

皮膚で発現する化学物質受容体が体の温度適応に与える影響

甲南大学大学院自然科学研究科／統合ニューロバイオロジー研究所

太田 茜、高垣 菜式

Animals senses temperature information for acclimation and habituation to dynamically changing environmental temperature conditions. However, their molecular and cellular machinery has not been well known. In this analysis, nematode *Caenorhabditis elegans* was utilized to study molecular and cellular machinery of temperature tolerance. Through the analysis, chemical receptor expressing in cuticle was involved in temperature acclimation of the body.

1. 緒言

温度は生体に影響を与える重要な環境情報であり、体温の1℃の変化が生体の状況に大きな影響を与える。これまでに環境温度に対する生体調節について、主に生化学的な視点から解析が行われてきたが、その分子機構については、未知の点が多く残されている。そのような背景において、従来の神経系に加えて表皮や皮下組織における温度の受容やその制御が、個体の温度に対する適応や耐性に重要である可能性が考えられている。そこで、本研究では、全細胞数が約1000個と非常に少ない線虫 *Caenorhabditis elegans* を解析系として、表皮で発現している受容体が個体の温度耐性に関わるかどうかを、分子遺伝学的に検証した。特に、ヒトにおいて神経系や表皮で発現している機械刺激受容体が実際に温度を受容して、個体の温度耐性を制御しているかを調べ、その変異体における体内の脂肪酸比率を測定したため、その現状を記載する。

我々ヒトを含む動物が生息している地球上では、その地域や昼夜によって劇的に温度が変化する。例えば、砂漠地区では日中の温度差が約50℃を超えることもあり、一年の最低と最高の気温差を見ると日本でも約40℃近い温度の変化幅の中で生活をしている。このような生物の機構として、高温適応や低温適応が存在する。そのなかでも低温適応については、植物から動物まで幅広く研究が行われている。生物が示す低温への適応としては、普段生息している温度よりも低い温度で生息すると、より低温にさらされてもダメージが少ない現象である。このような現象は、植物や昆虫でも観察され、それらにおいては、細胞内において凍結しにくいトレハロースなどの糖やアミノ酸を集積さ

せたり、細胞膜の組成を不飽和脂肪酸に置き換えることで低温耐性を獲得していると考えられている。このように、低温への適応や耐性に関して、最終的な脂質や糖の蓄積による不凍化が知られている一方で、このような不凍化を引き起こすまでの温度情報の受容や温度情報伝達に関しては、未知の点が多く残されている。その理由として、膨大な細胞によって構成される生物種では、それらの細胞からなる細胞間ネットワークと温度適応との相関性を解明するためのタイムスケールが大きくなるためである。そのような背景をふまえて、本研究においては、シンプルなモデル動物 *C. elegans* を利用して、温度適応を司る新規分子の同定を目指した。

C. elegans は土壌自活性の体長が約1mmの非寄生性の線虫であり、その体は959個の体細胞で構成されている。ゲノムDNAは、モデル動物の中でも小さく、約100Mbである。*C. elegans* の全遺伝子の約36%は、ヒトにも相同遺伝子が存在し、ヒトと対応付けした解析が行われている。*C. elegans* のライフサイクルは25℃で約2.5日、15℃で約7日とモデル動物の中では短く、精子と卵を一個体中に持つ雌雄同体であるため、系統維持が非常に容易であり、約0.1%の頻度で雄が出現するため、それを利用した交配を行うことで遺伝学を用いることができる。

C. elegans の温度に対する応答としては、温度走性や高温耐性が40年以上前から解析されているが¹⁾、近年、低温耐性や低温馴化と呼ばれる現象が報告され、その分子組織機構が少しずつ見つかってきている²⁾。例えば、25℃で飼育した個体は2℃に置かれると死滅してしまうのに対して、15℃で飼育した個体は2℃でも生存することができる(図1)³⁾。さらに、25℃で飼育された個体をわずか3時間から5時間だけ15℃に置くことで、2℃に置かれた際に生存できるようになる^{2,4)}。この現象は低温馴化と呼ばれる。低温耐性と低温馴化の分子機構が最近、少しずつ見つかってきている。低温耐性において、環境温度は頭部に存在するASJとADLと呼ばれる2対の感覚ニューロンで受容され、ASJからインスリンやステロイドホルモンが分泌され、それらが腸の受容体で受け取られる(図2)^{2,5)}。



