、両者とも行動開始領域から多くの個体が移動したことがわかる（図 17b）。領域外に存在するジアセチル経験個体の割合は、実験開始 40 分、60 分、90 分後においてコントロール個体のそれよりも有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 17c)。

ジアセチル条件付け後、25°C で 12 時間飼育した場合においても、ジアセチル経験個体の誘引率は実験中を通して有意に低い値を示した（図 17d）。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.65 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.49 \pm 0.04$  であった ( $P < 0.01$ )。行動開始領域に存在する割合は、実験開始からジアセチル経験個体が有意に上回っているが、90 分後では有意な差は確認されなかった（図 17e）。領域外に存在する割合の最大値はコントロール個体で実験開始後 40 分、ジアセチル経験個体では 90 分に最大値を示しており、10 分、90 分においてはジアセチル経験個体の割合がコントロール個体よりも有意に高い値を示した（図 17f）。

条件付け後、25°C で 18 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体よりもわずかに低い値を示したが、有意差は確認されなかつ

た (図 17g)。90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.78 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.73 \pm 0.02$  であった。行動開始領域に存在するジアセチル経験個体の割合はコントロール個体よりもわずかに高い値を示しており、実験開始 20 分、30 分後では有意差が確認された ( $P < 0.05$ 、図 17h)。領域外に存在する割合は、実験中において両個体群の割合に有意差は認められなかった (図 17i)。

### 3-3-2. *mev-1* 変異体の飼育温度別の反応

#### (1) 15°C で飼育した場合の順応の持続時間

*mev-1* 変異体は野生型線虫と比較して活性酸素発生レベルが高く、他の線虫と比べて運動量が少ない変異体として知られている。0.1%ジアセチルに対する条件付けの後、15°C で 2 時間飼育した *mev-1* 変異体のジアセチルの対する誘引率は、実験開始 90 分後においてジアセチル経験個体が有意に低い値を示し、コントロール個体で  $0.023 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.005 \pm 0.003$  を示した ( $P < 0.05$ 、図 18a)。ジアセチル経験個体の行動開始領域に存在する割合はコントロール個体よりも高く、実験開始後 20 分以降では有意な差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 18b)。領域外に存在する割合はコントロール個体が高い値を示し、実験開始 20 分以降から有意な差を示した ( $P < 0.05$ 、図 18c)。

条件付け後、15°C で 6 時間飼育した場合のジアセチル経験個体の誘引率は 0 であり、コントロール個体における 90 分後の誘引率は  $0.004 \pm 0.003$  であった (図 18d)。行動開始領域に存在する割合は両者間で有意差は存在せず、90 分後における行動開始領域の割合はコントロールで  $0.91 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.93 \pm 0.02$  と、ほとんどの個体が行動開始領域内に留まっていたことが分かる (図 18e)。領域外に存在する割合は実験開始 90 分で最大値を示し、両個体群に有意差は認められなかった (図 18f)。

## (2) 20°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルの条件付け後、20°C の飼育条件で 6 時間飼育した *mev-1* 変異体のジアセチルの対する誘引率は、実験開始後 40 分以降でジアセチル経験個体が有意に低い値を示した (図 19a)。90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.032 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.005 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.01$ )。行動開始領域に存在する割合は、実験開始 30 分以後からジアセチル経験個体が高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 19b)。領域外に存在する割合は、どちらの個体群も実験開始後 90 分に最大値を示している (図 19c)。

条件付け後、20°C で 12 時間飼育した *mev-1* 変異体のジアセチルの対する誘引率は、実験開始後 60 分、90 分においてジアセチル経験個体が有意に低い値を示した。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.032 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.005 \pm 0.01$  であった ( $P < 0.05$ 、図 19d)。行動開始領域に存在する割合は、ジアセチル経験個体がコントロール個体よりも高い値を示し、実験開始 20 分、50 分、90 分で有意差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 19e)。領域外に存在する割合は、どちらも 90 分後に最大値を示しており、実験開始後 20 分、50 分、60 分においてコントロール個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 19f)。

0.1%ジアセチルの条件付け後、20°C で 18 時間飼育した場合では、両者の誘引率に有意差は認められず、90 分後の値はコントロール個体で  $0.012 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.013 \pm 0.01$  であった (図 19g)。行動開始領域に存在する割合はコントロール個体がジアセチル経験個体よりも実験中を通して低い値を示すが、両者間に有意な差は認められなかった (図 19h)。領域外に存在する割合においてもコントロール個体がわずかに高い値を示したが、有意差は認められなかった (図 19i)。

### (3) 25°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルの条件付け後、25°C で 6 時間飼育した *mev-1* 変異体のジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体と比較して実験開始後 90 分で有意に低い値を示しており、コントロール個体で  $0.03 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $-0.00 \pm 0.01$  であった ( $P < 0.05$ 、図 20a)。ジアセチル経験個体の誘引率が負の値となった理由は、ジアセチル領域 (B) よりもコントロール領域 (A) に移動した線虫の個体数が多いためである。行動開始領域に存在する割合は両者間で有意差は確認されず、90 分後における割合は、どちらも個体群も  $0.74 \pm 0.03$  であった (図 20b)。領域外に存在する割合は、どちらの個体群も実験開始 90 分で最大値を示した (図 20c)。

ジアセチル条件付け後、25°C で 12 時間飼育した場合では、実験開始 30 分からジアセチル経験個体が有意に低い値を示し、90 分後においては、コントロール個体で  $0.05 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.01 \pm 0.01$  であった ( $P < 0.01$ 、図 20d)。ジアセチル経験個体の行動開始領域に存在する割合は、30~60 分においてコントロール個体よりも有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 20e)。領域外に存在する割合は、どちらの個体群も実験開始 90 分で最大値を示しており、実験開始後 40 分と 50 分では、コントロール個体が有意に高い値を示した (図 20f)。

ジアセチルに対する条件付け後、25°C で 18 時間飼育した場合の *mev-1* 変異体のジアセチルへの誘引率は、コントロールでは実験開始 50 分以降、ジアセチル経験個体では 40 分以降に上昇しており、両者に有意な差は認められなかった (図 20g)。実験開始 90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.02 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で  $0.01 \pm 0.01$  を示した (図 20g)。行動開始領域に存在する割合は両者間に有意差はみられなかった (図 20h)。領域外に存在する割合はどちらの個体も 90 分後に最大値を示し、有意差は確認されなかった (図 20i)。

### 3-3-3. 活性酸素発生レベルの高い変異体線虫の順応持続時間のまとめ

ジアセチル条件付け後の飼育をそれぞれの温度条件下で行った場合の、ジアセチルに対する反応を、実験開始 90 分後の誘引率で比較した。ジアセチルを経験した *gas-1* 変異体の誘引率が、コントロール個体と比較して有意に低下を示したのは、15°C で 6 時間、20°C および 25°C で 12 時間飼育した後までであった (図 21、*gas-1*)。 *gas-1* 変異体の 0.1%ジアセチルに対する順応の持続時間は、0.1%ジアセチルの条件付け後 15°C では約 6 時間、20°C と 25°C では約 12 時間であると考えられる。 *mev-1* 変異体において、ジアセチルを経験した個体群の物質に対する誘引率がコントロール個体の誘引率と比較して有意な低下を示したのは、15°C で 6 時間、20°C と 25°C で 12 時間の飼育を行った後までであった (図 21、*mev-1*)。 *mev-1* 変異体においても順応の持続時間は 15°C で約 6 時間、20°C および 25°C では約 12 時間であると考えられる。 *mev-1* 変異体はもともと運動量が少ないため、行動開始領域および領域外に存在する割合が実験開始 90 分後で最大値を示した。

活性酸素発生レベルの高い *gas-1* 変異体および *mev-1* 変異体はどちらも同様の結果を示した。ジアセチルに対する嗅覚順応の持続時間は、野生型線虫と比較して、15°C と 20°C で飼育した際に順応持続時間の延長が認められた。

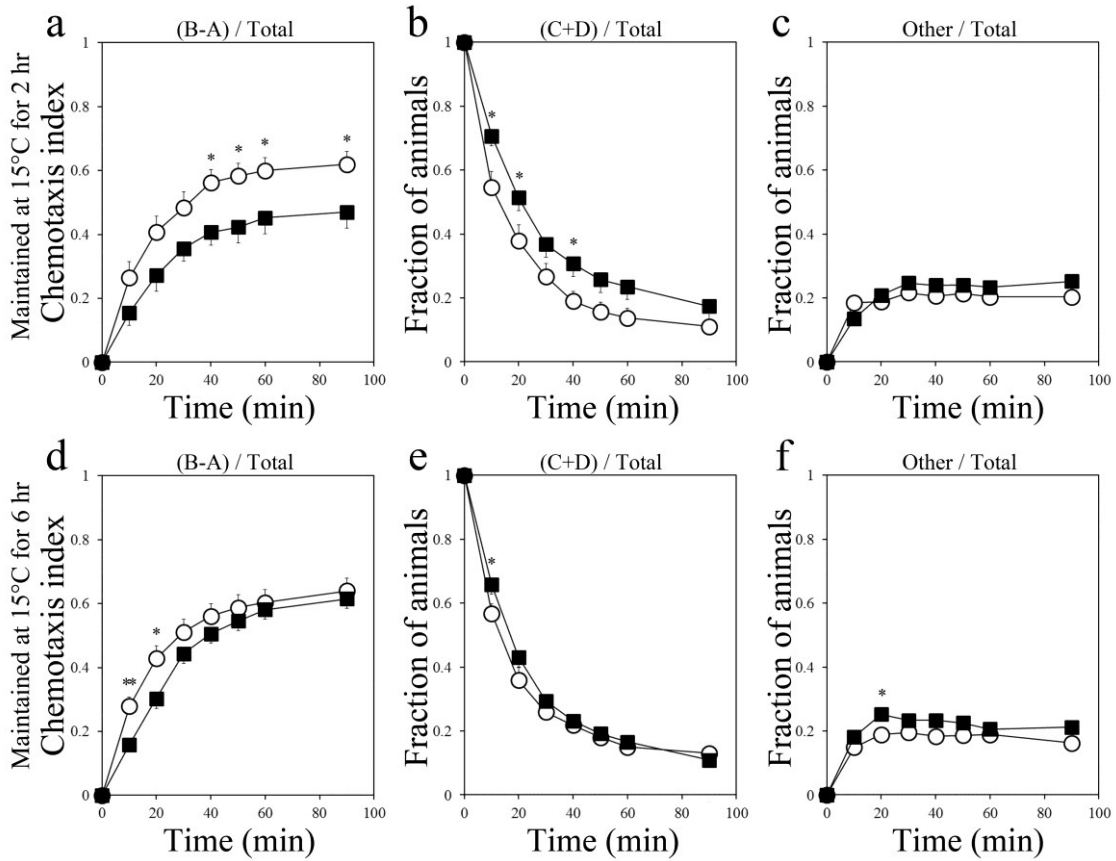


図 15. 0.1%ジアセチル経験後 15°C で飼育した *gas-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 15°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した *gas-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C の低温で 2 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールよりも有意に低下しており、ジアセチル順応が確認された。6 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールよりもわずかに低い値を示すが、有意な差は確認されなかった。2 時間 : コントロール n=16、ジアセチル経験個体 n=17。6 時間 : n=22。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

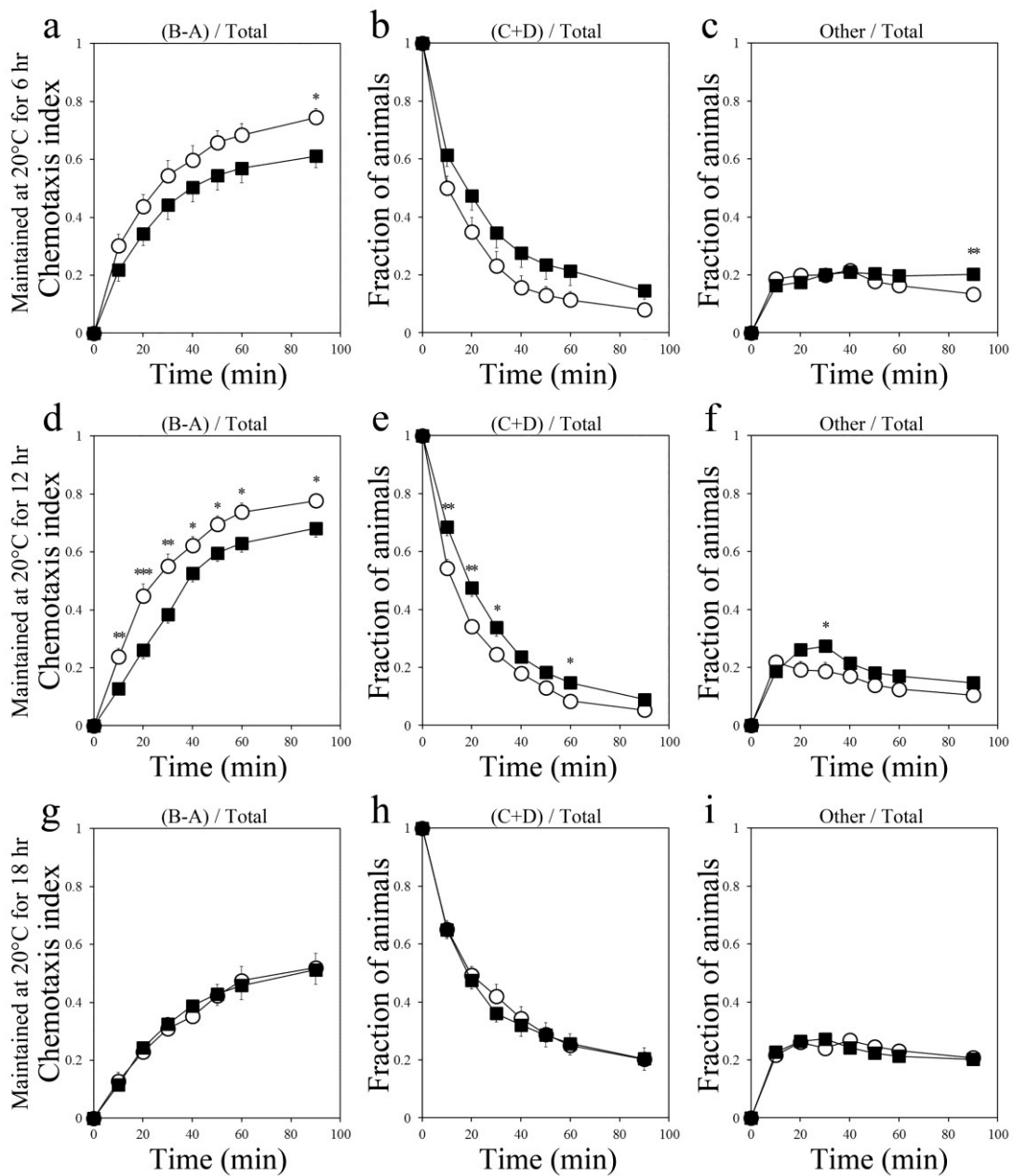


図 16. 0.1%ジアセチル経験後 20°C で飼育した *gas-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応。ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 20°C で 6 時間、d~f は 12 時間、g~i は 18 時間飼育した *gas-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率は 12 時間の飼育後においても有意に低下した。18 時間の飼育後では、両者間に有意な差は認められなかった。6 時間:n=33。12 時間: コントロール n=20、ジアセチル経験個体 n=18。18 時間: コントロール n=19、ジアセチル経験個体 n=20。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$ 、\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

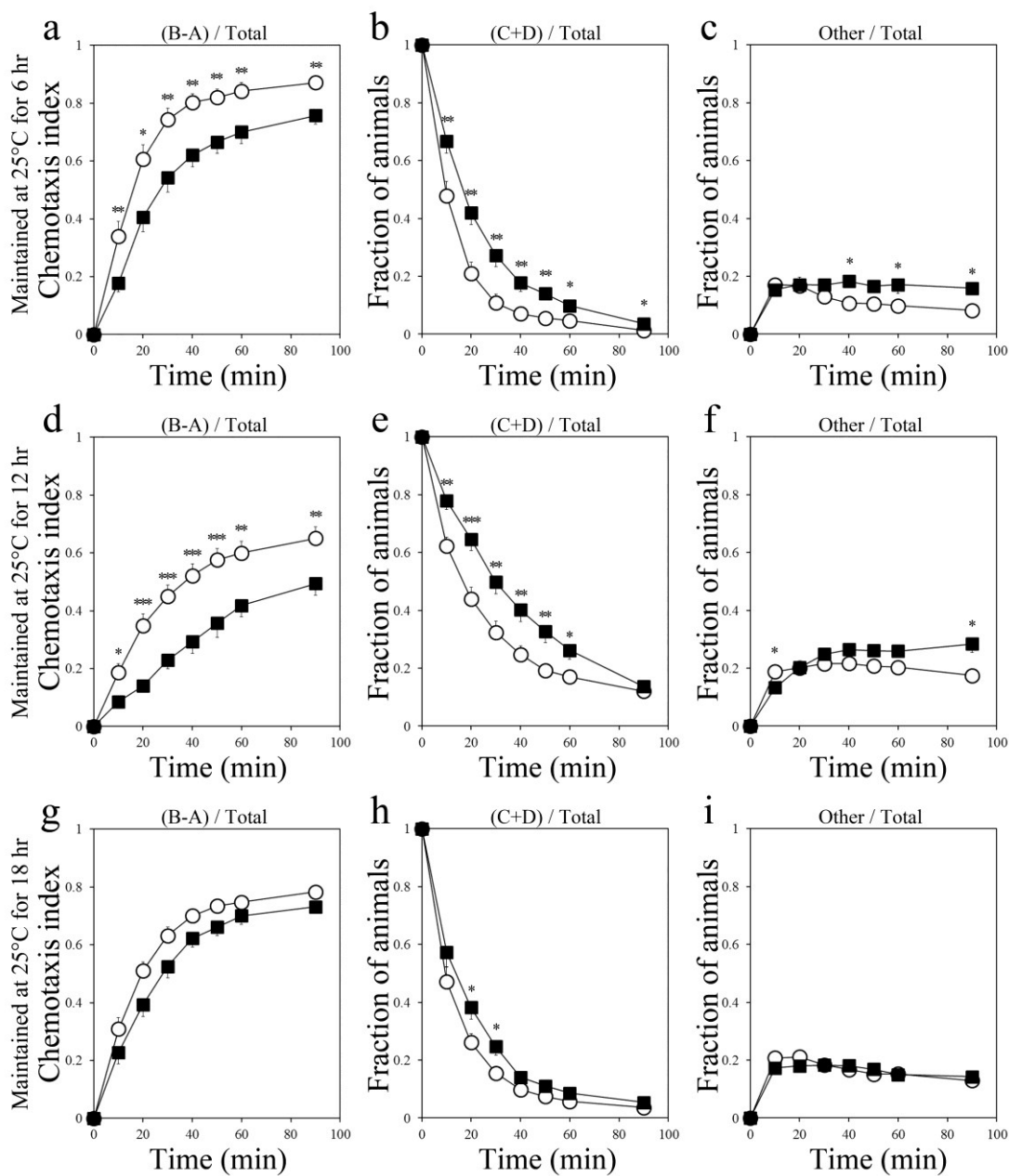


図 17. 0.1%ジアセチル経験後 25°C で飼育した *gas-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応。ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 25°C で 6 時間、d~f は 12 時間、g~i は 18 時間飼育した *gas-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°C で飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率は 12 時間の飼育後まで有意に低く、順応を示した。18 時間の飼育ではジアセチル経験個体がわずかに低い値を示したが、有意差は確認されなかった。6 時間：コントロール n=20、ジアセチル経験個体 n=22。12 時間：n=21。18 時間：n=30。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。



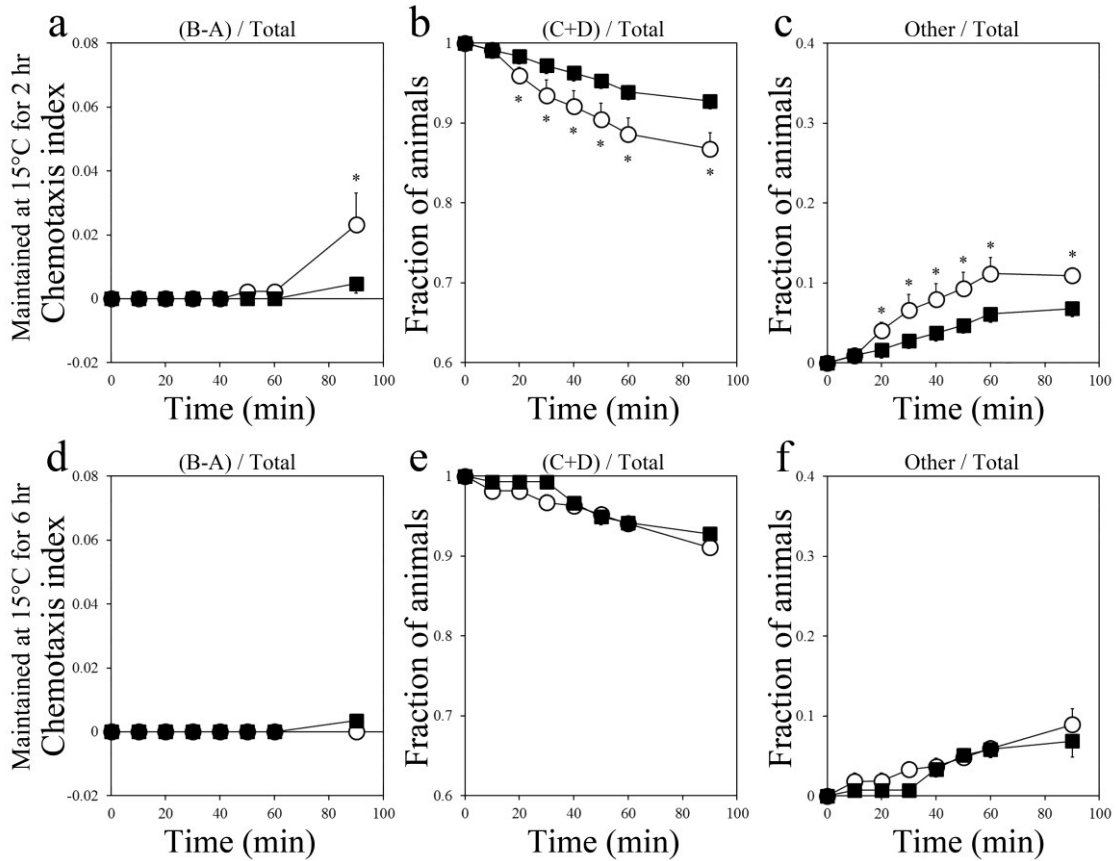


図 18. 0.1%ジアセチル経験後 15°C で飼育した *mev-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 15°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した *mev-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C の低温で 2 時間飼育した場合、実験開始 90 分後において、ジアセチル経験個体の誘引率は有意に低下し、ジアセチル順応が確認された。6 時間飼育した場合、両個体群の間に有意差は確認されなかった。2 時間 : n=21。6 時間 : n=13。\* :  $P < 0.05$ 。

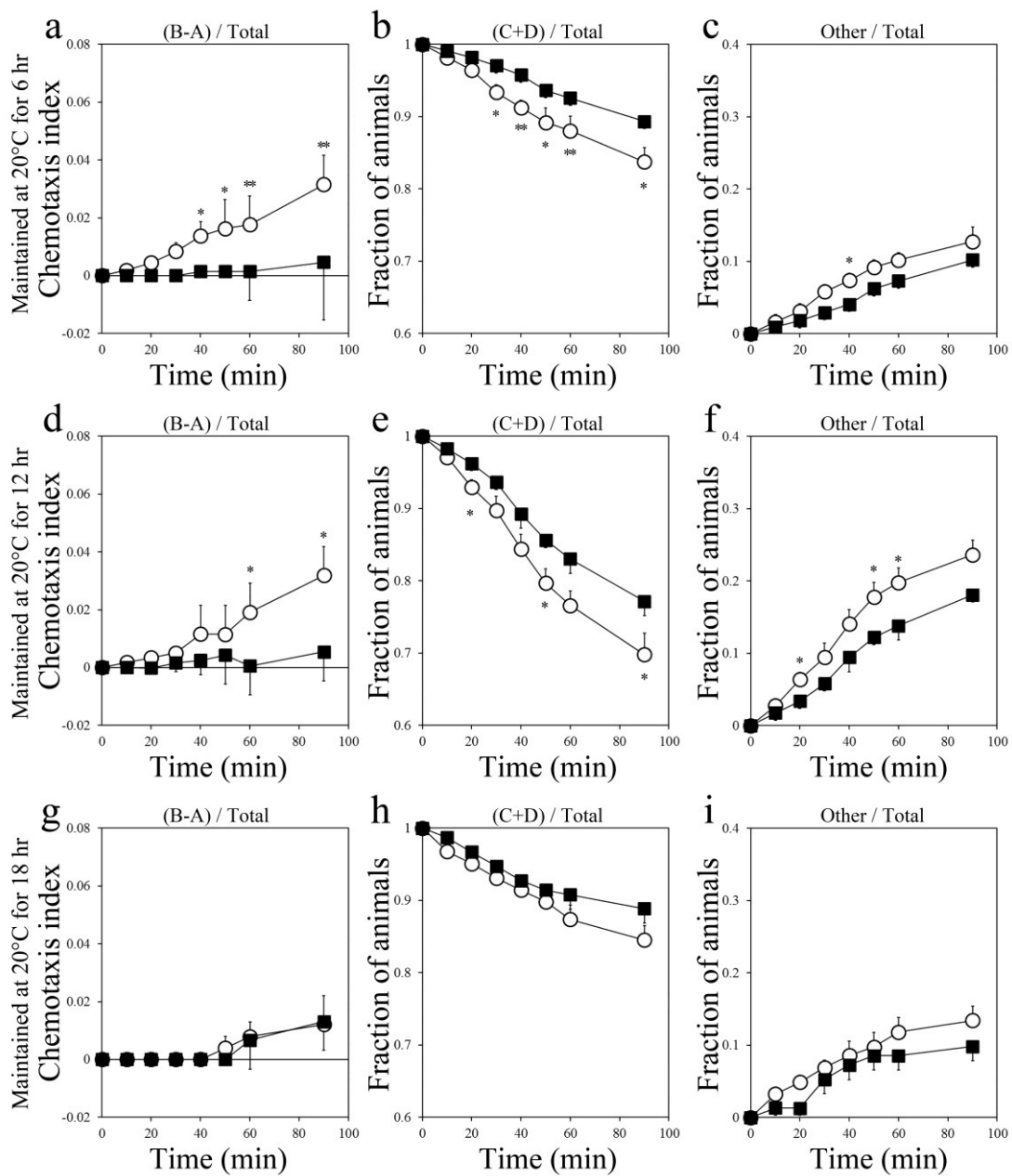


図 19. 0.1%ジアセチル経験後 20°C で飼育した *mev-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 20°C で 6 時間、d~f は 12 時間、g~i は 18 時間飼育した *mev-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率は 12 時間飼育後までコントロールよりも有意に低下した。18 時間の飼育では、両個体群の各反応率に有意差は確認されなかった。6 時間：コントロール n=24、ジアセチル経験個体 n=21。12 時間：コントロール n=25、ジアセチル経験個体 n=24。18 時間：n=12。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

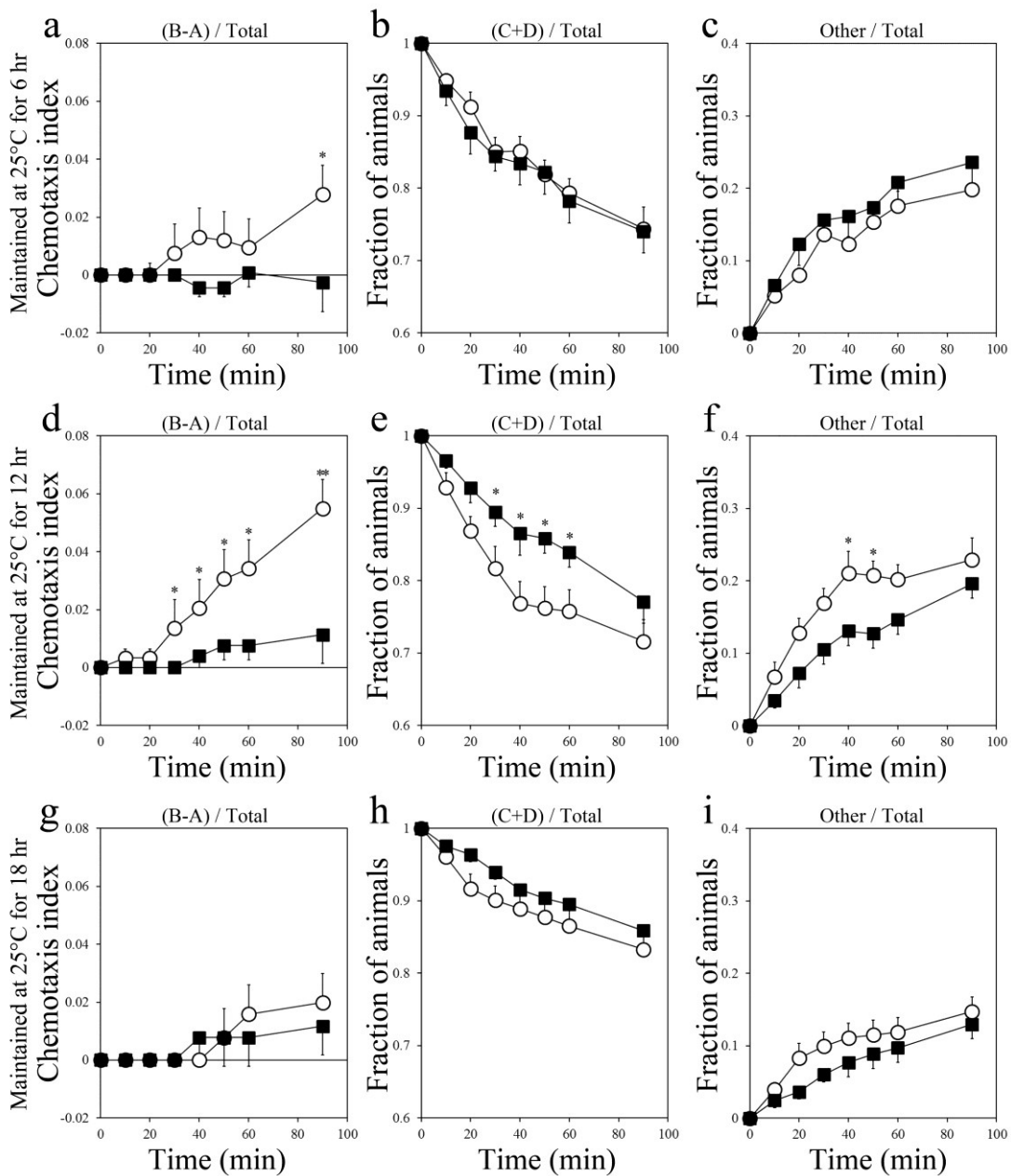


図 20. 0.1%ジアセチル経験後 25°C で飼育した *mev-1* 変異体のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後 25°C で 6 時間、d~f は 12 時間、g~i は 18 時間飼育した *mev-1* 変異体である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°C で飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率は 12 時間飼育後まで有意に低下し、順応が確認された。18 時間の飼育では両個体群の間に有意差は確認されなかった。6 時間 : n=18。12 時間 : n=13。18 時間 : n=12。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

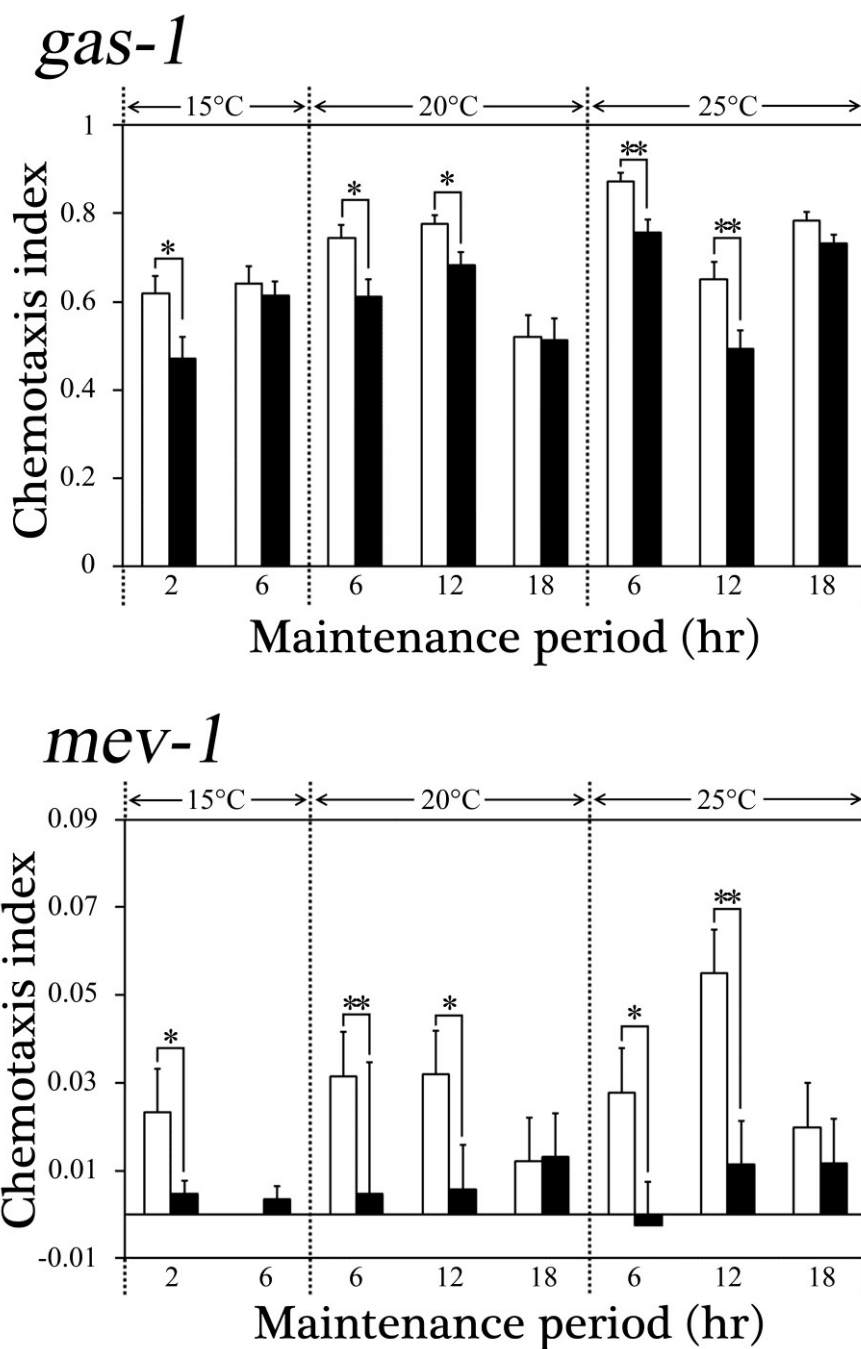


図 21. ジアセチル経験後、15°C、20°C、25°C で飼育した *gas-1* 変異体と *mev-1* 変異体のジアセチルに対する誘引率 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率の値を示している。横軸はジアセチル条件付け後に飼育した時間を示す。ジアセチルを経験した *gas-1* 変異体および *mev-1* 変異体のジアセチルに対する順応の持続時間は、条件付け後の飼育温度 15°C で約 2 時間、20°C と 25°C では 12 時間程度であることが明らかとなった。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。Nishino et al., 2013 より引用改変。

### 3-4. 抗酸化剤および酸化剤によるジアセチル順応への影響

#### 3-4-1. 抗酸化剤 $\alpha$ -LA の影響

活性酸素によって生じる酸化ダメージの増加は、細胞の機能低下をもたらすことから、「老化」の一因として考えられている。前述の変異体の実験結果は、活性酸素発生レベルの低い変異体のジアセチルに対する嗅覚順応の持続時間は、野生型線虫を通常の温度（20°C）で飼育した時と比べて短縮し、活性酸素発生レベルの高い変異体では延長することを示している。これは、ジアセチル順応の持続時間に活性酸素が関与している可能性を示唆している。 $\alpha$ -リポ酸(LA)は強い抗酸化作用があり、活性酸素による酸化ダメージを抑制する物質である。 $\alpha$ -LA を含ませた NGM プレートで、0.1%ジアセチルの条件付け後の飼育培地として使用し、前述と同様の実験を行った。実験には通常の NGM プレートで YA 期まで飼育した野生型線虫を使用した。野生型線虫において、15°C の温度条件下(低活性酸素発生状態)では順応の持続が2時間未満であったことから(図6)、本実験では20°Cと25°Cの温度条件下で実験を行った。0.1%ジアセチルの条件付け後、 $\alpha$ -LA を含む NGM プレートに移し、20°C で2時間および6時間、25°C で6時間および12時間の飼育を行い、その後0.1%ジアセチルに対する誘引反応を解析した。なお、条件付け時にジアセチルを経験していない個体群をコントロール個体とした。

##### (1) $\alpha$ -LA を用いて20°Cで飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルの条件付け後、20°Cの温度条件下において $\alpha$ -LAを含むNGMプレートで2時間飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引率は、実験開始20分後と40分、90分後でジアセチル経験個体が有意に低い値を示した( $P < 0.05$ 、図22a)。90分後の誘引率は、コントロール個体で $0.72 \pm 0.02$ 、ジアセチ

ル経験個体で  $0.63 \pm 0.03$  であった。行動開始領域に存在する割合は、ジアセチル経験個体がわずかに高い値を示し、実験開始 10 分後では有意差が認められたが、20 分以降では有意差が確認されなかった (図 22b)。実験開始 90 分後における領域外に存在する線虫の割合は、コントロール個体で  $0.16 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.18 \pm 0.02$  を示した (図 22c)。この値は通常の NGM プレートで飼育した野生型線虫の値 (図 4c) と比較し、高い値となった。 $\alpha$ -LA は行動開始領域から移動した線虫の、ジアセチル領域への移動を遅延させる可能性がある。領域外に存在する両個体群の割合に有意差は認められなかった (図 22c)。

ジアセチル条件付けの後、 $\alpha$ -LA を含む NGM で 6 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体はコントロール個体よりもわずかに低い値を示したが、有意差は確認されなかった (図 22d)。90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.87 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.82 \pm 0.03$  であった。行動開始領域に存在する割合は、10 分後においてコントロール個体が有意に高い値を示すが ( $P < 0.05$ )、20 分以降は有意な差が確認されなかった (図 22e)。また、実験開始 20 分後の行動開始領域に存在する割合は 0.1 以下となり、ほとんどの線虫が行動開始領域から移動したことが確認された (図 22e)。領域外に存在する割合は両者間に有意差は認められず、どちらの個体群も実験開始 10 分後において最大値を示した (図 22f)。

## (2) $\alpha$ -LA を用いて 25°C で飼育した場合の順応の持続時間

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、25°C の温度条件下において、 $\alpha$ -LA を含む NGM プレートで 6 時間飼育した野生型線虫のジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体と比較して有意に低い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 23a)。90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.73 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.61 \pm 0.04$  であった。ジアセチル経験個体の行動開始領域の割合はコントロール個体より

も有意に高い値を示しており、コントロール個体と比較して行動開始領域から移動しない個体が多いことがわかる (図 23b)。領域外に存在する割合は両者に有意な差は認められなかった (図 23c)。

ジアセチル条件付け後、25°C で 12 時間、 $\alpha$ -LA を含む NGM で飼育した野生型線虫のジアセチル経験個体の誘引率は、実験開始から 50 分後までコントロール個体の誘引率より有意に高い値を示したが ( $P < 0.05$ )、60 分以降では有意差は確認されなかった (図 23d)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.81 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.87 \pm 0.02$  であった。行動開始領域に存在するジアセチル経験個体の割合は、実験開始後 60 分までコントロール個体より有意に低い値を示したが、90 分では有意差が確認されなかった (図 23e)。領域外に存在する割合は、どちらの個体群も実験開始 10 分後に最大値を示した (図 23f)。

### 3-4-2. 抗酸化剤 $\alpha$ -LA のジアセチルに対する順応持続時間のまとめ

0.1%ジアセチルの条件付け後、抗酸化剤である  $\alpha$ -LA を含む NGM 上で飼育した場合、20°C の温度条件下では 2 時間、25°C では 6 時間後まで、ジアセチル経験個体のジアセチルに対する有意な低下が認められた ( $P < 0.05$ )。このことから、ジアセチルの条件付け後、 $\alpha$ -LA を含む NGM プレートでの飼育における順応の持続時間は、20°C では約 2 時間、25°C では約 6 時間であることが明らかとなった。通常の NGM を用いた野生型線虫のジアセチル順応は 20°C で約 6 時間、25°C で約 12 時間であることから (図 6)、 $\alpha$ -LA を用いることで順応の持続時間が短縮したことが示された (図 24)。この結果は、活性酸素の減少により順応持続時間が短縮したことを示しており、その持続には一定量の活性酸素が必要である可能性を強く支持している。

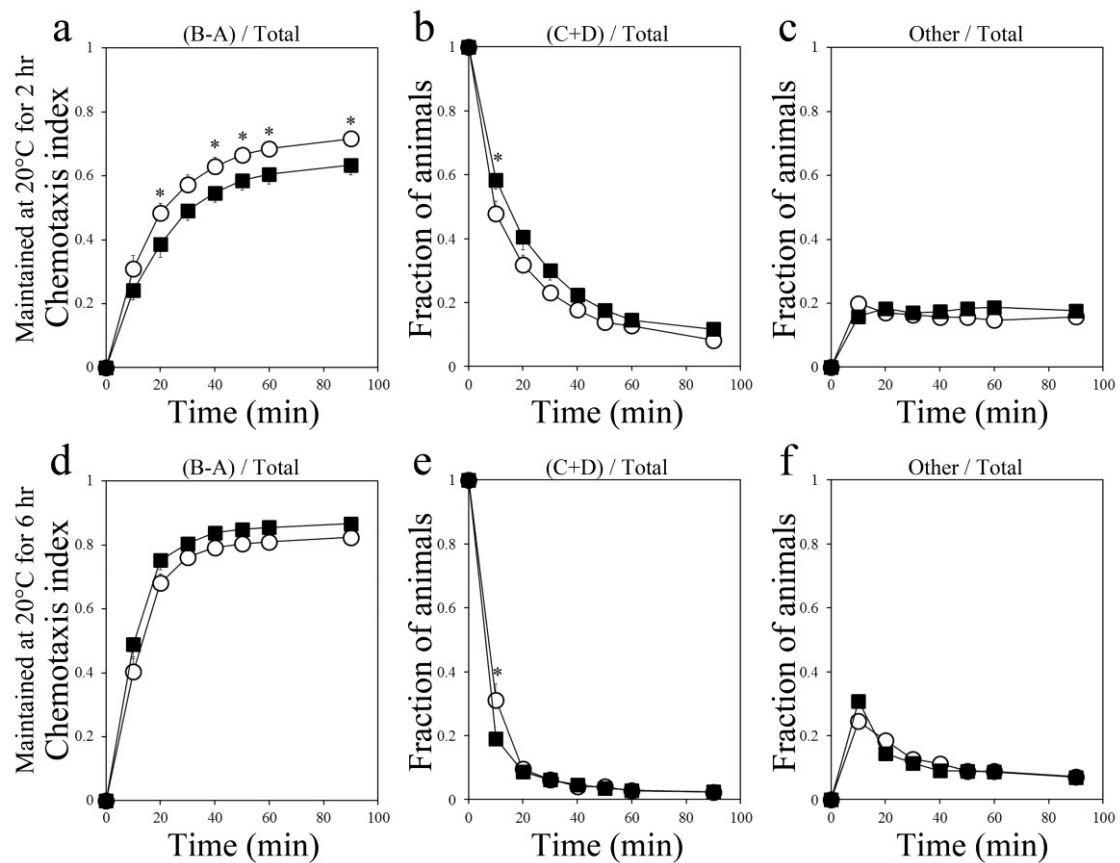


図 22. 0.1%ジアセチル経験後 20°C の温度条件下において  $\alpha$ -LA を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、 $\alpha$ -LA を含むプレート上において 20°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。 $\alpha$ -LA プレートを用いて 20°C で 2 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールよりも有意に低下し、ジアセチル順応が確認された。6 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体とコントロール個体の間に有意差は確認されなかった。2 時間 : n=36。6 時間 : n=35。\* :  $P < 0.05$ 。



