

博士学位論文

C. elegans の低温耐性における温度情報伝達の分子制御機構

Molecular mechanism for temperature signaling in cold tolerance of *C. elegans*.

宇治澤 知代

Tomoyo Ujisawa

2017 年 1 月

甲南大学大学院 自然科学研究科 生命・機能科学専攻

Graduate School of Natural Science, Konan University

目次

| | |
|--|-----|
| 要旨 | p1 |
| 1. 序論 | |
| 1.1 生物の温度適応 | p3 |
| 1.2 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> | p4 |
| 1.3 感覚情報伝達の分子生理機構 | p5 |
| 1.4 温度受容メカニズム | p8 |
| 2. 結果 | |
| 2.1 <i>C. elegans</i> の低温耐性 | p10 |
| 2.2 低温耐性と発生ステージの関連性の有無 | p11 |
| 2.3 低温耐性の獲得と消失に必要な時間 | p13 |
| 2.4 低温耐性に関わる組織 | p15 |
| 2.5 低温耐性に関わる感覚ニューロンの同定 | p18 |
| 2.6 ASJ 感覚ニューロンのカルシウムイメージング | p20 |
| 2.7 ASJ 内における光受容と温度情報伝達 | p23 |
| 2.8 ASJ 感覚ニューロンにおける G タンパク質経路を介した温度応答 | p26 |
| 2.9 ホスホジエステラーゼ変異体における ASJ 感覚ニューロンの温度応答 | p28 |
| 2.10 低温耐性における組織間ネットワーク制御 | p31 |
| 2.11 DAF-16 下流遺伝子の解析 | p33 |

| | |
|---------------------------|------|
| 3. 考察 | |
| 3.1 ASJ 感覚ニューロンで制御される低温耐性 | p37 |
| 3.2 ASJ 感覚ニューロン内の情報処理 | p38 |
| 3.3 低温耐性に関わる組織 | p40 |
| 4. 結語 | p43 |
| 5. 材料・方法 | p44 |
| 謝辞 | p53 |
| 引用文献 | p54 |
| 図・表 | p61 |
| 公表論文リスト | p101 |

要旨

温度は生物の生存にとって欠かせない環境情報である。生物は、めまぐるしく変化する環境温度下において生存するために、複雑な体内メカニズムを巧みに働かせている。しかし、この分子制御メカニズムには未知の点が残されている。本研究では、シンプルなモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて動物の温度応答メカニズムの解明を目指し解析を行った。動物の低温に対する応答メカニズムを解析するための実験系として、*C. elegans* の低温耐性現象を見つけた。低温耐性とは、15℃で飼育された個体は2℃の低温刺激後も生存できるが、20℃や25℃で飼育された個体は2℃の低温刺激後に死滅する現象である。また、25℃飼育個体は、わずか3時間15℃に置くことで2℃の低温刺激後も生存できるようになる。本研究では、この現象を指標にして低温耐性を制御する分子生理機構と組織ネットワークの解析をおこなった。低温耐性を制御する細胞を同定するために、神経系や腸などの組織に異常をもつ変異体の低温耐性を解析したところ、感覚ニューロンで機能する cGMP 依存性チャネル TAX-4 の変異体において低温耐性の異常が観察された。さらに、*tax-4* 変異体の頭部の ASJ 感覚ニューロンで *tax-4* 遺伝子を発現させたところ、低温耐性の異常が回復した。これまでに、ASJ 感覚ニューロンは光を感じる感覚ニューロンとして知られていた。そこで、ASJ 感覚ニューロンが光だけでなく温度をも感知しているのかを、カルシウムイメージング解析を用いて調べたところ、ASJ の温度に対する応答性が確認された。ASJ 感覚ニューロンの光情報伝達に関わる 3 量体 G タンパク質経路の変異体を調べたところ、低温耐性の異常がみられた。つまり、光と温度は同じ細胞において共通の分子経路を介して情報を下流へ伝達することが示唆された。低温耐性の表現型とカルシウムイメージングによる解

析から、ASJ 感覚ニューロンにおいて、複数の $G\alpha$ タンパク質、グアニル酸シクラーゼ、ホスホジエステラーゼが各々共同的に機能していることが示唆された。ASJ はシナプス部位からインスリンを分泌し、腸や神経系がインスリンを受容することが示唆された。さらに、インスリン情報伝達経路の下流で機能する FOXO 型転写因子 DAF-16 による遺伝子の発現制御などを受けて全身の低温耐性が制御されることが見つかった。

1. 序論

1.1 生物の温度適応

温度は地球上どのような環境下においても感じられ、温度情報を遮断することはできない。環境温度は1日、1年を通して時々刻々と変化するため、ヒトを含め生物には温度の変化を受容し、それに対して応答する生体メカニズムが存在する。恒温動物では、体内の温熱恒常性を維持するメカニズムをもつ。これは体温低下を防ぐ体温調節機能であり、蓄えておいた糖質や脂質をエネルギー源として消費し熱産生をして、体温調節している。このような体温調節は、脳の視索前野にある温度感受性ニューロンで制御されており、このニューロンが深部体温の変化を感知することと、環境温度の変化を皮膚にある受容器が感知し、皮膚で感じた温度を視索前野へ情報伝達することが環境温度の変化に応じた体温調節反応には必要である(Nakamura, 2011)。恒温動物だけでなく、変温動物にも温度耐性のメカニズムが存在する。昆虫では、細胞膜に不飽和脂肪酸を多くもつことで膜の流動性を保ち、低温環境下でも固まらないようにしている。また、細胞内のアミノ酸や糖類等の不凍結物質を細胞内に保持することで浸透圧を調節することや、高温や低温状況からの回復時に細胞が破壊されることを防ぐために、ヒートショックタンパク質(HSP)が機能することが知られている(Tsumiki *et al.*, 2010)。これらの低温耐性の分子メカニズムは、植物にも同様に存在する。*C. elegans* にも HSP やヒートショック因子(HSF)が温度ストレスを感じると機能することが知られている。しかし、温度情報の受容から応答に至るまでの複数の組織を介した情報伝達経路には未知の点が残されている。

線虫 *C. elegans* には、温度に対する耐性メカニズムとして高温耐性があること

が知られている。*C. elegans* には L1、L2、L3、L4 の 4 つの幼虫期があるが、L1 の時期に 27℃以上の高温環境下に置かれることで dauer と呼ばれる耐性幼虫期(L2d)に入る。dauer となった個体は、体が細くて代謝活動が鈍くエネルギー状態が低下している。口は厚いクチクラ層で覆われ、外部環境を遮断することで劣悪な環境を耐えしのいでいる。この耐性幼虫期への導入条件は、高温ストレスだけでなく個体密度の増加や餌の条件にも左右される。これを制御するのは ADF、ASG、ASI、ASJ などの感覚ニューロンで、細胞内の機能分子や耐性幼虫フェロモンも見つかっている (Bargmann and Horvitz, 1991b; Fielenbach and Antebi, 2008)。しかしながら、低温に対する耐性メカニズムは知られていなかった。

1.2 線虫 *Caenorhabditis elegans*

線虫 *C. elegans* は、雌雄同体で体長が約 1 mm の非寄生性生物であり、全 959 個の体細胞数のうち 302 個が神経細胞である (Brenner, 1974)。これら神経細胞同士の化学シナプス及びギャップ結合は電子顕微鏡による解析から明らかとなっており、神経回路網の全貌が明らかになっている唯一の生物である (White *et al.*, 1986)。体は透明であるため、蛍光化学物質や遺伝子によってコードされる蛍光タンパク質を用いることで、特定の遺伝子の発現細胞の同定や、神経活動の測定などを生きた個体(*in vivo*)でおこなうことができる。体が透明である利点を生かして、色素レーザーを用いて特定の細胞を破壊することも可能である (Kuhara *et al.*, 2008; Mori and Ohshima, 1995)。例えば、特定の感覚ニューロンを破壊することができるため、ある外部刺激に対する応答を、どの感覚

ニューロンが制御しているのかを同定したい場合にも用いられる。このように、*C. elegans* は特定の細胞と個体の現象を結びつける研究を行う上で優れたモデル生物であるといえる。

C. elegans のゲノム DNA の全塩基配列は、多細胞生物では一番初めに 1998 年に決定されており、ゲノムサイズはモデル動物の中でも特に小さい約 100 Mb である(*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)。*C. elegans* ゲノム DNA 中にはヒトゲノム中にも保存されている遺伝子を多くもつ。例えば、決まった時期に決まった細胞が死ぬようにプログラムされているプログラム細胞死という現象は、*C. elegans* で見つかると他の生物でもその存在が確認された現象である。プログラム細胞死は、*C. elegans* において、体内の受精卵を産卵するための陰門が形成される過程において初めて見つかった(Conradt and Horvitz, 1998)。陰門の形成におけるプログラム細胞死に異常をもつ変異体が遺伝学的に多数単離されており、それら変異体(*egl-1*、*ced-9*、*ced-4*、*ced-3* など)の原因遺伝子は、ヒトのアポトーシス関連遺伝子として高度に保存されている。例えば、*egl-1* は *bim*、*ced-9* は *bcl-2*、*ced-4* は *apaf-1*、そして *ced-3* は *caspase-9* のホモログである。アポトーシス関連遺伝子の変異はヒトの癌の発症にも関わるということが知られているため、*C. elegans* の研究から発見されたことがヒトの医療に応用されることもある。

1.3 感覚情報伝達の分子生理機構

光や匂い、温度などの環境刺激の感知は生物にとって必要不可欠である。動物はこれらの環境情報を主に神経系で受容することで適切に応答することができる。神

経系における刺激の感知メカニズムは、脊椎動物から無脊椎動物まで広く解析が行われている。脊椎動物の光や匂いを受容する感覚ニューロンは、類似した分子経路を使い感覚情報を伝達するが、それらの感覚情報を受容伝達する過程には異なる点も多い。脊椎動物の視細胞では、光は 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体タンパク質(GPCR)のロドプシンにより受容される。これはトランスデューシンと呼ばれる 3 量体 G タンパク質を活性化させ、その α サブユニットによりホスホジエステラーゼ(PDE)が活性化させる。PDE が活性化すると環状グアノシンーリン酸(cGMP)が分解される。暗闇ではロドプシンも PDE も不活性化しており、細胞内 cGMP 濃度が高く、それらが cGMP 依存性チャネル(CNG) に結合するためチャネルが開放され脱分極している。一方で、明るみに出るとロドプシンがトランスデューシンを活性化し、さらに PDE が活性化して cGMP を分解するため、視細胞の細胞内 cGMP 濃度が減少することでチャネルが閉じ、過分極が起こる(Fain *et al.*, 2001; Fesenko *et al.*, 1985)。匂い物質を受容する感覚ニューロンでは、特定の匂いを構成する化学物質は GPCR で受容された後に $G\alpha$ タンパク質を活性化し、それがアデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化し、細胞内の環状アデノシンーリン酸(cAMP)を増加させる。これが CNG チャネルの開口を引き起こし膜の脱分極が起こる(Kurahashi, 1990 ; Nakamura and Gold, 1987 ; Pace *et al.*, 1985)。

C. elegans は、匂いや味物質などの外部刺激を主に頭部や尾部に存在する感覚ニューロンで受容する。そのうち頭部には 12 対の感覚ニューロンがあり、受容する刺激やその細胞内情報伝達に関わる分子も部分的にわかっている。例えば、Diacetyl という匂い物質は AWA 感覚ニューロン、Benzaldehyde は AWC 感覚ニューロンで受容され、その匂いに対して誘因行動を起こす(Bargmann *et al.*, 1993)。また味覚を引き起こす水溶性の化学物質のうち NaCl は ASE 感覚ニューロンで受容され誘因を示す(Bargmann and

Horvitz, 1991a)。光のうち UV 域から青色の波長光は、ASJ 感覚ニューロンで受容され、忌避行動を引き起こす(Ward *et al.*, 2008)。これらの感覚ニューロン内には脊椎動物の感覚ニューロン内に存在する情報伝達経路とよく似た分子経路が存在する。AWC 感覚ニューロンで受容される Benzaldehyde はおそらく GPCR によって受容されると考えられており、活性化した GPCR が $G\alpha$ タンパク質である ODR-3 を活性化し、さらにグアニル酸シクラーゼ(GC)である ODR-1 が活性化されることで cGMP の合成が促進されることが考えられている。これにより cGMP 依存性チャネルである TAX-4 と TAX-2 が開口され、細胞内へカルシウムイオンが流入することで下流への情報伝達がおこなわれている。

AWA 感覚ニューロンでも同様に、GPCR が匂い化学物質を受容し、 $G\alpha$ が活性化する情報伝達系が存在する。AWA 感覚ニューロンで受容される Diacetyl は、*odr-10* 遺伝子によってコードされる GPCR で受容される。*odr-10* は全生物で初めて特定の匂い物質とその受容体との関係が見つかった GPCR である。AWA 感覚ニューロンにおける匂い情報伝達の分子機構は、AWC 感覚ニューロンのそれとは一部異なる。具体的には、ニューロンの膜電位を最初に変化させるプライマリーなカルシウムチャネルとして、cGMP 依存性のチャネルではなく、transient receptor potential (TRP) チャネルである OSM-9 が機能している。ASJ 感覚ニューロンは、光を感知するニューロンであり、ASJ 感覚ニューロン内に存在する分子情報伝達経路は、脊椎動物の分子経路と類似している。しかし、光情報を受け取った際の膜電位の変化が、脊椎動物と線虫では逆である(Liu *et al.*, 2010)。

具体的には、脊椎動物では、光を受容するとトランスデュシンと PDE が活性化し、cGMP を分解して CNG チャネルが閉じる。一方、*C. elegans* では、ASJ 感覚ニューロンで光が受容されると、 $G\alpha$ タンパク質が GC を活性化し、cGMP 濃度を上昇させることで CNG チャネルを開口させる。

1.4 温度受容メカニズム

これまでに温度センサーとして TRP チャネルの存在が知られている(Dhaka *et al.*, 2006)。TRP チャネルはイオンチャネルであり、TRPC、TRPV、TRPM、TRPA、TRPN、TRPP、TRPML の7つのサブファミリーをもち、ヒトから線虫まで広く保存されている。温度受容体としては 9 つの TRP チャネルが知られており、それぞれ活性化する温度域値が決まっている。TRPV1 は 43℃以上の熱刺激受容体として機能し、TRPA1 は 17℃以下の冷刺激受容体として機能すると言われている。*C. elegans* にも TRP チャネルのひとつとして *trpa-1* が存在し、腸や神経系に存在する TRPA-1 によって低温感受が行われると、寿命の延長が起こる(Xiao *et al.*, 2013)。*trpa-1* の下流ではプロテインキナーゼ C の *pkc-2* が機能し、その下流に存在する FOXO 型転写因子 *daf-16* へと情報伝達が行われることが報告されている。

C. elegans の感覚ニューロンにおける温度受容に関しては、温度に対する応答行動である温度走性を指標に解析が行われている。温度走性を制御する頭部の神経回路において、温度は、主に AFD 感覚ニューロンや AWC 感覚ニューロンで受容されると報告されている(Kuhara *et al.*, 2008; Mori and Ohshima, 1995)。AFD 温度受容ニューロンにおいては、TRP チャネルが温度受容を行うのではなく、AFD 感覚ニューロン特異的に発現しているレセプター型のグアニル酸シクラーゼ(rGC)/*gcy-8*、*gcy-18*、*gcy-23* が温度を受容している(Takeishi *et al.*, 2016)。GC には可溶型のものと膜結合型のものが存在するが、GCY-8、GCY-18、GCY-23 は膜結合型の中でも、細胞外の情報を細胞内に直接伝達するレセプター型の GC の構造を持っている。AFD ニューロンにおける、これら 3

つの rGC はそれぞれ単独の変異ではわずかな温度応答の異常しか示さないが、3 つを同時に欠損させることで完全に温度に対する応答性を失う。AFD において、温度は rGC で受容されたのちに、細胞内 cGMP 濃度を上昇させ、cGMP 依存性チャネルである TAX-4、TAX-2、CNG-3 を開口させ、細胞内に主にカルシウムイオンを透過させ、AFD を活性化させる。AFD や AWC 温度受容ニューロンで受け取られた温度情報は、各ニューロンのシナプス部位に伝達され、神経伝達物質であるグルタミン酸により下流の AIY 介在ニューロンや RIA 介在ニューロンへと伝達され、温度走性を引き起こす(Aoki and Mori, 2015)。

C. elegans の AFD 温度受容ニューロンにおける温度受容は GC で行われると報告されているため、温度走性における温度受容ニューロンでは GC が温度受容体であることが示唆されている。一方で、脊椎動物の光情報伝達において、一般的にグアニル酸シクラーゼの上流には G タンパク質共役型受容体(GPCR)が存在することが知られている。また、ショウジョウバエでは光を受容する GPCR であるロドプシンが温度も受容するといわれている(Shen *et al.*, 2011)。 *C. elegans* にはオプシンが存在しないが、無脊椎動物の味覚受容体に類似した GPCR 型の受容体である LITE-1 が光を受容していることが示唆されている。このように *C. elegans* においても、匂いや光刺激の受容に関しては、GPCR で受容されることが報告されているが、温度受容に GPCR が関与しているかは未だ報告がされていない。

2. 結果

2.1 *C. elegans* の低温耐性

C. elegans の低温耐性は、これまでにほとんど解析が行われていなかったため、はじめに野生株 N2 について詳細な表現型の解析と、低温耐性テストの条件検討を行った(図 1、2)。まず、飼育温度と低温刺激温度の検証を行った。線虫の生育温度は、13℃ から 27℃ である。そこで、個体の飼育温度をその範囲内で 7 つの温度域 13、15、17、20、23、25、27℃ に分け、それぞれの温度で卵から成虫まで飼育した(図 1)。このとき、それぞれの飼育温度個体に対する低温刺激は、0℃ 以下にすると植物や昆虫のように体表に厚いクチクラ層を持たない線虫は凝固してしまう可能性があったため、2℃ で 48 時間に設定した。これらの条件で解析を行った結果、13℃ と 15℃ で飼育された個体は 2℃ で 48 時間の低温刺激にも耐え、室温に戻した際にはほぼ 100% の生存率を示した。飼育温度が上昇するに従い、徐々に低温刺激後のプレート内に死個体が現れるようになり生存率も低下した。特に 23℃、25℃、または 27℃ で飼育された個体は低温刺激後に生存している個体は、ほとんど観察されなかった。以上の解析において、それぞれの温度で飼育した個体の低温刺激後の生存率はほぼ一定であり、テストを重ねても毎回同様の生存率を示していたが、一方で、20℃ で飼育された個体の低温刺激後の生存率は複数回のテストごとに結果が不安定であり、最低生存率と最高生存率に約 50% の差が見られた。このことから、20℃ 付近の飼育温度が低温耐性の獲得に関わる閾値であると考え、18、19、21、22℃ の温度で飼育した個体を新たに調べた。その結果、18℃ から 22℃ に飼育温度が上昇するにつれて低温刺激後の生存率が低下するという傾向がみられた。

次に、低温刺激温度を検証した(図 2)。このとき、飼育温度は 15℃、20℃ また

は 25℃に設定し、低温刺激時間は前回と同様 48 時間に固定した。低温刺激温度は 0、2、または 4℃とした。これらの条件で解析を行った結果、25℃で飼育された個体は、いずれの低温刺激温度でもほとんどが死滅した。20℃飼育個体では、2℃以下の低温刺激温度を与えるとほとんどの個体が死滅したが、4℃の低温刺激ではほぼ生存するという極端な結果が得られた。一方、15℃で飼育した個体は、2℃と 4℃の低温刺激後に約 100%の生存率を示したが、0℃の低温刺激を与えた条件では生存率が約 20%と急激に低下した。そこで、15℃飼育個体では、低温刺激の温度は 0℃と 2℃の間が閾値であると考えられたため、1℃の低温刺激温度を新たに設定し、15℃、20℃、または 25℃飼育個体についてそれぞれ 1℃の低温刺激を与え、その後の生存率を検証した。その結果、25℃や 20℃で飼育された個体は、1℃の低温刺激後に死滅してしまうが、15℃で飼育された個体に 1℃の低温刺激を与えた場合は、0℃と 2℃で低温刺激を与えた場合の生存率のほぼ中間の生存率を示した。以上の解析結果から、低温耐性の解析には、飼育温度は 15、20、または 25℃のそれぞれの温度で飼育した個体を用い、低温刺激を 2℃で 48 時間与える条件で解析を行うこととした。この低温刺激条件のとき、野生株の生存率は、15℃飼育後で 100%、20℃飼育後で約 20%、25℃飼育後で 10%以下であり、これらは変異体等を用いた解析を行なう際に、野生株との生存率の違いを検出しやすい条件であると考えた。

2.2 低温耐性と発生ステージの関連性の有無

低温耐性が特定の発生ステージで獲得される現象であるかどうかを、特定の

発生ステージにおいて飼育温度を変化させる解析から検証した(図 3)。 *C. elegans* の野生株は卵から孵化した後に L1、L2、L3、L4 という 4 つの幼虫期を経て成虫になる(Cassada and Russell, 1975)。 *C. elegans* の life cycle は既に知られており、各幼虫期までにかかる生育時間がわかっている。また体の大きさや形状も幼虫期で異なるため、生育時間と見た目を合わせて、個体の観察時点の発生ステージを判断した。

はじめに、L1～L4 の各幼虫期までを 15℃で飼育しておき、その後成虫になるまでを 25℃で飼育することで、飼育温度変更前と変更後どちらの温度に依存して低温耐性を獲得しているか検証した(図 3A)。L1 幼虫期までを 15℃で飼育し、その後 25℃に移して成虫まで生育させた個体に、2℃で 48 時間の低温刺激を与えるとほとんどの個体が死滅した。つまり、卵から成虫まで 25℃で飼育し続けた個体と同様の表現型を示した。この操作を L2、L3、または L4 幼虫期のそれぞれに行った結果、それらの個体はほぼ死滅し、温度シフト後である 25℃の低温耐性の表現型を示した。反対に、卵から L1 幼虫期までを 25℃で飼育し、その後 15℃に移して成虫まで生育させた個体に 2℃で 48 時間の低温刺激を与えると、ほとんどが生存した(図 3B)。この表現型は、卵から成虫までを 15℃で飼育し続けた個体の表現型と同様であった。同様に、卵から L2、L3、または L4 幼虫期まで 25℃で飼育し、その後 15℃に移して成虫まで生育させ低温刺激を与えても、ほとんどの個体が生存した。つまり、温度シフト後である 15℃の低温耐性の表現型を示した。以上の結果から、低温に対する耐性は、幼虫期ではなく成虫になったときに大部分が獲得されることが示唆された。

2.3 低温耐性の獲得と消失に必要な時間

低温耐性が幼虫期ではなく成虫期に獲得されることから、成虫期において低温耐性の獲得に必要な時間を調べた(図 4)。まず、15℃で卵から成虫まで飼育し、その後 25℃に 1 時間、2 時間、3 時間、5 時間、7 時間、10 時間、または 12 時間移した後に、それぞれに 2℃で 48 時間の低温刺激を与えた(図 4A)。解析の結果、25℃を 1 時間経験させただけでは、低温刺激後も個体はほとんどが生存しており、15℃の低温耐性の表現型を示したままであり、25℃の低温耐性の表現型への変化は見られなかった。ところが、2 時間や 3 時間と 25℃を経験させる時間を延ばすと、徐々に低温刺激後の生存率も低下し、25℃を 3 時間経験させた個体では、低温刺激後の生存率 50%を下回った。10 時間以上でほとんどの個体が低温刺激後に死滅し 25℃の低温耐性の表現型と同様の結果が得られた。つまり、飼育温度を 15℃から 25℃にシフトさせる場合は、3 時間以上の 25℃という新たな温度の経験が低温耐性を消失させるために必要であることが示唆された。

次に、25℃で卵から成虫まで飼育し、その後 15℃に 1 時間、2 時間、3 時間、5 時間、7 時間、10 時間、または 12 時間移した後に、それぞれに 2℃で 48 時間の低温刺激を与えた(図 4B)。すると、25℃飼育個体を 15℃に 1 時間置いただけでは、ほとんどの個体が低温刺激後に死滅し、15℃で飼育し続けた個体が示すような低温耐性は獲得されなかった。それに対して、25℃飼育個体を 15℃に 2 時間か 3 時間置くと、徐々に低温刺激後の生存率が上昇した。5 時間以上 15℃を経験させた個体ではほとんどが生存し、15℃飼育後に 2℃に置かれた時と同様の結果が得られた。これらの結果から、25℃から 15℃に飼育温度をシフトさせた場合も、15℃から 25℃にシフトさせた場合と同様に、約 3 時間で新たな温度の低温耐性を獲得するという結果が得られた。

さらに、20℃から 25℃、20℃から 15℃、15℃から 20℃、25℃から 20℃という 20℃の温度域も含めて低温耐性獲得と消失にかかる時間を検証した(図 5)。20℃で卵から成虫まで飼育し、その後 25℃に 1 時間から 12 時間移した後に、それぞれに 2℃で 48 時間の低温刺激を与えると、25℃を 2 時間以上経験する条件において、ほとんどの個体が死ぬ表現型が観察された(図 5A)。さらに、20℃で卵から成虫まで飼育し、その後 15℃に 1 時間から 12 時間静置した後に、それぞれの個体に 2℃で 48 時間の低温刺激を与えた場合も、15℃を 2 時間以上経験させた条件でほとんどの個体が生存できる表現型が観察された(図 5B)。一方、15℃で卵から成虫まで飼育し、その後 20℃で 1 時間から 7 時間静置した後に、それぞれに 2℃で 48 時間の低温刺激を与えた場合は、7 時間以上 20℃を経験させてもほとんどの個体が低温刺激後も生存しており、20℃の低温耐性の表現型へと変化していなかった(図 5C)。同様に、25℃で卵から成虫まで飼育し、その後 20℃に 1 時間から 10 時間静置した後に、それぞれに 2℃で 48 時間の低温刺激を与えた場合も、ほとんどの個体は死滅していた(図 5D)。しかし、25℃から 20℃に飼育温度を変化させる場合では、本来、25℃飼育個体の低温刺激後の生存率と 20℃飼育個体の低温刺激後の生存率には大きな差がないため、何時間 20℃に置かれることが低温耐性の獲得に必要なかは明確にはわからなかった。

25℃で飼育後に 20℃で 10 時間静置させた個体では、低温刺激後の生存率が上昇していた(図 5D)。しかし、*C. elegans* は 20℃で飼育されると 15℃で飼育された場合に比べて約 2 倍に成長速度が早くなり、25℃飼育個体ではより成長速度が早くなる。そのため、25℃で飼育した個体をさらに 20℃で 10 時間飼育することで、他の条件に比べて低温刺激時の個体は成熟してから時期が経ち、老個体になっていた可能性があった。そこで、老個体での低温耐性を検証した(図 6)。15℃で飼育された個体は、約 6 日で卵か

ら成虫まで成長する。そこで、15℃飼育個体を9日目か10日目まで飼育し、老個体になった条件で2℃で48時間の低温刺激を与えた(図 6A)。その結果、15℃飼育個体に関しては、6日間飼育した健康な成虫も10日間飼育した老個体もほとんどが生存しており、低温耐性の表現型に差は見られなかった。次に、20℃や25℃で飼育された個体に関して同様の解析を行った。20℃で飼育された個体は、3.5日で卵から成虫まで成長する。通常、20℃飼育後の個体の低温耐性解析には、20℃で4日間飼育された個体を使用している。そこで、20℃で5日間または6日間飼育し、老個体になった個体に低温刺激を与えたところ、老個体であるほど生存率も上昇した(図 6B)。25℃で飼育された個体は、約3日で卵から成虫まで成長する。25℃飼育個体に関しても、4日間25℃で飼育された老個体において低温耐性が顕著に上昇していた(図 6C)。以上の結果から、老個体では低温刺激後の生存率が上昇することが示唆されたため、この結果を踏まえて、今後の低温耐性の実験には個体の成長に注意し、老個体ではない健康な成虫個体を用いた。

2.4 低温耐性に関わる組織

これまでの解析から、*C. elegans* 野生株は15℃で飼育された後に低温刺激を与えても約100%の個体が生存できるが、20℃で飼育された個体は約20%、25℃で飼育された個体は低温刺激後の生存率は10%以下であった。このような低温耐性がどのような組織や遺伝子によって制御されているかを明らかにするために、神経系や表皮などに異常をもつ変異体の低温耐性を調べた(図 7)。神経系の変異体としてキネシンに異常をもつ *unc-104* の変異体、表皮の変異体としてコラーゲンに異常をもつ *rol-6* の変異体、そ

して筋肉の変異体としてミオシンに異常をもつ *unc-54* の変異体を用いた。これら変異体を卵から成虫まで 15°C、20°C、25°C でそれぞれ飼育した後に、2°C で 48 時間の低温刺激を与え生存率を調べた。その結果、15°C で飼育した条件では、*unc-104*、*rol-6*、*unc-54* 変異体は全て野生株と同様に、低温刺激後もほとんどの個体が生存していた。これに対して、20°C で飼育した条件では、*unc-104* 変異体でのみ低温刺激後もほぼ 100% の個体が生存する異常が観察された。同様に、25°C で飼育した条件でも、*unc-104* 変異体でのみ低温刺激後も約 80% の個体が生存できる異常が見られた(図 7)。キネシンをコードする *unc-104* 遺伝子は、ほぼすべてのニューロンで特異的に発現している(Otsuka *et al.*, 1991)。これらの結果から、低温耐性には少なくとも神経系が関与することが示唆された。

C. elegans では、温度受容とそれによって引き起こされる行動応答(温度走性)が知られており、温度走性に関わる温度受容ニューロンと介在ニューロンが既に同定されている (Kuhara *et al.*, 2008; Mori and Ohshima, 1995) (図 8A)。具体的には、温度走性の成立には、AFD と AWC と呼ばれる頭部にある各々 1 対の感覚ニューロンで温度情報を受容し、それらの下流に位置する AIY、AIZ、RIA と呼ばれる介在ニューロンに情報が伝達され、運動ニューロンを制御することが必須である。これまでに、温度走性の神経回路の発生や機能を司る遺伝子が多数同定されているため、それらの変異体を用いて、既知の温度走性の神経回路が低温耐性にも関与するかどうかを解析した。

