

甲南大学 博士学位論文

線虫 *C. elegans* における神経系と腸が連関した  
温度順化制御機構の解析

甲南大学大学院

自然科学研究科 生命・機能科学専攻

本村 晴佳

MOTOMURA Haruka

2024年 3月

## 目次

要旨	p. 1
略語一覧	p. 3
1. 序論	p. 6
1.1 動物の温度耐性と生体調節	
1.2 動物の温度応答における神経系の役割	
1.3 神経細胞の生理機構	
1.4 細胞内 Ca <sup>2+</sup> イメージングによる神経回路の解析	
1.5 モデル生物 線虫 <i>C. elegans</i>	
1.6 線虫 <i>C. elegans</i> の神経系	
1.7 CREB の分子機構と神経系での機能	
1.8 線虫 <i>C. elegans</i> の低温耐性と温度順化	
1.9 線虫 <i>C. elegans</i> の脂肪の貯蔵と分解	
1.10 線虫 <i>C. elegans</i> の脂肪の染色手法	
1.11 本研究の目的	
2. 結果	p. 27
2.1 転写因子 CREB は ASJ と RMG で機能し、温度順化を促進する	
2.2 CREB は ASJ 感覚ニューロンの温度応答性に関わる	
2.3 PVQ 介在ニューロンが ASJ から RMG への温度情報伝達を仲介する	
2.4 PVQ 介在ニューロンは ASJ 温度受容ニューロンから温度情報伝達を 受ける	

2.5	PVQ 介在ニューロンから RMG 介在ニューロンへの情報伝達はグルタミン酸が機能する	
2.6	神経ペプチド FLP-7 が腸の脂肪分解を介して温度順化を制御する	
2.7	高温下で ATGL-1 が機能し、脂肪の分解を行う	
3.	考察	p. 43
3.1	転写因子 CREB と温度順化の関係	
3.2	温度順化を促進する全身周回性の神経回路	
3.3	神経ペプチドを介した腸の脂肪分解経路と低温耐性の関係	
3.4	その他の考察	
3.5	<i>C. elegans</i> の低温死の解析における今後の展望	
4.	結語	p. 53
5.	材料・方法	p. 55
6.	謝辞	p. 74
7.	引用文献	p. 75
8.	図・表	p. 87

## 要旨

動物は生育環境の温度に合わせて生存戦略を取ることで、多様な環境の中で生存・繁殖を可能にしている。本研究では、線虫 *Caenorhabditis elegans* が飼育温度の変化によって頭部から尾部に跨る全身周回性の神経回路を駆動させ、腸の脂肪代謝を制御する温度順化機構を明らかにした。*C. elegans* は飼育温度が変化すると新しい温度に慣れる「温度順化」を示す。例えば低温環境下でも生存可能な 15°C 飼育個体を 25°C に移し 3 時間以上飼育すると、25°C に慣れて低温への耐性を失い、低温環境下で死滅するようになる。*C. elegans* の温度順化の制御において、転写因子 CREB (cAMP 応答配列結合タンパク質) が頭部に細胞体を持つ ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンにおいて温度順化を制御することが明らかになった。ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンの間を繋ぐギャップ結合やシナプス接続は存在しないため、この 2 つのニューロンを仲介するニューロンの存在が考えられた。そこで ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンの間の神経細胞のシナプス伝達を過活性化させた結果、尾部に細胞体を持つ PVQ 介在ニューロンが温度順化に関与している可能性が得られた。カルシウムイメージングと遺伝学的な解析により、PVQ 介在ニューロンはグルタミン酸を介して ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロン間の温度情報伝達を仲介していることが示唆された。以上により、頭部の ASJ 温度受容ニューロン、尾部の PVQ 介在ニューロン、頭部の RMG 介在ニューロンと全身に渡って構成される神経回路が温度順化の制御に関与することが示唆された。次にこの神経回路の下流の解析を進めた結果、腸の脂肪代謝に関わる神経ペプチド FLP-7 の変異体とその受容体 NPR-22 の変異体で温度順化に

遅れが見られることが分かった。神経ペプチド FLP-7 の下流で脂肪を分解することが報告されているトリグリセリドリパーゼ ATGL-1 は高温飼育時の方が発現量が増加した。中性脂肪を赤色に染める oil Red O で腸の脂肪量を定量化したところ、高温飼育時の方が腸の脂肪量が低下しており、トリグリセリドリパーゼ ATGL-1 の増加と腸の脂肪量の低下が同じ温度域で起こっていることが明らかになった。つまり、*C. elegans* は全身を周回する神経回路と腸が連関し、腸の脂肪代謝を介して温度順化を制御する生体システムが明らかになった。

## 略語一覽

AFP	Antifreeze protein
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATP	Adenosine triphosphate
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CBP	CREB-binding protein
cDNA	Complementary DNA
CeNGEN	<i>C. elegans</i> Neuronal Gene Expression Map & Network
CFP	Cyan fluorescent protein
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
DEG/ENaC	Degenerin/epithelial Na <sup>+</sup> channel
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
FFA	Free fatty acids
FLP	FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-amide)-related peptide
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
gf	Gain-of-function
GFP	Green fluorescent protein
HSL	Hormone-sensitive lipase

INS	Insulin
InsP3R	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
KID	Kinase-inducible domain
LB	Luria-Bertani
LDs	Lipid droplets
LROs	Lysosome-related organelles
LTP	Long-term potentiation
MCU	Mitochondrial calcium uniporter
MICU	Mitochondrial calcium uptake
NeuroPAL	Neuronal polychromatic atlas of landmarks
NGM	Nematode growth medium
NLP	neuropeptide-like protein
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
OMM	Outer mitochondrial membrane
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PDK	Phosphoinositide-dependent kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
POA	Preoptic area
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum ATPase

SFA	Saturated fatty acid
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor
TG	Triglyceride
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Transient receptor potential ankyrin
TRPC	Transient receptor potential canonical
TRPM	Transient receptor potential melastatin
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
VDAC	Voltage dependent anion channel
XDH	Xanthine dehydrogenase
YC	Yellow cameleon
YFP	Yellow fluorescent protein



# 1. 序論

## 1.1 動物の温度耐性と生体調節

動物は季節毎の環境変化に適切に対処することで生存している。特に冬は餌が乏しくなる上、低温から身を守らなければならない。越冬のために動物が取る戦略は種によって異なる。いわゆる「渡り鳥」の越冬戦略である餌のある温暖な地域への移動の他、シマリスやクマなどの一部の哺乳類は冬眠しエネルギーの消費量を抑えることで冬を越す(Alerstam and Backman, 2018; Kawamichi, 1996; Thiel *et al.*, 2022; Tsukamoto *et al.*, 2019)。耐寒性を獲得し冬季も餌を摂取しながら冬を越す種もあり、寒さに対する備えは種によって様々である。

動物が低温によって受ける障害は多岐に渡る。哺乳類細胞においては、脂質の過酸化、細胞膜の機能低下による細胞内外のイオン恒常性の喪失、Ca<sup>2+</sup>流入に伴うホスホリパーゼ・プロテアーゼの活性化、細胞骨格の損傷などが挙げられる(Boutilier, 2001; Rubinsky, 2003)。これらを防ぐために、生物は耐寒機構を持つ。例えばニカメイガの越冬幼虫は、体液中にグリセロールを蓄積することにより凍結耐性を獲得する(Izumi *et al.*, 2006)。-20°C下の越冬幼虫の脂肪体では、水は細胞内から細胞外に流出し、グリセロールは細胞外から細胞内に流入しており、凍結時に水チャネルタンパク質であるアクアポリンを介して細胞内の水と体液中のグリセロールを速やかに置換することで凍結障害を回避すると考えられている(Izumi *et al.*, 2006)。他にも魚類から植物に渡り保持されている不凍タンパク質 (AFP) は、過冷却中に生じる単結晶氷に結合して成長を阻害する氷結晶結合機能と、細胞膜表面に結合して細胞内イオンの漏出と流入を抑制する細胞保護機能を持つ(Hirano *et al.*,

2008)。魚類 AFP を加えた保存液では、4°Cに暴露したヒト肝がん細胞株の生存率が上昇し(Hirano *et al.*, 2008)、AFP を含んだ保存液を使用したラットの心臓は-1.3°Cでも凍結しない(Amir *et al.*, 2004)。線虫では担子菌由来の *TisAFP8* を体壁筋に発現させると、-5°C経験後の生存率に顕著な増加が見られることが報告されている(Kuramochi *et al.*, 2019)。近年、ヒトがん細胞において、低温によって誘導される細胞死が細胞内の鉄イオンに依存した細胞死様式であるフェロトーシスに近い性質を持つことが明らかにされている(Dixon *et al.*, 2012; Hattori *et al.*, 2017)。フェロトーシスでは、過酸化脂質と脂質ラジカル体が蓄積することにより、最終的に細胞形質膜が崩壊する(Dixon *et al.*, 2012)。他にも、ヒトのミトコンドリアマトリックスへの  $\text{Ca}^{2+}$  の輸送を正に制御する MICU1 の欠損は、ヒトがん細胞株の低温誘導性細胞死を抑制するという報告もあり(Nakamura *et al.*, 2021)、低温による細胞障害の回避には様々な分子機構が関与していると考えられる。

## 1.2 動物の温度応答における神経系の役割

動物は神経系に制御された体温調節機構を持つことで外界の温度変化に適応している。動物の体温調節機構は意識的な制御である行動性体温調節と意識的に制御できない自律性体温調節に分かれる(Morrison and Nakamura, 2019; Nakamura, 2011; Terrien *et al.*, 2011)。行動性体温調節として、群れを作って密集する、体を丸めて熱放散を防ぐ、日向ぼっこを行い日射により体を温めるなどの行動が挙げられる。ヒトの場合は、衣服の着用やエアコンを使用し行動性体温調節を行っている(Terrien *et al.*, 2011)。自律性体温調節として、高温では気化熱として体熱を放散する蒸散性熱放散、室温付近では主に皮

膚の血管収縮により放散量を調節する非蒸散性熱放散、寒冷環境では骨格筋のふるえ、もしくは褐色脂肪組織による熱産生が行われる (Morrison and Nakamura, 2019; Nakamura, 2011; Terrien *et al.*, 2011)。これらの体温調節機構を実行するには温度を感知する受容器、受容器から送られてくる情報を処理する神経系、神経系に制御された効果器が必要となる。

ヒトを含む多くの哺乳類は表皮下の末梢神経に存在する非選択的陽イオンチャンネルである温度感受性 TRP (Transient receptor potential : TRP) チャンネルで温度を受容し、その情報はシグナルとして脳へと伝達される (Bandell *et al.*, 2007; Caterina *et al.*, 1997; Julius, 2013; Laing and Dhaka, 2016)。TRP チャンネルが活性化するとナトリウムイオンや  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内に流入し、これにより電位依存性ナトリウムチャンネルなどが開口されることで神経が発火すると考えられている。TRP チャンネルはヒトでは 11 種類存在し、高温では TRPV1、TRPV2、TRPM3、体温に近い暖かい温度では TRPV3、TRPV4、TRPM2、TRPM4、TRPM5、低温では TRPM8、TRPA1、TRPC5 が活性化することでヒトは広い温度域を感知できる (Bandell *et al.*, 2007; Dhaka *et al.*, 2006; Kashio and Tominaga, 2022; Laing and Dhaka, 2016; Zimmermann *et al.*, 2011)。TRP チャンネルの温度感受性は種によって異なることが報告されており、例えば両生類の TRPA1 の種による違いが知られている (Saito *et al.*, 2022)。高温忌避性が異なるリュウキュウカジカガエル、カジカガエル、ニホンアカガエルの 3 種類から単離した高温センサーである TRPA1 が活性化する温度は、忌避温度が低いニホンアカガエルと忌避温度が高いリュウキュウカジカガエルで異なり、ニホンアカガエルの TRPA1 は高温で活性化するがリュウキュウカジカガエルの TRPA1 は高温に応答しない。忌避温度がリュウキュウカジカガエルより低く、ニホンアカガエルより高いカジカガエルの TRPA1 の温度感受性は、他の 2

種の中に位置していた (Saito *et al.*, 2022)。他にも TRP チャンネルの温度感受性の違いが温度に対する行動の変化に繋がる例として、コウテイペンギンの低温センサーである TRPM8 をマウスに導入すると低温忌避行動が弱くなるという報告もあり (Yang *et al.*, 2020)、生物はそれぞれの生育環境に合った温度応答性を進化の過程で獲得することで多様な温度環境での生存を可能にしていると考えられる。

哺乳類では、TRP チャンネルで受容された温度情報は視床下部の視索前野 (preoptic area : POA) で統合され、この部位から適切な信号を送られることで自律性体温調節が行われている (Morrison and Nakamura, 2019)。POA による体温の恒常性の維持にはフィードバック制御とフィードフォワード制御が重要となる。フィードバック制御による体温調節とは、深部体温が適正な温度域から逸脱したことを感知し、至適温度に戻すような制御機構を指す。フィードフォワード制御とは、感知した環境温度の変化を元に、深部体温が影響を受ける前に体温調節を行う制御機構を指す (Kanosue *et al.*, 2010; Morrison and Nakamura, 2019)。フィードバックシグナルは内臓や筋肉、脊髄、脳の温度受容体から送られる。例えば深部体温が上昇すると熱産生や血管収縮が抑制される負のフィードバックが働き、適正な温度に戻す。フィードフォワードシグナルは皮膚の温度受容体から送られ、例えば皮膚が冷たくなると熱産生や血管収縮を促進して体温の低下を防ぐ (Kanosue *et al.*, 2010; Morrison and Nakamura, 2019)。哺乳類の褐色脂肪組織の熱産生調節においては、興奮性のグルタミン酸作動性の入力と抑制性の GABA 作動性の入力のバランスにより制御されることが分かっている (Morrison and Nakamura, 2019)。

### 1.3 神経細胞の生理機構 (Kandel *et al.*, 2014)

動物の環境情報の受容とそれに伴う行動の制御を司る神経細胞は、機能的に感覚ニューロン、介在ニューロン、運動ニューロンの3つに分類される。感覚ニューロンは末梢の受容器に主に存在し、環境中の様々な情報を受け取る。感覚ニューロンで受容された情報はそれと接続している介在ニューロンに伝達され、運動ニューロンを介して筋肉や分泌腺に指令が送られる。

動物の感覚受容から応答までを担うこれらの神経細胞は典型的に4つの部位から成り立っている。他のニューロンからの情報入力を受ける樹状突起、核や小胞体がある細胞体、他の神経細胞に電気シグナル（活動電位）を伝達する軸索、他の神経細胞へのシグナル伝達に特化したシナプス前終末である。軸索の根元の軸索初節から発生する活動電位の振幅は100mVで維持され、毎秒1~100mの速さで伝達される。活動電位がシナプス終末に伝わることで前シナプスから後シナプスへの情報伝達が行われる。

神経細胞のシグナルは細胞膜内外の電位差によって生み出される。静止状態の神経細胞は電位差を-65mV（静止膜電位）に維持しているが、膜電位の急速な+40mVへの上昇（活動電位）がシグナルとなって軸索を伝わっていく。細胞膜内外の電位差を生み出すのは主にNa<sup>+</sup>とK<sup>+</sup>の不均衡な分布と、細胞膜の持つ選択的透過性である。細胞膜に存在する選択的透過性を持つイオンチャネルやイオンポンプの機能により、細胞内ではNa<sup>+</sup>の濃度は低く、K<sup>+</sup>の濃度は高く保たれているが、膜電位の変化によりNa<sup>+</sup>がチャネルを通過して細胞内に流れ込むようになると細胞内の負の電荷が中和され、活動電位が発生する。軸索初節から活動電位が生じるのは、電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルが最も高い密度で存在するためである。電荷の分離が縮小し負の膜電位が減少することを脱分極と呼び、電荷の分離が増加し負の膜電位が増加することを過分極と呼ぶ。脱分極は細胞が

活動電位を発生する能力高める興奮性の変化であるのに対し、過分極は活動電位を発生する可能性を減らす抑制性の変化である。

シナプスには、電流を使用する高速な伝達経路である電気シナプスと、多様な化学物質を使用する化学シナプスがある。電気シナプスでは、前シナプスと後シナプスの接触する部位はギャップ結合とよばれ、前シナプスの電流の一部がギャップ結合を通過して後シナプスに入る。これは前シナプスと後シナプスの間が約 4nm しか離れておらず、この狭い間隙はギャップ結合チャンネルにより連結されているために起こる。一方化学シナプスのシナプス間隙は 20~40nm の距離があるため、前シナプスが神経伝達物質を放出し、それを後シナプスが受容することで行われる。細胞体で形成されたシナプス小胞前駆体や神経ペプチドなどを貯蔵する有芯小胞は、ATP 依存性の速い軸索輸送によって軸索終末まで輸送される。神経伝達物質として低分子量伝達物質と神経ペプチドの 2 種類が主に使用されている。低分子量伝達物質はシナプス小胞(直径約 40nm)に貯蔵され、神経ペプチドは有芯小胞(直径約 70~250nm)に貯蔵されている。有芯小胞は低分子量伝達物質も含む場合がある。シナプス前終末で活動電位が発生すると電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが開き、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上がることで生化学反応が誘発され、小胞膜に発現しているシナプトブレビン SNARE (v-SNARE の一種) が、標的膜に発現している 2 種類の t-SNARE (シンタキシンと SNAP-25) と複合体を形成し、シナプス小胞とシナプス前膜が融合する。シナプス小胞が細胞膜と融合すると、シナプス間隙に神経伝達物質が放出される。

現在神経伝達物質として分かっているのは、アセチルコリン、生体アミン(ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニンなど)、アミノ酸(グルタミン酸、グリシン、GABA など)、アデノシン三リン酸(ATP)とその代謝産物などである。アミノ酸神経伝達物質の中でも興奮性のものと抑制性のものに分かれて

おり、グルタミン酸は興奮性シナプスの神経伝達物質である一方、グリシンと GABA は抑制性介在ニューロンで使用されている。

#### 1.4 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングによる神経回路の解析

$\text{Ca}^{2+}$  シグナルはセカンドメッセンジャーとして生体内の多くの分子経路の制御に関与している。 $\text{Ca}^{2+}$  は静止状態の細胞質で低く保たれているが、細胞外からの流入もしくは細胞内に貯蔵されていた  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されることで細胞質の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇する (Berridge *et al.*, 2000)。細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  の流入には、電位依存性カルシウムチャネル、イオンチャネル型グルタミン酸受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、TRPC チャネルなどが関与し、細胞外への排出には細胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP アーゼ (The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase : PMCA) と  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換体 (sodium-calcium exchanger : NCX) などが機能することが知られている (Berridge *et al.*, 2000; Grienberger and Konnerth, 2012)。 $\text{Ca}^{2+}$  は細胞内で小胞体、筋細胞では筋小胞体に蓄えられている。小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出にはイノシトール-1,4,5-三リン酸受容体 (InsP3R) とリアノジン受容体を使用され、取り込みには筋小胞体カルシウム ATP アーゼ (sarco-endoplasmic reticulum ATPase : SERCA) が機能する (Berridge *et al.*, 2000)。小胞体の他にミトコンドリアも細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアとして機能している (Berridge *et al.*, 2000)。 $\text{Ca}^{2+}$  は、電位依存性アニオンチャネル (Voltage Dependent Anion Channel : VDAC) を通ってミトコンドリア外膜 (outer mitochondrial membrane : OMM) に流入し、MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) と呼ばれるミトコンドリア内膜に存在するチャネルによりミトコンドリア内膜内部に入る。細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  の制御において、小胞体とミトコンドリアは密接に機能して

