

甲南大学 博士学位論文

C. elegans における酸素濃度依存的な低温馴化に関わる神経回路

博士(理学)

甲南大学大学院自然科学研究科
生命・機能科学専攻

山崎(岡畑) 美咲
Misaki Yamasaki-Okahata

2020年3月

目次

要旨	p.1
略語一覧	p.3
1. 序論	
1.1 生物の温度応答	p.4
1.2 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i>	p.5
1.3 線虫 <i>C. elegans</i> の温度に対する応答現象	p.7
1.4 線虫 <i>C. elegans</i> の低温耐性・馴化	p.8
1.5 KCNQ 型カリウムチャネル	p.10
1.6 <i>C. elegans</i> における酸素受容に関わる神経機構	p.11
1.7 <i>C. elegans</i> の TRP チャネルの役割	p.13
2. 結果	
2.1 <i>kqt-2</i> 変異体における低温馴化異常	p.15
2.2 カリウムチャネル KQT-2 は感覚ニューロンで発現する	p.18
2.3 <i>kqt-2</i> 変異体の低温馴化異常は ADL 感覚ニューロン特異的に <i>kqt-2</i> 遺伝子を発現させることで回復する	p.21
2.4 KQT 型カリウムチャネル KQT-3 は KQT-2 と反対の役割を果たす	p.24
2.5 TRP チャネル OCR-1 は ADL 感覚ニューロンの温度応答性の負の制御因子として働く	p.25
2.6 酸素情報は ADL を介する低温馴化に影響を与える	p.27

3. 考察	
3.1 ADL 感覚ニューロンが制御する低温馴化	p.31
3.2 酸素情報と温度情報の統合に関わる神経回路	p.34
3.3 低温馴化に関わる神経回路と組織	p.35
4. 結語	p.38
5. 材料・方法	p.39
謝辞	p.58
引用文献	p.59
図・表	p.69

要旨

温度は生物が常に感知する環境情報であり、生物は温度変化に馴化や適応することで生存・繁栄してきた。本研究では、動物の温度馴化の基本原理の理解のために、線虫 *Caenorhabditis elegans* の低温馴化を指標に解析をおこなった。低温馴化に関わる新規分子としてカリウムチャンネル KQT-2 を同定した。KQT-2 は、ヒトにおいて心臓病やてんかん等に関わる KCNQ 型カリウムチャンネルのホモログであり、そのノックアウト線虫である *kqt-2* 変異体では野生株よりも低温に早く馴化する異常が見られた。興味深いことに、直径 3.5 cm の寒天培地で飼育した場合よりも、直径 6 cm の寒天培地で飼育した際に *kqt-2* 変異体の低温馴化異常が強くなった。GFP レポーターを用いた解析から、*kqt-2* 遺伝子は頭部の ASK と ADL 感覚ニューロンと腸で発現しており、*kqt-2* 変異体の ADL 感覚ニューロンで特異的に *kqt-2* 遺伝子を発現させることによって *kqt-2* 変異体の低温馴化異常が回復した。これまでに、ADL は温度受容ニューロンであることが知られていたため、カルシウムイメージング法を用いて *kqt-2* 変異体の ADL の温度応答性を測定したところ、*kqt-2* 変異体では異常が見られた。神経回路上において、ADL は酸素受容ニューロン URX の下流に位置することが報告されている。そこで、低温馴化および ADL の温度応答性における酸素情報の関連性を調べるために、ADL で機能しているカリウムチャンネル KQT-2 の変異体に URX で機能する酸素受容体 GCY-35 の機能欠損変異を導入し、*gcy-35; kqt-2* 二重変異体の低温馴化および ADL の温度応答性を測定した。その結果、*kqt-2* 変異体のこれらの異常は *gcy-35* 変異によって抑圧された。つまり、URX 酸素受容ニューロ

ンの下流で ADL 温度受容ニューロンが働き、酸素濃度依存的な温度情報伝達がおこなわれている可能性が考えられた。*kqt-2* 変異体の低温馴化異常に酸素濃度が関わる可能性を考え、*kqt-2* 変異体を飼育する際の酸素濃度を変化させた。その結果、酸素濃度の低下に応じて *kqt-2* 変異体の低温馴化の低下が見られた。さらに、直径 6 cm と直径 3.5 cm の各々の寒天培地上の酸素濃度を測定したところ、直径 6 cm の寒天培地の方が直径 3.5 cm の寒天培地よりも約 5 % 高い酸素濃度を示した。以上の結果から、ADL 感覚ニューロンにおいてカリウムチャンネル KQT-2 は、URX 酸素受容ニューロンからの酸素情報依存的に温度情報伝達を調節し、低温馴化を変化させていることが示唆された。この神経回路は、温度と酸素という質的に異なる複数の感覚情報の統合の解析モデルとなりえると考えられる。

略語一覽

ATP	Adenosine triphosphate
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	Complementary DNA
CFP	Cyan fluorescent protein
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
FOXO	Forkhead box-containing protein, O sub-family
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GFP	Green fluorescent protein
KQT	K ⁺ channel related to QT interval
LB	Luria-Bertani
NGM	Nematode growth medium
PCR	Polymerase chain reaction
rGC	Receptor guanylyl cyclase
RNA	Ribonucleic acid
TRP	Transient receptor potential
YC	Yellow cameleon
YFP	Yellow fluorescent protein

1. 序論

1.1 生物の温度応答

ヒトを含む生物にとって、温度変化に対する生理的反応は重要なメカニズムである。動物は、体細胞および特定の温度受容ニューロンで温度を受容し、その温度情報を体の各器官に伝達することで温度に適切に応答していると考えられる。特に神経系における温度情報の受容とその情報伝達の分子メカニズムは、動物個体の温度変化への応答に必須である。温度受容の分子メカニズムとして、TRP チャネルは多くの生物で温度受容体として働くことが知られているが (Dhaka et al. 2006)、TRP チャネル非依存的な温度受容メカニズムが、線虫やショウジョウバエに存在していることが報告されている (Shen et al. 2011; Takeishi et al. 2016)。

ショウジョウバエの幼虫は、温度勾配上に置かれると、光受容ニューロンにおけるホスホリパーゼ C を含む Gq シグナリング経路を活性化し、非温度受容型の TRP チャネルを開口させ温度情報を伝達することで、温度勾配上でショウジョウバエの嗜好温度である 18 °C に移動する温度選択行動がなされている。さらに、このカスケードにはロドプシンが温度受容に必要であると考えられている (Shen et al. 2011)。しかし、ロドプシンが実際に温度受容体として機能するかについては未知の点が残されている。本研究では次節のような利点から、動物の温度応答の解析モデルとして、線虫 *C. elegans* を用いた。

1.2 線虫 *Caenorhabditis elegans*

C. elegans は体長約 1 mm の非寄生性の土壌自活性の線虫であり、体が透明であることから、GFP や DiI などの蛍光タンパク質を用いた細胞・組織観察が容易である。卵と精子をもつ雌雄同体であり、X 染色体の不分離により、希に精子のみをもつ雄が発生する。*C. elegans* の雌雄同体の成虫は 959 個の細胞から構成されており、そのうち 302 個は神経細胞である (Brenner 1974)。*C. elegans* の頭部から尾部までの約 3 万枚の切片による電子顕微鏡写真の解析から、雌雄同体の全神経細胞 302 個のシナプス接続とギャップ結合が明らかとなっていることから (White et al. 1986)、神経系の解析のモデル動物としても多くの研究室で使用されている。さらに近年、電子顕微鏡解析から雄の全神経ネットワークも同定されており、雌雄同体と雄では、大部分の神経細胞が共通であるにも関わらず、シナプス接続とギャップ結合のパターンが約 30 %異なることが報告された (Cook et al. 2019)。

ヒトは約 37 兆個の細胞から構成されていると考えられており、そのうち脳が約 1000 億個の神経細胞により構成されていることと比較すると、線虫の細胞数は非常に少ないことがわかる。一方で、遺伝子数はヒトと線虫で同程度のおよそ 2 万個であり、相同遺伝子も多く持っていることから、ヒトから線虫まで共通している基本的メカニズムも多い。また、受精卵から成体に至るまでの全細胞分裂の過程が、細胞系譜として明らかにされている。さらに、線虫 *C. elegans* は幼虫の冷凍保存が可能であることから、遺伝子組換え系統などの半永久的な保存が可能である。

C. elegans は L1、L2、L3、L4 と呼ばれる 4 つの幼虫期に分けられ、その後 young adult を経て卵を持った成虫に成長する。線虫は 25 °C で飼育すると約 2.5 日、20 °C で約 3.5 日、17 °C で 5 日、15 °C で約 7 日で卵から成虫に成長する。雌雄同体であることから、卵と精子を個体内で受精させ、受精卵を形成するため、掛け合わせをする必要がなく、また一生で約 300 個の卵を産むことから、飼育や継代は非常に容易である。線虫 *C. elegans* の生育温度は約 13 °C から 27 °C であり、飼育温度が 27 °C を越えると dauer と呼ばれる耐性幼虫期 (L2d) に入る。耐性幼虫になると代謝活動を極限まで低下させ、休眠のような状態になり、高温や餌がないような劣悪な生育環境でも最大約 4 ヶ月間生き延びることができる。線虫は高温や餌がないような劣悪な生育環境下では雄が出てくる確率が高まることが知られている。この現象を利用して、雌雄同体と雄を掛け合わせるにより、多重変異体の作製や戻し交配などが可能である。線虫のゲノムサイズは約 100 Mbp と他の生物と比べても非常に小さく、多細胞生物で初めて全ゲノム配列が解読されており、次世代 DNA シーケンサーによる全ゲノム配列の情報を用いた原因遺伝子のマッピングなどの解析が可能であり、遺伝学の解析に向いている。さらに、生殖巣にプラスミド化した外来遺伝子を導入することによって、染色体外遺伝子が次世代に遺伝することから、遺伝子組換え系統を非常に短期間で単離することができる。以上の点から、線虫 *C. elegans* は、生物学の研究に適した実験動物として多くの研究室で使用されている。

1.3 線虫 *C. elegans* の温度に対する応答現象

線虫 *C. elegans* の温度応答に関しては、温度走性、熱に対する忌避行動、高温による耐性幼虫への変化、低温耐性など、さまざまな現象が研究されている (Mori and Ohshima 1995; Wittenburg and Baumeister 1999; Fielenbach and Antebi 2008; Kuhara et al. 2008; Glauser et al. 2011; Schild and Glauser 2013; Ohta et al. 2014)。温度走性とは、餌の存在する条件で飼育された *C. elegans* は餌の無い温度勾配上で過去の飼育温度に移動する行動である。この温度走性に関わる神経回路が同定されており、温度受容ニューロンとして AFD 感覚ニューロンが知られている。AFD 温度受容ニューロンにおいて、受容体型グアニル酸シクラーゼ (rGCs) が温度受容体として機能する可能性が報告されており、rGCs は cGMP を分解するホスホジエステラーゼと拮抗的に働き、AFD 内の cGMP の濃度を変化させることで、cGMP 依存性チャネルである TAX-4/TAX-2 の開閉の制御を介して温度情報を伝達している (Takeishi et al. 2016)。熱に対する忌避行動には、TRPV (Transient receptor potential channels of the vanilloid subtype) チャネルの線虫ホモログである OSM-9 や OCR-2 が関与しており、神経系における OSM-9 と OCR-2 の機能が温度情報伝達に必須であることが示唆されている (Wittenburg and Baumeister 1999; Glauser et al. 2011; Schild and Glauser 2013)。一方で、OSM-9 と OCR-2 が温度感受性の TRP チャネルであることは報告されていない。TRP チャネルは腸でも発現しており、腸における低温感受性の TRP チャネルである TRPA-1 が、線虫個体の寿命に関与していることが示唆されている (Xiao et al. 2013)。

1.4 線虫 *C. elegans* の低温耐性・馴化

これまでの研究で線虫 *C. elegans* 野生株は高温にさらされると dauer と呼ばれる耐性幼虫になることが知られていたが、低温に対する耐性現象に関しては解析が進んでいなかった。近年の解析から、線虫 *C. elegans* 野生株は高温だけではなく、低温に暴露された際も耐性現象をもつことが分かってきた。低温耐性現象とは、例えば、25 °Cで飼育した野生株 N2 は2 °Cの低温刺激を与えると死滅するのに対し、15 °Cで飼育した野生株は2 °Cの低温刺激を与えても生存できる現象である (Ohta et al. 2014; Okahata et al. 2016; Sonoda et al. 2016; Ujisawa et al. 2018)。さらに、25 °Cで飼育後にわずか3時間15 °Cに置くことによって2 °Cで生存できるようになる低温馴化現象が見つかった (Ohta et al. 2014; Okahata et al. 2016)。世界各地で単離された *C. elegans* 多型株は多様な低温馴化の表現型を示し、その低温馴化の多様性に関わる原因遺伝子はゲノムの複数領域にマッピングされている (Okahata et al. 2016)。しかしながら、*C. elegans* の低温馴化に関わる遺伝子はこれまで単離されておらず、その分子生理メカニズムはほとんど解明されていない。

C. elegans の低温耐性には神経系や腸などを含む複数の組織ネットワークが関わっており、そのアウトプットとして、体内の不飽和脂肪酸比率を含む脂質構成を変化させ、細胞膜の流動性や代謝を変化することによって、環境の温度変化に対して適応するメカニズムを持っている (Murray et al. 2007; Savory et al. 2011; Xiao et al. 2013; Ohta et al. 2014)。 *C. elegans* の低温耐性の成立において、環境の温度情報が頭部に存在する2対の感覚ニューロンである ASJ と ADL で

受容されることが必須である。ASJ 感覚ニューロンは、頭部先端に感覚末端を伸張し、細胞体から 1 本の軸索を頭部の線虫の脳と呼ばれる神経環に投射している。ASJ は複数の感覚情報を受容する感覚ニューロンとして知られており、dauer 耐性幼虫からのリカバリーに関わるフェロモン受容ニューロンであると同時に (Bargmann and Horvitz 1991)、紫外から青色域の波長光を受容する光受容ニューロンとしても知られている (Ward et al. 2008)。ADL 感覚ニューロンも dauer 耐性幼虫を誘導するアスカロシドなどの dauer フェロモンを受容するフェロモン受容ニューロンとして知られており (Jang et al. 2012)、また、忌避性の化学物質も受容する (Troemel et al. 1997)。低温耐性において、ASJ と ADL は共に温度受容ニューロンとして機能し、低温耐性を負に制御している (Ohta et al. 2014; Ujisawa et al. 2018)。ASJ 感覚ニューロンが温度を受容すると、G タンパク質と cGMP シグナル経路を介してカルシウムイオンが流入し、細胞内カルシウム濃度が上昇することによってインスリンが分泌される。ASJ から分泌されたインスリンは腸や神経系で受容され、FOXO 型転写因子が働くことによって低温耐性に関わる遺伝子の発現を制御することにより、低温耐性が制御されることが示唆されている (Ohta et al. 2014)。さらに、インスリン経路の下流で精子の遺伝子が低温耐性を制御することが報告されている。腸からのインスリン経路を介した温度情報はステロイドホルモンにより精子に伝達され、精子は温度情報を ASJ 温度受容ニューロンにフィードバック制御し、ASJ の神経活動に影響を与える (Sonoda et al. 2016)。

最近の研究で、忌避性の化学物質を受容することで知られていた ADL 感覚ニューロンが温度も受容することが分かってきた。ADL で低温耐性を制御

する遺伝子として、Ca²⁺依存性 RNA 分解酵素 ENDU-2 が同定されている (Ujisawa et al. 2018)。ENDU-2 は神経系と筋肉で発現しており、ENDU-2 は陰門筋などの筋肉で働くことで、ADL 温度受容ニューロンの温度に対する神経応答を細胞非自律的に制御している。一方で、ENDU-2 は ADL 感覚ニューロン内において ADL 感覚ニューロンの温度に対する神経応答を細胞自律的にも制御している。つまり ADL 温度受容ニューロンの温度応答の調節において、ADL 内における ENDU-2 の細胞自律的な機能だけでなく、筋肉における ENDU-2 の ADL に対する細胞非自律的な機能も必須であることが示唆されている。ENDU-2 はカスパーゼ (CED-3) などのアポトーシス関連遺伝子の発現を制御することがトランスクリプトーム解析から見つかっている。この場合のアポトーシス関連遺伝子は、神経系において細胞死ではなくシナプスの構成を変化させることが示唆されている。これらの現象が組み合わさることで、ENDU-2 は ADL 感覚ニューロンの温度応答性を制御し、ADL から下流のニューロンへの温度情報伝達に影響を与えることで、低温耐性を変化させていると考えられている (Ujisawa et al. 2018)。

1.5 KCNQ 型カリウムチャネル

KCNQ 型カリウムチャネルはヒトにおいてさまざまな生理的役割を果たしている。KCNQ 遺伝子ファミリーの変異は、心臓病やてんかん、心不整脈や進行性難聴を引き起こす原因として知られている (Wang et al. 1996; Neyroud et al.

1997; Biervert et al. 1998; Charlier et al. 1998; Jentsch 2000; Singh et al. 2003)。 *C. elegans* には、KCNQ 型カリウムチャネルのホモログが存在し、KQT (K⁺ channel related to QT interval) 型チャネルと名付けられている。 *C. elegans* ゲノム中には、KQT 型チャネルをコードする 3 つの遺伝子 *kqt-1*、*kqt-2*、*kqt-3* が存在しており、その遺伝子産物のうち、KQT-1 と KQT-3 は化学受容ニューロン、機械刺激受容ニューロン、腸で発現し、KQT-2 は腸で発現することが報告されている (Wei et al. 2005)。腸では KQT 型カリウムチャネルは排便サイクルを制御する Ca²⁺ サイクルの促進に重要な役割を果たしている。KQT-2 と KQT-3 は、周期的な Ca²⁺/カルモジュリン依存的な腸への Ca²⁺ 流入の制御を通して、排便サイクルを制御している (Nehrke et al. 2008)。ラットでは、KCNQ チャネルは侵害低温感受性三叉神経節ニューロン (TG ニューロン) で発現し、低温感受性の制御に重要な役割を果たしている (Abd-Elsayed et al. 2015)。しかしながら、動物において KCNQ 型カリウムチャネルがどのようにして温度馴化を制御しているかはこれまでに報告されていない。

1.6 *C. elegans* における酸素受容に関わる神経機構

C. elegans の野生株はその産地によって、単独行動をする系統と集団行動をする系統に分かれる。この行動様式には環境の酸素濃度が関与し、酸素受容に関わる神経回路によって制御されていることが以下の知見から示されている。ハワイ産の CB4856 株は餌の縁に集まる集団行動を示すのに対して、ブリストル

産の N2 株は単独行動を示し、集団行動を示さない。ハワイ産 CB4856 株とブリ
ストル産 N2 株のこれらの行動様式の違いを決定する遺伝子を遺伝学的解析に
より、マッピングしたところ、原因遺伝子多型はニューロペプチド Y 受容体を
コードする *npr-1* 遺伝子中に存在した (de Bono and Bargmann 1998)。ブリストル
産 N2 株は集団行動を示さないのに対して、N2 において *npr-1* 遺伝子をノック
アウトした変異体は集団行動を示す。この *npr-1* 変異体の集団行動を示す異常
は、酸素受容体である GCY-35 あるいは GCY-36 の機能欠損型変異によって抑圧
される (Cheung et al. 2004)。GCY-35 と GCY-36 は AQR、PQR、URX 感覚ニュー
ロンで発現し (Cheung et al. 2004; Gray et al. 2004)、そのうち URX 酸素受容ニュー
ロンにおける GCY-35 と GCY-36 の機能が集団行動に関与している (Cheung et
al. 2004; Zimmer et al. 2009)。URX 酸素受容ニューロンにおいて、酸素は酸素受
容体 GCY-35/36 によって受容され (Cheung et al. 2004; Gray et al. 2004)、化学シナ
プスとギャップ結合を介して RMG 介在ニューロンに直接神経情報が伝達され
る。URX 酸素受容ニューロンからの酸素情報は RMG 介在ニューロンを介して
ADL を含む頭部の他の感覚ニューロンの神経活動を変化させる (Fenk and de
Bono 2017)。*npr-1* 変異体を高い酸素濃度下で飼育すると ADL 化学受容ニュー
ロンのアスカロシドフェロモンに対する神経応答が低下するが、低い酸素濃度で
飼育すると、その応答が上昇する。ADL の神経応答が上昇するとアスカロシド
濃度の低い方向に線虫個体は移動すると考えられる。アスカロシドフェロモン
は、線虫自身から分泌される忌避性のフェロモンであるため、ADL の神経応答
の上昇により、アスカロシド濃度の高い集団行動状態からアスカロシド濃度の
低い単独行動にシフトすると考えられている。このように、URX と RMG を介

して、酸素情報が ADL の神経活動を間接的に制御することによって、集団行動が制御されている (Fenk and de Bono 2017)。

1.7 *C. elegans* の TRP チャンネルの役割

TRP チャンネルは接触刺激、聴覚、味覚、視覚、嗅覚、温度などさまざまな感覚刺激の受容やその情報伝達に関わっている (Montell 2005)。TRP チャンネルそれ自体が外界の刺激を受容する受容体として機能する場合も多いが、例えば、ショウジョウバエの視細胞における光受容情報伝達経路では、ロドプシンによって受容された光情報が、細胞内のセカンドメッセンジャーを介して TRP チャンネルを開口させ視細胞を活性化する。このように、TRP チャンネルが感覚情報の受容体としてではなく感覚情報伝達の主要チャンネルとして機能する例も多い。TRP チャンネルは *C. elegans* にも保存されて存在しており、TRPV チャンネルをコードする *osm-9* 遺伝子は感覚ニューロンで発現し、浸透圧に対する忌避行動や匂い物質に対する化学走性を制御していることが知られている (Colbert et al. 1997)。OSM-9 は非温度感受性の TRP チャンネルとして報告されており、感覚情報伝達の主要チャンネルとして機能することが知られている。OSM-9 は熱に対する忌避行動にも関わっており、感覚ニューロンで受容された侵害的熱の情報伝達に関わる重要なチャンネルとして働く (Wittenburg and Baumeister 1999; Glauser et al. 2011; Schild and Glauser 2013)。*C. elegans* の TRPV サブユニットである *ocr-2* 遺伝子と *osm-9* 遺伝子は忌避刺激への反応に必要なチャンネルで、これらの遺伝子

が ASH と ADL 感覚ニューロンで機能することで、個体の集団行動を促進する (de Bono et al. 2002)。

OCR-2 のドミナント・ネガティブ変異 (OCR-2dn) は、OCR-2dn ホモチャンネルを形成した場合や、野生型の OCR-1 (OCR-1wt) とのヘテロチャンネル OCR-2dn/OCR-1wt や野生型の OCR-4 (OCR-4wt) とのヘテロチャンネル OCR-2dn/OCR-4wt を形成した場合に、チャンネルの機能を不活性化することにより、早期の産卵異常を引き起こすと考えられている (Jose et al. 2007)。TRP チャンネルは線虫の低温耐性にも関与している。低温耐性を制御している温度受容ニューロン ADL において、3 種類の TRP チャンネルサブユニットが、ADL の温度情報伝達における主要チャンネルとして機能している (Ujisawa et al. 2018)。TRP チャンネルをコードする 3 つの遺伝子である *ocr-2*, *osm-9* と *ocr-1* 遺伝子を同時にノックアウトした *ocr-2 osm-9; ocr-1* 三重変異体は、低温耐性に異常を示す (Ujisawa et al. 2018)。この異常は、三重変異体における ADL 温度受容ニューロンの温度刺激に対する神経応答の低下による (Ujisawa et al. 2018)。3 種類の TRP チャンネルサブユニットが ADL の温度応答に関与することは調べられているが、その一方で、それぞれの TRP チャンネルサブユニットの ADL 温度受容ニューロンにおける役割は同定されていない。

2. 結果

2.1 *kqt-2* 変異体における低温馴化異常

線虫 *C. elegans* は、低温に対して耐性をもつことが報告されている。低温耐性とは、野生株である N2 株を 25 °C で飼育した後に 2 °C に移すと死滅するのに対し、15 °C で飼育した後に 2 °C に移すと生存する現象である (図 1) (Ohta et al. 2014)。さらに興味深いことに、線虫は低温馴化現象をもつことが分かってきた (図 1) (Ohta et al. 2014; Okahata et al. 2016)。低温馴化現象とは、例えば、25 °C で飼育した線虫を数時間 15 °C に移すことによって 2 °C で生存でき、同様に 15 °C で飼育した線虫を数時間 25 °C に移すことによって 2 °C で死滅する現象である (Ohta et al. 2014; Okahata et al. 2016)。低温耐性現象は頭部の ASJ 温度受容ニューロンが温度を受容し、インスリンを分泌し、腸や神経がインスリンを受容することによって低温耐性が制御される (Ohta et al. 2014)。さらに、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、腸から精子、精子から神経へステロイドホルモンを介して影響を与えていることが分かってきた (Sonoda et al. 2016)。一方で低温馴化に関わるメカニズムには未知な点が多く残されている。

低温馴化に関わる新規遺伝子を同定するために、過去におこなわれた DNA マイクロアレイ解析の結果を利用した。野生株 N2 株を 23 °C で飼育した後に 17 °C に 4 時間温度シフトした際に発現変動する遺伝子として、79 個の遺伝子が単離されている (Sugi et al. 2011)。発現変動が見られた遺伝子のうち、変

異体が存在する系統の低温耐性テストがおこなわれた (Ohta et al. 2014)。そのうち、本研究では、低温耐性に異常が見られなかった 14 系統に関して低温馴化テストをおこなった (図 2A, B, C、図 3A, B, C)。25 °C で飼育した後に 15 °C に 0 から 8 時間置き、2 °C の低温刺激を与え生存率を測定した結果、野生株は 25 °C 飼育後 2 °C の低温刺激を与えると 5 % の生存率を示し、15 °C に 3 時間置くと 30 %、8 時間置くと 44 % の生存率を示した (図 2A, B, C)。それに対して、レチノールのデヒドロゲナーゼ (*dhs-4(tm2418)*) の変異体は 25 °C 飼育後 2 °C の低温刺激を与えると野生株 N2 に比べ高い生存率を示す異常が見られた (図 2A)。25 °C で飼育した後に 15 °C に 3 時間置いて 2 °C の低温刺激を与えると、C-type レクチン (*clcc-67(ok2770)*) の変異体において低い生存率を示す異常が見られ、カリウムチャネル (*kqt-2(ok732)*)、レチノールのデヒドロゲナーゼ (*dhs-4(tm2418)*)、G タンパク質 α サブユニット (*gpa-7(pk610)*) の変異体において高い生存率を示す異常が見られた (図 2B、図 4B)。さらに、25 °C 飼育後 15 °C に 8 時間置いても C-type レクチン (*clcc-67(ok2770)*) の変異体は 2 °C の低温刺激を与えると死滅する異常を示した (図 2C)。Cation transporting ATPase (*catp-3(ok1612)*)、システインプロテアーゼ関連タンパク (*cpr-1(ok1344)*)、レチノールのデヒドロゲナーゼ (*dhs-4(tm2418)*)、G タンパク質 α サブユニット (*gpa-7(pk610)*)、金属結合性タンパク質 (*mtl-1(tm1770)*)、ATP 結合タンパク (*pmp-1(ok773)*)、カリウムチャネル (*kqt-2(ok732)*)、カルボン酸エステル加水分解酵素 (*T28C12.4(tm1013)*) は 25 °C 飼育後 15 °C に 8 時間置いて 2 °C の低温刺激を与えると野生株に比べて高い生存率を示す異常を示した (図 2C、図 4C)。また、15 °C で飼育後、25 °C に 0~8 時間置き 2 °C の低温刺激を与えた結果、野生株は

15 °C飼育後 2 °Cの低温刺激を与えると 92%の生存率を示し、25 °Cに 3 時間置くと 26%、8 時間置くと 4%の生存率を示した (図 3A, B, C)。それに対して、DNA 結合転写因子 (*dmd-7(ok2276)*) の変異体において、生存率の低下が見られた (図 3A)。15 °Cで飼育した後に 25 °Cに 3 時間置くと、G タンパク質 α サブユニット (*gpa-7(pk610)*) の変異体において高い生存率を示す異常が見られた (図 3B)。

KQT 型カリウムチャネルである *kqt-2* 変異体は 25 °C飼育後 15 °Cに 3 時間あるいは 8 時間置き、2 °Cの低温刺激を与えると生存率が上昇する異常を示した (図 4B, C)。一方で、15 °Cあるいは 25 °C飼育後、温度シフトせずに 2 °Cの低温刺激を与えても *kqt-2* 変異体は異常を示さなかった (図 4A、図 5A)。また、15 °C飼育後 25 °Cに 3 時間あるいは 8 時間温度シフトし、2 °Cの低温刺激を与えても、*kqt-2* 変異体は低温馴化異常を示さなかった (図 5B, C)。これまでに低温耐性に関わる遺伝子として、cGMP 依存性チャネルを介した神経情報伝達経路上の遺伝子が多数単離されている。cGMP 依存性チャネルは感覚情報伝達において感覚ニューロンの膜電位を脱分極させる主要なカチオンチャネルであり、その開口によってニューロンを活性化させる。一方で、低温耐性に関して感覚ニューロンの活性を抑制するチャネルタンパク質の解析は進んでいない。そこで、本研究では、一般的に神経活動を抑制することが知られているカリウムチャネルである KQT-2 の解析をおこなうことにした。

kqt-2(ok732) の低温馴化異常が *kqt-2* 遺伝子の変異によるものであるかを調べるために、セカンドアレルである、*kqt-2(tm642)* の低温馴化テストをおこなった。*ok732* アレルと *tm642* アレルは KQT-2 チャネルのポアをコードする大

部分のエキソンが欠損している変異であるため (Wei et al. 2005)、ナル変異であることが示唆されている。これらの変異体の低温馴化テストをおこなった結果、25 °Cで飼育後 15 °Cに3時間置き、2 °Cの低温刺激を与えると、*kqt-2(tm642)*は*kqt-2(ok732)*と同様に低温馴化が上昇する異常を示した (図 6)。さらに、*kqt-2(ok732)*の低温馴化異常は野生型の*kqt-2*遺伝子を*kqt-2(ok732)*に導入することによって異常の回復が見られた (図 7)。以上の結果から、*kqt-2*は25 °Cから15 °Cに温度が変化する際の低温馴化に必須の遺伝子であることが示唆された。

2.2 カリウムチャネル KQT-2 は感覚ニューロンで発現する

過去の研究から、カリウムチャネル KQT-2 は腸でのみ発現することが報告されていた (Wei et al. 2005)。そこで、*kqt-2*変異体の低温馴化上昇の異常が腸の機能異常によって引き起こされると考え、*kqt-2(ok732)*において腸特異的プロモーターである*ges-1p*により、腸特異的に*kqt-2 cDNA*を発現させ、低温馴化を調べた。しかしながら、*kqt-2(ok732)*の低温馴化異常は腸特異的に*kqt-2 cDNA*を発現させても回復しなかった (図 8)。これまでの本研究室の解析により、*C. elegans*の低温耐性は感覚ニューロンと腸で制御されていることが報告されている (Ohta et al. 2014)。そのため、感覚ニューロン特異的プロモーターである*osm-6p*を用いて*kqt-2(ok732)*で特異的に*kqt-2 cDNA*を発現させ、低温馴化テストをおこなった。その結果、*kqt-2(ok732)*の低温馴化上昇の異常は感覚ニューロン特異的に*kqt-2 cDNA*を発現させることによって回復した (図 8)。

