

平成 30 年 4 月 1 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18579

研究課題名(和文) 線虫のASJ感覚ニューロンにおけるGタンパク質を介した温度情報伝達

研究課題名(英文) Temperature signaling through trimeric G protein in sensory neuron of *C. elegans*

研究代表者

太田 茜(久原茜)(Ohta, Akane)

甲南大学・自然科学研究科・研究員

研究者番号：50410717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物の温度受容機構の解明を目指し、線虫 *C. elegans* の低温耐性を解析モデルとしている。これまでに、頭部の光受容ニューロンが温度を受容し、Gタンパク質経路を介して低温耐性が制御されることが明らかとなった。一方で、その上流に存在するであろう温度受容体は見つかっていない。本研究では、複数のGタンパク分子による加算的な温度情報伝達を明らかにした。また、Gタンパク質共役型の温度受容体(GPCR)の同定を目指し、GPCRのRNAiを行い、顕著な異常を示した遺伝子についてノックアウト系統を作製し、低温耐性に関わるGPCRをみつけた。

研究成果の概要(英文)：Temperature is important information for biological reaction. Animals have acclimation mechanism to temperature changes. *C. elegans* has cultivation temperature-dependent cold tolerance. We are using the cold tolerance as a model for studying temperature signaling in animal. Previously reported, ASJ sensory neuron that is known as light and pheromone-sensing neuron senses temperature through trimeric G-protein pathway, which is required for photo signaling. However, photoreceptor LITE-1 was not involved in cold tolerance and temperature sensation in ASJ. In this study, we found that multiple G-proteins additively regulate temperature signaling in ASJ. To identify the temperature sensing receptor upstream of trimeric G protein, we screened G protein-coupled receptor (GPCR). We performed RNAi screening for GPCR genes. We constructed knockout mutants of respective GPCR genes by using CRISPR/Cas9 system, and analyzed cold tolerance.

研究分野：分子遺伝学

キーワード： *C. elegans* 3量体Gタンパク質 線虫 カルシウムイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

温度は地球上のどのような環境下においても存在するため、生物は常に温度を感じており、生体への温度情報を遮断することはできない。環境は時々刻々と変化するため、ヒトを含め生物は、温度の変化を感知しそれに対応するための生体メカニズムを持つ。恒温動物では、体内の温熱恒常性を維持するメカニズムをもつ。例えば低温時においては、糖質や脂質を消費することで熱産生を行い、体温を調節している。このような体温調節は、脳の視索前野のニューロンが深部体温の変化を感知することと、皮膚にある受容器が環境温度の変化を感知し、皮膚で感じた温度を視索前野へ情報伝達することによって、環境温度の変化に応じた体温調節反応を行う(Nakamura, 2011)。変温動物である昆虫では、細胞膜中の不飽和脂肪酸を多くすることで膜の流動性を保ち、低温環境下でも固まらないようにしている。また、細胞内のアミノ酸や糖類等を細胞内に保持することで浸透圧を調節することや、大きな温度変化が起こったときに細胞が破壊されることを防ぐために、ヒートショックタンパク質(HSP)が機能することが知られている(Tsumiki et al., 2010)。C. elegansにおいては、HSPやヒートショック因子(HSF)が温度ストレスを感じると機能することが知られている。しかし、温度情報の受容から応答に至るまでの分子メカニズムには未知の点が残されている。

線虫 C. elegans には、温度に対する耐性メカニズムとして高温耐性があることが知られている。C. elegans には L1、L2、L3、L4 の幼虫期を経て成虫になるが、L1 の時期に 27°C 以上の高温環境下に置かれることで dauer と呼ばれる耐性幼虫期(L2d)に入る。(Bargmann and Horvitz, 1991b; Fielenbach and Antebi, 2008)。一方で近年の解析より、線虫において新たな低温に対する耐性メカニズムが明らかとなった。

