

# メカノ受容体DEG-1を介した温度受容によるC. elegansの低温耐性の制御

著者	高垣 菜式
学位名	博士（理学）
学位授与機関	甲南大学
学位授与年度	令和元年度(2019年度)
学位授与番号	34506甲第113号
URL	<a href="http://doi.org/10.14990/00003536">http://doi.org/10.14990/00003536</a>

甲南大学 博士学位論文

メカノ受容体 DEG-1 を介した温度受容による *C. elegans* の低温耐性の制御

博士（理学）

甲南大学大学院自然科学研究科  
生命・機能科学専攻

高垣 菜式  
Natsune Takagaki

2020 年 3 月

## 目次

要旨	p.1
略語一覧	p.3
1. 序論	
1.1 動物の環境応答とモデル動物としての線虫 <i>C. elegans</i>	p.5
1.2 生物の温度耐性	p.6
1.3 <i>C. elegans</i> の低温耐性	p.7
1.4 キサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH)	p.8
1.5 生物の温度受容メカニズム	p.10
1.6 DEG/ENaC タイプメカノ受容体	p.11
2. 結果	
2.1 低温耐性に関わる新規変異の同定	p.13
2.2 低温耐性に関与するキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH-1)	p.15
2.3 <i>xdh-1</i> 変異体の ROS レベル	p.16
2.4 <i>xdh-1</i> 変異体が低温耐性異常を示すための条件解析	p.17
2.5 <i>xdh-1</i> 変異と既知の遺伝子変異との遺伝学的関係	p.18
2.6 <i>xdh-1</i> 変異体における化学走性行動と耐性幼虫形成	p.18
2.7 XDH-1 の発現細胞	p.20
2.8 <i>xdh-1</i> 変異の細胞特異的な回復解析	p.21
2.9 <i>xdh-1</i> 変異体における AIN と AVJ の Ca <sup>2+</sup> イメージング解析	p.23
2.10 低温耐性に関与するメカノ受容体 DEG-1	p.24
2.11 ASG 感覚ニューロンにおける DEG-1 を介した温度応答	p.25
2.12 シナプス伝達欠損変異体における ASG ニューロンの温度応答	p.26
2.13 <i>deg-1</i> 変異体における AIN と AVJ ニューロンの神経活動	p.27

2.14 温度刺激下での DEG-1 の電気生理解析	p.28
3. 考察	
3.1 低温耐性に関わる新規変異の同定	p.30
3.2 XDH-1 の AIN と AVJ 介在ニューロンにおける低温耐性制御	p.31
3.3 低温耐性を正に制御する新規の神経回路	p.33
3.4 DEG/ENaC タイプのメカノ受容体 DEG-1 を介した温度応答	p.34
4. 結語	p.37
5. 材料・方法	p.39
謝辞	p.62
引用文献	p.63
図・表	p.71

## 要旨

生物は環境の変化に応答することで、多様な環境下において生存・繁殖することができる。環境情報の中でも温度は常に地球上に存在するため、温度に対する応答の分子機構の解明は重要な課題である。本研究では、モデル動物である線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) の低温耐性現象を解析モデルとして、動物の温度応答機構の解析をおこなった。線虫の低温耐性とは、20°Cや25°Cで飼育した個体は2°Cに置かれると死滅するのに対し、15°Cで飼育した個体は2°Cに置かれても生存できるという現象である。本研究では、次世代DNAシーケンサーなどを用いた遺伝学的解析から、低温耐性を制御する新規遺伝子 *xdh-1* を同定した。この遺伝子は、ヒトのキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) に高い相同性を示す。XDHはプリン体代謝経路の下流で働き、ヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸への二段階の水酸化反応を触媒する酵素である。*xdh-1* 遺伝子の発現細胞解析と *xdh-1* 変異体の細胞特異的回復実験から、XDH-1はAINとAVJのわずか2つの介在ニューロンで低温耐性を制御することが示唆された。AINとAVJは介在ニューロンであるため、それらの上流に温度を感知する感覚ニューロンが存在する可能性が考えられた。AINとAVJ介在ニューロンの上流にはASG感覚ニューロンなどのメカノ受容体が発現している感覚ニューロンが複数存在していた。そこでメカノ受容体に焦点を当て、低温耐性解析をおこなった結果、Degenerin/epithelial sodium channel (DEG/ENaC) タイプのメカノ受容体 DEG-1 の変異体において顕著な低温耐性異常が見られた。*deg-1* 遺伝子はASG感覚ニューロンで発現しているため、Ca<sup>2+</sup>イメージングによりASG感覚ニ

ニューロンの温度に対する生理的応答を測定した。その結果、野生株では、ASG 感覚ニューロンは温度に対して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させるのに対し、*deg-1* 変異体ではその変化が顕著に低下していた。つまり ASG 感覚ニューロンの温度応答に DEG-1 が関与していることが示唆された。DEG-1 が温度受容体として機能するのかを調べるために、温度上昇に反応しない ASE 味覚ニューロンに DEG-1 を強制的に発現させ温度上昇刺激を与えて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を測定した。その結果、DEG-1 を発現させた ASE において温度応答が観察された。さらに直接的に DEG-1 の温度受容能を解析するために、アフリカツメガエルの卵母細胞 (*Xenopus oocyte*) を用いた電気生理解析をおこなった。線虫の DEG-1 とそのヒトホモログである MDEG1 をそれぞれ発現させた卵母細胞に温度変化を与えたところ、いずれにおいても温度に対する応答が見られた。つまり DEG-1 と MDEG1 は機械刺激だけではなく温度も受容していることが示唆された。以上の結果は、ヒトを含む動物においてメカノ受容体 DEG/ENaC が温度を受容し、個体の温度耐性を制御していることを示した初めてのケースである。

## 略語一覽

<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	Complementary DNA
CFP	Cyan fluorescent protein
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
cRNA	Complementary RNA
DEG/ENaC	Degenerin/epithelial sodium channel
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
DsRedm	<i>Discosoma sp.</i> Red
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FOXO	Forkhead box-containing protein, O sub-family
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GCaMP	GFP-calmodulin fusion protein
GFP	Green fluorescent protein
GMP	Guanosine monophosphate
GPCR	G protein coupled receptor
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethane sulfonic acid
H <sub>2</sub> DCF-DA	2', 7'-dichlorofluorescein diacetate

HSP	Heat shock protein
HSF	Heat shock factor
LB	Luria-Bertani
mRNA	Messenger RNA
PCR	Polymerase chain reaction
SNP	Single nucleotide polymorphism
TRP	Transient receptor potential
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NGS	Next generation sequencer
NGM	Nematode growth medium
PBST	Phosphate buffered saline with Tween 20
rGC	Receptor guanylyl cyclase
RFP	Red fluorescent protein
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
XDH	Xanthine dehydrogenase
XO	Xanthine oxidase
XOR	Xanthine oxidoreductase
YC	Yellow cameleon
YFP	Yellow fluorescent protein



## 1. 序論

### 1.1 動物の環境応答とモデル動物としての線虫 *C. elegans*

温度情報は常に地球上に存在し、遮断することができない。そのため、ヒトを含む生物には温度とその変化を受容し、それらに対して応答する生体メカニズムが存在する (Murray et al., 2007)。例えば、恒温動物であるヒトの場合、皮膚や感覚神経から受容された温度情報は中枢神経である脳の視床下部で統合され、骨格筋の震えによる発熱や血管を拡張させて熱を逃がすなどの変化を引き起こして環境温度に適切に応答している (Nakamura, 2011)。しかし、ヒトなどの高等動物になるほど生体や脳の構造が複雑化するため、温度応答の分子メカニズムの解明には時間を要することが考えられる。

本研究ではシンプルな実験動物である線虫 *C. elegans* をモデル実験系として用いて、動物の環境温度応答機構の解明を目指した。線虫 *C. elegans* は、体長が約 1 mm の土壌中に生育する非寄生性の線虫であり、個体、細胞ネットワーク、個々の細胞、遺伝子、分子というさまざまなレベルで、生命現象の基本原理の解析に適したモデル動物である。*C. elegans* には L1、L2、L3 と L4 の 4 つの幼虫期と成虫期があり、生活環は非常に短い (野生型では 20°C で約 3 日)。通常は雌雄同体として存在し、ホモ接合体としての系統維持が簡単なことに加え、0.1% の頻度で出現する雄を利用して交配が可能であるため、遺伝学的解析にも適している (Brenner, 1974)。体は透明であるため、緑色蛍光タンパク質 GFP などの遺伝子を線虫の体内で発現させることで特定の遺伝子の発現細胞の同定や

特定のタンパク質の細胞内局在を生きた個体 (*in vivo*) において解析することが容易である (Zhang et al., 2004)。さらに、昨今のオプトジェネティクスの発展により、例えば、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度によって蛍光波長や蛍光強度が変化する YC3.60 や GCaMP 等のタンパク質をコードする遺伝子を用いることで、*in vivo* における神経細胞の活動を測定することができる (Miyawaki et al., 2013; Nakai et al., 2001)。全 959 個の体細胞のうち、神経細胞は 302 個であり、全神経細胞間の化学シナプス及びギャップ結合が電子顕微鏡により明らかにされている (Cook et al., 2019; White et al., 1986)。また、ゲノムサイズはモデル動物の中でも特に小さい約 100 Mb であり、1998 年に全塩基配列が決定されている (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998)。ゲノム解析の結果から、全遺伝子の約 36% がヒトの遺伝子と類似した遺伝子であったため、*C. elegans* の遺伝学的解析から見つかった遺伝子をヒトの遺伝子解析に対応付けしやすい。これらの特徴から、*C. elegans* は、温度応答の分子メカニズムを調査するのに優れたモデル動物の一つであると考えられる。

## 1.2 生物の温度耐性

環境への耐性として、高温環境や低温環境に対する耐性がある。低温環境に対する耐性（低温耐性）の研究は、植物や昆虫でおこなわれている。低温耐性とは、通常の生育温度より低温の環境でも生存できる性質のことである。昆虫は、細胞膜の不飽和脂肪酸含有率を増加させて、低温環境下でも膜の流動

性を保っている。また、細胞内にアミノ酸や糖類等の不凍結物質を保持することで浸透圧を調節することや、高温や低温状況からの回復時に、ヒートショックタンパク質 (HSP) が機能することで細胞が破壊されるのを防ぐことが知られている (Tsumiki et al., 2010)。これらの分子メカニズムは、植物にも同様に存在する。*C. elegans* にも HSP やヒートショック因子 (HSF) が存在し、温度ストレスを感じると機能することが知られているが、温度情報を受容してから応答に至るまでの詳細な情報伝達経路には未知の点が多く残されている。

### 1.3 *C. elegans* の低温耐性

*C. elegans* の生育温度は約 13~27°C であり、生育温度を超えた 30°C 以上の高温または飢餓にさらされると L1 期の幼虫の大部分が耐性幼虫 (ダワー) になる高温耐性が知られている (Barr, 2003)。ダワーとなった個体は代謝活動が低下しており、多くの感覚ニューロンの感覚末端が露出している口をクチクラ層で覆うことで外部からの環境情報を遮断し、劣悪な環境を生き延びることができる (Hu, 2007)。

*C. elegans* には、低温に対する耐性メカニズムも存在する。*C. elegans* の低温耐性とは、例えば、15°C で飼育された野生株 (N2 株) は 2°C の低温刺激にも耐えられるが、20°C や 25°C で飼育された野生株は 2°C の低温刺激に耐えられず、死滅してしまう (図 1) (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2019; Sonoda et al., 2016; Ujisawa et al., 2018)。これまでの当研究室の解析により、頭部の ASJ と ADL と

呼ばれる 2 つの感覚ニューロンが温度を受容し、低温耐性を制御することがわかっている (図 2) (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2019; Sonoda et al., 2016; Ujisawa et al., 2018)。ASJ は温度を受容すると、シナプスからインスリンを分泌し、そのインスリンは腸と神経で受容され、インスリン情報伝達系を介して、FOXO 型転写因子によって遺伝子発現制御がおこなわれる (図 2) (Ohta et al., 2014)。さらに、低温耐性制御において、腸はステロイドホルモンを介して精子に働きかけ、精子から ASJ ニューロンへのフィードバック機構が存在することが示唆されている (図 2) (Sonoda et al., 2016)。これらの ASJ と ADL 温度受容ニューロンおよび、腸と精子を介した低温耐性の制御機構は、主に低温耐性を負に制御する機構である (Ohta et al., 2014; Sonoda et al., 2016; Ujisawa et al., 2018)。一方で、低温耐性を正に制御する機構に関してはほとんどが未解明の状態である。

本研究では、*C. elegans* の低温耐性現象を動物の温度応答機構の解析モデルと位置づけ、低温耐性の新規変異体の遺伝学的解析をおこなうとともに、その解析から明らかとなってきた、低温耐性におけるメカノ受容体の温度受容体としての機能を解析した。

#### 1.4 キサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH)

哺乳類において、キサンチンオキシレダクターゼ (XOR) は 2 つの構成ドメインを繋ぐリンカーペプチドの有無により、リンカーペプチドを有するキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) とリンカーペプチドが消失したキサンチン

オキシダーゼ (XO) の 2 種類の形態で存在している (Xi et al., 2000)。さらに、これらの両酵素はプリン体代謝経路の下流で働いており、XDH はヒポキサンチンからキサンチン、さらにキサンチンから尿酸への二段階の水酸化反応を触媒する (図 3、4) (Moriya and Satoh, 2016; Wang et al., 2016; Xi et al., 2000)。この化学反応の際には、NADH が同時に生成される (図 4) (Xi et al., 2000)。XDH タンパク質は一般的に鉄・硫黄中心、FAD、モリブドプテリンの 3 つのドメインを持ち、二量体として生体内で存在している (図 4)。FAD は NAD 結合部位であり、モリブドプテリンは酸化還元中心である。鉄・硫黄中心は電子供与体と電子受容体のどちらの機能も持つドメインであり、動物界全体で高度に保存されている。

ヒトにおいて、XDH は肝臓や小腸粘膜などで発現しており (Chung et al., 1997)、ヒトの培養細胞を用いた解析から、XDH の発現量の上昇は腫瘍浸潤や炎症誘発性・免疫性サイトカインの発現の上昇に関連していることがわかっている (Saidak et al., 2018)。そのため、ヒトにおいて、XDH の発現量と癌腫瘍の成長が関係していることが示唆されている (Saidak et al., 2018)。このように、XDH は腫瘍研究における有用な生物学的パラメーターであるにも関わらず、XO ほど研究はおこなわれていない。これは、哺乳類の XDH が可逆的または不可逆的に XO に変換されるため、体内の XDH 量が XO に比べて少ないことが原因である可能性がある (Saksela et al., 1999; Terawaki et al., 2017)。一方で、無脊椎動物の XOR は XDH としてのみ存在するため (Terawaki et al., 2017)、*C. elegans* は XDH を解析するのに適したモデル動物であると考えられる。

## 1.5 生物の温度受容メカニズム

これまでの研究から、生物の温度受容メカニズムにおいて TRP チャンネルが温度センサーとして広く知られている (Dhaka et al., 2006)。TRP チャンネルはイオンチャンネルであり、TRPC、TRPV、TRPM、TRPA、TRPN、TRPP、TRPML の 7 つのサブファミリーに分けられる。1 つのサブユニットに 6 つの膜貫通ドメインとイオンが流入するためのポアを持っている。TRP チャンネルはヒトから線虫まで広く保存されており、視覚や嗅覚などの五感のほかに物理刺激、化学刺激、温度刺激など様々な刺激の受容器として機能している (Venkatachalam and Montell, 2007)。哺乳類において、温度感受性がある TRP チャンネルとして TRPV、TRPM、TRPA のサブファミリーの中から 9 つのチャンネルが報告されており、それぞれ活性化する温度閾値が決まっている (Dhaka et al., 2006; Talavera et al., 2008; Tominaga and Caterina, 2004; Venkatachalam and Montell, 2007)。例えば高温で反応することが知られている TRPV1 は 42°C 以上に反応し、TRV2 はさらに高温領域の 52°C 以上で反応する (Dhaka et al., 2006)。一方で TRPM8 や TRPA1 は低温領域に反応する TRP チャンネルとして知られており、TRPM8 は 26°C 以下、TRPA1 は 17°C 以下の冷刺激受容体として機能する (Dhaka et al., 2006)。

TRP チャンネルに依存しない温度受容メカニズムも報告されている。例えば、ショウジョウバエのロドプシン (G タンパク質共役型受容体 (GPCR)) が、幼虫が温度勾配上で嗜好温度に移動する行動に関与しており、ロドプシンの変異体ではこの行動が異常になることから、ロドプシンが温度受容体として働く可能性が報告されている (Shen et al., 2011)。さらに、線虫 *C. elegans* の AFD 温

度受容ニューロンで発現しているレセプター型のグアニル酸シクラーゼ (rGC) が温度受容体として機能していることが考えられている (Takeishi et al., 2016)。この rGC を温度上昇に応答しないことがわかっている ASE 味覚ニューロンに異所的に発現させ、温度刺激を与えると、ASE ニューロンが温度上昇に反応するようになった (Takeishi et al., 2016)。このように *C. elegans* の神経系における、温度受容に関しては rGC が報告されているが、神経系で発現し、個体の低温耐性に関わる温度受容体は見つかっていなかった。そのため、本研究では低温耐性に関わる新規の温度受容体の同定を目指した。

## 1.6 DEG/ENaC タイプメカノ受容体

DEG/ENaC タンパク質は多様なナトリウムイオンチャネルファミリーからなり (Chen et al., 2016; Geffeney et al., 2011; Waldmann et al., 1996)、機械刺激を受容する三量体のメカノ受容体 (機械受容体) である (図 5) (Geffeney et al., 2011; Zhong et al., 2010)。DEG/ENaC タイプのメカノ受容体は機械刺激のほかにも様々な刺激を受容することがわかっている。DEG/ENaC タイプメカノ受容体は酸味や塩味などの味覚を受容する受容体として機能し (Chandrashekar et al., 2010; Liu et al., 2003; Ugawa et al., 2003)、また、海馬のシナプス可塑性や海馬に依存する空間記憶、恐怖条件付けの神経機構にも関与している (Wemmie et al., 2003; Wemmie et al., 2002; Wemmie et al., 2004; Zha et al., 2006; Ziemann et al., 2009)。 *C. elegans* の DEG/ENaC タイプメカノ受容体 DEG-1 はいくつかの感覚ニューロ

ンで発現しており、機械刺激を受容するメカノ受容体として働いている (Geffeney et al., 2011; Hall et al., 1997; Wang et al., 2008)。一方ヒトでは、DEG-1 のヒトホモログである MDEG1 が存在し、ヒトでは脳や皮質を含む様々な組織で発現している。さらに、MDEG1 のアイソフォームである MDEG2 (ASIC1) が低温下でプロトンに対する反応が増強することがわかっている (Askwith et al., 2001)。しかしながら、DEG/ENaC タイプメカノ受容体が直接温度受容に関わるかどうかについての知見は報告されていない。



## 2. 結果

### 2.1 低温耐性に関わる新規変異の同定

*C. elegans* の低温耐性に関わる新規の遺伝子を同定するために、飼育温度依存的に発現変動する遺伝子に関して解析をおこなった。所属研究室において過去におこなわれた DNA マイクロアレイ解析より、15°C 飼育後に 25°C に 3 時間静置したときに発現量が変動する遺伝子が同定されていた（アクセッションナンバー GEO: GSE81409）(Sonoda et al., 2016)。それらの遺伝子のうち、15 系統の変異体に関して低温耐性の表現型を観察した結果、RB2575 *flp-17(ok3587)* 変異体系統において、顕著な低温耐性異常が観察された（図 6）。ところが、*flp-17* 遺伝子の別のノックアウト変異体 *flp-17(n4894)* を用いて低温耐性テストをおこなったところ、この系統は異常を示さなかった（図 7）。さらに、RB2575 *flp-17(ok3587)* 変異体に野生株 N2 のゲノムから増幅した正常な *flp-17* 遺伝子を導入し、回復実験をおこなったが、RB2575 系統が示す低温耐性異常は回復しなかった（図 8）。以上のことから、RB2575 株が示す低温耐性異常はゲノム DNA 中の *flp-17(ok3587)* 以外の遺伝子などの変異、バックグラウンドミュートーションによって引き起こされていることが示唆された。そこで、RB2575 株が示す低温耐性異常の原因となる変異を同定するために、次世代 DNA シーケンサー (NGS) を用いて RB2575 系統の全ゲノム DNA 配列を解読し、ゲノムデータベースを構築した（アクセッションナンバー: DRA 002599）。その結果、RB2575 系統には野生株 N2 と比較して、652 個の一塩基多型 SNP を含む変異が存在した。これらの

SNP 情報を用いて、RB2575 系統が示す低温耐性異常の原因変異の染色体上の位置の遺伝学的マッピングをおこなったところ、原因変異は、4 番染色体の右腕にマップされた (図 9)。マッピング領域をさらに絞り込むために、4 番染色体の右腕の組み換え系統#bc5-1、#bc5-2 と KHR066、さらに KHR066 から *flp-17* 遺伝子上の *ok3587* 変異を取り除いた系統 KHR069 を獲得した (図 10a)。これらの系統の低温耐性表現型と SNP パターンに基づいて、原因変異の 4 番染色体上のマッピングを進めたところ、4 番染色体の 6.13 cM から 16.24 cM の間に低温耐性異常の原因変異があることが示唆された。この領域には、わずか 4 つの遺伝子の中の 5 つの変異のみを含んでいた (図 10b)。4 つの遺伝子のうち 3 つの遺伝子に関しては、変異体が存在していたため、それらの低温耐性解析をおこなった。また、変異体の存在しなかった *irg-6* 遺伝子に関しては、RB2575 株に野生株型の *irg-6* 遺伝子を導入する回復実験によって原因遺伝子であるかの判別をおこなった。これらの解析をおこなった結果、*F55B11.1* 遺伝子の変異体でのみ RB2575 株と同じくらい強い低温耐性異常が観察された (図 11)。さらに、野生型の *F55B11.1* 遺伝子を RB2575 株と *F55B11.1* 変異体に導入することで、各変異体の低温耐性の異常が回復した (図 12、13)。また、交配によって作製された組み換え系統 KHR066 と KHR069 は *F55B11.1(ok3234)* 変異体と同様の低温耐性異常を示した (図 14)。RB2575 株型の低温耐性異常を示す KHR066 と KHR069 にはどちらも *F55B11.1* 遺伝子上に変異が存在していたため、この変異が低温耐性異常を引き起こす原因変異であることが示唆された。低温耐性異常を引き起こす原因変異は *chr1* 変異と命名した (図 13)。

## 2.2 低温耐性に関与するキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH-1)

*F55B11.1* 遺伝子は、ヒトのキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) (NP\_000370) に高い相同性を示す分子をコードしていたため、この遺伝子を *xdh-1* と名付け、*C. elegans* 遺伝子データベース WormBase (<https://wormbase.org>) に登録した (図 15)。XDH は、一般的に鉄・硫黄中心と NAD 結合サイト (FAD) と酸化還元中心 (モリブトプテリン) をもち二量体で機能する (図 4)。XDH は、プリン体代謝経路の下流でヒポキサンチンを水酸化してキサンチンに代謝し、さらに、キサンチンを水酸化して尿酸へ代謝する酵素である (図 3) (Moriya and Satoh, 2016; Wang et al., 2016; Xi et al., 2000)。 *C. elegans* の XDH-1 とヒト XDH のアミノ酸配列を比較したところ、各ドメインが 37~57%の相同性と 52~67%の類似性を示した (図 15)。特に、動物界全体で高度に保存されている鉄・硫黄中心には非常に保存性の高い配列を有していた (図 15、16; 保存配列 1、2)。 *chr1* 変異は、鉄・硫黄中心ドメインのヒト XDH では保存されていないアミノ酸残基に 1 つの点変異があり、それに加えて、第 2 イントロンと第 3 エクソンのつなぎ目にあるスプライシングアクセプターサイト上に点変異が存在した (図 13、16)。一方、 *ok3234* 変異は NAD 結合部位が欠損する変異であったため (図 13、16)、遺伝学的にナル変異であると考えられる。これ以降の解析には *xdh-1(ok3234)* 変異体を用いた。

### 2.3 *xdh-1* 変異体の ROS レベル

XDH は、プリン体代謝経路において、ヒポキサンチンを水酸化することでキサンチンに代謝し、さらにキサンチンを水酸化することで尿酸に代謝する。XDH は、これらの水酸化反応を触媒する酵素であり、水酸化を引き起こす際に活性酸素種 (ROS) を産生する (Moriya and Satoh, 2016; Xi et al., 2000)。また、XDH の触媒によってできる最終産物の尿酸は抗酸化物質であり (Boardman et al., 2019)、XDH の欠損によって尿酸が産生されないことは抗酸化物質の減少に繋がっており、最終的に ROS が増加することが考えられる。つまり、細胞内において、XDH-1 の欠損が「直接的な ROS の減少」と「間接的な ROS の増加」という相反する現象を共に引き起こす可能性がある。そこで、ROS によって構造変化を起こして蛍光を発するようになる ROS インディケータ-H<sub>2</sub>DCF-DA を用いて、*xdh-1* 変異体の体内の ROS レベル測定をおこなった。その結果、野生株では時間経過とともに ROS レベルの上昇が見られ、*xdh-1* 変異体でも同様の結果が得られた (図 17)。コントロール系統として、体内の ROS レベルが低下していることが報告されている *daf-2* 変異体を使用した (図 17) (Larsen, 1993; McElwee et al., 2004; Murphy, 2006; Panowski et al., 2007; Vanfleteren, 1993)。また、ROS の産生に関わるいくつかの遺伝子の変異体を用いて、低温耐性を測定したが、ROS レベルの増減に関わらず、低温耐性に異常を示す系統は現れなかった (図 18)。以上の結果から、ROS レベルの変動が低温耐性に大きな影響を与えることはないと考えられる。一方で、今回おこなった線虫の ROS レベル測定では、個体の体全体をすり潰し、液化させたものに H<sub>2</sub>DCF-DA を添加することで測定をおこなっ

た。そのため、*xdh-1* 変異体は体全体の ROS レベルは正常であったとしても、*xdh-1* 変異体内の特定の 1 つの細胞における ROS レベルに異常が存在する可能性は残されている。

#### 2.4 *xdh-1* 変異体が低温耐性異常を示すための条件解析

*xdh-1* 変異体を示す低温耐性異常が、低温刺激時間によって変化するかを解析するために、低温刺激時間を 1~8 時間の間で 1 時間ごとに減少させた際の生存率を測定した。コントロールとして、*xdh-1* 変異体が低温耐性異常を示すことがわかっている条件である 24 時間の低温刺激を与えた条件でのテストをおこなった。解析の結果、*xdh-1* 変異体は、わずか 1 時間の低温刺激を与えることで生存率が約 55%に低下し、2 時間の低温刺激を与えることで約 80%の個体が死滅した (図 19)。これらの条件において野生株は約 100%生存できる (図 19)。

*xdh-1* 変異体を示す低温耐性異常と発生段階の関係を調べるために、成虫期の *xdh-1* 変異体と幼虫期 (L4) の *xdh-1* 変異体を用いて、低温耐性に差異が生じるかを解析した。15°Cで飼育した *xdh-1* 変異体と野生株の成虫期と幼虫期 (L4) の発生段階それぞれにおいて低温刺激を与えた。幼虫期 (L4) の線虫で解析をおこなうときは 1 日遅くテストを開始することで発生段階を調節した。解析の結果、成虫期の *xdh-1* 変異体を示す低温耐性異常は、幼虫期 (L4) の *xdh-1* 変異体では弱まった (図 20)。

## 2.5 *xdh-1* 変異と既知の遺伝子変異との遺伝学的関係

これまでの研究から、ASJ 感覚ニューロンが温度を感知し、インスリンとステロイドホルモンを介して、低温耐性を負に制御することがわかっている (Ohta et al., 2014)。*xdh-1* 変異と既知の低温耐性に関わる遺伝子の変異との遺伝学的関係を解析するために、*tax-4; xdh-1* 二重変異体と *daf-2; xdh-1* 二重変異体を作製した。TAX-4 は、ASJ が温度を感知した際、細胞内 cGMP 濃度が上昇することによって開口する cGMP 依存性チャネルであり、細胞内に  $\text{Ca}^{2+}$  を透過させ、ASJ を活性化させることが示唆されている (Ohta et al., 2014)。また、DAF-2 は線虫における唯一のインスリン受容体であり、腸およびニューロンの両方で低温耐性に関与していることが示唆されている (Ohta et al., 2014)。15°C で飼育した後の野生型 N2、*tax-4* 変異体および *daf-2* 変異体は低温刺激を与えても生存できたが、*xdh-1* 変異体は同条件下で死滅した (図 21)。*tax-4; xdh-1* 二重変異体は、各々の単独の変異体とは異なる中間の表現型を示した (図 21)。また、*daf-2; xdh-1* 二重変異体の結果から、*daf-2* 変異体を示す低温耐性表現型は *xdh-1* 変異によって顕著に抑圧された (図 21)。

## 2.6 *xdh-1* 変異体における化学走性行動と耐性幼虫形成

線虫の XDH-1 が機能する細胞を推測するために、*xdh-1* 変異体における、特定の感覚ニューロンの機能に依存する走性行動や耐性幼虫形成を測定し

た。具体的には、頭部に存在する AWA 嗅覚ニューロンによって受容されるジアセチルへの化学走性と、AWC 嗅覚ニューロンによって受容されるベンズアルデヒドへの化学走性と、頭部の複数の感覚ニューロンが関与するダワー形成を指標に解析をおこなった。その結果、コントロールである AWA の匂い情報伝達に関わる TRP チャネルが欠損した *osm-9* 変異体では、ジアセチルへの走性が見られないのに対して、野生株と *xdh-1* 変異体はジアセチルへの走性を示した (図 22b)。また、AWC の匂い情報伝達に関わる cGMP 依存性チャネルが欠損した *tax-4* 変異体と *tax-4; xdh-1* 二重変異体は、AWC で受容されるベンズアルデヒドへの走性を示さなかったのに対して、野生株と *xdh-1* 変異体はベンズアルデヒドへの走性を示した (図 22c)。つまり、ジアセチルとベンズアルデヒドへの走性行動を司る機構に XDH-1 は関与していないことが示唆された。

線虫 *C. elegans* は高温や高密度などの環境条件によって耐性幼虫 (ダワー) を形成する機構を備えており、ダワー耐性幼虫になることで、高温などのストレスに耐えることができる。本研究より、XDH-1 が低温ストレスに対する耐性機構に関与することが示唆されたため、XDH-1 と耐性幼虫形成機構の関係を調べるために、構成的なダワー形成異常を示す *daf-2* 変異体を用いてダワー形成頻度の解析をおこなった。コントロール系統の *daf-2* 変異体は、20°C 以上で飼育されると L1 から L2 への移行期に構成的にダワーになる。20°C、23°C、25°C で飼育されると *daf-2* 変異体では非常に高いダワー形成頻度が観察されるのに対して、野生株と *xdh-1* 変異体は一切ダワー形成が見られなかった (図 23)。*daf-2* 変異体の構成的なダワー形成は *xdh-1* との二重変異体になっても継続して観察された (図 23)。したがって、XDH-1 はダワー形成機構に関与していないことが考

えられ、また、*daf-2; xdh-1* 二重変異体でも高いダワー形成頻度が観察されたことから、XDH-1 の欠損は DAF-2 変異が引き起こすダワー形成異常を抑圧しないことがわかった。

## 2.7 XDH-1 の発現細胞

*xdh-1* プロモーターに緑色蛍光タンパク質 GFP を接続したプラスミドや *xdh-1* プロモーターに *xdh-1 cDNA* と GFP を接続したプラスミドなどを野生株に導入し、XDH-1 の発現細胞を GFP 蛍光を指標に解析した結果、AIN と AVJ 介在ニューロンを含む頭部のいくつかの神経と腸と浸透圧調節細胞 (Excretory cell) で発現が観察された (図 24、25)。*xdh-1* 遺伝子の発現ニューロンを同定するために、より詳細な発現細胞解析をおこなった。成虫期の線虫において、AIN 特異的に発現を誘導する *inx-17* プロモーターに YFP を繋いだプラスミドを作製し、*xdh-1p::dsRedm* と同時に野生株に導入した。YFP と DsRedm の蛍光を共焦点顕微鏡で観察した結果、2 つの蛍光タンパク質が AIN ニューロンで共発現していた (図 24c)。また、AVJ 特異的に発現を誘導する *hlh-34* プロモーターに DsRedm を繋いだプラスミドを作製し、*xdh-1p::xdh-1 cDNA::gfp* と同時に野生株に導入した結果、AVJ ニューロンにおいて GFP と DsRedm の共発現が観察された (図 24d)。なお、*hlh-34* 遺伝子が *C. elegans* データベース WormBase において、AVJ に加え腸でも発現が見られると記載されていたが、今回の解析で使用した *hlh-34* プロモーター領域は AVJ ニューロンでのみ発現を誘導すると報告され



ている (Cunningham et al., 2012)。さらに、*hlh-34p::dsRedm* を導入した系統の DsRedm の蛍光を観察した結果、AVJ ニューロン特異的に発現が見られ、腸での発現は見られなかった (図 26)。そのため、本研究で使用している *hlh-34* プロモーターは、AVJ 特異的に遺伝子発現するプロモーターであると考えられる。

## 2.8 *xdh-1* 変異の細胞特異的な回復解析

低温耐性において、XDH-1 が機能する細胞を同定するために、4 種類の長さの *xdh-1* プロモーターに *xdh-1 cDNA* と GFP を融合したプラスミドを作製し、それぞれを *xdh-1* 変異体に導入した系統を作製した (図 27)。これらの系統に関して、*xdh-1* 変異体を示す低温耐性異常が回復しているのか、また、長さの異なる *xdh-1* プロモーターによって発現誘導される細胞数に違いがあるのかを GFP 蛍光を指標に解析した (図 27)。低温耐性解析の結果、4 種類の *xdh-1* プロモーター (428 bp、952 bp、1,772 bp および 3,346 bp) で XDH-1::GFP を発現誘導したすべての遺伝子導入系統において、*xdh-1* 変異体を示す低温耐性異常の回復が観察された (図 27b)。GFP の蛍光量はプロモーターの長さが短縮するにつれてわずかに減少したが、発現細胞のパターンは全ての遺伝子導入系統において同様であった (図 27a)。以上のことから、XDH-1 の低温耐性における機能細胞での発現は、*xdh-1* 遺伝子上流わずか 428 bp のプロモーター領域で誘導されることが示唆された (図 27)。

低温耐性において、*xdh-1* 遺伝子がどの組織で機能することが必須であ

るかを同定するために、*xdh-1* 変異体の特定の組織において *xdh-1* 遺伝子を発現させ、組織特異的な回復実験をおこなった (図 28、表 1)。その結果、ほぼすべてのニューロンで XDH-1 の発現が誘導されると、*xdh-1* 変異体の低温耐性異常が回復した (図 28、表 1; *xdh-1; Ex[unc-14p::xdh-1 cDNA]*)。一方で、*xdh-1* 変異体の腸や浸透圧調節細胞 (Excretory cell) で *xdh-1* 遺伝子を発現させても、低温耐性の異常は回復しなかった (図 28、表 1)。*xdh-1* 遺伝子の低温耐性における機能ニューロンを同定するために、様々なニューロンでの発現を誘導するプロモーターによって *xdh-1* 遺伝子を *xdh-1* 変異体に発現させ、細胞特異的な回復実験をおこなった (図 29、30、表 2、3)。*xdh-1* 変異体において、XDH-1 を約 70 種のニューロンで発現誘導した系統 (Ex35) において、低温耐性異常の回復が見られた (図 29、表 2)。同様に約 30 種のニューロンで XDH-1 の発現を誘導した系統 Ex36 においても、*xdh-1* 変異体の低温耐性異常が回復した。Ex36 系統では、*eat-4* プロモーターと *unc-42* プロモーターを用いて *xdh-1* 遺伝子を発現していたため、次に、*eat-4* プロモーターと *unc-42* プロモーターの各々単独で *xdh-1* 遺伝子を発現させた系統として Ex38 と Ex39 を作製した。これら Ex38 と Ex39 系統の低温耐性の表現型を解析したところ、どちらの系統でも低温耐性異常の回復が観察された (図 29、表 2)。*eat-4* プロモーターと *unc-42* プロモーターが発現を誘導するニューロンのうち、2 種のプロモーターで重複して発現誘導されるのは ASH、AIN、AVJ の 3 種のニューロンのみであった。これらの 3 種のニューロンで XDH-1 の発現が誘導された系統 (Ex42 と Ex46) においても、*xdh-1* 変異体が示す低温耐性異常の回復が観察された (図 30、表 3)。しかし、ASH、AIN と AVJ の 3 種のニューロンのうち、ASH ニューロンでのみ XDH-1 を発現され

た系統 (Ex47) では *xdh-1* 変異体の異常は回復しなかった (図 30、表 3)。以上の結果から、AIN ニューロンと AVJ ニューロンで XDH-1 を発現させることで *xdh-1* 変異体の低温耐性異常が回復することが考えられたため、*inx-17* プロモーターおよび *hlh-34* プロモーターを同時に用いて *xdh-1* 遺伝子を AIN と AVJ で発現させると、予想通り *xdh-1* 変異体の低温耐性異常が回復した (図 30、表 3; Ex52)。さらに Cre/LoxP システムを用いて AIN と AVJ 特異的に XDH-1 の発現を誘導したところ、*xdh-1* 変異体の低温耐性異常の回復が観察された (図 31)。一方で、AIN または AVJ のいずれかのみで XDH-1 を発現させても、*xdh-1* 変異体が示す低温耐性異常を回復させることはできなかった (図 30、表 3; Ex53, 54)。

