

38. 環境適応における生体回路の時空間コントロール機構

久原 篤

甲南大学 理工学部 生物学科 生体調節学研究室／統合ニューロバイオロジー研究所

Key words : *C. elegans*, 温度応答, 組織ネットワーク, 環境適応

緒言

動物は環境温度の変化に対して、適切に応答や適応することで、常に変動する温度環境の下で生存や繁殖することができる。我々は、線虫 *C. elegans* における低温適応現象をモデルとして、動物の温度応答と適応機構の解明を目指している¹⁾。線虫 *C. elegans* の低温適応現象とは、野生株 N2 を 25 °C で飼育した後に 2 °C に置くと死滅してしまうのに対して、15 °C で飼育した後に 2 °C に置かれても生存できる現象である¹⁾。当研究室では現在までに、頭部に存在する ASJ 感覚神経が温度情報を受容し、インスリンを分泌し、腸や神経系がインスリンを受容することで FOXO 型の転写因子 DAF-16 が複数の遺伝子の発現を調節して、低温適応が制御されているとことを明らかとした。しかし、どのような遺伝子の発現調節が低温適応に重要であるかは未知の部分が残っている。そこで本研究では、低温適応に関与する新たな遺伝子の同定を目的として、飼育温度依存的に発現量が変化する遺伝子について低温適応をテストし、その結果から低温適応に関わると予測される遺伝子や、その相互作用について解析した。特に、これまでに低温適応との関係が解析されてこなかった生殖関係組織について、既存の低温適応に関与することが知られている神経系や腸を含めた生体ネットワークとしての解析を進めた。

方法

C. elegans の飼育法、培地や Buffer の組成等は先行論文に従った²⁾。

1. *C. elegans*

N2 Bristol (野生型)

変異体：図 1 - 4 参照

2. 大腸菌

OP-50 株：線虫の餌として NGM プレートに塗布した。

3. 低温適応テスト

主立った方法は先行論文に従った³⁾。20 °C で飼育した野生型の *C. elegans* を、2 個体ずつ新しい NGM プレートに植え継ぎ (P0)、各飼育温度 (15、20、25 °C) で 24 時間飼育し産卵させた。P0 を除去し、卵 (F1) が adult になるまで、各飼育温度で飼育し続けた。F1 が adult まで成長したら、NGM プレートを蓋を上に向けた状態で、氷上に 20 分間おいた。NGM プレートをタッパーに入れ、メディカルキャビネット内で 48 時間、低温刺激温度 (2 °C) で保存した (cold shock)。cold shock 後、室温に取り出し生存個体と死個体を数え、生存率を出した。変異体を使用したテストでも同様の条件で行った。

結果

1. 精子が低温適応に影響する可能性の検討

これまでの解析から、飼育温度依存的に発現変動する遺伝子の変異体のうち、精子に関連する遺伝子の変異体において、20℃および25℃飼育後に2℃においた場合の生存率が野生型よりも高くなる異常を示した。*gsp-3*は、減数分裂や精子運動に関わるタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 をコードし、*msd-4* は major sperm domain タンパク質をコードし、*spe-11* は初期発生に関わる精子タンパク質をコードする。これらの変異体が低温適応に異常を示したことから、他の精子遺伝子について、低温適応に関与するのかが調べた。

2. 精子遺伝子の変異体の低温適応表現型解析

精子に関わる遺伝子 (*gsp-4*, *ife-1*, *fem-1*, *fem-3*, *C04G2.8*, *fog-2*, *htas-1*, *him-8*, *swm-1*; *him-5*) の低温適応について検討した (図1)。25℃飼育後に2℃に48時間置かれると、野生株の生存率は約10%であるのに対して、*gsp-4* (*tm5415*)、*ife-1* (*bn127*)、*fem-3* (*q20*)、*him-8* (*e1489*) 変異体の生存率はそれぞれ41%、26%、38%、22%と有意に高かった。*gsp-4* 遺伝子はタンパク質脱リン酸化酵素を、*ife-1* 遺伝子は initiation factor 4E family を、*fem-3* 遺伝子は雄への発生を促進するノーベルプロテイン (novel protein) を、*him-8* 遺伝子は X 染色体の減数分裂に必要な Zing-finger protein をコードしている。20℃飼育後に2℃に48時間置かれると、野生株の生存率は約20%であるのに対して、*gsp-4* (*tm5415*)、*ife-1* (*bn127*)、*fem-1* (*hc17*)、*fem-3* (*q20*)、*fog-2* (*q71*)、*him-8* (*e1489*) 変異体の生存率はそれぞれ71%、64%、53%、75%、42%、51%と有意に高かった。*fem-1* 遺伝子は ankyrin repeat-containing protein を、*fog-2* 遺伝子は雌雄同体における精子形成に必要とされ、F-box と FTH (*fog-2* homolog) domain をもつタンパク質をコードする。15℃飼育後に2℃に48時間置いても生存率に異常は見られなかった。

