

博士学位論文

線虫 *Caenorhabditis elegans* の低温耐性における

精子から神経へのフィードバック制御

Sperm controls thermo-sensory neuron in cold tolerance
of *Caenorhabditis elegans*

園田 悟

Satoru Sonoda

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

1. 要旨	1
2. 序論	3
3. 結果	9
4. 考察	22
5. 材料と方法	31
6. 引用文献	53
7. 謝辞	59
8. 図	61
9. 公表論文リスト	95

要旨

生物にとって、環境温度は生存と繁殖に非常に重要な環境情報であるため、生物には環境温度に適応するための生体メカニズムが存在する。動物の温度適応メカニズムには神経を含む多くの組織が関与するが、それらの組織間の相互作用を含む統合的な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、シンプルなモデル動物である線虫 *Caenorhabditis elegans* の低温耐性現象を解析モデルとして、動物の温度適応メカニズムにおける組織ネットワークの解析を行った。線虫の低温耐性とは、20°Cで飼育した個体は2°Cに置かれると死滅するのに対し、15°Cで飼育した個体は2°Cに置かれても生存することができる現象である。これまでの研究から、頭部の温度受容ニューロンであるASJニューロンが温度を受容することでインスリンを分泌し、インスリンを受容した腸や神経系が遺伝子の発現を変化させることで低温耐性を制御することが明らかとなっている。本研究では、新たに精子が低温耐性に関与することが明らかとなり、精子が温度受容ニューロンをフィードバック制御することが示唆された。まず、腸のインスリン経路の下流で機能する遺伝子の解析から、精子が低温耐性に影響を与えることが示唆された。さらに、精子の遺伝子と他の組織の遺伝子との遺伝学的関係を調べたところ、精子の遺伝子変異が温度受容ニューロンASJの遺伝子変異より遺伝学的に優位であった。また、温度受容ニューロンASJの神経活動をカルシウムイメージング法により計測したところ、精子特異的プロテインホスファターゼPP1の変異体(*gsp-4*)において、温度に対する応答性が低下していた。さらに、*gsp-4*変異体の精子特異的に*gsp-4*遺伝子を発現させた遺伝子導入系統において、ASJの温度応答性が回復したことから、精子が温度

受容ニューロン ASJ に影響を与えることが示唆された。低温耐性において、精子、神経、そして腸という組織間の情報伝達を行う分子を同定するために、DNA マイクロアレイ解析で同定された飼育温度で発現変動する核内受容体 (Nuclear Hormone Receptor, NHR) の変異体の低温耐性を解析したところ、*nhr-88* と *nhr-114* の変異体で低温耐性の異常が見られた。遺伝学的解析から、既知のインスリン経路とは独立に、神経から NHR を介して腸に温度情報を送っていることが示唆された。以上の結果から、動物の温度適応において、精子が関与すること、そして、精子が頭部温度受容ニューロンをフィードバック制御することが示唆された。

以上の結果から、温度受容ニューロン ASJ で受容された温度情報がインスリンとステロイドホルモンを介して腸に伝達され、次に腸から精子に情報が送られた後に、精子が温度受容ニューロン ASJ の神経活動に影響を与えることが示唆された。本研究結果は、温度適応において、精子から感覚神経へのフィードバックシステムが存在するという新規の概念を提唱するものである。

序論

線虫 *Caenorhabditis elegans* の環境温度に対する応答

生物は常に外界からの情報を受け取り、それに適切に応答して生理的反応や行動を変化させる。外界から受け取る情報の中でも温度は生物の生存と繁殖に直接影響を与える重要な環境情報である。特に無脊椎動物などの成長速度と繁殖効率は、環境温度に大きく左右される。そこで多くの生物は、温度変化に対する行動応答や膜脂質の割合変化などの生理的反応で環境温度に適応するメカニズムをもっている(Murray *et al.*, 2007)。例えば、恒温動物である人間の場合、全身で受容された温度情報は中枢神経である脳の視床下部で統合され、骨格筋の震えによる発熱や皮膚の血管の変化などを引き起こして体温調節を行うことが分かっている(Nakamura, 2011)。一方で、高等動物になるほど生体や脳を構成する細胞数が増加するため、温度適応の細胞ネットワークを解明するためには時間を要すると考えられる。

本研究ではモデル動物として線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いている。*C. elegans* は体長が約 1 mmの土壤中に生息する自由生活性の生物で、透明な体をもつため体の内部構造を非侵襲的に直接観察することができる(Barr, 2003; Brenner, 1974)。雌雄同体の成虫の体細胞は 959 個からなり、そのうち 302 個が神経細胞で、電子顕微鏡を用いた連続切片像の解析から神経ネットワーク構造が再構築されている(White *et al.*, 1986)。さらに、ライフサイクルが 20°Cで約 4 日と短く、雌雄同体の自家受精による単為生殖と低確率で発生する雄個体との交配による有性生殖を行うため、系統の維持と遺伝学的解析が容易である。全ゲノム配列が解析済みであり、ゲノムサイズが約 100 Mbp で遺伝子数が約

20000 個であり、それらのうち 36%がヒトと共通する遺伝子であると報告されている(The *C.elegans* Sequencing Consortium, 1998)。これらの特徴から、*C. elegans* は、温度適応のメカニズムを調べるのに優れたモデル動物の一つであると考えられる。

C. elegans は、環境温度に応じた行動や形態変化が知られている。例えば、25°Cで飼育した場合、卵から成虫に成長するまでの時間は約 3 日であるのに対し、15°Cで飼育した場合は約 6 日と飼育温度に応じて成長速度が大きく変化する。生育限界温度である 30 度以上の高温または飢餓にさらされた *C. elegans* の幼虫は、ダワーと呼ばれる耐性幼虫に形態変化し、高温や飢餓に対し高い耐性を獲得する。ダワー耐性幼虫は環境が生存に適した状態になるまでダワー形態を維持し、その間成長と性成熟は停止する(Hu, 2007)。*C. elegans* は飼育温度と餌条件によって行動を変化させる。具体的には、一定の温度下で餌を十分に与えて飼育された個体は、温度勾配上で過去の飼育温度に向かい行動する。それに対して、一定の温度下で飢餓を経験した個体は、温度勾配上で飼育温度を忌避する。このような温度に対する行動は温度走性(thermotaxis)と呼ばれており、*C. elegans* が餌条件と飼育温度を関連づけて記憶し、行動応答に反映することを示す(Aoki and Mori, 2015; Hedgecock and Russell, 1975; Mori and Ohshima, 1995; Ohta and Kuhara, 2013)。

線虫 *C. elegans* の組織ネットワーク

生物の生存目的の一つは繁殖であるため、繁殖の効率を上げるための生殖機能のコントロール機構は必須である。動物において、個体の受精率は、受精に

直結する精子の運動性や数、卵の形成状態や数、および種特有の生殖行動によって左右される。これらは、神経系によって受容される外界の様々な環境要因によって変化する。例えば、*C. elegans* の場合、感覚ニューロンで受容された環境情報に応じて、精子の運動性や卵の数や受精率などが変化する。具体的には、感覚ニューロン ASI が受容した環境情報に応じて精子の運動性を制御し、精子の受精率に影響を与えることが分かっている(McKnight *et al.*, 2014)。感覚ニューロン ASI は、個体密度の上昇と餌の減少によって増加する ascaroside ホルモンを受容すると TGF- β 内分泌シグナルを減少させ、卵原幹細胞のプロスタグランジン合成に影響を与える。プロスタグランジンには精子を卵まで誘導する役割があり、精子の運動性に影響を与える(McKnight *et al.*, 2014)。この精子運動を制御するメカニズムは、ダワー幼虫形成と違い飼育温度には依存しないことが報告されている。

生物は外界からの情報を受容することで応答適応を行うが、適切な応答適応を行うには体細胞から神経細胞へのフィードバックも重要である。例えば、*C. elegans* の酸素に対する行動応答である走気性(aerotaxis)では、低酸素環境を体細胞生殖巣 uterine-vulval 細胞(uv1)が受容し、低酸素誘導因子HIF-1を介して神経回路にフィードバックすることで走気性を制御することが分かっている(Chang and Bargmann, 2008)。また、温度走性では、腸や筋肉で受容された温度情報がエストロゲンを介して温度受容ニューロン AFD にフィードバックされることが報告されている(Sugi *et al.*, 2011)。エストロゲンはステロイドホルモンであり核内受容体(NHR)がエストロゲン受容体として機能すると推測されている。

線虫の精子で機能する MSP

C. elegans は雌雄同体であるため、精子と卵細胞の両方を保有している。*C. elegans* の精子は、子宮と生殖腺の間にある貯精囊と呼ばれる組織に存在し、卵細胞が貯精囊を通り子宮へ排卵される際に受精が行われる。線虫 *C. elegans* の精子は、ヒトを含む哺乳類で見られるオタマジャクシ型の精子ではなく、アメーバ状の細胞である。オタマジャクシ型の精子は鞭毛によって運動を行うが、アメーバ状である *C. elegans* の精子は一本の仮足(Pseudopod)を使い這いずり運動を行う。多くのアメーバ状細胞の仮足の細胞骨格がアクチンによって構成されるのに対し、線虫の精子では Major Sperm Protein (MSP)によって仮足の細胞骨格が形成され、MSP の重合と脱重合による細胞骨格の伸縮が精子運動を制御する(Italiano *et al.*, 1996; Kelleher *et al.*, 2000; Smith, 2006)。仮足の細胞骨格を形成する MSP は精子特異的プロテインホスファターゼである GSP-3 と GSP-4 によって解離速度を調節され、精子の運動性が制御される(Wu *et al.*, 2012)。

MSP は精子運動だけでなく、精子から卵細胞へのシグナル伝達にも関与することが報告されている。線虫 *C. elegans* において、停止した卵細胞の減数分裂は、精子からのシグナルを受容することで再開が促進される(McCarter *et al.*, 1999)。具体的には、精子運動を行う仮足の細胞骨格因子である MSP が、精子から小胞を介して分泌され、卵細胞の減数分裂成熟を促進するシグナル物質として機能することが報告されている。MSP によるシグナル伝達は、卵細胞の成熟だけでなく、卵細胞を生殖腺から貯精囊へ移動させる排卵に関しても促進する(Kosinski *et al.*, 2005; Miller, 2001)。このように、精子に存在する MSP は、精子自身の運動を制御するだけでなく、精子と他の細胞間のシグナル伝達を行

う分子としても機能している。

線虫 *C. elegans* の低温耐性

我々は線虫 *C. elegans* の低温耐性現象をモデルとして、動物の温度適応メカニズムの解明を目指している。低温耐性とは、20°Cで飼育された線虫 *C. elegans* は 2°Cに 48 時間置かれると死滅するのに対し、15°Cで飼育された *C. elegans* は 2°Cの低温でも生存できる現象のことである(図 1) (Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。 *C. elegans* は、30°C以上の高温にさらされるとdauer耐性幼虫に形態変化するが、低温耐性では形態変化は観察されない。これまでの研究から、頭部の感覚ニューロン ASJ が温度を受容し、インスリンを分泌し、腸がインスリンを受容することで低温耐性を制御することが示唆されている (図 2) (Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。頭部の感覚ニューロン ASJ は光やフェロモンを受容することで知られているが、温度受容体は明らかとなっていない。温度情報が三量体 G タンパク質経路で温度情報を伝達されることが示唆されているため、温度受容体は G タンパク質共役型受容体であると予想されている。三量体 G タンパク質経路で温度情報を伝達した ASJ はシナプス領域からインスリンを分泌し、分泌されたインスリンは腸や神経系に受容され、最終的に腸の FOXO 型転写因子 DAF-16 が遺伝子発現を調節し、全身の低温耐性状態を維持または変化させる(図 2) (Cornils *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。しかし、低温耐性の制御に関して、DAF-16 による遺伝子発現制御の下流で起きる具体的な生体内変化、あるいは神経や腸以外の臓器の関与の可能性は全くわかっていない。そこで本研究では、*C. elegans* の低温耐性におけるインスリン経路の下

流ではたらく分子や組織の検討と、それらの組織間のネットワークについて解析を行い、低温耐性を協調して制御する組織ネットワークモデルを考案した。

結果

精子が低温耐性に影響を与える

線虫 *C. elegans* は環境温度の変化に適応するために、ダワー耐性幼虫や低温耐性といった生体メカニズムを有している(Hu, 2007; Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。これまでの研究から、頭部の ASJ 温度受容ニューロンが温度を受容し、三量体 G タンパク質経路で温度情報を伝達してシナプス領域からインスリンを分泌し、分泌されたインスリンを腸が受け取ることで低温耐性が制御されることが分かっている(図 2) (Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。具体的には、インスリン受容体 DAF-2 の下流で転写因子 DAF-16 などが遺伝子発現を調節することで低温耐性の状態を変化させると考えられる。この低温耐性の制御モデルにおいて、腸のインスリン経路の下流でどのような分子や組織の情報伝達系が機能するかは十分には明らかとされていなかった。そこで、インスリン経路の下流ではたらく遺伝子や組織を DNA マイクロアレイ解析によって調べることにした。まず、野生株とインスリン受容体に異常をもつ *daf-2* 変異体を 15°C で飼育し、25°C に 12 時間置いた後に、それぞれの個体から mRNA を抽出した。抽出された mRNA を DNA マイクロアレイを用いて比較解析し、野生株と *daf-2* 変異体で発現に 2 倍以上差がある遺伝子を約 1500 個同定した(図 3, 4)。同定された遺伝子を *C. elegans* のゲノムデータベースである WormBase (<http://www.wormbase.org>) で確認し、既にデータベースに遺伝子発現パターンが登録されている遺伝子を約 400 個ピックアップし、その発現領域を分類してグラフ化した(図 3)。ピックアップされた遺伝子のうち約 40% が神経と腸で発現していた。神経と腸は、これまでの研究から既に低温耐性に関与する組織であることが示唆されている組

織である(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。神経と腸に次いでピックアップされた遺伝子が多く発現していたのは生殖組織であった。生殖組織で発現する遺伝子をさらに詳細に分類すると精子で発現する遺伝子が最も多いことから、精子が低温耐性に関与する可能性が考えられた(図 3)。精子が低温耐性に関与するという報告はなかったため、精子遺伝子と低温耐性に関して解析を行うこととした。

まず、精子が低温耐性に関与するか調べるために、精子の機能や発生に関わる遺伝子の変異体の低温耐性を測定した(図 5)。その結果、20°C飼育後に 2°Cに 48 時間置かれた後に野生株よりも高い生存率を示す異常が複数の変異体で観察された。具体的には、20°C飼育後に 2°Cで 48 時間置かれた後の野生株の生存率が約 20%だったのに対し、*fem-1* 変異体で約 50%、*fog-2* 変異体で約 40%、*gsp-3* 変異体で約 85%、*gsp-4* 変異体で約 70%、*ife-1* 変異体で約 65%、*msd-4* 変異体で約 55%、*spe-11* 変異体で約 55%の生存率を示した(図 5)。特に強い異常を示した *gsp-4* と *gsp-3* は精子特異的に発現し、精子形成や精子運動を制御するプロテインホスファターゼ PP1 をコードすることが報告されている(Wu *et al.*, 2012)。

次に、擬似的な回復実験として、精子特異的プロテインホスファターゼの変異体である *gsp-4* の雌雄同体に、野生株の雄を交尾させることで健康な精子を導入した *gsp-4* 変異体個体の低温耐性を測定した(図 6)。その結果、コントロールである野生株の雄と交尾させていない野生株の雌雄同体は 20°C飼育後に 2°Cに 48 時間置かれた後の生存率が約 3%、交尾させた野生株の生存率は 0%、野生株の雄と交尾させていない精子変異体 *gsp-4* の生存率は約 44%だったのに対し、野生株の雄との交尾させた *gsp-4* 変異体は約 17%と交尾させていない *gsp-4*

変異体の低温耐性の異常が部分的に回復した(図 6)。これらのことから、精子の異常によって低温耐性の異常が引き起こされることが示唆された。

精子の MSP が低温耐性に影響を与える

変異体や精子の導入実験から、精子が低温耐性に影響を与えることが示唆された。しかし、精子がどのように低温耐性に影響を与えるのかは明らかとなっていない。そこで、精子が低温耐性に与える影響について調べるために、精子で機能することが明らかとなっている遺伝子に変異をもつ 22 系統の変異体の低温耐性を測定した(図 7)(L'Hernault, 2006)。その結果、20°C 飼育後に 2°C に置かれた *spe-15* と *spe-39* の変異体で低温耐性の異常が観察された(図 7)。*spe-15* は精子形成の第二減数分裂で精子細胞(spermatid)が残余小体(residual body)から出芽する際に、Fibrous Body-Membranous Organelles (FB-MOs)やミトコンドリアといった細胞小器官を取捨選択して輸送する役割を持つミオシン VI をコードしている(Kelleher *et al.*, 2000)。*spe-39* は FB-MOs の形成に必要な新規親水性タンパク質をコードしている(Zhu and L'Hernault, 2003)。この二つの遺伝子はどちらも精子形成に重要な役割を持つ細胞小器官 FB-MOs に関与する(Kelleher *et al.*, 2000; Zhu and L'Hernault, 2003)。FB-MOs は精子形成に重要なタンパク質が多数含まれている細胞小器官で、ゴルジ体由来の小胞である MO 部位と結晶様の繊維体である FB 部位からなる。FB 部位は非アクチン性の細胞骨格因子 MSP が会合した繊維体であり、MO 部位由来の膜構造で覆われている。FB 部位を構成する MSP は精子細胞から精子へと成熟する過程で一度解離して細胞質に放出され、精子の仮足の細胞骨格として再集合する(Italiano *et al.*,

1996; Kelleher *et al.*, 2000; Smith, 2006)。精子運動は MSP の重合と脱重合による仮足の伸縮によって行われ、MSP の解離は精子特異的プロテインホスファターゼ GSP-3/4 によって制御される(Wu *et al.*, 2012)。そこで、飼育温度依存的に発現変動する *msp* 遺伝子をピックアップし、フィーディング RNAi 法でノックダウンした *eri-1; lin-15B* 変異体個体の低温耐性を測定した (図 8)。*eri-1; lin-15B* 変異体は RNAi による遺伝子ノックダウンに強い感受性をもつ系統である。その結果、*msp-19* や *msp-38* など 21 種類の *msp* 遺伝子のノックダウン個体において、20°C 飼育後に 2°C に置かれた後にネガティブコントロールの *eri-1; lin-15B* 変異体よりも生存率が上昇する低温耐性の異常が観察された (図 8)。20°C 飼育後に 2°C に置かれた後にコントロール系統よりも生存率が上昇する異常は、精子変異体でも観察された (図 5, 7)。これらの結果から、精子の MSP に関わる分子機構が低温耐性に関与する可能性が考えられた。これらのような 20°C 飼育後の低温刺激で生存率が上昇する異常は、温度受容ニューロン ASJ の三量体 G タンパク質経路や、腸のインスリン受容体の変異体でも観察されている(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。