## 2.9 *xdh-1* 変異体における AIN と AVJ の $\text{Ca}^{2+}$ イメージング解析

XDH-1 が低温耐性において AIN と AVJ の 2 つの介在ニューロンで機能していることが示唆されたため、*xdh-1* 変異体において、AIN と AVJ ニューロンの機能が変化しているかを  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法を用いて測定した。 $\text{Ca}^{2+}$  インディケータとして、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度によって発する蛍光が変化するイエローカメレオン (YC3.60) を用いた。野生株と *xdh-1* 変異体の AIN または AVJ で YC3.60 を発現させた系統を作製し、その系統に温度刺激を与えた際の AIN と AVJ の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を測定した。その結果、野生株に  $10^{\circ}\text{C}$  から  $17^{\circ}\text{C}$  の温度刺激を与えると、AIN ニューロンにおける YC3.60 の蛍光輝度比が 8% 変化した (図 32)。それに対して、*xdh-1* 変異体では AIN の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が見られなくな

った (図 32)。AVJ ニューロンに関しては、10°Cから 17°Cの温度刺激を与えると、野生株では温度上昇刺激直後に 4%程度しか蛍光輝度比の変化が見られないのに対して、*x dh-1* 変異体では温度上昇刺激直後に約 10%の急激な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が観察された (図 33)。これらの *x dh-1* 変異体の AIN と AVJ ニューロンにおける異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化は、*x dh-1* 変異体の AIN と AVJ 特異的に *x dh-1* 遺伝子を発現させることによって回復した (図 32、33)。

## 2.10 低温耐性に関与するメカノ受容体 DEG-1

*x dh-1* 変異体の解析より、XDH-1 が AIN ニューロンと AVJ ニューロンの温度刺激に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に関与することが示唆された。しかしながら、AIN ニューロンと AVJ ニューロンはどちらも介在ニューロンであるため、AIN と AVJ 介在ニューロンの上流に感覚ニューロンが存在すると仮定すると、その感覚ニューロンが温度を受容し、AIN と AVJ 介在ニューロンに温度情報を送っている可能性が考えられる。AIN と AVJ ニューロンの上流に存在する感覚ニューロンを *C. elegans* ニューロンデータベース *C. elegans* Neural Network (<http://wormweb.org/neuralnet#c>) で検索したところ、9 対の感覚ニューロンがあり、そのうちの 5 対の感覚ニューロンにおいて機械刺激を受容するメカノ受容体の発現が見られた。そのため、一つの可能性として、メカノ受容体を発現している感覚ニューロンが低温耐性に関与することを予想し、様々な機械刺激情報伝達経路に関わる遺伝子の変異体を用いて解析をおこなったところ、メカノ受容体

や機械刺激情報伝達に関連する遺伝子の変異体である *mec-1*、*mec-2*、*mec-3*、*mec-4*、*mec-5*、*mec-7*、*mec-8*、*mec-14*、*mec-15*、*deg-1*、*let-2* と *pezo-1* 変異体において低温耐性の異常が観察された (図 34、35)。特に、*mec-8*、*mec-15* と *deg-1* 変異体で強い低温耐性異常が見られた (図 34、35)。*mec-8* は RNA 結合タンパク質、*mec-15* は F-ボックス/WD リピートドメイン、そして *deg-1* は DEG/ENaC タイプメカノ受容体をコードしている。DEG/ENaC タイプ以外のメカノ受容体では、*deg-1* 変異体ほどの顕著な異常は見られなかった (図 35)。本研究では、強い異常を示し、受容体として知られている DEG/ENaC タイプメカノ受容体である DEG-1 に関して詳細な解析をおこなった。

## 2.11 ASG 感覚ニューロンにおける DEG-1 を介した温度応答

*deg-1* 変異体において、*x dh-1* 変異体と同様に低温耐性異常が観察された。そこで、XDH-1 の機能細胞である AIN と AVJ の上流の感覚ニューロンのうち、*deg-1* 遺伝子を発現しているものを WormBase と *C. elegans* Neural Network から調べた。その結果、これらの条件を満たす感覚ニューロンは頭部に 1 対存在する ASG 感覚ニューロンであった。ASG は DEG-1 が発現していることがわかっている感覚ニューロンであり (Hall et al., 1997; Wang et al., 2008)、AIN 介在ニューロンの直接上流に位置し、AVJ 介在ニューロンとは他のニューロンを挟んで上流に位置していた。そこで、ASG ニューロンが温度を受容し、AIN と AVJ に温度情報を送っているという仮説を立てた。この仮説を検証するために *deg-1*

変異体を用いて、Ca<sup>2+</sup>イメージング法による温度刺激を与えた際の ASG ニューロンの細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を測定した。10°Cから 17°Cの温度刺激を与えられると、野生株の ASG では YC3.60 の蛍光輝度比が約 8%の変化を示すのに対して、*deg-1* 変異体では細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度変化は野生株の約半分であった (図 36)。さらに、この *deg-1* 変異体の ASG ニューロンの異常な温度応答は、*deg-1* 変異体の ASG 特異的に野生型の *deg-1* 遺伝子を発現させることによって回復した (図 36)。これらの現象は刺激温度域を広げて 13°Cから 27°Cの温度刺激を与えた際にも観察された (図 37)。また、DEG-1 が発現することが報告されている他の AVG や PVC 介在ニューロンに関しても、Ca<sup>2+</sup>イメージングによる温度応答解析をおこなったところ、温度刺激に対して応答を示したことから (図 38)、DEG-1 が様々なニューロンで発現し、そのニューロンの温度応答に関与する可能性が考えられる。

## 2.12 シナプス伝達欠損変異体における ASG ニューロンの温度応答

DEG-1 が、ASG の温度刺激に対する細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化に関与することが示唆されたが、一方で、ASG 感覚ニューロンが、他の感覚ニューロンで受容された温度情報を受け取り、温度刺激に反応している可能性も残されている。そのため、神経細胞同士のシナプス伝達に異常を持つ変異体を用いて、ASG の温度応答が正常であるかどうかを Ca<sup>2+</sup>イメージング解析によって測定した。用いた変異体は、プレシナプス細胞においてシナプス小胞とプレシナプス末端

の細胞膜とのドッキングに関わるシナプトブレビン (SNB-1) の変異体である。 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングの結果、*snb-1(md247)* 変異体の ASG は野生株と同程度の温度応答性を示した (図 36)。

### 2.13 *deg-1* 変異体における AIN と AVJ ニューロンの神経活動

DEG-1 が ASG ニューロンの温度応答に関与することが示唆され、さらに、ASG 感覚ニューロンは AIN 介在ニューロンの直接上流に位置し、AVJ 介在ニューロンとは他のニューロンを挟んで上流に位置していた。以上のことから、ASG 感覚ニューロンが DEG-1 を介して温度を受容し、AIN と AVJ に温度情報を伝達している可能性が考えられる。そのため、*deg-1* 変異体において、温度刺激を与えた際の AIN と AVJ 介在ニューロン内の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化が異常になることが考えられた。その可能性を検証するために、温度刺激を与えた際の *deg-1* 変異体における AIN と AVJ ニューロンの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化を  $\text{Ca}^{2+}$ イメージング法を用いて測定した。解析の結果、温度刺激を与えられた *deg-1* 変異体では、AIN ニューロンにおける蛍光輝度比の変化は約 0%であった (図 32)。一方で、*deg-1* 変異体の AVJ ニューロンは、温度上昇刺激直後に約 12%の急激な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇を示した (図 33)。これらの *deg-1* 変異体の AIN と AVJ の温度刺激に対する異常な反応は *x dh-1* 変異体の AIN と AVJ の温度応答異常と類似していた。さらに、*deg-1* 変異体の ASG 特異的に *deg-1* 遺伝子を発現させることによって、AIN と AVJ の異常な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化が回復した (図 32、33)。

*deg-1* 遺伝子と *x dh-1* 遺伝子の遺伝学的関係を解析するために、*x dh-1*; *deg-1* 二重変異体を作製し、低温耐性テストをおこなった。その結果、*x dh-1*; *deg-1* 二重変異体は 15°C 飼育後に 2°C で死滅する異常を示した。これはそれぞれの単独変異体が示す低温耐性異常と同等の異常であった (図 39)。

## 2.14 温度刺激下での DEG-1 の電気生理解析

DEG-1 が ASG ニューロンの温度応答に関与していることが示唆されたため、DEG-1 分子が温度応答機能を持つのかを調べるために、温度上昇を感知しない味覚ニューロン ASE に異所的に DEG-1 を発現させて、温度刺激条件下での ASE ニューロンの細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の変化を測定した。その結果、野生型の DEG-1 を異所的に発現させた ASE は、温度上昇刺激が加わると大きな細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の変化を示したが、DEG-1 が発現していない野生株の ASE は温度上昇刺激への反応を示さなかった (図 40)。

DEG-1 の温度に対する反応をより直接的に解析するために、電気生理解析をおこなおうとしたが、線虫での電気生理解析はほとんど確立されていない。そのため、アフリカツメガエルの卵母細胞に DEG-1 を発現させ、2 本差し電圧固定法による電気生理解析をおこなった。メカノ受容体 DEG-1 とそのヒトホモログである MDEG1 を卵母細胞に発現させるために、*deg-1 cDNA* および *MDEG1 cDNA* に対応する *cRNA* を卵母細胞に別々に注入した。それらの卵母細胞を用いて電気生理解析をおこなった結果、温度刺激によって *deg-1 cRNA* およ



び *MDEG1 cRNA* をそれぞれ導入した卵母細胞において内向き電流が誘導された (図 41、42)。一方、コントロールである、DEG-1 と MDEG1 を発現させていない卵母細胞では、そのような内向き電流は見られなかった (図 41a、42a; マゼンタ線)。また、DEG-1 を発現させた卵母細胞の温度刺激に対する反応は、DEG/ENaC タイプメカノ受容体の阻害剤として知られるアミロライドによって抑制された (図 43)。さらに、アレニウスプロットにデータを書き出すことで、DEG-1 と MDEG1 が発現した卵母細胞の温度刺激に対する反応の活性温度閾値を計算し、平均化したところ、DEG-1 は  $32.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$  (解析細胞数 = 8) に反応を示し (図 41c)、MDEG1 は  $31.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$  (解析細胞数 = 8) に反応を示した (図 42c)。

### 3. 考察

#### 3.1 低温耐性に関わる新規変異の同定

本研究では、飼育温度の上昇により発現量を変動させる遺伝子を多数同定し、それらの遺伝子のうち 15 個の変異体系統の低温耐性を測定し、その中から低温耐性異常を示す RB2575 系統を単離した (図 6)。RB2575 系統の示す低温耐性異常が別アレルの変異体では見られなかったことや (図 7)、野生型の *flp-17* 遺伝子を RB2575 系統に導入しても異常が回復しなかったことから (図 8)、RB2575 系統が示した低温耐性異常はバックグラウンドミュートーションが原因であると考えられた。次世代 DNA シーケンサーと snip-SNPs 解析を組み合わせた原因変異のマッピングから、低温耐性異常を引き起こす新規変異は、*xdh-1* 遺伝子上の *chr1* であることが示唆された (図 13、14)。次世代 DNA シーケンサーから得られたデータより、*chr1* 変異は *xdh-1* 遺伝子中の 2 箇所の塩基の置換変異であり、1 つ目の変異は第 1 エクソンの点変異で、これにより XDH-1 遺伝子産物の鉄・硫黄中心ドメインにアミノ酸の置換を引き起こす (図 13、16)。*chr1* 変異によって引き起こされる *xdh-1* 遺伝子中の 2 つ目の変異は、*xdh-1* 遺伝子の第 2 イントロンと第 3 エクソンのつなぎ目にあるスプライシングアクセプターサイトの点変異であり、この変異によって mRNA へのスプライシング反応が異常になると考えられる (図 13、16)。原因変異をマッピングする際に取得した組換え体系統 KHR066 や KHR069 は共に *chr1* 変異を持っており、どちらの系統も、キサンチンデヒドロゲナーゼ XDH-1 の活性に必須である NADH の生成

に関わる FAD ドメインが欠損している *xdh-1(ok3234)* 変異体と同等の低温耐性異常を示した (図 14)。これらのことから、*chr1* 変異は少なくとも XDH-1 の機能不全を引き起こす機能低下型変異であると考えられる。さらに、*xdh-1(chr1)* 変異体と *xdh-1(ok3234)* 変異体が示す低温耐性異常は、野生型の *xdh-1* 遺伝子を変異体に導入することで回復したことから、*xdh-1* 遺伝子が低温耐性に関わることが示唆された (図 12)。さらに、*xdh-1(ok3234)* 変異体は、わずか 1 時間の低温刺激で半数以上が死滅してしまうことから (図 19)、XDH-1 は低温に対する耐性において必須の分子であると考えられる。

### 3.2 XDH-1 の AIN と AVJ 介在ニューロンにおける低温耐性制御

蛍光タンパク質を用いた解析より、XDH-1 の発現細胞は AIN と AVJ 介在ニューロンを含む頭部のいくつかの神経と腸と浸透圧調節細胞であった (図 24、25)。さらに、*xdh-1* 変異体の組織特異的な回復実験と細胞特異的な回復実験より、XDH-1 は AIN ニューロンと AVJ ニューロンで機能することにより低温耐性を制御することが示唆された (図 29、30、31、表 2、3)。また、*xdh-1* が ASJ において低温耐性を負に制御している *tax-4* と遺伝学的に平行であることから (図 21)、低温耐性を正に制御する新規の神経回路の存在が考えられる。

Ca<sup>2+</sup>イメージング法を用いた解析より、温度刺激時の *xdh-1* 変異体では、AIN ニューロンの反応低下と AVJ ニューロンの過活性化が観察されたことから (図 32、33)、正常な低温耐性には AIN ニューロンの活性化と AVJ ニューロン

の抑制が必要であると考えられる。XDH-1 はプリン体代謝経路で機能し、尿酸産生に関わるため、*xdh-1* 変異体において細胞内の尿酸レベルが低下している可能性が考えられる。尿酸には抗酸化効果による神経保護作用があるとも報告されているが (Ya et al., 2018)、神経系における尿酸の機能については未知の点が多く、特に本研究のように特定の神経細胞の活性を真逆に制御する機構については未解明である。また、XDH-1 は尿酸産生の過程で ROS を産生することがわかっている (Moriya and Satoh, 2016; Xi et al., 2000)。一方で、尿酸は強力な抗酸化物質であるため (Boardman et al., 2019)、XDH-1 の欠損は抗酸化物質である尿酸の減少を通して ROS の蓄積を引き起こす可能性が考えられる。つまり、XDH-1 の機能不全は直接的な ROS の減少と間接的な ROS の増加を引き起こす可能性が考えられる。最終的に ROS の増加と減少のどちらが引き起こされるのかは、各細胞の内在性分子に左右されるのではないかと仮定している。過去の論文から、ROS の増加がニューロンの興奮を誘導する可能性があることが報告されている (Lee et al., 2017)。以上のことから、*xdh-1* 変異体では、XDH-1 の欠損と AIN と AVJ ニューロン内におけるそれぞれ異なる内在性分子経路によって、ROS レベルの異常な上昇か下降かが決定され、神経細胞活動の抑制もしくは過活性化が引き起されている可能性が考えられる。この可能性を検証するためには、セルソーターなどを用いて、*xdh-1* 変異体の AIN と AVJ ニューロンをそれぞれ単一細胞として単離し、ROS レベルを測定することが必要であると考えられる。しかし、単一細胞の ROS レベルを測定するために、線虫個体の特定の細胞のみを標的として、ROS レベル測定に耐えうる十分量の細胞数を獲得するためには多大な時間を要すると考えられる。

### 3.3 低温耐性を正に制御する新規の神経回路

Ca<sup>2+</sup>イメージング解析より、DEG/ENaC タイプメカノ受容体 DEG-1 が AIN と AVJ ニューロンの温度応答に関与することが示唆された (図 32、33)。DEG-1 が、ASG 感覚ニューロンの温度刺激に対する細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の変化にも関与すること (図 36、37)、そして、DEG-1 は AIN と AVJ ニューロンでは発現していないことから (Hall et al., 1997; Wang et al., 2008)、温度刺激時において、DEG-1 の ASG ニューロンにおける働きの結果として、AIN と AVJ ニューロンの活性が変化していると考えられる。*deg-1* 変異体の ASG 特異的に *deg-1* 遺伝子を発現させることで、*deg-1* 変異体の AIN の反応低下と AVJ の温度刺激直後の急激な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が回復したことから、この仮説は整合性があると考えられる (図 32、33)。一方で、10°C から 17°C の温度上昇刺激後に引き続き与えられる温度刺激に対して *deg-1; Ex[ASGp::*deg-1* cDNA]* の AVJ において、高濃度の細胞内 Ca<sup>2+</sup>が維持されていた (図 33)。これは、*deg-1* 変異体の ASG に導入した *deg-1* 遺伝子の発現量が野生株とは異なることや、ASG 以外のニューロンにおける DEG-1 の異常が影響を与えている可能性が考えられる。以上のことをまとめると、少なくとも ASG での DEG-1 の異常が、温度刺激時の AIN と AVJ の反応に影響を与えていると考えられる。また、遺伝学的な解析から、*deg-1* 遺伝子と *x dh-1* 遺伝子は遺伝学的に同一経路上で機能すると考えられることから (図 39)、一貫して ASG ニューロンが AIN と AVJ ニューロンの上流で機能していると考えられる。

### 3.4 DEG/ENaC タイプのメカノ受容体 DEG-1 を介した温度応答

低温耐性において ASG 感覚ニューロンにおける DEG-1 の機能が、温度刺激時の AIN と AVJ 介在ニューロンの反応に必須であることと (図 32、33)、ASG 感覚ニューロンはシナプス伝達が切断された状態でも温度刺激に応答することから (図 36)、ASG は温度受容ニューロンとして機能すると考えられる。さらに、DEG-1 の強制発現により、通常温度上昇刺激に対して反応を示さない ASE 味覚ニューロンに温度応答能を付与したことから (図 40)、低温耐性を正に制御する新規の神経回路において、DEG-1 が温度受容体として機能している可能性が考えられる。Ca<sup>2+</sup>イメージング解析は、Ca<sup>2+</sup>の濃度変化を可視化する解析であるため、Na<sup>+</sup>を通す DEG/ENaC タイプメカノ受容体である DEG-1 の反応を直接的に解析できたわけではない。しかし、Na<sup>+</sup>濃度の上昇は Ca<sup>2+</sup>の細胞質内への流入を誘発するため、DEG-1 を強制発現させた ASE 味覚ニューロンの温度上昇時の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇は、DEG-1 の温度応答の結果であると考えられる。

アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理解析から、通常卵母細胞は温度刺激に対して反応を示さないが (図 41a、42a; マゼンタ線)、DEG-1 とそのヒトホモログ MDEG1 を発現させた卵母細胞は 10°C から 35°C 付近までの温度上昇中に少しずつ Na<sup>+</sup>流入量が増加するアナログな反応を示し、30~32°C 付近 (活性温度閾値の平均値) で急激な電流値の変化を示した (図 41、42)。これらの DEG-1 を強制発現させた卵母細胞の反応は DEG/ENaC の阻害剤であるアミロライドで抑えられたことから (図 43)、温度刺激によって DEG-1 受容体が開口した結果によるものであると考えられる。これらの結果から、DEG-1 はアナ

ログな反応と、ある温度以上で急激に反応値が上昇する閾値反応の 2 つの側面を持ち合わせている可能性が考えられる。この仮説に基づくと、温度が徐々に上昇することで引き起こされる細胞膜の変化をメカノ受容体である DEG-1 が感知することでアナログな反応を示し、それと同時に、DEG-1 には TRP チャネルと同様に温度そのものを感知する機能があり、32°C 付近が平均活性化温度閾値である可能性が考えられる。つまり DEG-1 メカノ受容体は温度による膜の変化と温度そのものを感知している可能性がある。DEG-1 を線虫の ASE 味覚ニューロンで強制発現させて解析した際には、ASE ニューロンは温度上昇刺激に対して徐々に上昇するアナログな反応を見せ、活性化温度閾値は観察されなかった (図 40)。ASE ニューロンでの DEG-1 強制発現解析では、温度上昇刺激に対するニューロンの反応を  $\text{Ca}^{2+}$  インディケーター GCaMP8 を用いて計測した。DEG-1 は  $\text{Na}^+$  を通すチャネルであることから、この解析では DEG-1 の二次的な反応しか観察できておらず、DEG-1 が温度閾値を境に大きな反応を示していたとしても、波形に現れなかった可能性が考えられる。

DEG-1 を発現させた卵母細胞の 32°C 付近での反応は、*C. elegans* の生育温度が約 13~27°C であることと矛盾する。*C. elegans* の生育温度と卵母細胞における DEG-1 の反応温度との違いについて 3 つの原因を考えている、(1) *C. elegans* とアフリカツメガエル卵母細胞の膜脂質構成の違い、(2) 電気生理解析をおこなう際の特異的な細胞内もしくは細胞外の環境、そして、(3) DEG/ENaC が 1 つの遺伝子産物でチャネルを形成できる可能性が報告されているが、線虫体内で DEG-1 が他の遺伝子産物とともにヘテロチャネルを形成していると仮定すると、卵母細胞に DEG-1 しか導入しなかったことが原因となっている可能性が考

えられる。また、DEG-1 は、ASE 味覚ニューロンに強制発現させた際に、13°C から 27°C の温度上昇刺激に反応を示したことから、低温に反応する受容体ではなく通常飼育時の温度域に反応する受容体であると考えられる (図 40)。これは過去の研究から、*C. elegans* の低温耐性能が、15°C や 25°C などの飼育時の環境温度下において獲得されているという結果と矛盾しない (Ohta et al., 2014)。つまり、DEG-1 は低温耐性において、低温の受容に関わっているのではなく、飼育時の環境温度を受容する温度受容体として機能している可能性が高いと考えられる。



#### 4. 結語

本研究から、*C. elegans* のキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH-1) がわずか2つの介在ニューロン AIN と AVJ で機能することで、個体の低温耐性を正に制御していることがわかった。さらに、AIN と AVJ 介在ニューロンの上流では ASG 感覚ニューロンが温度を受容しており、その温度受容には DEG/ENaC タイプメカノ受容体 DEG-1 が関わることをアフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理解析などから示唆された。これまでに、*C. elegans* の低温耐性を負に制御する神経や、組織などは解析されてきたが、低温耐性を正に制御する機構はほとんど見つかっていなかった (Ohta et al., 2014; Okahata et al., 2019; Sonoda et al., 2016; Ujisawa et al., 2018)。また、その制御機構における温度受容体も見つかっていなかった。しかし、本研究から Degenerin/epithelial sodium channel (DEG/ENaC) タイプメカノ受容体 DEG-1 が ASG で温度受容に関与し、AIN と AVJ を通して低温耐性を正に制御するという新たな神経回路が存在することが示唆された (図 44)。

DEG/ENaC タイプメカノ受容体は、多くの生物において様々な刺激に反応することが報告されているが、DEG/ENaC が個体の低温耐性に関与することが示されるのは初めてのケースである。様々なメカノ受容体の変異体が低温耐性異常を示したことから、DEG-1 の他にも温度応答に関与する DEG/ENaC タイプメカノ受容体が存在すると考えられる。そのため、線虫の低温耐性を用いた実験系によって、TRP チャネルのように様々な温度域に対応する DEG/ENaC タイプメカノ受容体が見つかる可能性が期待される。また、DEG-1 は温度そのも

のを受容している可能性に加え、DEG-1 が機械刺激を受容するメカノ受容体であることから、温度変化による細胞膜の流動性の変化という物理刺激を受容している可能性もあり、これらのことを解析することにより、温度受容体が温度をどのように受容しているのかを解き明かす鍵となる可能性が考えられる。さらに、ヒトホモログ MDEG1 でも温度応答性が観察されていることから、線虫からヒトまで共通した温度応答の分子機構の解析に繋がる可能性が考えられ、将来的な薬理的解析から、ヒトの温度関連疾患への応用も期待される。

## 5. 材料・方法

*C. elegans* の飼育方法、培地やバッファの組成等は The Nematode *Caenorhabditis elegans* に従った (Wood and Researchers, 1988)。

### 使用した系統

野生株 N2 (Bristol 産)

KHR066/RB2575 *flp-17(ok3587)* *xdh-1(chr1)*, KHR067/RB2379 *xdh-1/F55B11.1(ok3234)*, VC883 *tag-273(gk371)*, FX07280 *tbc-9(tm7280)*, KHR069 *xdh-1(chr1)*, CB1066 *mec-1(e1066)*, CB75 *mec-2(e75)*, CB1338 *mec-3(e1338)*, CB1339 *mec-4(e1339)*, CB1340 *mec-5(e1340)*, CB1472 *mec-6(e1342)*, CB2477 *mec-7(e1343)*, CB398 *mec-8(e398)*, CB1515 *mec-10(e1515)*, CB3284 *mec-12(e1605)*, TU55 *mec-14(u55)*, TU75 *mec-15(u75)*, TU265 *mec-17(u265)*, TU228 *mec-18(u228)*, TU38 *deg-1(u38)*, NC279 *del-1(ok150)*, DH246 *let-2(b246)*, VC1812 *tab-1(gk858)*, MT1098 *unc-105(n506)*, VC2633 *degt-1(ok3307)*, FX010725 *pezo-1(tm10725)*, PT8 *pkd-2(sy606)*; *him-5(e1490)*, TQ296 *trp-4(sy695)*, CB49 *unc-8(e49)*, *xdh-1(ok3234)*; *deg-1(u38)*, RB791 *hsp-16.48(ok577)*, FX05192 *acox-3(tm5192)*, FX02994 *hrg-4(tm2994)*, WM159 *T23D8.7(tm1163)*, FX03455 *mak-1(tm3455)*, RB2207 *mak-1(ok2987)*, VC3059 *ZK6.11(ok3738)*, FX04022 *sms-3(tm4022)*, RB2549 *sms-3(ok3540)*, FX07132 *gad-3(tm7132)*, FX03007 *C52B11.5(tm3007)*, VC1290 *nhr-125(gk578)*, FX01987 *lipl-1(tm1987)*, FX06528 *cnnm-1(tm6528)*, MT15933 *flp-17(n4894)*, CB1370 *daf-2(e1370)*, FX00776 *sod-1(tm776)*, FX03294 *gst-4(tm3294)*, CB767 *bli-3(e767)*, TK22 *mev-1(kn1)*,

CX0010 *osm-9(ky10)*, FK127 *tax-4(p678)*, *tax-4(P678)*; *xdh-1(ok3234)*, *daf-2(e1370)*;  
*xdh-1(ok3234)*, N2; Ex [*xdh-1p::gfp*, pRF04], N2; Ex [*hlh-34p::dsRedm*, *xdh-1p(1,772*  
*bp)::xdh-1 cDNA::gfp*], N2; Ex [*xdh-1p::dsRedm*, *inx-17p::yc3.60::let-858UTR*], *xdh-*  
*1(chr1)*; Ex [*irg-6p::irg-6 genomic gene*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [pRF04],  
*xdh-1(chr1)*; Ex [*xdh-1p::xdh-1 genomic gene::gfp*, pRF04], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*xdh-*  
*1p::xdh-1 genomic gene::gfp*, pRF04], *xdh-1(ok3234)*; Ex [pAK62, pKDK66], *xdh-*  
*1(ok3234)*; Ex [*unc-14p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [p*gpg-*  
*12p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*ges-1p::xdh-1 cDNA*, pAK62,  
pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*xdh-1p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*;  
Ex [*dat-1p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*osm-6p::xdh-1 cDNA*,  
pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*osm-6p::xdh-1 cDNA*, *ncs-1p::xdh-1 cDNA*, *glr-*  
*1p::xdh-1 cDNA*, *unc-8p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*unc-*  
*47p::xdh-1 cDNA*, *acr-2p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*osm-*  
*6p::xdh-1 cDNA*, *ncs-1p::xdh-1 cDNA*, *glr-1p::xdh-1 cDNA*, *unc-8p::xdh-1 cDNA*, *unc-*  
*47p::xdh-1 cDNA*, *acr-2p::xdh-1 cDNA*, *eat-4p::xdh-1 cDNA*, *unc-42p::xdh-1 cDNA*,  
pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*eat-4p::xdh-1 cDNA*, *unc-42p::xdh-1 cDNA*,  
pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*unc-86p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-*  
*1(ok3234)*; Ex [*eat-4p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*unc-*  
*42p::xdh-1 cDNA*, pAK62, pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*ocr-4p::xdh-1 cDNA*, pAK62,  
pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*ceh-10p::xdh-1 cDNA*, *sra-6p::xdh-1 cDNA*, pAK62,  
pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*ocr-4p::xdh-1 cDNA*, *lim-4p::xdh-1 cDNA*, pAK62,  
pKDK66], *xdh-1(ok3234)*; Ex [*ser-2p::xdh-1 cDNA*, *ocr-4p::xdh-1 cDNA*, *lim-4p::xdh-1*

*cDNA, pAK62, pKDK66], xdh-1(ok3234); Ex[ceh-10p::xdh-1 cDNA, pAK62, pKDK66],*  
*xdh-1(ok3234); Ex[sra-6p::xdh-1 cDNA, pAK62, pKDK66], xdh-1(ok3234); Ex[glr-*  
*1p::xdh-1 cDNA, pAK62, pKDK66], xdh-1(ok3234); Ex[inx-17p::xdh-1 cDNA, hlh-*  
*34p::xdh-1 cDNA, pAK62, pKDK66], xdh-1(ok3234); Ex[inx-17p::xdh-1 cDNA, pAK62,*  
*pKDK66], xdh-1(ok3234); Ex[hhlh-34p::xdh-1 cDNA, pAK62, pKDK66], xdh-1(ok3234);*  
*Ex[hhlh-34p::xdh-1 cDNA, ges-1p::xdh-1 cDNA, pAK62, pKDK66], xdh-1(ok3234); Ex*  
*[ceh-10p::nCre, inx-17p::LoxP::xdh-1 cDNA::LoxP, hlh-34p::LoxP::xdh-1*  
*cDNA::LoxP], N2; Ex[hhlh-34p::yc3.60, pRF04], xdh-1(ok3234); Ex[hhlh-34p::yc3.60,*  
*pRF04], deg-1(u38); Ex[hhlh-34p::yc3.60, pRF04], N2; Ex[inx-17p::yc3.60::let-*  
*858UTR], xdh-1(ok3234); Ex[inx-17p::yc3.60::let-858UTR], deg-1(u38); Ex[inx-*  
*17p::yc3.60::let-858UTR], N2; Ex[gcy-21p::yc3.60], deg-1(u38); Ex[gcy-21p::yc3.60],*  
*deg-1(u38); Ex[gcy-21p::yc3.60, gcy-21p::deg-1 cDNA], N2; Ex[flp-6p::GCaMP8, gcy-*  
*5p::tag-rfp], N2; Ex[flp-6p::GCaMP8, gcy-5p::tag-rfp, gcy-5p::deg-1 cDNA], flp-*  
*17(ok3587) xdh-1(chr1); Ex[pAK62, pKDK66], flp-17(ok3587) xdh-1(chr1); Ex[flp-*  
*17p::flp-17 genomic gene, pAK62, pKDK66], N2; Ex[xdh-1p::gfp], N2; Ex[xdh-1p::gfp,*  
*pgp-12p::dsRedm], xdh-1(ok3234); Ex[pRF04], xdh-1(ok3234); Ex[xdh-1p(3,346*  
*bp)::xdh-1 cDNA::gfp, pRF04], xdh-1(ok3234); Ex[xdh-1p(1,772 bp)::xdh-1 cDNA::gfp,*  
*pRF04], xdh-1(ok3234); Ex[xdh-1p(952 bp)::xdh-1 cDNA::gfp, pRF04], xdh-1(ok3234);*  
*Ex[xdh-1p(428 bp)::xdh-1 cDNA::gfp, pRF04], N2; Ex[hhlh-34p::dsRedm, xdh-1p(1772*  
*bp)::xdh-1 cDNA::gfp], N2; Ex[nmr-1p::yc3.60, pRF04]*

## 大腸菌

OP50 株: 線虫の餌として NGM プレートに塗布した。

## 顕微鏡

透過式実体顕微鏡 SZX12 (Olympus Corporation, Japan)

蛍光実体顕微鏡 SMZ18 (Nikon Corporation, Japan)

IX81 顕微鏡 (Olympus Corporation, Japan)

共焦点顕微鏡 高感度ディテクター付き (FV1000, GaAsP PMT) (Olympus Corporation, Japan)

## NGM プレート (1000 ml)

NaCl 3 g、伊那寒天（伊那食品工業株式会社、日本）20 g、Bacto Peptone (Becton Dickinson, USA) 2.5 g、H<sub>2</sub>O 975 ml を三角フラスコなどの耐熱容器に入れて混合し、MADIA CLAVE10 (INTEGRA Biosciences, Switzerland) の内釜に入れ、20℃・121℃で加熱滅菌した。その後、60℃に保温してから、Cholesterol (5 mg/ml in EtOH) 1 ml、1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液 1 ml、1 M MgSO<sub>4</sub> 溶液 1 ml、1 M Potassium Phosphate (pH6.0) 溶液 25 ml を加えた。これを直径 6 cm のシャーレに 14 ml ずつ電動分注機 (FH-10SS; 株式会社ヒラカワ、日本) で分注して固めた。低温耐性テストには、これを直径 3.5 cm のシャーレに 6 ml ずつ分注し固めたものを使用した。

#### 化学走性テスト用プレート (1000 ml)

伊那寒天（伊那食品工業株式会社、日本）20 g、H<sub>2</sub>O 1000 ml を MADIA CLAVE10（INTEGRA Biosciences, Switzerland）の内釜に入れ、20℃・121℃で加熱滅菌した。その後、攪拌しながら約 50℃に冷ましてから 1 M CaCl<sub>2</sub> 溶液 1 ml、1 M MgSO<sub>4</sub> 溶液 1 ml、1 M Potassium Phosphate (pH6.0) 溶液 25 ml を加えた。これを直径 9 cm のシャーレに 12 ml ずつ電動分注機 (FH-10SS; 株式会社ヒラカワ、日本) で分注して固めた。

#### アンピシリン入り LB プレート

H<sub>2</sub>O 500 ml、LB Broth Lennox (Becton Dickinson, USA) 10 g、伊那寒天（伊那食品工業株式会社、日本）10 g を三角フラスコなどの耐熱容器に入れて混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。その後攪拌しながら約 50℃に冷ましてからアンピシリン (100 mg/ml) 1000 µl を加えた。これを直径 9 cm のシャーレに 12 ml ずつ分注して固めた。

#### LB 液体培地 (200 ml)

H<sub>2</sub>O 200 ml、LB Broth Lennox (Becton Dickinson, USA) 4 g を混合し、オートクレーブで加熱滅菌した。

#### M9 バッファー (1000 ml)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g、NaCl 5 g、H<sub>2</sub>O 1000 ml を混合し、オートクレーブで加熱滅菌した後に 1 M MgSO<sub>4</sub> 溶液 1 ml 加えた。

#### 発現細胞観察用アガロースゲルパッド

M9 バッファー 5  $\mu$ l、Agarose 1200 (PH Japan, Japan) 0.1 g を 15 ml ファルコンチューブに入れ混合し、7~8 分目まで H<sub>2</sub>O の入った 100 ml ビーカーに入れ温めた。Agarose が溶解したら、パスツールピペットでスライドガラスに滴下し、上からさらにスライドガラスをかぶせた。

#### *in vivo* Ca<sup>2+</sup>イメージング用アガロースゲルパッド

M9 バッファー 5  $\mu$ l、Agarose 1200 (PH Japan, Japan) 0.1 g を 15 ml ファルコンチューブに入れ混合し、7~8 分目まで H<sub>2</sub>O の入った 100 ml ビーカーに入れ温めた。Agarose が溶解したら、パスツールピペットで 24 × 24 カバーガラスに滴下し、上からさらに 24 × 24 カバーガラスをかぶせた。

#### インジェクション用アガロースゲルパッド

Agarose 1200 (PH Japan, Japan) 0.05 g、イオン交換水 2.4 ml を 15 ml ファルコンチューブに入れ混合し、7~8 分目まで H<sub>2</sub>O の入った 100 ml ビーカーに入れ温めた。Agarose が溶解したら、パスツールピペットでカバーガラスに滴下し、上からさらにカバーガラスをかぶせた。Agarose がカバーガラスの重みで押し広げられたところでカバーガラスを一枚外し、60°C で 1 時間乾熱滅菌をした。

#### 酸化測定用蛍光試薬 H<sub>2</sub>DCF-DA

H<sub>2</sub>DCF-DA (0.2 mol) (Thermo Fisher Scientific, USA) 100 mg を無水 DMSO (Molecular Probes, USA) 2 ml に溶かし、10  $\mu$ l ずつ 200  $\mu$ l チューブに分注し -20°C



に保存した。これをストック溶液とし、測定の際にはストック溶液を 50  $\mu\text{M}$  になるように無水 DMSO で希釈して添加した。

#### C. elegans の凍結保存に用いた Freezing Solution (2000 ml)

NaCl 10.85 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9.8 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g、Glycerol 300 g、1 M NaOH 溶液 5.6 ml をメジウム瓶に加えた後に  $\text{H}_2\text{O}$  で 2000 ml までメスアップした。これをオートクレーブで加熱滅菌した後に 1 M  $\text{MgSO}_4$  溶液 1.3 ml を加えた。

#### 低温耐性テスト

1 アッセイにつき NGM プレート (3.5 cm) を 4 枚用いた。野生型の *C. elegans* を、1 または 2 個体ずつ OP50 が塗布された新しい 2% (w/v) NGM プレートに植え継ぎ (変異体によっては 2~4 匹)、 $P_0$  とした。 $P_0$  を 15°C で 16~24 時間飼育し産卵させた。飼育後、発生段階を揃える為に  $P_0$  を取り除き、卵 ( $F_1$ ) が成虫期になるまで 15°C で 144~150 時間飼育した。プレート中の  $F_1$  70~150 個体が成虫期まで成長した後、NGM プレートの寒天側を下に向けた状態で 20 分間氷上に置いた。その後 2°C のインキュベーター (CRB-41A; Hitachi, Japan) に 1~96 時間静置し低温刺激を与えた。低温刺激後、室温に取り出し数時間静置もしくは 15°C に移し一晩静置した。その後、生存個体と死滅個体を数え、各プレートの生存率と、アッセイをおこなったプレートの生存率から平均生存率、標準偏差、標準誤差を算出した (Ujisawa et al., 2014)。