いる。例えば小胞体の InsP3R は、細胞質シャペロンの Grp75 と OMM の VDAC1 と複合体を形成することで、小胞体から InsP3R を介して放出された  $\text{Ca}^{2+}$  をミトコンドリアへ送る (Rossi *et al.*, 2019)。

$\text{Ca}^{2+}$  シグナルは心筋細胞の収縮や細胞周期の制御、細胞死に至るまで多くの細胞内プロセスに関わる (Berridge *et al.*, 2000; Grienberger and Konnerth, 2012)。神経においては、シナプス前末端におけるシナプス小胞の分泌を誘導する他、CREB を介した核の遺伝子転写などの制御にも関わっており、*in vivo* での  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化の観察は生体システムの解析において非常に重要である (Berridge *et al.*, 2000; Grienberger and Konnerth, 2012)。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングとは、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を可視化する技術のことである。 $\text{Ca}^{2+}$  インディケータとして紫外線で励起される Quin-2 が初めて生物実験に使用されて以来、異なる励起波長と、より感受性の高い  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータの開発が進められてきた (Grienberger and Konnerth, 2012)。遺伝子にコードされた  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータのイエローカメレオン (Yellow cameleon: YC) は、1997 年に開発された  $\text{Ca}^{2+}$  インディケータであり、蛍光タンパク質 CFP と YFP のキメラタンパクである (Madisen *et al.*, 2015; Miyawaki *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2004)。CFP と YFP の間はカルシウム結合サイト (カルモジュリン (CaM) の一部) と CaM 結合タンパク質の一部 (ミオシン軽鎖キナーゼ M13) で繋がっており、 $\text{Ca}^{2+}$  がこの部位に結合するとカメレオンの立体構造が変化する。これにより CFP から YFP に蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) が起き、励起光照射下で発される CFP の藍色蛍光を YFP が吸収し、黄色の蛍光を発するようになる (Miyawaki *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2004)。よってカメレオンの CFP と



YFP の蛍光の比を取ることで、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を定量化することが可能となる。

### 1.5 モデル生物 線虫 *C. elegans*

*Caenorhabditis elegans* は土壌に生息する非寄生性の線虫の一種で、1974年にシドニー・ブレナーによって見出されて以降、プログラム細胞死や RNAi 干渉などの発見をもたらしたモデル動物である。体長は 1mm ほどで、全 959 個の細胞で構成される。体色が透明であることから、蛍光タンパク質を用いることで生体内 (*in vivo*) の個々の細胞を可視化する解析が容易にできるという利点がある。神経ネットワークは 302 個の神経細胞で構成されており、全神経細胞間の化学シナプス及びギャップ結合は電子顕微鏡を用いた切片解析から明らかにされている (White *et al.*, 1986)。*C. elegans* は雌雄同体であるため、ホモ接合体としての系統維持が容易である。さらに、*C. elegans* の生まれてくる子孫のうち、0.1%の頻度で雄が出現する。この雄の個体は雌雄同体の個体と交配が可能であることから、*C. elegans* は遺伝学的解析にも適している (Brenner, 1974)。またゲノムサイズが約 100Mbp とモデル動物の中でも特に小さく、全ゲノム DNA 配列は 1998 年に決定されている (Consortium, 1998)。ゲノム DNA に存在する全遺伝子の約 36%がヒトの遺伝子と類似した遺伝子であるため、線虫で働く遺伝子をヒトの遺伝子と比較的容易に対応させて解析できる。

*C. elegans* の生育温度は約 13°C から 27°C であるが、生育温度によって繁殖力や成長速度が異なり、最も繁殖力が強い最適温度は約 18.2°C である (Begasse *et al.*, 2015; Gouvea *et al.*, 2015)。*C. elegans* の成長段階は幼虫期の

L1、L2、L3、L4 と成虫期に分けられる。L1 段階の幼虫を 15°C、20°C、25°C で成長させた場合、卵を持ち始めた若い成虫(ヤングアダルト)になるまで 15°C では約 89 時間、20°C は約 52 時間、25°C は約 41 時間必要となり、15°C で飼育した場合と 25°C で飼育した場合では成長速度が 2 倍ほど変わる (Gouvea *et al.*, 2015)。

## 1.6 線虫 *C. elegans* の神経系

線虫 *C. elegans* の神経系は、1986 年に電子顕微鏡を用いた切片解析により全神経細胞のネットワークが明らかにされて以来、発生から機能、遺伝子レベルまで多面的に解析が進められてきた (Hobert, 2016; White *et al.*, 1986)。

*C. elegans* の神経系は雌雄同体と雄で異なっている。雌雄同体は 302 個のニューロンを持つ一方、雄は 385 個のニューロンからなる神経系を持つ。このうち雌雄同体では 8 個のニューロンが特異的であり、雄では 91 個のニューロンが特異的である (Cook *et al.*, 2019)。

*C. elegans* の神経系では神経情報伝達物質として GABA、グルタミン酸、アセチルコリンや、アミン作動性の神経伝達物質であるドーパミン、セロトニン、オクトパミン、チラミンと 200 以上の神経ペプチドを使用している (Hobert, 2016)。神経ペプチド遺伝子ファミリーはインスリン様ペプチド (INS)、FMRF amide 様ペプチド (FLP)、神経ペプチド様タンパク質 (NLP) の 3 つの主要なファミリーに分類される (Frooninckx *et al.*, 2012)。グルタミン酸やアセチルコリンは透明なシナプス小胞に局在し、神経ペプチドや生体アミン神経伝達物質は有芯小胞に局在する (Palamiuc *et al.*, 2017)。

*C. elegans* の神経系ではアセチルコリンとグルタミン酸が最も用いられており、GABA やアミン作動性のニューロンは 10%ほどである (Hobert, 2016)。

*C. elegans* の神経系の解析は遺伝子を含む多階層レベルで進められていることから、データベースが豊富にあるという利点がある。2018 年には単一細胞 RNA シーケンシングによる全神経細胞の遺伝子発現プロファイルを作製する *C. elegans* Neuronal Gene Expression Map & Network (CeNGEN) プロジェクトが行われた (Hammarlund *et al.*, 2018; Taylor *et al.*, 2021)。これにより、Web アプリケーション上で各単一神経細胞で発現している遺伝子の種類と、その遺伝子発現の強度が容易に検索できる。

また *C. elegans* では全脳イメージングを行える系統が確立されている。近年、Eviatar Yemini らが 41 個のレポーター遺伝子を導入した NeuroPAL (a Neuronal Polychromatic Atlas of Landmarks) 株を公表した。この神経多色地図システムでは、蛍光タンパク質である mTagBFP2 (青色)、CyOFP1 (オレンジ色)、mNeptune2.5 (ピンク色) の蛍光をソフトウェアで擬似着色して組み合わせることにより全神経細胞が同定可能となる (Yemini *et al.*, 2021)。さらに、この NeuroPAL 系統では、緑色蛍光タンパク質 GFP の緑色の波長域の蛍光タンパク質は使用されていないため、NeuroPAL 系統に、各自の興味のある遺伝子の制御配列の元で GFP を発現させることで、その遺伝子の発現神経細胞を 1 細胞のレベルで同定することができる。

### 1.7 CREB の分子機構と神経系での機能

cAMP 応答配列結合タンパク質 (cAMP response element-binding protein: CREB) は、N 末端にグルタミン残基が豊富な Q1 と呼ばれるドメインと、リン酸

化修飾を受けるキナーゼ誘導性ドメイン (kinase-inducible domain : KID) 、Q2 ドメイン、C 末端に二量体の形成と DNA 結合を行う塩基性アミノ酸・ロイシンジッパー (bZIP) ドメインを持つ転写調節因子であり、CREB は特定の遺伝子のプロモーターDNA 配列に存在する CRE 配列 (TGACGTCA) に結合する (Johannessen *et al.*, 2004; Schumacher *et al.*, 2000; Stati *et al.*, 2021)。CREB は DNA の CRE 配列に結合しているがその状態では転写促進せず、その活性は cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) や CaMKIV などのリン酸化酵素による CREB タンパク質のリン酸化によって制御されている。CREB がもつ KID 領域内の 133 番目のセリン残基 (Ser133) がリン酸化修飾を受けることで、CREB はヒストンのアセチル化活性を持つ共活性化因子 CREB-binding protein (CBP) と複合体を形成し、その CREB と CBP の複合体がヒストンアセチル化を行うことでクロマチン構造を変化させ転写を促進する (Greer and Greenberg, 2008; Lisman *et al.*, 2018; Stati *et al.*, 2021)。CBP はヒストンアセチル化のみでなく RNA ポリメラーゼ II をリクルートして転写を促進する (Greer and Greenberg, 2008)。

CREB はヒトから *C. elegans* まで保存されており、遺伝子の転写・翻訳によって新たなシナプスを形成することで動物の長期記憶の形成に関わることが報告されている。2001 年に Kandel らによりアメフラシ (*Aplysia californica*) の水管・エラ引き込み反射の連合学習には CREB が必要であることが示され (Kandel, 2001)、マウスで CREB を欠失させると、脳内の記憶を司る海馬のニューロンにおけるシナプスの長期増強である LTP の誘導に欠陥が生じるが、CREB の構成的活性型 (CREB-VP16) の発現により、LTP が増強するという報告もある (Greer and Greenberg, 2008)。CREB は転写促進によるシナプスの形成のほか、CREB を過剰発現させた神経細胞ではより多くの活動電位が生じるとい

う報告もあり、CREB が細胞の興奮性の増強に関与していると考えられる (Lisman *et al.*, 2018)。

CREB が温度記憶に関与する例がモデル生物 *C. elegans* において報告されている。*C. elegans* は飼育温度と餌の有無をそれぞれ記憶し、それらを関連付けて学習することができる (Aoki and Mori, 2015; Mori *et al.*, 2007; Ohta and Kuhara, 2013)。この連合学習は行動レベルで観察することができる。一定の温度下で餌のある条件で飼育された *C. elegans* は、餌の無い温度勾配のある寒天上に置かれると過去に飼育されていた温度付近に移動するという温度走性を示す。この行動に関わる神経回路レベルでの情報処理として、まず頭部にある AFD 感覚ニューロンと AWC 感覚ニューロンが温度を受容し、その情報が下流の AIY 介在ニューロンと AIZ 介在ニューロンに伝達される。AIY 介在ニューロンと AIZ 介在ニューロンの情報は RIA 介在ニューロンで統合され、体壁筋を制御する運動ニューロンに信号が送られることで運動が制御される (Kuhara *et al.*, 2008; Mori and Ohshima, 1995; Mori *et al.*, 2007; Nishida *et al.*, 2011)。この温度走性の成立には温度受容ニューロンで機能する CREB が関与している (Nishida *et al.*, 2011)。17°C で飼育された CREB 変異体は野生株と似た温度走性の表現型を示すが、20°C や 23°C で飼育された CREB 変異体は野生株に比べて低い温度に移動する異常を示した。この行動異常は AFD 感覚ニューロンに CREB の野生型の cDNA を導入することで、野生株と同様の表現型を示すよう回復する (Nishida *et al.*, 2011)。CREB 変異体では AFD 感覚ニューロンの温度応答性が野生株と異なることが分かっている。具体的には、温度走性の表現型と同様に、17°C で飼育された CREB 変異体の AFD 感覚ニューロンでは温度刺激時の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化率は野生株と変わらないが、20°C もしくは 23°C で飼育された CREB 変異体の AFD 感覚ニューロンは野生株に比べて温度応答性が

低下しており、この温度刺激に対する感覚ニューロンの  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化の差異が、CREB 変異体の温度走性に影響を与えていると考えられている。(Nishida *et al.*, 2011)。

### 1.8 線虫 *C. elegans* の低温耐性と温度順化

*C. elegans* の低温耐性は飼育温度に依存して変化する (図 1)。25°Cで飼育された *C. elegans* は 0°C、1°C、2°C、4°Cに暴露されるといずれの場合でも死滅するが、20°Cで飼育された *C. elegans* は 0°Cから 2°Cに暴露された場合は死滅し、4°Cでは生存率が 80%以上となる。15°Cで飼育された *C. elegans* は 2°C、4°Cではほぼ全ての個体が生存し、1°Cでは 60%、0°Cでは 20%ほど生存する (Ohta *et al.*, 2014)。

多くの神経細胞でキネシンが欠損した *unc-104* 変異体、キューティクルの形成が異常になる *rol-6* 変異体、筋細胞に異常がでる *unc-54* 変異体など特定の組織に異常を持つ変異体のうち、*unc-104* 変異体で 20°C飼育の個体が低温暴露後に生存する低温耐性異常を示しており、さらに頭部のほぼすべての感覚神経に発現している OSM-6 の欠損変異体でも同様の異常が現れることから、*C. elegans* の低温耐性には神経系からの情報伝達が重要であること明らかになっている (Ohta *et al.*, 2014)。しかし、*C. elegans* の温度走性行動に関わる温度受容ニューロンである AFD 感覚ニューロンの発生に関わる OTX 型転写因子 TTX-1 の変異体と、同じく温度走性における温度受容ニューロンである AWC 感覚ニューロンで温度情報伝達に関わる三量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット ODR-3 の変異体は野生株と同じ低温耐性の表現型を示すことから、線虫 *C. elegans*

の低温耐性に関わる神経回路は温度走性行動に関わる神経回路とは別経路であると考えられている (Ohta *et al.*, 2014)。

これまでに低温耐性や温度順化に関与する感覚ニューロンとして ASJ 感覚ニューロン、ADL 感覚ニューロン、ASG 感覚ニューロンが見つまっている。ASJ 感覚ニューロンにおける温度受容情報伝達の分子経路の仮説として、何らかの温度受容体が温度を受容した後に、これまでに同定されている三量体 G タンパク質  $\alpha$  サブユニット GPA-1、GPA-3、GOA-1 がその情報を伝達し、グアニル酸シクラーゼである DAF-11 と ODR-1 を活性化し、ASJ 細胞内の環状 GMP の濃度を上昇させ、環状 GMP 依存性チャネル TAX-4/TAX-2 を開口させ、TAX-4/TAX-2 から  $Ca^{2+}$  が流入することで ASJ 感覚ニューロンを発火させること、また、環状 GMP を分解するホスホジエステラーゼ PDE-1 と PDE-2 がこの経路を抑制することが提唱されている (Ohnishi *et al.*, 2018; Ohta *et al.*, 2014; Takeishi *et al.*, 2020; Ujisawa *et al.*, 2016)。ASJ 感覚ニューロンは光受容ニューロンとしても知られている。ASJ 感覚ニューロンにおける温度情報伝達に関わる分子経路の構成分子は、ASJ 感覚ニューロンの光情報伝達経路の構成分子として既に同定されていた。このように ASJ 感覚ニューロンにおいて、温度情報伝達と光情報伝達の分子経路に共通点があるが、一方で、ASJ 感覚ニューロンの光受容体 LITE-1 の変異体では低温耐性は異常を示さないため、ASJ 感覚ニューロンにおいて未同定の温度受容体が存在し、それが光情報伝達経路と同様の分子経路を活性化し、ASJ 感覚ニューロン内の温度情報伝達を行っていると考えられる。

ASJ 感覚ニューロンは温度刺激によってインスリン様分子 DAF-28 と INS-6 を分泌し、腸のインスリン受容体 DAF-2 に受容される (Ohta *et al.*, 2014; Ohta *et al.*, 2023)。DAF-2 は、PI3 キナーゼ AGE-1、PDK キナーゼ PDK-1、AKT キナ

一ゼ AKT-1, 2 を順次活性化し、FOXO 型転写因子 DAF-16 の核への移動を抑制することで遺伝子発現を変化させ、*C. elegans* の低温耐性に関与していると考えられている (Ohta *et al.*, 2014; Ohta *et al.*, 2023)。

インスリンの経路の他にも、精子が ASJ 感覚ニューロンの神経活動に影響を与え、低温耐性に関わるフィードバック機構も明らかになっている。ASJ 感覚ニューロンからの情報伝達が腸の核ホルモン受容体 NHR-88 と NHR-114 で受容され、精子に存在する脱リン酸化酵素 GSP-4 が低温耐性に関与する (Sonoda *et al.*, 2016)。

ADL 感覚ニューロンの温度感受性では、活性化を促進する 3 つの TRP チャネルが関与する分子経路と、抑制する方向に機能する 2 つのカリウムチャネルが関与する経路のバランスによって温度刺激化の活性化が制御されていることが明らかになっている (Ohnishi *et al.*, 2020; Okahata *et al.*, 2019)。TRP チャネル OSM-9 と OCR-2 は温度受容体として協調的に機能し、OCR-1 は ADL における OSM-9/OCR-2 の遺伝学的な負の制御因子として機能する (Okahata *et al.*, 2019)。KCNQ 型カリウムチャネル KQT-2 は KQT-3 の制御因子として機能し、KQT-3 は ADL 感覚ニューロンの負の制御因子として働く可能性が示唆されている (Okahata *et al.*, 2019)。

ADL 感覚ニューロンの温度応答性には、上流の URX 酸素受容ニューロンからの酸素情報伝達が影響する。URX 酸素受容ニューロンにおいて、酸素受容体として機能するグアニル酸シクラーゼ GCY-35 が酸素を受容すると、その酸素情報が URX とシナプスで接続している RMG 介在ニューロンに伝達され、RMG 介在ニューロンはギャップ結合によって、ADL 温度受容ニューロンの温度応答の感度を調節している。このように、ADL 温度受容ニューロンでは、酸素と温度の



シグナルが統合され、最終的には温度順化を調節している (Okahata *et al.*, 2019; Takeishi *et al.*, 2020)。

温度刺激によって ADL 温度受容ニューロンの細胞質内に  $\text{Ca}^{2+}$  が流入することにより  $\text{Ca}^{2+}$  依存性エンドリボヌクレアーゼ ENDU-2 が機能することが低温耐性に必要であることが明らかになっている (Ujisawa *et al.*, 2018)。ENDU-2 は RNA を分解してリボソームの生合成を制御する核小体低分子 RNA (snoRNA) の生成を行っており、カスパーゼ CED-3 を介したアポトーシスシグナルを阻害することで低温耐性の制御に関わっている (Ujisawa *et al.*, 2018)。 *endu-2* 変異体では ADL 感覚ニューロンの温度刺激時の神経活動が低下しており、これは ADL におけるアポトーシスシグナルの過活性化に起因する可能性が考えられている (Ujisawa *et al.*, 2018)。