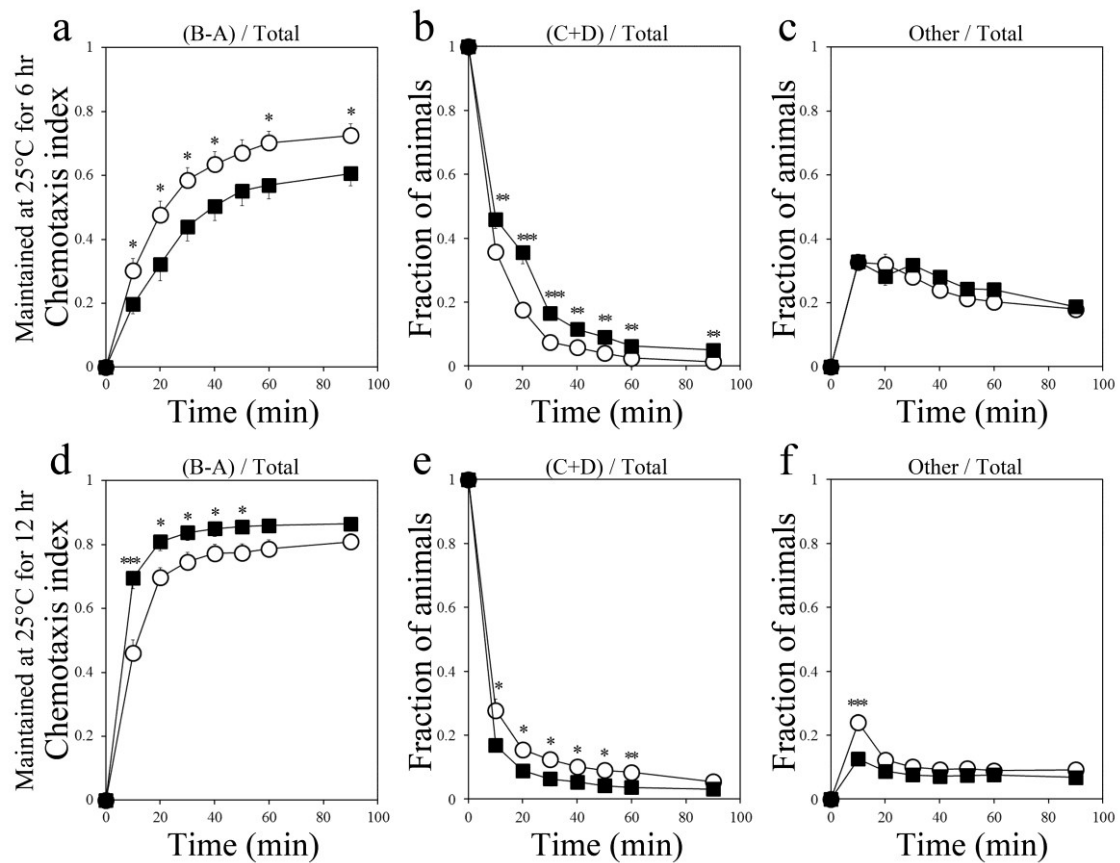


図 23. 0.1%ジアセチル経験後 25°C の温度条件下において  $\alpha$ -LA を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、 $\alpha$ -LA を含むプレート上において 25°C で 6 時間、d~f は 12 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。 $\alpha$ -LA プレートを用いて 25°C で 6 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロールよりも有意に低下した。12 時間飼育した場合、ジアセチル経験個体はコントロールよりも誘引率が上回っているが、実験開始 90 分後では両個体群の間に有意差は確認されなかった。2 時間 : n=20。6 時間 : n=30。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

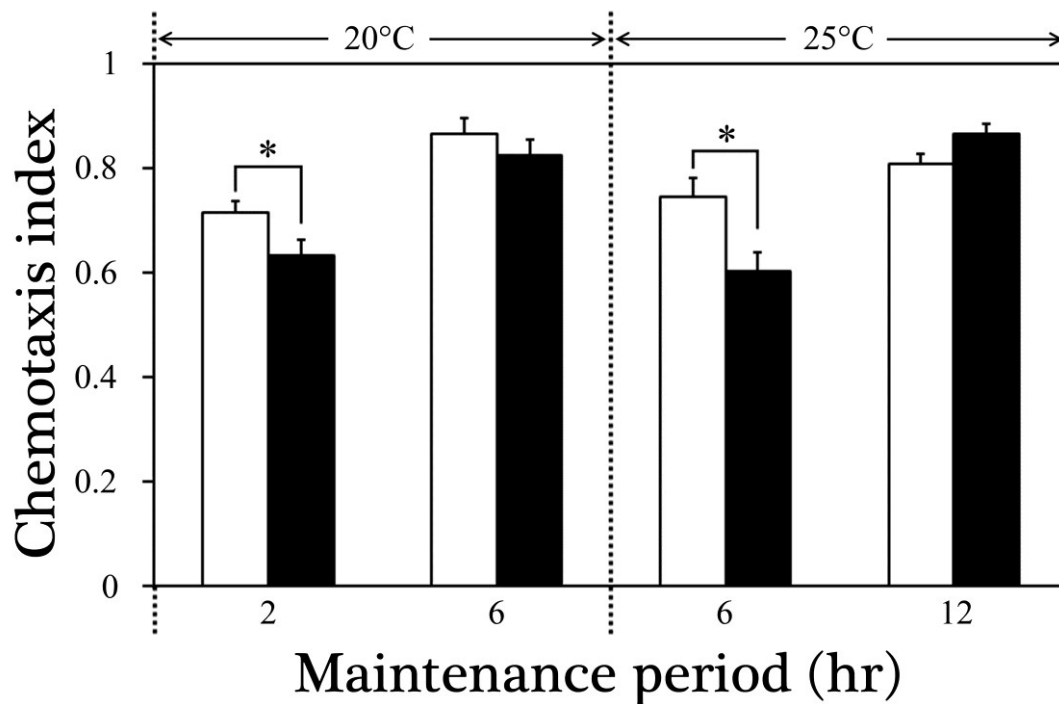


図 24. ジアセチル経験後、 $\alpha$ -LA を含むプレートを用いて 20°C、25°C で飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引率 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始 90 分後の誘引率の値を示している。横軸はジアセチル経験後に飼育した時間を示す。ジアセチル経験後に  $\alpha$ -LA を含む NGM プレートで飼育した線虫は、20°C では 2 時間、25°C では 6 時間程度までジアセチル順応を示すことが明らかとなった。これは、通常の NGM で飼育した場合よりも持続時間が短縮している。\*:  $P < 0.05$ 。Nishino et al., 2013 より引用改変。

### 3-4-3. 酸化剤 PQ の影響

前述の通り、線虫の飼育培地に抗酸化剤である  $\alpha$ -LA を含ませた場合、通常の飼育条件時と比較してジアセチル順応の持続時間に変化が確認された(図 6, 24)。そこで、酸化剤を NGM プレートに含ませた場合のジアセチル順応の持続時間への影響を調査した。本実験で使用したパラコート (PQ) は強力な酸化剤として知られている。実験に用いる最適な濃度を検討するため、様々な濃度の PQ を NGM 用の寒天溶液に溶かして飼育培地を作成した。PQ は水 ( $H_2O$ ) を用いて希釈を行っており、溶液を混ぜるタイミングは  $\alpha$ -LA を含む NGM プレートの作成(使用した動物と実験準備 (3) 参照)と同様の手順で行った。

#### (1) 0.1mM PQ を用いた場合

0.1%ジアセチルに対する条件付け後、0.1mM PQ が含まれる NGM プレートをを用いて 20°C で 2 時間、6 時間飼育した野生型線虫のジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体と比較して低い値を示したが有意差は確認されなかった(図 25a, d)。2 時間飼育後の 90 分の誘引率はコントロール個体で  $0.70 \pm 0.04$ 、ジアセチ経験個体で  $0.60 \pm 0.06$  であった。6 時間飼育後ではコントロール個体で  $0.73 \pm 0.03$ 、ジアセチ経験個体で  $0.71 \pm 0.04$  であった。行動開始領域および領域外に存在する割合は、どの飼育時間の場合でも両個体群に有意な差はなく、同程度の傾向を示した(図 25b, c, e, f)。

25°C の温度条件下で 2 時間飼育した場合、ジアセチル順応は引き起こされず、誘引率はコントロール個体で  $0.75 \pm 0.06$ 、ジアセチ経験個体で  $0.76 \pm 0.03$  を示した(図 26a)。行動開始領域に存在する割合も両者同程度の値を示し、有意差は確認されなかった(図 26b)。領域外に存在する割合はジアセチル経験個体が実験開始 90 分後にわずかに高い値を示すが、有意差は認められなかった(図 26c)。

## (2) 0.5mM PQ を用いた場合

条件付け後の NGM プレートに含まれる PQ 濃度を 0.5mM にした場合、20°C で 2 時間飼育した野生型線虫のジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体と比較してわずかに下回っており、実験開始 10 分、20 分では有意な差が確認された ( $P < 0.05$ 、図 27a)。30 分以後からは両個体群に有意差はなく、90 分後の誘引率はコントロールで  $0.69 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.62 \pm 0.03$  であった。ジアセチル経験個体の行動開始領域に存在する割合は、実験開始 10 分後に有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 27b)。領域外に存在する割合は、どちらも実験開始 10 分後に最大値を示しており、実験中を通して有意な差は確認されなかった (図 27c)。

## (3) 5mM PQ を用いた場合

ジアセチル条件付け後の飼育培地に含まれる PQ 濃度を 5mM とし、各温度条件下で飼育を行った。いずれの飼育条件下においても、ジアセチル経験個体の誘引率には有意な変化は認められず、順応は確認されなかった。

15°C で 2 時間飼育した場合には、ジアセチル経験個体の誘引率は実験開始 10 分後においてコントロール個体よりも有意に低い値を示したが ( $P < 0.001$ )、20 分以降の有意差は確認されなかった (図 28a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.80 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.79 \pm 0.03$  であった。行動開始領域に存在するジアセチル経験個体の割合は、実験開始 90 分後に有意に低い値を示しており ( $P < 0.05$ )、コントロール個体よりも移動している個体数がわずかに多いことがわかる (図 28b)。領域外に存在する割合は、実験開始後 20 分までジアセチル経験個体が高い値を示したが ( $P < 0.05$ )、90 分後においては有意な差は認められなかった (図 28c)。

20°C の温度条件下で 6 時間、12 時間飼育した場合、6 時間の飼育では、実験開始 60 分後までジアセチル経験個体の誘引率が有意に低下したが ( $P < 0.05$ )、90 分後において有意な差は認められず、順応は確認されなかった。(図 29a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.79 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.71 \pm 0.04$  であった。行動開始領域に存在する割合は、実験開始からジアセチル経験個体が有意に高い値を示し、コントロール個体よりも移動する個体数が少ないことがわかる(図 29b)。領域外に存在する割合は、両個体群とも同程度の値を示し、有意差は確認されなかった(図 29c)。12 時間の飼育においては、ジアセチルに対する両個体群の誘引率に有意な差は確認されず、90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.52 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.57 \pm 0.04$  を示した(図 29d)。行動開始領域および領域外に存在する割合についても、両者間に有意差は認められず、実験を通して同程度の値を示した(図 29e、f)。

ジアセチル条件付け後、5mM の PQ を含む NGM プレートにて 25°C の温度条件下で 2 時間の飼育を行った場合、実験開始 90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.79 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.81 \pm 0.02$  を示し、有意差は認められなかった(図 30a)。行動開始領域に存在する割合はコントロール個体がわずかに上回り、実験開始 40 分以降で有意差が確認された ( $P < 0.05$ 、図 30b)。領域外に存在するジアセチル経験個体の割合は、コントロール個体と比較して実験開始 10 分後にわずかに高い値を示すが、有意差は認められなかった(図 30c)。ジアセチル条件付け後に 6 時間の飼育を行った場合、実験開始 10 分後においてジアセチル経験個体の誘引率が有意な低下を示した ( $P < 0.05$ 、図 30d)。20 分以降もコントロール個体と比較してわずかに低い値を示すが、有意差は認められなかった。実験開始 90 分後のジアセチルへの誘引率はコントロール個体で  $0.75 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.70 \pm 0.06$  であった(図 30d)。ジアセチル経験個

体の行動開始領域に存在する割合はコントロール個体よりも上回り、実験開始 10 分、60 分、90 分後において有意な差が確認された ( $P < 0.05$ 、図 30e)。領域外に存在する割合は、実験開始 20 分以後からジアセチル経験個体がコントロール個体のそれよりも低く、40~60 分後においては有意差が認められた ( $P < 0.01$ 、図 30f)。

#### (4) 10mM PQ を用いた場合

ジアセチル条件付け後、各温度条件にて 10mM の PQ を含む NGM プレート上でそれぞれの時間飼育を行い、その後、ジアセチルに対する反応実験を行った。

15°C で 2 時間飼育した場合のジアセチル経験個体群の誘引率は、コントロール個体と比較して実験開始 20 分後まで有意に低い値を示したが、30 分以降では有意な差は認められなかった (図 31a)。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.74 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.72 \pm 0.03$  を示した (図 31a)。行動開始領域に存在する割合は、実験開始 90 分後にコントロール個体がわずかに高い値を示すが両者間に有意な差は確認されなかった (図 31b)。領域外に存在する割合は、実験開始 30 分後までジアセチル経験個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 31c)。条件付け後の飼育を 6 時間行った場合、両個体群のジアセチルへの誘引率に有意差は認められず、ジアセチル順応は確認されなかった (図 31d)。実験開始 90 分後における誘引率はコントロール個体で  $0.65 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.68 \pm 0.04$  であった (図 31d)。行動開始領域に存在する割合は、実験開始からジアセチル経験個体が低い値を示しており、実験開始 30 分後においては有意差が認められた ( $P < 0.05$ 、図 31e)。領域外に存在する割合はどちらも実験開始 10 分後に最大値を示し、有意差は確認されなかった (図 31f)。

ジアセチル条件付け後、10mM の PQ 存在下において 20°C で飼育した場合、6

時間の飼育でジアセチル順応が確認された (図 32a)。実験開始からジアセチル経験個体の誘引率はコントロール個体よりも有意に低い値を示し、90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.82 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.71 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.05$ 、図 32a)。行動開始領域に存在する割合は、実験開始 30 分以降どちらも 0.1 以下を示しており、ほとんどの線虫がこの領域から移動したことがわかる (図 32b)。領域外に存在する割合は両者とも同傾向を示し、ジアセチル経験個体がわずかに上回っているが、有意差は認められなかった (図 32c)。条件付け後 12 時間の飼育を行った場合では、ジアセチル順応は確認されなかった。実験開始からジアセチル経験個体がわずかに高い値を示すが、どの経過時間においても有意差は確認されず、実験開始 90 分後における誘引率はコントロール個体で  $0.41 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.49 \pm 0.04$  であった (図 32d)。行動開始領域に存在する割合は、両個体群で有意差は認められなかった (図 32e)。領域外に存在する割合は、実験開始 60 分以降にコントロール個体が有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ 、図 32f)。

10mM の PQ 存在下において 25°C で飼育した場合では、飼育時間に関係なく順応は確認されなかった。2 時間の飼育後に行った実験では、両個体群とも同程度の誘引率を示し、実験開始 90 分後ではコントロール個体で  $0.79 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.74 \pm 0.03$  であった (図 33a)。行動開始領域および領域外に存在する割合においても両者間に有意な差は認められず、両者とも同程度の値を示した (図 33b、c)。6 時間の飼育を行った線虫の、実験開始 90 分後のジアセチルに対する誘引率は、コントロール個体で  $0.66 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体では  $0.75 \pm 0.04$  であり、ジアセチル経験個体がわずかに高い値を示したが、有意差は認められなかった (図 33d)。行動開始領域に存在する割合は、コントロール個体がわずかに高い値を示したが、両者に有意差は認められなかった (図

33e)。領域外に存在する割合は、実験開始 10 分後において、ジアセチル経験個体が有意に高い値を示すが ( $P < 0.01$ )、それ以降ではコントロールとの間に有意差は確認されず、同程度の割合を示した (図 33f)。

#### 3-4-4. 酸化剤 PQ のジアセチルに対する順応持続時間のまとめ

0.1%ジアセチルの条件付け後、野生型線虫を様々な濃度の PQ を含む NGM プレートを用いて、各温度条件下で飼育した。実験開始 90 分後の誘引率をそれぞれ比較した結果、10mM PQ 存在下において 20°C で 6 時間程度の順応の持続が認められたが、他の条件下ではジアセチル順応を確認することはできなかった (図 34)。生体内における活性酸素の発生レベルを促進させることを目的とし酸化剤を用いたが、PQ は強力な酸化剤であるため、線虫の酸化ダメージを促進させるだけでなく、体細胞に対する直接的な影響を与えた可能性が考えられる。



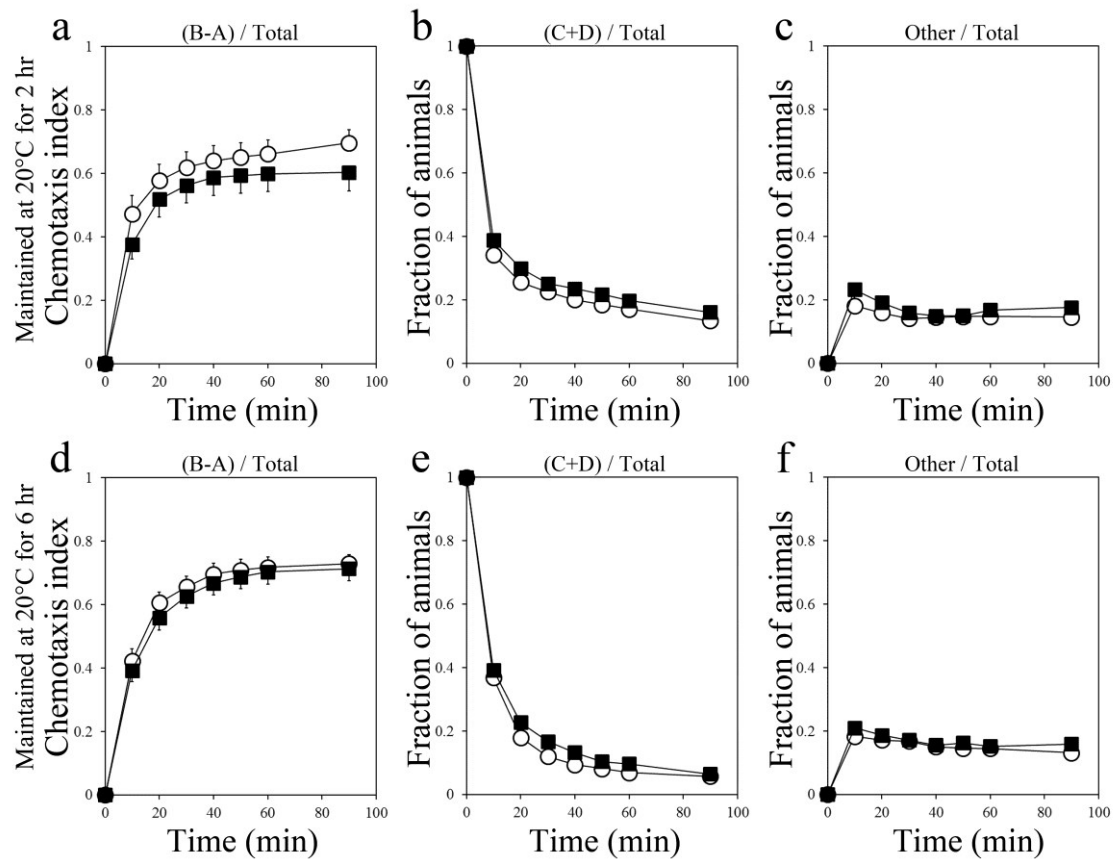


図 25. 0.1%ジアセチル経験後 20°C の温度条件下において 0.1mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応。ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、0.1mM PQ を含むプレート上において 20°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。0.1mM PQ を含むプレートで飼育を行った場合、飼育時間に関係なく、両個体群のジアセチルへの誘引率および行動開始領域に存在する割合、領域外に存在する割合に有意差は確認されなかった。2 時間：n=22。6 時間：コントロール n=24、ジアセチル経験個体 n=25。

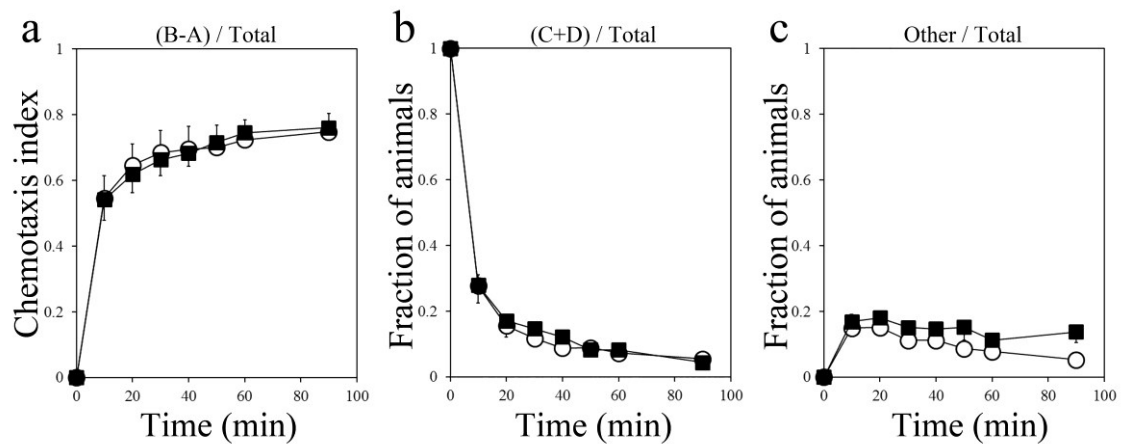


図 26. 0.1%ジアセチル経験後 25°C の温度条件下において 0.1mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 条件付け後、0.1mM PQ を含むプレート上において 25°C で 2 時間飼育した野生型線虫である。ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。飼育温度を 25°C にした場合、2 時間の飼育時間においては両個体群のジアセチルに対する誘引率および行動開始領域に存在する割合、領域外に存在する割合に有意差は確認されなかった。n=5。

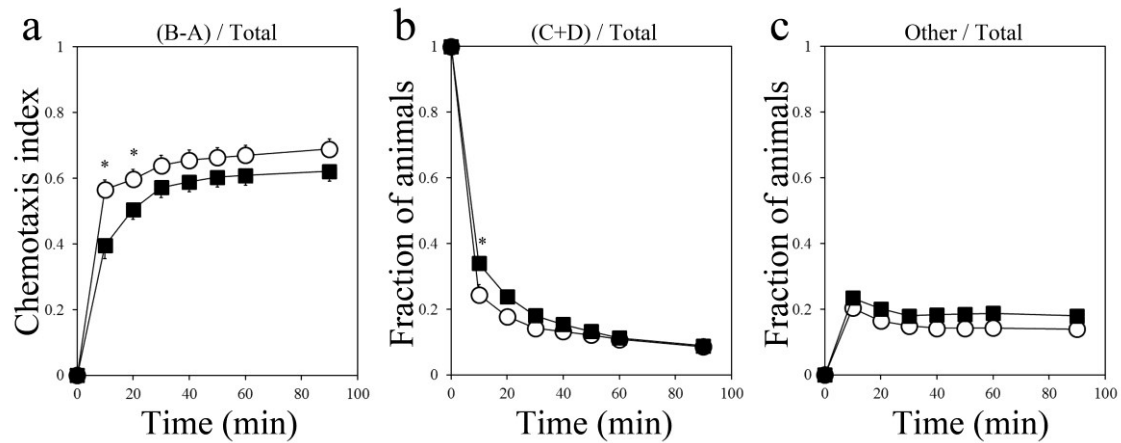


図 27. 0.1%ジアセチル経験後 20°C の温度条件下において 0.5mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 条件付け後、0.5mM PQ を含むプレート上において 20°C で 2 時間飼育した野生型線虫である。ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群を示す。20°C で 2 時間飼育した場合、ジアセチル経験个体の誘引率はコントロール个体と比べ、わずかに低い値を示した。実験開始 90 分後では有意差は確認されなかった。コントロール n=23、ジアセチル経験个体 n=25。  
\* :  $P < 0.05$ 。

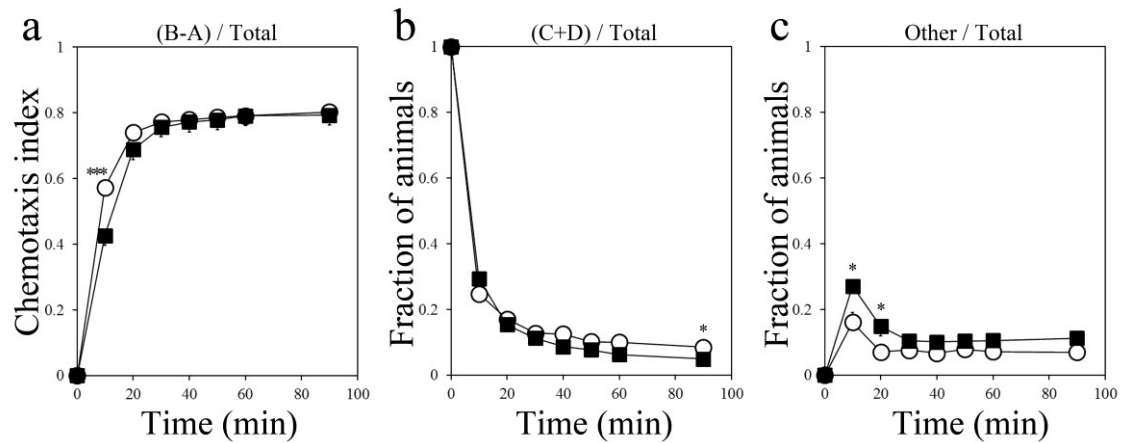


図 28. 0.1%ジアセチル経験後 15°C の温度条件下において 5mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 条件付け後、5mM PQ を含むプレート上において 15°C で 2 時間飼育した野生型線虫である。ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。5mM PQ を含むプレートにおいて、15°C で 2 時間の飼育を行った場合、ジアセチルに対する誘引率は実験開始後に有意に低い値を示すが、20 分以降で有意差は確認されなかった。n=12。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

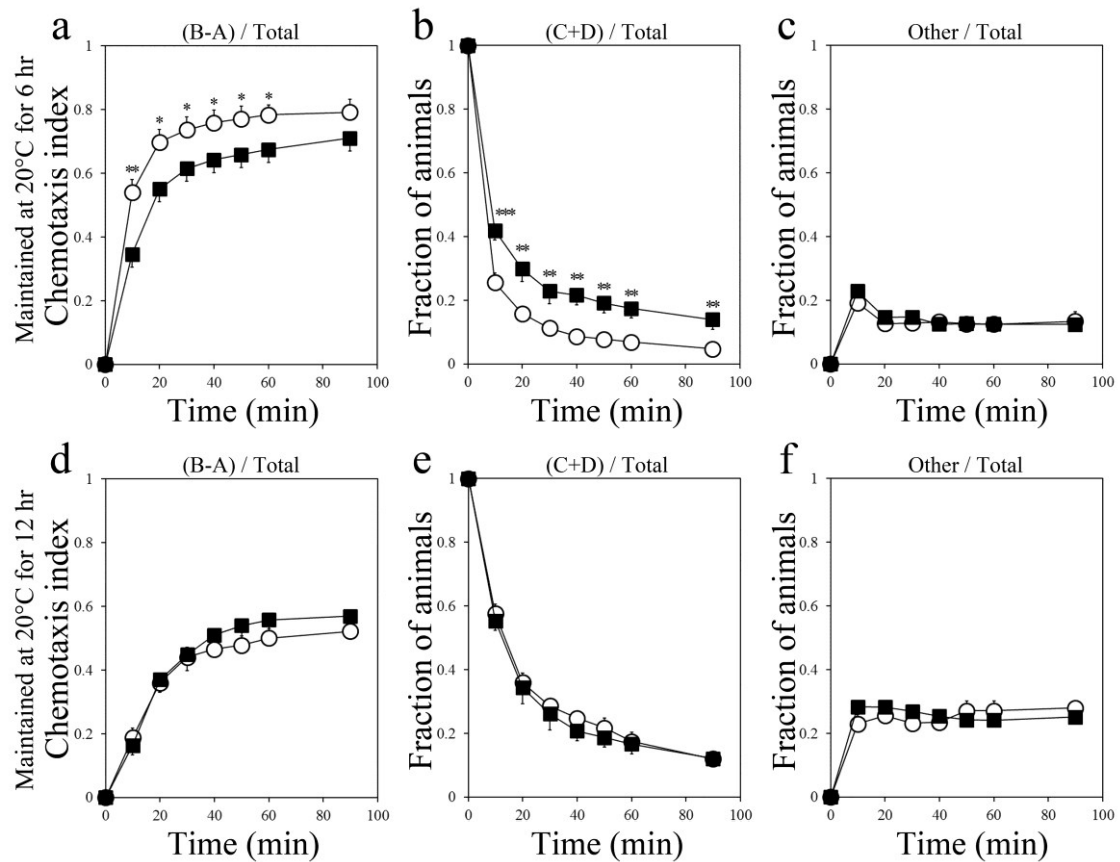


図 29. 0.1%ジアセチル経験後 20°C の温度条件下において 5mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、5mM PQ を含むプレート上において 20°C で 6 時間、d~f は 12 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。5mM PQ を含むプレートにおいて 20°C で飼育を行った場合、6 時間の飼育後において、実験開始からジアセチル経験個体の行動開始領域に存在する割合は高く、ジアセチルへの誘引率がコントロールよりも有意に低い値を示したが、実験開始 90 分後においてジアセチル順応は確認されなかった。12 時間の飼育後においては両者の誘引率、行動開始領域に存在する割合、領域外に存在する割合に有意な差は確認されなかった。6 時間: コントロール n=27、ジアセチル経験個体 n=29。12 時間: n=15。\*:  $P < 0.05$ 、\*\*:  $P < 0.01$ 、\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

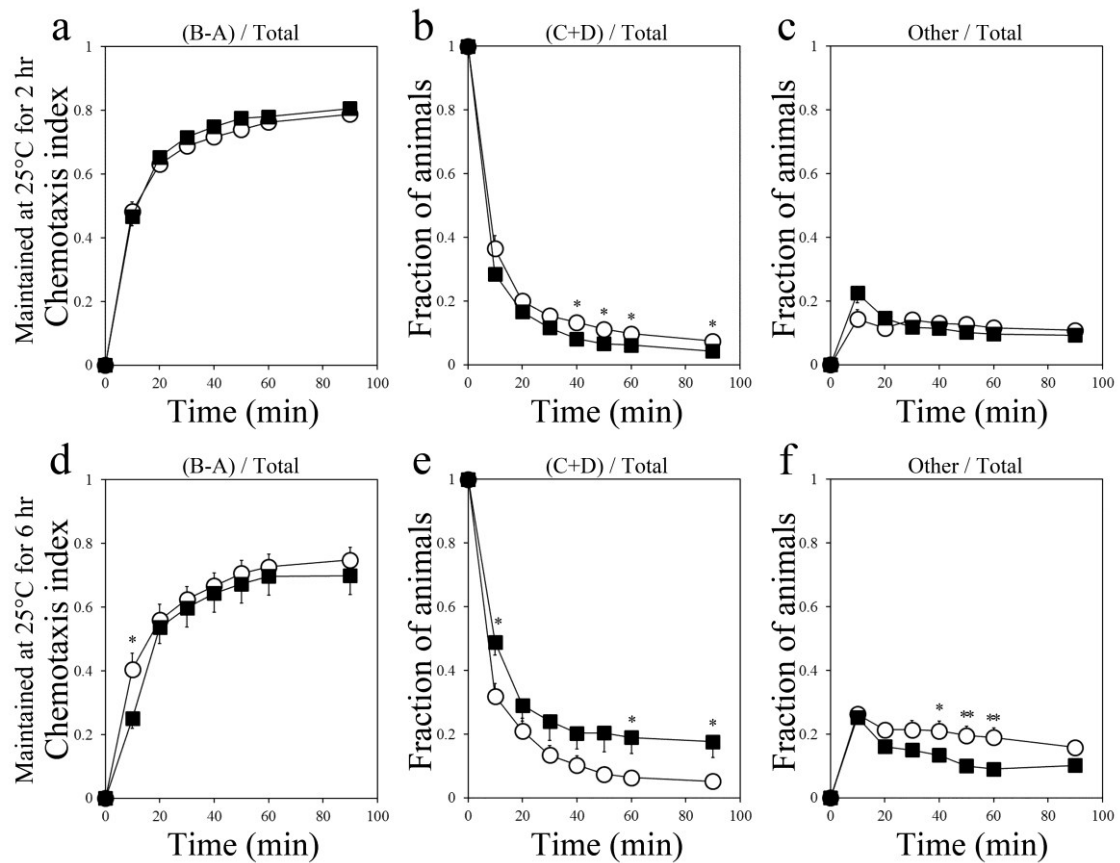


図 30. 0.1%ジアセチル経験後 25°C の温度条件下において 5mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、5mM PQ を含むプレート上において 25°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。5mM PQ を含むプレートにおいて 25°C で飼育を行った場合、実験開始 90 分後において両個体群のジアセチルへの誘引率に有意な差は認められず、ジアセチル順応は確認されなかった。2 時間：コントロール n=23、ジアセチル経験個体 n=24。6 時間：n=14。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

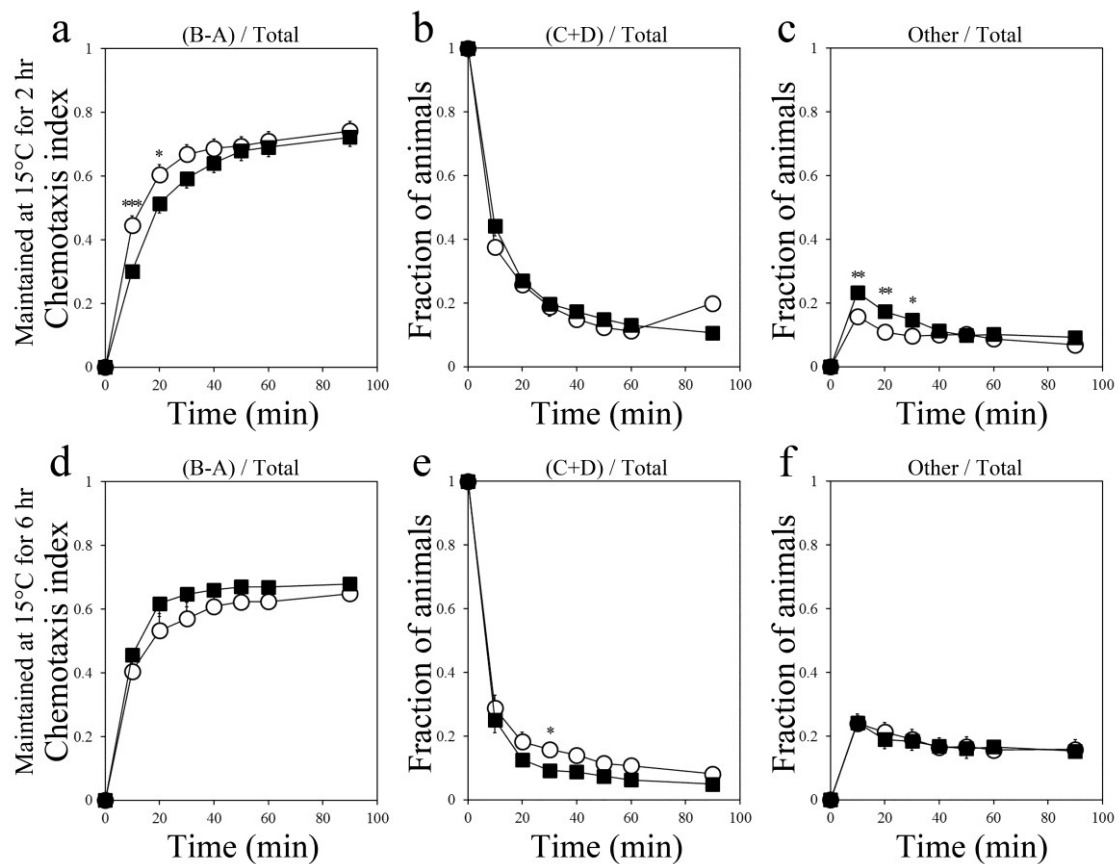


図 31. 0.1%ジアセチル経験後 15°C の温度条件下において 10mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、10mM PQ を含むプレート上において 15°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。10mM PQ を含むプレートにおいて 15°C で飼育を行った場合、飼育時間に関係なく、ジアセチル順応は確認されなかった。2 時間：コントロール n=16、ジアセチル経験個体 n=15。6 時間：コントロール n=21、ジアセチル経験個体 n=22。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

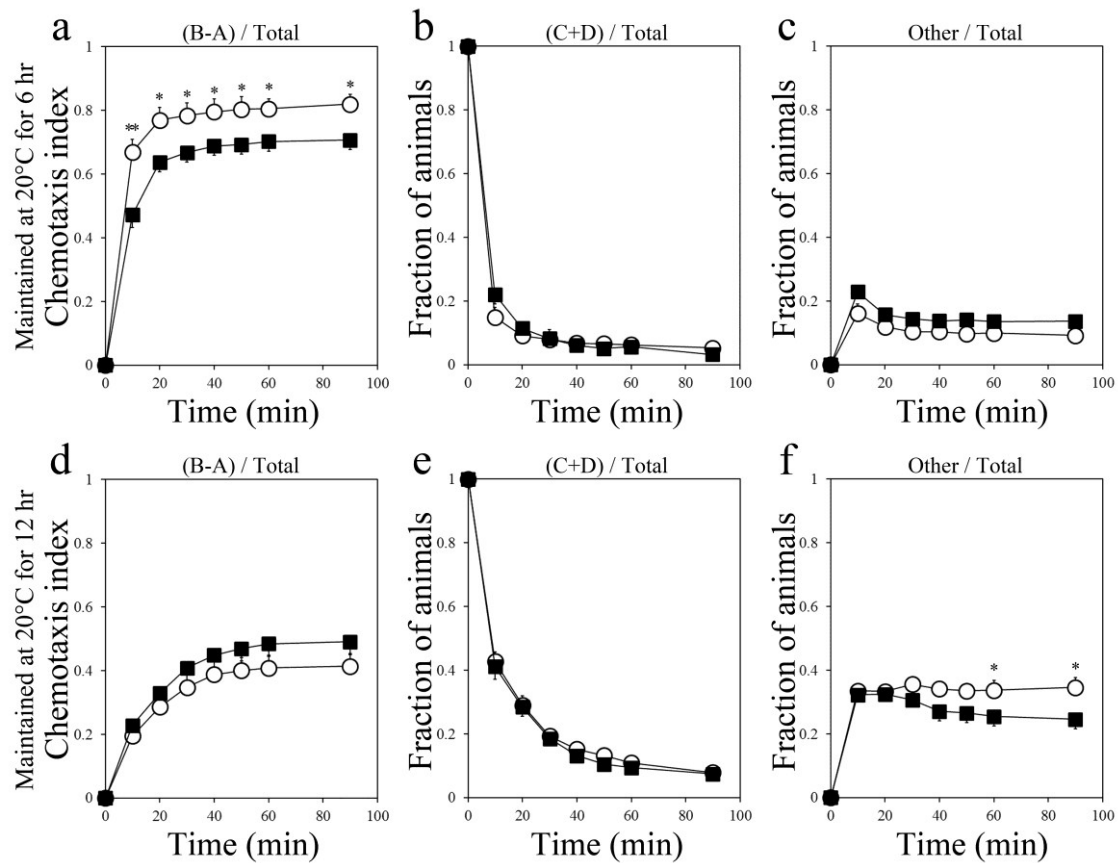


図 32. 0.1%ジアセチル経験後 20°C の温度条件下において 10mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、10mM PQ を含むプレート上において 20°C で 6 時間、d~f は 12 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。10mM PQ を含むプレートにおいて 20°C で 6 時間の飼育を行った場合、実験開始からジアセチル経験個体の誘引率はコントロールよりも有意に低下を示し、ジアセチル順応が確認された。12 時間の飼育後では、コントロールがわずかに低い値を示したが、両個体群の誘引率に有意な差確認されなかった。6 時間 : n=16。12 時間 : n=30。\* : P < 0.05、\*\* : P < 0.01。



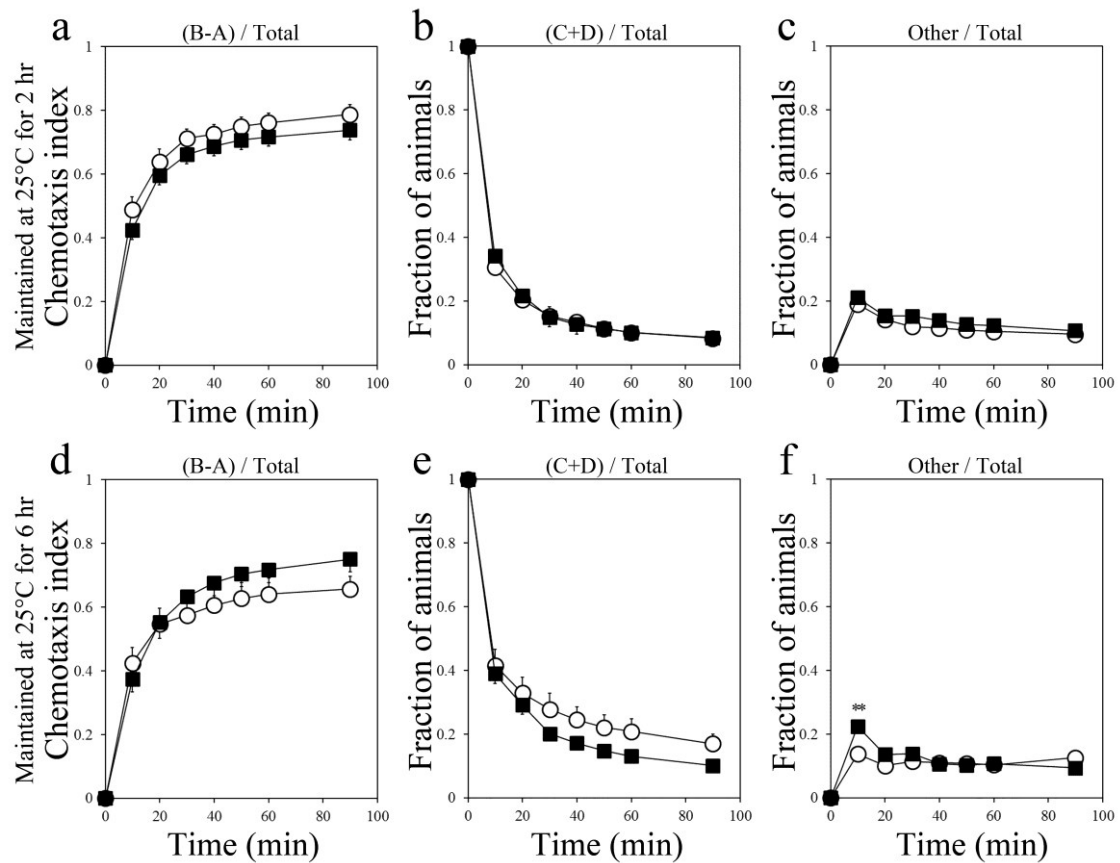


図 33. 0.1%ジアセチル経験後 25°C の温度条件下において 10mM PQ を含むプレートで飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引反応 ジアセチル領域に存在する線虫の割合 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示している。a~c は条件付け後、10mM PQ を含むプレート上において 25°C で 2 時間、d~f は 6 時間飼育した野生型線虫である。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。10mM PQ を含むプレートにおいて 25°C で飼育を行った場合、両個体群のジアセチルへの誘引率に有意差は確認されなかった。2 時間：n=21。6 時間：コントロール n=17、ジアセチル経験個体 n=20。\*\*：P<0.01。

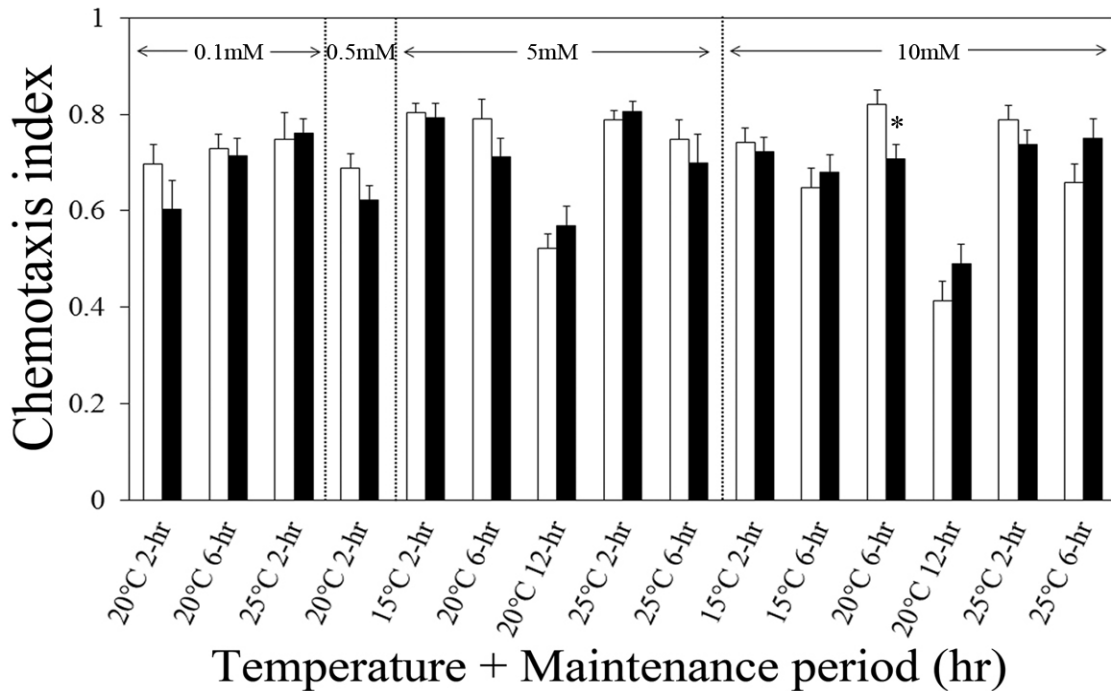


図 34. ジアセチル経験後、様々な濃度の PQ を含むプレートを用いて 15°C、20°C、25°C で飼育した野生型線虫のジアセチルに対する誘引率 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始 90 分後の誘引率の値を示している。横軸は飼育した温度と時間を示す。ジアセチル経験後に PQ を含む NGM プレートで飼育した場合、10mM PQ の存在下において 20°C で 6 時間の飼育を行った場合を除き、どの条件下においてもジアセチル順応を確認することはできなかった。\* :  $P < 0.05$ 。

### 3-5. 線虫の運動量

0.1%ジアセチルの条件付け後、野生型線虫や変異体線虫を 15°C、20°C、25°C の条件下で、それぞれの時間飼育した場合の運動量を計測した。α-LA を含む NGM プレートで飼育した野生型線虫についても同様に運動量の計測を行った。

#### 3-5-1. 野生型線虫の運動量

野生型線虫において、0.1%ジアセチルの条件付け後に、15°C の温度条件で 2 時間の飼育、20°C で 0 (条件付け直後)、2、6、12 時間の飼育、25°C で 12、18 時間の飼育を行った後に運動量を測定した。コントロール個体およびジアセチル経験個体の運動量に有意な差は認められなかった (図 35a)。ジアセチル経験個体の誘引率の低下は、運動量の低下によりもたらされるものではないことがわかる。

