

甲南大学 博士学位論文

C. elegans の低温馴化を司る温度受容体の同定

甲南大学大学院
自然科学研究科 生命・機能科学専攻

大西 康平
Kohei Ohnishi

2021 年 2 月

※所属研究室における研究途上にある内容を含むため、本稿は内容を要約した
ものである。

目次

要旨	p. 1
略語一覧	p. 3
1. 序論	p. 5
1.1 温度変化に対する動物の生体調節機構	
1.2 生物における温度センサー分子	
1.3 Gタンパク質共役型受容体 (GPCR)	
1.4 線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C. elegans</i>)	
1.5 線虫における温度応答	
1.6 低温耐性・馴化の分子組織ネットワーク	
1.7 線虫で機能する TRP チャンネル	
1.8 本研究における目的	
2. 結果	p. 30
2.1 15°Cで飼育された TRPV 変異体の温度馴化異常	
2.2 TRPV 変異体における ADL のカルシウムイメージング解析	
2.3 線虫 TRPV を発現させた味覚ニューロンのカルシウムイメージング	
2.4 アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた 2 本差し膜電位固定法による OSM-9/OCR-2 の電気生理学的解析	
2.5 OSM-9/OCR-2 チャンネルの電気生理学的特性	
2.6 低温耐性に関わる GPCR 型温度受容体の RNAi スクリーニング	
2.7 低温耐性に関与する可能性のある GPCR 遺伝子の発現細胞解析	
2.8 CRISPR/Cas9 によるノックアウトシステムの作製 1	

- 2.9 CRISPR/Cas9によるノックアウト系統の作製 2
- 2.10 CRISPR/Cas9によるノックアウト系統の作製 3 (Dual sgRNA を使用)
- 2.11 GPCR 遺伝子のノックアウト変異体の低温耐性
- 2.12 GPCR 遺伝子の発現細胞の同定
- 2.13 GPCR 変異体を示す温度馴化異常の ADL 特異的な回復実験
- 2.14 GPCR 変異体における化学走性行動と耐性幼虫形成
- 2.15 GPCR 変異体における ADL のカルシウムイメージング解析
- 2.16 温度受容体候補 GPCR の異所的発現解析(カルシウムイメージング)
- 2.17 異所的発現解析において GPCR の下流で機能する分子の同定
- 2.18 Gq タイプの $G\alpha$ タンパク質は低温耐性に関与し、ADL の温度情報伝達
に関与する
- 2.19 Gi タイプの $G\alpha$ タンパク質と Gi 様 $G\alpha$ タンパク質は低温耐性に関与
し、ADL の温度情報伝達を負に制御する
- 2.20 Gs タイプの $G\alpha$ タンパク質とアデニル酸シクラーゼは低温耐性に関与
する
- 2.21 ADL で発現する Gi 様 $G\alpha$ タンパク質の解析

※所属研究室における研究途上にある内容を含むため、本稿では、上記の 2.12～2.21 に含まれる内容を要約し、2.11 の中に追記記載した。

3. 考察

p. 52

3.1 温度受容ニューロン ADL で機能する温度受容体 TRPV チャネル

- 3.2 TRPV チャンネル OSM-9 と OCR-2 の活性調節
- 3.3 網羅的な RNAi スクリーニングによる低温耐性に関わる GPCR の同定
- 3.4 温度受容ニューロン ADL の温度情報伝達に関わる GPCR の同定
- 3.5 ADL において GPCR の下流で機能する $G\alpha$ タンパク質の探索
- 3.6 ADL における温度情報伝達の分子モデル
- 3.7 温度受容体候補 GPCR の機能

※所属研究室における研究途上にある内容を含むため、本稿では、上記の 3.3～3.7 に含まれる内容を要約し、3.3 の中に要約記載した。

4. 結語	p. 61
5. 材料・方法	p. 64
6. 謝辞	p. 91
7. 引用文献	p. 92
8. 図・表	p. 120

要旨

温度は生物が常に感知する環境情報であるため、生物の温度への応答メカニズムの解明は重要な課題である。本研究では、動物の温度応答メカニズムの基本原理の理解を目指して、線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) の低温耐性を指標に解析を行った。20°Cや 25°Cで飼育された線虫個体は 2°Cにおくと死滅するが、15°Cで飼育された個体は 2°Cでも生存できる。低温耐性において、ADL ニューロンが温度を受容し、TRPV チャネルである OSM-9 と OCR-2 が温度情報伝達に関与することが示唆されていた。そこでまず、この線虫の TRPV が温度を受容する温度センサー分子であるかを調べた。OSM-9 と OCR-2 を同時に温度に反応しない味覚ニューロン (ASE) に発現させて温度刺激を与えた結果、ASE が温度上昇に応答するようになった。電気生理学解析から、OSM-9 と OCR-2 を同時に発現するアフリカツメガエルの卵母細胞は温度上昇に応答するようになった。これらの結果は、線虫の TRPV が温度受容能を持つことを示した初めてのケースとなった。一方で、この線虫 TRPV の温度応答性は非常に弱かったことから、TRPV の他にも未知の温度センサー分子が存在する可能性が考えられた。ADL の温度情報伝達に 3 量体 G タンパク質が関与していることが見つかったため、その上流で GPCR 型の温度受容体が存在するという仮説を立てた。そこで、低温耐性に関わる温度受容ニューロンである ADL と ASJ で機能する GPCR 型温度受容体の同定を試みた。RNAi を用いて線虫に存在する約 1000 個の GPCR 遺伝子をノックダウンし、低温耐性に異常を示した 86 個の GPCR 遺伝子を同定した。これらのうち、ADL か ASJ で発現する 16 個の遺伝子について、CRISPR/Cas9 によってノックアウトシステムを作製した結果、2 つの GPCR の変異体において低温耐性異常

が見られた。この GPCR 遺伝子を詳細に解析した結果、この GPCR は ADL の温度情報伝達を制御し、低温耐性に関与することがわかった。さらに、ASE 味覚ニューロンに GPCR を発現させて温度上昇刺激を与えた結果、温度に対する応答が確認された。つまり、この GPCR は温度を受容している可能性が考えられた。以上の結果から、温度受容に関与する TRPV と新規の GPCR が同定された。これはヒトを含む動物において、温度受容に関与する GPCR が個体の温度耐性に関わることを示した初めてのケースである。

略語一覽

APS	Ammonium peroxodisulfate
cDNA	Complementary DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CFP	Cyan fluorescent protein
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeat
cRNA	Complementary RNA
DiI	1, 1'-Dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMF	<i>N, N</i> -dimethylformamide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GCaMP	GFP-calmodulin fusion protein
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Green fluorescent protein
GMP	Guanosine monophosphate
GPCR	G protein coupled receptor
GTP	Guanosine triphosphate
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LB	Luria-Bertani
mRNA	Messenger RNA
NGM	Nematode growth medium
PCR	Polymerase chain reaction
PBST	Phosphate buffered saline with Tween 20
RNA	Ribonucleic acid
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylenediamine
TRP	Transient receptor potential
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
YC	Yellow cameleon
YFP	Yellow fluorescent protein

1. 序論

1.1 温度変化に対する動物の生体調節機構

動物は環境中の物理的・化学的刺激を、体細胞や特定の神経細胞で視覚・聴覚・触覚・嗅覚・味覚として感知する。環境情報の一つである温度は、地球上において刻々と変化し、生体内においては、化学反応の速度を変えたり、核酸やタンパク質などの様々な生体分子の構造を変化させて活性を変えたりと、細胞の生理機能に大きな影響を及ぼす。そのため生物には、環境温度および温度変化を感知して、それに対応する生体メカニズムが備わっている。

ヒトを含めた哺乳動物や鳥類のほとんどは、環境温度に依存せず深部温度を一定温度に保っており、恒温動物や温血動物と呼ばれている。一方で、脊椎動物である魚類、両生類、爬虫類、そして無脊椎動物の全般は、環境温度に依存して深部温度が変化するため、変温動物もしくは冷血動物と呼ばれている。生体の恒常性を保つための体温調節機構としては大きく 2 つに分けられ、行動性体温調節と自律性体温調節が存在する。恒温動物が持つ自律性体温調節は、体温調節中枢の視索前野や前視床下部にある温度感受性ニューロンが脳組織温度の上昇に反応し、深部体温の変化を感知して適正な状態を維持するという機構と、環境温度の変化を皮膚にある知覚神経末端の温度受容器が受けとって視索前野に情報伝達を行い、深部体温情報と統合される機構によって調節されると考えられている (Kanosue et al., 2010; Nakamura, 2011; Nakayama et al., 1961; 中村和弘, 2015)。行動性体温調節はほぼ全ての生物において見られ、暑い時に日陰に移動するなどの最適な温度環境への移動に加え、着衣やエアコンをつけ

るなどの行動が含まれる。一方で、自律性体温調節はほとんどの恒温動物で見られる。一般的に、恒温動物は、体温を一定に保つために、体内からの熱を放散し、体温低下時には体内で熱を産生する。熱の放散は、ヒトでは汗の分泌、マウスなどでは唾液を分泌して体に塗るなどの、水分が蒸発する時の気化熱を利用した蒸散性熱放散と、皮膚血管の収縮・拡張による血流の増減によって体熱の放散を調節するなどの非蒸散性熱放散が存在する。一方で、熱の産生について、熱は体内における化学反応や筋運動の副産物としても得られるが、骨格筋によるふるえ熱産生や褐色脂肪組織の代謝による非ふるえ熱産生によっても積極的に産生されている (Cannon and Nedergaard, 2004; Peirce and Vidal-Puig, 2013)。

褐色脂肪組織は新生児や冬眠動物で多く見られ、ヒトでは鎖骨や胸まわりに存在する。褐色脂肪組織は主に褐色脂肪細胞で構成され、多房性脂肪滴と多数のミトコンドリアを含む。褐色脂肪細胞による熱産生は主に交感神経系からのノルアドレナリンの放出によって制御される (Cypess and Kahn, 2010; Razzoli et al., 2016; 入江由希子, 1999)。例えば、ヒトが寒冷にさらされて交感神経が活動を高めると、ノルアドレナリンが放出されて褐色脂肪細胞の細胞膜に存在する β -アドレナリン受容体に受け取られる。アドレナリン受容体は G タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP の上昇、プロテインキナーゼ A (PKA) の活性化、そしてホルモン感受性リパーゼの活性化が引き起こされ、最終的に中性脂肪の加水分解が誘導される (Cao et al., 2001; Rehnmark et al., 1990)。脂肪が加水分解されるとグリセロールと脂肪酸が遊離し、遊離した脂肪酸は酸化されて熱産生に利用されるとともに、脱共役タンパク質 1 (uncoupling protein 1 ; UCP-1) を活性化させる。ミトコンドリア内膜

では電子伝達系によってプロトン濃度勾配が生じ、このプロトン濃度勾配によって ATP が合成される。この一連の反応は、酸化リン酸化とよばれる。しかし、UCP-1 がこのプロトン濃度勾配を解消することによって、脂肪酸などの酸化分解によって得られたエネルギーが、酸化リン酸化でなく熱産生に利用される (Nicholls and Locke, 1984)。哺乳類には UCP-1 以外に 4 つの UCP ホモログ (UCP-2、UCP-3、UCP-4、BMCP-1) が存在するが、それらの機能の詳細は明らかになっていない。UCP 遺伝子と相同な遺伝子が恒温動物である鳥類で見られるが、それ以外の変温動物に属している魚類や、多細胞生物以外にも菌類や原生動物にも存在することが報告されている (Jastroch et al., 2005; Ledesma et al., 2002; Talbot et al., 2004)。また植物にも UCP と相同な遺伝子である PUMP (plant-uncoupling mitochondrial protein) が存在する。植物での役割は不明な部分も多いが、ジャガイモやシロイヌナズナなどで、低温ストレスにさらされた時に機能することが明らかとなっている。また、トマトとマンゴーにおける果実の成熟中に起こる熱産生は、UCP が重要な役割を果たすことが報告されている (Considine et al., 2001)。さらに、変温動物に属す魚類では UCP-1 が関与しない非ふるえ熱産生の機構も見つかっている。サバ亜目に属するカジキ、メカジキ、そしてバタフライサバは、脳の下側の両側に骨格筋から進化した特殊な熱発生器官を持つ。この器官は周囲の水温より 20°C 高い温度まで脳と目を暖めることが知られている (Block et al., 1993; Carey, 1982; Morrissette et al., 2003)。

一方で、節足動物などの全ての無脊椎動物と、魚類、両生類、爬虫類が含まれる変温動物は、自らの熱産生によって体温を環境温度より高く維持する

ことはできない。そのため変温動物は、主に生体内における生理学的な変化によって環境の温度変化に対応する。例えば、変温動物を含む多くの生物が低温ストレスにさらされると、体内の生体膜を構成する脂質であるリン脂質中の不飽和脂肪酸の割合が増加する (Hayward et al., 2014; Lee et al., 2006)。不飽和脂肪酸の増加は生体膜の流動性を増加させ、これによって低温環境下でも生体膜が硬くなりにくくなり、細胞のダメージを防ぐことができる (Savory et al., 2011)。また低温ストレスに応答して、細胞内でグリセロール、トレハロースなどの糖や遊離アミノ酸などの代謝物が上昇することが知られる (Goto et al., 2001; Michaud and Denlinger, 2007; Yu et al., 2014)。低温時に起こる脊椎動物の褐色細胞での熱産生に関与する G タンパク質、アデニル酸シクラーゼとプロテインキナーゼ A (PKA) を介したホルモン感受性リパーゼの活性による脂肪の加水分解経路は無脊椎動物でも見つかっているが (Liu et al., 2017)、無脊椎動物には UCP-1 が存在しないため、無脊椎動物にとって脂肪の加水分解によって得られるグリセロールは低温に対する防御に重要であると考えられる。これらの代謝物によって、細胞が凍結しづらくなり、またタンパク質や細胞膜が保護されるため、低温ストレスに対応することができる。これらの低温耐性の分子メカニズムは、動物だけでなく植物にも同様に存在する。

1.2 生物における温度センサー分子

生体内で温度を感知するための温度センサー分子は 4 つのタイプがあり、DNA 型、RNA 型、タンパク質型、膜-タンパク質型に分類することができる (Sengupta and Garrity, 2013)。生体内で機能する分子の温度感知メカニズム

には核酸、タンパク質や脂質の温度変化に応じた構造の不安定性が関与する。

核酸 (DNA と RNA) は水素結合によって相補的な塩基対を形成しているが、水素結合は熱に対して不安定である。この性質を利用して、多くの細菌において DNA と RNA は温度センサーとして機能し、転写および翻訳の段階において遺伝子発現に関与し、短期的な温度応答や長期的な温度適応応答を引き起こす。DNA の温度変化による構造変化は転写レベルでの遺伝子発現調節に関与し、例えば赤痢菌の宿主への侵入に必要な *virF* 病原性遺伝子の転写の温度依存性が挙げられる。具体的には、低温では *virF* プロモーター領域の DNA が曲がると、転写阻害因子が働いて *virF* 病原性遺伝子の転写を抑制する。32°C を超える温度では DNA の曲がりが消え、転写活性化因子が結合する (Di Martino et al., 2016)。RNA の温度変化による構造変化は翻訳レベルでの遺伝子発現調節に関与し、細菌における病原性応答や熱ショック応答などの調節に関与する (Loh et al., 2018; Somero, 2018)。基本的に mRNA は、低温では 5' UTR にヘアピン構造を形成し、これが翻訳を妨げる。高温では、このヘアピン構造が開くことでリボソームの結合、そして翻訳が可能となる。

タンパク質型の温度センサーは真正細菌でよく研究されており、様々な生体反応に関与することが知られる。いくつかの転写調節タンパク質は温度によって構造変化が起こり、DNA 結合特性が変化して、遺伝子の転写を調節する。例えばサルモネラ菌において TlpA 自己調節抑制タンパク質は、低温でコイルドコイルホモ二量体を形成することで DNA に結合し、TlpA 自身の転写を抑制する。37°C ではこの二量体が解離し、転写抑制活性がなくなる (Hurme et al., 1996; Hurme et al., 1997)。最も研究されているタンパク質型温度センサーの一つと

して、大腸菌の温度センサーがある。原核単細胞生物である大腸菌は、より温度の高いところに移動するという温度走性(走熱性)を示す(Maeda et al., 1976)。大腸菌は温度勾配のある液体内において、周囲の温度変化を感知しながら、直進(スムーズ・スイミング)と方向転換(タンブリング)によって移動する。大腸菌のべん毛は左巻きらせんであり、基部のモーターによって左回転すると数本のべん毛が束ねられることにより推進力が生まれ、菌は直進する。逆に、右回転すると束がほどけることで推進力が失われ、菌は方向転換する(Brown and Berg, 1974; Macnab and Koshland, 1972)。大腸菌には、温度を含めた化学物質・pH変化などの様々な刺激に対する走性行動が知られており、共通のシグナル伝達経路によって制御される。まず二回膜貫通型受容体によって刺激が受け取られると、受容体は構造変化を起こし、足場タンパク質 CheW を介してヒスチジンキナーゼ CheA が活性化される、もしくは活性阻害される。CheA が活性化されると応答調節タンパク質 CheY がリン酸化され、べん毛が右回転になることで大腸菌はタンブリングを行う。一方で、ホスファターゼ CheZ によって CheY が脱リン酸化され、べん毛が左回転になることで、大腸菌はスムーズ・スイミングを行う(Falke and Hazelbauer, 2001; Hazelbauer et al., 2008)。一方で、刺激が一定期間続くと刺激に対して応答しなくなる適応機構が存在するが、これはメチルトランスフェラーゼ CheR およびメチルエステラーゼ CheB が受容体のメチル化状態を制御し、受容体の活性が調節されることで引き起こされる(Goy et al., 1977; Springer et al., 1979)。大腸菌で機能する受容体は、二回膜貫通型タンパク質のホモダイマーであり、大腸菌表面のペリプラズム側にある刺激を受け取るためのリガンド結合ドメイン、膜貫通領域、細胞質側にあるシグナル産生

ドメインとメチル化部位から構成される。大腸菌の二回膜貫通型受容体は、セリン・グリシン受容体 (Tsr)、アスパラギン酸受容体 (Tar)、リボース/ガラクトース受容体 (Trg)、ジペプチド受容体 (Tap)、酸化還元電位受容体 (Aer) が知られており、これらが協調的に働くことによって大腸菌は様々な刺激に対する走性を示す。これらのうち、主に Tsr と Tar が温度センサーとして温度応答に関与し、温度走性を制御する。受容体が温度センサーとして機能する場合でも、温度以外の刺激を受容した時と同様の走性行動に関わるシグナル伝達が行われるため、シグナル産生ドメインから同じシグナルが伝達されている。一方で、Tsr において、セリンのリガンド結合ドメインに対する親和性は、少なくとも約 20°C から 30°C の生理的な温度においては変化しないことから、温度とそれ以外の化学物質などの受容に関わる分子メカニズムは異なると考えられる (Iwama et al., 1997; 西山 宗一郎, 1999)。温度センサーである Tsr と Tar は化学受容体としても機能し、セリン・グリシンもしくはアスパラギン酸を長時間受容し続けると、Tsr と Tar がメチル化され、走性行動に関わるシグナルが低下する。興味深いことに受容体がメチル化されると、Tsr と Tar の温度に対する応答性が変化することが知られている (Imae et al., 1984; Mizuno and Imae, 1984; Paster and Ryu, 2008; Salman and Libchaber, 2007; Yoney and Salman, 2015)。つまり、Tar は低メチル化状態では温度上昇に対して応答するための高温センサーとして機能するが、高メチル化状態になると温度低下に対して応答するための低温センサーとして機能するようになる (Mizuno and Imae, 1984; Nara et al., 1996; Nishiyama et al., 1999a; Nishiyama et al., 1999b)。また Tsr は低メチル化状態では温度上昇に対して応答するための高温センサーとして機能する

が、高メチル化状態になると温度に対して応答しなくなる可能性と、もしくは温度低下に対して応答するための低温センサーとして機能するようになる可能性が報告されている (Mizuno and Imae, 1984; Oleksiuk et al., 2011)。しかし、メチル化状態による Tar と Tsr の温度応答の分子メカニズムには未知の部分が残されている。

温度によって細胞膜などの分子構造が変化し、それが二次的にタンパク質の活性を変化させることもある。枯草菌 *B. subtilis* において複数回膜貫通型ヒスチジinkinナーゼ DesK は低温センサーとして機能し、膜の流動性を維持する。低温によって細菌膜が流動性を失うと、細菌膜の厚さが増加する。DesK はこれを感じて下流の DesR をリン酸化し、DesR が脂肪酸デサチュラーゼ Des の転写を誘導する。脂肪酸デサチュラーゼ Des は飽和脂質に二重結合を導入し、細菌膜に不飽和脂肪酸が導入されることで細菌膜の流動性を増加させ、細菌の低温での生存率を高める (Aguilar et al., 2001; Albanesi et al., 2004; Altabe et al., 2003; Cybulski et al., 2002; Cybulski et al., 2004; Cybulski et al., 2010; Weber et al., 2001)。膜の流動性が高い状態では DesK の脱リン酸化機能が活性化するので、DesR は脱リン酸化され Des の転写が停止する (Cybulski and de Mendoza, 2011)。ヒスチジinkinナーゼ DesK は 5 つの膜貫通領域と細胞質触媒ドメインからなり、脂質膜に埋め込まれた膜タンパク質である。5 つの膜貫通領域のうち、N 末端の膜貫通ドメインに存在する親水性アミノ酸 (9 番目のグルタミン酸、10 番目のリジン、および 12 番目のアスパラギン) からなる SB モチーフ (The sunken buoy : 沈んだブイ) が温度による膜の厚さの変化を感知するのに必要であることが示唆された (Cybulski et al., 2010)。

SB モチーフは膜界面に近い部分に存在しているが、高温時には膜が薄いので脂質膜表面に浮いて水和され、低温時には膜が厚くなることによって疎水性である脂質膜に埋め込まれると考えられる (Nagle and Tristram-Nagle, 2000)。これによってヒスチジンキナーゼ DesK が構造変化を起こし、自己リン酸化を行うことで活性化する (Albanesi et al., 2009; Cybulski et al., 2010)。

植物における環境温度への応答メカニズムもいくつか報告されている。植物細胞において光合成を行うオルガネラである葉緑体は、環境に応じて細胞内での位置を変える。植物細胞が強い光にさらされると光ダメージを避けるために細胞側面に移動するが、植物細胞が弱い光にさらされると光合成を行うために細胞表面に移動する (Kasahara et al., 2002; Wada, 2013)。一方で、植物細胞が低温下におかれると葉緑体が細胞側面に移動する。葉緑体の細胞内局在には光受容体であるフォトトロピンが関与するが、同時にフォトトロピンが寒冷逃避反応における温度センサーとしても機能することが明らかとなった (Fujii et al., 2017; Kodama et al., 2008; 児玉, 2018) (図 1A)。青色光受容体であるフォトトロピンは N 末端領域に光受容ドメイン LOV1 と LOV2 を持ち、発光団であるフラビンモノヌクレオチド (FMN) がそれぞれのドメインに 1 つ結合している。C 末端領域にはセリン-スレオニンキナーゼドメインを持つ。暗所において FMN は LOV ドメインに非共有結合しているが、青色光を受け取ると LOV ドメインに共有結合し、LOV が活性化される。するとキナーゼドメインが活性化され、フォトトロピンが自己リン酸化することによって下流に情報が伝えられる。活性型 LOV ドメインは徐々に FMN の共有結合を切断し、不活性型 LOV ドメインに戻る。不活性化への変換には熱依存性があることから、熱反転と呼ばれ、

高温であれば活性型 LOV の寿命は短くなり、低温であれば活性型 LOV の寿命は伸びる。寒冷逃避反応においては活性型 LOV2 ドメインが重要な役割を果たす。低温下において活性型 LOV2 の寿命が伸びることでフォトトロピンの自己リン酸化の量が増加し、これによって寒冷逃避反応が誘導される (Fujii et al., 2017; 兎玉, 2018)。

モデル生物であるシロイヌナズナは気温が高くなると、伸長成長 (熱形態形成) が増加し、開花が促進されることが知られている。この現象には赤色光受容体であるフィトクロムが温度センサーとして機能し、高温時の伸長成長を促すことが報告されている (Jung et al., 2016; Legris et al., 2016) (図 1A)。フィトクロムは、発色団であるフィトクロモビリン (PFB) が共有結合した二量体色素タンパク質であり、N 末端に光を受容するための光感覚モジュール (PSM)、C 末端にシグナル伝達を行う出力モジュール (OPM) を持ち、二量体を形成して存在する (Nagatani, 2010; Rockwell et al., 2006)。フィトクロムは不活性化状態である赤色光吸収 Pr 型で存在するが、赤色光を受け取ると活性化状態である遠赤色吸収 Pfr 型に変換される (Burgie and Vierstra, 2014; Quail et al., 1995)。活性化したフィトクロムは核に移行して核内構造であるフォトボディ (PB) に局在し、光応答に関与する遺伝子の転写調節に関与する (Chen and Chory, 2011)。シロイヌナズナのフィトクロムは、フィトクロム A から E の 5 種類が存在するが、そのうちフィトクロム B では暗い状態で活性型 Pfr が不活性化型 Pr になる暗反転が見られる (Klose et al., 2020; Klose et al., 2015; Sweere et al., 2001)。暗条件において、温度が上昇するとフィトクロム B の暗反転が起こり、核に移行した Pfr が減少する。すると伸長の成長と開花に関与する bHLH

転写因子 PIF4 が活性化され、植物ホルモンであるオーキシンが増加することによって伸長の成長が起こる (Franklin et al., 2011)。また、明条件においても、赤色光だけをあてると温度が上昇した時にフィトクロム B の暗反転がおこり、HEMER タンパク質が活性化されることで伸長することも報告された (Qiu et al., 2019)。このように、植物においては、ほぼすべての光受容体に見られる「活性型光受容ドメインの熱依存性」を利用した温度受容機構が報告されている。

神経系を持つ動物では、温度センサーとして機能する膜貫通タンパク質であるイオンチャネルとして電位依存性プロトンチャネル Hv1 (Decoursey, 2003; Fujiwara et al., 2012)、クロライドチャネル CLC-0 (Pusch et al., 1997)、ANO1 (Cho et al., 2012)、connexin38 (Ebihara, 1996)、Two-pore domain カリウムチャネル TRAAK (KCNK4) や TREK1/2 (KCNK2/KCNK10) (Schneider et al., 2014)、そして TRP チャネルが知られている。非選択的陽イオンチャネルである TRP (Transient receptor potential) は、線虫からヒトまで多くの動物で進化的に保存され、視覚、味覚、嗅覚、聴覚、触覚、熱や浸透圧など様々な感覚に関与する (Castillo et al., 2018; Venkatachalam and Montell, 2007)。TRP チャネルは TRPC、TRPV、TRPM、TRPA、TRPP、TRPML、そして TRPN (哺乳類に存在しない) の 7 つのサブファミリーから構成され、これらの中で温度感受性 TRP チャネルがいくつか報告されている (Castillo et al., 2018; Venkatachalam and Montell, 2007) (図 1B)。温度感受性 TRP チャネルは、線虫からヒトまでの動物において様々な神経細胞もしくは非神経細胞で発現し、細胞内カルシウムを増加させることにより多くの熱感覚応答に関与する (Castillo et al., 2018; Venkatachalam and Montell, 2007)。温度感受性 TRP チャネルはそれぞれ活性

化する温度閾値が決まっており、哺乳類では低温受容体として TRPA1、TRPM8 と TRPC が、高温受容体として TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM2、TRPM3、TRPM4 と TRPM5 が見つかっている (Baez et al., 2014; Castillo et al., 2018; Caterina et al., 1999; Caterina et al., 1997; Dhaka et al., 2006; McKemy et al., 2002; Patapoutian et al., 2003; Peier et al., 2002; Smith et al., 2002; Story et al., 2003; Togashi et al., 2006; Watanabe et al., 2002; Xu et al., 2002; Zimmermann et al., 2011)。例えば TRPV1 は 40°C 以上、TRPV2 は 50°C 以上、TRPV3 は 37°C 以上、TRPV4 はおよそ 30°C から 40°C 以上においてそれぞれ活性化する。一方で、同じ種類の TRP チャネルでも種によって特性が異なることがある。例えば、TRPA1 は齧歯類においては低温受容体として機能するが、両生類、爬虫類や鳥類では熱受容体として機能する (Chen et al., 2013; Gracheva et al., 2010; Prober et al., 2008; Saito et al., 2014; Saito et al., 2012)。ヒト TRPA1 は温熱と冷熱の両方に反応すると考えられている (Moparthy et al., 2016)。また、TRPV3 はヒトや齧歯類では 37°C で活性化される温熱受容体であるが、両生類では 16°C で活性化される低温受容体である (Saito et al., 2011)。哺乳類において TRPA1、TRPM8、TRPV1、TRPV2、TRPV3 と TRPV4 は感覚ニューロンで発現し、TRPV3 と TRPV4 は表皮を構成するケラチノサイトでも発現が見られ、温度感知に関与する (Dhaka et al., 2006; Lee and Caterina, 2005; Mandadi et al., 2009; Patapoutian et al., 2003)。TRPV1 や TRPM8 はそれぞれ、精製したのちに脂質二重層に組み込んでも温度センサーとして機能するため、それ単体で温度センサーとして機能すると考えられる。TRP チャネルは細胞質内に N 末端と C 末端、6 つの膜貫通部位とその膜貫通部位

の 5 番目と 6 番目の間に細孔を持ち、これらの構造が TRP チャネルの温度感知機能に関与していると考えられる (Brauchi et al., 2006; Grandl et al., 2010; Yang et al., 2010; Yao et al., 2011)。TRP チャネルの N 末端には、他のタンパク質にも見られるタンパク質同士の相互作用に関与するアンキリンリピートドメインが存在し、このアンキリンリピートドメイン内のアミノ酸の違いが TRP チャネルの温度感受性を変えることが知られる。例えば、低温感受性の TRPA1 が持つアンキリンリピートドメインの 3 つのアミノ酸が変わる変異は、TRPA1 を温熱感受性に変化させる (Jabba et al., 2014)。また、温熱感受性 TRPV1 と低温感受性 TRPM8 の間でそれぞれの C 末端を交換するとそれらの熱感受性が交換され (Brauchi et al., 2006)、また TRPV1 の C 末端に存在する数十アミノ酸が TRPM8 の低温感受性を温熱感受性に変えることができる (Brauchi et al., 2007)。温度感受性 TRP チャネルの活性化温度閾値を推定するための方法として、化学反応における反応速度と温度の関係を示したアレニウスの式をもとにしたアレニウスプロットが用いられる。イオンチャネルにおいてはイオン透過速度と温度がアレニウスの式に従うと考えられ、温度感受性 TRP チャネルの温度刺激時のイオン電流を測定し、Y 軸に電流値の対数、X 軸に温度の逆数をプロットしたグラフを作成することによって活性化温度閾値を予想することができる。一般的にチャネルや酵素などのタンパク質は温度上昇に伴い活性が高くなるが、温度感受性 TRP チャネルは特定の温度域において急激に活性が上がる特徴を示す。

温度感受性 TRP チャネルにおける温度受容は、理論的には温度依存的なタンパク質の変性プロセスと同じような機構によって行われると考えられて

いる(Clapham and Miller, 2011; Islas, 2017; Raddatz et al., 2014; Yao et al., 2010)。熱力学的に安定な構造を保っているタンパク質において、タンパク質のコアに埋め込まれた疎水性残基は非極性残基と相互作用し、逆に極性残基はタンパク質の周辺にあることが多いが、コアにある場合には弱いイオン性相互作用である塩橋を形成するなどにより他の極性残基と相互作用している(Dorairaj and Allen, 2007)。これらの相互作用は温度などによって変化し、温度変化によってコアに埋め込まれた疎水性残基が外に露出し、相互作用が乱されるとタンパク質が変性を起こす(Privalov et al., 1989)。温度感受性 TRP チャンネルにおいても、チャンネルの細孔と他のドメインの相互作用が温度によって変化し、チャンネルの構造が変化することで温度受容が行われているという仮説がたてられている(Clapham and Miller, 2011; Islas, 2017; Raddatz et al., 2014; Yao et al., 2010)。

それ以外の温度センサー候補として、G タンパク質共役型受容体であるロドプシンがある。ロドプシンがショウジョウバエの幼虫の温度勾配上で嗜好温度に移動する行動に関与することが明らかとなっているが、ロドプシンが温度受容体として機能しているかは不明である(Shen et al., 2011) (図 1C)。

1.3 G タンパク質共役型受容体 (GPCR)

G タンパク質共役型受容体 GPCR は、細胞表面に存在する受容体のうちゲノム中において最大の遺伝子ファミリーであり、ヒトでは 800 種類以上が知られている(Duc et al., 2015)。GPCR は共通して 7 回膜貫通領域を持ち、N 末端は細胞外に、C 末端は細胞内に存在する。GPCR は細胞同士の情報伝達に必須

であるホルモンや神経伝達物質に加えて、光、匂い、味などのほとんどの環境刺激を受容する。例えば視覚に関わる光受容体であるロドプシンは2000年にGPCRで初めて立体構造が明らかとなり、それ以降もGPCRの解析モデルとして様々な研究が行われている(Palczewski et al., 2000; Smith, 2010)。また2007年には、レフコウィッツ博士とコビルカ博士らにより $\beta 2$ アドレナリン受容体の立体構造と機能が明らかとなった(Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007)。GPCRは創薬分野において主要な薬剤の標的分子として知られ、現在使われている薬剤の約20-50%がGPCRをターゲットしていると言われている(Hauser et al., 2017; Rask-Andersen et al., 2011; Santos et al., 2017)。

GPCRが刺激によって活性化されると構造変化が起こり、下流に存在する三量体グアニンヌクレオチド結合タンパク質(Gタンパク質)を活性化させる。三量体Gタンパク質は3つのサブユニット $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ から構成される。活性化したGPCRによって $G\alpha$ サブユニットに結合しているグアノシン二リン酸(GDP)がグアノシン三リン酸(GTP)に置き換えられると、活性化された $G\alpha$ サブユニットと $G\beta\gamma$ サブユニットが分離する(Bornancin et al., 1989; Oldham and Hamm, 2006, 2008)。これらの分離したサブユニットが様々な分子に作用し、下流分子群を活性化させることによって情報伝達が行われる(Baltoumas et al., 2013)。ヒトでは21個の $G\alpha$ 、6個の $G\beta$ 、12個の $G\gamma$ サブユニットが同定され、それぞれの三量体Gタンパク質は $G\alpha$ サブユニットの配列類似性から、 G_s 、 G_i/o 、 $G_q/11$ 、 $G_{12/13}$ の4つに分類される(Baltoumas et al., 2013; Neves et al., 2002)。これら複数のサブユニット同士が様々な組み合わせで三量体を形成することで、GPCRとその下流の経路に特異性を持たせることができる(Oldham and

Hamm, 2008)。活性化された G タンパク質は、GTP が GDP に加水分解されることによって、G α サブユニットと G $\beta\gamma$ サブユニットが再び結合し、不活性状態に戻る (Oldham and Hamm, 2008)。