ASG 感覚ニューロンでは、Degenerin/epithelial  $\text{Na}^+$  channel (DEG/ENaC) タイプのメカノ受容体である DEG-1 が温度を受容していることが *C. elegans* のカルシウムイメージング解析と、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた 2 電極電圧クランプ法による電気生理学的解析により明らかになっている (Takagaki *et al.*, 2020)。ASG 感覚ニューロンで受容された温度情報は、キサンチン脱水素酵素 (XDH) の相同タンパク質である XDH-1 が機能する AIN 介在ニューロンと AVH 介在ニューロンに伝達され、低温耐性を制御する (Okahata *et al.*, 2022; Takagaki *et al.*, 2020)。

以上のように、これまでに *C. elegans* の低温耐性や温度順化に関わる温度受容ニューロンと、その温度応答に関わる温度受容体や分子について解析が進められてきた。しかし、これらの温度受容ニューロンの下流の神経回路や低温耐性の獲得・喪失の原因は分かっていない。

## 1.9 線虫 *C. elegans* の脂肪の貯蔵と分解

*C. elegans* は摂取した脂肪酸を、グリセロール骨格に 3 分子の脂肪酸が結合したトリグリセリド (Triglyceride : TG) に変換して貯蔵する。その大部分は腸の脂肪滴 (Lipid droplets : LDs) と呼ばれるリン脂質一重膜で構成された 50~3000nm の細胞小器官で貯蔵され、一部はリソソーム関連オルガネラ (Lysosome-related organelles : LROs) で貯蔵される (An *et al.*, 2023; Srinivasan, 2015; Zhang *et al.*, 2010)。腸の他には生殖巣、卵、皮下組織が脂質染色で染色されることから、これらの組織にも脂肪が蓄えられていると考えられる (O'Rourke *et al.*, 2009)。<sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N の安定同位体による標識とマスマスペクトロメトリーを組み合わせた解析により、貯蔵されている脂質の 2.4%、膜脂質の 4.7% が 1 時間ごとに入れ替わることが明らかにされている (Dancy *et al.*, 2015; Perez and Watts, 2021)。

*C. elegans* の主なリパーゼは脂肪分解酵素トリグリセリドリパーゼ (Adipose triglyceride lipase : ATGL) とホルモン感受性リパーゼ (Hormone-sensitive lipase : HSL) である (An *et al.*, 2023)。ATGL はヒトから *C. elegans* まで保存され、哺乳類細胞では LDs の表面に局在している (Smirnova *et al.*, 2006)。ATGL は TG をジグリセリドと遊離脂肪酸 (Free fatty acids : FFA) に分解する (Haemmerle *et al.*, 2006)。絶食状態の *C. elegans* では ATGL の発現量が増加し、再び餌が与えられると C18 脂肪酸デサチユラーゼ FAT-7 を誘導して脂肪レベルを回復する (Srinivasan, 2015)。

リパーゼの作用により TG から分離した FFA はミトコンドリアとペルオキシソームで  $\beta$  酸化経路によるエネルギーの生成に使用される。FFA のうち、短鎖、中鎖、長鎖脂肪酸はミトコンドリアでアセチル-CoA に変換され、超長鎖脂

脂肪酸はペルオキシソームでアセチル-CoAに変換される (An *et al.*, 2023; Srinivasan, 2015)。

これまでに、*C. elegans*の低温環境 (4°C) での長期の生存にホルモン感受性リパーゼ HOSL-1 を介した脂質分解経路が関与することが報告されているが (Liu *et al.*, 2017)、*C. elegans*の温度順化に脂肪の代謝経路が関わっているのかは明らかにされていない。

### 1.10 線虫 *C. elegans* の脂肪の染色手法

*C. elegans*の脂肪の染色には Nile red、BODIPY や oil Red O などの色素が使用される。Nile red は *in vitro* や細胞株で使用すると疎水性環境で濃縮され、黄金色の蛍光を発する脂溶性色素である (O'Rourke *et al.*, 2009)。Nile red と BODIPY は、餌である大腸菌に混ぜることで生きた *C. elegans* の染色が可能となることから脂肪の蓄積の解析に用いられてきたが、これらの色素が主な脂肪の貯蔵機関ではなく、一部の脂肪を貯蔵している LROs を染色していると報告されている (O'Rourke *et al.*, 2009)。*C. elegans* の腸には形態的・機能的に異なる顆粒が存在しており、Nile red で染色される酸性の LROs の他に、LROs と異なるマーカーで標識され、Nile red では染色されない中性の顆粒も存在する (O'Rourke *et al.*, 2009)。*C. elegans* は餌が無い状態に置かれると貯蔵した TG を分解・代謝してエネルギーとするため、絶食の条件下では TG 量が低下するが、Nile red のシグナルはむしろ増加する (O'Rourke *et al.*, 2009)。LROs は、 $\beta$  酸化経路によるエネルギーの生成のために中性脂肪滴からミトコンドリアやペルオキシソームへ脂肪を移動させる通過区画として機能している可能性が示唆されている (Srinivasan, 2015)。このことから、絶食の条

件下で Nile red のシグナルが増加しているのは、エネルギーの生成に脂肪を動員するために LROs へ脂肪の移行が進むためではないかと考えられる。

*C. elegans* の主な脂肪の貯蔵機関を染色する色素として LipidTOX neutral-lipid green、LipidTOX neutral-lipid red、Sudan black、oil red 0 が検討された (O' Rourke *et al.*, 2009)。LipidTOX neutral-lipid green、LipidTOX neutral-lipid red は染色効率が悪く、*C. elegans* の外表面を覆うクチクラ層を透過処理した後でも 10%未満しか染まらず、これらの色素のシグナルは光退色に対して非常に敏感である (O' Rourke *et al.*, 2009)。Sudan black を用いた染色では、エタノールによる洗浄段階の操作が最終的なシグナルに強く影響するため誤差が生じやすい (O' Rourke *et al.*, 2009)。一方 oil Red 0 は *C. elegans* の解剖学的構造を保存でき、サンプル間のばらつきも少なかった (O' Rourke *et al.*, 2009)。oil Red 0 で染色して定量化した場合では、代謝変異体とガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーによる TG の生化学的測定の結果が相関しており、絶食条件においては Nile red で染めた場合とは異なりシグナルが低下した (O' Rourke *et al.*, 2009)。そのため、oil Red 0 を使用した染色法によって *C. elegans* の脂肪の定量化が行われている。

### 1.11 本研究の目的

これまで *C. elegans* の低温耐性や温度順化に関わる温度受容ニューロンとその分子機構の解析は進められてきたが、温度受容ニューロンの下流の神経回路や低温耐性の獲得・喪失の原因となる機構の解析は進められていなかった。そのため、本研究では *C. elegans* の温度順化に焦点を当て、まず温度順化を制御する新規の分子の探索とその分子の機能細胞の同定を行い、温度順化の制

御に関わるニューロンを探索した。次にカルシウムイメージング法を用いて温度刺激時の神経活動を調べることにより、温度順化に関与する温度受容ニューロンとその下流のニューロンからなる神経回路の動態を測定した。その後、神経回路の下流で制御される組織として腸の脂肪代謝経路と温度順化の関係と、温度による脂肪量の差異について調べた。

## 2. 結果

### 2.1 転写因子 CREB は ASJ と RMG で機能し、温度順化を促進する

これまでの研究から低温耐性や温度順化に関わる新規の温度受容ニューロンや、温度受容ニューロン内での分子メカニズムの解析が進められてきたが、下流の情報伝達経路は不明の部分が多かった。そこで温度受容ニューロンの下流の経路の解明に向け、まず *C. elegans* の温度順化に関わる新たな分子の探索を行った。

転写因子 CREB は線虫から哺乳類まで保存され長期記憶の形成に関与する (Greer and Greenberg, 2008; Kandel, 2001)。CREB が *C. elegans* の温度順化に関わっているのか、温度シフトテストを用いて検証した。その結果、転写因子 CREB の変異体 (*crh-1* 変異体) は、野生株 N2 (Wild-type) に比べ新しい温度への順化が遅れることが分かった (図 2、3) (Motomura *et al.*, 2022)。高温環境から低温環境への温度シフト (図 2 ; 25°C→15°C→2°C) では、25°C 飼育後に 15°C を 3 時間経験した N2 の生存率が約 75% だったのに対し、*crh-1* 変異体は 40% ほどに留まった。一方、低温環境から高温環境への温度シフト (図 3 ; 15°C→25°C→2°C) では、15°C で飼育された *crh-1* 変異体は 25°C への順化が遅れ、野生株に比べ生存率が増加した。特に 15°C 飼育後に 25°C で 3 時間飼育した場合に N2 と *crh-1* 変異体の生存率の差は顕著であった (N2 ; 約 5%、*crh-1* 変異体 ; 約 50%) (図 3)。このことから CREB は温度変化後 3 時間の間に作用し、温度順化を促進する可能性が考えられた。

次に *crh-1* 変異体の様々な組織に *crh-1cDNA* を導入し、野生型の *crh-1* 遺伝子を発現させ、CREB が温度順化において *C. elegans* のどの組織で機能するのと同定した (図 4) (Motomura *et al.*, 2022)。*crh-1* 変異体の温度順化異常は、*unc-14* プロモーターを使用して *crh-1cDNA* を発現させた際に回復した (図

4)。*unc-14* プロモーターはほとんどの神経細胞で遺伝子を発現させることから、CREB がいずれかの神経細胞で機能することが示唆された。そこで、どの神経細胞が *crh-1* 変異体の温度順化異常の原因であるかをより詳細に調べるために、特定のニューロンで遺伝子発現を誘導することが既に報告されている様々なプロモーターDNA 配列を用いて、*crh-1* 変異体の特定のニューロンで野生型の *crh-1* 遺伝子を発現させる解析を行った。まず 302 個ある神経細胞のうち、64 個の神経細胞で発現誘導することが可能な 6 つのプロモーターDNA 配列 (*osm-6p*, *ncs-1p*, *ceh-10p*, *glr-1p*, *unc-8p*, *unc-86p*) の下流に *crh-1cDNA* を融合したプラスミド DNA を作製し、それら 6 つの DNA コンストラクトを混合して、*crh-1* 変異体に導入した。その結果、*crh-1* 変異体の温度順化異常が野生株と同程度まで回復した (図 4)。しかし、41 個の神経細胞で発現誘導する 3 つのプロモーターDNA 配列 (*glr-1p*, *unc-8p*, *unc-86p*) で *crh-1* 遺伝子を発現させたトランスジェニック系統は *crh-1* 変異体と同様の温度順化異常を示した (図 4)。次に、55 個の神経細胞で発現誘導する 5 つのプロモーターDNA 配列 (*trx-1p*, *ncs-1p*, *glr-1p*, *unc-8p*, *unc-86p*) の下流に *crh-1cDNA* を融合したプラスミド DNA を作製し、それら 5 つを混合して *crh-1* 変異体に導入した場合においても、*crh-1* 変異体の温度順化異常が野生株と同程度まで回復した (図 4)。さらに、42 個の神経細胞で発現誘導する 4 つのプロモーターDNA 配列 (*trx-1p*, *glr-1p*, *unc-8p*, *unc-86p*) を使用して作成したトランスジェニック系統においても温度順化異常が部分的に回復したことから、ASJ 感覚ニューロンが温度順化における CREB の機能細胞である可能性が考えられた (図 4)。ところが、*crh-1* 変異体の ASJ 感覚ニューロンのみに *crh-1cDNA* を導入しても (使用プロモーター: *trx-1p*)、温度シフトテストで生存率が高くなる異常は回復しなかった。この結果から、温度順化の成立には CREB が ASJ 感覚ニュー

ロンで機能するだけでは十分でなく、他のニューロンにおける CREB の機能も必要である可能性が考えられた。

そこで、*crh-1* 変異体において ASJ 感覚ニューロンに加え ASJ 以外のニューロンでも同時に *crh-1cDNA* を導入した系統を作製した。具体的には、(1)ASJ と PVQ 介在ニューロン (使用プロモーター: *trx-1p*, *glr-1p*)、(2)ASJ と HSN 運動ニューロン (使用プロモーター: *trx-1p*, *unc-86p*)、(3)ASJ と AIY 介在ニューロン (使用プロモーター: *trx-1p*, *ceh-10p*)、(4)ASJ と RMG 介在ニューロン (使用プロモーター: *trx-1p*, *RMGp\**) に *crh-1cDNA* を導入した *crh-1* 変異体トランスジェニック系統を作製し、温度順化テスト後の生存率を測定した。その結果、(4)ASJ 感覚ニューロンと RMG 介在ニューロンで同時に *crh-1cDNA* を導入した系統において、*crh-1* 変異体の温度順化異常が強く回復した (図 4)。なお、ASJ と PVQ 介在ニューロンに *crh-1cDNA* を導入した系統と、ASJ と HSN 運動ニューロンに *crh-1cDNA* を導入した系統でも *crh-1* 変異体の温度順化異常が部分的に回復したが、これは使用したプロモーターの *unc-86p* と *glr-1p* が僅かに RMG 介在ニューロンでも発現誘導していることが最近報告されたため (Taylor *et al.*, 2021)、その影響であったと考えられる。また、*crh-1* 変異体の RMG 介在ニューロンでのみ *crh-1cDNA* を導入したトランスジェニック系統では、*crh-1* 変異体を示す温度順化異常は回復しなかったことから、野生株において CREB は ASJ 感覚ニューロンと RMG 介在ニューロンで機能し、温度順化を促進すると考えられた (Motomura *et al.*, 2022)。

## 2.2 CREB は ASJ 感覚ニューロンの温度応答性に関わる

野生株の ASJ 感覚ニューロンの温度応答性は *C. elegans* の飼育温度に依存して変化する (Ohta *et al.*, 2014)。CREB の欠損が ASJ 感覚ニューロンの温度



応答性にどのような影響を与えるのか確認するために *crh-1* 変異体の ASJ 感覚ニューロンに  $\text{Ca}^{2+}$  の離脱と結合によって蛍光が変化する CFP と YFP のキメラタンパク質であるイエローカメレオン YC3.60 を発現させ (Nagai *et al.*, 2004)、温度刺激下の細胞体の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を可視化し、野生株と比較した (図 5-7) (Motomura *et al.*, 2022)。ASJ 感覚ニューロンで発現誘導する *trx-1* プロモーター配列の下流に *yc3.60* cDNA を融合したプラスミド DNA を作製し、野生株、シナプス接続に異常をもつシナプトブレビン *snb-1* 変異体と *crh-1* 変異体に導入した。シナプトブレビンは、神経細胞間の情報伝達機構であるシナプス伝達において、前シナプスのシナプス小胞をシナプス終末に係留する分子として知られている。

飼育温度の違いにより温度刺激に対する ASJ 感覚ニューロンの温度応答性に違いがみられることが報告されていたため (Ohta *et al.*, 2014)、特定の温度域のみで野生株と *crh-1* 変異体で ASJ 温度受容ニューロンの温度応答性に差がある可能性を考慮し、15°C 飼育、20°C 飼育、23°C 飼育した個体を使用して、それぞれ飼育温度付近の温度刺激を与えた。 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った結果、20°C または 23°C で飼育した野生株の ASJ 感覚ニューロンは  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が見られるが、*crh-1* 変異体では野生株に比べ有意に低下した (図 5-7)。シナプス接続が低下している *snb-1* 変異体の ASJ 感覚ニューロンでは、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化は野生株とほぼ同じであったことから (図 7)、*crh-1* 変異体の ASJ 感覚ニューロンの温度刺激時の神経活動の低下は他のニューロンからの影響ではないと考えられる。また 20°C で飼育された *crh-1* 変異体の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の低下は、*crh-1* 変異体の ASJ 感覚ニューロンに野生型 CREB を特異的に発現させることで回復した (図 6 ; *crh-1; Ex[trx-1p::crh-1 cDNA]*)。これらの結果から CREB は ASJ 感覚ニューロンの温度応答性に関与することが示唆された。

ASJ 感覚ニューロンで発現誘導する *trx-1* プロモーター配列の下流に *snb-1* cDNA と蛍光タンパク質 VENUS を融合したプラスミド DNA (*trx-1p::snb-1::VENUS*) を、*crh-1* 変異体に導入し、Z 軸方向の焦点面を変化させながら取得した画像を立体構築することによりシナプスの形態観察を行った。その結果、*crh-1* 変異体の ASJ 感覚ニューロンは SNB-1::VENUS の蛍光強度やシナプス間の距離に野生株との違いはないが、シナプスの総量が低下していることが分かった (図 8) (Motomura *et al.*, 2022)。

以上の結果から、*crh-1* 変異体は野生株に比べ ASJ 感覚ニューロンの温度応答性が低下しており、これにより ASJ 感覚ニューロンに接続している他の神経細胞への情報伝達も低下していると考えられる。これらの異常が CREB 変異体の温度順化の遅れに繋がる可能性が得られた。

### 2.3 PVQ 介在ニューロンが ASJ から RMG への温度情報伝達を仲介する

*crh-1* 変異体の回復実験から温度順化の促進に関わる神経細胞として ASJ 感覚ニューロンと RMG 介在ニューロンが見つかったが、ASJ 感覚ニューロンと RMG 介在ニューロンはギャップ結合やシナプス結合で接続していないため (図 9) (White *et al.*, 1986)、この 2 つのニューロン間の情報伝達を仲介する神経細胞の存在が考えられた。

ASJ 感覚ニューロンから RMG 介在ニューロンへの最短の神経回路の経路は、HSN 運動ニューロン、PVQ 介在ニューロン、ASK 感覚ニューロンのいずれかを介した経路である (図 9) (White *et al.*, 1986)。そこで ASJ 感覚ニューロン、PVQ 介在ニューロン、ASK 感覚ニューロン、そして HSN 運動ニューロンにプロテインキナーゼ C の構成的活性化型である PKCgf を導入し、人工的に神経ペプチドを介したシナプス伝達を過活性化した (図 10) (Motomura *et al.*,

2022)。プロテインキナーゼ C は前シナプスの有芯小胞の放出を促進するため、その構成的活性化によりシナプス伝達を過活性化することができる (Sieburth *et al.*, 2007)。HSN 運動ニューロン、PVQ 介在ニューロン、または ASK 感覚ニューロンで発現誘導するそれぞれのプロモーターの下流に *ttx-4(gf)cDNA* 配列を繋いだプラスミドを作製し、野生株に遺伝子導入してトランスジェニック系統を作製した。