野生型線虫の飼育培地に α-LA を含ませ、20°C および 25°C で飼育した場合においても、両個体群の運動量に有意な差は確認されなかった (図 35b)。また、α-LA を含む NGM プレートで飼育した野生型線虫の運動量は、通常の NGM プレートで飼育した場合と比較し低い値を示した。

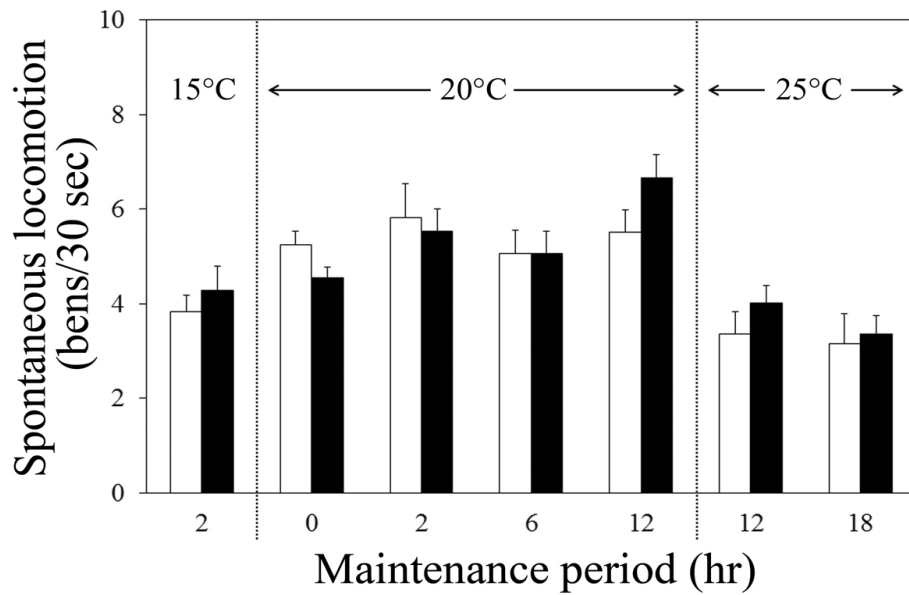
#### 3-5-2. 変異体線虫の運動量

ジアセチル経験後、各温度条件下において、それぞれの時間飼育した変異体線虫の運動量について測定した。活性酸素発生レベルの低い *isp-1* 変異体、*clk-1* 変異体および活性酸素発生レベルの高い *gas-1* 変異体、*mev-1* 変異体の運動量は、コントロール個体とジアセチル経験個体の間で有意差は確認されなかった (図 36、図 37)。

どの変異体においても、それぞれの温度条件下における同じ飼育時間の運動

量を比較すると、20°C で飼育を行った個体よりも、15°C や 25°C で飼育した個体の運動量が低下している。野生型線虫においても同様の傾向が認められた。また、活性酸素発生レベルの高い *gas-1* 変異体、*mev-1* 変異体の運動量は、野生型線虫や活性酸素発生レベルの低い変異体よりも低い値を示した。これまでの実験結果から、活性酸素の発生レベルは線虫のジアセチルに対する順応の持続時間に比例すると考えられるが、運動量の変化は活性酸素の発生レベルの量では説明できないことが明らかとなった。

(a) Wild-type



(b)  $\alpha$ -LA

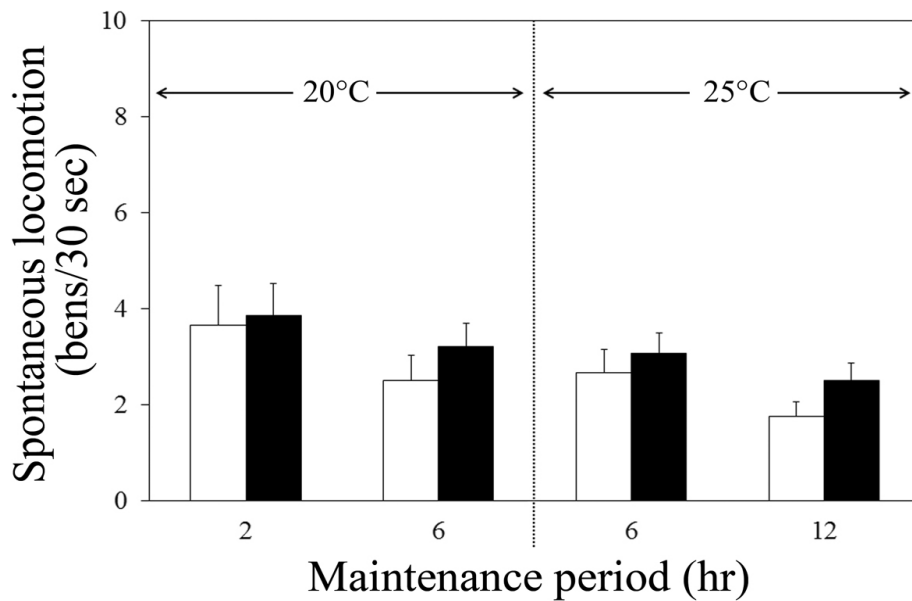


図 35. ジアセチル経験後、15°C、20°C、25°C で飼育した野生型線虫と  $\alpha$ -LA 存在下において 20°C、25°C で飼育した野生型線虫の運動量 (a) は通常の NGM プレートで飼育した野生型線虫、(b) は  $\alpha$ -LA を含ませた NGM プレートで飼育した野生型線虫の運動量を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群である。横軸は条件付け後の飼育時間を示す。通常の NGM プレートおよび  $\alpha$ -LA を含んだプレートで飼育した場合でも、両個体群の運動量に有意な差は認められなかった。Wild-type : n=20。  
 $\alpha$ -LA : n=20。

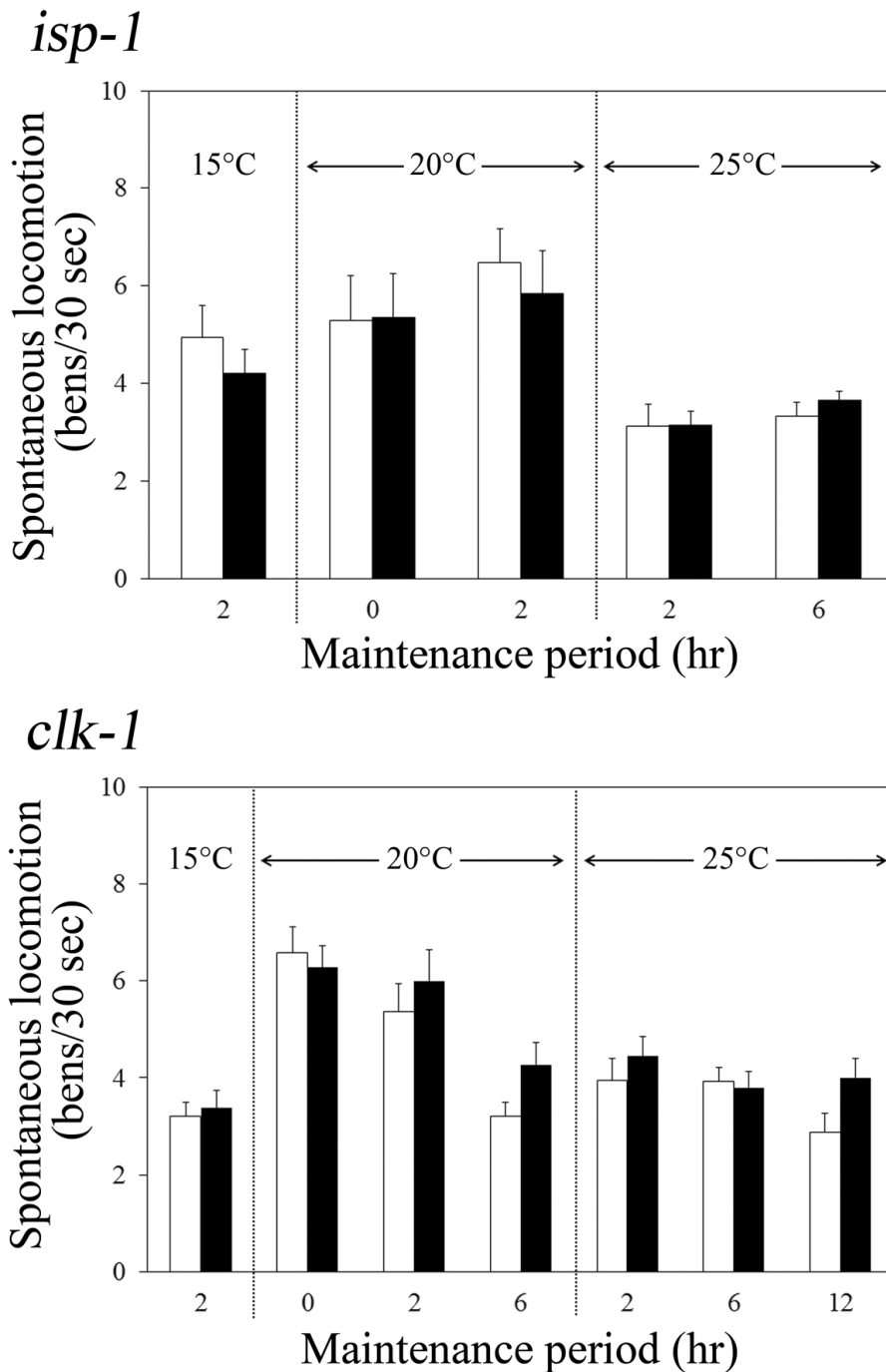
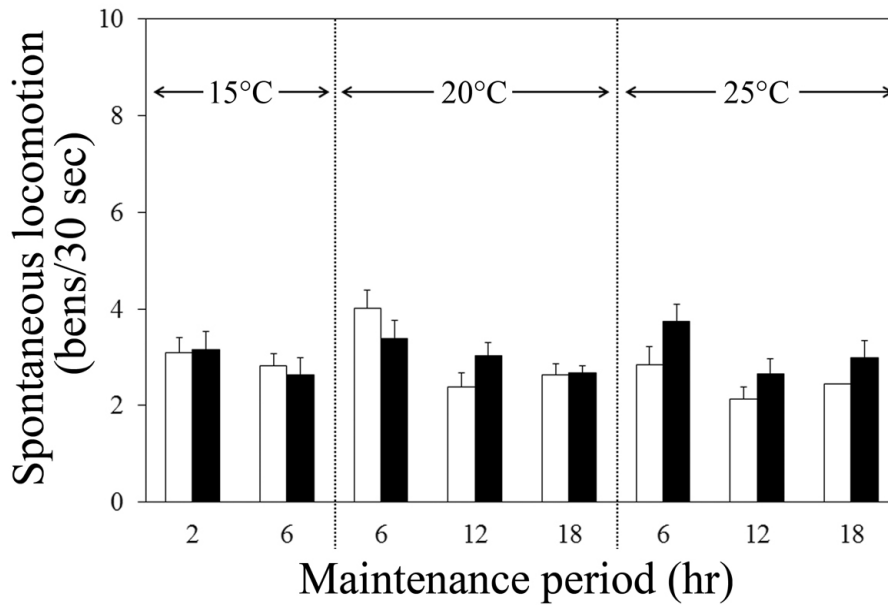


図 36. ジアセチル経験後、15°C、20°C、25°C で飼育した長寿命変異体の運動量 上段は *isp-1* 変異体、下段は *clk-1* 変異体の運動量を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群である。横軸は条件付け後の飼育時間を示す。ジアセチル経験個体およびコントロール個体の運動量に有意差は認められなかった。*isp-1* : n=20。 *clk-1* : n=20。

## *gas-1*



## *mev-1*

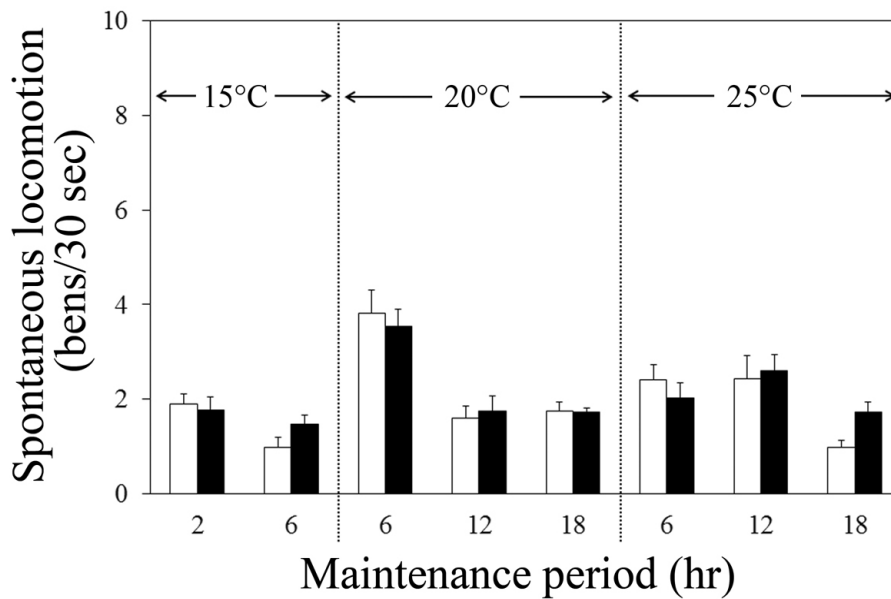


図 37. ジアセチル経験後、15°C、20°C、25°C で飼育した短寿命変異体の運動量 上段は *gas-1* 変異体、下段は *mev-1* 変異体の運動量を示している。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群である。横軸は条件付け後の飼育時間を示す。ジアセチル経験個体およびコントロール個体の運動量に有意な差は認められなかった。 *gas-1* : n=20。 *mev-1* : n=20。

表 1. それぞれの線虫におけるジアセチルに対するジアセチル順応持続時間

線虫		順応持続時間 (hr)		
		15°C	20°C	25°C
野生型線虫	野生型線虫	2時間未満	6	12
	$\alpha$ -LA	-	2	6
変異体	<i>isp-1</i>	2時間未満	2時間未満	6
	<i>clk-1</i>	2	2	6
	<i>gas-1</i>	2	12	12
	<i>mev-1</i>	2	12	12

## 4. 考察

### 4-1. 運動量とジアセチル順応の持続時間

0.1%ジアセチル条件付け後、15°C、20°C、25°C の温度条件下で様々な時間飼育した野生型線虫や変異体の運動量について、コントロール個体とジアセチル経験個体の間に有意差は確認できなかった (図 35、36、37)。ジアセチルの存在は線虫の運動に影響を及ぼさないものと考えられる。

### 4-2. 野生型線虫のジアセチルに対する順応の持続時間

線虫は、揮発性の誘引物質であるジアセチルに連続的にさらされると、その匂いに対して感受性が低下する性質が存在する。これは嗅覚順応と呼ばれる非連合学習である (Colbert et al., 1995)。Matsuura らの研究においても、0.1%ジアセチルに 120 分間さらされた線虫が、同濃度のジアセチルに対して順応を起こすことが確認されている。さらに、この順応はジアセチルにさらした数時間後においても持続し、飼育温度の上昇にともない持続時間が延長すると報告され



ている (Matsuura et al., 2009)。Matsuura らは線虫の自由行動中の順応について解析する目的で麻酔効果のあるアジ化ナトリウムを用いてない。一方、アジ化ナトリウムを使用した本研究においても Matsuura らと同様の結果が得られた (図 6)。具体的には、0.1%ジアセチル条件付けを 2 時間行った後の飼育温度を 15°C にした場合、順応の持続時間は 2 時間未満、20°C の場合では 6 時間程度、25°C の場合は 12 時間程度であった。これらの結果から、線虫のジアセチルに対する順応の持続時間は飼育温度に比例することが明らかとなった。

20°C で飼育した線虫と比較し、15°C で飼育した線虫は成長が遅くなるため長寿命となる。一方、25°C で飼育した線虫は成長が亢進され短寿命となる。YA 期以降の生存期間は 15°C で  $23.68 \pm 0.12$  日、20°C で  $13.48 \pm 0.13$  日、25°C で  $10.98 \pm 0.12$  日である (Matsuura et al., 2009)。生体内の化学反応速度には温度が大きく関与している。線虫は、餌の量や周囲の温度変化といった単純な外部環境の操作によって寿命が変化することから、代謝率の変化によって寿命が決定される可能性が指摘されている (Voorhies and Ward, 1999)。当初我々は、成長速度とジアセチル順応の持続時間は反比例の関係にあり、成長が遅ければより長く順応が持続し、成長が速ければ持続時間が短縮すると考え、老化の進行速度が順応の持続時間に関係すると仮定した。高温での飼育はミトコンドリアの活性酸素の生成を上昇させるという報告から (Heise et al., 2003)、温度上昇にともなう化学反応の加速は代謝率をあげ、生体内の老化が亢進することで順応の低下をもたらすと推測できる。しかし、本研究で得られた結果は当初の仮定と異なり、ジアセチル順応の持続時間は、線虫の飼育温度、つまり成長速度に比例した。線虫のジアセチル順応の持続は、寿命という絶対時間によって決定されるものではなく、独立した線虫独自の体内リズムによって制御されている可能性がある。代謝過程における活性酸素の発生は、代謝率の上昇に比例する。野生型線

虫をジアセチル条件付け後に様々な温度で飼育することで、順応持続時間に変化が得られたことから、ジアセチル経験後の活性酸素の発生レベルがジアセチル順応の持続に大きく関与していることが示唆された。

#### 4-3. 変異体線虫のジアセチルに対する順応の持続時間

活性酸素とジアセチル順応の関連性について、活性酸素の発生レベルが異なる変異体を用いて同様の実験を行い、順応の持続時間を比較した。

活性酸素の発生レベルが低い *isp-1* 変異体と *clk-1* 変異体の YA 以降の生存日数は、*isp-1* 変異体で  $20.28 \pm 0.10$  日、*clk-1* 変異体で  $16.38 \pm 0.12$  日であり、野生型線虫よりも長寿命である (Matsuura et al., 2009)。これらの線虫を  $15^{\circ}\text{C}$  および  $20^{\circ}\text{C}$  で飼育した場合、*isp-1* 変異体では 2 時間未満、*clk-1* 変異体で 2 時間程度であった (図 14)。野生型線虫を  $20^{\circ}\text{C}$  で飼育した場合では順応の持続時間は 6 時間程度であることから、*isp-1* 変異体および *clk-1* 変異体のジアセチル順応の持続時間は野生型線虫と比較して短いことが明らかである。また、野生型線虫を  $15^{\circ}\text{C}$  で飼育し、活性酸素発生レベルを低下させた場合では持続時間は 2 時間未満であった。 $25^{\circ}\text{C}$  で飼育した場合、野生型線虫では 12 時間程度持続するのに対して、*isp-1* 変異体では 2 時間程度、*clk-1* 変異体では 6 時間程度の順応の持続が確認された (図 14)。活性酸素発生レベルの低い長寿命の変異体のジアセチル順応の持続時間は、 $20^{\circ}\text{C}$  と  $25^{\circ}\text{C}$  で飼育した場合に野生型線虫よりも低下することが明らかとなった。*isp-1* 変異体はミトコンドリア内における活性酸素発生レベルが抑制されているが、*clk-1* 変異体は細胞内の活性酸素が抑制されており、エネルギーの生産量は野生型線虫と同程度であることが報告されている (Hekimi and Guarente, 2003)。また、*clk-1* 変異体は、抗酸化酵素群の遺伝子発現に加えて代謝関連の遺伝子発現が増加しており、活性酸素の発生は低下しているが、野生型

線虫と比較してミトコンドリアの生合成は増加していることも報告されている (Cristina et al., 2009; Kayser et al., 2004a)。つまり、*clk-1* 変異体では活性酸素も多く発生するがそれを除去する働きが強いことを示す。これは、15°C および 20°C、25°C で飼育した際に、*clk-1* 変異体の順応が *isp-1* 変異体のそれよりも長く持続した結果からも支持される。

活性酸素発生レベルの高い *gas-1* 変異体および *mev-1* 変異体の YA 以降の生存日数は *gas-1* 変異体で  $10.27 \pm 0.12$  日、*mev-1* 変異体で  $8.53 \pm 0.14$  日であり、野生型線虫と比べて短寿命の線虫である。15°C で飼育した場合、野生型線虫では順応の持続が 2 時間未満であったのに対し、*gas-1* 変異体、*mev-1* 変異体では 2 時間程度の順応の持続が確認された (図 6、図 21)。*gas-1*、*mev-1* 変異体を 20°C で飼育した場合の嗅覚順応はどちらも 12 時間程度であり、野生型線虫で確認された約 6 時間の持続時間よりも延長した。ジアセチル条件付け後の飼育温度を 25°C で行った野生型線虫や *gas-1* 変異体、*mev-1* 変異体の順応の持続時間は、いずれも 12 時間程度であった。*gas-1* 変異体、*mev-1* 変異体は、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I、II がそれぞれ変異しており、活性酸素が過剰に産生される (Hartman et al., 2001; Kondo et al., 2005; Senoo et al., 2001)。活性酸素発生レベルの高い変異体を 15°C および 20°C で飼育した場合に、野生型線虫よりも順応の持続時間が延長していることから、活性酸素が嗅覚順応の持続に大きく関与していることが示唆される。しかしながら、活性酸素が過剰に発生することで、老化マーカーとなるリポフスチンや酸化タンパク質が蓄積し、細胞死や突然変異頻度の増加が引き起こされることが知られている (Adachi et al., 1998; Hosokawa et al., 1994)。そのため、25°C での *gas-1*、*mev-1* 変異体の飼育は、活性酸素の発生レベルを上げるだけでなく、老化に関与する酸化タンパク質の蓄積や細胞死をより亢進させた可能性が大きい。また、25°C の温度条件下における

*gas-1*、*mev-1* 変異体の順応の持続が 12 時間程度であったことから、線虫のジアセチルに対する嗅覚順応の持続時間は有限的なものであり、約 12 時間が持続の限界であると考えられる。

#### 4-4. ジアセチル順応に対する抗酸化剤や酸化剤の影響

0.1%ジアセチルの条件付けの後に抗酸化剤  $\alpha$ -LA を含んだ NGM プレート上で飼育した線虫を用いて、活性酸素とジアセチル順応の関係性について解析した。その結果、抗酸化剤  $\alpha$ -LA を含んだ NGM プレートで飼育した野生型線虫のジアセチル順応の持続時間は、通常の NGM プレートで飼育した野生型線虫と比較して、持続時間に短縮が確認された (図 6, 24)。具体的には、通常の NGM プレートで飼育した場合の持続時間は、20°C では約 6 時間、25°C では約 12 時間であったのに対し、 $\alpha$ -LA を含んだ NGM プレートでの飼育では、20°C で約 2 時間、25°C 約 6 時間であった。 $\alpha$ -LA はミトコンドリア内においてエネルギー代謝に重要な補酵素として働き、抗酸化作用をもつグルタチオンの産生を促進する (Han et al., 1997; Pic et al., 1995)。ミトコンドリアは活性酸素の主要な発生源であり、活性酸素を除去する抗酸化酵素にはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、グルタチオンペルオキシターゼ、カタラーゼがある。SOD は活性酸素を過酸化水素と水に分解する働きをもち、SOD の働きにより作られた過酸化水素はグルタチオンペルオキシターゼとカタラーゼによって代謝される。グルタチオンペルオキシターゼはグルタチオンを基質として消費しており、 $\alpha$ -LA はグルタチオン産生の亢進に加え、フローラジカルにより酸化されたビタミンおよびビタミン E、グルタチオンを再生する働きがあることが報告されている (Biewenga et al., 1997)。 $\alpha$ -LA を飼育培地である NGM に含ませることによって線虫の生体内の活性酸素の除去が促進したため、順応の持続時間の短縮が引き起こされたものと考えられる。

条件付け後の NGM プレートに酸化剤である PQ を含ませた場合では、10mM PQ 存在下において 20°C で 6 時間飼育した条件を除き、どの濃度、温度条件下においてもジアセチル順応は確認されなかった (図 34)。PQ は活性酸素を産生させる強力な除草剤であり、ヒトを含め動物に対し強い毒性を示す。これまでに、0.1mM の PQ は線虫のミトコンドリア内の活性酸素レベルを上昇させたのにも関わらず、その寿命は延長することが報告されている (Yang and Hekimi, 2010)。これは少量の酸化剤を用いたことで体内の抗酸化機能が誘発され、結果的に活性酸素の除去機能が大きく働いたために寿命が延長した可能性が高い。本実験においても、PQ を含んだ NGM プレートでの飼育では、順応の持続時間に延長が認められなかったことから、同様の理由が可能性として考えられる。さらに、毒性の強い物質であるため、高濃度の PQ は活性酸素発生のレベルを上昇させるだけでなく、生体内に直接的なダメージを与えた可能性も否定できない。

#### 4-5. 考察のまとめ

線虫の寿命の延長は代謝率の低下によって引き起こされる (Voorhies and word, 1999)。低温での飼育や抗酸化剤を用いることで成長を遅めた野生型線虫や、長寿命の変異体ではエネルギー代謝が小さいために活性酸素の発生が緩やかになる。一方、高温での飼育で成長を促進させた野生型線虫や短寿命の変異体は、エネルギー代謝が大きく、活性酸素の発生を増加させる。本実験において、線虫のジアセチル順応の持続時間は、活性酸素発生レベルが低い場合は短く、逆に、活性酸素の発生レベルの高い場合では延長することを明らかにした (表 1)。一種の記憶保持時間が活性酸素の発生レベルによって異なる事を意味している。ジアセチル順応を示す個体の行動開始領域に存在する割合は、コントロール個

体と比較しても多く、また、順応を示さなくなる個体と比べても多いことから、活性酸素は匂い物質を感知する受容器の鋭敏化に関わる遺伝子発現シグナル、あるいは匂いと環境の関連付けおよびその記憶に関わる遺伝子発現のシグナルとして働いている可能性がある。本実験における飼育温度の相違や寿命の異なる変異体の順応持続時間の変化には、活性酸素が大きく影響していると考えられるがそのメカニズムは明らかではない。このメカニズムを解明するためには、本実験で使用した以外の変異体線虫を用いた解析や、活性酸素の発生レベルを直接的に測定し、比較する必要がある。Yang と Hekimi の実験では、活性酸素種（ROS）検出用試薬である H<sub>2</sub>DCFDA や MitoSox の蛍光染料を用いて ROS レベルの直接的な測定を行っている（Yang and Hekimi, 2010）。各線虫の活性酸素発生レベルおよび SOD 活性の違いや、成長ステージによる活性酸素の発生レベルの違いを明確にすることで、活性酸素とジアセチル順応の関連性が明らかとなるに違いない。第一章で記述した本研究内容については原著論文として 2013 年に公開されている（Nishino et al., 2013）。

## 5. 参考文献

- Adachi H, Fujiwara Y, Ishii N. 1998. Effects of oxygen on protein carbonyl and aging in *Caenorhabditis elegans* mutants with long (*age-1*) and short (*mev-1*) life spans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 53:B240–B244.
- Bargmann CI, Hartweg E, Horvitz HR. 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C.elegans*. *Cell* 74:515–527.
- Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. 1997. The pharmacology of the anti oxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol* 29:315–331.
- Colbert HA, Bargmann CI. 1995. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 14:803–812.
- Cristina D, Cary M, Lunceford A, Clarke C, Kenyon C. 2009. A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5:e1000450.
- Feng J, Bussiere F, Hekimi S. 2001. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* 1:633–644.
- Han D, Handelman G, Marcocic L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Flohe L, Packer L. 1997. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization. *Biofactors* 6:321–338.
- Hartman PSN, Ishii EB, Kayser PG, Morgan MM, Sedensky. 2001. Mitochondrial mutations differentially affect aging, mutability and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing* 122:187–201.
- Heise K, Puntarulo S, Portner HO, Abele D. 2003. Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp Biochem Physiol C* 134:79–90.

- Hekimi S, Guarente L. 2003. Genetics and the Specificity of the Aging Process. *Science* 299:1351–1354.
- Hosokawa H, Ishii N, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H, Suzuki K. 1994. Rapid accumulation of fluorescent material with aging in an oxygen-sensitive mutant *mev-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Aging Dev* 74:161–170.
- Honda S, Ishii N, Suzuki K, Matsuo M. 1993. Oxygen-dependent perturbation of lifespan and aging rate in the nematode. *J Gerontol* 48: B57–B61.
- Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K., Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K. 1998. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394:694–697.
- Kayser EB, Morgan PG, Sedensky MM. 2004a. Mitochondrial complex I function affects halothane sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Anesthesiology* 101:365–372.
- Kayser EB, Sedensky MM, Morgan PG, Hoppel CL. 2004b. Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant *clk-1*. *J Biol Chem* 279:54479–54486.
- Kondo M, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ishii T, Hartman PS, Ishii N. 2005. Effect of oxidative stress on translocation of DAF-16 in oxygen-sensitive mutants, *mev-1* and *gas-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing* 126:637-641.
- Larsen PL, Clarke CF. 2002. Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* 295:120–123.
- Matsuura T, Suzuki S, Musashino A, Kanno R, Ichinose M. 2009. Retention time of attenuated response to diacetyl after pre-exposure to diacetyl in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool A* 311:483–495.



- Matsuura T, Oikawa T, Wakabayashi T, Shingai R. 2004. Effect of simultaneous presentation of multiple attractants on chemotactic response of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res* 48:419–429.
- Mori I, Ohshima T. 1995. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 376:344–348.
- Murakami S, Murakami H. 2005. The effect on aging and oxidative stress on learning behavior in *C. elegans*. *Neurobiol Aging* 26:899–905.
- Nishino A, Kanno R, Matsuura T. 2013. The role of oxygen intermediates in the retention time of diacetyl adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool* 319A:431–439.
- Pick U, Haramaki N, Constantinescu A, Handelman GJ, Tritschler HJ. 1995. Glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase have opposite stereospecificities for alpha-lipoic acid enantiomers. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 206:724-730.
- Saeki S, Yamamoto M, Iino Y. 2001. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Biol* 204:1757–1764.
- Senoo-Matsuda N, Yasuda K, Tsuda M, Ohkubo T, Yoshimura S, Nakazawa H, Hartman PS, Ishii N. 2001. 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* 276:41553–41558.
- Tomioka M, Adachi T, Suzuki H, Kunitomo H, Schafer W, Iino Y. 2006. The insulin/PI 3-kinase pathway regulates salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* 51:613–625.

Voorhies WAV, Ward S. 1999. Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. Proc Natl Acad Sci USA 96:113990–11403.

Wen JYM, Kumar N, Morrison G, Rambaldini G, Runciman S, Rousseau J, van der Kooy D. 1997. Mutations that prevent associative learning in *C. elegans*. Behav Neurosci 111:354–368.

Yang W, Hekimi S. 2010. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Biol 8: e1000556.

桂 勲 (2000) 線虫の行動遺伝学

山本 大輔 編. 行動の分子遺伝学. シュプリンガー・フェラーク東京

菅野 令 (2008) 線虫の学習獲得における酸化ストレスの影響

岩手大学工学部福祉システム工学科卒業論文

## 第 2 章

### 線虫の順応獲得時期に関わる活性酸素の影響

#### 1. 背景

老化はすべての動物において避けられない生命現象である。この現象はフリーラジカル説を原点とした酸化ストレス説の考えが一般的である (Beckman et al., 1998; Ishii et al., 1998; Martin et al., 1996; Sohal and Weindruch, 1996)。近年、活性酸素による酸化ストレスは有毒なものではなく、様々な回路を管理するのに重要な役割を担っていることが報告されており (Back et al., 2012)、線虫の学習効果にも関与している可能性がある。1 章では、誘引性物質ジアセチルに対する順応の持続時間が線虫の飼育温度に依存することについて論述した。ジアセチル経験後、15°C で 2 時間飼育した場合には、ジアセチル順応は認められないが、20°C で飼育した場合は約 6 時間、25°C で飼育した場合は約 12 時間の順応の持続が確認されており、Matsuura らによって報告された結果と一致した (Matsuura et al., 2009)。線虫の飼育温度によっては寿命の制御が容易であり、寿命にはエネルギー代謝が関与すると考えられている (Voorhies et al, 1999)。エネルギー代謝に直接関わる変異体線虫を用いた解析の結果、活性酸素発生レベルの低い *isp-1*、*clk-1* 変異体のジアセチルに対する順応の持続時間は短縮し、活性酸素発生レベルの高い *gas-1*、*mev-1* 変異体では順応の持続時間の延長が確認された。また、抗酸化剤である  $\alpha$ -リポ酸 (LA) を飼育培地に加えて野生型線虫を飼育し、生体内の活性酸素による酸化ダメージを抑制したところ、順応持続時間の短縮が確認された。以上の結果は、線虫のある種の記憶保持には活性酸素が関与することを示している (Nishino et al., 2013)。先行研究より、ジアセチルをあらか

じめ経験することで生じるジアセチル順応は、ヤングアダルト (YA) 期から成虫脱皮後 5 日目 (A5) まで成立することが報告されている (伊藤、2007)。第 2 章では、線虫を 15°C、20°C、25°C で飼育した場合の、線虫のジアセチル順応の成立可能期間について行動遺伝学的に解析した。前述のように飼育温度の違いは、線虫の生体内の活性酸素発生レベルに差異を与える。活性酸素の発生レベルの低い変異体は寿命が長く、逆にレベルの高い変異体は寿命が短くなる。ジアセチル順応の成立に与える活性酸素の影響を調べるため、活性酸素発生レベルが異なる *isp-1(qm150)*、*clk-1(qm30)*、*gas-1(fc21)*、*mev-1(kn1)* 変異体や、抗酸化剤  $\alpha$ -LA を用いた実験を行った。一方、寿命や老化にはインスリン様シグナル伝達経路も関与している。本実験では寿命の異なるインスリン様シグナル伝達系に関わる *daf-2(m577)*、*daf-2(e1370)*、*daf-16(mu86)* 変異体を用いた解析も行った。

## 2. 実験方法

### 2-1. 各成長ステージの線虫を得るまでの飼育

実験に使用する野生型線虫や変異体は成長段階を揃える必要がある。卵を持った成虫個体を 50 匹 NGM プレートに移し、野生型線虫と *isp-1*、*clk-1*、*daf-2*、*daf-16* 変異体は 25°C で 3 時間卵を産ませ、その後線虫を拾い、プレート上には卵のみが残るようにした (使用した動物と実験準備 (1) 参照)。 $\alpha$ -LA を含む NGM プレートで飼育する野生型線虫の場合も同様に、 $\alpha$ -LA を含む NGM プレートに成虫をおいて 25°C のインキュベーター内で 3 時間産卵させた。*gas-1*、*mev-1* 変異体の場合は 20°C のインキュベーター内におき、3 時間産卵させた。卵のみが残るプレートを各温度でそれぞれの成長ステージまで飼育し、実験に用いた。飼育温度によって線虫の成長速度は異なるため、YA 期までの成長段階は目視により判別を行った。線虫の幼虫期には 4 段階あり、脱皮を繰り返して成虫とな

る。幼虫期のそれぞれの段階は幼虫 Larva の頭文字をとり、L1、L2、L3、L4 と表記している。実験には L3 期以降からの線虫を用いた。L4 期の線虫は特徴的な構造をもっているため、L3 と L4、YA 期の線虫の識別が可能である。どの温度条件下で育てた場合も、YA 期以降 1 日目を A1、2 日目を A2、3 日目を A3... とし、成虫へ脱皮後の日数を表記した。使用した  $\alpha$ -LA 濃度については、Murakami らによって報告されたものを参考とした (Murakami and Murakami, 2005)。

## 2-2. ジアセチルに対する条件付け

線虫にジアセチル順応を誘発させるための条件付けプレートは、直径 6cm のディッシュにアガー溶液を 5ml ずつ分注することで作成した (使用した動物と実験準備 (4) 参照)。この寒天プレート上に洗浄作業を行った線虫を移動させ、プレートのフタの内側 4 箇所にも 0.1%ジアセチルを 1.5 $\mu$ l を滴下し、フタをして 20°C の温度下で 120 分間放置した。ジアセチルは 99.5%エタノールで希釈をしたものを使用した。条件付けと同時に、フタの内側にジアセチルを置かず 120 分間放置した線虫をコントロールとして用いた。

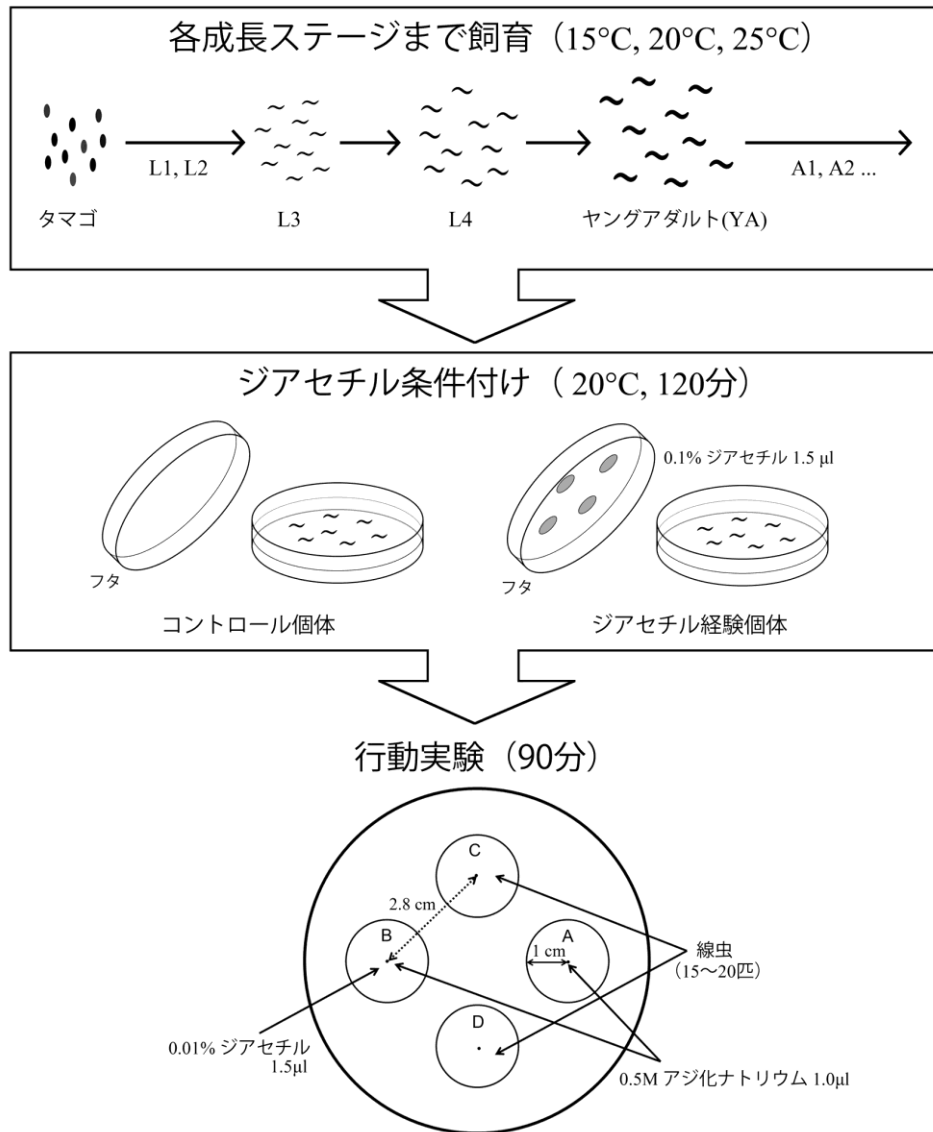
## 2-3. 誘引反応の計測

120 分間の条件付け後、線虫の存在する条件付け用のプレートに洗浄液を 2ml 滴下し、線虫を含んだ洗浄液を 15ml の遠心管に移した。約 8ml の洗浄液を加え、遠心分離 (500rpm、90sec) を 1 回行った。ジアセチルの条件付けではプレート内にエサである大腸菌が塗布されていないため、洗浄作業は 1 度のみ行った。マイクロピペットを用いて遠心管の底に沈んだ線虫を 3 $\mu$ l ずつ吸い取り、実験プレートの C、D 領域に約 15~20 個体の線虫を置いた。A および B 点には 0.5M アジ化ナトリウム 1.0 $\mu$ l を滴下し、さらに B 点には 0.01%ジアセチル 1.5 $\mu$ l

を実験直前に滴下した（実験プレート図）。先行研究より、本研究を行うにあたり、0.1%のジアセチルの条件付け直後に行う行動実験は、0.01%ジアセチルを使用することが最も適正であることが報告されている（伊藤、2007）。実験のプロトコルを図 1 に示す。ジアセチルを滴下した時を 0 分として、実験プレート上の各領域内の線虫の個体数と、領域外（Other）に存在する線虫の個体数を実体顕微鏡（OLYMPUS SZ40）下において 10 分間隔で 60 分間、さらにその 30 分後（実験開始 90 分後）にカウントを行い、0.01%ジアセチルに対する線虫の誘引行動を評価した。

#### 2-4. データ解析

解析はコンピュータソフト Microsoft Excel にデータを入力して行った。実験開始 0 分から 10 分毎における A、B、C、D 各領域内にいる個体数と領域外（Other）の個体数を入力し、それぞれの時間ごとの誘引率を算出した。誘引反応の評価には、Chemotaxis index (Bargmann et al., 1993) または Fraction of animals (Matsuura et al., 2004) を用いた。ジアセチルに対する誘引率（Chemotaxis index : C.I.）は  $(B \text{ 領域の個体数} - A \text{ 領域の個体数}) / \text{全個体数}$  より求めた  $((B-A)/\text{Total})$ 。Fraction of animals は、 $C$  および  $D$  領域の個体数 / 全個体数、領域外に存在する個体数 / 全個体数 によって算出し、それぞれを行動開始領域に存在する線虫の割合  $((C+D)/\text{Total})$ 、および各領域外に存在する線虫の割合  $(\text{Other}/\text{Total})$  とした。



**図 1. 実験のプロトコル** 各成長ステージまで飼育した線虫を、ジアセチルを均一にした条件付けプレート上に線虫をおき（ジアセチル経験個体）、120 分間放置した。その後、実験プレート上で、0.01%ジアセチルに対する誘引行動を 90 分間解析した。ジアセチルを経験していない線虫をコントロールとして用いた。

### 3. 結果

#### 3-1. 野生型線虫のジアセチル順応成立期間

先行研究において、通常の温度（20°C）で成長した線虫のジアセチル順応は、YA から A5 の期間で成立することが明らかとされている（伊藤、2007）。本実験でも同様の傾向が認められ、野生型線虫のジアセチル順応成立期間は YA 期以降成立し、A5 期まで生じることが明らかとなった（図 2、10）。ジアセチル順応の成立期間、すなわち、学習可能な期間は、飼育温度が異なる場合にどのような変化を与えるかについて行動実験を行った。

##### 3-1-1. 飼育温度の異なる場合のジアセチル順応成立期間

###### (1) 15°C で飼育した野生型線虫の順応成立期間

卵の状態から 15°C の温度で飼育した野生型線虫の、0.1%ジアセチル条件付け後の 0.01%ジアセチルに対する誘引率は、20°C で飼育した時と同様、YA 期から順応が成立した。L3 期における誘引率はコントロール個体で  $0.11 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.07 \pm 0.01$  を示し、L4 期における誘引率はコントロール個体で  $0.28 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.26 \pm 0.04$  を示した（図 2 L3、L4、(B-A)/Total）。これら幼虫期の線虫の行動開始領域に存在する割合 ((C+D)/Total) は 4 割以上を示しており、多くの個体が行動開始領域から移動しないことがわかる。YA 期の誘引率はコントロール個体で  $0.47 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.21 \pm 0.03$  を示し、順応が成立した ( $P < 0.001$ 、図 2 YA)。順応の成立は A3 期まで認められた。各成長ステージにおける行動開始領域に存在する割合も 0.1 以下を示していることから、ほとんどの個体が移動したことが明らかである。A1 期のコントロール個体の誘引率は  $0.62 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体は  $0.37 \pm 0.05$  ( $P < 0.001$ ) であり、A2 期ではコントロール個体で  $0.73 \pm 0.03$ 、ジアセチル



経験個体で  $0.47 \pm 0.03$  ( $P < 0.001$ )、A3 期はコントロールで  $0.55 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.32 \pm 0.04$  ( $P < 0.001$ ) を示した (図 2 A1、A2、A3)。A5 期ではジアセチル順応は確認されず、実験開始から両者とも同程度の誘引率を示した。実験開始 90 分後における誘引率はコントロール個体で  $0.37 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.38 \pm 0.02$  であった (図 2 A5)。A5 期の線虫の行動開始領域に存在する割合は 0.1 以下を示した。一方、領域外に存在する割合 (Other/Total) は約 4 割となった。

## (2) 20°C で飼育した野生型線虫の順応成立期間

20°C の温度条件下で野生型線虫を飼育した場合、ジアセチル条件付けを経験した個体のジアセチルに対する有意な反応行動の低下は、L3、L4 の幼虫期では確認されなかった。実験開始 90 分後における誘引率は、L3 期のコントロール個体で  $0.11 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.10 \pm 0.03$  であり、L4 期ではコントロール個体で  $0.22 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.18 \pm 0.03$  であった (図 3 L3、L4)。一方、YA 期の野生型線虫では、実験中を通してジアセチル経験個体が有意に低い値を示し、順応の成立が確認された ( $P < 0.01$ 、図 3 YA)。実験開始 90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.54 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.39 \pm 0.03$  であった。ジアセチル順応の成立は A5 期まで確認され、A7 期では確認されなかった。各成長ステージにおける 90 分後の誘引率は、A1 期のコントロール個体で  $0.60 \pm 0.06$ 、ジアセチル経験個体で  $0.38 \pm 0.06$  ( $P < 0.05$ )、A2 期ではコントロール個体で  $0.71 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.60 \pm 0.04$  ( $P < 0.05$ )、A3 期ではコントロール個体で  $0.65 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.43 \pm 0.04$  ( $P < 0.001$ )、A5 期ではコントロール個体で  $0.62 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.45 \pm 0.04$  ( $P < 0.05$ ) であった (図 3 A1、A2、A3、A5)。A7 期における誘引率は