次に、*kqt-2* が発現する感覚ニューロンを同定するために、*kqt-2* 遺伝子由来の上流約 9 kb のプロモーター領域の下流にゲノム由来の *kqt-2* 遺伝子の 1 番エキソンから 12 番エキソンまでが含まれた配列と GFP をつなげたプラスミドを Aguan D. Wei 博士より分与していただいた。KQT-2::GFP が導入された野生株の発現細胞解析をおこなったところ、GFP 蛍光は線虫の頭部感覚ニューロンで検出された (図 9A, B)。過去の論文によると、*kqt-2* は神経では発現しないとされていたが (Wei et al. 2005)、感覚ニューロンの *kqt-2* 遺伝子の発現レベルあるいは発現頻度が腸よりも弱い可能性を考え、1 kb から 9 kb の *kqt-2* 遺伝子のプロモーターによる、感覚ニューロンの発現を調べた。1 kb から 9 kb の *kqt-2* 遺伝子由来のプロモーターの下流に *kqt-2* の 1 番エキソンから 12 番目のエキソン、GFP を融合したプラスミドを野生株に導入し、感覚ニューロンの発現レベルを定量化したところ、*kqt-2::gfp* は最も短いプロモーター (1 kb) で発現レベルが強かった (図 10A, B)。このことから、*kqt-2* 遺伝子上流約 9 kb プロモーター領域の中には *kqt-2* 遺伝子の神経細胞の発現を抑制する配列が存在することが示唆された。さらに、*kqt-2::gfp* はオスの尾部の先端まで樹状突起が伸張している尾部の感覚ニューロンでも発現が見られた (図 9C)。

KQT-2::GFP を用いた発現細胞解析から、KQT-2 が発現する頭部のニューロンは感覚末端が頭部先端まで伸びている感覚ニューロンであることが示唆された (図 9A, B, D)。KQT-2 が機能している頭部感覚ニューロンを推定するために、*kqt-2* 変異体における特定の感覚ニューロンの機能を行動レベルで解析した。具体的には、比較的容易に行動解析をおこなえる AWA 感覚ニューロンと AWC 感覚ニューロンが関与する嗅覚応答テストをおこなった (図 11A, B, C)。

AWA はジアセチルを受容する嗅覚ニューロンとして、AWC はベンズアルデヒドを受容する嗅覚ニューロンとして知られている (Bargmann et al. 1993; Colbert and Bargmann 1995)。AWA 嗅覚ニューロンにおいて、匂い物質は7回膜貫通型の受容体タンパクによって受容され (Sengupta et al. 1996)、G タンパクを活性化させ、陽イオン透過チャネルである TRP チャネル (OSM-9) を活性化させる (Colbert et al. 1997)。*osm-9* 変異体は AWA の匂い情報伝達に異常を示すことから、ネガティブコントロールとして使用した (図 11A)。野生株はジアセチルに対して化学走性行動を示したのに対し、*osm-9* 変異体は走性行動が見られなかった。*kqt-2* 変異体は野生株と同様の表現型を示した (図 11A)。同様に、*kqt-2* 変異体において、AWC 嗅覚ニューロンのベンズアルデヒドに対する化学走性テストをおこなった (図 11B)。ネガティブコントロールとして、AWC 嗅覚ニューロンにおいて、ベンズアルデヒドの匂い情報伝達に関わる cGMP 依存性チャネル *tax-4* 遺伝子の変異体を使用した。野生株はベンズアルデヒドに対する化学走性行動が見られたのに対し、*tax-4* 変異体は走性行動が見られない異常を示した。それに対して、*kqt-2* 変異体は野生株と同様にベンズアルデヒドに対して正常な化学走性行動を示した (図 11B)。これらの結果から、KQT-2 の機能細胞は AWA ニューロンと AWC ニューロンではない可能性が考えられた。そこで、AWA と AWC 以外の頭部の特定の 6 対の感覚ニューロン (ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB) を赤色蛍光で染色する DiI 染色法を用いて KQT-2 の発現細胞を調べた。*kqt-2::gfp* を導入した線虫を DiI 染色し、頭部の感覚ニューロンを観察したところ、DiI によって染色される ADL と ASK 感覚ニューロンにおいて、KQT-2::GFP の発現が見られた (図 9A, B)。*kqt-2* 遺伝子が頭部の各 1 対の感覚ニューロンである ADL

と ASK で発現するという結果は、*kqt-2* 変異体の低温馴化異常が感覚ニューロンで特異的に *kqt-2 cDNA* を発現させることにより回復すること、さらに *kqt-2* 変異体の AWA と AWC 嗅覚ニューロンの嗅覚応答が正常であるという結果と一致している (図 8、 図 11A, B)。KQT-2 の感覚ニューロンの細胞内局在を調べるため、*kqt-2* 由来のプロモーターの下流に *kqt-2 cDNA* と GFP を挿入したプラスミドを作製し、局在解析をおこなった。その結果、KQT-2::GFP は感覚ニューロン全体で発現が見られたが、特に感覚ニューロンの感覚末端と細胞体で強い GFP の蛍光が見られた (図 9D)。つまり、KQT-2 は感覚ニューロンの感覚末端と細胞体に主に局在していると考えられる。また、GFP が発現しているニューロン数が増加していた。その理由としては、この局在解析に用いた DNA コンストラクトは、*kqt-2* 遺伝子の開始コドン上流 9 kb プロモーターの直下に *kqt-2 cDNA::gfp* を融合させたものであるため、ゲノム DNA に通常存在する *kqt-2* 遺伝子のイントロン配列を含んでいない。そのため、ゲノム DNA 中の *kqt-2* 遺伝子のイントロンの配列には、いくつかのニューロンでの発現を抑制するための DNA 配列が含まれていることが考えられる (図 9D)。

2.3 *kqt-2* 変異体の低温馴化異常は ADL 感覚ニューロン特異的に *kqt-2* 遺伝子を発現させることで回復する

kqt-2 変異体の低温馴化が上昇する異常は感覚ニューロン特異的に *kqt-2 cDNA* を発現させることによって回復した (図 8)。そこで、KQT-2 が低温馴化

を制御する感覚ニューロンを同定するために、細胞特異的レスキュー実験をおこなった。ADL 感覚ニューロン特異的プロモーターである *sre-1p* と ASK 感覚ニューロン特異的プロモーターである *sra-7p* を用いて、それぞれのニューロン特異的に *kqt-2 cDNA* を *kqt-2* 変異体に発現させ、低温馴化テストをおこなった (図 12)。その結果、*kqt-2* 変異体の低温馴化が上昇する異常は ADL 感覚ニューロン特異的に *kqt-2 cDNA* を発現させることによって回復し、ASK 感覚ニューロンでは回復しなかった (図 12)。ADL 感覚ニューロンは 1-octanol やアスカロシドフェロモンなど、忌避性の化学物質を受容する感覚ニューロンとして知られているため、1-octanol に対する *kqt-2* 変異体の忌避性の行動テストをおこなった (図 13A, B)。1-octanol は頭部の ADL、ASH、AWB 感覚ニューロンで受容されることが知られている (Troemel et al. 1995; Troemel et al. 1997; Hart et al. 1999)。ネガティブコントロールとして、ADL と ASH における 1-octanol の受容情報伝達に関わる TRP チャネル OSM-9 と、ADL と AWB における 1-octanol の受容情報伝達に関わる cGMP 依存性チャネル TAX-4 の変異体を用いて 1-octanol に対する忌避行動テストをおこなった (図 13A, B)。その結果、野生株は 1-octanol に対して忌避行動を示したのに対し、ネガティブコントロールである *osm-9* 変異体と *tax-4* 変異体では忌避行動の異常が見られた (図 13A)。*kqt-2* 変異体では野生株に比べ、1-octanol に対する忌避行動の低下が見られた (図 13A)。これらの細胞特異的レスキュー実験と忌避行動テストの結果から、KQT-2 は ADL 感覚ニューロンにおいて低温馴化と忌避行動の制御に関わることが示唆された。

これまでに、25 °C で飼育した野生株に温度刺激を与えると、ADL 感覚ニューロン内の細胞内カルシウム濃度が温度変化に応じて変化することが報告

されている (Ujisawa et al. 2018)。このことから ADL は温度受容ニューロンであると考えられている。この ADL 温度受容ニューロンの温度応答性が飼育温度に依存するかを調べるために、カルシウムインディケータである YC3.60 を ADL 温度受容ニューロン特異的に発現させ、カルシウムイメージング解析をおこなった。25 °C 飼育後の野生株では、17 °C から 23 °C に温度変化させた際に ADL 感覚ニューロン内におけるカメレオンの蛍光輝度比が約 9~10 % 変化した (図 14A, B)。それに対し、15 °C 飼育の野生株では 25 °C 飼育の野生株よりも ADL 温度受容ニューロンの温度変化に対するカルシウム濃度変化が低く、約 4~5 % の蛍光輝度比の変化が見られた (図 14A, B)。以上の結果から、飼育温度によって ADL 温度受容ニューロンの温度応答性が変化することが示唆された。

25 °C 飼育後の *kqt-2* 変異体の ADL 温度受容ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージング解析で調べたところ、17 °C から 23 °C の温度変化に対して、*kqt-2* 変異体の ADL では野生株に比べ温度応答性の神経活動の低下が見られた (図 15A, B)。*kqt-2* 変異体の ADL 温度受容ニューロンの温度応答性の低下異常は、ADL 感覚ニューロン特異的に *kqt-2* 遺伝子を発現させることによって回復した (図 15A, B)。しかしながら、15 °C で飼育した *kqt-2* 変異体では、ADL の温度応答性に異常は見られなかった (図 16A, B)。以上の *kqt-2* 変異体のカルシウムイメージングの結果は、*kqt-2* 変異体が 25 °C 飼育後に低温馴化異常を示すが、15 °C 飼育後の *kqt-2* 変異体は正常な低温馴化を示すことと一致している。以上の結果から、カリウムチャンネル KQT-2 は 25 °C 飼育個体において ADL 温度受容ニューロンの温度感知情報伝達と低温馴化を制御していることが示唆された。

2.4 KQT 型カリウムチャンネル KQT-3 は KQT-2 と反対の役割を果たす

哺乳類の KQT 型カリウムチャンネルである KCNQ チャンネルは活性化することによって神経活動を抑制することが知られているが、予想に反して *kqt-2* 変異体では温度変化に対する ADL の神経活動の低下が見られた (図 15A, B)。そこで、KQT-2 がどのようにして ADL の神経活動を制御するかを調べるために、ADL 感覚ニューロンで *kqt-2 cDNA* を過剰発現させた野生株の温度依存的なカルシウム濃度変化を測定した。*kqt-2* 遺伝子を ADL で過剰発現させた野生株において、カルシウムイメージング解析をおこなったところ、ADL の神経活動が過活性化する表現型が見られた (図 17A, B)。つまり、カリウムチャンネル KQT-2 は野生株の ADL において、神経活動を活性化する働きをもつことが示唆された。哺乳類の KCNQ2 と KCNQ3 はヘテロチャンネルを形成することが報告されている (Wang et al. 1998)。そのため、KQT-2 もまた、他の KQT 型カリウムチャンネルと複合体を形成し、KQT-2 がネガティブレギュレーターとして働く可能性が考えられた。*C. elegans* は *kqt-1*、*kqt-2* と *kqt-3* の 3 種類の KQT 型カリウムチャンネルをコードしている。そこで、*kqt-1* 変異体と *kqt-3* 変異体の低温馴化テストをおこなった。*kqt-1* 変異体は低温馴化に異常は見られなかったが、*kqt-3* 変異体では低温馴化が上昇する異常が見られた (図 18A-F、図 19)。*kqt-3* は ADL を含む複数の感覚ニューロンで発現していることが報告されている (Wei et al. 2005)。そこで、KQT-3 が温度変化に対する ADL 感覚ニューロンの神経活動に関わっているかを調べるために、*kqt-3* 変異体のカルシウムイメージング解析をおこなった。*kqt-3* 変異体の ADL 感覚ニューロンの温度変化に対するカルシウム濃度変化を

測定したところ、野生株と比べ細胞内カルシウム濃度の上昇が見られた (図 20A, B)。

kqt-2 変異と *kqt-3* 変異の遺伝学的優位関係を調べるために、*kqt-2; kqt-3* 二重変異体を作製し、ADL の温度応答性のカルシウムイメージング解析と低温馴化テストをおこなった。*kqt-2; kqt-3* 二重変異体の ADL 温度受容ニューロンのカルシウムイメージング解析の結果、*kqt-2* 変異体の温度変化に対する ADL の神経活動の低下は *kqt-3* 変異によって抑圧され、*kqt-3* 変異体と同様の表現型を示した (図 20A, B)。さらに、*kqt-2; kqt-3* 二重変異体の低温馴化テストの結果、*kqt-2* 変異体の低温馴化異常は *kqt-3* 変異によって抑圧された (図 19)。これらの遺伝学的解析から、*kqt-3* は遺伝学的に *kqt-2* の下流で低温馴化と ADL の神経活動を制御することが示唆された。この結果は KQT-2 が KQT-3 のネガティブレギュレーターとして働くという仮説と一致している。以上の結果から、KQT-2 は ADL 感覚ニューロンにおいて、KQT チャンネルのネガティブレギュレーターとして働くことによって、ADL の温度感知を制御する可能性が考えられた。

2.5 TRP チャンネル OCR-1 は ADL 感覚ニューロンの温度応答性の負の制御因子として働く

カリウムチャンネル KQT-2 は ADL 温度受容ニューロンで低温馴化を制御し、ADL 感覚ニューロンの温度応答性を正に制御することが示唆された。次に、KQT-2 と既知の ADL 温度受容ニューロンにおける温度情報に関わる分子と

の遺伝学的な関係を調べた。過去の解析から、ADL で発現する TRP チャネルである OSM-9、OCR-1 と OCR-2 は低温耐性に関与し、OSM-9、OCR-1 と OCR-2 を介して ADL 内の温度情報伝達がおこなわれていることが報告されている (Ujisawa et al. 2018)。また、*osm-9* 変異体と *ocr-2 osm-9; ocr-1* 三重変異体は低温耐性に異常を示すが、*ocr-1* 変異体と *ocr-2* 変異体の各単独の変異体では低温耐性の異常は見られなかった (Ujisawa et al. 2018)。そこで、*ocr-1* 変異体と *ocr-2* 変異体の各単独の変異体に関して、低温馴化テストと ADL 温度受容ニューロンの温度応答性のカルシウムイメージング解析をおこなった。その結果、*ocr-1* 変異体と *ocr-2* 変異体は低温馴化に異常を示さなかったが (図 21A, B)、*kqt-2* 変異体の低温馴化異常は *ocr-1* 変異によって抑圧された (図 22)。このことから、低温馴化において、*ocr-1* 変異は *kqt-2* 変異に対して遺伝学的に優位であることが示唆された。つまり、低温馴化に関して、OCR-1 と KQT-2 は遺伝学的に同一経路上で作用していると考えられる (図 22)。

TRP チャネルは、活性化すると脱分極を引き起こす非選択性陽イオンチャネルとして知られているため、TRP チャネルの機能欠失型の変異体では神経活動が低下すると考えられる。*ocr-1* 変異体のカルシウムイメージングの結果、予想に反して温度変化に対して ADL 感覚ニューロンの細胞内カルシウム濃度が野生株に比べて上昇する異常が見られた (図 23A, B)。さらに、*osm-9; ocr-1* 二重変異体と *ocr-2; ocr-1* 二重変異体のカルシウムイメージングをおこなった結果、*ocr-1* 変異体において ADL の温度応答性が上昇する異常は、*osm-9* 変異または *ocr-2* 変異によって抑圧された (図 24A, B、図 25A, B)。以上の結果から、*osm-9* 変異と *ocr-2* 変異は、*ocr-1* 変異に対して遺伝学的に優位であることが示唆され

た。つまり、OCR-1 は OCR-2 と OSM-9 の抑制因子として機能し、OCR-1、OCR-2 と OSM-9 は遺伝学的に同一経路上で作用していると考えられる。

次に、*kqt-2; ocr-1* 二重変異体のカルシウムイメージング解析をおこなった。その結果、*kqt-2* 変異体の温度刺激に対する ADL の神経活動の低下は *ocr-1* 変異によって部分的に抑圧され、*ocr-1* 変異体と *kqt-2* 変異体の ADL の温度応答性の中間の表現型を示した (図 26A, B)。以上の多重変異体における ADL の温度応答性のカルシウムイメージング解析から、ADL 温度受容ニューロン内において、TRP チャンネルである OCR-1 はカリウムチャンネル KQT-2 とは別経路で ADL 感覚ニューロンの温度変化に対する神経活動を制御していると考えられる。

2.6 酸素情報は ADL を介する低温馴化に影響を与える

これまでの解析から *kqt-2* 変異体は、低温馴化に異常をもつことが示唆された。*kqt-2* 変異体の低温馴化の表現型解析を進めるなかで、予想に反して、*kqt-2* 変異体の低温馴化は飼育寒天培地 (NGM プレート) の大きさによって異なる表現型が見られた。卵から成虫まで直径 3.5 cm の寒天培地 (直径 3.5 cm プレート) で飼育した後に 2 °C の低温刺激を与えても、野生株と *kqt-2* 変異体の間で顕著な低温馴化の差は見られなかった。ところが、野生株と *kqt-2* 変異体を直径 6 cm の寒天培地 (直径 6 cm プレート) で飼育した後に 2 °C の低温刺激を与えると、*kqt-2* 変異体では野生株に比べて顕著に低温馴化が上昇する異常が見られた (図 27)。つまり、飼育温度に加えて、飼育培地の大きさに起因する他の環境

因子が *kqt-2* 変異体の低温馴化異常に影響を与えていることが示唆された。ここまでの *kqt-2* 変異体の低温馴化テストとカルシウムイメージング解析から、ADL 温度受容ニューロンが低温馴化を制御することが示唆された (図 12、図 15A, B)。ADL は忌避性の化学物質を受容する嗅覚ニューロンとしても知られており、忌避物質であるアスカロシドフェロモンに対する ADL 感覚ニューロンの神経応答性は、酸素濃度の影響を受けることが報告されている (Fenk and de Bono 2017)。具体的には、酸素受容ニューロンである URX 感覚ニューロンは RMG 介在ニューロンを介して、間接的に ADL の神経活動を変化させることが神経回路レベルで見つかっている (Fenk and de Bono 2017)。これらの情報をもとに、直径 3.5 cm プレートと直径 6 cm プレートの酸素濃度の違いが *kqt-2* 変異体の低温馴化の表現型に影響を与えている可能性を考えた。過去の研究から、寒天プレート上の酸素濃度は線虫の餌である大腸菌によって影響されることが報告されている (Gray et al. 2004)。そこで、低温馴化テストで使用している直径 3.5 cm プレートと直径 6 cm プレートで酸素濃度が異なるかを調べた。具体的には、光学的に酸素濃度を測定できる装置を用いて餌である大腸菌が塗られた寒天上の酸素濃度を測定した (図 28)。低温馴化テストの操作プロトコルと同様に、大腸菌が塗布された飼育寒天培地上で親に卵を産ませ、数時間後に親を取り除き、飼育プレートをパラフィルムで密閉した。それらのプレートを 24 時間から 64 時間静置し、飼育プレート中の寒天培地上に塗布された大腸菌中の酸素濃度を測定した。その結果、産卵後 52 時間から 64 時間後において、直径 6 cm プレートの大腸菌上の酸素濃度は安定して約 15% の酸素濃度を示したのに対し、直径 3.5 cm プレートでは寒天培地上に塗布された大腸菌中の酸素濃度は約 10% であった (表 1)。

酸素情報が低温馴化に影響を与える可能性が考えられたため、酸素受容に異常をもつ変異体における低温馴化を解析することにした。URX 酸素受容ニューロンは RMG 介在ニューロンを介して ADL 感覚ニューロンと神経回路を形成している。この URX における酸素受容体 GCY-35 の変異体について低温馴化を測定した。*gcy-35* 変異体を用いて低温馴化テストをおこなったところ、*gcy-35* 変異体は低温馴化の低下を示した。この *gcy-35* 変異体の低温馴化の低下は、*kqt-2* 変異体を示す低温馴化の上昇とは反対の表現型であった。さらに、*gcy-35* 変異によって *kqt-2* 変異体の低温馴化の上昇異常が抑圧された (図 29)。また、カルシウムイメージング解析から、*kqt-2* 変異体の ADL 感覚ニューロンの温度変化に対する神経活動の低下も *gcy-35* 変異によって抑圧された (図 30)。以上の結果から、酸素受容体 GCY-35 は、ADL 感覚ニューロンの温度情報伝達と個体の低温馴化に影響を与えていることが示唆された。

飼育時の酸素濃度が、低温馴化に直接影響を与えているかを調べるために、酸素濃度を変更できるインキュベーターを用いて、20 %酸素濃度、10 %酸素濃度、5 %酸素濃度で飼育した後の野生株と *kqt-2* 変異体の低温馴化の表現型を調べた。野生株では、20 %酸素濃度と 10 %酸素濃度で各々飼育した後の低温馴化に差は見られなかった。しかし、5 %酸素濃度で飼育すると 20 %酸素濃度で飼育した野生株に比べて低い生存率を示した (図 31)。このことから、野生株においても低温馴化は飼育酸素濃度に影響されることが示唆された。*kqt-2* 変異体は、低い酸素濃度 (10 %あるいは 5 %) で飼育されると、野生株と同様に低温馴化できず低い生存率を示した (図 32)。この結果は、酸素濃度が低い直径 3.5 cm の寒天培地で飼育した時よりも、酸素濃度が高い直径 6 cm の寒天培地で *kqt-*

2 変異体を飼育した方が低温馴化が上昇する結果と一致している (図 27)。URX 酸素受容ニューロンで酸素受容体として働く GCY-35 の変異体では、URX で受容された酸素情報が ADL に伝達されないため、*gcy-35* 変異体の低温馴化の表現型は飼育酸素濃度の影響を受けないと予想し、解析をおこなった (図 33)。その結果、20%酸素濃度と 10%酸素濃度で飼育後の *gcy-35* 変異体では、低温馴化に各飼育条件間で顕著な差は見られなかった (図 33)。ところが予想に反して、*gcy-35* 変異体を 5%酸素濃度下で飼育すると、20%酸素濃度下で飼育した場合よりも低い生存率を示した (図 33)。同様に、10%酸素濃度または 5%酸素濃度下で飼育された *gcy-35; kqt-2* 二重変異体は、20%酸素濃度下で飼育された *gcy-35; kqt-2* 二重変異体に比べて低温馴化テストにおいて低い生存率を示した (図 34)。これらの結果から、GCY-35 以外にも低温馴化に影響を与える酸素受容体は存在する可能性が考えられる。

以上の結果から、少なくとも URX 酸素受容ニューロンで酸素受容体として働く GCY-35 を介して酸素情報が ADL 温度受容ニューロンに影響を与え、低温馴化が制御されることが示唆された。高い酸素濃度下では URX 感覚ニューロンが活性化し、RMG 介在ニューロンを介して、ADL 温度受容ニューロンの温度応答性を負に制御していると考えられる。その結果として、*kqt-2* 変異体では高い酸素濃度下において低温馴化が上昇する異常が見られたと考えられる。

3. 考察

3.1 ADL 感覚ニューロンが制御する低温馴化

本研究の生理学的解析と遺伝学的解析により、KQT-2 の発現が見られた組織のうち、ADL 感覚ニューロンが温度変化に対する神経活動を変化させることによって、低温馴化を制御することが示された。KQT 型カリウムチャンネルである KQT-2 と KQT-3 の変異体の低温馴化テストの結果から、KQT-2 と KQT-3 は ADL 感覚ニューロンで低温馴化を制御することが示唆された。さらに、ADL 感覚ニューロンの温度応答性を測定するカルシウムイメージング解析から、KQT-2 は KQT-3 のネガティブレギュレーターとして働くことにより、ADL ニューロンの神経活動を制御することが示唆された (図 20)。過去の研究から、*kqt-2* 遺伝子は野生株 N2 を 23 °C で飼育した後に 17 °C に 4 時間温度シフトすることによって発現が上昇することが報告されている (Sugi et al. 2011)。本研究の低温馴化テストの条件として、線虫を 25 °C で飼育した後に 15 °C に 3 時間置き、2 °C の低温刺激を与える実験系を用いた。そのため、野生株において、25 °C に置いたままの個体と比べると、25 °C から 15 °C に 3 時間静置された個体は *kqt-2* 遺伝子の発現量が増加し、KQT-2 の増加が低温馴化に影響を与えたと考えられる。KCNQ 型カリウムチャンネルである KCNQ2 と KCNQ3 はヘテロ複合体を形成し、比較的低い閾値を持つ電位依存性のカリウム電流である M 電流を制御するチャンネルとして働くことが知られている (Wang et al. 1998)。KCNQ 型カリウムチャンネルと同様に、KQT-2 は 25 °C で飼育した後に低い温度に移されることで発

現が増加し、KQT-3 と複合体を形成して、KQT-2/KQT-3 ヘテロチャネルを形成し、チャネルの活性を抑制する可能性が考えられる。*kqt-2* 変異体では、KQT-2/KQT-3 ヘテロチャネルが形成されず、活性化した KQT-3 ホモチャネルが、カリウムイオンを過剰に放出することによって、温度変化に対する ADL の神経活動が低下したと考えられる。さらに、*kqt-2* 遺伝子を ADL で過剰発現させると KQT-2/KQT-3 ヘテロチャネルが過剰に形成され、チャネルが閉口することにより、カリウムイオンの放出が抑制されることによって、神経活動が上昇したと考えられる (図 17)。このように、KQT-2 は環境の変化に応じて発現量を変化させることにより、KQT-3 の活性の調節をするタンパク質として働くことが示唆された。KQT-2 が働くことにより、ADL 温度受容ニューロンの神経活動が調節され、新しい温度環境への馴化メカニズムが制御されていることが考えられる。KQT-2 は KQT-3 のネガティブレギュレーターとして働くことによって、ADL の神経活動を上昇させ、TRP チャネルである OCR-1 は OCR-2/OSM-9 のネガティブレギュレーターとして働くことによって、ADL の神経活動を低下させることがわかった (図 35)。このように、KQT 型カリウムチャネルと TRP チャネルは類似した制御機構でチャネルの開閉を制御していることが示唆された。*kqt-2; ocr-1* 二重変異体の低温馴化とカルシウムイメージングの解析から、KQT 型カリウムチャネルと TRP チャネルは別経路で働くことによって ADL の神経活動を調節し、低温馴化を制御していることが示唆された (図 35)。温度が変化すると、ADL で発現する TRPV チャネルである OSM-9、OCR-2 と OCR-1 がカルシウムイオンを流入させることにより、ADL の神経活動を上昇させ、逆に KQT 型カリウムチャネルはカリウムイオンを放出することによって ADL の神経活動を低下

させることが示唆された (図 35)。このように TRP チャンネルと KQT 型カリウムチャンネルがそれぞれ逆の機能を果たすことによって、温度刺激時の ADL の神経活動の活性を別経路で調節していると考えられる。

過去の DNA マイクロアレイ解析の結果から、野生株を 23 °C で飼育した後に 4 時間 17 °C に静置した際に発現変動する遺伝子として 79 遺伝子が単離された (Sugi et al. 2011)。これら 79 遺伝子のうち、最も発現量が上昇したとして単離されたエンドヌクレアーゼをコードする *endu-2* 遺伝子の変異体は 20 °C あるいは 25 °C で飼育後に低温耐性が上昇する異常を示した (Ohta et al. 2014; Ujisawa et al. 2018)。さらに、*endu-2* 変異体は温度変化に対する ADL 温度受容ニューロンの神経活動が低下する異常が見られた (Ujisawa et al. 2018)。カリウムチャンネルをコードする *kqt-2* 遺伝子は *endu-2* 遺伝子に次いで 2 番目に発現量が上昇した遺伝子として単離された (Sugi et al. 2011)。*kqt-2* 変異体では 25 °C で飼育した後に 15 °C に 3 時間置いて 2 °C の低温刺激を与えると野生株に比べて生存率が上昇する異常を示し、ADL の温度変化に対する神経活動が低下する異常が見られた。この低温馴化異常と ADL の温度変化時の神経活動の異常は ADL ニューロンで特異的に *kqt-2* 遺伝子を発現させることによって回復した。さらに、ADL で発現する TRPV チャンネルの三重変異体 (*ocr-2 osm-9; ocr-1*) では、低温耐性の上昇異常が見られ、ADL の神経活動が低下する異常も示すことが報告されている (Ujisawa et al. 2018)。これらの *endu-2* 変異体と *kqt-2* 変異体、そして TRPV チャンネル変異体の低温耐性・低温馴化の表現型と ADL の温度応答性のカルシウムイメージング解析の結果から、ADL 温度受容ニューロンの温度変化に対する神経活動の低下が低温耐性・低温馴化の上昇につながると考えられる。

3.2 酸素情報と温度情報の統合に関わる神経回路

kqt-2 変異体の低温馴化が上昇する異常は飼育酸素濃度によって影響されることがわかった。過去の研究から、URX 酸素受容ニューロンからの酸素情報は RMG 介在ニューロンを介して ADL 化学受容ニューロンのアスカロシドフェロモンに対する神経活動を変化させることが報告されている (Fenk and de Bono 2017)。*kqt-2* 変異体は ADL ニューロンの神経活動が低下し、低温馴化が上昇する異常を示すのに対し、*kqt-2; gcy-35* 二重変異体では URX 酸素受容ニューロンで酸素受容体として働く *gcy-35* 変異により、*kqt-2* の低温馴化の上昇は抑圧され、野生株と同じ低温馴化を示した (図 36)。以上の結果から、URX 酸素受容ニューロンによって受容された酸素情報と ADL 温度受容ニューロンによって受容された温度情報が ADL 感覚ニューロンで統合されることによって低温馴化が制御されている可能性が考えられる (図 36)。

低温耐性を制御することが報告されている ASJ ニューロンは温度だけではなく、光も受容することが報告されている (Ward et al. 2008)。ADL もまた、温度だけではなく、アスカロシドフェロモンや 1-octanol などの化学物質を受容することが報告されている (Troemel et al. 1995; Troemel et al. 1997; Jang et al. 2012)。さらに、ADL の上流に存在する URX 感覚ニューロンは酸素を受容し、RMG 介在ニューロンを介して ADL のアスカロシドフェロモンに対する神経活動が変化することが知られており (Fenk and de Bono 2017)、本研究の解析から、URX からの酸素情報は ADL ニューロンの温度応答性に影響を与えることも分かってきた。これらのことから、ADL は他の感覚ニューロンともシナプス結合やギャッ

ブ結合を介して接続しており、ADL の上流の感覚ニューロンで受容された環境情報を下流の神経に伝達する役割も果たすことが分かってきた。このように、ADL はさまざまな環境刺激に対して直接的、または間接的に環境情報を受け取り、下流のニューロンに情報を伝達する役割を果たしている。線虫 *C. elegans* の神経細胞は 302 個であり、そのうち頭部の感覚ニューロンは左右 12 対、わずかに 24 個である。線虫 *C. elegans* は限られた数の感覚ニューロンで複数の環境情報を受容し、それらの情報を区別や統合する神経回路が形成されていると考えられる。ヒトを含む高等動物では、さらに莫大な情報量を適切に処理するための複雑な神経回路を構成している。脳・神経系を構成する個々の神経細胞に入力される複数の情報が混線することなく、どのように神経細胞内や神経回路内で区別や統合、クロストークされているのかについては、未知な点が残されている。ヒトの脳の複雑な神経ネットワークの解明には時間を要すると考えられるため、本研究の *C. elegans* の複数の神経情報の区別や統合に関わるメカニズムの解析を進めることで、高等動物の脳・神経系における神経情報の区別や統合に関わる神経回路メカニズムの基本原理を理解する糸口になると考えられる。

3.3 低温馴化に関わる神経回路と組織

15 °C で飼育した野生株と 25 °C で飼育した *kqt-2* 変異体は ADL の神経活動の低下が見られ、2 °C の低温刺激を与えると高い生存率を示す。つまり、ADL の神経活動が低下することによって、低温馴化が上昇する可能性が考えら