線虫 C. elegans は飼育温度に依存的な低温耐性と呼ばれる性質をもつ。具体的には、Bristol 産の野生株である N2 株を 25°C、もしくは 20°C で飼育した後に、2°C に移すと死滅するのに対して(25°C→2°C, 20°C→2°C:死滅)、15°C で飼育した N2 株は 2°C に移された際、90%以上の個体が生存する現象である(15°C→2°C:90%生存)。これまでに、低温耐性において、温度情報は光とフェロモンを受容する ASJ ニューロンで受け取られ、インスリン分子などを介して腸・神経系などへ情報伝達が行われる。また、ASJ 感覚ニューロン内では、3 量体 G タンパク質が関わる経路によって温度情報伝達が行われることが明らかとなった(Ohta, Ujisawa et al., 2014)(Sonoda et al., 2016)(Ujisawa et al., 2016)。

C. elegans の感覚ニューロンにおける温度受容に関しては、温度に対する応答行動である温度走性を指標に解析が行われている。温

度走性において、温度は、主に AFD 感覚ニューロンや AWC 感覚ニューロンで受容されると報告されている(Kuhara et al., 2008; Mori and Ohshima, 1995)。AFD 温度受容ニューロンでは、TRP チャンネルが温度受容を行うのではなく、AFD 感覚ニューロン特異的に発現しているレセプター型のグアニル酸シクラーゼ(rGC)/gcy-8、gcy-18、gcy-23 が温度を受容していることが示唆されている(Takeishi et al., 2016)。rGC によって温度が受容されると、細胞内 cGMP 濃度を上昇し、cGMP 依存性チャンネルである TAX-4、TAX-2、CNG-3 が開口することで細胞内に主にカルシウムイオンが流入し、AFD は活性化させる(Aoki and Mori, 2015)。

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

## 2. 研究の目的

これまでに C. elegans の低温耐性に関する分子神経制御機構の一部が分かかってきており、低温耐性における温度情報は頭部の ASJ 感覚ニューロンで受容され、その情報は ASJ 内において三量体 G タンパク質を介した経路によって伝達される(Ohta et al., 2014)。通常、野生株個体を 20°C で飼育した後に、2°C に移すと死滅してしまうが、既知の ASJ 温度受容ニューロン内で温度情報伝達に関わる遺伝子の変異体は 20°C で飼育した後に、2°C に移しても生存できるという表現型を示す。そこで、三量体 G タンパク質の上流に存在するであろう未知の GPCR 型温度受容体の変異体も同様の表現型を示すのではないかと考え、線虫ゲノム中に存在する GPCR 遺伝子について遺伝子ノックダウンを行い、低温耐性を調べることに着想した。また、ASJ 内において複数の三量体 G タンパク質が温度情報伝達に関与する可能性が考えられたため、ASJ 内における温度情報伝達と三量体 G タンパク質の関係性についても解析するに至った。

## 3. 研究の方法

ASJ ニューロン内において、感覚情報の伝達に関わる 3 量体 G タンパク質(Gα)の機能欠失変異(goa-1, gpa-1, gpa-3)と、グアニル酸シクラーゼ(GC)の機能欠失変異(odr-1, daf-11)と、ホスホジエステラーゼ(PDE)の

機能欠失変異 (*pde-1*, *pde-5*, *pde-3*, *pde-2*) と、cGMP 依存性チャネル(CNG) の機能欠失変異 (*tax-4*) を用いた。これらの単独の変異体や多重変異体を持ちいて、それらの感覚応答を測定した。

線虫では、餌である大腸菌に RNAi 用のプラスミドを発現させることで、その餌を食べた次世代の線虫でノックダウンを引き起こすことができるため、この feeding RNAi を用いた。また、線虫において 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 の感受性をもつ *eri-1*; *lin-15B* 系統を使用した。1 回のアッセイにつき 6~12 系統のテストを行い、その時々で *eri-1*; *lin-15B* 系統の生存率を「1」とした時の生存比率を算出したデータを参考にした。その結果、20°C で飼育した後に、2°C に移した時に、control である RNAi 感受株 *eri-1*; *lin-15B* 二重変異体と比較した。