トランスジェニック系統を使用して温度シフトテスト (15°C→25°C→2°C) を行った結果、ASK 感覚ニューロン に PKCgf を導入した系統 (N2; *Ex[sra-7p:: ttx-4(gf)cDNA]*) と HSN 運動ニューロンに PKCgf を導入した系統 (N2; *Ex[tph-1p:: ttx-4(gf)cDNA]*) は、低温刺激後も野生株と同程度の生存率を示したが、ASJ 感覚ニューロンに PKCgf を導入した系統 (N2; *Ex[trx-1p:: ttx-4(gf)cDNA]*) と PVQ 介在ニューロンに PKCgf を導入した系統 (N2; *Ex[sra-6p:: ttx-4(gf)cDNA]*) は、野生株よりも低温刺激後の生存率が有意に増加した (図 10)。セロトニン作動性ニューロンである HSN 運動ニューロンのセロトニン合成に異常が起こる *tph-1* 変異体 とセロトニン受容体 *mod-1* 変異体も温度順化異常を示さなかったことから、HSN 運動ニューロンの神経情報伝達の異常は温度順化に影響しないと考えられた (図 11) (Motomura *et al.*, 2022)。

次に、カルシウムイメージング法を用いて PVQ 介在ニューロンと RMG 介在ニューロンが温度情報伝達に関与しているか調べた。野生株の生殖巣にイエローカメレオン (YC3.60) 遺伝子の DNA をマイクロインジェクションで導入し、PVQ 介在ニューロンと RMG 介在ニューロンで YC3.60 が発現するトランスジェニック系統を作製した。その系統の個体に温度刺激を与えながら、PVQ 介在ニューロンまたは RMG 介在ニューロンにおける Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を計測した (図 12)。その結果、23°C で飼育した *C. elegans* の PVQ 介在ニューロンと RMG 介

在ニューロンの細胞体では、温度変化に伴う  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が起こった。同じ条件において、ASJ 温度受容ニューロンでも温度変化に伴う  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が見られたことから（図 12）、ASJ 温度受容ニューロン、PVQ 介在ニューロン、RMG 介在ニューロンは同じ温度域で活性化状態にあり、神経回路の接続地図を加味すると（図 9）、ASJ 温度受容ニューロンで受容された温度情報が、PVQ 介在ニューロンを介して RMG 介在ニューロンに伝達される可能性が得られた (Motomura *et al.*, 2022)。

#### 2.4 PVQ 介在ニューロンは ASJ 温度受容ニューロンから温度情報伝達を受ける

前項より PVQ 介在ニューロンが温度順化に関わる温度情報伝達に関与していることが明らかになったものの、このニューロンの活性化が上流の感覚ニューロンからの情報伝達に依存するのか、それとも PVQ 介在ニューロンに温度受容機構が存在しているのかは不明のままだった。そこで、温度刺激下の PVQ 介在ニューロンの神経活動が上流の感覚ニューロンに依存するのか調べるために、シナプス接続に異常をもつシナプトブレビン *snb-1* 変異体の PVQ 介在ニューロンでカルシウムイメージングを行った（図 13） (Motomura *et al.*, 2022)。これまでに *C. elegans* の温度順化や低温耐性に関わる温度感受性を持つ感覚ニューロンとして ASJ 感覚ニューロン、ADL 感覚ニューロン、ASG 感覚ニューロンが報告されている。これらの感覚ニューロンはどれも PVQ 介在ニューロンの上流に位置している（図 9）。PVQ 介在ニューロンは ASJ 感覚ニューロンと相互にシナプス接続を持つ。ADL 感覚ニューロンとは AVJ 介在ニューロンを介して接続しており、ADL 感覚ニューロンと AVJ 介在ニューロン間、AVJ 介在ニューロンと PVQ 介在ニューロン間はともにシナプス接続である。ASG 感覚ニューロンからは ASK 感覚ニューロンを介して接続している。ASG 感覚ニューロンと

ASK 感覚ニューロンの間はシナプス接続だが、ASK 感覚ニューロンと PVQ 介在ニューロンはギャップ結合で接続している。よって、シナプス接続が低下した PVQ 介在ニューロンは ASJ 感覚ニューロン、ADL 感覚ニューロン、ASG 感覚ニューロンからの温度情報伝達が低下していると考えられる。

*snb-1* 変異体の PVQ 介在ニューロンにイエローカメレオン (*yc3.60*) を導入したトランスジェニック系統 (使用プロモーター: *sra-6p*) を作製し、カルシウムイメージングを行った結果、温度刺激時の *snb-1* 変異体では、PVQ 介在ニューロンの  $Ca^{2+}$  濃度変化が野生株よりも減少することが分かった (図 13) (Motomura *et al.*, 2022)。*snb-1* 変異体の PVQ 介在ニューロンにおいて温度刺激下の神経活動が完全に低下しないのは、PVQ 介在ニューロン自身も僅かに温度応答している可能性と、PVQ 介在ニューロンにギャップ結合で接続している感覚ニューロンからの影響の可能性がある。しかし、*snb-1* 変異体における PVQ 介在ニューロンでは神経活動の顕著な低下が見られたことから、温度刺激下の PVQ 介在ニューロンの活性化には、上流の感覚ニューロンからのシナプスを介した温度情報伝達が重要であることが示唆された。

次に PVQ 介在ニューロンを活性化する上流の感覚ニューロンの同定を行った。これまでに ASJ 感覚ニューロン、ADL 感覚ニューロン、ASG 感覚ニューロンの温度刺激時の  $Ca^{2+}$  濃度変化が低下する変異体が報告されているため (Ohta *et al.*, 2014; Takagaki *et al.*, 2020; Ujisawa *et al.*, 2018)、これらの変異体を用いて温度刺激下の PVQ 介在ニューロンの  $Ca^{2+}$  濃度の変化を計測した (図 14-16) (Motomura *et al.*, 2022)。

環状 GMP 依存性チャネル TAX-4 を欠損した変異体では、ASJ 感覚ニューロンの温度応答性が著しく低下する (Ohta *et al.*, 2014)。*tax-4* 変異体の PVQ 介在ニューロンにイエローカメレオンを導入したトランスジェニック系統 (使用プ

ラスミド：*npr-11p::ycx2.60*) を作製し、カルシウムイメージングを行ったところ、温度刺激下の *tax-4* 変異体の PVQ 介在ニューロンは野生株に比べ神経活動が低下していた (図 14) (Motomura *et al.*, 2022)。さらに、*tax-4* 変異体における温度刺激時の PVQ 介在ニューロンの神経活動の低下は、野生型の *tax-4* 遺伝子を *tax-4* 変異体の ASJ 感覚ニューロンで特異的に発現させたトランスジェニック系統で回復した (使用プロモーター：*trx-1p*) (図 14) (Motomura *et al.*, 2022)。これらの結果は、ASJ 感覚ニューロンからの温度情報シグナルが PVQ 介在ニューロンを正に制御していることを示している。

温度感受性を持ち、低温耐性の制御に関わる ASG 感覚ニューロンの温度応答性が低下した変異体 *deg-1* 変異体の PVQ 介在ニューロンにイエローカメレオンを導入したトランスジェニック系統 (使用プラスミド：*sra-6p::ycx2.60*) では、温度刺激時において PVQ 介在ニューロンに僅かな神経活動の上昇が見られたが、有意差のある神経活動の変化は起こらず、ASG 感覚ニューロンの温度応答性の低下による PVQ 介在ニューロンへの影響は少ないと考えられた (図 15) (Motomura *et al.*, 2022; Takagaki *et al.*, 2020)。同じく温度順化に関与し、温度感受性を持つ ADL 感覚ニューロンの温度応答性が低下する *ocr-2 osm-9; ocr-1* 変異体の PVQ 介在ニューロンにイエローカメレオンを導入したトランスジェニック系統 (使用プラスミド：*sra-6p::yc3.60*) の PVQ 介在ニューロンでは、温度刺激時に野生株と同様の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が見られた (図 16) (Motomura *et al.*, 2022; Ujisawa *et al.*, 2018)。

以上の結果から、温度刺激下の PVQ 介在ニューロンは ASJ 感覚ニューロンからの温度情報伝達によって制御されていると考えられる (Motomura *et al.*, 2022)。

## 2.5 PVQ 介在ニューロンから RMG 介在ニューロンへの情報伝達はグルタミン酸が機能する

ASJ 感覚ニューロンからの温度情報伝達が PVQ 介在ニューロンに伝達されていることが示唆されたため、次に、PVQ 介在ニューロンから RMG 介在ニューロンへの情報伝達を担う神経伝達物質の同定を行った。PVQ 介在ニューロンはグルタミン酸作動性ニューロンであり、グルタミン酸をシナプス小胞に取り込む小胞型グルタミン酸輸送体 (VGLUT) をコードする *eat-4* 遺伝子を発現している。この *eat-4* 遺伝子に 614bp の欠損が起きている *eat-4* 変異体に関して、温度順化の表現型を測定した。15°C で飼育した *eat-4* 変異体を 25°C に 2 時間静置した後に 2°C に置くと (15°C → 25°C → 2°C)、*eat-4* 変異体は野生株に比べて生存率が高くなる異常を示すことが分かった (図 17) (Motomura *et al.*, 2022)。*eat-4* 変異体の PVQ 介在ニューロンを含むニューロンに *eat-4* の cDNA を導入したトランスジェニック系統と、トランスジェニックマーカーとなる遺伝子のみを導入した系統を作製し、温度順化テスト (15°C → 25°C → 2°C) を行った。マーカー遺伝子のみを導入した *eat-4* 変異体系統は、マーカー遺伝子を導入していない *eat-4* 変異体と同様に高い生存率を示す異常を示したが、*eat-4* 変異体の PVQ 介在ニューロンに野生型の *eat-4* cDNA を導入した系統では、野生株と同程度の生存率を示すようになった (図 17) (Motomura *et al.*, 2022)。つまり、*eat-4* 変異体の温度順化異常は PVQ 介在ニューロンにおける *eat-4* 遺伝子の機能欠損が原因である可能性が得られた。

そこで次に、PVQ 介在ニューロンで機能する EAT-4 が温度順化に関与することを確認するため、野生株の PVQ 介在ニューロンで特異的に *eat-4* 遺伝子を RNAi によってノックダウンした場合に温度順化異常が見られるかを調べた。野生株の PVQ 介在ニューロン特異的に *eat-4* をノックダウンしたトランスジェニ

ック系統を作製し、温度順化テストを行ったところ、*eat-4* 変異体と同様の温度順化異常が見られた (図 18) (Motomura *et al.*, 2022)。以上の結果から、PVQ 介在ニューロンで発現している小胞型グルタミン酸輸送体 (VGLUT) である EAT-4 が温度順化に関与していることが示唆された。VGLUT は、神経終末のシナプス部位に存在するシナプス小胞に神経伝達物質であるグルタミン酸を取り込む輸送体であり、一般的に VGLUT の変異体ではグルタミン酸がシナプスから放出されないため、グルタミン酸を介した神経伝達が欠損している。このことと今回の結果をふまえると、*C. elegans* の野生株の温度順化の成立において、PVQ 介在ニューロンのシナプスから神経伝達物質であるグルタミン酸が放出されることが温度順化に必要であると考えられる。

温度順化において PVQ 介在ニューロンの下流に位置する介在ニューロンとして RMG 介在ニューロンを同定した。そのため、PVQ 介在ニューロンから分泌されたグルタミン酸は、RMG 介在ニューロンに存在するグルタミン酸受容体で受容されることで、RMG 介在ニューロンの活性を変化させ、最終的に温度順化を引き起こしていると考えられる。そこで、温度順化において、PVQ 介在ニューロンから分泌されるグルタミン酸を受容する RMG 介在ニューロンのグルタミン酸受容体を同定するために、様々なグルタミン酸受容体の変異体を用いて温度順化テスト (15°C→25°C→2°C) を行った。その結果、AMPA 型グルタミン酸受容体である GLR-4 の変異体、NMDA 型グルタミン酸受容体である NMR-1 と NMR-2 の変異体、グルタミン酸作動性クロライドチャネル (GLC) である AVR-14, 15 と GLC-1 の多重変異体 (*avr-14; avr-15 glc-1* と *avr-14; glc-1*) において、温度順化テスト後に生存率が上昇する異常が見られた (図 19) (Motomura *et al.*, 2022)。なかでも GLR-4 は RMG 介在ニューロンで発現する AMPA 型グルタミン酸受容体であったため、野生株の RMG 介在ニューロンでのみ *glr-4* 遺伝子と *glr-*



5遺伝子の両者を RNAi でダブルノックダウンしたトランスジェニック系統を作製し、温度順化テスト (15°C→25°C→2°C) を行った。その結果、*glr-4* 遺伝子と *glr-5* 遺伝子を同時にノックダウンした系統では、温度順化時の生存率が野生株より上昇することが分かった (図 20) (Motomura *et al.*, 2022)。

次に、*glr-4* 遺伝子と *glr-5* 遺伝子をダブルノックダウンした RMG 介在ニューロンの温度応答性を、カメレオン YC3.60 を用いたカルシウムイメージングにより測定した。その結果、高温刺激下において、*glr-4* 遺伝子と *glr-5* 遺伝子をダブルノックダウンした系統では野生株よりも細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化が低下することが分かった (図 21) (Motomura *et al.*, 2022)。野生株には劣るが、RMG 介在ニューロンの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化が完全に無くならず、温度に刺激に伴い上昇するのは、RMG 介在ニューロンが他の温度受容ニューロンと接続しているためだと考えられる。特に温度順化に関わることが分かっている ADL 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンはギャップ結合で直接接続している (図 9) (Okahata *et al.*, 2019)。RMG 介在ニューロンが他の温度受容ニューロンから温度情報伝達を受けたことにより、神経活動が上昇するものの、グルタミン酸受容体がダブルノックダウンされた影響で野生株の RMG 介在ニューロンと比べ神経活動が低下したと予想される。これらの結果から、RMG 介在ニューロンで発現しているグルタミン酸受容体 GLR-4 と GLR-5 は、温度順化の促進に関与していると考えられる。つまり、温度順化において、PVQ 介在ニューロンから分泌されるグルタミン酸は、RMG 介在ニューロンのグルタミン酸受容体 GLR-4 と GLR-5 で受容されていると考えられた。

PVQ 介在ニューロンはグルタミン酸を介した情報伝達経路の他にもギャップ結合で他のニューロンと接続している。PVQ 介在ニューロンのギャップ結合が温度順化に与える影響を調べるために、PVQ 介在ニューロンにおいてギャップ

結合を形成するイネキシンを欠損した変異体で温度順化テスト (15°C→25°C→2°C) を行った。その結果、イネキシンである UNC-7、INX-9 と INX-19 の変異体で温度順化異常が見られた (図 22A) (Motomura *et al.*, 2022)。温度順化異常が見られたイネキシン変異体のうち、INX-9 と INX-19 は ASJ 感覚ニューロン、PVQ 介在ニューロン、または RMG 介在ニューロンのいずれのニューロンでも発現していないが、UNC-7 は PVQ 介在ニューロンと RMG 介在ニューロンで発現している。イネキシンは通常、ヘテロもしくはホモ複合体を形成することで機能的なギャップ結合となる。PVQ 介在ニューロンには、イネキシン UNC-7 と複合体を形成する可能性のあるイネキシンである UNC-9 も発現している。そこで、野生株の PVQ 介在ニューロン特異的にイネキシンである UNC-7 と UNC-9 を RNAi でダブルノックダウンし、温度順化テスト (15°C→25°C→2°C) を行ったところ、RNAi 系統では野生株より高い生存率を示した (図 22B) (Motomura *et al.*, 2022)。この UNC-7 と UNC-9 のダブルノックダウン系統が示す温度順化テストの生存率は野生株よりは高かったものの約 40%と、*unc-7* 変異体で同様のテストを行った際に比べて野生株の生存率との差が減少した (図 22A、B) (Motomura *et al.*, 2022)。UNC-7 は PVQ 以外の多数のニューロンで発現しているため、*unc-7* 変異体を示す温度順化異常は主に PVQ 以外のニューロンにおけるギャップ結合の異常が原因であると考えられた。これらのことから、野生株の PVQ 介在ニューロンにおいて、ギャップ結合が温度順化に与える影響はシナプス接続よりも少ないと考えられる。

## 2.6 神経ペプチド FLP-7 が腸の脂肪分解を介して温度順化を制御する

C. *elegans* の低温耐性の獲得と喪失につながる生理的な原因は解明されていなかった。そのため温度情報伝達に関わる神経回路の下流で、どのような分子

経路が機能し、低温刺激後に個体の死に至るのか調べた。脂肪の代謝が低温耐性と関係していることが示唆されており (Murray *et al.*, 2007)、脂肪代謝に関わる分子と温度順化との関係に着目した。

*C. elegans* の脂肪代謝に関わる経路として、セロトニンシグナルの下流で脂肪分解酵素を介して腸の脂肪分解を制御する経路が報告されている。この経路ではセロトニンシグナルに応答して頭部の ASI 感覚ニューロンから神経ペプチド FLP-7 が分泌され、それを腸にある神経ペプチド NPR-22 受容体が受け取ることで腸の脂肪分解酵素 ATGL-1 を活性化する (Palamiuc *et al.*, 2017)。これら脂肪代謝に関わる神経ペプチド FLP-7 とその受容体 NPR-22 の変異体を使い温度シフトテスト (15°C→25°C→2°C) を行った結果、これら *flp-7* 変異体と *npr-22* 変異体は野生株に比べ生存率が上昇する温度順化異常が見られた (図 23) (Motomura *et al.*, 2022)。

次に温度順化に関わる神経ペプチド FLP-7 が、RMG 介在ニューロンで受容するグルタミン酸シグナル経路と同じ経路で機能するか調べた。野生株と *flp-7* 変異体、野生株の RMG 介在ニューロン特異的にグルタミン酸受容体 *glr-4* と *glr-5* を RNAi でダブルノックダウンした系統、*flp-7* 変異体の RMG 介在ニューロン特異的にグルタミン酸受容体 *glr-4* と *glr-5* を RNAi でダブルノックダウンした系統で温度シフトテスト (15°C→25°C→2°C) を行った (図 24)

(Motomura *et al.*, 2022)。その結果、*flp-7* 変異体と、野生株の RMG 介在ニューロン特異的に *glr-4* と *glr-5* をダブルノックダウンした系統、*flp-7* 変異体の RMG 介在ニューロン特異的に *glr-4* と *glr-5* をダブルノックダウンした系統で生存率が上昇する異常が見られた (図 24) (Motomura *et al.*, 2022)。FLP-7 とグルタミン酸が別経路で機能していた場合、温度順化に関わる 2 つの経路が欠損した系統はより温度順化異常の表現型が強くなると考えられるため、これ