低温耐性において、精子の *gsp-4* はインスリン経路の下流で機能する

ここまでの変異体を用いた低温耐性の解析から、精子が低温耐性に関与することが示唆された。そこで、低温耐性に関わることが示唆されている組織である神経系や腸と精子との関係を遺伝学的に調べることにした(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。これまでに、神経系や腸におけるインスリン情報伝達経路が、低温耐性に必須であることが報告されている。また、本研究の DNA マイクロアレイを

用いた結果から、インスリン情報伝達経路が多くの精子遺伝子の発現を制御することが示唆された (図 3)。これらの情報に基づき、低温耐性における腸と精子の関係がどのようなものか調べるために、低温耐性に関与するそれぞれの組織の遺伝子変異を利用して遺伝学的解析を行った (図 9, 10, 11)。これまでの研究から、腸は神経系から分泌されたインスリンをインスリン受容体 DAF-2 で受容することで遺伝子発現を変化させ低温に対する適応性を変化させることが分かっている (図 2) (Kimura *et al.*, 1997; Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。そこで、腸ではたらく遺伝子としてインスリン受容体をコードする *daf-2* 遺伝子、精子ではたらく遺伝子として精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 をコードする *gsp-4* 遺伝子を用いて、それらの二重変異体を作製し、低温耐性を測定した。20°C 飼育後に 2°C に置いたあと、野生株のほとんどが死滅するのに対し、精子の *gsp-4* 変異体と腸の *daf-2* 変異体は高い生存率を示した。そして、*gsp-4; daf-2* 二重変異体はそれぞれの単独の変異体と同程度の異常を示した (図 9)。このことから、*gsp-4* と *daf-2* は遺伝学的に同一経路上で機能する可能性が示唆された。さらに、定量的 PCR を用いて、野生株とインスリン受容体 *daf-2* 変異体における精子特異的プロテインホスファターゼ *gsp-3* と *gsp-4* の mRNA の発現量を比較した。その結果、インスリン受容体 *daf-2* の変異体において *gsp-3* と *gsp-4* の発現レベルが上昇した (図 10, 11)。つまり、腸のインスリン受容体 DAF-2 を介した情報伝達経路が、精子の *gsp-3* と *gsp-4* の発現に影響を与えていることが示唆された。これらの結果から、遺伝学的に DAF-2 の下流で精子の GSP-4 が機能する可能性が示唆された。遺伝学的に上流または下流とは、ある現象に対する一連の生化学反応において、影響を与える遺伝子の順番を示す上下関係のことである。

る。表現形は下流の遺伝子の影響が優先される。

精子の *gsp-4* 変異は ASJ ニューロンの温度伝達経路の異常で抑制される

次に、精子と低温耐性に関与することが分かっている ASJ 温度受容ニューロンとの遺伝学的な関係を調べるために、低温耐性に関与するそれぞれの組織の遺伝子変異を利用して遺伝学的解析を行った(図 12, 13)。これまでの研究から、ASJ 温度受容ニューロンは未同定の受容体で温度を受容し、三量体 G タンパク質 α サブユニット($G\alpha$)である GPA-3 やグアニル酸シクラーゼ(GCY)である ODR-1 を介して温度情報を伝達し、ASJ のシナプス部位からのインスリンの分泌を制御することが分かっている(図 2) (L'Etoile and Bargmann, 2000; Lochrie *et al.*, 1991; Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。精子と ASJ 温度受容ニューロンとの遺伝学的な関係を調べるために、ASJ 温度受容ニューロンではたらく $G\alpha$ や GCY の変異と、精子ではたらく遺伝子の変異との二重変異体を作製し、その低温耐性を測定した(図 12, 13)。この解析では、ASJ ニューロンで機能する $G\alpha$ として GPA-3 を、GCY として ODR-1 を用いた。精子の変異として、低温耐性異常を引き起こす、精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 をコードする *gsp-4* 遺伝子の変異を用いた (図 12, 13)。

20°C 飼育後に 2°C に置いたあと、野生株のほとんどが死滅するのに対し、ASJ 温度受容ニューロンの温度情報伝達経路に異常をもつ *gpa-3* 変異体と *odr-1* 変異体はどちらも野生株よりもやや高い生存率を示した(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。同様に、精子に異常をもつ *gsp-4* 変異体も高い生存率を示した(図 12, 13)。*gsp-4; gpa-3* 二重変異体と *gsp-4; odr-1* 二重変異体は、予想外なことに精子の

gsp-4 変異体の異常が抑制され、*odr-1* 変異体または *gpa-3* 変異体と同程度の生存率を示した(図 12, 13)。さらに、定量的 PCR 解析の結果、精子に異常をもつ *gsp-4* 変異体では、ASJ 温度受容ニューロンで発現している *gpa-3* や *odr-1* 遺伝子の発現レベルが変化していた(図 14, 15)。これらの結果から、ASJ 温度受容ニューロンの GPA-3 と ODR-1 は遺伝学的に精子の GSP-4 の下流で機能する可能性が示唆された。

精子が感覚ニューロンの神経活動に影響を与える

二重変異体を用いた遺伝学的解析と定量的 PCR 解析の結果から、低温耐性において ASJ 温度受容ニューロンの三量体 G タンパク質経路が精子の下流で機能する可能性が示唆された。そこで、精子の異常が ASJ 温度受容ニューロンに与える影響について調べるために、カルシウムイメージングを用いて精子変異体の ASJ 温度受容ニューロンの神経活動を測定した(図 16)。カルシウムインディケーターとしてカメレオンタンパク質を使用した(Miyawaki *et al.*, 1997)。カメレオンタンパク質は遺伝子によってコードされ、N 末に CFP、C 末に YFP をもつ。さらに、中央にカルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンの一部であるカルシウムイオン結合部位(EF ハンドドメイン)と、カルモジュリンと結合するミオシン軽鎖キナーゼ(M13)のカルモジュリン結合部位をもつ。カメレオンは、440 nm の励起光を照射した際に、細胞内のカルシウム濃度が低いときには CFP の青色(480 nm)の蛍光を発する。一方、細胞内カルシウム濃度が高いときは、カルシウムイオンがカメレオン内の EF ハンドドメインに結合することで、M13 と結合する、それによって CFP と YFP 間の距離が近づく。この際に、440

nm の励起光を当てると CFP の青色(480 nm)の蛍光エネルギーが YFP に移動して、YFP の黄色(535 nm)の蛍光を発する FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)と呼ばれる現象が起こる。この際の YFP と CFP の蛍光の比を取ることで細胞内カルシウム濃度の変化を定量化することができる。一般的に神経細胞はカルシウム濃度が上昇するとその活性も上昇すると考えられているため、カメレオンを用いて神経活動を測定することができる。

カメレオン遺伝子を、精子に異常をもつ *gsp-4* 変異体の ASJ 温度受容ニューロン特異的に発現させた遺伝子導入系統を作製し、温度刺激を与えた際の ASJ 温度受容ニューロン内のカルシウム濃度の変化を測定した(図 16)。これまでに行われたカルシウムイメージング解析から、野生型の温度受容ニューロン ASJ の神経活動は、温度刺激によって変化することが報告されている(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。本研究でも、ASJ 温度受容ニューロン特異的にカメレオンを発現させた野生型系統に温度刺激を与えた場合に、温度刺激に応じた細胞内カルシウム濃度の変化が観察された(図 16)。それに対して、精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 に異常をもつ *gsp-4* の変異系統では、野生型系統と同じ温度刺激を与えても ASJ 温度受容ニューロンの応答性は低下していた(図 16)。さらに、*gsp-4* 変異体が生じた ASJ 温度受容ニューロンの温度応答性の低下は、*spe-11* プロモーターを用いて精子特異的に *gsp-4* 遺伝子を発現させた *gsp-4* 変異体で回復した(図 16)。つまり、*gsp-4* 変異体の精子の異常を回復させることで、ASJ 温度受容ニューロンの温度応答性の低下が回復した。これらの結果から、精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 である GSP-4 は、ASJ 温度受容ニューロンの温度に対する応答性に影響を与えることが示唆された。

遺伝学的解析と生理学的解析から、低温耐性において精子が ASJ 温度受容ニューロンの神経活動に影響を与えることが示唆された。つぎに、精子の状態が他の環境応答に影響を与える可能性を考え、精子が ASJ 温度受容ニューロン以外の神経活動、たとえば嗅覚ニューロンの応答性などにも影響を与えるかを調べた。具体的には、精子に異常をもつ *gsp-4* 変異体が、AWA 嗅覚ニューロンで受容されるジアセチルや AWC 嗅覚ニューロンで受容されるイソアミルアルコールに対する化学走性の異常を示すかを測定した(図 17) (Bargmann *et al.*, 1993; Kuhara *et al.*, 2002)。化学走性テストを行った結果、野生型はジアセチルとイソアミルアルコールに強く誘引されたのに対し、*gsp-4* 変異体はどちらに対してもほとんど誘引されなかった(図 17)。これらのことから、精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 である GSP-4 は AWA 嗅覚ニューロンと AWC 嗅覚ニューロンの嗅覚応答にも影響を与える可能性が示唆された。

低温耐性に関わる組織間を繋ぐステロイドホルモン受容体の探索

ここまでの遺伝学的解析や定量的 PCR 解析、カルシウムイメージングを用いた解析から、腸が精子に影響を与え、その後精子が ASJ 温度受容ニューロンにフィードバックすることで神経活動に影響を与えることが示唆された。つまり、神経から腸へ、腸から精子へ、精子から神経へという組織間ネットワークが低温耐性に関与すると考えられた。これまでに ASJ 温度受容ニューロンから腸への情報伝達はインスリンを介して行われることが明らかになっている(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。それに対して、腸から精子への情報伝達や、精子から頭部の ASJ 感覚ニューロンへの情報伝達に関わる分子は同定されていない。C.

elegans の体内において、精子と ASJ ニューロン間の距離は相対的に大きく、物理的に直接のコンタクトを持つことはできないため、これらの組織間における情報伝達を担う分子として、分泌性シグナルの可能性を考えた。これまでの解析から、ステロイドホルモン合成に関わるヒドロキシステロイド 17 β デヒドロゲナーゼをコードする *dhs-4* 遺伝子の変異が、低温耐性に影響を与えることが報告されている(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。そこで、ステロイドホルモン受容体である Nuclear Hormone Receptor (NHR)の遺伝子が、低温耐性に与える影響を解析した(図 18, 19)。

DNA マイクロアレイ解析を用いて、25°Cの温度刺激を与えた際に発現変動する遺伝子(図 3, 4)を野生株とインスリン受容体 *daf-2* の変異体で比較することでリスト化し、その中から NHR をコードする遺伝子をピックアップした。ピックアップされた遺伝子の欠損変異体あるいは RNAi によるノックダウン個体の低温耐性を測定した(図 18, 19)。その結果、20°C飼育後の *nhr-88* と *nhr-114* の変異体において 2°Cに置かれた後も高い生存率が観察された(図 18)。この二つの *nhr* 変異体のうち、*nhr-88* 変異体では、AWA 嗅覚ニューロンで受容されるジアセチルと、AWC 嗅覚ニューロンで受容されるイソアミルアルコールに対する化学走性が低下していた (図 17)。NHR-88 は脂質貯蔵に関与することが報告されている(Ashrafi *et al.*, 2003)。NHR-114 は、餌の種類で変化する腸の代謝変化による生殖細胞への負荷を緩和する役割が報告されている(Gracida and Eckmann, 2013)。*nhr-88* 遺伝子と *nhr-114* 遺伝子の発現細胞を調べるために、緑色蛍光タンパク質 GFP をマーカーとして解析を行った。*nhr-114* 遺伝子に関しては、プロモーターDNA 配列と遺伝子全長に GFP 遺伝子を融合させたプラ

スミドを作製し、*nhr-88* 遺伝子に関しては、プロモーターDNA 配列と遺伝子の一部に GFP 遺伝子を融合させたプラスミドを作製した。これらのプラスミドを野生株に導入し GFP が発現している細胞を調べたところ、どちらも腸において GFP の発現が観察された(図 20)。

nhr-88 遺伝子と *nhr-114* 遺伝子が、低温耐性に関わる神経と腸と精子を介した組織ネットワークの上のどの組織間の情報伝達を担っているかを調べるために、低温耐性に関与するそれぞれの組織の遺伝子変異を利用して遺伝学的なエピスタシス解析を行った(図 21, 23-26)。まず、精子ではたらく精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 をコードする *gsp-4* 遺伝子の変異と、*nhr-88* か *nhr-114* 遺伝子の変異を用いて二重変異体を作成し、それらの低温耐性を測定した(図 21)。*nhr-88* 変異体と *nhr-114* 変異体と精子に異常をもつ *gsp-4* 変異体は 20°C 飼育後に 2°C に置かれた後いずれも野生株より高い生存率を示した。それに対し、*gsp-4; nhr-88* 二重変異体と *gsp-4; nhr-114* 二重変異体はどちらも *gsp-4* 変異体と同程度の異常を示した(図 21)。*nhr* 変異は *gsp-4* 変異によって抑制されたことから、*gsp-4* 変異は、遺伝学的に、*nhr-88* 変異と *nhr-114* 変異の下流に位置すると考えられる。さらに、定量的 PCR 解析から、精子で発現している *gsp-4* 遺伝子の発現レベルが *nhr-88* 変異体と *nhr-114* 変異体の両方で変化していた(図 22)。これらの結果から、精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 である GSP-4 は、腸で発現するステロイドホルモン受容体 NHR-88 と NHR-114 の下流で機能していると考えられる。次に、ASJ 温度受容ニューロンの温度受容情報伝達に関わる GCY をコードする *odr-1* 遺伝子の変異と、*nhr-88* 遺伝子や *nhr-114* 遺伝子の変異を用いて二重変異体を作製し、それらの低温耐性を測

定した(図 23, 24)。ASJ 温度受容ニューロンの温度情報伝達経路に異常をもつ *odr-1* 変異体は、20°C飼育後に野生株よりもやや高い生存率を示した(図 24) (Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。しかし、今回行った *nhr-88; odr-1* 二重変異体の実験では、通常の 2°Cに 48 時間静置する条件では *odr-1* 変異体の大半が死滅してしまい、野生型と比べて大きな異常は見られなかったため、2°Cに 12 時間静置する条件で解析を行った。その結果、*nhr-88; odr-1* 二重変異体は *nhr-88* 変異体と同程度の低温耐性異常を示した(図 23)。*nhr-114; odr-1* 二重変異体は通常の 2°Cで 48 時間置かれた後、*nhr-114* 変異体と同様の低温耐性異常を示した(図 24)。それぞれの二重変異体が *nhr* 遺伝子の変異体と同様の低温耐性異常を示したことから、遺伝学的に腸で発現する NHR-88 と NHR-114 は ASJ 温度受容ニューロンの温度情報伝達経路で機能する GCY である ODR-1 の下流で機能すると考えられる(図 23, 24)。これらの結果から、低温耐性において腸で発現するステロイドホルモン受容体 NHR-88 と NHR-114 は、ステロイドホルモンを介して温度受容ニューロン ASJ から何らかのシグナルを受け取ることが示唆された。これまでの研究から、ASJ 温度受容ニューロンから腸への温度情報伝達はインスリンを介して行われることが明らかとなっている(図 2)(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。そこで、腸のインスリン受容体 DAF-2 と、二つのステロイドホルモン受容体 NHR-88 や NHR-114 との遺伝学的関係を調べるために、*daf-2* 遺伝子と *nhr-88* 遺伝子や *nhr-114* 遺伝子の変異を用いて二重変異体を作製し、その低温耐性を測定した(図 25, 26)。*daf-2* 変異体とそれぞれの *nhr* 変異体は、20°C飼育後に 2°Cに置かれた後野生株よりも高い生存率を示した。一方、*nhr-88; daf-2* 二重変異体と *daf-2; nhr-114* 二重変異体はそれぞれの単独の変異体よりも高い

生存率を示した(図 25, 26)。 *nhr-88; daf-2* と *daf-2; nhr-114* の両方の二重変異体で低温耐性の異常が増強することから、インスリン受容体 DAF-2 とそれぞれの核内受容体受容体 NHR は、別経路で低温耐性に影響を与えていることが示唆された。

精子変異体の脂質組成

線虫 *C. elegans* を含む多くの生物において、体を構成する様々な脂肪酸の比率は低温耐性に大きく影響することが報告されている(Murray *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 2014)。これまでの研究で、腸で低温耐性を制御することが明らかとなっているインスリン受容体 DAF-2 の機能を欠損する *daf-2* 変異体において、個体を構成する脂肪酸の比率が変化することが報告されている(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。そこで、低温耐性に関与することが示唆された精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 に異常をもつ *gsp-4* 変異体においても脂肪酸の脂質割合を測定した。野生株と *gsp-4* 変異体の総脂質を比較した結果、16:1n-7 や 18:1n-9 など 11 種類の脂肪酸で有意な差を示した(図 27)。しかし、SFA (飽和脂肪酸)、MUFA (単不飽和脂肪酸)、PUFA (多価不飽和脂肪酸) に大別した場合有意差は見られなかった。これまでの研究では、どのような脂肪酸が低温耐性に重要であるかまだ分かっていないため、個々の脂肪酸と低温耐性との関連性を同定するためには、各々の代謝経路の変異体の低温耐性を解析する必要があると考えられる。