* Effects of skin-expressed chemical receptors on body temperature acclimation

* Akane Ohta, Natsune Takagaki

Graduate school of Natural Science /
Institute for Integrative Neurobiology,
Konan University

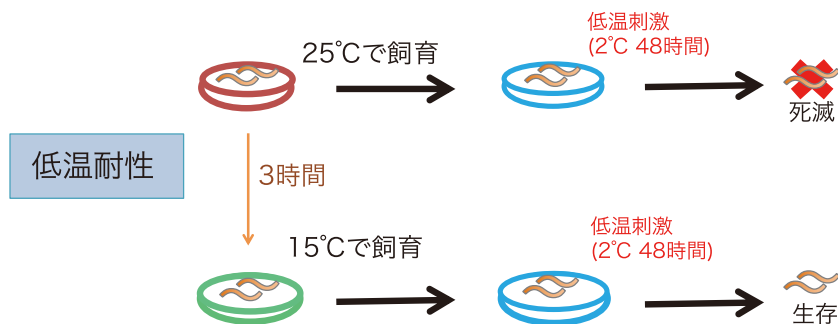


図1 *C. elegans*の低温耐性

15°Cで飼育した*C. elegans*は2°Cで48時間の低温にも耐えられるが、25°Cで飼育した*C. elegans*は低温に耐えられず、死滅する。25°C飼育個体を3時間以上15°Cに静置することで、2°Cで48時間の低温でも生存できるようになる。

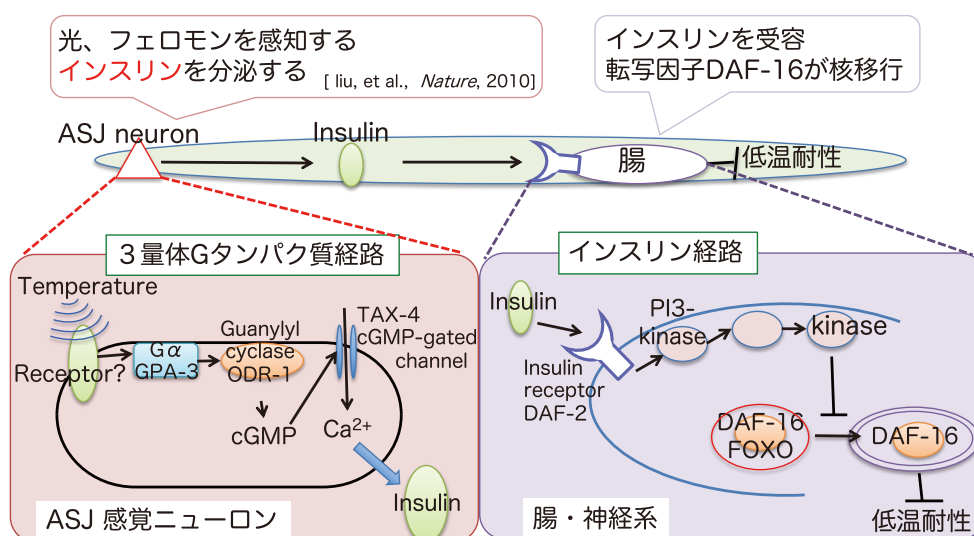


図2 既知の低温耐性の分子組織ネットワーク

頭部に存在するASJ感覚ニューロンが温度を受容すると、ASJからインスリンが分泌され、腸や神経系がインスリンを受容し、低温耐性が制御されている。

腸においてインスリン受容体情報伝達を介して、フォークヘッド型の転写因子である DAF-16 が遺伝子発現を誘導し、体内の脂質合成系の遺伝子などを発現する (図2)²⁾。また、腸からステロイドホルモンが分泌され、それが精子に働きかけ、さらに、精子が頭部の ASJ 温度受容ニューロンをフィードバック制御する⁶⁾。低温馴化に関しては、ADL 温度受容ニューロンで受容される温度情報が、ADL と局所神経回路を構築している酸素受容ニューロンからの酸素濃度の情報と統合され、環境の酸素濃度依存的な低温馴化の制御が行われる⁷⁾。ADL における温度情報伝達には TRP チャンネルと KQT 型カリウムチャンネルが関与している。これらの ASJ と ADL 温度受容ニューロンを介した温度情報伝達は、低温耐性や馴化を負に制御する経路である⁸⁾、一方で、低温耐性を正に制御する分子経路はほとんど未知であった。本研究では、*C. elegans* の低温耐性の実験系を