はじめに、温度走性の神経回路上の個々のニューロンの発生や機能に異常をもつ変異体について低温耐性を測定した。具体的には、AFD 温度受容ニューロンの発生のマスター因子である OTX 型転写因子/TTX-1 の変異体(*ttx-1*) (Satterlee *et al.*, 2001)、AWC 温度受容ニューロンの温度情報伝達に関わる 3 量体 G タンパク質/ODR-3 の変異体(*odr-3*)、AFD や AWC とシナプス接続している AIY 介在ニューロンの発生に関わる

LIM ホメオドメイン転写因子/TTX-3 の変異体(*ttx-3*) (Hobert *et al.*, 1997)、AIY の下流に位置する RIA 介在ニューロンのシナプス局在に関わるイノシトールモノフォスファターゼ/TTX-7 の変異体(*ttx-7*) (Tanizawa *et al.*, 2006)、さらに、AFD、AWC、RIA のシナプス伝達に関わるグルタミン酸輸送体/EAT-4 の変異体(*eat-4*)を用いて低温耐性を解析した(Ohnishi *et al.*, 2011)。その結果、これらの変異体では 15℃飼育後、20℃飼育後、または 25℃飼育後の各条件において、低温刺激後の生存率は野生株と同程度であった(図 8B)。つまり、温度走性に関わる既知のニューロンは低温耐性には必須でないことが示唆された。

温度走性に異常をもつ他の変異体についても低温耐性を測定した。具体的には、プロテインキナーゼ C/ TTX-4、RGS/EAT-16、グルタミン酸依存性 Cl⁻チャネル/GLC-3、そしてマコイリンタンパク質/TTX-8 の変異体について 15℃飼育後、20℃飼育後、または 25℃飼育後の各条件において、低温刺激後の生存率を測定したところ、野生株よりも生存率が高くなる異常が観察された(図 8B)。これらの結果から、各遺伝子が低温耐性に関与することは示唆されるが、各変異体の原因遺伝子は温度走性の神経回路だけでなく他の多くのニューロンでも発現しているため、温度走性のニューロンと低温耐性を直接結びつける結果とはならないと考えられる。温度走性に関わる他の遺伝子としてカルシニューリン/TAX-6がある。この *tax-6* の変異体について低温耐性を調べたところ、20℃で飼育した個体と 25℃で飼育した個体で低温耐性が増強する異常が見られた(図 9)。この *tax-6* も非常に多くのニューロンや筋肉などの組織で機能している分子である(Kuhara *et al.*, 2002)。過去に行われた解析から、*tax-6* 変異体の特定の神経細胞で *tax-6* の遺伝子を発現させたトランスジェニック系統が多数報告されている(Kuhara and Mori, 2006)。そこで、これらの系統を利用して、低温耐性を調べ、低温耐性に関わる可能性のある神経

細胞の絞り込みを行った。20℃または25℃で飼育された *tax-6* 変異体は、低温刺激後も90%以上が生存したが、ほぼ全てのニューロンでの遺伝子発現を誘導する *unc-14* プロモーターの下流で *tax-6* の遺伝子を発現させた *tax-6* 変異体のトランスジェニック系統では、20℃飼育後に低温刺激を与えた際の生存率が野生株と同様の10%以下となった。25℃飼育個体でも低温刺激後の生存率が約50%となり、野生株の表現型に近づいた。さらに、主に感覚ニューロンで *tax-6* 遺伝子を発現させた *tax-6* 変異体トランスジェニック系統 (*tax-6; Ex[tax-6p(1.1kb)::tax-6]*) においても、*tax-6* 変異体を示す低温耐性異常の部分的な回復が見られた(図9)。以上の結果から、低温耐性は感覚ニューロンで制御される可能性が得られた。一方で、この *tax-6; Ex[tax-6p(1.1kb)::tax-6]* 系統が持っている、*tax-6p(1.1kb)::tax-6* プラスミドは、少数であるが感覚ニューロン以外の介在ニューロンでも発現するため、低温耐性と感覚ニューロンとの相関性を得るにはさらなる解析が必要であると考えた。そこで、感覚ニューロンの感覚末端(感覚繊毛)の構造形成やその維持に関わる幾つかの遺伝子の変異体を用いて、低温耐性を解析したところ(図10、表1)、IFT complex B/ *che-13* と IFT52/*osm-6* の変異体で20℃飼育後の低温耐性の異常が観察された(図10A)。この2つの遺伝子は、すべての感覚ニューロンで発現していることから、いずれかの感覚ニューロンが低温耐性に関与することが示唆された(Collet *et al.*, 1998; Deane *et al.*, 2001; Haycraft *et al.*, 2003; Perkins *et al.*, 1986)。

2.5 低温耐性に関わる感覚ニューロンの同定

低温耐性に関わる特定の感覚ニューロンを同定するために、より少数の感覚

ニューロンの発生や機能が異常になっている変異体を用いて、解析を行った。その結果、cGMP 依存性チャネルをコードする *tax-4* と *tax-2* の変異体において、20℃で飼育した個体の低温刺激後の生存率が約 90%と顕著な異常がみられた(図 10B)。TAX-4 は頭部の 10 対の感覚ニューロンで発現している(Coburn and Bargmann, 1996 ; Komatsu *et al.*, 1996) (表 1)。そこで、特定の感覚ニューロン特異的に発現する遺伝子のプロモーターの下流に *tax-4* cDNA をつないだないだプラスミドを作製し、それを *tax-4* 変異体で発現させた *tax-4* トランスジェニック系統を作製した。*tax-4* 変異体を示す低温耐性の異常は、*trx-1* プロモーターを用いて、*tax-4* 変異体の ASJ 感覚ニューロン特異的に *tax-4* 遺伝子を発現させたときに、最も顕著な回復が見られた(図 11)。また、*str-3* プロモーターを用いて *tax-4* 変異体の ASI 感覚ニューロンで *tax-4* 遺伝子を発現させた場合にも、極わずかであるが *tax-4* 変異体を示す低温耐性の増強が低下した。一方、*ceh-36* プロモーターを用いて、温度受容ニューロンとして知られている AWC 感覚ニューロンで *tax-4* 遺伝子を発現させた場合には、*tax-4* 変異体の低温耐性の異常は回復しなかった。つまり、cGMP 依存性チャネル TAX-4 の ASJ 感覚ニューロンにおける機能が低温耐性の成立において必須であることが示唆された。

ASJ 感覚ニューロンが低温耐性に関与する可能性が得られたため、これまで ASJ 感覚ニューロンで遺伝子発現を誘導するプロモーターとして使用していたチオレドキシシン/TRX-1 の変異体についても低温耐性を調べたところ、20℃で飼育した個体で低温刺激後の生存率が高くなる異常がみられた(図 12)。さらに、野生株の ASJ 感覚ニューロンを色素レーザーにより物理的に破壊することで、*tax-4* 変異体と同様の低温耐性の増強異常が観察されるかを検証した。まず、ASJ 感覚ニューロンで GFP を発現する系統を作製した(図 13A)。この系統を用いて ASJ 感覚ニューロンの位置を確認しながら、

ASJ 感覚ニューロンの核を色素レーザーで破壊した。ASJ 感覚ニューロンにおける GFP の蛍光が消えたことを確認した後、それらの個体の低温耐性の表現型を合計 15 個体について確認したところ、20℃で飼育した後に 2℃に置かれても大部分が生存する異常が観察された(図 13B)。この表現型は、*tax-4* 変異体同様の表現型であった。以上の結果から、ASJ 感覚ニューロンが個体の低温耐性に関与することが示唆された。

2.6 ASJ 感覚ニューロンのカルシウムイメージング

低温耐性に関与することが示唆された ASJ 感覚ニューロンは、これまでに光を受容する感覚ニューロンとして知られていた。ASJ 感覚ニューロンが低温耐性の成立に関して、プライマリーな温度刺激を受け取る感覚ニューロンであるかどうかを測定するために、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージング法を用いて解析した。なお、温度受容ニューロンとして知られている AFD 感覚ニューロンや AWC 感覚ニューロンは、本研究結果から低温耐性に関与していないことが示唆されているため、ASJ 感覚ニューロンだけに焦点を当ててカルシウムイメージング解析を行った。*C. elegans* には哺乳類のような電位依存性ナトリウムチャネルを介した活動電位がないため、細胞内へのカルシウムイオンの流入が直接の神経活動の変化として観察できる。そこで、温度刺激時の細胞内のカルシウム濃度を *in vivo* で非侵襲的に測定するために、遺伝子によってコードされる *cameleon* と呼ばれるカルシウムインディケーター遺伝子を用いた。*cameleon* は N 末に藍色蛍光タンパク質である CFP を、C 末に黄色蛍光タンパク質である YFP をもち、その間にカルシウム結合サイトを持つキメラタンパク質で

ある(Miyawaki *et al.*, 1997)。通常、細胞内カルシウム濃度が低い状態では、440 nm の励起光を当てると CFP の蛍光が観察されるが、細胞内へカルシウムイオンが流入すると、cameleon のカルシウム結合サイトにそれらが結合し、CFP と YFP が数 nm に接近する。その結果、CFP の蛍光が、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) と呼ばれるエネルギー移動により YFP に移動し、YFP の蛍光も見られるようになる。この時の、CFP と YFP の蛍光の比(YFP/CFP)を計算することで細胞内カルシウム濃度を定量化することができる。これまでに、温度走性における温度受容ニューロンである AFD や AWC の温度応答性が、cameleon を用いたカルシウムイメージングによって解析されている(Kimura *et al.*, 2004; Kuhara *et al.*, 2008)。AFD 感覚ニューロンや AWC 感覚ニューロンは、温度刺激を与えると YFP/CFP の値が大きく変化する。一方で、温度受容を行わない ASH 感覚ニューロンや ASE 感覚ニューロンでは、温度刺激を与えても YFP/CFP の値に変化が起こらないことが報告されている(Kuhara *et al.*, 2008)。

15℃飼育後の野生株の ASJ 感覚ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージングで測定した(図 14A)。まず、野生株の ASJ 感覚ニューロンに cameleon を発現させた系統を作製した。cameleon を発現させた個体を乗せたプレパラートを、倒立顕微鏡ステージ上の温度制御プレートに固定し、400 倍の倍率で観察しながら、17℃→23℃→17℃というなだらかな温度変化を与え、その際の ASJ 感覚ニューロンで見られる CFP と YFP の蛍光値を記録測定した。その結果、野生株の ASJ 感覚ニューロンでは、温度上昇と下降に伴い細胞内カルシウム濃度も上昇と下降を示し、定常状態から最大値の間には約 10%の YFP/CFP の変化が観察された。同様に、20℃飼育後または 25℃飼育後の野生株個体についても温度刺激時の ASJ 感覚ニューロンのカルシウムイメージングを行った。その結果、20℃飼育された個体では約 15%、25℃飼育された個体

では約 20%の YFP/CFP の変化が見られ、飼育温度が高いほど YFP/CFP の変化値も上昇し、温度に対する反応性が高くなった(図 14B)。次に、低温耐性に異常を示した *tax-4* 変異体を用いて、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージングで解析した。その結果、*tax-4* 変異体では、温度刺激を与えても ASJ 細胞内のカルシウム濃度はあまり変化せず、温度に対する反応性を示さなかった(図 15A, B)。*tax-4* 変異体の ASJ 感覚ニューロンでのみ *tax-4* 遺伝子を発現させた系統に関してもカルシウムイメージングを行ったところ、この系統の ASJ は温度刺激に対して反応が見られ、温度応答性の異常が回復した(図 15A, B)。

ASJ 感覚ニューロンは光受容ニューロンとして知られているが、特に紫外から青色光を感知することが知られている。今回のカルシウムイメージングに使用した *cameleon* の励起光は 440 nm であることから、この励起光自体が ASJ 感覚ニューロンの活性に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、ASJ 感覚ニューロンが青色光に反応しているのではなく、温度に反応していることを明確にするために ASJ で機能する唯一の光受容体である LITE-1 を欠損した *lite-1* 変異体を用いて、ASJ のカルシウムイメージングを行った。その結果、*lite-1* 変異体では、野生株同様に温度の上昇と下降に対して細胞内カルシウム濃度の変化が観察され、光受容体 LITE-1 がない状態でも温度に対する反応性が確認できた(図 15A, B)。つまり、ASJ 感覚ニューロンは *cameleon* の励起光ではなく温度を感知して反応することが示唆された。なお、それぞれの系統に対して温度刺激を与えない条件で *cameleon* の励起光のみを照射した状態の ASJ のカルシウム濃度の変化も測定したところ、細胞内カルシウム濃度の顕著な変化は見られなかった(図 15C, D)。今回の解析では、*cameleon* の励起光(440nm)は 1 秒間に 100-50 msec という非常に短時間のパルス照射をしているため、青色光照射の影響は除外できる範囲内と考

えた。

以上のカルシウムイメージングによる解析結果から、従来、光受容ニューロンとして知られたた ASJ 感覚ニューロンが温度にも反応する温度受容ニューロンであることが示唆された。

2.7 ASJ 内における光受容と温度情報伝達

これまでの結果から、低温耐性の成立において ASJ 感覚ニューロンが温度を受容していることがわかった。ASJ 感覚ニューロンは光受容ニューロンとして知られており、ASJ 内において光情報伝達に関わる分子経路が明らかとなっている(Liu *et al.*, 2010) (図 16A)。光は、頭部 ASJ ニューロンの樹状突起先端に局在している光受容体 LITE-1 で受け取られ、3 量体 G タンパク質 α サブユニットである GOA-1 と GPA-3 を活性化し、グアニル酸シクラーゼである DAF-11 と ODR-1 を介して細胞内 cGMP 濃度を変化させ、それによって cGMP 依存性チャネル TAX-4 の開口を制御することで細胞内情報伝達を引き起こす。また、cGMP を加水分解するホスホジエステラーゼ PDE-1、PDE-2、そして PDE-5 も ASJ 内において機能している。これら ASJ 感覚ニューロンの光受容情報伝達で機能する分子が低温耐性の制御に共通しているかどうかを調べるため、ASJ の光受容情報伝達に関わる分子の変異体について低温耐性を調べた(図 16B)。ASJ に存在する唯一の光受容体である LITE-1 を欠損した *lite-1* 変異体は、野生株とほぼ同様の表現型を示したことから、光受容体は低温耐性に関与しないことが示唆された。

ASJ の光情報伝達に関わる 3 つの G α タンパク質(*goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3*) の変

異体や、2 つのグアニル酸シクラーゼ(*odr-1* と *daf-11*) のそれぞれの変異体は、20℃飼育後に低温刺激を与えても生存できる異常が観察された。さらに、ホスホジエステラーゼの変異体においても異常が観察された。以上のことから、ASJ 感覚ニューロンの光情報伝達に関わる分子が低温耐性にも関わることが示唆され、光と温度の受容は、共通の分子による G タンパク質経路で伝達される可能性が考えられた。さらに、G α タンパク質の変異体である *goa-1* または *gpa-1* の低温耐性の異常は、二重変異体や三重変異体によってより強い低温耐性の異常が見られた (図 16B、*goa-1*; *gpa-1* 二重変異体、*goa-1*; *gpa-3* *gpa-1* 三重変異体)。同様に、グアニル酸シクラーゼの変異体である *daf-11* と *odr-1* の低温耐性の異常も *daf-11*; *odr-1* 二重変異にすることで、ほぼ 100%の生存率を示す異常が観察された(図 16B)。つまり、これら G α タンパク質やグアニル酸シクラーゼは、複数の分子がそれぞれ共同して機能していると考えられた。一方で、これらの遺伝子は ASJ 感覚ニューロン以外でも発現することが報告されている。GOA-1 は、ほぼ全てのニューロンで発現しており、GPA-1 と GPA-3 も ASJ 感覚ニューロンを含む複数のニューロンで発現している(Jansen *et al.*, 1999)。 *tax-4* 変異体のカルシウムイメージングの結果から、ASJ 感覚ニューロンにおける温度情報伝達は、ASJ の感覚末端に存在する cGMP 依存性チャネル/TAX-4 を介して行われることが示唆されているため、温度受容は ASJ の感覚末端で行われていると考えられる。そこで、GOA-1、GPA-1、GPA-3 それぞれが ASJ 感覚ニューロンの感覚末端に局在しているかを調べるために、ASJ 特異的に遺伝子発現を誘導する *trx-1* プロモーターの下流に *goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3* の各 cDNA と YFP(*venus*)遺伝子をつないだ DNA コンストラクトをそれぞれ野生株に遺伝子導入した(図 17)。VENUS の蛍光を指標に解析を行ったところ、GPA-1 と GPA-3 は感覚末端に局在していたが、GOA-1 は感覚末端以外にも細胞体や軸索にも存在していることがわ

かった。

次に、これらの $G\alpha$ タンパク質の変異体の低温耐性の異常が ASJ 温度受容ニューロンの異常によるものかを調べた。具体的には、*goa-1; gpa-3 gpa-1* 三重変異体の ASJ 感覚ニューロン特異的に、3 つの $G\alpha$ タンパク質の cDNA を発現させたトランスジェニック系統を作製し、低温耐性を解析した。その結果、*goa-1; gpa-3 gpa-1* 三重変異体 が示す 20℃飼育後の低温耐性の異常が部分的に回復した(図 18)。一方、ASE 味覚ニューロンや、温度走性の神経回路上の AWC 温度受容ニューロンで 3 つの $G\alpha$ タンパク質の cDNA を発現させた *goa-1; gpa-3 gpa-1* 三重変異体では、低温耐性の異常は回復しなかった。つまり、これらの $G\alpha$ タンパク質の ASJ 感覚ニューロンにおける機能が、低温耐性に重要であることが示唆された。しかし、*goa-1; gpa-3 gpa-1* 三重変異体の ASJ 感覚ニューロンで 3 つの $G\alpha$ タンパク質の cDNA を発現させただけでは、三重変異体 が示す低温耐性異常は完全に回復しなかった。そこで、それぞれの $G\alpha$ タンパク質の遺伝子を各々の遺伝子自身のプロモーターを用いて発現させ、その場合の表現型を調べた。その結果、それらの系統においても三重変異体 が示す低温耐性異常は完全に回復せず、ASJ 感覚ニューロン特異的に $G\alpha$ タンパク質の遺伝子を発現させた場合と同程度の回復率となった。以上の解析から、ASJ 感覚ニューロン特異的プロモーターを用いて 3 つの $G\alpha$ タンパク質の cDNA を同時に発現させた三重変異体でも、それぞれの $G\alpha$ タンパク質自身のプロモーターを用いてそれらの $G\alpha$ タンパク質の cDNA を同時に発現させた三重変異体でも部分的な回復しか見られなかった。つまり、ASJ 感覚ニューロン特異的に 3 つの $G\alpha$ タンパク質を発現させた三重変異体系統では、低温耐性の表現型が十分に回復している可能性が考えられた。一方で、完全に回復しなかった理由としては、 $G\alpha$ タンパク質の cDNA には選択的スプライシングによるアイソフォームが存在するため、今

回用いた $G\alpha$ タンパク質の cDNA のアイソフォームだけでは不十分であった可能性が考えられる。また、3 種類の $G\alpha$ タンパク質の遺伝子を同時に発現させているため、その発現量のバランスも重要な要素かもしれない。

2.8 ASJ 感覚ニューロンにおける G タンパク質経路を介した温度応答

低温耐性において、ASJ 温度受容ニューロンにおける 3 つの $G\alpha$ タンパク質の共同的な制御が必須であることが示唆されたため、次に、ASJ ニューロンの神経活動のレベルでも複数の分子が共同して機能しているかをカルシウムイメージング法を用いて解析した。ASJ ニューロンの温度応答性解析に用いた温度刺激は $17^{\circ}\text{C} \rightarrow 23^{\circ}\text{C} \rightarrow 17^{\circ}\text{C}$ という温度刺激パターンに加え、 $23^{\circ}\text{C} \rightarrow 17^{\circ}\text{C} \rightarrow 23^{\circ}\text{C}$ という温度刺激パターンも用いた(図 19)。このとき注目した値として、細胞内カルシウム濃度が最も高くなったポイントである Maximum(Max)と、反対に最も低くなったポイントである Minimum(Min)、そして最大変化値と最小変化値の差である Max-Min が挙げられる。Max は、 17°C から 23°C に温度を変化させた際の神経活動の変化を表しており、Min は 23°C から 17°C へ温度を戻したときの定常状態への戻り具合を表している。また、 17°C から 23°C への温度変化を 1 次温度刺激とし、 23°C から 17°C への温度変化を 2 次温度刺激と見なし、この 2 次温度刺激に対する反応性を Max-Min で表している。 $23^{\circ}\text{C} \rightarrow 17^{\circ}\text{C} \rightarrow 23^{\circ}\text{C}$ の温度刺激を与えた場合も同様に、最大変化値を Max、最小変化値を Min とし、これらの差を Min-Max で表した。 20°C で飼育した野生株に $17^{\circ}\text{C} \rightarrow 23^{\circ}\text{C} \rightarrow 17^{\circ}\text{C}$ の温度刺激を与えると、温度上昇に伴い約 10% の YFP/CFP の上昇がみられたが(図 19B)、 $23^{\circ}\text{C} \rightarrow 17^{\circ}\text{C} \rightarrow 23^{\circ}\text{C}$ の温度刺激

を与えると温度低下に伴い約 10%の YFP/CFP の低下がみられた(図 19C)。この 17°C→23°C→17°Cと 23°C→17°C→23°Cの温度刺激を Gα タンパク質, グアニル酸シクラーゼ、ホスホジエステラーゼの各変異体に与え、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性を解析した(図 20-25)。このとき、G タンパク質経路上において正の温度情報伝達を行う Gα タンパク質やグアニル酸シクラーゼの機能が欠損している変異体では、cGMP 依存性チャンネルからのカルシウムイオンの細胞内流入が妨げられるため、17°C→23°C→17°Cの温度刺激に対しては、温度応答性が弱くなり、例えば Max の値が野生株よりも小さくなると予想した。反対に、ホスホジエステラーゼでは、cGMP 依存性チャンネルからのカルシウムイオンの細胞内流入が過剰になるため、温度応答性が強くなり、Max の値が野生株よりも大きくなると考えられた。

まず、17°C→23°C→17°Cの温度刺激を与えた際に、Gα タンパク質の変異体である *goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3* それぞれの ASJ 感覚ニューロンにおけるカルシウム濃度の変化を調べたところ、*gpa-1* 変異体のみで Max にわずかな異常が見られた(図 20B, F)。この傾向は、*goa-1*; *gpa-1* 二重変異体や *goa-1*; *gpa-1 gpa-3* 三重変異体にも見られた(図 20D, E, F)。23°C→17°C→23°Cの温度刺激を与えた場合にも、*gpa-1* 変異体のみで Max にわずかな異常が見られ(図 21B, F)、多重変異体でも同様に Max にわずかな異常が見られた(図 21D, E, F)。つまり、これら Gα タンパク質の多重変異体における Max の異常は *gpa-1* 変異によって引き起こされていると考えられた。また、*goa-1*; *gpa-1 gpa-3* 三重変異体においても、ASJ の温度応答性が完全に欠損していないことから ASJ で機能する他の未同定の Gα タンパク質が存在し、それが *goa-1*; *gpa-1 gpa-3* 三重変異体の ASJ で機能している可能性も考えられる。17°Cから 23°Cへの刺激に対する Max の異常は *gpa-1* 変異体のみで観察された。一方で、23°Cから 17°Cへの刺激に対しては、*goa-1*、*gpa-1*、*goa-3*

変異体すべてにおいて Min または Max-Min の異常が見られた(図 20A-C, G, H)。つまり、これらの G α タンパク質は細胞内のカルシウム濃度を定常状態へ戻す際に機能している可能性が考えられた。グアニル酸シクラーゼの変異体についても解析を行ったところ、17°C→23°C→17°Cの温度刺激に対して *daf-11* 変異体は Max に異常を示し、*odr-1* 変異体は Min と Max-Min に異常を示した(図 22)。一方、23°C→17°C→23°Cの温度刺激に対しては、*daf-11* 変異体においてのみ Min-Max に異常が見られた(図 23) (Ujisawa *et al.*, 2016)。

2.9 ホスホジエステラーゼ変異体における ASJ 感覚ニューロンの温度応答

ホスホジエステラーゼ(PDE)はグアニル酸シクラーゼの機能とは逆に、cGMP を加水分解することで細胞内へのカルシウム流入を抑制することで知られている。PDE の変異体の低温耐性異常は G α や GC の変異体と同じタイプの異常であったことから、ASJ 感覚ニューロンにおいて PDE が温度情報伝達に抑制的に働くと仮定した場合、PDE の変異体を示す低温耐性異常の表現型を説明するには矛盾があった。そこで、PDE が欠損することで本当に ASJ 感覚ニューロンが過剰活性化しているのかどうかを、カルシウムイメージングにより測定した。17°C→23°C→17°Cの刺激を与えた条件において、*pde-2* 変異体と *pde-3* 変異体において Max の異常が観察された(図 24B, C, G)。この傾向は *pde-1 pde-5; pde-2* 三重変異体でも見られ、さらに *pde-1 pde-5; pde-3; pde-2* 四重変異体では、異常が増強された(図 24E, F, G)。さらに、*pde-1 pde-5; pde-3; pde-2* 四重変異体では、Min と Max-Min の値も低くなった (図 24F, H, I)。通常、PDE が欠損することで、感覚ニューロン内の cGMP が分解されず、CNG チャネルが開口した状態になるため、

pde-5 の変異体に見られるように細胞内カルシウム濃度が高い状態が維持されると想定される。しかし、今回のカルシウムイメージングの結果から、PDE が欠損すると、感覚ニューロン内カルシウム濃度が低下していることが示された。脊椎動物の視細胞では、細胞内へのカルシウムイオンの異常な流入がカルシウム結合タンパク質などを介して GC を抑制し、その結果、カルシウムイオンの流入を妨げることが報告されている (Koch and Stryer, 1988; Nakatani and Yau, 1988)。このことから、*C. elegans* においても、PDE の欠損により細胞内へのカルシウムイオンの異常な流入が起こり、これが GC を抑制することにより、ASJ 感覚ニューロンの不活性化が起きている可能性が考えられた。このような現象は 23°C→17°C→23°C の刺激を与えた結果にも見られ、*pde-3* 変異体では野生株よりも Max の値が高くなる異常が見られたが(図 25C, G)、*pde-1 pde-5*; *pde-3*; *pde-2* 四重変異体では値が低くなっていた(図 25F, G)。

ASJ 感覚ニューロンのカルシウム濃度は 17°C から 23°C への warming 時に上昇し、23°C から 17°C への cooling 時には減少する。*pde-3* 変異体では、23°C→17°C→23°C の cooling 刺激を与えた場合に野生株よりも反応性が弱くなった(図 25C, G)。一方、*pde-5* 変異体では、17°C→23°C→17°C の warming 刺激を与えた場合に野生株よりも反応性が強くなった(図 24D, G)。これは、PDE-3 が cooling 刺激に対しての抑制因子として機能し、PDE-5 が warming 刺激に対しての抑制因子として機能していることを表していると考えられた。これらの結果は、多くの動物において、PDE がカルシウム流入を抑制するという機能をもつことと矛盾しなかった。次に、PDE-3 や PDE-5 が遺伝学的に G タンパク質の下流で機能しているのかを確かめるために、*gpa-1* 変異体と *pde-3* または *pde-5* 変異体の二重変異体を作製し、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性を解析した(図 26, 27)。まず、*pde-5*; *gpa-1* 二重変異体に対して 17°C→23°C→17°C の温度刺激を与えた場合、こ

の二重変異体は *pde-5* 変異体と同様の温度応答性を示した(図 26)。さらに、*pde-3; gpa-1* 二重変異体に対して 23°C→17°C→23°Cの温度刺激を与えた場合にも、この二重変異体は *pde-3* 変異体と同様の温度応答性を示した(図 27)。つまり、分子経路において PDE は G タンパク質よりも下流に位置しているため、神経活動レベルにおいても PDE の変異が優位(epistatic)であったと考えられる(Ujisawa *et al.*, 2016)。

ここまでの結果を図 28 にまとめた。ASJ 感覚ニューロンの G タンパク質経路上の分子は複数の分子が共同して機能し、温度変化時に機能するものやカルシウム濃度を定常状態へ戻す際に機能するものなど、生理学的に様々な側面において、それぞれの役割を担っていることがカルシウムイメージングから示唆された。ASJ 感覚ニューロンの光受容情報伝達に関わる分子経路と比較してみると、光は光受容体 LITE-1 で受け取られ、G α タンパク質として GOA-1 と GPA-3、グアニル酸シクラーゼとして DAF-11 と ODR-1、ホスホジエステラーゼとして PDE-1、PDE-2、PDE-5 が機能するが、温度情報伝達には GPA-1 と PDE-3 も機能することがわかった。さらに、*pde-3* 変異体は cooling 刺激に(図 25)、*pde-5* 変異体は warming 刺激に対して異常を示したことから(図 24)、温度刺激の種類によって機能する分子が異なる可能性も考えられた。しかし、今回用いた変異体において ASJ 感覚ニューロンの温度に対する応答性が完全には消滅していないことから、他の未同定の G α や GC が ASJ 感覚ニューロン内に存在する可能性も考えられる。さらに、ASJ 感覚ニューロンにおける温度受容神経活動と低温耐性の表現型は完全に一致しない部分も存在する。後述のように、低温耐性は、複数のニューロンや組織を介して制御されているため、ASJ 感覚ニューロンの神経活動の変化値をパラメータとして、低温耐性の表現型を完全に説明するには、他のニューロンや組織のパラメータや、低温死の原因であるアウトプットのパラメータを明確にする必要があると考え

られる。

2.10 低温耐性における組織間ネットワーク制御

ここまでの解析から、低温耐性の成立には ASJ 感覚ニューロンが関与することが示された。ASJ 感覚ニューロンが直接的に温度を感知して ASJ の神経活動を変化させていると考えられるが、他のニューロンが温度を受容して、その温度受容情報が ASJ 感覚ニューロンに伝達され、ASJ の神経活動を変化させている可能性も残されていた。そこで、ASJ 感覚ニューロン以外からのシナプスを介した情報伝達が欠損した状態で、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性を解析した。具体的には、シナプス伝達に関わる変異体として、シナプトブレビン/SNB-1、神経ペプチド合成酵素/EGL-21、シナプトタグミン/SNT-1、シンタキシン/UNC-64 を用いて解析を行った(図 29)。神経細胞間の情報伝達は神経接続部でおこなわれ、神経細胞の興奮に応じて、神経伝達物質はシナプス小胞内に濃縮される。小胞膜にはシナプトタグミンとシナプトブレビンが存在し、それが、細胞膜上にあるシンタキシンと複合体を形成して、膜融合を起こし、神経伝達物質をシナプス間隙に放出することで、後細胞へと情報伝達が行われている。そこで、まずシナプス小胞膜の構成分子であるシナプトブレビンに異常をもつ *snb-1* 変異体において、ASJ のカルシウムイメージングをおこない、ASJ 感覚ニューロン以外からのシナプス伝達を断った状態で、ASJ が温度刺激に反応できるかを調べた(図 29A, B)。その結果、*snb-1* 変異体の ASJ ニューロンは野生株と同様に、温度変化刺激に対して応答を示したため、ASJ 感覚ニューロンが単独で直接温度を受容していることが示唆された。さらに、*snb-1*