考察

低温耐性に精子の MSP が関与する

精子形成や機能の変異体や、精子に異常をもつ *gsp-4* 変異体と野生株の雄との掛け合わせによる精子導入実験から、精子が低温耐性に影響を与えることが示唆された(図 5, 6)。さらに、精子遺伝子の変異体と RNAi によるノックダウン個体の低温耐性の解析から、精子の MSP が低温耐性に関与することが示唆された(図 7, 8)。MSP は精子特異的な非アクチン性の細胞骨格因子で、精子運動を行う仮足の細胞骨格として機能する(Italiano *et al.*, 1996; Kelleher *et al.*, 2000; Smith, 2006)。MSP は精子形成の初期から検出され、一次性細胞期から二次性細胞期はゴルジ体由来の小胞である MO 上に集合して結晶様の繊維体 FB を形成し MO 由来の膜構造に覆われることで FB-MO と呼ばれる精子特異的細胞小器官となる。精子細胞が残余小体から出芽する時、FB-MO は SPE-15 によって精子細胞に輸送され、その後 FB が脱重合して MSP は細胞質へと放出され、仮足の細胞骨格として再重合する。仮足の細胞骨格である MSP は仮足先端部で重合、仮足基部で脱重合して伸縮し、精子の運動を制御する(図 28)(Smith, 2006)。低温耐性に影響を与えることが示唆された SPE-39 と SPE-15 は FB-MO の形成と輸送に関与することから、MSP の正常な機能が低温耐性に影響を与える可能性が考えられる(Kelleher *et al.*, 2000; Zhu and L'Hernault, 2003)。また、仮足を形成する MSP の脱重合は精子特異的プロテインホスファターゼ GSP-3 と GSP-4 によって制御される(図 28) (Wu *et al.*, 2012)。この精子特異的プロテインホスファターゼ GSP-3 と GSP-4 はホ乳類の精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 γ のオルソログであり、ホ乳類においては精子の鞭毛による運動性

と成熟を制御する(Varmuza *et al.*, 1999)。精子特異的プロテインホスファターゼが線虫と哺乳類で同様の役割をすることと、過去に行われた研究でヒトと線虫の間で共通するメカニズムが多く見つかっていることから、ヒトの温度適応にも精子が関与する共通のメカニズムが存在することを期待している。また、MSP は精子運動を制御する仮足の細胞骨格以外に、精子から分泌されることで情報伝達物質として機能することが報告されている(Kosinski *et al.*, 2005)。MSP による情報伝達は精子細胞や成熟精子から分泌され、卵細胞で減数分裂の成熟や生殖腺鞘細胞で卵細胞を貯精嚢へ排卵を促進する。遺伝学的解析や定量的 PCR 解析、カルシウムイメージングを用いた解析などから、低温耐性は精子を含む複数の組織が相互作用して制御していることが示唆されている(図 9-16)。*C. elegans* の精子は貯精嚢に存在し、神経系と距離があるため物理的に直接のコンタクトを持つことはできない。そのため、MSP のような分泌ホルモンによって周辺組織と情報伝達をする可能性が考えられる。これまでの解析から、ステロイドホルモン合成に関わる遺伝子の変異が低温耐性に影響を与えることが報告されており(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)、貯精嚢を越えた情報伝達を行うことから、精子と他の組織の情報伝達にはステロイドホルモンが関与している可能性が考えられる。

今回の研究で、精子が低温耐性に関与することが示唆された。そこで、精子に物理的な損傷を与えたことによる低温耐性の影響についても検証を行った。精子に物理的な損傷を与える方法として、精子に対するレーザー照射による細胞破壊を行った(図 29)。実験には精子特異的に蛍光を発現する野生型の遺伝子導入系統を使い、25 M の NaH₃ で麻酔した上で蛍光をターゲットにレーザー照

射を行った。精子の損傷は蛍光の減少を観察することで確認した(図 29)。レーザー照射後に 20°C で飼育してから 2°C で 48 時間の低温刺激を与え場合、麻酔のみのモック処理を行ったコントロール個体は約 15% の生存率を示したのに対し、精子にレーザー照射を行った個体では約 42% の生存率を示した(図 29)。つまり、レーザー照射による精子の物理的な損傷が、20°C 飼育後の低温耐性における生存率を上昇させることを示唆した。しかし、線虫 *C. elegans* は約 300 個の精子を形成するので、レーザー照射で全ての精子に損傷を与えることは難しかった(図 29)。さらに、レーザーは精子特異的に発現させた蛍光に焦点を合わせて行ったが、精子の存在している貯精囊の周辺組織にも損傷を与えた可能性があり、それらの損傷が低温耐性に影響を与えた可能性も考えられた。

低温耐性に精子の関与が示唆されたことから、精子形成の前後で低温耐性が変化する可能性が考えられた。そこで、精子形成が行われる L4 幼虫期より前の L3 幼虫期の低温耐性についても測定した(図 30)。15°C 飼育後と 20°C 飼育後の野生株の L3 幼虫に 2°C 48 時間の低温刺激を与えた結果、15°C 飼育後の L3 幼虫の生存率は成虫より低下することが観察された(図 30)。しかしながら、L3 幼虫から成虫へは脱皮を経て体構造が大きく変化するため、精子形成以外の影響も大きいと考えられる。また、成虫と L3 幼虫では体のサイズも大きく違うことから、環境温度による影響を L3 幼虫の方が大きく受ける可能性が考えられた。これらのことから、L3 幼虫期の低温耐性は精子以外にも低温耐性に影響を与える要素が大きく、精子形成の前後で低温耐性がどのように変化するかについては明らかにできなかった。

多くの生物、特に線虫のような寿命が短く子孫を多く残すような生活様式の

生物は個体の生存よりも生殖に非常に多くのエネルギーを配分する。しかし、ストレス環境下において、生殖能力の減少と連動して生存能力が上昇する報告が存在する。例として、通常の飼育条件より餌の量を減らした個体は、寿命が延長し生殖能力が減少する(Thondamal *et al.*, 2014)。L1 幼虫期に飢餓を経験した個体の子・孫世代は生殖能力と個体サイズが減少し高温などに対するストレス耐性が上昇する(Jobson *et al.*, 2015)。そこで、精子遺伝子の変異体で生じる生殖能力の減少が低温耐性に影響を与えるかどうかを確認するために、野生型と精子遺伝子の変異体が産む受精卵、未受精卵の数を測定するプロジェニーカウントを行った(図 31)。*C. elegans* の雌雄同体の精子は L4 幼虫期に作られ、そのほぼ全てが受精するので、受精卵の総数を正常な精子の数として考えることができる。プロジェニーカウントの結果、野生株の受精卵が約 300 個に対し、*spe-6* 変異体以外の精子変異体で受精卵数は減少した。しかし、20°C 飼育後に 2°C に 48 時間置かれたときの生存率と、総産卵数および受精卵数に相関関係は見られなかった。具体的な例では、20°C 飼育後に 2°C に置かれた *gsp-4* 変異体は約 70% の生存率を示したのに対し、産卵数は約 200 個でほとんどが受精卵であった。一方、低温耐性に異常を示さなかった *spe-4* 変異体の産卵数は約 20 個で、ほぼ未受精卵であった(図 31)。同様に、産卵数が少なくても低温耐性が正常な変異体が複数あったことから、精子の異常による産卵数の減少と低温耐性異常に直接的な関係はないと考えられた。今回の研究では生殖能力と低温耐性に関連性は見られなかったが、前述のように生殖能力の低下でストレス耐性が上昇する報告は、本来生殖に使われるエネルギーのリソースが個体の生存に配分されることで生じる現象だと考えられる。精子遺伝子の変異により精子形成に異

常が生じれば、その後の成長は精子異常の影響を受けるのでエネルギーリソースを個体の生存のために配分する可能性を考えられ、低温ストレスへの応答にもなんらかの影響を与える可能性が考えられる。しかし、精子形成が完了している *gsp-4* 変異体の雌雄同体の成虫に野生型の雄を交尾させて精子を導入することで低温耐性がある程度回復した(図 6)ことから、精子形成の異常よりも精子機能の方が大きく低温耐性に影響を与える可能性が示唆された。

低温耐性では腸から精子へ情報が伝達される

これまでの研究から、温度受容ニューロン ASJ から腸へインスリン経路を介して温度情報が伝達されることが分かっている(図 2) (Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。インスリン経路はダワー幼虫形成にも関与することが知られており、ダワー幼虫では性成熟が停止することから、インスリン経路によって精子が影響を受けることが示唆されている(Hu, 2007)。また、DNA マイクロアレイの比較解析の結果も、多くの精子遺伝子の発現がインスリン経路によって影響を受けることを示唆した(図 3)。遺伝学的解析と定量的 PCR 解析から、腸のインスリン経路の下流で精子が低温耐性に影響を与えることが示唆された(図 9, 10, 11)。また、定量的 PCR 解析では、インスリン受容体 *daf-2* 変異体において精子の *gsp-4* 遺伝子と *gsp-3* 遺伝子の mRNA 発現量が増加した (図 10, 11)。しかし、低温耐性テストに用いた *daf-2* 遺伝子や *gsp-3* 遺伝子、*gsp-4* 遺伝子の変異体はいずれも機能減少型の変異で、低温刺激後の生存率が上昇した。このことから、*daf-2* 変異体で *gsp-3* 遺伝子と *gsp-4* 遺伝子の発現が増加しても低温耐性で生存率が上昇するということは一見矛盾するようにも見られるが、*daf-2* 変異体が引

き起こす異常を何らかの形で相殺するために発現が増加している可能性が考えられる。このような遺伝子の欠損によって生じる異常を相殺するための発現増加は他の分子経路においても見られることがある(Sergina *et al.*, 2007)。

精子が感覚ニューロンに与える影響

遺伝学的解析、定量的 PCR 解析、カルシウムイメージングを用いた解析により、精子から温度受容ニューロン ASJ へのフィードバックが存在することが示唆された(図 12-16)。線虫 *C. elegans* において、生殖能力は環境情報を受容した神経回路によってコントロールされることは報告されていた(McKnight *et al.*, 2014)が、温度適応において生殖能力の異常が神経系に影響を与えるという報告は初めてのケースであった。フィードバックシステムは、自身の状態を反映して環境に適切に適応するための生体メカニズムであるため、温度適応以外でも精子の状態が他の環境応答に影響を与える可能性が考えられた。精子特異的プロテインホスファターゼ PP1 をコードする *gsp-4* の変異体の嗅覚応答の解析から、精子の GSP-4 の異常が ASJ 温度受容ニューロンだけでなく AWA 嗅覚ニューロンと AWC 嗅覚ニューロンによって制御される嗅覚応答にも影響を与える可能性が示唆された(図 17)。今回の嗅覚応答実験で見られた *gsp-4* 変異体のジアセチルとイソアミルアルコールに対して誘引されなくなるという化学走性の異常にも何らかの意味があると考えられる。線虫 *C. elegans* の雌雄同体は、精子を L4 幼虫期にのみ作るので野生型は約 300 個と数が決まっているが、成虫で卵細胞を作り続けている。また、*gsp-4* 変異体はプロジェニーカウントから受精卵数、つまり精子が減少していることが分かった(図 31)。つまり、*gsp-4* 変異体

は正常な個体より精子が少なく、野生株と同程度の卵細胞を生産すると卵細胞が余っている状態の成虫といえる。ならば、繁殖のために精子の獲得、つまり雄との交配を積極的に行えるような行動変化を起こし、化学走性に変化が生じた可能性が考えられる。

また、本研究では低温耐性において精子が ASJ 温度受容ニューロンの神経活動に影響を与えることと、遺伝学的に腸の下流で機能することも示唆された(図 9-11)。そこで、インスリン受容体に異常をもつ *daf-2* 変異体の ASJ 温度受容ニューロンの神経活動をカルシウムイメージングで測定した(図 32)。精子の *gsp-4* 変異体と同様に 300 秒かけて 17°C から 23°C の温度変化を与えた結果、*daf-2* 変異体の ASJ 温度受容ニューロンの神経活動は野生株よりも低い応答性を示した(図 32)。応答性が低下した理由として、腸のインスリン経路が精子に影響を与えたことで精子から神経へのフィードバックにより神経活動が変化した場合と、インスリン経路からフィードバックが行われた場合、あるいはその両方が神経に影響を与えた可能性が考えられる。しかし、今回の研究では *daf-2* 変異体で ASJ 温度受容ニューロンの温度適応が低下した理由は特定に至らなかった。

結語

温度適応の組織ネットワークにおける精子と神経間のフィードバックシステム

温度は生体反応に直接影響を及ぼすため、動物は環境温度の変化に対する適応のために、多数の組織による統合的な温度適応メカニズムを有していると考えられる。今回の研究では、線虫 *C. elegans* の低温耐性において、精子が低温

耐性に影響を与えることと、精子特異的プロテインホスファターゼ GSP-4 の異常が ASJ 温度受容ニューロンの神経活動に影響を与えることが明らかとなった (図 5-8, 16)。これまでの研究と、今回の遺伝学的解析や生理学的解析から得られた知見を組み合わせることで、低温耐性において、以下に記述するようなフィードバックシステムを含む組織ネットワークモデルが考えられた。ASJ 温度受容ニューロンが環境温度を受容し、インスリンとステロイドホルモンを介して腸に情報が伝達され、腸が精子に影響を与え、その後、精子が ASJ 温度受容ニューロンの温度情報伝達に影響を与える (図 33)。 *C. elegans* の精子は貯精嚢に存在し、頭部の ASJ 温度受容ニューロンと物理的に距離があるため、お互いに物理的に直接のコンタクトを持つことはできないと考えられる。一方で、今回低温耐性に関わることが見つかった MSP は、卵細胞の成熟と排卵に関わる筋肉運動の制御に関して、分泌性のシグナル分子として働き、卵細胞や排卵管の筋肉に直接作用することが報告されている (Kosinski *et al.*, 2005)。これらのことから、MSP による分泌性のシグナルが神経系へのフィードバックに関わっている可能性も挙げられる。また、精子から ASJ 温度受容ニューロンへのフィードバックには、精子が他の組織を介して、間接的に ASJ 温度受容ニューロンの神経活動を調節する可能性も考えられる。いずれに関しても、物理的に距離の離れた組織間の情報伝達が必要であることから、精子から神経系へのフィードバック制御には、分泌性の情報伝達因子が介在している可能性が考えられる。そこで、情報伝達にステロイドホルモンが関与しているのではないかと考えたが、情報伝達因子の同定には至らなかった。

低温耐性において精子から神経へのフィードバックが示されるのは初めての

ケースである。ここで考えられた組織ネットワークモデルは、精子の状態が神経にフィードバックすることで、環境に対する繁殖行動を最適化するメカニズムではないかと考えられる。基本的な生理的かつ分子生物学的メカニズムの多くは線虫 *C. elegans* からヒトを含む高等動物に至るまで保存されているため、高等動物においても同様の機構が存在する可能性が期待される。本研究から見つかった温度適応に関する組織ネットワークとフィードバック機構をモデルに解析を進めることで、動物の温度適応メカニズムや、温度が関わる疾患の解析に利用できる可能性が考えられる(図 33)。

材料と方法

・使用した *C. elegans* 系統

wild-type N2 Bristol, BA17 *fem-1(hc17)*, CB4108 *fog-2(q71)*, FX01505 *gsp-3(tm1505)*, FX05415 *gsp-4(tm5415)*, *gsp-4(y418)*, SS712 *ife-1(bn127)*, RB2191 *msd-4(ok2971)*, BA819 *spe-11(hc77)*, DR1572 *daf-2(e1368)*, IK038 *daf-2(e1370)*, NL335 *gpa-3(pk35)*, CX2336 *odr-1(n1936)*, VC1290 *nhr-125(gk578)*, FX00886 *nhr-19(tm886)*, MH1955 *nhr-25(ku217)*, FX01033 *nhr-88(tm1033)*, VC1759 *nhr-95(gk836)*, FX016661 *nhr-121(tm6661)*, VC1554 *nhr-155(ok2026)*, FX01819 *nhr-156(tm1819)*, VC2567 *nhr-209(gk1135)*, RB1407 *nhr-60(ok1600)*, RB1425 *nhr-60(ok1622)*, FX02174 *nhr-65(tm2174)*, VC1760 *nhr-114(gk849)*, VC1565 *nhr-116(gk728)*, VC1591 *nhr-116(gk746)*, FX01185 *nhr-205(tm1185)*, VC2761 *nhr-243(gk1213)*, VC1095 *nhr-62(gk478)*, RB1592 *nhr-64(ok1957)*, RB1578 *nhr-69(ok1926)*, VC1140 *nhr-132(gk523)*, FX01698 *nhr-136(tm1698)*, FX00699 *nhr-152(tm699)*, VC1364 *nhr-206(gk603)*, VC1751 *nhr-246(gk856)*, JK3231 *puf-8(q725)*, SL754 *spe-39(eb9)/nT1[unc-(n754) let-?]*, SL753 *spe-39(tx12)/nT1[unc-(n754) let-?]*, *spe-6(hc163)*, BA714 *sDf5/spe-4(hc78)*, BA763 *spe-5(hc93)*; *sDp2*, VC2253 *spe-17(ok2631)*, BA744 *spe-10(hc104)*, BA6 *fer-6(hc6)*, BA15 *fer-15(hc15)*, BA840 *spe-26(hc139)*, SL3 *spe-15(hc75)*, BA1 *fer-1(hc1)*, BA785 *spe-8(hc40)*, BA783 *spe-12(hc76)*, BA963 *spe-27(it132)*, BA962 *spe-29(it127)*, PS4330 *spe-41(sy693)*; *him-5(e1490)*, BA708 *spe-9(hc52)*, AD271 *spe-38(eb44)*; *him-5(e1490)*; *asEx78[spe-38p::spe-38(cDNA)::spe-38 3'UTR + myo-3p::GFP]*, BA14 *fer-14(hc14)*,

SL1138 *spe-42(tn1231)/ nT1[unc-?(n754) let-? qIs50], EG4883*

oxIs318[*spe-11p::mCherry::histone + unc-119(+); unc-119(ed3)*].

unc-?(n754) と *let-?* は表現型が確定しているが未同定の変異

• 使用したプラスミド

pPD95.75

pPD49.26

pBluescript II SK+

pSND01 [*spe-11p::gsp-4cDNA*]

nhr-88(anterior half)-GFP

nhr-114(full)-GFP

• 作製した系統

gsp-4(tm5415); daf-2(e1368)

gsp-4(tm5415); gpa-3(pk35)

gsp-4(tm5415); odr-1(n1936)

gsp-4(tm5415); nhr-88(tm1033)

gsp-4(tm5415); nhr-114(gk849)

nhr-88(tm1033); odr-1(n1936)

nhr-114(gk849); odr-1(n1936)

nhr-88(tm1033); daf-2(e1368)

daf-2(e1368); nhr-114(gk849)

gsp-4(tm5415); Ex[rx-1p::yc3.60]

gsp-4(tm5415); Ex[spe-11p::gsp-4cDNA, trx-1p::yc3.60]