コントロール個体で  $0.42 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.39 \pm 0.03$  を示し、計測中、両者とも同程度の値となった (図 3 A7)。

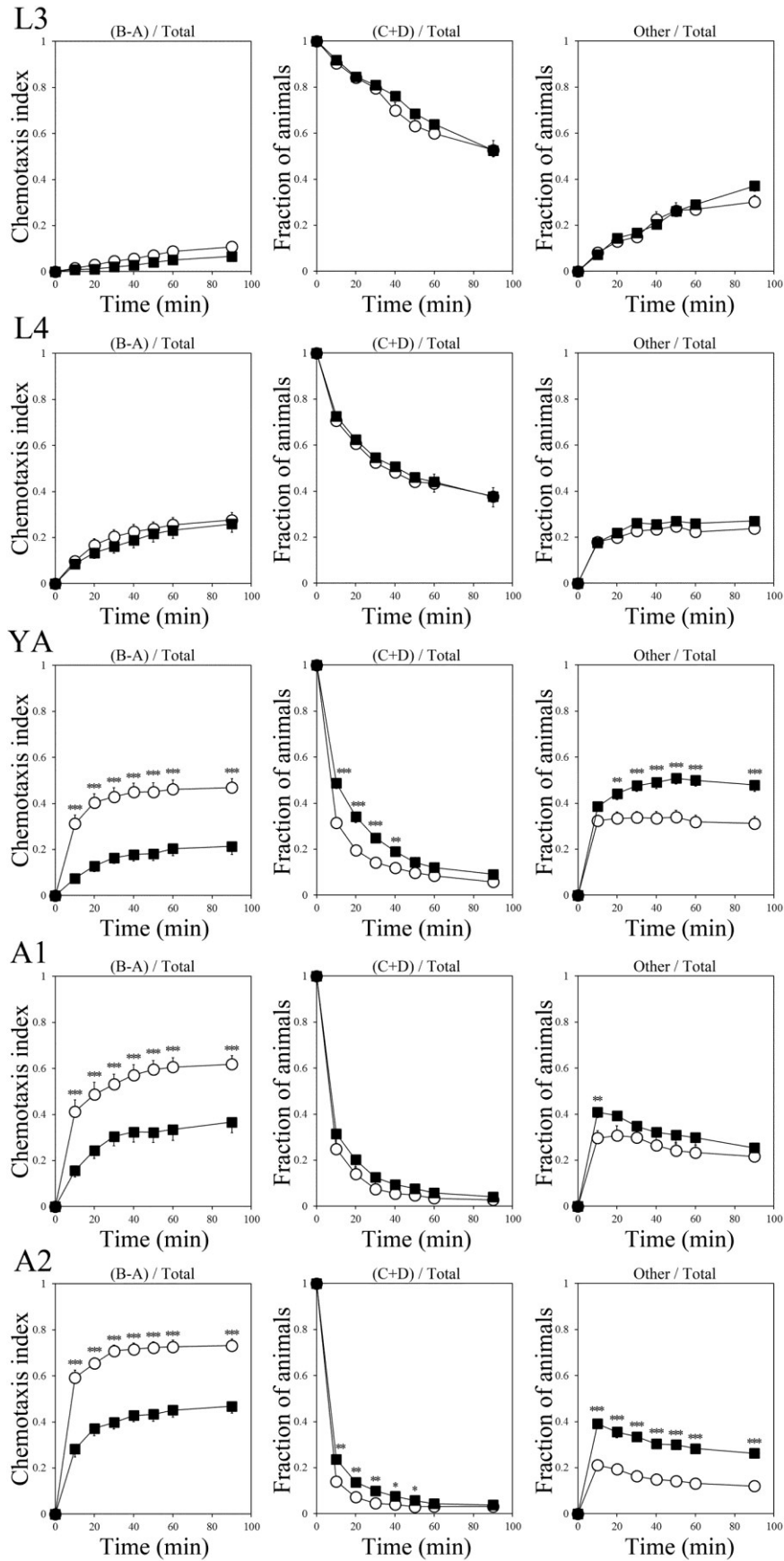
### (3) 25°C で飼育した野生型線虫の順応成立期間

25°C の温度条件下で野生型線虫を L3、L4 まで飼育した場合、ジアセチル条件付け後の 0.01%ジアセチルに対する誘引率は、実験開始後コントロール個体と比較しジアセチル経験個体が有意に低い値を示すが、実験開始 90 分後では有意差は認められなかった (図 4 L3、L4)。L3 期における誘引率はコントロール個体が  $0.18 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体が  $0.13 \pm 0.02$ 、L4 期ではコントロール個体が  $0.20 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体が  $0.16 \pm 0.02$  であった。YA 期まで飼育した個体では、ジアセチル経験個体の誘引率がコントロール個体のそれよりも有意に低下し、順応が認められた (図 4 YA)。実験開始 90 分後における誘引率はコントロール個体で  $0.58 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.29 \pm 0.04$  であった ( $P < 0.001$ )。ジアセチル順応の成立は A7 期まで確認され、YA 期から A7 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、実験中有意に低い値を示した。各成長ステージにおける 90 分後の誘引率は、A1 期のコントロール個体が  $0.71 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体が  $0.42 \pm 0.05$  ( $P < 0.001$ )、A2 期ではコントロール個体が  $0.64 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体が  $0.40 \pm 0.03$  ( $P < 0.001$ )、A3 期コントロール個体が  $0.61 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体が  $0.34 \pm 0.03$  ( $P < 0.001$ )、A5 期ではコントロール個体が  $0.51 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体が  $0.34 \pm 0.03$  ( $P < 0.001$ )、A7 期ではコントロール個体が  $0.36 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体が  $0.09 \pm 0.02$  ( $P < 0.001$ ) であった (図 4 A1、A2、A3、A5、A7)。順応が認められなかった A9 期の誘引率はコントロール個体が  $0.20 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体が  $0.14 \pm 0.03$  であり、他の成長ステージにおける誘引率と比較して大きく低下した。また、幼虫期におい

て、行動開始領域に存在する個体の割合は、実験開始 90 分後においても 0.4 以上を示したが、YA 期から A7 期の順応が成立した期間では 0.1 以下を示し、成虫脱皮後に運動が活発になるものと考えられる。

### 3-1-2. 飼育温度の異なる野生型線虫のジアセチル順応成立期間のまとめ

野生型線虫を 15°C、20°C、25°C で飼育し、各成長ステージにおけるジアセチル順応の獲得について調べた。各温度で飼育した線虫において、ジアセチル順応は YA 期から確認することができた。ジアセチル順応の成立は、成虫になった YA 期から成立することが明らかとなった（図 2、3、4、5）。飼育温度は線虫の成長速度に大きく影響し、高温での飼育は成長速度を加速させ、低温では減速させる。15°C で飼育された線虫は、20°C で飼育された個体よりも寿命は長くなるが、ジアセチル順応の成立可能な期間は短くなった。一方、25°C で飼育された線虫は、20°C で飼育された個体よりも寿命が短くなるにも関わらず、ジアセチル順応の成立期間の延長が確認された（図 5）。



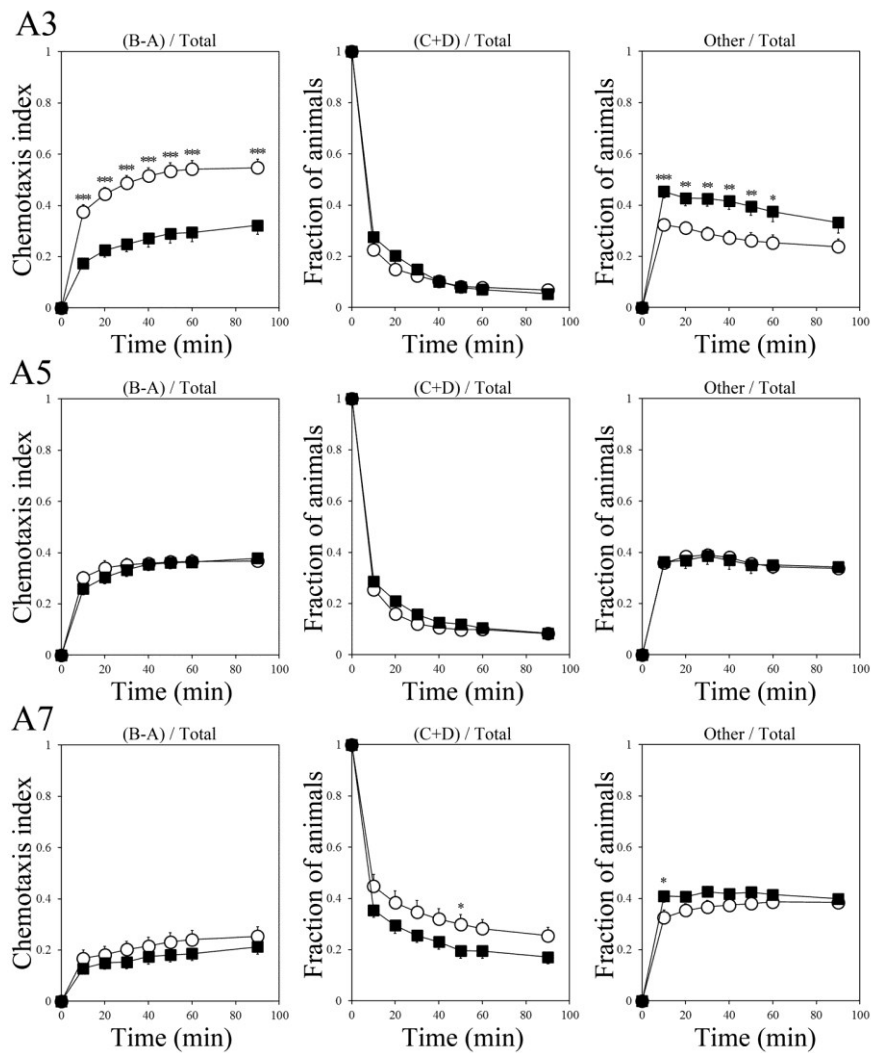
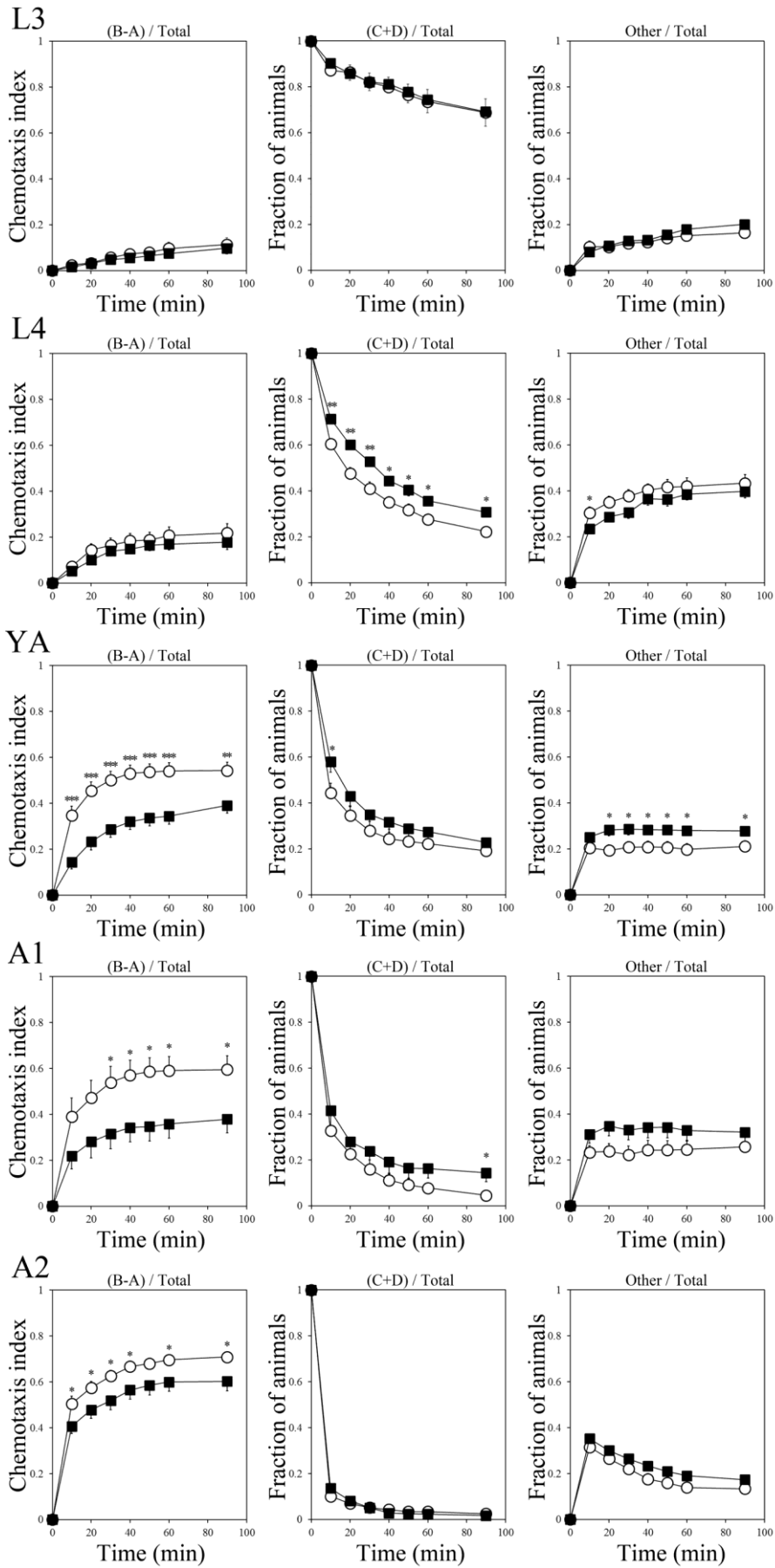


図 2. 15°C で飼育した野生型線虫の成長ステージ別におけるジアセチル経験後のジアセチルに対する反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C で飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率の有意な低下は YA 期から A3 期において確認された。n $\geq$ 14。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。



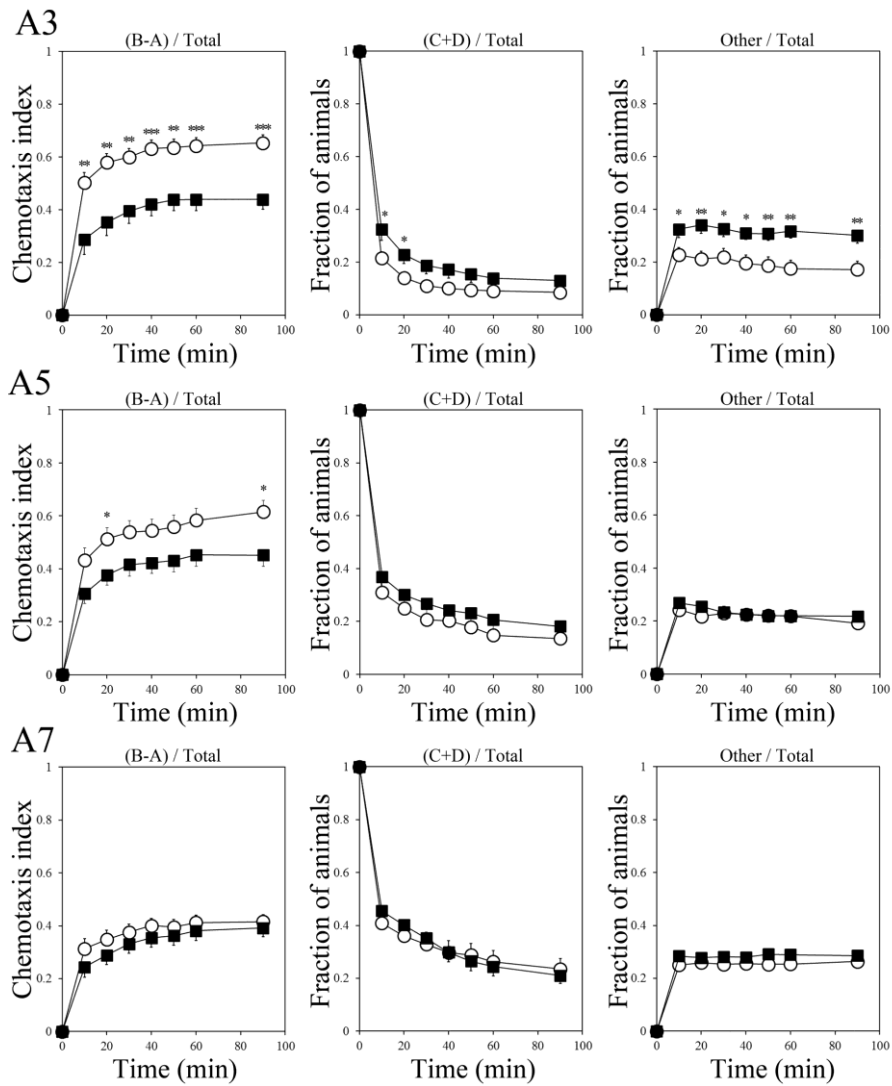
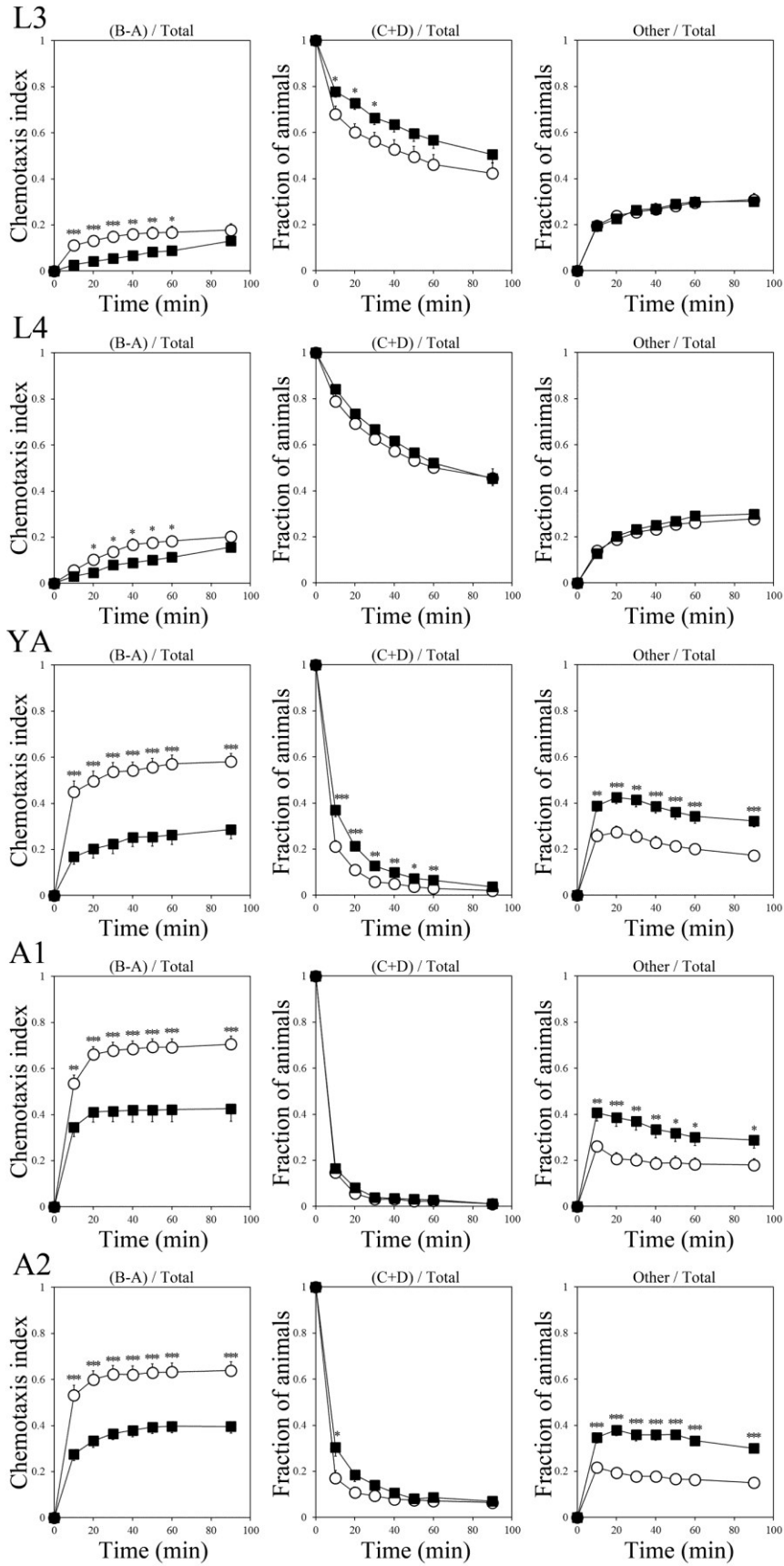


図 3. 20°C で飼育した野生型線虫の成長ステージ別におけるジアセチル経験後のジアセチルに対する反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率の有意な低下は YA 期から A5 期において確認された。n ≥ 14。\* : P < 0.05、\*\* : P < 0.01、\*\*\* : P < 0.001。





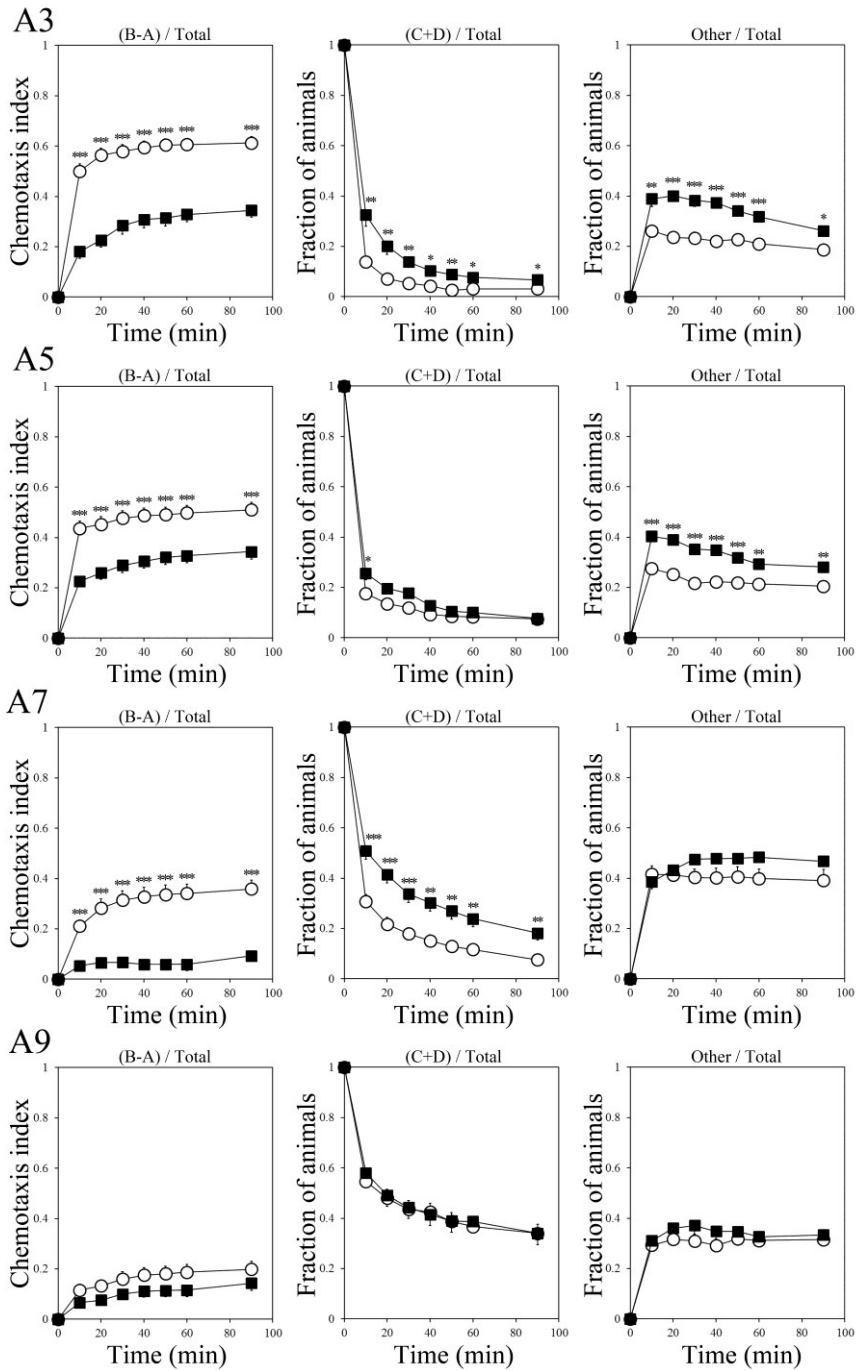


図 4. 25°C で飼育した野生型線虫の成長ステージ別におけるジアセチル経験後のジアセチルに対する反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°C で飼育した場合、ジアセチル経験個体の誘引率の有意な低下は YA 期から A7 期において確認された。n ≥ 18。\* : P < 0.05、\*\* : P < 0.01、\*\*\* : P < 0.001。

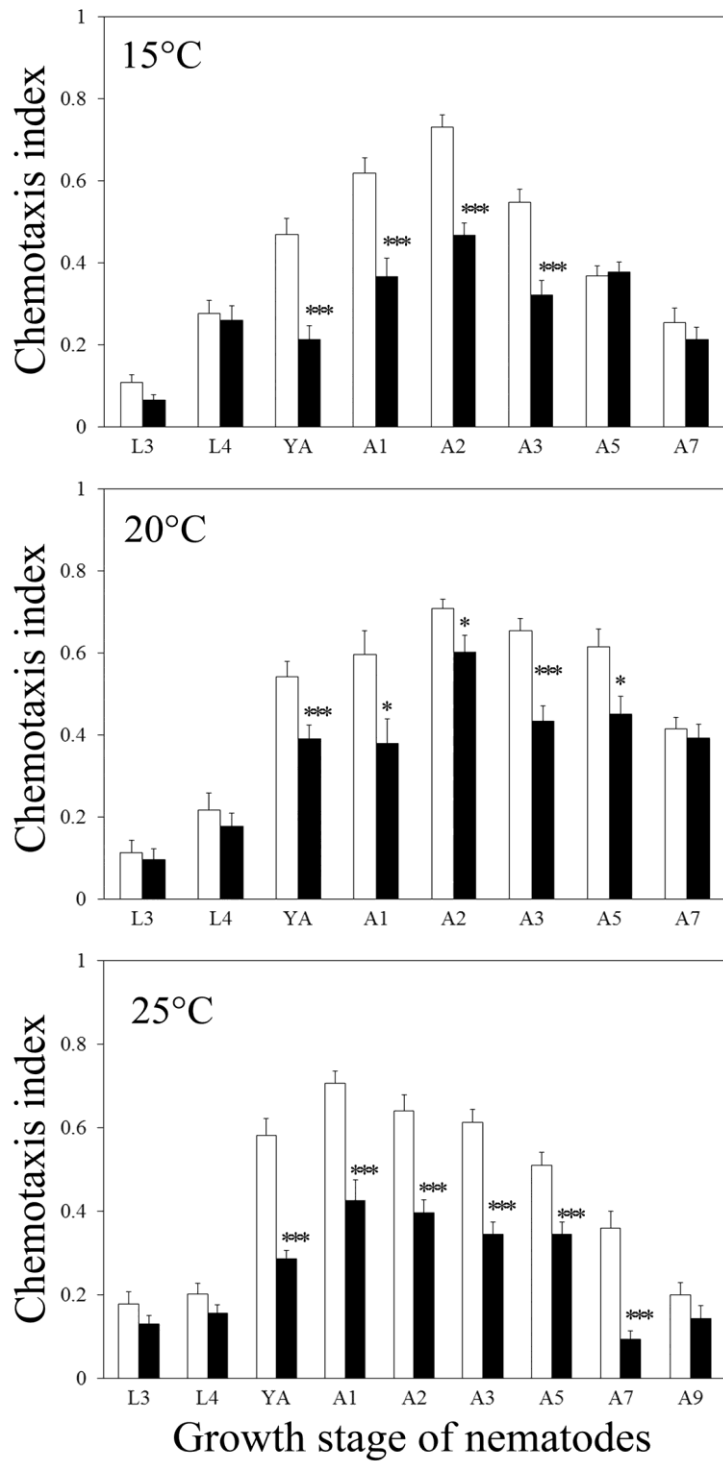


図 5. 15°C、20°C、25°C で飼育した野生型線虫のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸は各成長ステージを示している。どの飼育温度においても、ジアセチル順応は YA 期から成立し、15°C では A3 期、20°C では A5 期、25°C では A7 期まで順応が認められた。成立期間は飼育温度に依存することが明らかとなった。\* :  $P < 0.05$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

## 3-2. 活性酸素発生レベルの異なる変異体

### 3-2-1. 活性酸素発生レベルの低い変異体のジアセチル順応成立期間

活性酸素発生レベルの低い *isp-1* 変異体はミトコンドリア電子伝達系の複合体 III に変異を持つ酸素消費量が低下した長寿命変異体であり (Feng et al., 2001)、*clk-1* 変異体は電子伝達系を通じた活性酸素種の発生が低下している長寿命変異体である (Larsen and Clarke, 2002)。野生型線虫の実験結果より、ジアセチル順応は飼育温度に関係なく、YA 期から成立することが明らかとなっており (図 5)、*isp-1* および *clk-1* 変異体を 20°C で飼育した場合でも YA 期から成立が認められた (図 6)。それぞれの温度下で飼育したこれらの変異体が、どの成長ステージまでジアセチル順応を成立させることができるかについて解析した。

#### (1) *isp-1* 変異体の順応成立期間

卵の状態から 15°C で飼育した *isp-1* 変異体のジアセチル順応の成立期間について調査した。0.1%ジアセチル条件付け直後の、ジアセチル経験個体の 0.01%ジアセチルに対する誘引率の低下は A2 期まで確認され、A3 期では確認されなかった (図 7)。このことから、15°C で飼育した *isp-1* 変異体の順応の成立期間は YA から A2 期であるといえる。行動実験を開始した 90 分後の誘引率は、A2 期ではコントロール個体で  $0.57 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.42 \pm 0.04$  であり、ジアセチル経験個体が有意に低い値を示した ( $P < 0.01$ )。一方、A3 期の誘引率はコントロール個体で  $0.56 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.48 \pm 0.03$  であった。A2 および A3 期の行動開始領域に存在する個体の割合は、両個体群とも 0.1 以下を示し、ほとんどの個体が行動開始領域から移動していることがわかる。

*isp-1* 変異体を 20°C で飼育した場合には、ジアセチル順応は A3 期まで確認された。A3 期における 90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.30 \pm 0.03$ 、ジア

セチル経験個体で  $0.19 \pm 0.02$  であった ( $P < 0.05$ 、図 8 A3)。A5 期では順応は確認されず、コントロール個体で  $0.11 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.09 \pm 0.02$  であり、いずれも低い値を示した (図 8 A5)。領域外に存在する割合は、成長ステージに関わらず両個体群において高い値を示した (図 8、Other / Total)。

25°C で飼育した場合のジアセチル順応は A5 期まで確認され、A7 期では確認されなかった (図 9)。行動実験開始 90 分後の誘引率は、A5 期のコントロール個体で  $0.15 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.04 \pm 0.01$  であり、ジアセチル経験が有意に低い値を示した ( $P < 0.01$ )。A7 期における誘引率はコントロール個体で  $0.09 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.09 \pm 0.03$  であった。*isp-1* 変異体を 25°C で飼育した場合、20°C で飼育した場合と比較して順応の成立期間の延長が認められたが、15°C、20°C で飼育した場合と比べ、その誘引率は低い値を示した。行動開始領域に存在する個体の割合は、A5 および A7 期の変異体どちらの両個体群も 0.6 以上を示しており、行動開始領域からほとんど移動していないことが明らかとなった (図 9)。

## (2) *clk-1* 変異体の順応成立期間

卵の状態から各温度で飼育した *clk-1* 変異体のジアセチル順応の成立期間について調査した。15°C で飼育した場合、0.1%ジアセチル条件付け直後の、ジアセチル経験個体の 0.01%ジアセチルに対する誘引率の低下は A2 期まで確認され、A3 期では確認されなかった (図 10)。*isp-1* 変異体同様、15°C で成長した *clk-1* 変異体の順応の獲得が可能な期間は YA 期から A2 期であることが明らかとなっている。実験開始 90 分後の誘引率は、A2 期のコントロール個体で  $0.55 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.31 \pm 0.04$  であり、ジアセチル経験個体が有意に低い値を示した ( $P < 0.001$ )。A3 期における誘引率はコントロール個体で  $0.32 \pm 0.04$ 、

ジアセチル経験個体で  $0.31 \pm 0.03$  であった。A2 期の行動開始領域に存在する割合および領域外に存在する割合は、ジアセチル経験個体がコントロール個体よりも有意に高い値を示した ( $P < 0.001$ 、図 10 A2)。

20°C で飼育した場合、ジアセチル順応は A3 期まで確認され、A5 期では確認されなかった (図 11)。A3 期のジアセチル経験個体の誘引率は、実験開始からコントロールよりも有意に低下し、90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.61 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.33 \pm 0.04$  であった ( $P < 0.001$ )。行動開始領域および領域外に存在するジアセチル経験個体の割合はコントロール個体よりも有意に低い値を示した (図 11 A3)。順応が確認されなかった A5 期では、ジアセチル経験個体の誘引率がコントロールよりもわずかに低い値を示したが、有意な差は認められなかった。実験開始 90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.44 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.35 \pm 0.03$  であった。両個体群の行動開始領域および領域外に存在する割合においても有意な差は確認されなかった。

25°C で飼育した場合、*clk-1* 変異体のジアセチル順応は A5 期まで確認され、A7 期では確認されなかった (図 12)。A5 期ではジアセチル経験個体の有意な誘引率の低下が認められ、実験開始 90 分後ではコントロール個体で  $0.42 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.18 \pm 0.03$  であった ( $P < 0.001$ )。*clk-1* 変異体を 20°C で飼育した場合は A3 期までであったことから、25°C で飼育した場合では順応の獲得期間が延長していることが確認された。A7 期の両個体群の誘引率は同程度の値を示し、実験開始 90 分後ではコントロール個体で  $0.17 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.15 \pm 0.03$  であった。A5 期の行動開始領域に存在する割合は、ジアセチル経験個体が有意に高い値を示すが、実験開始 90 分後では両個体群とも 0.2 以下となり、多くの個体が行動開始領域から移動したことを示している。一方、A7 期における行動開始領域に存在する割合は、両個体群とも 0.4 以上を示し、

行動開始領域から移動しない個体が多いことを示した。

### 3-2-2. 活性酸素発生レベルの低い変異体のジアセチル順応成立期間のまとめ

活性酸素発生レベルの低い長寿命の *isp-1* 変異体および *clk-1* 変異体のジアセチル順応の獲得はいずれも YA 期から認められた。15°C で飼育した場合は A2 期まで、20°C では A3 期まで、25°C では A5 期まで順応の成立が確認された (図 13)。活性酸素発生レベルの低い変異体線虫の順応の成立期間が温度条件に比例して延長することが判明した。また、各温度で飼育した野生型線虫の順応成立期間と比べると、*isp-1* 変異体、*clk-1* 変異体の順応の獲得時期が、いずれの温度条件下においても短縮していることが認められた (図 5、13)。

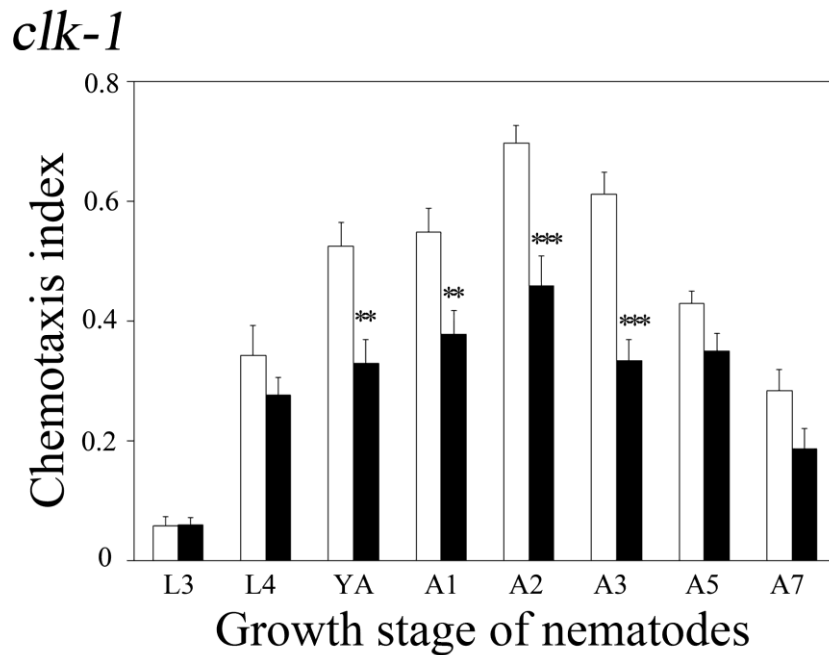
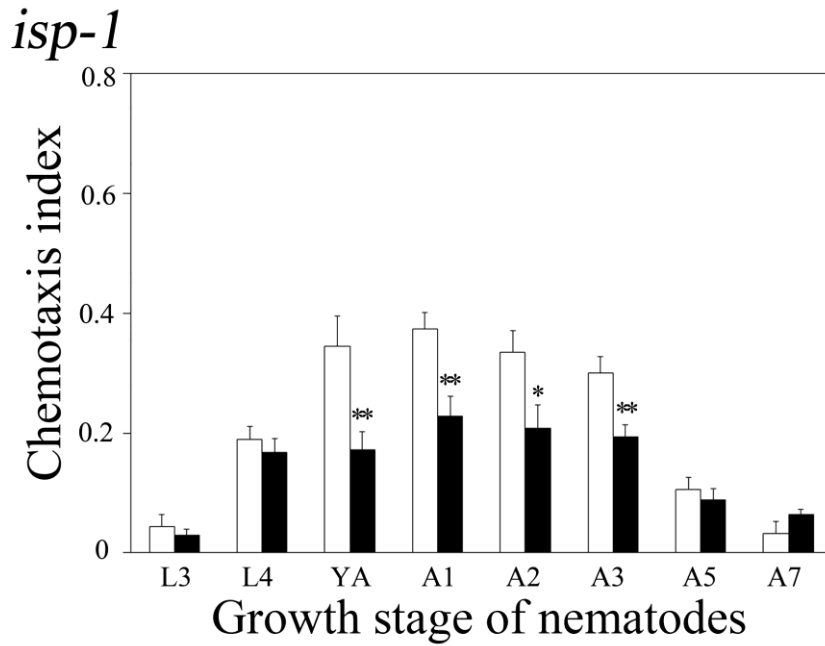


図 6. 20°C で飼育した長寿命変異体のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸は 20°C で飼育した場合の成長段階を示す。活性酸素発生レベルの低い長寿命の *isp-1* および *clk-1* 変異体を 20°C で飼育した場合、YA 期から順応の成立が可能となり、A3 期まで確認された。

\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

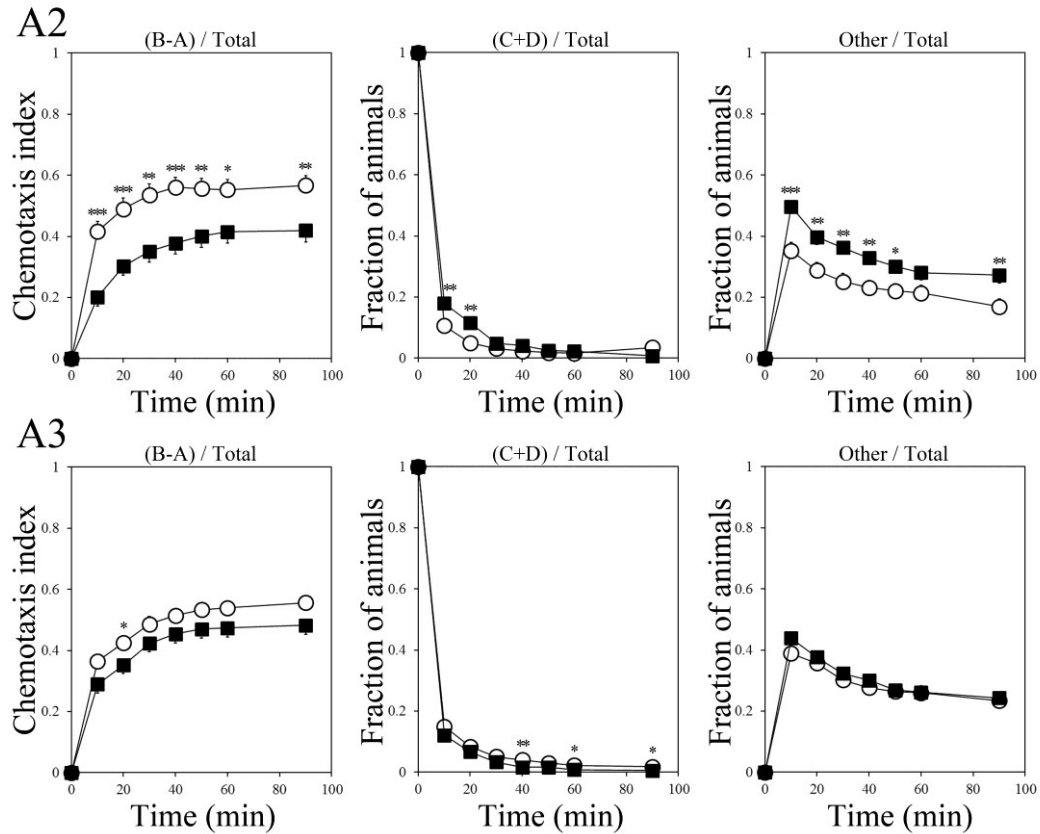


図7. 15°Cで飼育した *isp-1* 変異体における 0.1%ジアセチル経験後の 0.01%ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A2 期、下段は A3 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°Cで飼育した *isp-1* 変異体の A2 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。

A2 : n=16、A3 : n=24。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。



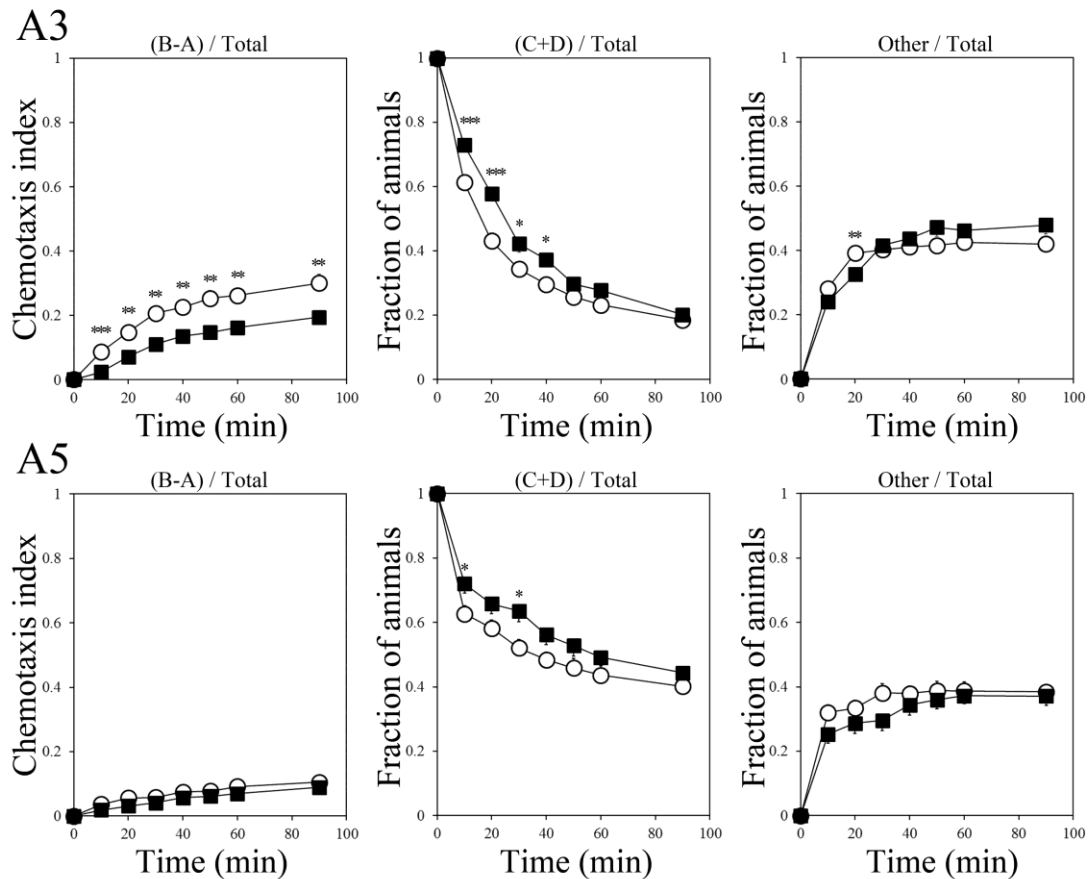


図 8. 20°C で飼育した *isp-1* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A3 期、下段は A5 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した *isp-1* 変異体の A3 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意低い値を示した。A3 : n=24, A5 : n=15。\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ 。