#### 4. 研究成果

##### GPCR 遺伝子ノックダウン系統の低温適応

RNAi ライブラリーに存在する約 1000 個の GPCR 遺伝子について、RNAi スクリーニングをそれぞれ 3 回以上行なった結果、ノックダウンに使用した *eri-1*; *lin-15B* 株と比較して、約 50 の遺伝子のノックダウン系統に再現性よい高い生存率がみられた。これら遺伝子のうち *str-45* は 6 試行の解析を行ったが、そのうち 3 回は低い生存率を示した。

##### 低温適応に関わる GPCR 型温度受容体候補の発現パターン解析

50 個の遺伝子のうち、すでに分かっている ASJ ニューロン内で低温適応に関与していることがわかっている  $G\alpha$  (*gpa-1*) は  $Gi/o$  型に分類されるので、 $Gi/o$  の GPCR を優先的に観察した。これまでに 20 個の遺伝子の発現パターンを当研究室の研究者である宇多とともに解析した。その結果、8 個の GPCR 遺伝子が ASJ 感覚ニューロンで発現していることが分かった。ASJ のみで発現しているものや、ASJ と他の神経細胞で発現しているもの、さらに、*srd-46*, *srd-48* については成虫期ではなく幼虫期でのみ発現がみられるなどの結果が得られた。

CRISPR/Cas9 で作製した KHR44, KHR45 *str-45* 変異体、KHR61, KHR63 *str-92* 変異体で 20°C → 2°C の低温適応テストを行ったが異常はみられなかった。

*srg-37* 変異体で 15°C → 2°C、25°C → 15°C (0, 3, 5, 18h) → 2°C と 15°C → 25°C (0, 3, 5, 18h) → 2°C の低温適応スピードテストを行なったが、野生株 N2 と比べて表現型に異常はみられなかった

過去の研究で *srg-37* が L2 幼虫期に ASI と他のいくつかのニューロンで発現しており、フェロモン受容体として働くことで

dauer 形成に関わっていることが知られていた (Patrick T. McGrath et. al, Nature 2012)。今回の発現解析で *srg-37* が ASJ においても発現していることがわかった。*srg-37* 変異体は低温適応に異常が見られなかったことから、ASJ はフェロモンを受容し、dauer 形成促進または復帰に関わっていることが知られているので、*srg-37* はそれに関わると考えられる。また、*str-45* でも低温適応の異常は観察されなかった。これら 2 つの遺伝子の RNAi ノックダウン系統で低温適応の異常が観察された理由としては、*srg-37*, *str-45*, *str-92* の RNAi に使用した配列が他の遺伝子内にも似た配列があり、そのため RNAi では異常が観察されたのではないかと考える。一方で、RNAi により低温耐性異常を引き起こした遺伝子のなかから 1 つの遺伝子に関しては、ノックアウト変異体で低温馴化の異常が観察された。そのため、この遺伝子は目的の遺伝子候補であると考えられる。

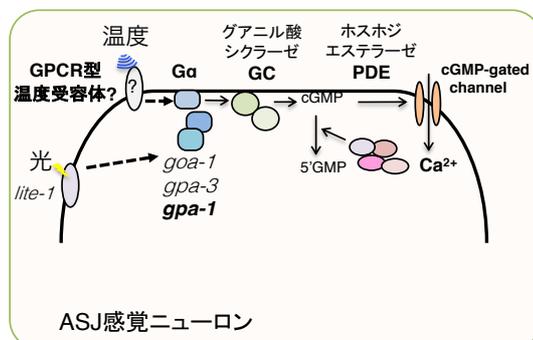


図 1: ASJ 感覚ニューロンにおける温度感知情報伝達に関する分子制御機構の模式図。複数の  $G\alpha$  タンパク質が加算的に働く。GPCR 型温度受容体に関しては未同定である。

