

令和 6 年 4 月 1 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19279

研究課題名（和文）ディジェネリン型メカノ受容体DEG-1を介した温度受容と低温耐性制御

研究課題名（英文）Regulation of cold tolerance and thermo-sensation via degenerin-type mechano receptor DEG-1

研究代表者

久原 篤（Kuhara, Atsushi）

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：00402412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：温度は生体の生存と繁栄に関わる重要な環境情報のひとつである。本研究では、線虫*C. elegans*が示す温度応答のひとつである低温耐性を実験系として、温度受容の分子機構に関わる新しい原理の同定を目的とした解析を進めた。特に、近年同定した新規温度受容体であるDEG/ENaC DEG-1を起点として、温度受容に関わる新規の分子の同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを含む高等動物においてもDEG/ENaCは存在し、ヒトのMDEGも温度受容に関わることを以前に発表した。そのため、本研究で見つけてきた新たな温度受容体やその関連分子の解析を発展させることで、ヒトを含む動物の温度受容や温度関連疾患の原因解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Temperature is one of the most important environmental information for the survival and prosperity of living organisms. In this study, we analyzed one of the temperature responses exhibited by the nematode *C. elegans*, cold tolerance, as an experimental system, with the aim of elucidating new principles involved in the molecular mechanism of thermosensation. Since we previously found that the mechanoreceptor DEG-1, DEG/ENaC, is a temperature receptor, we identified a new molecule related to mechanoreceptor-mediated thermosensation.

研究分野：生物学

キーワード：C. elegans 低温耐性 線虫 温度受容体 DEG/ENaC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

ディジェネリン型メカノ受容体 DEG-1 を介した温度受容と低温耐性制御

1. 研究開始当初の背景

温度は生体の生存と繁殖に関わる重要な環境情報のひとつである。線虫 *C. elegans* が示す温度応答のひとつである低温耐性は動物の温度適応を解析する実験系として有用であり、温度受容の分子機構に関わる新しい原理を解き明かすことを目的として解析を進められてきていた。そのなかから、研究開始当初、メカノ受容体である DEG/ENaC が温度受容に関わることが見つかってきていたため、メカノ受容体 DEG/ENaC を介した温度受容の分子生理的機構を明らかにすることが望まれるという背景であった。

2. 研究の目的

これまでに、メカノ受容体である DEG/ENaC の線虫変異体である *deg-1* 変異体は低温耐性に異常をもち、その原因は ASG 感覚ニューロンにおける DEG-1 を介した温度受容情報伝達の低下にあることが示唆されていた。一方で DEG/ENaC を介した温度受容に関してその分子生理的機構には未知の点が多く残されていた。そこで、メカノ受容体を介した温度受容に関して、その関連分子の同定やメカノ受容体による温度受容の生理的な機構を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

温度刺激依存的に発現変動する遺伝子を同定するためのトランスクリプトーム解析や、変異体線虫の低温耐性解析、メカノチャネルの温度応答性を解析するための電気生理学的解析に関する方法を用いた。

低温耐性テスト

低温耐性の解析は過去に公表した論文を参考に行った (Ohta et al., *Nature commun*, 2014; Ujisawa et al., *Protocol Exchange*, 2014; Okahata et al., *Journal of Comparative Physiology B*, 2016)。15°Cか25°Cで飼育された *C. elegans* を 2°C のメディカルキャビネットにて特定の時間静置し、低温刺激温度を与える。その後、キャビネットからタッパーを取り出し、15°Cで一晩置き、生存率を顕微鏡下で測定する。(18H02484 報告書より改変引用)

アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた 2 本差し電圧固定法

MDEG cRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞 (*Xenopus oocyte*) にそれぞれ 30 個体ずつ injection し、電気生理解析をおこなう前に 1~4 日間 18°C で培養した。卵母細胞の膜電位を -80 mV に保持し、100 mM NaCl 溶液、2 mM MgCl₂ 溶液、10 mM HEPES (pH7.3) 溶液、1mM KCl 溶液、1mM CaCl₂ 溶液で作製されたバスソリューション中で Oocyte Clamp (OC-725C; Warner Instruments, USA) 及び clamp software (Molecular Devices, USA) を使用した 2 本差し電圧固定法を用いて電流を記録した。温度刺激は lab-made temperature controller を用いて 10~35°C まで調節し、卵母細胞に隣接する温度プローブと温度計 (DIGITAL THERMOMETER PTC-401; UNIQUE MEDICAL, Japan) の両方によって記録した。アレニウスプロットは、縦軸に温度の逆数