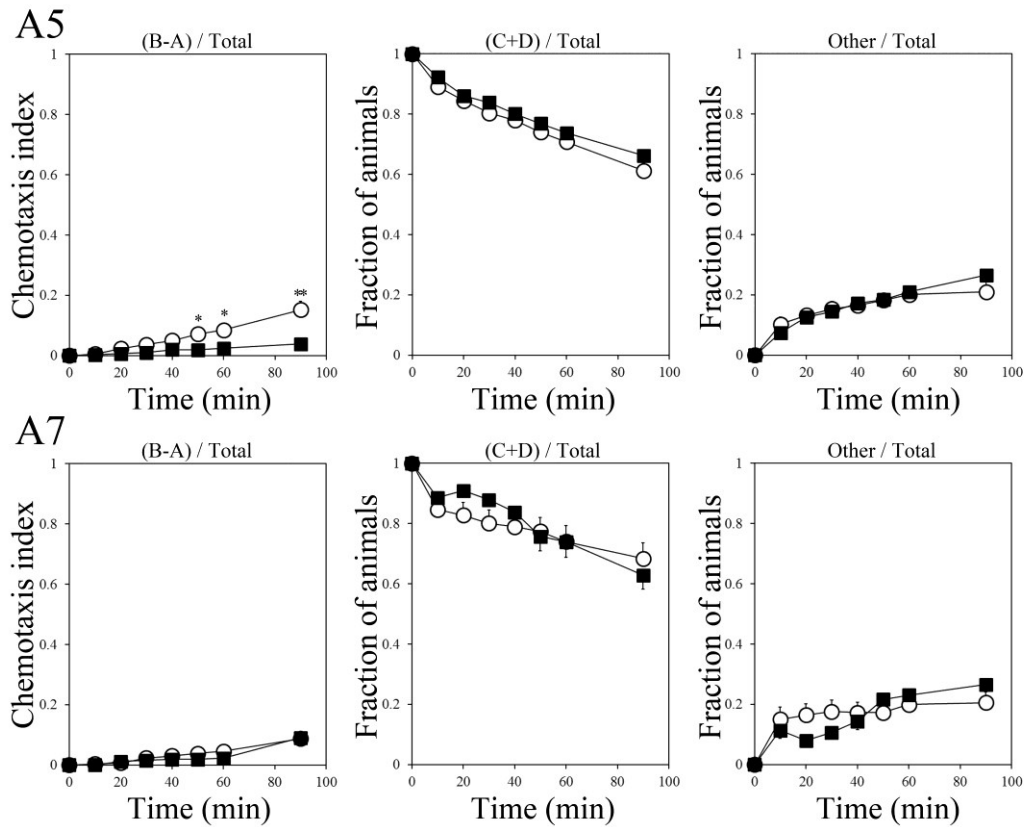


図9. 25°Cで飼育した *isp-1* 変異体における 0.1%ジアセチル経験後の 0.01%ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A5 期、下段は A7 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°Cで飼育した *isp-1* 変異体の A5 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。

A5 : n=12, A7 : n=12。\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ 。

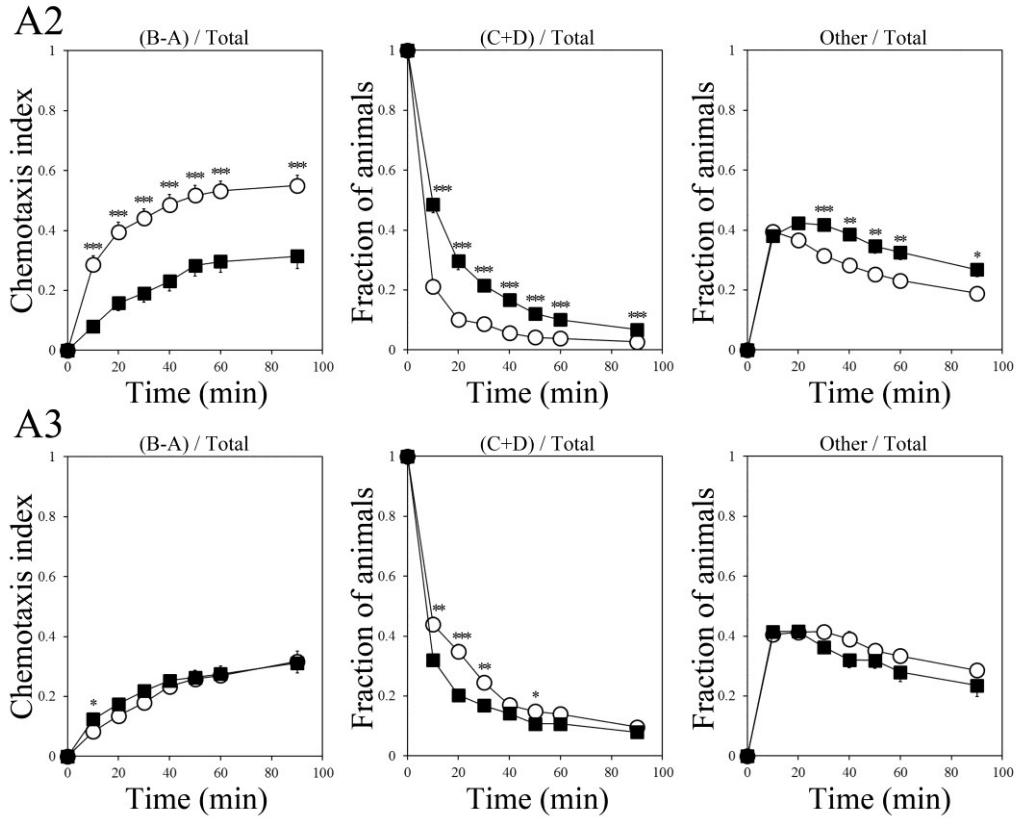


図 10. 15°C で飼育した *clk-1* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A2 期、下段は A3 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C で飼育した *clk-1* 変異体の A2 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。

A2 : n=21、A3 : n=22。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

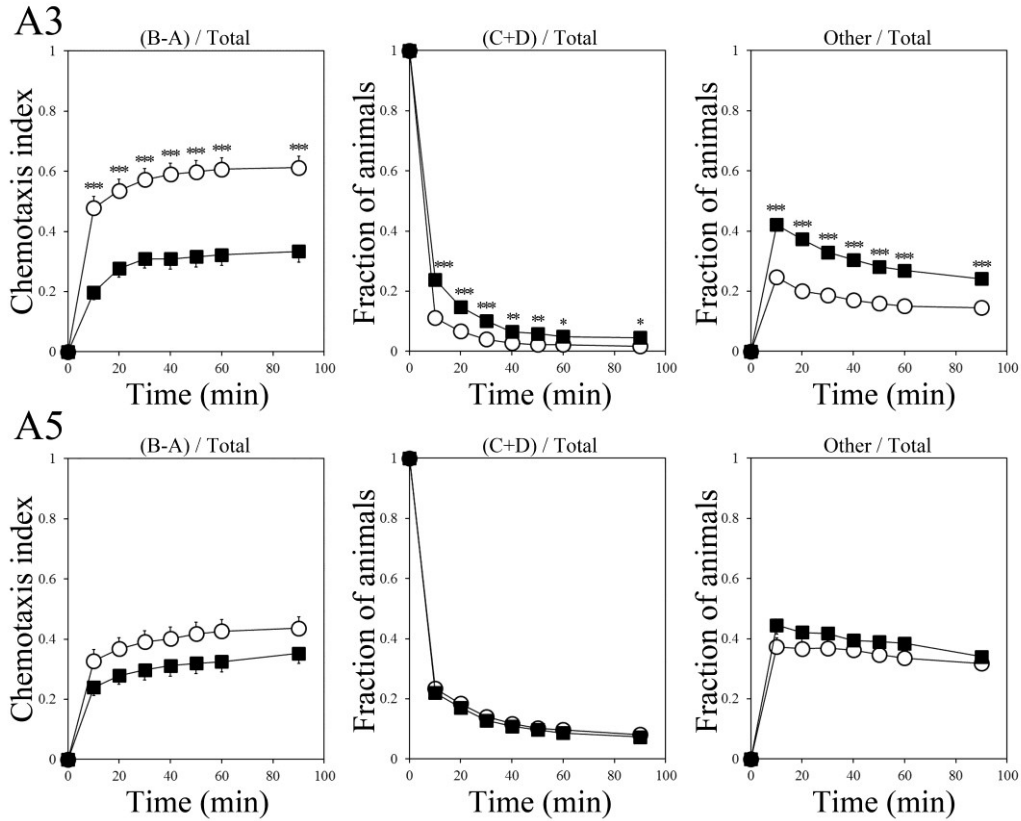


図 11. 20°C で飼育した *clk-1* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A3 期、下段は A5 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した *clk-1* 変異体の A3 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示す。A3 : n=33、A5 : n=27。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

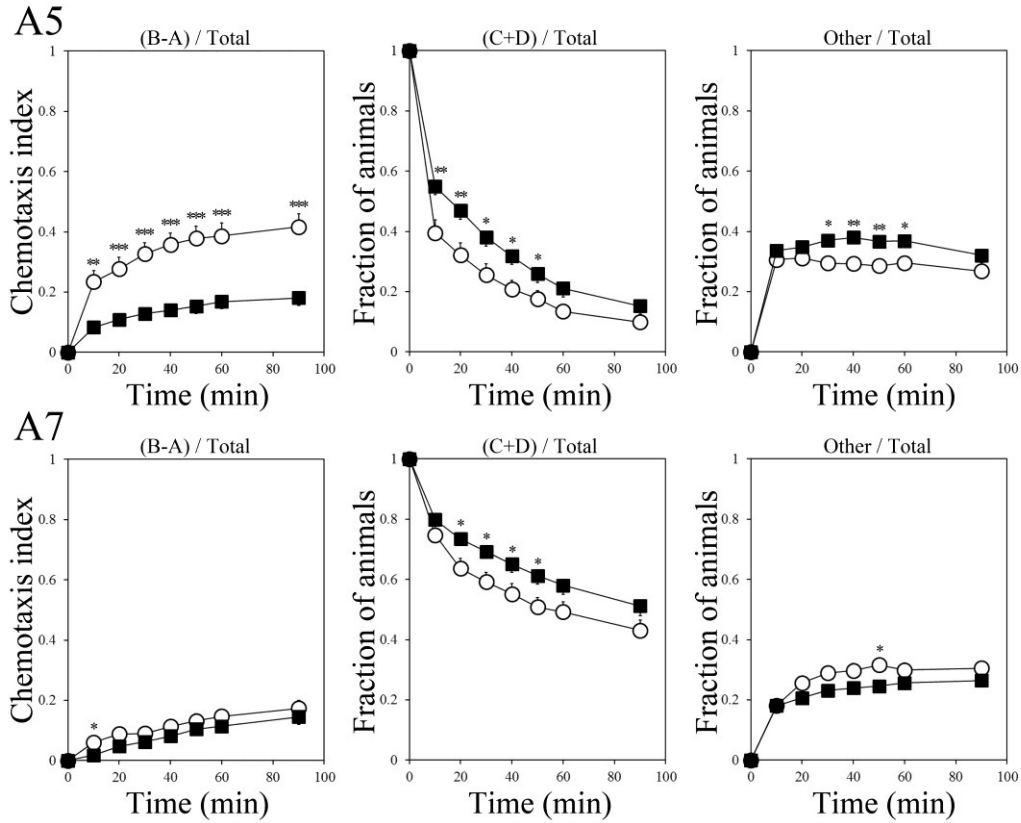


図 12. 25°C で飼育した *clk-1* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A5 期、下段は A7 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°C で飼育した *clk-1* 変異体の A5 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。

A5 : n=20、A7 : n=23。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

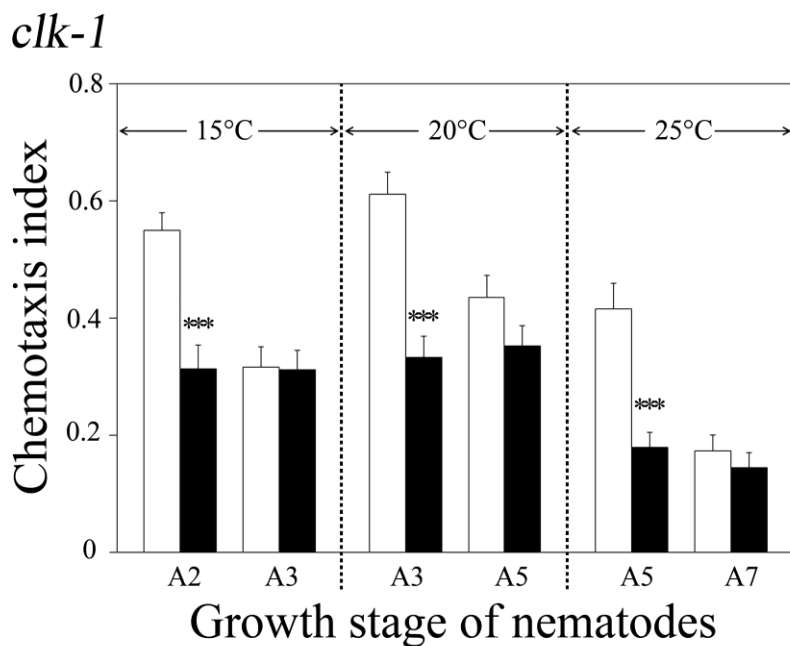
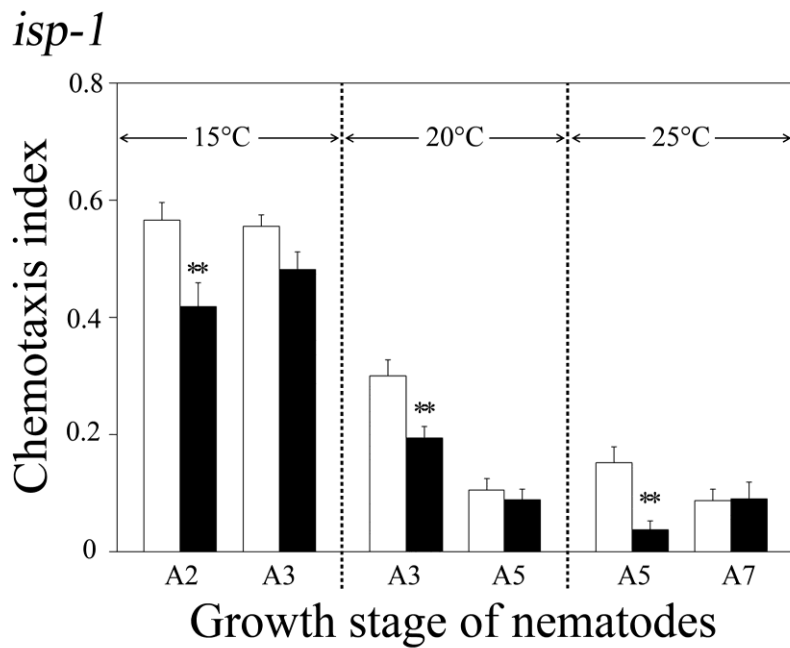


図 13. 15°C、20°C、25°C で飼育した長寿命変異体のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸はジアセチル順応が成立した成長ステージと成立が確認できなかったステージを示す。活性酸素発生レベルの低い長寿命の *isp-1* および *clk-1* 変異体を 15°C で飼育した場合には A2 期、20°C では A3 期、25°C では A5 期までジアセチル経験个体がコントロールよりも有意に低い値を示した。\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

### 3-2-3. 活性酸素発生レベルの高い変異体のジアセチル順応成立期間

活性酸素発生レベルの高い *gas-1* 変異体はミトコンドリア電子伝達系の複合体 I に、*mev-1* 変異体は複合体 II に変異をもち、野生型線虫よりも寿命の短い変異体として知られている (Honda et al., 1993; Ishii et al., 1998; Senoo-Matsuda et al., 2001)。 *gas-1* 変異体を通常の温度である 20°C で飼育した場合、野生型線虫と同様に YA 期からの順応獲得が確認された (図 14)。それぞれの温度下で飼育したこれらの変異体が、どの期間までジアセチル順応を獲得することができるか調査した。ここでは、順応獲得が認められた成長ステージと、認められなくなった成長ステージにおける反応について解析した。

#### (1) *gas-1* 変異体の順応成立期間

卵の状態から 15°C で飼育した *gas-1* 変異体のジアセチル順応の成立期間について調べた。0.1%ジアセチル条件付け直後の、ジアセチル経験個体の 0.01%ジアセチルに対する誘引率の有意な低下は A5 期まで確認された。A5 期における誘引率は実験開始からジアセチル経験個体の有意に低い値を示し、90 分後ではコントロール個体で  $0.25 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.11 \pm 0.02$  を示した ( $P < 0.001$ 、図 15 A5)。A7 期においては順応を確認できず、実験開始 90 分後の誘引率は、コントロール個体で  $0.23 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.21 \pm 0.02$  であった (図 15 A7)。両個体群の誘引率および行動開始領域の割合や領域外に存在する割合は同程度の値を示した (図 15 A7)。15°C 飼育における *gas-1* 変異体のジアセチル順応の成立期間は YA から A5 期であることが明らかとなった。また、15°C で飼育した *gas-1* 変異体の A5 期と A7 期の線虫は、行動開始領域から移動する個体が多い一方、領域外に存在する割合も多く、その値は 0.4 以上を示した (図 15 (C+D)/Total、Other/Total)。

20°C で飼育した場合、ジアセチル順応は A7 期まで確認され、A9 期では確認されなかった (図 16)。A7 期における誘引率は、実験開始からジアセチル経験個体がコントロール個体よりも有意に低い値を示し、90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.33 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.16 \pm 0.03$  を示した ( $P < 0.001$ 、図 16 A7)。A9 期の誘引率はコントロール個体で  $0.10 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.09 \pm 0.02$  を示し、有意な差は認められなかった (図 16 A9)。A9 期の *gas-1* 変異体は生存を確認したうえで実験を行っているが、行動開始領域に存在する割合は両個体群とも 0.6 以上を示し、ほとんどの個体が移動しないことが明らかである。

卵の状態から 25°C で飼育した *gas-1* 変異体のジアセチル順応は、A7 期まで確認され、A9 期では順応の成立は認められなかった (図 17)。*gas-1* 変異体を 20°C で飼育した場合と同じ順応の成立期間を示したが、誘引率はどちらの個体群も 20°C で飼育した場合と比較して低下した。実験開始 90 分後の誘引率は、A7 期ではコントロール個体で  $0.14 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.06 \pm 0.01$  を示し ( $P < 0.05$ )、A9 期ではコントロール個体で  $0.04 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.04 \pm 0.01$  であった。また、A7 期、A9 期どちらも行動開始領域に存在する個体数が多く、行動開始領域内からほとんど移動しないことがわかる。*gas-1* 変異体の活性酸素発生レベルは高く、野生型線虫よりも寿命が短い。高温での飼育は代謝速度が増すため、活性酸素の発生レベルもより高くなる。過剰な活性酸素は細胞へのダメージを与えるため、*gas-1* 変異体の運動等に影響が生じ、20°C で飼育した場合と比較して誘引率が減少したものと考えられる。

## (2) *mev-1* 変異体の順応成立期間

卵の状態から各温度で飼育した *mev-1* 変異体のジアセチル順応の成立期間に



ついて調査した。15°Cで飼育した場合、*mev-1*変異体のジアセチル順応はA5期まで確認され、A7期では確認されなかった(図18)。A5期における実験開始90分後の誘引率は、コントロール個体で $0.020 \pm 0.004$ 、ジアセチル経験個体で $0.005 \pm 0.002$ であり、ジアセチル経験個体が有意に低い値を示した( $P < 0.01$ )。A7期の誘引率はコントロールで $0.008 \pm 0.005$ 、ジアセチル経験個体で $0.008 \pm 0.004$ であった。*mev-1*変異体は、他の線虫と比べて運動量が著しく低い線虫である。そのため行動開始領域に存在する線虫の割合は、A5期のコントロール個体で $0.88 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で $0.90 \pm 0.01$ 、A7期のコントロールで $0.86 \pm 0.01$ 、ジアセチル経験個体で $0.87 \pm 0.01$ であった。多くの個体が行動開始領域内に留まっていることが明らかである。

20°Cで飼育した場合、ジアセチル順応はA7期まで確認された。実験中を通してジアセチル経験個体の誘引率はコントロールよりも有意に低い値を示し、実験開始90分後においてはコントロール個体で $0.062 \pm 0.009$ 、ジアセチル経験個体で $0.018 \pm 0.005$ であった( $P < 0.001$ 、図19A7)。実験開始10分においてジアセチル経験個体の誘引率が負の値を示したが、これは実験プレートのコントロール領域(A)に入った個体の数がジアセチル滴下領域(B)よりも多かったためである。行動開始領域に存在する割合はコントロール個体が有意に低い値を示し、実験開始90分後の割合はコントロール個体で $0.69 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で $0.78 \pm 0.01$ であった。他の飼育温度条件下の*mev-1*変異体と比較し、移動した個体数が多かったものと考えられる。A9期ではジアセチル順応の獲得は確認されず、実験開始90分後における誘引率はコントロール個体で $0.021 \pm 0.006$ 、ジアセチル経験個体で $0.025 \pm 0.005$ であった(図19A9)。行動開始領域に存在する割合は、どちらの個体群も0.8以上を示し、多くの個体が行動開始領域内に留まっていることが明らかとなった。

25°Cで飼育した場合、ジアセチル順応はA7期まで確認され、A9期では確認されなかった(図20)。A7期の実験開始90分後の誘引率は、コントロール個体で $0.024 \pm 0.006$ 、ジアセチル経験個体で $0.005 \pm 0.003$ を示し( $P < 0.01$ )、A9期ではコントロール個体で $0.003 \pm 0.003$ 、ジアセチル経験個体で $0.007 \pm 0.004$ を示した。行動開始領域に存在する割合は、A7およびA9期の両個体群とも0.9以上を示した。生存は確認できるが、行動開始領域外へ移動する個体は少なかった。同じ活性酸素発生レベルの高い*gas-1*変異体は、野生型線虫や*isp-1*変異体、*clk-1*変異体のように十分な運動を示すが、*mev-1*変異体の多くの個体は実験開始領域に留まり、サインカーブやオメガターンのような運動をほとんど示さない。そのため、誘引率が顕著に低い値を示したものと考えられる。

#### 3-2-4. 活性酸素発生レベルの高い変異体のジアセチル順応成立期間のまとめ

活性酸素発生レベルの高い*gas-1*、*mev-1*変異体のジアセチル順応の成立は、いずれもYA期から確認され、15°Cで飼育した場合A5期まで、20°Cと25°CではA7期まで確認された(図21)。野生型線虫ではそれぞれ、15°CではA3期、20°CではA5期、25°CではA7期であり(図5)、活性酸素発生レベルの高い*gas-1*や*mev-1*変異体線虫では、15°Cと20°Cで飼育した場合に順応成立期間の延長が認められた。これら変異体は活性酸素の発生レベルが高い変異体である。過度な活性酸素は線虫の生体内に害を及ぼす可能性があることから、25°Cで飼育した場合、*gas-1*、*mev-1*変異体の代謝速度が増し、それにとまなう活性酸素が過剰に発生した可能性がある。この過剰な活性酸素が、ジアセチルに対する順応の獲得に影響したものと考えられる。

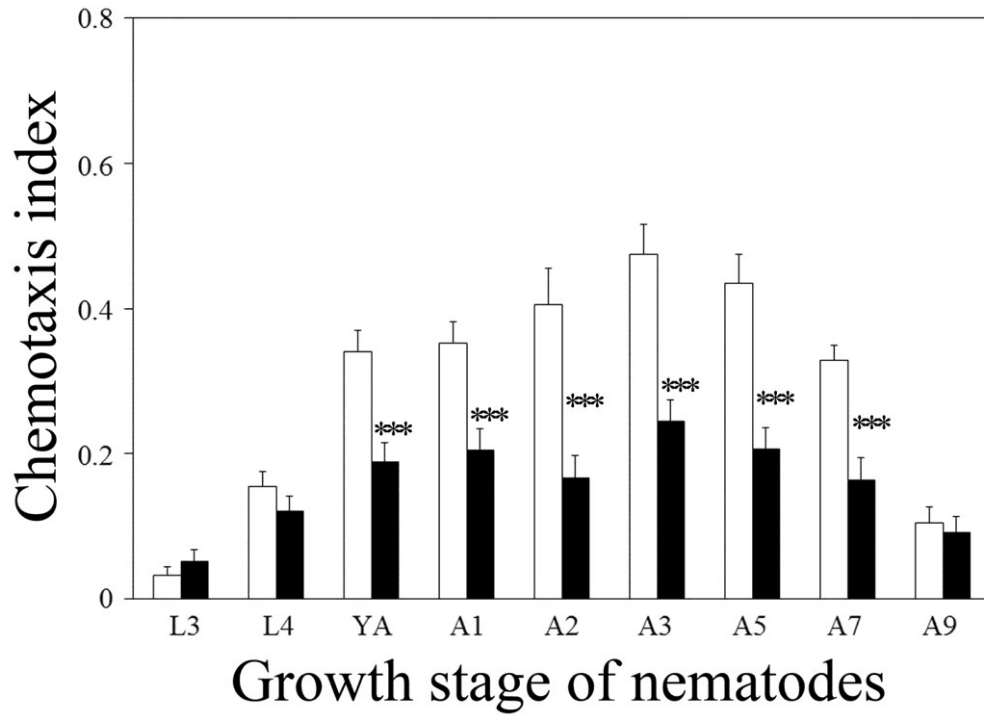


図 14. 20°C で飼育した短寿命 *gas-1* 変異体のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸は 20°C で飼育した場合の成長段階を示す。活性酸素発生レベルの低い長寿命の *gas-1* 変異体を 20°C で飼育した場合、YA 期から順応の成立が可能となり、A7 期まで確認された。  
 \*\*\* :  $P < 0.001$ 。

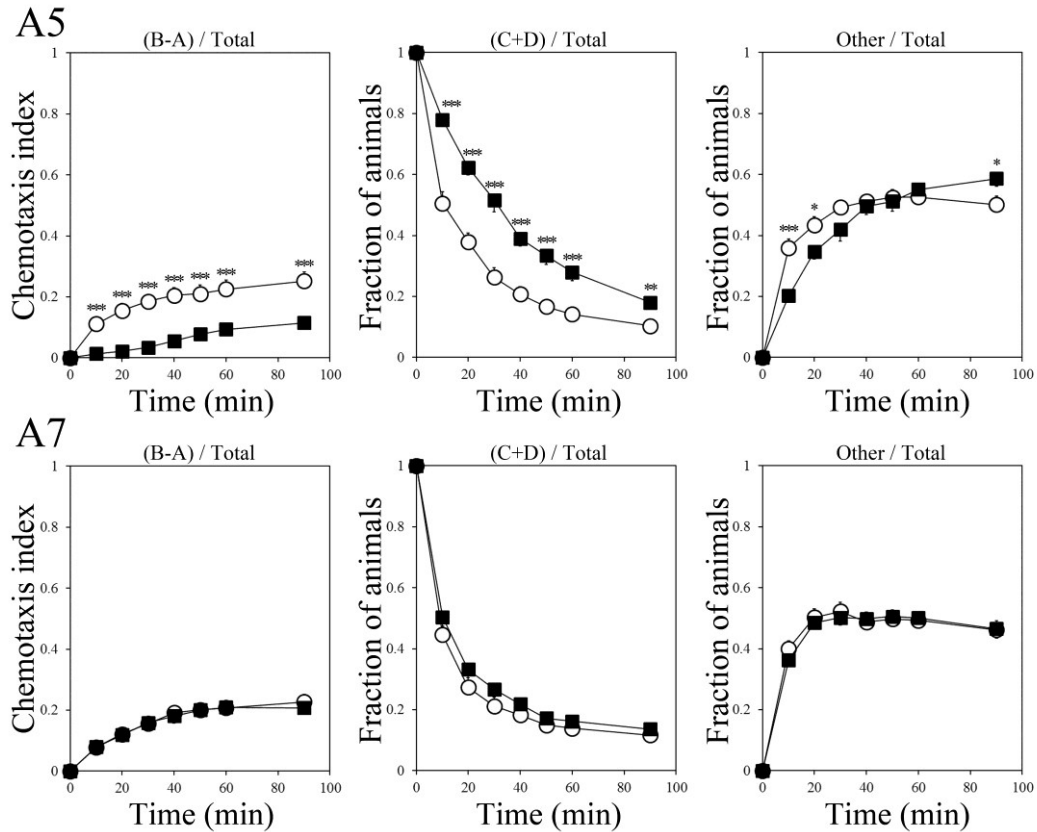


図 15. 15°C で飼育した *gas-1* 変異体における 0.1%ジアセチル経験後の 0.01%ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A5 期、下段は A7 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C で飼育した *gas-1* 変異体の A5 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A5 : n=18、A7 : n=17。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

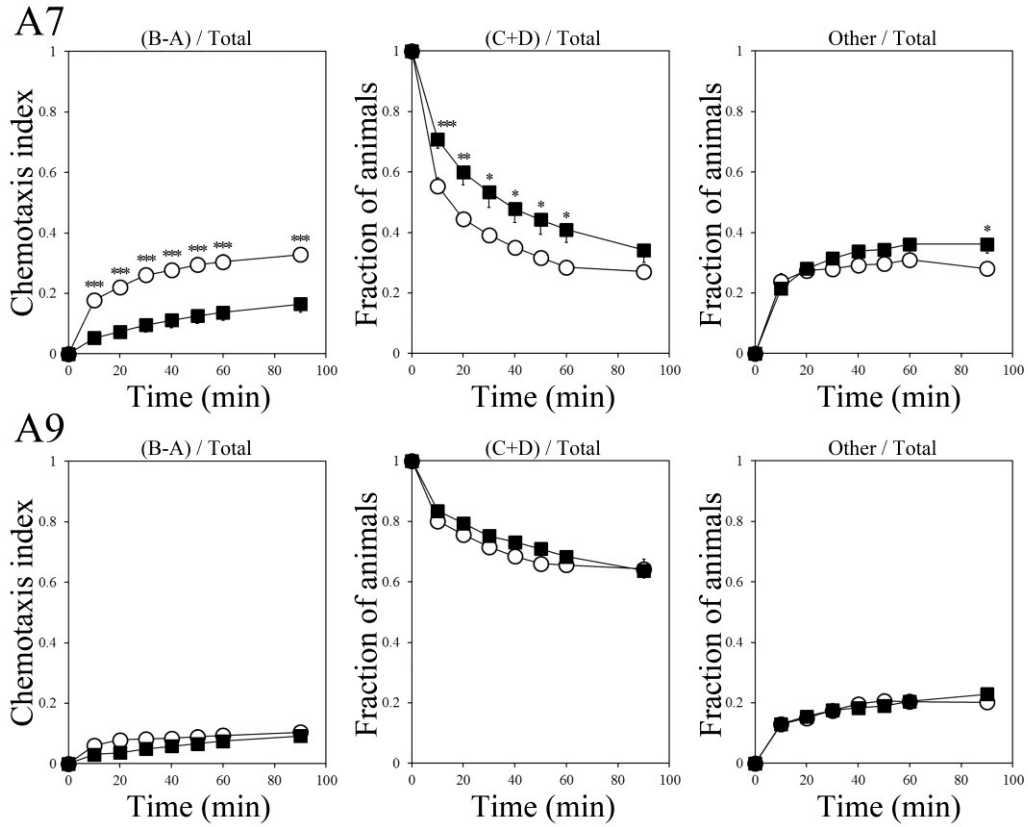


図 16. 20°C で飼育した *gas-1* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A7 期、下段は A9 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した *gas-1* 変異体の A7 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A7 : n=16、A9 : n=19。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

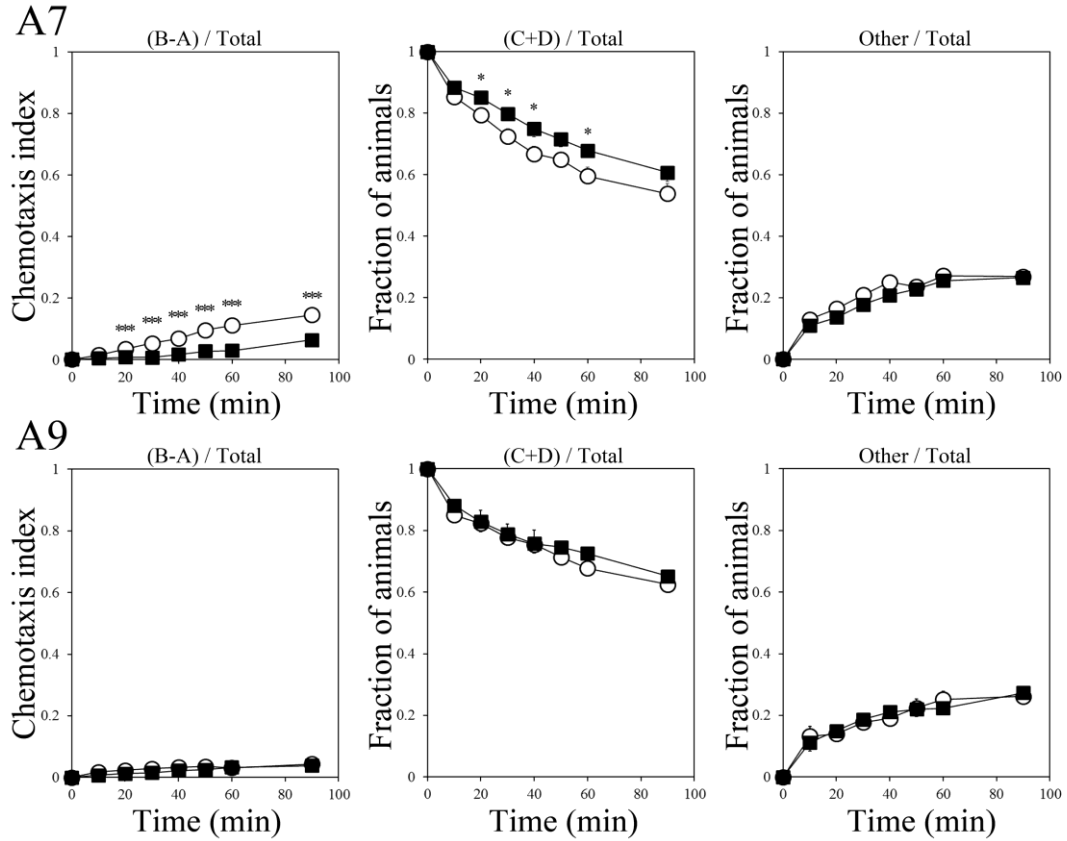


図 17. 25°C で飼育した *gas-1* 変異体における 0.1%ジアセチル経験後の 0.01%ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A7 期、下段は A9 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°C で飼育した *gas-1* 変異体の A7 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A7 : n=31、A9 : n=15。\* :  $P < 0.05$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

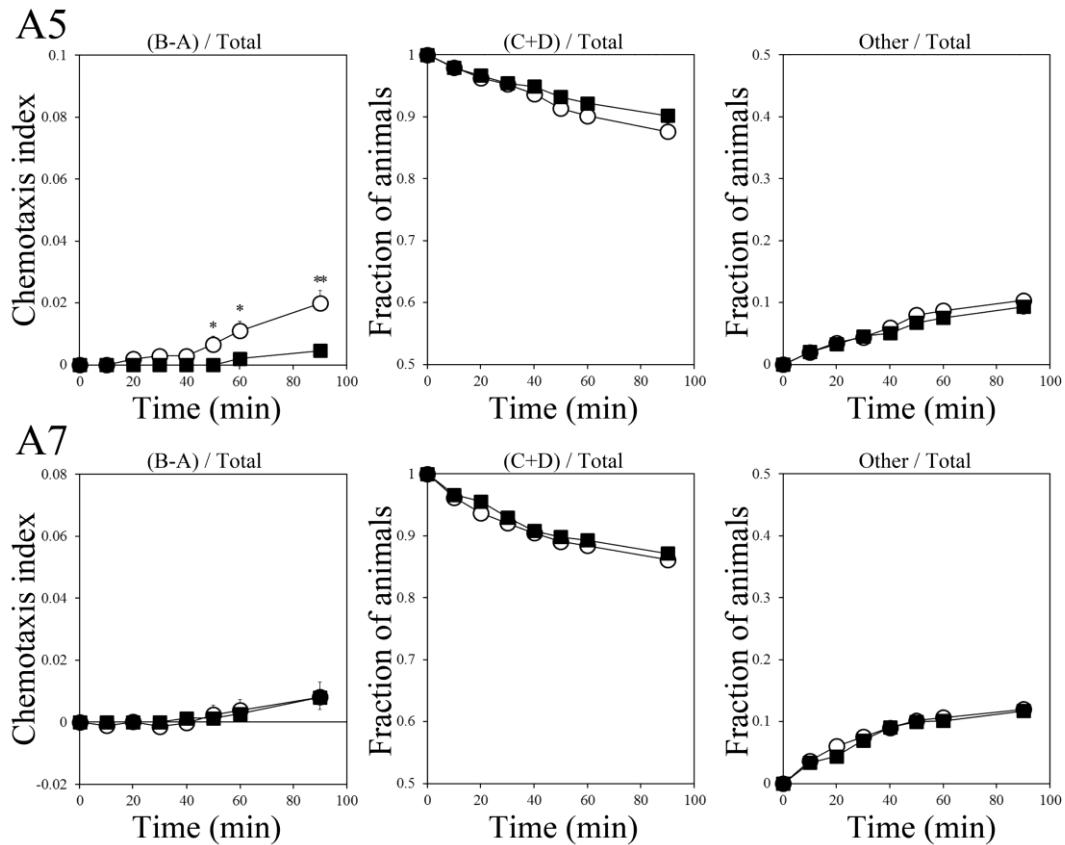


図 18. 15°C で飼育した *mev-1* 変異体における 0.1%ジアセチル経験後の 0.01%ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A5 期、下段は A7 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群を示す。15°C で飼育した *mev-1* 変異体の A5 期におけるジアセチル経験个体の誘引率は、コントロール个体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A5 : n=43、A7 : n=33。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

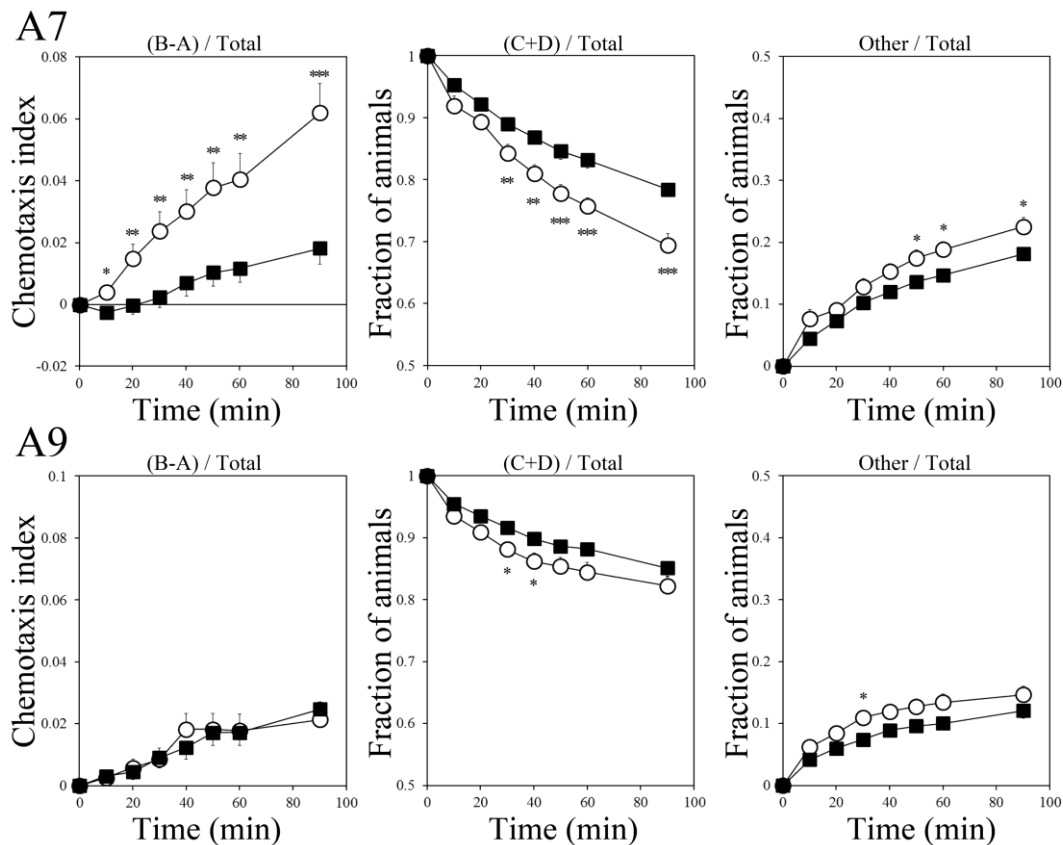


図 19. 20°C で飼育した *mev-1* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A7 期、下段は A9 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群を示す。20°C で飼育した *mev-1* 変異体の A7 期におけるジアセチル経験个体の誘引率は、コントロール个体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A7 : n=34、A9 : n=30。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。



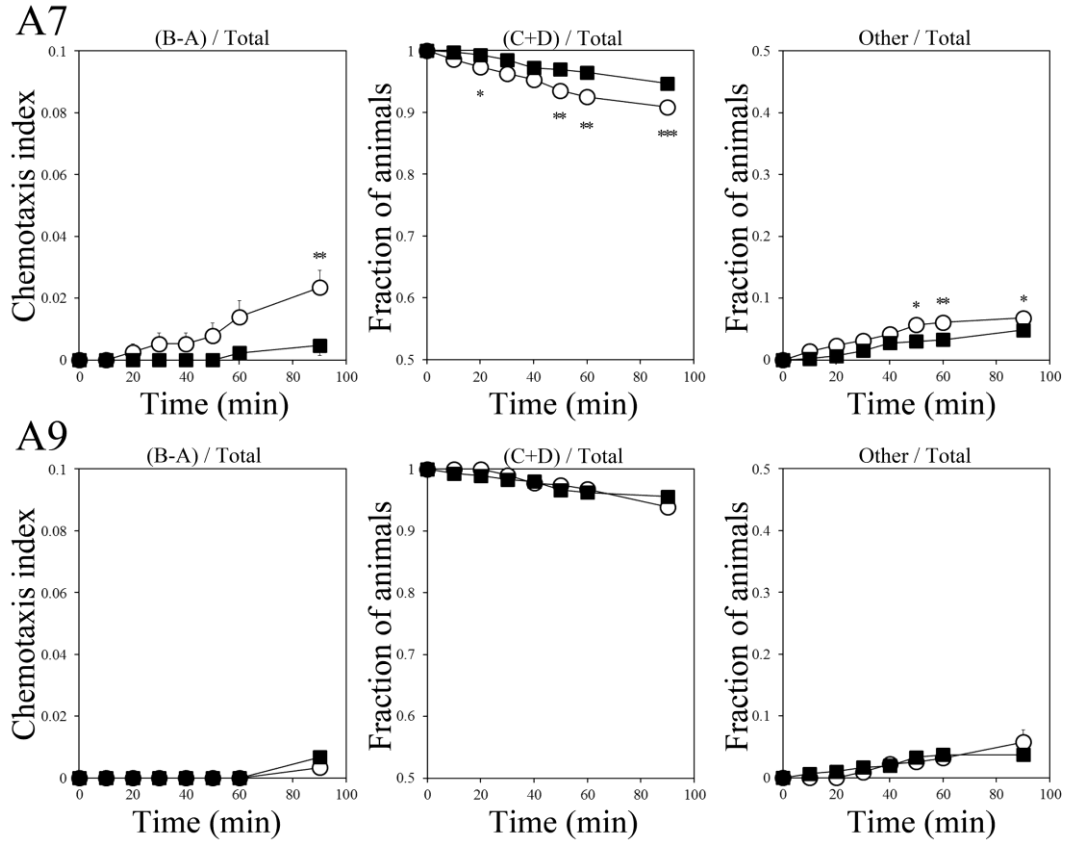


図 20. 25°C で飼育した *mev-1* 変異体における 0.1%ジアセチル経験後の 0.01%ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A7 期、下段は A9 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群を示す。25°C で飼育した *mev-1* 変異体の A7 期におけるジアセチル経験个体の誘引率は、コントロール个体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A7 : n=18、A9 : n=14。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

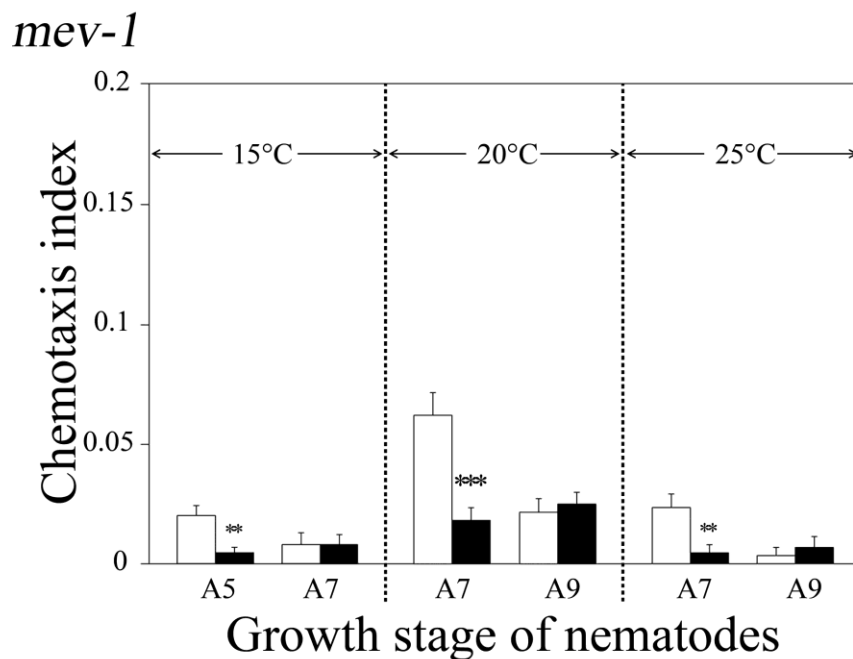
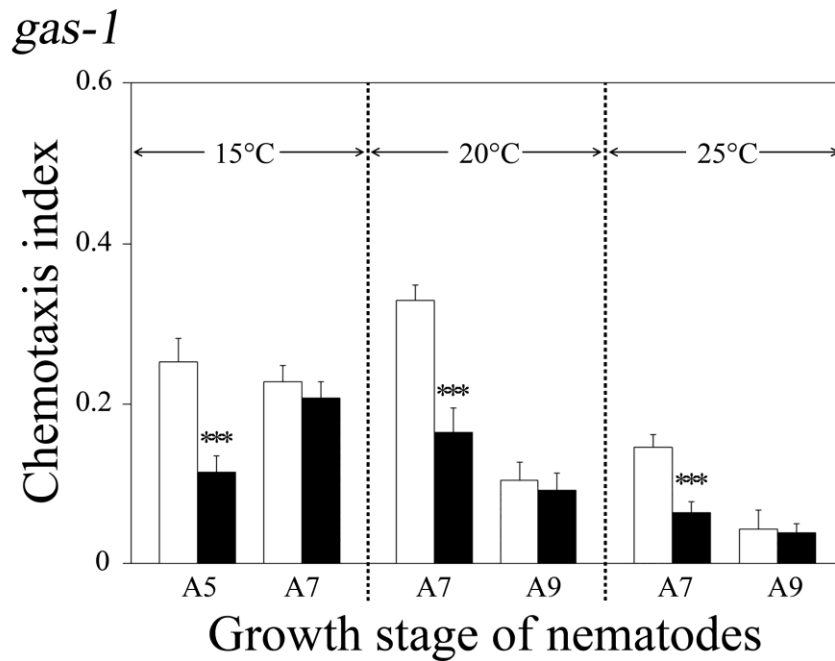