1.4 線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

C. elegans は外部環境に対する応答性の仕組みを、分子（遺伝子）・細胞・神経回路・個体の 4 つの階層レベルで解析可能であり、かつそれら 4 つの階層を統合したハイスループットな解析を行うことができるモデル動物である。*C. elegans* は、成虫の体長が約 1 mm の土壌中に生息する線形動物である。4 つの幼虫期 (L1、L2、L3、L4) と成虫期があり、世代時間が 20°C で約 3 日と短い。大部分の野生株個体は雌雄同体であり、自家受精を行うため、ホモ接合体の状態での系統維持が容易である。その一方で、約 0.1% の頻度で現れる雄を雌雄同体と交配させることが可能であるため、遺伝学解析にも適している (Brenner, 1974)。

1998 年に全ゲノム DNA の塩基配列が決定されており、そのゲノムサイズは約 100 Mb とモデル動物の中でも特に小さいが、全ゲノム配列に対する遺伝子検索プログラムによる解析から、少なくとも 19000 個の遺伝子が存在し、それらの遺伝子産物の約 42% は他の生物の遺伝子産物にも相同性を持つ (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)。ゲノム情報を利用して、特定遺伝子の発現細胞を同定するためのレポーター遺伝子解析が網羅的に行われ、遺伝子の発現細胞データベースが公開されている。また、ゲノム DNA 配列と発現細胞情報などを参考にして、特定の遺伝子の機能を RNA 干渉で低下させることや (Fraser e

t al., 2000)、CRISPR/Cas9 法などを用いた遺伝子破壊などの逆遺伝学的解析も一般的に行われている (Friedland et al., 2013)。

C. elegans の体は透明であるため、蛍光タンパク質の遺伝子などを線虫に導入することで、特定の遺伝子の発現細胞の同定や特定のタンパク質の細胞内局在を生きたまま (*in vivo*) 観察することができる (Zhang et al., 2004)。また、オプトジェネティクスの発展により、例えば、細胞内カルシウム濃度によって蛍光波長や蛍光強度が変化するインディケーター分子を用いることで、*in vivo* で神経活動などを解析することができる (Miyawaki et al., 2013; Nakai et al., 2001)。また、体が透明であることを生かし、受精後の 1 細胞から成虫に至るまでの全細胞の分裂パターンである細胞系譜が明らかとなっている。成虫における体細胞数は、雌雄同体で 959 個、雄では 1031 個であり、そのうち神経細胞は雌雄同体では 302 個、雄では 385 個である。雌雄同体と雄をそれぞれ頭部から尾部まで連続切片化し、それらを電子顕微鏡で撮影し、コンピューター内で再構築する解析から、雌雄同体では 4887 個の化学シナプスと 1447 個のギャップ結合、雄では 5315 個の化学シナプスと 1755 個のギャップ結合からそれぞれ構成される全神経細胞間の接続が明らかとなっている (Cook et al., 2019; White et al., 1986)。

1.5 線虫における温度応答

C. elegans の神経系は他の動物と比べて比較的シンプルであるが、その一方で、匂いや味、温度などの多様な刺激を受容し、複雑な応答を示す。*C. elegans* の温度に対する応答として、温度走性、高温忌避や耐性幼虫形成などが

知られている。*C. elegans*の温度走性とは、餌のある状態で、一定の温度条件で飼育された*C. elegans*が、温度勾配上において過去に飼育されていた温度に移動する行動である(Hedgecock and Russell, 1975)。温度走性において、温度は AFD 感覚ニューロンなどによって受け取られ、受容体グアニル酸シクラーゼ (rGCs)、ホスホジエステラーゼ (PDE) と cGMP 依存性チャネル (CNGs) によって AFD 感覚ニューロン内の温度情報伝達が行われる(Aoki and Mori, 2015; Mori and Ohshima, 1995)。そのなかでも、受容体グアニル酸シクラーゼ (GCY-8、GCY-18 と GCY-23) は環境の温度を受容する温度センサー分子として機能することが明らかとなっている(Takeishi et al., 2016)。AWC 感覚ニューロンも温度走性における温度受容ニューロンとして知られており、AWC において温度情報は三量体 G タンパク質、グアニル酸シクラーゼと cGMP 依存性チャネルによって伝達されるが、温度受容体は見つかっていない(Kuhara et al., 2008)。

*C. elegans*にとって害のある侵害温度に対する高温忌避は、頭部については AFD と FLP 感覚ニューロンが、尾部については PHC 感覚ニューロンがそれぞれ制御している(Liu et al., 2012; Wittenburg and Baumeister, 1999)。高温忌避において AFD 内では CNGs である TAX-4 と TAX-2 が温度情報伝達に関与するが、温度走性において温度センサーとして働く rGCs は関与していない(Liu et al., 2012)。温度走性に関わる rGCs とは別の rGCs である GCY-12 が、CNGs の上流で機能していることが知られている(Liu et al., 2012)。

高温に対する侵害刺激応答以外にも、低温に対する侵害刺激応答に関わる温度受容体も知られている。AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体である GLR-3 は、ASE 味覚ニューロンにおいて、侵害低温刺激に対する受容体として機

能し、GLR-3 の下流の温度情報伝達には GLR-3 自体が持っているカチオンチャンネル機能は関与しないことが知られている。一方で、GLR-3 が下流の G タンパク質経路に温度情報を伝達していることが示唆されている (Gong et al., 2019)。

C. elegans の L1 幼虫期は、高温ストレス、個体密度の増加や餌の条件のそれぞれの統合により Dauer 耐性幼虫期に移行する (Golden and Riddle, 1984a, b)。Dauer 個体は体が収縮し、特殊なキューティクルを持つ (Cassada and Russell, 1975)。また、口は塞がれ、咽頭の活動も抑えられるなど様々な組織が Dauer 特有の形態を持つことによって、外部環境を遮断することで劣悪な環境を耐えることができる (Cassada and Russell, 1975; Riddle et al., 1981; Vowels and Thomas, 1992)。Dauer 形成は ADF、ASG、ASI と ASJ などの感覚ニューロンによって制御されることがわかっており、耐性幼虫形成に関わるアスカロシドなどのフェロモンとその受容体、および受容体の下流で機能する分子群が見つかっている (Bargmann and Horvitz, 1991; Fielenbach and Antebi, 2008)。*C. elegans* の L1 幼虫を 27°C 以上の高温条件に置くと Dauer 耐性幼虫となる。この高温依存的な耐性幼虫形成には、ASI 感覚ニューロンが主要な役割を担っている (Ailion and Thomas, 2000, 2003)。

1.6 低温耐性・馴化の分子組織ネットワーク

C. elegans には高温に対する耐性機構だけでなく、低温に対する耐性や馴化の機構が備わっていることが明らかとなってきた。 *C. elegans* の低温耐性とは、例えば野生株である 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 に移すと生存する現象である (Ohta et al.,

2014) (図 2)。さらに *C. elegans* は温度馴化機構を持ち、飼育温度をシフトさせた後の低温耐性の変化を観察することができる (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2016)。例えば、15°C で飼育した野生株 N2 を数時間 25°C で静置した後に、2°C に対する低温耐性テストを行うと大部分が死滅するが、25°C で飼育した野生株 N2 を数時間 15°C に静置した後に、2°C に対する低温耐性テストを行うと大部分が生存できるようになる (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2016) (図 2)。

C. elegans の低温耐性において、神経系や腸など複数の組織からなるネットワークによって組織間での情報伝達が行われ、最終的なアウトプットとして体内の脂肪酸構成比率を変化させる。特に低温下において生体膜の流動性を高める不飽和脂肪酸比率などが変化し、細胞膜の特性や代謝が変化することによって、環境中の温度変化に耐えることができると考えられている (Murray et al., 2007; Ohta et al., 2014; Savory et al., 2011; Xiao et al., 2013)。一方で、不飽和脂肪酸合成を促進する酵素が欠損している変異体において、不飽和脂肪酸比率が低下しているにもかかわらず、むしろ低温耐性の上昇が見られることもあり (太田ら、未発表)、生体膜の流動性だけでは説明できない生理的な機構も低温耐性・馴化のアウトプットに関与していると考えている。

低温耐性・馴化において、頭部の ASJ、ADL や ASG と呼ばれる 3 つの感覚ニューロンが温度を受容することがわかっている (図 3) (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2019; Takagaki et al., 2020; Ujisawa et al., 2018)。ASJ において温度は、G α タンパク質、グアニル酸シクラーゼ (GCs)、PDE と CNGs によって伝達され、これらの変異体は 20°C 飼育後に 2°C に置かれた際の低温耐性に

異常を示した(Ohta et al., 2014; Ujisawa et al., 2016)。ASJ 温度受容ニューロンが温度を受容すると、ASJ の軸索末端のシナプス小胞からホルモンであるインスリンが分泌され、分泌されたインスリンは腸と神経系で発現しているインスリン受容体 DAF-2 で受け取られる。DAF-2 の下流では、PI3 キナーゼなどのインスリン情報伝達系を介して、最終的に FOXO 型転写因子である DAF-16 の細胞核への輸送を抑制することで、DAF-16 依存的な遺伝子発現を抑制し、低温耐性を負に制御する(Ohta et al., 2014)。低温耐性において、腸はステロイドホルモンを介して精子に影響を与え、精子から ASJ へフィードバック制御が行われることが示唆された(Sonoda et al., 2016)。

ADL 温度受容ニューロンにおいて、3 つの TRPV チャネルである OSM-9、OCR-1 と OCR-2 が温度受容機構に関与し(Ujisawa et al., 2018)、OCR-1 は他の 2 つの TRPV の負の制御因子として機能することが遺伝学的に示唆されている(Okahata et al., 2019) (図 3)。また OSM-9 の変異体は、25°C 飼育後の低温耐性が増強する異常を示す(Ujisawa et al., 2018)。しかし、ADL においてこれらの TRPV が温度を直接受容しているかは明らかとなっていない。ADL 内において、TRPV だけでなく、KCNQ 型カリウムチャネルである KQT-2 と KQT-3 も温度情報伝達に関与している(Okahata et al., 2019)。KQT-3 の変異体では、ADL 温度受容ニューロンの温度応答性が上昇している。一般的にカリウムチャネルは神経機能を低下させる働きを持っているため、その変異体では神経活動が上昇する。ところが、KQT-2 の変異体では、ADL 温度受容ニューロンの温度応答性が低下している。これは、KQT-2 が KQT-3 を負に制御しているためである。このように、ADL 内において、KCNQ 型カリウムチャネルである KQT-2/KQT-3 と TRPV チャネルであ

る OSM-9/OCR-2/OCR-1 は相反した働きを担っている。*kqt-2* 変異体は、野生株と比較して短時間で低温に馴化する。この低温馴化が促進する異常は、*kqt-2* 変異体を飼育する寒天培地プレート大きさによって変化する。この現象には、寒天プレート内の酸素濃度が関係していることが示唆されている。線虫の体内を循環する体液中の酸素濃度を検出する頭部体腔の酸素受容ニューロンである URX が、RMG 介在ニューロンを介して ADL 温度受容ニューロンと局所神経回路を形成している。URX で受容された酸素情報は、RMG を経て ADL の KQT-2 を介した温度情報伝達に影響を与え、その結果として低温馴化が変化すると考えられている (Okahata et al., 2019)。

ASJ と ADL、腸と精子を介した情報伝達は、主に低温耐性を負に制御する機構である。それに対して、低温耐性を正に制御する機構も見つかった。ASG 感覚ニューロンは、低温耐性を正に制御する温度受容ニューロンである (Takagaki et al., 2020)。ヒトのキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) に高い相同性を示す線虫の XDH-1 は、線虫頭部の AIN と AVJ という 2 対の介在ニューロンで低温耐性を正に制御している (Takagaki et al., 2020)。AIN と AVJ は介在ニューロンであるため、それらの上流に存在する感覚ニューロンを探索したところ、ASG 感覚ニューロンが、AIN と AVJ の上流の温度受容ニューロンであることが示された。ASG において、Degenerin/epithelial sodium channel (DEG/ENaC) タイプのメカノ受容体 DEG-1 が温度情報伝達に関与し、DEG-1 やそのヒトホモログである MDEG のアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理解析から、DEG-1 と MDEG が温度受容体であることが示唆された。また、カルシウムイメージング解析から、ASG の DEG-1 が環境の温度情報を受容し、ASG が AIN を正に、

AVJ を負に制御することで低温耐性が正に制御されることが示唆された (Takagaki et al., 2020)。

以上のように、*C. elegans* の低温耐性・低温馴化は分子・細胞レベルでの温度受容メカニズムの解析モデルとして有用である (Ohnishi et al., 2019; Takeishi et al., 2020)。実際に、温度受容体として ASG で機能する DEG-1 メカノ受容体が見つかったが、その一方で ASJ と ADL 温度受容ニューロンにおいて、温度感覚によって神経活動を変化させうる温度受容体分子は見つかっていない。

1.7 線虫で機能する TRP チャンネル

線虫 *C. elegans* には多数の TRP チャンネルをコードする遺伝子があり、それらの TRP チャンネルは神経系や腸などで発現している。*C. elegans* における温度感受性 TRP チャンネルとして、腸において機能する低温感受性の TRPA-1 が知られ、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)。*C. elegans* が持つ OSM-9 は、ヒトにおいて複数の温度センサーが存在する TRPV ファミリーの、特に温度・機械刺激受容に関与する TRPV4 と相同性が高い TRP チャンネルである (Alessandri-Haber et al., 2004; Caterina et al., 1997; Colbert et al., 1997; Guler et al., 2002; Liedtke et al., 2003; Todaka et al., 2004; Tominaga et al., 1998)。*ocr-1*、*ocr-2*、*ocr-3*、そして *ocr-4* (OSM-9/capsaicin receptor-related) 遺伝子は *osm-9* 遺伝子と相同性があり、組織内において同時に発現していることが多い。例えば、OSM-9 と OCR-2 は ASH 侵害受容ニューロンと AWA 化学受容ニューロンで協調的に機能し、浸透

圧受容、化学受容や侵害刺激受容に関与することが知られる (Tobin et al., 2002)。OSM-9 と OCR-2 は、ASH と ADL 化学受容ニューロンにおいて飢餓感知や密度増加感知に関与する (de Bono et al., 2002)。しかし、OSM-9 と OCR-2 は、これまでのアフリカツメガエルの卵母細胞や、ヒトの培養細胞 HEK293 などでは強制的に発現させ、それらの細胞膜の内外に発生する電流や膜電位を測定する電気生理学的解析においては、熱、電圧、IP3、カプサイシン、タプシガルギン、高浸透圧などの刺激に対する応答性は見られていない (Colbert et al., 1997; Jose et al., 2007; Tobin et al., 2002)。

1.8 本研究における目的

低温耐性に関与する ADL 温度受容ニューロンでは温度受容体が見つからない。ADL では TRPV チャンネルである OSM-9 などが発現しているが、これまでに温熱刺激に関与する TRP は線虫では見つからないため、TRPV チャンネル OSM-9 などが温度受容体か検討した。本研究において ADL で発現している TRPV チャンネルの温度応答性は非常に弱かったため、ADL 温度受容ニューロンにおいて、TRP の上流で機能する可能性のある GPCR 型の温度受容体の探索も進めた。また、ASJ 温度受容ニューロンにおいて温度情報伝達に関わる三量体 G タンパク質の上流に存在する可能性のある GPCR 型の温度受容体の探索も行った。これまでに、ヒトを含めた動物において、GPCR 型の温度受容体は見つかっていない。ショウジョウバエにおいて GPCR が温度走性行動に関与することは報告されているが、GPCR が直接温度を受容する文献は公表されていないことから、GPCR 型の温度受容体が単離されれば、神経系における温度受容機構において新しい発見となる

と考えられる。

2. 結果

2.1 15°Cで飼育された TRPV 変異体の温度馴化異常

C. elegans は低温耐性・温度馴化機構を持つ。例えば、25°Cで飼育した野生株 N2 は 2°Cに置かれると死滅するが、15°Cで飼育した野生株 N2 は 2°Cに置かれても生存する (Ohta et al., 2014)。この現象は低温耐性と定義されている。さらに、15°Cで飼育した野生株 N2 は数時間 25°Cで静置した後に 2°Cに対する低温耐性テストを行うと大部分が死滅し、25°Cで飼育した野生株 N2 は数時間 15°Cに静置した後に 2°Cに対する低温耐性テストを行っても大部分が生存できる (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2016)。この現象は、温度馴化や低温馴化と定義されており、飼育温度をシフトさせた後の低温耐性の変化を観察することができる (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2016)。低温馴化および低温耐性において、ADL 感覚ニューロンは温度受容に関与し、ADL 内では TRPV チャンネル OSM-9、OCR-2 と OCR-1 が機能することが明らかとなっている (Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018)。これまでの解析から、25°Cで飼育された *osm-9* 変異体において、野生株と比較して低温耐性が上昇する異常が見られたため、OSM-9 は 25°C飼育後の低温耐性を負に制御していると考えられる (Ujisawa et al., 2018)。一方で、15°Cで飼育された *osm-9* 変異体では低温耐性の異常が見られなかった (Ohta et al., 2014)。そこで、本研究ではまず、ADL で機能する TRPV チャンネルの変異体がこれまでとは異なる実験条件において、より顕著な低温耐性異常を示すかを調べた。具体的には、15°Cで飼育された *osm-9* 変異体、*ocr-2* 変異体、*osm-9 ocr-2* 二重変異体、そして *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異

体を数時間 25°C に静置した後に、それらの 2°C における生存率を測定した。15°C で飼育した野生株 N2 を 25°C に 0 時間、3 時間もしくは 5 時間静置したのちに 2°C (48 時間) の低温刺激を与えた場合の野生株 N2 の生存率はそれぞれ、86%、46%、23%であった (図 4、[15°C→2°C]、[15°C→25°C (3 h) →2°C]、[15°C→25°C (5 h) →2°C])。これに対して、*osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体は、[15°C→25°C (3 h) →2°C] や [15°C→25°C (5 h) →2°C] の条件でテストを行った場合において、低温耐性が上昇する表現型を示した。同様に、*osm-9 ocr-2* 二重変異体と *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体においても低温耐性の上昇が観察された (図 4)。つまり、OSM-9、OCR-2 と OCR-1 は遺伝学的に同じ経路で機能し、飼育温度をシフトさせた後の低温耐性 (温度馴化) を負に制御していると考えられる。次に、温度馴化において、*osm-9* と *ocr-2* 遺伝子が ADL で機能するかを調べるために、*osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体の ADL 特異的にそれぞれの遺伝子を発現させる細胞特異的な回復実験を行った。この解析では、*osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体の低温耐性の上昇に関して最も野生株との差が見られた [15°C→25°C (3 hr) →2°C] の実験条件を用いた。*osm-9* 変異体または *ocr-2* 変異体の ADL 特異的に *osm-9* 遺伝子または *ocr-2* 遺伝子を発現させた結果、それぞれの変異体が示す低温耐性の上昇が部分的に回復した (図 5)。つまり野生株において、TRPV である OSM-9 と OCR-2 は ADL において温度馴化に関与することが示唆された。一方で、*osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体の低温耐性の上昇異常は各変異体の ADL を回復させただけでは完全に回復しなかったことから、ADL に加えてそれ以外のニューロンでの OSM-9 と OCR-2 の機能も温度馴化には必要であると考えられる。あるいは、この解析では各遺伝子導入系統について独立に 3 系統ずつテストを行ったが、染色体外

遺伝子の発現レベルが野生株と同程度でない可能性も考えられる。その場合は、OSM-9 と OCR-2 が ADL のみで温度馴化を制御しているとしても、その発現量が重要である可能性が考えられる。

2.2 TRPV 変異体における ADL のカルシウムイメージング解析

ADL 感覚ニューロンは温度に反応する温度受容ニューロンであり、その ADL の温度応答は TRP チャネルの変異体で低下することが、これまでに報告されていた (Ujisawa et al., 2018)。具体的には、3 つの TRPV チャネルの機能が低下している *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体では、17°C から 23°C への 6°C 幅の温度上昇刺激を与えた際に、ADL の細胞内カルシウム濃度変化が野生株 N2 と比べて低下することがカルシウムイメージング解析から見つかった (Ujisawa et al., 2018)。一方で、*osm-9* 変異体、*ocr-2* 変異体と *osm-9 ocr-2* 二重変異体に同様の 17°C から 23°C への 6°C 幅の温度上昇刺激を与えると、これら 3 つの変異体の ADL 内の細胞内カルシウム濃度の変化は野生株 N2 と同様であることが報告されている (Okahata et al., 2019)。

本研究では、TRPV 変異体である *osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体について、より広範囲の温度刺激を与えることで、ADL の温度応答性に異常が見られる可能性を考え、13°C から 27°C への 14°C 幅の温度上昇刺激を与えてカルシウムイメージングを行った (図 6)。 *C. elegans* は哺乳類のような電位依存性ナトリウムチャネルを持たないため、ニューロン内のカルシウムイオンの濃度変化が直接の神経活動として検出できる。これまで行われた解析と同様に、ニューロン内のカルシウム濃度変化を検出するために、カルシウムイオンの濃度により蛍光が変

化するカルシウムインディケータであるイエローカメレオン Yellow cameleon (YC3.60) を用いた。*C. elegans* の ADL に YC3.60 を発現させ、13°C から 27°C への温度上昇刺激を与えた際の ADL 内のカルシウム濃度変化を測定した。ADL で YC3.60 を発現している *osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体に 13°C から 27°C の温度上昇刺激を与えた結果、ADL におけるカルシウム濃度変化がそれぞれの変異体において野生株と比較して顕著に低下する異常が見られた (図 6)。

OSM-9 と OCR-2 はいくつかの感覚ニューロンで発現・機能しているため、*osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体の ADL における温度上昇刺激に対するカルシウム濃度変化の低下異常が、ADL ニューロンで発現している OSM-9 と OCR-2 の細胞自律的な機能の低下によって引き起こされたのか、それとも ADL 以外のニューロンにおける OSM-9 と OCR-2 の機能低下が細胞非自律的に ADL に影響を与えたのかについて検証した。*osm-9* 変異体または *ocr-2* 変異体の ADL 特異的に野生型の *osm-9* または *ocr-2* 遺伝子を発現させた。その結果、それらの遺伝子導入系統において ADL における温度上昇に伴うカルシウム濃度変化の低下異常の回復が見られたため (図 7)、OSM-9 と OCR-2 は ADL において細胞自律的に温度情報伝達に関与することが示唆された。一方で、予想に反して、*osm-9 ocr-2* 二重変異体と *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体は 13°C から 27°C への 14°C 幅の温度上昇刺激を与えた際に、ADL 内カルシウム濃度変化は野生株 N2 と同様であった (図 6)。これは、例えば ADL において機能する TRPV が複数欠損することにより、それ以外の ADL での温度情報伝達を補う機構が働くことで、ADL の正常な温度応答が見られたと考えられる。

2.3 線虫 TRPV を発現させた味覚ニューロンのカルシウムイメージング

TRPV の線虫ホモログである OSM-9 と OCR-2 が、ADL 温度受容ニューロンの温度応答に関与していたことから、これらの TRPV が直接温度を受容するのかを調べた。具体的には、*C. elegans* の頭部に 1 つだけ存在する味覚ニューロン ASE right (ASER) に TRPV である OSM-9 と OCR-2 を強制的に発現させて、13°C から 27°C への温度上昇刺激を与えたときの ASER の細胞内カルシウム濃度の変化を、カルシウムイメージング法を用いて測定した。ASER 味覚ニューロンは温度上昇に反応しないことから、これまでに、温度走性における温度受容体である受容体グアニル酸シクラーゼや低温耐性における温度受容体の一つである DEG-1 を ASER 味覚ニューロンで発現させ、温度感受性の獲得の有無を調べる解析においても使用されてきた (Takagaki et al., 2020; Takeishi et al., 2016)。これらの解析ではカルシウムインディケータとして、YC3.60 よりもカルシウム濃度変化を高感度で検出できる G-CaMP6 や G-CaMP8 が用いられていたため、本研究においても ASER で G-CaMP8 を発現する系統を用いた。また、最近の解析から、ASER は温度上昇には反応しないが、低温に反応することが見付き、その低温受容において、AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体である GLR-3 が低温受容体として機能することが報告された (Gong et al., 2019)。そこで、低温受容体である GLR-3 が欠損した *glr-3* 変異体の ASER を TRPV の強制発現解析の実験系として用いた。まず *glr-3* 変異体の ASER に G-CaMP8 を発現させ、13°C から 27°C への温度上昇刺激を与え、温度上昇に対しては反応が見られないことを確認した (図 8)。OSM-9 が発現する感覚ニューロンとして ADL 以外にも ASER が知られているため、*glr-3* 変異体の ASER に *osm-9* 遺伝子を過剰発現させたところ

ろ、ASER の温度上昇に対する反応は見られなかった (図 8)。対照的に、*osm-9* 遺伝子と *ocr-2* 遺伝子を染色体外遺伝子として、*glr-3* 変異体の ASER 特異的に発現させた系統では、ASER が温度上昇に対して反応した (図 8)。これらのことから、OCR-2 もしくは OSM-9 と OCR-2 の複合体が温度受容体として機能している可能性が考えられた。そこで次に、OCR-2 が温度受容体として働くのか、それとも OSM-9 と OCR-2 の両方が温度受容体として働く TRPV チャネルであるのかを調べるために、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的解析を行なった (図 9、10、11)。

2.4 アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた 2 本刺し膜電位固定法による OSM-9 と OCR-2 の電気生理学的解析

TRPV の温度応答能をより直接的に解析するために、アフリカツメガエルの卵母細胞に TRPV を発現させ、2 本刺し膜電位固定法を用いて卵母細胞の細胞膜の膜電位を固定させながら、TRPV チャネルに依存した電流の変化を測定する電気生理解析を行った (図 9、10、材料と方法参照)。これまでに OSM-9 と OCR-2 についての電気生理学解析が報告されているが、熱を含む様々な刺激に対する応答性は確認されていなかった (Colbert et al., 1997; Jose et al., 2007; Tobin et al., 2002)。そこでまず、*osm-9* cDNA と *ocr-2* cDNA に対応するそれぞれの RNA 配列 (cRNA: complementary RNA) を卵母細胞に別々に注入したところ、ネガティブコントロールである蒸留水 (DW) を導入した卵母細胞と同様に、約 25°C から約 35°C まで温度を上昇させる温度上昇刺激に対しての反応は見られなかった (図 9)。一方で、*osm-9* cRNA と *ocr-2* cRNA を同時に卵母細胞に注入

したところ、約 25°C から約 35°C の温度上昇刺激に対して内向き電流が見られ (図 9、OSM-9 OCR-2)、その内向き電流は温度変化が開始すると同時に見られた。これまでの *C. elegans* の温度馴化解析と ADL 温度受容ニューロンにおける温度応答性のカルシウムイメージング解析より、*C. elegans* において OSM-9、OCR-2 と OCR-1 が温度受容ニューロンの活性を制御しており、OCR-1 が他の TRPV チャネルの遺伝学的な抑制因子として機能する可能性が考えられている (Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018)。そこで、*osm-9* cRNA と *ocr-2* cRNA に加えて、*ocr-1* cDNA に対応する *ocr-1* cRNA を同時に卵母細胞に注入した。その卵母細胞に対して、約 25°C から約 35°C の温度上昇刺激を与えたところ内向き電流が見られたが、この電流は *osm-9* cRNA と *ocr-2* cRNA の 2 つを導入した卵母細胞の内向き電流と同程度であった (図 9、OSM-9 OCR-2 OCR-1)。また、*ocr-1* cRNA のみを注入した卵母細胞は温度上昇刺激に対して反応しなかった (図 9、OCR-1)。

OSM-9 と OCR-2 を同時に導入した卵母細胞において、温度刺激を与える前の室温 (約 25°C) の状態でも内向き電流が見られ、この電流は OSM-9 と OCR-2 を別々に導入した卵母細胞では見られなかった (図 9)。このことから、OSM-9/OCR-2 チャネルの温度活性化閾値が 25°C 以下にある可能性が考えられた。そこで次に、約 25°C から約 15°C への温度下降刺激を与え、その後約 35°C の温度上昇刺激を与える解析を行った。その結果、OSM-9 と OCR-2 を同時に導入した卵母細胞において、約 15°C から約 35°C の刺激に対して内向き電流が見られた (図 10、OSM-9 OCR-2)。また、その内向き電流は約 15°C の状態でも温度上昇刺激を与えると同時に見られた。以上の結果から、TRPV チャネルである OSM-9/OCR-2 は、線虫の生理的な温度において明確な温度活性化閾値は確認されなかった。一

方で、OSM-9 と OCR-2 を導入した卵母細胞は約 15°Cの温度下降刺激を与えた時に内向き電流が少しであるが変化したことから (図 10)、15°C以下の低温域に活性化閾値がある可能性も考えられる。これまでに哺乳類で見つかっている温度感受性 TRP チャネルにおいて、TRPV1 は約 40°C以上、TRPV2 は約 50°C以上、TRPV3 は約 33°C以上、TRPV4 は約 30°Cから 40°C以上、TRPM8 は約 25°C以下から、TRPA1 は約 17°C以下で活性化し始めるように、温度閾値がはっきりとしているものだけでなく、温度閾値がはっきりしないものもある (Baez et al., 2014; Castillo et al., 2018; Caterina et al., 1999; Caterina et al., 1997; Dhaka et al., 2006; McKemy et al., 2002; Patapoutian et al., 2003; Peier et al., 2002; Smith et al., 2002; Story et al., 2003; Togashi et al., 2006; Watanabe et al., 2002; Xu et al., 2002; Zimmermann et al., 2011)。例えば、TRPM2 は約 30°Cから 40°Cの間、TRPM3 は約 20°Cから 40°Cの間、TRPM4 と TRPM5 では約 15°Cから 35°Cの間で活性化する。これらの知見から、本研究における OSM-9 と OCR-2 は、温度閾値がはっきりしない温度感受性 TRP チャネルであるかもしれない。

2.5 OSM-9 と OCR-2 チャネルの電気生理学的特性

温度上昇刺激時の OSM-9 と OCR-2 のチャネル特性を調べるために、アフリカツメガエルの卵母細胞における OSM-9 と OCR-2 が引き起こす温度刺激依存的な電流と電圧の関係 (Current-voltage relationship、I-V 曲線) を測定した。イオンチャネルの電気生理学において、電圧が負の時と比べて電圧が正の時に大きな電流を示すような上方への偏向は、外向き整流性と定義されている。イ

オンチャネルにおける外向き電流は、細胞内からの陽イオンの流出もしくは細胞内への陰イオンの流入によって引き起こされる。ヒト TRPV1 などを含む典型的な TRP チャネルは、外向き整流性を示し、カルシウムイオンが細胞内から流出しやすい性質を持つ (Caterina et al., 1997; Premkumar et al., 2002; Tominaga et al., 1998)。線虫の TRP チャネルである OSM-9 と OCR-2 もヒトの TRP チャネルと同様な電気生理学的な特性を持つかを調べた。具体的には、OSM-9 と OCR-2 が発現しているアフリカツメガエルの卵母細胞に、 -80 mV から $+80$ mV になり、即時に $+80$ mV から -80 mV に戻る電圧変化 (ランプパルス) を約 0.5 秒間で与え、その後に 2.5 秒のインターバルを挟んで、再び -80 mV から $+80$ mV のランプパルスを与える操作を繰り返した (図 11)。これらの一連の電圧変化時の電流値を測定して、縦軸が電流変化、横軸が電圧変化のグラフである I-V 曲線を作成し、約 25°C の室温時の I-V 曲線と温度上昇刺激時の I-V 曲線を比較した。室温時において DW、OSM-9 もしくは OCR-2 を個々に導入した卵母細胞では、例えば電圧が -80 mV の時に電流はほぼ 0 μA であり、電圧が $+80$ mV の時に電流は 0.5 μA であった (図 11、青い線グラフ)。それに対して、約 25°C の室温時において OSM-9 と OCR-2 を同時に導入した卵母細胞では、例えば電圧が -80 mV の時に電流は約 -0.3 μA であり、電圧が $+80$ mV の時に電流は約 1.2 μA であった (図 11、青い線グラフ)。OSM-9 と OCR-2 を導入した卵母細胞の外向き整流性は温度上昇刺激により増強された ($33.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$; 図 11、赤い線グラフ)。この結果から、TRPV である OSM-9 と OCR-2 は細胞内からカルシウムイオンが流出しやすい外向き整流性を持つことがわかり、TRPV である OSM-9 と OCR-2 は温度刺激に対して他の生物と同様の活性特性を持つことが示唆された。

2.6 低温耐性に関わる GPCR 型温度受容体の RNAi スクリーニング

これまでの解析から、ADL 温度受容ニューロンにおいて、3つの TRPV チャネルが温度情報伝達に関与し (Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018)、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた解析から TRPV OSM-9 と OCR-2 が直接温度を受容している可能性が考えられた (Ohnishi et al., 2020)。しかし、OSM-9 と OCR-2 の温度に対する応答性 (内向き電流) は約 $0.055 \mu\text{A}$ であり (図 9B)、他の生物が持つ TRPV チャネルの温度に対する応答性は数 μA であるため (Guler et al., 2002; Yatsu et al., 2015)、それらと比較してとても低かった。例えば、OSM-9 と最も相同性が高い、他の生物の TRPV4 に関する電気生理学解析を例に挙げると、哺乳類の TRPV4 を導入したアフリカツメガエルの卵母細胞の細胞内電圧を -40 mV に固定し、 45°C の温度刺激を与えた時の内向き電流が約 $1 \mu\text{A}$ というデータが報告されている (Guler et al., 2002)。また、アメリカアリゲーター (*Alligator mississippiensis*) が持つ TRPV4 である AmTRPV4 を導入したアフリカツメガエルの卵母細胞の細胞内電圧を -40 mV に固定し、約 40°C の温度温度刺激を与えた時の内向き電流が約 $4 \mu\text{A}$ というデータが報告されている (Yatsu et al., 2015)。OSM-9 と OCR-2 の温度に対する応答性が弱い原因として、卵母細胞での OSM-9 と OCR-2 の発現量が低いことや、OSM-9 と OCR-2 の膜への移行がうまくいかない可能性も挙げられるが、他の可能性として、*C. elegans* の温度受容ニューロンにおいて、未同定の TRP 以外の温度を受容する分子が OSM-9 と OCR-2 の温度応答性を増強させている可能性も考えられる。例えば線虫から哺乳類において、いくつかの TRP のチャネルは、上流に存在する GPCR と G タン

パク質経路によってその開口が調節されることが知られている (Veldhuis et al., 2015)。そのため、線虫の ADL 温度受容ニューロンで機能する TRP チャネルの上流にも GPCR 型の温度受容体分子が存在する可能性を考えた。また、線虫の低温耐性においては、ADL 以外にも温度情報を受け取る感覚ニューロンが明らかとなっており、このうちの ASJ 感覚ニューロンにおいて、温度情報が三量体 G タンパク質を介した経路によって伝達されることが示されている (Ohta et al., 2014; Sonoda et al., 2016; Ujisawa et al., 2016) (図 12)。ASJ で機能する温度受容体は未同定であるが、ASJ 内における温度情報伝達に三量体 G タンパク質が関与することから GPCR の存在が考えられた。