れる。しかしながら、*kqt-3* 変異体と *ocr-1* 変異体は温度変化に対する ADL の神経活動が上昇するにも関わらず、*kqt-3* 変異体は低温馴化が上昇し、*ocr-1* 変異体は正常な低温馴化の表現型を示す。さらに、*gcy-35* 変異体では ADL の温度変化に対する神経活動は正常だが、低温馴化に関して低い生存率を示す。そのため、ADL 感覚ニューロンは低温馴化を制御すると考えられるが、低温馴化のメカニズムには ADL に加え、低温馴化への関与が未同定のニューロンも含んだ複雑な神経回路情報処理が必要である可能性が考えられる。

これまでの研究から、低温耐性には ASJ 温度受容ニューロン、精子、腸、筋肉が関わっていることが報告されている。ASJ 温度受容ニューロンが温度を受容すると、インスリンを分泌し、腸がインスリンを受容することによって低温耐性が制御され、さらに、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ことがわかっている (Ohta et al. 2014; Sonoda et al. 2016; Ujisawa et al. 2016)。精子の変異体、*gsp-4* 変異体の低温馴化異常は *kqt-2* 変異によって抑圧されることから、精子が ADL に影響を与えていることが示唆されており、KQT-2 の低温馴化メカニズムは既知の低温耐性に関わる組織との相互作用によって制御されている可能性が考えられる (Okahata et al. 2019)。

体腔の酸素受容ニューロン URX において酸素受容体として働く GCY-35 の変異体では低温馴化の低下が見られ、*gcy-35* 変異は *kqt-2* 変異体の低温馴化の上昇と ADL の神経活動の低下を抑圧した。また、20 %と 10 %酸素濃度で飼育した *gcy-35* 変異体の低温馴化は変わらなかったが、*kqt-2* 変異体は 10 %酸素濃度で飼育した方が 20 %酸素濃度飼育後の *kqt-2* 変異体よりも低温馴化が低下する表現型を示した (図 32)。このことから、URX からの酸素情報が *kqt-2* によ

って低温馴化が制御される ADL の神経活動に影響を与えて、低温馴化が変化することが示唆された。しかし、野生株と *gcy-35* 変異体を 5 %酸素濃度で飼育すると、低温馴化の低下が見られ、10 %酸素濃度飼育後の *gcy-35; kqt-2* でも *kqt-2* 変異体と同様に低温馴化の低下が見られた。このことから *gcy-35* 以外にも酸素受容体は存在し、他の酸素受容体からの酸素情報が低温馴化に影響を与えている可能性が考えられる。

gcy-35 変異体は ADL の神経活動が正常であるのにも関わらず、*kqt-2* 変異体の ADL の神経活動の低下は *gcy-35* 変異によって抑圧された。この結果は、*gcy-35* 変異体では、*gcy-35* 変異により酸素情報が伝達されない状況を防ぐために、他の酸素受容体が代償的に酸素情報を ADL に伝えることで、野生株と同様の ADL の神経活動を示した可能性を示唆している。しかし、*gcy-35; kqt-2* 二重変異体では *kqt-2* 変異により、ADL の神経活動が低下しているため、他の酸素受容体からの酸素情報よりも、*gcy-35* 変異による ADL への神経活動の影響が強く現れた可能性が考えられる。

以上のことから、ASJ、腸、精子、筋肉などの既知の低温耐性に関わる組織や、他の酸素受容体からの酸素情報、まだ同定されていない低温馴化を制御するニューロンなどの複雑なネットワークにより、個体レベルでの低温馴化の表現型が決定される可能性が考えられる。

4. 結語

本研究から、線虫 *C. elegans* は酸素濃度依存的に温度情報伝達をしていることが示唆され、そのシンプルな神経回路を同定した。これまで、低温耐性に関わる遺伝子や低温耐性を制御する組織は複数同定されているが、温度馴化メカニズムに関しては報告が無かった。今回の解析により、温度馴化には KQT 型カリウムチャンネルが関わっており、KQT 型カリウムチャンネルは ADL で低温馴化を制御することがわかった。また、ADL では TRP チャンネル OSM-9、OCR-2、OCR-1 が温度変化に対する神経活動を制御しており、OCR-1 が OSM-9、OCR-2 を負に制御することが示唆された。さらに、KQT 型カリウムチャンネルが制御する温度馴化は飼育酸素濃度によって影響を受けることがわかった。KQT 型カリウムチャンネルが低温馴化を制御する ADL 温度受容ニューロンの上流には URX 酸素受容ニューロンが存在しており、温度情報と URX からの酸素情報が ADL 温度受容ニューロンで統合されることによって、低温馴化が酸素濃度に依存すると考えられる。動物は常に複数の環境情報を受けとり、情報処理していると考えられるが、高等動物では複雑であるため、複数の環境情報を伝達する神経回路のメカニズムを解明するには時間を要すると考えられる。本研究ではシンプルなモデル動物である線虫 *C. elegans* を用いて、温度情報と酸素情報という、異なる 2 つの感覚情報の統合に関わる神経回路モデルを提唱した。今後、この実験系を用いて解析を進めることで、高等動物まで保存された神経回路における情報の区別や統合の基本原理の理解に繋がると考えられる。

5. 材料・方法

線虫 *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)。

使用した線虫系統

N2 Bristol England, KHR181 *kqt-2(ok732)*, *kqt-2(tm642)*, CX4544 *ocr-2(ak47)*, CX4652 *ocr-2(ak47)* *osm-9(ky10)*, ZK64 *kqt-3(aw1)*, KHR182 *kqt-3(aw1); kqt-2(ok732)*, CX4533 *ocr-1(ok132)*, KHR183 *ocr-1(ok132); kqt-2(ok732)*, KHR184 *ocr-2(ak47); kqt-2(ok732)*, CX6448 *gcy-35(ok769)*, KHR185 *gcy-35(ok769); kqt-2(ok732)*, RB1415 *catp-3(ok1612)*, VC693 *cgt-1(ok1045)*, RB2095 *clec-67(ok2770)*, RB1262 *cpr-1(ok1344)*, FX2418 *dhs-4(tm2418)*, RB1772 *dmd-7(ok2776)*, FX2468 *F58E6.7(tm2468)*, NL795 *gpa-7(pk610)*, RB1373 *gpdh-1(ok1558)*, RB883 *kqt-2(ok732)*, CZ1758 *max-1(ju142)*, FX1770 *mtl-1(tm1770)*, FX830 *pgp-9(tm830)*, RB908 *pmp-1(ok773)*, T28C12.4(*tm1013*), CX0010 *osm-9(ky10)*, FK127 *tax-4(p678)*, VC1149 *C25B8.4&kqt-1(ok413)*, KHR186 *tax-4(p678); kqt-2(ok732)*, FX05415 *gsp-4(tm5415)*, KHR187 *gsp-4(tm5415); kqt-2(ok732)*, *kqt-2(ok732); Ex[pKDK66, pAK62], kqt-2(ok732); Ex[kqt-2 genomic gene, pKDK66, pAK62], kqt-2(ok732); Ex[ges1-p::kqt-2, pKDK66, pAK62], kqt-2(ok732); Ex[osm-6p::kqt-2, pKDK66, pAK62], N2; Ex[pMSK029 kqt-2p(1 kb)::kqt-2 genomic gene(1st to 12th exon)::gfp, pRF4], N2; Ex[pMSK030 kqt-2p(2.3 kb)::kqt-2 genomic gene(1st to 12th exon)::gfp, pRF4], N2; Ex[pMSK031 kqt-2p(4.6 kb)::kqt-2 genomic gene(1st to 12th exon)::gfp, pRF4], N2; Ex[kqt-2 cDNA::gfp], *kqt-2(ok732)*; *Ex[sra-**

*7p::kqt-2 cDNA pAK62, pKDK66], kqt-2(ok732); Ex[sre-1p::kqt-2 cDNA, pAK62, pKDK66], N2; Ex[sre-1p::yc3.60, pRF6], kqt-2(ok732); Ex[sre-1p::yc3.60, pRF6], kqt-2(ok732); Ex[sre-1p::kqt-2 cDNA, sre-1p::yc3.60], N2; Ex[sre-1p::kqt-2 cDNA, sre-1p::yc3.60], kqt-3(*aw1*); kqt-2(ok732) Ex[sre-1p::yc3.60], kqt-3(*aw1*); Ex[sre-1p::yc3.60], ocr-1(ok132); Ex[sre-1p::yc3.60], ocr-2(*ak47*); Ex[sre-1p::yc3.60], osm-9(*ky10*); ocr-1(ok132); Ex[sre-1p::yc3.60], ocr-2(*ak47*); ocr-1(ok132); Ex[sre-1p::yc3.60], ocr-1(ok132); kqt-2(ok732); Ex[sre-1p::yc3.60], osm-9(*ky10*)ocr-2(*ak47*); Ex[sre-1p::yc3.60].*

線虫の餌として使用した大腸菌

OP50 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 (OLYMPUS SZX12) (Olympus Corporation, Japan)

透過式実体蛍光顕微鏡 (NIKON SMZ18) (Nikon Corporation, Japan)

Olympus IX81 顕微鏡 (Olympus Corporation, Japan)

共焦点顕微鏡 高感度ディテクター付き (FV1000-IX81 with GaAsP PMT)
(Olympus Corporation, Japan)

線虫を飼育するのに使用した培地

培地の作製には全自動培地作製装置 MEDIA CLAVE10 (INTEGRA Biosciences, Switzerland) を用いた。Nematode Growth Medium (NGM) Plate (1,000 ml): 3 g の

NaCl、20 g の伊那寒天（伊那食品工業株式会社、日本）、2.5 g の Bacto Peptone (Becton Dickinson, USA)、975 ml の H₂O を MEDIA CLAVE10 の内釜に入れ、20 分 121 °C で加熱滅菌した。その後 60 °C に保温してから 1 ml の MgSO₄ 溶液 (1 M)、1 ml の CaCl₂ 溶液 (1 M)、1 ml の Cholesterol 溶液 (5 mg/ml in EtOH)、25 ml の Potassium Phosphate 溶液 (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 ずつ電動分注機 (FH-10SS, 株式会社ヒラカワ、日本) で分注して固めた。

アンピシリン入り LB (Luria-Bertani) プレート

H₂O 500 ml、LB Broth Lennox (Becton Dickinson, USA) 10 g、伊那寒天（伊那食品工業株式会社、日本）10 g を三角フラスコなどの耐熱容器に入れて混合し、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 に冷ましてからアンピシリン (100 mg/ml) 1,000 µl を加えた。これを直径 9 cm のシャーレに 12 ml ずつ分注して固めた。

LB 液体培地 (200 ml)

H₂O 200 ml、LB Broth Lennox (Becton Dickinson, USA) 4 g をメジウム瓶に入れて混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。

***C. elegans* の凍結保存に用いた Freezing Solution (2,000 ml)**

NaCl 10.85 g、KH₂PO₄ 9.8 g、Na₂HPO₄ 6 g、Glycerol 300 g、1 M NaOH 溶液 5.6 ml をメジウム瓶に加えた後に H₂O で 2,000 ml までメスアップした。これをオート

クレーブで加熱滅菌した後に 1 M MgSO₄ 溶液 1.3 ml を加えた。

M9 buffer (1000 ml)

KH₂PO₄ 3 g、Na₂HPO₄ 6 g、NaCl 5 g、H₂O 1000 ml を混合し、オートクレーブで加熱滅菌した後に 1 M MgSO₄ 溶液 1 ml を加えた。

低温耐性テスト

直径 3.5 cm あるいは直径 6 cm の NGM プレートで餌である *E. coli* OP50 を十分に与えた *C. elegans* を解析に用いた。1 または 2 個体ずつ OP50 が塗られた新しい 2 % (w/v) NGM プレートに置き (P₀)、各飼育温度で 12~24 時間飼育し、約 100 個の卵を産ませた。P₀ を除去し、卵 (F₁) が成虫になるまで、15 °C の場合は 132~150 時間、25 °C の場合は 52~67 時間飼育した。プレート中の F₁ 個体が成虫まで成長した後、NGM プレートの寒天培地側を氷の上に 20 分静置し、20 分後 2 °C の冷蔵庫 (CRB-41A, Hitachi, Japan) に移して 48 時間静置した。2 °C で 48 時間静置した後、15 °C に 1 日静置し、生きている線虫と死んでいる線虫を数えた。1 回のアッセイには 3 プレート以上用意し、異なる日に 3 回以上、計 9 プレート以上を準備した (Ujisawa et al. 2014)。

低温馴化テスト

低温馴化テストは過去の論文を参考にしておこなった (Ujisawa et al. 2014)。直径 3.5 cm あるいは直径 6 cm の NGM プレートで餌である *E. coli* OP50 を十分に与えた *C. elegans* を解析に用いた。1~2 匹の成虫 (P₀) を最初の温度で 15~20

時間飼育し、約 100 個の卵を産ませた。P₀ を 3 匹以上置く場合は約 100 個の卵を産むまで数時間飼育した。低温馴化の解析に十分な量の卵を産ませた後、世代を揃えるために P₀ を取り除き、卵から成虫になるまで最初の温度で飼育した。最初の温度が 15 °C の場合は成虫になるまで 132~150 時間飼育し、25 °C の場合は 52~67 時間飼育した。最初の温度で成虫になるまで飼育した後、2 番目の温度のインキュベーターに移し、0、3、5、8 時間静置した。2 番目の温度で飼育後、0、3、5、8 時間経ったら、NGM プレーートの寒天培地側を氷の上に 20 分静置し、20 分後 2 °C の冷蔵庫 (CRB-41A, Hitachi, Japan) に移して 48 時間静置した。2 °C で 48 時間静置した後、15 °C に 1 日静置し、生きている線虫と死んでいる線虫を数えた。1 回のアッセイには 3 プレート以上用意し、異なる日に 3 回以上、計 9 プレート以上を準備した (Ujisawa et al. 2014)。

ヒートショックによるオスの取得

掛け合わせたい線虫系統の L4 (P₀) を 1 つのプレートに 30~50 匹のせて 30 °C の温度ショックを 8 時間与えた。翌日、成虫になった個体を 2~3 匹ずつ新しいプレートに置き、F₁ が成虫になるまで飼育した。F₁ が成虫になったら、プレートからオス (F₁) を見つけ出し、2~3 匹ずつメイティングプレート (培地の中心部分だけに大腸菌をのせたもの) に移し、そこに掛け合わせたい線虫系統の雌雄同体を約 4 匹のせ、交配させた。このプレートを 3~5 枚用意した。翌日、掛け合わせた雌雄同体を 1 匹ずつ新しいプレートに移し、次世代が成虫になるまで飼育し、雄が出ているか確認した。

欠失変異を指標とした戻し交配 (例: *kqt-2(ok732)*)

雌雄同体の *kqt-2(ok732)* (P₀) と N2; *ExUDA17[pAK62 AIYp::gfp, pKDK66 ges-1p::gfp]* (P₀) のオスと交配させ、蛍光を発する F₁ 個体、つまり、変異 (deletion) がヘテロとなる雌雄同体 (F₁) を単離した。自家受精すると、変異型のホモ、野生型のホモ、もしくはヘテロを持った線虫が発生する (F₂)。F₂ 個体を 1 匹ずつシャーレに移し、一晚卵を産ませた後、翌日 F₂ から線虫 1 個体由来のゲノムを採取した。そのゲノムを用いて PCR をおこない、変異型のホモ、ヘテロ、野生型のホモを見分けた。遺伝学的には、1/4 の確率で変異型のホモを持った系統が現れる。この系統を用いてもう一度戻し交配をおこなった。これを 5 回繰り返すと、元々あった変異 (deletion) 以外の変異は野生型に置き換わる。最後に低温馴化テストをおこない、異常が残っているかを確認した。

kqt-2 変異体の低温馴化異常を遺伝子導入により回復させる実験

kqt-2 遺伝子全長を野生株のゲノムを鋳型として PCR 法を用いてプロモーター領域を含む DNA 断片を増幅し、電気泳動をおこなった。目的のバンドを切り出し、カラムを用いてゲル抽出し、不純物を取り除いた。組織特異的な *kqt-2* 変異体の回復実験には Aguan D. Wei 博士より分与していただいた *kqt-2 cDNA* の上流に特異的プロモーターを挿入したプラスミドを用いた。導入する遺伝子とインジェクションマーカー、*ges-1p::nls::gfp* 溶液と *AIYp::gfp* 溶液を混合したインジェクション溶液をガラス針を用いて *kqt-2* 変異体の生殖巣に注入した。インジェクションした個体から生まれた線虫のうち、マーカーを持つ個体を系統化し、表現型が野生株と同程度まで回復しているか低温馴化テストをおこなった。テス

トの際には低温刺激の前日に GFP の蛍光を有している個体のみを約 30 匹/プレートになるように集め、それを 3 プレート以上準備し解析をおこなった。

分子生物学的解析

(1) PCR 溶液とサーマルサイクラーの温度プログラム

- *Ex Taq* (Takara Bio, Japan) を用いた PCR

1 μl の 10 \times *Ex Taq* Buffer、0.8 μl の 2.5 mM dNTP Mixture 溶液、目的の遺伝子領域を増幅させ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、0.05 μl の *Ex Taq*、テンプレートとなる DNA を 100 ng 以下になるように加え、全量 10 μl になるように dH₂O を入れてよく混合した。サーマルサイクラー LifeECO (Hangzhou Bioer Technology, China) あるいは LifeTouch (Hangzhou Bioer Technology, China) の温度プログラムは、94 $^{\circ}\text{C}$ を 2 分、94 $^{\circ}\text{C}$ を 15 秒、58 $^{\circ}\text{C}$ を 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ (30 秒/1 kb) を 1 サイクルとし、42 回繰り返し、15 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

- KOD -Plus- Neo (東洋紡、日本) を用いた PCR

5 μl の 10 \times PCR Buffer for KOD -Plus- Neo、5 μl の 2 mM dNTPs 溶液、3 μl の 25 mM MgSO₄ 溶液、目的の遺伝子領域を増幅させ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 1 μl ずつ、1 μl の KOD -Plus- Neo、テンプレートを Genomic DNA \sim 200 ng/50 μl 、Plasmid DNA \sim 50 ng/50 μl になるように加え、全量 50 μl になるように dH₂O を 200 μl チューブに入れてよく混合した。サーマルサイクラー LifeECO (Hangzhou Bioer Technology, China) あるいは

LifeTouch (Hangzhou Bioer Technology, China) の温度プログラムは、2 ステップあるいは3 ステップのプログラムを用いた。2 ステップの場合は、94 °Cを2分、98 °Cを10秒、68 °C (30 sec/1 kb) を1サイクルとし、35回繰り返す、15 °Cで保存した。3 ステップの場合は、94 °Cを2分、98 °Cを10秒、使用するプライマーの T_m 値に合わせた温度で30秒、68 °C (30 sec/1 kb) を1サイクルとし35回繰り返す、15 °Cで保存した。

・ *LA Taq* (Takara Bio, Japan) を用いた PCR

1 µl の 10 × LA PCR BufferII (Mg²⁺ free)、0.8 µl の 2.5 mM dNTPs Mixture 溶液、0.6 ~0.8 µl の 25 mM MgCl₂ 溶液、目的の遺伝子領域を増幅させ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 0.25 µl ずつ、0.1 µl の *LA Taq*、テンプレートとなる DNA を 1 µg 以下になるように加え、全量 10 µl になるように dH₂O を 200 µl チューブに入れてよく混合した。サーマルサイクラー LifeECO (Hangzhou Bioer Technology, China) あるいは LifeTouch (Hangzhou Bioer Technology, China) の温度プログラムは、94 °Cを2分、94 °Cを30秒、プライマーの T_m 値に合わせた温度で30秒、68 °C (1 min/1 kb) を1サイクルとし40回繰り返す、15 °Cで保存した。

(2) プラスミドの作製に用いた手法

・ In-Fusion 法によるプラスミドベクターへの DNA 断片の挿入

制限酵素処理もしくは PCR によって線状にしたベクターDNA の末端配列に相同な 15 塩基を、目的遺伝子増幅用プライマーの 5'末端に付加し、目的遺伝子を

PCR 増幅した。増幅産物を電気泳動し、ゲルから精製して、5 × In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara Bio, Japan) 2 µl と線状化ベクターとインサートをそれぞれ 100 ng になるように加え、全量 10 µl になるように dH₂O を混合し、結合させた (In-Fusion 反応 : 50 °C、15 分)。In-Fusion 反応液で形質転換をおこない、目的クローンをスクリーニングした。

- Ligation 法によるプラスミドベクターへの DNA 断片の挿入

利用するプラスミドベクターとインサートを同様の制限酵素で切断し、電気泳動後、ゲルから精製して、線状化ベクター:インサート =1:3 の割合で混合した。ベクターとインサートの混合溶液 : Ligation high Ver. 2 (東洋紡、日本) = 1:1 の割合で混合した溶液を 15 °C のインキュベーターで 30 分以上静置し、結合させた (Ligation 反応)。Ligation 反応液で形質転換をおこない、目的クローンをスクリーニングした。

- エレクトロポレーションによるプラスミド DNA の大腸菌への形質転換

-20 °C に保管してあるコンピテントセル DH10β (エレクトロポレーション用) を氷上で溶かした。この際キュベットを冷やしておき、溶けたコンピテントセル 20 µl にプラスミド DNA 溶液を 1~2 µl 入れ軽く混ぜてから、キュベットの隙間に泡立たないように注意しながら入れた。MicroPulser (Bio-Rad, USA) のレバーに向きを確認して挿入し、pulse と書かれたボタンを押した。180 µl の LB 液体培地でコンピテントセルを回収し、50 µl~100 µl をアンピシリン入り LB プレートにまき、37 °C で一晩培養した。

・ヒートショック法によるプラスミド DNA の大腸菌への形質転換

-80 °Cに保存してあるコンピテントセル DH10 β を氷上で溶かした。溶かした DH10 β と目的のプラスミド溶液を混合した。混ぜ合わせた溶液を 42 °Cで 45 秒間ヒートショックを与え、目的のプラスミドをコンピテントセルに導入した。ヒートショック後の溶液を氷上にしばらく静置した後、クリーンベンチでアンピシリン入り LB プレートに塗り広げ、37 °Cで一晩培養した。

解析に用いた PCR 断片とプラスミドの作製法

kqt-2 変異体の低温馴化異常を回復させる実験に用いた PCR 断片は、ゲノム由来の *kqt-2* 遺伝子上流 3.2 kb と全てのエキソンを含んだ領域を PCR により増幅し、電気泳動後にゲル抽出して精製したものを使用した。*kqt-2* 変異体の細胞特異的な低温馴化回復実験に用いたプラスミドは以下の方法で作製した。pMSK008 は Kozak 配列と *kqt-2 cDNA*、その下流に *unc-54* 遺伝子の 3'UTR を含んでいる。この pMSK008 の *kqt-2 cDNA* の上流に腸特異的プロモーター *ges-1p* (3.3 kb)、感覚ニューロン特異的プロモーター *osm-6p* (2.1 kb)、ASK 特異的プロモーター *sra-7p* (4.2 kb)、ADL 特異的プロモーター *sre-1p* (1.2 kb) をそれぞれ挿入し、pMSK004、pMSK005、pMSK007、pMSK024 を作製した。本研究で観察した *kqt-2::gfp* のプラスミドは Aguan D. Wei 博士より分与していただいた。このプラスミドは *kqt-2* 遺伝子上流 9 kb プロモーター領域、*kqt-2* 遺伝子の 1 番目エキソンから 12 番目エキソンが含まれたゲノム由来の遺伝子配列の下流に GFP が導入されていた (Wei et al. 2005)。このプラスミドを元に Inverse PCR 法を用いて目的配列を増幅した後に self ligation をおこない、プロモーター領域をそれぞれ 4.5 kb、2.3 kb、

1 kb に縮めたプラスミド (pMSK031、pMSK030、pMSK029) を作製した (図 10A)。KQT-2 の局在解析用のプラスミドである *kqt-2 cDNA::gfp* (pMSK028) の作製には、GFP が含まれている pPD95.75 をベクタープラスミドに用いた。*kqt-2* 遺伝子の上流 9 kb のプロモーター領域と *kqt-2 cDNA* を GFP の上流に挿入し、その際 *kqt-2 cDNA* の終止コドンを除いて GFP との融合遺伝子を作製した。

低酸素濃度の低温馴化テスト

餌である *E. coli* OP50 を十分に与えた成虫 (P₀) を複数匹 NGM プレートにのせ、約 100 個の卵を産むまで数時間飼育した。十分な卵を産ませた後、世代を揃えるために P₀ を取り除き、パラフィルムで NGM プレートを密閉した。ガスバリア性パウチ袋の奥へ O₂ メーター-BIONIX-3 (nB-3) (SUGIYAMA-GEN, Japan) を入れ、そのすぐ横に NGM プレートを置き、ガス濃度調節剤を入口付近に置いて、クリップで密封した。ガス濃度調節剤によりパウチ内の O₂ が吸収され、O₂ メーターが目的の O₂ 濃度を示した後、ガス濃度調節剤と NGM プレートをクリップで分離し、O₂ 吸収をストップさせた。パウチ袋に入れたまま、卵から成虫になるまで 25 °C のインキュベーターで 52~67 時間飼育後、15 °C のインキュベーターに移し、3 時間静置した。15 °C で 3 時間飼育後、パウチ袋に入れたまま、NGM プレートの寒天培地側を下にして氷上に 20 分静置した。20 分後、パウチ袋から NGM プレートを取り出し、タッパーに移して 2 °C の冷蔵庫 (CRB-41A, Hitachi, Japan) で 48 時間静置した。2 °C で 48 時間後、15 °C に 1 日静置し、生きている線虫と死んでいる線虫を数えた。1 回のアッセイに 3 プレート用意し、異なる日に 3 回以上、計 9 プレート以上を準備した。

酸素濃度の測定

酸素濃度は OXY-1 SMA (PreSens Precision Sensing GmbH, Germany)を用いて、酸素濃度を光学的に測定した。酸素センサーチップ SP-PSt3-NAU-D5-YOP (PreSens Precision Sensing GmbH, Germany) を直径 3.5 cm あるいは直径 6 cm の NGM プレーートの餌である大腸菌の上に置き、餌を十分に与えた線虫 (P_0) 置いて 60~100 匹の卵を産むまで 2~3 時間静置した。十分な卵を産ませた後、世代を揃えるために P_0 を取り除き、パラフィルムで NGM プレーートを密閉し、25 °C で飼育した。卵を産んでから 24 時間~64 時間後、光ファイバーから励起光を酸素センサーチップにあてて、酸素濃度に応じた蛍光を測定することによって光学的に酸素濃度を測定した。酸素濃度計 (PreSens OXY-1 SMA) を用いて、1 秒に 1 回の間隔で酸素濃度を測定し、卵を産んでから 24 時間~64 時間後にそれぞれ 10 秒間の酸素濃度を平均し、数値を算出した。

DiI 染色

DiI 染色により、露出している頭部のニューロン (ADL, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWB) と尾部のニューロン (PHA, PHB) が染色される。DiI 染色は WORMATLAS のプロトコル (<http://www.wormatlas.org/EMmethods/DiIDiO.htm>) を参考におこなった。DiI のストック溶液 (5 mg/ml) を入れたチューブはアルミホイルを巻いて遮光し、-20 °C で保存した。線虫を DiI 染色する際には DiI ストック溶液 (5 mg/ml) 0.7 μ l を 2 ml の M9 に溶かして希釈し、そのうち 150 μ l を 200 μ l のチューブに分注した。染色したい線虫複数匹を染色液に入れ、1 時間程度室温で染色した後、パストールピペットを使って大腸菌が塗られた新しい

NGM プレートに線虫を移した。約 1 時間線虫を這わせることで腸に入り込んだ DiI 染色液や体についた染色液を脱色した。100 mM NaN₃ 溶液を数滴置いたアガー スパット上に脱色後の線虫をのせて、カバーガラスをかけ、蛍光観察した。

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おこなった (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には、pKDK66 *ges-1p::nls::gfp* を 50 ng/μl、pAK62 *AIYp::gfp* を 30 ng/μl、または pRF4 *rol-6gf* を 30 ng/μl の濃度で入れた。

化学走性用プレートの作製

20 g の伊那寒天 (伊那食品工業株式会社、日本)、1,000 ml の H₂O を MEDIA CLAVE10 (INTEGRA Biosciences, Switzerland) で 20 分 121 °C で加熱滅菌した。その後 60 °C に保温してから 1 ml の MgSO₄ 溶液 (1 M)、1 ml の CaCl₂ 溶液 (1 M)、25 ml の Potassium Phosphate 溶液 (1 M, pH 6.0) を加えた。これを直径 9 cm のシャーレに 12 ml ずつ電動分注機 (FH-10SS, 株式会社ヒラカワ、日本) で分注して固めた。

忌避行動解析

忌避行動の解析は過去の論文に従っておこなった (Troemel et al. 1997; Kimura et

al. 2010)。餌である *E. coli* OP50 を十分に与えた成虫 2, 3 匹を乗せ、約 200 匹の卵を産ませた。解析する個体の成長速度を合わせるために約 20 時間後に親 (P₀) を取り除き、卵から成虫まで 20 °C で飼育した。忌避行動の解析用プレートには、直径 9 cm の化学走性用プレート [2 % agar, 1 mM MgSO₄ 溶液, 1 mM CaCl₂ 溶液, 25 mM potassium phosphate 溶液 (pH 6.0)] を使用した。直径 9 cm の化学走性用プレートは 12 区画 (#1-12) に等分しておいた。20 °C で飼育しておいた成虫を NG バッファーで 1.5 ml チューブに回収し、線虫が底に沈んだのを確認した後に上澄みを取り除いた。さらに NG バッファーを 1 ml 加え、線虫が底に沈んだのを確認した後に上澄みを取り除いた。同様の操作をもう一度おこない、計 2 回 NG バッファーで線虫を洗浄した。直径 9 cm の寒天培地プレートの中央線上に 3 箇所に分けて線虫を置き、NG バッファーを取り除いた後に左から 3 番目の線上に 2 箇所に分けて 1-octanol を置いた。プレートを裏返し、線虫を置いた位置をマジックで囲って記しておいた。アッセイプレートを 12 分静置後、忌避行動した線虫が動かないように、CHCl₃ 溶液を暴露した。アッセイは別の日に 3 回おこなった。12 区画それぞれの区画に存在する線虫の数をカウントし、下記の計算式 (Avoidance index) に当てはめて計算をおこなった (図 13B)。プレート中央のマジックで囲われた部分 (初めに線虫を置いた位置) の個体数は作業の途中で傷ついた可能性があるため、カウントにいれなかった。

Avoidance index = $\sum W_i N_i / N$, [W_i: -2.5 (#1), -2.0 (#2), -1.5 (#3), -1.0 (#4), -0.5 (#5), -0.25 (#6), +0.25 (#7), +0.5 (#8), +1.0 (#9), +1.5 (#10), +2.0 (#11), +2.5 (#12)] (N_i: それぞれの区画の線虫の数)、(N: 全ての区画に存在する線虫の数)