図 21. 15°C、20°C、25°C で飼育した短寿命変異体のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸は成長ステージを示す。活性酸素発生レベルの高い短寿命の *gas-1* および *mev-1* 変異体を 15°C で飼育した場合には A5 期まで、20°C および 25°C では A7 期まで、ジアセチル経験個体の誘引率がコントロール個体のそれと比べ有意に低い値を示した。 \*\*:  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

### 3-3. 抗酸化剤による影響

抗酸化剤  $\alpha$ -LA を含む NGM プレート上で野生型線虫を卵の状態から 15°C、20°C、25°C の温度条件下で飼育した。線虫のジアセチル順応の成立期間に与える  $\alpha$ -LA の影響について、これまでの実験と同様、各成長ステージまで飼育した線虫に 0.1%ジアセチルを 120 分間経験させ、その後、0.01%ジアセチルに対する反応を解析した。L3、L4、YA 期までの成長段階の判断は目視で確認しており、YA 期以降からは 1 日毎に A1、A2...とした。 $\alpha$ -LA を含む NGM プレート上で飼育した場合でも、順応の成立は YA 期から成立を示す (図 22)。15°C、25°C の飼育温度条件下における順応の成立について調査した。

#### 3-3-1. 抗酸化剤による野生型線虫の飼育温度別における順応成立期間

##### (1) 15°C で飼育した場合

$\alpha$ -LA を含む NGM プレート上において、卵の状態から 15°C で飼育した野生型線虫のジアセチル順応は A2 期まで認められ、A3 期では確認されなかった。それぞれの実験開始 90 分後の誘引率は、A2 期のコントロール個体で  $0.68 \pm 0.05$ 、ジアセチル経験個体で  $0.39 \pm 0.04$  ( $P < 0.001$ )、A3 期のコントロール個体で  $0.54 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.48 \pm 0.04$  であった (図 23)。A2 期では、実験中を通してジアセチル経験個体の誘引率がコントロールよりも有意に低下した (図 23 A2)。行動開始領域および領域外に存在する割合もコントロール個体が有意に低い値を示し、ジアセチル経験個体よりも移動が活発であることがわかる (図 23 A2)。A3 期の誘引率では、実験開始からジアセチル経験個体がわずかに低い値を示したが、有意な差は認められなかった (図 23 A3)。実験開始 90 分後における行動開始領域および領域外に存在する割合は両個体群とも同程度の値を示した (図 23 A3)。

## (2) 20°C で飼育した場合

$\alpha$ -LA を含む NGM プレート上で、卵の状態から 20°C の温度で飼育した野生型線虫のジアセチル順応の成立は、これまでと同様、YA 期から認められた (図 24)。順応の成立は A3 期まで認められ、A5 期では認められなかった。それぞれの実験開始 90 分後の誘引率は A3 期ではコントロール個体で  $0.70 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.61 \pm 0.04$  であり ( $P < 0.001$ 、図 24 A3)、A5 期ではコントロール個体で  $0.70 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.67 \pm 0.03$  であった (図 24 A5)。行動開始領域に存在する割合は、A3 期、A5 期の線虫どちらも 0.1 以下を示し、ほとんどの個体が行動開始領域内から移動していることが明らかとなった。

## (3) 25°C で飼育した場合

$\alpha$ -LA を含む NGM プレート上で、25°C の温度で飼育した野生型線虫のジアセチル順応の成立は A5 期まで認められ、A7 期では認められなかった (図 25)。A5 期の線虫では実験開始からジアセチル経験個体の誘引率がコントロール個体よりもわずかに低い値を示し、90 分後において有意な差が確認された。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.51 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.35 \pm 0.04$  であった ( $P < 0.01$ 、図 25 A5)。A7 期における誘引率はコントロール個体で  $0.56 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.52 \pm 0.05$  であり、有意差は認められなかった (図 25 A7)。 $\alpha$ -LA を含むプレートにおいて、20°C で飼育した線虫の順応の獲得時期は A3 期までであったことから、25°C における A5 期の順応の獲得は、温度の上昇にともなう順応成立期間の延長を示している。

### 3-3-2. 抗酸化剤による野生型線虫のジアセチル順応成立期間のまとめ

抗酸化剤  $\alpha$ -LA を含む NGM プレートで飼育した野生型線虫のジアセチル順応

の成立期間は、15°Cで飼育した場合 A2 期まで、20°Cでは A3 期まで、25°Cでは A5 期まで確認された (図 26)。通常の NGM プレートで飼育した野生型線虫は、15°Cで A3 期まで、20°Cで A5 期まで、25°Cで A7 期まで順応の成立が認められた (図 5)。以上の結果より、 $\alpha$ -LA を含む NGM プレートで飼育することによる順応成立期間の短縮が明らかとなった。また、 $\alpha$ -LA を用いた実験においても、温度に依存した順応成立期間の延長が認められた。野生型線虫や活性酸素発生レベルの異なる変異体では、順応の成立が確認できなかった成長ステージのコントロール個体の誘引率が、順応が成立したコントロール個体のそれと比較して低い値を示した (図 5、13、21)。一方、 $\alpha$ -LA を用いた場合、それぞれの成長ステージにおけるコントロール個体の誘引率に大きな変化は認められなかった。 $\alpha$ -LA は老化の原因となる細胞の酸化ダメージを抑制する働きがある。そのため、加齢による運動の低下を抑制した可能性が考えられる。

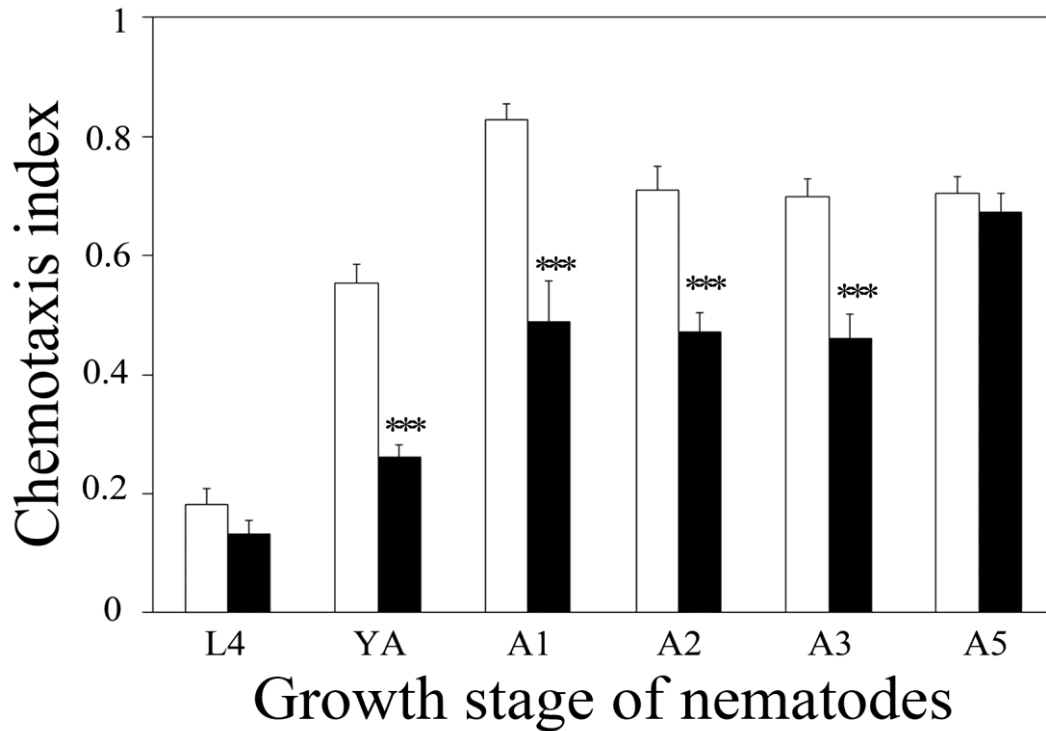


図 22.  $\alpha$ -LA を含む NGM プレート上において 20°C で飼育した野生型線虫のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸は 20°C で飼育した場合の成長段階を示す。 $\alpha$ -LA が存在する培地で飼育した野生型線虫においても、YA 期から順応の成立が可能となり、A3 期まで順応が確認された。\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

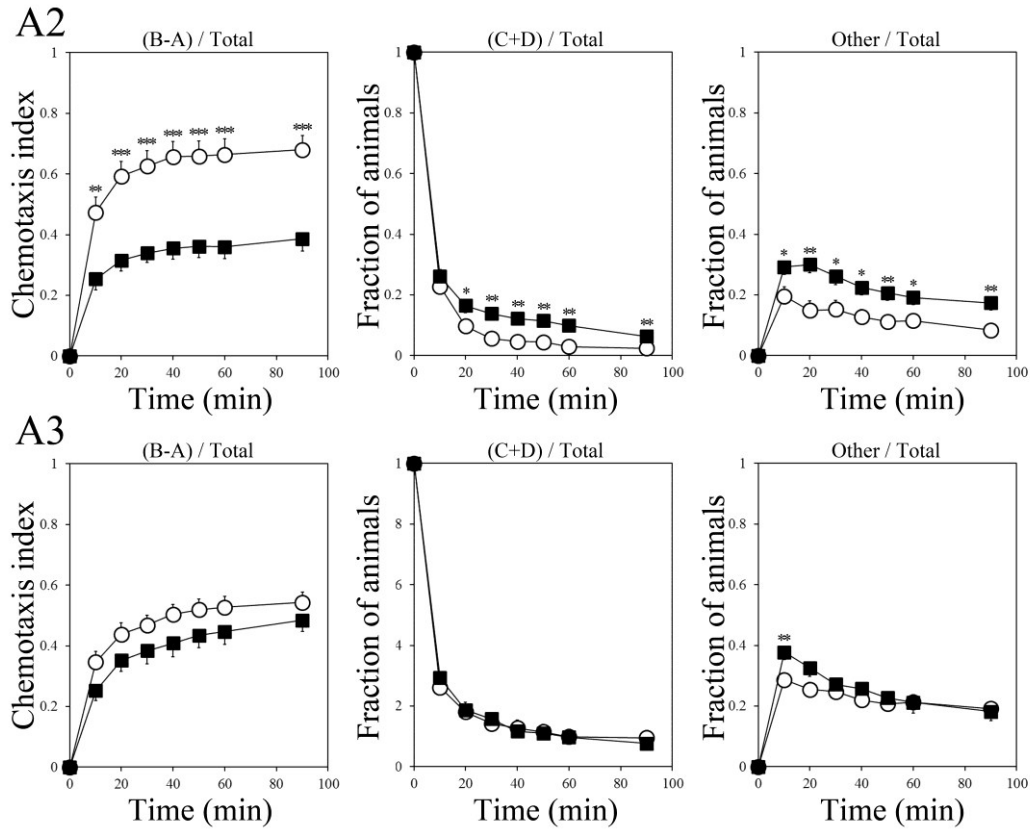


図 23.  $\alpha$ -LA を含む NGM プレート上において 15°C で飼育した野生型線虫の 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A2 期、下段は A3 期の線虫であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。 $\alpha$ -LA 存在の下、15°C で飼育した野生型線虫の A2 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A2 : n=16、A3 : n=16。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

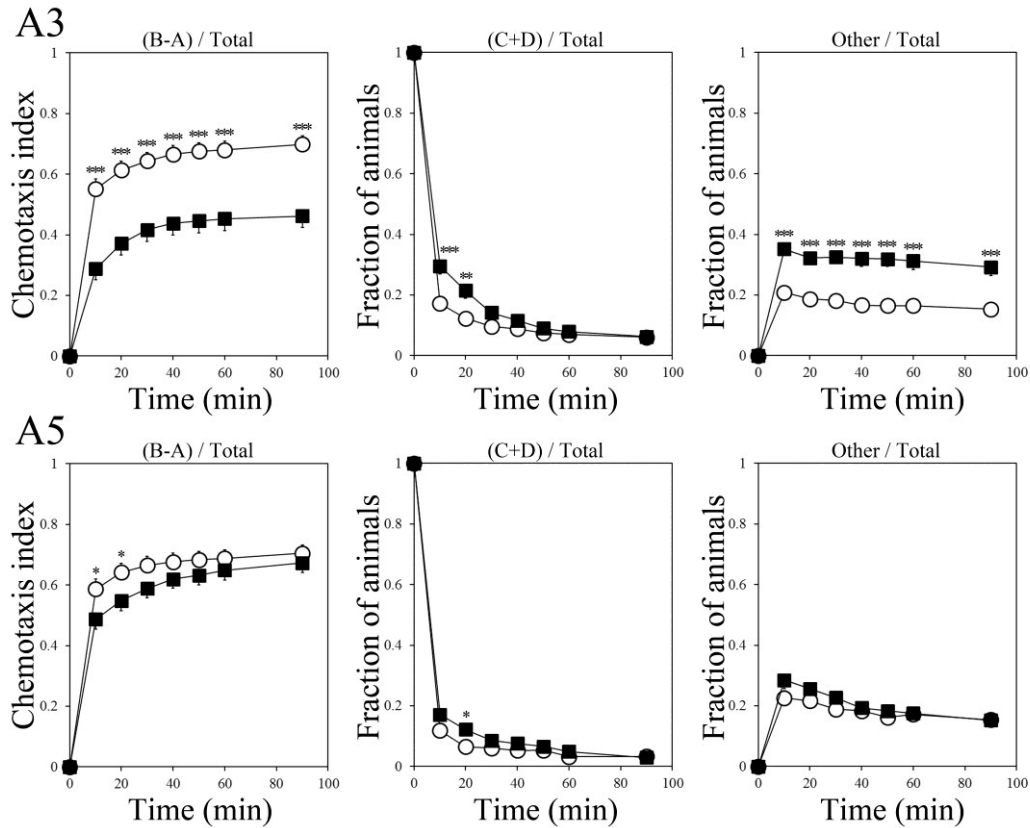


図 24.  $\alpha$ -LA を含む NGM プレート上において 20°C で飼育した野生型線虫の 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A3 期、下段は A5 期の線虫であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。 $\alpha$ -LA 存在の下、20°C で飼育した野生型線虫の A3 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A3 : n=23、A5 : n=25。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。



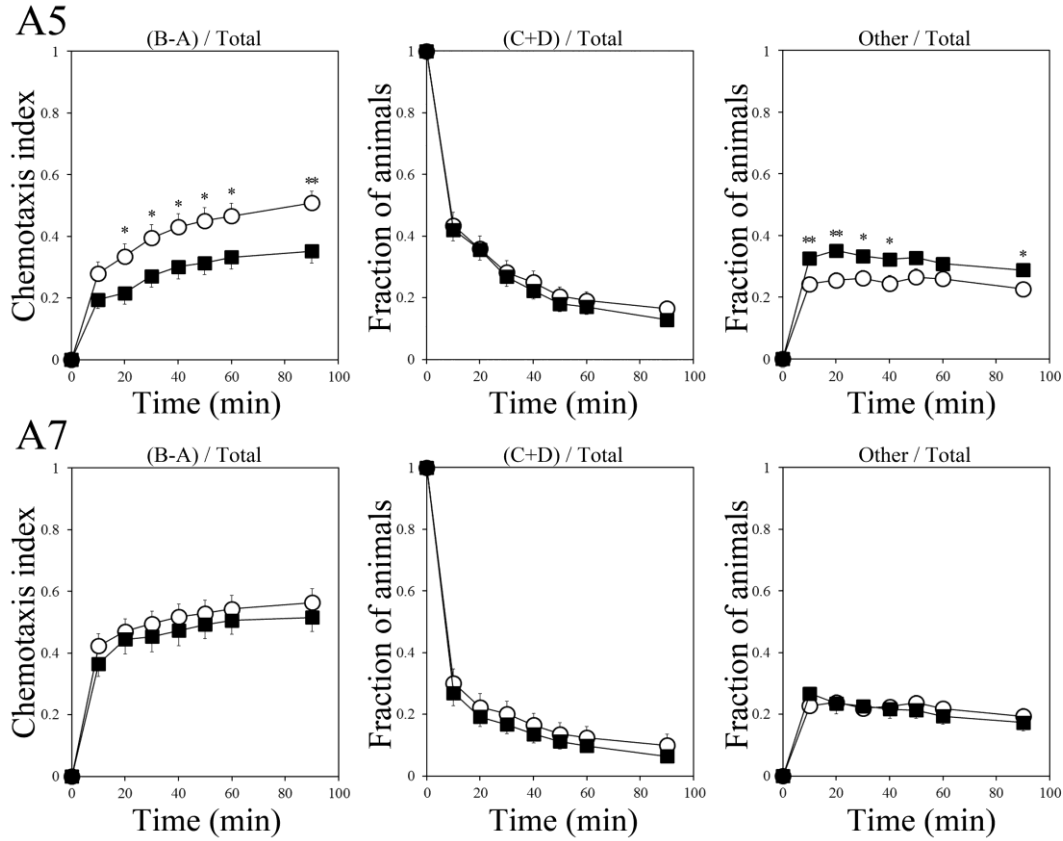


図 25.  $\alpha$ -LA を含む NGM プレート上において 25°C で飼育した野生型線虫の 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A5 期、下段は A7 期の線虫であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。 $\alpha$ -LA 存在の下、25°C で飼育した野生型線虫の A5 期における間でジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体と比較し、有意に低い値を示した。A5 : n=24、A7 : n=20。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

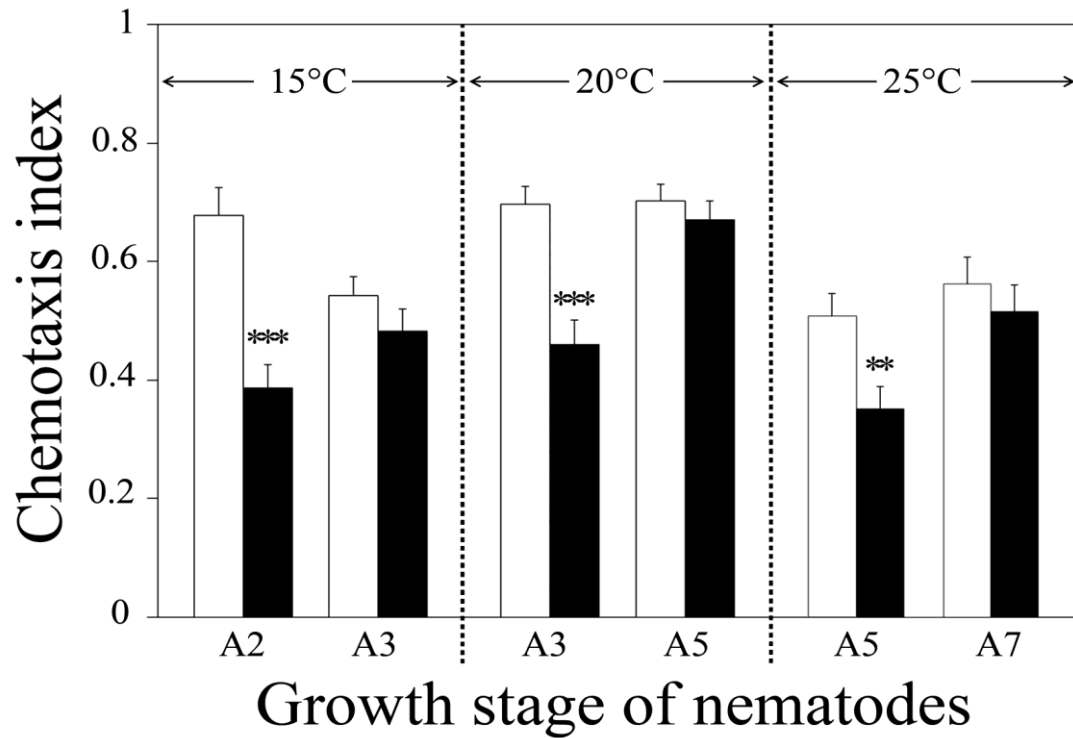


図 26.  $\alpha$ -LA を含む NGM プレート上において 15°C、20°C、25°C で飼育した野生型線虫のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸はジアセチル順応が成立した成長ステージと成立が確認できなかったステージを示す。 $\alpha$ -LA 存在下で飼育した線虫において、15°C では A2 期まで、20°C では A3 期まで、25°C では A5 期まで、ジアセチル経験个体の誘引率はコントロール个体のそれと比較し有意に低い値を示した。\*\*:  $P < 0.01$ 、\*\*\*:  $P < 0.001$ 。

### 3-4. インスリン様シグナル伝達経路に関与する変異体

動物の学習や寿命にはインスリンが強く関わっていることが知られている。線虫のインスリン様シグナル伝達経路に関わる遺伝子として *daf-2*、*age-1*、*daf-16* などが知られている。ここでは、*daf-2* および *daf-16* 変異体を用いて同様の実験を行い、ジアセチル順応に与えるインスリン様シグナル伝達系の影響について解析した。*daf-2* および *daf-16* 変異体は線虫の寿命や耐性幼虫の形成に関わっている (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997; Larsen et al., 1995; Paradis and Ruvkun, 1998)。耐性幼虫は、幼虫期において生育環境の悪化にともない、幼虫期の状態で成長を休止し、長期間生存することができる。長寿命の *daf-2(m577)* 変異体と、野生型線虫よりも寿命の短い *daf-16(mu86)* 変異体を通常飼育温度 20°C で飼育した場合、どちらの変異体線虫も YA 期からの順応獲得が確認された (図 27)。これら変異体を 15°C、25°C の温度条件下で飼育し、各成長ステージにおけるジアセチル順応の獲得について調査した。

#### 3-4-1. *daf-2* 変異体のジアセチル順応成立期間

インスリン/インスリン様成長因子受容体にコードされている *daf-2* 遺伝子は、寿命や耐性幼虫の形成に関わっている。*daf-2* 変異体は抗酸化酵素のスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) のうちの Mn SOD をコードする *sod-3* の mRNA 量が野生型線虫よりも多く、活性酸素によりもたらされる酸化ダメージに対して強い耐性を持つ変異体である (Kimura et al., 1997; Honda and Honda, 1999)。そのため、*daf-2* 変異体は長寿命の線虫として知られている。本実験では系統の異なる *daf-2* 変異体 2 種を用いて、各温度条件下で飼育した場合の順応の獲得の獲得時期について解析した。

##### (1) *daf-2(m577)* 変異体

卵の状態から 15°C の温度で飼育した *daf-2(m577)* 変異体のジアセチル順応は A7 期まで確認された。計測中、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロール個体よりも有意に低い値を示し、実験開始 90 分後ではコントロール個体で 0.49 ±

0.05、ジアセチル経験個体で  $0.32 \pm 0.04$  を示した ( $P < 0.01$ 、図 28 A7)。領域外に存在する割合は実験開始以降ジアセチル経験個体が有意に高い値を示すが、90 分後においては両個体群に有意な差は認められなかった。A9 期における誘引率は、実験開始からジアセチル経験個体がコントロール個体よりもわずかに低い値を示しているが、両者間に有意な差は認められなかった (図 28 A9)。実験開始 90 分後における誘引率はコントロール個体で  $0.35 \pm 0.04$ 、ジアセチル経験個体で  $0.29 \pm 0.04$  であった。A7 および A9 期の行動開始領域に存在する線虫の割合は両個体群とも同程度の値を示し、有意な差は認められなかった。

20°C で飼育した場合、ジアセチル順応の獲得は A3 期まで確認され、A5 期では確認されなかった (図 29)。A3 期の個体では、ジアセチル経験個体の誘引率は実験開始からコントロールよりも有意に低下し、90 分後のコントロール個体の誘引率は  $0.60 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体は  $0.42 \pm 0.04$  であった ( $P < 0.01$ 、図 29 A3)。行動開始領域に存在する割合は両個体群とも 0.1 以下を示し、ほとんどの個体が行動開始領域から移動したことがわかる。領域外に存在するジアセチル経験個体の割合はコントロール個体よりも有意に高い値を示した。順応獲得が認められなかった A5 期では、実験開始からジアセチル経験個体の誘引率がコントロールよりもわずかに低い値を示し、30 分、40 分後においては有意な差が認められたが ( $P < 0.05$ )、50 分以降では有意差は認められなかった (図 29 A5)。実験開始 90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.67 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.60 \pm 0.03$  であった。行動開始領域に存在する割合は、10、50、90 分後においてジアセチル経験個体がコントロールよりも有意に低い値を示したが、いずれも 0.1 以下であり、多くの個体が行動開始領域から移動している。領域外に存在する割合は、開始 10 分後では有意差が認められたが、20 分以降では有意差は確認できなかった (図 29 A5)。

卵の状態から 25°C で飼育した場合、*daf-2(m577)*変異体は孵化後、幼虫期以降の成長を確認することができなかった。そのため、25°C 飼育における順応の解析は行っていない。

## (2) *daf-2(e1370)*変異体

卵の状態から 15°C で飼育した場合、0.1%ジアセチル条件付け直後の、ジアセチル経験個体の 0.01%ジアセチルに対する誘引率の低下は、*daf-2(m577)*変異体と同様、A7 期まで確認された。計測中、ジアセチル経験個体の誘引率はコントロール個体よりも有意に低い値を示し、実験開始 90 分後ではコントロール個体で  $0.59 \pm 0.05$ 、ジアセチル経験個体で  $0.34 \pm 0.07$  を示した ( $P < 0.05$ 、図 30 A7)。行動開始領域および領域外に存在する両個体群の割合に有意差は確認されなかった (図 30 A7)。A9 期の誘引率は、実験開始からジアセチル経験個体がコントロール個体よりもわずかに低い値を示したが、有意差は認められなかった (図 30 A9)。実験開始 90 分後における誘引率はコントロール個体で  $0.36 \pm 0.07$ 、ジアセチル経験個体で  $0.28 \pm 0.07$  であった。行動開始領域に存在する線虫の割合は、ジアセチル経験個体がわずかに上回り、実験開始 20、30 分後においては有意な増加が認められた ( $P < 0.05$ )。

20°C で飼育した場合、ジアセチル順応は A3 期まで確認され、A5 期では確認されなかった (図 31)。A3 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、実験開始からコントロール個体のそれよりも有意に低い値を示し、90 分後ではコントロール個体で  $0.76 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.65 \pm 0.03$  を示した ( $P < 0.01$ 、図 31 A3)。行動開始領域に存在する両個体群の割合は、実験開始 10 分以降から 0.1 以下を示しており、実験直後から多くの個体が移動したことを示している。領域外に存在する割合は、実験開始 10 分後においてジアセチル経験個体が有意

に高い値を示したが ( $P < 0.05$ )、20 分以降では両個体群とも同程度の値を示した (図 31 A3)。A5 期における誘引率は、実験開始からジアセチル経験個体がコントロール個体よりもわずかに低い値を示したが、有意差は認められなかった (図 31 A5)。実験開始 90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.68 \pm 0.06$ 、ジアセチル経験個体で  $0.65 \pm 0.07$  であった。行動開始領域に存在する割合は、A3 期と同様に、実験開始 10 分後から 0.1 以下となり、実験開始直後からほとんどの個体が行動開始領域から移動している。行動開始領域および領域外に存在する両個体群の割合に有意な差は確認されなかった。

*daf-2(e1370)*変異体を 25°C で飼育した場合、*daf-2(m577)*変異体同様、孵化は行いが、幼虫期以降の成長を確認することができなかった。

### 3-4-2. *daf-2* 変異体のジアセチル順応成立期間のまとめ

これまでに、線虫の順応成立期間は飼育温度に比例し、低温の飼育では短縮、高温の飼育では延長することが明らかにされている。しかし、*daf-2* 変異体では 2 つの系統のどちらも逆の現象が引き起こされた。15°C で飼育した場合は A7 期まで、20°C では A3 期までジアセチル順応が誘発された (図 35)。また、25°C の条件下では、*daf-2* 変異体の成長を確認することはできなかった。

### 3-4-3. *daf-16* 変異体のジアセチル順応成立期間

耐性幼虫の形成に関わる *daf-16* 遺伝子の変異体は、生育に適さない環境下であっても耐性幼虫となることができず、寿命の調節に深く関わっている (Kenyon et al., 1993; Larsen et al., 1995)。*daf-16(mu86)*変異体を 20°C で飼育したところ、YA 期から A7 期までの成長ステージで順応の成立が確認された (図 27)。15°C、20°C、25°C の温度条件下で飼育した場合の、ジアセチル順応の獲得について解

析した。

15°C で飼育した *daf-16* 変異体のジアセチル順応の獲得時期について調査した。0.1%ジアセチル条件付け直後の、0.01%ジアセチルに対するジアセチル経験個体の誘引率の有意な低下は A3 期まで確認され、A5 期では確認されなかった (図 32)。計測中の A3 期の誘引率は、ジアセチル経験個体がコントロール個体よりも有意に低い値を示し、実験開始 90 分後における誘引率はコントロール個体で  $0.49 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.28 \pm 0.02$  であった ( $P < 0.001$ 、図 32 A3)。行動開始領域および領域外に存在するジアセチル経験個体の割合は、コントロール個体のそれよりも高い値を示した (図 32 A3)。A5 期における誘引率は、コントロール個体で  $0.26 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.22 \pm 0.03$  を示し、有意な差は確認されなかった (図 32 A5)。

20°C で飼育した場合、ジアセチル順応は A7 期まで確認され、A9 期では確認されなかった (図 33)。A7 期のジアセチル経験個体の誘引率は、計測中、コントロール個体よりも低い値を示し、50 分と 90 分後において有意差が認められた ( $P < 0.05$ )。90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.32 \pm 0.05$ 、ジアセチル経験個体で  $0.17 \pm 0.03$  であった (図 33 A7)。ジアセチル経験個体とコントロール個体の行動開始領域および領域外に存在する割合に有意差は認められなかった (図 33 A7)。一方、A9 期では、コントロール個体とジアセチル経験個体の誘引率に有意差は認められなかった。実験開始 90 分後の誘引率はコントロール個体で  $0.17 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.20 \pm 0.04$  であった (図 33 A9)。両個体群の行動開始領域および領域外に存在する割合においても有意な差は確認されなかった。20°C で飼育した野生型線虫では、YA 期から A5 期において順応が確認された (図 5)。以上の結果は、*daf-16* 変異体の順応成立期間は野生型線虫と比較し延長することを示している。また、活性酸素発生レベルの高い短寿命の *gas-1*

変異体と *mev-1* 変異体では、20°C の飼育で A7 期まで順応が確認されており (図 21)、*daf-16* 変異体も同様の結果となった。

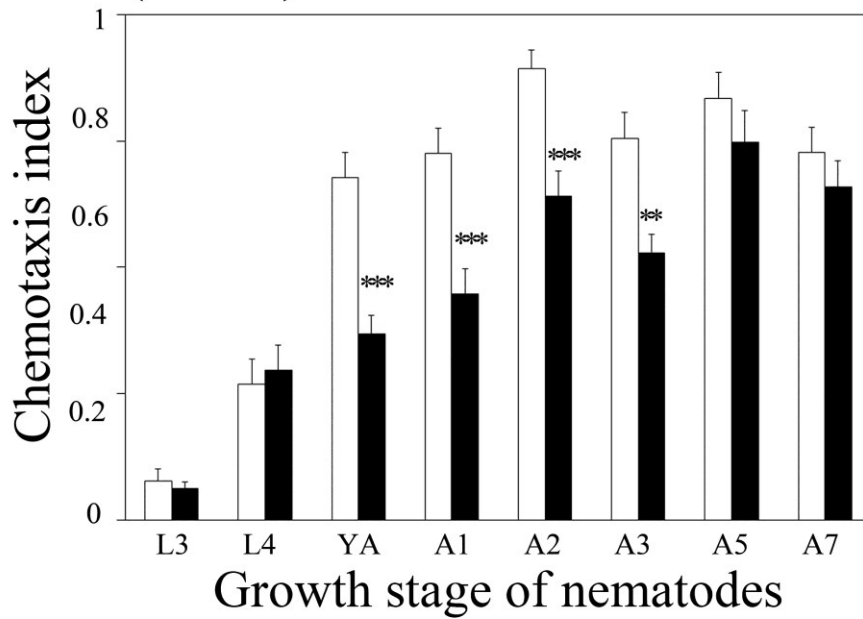
25°C で飼育した場合、*daf-16* 変異体のジアセチル順応は A5 期まで確認され、A7 期では確認されなかった (図 34)。A5 期のジアセチル経験個体の誘引率は、実験開始からコントロール個体よりも有意に低下し、実験開始 90 分後ではコントロール個体で  $0.28 \pm 0.03$ 、ジアセチル経験個体で  $0.18 \pm 0.03$  を示した ( $P < 0.05$ 、図 34 A5)。行動開始領域に存在する両個体群の割合は 0.4 以上を示しており、多くの個体が行動開始領域に留まっているものと考えられる。7 期の両個体群の誘引率は同程度の値を示し、実験開始 90 分後ではコントロール個体で  $0.17 \pm 0.02$ 、ジアセチル経験個体で  $0.19 \pm 0.03$  を示した (図 34 A7)。行動開始領域および領域外に存在する両個体群の割合においても有意な差は認められなかった。

#### 3-4-4. *daf-16* 変異体のジアセチル順応成立期間のまとめ

*daf-16* 変異体のジアセチル順応は、15°C では A3 期まで、20°C では A7 期まで、25°C では A5 期まで確認された (図 35)。20°C で飼育した場合と比較して、15°C の飼育温度では順応の成立期間に短縮が認められた。25°C で飼育した線虫の順応の成立期間は延長することが確認されているが、*daf-16* 変異体では期間の短縮が認められた。



### *daf-2(m577)*



### *daf-16(mu86)*

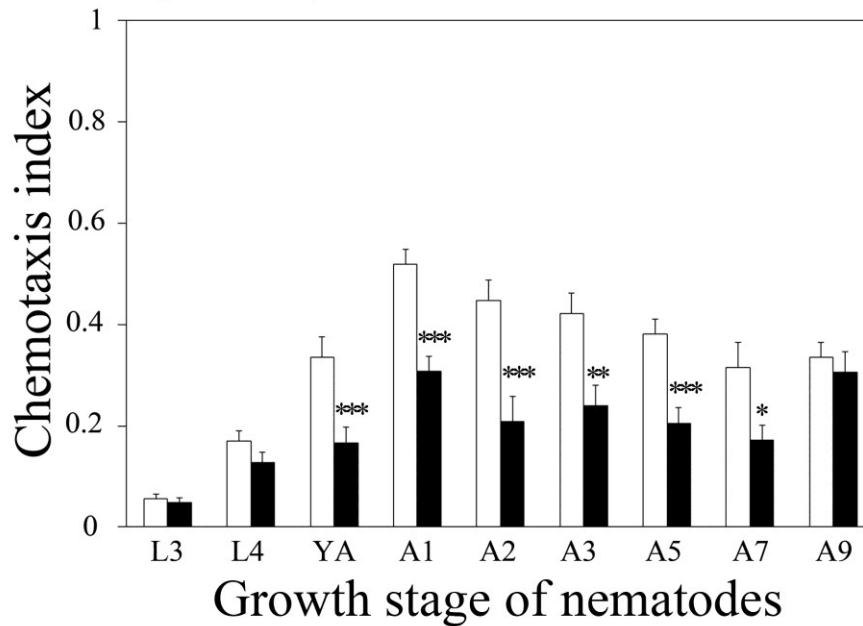


図 27. 20°C で飼育した *daf-2 (m577)* および *daf-16(mu86)* 変異体のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸は 20°C で飼育した場合の成長段階を示す。インスリン様シグナル伝達経路に関する変異体においても、YA 期から順応が成立し、*daf-2 (m577)* 変異体では A3 期まで、*daf-16(mu86)* 変異体では A7 期まで順応が確認された。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

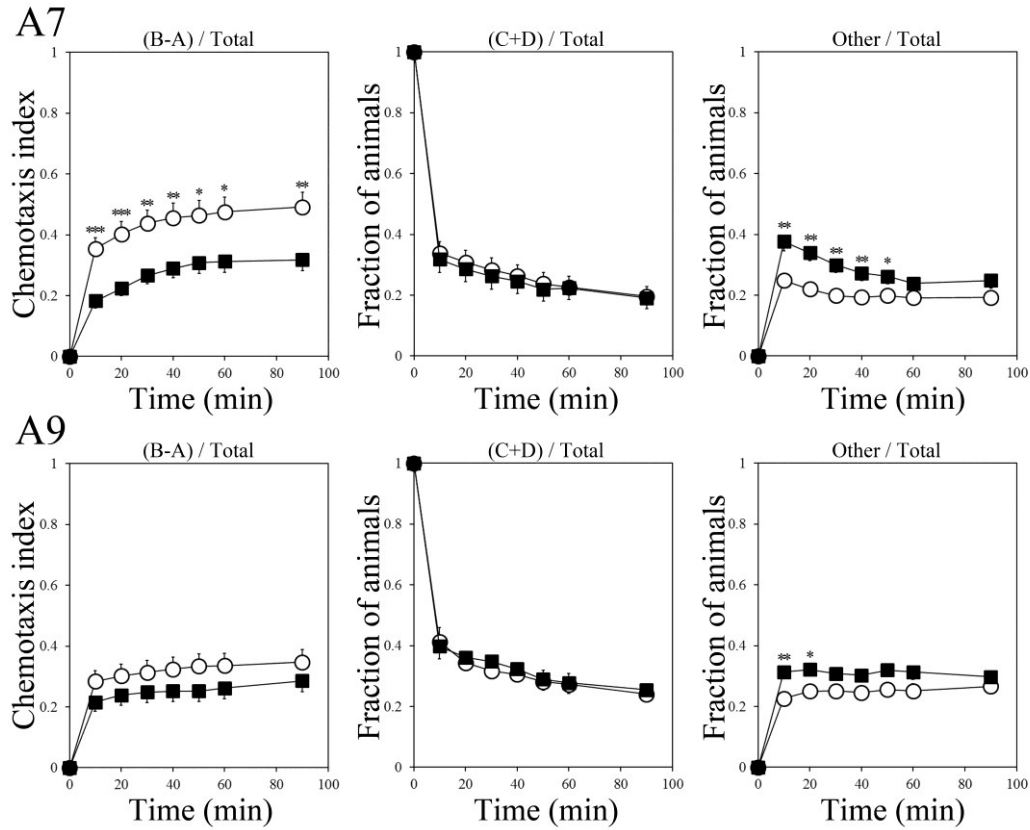


図 28. 15°C で飼育した *daf-2(m577)* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A7 期、下段は A9 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C で飼育した *daf-2(m577)* 変異体の A7 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A7 : n=22、A9 : n=21。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

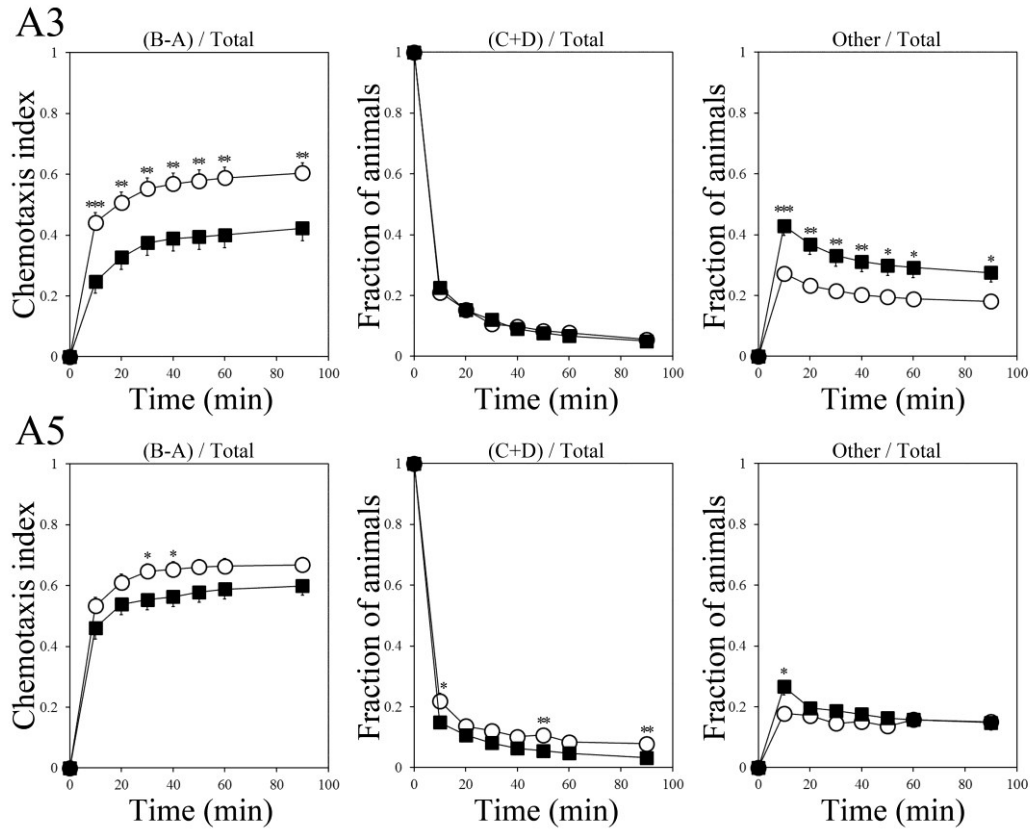


図 29. 20°C で飼育した *daf-2(m577)* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A3 期、下段は A5 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した *daf-2(m577)* 変異体の A3 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A3 : n=28、A5 : n=16。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

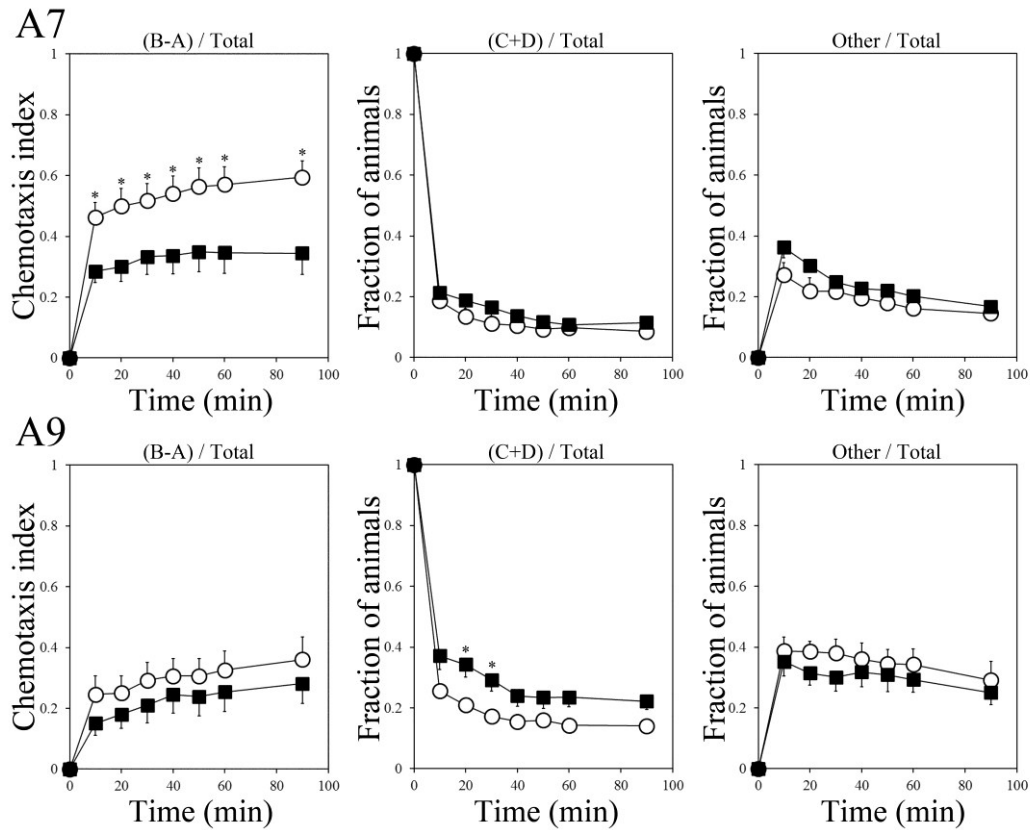


図 30. 15°C で飼育した *daf-2(e1370)* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A7 期、下段は A9 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C で飼育した *daf-2(e1370)* 変異体の A3 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A7 : n=12、A5 : n=12。\* :  $P < 0.05$ 。