(1,000/K)、横軸に温度刺激によって誘導された電流値の対数 (log) をとって示した。温度閾値はプロットされた 2 つの直線の交点から計算し、そこで得られた温度を閾値として平均化を行った。ネガティブコントロール実験として、DEG/ENaC の阻害剤である amiloride を使用した。電気生理学解析前に卵母細胞を 500 μ M の amiloride 溶液 (Sigma-Aldrich, USA) を含む溶液中で 18°C・48 時間インキュベートを行なった。また、電位依存性チャネルの検証においては -150mV から 100mV まで膜電位を変化させた際の電流値の変化を測定した。それぞれ温度を 10°C、20°C、30°C 一定にさせ、温度ごとの電位依存性を確認した。また、2 つの cRNA を同時に発現させる場合は、cRNA を 1:1 の割合で混ぜ、milliQ で 1/10 または 1/5 の濃度に希釈してから injection を行った。(佐藤夕希 甲南大学修士論文より引用)

4. 研究成果

温度は生体の生存と繁殖に関わる重要な環境情報のひとつである。本研究では、線虫 *C. elegans* が示す温度応答のひとつである低温耐性を実験系として、温度受容の分子機構に関わる新しい原理を解き明かすことを目的として解析を進めた。特に、メカノ受容体である DEG/ENaC である DEG-1 が温度受容体であることを近年見つけたため、メカノ受容体を介した温度受容に関して解析をすすめた。これまでに、メカノ受容体である DEG/ENaC の変異体である *deg-1* 変異体が低温耐性に異常をもち、その原因は ASG 感覚ニューロンにおける DEG-1 を介した温度受容情報伝達の低下にあることが示唆されてきた。そこで、メカノ受容体を介した温度受容に関して、その関連分子の同定やメカノ受容体による温度受容の生理的な解析をすすめた。

温度刺激依存的に発現変動する遺伝子をトランスクリプトーム解析から同定し、その中からメカノチャネルおよびメカノチャネルの制御分子をコードする遺伝子を選別した。そのなかには、DEG-1 以外の DEG/ENaC チャネルも含まれていたため、その遺伝子の変異体の低温耐性を測定したところ、ナル変異体では低温耐性異常が見られなかったため、その遺伝子の機能獲得型変異体を用いて、低温耐性の異常の有無を確認した。機能獲得型変異体において低温耐性の異常が確認されたため、DEG/ENaC チャネルのナル変異体に DEG/ENaC の機能獲得型遺伝子を外来遺伝子として導入し、それによって、低温耐性の異常が見られるようになるかを解析したところ、実際に異常が見られた。さらに、温度刺激依存的に発現変動する遺伝子のトランスクリプトーム解析から、DEG/ENaC 以外の新規の温度受容体候補遺伝子として、3 量体 G タンパク質に関連した遺伝子が見つかったため、その遺伝子の変異体の低温耐性を調べたところ、異常が観察された。また、3 量体 G タンパク質に関連した遺伝子の変異体において温度受容ニューロンの活動をカルシウムイメージングで測定した結果、温度応答性の低下が見られた。

単離されてきた DEG-1 以外の DEG/ENaC が温度に反応するチャネルであるかどうかを電気生理学的に解析するために、アフリカツメガエルの卵母細胞に当該 DEG/ENaC チャネルを発現させ、2 本差しパッチクランプ法を用いて、温度刺激に対して細胞内ナトリウムイオン濃度の変化が生じるかを電気生理学的に測定した。その結果、温度に反応するチャネルであることが示唆された(図 1)。また、人工膜で DEG-1 や新たに見つけた温度感受性 DEG/ENaC を発現させるための材料を作成し、条件検討のためのヒト培養細胞での発現に成功した。