匂い物質に対する応答テスト

化学走性テストは Bargmann らの論文に従っておこなった (Bargmann et al. 1993)。直径 9 cm の化学走性用プレートの揮発性誘引物質を置く位置にマジックで A (A は Attractant (誘引物質) の意味)、エタノールをおく位置に C (C は Control の意味)、線虫を置く場所を中央線で記した。線虫を 3 匹置き、20 °C で卵を産ませた後 P₀ を取り除き、20 °C で餌を十分に与えた条件で F₁ を飼育して得られた成虫個体 (150~300 個体/6 cm NGM プレート) をテストに使用した。直径 6 cm の NGM プレート上に、M9 buffer 1 ml を加え、線虫を 1.5 ml チューブに回収し、チューブの底に十分沈んだ後、上清を除いた。さらに M9 buffer 1 ml を加え、線虫が底に沈んだあとに再び上清を除き、洗浄した (2 回)。化学走性用プレート上の A 点と C 点に 1 M NaN₃ 溶液をそれぞれ 1 µl ずつ滴下し、化学走性用プレートの中央線上に線虫を 3 点に分けてスポットした。スポット後、ティッシュかキムワイプの先端を細く丸め水分がなくなるまで吸った。プレートの A 点に揮発性匂い物質を素早く 4 µl 滴下し、C 点にはコントロールとして溶媒であるエタノールを素早く 4 µl 滴下した。プレートを裏返し、線虫を置いた位置をマジックで囲って記しておいた。60 分間静置して線虫を自由に行動させ、テストの終了時間になったら、プレートを裏返したまま CHCl₃ 溶液を蓋に滴下し、蓋を開けずにドラフト内に 5 分以上静置することによって、線虫を殺した。その後、4 °C で一晩インキュベートし、翌日カウントした。匂い物質側とエタノール側の個体数をそれぞれの A (attractant) と C (control) として計測し、Chemotaxis Index を式 $\text{Chemotaxis Index} = (\text{A にいる個体数} - \text{C にいる個体数}) / (\text{A にいる個体数} + \text{C にいる個体数})$ で算出した。有効数字は 2 桁 (プレート中央のマジ

ックで囲われた部分（初めに線虫を置いた位置）の個体数は作業の途中で傷ついた可能性があるため、カウントに入れなかった）（図 11C）。

***in vivo* カルシウムイメージング**

本研究の ADL の *in vivo* カルシウムイメージングは過去の論文に従っておこなった (Kuhara et al. 2011; Ohnishi et al. 2011)。カルシウムイメージングとは光遺伝学を用いて神経細胞内カルシウム濃度変化を定量化する技術である。本研究では、カルシウムインディケーターとして Yellow Cameleon 3.60 (YC3.60) を用いた。YC3.60 は、N 末に CFP、C 末に YFP をもち、中央にカルシウム結合部位をもつキメラタンパク質である。細胞内カルシウム濃度が低い時に、YC3.60 に 440 nm の励起光をあてると 480 nm をピークとする青色の蛍光を発する。ところが、細胞内カルシウム濃度が上昇すると、YC3.60 のカルシウム結合にカルシウムイオンが結合することで立体構造が変化し、CFP と YFP 間の距離が数ナノメートルと近くなる。このときに、440 nm の励起光をあてると、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 535 nm をピークとする YFP の黄色の蛍光を発するようになる。この黄色と青色の蛍光の比を取ることによって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。YC3.60 タンパク質は遺伝子によってコードされているため、目的とする特定の細胞で *yc3.60* 遺伝子を発現させるプラスミドを作製し、線虫の生殖巣に導入することによって、解析したい神経細胞のカルシウム濃度変化を測定することができる。本研究では ADL ニューロンで特異的に遺伝子発現を誘導するプロモーターである *sre-1* プロモーターを用いて *yc3.60* 遺伝子を発現誘導するプラスミド [*sre-1p::yc3.60*

(pTOM63)] を線虫に導入し、ADL の温度変化に対するカルシウムイメージング解析をおこなった。解析には、25 °Cあるいは 15 °Cで餌が十分に存在する培地で飼育した成虫を用いた。カルシウムイメージング解析をおこなう当日から 2 日前までに 24 × 24 カバーガラスの上に、2 % (w/v) アガロースパッドを作製した。アガロースパッドの上にカルシウムイメージング用の系統 *Ex[sre-1p::yc3.60]* を約 4 匹置き、医療用接着剤アロンアルファ A (第一三共株式会社、日本) で頭部と尾部を固定した。M9 buffer を垂らし、上からやさしくカバーガラスを掛け、マニキュアで封をして蒸発を防いだ。解析には 4 匹のうち、接着剤でうまく固定できた個体を使用した。サンプルを Olympus IX81 microscope (Olympus Corporation, Japan) に装備されている ITO ガラスプレート (Tokai Hit, Japan) の上に置いた。2 分ほど置き、Dual-View optical system (Molecular Devices, USA) を用いて蛍光を観察した。蛍光画像は EM-CCD カメラ Evolve 512 (Photometrics, USA) で、1 × 1 ビニング、EM Gain 100、30 ms の露光時間で 1 秒ごとに撮影した。ガラスプレートの温度はカスタムメイド温度制御システム (Tokai Hit, Japan) によって制御し、温度を記録した。それぞれの画像の蛍光強度は MetaMorph Image Analysis Software (Molecular Devices, USA) により解析した。細胞内のカルシウム濃度の相対変化は YC3.60 の acceptor/donor (黄色蛍光値 / 青色蛍光値) 蛍光の比で計算した。全てのバンドパスフィルターは YC3.60 においてこれまでの報告を参考に(Kuhara et al. 2011)、それぞれの波長に適したバンドパスフィルターを用いた。カスタムメイド温度制御システムを用いて、17 °C → 23 °C → 17 °C の温度変化刺激を与え、約 5 分間 ADL 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。

共焦点顕微鏡を用いた観察

共焦点顕微鏡を用いて蛍光観察する前日あるいは当日に共焦点顕微鏡撮影用アガロースパットを作製した。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、100 mM NaN₃ 溶液を 10 μ l 滴下した。その上に 5~10 匹の成虫を置き、線虫を固定し、上からカバーガラスをかけた。このプレパラートを共焦点顕微鏡 (FV1000-IX81 with GaAsP PMT, Olympus Corporation, Japan) のステージに乗せ、観察に適したフィルターに合わせて蛍光画像を撮影した。撮影には FV10-ASW software (Olympus Corporation, Japan) を用いた。本研究の観察に用いた *kqt-2::gfp* のプラスミドは Aguan D. Wei 博士より分与していただいた。このプラスミドは *kqt-2* 遺伝子上流 9 kb のプロモーター領域、*kqt-2* 遺伝子の 1 番目エクソンから 12 番目エクソンが含まれたゲノム由来の遺伝子配列の下流に GFP が導入されていた (Wei et al. 2005)。このプラスミドを元に Inverse PCR 法を用いて、プロモーター領域をそれぞれ 4.5 kb、2.3 kb、1 kb に縮めたプラスミドを作製し、蛍光観察をおこなった (図 9A, B, C)。

シスエレメント解析

野生株の *kqt-2* 遺伝子のプロモーター領域 9 kb、4.5 kb、2.3 kb、1 kb の *kqt-2::gfp* のプラスミドをそれぞれ野生株に導入した。観察には、餌が十分に存在する培地で飼育した成虫を用いた。24 \times 24 カバーガラスの上に、2 % (w/v) アガロースパッドを作製し、アガロースパッドの上に *kqt-2::gfp* を導入した系統を置き、医療用接着剤アロンアルファ A (第一三共株式会社、日本) で頭部と尾部を固定した。M9 buffer を垂らし、上からやさしくカバーガラスを掛け、マニキュアで封

をして蒸発を防いだ。サンプルを Olympus IX81 microscope (Olympus Corporation, Japan) のステージ上に置き、蛍光を観察した。蛍光画像は EM-CCD カメラ Evolve 512 (Photometrics, USA) で、EM Gain 70、Exposure time 200 ms、レーザーパワー133、40 倍対物レンズの条件で撮影した。感覚ニューロンの細胞体で GFP が発現している個体の平均輝度値を MetaMorph Image Analysis Software (Molecular Devices, USA) を用いて数値化した。

統計解析

低温耐性テストは 8 プレート以上、少なくとも 3 回のアッセイをおこなった。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。全てのデータの分散は正規分布すると仮定し、パラメトリック検定である Tukey-Kramer 法と Dunnett's 検定、または分散が等しくないと仮定した 2 標本による t 検定 (Welch) を用いて解析した。多重比較には Tukey-Kramer 法と Dunnett's 検定を用いて、Dunnett's 検定は一番左の棒グラフと他のグループを比較した。2 群比較には unpaired t test (Welch) を使った。図中の (*) と (**) はそれぞれ $p < 0.05$ と $p < 0.01$ を意味する。unpaired t test (Welch) にはデータ分析ツール (Excel アドイン) を用いた。Tukey-Kramer 法と Dunnett's 検定にはマック統計解析 ver. 2 (ESUMI, Japan) を用いた。

謝辞

本研究をおこなうに当たり、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 教授と太田茜 博士に心より厚くお礼申し上げます。そして、*C. elegans* 変異体を提供していただきました *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC)、National Bioresource Project (Japan) 三谷昌平 教授、The Rockefeller University Cori Bargmann 教授、プラスミドを提供していただきました名古屋大学 森郁恵 教授、変異体に加えてプラスミドを提供していただきました Center for Integrative Brain Research Aguan D. Wei 博士、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 に採用いただき、科研費提供による研究支援をいただきましたことに厚くお礼申し上げます。さらに、学位論文の作成指導をしてくださいました甲南大学久原篤 教授、日下部岳広 教授、渡辺洋平 教授、本多大輔 教授、上田晴子 准教授、向正則 教授、茶山健二 教授、渡邊順司 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、私の研究生生活を応援してくれた家族と友人に深く感謝いたします。

引用文献

Abd-Elseyed AA, Ikeda R, Jia Z, Ling J, Zuo X, Li M, Gu JG. 2015. KCNQ channels in nociceptive cold-sensing trigeminal ganglion neurons as therapeutic targets for treating orofacial cold hyperalgesia. *Molecular Pain* **11**: 45.

Bargmann CI, Hartweg E, Horvitz HR. 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* **74**: 515-527.

Bargmann CI, Horvitz HR. 1991. Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **251**: 1243-1246.

Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. 1998. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* **279**: 403-406.

Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.

Charlier C, Singh NA, Ryan SG, Lewis TB, Reus BE, Leach RJ, Leppert M. 1998. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nature Genetics* **18**: 53-55.

- Cheung BH, Arellano-Carbajal F, Rybicki I, de Bono M. 2004. Soluble guanylate cyclases act in neurons exposed to the body fluid to promote *C. elegans* aggregation behavior. *Current Biology* **14**: 1105-1111.
- Colbert HA, Bargmann CI. 1995. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* **14**: 803-812.
- Colbert HA, Smith TL, Bargmann CI. 1997. OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience* **17**: 8259-8269.
- Cook SJ, Jarrell TA, Brittin CA, Wang Y, Bloniarz AE, Yakovlev MA, Nguyen KCQ, Tang LT, Bayer EA, Duerr JS, Bülow HE, Hobert O, Hall DH, Emmons SW. 2019. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* **571**: 63-71.
- de Bono M, Bargmann CI. 1998. Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. *Cell* **94**: 679-689.
- de Bono M, Tobin DM, Davis MW, Avery L, Bargmann CI. 2002. Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature* **419**: 899-903.

Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. 2006. Trp ion channels and temperature sensation.

Annual Review of Neuroscience **29**: 135-161.

Fenk LA, de Bono M. 2017. Memory of recent oxygen experience switches pheromone valence in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**: 4195-4200.

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

Glauser DA, Chen WC, Agin R, Macinnis BL, Hellman AB, Garrity PA, Tan MW, Goodman MB. 2011. Heat avoidance is regulated by transient receptor potential (TRP) channels and a neuropeptide signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **188**: 91-103.

Gray JM, Karow DS, Lu H, Chang AJ, Chang JS, Ellis RE, Marletta MA, Bargmann CI. 2004. Oxygen sensation and social feeding mediated by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. *Nature* **430**: 317-322.

Hart AC, Kass J, Shapiro JE, Kaplan JM. 1999. Distinct signaling pathways mediate touch and osmosensory responses in a polymodal sensory neuron. *The Journal of Neuroscience* **19**: 1952-1958.

Jang H, Kim K, Neal SJ, Macosko E, Kim D, Butcher RA, Zeiger DM, Bargmann CI, Sengupta P. 2012. Neuromodulatory state and sex specify alternative behaviors through antagonistic synaptic pathways in *C. elegans*. *Neuron* **75**: 585-592.

Jentsch TJ. 2000. Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nature Review of Neuroscience* **1**: 21-30.

Jose AM, Bany IA, Chase DL, Koelle MR. 2007. A specific subset of transient receptor potential vanilloid-type channel subunits in *Caenorhabditis elegans* endocrine cells function as mixed heteromers to promote neurotransmitter release. *Genetics* **175**: 93-105.

Kimura KD, Fujita K, Katsura I. 2010. Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience* **30**: 16365-16375.

Kuhara A, Ohnishi N, Shimowada T, Mori I. 2011. Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications* **2**: Article number: 355.

Kuhara A, Okumura M, Kimata T, Tanizawa Y, Takano R, Kimura KD, Inada H, Matsumoto K, Mori I. 2008. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit

- controlling behavior of *C. elegans*. *Science* **320**: 803-807.
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V. 1991. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO Journal* **10**: 3959-3970.
- Montell C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Science Signaling* **2005**: Article number: re3.
- Mori I, Ohshima Y. 1995. Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **376**: 344-348.
- Murray P, Hayward SA, Govan GG, Gracey AY, Cossins AR. 2007. An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5489-5494.
- Nehrke K, Denton J, Mowrey W. 2008. Intestinal Ca²⁺ wave dynamics in freely moving *C. elegans* coordinate execution of a rhythmic motor program. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology* **294**: C333-344.
- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Faure S, Gary F,

- Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P. 1997. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature Genetics* **15**: 186-189.
- Ohnishi N, Kuhara A, Nakamura F, Okochi Y, Mori I. 2011. Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal* **30**: 1376-1388.
- Ohta A, 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, Kuhara A. 2014. Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications* **5**: Article number: 4412.
- Okahata M, Ohta A, Mizutani H, Minakuchi Y, Toyoda A, Kuhara A. 2016. Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Comparative Physiology B* **186**: 985-998.
- Okahata M, Wei AD, Ohta A, Kuhara A. 2019. Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in *Caenorhabditis elegans*. *Science Advances* **5**, 2,

Article number: eaav3631

Savory FR, Sait SM, Hope IA. 2011. DAF-16 and Delta9 desaturase genes promote cold tolerance in long-lived *Caenorhabditis elegans age-1* mutants. *PLOS ONE* **6**: Article number: e24550.

Schild LC, Glauser DA. 2013. Dynamic switching between escape and avoidance regimes reduces *Caenorhabditis elegans* exposure to noxious heat. *Nature Communications* **4**: Article number: 2198.

Sengupta P, Chou JH, Bargmann CI. 1996. *odr-10* encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* **84**: 899-909.

Shen WL, Kwon Y, Adegbola AA, Luo J, Chess A, Montell C. 2011. Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. *Science* **331**: 1333-1336.

Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, Anderson VE, Sanguinetti MC, Leppert MF, Consortium BP. 2003. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain* **126**: 2726-2737.

Sonoda S, Ohta A, Maruo A, Ujisawa T, Kuhara A. 2016. Sperm Affects Head Sensory

- Neuron in Temperature Tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Reports* **16**: 56-65.
- Sugi T, Nishida Y, Mori I. 2011. Regulation of behavioral plasticity by systemic temperature signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Neuroscience* **14**: 984-992.
- Takeishi A, Yu YV, Hapiak VM, Bell HW, O'Leary T, Sengupta P. 2016. Receptor-type Guanylyl Cyclases Confer Thermosensory Responses in *C. elegans*. *Neuron* **90**: 235-244.
- Troemel ER, Chou JH, Dwyer ND, Colbert HA, Bargmann CI. 1995. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* **83**: 207-218.
- Troemel ER, Kimmel BE, Bargmann CI. 1997. Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* **91**: 161-169.
- Ujisawa T, Ohta A, Ii T, Minakuchi Y, Toyoda A, Ii M, Kuhara A. 2018. Endoribonuclease ENDU-2 regulates multiple traits including cold tolerance via cell autonomous and nonautonomous controls in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115** (35): 8823-8828.

Ujisawa T, Ohta A, Okahata M, Sonoda S, Kuhara A. 2014. Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. *Protocol Exchange* **2014 (032)**: 1-6.

Ujisawa T, Ohta A, Uda-Yagi M, Kuhara A. 2016. Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* **11**: Article number: e0165518.

Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. 1998. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* **282**: 1890-1893.

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. 1996. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature Genetics* **12**: 17-23.

Ward A, Liu J, Feng Z, Xu XZ. 2008. Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in *C. elegans*. *Nature Neuroscience* **11**: 916-922.

Wei AD, Butler A, Salkoff L. 2005. KCNQ-like potassium channels in *Caenorhabditis*

elegans. Conserved properties and modulation. *The Journal of Biological Chemistry* **280**: 21337-21345.

White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **314**: 1-340.

Wittenburg N, Baumeister R. 1999. Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: an approach to the study of nociception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10477-10482.

Wood WB and the Community of *C. elegans* Reserchers 1988. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Cold Spring Harbor Labolatory Press*

Xiao R, Zhang B, Dong Y, Gong J, Xu T, Liu J, Xu XZ. 2013. A genetic program promotes *C. elegans* longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel. *Cell* **152**: 806-817.

Zimmer M, Gray JM, Pokala N, Chang AJ, Karow DS, Marletta MA, Hudson ML, Morton DB, Chronis N, Bargmann CI. 2009. Neurons detect increases and decreases in oxygen levels using distinct guanylate cyclases. *Neuron* **61**: 865-879.

低温馴化現象 (例: 野生株 N2株)

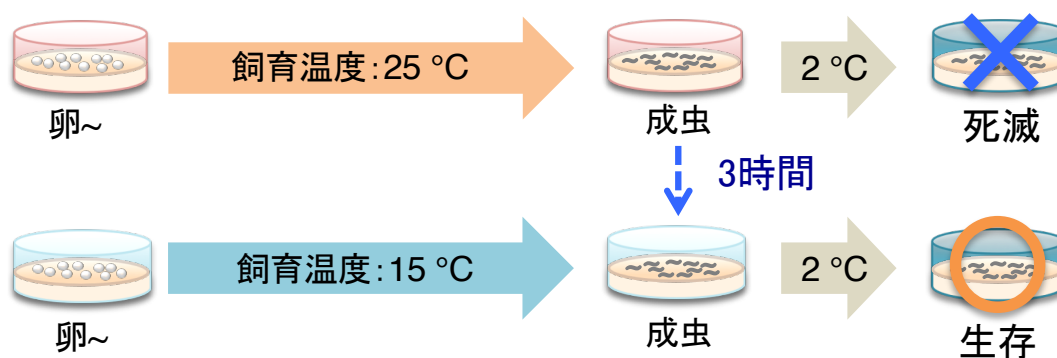


図1. 低温馴化現象

野生株N2を25 °Cで飼育した後に2 °Cに移すと死滅するのに対し、15 °Cで飼育した後に2 °Cに移すと生存できる。さらに、25 °Cで飼育した後に15 °Cに3時間置くことで2 °Cで生存できるようになる。

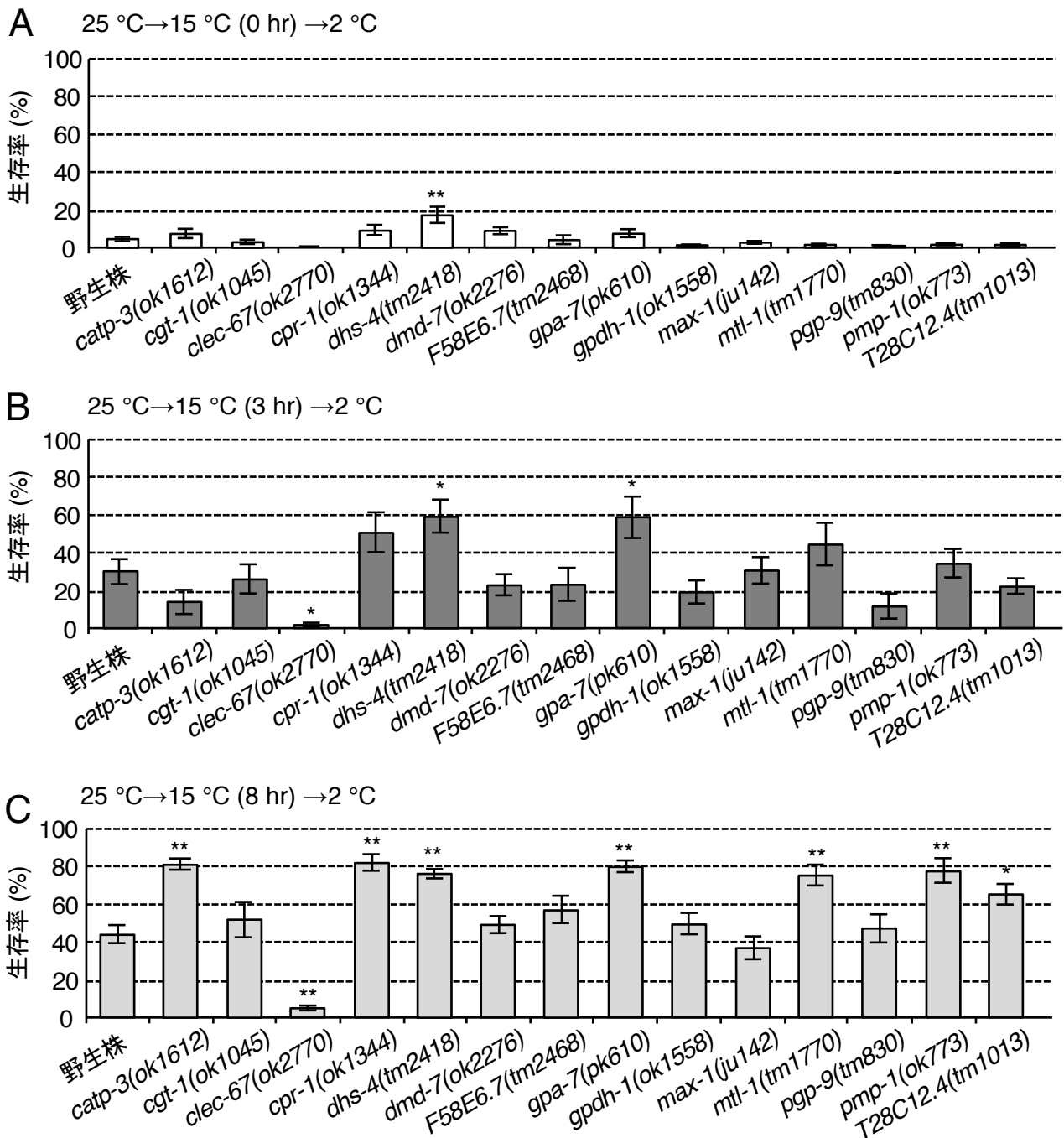


図2. 変異体の低温馴化テスト

野生株N2を23 °Cで飼育した後17 °Cに4時間置いた際に発現変動する遺伝子の変異体の低温馴化 [25 °C → 15 °C (0 hr, 3 hr, 8 hr) → 2 °C]。アッセイ数 ≥ 8。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。

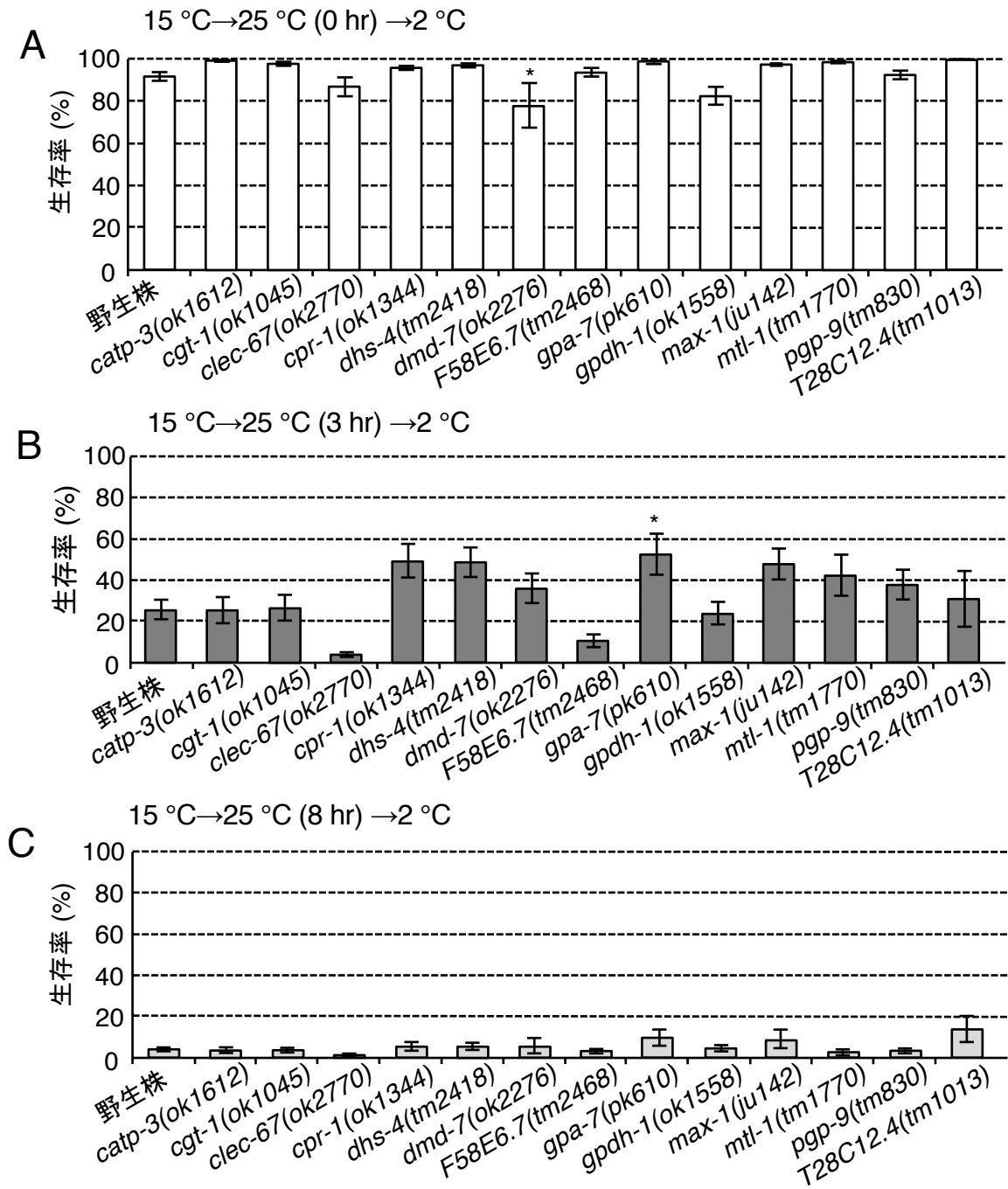


図3. 変異体の低温馴化テスト

野生株N2を23 °Cで飼育した後17 °Cに4時間置いた際に発現変動する遺伝子の変異体の低温馴化 [15 °C → 25 °C (0 hr, 3 hr, 8 hr) → 2 °C]。アッセイ数 ≥ 3。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。

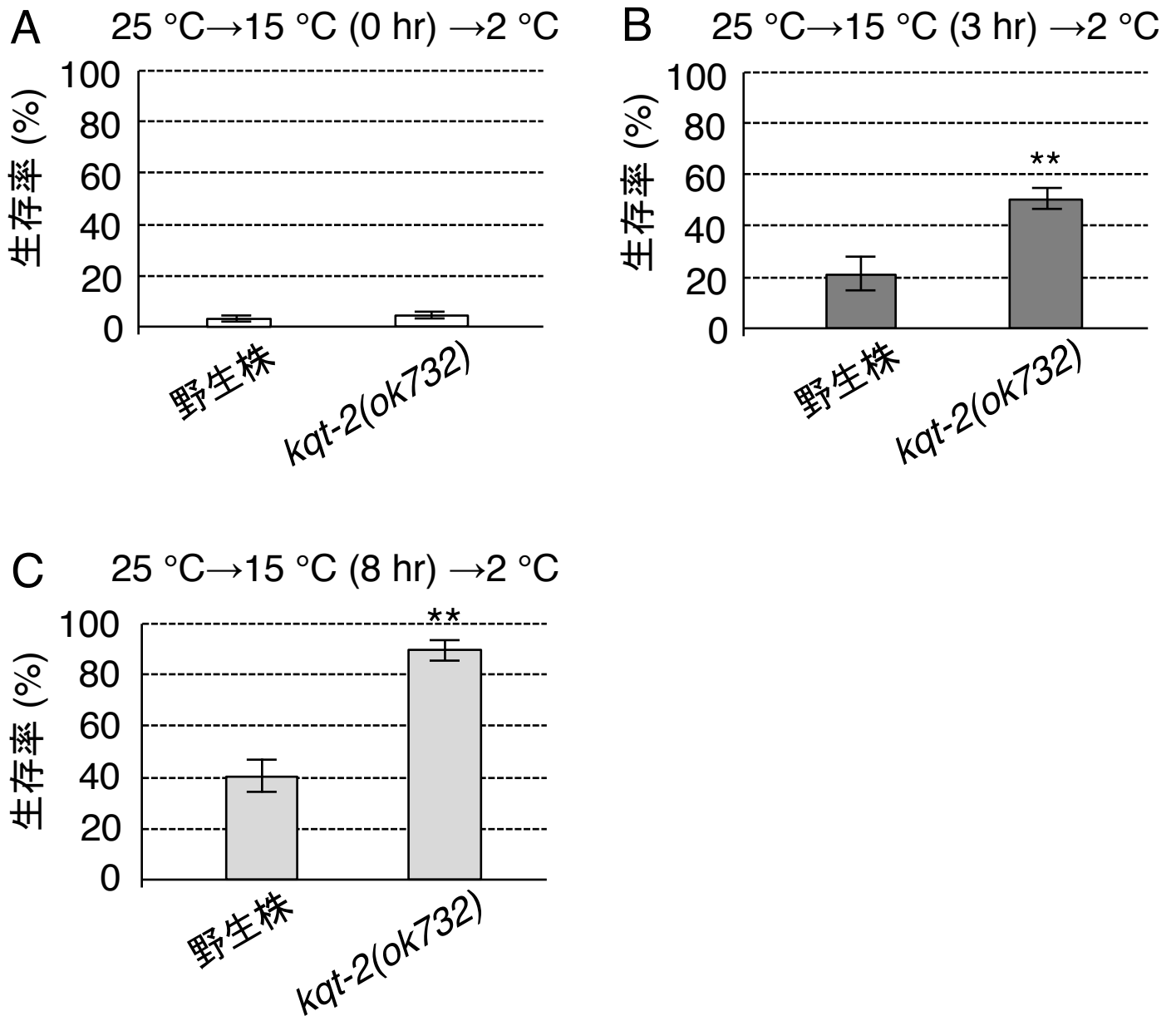


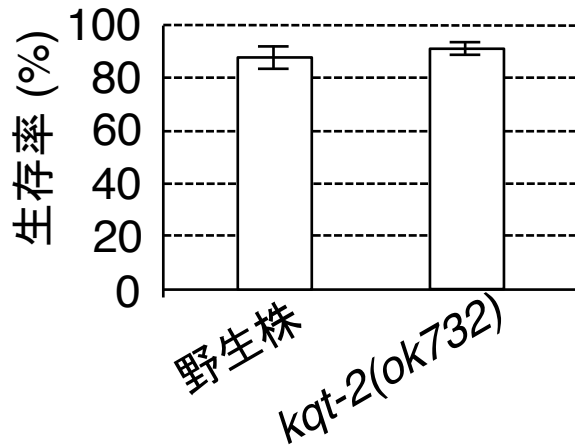
図4. カリウムチャネル*kqt-2*変異体の低温馴化解析 (25 °C→15 °C→2 °C) のまとめ
 (A) 25 °C飼育後15 °Cにシフトせずに2 °Cの低温刺激を与えた際の低温馴化
 (B, C) 25 °Cで飼育後15 °Cに3時間、あるいは8時間シフトすると*kqt-2*変異体は野生株に比べて生存率が上昇する異常を示した。

