

令和 6 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15141

研究課題名（和文）線虫*C. elegans*の高い温度への馴化に関わるミトコンドリア分子の解析

研究課題名（英文）HADH, involved in mitochondrial fatty acid metabolism, regulates temperature acclimation

研究代表者

岡畑 美咲 (Okahata, Misaki)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特別研究員 (RPD)

研究者番号：20880561

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：動物が温度変化に適応するメカニズムの解明を目指して、線虫*C. elegans*の高温馴化現象の解析を行なった。RNAシーケンス解析から、温度上昇時に発現が増加するHADHに着目した。HADHはミトコンドリアにおいて脂肪酸代謝の酸化に関わることが知られていたが、温度応答に関わるかはわかっていなかった。hadh変異体は高温馴化異常を示したため、hadh変異体が高温馴化を制御する組織の絞り込みを行なった。HADHは腸とニューロンで発現し、ニューロンで野生型hadh遺伝子を発現させることで変異体の異常が回復した。このことから、HADHはニューロンで機能することで高温馴化を制御することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は常に存在する重要な環境情報であり、動物は温度変化に適応する生体メカニズムを備えている。体温調節機能の異常は熱中症やヒートショックなどを引き起こすことから、温度に馴れる仕組みを明らかにすることにより、温度に関わる疾患の解明につながると考えられる。本研究では、モデル動物である線虫*C. elegans*を用いた温度応答解析から、ミトコンドリアの脂肪酸代謝に関わるHADHが神経系で温度応答を制御することを明らかにした。HADHが温度応答に関わるという報告は本研究によって初めて明らかになったことから、今後解析を進めることにより、温度応答に関わる新規メカニズムの解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism by which animals acclimate to temperature changes, we analyzed temperature acclimation of *C. elegans*. We screened for genes whose expression was altered by temperature change with RNA sequencing analysis. We focused on hadh gene, which is upregulated upon temperature increase. HADH is known to be involved in  $\beta$ -oxidation of fatty acid metabolism in mitochondria in humans, but it has not been reported to be involved in temperature response. The hadh mutant showed abnormal temperature acclimation with slower acclimation to 25 °C compared to the wild-type animals. To identify tissues in which HADH regulates temperature acclimation, we performed expression analysis and tissue-specific rescue experiments. HADH was expressed in the intestine and some neurons. Abnormal temperature acclimation in hadh mutants was restored by expressing the wild-type hadh gene in neurons, suggesting that hadh regulate temperature acclimation by functioning in neurons.

研究分野：遺伝学

キーワード：*C. elegans* 高温馴化

## 1. 研究開始当初の背景

生物は常に温度を受容し、急激な温度変化にも適応することで恒常性を維持している。一方で、温度変化に適応するメカニズムに関しては未知な点が多く残されている。そこで、動物が温度に慣れる仕組みを明らかにするために、モデル動物である線虫 *C. elegans* の低温耐性・温度馴化現象を指標に解析を行なっている。これまでに、低い温度への馴化には KCNQ 型カリウムチャネルである KQT-2 が温度受容ニューロン ADL で機能することで温度馴化を制御することが明らかになっていたが (Okahata et al., *Science Advances*, 2019)、高い温度への馴化に関わるメカニズムに関してはわかっていなかった。高温馴化を制御する新規遺伝子を同定するために、飼育温度依存的に発現変動する遺伝子を調べた。ヒトにおいてミトコンドリアの脂肪酸代謝経路で機能する HADH の線虫ホモログ遺伝子は高い温度に数時間置くと発現が増加していた。HADH が温度応答に関わる報告はこれまでになかったため、HADH の高温馴化の解析を進めることで、ヒトにまで保存された温度適応機構の解明を目指すに至った。

## 2. 研究の目的

温度は常に存在する重要な環境情報であり、動物は温度変化に適応するためのメカニズムを備えている。一方で、動物の温度応答メカニズムには未知な点が多く残されているため、動物が温度変化に馴れる仕組みの解明を目指して、線虫 *C. elegans* の温度馴化現象を指標に解析を行なっている。これまでに、線虫 *C. elegans* が高い温度に馴れる現象には、HADH (3 ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素) が関わるということがわかってきた。ヒトの HADH はミトコンドリアのベータ酸化経路の 3 段階目の反応を触媒することが知られていたが、温度馴化における機能は全くわかっていなかった。そこで、本研究では線虫 *C. elegans* を用いて HADH が温度馴化を制御するメカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

HADH が高温馴化を制御する組織を同定するために、線虫 *C. elegans* の HADH の発現細胞解析と *hadh* 変異体の温度馴化回復実験を行なった。

### HADH の発現細胞解析

HADH が発現する組織を調べるために、*hadh* 遺伝子のプロモーターの下流に *hadh* cDNA と GFP 蛍光タンパク質を繋いだプラスミドを野生株に導入し、蛍光観察をおこなったところ、腸とニューロンで GFP 蛍光が観察された。HADH が発現するニューロンを同定するために、全ての神経細胞が 4 色の蛍光タンパクで色分けされた NeuroPAL 系統を用いて、*hadh* プロモーターが発現誘導する GFP 蛍光タンパク質との蛍光の重なりを調べた。