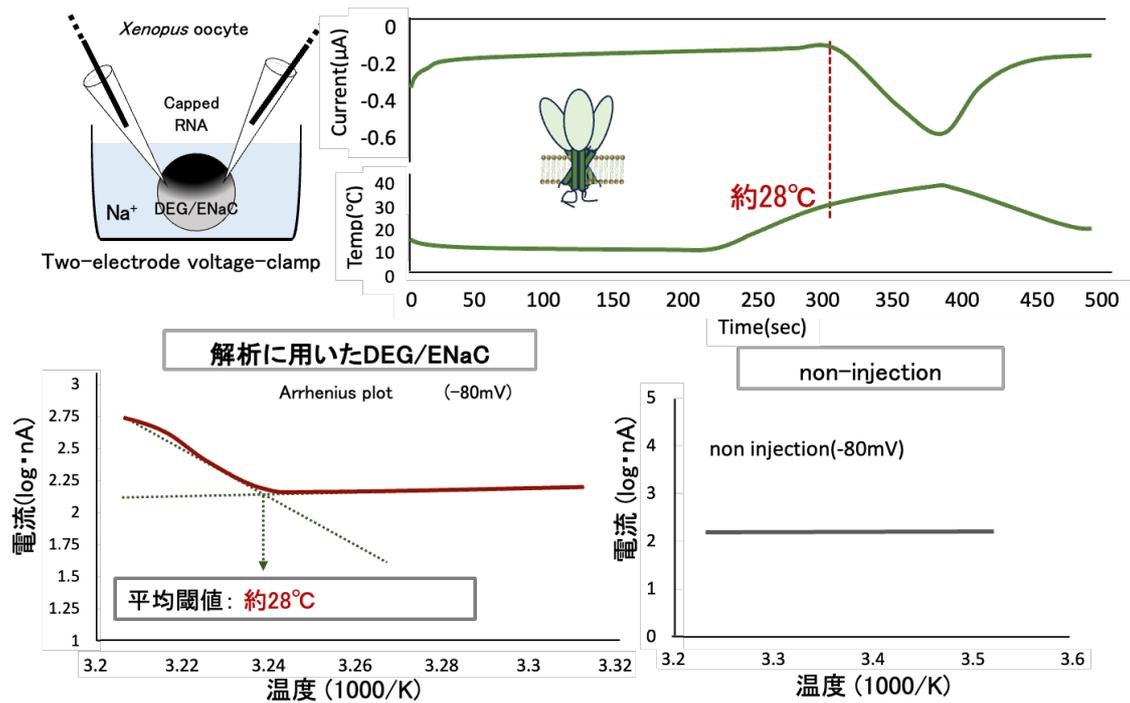


図1 新規 DEG/ENaC を発現させた *Xenopus* 卵母細胞における Na⁺流入の二本差し電圧固定法を用いた測定

(A)代表例の生データを模擬的に記載したグラフ。

(B)(A)のアレニウスプロット。横軸が温度の逆数で、縦軸が電流値を示す。温度が 28.6°Cに達した時点で、UNC-8 を発現している卵母細胞の電流が有意に変化していた。この時の膜電位は -80mV である。