以上の結果と考察をもとに、ADL と ASJ で機能する GPCR 型温度センサー分子の単離を目指して解析を行った。通常、野生株個体を 25°C もしくは 20°C で飼育した後に、2°C に移すと死滅してしまうのに対して、ASJ や ADL 内の温度情報伝達に関わる遺伝子の変異体は、それぞれ 20°C や 25°C で飼育した後に 2°C の低温刺激を与えても生存できる表現型を示す。そこで、それぞれの温度受容ニューロンに存在すると仮定している未知の GPCR 型温度受容体の変異体も同様に、低温耐性が増強する表現型を示すという予想を立てた。線虫ゲノム中には約 1700 個の GPCR 遺伝子が存在し、そのうちの 400 個はタンパク質をコードしなくなった偽遺伝子と考えられる (Chen et al., 2005; Robertson, 1998, 2000, 2001; Stein et al., 2003; Thomas, 2006; Thomas et al., 2005; Troemel et al., 1995)。約 1700 個のうち、約 1000 個の GPCR 遺伝子について RNA 干渉 (RNAi) 法を用いて遺伝子ノックダウンを行い、各ノックダウン系統の低温耐性を測定した (図 13)。RNAi とは、二本鎖 RNA によってその配列に対応する mRNA が分解

される現象であり、これを利用して、人工的に二本鎖 RNA を導入することで、特定の遺伝子の機能を低下させることができる (Fire et al., 1998)。線虫では、大腸菌に特定遺伝子に対応する二本鎖 RNA を産生させ、その大腸菌を食べさせる Feeding RNAi 法を用いることで、それを食べた世代(P₀)に加えて、次世代以降の線虫においても遺伝子ノックダウンを引き起こすことができる (Timmons and Fire, 1998)。線虫の野生株において RNAi は系統・組織によって効果が異なり、特に神経系で RNAi の効果が得られにくいことが知られている。そのため、神経系でも RNAi の効果が得られる *eri-1; lin-15B* 系統を解析に使用した (Wang and Barr, 2005)。1 回のアッセイにつき 6~12 系統のテストを行い、*eri-1; lin-15B* の生存率を「1.0」とした時の生存比率を算出した。その結果、線虫を 20°C で飼育した後に 2°C の低温刺激を与えた際に、コントロール系統である *eri-1; lin-15B* と比較して顕著に生存率が上昇する低温耐性異常が見られたノックダウン系統が 50 系統見つかった (図 13)。一方で、*eri-1; lin-15B* と比較して顕著に生存率が低下する低温耐性異常が見られたノックダウン系統も 36 系統見つかった (図 13)。本研究における全ての GPCR 遺伝子ノックダウン系統の 20°C で飼育した時の低温耐性の結果は表 6 に示す。

2.7 低温耐性に関与する可能性のある GPCR 遺伝子の発現細胞解析

GPCR 遺伝子ノックダウン系統の低温耐性の解析から、低温耐性に関与する GPCR の候補が単離された。本研究では、温度受容ニューロン ADL と ASJ で機能する GPCR 型の温度受容体の同定を目的としているため、GPCR 遺伝子の RNAi スクリーニングから単離された低温耐性に関与する GPCR のうち、ADL や ASJ 温

度受容ニューロンで発現している GPCR に絞り込む解析を進めた。具体的には、RNAi スクリーニングから単離された 50 個の GPCR 遺伝子に関して蛍光タンパク質 GFP を用いた発現細胞解析を行い、ADL や ASJ での発現の有無を解析した。それぞれの GPCR 遺伝子の開始コドン上流のプロモーターDNA に緑色蛍光タンパク質 GFP の遺伝子を繋いだプラスミドを作製し、野生株の生殖巣にマイクロインジェクション法によって導入した。得られたトランスジェニック系統に関して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて GFP の蛍光観察を行った。なお、これらの系統では、ASJ の位置を同定できるように ASJ で赤色蛍光タンパク質 (DsRed monomer) を発現させるプラスミド *trx-1p::DsRedm* も同時に導入した (図 14)。50 個の温度受容体候補 GPCR 遺伝子について、GFP を用いた発現細胞の観察を行った結果、14 個の遺伝子が ASJ で発現していることが明らかとなった。さらに、ADL での発現を調べるために、得られた GFP 発現系統を DiI という赤色蛍光色素を用いた Dye filling 法により、主に ADL を含む頭部の特定の 6 対の感覚ニューロン (ADL、ASH、ASI、ASJ、ASK、AWB) を染色した。あるいは、ADL で赤色蛍光タンパク質 (DsRed monomer) を発現させるプラスミド *srh-220p::DsRedm* を同時に導入した。さらに、50 個の候補遺伝子のうち 17 個について解析を行った結果、3 個の遺伝子が ADL で発現していることを明らかにした。ASJ や ADL で発現していない遺伝子についても、ほとんどの遺伝子が頭部のニューロンで発現していた。本研究において発現細胞解析に使用したプライマーは表 1 に示す。

2.8 CRISPR/Cas9 によるノックアウト系統の作製 1

RNAi による遺伝子ノックダウンでは目的の遺伝子以外の遺伝子がノッ

クダウンされることがあり、RNAi により遺伝子をノックダウンした個体と遺伝子を欠損させた（ノックアウト）した個体の表現型が異なる場合がある。そのため、網羅的 RNAi スクリーニングにおいて低温耐性に異常を示し、ADL や ASJ 温度受容ニューロンで発現していた GPCR 遺伝子に関しても、ノックアウト系統の低温耐性を調べる必要があった。そこで CRISPR/Cas9 を用いて遺伝子ノックアウト系統を作製した。CRISPR/Cas9 法とは、ゲノム配列の任意の部位を自由に編集することができるゲノム編集技術の一つである (Jinek et al., 2012)。CRISPR/Cas9 は元々細菌や古細菌で発見された適応免疫システムであり、このシステムを利用することにより、ゲノム中の遺伝子を破壊することやゲノム中に遺伝子を導入することができる (図 15)。方法としては、二本鎖 DNA を切断するエンドヌクレアーゼである Cas9 タンパク質と、Cas9 が結合する任意の PAM 配列 (NGG) の上流 20 bp の配列を持つガイド RNA (gRNA) を細胞内に導入する (図 15)。gRNA により Cas9 が目的配列に誘導され、Cas9 は PAM 配列上流で二本鎖切断 (DSB: Double Strand Break) を引き起こす。二本鎖切断が起こると誘導される 2 種類の DNA 修復機構 (NHEJ: 非相同末端連結、HDR: 相同組換え) を利用することによって遺伝子の改変を行う (Jinek et al., 2012)。非相同末端連結では切断された DNA 末端が連結されるが、この時に塩基の挿入や欠損などのエラーがよく起こるため、このランダムなエラーを利用することで遺伝子を破壊することができる。相同組換えは、正常な姉妹染色体を鋳型にしてゲノム DNA が修復される機構である。CRISPR/Cas9 と相同組換えを組み合わせると、外来の遺伝子や特定の配列を標的となるゲノム領域に挿入することも可能である。具体的には、任意のゲノム配列と相同な塩基配列を含む DNA 断片を Cas9 と gRNA と同

時に導入することで、その DNA 断片が Cas9 によって切断された部位に挿入され、外来遺伝子や特定の配列を挿入できる。

温度受容体候補 GPCR 遺伝子の網羅的 RNAi スクリーニングの中から、RNAi によって低温耐性に異常を引き起こし、かつ温度受容ニューロンで発現していた候補 GPCR 遺伝子のうち、最も再現性よく低温耐性の異常が見られた *str-45* 遺伝子について非相同末端連結を利用した遺伝子ノックアウトを試みた (Friedland et al., 2013) (図 15)。20 個体の野生株に gRNA 50 ng/ μ l と Cas9 遺伝子 50 ng/ μ l、そして、マイクロインジェクションのマーカー遺伝子として全ての細胞で GFP を発現する *sur-5p::GFP* を同時にマイクロインジェクションし、2 個体ずつ新しい飼育寒天培地 10 枚においた (P_0)。この P_0 を 15°C で 6 日飼育後、6 枚の培地から *sur-5p::GFP* の発現が見られる個体が得られたことを確認した上で、 F_1 世代の 60 個体を単離した (そのうち 10 個体は卵を産まなかった)。卵を産んだ 50 個体の F_1 のゲノムを抽出し、PCR によって *str-45* 遺伝子周辺の DNA 断片を増幅して、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて *str-45* ヘテロ変異の検出を行った。非相同末端連結による修復では数十塩基の挿入や欠損が考えられるため、その検出方法として HMA (Heteroduplex Mobility Assay、ヘテロ二本鎖移動度分析) を用いた。相補的二本鎖 DNA は電気泳動すると、分子量に応じて移動するが、一部にミスマッチが生じた二本鎖 DNA は、ミスマッチ部分の立体構造によって電気泳動の移動速度が低下する。ミスマッチが生じた二本鎖 DNA は、PCR 産物を熱によって解離させ、再び二本鎖を形成させることによって作製する。*str-45* ヘテロ変異が生じていた場合、PCR 産物を電気泳動すると野生型の DNA 断片と、野生型よりも移動量の少ない DNA 断片が検出される。

ところが HMA を用いた解析からは、*str-45* ヘテロ変異体を得ることはできなかつた。そこで、*C. elegans* 内で Cas9、gRNA が発現していればいずれノックアウトができるのではないかと考え、系統化した 6 系統の F₂ 世代を 100 個体、F₃ 世代を 300 個体について変異の有無を確認したが、*str-45* ヘテロ個体は得られなかつた。gRNA の配列によってノックアウトの効率が異なることが知られているため、*str-45* 遺伝子内の異なる部位で gRNA を数個作製し、それら 2 つの gRNA を同時に野生株の生殖巣マイクロインジェクションし、上記と同程度の F₁ 世代の数個体を解析したが、*str-45* ヘテロ変異体は得られなかつた。F₁ 個体で遺伝子ノックアウトが起こらない配列を持つ gRNA は、F₂ と F₃ 世代でもノックアウトができないと考え、以後は F₂ と F₃ 個体の解析は行わなかつた。

次に、CRISPR/Cas9 法と相同組換えを組み合わせて、任意の変異を遺伝子内に挿入することを試みた (図 16) (Paix et al., 2014)。この解析では、*str-45* 遺伝子の第 1 エクソン内に終止コドン挿入するための 1 本鎖 DNA (オリゴヌクレオチド) 断片を用いた。相同組換えを利用した方法では、CRISPR/Cas9 によって切断された領域が、導入した外来のオリゴヌクレオチドを鋳型にして修復される。これを利用して、野生株の *str-45* 遺伝子の第 1 エクソン内でかつ PAM 配列近傍に終止コドン挿入する部位を設計し、その終止コドンが挿入される予定領域の前後約 35 bp ずつを含む約 70 bp のオリゴヌクレオチドを人工的に作製した。このオリゴヌクレオチドを、Cas9 と gRNA と共に野生株 (P₀) に導入した。また、相同組換え体の単離効率を上げるために co-CRISPR を用いた。co-CRISPR は、標的遺伝子と同時に、表現型が見目で分かる遺伝子の変異も一緒に導入する方法である。具体的には、CRISPR/Cas9 による相同組換えを利用し

て、標的遺伝子変異(本研究では GPCR)に加えて、個体の見た目が変化する点変異をマーカーとして導入する方法であり、後者のマーカー遺伝子内で相同組換えが起きた個体では、標的遺伝子(本研究では GPCR)においても相同組換えが起きている可能性が高い。co-CRISPR マーカーとして、*str-45* 遺伝子の第 1 エクソンに対応するオリゴヌクレオチドと同時に、*dpy-10* 遺伝子に機能獲得型である点変異 *cn64* を挿入させるためのオリゴヌクレオチドも導入した (図 16) (Arribere et al., 2014)。P₀ が生殖巣内に持つ卵母細胞において、*dpy-10* の遺伝子座で相同組換えが起きると、野生株が持つ片方の *dpy-10* 遺伝子に優性点変異 *cn64* が挿入され、その卵から発生した F₁ 個体は *cn64/+* の遺伝型を示す (+: 野生型、*cn64*: 点変異)。一方で、P₀ が生殖巣内に持つ卵母細胞において、野生株が持つ片方の *dpy-10* の遺伝子座において、CRISPR による *dpy-10* 遺伝子の切断と修復により単に *dpy-10* 遺伝子の機能欠失変異が生じる場合もある。その場合には、卵から発生した F₁ 個体は *0/+* の遺伝型を示す(0: 機能欠失変異)。稀に *dpy-10* の遺伝子座で、片方の *dpy-10* 遺伝子に優性点変異 *cn64* が挿入され、もう片方の *dpy-10* の遺伝子座で機能欠失変異が生じる場合もあり、その場合は、卵から発生した F₁ 個体は *cn64/0* の遺伝型を示す。つまり、F₁ 個体では、*+/+*、*cn64/+* や *cn64/0* もしくは *0/+* 型の遺伝型を持つ個体が得られる可能性が高いと考えられる。このとき *cn64/0* と *0/+* の遺伝型を持つ個体は、太く短く、かつ左向きに回転する Dumpy left roller の表現型を示し、*cn64/+* の遺伝型を持つ個体は Left roller の表現型のみを示す。Left roller の表現型を示す *cn64/+* の遺伝型を持つ Left roller の個体では co-CRISPR が成功し、*dpy-10* 遺伝子内で相同組み換えが生じていることから、標的としている *str-45* 遺伝子の第 1 エク

ソン内にも同様に相同組み換えが生じている可能性が高いため、この個体を獲得することを目指した。

標的とする遺伝子によって co-CRISPR の効率が異なることが報告されていたため、*str-45* 遺伝子と *srd-4* 遺伝子の 2 つの遺伝子についてノックアウトを試みた。遺伝子をノックアウトするために、遺伝子内に終止コドンを生じさせ、それによるナンセンス変異の導入を制限酵素処理パターン (PCR-RFLP) で簡便に見分けるために、*str-45* には DdeI、*srd-4* には BfaI の制限酵素サイトをサイレント変異で挿入させた。そのために、PAM 配列近傍と相同的な配列の中央に、ストップコドンと制限酵素サイトを入れた全長 70 bp のオリゴヌクレオチドを設計した。野生株の生殖巣に gRNA 25 ng/μl と Cas9 遺伝子 50 ng/μl とオリゴヌクレオチド 500 nM とマーカー遺伝子 (*dpy-10* 遺伝子) の gRNA 25 ng/μl とオリゴヌクレオチド 500 nM を同時にマイクロインジェクションで導入した。*srd-4* 変異体を作製する際には、*dpy-10(cn64)*ヘテロ変異体を示す Left roller の個体のみを数枚のプレートから約 100 個体単離した。Left roller の表現型が出ていない場合も、*str-45* の遺伝子座には変異が入っている可能性があると考え、Left roller の表現型を示す個体が現れた数枚のプレートから一枚を選別し、そのプレートの中の個体約 100 個体すべてを拾い単離した。卵を産んだ個体の F₁ のゲノムを抽出し、PCR によって遺伝子周辺の DNA 断片を増幅して、制限酵素処理後にアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルで変異の検出を行った (PCR-RFLP)。しかし、ノックアウト系統を得ることはできなかった。以上の方法では、目的遺伝子のノックアウト系統を作製することができなかったため、さらに別の方法を行うこととした。

2.9 CRISPR/Cas9 によるノックアウト系統の作製 2

CRISPR/Cas9 システムが高確率で働くために必要な gRNA 配列が報告されたため、これを用いた (Farboud and Meyer, 2015)。具体的には、gRNA の 3' 側の 2 塩基が GG (3' GG) となるような配列の場合に CRISPR/Cas9 が高確率で働くという報告があったため (Farboud and Meyer, 2015)、その報告に従い、gRNA の 3' 側 2 塩基が GG (3' GG) である配列を探した。また、gRNA の 5' 末端に G を付加すると、転写効率があがることが知られていたため、gRNA の 5' 末端に G を付けた gRNA を作製し、*str-45* 遺伝子のノックアウトを試みた。ストップコドンと Nhe I 制限酵素サイトを含んだ 5 bp のインサート (CTAGC) を入れた 70 bp のオリゴヌクレオチドを設計した。これ以降の操作は前回と同様 PCR-RFLP で遺伝子型を確認した。P₀ 40 匹の野生株に gRNA 25 ng/μl と Cas9 遺伝子 50 ng/μl と 70 bp のオリゴヌクレオチド 500 nM と Co-CRISPER マーカー遺伝子 (*dpy-10* 遺伝子) の gRNA 25 ng/μl とオリゴヌクレオチド 500 nM を同時に野生株の生殖巣にマイクロインジェクションし、15°C で 6 日飼育後、F₁ 個体を確認した。その結果、太く短い Dumpy の表現型を示す個体は出現したが、Left roller はあらわれなかった。これは、*dpy-10(cn64)* ホモ変異体が温度感受性 (25°C で Dumpy left roller、15°C で Dumpy) の変異でありかつ、*cn64* がドミナント変異であるため、15°C で飼育したことによって *dpy-10(cn64)* ヘテロ変異体では left roller の表現型が現れず、Dumpy の表現型のみが現れる傾向が見られたと考えられた (Levy et al., 1993)。しかし、Dumpy の表現型のみを示す個体であっても、CRISPR/Cas9 が働いていたと考えられたため、標的である *str-45* 遺伝子内に変異が入ってい

る可能性が考えられた。そのため、F₁ 世代で Dumpy の表現型を示す個体を約 50 匹単離したところ、2 匹の個体において *str-45* 遺伝子にヘテロ変異が確認された。F₂ 個体で *dpy-10* の表現型が抜けた個体を 12 匹ずつ単離し、2 系統の *str-45* ホモ変異系統を獲得した。変異部位の配列を確認するためにジデオキシ法を用いて DNA シーケンスを行ったところ、狙いどおり第 1 エクソン内にナンセンス変異を持つ変異体と、第 1 エクソンが 243 bp 欠損した変異体を単離した。

上記の解析では、飼育温度として 15°C を用いたが、*dpy-10(cn64)* 変異体は 15°C 飼育時に Dumpy の表現型を示したため、Left roller の表現型を示す個体を得るために 23°C 飼育で上記と同様の解析を行った。具体的には、P₀ 40 個体の野生株に、*str-45* 遺伝子を標的とした gRNA と Cas9 遺伝子と 70 bp のオリゴヌクレオチド、そして co-CRISPR マーカー遺伝子 (*dpy-10* 遺伝子) の gRNA とオリゴヌクレオチドを同時に導入した。生まれてきた F₁ 個体を 23°C で 3 日飼育したところ、Left roller の表現型を示した F₁ 個体を約 100 匹単離した。その結果、16 匹の *str-45* ヘテロ変異体が単離され、次世代で 5 系統の *str-45* ホモ変異体を獲得した。変異部位の配列を確認するためにジデオキシ法を用いて DNA シーケンスを調べたところ、狙いどおり *str-45* 遺伝子に終止コドンが挿入された変異体を 4 系統と、終止コドンの変異に加えて 90 bp の挿入を持つ変異体 1 系統を単離した。今回得られた変異体 7 系統のうち、2 回目の解析で得られた第 1 エクソン内にナンセンス変異を持つ変異体 1 系統を KHR44 *str-45(chr2)*、1 回目の解析で得られた第 1 エクソンが 243 bp 欠損した変異体を KHR45 *str-45(chr3)* とした (図 17)。

2.10 CRISPR/Cas9 によるノックアウト系統の作製 3 (Dual sgRNA を使用)

str-45 遺伝子のノックアウト系統の単離に成功したことを踏まえて、CRISPR/Cas9 システムが高確率で働くために必要な、gRNA の 3' 側の 2 塩基が GG となる 3' GG の配列が遺伝子のエクソン中には見つからず、イントロン中にのみ見られた *str-92* 遺伝子のノックアウト系統の単離を試みた。*str-92* 遺伝子のイントロン中には 2 つの 3' GG の配列があり、その間には *str-92* 遺伝子の第 3 エクソンと第 4 エクソンが含まれていた。そこで、*str-92* 遺伝子中の第 3、第 4 エクソンの 2 つのエクソンを欠損させることを考え、2 つのエクソンをまたぐように 2 つの gRNA を設計した (図 18)。まず、2 つの gRNA の濃度をそれぞれ 25 ng/μl として P₀ 40 匹の野生株にマイクロインジェクションした。生まれてきた F₁ 個体のなかから Left roller 個体のみを 54 匹単離し、それらの F₁ 個体に関して *str-92* 遺伝子の第 3、第 4 エクソンの欠損を PCR 法で調べたが、目的の欠損変異は得られなかった。そこで、gRNA の濃度をそれぞれ 50 ng/μl に増やして P₀ 40 匹にマイクロインジェクションし、生まれてきた F₁ 個体に関して Dumpy 個体と Left roller 個体の両方について、*str-92* 遺伝子内の第 3・第 4 エクソンの欠損を PCR 法で調べた。約 200 匹の F₁ 個体を解析した結果、*str-92* 遺伝子内の第 3、第 4 エクソンに欠損を持つヘテロ変異体を 16 個体獲得した。F₂ 世代において *dpy-10(cn64)* の表現型を示さない個体を 12 匹ずつ単離し、それらの遺伝型を PCR 法で確認したところ、*str-92* 遺伝子を欠損したホモ変異体系統を 3 つ獲得した。得られた変異体系統に関して、ジデオキシ法を用いて DNA シークエンスを調べたところ、3 系統全てにおいて、第 3、第 4 エクソンを欠損させる約 500 ~600 bp の欠失変異が見られ、かつその変異部位に 3~100 bp の塩基の挿入も

起きていた。今回得られた 3 系統の *str-92* 変異体うち、第 3、第 4 エクソンを含んだ 527 bp が欠損し、そこに 3 bp の挿入が起きた系統を KHR61 *str-92(chr4)* とし、第 3 エクソンと第 4 エクソンを含んだ 562 bp が欠損し、そこに 89 bp の挿入が起きた系統を KHR62 *str-92(chr5)* と名付け、第 3、第 4、第 5 エクソンの一部を含んだ 626 bp が欠損し 96 bp の挿入が起きた系統を KHR63 *str-92(chr6)* とした (図 18)。

2.11 GPCR 遺伝子のノックアウト変異体の低温耐性

これまでに CRISPR/Cas9 法をもちいて、12 つの GPCR 遺伝子に関してノックアウト系統を作製し、2 つの GPCR 遺伝子に関しては既に単離されていた 2 つのノックアウト系統をナショナルバイオリソース プロジェクト (NBRP) より取り寄せた。その結果、2 つの GPCR 変異体において低温耐性異常が見られた。それらのうちの 1 つの GPCR 遺伝子は ADL 温度受容ニューロンで発現しており、ADL の温度情報伝達に関与し、低温耐性に関与することが明らかとなった。この GPCR を ASE 味覚ニューロンに強制発現させると味覚ニューロンが温度上昇に応答するようになったことから、GPCR が温度に応答する可能性が示唆された。なお、GPCR を単独でアフリカツメガエルの卵母細胞などに発現させて電気生理学的解析を行ったが、これらについては温度に対する応答性が確認されなかった。アフリカツメガエルの卵母細胞などでは、GPCR の下流で機能する分子が存在しないため、反応が見られなかったと考えられる。

3. 考察

3.1 温度受容ニューロン ADL で機能する温度受容体 TRPV チャンネル

本研究ではまず、線虫の TRPV チャンネル OSM-9 と OCR-2 が協調的に温度センサーとして機能することを見つけた (Ohnishi et al., 2020)。OSM-9 もしくは OCR-2 が欠失した *C. elegans* では、ADL 温度受容ニューロンの温度に対する応答性が低下し、結果として、*C. elegans* 個体の低温馴化に異常が見られたと考えられる。ASE 味覚ニューロンに OSM-9 と OCR-2 を同時に発現させると、味覚ニューロンが温度上昇に応答するようになった。さらに、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的解析より、OSM-9 と OCR-2 が温度上昇刺激に対して応答することが明らかとなった。これらのことから TRPV チャンネル OSM-9 と OCR-2 は *C. elegans* の温度受容ニューロンにおいて、直接温度を感知するセンサーとして機能し、個体レベルの温度応答に関与することが示された。

これまでの解析から、*C. elegans* の低温馴化において、ADL 温度受容ニューロンが温度を受容し、ADL 内の TRPV チャンネル OSM-9、OCR-2 と OCR-1 が温度情報伝達に関与していることが示唆されている (Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018)。これまでの *C. elegans* の低温耐性解析において、25°C で飼育された *osm-9* 変異体は低温耐性の上昇異常を示し、15°C で飼育された *osm-9* 変異体では異常を示さなかったため、OSM-9 は 25°C 飼育後の低温耐性を負に制御していると考えられている (Ohta et al., 2014; Ujisawa et al., 2018)。本研究では、15°C で飼育された *osm-9* 変異体、*ocr-2* 変異体、*osm-9 ocr-2* 二重変異体、そして *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体を、数時間 25°C に静置した後の低

温耐性（温度馴化）を調べた（図 4）。その結果、これらの変異体は飼育温度シフト後の低温耐性が上昇する異常を示したため、OSM-9、OCR-2 と OCR-1 は遺伝学的に同じ経路で機能し、温度馴化を負に制御していると考えられる。*osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体の温度馴化異常は、それぞれの変異体の ADL 温度受容ニューロン特異的に *osm-9* 遺伝子もしくは *ocr-2* 遺伝子を発現させることで回復したことから、OSM-9 と OCR-2 は ADL において温度馴化に関与することが示唆された（図 5）。

これまでの所属研究室における TRPV チャネル変異体における ADL の温度応答性のカルシウムイメージング解析において、17°C から 23°C への 6°C 幅の温度上昇を与えると、*osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体では野生株と比べて ADL の温度応答性が低下する異常が見られたが (Ujisawa et al., 2018)、*osm-9* 変異体、*ocr-2* 変異体と *osm-9 ocr-2* 二重変異体に同様の温度刺激を与えても、ADL の温度応答性は野生株と同様であった (Okahata et al., 2019)。一方で、*ocr-1* 変異体では野生株と比べて ADL の温度応答性が上昇する異常が見られたことから、OCR-1 が他の TRPV チャネルの遺伝学的な抑制因子として機能する可能性が示唆されていた (Okahata et al., 2019)。本研究では、より広範囲の 13°C から 27°C への 14°C 幅の温度上昇を与えてカルシウムイメージング解析を行った（図 6）。その結果、*osm-9* 変異体と *ocr-2* 変異体において、野生株と比べて ADL の温度応答性が低下する異常が見られた。この *osm-9* 変異体もしくは *ocr-2* 変異体の異常は、それぞれの変異体の ADL 特異的に *osm-9* 遺伝子もしくは *ocr-2* 遺伝子を発現させることで回復したことから、OSM-9 と OCR-2 は ADL において細胞自律的に温度情報伝達に関与することが示唆された（図 7）。一方で、予想に反し

て、*osm-9 ocr-2* 二重変異体と *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体の ADL は、14°C 幅の温度上昇に対して野生株と同様の温度応答性を示した (図 6)。*osm-9 ocr-2* 二重変異体と *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体において、正常な ADL の温度応答性が見られた原因として、代償メカニズムにより ADL において OSM-9、OCR-2 と OCR-1 以外の TRPV サブユニットの発現が誘導される可能性や、TRP シグナリングが欠失することで、未同定の温度情報伝達を補う代償メカニズムが働く可能性などが考えられる。以前の報告で、*osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体の ADL において温度に対する応答性が低下していたにもかかわらず (Ujisawa et al., 2018)、本研究においては *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体の ADL の温度に対する応答性は野生株と同様であった (Ohnishi et al., 2020)。原因として、異なる加温範囲 (6°C または 14°C) によって引き起こされる温度上昇速度の違いが TRP の温度応答性に影響を与える可能性がある。他の可能性として、線虫の飼育温度が挙げられる。以前の解析では、25°C で飼育された個体が用いられたが、本研究においては 15°C で飼育された個体を用いた。この場合、上記の ADL の温度情報伝達を補う代償メカニズムが 15°C で飼育された時にのみ働き、25°C では代償メカニズムが機能しない可能性が考えられ、*osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体の ADL の温度応答性に異常が見られたと考えられる。*osm-9 ocr-2* 二重変異体と *osm-9 ocr-2; ocr-1* 三重変異体は、個体レベルでは飼育温度シフト後の低温耐性に異常が確認されたが、カルシウムイメージング解析のレベルでは ADL の温度応答性が確認された。これは、これらの多重変異体の ADL において、カルシウムイメージング解析レベルでは温度応答性が野生株と同様に観察されたとしても、例えば、詳細な電気生理学的解析を行った場合には、異常が観察される可能

性があると考えられる。

C. elegans の頭部に存在する温度上昇に応答しない味覚ニューロン ASER に OSM-9 と OCR-2 を発現させてカルシウムイメージングを行った結果、ASER の温度上昇に対する応答性が確認された (図 8)。そこで、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いて電気生理学的解析を行った結果、OSM-9 または OCR-2 を別々に導入した卵母細胞は温度上昇刺激に反応しなかったが、OSM-9 と OCR-2 を同時に導入した卵母細胞は温度上昇刺激に対して反応した (図 9、10)。これらの生理学的な解析から、OSM-9 と OCR-2 は協調して温度受容体として機能する可能性が示唆された。*osm-9* 変異体、*ocr-2* 変異体は、15°C で飼育された後に数時間 25°C に静置した後の低温耐性 (温度馴化) において異常が見られたことから、OSM-9 と OCR-2 は 15°C から 25°C の温度上昇変化を感知する温度受容体として機能し、*C. elegans* の温度馴化を負に制御することが考えられる。以前の線虫を用いたカルシウムイメージング解析より、OCR-1 が OSM-9 や OCR-2 の抑制因子として機能することが示唆されていたが、OSM-9 と OCR-2 と OCR-1 を同時に導入した卵母細胞は、OSM-9 と OCR-2 を導入した卵母細胞と同程度の温度応答性を示した。少なくとも本研究での解析においては、OSM-9 と OCR-2 の温度応答性に対する OCR-1 の影響は見られなかったため、線虫体内において、TRPV チャネルの OCR-1 による抑制的な調節には追加の因子が必要である可能性がある。

様々な動物において、TRP チャネルは同じサブタイプ (ホモ) もしくは異なるサブタイプ (ヘテロ) の複合体を形成して機能することが知られている。最初に TRP チャネルが複合体を形成することが明らかになったのは、ショウジョウバエにおいて視覚情報に関与する TRP と TRPL チャネルであり、TRP ホモ複

合体と TRP-TRPL ヘテロ複合体が協調的に光に反応して神経を活性化することが明らかとなっている (Xu et al., 1997)。TRPV ファミリーに属する TRP チャネルに関しても、例えばヒトの TRPV5 と TRPV6 はそれぞれのホモ複合体もしくはヘテロ複合体を形成して機能することが知られている (Chang et al., 2004; Hoenderop et al., 2003; Kedei et al., 2001; Woudenberg-Vrenken et al., 2012)。 *C. elegans* において、TRPV チャネルである OSM-9 と OCR-2 は AWA 感覚ニューロンで化学物質の受容、そして ASH 感覚ニューロンで機械刺激と浸透圧変化の受容に関与している。これらの感覚ニューロンにおいて OSM-9 と OCR-2 は感覚末端に共局在して機能するが、OSM-9 が欠損すると OCR-2 の感覚末端への局在が異常になるという様に、それぞれの TRPV チャネルの感覚末端への局在はもう一方の TRPV チャネルに依存している (Tobin et al., 2002)。このことから、AWA と ASH 感覚ニューロンにおいては、OSM-9 と OCR-2 はヘテロ複合体を形成して機能していると考えられている。また、 *C. elegans* の TRPV チャネルである OCR-4 は OSM-9 とヘテロ複合体を形成し、ビタミン B 群の一つであり内因性の代謝物であるニコチンアミド (NAM) を受容していることがアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的解析から明らかとなっている (Upadhyay et al., 2016)。OSM-9 もしくは OCR-4 のどちらかのみを発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞においては NAM に対する応答は見られなかった一方で、OSM-9 もしくは OCR-4 を同時に発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞においては NAM に対する応答が見られている (Upadhyay et al., 2016)。また、GFP 標識された OSM-9 と OCR-4 を使って、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF microscope: Total Internal Reflection Fluorescence microscope) を用いて行われた化学量論的解析から、

OSM-9 と OCR-4 がヘテロ複合体を形成して NAM 受容に関わることが示唆されている (Upadhyay et al., 2016)。本研究においても、OSM-9 と OCR-2 をそれぞれ単独で発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞は温度に対して反応しなかったが、OSM-9 と OCR-2 を同時に発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞は温度に対して反応が見られた (図 9、10)。またアフリカツメガエルの卵母細胞において温度刺激依存的な電流と電圧の関係 I-V を測定した際、OSM-9 と OCR-2 を同時に発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞においてのみ、典型的な TRP チャネルに見られる内向き整流性が見られた (Caterina et al., 1997; Premkumar et al., 2002; Tominaga et al., 1998) (図 11)。以前の研究と本研究から、OSM-9 と OCR-2 はヘテロ複合体を形成して機能する温度感受性 TRP であると考えられる。

OSM-9 と OCR-2 を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞の温度に対する応答は、約 25°C もしくは約 15°C から、約 35°C の温度上昇刺激を与えると同時に見られた (図 9、10)。このことから以下の二つの可能性が考えられた。つまり、「1. OSM-9 と OCR-2 の温度に対する反応閾値は 15°C 以下にある可能性」と「2. OSM-9 と OCR-2 の温度に対する反応閾値は決まっておらず、温度上昇に対して反応する可能性」である。「1. OSM-9 と OCR-2 の温度に対する反応閾値は 15°C 以下にある」という可能性は、約 25°C の状態で温度刺激を与えなくても外向き整流性を示し、これは OSM-9 と OCR-2 が少なくとも約 25°C で部分的に活性化していると考えられることによって示唆される (図 9、10)。さらに、OSM-9 と OCR-2 を導入したアフリカツメガエルの卵母細胞は、約 25°C から約 15°C の温度下降刺激を与えた時に内向き電流が少し変化した結果も、15°C 以下の低温域

に活性化閾値があることを示唆する (図 10)。OSM-9 と OCR-2 が 15°C 以下の低温域に活性化閾値を持つ場合、線虫の至適温度域である 15°C から 25°C 付近とは大きく異なるが、この違いは *C. elegans* とアフリカツメガエルの卵母細胞の間で膜脂質組成が違うことや、電気生理学的解析における細胞内と細胞外の状態によって引き起こされた可能性が考えられる。しかし、15°C 以下の低温ではアフリカツメガエルの卵母細胞が温度刺激非依存的な電流変化を示すため、技術的に検証解析を行うことができなかった。

一方で、約 15°C から約 35°C の温度上昇刺激を与えた際の電流値が、約 25°C から約 35°C の温度上昇刺激を与えた際の電流値と同程度であり、温度域にかかわらず一定の応答性を示すことから (図 10)、「2. OSM-9 と OCR-2 の温度に対する反応閾値は決まっておらず、温度上昇に対して反応する可能性」が考えられる。この場合、OSM-9 と OCR-2 は常にチャネル活性を持つ構成的活性型チャネルであると考えられ、この性質を持つことから、OSM-9 と OCR-2 を導入した卵母細胞が約 25°C の状態で温度刺激を与えなくても内向き電流が流れるリーク電流を示したと考えられる。この構成的活性の性質を示す TRP チャネルは脊椎動物などで報告されている (Yatsu et al., 2015)。この時、約 25°C の状態で見られるリーク電流は約 25°C から約 15°C の温度下降刺激を与えた時でもあまり変化していないと考えられる (図 10)。