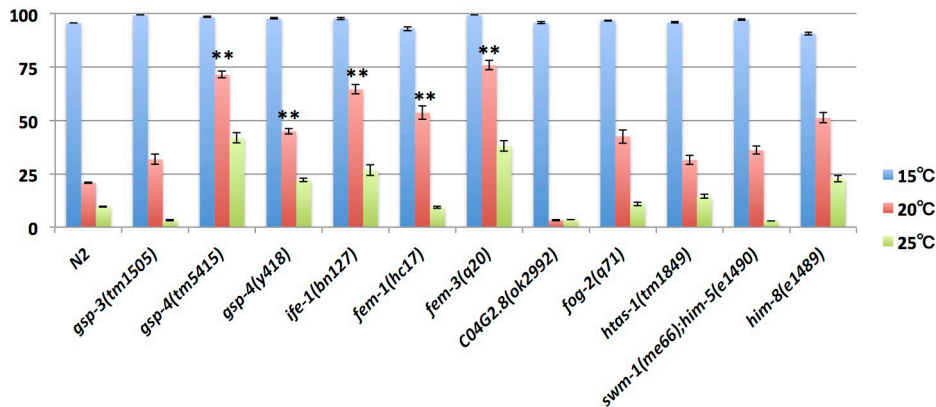


図1. 精子に関わる変異体の低温適応

野生株は20℃飼育後に2℃におかれるとほぼ死滅する。しかし、脱リン酸化酵素 PP1 をコードし、精子運動などに関わる *gsp-3* と *gsp-4* 変異体では、生存できる異常が観察された。GSP-3、GSP-4 の転写因子である IFE-1 でも異常がみられた。また、精子形成などにかかわる、アンキリンリピートタンパク FEM-1 と、novel protein FEM-3 でも異常があった。同様に、精子形成や減数分裂に関わる FTH protein や Zing finger protein の変異体でも異常があった。つまり、精子が低温適応に関与することが示唆された。統計処理: ダネット検定。ダブルアスタリスクは $p < 0.01$ である。縦軸は個体の生存率 (%), 横軸は系統名を表す。

3. 低温適応を制御する組織間相互作用の遺伝学的解析

これまでの研究から、低温適応を制御する組織として、神経細胞である ASJ 温度受容ニューロン、ASJ ニューロンから分泌されるインスリンを受容する腸の関与が示唆された。また、腸と神経系で機能して低温耐性を制御するインスリン受容体 *daf-2* 変異体において⁴⁾、精子の減数分裂に関わる *gsp-3* 遺伝子の発現量が顕著に増加していることがわかった。以上のことから、神経・腸・精子の異なる組織が関連し合っ低温適応を制御している可能性が考えられたため、本研究では、これら3つの組織で低温適応にかかわる遺伝子変異の二重変異体を作製し、遺伝学的な相互作用を解析し

た(図2-4)。解析に用いた遺伝子の変異体は、すべて20℃飼育後に2℃の低温刺激を与えた場合の生存率が野生型よりも高くなる異常を示した、精子関連遺伝子の変異体のうち *him-8*、*fem-3*、*gsp-4*、インスリン受容体 *daf-2* 変異、ASJ 温度受容ニューロンで機能する三量体 G タンパク質経路の G α タンパク質をコードする *gpa-3*、G α の下流のグアニル酸シクラーゼをコードする *odr-1* をもちいた⁵⁾。

腸などで働くインスリン経路と、精子遺伝子との遺伝学的関係を調べるために各種の二重変異体を作成し、低温適応の表現型を解析した(図2)。*daf-2;him-8* 二重変異体の生存率は約72%で、*daf-2* 変異体の76%とは有意な差がなかったが、*him-8* 変異体の52%よりは有意で高かった。野生株の生存率は24%で異常は見られなかった。*daf-2;fem-3* 二重変異体の生存率は約58%で、*daf-2* 変異体の41%や *fem-3* 変異体の46%と有意な差はなかった。野生株の生存率は4%で異常は見られなかった。*daf-2;gsp-4* 二重変異体の生存率は約86%で、*daf-2* 変異体の80%や *gsp-4* 変異体の90%と有意な差はなかった。野生株の生存率は31%で異常は見られなかった。