### 共焦点顕微鏡解析を用いた蛍光の観察

スライドガラス上に作製した 2% (w/v) のアガロースゲルパッドに 100 mM アジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ ) 溶液を 10  $\mu\text{l}$  滴下した。その上に 5~6 匹の線虫を置き、カバーガラスをかけた。このプレパラートを共焦点顕微鏡 (FV1000, GaAsP PMT) で観察し、FV10-ASW software (Olympus Corporation, Japan) で解析した。

### マイクロインジェクションによる遺伝子導入

線虫の遺伝子導入系統作製はこれまでに報告されてきた方法をもとにおこなった (Mello et al., 1991)。アガロースゲルパッドにミネラルオイルを落とし、その中に餌のないプレートからピックした線虫を置いた。線虫の置かれたアガロースゲルパッドを顕微鏡に置き、線虫の生殖巣に針を刺し、目的の染色体外遺伝子それぞれ 5~100 ng/ $\mu\text{l}$  と、マーカー遺伝子として pKDK66 *ges-1p::nls::gfp* を 50 ng/ $\mu\text{l}$  と pAK62 *AIYp::gfp* を 30 ng/ $\mu\text{l}$ 、または pRF4 *rol-6gf* を 50 ng/ $\mu\text{l}$  を導入した。遺伝子導入できたものは、GFP の蛍光や回転する動きが観察される。F<sub>1</sub> でマーカーを指標に 1 個体ずつ新しい NGM プレートに移し、20°C で飼育した。自家受精により次世代を産ませ、F<sub>2</sub> にもマーカーが確認できたところで、これを遺伝子導入系統として解析に用いた。

### ヒートショックによるオスの取得

野生株 N2 の L4 (P<sub>0</sub>) を 1 プレートに 30~40 匹のせて 30°C の高温刺激を 8 時間与えた。翌日、ヤングアダルト期になった P<sub>0</sub> を 3 匹ずつ新しい NGM プレートに置き、20°C に 2 日間静置した。2 日後、プレートからオス (F<sub>1</sub>) を見つけ出し

4匹ずつメイトングプレート（培地の中心部分だけに大腸菌 OP50 をのせたもの）に移し、そこに雌雄同体の野生株 N2 を 5 匹のせ一晚交配させた。交配が成功すると F<sub>2</sub> に 50% の確率でオスが発生する。

表現型を指標とした戻し交配（例: RB2575 *x dh-1(chr1) flp-17(ok3587)*）

変異体 RB2575 *x dh-1(chr1) flp-17(ok3587)* (P<sub>0</sub>) と野生株 N2; *ExUDA17[pAK62 AIYp::gfp, pKDK66 ges-1p::nls::gfp]* (P<sub>0</sub>) のオスとを交配させると、低温耐性に異常を引き起こす変異 *chr1* がヘテロとなり蛍光を発する個体が生まれた (F<sub>1</sub>)。雌雄同体 F<sub>1</sub> を自家受精させると、*chr1* 変異のホモ、ヘテロもしくは N2 型の線虫が発生した (F<sub>2</sub>)。F<sub>2</sub> を 1 匹ずつ新しい NGM プレートに移し、増殖させ F<sub>3</sub>~F<sub>6</sub> について低温耐性テストをおこなった。遺伝学的には、1/4 の確率で *chr1* 型ホモの系統が現れる。つまり、1/4 の確率で低温耐性が異常な系統が発生する。低温耐性の異常を示した系統を単離し、さらに戻し交配をおこなうことで低温耐性に関係のないバックグラウンドミュレーションを取り除いた。

遺伝子変異を指標とした戻し交配（例: *x dh-1(ok3234)*）

変異体 *x dh-1(ok3234)* (P<sub>0</sub>) と野生株 N2; *ExUDA17[pAK62 AIYp::gfp, pKDK66 ges-1p::nls::gfp]* (P<sub>0</sub>) のオスとを交配させ、*ok3234* 変異がヘテロとなり蛍光を発する個体を得た (F<sub>1</sub>)。F<sub>1</sub> の雌雄同体を自家受精させると *ok3234* 変異のホモ、ヘテロもしくは N2 型の線虫が発生した (F<sub>2</sub>)。F<sub>2</sub> を 1 匹ずつ新しい NGM プレートに移し、一晚卵を産ませた。翌日 F<sub>2</sub> から線虫 1 個体由来のゲノムを採取した。そのゲノムを用いて PCR をおこない、*ok3234* 変異のホモ、ヘテロもしくは N2 型

を判別し、*ok3234* 変異のホモ型の系統を用いてもう一度戻し交配をおこない、*ok3234* 変異以外のバックグラウンドミューテーションを取り除いた。

#### snip-SNPs 解析 (例: RB2575 *xdh-1(chr1) flp-17(ok3587)*)

RB2575 *xdh-1(chr1) flp-17(ok3587)* 変異体において低温耐性異常が確認されたが、ゲノム中のバックグラウンドミューテーションが異常を引き起こしていると考えられた。そのため RB2575 *xdh-1(chr1) flp-17(ok3587)* 変異体の全ゲノム配列を次世代 DNA シークエンサーによって解読し、その情報を元に snip-SNPs 解析をおこなった。まずは 1~5 番と X 染色体それぞれの中心部位と両端部位の SNP を用いて、ラフマッピングをおこなった。

##### • snip-SNPs 法の原理

線虫 *C. elegans* では、野生型 N2 株と野生型 CB4856 株の間の一塩基多型 (SNP) をゲノム上のマップポジションのマーカーとして用い、マッピングをおこなう方法 (snip-SNPs 法) が確立されている (Wicks et al., 2001)。この snip-SNPs 法を利用して本研究では、まず、RB2575 *xdh-1(chr1) flp-17(ok3587)* 株 (P<sub>0</sub>) を野生株 N2 (P<sub>0</sub>) を用いて戻し交配をおこない、正常な低温耐性を示す系統 (F<sub>2</sub> 以降) と RB2575 型の異常な低温耐性を示す系統 (F<sub>2</sub> 以降) とを得た。それぞれの系統からゲノムを採取し、各染色体の中心部位と両端部位の SNP 型が野生株 N2 由来であるか RB2575 型由来であるかを判別した。具体的には、各系統から精製したゲノム DNA を鋳型として、PCR によって SNP を含むゲノム断片を増幅し、SNP を含む配列を認識する制限酵素で処理した。その際、野生株 N2 型と RB2575 型とで異なるバンドパターンがあらわれるようにプライマー及び、制限酵素を設

計した。以上のような方法で、組み換え体の集団のゲノムから、PCR 及び制限酵素処理という簡便な操作によって、染色体のどこに RB2575 *x dh-1(chr1) flp-17(ok3587)* 型由来の SNP を含むのか判別することができた。

#### 多重変異体作製 (例: *daf-2(e1370); x dh-1(ok3234)*)

変異体 *daf-2(e1370)* (P<sub>0</sub>) と *x dh-1(ok3234); ExUDA17[pAK62 A1Yp::gfp, pKDK66 ges-1p::nls::gfp]* (P<sub>0</sub>) のオスとを交配させると、*e1370* 変異と *ok3234* 変異がヘテロとなり蛍光を発する個体が生まれた (F<sub>1</sub>)。F<sub>1</sub> の雌雄同体を自家受精させると、*e1370/+; +/+*, *e1370/+; ok3234/ok3234*, *e1370/+; ok3234/+*, *+/+; +/+*, *+/+; ok3234/ok3234*, *+/+; ok3234/+*, *e1370/e1370; +/+*, *e1370/ e1370; ok3234/ ok3234*, *e1370/e1370; ok3234/+* 型の虫が発生した (F<sub>2</sub>)。F<sub>2</sub> を 1 匹ずつ新しい NGM プレートに移し、一晚卵を産ませた。翌日 F<sub>2</sub> から線虫 1 個体由来のゲノムを採取して、そのゲノムを用いて PCR と制限酵素処理 (変異検出) をおこない、遺伝子型を判別した。遺伝学的には、1/16 の確率で *e1370/e1370; ok3234/ok3234* 型の系統が現れる。両方の変異がホモ型の系統が取得できたら、次世代 (F<sub>3</sub>) を 5~6 匹からゲノムを採り、再度 PCR と制限酵素処理で遺伝子型を判別し系統の完成とした。その他の多重変異体も同様に作製した。

#### 個体レベルでの ROS レベルの測定

コントロールには ROS レベルが低下している変異体である *daf-2(e1370)* を用いた。成虫期の線虫を 2 匹ずつ植え継ぎし (野生株 N2 6 枚、*x dh-1(ok3234)* 6 枚、*daf-2(e1370)* 8 枚) 15°C で 16 時間飼育した (P<sub>0</sub>)。翌日、世代を揃えるために P<sub>0</sub>

を取り除き F<sub>1</sub> が成虫になるまで 15°C で 5 日間飼育し、5 日後に匹数を数えた。各系統 250±5 匹になるように調節し、M9 で回収し、3 回洗浄して大腸菌を取り除いた。洗浄後 M9 を取り除き PBST 400 µl を添加し、PBST で共洗いしたガラスホモジェナイザーに移して線虫の身体が確認できなくなるまで粉碎した。この際ゴム手袋を着用し、氷上で作業した。粉碎後 4°C、10,000 × g、15 分遠心した。上清を 1.5 ml チューブに移し、全体量を 100 µl として、原液、2 倍希釈、4 倍希釈、8 倍希釈のグラデーションで希釈し 8 連チューブに移した。またコントロールとして PBST のみの溶液も用意した。希釈後の溶液それぞれに 100 mM H<sub>2</sub>DCF-DA ストック溶液を 50 µM になるように 0.5 µl ずつ添加し、フタを閉めて CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, USA) で蛍光を 1 時間 10 分ごとに計測した (励起光 485 nm 蛍光 535 nm)。

#### 低温耐性変異体の表現型回復実験

低温耐性に異常を示した変異体に野生株のゲノムから増幅した遺伝子、またはプラスミドとマーカー遺伝子が導入された遺伝子導入システムを作製した。作製したシステムを用いて低温耐性の表現型が野生株と同程度まで回復しているか低温耐性テストによって解析した。テストの際には遺伝子導入システムのみ低温刺激の前日にマーカー遺伝子の GFP 蛍光を有している個体だけ 30 匹以上×3 プレート拾い、翌日低温刺激を与えた。

#### DNA 断片のライゲーション (エレクトロポレーション用)

同じ制限酵素で処理をしたベクターDNA とインサート DNA を 1 対 3 のモル比で混ぜ合わせ、2.5  $\mu$ l まで dH<sub>2</sub>O でメスアップした。そこに Electro Ligase Reaction バッファー (New England Biolabs, Japan) 2.5  $\mu$ l と Electro Ligase (New England Biolabs, Japan) 0.5  $\mu$ l を加えピペッティングで混合し、室温 25°C で 30~60 分間静置した。最後に Electro Ligase を失活させるために 65°C で 15 分間温めた。

#### DNA 断片のライゲーション (ヒートショック用)

同じ制限酵素で処理をしたベクターDNA とインサート DNA を 1 対 3 のモル比で混ぜ合わせ、ベクターDNA とインサート DNA の合計量と等量になるように Ligation high Ver. 2 (東洋紡、日本) を入れた。混合液をピペッティングし、15°C インキュベーターで 60 分間~一晩静置し、ライゲーション反応させた。

#### エレクトロポレーションによるプラスミド DNA の大腸菌への形質転換

-80°C に保管してあるコンピテントセル DH10 $\beta$  (エレクトロポレーション用) を氷上で 20 分間静置して溶かした。この際キュベットを冷やしておいた。溶けたコンピテントセル 20  $\mu$ l にプラスミド DNA を 1~2  $\mu$ l 入れタッピングで軽く混ぜ、キュベットの隙間に泡立たないように注意しながら入れた。MicroPulser (Bio-Rad, USA) のレバーにキュベットを挿入し、Setting を Bacteria に設定し、Pulse と書かれたボタンを機械音が鳴るまで押した。その後、180  $\mu$ l の LB 液体培地をキュベットに入れて LB 液体培地ごとコンピテントセルを回収し、50  $\mu$ l~全量をアンピシリン入り LB プレートにまいて 37°C で一晩培養した。

### ヒートショックによるプラスミド DNA の大腸菌への形質転換

-80°Cに保管してあるコンピテントセル DH10 $\beta$  (ヒートショック用) を氷上で 20 分間静置して溶かした。溶けたコンピテントセル 20  $\mu$ l にプラスミド DNA を 1 ~2  $\mu$ l 入れタッピングで軽く混ぜ、42°C・45 秒ヒートショックを与えた。ヒートショック後の溶液を氷上に 2 分間静置した後、50  $\mu$ l~全量をアンピシリン入り LB プレートにまいて 37°Cで一晩培養した。

### In-Fusion

制限酵素処理もしくは PCR によって線状にしたベクターDNA の末端配列に相同な 15 塩基を、インサート DNA 増幅用プライマーの 5'末端に付加し、目的遺伝子を PCR で増幅した。全量 10  $\mu$ l とし、インサート DNA (PCR 産物) 10 ng/ $\mu$ l となるよう適量、5  $\times$  In-Fusion HD Enzyme Premix (Takara Bio, Japan) 2  $\mu$ l、線状化ベクターDNA 5 ng/ $\mu$ l となるよう適量を混合し、dH<sub>2</sub>O で 10  $\mu$ l になるようにメスアップした。混合液を 50°C・15 分で In-Fusion 反応させた。

### 次世代 DNA シーケンス用ゲノム DNA の採取

成虫期の線虫を 3 匹ずつ 6 cm プレートに 20 枚に置き、十分に個体数が増えるのを待った (15°C・8 日、20°C・5 日)。氷上で dH<sub>2</sub>O 800  $\mu$ l で線虫を 15 ml ファルコンに回収し、dH<sub>2</sub>O 4 ml で 3 回洗浄した。2,000 rpm・3 分・4°C遠心した後、氷上で 30 秒程静置して線虫を沈め、上清を取り除いた。dH<sub>2</sub>O 1 ml 加え懸濁し、1.5 ml チューブに溶液を回収し、13,000~16,000 rpm・3 分・4°Cで遠心した。遠心後、氷上に 30 秒静置し、再び上清を取り除いた。細胞膜を破壊するため Cell



Lysis Solution 600  $\mu$ l 加え、1.5 ml チューブを反転させて混合した。次に DNAase を破壊するため 20 mg/ml Puregene Protein K 3  $\mu$ l を添加し、チューブを 25 回反転させて混合した。Puregene Protein K がチューブ内に分散したら線虫が完全に溶解するまで 3 時間から一晩 55°C でインキュベートした。一晩置いても線虫が完全に溶解していない場合、Cell Lysis Solution を 600  $\mu$ l~1,200  $\mu$ l 追加し、さらに 1~2 時間 55°C でインキュベートし溶解させ、その後の処理液は増やした Cell Lysis Solution の倍率と等倍にした。線虫の溶解を確認したら、RNase A Solution 3  $\mu$ l 加え、チューブを 25 回反転させて混合し、15 分~1 時間 37°C でインキュベートした。インキュベート後、氷上に 1 分静置し、Protein Precipitation Solution 200  $\mu$ l 添加し、20 秒間ハイスピードでボルテックスした。13,000~16,000 rpm  $\cdot$  3 分  $\cdot$  4°C で遠心し、タンパク質を沈殿させて上清を新しいチューブに回収した。新しいチューブにイソプロパノール 600  $\mu$ l を加え、そこに先ほど採った上清を加え、50 回程緩やかに混合した。13,000~16,000 rpm  $\cdot$  1 分  $\cdot$  4°C で遠心すると DNA の白い沈殿が見られるため、吸わないように注意し上清を捨てた。10~15 分室温で沈殿を乾燥させ、沈殿が完全に乾燥したところで DNA Hydration Solution 100  $\mu$ l で懸濁し、65°C で 1 時間インキュベートした。DNA Hydration Solution に DNA が溶解したら、Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA) によって濃度と吸光度 260/280 を計測した。吸光度 260/280 が 1.8~2.0 に収まるよう調節し、100 ng/ $\mu$ l DNA 溶液 100  $\mu$ l を次世代 DNA シーケンス解析に用いた。

### 化学走性テスト (図 22a)

揮発性匂い物質に対する化学走性実験は過去の論文を参考におこなった (Bargmann et al., 1993)。線虫を 3 匹を 6 cm NGM プレートに置き、20°C で卵を産ませた後 P<sub>0</sub> を取り除き、20°C の餌を十分に与えた条件で F<sub>1</sub> を飼育して得られた成虫個体 (150~300 匹) をテストに使用した。成虫個体を M9 バッファー 1 ml で試験管に回収し、線虫が試験管の底に十分沈んだ後、上清を除いた。大腸菌を取り除くため M9 バッファーで 2 回洗浄し、化学走性テスト用プレートの中央線上に線虫を 3 点に分けてスポットした。スポット後、キムワイプの先端を細く丸め水分がなくなるまで吸いとった。化学走性テスト用プレートの端には 1 M NaN<sub>3</sub> 溶液 1 µl と揮発性匂い物質であるジアセチル 4 µl またはベンズアルデヒド 4 µl を滴下し、対角線上反対にはコントロールとして 1 M NaN<sub>3</sub> 溶液 1 µl とエタノール 4 µl を滴下した。60 分間静置して線虫を自由に行動させた後、クロロホルムを使い線虫を死滅させ、4°C で一晩インキュベートし、翌日匹数を数えた。匂い物質に誘引された個体数からコントロールの誘因数を減算し、全体数で割ったものを走性指数とした。全体数を数える際、はじめにスポットした位置から動いていない線虫は含まないように数えた。

### *in vivo* Ca<sup>2+</sup>イメージング

これまでの方法を参考におこなった (Kuhara et al., 2011; Ohnishi et al., 2011)。2% (w/v) アガロースゲルパッドに解析する系統を 1~数匹置き、医療用アロンアルファ A (第一三共株式会社、日本) で固定し、M9 バッファーに浸して丸型カバーガラスをかぶせた。カバーガラスの縁をマニキュアで封をして蒸発を防ぎ、イ

メージング解析する。この操作を3分以内におこなった。サンプルをIX81顕微鏡 (Olympus Corporation, Japan) に装備されている、カスタメイドITOガラスプレート (Tokai Hit, Japan) の上に置いた。ガラスプレート上の温度はカスタメイド温度制御装置 (Tokai Hit, Japan) によって制御・記録した。W-View gemini (Hamamatsu photonics, Japan) を用いて蛍光を観察した。蛍光画像はEM-CCDカメラ Evolve 512 (Photometrics, USA) を用いて、EM ゲイン 10~300、露光時間 10~300 ms、1 × 1 ビニングで1秒ごとに300秒間撮影した。それぞれの画像の蛍光強度はMetaMorph Image Analysis Software (Molecular Devices, USA) により解析した。細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度の相対変化はイエローカメレオン (YC3.60) の acceptor/donor (黄色蛍光値 / 藍色蛍光値) もしくは GCaMP8 と tag-RFP (pKOB006 *gcy-5p::tag-rfp* (Kobayashi et al., 2016)) の acceptor/donor (緑色蛍光値 / 赤色蛍光値) 蛍光の比で計算した。イエローカメレオンは、N末にCFP、C末にYFPをもち、中央にCa<sup>2+</sup>結合サイトをもつキメラタンパクである。イエローカメレオンは、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が低いときには、440 nmの励起光を照射すると藍色の蛍光を発する。ところが、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇すると、CFPとYFP間の距離が数nmほどに近づく。この際に、440 nmの励起光をあてると、FRETと呼ばれるエネルギー移動が起こり、黄色の蛍光を発するようになる。この黄色と藍色の蛍光の比を取ることで細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化を定量化した。GCaMP8はEGFPのN末にカルモジュリン、C末にミオシン軽鎖M13フラグメントをもつキメラタンパクである。Ca<sup>2+</sup>がカルモジュリンと結合すると複合体を形成する。この複合体はM13フラグメントと相互作用し、EGFPの立体構造を変化させ、EGFPの蛍光強度が増強される。この特性を利用することによって、Ca<sup>2+</sup>量を蛍

光強度の変化として検出することができる。本研究では、蛍光強度が変化することがない tag-RFP と GCaMP8 を共発現させ、GCaMP8 の緑色と tag-RFP の赤色の蛍光の比を取ることで細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化をより正確に定量化した。

#### アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた 2 本差し電圧固定法

*deg-1 cRNA* と *MDEG1 cRNA* をアフリカツメガエルの卵母細胞 (*Xenopus oocyte*) に各々インジェクションし、電気生理解析をおこなう前に 3~6 日間 18°C で培養した。卵母細胞の膜電位を -80 mV に保持し、100 mM NaCl 溶液、2 mM  $\text{MgCl}_2$  溶液、10 mM HEPES (pH7.3) 溶液で作製されたバスソリューション中で Oocyte Clamp (OC-725C; Warner Instruments, USA) 及び pClamp software (Molecular Devices, USA) を使用した 2 本差し電圧固定法を用いて電流を記録した。温度刺激は lab-made temperature controller を用いて 10~35°C まで調節し、卵母細胞に隣接する温度プローブと温度計 (DIGITAL THERMOMETER PTC-401; UNIQUE MEDICAL, Japan) の両方によって記録した。アレニウスプロットは、x 軸上に温度の逆数 (1,000/K)、y 軸上に温度刺激によって誘導された電流値の対数 (log) をとって示した。温度閾値はプロットされた 2 つの領域にひいた接線 (マゼンタ線) の交点から計算し、平均化した。ネガティブコントロール実験として、DEG/ENaC の阻害剤であるアミロライドを使用した。具体的には、電気生理解析前に卵母細胞を 500  $\mu\text{M}$  のアミロライド溶液 (Sigma-Aldrich, USA) を含む溶液中で 18°C・48 時間インキュベートした。

## 統計解析

全ての図に表記されている標準誤差は standard error of the mean (SEM) を表している。すべての統計解析は正規分布を仮定し、パラメトリック検定である Tukey-Kramer 法、Dunnett 検定、または分散が等しくないと仮定した 2 標本による t 検定 (Welch) を用いて解析した。多重比較は Tukey-Kramer 法と Dunnett 検定を用いた。Dunnett 検定はグラフ上の一番左のグループを他のグループと比較するためにおこなった。2 標本の比較は t 検定 (Welch) を使用した。図中の (\*) と (\*\*) はそれぞれ  $p < 0.05$  と  $p < 0.01$  を意味する (Okahata et al., 2019)。t 検定 (Welch) にはデータ分析ツール (Excel アドイン) を用いた。Tukey-Kramer 法と Dunnett 検定にはマック統計解析 ver. 2 (株式会社エスミ、日本) を用いた。

## 分子生物学手法を用いたプラスミドの作製

pNTN020 *xdh-1p::xdh-1 genomic gene::gfp* は野生株 N2 ゲノムより PCR で増幅された *xdh-1* 遺伝子全長とその上流 3,346 bp の *xdh-1* プロモーターを含んでおり、*xdh-1* 遺伝子のストップコドンを取り除いた領域に GFP を挿入した。*xdh-1* 遺伝子全長は非常に長い断片であったため、増幅は 3 断片に分けておこなった。

pNTN026 *xdh-1p::gfp* は野生株 N2 ゲノムより PCR で増幅された 3,346 bp の *xdh-1* プロモーターと *xdh-1* 遺伝子の 3'UTR を含んでおり、*xdh-1* プロモーターと *xdh-1* 遺伝子の 3'UTR の間に GFP を挿入した。pNTN032 *pgp-12p::dsRedm* は *pgp-12* 遺伝子上流 3,500 bp の *pgp-12* プロモーター (参考: (Zhao et al., 2005)) と DsRedm を含む。pNTN058 *xdh-1p (3,346 bp)::xdh-1 cDNA::gfp* は野生株 N2 ゲノムより PCR で増幅された 3,346 bp の *xdh-1* プロモーターと cDNA ライブラリーよ

り作製された *xdh-1 cDNA* を含んでおり、*xdh-1 cDNA* のストップコドンを取り除いた領域に GFP を挿入した。pNTN118 *xdh-1p::dsRedm* は *xdh-1* プロモーターと DsRedm を含んでいる。pNTN027 は線虫コザック配列、*xdh-1 cDNA*、*unc-54* 遺伝子の 3'UTR を含んでおり、pNTN027 の線虫コザック配列と *xdh-1 cDNA* の上流に以下の様々な遺伝子のプロモーター領域を挿入し、複数のプラスミドを作製した。pNTN027 の *xdh-1 cDNA* 上流に *unc-14p* (1.4 kb)、*pgp-12p* (3.5 kb)、*ges-1p* (3.3 kb)、*xdh-1p* (3.4 kb)、*dat-1p* (0.7 kb)、*osm-6p* (2 kb)、*ncs-1p* (3.1 kb)、*glr-1p* (5.4 kb)、*unc-8p* (4.2 kb)、*unc-47p* (0.3 kb)、*acr-2p* (3.4 kb)、*eat-4p* (6.4 kb)、*unc-42p* (3 kb)、*unc-86p* (3.6 kb)、*ocr-4p* (4.8 kb)、*ceh-10p* (3.5 kb)、*sra-6p* (3.8 kb)、*lim-4p* (3.6 kb)、*ser-2p* (4.1 kb)、*inx-17p* (1.2 kb)、*hlh-34p* (2.5 kb) をそれぞれ挿入し、pNTN034、035、036、046、047、048、049、050、051、052、053、054、055、057、059、060、061、063、064、067、068 を作製した。pNTN075 *hlh-34p::yc3.60* は 2.5 kb の *hlh-34p* と *yc3.60* を含む。pNTN106 *gcy-5p::deg-1 cDNA* は東京大学の飯野教授よりいただいた *gcy-5* プロモーターと *deg-1 cDNA* を含む。pNTN116 は野生株 N2 ゲノムより PCR で増幅された *inx-17* プロモーターと、*yc3.60*、さらに、*let-858* 遺伝子の 3'UTR を含む (Altun et al., 2009)。pNTN123 *gcy-21p::yc3.60* は野生株 N2 ゲノムより *gcy-21* 遺伝子上流の 1,403 bp プロモーター領域を PCR で増幅し、pNTN075 の *hlh-34p* と入れ替えた。既存の論文より、*gcy-21p::gfp* の *gcy-21* プロモーターには *gcy-21* 遺伝子の第 1 エクソンと第 2 エクソンが含まれており、このプロモーター領域によって発現を誘導される GFP は ASG で強く発現し、ADL では微弱な発現が見られる (Ortiz et al., 2006)。しかし、*gcy-21* プロモーターから全てのエクソンとイントロンを取り除いたところ、GFP の発現は

ASG でだけ観察された。本研究ではすべてのエクソンとイントロンが取り除かれた *gcy-21* プロモーターを ASG 特異的プロモーターとして使用する。pNTN126 *gcy-21p::deg-1 cDNA* は 1,403 bp の *gcy-21* プロモーターと *deg-1 cDNA* を含む。pMIU34 *flp-6p::CeGCAMP8* は *flp-6* 遺伝子上流の 2,680 bp の *flp-6p* と *C. elegans* 用にコドン最適化された CeGCAMP8 を含む。pNTN119 は電気生理解析用に *deg-1 cDNA* をアフリカツメガエルの  $\beta$  グロビン 5'UTR と  $\beta$  グロビン 3'UTR を持つ pGEMHE に挿入して作製された。*xdh-1* PCR 1、2、3 断片はそれぞれ 1,772 bp、952 bp、428 bp の *xdh-1* プロモーターと *xdh-1 cDNA::gfp* を含むように pNTN058 より PCR で作製された。pNTN125 は電気生理解析用に *MDEG1 cDNA* をアフリカツメガエル  $\beta$  グロビン 5'UTR と  $\beta$  グロビン 3'UTR を持つ pGEMHE に挿入して作製された。pNTN143 *ceh-10p::nCre* は *ceh-10* プロモーターと nCre 配列を含む。pNTN144 *hlh-34p::LoxP::xdh-1 cDNA::LoxP* は *hlh-34* プロモーターとストップコドンを含む *LoxP* 配列に挟まれた *xdh-1 cDNA* を持つ。pNTN145 *inx-17p::LoxP::xdh-1 cDNA::LoxP* は *inx-17* プロモーターとストップコドンを含む *LoxP* 配列に挟まれた *xdh-1 cDNA* を持つ。pNTN159 *nmr-1p::yc3.60* は *nmr-1* 遺伝子の第 1 エクソンの 5 コドンを含む上流 5 kb をプロモーター領域として含み (参考: (Brockie et al., 2001))、*yc3.60* を接続したプラスミドである。

#### Taq DNA ポリメラーゼを用いた DNA 断片の PCR による増幅

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

・ Ex Taq (Takara Bio, Japan) を用いた PCR

全量 10  $\mu$ l になるように作製した。10  $\times$  Ex Taq バッファー 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTPs 溶液 0.8  $\mu$ l、10  $\mu$ M フォワードプライマー 0.5  $\mu$ l、10  $\mu$ M リバープライマー 0.5  $\mu$ l、Ex Taq 0.01  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O 5.65  $\mu$ l を 1.5 ml チューブ内で混合し、テンプレートとなる DNA を 1  $\mu$ l 加えた。サーマルサイクラーの温度プログラムは 1 サイクル (94°C・2 分)、42 サイクル (94°C・15 秒、58°C・30 秒、72°C・1 kb/1 分)、1 サイクル (15°C・ $\infty$ ) を用いた。

・ One Taq (New England BioLabs, Inc., USA) を用いた PCR

全量 10  $\mu$ l になるように作製した。5  $\times$  One Taq バッファー 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTPs 溶液 0.8  $\mu$ l、10  $\mu$ M フォワードプライマー 0.2  $\mu$ l、10  $\mu$ M リバープライマー 0.2  $\mu$ l、One Taq 0.05  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O 5.75  $\mu$ l を 1.5 ml チューブ内で混合し、テンプレートとなる DNA を 1  $\mu$ l 加えた。サーマルサイクラーの温度プログラムは 1 サイクル (94°C・2 分)、42 サイクル (94°C・30 秒、64°C・30 秒、68°C・1 kb/1 分)、1 サイクル (68°C・5 分)、1 サイクル (15°C・ $\infty$ ) を用いた。

・ KOD -Plus- Neo (東洋紡、日本) を用いた PCR

全量 50  $\mu$ l になるように作製した。10  $\times$  KOD -Plus- Neo バッファー 5  $\mu$ l、2 mM dNTPs 溶液 5  $\mu$ l、25 mM MgSO<sub>4</sub> 溶液 3  $\mu$ l、10  $\mu$ M フォワードプライマー 1.5  $\mu$ l、10  $\mu$ M リバープライマー 1.5  $\mu$ l、KOD -Plus- Neo 1  $\mu$ l を 1.5 ml チューブ内で混合し、テンプレートは種類ごとに適量添加した (ゲノム DNA ~200 ng/50  $\mu$ l、プラスミド DNA ~50 ng/50  $\mu$ l、cDNA ~200 ng/50  $\mu$ l)。dH<sub>2</sub>O は全量が 50  $\mu$ l にな



るよう適量入れた。サーマルサイクラーの温度プログラムは、1 サイクル (94°C・2 分)、45 サイクル (98°C・10 秒、プライマーの TM 値°C・30 秒、68°C・1 kb/30 秒)、1 サイクル (15°C・∞) を用いた。

・ KOD -FX- Neo (東洋紡、日本) を用いた PCR

全量 50  $\mu$ l になるように作製した。2 × KOD -FX- Neo バッファー 25  $\mu$ l、2 mM dNTPs 溶液 10  $\mu$ l、10  $\mu$ M フォワードプライマー 1.5  $\mu$ l、10  $\mu$ M リバープライマー 1.5  $\mu$ l、KOD -FX- Neo 1  $\mu$ l を 1.5 ml チューブ内で混合し、テンプレートは種類ごとに適量添加した (ゲノム DNA ~200 ng/50  $\mu$ l、プラスミド DNA ~50 ng/50  $\mu$ l、cDNA ~200 ng/50  $\mu$ l) 。dH<sub>2</sub>O は全量が 50  $\mu$ l になるよう適量入れた。サーマルサイクラーの温度プログラムは、1 サイクル (94°C・2 分)、45 サイクル (98°C・10 秒、プライマーの TM 値°C・30 秒、68°C・1 kb/30 秒)、1 サイクル (15°C・∞) を用いた。

・ LA Taq (Takara Bio, Japan) を用いた PCR

全量 10  $\mu$ l になるように作製した。10 × LA Taq バッファー 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTPs 溶液 0.8  $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub> 溶液 0.6~8  $\mu$ l、10  $\mu$ M フォワードプライマー 0.25  $\mu$ l、10  $\mu$ M リバープライマー 0.25  $\mu$ l、LA Taq 0.1  $\mu$ l、テンプレートとなる DNA を < 200 ng になるように加え、チューブ内で混合した。dH<sub>2</sub>O は全量が 10  $\mu$ l になるよう適量入れた。サーマルサイクラーの温度プログラムは、1 サイクル (94°C・2 分)、40 サイクル (94°C・30 秒、プライマーの TM 値°C・30 秒、68°C・1 kb/1 分)、1 サイクル (15°C・∞) を用いた。

## 謝辞

本研究をおこなうに当たり、熱心なご指導ご鞭撻を賜りました甲南大学 理工学部 生体調節学研究室 久原篤 教授と太田茜 博士に深謝申し上げます。香川大学 医学部 医学科 分子生理学研究室 藤原祐一郎 教授と川鍋陽 先生には電気生理解析に関して多大なるご協力をいただくとともに有益なご助言をいただきました。心より御礼申し上げます。次世代 DNA シーケンサーを用いた遺伝学解析にご協力いただきました国立遺伝学研究所 豊田敦 教授と水口洋平 博士に心より御礼申し上げます。遺伝工学解析にご協力いただきました甲南大学 自然科学研究科 生命・機能科学専攻 大西康平氏と三浦徹氏に心より感謝申し上げます。そして、数多くの *C. elegans* 変異体を提供していただいた *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC)、National Bioresource Project 三谷昌平 教授並びに、プラスミドを提供していただいた名古屋大学 森郁恵 教授、東京大学 飯野雄一 教授、Dr. Martin Chalfie (Columbia University)、Dr. Laura Bianchi (Miami University)、Dr. Zhao-Wen Wang (University of Connecticut)、Dr. Jeff Grant (Miami University) に感謝申し上げます。また、本研究は日本学術振興会 特別研究員 DC2 (特別研究員 No. 18J10116) に採用していただき、科研費提供による研究支援をいただけたことで遂行できました。深く感謝申し上げます。さらに、学位論文の作成指導をしてくださいました甲南大学 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、向正則 教授、檀上博史 教授、渡邊順司 教授に心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、大学 4 年間及び大学院 5 年間、私の研究生生活を支え、励まして下さった家族と友人に心より感謝いたします。

## 引用文献

- Altun ZF, Chen B, Wang ZW, Hall DH. 2009. High resolution map of *Caenorhabditis elegans* gap junction proteins. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **238**: 1936-1950.
- Askwith CC, Benson CJ, Welsh MJ, Snyder PM. 2001. DEG/ENaC ion channels involved in sensory transduction are modulated by cold temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6459-6463.
- Bargmann CI, Hartwig E, Horvitz HR. 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* **74**: 515-527.
- Barr MM. 2003. Super models. *Physiological Genomics* **13**: 15-24.
- Boardman NT, Falck AT, Lund T, Chu X, Martin-Armas M, Norvik JV, Jenssen TG, Ytrehus K. 2019. Human concentrations of uric acid scavenges adaptive and maladaptive ROS in isolated rat hearts subjected to ischemic stress. *Canadian journal of physiology and pharmacology* doi: 10.1139/cjpp-2019-0024. [Epub ahead of print].
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**: 71-94.
- Brockie PJ, Madsen DM, Zheng Y, Mellem J, Maricq AV. 2001. Differential expression of glutamate receptor subunits in the nervous system of *Caenorhabditis elegans* and their regulation by the homeodomain protein UNC-42. *The Journal of Neuroscience* **21**: 1510-1522.
- C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018.
- Chalfie M and Wolinsky E. 1990. The identification and suppression of inherited

- neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **345**: 410-416.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS. 2010. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* **464**: 297-301.
- Chen Y, Bharill S, O'Hagan R, Isacoff EY, Chalfie M. 2016. MEC-10 and MEC-19 Reduce the Neurotoxicity of the MEC-4(d) DEG/ENaC Channel in *Caenorhabditis elegans*. *Genes, Genomes, Genetics (Bethesda)* **6**: 1121-1130.
- Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. 1997. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha)* **20**: 127-140.
- Cook SJ, Jarrell TA, Brittin CA, Wang Y, Bloniarz AE, Yakovlev MA, Nguyen KCQ, Tang LT, Bayer EA, Duerr JS, Bülow HE, Hobert O, Hall DH, Emmons SW. 2019. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* **571**: 63-71.
- Cunningham KA, Hua Z, Srinivasan S, Liu J, Lee BH, Edwards RH, Ashrafi K. 2012. AMP-activated kinase links serotonergic signaling to glutamate release for regulation of feeding behavior in *C. elegans*. *Cell Metabolism* **16**: 113-121.
- Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. 2006. Trp ion channels and temperature sensation. *Annual Review of Neuroscience* **29**: 135-161.
- Geffeney SL, Cueva JG, Glauser DA, Doll JC, Lee TH, Montoya M, Karania S, Garakani AM, Pruitt BL, Goodman MB. 2011. DEG/ENaC but not TRP channels are the major mechanoelectrical transduction channels in a *C. elegans* nociceptor. *Neuron* **71**: 845-857.
- Hall DH, Gu G, Garcia-Anoveros J, Gong L, Chalfie M, Driscoll M. 1997. Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*

17: 1033-1045.

Hu PJ. 2007. Dauer. *WormBook*: 1-19.

Kobayashi K, Nakano S, Amano M, Tsuboi D, Nishioka T, Ikeda S, Yokoyama G, Kaibuchi K, Mori I. 2016. Single-Cell Memory Regulates a Neural Circuit for Sensory Behavior. *Cell Reports* **14**: 11-21.

Kuhara A, Ohnishi N, Shimowada T, Mori I. 2011. Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviours in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications* **2**: 355 (Article number).

Larsen PL. 1993. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 8905-8909.

