

アポトーシスシグナリングによる温度適応制御

甲南大学大学院自然科学研究科

太田 茜

1. はじめに、緒言、目的、背景、序論

ヒトを含む動物は、環境に存在するさまざまな情報を特殊化された感覚器官で受容することによって、環境変化に柔軟に応答することができる。環境情報の中でも地球上に常に存在するものとして「温度」が挙げられる。温度は、細胞内の生化学反応に変化をもたらす重要な環境情報であり、動物は温度環境の変化に対して適切に応答する機構をもっている。温度に関わる疾患は多数知られており、急激な温度変化によるヒートショック死や低体温症などは社会問題にもなっている。また、地球規模で地球温暖化や地域によっては局所的な寒冷化が進んでおり、それらの地域における生物の温度変化への適応は重要な課題のひとつである。このように温度は広く生物や環境と密接しているが、動物の温度環境への応答や耐性の分子機構には未知な部分が残されている。本研究では、シンプルな実験動物である線虫 *C. elegans* をモデル動物として、動物の温度応答に関わる新しい分子制御機構の解明を目指した。

C. elegans の温度に対する応答は温度走性行動や高温に対する耐性など様々なものが知られているが (Ohta and Kuhara, 2013)、本申請者等はこれまでに *C. elegans* の低温に対する耐性である低温耐性を解析モデルとして、温度応答の分子組織機構の一端を明らかにしてきた (Ohta et al., 2014; Sonoda et al., 2016)。*C. elegans* の低温耐性とは、例えば 25°C で飼育された野生株個体は 2°C の低温に 48 時間静置されると死滅してしまうが、15°C で飼育された個体は 2°C でも生存できる現象である。さらに、この低温耐性はわずか 3 時間だけ別の温度に置くことで獲得や消失する (Okahata et al., 2016)。*C. elegans* の低温耐性に関わる組織や遺伝子がこれまでの解析から見つかってきている。頭部に存在する光受容ニューロン ASJ が温度を受容し、ASJ のシナプスからインスリンを分泌し、それが腸や神経系で受容されることで、体内の脂肪酸の構成率を変化させることで低温耐性に制御されている (Ohta et al., 2014; Ujisawa et al., 2016)。近年、低温耐性の制御に関して、腸の下流で精子が関与していることが示唆された。さらに、精子が頭部の温度受容ニューロン ASJ をネガティブフィードバック制御することが見つかってきた (Sonoda et al., 2016)。しかし、低温耐性の制御に関わる組織や遺伝子は他にもたくさん存在すると考えられる。そこで、本研究では低温耐性に関わる新規の分子組織機構を明らかにする目的で、新規の低温耐性変異体の解析を行った。

2. 方法

温度耐性に関する解析系として、*C. elegans* の低温耐性の実験系をもちいた。主に使用した温度条件としては、25°C 飼育後の野生株や変異体個体を 2°C に静置し、24 時間もしくは 48 時間後のそれぞれの個体の生存率を測定した。

解析にもちいた遺伝子の線虫内での発現パターンは、蛍光タンパク質である GFP を用いて解析した。細胞内小器官は CFP や YFP を用いて解析した。

感覚ニューロンの温度応答性は、細胞内カルシウムイメージング法によって測定した。カルシウムインディケータとして、遺伝子によってコードされるカメレオン遺伝子産物を用いた。

3. 結果、研究成果

低温耐性の新規のシステムを見つける目的で、これまでに解析があまり行われていない低温耐性変異体について解析を進めた。これまでに温度刺激によって発現変動する遺伝子である *endu-2* が低温耐性に関与することを報告したが(Ohta, Ujisawa et al., *Nature commun*, 2014)、*endu-2*に関する詳細な解析は行っていなかったため、本研究においてその解析を進めた。*endu-2*遺伝子はエンドヌクレアーゼドメインをもつ線虫からヒトまで保存されている分子をコードしている。まず、ENDU-2がどのようなヌクレオチドを基質としているかを調べるために、single strand DNA や RNA と、double strand DNA や RNA を基質としてヌクレアーゼ活性を生化学的に測定した。その結果、ENDU-2はsingle strand と double strand の RNA を基質しているエンドリボヌクレアーゼであることが示唆された(Ujisawa et al., 2018)。

endu-2 遺伝子の発現細胞を同定するために、*endu-2* 遺伝子のプロモーターと ORF を含み、終止コドン を GFP に置き換えたプラスミドを作成した。このプラスミドを野生株に導入し、*endu-2* 遺伝子の発現パターンを同定したところ、*endu-2* 遺伝子は頭部のマッスルアームや尾部の筋肉や腸で発現することが明らかになった。さらに、抗 GFP 抗体を用いた解析から、*endu-2* 遺伝子は神経系でも発現していることが示唆された。ENDU-2 が細胞内のどのようなイベントに関与しているかを調べるために、ENDU-2 が細胞内小器官に局在しているかを解析した。その結果、ENDU-2 は細胞質全体に存在し ER にも一部局在していた。ENDU-2 が ER にも局在していたことから、野生株と *endu-2* 変異体に関して ER の表面積を測定したところ、*endu-2* 変異体では、ER の表面積が低下していた(Ujisawa et al., 2018)。