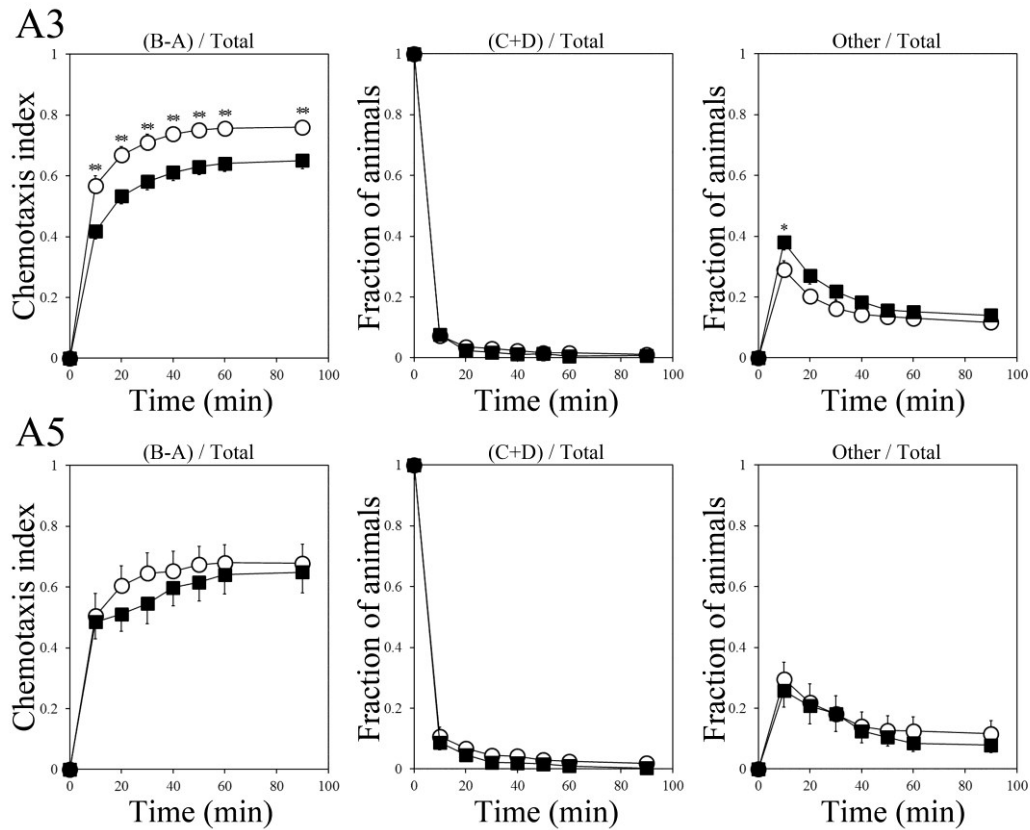


図 31. 20°C で飼育した *daf-2(e1370)* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A3 期、下段は A5 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験个体群を示す。20°C で飼育した *daf-2(e1370)* 変異体の A3 期におけるジアセチル経験个体の誘引率は、コントロール个体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A3 : n=17、A5 : n=8。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。

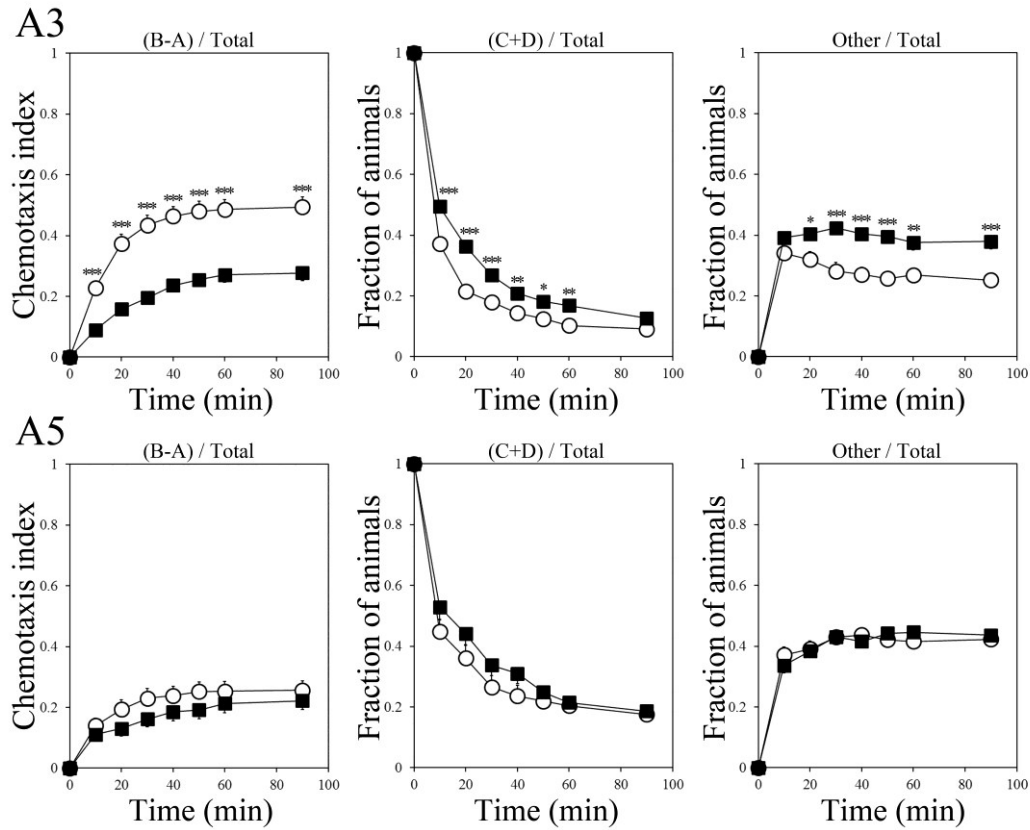


図 32. 15°C で飼育した *daf-16(mu86)* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A3 期、下段は A5 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。15°C で飼育した *daf-16(mu86)* 変異体の A3 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A3 : n=24、A5 : n=23。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

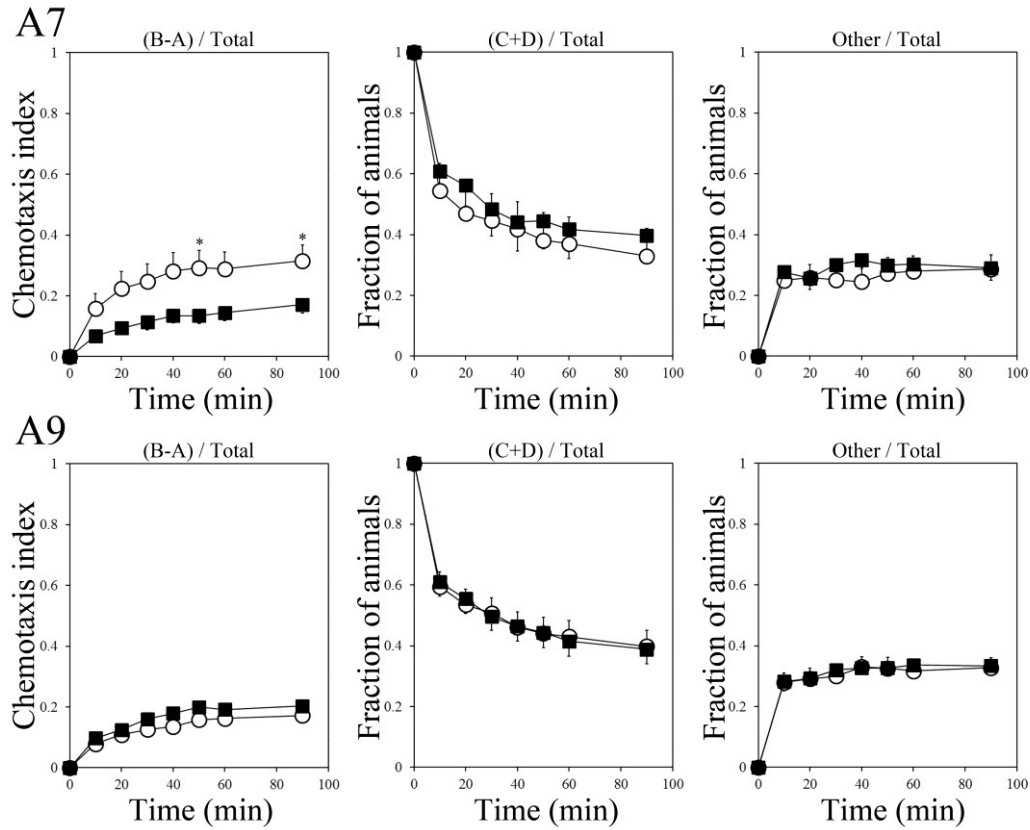


図 33. 20°C で飼育した *daf-16(mu86)* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動 ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A7 期、下段は A9 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。20°C で飼育した *daf-16(mu86)* 変異体の A7 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A7 : n=8、A9 : n=16。\* :  $P < 0.05$ 。

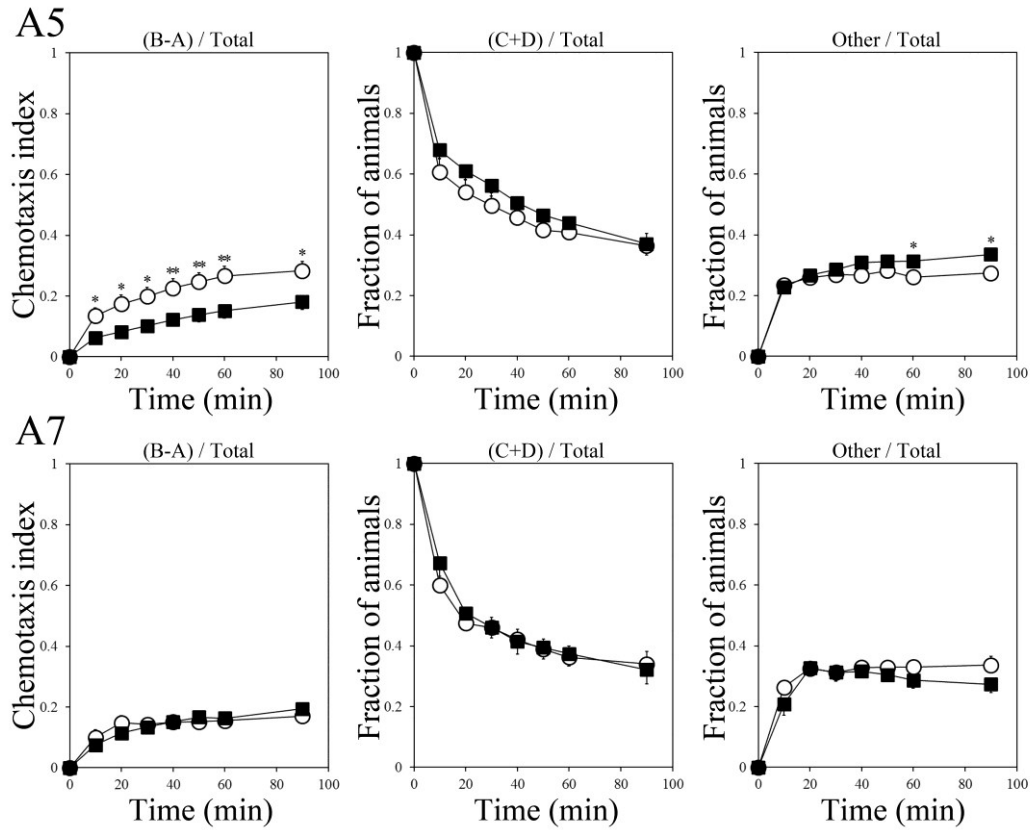


図 34. 25°C で飼育した *daf-16(mu86)* 変異体における 0.1% ジアセチル経験後の 0.01% ジアセチルへの反応行動。ジアセチルに対する誘引率 ((B-A)/Total)、行動開始領域に存在する線虫の割合 ((C+D)/Total)、領域外に存在する線虫の割合 (Other/Total) の時間ごとの反応率を示す。上段は A5 期、下段は A7 期の変異体であり、白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群を示す。25°C で飼育した *daf-16(mu86)* 変異体の A5 期におけるジアセチル経験個体の誘引率は、コントロール個体のそれと比較し、有意に低い値を示した。A5 : n=26、A7 : n=8。\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 。



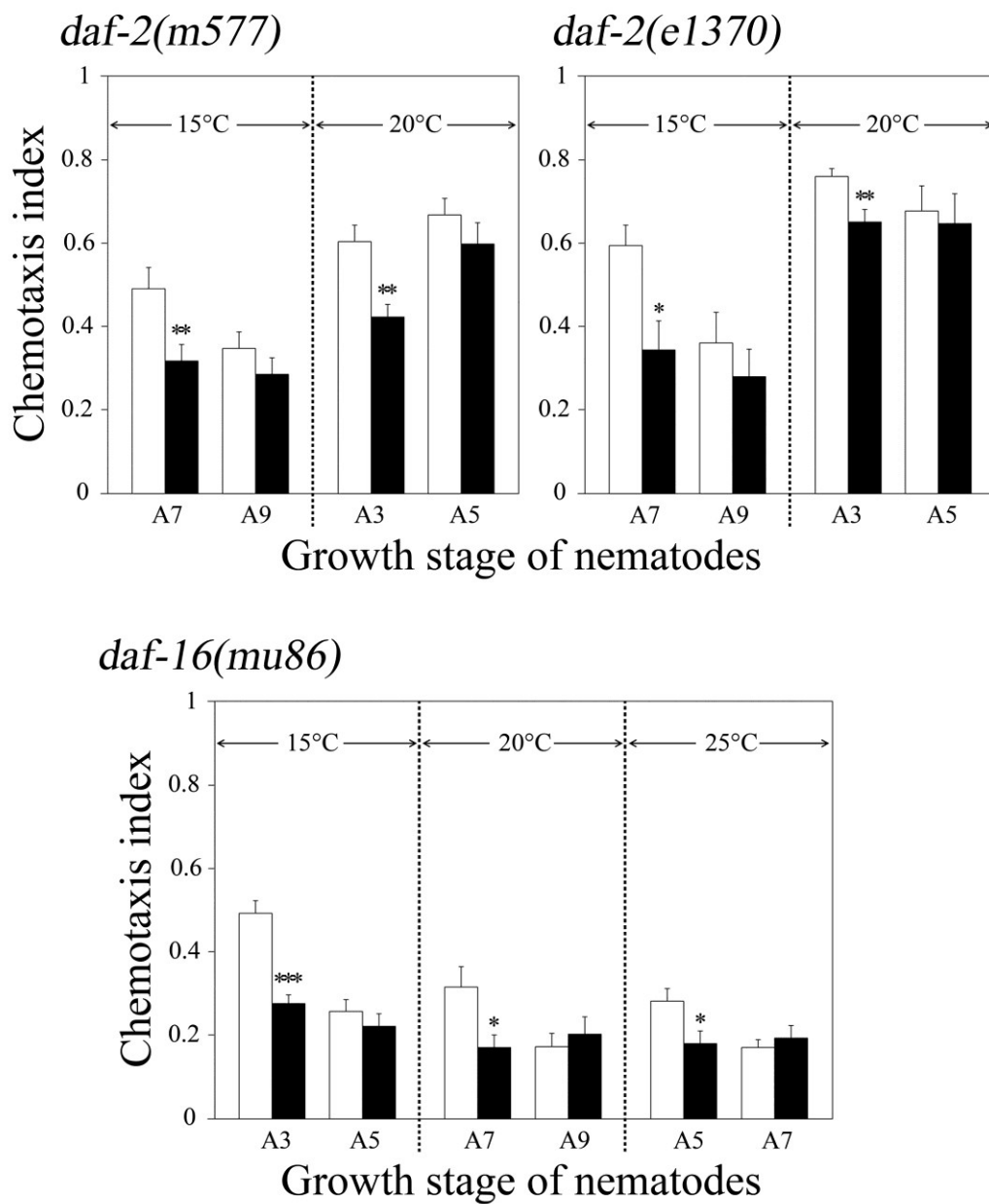


図 35. 15°C、20°C、25°C で飼育した *daf-2* 変異体および *daf-16* 変異体のジアセチル順応成立期間 白はコントロール群、黒はジアセチル経験個体群の実験開始後 90 分の誘引率を示す。横軸はジアセチル順応が成立した成長ステージと成立が確認できなかったステージを示す。*daf-2* 変異体では 15°C で A7 期、20°C で A5 期まで順応が認められた。*daf-16* 変異体では 15°C で A3 期、20°C で A7 期、25°C で A5 期まで順応が認められた。  
\* :  $P < 0.05$ 、\*\* :  $P < 0.01$ 、\*\*\* :  $P < 0.001$ 。

表 1. それぞれの線虫におけるジアセチルに対するジアセチル順応獲得可能時期

線虫		順応獲得可能時期 (YA~)		
		15°C	20°C	25°C
野生型線虫	野生型線虫	A3	A5	A7
	$\alpha$ -LA	A2	A3	A5
活性酸素発生レベルの異なる変異体	<i>isp-1</i>	A2	A3	A5
	<i>clk-1</i>	A2	A3	A5
	<i>gas-1</i>	A5	A7	A7
	<i>mev-1</i>	A5	A7	A7
インスリン系に關与する変異体	<i>daf-2(m577)</i>	A7	A3	-
	<i>daf-2(e1370)</i>	A7	A3	-
	<i>daf-16(mu86)</i>	A3	A7	A5

## 4. 考察

### 4-1. 野生型線虫のジアセチルに対する順応の成立期間

線虫は、0.1%のジアセチルに対して誘引行動を示すことが明らかとなっている (Matsuura et al., 2004, 2007, 2009)。YA 期の野生型線虫に 0.1%ジアセチルをエサの無い条件下で 120 分経験させると、0.01%ジアセチルに対する誘引行動が低下する。ここで生じるジアセチル順応は学習の一種である。順応を示すことができる時期は、通常の飼育温度 (20°C) において YA 期から A5 期の間であることが先行研究より報告されており (伊藤、2007、佐藤、2008)、本研究でも同様の結果が得られた (図 5)。成虫脱皮後の加齢にともない、ジアセチルに対する誘引率は、ジアセチル経験の有無に関わらず低下する。この現象は Matsuura らの研究により確認されており、老化による運動能力の低下が可能性として考

えられている (Matsuura et al., 2007、伊藤、2007、佐藤、2008)。老化の主要因として、活性酸素による生体内への酸化ダメージの蓄積を挙げることができる。本論文の第 1 章では、活性酸素がジアセチル順応の持続時間を延長させるのに必要であることを明らかにした。活性酸素はエネルギー代謝にともない発生する。線虫は飼育温度を変えることで寿命を容易に調節することが可能である。低温では代謝が緩やかなため活性酸素の発生は低くなり長寿命となる。一方、高温での飼育は代謝が活発になり、活性酸素の発生量が多くなることで短寿命となる。寿命と代謝速度は深く関係していることが指摘される (Heise et al., 2003; Voorhies and Ward, 1999)。野生型線虫を低温または高温で飼育し、それぞれの成長時期におけるジアセチル順応の成立について調査したところ、15°C あるいは 25°C で飼育した場合のいずれも、順応の獲得は YA 期から確認された (図 5)。線虫は脱皮を 4 回繰り返し、成虫となる。幼虫期では、コントロール個体においても誘引率は低く、ほとんどの個体が実験プレートの行動開始領域に留まっている (図 2、3、4)。幼虫期ではジアセチルの感覚受容器が未発達、あるいは感覚受容からの神経伝達が未熟である可能性が示唆される。

野生型線虫のジアセチル順応はそれぞれ、15°C では A3 期、20°C では A5 期、25°C では A7 期まで認められた (図 5)。YA 期以降は 1 日毎に A1、A2... としたため、同じ A1 期の線虫でも 15°C と 25°C の飼育温度下では体内の活性酸素発生量が異なる。25°C で飼育した野生型線虫は代謝速度が速まり、それにとまなう活性酸素の発生レベルは高くなる。そのため老化の要因となる細胞の酸化ダメージが増すことで老化が早まり、寿命は短くなるが、順応はより長い期間で獲得可能であることを明らかにした。一方、15°C で飼育した線虫では、ジアセチル順応の成立期間が短縮した。飼育温度は線虫の代謝速度に関わり、それにとまなう活性酸素の発生レベルを大きく左右することから、ジアセチルに対する

嗅覚順応の獲得には活性酸素が影響していることを示唆している。活性酸素がジアセチルに対する嗅覚順応の保持時間に関与していることをこれまでの研究によって明らかにしており (Matsuura et al., 2009; Nishino et al., 2013)、本実験においてもこれを支持する結果が得られた。

#### 4-2. 活性酸素発生レベルの異なる変異体線虫の順応の成立期間

活性酸素の発生レベルが異なる変異体はそれぞれ寿命が異なる。活性酸素発生レベルが低い *isp-1* 変異体と *clk-1* 変異体は野生型線虫よりも長寿命の線虫であり、活性酸素発生レベルの高い *gas-1* 変異体および *mev-1* 変異体は短寿命の線虫である。これら変異体においても、ジアセチル順応は YA 期以降成立することが明らかとなった (図 6、14)。野生型線虫と同様に、幼虫期ではジアセチルに対する感覚受容器の未発達、あるいは感覚受容からの神経伝達が未熟であるために順応の発現が誘発されない可能性が示唆される。

活性酸素発生レベルの低い *isp-1* 変異体および *clk-1* 変異体を 15°C、20°C、25°C の温度で飼育した場合、順応の獲得が可能な期間は 15°C で A2 期まで、20°C で A3 期まで、25°C で A5 期までであった。順応の成立期間は飼育温度に依存して延長していることが確認された (図 13)。野生型線虫では 15°C で A3 期、20°C で A5 期、25°C で A7 期までであったことから、*isp-1*、*clk-1* 変異体では順応成立期間が短縮することが明らかとなった。*isp-1* はミトコンドリア電子伝達系の複合体 III にコードしており、*isp-1* 変異体はミトコンドリア内における活性酸素発生レベルを抑制している (Feng et al., 2001; Hekimi and Guarente, 2003)。*clk-1* はコエンザイム Q 合成酵素の形成に関わっており、変異体は ATP 産生に必須な酸化リン酸化反応が抑制されることによって活性酸素の発生が低下している (Larsen and Clarke, 2002、Kayser et al., 2004b)。これら報告の一方で、*clk-1* 変異

体は代謝関連の遺伝子発現が増加しており、ミトコンドリアの生合成が増加していること、また、エネルギーの生産量は野生型線虫と同程度であることが報告されている (Cristina et al., 2009, Hekimi and Guarente, 2003, Kayser et al., 2004a)。同時に抗酸化酵素群の遺伝子発現も亢進しており、*clk-1* 変異体は細胞内の活性酸素を抑制している。そのため、*clk-1* 変異体は活性酸素を除去する働きが強くなると考えられる。活性酸素の発生レベルの低い変異体線虫のジアセチル順応の獲得時期は、野生型線虫と比較して短くなることから、活性酸素は感覚受容の鈍感化、あるいは順応行動を発現させるための感覚受容による情報伝達とエサのない環境を適合するための経路に影響を与えている可能性がある。

活性酸素発生レベルの高い *gas-1* 変異体および *mev-1* 変異体では、15°C で A5 期、20°C の飼育で A7 期まで確認され (図 21)、野生型線虫と比較して順応の成立期間の延長が認められた。一方、25°C で飼育した場合、順応は野生型線虫と同じく A7 期まで観察された。これらの変異体は短寿命であり、*gas-1*、*mev-1* 変異体の YA 以降の生存日数は *gas-1* 変異体で  $10.27 \pm 0.12$  日、*mev-1* 変異体で  $8.53 \pm 0.14$  日である (Matsuura et al., 2009)。*gas-1*、*mev-1* 遺伝子はミトコンドリア電子伝達系の複合体 I、II をそれぞれコードしており、変異体は活性酸素が過剰に生成される (Hartman et al., 2001, Kondo et al., 2005, Senoo et al., 2001)。過剰な活性酸素の発生は細胞への酸化ダメージを与える原因となり、酸化ダメージの蓄積による細胞死や突然変異の頻度の増加は生体内へ悪影響を及ぼす。*gas-1*、*mev-1* 変異体は活性酸素の発生レベルが高い変異体線虫であるため、25°C での飼育は活性酸素をより過剰に生成した可能性が高い。25°C で飼育した場合、活性酸素発生レベルの高い変異体では、生体内における酸化ダメージ等の影響が強くなり、順応の獲得時期が延びなかったものと考えられる。以上ことは、順応獲得の期間には限界があり、線虫にとっては A7 期までであると予想される。

通常の飼育温度で育った野生型線虫の運動量は老化にともない低下し、A5期以降では大きく減少する (Matsuura et al., 2007)。野生型線虫や変異体では、ジアセチル順応の獲得の有無に関わらず成虫脱皮後数日で誘引率の低下が確認された (図 5、6、14)。これら誘引率の低下は、運動量の低下によりもたらされた可能性が示唆された。

#### 4-3. 順応の成立期間におよぼす抗酸化剤の影響

抗酸化剤  $\alpha$ -LA を含んだ NGM プレート上で野生型線虫を卵の状態から飼育すると、野生型線虫の成長は通常の NGM プレートで飼育した場合よりも約一日遅延する。ここでも、ジアセチル順応の獲得は YA 期から認められた (図 22)。各飼育温度における順応の獲得期間は、通常の NGM プレートで飼育した野生型線虫よりも短縮された (図 5、26)。一方、温度に比例した獲得時期の延長も確認された。15°C で飼育した場合 A2 期まで、20°C では A3 期まで、25°C では A5 期まで順応の成立が確認された (図 26)。 $\alpha$ -LA はミトコンドリア内においてエネルギー代謝に重要な補酵素として働き、グルタチオンの産生を促進する (Han et al., 1997; Pic et al., 1995)。グルタチオンは、SOD が活性酸素を分解した際に生成する過酸化水素の代謝に働くグルタチオンペルオキシターゼが消費している抗酸化物質である。 $\alpha$ -LA を飼育培地である NGM に含ませることで、線虫の生体内における活性酸素を除去し、活性酸素レベルを抑制したことで、通常の NGM プレートで飼育した場合よりも順応の成立期間が短縮したものと考えられる。以上の結果は、活性酸素がジアセチル順応の獲得に大きく関与していることを示唆している。また、成虫脱皮から 5 日以降の線虫では運動量が大きく減少すると報告されているが (Matsuura et al., 2007)、 $\alpha$ -LA を含む NGM プレートをを用いて 20°C で飼育した野生型線虫の A2 期から A5 期のコントロール個体の誘引率は同程度の値を示した (図 22)。 $\alpha$ -LA の抗酸化能力は成虫脱皮から老化

に向かう線虫の運動量を一定に保持する可能性があるかもしれない。

#### 4-4. インスリン様シグナル伝達経路に関与する変異体線虫の順応の成立期間

全ての動物において、エネルギー代謝にはインスリンの作用が重要な役割を担っている。線虫においても同様に、インスリン様シグナル伝達経路はエネルギー代謝に深く関わっており、寿命にも大きく影響している。さらに、線虫の学習にインスリン様シグナル伝達経路の作用が影響している可能性について報告されている (Matsuura et al., 2009)。本実験では、線虫の順応成立時期と活性酸素の関係について調査し、活性酸素の発生レベルが低く長寿命の線虫における順応成立時期の短縮、活性酸素の発生レベルの高い短寿命の個体における時期の延長を明らかにした。同様に、寿命調整に関与するインスリン様シグナル伝達経路上に存在する *daf-2* および *daf-16* 遺伝子にも注目した。*daf-2*、*daf-16* 遺伝子は線虫の寿命や耐性幼虫の形成に関与しており、*daf-16* は *daf-2* の下流に位置し、*daf-2* は *daf-16* に対して抑制的に働いている (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997; Larsen et al., 1995; Paradis and Ruvkun, 1998)。*daf-2* 遺伝子はインスリン/インスリン様成長因子受容体にコードされており、長寿命の変異体としてよく知られている。*daf-16* 遺伝子は耐性幼虫の形成に関与しており、その変異体は野生型線虫と比較して寿命が短い。これらの変異体線虫を 20°C の温度条件下で飼育を行い、各成長ステージにおける順応の成立について解析したところ、YA 期以降に順応が成立することが明らかとなった (図 27)。長寿命の *daf-2* 変異体では A3 期まで順応の成立が確認され、これより寿命の短い *daf-16* 変異体では A7 期まで成立が確認された。20°C で飼育した *daf-2*、*daf-16* 変異体線虫の順応の獲得時期は、これまでに得られた長寿命変異体や、短寿命変異体の知見と一致した (図 5、6、14、27)。一方、*daf-2* 変異体を 15°C で飼育した場合、順応は A7

期まで認められた (図 35)。 *daf-16* 変異体のジアセチルに対する順応の獲得は、15°C の飼育条件下で A3 期まで確認され、野生型線虫と比較し順応の獲得時期が短縮した (図 35)。一方、20°C では A7 期まで順応が成立したのに対し、25°C では A5 期までであり、順応の獲得時期の短縮が認められた (図 35)。野生型線虫や活性酸素の発生レベルに由来した寿命の異なる変異体は、飼育温度に比例して順応の獲得時期が変化したが、インスリン様シグナル経路に由来する寿命の異なる変異体では異なる結果が得られた。線虫のインスリン様シグナル伝達経路は代謝や寿命、学習行動に深く関わっていることが知られている。学習にはインスリンと活性酸素が拮抗的に作用するものと考えられるが、その関係については明らかではない。また、25°C で飼育した *daf-2* 変異体は、幼虫期以降の成長を確認することができなかつた。これらの現象は系統の異なる *daf-2(m577)* 変異体と *daf-2(e1370)* 変異体の両方で確認された。*daf-2* 変異体の寿命の延長には *daf-16* の活性が必要である (Henderson and Johnson, 2001; Libina et al., 2003; Lin et al., 1997)。25°C での飼育が線虫の耐性幼虫の形成に関わる *daf-16* を活性化させることで耐性幼虫となり、それ以降の成長を誘導しなかつた可能性が考えられる。

#### 4-5. まとめと今後の課題

線虫の寿命はエネルギー代謝の変化によって決定される (Voorhies and word, 1999)。エネルギー代謝にともない発生する活性酸素は、細胞への酸化ダメージをもたらす、老化を促進させる要因とされている (Ishii et al., 1998; Martin et al., 1996; Sohal and Weindruch, 1996)。低温での飼育は、線虫の活性酸素発生を緩やかにし、活性酸素の発生レベルの低い線虫では寿命が延長する。一方で、高温で飼育した活性酸素発生レベルの高い線虫では寿命は短縮する。活性酸素の発生



レベルが異なる場合においても、ジアセチルに対する嗅覚順応は YA 期から成立することが本実験より明らかとなった (図 5、6、14、22、27)。幼虫期における順応獲得の不成立には、順応獲得に関与する感覚受容器や神経伝達系の未熟さが関与している可能性がある。

線虫のジアセチル順応の獲得時期は、活性酸素の発生レベルが低い線虫において短く、活性酸素の発生レベルの高い線虫では延長した。過度な活性酸素は細胞への酸化ダメージを与え、生体内に悪影響を及ぼし、加齢を促進させる主な原因とされている。その一方、順応の獲得には必要な要因として大きく影響することが明らかとなった。Morimoto らによる精子幹細胞の研究では、適度な量の活性酸素が、精子幹細胞の生存や自己複製分裂機能に必要であることが報告されている (Morimoto, et al., 2013)。また、活性酸素の過度な抑制は幹細胞において害をもたらすことから、適度な活性酸素量が機能維持に必要であると考えられている (Liu and Finkel, 2013)。ジアセチル順応の獲得においても、活性酸素の適度なバランスが重要であるといえる。

線虫を含め、動物の寿命には活性酸素以外にインスリンの働きが大きく関与している。インスリン様シグナル伝達回路に関わる長寿命の変異体線虫は 15°C で飼育した場合にジアセチル順応の延長が確認され、短寿命の変異体線虫を 25°C で飼育した場合に順応成立の期間が短縮した (図 35)。インスリン様シグナル経路はエネルギーの代謝にも関係している。代謝には活性酸素の発生が伴うことから、順応の獲得においてインスリンと活性酸素は相互に作用していると考えられる。しかし、その詳細なメカニズムは明らかではない。今後、実験に使用する変異体の種類を増やして検討する必要がある。例えば、*age-1* 変異体は長寿命の線虫として知られている (Friedman and Johnson, 1988; Johnson, 1990)。*daf-2* 遺伝子がコードする受容体からのシグナルは、PI3 キナーゼシグナル伝達

経路を活性する。この伝達経路にはそれぞれ *age-1*、*pdk-1*、*akt-1* が関与しており、*daf-16* に対して抑制的に働き、耐性幼虫の形成や寿命の調節、学習行動に関わっている。*daf-2* 遺伝子の変異による寿命の延長には AMP キナーゼをコードする AAK-2 の機能も必要であることが報告されており (Apfeld et al., 2004)、*aak-2* 変異体は寿命の短い線虫である。また、インスリンシグナル伝達経路と活性酸素の関係を明らかにするためには、各温度で飼育した線虫や変異体の活性酸素の発生レベルを直接的に測定する必要がある。活性酸素種の全体量および活性酸素を分解したときに発生する過酸化水素量の測定を行うことで、活性酸素の発生レベルやそれを除去する SOD の活性程度を評価することが可能である。これらを明確にすることで、学習の獲得に与えるインスリンと活性酸素の関連性が明らかとなるだろう。

## 5. 参考文献

- Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* 18:3004–3009.
- Bargmann CI, Hartweg E, Horvitz HR. 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C.elegans*. *Cell* 74:515–527.
- Back P, Braeckman BP, Matthijssens F. 2012. ROS in aging *Caenorhabditis elegans*: damage or signaling? *Oxid Med Cell Longev* 2012:608478.
- Beckman KB, BN Ames. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547–581.
- Cristina D, Cary M, Lunceford A, Clarke C, Kenyon C. 2009. A regulated response to impaired respiration slows behavioral rates and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 5:e1000450.
- Feng J, Bussiere F, Hekimi S. 2001. Mitochondrial electron transport is a key determinant of life span in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Cell* 1:633–644.
- Friedman DB, Johnson TE. 1988. A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* 118: 75–86.
- Han D, Handelman G, Marcocic L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Flohe L, Packer L. 1997. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization. *Biofactors* 6:321–338.
- Hartman PSN, Ishii EB, Kayser PG, Morgan MM, Sedensky. 2001. Mitochondrial mutations differentially affect aging, mutability and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing* 122:187–201.
- Heise K, Puntarulo S, Portner HO, Abele D. 2003. Production of reactive oxygen

- species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) under heat stress. *Comp Biochem Physiol C* 134:79–90.
- Hekimi S, Guarente L. 2003. Genetics and the Specificity of the Aging Process. *Science* 299:1351–1354.
- Henderson ST, Johnson TE. 2001. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* 11: 1975–1980.
- Honda Y, Honda S. 1999. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J* 13: 1385–93.
- Honda S, Ishii N, Suzuki K, Matsuo M. 1993. Oxygen-dependent perturbation of lifespan and aging rate in the nematode. *J Gerontol* 48: B57–B61.
- Ishii N, Fujii M, Hartman PS, Tsuda M, Yasuda K., Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K. 1998. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 394:694–697.
- Johnson TE. 1990. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* 249: 908–912.
- Kayser EB, Morgan PG, Sedensky MM. 2004a. Mitochondrial complex I function affects halothane sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Anesthesiology* 101:365–372.
- Kayser EB, Sedensky MM, Morgan PG, Hoppel CL. 2004b. Mitochondrial oxidative phosphorylation is defective in the long-lived mutant *clk-1*. *J Biol Chem* 279:54479–54486.
- 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.
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277: 942–946.
- Kondo M, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ishii T, Hartman PS, Ishii N. 2005. Effect of oxidative stress on translocation of DAF-16 in oxygen-sensitive mutants, *mev-1* and *gas-1* of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing* 126:637-641.
- Larsen PL, Albert PS, Riddle DL. 1995. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139:1567–1583.
- Larsen PL, Clarke CF. 2002. Extension of life-span in *Caenorhabditis elegans* by a diet lacking coenzyme Q. *Science* 295:120–123.
- Libina N, Berman JR, Kenyon C. 2003. Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan. *Cell* 115:489–502.
- Lin K, Dorman JB, 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.
- Liu J, Finkel T. 2013. Stem cells and oxidants: too little of a bad thing. *Cell Metab* 18:1–2.
- Martin GM, Austad SN, Johnson TE. 1996. Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nat Genet* 13:25–34.
- Matsuura T, Endo S, Iwamoto R, Takahashi H, Ichinose M. 2007. Developmental changes in chemotactic response and choice of two attractants, sodium acetate and diacetyl, in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol A* 147:920–927.

- Matsuura T, Oikawa T, Wakabayashi T, Shingai R. 2004. Effect of simultaneous presentation of multiple attractants on chemotactic response of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res* 48:419–429.
- Matsuura T, Suzuki S, Musashino A, Kanno R, Ichinose M. 2009. Retention time of attenuated response to diacetyl after pre-exposure to diacetyl in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool A* 311:483–495.
- Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, Inoue K, Atsuo O, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto T, Yabe-Nishimura C, Shinohara T. 2013. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 12:774–786.
- Murakami S, Murakami H. 2005. The effect on aging and oxidative stress on learning behavior in *C. elegans*. *Neurobiol. Aging* 26:899–905.
- Nishino A, Kanno R, Matsuura T. 2013. The role of oxygen intermediates in the retention time of diacetyl adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool.* 319A, 431–439.
- Paradis S, Ruvkun G. 1998. *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 12:2488–2498.
- Pick U, Haramaki N, Constantinescu A, Handelman GJ, Tritschler HJ. 1995. Glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase have opposite stereospecificities for alpha-lipoic acid enantiomers. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 206:724-730.
- Senoo-Matsuda N, Yasuda K, Tsuda M, Ohkubo T, Yoshimura S, Nakazawa H, Hartman PS, Ishii N. 2001. 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 276:41553–41558.

Sohal RS, Weindruch R. 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273:59–63.

Voorhies WAV, Ward S. 1999. Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate. Proc Natl Acad Sci USA 96:113990–11403.

伊藤 久仁子 (2007) 線虫の連合学習獲得における加齢の影響

岩手大学工学部福祉システム工学科卒業論文

佐藤 文彦 (2008) 線虫の連合学習獲得に及ぼす加齢の影響

岩手大学工学部福祉システム工学科卒業論文

## 第2部

# 覚醒マウスを用いた血流動態および脳酸素代謝の 新規光イメージングシステムの構築

### 1. 序論と背景

高等動物の脳は神経細胞以外にもグリア細胞や血管など、様々な機能をもつ微小な細胞集団によって構成されている。神経細胞やグリア細胞の活動時には酸素やグルコースが使われ、エネルギー代謝が行われる (Iadecola, 2004)。脳血管系はこのエネルギー代謝によって消費された酸素やエネルギーとなるグルコースを供給し、さらに老廃物を排出している。このように、脳を構成する微小な細胞が脳内の代謝と供給のバランスを保つことで脳機能は維持されている。神経細胞のエネルギー蓄積量には限りがあるため、血流による絶え間ない酸素やエネルギーの供給は、脳機能の恒常性を維持するために必須である。神経が活動すると、それにともない局所的な脳血管の拡張が生じ、脳血流が上昇する (Roy and Sherrington, 1890)。脳血流が上昇すると神経活動部位への酸素やグルコースの供給が増大する (Attwell et al., 2010)。脳神経活動時における血管拡張は、神経活動による神経細胞や周辺のグリア細胞の一種であるアストロサイトから放出される血管拡張因子により生じるとされているが (Gordon et al., 2008; Iadecola, 2004)、その完全なメカニズムは明らかではない。

神経活動によりもたらされる血流変化などの脳血管反応性は、ポジトロン断層画像法 (PET) や機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI)、機能的近赤外分光法 (NIRS) 等の脳イメージング画像法の信号源として用いられている。脳血流量や脳血液量、脳酸素消費量といった脳機能の維持に関わる調節機序は認知症や脳疾患と



深く関わっていることが知られており、これらのパラメータを用いた画像診断や病態評価は、現代の臨床研究や医療現場において実際に利用されている。一例として、アルツハイマー病では神経活動時に伴う脳血管反応性が低下するといった脳機能血管障害がもたらされており、病態の増悪因子となることが報告されている (Iadecola, 2004; Nicolakakis et al., 2011)。

PET による脳内のイメージング技術は、生体内へ蛍光トレーサーを投与することで、脳血流やブドウ糖（グルコース）代謝、神経伝達機能、アミロイドなど様々な生体機能や生体内物質を画像化することができる。例えばヒト脳における脳血流や脳血液量といった脳循環動態や、酸素摂取率や酸素消費量といった酸素代謝の PET 画像は脳卒中患者の病態診断において重要なパラメータとなっている。脳卒中の評価指標としては、脳血流、脳血液量、酸素摂取率、酸素消費量等の増加、減少の程度を比較することで、病態の進行をステージ I、II、III と評価している (Nemoto et al., 2004)。脳内メカニズムの解明は病態の診断や評価、治療に大きく貢献することが期待されており、脳内イメージング法における脳循環動態や酸素代謝などの各パラメータの測定精度の向上が求められている。近年では、脳血流の機序に毛細血管が積極的に関与することも示唆されており (Itoh and Suzuki, 2012)、微小血管系などの細やかな部位の機能についても詳細に調査する必要がある。しかし、PET 装置による画像の解像度は数 mm 程度であり、これらの評価をヒトで行うには倫理的な限界が存在する。そのため、小動物を用いた基盤研究が必須となる。

小動物を用いた実験ではウレタン、 $\alpha$ -クロラロース、イソフルランなどの麻酔を用いた実験が主流であるが、麻酔は脳微小循環系の反応に影響を与える (Flecknell, 1987; Martin et al., 2006; Masamoto et al., 2007)。神経活動と脳血管反応性の正確な評価を行うためには、麻酔を使用しない覚醒状態の動物を用いて、

本来の脳機能を正確に測定する必要がある。また、脳の賦活時には、神経活動とそれにとまなう脳血流変化が引き起こされるが、これまでの脳賦活時における血管反応性に関する研究では、神経活動と脳血流の変化は別々に計測されてきた。したがって、脳の血管反応時における神経活動と脳血流の関係を明らかにするためには、両者の同時測定と比較解析が重要となる。小動物を用いてこれらを満たすことのできる脳賦活時の循環代謝測定が可能となれば、神経活動と脳の血管反応性を正確に評価することができ、病態診断や評価の向上につながる。また、ヒトを対象では行えない薬物投与実験等が可能となる。さらに、病態疾患モデル動物から、別々の測定では比較が難しい一過性の反応を同時に捉えることも可能となる。

小動物の脳はヒトと比べて非常に小さいため、循環代謝測定には高い空間解像度をもつ新たなシステム開発が必要とされる。本研究では、これら条件を満たす高速 CCD カメラシステムを用いた光イメージングシステムと、麻酔を使用しない覚醒マウスの実験系を組み合わせることで、新しい光イメージング法を構築した。この新規光イメージングシステムでは、酸素やエネルギーの供給に寄与する脳血流と脳血液量、神経活動により代謝に使われる酸素の消費量の変化を二次元的な画像として得ることが可能である。脳血流の測定にはレーザースペックルイメージング、脳血液量には内因性信号イメージング、酸素消費量の測定にはフラビンタンパク質蛍光イメージングを使用した。脳血流と脳血液量は同時測定が可能なシステムを開発し、これらイメージング法を用いたマウスの脳循環代謝における測定精度の評価を行った。本研究で用いている覚醒マウスの実験系は Takuwa らによって既に確立されている (Takuwa et al., 2011)。本実験は (独) 放射線医学総合研究所との共同研究によって行われた。

## 2. 実験方法

### 2-1. 使用した動物

実験には生後 7~11 週齢のオスの C57BL/6J マウスを 8 匹用いた。1 つのケージにつき 1 匹を飼育し、水や餌は常に十分な量を用意した。室内は 25°C に調節し、12 時間ごとの明暗周期で照明を管理した。実験ではマウスの脳表から直接測定を行うため、これまでに確立されている慢性頭窓法に従いマウス頭部に頭蓋窓を取り付けた (Tomita et al., 2005)。頭蓋窓は、脳表を暴露したマウス大脳皮質体性感覚野上部に直径約 3mm のガラスプレートを装着し、デンタルセメントを用いて頭蓋骨とガラスプレートの隙間を密封したものである。頭蓋窓からは、1 ヶ月以上にわたり安定したイメージングを行えることが確認されている (Yoshihara et al., 2013)。そのため、同一個体からの観察を長期間行うことが可能である。手術の最後に、頭部固定用のアルミ製のプレートをマウスの頭部にデンタルセメントを用いて接着した (図 1a)。マウス頭部に頭蓋窓を施す手術および固定具の装着はイソフルラン麻酔下で行っており、実験を行う 1 週間以上前にこれらの外科的処置を行った。なお、頭蓋窓の手術および動物実験等は、動物実験等に関する法令に従い、放射線医学総合研究所の機関内規程に基づいて実施した。

### 2-2. 実験手順

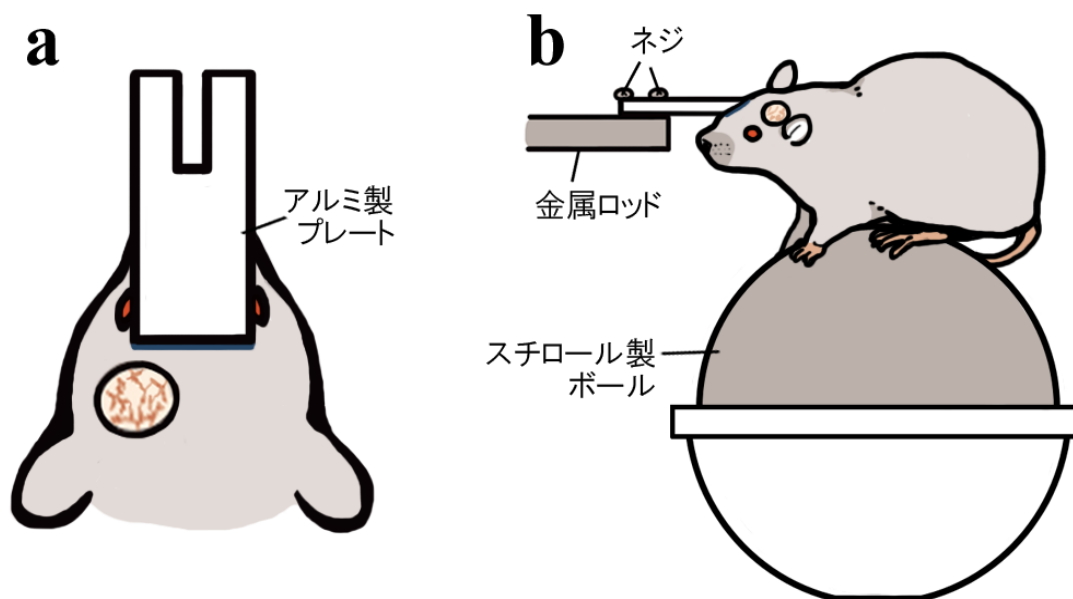
はじめに、マウスの頭部に装着したアルミ製のプレートを実験装置の金属ロッドにネジ止めし、頭部のみを固定した。この時、マウスはスチロール製のボールに乗せているため、肢の動きは拘束することなく自由に運動が可能である (図 1b)。ボールは圧縮空気によりわずかに浮遊した状態であり、マウスの運動に合わせて回転する。マウス頭部に取り付けられた頭蓋窓が対物レンズと平行にな