変異体を含め、*egl-21* や、*snt-1* と *unc-64* の各変異体は低温耐性の異常を示した(図 29C)。

つまり、ASJ 感覚ニューロンは単独で温度を感じることができ、ASJ 感覚ニューロンのシナプスを介して分泌性の温度情報が下流の細胞へ伝達されている可能性が考えられた。

ASJ 感覚ニューロンから分泌される分子や下流組織の解析が行われ、低温耐性には ASJ 感覚ニューロンの下流組織として腸や神経系が関与していることがわかった(Ohta *et al.*, 2014) (図 30A)。ASJ ニューロンから分泌されるインスリン分子 INS-6 と DAF-28 が、腸にあるインスリン受容体 DAF-2 によって受容される。そこでは、DAF-2 の下流のインスリンシグナル伝達経路を経て情報が伝達され、FOXO 型転写因子による遺伝子の発現制御が行われることで低温耐性が制御されることが示唆されている。この低温耐性は約 3 時間で獲得・消失されるため (図 4)、複数の組織を介して低温耐性を獲得するためには、ASJ 感覚ニューロンの神経活動変化が一時的なもので十分なのか、長時間にわたり必要なかを調べる必要があった。そこで、15℃飼育個体に 17℃から 23℃の温度刺激を与え、その後、5 時間 23℃の温度刺激を与え続けた場合の ASJ 感覚ニューロンの神経活動をカルシウムイメージングで調べた(Ujisawa *et al.*, 2014a) (図 30B)。温度刺激を与える前と、温度刺激後 30 分、1 時間、3 時間、5 時間の時点での ASJ の神経活動状態を解析した結果、30 分後に ASJ の活動が最大となり、約 1 時間後に定常状態に戻ることがわかった。また、園田らの解析から低温耐性には腸だけでなく、精子が関わることをわかってきた。精子の変異体であるプロテインホスファターゼ 1(PP1)をコードする *GSP-4* の変異体において ASJ 感覚ニューロンのカルシウムイメージング解析を行ったところ、温度刺激に対する応答性が低下していた(Sonoda *et al.*, 2016)。この応答性の低下は、精子特異的に遺伝子発現を誘導するプロモーター(*spe-11p*)を用いて、*gsp-4*

の精子特異的に *gsp-4* 遺伝子を発現させることで回復した。このことから、精子が頭部の ASJ 温度受容ニューロンの神経活動に影響を与えている可能性が考えられた。

さらに、グリア細胞が ASJ 感覚ニューロンの温度受容に与える影響を調べた。中台と太田らによって、グリア細胞で機能するホメオドメイン型転写因子 **PROS-1** の低温耐性への関与が見つかった。*pros-1* はグリア細胞(AMsh)で発現し、これが欠損すると致死となるため、ノックアウト変異体を解析に用いることはできない。そこで、**feeding RNAi** により *eri-1; lin-15B* 系統の *pros-1(ceh-26)* 遺伝子をノックダウンさせ、このノックダウン個体の ASJ 感覚ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージングで測定した (Kage-Nakadai *et al.*, 2016) (図 31)。その結果、15°C や 20°C で飼育した *pros-1* ノックダウン個体の ASJ 感覚ニューロンの温度応答性は、ノックダウンをしていない *eri-1; lin-15B* の系統と同様の反応性を示し、温度応答性は正常であることがわかった。*pros-1* ノックダウン個体は低温耐性に異常を示すが、15°C 飼育後に 2°C で生存率が低下する異常であった。この異常は、ASJ ニューロンの温度情報伝達の変異体を示す 20°C 飼育後に 2°C で生存率が上昇する異常とは質的に異なった。これらのことから、*pros-1* が発現しているグリア細胞(AMsh)は ASJ 以外のニューロンに影響を与えることで低温耐性に関与していると考えられた。

2.11 DAF-16 下流遺伝子の解析

ASJ 感覚ニューロンからは、インスリン様分子 DAF-28 と INS-6 が発現しているため、太田らによりインスリン分子の解析が行われた。さらに、インスリン受容体で

ある DAF-2 の変異体で 20℃や 25℃飼育後に低温耐性が上昇する異常が観察された。そこで、*daf-2* 変異体の腸や神経系で特異的に *daf-2* 遺伝子を発現させた系統を作製し、低温耐性の解析が行われた。その結果、低温耐性の成立には、ASJ 感覚ニューロンから分泌されたインスリンが、腸や神経系のインスリン受容体(DAF-2)で受容され、インスリン情報伝達系を介して、最終的に FOXO 型転写因子(DAF-16)による遺伝子発現制御が必要であることが示唆された。低温耐性の成立にインスリン情報伝達系を介した遺伝子発現が必須であることから、低温耐性において、DAF-16 の下流に位置する遺伝子を見つけるための解析を行った。過去に行われた杉らの DNA マイクロアレイ解析によると、23℃から 17℃に飼育温度を変化させた際に発現量が変動する遺伝子が 79 個存在した (Sugi *et al.*, 2011)。これらの遺伝子うちの少なくとも 20 個の遺伝子については変異体の存在が公表されていたため、それらの変異体について低温耐性を調べた。その結果、グルコシルセラミド合成酵素 CGT-1、システインプロテアーゼ CPR-1、ヒドロキシステロイド 17β 脱水素酵素 DHS-4、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 GPDH-1 をそれぞれコードする遺伝子の変異体において、20℃で飼育した個体の低温耐性に異常が見られた。一方、doublesex 型転写因子の DMD-7 や Gα タンパク質の GPA-7 をコードする遺伝子の変異体では、25℃で飼育した個体の低温耐性に異常が見られ、エンドリボヌクレアーゼである M60.2 をコードする遺伝子の変異体では、20℃で飼育した個体と 25℃で飼育した個体の両方で低温耐性の異常が観察された(図 32)。温度に依存して発現量が変動する遺伝子の中には、温度ストレスを感じた際に機能することで知られているヒートショックタンパク質(HSP)をコードする遺伝子である *hsp-16.2*、*hsp-16.41*、そして *hsp-16.48* が含まれていた。しかし、これら 3 つの遺伝子の変異体はそれぞれ低温耐性に異常は示さなかった(図 33)。*hsp* 遺伝子の転写調節に関わる分子として、ヒートショック転写因子

である HSF-1 があり、HSF-1 をコードする遺伝子の変異体(*hsf-1*)でも低温耐性に異常は見られなかった(図 33)。

変異体が低温耐性に異常を示した 7 つの遺伝子がインスリン経路の下流で発現調節をされているのかを調べるために、定量的 PCR 法を用いて、これら 7 つの遺伝子の mRNA の量を野生株とインスリン受容体 *daf-2* 変異体において測定した。*daf-2* 変異体は高温で飼育すると dauer になってしまうため、野生株と *daf-2* 変異体をそれぞれ 15°C 飼育個体、15°C で L4 まで飼育後 20°C で 12 時間飼育した個体、または 15°C で L4 まで飼育後 25°C で 12 時間飼育した個体から、それぞれ体内 mRNA を抽出し、定量的 PCR 解析を行った(図 34)。まず、25°C 飼育後の低温耐性に異常を示していた *gpa-7* 遺伝子の mRNA 量を野生株と *daf-2* 変異体で比べたところ、25°C で飼育した *daf-2* 変異体において *gpa-7* の mRNA の量が野生株に比べて 10 倍以上に増加していた (図 34B)。一方で、15°C、20°C、または 25°C で飼育された野生株において *gpa-7* 遺伝子の発現量を比較したところ、飼育温度の違いによる発現量の違いは見られなかった(図 34C)。これらの結果から、*daf-2* 遺伝子が欠損することによりインスリン情報伝達系が機能しなくなり、25°C 飼育された個体内で *gpa-7* 遺伝子の発現量が増加し、それが低温耐性の異常に関連していると考えられた。同様に、*daf-2* 変異体では、変異体が低温耐性異常を示した 7 つの遺伝子のほとんどに関して、その異常を示した飼育温度における発現量が増加していた。一方、変異体が 20°C で飼育された際に低温耐性に異常を示していた *cpr-1* 遺伝子に関しては、20°C 飼育個体よりも 25°C 飼育個体の方が、*daf-2* 変異体における発現量が増加していた。このことから、*cpr-1* 遺伝子に関しては、低温耐性に異常には、必ずしも野生株との発現量の差が大きくある必要性がないことが示唆された。

DAF-2 の下流には PI3 キナーゼの AGE-1、PDK-1、AKT/PKB キナーゼの AKT-1、

AKT-2、そして FOXO 型転写因子の DAF-16 へと繋がるインスリンシグナル経路が存在する(Fielenbach and Antebi, 2008; Malone *et al.*, 1996) (図 30A)。この経路は高温耐性(dauer)時にも機能しており、細胞内にある DAF-16 が核内に移行し、下流の遺伝子発現を制御することで耐性が制御されていることが報告されているため、今回調べた温度依存的に発現量の変動する遺伝子は、DAF-16 により制御を受けている可能性が考えられる。

細胞膜の流動性を決める不飽和脂肪酸などの脂質膜構成の変化は、多くの生物の低温耐性にとって重要である。脂肪酸不飽和化酵素である $\Delta 9$ デサチュラーゼは、多くの生物の低温耐性に重要な役割を果たしている。*C. elegans* にも *fat-5*、*fat-6*、*fat-7* という $\Delta 9$ デサチュラーゼをコードする遺伝子が存在し、それらは、DAF-16 によって発現制御を受ける標的遺伝子として知られている。これらが欠損すると *C. elegans* の低温耐性も低下するといわれている(Savory *et al.*, 2011)。この報告から、今回の低温耐性時にも細胞膜の流動性を変えて低温耐性を獲得できるように変化している可能性が考えられた。そこで、定量的 PCR を用いて、これらの遺伝子の発現量を野生株と *daf-2* 変異体で比較したところ、20℃または 25℃で飼育した *daf-2* 変異体において、*fat-5* 遺伝子の発現量が上昇していた(図 35)。

3. 考察

3.1 ASJ 感覚ニューロンで制御される低温耐性

C. elegans の低温に対する耐性機構は、これまでに知られていなかったため、具体的な温度などの条件を検証する必要があった。今回、15℃で飼育された個体は2℃の低温刺激を与えても生存でき、20℃や25℃で飼育された個体は2℃の低温刺激を与えると死滅することがわかった(図1、2)。つまり、この低温耐性現象は飼育された温度に依存していることがわかった。さらに、この低温耐性はわずか3時間で獲得されることがわかった(図4)。これまでに、温度ストレスを与えると HSF や HSP が機能し、ストレスによる影響から細胞を保護することは他の生物でも知られている。しかし、今回の低温耐性に関しては、これらの分子は関与していないことがわかり(図33)、この3時間という短時間で遺伝子の転写が行われ、どのような体内メカニズムが起こっているのかはわかっていない。まず、どここの組織が機能するかを探り、神経系が重要であることがわかった。しかし、既に温度受容に関係する現象の一つとして、温度走性があり、この神経回路にかかわる AFD 温度受容ニューロンの変異体を調べたが、低温耐性は正常であった(図8)。このように、温度走性に関わる AFD 温度受容ニューロンの機能が欠損していても低温耐性が成立することから、AFD 温度受容ニューロンは低温耐性に関与しないと考えられた。しかし、温度走性の神経回路にくわえて加えて他の感覚ニューロンの機能に関わる cGMP 依存性チャネルの *tax-4* 変異体では、20℃飼育後の低温耐性に異常がみられ、*tax-4* 変異体の ASJ 感覚ニューロンで *tax-4* 遺伝子を発現させたトランスジェニック系統では、*tax-4* 変異体を示す低温耐性の異常が回復した(図11)。ところが、他の AWC 感覚ニューロンで *tax-4* 遺伝子を発現させ、AWC ニューロンの温度受容を正

常に戻した系統では、低温耐性は回復しなかった(図 11)。つまり、温度走性に関わる AWC ニューロンも低温耐性には関与しなかった。これらの解析からも、温度走性に必要な温度受容ニューロンとは別のニューロンが低温耐性を制御することがわかった。

3.2 ASJ 感覚ニューロン内の情報処理

tax-4 変異体のレスキュー系統やカルシウムイメージングの結果などから、低温耐性に光受容ニューロンである ASJ 感覚ニューロンが低温耐性を制御していることが明らかとなった。さらに、3 量体 G タンパクなどの感覚情報伝達に使われる分子に関しても、ASJ における光と温度の情報伝達においてほとんど同じものが機能していることが示唆された(図 16)。しかし、受容体は異なり、光受容体である LITE-1 は温度受容と低温耐性には関与していない(図 15、16)。一般的に 3 量体 G タンパクの上流には、G タンパク共益型受容体 GPCR があるが、ASJ の温度受容体はまだ見つかっていない。温度走性行動の主要な温度受容ニューロンである AFD 感覚ニューロンでは、レセプター型グアニル酸シクラーゼ(rGC)が温度受容体の役割をしているといわれている(Takeishi *et al.*, 2016)。しかし、ASJ 感覚ニューロンでは、一般的に GC の上流に位置する $G\alpha$ を欠損させることで温度受容情報伝達が低下することから、GC と $G\alpha$ の上流には何らかの温度受容体が機能していることが示唆された。

ASJ 感覚ニューロンが温度と光という異なる情報を受容することから、一つの疑問として、光と温度の情報が ASJ 内でクロストークしているのか、それとも区別されているのかが挙げられた。所属研究室のメンバーが、温度と光を同時に当てる実験

として、ASJ 感覚ニューロンで受容する青色光と温度刺激を同時に与え、低温耐性に影響が出るか調べたが、影響は出なかった。この結果だけでは断定はできないが、温度と光は区別されているかも知れない。ASJ 感覚ニューロンの中で、光と温度の情報を区別している方法として、分子の働き分けが考えられた。例えば、ASJ 感覚ニューロンは、高温ストレスを感じた際に起こる耐性幼虫のメカニズムにも関与している。耐性幼虫現象において、ASJ のグアニル酸シクラーゼ DAF-11 が cGMP 依存性チャネル TAX-4/TAX-2 を促進する経路が働く。耐性幼虫機構に関わるグアニル酸シクラーゼは DAF-11 以外にも複数存在し、DAF-11 と ODR-1 は発現細胞が重なっているが、同じ細胞の中で働きを区別していると言われている。実際に、今回の低温耐性の解析において、DAF-11 の変異体に比べて ODR-1 の変異体の方が低温耐性の異常が強かった(図 16B)。つまり、高温ストレスには DAF-11 が主に働くが、低温耐性には ODR-1 が主に働くといった使い分けが行われている可能性が考えられた。そのような理由で、ASJ の G タンパク質経路の変異体における ASJ 感覚ニューロンのカルシウムイメージングを行い、光情報と温度情報で機能する分子が神経活動レベルで分かれているのか解析し、結果として、G タンパク質経路上の分子が温度刺激における温度域や温度変化パターンなどさまざまな側面において、それぞれ使い分けられている場合や共同的に機能している場合があることがわかった(図 20-25)。

本解析で用いた変異体の低温耐性の異常と、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性のカルシウムイメージングの解析で得られた異常の強さなどが一致しない部分が見られた。例えば、Gα タンパク質では *goa-1* 変異体と *gpa-1* 変異体では低温耐性の異常が見られ、*gpa-3* 変異体ではあまり低温耐性の異常は見られなかった(図 16)。しかし、これらの変異体の ASJ 感覚ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージングで調べ

ると、全ての変異体で部分的ではあるが異常が見られた(図 20、21、24、25)。*goa-1; gpa-3 gpa-1* 三重変異体の低温耐性が *tax-4* 変異体ほどの異常を示さず、ASJ の神経活動も完全に欠損していなかった結果から、ASJ 感覚ニューロンにおいて他の $G\alpha$ タンパク質が存在する可能性が考えられた。グアニル酸シクラーゼに関しては、*daf-11; odr-1* 二重変異体において顕著な低温耐性の異常が見られた(図 16)。しかし、*daf-11; odr-1* 二重変異体の ASJ の温度応答性には顕著な異常は見られなかったことから、グアニル酸シクラーゼも他に存在しているかも知れない(図 22、23)。 $G\alpha$ タンパク質やグアニル酸シクラーゼなどは、ASJ 以外の他の多くのニューロンでも発現しているため、低温耐性の異常として表れるには、ASJ ニューロン内の異常だけではなく、他のニューロンや組織の異常も影響して表れる可能性も考えられる。

3.3 低温耐性に関わる組織

太田らの解析から、温度刺激により ASJ 感覚ニューロンからインスリン様分子である DAF-28 と INS-6 が分泌され、腸や神経系で受け取られ、低温耐性を制御することが示唆された(図 30A)。このインスリン様分子はヒトのインスリンに似た構造をもつインスリン様ホルモンと呼ばれており、ニューロペプチドのように神経系に作用することが報告されている (Kodama *et al.*, 2006)。インスリン情報伝達経路では、インスリン受容体である DAF-2 の下流で、FOXO 型転写因子 DAF-16 による遺伝子の発現制御などが行われ、全身の低温耐性が制御されていると考えられる。低温耐性は、約 3 時間で獲得・消失されるが、5 時間のカルシウムイメージングの結果から、ASJ 感覚ニュー

ニューロンの神経活動は温度変化を感じてから約 30 分で活動が最大となりとなり、その後は定常状態に戻ることがわかった。一見すると、ASJ 感覚ニューロンの神経活動と低温耐性の獲得・消失にかかる時間の間に差が生じている。これは、ASJ 感覚ニューロンからの温度情報がインスリン分子により下流の組織へ伝達され、その下流ではさらに DAF-16 による遺伝子の発現を伴う制御がおこなわれ、そこから低温耐性に必要な生体調節がおこなわれるため、時間のズレが生じていると考えられる。

インスリン情報伝達経路は高温耐性時にも機能するが、両者の違いとして、高温耐性の場合には、このインスリン情報伝達経路は L1 幼虫期において機能し、dauer 幼虫形成という形態の変化を伴う。しかし、低温耐性にはそのような見た目の形態的变化はみられない。DAF-16 に調節を受ける遺伝子は非常に多い。そのうちの 하나가 $\Delta 9$ デサチュラーゼの *fat-5*、*fat-6*、*fat-7* 遺伝子である(Savory *et al.*, 2011)。これらが欠損すると低温耐性も低下すると言われている。その他の DAF-16 の下流で発現制御されている低温耐性遺伝子については解析が進行中であるが、これまでに低温耐性に異常を示した変異体の原因遺伝子の中で、DAF-16 の下流で機能している遺伝子の候補としては、温度に依存して発現量の変動する遺伝子である *gpdh-1*(グリセロール 3 リン酸デヒドロゲナーゼ)や *cpr-1*(システインプロテアーゼ)など 7 つの遺伝子が見つかった(図 32)。昆虫の低温耐性機構の一つに、細胞内に不凍化物質として様々な種類の糖を蓄積させ、細胞内凍結を回避したり、体液中のグリセロールと細胞内の水を置換したりすることで細胞内凍結を防ぐことがわかっている。*C. elegans* において浸透圧は、excretory cell と呼ばれる浸透圧を調節する細胞で調節されており、doublesex 型転写因子の *dmd-7* や、セラミドグルコシルトランスフェラーゼの *cgt-1* 遺伝子はこの excretory cell でも発現している。*C. elegans* の体は浸透圧で調節されており、高い流体静力学的な内圧で維持され

ている。これらの遺伝子がこの内圧を維持するための excretory cell で働き、低温耐性に
関与している可能性も考えられる。*cgt-1*、*cpr-1*、*dhs-4*、*dmd-7*、*gpa-7*、*gpdh-1*、*M60.2*
遺伝子は、*C. elegans* 野生株を高温(23℃)から低温(17℃)に移したときに発現量が増減す
る(Sugi *et al.*, 2011)。これらの遺伝子の変異体である、*cgt-1*、*cpr-1*、*dhs-4*、*gpdh-1* 変異
体は 20℃飼育後の低温耐性の異常を示し、*dmd-7* 変異体と *gpa-7* 変異体は、25℃飼育後
の低温耐性に異常を示し、*M60.2* 変異体は 20℃または 25℃飼育後の低温耐性に異常を
示した。これらの結果と定量的 PCR の結果を合わせると、*dhs-4* や *dmd-7*、*gpa-7* 遺伝
子は、それらの変異体の低温耐性に異常が見られた温度において、*daf-2* 変異体におけ
る発現量が高くなっている(図 34)。一方で、*cpr-1* や *gpdh-1* 遺伝子など、低温耐性の異
常が見られた温度とは異なる温度で発現量が高くなっている遺伝子もある。今回の定量
的 PCR は、個体全体から回収した mRNA をもとに測定されたものであるため、低温耐
性に関わる組織では、これらの遺伝子の発現量が、個体全体で見られる発現変動パター
ンと異なる可能性も考えられた。

本研究から明らかになった *C. elegans* の低温耐性の制御機構をまとめると、
ASJ 感覚ニューロンが温度を受容し、インスリン分子が分泌され、それが腸で受容され
ることで遺伝子発現を介して個体の低温耐性が成立するという、新規の温度制御メカニ
ズムである(図 36)。しかし、この ASJ 感覚ニューロンに依存した温度シグナルは、最終
的に低温耐性を抑制する経路である。つまり、低温耐性には他の細胞を介した正の経路
の存在が考えられ、正と負の両方の経路を介した複雑なメカニズムが低温耐性の成立に
は必須であると考えられる。

4. 結語

本研究から、*C. elegans* は飼育された温度に依存して低温に耐性をもつことがわかった。さらに、これまで他の動物で未知であった神経系における温度情報のインプットから腸へつながる分子経路が低温耐性に関わることがわかった。これまでに個体を構成する個々細胞で脂肪酸合成酵素が細胞膜の脂肪酸に作用し、細胞膜の流動性を変えることで、低温下でも生存できる仕組みがあることが示唆されていた (Savory *et al.*, 2011)。しかし、今回の解析から各々の細胞における温度応答が個体の低温耐性を制御するのではなく、光受容ニューロンが温度を感知し、その情報が腸に伝達されることで、低温耐性が制御されるという、新規の低温耐性の解析モデルを確立した。ASJ 感覚ニューロン内では G タンパク質経路を介して温度情報伝達が行われるが、3 量体 G タンパク質の上流に存在すると考えられる温度受容に関わる受容体はまだ見つかっていない。ショウジョウバエでは、光受容体であるロドプシンが温度受容に関わるという報告もあるが(Shen *et al.*, 2011)、*C. elegans* の ASJ ニューロンにおいては、唯一の光受容体である LITE-1 は温度受容には関与していないことが示唆された。つまり、光受容体以外の温度受容体の存在が示唆された。さらに、ASJ 感覚ニューロンを含めて、1 細胞内で複数の情報が識別される仕組みには未知の点が残されており、今回の ASJ ニューロンにおける温度と光のクロストークの実験は、感覚ニューロンや介在ニューロンが複数の情報を受け取り、その情報識別して下流へ情報伝達する仕組みを解明する実験系に利用できると考えられる。

5. 材料・方法

C. elegans の飼育法、培地や Buffer の組成等は *THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS* に従った(Wood and Researchers, 1988)。

Strain

N2 Bristol (野生型)

RB1415 *catp-3 (ok1612)*, VC693 *cgt-1 (ok1045)*, RB2095 *clec-67 (ok2770)*, PR674 *che-1(p674)*, CB1033 *che-2(e1033)*, CB3323 *che-13(e1805)*, RB1262 *cpr-1 (ok1344)*, IK038 *daf-2(e1370)*, CB1377 *daf-6(e1377)*, DR47 *daf-11(m47)*, CX2454 *daf-11(sa195); odr-1(n1936)*, FX2418 *dhs-4 (tm2418)*, RB1772 *dmd-7 (ok2776)*, *eat-4 (ky5)*, *eat-16(nj8)*, KP2018 *egl-21(n476)*, FX2468 *F58E6.7 (tm2468)*, *glc-3(ok321)*, MT2426 *goa-1(n1134)*, NL332 *gpa-1(pk15)*, *gpa-1(pk15); goa-1(n1134)*, NL335 *gpa-3(pk35)*, NL795 *gpa-7(tm5828)*, RB1373 *gpdh-1 (ok1558)*, PS3551 *hsf-1(sy441)*, VC475 *hsp-16.2 (gk249)*, *hsp-16.41 (tm1093)*, RB791 *hsp-16.48 (ok577)*, RB883 *kqt-2 (ok732)*, TQ1101 *lite-1(xu7)*, CZ1758 *max-1 (ju142)*, FX1770 *mtl-1 (tm1770)*, FX4977 *M60.2 (tm4977)*, FX11134 *pept-1(opt-2/lon-2) (tm302/e678)*, CX2336 *odr-1(n1936)*, MT3644 *odr-3 (n1605)*, CX4 *odr-7(ky4)*, PR802 *osm-3(p802)*, PR813 *osm-5(p813)*, PR811 *osm-6(p811)*, CX0010 *osm-9 (ky10)*, MT3641 *osm-10(n1602)*, IK616 *pde-1(nj57)*, IK618 *pde-2(nj58)*, *pde-3(nj59)*, IK510 *pde-5(nj49)*, IK792 *pde-1(nj57); pde-2(nj58)*, IK794 *pde-1(nj57) pde-5(nj49)*, IK796 *pde-5(nj49); pde-2(nj58)*, IK798 *pde-1(nj57) pde-5(nj49); pde-2(nj58)*, *pde-1(nj57) pde-5(nj49); pde-3(nj59); pde-2(tm3098)*, FX830 *pgp-9 (tm830)*, RB908 *pmp-1 (ok773)*, *rol-6(e187)*, NM467 *snb-1(md247)*, NM204

snt-1(md290), FK100 *tax-2(ks10)*, FK127 *tax-4 (p678)*, *tax-6 (db60)*, IK659 *tax-6 (db60)*;
njEx343[tax-6p(1.1kb)::tax-6, ges-1 NLS GFP], IK1053 *tax-6 (db60)*; *njEx424[unc-14p::tax-6]*,
trx-1(ok1449), *trx-1(tm1786)*, IK615 *ttx-1(p767)*, *ttx-3 (mg158)*, *ttx-4 (nj1)*, IK589 *ttx-7(nj50)*,
ttx-8(nj34), T28C12.4 (*tm1013*), CB1092 *unc-54(e1092)*, MC339 *unc-64(md130)*, CB1265
unc-104 (e1265), *unc-112 (r367)*; *gkDf2 (X)*

大腸菌

OP-50 株: 線虫の餌として NGM プレートに塗布した。

顕微鏡

透過式実体顕微鏡 (Leica: MZ16)

透過式実体蛍光顕微鏡 (OLYMPUS SZX12)

共焦点レーザー顕微鏡(FV1000-IX81 with GaAsP PMT, Olympus)

Nematode Growth Medium (NGM) Plate (1000 ml)

NaCl 3 g、Agar (伊那寒天) 20 g、Bacto Peptone (BD Falcon) 2.5 g、H₂O 975 ml を混合し、オートクレーブした後に Cholesterol (5 mg/ml in EtOH) 1 ml、1M CaCl₂ 1 ml、1M MgSO₄ 1 ml、1M Potassium Phosphate (pH6.0) 25 ml を加えた。これを直径 6 cm のシャーレに 14 ml または、3.5cm のシャーレに 6 ml ずつ分注して固めた。

M9 buffer (1000 ml)

KH₂PO₄ 3 g、Na₂HPO₄ 6 g、NaCl 5 g、H₂O 1000 ml を混合し、オートクレーブした後に

1M MgSO₄ 1 ml 加えた。

低温耐性テスト

20℃で飼育した野生型の *C. elegans* を、1 または 2 個体ずつ OP50 が塗られた新しい 2%(w/v)NGM プレートに植え継ぎ(P₀)、各飼育温度(15、20、25℃)で 8-12 時間飼育し産卵させた。P₀を除去し、卵(F₁)が adult になるまで、各飼育温度で飼育し続けた(15℃で 144-150 h、20℃で 85-90 h、25℃で 60-65 h)。プレート中の F₁ 70-150 個体が adult まで成長した後、NGM プレートの寒天側を下に向けた状態で、氷上に 20 分間おいた。その後プレートに 2℃で 48 時間の低温刺激を与えた。低温刺激後、室温に取り出し生存個体と死個体を数え、生存率を出した(Ujisawa *et al.*, 2014b)。

低温耐性の温度シフトアッセイ

幼虫期において、15℃ から 25℃ への温度シフトアッセイをする場合、線虫を各幼虫期まで 15℃ で飼育した後、飼育温度を 25℃ にシフトし、成虫になるまで飼育した。その後、通常の低温耐性テストと同様に低温刺激を与え、生存率を求めた。成虫期において、15℃ から 25℃ への温度シフトアッセイをする場合、線虫を成虫になるまで 15℃ で飼育した後、飼育温度を 25℃ にシフトし、1-5 時間飼育した。その後、低温刺激を与えた。7-12 時間など長時間 25℃で飼育する場合、15℃で L4 幼虫まで飼育したところで 25℃に移した(Ujisawa *et al.*, 2014b)。

Molecular biology

trx-1p::tax-4 cDNA(pTOM4)、*str-3p::tax-4* cDNA(pTOM3) 、*ceh-36p::tax-4* cDNA(pTOM10)

は、*pDEST-tax-4*cDNA(a gift from Dr. Iino) (Hirotsu and Iino, 2005)から PCR で増やした *tax-4* cDNA と *unc-54* の 3'UTR を含む。pTOM4 の ASJ 特異的プロモーターとして使用した *trx-1* プロモーターは、pQZ37 *trx-1p::ICE* (a gift from Dr. Alcedo) (Miranda-Vizuete *et al.*, 2006)から使用した。pTOM3 の ASI 特異的プロモーターとして使用した *str-3* プロモーター(3.1Kb)は、pQZ36 *str-3p::GFP* (a gift from Dr. Alcedo)から使用した。pTOM10 の AWC 特異的プロモーターとして使用した *ceh-36* プロモーター(368bp)は、pAK203 から使用した。