3.2 TRPV チャネル OSM-9 と OCR-2 の活性調節

アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた解析から TRPV OSM-9 と OCR-2 が直接温度を受容している可能性が考えられた。しかし、OSM-9 と OCR-2 の温度

に対する応答性（内向き電流）は極めて低かった。この原因として卵母細胞での OSM-9 と OCR-2 の発現量が低いことや、OSM-9 と OCR-2 の膜への移行がうまくいかない可能性も挙げられるが、他の可能性として、*C. elegans* の温度受容ニューロンにおいて、未同定の TRP 以外の温度を受容する分子が OSM-9 と OCR-2 の温度応答性を増強させている可能性も考えられる。いくつかの TRP のチャンネルは、上流に存在する GPCR と G タンパク質経路によってその開口が調節されることが知られている。例えば、ショウジョウバエの光情報伝達において、GPCR であるロドプシン、その下流の Gq タイプの三量体 G タンパク質 α サブユニットとホスホリパーゼ C (PLC) が TRP と TRPL チャンネルの開口を制御していることが知られている (Bloomquist et al., 1988; Hardie and Raghu, 2001; Minke and Cook, 2002; Montell, 2005; Montell et al., 1985)。さらに細胞内に存在する多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が TRPL チャンネルを活性化することが報告されている (Chyb et al., 1999; Delgado and Bacigalupo, 2009)。またショウジョウバエの幼虫が最適な温度に向かって移動する温度走性行動は、ロドプシン、Gq タイプの G α タンパク質、PLC、そして TRPA1 チャンネルからなるシグナル伝達経路によって制御されることが報告されている (Kwon et al., 2008; Shen et al., 2011; Sokabe et al., 2016)。哺乳類においても、皮膚、胃腸や呼吸器系における侵害性、刺激性や炎症性の刺激感知に関与する GPCR~TRP 感覚シグナル伝達が報告されている (Veldhuis et al., 2015)。侵害受容ニューロンに存在する多種類の GPCR は、プロテアーゼ、ペプチド、プリンや脂質などの侵害刺激によって活性化される (Bautista et al., 2014)。この GPCR シグナルが TRP チャンネルを含む下流の経路を増幅もしくは活性化することで、GPCR シグナルを増幅もし

くは維持する。例えば、cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) またはプロテインキナーゼ C (PKC) は TRP チャネルをリン酸化して、内因性アゴニストに対する活性化閾値を低下させる (Petho and Reeh, 2012)。

TRP が GPCR シグナル伝達の下流で作用する可能性は *C. elegans* においてもいくつか報告されている。例えば、GPCR シグナル伝達に関与する分子である G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK-2) および Regulator of G protein signalling 3 (RGS-3) は、TRPV チャネル活性を直接的または間接的に調節することが示されている (Ferkey et al., 2007; Fukuto et al., 2004)。
C. elegans の AWA 化学感覚ニューロンでは、GPCR が化学物質を受容しており、下流の三量体 G タンパク質 ODR-3 および GPA-3 を介して、OSM-9 と OCR-2 チャネルを活性化する (Hilliard et al., 2004; Roayaie et al., 1998)。また、ASH 侵害受容ニューロンの G タンパク質 α サブユニット GOA-1 は、強アルカリ性 pH に対する *C. elegans* の回避行動に役割を果たし、OSM-9 と OCR-2 の上流で機能する可能性が報告されている (Sassa et al., 2013)。これらの場合、GPCR と G タンパク質共役型シグナル伝達は TRP チャネルの上流で機能すると考えられている。

3.3 網羅的な RNAi スクリーニングによる低温耐性に関わる GPCR の同定

線虫の温度受容ニューロンにおいて機能する GPCR 型の温度受容体の同定を、網羅的 RNAi スクリーニングと発現解析と、ノックアウト変異体の低温馴化異常の回復実験を組み合わせおこなった。さらに、GPCR をノックアウトした変異体における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

ング解析および、候補 GPCR を味覚ニューロンに異所的に発現させた解析から、GPCR の温度受容能が推測されたため、今後の再構成系における解析が望まれる。

4. 結語

本研究から、*C. elegans* の TRPV チャンネル OSM-9 と OCR-2 が ADL 温度受容ニューロンで直接温度を感じていることが示唆された。これまでに、*C. elegans* の低温耐性に関与する ADL 温度受容ニューロンにおいて、TRPV チャンネルである OSM-9、OCR-2 と OCR-1 が温度情報伝達に関与していることがわかってきたが、これらが温度センサーとして機能するかは知られていなかった (Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018)。また、OSM-9 と OCR-2 は *C. elegans* の感覚ニューロンにおいて浸透圧受容や化学受容などに関与するが、アフリカツメガエルの卵母細胞やヒトの培養細胞 HEK293 などを用いた電気生理学的解析においては、これらの刺激に対する応答性は見られていなかった (Colbert et al., 1997; Jose et al., 2007; Tobin et al., 2002)。しかし本研究において、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理解析から、OSM-9 と OCR-2 が温度を受容することを見つけた。また、TRPV はヒトなどでは温度センサーとして機能することが知られるが、本研究から *C. elegans* の TRPV チャンネルも温度センサーとして機能することを証明した。

本研究ではさらに、GPCR 型の温度受容体を同定するために、*C. elegans* で機能する約 1000 個の GPCR 遺伝子をノックダウンし、低温耐性を測定した。

その結果、多数の GPCR 遺伝子ノックダウン系統において低温耐性異常が確認され、それに続く解析から二つの温度受容体候補 GPCR が見つかった。今後も RNAi スクリーニングを用いることで低温耐性に関与する GPCR、そして GPCR 型温度受容体の候補が多数見つかることが期待される。今回見つかった温度受容体候補 GPCR は ADL 温度受容ニューロンの温度情報伝達に関与し、個体の低温耐性を負に制御することが示され、*C. elegans* の温度応答において GPCR が関与する初めてのケースである。なお、これまでにショウジョウバエにおいて、GPCR が温度情報伝達に関与することが示唆されているが、GPCR が直接温度を受容することは示されていない。本研究では、*C. elegans* の味覚ニューロンに温度受容体候補 GPCR を強制発現させる異所的発現解析から、GPCR が直接的に温度を受容する可能性が示唆された。今後、この GPCR を解析することが、生体内の温度センサー分子の温度応答メカニズムを解明する鍵となる可能性が考えられる。GPCR はヒトでも多数存在することから、線虫からヒトまで共通した温度応答メカニズムの解析に繋がる可能性があり、また GPCR は主要な薬剤の標的分子であるため、ヒトの温度関連疾患への応用が期待される。

アフリカツメガエルの卵母細胞とショウジョウバエの培養細胞 S2 を用いた生理学的解析において、温度受容体候補 GPCR の温度応答性は確認されなかったが、GPCR は通常セカンドメッセンジャーを介してイオンチャネルなどを活性化させるため、温度受容体候補 GPCR の下流で働く特定の分子も同時に強制発現させる必要があると考えられる。GPCR は例えばヒトでは約 800 個と多数存在し、さらに、GPCR の下流で働く三量体 G タンパク質も、ヒトでは 16 種類の $G\alpha$ 、6 種類の $G\beta$ 、12 種類の $G\gamma$ サブユニットそれぞれが様々に組み合わせられて機能

するため、潜在的に約 1000 種の組合せが存在することになる。また、1 つの GPCR が 1 つの G タンパク質に共役するだけでなく、複数の GPCR が同一の G タンパク質に共役したり、単一の GPCR が複数の G タンパク質に共役したりすることも報告されており、GPCR シグナリングは複雑であると考えられる。本研究の $G\alpha$ タンパク質の変異体の解析においても、複数の $G\alpha$ タンパク質が ADL の温度情報伝達に関与する可能性が得られており、今後の解析からこれまで明らかとなっていない GPCR を介した温度シグナリングが解明されるかもしれない。

5. 材料・方法

C. elegans の飼育方法、培地やバッファーの組成等は The Nematode *Caenorhabditis elegans* に従った (Wood and Researchers, 1988)。

使用した線虫の系統

野生株 N2 (Bristol 産)

osm-9(ky10), *ocr-2(ak47)*, *osm-9(ky10) ocr-2(ak47)*, FG125 *osm-9(ky10) ocr-2(ak47)*; *ocr-1(ak46)*, SH231 *osm-9(ky10)*; *pdrEx30[sre-1p::osm-9 cDNA::gfp*, *unc-122::DsRed]*, *srg-37(tm6880)*, *srg-37(tm6502)*, *srh-247(tm6072)*, *gcy-5(tm897)*, *glr-3(tm6403)*, *tax-4(p678)*, *srh-247(tm6072)*, *eri-1(mg366)*; *lin-15B(n744)*, N2; *Ex[sre-1p::yc3.60, rol-6(gf)]*, *osm-9(ky10)*; *Ex[sre-1p::yc3.60]*, *ocr-2(ky10)*; *Ex[sre-1p::yc3.60]*, *osm-9(ky10)*; *ocr-2(ky10)*; *Ex[sre-1p::yc3.60]*, *osm-9(ky10)*; *ocr-2(ky10)*; *ocr-1(ak46)*; *Ex[sre-1p::yc3.60, rol-6(gf)]*, N2; *Ex[flp-6p::CeG-CaMP8, gcy-5p::tagRFP]*, N2; *Ex[ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP, pBluescript II SK+]*, MT2426 *goa-1(n1134)*, NL335 *gpa-3(pk35)*, KHR040 *goa-1(n1134)*; *gpa-3(pk35)*, CE1047 *egl-30(ep271)*, DA1084 *egl-30(ad806)*, KG42 *gsa-1(ce81)*, KG518 *acy-1(ce2)*, KP1182 *acy-1(nu329)*, VC2393 *acy-2(ok3003)*, *acy-3(tm2461)*, *acy-1(pk866)*; *dpy-20(e1362)*; *pkIs296[hsp::gsa-1(Q208L), dpy-20(+)]*, NL1146 *gpa-6(pk480)*, NL787 *gpa-11(pk349)*, NL797 *gpa-15(pk477)*

本研究で作製した系統は表 5 に記載した。

大腸菌

OP-50 株：線虫の餌として NGM プレートに塗布した。

HT115 株：Feeding RNAi に使用した。

アフリカツメガエル

Xenopus laevis (Hamamatsu, Japan)

顕微鏡

透過式実体顕微鏡 SMZ800 (Nikon, Japan)

蛍光実体顕微鏡 SMZ18 (Nikon, Japan)

IX81 倒立顕微鏡 (Olympus, Japan)

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

BX61 正立顕微鏡 (Olympus, Japan)

1×M9 バッファー (1000 ml)

KH_2PO_4 3 g、 Na_2HPO_4 6 g、NaCl 5 g、滅菌水 1000 ml を混合し、121°C で 20 分加熱滅菌した後に室温になってから、1 M MgSO_4 溶液 1 ml と 10%ゼラチン溶液 2 ml を加えた。

NG バッファー (1000 ml)

NaCl 3 g、滅菌水 975 ml を混合し、121°C で 20 分加熱滅菌した後に室温になってから、1 M MgSO_4 溶液 1 ml、1 M CaCl_2 溶液 1 ml、pH6.0 に調整した

1 M KPO_4 バッファー溶液 (KH_2PO_4 と K_2HPO_4 と滅菌水を混合して作製) 25 ml を加えた。

NGM プレート (寒天培地) 4000 ml

MADIA CLAVE10 (INTEGRA Biosciences, Switzerland) を用いて作製した。NaCl 12 g、伊那寒天 (伊那食品工業株式会社、日本) 80 g、Bacto Peptone (Becton Dickinson, USA) 10 g、DW 3900 ml を混ぜ、 121°C で 20 分間加熱滅菌した。その後、 60°C に保温された溶液に Cholesterol (5 mg/ml in EtOH) 1 ml、1 M CaCl_2 溶液 1 ml、1 M MgSO_4 溶液 1 ml、pH6.0 に調整した 1 M KPO_4 バッファー溶液 25 ml を加えた。これを直径 3.5 cm のシャーレに 6 ml ずつ、直径 6 cm のシャーレに 14 ml ずつ電動分注機 (FH-10SS; 株式会社ヒラカワ、日本) で分注し、溶液が固まるまで静置した。

忌避行動テスト用プレート (寒天培地) 1000 ml

MADIA CLAVE10 (INTEGRA Biosciences, Switzerland) を用いて作製した。伊那寒天 (伊那食品工業株式会社、日本) 20 g、滅菌水 1000 ml を混合し、 121°C で 20 分加熱滅菌した。その後、 60°C に保温された溶液に 1 M CaCl_2 溶液 1 ml、1 M MgSO_4 溶液 1 ml、pH6.0 に調整した 1 M KPO_4 バッファー溶液 25 ml を加えた。これを直径 10 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、溶液が固まるまで静置した。

アンピシリン入り LB プレート (寒天培地)

滅菌水 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 を混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。攪拌しながら約 50°C に冷まし、アンピシリン (100 mg/ml) 1000 μ l を加えた。これを直径 9 cm のシャーレに約 12 ml ずつ分注し、固まるまで静置した。

LB 液体培地 (200 ml)

滅菌水 200 ml、LB Broth Lennox (Becton Dickinson, USA) 4 g を混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。

C. elegans 凍結保存用 Freezing Solution (2000 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、滅菌水で 2000 ml までメスアップした。これを加熱滅菌した後に 1 M MgSO₄ 溶液 1.3 ml を加えた。

低温耐性テスト

低温耐性テストは過去の論文を参考にして行った (Ohta et al., 2014)。実験には餌である大腸菌 OP50 が塗布された直径 3.5 cm の 2% (w/v) NGM プレートを使用し、餌を十分に与えた *C. elegans* を用いた。20°C で飼育した *C. elegans* を、1 個体ずつ (変異体によっては 2~4 個体ずつ) 新しい NGM プレートに置く (P₀)。NGM プレートにはパラフィルムを巻く。各飼育条件 (15、20、25°C) で 12~20 時間飼育し産卵させた後に、発生段階を揃える為に P₀ を取り除き、卵 (F₁)

が成虫期になるまで各飼育温度で飼育した(15°Cで 144-150 h、20°Cで 85-90 h、25°Cで 60-65 h)。NGM 寒天培地の寒天側を下に向けた状態で 20 分間氷上に置いた後 2°Cのインキュベーター (CRB-41A; Hitachi, Japan) に 48 時間静置し低温刺激を与えた。低温刺激後 15°Cに移し一晩静置した後、生存個体と死滅個体を実態顕微鏡下で数え、各プレートの生存率を算出した。1 回の実験には 3 サンプル以上を用意し、異なる日に 3 回以上、つまり計 9 サンプル以上の平均値を比較した。

飼育温度をシフトさせた後の低温耐性 (温度馴化) テスト

飼育温度をシフトさせた後の低温耐性 (温度馴化) テストは過去の論文を参考にして行った(Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2016; Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2014)。実験には餌である大腸菌 OP50 が塗布された直径 3.5 cm の 2% (w/v) NGM プレートを使用し、餌を十分に与えた *C. elegans* を用いた。最初の温度条件 (15°Cもしくは 25°C) で 12~20 時間飼育し、産卵させた後に、発生段階を揃える為に P₀を取り除き、卵 (F₁) が成虫期になるまで各飼育温度で飼育した(15°Cで 144-150 h、20°Cで 85-90 h、25°Cで 60-65 h)。そのプレートを次の温度条件 (25°Cもしくは 15°C) に移し、0、3 または 5 時間静置したのちに低温刺激を与えた。2°Cのインキュベーター (CRB-41A; Hitachi, Japan) に 48 時間静置した後に、15°Cに移し一晩静置した後、生存個体と死滅個体を数え、各プレートの生存率を算出した。1 回の実験には 3 サンプル以上を用意し、異なる日に 3 回以上、つまり計 9 サンプル以上の平均値を比較した。図 4B で示す温度馴化テストにおける野生株の生存率は、図 5 で示す温度馴化テス

トにおける野生株の生存率と比べて高かった。これは、図 4 で示す温度馴化は冬から春にかけて行い、図 5 で示す温度馴化は雨季にかけて行ったため、季節による湿度の違いおよび他の未知の要因が低温耐性・温度馴化に影響を与えることによって引き起こされた可能性がある。この可能性については過去に公表された論文においても同様の考察がなされている (Ohnishi et al., 2020; Sonoda et al., 2016; Ujisawa et al., 2014)。

Feeding RNAi

Ahringer 博士の研究グループにより作製された、*C. elegans* feeding RNAi 用の大腸菌 (HT115 株) ライブラリーを用いた (Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003)。Ahringer 博士らは、*C. elegans* ゲノム中の大部分の遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現させるプラスミドライブラリーを作製し、それらの個々のプラスミドを保持した HT115 由来の大腸菌系統を作製している (Fraser et al., 2000; Kamath et al., 2003)。これら的大腸菌には、2つの T7 プロモーターで挟まれた特定遺伝子に対応する 500 bp から 2.5 kb の二本鎖 RNA 配列を持つプラスミドが導入されている。大腸菌 HT115 株は IPTG 誘導性 T7 ポリメラーゼを持ち、IPTG の存在下において、各ライブラリー株が持つ各々のプラスミドがコードしている *C. elegans* の特定の遺伝子に対する二本鎖 RNA を発現させる。なお、HT115 株は、二本鎖 RNA を切断する酵素を発現させる RNase III 遺伝子を破壊した大腸菌株であるため、大腸菌内で発現した二本鎖 RNA が RNase III によって切断分解されることはない (Timmons et al., 2001)。RNAi 用の大腸菌ライブラリーは普段 -80°C で冷凍保存してある。使用時には -80°C から解凍し、

「アンピシリン(Amp)とテトラサイクリン(Tet)の入った LB」寒天プレートに塗布し、37°Cで一晩培養する。二本鎖 RNA を発現させるプラスミドにはテトラサイクリン耐性遺伝子が含まれているため、プラスミドを持つ大腸菌のみが培養される。翌日に「LB+Amp」液体培地 3 ml に植菌し、37°Cで約 5 時間培養後、2 ml チューブに 1.8 ml ずつ分注する。10,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を捨てた後に、LB+Amp+IPTG (LB 10 ml につき Amp 10 μ l、IPTG 12 μ l) を 600 μ l 加えて大腸菌を溶解する。それを NGM+Amp+IPTG プレート 8 枚に均等に分注して室温で一晩おく。IPTG により大腸菌 HT115 株が持つ T7 ポリメラーゼが誘導され、*C. elegans* の遺伝子を RNAi するための二本鎖 RNA が転写される。プレートに大腸菌が生えたら、2 枚の NGM+Amp+IPTG プレートにそれぞれ約 30 個体の L4 幼虫～成虫の線虫をのせ、20°Cで一晩飼育する。その 2 枚の培地から 5 個体ずつを、残りの NGM+Amp+IPTG プレート 6 枚に置き 20°Cで一晩卵を産ませたあと、発生段階を揃えるために線虫を取り除く。20°Cで 3 日間成虫になるまで飼育したのちに、低温耐性テストを行う。

2%アガロースゲルパッド

マイクロインジェクション用:イオン交換水 2.4 ml、Agarose 1200 (PH Japan, Japan) 0.05 g を 15 ml プラスチックチューブ内で混合し、水の入った 100 ml ビーカーに入れて電子レンジで加熱した。アガロースが溶解したら 15 ml プラスチックチューブを温めながら、パストゥールピペットで 24×48 カバーガラスに滴下し、上からさらに 24×48 カバーガラスをかぶせた。アガロースが固まったら片方のカバーガラスを外し、アガロースゲルがついたカバーガラスを

60℃で1時間乾熱滅菌した。

倒立顕微鏡を用いた蛍光観察用：M9 バッファー 5 ml、Agarose 1200 (PH Japan, Japan) 0.1 g を 15 ml プラスチックチューブ内で混合し、水の入った 100 ml ビーカーに入れ電子レンジで加熱した。アガロースが溶解したら 15 ml チューブを温めながら、パスツールピペットでスライドガラスに滴下して上からさらにスライドガラスをかぶせた。

正立顕微鏡や倒立顕微鏡を用いたカルシウムイメージング用：M9 バッファー 5 mL、Agarose 1200 (PH Japan, Japan) 0.1 g を 15 ml チューブ内で混合し、水の入った 100 ml ビーカーに入れ電子レンジで加熱した。アガロースが溶解した後に、15 ml プラスチックチューブを温めながら、パスツールピペットで 24×24 カバーガラスに滴下し、上からさらに 24×24 カバーガラスをかぶせた。この時、スライドガラスとカバーガラスを用いて作成したアガロースゲルパッドが、カバーガラス一枚分の厚さになるようにするための道具を用いた。

マイクロインジェクションによる遺伝子導入

C. elegans への遺伝子導入と遺伝子導入系統の作製は、過去の論文をもとに行った (Mello et al., 1991)。線虫の生殖巣に DNA 断片を導入すると、細胞質において互いに結合し、ひとつの染色体様の構造である染色体外アレイ (Extrachromosomal array) を形成する。この Extrachromosomal array は卵の形成時に核へと取り込まれ、ある頻度で複製・分配を行いながら次世代に伝達される。*C. elegans* の生殖巣への DNA のマイクロインジェクションの手順として、まずアガロースゲルパッドにミネラルオイルを滴下し、餌がついていない線虫

を置き、*C. elegans* をアガロースゲルパッドに接着させる。顕微鏡下で *C. elegans* の生殖巣に DNA 溶液を入れたガラス針を刺し、目的の DNA 溶液をそれぞれ 5~100 ng/ μ l と、マーカー遺伝子として pKDK66 *ges-1p::nls::gfp* のプラスミド溶液を 50 ng/ μ l と pAK62 *AIYp::gfp* のプラスミド溶液を 30 ng/ μ l、または pRF4 *rol-6(gf)* のプラスミド溶液を 20-30 ng/ μ l 注入する。遺伝子導入されたトランスジェニック個体は、マーカー遺伝子により腸と AIY 介在ニューロンの GFP 蛍光、もしくは回転する動きが観察される。遺伝子を導入した線虫を、M9 バッファーを用いて新しい NGM プレートに回収し (2 worms/plate)、20°C or 23°C で飼育した。3 日後に F₁ 世代でマーカー遺伝子が発現した際の個体の表現型を指標に、1 個体ずつ新しい NGM プレートに移し、20°C で飼育した。自家受精により次世代を産ませ、F₂ 世代でもマーカー遺伝子の発現やその際の表現型が確認できた個体を遺伝子導入系統として残した。

共焦点顕微鏡解析を用いた細胞の蛍光観察

アガロースゲルパッドに 100 mM アジ化ナトリウム (NaN₃) 溶液を 10 μ l 滴下し、その上に 5~6 匹の *C. elegans* を置き、カバーガラスをかけた。共焦点顕微鏡 (FV1000, GaAsP PMT) で観察し、FV10-ASW software (Olympus Corporation, Japan) で解析した。

Dye filling 法

橙赤色蛍光の分子プローブ DiI を用いた。DMF に溶解した 5 mg/ml DiI ストック溶液を M9 バッファーで 20 倍希釈して使用する。観察したい *C. elegans*

を希釈した DiI 溶液に浸して、室温で 20~30 分静置した後に、新しい NGM プレートに *C. elegans* を移して 1 時間以上置く。これにより余分な DiI や腸にたまった DiI を取り除く。その後、共焦点顕微鏡で観察する。

CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウト

手順の詳細は本論文の結果の項目に記載した。遺伝子のエクソン内に 3' GG が存在する遺伝子に関しては、任意の変異を遺伝子内に挿入できる CRISPR/Cas9 による相同組換えを利用した方法を用い、遺伝子のエクソン内に 3' GG が存在しないもの、もしくは前者の方法でうまくいかなかったものに関しては 2 つの gRNA を使用して遺伝子内に欠失を起こさせる方法を用いた。

in vivo カルシウムイメージング

既に公表されている方法を参考に *in vivo* カルシウムイメージング解析を行った (Kuhara et al., 2011; Ohnishi et al., 2011)。アガロースゲルパッドに *C. elegans* を 4 個体置き、医療用アロンアルファ A (第一三共株式会社、日本) で *C. elegans* 頭部の先端を塞がないように頭部咽頭筋付近と尾部あたりを接着する。M9 バッファーを滴下し、蒸発を防ぐために丸型カバーガラスをかけて、その縁にマニキュアをぬり封入した。サンプルを IX81 顕微鏡もしくは BX61 顕微鏡 (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。ガラスプレートの温度はカスタメイド温度制御装置 (Tokai Hit, Japan) によって制御した。蛍光は Dual-View (Molecular Devices, San Jose, CA) もしくは Split-view model の CSU-W1

(Yokogawa Electric Corporation, Tokyo, Japan) を用いて観察した。カルシウムインディケータとして遺伝子によってコードされたイエローカメレオン (YC3.60) と GFP-calmodulin fusion protein (G-CaMP8) を用いた。YC3.60 は、藍色蛍光タンパク質 CFP、カルモジュリン CaM の EF ハンドドメイン、ミオシン軽鎖キナーゼの CaM 結合部位 (M13)、そして黄色蛍光タンパク質 YFP が連続して結合しているキメラタンパク質である。YC3.60 は、440 nm をピークとする励起光を照射した時に、細胞内カルシウム濃度が低い場合には約 480 nm をピークとした藍色の蛍光が増大する。一方で、細胞内カルシウム濃度が上昇すると、YC3.60 内の立体構造が変化して CFP と YFP が隣接することにより FRET と呼ばれるエネルギー移動が起こるようになるため、440 nm の励起光を照射した時に、約 535 nm をピークとする黄色の蛍光を発するようになる。この黄色と藍色の蛍光比をとることで細胞内カルシウム濃度の変化を定量化する。G-CaMP8 は緑色蛍光タンパク質 GFP に、カルモジュリン CaM とカルモジュリン結合部位であるミオシン軽鎖キナーゼフラグメント M13 を結合させたキメラタンパク質である。カルシウムイオンが存在すると CaM と M13 が結合することによって GFP の立体構造が変化し、GFP の蛍光強度が増強される。蛍光強度の変化をカルシウム濃度の変化として検出する。本研究では、G-CaMP8 とカルシウム濃度によって蛍光強度が変化しない赤色蛍光タンパク質である tagRFP を標的細胞で共発現させ、G-CaMP8 の緑色と tagRFP の赤色の蛍光比を計算することで細胞内カルシウム濃度の変化を定量化した。また蛍光比をとることでタンパク質自体の温度感受性をほぼ無視することができる。本研究では、ADL に YC3.60 を発現誘導するプラスミドである pTOM063 *sre-1p::yc3.60* (Ujisawa et al., 2018) と、ASER 特異的

に線虫用にコドン最適化された G-CaMP8 を発現誘導するプラスミド pMIU34 *flp-6p::CeG-CaMP8* (Takagaki et al., 2020)、ASER 特異的に赤色蛍光タンパク質 tagRFP を発現誘導するプラスミド pK0B006 *gcy-5p::tagRFP* (Kobayashi et al., 2016) を使用した。 *osm-9* 変異体、 *ocr-2* 変異体、 *osm-9 ocr-2* 変異体、そして *osm-9 ocr-2; ocr-1* 変異体の ADL 温度受容ニューロンに YC3.60 を発現させた系統は以前に作製され、公表されている (Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018)。 YC3.60 の Acceptor/Donor (黄色蛍光/藍色蛍光) もしくは G-CaMP8 と tagRFP の Acceptor/Donor (緑色蛍光/赤色蛍光) のそれぞれの蛍光は、EM-CCD カメラ EVOLVE512 (Teledyne Photometrics, Tucson, AZ、EM ゲイン 10~300、露光時間 10~300 ms、1×1 binning) もしくは iXon Ultra 888 (Oxford Instruments, Abingdon, UK、露光時間 10~300 ms)、によってそれぞれ同時に 1 秒ごとに 300 回撮影した。それぞれの画像の蛍光強度は MetaMorph Image Analysis System (Molecular Devices, USA) により解析を行った。それぞれの解析に用いるカルシウムインディケータは以前の研究に従って選択した (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2019; Takagaki et al., 2020; Takeishi et al., 2016; Ujisawa et al., 2018)。 YC3.60 は ADL 感覚ニューロンなどの低温耐性を制御する温度受容ニューロンのカルシウムイメージングに使用されている (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2019; Ujisawa et al., 2018)。 G-CaMP8 は YC3.60 と比べてカルシウムに対する感受性が高いことから、ASER 味覚ニューロンを用いた温度受容体の異所的発現解析に使用されている (Takagaki et al., 2020; Takeishi et al., 2016)。

図 7A、B で示すカルシウムイメージング解析において、ADL の温度に対

する応答性は、図 6 で示すカルシウムイメージング解析における ADL の温度に対する応答性と比べて低下していた。これは図 6 で示すカルシウムイメージング解析は冬から春にかけて行ったのに対して、図 7A、B で示すカルシウムイメージング解析は雨季にかけて行ったため、温度馴化と同様に、季節による湿度の違いおよび他の未知の要因によって引き起こされた可能性がある (Sonoda et al., 2016; Ujisawa et al., 2014)。

変異体が示す温度馴化異常の回復実験

本研究で用いた変異体が示す温度馴化異常を回復させる解析において、野生株ゲノムに存在する目的の遺伝子を含む DNA 領域を PCR 法で増幅した二本差 DNA フラグメント、もしくは細胞特異的なプロモーターに繋いだ cDNA を、温度馴化異常を示す変異体の生殖巣にマイクロインジェクションで導入し、トランスジェニック系統を作製した。マイクロインジェクションのマーカースとして腸と AIY ニューロンに GFP を発現させるプラスミドを導入した。

このトランスジェニック系統を 15°C で飼育して卵を産ませ、15°C で飼育後 4 日目にマイクロインジェクションのマーカースである GFP の蛍光を有している個体のみを新しい NGM プレートに約 40 匹ずつ拾い、6 日目に温度シフトしたのちに低温刺激を与えた。作製したトランスジェニック系統に加えて野生株などのコントロール系統も同時に温度馴化テストを行い、温度馴化異常を示す変異体の温度馴化の表現型が、トランスジェニック系統において、野生株と同程度まで回復しているかどうかを解析した。

ヒートショックによる雄の取得

C. *elegans* は通常、大部分が雌雄同体であるが、熱ショックなどにより雄が発生しやすくなる。発生した雄を雌雄同体と交配することで、遺伝学解析を簡便に行える。雄を取得する方法としては、まず、雄を取得したい系統の L4 幼虫 (P₀) を 1 枚の NGM プレートにつき 3 匹ずつ置いたものを 10 プレート作製し、30°C の高温刺激を 8 時間与える。その後に、それらのプレートを 20°C に静置し、3 日間飼育したのちに各プレートから雄 (F₁ 世代) を見つけ出す。この雄を交配実験に使用することも可能であるが、雄の数が少ないことも多いため、得られた雄を雌雄同体と交配し、雄を増やすこともある。雄と雌雄同体との交配には、NGM プレートの中心にだけ少量の大腸菌 OP50 をはやしたメイティングプレートを用いる。1 枚のメイティングプレートには、4 匹の雄と 2 匹の雌雄同体 (野生株や目的とする変異体系統など) を置き、15°C で 2 日間交配させた。雌雄同体を新しい NGM プレートに植え継いで、20°C で 3 日間飼育して雄がいるかを確認し、交配の成功を確認する。交配が成功すると F₂ 世代に 50% の確率で雄が発生する。

遺伝子変異をヘテロで維持した状態での交配を繰り返す戻し交配 (例: *srh-247(tm6072)*)

遺伝子変異をヘテロで維持した状態での戻し交配を、*srh-247(tm6072)* 変異を例に記載する。*srh-247* 遺伝子は V 番染色体に位置し、*tm6072* 変異は欠失変異であり、PCR 法により変異のホモとヘテロを容易に区別できる。

srh-247(tm6072) 変異体 (遺伝型: *tm6072/tm6072*) の雌雄同体と野生

株 N2 (遺伝型: +/+) の雄 (P₀) を交配させると、*tm6072* 変異のヘテロ個体 (遺伝型: *tm6072/+*) が得られる (F₁)。次に、F₁ ヘテロ個体の雄 (遺伝型: *tm6072/+*) と野生株 N2 の雌雄同体 (遺伝型: +/+) を交配させると、遺伝型が「*tm6072/+*」または「+/+」の雄が生まれる (F₂)。この段階では各雄個体の遺伝型は見た目の表現型だけでは分からないため、ヘテロ個体を含む F₂ 世代の雄 (遺伝型: *tm6072/+* または +/+) の約 4 個体を 1 個体ずつ、それぞれ別々のメイトングプレートに分離し、そのプレートに野生株 N2 の雌雄同体 (遺伝型: +/+) を 2 個体置く。このプレートを 15°C で 2 日間静置し、その後に、始めにプレートに入れた F₂ 世代の雄のみを回収して、PCR 法で遺伝型が *tm6072/+* と +/+ のどちらであるかを確認する。PCR 解析の結果、遺伝型が *tm6072/+* であった F₂ 世代の雄の入っていたメイトングプレートのみを残す。このプレートでは、F₂ 世代のヘテロ個体の雄 (遺伝型: *tm6072/+*) が野生株 N2 の雌雄同体 (遺伝型: +/+) と交配し、F₃ 世代で *tm6072/+* と +/+ 型の雌雄同体が生まれる (F₃)。F₃ の雌雄同体 (遺伝型: *tm6072/+* または +/+) を自家受精させると *tm6072/tm6072*, *tm6072/+*, +/+ の各遺伝型を持つ個体 that 得られる (F₄)。それぞれの F₄ 個体からゲノムを採取し、PCR 法で *tm6072* 変異の有無を確認し、遺伝型が *tm6072/tm6072*, *tm6072/+* もしくは +/+ のいずれであるかを検出し、*tm6072* 変異のホモ系統を獲得する。本研究で用いた *srh-247* 変異体と *glr-3* 変異体について、上記の操作で戻し交配を行った。

多重変異体作製 (例: KHR77 *str-45(chr2) str-92(chr6)*)

多重変異体の作製方法を *str-45(chr2) str-92(chr6)* 二重変異体を例に記す。*str-45(chr2)* 変異体は、V 番染色体の 7.48 cM 付近に位置する *str-45*

遺伝子のエクソン内に終止コドンを生じるナンセンス変異を持つ系統である。点変異であるため、変異は PCR-RFLP によって検出できる。*str-92(chr6)*変異体は、V 番染色体の 13.01 cM 付近に位置する *str-92* 遺伝子のエクソン内に欠失変異を持つ系統である。欠失変異であるため、PCR 法で変異を検出できる。