Lee HI, Park BR, Chun SW. 2017. Reactive oxygen species increase neuronal excitability via activation of nonspecific cation channel in rat medullary dorsal horn neurons. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology* **21**: 371-376.

Liu L, Leonard AS, Motto DG, Feller MA, Price MP, Johnson WA, Welsh MJ. 2003. Contribution of Drosophila DEG/ENaC genes to salt taste. *Neuron* **39**: 133-146.

McElwee JJ, Schuster E, Blanc E, Thomas JH, Gems D. 2004. Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 44533-44543.

Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V. 1991. Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *The EMBO Journal* **10**: 3959-3970.

Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H. 2013. Imaging intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration using

- yellow cameleons. *Cold Spring Harbor Protocols* **2013**.
- Moriya C, Satoh H. 2016. Teneligliptin Decreases Uric Acid Levels by Reducing Xanthine Dehydrogenase Expression in White Adipose Tissue of Male Wistar Rats. *Journal of Diabetes Research* **2016**: 3201534 (Article number) 1-9.
- Murphy CT. 2006. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Experimental Gerontology* **41**: 910-921.
- Murray P, Hayward SA, Govan GG, Gracey AY, Cossins AR. 2007. An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5489-5494.
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K. 2001. A high signal-to-noise Ca (2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **19**: 137-141.
- Nakamura K. 2011. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **301**: R1207-R1228.
- Ohnishi N, Kuhara A, Nakamura F, Okochi Y, Mori I. 2011. Bidirectional regulation of thermotaxis by glutamate transmissions in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal* **30**: 1376-1388.
- Ohta A, Ujisawa T, Sonoda S, Kuhara A. 2014. Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications* **5**: 4412 (Article number).
- Okahata M, Wei AD, Ohta A, Kuhara A. 2019. Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in *Caenorhabditis elegans*. *Science Advances* **5** (2): eaav3631 (Article number) 1-12.

- Ortiz CO, Etchberger JF, Posy SL, Frokjaer-Jensen C, Lockery S, Honig B, Hobert O. 2006. Searching for neuronal left/right asymmetry: genomewide analysis of nematode receptor-type guanylyl cyclases. *Genetics* **173**: 131-149.
- Panowski SH, Wolff S, Aguilaniu H, Durieux J, Dillin A. 2007. PHA-4/Foxa mediates diet-restriction-induced longevity of *C. elegans*. *Nature* **447**: 550-555.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., and Priess, J.R. 1997. *C. ELEGANS II. CSHL PRESS.*
- Saidak Z, Louandre C, Dahmani S, Sauzay C, Guedda S, Chauffert B, Chatelain D, Ceballos-Picot I, Galmiche A. 2018. A pan-cancer study of the transcriptional regulation of uricogenesis in human tumours: pathological and pharmacological correlates. *Bioscience Reports* **38 (5)**: 1-12.
- Saksela M, Lapatto R, Raivio KO. 1999. Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS Letters* **443**: 117-120.
- Shen WL, Kwon Y, Adegbola AA, Luo J, Chess A, Montell C. 2011. Function of rhodopsin in temperature discrimination in *Drosophila*. *Science* **331**: 1333-1336.
- Sonoda S, Ohta A, Maruo A, Ujisawa T, Kuhara A. 2016. Sperm Affects Head Sensory Neuron in Temperature Tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Reports* **16**: 56-65.
- Takeishi A, Yu YV, Hapiak VM, Bell HW, O'Leary T, Sengupta P. 2016. Receptor-type Guanylyl Cyclases Confer Thermosensory Responses in *C. elegans*. *Neuron* **90**: 235-244.
- Talavera K, Nilius B, Voets T. 2008. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends in Neuroscience* **31**: 287-295.
- Terawaki H, Murase T, Nakajima A, Aoyagi K, Fukushima N, Tani Y, Nakamura T,

- Kazama JJ. 2017. The Relationship between Xanthine Oxidoreductase and Xanthine Oxidase Activities in Plasma and Kidney Dysfunction. *Journal of Clinical & Experimental Nephrology* **02**: 1-5.
- Tominaga M, Caterina MJ. 2004. Thermosensation and pain. *Journal of Neurobiology* **61**: 3-12.
- Tsumiki H, Tanaka K, Gotō M. 2010. Konchū no teion taisei : sono shikumi to shirabekata = Insect tolerance at low temperatures : mechanisms and laboratory manuals. *Okayama Daigaku Shuppankai, Okayama-shi*.
- Ugawa S, Yamamoto T, Ueda T, Ishida Y, Inagaki A, Nishigaki M, Shimada S. 2003. Amiloride-insensitive currents of the acid-sensing ion channel-2a (ASIC2a)/ASIC2b heteromeric sour-taste receptor channel. *The Journal of Neuroscience* **23**: 3616-3622.
- Ujisawa T, Ohta A, Ii T, Minakuchi Y, Toyoda A, Ii M, Kuhara A. 2018. Endoribonuclease ENDU-2 regulates multiple traits including cold tolerance via cell autonomous and nonautonomous controls in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 8823-8828.
- Ujisawa T, Ohta A, Okahata M, Sonoda S, Kuhara A. 2014. Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. *Protocol Exchange* **2014 (032)**: 1-6.
- Vanfleteren JR. 1993. Oxidative stress and ageing in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical journal* **292 (Pt 2)**: 605-608.
- Venkatachalam K, Montell C. 2007. TRP channels. *Annual Review of Biochemistry* **76**: 387-417.
- Waldmann R, Champigny G, Voilley N, Lauritzen I, Lazdunski M. 1996. The mammalian degenerin MDEG, an amiloride-sensitive cation channel activated by mutations



- causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 10433-10436.
- Wang CH, Zhang C, Xing XH. 2016. Xanthine dehydrogenase: An old enzyme with new knowledge and prospects. *Bioengineered* **7**: 395-405.
- Wang Y, Apicella A, Jr., Lee SK, Ezcurra M, Slone RD, Goldmit M, Schafer WR, Shaham S, Driscoll M, Bianchi L. 2008. A glial DEG/ENaC channel functions with neuronal channel DEG-1 to mediate specific sensory functions in *C. elegans*. *The EMBO Journal* **27**: 2388-2399.
- Wemmie JA, Askwith CC, Lamani E, Cassell MD, Freeman JH, Jr., Welsh MJ. 2003. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. *Journal of Neuroscience* **23**: 5496-5502.
- Wemmie JA, Chen J, Askwith CC, Hruska-Hageman AM, Price MP, Nolan BC, Yoder PG, Lamani E, Hoshi T, Freeman JH, Jr. Welsh MJ. 2002. The acid-activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* **34**: 463-477.
- Wemmie JA, Coryell MW, Askwith CC, Lamani E, Leonard AS, Sigmund CD, Welsh MJ. 2004. Overexpression of acid-sensing ion channel 1a in transgenic mice increases acquired fear-related behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3621-3626.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **314**: 1-340.
- Wicks SR, Yeh RT, Gish WR, Waterston RH, Plasterk RH. 2001. Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. *Nature Genetics* **28**: 160-164.

- Wood WB and the Community of *C. elegans* Researchers. 1988. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Xi H, Schneider BL, Reitzer L. 2000. Purine catabolism in Escherichia coli and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *Journal of Bacteriology* **182**: 5332-5341.
- Ya BL, Liu Q, Li HF, Cheng HJ, Yu T, Chen L, Wang Y, Yuan LL, Li WJ, Liu WY, Bai B. 2018. Uric Acid Protects against Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion-Induced Oxidative Stress via Activating Nrf2 and Regulating Neurotrophic Factor Expression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**: 6069150 (Article number) 1-10.
- Zha XM, Wemmie JA, Green SH, Welsh MJ. 2006. Acid-sensing ion channel 1a is a postsynaptic proton receptor that affects the density of dendritic spines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 16556-16561.
- Zhang S, Ma C, Chalfie M. 2004. Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins. *Cell* **119**: 137-144.
- Zhao Z, Fang L, Chen N, Johnsen RC, Stein L, Baillie DL. 2005. Distinct regulatory elements mediate similar expression patterns in the excretory cell of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 38787-38794.
- Zhong L, Hwang RY, Tracey WD. 2010. Pickpocket is a DEG/ENaC protein required for mechanical nociception in Drosophila larvae. *Current Biology* **20**: 429-434.
- Ziemann AE, Allen JE, Dahdaleh NS, Drebot, II, Coryell MW, Wunsch AM, Lynch CM, Faraci FM, Howard MA, 3rd, Welsh MJ, Wemmie JA. 2009. The amygdala is a chemosensor that detects carbon dioxide and acidosis to elicit fear behavior. *Cell* **139**: 1012-1021.

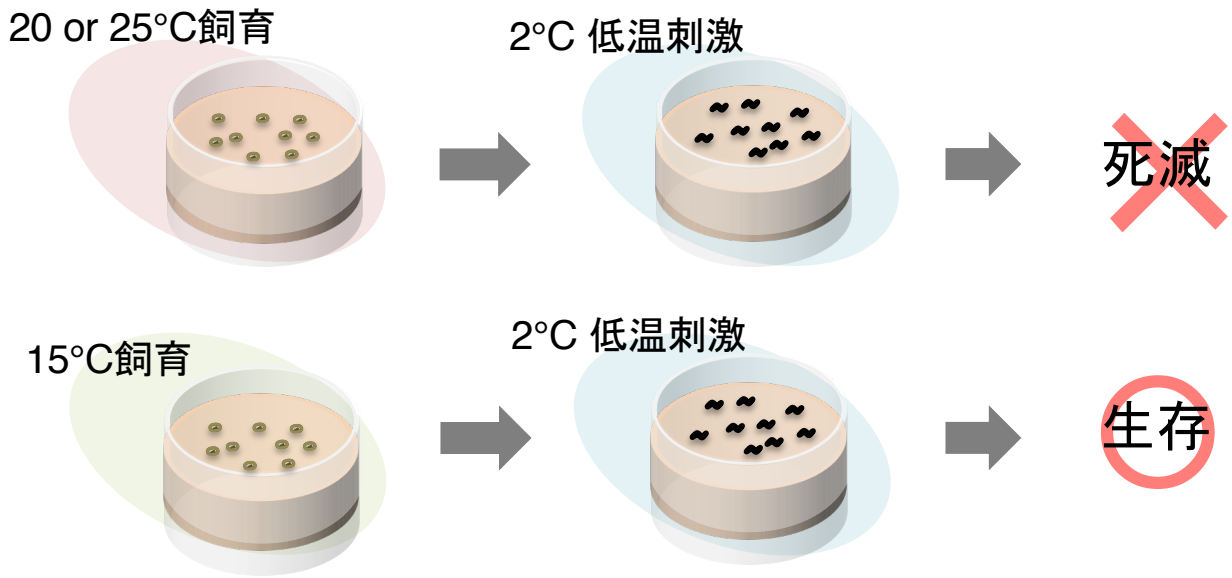


図1 線虫 *C. elegans* の低温耐性

線虫 *C. elegans* の低温耐性現象とは、野生株N2は、20°Cや25°Cで飼育後に2°Cに24から96時間置かれると大半の個体が死滅するのに対し、15°Cで飼育後に2°Cの低温刺激を与えられても生存できるという現象である。

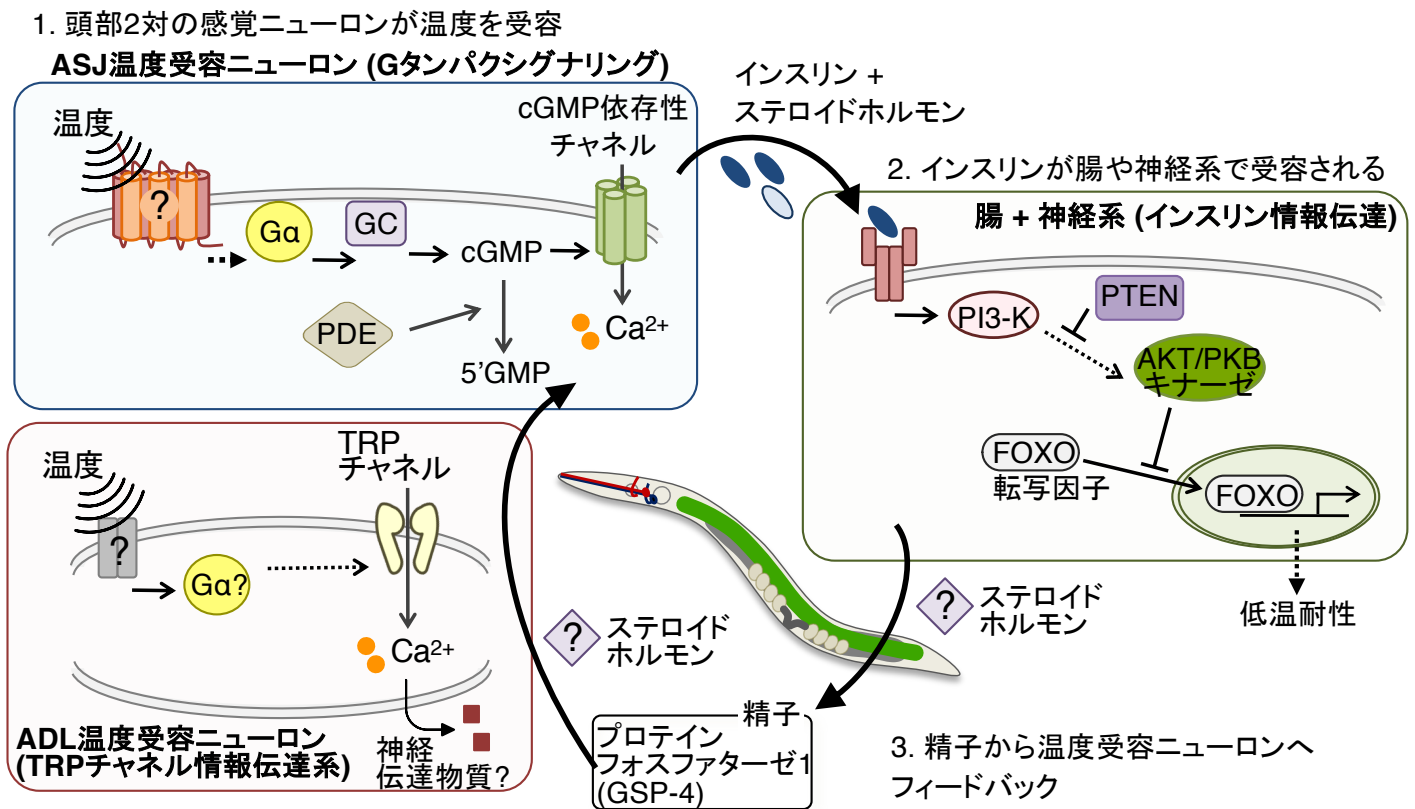


図2 *C. elegans* の低温耐性の生体ネットワーク

これまでの研究から、ASJとADLと呼ばれる2つの感覚ニューロンが、温度を受容し、低温耐性を負に制御することがわかっている。ASJは温度を受容すると、シナプスからインスリンを分泌し、そのインスリンは腸と神経で受容され、インスリン情報伝達系を介して、FOXO型転写因子によって遺伝子発現制御がおこなわれる。さらに、精子を介して頭部のASJニューロンへのフィードバック制御がおこなわれていると考えられている。しかしながら、低温耐性の正の制御機構はほとんど未解明である。

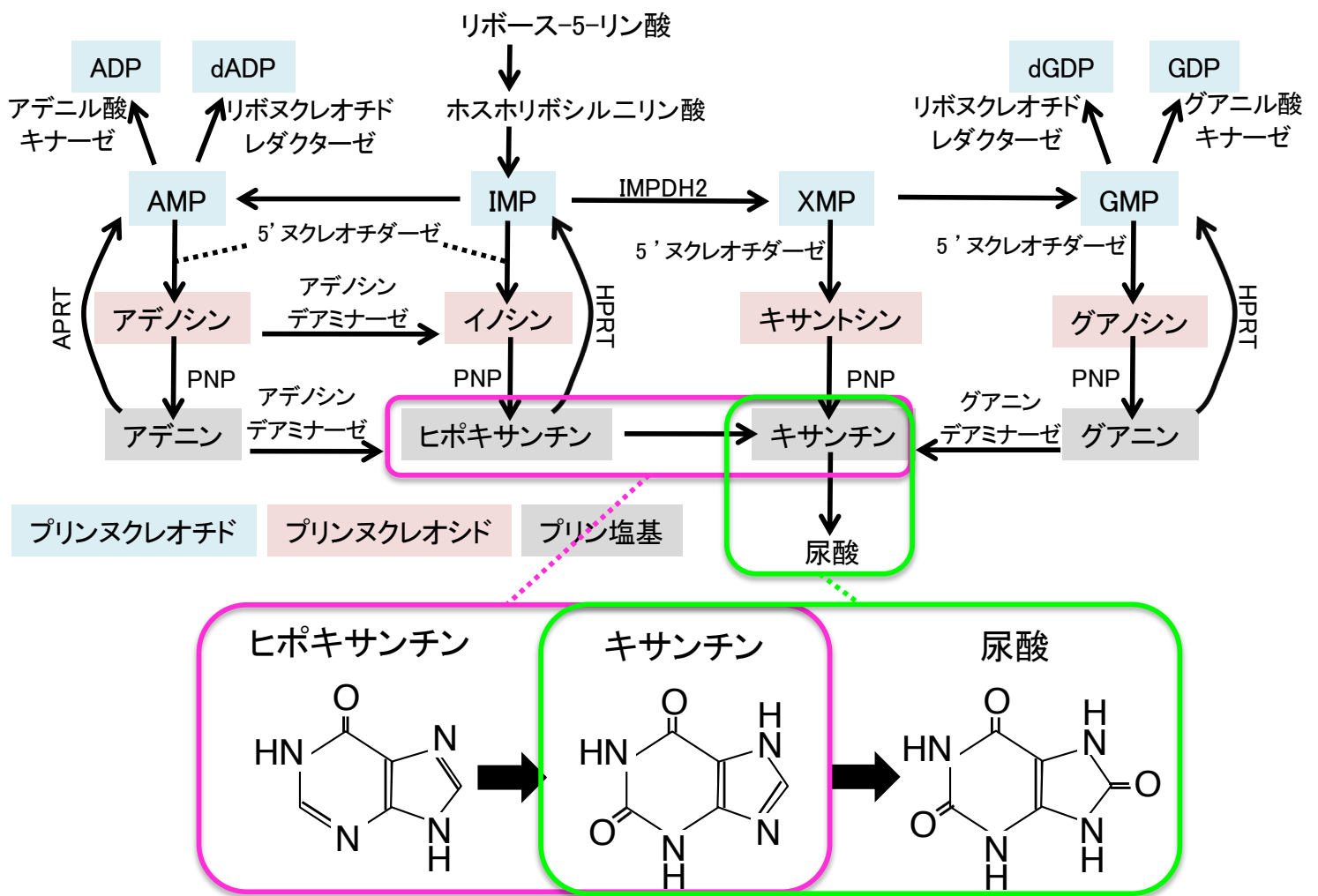


図3 プリン体代謝経路とキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH)

XDHは哺乳動物、特にヒトでは肝臓と小腸粘膜に存在する。主にプリン体代謝経路下流で働き、ヒポキサンチンを水酸化してキサンチンに代謝し、さらに、キサンチンを水酸化して尿酸へ代謝する酵素である。

IMPDH2: イノシン-5'-リン酸デヒドロゲナーゼ2

IMP: イノシン-リン酸

AMP: アデノシン-リン酸

ADP: アデノシンニリン酸

dADP: デオキシアデノシンニリン酸

GMP: グアノシン-リン酸

GDP: グアノシンニリン酸

dGDP: デオキシグアノシンニリン酸

XMP: キサンチル酸

PNP: プリンヌクレオシドフォスホリラーゼ

APRT: アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ

HPRT: ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ

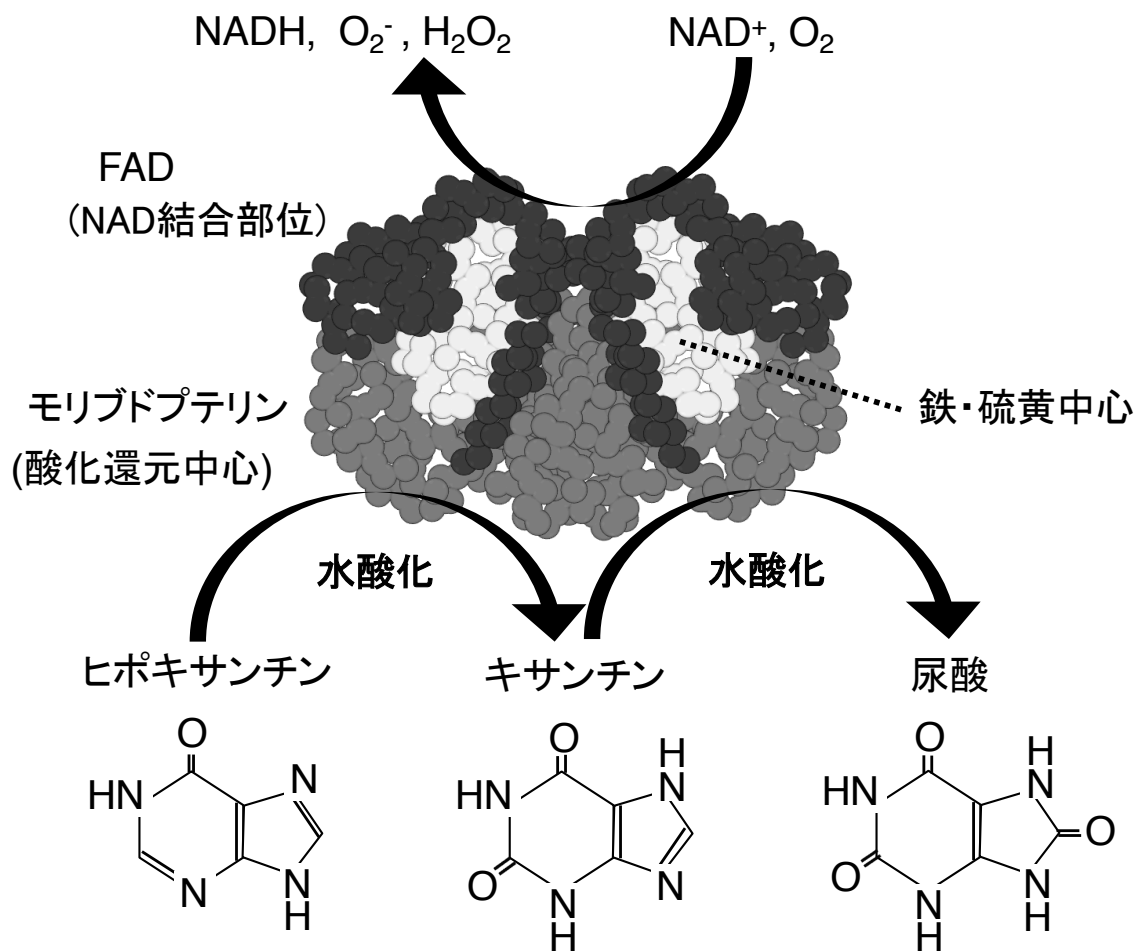


図4 キサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) の模式図

一般的にキサンチンデヒドロゲナーゼは鉄・硫黄中心、FAD (NAD結合部位)、モリブドプテリン (酸化還元中心) の3つのドメインからなり、二量体として存在する。プリン体代謝経路の下流で働き、ヒポキサンチンからキサンチン、さらに、キサンチンから尿酸への水酸化反応を触媒する酵素である。

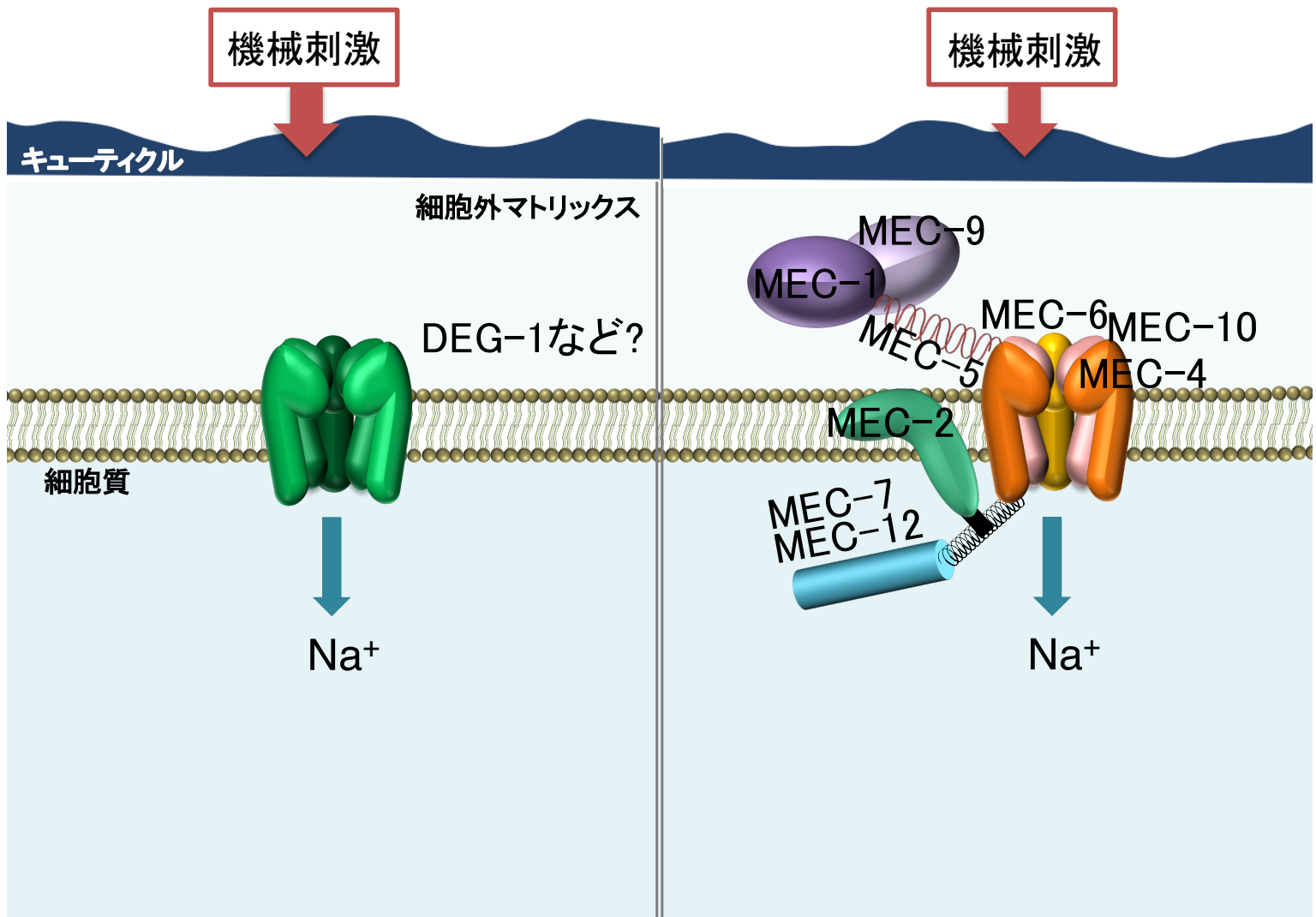


図5 線虫Degenerin/epithelial sodium channel (DEG/ENaC) タイプメカノ受容体のモデル図

機械刺激を受容する三量体のメカノ受容体(機械受容体)であり、主に $\text{Na}^+$ を通す。左図のように1遺伝子産物からでもホモ3量体を形成することができると考えられる。また、右図のMEC-4、6、10のように異なる遺伝子産物が三量体を形成し、複数の開閉制御分子が存在するものがある(Riddle et al., 1997)。

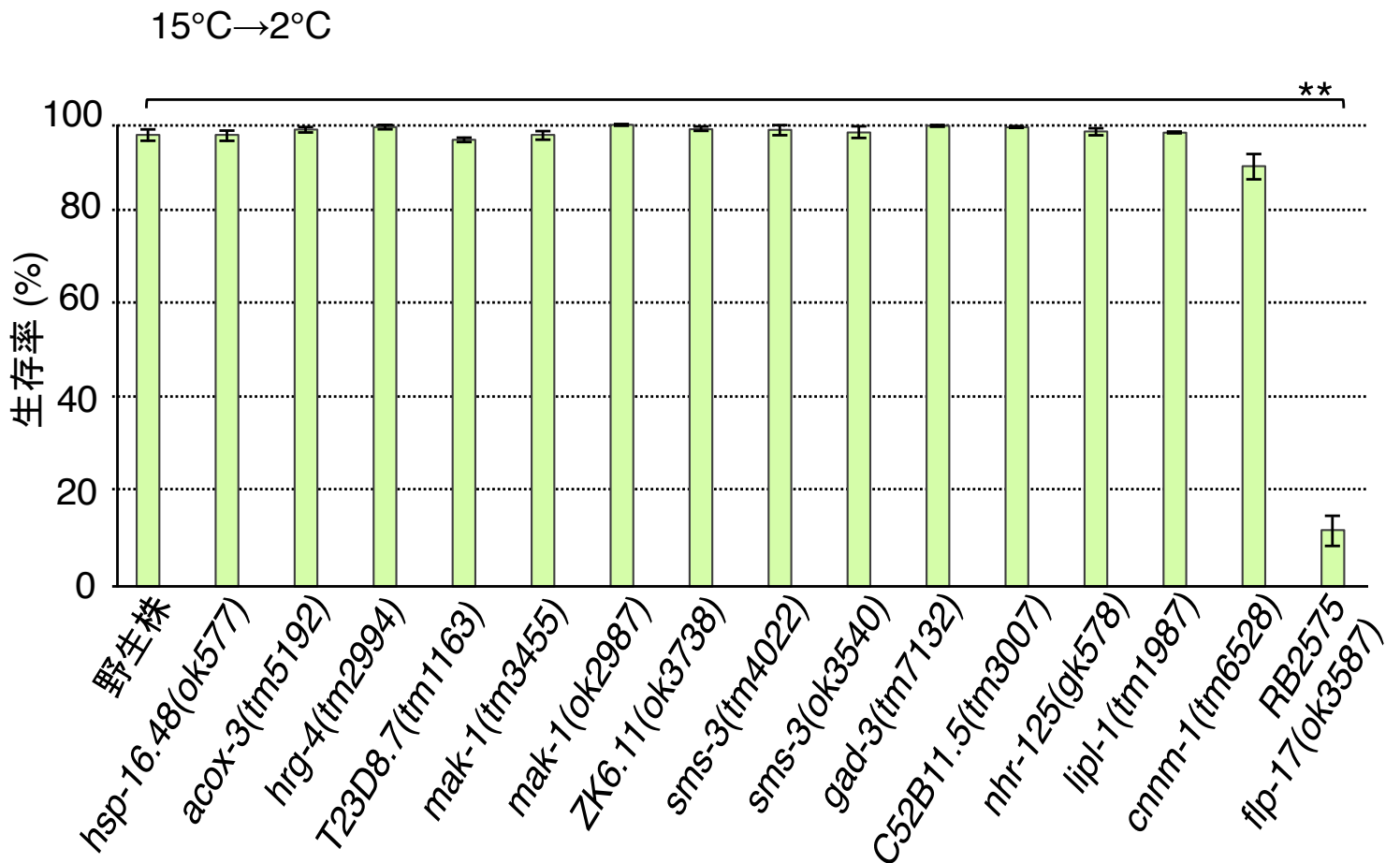


図6 飼育温度依存的に発現変動した遺伝子の変異体の低温耐性解析

15°C飼育後、25°Cに3時間置いた際に発現変動を示した遺伝子のうち、15系統の変異体に関して低温耐性解析をおこなった(アッセイ数 ≥ 9)。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\*p < 0.01 (Dunnett's test)。RB2575系統のみ強い低温耐性異常を示した。



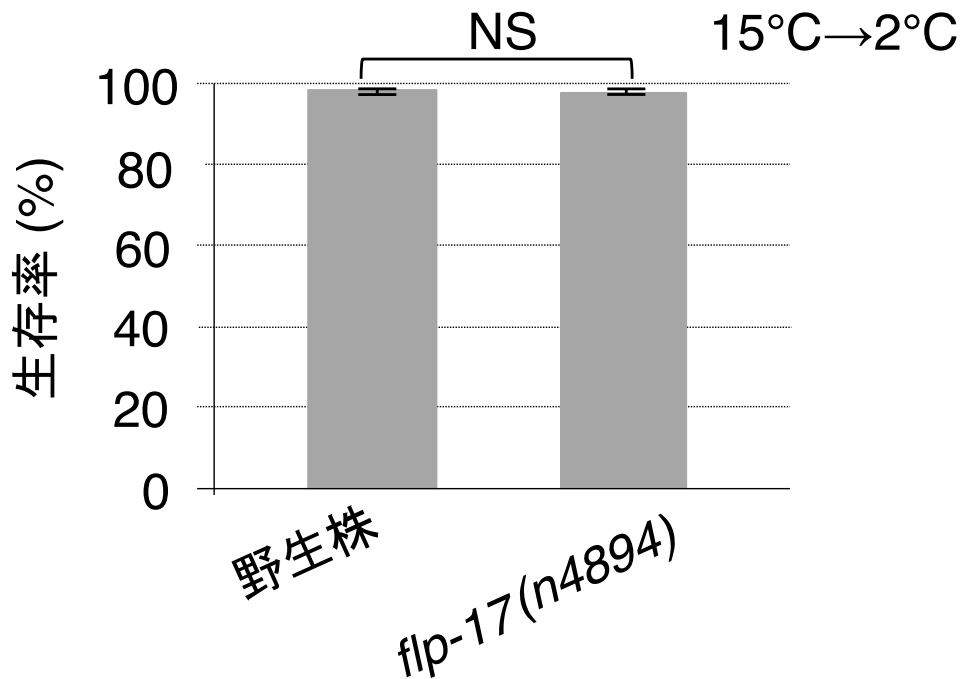
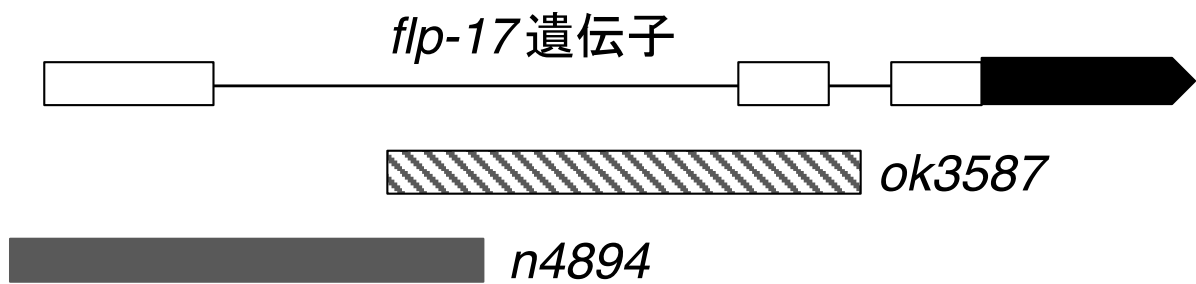


図7 *flp-17* 遺伝子の別アレルの変異体の低温耐性

(上) *flp-17* 遺伝子の模式図。斜めストライプボックスは *ok3587* 変異、暗いグレーボックスは *n4894* 変異を示している。

(下) *flp-17* 遺伝子の別アレルの低温耐性を解析したが、異常を示さなかった (アッセイ数  $\geq 9$ )。15°C 飼育後に 2°C に 48 時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Unpaired t test (Welch))。

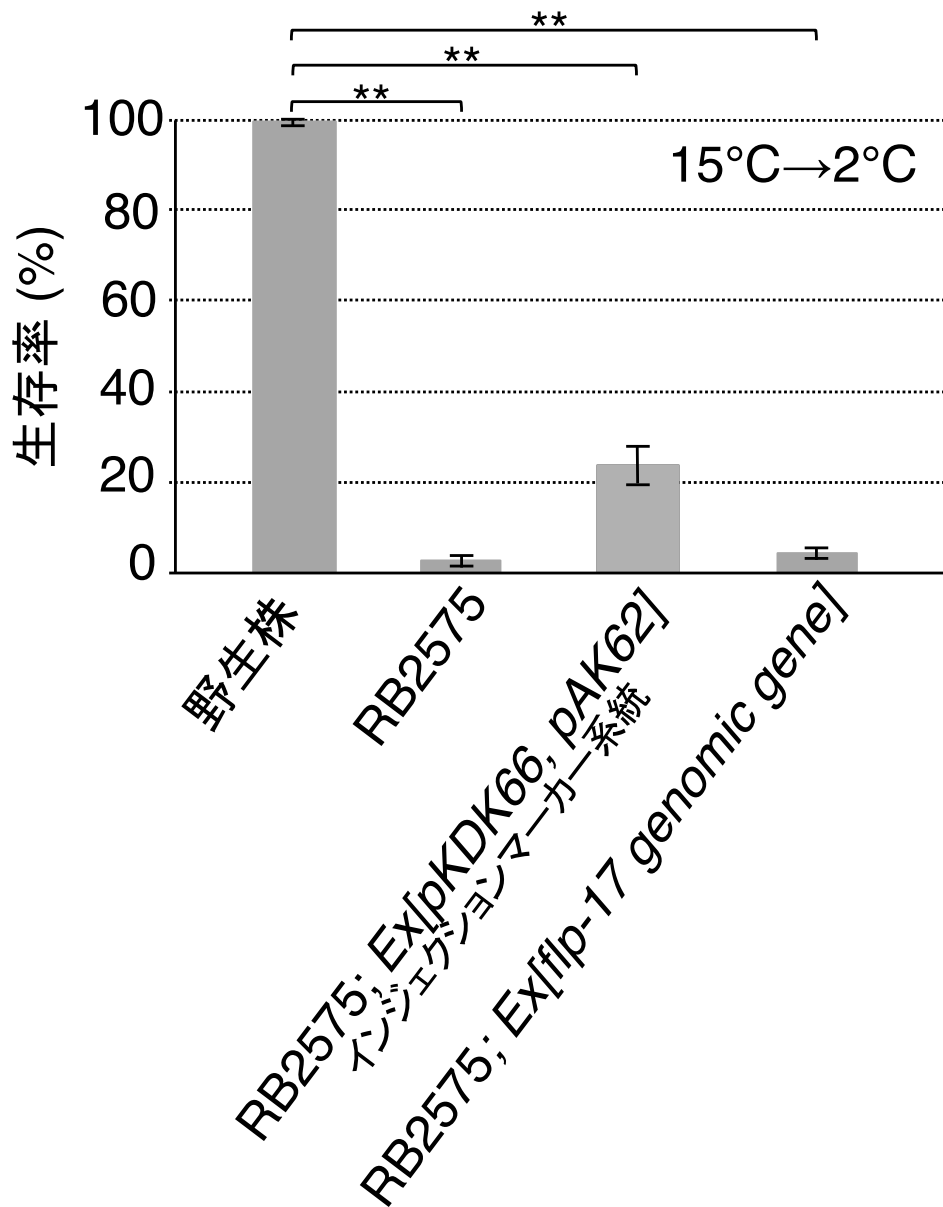


図8 野生株の *flp-17* 遺伝子全長を用いた回復実験

野生株ゲノムから精製した *flp-17* 遺伝子全長 (プロモーター領域含む) を RB2575 系統に導入し、低温耐性の異常が回復するかを解析した。RB2575 系統の低温耐性の異常は回復しなかった (アッセイ数  $\geq 9$ )。15°C 飼育後に 2°C に 48 時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)。