局在解析に使用した *trx-1p::gpa-1* cDNA::*venus* (pUDA14)は、site-directed mutagenesis により *gpa-1* cDNA の終止コドン进行を削り、*gpa-1* cDNA を *trx-1* プロモーターと *trx-1p::daf-28::venus* (pOTA10) の *venus* 遺伝子の間に挿入した。*trx-1p::gpa-3* cDNA::*venus* (pUDA15) と *trx-1p::goa-1* cDNA::*venus* (pUDA13) も同様に作製した。作製したプラスミドは表 2 に記載した。

遺伝子導入

遺伝子導入はこれまでに報告されてきた方法をもとに行った(Mello *et al.*, 1991)。遺伝子導入の際、co-injection mix には実験に使用する DNA をそれぞれ 5–50 ng/μl の濃度で入れた。インジェクションマーカーには、pKDK66 *ges-1p::nls-gfp* を 50 ng/μl, pNAS88 *ges-1p::nls-tag rfp* を 50 ng/μl、または pRF4 *rol-6gf* を 30 ng/μl の濃度で入れた。作製した系統は表 4 に記載した。

掛け合わせ

野生株に *Ex[trx-1p::yc3.60]* とマーカー遺伝子として *Ex[ges-1p::taqRFP]* をマイクロイン

ジェクションによって導入した。遺伝子導入できたものに、腸に RFP の蛍光と ASJ 感覚ニューロンに *cameleon* の青色の蛍光が観察された。得られた個体(F₁)を 1 個体ずつ NGM プレートに移し、15°C で飼育した。自家受精により次世代を生ませ、F₂にも蛍光が確認できたところで、これをカルシウムイメージングに使用した。次に、この系統を用いて、交配により *tax-4* 変異体と *lite-1* 変異体にも遺伝子が導入された系統を作製した。まず、遺伝子導入されていない野生株の雄と上記で作製した遺伝子導入された野生株の雌雄同体を交配させた。そのために、NGM プレートの中心の狭い領域に餌を塗布し、雄 5 匹と雌雄同体 3 匹を置いた。F₁ 世代において、RFP の蛍光が見られる雄を選ぶことにより、染色体外遺伝子を持つ個体が得られた。この雄と *tax-4* 変異体の雌雄同体をさらに交配した。F₁ 世代において、今度は RFP の蛍光が見られる雌雄同体を選んだ。

*lite-1(xu7); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::taqRFP]*も同様に作製した。

KHR80 *goa-1(n1134); gpa-3(pk35)* と KHR81 *gpa-3(pk35) gpa-1(pk15)*、KHR82 *goa-1(n1134); gpa-3(pk35) gpa-1(pk15)*、KHR88 *pde-3(nj59); gpa-1(pk15); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::taqRFP, rol-6gf]*、KHR89 *pde-5(nj49); gpa-1(pk15); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::taqRFP, rol-6gf]*は遺伝学的な掛け合わせ法と、PCR と電気泳動を用いた変異検出法を用いて作製した。作製した系統は表 4 に記載した。

in vivo カルシウムイメージング

これまでに行われてきた方法に従いおこなった(Kuhara *et al.*, 2011; Ohnishi *et al.*, 2011)。24×24 カバーガラスの上に、2%(v/w)アガロースパッドを作製した。その上にカルシウムイメージング用の系統 *Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::taqRFP]*を、1~3 数匹置き、医療用接着剤(医療用アロンアルファ A「三共」)で固定する。M9 buffer を垂らした上にやさしく

カバーガラスを掛ける。マニキュアで封をして蒸発を防ぎ、イメージングする。この操作を3分以内に行う。サンプルを Olympus IX81 microscope(Olympus Corporation, Tokyo, Japan)に装備されているペルチェタイプの温度制御装置(Tokai Hit Co. Ltd., Fujinomiya, Japan) の上に置く。2分ほど放置し、Dual-View (Molecular Devices, USA) optical system. を用いて蛍光を観察した。蛍光画像は EM-CCD カメラ EVOLVE512 (Photometrics, USA) で、50-100 ms の露光時間で 1 秒ごとに撮影した。アガロースパッドの温度は MATS-5500RA-KY (Tokai Hit)の温度システムによって記録した。それぞれの画像の蛍光強度は MetaMorph (Molecular Devices) image analysis software system により解析した。細胞内のカルシウム濃度の相対変化は cameleon の acceptor/donor (YFP/CFP)蛍光の比で計算した。全ての band-pass filters は cameleon においてこれまでに報告されているものを使用した。温度制御装置を用いて、17℃→23℃→17℃の温度変化刺激を与え、約5分間 ASJ 感覚ニューロンの細胞体内のカルシウム濃度の変化を測定した。個体を回復する時は、カバーガラスをスライドさせず、優しく持ち上げた。線虫に少量の M9 を掛けて回収した。

長時間のカルシウムイメージングを行う場合は、10%(v/w)アガロースパッドを使用し、虫の固定には直径 0.1 μm 2.5%(w/v) polystyrene microsphere を用いた。2.5%(w/v) polystyrene microsphere の原液または、希釈した溶液をアガロースパッドの上に 0.5 μl 位ずつ、数点置いた。虫を各点に 1~数匹置き、やさしくカバーガラスを掛ける。ミネラルオイルで封をして蒸発を防ぎ、イメージングした。温度刺激を与えて 17℃から 23℃に上昇している時間を -1 sec.とし、23℃に温度が安定したところを 0 sec.とした。そのまま温度制御装置を 23℃のまま 5 時間置いた。その間、30 分後、1 時間後を計測し、その後からは 1 時間おきに 5 時間後まで計測した。最後に、17℃に戻したときの細胞内

カルシウム濃度も計測した。計測終了後、線虫に少量の M9 buffer を掛けて、生存しているか確認した(Ujisawa *et al.*, 2014a)。

色素レーザーによる細胞破壊

色素レーザーを用いた細胞破壊実験はこれまでに行われてきた方法に従って行った(Kuhara *et al.*, 2008; Mori and Ohshima, 1995)。野生株に *Ex[trx-1p::GFP, ges-1p::GFP]* が遺伝子導入された系統を用いた。5%(v/w)アガロースパッドの上に、25M NaN₃ を 4 μ l 置き、上記の系統の L3~L4 幼虫を 2 匹置いた。カバーガラスをかけてレーザー破壊装置 Micropoint system laser microbeam(Photonic Instruments, USA)で ASJ 感覚ニューロンの核を狙って、レーザーを照射した。このとき、励起ガスには窒素ガス、laser dye にはクマリン(Methanol < 1% BPBD 365 (6 mM))を用いた。感覚ニューロンは左右に一对の細胞体があるため、両方の細胞体の核を破壊した。ASJ 感覚ニューロンの GFP の蛍光が消えたのを確認し、カバーガラスを取り、M9 buffer をかけて個体を回収し、NGM プレートに移した。20°C で 1 日飼育し、ASJ 感覚ニューロンに蛍光がないことを確認したところで、これを低温耐性テストに用いた。このとき、コントロールとして ASJ 感覚ニューロンに直接レーザーを照射はしないが、同じ操作を受けた(Mock)個体も同時に低温耐性テストした。

コンフォーカル顕微鏡を用いた観察

スライドガラスの上に 2%(w/v)のアガロースゲルを作製し、100mM NaN₃ を 10 μ l 滴下した。その上に 2-3 匹の成虫を置き、カバーガラスをかける。このプレパラートをコンフォーカル顕微鏡(FV1000-IX81 with GaAsP photomultiplier tubes, Olympus)で観察し、

FV10-ASW software(Olympus)で解析した。

mRNA の回収

*daf-2(e1370)*は 25℃で dauer になるため、L1-L3 幼虫期を 25℃で飼育できない。野生株と *daf-2(e1370)*変異体を 15℃で 5 日飼育して L3 幼虫期を過ぎた頃に、20℃または 25℃に移して 1 日それぞれ飼育した。mRNA の回収には、卵から孵化した個体の多くが、成虫になったプレートを用いた。この NGM プレートから、M9 buffer を用いて線虫を回収した。各飼育温度において同じ時期に仕込んだ 1-2 枚の飼育プレートは、適切な表現型を示す個体の mRNA がとれたか確認するため、低温耐性テストをした。mRNA の線虫を飼育した NGM プレートから M9 buffer で回収し、M9 buffer を 2 回入れ替えて大腸菌や幼虫などを洗い流した。精製手順は、RNeasy kit (QIAGEN)の手順書に従った。洗浄された個体を 650 μ l の RLT buffer で懸濁し、液体窒素で凍結し、すり潰した溶液から RNA を回収した。

定量的 PCR

野生株と *daf-2(e1370)*変異体の mRNA を上記の手順に従い、回収、精製を行った。精製した mRNA を 100 ng に調製し、iScript Advanced cDNA Synthesis kit for RT-PCR (Bio-Rad)を用いて逆転写により cDNA を合成した。定量的 PCR は cDNA に対して遺伝子特異的なプライマー、Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) そして DNA Engine Peltier Thermal Cycler-CFX96 (Bio-Rad)を用いて行った。各 Sample についてトリプリケイトで行い、従来の protocol に step5 と 6 を加えてアニーリング時間を 5 sec.から 8 sec.にした。

step1. 95℃ 30 sec. > step2. 95℃ 5 sec. > step3. アニーリング温度 8 sec. > step4. 2 へ

戻る(×39 回) > step5. 95°C 10 sec. > step6. 65°C 3 min > step7. Melt Curve 65°C to 95°C

それぞれの遺伝子の fold change 値は、ハウスキーピング遺伝子である *lmn-1*(ラミニン) または *tba-1*(α -チューブリン)の fold change 値を基準に、正規化を行った。使用したプライマーは表 3 に記載した。

統計解析

全ての図に表記されている標準誤差は standard error of the mean (SEM)を表している。

全ての図の統計解析は一元配置分散分析(ANOVA)を行い、Dunnett's *post hoc* tests for multiple comparisons により解析した。図中の(*)と(**)はそれぞれ $p < 0.05$ と $p < 0.01$ を意味する。

謝辞

本研究を行うに当たり、熱心にご指導していただきました甲南大学理工学部 生体調節学研究室 久原篤 准教授と太田茜 博士に心より厚くお礼申し上げます。遺伝学的解析および生理学的解析にご協力頂きました甲南大学 理工学部 生物学科 生体調節学研究室の卒業生 石割友博さん、桑原直人さん、長屋ひろみさん、水谷仁美さん、井上奈穂さん、研究員の八木美里さんには心より感謝申し上げます。そして、多くの *C. elegans* 変異体を提供して頂きました *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC)、National Bioresource Project (Japan) 三谷昌平 先生、変異体に加えてプラスミドを提供して頂きました、名古屋大学 森郁恵 先生、東京大学 飯野雄一 先生、University of Michigan Dr. X. Z. S. Xu、Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research Dr. J. Alcedo、University of California San Francisco Dr. C. I. Bargmann に厚くお礼申し上げます。また、日本学術振興会 特別研究員 DC に採用頂き、科研費提供による研究支援を頂きましたことに厚くお礼申し上げます。さらに、学位審査をしてくださいました甲南大学 日下部岳広 教授、西村いくこ 教授、山本雅博 教授、渡邊順司 教授、本多大輔 教授、渡辺洋平 准教授に心より感謝申し上げます。

最後に、大学4年間及び大学院5年間、私の研究生活を支えてくれた家族と友人に深く感謝いたします。

引用文献

Aoki, I., and Mori, I. (2015). Molecular biology of thermosensory transduction in *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 34, 117-124.

Bargmann, C.I., Hartwig, E., and Horvitz, H.R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74, 515-527.

Bargmann, C.I., and Horvitz, H.R. (1991a). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* 7, 729-742.

Bargmann, C.I., and Horvitz, H.R. (1991b). Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 251, 1243-1246.

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

C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012-2018.

Cassada, R.C., and Russell, R.L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 46, 326-342.

Coburn, C.M., and Bargmann, C.I. (1996). A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* 17, 695-706.

Collet, J., Spike, C.A., Lundquist, E.A., Shaw, J.E., and Herman, R.K. (1998). Analysis of *osm-6*, a gene that affects sensory cilium structure and sensory neuron function in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 148, 187-200.

Conradt, B., and Horvitz, H.R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529.

Deane, J.A., Cole, D.G., Seeley, E.S., Diener, D.R., and Rosenbaum, J.L. (2001). Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles. *Curr Biol* 11, 1586-1590.

Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* 29, 135-161.

Fain, G.L., Matthews, H.R., Cornwall, M.C., and Koutalos, Y. (2001). Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiological reviews* 81, 117-151.

Fesenko, E.E., Kolesnikov, S.S., and Lyubarsky, A.L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313, 310-313.

Fielenbach, N., and Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & development* 22, 2149-2165.

Haycraft, C.J., Schafer, J.C., Zhang, Q., Taulman, P.D., and Yoder, B.K. (2003). Identification of CHE-13, a novel intraflagellar transport protein required for cilia formation. *Experimental cell research* 284, 251-263.

Hirotsu, T., and Iino, Y. (2005). Neural circuit-dependent odor adaptation in *C. elegans* is regulated by the Ras-MAPK pathway. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 10, 517-530.

Hobert, O., Mori, I., Yamashita, Y., Honda, H., Ohshima, Y., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). Regulation of interneuron function in the *C. elegans* thermoregulatory pathway by the *ttx-3* LIM homeobox gene. *Neuron* 19, 345-357.

Jansen, G., Thijssen, K.L., Werner, P., van der Horst, M., Hazendonk, E., and Plasterk, R.H. (1999). The complete family of genes encoding G proteins of *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 21, 414-419.

Kage-Nakadai, E., Ohta, A., Ujisawa, T., Sun, S., Nishikawa, Y., Kuhara, A., and Mitani, S.

(2016). *Caenorhabditis elegans* homologue of Prox1/Prospero is expressed in the glia and is required for sensory behavior and cold tolerance. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 21, 936-948.

Kimura, K.D., Miyawaki, A., Matsumoto, K., and Mori, I. (2004). The *C. elegans* thermosensory neuron AFD responds to warming. *Curr Biol* 14, 1291-1295.

Koch, K.W., and Stryer, L. (1988). Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. *Nature* 334, 64-66.

Kodama, E., Kuhara, A., Mohri-Shiomi, A., Kimura, K.D., Okumura, M., Tomioka, M., Iino, Y., and Mori, I. (2006). Insulin-like signaling and the neural circuit for integrative behavior in *C. elegans*. *Genes & development* 20, 2955-2960.

Komatsu, H., Mori, I., Rhee, J.S., Akaike, N., and Ohshima, Y. (1996). Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* 17, 707-718.

Kuhara, A., Inada, H., Katsura, I., and Mori, I. (2002). Negative regulation and gain control of sensory neurons by the *C. elegans* calcineurin TAX-6. *Neuron* 33, 751-763.

Kuhara, A., and Mori, I. (2006). Molecular physiology of the neural circuit for calcineurin-dependent associative learning in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 26, 9355-9364.

Kuhara, A., Ohnishi, N., Shimowada, T., and Mori, I. (2011). Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 2, 355.

Kuhara, A., Okumura, M., Kimata, T., Tanizawa, Y., Takano, R., Kimura, K.D., Inada, H., Matsumoto, K., and Mori, I. (2008). Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science* 320, 803-807.

Kurahashi, T. (1990). The response induced by intracellular cyclic AMP in isolated olfactory

receptor cells of the newt. *The Journal of physiology* *430*, 355-371.

Liu, J., Ward, A., Gao, J., Dong, Y., Nishio, N., Inada, H., Kang, L., Yu, Y., Ma, D., Xu, T., *et al.* (2010). *C. elegans* phototransduction requires a G protein-dependent cGMP pathway and a taste receptor homolog. *Nat Neurosci* *13*, 715-722.

Malone, E.A., Inoue, T., and Thomas, J.H. (1996). Genetic analysis of the roles of *daf-28* and *age-1* in regulating *Caenorhabditis elegans* dauer formation. *Genetics* *143*, 1193-1205.

Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *Embo J* *10*, 3959-3970.

Miranda-Vizuete, A., Fierro Gonzalez, J.C., Gahmon, G., Burghoorn, J., Navas, P., and Swoboda, P. (2006). Lifespan decrease in a *Caenorhabditis elegans* mutant lacking TRX-1, a thioredoxin expressed in ASJ sensory neurons. *FEBS Lett* *580*, 484-490.

Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* *388*, 882-887.

Mori, I., and Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *376*, 344-348.

Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* *301*, R1207-1228.

Nakamura, T., and Gold, G.H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* *325*, 442-444.

Nakatani, K., and Yau, K.W. (1988). Calcium and light adaptation in retinal rods and cones. *Nature* *334*, 69-71.

Ohnishi, N., Kuhara, A., Nakamura, F., Okochi, Y., and Mori, I. (2011). Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 30, 1376-1388.

Ohta, A., Ujisawa, T., Sonoda, S., and Kuhara, A. (2014). Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications* 5, 4412.

Otsuka, A.J., Jeyaprakash, A., Garcia-Anoveros, J., Tang, L.Z., Fisk, G., Hartshorne, T., Franco, R., and Born, T. (1991). The *C. elegans* *unc-104* gene encodes a putative kinesin heavy chain-like protein. *Neuron* 6, 113-122.

Pace, U., Hanski, E., Salomon, Y., and Lancet, D. (1985). Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316, 255-258.

Perkins, L.A., Hedgecock, E.M., Thomson, J.N., and Culotti, J.G. (1986). Mutant sensory cilia in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 117, 456-487.

Satterlee, J.S., Sasakura, H., Kuhara, A., Berkeley, M., Mori, I., and Sengupta, P. (2001). Specification of thermosensory neuron fate in *C. elegans* requires *ttx-1*, a homolog of *otd/Otx*. *Neuron* 31, 943-956.

Savory, F.R., Sait, S.M., and Hope, I.A. (2011). DAF-16 and Delta9 desaturase genes promote cold tolerance in long-lived *Caenorhabditis elegans* *age-1* mutants. *PLoS One* 6, e24550.

Shen, W.L., Kwon, Y., Adegbola, A.A., Luo, J., Chess, A., and Montell, C. (2011). Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. *Science* 331, 1333-1336.

Sonoda, S., Ohta, A., Maruo, A., Ujisawa, T., and Kuhara, A. (2016). Sperm Affects Head Sensory Neuron in Temperature Tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell reports* 16, 56-65.

Sugi, T., Nishida, Y., and Mori, I. (2011). Regulation of behavioral plasticity by systemic temperature signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Neurosci* 14, 984-992.

Takeishi, A., Yu, Y.V., Hapiak, V.M., Bell, H.W., O'Leary, T., and Sengupta, P. (2016). Receptor-type Guanylyl Cyclases Confer Thermosensory Responses in *C. elegans*. *Neuron* 90, 235-244.

Tanizawa, Y., Kuhara, A., Inada, H., Kodama, E., Mizuno, T., and Mori, I. (2006). Inositol monophosphatase regulates localization of synaptic components and behavior in the mature nervous system of *C. elegans*. *Genes & development* 20, 3296-3310.

Tsumiki, H., Tanaka, K., and Goto, M. (2010). Insect tolerance at low temperatures : mechanisms and laboratory manuals, Shohan. edn (Okayama-shi: Okayama Daigaku Shuppankai).

Ujisawa, T., Ohta, A., and Kuhara, A. (2014a). Long-term calcium imaging of ASJ sensoryneuron controlling cold tolerance in *C. elegans*. *Protocol Exchange*.

Ujisawa, T., Ohta, A., M., O., S., S., and Kuhara, A. (2014b). Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. *Protocol Exchange*.

Ujisawa, T., Ohta, A., Uda-Yagi, M., and Kuhara, A. (2016). Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 11, e0165518.

Ward, A., Liu, J., Feng, Z., and Xu, X.Z. (2008). Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in *C. elegans*. *Nature neuroscience* 11, 916-922.

White, J.G., Southgate, E., Thomson, J.N., and Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos trans R Soc London Ser B Biol Sci* 314, 1-340.

Wood, W.B., and Researchers, t.C.o.C.e. (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*.

Xiao, R., Zhang, B., Dong, Y., Gong, J., Xu, T., Liu, J., and Xu, X.Z. (2013). A genetic

program promotes *C. elegans* longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel. *Cell* 152, 806-817.

久原 篤, 宇治澤 知代, 太田 茜 (2015) "線虫 *Caenorhabditis elegans* の温度適応を制御する神経と腸を介した情報処理" 比較生理生化学, Vol.32 No.2, p67-75,

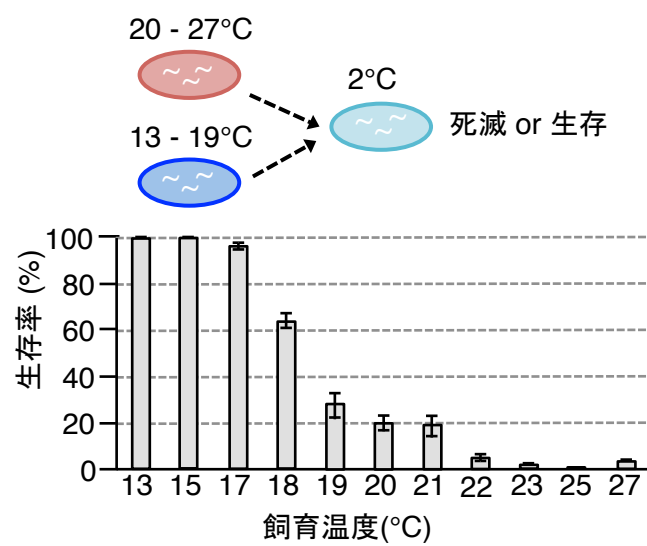


図1. *C. elegans*の飼育温度依存的な低温耐性
飼育温度(13-27°C)の影響。13°C-15°Cで飼育された野生株は2°Cでも生存できるが、20°C-27°Cで飼育された
個体は2°Cで死滅する。それぞれn≥6。

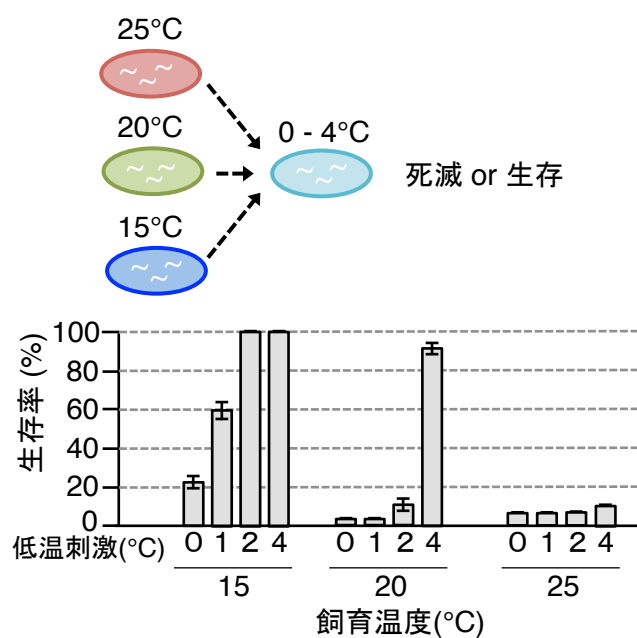


図2. 低温刺激温度の検証

低温刺激温度(0、1、2、4°C)の影響。15°Cで飼育された個体は2°Cや4°Cでも生存でき、20°Cで飼育された個体は4°Cで生存できる。25°Cで飼育された個体は0-4°Cのどの温度でも生存できない。それぞれ $n \geq 6$ 。

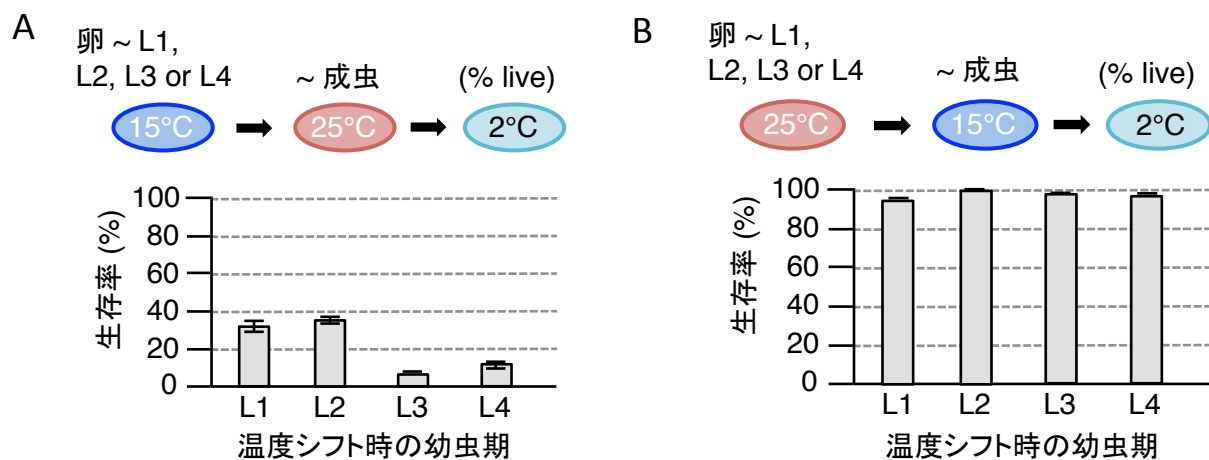


図3. L1からL4幼虫を用いた温度シフト実験

(A) 野生株を卵から各幼虫期まで15°Cで飼育する。その後、25°Cへ移動させて成虫まで飼育する。その成虫に、2°Cで48時間の低温刺激を与えた結果。(B) 野生株を卵から各幼虫期まで25°Cで飼育する。その後、15°Cへ移動させて成虫まで飼育する。その成虫に、2°Cで48時間の低温刺激を与えた結果。低温耐性は幼虫期に経験した飼育温度には依存しない。それぞれ $n \geq 6$ 。

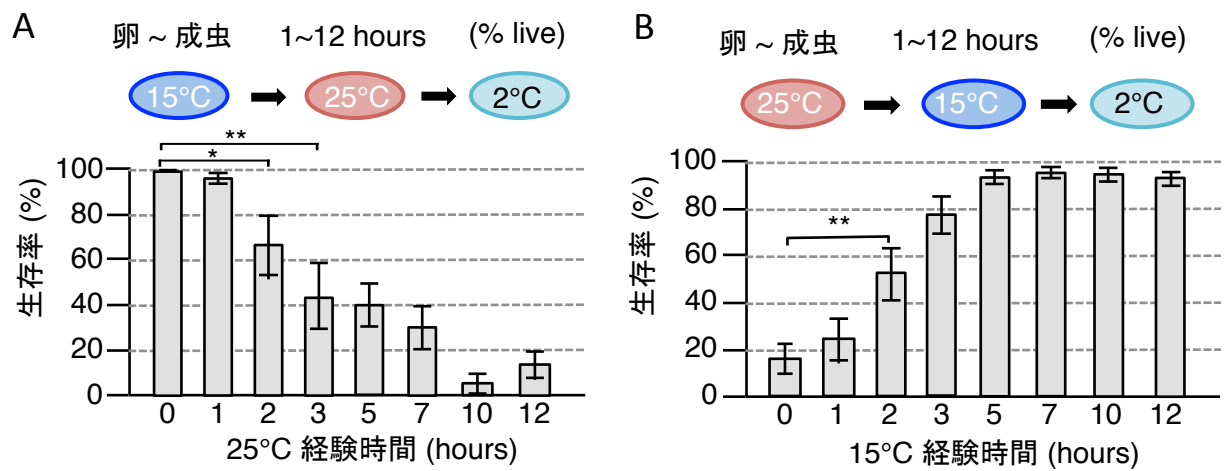


図4. 成虫期での温度シフト実験

(A) 野生株を15°Cで卵から成虫まで飼育し、その後25°Cで1-12時間飼育した後、2°Cで48時間の低温刺激を与えた結果。(B) 野生株を25°Cで卵から成虫まで飼育し、その後15°Cで1-12時間飼育した後、低温刺激を与えた結果。それぞれ $n \geq 6$ 。飼育温度を変えてから3時間後に低温耐性が獲得された。 $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ 。