これらの二重変異体を作製するために、*str-92(chr6)*変異体の雌雄同体と *str-45(chr2)*の雄を交配させる (P_0)。 *str-45(chr2)*変異と *str-92(chr6)*変異は共に V 番染色体上にあるため、 F_1 世代において、*chr6* 変異と *chr2* 変異のヘテロ個体 (遺伝型: + *str-92(chr6)* / *str-45(chr2)* +) が生まれる (F_1)。 *str-45* 遺伝子と *str-92* 遺伝子間の V 番染色体上での遺伝学的な距離は、約 5.5 cM であるため、約 5.5%の確立でこの 2 つの遺伝子間で組み替えが起きる。そのため、*chr6* 変異と *chr2* 変異のヘテロ雌雄同体 (遺伝型: + *str-92(chr6)* / *str-45(chr2)* +) (F_1) を自家受精させると、 F_2 世代において、少なくとも片側の染色体の遺伝型が *str-45(chr2) str-92(chr6)* となる確率は、組み替え価を p とすると $p-(p^2/4)$ であり、 $p=0.05$ とすると $p-(p^2/4)=0.05$ であるため、約 5%である。つまり、18.2 個体に 1 個体の割合で片側の染色体の遺伝型が *str-45(chr2) str-92(chr6)* となる (F_2)。そこで、 F_2 個体の約 40 個体をそれぞれ別々の NGM プレートに移し、一晚卵 (F_3) を産ませる。その後、それぞれの F_2 個体を回収し、各々のゲノムを採取して、PCR と PCR-RFLP 法 (制限酵素: NheI) を用いて遺伝子型を判別する。 F_2 個体の遺伝型において、*str-45(chr2)* がホモかつ *str-92(chr6)* がヘテロの個体 (遺伝型: *str-45(chr2) str-92(chr6)* / *str-45(chr2)* +)、もしくは *str-92(chr6)* がホモかつ *str-45(chr2)* がヘテロの個体 (遺伝型: *str-45(chr2) str-92(chr6)* / + *str-92(chr6)*) を見つける。なお、それぞれの変異が

ホモとなる個体が単離される確率は $p^2/4$ =約 0.06%と小さいため無視する。目的の遺伝型を示す F_2 個体を見つけた後に、その F_2 個体から生まれた F_3 世代の卵や幼虫が存在する NGM プレートのみを残し、それらのプレートから各 5~6 匹の F_3 個体を、それぞれ別々の NGM プレートに移し、一晚卵 (F_4 世代) を産ませる。その後、それぞれの F_4 個体を回収し、各々のゲノムを採取して、PCR と PCR-RFLP 法(制限酵素: NheI) を用いて遺伝子型を判別し、*str-45(chr2)* と *str-92(chr6)* が共にホモの個体(遺伝型: *str-45(chr2) str-92(chr6)/str-45(chr2) str-92(chr6)*)を残す。その個体の子孫を二重変異体のホモ系統とする。その他の多重変異体については、染色体が異なるものに関しては、上記の操作における組み替え価をゼロとして計算し、同様の手順を行う。

表現型を指標とした戻し交配 (*srd-48(chr7)*)

CRISPR/Cas9 を用いて *srd-48* 遺伝子のノックアウト系統を作製し、*srd-48* 遺伝子の第 3 エクソン内に終止コドンと 4-24 bp の挿入変異を持つ 3 系統 KHR70 *srd-48(chr7)*、KHR71 *srd-48(chr8)* と KHR72 *srd-48(chr9)* を獲得した。これらの系統に関して、20°C 飼育後の低温耐性を測定したところ、KHR70 *srd-48(chr7)* においてのみ野生株と比べて低温耐性が上昇する異常が見られた。*srd-48* 遺伝子をノックアウトした 3 系統はそれぞれほぼ同じ変異を持つにもかかわらず、KHR70 *srd-48(chr7)* においてのみ低温耐性の異常が見られたのは、CRISPR/Cas9 によって *srd-48* ではない遺伝子が破壊される、CRISPR/Cas9 のオフターゲット効果によると考えられた。その場合、一つの可能性として、GPCR 遺伝子である *srd-48* と相同性の高い他の GPCR に CRISPR/Cas9 法に用いるカイド

RNA が結合して、その GPCR をロックアウトしたため、低温耐性異常が生じた可能性を考えた。そこで、KHR70 *srd-48(chr7)*において見られた低温耐性異常の原因となる遺伝子を同定するために、表現型を指標とした戻し交配を行って原因となる遺伝子変異以外の変異を取り除いたのちに、次世代 DNA シーケンサーを用いてその変異部位を同定しようと考えた。

*srd-48(chr7)*変異体の雌雄同体と野生株 *N2; ExUDA17[pAK62 AIYp::gfp, pKDK66 ges-1p::NLS::gfp]*の雄(P_0)を交配させると、 F_1 世代で低温耐性異常に関わる目的変異のヘテロ接合体で GFP の蛍光を腸と AIY 介在ニューロンで発する個体を得られる。 F_1 世代の雌雄同体を自家受精させると F_2 世代において野生型と、低温耐性異常に関わる変異がホモもしくはヘテロの個体を得られる。 F_2 世代の 20 個体をそれぞれ別々の NGM プレートに移し、一晚卵(F_3)を産ませる。その後、それぞれの F_2 個体をそれぞれ別々の NGM プレートに移し、一晚卵(F_3)を産ませたプレートを用いて低温耐性テストを行った。遺伝学的には、1/4 の確率で目的変異のホモ個体が現れるため、目的変異が劣性変異である場合は 1/4 の確率で低温耐性に異常が見られる系統が得られる。低温耐性に異常が見られた F_3 個体の子孫を獲得し、次世代 DNA シーケンス解析に用いた。次世代 DNA シーケンサーを用いて、KHR70 *srd-48(chr7)*のゲノム配列を決定したところ、アミノ酸置換などを含む変異が、約 15 個存在していた。しかし、その中には GPCR 遺伝子は含まれていなかったため、これ以上の解析は行わなかった。

次世代 DNA シーケンス用ゲノム DNA の採取

卵を持つ *C. elegans* を 3 匹置いた 6 cm の NGM プレートを 20 枚作製す

る。15°Cで8日もしくは20°Cで5日飼育したのちに、NGMプレートに滅菌水 800 μ l を入れ、その滅菌水と共に *C. elegans* を 15 ml プラスチックチューブに回収する。これ以降の操作は氷上で行なう。*C. elegans* が底に沈むのを確認してから上清の水を捨て、その上に滅菌水 4 ml を加える。この操作を3回繰り返して餌である大腸菌を洗い流す。上清を捨てたのちに滅菌水 1 ml を加え、線虫を 1.5 ml チューブに回収し、14,000 rpm・3分・4°Cで遠心し、上清を取り除く。細胞膜を破壊するために Cell Lysis Solution (QIAGEN, Genra Puregene Tissue kit) 600 μ l を加え、1.5 ml チューブを数回反転させて混合する。次に、DNA 分解酵素である DNAase を破壊するために 20 mg/ml Puregene Protein K 3 μ l を添加し、チューブを 25 回ほど反転させて混合する。3時間から一晩 55°Cに置き、その間に何度か反転させて混合しながら *C. elegans* を完全に溶解させる。*C. elegans* の溶解を確認したら、RNase A Solution (QIAGEN, Genra Puregene Tissue kit) 3 μ l を加え、チューブを 25 回ほど反転させて混合し、1時間 37°Cで静置する。37°C静置後、氷上に1分静置したのちに Protein Precipitation Solution (QIAGEN, Genra Puregene Tissue kit) 200 μ l を添加し、ボルテックスで20秒間混合する。14,000 rpm・3分・4°Cで遠心することでタンパク質を沈殿させ、上清のみを新しい 1.5 ml チューブに回収する。新しいチューブにイソプロパノール 600 μ l を入れ、そこに先ほど回収した上清を加え、50回ほどチューブを反転させて緩やかに混合した。13,000~16,000 rpm・1分・4°Cで遠心し、DNAの白い沈殿を吸わないように注意して上清を捨てる。10~15分室温で乾燥させ、沈殿が完全に乾燥したところで DNA Hydration Solution (QIAGEN, Genra Puregene Tissue kit) 100 μ l を加えて懸濁し、65°Cで

1 時間静置して DNA を溶解する。Microdrop (Thermo Fisher Scientific, USA) によって精製した DNA の濃度を計測し、吸光度 260/280 を算出する。吸光度 260/280 は DNA や RNA の純度を大まかに調べることができ、吸光度 260/280 が 1.8~2.0 に収まっているタンパク質などの残留が少なく純度が高いと言える。この DNA 溶液の濃度を 100 ng/ μ l に調整し、100 μ l を次世代 DNA シーケンス解析に用いる。

In-Fusion

制限酵素処理もしくは PCR によって増幅した線状ベクターDNA の両側それぞれの末端配列に相同な 15 塩基を、目的の DNA 断片を増幅するためのプライマーの 5' 側にそれぞれ付加し、目的の DNA 断片を PCR で増幅した (インサート DNA)。ベクターDNA とインサート DNA を 50 ng : 100-150 ng の割合で混ぜ合わせ、5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara Bio, Japan) 2 μ l を加え、最終溶液量が 10 μ l になるように DW でメスアップした。この In-Fusion 混合液を 50°C・15 分で静置した。

ライゲーション (エレクトロポレーション用)

同じ制限酵素で処理をしたベクターDNA とインサート DNA を 50 ng : 100-150 ng の割合で混ぜ合わせ、溶液量が 2.5 μ l になるように DW でメスアップした。そこに Electro Ligase Reaction バッファー (New England Biolabs, Japan) 2.5 μ l と Electro Ligase (New England Biolabs, Japan) 0.5 μ l を加えてピペッティングで混合し、室温 25°C で 30 分間静置した。

ライゲーション（ヒートショック用）

同じ制限酵素で処理をしたベクターDNA とインサート DNA を 50 ng : 100-150 ng の割合で混ぜ合わせ、ベクターDNA とインサート DNA の合計量の半分の量の Ligation high Ver. 2（東洋紡、日本）を加えた。15°C インキュベーターで 30 分間静置した。

エレクトロポレーションによる DNA の大腸菌への形質転換

-80°C に保管してある大腸菌コンピテントセル DH10 β （エレクトロポレーション用）を氷上で溶かした。DH10 β が溶けた溶液 20 μ l にプラスミド DNA もしくはライゲーション後の溶液を 2 μ l 入れて混ぜ、冷やしておいたキュベットに泡立たないように入れた。キュベットについた水分を丁寧に拭き取り、MicroPulser（Bio-Rad, USA）のフォルダーにキュベットを挿入し、「Setting」を「Bacteria」に設定し、「Pulse」と書かれたボタンを機械音が鳴るまで押した。その後、200 μ l の LB 液体培地を用いてキュベットからコンピテントセルを回収し、50 μ l ~ 200 μ l をアンピシリン入り LB プレートに塗布して 37°C で一晩培養した。

ヒートショックによるプラスミド DNA の大腸菌への形質転換

-80°C に保管してある大腸菌コンピテントセル DH10 β （ヒートショック用）を氷上で溶かした。コンピテントセル 50 μ l にプラスミド DNA もしくはライゲーション後の溶液を 5 μ l 入れて混ぜ、42°C・40 秒のヒートショックを与

えた。氷上に2分間静置した後、全量をアンピシリン入りLBプレートに塗布して37°Cで一晩培養した。

1-オクタノールに対する忌避行動テスト

忌避行動テストは過去の論文に従って行った(Kimura et al., 2010; Troemel et al., 1997)。餌を十分に与え、卵を持った *C. elegans* を直径 3.5 cm の NGM プレートに1個体のせ、20°Cで16~20時間飼育し、約40-180匹の卵を産ませる (P_0)。発生段階を揃える為に P_0 は取り除き、卵 (F_1) が成虫期になるまで20°Cで85-90時間飼育した。忌避行動テストには化学走性テストと同様の、直径9.0 cmの化学走性用プレート(2%アガロース, 1 mM $MgSO_4$ 溶液, 1 mM $CaCl_2$ 溶液, 25 mM K_3PO_4 溶液 (pH 6.0)) を用いる。化学走性用プレートを油性ペンで12区画(#1-12)に等分する線を引く。NGMプレート中の成虫をNGバッファーで試験管に回収する。*C. elegans* が試験管の底に十分沈んだら上清を除いてNGバッファーを加える。大腸菌を取り除くためにこれを2回繰り返して洗浄を行う。上清を取り除き、プレートの中央に *C. elegans* を滴下した後、キムワイプで水分を吸いとる。*C. elegans* を滴下した位置を油性ペンでマークする。区画#3と#4の間の線上2箇所に分けて1-オクタノールをそれぞれ3 μ l ずつ滴下する。12分間静置した後、化学走性テストプレートを開け、蓋にクロロホルムを入れ、再度蓋を閉めて線虫を死滅させてから、プレート中の各区画に存在する *C. elegans* の数を数える。下記の計算式に当てはめて Avoidance index を算出した(図24)。この時、線虫をテストプレートに滴下し油性ペンでマークした位置から動いていない個体は計算に入れない。1回の実験には3プレート以上を用意し、異

なる日に3回以上、つまり計9プレート以上の平均値を比較した。

Avoidance index = $\sum WiNi/N$, [Wi: -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)] (Ni: 各区画の線虫の数)、(N: 全区画の線虫の数)

アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学解析

これまでに公表されている方法を参考に行った(Saito et al., 2011)。使用したアフリカツメガエル *Xenopus laevis* (Hamamatsu, Japan) の雌を18°C~20°Cで飼育する。卵母細胞に発現させる遺伝子のcDNAを、アフリカツメガエル由来の β -globin遺伝子の5' UTRと3' UTR (untranslated region) 配列を含んだpOX(+)-ベクターに導入した。これを任意の制限酵素を用いて線状にしたのちにmMESSAGE MACHINE SP6 kit (Ambion) を用いて、アフリカツメガエル由来の β -globin遺伝子の5' UTRと3' UTRの間に目的遺伝子のcDNAに対応するRNA配列が挟まれたRNA (cRNA: complementary RNA) を作製した。成熟したアフリカツメガエルの雌から卵母細胞を摘出し、コラゲナーゼA (Roche, Basel, Switzerland)を用いてFollicle膜を取り除いた。50 nLのcRNAを卵母細胞に各々インジェクションし、17°Cで5日間培養した。インジェクションした *osm-9*、*ocr-2*、*ocr-1* cRNAの濃度はそれぞれ123 ng/ μ L、118 ng/ μ L、111 ng/ μ Lである。イオン電流は2本刺し膜電位固定法によって測定した。卵母細胞内の電圧を-60 mVに固定し、OC-725C増幅器 (Warner Instruments, Hamden, CT) とDigidata 1,440 (Axon Instruments, Molecular Devices)を用いて電流を記

録した。イオン電流測定は室温で行い、温度刺激は冷やした、もしくは温めた ND96 等張液 (209.4 mOsm, pH7.4) [96 mM NaCl 溶液、2 mM KCl₂ 溶液、1.8 mM CaCl₂ 溶液、1 mM MgCl₂ 溶液、5 mM HEPES 溶液] を灌流させることにより 15~36°C に調節し、温度変化を卵母細胞に隣接する温度プローブで検出し、そのデータを TC-344B temperature controller (Warner Instruments, Hamden, CT) によって記録した。I-V 特性曲線は 3 秒ごとの -80 mV から +80 mV のランプパルスを用いて取得した。

統計解析

全ての図に表記されているエラーバーは standard error of the mean (SEM) を表している。多重比較は ANOVA の後に Bonferroni 検定または Dunnett 検定を用いて行った。Dunnett 検定はグラフの一番左のコントロールサンプルを他のサンプルと比較した。2 標本の比較は t 検定 (Welch) を使用した。(*) と (***) はそれぞれ $p < 0.05$ と $p < 0.01$ を意味する。t 検定 (Welch) にはデータ分析ツール (Excel アドイン) を用いた。Bonferroni 検定と Dunnett 検定にはマック統計解析 ver. 3 (株式会社エスミ、日本) を用いた。アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学解析後の統計解析には ANOVA の後に Bonferroni 検定を行い、それぞれのグループを「a」と「b」で示した ($p < 0.05$)。

PCR 法

サーマルサイクラーは LifeECO (Hangzhou Bioer Technology, China) もしくは Life Touch (Hangzhou Bioer Technology, China) を用いた。PCR 試

薬および耐熱性 DNA ポリメラーゼとして、変異検出用には Ex Taq (Takara Bio, Japan) を、プラスミド作製には KOD -Plus- Neo (東洋紡、日本) を使用し、それぞれの PCR 試薬のプロトコールに従って行った。PCR バッファー、dNTPs 溶液、プライマー、Ex Taq もしくは KOD -Plus- Neo を混合し、滅菌水で全量 10-40 μ l になるように合わせた。温度プログラムは 94°C 2 分、94°C 15 秒、55-68°C、72°C もしくは 68°C 1 kb/30 秒、を 1 サイクルとし、これを 40 サイクル繰り返した。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動

自作ゲル作製キットを用いて、DNA を泳動するためのポリアクリルアミドゲル板を作製する。今回は、検出対象である DNA の長さを考慮し、8%のポリアクリルアミドゲルを使用した。滅菌水 5.9 ml、5×TBE 2.0 ml、30%アクリルアミド溶液 2.0 ml、10% APS 100 μ l を混合し、最後に TEMED 10 μ l を添加した後に、直ちにガラス板で作製した鋳型に流し込んで、DNA を流すためのウェルを作るためにコームを差し込む。溶液が固まったらコームを抜いてウェル部分を滅菌水ですすぐ。電気泳動はスラブゲル電気泳動装置 (AE-6530 ATTO) と Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL (電圧装置) を用いて行った。泳動槽の下側に泳動バッファーである TBE を入れ、そこに作製したポリアクリルアミドゲル板をセットする。泳動槽の上側にも TBE をポリアクリルアミドゲル板が浸るまで入れる。この時、ガラス板間に空気が入らないようにする。電気泳動の準備ができたなら、まず DNA を泳動する前に、定電圧 100 V で 30 分電気泳動 (Pre-run) を行うことで、不純物である 10% APS や TEMED をゲルから流し出し、

ゲルの状態を均一にする。Pre-run が終わったら、DNA サンプル 10 μ l をウェルにアプライし、DNA を検出するためのエチジウムブロマイドを 10 μ l 添加する。

プラスミドの作製

本研究において、プラスミドの作製に使用したプライマーと作製したプラスミドは表 1~4 に示した。pKOH220、pKOH226 と pMIU084 はそれぞれ、アフリカツメガエルの β グロビン 5' UTR と β グロビン 3' UTR を含む pOX(+) に *osm-9 cDNA*、*ocr-2 cDNA* か *ocr-1 cDNA* を挿入して作製された。*osm-9 cDNA* は線虫のトランスジェニック系統 SH231 *osm-9(ky10); pdrEx30[sre-1p::osm-9 cDNA::gfp, unc-122::DsRed]* の Extrachromosomal array より PCR で増幅した。*ocr-2 cDNA*、*ocr-1 cDNA* は Cori Bargmann 教授よりいただいたプラスミドから PCR で増幅した。これらのプラスミドの cDNA を入れ替えることによって以下のプラスミドを作製した。pMIU091 は *gcy-5* プロモーターと *osm-9 cDNA* を、pMIU092 は *gcy-5* プロモーターと *ocr-2 cDNA* を含む。pMIU115 は *srh-220* プロモーターと *osm-9 cDNA* を、pMIU116 は *srh-220* プロモーターと *ocr-2 cDNA* を含む。pKOH141 *srh-220p::DsRedm* は *srh-220* 遺伝子の上流 2462 bp の *srh-220* プロモーターと DsRedm を含む (Mohan et al., 2013)。

RNAi スクリーニングにおける発現細胞解析に使用したプラスミドは、目的遺伝子の第 1 エクソンの一部とそのプロモーター領域 (0.5-4 kb) を野生株ゲノムより PCR によって増幅し、GFP を含むベクター pPD95.75 に挿入した。CRISPR/Cas9 法に用いた gRNA は以下の様に作製した。伊原助教よりいただいた

プラスミド pls99 (U6 プロモーターと *lin-17* gRNA、gRNA scaffold の配列を含む) を鋳型として使用し、*lin-17* の gRNA 配列の代わりに目的の遺伝子の gRNA 配列を入れ替えるため、目的の gRNA 配列を付加したプライマーで PCR を行った。目的の遺伝子の gRNA 配列と gRNA scaffold の配列を持つ断片と U6 プロモーターを含んだベクターの断片を増幅し、それを Infusion 法によってプラスミド化した。gRNA の 5' 末端に G を付けると転写効率が上がるため、gRNA は PAM 配列の上流 20 bp に加えて 5' 側に G を付けた 21 bp で設計した。

謝辞

本研究を行うに当たり、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 教授、太田茜 博士と三浦徹研究員に深謝申し上げます。自然科学研究機構生命創成探究センター 富永真琴 教授、曾我部隆彰 准教授、齋藤茂 助教の皆様には電気生理解析の共同研究に関してご指導ご鞭撻を賜るとともに有益なご助言をいただきました。心より御礼申し上げます。次世代 DNA シーケンサーを用いた遺伝学解析にご協力いただきました国立遺伝学研究所 豊田敦 教授と水口洋平 博士に心より御礼申し上げます。本研究において多大なご協力いただきました三浦徹氏に重ねて心より感謝申し上げます。そして、数多くの *C. elegans* 変異体を提供していただいた Caenorhabditis Genetic Center (CGC)、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) 三谷昌平 教授並びに、プラスミドを提供していただいた森郁恵 教授 (名古屋大学)、飯野雄一 教授 (東京大学)、Dr. Cori Bargmann (Rockefeller University)、伊原伸治 教授 (県立広島大学) に感謝申し上げます。また、本研究は日本学術振興会 特別研究員 DC2 に採用していただき、科研費提供 (19J10052) による研究支援をいただけたことで遂行できました。深く感謝申し上げます。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 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、檀上博史 教授、片桐幸輔 准教授に心より感謝申し上げます。

引用文献

Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C., and de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo J* 20, 1681-1691.

Ahringer J (2006) Reverse genetics. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.47.1, <http://www.wormbook.org>.

Ailion, M., and Thomas, J.H. (2000). Dauer formation induced by high temperatures in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156, 1047-1067.

Ailion, M., and Thomas, J.H. (2003). Isolation and characterization of high-temperature-induced Dauer formation mutants in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 165, 127-144.

Albanesi, D., Mansilla, M.C., and de Mendoza, D. (2004). The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. *J Bacteriol* 186, 2655-2663.

Albanesi, D., Martín, M., Trajtenberg, F., Mansilla, M.C., Haouz, A., Alzari, P.M., de Mendoza, D., and Buschiazzi, A. (2009). Structural plasticity and catalysis regulation of a thermosensor histidine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 16185-16190.

Alessandri-Haber, N., Dina, O.A., Yeh, J.J., Parada, C.A., Reichling, D.B., and Levine, J.D. (2004). Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J Neurosci* 24, 4444-4452.

Altabe, S.G., Aguilar, P., Caballero, G.M., and de Mendoza, D. (2003). The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *J Bacteriol* 185, 3228-3231.

Arribere, J.A., Bell, R.T., Fu, B.X., Artiles, K.L., Hartman, P.S., and Fire, A.Z. (2014). Efficient marker-free recovery of custom genetic modifications with CRISPR/Cas9 in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 198, 837-846.

Baez, D., Raddatz, N., Ferreira, G., Gonzalez, C., and Latorre, R. (2014). Gating of thermally activated channels. *Curr Top Membr* 74, 51-87.

Baltoumas, F.A., Theodoropoulou, M.C., and Hamodrakas, S.J. (2013). Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol* 182, 209-218.

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

Bautista, D.M., Wilson, S.R., and Hoon, M.A. (2014). Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nat Neurosci* 17, 175-182.

Berger, A.J., Hart, A.C., and Kaplan, J.M. (1998). G alphas-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 18, 2871-2880.

Block, B.A., Finnerty, J.R., Stewart, A.F., and Kidd, J. (1993). Evolution of endothermy in fish: mapping physiological traits on a molecular phylogeny. *Science* 260, 210-214.

Bloomquist, B.T., Shortridge, R.D., Schneuwly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., and Pak, W.L. (1988). Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* 54, 723-733.

Bornancin, F., Pfister, C., and Chabre, M. (1989). The transitory complex between photoexcited rhodopsin and transducin. Reciprocal interaction between the retinal site in rhodopsin and the nucleotide site in transducin. *Eur J Biochem* 184, 687-698.

Brauchi, S., Orta, G., Mascayano, C., Salazar, M., Raddatz, N., Urbina, H., Rosenmann, E., Gonzalez-Nilo, F., and Latorre, R. (2007). Dissection of the components for PIP2 activation and thermosensation in TRP channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 10246-10251.

Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E., and Latorre, R. (2006). A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* 26, 4835-4840.

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

Brown, D.A., and Berg, H.C. (1974). Temporal stimulation of chemotaxis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71, 1388-1392.

Burgie, E.S., and Vierstra, R.D. (2014). Phytochromes: An Atomic Perspective on Photoactivation and Signaling. *The Plant Cell* 26, 4568-4583.

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

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.

Cao, W., Medvedev, A.V., Daniel, K.W., and Collins, S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 276, 27077-27082.

Carey, F.G. (1982). A brain heater in the swordfish. *Science* 216, 1327-1329.

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

Castillo, K., Diaz-Franulic, I., Canan, J., Gonzalez-Nilo, F., and Latorre, R. (2018). Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection. *Phys Biol* 15, 021001.

Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., and Julius, D. (1999). A

capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

Chang, Q., Gyftogianni, E., van de Graaf, S.F., Hoefs, S., Weidema, F.A., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2004). Molecular determinants in TRPV5 channel assembly. *J Biol Chem* 279, 54304-54311.

Chen, J., Kang, D., Xu, J., Lake, M., Hogan, J.O., Sun, C., Walter, K., Yao, B., and Kim, D. (2013). Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat Commun* 4, 2501.

Chen, M., and Chory, J. (2011). Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biol* 21, 664-671.

Chen, N., Pai, S., Zhao, Z., Mah, A., Newbury, R., Johnsen, R.C., Altun, Z., Moerman, D.G., Baillie, D.L., and Stein, L.D. (2005). Identification of a nematode chemosensory gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 146-151.

Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., et al. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258-1265.

Cho, H., Yang, Y.D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S.K., Na, H.S., Harfe, B.D., Wang, F., et al. (2012). The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* 15, 1015-1021.

Chyb, S., Raghu, P., and Hardie, R.C. (1999). Polyunsaturated fatty acids activate the *Drosophila* light-sensitive channels TRP and TRPL. *Nature* 397, 255-259.

Clapham, D.E., and Miller, C. (2011). A thermodynamic framework for understanding temperature sensing by transient receptor potential (TRP) channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 19492-19497.

Colbert, H.A., Smith, T.L., and Bargmann, C.I. (1997). OSM-9, a novel protein with structural similarity to channels, is required for olfaction, mechanosensation, and olfactory adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 17, 8259-8269.

Considine, M.J., Daley, D.O., and Whelan, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiol* 126, 1619-1629.

Cook, S.J., Jarrell, T.A., Brittin, C.A., Wang, Y., Bloniarz, A.E., Yakovlev, M.A., Nguyen, K.C.Q., Tang, L.T.H., Bayer, E.A., Duerr, J.S., et al. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* 571, 63-71.

Cuppen, E., van der Linden, A.M., Jansen, G., and Plasterk, R.H.A. (2003). Proteins interacting with *Caenorhabditis elegans* Galpha subunits. *Comp Funct Genomics* 4, 479-491.

Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mansilla, M.C., Altabe, S., Aguilar, P.S., and de Mendoza, D. (2002). Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol Microbiol* 45, 1379-1388.

Cybulski, L.E., and de Mendoza, D. (2011). Bilayer hydrophobic thickness and integral membrane protein function. *Curr Protein Pept Sci* 12, 760-766.

Cybulski, L.E., del Solar, G., Craig, P.O., Espinosa, M., and de Mendoza, D. (2004). *Bacillus subtilis* DesR functions as a phosphorylation-activated switch to control membrane lipid fluidity. *J Biol Chem* 279, 39340-39347.

Cybulski, L.E., Martín, M., Mansilla, M.C., Fernández, A., and de Mendoza, D. (2010).

Membrane thickness cue for cold sensing in a bacterium. *Curr Biol* 20, 1539-1544.

Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17, 143-149.

de Bono, M., Tobin, D.M., Davis, M.W., Avery, L., and Bargmann, C.I. (2002). Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. *Nature* 419, 899-903.

Delgado, R., and Bacigalupo, J. (2009). Unitary recordings of TRP and TRPL channels from isolated *Drosophila* retinal photoreceptor rhabdomeres: activation by light and lipids. *J Neurophysiol* 101, 2372-2379.

Decoursey, T.E. (2003). Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physiol Rev* 83, 475-579.

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

Di Martino, M.L., Falconi, M., Micheli, G., Colonna, B., and Prosseda, G. (2016). The Multifaceted Activity of the VirF Regulatory Protein in the Shigella Lifestyle. *Front Mol Biosci* 3, 61-61.

Dorairaj, S., and Allen, T.W. (2007). On the thermodynamic stability of a charged arginine side chain in a transmembrane helix. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4943-4948.

Duc, N.M., Kim, H.R., and Chung, K.Y. (2015). Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol* 763, 214-222.

Ebihara, L. (1996). *Xenopus* connexin38 forms hemi-gap-junctional channels in the nonjunctional plasma membrane of *Xenopus oocytes*. *Biophysical journal* 71, 742-748.

El-Brolosy, M.A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., Kikhi,

K., Boezio, G.L.M., Takacs, C.M., Lai, S.-L., et al. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568, 193-197.

Falke, J.J., and Hazelbauer, G.L. (2001). Transmembrane signaling in bacterial chemoreceptors. *Trends Biochem Sci* 26, 257-265.

Farboud, B., and Meyer, B.J. (2015). Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design. *Genetics* 199, 959-971.

Ferkey, D.M., Hyde, R., Haspel, G., Dionne, H.M., Hess, H.A., Suzuki, H., Schafer, W.R., Koelle, M.R., and Hart, A.C. (2007). *C. elegans* G protein regulator RGS-3 controls sensitivity to sensory stimuli. *Neuron* 53, 39-52.

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

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Franklin, K.A., Lee, S.H., Patel, D., Kumar, S.V., Spartz, A.K., Gu, C., Ye, S., Yu, P., Breen, G., Cohen, J.D., et al. (2011). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 20231-20235.

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.

Friedland, A.E., Tzur, Y.B., Esvelt, K.M., Colaiacovo, M.P., Church, G.M., and Calarco, J.A. (2013). Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. *Nat Methods* 10, 741-743.

Fujii, Y., Tanaka, H., Konno, N., Ogasawara, Y., Hamashima, N., Tamura, S., Hasegawa, S., Hayasaki, Y., Okajima, K., and Kodama, Y. (2017). Phototropin perceives temperature based on the lifetime of its photoactivated state. *Proc Natl Acad Sci USA* 114, 9206-9211.

Fujiwara, Y., Kurokawa, T., Takeshita, K., Kobayashi, M., Okochi, Y., Nakagawa, A., and Okamura, Y. (2012). The cytoplasmic coiled-coil mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H⁺ channel Hv1. *Nat Commun* 3, 816.

Fukuto, H.S., Ferkey, D.M., Apicella, A.J., Lans, H., Sharmeen, T., Chen, W., Lefkowitz, R.J., Jansen, G., Schafer, W.R., and Hart, A.C. (2004). G protein-coupled receptor kinase function is essential for chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* 42, 581-593.

Golden, J.W., and Riddle, D.L. (1984a). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental biology* 102, 368-378.

Golden, J.W., and Riddle, D.L. (1984b). A pheromone-induced developmental switch in *Caenorhabditis elegans*: Temperature-sensitive mutants reveal a wild-type temperature-dependent process. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 819-823.

Gong, J., Liu, J., Ronan, E.A., He, F., Cai, W., Fatima, M., Zhang, W., Lee, H., Li, Z., Kim, G.H., et al. (2019). A Cold-Sensing Receptor Encoded by a Glutamate Receptor Gene. *Cell* 178, 1375-1386.e1311.

Goto, M., Sekine, Y., Outa, H., Hujikura, M., and Koichi, S. (2001). Relationships between cold hardiness and diapause, and between glycerol and free amino acid contents in overwintering larvae of the oriental corn borer, *Ostrinia furnacalis*. *J Insect Physiol* 47, 157-165.

Goy, M.F., Springer, M.S., and Adler, J. (1977). Sensory transduction in *Escherichia coli*: role of a protein methylation reaction in sensory adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 4964-4968.

Gracheva, E.O., Ingolia, N.T., Kelly, Y.M., Cordero-Morales, J.F., Hollopeter, G., Chesler, A.T., Sánchez, E.E., Perez, J.C., Weissman, J.S., and Julius, D. (2010). Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* 464, 1006-1011.

Grandl, J., Kim, S.E., Uzzell, V., Bursulaya, B., Petrus, M., Bandell, M., and Patapoutian, A. (2010). Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain. *Nat Neurosci* 13, 708-714.

Gu, Q., Kwong, K., and Lee, L.Y. (2003). Ca²⁺ transient evoked by chemical stimulation is enhanced by PGE₂ in vagal sensory neurons: role of cAMP/PKA signaling pathway. *J Neurophysiol* 89, 1985-1993.

Guler, A.D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M., and Caterina, M. (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22, 6408-6414.

Hardie, R.C., and Raghu, P. (2001). Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413, 186-193.

Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., and Gloriam, D.E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829-842.

Hayward, S.A., Manso, B., and Cossins, A.R. (2014). Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. *J Exp Biol* 217, 6-15.

Hazelbauer, G.L., Falke, J.J., and Parkinson, J.S. (2008). Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays. *Trends Biochem Sci* 33, 9-19.

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

Hilliard, M.A., Bergamasco, C., Arbucci, S., Plasterk, R.H., and Bazzicalupo, P. (2004). Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance

in *Caenorhabditis elegans*. *Embo j* 23, 1101-1111.

Hoenderop, J.G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B., and Bindels, R.J. (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Embo J* 22, 776-785.

Hurme, R., Berndt, K.D., Namork, E., and Rhen, M. (1996). DNA binding exerted by a bacterial gene regulator with an extensive coiled-coil domain. *J Biol Chem* 271, 12626-12631.

Hurme, R., Berndt, K.D., Normark, S.J., and Rhen, M. (1997). A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90, 55-64.

Hussey, R., Stieglitz, J., Mesgarzadeh, J., Locke, T.T., Zhang, Y.K., Schroeder, F.C., and Srinivasan, S. (2017). Pheromone-sensing neurons regulate peripheral lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 13, e1006806.

Imae, Y., Mizuno, T., and Maeda, K. (1984). Chemosensory and thermosensory excitation in adaptation-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 159, 368-374.

Islas, L.D. (2017). Molecular Mechanisms of Temperature Gating in TRP Channels. In *Neurobiology of TRP Channels*, Frontiers in Neuroscience, T.L.R. Emir, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis © 2018 by Taylor & Francis Group, LLC.), pp. 11-25.

Iwama, T., Homma, M., and Kawagishi, I. (1997). Uncoupling of ligand-binding affinity of the bacterial serine chemoreceptor from methylation- and temperature-modulated signaling states. *J Biol Chem* 272, 13810-13815.

Jabba, S., Goyal, R., Sosa-Pagán, J.O., Moldenhauer, H., Wu, J., Kalmeta, B., Bandell, M., Latorre, R., Patapoutian, A., and Grandl, J. (2014). Directionality of temperature activation in mouse TRPA1 ion channel can be inverted by single-point mutations in ankyrin repeat six. *Neuron* 82, 1017-1031.

Jang, H., Kim, K., Neal, S.J., Macosko, E., Kim, D., Butcher, R.A., Zeiger, D.M., Bargmann, C.I., and Sengupta, P. (2012). Neuromodulatory state and sex specify alternative behaviors through antagonistic synaptic pathways in *C. elegans*. *Neuron* 75, 585-592.