らの系統の生存率に有意な差はなかったことから、グルタミン酸が機能する RMG 介在ニューロンと FLP-7 は同じ経路で機能していると考えられる。

## 2.7 高温下で ATGL-1 が機能し、脂肪の分解を行う

低温環境（4℃）で代謝に関わる経路としてホルモン感受性リパーゼ HOSL-1 を介した脂肪分解経路が報告されているが、ATGL-1 はこの低温下での長期生存には関与していない(Liu *et al.*, 2017)。しかし、*hos1-1* は 4℃ の環境下で発現量が増加することから(Liu *et al.*, 2017)、ATGL-1 の発現量も温度の影響を受けて変動する可能性が考えられた。

そこで 15℃ で飼育して成長させた個体と 25℃ で飼育して成長させた個体の野生株の腸の ATGL-1::GFP の蛍光強度を定量化し、環境温度依存的に ATGL-1 の発現量が増加するのか調べた。*hjls67[atgl-1p::atgl-1::GFP+mec-7::RFP]* の系統を用いて蛍光強度を定量化した結果、15℃ 飼育時に比べ 25℃ 飼育時の方が GFP の蛍光強度が強く、飼育温度依存的に ATGL-1 の発現量が増加していた (図 25) (Motomura *et al.*, 2022)。これにより、ATGL-1 による脂肪分解がより高い温度 (25℃) で活性化されている可能性が得られた。

次に中性脂質を赤く染める oil red 0 で染色し、腸の脂肪量の定量化を行った。25℃ で飼育し成長させた野生株と 15℃ で飼育し成長させた野生株の脂肪量を比較したところ、25℃ 飼育時の野生株は 15℃ 飼育時の野生株より腸の脂肪量が低下していた (図 26) (Motomura *et al.*, 2022)。この飼育温度依存的な腸の脂肪量の変化は、神経ペプチド *flp-7* 変異体や神経ペプチド受容体 *npr-22* 変異体では見られず、これは *flp-7; npr-22* 二重変異体も同様だった (図 26) (Motomura *et al.*, 2022)。これらの結果から、FLP-7 と NPR-22 が関与する脂肪の代謝経路が高温飼育下での腸の脂肪分解に関与していると考えられた。

*crh-1* 変異体では 15°C 飼育時と 25°C 飼育時の腸の脂肪量に有意の差はなかったが、*crh-1* 変異体の ASJ 温度受容ニューロンと RMG 介在ニューロンで *crh-1* cDNA を発現させると野生株と同様の表現型を示すようになった (図 27) (Motomura *et al.*, 2022)。この *crh-1* 変異体に *crh-1* cDNA を導入した後の表現型の変化は、*crh-1* 変異体の ASJ 感覚ニューロンおよび RMG 介在ニューロンで *crh-1* 遺伝子を発現させた際に温度順化の表現型が回復した結果と一致しており (図 4) (Motomura *et al.*, 2022)、温度順化現象と飼育温度依存的な腸の脂肪量の減少は、どちらも ASJ 感覚ニューロンと RMG 介在ニューロンで機能する CREB で制御されていると考えられる。また、*crh-1; flp-7* 二重変異体でも、それぞれの変異体と同様に 15°C 飼育時と 25°C 飼育時の腸の脂肪量に有意の差がなかったことから、CREB と FLP-7 は同じ経路で機能し、腸の脂肪分解を促進していると考えられる (図 27) (Motomura *et al.*, 2022)。

脂肪酸組成の差異が *C. elegans* の低温耐性に影響を与えるか確認するため、脂肪酸組成を気-液クロマトグラフィーにより計測した。様々な飼育温度条件 (15°C、25°C、15°C→25°C (3hr)、25°C→15°C (3hr)) の *crh-1* 変異体と野生株 N2 (wild-type) を調べたところ、15°C 飼育から 25°C に 3 時間置いた *crh-1* 変異体 [*crh-1* (15°C→25°C (3hr))] は、同じ温度シフト条件の野生株 [Wild-type (15°C→25°C (3hr))] に比べ飽和脂肪酸 (Saturated fatty acid: SFA) の量が多く、一方で多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acid: PUFA) の量が低下していた (図 28) (Motomura *et al.*, 2022)。不飽和脂肪酸量が多い方が低温下での細胞膜の流動性を保持できるはずであるが、*crh-1* 変異体では逆の結果となった。このことから、*crh-1* 変異体の低温耐性の保持は細胞膜の脂肪酸組成によるものではなく、腸の脂肪の総量が関わっていると考えられる。

### 3. 考察

#### 3.1 転写因子 CREB と温度順化の関係

温度順化異常を示す *crh-1* 変異体を使用して CREB の機能細胞の同定を進めた結果、ASJ 感覚ニューロンと RMG 介在ニューロンが温度順化の促進に関与することが明らかになった。CREB を欠損した変異体の ASJ 感覚ニューロンの温度応答性は野生株に比べて低下していることが分かった (図 4、6-7) (Motomura *et al.*, 2022)。

ASJ 感覚ニューロンは光受容ニューロンとしても知られており、ASJ 感覚ニューロン内の温度情報伝達経路は光情報伝達経路と同様の分子経路を活性化している (Ohta *et al.*, 2014)。 *C. elegans* は土壌中に生息しており、土壌中では光情報と温度情報を同時に処理する状況は少ないと考えられるが、光受容ニューロンが温度受容も行い、 *C. elegans* の温度順化に関与している理由を考察する。光情報と温度情報が結びつけられる理由として、日照時間の変化が挙げられる。環境中では日照時間という光情報と温度情報が密接に結びついている。実際にメダカやチャコウラナメクジでは光情報と温度情報に関連があると報告されている。メダカは水温の変化に応じて光感受性や色覚が異なることが明らかになっている。夏を模した長日・温暖な環境で飼育されたメダカは光に対して負の走性を持ち、婚姻色のバーチャルメダカに誘引されるが、冬を模した短日・低温で飼育したメダカはこれらに反応を示さない (Shimmura *et al.*, 2017)。チャコウラナメクジでは短日条件で飼育した個体の方が長日条件より強い低温耐性を持つ (Udaka *et al.*, 2008)。現在のところ *C. elegans* において光情報が低温耐性に影響を与えるかは分かっていないが、光受容機構と温度受容機構が互いに影響し合うメカニズムが種をこえて保存された結果、光受容

ニューロンである ASJ 感覚ニューロンが温度順化機構の制御にも使用されているのかもしれない。

次に転写因子 CREB を欠損した個体が温度順化に異常を示す理由を考察する。現在明らかになっている野生株と *crh-1* 変異体の違いは、15°C 飼育時の ASJ 感覚ニューロンのシナプスの体積の減少と温度刺激時の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の減少である (図 6-7、8) (Motomura *et al.*, 2022)。15°C 飼育の時点でシナプスの形成が野生株と異なるうえ、温度刺激に対しての応答性が低下することにより 15°C から 25°C に移動させた際に下流に伝達される情報に差が生まれる。CREB 変異体の RMG 介在ニューロンのカルシウムイメージングは実施していないが、RMG 介在ニューロンでも ASJ 感覚ニューロンと同様にシナプスの形成と温度刺激時の興奮性の低下が起こっているとすると、温度情報の入力と統合が異常になり腸に送られるシグナルが本来必要なタイミングで送られなくなる、もしくは充分量のシグナル物質が分泌されず、腸内の代謝変化が温度環境と適合しないことによって低温耐性に異常がでるのではないかと考えられる。

### 3.2 温度順化を促進する全身周回性の神経回路

RMG 介在ニューロンと ASJ 感覚ニューロンの間に存在する複数あるニューロンのうち、PVQ 介在ニューロンのシナプス伝達を人工的に過活性化した系統で温度順化異常が見られた。カルシウムイメージングの結果から、ASJ、PVQ、RMG は同じ温度域で神経活動が見られることが明らかになった。シナプス接続が低下した *snb-1* 変異体、ASJ 感覚ニューロンの温度感受性が低下している *tax-4* 変異体を使用したカルシウムイメージングにより、温度刺激下の PVQ 介在ニューロンは ASJ 感覚ニューロンからの温度情報伝達に依存して活性化していることが分かった (図 10、12-14) (Motomura *et al.*, 2022)。

頭部に細胞体を持つ ASJ 感覚ニューロンで受容され、同じく頭部に細胞体を持つ RMG 介在ニューロンに伝達される温度情報が一度、尾部を経由する理由を考察する。*C. elegans* は頭部にアンフィド (Amphid) と呼ばれる感覚神経が密集する部位を持つが、尾部にもファスミド (Phasmid) と呼ばれる神経細胞の密集部位を持つ。ファスミドはアンフィドに比べ小さいものの、ファスミドを構成するニューロンのうち PHA 感覚ニューロンと PHB 感覚ニューロンは化学受容、PLM 感覚ニューロンはメカノ受容、PQR 感覚ニューロンは O<sub>2</sub> 受容、PHC 感覚ニューロンは回避行動を誘導する有害な高温刺激の受容に関わることが報告されている (Cheung *et al.*, 2005; Hilliard *et al.*, 2002; Hobert, 2016; Liu *et al.*, 2012; Pirri and Alkema, 2012)。*C. elegans* は死の原因となり得る環境情報をこれらの感覚ニューロンで受容し、体の後方に危険が迫った場合に忌避行動を行う。頭部で受容した情報が尾部ニューロンの神経活動にどのような影響を与えるのか不明だが、温度情報が一度 PVQ 介在ニューロンを経由するのは、頭部で受容した環境情報と尾部で受容した環境情報を統合することで、少ない神経細胞で周囲の環境に適切に対応するためである可能性が考えられる。

PVQ 介在ニューロンから RMG 介在ニューロンへの情報伝達はグルタミン酸が媒介することが、PVQ の小胞型グルタミン酸輸送体 EAT-4 をノックダウンした系統と RMG のグルタミン酸受容体 GLR-4 と GLR-5 をノックダウンした系統で温度順化異常が見られたことから明らかにされているが (図 18、20) (Motomura *et al.*, 2022)、おそらくグルタミン酸の関与は PVQ 介在ニューロンから RMG 介在ニューロンの間だけには止まらないと予測される。様々なグルタミン酸受容体の変異体を用いた低温耐性テストの結果から、グルタミン酸受容体の種類によって低温刺激後の生存率が変化することが分かっている (図 19)



(Motomura *et al.*, 2022)。AMPA 型グルタミン酸受容体 GLR-4 と GLR-5 の変異体よりも NMDA 型グルタミン酸受容体 NMR-1 と NMR-2 の変異体の方がより高い生存率の上昇を示した。これは、発現細胞の違いによる影響もあるだろうが、AMPA 型グルタミン酸受容体は陽イオンチャネルとして機能するが  $\text{Ca}^{2+}$  に対しては非透過性であるのに対し、NMDA 型グルタミン酸受容体は  $\text{Ca}^{2+}$  の透過性を持つことが原因であると考えている。一つの AMPA 型グルタミン酸受容体が欠損しても他の経路により脱分極が進めば NMDA 型グルタミン酸受容体を駆動できるが、NMDA 型グルタミン酸受容体を欠損した場合  $\text{Ca}^{2+}$  の急速な増加が十分にできなくなるため、より強い温度順化異常が示されたと考えられる。ASJ 感覚ニューロン、RMG 介在ニューロンで NMR-1 と NMR-2 の発現は報告されておらず、PVQ 介在ニューロンでは NMR-2 が僅かに発現している (Hammarlund *et al.*, 2018; Taylor *et al.*, 2021)。このことから、NMDA 型グルタミン酸受容体 NMR-1 と NMR-2 は ASJ、PVQ、RMG 以外のニューロンで機能し、温度順化に関わっている可能性が高い。

イオンチャネル型グルタミン酸受容体の変異体では生存率の上昇が見られた一方、代謝型グルタミン酸受容体 MGL-1 は野生株よりも生存率が低下し、*mgl-2*; *mgl-1* の二重変異体でも野生株より僅かに低下していた。MGL-1 は神経環や咽頭神経系で発現して脂質貯蔵の正の制御に関与することが報告されており (Dillon *et al.*, 2015; Jeong and Paik, 2017)、野生株より脂質の貯蔵が低下することによりこの様な表現型になった可能性がある。

クロライドチャネルの活性に関わる AVR-14 変異体では野生株と同様の生存率を示したが、AVR-14、AVR-15 と GLC-1 の三重変異体と AVR-14 と GLC-1 の二重変異体では生存率が上昇する温度順化異常を示した。グルタミン酸作動性クロライドチャネル GLC-1 は体壁筋や咽頭筋、頭部ニューロンで発現する (Ghosh

*et al.*, 2012)。AVR-14 は神経系で発現する (Dent *et al.*, 2000)。クロライドチャンネルは細胞内に Cl<sup>-</sup>を取り込むことから細胞の発火の制御に重要であると考えられる。クロライドチャンネルの変異体が、陽イオンチャンネルである AMPA 型グルタミン酸受容体や NMDA 型グルタミン酸受容体の変異体と似た表現型を示す理由はまだ分かっていない。

### 3.3 神経ペプチドを介した腸の脂肪分解経路と低温耐性の関係

温度順化テストの結果、脂肪の代謝に関わる神経ペプチド FLP-7 と神経ペプチド受容体 NPR-22 が温度順化に関わっており、FLP-7 はグルタミン酸が機能する RMG 介在ニューロンと同じ経路で機能していることが分かった。FLP-7 と NPR-22 の下流で機能する脂肪分解酵素 ATGL-1 は 15°C 飼育時に比べ 25°C 飼育時の方が多く発現しており、野生株の腸の脂肪量は 15°C 飼育時に比べ 25°C 飼育時の方が少なかった。FLP-7 変異体と NPR-22 変異体では飼育温度依存的な腸の脂肪量の変化が見られなくなったことから、ATGL-1 を制御する FLP-7 と NPR-22 の経路は 25°C 飼育で機能していると考えられる (図 23、25、26) (Motomura *et al.*, 2022)。

FLP-7 と NPR-22 は摂食と代謝に関わるシグナルであるセロトニンシグナルに応答することが報告されているが (Palamiuc *et al.*, 2017)、セロトニンの合成を行うトリプトファン水酸化酵素 TPH-1 の変異体 (*tph-1* 変異体) とセロトニン作動性クロライドチャンネル MOD-1 の変異体 (*mod-1* 変異体) は温度順化に異常を示さなかった (図 11) (Motomura *et al.*, 2022)。このことから、温度順化に関わる神経ペプチド FLP-7 と神経ペプチド受容体 NPR-22 はセロトニンシグナルで調節される経路とは別に、温度情報によってのみ駆動している可能性がある。摂食シグナルで駆動される経路が温度シグナルでも使用されるの

は、*C. elegans* が温度と餌の情報を結びつけていることに由来するのかもしれない。*C. elegans* は餌があった温度を記憶し、その温度に向かう温度走性を示すことが報告されている (Aoki and Mori, 2015; Mori *et al.*, 2007)。餌が豊富に望める環境を温度情報を元に検知しているのであれば、温度シグナルと摂食シグナルを統合することにより、脂肪を分解する量の調節を厳密に行えるのでないかと考えられる。*C. elegans* の成長速度は環境温度に依存する。15°C で飼育された *C. elegans* は卵から成虫になるまでに約 7 日を要するが、20°C で飼育された *C. elegans* は約 3 日で成虫になる。この約 2 倍の成長スピードを実現するために、高温ではエネルギーを使用する必要があり、貯蔵するよりも積極的な脂肪の分解が行われている可能性がある。よって温度シグナルと摂食シグナルの下流に共通した分子経路を持つことで、餌が豊富にあり、且つ生育に適した温度環境で脂肪の分解経路を活発に動かせるように調節している可能性が考えられる。

### 3.4 その他の考察

生物は環境状態の変化に生存できるように対応するにも関わらず、本研究では野生株は新たな環境に適応することにより低温で死滅し、変異体はむしろ生存する結果となった。*C. elegans* が自ら低温耐性を捨ててしまう理由として、子孫にエネルギーを投資することにより、個体の生存ではなく種として生存を図る戦略を取っている可能性がある。*C. elegans* は 15°C よりも 20°C や 25°C の温度環境で飼育された方が速く成長できることから、もし周辺環境が 15°C 付近から 20°C 以上に变化した場合、新しい温度にすぐに慣れることができれば、慣れない系統よりも早く成長・繁殖できると考えている。温度順化経路が遅れる系統は自然環境中で成長・繁殖に適した環境に偶然辿りつけたとしてもすぐに

対応できず、その間に温度変化に直ぐに対応できる個体が繁殖してしまい、食糧などを確保できなくなるため、低温に強い状態を保持していたとしても自然環境では淘汰されてしまうのではないかと考えられる。

*C. elegans* が温度順化経路を持つもう一つの理由として、高温耐性の獲得が挙げられる。周辺の温度が 15°C から 20°C 以上に上昇した場合、環境温度が急激に 2°C まで低下する可能性より、そのまま上昇し続け、*C. elegans* の繁殖・生存に影響を及ぼす 25°C 以上の高温環境となる可能性の方が高いと予想される。20°C で飼育した *C. elegans* を 25°C で 18 時間飼育すると熱ストレス (35°C) への耐性を向上させると報告されていることから (Treinin *et al.*, 2003)、25°C への慣れが低温耐性の欠失を起こす反面、高温耐性の獲得に繋がり、熱ストレスによる死滅を回避できたと考えられる。

温度情報は生物の生殖系にも影響している。温度環境と生殖系の関係について、これまでに低温刺激後に腸の脂肪が生殖細胞に移動しない変異体では低温刺激後の個体の死を防げることが報告されている (Gulyas and Powell, 2022)。この論文では 2°C に 4 時間暴露された *C. elegans* 由来の卵は、低温刺激を受けなかった親の卵に比べ低温刺激 (2°C、24 時間) 後の孵化率が高くなることも指摘されている (Gulyas and Powell, 2022)。温度環境の生殖系への影響は低温環境のみでなく高温環境でも起こっている可能性があり、25°C で飼育された *C. elegans* 由来の卵は、15°C と 20°C で飼育された *C. elegans* 由来の卵に比べ高温刺激 (29°C、24 時間) 後の孵化率が高くなる (Gouvea *et al.*, 2015)。これらの報告を踏まえると、*C. elegans* は環境変化に合わせて子孫にエネルギーを投資することが適応機構の一つとして存在している可能性がある。また *C. elegans* の腸は卵の卵黄を生成し、生殖細胞を育てる役割を持つ

ことから(Perez and Lehner, 2019)、この適応機構に腸に蓄積された脂肪が深く関わっている可能性がある。

今回示した温度順化を制御する脳腸関連モデルが他の動物にも共通している可能性がある。哺乳類において、脳で処理された温度情報が腸に影響を与えているかは分かっていないが、脳と腸が互いに影響しあっている事例は報告されている。例えば、慢性的な腹痛や腹部の不快感等を特徴とする機能的疾患である過敏性腸症候群に、神経炎症による視床下部・下垂体・副腎皮質系