(A, B, C) アッセイ数 ≥ 12 。エラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

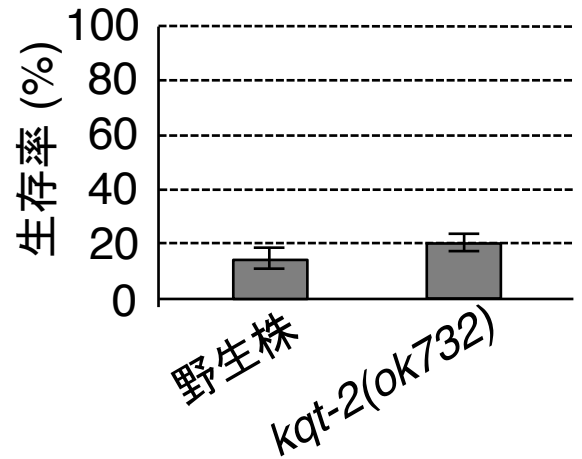
図4A, Cは、図2に記載した*kqt-2(ok732)*の解析結果を抜粋したものであり、野生株に関しても図2に記載した*kqt-2(ok732)*の解析をおこなった日時の野生株の解析結果を抜粋したものである。

図4Bは、図2に記載した*kqt-2(ok732)*の解析結果に新規の結果を加えた総合結果であり、図4Bの野生株に関しても図2に記載した*kqt-2(ok732)*の解析をおこなった日時の野生株の解析結果に新規の結果を加えた総合結果である。

A 15 °C→25 °C (0 hr) →2 °C



B 15 °C→25 °C (3 hr) →2 °C



C 15 °C→25 °C (8 hr) →2 °C

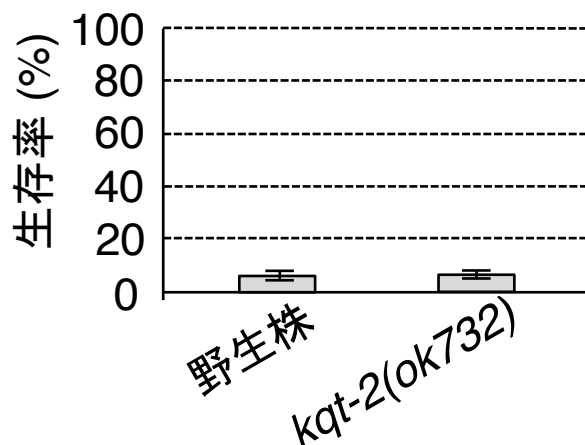


図5. カリウムチャネル*kqt-2*変異体の低温馴化 (15 °C→25 °C→2 °C) のまとめ
(A) 15 °C飼育後25 °Cにシフトせずに2 °Cの低温刺激を与えた際の低温馴化。
(B, C) 15 °Cで飼育後25 °Cに3時間、あるいは8時間シフトした際の低温馴化。いずれも異常は見られなかった。
(A, B, C) アッセイ数 ≥ 10。エラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。
図5のグラフは、図3に記載した*kqt-2(ok732)*の解析結果を抜粋したものであり、野生株についても図3に記載した*kqt-2(ok732)*の解析をおこなった日時の野生株の解析結果を抜粋したものである。

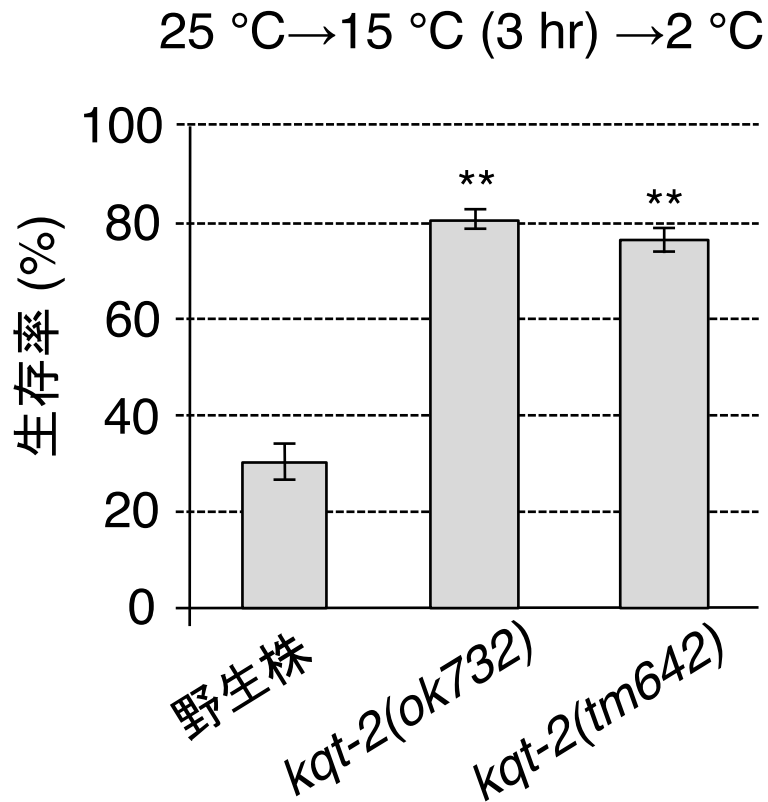


図6. *kqt-2*変異体の低温馴化

25 °C飼育後15 °Cに3時間置き、2 °Cの低温刺激を与えると*kqt-2(ok732)*と*kqt-2(tm642)*は、ともに野生株よりも高い生存率を示す異常が見られた。

アッセイ数 ≥ 11。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

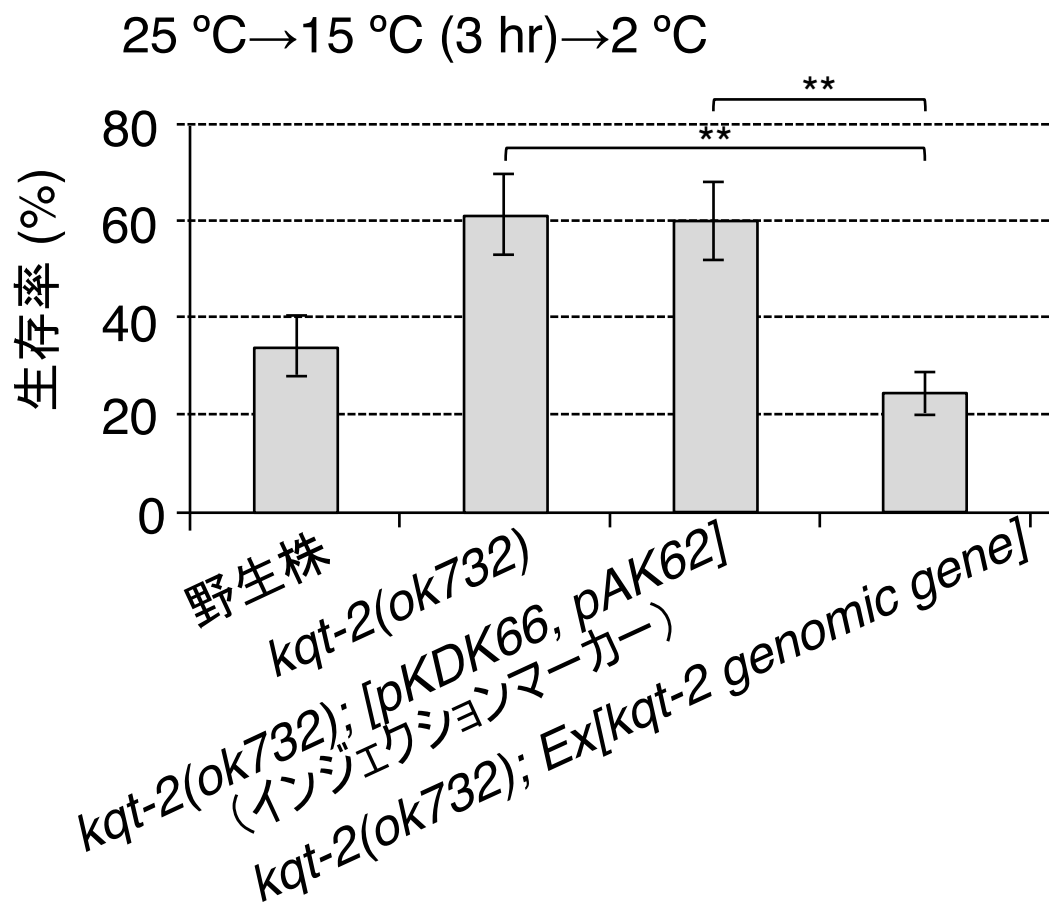


図7. *kqt-2*変異体レスキュー系統の低温馴化

*kqt-2*変異体にインジェクションマーカを導入した系統は、*kqt-2*変異体同様に低温馴化の上昇を示した。ゲノム由来の*kqt-2*遺伝子全長を導入した*kqt-2*変異体では、低温馴化上昇の異常が回復した。アッセイ数 ≥ 8 。エラーバーはSEM。テューキーライマー検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

25 °C → 15 °C (3 hr) → 2 °C

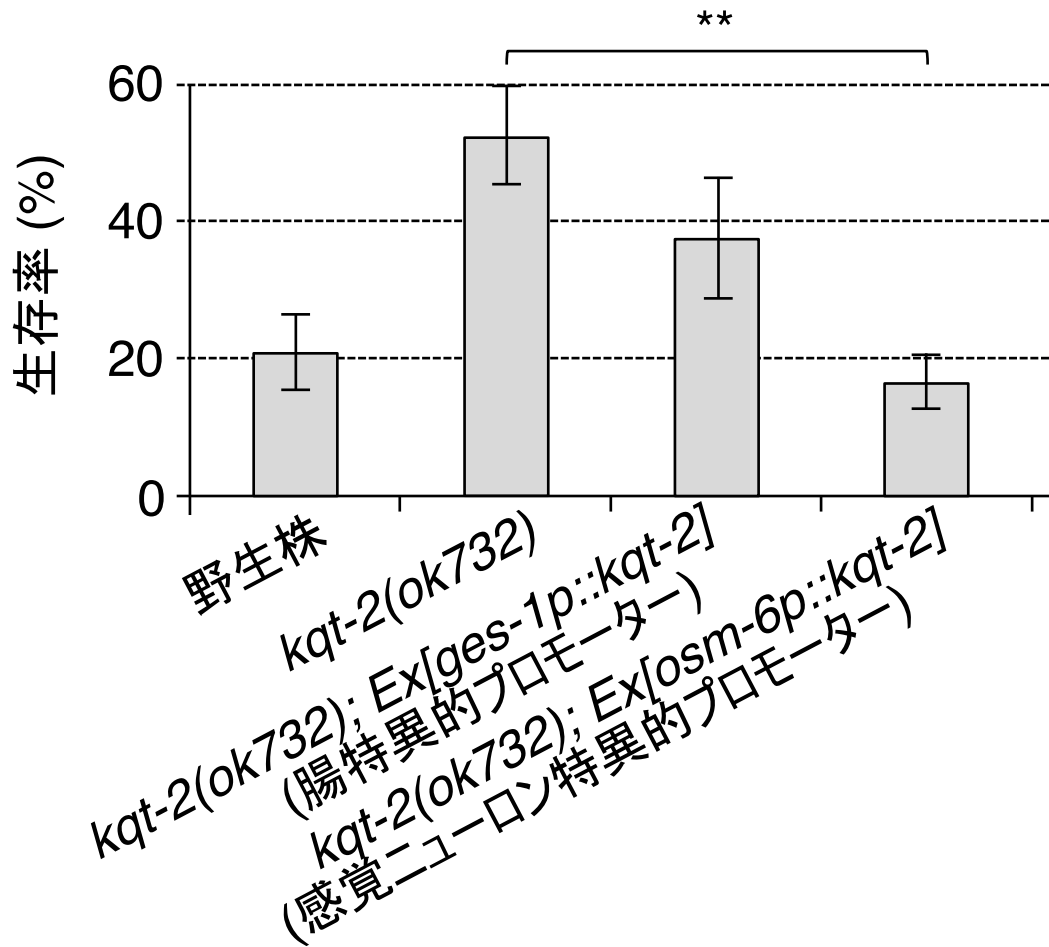


図8. *kqt-2*変異体の組織特異的レスキュー実験

*kqt-2*変異体の低温馴化上昇の異常は腸特異的に*kqt-2 cDNA*を発現させても回復しなかったが、感覚ニューロン特異的に*kqt-2 cDNA*を発現させると回復した。アッセイ数 ≥ 9 。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

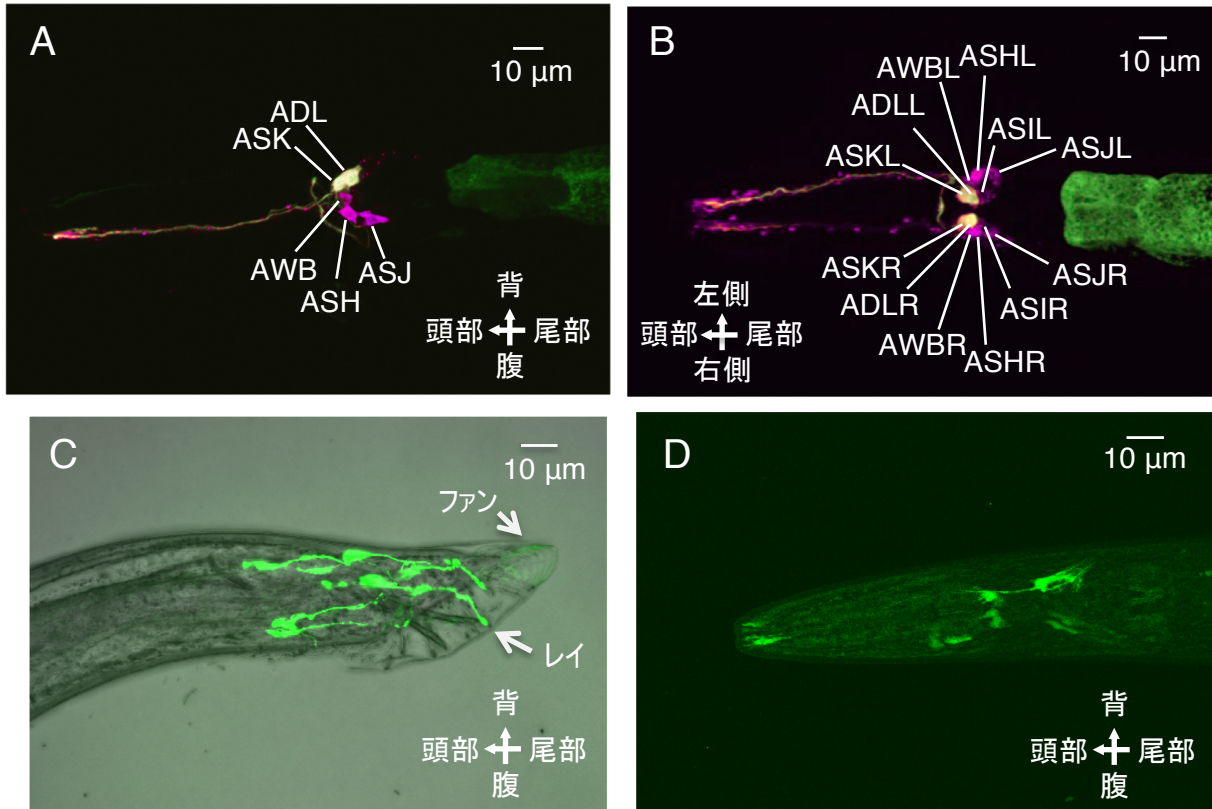


図9. KQT-2の発現細胞解析

(A, B) *kqt-2*遺伝子上流9 kbプロモーターの下流に*kqt-2::gfp*を融合したプラスミドを野生株に導入し、KQT-2の発現細胞を観察した。KQT-2::GFPは頭部の2対の感覚ニューロン(ADLとASK)で発現が見られた。Dilにより染色された頭部の6対の感覚ニューロン(マゼンダ)のうち、ADLとASKにおいてKQT-2::GFP(緑色)と蛍光の重なりが見られた。側面図 (A)、腹側図 (B)。

(C) KQT-2::GFPをオス個体で発現させ、発現細胞を観察した。オスの尾部のレイの感覚ニューロンとファンにおいて、KQT-2::GFPの発現が見られた。

(D) KQT-2の細胞内局在。野生株において、*kqt-2 cDNA::gfp*を*kqt-2*遺伝子の開始コドンの上流9 kbプロモーター領域を用いて発現誘導した系統。KQT-2::GFPは特定のニューロン内で全体的に発現が見られ、特に感覚末端と細胞体で局在が見られた。

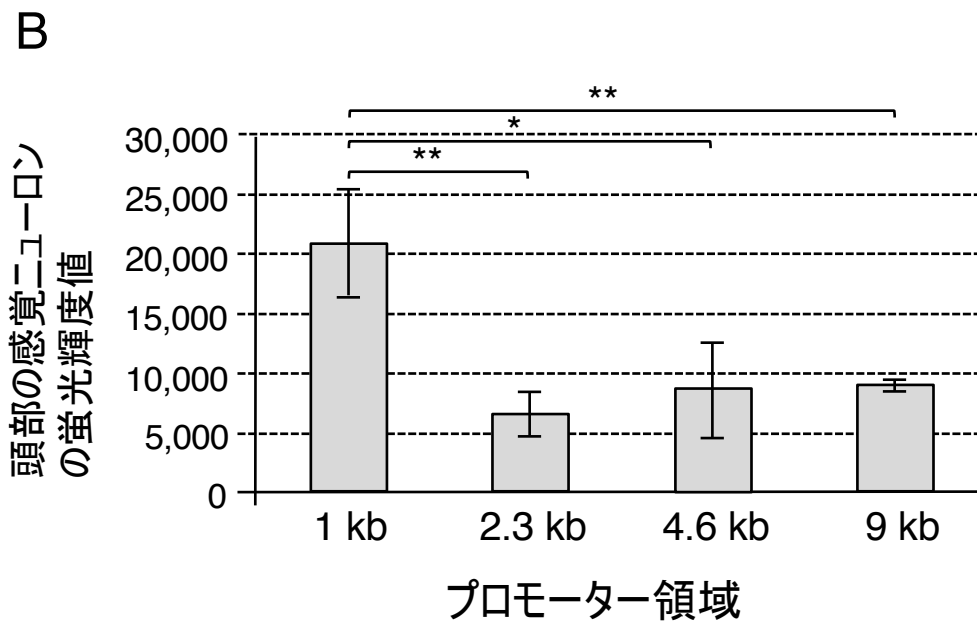
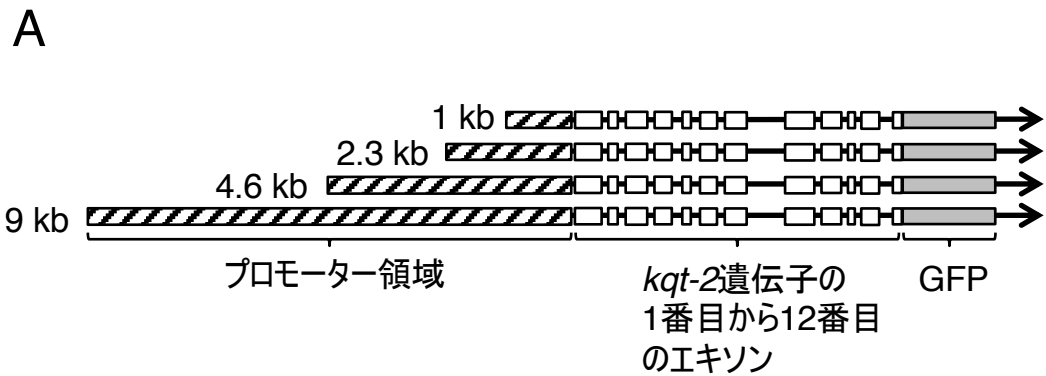
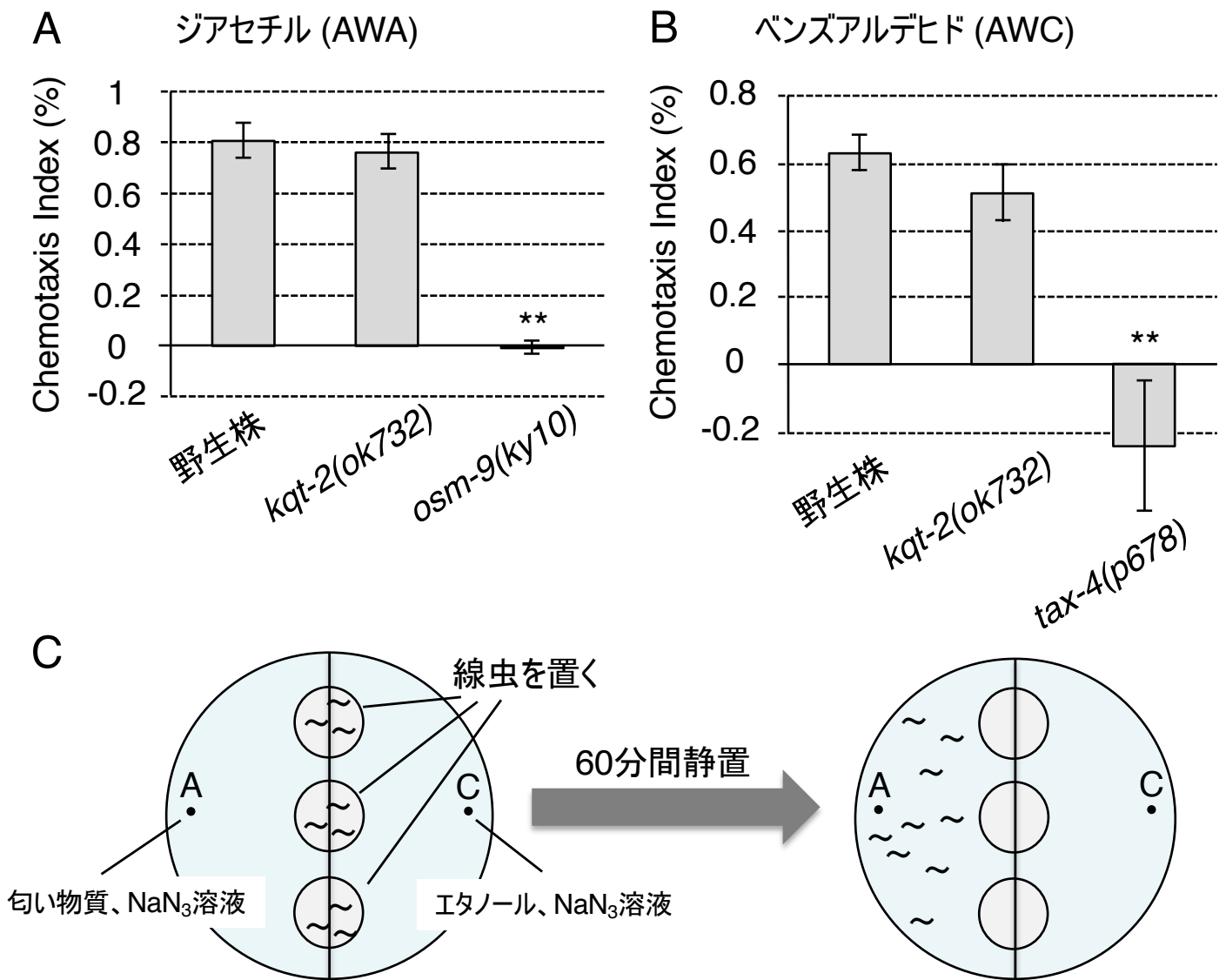


図10. *kqt-2*遺伝子のプロモーター領域のシスエレメント解析

(A, B) 1 kbから9 kbの*kqt-2*遺伝子由来のプロモーターの下流に、*kqt-2*の1番エキソンから12番目のエキソン、そして*gfp*遺伝子を融合したプラスミドを野生株に導入し、発現が見られた頭部の感覚ニューロンの細胞体の蛍光輝度値を定量化した。KQT-2::*GFP*は最も短いプロモーター(1 kb)で発現レベルが強かった。アッセイ数 ≥ 7 。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。



Chemotaxis index =

$$(\text{Aにいる個体数} - \text{Cにいる個体数}) / (\text{Aにいる個体数} + \text{Cにいる個体数})$$

図11. *kqt-2*変異体の化学走性テスト

(A) *kqt-2*変異体のジアセチルに対する匂い走性。AWAでジアセチルの受容に関わる*osm-9*変異体は走性行動を示さなかった。*kqt-2*変異体はジアセチルに対する走性行動に異常は見られなかった。アッセイ数 ≥ 9 。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

(B) *kqt-2*変異体のベンズアルデヒドに対する匂い走性。AWCでベンズアルデヒドの受容に関わる*tax-4*の変異体は走性行動を示さなかった。*kqt-2*変異体はベンズアルデヒドに対する走性行動に異常は見られなかった。アッセイ数 ≥ 9 。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

(C) シャーレを中央で2分割し、A側に匂い物質と NaN_3 溶液を、C側にはコントロールとしてエタノールと NaN_3 溶液を置いた。解析に用いる線虫を中央に置き、60分間静置した。野生株は匂い物質に対して誘引を示し、A側へ移動した。

25 °C → 15 °C (3 hr) → 2 °C

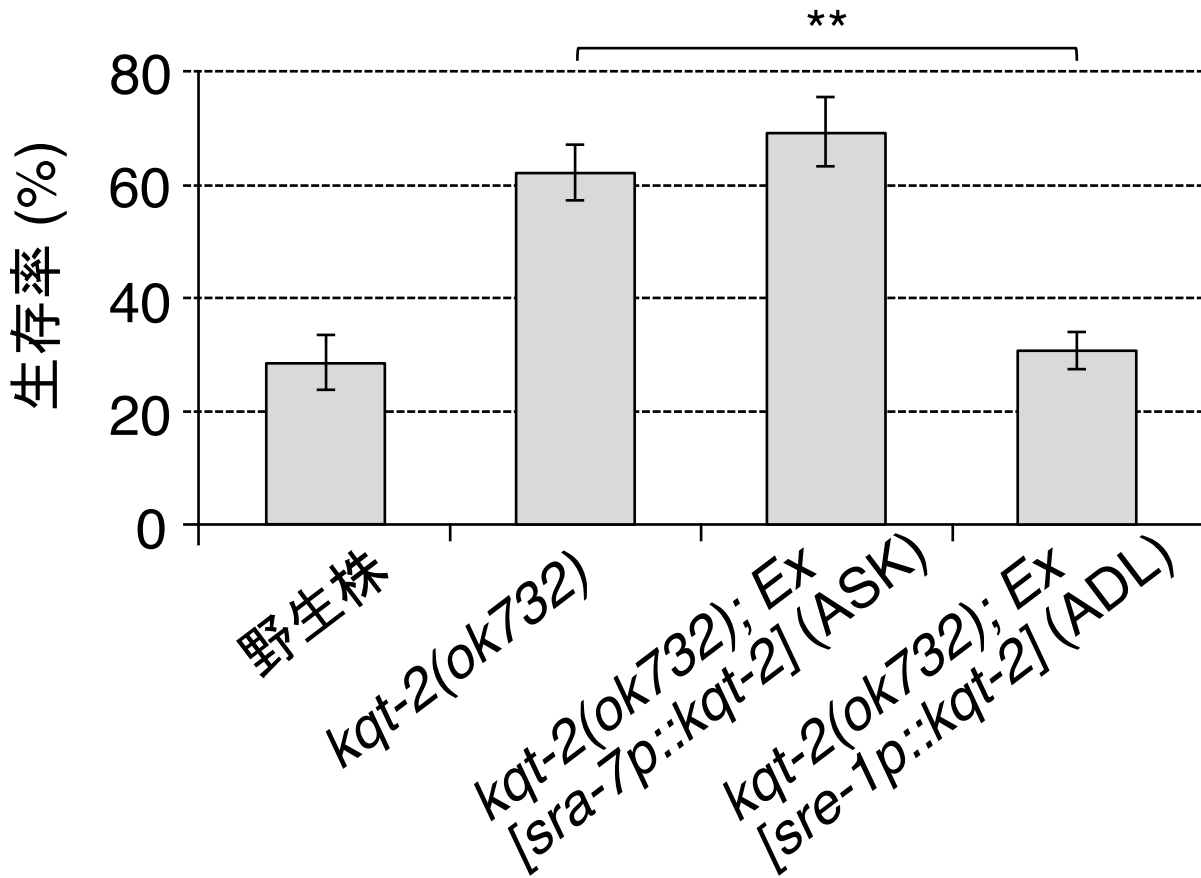
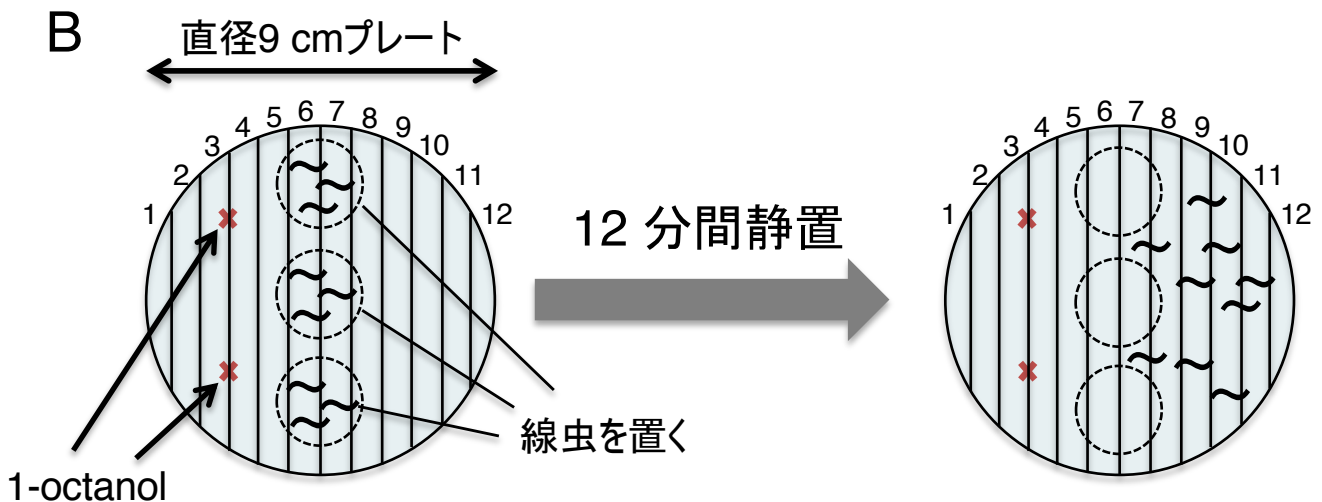
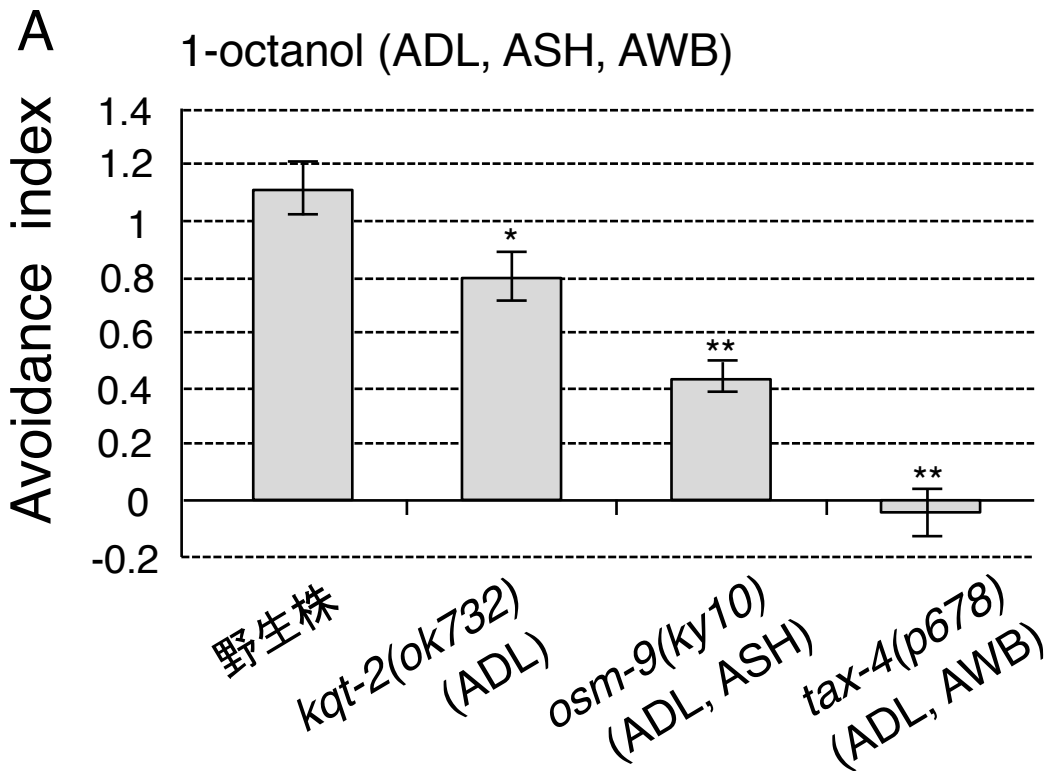