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

Jastroch, M., Wuertz, S., Kloas, W., and Klingenspor, M. (2005). Uncoupling protein 1 in fish uncovers an ancient evolutionary history of mammalian nonshivering thermogenesis. *Physiol Genomics* 22, 150-156.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.

Jose, A.M., Bany, I.A., Chase, D.L., and Koelle, M.R. (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.

Jung, J.H., Domijan, M., Klose, C., Biswas, S., Ezer, D., Gao, M., Khattak, A.K., Box, M.S., Charoensawan, V., Cortijo, S., et al. (2016). Phytochromes function as thermosensors in *Arabidopsis*. *Science* 354, 886-889.

Kahn-Kirby, A.H., Dantzer, J.L., Apicella, A.J., Schafer, W.R., Browse, J., Bargmann, C.I., and Watts, J.L. (2004). Specific polyunsaturated fatty acids drive TRPV-dependent sensory signaling in vivo. *Cell* 119, 889-900.

Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., et al. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 421, 231-237.

Kanosue, K., Crawshaw, L.I., Nagashima, K., and Yoda, T. (2010). Concepts to utilize in describing thermoregulation and neurophysiological evidence for how the system works. *Eur J Appl Physiol* 109, 5-11.

Kasahara, M., Kagawa, T., Oikawa, K., Suetsugu, N., Miyao, M., and Wada, M. (2002). Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420, 829-832.

Kedei, N., Szabo, T., Lile, J.D., Treanor, J.J., Olah, Z., Iadarola, M.J., and Blumberg, P.M. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 276, 28613-28619.

Kimura, K.D., Fujita, K., and Katsura, I. (2010). Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci* 30, 16365-16375.

Klose, C., Nagy, F., and Schäfer, E. (2020). Thermal Reversion of Plant Phytochromes. *Mol Plant* 13, 386-397.

Klose, C., Venezia, F., Hussong, A., Kircher, S., Schäfer, E., and Fleck, C. (2015). Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity. *Nat Plants* 1, 15090.

Kobayashi, K., Nakano, S., Amano, M., Tsuboi, D., Nishioka, T., Ikeda, S., Yokoyama, G., Kaibuchi, K., and Mori, I. (2016). Single-cell memory regulates a neural circuit for sensory behavior. *Cell Rep* 14, 11-21.

Kodama, Y., Tsuboi, H., Kagawa, T., and Wada, M. (2008). Low temperature-induced chloroplast relocation mediated by a blue light receptor, phototropin 2, in fern gametophytes. *J Plant Res* 121, 441-448.

Korswagen, H.C., van der Linden, A.M., and Plasterk, R.H. (1998). G protein hyperactivation of the *Caenorhabditis elegans* adenylyl cyclase SGS-1 induces neuronal degeneration. *Embo J* 17, 5059-5065.

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.

Kwon, Y., Shim, H.S., Wang, X., and Montell, C. (2008). Control of thermotactic behavior via coupling of a TRP channel to a phospholipase C signaling cascade. *Nat Neurosci* 11, 871-873.

Kwong, K., and Lee, L.Y. (2002). PGE₂ sensitizes cultured pulmonary vagal sensory neurons to chemical and electrical stimuli. *J Appl Physiol* (1985) 93, 1419-1428.

Lackner, M.R., Nurrish, S.J., and Kaplan, J.M. (1999). Facilitation of Synaptic Transmission by EGL-30 Gq α and EGL-8 PLC β : DAG Binding to UNC-13 Is Required to Stimulate Acetylcholine Release. *Neuron* 24, 335-346.

Ledesma, A., de Lacoba, M.G., and Rial, E. (2002). The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biology* 3, reviews3015.1.

Lee, H., and Caterina, M.J. (2005). TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflugers Arch* 451, 160-167.

Lee, R.E., Jr., Damodaran, K., Yi, S.X., and Lorigan, G.A. (2006). Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. *Cryobiology* 52, 459-463.

Legris, M., Klose, C., Burgie, E.S., Rojas, C.C., Neme, M., Hiltbrunner, A., Wigge, P.A., Schäfer, E., Vierstra, R.D., and Casal, J.J. (2016). Phytochrome B integrates light and temperature signals in *Arabidopsis*. *Science* 354, 897-900.

Levy, A.D., Yang, J., and Kramer, J.M. (1993). Molecular and genetic analyses of the *Caenorhabditis elegans* *dpy-2* and *dpy-10* collagen genes: a variety of molecular alterations affect organismal morphology. *Mol Biol Cell* 4, 803-817.

Liedtke, W., Tobin, D.M., Bargmann, C.I., and Friedman, J.M. (2003). Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 Suppl 2, 14531-14536.

Liu, F., Xiao, Y., Ji, X.L., Zhang, K.Q., and Zou, C.G. (2017). The cAMP-PKA pathway-mediated fat mobilization is required for cold tolerance in *C. elegans*. *Sci Rep* 7, 638.

Liu, S., Schulze, E., and Baumeister, R. (2012). Temperature- and touch-sensitive neurons couple CNG and TRPV channel activities to control heat avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 7, e32360.

Loh, E., Righetti, F., Eichner, H., Twittenhoff, C., and Narberhaus, F. (2018). RNA Thermometers in Bacterial Pathogens. *Microbiol Spectr* 6.

Ma, Z., Zhu, P., Shi, H., Guo, L., Zhang, Q., Chen, Y., Chen, S., Zhang, Z., Peng, J., and Chen, J. (2019). PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. *Nature* 568, 259-263.

Macnab, R.M., and Koshland, D.E., Jr. (1972). The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 2509-2512.

Maeda, K., Imae, Y., Shioi, J.I., and Oosawa, F. (1976). Effect of temperature on motility and chemotaxis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 127, 1039-1046.

Mandadi, S., Sokabe, T., Shibasaki, K., Katanosaka, K., Mizuno, A., Moqrich, A., Patapoutian, A., Fukumi-Tominaga, T., Mizumura, K., and Tominaga, M. (2009). TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflugers Arch* 458, 1093-1102.

McKemy, D.D., Neuhausser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.

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.

Michaud, M.R., and Denlinger, D.L. (2007). Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J Comp Physiol B* 177, 753-763.

Miller, K.G., Emerson, M.D., and Rand, J.B. (1999). $G\alpha$ and Diacylglycerol Kinase Negatively Regulate the $Gq\alpha$ Pathway in *C. elegans*. *Neuron* 24, 323-333.

Minke, B., and Cook, B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82, 429-472.

Miyawaki, A., Nagai, T., and Mizuno, H. (2013). Imaging intracellular free Ca^{2+} concentration using yellow cameleons. *Cold Spring Harb Protoc* 2013.

Mizuno, T., and Imae, Y. (1984). Conditional inversion of the thermoresponse in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 159, 360-367.

Mohan, S., Timbers, T.A., Kennedy, J., Blacque, O.E., and Leroux, M.R. (2013). Striated rootlet and nonfilamentous forms of rootletin maintain ciliary function. *Curr Biol* 23, 2016-2022.

Montell, C. (2005). TRP channels in *Drosophila* photoreceptor cells. *J Physiol* 567, 45-51.

Montell, C., Jones, K., Hafen, E., and Rubin, G. (1985). Rescue of the *Drosophila* phototransduction mutation *trp* by germline transformation. *Science* 230, 1040-1043.

- Moparthy, L., Kichko, T.I., Eberhardt, M., Högestätt, E.D., Kjellbom, P., Johanson, U., Reeh, P.W., Leffler, A., Filipovic, M.R., and Zygmunt, P.M. (2016). Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep* 6, 28763-28763.
- Morrisette, J.M., Franck, J.P., and Block, B.A. (2003). Characterization of ryanodine receptor and Ca²⁺-ATPase isoforms in the thermogenic heater organ of blue marlin (*Makaira nigricans*). *J Exp Biol* 206, 805-812.
- 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 USA* 104, 5489-5494.
- Nagatani, A. (2010). Phytochrome: structural basis for its functions. *Curr Opin Plant Biol* 13, 565-570.
- Nagle, J.F., and Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1469, 159-195.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19, 137-141.
- Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301, R1207-1228.
- Nakayama, T., Eisenman, J.S., and Hardy, J.D. (1961). Single unit activity of anterior hypothalamus during local heating. *Science* 134, 560-561.
- Nara, T., Kawagishi, I., Nishiyama, S., Homma, M., and Imae, Y. (1996). Modulation of the thermosensing profile of the *Escherichia coli* aspartate receptor tar by covalent modification of its methyl-accepting sites. *J Biol Chem* 271, 17932-17936.
- Neves, S.R., Ram, P.T., and Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science* 296, 1636-

1639.

Nicholls, D.G., and Locke, R.M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 64, 1-64.

Nishiyama, S., Maruyama, I.N., Homma, M., and Kawagishi, I. (1999a). Inversion of thermosensing property of the bacterial receptor Tar by mutations in the second transmembrane region. *J Mol Biol* 286, 1275-1284.

Nishiyama, S.I., Umemura, T., Nara, T., Homma, M., and Kawagishi, I. (1999b). Conversion of a bacterial warm sensor to a cold sensor by methylation of a single residue in the presence of an attractant. *Mol Microbiol* 32, 357-365.

Nurrish, S., Ségalat, L., and Kaplan, J.M. (1999). Serotonin inhibition of synaptic transmission: G α o decreases the abundance of UNC-13 at Release Sites. *Neuron* 24, 231-242.

Ohnishi, K., Saito, S., Miura, T., Ohta, A., Tominaga, M., Sokabe, T., and Kuhara, A. (2020). OSM-9 and OCR-2 TRPV channels are accessory warm receptors in *Caenorhabditis elegans* temperature acclimatisation. *Sci Rep* 10, 18566.

Ohnishi, K., Takagaki, N., Okahata, M., Fujita, M., Ohta, A., and Kuhara, A. (2019). Molecular and Cellular Network Systems Underlying Cold Tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cryobiology and Cryotechnology* 64, 53-59.

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

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

Okahata, M., Ohta, A., Mizutani, H., Minakuchi, Y., Toyoda, A., and Kuhara, A. (2016). Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Physiol B* 186, 985-998.

Okahata, M., Wei, A.D., Ohta, A., and Kuhara, A. (2019). Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Adv* 5, eaav3631.

Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2006). Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys* 39, 117-166.

Oldham, W.M., and Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60-71.

Oleksiuk, O., Jakovljevic, V., Vladimirov, N., Carvalho, R., Paster, E., Ryu, W.S., Meir, Y., Wingreen, N.S., Kollmann, M., and Sourjik, V. (2011). Thermal robustness of signaling in bacterial chemotaxis. *Cell* 145, 312-321.

Paix, A., Wang, Y., Smith, H.E., Lee, C.Y., Calidas, D., Lu, T., Smith, J., Schmidt, H., Krause, M.W., and Seydoux, G. (2014). Scalable and versatile genome editing using linear DNAs with microhomology to Cas9 Sites in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 198, 1347-1356.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.

Paster, E., and Ryu, W.S. (2008). The thermal impulse response of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5373-5377.

Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4, 529-539.

Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705-715.

Peirce, V., and Vidal-Puig, A. (2013). Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue. *Lancet Diabetes Endocrinol* 1, 353-360.

Petho, G., and Reeh, P.W. (2012). Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* 92, 1699-1775.

Pintér, E., Helyes, Z., and Szolcsányi, J. (2006). Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* 112, 440-456.

Premkumar, L.S., Agarwal, S., and Steffen, D. (2002). Single-channel properties of native and cloned rat vanilloid receptors. *J Physiol* 545, 107-117.

Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov, S., Griko Yu, V., Makhatadze, G.I., and Khechinashvili, N.N. (1989). Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state. *J Mol Biol* 205, 737-750.

Prober, D.A., Zimmerman, S., Myers, B.R., McDermott, B.M., Jr., Kim, S.-H., Caron, S., Rihel, J., Solnica-Krezel, L., Julius, D., Hudspeth, A.J., et al. (2008). *Zebrafish* TRPA1 channels are required for chemosensation but not for thermosensation or mechanosensory hair cell function. *J Neurosci* 28, 10102-10110.

Pusch, M., Ludewig, U., and Jentsch, T.J. (1997). Temperature dependence of fast and slow gating relaxations of ClC-0 chloride channels. *J Gen Physiol* 109, 105-116.

Qiu, Y., Li, M., Kim, R.J.-A., Moore, C.M., and Chen, M. (2019). Daytime temperature is sensed by phytochrome B in *Arabidopsis* through a transcriptional activator HEMERA. *Nat Commun* 10, 140.

Quail, P., Boylan, M., Parks, B., Short, T., Xu, Y., and Wagner, D. (1995). Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 268, 675-680.

Raddatz, N., Castillo, J.P., Gonzalez, C., Alvarez, O., and Latorre, R. (2014). Temperature and voltage coupling to channel opening in transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8). *J Biol Chem* 289, 35438-35454.

Rask-Andersen, M., Almén, M.S., and Schiöth, H.B. (2011). Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 10, 579-590.

Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., et al. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.

Razzoli, M., Frontini, A., Gurney, A., Mondini, E., Cubuk, C., Katz, L.S., Cero, C., Bolan, P.J., Dopazo, J., Vidal-Puig, A., et al. (2016). Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis. *Mol Metab* 5, 19-33.

Rehnmark, S., Néchad, M., Herron, D., Cannon, B., and Nedergaard, J. (1990). Alpha- and beta-adrenergic induction of the expression of the uncoupling protein thermogenin in brown adipocytes differentiated in culture. *J Biol Chem* 265, 16464-16471.

Reynolds, N.K., Schade, M.A., and Miller, K.G. (2005). Convergent, RIC-8-dependent Galpha signaling pathways in the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network. *Genetics* 169, 651-670.

Riddle, D.L., Swanson, M.M., and Albert, P.S. (1981). Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature* 290, 668-671.

Roayaie, K., Crump, J.G., Sagasti, A., and Bargmann, C.I. (1998). The G alpha protein ODR-3 mediates olfactory and nociceptive function and controls cilium morphogenesis in *C. elegans* olfactory neurons. *Neuron* 20, 55-67.

Robertson, H.M. (1998). Two large families of chemoreceptor genes in the nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae* reveal extensive gene duplication, diversification, movement, and intron loss. *Genome Res* 8, 449-463.

Robertson, H.M. (2000). The large srh family of chemoreceptor genes in *Caenorhabditis* nematodes reveals processes of genome evolution involving large duplications and deletions and intron gains and losses. *Genome Res* 10, 192-203.

Robertson, H.M. (2001). Updating the str and srj (stl) families of chemoreceptors in *Caenorhabditis* nematodes reveals frequent gene movement within and between chromosomes. *Chem Senses* 26, 151-159.

Rockwell, N.C., Su, Y.-S., and Lagarias, J.C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 837-858.

Saito, S., Banzawa, N., Fukuta, N., Saito, C.T., Takahashi, K., Imagawa, T., Ohta, T., and Tominaga, M. (2014). Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Mol Biol Evol* 31, 708-722.

Saito, S., Fukuta, N., Shingai, R., and Tominaga, M. (2011). Evolution of vertebrate transient receptor potential vanilloid 3 channels: opposite temperature sensitivity between mammals and western clawed frogs. *PLoS Genet* 7, e1002041.

Saito, S., Nakatsuka, K., Takahashi, K., Fukuta, N., Imagawa, T., Ohta, T., and Tominaga, M. (2012). Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. *J. Biol. Chem* 287, 30743-30754.

Salman, H., and Libchaber, A. (2007). A concentration-dependent switch in the bacterial response to temperature. *Nat Cell Biol* 9, 1098-1100.

Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., et al. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 16, 19-34.

Sassa, T., Murayama, T., and Maruyama, I.N. (2013). Strongly alkaline pH avoidance mediated by ASH sensory neurons in *C. elegans*. *Neurosci Lett* 555, 248-252.

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

Schneider, E.R., Anderson, E.O., Gracheva, E.O., and Bagriantsev, S.N. (2014). Temperature sensitivity of two-pore (K2P) potassium channels. *Curr Top Membr* 74, 113-133.

Sengupta, P., and Garrity, P. (2013). Sensing temperature. *Curr Biol* 23, R304-307.

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

Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.P., Ooi, L., et al. (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186-190.

Smith, S.O. (2010). Structure and activation of the visual pigment rhodopsin. *Annu Rev Biophys* 39, 309-328.

Sokabe, T., Chen, H.C., Luo, J., and Montell, C. (2016). A Switch in Thermal Preference in *Drosophila* Larvae Depends on Multiple Rhodopsins. *Cell Rep* 17, 336-344.

Somero, G.N. (2018). RNA thermosensors: how might animals exploit their regulatory potential? *J Exp Biol* 221.

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

Springer, M.S., Goy, M.F., and Adler, J. (1979). Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction. *Nature* 280, 279-284.

Stein, A.T., Ufret-Vincenty, C.A., Hua, L., Santana, L.F., and Gordon, S.E. (2006). Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol* 128, 509-522.

Stein, L.D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M.R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., et al. (2003). The Genome Sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A Platform for Comparative Genomics. *PLOS Biology* 1, e45.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., et al. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819-829.

Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Bährle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E., and Harter, K. (2001). Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science* 294, 1108-1111.

Takagaki, N., Ohta, A., Ohnishi, K., Kawanabe, A., Minakuchi, Y., Toyoda, A., Fujiwara, Y., and Kuhara, A. (2020). The mechanoreceptor DEG-1 regulates cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Embo Rep*, e48671.

Takeishi, A., Takagaki, N., and Kuhara, A. (2020). Temperature signaling underlying thermotaxis and cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurogenet*, 1-12.

Takeishi, A., Yu, Y.V., Hapiak, V.M., Bell, H.W., O'Leary, T., and Sengupta, P. (2016).

Receptor-type guanylyl cyclases confer thermosensory responses in *C. elegans*. *Neuron* 90, 235-244.

Talbot, D.A., Duchamp, C., Rey, B., Hanuise, N., Rouanet, J.L., Sibille, B., and Brand, M.D. (2004). Uncoupling protein and ATP/ADP carrier increase mitochondrial proton conductance after cold adaptation of king penguins. *J Physiol* 558, 123-135.

Thomas, J.H. (2006). Analysis of homologous gene clusters in *Caenorhabditis elegans* reveals striking regional cluster domains. *Genetics* 172, 127-143.

Thomas, J.H., Kelley, J.L., Robertson, H.M., Ly, K., and Swanson, W.J. (2005). Adaptive evolution in the SRZ chemoreceptor families of *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4476-4481.

Timmons, L., Court, D.L., and Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263, 103-112.

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

Tobin, D., Madsen, D., Kahn-Kirby, A., Peckol, E., Moulder, G., Barstead, R., Maricq, A., and Bargmann, C. (2002). Combinatorial expression of TRPV channel proteins defines their sensory functions and subcellular localization in *C. elegans* neurons. *Neuron* 35, 307-318.

Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J., Mizuno, A., and Suzuki, M. (2004). Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* 279, 35133-35138.

Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., and Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *Embo J* 25, 1804-1815.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.

Troemel, E.R., Chou, J.H., Dwyer, N.D., Colbert, H.A., and Bargmann, C.I. (1995). Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* 83, 207-218.

Troemel, E.R., Kimmel, B.E., and Bargmann, C.I. (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., and Kuhara, A. (2018). Endoribonuclease ENDU-2 regulates multiple traits including cold tolerance via cell autonomous and nonautonomous controls in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*.

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

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

Upadhyay, A., Pisupati, A., Jegla, T., Crook, M., Mickolajczyk, K.J., Shorey, M., Rohan, L.E., Billings, K.A., Rolls, M.M., Hancock, W.O., et al. (2016). Nicotinamide is an endogenous agonist for a *C. elegans* TRPV OSM-9 and OCR-4 channel. *Nat Commun* 7, 13135.

van Swinderen, B., Metz, L.B., Shebest, L.D., Mendel, J.E., Sternberg, P.W., and Crowder, C.M. (2001). Goalpha regulates volatile anesthetic action in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 158, 643-655.

- Veldhuis, N.A., Poole, D.P., Grace, M., McIntyre, P., and Bunnett, N.W. (2015). The G protein-coupled receptor-transient receptor potential channel axis: molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation. *Pharmacol Rev* 67, 36-73.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387-417.
- Vowels, J.J., and Thomas, J.H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 130, 105-123.
- Wada, M. (2013). Chloroplast movement. *Plant Sci* 210, 177-182.
- Wang, J., and Barr, M.M. (2005). RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol* 392, 36-55.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G., and Nilius, B. (2002). Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 47044-47051.
- Weber, M.H., Klein, W., Müller, L., Niess, U.M., and Marahiel, M.A. (2001). Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol Microbiol* 39, 1321-1329.
- 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 Lond B Biol Sci* 314, 1-340.
- Williams, J.T., Ingram, S.L., Henderson, G., Chavkin, C., von Zastrow, M., Schulz, S., Koch, T., Evans, C.J., and Christie, M.J. (2013). Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev* 65, 223-254.

Wittenburg, N., and Baumeister, R. (1999). Thermal avoidance in *Caenorhabditis elegans*: an approach to the study of nociception. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10477-10482.

Wood, W.B., and Researchers, t.C.o.C.e. (1988). The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Woudenberg-Vrenken, T.E., Lameris, A.L., Weissgerber, P., Olausson, J., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Freichel, M., and Hoenderop, J.G. (2012). Functional TRPV6 channels are crucial for transepithelial Ca²⁺ absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303, G879-885.

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

Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., et al. (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418, 181-186.

Xu, X.Z., Li, H.S., Guggino, W.B., and Montell, C. (1997). Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* 89, 1155-1164.

Yang, F., Cui, Y., Wang, K., and Zheng, J. (2010). Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 7083-7088.

Yao, J., Liu, B., and Qin, F. (2010). Kinetic and energetic analysis of thermally activated TRPV1 channels. *Biophys J* 99, 1743-1753.

Yao, J., Liu, B., and Qin, F. (2011). Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 11109-11114.

Yatsu, R., Miyagawa, S., Kohno, S., Saito, S., Lowers, R.H., Ogino, Y., Fukuta, N., Katsu, Y., Ohta, Y., Tominaga, M., et al. (2015). TRPV4 associates environmental temperature

and sex determination in the American alligator. *Sci Rep* 5, 18581.

Yoney, A., and Salman, H. (2015). Precision and variability in bacterial temperature sensing. *Biophys J* 108, 2427-2436.

Yu, Z.J., Lu, Y.L., Yang, X.L., Chen, J., Wang, H., Wang, D., and Liu, J.Z. (2014). Cold hardiness and biochemical response to low temperature of the unfed bush tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *Parasit Vectors* 7, 346.

Zhang, S., Ma, C., and Chalfie, M. (2004). Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. *Cell* 119, 137-144.

Zimmermann, K., Lennerz, J.K., Hein, A., Link, A.S., Kaczmarek, J.S., Delling, M., Uysal, S., Pfeifer, J.D., Riccio, A., and Clapham, D.E. (2011). Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 18114-18119.

児玉, 豊 (2018). 植物が温度を感じる仕組み
ようやく発見！植物の温度センサー分子. *化学と生物* 57, 21-28.

西山 宗一郎, 本間道夫, 川岸 郁朗 (1999). 大腸菌温度センサーの構造と機能.
生物物理 39 卷 4 号, p. 223-228.

中村和弘 (2015). 体温調節の神経回路. *脳科学辞典*.

入江由希子, 斉藤昌之 (1999). ミトコンドリア脱共役蛋白質 UCP ファミリーとエネルギー消費・肥満. *化学と生物* Vol. 37 No. 8, 514-520.

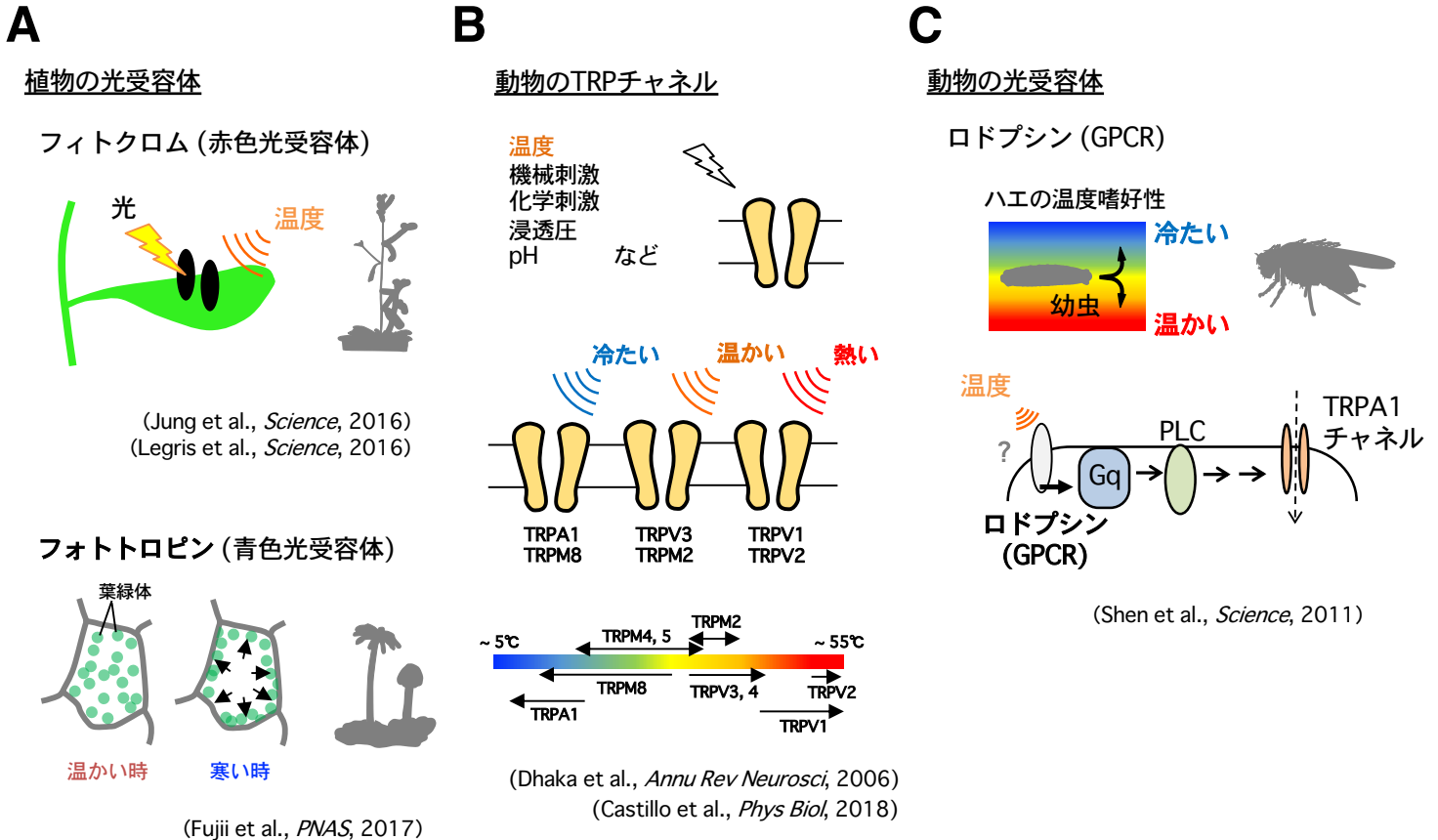
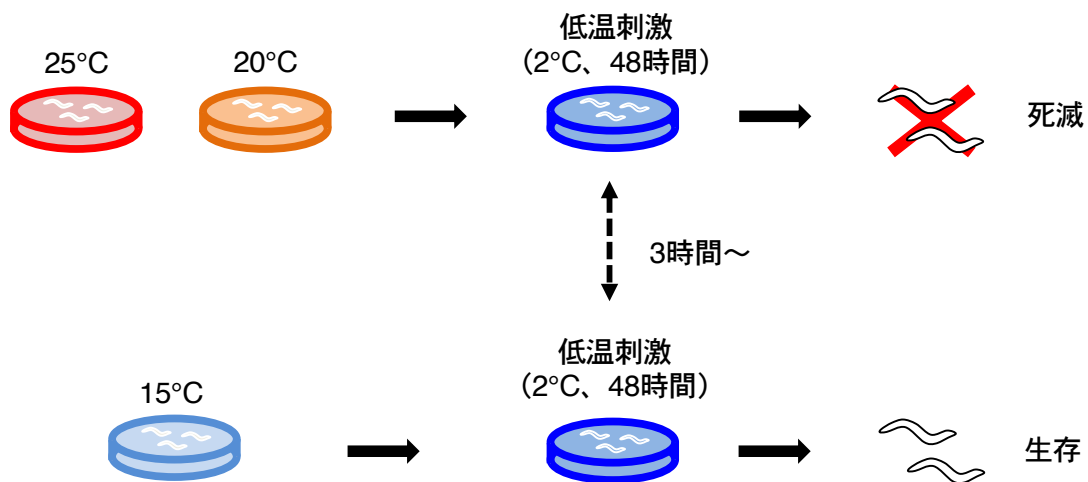


図1. 生体内で機能する温度センサータンパク質

(A) 光受容体であるフィトクロムやフィトトロピンが、それぞれ温度センサーとして働くことが報告されている。

(B) TRPチャンネルはヒトから線虫まで保存される温度センサー分子である。TRPはpHや機械刺激など様々な刺激を受容するチャンネルであり、ヒトでは、温度センサーとして機能する温度感受性TRPチャンネルが複数見つかっている。それらはそれぞれ活性化する温度閾値を持っているため、ヒトはほとんどの温度を感知することができる。

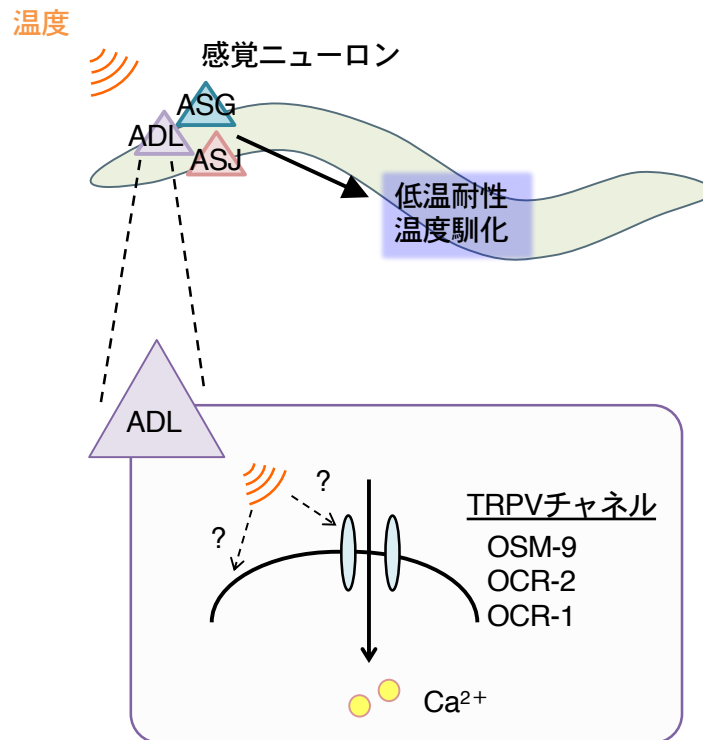
(C) ショウジョウバエにおいては、光受容体であるロドプシンが幼虫の温度走性の温度情報伝達に関わる。



(Ohta et al., *Nat commun*, 2014)
 (Okahata et al., *J. Comp. Physiol. B*, 2016)

図2. 線虫 *C. elegans* の飼育温度依存的な低温耐性・温度馴化

線虫 *C. elegans* は低温耐性を持ち、25°C もしくは 20°C で飼育された野生株は 2°C で 48 時間の低温刺激を与えると死滅するが、15°C で飼育された野生株は 2°C で 48 時間の低温刺激を与えても生存できる。さらに *C. elegans* は温度馴化機構を持ち、15°C で飼育した野生株 N2 を数時間 25°C で静置した後に、2°C に対する低温耐性テストを行うと死滅するが、25°C で飼育した野生株 N2 を数時間 15°C に静置した後に、2°C に対する低温耐性テストを行うと生存する。



(Ohta et al., *Nat commun*, 2014)
 (Sonoda et al., *Cell Rep*, 2016)
 (Ujisawa et al., *PNAS*, 2018)
 (Okahata et al., *Sci Adv*, 2019)
 (Takagaki et al., *EMBO Rep*, 2020)

図3. 線虫 *C. elegans* の低温耐性・温度馴化に関わる3つの感覚ニューロン

低温耐性・温度馴化において、頭部の3つの感覚ニューロンが温度を受容している。ADL温度受容ニューロンにおいて、3つのTRPVチャンネルであるOSM-9、OCR-1とOCR-2が温度受容機構に関与し、OCR-1は他の2つのTRPVの負の制御因子として機能することが遺伝学的に示唆されている。

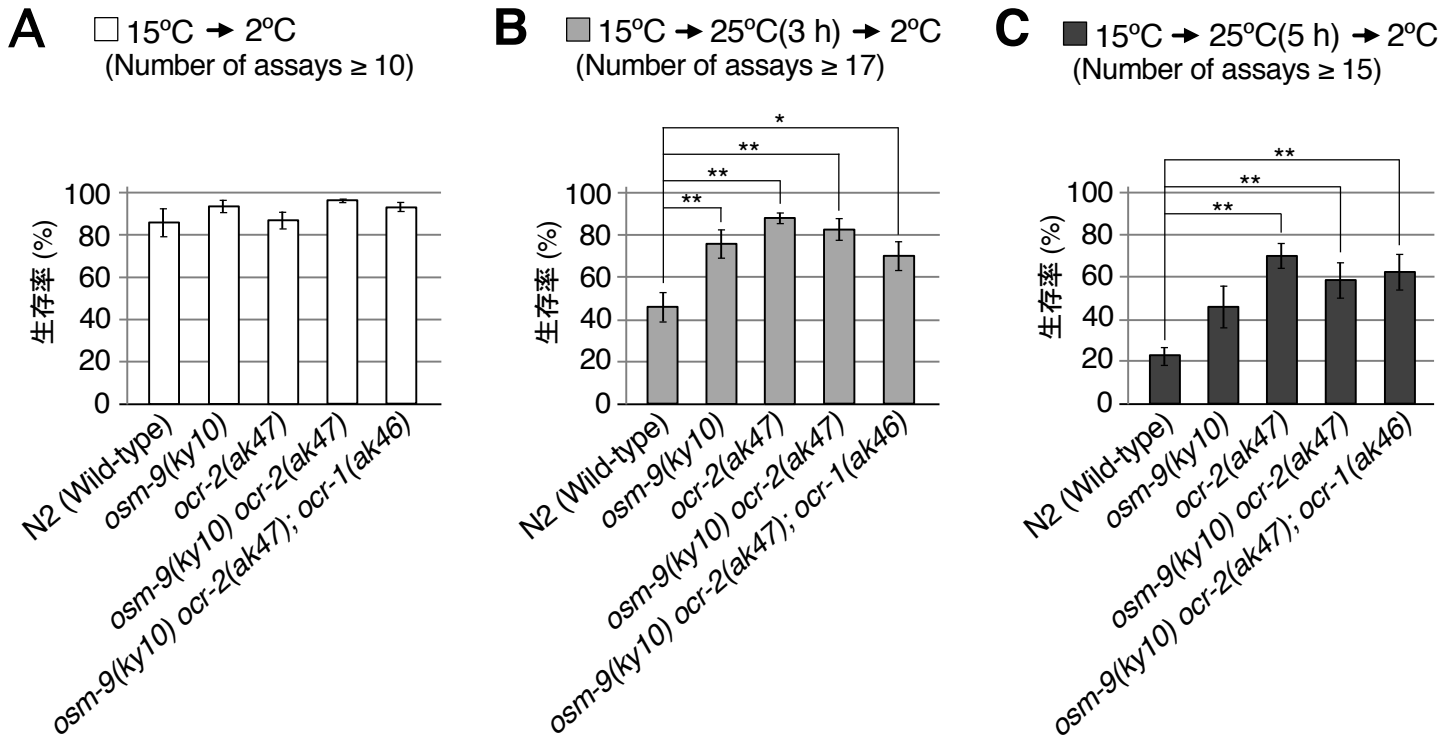
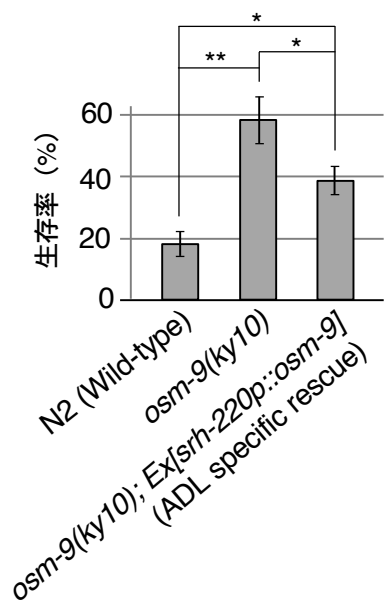