(hypothalamic-pituitary-adrenal axis) とセロトニン作動性機能の調節不全が一部関与している可能性が報告されている(Ng *et al.*, 2018)。他にもマウスにおいて腸内細菌叢の細菌細胞壁の断片であるムロペプチドが視床下部ニューロンに感知されることで、摂食行動、営巣行動、体温調節に影響することが示されている(Gabanyi *et al.*, 2022)。よって、哺乳類においても温度が神経伝達物質の分泌の変化に関与し、結果的に腸に影響を与える経路も見つかるかもしれない。

### 3.5 C. elegans の低温死の解析における今後の展望

低温死の原因の解析を進めるためには、まずどのタイミングで個体が死亡しているかを確認する必要がある。現在のところ、低温下(2℃)で死亡しているのか、それとも低温刺激後生育温度に戻された後に死亡するのかは分かってない。そこで、線虫 *C. elegans* の青色自家蛍光に着目した。

生体内には特定の波長を照射すると蛍光を発する物質が複数存在しており、線虫 *C. elegans* は紫外域と青色域の2つの自家蛍光を示す。290 nm の励起光(Ex290)を *C. elegans* に照射すると 330 nm の自家蛍光(Em330)を発し、340 nm の励起光(Ex340)を照射すると 430 nm の自家蛍光(Em430)を発する。Ex290/

Em330 の自家蛍光については、この蛍光波長と似た蛍光波長を持つ芳香族アミノ酸のトリプトファンの蛍光性に起因すると予想されている (Gerstbrein *et al.*, 2005)。もう一つの蛍光波長である励起波長 Ex340/Em430 の自家蛍光については終末糖化産物 (Advanced Glycation End-products : AGEs) であると報告されている (Gerstbrein *et al.*, 2005; Komura *et al.*, 2021)。この *C. elegans* の青色自家蛍光は加齢とともに増加し、これは、青色自家蛍光を発する糖化された卵黄タンパク質ビテロゲニン (vitellogenin) が老化の過程で増加するためではないかと考えられている (Komura *et al.*, 2021)。老化のバイオマーカーとして過酸化脂質や過酸化タンパク質により形成される色素のリポフスチンが知られているが、リポフスチンは紫外線域の励起光下で 540-640 nm の蛍光を発するため、加齢による青色蛍光の増加はリポフスチンの蓄積によるものではないと考えられている (Coburn *et al.*, 2013; Komura *et al.*, 2021)。

線虫 *C. elegans* の青色自家蛍光はバイオマーカーとしての有用性が報告されている。酸化ストレスの原因となる AGEs のバイオマーカーとしての利用可能性が示唆されているほか (Gerstbrein *et al.*, 2005; Komura *et al.*, 2021)、2013 年に Coburn らが、腸の青色自家蛍光が個体の死亡を示すバイオマーカーとして利用できることを報告した。具体的には、*C. elegans* の青色自家蛍光は、若い成虫では主に腸の顆粒 (リソソーム関連オルガネラ) で観察できるが (Coburn *et al.*, 2013; Gerstbrein *et al.*, 2005)、*C. elegans* が致死の刺激を受けると腸の顆粒が壊れ、腸全体にアントラニル酸グルコシルエステル (Anthranilic Acid Glucosyl Esters) の青色の蛍光が増加する。老衰死する *C. elegans* において、青色自家蛍光の増加は死亡する 2 時間前から起こりはじめ、死亡前に比べて 400%増加したのち、その後 6 時間のうちに減少していく

(Coburn *et al.*, 2013)。この青色自家蛍光の増加は老衰死においてだけでなく、頭部付近への熱ストレスによる殺傷や、凍結融解、低 pH による殺傷でも起こったことから、腸の青色自家蛍光が *C. elegans* の死亡マーカーとして使用できると考えられている (Coburn *et al.*, 2013)。

*C. elegans* の体内で死に向かう生理的機構が働き死に向かっているかどうかを確認する指標として、腸の周期的な  $\text{Ca}^{2+}$  波に着目している。通常、健康な野生株の *C. elegans* では尾部末端側の腸の細胞の  $\text{Ca}^{2+}$  スパイクに誘発される  $\text{Ca}^{2+}$  波が起こっている (Peters *et al.*, 2007)。しかし、死亡する前には腸の前方から後方に伝播する  $\text{Ca}^{2+}$  波が流れ、ネクローシス経路を活性化させることで *C. elegans* の死に繋がると報告されている (Coburn *et al.*, 2013)。低温刺激後の個体の自家蛍光と  $\text{Ca}^{2+}$  をイメージングすることで、どの時点で腸の破壊が進んでいるのかを確認することが可能になると考えており、低温に置かれた際に死亡するタイミングを同定し、その直前から *C. elegans* 個体の死が進んでいく過程を詳細に観察する解析が可能であると考えられる。これにより個体の死を進める原因を特定し、最終的には動物個体の低温死を防ぐ分子生理機構の発見につながることを期待している。

#### 4. 結語

本研究から、温度変化を感知した線虫 *C. elegans* は全身を周回する神経回路を駆動し、最終的に腸の脂肪代謝経路を制御するという温度応答の「神経回路・腸連関」の生体システムが明らかになった (図 29) (Motomura *et al.*, 2022)。これまで低温耐性や温度順化に関わる温度受容ニューロンとその分子機構の解析は進められてきたが、温度受容ニューロンの下流の神経回路や低温耐性の獲得・喪失の原因となる機構の解析は進められていなかった。今回の解析から、気温の変化を感じた神経系が腸内に蓄えられた脂肪を増減させていることがわかり、神経系と臓器の代謝経路を結びつけることができた。周囲の温度が 15°C から 25°C に変化すると、まず頭部に位置する ASJ 感覚ニューロンが温度情報として受容し、尾部に細胞体を持つ PVQ 介在ニューロンに情報が伝達される。次に PVQ 介在ニューロンはグルタミン酸を介して頭部に細胞体を持つ RMG 介在ニューロンに情報を送る。RMG 介在ニューロンは、腸の代謝経路の制御に関わる神経ペプチドである FLP-7 の分泌を促す。FLP-7 は腸にある神経ペプチド受容体 NPR-22 で受容され、腸の脂肪分解酵素 (トリグリセリドリパーゼ) である ATGL-1 を活性化させる。これにより 25°C で飼育されている間に脂肪の分解が進み、低温耐性の喪失につながる可能性が得られた (図 29) (Motomura *et al.*, 2022)。今後この研究を発展させ、神経系が下流の臓器の制御を行う分子メカニズムをより詳細に解析することで、人工的な神経操作により個体全体の低温に対する表現型の制御が可能になるのではないかと考えている。脂肪と低温死の関係を探ることで低温による死を防ぐことができるような生体システムの発見も期待できる。*C. elegans* は分子レベルから個体レベルまでの生命現象を包括的に理解できる実験系であり、ヒトと共通の遺伝子を多く持っていることから、本研究で見つかった温度応答の神経回路・腸連関



システムに関して、他の動物においても解析が進展することで、今後、動物の温度応答メカニズムに新しい視点が加わる可能性が考えられる。

## 5. 材料・方法

*C. elegans* の飼育法、培地や Buffer の組成等は THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS に従った (Wood and The Community of *C. elegans* Researchers, 1988)。

試薬	購入元	製品番号
Oil red O	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN:1320-06-5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN: 10039-32-4
KCl	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN: 7447-40-7
NaCl	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN: 7647-14-5
Na <sub>2</sub> EGTA	NACALAI TESQUE, INC.	Cat#37346-05
spermidine-HCl	NACALAI TESQUE, INC.	CAS RN; 334-50-9
spermine	NACALAI TESQUE, INC.	CAS RN; 71-44-3
Na-PIPES	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN: 1100037-69-2
$\beta$ -mercaptoethanol	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN: 60-24-2
paraformaldehyde	TAAB Laboratories	Cat#P001/1
TritonX	ICN Pharmaceuticals, Inc.	Cat#807426
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN: 7778-77-0
isopropanol	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	CAS RN: 67-63-0

使用した系統	提供元・出典元	系統名
N2 (Bristol)	CGC	N2
<i>crh-1(tz2)</i>	CGC	YT17
<i>snb-1(md247)</i>	CGC	NM467
<i>eat-4(ky5) bc10</i>	Ohnishi <i>et al.</i> , EMBO J, 2011	MT6308
<i>tax-4 (p678)</i>	Komatsu <i>et al.</i> , Neuron, 1996	PR678
<i>ocr-2 (ak47) osm-9 (ky10); ocr-1 (ak46)</i>	CGC	FG125
<i>deg-1 (u38)</i>	CGC	TU38
<i>glr-4(tm3239)</i>	NBRP	tm3239
<i>glr-5(tm3506)</i>	NBRP	tm3506
<i>nmr-1(ak4)</i>	CGC	VM487
<i>nmr-2(ok3324)</i>	CGC	VC2623
<i>mgl-1(tm1811)</i>	NBRP	tm1811
<i>mgl-2(tm355); mgl-1(tm1811)</i>	CGC	DA2250
<i>avr-14(ad1305); avr-15(vu227) glc-1(pk54)</i>	CGC	DA1316
<i>avr-14(ad1302); glc-1(pk54)</i>	CGC	DA1384
<i>unc-7(e5)</i>	CGC	CB5
<i>inx-2(ok376)</i>	CGC	CX13325
<i>inx-7(ok2319)</i>	CGC	RB1792
<i>inx-9(ok1502)</i>	CGC	CX12726
<i>inx-19(ky634)</i>	CGC	CX6161
<i>npr-22(tm8953)</i>	NBRP	tm8953
<i>npr-22(ok1598)</i>	CGC	RB1405
<i>flp-7(ok2625)</i>	CGC	RB1990
<i>npr-1(ad609)</i>	CGC	<u>DA609</u>
<i>tph-1(mg280)</i>	CGC	MT15434
<i>mod-1(ok103)</i>	CGC	MT9668
<i>npr-22(ok1598); flp-7(ok2625)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR241

<i>crh-1(tz2); flp-7(ok2625)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR242
<i>hjls67[atgl-1p::atgl-1::GFP+mec-7::RFP]</i>	CGC	VS20
<i>crh-1(tz2); otaEx40[ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP] #10-6 (+injection marker)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR202
<i>crh-1(tz2); otaEx39[unc-14p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP] #10-3</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR203
<i>crh-1(tz2); otaEx38[trx-1p::crh-1(wt), ges-1::NLS::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR204
<i>crh-1(tz2); otaEx44[osm-6p::ncs-1p::che-10p::glr-1p::unc-8p::unc-86::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP] #5-12</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR205
<i>crh-1(tz2); otaEx54[osm-6p::glr-1p::unc-8p::unc-86p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR206
<i>crh-1(tz2); otaEx46[interneuron(glr-1p, unc-8p, unc-86p)::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP] #1-2</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR207
<i>crh-1(tz2); otaEx55[interneuron(glr-1p, unc-8p, unc-86p)::trx-1p::ncs-1p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR208
<i>crh-1(tz2); otaEx48[interneuron(glr-1p, unc-8p, unc-86p)::trx-1p::ceh-10p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR209
<i>crh-1(tz2); otaEx47[interneuron(glr-1p, unc-8p, unc-86p)::trx-1p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR210
<i>crh-1(tz2); otaEx49[glr-1p::trx-1p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR211

<i>crh-1(tz2);otaEx60[trx-1p::unc-86p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR212
<i>crh-1(tz2);otaEx50[trx-1p::ceh-10p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR213
<i>crh-1(tz2);otaEx61[trx-1p::AIYp::sra-6p::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR214
<i>crh-1(tz2);otaEx63[ncs-1p::nCre, trx-1p, flp-21p::LoxP::crh-1cDNA, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR215
<i>crh-1(tz2);otaEx65[ncs-1p::nCre::UTR, flp-21p::LoxP::crh-1cDNA::SL2::GFP, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR216
<i>WT; Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::GFP]</i>	(Ohta, <i>et al.</i> , Nat Commun, 2014)	KHR243
<i>snb-1(md247); Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::tagRFP]</i>	(Ohta, <i>et al.</i> , Nat Commun, 2014)	KHR244
<i>crh-1(tz2);Ex[trx-1p::yc3.60, ges-1p::tagRFP, rol-6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR217
<i>crh-1(tz2);Ex[trx-1p::yc3.60, trx-1p::crh-1cDNA, ges-1p::tagRFP, rol-6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR218
<i>N2; Ex[trx-1p::dsRedm, trx-1p::snb-1::Venus, rol-6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR260
<i>crh-1(tz2); Ex[trx-1p::dsRedm, trx-1p::snb-1::Venus, rol-6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR262
<i>WT;Ex[ges-1p::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR219

<i>WT;Ex[sra-6p::ttx-4(gf), ges-1p::GFP, AIYp::GFP] (PVQ etc.)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR220
<i>WT;Ex[trx-1p::ttx-4(gf), ges-1p::GFP, AIYp::GFP] (ASJ)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR221
<i>WT;Ex[sra-7p::ttx-4(gf), ges-1p::GFP, AIYp::GFP] (ASK)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR222
<i>WT;Ex[tph-1p::ttx-4(gf), ges-1p::GFP, AIYp::GFP] (HSN etc.)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR223
<i>N2;ExFJI07[trx-1p::yc3.60, sra-6p::yc3.60, rol-6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR224
<i>N2;ExMOT02[ncs-1p::nCre, flp21p::LoxP::yc3.60, rol-6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR225
<i>snb-1;ExFJI07[trx-1p::yc3.60, sra-6p::yc3.60, rol-6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR226
<i>N2;ExMOT33[npr-11p::ycx2.60, pRF4]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR227
<i>tax-4;ExMOT33[npr-11p::ycx2.60, pRF4]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR228
<i>tax-4;ExMOT34[npr-11p::ycx2.60, trx-1p::tax-4cDNA, pRF4]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR229
<i>N2;ExMOT20[sra-6p::ycx2.60, pRF4]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR230
<i>deg-1; ExMOT20[sra-6p::ycx2.60, pRF4]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR231

<i>deg-1; ExMOT27[sra-6p::ycx2.60, gcy-21p::deg-1cDNA, pRF4]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR232
<i>ocr-2(ak47)osm-9(ky10);ocr-1(ak46);ExMOT05[sra-6p::yc3.60, trx-1p::yc3.60, rol6(gf)]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR233
<i>eat-4(ky5); otaEx80[ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR234
<i>eat-4(ky5); otaEx82[sra-6p::eat-4, ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP] (PVQ, ASH)</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR235
<i>WT; otaEx142[PVQp::eat-4(RNAi), ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR236
<i>WT; otaEx118[RMGp::glr-4(RNAi), RMGp::glr-5(RNAi), ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR237
<i>N2; ExMOT50[RMGp::glr-4(RNAi), RMGp::glr-5(RNAi), RMGp::yc3.60]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR238
<i>WT; otaEx128[ASKp&amp;PVQp::unc-7(RNAi), ASKp&amp;PVQp::unc-9(RNAi), ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR239
<i>f1p-7(ok2625); Ex118[RMGp::glr-4&amp;glr-5(RNAi), ges-1p::NLS::GFP, AIYp::GFP]</i>	(Motomura, <i>et al.</i> , PNAS, 2022)	KHR240

### 顕微鏡

透過式実体顕微鏡 (Nikon SMZ800)

透過式実体蛍光顕微鏡 (OLYMPUS: SZX12)

### 使用したソフトウェア

MetaMorph ver. 7.8 (Molecular Devices)

MetaVue software ver. 7.10 (Molecular Devices)

MetaMorph ver. 7.10 (Molecular Devices)

### 大腸菌

OP-50 株:C. elegans の餌として NGM プレートに塗布した。

### 6cm(3.5cm) Nematode Growth Medium (NGM) Plate (1000ml)

NaCl ..... 3g  
Agar (伊那寒天) ..... 20g  
Peptone (Bacto) ..... 2.5g  
H<sub>2</sub>O ..... 975ml

以上をオートクレーブした後、以下を加えた。

Cholesterol (5mg/ml in EtOH)            1ml  
1M CaCl<sub>2</sub>                                    1ml  
1M MgSO<sub>4</sub>                                    1ml  
1M Potassium Phosphate (pH6.0)        25ml

これを直径 6cm のシャーレには 14ml ずつ、直径 3.5cm のシャーレには 6ml ずつ分注し固めた。

### Freezing Solution(2000ml)

NaCl ..... 10.85g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 49.8g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 46g  
glycerol ..... 300g  
1M NaOH ..... 5.6ml  
dH<sub>2</sub>O ..... 2000ml mess up

以上をオートクレーブした後、以下の溶液を加えた。



1M MgSO<sub>4</sub> ····· 1.3ml

M9 buffer(1000ml)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ····· 3g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ····· 6g

NaCl ····· 5g

H<sub>2</sub>O ····· 1000ml

以上をオートクレーブした後、以下の溶液を加えた。

1M MgSO<sub>4</sub> ····· 1ml

カルシウムイメージング用 2%アガロースパッド(5ml)

M9 buffer ····· 5ml

agarose ····· 0.1g

以上を溶かし、30ml ずつ 24×24 カバーガラスに滴下し、上から 24×24 カバーガラスをかぶせた。

マイクロインジェクション用 2%アガロースパッド(5ml)

M9 buffer ····· 5ml

agarose ····· 0.1g

以上を湯煎で溶かし、パスツールピペットでカバーガラスに一滴のせ、その上から別のカバーガラスをかぶせた。カバーガラスを一枚外し、60℃で1時間乾熱滅菌した。

電気泳動用アガロースゲル(1%)

1×TAE ····· 100ml

agarose ..... 1g

以上を電子レンジで溶かした後、エチジウムブロマイドを  $10\mu\ell$  加えて、ゲル用の型に流し、コームを挿してゲル化したものを使用した。

#### LB 液体培地 (200 ml)

dH<sub>2</sub>O ..... 200ml

LB Broth Lennox (Becton Dickinson, USA)

..... 4 g

以上を混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。

#### アンピシリン入り LB プレート (寒天培地)

dH<sub>2</sub>O ..... 500ml

LB Broth Lennox (Becton Dickinson, USA)

..... 10 g

Agar (伊那寒天) ..... 10g

以上を混合しオートクレーブで加熱滅菌した後、攪拌しながら約 50°C に冷まし、以下の溶液を加えた。

Ampicillin (100 mg/ml) ..... 1000  $\mu\ell$

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。

#### マイクロインジェクションによるトランスジェニック系統の作製

*C. elegans* の生殖巣への遺伝子導入とトランスジェニック系統の作製は、過去の論文をもとに行った (Mello *et al.*, 1991)。まず乾燥させたアガロースゲルパッドの上にミネラルオイルを滴下し、アガロースゲルパッドに *C. elegans*