図12. *kqt-2*変異体の神経細胞特異的レスキュー実験

*kqt-2*変異体の低温馴化が上昇する異常はADLで特異的に*kqt-2* cDNAを発現させることによって回復した。ASKでは回復は見られなかった。アッセイ数 ≥ 18 。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。



$$\text{Avoidance index} = \sum W_i N_i / \text{total}$$

(W_i : -2.5 (#1)、-1.5 (#2)、-0.5 (#3)、+0.5 (#4)、+1.5 (#5)、+2.5 (#6))

(N_i : それぞれの区画にいる個体数)

図13. *kqt-2*変異体の忌避行動テスト

(A) ADL、ASH、AWBで受容される1-octanolに対する忌避行動テスト。ADLとASHで発現する*osm-9*変異体と、ADLとAWBで発現する*tax-4*変異体は1-octanolに対する忌避行動に異常を示した。ADLで発現するカリウムチャンネル*kqt-2*変異体は1-octanolに対する忌避行動に異常を示した。アッセイ数 ≥ 9 。エラーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

(B) シャーレを12分割し、3区画目の線上に1-octanolを置いた。解析に用いる線虫を中央に置き、12分間静置した。野生株は1-octanolに対して忌避行動を示し、右側へ移動した。

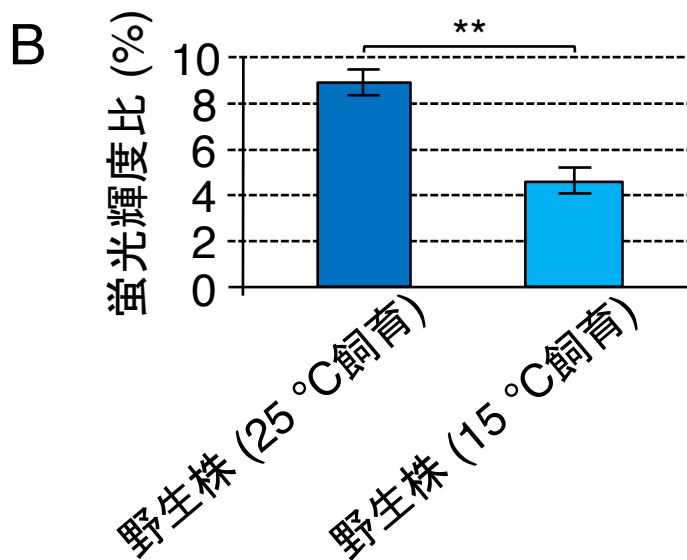
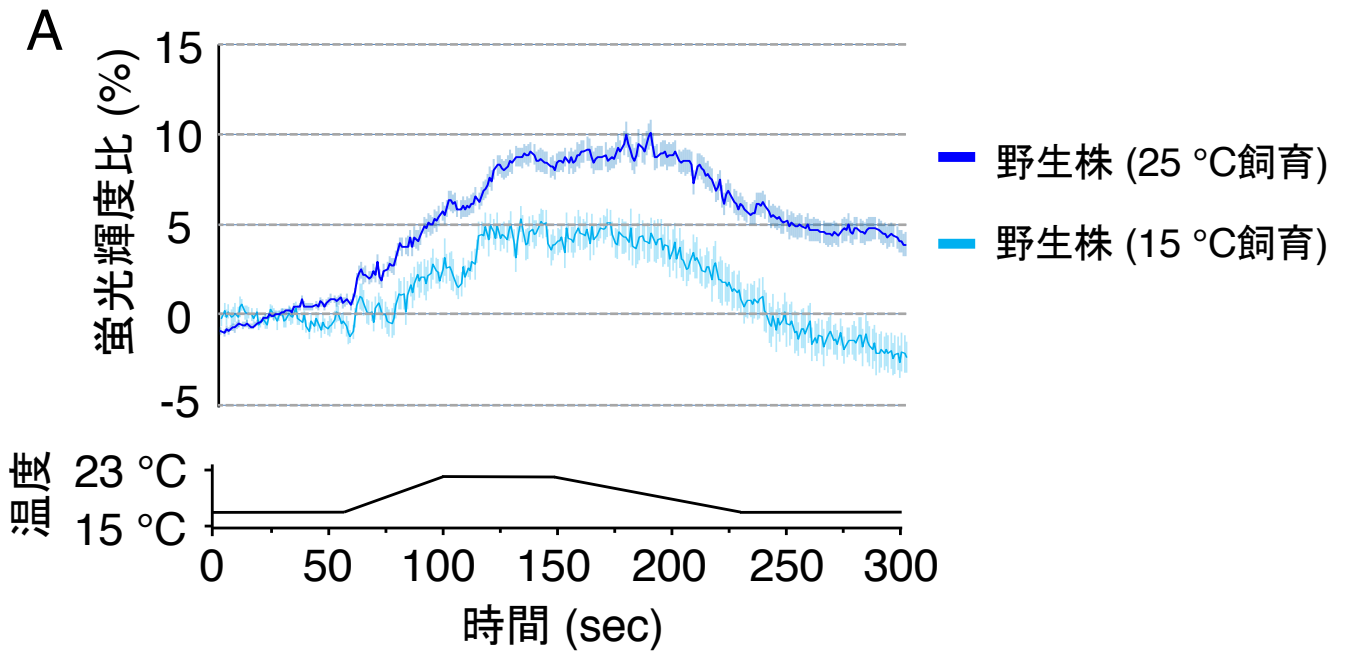


図14. ADL感覚ニューロンの温度応答性

(A) 25 °Cで飼育した野生株は15 °Cで飼育した野生株に比べて、温度変化に対する反応性が高かった。温度変化パターンはグラフ下に記載 (17 °C→23 °C→17 °C)。

(B) グラフAの160-170 secの10秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 16。エラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。25 °C飼育の野生株のデータは図15、17、20、23、24、25、26、30と共通。15 °C飼育の野生株のデータは図16と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

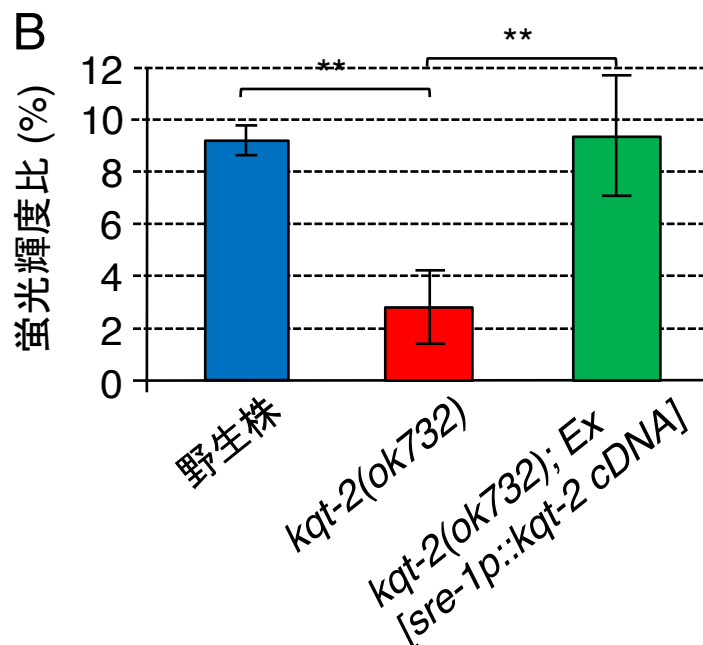
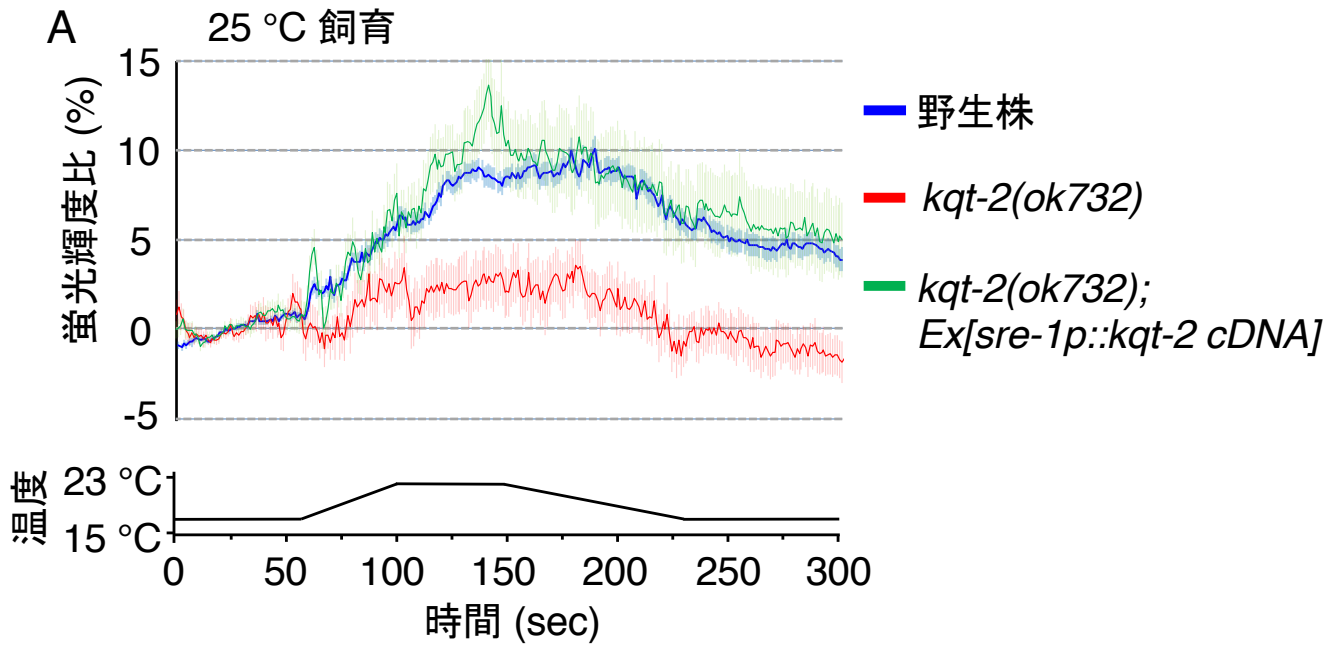


図15. 25 °C飼育時の*kqt-2*変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性
(A) *kqt-2*変異体はADLの温度変化に対する応答性が低下する異常を示し、この異常はADLで特異的に*kqt-2 cDNA*を発現させることによって回復した。すべて 25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載。(17 °C→23 °C→17 °C)。

(B) グラフAの170-180 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 18。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。野生株のデータは図14、17、20、23、24、25、26、30と共通。*kqt-2*変異体のデータは図20、26、30と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

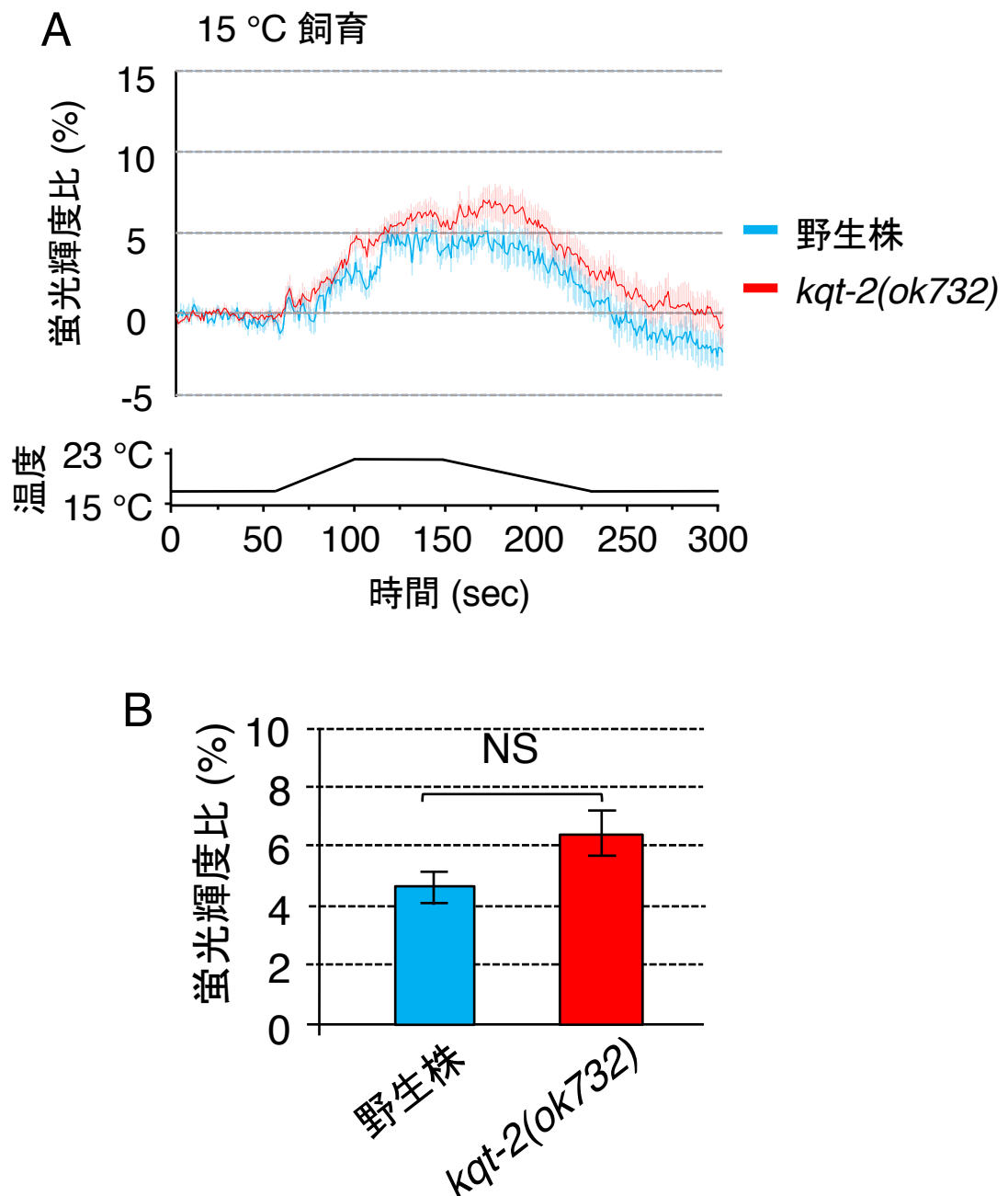


図16. 15 °C飼育時の*kqt-2*変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性
 (A) 15 °Cで飼育した*kqt-2*変異体は野生株と同様の温度応答性を示す。温度変化パターンはグラフ下に記載(17 °C→23 °C→17 °C)。
 (B) グラフAの160-170 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 16。エラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。15 °C飼育の野生株のデータは図14と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

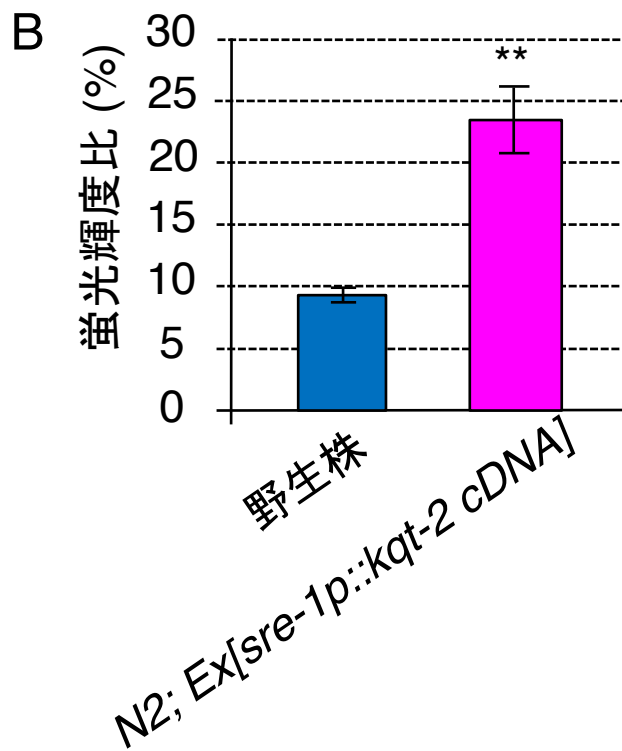
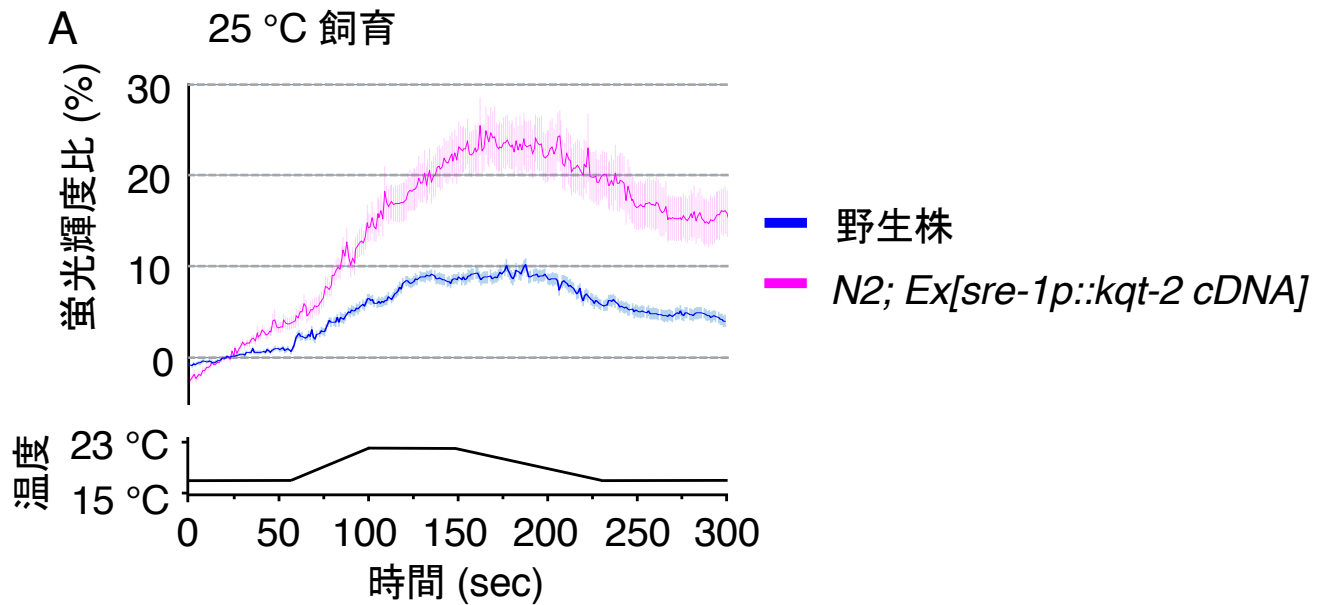


図17. *kqt-2*遺伝子過剰発現体のADL感覚ニューロンの温度応答性

(A) *kqt-2 cDNA*を野生株のADLで過剰発現させると、ADLの温度変化に対するカルシウム濃度が上昇した。25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載 (17 °C→23 °C→17 °C)。

(B) グラフAの170-180 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 25。エラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。25 °C飼育の野生株のデータは図14、15、20、23、24、25、26、30と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

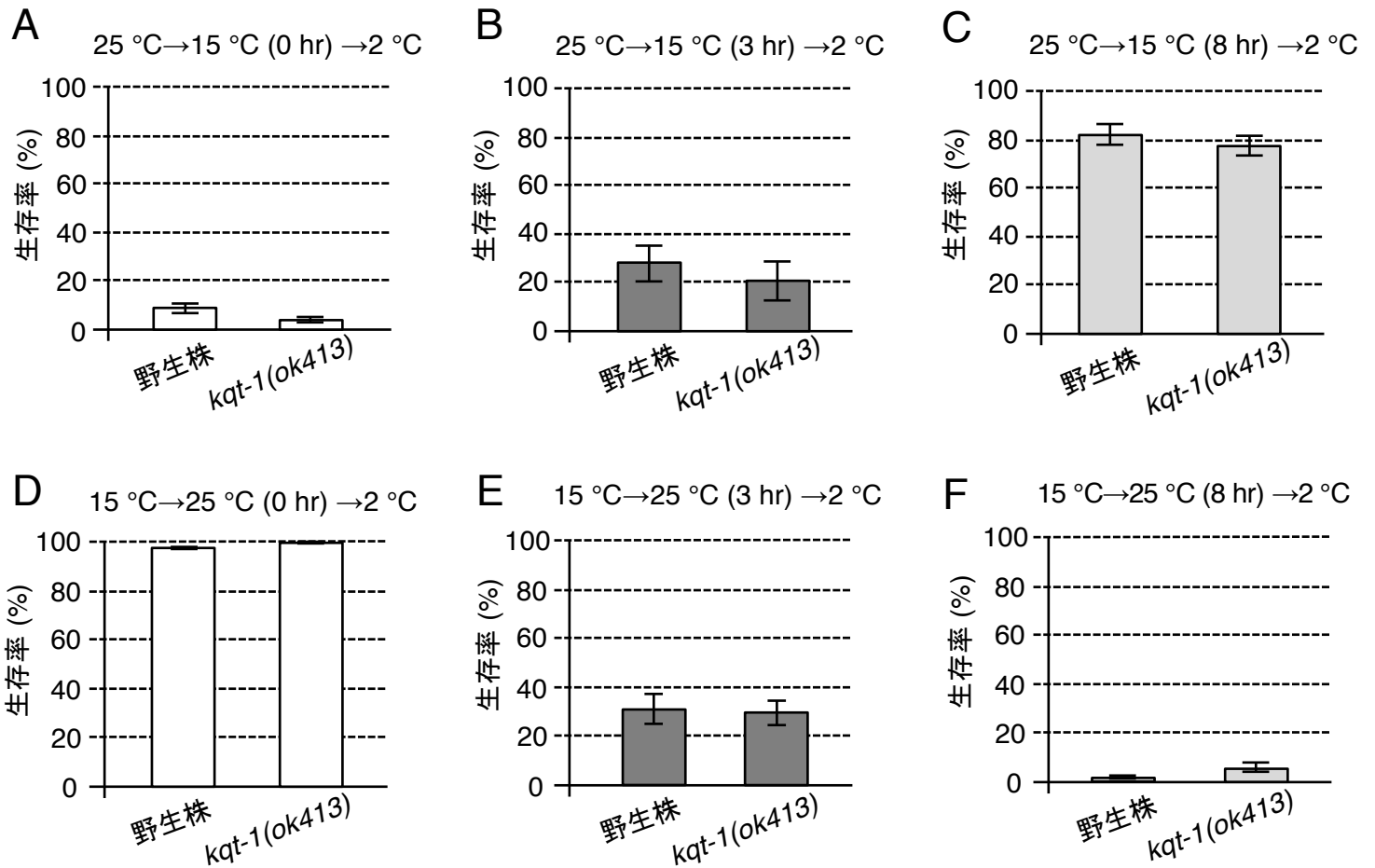


図18. カリウムチャンネル*kqt-1*変異体の低温馴化

(A) 25 °C飼育後に15 °Cにシフトせずに2 °Cの低温刺激を与えた後の生存率。

(B, C) 25 °Cで飼育後15 °Cに3時間、あるいは8時間シフトした際の低温馴化。いずれも異常は見られなかった。

(A, B, C) アッセイ数 ≥ 11。エラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

(D) 15 °C飼育後25 °Cにシフトせずに2 °Cの低温刺激を与えた際の低温馴化。

(E, F) 15 °Cで飼育後25 °Cに3時間、あるいは8時間シフトした際の低温馴化。いずれも異常は見られなかった。

(D, E, F) アッセイ数 ≥ 7。エラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

25 °C → 15 °C (3 hr) → 2 °C

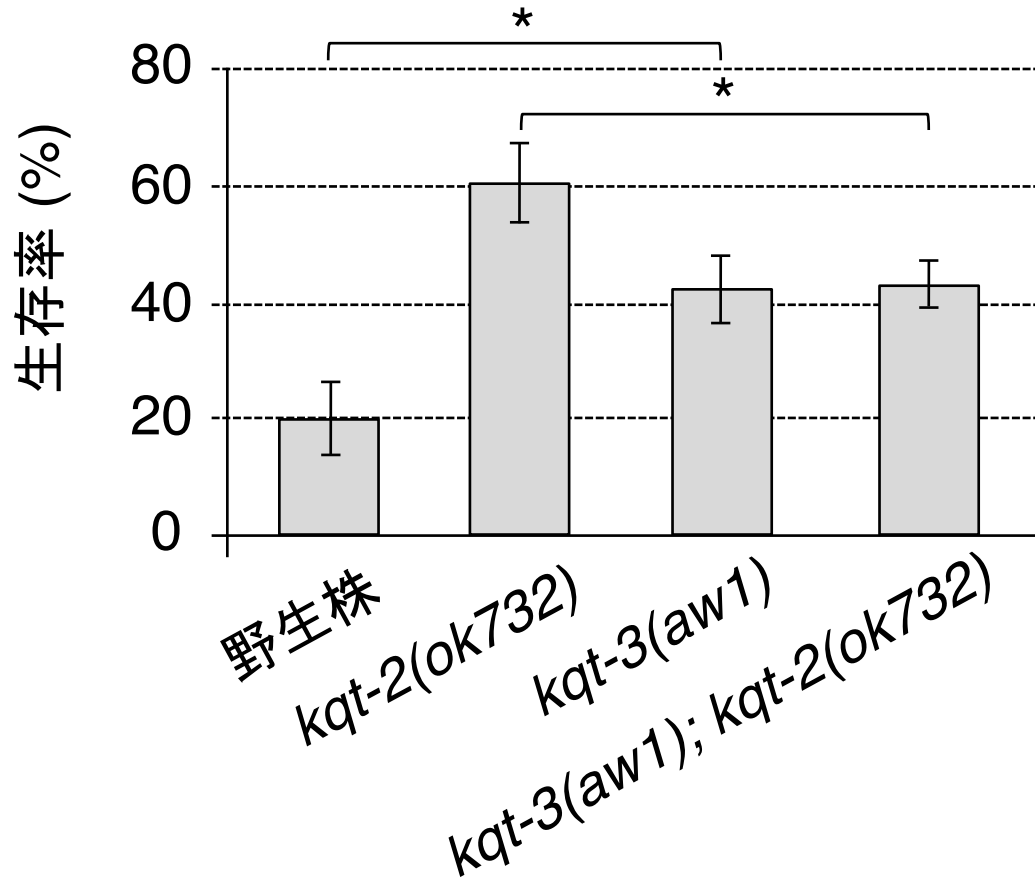


図19. *kqt-3*変異体の低温馴化

25 °Cで飼育後15 °Cに3時間シフトした際の低温馴化。*kqt-3*変異体は低温馴化が上昇する異常を示した。*kqt-3*; *kqt-2*二重変異体では*kqt-2*変異体の低温馴化上昇の異常が抑圧され、*kqt-3*変異体と同様の表現型を示した。アッセイ数 ≥ 12。エラーバーはSEM。チューキーライマー検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

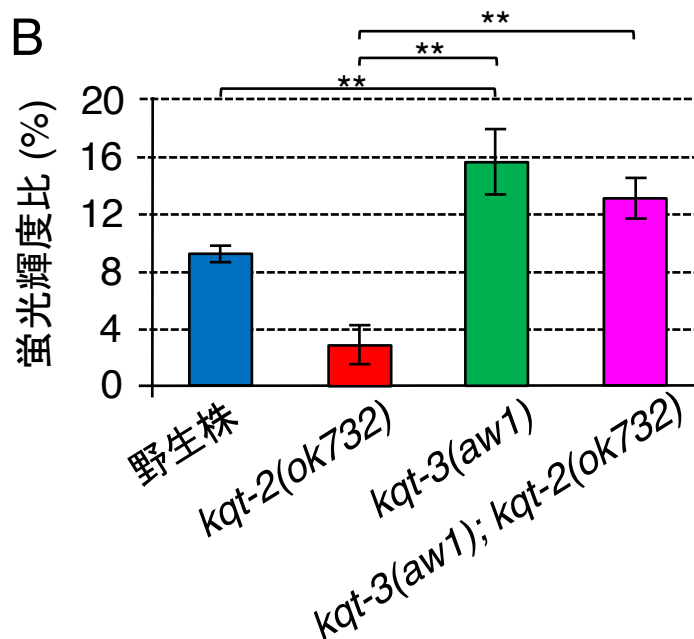
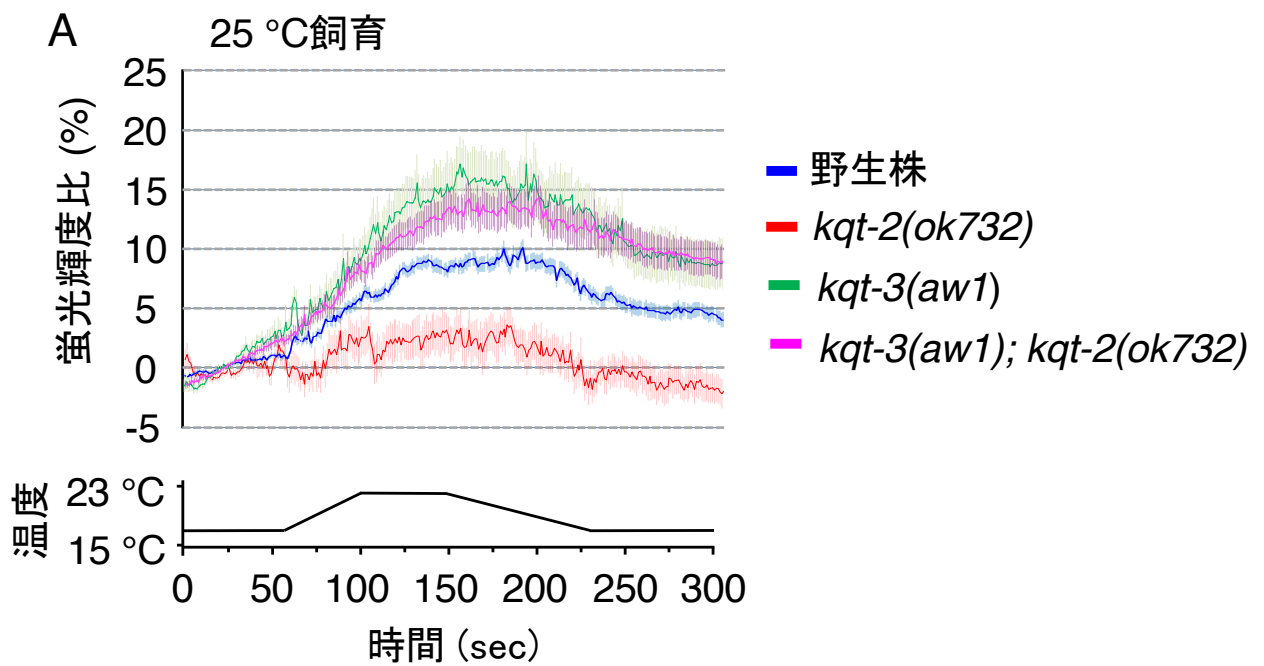