ASJ の光情報伝達に関わる 3 つの  $G\alpha$  タンパク質 (*goa-1*, *gpa-1*, *gpa-3*) の変異体や、2 つのグアニル酸シクラーゼ (*odr-1* と *daf-11*) のそれぞれの変異体は、20°C 飼育後に低温刺激を与えても生存できる異常が観察された。さらに、ホスホジエステラーゼの変異体においても異常が観察された。以上のことから、ASJ 感覚ニューロンの光情報伝達に関わる分子が低温耐性にも関わることを示唆され、光と温度の受容は、共通の分子による G タンパク質経路で伝達される可能性が考えられた。さらに、 $G\alpha$  タンパク質の変異体である *goa-1* または *gpa-1* の低温耐性の異常は、二重変異体や三重変異体にすることでより強い低温耐性の異常が見られた。同様に、グアニル酸シクラーゼの変異体である *daf-11* と *odr-1* の低温耐性の異常も *daf-11*; *odr-1* 二重変異にすることで、ほぼ 100% の生存率を示す異常が観察された。つまり、これら  $G\alpha$  タンパク質やグアニル酸シクラーゼは、複数の分子がそれぞれ共同して機能していると考えられた。

温度の情報伝達に関して、ASJ 温度受容ニューロンにおける 3 つの  $G\alpha$  タンパク質の共

同的な制御が必須であることが示唆されたため、次に、ASJ ニューロンの神経活動のレベルでも複数の分子が共同して機能しているかをカルシウムイメージング法を用いて解析した。

温度刺激を与えた際に、G $\alpha$  タンパク質の変異体である *goa-1*、*gpa-1*、*gpa-3* それぞれの ASJ 感覚ニューロンにおけるカルシウム濃度の変化を調べたところ、*gpa-1* 変異体のみでわずかな異常が見られた。一方で、温度刺激パターンを変えると、*goa-1*、*gpa-1*、*goa-3* 変異体すべてにおいて異常が見られた。詳細なデータを加味すると、これらの G $\alpha$  タンパク質は細胞内のカルシウム濃度を定常状態へ戻す際に機能している可能性が考えられた。以上の結果から、ASJ において複数の G $\alpha$  タンパク質が温度情報伝達を加算的に処理していることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

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

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

*Cell Reports*, 16, 1, 56-65, 2016 (査読有)

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

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

*PLOS ONE*, 11(10): e0165518., 1-20, 2016 (査読有)

(3) Okahata M., Ohta, A., Mizutani, H., Minakuchi, Y., Toyoda, A., Kuhara, A.

Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in *Caenorhabditis elegans*

*Journal of Comparative Physiology B*, 186, 8, 985-998, 2016 (査読有)

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

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

*Genes to Cells*, 21, 9, 936-948, 2016 (査読有)

(5) 久原 篤, 宇治澤 知代, 太田 茜

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

[学会発表] (計 17 件)

(1) 大西康平、三浦徹、宇治澤知代、太田茜、久原篤

*C. elegans* をモデルとした GPCR 型温度受容体のスクリーニング

温度生物学若手の会

2018 年 1 月 19-20 日

邦和セミナープラザ、名古屋、愛知

(2) 大西康平、三浦徹、宇治澤知代、太田茜、久原篤

線虫 *C. elegans* における新規の GPCR 型温度センサーの探索

分子生物学会

2017 年 12 月 6-9 日

神戸国際会議場、神戸市、兵庫

(3) 久原篤、太田茜

線虫の温度応答を使い脳神経系を理解する  
大阪府生物教育研究会

2017 年 11 月 29 日

甲南大学、神戸市、兵庫

(4) 大西康平、三浦徹、宇治澤知代、太田茜、久原篤

線虫 *C. elegans* の温度耐性における GPCR 型の温度受容体の単離に向けた解析

日本動物学会第 88 回年会

2017 年 9 月 21-23 日

富山県民会館、富山市、富山

(5) 大西康平、三浦徹、宇治澤知代、太田茜、久原篤

線虫 *C. elegans* の低温耐性を制御する GPCR 型温度受容体の探索

日本遺伝学会

2017 年 9 月 13-15 日

岡山大学、岡山市、岡山

(6) Kohei Ohnishi, Toru Miura, Tomoyo Ujisawa, Akane Ohta, Atsushi Kuhara

Screening for temperature sensor in ASJ sensory neuron regulating cold tolerance

21th *C. elegans* International conference

2017 年 6 月 21-25 日

UCLA, Los. Angels, USA

(7) 久原篤、太田茜

線虫をモデルとした温度応答の分子神経科学

Advanced Biological Chemistry seminar

2017 年 6 月 19 日

京都大学、京都市、京都

(8) 太田茜  
温度情報伝達の分子制御機構  
大学女性協会 守田科学研究奨励賞式 受賞講演  
2017年6月4日  
アルカディア市ヶ谷(私学会館)、市ヶ谷、東京