N2; Ex[nhr-88(anterior half)-GFP, trx-1p::dsRed, ges-1p::tagRFP(30ng/μl), pRF4 rol-6(gf)]

N2; Ex[nhr-114(full)-GFP, trx-1p::dsRed, ges-1p::tagRFP(30ng/μl), pRF4 rol-6(gf)]

- 使用した大腸菌

OP-50 株 : 線虫の餌として NGM プレートに塗布した。

- 使用した顕微鏡

透過式実体顕微鏡 (Leica: MZ16)

Olympus IX81 顕微鏡

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

- 使用した培地

- (1) Nematode Growth Medium (NGM) Plate (1000 ml)

3 g の NaCl、20 g の agar(伊那寒天)、2.5 g の Bacto Peptone(BD Falcon)、975 ml の H₂O を三角フラスコなど耐熱容器に入れ攪拌子で混合し、40 分オートクレーブで加熱滅菌した。その後攪拌しながら約 50 °C に冷ましてから 1 ml の MgSO₄ (1 M)、1 ml の CaCl₂ (1 M)、1 ml の Cholesterol (5 mg/ml in EtOH)、25 ml の Potassium Phosphate (1 M, pH 6.0)を加えた。

これを直径 6 cm のシャーレに 14 ml、あるいは 3.5 cm のシャーレに 6 ml ずつ自動分注機で分注して固めた。

(2) ODR Plate (1000 ml)

20 g の Difco Bacto Agar、1000 ml の H₂O を三角フラスコなど耐熱容器に入れ攪拌子で混合し、40 分オートクレーブで加熱滅菌した。その後攪拌しながら約 50 °C に冷ましてから 1 ml の MgSO₄ (1 M)、1 ml の CaCl₂ (1 M)、25 ml の Potassium Phosphate (1 M, pH 6.0) を加えた。これを直径 9 cm のシャーレに 12 ml ずつ自動分注機で分注して固めた。

・使用したプライマー

(1) 多重変異体を作製する際に用いた特定の変異を検出するためのプライマー

プライマーの名前 KHR220_gpa-3_new_fwd_primer

DNA の配列情報 GCAGAGGACAAAGAACTGAC

プライマーの名前 KHR221_gpa-3_new_rev_primer

DNA の配列情報 TACAAACCGCATCCTTGC

プライマーの名前 KHR155_gpa3(pk35)_internal_fwd

DNA の配列情報 TGGTTCATCAATACTTCAATGAT

プライマーの名前 KHR132_gsp-4tm5415_fwd1

DNA の配列情報 AGCAGGCAGGATTTTATGC

プライマーの名前 KHR133_gsp-4tm5415_rev1

DNA の配列情報 TGGCAAACGGAAAAACGC

プライマーの名前 KHR134_gsp-4tm5415_int_fwd2

DNA の配列情報 TACTGTCCGTGGATGTCTCC

プライマーの名前 KHR137_odr-1n1936_RsaI_fwd

DNA の配列情報 TCCTACGCTATCAACGCAG

プライマーの名前 KHR138_odr-1n1936_RsaI_rev

DNA の配列情報

TCCGATTTTTTTTTTTGTCTAAAACCTTTCATTTTGAAGTA

プライマーの名前 KHR011_daf2e1368_AclI_fwd

DNA の配列情報 TAAAGAAGACCGAGTCCGC

プライマーの名前 KHR012_daf2e1368_AclI_rev

DNA の配列情報

TTGAACATGTTCCGGAATTTACGACGTATTGAGGCAACGT

プライマーの名前 KHR320_nhr-114gk849_fwd1

DNA の配列情報 ACCTTGGGTTCCGGAATATC

プライマーの名前 KHR321_nhr-114gk849_rev1

DNA の配列情報 GAACCAGTCTCTCTCGTGCC

プライマーの名前 KHR322_nhr-114gk849_int_fwd2

DNA の配列情報 AAGTGACGAAGGAGCAAGCACC

プライマーの名前 KHR431_nhr-88_tm1033_int_fwd4

DNA の配列情報 TGAGCCAAATCCTAAGCCTACGC

プライマーの名前 KHR432_nhr-88_tm1033_fwd2

DNA の配列情報 CTCCTTCGACGGTTTATACCTATGG

プライマーの名前 KHR433_nhr-88_tm1033_rev2

DNA の配列情報 GAAGCTCCCTTCAAGTTTACCTAGG

(2) 特定遺伝子の発現領域に GFP マーカーを発現させるためのプライマー

nhr-114 の 3'UTR 領域 1 kbp

プライマーの名前 KHR316_*nhr-114*_1K_fwd

DNA の配列情報 TCGTAGAATTCCTGCTCACAAATTGTGAAGTG

プライマーの名前 KHR317_*nhr-114*_1K_rev

DNA の配列情報 CGAAAGGGCCCGAATCCTAAAATTGGCCTG

nhr-114 の上流 4 kbp を含む 6.6 kbp の PCR フラグメント

プライマーの名前 KHR318_4K+*nhr-114*_fwd

DNA の配列情報

ATGCCTGCAGGTCGACCAGATAAATCAAGTGATTTC

プライマーの名前 KHR319_4K+*nhr-114*_rev

DNA の配列情報 CCGGGGATCCTCAATTTGTGAGCAACAACGCTCG

nhr-88 の 3'UTR 領域 1 kbp

プライマーの名前 KHR364_*nhr-88*_UTR_EcoRI_fwd primer

DNA の配列情報

AGCATTCGTAGAATTCTCATCGTTTTTTTTGTTGTTGTG

プライマーの名前 KHR365_nhr-88_UTR_SpeI_rev primer

DNA の配列情報 CGTACGGCCGACTAGTACAAGAGAAACGGGG

nhr-88 の上流 4 kbp を含む 6.7 kbp フラグメント

プライマーの名前 KHR414_nhr88a_Inf_fwd

DNA の配列情報

ATAAGCTTGCATGCCTGCAGGTTTCCAGGTTCCAACGCCC)

プライマーの名前 KHR415_nhr88a_Inf_rev

DNA の配列情報

TTTGGCCAATCCCGGGGATCCTACGCGTTTCAGTGTCCGAAAGGG

(3) カルシウムイメージングに用いる精子特異的 *gsp-4* レスキュー系統の作製

のためのプライマー

spe-11 のプロモーター領域を含む 294 bp フラグメント

プライマーの名前 KHR848_spe-11promoter_SbfI_fwd

DNA の配列情報 CCCCCCTGCAGGGTCGACAGAACATTTTTCCG

プライマーの名前 KHR849_spe-11promoter_XmaI_rev

DNA の配列情報 TCCCCCGGGTTTATCTAGTCGGTTTGCG

gsp-4 の cDNA 領域を含む 936 bp フラグメント

プライマーの名前 KHR852_ *gsp-4*cDNA_XmaI_fwd2

DNA の配列情報 TCCCCCGGGATGACAGCGACAATCGATGTCG

プライマーの名前 KHR853_ *gsp-4*cDNA_KpnI_rev2

DNA の配列情報 GGGGTACCCTATCCTTTACGAAGAGACTTCGG

(4) 定量的 PCR 解析に用いる特定遺伝子検出用プライマー

gpa-3 検出用プライマー

プライマーの名前 KHR634_ *gpa-3*_fwd_RT-PCR

DNA の配列情報 GCCAATCTGCAGAGGACAAA

プライマーの名前 KHR635_ *gpa-3*_rev_RT-PCR

DNA の配列情報 GCAGTAAATCCGTGATCGTGA

gsp-4 検出用プライマー

プライマーの名前 KHR638_ *gsp-4*_fwd_RT-PCR

DNA の配列情報 GCAACCGTCGTTACAAGTCG

プライマーの名前 KHR639_ *gsp-4*_rev_RT-PCR

DNA の配列情報 GTTTGGAGGTGTGGGGAGAG

odr-1 検出用プライマー

プライマーの名前 KHR724_odr-1_fwd2_Q-PCR

DNA の配列情報 GCGAAGACCCCTACCATTTA

プライマーの名前 KHR725_odr-1_rev3_Q-PCR

DNA の配列情報 CGCTGGCAACATTTTCATTTA

KHR724 と KHR725 は論文より引用(Juang *et al.*, 2013)。

・ PCR solution とサーマルサイクラーの温度プログラム

(1) 研究室で精製した r taq ポリメラーゼを用いた PCR

1 μ l の 10 \times r taq buffer、0.6 μ l の MgCl₂ (25 mM)、0.5 μ l の dNTPs (2.5 mM)、目的の遺伝子を検出するためのプライマーを各 10 μ M で 0.5 μ l ずつ、0.25 μ l の r taq、5.65 μ l の dH₂O を 200 μ l チューブでよく混合し、テンプレートとなる DNA を 1 μ l 加えた。目的の遺伝子が重複転移をしているか確認を行う場合はフォワードプライマーとリバースプライマーの量が等しくなるように 0.5 μ l、0.25 μ l、0.25 μ l とした。サーマルサイクラーの温度プログラムは、まず 94 $^{\circ}$ C を 2 分、その後 94 $^{\circ}$ C を 15 秒、58 $^{\circ}$ C を 30 秒、72 $^{\circ}$ C を 1 分までを 1 サイクルとし 42 回繰り返す、15 $^{\circ}$ C で保存した。

(2) Ex taq を用いた PCR

1 μl の 10 \times Ex taq buffer、0.5 μl の dNTPs (2.5 mM)、目的の遺伝子を検出するためのフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 μM で 0.5 μl ずつ、0.1 μl の Ex taq、6.4 μl の dH₂O を 200 μl チューブでよく混合し、テンプレートとなる DNA を 1 μl 加えた。サーマルサイクラーの温度プログラムは、まず 94 $^{\circ}\text{C}$ を 2 分、その後 94 $^{\circ}\text{C}$ を 15 秒、58 $^{\circ}\text{C}$ を 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ を 1 分までを 1 サイクルとし 42 回繰り返し、15 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

(3) KOD-plus-Neo を用いた PCR

1 μl の 10 \times KOD-plus-Neo buffer、0.1 μl の dNTPs (2 mM)、目的の遺伝子を検出するためのフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 μM で 0.3 μl ずつ、0.2 μl の KOD-plus-Neo、6.2 μl の dH₂O を 200 μl チューブでよく混合し、テンプレートとなる DNA を 1 μl 加えた。サーマルサイクラーの温度プログラムは、まず 94 $^{\circ}\text{C}$ を 2 分、その後 98 $^{\circ}\text{C}$ を 10 秒、62 $^{\circ}\text{C}$ を 30 秒、68 $^{\circ}\text{C}$ を 30 秒までを 1 サイクルとし 42 回繰り返し、15 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

(4) LA taq PCR

1 μl の 10 \times LA buffer、0.8 μl の dNTPs (2.5 mM)、0.7 μl の MgCl₂ (25 mM) 目的の遺伝子を検出するためのフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 μM で 0.5 μl ずつ、0.2 μl の LA taq、5.9 μl の dH₂O を 200 μl チューブでよく混合し、テンプレートとなる DNA を 1 μl 加えた。サーマルサ

イクラの温度プログラムは、まず 94 °C を 1 分、その後 94 °C を 30 秒、60 °C を 30 秒、72 °C を 1 分までを 1 サイクルとし 42 回繰り返す、さらに 72 °C で 20 分置いた後 15°C で保存した。

・ 制限酵素(RE)処理

使用する制限酵素に適した 1 µl の NEB buffer または Cut Smart、0.2 µl の制限酵素、3.8 µl の dH₂O を 200 µl チューブでよく混合し、5 µl の PCR 産物を加えた。その後 37 °C で 12 時間以上静置した。

・ 統計解析

図中の全ての誤差は標準誤差(SEM)を示す。精子に異常をもつ *gsp-4* 変異体と野生株の雄との掛け合わせによる精子導入実験(図 6)と色素レーザー照射による細胞破壊実験(図 29)以外の図中の全ての統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。交尾による精子の疑似回復実験と色素レーザーによる細胞破壊実験はフィッシャーの直接確率検定を行った。図中のシングルアスタリスク(*)とダブルアスタリスク(**)はそれぞれ *p* 値が 0.05 未満と 0.01 未満を示す。それぞれの実験に用いた検定は過去の論文を参考に行った(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。

・ GFP による *nhr* 遺伝子の発現解析

nhr-114 の 3'UTR 領域 1 kbp は野生株 N2 のゲノムから KHR316 と KHR317 プライマーで増幅された。*nhr-114* の 3'UTR 領域 1 kbp の PCR フラグメントは EcoRI と BanII のサイトを使い pPD95.75 に挿入した。*nhr-114* の上流 4 kbp を含む 6.6 kbp の PCR フラグメントは野生株 N2 のゲノムから KHR318 と KHR319 プライマーで増幅した。*nhr-114* のプロモーターを含む 6.6 kbp と遺伝子領域は SbfI と BamHI サイトを使い 3'UTR 領域 1 kbp を挿入した pPD95.75 に挿入した。

nhr-88 の 3'UTR 領域 1 kbp は野生株 N2 のゲノムから KHR364 と KHR365 プライマーで増幅した。*nhr-88* の 3'UTR 領域 1 kbp の PCR フラグメントは InFusion(Clontech)法により、EcoRI と BanII で切断された pPD95.75 に挿入した。*nhr-88* の上流 4 kbp を含む 6.7 kbp フラグメントと *nhr-88* 遺伝子の第 3 インtron までの部分領域は野生株 N2 のゲノムから KHR414 と KHR415 プライマーで増幅した。*nhr-88* プロモーターを含む 6.7 kbp フラグメントは InFusion(Clontech)法により、SbfI と XmaI で切断され、*nhr-88* 3'UTR 領域 1 kbp を挿入した pPD95.75 に挿入された。

・ 低温耐性テスト

低温耐性テストには、卵を産み始めた頃の新鮮な成虫が 70~150 匹ほどのつたプレートを使った。

新鮮な雌雄同体の成虫 2 匹を、大腸菌 OP50 が塗布された線虫培養培地(NGM)

プレートにのせ、8-12 時間卵を産ませた後に取り除いた。生まれた子世代はそれぞれ 15°C で 144-150 時間、20°C で 85-90 時間、25°C では 60-65 時間飼育した。卵を産み始める頃の新鮮な子世代の成虫が十分いることを確認してから、氷上に 20 分、その後 2°C の冷蔵キャビネットに 48 時間静置した(CRB-41A Hitachi, Japan)。成長速度の異なる変異体を使う場合は、親に卵を産ませる時間をずらして、コントロールである野生株と同時に 2°C に静置した。*daf-2* 変異はダワー形成を引き起こすので、コントロールである野生株と一緒に卵から L4 幼虫まで 15°C で飼育し、一晩 12 時間以上 20°C もしくは 25°C で飼育してからコールドショックを行った。温度はデジタル温度計と水銀温度計の両方を用いて確認した。48 時間、一部実験では 12 時間 2°C に静置した後、プレートを 15°C に移し一晩インキュベートし、生存個体数と死亡個体数をカウントした。*nhr-88; odr-1* 二重変異体を解析した時期は *odr-1* 変異体の表現型が非常に低かった。これには湿度など何らかの条件が影響を与えている可能性が考えられた。そのため、この実験に関しては 2°C で 12 時間の条件でコールドショックを行った(Ujisawa *et al.*, 2014)。

・精子特異的に *gsp-4* 遺伝子を発現させるプラスミドの作成

精子特異的に発現させる *spe-11* プロモーター領域を含む 294 bp の PCR フラグメントは野生株 N2 のゲノムから KHR848 と KHR849 プライマーで増幅した。*spe-11* プロモーター領域 294 bp の PCR フラグメントは SbfI と KpnI のサイトを使い pPD49.26 に挿入した。*gsp-4* の cDNA 領域を含む 936 bp の PCR フラグ

メントは、野生株 N2 から採取された RNA を逆転写した cDNA から、KHR852 と KHR853 プライマーで増幅した。*gsp-4* の cDNA 領域 936 bp の PCR フラグメントは XmaI と KpnI のサイトを使い *spe-11* プロモーター領域 294 bp を挿入した pPD49.26 に挿入した。

・カルシウムイメージングによる細胞内カルシウム濃度の測定

カルシウムイメージングは過去に行われた実験を参考にして行った(Kuhara *et al.*, 2011; Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。実験には、温度受容ニューロンである ASJ 特異的に発現させるためのプロモーターの *trx-1p* に、カルシウムインディケーターであるイエローカメレオンをコードする配列を繋いだ組み替え遺伝子 (*trx-1p::yc3.60* (pTOM13)) を導入した個体を使った。カメレオンは、N 末に CFP、C 末に YFP をもち、中央にカルシウム結合サイトをもつキメラタンパクである。カメレオンは、細胞内カルシウム濃度が低いときは 440 nm の励起光を当てると、青色の蛍光を発するのに対し、細胞内カルシウム濃度が高いときは、440 nm の励起光をあてると、黄色の蛍光を発する。この黄色と青色の蛍光の比を取ることで細胞内カルシウム濃度の変化を定量化することができる。サンプルである ASJ 特異的にカメレオンを発現した個体は 2%(w/v)アガーパッドの上に接着剤(医療用アロンアルファ A, 東亜合成株式会社)を用いて固定し、M9 バッファーに浸してカバーガラスをかぶせた。この操作は 3 分以内に行った。サンプルは Olympus IX81 顕微鏡のステージに取り付けた温度制御装置(Tokai Hit, Japan)に設置し、2 分かけてサンプル温度を開始温度に合わせてから、温度刺

激を与えた際の蛍光をデュアルビュー (Molecular Devices, USA)で計測した。画像は 100 ミリ秒露光、1×1 ビニングで撮影し、アガーパッド上の温度は MATS-5500RA-KY (Tokai Hit)温度計で計測した。実験ごとに、蛍光強度は MetaMorph (Molecular Devices, USA)を使い測定された。

・ 遺伝子導入系統の作製

線虫の遺伝子導入系統 (transgenic animal) は、目的の DNA (PCR 断片またはプラスミドを最終濃度が 5-50 ng/ul) と遺伝子導入マーカーとなる DNA を含むインジェクション溶液を生殖腺に注入することで行われた(Mello *et al.*, 1991)。本研究では、遺伝子導入マーカー遺伝子として、*rol-6(gf)*もしくは *ges-1p::NLS::GFP* と *AIYp::GFP* を用い、pBluescript II SK+を加え、最終の全遺伝子濃度の合計を 100 ng/ul に調整した。インジェクション溶液はガラス針とインジェクターを用いて生殖腺に注入された。

・ DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の比較解析

DNA マイクロアレイ解析の基本的な方法は Sugi らの論文の記述に従った (Sugi *et al.*, 2011)。我々はまず以下の 3 つの条件で飼育した線虫から RNA を単離した。(1) 野生型 N2 株を 15°Cで飼育した成虫 (2) 野生型 N2 株を 15°Cで 5 日間飼育した後 25°Cに 12 時間おいた成虫 (3) *daf-2(e1370)*変異体を 15°Cで 5 日間飼育した後 25°Cに 12 時間おいた成虫。RNA 抽出は低温耐性テストと同じ

条件の線虫から、RNeasy Mini kit (Qiagen; 74104)を使い行った。線虫を飼育した NGM プレートから M9 バッファーを使い回収し、M9 を 2 回入れ替えて大腸菌や幼虫などを洗い流した。線虫を 650 μ l の RLT バッファー(RNeasy kit)で懸濁し、液体窒素で凍結した。その後、すり潰した溶液から RNA を抽出した。100 ng の総 RNA と Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent; 5190-2305)を使い、Cy3 標識された cRNA を増幅した。cRNA は 1.65 μ g ずつ gene expression hybridization kit (Agilent; 5188-5242)を使い *C. elegans* oligo DNA microarray (Ver2.0) (Agilent)とハイブリダイゼーションされた。スライドは 4×44 列スライドの単色スキャン設定(スキャン領域 61×21.6 mm, 解像度 5 μ m, dye channel set to green PMT 100%)が使われた Agilent SureScan Microarray Scanner (G2600D)上で洗浄後すぐにスキャンした。そのデータは GeneSpring software を使い解析した。我々はサンプル採取からマイクロアレイ解析まで独立に 3 回試行した。

・ 定量的 PCR 解析による mRNA 発現量の比較

定量的 PCR 解析には、野生株、*gsp-4*、*nhr-88*、*nhr-114* 変異体をそれぞれ 15°C、20°C、25°Cで飼育した個体から採取した RNA を使った。また、*daf-2* 変異体の 20°Cと 25°Cは 15°Cで 5 日間飼育してから目的の温度に移動させ、一晚インキュベートしたものから RNA を採取した。RNA の採取には RNeasy Mini kit (Qiagen; 74104)を使用した。採取された総 RNA(100 或いは 500 ng)は Bio-Rad 製の RT-PCR 用 iScript Advanced cDNA Synthesis kit を使うことで

cDNA に逆転写した。実験には、目的の遺伝子用のプライマー、Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)、DNA Engine Peltier Thermal Cycler- CFX96 (Bio-Rad)を使用した。1 回の実験に各サンプルの同一希釈溶液を 3 つずつ測定した(triplicate)。各遺伝子の発現のノーマリゼーションはハウスキーピング遺伝子である *tba-1*(α -tubulin)を使い平均化した。

・ RNA 干渉法を用いた遺伝子ノックダウン

本研究で行われた RNAi 解析では、Dr. Ahringer によって確立された *C. elegans* の RNA ライブラリーを Source BioScience から購入し、使用した (Fraser *et al.*, 2000)。我々は Kamath らの論文を参考に、RNAi フィーディング法で実験を行った(Kamath *et al.*, 2001)。実験には特に神経系における RNAi 感受性株として *eri-1; lin-15B* 株を使用した (Kennedy *et al.*, 2004; Timmons and Fire, 1998)。また、低温耐性のポジティブコントロールとして、異常を示すことが報告されている *akt-1* 遺伝子の RNAi ノックダウン個体を使用した (Murray *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 2014)。*akt-1* 遺伝子はインスリン経路で機能する AKT キナーゼをコードしている。

・ 共焦点顕微鏡解析を用いた蛍光の観察

スライドガラス上に作成した 2% (w/v)アガロースパッドに 10 μ l の 100 mM の NaN_3 を滴下し、数匹の成虫を乗せカバーガラスをかぶせた。蛍光画像は共

焦点レーザー顕微鏡(FV1000-IX81 with GaAsP PMT, Olympus)と FV10-ASW software (Olympus)を使って解析した。

・揮発性誘引物質に対する化学走性テスト

揮発性におい物質に対する化学走性実験は過去の論文を参考に行った (Bargmann *et al.*, 1993)。実験には、低温耐性と同一条件で野生株、*gsp-4*、*nhr-88*、*nhr-114* 変異体をそれぞれ 20°C で飼育した個体を使用した。各系統の成虫を M9 バッファーで回収、M9 で 2 回洗浄し大腸菌を洗い流してから、9 cm の ODR プレート中央にのせた。ODR プレートには 1 μ l の NaN_3 と 4 μ l のジアセチルまたはイソアミルアルコールを滴下し、対角線上にはコントロールとして NaN_3 とエタノールを滴下した。1 時間インキュベート後にクロロホルムを使い線虫を死滅させ、滴下点から 1.5cm 範囲に誘引された個体をカウントした。匂い物質に誘引された個体数からコントロールの誘因数を減算し、全体数で割ったものを Chemotaxis Index とした(図 17)。

・色素レーザー照射による細胞破壊実験

レーザーイルミネーション実験は過去の論文を参考に行った(Kuhara *et al.*, 2008; Mori and Ohshima, 1995)。実験には、精子で *mCherry::histone* を発現させた野生型系統である EG4883 株を用いた。色素レーザーは Micropoint system laser microbeam (Photonic Instruments, USA)装置で照射し、励起ガスには窒

素ガス、laser dye にはクマリン(Methanol < 1% BPBD 365 (6 mM))、レーザーユニットに GFP 励起フィルター(型式 2253 中心波長 480 / 半値幅 20 nm)を使用した。観察用の蛍光と色素レーザーはダイクロイックミラー(U-MRFPHQ 励起 : 535-555HQ 吸収 ; 570-625HQ ダイクロ : 565)で光路を合流させた。色素レーザー照射時は GFP 蛍光フィルター(R488-568 Em01-R488 / 568-25 405 nm 442 nm 488 nm 561 nm 568 nm)を用意し、シャッターで遮光できるようにした。スライドガラス上に作製した 5%アガロースパッドに 25 M の NaH₃ を 4 μ l 滴下し、sample 個体に麻酔をかけてカバーガラスをかぶせた。低倍率の対物レンズ ($\times 10$) で sample を視野の中心に置き、油浸した高倍率の対物レンズ ($\times 100$) で蛍光を指標にレーザーの狙いを定めた。観察用の蛍光路を遮蔽後、レーザー用の光路のシャッターを開き、レーザーを照射した。左右の生殖巣にそれぞれ 30 から 40 回レーザーを照射し、蛍光が減少していることで目的の細胞の損傷を確認してから、M9 buffer を滴下して sample 個体を回収、大腸菌を塗布した新しい NGM プレートに一匹ずつ移した。実験では L4 幼虫期にレーザー照射後 15°C で一晩おき、young adult 期に再度レーザー照射を行った後、20°C で 12 時間インキュベートしてから低温耐性テストを行った。低温耐性テスト後にも蛍光が減少していることを確認した。

・気体-液体クロマトグラフィーによる脂質組成の比較解析

脂質解析は過去の論文を参考に行った(Murray *et al.*, 2007; Ohta *et al.*, 2014)。野生株と *gsp-4* 変異体の成長速度を合わせて 15°C 飼育後 20°C に 24 時間インキ

ュベートし、脂質抽出を行いトランスメチル化した。脂肪酸メチルエステルは気体-液体クロマトグラフィーで解析、ピーク保持時間の比較で同定された。

・プロジェニーカウントによる生殖能力プロファイリング

NGM プレート上に 20°C で飼育した卵を産む前の成虫 1 匹ずつ置き、8 時間ごとに新しいプレートに移した。卵を産み始めてから約 48 時間で産んだ受精卵と未受精卵をそれぞれ数え、総産卵数、受精卵数、未受精率をプロファイリングした。

引用文献

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

Ashrafi, K., Chang, F.Y., Watts, J.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., and Ruvkun, G. (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* *421*, 268-272.

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

Barr, M.M. (2003). Super models. *Physiol Genomics* *13*, 15-24.

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

Chang, A.J., and Bargmann, C.I. (2008). Hypoxia and the HIF-1 transcriptional pathway reorganize a neuronal circuit for oxygen-dependent behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 7321-7326.

Cornils, A., Gloeck, M., Chen, Z., Zhang, Y., and Alcedo, J. (2011). Specific insulin-like peptides encode sensory information to regulate distinct developmental processes. *Development* *138*, 1183-1193.

Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M., and Ahringer, J. (2000). Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* *408*, 325-330.

Gracida, X., and Eckmann, C.R. (2013). Fertility and germline stem cell maintenance under different diets requires *nhr-114/HNF4* in *C. elegans*.

Curr Biol 23, 607-613.

Hedgecock, E.M., and Russell, R.L. (1975). Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 72, 4061-4065.

Hu, P.J. (2007). Dauer. WormBook, 1-19.

Italiano, J.E., Jr., Roberts, T.M., Stewart, M., and Fontana, C.A. (1996). Reconstitution in vitro of the motile apparatus from the amoeboid sperm of *Ascaris* shows that filament assembly and bundling move membranes. Cell 84, 105-114.

Jobson, M.A., Jordan, J.M., Sandrof, M.A., Hibshman, J.D., Lennox, A.L., and Baugh, L.R. (2015). Transgenerational Effects of Early Life Starvation on Growth, Reproduction, and Stress Resistance in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 201, 201-212.

Juang, B.T., Gu, C., Starnes, L., Palladino, F., Goga, A., Kennedy, S., and L'Etoile, N.D. (2013). Endogenous nuclear RNAi mediates behavioral adaptation to odor. Cell 154, 1010-1022.

Kamath, R.S., Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G., and Ahringer, J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Genome Biol 2, RESEARCH0002.

Kelleher, J.F., Mandell, M.A., Moulder, G., Hill, K.L., L'Hernault, S.W., Barstead, R., and Titus, M.A. (2000). Myosin VI is required for asymmetric segregation of cellular components during *C. elegans* spermatogenesis. Curr Biol 10, 1489-1496.

Kennedy, S., Wang, D., and Ruvkun, G. (2004). A conserved

siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* *427*, 645-649.

Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., and Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *277*, 942-946.

Kosinski, M., McDonald, K., Schwartz, J., Yamamoto, I., and Greenstein, D. (2005). *C. elegans* sperm bud vesicles to deliver a meiotic maturation signal to distant oocytes. *Development* *132*, 3357-3369.

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., 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.

L'Etoile, N.D., and Bargmann, C.I. (2000). Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron* *25*, 575-586.

L'Hernault, S.W. (2006). Spermatogenesis. *WormBook*, 1-14.

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

Lochrie, M.A., Mendel, J.E., Sternberg, P.W., and Simon, M.I. (1991). Homologous and unique G protein alpha subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cell Regul* *2*, 135-154.

McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T., and Schedl, T. (1999). On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* *205*, 111-128.

McKnight, K., Hoang, H.D., Prasain, J.K., Brown, N., Vibbert, J., Hollister, K.A., Moore, R., Ragains, J.R., Reese, J., and Miller, M.A. (2014). Neurosensory perception of environmental cues modulates sperm motility critical for fertilization. *Science* *344*, 754-757.

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.

Miller, M.A. (2001). A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation (vol 292, pg 2144, 2001). *Science* *292*, 639-639.

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.

Murray, P., Hayward, S.A., Govan, G.G., Gracey, A.Y., and Cossins, A.R. (2007). An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 5489-5494.

Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *301*, R1207-1228.

Ohta, A., and Kuhara, A. (2013). Molecular mechanism for trimeric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience research* *76*, 119-124.

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.

Sergina, N.V., Rausch, M., Wang, D., Blair, J., Hann, B., Shokat, K.M., and Moasser, M.M. (2007). Escape from HER-family tyrosine kinase inhibitor therapy by the kinase-inactive HER3. *Nature* *445*, 437-441.

Smith, H. (2006). Sperm motility and MSP. *WormBook*, 1-8.

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

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* *282*, 2012-2018.

Thondamal, M., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., and Aguilaniu, H. (2014). Steroid hormone signalling links reproduction to lifespan in dietary-restricted *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* *5*, 4879.

Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* *395*, 854.

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

Varmuza, S., Jurisicova, A., Okano, K., Hudson, J., Boekelheide, K., and Shipp, E.B. (1999). Spermiogenesis is impaired in mice bearing a targeted mutation in the protein phosphatase 1cgamma gene. *Dev Biol* *205*, 98-110.

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.

Wu, J.C., Go, A.C., Samson, M., Cintra, T., Mirsoian, S., Wu, T.F., Jow, M.M., Routman, E.J., and Chu, D.S. (2012). Sperm development and motility are regulated by PP1 phosphatases in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *190*, 143-157.

Zhu, G.D., and L'Hernault, S.W. (2003). The *Caenorhabditis elegans* *spe-39* gene is required for intracellular membrane reorganization during spermatogenesis. *Genetics* *165*, 145-157.

謝辞

本研究を行うに当たり、研究における熱心なご指導ご鞭撻を賜り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 博士に心より深くお礼申し上げます。

線虫の系統を提供して頂きました *Caenorhabditis Genetic Center (CGC)*、National Bioresource Project (Japan)三谷 昌平 先生、摂南大学 西村仁 先生、San Francisco State University Diana S. Chu 先生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特にご協力頂きました甲南大学 自然科学研究科 博士課程 宇治澤知代氏と修士課程 圓尾綾菜氏に心より厚くお礼申し上げます。

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心より厚くお礼申し上げます。

常日頃議論に加わり、有用なご助言を下さいました甲南大学理工学部生体調節学研究室の大学院生並びに四回生の皆様方に深く感謝致します。

最後になりましたが、大学4年間及び大学院5年間の計9年間、私の研究生活に反対することなく応援してくれた両親と家族に対して、改めて感謝申し上げます。

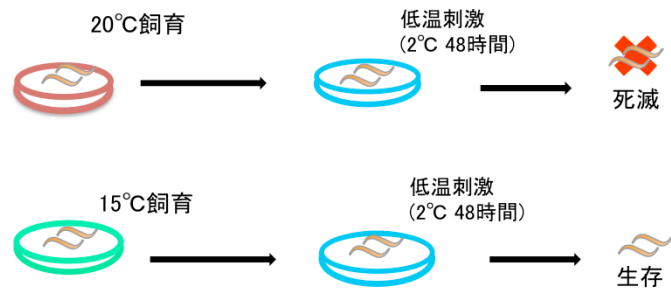


図1 線虫*C. elegans*の低温耐性

線虫*C. elegans*の成虫は、20°Cで飼育してから2°Cに48時間置くと大半の個体が死滅するのに対し、15°Cで飼育してから2°Cに48時間置いても大半の個体が生存する低温耐性という現象を示す (Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。また、低温刺激の温度と時間を変化させることで系統間の表現形の差を観察することができる。我々は変異体における生存率の変化を観察することで低温耐性のメカニズムを解析している。

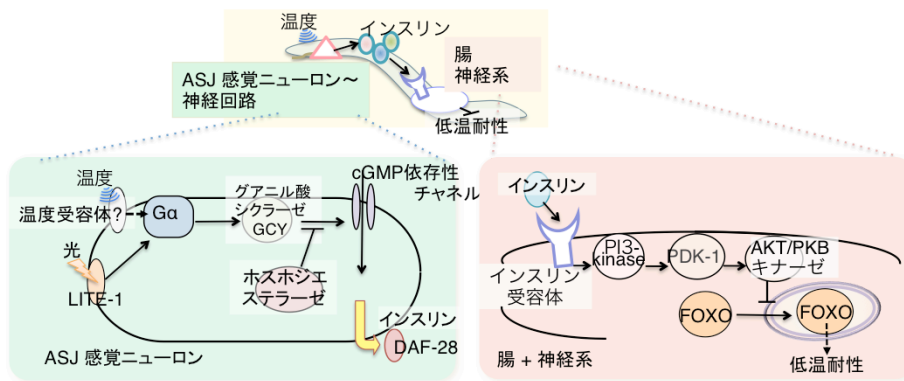


図2 低温耐性の制御機構

これまでの研究から、頭部のASJ感覚ニューロンと腸のインスリン経路が低温耐性を制御することが明らかとなっている。頭部のASJ感覚ニューロンでは、未同定のGタンパク質共役型受容体が温度を受容し、三量体Gタンパク質経路で温度情報が伝達され、インスリンがシナプス領域から分泌される。三量体Gタンパク質経路では、G α サブユニットのGPA-3と、グアニル酸シクラーゼのODR-1が関与することが分かっている。分泌されたインスリンは腸や神経系のインスリン受容体DAF-2で受容され、最終的に腸のFOXO型転写因子DAF-16が遺伝子発現を調節し、全身の低温耐性状態を維持または変化させると考えられている(Cornils *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2010; Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。

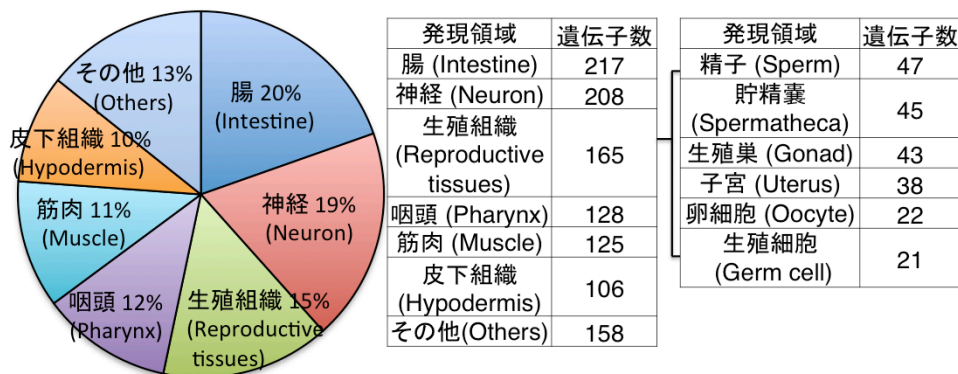


図3 インスリン経路で発現変動する遺伝子の発現領域

野生株とインスリン受容体 *daf-2* の変異体で温度変化に対して遺伝子発現に差があった約400個の遺伝子の主な発現領域をグラフ化した。野生株とインスリン受容体の変異体を15°C飼育後に12時間25°Cに置くという条件で抽出されたmRNAをDNAマイクロアレイ解析で比較解析し、発現に2倍以上の差がある遺伝子が約1500個同定された。それら約1500個の遺伝子のうち、*C. elegans* のゲノムデータベースである WormBase (<http://www.wormbase.org>) で解析済みであった遺伝子がグラフ化した約400個である。複数の領域で発現している遺伝子はそれぞれの発現領域にカウントしている。これらの温度変化で発現変動する遺伝子の発現領域は腸(20%)、神経(19%)、生殖組織(15%)で半分以上が占められている。腸と神経は低温耐性に関与することが報告されている組織である。また、生殖組織で発現する遺伝子はさらに詳細に分類した結果、精子で発現する遺伝子が47個で最も多く、その次に貯精囊で発現する遺伝子が多かった。