	染色体位置	遺伝子型
染色体 1	4377261	野生株
	6290450	野生株/RB2575
	14874142	野生株/RB2575
染色体 2	4795820	野生株
	6948145	野生株
	1540306	野生株/RB2575
染色体 3	592022	
	4594988	野生株/RB2575
	8883292	野生株/RB2575
染色体 4	1981523	野生株/RB2575
	7663908	野生株/RB2575
	14412775	RB2575
染色体 5	2638723	野生株/RB2575
	8773000	野生株/RB2575
	17057384	野生株/RB2575
染色体 X	2029668	野生株/RB2575
	9299203	
	13054947	野生株/RB2575

図9 RB2575系統の低温耐性異常の原因変異を同定するためのsnip-SNPs解析 (ラフマッピング)

RB2575株 (P<sub>0</sub>) を野生株N2 (P<sub>0</sub>) と掛け合わせて戻し交配をおこない、正常な低温耐性を示す系統 (F<sub>2</sub>以降) とRB2575型の異常な低温耐性を示す系統 (F<sub>2</sub>以降) とを得た。それぞれの系統からゲノムを採取し、各染色体の中心部位と両端部位のSNP型が野生株N2由来であるかRB2575 *x dh-1(chr1) flp-17(ok3587)* 株由来であるかをsnip-SNPs解析によって解析した。具体的には、各系統から精製したゲノムDNAを鋳型として、PCRによってSNPを含むゲノム断片を増幅し、SNPを含む配列を認識する制限酵素で処理した。遺伝子型は野生株 (白カラム)、野生株/RB2575のヘテロ (薄グレーカラム)、RB2575 (濃グレーカラム) として表示する。

a

	遺伝子型									
cM	-12.45	3.38	3.96	4.83	6.13	6.46	9.30	11.87	12.18	16.24
系統						<i>irg-6</i>	<i>tbc-9</i>	<i>F55B1.1</i>	<i>tag-273</i>	<i>flp-17</i>
#bc5-1	野生株	野生/RB	野生/RB	野生/RB	未知	未知	未知	RB2575	RB2575	RB2575
#bc5-2	野生株	RB2575	RB2575	RB2575	RB2575	RB2575	RB2575	RB2575	RB2575	RB2575
KHR066	野生株	野生株	野生株	野生株	野生株	未知	RB2575	RB2575	RB2575	RB2575
KHR069	野生株	野生株	野生株	野生株	野生株	未知	RB2575	RB2575	未知	野生株

b

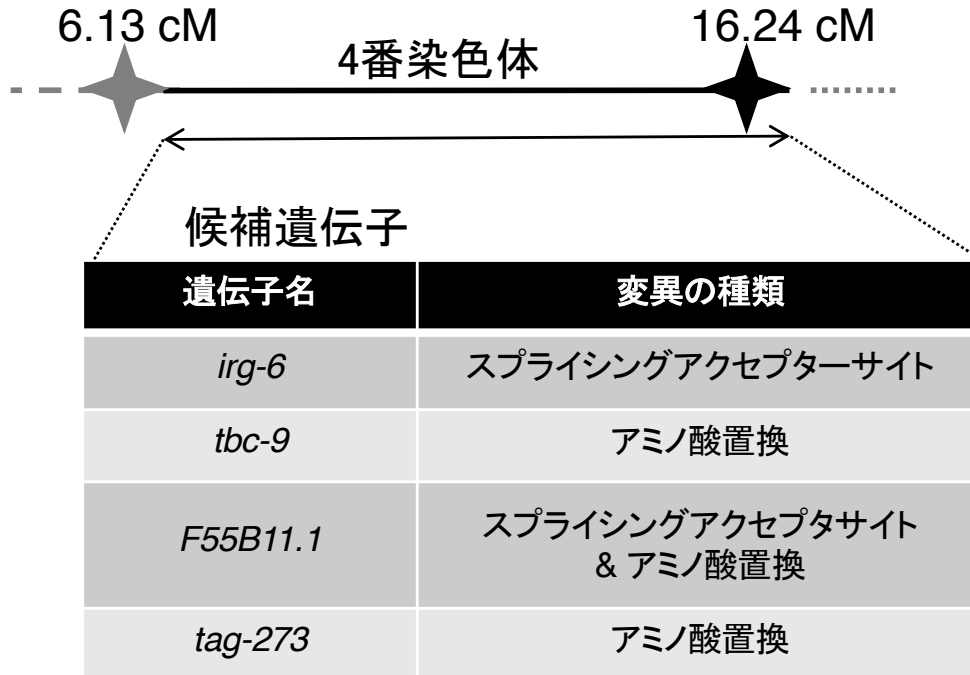


図10 4番染色体に関する詳細なsnip-SNPs解析

(a) ラフマッピングによって原因変異の位置が4番染色体まで絞られたため、組換え体を作製し、より詳細なマッピングをおこなうことで原因変異を6.13 cMから16.24 cMまで絞り込んだ。KHR066はRB2575系統を表現型指標に戻し交配して作製した系統であり、KHR066から*flp-17*遺伝子上の*ok3585*変異を取り除いた系統がKHR069である。遺伝子型は野生株（白カラム）、野生/RBのヘテロ（薄グレーカラム）、RB2575（濃グレーカラム）、未知（ドット）として表示する。

(b) 4番染色体の6.13 cMから16.24 cMの領域には4つの遺伝子が存在していた。遺伝子上には変異が5つあった。

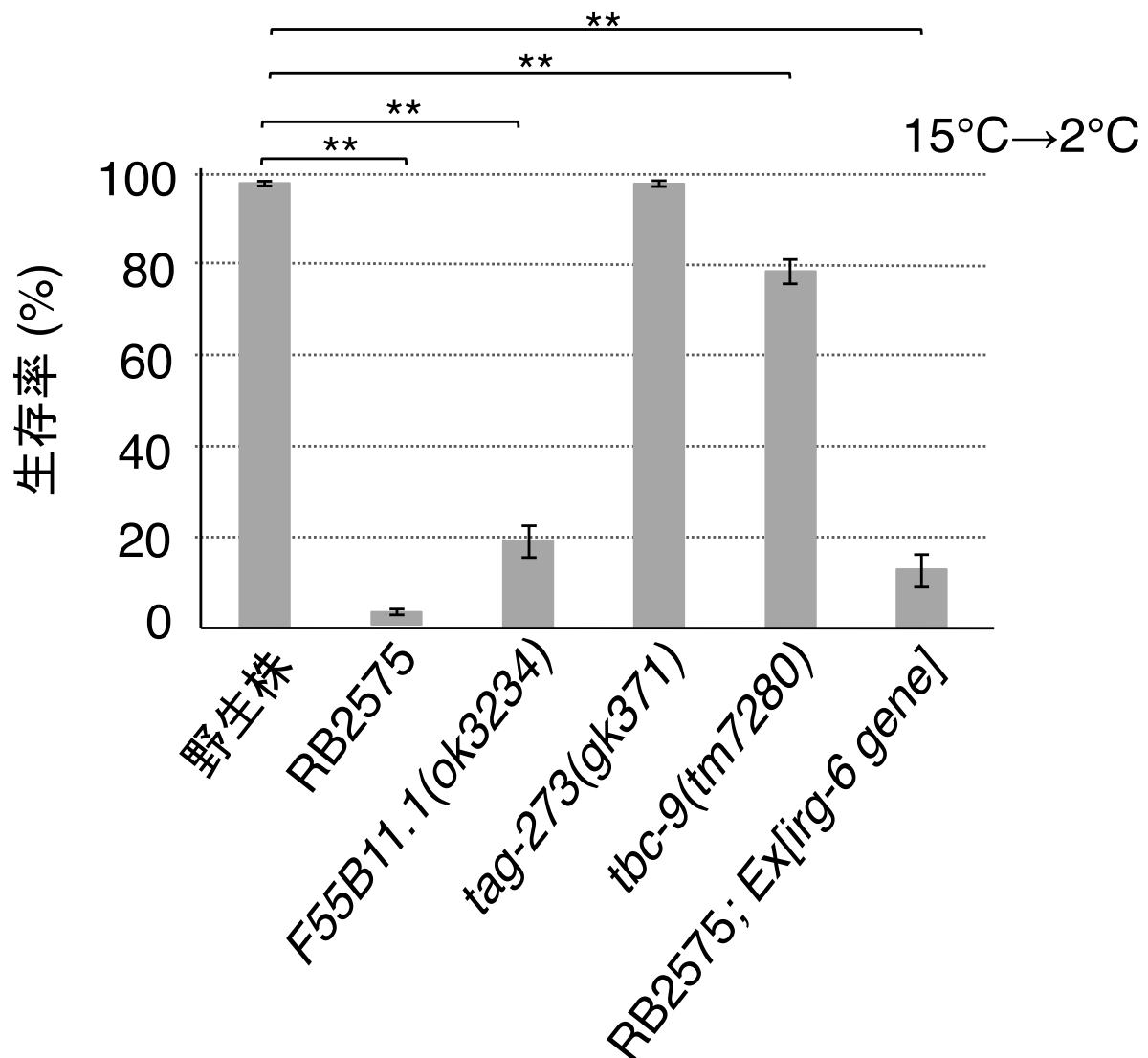


図11 候補遺伝子の変異体の低温耐性解析

4番染色体の6.13 cMから16.24 cMの領域に存在していた候補遺伝子の変異体の低温耐性解析をおこなった(アッセイ数  $\geq 10$ )。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。\*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)。irg-6遺伝子の変異体は存在しなかったため、RB2575系統に野生株由来のirg-6遺伝子を導入した回復実験をおこなうことで検証した。irg-6遺伝子を導入した系統はRB2575型の低温耐性異常を示した。RB2575系統と同じくらい強い低温耐性異常を示したのはF55B11.1変異体のみであった。

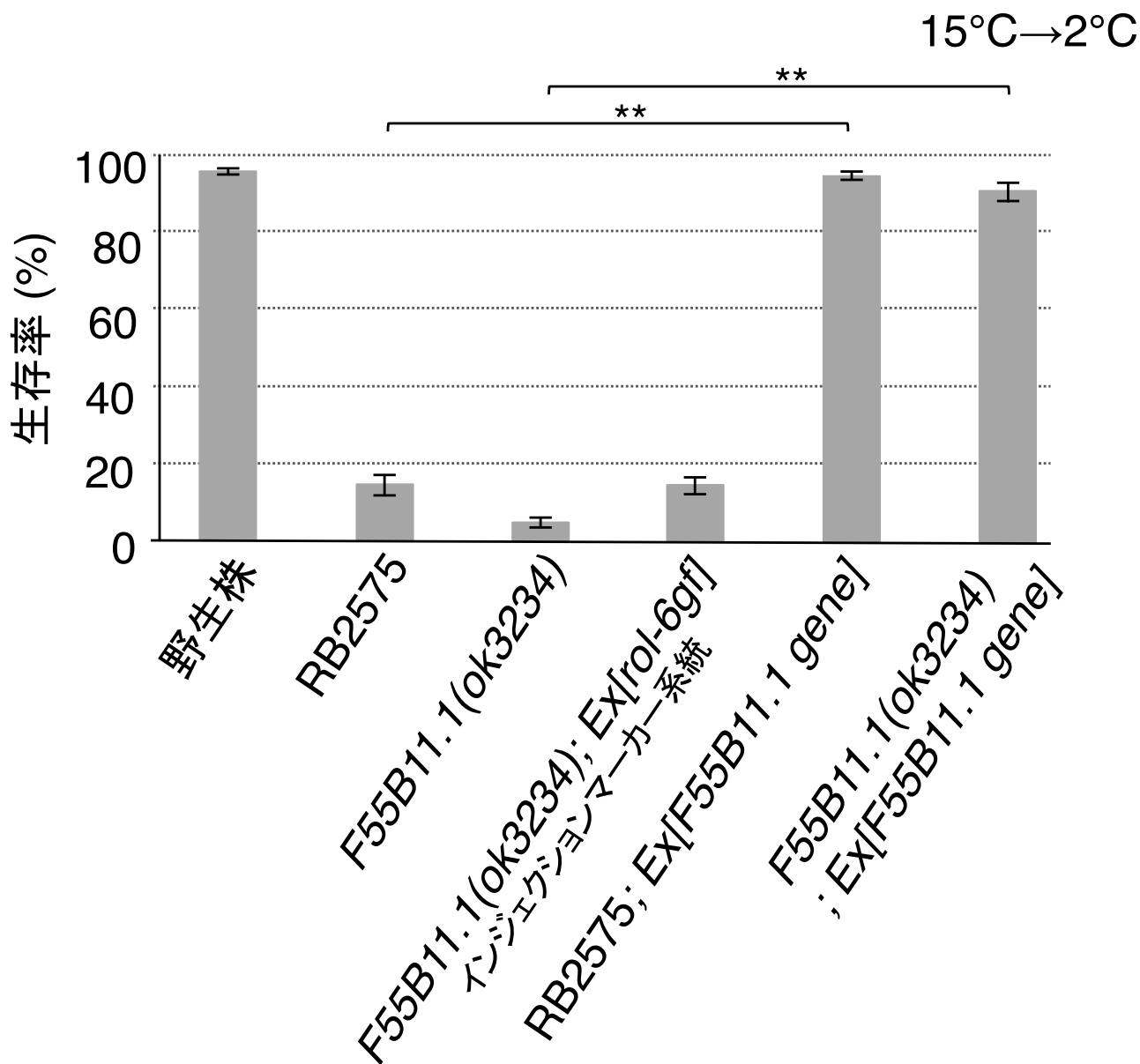


図12 野生株の*F55B11.1*遺伝子全長を用いた回復実験

野生株から精製した*F55B11.1*遺伝子全長(プロモーター領域含む)をRB2575系統と*F55B11.1(ok3234)*変異体に導入し、低温耐性の異常が回復するかを解析した(アッセイ数 ≥ 11)。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\*p < 0.01 (Tukey-Kramer)。RB2575系統と*F55B11.1(ok3234)*変異体の低温耐性異常が*F55B11.1*遺伝子全長の導入によって回復した。

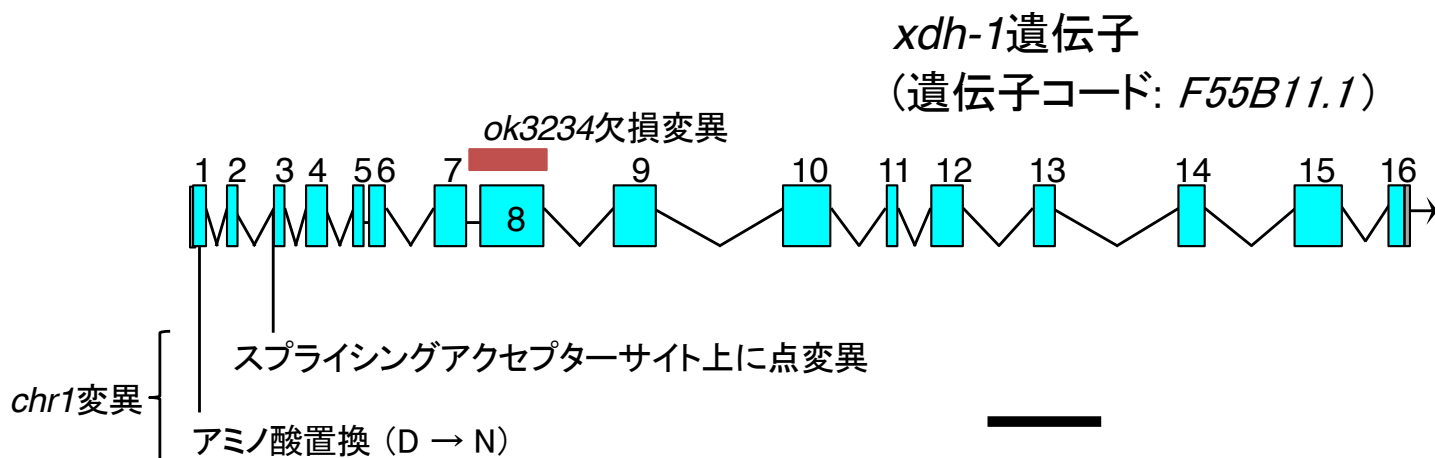


図13 低温耐性異常の原因遺伝子 *xdh-1* (遺伝子コード: *F55B11.1*)

RB2575系統が示す低温耐性異常の原因遺伝子 *xdh-1* (遺伝子コード: *F55B11.1*) の模式図。16個のエクソン(水色ボックス)、イントロン(V字)、両端にUTR(薄グレーボックス)で遺伝子が示される(スケールバー: 1 kb)。1番エクソンと3番エクソンから引いた線は *chr1* 変異を示しており、これはRB2575系統、組換え体系統のKHR066、KHR069が有している変異である。8番エクソン上にある赤いボックスは *ok3234* 欠損変異を示している。

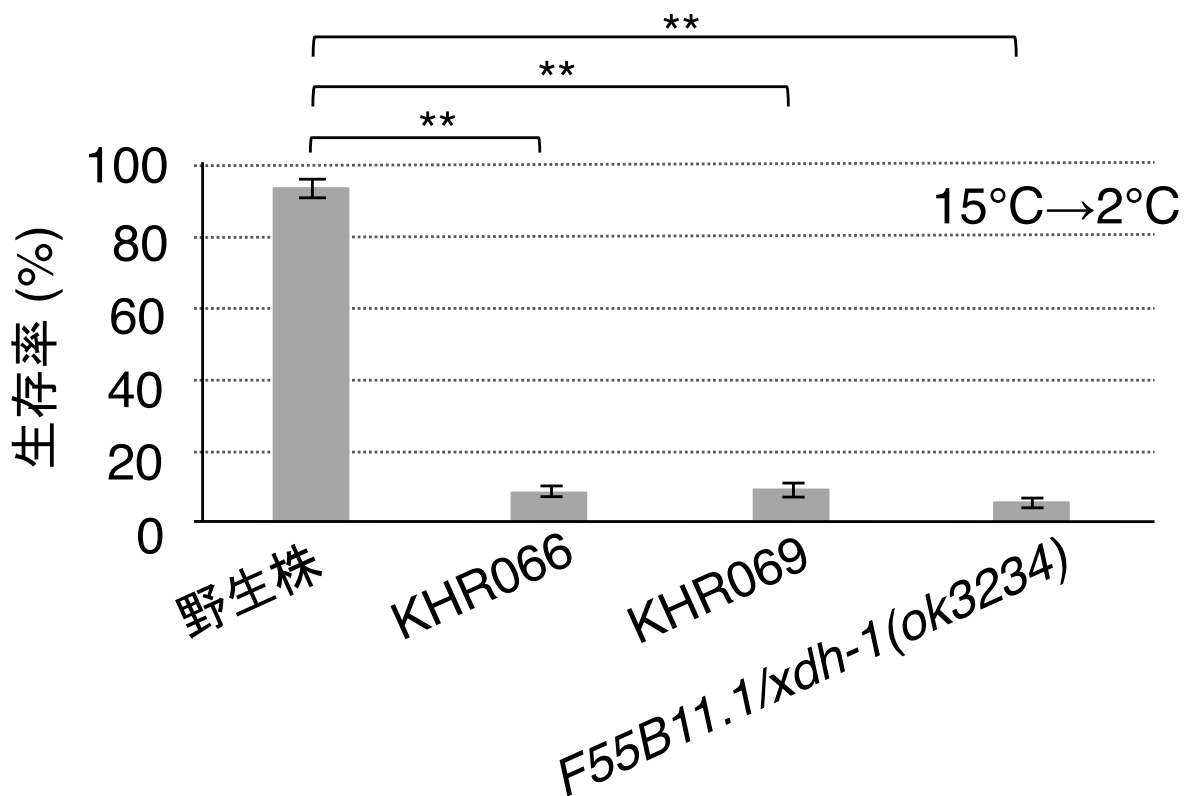


図14 *F55B11.1/xdh-1* 遺伝子の変異体の低温耐性

図10で示す、KHR066系統とKHR069系統、そして*F55B11.1/xdh-1*遺伝子上に *ok3234* 変異を持つ変異体の低温耐性異常を比較した(アッセイ数  $\geq 12$ )。KHR066はRB2575を戻し交配して作製された系統であり、*flp-17* 遺伝子上の *ok3587* 変異と *F55B11.1* 遺伝子上の *chr1* 変異を持つ。KHR069は、KHR066と野生株を掛け合わせ、*flp-17* 遺伝子上の *ok3587* 変異を取り除き、*F55B11.1* 遺伝子上の *chr1* 変異のみを持っている状態にした系統である。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)。KHR066系統とKHR069系統、そして *F55B11.1/xdh-1* 変異体のすべての系統で低温耐性異常が見られた。解析に用いた野生株のデータの一部を図18と共有している。



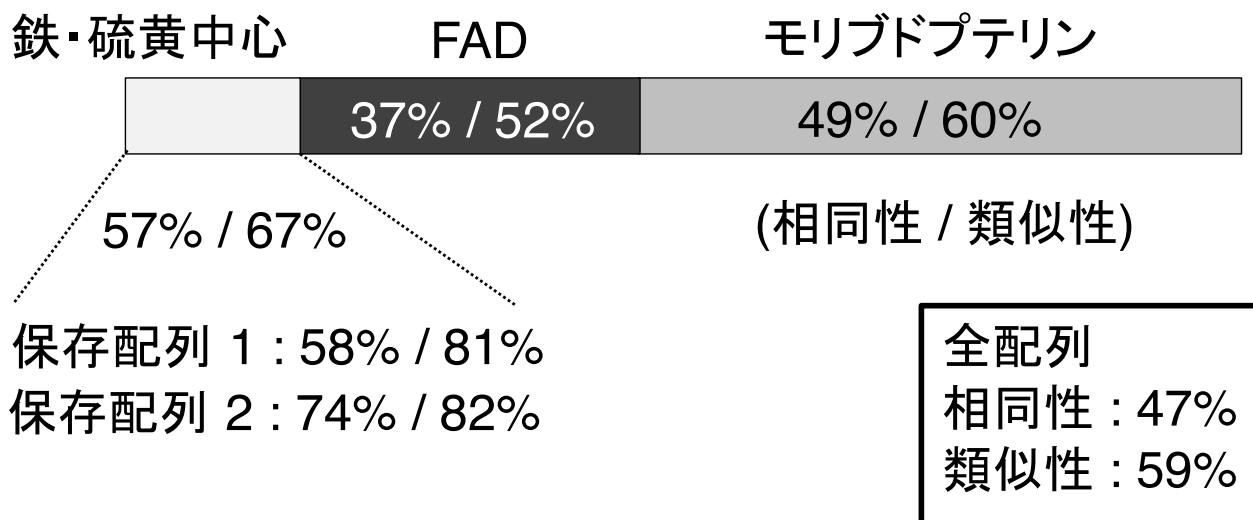


図15 *C. elegans* のXDH-1と*Homo sapiens* のXDH (NP\_000370) のアミノ酸配列比較①

*C. elegans* のXDH-1と*Homo sapiens* のXDHのアミノ酸配列を比較し、相同性と類似性を提示した。配列全体の相同性は47%、類似性は59%であった。ドメインごとの相同性と類似性を、鉄・硫黄中心(薄グレー)、FAD(濃グレー)、モリブドプテリン(グレー)と色分けして示した。鉄・硫黄中心には生物種間でとくに高度に保存されている保存配列が2箇所存在し、どちらの配列も*C. elegans* のXDH-1と*Homo sapiens* のXDHは50%以上の相同性と80%以上の類似性を示した。

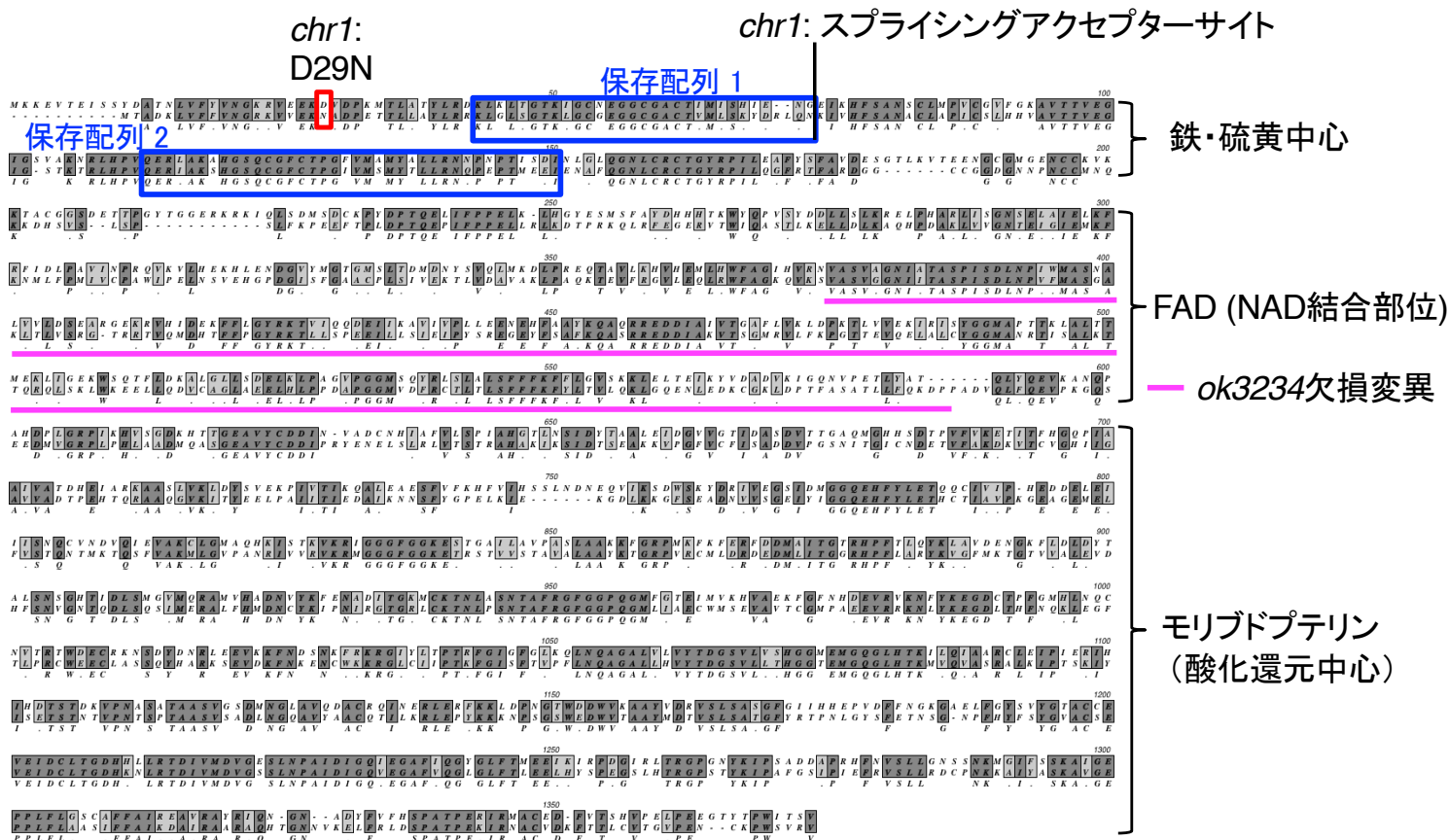


図16 *C. elegans* のXDH-1と*Homo sapiens* のXDH (NP\_000370) のアミノ酸配列比較②

*C. elegans* のXDH-1と*Homo sapiens* のXDHのアミノ酸配列を比較し、相同なアミノ酸(濃グレー)と類似のアミノ酸(グレー)を提示した。*chr1*のアミノ酸置換(赤枠)、スプライシングアクセプターサイト上の点変異(黒線)、保存配列1、2(青枠)、*ok3234*欠損変異(マゼンタ線)の部位をそれぞれ示している。

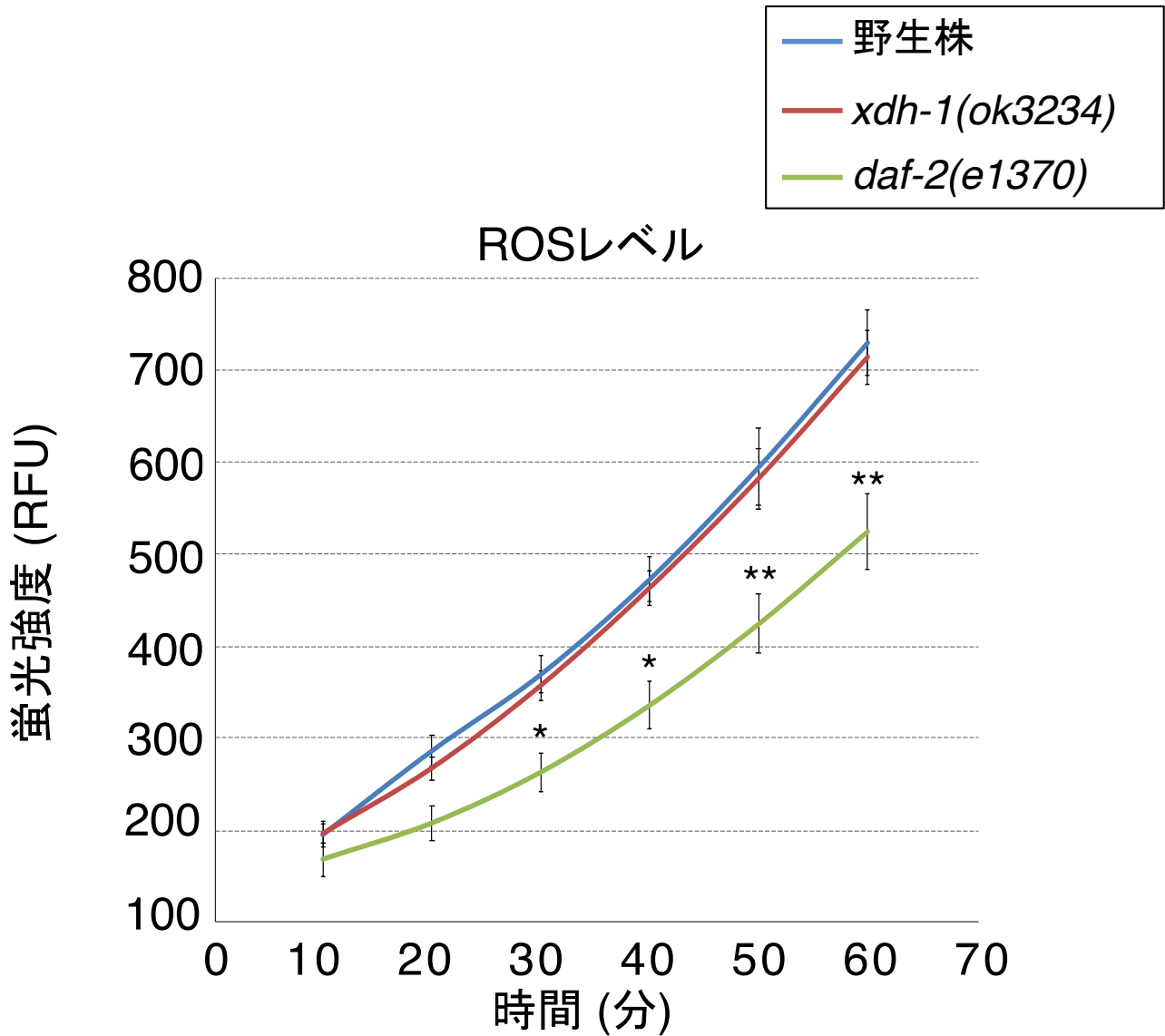


図17 H<sub>2</sub>DCF-DAを用いた活性酸素種 (ROS)レベル測定

ROSのインジケータH<sub>2</sub>DCF-DAによる*xdh-1*変異体のROSレベルの測定(アッセイ数 ≥ 10)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (Dunnett's test)。コントロールにはROSレベルの低下が報告されている*daf-2*変異体を用いた。*xdh-1*変異体のROSレベルは正常であった。

**a**

変異体	ROSレベル
<i>sod-1</i>	上昇
<i>gst-4</i>	上昇
<i>bli-3</i>	減少
<i>mev-1</i>	上昇

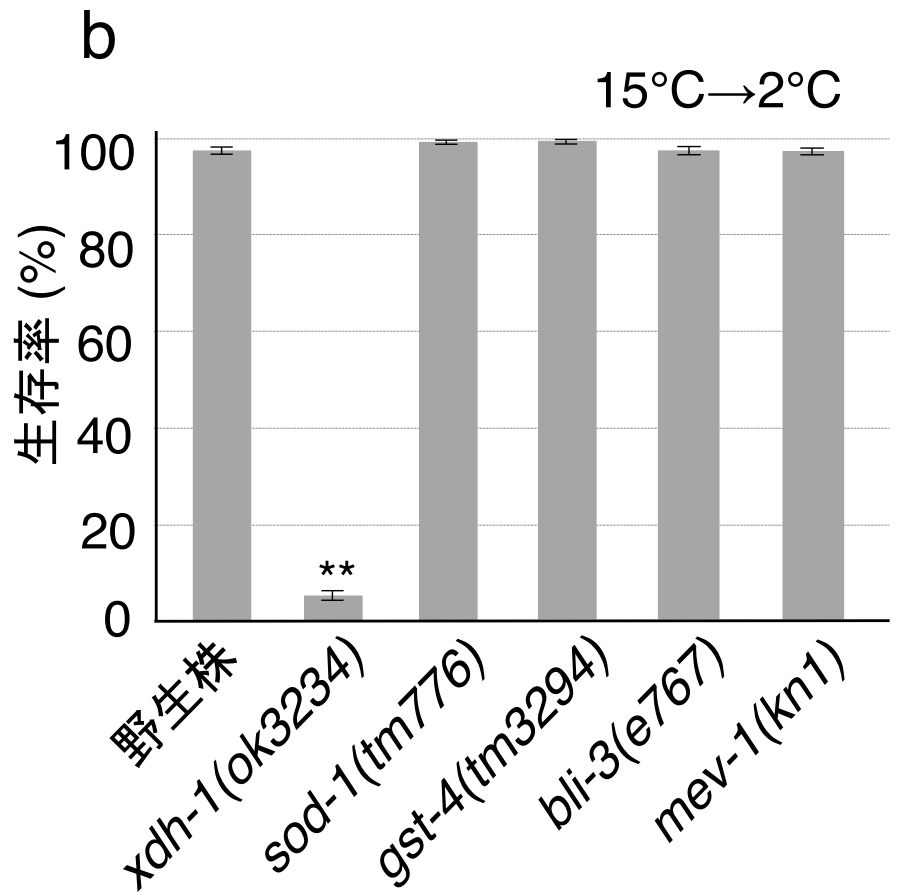


図18 ROS産生関連遺伝子の変異体の低温耐性

(a) 変異体ごとのROSレベルの増減。

(b) ROS産生に関わる遺伝子の変異体の低温耐性を解析した(アッセイ数 ≥ 11)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。\*\*p < 0.01

(Dunnett's test)。低温耐性異常を示す変異体は現れなかった。解析に用いた野生株のデータの一部を図14と共有している。

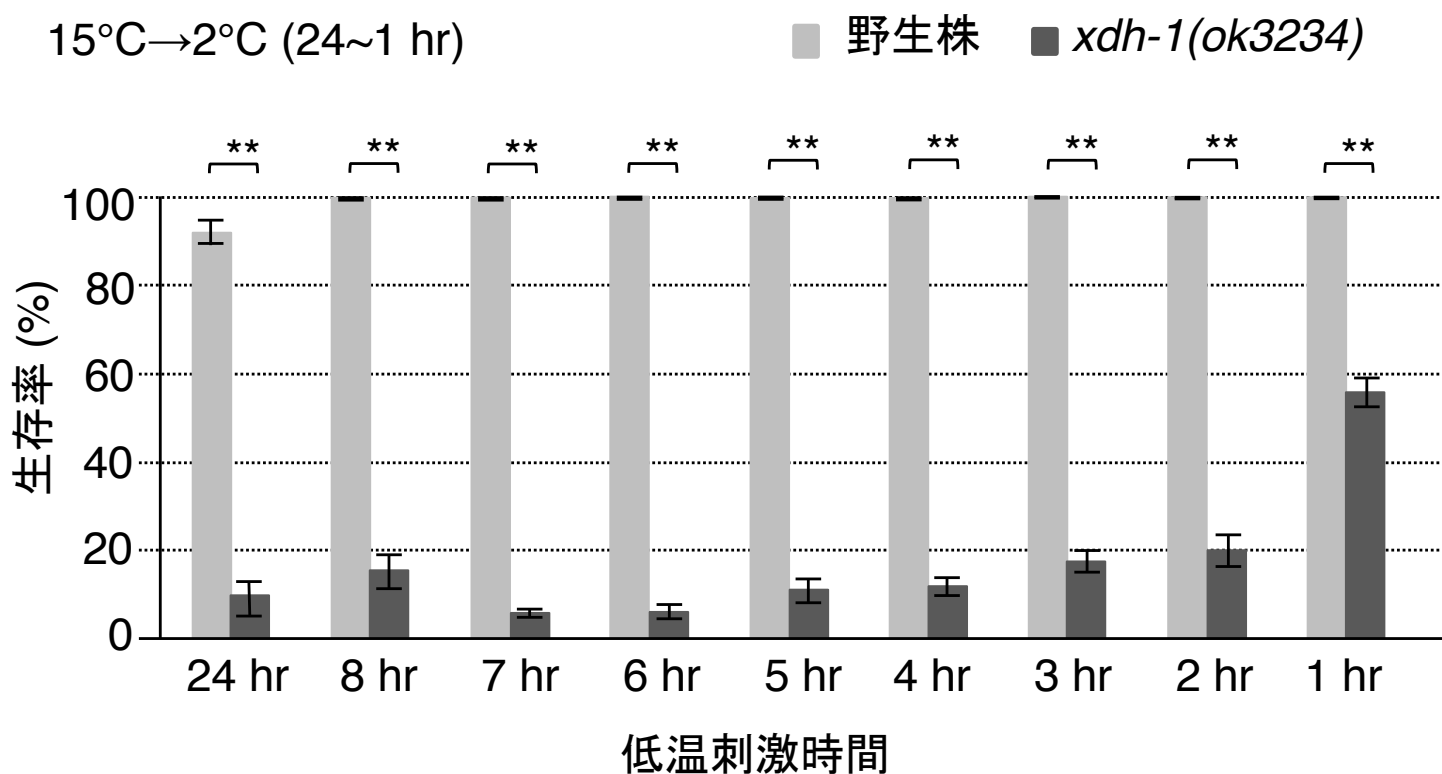


図19 *xdh-1* 変異体が低温耐性異常を示す最小低温刺激時間の検証

*xdh-1* 変異体はわずか1時間の低温刺激が与えられただけで低温耐性異常を示した(アッセイ数  $\geq 11$ )。15°C飼育後に2°Cに1~24時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Unpaired t test (Welch))。