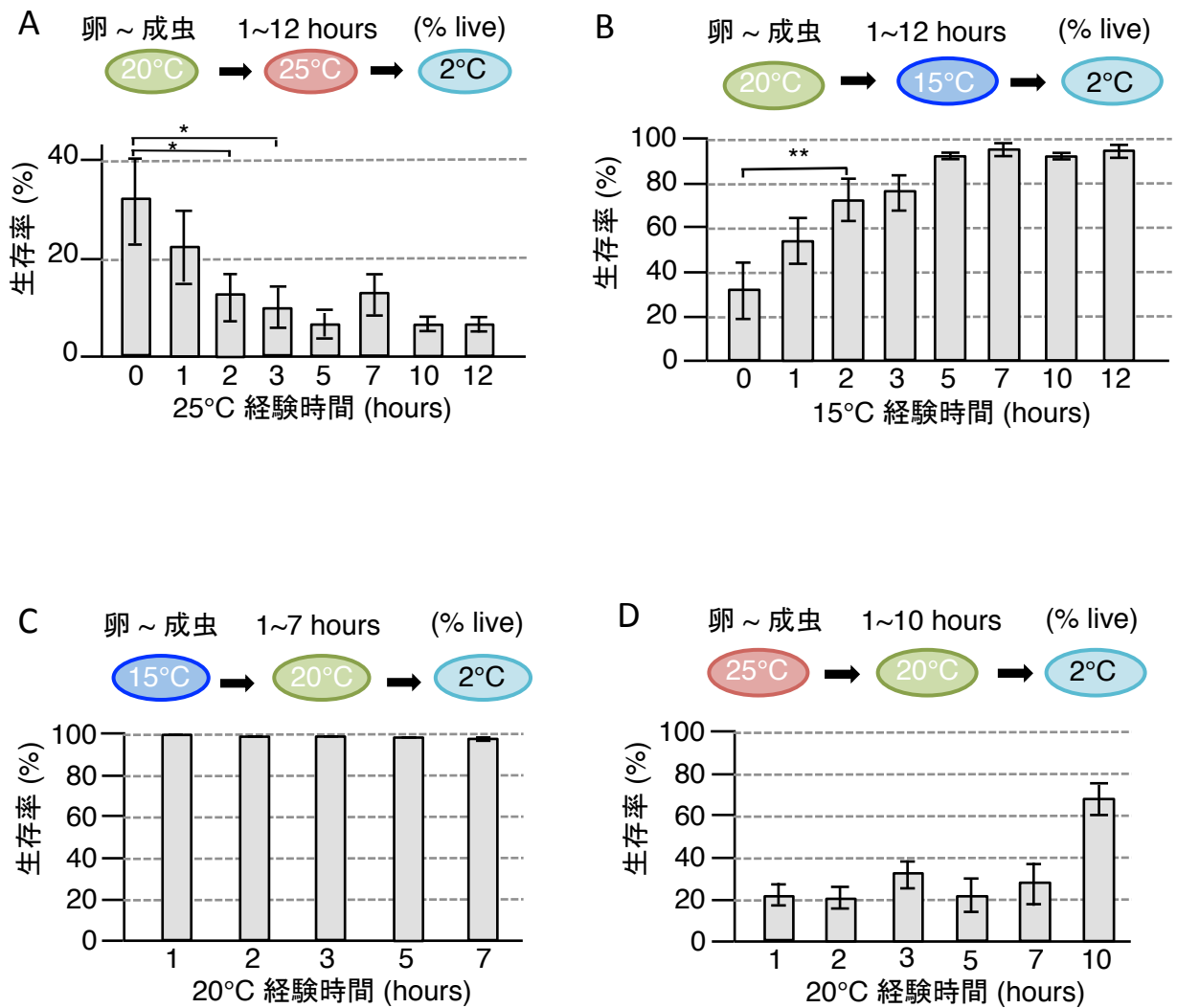


図5. 成虫期での温度シフト実験2

(A) 野生株を20°Cで卵から成虫まで飼育し、その後25°Cで1-12時間飼育した後、2°Cで48時間の低温刺激を与えた結果。(B) 20°Cで卵から成虫まで飼育し、その後15°Cで1-12時間飼育した後、低温刺激を与えた結果。(C) 15°Cで卵から成虫まで飼育し、その後20°Cで1-7時間飼育した後、低温刺激を与えた結果。(D) 25°Cで卵から成虫まで飼育し、その後20°Cで1-10時間飼育した後、低温刺激を与えた結果。それぞれ $n \geq 6$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

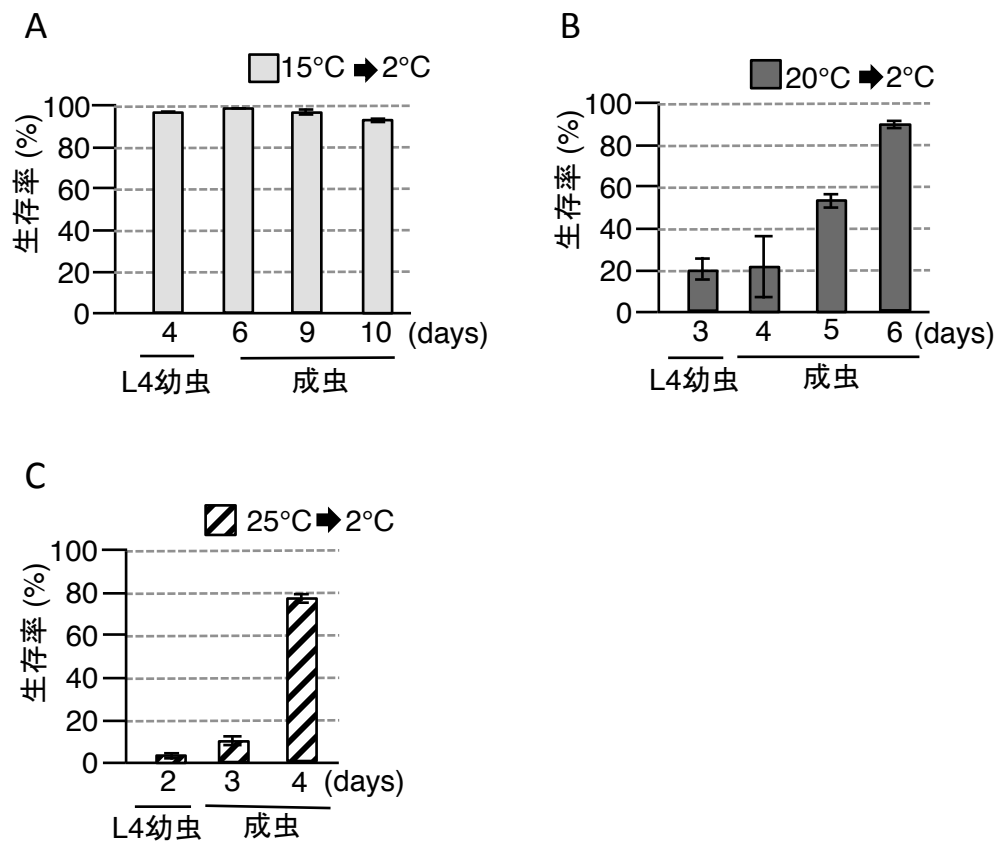


図6. 老個体の低温耐性

(A) 野生株を15°Cで4-10日飼育後、2°Cで48時間の低温刺激を与えた結果。(B) 20°Cで3-6日飼育後、2°Cで48時間の低温刺激を与えた結果。(C) 25°Cで2-4日飼育後、2°Cで48時間の低温刺激を与えた結果。成虫になってから期間が経過するほど低温耐性が獲得される。それぞれ $n \geq 4$ 。

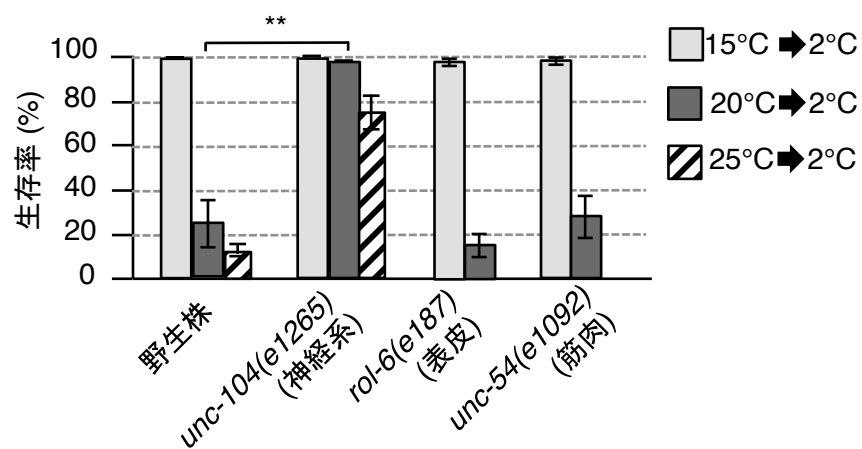


図7. *C. elegans*の低温耐性に関わる組織

神経系で機能する*unc-104*/キネシンが異常な変異体は20°Cで飼育させた後の低温耐性に異常を示した。表皮で機能する*rol-6*/コラーゲンの変異体や、筋肉で機能する*unc-54*/ミオシンの変異体では低温耐性に異常は見られなかった。それぞれ $n \geq 6$ 。** $P < 0.01$ 。

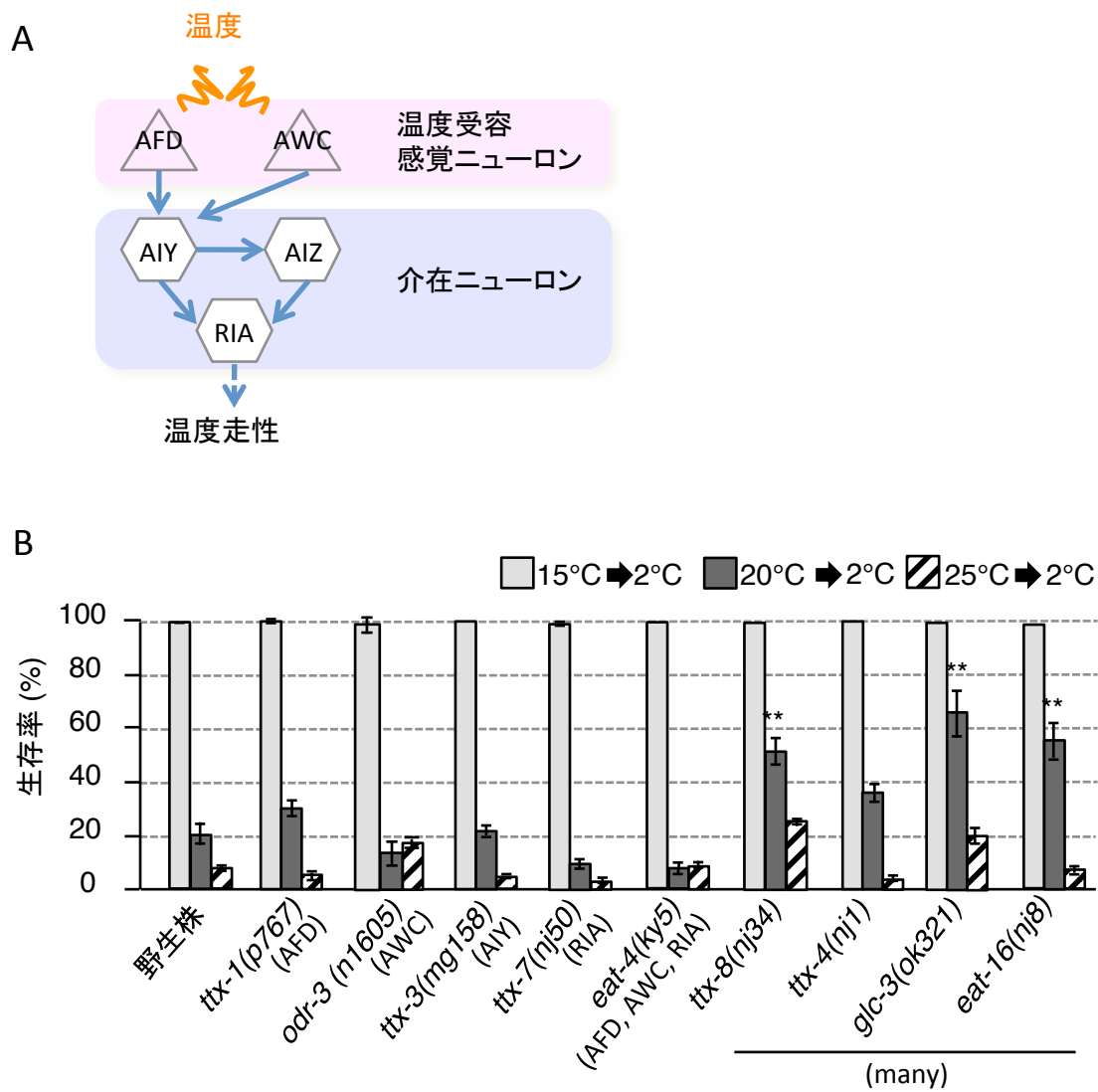


図8. 温度受容情報伝達に関わる変異体の低温耐性

(A) 温度受容情報伝達(温度走性)の神経回路図。(B) 温度走性のニューロンAFD、AWC、AIY、RIAにおいて、発生や機能に異常のある変異体は低温耐性に異常を示さない。それぞれ $n \geq 6$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

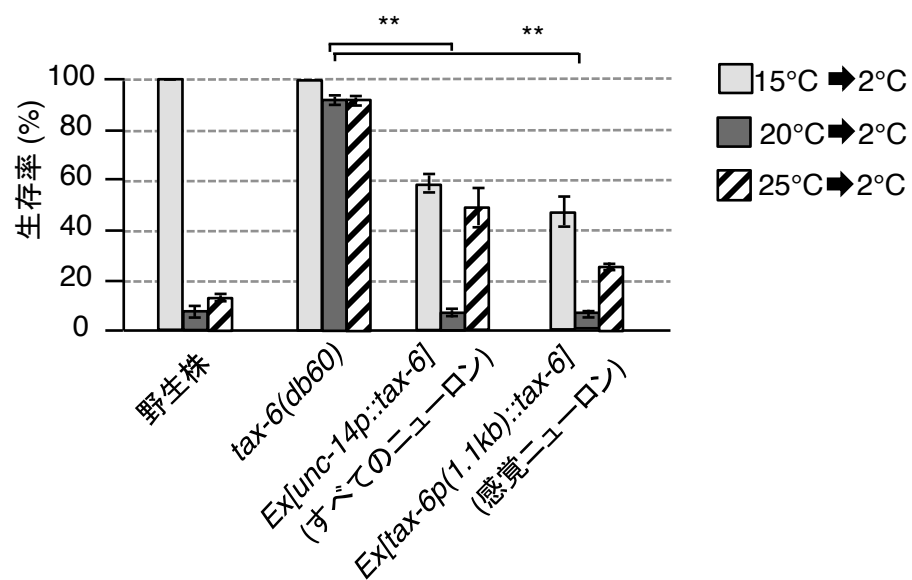


図9. TAX-6変異体の遺伝子レスキュー系統の低温耐性
温度走性の変異体である*tax-6*/カルシニューリンで低温耐性の異常が見られた。この異常は、*tax-6*変異体のすべてのニューロン(*unc-14p::tax-6*)または、感覚ニューロン(*tax-6p(1.1kb)::tax-6*)で*tax-6*遺伝子を発現させると部分的に回復した。それぞれ $n \geq 6$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

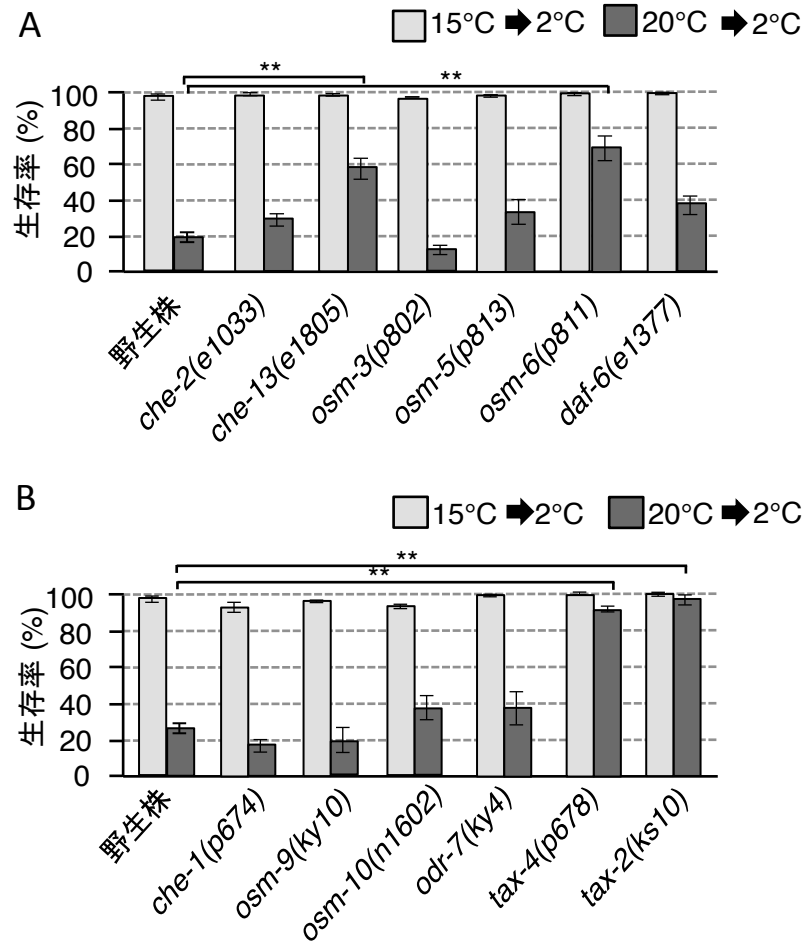


図10. 感覚ニューロンに異常のある変異体の低温耐性
 遺伝子の産物と発現細胞は表1に記載。(A) 20°Cで飼育させた*che-13*と*osm-6*変異体で低温耐性が上昇する異常が見られた。(B) 20°Cで飼育されたcGMP依存性チャネルの*tax-4*と*tax-2*変異体で低温耐性の顕著な異常が見られた。それぞれ $n \geq 6$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

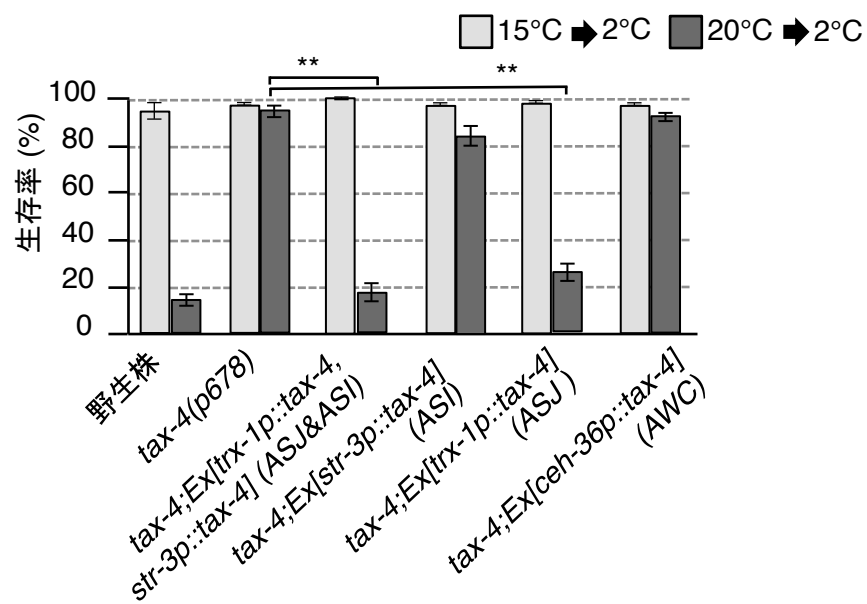


図11. TAX-4変異体の遺伝子レスキュー系統の低温耐性
細胞特異的プロモーターとして*trx-1*プロモーター(ASJ)、*str-3*プロモーター(ASI)、*ceh-36*プロモーター(AWC)を使用した。*tax-4*変異体の低温耐性の異常は、*tax-4*遺伝子をASJ感覚ニューロンで発現させると回復した。それぞれ $n \geq 6$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

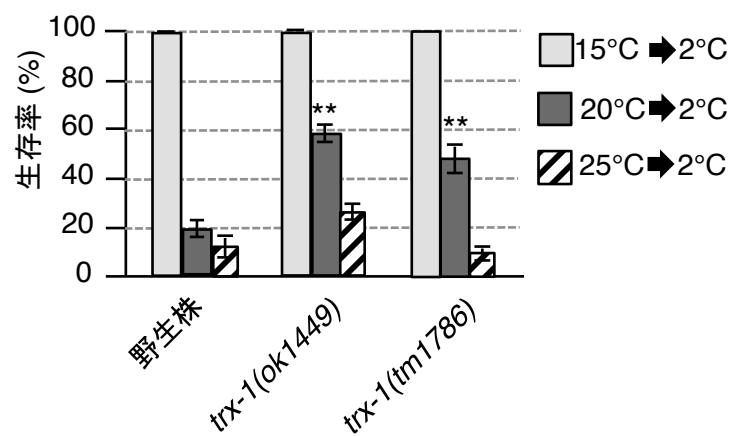
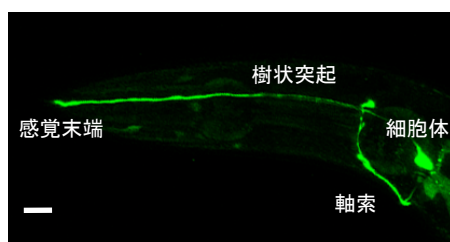


図12. ASJ感覚ニューロンの変異体の低温耐性

ASJ感覚ニューロン特異的に遺伝子発現を誘導するプロモーターとして使用した*trx-1*/チオレドキシンの変異体の低温耐性を解析した結果。20°C飼育後の低温耐性に異常が見られた。それぞれ $n \geq 6$ 。** $P < 0.01$ 。

A



B

| 処置 | 生存 個体数 | 死 個体数 | 全体数 | 生存率 (%) |
|--------|-----------|----------|-----|------------|
| ASJ 破壊 | 11 | 4 | 15 | 73.3 |
| Mock | 1 | 20 | 21 | 4.76 |

図13. ASJ感覚ニューロンの色素レーザー破壊による低温耐性への影響

(A) ASJ感覚ニューロンのGFP蛍光写真[比較生理生化学, Vol.32 No.2, p67-75, 2015より改変引用]。Scale bar 100 μ m (B) 20°Cで飼育された野生株のASJ感覚ニューロンの核を色素レーザーで破壊した個体の低温耐性。ASJを破壊された個体は、Mock処置の個体よりも低温耐性が上昇する異常を示した。

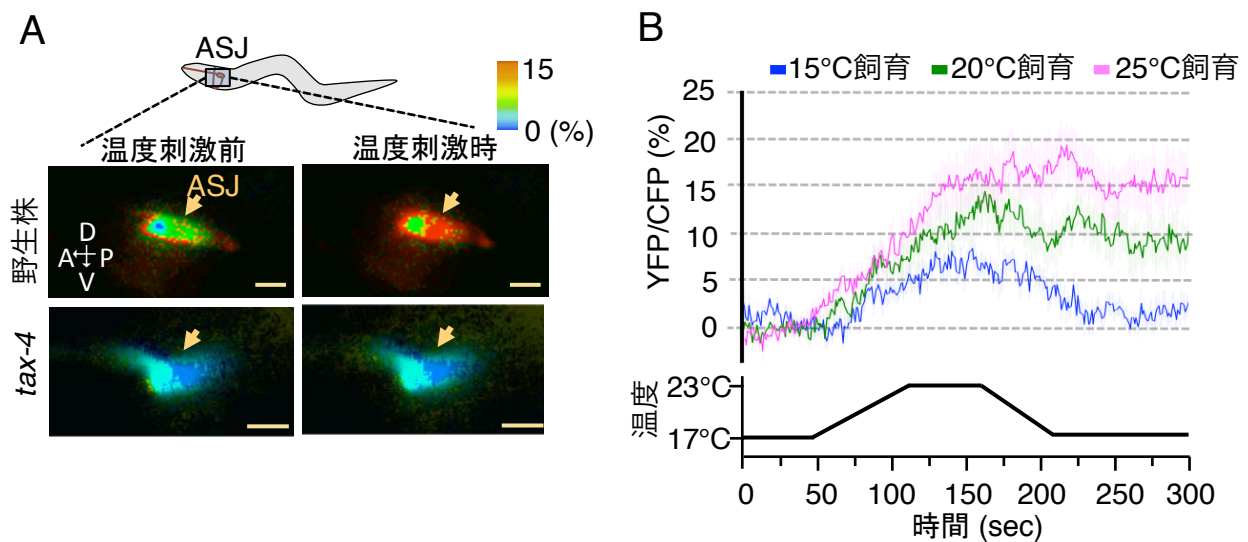


図14. ASJ感覚ニューロンの温度応答性

(A) 野生株と変異体に *trx-1* プロモーターで yellowameleon (*trx-1p::yc3.60*) を発現させた個体をカルシウムイメージングに使用した。15°C で飼育した野生株と *tax-4* 変異体に温度刺激を与えた際の、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) のシグナル。画像は ASJ 感覚ニューロンの細胞体に温度刺激に対する反応性を疑似カラーで表したものである。Scale bar 10 μm 。(B) 15°C、20°C または 25°C 飼育で飼育した野生株の ASJ 感覚ニューロンに 17°C–23°C–17°C の温度刺激を与えた場合の YFP/CFP 変化。細胞内カルシウム濃度の上昇と下降を yellowameleon の黄色蛍光 (YFP)/ 藍色蛍光 (CFP) の変化値から測定した。時間経過に対する温度変化をグラフ下に記載。野生株の ASJ 感覚ニューロンは温度刺激に従って変化した。n \geq 12。

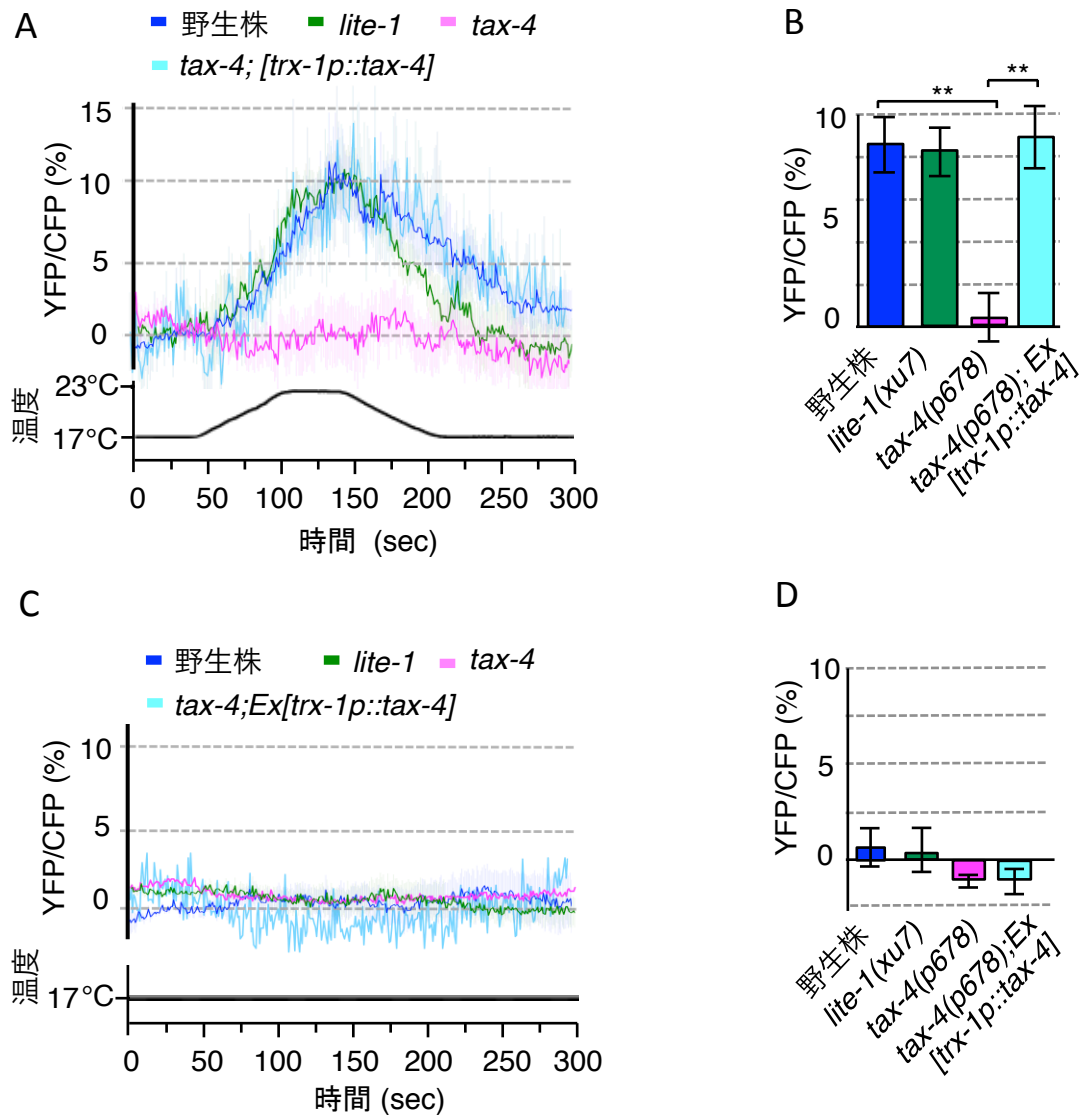
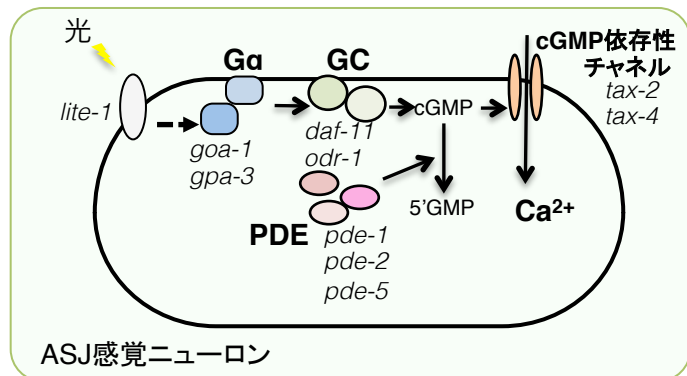


図15. 変異体のASJ感覚ニューロンのカルシウムイメージング

(A) *tax-4*変異体のASJ感覚ニューロンは、温度刺激に対して反応性を示さない。温度刺激パターンはグラフ下に記載。*lite-1*変異体または、*tax-4*変異体のASJ感覚ニューロンで*tax-4cDNA*を発現させた*tax-4; Ex[trx-1p::tax-4]*系統は温度刺激に反応した。すべて15°C飼育。それぞれ $n \geq 12$ 。(B) グラフAの120-140secの20秒間のYFP/CFPの平均。バーグラフの色はグラフAの色と対応。(C) 温度刺激を与えない場合のASJ感覚ニューロンの反応性。時間経過に対する温度変化をグラフ下に記載。すべて15°C飼育。それぞれ $n \geq 11$ 。(D) グラフCの120-140secの20秒間のYFP/CFPの平均。バーグラフの色はグラフCの色と対応。** $P < 0.01$ 。