三量体 G タンパク質経路と精子との遺伝学的関係を調べるために、*gpa-3*、*odr-1* と各精子遺伝子 (*him-8*、*fem-3*、*gsp-4*) との二重変異体の低温適応の表現型を測定した(図3、4)。*gpa-3;him-8* 二重変異体の生存率は約26%で、*gpa-3* 変異体の27%や *him-8* 変異体の34%と有意な差はなかった。野生株の生存率は11%で異常は見られなかった。*odr-1;him-8* 二重変異体の生存率は約37%で、*odr-1* 変異体の38%や *him-8* 変異体の34%と有意な差はなかった。野生株の生存率は11%で異常は見られなかった。*gpa-3;fem-3* 二重変異体の生存率は約64%で、*gpa-3* 変異体の51%や *fem-3* 変異体の44%と優位な差はなかった。野生株の生存率は28%で異常はなかった。*odr-1;fem-3* 二重変異体の生存率は約76%で、*odr-1* 変異体の63%や *fem-3* 変異体の66%と優位な差はなかった。野生株の生存率は13%であった。*gpa-3;gsp-4* 二重変異体の生存率は約24%で、*gpa-3* 変異体の20%とは有意な差がなかったが、*gsp-4* 変異体の70%よりは有意に低かった。野生株の生存率は8%で異常は見られなかった。*odr-1;gsp-4* 二重変異体の生存率は約34%で、*odr-1* 変異体の25%とは有意な差がなかったが、*gsp-4* 変異体の80%よりは有意に低かった。野生株の生存率は5%で異常は見られなかった。

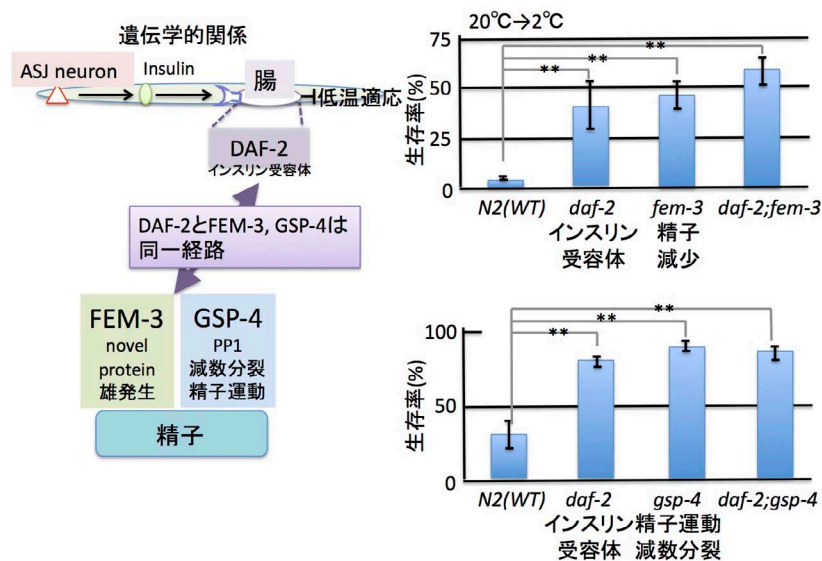


図2. 腸などで働くインスリン経路と、精子遺伝子との遺伝学的関係

腸の遺伝子としてインスリン受容体 *daf-2* を使った。精子との遺伝子として novel protein *fem-3* と PP1 *gsp-4* を使った。*daf-2* と *fem-3* の single mutant は、それぞれ、20℃飼育後に2℃で高い生存率を示した。*daf-2;fem-3* double mutant は single mutant と同じ異常を示した。同様に *daf-2* と *gsp-4* の double mutant でも single mutant と同じ異常を示した。腸のインスリン受容体と、精子の遺伝子が、遺伝学的に同一経路上にあると考えられる。統計処理：ダネット検定。ダブルアスタリスクは $p < 0.01$ である。