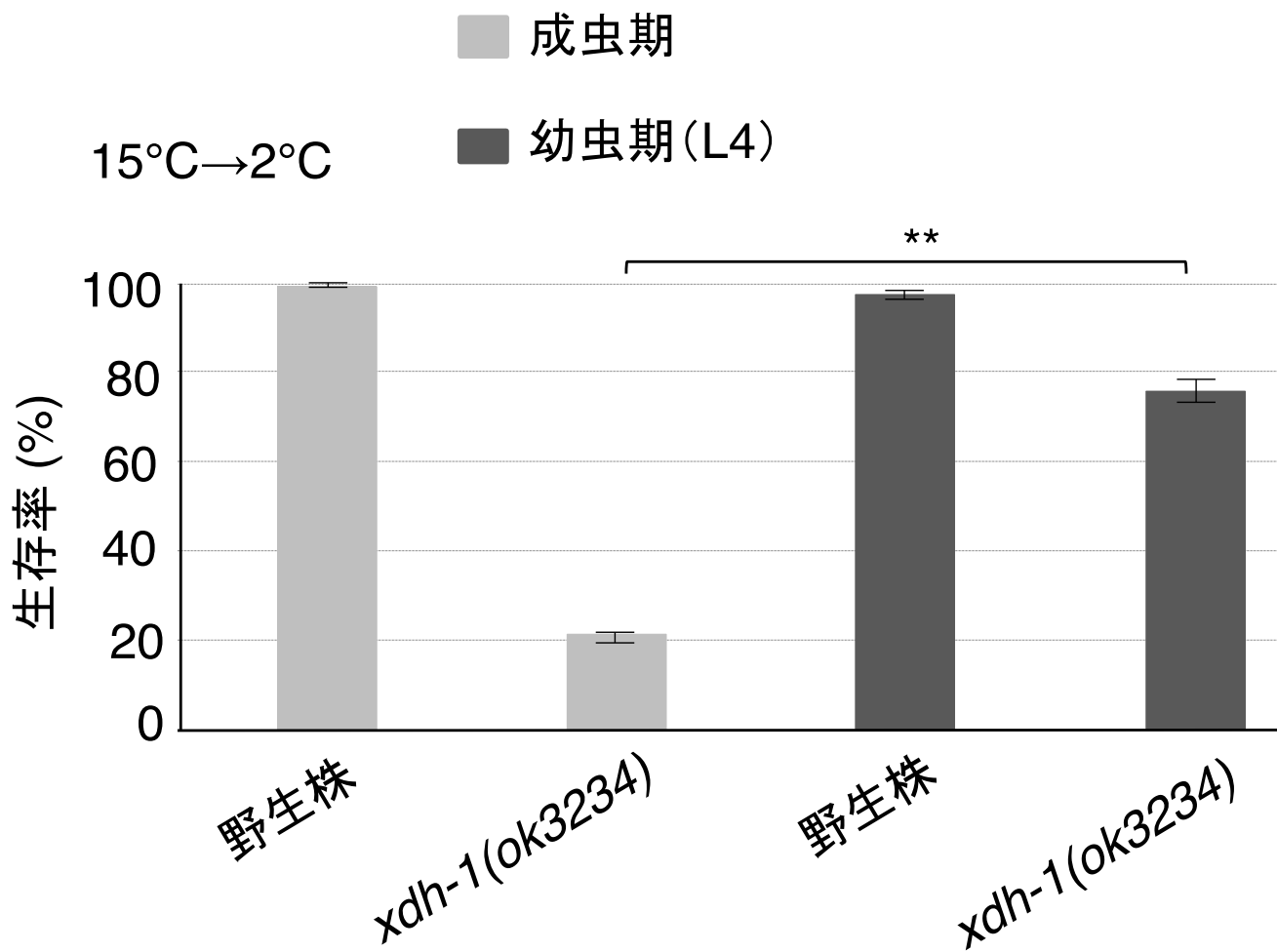


図20 発生段階ごとの*xdh-1*変異体の低温耐性

成虫期と幼虫期(L4)における、*xdh-1*変異体の低温耐性解析(アッセイ数 ≥ 9)。15°C飼育後に2°Cに24時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\*p < 0.01 (Tukey-Kramer)。成虫期の*xdh-1*変異体を示す低温耐性異常が幼虫期(L4)の*xdh-1*変異体では弱まった。

15°C→2°C

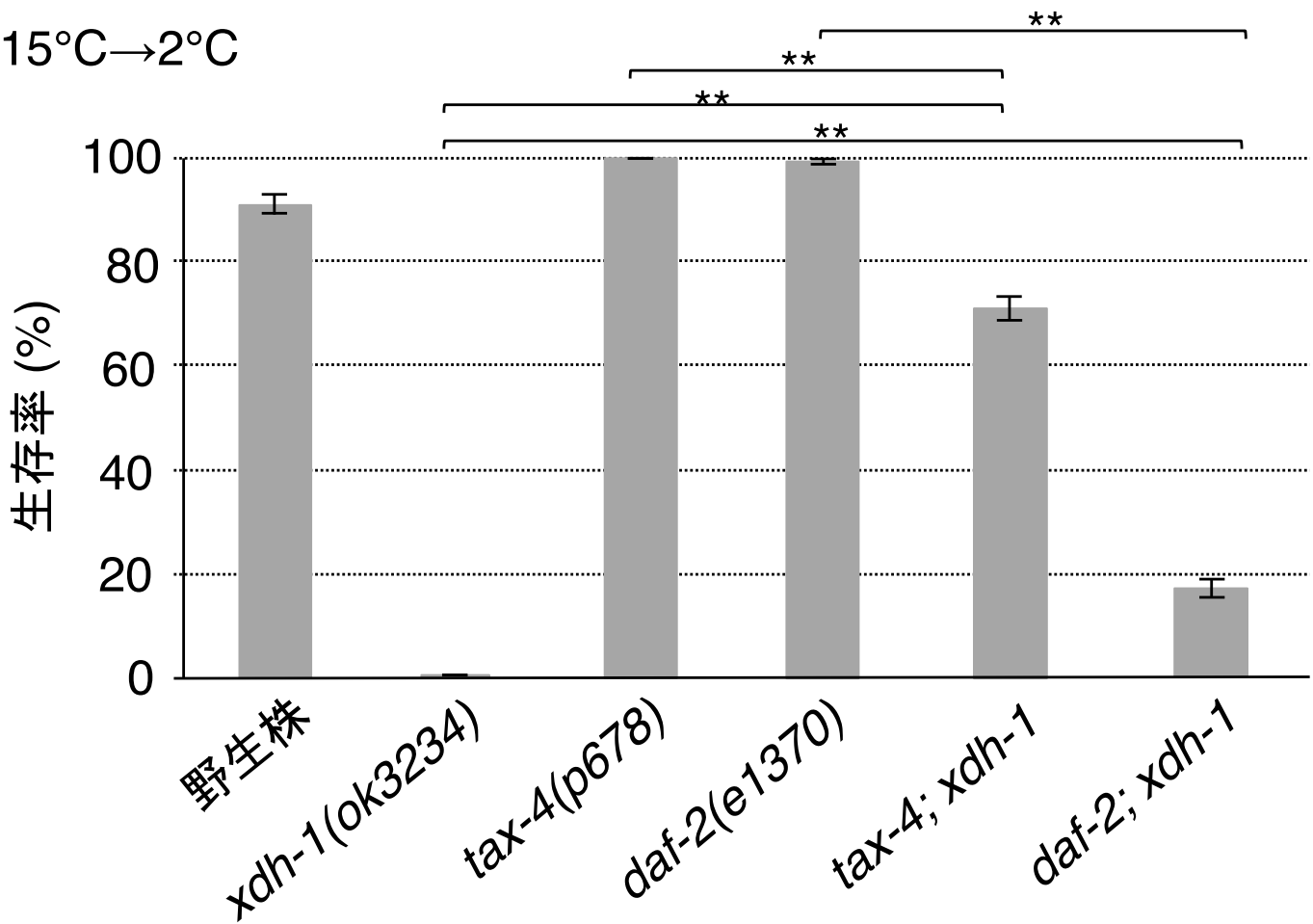
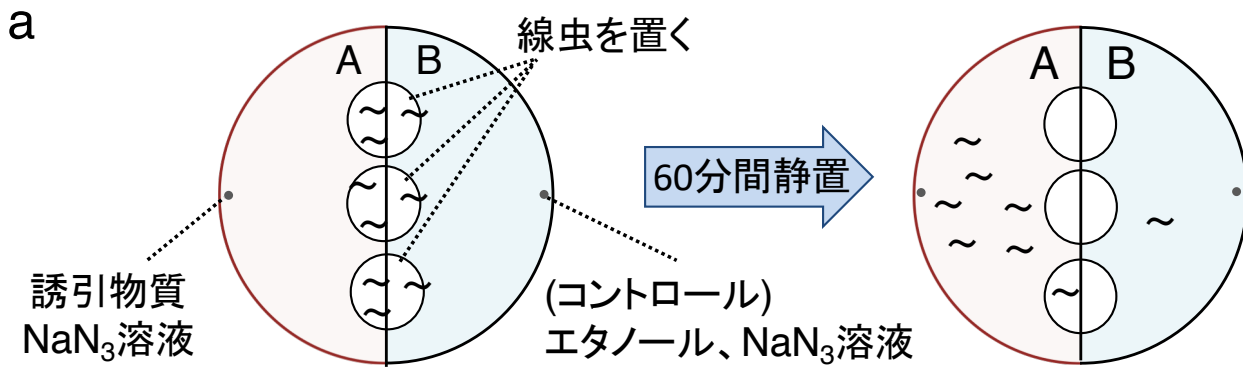


図21 既知の低温耐性遺伝子の変異体と*xdh-1*変異体の二重変異体解析

既知の低温耐性遺伝子の変異体 *tax-4(p678)* と *daf-2(e1370)* を用いて *xdh-1* 変異体との二重変異体を作製して、低温耐性における遺伝学的関係を解析した(アッセイ数  $\geq 16$ )。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。TAX-4はcGMP依存性チャンネルであり、DAF-2はインスリン受容体である。*tax-4; xdh-1* 二重変異体は *tax-4* 変異体と *xdh-1* 変異体の中間の表現型を示した。また、*daf-2; xdh-1* 二重変異体の結果から、*daf-2* 変異体を示す低温耐性の表現型は *xdh-1* 変異によって顕著に抑圧された。



$$\text{走性指数} = \frac{\text{Aの個体数} - \text{Bの個体数}}{\text{A + Bの個体数}}$$

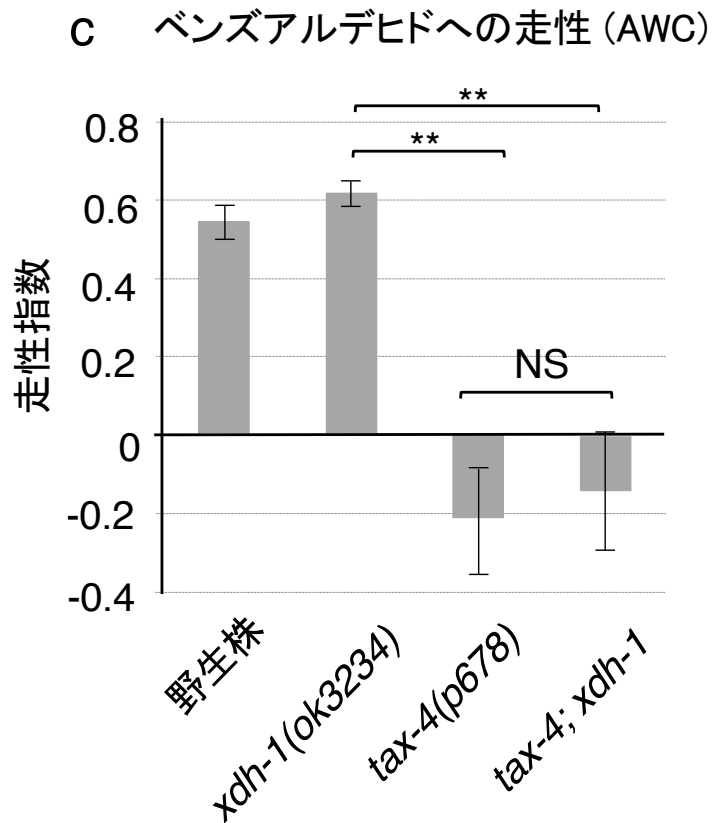
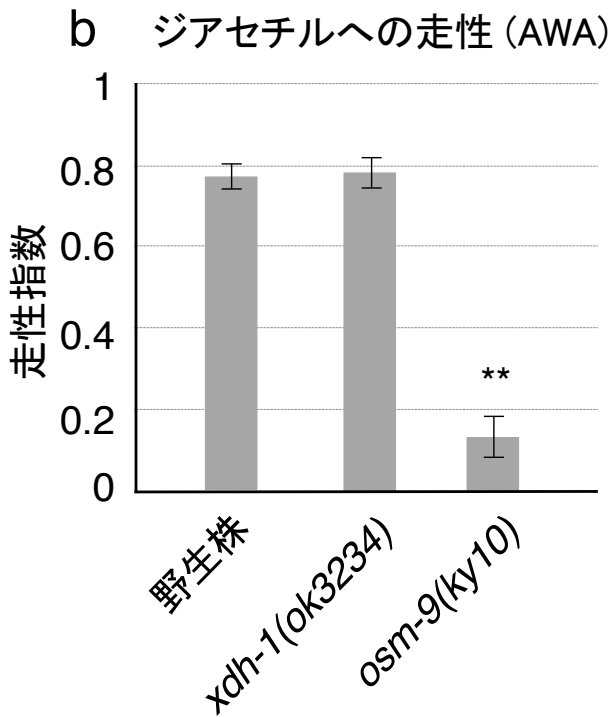


図22 *xdh-1* 変異体の化学走性テスト

(a) 化学走性テストの操作模式図。

(b) AWAニューロンによって受容されるジアセチルへの走性テスト(アッセイ数 ≥ 9)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\**p* < 0.01 (Dunnett's test)。 *xdh-1* 変異体はジアセチルに対して正常な走性を示した。

(c) AWCニューロンによって受容されるベンズアルデヒドへの走性テスト(アッセイ数 ≥ 12)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\**p* < 0.01 (Tukey-Kramer)。 *xdh-1* 変異体はベンズアルデヒドに対して正常な走性を示した。



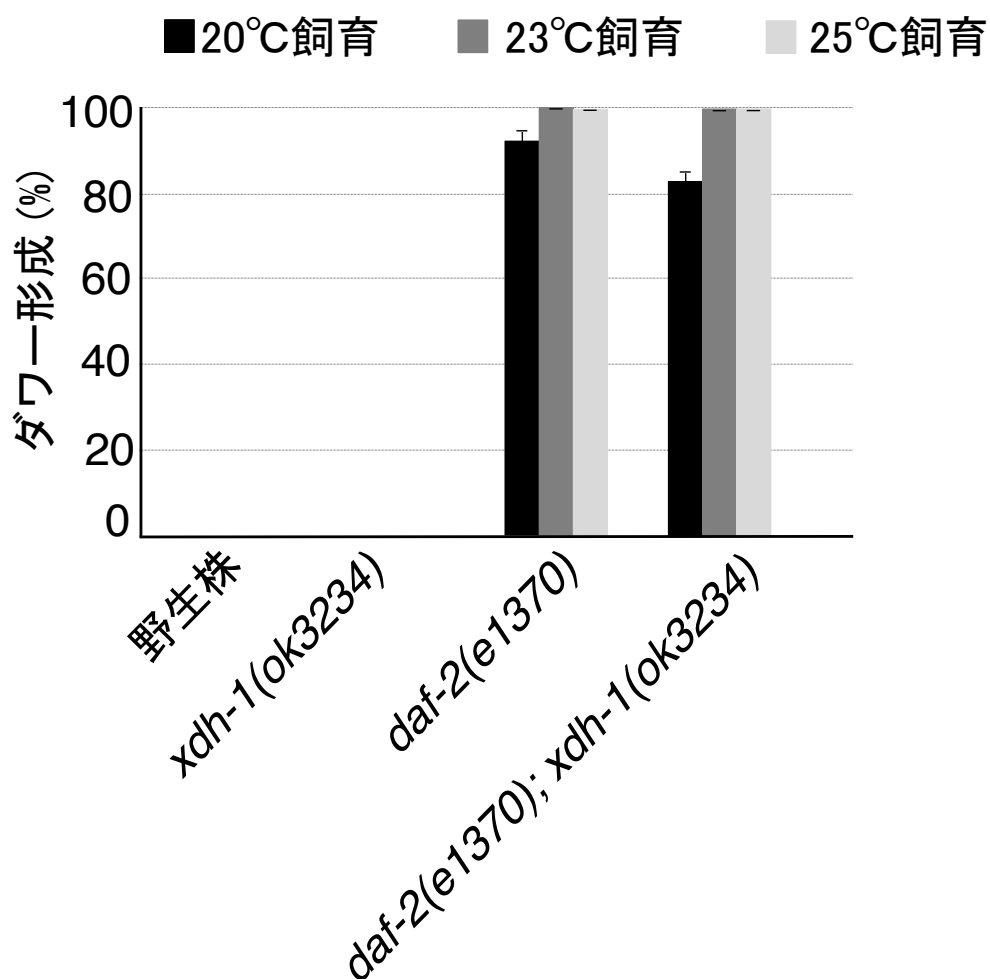


図23 *xdh-1* 変異体の構成的ダワー形成頻度解析

XDH-1とダワー形成機構との関係を調べるために、ダワー形成頻度の解析をおこなった(アッセイ数  $\geq 11$ )。コントロールには、構成的なダワー形成異常を示す *daf-2* 変異体を用いた。*xdh-1* 変異体は構成的なダワー形成異常を示さなかった。また、*daf-2; xdh-1* 二重変異体は *daf-2* 変異体と同程度のダワー形成異常を示した。

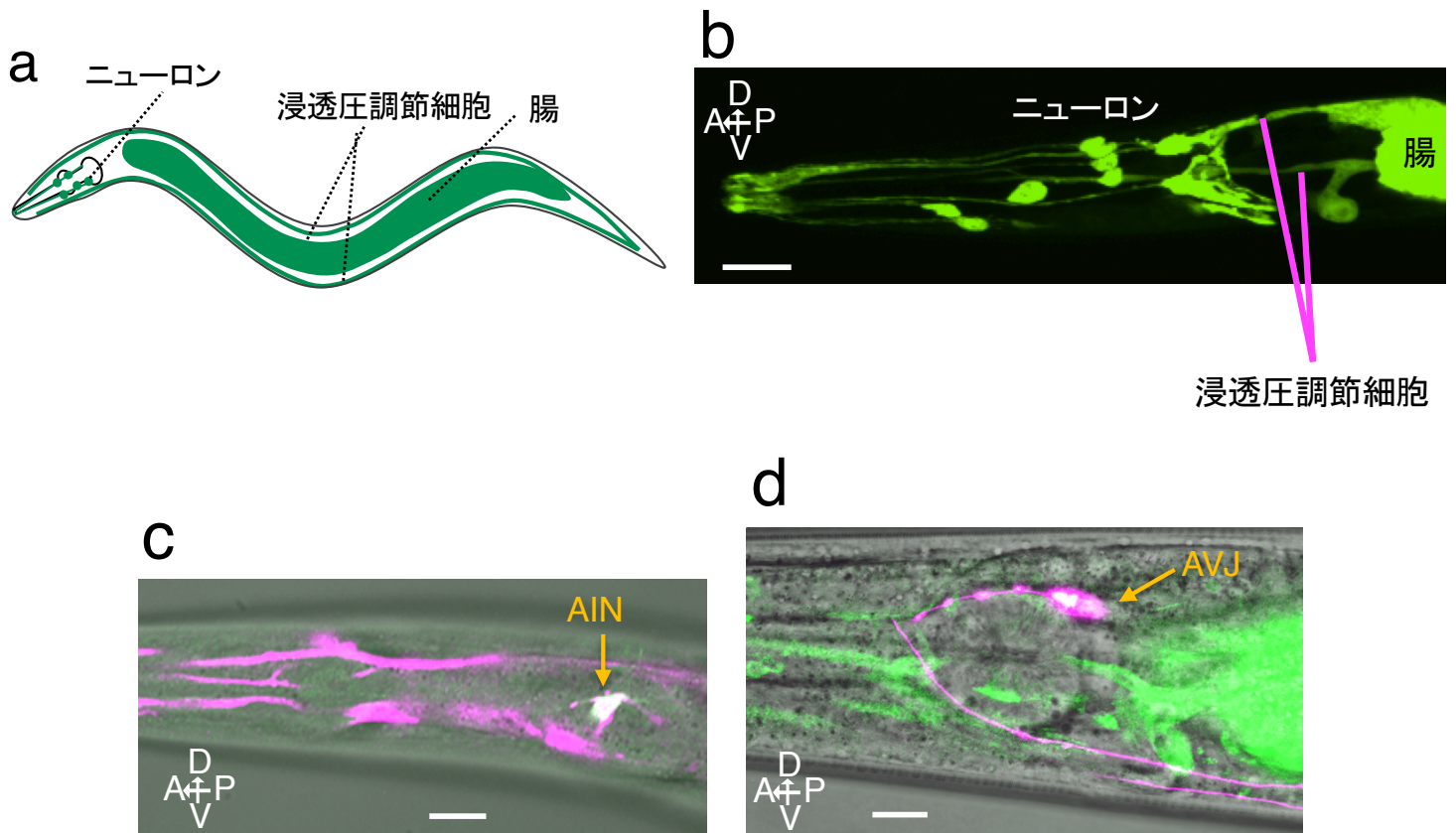


図24 *xdh-1* 遺伝子の発現細胞①

(a) *xdh-1* 遺伝子の発現細胞パターンの模式図。

(b) *xdh-1p::gfp* を用いた XDH-1 の発現細胞解析。ニューロン、腸、浸透圧調節細胞で GFP の蛍光が観察された (スケールバー:  $10\ \mu\text{m}$ )。

(c) *xdh-1p::dsRedm* (マゼンタ) と *inx-17p(AINp)::yfp* (緑) (スケールバー:  $10\ \mu\text{m}$ )。矢印は、AIN 介在ニューロンにおける YFP と DsRedm の共発現を示す (白)。

(d) *xdh-1p::xdh-1\ cDNA::gfp* (緑) と *hlh-34p(AVJp)::dsRedm* (マゼンタ) (スケールバー:  $10\ \mu\text{m}$ )。矢印は、AVJ 介在ニューロンにおける GFP と DsRedm の共発現を示す (白)。

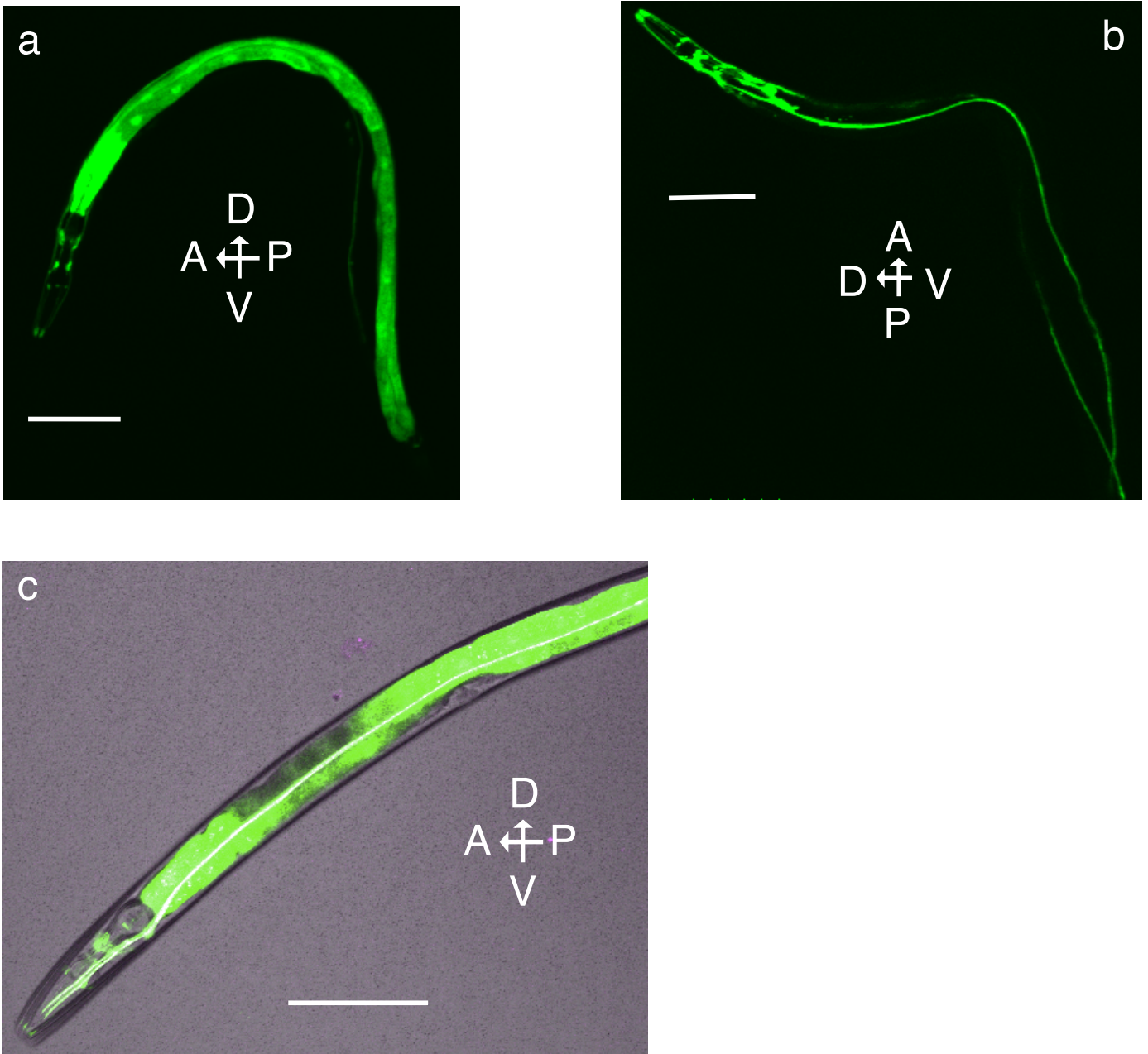


図25 *xdh-1* 遺伝子の発現細胞②

- (a) *xdh-1p::gfp* を用いて XDH-1 の発現細胞を可視化。ニューロン、腸、浸透圧調節細胞で GFP の蛍光が観察された (スケールバー: 100 μm)。
- (b) *xdh-1p::gfp* による XDH-1 の発現細胞解析。蛍光は腸では検出されず、浸透圧調節細胞がはっきりと観察された。これはモザイク現象が原因であると考えられる (スケールバー: 100 μm)。
- (c) *xdh-1p::gfp* (緑) と *pgp-12p::dsRedm* (マゼンタ) (スケールバー: 100 μm)。白線は浸透圧調節細胞における GFP と DsRedm の共発現を示す。

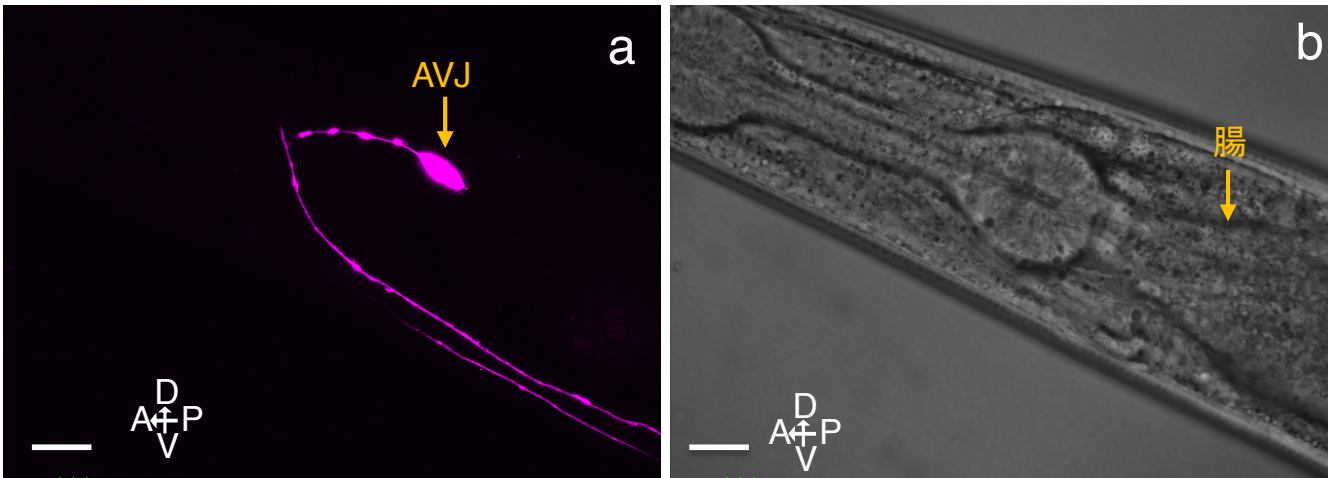


図26 *hlh-34p::dsRedm* の発現細胞

(a) *hlh-34p::dsRedm* によるAVJニューロンの蛍光画像。DsRedmの励起光照射によって、蛍光はAVJニューロン特異的に観察された(スケールバー:  $10\ \mu\text{m}$ )。  
 (b) 図26aのノマルスキー画像(スケールバー:  $10\ \mu\text{m}$ )。

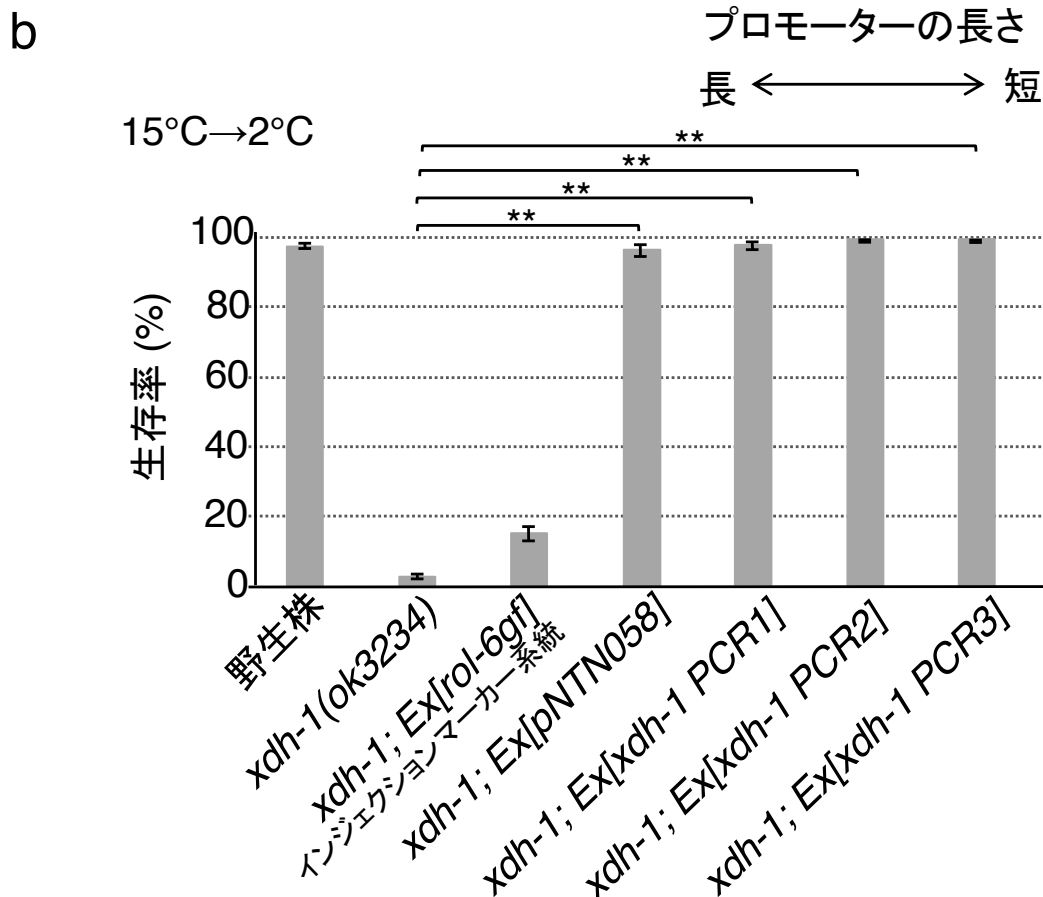
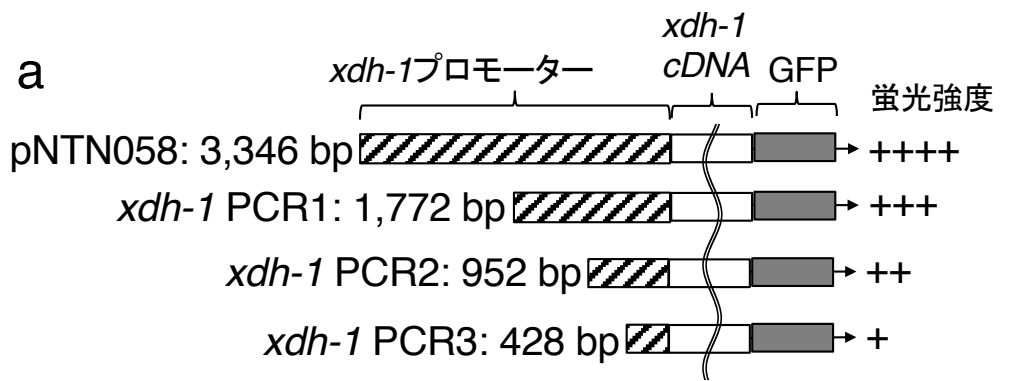


図27 プロモーターの長さを変えた*xdh-1*変異体の回復実験

(a) 図27bの遺伝子導入システムを作製するのに用いたプラスミドやPCR断片の模式図。  
 (b) *xdh-1*プロモーターの長さを変更して、XDH-1の低温耐性における機能細胞での発現誘導に必要なプロモーター領域を解析した(アッセイ数  $\geq 18$ )。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。428 bpまでプロモーターが短縮された系統でも*xdh-1*変異体の低温耐性異常の回復が見られた。