(9) 宇治澤知代、太田茜、井伊美紀、有坂勝史、豊田敦、久原篤  
線虫 *C.elegans* の低温耐性を司る分子生理メカニズム  
動物学会近畿支部会  
2017年5月13日  
神戸大学、神戸、兵庫

(10) 大西康平、三浦徹、宇治澤知代、太田茜、久原篤  
線虫 *C. elegans* の低温耐性における GPCR 型の温度センサーの探索  
動物学会近畿支部会  
2017年5月13日  
神戸大学、神戸、兵庫

(11) 大西康平、宇治澤知代、太田茜、久原篤  
線虫から探る温度応答の分子神経メカニズム  
統合ニューロバイオロジー研究所 第4回シンポジウム  
(招待講演 国内シンポジウム)  
2017年1月16日  
甲南大学、神戸、兵庫

(12) 久原篤、太田茜  
線虫から学ぶ温度応答の制御機構  
第1回 Biothermology Workshop - 生命システムの熱科学 -  
(招待講演 国内ワークショップ)  
岡崎コンファレンスセンター、岡崎、愛知  
2016年12月10-11日

(13) 久原篤、宇治澤知代、太田茜  
線虫から探る温度応答と記憶のエッセンス  
動物学会近畿支部会 秋期講習会/  
統合ニューロバイオロジー研究所 第3回シンポジウム  
(招待講演 国内シンポジウム)  
2015年12月5日  
甲南大学、神戸、兵庫

(14) 宇治澤知代、宇多美里、井伊辰也、井伊美紀、太田茜、久原篤  
温度適応における温度受容ニューロンと下流組織の分子制御機構  
分子生物学会年会  
(口頭発表、査読有)  
2015年12月1-4日  
国部国際会議場、神戸、兵庫

(15) 久原篤、宇治澤知代、太田茜  
Regulatory system for temperature response in nematode *C. elegans*  
動物学会 ホメオスタシスバイオロジースンポジウム  
(招待講演 国内シンポジウム)  
2015年9月18日  
朱鷺メッセ、新潟

(16) Tomoyo Ujisawa, Kohei Ohnishi, Tohru Miura, Akane Ohta, Atsushi Kuhara  
Temperature experience-dependent cold acclimation in nematode *C. elegans*  
生物物理学会  
(招待講演 国内シンポジウム)  
2015年9月13日  
金沢大学、金沢、石川

(17) Atsushi Kuhara, Tomoyo Ujisawa, Tohru Miura, Misato Uda, Akane Ohta  
Temperature experience-dependent cold habituation in *C. elegans*  
神経科学学会  
(口頭発表、査読有)  
2015年7月28-31日  
国部国際会議場、神戸、兵庫

[図書] (計2件)

(1) 太田茜、園田悟、久原 篤  
匂いに慣れたらどうなるの? センチュウの匂い順応テスト: 嗅覚順応行動の測定  
研究者が教える動物実験 第1巻 感覚, p42-45, 共立出版, 2015

(2) 太田茜、園田悟、久原 篤  
好きなにおいに向かっていく行動を見てみよう センチュウの走化性テスト: 嗅覚応答行動の測定  
研究者が教える動物実験 第3巻 行動, p32-35, 共立出版, 2015

[その他]  
ホームページ等  
所属研究室ホームページ  
<http://kuharan.com/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
太田 茜 (OHTA AKANE)  
甲南大学大学院・自然科学研究科・特別研究員  
研究者番号: 50410717