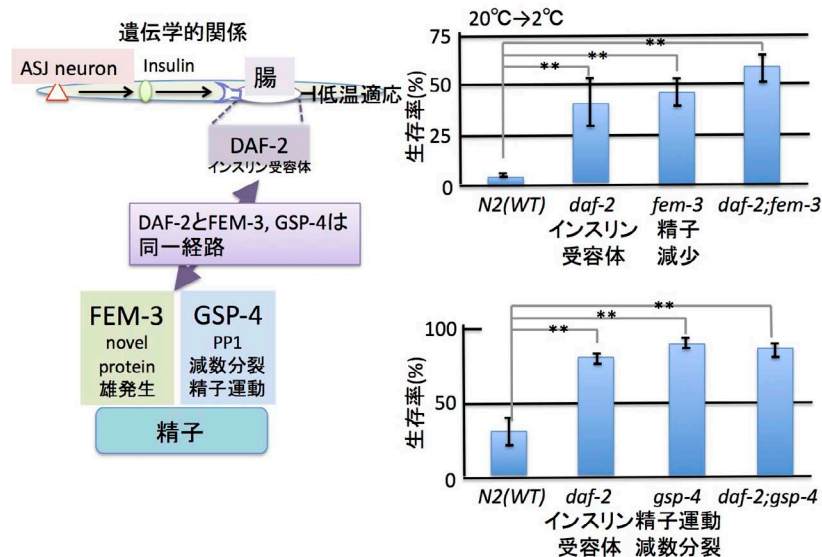


図3. ASJ 温度受容ニューロンと精子遺伝子との遺伝学的関係

ASJ ニューロンの遺伝子として三量体 G タンパク質 *Ga gpa-3* と、グアニル酸シクラーゼ *odr-1* を使った。精子との遺伝子として novel protein *fem-3* を使った。 *gpa-3* と *fem-3* の single mutant は、それぞれ、20 °C 飼育後に 2 °C で高い生存率を示した。 *gpa-3;fem-3* double mutant は single mutant と同じ異常を示した。同様に *odr-1* と *fem-3* の double mutant でも single mutant と同じ異常を示した。ASJ 温度受容ニューロンの G タンパク経路と、精子遺伝子が遺伝学的に同一経路上にあると考えられた。統計処理：ダネット検定。ダブルアスタリスクは $p < 0.01$ である。

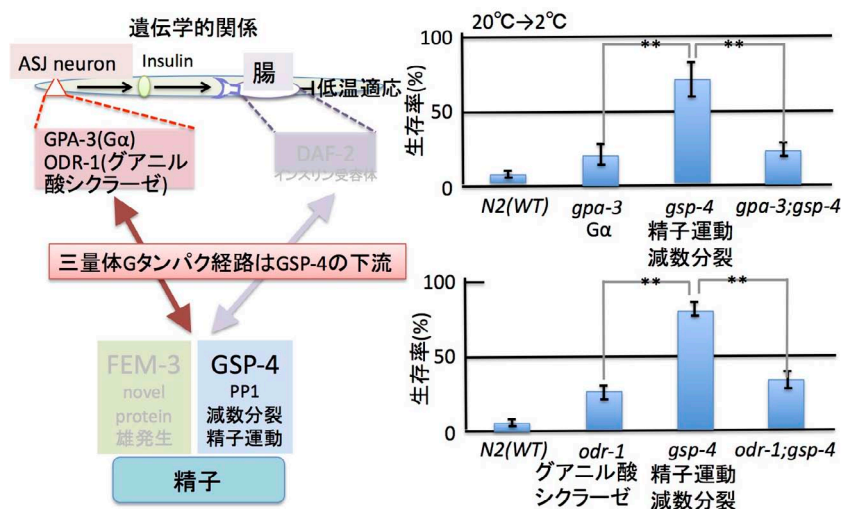


図4. 精子遺伝子の下流に ASJ ニューロンの遺伝子が遺伝学的に存在する

ASJ ニューロンの *Ga gpa-3* の変異体は、野生株よりもやや高い異常を示した。精子の *gsp-4* 変異体は高い異常を示した。 *gpa-3;gsp-4* double mutant では、異常が抑圧された。同様に、精子の *gsp-4* 変異体の異常は、ASJ ニューロンの *odr-1* 変異によって抑圧された。つまり、精子遺伝子の下流に ASJ ニューロンの遺伝子が遺伝学的に存在し、精子から ASJ 温度受容ニューロンに何らかの情報が伝達されている可能性がある。統計処理：ダネット検定。ダブルアスタリスクは $p < 0.01$ である。

考 察

1. 低温適応に関わる精子遺伝子

飼育温度依存的に発現変動する遺伝子の中でもこれまでに解析を行っていなかった精子に着目して解析を行った。25℃飼育後のテストで野生株より生存率が高くなる変異体が *gsp-4*, *ife-1*, *fem-3*, *him-8* 変異体の 4 系統、20℃飼育後のテストで野生株より生存率が高くなる変異体が *gsp-4*, *ife-1*, *fem-1*, *fem-3*, *fog-2*, *him-8* 変異体の 6 系統あった。このことから、精子に関わる遺伝子は低温適応現象に関与している可能性が高いと考えられる (図 1)。