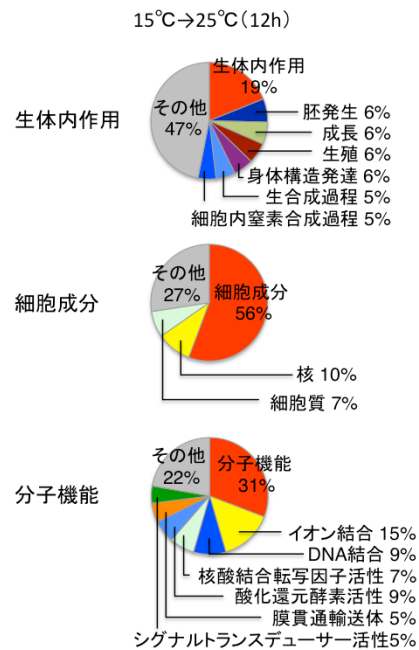


図4 DNAマイクロアレイ解析

野生株とインスリン受容体の変異体*daf-2*を15°Cで飼育してから25°Cに12時間置いた時の遺伝子を比較して発現量が2倍もしくは2分の1になった遺伝子($q < 0.05$)について生体内作用、細胞成分、分子機能で分類し円グラフ化した。これらのグラフから、細胞成分に関わる遺伝子の変化が多いことが観察された。

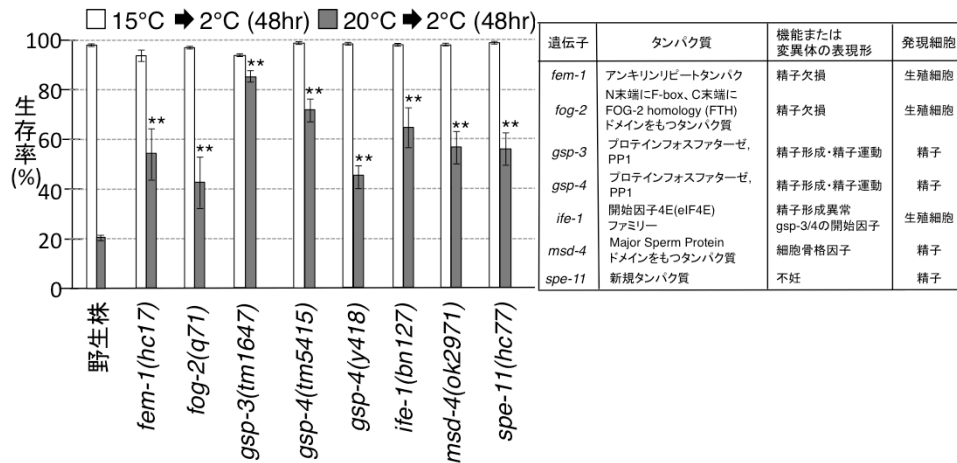


図5 精子変異体の低温耐性

15°Cと20°Cでそれぞれ飼育した精子に関わる遺伝子の変異体個体に2°C48時間の低温刺激を与えた時の生存率をグラフ化した。20°C飼育後に野生株よりも高い生存率を示す異常が複数の変異体で観察された。具体的には、20°C飼育後の野生株の生存率が約20%だったのに対し、*fem-1*変異体で約50%、*fog-2*変異体で約40%、*gsp-3*変異体で約85%、*gsp-4*変異体で約70%、*ife-1*変異体で約65%、*msd-4*変異体で約55%、*spe-11*変異体で約55%の生存率で有意な差を示した。このデータは9プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。**はp値が0.01未満であることを示す。右の表は各遺伝子のコードするタンパク質、機能あるいは変異体の表現形、発現細胞を示す。

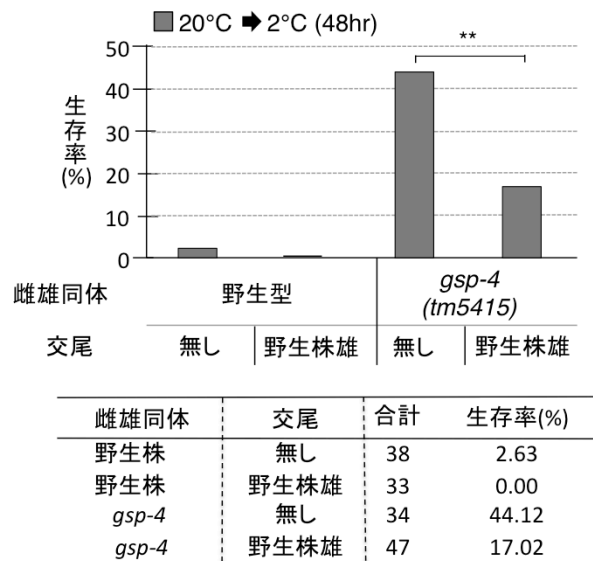


図6 精子に異常をもつ*gsp-4*変異体と野生株の雄との交尾による精子導入実験

20°Cで飼育した精子特異的プロテインフォスファターゼの変異体である*gsp-4*の雌雄同体に、野生型の雄を交尾させることで健康な精子を導入し、2°C48時間の低温刺激を与えたときの生存率を測定した。雄と交尾した雌雄同体は1:1の比率で雄を産むことから、低温刺激前に産ませた卵から生まれた個体の雄の比率で交尾の成否を確認した。コントロールである20°C飼育後の交尾させていない野生株は生存率が約3%、野生型の雄と交尾させた野生株の生存率は0%、交尾させていない精子変異体*gsp-4*の生存率は約44%を示した。それに対し、野生型の雄との交尾させた*gsp-4*変異体は約17%となり、低温耐性異常の部分的な回復を示した。統計解析はフィッシャーの直接確率検定で判定した。**は*p*値が0.01未満であることを示す。

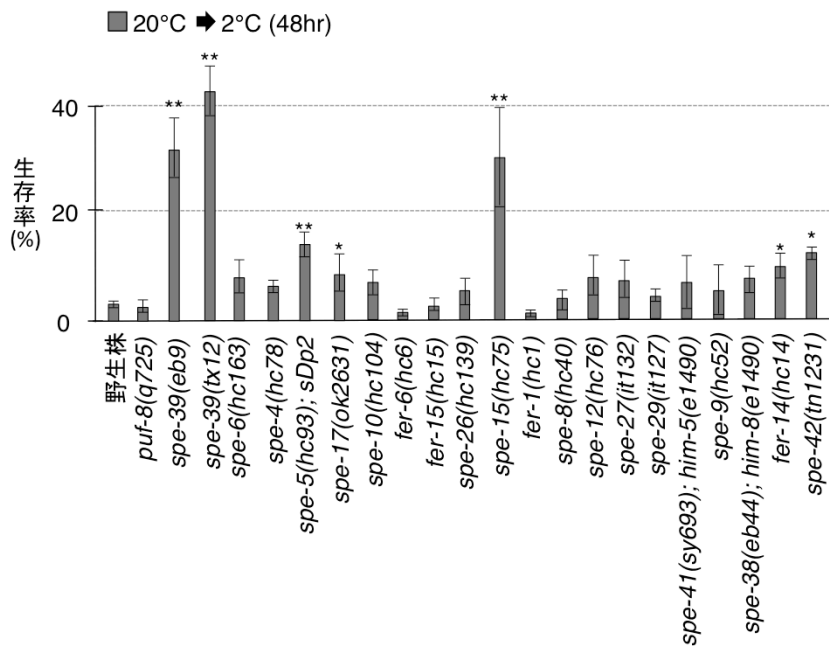


図7 精子遺伝子の変異体の低温耐性

20°Cで飼育した、機能の明らかとなっている精子の遺伝子の変異体22系統 (L'Hernault, 2006)に2°C48時間の低温刺激を与えたときの生存率を測定した。20°C飼育後に2°Cに48時間おいたときの生存率は野生型で約3%だったのに対し、*spe-15*変異体で約30%、*spe-39*変異体2系統で約32%と約43%と顕著な異常を示した。*spe-15*と*spe-39*は精子特異的細胞小器官FB-MOIに関与する遺伝子である。また、*spe-5*, *spe-17*, *fer-14*, *spe-42*の変異体でも若干の有意差が認められた。このデータは4プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。**は*p*値が0.01未満、*は*p*値が0.05未満であることを示す。

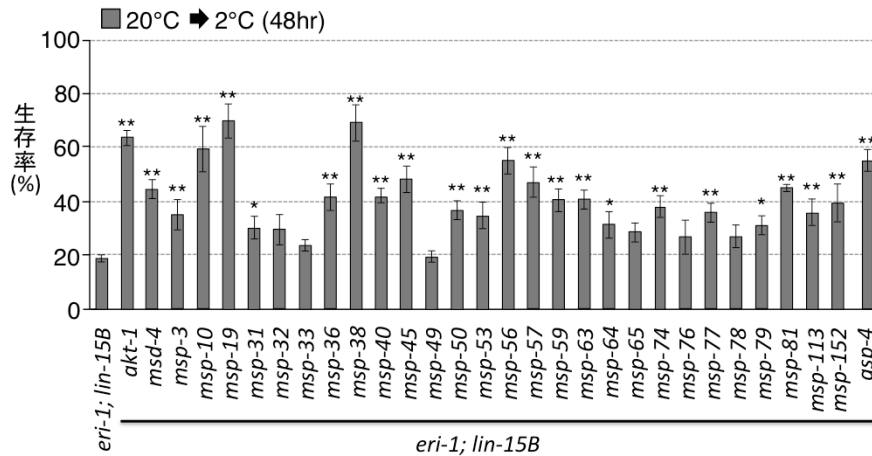


図8 MSPのRNAiノックダウン個体の低温耐性

飼育温度依存的に発現変動する*msh*遺伝子をRNAiフィーディング法でノックダウンした*eri-1; lin-15B*系統に2°C48時間の低温刺激を与えたときの生存率を測定した。ポジティブコントロールとして、インスリン経路で低温耐性に関与する*akt-1*遺伝子と、精子特異的のプロテインフォスファターゼPP1 *gsp-4*遺伝子をノックダウンした個体を用いた(Ohta, Ujisawa *et al.*, 2014)。20°C飼育後の生存率は、*eri-1; lin-15B*変異体で約23%、*akt-1*ノックダウン個体で約65%なのに対し、*msh-19*や*msh-38*ノックダウン個体で約70%など21種類の*msh*遺伝子のノックダウン個体で生存率が上昇する異常が観察された。このデータは5プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。**は*p*値が0.01未満、*は*p*値が0.05未満であることを示す。

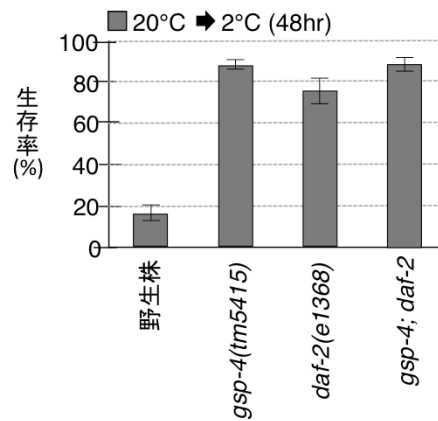


図9 精子遺伝子と腸の遺伝子の二重変異体の解析

20°Cで飼育した精子特異的プロテインフォスファターゼをコードする*gsp-4*遺伝子とインスリン受容体をコードする*daf-2*遺伝子の二重変異体に、2°C48時間の低温刺激を与えたときの生存率を測定した。野生株の生存率は約17%だったのに対し、精子の*gsp-4*変異体は約86%、腸の*daf-2*変異体は約76%と高い生存率を示した。そして、*gsp-4;daf-2*二重変異体の生存率は約88%とそれぞれの単独変異体と同程度の異常を示し、有意差は示さなかった。このデータは5プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。

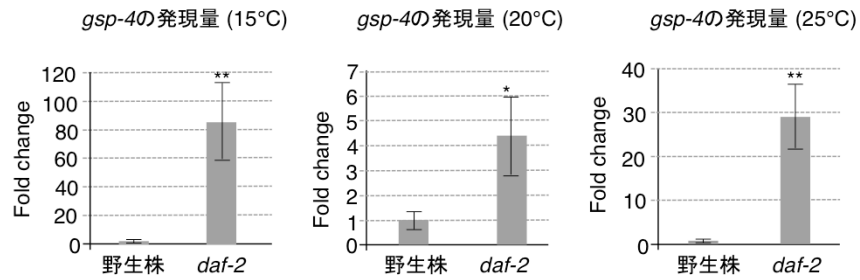


図10 インスリン受容体*daf-2*変異体における*gsp-4*の発現量

15°C、20°C、25°Cで飼育した野生株とインスリン受容体*daf-2*変異体における精子特異的プロテインフォスファターゼ*gsp-4*のmRNAの発現量を定量的PCRで測定した。その結果、インスリン受容体*daf-2*の変異体においていずれの飼育温度でも*gsp-4*の発現レベルが上昇していることが明らかとなった。このデータは3回以上の結果から解析した。** は*p*値が0.01未満、* は*p*値が0.05未満であることを示す。

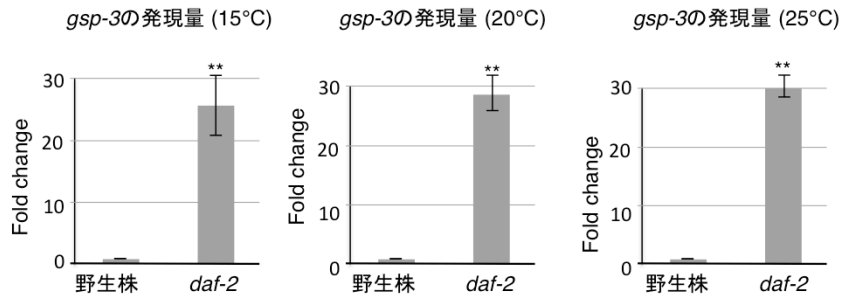


図11 インスリン受容体*daf-2*変異体における*gsp-3*の発現量

15°C、20°C、25°Cで飼育した野生株とインスリン受容体*daf-2*変異体における精子特異的プロテインフォスファターゼ*gsp-3*のmRNAの発現量を定量的PCRで測定した。その結果、インスリン受容体*daf-2*の変異体においていずれの飼育温度でも*gsp-3*の発現レベルが上昇していることが明らかとなった。このデータは3回の結果から解析した。** は*p*値が0.01未満、* は*p*値が0.05未満であることを示す。

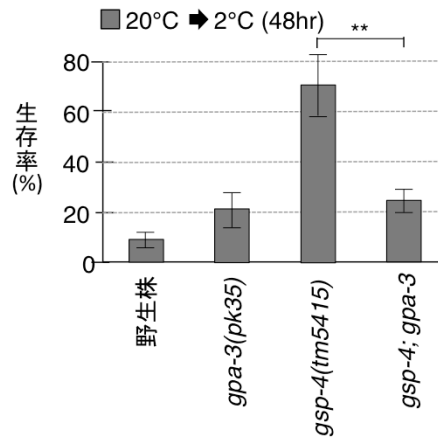


図12 精子遺伝子とASJ温度受容ニューロンの遺伝子の二重変異体の解析

20°Cで飼育した精子特異的プロテインフォスファターゼをコードする*gsp-4*遺伝子とASJ温度受容ニューロンのGタンパク質の α サブユニットをコードする*gpa-3*遺伝子の二重変異体に、2°C48時間の低温刺激を与えたときの生存率を測定した。野生株の生存率は約9%だったのに対し、ASJ温度受容ニューロンの*gpa-3*変異体は約21%と野生株よりもやや高い生存率を示した。精子の*gsp-4*変異体は約71%と高い生存率を示した。そして、これらの遺伝子の二重変異体の生存率は約24%と、予想外なことに精子の*gsp-4*変異体の異常が抑制され、*gpa-3*変異体と同程度の生存率を示した。このデータは5プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** は*p*値が0.01未満であることを示す。

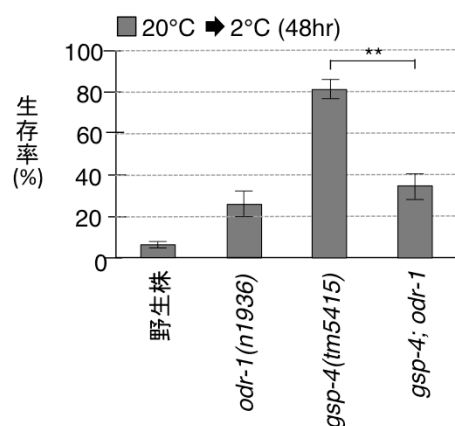


図13 精子遺伝子とASJ温度受容ニューロンの遺伝子の二重変異体の解析(2)

20°Cで飼育した精子特異的プロテインフォスファターゼをコードする*gsp-4*遺伝子とASJ温度受容ニューロンのGCYをコードする*odr-1*遺伝子の二重変異体に、2°C48時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。野生株の生存率は約6%だったのに対し、ASJ温度受容ニューロンの*odr-1*変異体は約26%と野生株よりもやや高い生存率を示した。精子の*gsp-4*変異体は約81%と高い生存率を示した。そして、これらの遺伝子の二重変異体の生存率は約34%と、予想外なことに精子の*gsp-4*変異体の異常が抑制され、*gpa-3*変異体と同程度の生存率を示した。このデータは6プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** は*p*値が0.01未満であることを示す。