## hadh 変異体の温度馴化回復実験

HADH が高温馴化を制御する組織を調べるために、hadh 変異体の組織特異的回復実験を行なった。HADH の発現が見られた組織で特異的に hadh cDNA を発現させた hadh 変異体の高温馴化を作製し、高温馴化の異常が回復するかを調べた。具体的には、15 度で卵から成虫になるまで飼育し、25 度に 3 時間置いてから 2 度の低温刺激を 48 時間与えた。その後一晩 15 度に置き、翌日死んでいる個体と生きている個体を数え、生存率を算出した。これらの操作は過去に公表された論文を参考に行なった (Ohta et al, *Nature commun*, 2014; Ujisawa et al., *Protocol Exchange*, 2014; Okahata et al., *Journal of Comparative Physiology B*, 2016)。

### 4. 研究成果

HADH プロモーターにより GFP が発現誘導される細胞を観察したところ、腸とニューロンで GFP 蛍光が観察された。そこで、腸とニューロン特異的に野生型 hadh 遺伝子を発現させた hadh 変異体の高温馴化を測定した。腸で特異的に hadh 遺伝子を発現させても高温馴化異常は回復しなかったが、ニューロン特異的に hadh 遺伝子を発現させると異常が回復した (図 1)。このことから、HADH はニューロンで機能することで高温馴化を制御することが示唆された。

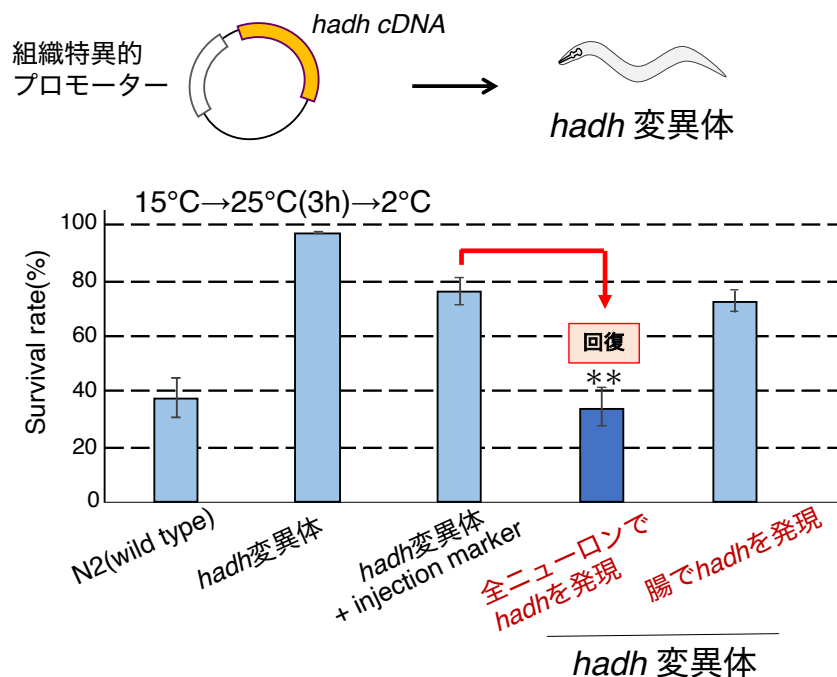


図1 hadh 変異体の組織特異的回復実験

15 度で飼育した後、25 度に 3 時間置いて 2 度の低温刺激を与えると、約 60% の野生株は 25 度の温度に馴化して死滅する。15 度で飼育した hadh 変異体のほとんどの個体は 25 度に馴化できず、ほとんどの個体が生存する高温馴化異常を示す。hadh 変異体の高温馴化異常は腸で特異的に野生型 hadh 遺伝子を発現させても回復しなかったが、ニューロンで特異的に発現させることで回復した。

HADH が高温馴化を制御するニューロンを絞り込むために、様々なニューロン特異的プロモーターを用いて *hadh* 遺伝子を特定のニューロンで発現させた *hadh* 変異体の高温馴化を測定した。その結果、13 種類のニューロンで特異的に *hadh* 遺伝子を発現させると *hadh* 変異体の高温馴化異常が回復した (図2)。このことから、HADH は 13 種類のニューロンのいずれかで機能することで高温馴化を制御することが示唆された。

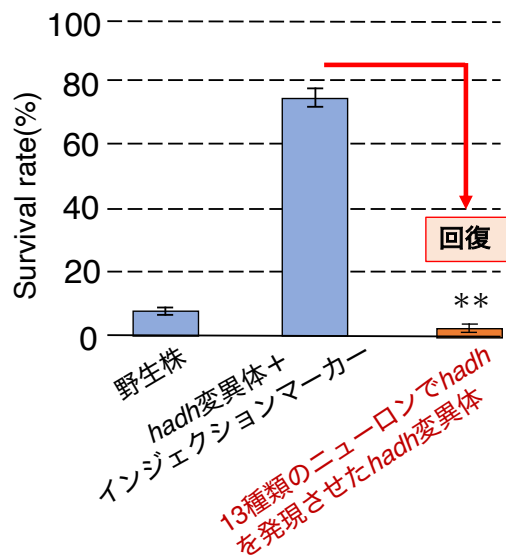


図2 *hadh* 変異体のニューロン特異的回復実験  
*hadh* 変異体は 25 度に馴化するのが遅くなる高温馴化異常を示し、この異常は 13 種類のニューロンで特異的に野生型 *hadh* 遺伝子を発現させることで完全に回復した。