利用して、温度受容に関わる新規の分子の同定を目指した。その中で、皮下組織で発現している GPCR 型の受容体が温度適応に関与していることが見つかった、また、ヒトの機械刺激の受容に関わる DEG/ENaC 型のメカノ受容体が温度に応答することが見つかり、そのホモログを欠損したシンプルなモデル動物 *C. elegans* では、低温耐性の異常が観察され、体内の脂肪酸構成比が変化していることが示唆されたため報告する⁹⁾。

2. 実験

低温耐性テスト

15°Cで飼育された*C. elegans*の2～4個体を新しい培地に乗せ(P0)、解析目的となる飼育温度で一晩飼育し産卵させる。その後P0個体を取り除き、卵(F1)を各飼育温度で飼育する。F1が成虫に成長した後に、飼育培地を氷

上に20分間置き、タッパーに入れ、2℃のメディカルキャビネット内で48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℃で一晩置き、生存率を顕微鏡下で測定する³⁾。1回の解析につき、3枚の飼育培地を用意し、1系統につき少なくとも9枚分の解析を行った。

in vivo カルシウムイメージング

2% (v/w) アガロースパッドに線虫系統を1~数匹置き、医療用接着剤で固定し、M9バッファーに浸して丸型カバーガラスをかぶせた。サンプルを倒立顕微鏡に装備されているITOガラスプレートタイプの温度制御装置の上に置いた。W-Viewoptical systemを用いて蛍光を観察し、蛍光画像はEM-CCDカメラで撮影した。画像の蛍光強度はMetaMorphにより解析した。細胞内のカルシウム濃度の相対変化はイエローカメレオン (yellow cameleon 3.60 (YC3.60)) の acceptor/donor (YFP/CFP) もしくはGCaMP8 と tag-RFP (pKOB006 *gcy-5p::tag-RFP*¹⁰⁾ の acceptor/donor (GFP/RFP) 蛍光の比で計算した。温度変化刺激は、温度制御装置を用いて与え、約5分間ニューロンの細胞体内のCa²⁺濃度の変化を測定した。

3. 結果

1 皮膚で発現する化学物質受容体分子が低温耐性に関与

低温耐性に関わる新規の分子を同定するために、温度受容ニューロンと味覚ニューロンを用いた1細胞トランスクリプトーム解析を行った。その結果、温度受容ニューロンでのみ強く発現している化学受容体様分子の遺伝子が見つかった。その遺伝子の発現をGFPなどを用いて解析したところ、上皮細胞において発現が観察された。さらに、ノックアウト変異体を作成して、その低温耐性を調べたところ、低温耐性の低下が観察された。この結果から、上皮細胞で発現している化学受容体様分子が、個体の温度適応関与している可能性が考えられた。

2 接触刺激を受容する受容体が低温耐性に関与

低温耐性を正に制御する分子はこれまでにほとんど同定されていなかったため、順遺伝学的解析から低温耐性が低下している変異体を単離した。その変異体の原因遺伝子を次世代DNAシーケンサーなどを駆使して同定した結果、低温耐性を制御する新規遺伝子 *xdh-1* を同定した。この遺伝子の産物は、ヒトのプリン体代謝経路において、ヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への酸化を触媒する酵素であるキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) のホモログであった。*xdh-1* 変異体において、特定の細胞のみで野生型の *xdh-1* 遺伝子を発現させる細胞

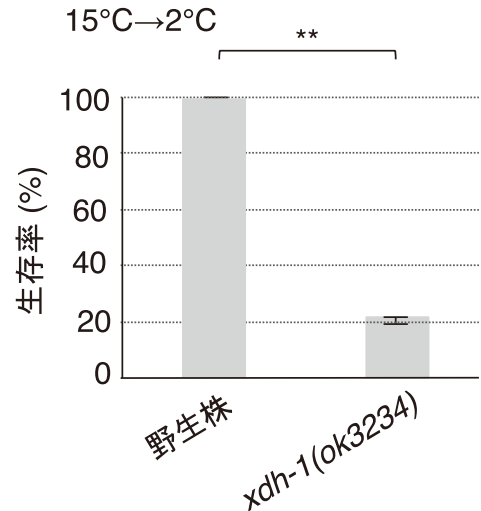


図3 *xdh-1* 変異体の低温耐性

成虫期における、*xdh-1* 変異体の低温耐性解析 (アッセイ数 ≥ 9)。エラーバー: SEM。**p < 0.01 (Tukey-Kramer)。 *xdh-1* 変異体は低温耐性異常を示した。