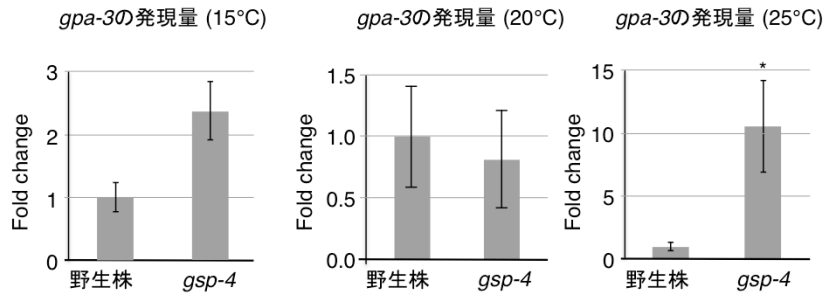


図14 精子特異的プロテインフォスファターゼPP1*gsp-4*変異体における*gpa-3*の発現量

15°C、20°C、25°Cで飼育した野生株と精子の*gsp-4*変異体におけるの三量体Gタンパク質の α サブユニットGPA-3のmRNAの発現量を定量的PCRで測定した。その結果、25°Cで飼育した*gsp-4*変異体で発現の上昇が観察された。このデータは3回以上の結果から解析した。*は*p*値が0.05未満であることを示す。

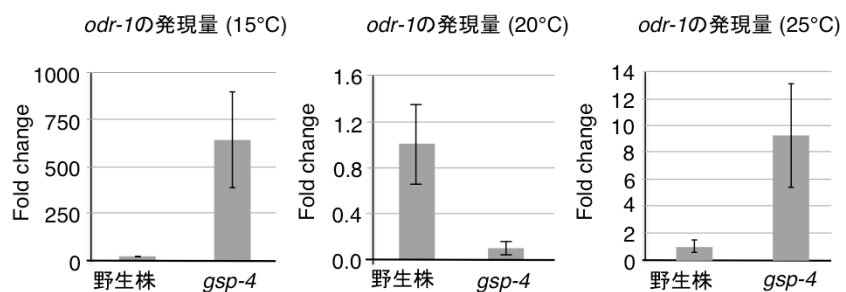


図15 精子特異的プロテインフォスファターゼPP1 *gsp-4*変異体における*odr-1*の発現量

15°C、20°C、25°Cで飼育した野生株と精子の*gsp-4*変異体におけるのグアニル酸シクラーゼODR-1のmRNAの発現量を定量的PCRで測定した。発現量の変化は見られたが、誤差が大きく有意差は見られなかった。このデータは3回以上の結果から解析した。

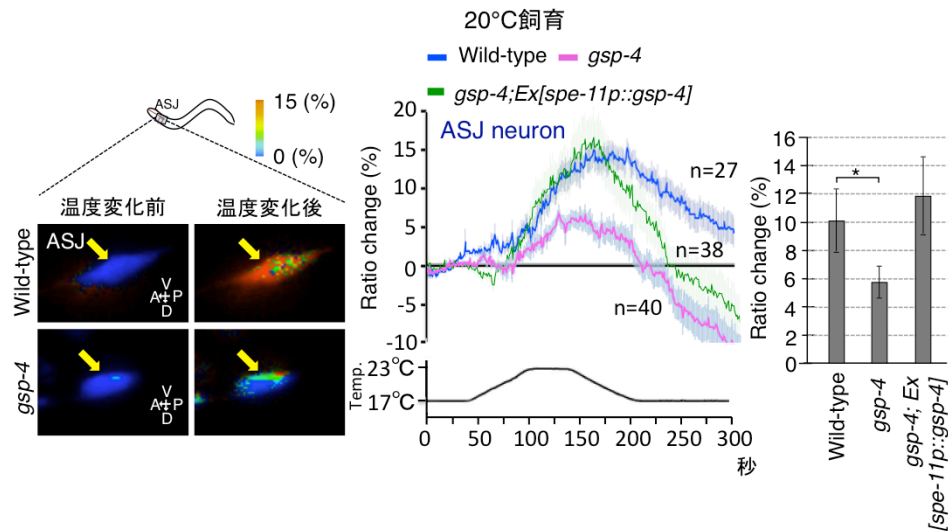


図16 精子変異体の温度受容ニューロンASJの神経活動

カルシウムインディケータであるカメレオンを*trx-1*プロモーターを用いてASJ温度受容ニューロン特異的に発現させた系統に300秒かけて17°Cから23°Cの温度刺激を与えた時の神経活動を測定した。ASJ温度受容ニューロン特異的にカメレオンを発現させた野生型系統に温度刺激を与えた結果、細胞内カルシウム濃度が約15%変化した。それに対し、精子特異的プロテインフォスファターゼPP1 GSP-4に異常をもつ*gsp-4*変異体では、野生型系統と同じ温度刺激を与えてもカルシウム濃度が約5%しか変化せず、ASJ温度受容ニューロンの応答性の低下が観察された。さらに、*gsp-4*変異体に*spe-11*プロモーターを用いて精子特異的に*gsp-4*を回復した系統では、この温度に対する応答性が回復していた。左は野生株と精子の*gsp-4*変異体のカルシウム濃度の変化に擬似的な色をつけた図。中央は時間あたりのカルシウム濃度の変化を示す。右は130秒から150秒の平均カルシウム濃度の変化量を棒グラフ化した。

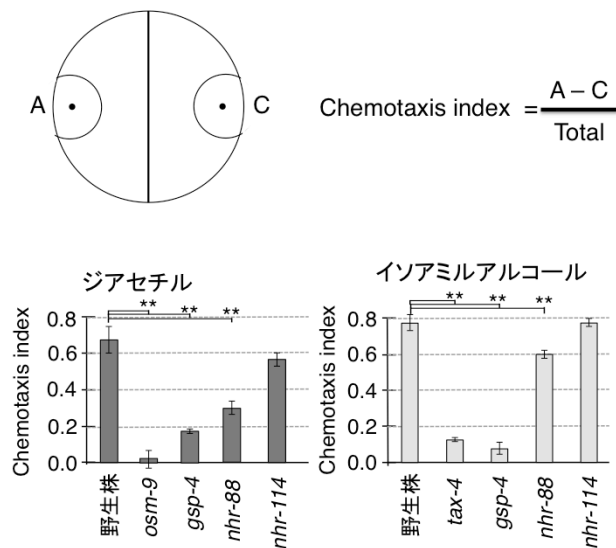


図17 匂い物質に対する化学走性

低温耐性に異常を示した*gsp*-変異体4, *nhr-88*変異体, *nhr-114*変異体のAWA嗅覚ニューロンで受容されるジアセチルと、AWC嗅覚ニューロンで受容されるイソアミルアルコールに対する化学走性を測定した(Bargmann *et al.*, 1993)。Chemotaxis Indexは1時間で匂い物質滴下点から1.5cmの範囲に移動した個体数(A)からコントロールであるエタノール滴下点から1.5cmの範囲に移動した個体数(C)を減算してプレート上の全個体数で除算した。最初に置いた位置から移動していない線虫は全個体数にはカウントしなかった。また、コントロールとしてジアセチルには*osm-9*変異体、イソアミルアルコールには*tax-4*変異体を用いた。その結果、野生型個体はジアセチル、イソアミルアルコール双方に強く誘引されたのに対し、*gsp-4*変異体はどちらに対しても誘因性が低下していた。また、*nhr-88*と*nhr-114*変異体のジアセチルとイソアミルアルコールに対する化学走性を測定した結果、*nhr-88*変異体で誘因性が低下する異常が観察された。このデータは4プレート分の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。**は*p*値が0.01未満であることを示す。

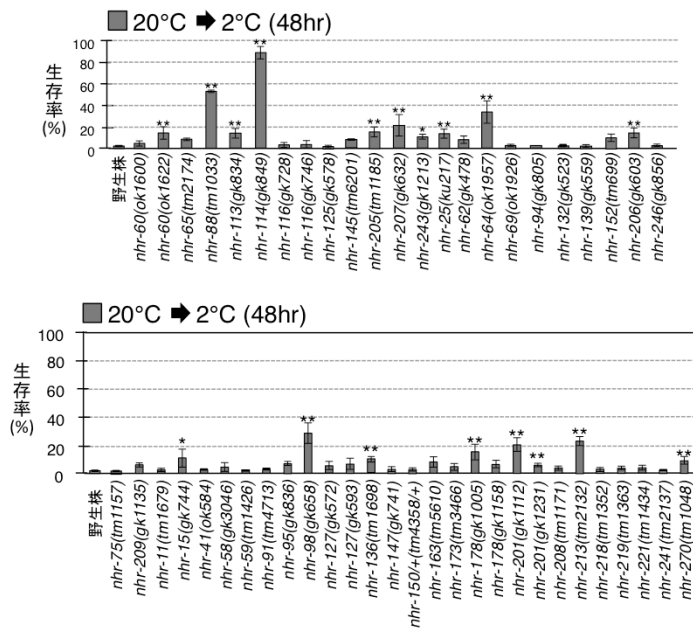


図18 ステロイドホルモン受容体NHRの低温耐性

DNAマイクロアレイ解析を用いて、25°Cの温度刺激を与えた際に発現変動する遺伝子を野生株とインスリン受容体*daf-2*の変異体で比較することでリスト化し、その変異体に2°C48時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。20°Cで飼育した野生株の生存率は約3%だったのに対し、*nhr-88*変異体では約53%、*nhr-114*変異体では約88%と顕著な異常が観察された。また、それら以外にもいくつかの遺伝子の変異体で有意差が見られた。このデータは9プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** は*p*値が0.01未満、* は*p*値が0.05未満であることを示す。

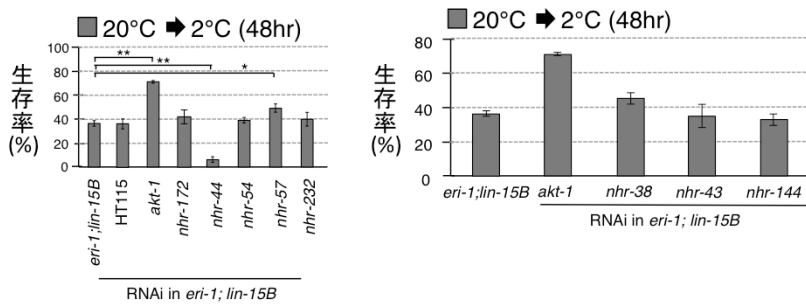


図19 ステロイドホルモン受容体NHRの低温耐性(3)

DNAマイクロアレイ解析を用いて、25°Cの温度刺激を与えた際に発現変動する遺伝子を野生株とインスリン受容体*daf-2*の変異体で比較することでリスト化し、その遺伝子をRNAiフィーディング法でノックダウンした*eri-1; lin-15B*系統に2°C48時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。ポジティブコントロールとして、インスリン経路で機能する*akt-1*遺伝子をノックダウンした個体を用いた。20°C飼育後の生存率は、コントロールである*eri-1; lin-15B*変異体で約38%であるのに対し、*nhr-44*ノックダウン個体で約6%、*nhr-57*ノックダウン個体で約49%と有意差が見られたが、精子の*gsp-4*や腸の*daf-2*などの変異体で見られるような顕著に生存率が上昇する結果は見られなかった。このデータは5プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。**は*p*値が0.01未満、*は*p*値が0.05未満であることを示す。

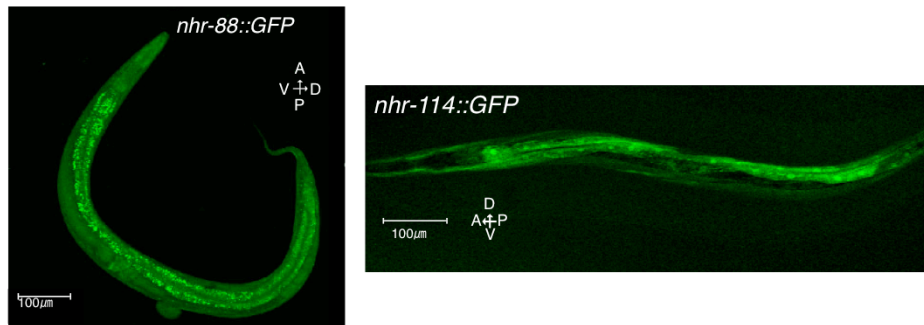


図20 *nhr-88*と*nhr-114*の発現領域

*nhr-88*と*nhr-114*の遺伝子に緑色蛍光タンパク質GFPを繋いだ遺伝子を導入した野生株で蛍光を観察した。*nhr-114*は上流4 kbpおよび全配列の後にGFPを、*nhr-88*は上流4 kbpおよび第3イントロンまでの配列の後にGFP遺伝子をつなげたプラスミドを作製し、マーカーである*rol-6(gf)*とともに野生株にインジェクションを行った。どちらの遺伝子導入系統も腸で蛍光が観察されたことから、NHR-88とNHR-114は腸で発現していることが示唆された。

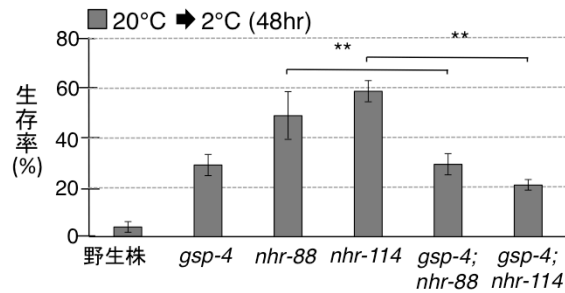


図21 精子遺伝子と*nhr*遺伝子の二重変異体の解析

20°Cで飼育した精子特異的プロテインフォスファターゼをコードする*gsp-4*遺伝子に対し、ステロイドホルモン受容体をコードする*nhr-88*と*nhr-114*それぞれの二重変異体を作製し、2°C48時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。20°C飼育した野生株の生存率は約4%だったのに対し、精子の*gsp-4*変異体では約29%、腸の*nhr-88*変異体では約49%、*nhr-114*変異体では約59%と野生株より高い生存率を示した。そして、*gsp-4; nhr-88*二重変異体では約30%、*gsp-4; nhr-114*二重変異体では約21%と、どちらも*nhr*変異の異常を*gsp-4*の変異が抑制した。このデータは12プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** は*p*値が0.01未満であることを示す。

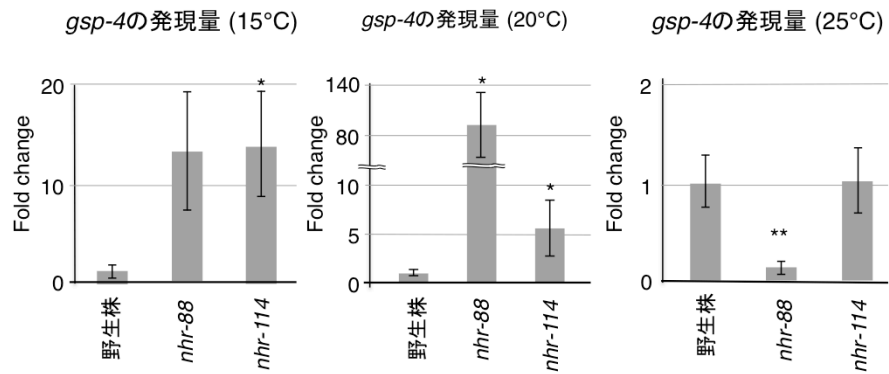


図22 *nhr*変異体における精子特異的プロテインフォスファターゼPP1*gsp-4*の発現量

15°C、20°C、25°Cで飼育した野生株と精子の*nhr-88*、*nhr-114*変異体におけるの精子の*gsp-4*のmRNAの発現量を定量的PCRで測定した。*nhr-88*変異体では20°C飼育時と25°C飼育時に、*nhr-114*変異体では15°C飼育時と20°C飼育時に発現量の変化が観察された。このデータは3回以上の結果から解析した。**は*p*値が0.01未満、*は*p*値が0.05未満であることを示す。

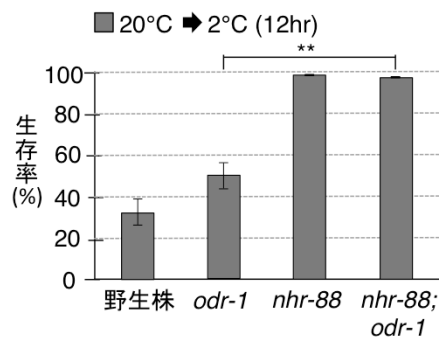


図23 温度受容ニューロンの遺伝子と*nhr-88*遺伝子の二重変異体の解析

20°Cで飼育したASJ温度受容ニューロンのグアニル酸シクラーゼをコードする*odr-1*と腸のステロイドホルモン受容体をコードする*nhr-88*の二重変異体に2°C12時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。今回行った*nhr-88; odr-1*二重変異体の実験では、通常の2°Cで48時間の低温刺激の条件で十分な差が見られなかったため、2°Cで12時間の条件で実験を行った。野生株の生存率は約33%だったのに対し、神経の*odr-1*変異体では約50%、腸の*nhr-88*変異体では約99%と野生株よりも高い生存率を示した。そして、*nhr-88; odr-1*二重変異体の生存率は約98%と、*nhr-88*変異体と同様の低温耐性異常を示した。このデータは8プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** は*p*値が0.01未満であることを示す。

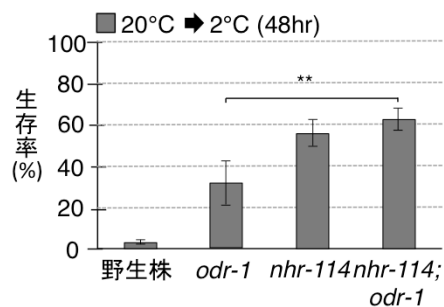


図24 温度受容ニューロンの遺伝子と*nhr-114*遺伝子の二重変異体の解析

20°Cで飼育したASJ温度受容ニューロンのグアニル酸シクラーゼをコードする*odr-1*と腸のステロイドホルモン受容体をコードする*nhr-114*の二重変異体に2°C12時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。20°Cで飼育した野生株の生存率は約3%だったのに対し、神経の*odr-1*変異体では約31%、腸の*nhr-114*変異体では約56%と野生株よりも高い生存率を示した。そして、*nhr-114; odr-1*二重変異体の生存率は約62%と、*nhr-114*変異体と同様の低温耐性異常を示した。このデータは8プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** は*p*値が0.01未満であることを示す。