(C) 新規 DEG/ENaC をキャップしていない卵母細胞では電流の変化は見られなかった。この時の膜電位は -80mV である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Motomura Haruka, Ioroi Makoto, Murakami Kazutoshi, Kuhara Atsushi, Ohta Akane	4. 巻 119
2. 論文標題 Head-tail-head neural wiring underlies gut fat storage in <i>Caenorhabditis elegans</i> temperature acclimation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2203121119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 OKAHATA Misaki, MOTOMURA Haruka, OHTA Akane, KUHARA Atsushi	4. 巻 98
2. 論文標題 Molecular physiology regulating cold tolerance and acclimation of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 126 ~ 139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2183/pjab.98.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 岡畑美咲、久原 篤	4. 巻 61
2. 論文標題 Neural Circuit Model for Sensory Information Integration in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 192-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.61.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohnishi Kohei, Sokabe Takaaki, Miura Toru, Tominaga Makoto, Ohta Akane, Kuhara Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 G protein-coupled receptor-based thermosensation determines temperature acclimatization of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-46042-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okahata Misaki, Sawada Natsumi, Nakao Kenji, Ohta Akane, Kuhara Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Screening for cold tolerance genes in <i>C. elegans</i> , whose expressions are affected by anticancer drugs camptothecin and leptomycin B	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-55794-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Akane, Yamashiro Serina, Kuhara Atsushi	4. 巻 194
2. 論文標題 Temperature acclimation: Temperature shift induces system conversion to cold tolerance in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2023.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計25件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Atsushi Kuhara, Kohei Ohnishi, Serina Yamashiro, Takaaki Sokabe, Haruka Motomura, Toru Miura, Makoto Tominaga, Akane Ohta
2. 発表標題 GPCR-mediated thermoensation and iron transport via SLCR are required for <i>C. elegans</i> cold tolerance
3. 学会等名 International Symposium on Mechanobiology for Human Health (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chinatsu Morimoto, Chie Miyazaki, Kohei Ohnishi, Tohru Miura, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 A new candidate of thermoreceptor in cold tolerance of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sana Murakami, Misaki Okahata, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Isolation of novel gene involved in cold tolerance and measurement of thermosensory activity depending on cultivation temperature
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sana Murakami, Misaki Okahata, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Screen for new genes required for temperature acclimation and thermal-memory in thermosensory neuron of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 11th International Tunicate Meeting (11ITM) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akane Ohta, Kohei Ohnishi, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 DEG/ENaC and GPCR-mediated temperature sensation required for cold tolerance in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 11th International Tunicate Meeting (11ITM) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sana Murakami, Misaki Okahata, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Screen for novel genes involved in temperature acclimation and sensitivity control of thermosensory neuron dependent on cultivating temperature
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回 日本神経科学大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Kuhara, Kohei Ohnishi, Akane Ohta
2. 発表標題 Identification of DEG/ENaC and GPCR temperature receptors underlying cold tolerance in <i>Caenorhabditis elegans</i>
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回 日本神経科学大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤夕希, 美馬 直, 磯野一帆, 太治輝昭, 太田茜, 久原篤
2. 発表標題 動物と植物の温度耐性に共通して関わるスプライソソーム因子AQRの解析
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春の分科会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺西宏顕, 井関 敏啓, 高垣菜式, 水口洋平, 豊田敦, 太田茜, 久原篤
2. 発表標題 線虫の低温耐性における転写伸長因子TCEB-3の機能細胞解析
3. 学会等名 第2回日本遺伝学会春の分科会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Nervous-gut system coordinates temperature acclimation in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 the TARA international online symposium (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久原篤、太田茜
2. 発表標題 Molecular-neurogenetics of temperature response in animal
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久原篤、太田茜
2. 発表標題 Identification of novel temperature receptor isolated from cold tolerance and acclimation of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤夕希, 美馬 直, 磯野一帆, 太治輝昭, 太田茜, 久原篤
2. 発表標題 Analysis of splicing factor AQR that is involved in temperature tolerance and responsible gene for abnormal cold tolerance in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久原篤
2. 発表標題 動物の低温耐性の研究における今後の発展に向け
3. 学会等名 第74回 甲南大学総合研究所公開講演会、異分野融合研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Teranishi, Toshihiro Iseki, Natsune Takagaki, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Neuronal transcription elongation factor TCEB-3 positively regulates cold tolerance in C elegans
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会、第1回 CJK 国際会議(The 1st China-Japan-Korea International Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroaki Teranishi, Toshihiro Iseki, Natsune Takagaki, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Transcription elongation factor, elongin TCEB-3, positively controls cold tolerance
3. 学会等名 23th C. elegans International conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤夕希, 磯野一帆, 太治輝昭, 太田茜, 久原篤
2. 発表標題 線虫C. elegansの温度耐性におけるDEG/ENaCおよびAQRの関与
3. 学会等名 動物学会近畿支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Sato, Akane Ohta, Akira Kawanabe, Yuichiro Fujiwara, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Regulation of cold tolerance by temperature-sensitive DEG/ENaC, DEG-1 and UNC-8
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoka Sakaguchi, Kohei Ohnishi, Tohru Miura, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Analysis of a GPCR STR involved in temperature acclimation of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohei Ohnishi, Takaaki Sokabe, Toru Miura, Makoto Tominaga, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Thermosensitive G protein-coupled receptor regulates temperature acclimatization of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 比較生理生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤夕希, 太田茜, 川鍋陽, 藤原祐一郎, 久原篤
2. 発表標題 DEG/ENaC 型メカノレセプターは線虫 <i>C. elegans</i> の低温耐性と温度受容に関与する
3. 学会等名 動物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤夕希, 太田茜, 川鍋陽, 藤原祐一郎, 久原篤
2. 発表標題 DEG/ENaC 型メカノレセプターは線虫の温度受容や低温耐性に関与する
3. 学会等名 線虫の未来を創る会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Kuhara, Kohei Ohnishi, Takaaki Sokabe, Toru Miura, Makoto Tominaga, Akane Ohta
2. 発表標題 GPCR SRH-mediated thermoensation is required for <i>C. elegans</i> temperature acclimatization
3. 学会等名 神経科学学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Sato, Akane Ohta, Akira Kawanabe, Yuichiro Fujiwara, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Functional analysis of the DEG/ENAC-type thermoreceptor complex involved in cold tolerance of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 神経科学学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Kuhara, Akane Ohta
2. 発表標題 Temperature sensation and gut fat storage in cold acclimation of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 The 8th Diabetes Research Innovation Symposium 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山城芹奈, 太田茜, 久原篤	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 337
3. 書名 温度刺激による生体応答ダイナミクス (p47-55を担当 環境温度ストレスによる生体応答)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

久原研究室ホームページ
<http://kuharan.com/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------