が接着する様に置いた。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、目的の染色体外遺伝子 (5~100 ng/ $\mu$ l) とマーカー遺伝子を導入した。マーカー遺伝子は腸で GFP が発現する pKDK66 *ges-1p::nls::gfp* (50 ng/ $\mu$ l) と AIY 介在ニューロンで GFP が発現する pAK62 *AIYp::gfp* (30 ng/ $\mu$ l)、または回転する動きが観察される pRF4 *rol-6(gf)* (20-30 ng/ $\mu$ l) を使用した。生殖巣に DNA 溶液を注入した後、M9 バッファーを滴下して個体を浮かせ、ピッカーを用いて新しい NGM プレートに回収した (2 worms/plate)。遺伝子を導入した *C. elegans* を 20°C で飼育した。F<sub>1</sub> 世代のうち、マーカー遺伝子により遺伝子導入された個体を選別し、1 個体ずつ新しい NGM プレートに移した。自家受精により次世代を産ませ、F<sub>2</sub> 世代でもマーカー遺伝子の伝播が確認できた個体をトランスジェニック系統とした。

### プラスミド作製

*crh-1* cDNA は pNYU15 *sra-6p::crh-1* cDNA として入手し、*eat-4* cDNA は森博士のご厚意によりご提供頂いた。この研究では以下の神経細胞プロモーターを用いた：*unc-14p* (1410 bp), *trx-1p* (1028 bp), *osm-6p* (2057 bp), *ncs-1p* (3125 bp), *ceh-10p* (3457 bp), *glr-1p* (5323 bp), *unc-8p* (4218 bp), *unc-86p* (3604 bp), *sra-7p* (4164 bp), and *tph-1p* (3155 bp)。これらのプロモーターは、各遺伝子のそれぞれの開始コドンの上流の DNA 配列を含んでいる。AIY プロモーター (844 bp) は以前以前の報告と同じ領域を使用した。RMG 介在ニューロンの *crh-1* cDNA と *yc3.60* の発現には Cre-LoxP システムを用いた；pEM3 *ncs-1p::nCre*, および pEM1 *flp-21p::LoxP::STOP::LoxP::npr-1::SL2::GFP* プラスミドは Bargmann 博士からご提供頂いた。pEM1 プラスミド

中の *ncs-1* cDNA を *crh-1* cDNA または *yc3.60* 遺伝子で置換し、pOTA42 *flp-2lp::LoxP::STOP::LoxP::crh-1cDNA::SL2::GFP*、および pOTA125 *flp-2lp::LoxP::yc3.60* を作製した。その後、pEM3 と pOTA42 を共に 20 ng/ $\mu$ l で *C. elegans* の生殖巣にマイクロインジェクションを行った。

RMG 介在ニューロンで発現したものを除くレスキュープラスミドは、マーカー pKDK66、*ges-1p::NLS::GFP*、pAK62、*AIYp::GFP* を用いて、8ng/ $\mu$ l の濃度で注入した。PVQ のカルシウムイメージングは特定のプロモーター (*sra-6* または *npr-11* プロモーター) とイエローカメレオン (YC) 遺伝子 *yc3.60* (Nagai *et al.*, 2004) または *ycx2.60* (Madisen *et al.*, 2015) と結合させて、pMOT19 *sra-6p::ycx2.60* および pMOT29 *npr-11p::ycx2.60* を作製した。過去の論文に従い、ASJ のカルシウムイメージングには *trx-1* プロモーターを用いた (Ohta *et al.*, 2014)。

### DNA 断片のライゲーション

使用するベクターDNA とインサート DNA を同じ制限酵素で処理した後、電気泳動によりライゲーションに使用する線状化ベクターとインサートをゲルから精製した。線状化ベクター:インサート=1:3 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 1/2 の量の Ligation high Ver. 2 (東洋紡、日本) を加えた。混合溶液を 15°C インキュベーターで 30 分間静置し、線状化ベクターとインサートを結合させた。

### In-Fusion

線状化ベクターDNA は制限酵素処理もしくは PCR によって取得した。インサート DNA は、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。線状化ベクター:インサート=50 ng : 100-150 ng の割合で混ぜ合わせ、5 × In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara Bio, Japan) 2  $\mu$ l を加えた。DW で全量が 10  $\mu$ l になるようにメスアップし、50°C で 15 分間静置して線状化ベクターとインサートを結合させた。

#### エレクトロポレーションによる大腸菌の形質転換

形質転換には大腸菌コンピテントセル DH10  $\beta$  (エレクトロポレーション用) を用いた。-80°C に保管してある DH10  $\beta$  を氷上で溶かした後、DH10  $\beta$  溶液 20  $\mu$ l に対しプラスミド DNA もしくはライゲーション後の溶液を 2  $\mu$ l を混ぜた。これを氷上で冷やしておいたキュベットに泡を立たせずに入れた。キュベットについた水分を拭き取り、MicroPulser (Bio-Rad, USA) のホルダーにキュベットを挿入し、「Pulse」と書かれたボタンを押した。200  $\mu$ l の LB 液体培地をキュベットにいれ、コンピテントセルを回収した。50  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ 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大腸菌の形質転換

形質転換には大腸菌コンピテントセル DH10  $\beta$  (ヒートショック用) を用いた。-80°C に保管してある DH10  $\beta$  を氷上で溶かした後、コンピテントセル 50  $\mu$ l に目的のプラスミド DNA の溶液を混ぜた。この溶液に 42°C で 45 秒間のヒートショックを与え、氷上に 2 分間静置した。その後、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。

#### PCR 法

PCR 試薬および耐熱性 DNA ポリメラーゼは KOD -Plus- Neo (東洋紡、日本) を用いた。10×PCR Buffer for KOD -Plus- Neo 5  $\mu$ l、2mM dNTPs 溶液 5  $\mu$ l、25mM MgSO<sub>4</sub> 3  $\mu$ l、10  $\mu$ M フォワードプライマー 1  $\mu$ l、10  $\mu$ M リバープライマー 1  $\mu$ l、Plasmid DNA  $\sim$ 50ng/50  $\mu$ l、KOD -Plus- Neo 1  $\mu$ l をよく混合した後、滅菌水で全量 50  $\mu$ l になるように合わせた。温度プログラムは 94°C 2 分、98°C 10 秒、使用するプライマーの T<sub>m</sub> 値に合わせた温度で 30 秒、68°C 1 kb/30 秒を 1 サイクルとし、これを 35 サイクル行った。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。

### 温度順化テスト

温度順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.*, 2014b)。直径 3.5cm のプラスチックプレートに 2%(w/v) の寒天を入れた NGM プレートに餌となる大腸菌 OP50 を塗布した。大腸菌の生えた NGM プレートの寒天上に 1 個体以上の成虫 (P<sub>0</sub>) を置き、15~20 時間の各解析に使用する温度で飼育し、その後 P<sub>0</sub> 成虫を取り除いた。このプレートを温度順化テストに用いるアッセイプレートとした。P<sub>0</sub> から生まれた F<sub>1</sub> 世代は卵から成虫になるまで、同じ飼育温度で成長させた。15°C の場合は、F<sub>1</sub> を 5~6 日間飼育し、25°C で飼育する場合は 60~72 時間飼育した。

F<sub>1</sub> が成体まで成長した後に、アッセイプレートを新しい温度環境に移して数時間飼育した。その後、プレートを氷上で 20 分間冷却し、2°C の冷蔵庫

(CRB-41A、日立、日本) に移して 48 時間飼育した。48 時間後、アッセイプ

レートで 15°C で 1 日静置した。その後、実体顕微鏡下で、生存している個体と死亡している個体を数えた。各アッセイは少なくとも 3 回実施した。

### 生体内カルシウムイメージング

生体内カルシウムイメージングは過去の論文を参考にして行った (Ujisawa *et al.*, 2014a)。実験に使用する *C. elegans* をスライドガラス上の 2% (w/v) アガーパッドに接着し、M9 バッファーを滴下した後にカバーガラスを被せ、マニキュアで封入した。カルシウムイメージングには、オリンパス IX81 または BX60 顕微鏡 (オリンパス株式会社、日本) を使用し、サンプルをステージに取り付けられた ITO ガラスベースのサーモコントローラー (東海ヒット株式会社、日本) 上に置いて行った。

カルシウムインディケーターの蛍光画像の取得には、顕微鏡のカメラポートに直結させた Dual-view (Molecular Devices, USA) に取り付けられた EM-CCD カメラ EVOLVE512 (Photometrics, USA)、または顕微鏡のカメラポートに直結させた CSU-W1 Sprit-view Model (横河電機、日本) に取り付けられた EM-CCD カメラ iXonUltra888 (Andor, UK)、または顕微鏡のカメラポートに直結させた W-view (浜松ホトニクス、日本) に付けた ORCA fusion (Hamamatsu Photonics) を用いて撮影した。画像は 30-300ms の露光時間で、1×1 ビニングまたは 4×4 ビニングで撮影した。ガラスプレートの温度の測定には、サーモメーター (TP-OT-B14M、東海ヒット株式会社) を使用した。

各イメージング実験について、蛍光強度を取得し、MetaMorph ver. 7.10 画像解析ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて処理した。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の相対的な変化は、YC 蛍光比の変化として測定された。カルシウムインディケーター YC3.60 および YCX2.60 を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを実施した (Madisen

*et al.*, 2015; Nagai *et al.*, 2004)。YC 実験のバンドパスフィルターは、過去の論文に記載されているものを使用した (Ohta *et al.*, 2014; Okahata *et al.*, 2019; Takagaki *et al.*, 2020)。

### 特定の神経細胞における RNA 干渉

特定の神経細胞における RNA 干渉は過去の論文を参考にして行った (Esposito *et al.*, 2007)。RNAi 解析の標的遺伝子のセンスおよびアンチセンス塩基配列は、Ahringer の *C. elegans* RNAi クローンライブラリーの中に含まれる標的遺伝子クローンの DNA 配列の情報に従って、PCR 法を用いて DNA 断片を増幅した (Kamath and Ahringer, 2003)。センスおよびアンチセンス方向にクローニングされた標的遺伝子の断片の上流に、細胞特異的プロモーターを融合させた。

RMG ニューロン特異的に標的遺伝子を RNAi するためには、RMG ニューロンでのみ遺伝子発現を誘導するプロモーターが必要であったが、単独の遺伝子プロモーターで RMG ニューロン特異的に発現誘導するものが存在しなかった。そのため、RMG ニューロンを含む複数のニューロンで発現誘導する 2 種類のプロモーターである *ncs-1* プロモーターと *avr-15* プロモーターを用いて、前者を用いて標的遺伝子の「センス」配列を発現させ、後者で標的遺伝子の「アンチセンス」配列を発現させた。*C. elegans* 体内では *ncs-1* プロモーターと *avr-15* プロモーターの発現が重複する RMG 介在ニューロンでのみ、標的遺伝子のセンス配列とアンチセンス配列が共存する状態ができるため、この方法を用いて RMG ニューロン特異的に標的遺伝子である *glr-4* 遺伝子と *glr-5* 遺伝子の RNAi を行った。



PVQ ニューロン特異的に標的遺伝子 (*eat-4* 遺伝子、*unc-7* 遺伝子、*unc-9* 遺伝子) の RNAi を行う解析においても同様に、PVQ ニューロン特異的に遺伝子発現を誘導させる単独のプロモーターは公表されていなかったため、PVQ ニューロンを含む複数のニューロンで発現誘導する 2 種類のプロモーターである *sra-6* プロモーターと *npr-11* プロモーターを用いた。これらのプロモーターで発現が重複する PVQ ニューロンでのみ標的遺伝子のセンス配列とアンチセンス配列が共存する状態ができるため、この方法を用いて PVQ ニューロン特異的に標的遺伝子 (*eat-4* 遺伝子、*unc-7* 遺伝子、*unc-9* 遺伝子) の RNAi を行った。標的遺伝子のセンスおよびアンチセンス断片を、*ges-1p::NLS::GFP* および *AIYp::GFP* などのマーカー 30ng/ $\mu$ l と共に 20ng/ $\mu$ l で *C. elegans* の生殖巣にマイクロインジェクションした。

#### Oil Red O 染色

Oil Red O 染色は過去の論文を参考にして行った (O'Rourke *et al.*, 2009)。一定の温度下で飼育し、成長段階を揃えた個体を使用した。成虫になって 1 日目の個体を集め、1×PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄し、ガラス試験管に回収した。その後、120  $\mu$ l の PBS と等量の 2% パラホルムアルデヒドを含む 2×MRWB バッファー (160mM KCl、40mM NaCl、14mM Na<sub>2</sub>EGTA、1mM spermidine-HCl、0.4mM spermine、30mM Na-PIPES、pH7.4 および 0.2% b-mercaptoethanol) を加えて 1 時間穏やかに揺動し、バッファーを除去後、*C. elegans* を 1×PBS で洗浄した。脱水のため、1.0 mL の 60% イソプロパノールを加え、室温で 15 分間静置した。oil red O 原液 (1% oil red O 含有イソプロパノール) を数日間平衡化し、水で 60% に希釈して 1 時間揺動した後、0.22mm フィルターで濾過した。脱水後の *C. elegans* が入った試験管から、60% イソプロパノールを除去し、

oil red 0 染色液 1mL を加え、*C. elegans* の入った溶液をローテーターで 30 分間もしくは一晩、回転させた。その後、oil red 0 溶液を除去し、0.01% Triton X-100 を含む 1×PBS 1.0 mL で *C. elegans* を 3 回洗浄した。最後に、*C. elegans* をマウントし、カラー CCD カメラ (EOS kissX9, Canon) で明視野画像を取得した。

#### Oil Red 0 染色個体の撮影条件

顕微鏡 : SZX12  
倍率 : 90 倍  
レンズ : DF PLAPO 1.6X PF  
コントラスト : 最小  
フィルター : KB-4  
閾値設定 : なし  
露光時間 : 1/5 (200ms)  
ISO : 100  
機種 : EOS KISS X9  
撮影モード : Manual  
光源の電流値 : -2A (ダイヤル : 6 )

#### Oil Red 0 の画像取得と定量化

すべての oil red 0 染色個体の画像は、同一の設定と露光時間で取得した。oil red 0 蛍光は、画像解析ソフトウェアである MetaMorph ver. 7.8 (Molecular Devices) を用いて、RBG カラー画像から取得した。MetaMorph を用いてカラー画像から oil red 0 蛍光を取得し、そのうち Red チャンネルの値

を最大値 (255) から引いて反転させ、ネガティブコントロールとして oil red 0 染色を行わず他の操作は同様におこなったモック個体の反転値を差し引くことで定量化した。個体ごとの平均 oil red 0 蛍光強度は、咽頭筋の直下から位置している腸の細胞のうち、2 対目と 3 対目の腸細胞の強度の合計として取得された。

#### ATGL-1::GFP 蛍光画像の定量化

ATGL-1::GFP 蛍光画像の定量化は過去の論文を参考にして行った (Palamiuc *et al.*, 2017)。蛍光画像は、MetaVue ソフトウェア ver. 7.10 (Molecular Devices) を用いて、DOC-Cam Compact モノクロカメラ (Molecular Devices) を取り付けた Olympus IX81 倒立顕微鏡の 20×対物レンズ (UPlanSApo 20x, Olympus) で撮影した。個体あたりの平均 ATGL-1::GFP 蛍光強度は、2 対目と 3 対目の腸細胞の囲まれた領域内の強度の合計として取得した。

#### 脂肪酸組成

発生段階を揃えたヤングアダルトの個体から脂質を抽出し、過去の論文を参考にメチル基転移させた (Murray *et al.*, 2007)。脂肪酸メチルエステルは気-液クロマトグラフィーで分析し、ピークの保持時間を標準物質と比較することで定量化した。脂肪酸組成は重量百分率で表示した。すべてのサンプルは独立して 3 回収集した。

#### 統計解析

温度順化テストは、6 枚以上のプレートで少なくとも 3 回試行をそれぞれ別日に実施した。個々の実験データの値は、棒グラフ上にドットで示した。エラー

ーバーは standard error of the mean (SEM) を示す。統計解析は、すべてのデータの分散は正規分布すると仮定し、パラメトリック検定である Dunnett' s 検定または Tukey-Kramer 検定、分散が等しくないと仮定した 2 標本による Welch の t 検定を用いて行った。図中の (\*) および (\*\*) は、それぞれ  $P < 0.05$  および  $P < 0.01$  を示す。これらの検定は、Mac 統計解析 ver. 3 (株式会社エスミ、日本)を使用した。

## 6. 謝辞

はじめに、本研究を行うにあたり、適切な助言をしていただきました久原篤教授に深く感謝致します。ならびに、実験計画や実験操作の指導、実験結果に対する議論等、本研究を通して多大なアドバイスとご指導をして頂きました太田茜博士に心から感謝致します。oil Red 0を使用した腸の脂肪量の定量化に尽力頂きました村上一寿氏、Cameleon 遺伝子を ASJ ニューロンと PVQ ニューロンに導入した系統を作製して頂きました藤井智子氏、カルシウムイメージングに用いる温度プログラムを作製して頂いた五百藏誠氏、カルシウムイメージングの実験操作やプラスミド作製等の実験操作の指導をしてくださった三浦徹氏、岡畑美咲博士、高垣菜式博士に感謝申し上げます。また、日本学術振興会 特別研究員 DC に採用頂き、科研費提供による研究支援を頂きましたこと厚く御礼申し上げます。さらに、学位論文の作成指導をして下さいました甲南大学 久原篤 教授、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、岩月聡史 教授に心から感謝申し上げます。最後に、大学 4 年間及び大学院 5 年間、研究生活を支えて下さった家族と友人に深く感謝いたします。

## 7. 引用文献

- Alerstam, T., and Backman, J. (2018). Ecology of animal migration. *Curr Biol* 28, R968-R972. 10.1016/j.cub.2018.04.043.
- Amir, G., Horowitz, L., Rubinsky, B., Yousif, B.S., Lavee, J., and Smolinsky, A.K. (2004). Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III. *Cryobiology* 48, 273-282. 10.1016/j.cryobiol.2004.02.009.
- An, L., Fu, X., Chen, J., and Ma, J. (2023). Application of *Caenorhabditis elegans* in Lipid Metabolism Research. *Int J Mol Sci* 24. 10.3390/ijms24021173.
- Aoki, I., and Mori, I. (2015). Molecular biology of thermosensory transduction in *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* 34, 117-124. 10.1016/j.conb.2015.03.011.
- Bandell, M., Macpherson, L.J., and Patapoutian, A. (2007). From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* 17, 490-497. 10.1016/j.conb.2007.07.014.
- Begasse, M.L., Leaver, M., Vazquez, F., Grill, S.W., and Hyman, A.A. (2015). Temperature Dependence of Cell Division Timing Accounts for a Shift in the Thermal Limits of *C. elegans* and *C. briggsae*. *Cell Rep* 10, 647-653. 10.1016/j.celrep.2015.01.006.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21. 10.1038/35036035.
- Boutillier, R.G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol* 204, 3171-3181. 10.1242/jeb.204.18.3171.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94. 10.1093/genetics/77.1.71.
- 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. 10.1038/39807.

Cheung, B.H., Cohen, M., Rogers, C., Albayram, O., and de Bono, M. (2005). Experience-dependent modulation of *C. elegans* behavior by ambient oxygen. *Curr Biol* *15*, 905-917. 10.1016/j.cub.2005.04.017.