13 種類のニューロンのうち、どのニューロンで HADH が発現するかを調べるために、*hadh* プロモーターによって発現誘導される GFP 蛍光の観察をおこなった。その結果、頭部ニューロンと尾部のニューロンで GFP 蛍光が観察された (図3)。HADH が発現するニューロンを同定するために、全ての神経細胞が 4 色の蛍光タンパクで色分けされた NeuroPAL 系統を用いた。*hadh* 変異体の高温馴化が回復する 13 種類のニューロンのうち、尾部のニューロンにおいて HADH が発現することがわかった。発現がみられた尾部のニューロンで *hadh* 遺伝子を発現させた *hadh* 変異体を作製し、高温馴化異常が回復するかを調べたが、高温馴化異常は回復しなかった。今後、個々のニューロンで発現するプロモーターを用いて、HADH が高温馴化を制御するニューロンセットの絞り込みを行う予定である。

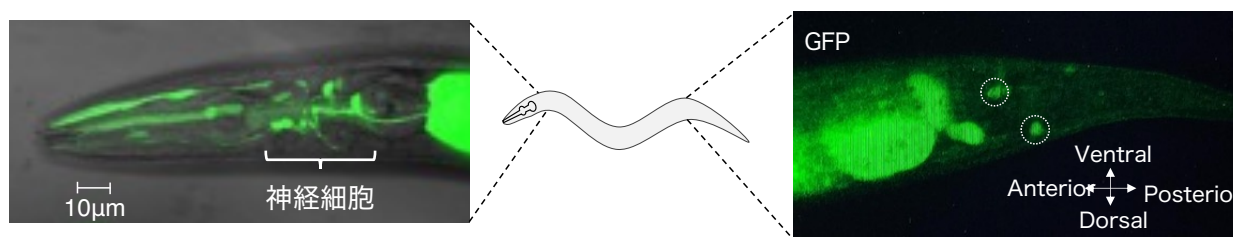


図3 HADH の発現細胞解析

GFP 蛍光タンパク質を用いて HADH が発現する組織を調べた。*hadh* 遺伝子のプロモーターにより、頭部と尾部のニューロンにおいて GFP の発現がみられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Okahata Misaki, Sawada Natsumi, Nakao Kenji, Ohta Akane, Kuhara Atsushi	4. 巻 14
2. 論文標題 Anticancer drugs affect temperature signaling and epigenetic factors in the cold tolerance of <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2022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） 10.21203/rs.3.rs-2261648/v1	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 HADH regulating temperature acclimation function in mitochondria of neuron of <i>C. elegans</i> 温度馴化を制御する遺伝子HADHは線虫の神経細胞のミトコンドリアで機能する
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 HADH involved in mitochondrial $\beta$ -oxidation regulates temperature acclimation in interneurons of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Mitochondria metabolism in neuron regulates temperature acclimation 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 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 "神経細胞のミトコンドリアのHADHが温度馴化を制御する HADH in mitochondria of neuron regulates temperature acclimation in <i>C. elegans</i> "
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 HADH functioning in neural cells regulates cold acclimation in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 比較生理生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 HADH which functions in neural cells regulates temperature acclimation 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 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 C. elegans homologue of HADH involved in human mitochondrial fatty acid metabolism regulates neural function in temperature acclimation
3. 学会等名 生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 HADH in beta oxidation reaction of fatty acid metabolism of mitochondria regulates cold acclimation
3. 学会等名 遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 線虫C. elegansの低温馴化は神経系におけるミトコンドリア脂肪酸β酸化関連分子によって制御される
3. 学会等名 動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 HADH involved in beta-oxygen reaction regulates cold acclimation in neurons
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Cold acclimation regulated by neural fatty acid metabolism in mitochondria via HADH
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 6st China-Japan-Korea International Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 HACD-1 in neural cells regulate cold acclimation in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 23th <i>C. elegans</i> International conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihisa Fukumoto, Misaki Okahata, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 ミトコンドリアの脂肪酸代謝に関わるHACD-1は神経系において線虫の低温馴化を制御する
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 Yukina Mori, Misaki Okahata, Akihisa Fukumoto, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Neuronal HACD-1 regulates 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 Yukina Mori, Misaki Okahata, Akihisa Fukumoto, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara
2. 発表標題 Neuronal function of HADH is required for temperature acclimation of <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 神経科学学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室ホームページ <a href="http://kuharan.com">http://kuharan.com</a> 所属研究室ホームページ <a href="http://kuharan.com/index.html">http://kuharan.com/index.html</a>
--

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
---------	---------