A



B

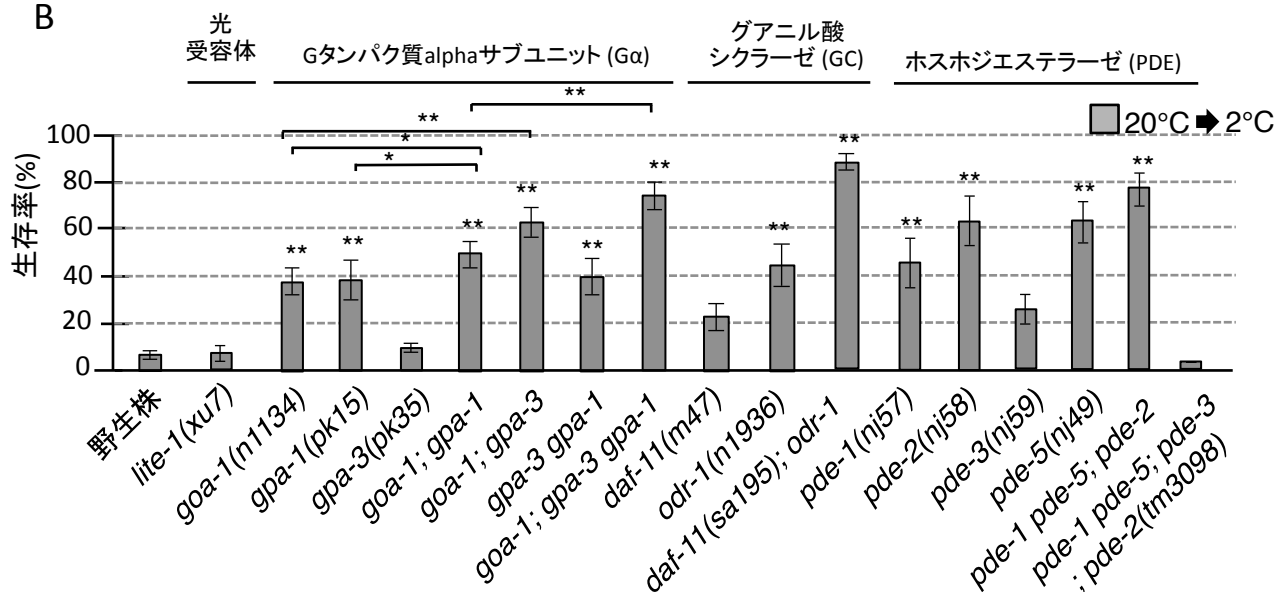


図16. 温度情報はASJ感覚ニューロンのcGMP経路を介して伝達される

(A) ASJ感覚ニューロン内で機能する3量体Gタンパク質とcGMP依存性チャネルを介した光受容情報伝達の分子経路図。(B) 光受容の情報伝達で機能する遺伝子の変異体の低温耐性。光受容体(*lite-1*)、3量体Gタンパク質αサブユニット(*goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3*)、グアニル酸シクラーゼ(*daf-11*、*odr-1*)、ホスホジエステラーゼ(*pde-1*、*pde-2*、*pde-3*、*pde-5*)。二重変異体や三重変異体のアリル名は単独変異のものと同じ。それぞれ $n \geq 9$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。Gα: Gタンパク質αサブユニット、GC: グアニル酸シクラーゼ、PDE: ホスホジエステラーゼ。

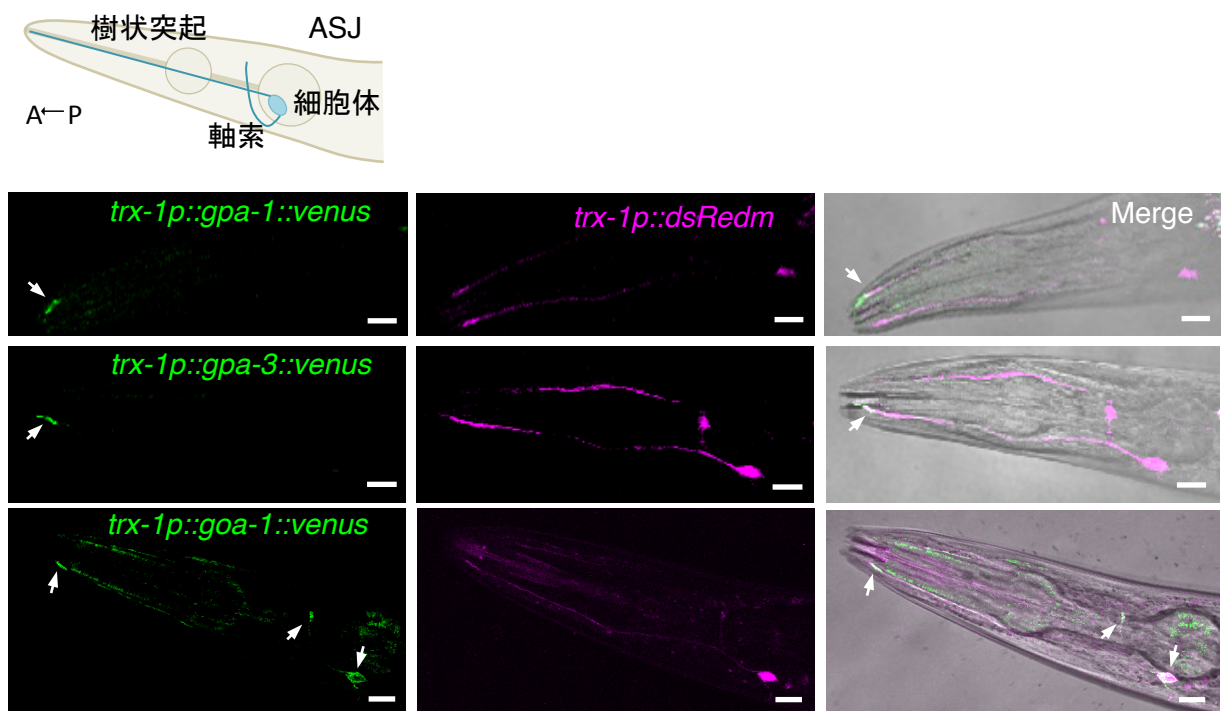


図17. ASJ感覚ニューロン内のGタンパク質alphaサブユニットの局在
野生株にASJ感覚ニューロン特異的にDsRedmとそれぞれのGα(GPA-1、GPA-3、GOA-1)::Venusを発現させた。ASJ感覚ニューロンの模式図を一番上に示す。左の画像はASJ感覚ニューロンにおけるGα::Venusの局在を示している。中央の画像はDsRedmのASJでの発現を示している。右の画像は左と中央の画像を明視野で重ね合わせたもの。矢印はGα::VenusとDsRedmのASJで共局在している部分を示している。scale bar 100 μm

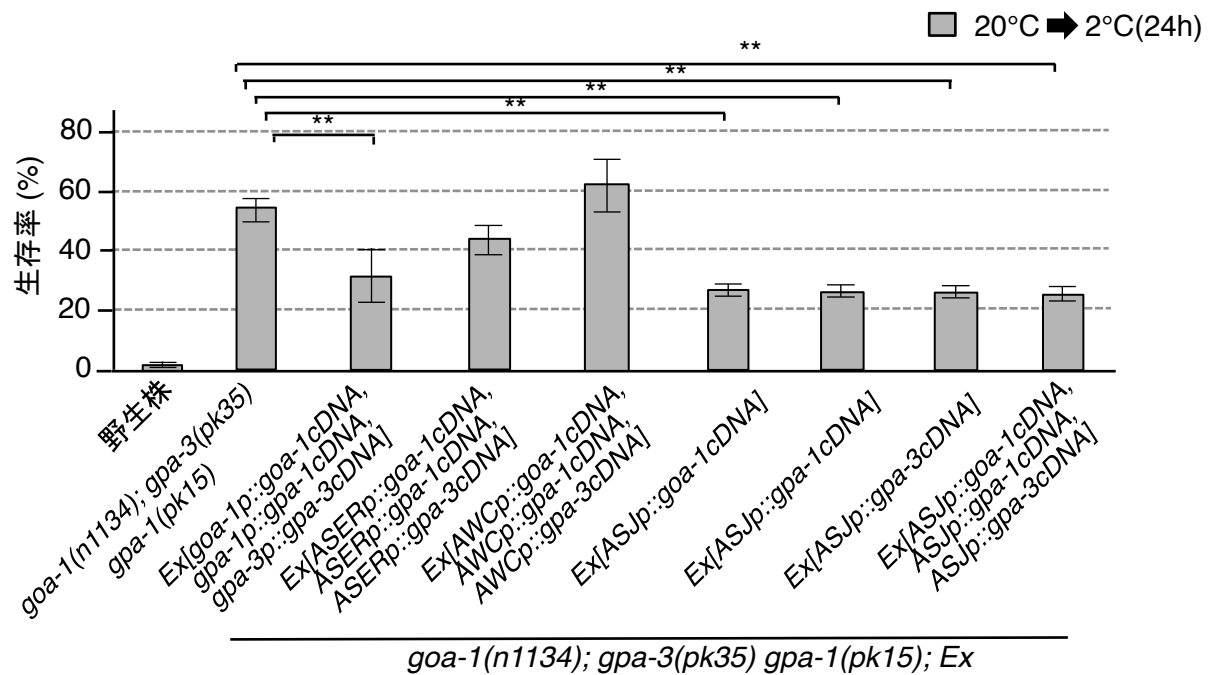


図18. Gタンパク質alphaサブユニットの遺伝子レスキュー実験

Gαタンパク質の遺伝子の三重変異体は20°Cで飼育された後に2°Cで24時間時間の低温刺激を与えても約60%が生存できる。この三重変異体においてASJ感覚ニューロン特異的にGα遺伝子を発現させると部分的な表現型の回復が見られた。*goa-1pl*には *goa-1*'s own promoter(3kb), *gpa-1pl*には *gpa-1*'s own promoter(1.5kb), *gpa-3pl*には *gpa-3*'s own promoter(3kb)を用いた。、*gcy-5pl*はASER 味覚ニューロン特異的プロモーター、*ceh-36p* は温度走性の神経回路に関わるAWC感覚ニューロン特異的プロモーター、*trx-1p* はASJ 感覚ニューロン特異的プロモーターとして用いた。それぞれ $n \geq 10$ 。** $P < 0.01$ 。

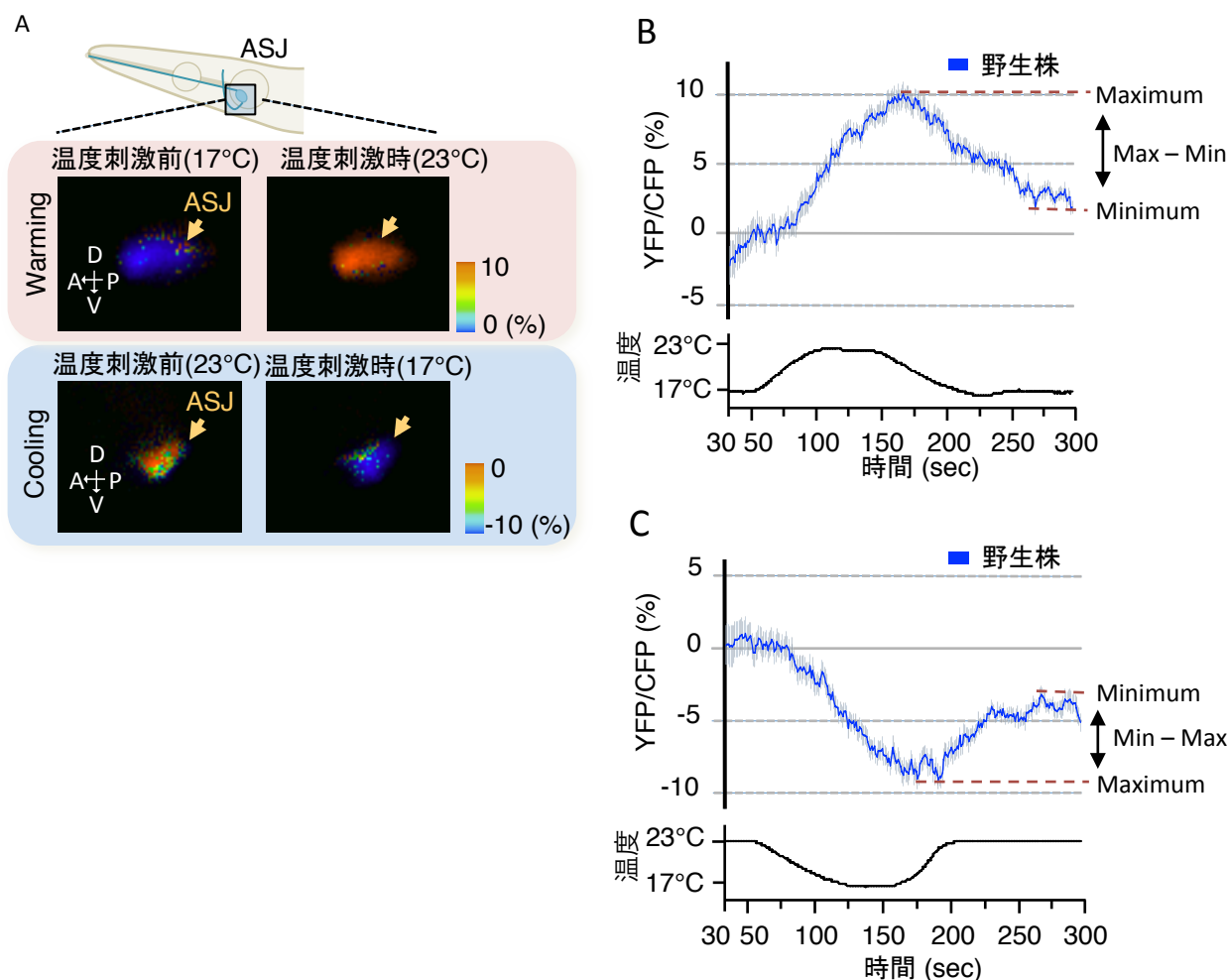


図19. ASJ感覚ニューロンのWarming刺激とCooling刺激に対する応答性

(A) 野生株のASJ感覚ニューロンにWarming刺激(上)またはCooling刺激(下)を与えた時の細胞体の様子。Warming刺激を与えると、ASJ感覚ニューロン内のカルシウム濃度が上昇する。Cooling刺激を与えると、カルシウム濃度が低下する。(B) 20°Cで飼育した野生株の17-23-17°C温度刺激(Warming)に対する反応性。最も高い反応性を示した点のYFP/CFPをMaximumとし、その後定常状態へ戻った値をMinimum、MaximumとMinimumの差をMax-Minであらわす。n=18。(C) 20°Cで飼育した野生株の23-17-23°C温度刺激(Cooling)に対する反応性。最も低い反応性を示した点のYFP/CFPをMaximumとし、その後定常状態へ戻った値をMinimum、MinimumとMaximumの差をMin-Maxで表す。n=14。時間経過に対する温度変化をグラフ下に記載。

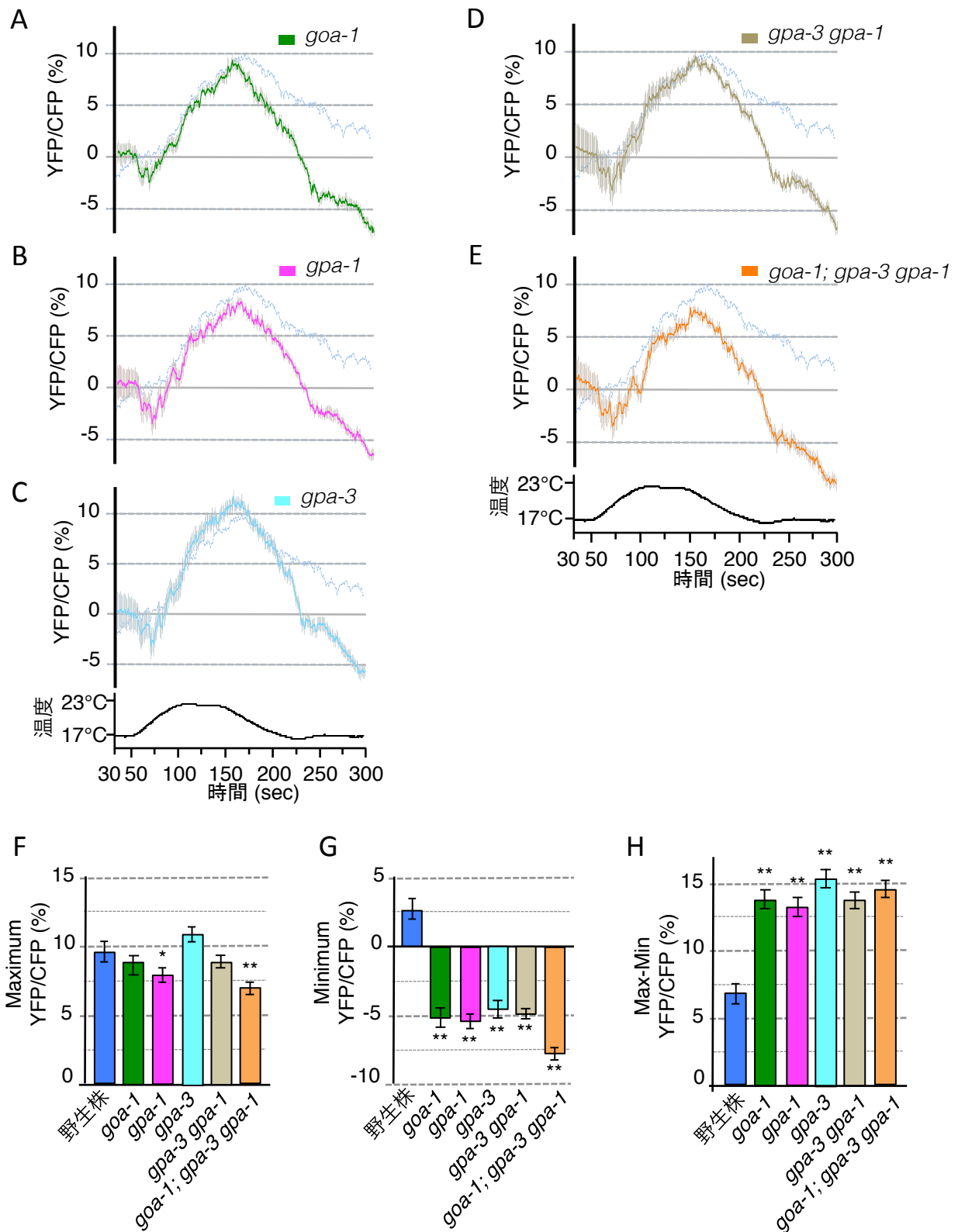


図20. Gαタンパク質の変異体のWarming刺激に対する応答性
 (A-C) Gαタンパク質*goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3*変異体の温度応答性。薄い青色の線は野生株のASJ感覚ニューロンの温度応答性を示す。(D,E) Gαタンパク質の多重変異体の温度応答性。それぞれ $n=18-20$ 。(F) A-Eの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(G) A-EのMinimum(280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP変化。(H) A-EのMaximum-MinimumのYFP/CFP変化の差。バーグラフの色はそれぞれのグラフA-Eの色に対応。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

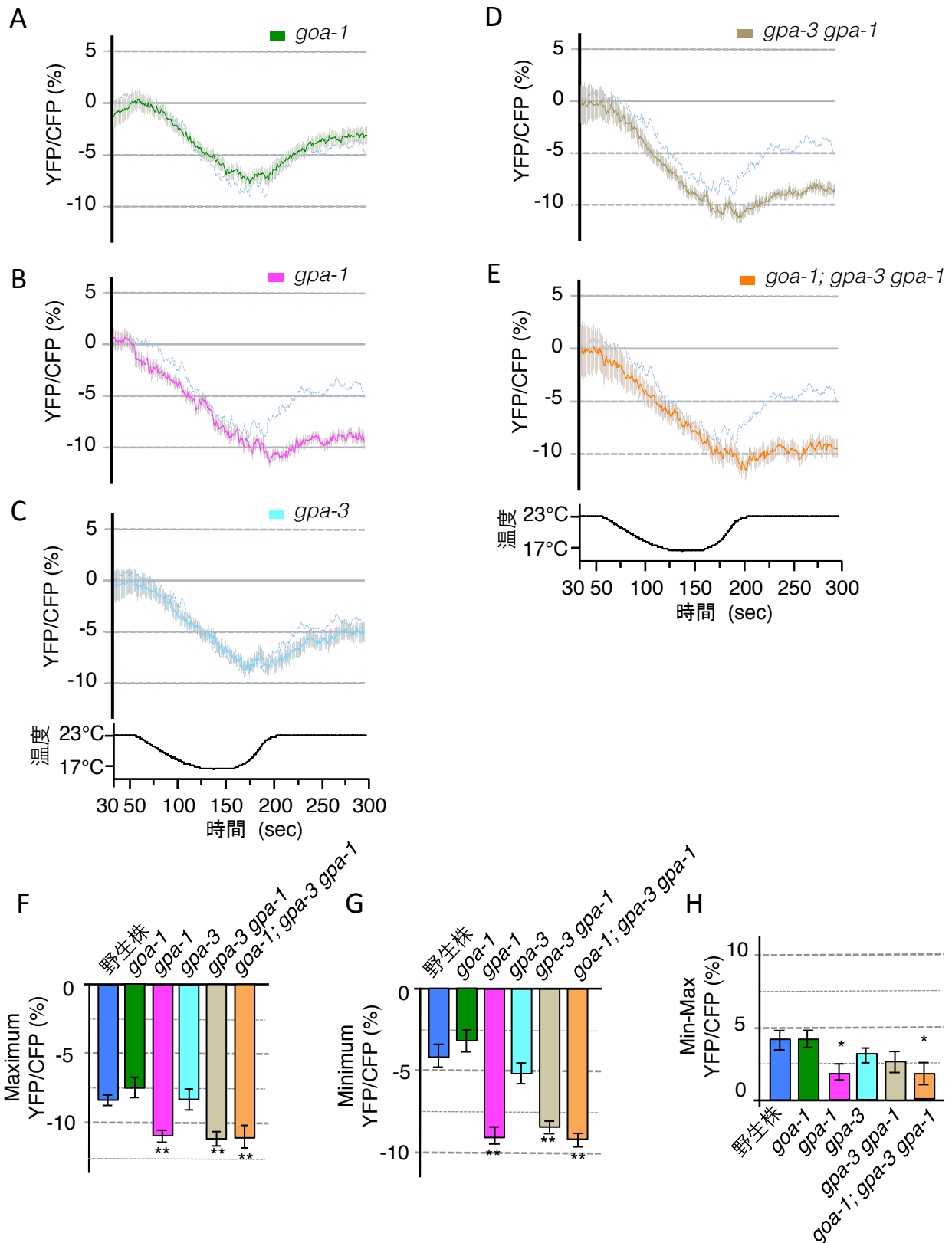


図21. Gαタンパク質の変異体のCooling刺激に対する応答性

(A-C) Gαタンパク質*goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3*変異体の温度応答性。薄い青色の線は野生株のASJ感覚ニューロンの温度応答性を示す。(D,E) Gαタンパク質の多重変異体の温度応答性。それぞれn=18-20。(F) A-Eの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(G) A-EのMinimum(280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP変化。(H) A-EのMinimum-MaximumのYFP/CFP変化の差。バーグラフの色はそれぞれのグラフA-Eの色に対応。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

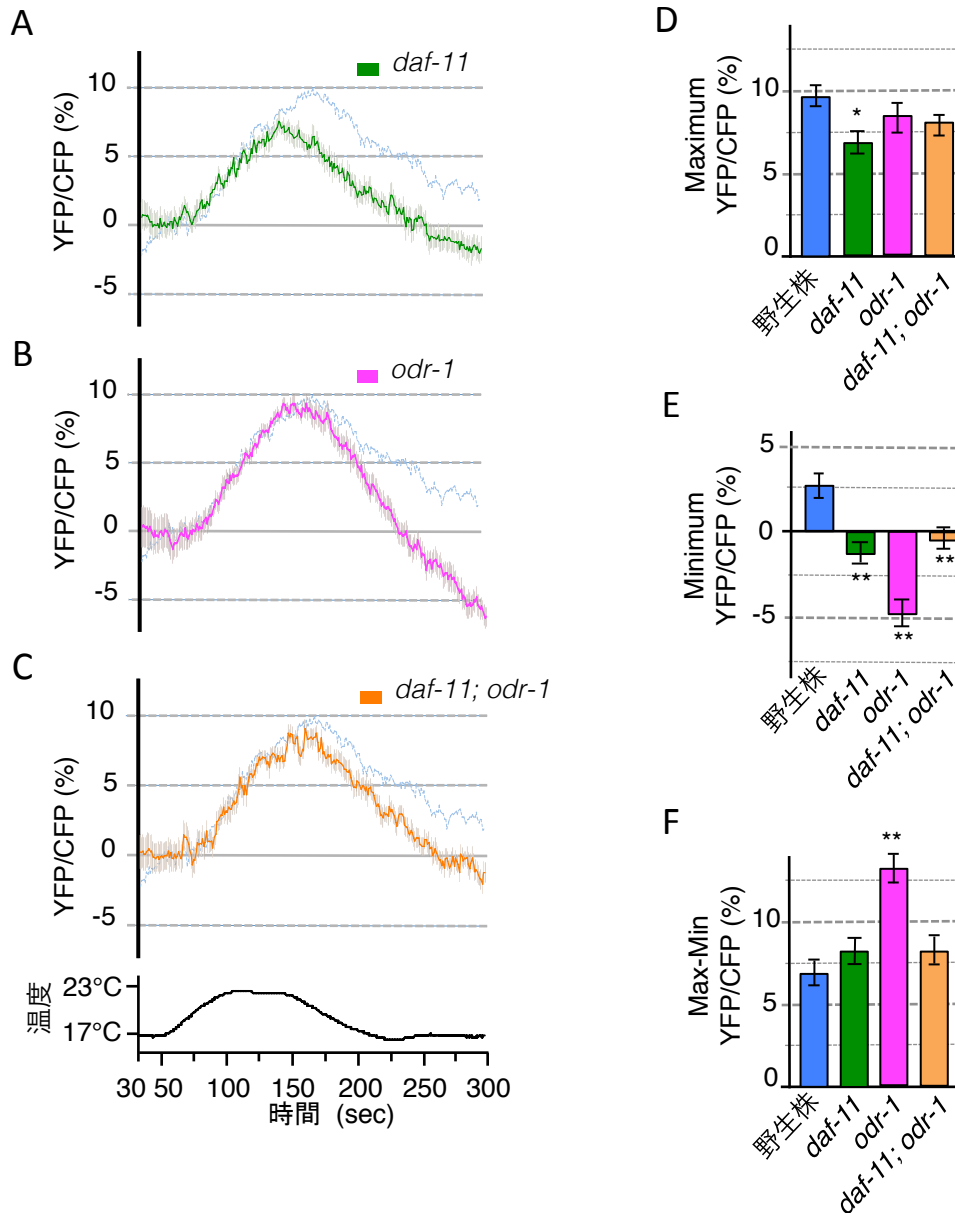


図22. グアニル酸シクラーゼの変異体のWarming刺激に対する応答性
 (A,B) グアニル酸シクラーゼ *daf-11*、*odr-1* 変異体の温度応答性。薄い青色の線は野生株のASJ感覚ニューロンの温度応答性を示す。(C) グアニル酸シクラーゼの二重変異体の温度応答性。それぞれ $n=17-23$ 。(D) A-Eの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(E) A-EのMinimum(280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP変化。(F) A-EのMaximum-MinimumのYFP/CFP変化の差。バーグラフの色はそれぞれのグラフA-Cの色に対応。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

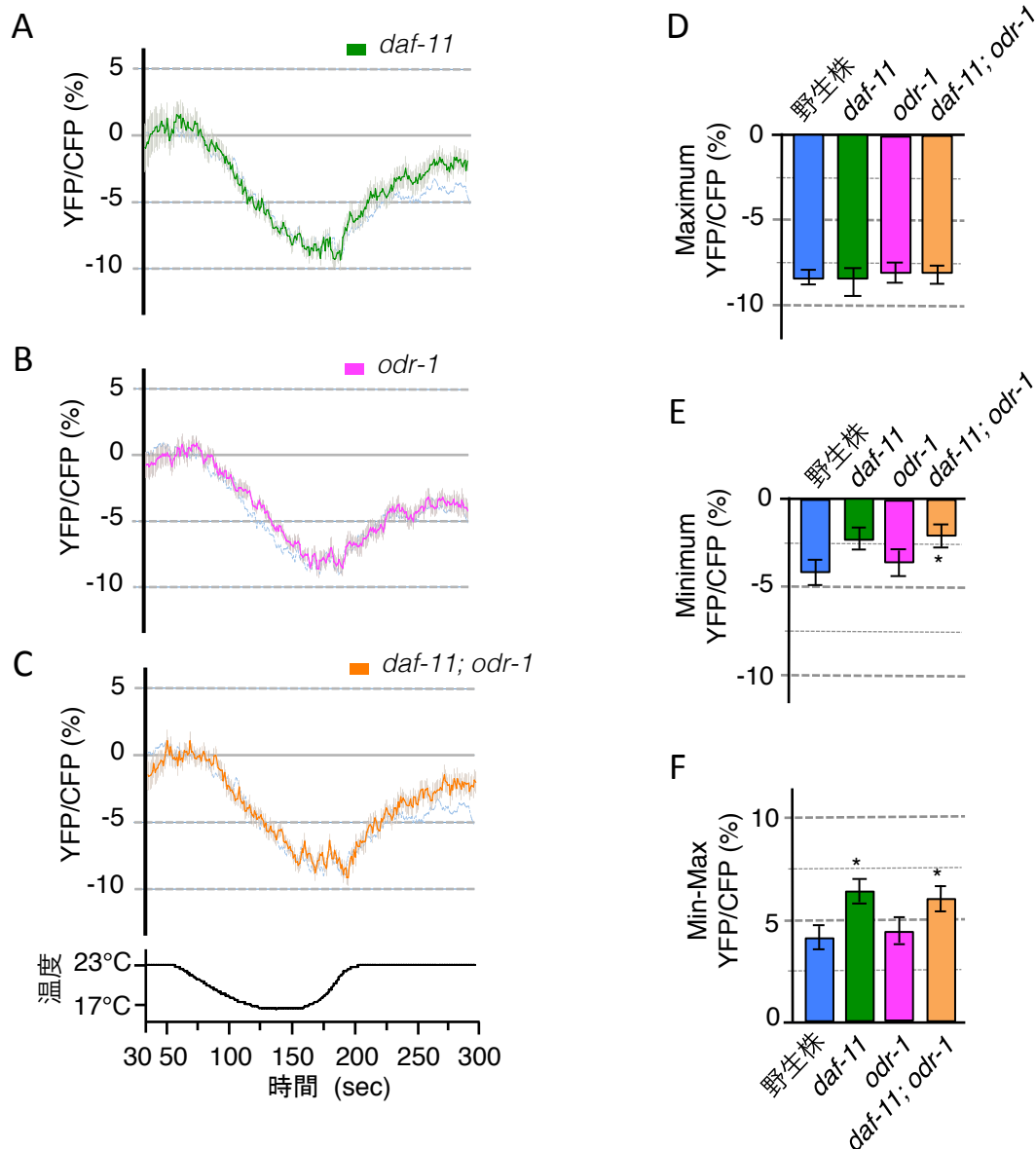


図23. グアニル酸シクラーゼの変異体のCooling刺激に対する応答性

(A,B) グアニル酸シクラーゼ *daf-11*、*odr-1* 変異体の温度応答性。薄い青色の線は野生株のASJ感覚ニューロンの温度応答性を示す。(C) グアニル酸シクラーゼの二重変異体の温度応答性。それぞれ $n=15-21$ 。(D) A-Eの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(E) A-EのMinimum(280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP変化。(F) A-EのMinimum-MaximumのYFP/CFP変化の差。バーグラフの色はそれぞれのグラフA-Cの色に対応。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