図20. *kqt-3*変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性

(A) *kqt-3*変異体はADLの温度応答性が上昇する異常を示した。*kqt-3; kqt-2*二重変異体では*kqt-2*変異体の温度応答性の低下が*kqt-3*変異によって抑圧され、*kqt-3*変異体と同様の表現型を示した。25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載(17 °C→23 °C→17 °C)。

(B) グラフAの160-170 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 16。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。
*p < 0.05; **p < 0.01。野生株のデータは図14、15、17、23、24、25、26、30と共通。*kqt-2*変異体のデータは図15、26、30と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

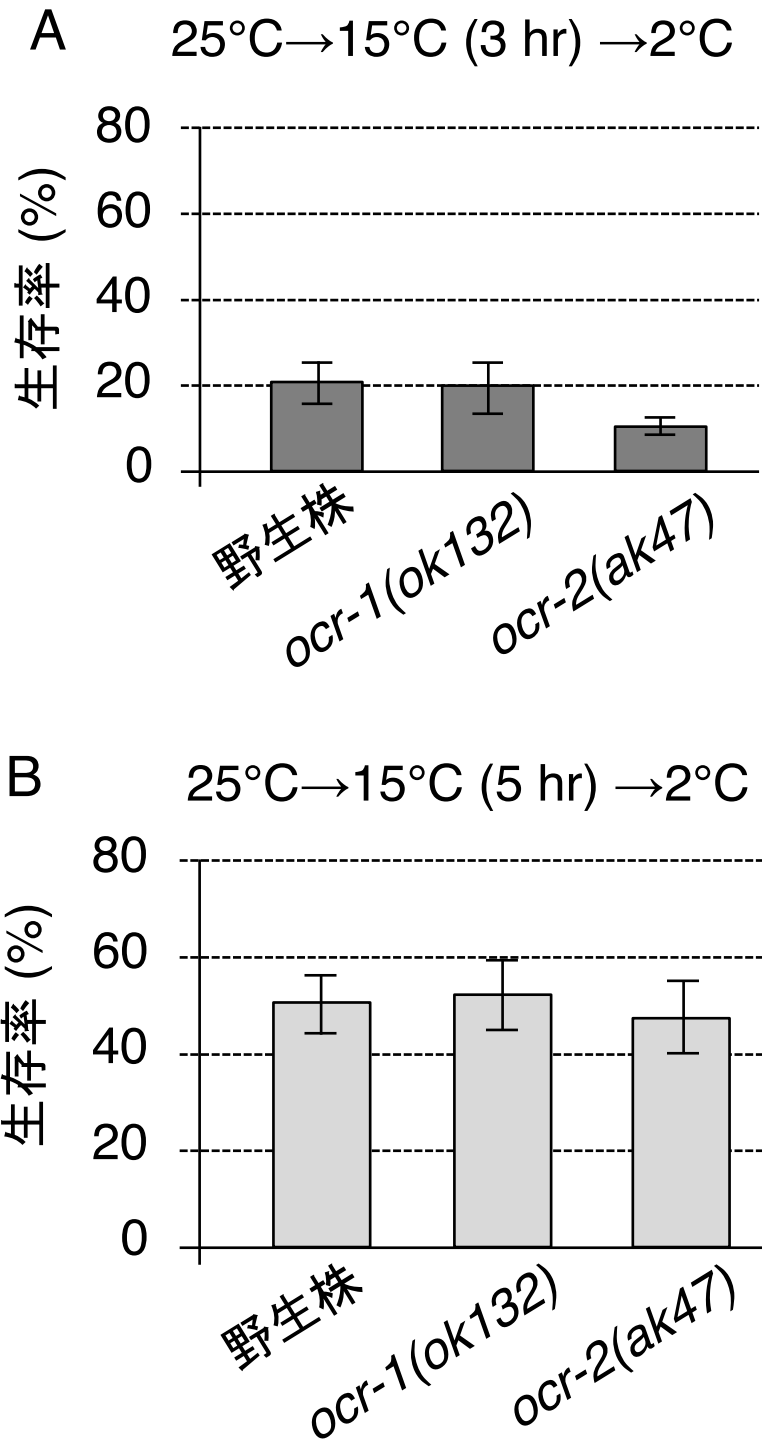


図21. *ocr-1*変異体と*ocr-2*変異体の低温馴化

(A) 25 °C飼育後15 °Cに3時間置いた際の低温馴化。

(B) 25 °Cで飼育後15 °Cに5時間置いた際の低温馴化。いずれも異常は見られなかった。

(A, B) アッセイ数 ≥ 13。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

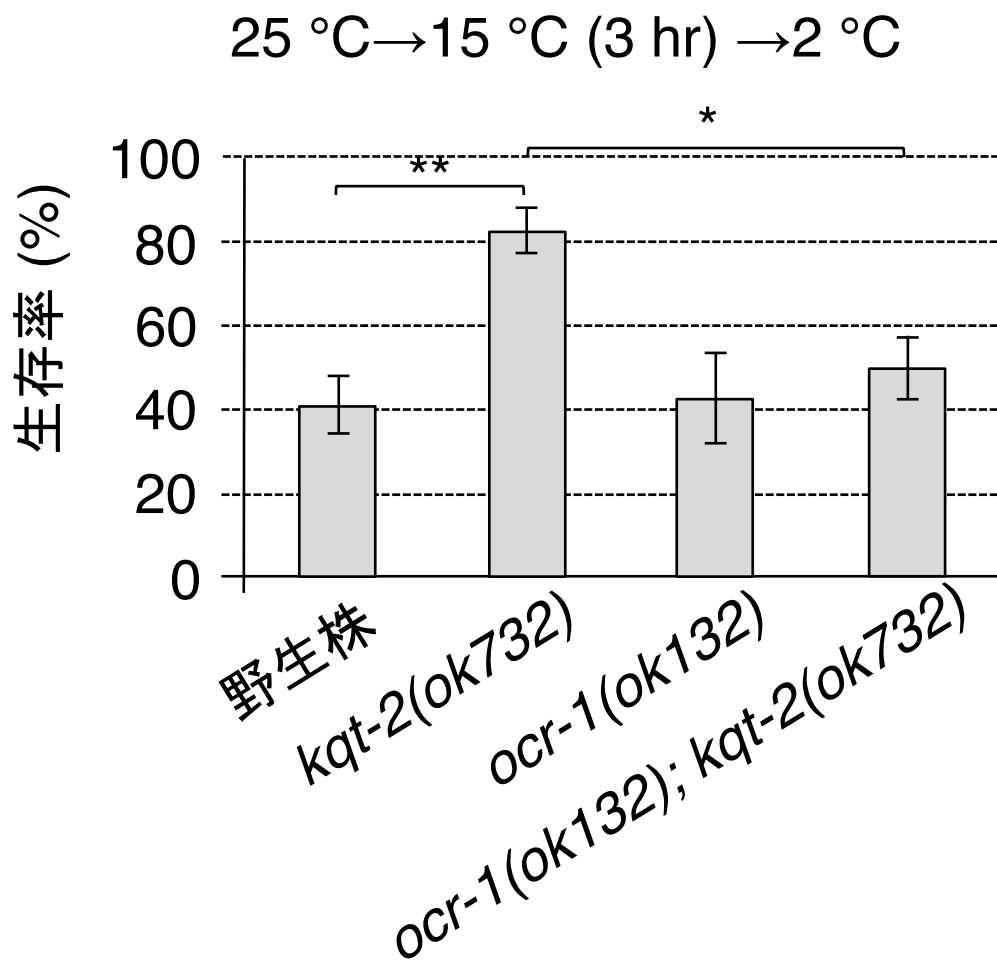


図22. *ocr-1*; *kqt-2*二重変異体の低温馴化

25 °C飼育後15 °Cに3時間置いた際の低温馴化。*kqt-2*変異体の低温馴化が上昇する異常は*ocr-1*変異によって抑圧された。アッセイ数 ≥ 8。エラーバーはSEM。テューキーライマー検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

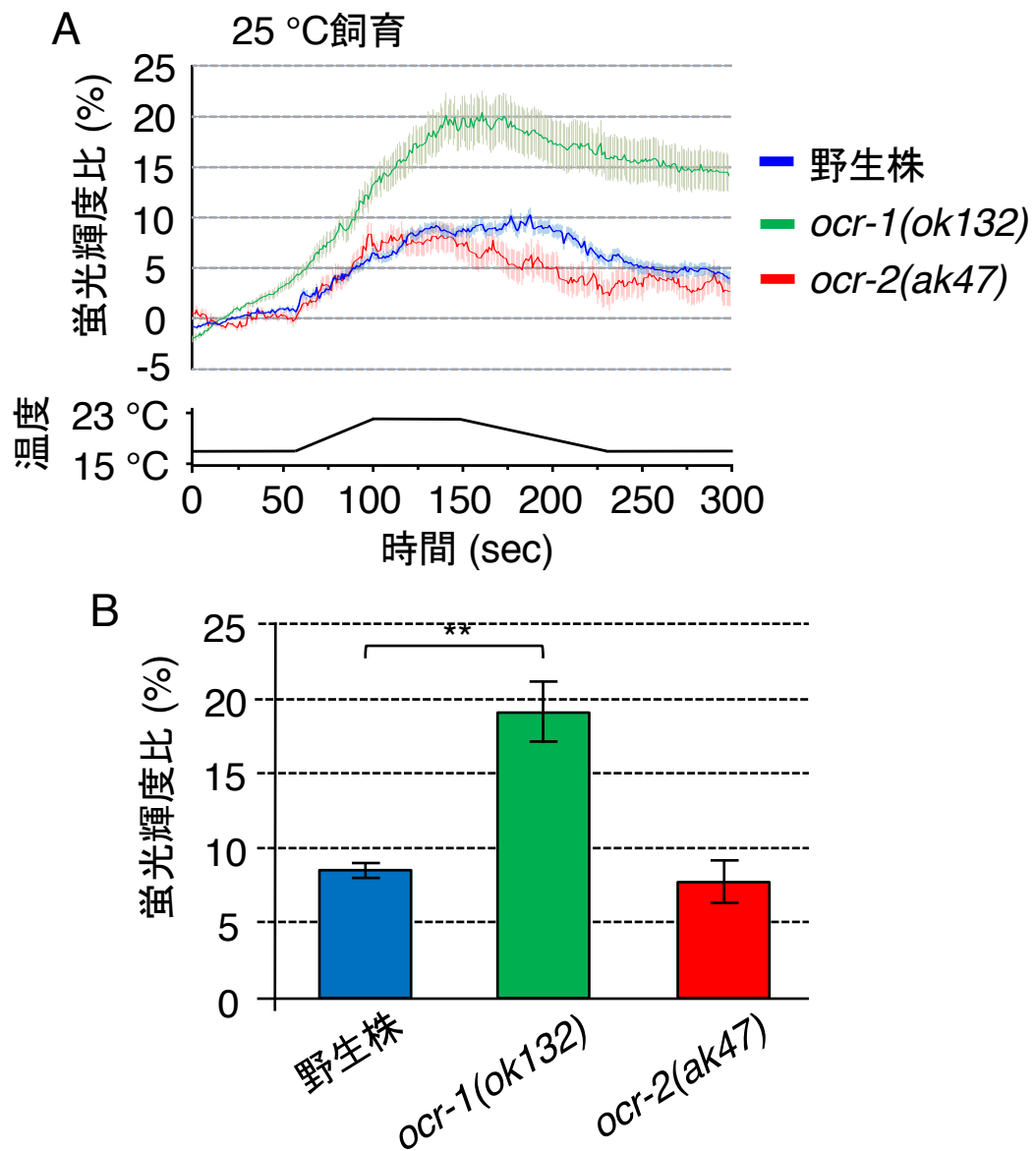


図23. *ocr-1*変異体、*ocr-2*変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性
 (A) *ocr-1*変異体はADLの温度応答性が上昇する異常を示した。25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載(17 °C→23 °C→17 °C)。
 (B) グラフAの140-150 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 17。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。野生株のデータは図14、15、17、20、24、25、26、30と共通。*ocr-1*変異体のデータは図24、26と共通。*ocr-2*変異体のデータは図25と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

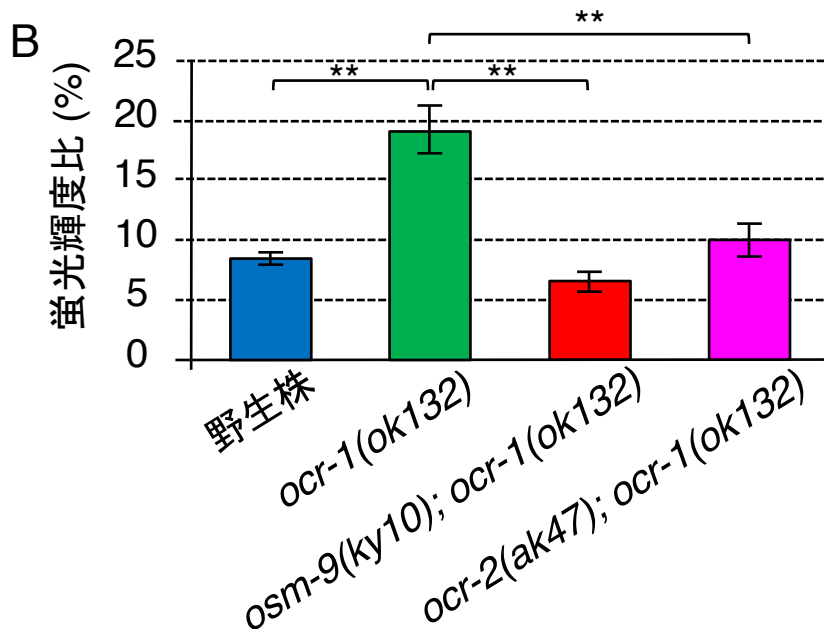
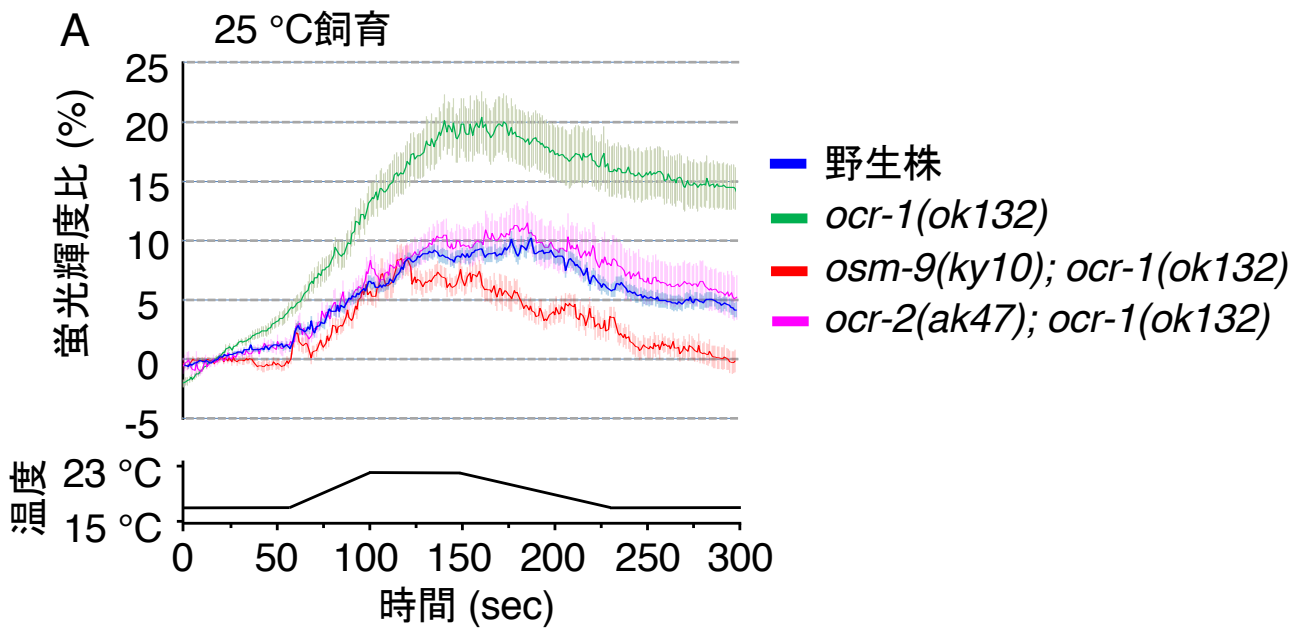


図24. *osm-9; ocr-1*二重変異体、*ocr-2; ocr-1*二重変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性

(A) *ocr-1*変異体のADLの温度応答性が上昇する異常は*osm-9*変異、*ocr-2*変異によってそれぞれ抑圧された。25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載 (17 °C→23 °C→17 °C)。

(B) グラフAの140-150 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 18。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。野生株のデータは図14、15、17、20、23、25、26、30と共通。*ocr-1*変異体のデータは図23、26と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

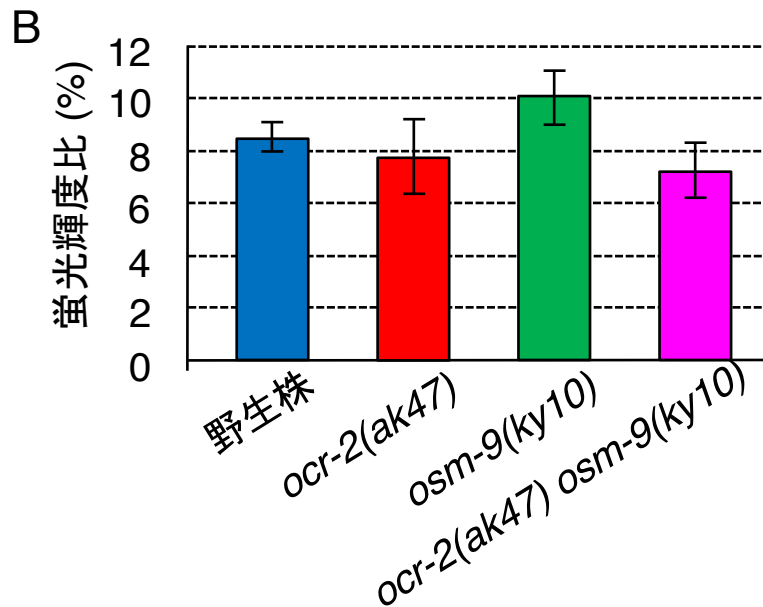
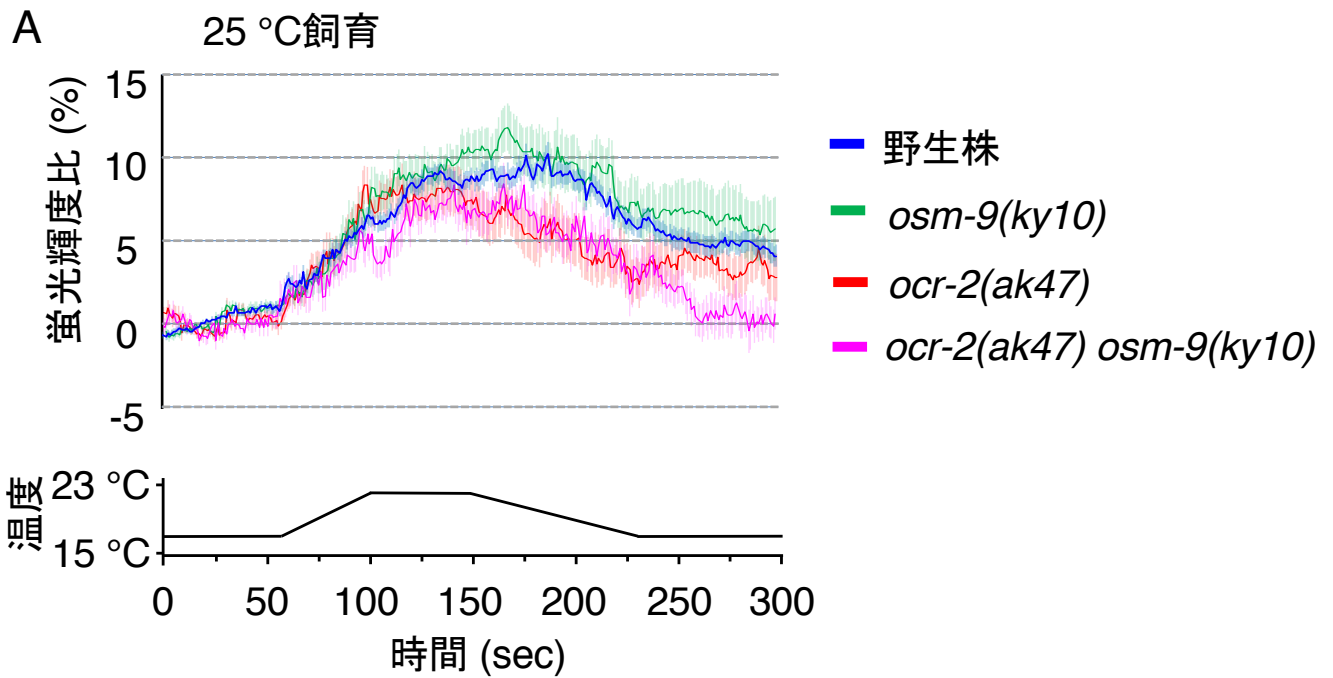


図25. *ocr-2*変異体、*osm-9*変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性
 (A) *ocr-2*変異体、*osm-9*変異体はADLの温度応答性に異常を示さなかった。25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載(17 °C→23 °C→17 °C)。
 (B) グラフAの140-150 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 17。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。野生株のデータは図14、15、17、20、23、24、26、30と共通。*ocr-2*変異体のデータは図23と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

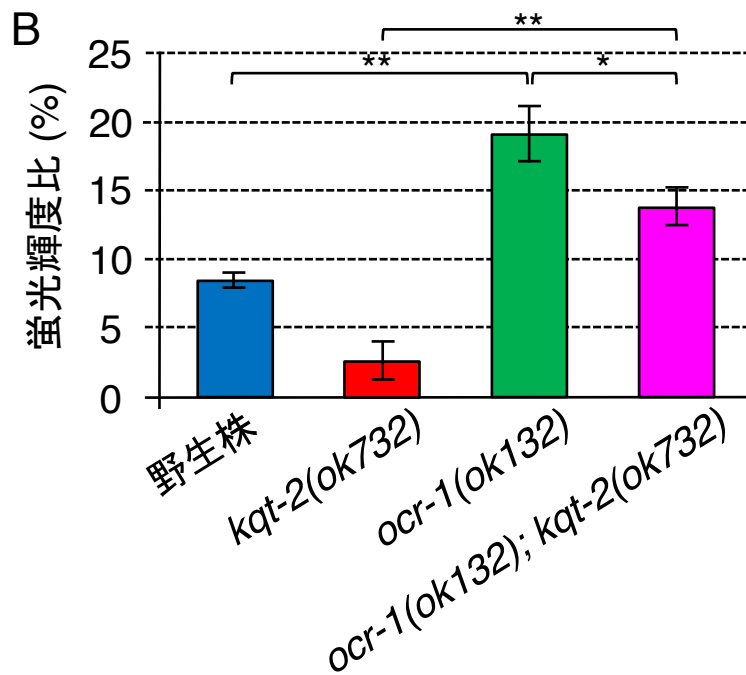
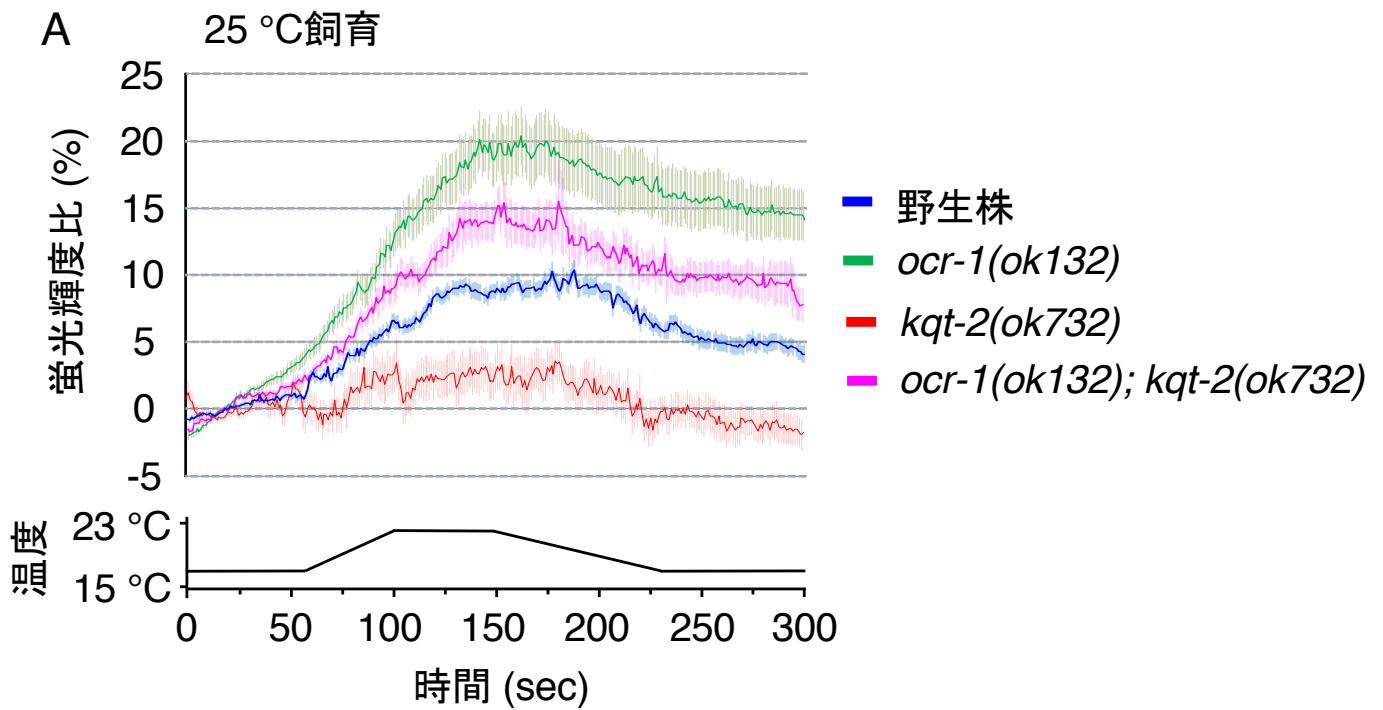


図26. *ocr-1; kqt-2*二重変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性

(A) *ocr-1; kqt-2*二重変異体のADLの温度変化に対するカルシウムイメージング解析の結果、*kqt-2*変異体の神経活動の低下は*ocr-1*変異によって抑圧され、同様に、*ocr-1*変異体の神経活動の上昇は*kqt-2*変異によって抑圧された。25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載(17 °C→23 °C→17 °C)。

(B) グラフAの140-150 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 18。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。野生株のデータは図14、15、17、20、23、24、25、30と共通。*kqt-2*変異体のデータは図15、20、30と共通。*ocr-1*変異体のデータは図23、24と共通。それぞれの実験は同時期におこなった。

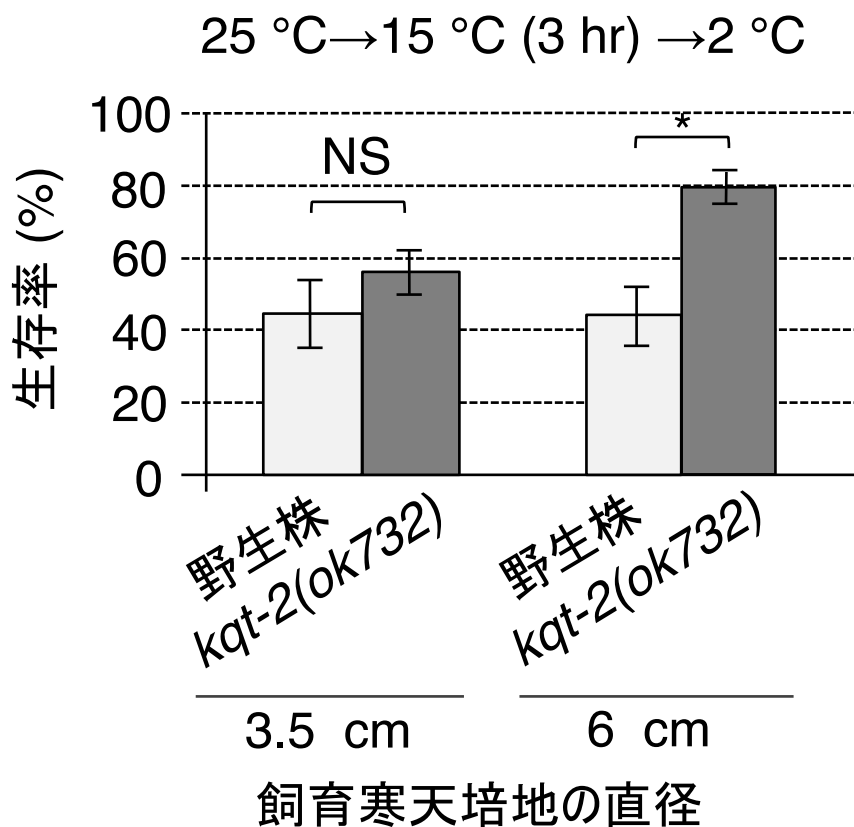


図27. 直径3.5 cmと6 cmの寒天培地で飼育した*kqt-2*変異体の低温馴化
 25 °Cで飼育後15 °Cに3時間シフトした際の低温馴化。直径3.5 cmで飼育した
*kqt-2*変異体では野生株と同様の低温馴化を示したが、直径6 cmの寒天培地で
 飼育した*kqt-2*変異体は顕著な低温馴化上昇の異常を示した。アッセイ数 ≥ 8。エ
 ラーバーはSEM。t検定 (Welch) による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

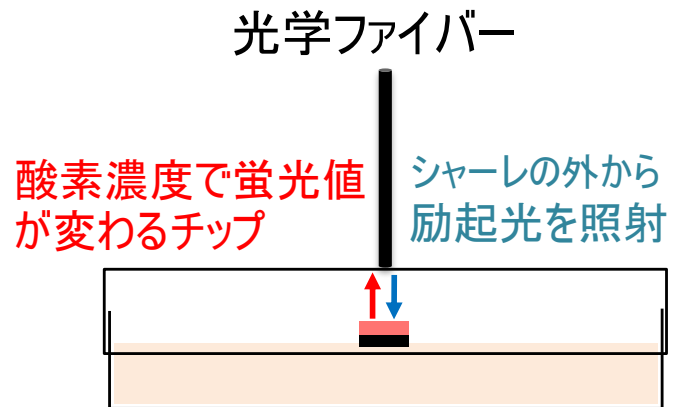
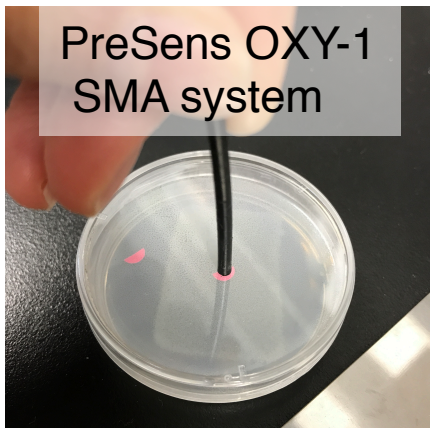


図28. 光学的な酸素濃度の測定

PreSens OXY-1 SMA systemを用いた酸素濃度の測定。酸素濃度で蛍光値が変化するチップをシャーレ内に置き、パラフィルムで密閉したシャーレの蓋の上からチップに励起光を照射して蛍光値を測定した。