低温耐性の成立において ENDU-2 がどのような組織や細胞で機能することが必須であるかを調べるために、*endu-2* 変異体の特定の組織や細胞において *endu-2* 遺伝子を発現させる細胞特異的レスキュー実験を行った。その結果、*endu-2* 変異体の低温耐性の異常は、神経系または筋肉組織で *endu-2* 遺伝子を発現させることで回復した。さらに、頭部の ADL 感覚ニューロンや陰門筋で *endu-2* 遺伝子を発現させることで、*endu-2* 変異体の低温耐性の異常が回復した。以上の結果から、ENDU-2 の ADL 感覚ニューロンまたは筋肉における機能が低温耐性の成立に必須であることが示唆された。また、ENDU-2 のエンドリボヌクレアーゼネガティブ型を用いた解析から、ENDU-2 のエンドリボヌクレアーゼが低温耐性に必要であることが示唆された(Ujisawa et al., 2018)。

ADL 感覚ニューロンはこれまでに忌避性の化学物質を受容する化学受容ニューロンであることが知られていた。この ADL 化学受容ニューロンが個体の低温耐性を制御していることから、ADL 化学受容ニューロンが温度に応答する可能性を考え、ADL の温度に対する応答性を細胞内カルシウムイメージングによって測定した。その結果、ADL 感覚ニューロンは温度に応答することが示唆された。ADL 化学受容ニューロンにおける化学物質受容応答情報伝達におけるプライマリーな膜電位変化を引き起こすチャネルとして TRP 型チャネルである OCR-1, 2 と OSM-9 が報告されている。これらの分子が ADL 感覚ニューロンにおいて温度応答にも関与しているかを調べるために、*ocr-2 osm-9; ocr-1* 三重変異体の ADL 感覚ニューロンの温度応答性をカルシウムイメージングによって測定したところ、顕著に温度応答性が低下していた。これらの結果から、OCR-1, 2 と OSM-9 が ADL 感覚ニューロンにおいて温度情報伝達に関与していることが示唆された。また、*ocr-2 osm-9; ocr-1* 三重変異体は低温耐性に関しても *endu-2* 変異体と同様の異常を示した(Ujisawa et al., 2018)。

エンドリボヌクレアーゼ ENDU-2 の下流の遺伝子を同定するために、次世代 DNA シークエンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行った。*endu-2* 変異体と野生株における mRNA の種類と量を比較したところ、数千の遺伝子の発現が変動していた。その中で変異体が存在する約 100 個について、変異体の低温耐性を測定したところ、アポトーシスに関与する遺伝子の変異体において低温耐性異常が観察された。例えば、カスパーゼ CED-3 などが含まれていた。この *ced-3* 変異体が示す低温耐性の異常は、ADL 感覚ニューロンに *ced-3cDNA* を導入することで回復した。つまり、*ced-3* 変異体が示す低温耐性の異常は、*endu-2* 変異体と同様に ADL 感覚ニューロンの異常によると考えられる。*ced-3* 変異と *endu-2* 変異を二重変異にすることで、*endu-2* 変異体が示す低温耐性の上昇が抑圧され、*ced-3* 変異体が示す低温耐性の低下異常と同様の表現型を示した。つまり、ENDU-2 の下流で CED-3 が機能し、ENDU-2 は CED-3 を負に制御していると考えられる(Ujisawa

et al., 2018)。

ADL 感覚ニューロンにおいて CED-3 がどのような細胞内イベントに関与しているかが次の疑問であった。カスパーゼ CED-3 はアポトーシスを誘導するため、CED-3 の負の制御因子である ENDU-2 では、ADL がアポトーシス状態になっていると考えられる。一方で、*endu-2* 変異体の ADL は細胞死を起こすことなく、見た目は正常に存在している。そのため、CED-3 が ADL ニューロン内のもっと微細な部分の異常を引き起こしている可能性を考えた。これまでに、カスパーゼ CED-3 はシナプスの刈り込みとリモデリングに関与していることが報告されていたので、*ced-3* 変異体の ADL ニューロンのシナプスを観察したが、ADL のシナプス密度が高いため、野生株との違いが光学顕微鏡レベルでは観察できなかった。*ced-3* 変異体におけるシナプスの刈り込みとリモデリングの異常は主に背腹の運動ニューロンの軸索において、光学顕微鏡レベルで観察されているため、*endu-2* 変異体についてもその部位のシナプスを観察したところ、シナプス数の変化が観察された。つまり、ENDU-2 もシナプスの刈り込みとリモデリングに関与していることが示唆された。以上の結果から、ADL においても ENDU-2 と CED-3 がシナプスの刈り込みとリモデリングに関与している可能性がある (Ujisawa et al., 2018)。

4. 考察、まとめ

線虫の低温耐性には、従来、忌避性の化学物質を受容することが知られていた感覚ニューロンが必須であることが明らかとなった。一般的に、温度耐性は個々の細胞における熱ショックタンパク質などの機能で、細胞レベルで制御されていると考えられているため、本結果は、単一の感覚ニューロンの機能により、個体全体の温度耐性が制御されるという興味深い結果であった。また、ENDU-2 が背腹の運動ニューロンの軸索のシナプスの刈り込みとリモデリングに関与していることから、ADL 感覚ニューロンにおいても ENDU-2 と CED-3 がシナプスの刈り込みとリモデリングに関与している可能性がある。本研究から、化学受容ニューロンを介した個体全体の低温耐性の制御と、エンドリボヌクレアーゼを介したシナプスの刈り込みという 2 つの点で興味深い結果が見られた。高等動物においても同様のシステムが存在することが期待される。

5. 発表論文、参考文献

Ohta, A., and Kuhara, A. (2013). Molecular mechanism for trimeric G protein-coupled thermosensation and synaptic regulation in the temperature response circuit of *Caenorhabditis elegans*. *Neuroscience research* 76, 119-124.

Ohta, A., Ujisawa, T., Sonoda, S., and Kuhara, A. (2014). Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications* 5, 4412.

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*. *Journal of comparative physiology B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*.

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.

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*.

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.