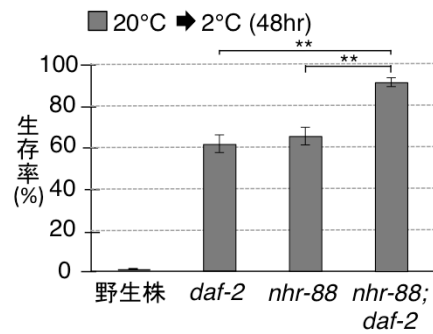


図25 腸の遺伝子*nhr-88*と*daf-2*の二重変異体の解析

20°Cで飼育したインスリン受容体をコードする*daf-2*と腸のステロイドホルモン受容体をコードする*nhr-88*の二重変異体に2°C12時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した20°C飼育した野生株の生存率は約1%だったのに対し、腸の*daf-2*変異体では約62%、腸の*nhr-88*変異体では約66%と野生株よりも高い生存率を示した。そして、*nhr-88; daf-2*二重変異体の生存率は約96%と、それぞれのシングルミュータントよりも高い生存率を示した。このデータは12プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** は*p*値が0.01未満であることを示す。

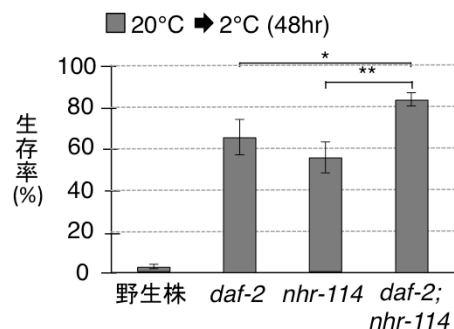


図26 腸の遺伝子*nhr-114*と*daf-2*の二重変異体の解析

20°Cで飼育したインスリン受容体をコードする*daf-2*と腸のステロイドホルモン受容体をコードする*nhr-114*の二重変異体に2°C12時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した20°C飼育した野生株の生存率は約3%だったのに対し、腸の*daf-2*変異体では約65%、腸の*nhr-114*変異体では約56%と野生株よりも高い生存率を示した。このデータは8プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。**は*p*値が0.01未満、*は*p*値が0.05未満であることを示す。

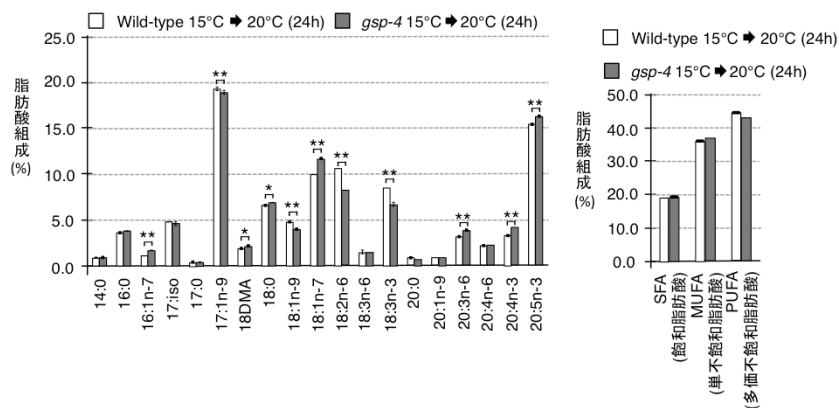


図27 野生型と精子変異体*gsp-4*との脂肪酸組成の比較解析

15°Cから20°Cに24時間温度変化させた野生株と精子特異的プロテインフォスファターゼPP1を欠損する*gsp-4*変異体の脂肪酸の脂質割合を測定した。野生株と*gsp-4*変異体の総脂質を比較した結果、16:1n-7や18:1n-9など11種類の脂肪酸で有意な差を示したが、SFA(飽和脂肪酸)、MUFA(単不飽和脂肪酸)、PUFA(多価不飽和脂肪酸)に大別した場合有意差は見られなかった。このデータは3回の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。** はp値が0.01未満、* はp値が0.05未満であることを示す。

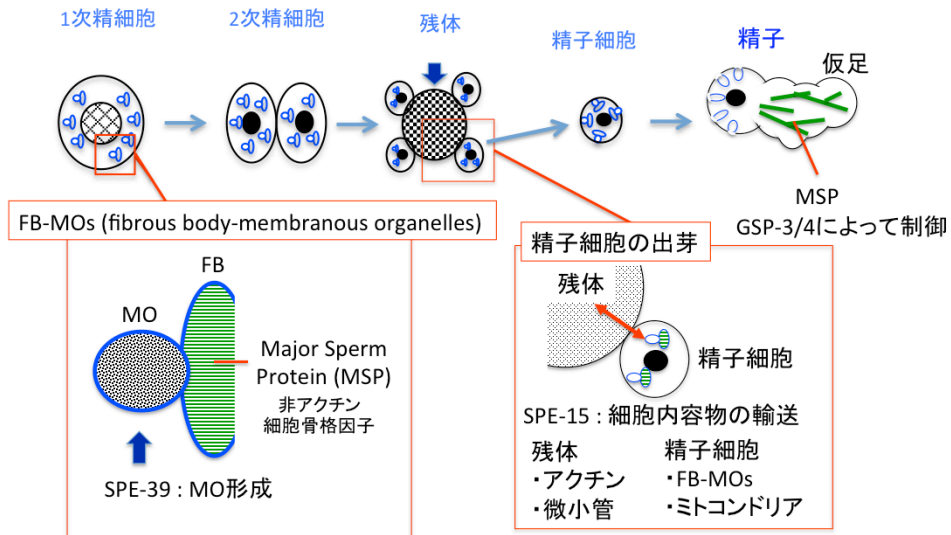
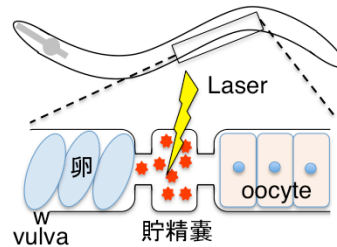
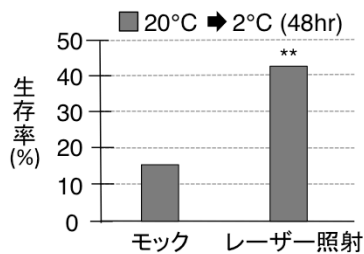


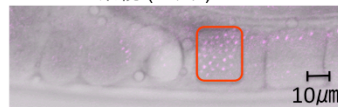
図28 低温耐性に関与する遺伝子の機能

低温耐性に異常を示した遺伝子の精子形成過程における機能。SPE-39は1次精細胞期にMO形成に関与する(Zhu and L'Hernault, 2003)。MO上にMajor Sperm Protein (MSP)が集合して結晶様の繊維体FBを形成し、MO由来の膜で囲われFB-MOとなる。SPE-15は精子細胞が出芽するときに、精子細胞には精子形成に必要なFB-MOsやミトコンドリアを、残体には精子に不必要なアクチンや微小管を輸送する(Kelleher *et al.*, 2000)。GSP-3とGSP-4は第二減数分裂時の染色体分離と仮足のMSPの解離に関与する(Wu *et al.*, 2012)。MSPは1次精細胞期にMO上に会合してFBを形成し、精子細胞で解離した後、精子で仮足の細胞骨格となる(Italiano *et al.*, 1996; Kelleher *et al.*, 2000; Smith, 2006)。



処理	生存数	死亡数	総個体数	生存率 (%)
モック	9	49	58	15.52
レーザー照射	21	28	49	42.86

EG4883系統 (モック)



レーザー照射個体

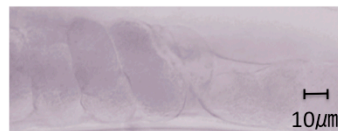


図29 色素レーザー照射による細胞破壊実験

レーザー照射で精子に損傷させた個体に2°C48時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。精子特異的に蛍光を発現する野生型の蛍光をターゲットにレーザー照射を行い、蛍光の減少で精子の損傷を確認していた。20°Cコントロールとして麻酔のみのモック処理を行った個体は約15%の生存率を示したのに対し、精子にレーザー照射を行った個体では約42%の生存率を示した。右下はレーザー照射した個体とモック処理個体。統計解析はフィッシャーの直接確率検定で判定した。**はp値が0.01未満であることを示す。

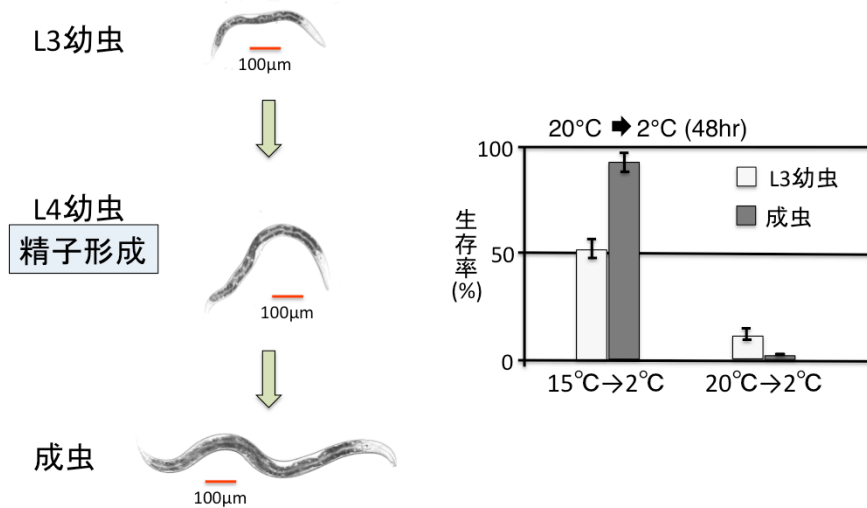


図30 精子形成による低温耐性の変化の解析

精子形成前の野生型L3幼虫に2°C48時間の低温刺激を与えた時の生存率を測定した。15°C飼育後と20°C飼育後の野生株に低温刺激を与えた結果、15°C飼育後のL3幼虫の生存率は成虫より低下することが観察された。しかし、成虫とL3幼虫ではサイズ、形態ともに差があるため精子以外の影響の方が大きいと考えられる。このデータは6プレート以上の結果から解析した。統計解析には一元配置分散分析(ANOVA)を行い、複数比較のためダネット検定で判定した。

系統	生存率(%)	産卵数	受精卵数	未受精率(%)	実験回数
野生株	2.96	301±11	286±10	4.90	10
<i>gsp-3(tm1647)</i>	85.55	109±22	108±21	0.88	6
<i>gsp-4(tm5415)</i>	71.49	199±17	198±17	0.63	6
<i>ife-1(bn127)</i>	64.60	60±9	24±6	64.34	8
<i>puf-8(q725)</i>	2.51	88±20	88±20	0.79	6
<i>spe-39(eb9)</i>	31.54	75±9	1±1	99.10	8
<i>spe-39(tx12)</i>	42.69	19±4	1±1	97.67	9
<i>spe-6(hc163)</i>	7.79	306±8	226±8	25.76	7
<i>spe-4(hc78)</i>	6.19	20±7	1±1	99.43	8
<i>spe-5(hc93); sDp2</i>	14.46	49±13	3±1	96.27	8
<i>spe-17(ok2631)</i>	8.49	134±17	8±1	93.40	9
<i>spe-10(hc104)</i>	6.87	137±14	19±3	86.67	6
<i>fer-6(hc6)</i>	0.26	175±17	72±10	58.29	8
<i>fer-15(hc15)</i>	2.71	237±20	195±15	17.21	9
<i>spe-26(hc139)</i>	5.24	64±9	1±1	99.50	8
<i>spe-15(hc75)</i>	30.33	89±11	2±1	97.55	7
<i>spe-8(hc40)</i>	3.68	134±17	1±1	99.74	9
<i>spe-12(hc76)</i>	8.13	129±4	1±1	99.25	9
<i>spe-27(it132)</i>	7.38	200±10	1±1	99.54	8
<i>spe-29(it127)</i>	4.43	117±15	2±1	98.83	9
<i>spe-41(sy693); him-5(e1490)</i>	7.06	80±8	6±2	90.89	8
<i>spe-38(eb44); him-5(e1490)</i>	7.66	47±7	1±1	99.37	9
<i>fer-14(hc14)</i>	9.85	94±9	7±2	91.20	9
<i>spe-42(tn1231)</i>	12.35	41±5	0	100.00	9

図31 低温耐性と生殖能力の関係

野生型と精子変異体が産む受精卵、未受精卵の数を測定するプロジェクトを行った。野生型系統の受精卵が約300個に対し、*spe-6*変異体以外の精子変異体で受精卵数は減少した。しかし、20°C飼育後に2°Cに48時間置かれた時の生存率と、総産卵数および受精卵数に相関関係は見られなかった。具体的な例では、20°C飼育後に約70%の生存率を示した*gsp-4*変異体の産卵数は約200個でほとんどが受精卵だが、低温耐性に異常を示さなかった*spe-4*変異体の産卵数は約20個で、ほぼ未受精卵である。同様に、産卵数が少なくても低温耐性が正常な変異体が複数あったことから、精子異常による産卵数の減少と低温耐性異常に直接的な関係はないと考えられる。

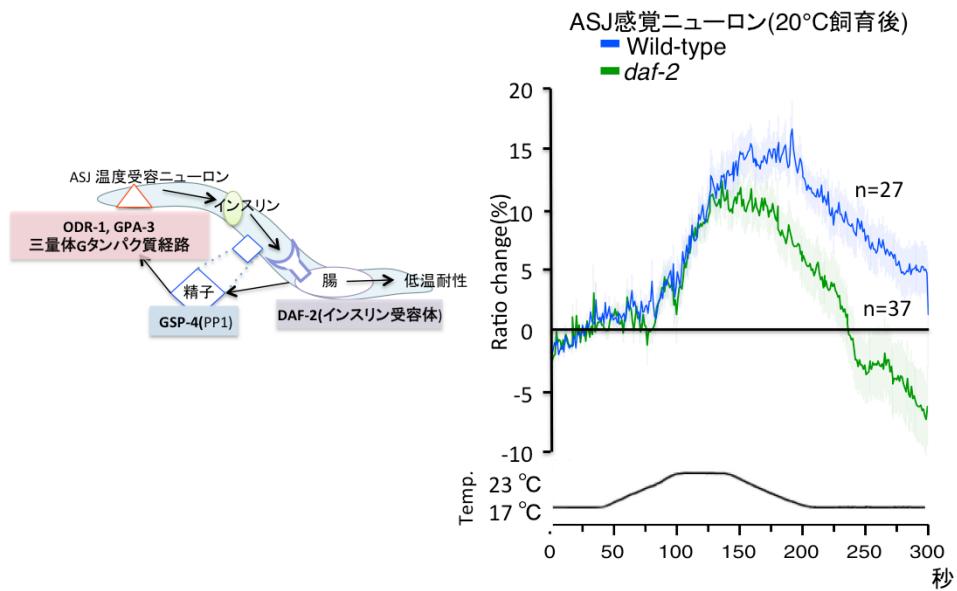


図32 インスリン受容体*daf-2*変異体の温度受容ニューロンASJの神経活動

インスリン受容体を欠損する*daf-2*変異体におけるASJ温度受容ニューロンの神経活動をカルシウムイメージングで測定した。精子変異体と同条件の17°Cから23°Cの温度変化を与えた結果、カルシウム濃度が約10%しか変化せず、応答性の低下が観察された。

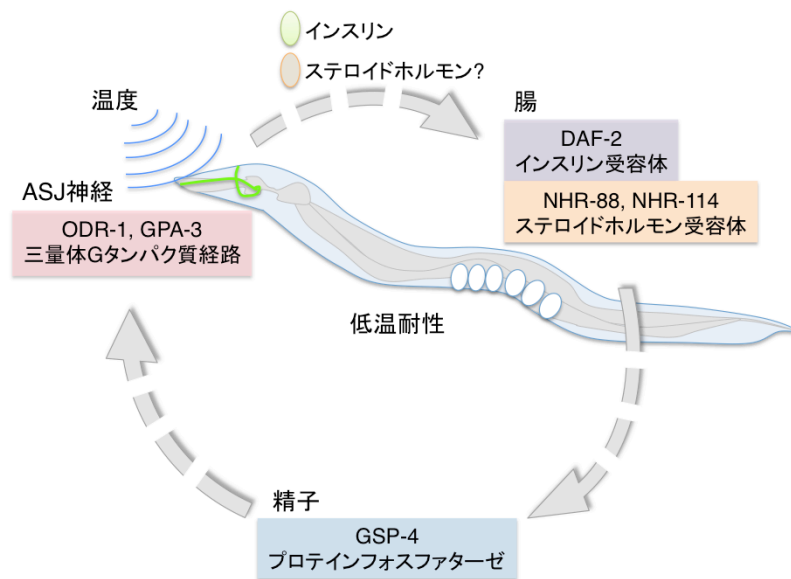


図33 低温耐性の組織ネットワークモデル

今回の研究から考えられた精子から神経へのフィードバックシステムを含む組織ネットワークモデル。ASJ温度受容ニューロンが環境温度を受容し、インスリンとステロイドホルモンを介して腸に情報が伝達され、腸が精子に影響を与え、その後精子がASJ温度受容ニューロンの温度情報伝達に影響を与える。精子からASJ温度受容ニューロンへのフィードバックは、直接か間接か不明だがおそらく分泌性ホルモンによって行われると考えられる。このシンプルなフィードバックモデルは、温度適応メカニズムがより複雑化しても、基本的なモデルとして利用できると期待される。

公表論文リスト

副論文

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

参考論文

Ohta A., Ujisawa T., Sonoda S., Kuhara A.

Light and pheromone-sensing neuron regulates cold through insulin signaling in *C. elegans*

Nature commun, 5: 4412, 1-12, 2014

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, 2014

太田茜、園田悟、久原篤

においに慣れたらどうなるの？ センチュウのにおい順応テスト：嗅覚順応行動の測定

研究者が教える動物実験 第1巻 感覚, p42-45, 共立出版, 2015比較生理生化学会 編

太田茜、園田悟、久原篤

好きなにおいに向かっていく行動を見てみよう センチュウの走化性テスト：嗅覚応答行動の測定

研究者が教える動物実験 第3巻 行動, p32-35, 共立出版, 2015比較生理生化学会 編

太田茜、園田悟、久原篤

突然変異遺伝子のDNAを見てみよう PCR法と制限酵素による突然変異部位の可視化

研究者が教える動物実験 第3巻 行動, p40-43, 共立出版, 2015比較生理生化学会 編