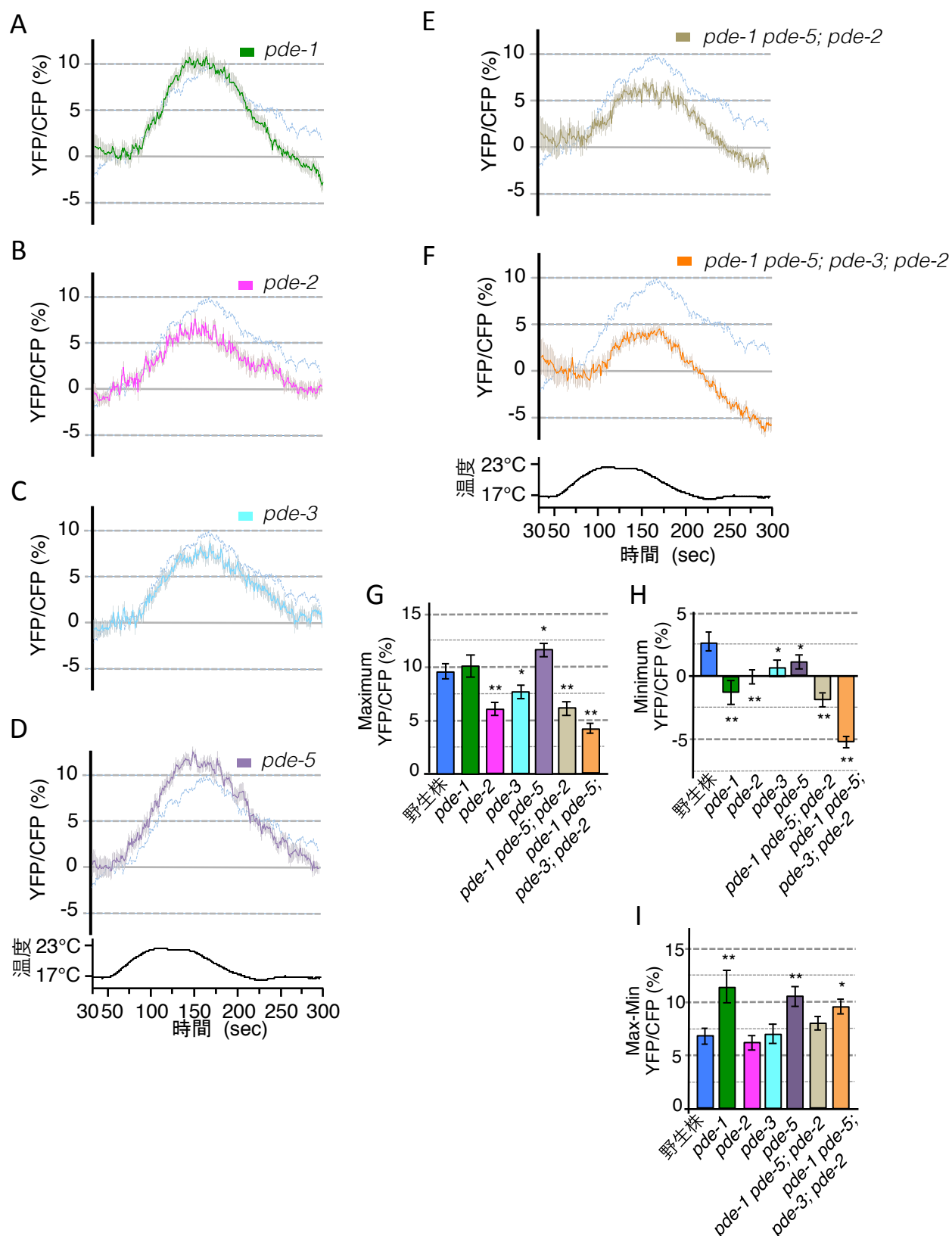


図24. ホスホジエステラーゼの変異体のWarming刺激に対する応答性
 (A-D) ホスホジエステラーゼ *pde-1*、*pde-2*、*pde-3*、*pde-5* 変異体の温度応答性。薄い青色の線は野生株のASJ 感覚ニューロンの温度応答性を示す。(E, F) ホスホジエステラーゼの多重変異体の温度応答性。それぞれ $n=15-19$ 。(G) A-Fの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(H) A-Fの Minimum(280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP変化。(I) A-FのMaximum-MinimumのYFP/CFP変化の差。 バーグラフの色はそれぞれのグラフA-Fの色に対応。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

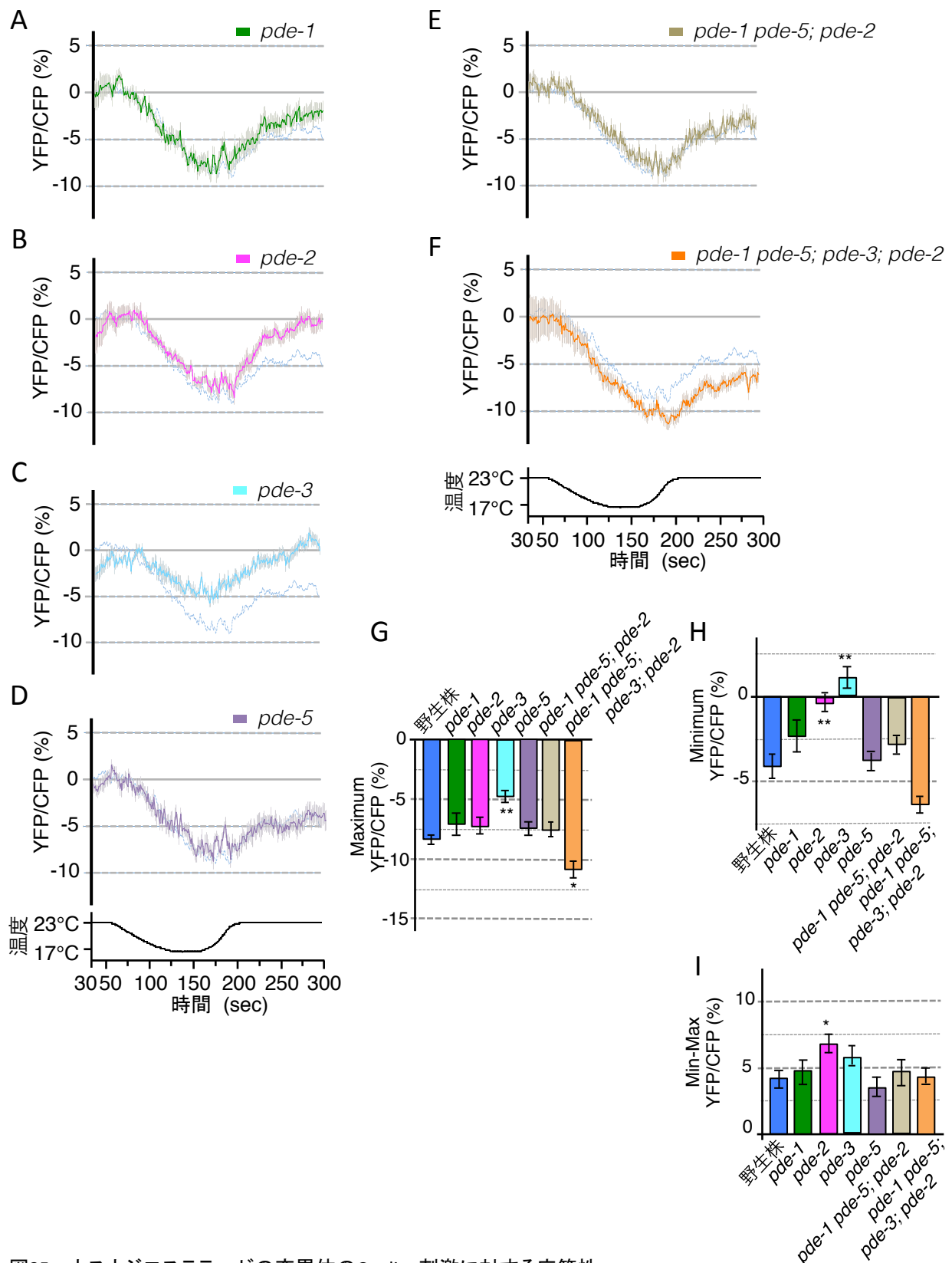


図25. ホスホジエステラーゼの変異体のCooling刺激に対する応答性

(A-D) ホスホジエステラーゼ *pde-1*、*pde-2*、*pde-3*、*pde-5* 変異体の温度応答性。薄い青色の線は野生株のASJ 感覚ニューロンの温度応答性を示す。(E, F) ホスホジエステラーゼの多重変異体の温度応答性。それぞれ $n=13-21$ 。(G) A-Fの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(H) A-FのMinimum (280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP。(I) A-FのMinimum-MaximumのYFP/CFP変化の差。バーグラフの色はそれぞれのグラフA-Fの色に対応。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

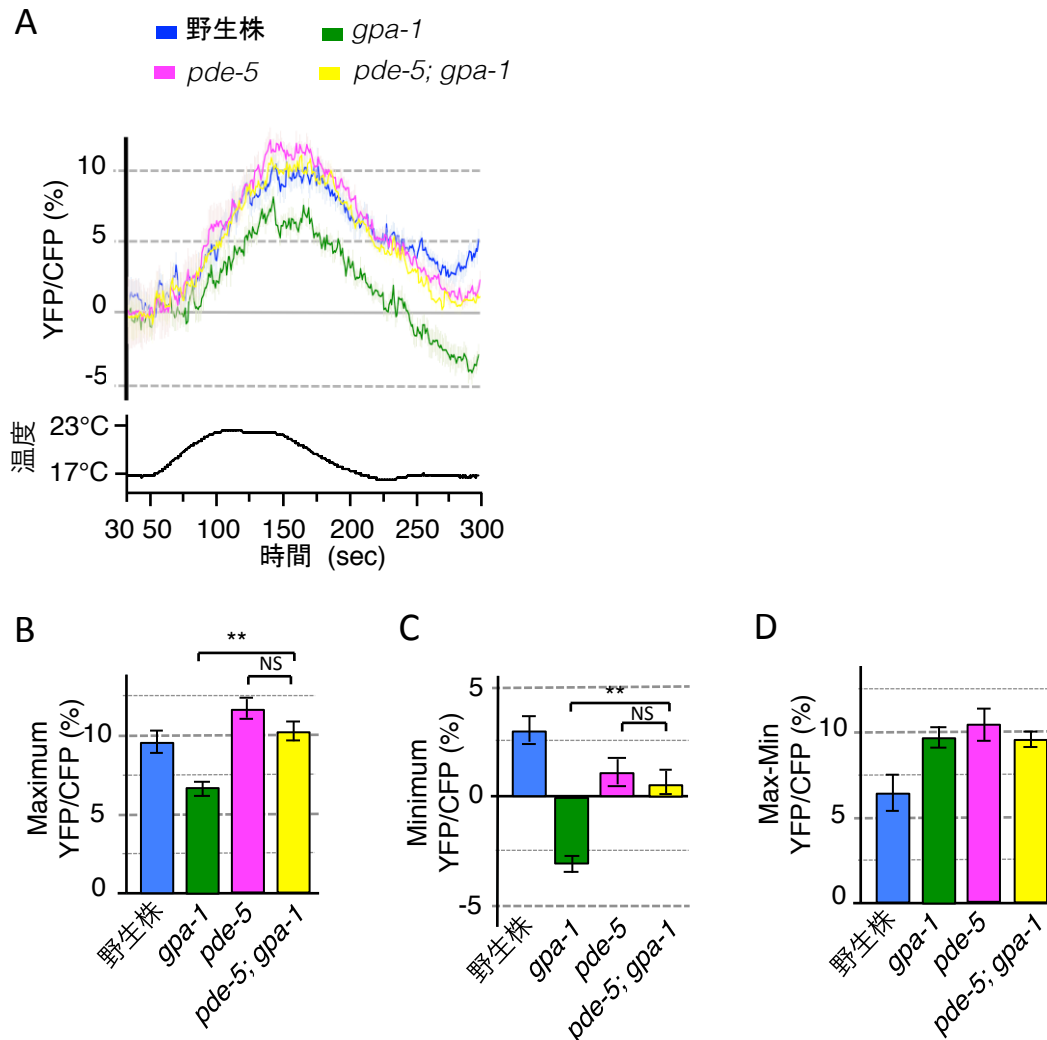


図26. GαとPDE変異体によるWarming刺激に対する上位関係の検証

(A) Gαタンパク質*gpa-1*とホスホジエステラーゼ*pde-5*との二重変異体の温度応答性から、Gαの変異とPDEの変異の上位関係を解析。(B) Aの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(C) AのMinimum(280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP変化。(D) AのMaximum-MinimumのYFP/CFP変化の差。*pde-5; gpa-1*の温度応答性は、*pde-5*に依存している。バーグラフの色はそれぞれのグラフAの色に対応。n=9-14。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

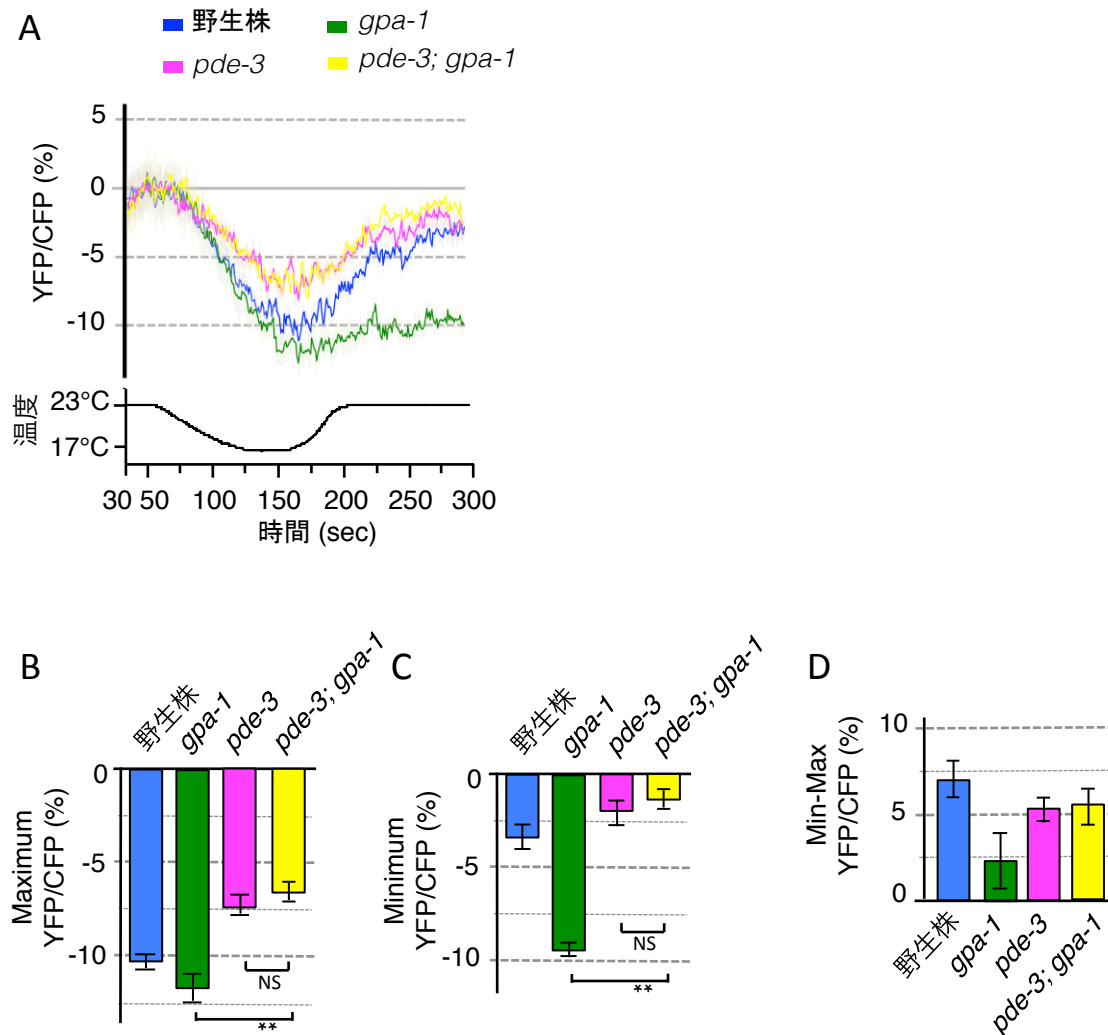


図27. GαとPDE変異体によるCooling刺激に対する上位関係の検証

(A) Gαタンパク質*gpa-1*とホスホジエステラーゼ*pde-3*との二重変異体の温度応答性から、Gαの変異とPDEの変異の上位関係を解析。(B) Aの最大変化(Maximum)時点から前後5秒ずつの10秒間のYFP/CFP変化。(C) AのMinimum(280-290 sec)時点の10秒間のYFP/CFP変化。(D) AのMaximum-MinimumのYFP/CFP変化の差。*pde-3; gpa-1*の温度応答性は、*pde-3*に依存している。バーグラフの色はそれぞれのグラフAの色に対応。
n=11-13。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

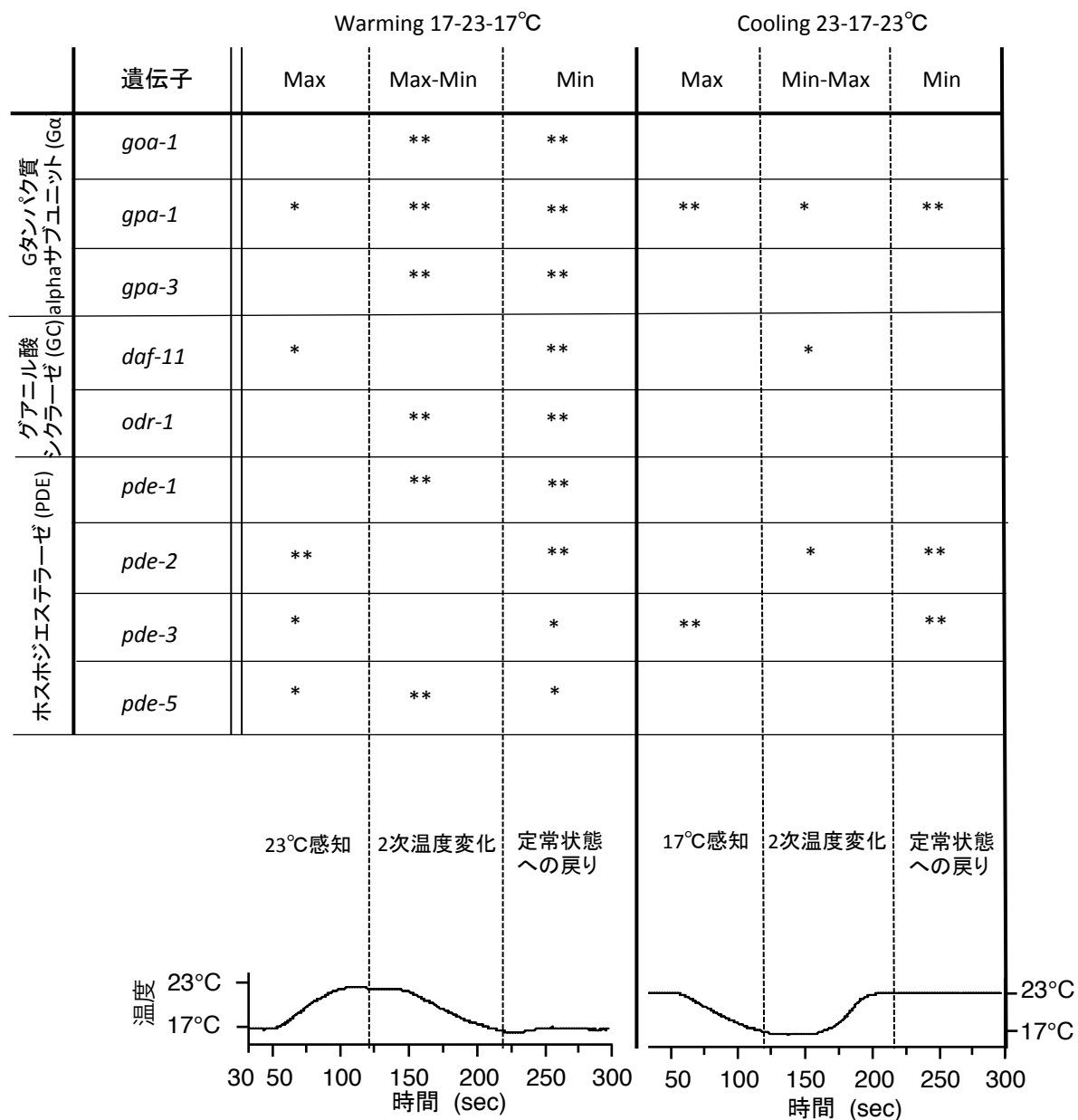


図28. ASJ感覚ニューロンのWarming刺激とCooling刺激に対する応答性のまとめ

図20-25の変異体の温度応答性に対する異常のまとめ。Maximum(Max)は1次温度変化に対する反応性を示し、Minimum(Min)は定常状態への戻り具合を示す。Max-MinまたはMin-Maxは2次温度変化に対する反応性を示している。 $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ 。

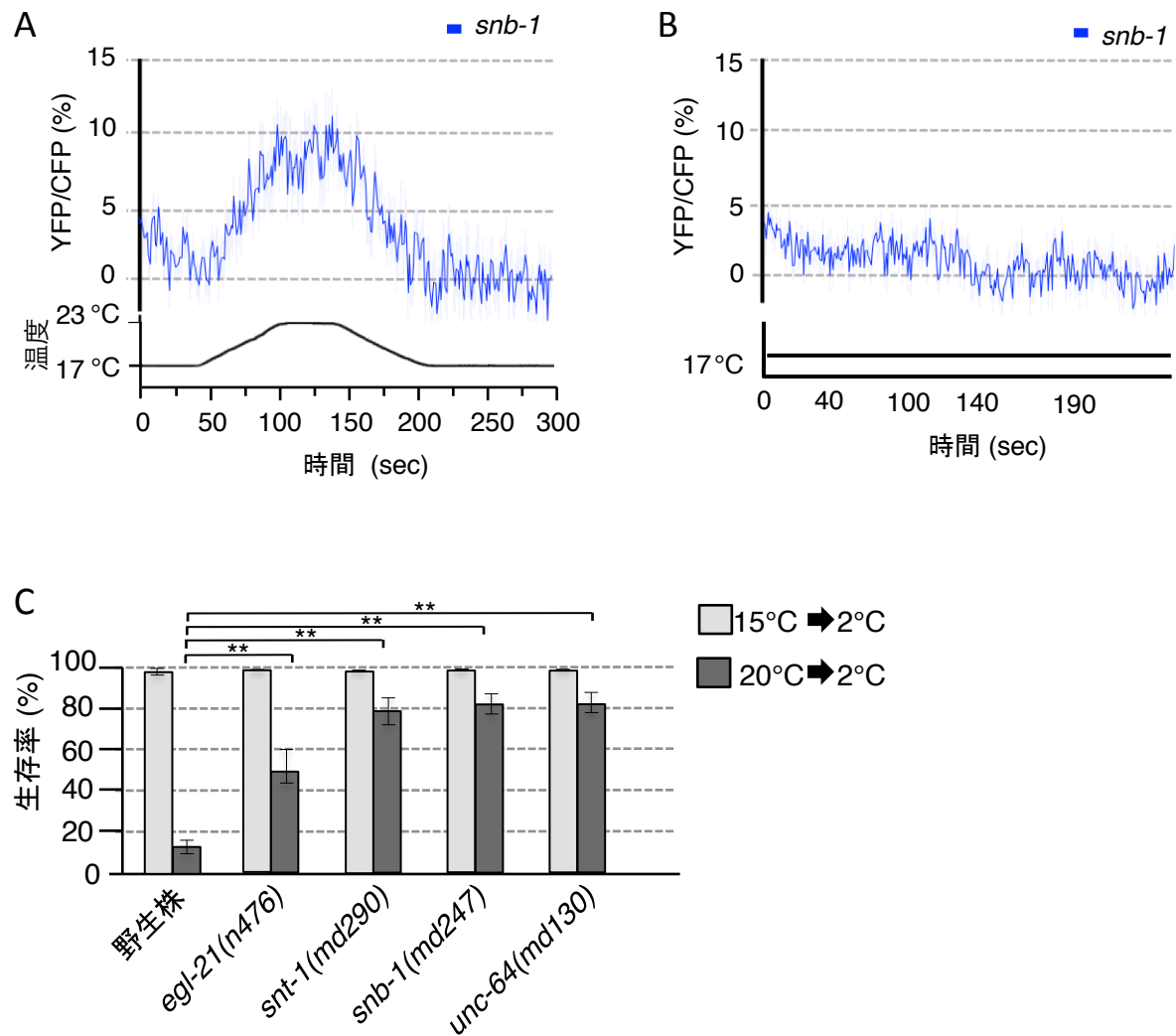
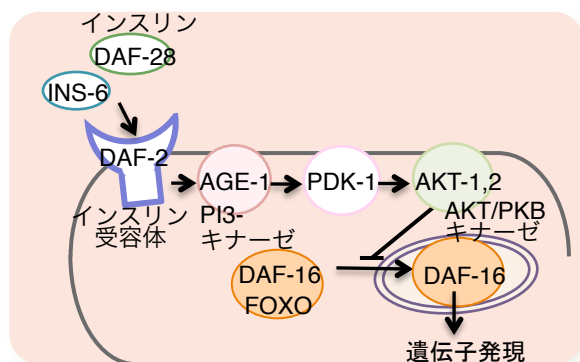


図29. ASJ感覚ニューロンは単体で直接温度を受容する

(A) シナプス伝達に関わる変異体として、*snb-1*/シナプトブレ빈の変異体に温度刺激を与えた際のASJ感覚ニューロンの反応性を解析。*snb-1*変異体は温度応答性を示した。(B) 温度刺激を与えない場合の温度応答性。時間経過に対する温度変化をグラフ下に記載。(C) 神経伝達に関わる分子である神経ペプチド合成酵素(*egl-21*)、シナプトタグミン(*snt-1*)、シナプトブレ빈(*snb-1*)、シンタグシン(*unc-64*)の変異体の低温耐性。それぞれ $n \geq 6$ 。** $P < 0.01$ 。

A



B

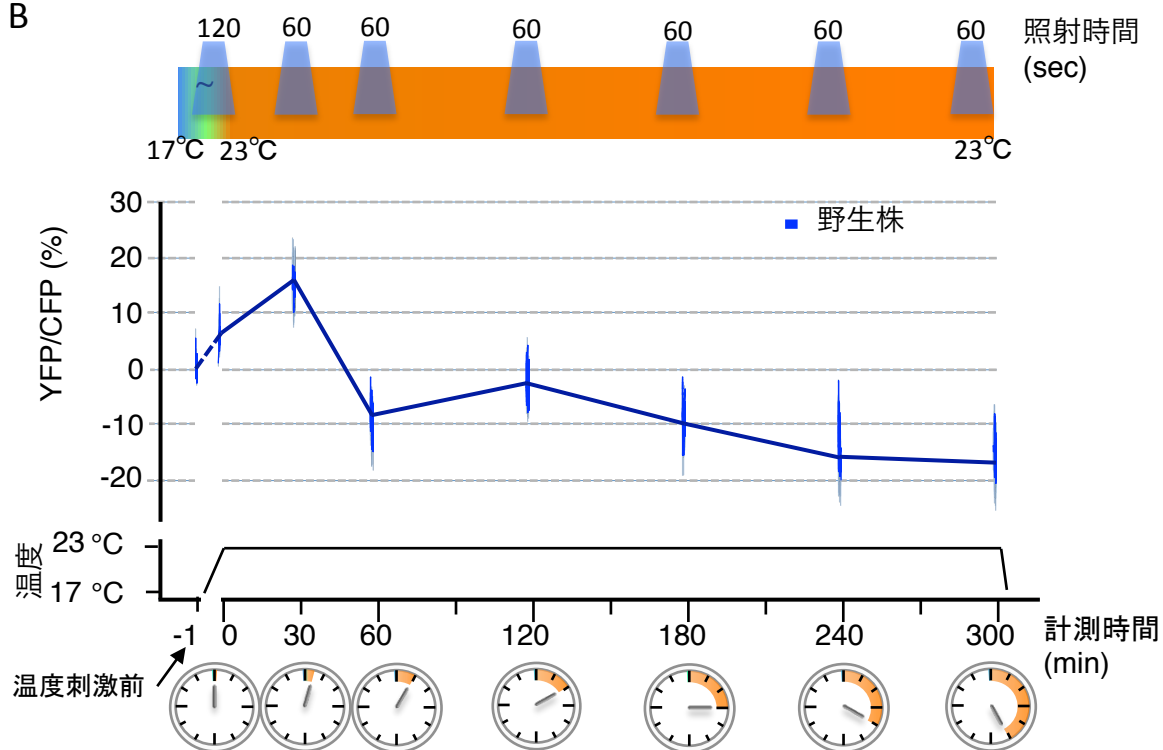


図30. ASJ感覚ニューロンの下流への情報伝達系

(A) ASJ感覚ニューロンからはインスリンが分泌され、腸や神経系のインスリン受容体DAF-2で受容される。(B) 野生株のASJ感覚ニューロンの長時間カルシウムイメージング。温度刺激を与えてから30分後、細胞内カルシウム濃度が最大となった。その後、カルシウム濃度は減少し、定常状態に戻った。YFP/CFP変化は-1、0、30、60、120、180、240、300 minの時点で60秒間それぞれ測定した。時間経過に対する温度変化をグラフ下に記載。n=13。