図4. *C. elegans*におけるTRPVチャネル変異体の飼育温度シフト後の低温耐性
*osm-9*変異体、*ocr-2*変異体、*osm-9 ocr-2*二重変異体、そして*osm-9 ocr-2*;
*ocr-1*三重変異体を、15°Cで飼育した後に25°Cで0、3もしくは5時間静置し、2°C
の低温刺激を与えた時の生存率 [15°C→25°C (0, 3, 5 h)→2°C]。*osm-9*変異体、
*ocr-2*変異体、*osm-9 ocr-2*二重変異体、そして*osm-9 ocr-2*;
*ocr-1*三重変異体は、飼育温度シフト後の低温耐性テスト[15°C→25°C (3, 5 h)→2°C]において、野生株
に比べて生存率が上昇する異常を示した (アッセイ数 ≥ 12、平均 ± 標準誤差)。統計処理は、15°C→25°C (0, 3, 5 h)→2°Cそれぞれの条件でダネット検定を行い、それ
ぞれのグラフ中の一番左の野生株とそれぞれの変異体の生存率を比較した (* p < 0.05, ** p < 0.01)。

■ 15°C → 25°C(3 h) → 2°C
(Number of assays ≥ 9)



■ 15°C → 25°C (3 h) → 2°C
(Number of assays ≥ 10)

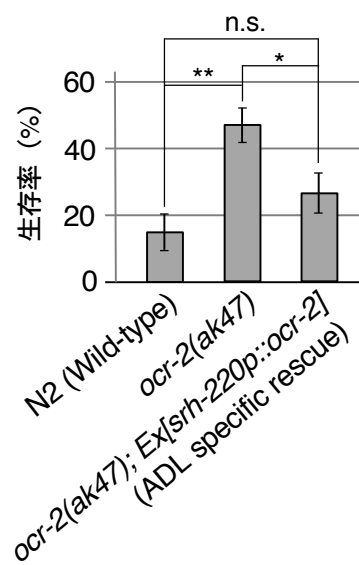


図5. TRPV変異体が示す飼育温度シフト後の低温耐性異常のADL特異的な回復実験
*osm-9*変異体もしくは*ocr-2*変異体が生ずる飼育温度シフト後の低温耐性異常はそれぞれ、ADL感覚ニューロン特異的に*osm-9*遺伝子もしくは*ocr-2*遺伝子を発現させることによって回復した (アッセイ数 ≥ 9、平均 ± 標準誤差)。飼育条件は 15°C → 25°C (3h) → 2°C。統計処理は、ボンフェローニ検定を用いて多重比較を行った (n.s. $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

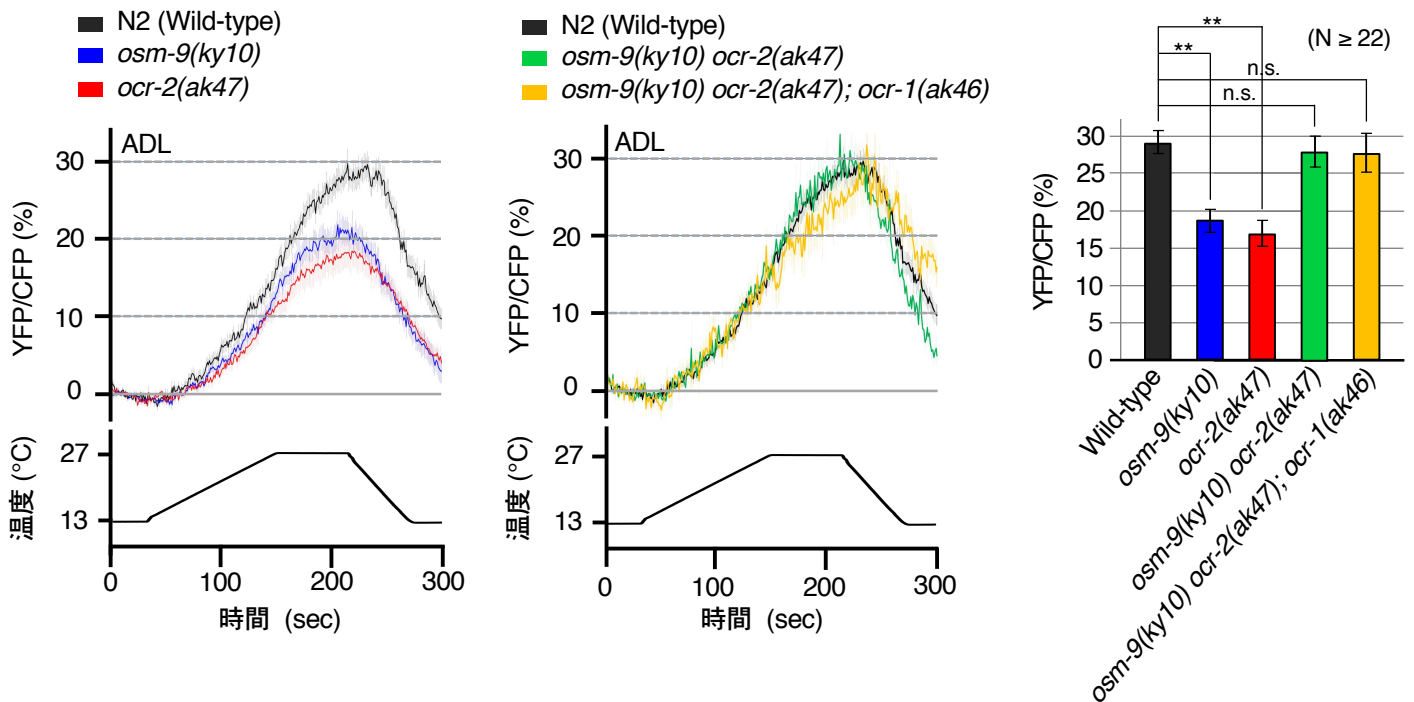


図6. TRP変異体におけるADL感覚ニューロンのカルシウムイメージング

YC3.60を用いたADL感覚ニューロンのカルシウムイメージング。線グラフはYFP/CFPの蛍光輝度比 (%) の平均値である。15°Cで飼育した*osm-9*変異体と*ocr-2*変異体に13°C→27°C→13°Cの温度刺激を与えた結果、ADLにおけるカルシウム濃度変化が野生株と比較して顕著に低下する異常が見られた(左パネル)。一方で、*osm-9 ocr-2*二重変異体と*osm-9 ocr-2; ocr-1*三重変異体は温度刺激に対して正常な反応を示した(中央パネル)。野生株のデータは左と中央パネルで共通(同時に解析を行ったため)。棒グラフは230-235秒の間の蛍光輝度比 (%) の平均値である(個体数 ≥ 22、平均 ± 標準誤差)。統計処理は、ダネット検定を行い、棒グラフ中の一番左の野生株とそれぞれの変異体の数値を比較した(n.s. $p \geq 0.05$ 、** $p < 0.01$) (右パネル)。

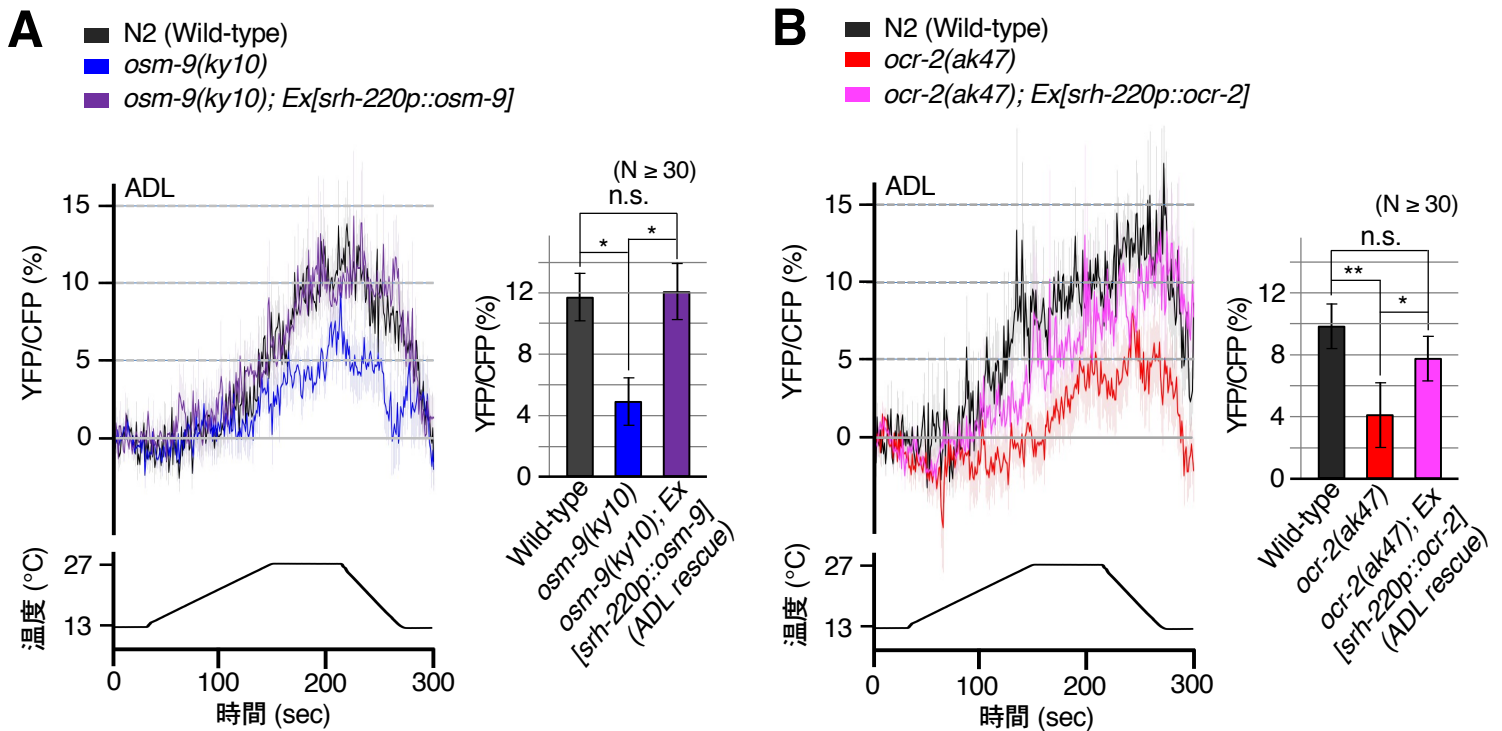
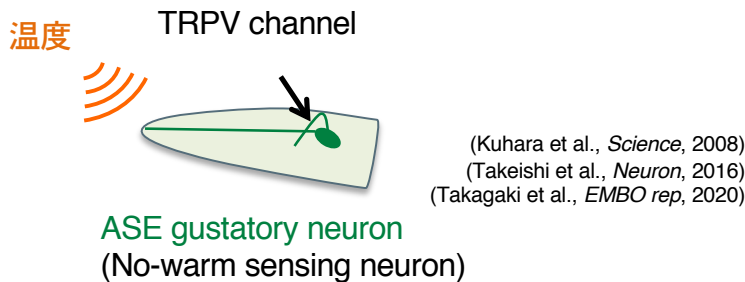


図7. TRP変異体におけるADL感覚ニューロンのカルシウムイメージング

YC3.60を用いたADL感覚ニューロンのカルシウムイメージング。線グラフはYFP/CFPの蛍光輝度比 (%) の平均値であり、棒グラフは230-235秒の秒間の蛍光輝度比 (%) の平均値である。飼育温度: 15°C。 *osm-9*変異体もしくは*ocr-2*変異体が見せるADLにおけるカルシウム濃度変化、つまり温度に対する応答性の低下異常はそれぞれ、ADL特異的に*osm-9*遺伝子もしくは*ocr-2*遺伝子を発現させることによって回復した (個体数 ≥ 30 、平均 \pm 標準誤差)。統計処理はそれぞれの解析で、ボンフェローニ検定を用いて多重比較を行った (n.s. $p \geq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。



- *glr-3(tm6403)*
- *glr-3(tm6403); Ex[gcy-5p::osm-9]*
- *glr-3(tm6403); Ex[gcy-5p::osm-9, gcy-5p::ocr-2]*

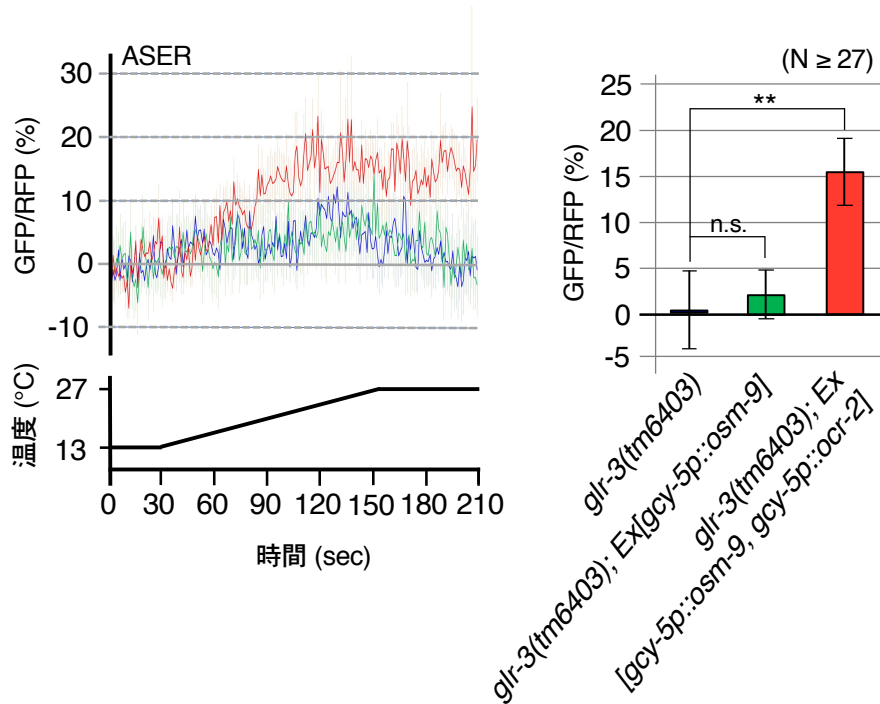
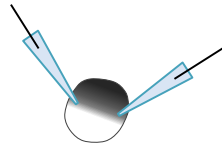


図8. OSM-9とOCR-2を発現させたASER味覚ニューロンのカルシウムイメージング
*osm-9*遺伝子のみ、もしくは*osm-9*遺伝子と*ocr-2*遺伝子をASER味覚ニューロンに発現させた*glr-3*変異体における、温度刺激を与えた時のカルシウムイメージング解析の結果。*glr-3*変異体はASERで機能する低温受容体であるGLR-3が欠損している。飼育温度: 15°C。線グラフはG-CaMP8/tagRFPの蛍光輝度比 (%) の平均値、棒グラフは181-200秒の間の蛍光輝度比 (%) の平均値 (個体数 ≥ 27, 平均 ± 標準誤差)。*glr-3*変異体のASERと、ASERにOSM-9を発現させた*glr-3*変異体のASERでは温度上昇に対する応答性は見られないが、ASERにOSM-9とOCR-2を発現させた*glr-3*変異体のASERでは温度上昇に対する応答性が見られた。統計処理はダネット検定を行い、棒グラフ中の一番左の*glr-3*変異体とそれぞれの変異体の数値を比較した (n.s. $p \geq 0.05$, ** $p < 0.01$) (右パネル)。

2本刺し膜電位固定法

細胞内電圧を-60 mVに固定

-60 mV



アフリカツメガエル
卵母細胞

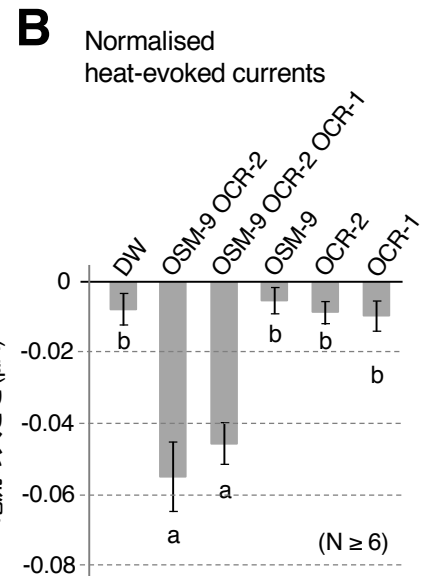
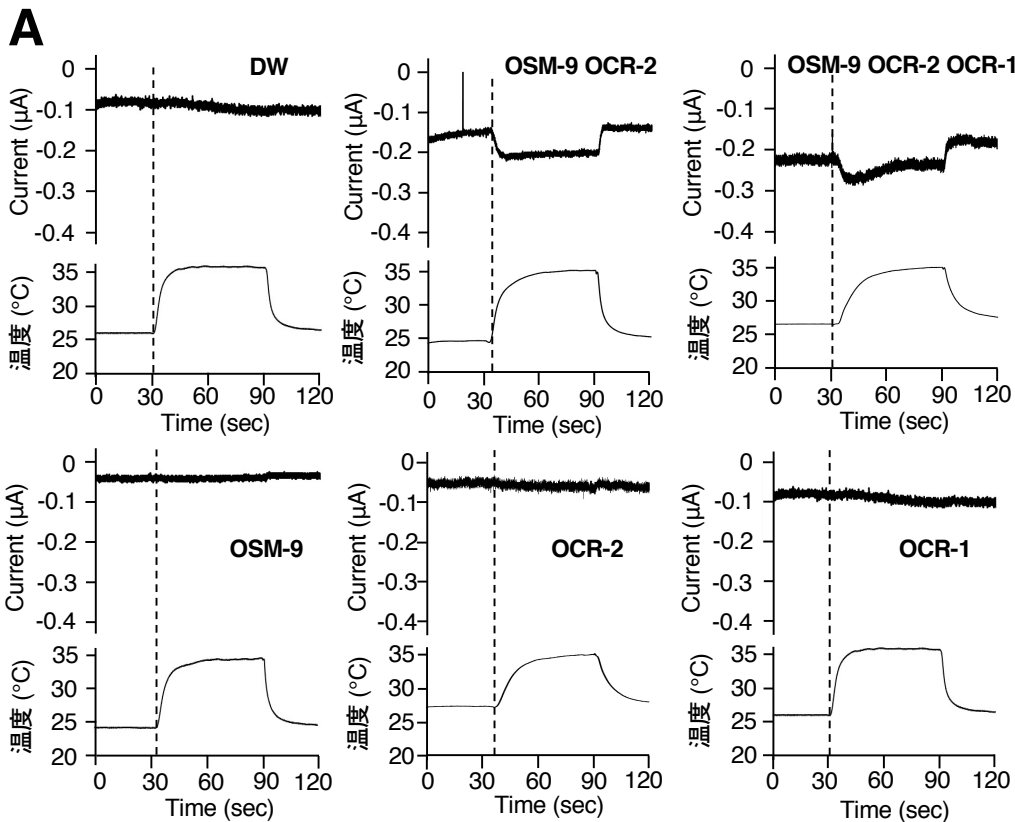
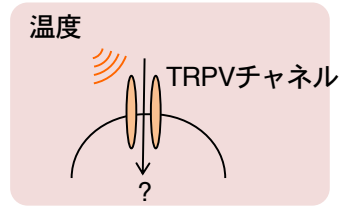
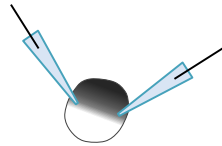
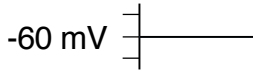


図9. 線虫TRPVを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の温度上昇刺激に対する応答性
(A) OSM-9、OCR-2、OCR-1、OSM-9/OCR-2、OSM-9/OCR-2/OCR-1もしくは蒸留水 (DW) をそれぞれ導入したアフリカツメガエル卵母細胞に25°Cから35°Cの温度上昇刺激を与えた時の代表データのトレース。各々について、上グラフが電流値、下グラフが温度変化を示す。卵母細胞内の電圧を-60 mVに固定して測定を行った。

(B) 温度上昇刺激を与えたときのそれぞれの電流は、各アフリカツメガエル卵母細胞の温度変化後の内向き電流の最大値から室温(約25°C)での内向き電流の最大値を差し引くことで算出され、それぞれの温度上昇刺激を与えたときのそれぞれの電流値を比較した(それぞれのアッセイ数 ≥ 6 、平均 \pm 標準誤差)。OSM-9/OCR-2もしくはOSM-9/OCR-2/OCR-1を発現させた卵母細胞は温度上昇刺激に対して反応が見られた。一方でOSM-9、OCR-2、OCR-1もしくはDWを導入した卵母細胞では反応は見られなかった。統計処理はボンフェローニ検定を用いて行い、統計的有意性をグループ「a」とグループ「b」で表示した ($p < 0.05$)。

2本刺し膜電位固定法

細胞内電圧を-60 mVに固定



アフリカツメガエル
卵母細胞

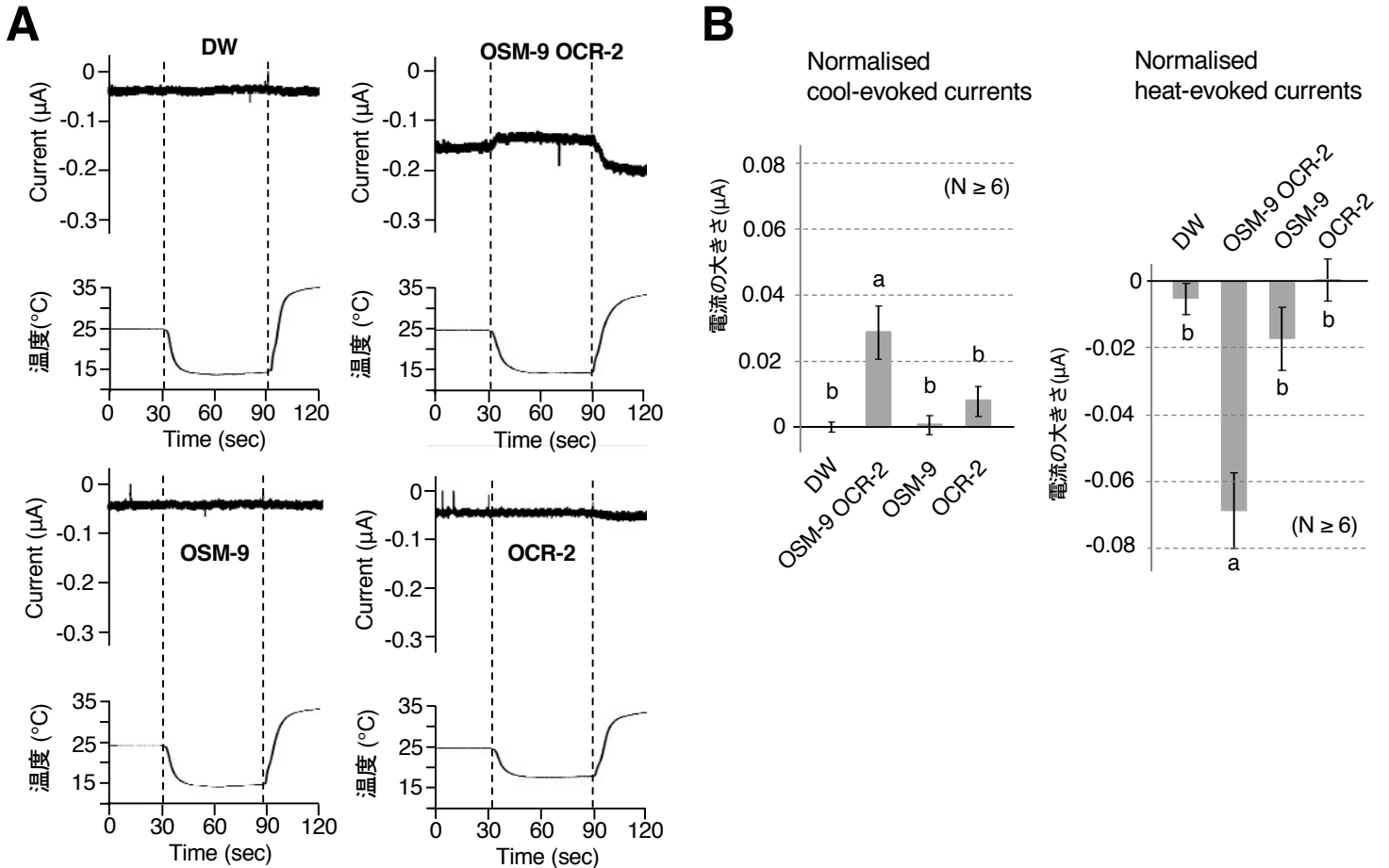
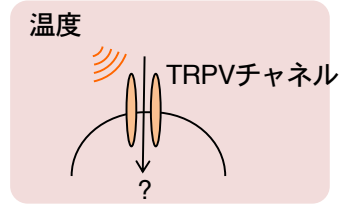
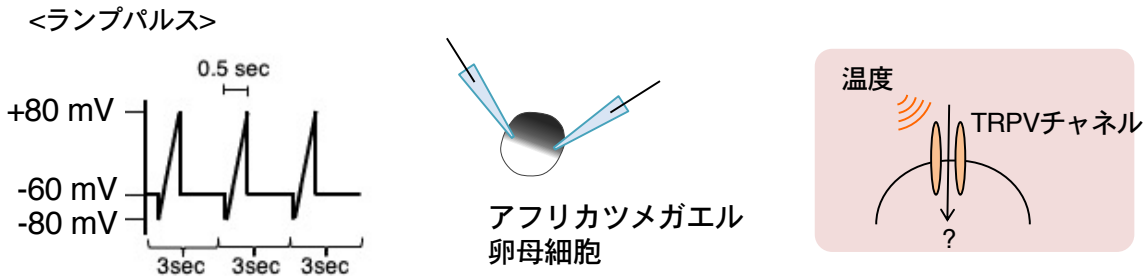


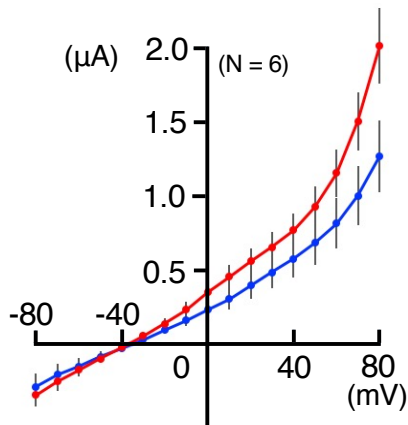
図10. 線虫TRPVを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の温度下降刺激に対する応答性

(A) OSM-9、OCR-2、OSM-9/OCR-2もしくは蒸留水 (DW) をそれぞれ導入したアフリカツメガエル卵母細胞に25°Cから15°Cの温度下降刺激、そして15°Cから35°Cの温度上昇刺激を与えた時の代表データのトレース。上グラフ: 電流値、下グラフ: 温度変化。卵母細胞内の電圧を-60 mVに固定して測定を行った。

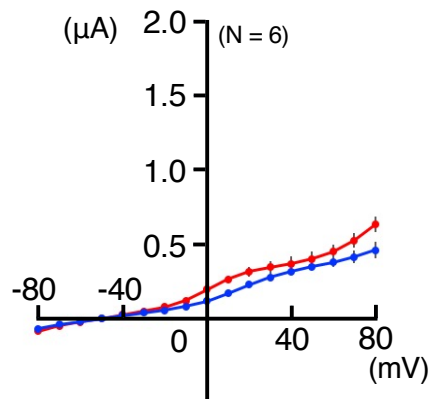
(B) 温度下降刺激を与えたときのそれぞれの電流は、各アフリカツメガエル卵母細胞に温度下降刺激 (約15°C) を与えた時の内向き電流の最大値から室温 (約25°C) での内向き電流の最大値を差し引くことで算出され、温度下降刺激を与えたときのそれぞれの電流値を比較した (左パネル、それぞれN ≥ 6、平均±標準誤差)。温度上昇刺激を与えたときのそれぞれの電流は、各アフリカツメガエル卵母細胞に温度上昇刺激 (約35°C) を与えた時の内向き電流の最大値から室温 (約25°C) での内向き電流の最大値を差し引くことで算出され、温度上昇刺激を与えたときのそれぞれの電流値を比較した (右パネル、それぞれのアッセイ数 ≥ 6、平均±標準誤差)。統計処理はボンフェローニ検定を用いて行い、統計的有意性をグループ「a」とグループ「b」で表示した (p < 0.05)。



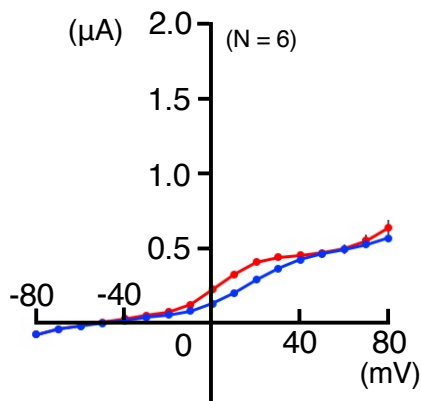
OSM-9 OCR-2 ■ 室温 ($24.5 \pm 0.4^\circ\text{C}$)
■ 温度上昇刺激 ($33.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$)



OSM-9 ■ 室温 ($25.7 \pm 0.3^\circ\text{C}$)
■ 温度上昇刺激 ($34.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$)



OCR-2 ■ 室温 ($24.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$)
■ 温度上昇刺激 ($33.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$)



DW ■ 室温 ($25.0 \pm 0.4^\circ\text{C}$)
■ 温度上昇刺激 ($33.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$)

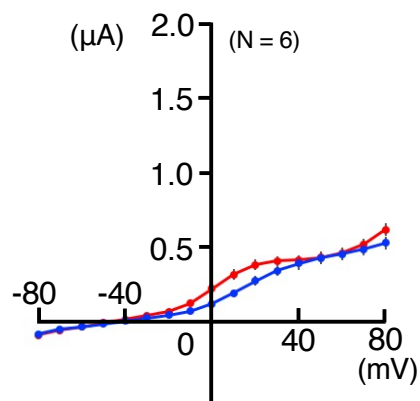


図11. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた線虫TRPVチャネルの電気生理学的特性解析

OSM-9、OCR-2、OSM-9/OCR-2もしくは蒸留水 (DW) をそれぞれ導入したアフリカツメガエルの卵母細胞に、 -80 mV から $+80\text{ mV}$ になり、即時に $+80\text{ mV}$ から -80 mV に戻る電圧変化 (ランプパルス) を約 0.5 秒間与え、その後 2.5 秒のインターバルを挟んで、再び -80 mV から $+80\text{ mV}$ のランプパルスを与える操作を繰り返した。これらの一連の電圧変化時の電流値を測定して、電流と電圧の関係を示したI-V曲線を作製し、約 25°C の室温時のI-V曲線 (青い線グラフ) と温度上昇刺激時のI-V曲線 (赤い線グラフ) を比較した (それぞれのアッセイ数 ≥ 6 、平均 \pm 標準誤差)。

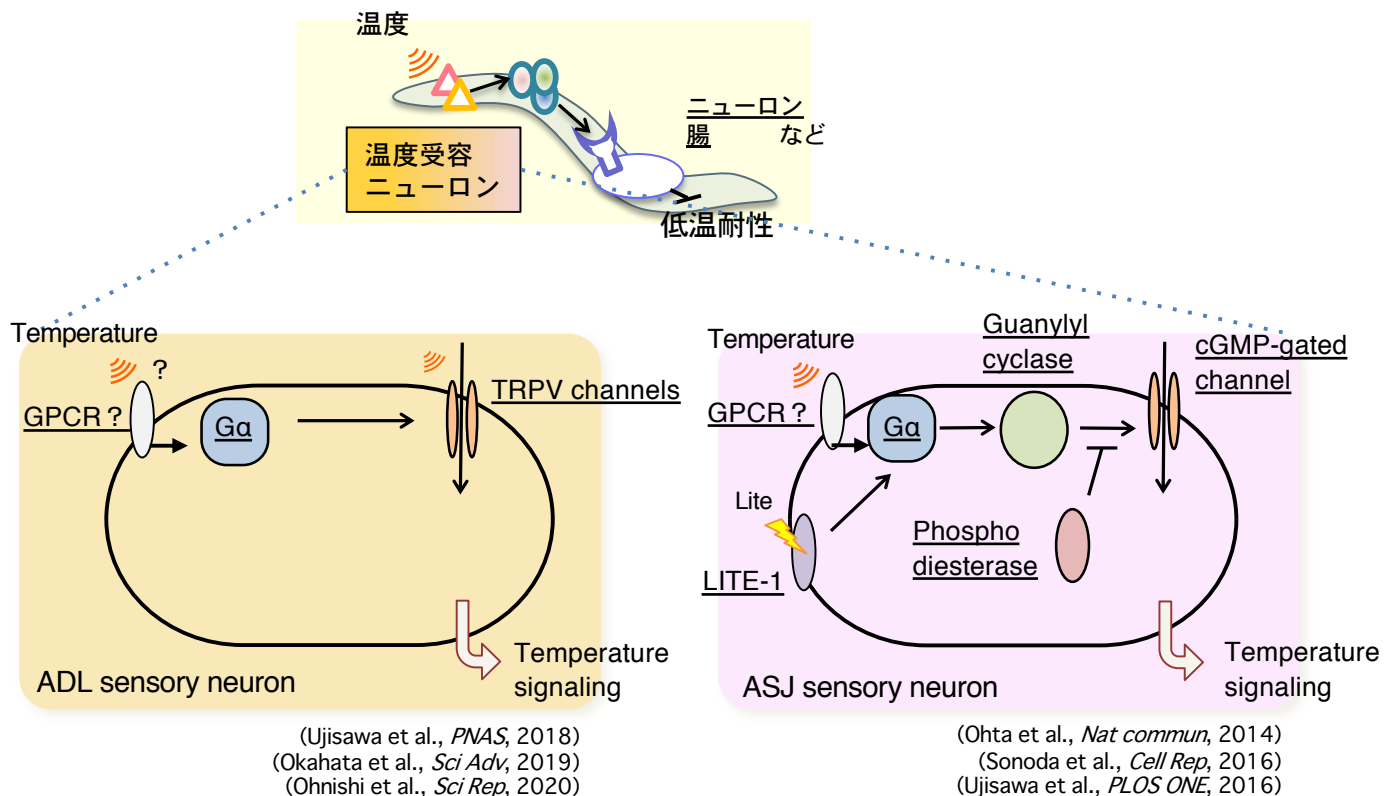


図12. *C. elegans*の低温耐性に関わる感覚ニューロン内の既知の分子メカニズム

低温耐性において機能する温度受容ニューロンとして、頭部のADL感覚ニューロンやASJ感覚ニューロンが分かっている。ADLではTRPVチャネルであるOSM-9、OCR-2とOCR-1が温度受容機構に関与し、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学解析からOSM-9/OCR-2が温度センサーとして機能することが明らかとなった。一方で、このOSM-9/OCR-2の温度に対する応答はとても弱かったため、ADLにおいてTRPVチャネル以外の温度センサー分子も働いている可能性がある。ASJでは、3量体Gタンパク質経路が温度情報伝達に必須であるが、温度受容体は未同定である。3量体Gタンパク質の上流には通常、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) が存在するため、ASJにおいてGPCR型の温度センサーが機能している可能性がある。