特異的な回復実験を行った結果、AINとAVJと呼ばれるわずか2対の介在ニューロンにおいてXDH-1が低温耐性を制御していることが見つかった。AINとAVJは介在ニューロンであるため、それらが温度を受容している可能性もあるが、一般的にはそれらの介在ニューロンの上流に温度を感知する感覚ニューロンが存在する可能性が考えられた。そこで、AINとAVJ介在ニューロンの上流に位置する感覚ニューロンを神経回路データベースから調べたところ、ASG感覚ニューロンなどのメカノレセプターが発現している感覚ニューロンが複数存在していた。そこで、メカノレセプターに焦点を当て、メカノレセプターの変異体を用いて低温耐性の異常の有無を調べたところ、Degenerin/Epithelial Sodium Channel (DEG/ENaC) タイプのメカノレセプター DEG-1の変異体において、低温耐性の低下異常が見られた。DEG-1はAIN介在ニューロンの上流に位置するASG感覚ニューロンで発現しているため、Ca²⁺イメージング法を用いてASGの温度に対する応答性を測定した^{11,12)}。野生株のASGは温度に対して大きな応答を示した。それに対して、*deg-1* 変異体ではその反応が低下していた。以上の結果から、DEG-1は温度受容情報伝達に関与していることが示唆された。実際に、DEG-1が温度を受容するのかを調べるために温度を受容しない細胞にDEG-1を発現させて、温度に応答するようになるかをカルシウムイメージング法で測定したところ、温度に応答するようになった。そこで、DEG-1の温度感受性を直接的に調べるために、*Xenopus oocyte*にDEG-1を発現させて、電気生理解析を行ったところ、温度に対する反応が見られた。さらに、ヒトのDEG/ENaCタイプの

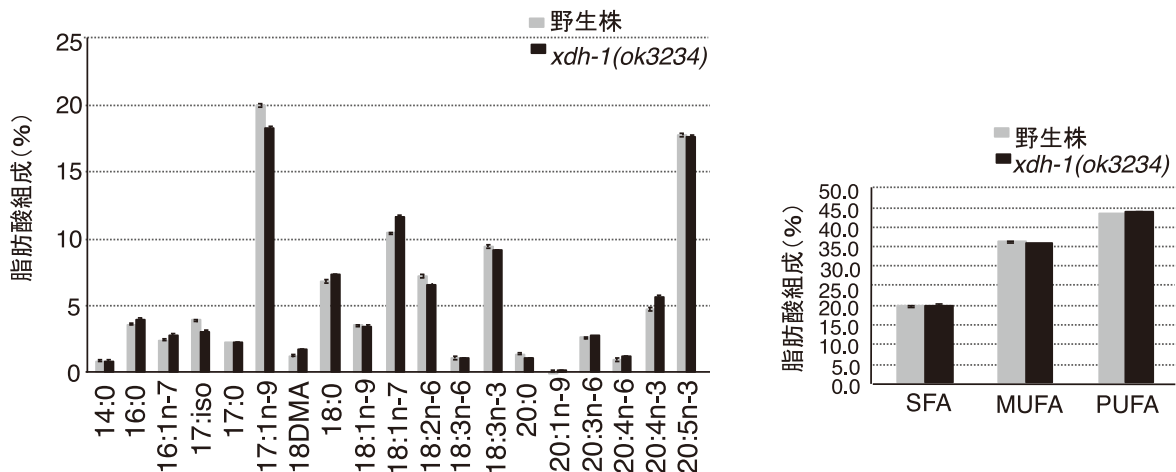


図4 成虫期の野生株と成虫期の*xdh-1*変異体の脂肪酸組成比率測定

左図は、成虫期の野生型および成虫期の*xdh-1*変異体の個々の脂肪酸種の比率を示す。右図は、飽和脂肪酸(SFA)、モノ不飽和脂肪酸(MUFA)、およびポリ不飽和脂肪酸(PUFA)。左右の図共に、各アッセイでN=3。エラーバーはSEMを示す。文献⁹⁾より引用一部改変。