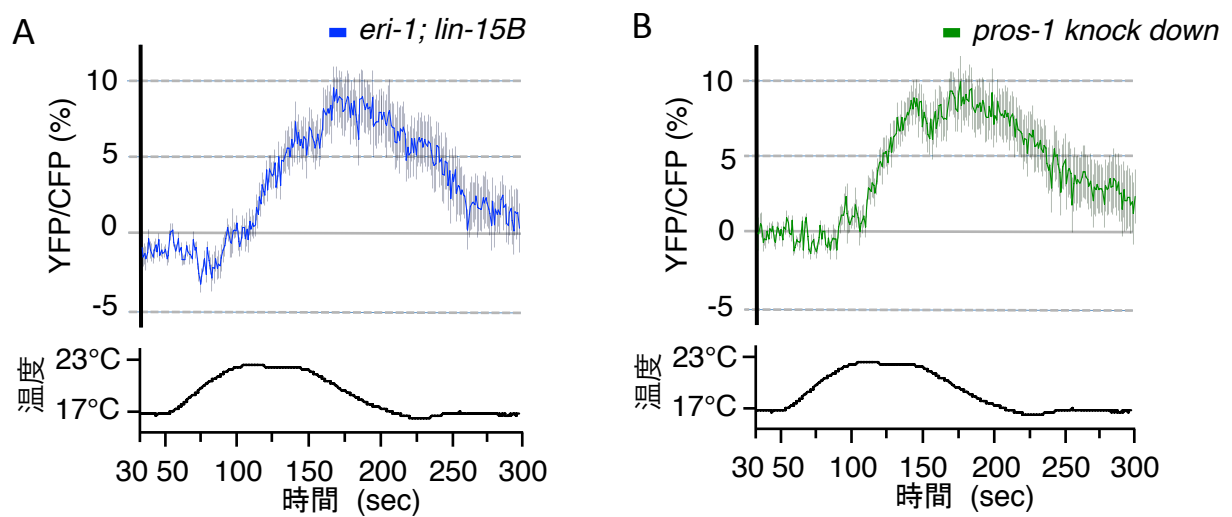


図31. *pros-1*ノックダウン系統の温度刺激に対するASJ感覚ニューロンの応答性
*pros-1*欠損株は致死性を示すため、*eli-1; lin-15B*系統に対して*pros-1(ceh-26)*遺伝子をRNAi法を用いてノックダウンし、グリア細胞(AMsh)のASJ感覚ニューロンの温度応答性に対する影響をカルシウムイメージングで解析した。(A) *eli-1; lin-15B*系統は野生株と同様の温度応答性を示した。n=15。(B) RNAi法を用いて*eli-1; lin-15B*系統に対して*pros-1*遺伝子をノックダウンした系統の温度応答性。n=19。時間経過に対する温度変化をグラフ下に記載。

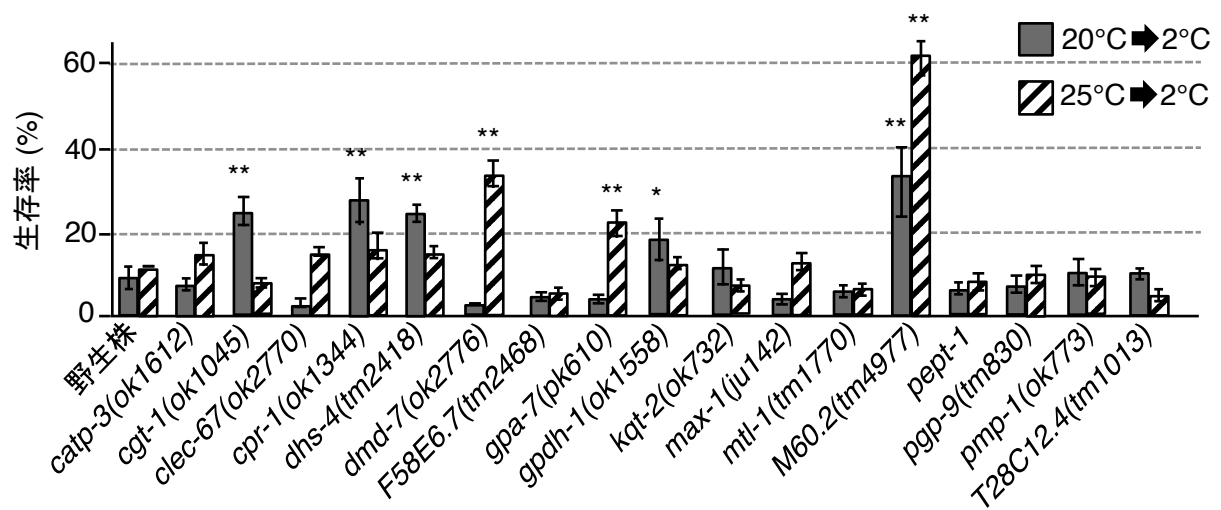


図32. 低温耐性におけるインスリンシグナル経路の下流遺伝子
DNAマイクロアレイ解析(Sugi *et al.*, 2011)から同定された温度に依存して発現変動する遺伝子の変異体の
20°Cまたは25°C飼育後の低温耐性。それぞれn≥6。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

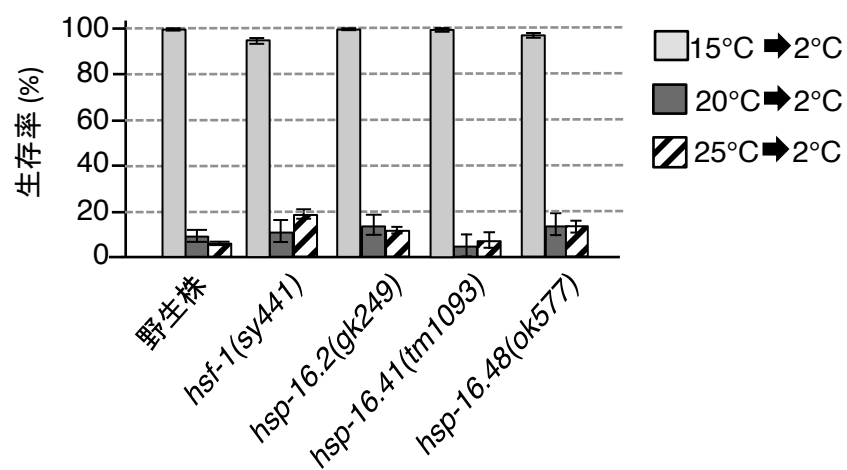


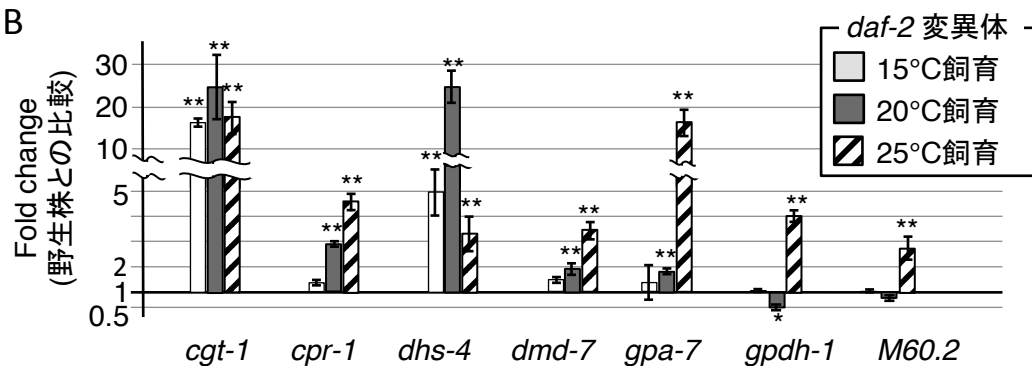
図33. 温度ストレスに応じて機能する遺伝子の解析

温度ストレス時に機能するヒートショック因子 (*hsf-1*)、ヒートショックタンパク質 (*hsp-16.2*、*hsp-16.41*、*hsp-16.48*) の変異体の15°C、20°C、25°C飼育後の低温耐性。それぞれ $n \geq 6$ 。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

A

| 遺伝子 | タンパク質 |
|---------------|--------------------------|
| <i>cgt-1</i> | セラミドグルコシルトランスフェラーゼ |
| <i>cpr-1</i> | システインプロテアーゼ |
| <i>dhs-4</i> | ヒドロキシステロイド 17-β デヒドロゲナーゼ |
| <i>dmd-7</i> | doublesex型転写因子 |
| <i>gpa-7</i> | 3量体Gタンパク質αサブユニット |
| <i>gpdh-1</i> | グリセロール 3-リン酸 デヒドロゲナーゼ |
| <i>M60.2</i> | RNA分解酵素 |

B



C

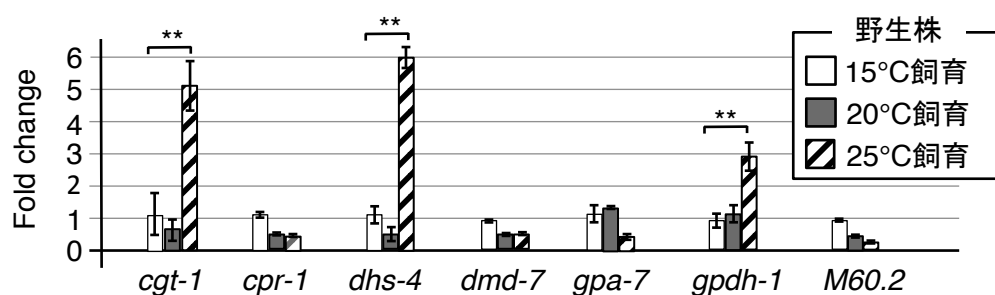


図34. 野生株と*daf-2*変異体における遺伝子発現量の解析

(A) 温度依存的に発現量が変動する遺伝子のうち、低温耐性に異常を示した遺伝子の一覧。(B) Aの遺伝子の*daf-2*変異体における定量的PCRの結果。それぞれのバーグラフは各温度で飼育された野生株との相対値を示す。(C) Aの遺伝子の野生株における発現量。それぞれn=3。***P* < 0.01。

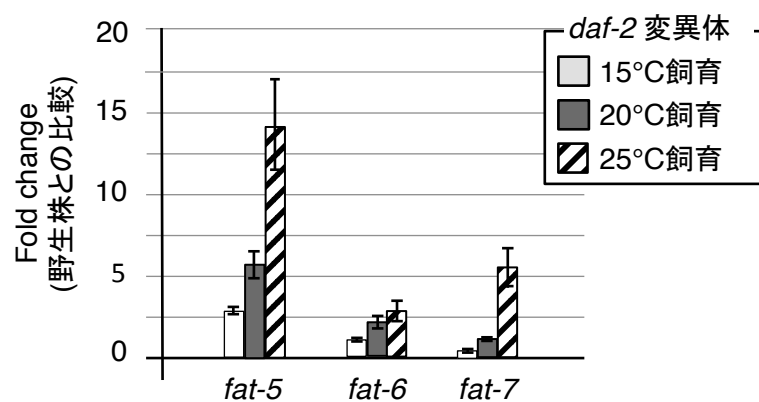


図35. 脂質構成に関わる遺伝子の*daf-2*変異体における発現量の解析
*C. elegans*の脂質膜構成に関わる遺伝子である $\Delta 9$ デサチュラーゼ (*fat-5*、*fat-6*、*fat-7*)の*daf-2*変異体における定量的PCRの結果。それぞれのバーグラフは各温度で飼育された野生株との相対値を示す。n=3。

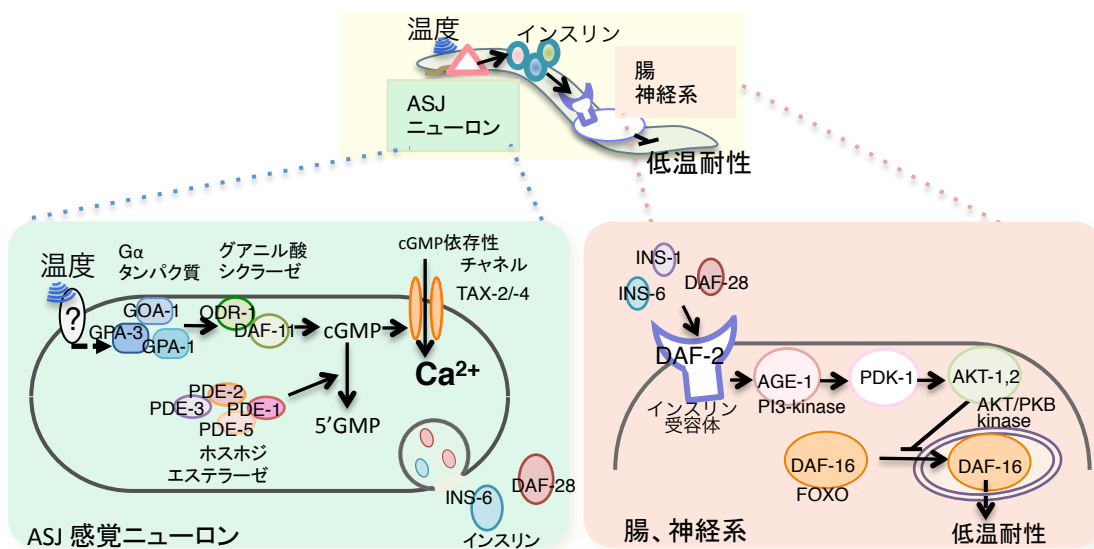


図36. *C. elegans*の低温耐性の分子経路図

*C. elegans*の低温耐性では、温度刺激をASJ感覚ニューロンが受容し、3量体Gタンパク質が関わる経路を介して伝達される。ASJ感覚ニューロンからはインスリン分子DAF-28とINS-6が分泌され、それが腸や神経系にあるインスリン受容体DAF-2により受容される。その下流ではFOXO型転写因子DAF-16による遺伝子の発現制御が行われることで低温耐性が制御されている。

発現細胞

| Gene | Protein | 発現ニューロン |
|---------------|--|--|
| <i>che-2</i> | WD-40 repeats | All amphid and phasmid sensory neurons except BAG and AFD |
| <i>che-13</i> | IFT complex B | All amphid, phasmid sensory neurons, inner and outer labial neurons |
| <i>osm-3</i> | kinesin-2 family | All amphid and phasmid sensory neurons |
| <i>osm-5</i> | IFT88 | All amphid and phasmid sensory neurons, inner and outer labial neurons |
| <i>osm-6</i> | IFT52 | All amphid and phasmid sensory neurons except BAG and FLP |
| <i>daf-6</i> | Patched-related protein | Amphid sheath glia and socket cells, phasmid sensory organ sheath and socket cells |
| <i>che-1</i> | C2H2-type zinc finger transcription factor | ASE |
| <i>osm-9</i> | TRPV channel | OLQ, IL2, AWA, AWC, ASE, ADF, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK, ADL, FLP, PVD, PHA, PHB |
| <i>osm-10</i> | novel protein | ASH, ASI, PHA, PHB |
| <i>odr-7</i> | Nuclear hormone receptor | AWA |
| <i>tax-4</i> | cGMP gated channel alpha subunit | AFD, ASE, ASG, ASI, ASJ, ASK, AWB, AWC, BAG, URX |
| <i>tax-2</i> | cGMP gated channel beta subunit | AFD, ASE, ASG, ASI, ASJ, ASK, AWB, AWC, BAG, URX |

表1. 感覚ニューロンで機能する遺伝子がコードするタンパク質と発現しているニューロン名
左から遺伝子名、コードするタンパク質、それが発現しているニューロンの名前。

Rescue系統作製用

| プラスミド番号 | |
|---------|----------------------------|
| pTOM1 | <i>ges-1p::daf-2cDNA</i> |
| pTOM5 | <i>unc-14p::daf-2cDNA</i> |
| pTOM3 | <i>str-3p::tax-4cDNA</i> |
| pTOM4 | <i>trx-1p::tax-4cDNA</i> |
| pTOM10 | <i>ceh-36p::tax-4cDNA</i> |
| pTOM6 | <i>trx-1p::daf-28cDNA</i> |
| pTOM7 | <i>str-3p::daf-28cDNA</i> |
| pTOM8 | <i>ceh-36p::daf-28cDNA</i> |
| pTOM53 | <i>goa-1p::goa-1cDNA</i> |
| pTOM54 | <i>gpa-1p::gpa-1cDNA</i> |
| pTOM55 | <i>gpa-3p::gpa-3cDNA</i> |
| pUDA3 | <i>trx-1p::goa-1cDNA</i> |
| pUDA4 | <i>trx-1p::gpa-1cDNA</i> |
| pUDA5 | <i>trx-1p::gpa-3cDNA</i> |
| pUDA6 | <i>ceh-36p::goa-1cDNA</i> |
| pUDA7 | <i>ceh-36p::gpa-1cDNA</i> |
| pUDA8 | <i>ceh-36p::gpa-3cDNA</i> |
| pUDA10 | <i>gcy-5p::goa-1cDNA</i> |
| pUDA11 | <i>gcy-5p::gpa-1cDNA</i> |
| pUDA12 | <i>gcy-5p::gpa-3cDNA</i> |

Calcium imaging系統作製用

| プラスミド番号 | |
|---------|-----------------------|
| pTOM13 | <i>trx-1p::yc3.60</i> |

Conforcal系統作製用

| プラスミド番号 | |
|---------|---------------------------------|
| pQZ34 | <i>trx-1p::GFP</i> |
| pUDA13 | <i>trx-1p::goa-1cDNA::venus</i> |
| pUDA14 | <i>trx-1p::gpa-1cDNA::venus</i> |
| pUDA15 | <i>trx-1p::gpa-3cDNA::venus</i> |

Injection marker用

| プラスミド番号 | |
|---------|----------------------------|
| pKDK66 | <i>ges-1p::NLS::GFP</i> |
| pAK62 | <i>AIYp::GFP</i> |
| pNAS88 | <i>ges-1p::NLS::taqRFP</i> |
| pRF4 | <i>rol-6gf</i> |
| pOTA4 | <i>trx-1p::deRedm</i> |

表2. 本研究で使用したプラスミドの一覧

Mutaion check用 primer

| プライマー番号 | 配列(5'-3') | 用途 |
|-----------------------------|--|---|
| KHR137_odr-1n1936_RsaI_fwd | TCCTACGCTATCAACGCAG | <i>odr-1(n1936)</i> mutation check (RFLP) |
| KHR138_odr-1n1936_RsaI_rev | TCCGATTTTTTTTTTGTCTAAACTTTTCATTTGAAGTA | |
| KHR165_goa-1_fwd | CTTCATTCTCCATCTCACTGTG | <i>goa-1(n1134)</i> mutation check (RFLP) |
| KHR166_goa-1_rev | CGAACCAAATGAAACGCCTAAG | |
| KHR151_gpa-1_fwd | AGTCGAGAACTTGTAGCTCAAGC | <i>gpa-1(pk15)</i> deletion check |
| KHR152_gpa-1_fwd2 | ATCGAATGCACGAATCAATACAG | |
| KHR153_gpa-1_rev | CAATACAATCCACATCCCTTCAG | |
| KHR220_gpa-3_fwd | GCAGAGGACAAAGAACTGAC | <i>gpa-3(pk35)</i> deletion check |
| KHR221_gpa-3_rev | TACAAACCGCATCCTTGC | |
| KHR155_gpa-3_fwd2 | TGGTTCATCAATACTTCAATGAT | |
| KHR_1175_pde3_del_check_fwd | CACCACAATTGACGGACAAC | <i>pde-3(nj59)</i> deletion check |
| KHR_1176_pde3_del_check_rev | ACTTCACGGGAAACAATGTC | |
| KHR_1177_pde5_del_check_fwd | CGGATCTATCAATGAAGCGGAG | <i>pde-5(nj49)</i> deletion check |
| KHR_1178_pde5_del_check_rev | CCAATTGTGGTAGGCAACTCGG | |

Real-time PCR用 primer

| プライマー番号 | 配列(5'-3') | 用途 |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| KHR_031_daf28(tm2308)_fwd | CTCTGTCTCCTCTCAACAATATC | pTOM8用 |
| KHR_032_daf28(tm2308)_rev1 | TCCACACATACGGAACGAG | |
| KHR_020_lmn1_fwd_RT-PCR | CGTTCACCACCCACCAGAA | ハウスキーピング遺伝子 <i>lmn-1</i> |
| KHR_021_lmn1_rev_RT-PCR | CAAGACGAGCTGATGGGTTATCT | |
| KHR_024_cpr1_fwd_RT-PCR | AGCTGGATGCAAACCATACC | <i>cpr-1</i> |
| KHR_025_cpr1_rev_RT-PCR | GGAACAGCGTAGGCAGAGAC | |
| KHR_034_M60.2_fwd_RT-PCR | AAGAAGAGCCCAGACCACGA | <i>M60.2</i> |
| KHR_035_M60.2_rev_RT-PCR | CATCCGAGGCAATGAAGTTGT | |
| KHR_036_gpa7_fwd_RT-PCR | TCGACGCAGCAATGAATACC | <i>gpa-7</i> |
| KHR_037_gpa7_rev_RT-PCR | TGCCCTCCAACATCTATCACTC | |
| KHR_038_dmd7_fwd_RT-PCR | AACGCGAACAGCTAAATGGA | <i>dmd-7</i> |
| KHR_039_dmd7_rev_RT-PCR | GCGTGCCCTTTCAGTACAAC | |
| KHR_040_cgt1_fwd_RT-PCR | GCGATTTTATGAGACCCGATG | <i>cgt-1</i> |
| KHR_041_cgt1_rev_RT-PCR | CGAACATACAACGCCGAGAA | |
| KHR_042_dhs4_fwd_RT-PCR | CTTCGATGTTTGACGCCACT | <i>dhs-4</i> |
| KHR_043_dhs4_rev_RT-PCR | CGACCATTGCCTGAGCTTT | |
| KHR_057_gpdh1_fwd_RT-PCR | GGGTGACAACGGATTATGAGG | <i>gpdh-1</i> |
| KHR_058_gpdh1_rev_RT-PCR | CCGACGGAACCTTGGGTAGAA | |
| KHR_066_tba1_fwd_RT-PCR | AGACCAACAAGCCGATGGAG | ハウスキーピング遺伝子 <i>tba-1</i> |
| KHR_067_tba1_rev_RT-PCR | GCATCTTCCTTTCGGGTGAT | |
| KHR212_fat-5_fwd_RTPCR | TGGGATGGTTGTTGGTGAAG | <i>fat-5</i> |
| KHR213_fat-5_rev_RTPCR | CGTGTAGAAGGCGATGAAGG | |
| KHR214_fat-6_fwd_RTPCR | CCCACTTGTCATCTTGTGCTG | <i>fat-6</i> |
| KHR215_fat-6_rev_RTPCR | TTTCGACTGGGGTAATTGAGG | |
| KHR216_fat-7_fwd_RTPCR | TGGCTCTCTTTGCTGCTCTG | <i>fat-7</i> |
| KHR217_fat-7_rev_RTPCR | TTGGTGTGGTTGCCTTGATG | |

Gαタンパク質plasmid作製 primer

| プライマー番号 | 配列(5'-3') | 用途 |
|----------------------|--|--|
| KHR_1169_goa1p_fwd | ATAAGCTTGCATGCCTGCAGGTTTCTCTTTGCAACAACCTG | <i>goa-1</i> promoter (3.0 kb upstream of C26C6.2) |
| KHR_1170_goa1p_rev | TTTGGCCAATCCCGGGGCGCTAGAGTTGATGAACG | |
| KHR_1171_gpa1p_fwd | ATAAGCTTGCATGCCTGCAGGAGTATCACATCGTTTCTCTGG | <i>gpa-1</i> promoter (1.5 kb upstream of T19C4.6a) |
| KHR_1172_gpa1p_rev | TTTGGCCAATCCCGGGGCTGAAGTCTTCGAATAAATGAC | |
| KHR_1173_gpa3p_fwd | ATAAGCTTGCATGCCTGCAGGCCACACATTATTATGTCAGG | <i>gpa-3</i> promoter (3.0 kb upstream of E02C12.5a) |
| KHR_1174_gpa3p_rev | TTTGGCCAATCCCGGGAATTGTTCTTTGGCTAATA | |
| KHR526_goa-1_Inf_fwd | GTATTTTCATCGGTACCATGGGTTGTACCATGTCACAGG | <i>goa-1</i> cDNA |
| KHR527_goa-1_Inf_rev | TGCTCACCATGCTAGCATACAAGCCGCATCCACG | |
| KHR528_gpa-1_Inf_fwd | GTATTTTCATCGGTACCATGGGAACTGCGAAAGTCG | <i>gpa-1</i> cDNA |
| KHR529_gpa-1_Inf_rev | TGCTCACCATGCTAGCATACAATCCACATCCCT | |
| KHR530_gpa-3_Inf_fwd | GTATTTTCATCGGTACCATGGGATTATGCCAATCTGC | <i>gpa-3</i> cDNA |
| KHR531_gpa-3_Inf_rev | TGCTCACCATGCTAGCGTACAAACCGCATCCTTGC | |

表3. 本研究で使用したプライマーの一覧

Rescue系統

| 系統名 | |
|-----|--|
| | <i>daf-2(n1370); Ex[unc-14p::daf-2cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>daf-2(n1370); Ex[ges-1p::daf-2cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>daf-2(n1370); Ex[unc-14p::daf-2cDNA, ges-1p::daf-2cNDA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>tax-4(p678); Ex[trx-1p::tax-4cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>tax-4(p678); Ex[str-3p::tax-4cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>tax-4(p678); Ex[ceh-36p::tax-4cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>tax-4(p678); Ex[trx-1p::tax-4cDNA, str-3p::tax-4cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>daf-28(tm2308); Ex[trx-1p::daf-28cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>daf-28(tm2308); Ex[str-3p::daf-28cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>daf-28(tm2308); Ex[ceh-36p::daf-28cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>daf-28(tm2308); Ex[trx-1p::daf-28cDNA, str-3p::daf-28cDNA, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>goa-1(n1134); gpa-3(pk35) gpa-1(pk15); Ex[goa-1p::goa-1cDNA, gpa-1p::gpa-1cDNA, gpa-3p::ga-3cNDA, AIYp::GFP, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>goa-1(n1134); gpa-3(pk35) gpa-1(pk15); Ex[gcy-5p::goa-1cDNA, gcy-5p::gpa-1cDNA, gcy-5p::ga-3cNDA, AIYp::GFP, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>goa-1(n1134); gpa-3(pk35) gpa-1(pk15); Ex[ceh-36p::goa-1cDNA, ceh-36p::gpa-1cDNA, ceh-36p::ga-3cDNA, AIYp::GFP, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>goa-1(n1134); gpa-3(pk35) gpa-1(pk15); Ex[trx-1p::goa-1cDNA, trx-1p::gpa-1cDNA, trx-1p::ga-3cDNA, AIYp::GFP, ges-1p::NLS::GFP]</i> |

Calcium imaging系統

| 系統名 | |
|-------|---|
| | <i>N2; Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>lite-1(xu7); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>tax-4(p678); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>tax-4(p678); Ex[trx-1p::yc3.60, trx-1p::tax-4cDNA, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>snb-1(md247); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>goa-1(n1134); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>gpa-1(pk15); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>goa-1(pk35); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>gpa-3(pk35) gpa-1(pk15); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>goa-1(n1134); gpa-3(pk35) gpa-1(pk15); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>daf-11(m47); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>odr-1(n1936); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>daf-11(sa195); odr-1(n1936); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>pde-1(nj57); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP]</i> |
| | <i>pde-2(nj58); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>pde-3(nj59); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>pde-5(nj49); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>pde-1(nj57) pde-5(nj49); pde-2(nj58); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| | <i>pde-1(nj57) pde-5(nj49); pde-3(nj59); pde-2(tm3098); Ex[trx-1p::NLS::yc3.60, ges-1p::taqRFP]</i> |
| KHR88 | <i>pde-3(nj59); gpa-1(pk15); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |
| KHR89 | <i>pde-5(nj49); gpa-1(pk15) Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::NLS::taqRFP, rol-6gf]</i> |

Conforcal系統

| 系統名 | |
|-----|--|
| | <i>N2; Ex[trx-1p::GFP, ges-1p::NLS::GFP]</i> |
| | <i>N2; Ex[trx-1p::goa-1cDNA::venus, trx-1p::dsRedm, rol-6gf]</i> |
| | <i>N2; Ex[trx-1p::gpa-1cNDA::venus, trx-1p::dsRedm, rol-6gf]</i> |
| | <i>N2; Ex[trx-1p::gpa-3cDNA::venus, trx-1p::dsRedm, rol-6gf]</i> |

多重変異体系統

| 系統名 | |
|-------|--|
| KHR80 | <i>goa-1(n1134); gpa-3(pk35)</i> |
| KHR81 | <i>gpa-3(pk35) gpa-1(pk15)</i> |
| KHR82 | <i>goa-1(n1134); gpa-3(pk35) gpa-1(pk15)</i> |

表4. 本研究で作製した系統の一覧

公表論文リスト

副論文

- 1) Ohta*, A., Ujisawa, T*, Sonoda, S. & Kuhara, A. (*Equally contributed)

Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*.

Nature communications, 5 (4412), 1-12, 2014

- 2) Ujisawa, T., Ohta, A., Uda-Yagi, M., Kuhara, A.

Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in *Caenorhabditis elegans*.

PLOS ONE, 11(10), e0165518, 1-20, 2016

参考論文

- 1) Sonoda S., Ohta, A., Maruo, A., Ujisawa, T., Kuhara, A.

Sperm affects head sensory neuron in temperature tolerance of *Caenorhabditis elegans*.

Cell Reports, 16, 1, 56–65, 2016

- 2) Kage-Nakadai, E., Ohta, A., Ujisawa, T., Sun, S., Nishikawa, Y., Kuhara, A., Mitani, S.

A *Caenorhabditis elegans* homolog of Prox1/Prospero is expressed in the glia and is required for sensory behavior and cold tolerance.

Genes to Cells, 21, 9, 936-948, 2016

- 3) Ujisawa, T., Ohta, A., Okahata, M., Sonoda, S. & Kuhara, A.

Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*.

Protocol Exchange, doi:10.1038/protex.2014.032, 1-7, 2014

- 4) Ujisawa, T., Ohta, A., & Kuhara, A.

Long-term calcium imaging of ASJ sensory neuron controlling cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*.

Protocol Exchange, doi:10.1038/protex.2014.034, 1-6, 2014

- 5) 久原篤, 宇治澤知代, 太田茜 [総説]

線虫 *Caenorhabditis elegans* の温度適応を制御する神経と腸を介した情報処理

比較生理生化学, 32 (2), 67-75, 2015