Coburn, C., Allman, E., Mahanti, P., Benedetto, A., Cabreiro, F., Pincus, Z., Matthijssens, F., Araiz, C., Mandel, A., Vlachos, M., et al. (2013). Anthranilate fluorescence marks a calcium-propagated necrotic wave that promotes organismal death in *C. elegans*. *PLoS Biol* *11*, e1001613. 10.1371/journal.pbio.1001613.

Consortium, C.e.S. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* *282*, 2012-2018. 10.1126/science.282.5396.2012.

Cook, S.J., Jarrell, T.A., Brittin, C.A., Wang, Y., Bloniarz, A.E., Yakovlev, M.A., Nguyen, K.C.Q., Tang, L.T., Bayer, E.A., Duerr, J.S., et al. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* *571*, 63-71. 10.1038/s41586-019-1352-7.

Dancy, B.C., Chen, S.W., Drechsler, R., Gafken, P.R., and Olsen, C.P. (2015). <sup>13</sup>C- and <sup>15</sup>N-Labeling Strategies Combined with Mass Spectrometry Comprehensively Quantify Phospholipid Dynamics in *C. elegans*. *PLoS One* *10*, e0141850. 10.1371/journal.pone.0141850.

Dent, J.A., Smith, M.M., Vassilatis, D.K., and Avery, L. (2000). The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 2674-2679. 10.1073/pnas.97.6.2674.

Dhaka, A., Viswanath, V., and Patapoutian, A. (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* *29*, 135-161. 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112958.

Dillon, J., Franks, C.J., Murray, C., Edwards, R.J., Calahorra, F., Ishihara, T., Katsura, I., Holden-Dye, L., and O'Connor, V. (2015). Metabotropic Glutamate Receptors: MODULATORS OF CONTEXT-DEPENDENT FEEDING BEHAVIOUR IN *C. ELEGANS*. *J Biol Chem* *290*, 15052-15065. 10.1074/jbc.M114.606608.

Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* *149*, 1060-1072.

10.1016/j.cell.2012.03.042.

Esposito, G., Di Schiavi, E., Bergamasco, C., and Bazzicalupo, P. (2007). Efficient and cell specific knock-down of gene function in targeted *C. elegans* neurons. *Gene* 395, 170-176. 10.1016/j.gene.2007.03.002.

Frooninckx, L., Van Rompay, L., Temmerman, L., Van Sinay, E., Beets, I., Janssen, T., Husson, S.J., and Schoofs, L. (2012). Neuropeptide GPCRs in *C. elegans*. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 167. 10.3389/fendo.2012.00167.

Gabanyi, I., Lepousez, G., Wheeler, R., Vieites-Prado, A., Nissant, A., Chevalier, G., Wagner, S., Moigneu, C., Dulauroy, S., Hicham, S., et al. (2022). Bacterial sensing via neuronal Nod2 regulates appetite and body temperature. *Science* 376, eabj3986. 10.1126/science.abj3986.

Gerstbrein, B., Stamatias, G., Kollias, N., and Driscoll, M. (2005). In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 4, 127-137. 10.1111/j.1474-9726.2005.00153.x.

Ghosh, R., Andersen, E.C., Shapiro, J.A., Gerke, J.P., and Kruglyak, L. (2012). Natural variation in a chloride channel subunit confers avermectin resistance in *C. elegans*. *Science* 335, 574-578. 10.1126/science.1214318.

Gouvea, D.Y., Aprison, E.Z., and Ruvinsky, I. (2015). Experience Modulates the Reproductive Response to Heat Stress in *C. elegans* via Multiple Physiological Processes. *PLoS One* 10, e0145925. 10.1371/journal.pone.0145925.

Greer, P.L., and Greenberg, M.E. (2008). From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* 59, 846-860. 10.1016/j.neuron.2008.09.002.

Grienberger, C., and Konnerth, A. (2012). Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73, 862-885. 10.1016/j.neuron.2012.02.011.

Gulyas, L., and Powell, J.R. (2022). Cold shock induces a terminal investment



reproductive response in *C. elegans*. *Sci Rep* 12, 1338. 10.1038/s41598-022-05340-6.

Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., et al. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737. 10.1126/science.1123965.

Hammarlund, M., Hobert, O., Miller, D.M., 3rd, and Sestan, N. (2018). The CeNGEN Project: The Complete Gene Expression Map of an Entire Nervous System. *Neuron* 99, 430-433. 10.1016/j.neuron.2018.07.042.

Hattori, K., Ishikawa, H., Sakauchi, C., Takayanagi, S., Naguro, I., and Ichijo, H. (2017). Cold stress-induced ferroptosis involves the ASK1-p38 pathway. *EMBO Rep* 18, 2067-2078. 10.15252/embr.201744228.

Hilliard, M.A., Bargmann, C.I., and Bazzicalupo, P. (2002). *C. elegans* responds to chemical repellents by integrating sensory inputs from the head and the tail. *Curr Biol* 12, 730-734. 10.1016/s0960-9822(02)00813-8.

Hirano, Y., Nishimiya, Y., Matsumoto, S., Matsushita, M., Todo, S., Miura, A., Komatsu, Y., and Tsuda, S. (2008). Hypothermic preservation effect on mammalian cells of type III antifreeze proteins from notched-fin eelpout. *Cryobiology* 57, 46-51. 10.1016/j.cryobiol.2008.05.006.

Hobert, O. (2016). A map of terminal regulators of neuronal identity in *Caenorhabditis elegans*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5, 474-498. 10.1002/wdev.233.

Izumi, Y., Sonoda, S., Yoshida, H., Danks, H.V., and Tsumuki, H. (2006). Role of membrane transport of water and glycerol in the freeze tolerance of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *J Insect Physiol* 52, 215-220. 10.1016/j.jinsphys.2005.11.001.

Jeong, H., and Paik, Y.K. (2017). MGL-1 on AIY neurons translates starvation to reproductive plasticity via neuropeptide signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 430, 80-89. 10.1016/j.ydbio.2017.08.014.

Johannessen, M., Delghandi, M.P., and Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cell Signal* 16, 1211-1227. 10.1016/j.cellsig.2004.05.001.

Julius, D. (2013). TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29, 355-384. 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833.

Kamath, R.S., and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30, 313-321. 10.1016/s1046-2023(03)00050-1.

Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038. 10.1126/science.1067020.

Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., and Hudspeth, A.J. (2014). *カandel神経科学. メディカル・サイエンス・インターナショナル.*

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. 10.1007/s00421-009-1256-6.

Kashio, M., and Tominaga, M. (2022). TRP channels in thermosensation. *Curr Opin Neurobiol* 75, 102591. 10.1016/j.conb.2022.102591.

Kawamichi, M. (1996). Ecological factors affecting annual variation in commencement of hibernation in wild chipmunks (*Tamias sibiricus*). *JOURNAL OF MAMMALOGY* 77(3):731-744. <https://doi.org/10.2307/1382678>.

Komura, T., Yamanaka, M., Nishimura, K., Hara, K., and Nishikawa, Y. (2021). Autofluorescence as a noninvasive biomarker of senescence and advanced glycation end products in *Caenorhabditis elegans*. *NPJ Aging Mech Dis* 7, 12. 10.1038/s41514-021-00061-y.

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. 10.1126/science.1148922.

- Kuramochi, M., Takanashi, C., Yamauchi, A., Doi, M., Mio, K., Tsuda, S., and Sasaki, Y.C. (2019). Expression of Ice-Binding Proteins in *Caenorhabditis elegans* Improves the Survival Rate upon Cold Shock and during Freezing. *Sci Rep* 9, 6246. 10.1038/s41598-019-42650-8.
- Laing, R.J., and Dhaka, A. (2016). ThermoTRPs and Pain. *Neuroscientist* 22, 171-187. 10.1177/1073858414567884.
- Lisman, J., Cooper, K., Sehgal, M., and Silva, A.J. (2018). Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nat Neurosci* 21, 309-314. 10.1038/s41593-018-0076-6.
- 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. 10.1038/s41598-017-00630-w.
- 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. 10.1371/journal.pone.0032360.
- Madisen, L., Garner, A.R., Shimaoka, D., Chuong, A.S., Klapoetke, N.C., Li, L., van der Bourg, A., Niino, Y., Egolf, L., Monetti, C., et al. (2015). Transgenic mice for intersectional targeting of neural sensors and effectors with high specificity and performance. *Neuron* 85, 942-958. 10.1016/j.neuron.2015.02.022.
- 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. 10.1002/j.1460-2075.1991.tb04966.x.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388, 882-887. 10.1038/42264.
- Mori, I., and Ohshima, Y. (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 376, 344-348. 10.1038/376344a0.

- Mori, I., Sasakura, H., and Kuhara, A. (2007). Worm thermotaxis: a model system for analyzing thermosensation and neural plasticity. *Curr Opin Neurobiol* *17*, 712-719. 10.1016/j.conb.2007.11.010.
- Morrison, S.F., and Nakamura, K. (2019). Central Mechanisms for Thermoregulation. *Annu Rev Physiol* *81*, 285-308. 10.1146/annurev-physiol-020518-114546.
- Motomura, H., Ioroi, M., Murakami, K., Kuhara, A., and Ohta, A. (2022). Head-tail-head neural wiring underlies gut fat storage in *Caenorhabditis elegans* temperature acclimation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *119*, e2203121119. 10.1073/pnas.2203121119.
- 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 U S A* *104*, 5489-5494. 10.1073/pnas.0609590104.
- Nagai, T., Yamada, S., Tominaga, T., Ichikawa, M., and Miyawaki, A. (2004). Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca(2+) by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10554-10559. 10.1073/pnas.0400417101.
- Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *301*, R1207-1228. 10.1152/ajpregu.00109.2011.
- Nakamura, T., Ogawa, M., Kojima, K., Takayanagi, S., Ishihara, S., Hattori, K., Naguro, I., and Ichijo, H. (2021). The mitochondrial Ca(2+) uptake regulator, MICU1, is involved in cold stress-induced ferroptosis. *EMBO Rep* *22*, e51532. 10.15252/embr.202051532.
- Ng, Q.X., Soh, A.Y.S., Loke, W., Lim, D.Y., and Yeo, W.S. (2018). The role of inflammation in irritable bowel syndrome (IBS). *J Inflamm Res* *11*, 345-349. 10.2147/JIR.S174982.
- Nishida, Y., Sugi, T., Nonomura, M., and Mori, I. (2011). Identification of the AFD neuron as the site of action of the CREB protein in *Caenorhabditis elegans* thermotaxis. *EMBO Rep* *12*, 855-862. 10.1038/embor.2011.120.

- O'Rourke, E.J., Soukas, A.A., Carr, C.E., and Ruvkun, G. (2009). *C. elegans* major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metab* *10*, 430-435. 10.1016/j.cmet.2009.10.002.
- Ohnishi, K., Saito, S., Miura, T., Ohta, A., Tominaga, M., Sokabe, T., and Kuhara, A. (2020). OSM-9 and OCR-2 TRPV channels are accessorial warm receptors in *Caenorhabditis elegans* temperature acclimatisation. *Sci Rep* *10*, 18566. 10.1038/s41598-020-75302-3.
- Ohnishi, K., Takagaki, N., Okahata, M., Fujita, M., Ohta, A., and Kuhara, A. (2018). *Cryobiology and Cryotechnology* *64*, No. 2, 53~59.
- Ohta, A., and Kuhara, A. (2013). Molecular mechanism for trimetric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci Res* *76*, 119-124. 10.1016/j.neures.2013.03.008.
- 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. 10.1038/ncomms5412.
- Ohta, A., Yamashiro, S., and Kuhara, A. (2023). Temperature acclimation: Temperature shift induces system conversion to cold tolerance in *C. elegans*. *Neurosci Res* *194*, 1-6. 10.1016/j.neures.2023.04.005.
- Okahata, M., Motomura, H., Ohta, A., and Kuhara, A. (2022). Molecular physiology regulating cold tolerance and acclimation of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* *98*, 126-139. 10.2183/pjab.98.009.
- 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. 10.1007/s00360-016-1011-3.
- 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. 10.1126/sciadv.aav3631.

- Palamiuc, L., Noble, T., Witham, E., Ratanpal, H., Vaughan, M., and Srinivasan, S. (2017). A tachykinin-like neuroendocrine signalling axis couples central serotonin action and nutrient sensing with peripheral lipid metabolism. *Nat Commun* 8, 14237. 10.1038/ncomms14237.
- Perez, M.A., and Watts, J.L. (2021). Worms, Fat, and Death: *Caenorhabditis elegans* Lipid Metabolites Regulate Cell Death. *Metabolites* 11. 10.3390/metabo11020125.
- Perez, M.F., and Lehner, B. (2019). Vitellogenins - Yolk Gene Function and Regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Front Physiol* 10, 1067. 10.3389/fphys.2019.01067.
- Peters, M.A., Teramoto, T., White, J.Q., Iwasaki, K., and Jorgensen, E.M. (2007). A calcium wave mediated by gap junctions coordinates a rhythmic behavior in *C. elegans*. *Curr Biol* 17, 1601-1608. 10.1016/j.cub.2007.08.031.
- Pirri, J.K., and Alkema, M.J. (2012). The neuroethology of *C. elegans* escape. *Curr Opin Neurobiol* 22, 187-193. 10.1016/j.conb.2011.12.007.
- Rossi, A., Pizzo, P., and Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866, 1068-1078. 10.1016/j.bbamcr.2018.10.016.
- Rubinsky, B. (2003). Principles of low temperature cell preservation. *Heart Fail Rev* 8, 277-284. 10.1023/a:1024734003814.
- Saito, S., Saito, C.T., Igawa, T., Takeda, N., Komaki, S., Ohta, T., and Tominaga, M. (2022). Evolutionary Tuning of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Underlies the Variation in Heat Avoidance Behaviors among Frog Species Inhabiting Diverse Thermal Niches. *Mol Biol Evol* 39. 10.1093/molbev/msac180.
- Schumacher, M.A., Goodman, R.H., and Brennan, R.G. (2000). The structure of a CREB bZIP-somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *J Biol Chem* 275, 35242-35247. 10.1074/jbc.M007293200.

Shimmura, T., Nakayama, T., Shinomiya, A., Fukamachi, S., Yasugi, M., Watanabe, E., Shimo, T., Senga, T., Nishimura, T., Tanaka, M., et al. (2017). Dynamic plasticity in phototransduction regulates seasonal changes in color perception. *Nat Commun* 8, 412. 10.1038/s41467-017-00432-8.

Sieburth, D., Madison, J.M., and Kaplan, J.M. (2007). PKC-1 regulates secretion of neuropeptides. *Nat Neurosci* 10, 49-57. 10.1038/nn1810.

Smirnova, E., Goldberg, E.B., Makarova, K.S., Lin, L., Brown, W.J., and Jackson, C.L. (2006). ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep* 7, 106-113. 10.1038/sj.embor.7400559.

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. 10.1016/j.celrep.2016.05.078.

Srinivasan, S. (2015). Regulation of body fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Physiol* 77, 161-178. 10.1146/annurev-physiol-021014-071704.

Stati, G., Passaretta, F., Gindraux, F., Centurione, L., and Di Pietro, R. (2021). The Role of the CREB Protein Family Members and the Related Transcription Factors in Radioresistance Mechanisms. *Life (Basel)* 11. 10.3390/life11121437.

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* 21, e48671. 10.15252/embr.201948671.

Takeishi, A., Takagaki, N., and Kuhara, A. (2020). Temperature signaling underlying thermotaxis and cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurogenet* 34, 351-362. 10.1080/01677063.2020.1734001.

Taylor, S.R., Santpere, G., Weinreb, A., Barrett, A., Reilly, M.B., Xu, C., Varol, E., Oikonomou, P., Glenwinkel, L., McWhirter, R., et al. (2021). Molecular topography of an entire nervous system. *Cell* 184, 4329-4347 e4323. 10.1016/j.cell.2021.06.023.

Terrien, J., Perret, M., and Aujard, F. (2011). Behavioral thermoregulation in mammals:

a review. *Front Biosci (Landmark Ed)* *16*, 1428-1444. 10.2741/3797.

Thiel, A., Giroud, S., Hertel, A.G., Friebe, A., Devineau, O., Fuchs, B., Blanc, S., Stoen, O.G., Laske, T.G., Arnemo, J.M., and Evans, A.L. (2022). Seasonality in Biological Rhythms in Scandinavian brown Bears. *Front Physiol* *13*, 785706. 10.3389/fphys.2022.785706.

Treinin, M., Shliar, J., Jiang, H., Powell-Coffman, J.A., Bromberg, Z., and Horowitz, M. (2003). HIF-1 is required for heat acclimation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Physiol Genomics* *14*, 17-24. 10.1152/physiolgenomics.00179.2002.

Tsukamoto, D., Hasegawa, T., Hirose, S.I., Sakurai, Y., Ito, M., and Takamatsu, N. (2019). Circadian transcription factor HSF1 regulates differential HSP70 gene transcription during the arousal-torpor cycle in mammalian hibernation. *Sci Rep* *9*, 832. 10.1038/s41598-018-37022-7.

Udaka, H., Goto, S.G., and Numata, H. (2008). Effects of photoperiod and acclimation temperature on heat and cold tolerance in the terrestrial slug, *Lehmannia valentiana* (Pulmonata: Limacidae). *Applied Entomology and Zoology*.

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 U S A* *115*, 8823-8828. 10.1073/pnas.1808634115.

Ujisawa, T., Ohta, A., and Kuhara, A. (2014a). Long-term calcium imaging of ASJ sensory neuron controlling cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Protocol Exchange*.

Ujisawa, T., Ohta, A., Okahata, M., Sonoda, S., and Kuhara, A. (2014b). 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. 10.1371/journal.pone.0165518.



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. 10.1098/rstb.1986.0056.

Wood, W.B., and The Community of *C. elegans* Researchers, ed (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor monograph series 17.

Yang, S., Lu, X., Wang, Y., Xu, L., Chen, X., Yang, F., and Lai, R. (2020). A paradigm of thermal adaptation in penguins and elephants by tuning cold activation in TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* *117*, 8633-8638. 10.1073/pnas.1922714117.

Yemini, E., Lin, A., Nejatbakhsh, A., Varol, E., Sun, R., Mena, G.E., Samuel, A.D.T., Paninski, L., Venkatachalam, V., and Hobert, O. (2021). NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in *C. elegans*. *Cell* *184*, 272-288 e211. 10.1016/j.cell.2020.12.012.

Zhang, S.O., Trimble, R., Guo, F., and Mak, H.Y. (2010). Lipid droplets as ubiquitous fat storage organelles in *C. elegans*. *BMC Cell Biol* *11*, 96. 10.1186/1471-2121-11-96.

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 U S A* *108*, 18114-18119. 10.1073/pnas.1115387108.