るよう調節し、対物レンズの真下に固定した。

次に、高速 CCD カメラ (MiCAM02、Brainvision、Tokyo、Japan) と測定装置を組み合わせた光イメージングシステムを用いて、マウスの頭蓋窓から脳表の脳血流、脳血液量、酸素消費量を測定した。高速 CCD カメラはサンプリングレート (1 秒あたりのサンプル数) が多く、本実験では 50Hz で撮影を行うことで脳表から得られる脳循環代謝の変化を正確に撮像することを可能とした。脳賦活時の脳血流、脳血液量、酸素消費量の変化を比較し、それぞれの関係性を評価するため、覚醒マウスの頬ヒゲに空気流を与えた。マウスの頬ヒゲは体性感覚野のバレル構造と対応しており、1 本のヒゲからの情報は 1 つのバレルへと伝えられる。頬ヒゲに与えられる刺激のシグナルは三叉神経核、VPM 核を介してバレルに伝達される (Erzurumlu and Gaspar, 2012)。右側の頬ヒゲは左脳、左側の頬ヒゲは右脳の体性感覚野と対応しているため、頭蓋窓を取り付けている位置と反対側の頬ヒゲに空気流を与えた。

脳血流および脳血液量の測定はそれぞれ、レーザースペckルイメージング (LSI) と内因性信号イメージング (IOSI) を用いて行った。酸素消費量の測定は、フラビンタンパク質蛍光イメージング (FAI) を用いて行った。はじめに LSI と IOSI の同時測定を 40 分間行い、次に FAI 測定を 40 分間行った。その後、レーザー Doppler 血流計 (LDF) を用いて脳血液流量の測定を 40 分間行った (図 2c)。各測定では高速 CCD カメラを用いて 40 秒間の撮影を 20~30 回行った。撮影開始 10 秒後、覚醒マウスの頬ヒゲに空気流刺激を 10 秒間与え、残り 20 秒は安静状態とした。継続的なヒゲへの空気流刺激は感受性を低下させるため、試行毎に 30 秒間のインターバルを設け、この間の撮影は行わないものとした。空気流を与えるエアーチューブはマウスに触れることなく、空気流刺激が頬ヒゲ全体にあたる位置に設置した。刺激周波数は 10 Hz とし、刺激時間および刺激

周波数は Master-8 (A.M.P.I., Jerusalem, Israel) より管理した。



**図 1. 頭部固定用プレートと実験中のマウスの設置** aはマウス頭部に装着した固定用アルミ製プレートであり、bは実験中における頭部のみを固定したマウスの様子である。頭部固定用プレートは中央部分が空いており、この間にネジを通して固定している。スチロール製のボールは圧縮空気によってわずかに浮遊しており、マウスの運動に合わせて回転する。

### 2-3. LSI と IOSI の同時測定

脳血流は LSI を用いて測定した。マウスの脳表には生体内透過性の高い 780nm のレーザー光を照射した。脳表にレーザー光を照射することで光は赤血球の動きによって散乱し、レーザー散乱光が干渉するとランダムな斑点模様 (スペckル) が生じる。このスペckルは赤血球の動体速度に比例して変化しており、

LSI 測定における高速 CCD カメラはこの変化を撮影している。撮影した画像はピクセルごとの血流量を演算して二次元マッピング化し、血流量変化の差分処理を行うことで脳血流の時間変化率を可視化した。LSI 単独の測定ではマウスの頭蓋窓から脳表の脳血流を安定して測定できることが報告されている (Takuwa et al., 2011)。

脳血液量は IOSI を用いて測定を行った。570nm のバンドパスフィルタを介したハロゲンランプ (LS-LHA、住田光学ガラス、Saitama、Japan) をマウスの脳表に照射し、その反射光を高速 CCD カメラで撮影した。血液を構成するヘモグロビン量は脳血液量の変化にともない変化する (Martin et al., 2006; Zhao et al., 2011; Ma et al., 2013)。血液内のヘモグロビンには酸素と結合した酸化ヘモグロビンと酸素と解離した還元ヘモグロビンが存在する。本実験ではこれらヘモグロビンの等吸光点に近い 570nm の光を照射した。酸化ヘモグロビンおよび還元ヘモグロビンが光を吸光するとその反射光は減少する。IOSI 測定における高速 CCD カメラはこの反射光の変化を撮影しており、反射光の変化は総ヘモグロビン量の変化を意味している。

実験では、LSI と IOSI の撮像法を組み合わせ、同測定部位から脳血流と脳血液量の同時測定を行った。2 つの異なる蛍光波長の光はダイクロイックミラー (580nm) を用いて分離した (図 2 a)。

#### 2-4. FAI 測定

酸素消費量は FAI を用いて測定した。450nm のバンドパスフィルタを介したハロゲンランプをマウスの脳表に照射し、脳細胞から発せられる自家蛍光強度変化を高速 CCD カメラで撮影した。脳神経活動時には酸素が消費される。酸素代謝が拮抗することで、ミトコンドリア電子伝達系内のフラビン蛋白は酸化型

となる。この酸化型フラビン蛋白は青色波長の光を照射すると緑色波長の自家蛍光を発する。FAI 測定で用いる 450nm の励起光は青色波長の光であり、これにより発せられた脳細胞からの自家蛍光は、ロングパスフィルタ (> 500nm) を介して 535nm のバンドパスフィルタを通り、高速 CCD カメラによりその蛍光強度が撮影される (図 2 b)。ここで得られる自家蛍光強度の変化は、酸素消費量の変化を反映している。

## 2-5. LDF 測定

LDF (FLO-C1、OMEGAWAVE、Tokyo、Japan) を用いた脳血流および赤血球濃度の計測は、前述の測定より得られた体性感覚野の関心領域 (ROI) で行った。LDF プロブ (Type NS、OMEGAWAVE、Tokyo、Japan) は ROI の脳表と垂直になるよう設置した。LDF 測定はプロブ先端から照射したレーザー光 (780nm) の反射光を電気信号に変換することで、生体組織の血流情報を検出することができる。反射光は赤血球の動きによってドップラー効果を受ける。ここで生じる光の周波数変調 (ドップラーシフト) の程度は赤血球速度の変化を示し、光量は赤血球濃度の変化を示す。これらの積から脳血流が求められる。従って LDF システムは脳血流、赤血球速度、赤血球濃度の 3 つのパラメータを同時に得ることができる。また、LDF は半径約 1mm 半球における脳血流量の変化を測定することが可能である (Nilsson, 1984)。記録はアナログデータレコーダー AcqKnowledge (Biopac Systems、Goleta、CA) を用いて行った。サンプリングレートは 10 Hz であり、データは 20 試行の平均値とした。

## 2-6. データ解析

LSI と IOSI の同時測定より得られた画像から直径約 1mm の ROI を定め、そ

れぞれで計測される脳血流、脳血液量の時間反応曲線を ROI から求めた。同時測定より決定した ROI は位置や大きさを固定したまま保存が可能である。FAI 測定より得られた画像にも同じ ROI を適用し、そこから酸素消費量の時間反応曲線を求めた。LSI と IOSI 同時測定と FAI 測定は連続して行っており、測定法の切り替えにはロングパスフィルタの設置とバンドパスフィルタの入れ替え作業を行うのみで、マウスへの接触や固定位置の移動等を行わない。そのため、LSI と IOSI 同時測定、FAI 測定における時間反応曲線は、同一領域から得られたものである。LDF 測定もこれら ROI 上に LDF プローブを設置して行っている。LSI と IOSI 同時測定による脳血流および脳血液量の変化と、LDF による脳血流および赤血球濃度の変化は、同じ領域から得られたものであるといえる。LSI および IOSI による脳血流量と脳血液量の反応率や、LDF による脳血流、赤血球濃度の反応率は、ベースラインと 10 秒間の賦活刺激時の反応を比較することで求めた。FAI による酸素消費量の賦活時の反応率は、脳血液による影響があるため、ベースラインと刺激開始 2 秒間における賦活時の反応を比較して求めた。統計分析には t 検定および相関係数を用いた。



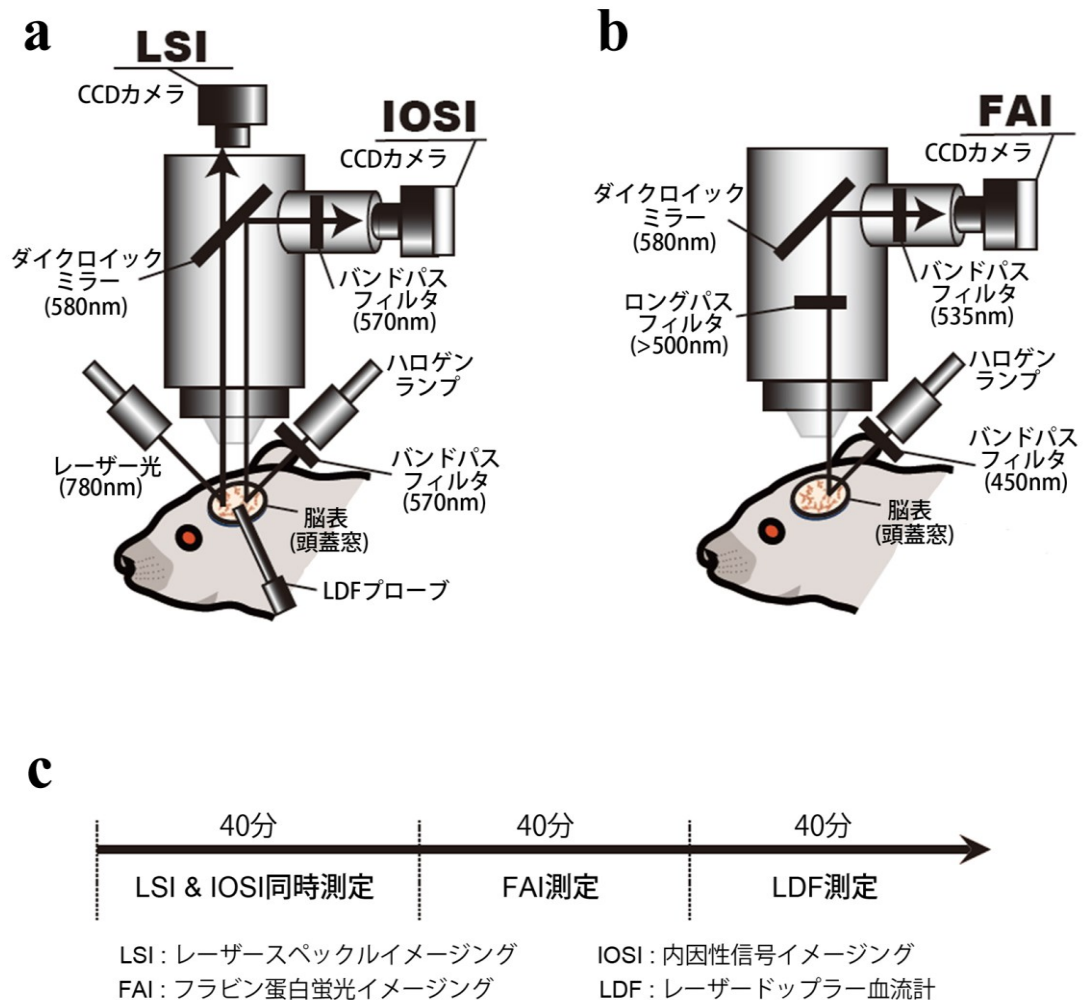


図 2. 実験装置の模式図と実験プロトコル (a) LSI と IOSI の同時測定および LDF 測定による実験装置の模式図と、(b) FAI 測定の模式図を示す。実験のプロトコルを (c) に示す。はじめに、LSI と IOSI 同時測定を行い、その後、ロングパスフィルタの設置とバンドパスフィルタを入れ替え、FAI 測定を行った。最後に LDF 測定を行った。各測定時間は 40 分とした。Takuwa et al., 2014 より引用、一部改変。

### 3. 結果

#### 3-1. LSI、IOSI、FAI によるイメージング画像

イメージング画像は1個体につき約20試行の平均をとったものである。基となるベースライン画像と、脳血流、脳血液量、酸素消費量の様子を示したそれぞれの安静時（賦活刺激1秒前）、賦活時の刺激1秒後と5秒後の画像を比較した（図3）。マウス頬ヒゲへの空気流刺激による賦活開始から1秒後にFAIにおいて大きな反応がみられ、酸素消費量の増加が確認された（図3FAI）。賦活開始5秒後ではLSIとIOSIにおいて大きな反応がみられ、それぞれ脳血流と脳血液量の増加が確認された（図3LSI、IOSI）。賦活による脳循環動態と酸素代謝をLSI、IOSI、FAIによるイメージング画像の比較から、脳賦活時には先に酸素消費量が上昇し、その後、脳血流および脳血液量の増加が起こることが確認された。図3のLSI測定によるイメージング画像では光の強度変化率を±10%としており、IOSIおよびFAIのイメージング画像では変化率を±4.5%として示している。このことから、LSIによって測定される脳血流の増加率は、IOSIによる脳血液量やFAIによる酸素消費量の増加率よりも大きいことが明らかとなった。

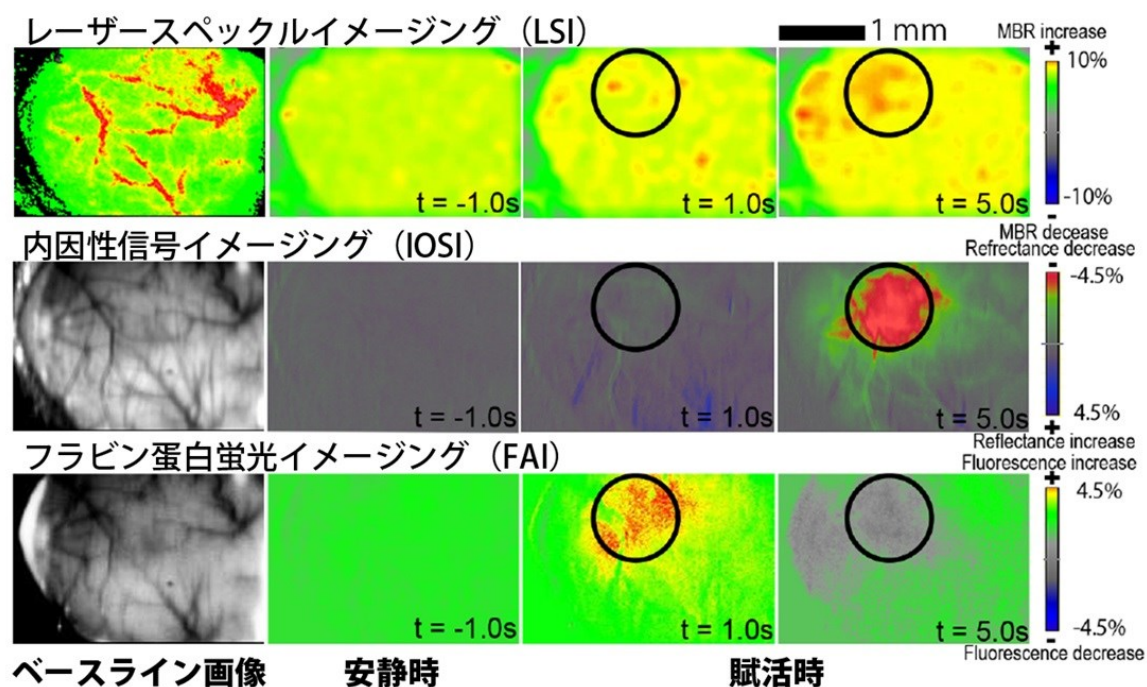


図3. 脳血流、脳血液量、酸素消費量イメージング画像 1個体の脳表から得た画像サンプルを示す。上からLSIによる脳血流、IOSIによる脳血液量、FAIによる酸素消費量を表すイメージング画像。左からベースライン、安静時、賦活刺激1秒後と5秒後のイメージング画像。賦活1秒後ではFAI測定による反応が大きく、5秒後ではLSIとIOSI測定による反応が大きい。脳賦活時では先に酸素消費量が上昇し、その後脳血流、脳血液量が上昇することを意味している。黒丸は関心領域であるROIを示す。画像はマウス左脳の体性感覚野に設置した頭蓋窓をほぼ全体的に撮像したものであり、上側がマウスの鼻先である。イメージング画像は頬ヒゲへ空気流刺激を与えるテスト20試行分を平均して得た。Takuwa et al., 2014 より引用、一部改変。

### 3-2. LSI、IOSI、FAI、LDF による時間反応率

体性感覚野上の ROI から LSI、IOSI、FAI、LDF 測定によるそれぞれのパラメータの時間経過における反応率を時間反応曲線として示した。

#### 3-2-1. LSI と IOSI 同時測定による時間反応曲線

LSI と IOSI の同時測定における時間反応曲線は、刺激開始から両者とも上昇しており、脳賦活によって脳血流と脳血液量が増加したことが確認された (図 4 LSI & IOSI)。LSI と IOSI の増加率を比較すると、LSI による脳血流の増加率が大きいことがわかる。刺激終了後、どちらのパラメータもわずかに上昇し、その後、緩やかな下降を示した。ベースラインと賦活時の増加率を比較すると、LSI による脳血流は IOSI による脳血液量よりも有意に高く ( $P < 0.01$ )、LSI で  $7.6 \pm 3.7\%$ 、IOSI で  $2.7 \pm 1.8\%$ であった (図 5 a)。

#### 3-2-2. FAI 測定による賦活時の反応

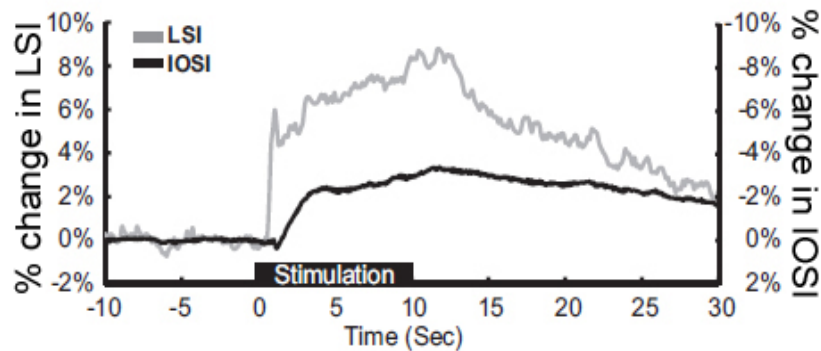
FAI 測定からのシグナルは酸素消費量を反映している。FAI の時間反応曲線から、賦活後すぐに酸素消費量が増加していることがわかる (図 4 FAI)。その後は急激な下降を示し、賦活刺激終了後も緩やかな低下を示した。この緩やかな低下は、脳血液量の増加が影響している可能性がある (考察参照)。刺激前のベースラインと刺激後 2 秒間の反応率を比較した FAI (酸素消費量) の増加率は  $1.9 \pm 0.8\%$ であった。LSI、IOSI による脳血流、脳血液量の増加率と比較すると、FAI の増加率はそれらよりも小さいことが明らかとなった。

#### 3-2-3. LDF 測定による賦活時の反応

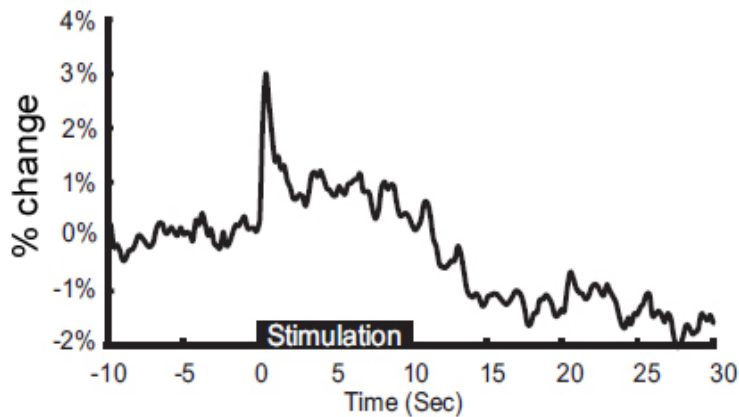
LDF 測定より、脳血流と赤血球濃度の時間反応曲線を示した (図 4 LDF)。刺

激後、脳血流量、赤血球濃度は徐々に上昇し、刺激終了後は緩やかな下降を示した。賦活時における脳血流、赤血球濃度の増加率を比較すると、脳血流は  $5.6 \pm 1.2\%$ 、赤血球濃度は  $2.8 \pm 1.7\%$ であった(図 5 b)。LSI と IOSI の反応と同様に、脳血流量の変化は赤血球濃度と比較し、有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。

## LSI & IOSI



## FAI



## LDF

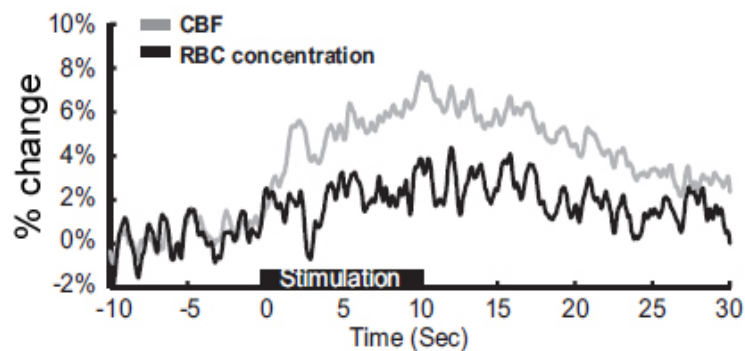


図4. 各パラメータの時間反応曲線 上から、LSIとIOSIの同時測定、FAI測定、LDF測定によるROIより得られた時間反応曲線を示す。縦軸は反応率、横軸は刺激開始10秒前から刺激後30秒、計40秒間の時間を示している。LSI、IOSIの同時測定において、グレーの線は脳血流、黒の線は脳血液量を示している。FAI測定では酸素消費量を示し、LDFではグレーの線が脳血流、黒の線が赤血球濃度を示している。各測定による時間反応曲線は同一のROIから得られたものである。Takuwa et al., 2014より引用改変。

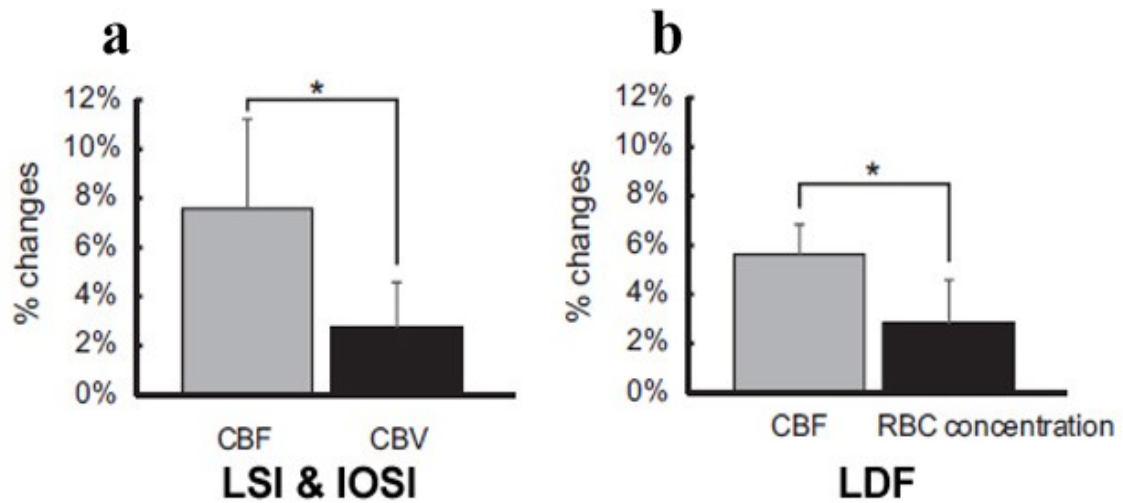


図 5. 賦活時における LSI と IOSI の同時測定と LDF 測定による血流量と赤血球濃度の増加率 (a) LSI、IOSI 同時測定による賦活時の脳血流 (CBF) と脳血液量 (CBV) の増加率を示す。(b) LDF 測定による賦活時の脳血流 (CBF) と赤血球濃度 (RBC concentration) の増加率を示す。縦軸は刺激前のベースラインを 0%とした場合の変化率を示している。\* :  $P < 0.05$ 。Takuwa et al., 2014 より引用改変。

## 4. 考察

### 4-1. LSI および IOSI 同時測定と LDF 測定と比較

頬ヒゲに対して空気流刺激を与えた時の覚醒マウスの脳表における脳血流および脳血液量の変化を LSI と IOSI の同時測定により評価した。体性感覚野上の脳表に設置した約 1mm の ROI から得られた反応曲線より、賦活時の脳血液量の増加率は脳血流のそれよりも小さいことが確認された (図 4 LSI & IOSI)。ヒトの PET 研究において、脳賦活時の脳血流の増加は脳血液速度に寄与しており、脳血液量の関与は小さいことが報告されている (Ito et al., 2003)。LSI と IOSI の同時測定により得られた結果は、これらの関係性と一致した。また、賦活後からの脳血流の増加と、脳血液量の増加のタイミングにわずかなズレが確認された。これは、脳血流が先に上昇したことによって、ヘモグロビン量 (脳血液量) が増えたために生じた結果であると考えられる。

覚醒マウスを用いた LDF 測定は、脳血流および赤血球濃度の変化を安定して評価することが可能である (Takuwa et al., 2011, 2012, 2013a, b)。賦活時における赤血球濃度の増加率は脳血流の増加率よりも低いことが明らかとなっており、本実験で行った LDF 測定においても同様の結果が得られた (図 4 LDF)。全血液中における赤血球容積率を示すヘマトクリットは、ヘモグロビンと並行して変動しており、血液量はヘモグロビン量に依存する (Ma et al., 2013; Martin et al., 2006; Zhao et al., 2011)。IOSI による脳血液量の測定は、脳血液内の酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの総ヘモグロビン量の変化を反映していることから、IOSI 測定で得られる脳血液量の変化は、LDF 測定で測定される赤血球濃度の変化に対応すると考えられる。LSI と IOSI の同時測定により得られる脳血流、脳血液量の賦活時における増加率変化と、LDF 測定より得られる脳血流、赤血球濃度の賦活時における増加率変化が類似している点もこのことを支持している。



LSI と LDF によるそれぞれの脳血流の増加率を比較すると、両者の増加率に有意な相関認められた ( $r < 0.85$ 、図 6 a)。両者の相関性は麻酔下にあるラットを用いた研究においても確認されている (Dunn et al., 2001)。LSI による脳血流量の増加は LDF で測定されるものよりもわずかに高い値を示す(図 5)。これは、同測定部位から測定される深さの違いによりもたらされると考えられる。脳の賦活によって、細動脈はその径を拡張させることで脳血流の増加を引き起す。LSI は脳表の血流変化を測定しており、LDF は脳表から約 1mm 半球の血流量変化を測定している。脳表より深部には多くの毛細血管が存在する。半球 1mm の範囲内から得られる脳血流の変化は、脳表の大きな血流量の変化以外に、深部の毛細血管におけるわずかな血流量の変化も捉え、平均化している可能性が高い。そのため、LDF による脳血流の増加率は LSI による脳血流の増加率よりも低い値を示した可能性がある。IOSI による脳血液量の増加率と LDF による赤血球濃度の増加率を比較すると、両者ともほぼ同程度の値を示し、有意な相関があることが認められた ( $r < 0.92$ 、図 6 b)。毛細血管における赤血球の割合は変化しないことから (Chen et al., 1994)、LDF により測定される約 1mm 半球における赤血球量は一定であると仮定される。ヘマトクリットはヘモグロビンとともに変動することから、一定量の赤血球量における総ヘモグロビン量は一定である。そのため、IOSI による脳血液量 (総ヘモグロビン量) と LDF による赤血球濃度の変化は類似した結果となったと考えられる。

覚醒マウスから得られる LSI と IOSI の同時測定による脳血流、脳血液量の変化は、ヒトの PET 研究より得られた賦活時の脳血流、脳血液量の変化とよく一致し (Ito et al., 2003, 2005)、同一部位から測定した LDF による脳血流、赤血球濃度の変化とも有意な相関が得られた。LSI、IOSI の同時測定は脳血流と脳血液量の関係性を的確に評価できるものと期待できる。

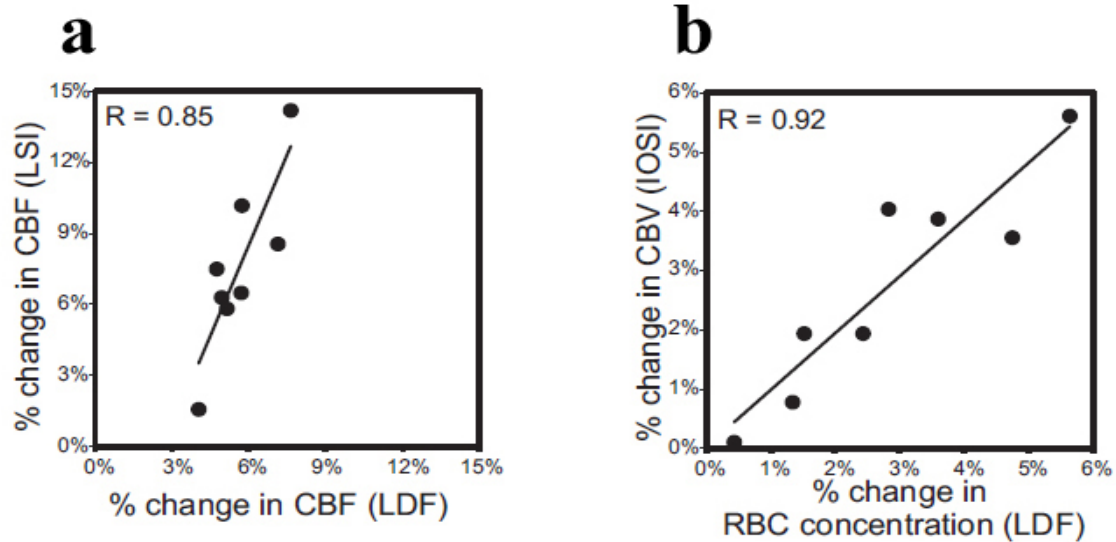


図 6. LSI、IOSI 同時測定と LDF 測定による増加率の比較 (a) : 賦活時における脳血流の増加率についての相関。縦軸は LSI による脳血流、横軸は LDF による脳血流の増加率を示す。(b) : 賦活時における脳血液量と赤血球濃度の増加率についての相関。縦軸は IOSI による脳血液量、横軸は LDF による赤血球濃度を示す。LSI、IOSI 同時測定と LDF 測定で得られたそれぞれのパラメータには、有意な相関が認められた。(a) :  $r < 0.85$ 、(b) :  $r < 0.92$ 。Takuwa et al., 2014 より引用。

## 4-2. FAI 測定と LSI 測定と比較

脳内における神経細胞と血管系は密接な相互関係をもち、神経活動には多くのエネルギーと酸素を必要とする。脳血管系はこれらを供給しており、脳神経の活動時には酸素の消費量が増加する。酸素を消費し、エネルギー代謝を行うことで生じるミトコンドリア電子伝達系内の酸化型フラビン蛋白の自家蛍光強度の変化は、感覚刺激および神経活動に依存しているため、脳機能イメージングに適していることが報告されている (Shibuki et al., 2003; Vazquez et al., 2012)。FAI 測定は動物実験において神経活動を評価するために広く用いられている (Honma et al., 2013; Neethu et al., 2014; Shibuki et al., 2003; Takahashi et al., 2006; Vazquez et al., 2012)。これまでに、ヒトの PET 研究において、神経活性時の脳血流の増加率は、酸素消費量よりも大きいことが明らかとなっている (Ito et al., 2005; Seitz and Roland, 1992; Vafae and Gjedde, 2000)。本実験においても、LSI、IOSI 同時測定における LSI (脳血流) の賦活時の増加率が、FAI 測定による酸素消費量のそれよりも大きいことを確認した (図 4 LSI & IOSI, FAI)。

図 3 より、覚醒マウスの頬ヒゲに空気流刺激を与えて脳を賦活させると、先に酸素消費量が増加し、その後、脳血流、脳血液量の増加が起ることを確認した。一方で、脳血流、脳血液量が増加するとともに酸素代謝量が大きく減少した。これには、脳血流量が増えたことによる血液内のヘモグロビンの増加が影響しているものと考えられる。FAI 測定では 450 nm の励起光をマウス脳表に照射することで、脳細胞から発せられる自家蛍光強度の変化を測定している。ここで発せられた自家蛍光の波長は、ヘモグロビンが吸光する波長でもある。神経活性時の酸素消費にともない脳血流が上昇することで、総ヘモグロビンが増加する。ヘモグロビンの増加は自家蛍光の吸光を強くする。したがって、FAI による賦活時数秒後の自家蛍光強度の急激な低下には、ヘモグロビンによる自

家蛍光の吸光が関与している可能性が高い。ヘモグロビンがどの程度影響しているのか明確ではないため、今後、IOSI 測定による脳血液量と FAI 測定による酸素消費量の変化を同時に測定可能なシステムを構築し、FAI の下降時と IOSI の上昇時の傾向を比較する必要がある。

酸素消費量 ( $CMRO_2$ ) と脳血流量 (CBF) の関係式は、酸素摂取量 OEF と動脈血全体の酸素含有量  $C_a$  より、 $CMRO_2 = CBF \times OEF \times C_a$  と表される。神経活動時に伴う脳血流の増加による酸素やエネルギーの供給は、エネルギー需要の変化に見合うものであるかどうか、未だ明確ではない。Hyder らより、有効酸素拡散能 D 値を組み込むことで、神経活動の変化にともなう酸素消費量の変化 (需要) に見合っただけの脳血流の変化 (供給) が起こると定義されている (Hyder et al., 1998)。Hyder らのモデルより、D 値と CBF、OEF の関係は  $OEF = 1 - e^{(-D/CBF)}$  と表される。D 値は PET により測定された OEF、CBF の値で求めることが可能である。Hyder らのモデルを、はじめに記した  $CMRO_2$  と CBF の関係式に当てはめると  $CMRO_2 = CBF \times C_a \times (1 - e^{(-D/CBF)})$  の関係式が成り立つ。

酸素消費量  $CMRO_2$  と脳血流量 CBF の関係は D 値によって決定することがわかる。Hyder らのモデルは毛細血管から脳組織への酸素拡散について定義するものであり、D 値は毛細血管の体積に比例するパラメータを意味する。D 値は神経活動の変化にともなう毛細血管の血管径の変化に依存していると想定してシミュレーションを行い、慢性低酸素環境下ではマウス脳血管径の拡張、急性高酸素環境下では血管収縮が観察された。その結果、D 値が脳組織における毛細血管径の変化と関係していることが確認された (Tajima et al., 2014; Takuwa et al., 2013a)。

これまでの酸素消費量  $CMRO_2$  は仮定した値であったが、本実験の FAI 測定により得られた値を  $CMRO_2$  として置き換えたところ、これまでのシミュレーショ

ンとほぼ一致した結果が得られた。したがって、酸素消費量と脳血流は、有意な相関があることが明らかとなった ( $r < 0.91$ 、図 7)。

覚醒マウスから得た FAI による酸素消費量の変化は、ヒトの PET 研究より得られた結果と同様の傾向を示し、かつ、シミュレーション研究から得られた結果とも一致していることから、今後の覚醒状態の動物を用いた基礎研究に有用であることが示唆される。

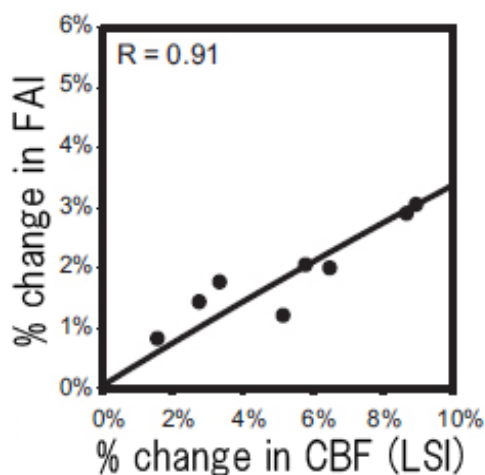


図 7. FAI と LSI 測定より得られた酸素消費量と脳血流の増加率の比較 賦活時における酸素消費量と脳血流の増加率についての相関。縦軸は FAI による酸素消費量の賦活時の増加率、横軸は LSI による脳血流の賦活時の増加率を示す。FAI と LSI の増加率の関係は、シミュレーション結果と有意な相関が得られた。  $r < 0.91$ 。Takuwa et al., 2014 より引用。

### 4-3. 今後の課題

本研究では、麻酔の影響のない覚醒状態のマウスから脳血流、脳血液量の変化を同時に測定可能な LSI と IOSI の同時測定法および、酸素消費量の変化を測定可能な FAI 測定法を確立した。これら測定法から得られた結果は、ヒトの PET 研究や先行研究の結果とよく一致しており、脳内の血流動態と酸素代謝の関係を適正に評価できることが期待される。LSI 測定と IOSI 測定を同時に行うことで、一過性の事象を 2 つのパラメータで得ることができ、これらの関係性を比較しながら検討することが可能となる。脳活動における脳血流、脳血液量、酸素消費量を測定することは、神経活動と脳の血管反応性の関係を評価することが可能であり、病態の診断や評価に非常に有用である。

光イメージングは空間解像度が高いため、マウスなど小動物の脳機能解析に適している。マウスは多くの病態モデルが存在し、侵襲的な解析や薬剤投与などを行う研究が可能であることから、新たな光イメージングによる計測はこれら病態疾患の基礎研究に有効である。FAI 測定による酸素消費量の変化は、ヘモグロビン量の変化が影響していることから、今後、FAI と IOSI による酸素消費量と脳血液量の同時測定法を構築する必要がある。また、これら光イメージングにより得られた 3 つのパラメータ（脳血流、脳血液量、酸素消費量）が、PET 測定で得られるパラメータとどの程度対応するか、実際の動物 PET 計測から得られる結果と比較する必要がある。動物用 Open PET は検出器と測定対象動物との間に広いスペースがあるため、これら光イメージングシステムを組み込むことが可能である (Tashima et al., 2012)。動物 PET と光イメージングシステムを組み合わせることで、複数の脳機能パラメータの関係性を詳細に明確にすることができる。病態モデルマウスを用いた応用研究や、病態メカニズムの解明に大きく貢献できることが期待できる。

## 5. 参考文献

- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, MacVicar BA, Newman EA. 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468:232–243.
- Chen JL, Wei L, Bereczki D, Hans FJ, Otsuka T, Finnegan W, Patlak C, Fenstermacher L. 1994. Slightly altered permeability-surface area products imply some cerebral capillary recruitment during hypercapnia. *Microvasc Res* 48:190–211.
- Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA. 2001. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 195–201.
- Erzurumlu RS, Gaspar P. 2012. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *Eur J Neurosci* 10:1540–53.
- Flecknell PA. 1987. *Laboratory Animal Anaesthesia: An Introduction for Research Workers and Technicians*. Academic Press.
- Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, MacVicar BA. 2008. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 11:745–749.
- Honma Y, Tsukano H, Horie M, Ohshima S, Tohmi M, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takahashi S, Shibuki K. 2013. Auditory cortical areas activated by slow frequency-modulated sounds in mice. *PLoS One* 8: e68113.
- Hyder F, Shulman RG, Rothman DL. 1998. A model for the regulation of cerebral oxygendelivery. *J Appl Physiol* 85:554–64.
- Iadecola C. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347-360.
- Ito H, Ibaraki M, Kanno I, Fukuda H, Miura S. 2005. Changes in cerebral blood flow and cerebral oxygen metabolism during neural activation measured by positron

- emission tomography: comparison with blood oxygenation level-dependent contrast measured by functional magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:371–377.
- Ito H, Kanno I, Ibaraki M, Hatazawa J, Miura S. 2003. Changes in human cerebral blood flow and cerebral blood volume during hypercapnia and hypocapnia measured by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:665–670.
- Itoh Y, Suzuki N. 2012. Control of brain capillary blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1167–176.
- Ma H, Zhao M, Schwartz TH. 2013. Dynamic neurovascular coupling and uncoupling during ictal onset, propagation, and termination revealed by simultaneous in vivo optical imaging of neural activity and local blood volume. *Cereb Cortex* 23:885–899.
- Martin C, Martindale J, Berwick J, Mayhew J. 2006. Investigating neural-hemodynamic coupling and the hemodynamic response function in the awake rat. *Neuroimage* 32:33–48.
- Masamoto K, Kim T, Fukuda M, Wang P, Kim SG. 2007. Relationship between neural, vascular, and BOLD signals in isoflurane-anesthetized rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 17:942–950.
- Neethu M, Hans-Joachim B, Siegrid L. 2014. Flavoprotein autofluorescence imaging of visual system activity in zebra finches and mice. *PLoS One* 9: e85225.
- Nemoto EM, Yonas H, Kuwabara H, Pindzola RR, Sashin D, Meltzer CC, Price JC, Chang Y, Johnson DW. 2004. Identification of hemodynamic compromise by cerebrovascular reserve and oxygen extraction fraction in occlusive vascular



- disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 10:1081-9.
- Nicolakakis N, Hamel E. 2011. Neurovascular function in Alzheimer's disease patients and experimental models. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1354-1370.
- Nilsson GE. 1984. Signal processor for laser Doppler tissue flowmeters. *Med Biol Eng Comput* 22:343–348.
- Roy CS, Sherrington CS. 1980. On the regulation of the blood-supply of the brain. *J Physiol* 11:85-158.
- Seitz RJ, Roland PE. 1992. Vibratory stimulation increases and decreases the regional cerebral blood flow and oxidative metabolism: a positron emission tomography (PET) study. *Acta Neurol Scand* 86:60–67.
- Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M, Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T, Tanaka R. 2003. Dynamic imaging of somatosensory cortical activities in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol* 549: 919–927.
- Tajima Y, Takuwa H, Nishino A, Matsuura T, Kawaguchi H, Ikoma Y, Taniguchi J, Seki C, Masamoto K, Kanno I, Saeki N, Ito H. 2014. Cerebral hemodynamic response to acute hyperoxia in awake mice. *Brain Res* 1557:155–163.
- Takahashi K, Hishida R, Kubota Y, Kudoh M, Takahashi S, Shibuki K. 2006. Transcranial fluorescence imaging of auditory cortical plasticity regulated by acoustic environments in mice. *Eur J Neurosci* 23:1365–1376.
- Takuwa H, Autio J, Nakayama H, Matsuura T, Obata T, Okada E, Masamoto K, Kanno I. 2011. Reproducibility and variance of a stimulation-induced hemodynamic response in barrel cortex of awake behaving mice. *Brain Res* 1369:103–111.
- Takuwa H, Matsuura T, Obata T, Kawaguchi H, Kanno I, Ito H. 2012. Hemodynamic changes during somatosensory stimulation in awake and isoflurane-anesthetized

- mice measured by laser-Doppler flowmetry. *Brain Res* 1472:107–112.
- Takuwa H, Masamoto K, Yamazaki K, Kawaguchi H, Ikoma Y, Tajima Y, Obata T, Tomita Y, Suzuki N, Kanno I, Ito H. 2013a. Long-term adaptation of cerebral hemodynamic response to somatosensory stimulation during chronic hypoxia in awake mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:774–779.
- Takuwa H, Tajima Y, Kokuryo D, Matsuura T, Kawaguchi H, Masamoto K, Taniguchi J, Ikoma Y, Seki C, Aoki I, Tomita Y, Suzuki N, Kanno I, Ito H. 2013b. Hemodynamic changes during neural deactivation in awake mice: a measurement by laser-Doppler flowmetry in crossed cerebellar diaschisis. *Brain Res* 6:350–355.
- Tashima H, Yamaya T, Yoshida E, Kinouchi S, Watanabe M, Tanaka E. 2012. A single-ring OpenPET enabling PET imaging during radiotherapy. *Phys Med Biol* 57:4705–4718.
- Tomita Y, Kubis N, Calando Y, Tran Dinh A, Meric P, Seylaz J, Pinard E. 2005. Long-term *in vivo* investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:858–867.
- Yoshihara K, Takuwa H, Kanno I, Okawa S, Yamada Y, Masamoto K. 2013. 3D analysis of intracortical microvasculature during chronic hypoxia in mouse brains. *Adv Exp Med Biol* 765:357–363.
- Vafaee MS, Gjedde A. 2000. Model of blood-brain transfer of oxygen explains nonlinear flow-metabolism coupling during stimulation of visual cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:747–754.
- Vazquez AL, Fukuda M, Kim SG. 2012. Evolution of the dynamic changes in functional

cere-bral oxidative metabolism from tissue mitochondria to blood oxygen. J CerebBlood Flow Metab 32:745–58.

Zhao M, Nguyen J, Ma H, Nishimura N, Schaffer CB, Schwartz TH. 2011. Preictal and ictal neurovascular and metabolic coupling surrounding a seizure focus. J Neurosci 31:13292–13300.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始丁寧なご指導を賜りました岩手大学の松浦哲也先生および関係して下さった全ての先生方、(独)放射線医学総合研究所の田桑弘之研究員や多くの皆様に深く感謝申し上げます。同研究室のメンバーからは様々な刺激を得ることができました。この場をかりて感謝申し上げます。