そのなかでも、20℃および 25℃飼育後のテストで強い異常を示した *gsp-4* 遺伝子は protein phosphatase (PP1) をコードし、飼育温度の変化で発現変動する *gsp-3* 遺伝子と約 98% という高い相同性をもつ。GSP-4 は精子特異的に発現し、減数分裂における 2 度目の染色体分離、および MSP (major sperm domain protein) によって構成される仮足繊維の基部での分解によるトレッドミル制御を行うため、*gsp-4* 遺伝子および *gsp-3* 遺伝子を欠損した変異体は精子機能をほぼ完全に喪失する。*ife-1* 遺伝子は翻訳開始複合体 eIF4F の mRNA5' キャップ結合構成成分である eIF4E のホモログをコードする。IFE-1 はいくつかの精子特異的遺伝子、特に GSP-3 の発現を制御する。これらのことから、精子が低温適応に関与することが示唆される。

また、Real-time PCR の結果から、腸と神経系で働くインスリン受容体である *daf-2* 変異体において、精子特異的に発現し低温適応に関わる *gsp-3* 遺伝子の発現レベルが約 30 倍に増加していることが明らかとなった。このことから、腸のインスリン経路が、精子遺伝子の発現に関連すると考えられる。

2. 低温適応を制御する組織間相互作用の遺伝学的解析

精子に関わる遺伝子とインスリン受容体の二重変異体や、精子に関わる遺伝子と ASJ 感覚神経で温度情報を伝達に関わる遺伝子の二重変異体を作成し、その低温適応をテストすることで、組織間ネットワークの遺伝学的関係を調査した。その結果、*him-8* 遺伝子、*fem-3* 遺伝子、*gsp-4* 遺伝子の変異体と *daf-2* 遺伝子の変異体、およびその二重変異体の生存率に差がなかったことから、これらの遺伝子は遺伝学的に同一経路上にあることが示唆された。つまり、腸のインスリン受容体と、精子の遺伝子が、遺伝学的に同一経路上にあると考えられる (図 2)。

him-8 遺伝子、*fem-3* 遺伝子の変異体と *odr-1* 遺伝子、*gpa-3* 遺伝子の変異体、およびその二重変異体は生存率に差がなかったことから、遺伝学的に同一経路上にあると考えられる。つまり、ASJ 温度受容ニューロンの G タンパク経路と、精子遺伝子が遺伝学的に同一経路上にあると考えられる (図 3)。

予想外なことに、*gsp-4* 遺伝子と *odr-1* 遺伝子、*gpa-3* 遺伝子の二重変異体は *odr-1* 変異体、*gpa-3* 変異体と同程度の生存率を示し、*gsp-4* 変異体の生存率よりも大幅に低かった (図 4)。このことから、*odr-1* 遺伝子、*gpa-3* 遺伝子は遺伝学的に *gsp-4* 遺伝子よりも下流にあることになる。*odr-1* 遺伝子と *gpa-3* 遺伝子は温度情報を受容する ASJ 感覚神経内における温度情報の伝達に関わることが明らかとなっているので、精子から ASJ ニューロンへ情報伝達が行われている可能性が示唆された (図 4)。今後、この可能性を詳しく解析するために、Ca²⁺ の濃度で蛍光を変化させるイエローカメレオンを ASJ 特異的に発現するように精子遺伝子の変異体に導入し⁶⁾、その ASJ 感覚神経の神経活動をカルシウムイメージングで測定する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、甲南大学理工学部生物学科の大学院生の園田悟氏 太田茜博士である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) A. Ohta, T. Ujisawa, S. Sonoda, A. Kuhara. Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications*. 2014;5:1-12. PubMed PMID: 25048458.
- 2) S. Brenner. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77(71):71-94. PubMed PMID: 4366476.
- 3) T. Ujisawa, A. Ohta, O. M., S. S., A. Kuhara. Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. *Protocol Exchange*. 2014. doi:10.1038/protex.2014.032

- 4) K. D. Kimura, H. A. Tissenbaum, Y. Liu, G. Ruvkun. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997;277(942):942-6. PMID: 9252323.
- 5) N. D. L'Etoile, C. I. Bargmann. Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1. *Neuron*. 2000;25(3):575-86. PMID: 10774726.
- 6) A. Miyawaki et al., Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 1997;388(882):882-7. PMID: 9278050.