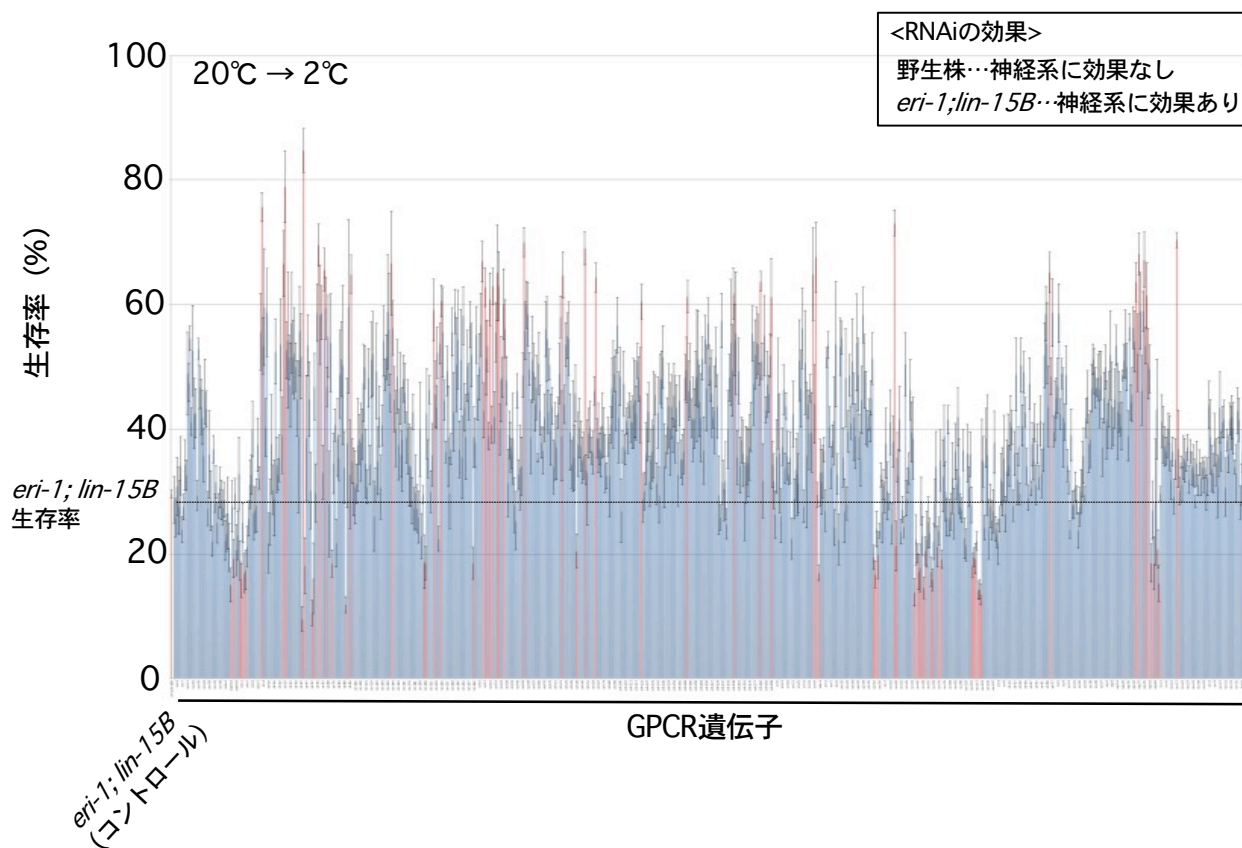
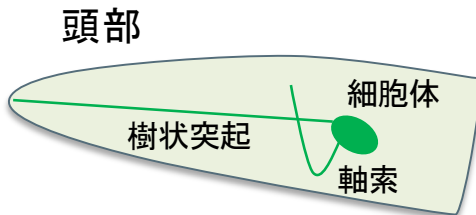
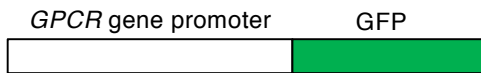


図13. 20°C飼育時の低温耐性の結果（RNAiスクリーニング）

*C. elegans*に存在する約1000個のGタンパク質共役型受容体（GPCR）遺伝子をRNAiによって遺伝子ノックダウンし、20°C飼育時の低温耐性を調べた結果。赤いバーで示した86個のノックダウン系統（表6を参照）において、コントロール系統の*eri-1; lin-15B*と比較して、20°C飼育後の低温耐性が高くなる、もしくは低くなる表現型が再現性よく確認された。

A

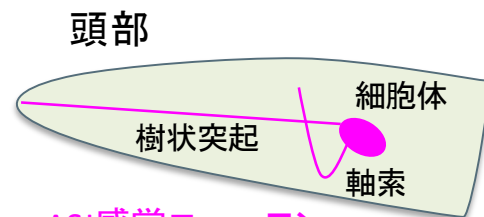
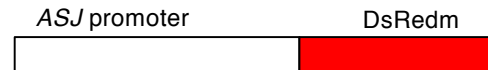
GFP



感覚ニューロンなど

B

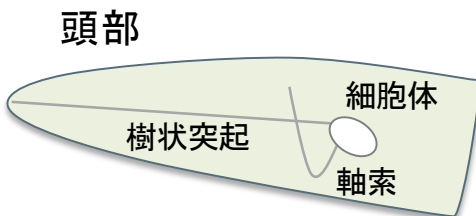
RFP



ASJ感覚ニューロン

C

Merge



GFPとRFPの重ね合わせ

図14. GPCR型温度受容体候補遺伝子の発現細胞解析

RNAiスクリーニングにおいて生存率の上昇が見られた50個のGPCR遺伝子についての発現細胞解析。本図は博士論文の要約としてその解析の概要を図示する。

(A) それぞれのGPCR遺伝子の開始コドン上流のプロモーターDNA配列に緑色蛍光タンパク質GFPの遺伝子を繋いだプラスミドを野生株を導入し、観察を行った。

(B) ASJ感覚ニューロン特異的にDsRedmを図14(A)のプラスミドと同時に発現させた系統を用いて、観察を行った。

(C) 図14(A)と図14(B)を同時に発現させた系統では、GFPの緑色とRFPの赤色が同時に発現している。それらの重ね合わせ画像を作成したさいに、ASJが白色になる場合には、解析に用いたGPCRがASJで発現していると判断した。

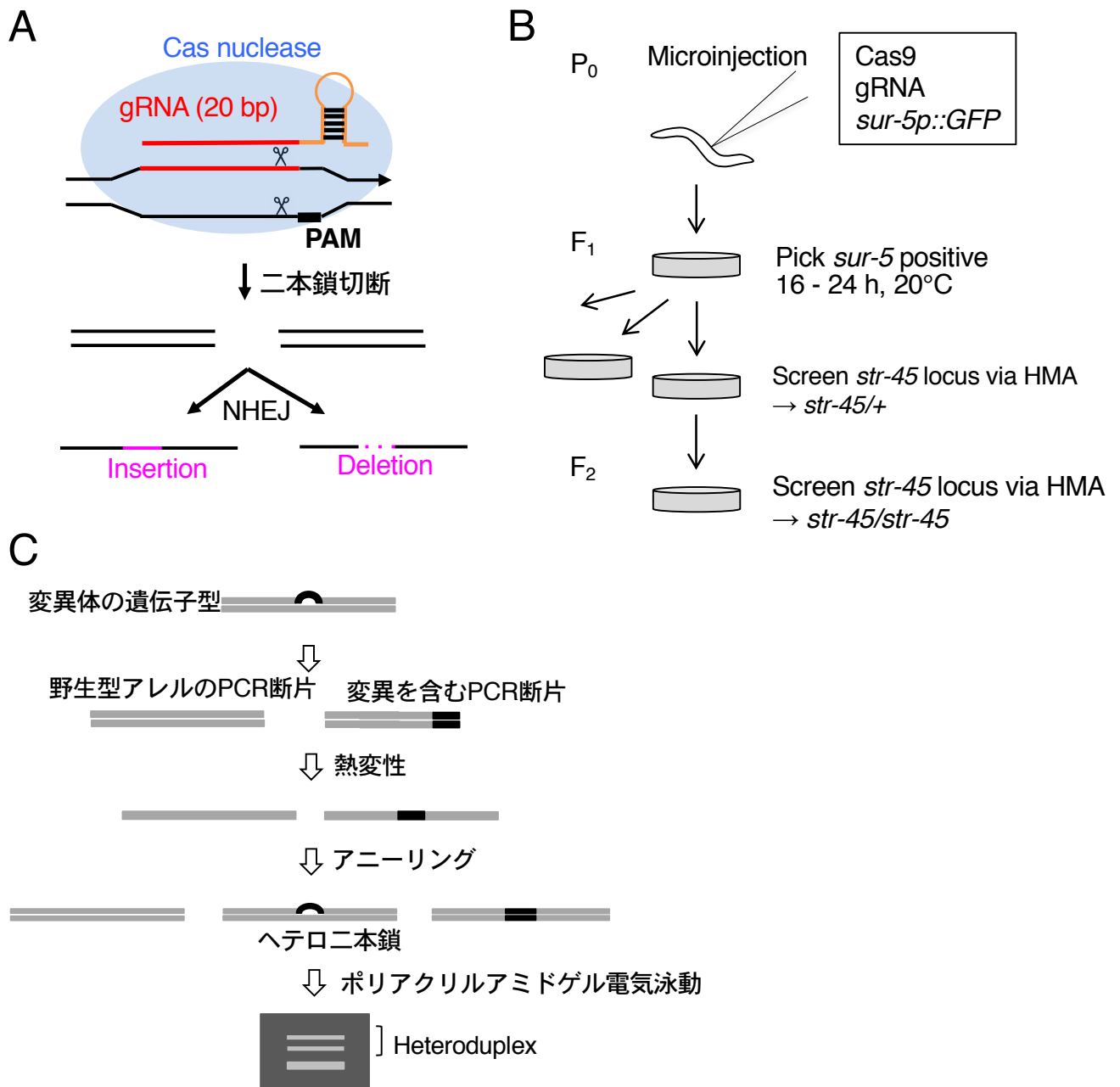
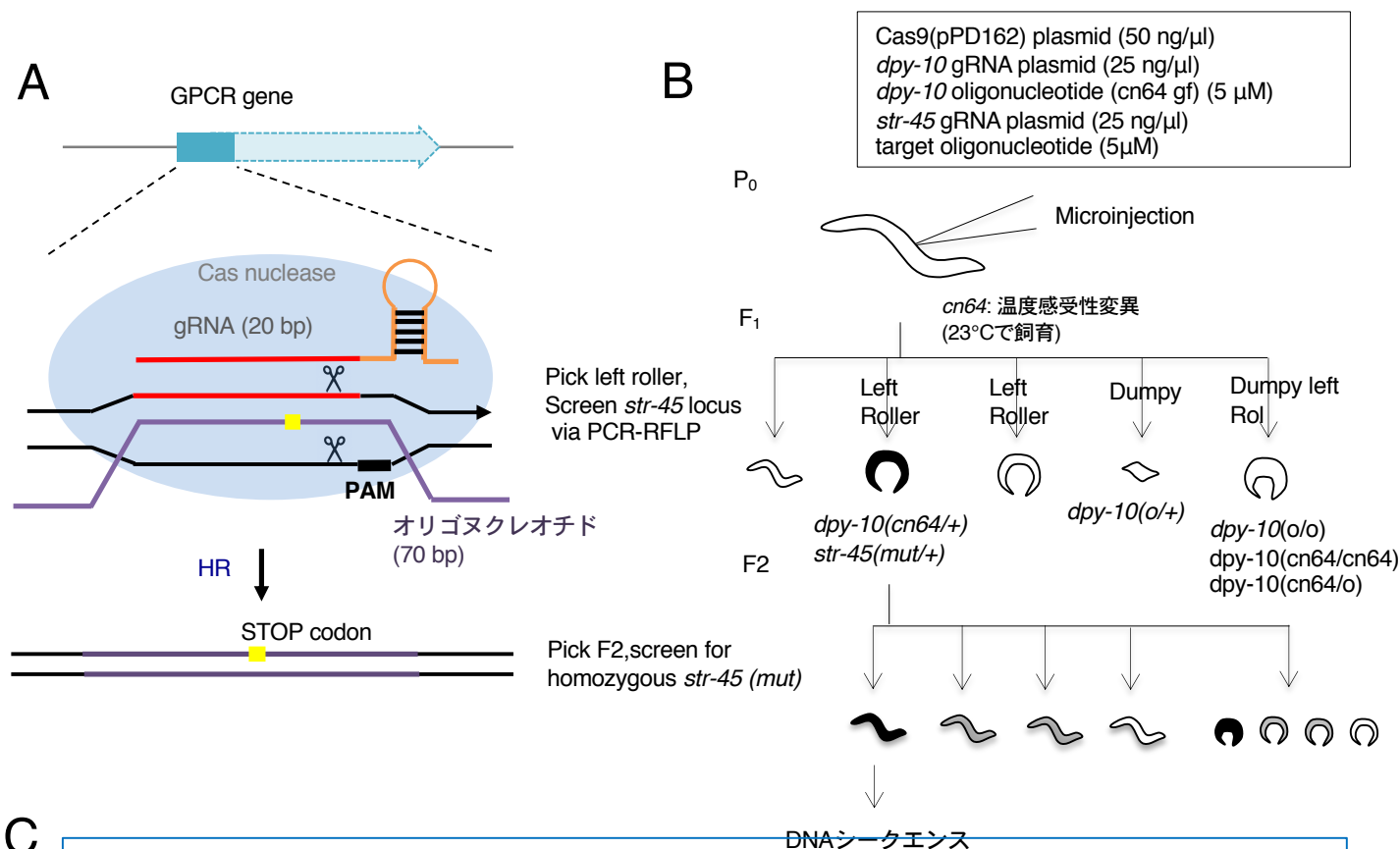


図15. CRISPR/Cas9による非相同末端連結（NHEJ: Non-Homologous End Joining）を利用したノックアウト系統の作製方法

(A) Casヌクレアーゼと、Cas9が結合するPAM配列（NGG）の上流20 bpの任意の配列を持つガイドRNA（gRNA）を細胞内に導入すると、CasヌクレアーゼがgRNAに誘導され、PAM配列の3 bp上流を二本鎖切断する。二本鎖切断が起こると非相同末端連結（NHEJ）によって切断DNA末端が連結されるが、この時に生じる挿入、欠損によって遺伝子ノックアウトを行う。

(B) Cas9、標的遺伝子のgRNA、*sur-5::GFP*（マイクロインジェクションのマーカージェン型）をマイクロインジェクションによって線虫に導入する（P₀）。3日後、*sur-5* positiveのF₁個体を単離して卵を産ませた後に、F₁個体のゲノムを回収し、PCRによって遺伝子周辺のDNA断片を増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて変異を検出する。F₁個体でヘテロ変異が確認されたら、そのF₁個体が産んだF₂個体を数匹単離して、1/4の確率で得られるホモ変異を持つ個体を獲得する。

(C) HMA（Heteroduplex Mobility Assay、ヘテロ二本鎖移動度分析）は3~10 bpの変異を検出する方法である。変異を検出するためにPCRを用いて、中央部分に変異部位が来るようなDNA断片を増幅する。増幅したDNA断片に95°C、2分の熱処理を行い、二本鎖を解離させる。そこから30分かけて25°Cまで温度を下げ、DNA断片をゆっくりとアニーリングさせる。こうしてミスマッチを含む二本鎖DNAができると、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動をした際にミスマッチ部分が立体障壁となり、ミスマッチを含まない二本鎖DNAと比べるとポリアクリルアミドゲル内の移動速度が遅くなるので、変異が検出できる。



C

具体的な解析手法の概要とまとめ

<材料>

プラスミドとその使用法：国立遺伝学研究所 伊原助教より分与して頂いたpDD162をCas9として使用。gRNAは別のプラスミドであるpls99 *PU6-lin-11gRNA* (U6プロモーターとlin-17gRNA、gRNA scaffoldの配列を含む)をベースベクターとして作製。gRNA配列は、gRNAの3'末端配列がGGであるものを選び、5'末端にはGを付加した。標的遺伝子の目的部位にSTOPコドン挿入するために、中央にSTOPコドンと、変異検出用の制限酵素配列を含んだ70 bpのオリゴヌクレオチドを用いた。マイクロインジェクションのマーカースとして、*dpy-10*の機能獲得型である点変異cn64をCRISPR/Cas9によって導入した (co-CRSPR)。 *dpy-10*(cn64)のヘテロ変異はLeft rollerの表現型を示す。

<操作>

- ① 約30~40匹のP₀にマイクロインジェクションし、Left rollerの表現型を示す100~150匹のF₁個体を単離。
- ② PCRと制限酵素を用いて標的遺伝子内のヘテロ変異を確認する。
- ③ F₂世代以降でLeft rollerの表現型を示さないホモ変異個体を単離する。
- ④ ダイデオキシ法を用いたDNAシーケンスによって変異を確認する。
- ⑤ F₁個体を200~300匹以上解析して (①を2回行っても) 変異体が獲得されない場合、もう一つのgRNAを作製し、1つの時と同様のマーカースを使用して2つのgRNAを用いて欠失を起こさせる。

<効率>

12個の遺伝子のノックアウトを試み、9個について目的通りの変異を起こさせることに成功した。具体的な数値 (F₂/F₁) としては、平均6%、最高が21%、最低が1%であった。さらに上記で得られなかった3個の遺伝子に関して2つのgRNAを使用して欠失変異を起こした結果、2個に関しては成功し、変異率はそれぞれ16%、5%であった。

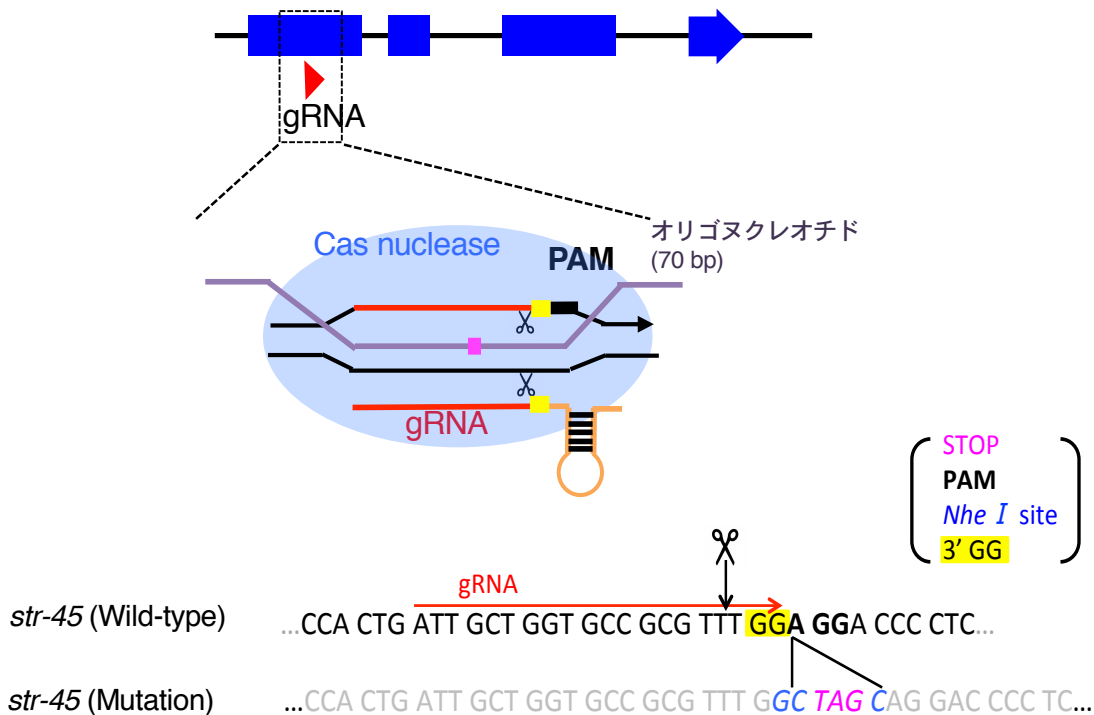
図16. CRISPR/Cas9と相同組換え (HR: Homologous Recombination)を利用したノックアウトシステムの作製

(A) 図15と比べてオリゴヌクレオチドを入れる点異なる。CasヌクレアーゼとgRNAによって二本鎖切断が起こると、相同組換えによって導入したオリゴヌクレオチドの配列が切断部位に挿入される。本研究では、遺伝子の途中にSTOPコドン挿入することで、遺伝子ノックアウトを行う。

(B) Cas9、標的遺伝子 *str-45* のgRNA、 *str-45* 遺伝子内にSTOPコドンと、変異検出用の制限酵素配列を入れるための70 bpのオリゴヌクレオチド、co-CRSPRマーカースである *dpy-10* gRNAとcn64変異を含んだオリゴヌクレオチドをマイクロインジェクションによって線虫に導入する (P₀)。23°Cで3日間飼育後、*dpy-10*(cn64)のヘテロ変異の表現型であるLeft rollerのF₁個体を単離して、卵を産ませる。卵を確認してからF₁個体のゲノムを回収してPCR-RFLPを行い、*str-45*ヘテロ変異体を獲得する。F₂個体でLeft rollerの表現型を示さない個体を8匹単離して卵を産ませる。F₂個体のゲノムを回収してPCR-RFLPを行い、1/4で得られるホモ変異体を獲得し、ダイデオキシ法を用いたDNAシーケンスによって変異を確認する。

(C) 相同組換えを利用したCRISPR/Cas9によるノックアウトシステムの作製の具体的な手法とその効率。

相同組換え ◆Oligonucleotide-based (*str-45*)



<単離した変異体>

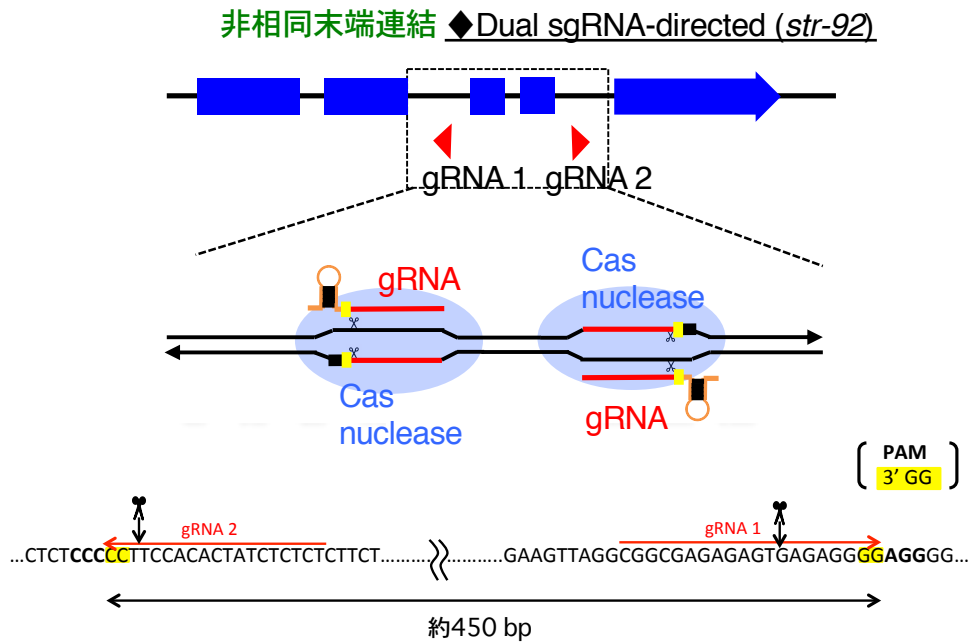
F₁世代 150個体から16系統

KHR44 *str-45*(chr2) (STOP, NheI site)
 TGATTGCTGGTGCCGCGTTTG**GctagcAGG**ACCCC (+5 bp)

KHR45 *str-45*(chr3) (243 bp deletion)
 ...AGACCGTTTG-----(-243 bp) -----GAGGAC...
 もしくは
 ...AGACC-----(-243 bp) -----GTTTGGAGGAC

図17. 3' GG配列をもつgRNAを使ったCRISPR/Cas9によるノックアウト系統の作製

gRNAの3'側の2 bpがGG (3' GG)であるとCRISPRの確率が上がることが報告されたため(Farboud and Meyer, Genetics, 2015)、標的配列を変更した。*str-45*遺伝子では第1エキソン内にある3' GG配列のgRNAを使って、Nhe Iの制限酵素サイトとSTOPコドンを入れようとした。その結果、トランスジェニック系統のF₁個体約150個体 (Left roller) から16系統の変異体を得ることができた。狙い通りの変異を持ったKHR44 *str-45*(chr2)と偶然欠失変異を起こしたKHR45 *str-45*(chr3)が得られた。



<単離した変異体>

F₁ 200個体から17系統

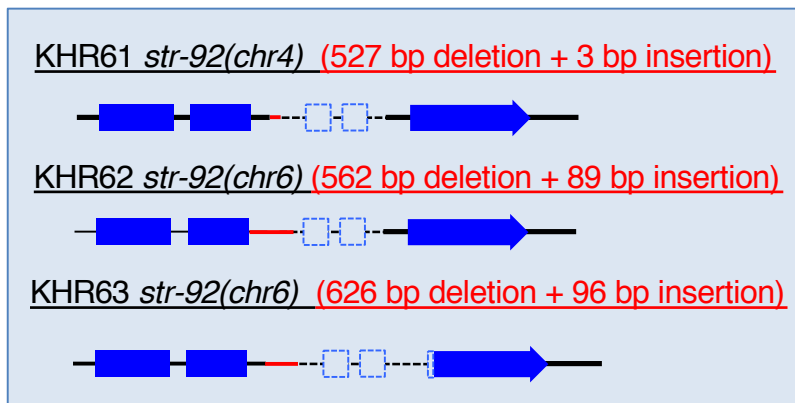


図18. 3'末端にGG配列をもつgRNAを使ったCRISPR/Cas9によるノックアウト系統の作製
*str-92*では、イントロンにしかgRNAの3'側の2 bpがGGである配列(3' GG)が存在しなかったため、2つのgRNAを使い、第3、4エクソンを含む大きな欠失をつくる方法を試みた。その結果、トランスジェニック系統のF₁ 200個体(Left roller)から17系統の変異体が得られた。

表1. 遺伝子解析に使用したプライマー

名前	配列 (5'-3')	遺伝子	用途
KHR2329	GGGCGTGGTGCTCGAGCCCGGGATGGGCGGTGGAAGTTCGCG	<i>osm-9</i>	cDNA
KHR2330	GCTTACCTTCGAACCGCGGAATTCTCATTTCGCTTTTGTCAATTTGTCG	<i>osm-9</i>	cDNA
KHR2493	CTTTGGCAGAGCTAGATGGGCGGTGGAAGTTCGCG	<i>osm-9</i>	cDNA
KHR2494	ATGCGCGGTGCTCGATCATTTCGCTTTTGTCAATTTGTCG	<i>osm-9</i>	cDNA
KHR2336	AAAACAAGCGGCAAATGC	<i>osm-9</i>	DNAシーケンス
KHR2337	TTGTTAACAATTCACAGG	<i>osm-9</i>	DNAシーケンス
KHR2338	ACGTGTTACCCATCATGG	<i>osm-9</i>	DNAシーケンス
KHR2339	GAAGCTTCTGACCGATCC	<i>osm-9</i>	DNAシーケンス
KHR2340	TCAGCCTGAGAAAGTTCC	<i>osm-9</i>	DNAシーケンス
KHR2441	CTTCTGCGTTTTTCAAAATCG	<i>ocr-2</i>	cDNA
KHR2442	CAATTCTCTTAATATCACGG	<i>ocr-2</i>	cDNA
KHR2543	AGCCCGGGGATCCAAGTCAACATGGGTTCTCATCTTCAACCC	<i>ocr-2</i>	cDNA
KHR2544	ATGCGCGGTGCTCGAG	<i>ocr-2</i>	cDNA
KHR2387	TGAGAATGCTCCAAGTCG	<i>ocr-2</i>	DNAシーケンス
KHR2388	AGATTTCTTGTATAATGG	<i>ocr-2</i>	DNAシーケンス
KHR2389	TTGAATGAAGCTTCTGCA	<i>ocr-2</i>	DNAシーケンス
KHR2390	TTCCCTGCTAAAATCACG	<i>ocr-2</i>	DNAシーケンス
KHR2391	AGTTTACAGTACTTTACC	<i>ocr-2</i>	DNAシーケンス
KHR2392	TGGATACAGTCGTACACC	<i>ocr-2</i>	DNAシーケンス
KHR2437	ATTGATCCACGTTCTTCC	<i>ocr-2</i>	DNAシーケンス
KHR2444	CAGTGTGCTGGAATTGCTAGCAATGGGTACTAAAAATTCAAAGATTGC	<i>ocr-1</i>	cDNA
KHR2445	TAGATGCATGCTCGAGTCACATCTTCGAGTTTGCATC	<i>ocr-1</i>	cDNA
KHR2305	TTCTAGCCTTGACAAGTCC	<i>ocr-1</i>	DNAシーケンス
KHR2307	CATTACTTCTCCGTCTTGGC	<i>ocr-1</i>	DNAシーケンス
KHR2308	GGAGAAATGAATGATACTAGTGC	<i>ocr-1</i>	DNAシーケンス
KHR2310	GTCATTCTAATGTTGGAAATGG	<i>ocr-1</i>	DNAシーケンス
KHR2334	ATGGGTACTAAAAATTCAAAGATTGC	<i>ocr-1</i>	DNAシーケンス
KHR2335	TCACATCTTCGAGTTTGCATC	<i>ocr-1</i>	DNAシーケンス
KHR2656	ATTACGCCAAGCTTGCATGCGCAGGCTGATAGATAGACCG	<i>srh-220</i>	プロモーター/Cell specific RNAi
KHR2657	CCTCTAGAGTCGACCTGCAGCTCTAGAACTTGAGTTTGGACC	<i>srh-220</i>	プロモーター
KHR1795	AATGAAATAAGCTTGcatgcTATACATGAAATACATACATAG	<i>gcy-5</i>	プロモーター
KHR1796	CAGTTTTTCATCTCGAgcccgggTTTTTCATCAGAATAAGTAATTTTTTC	<i>gcy-5</i>	プロモーター

表2. 本研究で使用したプラスミドの一覧

A. CRISPR/Cas9用プラスミド

プラスミド名	内容
	<i>Peft-3-Cas9</i>
pKOH001	<i>str-45 gRNA1</i>
pKOH008	<i>str-45 gRNA2</i>
pKOH007	<i>str-45 gRNA3</i>
pKOH016	<i>str-45 gRNA4</i>
pKOH020	<i>str-45 gRNA5</i>
pKOH010	<i>dpy-10 gRNA</i>
pKOH017	<i>str-92 gRNA1</i>
pKOH021	<i>str-92 gRNA2</i>
pKOH022	<i>str-92 gRNA3</i>

B. 遺伝子解析用プラスミド

プラスミド名	内容
pMIU115	<i>srh-220p::osm-9cDNA</i>
pMIU116	<i>srh-220p::ocr-2cDNA</i>
pMIU091	<i>gcy-5p::osm-9cDNA</i>
pMIU092	<i>gcy-5p::ocr-2cDNA</i>
pKOH226	<i>ocr-2cDNA</i> in pOX(+)
pKOH220	<i>osm-9cDNA</i> in pOX(+)
pMIU084	<i>ocr-1cDNA</i> in pOX(+)
pKOH141	<i>srh-220p::DsRedm</i>
pKOH159	pUC57-Ce-G-CaMP8
pMIU034	<i>flp-6p::CeG-CaMP8</i>
pKOB12	<i>gcy-5p::tagRFP</i>
pTOM025	<i>trx-1p::NLS::DsRedm</i>
pTOM063	<i>sre-1p::yc3.60</i>
pOTA004	<i>trx-1p::DsRedm</i>
pPD95.75	<i>gfp vector</i>
pRF4	<i>rol-6(gf)</i>
pPD162	<i>Peft-3::Cas9</i>
pls99	<i>PU6-lin-11gRNA</i>
pKDK66	<i>ges-1p::gfp</i>
pAK62	<i>AIYp::gfp</i>
	<i>pBluescript II SK+</i>

表3. 本研究で作製した系統の一覧

A. 本研究で作製したノックアウト系統

系統名
KHR44 <i>str-45(chr2)</i>
KHR45 <i>str-45(chr3)</i>
KHR61 <i>str-92(chr4)</i>
KHR62 <i>str-92(chr5)</i>
KHR63 <i>str-92(chr6)</i>
KHR105 <i>srh-247(tm6072) bc1</i>
KHR197 <i>glr-3(tm6403) bc3</i>

B. 遺伝子解析用

系統名
<i>osm-9(ky10); Ex[AIYp::GFP, ges-1p::NLS GFP, pBluescript II SK+]</i>
<i>osm-9(ky10); Ex[srh-220p::osm-9cDNA, AIYp::GFP, ges-1p::NLS GFP, pBluescript II SK+]</i>
<i>ocr-2(ak47); Ex[AIYp::GFP, ges-1p::NLS GFP, pBluescript II SK+]</i>
<i>ocr-2(ak47); Ex[srh-220p::ocr-2cDNA, AIYp::GFP, ges-1p::NLS GFP, pBluescript II SK+]</i>
<i>osm-9(ky10); Ex[srh-220p::osm-9cDNA, sre-1p::yc3.60, rol-6(gf)]</i>
<i>ocr-2(ak47); Ex[srh-220p::ocr-2cDNA, sre-1p::yc3.60, rol-6(gf)]</i>
<i>glr-3(tm6403); Ex[flp-6p::CeG-CaMP8, gcy-5p::tagRFP]</i>
<i>glr-3(tm6403); Ex[flp-6p::CeG-CaMP8, gcy-5p::tagRFP, gcy-5p::osm-9, gcy-5p::ocr-2]</i>
<i>glr-3(tm6403); Ex[flp-6p::CeG-CaMP8, gcy-5p::tagRFP, gcy-5p::osm-9]</i>