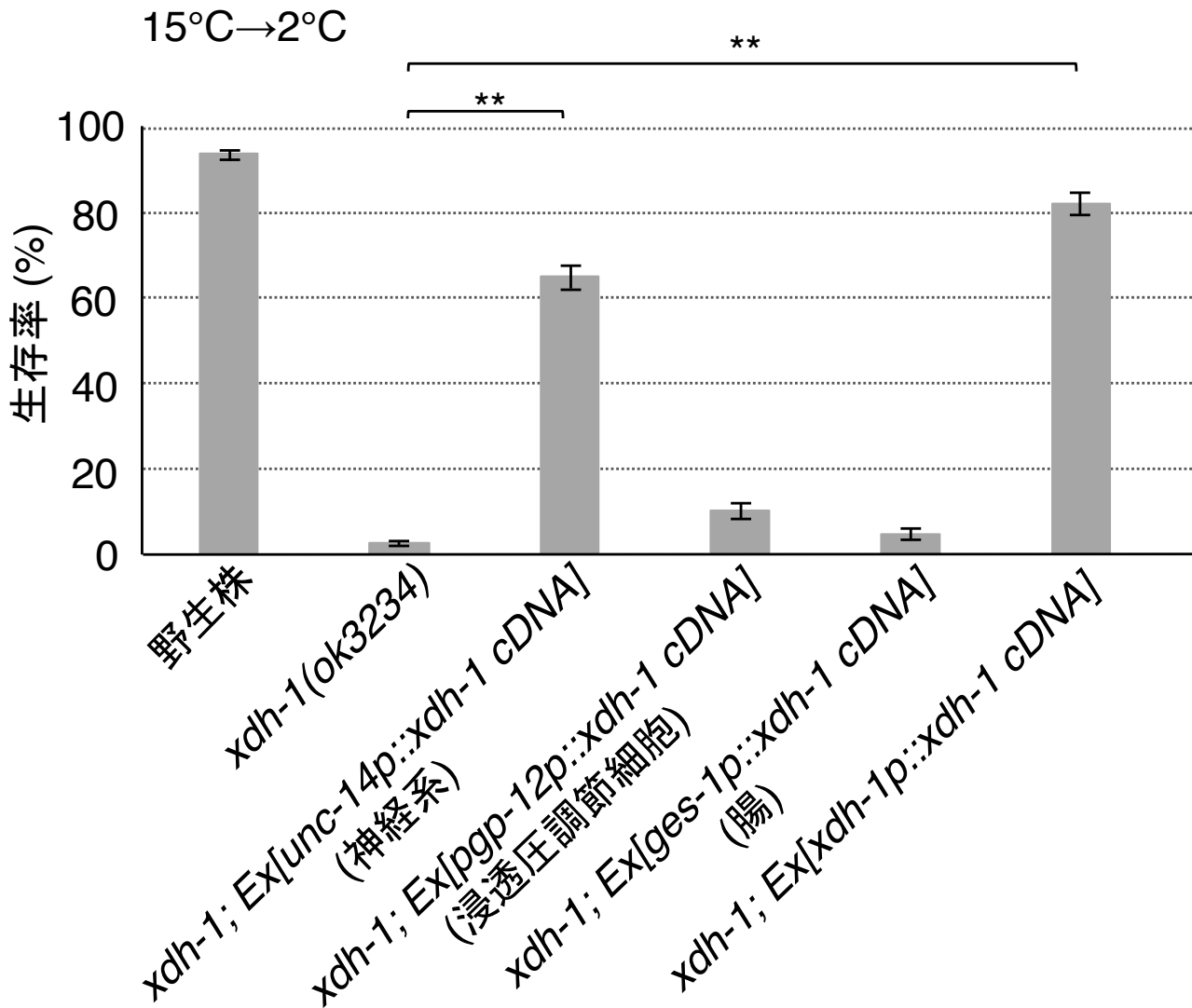


図28 *xdh-1(ok3234)* の組織特異的回復実験

*xdh-1* 変異体の低温耐性異常は神経系で*xdh-1* 遺伝子を発現させることにより回復した。一方、*xdh-1* 変異体の浸透圧調節細胞や腸で*xdh-1* 遺伝子を発現させても異常は回復しなかった。(アッセイ数  $\geq 9$ )。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。野生株と*xdh-1; Ex[unc-14p::xdh-1 cDNA]* のデータの一部は図29と共有している。

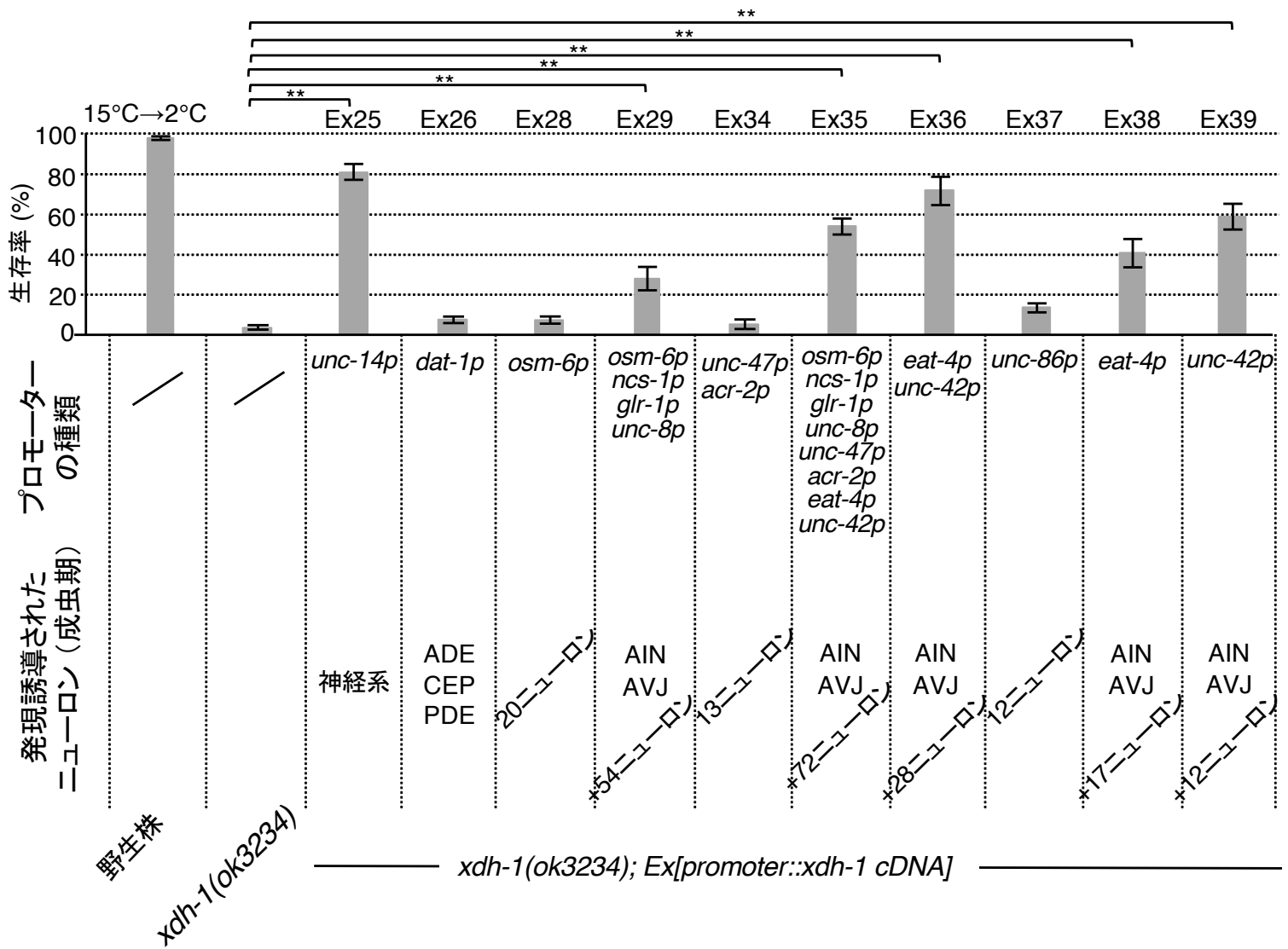


図29 *xdh-1(ok3234)* の細胞特異的回復実験①

*xdh-1* 変異体において、様々な特異的プロモーターを用いて *xdh-1* 遺伝子を発現させ、XDH-1の低温耐性における機能ニューロン同定をおこなった(アッセイ数  $\geq 6$ )。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。 *xdh-1* 変異体の低温耐性異常はEx25, 29, 35, 36, 38, 39系統で回復した。野生株と *xdh-1; Ex[unc-14p::xdh-1 cDNA]* (Ex25) のデータの一部を図28と共有している。

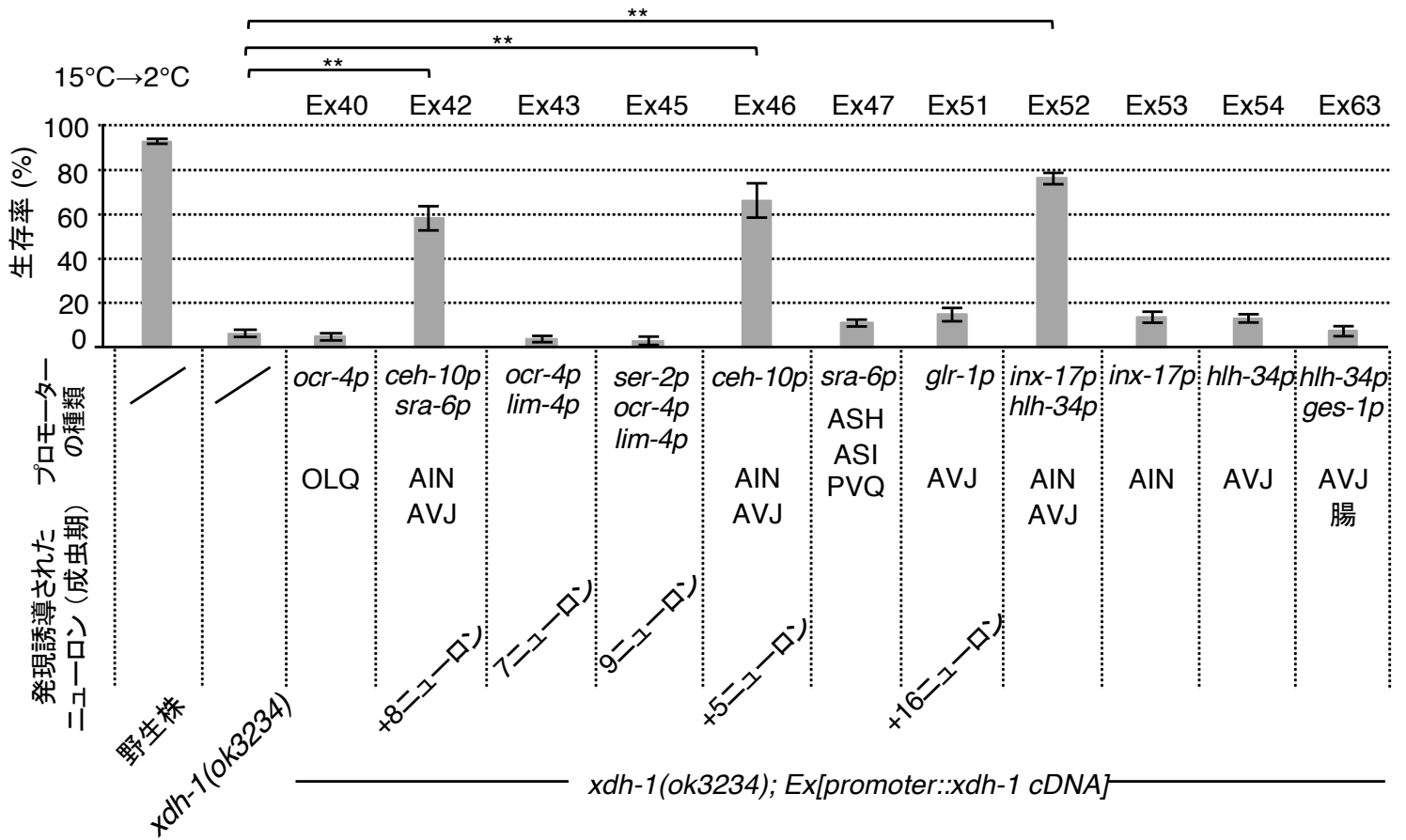


図30 *xdh-1(ok3234)* の細胞特異的回復実験②

*xdh-1* 変異体において、様々な特異的プロモーターを用いて *xdh-1* 遺伝子を発現させ、XDH-1の低温耐性における機能ニューロン同定をおこなった(アッセイ数  $\geq 6$ )。15°C飼育後に2°Cに48時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。 *xdh-1* 変異体の低温耐性異常はEx42, 46, 52系統で回復した。



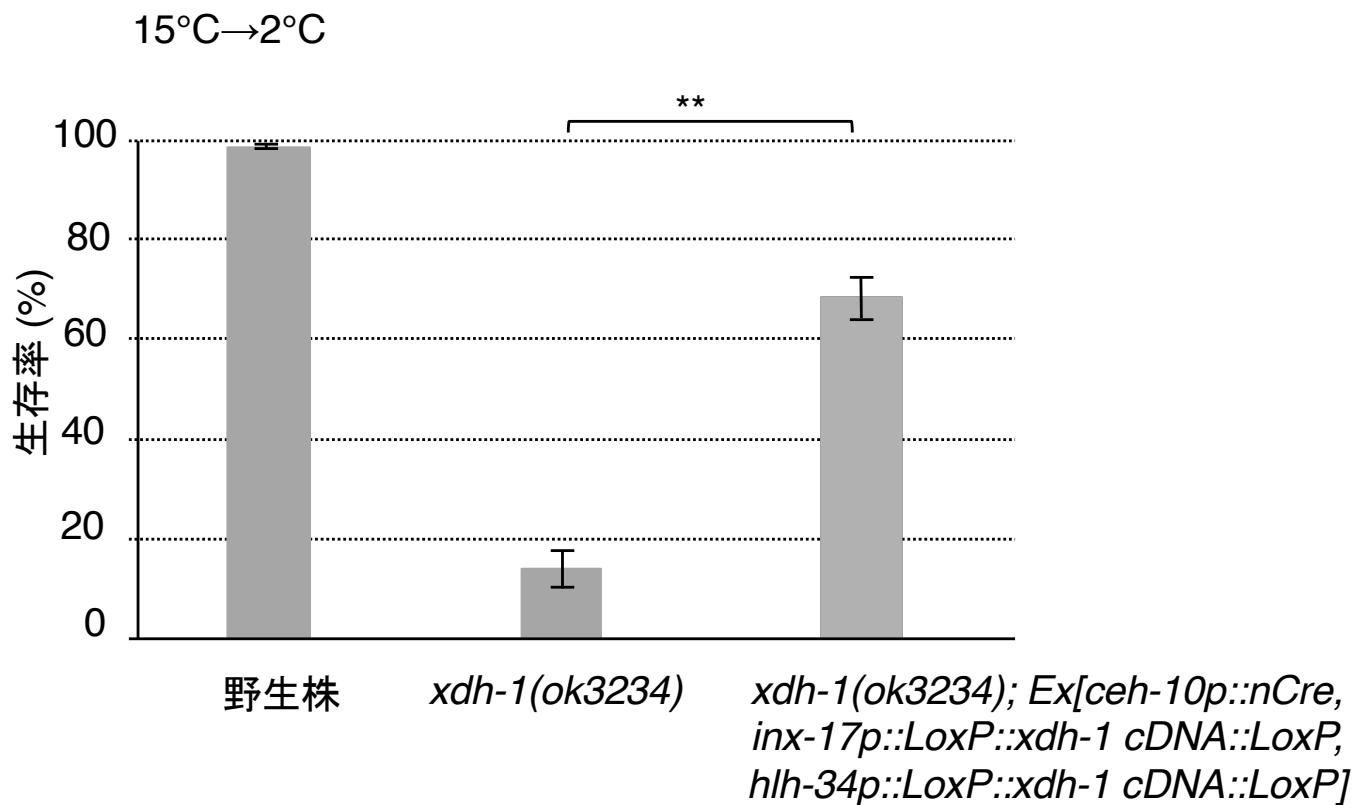


図31 Cre/LoxPシステムを用いた細胞特異的回復実験

Cre/LoxPシステムによってAINとAVJ特異的に*xdh-1*遺伝子を発現させた細胞特異的回復実験(アッセイ数  $\geq 6$ )。15°C飼育後に2°Cに8時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。 *xdh-1* 変異体のAINとAVJでのみ*xdh-1* 遺伝子を発現させると、低温耐性異常が回復した。

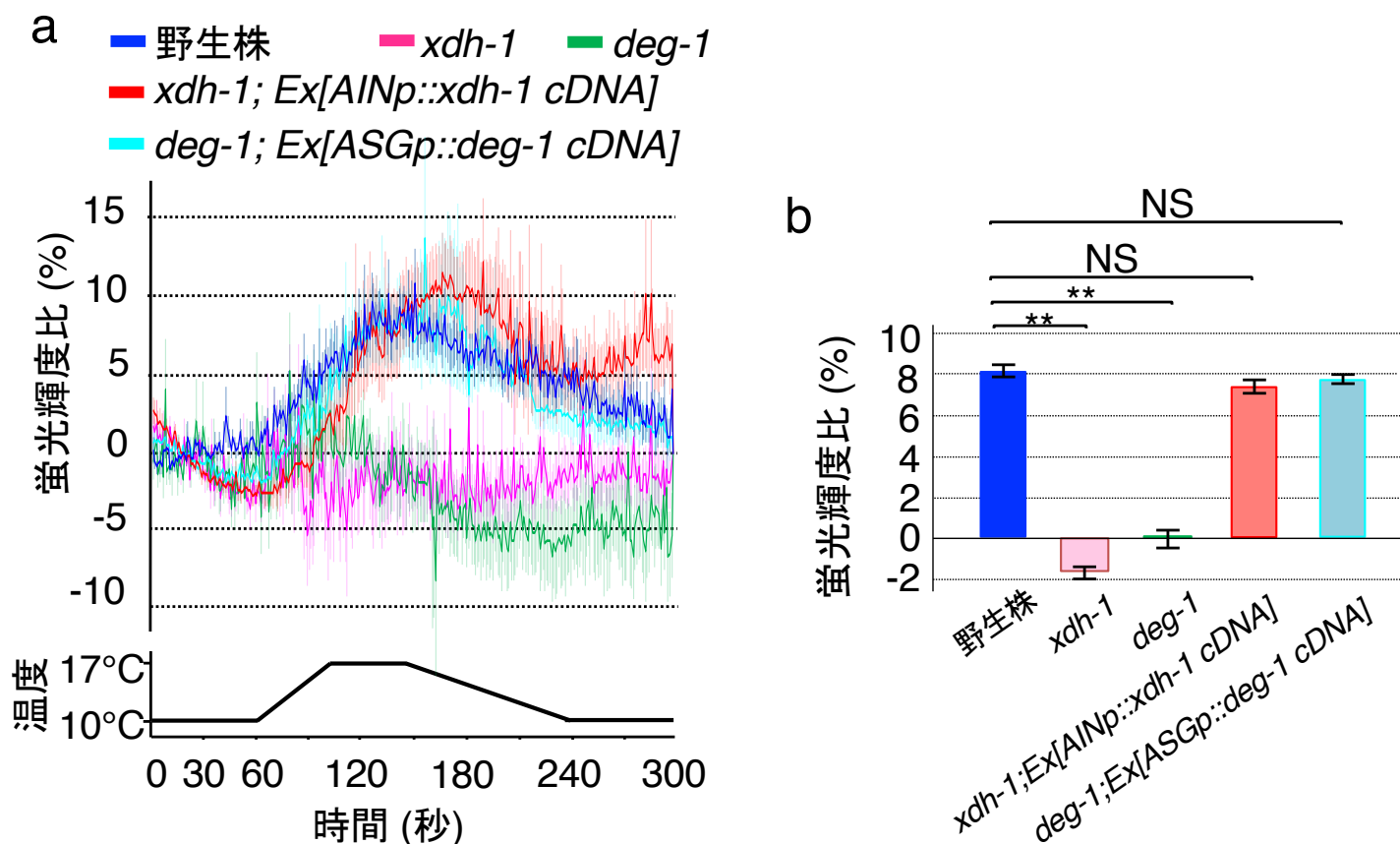


図32 AIN介在ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング

(a) YC3.60を用いたAIN介在ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング (解析個体数 ≥ 14)。飼育温度: 15°C。温度刺激パターンはグラフ下に記載。*xdh-1* 変異体と*deg-1* 変異体は温度刺激に対して異常な反応低下を示した。*xdh-1* 変異体のAINで*xdh-1* 遺伝子を発現させた*xdh-1; Ex[inx-17p(AINp)::*xdh-1* cDNA]* 系統では反応低下が回復した。また、*deg-1* 変異体のASGで*deg-1* 遺伝子を発現させた*deg-1; Ex[gcy-21p(ASGp)::*deg-1* cDNA]* 系統では反応低下が回復した。

(b) 図32aの120-131秒の11秒間の蛍光輝度比 (%) の平均を棒グラフにした。棒グラフの色は図32aの色と対応している。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\**p* < 0.01 (Tukey-Kramer)。

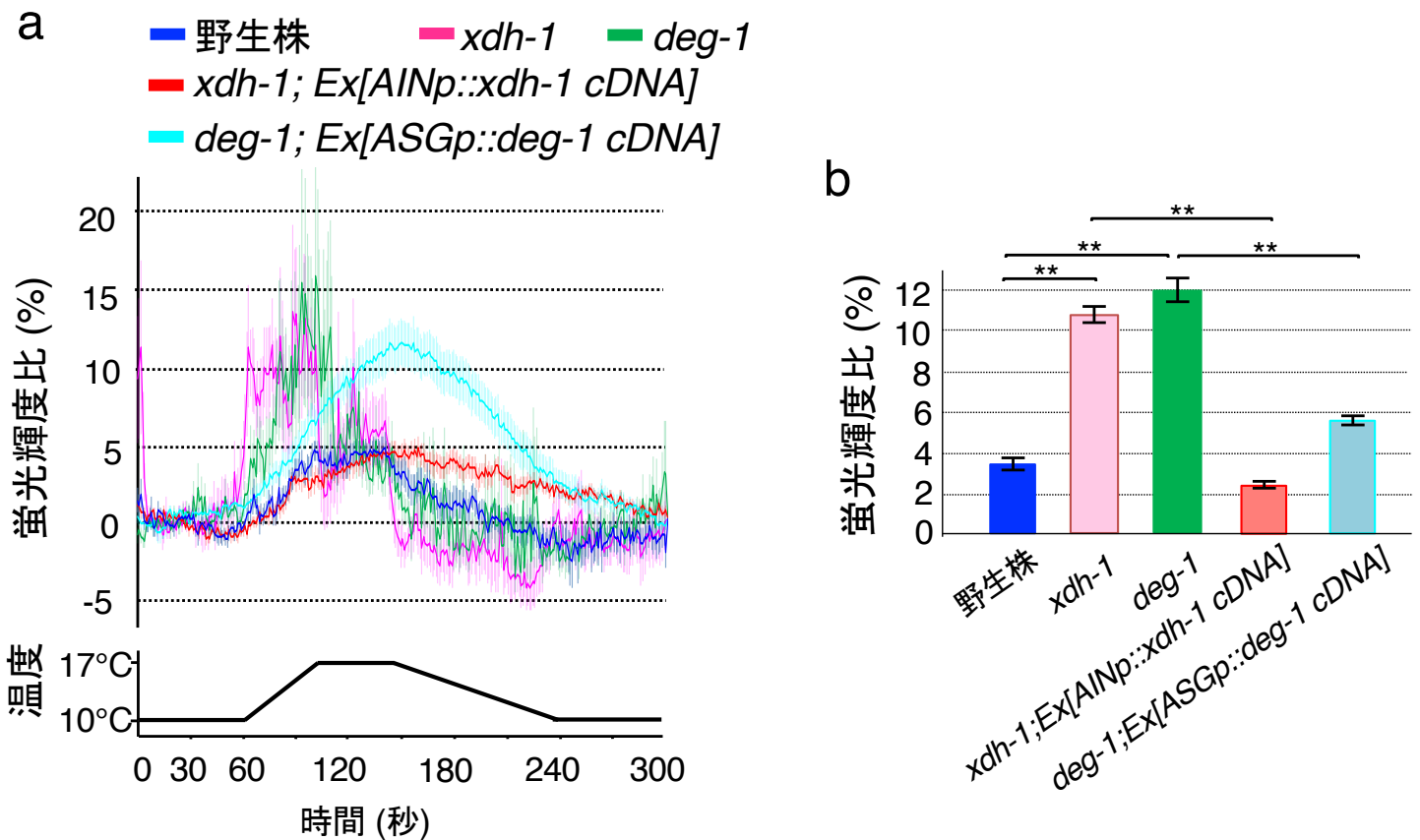


図33 AVJ介在ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング

(a) YC3.60を用いたAVJ介在ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング (解析個体数 ≥ 16)。飼育温度: 15°C。温度刺激パターンはグラフ下に記載。*xdh-1* 変異体と*deg-1* 変異体は温度刺激に対して異常な過活性を示した。*xdh-1* 変異体のAVJで*xdh-1* 遺伝子を発現させた*xdh-1; Ex[h1h-34p(AVJp)::*xdh-1* cDNA]* 系統では異常な過活性が回復した。また、*deg-1* 変異体のASGで*deg-1* 遺伝子を発現させた*deg-1; Ex[gcy-21p(ASGp)::*deg-1* cDNA]* 系統では温度上昇直後の過活性が回復した。

(b) 図33aの90-101秒の11秒間の蛍光輝度比 (%) の平均を棒グラフにした。棒グラフの色は図33aの色と対応している。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\**p* < 0.01 (Tukey-Kramer)。

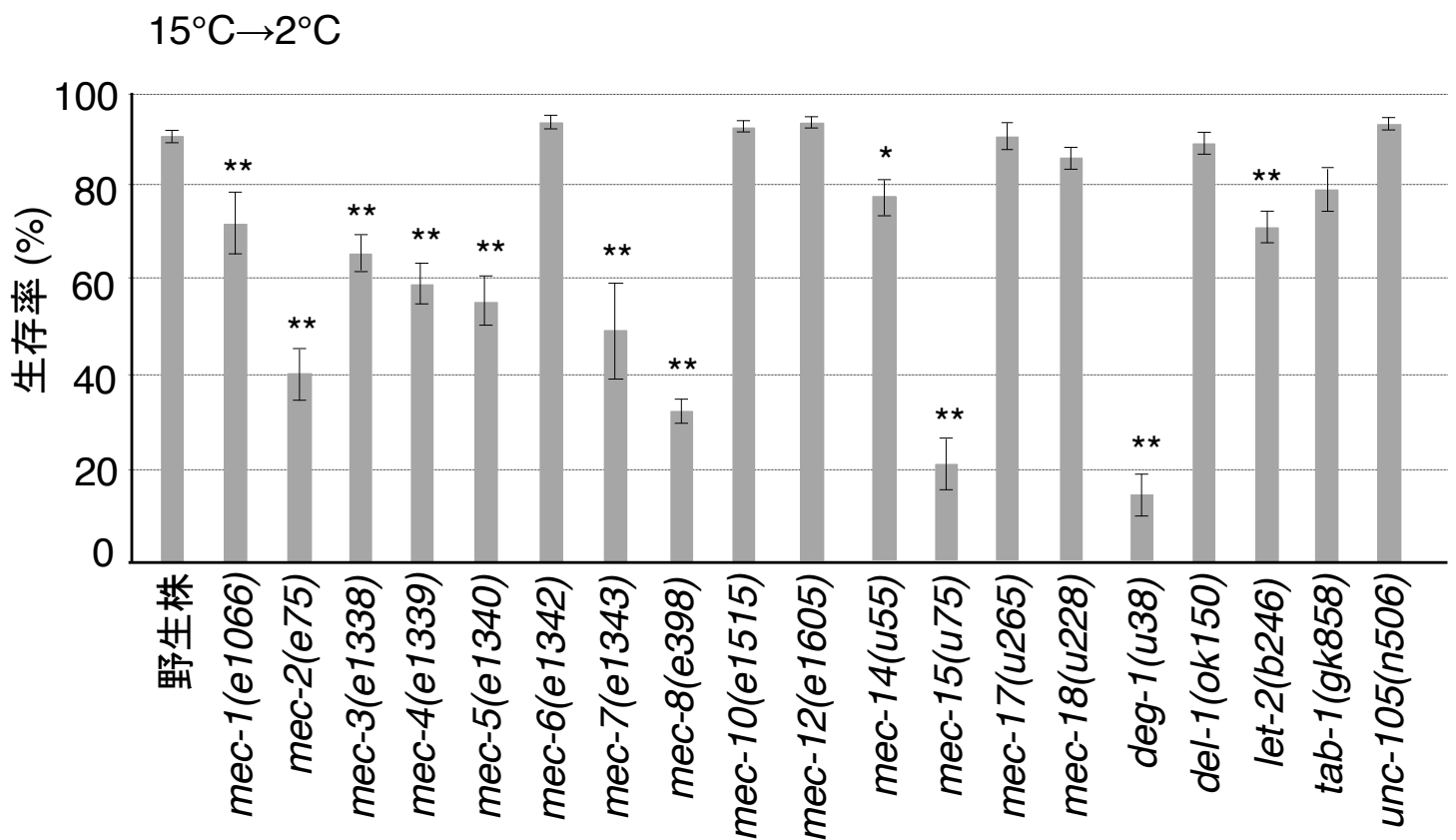


図34 DEG/ENaCタイプメカノ受容体や機械刺激情報伝達関連遺伝子の変異体の低温耐性解析

DEG/ENaCタイプのメカノ受容体をコードする遺伝子の変異体や、機械刺激情報伝達関連遺伝子の変異体の低温耐性解析 (アッセイ数  $\geq 10$ )。15°C飼育後に2°Cに96時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Dunnett's test)。*mec-1*, *mec-2*, *mec-3*, *mec-4*, *mec-5*, *mec-7*, *mec-8*, *mec-14*, *mec-15*, *deg-1*, *let-2* 変異体が低温耐性異常を示した。中でも *deg-1* 変異体が顕著な異常を示した。

15°C→2°C

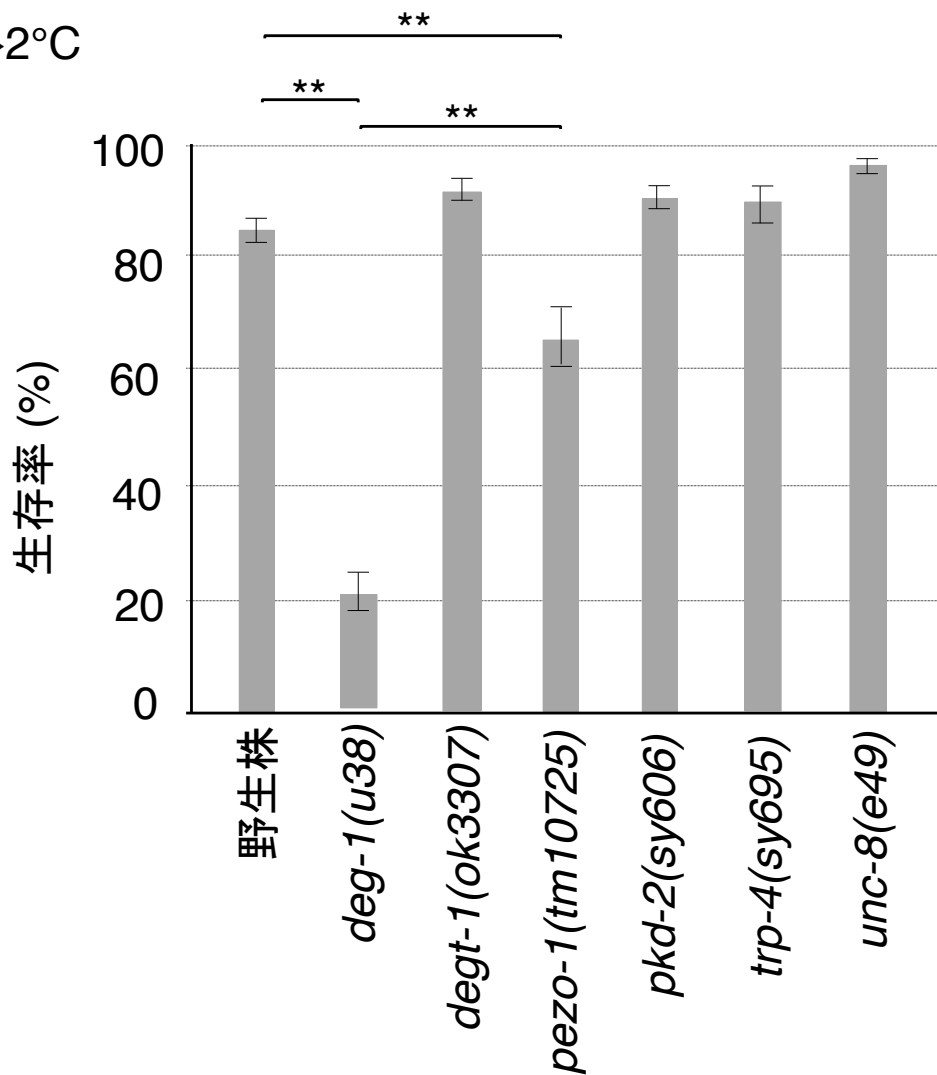


図35 DEG/ENaCタイプメカノ受容体とその他のメカノ受容体関連遺伝子の変異体の低温耐性解析

DEG/ENaCタイプ以外のメカノ受容体をコードする遺伝子の変異体の低温耐性も解析した (アッセイ数  $\geq 11$ )。15°C飼育後に2°Cに96時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。*deg-1*, *degt-1*, *unc-8*はDEG/ENaCタイプメカノ受容体をコードする。*pezo-1*はヒトのPIEZOのオルソログをコードする。*trp-4*と*pkd-2*はTRPチャンネルをコードする。*deg-1*変異体ほど顕著な異常を示す系統は現れなかった。

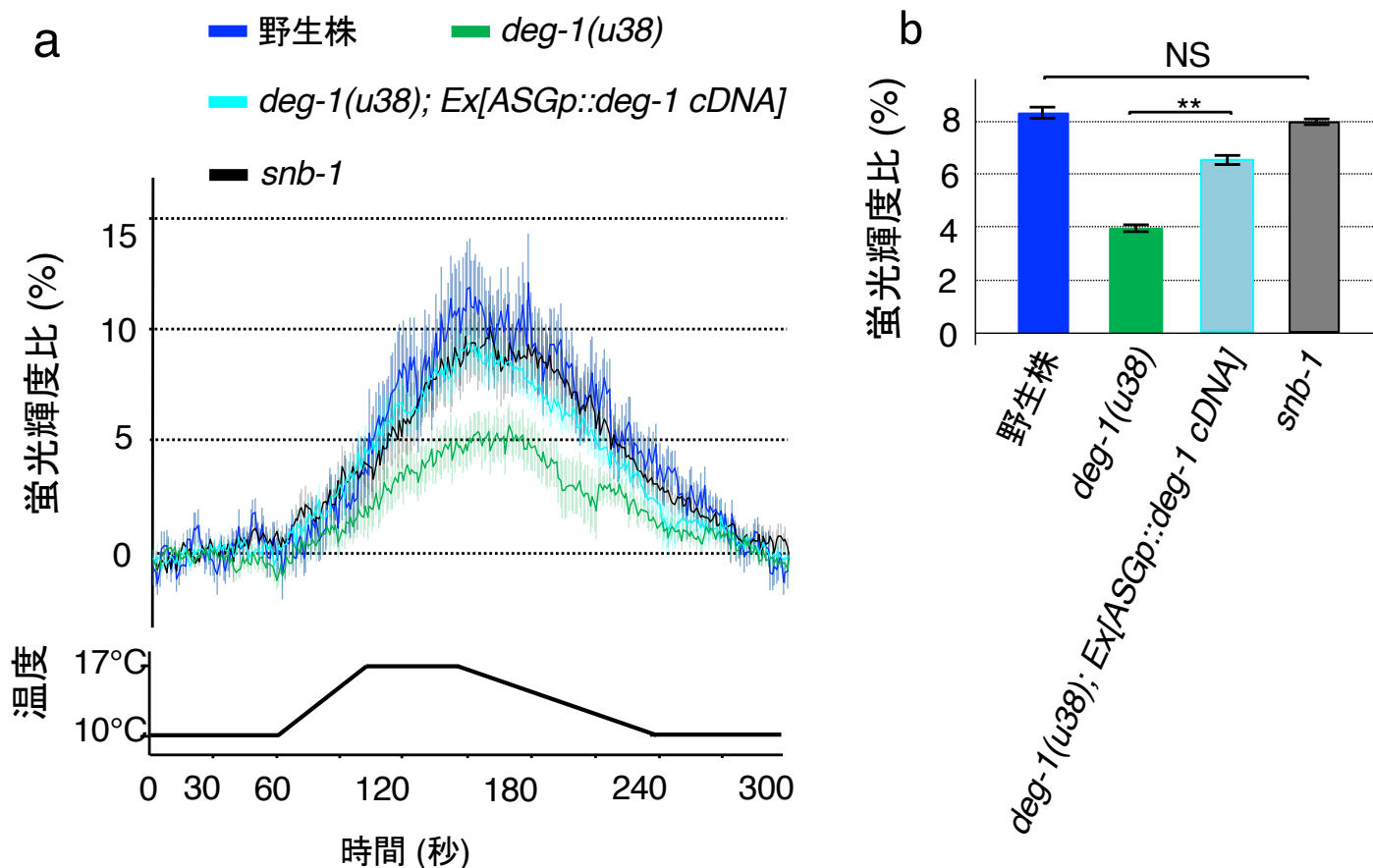


図36 ASG感覚ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング

(a) YC3.60を用いたASG感覚ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング (解析個体数 ≥ 14)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。飼育温度: 15°C。温度刺激パターンはグラフ下に記載。*deg-1(u38)* 変異体は温度刺激に対して異常な反応低下を示した。*deg-1(u38)* 変異体のASGで*deg-1* 遺伝子を発現させた*deg-1(u38); Ex[gcy-21p(ASGp)::deg-1 cDNA]* 系統では反応低下が回復した。*u38* 変異はドミナントネガティブ変異であるが、野生株型の*deg-1* 遺伝子を導入することで機械刺激への反応異常が回復することが報告されている (Chalfie et al., 1990)。*snb-1* 変異体では野生株と同等の反応が見られた。

(b) 図36aの180-191秒の11秒間の蛍光輝度比 (%) の平均を棒グラフにした。棒グラフの色は図36aの色と対応している。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\**p* < 0.01 (Tukey-Kramer)。