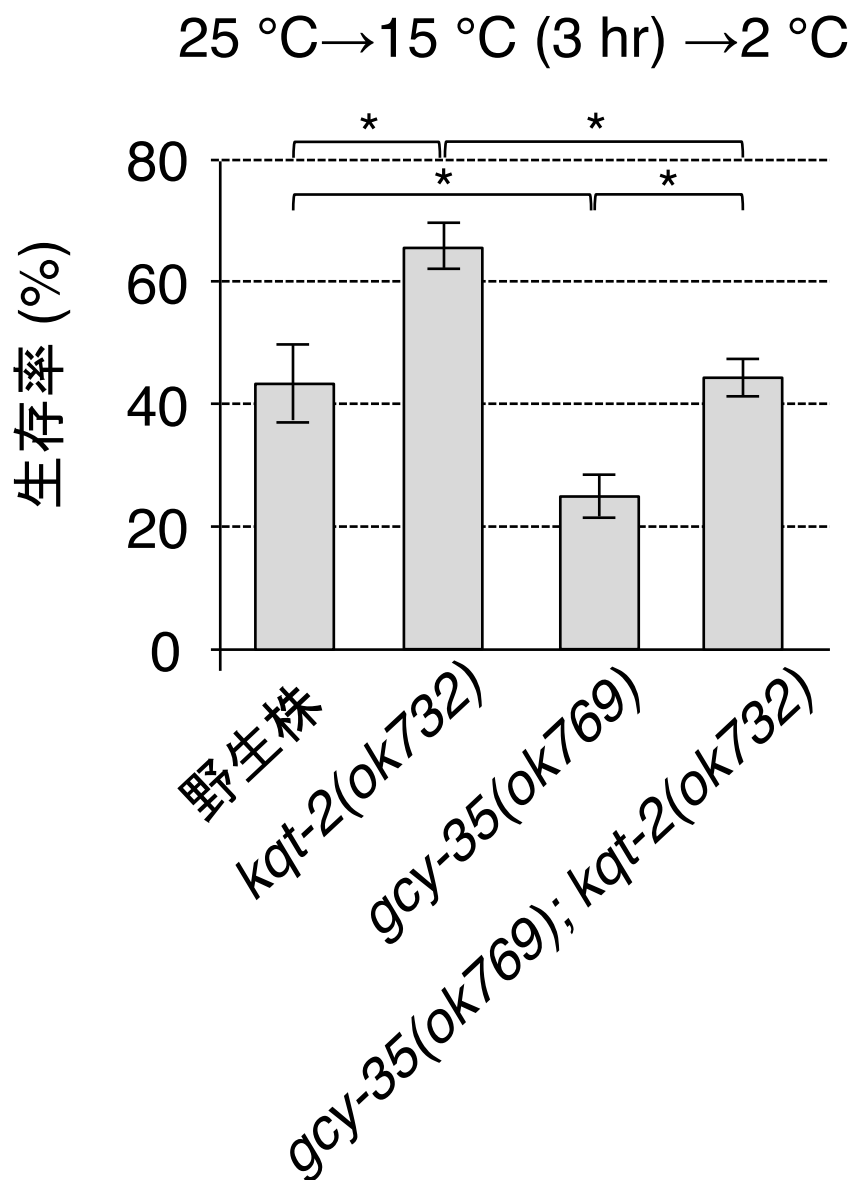


図29. 酸素受容体gcy-35変異体の低温馴化

25 °Cで飼育後15 °Cに3時間シフトした際の低温馴化。酸素受容体GCY-35の変異体では低温馴化が低下する異常を示した。kqt-2変異体の低温馴化が上昇する異常はgcy-35変異によって抑圧された。アッセイ数 ≥ 11。エラーバーはSEM。テューキーライマー検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。

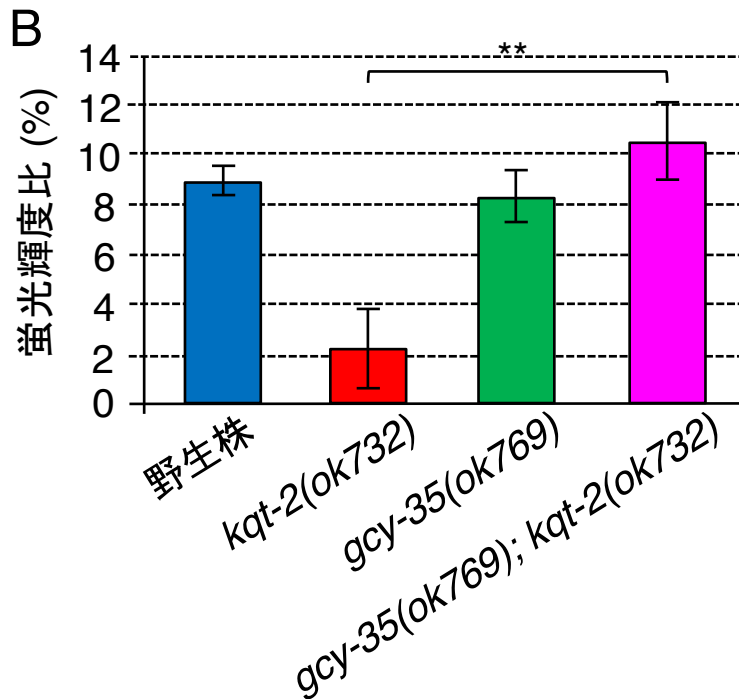
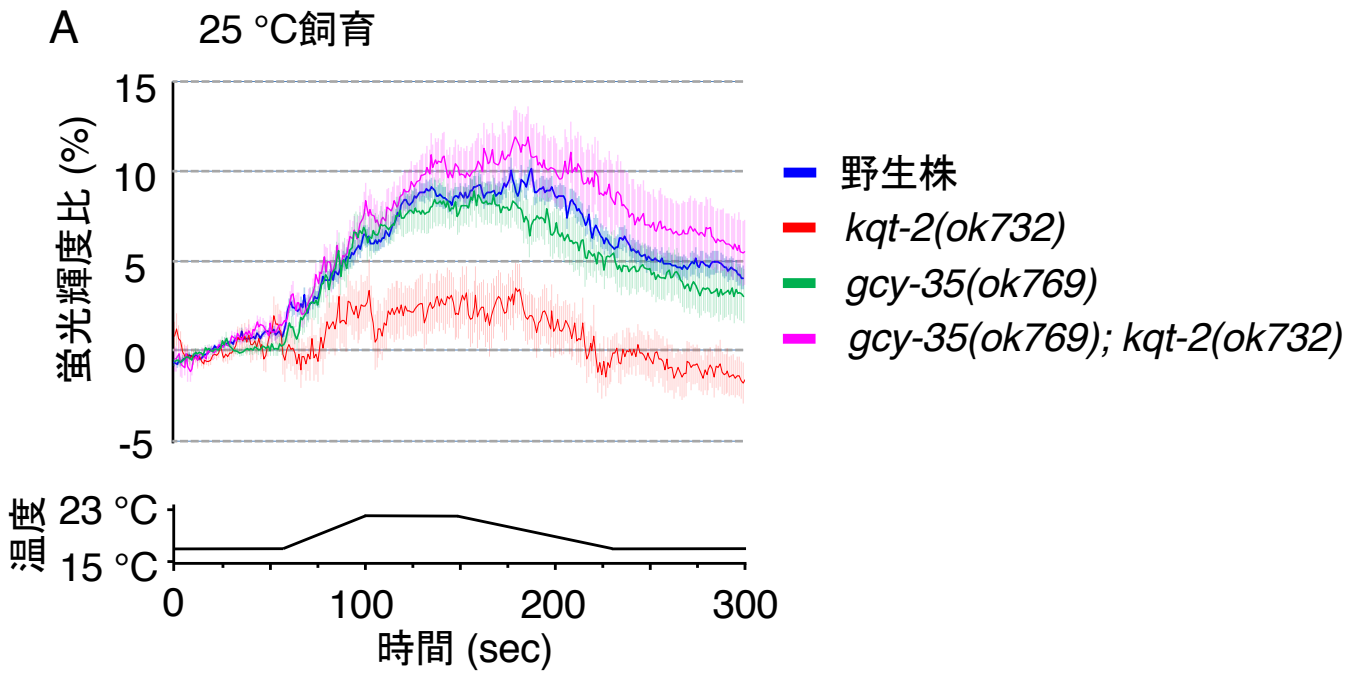


図30. 酸素受容体、*gcy-35*変異体のADL感覚ニューロンの温度応答性

(A) *kqt-2*変異体の温度変化に対する神経活動の低下は酸素受容体である*gcy-35*変異によって抑圧された。25 °C飼育。温度変化パターンはグラフ下に記載 (17 °C→23 °C→17 °C)。

(B) グラフAの140-150 secの11秒間の蛍光輝度比の平均。棒グラフの色はグラフAの色と対応。n ≥ 18。エラーバーはSEM。チューキークライマー検定による統計解析。
 *p < 0.05; **p < 0.01。野生株のデータは図14、15、17、20、23、24、25、26と共通。*kqt-2*変異体のデータは図15、20、26と共通。

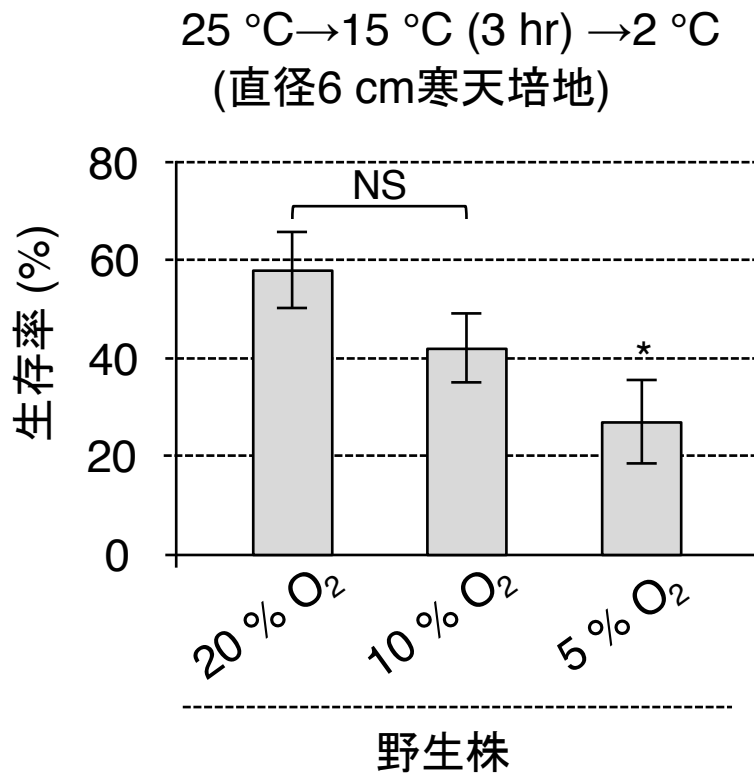


図31. 野生株の飼育酸素濃度依存的な低温馴化

野生株を20 %、10 %、5 %酸素濃度で飼育した際の低温馴化。5 %酸素濃度で飼育した野生株は20 %酸素濃度で飼育した野生株に比べ、低温馴化の低下が見られた。アッセイ数 ≥ 9。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。

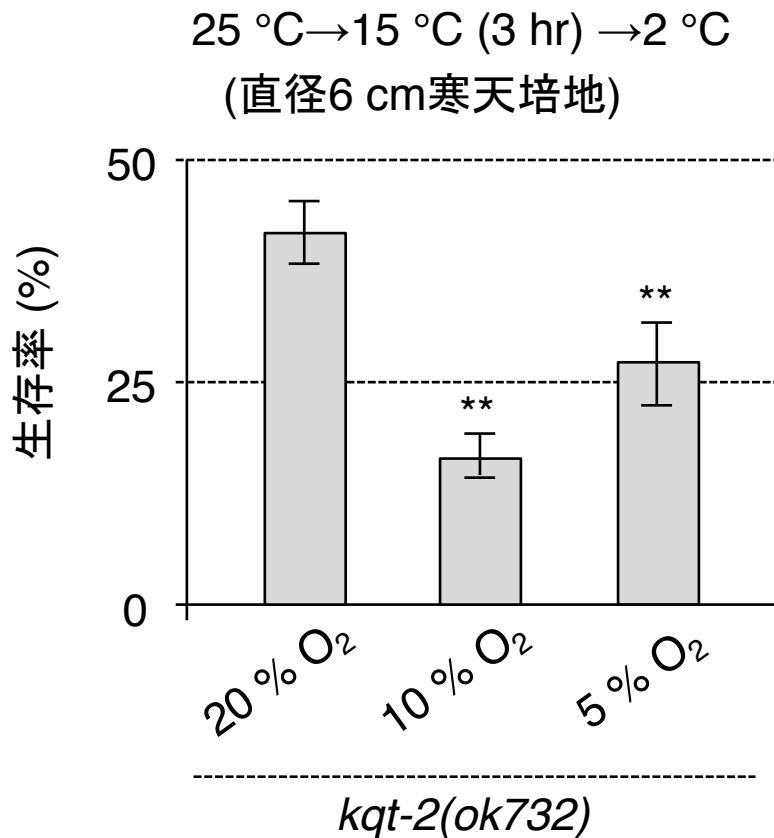


図32. *kqt-2*変異体の飼育酸素濃度依存的な低温馴化

*kqt-2*変異体を20%、10%、5%酸素濃度で飼育した際の低温馴化。10%と5%酸素濃度で飼育した*kqt-2*変異体において、低温馴化の低下が見られた。アッセイ数 ≥ 9。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

この解析では、酸素濃度を変化させるために専用のパウチに入れて線虫を飼育した。パウチに入れて飼育することにより、20% O₂濃度においても*kqt-2*変異体の低温馴化が低下していた。おそらく、パウチに入れることによりプレート内の湿度やパウチ内の気圧などが通常飼育したプレートとは異なったことが原因である可能性が考えられる。

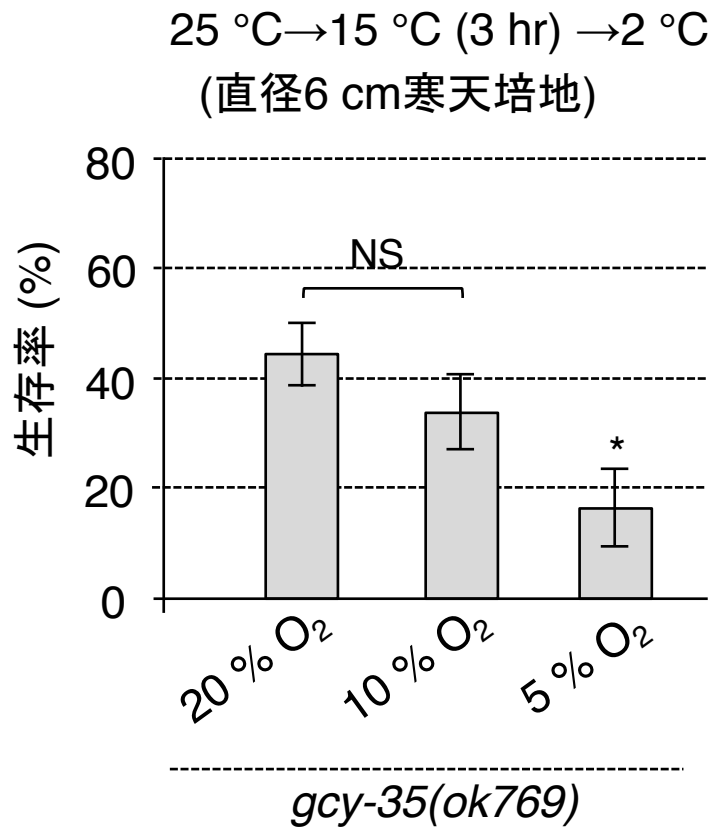


図33. *gcy-35*変異体の飼育酸素濃度依存的な低温馴化

*gcy-35*変異体を20%、10%、5%酸素濃度で飼育した際の低温馴化。5%酸素濃度で飼育した*gcy-35*変異体は20%酸素濃度で飼育した*gcy-35*変異体に比べ、低温馴化の低下が見られた。アッセイ数 ≥ 9。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

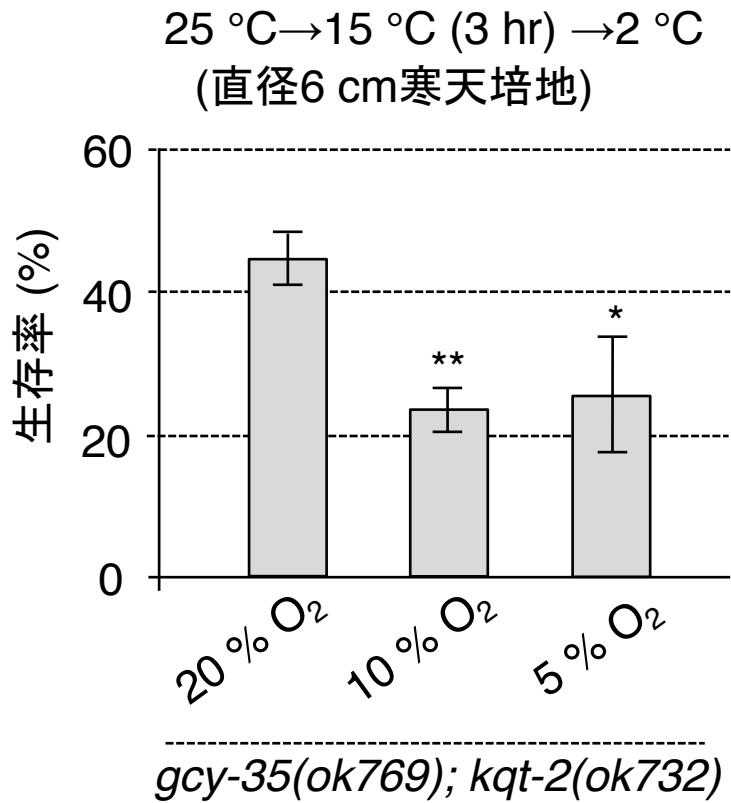


図34. *gcy-35; kqt-2*二重変異体の飼育酸素濃度依存的な低温馴化
*gcy-35; kqt-2*二重変異体を20%、10%、5%酸素濃度で飼育した際の低温馴化。
 10%と5%酸素濃度で飼育した*gcy-35; kqt-2*二重変異体において、低温馴化の低下が見られた。アッセイ数 ≥ 9。エラーバーはSEM。ダネット検定による統計解析。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

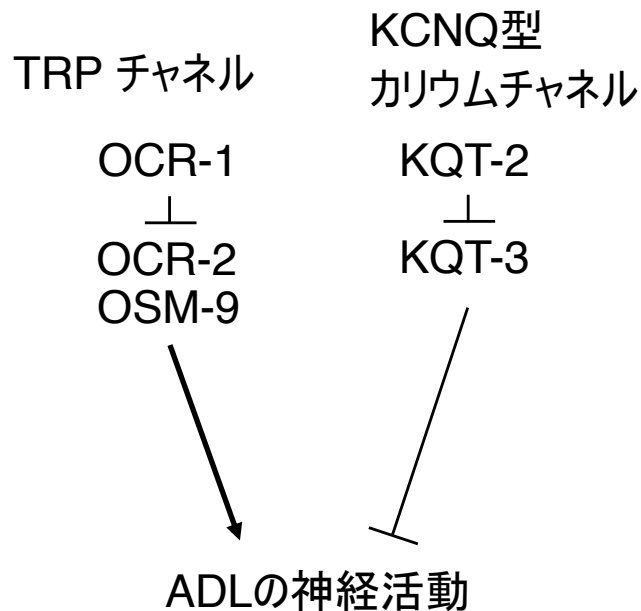


図35. ADLの神経活動を制御する分子の遺伝学的関係

TRPチャンネルであるOCR-1はOCR-2とOSM-9のネガティブレギュレーターとして働き、これらのTRPチャンネル複合体はADLの神経活動を活性化させる。ヒトのKCNQチャンネルのホモログであるKQT-2はKQT-3のネガティブレギュレーターとして働き、ADLの神経活動を制御する。

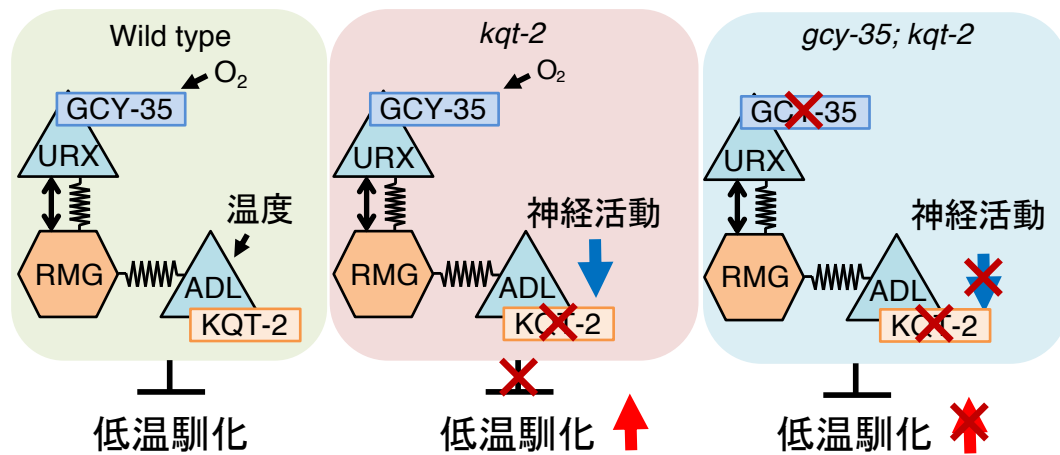


図36. 酸素濃度依存的な低温馴化を制御する神経回路モデル

野生株において、カリウムチャンネルKQT-2はADL温度受容ニューロンで温度変化に対する神経活動を上昇させることにより、低温馴化が抑制される。この温度受容ニューロンADLの神経活動は上流の酸素受容ニューロンURXからの酸素情報の影響を受ける。URX酸素受容ニューロンで酸素受容体として働くGCY-35が酸素を受容し、RMG介在ニューロンを介して、ADL温度受容ニューロンの神経活動を変化させる。*kqt-2*変異体では、ADLの神経活動が低下するため、低温馴化が上昇する。*gcy-35; kqt-2*二重変異体では、GCY-35によって酸素情報が伝達されないため、*kqt-2*変異によるADLの神経活動の低下が抑圧され、*kqt-2*変異体の低温馴化が上昇する異常が抑制される。

表1. 直径3.5 cmと直径6 cmの寒天培地の酸素濃度変化

産卵後の時間	プレートの直径	酸素濃度の平均値±SEM (%)
24時間	3.5 cm	14.07±0.34
	6 cm	16.23±0.33
52時間	3.5 cm	11.64±0.93
	6 cm	15.99±0.77
54時間	3.5 cm	11.23±1.03
	6 cm	15.93±0.79
56時間	3.5 cm	11.13±1.10
	6 cm	15.69±0.94
58時間	3.5 cm	11.04±1.11
	6 cm	15.39±0.94
60時間	3.5 cm	10.77±1.19
	6 cm	15.38±1.01
62時間	3.5 cm	10.15±1.30
	6 cm	14.87±1.20
64時間	3.5 cm	9.79±1.40
	6 cm	14.41±1.19

産卵後24時間後から64時間後までの直径3.5 cmと直径6 cmの寒天培地の酸素濃度変化。直径3.5 cmの寒天培地は直径6 cmの寒天培地よりも顕著に低い酸素濃度を示した。n = 10。t検定 (Welch) による統計解析。*p < 0.05; **p < 0.01。

表2. 本研究で使用したプライマー一覧

Primer		
Mutation check用プライマー		
プライマー番号	配列(5'-3')	用途
KHR854_kqt-2_inner_fwd	GAG AAT GCC GGA AAA TTC AA	<i>kqt-2(ok732)</i> 変異チェック用プライマー
KHR855_kqt-2_inner_rev	TGG CAA TAA AGT GAC GCT TG	
KHR856_kqt-2_internal1_rev	GCG TAA ACG AGT TCT ATT TGC G	
KHR1179_kqt-3_deletion_fwd	GCT CGA TAC CGT AAC ATA AAG GAG	<i>kqt-3(aw1)</i> 変異チェック用プライマー
KHR1180_kqt-3_deletion_rev	AGG AAT CCG ATG TAG AGA GTT GTG	
KHR1181_kqt-3_deletion_inter	CGA CAT TTA GCA GGA CCA G	
KHR2022_ocr-1(ok132)_fwd	GAT GAA TTC GAT CAG GGA CAA GC	<i>ocr-1(ok132)</i> 変異チェック用プライマー
KHR2023_ocr-1(ok132)_rev	TTT CCC GAT CCA TTT CAT CCA G	
KHR2024_ocr-1(ok132)_inter_r	TCT TTC ATC AAC GCT CCA TAC C	
KHR2025_ocr-2(ak47)_fwd	CAA GCT AGC ATT AGA ATG TGG AGC	<i>ocr-2(ak47)</i> 変異チェック用プライマー
KHR2026_ocr-2(ak47)_rev	CCT GTC GTT TAT ACT CCA GTT GTG	
KHR2027_ocr-2(ak47)_inter_r	GGC AAA TGC TTC CCA TTT CG	
KHR2074_gcy-35_f	TGG AAA ACT CCG CAA CAA CG	<i>gcy-35(ok769)</i> 変異チェック用プライマー
KHR2075_gcy-35_r	GTT GAG CTT CCC AGT CTC GC	
KHR2076_gcy-35_inter_f	ATG AGA CAC TCT GAC ACC ACG TG	
KHR132_gsp-4tm5415_fwd1	AGCAGGCAGGATTTATGC	<i>gsp-4(tm5415)</i> 変異チェック用プライマー
KHR133_gsp-4tm5415_rev1	TGGCAAACGGAAAAACGC	
KHR134_gsp-4tm5415_int_fwd2	TACTGTCCGTGGATGTCTCC	
レスキュー用 PCR断片		
プライマー番号	配列(5'-3')	用途
KHR1053_kqt-2_full_fwd	GAT CAT GTC GAT GAC GCA ATG AG	<i>kqt-2</i> 遺伝子上流3kbプロモーター領域と <i>kqt-2</i> 遺伝子全長を増幅するためのプライマー
KHR1054_kqt-2_full_rev	CTA GCG ATC CAA TTG ATT TCC GTC	
KHR1055_kqt-2_full_out_fwd	CCA GTG GAA TTT TAT GCT TTC CGG	KHR1053, KHR1054で増幅したPCR産物をTemplateにして <i>kqt-2</i> のプロモーターと遺伝子全長を増幅するためのNested primer
KHR1056_kqt-2_full_out_rev	GTC AGG AGA TTT TTG GTT TCC TGG	
Plasmid作成に用いたプライマー		
プライマー番号	配列(5'-3')	用途
KHR1112_kqt-2cDNA_primer1_rev	TCC GTT GCC TTT GAT TTC C	<i>kqt-2cDNA</i> のダイレクトシーケンス用
KHR1113_kqt-2cDNA_primer2_fwd	GAC GAT GCC GAA GAT TCA G	
KHR1114_kqt-2cDNA_primer3_fwd	CAT TCT CAT CAT CCC AGC C	
KHR1115_kqt-2cDNA_primer4_fwd	ATG GTG GTT CAC TGC TGT C	
KHR1116_kqt-2cDNA_primer5_fwd	TCT ATG TTA CCG AGG AGC G	
KHR1117_kqt-2cDNA_primer6_fwd	GAA GTA GAC ATC AGC CTG C	
KHR1118_kqt-2cDNA_primer7_fwd	ACA AAG AAC CAT TGG ACC G	<i>kqt-2cDNA</i> の下流に <i>unc-54</i> UTRを導入するためのプライマー
KHR1141_kqt-2_3UTR_infus_fwd	CAT TAT CAC CAC GTG CGT AGA ATT CCA ACT GAG CG	
KHR1142_kqt-2_3UTR_infus_rev	CCC GCG GTG GCG GCC GAC AAG CTG TGA CCG TCT CCG	
KHR1157_kqt-2_arti_infu_fwd	GGG AAC AAA AGC TGG GTA CCA AGC TTC CTG CAG GGC ATG C	<i>kqt-2cDNA</i> の人工遺伝子を導入するためのInfusion用プライマー
KHR1158_kqt-2_arti_infu_rev	ATA TGG CGC TGA CGC TGC ATT CAA TGG TTT TTC AAG G	
KHR1159_kqt-2cDNA_primer8_fwd	CAC CTC TAA CAA TGA AAT TGT G	ダイレクトシーケンス用
KHR1160_kqt-2cDNA_primer9_fwd	CAA GTA TTG ATG AGC ACG ATG C	
KHR1342_kqt-2_pro_4.5k_inv_f	TGA CCT TCT GCT ATC ACC GAA CTC	<i>kqt-2</i> 遺伝子のプロモーター領域のシスエレメント解析用プラスミド作成に用いたプライマー
KHR1343_kqt-2_pro_2.3k_inv_f	TTC TCG AGT TCC TTC TTT CGA TCG	
KHR1344_kqt-2_pro_1k_inv_f	GAC TTC GTT GCT CTT GAT CTC ACC	
KHR1345_kqt-2_promoter_inv_r	GAC ACT CAT AGA TGA AAA CGA CTG G	
KHR1947_pMSK027_kqt-2cDNA_Insert_f	GACTCTAGAGGATCATGCCAAAATACGTTGCGTT	KQT-2の局在解析用プラスミド作成に用いたプライマー (<i>kqt-2cDNA::GFP</i>)
KHR1948_pMSK027_kqt-2cDNA_Insert_r	TCATTTTTTCTACCGAGACTCTATCCAAGCTGACT	
KHR1949_pMSK028_kqt-2promoter_infu_f	GAAATGAAATAAGCTTGCTCTAAGACACATATGAAA	
KHR1950_pMSK028_kqt-2promoter_infu_r	CCTCTAGAGTCGACCTAATTCATTGATTTAATTTCCAT	

表3. 本研究で使用したプラスミド一覧

Plasmid

Rescue系統作製用

プラスミド番号	
pMSK004	<i>ges-1p::kqt-2cDNA::unc-54UTR</i>
pMSK005	<i>osm-6p::kqt-2cDNA::unc-54UTR</i>
pMSK007	<i>sra-7p::kqt-2cDNA::unc-54UTR</i>
pMSK008	<i>kqt-2cDNA::unc-54UTR</i>
pMSK024	<i>sre-1p::kqt-2cDNA::unc-54UTR</i>

発現細胞解析用

pMSK028	<i>kqt-2_9kb_promoter::kqt-2cDNA::GFP</i>
pMSK029	<i>kqt-2_1kb_promoter::kqt-2 genomic gene(1st-12th exon)::GFP</i>
pMSK030	<i>kqt-2_2.3kb_promoter::kqt-2 genomic gene(1st-12th exon)::GFP</i>
pMSK031	<i>kqt-2_4.5kb_promoter::kqt-2 genomic gene(1st-12th exon)::GFP</i>

Calcium imaging系統作製用

プラスミド番号	
pTOM63	<i>sre-1p::yc3.60</i>

Injection marker用

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

公表論文リスト

副論文

- 1) Okahata M., Wei A. D., Ohta A., Kuhara A.

Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in *Caenorhabditis elegans*
Science Advances, 5, 2, eaav3631, 1-12, 2019

- 2) Okahata M., Ohta A., Mizutani H., Minakuchi Y., Toyoda A., Kuhara A.

Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in *Caenorhabditis elegans*
Journal of Comparative Physiology B, 186, 8, 985–998, 2016

参考論文

- 1) Ohnishi K., Takagaki N., Okahata M., Fujita M., Ohta A., Kuhara A.

Molecular and Cellular Network Systems Underlying Cold Tolerance of *Caenorhabditis elegans*
Cryobiology and Cryotechnology, 64, 2, 53–59, 2019