メカノレセプターであるMDEGを*Xenopus oocytes*に発現させ、温度変化を与えたところ、温度に対する反応が見られた。つまりDEG-1だけでなく、ヒトのDEG/ENaCタイプメカノレセプターであるMDEGも機械刺激だけではなく温度も受容していることがわかった⁹⁾。

3 低温適応時の脂質構成率の変化

DEG/ENaCタイプメカノレセプターDEG-1の変異体において、体内の脂肪酸構成率の変化が起きているかをMS解析などで調べた。多くの生物において、体を構成する飽和および不飽和脂肪酸の比率は環境温度によって変化するため、野生株と*deg-1*変異体の脂肪酸の脂質割合を測定した。その結果、SFA(飽和脂肪酸)、MUFA(単不飽和脂肪酸)そしてPUFA(多価不飽和脂肪酸)のいずれにおいても野生株と*deg-1*変異体において差が存在した。さらに、個々の脂肪酸種に関してもそれらの構成比率を比較したところ、*deg-1*変異体においても20:4n-3の増加が存在した⁹⁾。つまり、DEG-1の異常により、体内の膜脂質の構成が変化し、低温耐性に影響を与えている可能性が考えられる。

4. 考 察

温度シフトにおけるGPCRをコードする複数の遺伝子の発現量が変化していた。そのなかでも、皮膚で発現するGPCRをコードする変異体について低温耐性を測定したところ、低温耐性や馴化の異常が観察されたことから、この受容体の低温耐性への関与が示唆された。このGPCR遺伝子は、皮膚に加えて幾つかの神経細胞などでも発現していたため、今回見つかった低温耐性の異常がどの細胞の異常

によるかについては、今後の細胞特異的な回復実験などで明らかになると考えられる。さらに、順遺伝学的解析から得られたヒトの触角刺激受容に関わるメカノ受容体のホモログが低温耐性に関与しており、ヒトのMDEGも温度受容に関わっていた。これはヒトを含む動物でメカノレセプターDEG/ENaCが個体の温度耐性を制御している初めてケースである⁹⁾。今後は、これらの分子に関わる温度受容についての生理学的解析がより必要になると考えられる。

(引用文献)

- 1) A. Ohta, A. Kuhara, Molecular mechanism for trimeric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience research* **76**, 119-124 (2013).
- 2) A. Ohta, T. Ujisawa, S. Sonoda, A. Kuhara, Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications* **5**, 4412 (2014).
- 3) T. Ujisawa, A. Ohta, O. M., S. S., A. Kuhara, Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. *Protocol Exchange*, (2014).
- 4) M. Okahata *et al.*, Natural variations of cold tolerance and temperature acclimation in *Caenorhabditis elegans*. *J Comp Physiol B* **186**, 985-998 (2016).
- 5) T. Ujisawa *et al.*, Endoribonuclease ENDU-2 regulates multiple traits including cold tolerance via cell autonomous and nonautonomous controls in

- Caenorhabditis elegans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (2018).
- 6) S. Sonoda, A. Ohta, A. Maruo, T. Ujisawa, A. Kuhara, Sperm Affects Head Sensory Neuron in Temperature Tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell reports* **16**, 56-65 (2016).
- 7) M. Okahata, A. D. Wei, A. Ohta, A. Kuhara, Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Adv* **5**, eaav3631 (2019).
- 8) T. Ujisawa, A. Ohta, M. Uda-Yagi, A. Kuhara, Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one* **11**, e0165518 (2016).
- 9) N. Takagaki *et al.*, Mechanoreceptor-mediated circuit regulates cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *bioRxiv* **5**, (2019).
- 10) K. Kobayashi *et al.*, Single-Cell Memory Regulates a Neural Circuit for Sensory Behavior. *Cell Rep* **14**, 11-21 (2016).
- 11) A. Kuhara, N. Ohnishi, T. Shimowada, I. Mori, Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* **2**, 355 (2011).
- 12) T. Ujisawa, A. Ohta, A. Kuhara, Long-term calcium imaging of ASJ sensoryneuron controlling cold tolerance in *C. elegans*. *Protocol Exchange*, (2014).