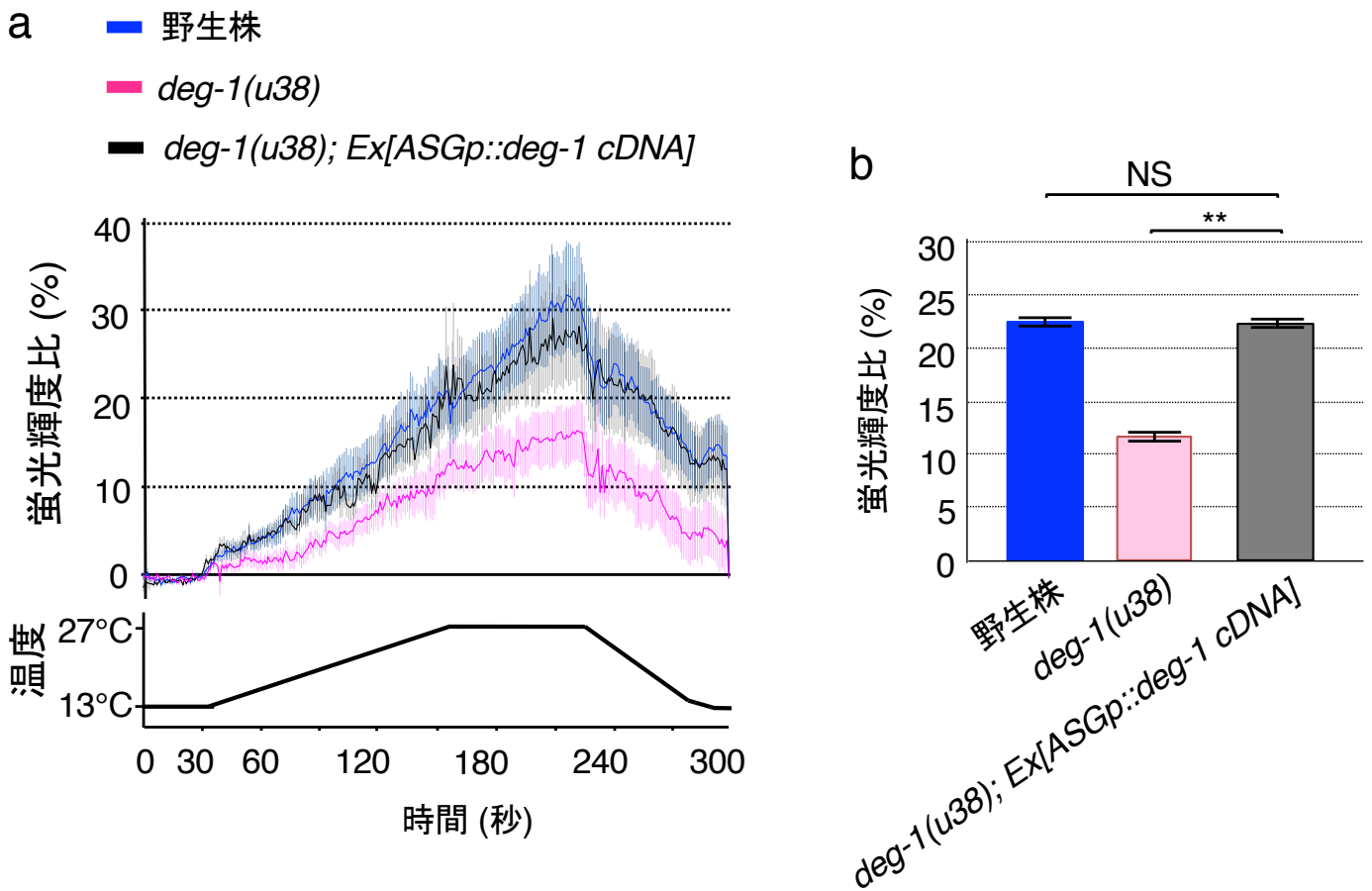


図37 ASG感覚ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング (13°C→27°C→13°C)

(a) YC3.60を用いたASG感覚ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング (解析個体数 ≥ 20)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。飼育温度: 15°C。温度刺激パターンはグラフ下に記載。*deg-1(u38)* 変異体は温度刺激に対して異常な反応低下を示した。*deg-1(u38)* 変異体のASGで*deg-1* 遺伝子を発現させた*deg-1(u38); Ex[gcy-21p(ASGp)::*deg-1* cDNA]* 系統では反応低下が回復した。*u38* 変異はドミナントネガティブ変異であるが、野生株型の*deg-1* 遺伝子を導入することで機械刺激への反応異常が回復することが報告されている (Chalfie et al., 1990)。

(b) 図37aの230-241秒の11秒間の蛍光輝度比 (%) の平均を棒グラフにした。棒グラフの色は図37aの色と対応している。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\**p* < 0.01 (Tukey-Kramer)。

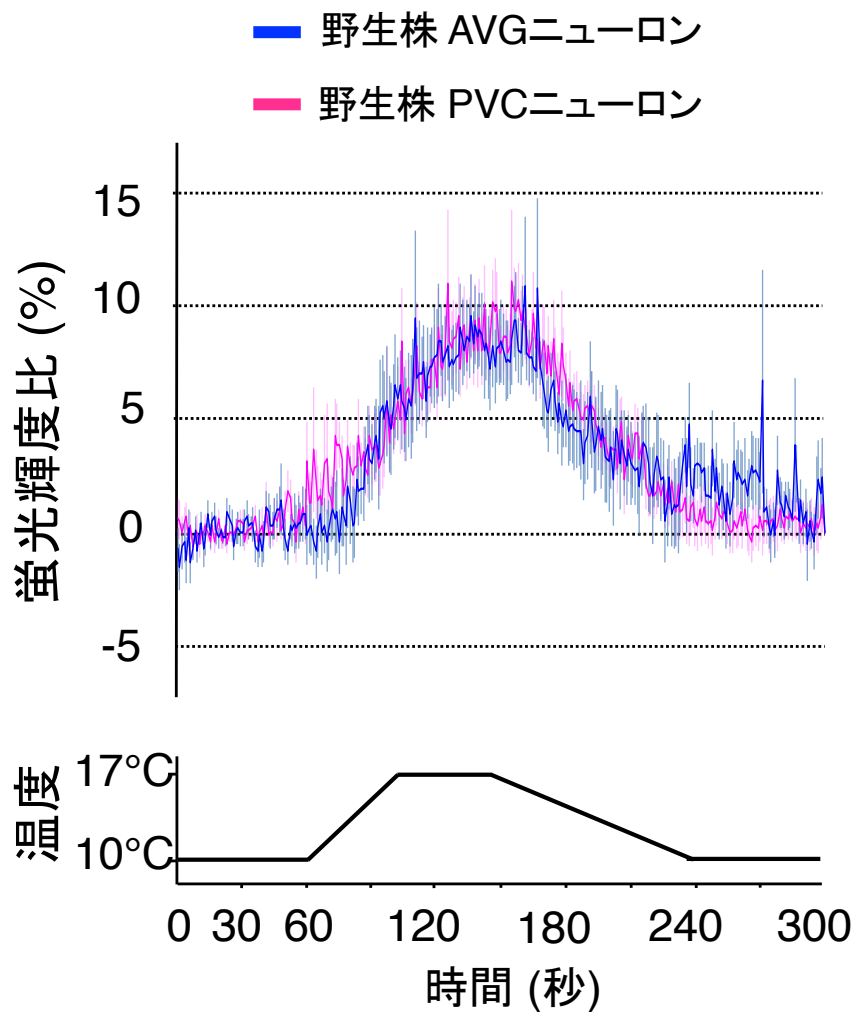


図38 AVG介在ニューロンとPVC介在ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング

YC3.60を用いたAVGとPVCニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング (解析個体数 ≥ 7)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。飼育温度: 15°C。温度刺激パターンはグラフ下に記載。AVG介在ニューロンとPVC介在ニューロンは温度刺激に反応した。



15°C→2°C

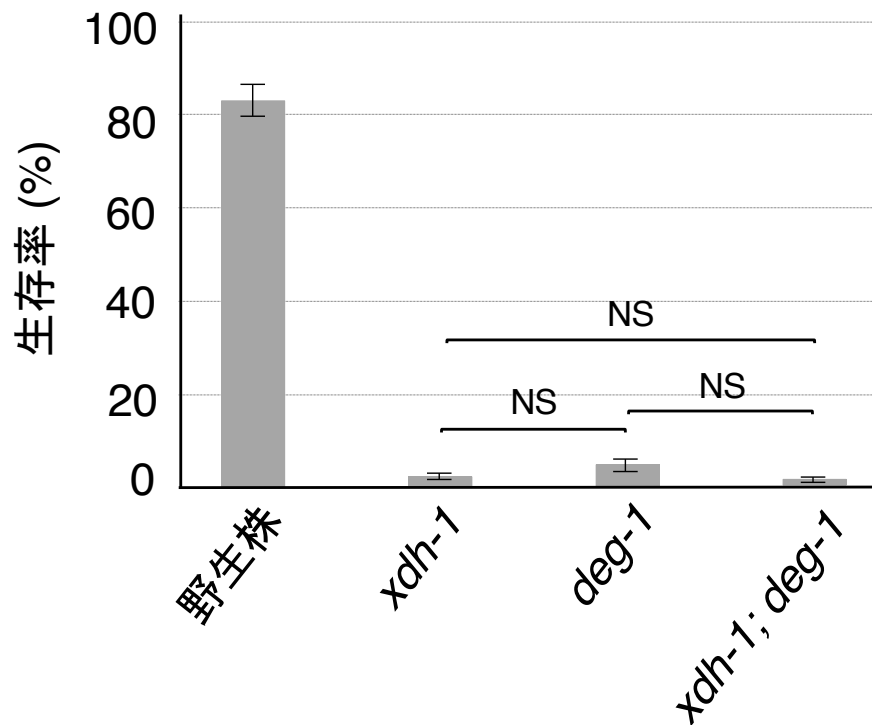


図39 *xdh-1*と*deg-1*の遺伝学的解析

*xdh-1* 遺伝子と *deg-1* 遺伝子の二重変異体を作製し、低温耐性解析をおこなった (アッセイ数  $\geq 12$ )。15°C 飼育後に 2°C に 96 時間置いた。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\* $p < 0.01$  (Tukey-Kramer)。*xdh-1; deg-1* 二重変異体はそれぞれの単一変異体と同等の低温耐性異常を示した。

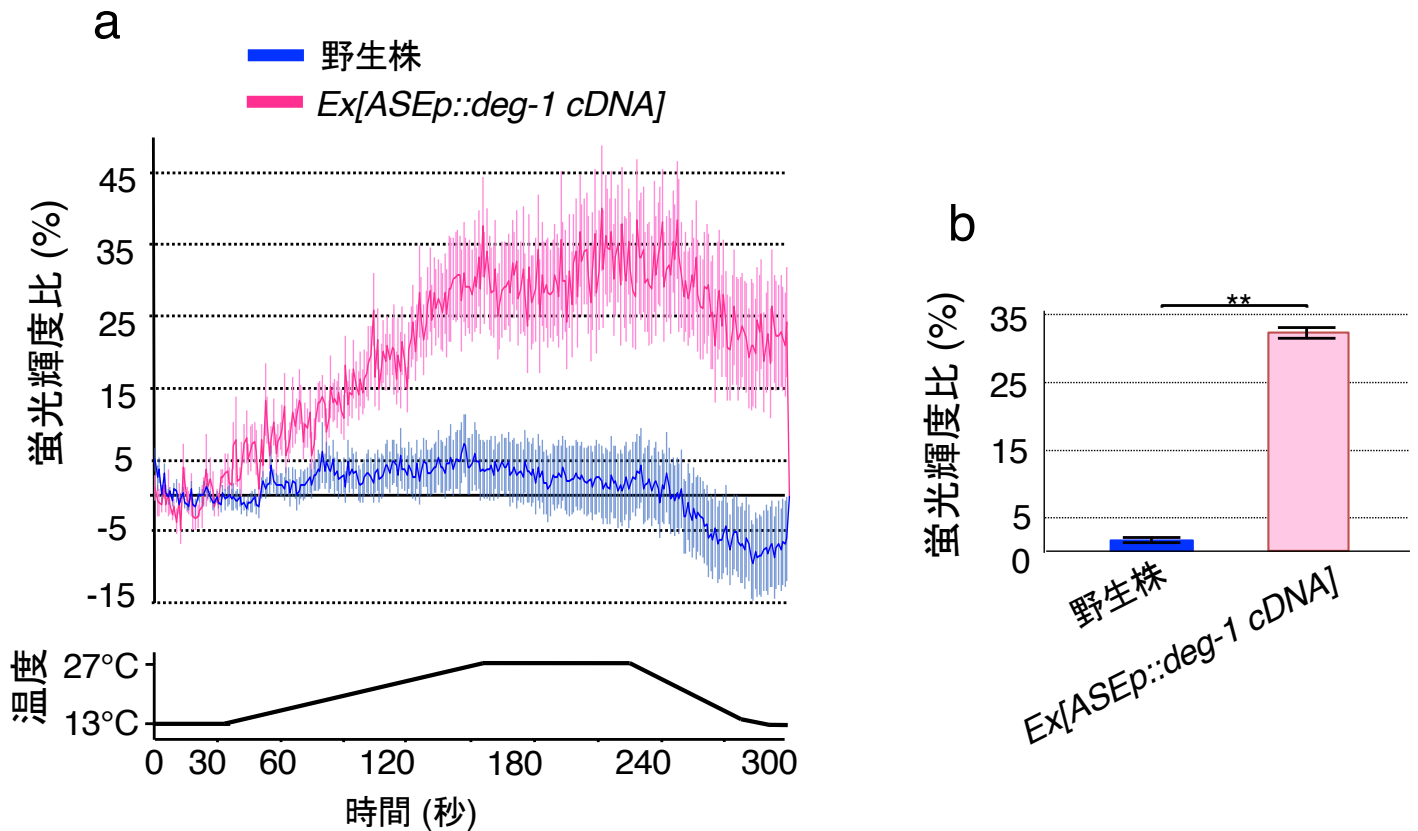


図40 ASE味覚ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング

(a) GCaMP8とtag-RFPを用いたASE味覚ニューロンのCa<sup>2+</sup>イメージング (解析個体数 ≥ 19)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。飼育温度: 15°C。温度刺激パターンはグラフ下に記載。DEG-1を強制的に発現させた *N2; Ex[gcy-5p(ASEp)::deg-1 cDNA]* のASEは温度上昇に反応を示した。

(b) 図40aの230-241秒の11秒間の蛍光輝度比 (%) の平均を棒グラフにした。棒グラフの色は図40aの色と対応している。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\*\*p < 0.01 (Tukey-Kramer)。

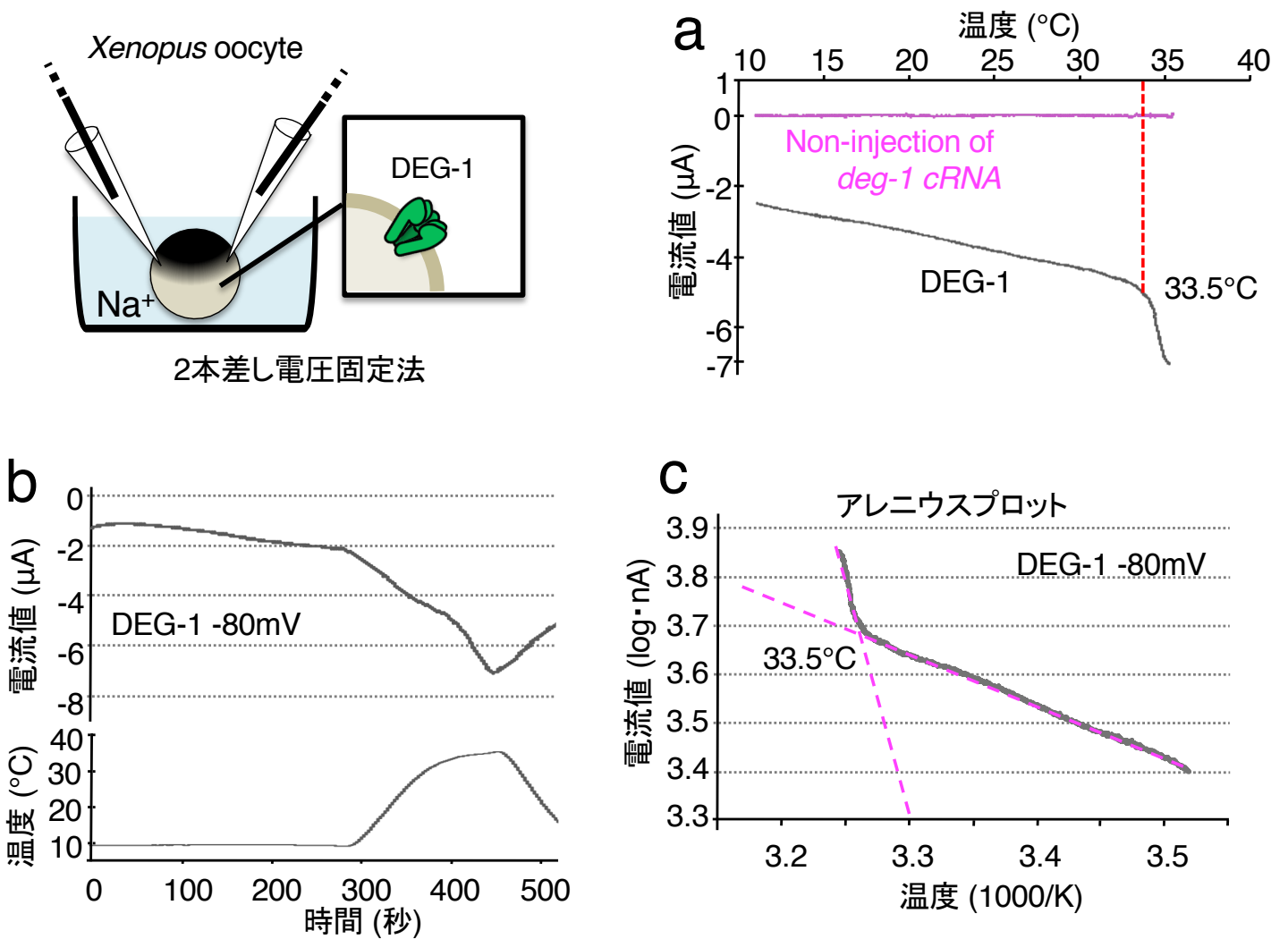


図41 DEG-1を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の温度刺激に対する反応

(a) 図41bに示す電流と温度の相関性グラフ (解析細胞数 = 8、図は代表1データのトレース)。アレニウスプロットで算出された活性温度閾値付近で電流値の大きな変化が見られた。インジェクションをおこなっていない卵母細胞では反応は見られない(マゼンタ)。

(b) 代表1データのトレース。(上グラフ) 電流値、(下グラフ) 温度 (解析細胞数 = 8)。

(c) 図41bのデータのアレニウスプロット (解析細胞数 = 8、図は代表1データのトレース)。活性温度域値は、マゼンタ線の交点から算出した。DEG-1の活性閾値温度平均:  $32.0 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 。

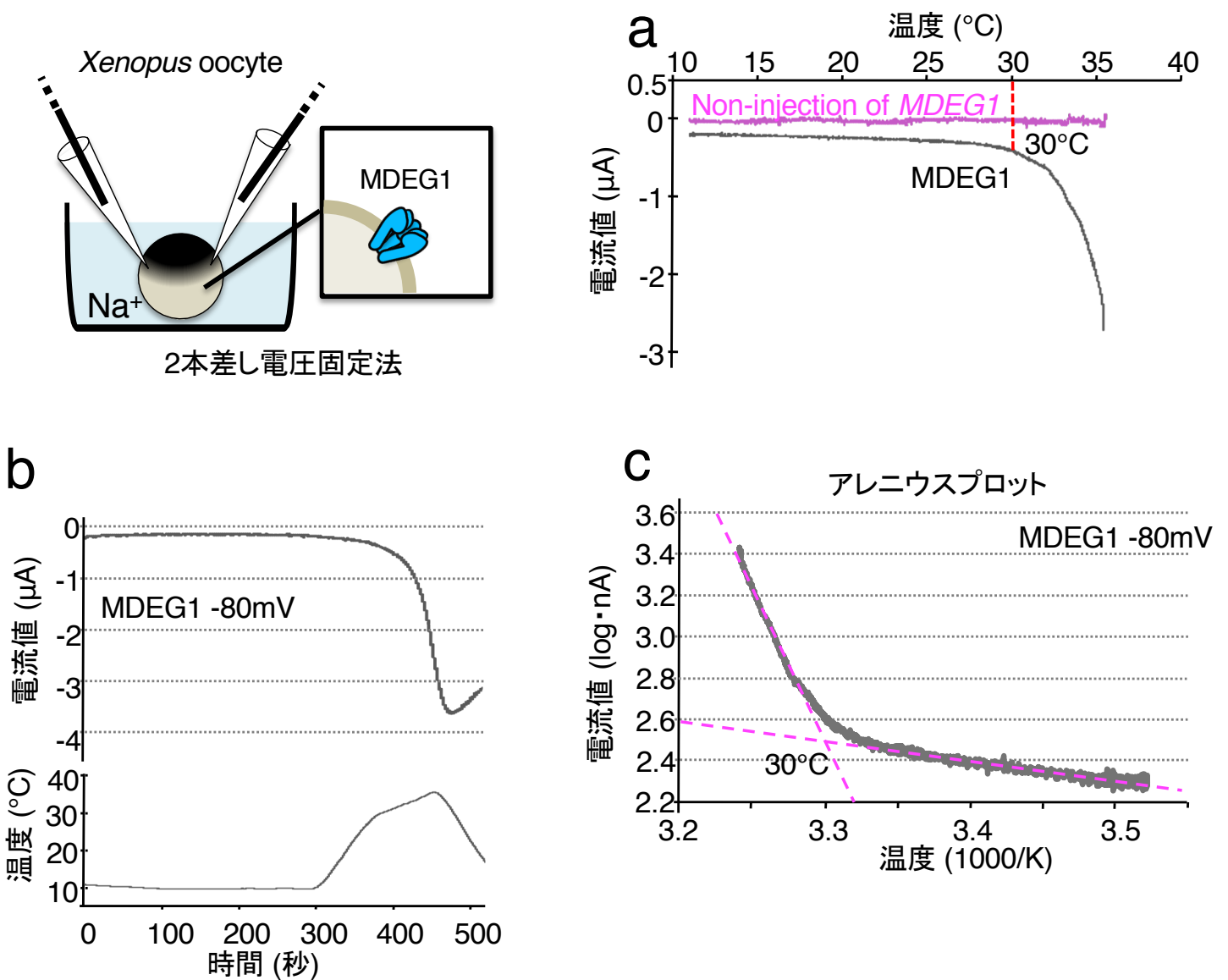


図42 MDEG1を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の温度刺激に対する反応

(a) 図42bに示す電流と温度の相関性グラフ (解析細胞数 = 8、図は代表1データのトレース)。アレニウスプロットで算出された活性温度閾値付近で電流値の大きな変化が見られた。インジェクションをおこなっていない卵母細胞では反応は見られない (マゼンタ)。

(b) 代表1データのトレース。(上グラフ) 電流値、(下グラフ) 温度 (解析細胞数 = 8)。

(c) 図42bのデータのアレニウスプロット (解析細胞数 = 8、図は代表1データのトレース)。活性温度域値は、マゼンタ線の交点から算出した。MDEG1の活性閾値温度平均:  $31.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 。

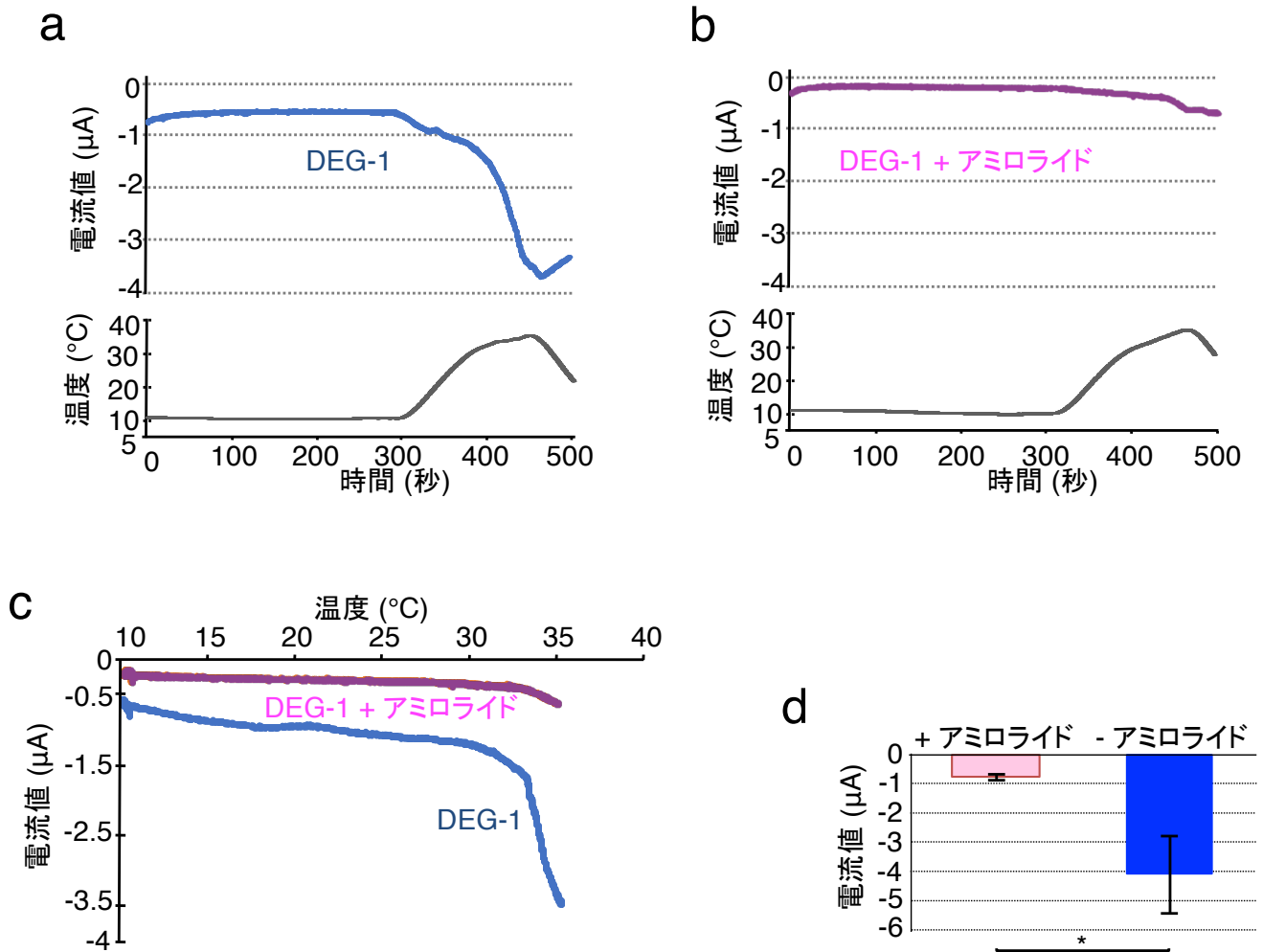


図43 DEG/ENaCの阻害剤アミロライドを用いてDEG-1の反応を抑制した

(a) 代表1データのトレース。(上グラフ) 電流値、(下グラフ) 温度。DEG-1を発現させた卵母細胞の反応。アミロライドなし。解析細胞数 = 5。

(b) 代表1データのトレース。(上グラフ) 電流値、(下グラフ) 温度。DEG-1を発現させた卵母細胞の反応。アミロライドあり。解析細胞数 = 5。

(c) 図43a, bに示す電流と温度の相関性グラフ。DEG-1、アミロライドなし (青)。DEG-1、アミロライドあり (マゼンタ)。図はそれぞれ代表1データのトレース。解析細胞数 = 5。

(d) 温度刺激に対する電流値の変化量の平均を示した (解析細胞数 = 5)。アミロライドあり (マゼンタ)、アミロライドなし (青)。エラーバー: 標準誤差 (SEM)。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Unpaired t test (Welch))。

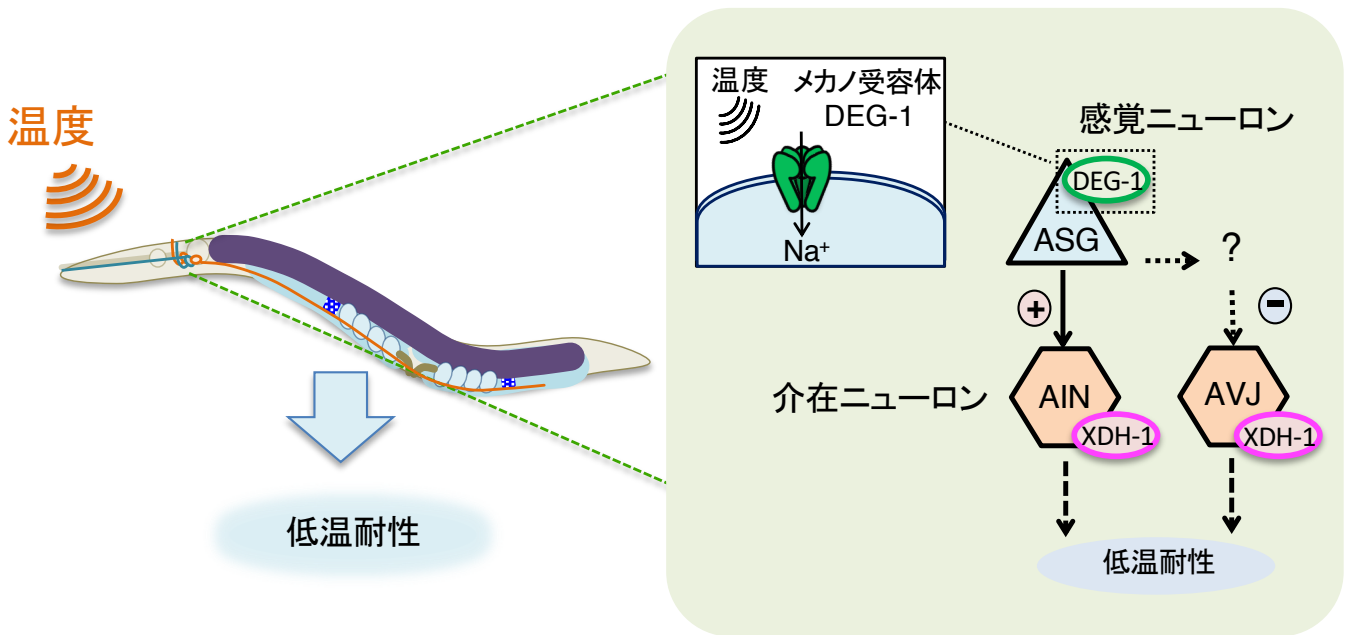


図44 低温耐性を正に制御する新たな神経回路モデル図

ASG感覚ニューロンがDEG-1を介して温度を受容し、AINおよびAVJ介在ニューロンへの温度情報伝達を通して低温耐性を制御する新たな神経回路の存在が示唆された。DEG-1が温度を受容するとASGが反応し、AINを活性化させ（矢印）、AVJを抑制する（点線矢印）ことで低温耐性を正に制御する。ASGからAVJへは直接の接続がないため、未知のニューロンなどを介して情報伝達がおこなわれていると考えられる。

# 表 1

図28グラフの表

系統名	15°C→2°C (48hr) 生存率 (%) (±SEM)	<i>xdh-1</i> 遺伝子発現組織
Wild-type	94.0±1.2	／
<i>xdh-1(ok3234)</i>	1.7±0.3	／
<i>xdh-1; Ex[unc-14p::<i>xdh-1</i> cDNA]</i>	64.7±3.4	神経系
<i>xdh-1; Ex[pqp-12p::<i>xdh-1</i> cDNA]</i>	9.7±2.3	浸透圧調節細胞
<i>xdh-1; Ex[ges-1p::<i>xdh-1</i> cDNA]</i>	4.3±1.1	腸
<i>xdh-1; Ex[xdh-1p::<i>xdh-1</i> cDNA]</i>	82.4±2.9	いくつかの神経、腸、 浸透圧調節細胞

# 表 2

図29グラフの表

系統名	15°C→2°C (48hr) 生存率 (%) (±SEM)	プロモーター	<i>xdh-1</i> 遺伝子発現細胞
Wild-type	98.6±0.3	／	／
<i>xdh-1(ok3234)</i>	3.8±0.4	／	／
<i>xdh-1; Ex25</i>	81.0±4.0	<i>unc-14p</i>	神経系
<i>xdh-1; Ex26</i>	8.1±1.5	<i>dat-1p</i>	ADE, CEP, PDE
<i>xdh-1; Ex28</i>	7.7±1.8	<i>osm-6p</i>	ADE, ADF, ADL, AFD, AQR, ASE, ASG ASH, ASI, ASJ, ASK, AWA, AWB, AWC CEP, FLP, PDE, PHA, PHB, PQR, CEM
<i>xdh-1; Ex29</i>	28.5±5.4	<i>osm-6p, ncs-1p glr-1p, unc-8p</i>	ADE, ADF, ADL, AFD, AIB, AIN, AIY, AIZ AQR, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK, AVA AVB, AVD, AVE, AVG, AVJ, AVK, AWA AWB, AWC, BAG, BDU, CEP, DA, DB, DD DVC, FLP, HSN, PDA, PDB, PDE, PHA PHB, PVC, PVM, PVQ, RIG, RIM, RIS, RMD RME, RMG, SAB, SMD, URY, VA, VB, VC VD, PQR
<i>xdh-1; Ex34</i>	5.9±2.1	<i>unc-47p, acr-2p</i>	AVL, DA, DB, DD, DVB, IL1, PVQ, RIS RMD, RME, VA, VB, VD
<i>xdh-1; Ex35</i>	54.5±3.4	<i>osm-6p, ncs-1p glr-1p, unc-8p unc-47p, acr-2p eat-4p, unc-42p</i>	ADA, ADE, ADF, ADL, AFD, AIB, AIN, AIY AIZ, ALM, AQR, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ ASK, AUA, AVA, AVB, AVD, AVE, AVG AVJ, AVK, AVL, AVM, AWA, AWB, AWC BAG, BDU, CEP, DA, DB, DD, DVB, DVC FLP, HSN, IL1, LUA, NSM, OLL, OLQ, PDA PDB, PDE, PHA, PHB, PLM, PVC, PVD PVM, PVQ, PVR, RIG, RIM, RIS, RIV, RMD RME, RMG, SAA, SAB, SIB, SMD, URY, VA VB, VC, VD, PQR, CEM
<i>xdh-1; Ex36</i>	72.2±6.5	<i>eat-4p, unc-42p</i>	ADA, AFD, AIN, ALM, ASH, ASK, AUA, AVA AVD, AVE, AVH, AVJ, AVK, AVM, AWC, DD FLP, IL1, LUA, NSM, OLL, OLQ, PLM, PVD PVR, RIV, RMD, SAA, SIB, SMD
<i>xdh-1; Ex37</i>	14.1±1.9	<i>unc-86p</i>	ADA, AIM, AIZ, ALM, ALN, BDU FLP, HSN, IL2, NSM, PLM, URY
<i>xdh-1; Ex38</i>	41.3±6.5	<i>eat-4p</i>	ADA, AFD, AIN, ALM, ASH, ASK, AUA, AVJ AVM, AWC, FLP, IL1, LUA, NSM, OLL, OLQ PLM, PVD, PVR,
<i>xdh-1; Ex39</i>	59.3±6.2	<i>unc-42p</i>	AIN, ASH, AVA, AVD, AVE, AVH, AVJ, AVK DD, RIV, RMD, SAA, SIB, SMD



# 表 3

図30グラフの表

系統名	15°C→2°C (48hr) 生存率 (%) (±SEM)	プロモーター	<i>xdh-1</i> 遺伝子の発現細胞
Wild-type	92.3±1.1	/	/
<i>xdh-1(ok3234)</i>	6.4±1.4	/	/
<i>xdh-1; Ex40</i>	5.5±1.1	<i>ocr-4p</i>	OLQ
<i>xdh-1; Ex42</i>	58.5±5.1	<i>ceh-10p, sra-6p</i>	AIN, AIY, ALA, AVJ, CEP, ASH, ASI, PVQ RID, RME
<i>xdh-1; Ex43</i>	4.2±1.2	<i>ocr-4p, lim-4p</i>	AWB, OLQ, RID, RIV, RMD, RME, SAA, SIA
<i>xdh-1; Ex45</i>	3.2±2.0	<i>ser-2p, ocr-4p lim-4p</i>	AWB, OLL, OLQ, PVD, RID, RIV, RMD RME, SAA, SIA
<i>xdh-1; Ex46</i>	66.5±7.4	<i>ceh-10p</i>	AIN, AIY, ALA, AVJ, CEP, RID, RME
<i>xdh-1; Ex47</i>	11.3±1.5	<i>sra-6p</i>	ASH, ASI, PVQ
<i>xdh-1; Ex51</i>	15.5±2.3	<i>glr-1p</i>	AIB, AVA, AVB, AVD, AVE, AVG, AVJ, DVC PVC, PVQ, RIG, RIM, RIS, RMD, RME SMD, URY
<i>xdh-1; Ex52</i>	76.5±2.3	<i>inx-17p, hlh-34p</i>	AIN, AVJ, DVA(幼虫初期), DVC(幼虫初期) PVT(幼虫初期)
<i>xdh-1; Ex53</i>	14.0±2.3	<i>inx-17p</i>	AIN, DVA(幼虫初期), DVC(幼虫初期) PVT(幼虫初期)
<i>xdh-1; Ex54</i>	13.4±1.7	<i>hlh-34p</i>	AVJ
<i>xdh-1; Ex63</i>	8.0±1.8	<i>hlh-34p, ges-1p</i>	AVJ, 腸

## 本研究で使用したプライマー

### SNP解析用primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途	PCR-RFLPIに用いたRE
KHR444	cgatgaggttgagaaaattcggg	1番染色体左腕	Fok I
KHR445	tacatcgtgtagaggaaaagggc		
KHR446	ctgatgcctctcatttctctgc	1番染色体中央	Taq I
KHR447	gttcagatgcagaatcaaggagc		
KHR448	tcctggatgcgagatgctctcc	1番染色体右腕	Mfl I
KHR449	gccagcgtagattgccaaagg		
KHR450	tctccggaatgaagccagtcac	2番染色体左腕	Ban II
KHR451	ttgtcgtgaccaggggagatacc		
KHR452	cgtaggtgtcacatggcaatgc	2番染色体中央	Hind III
KHR453	tatttccagaactccaacgcc		
KHR454	tgttctgtagctctacgaacgac	2番染色体右腕	Ava I
KHR455	ggatcattcttctcctgcaacgc		
KHR460	cggccgggtaaattggattaaatgc	5番染色体左腕	BssH II
KHR461	ctgccaagtaggtgttatctgtctg		
KHR462	gttggatgggccccatattaatgctc	5番染色体中央	BspH I
KHR463	cattgagcagcatagaacgtgtagac		
KHR464	tgacttatagtgacgacctgtgtg	5番染色体右腕	Afl III
KHR465	gtagaatcgacgcatctggaaaagg		
KHR466	taatgatcaggtgggtatcgtctcg	X染色体左腕	EcoRI-HF
KHR467	gtggaatcaggatcttcttcagtg		
KHR468	catccataaccagcttgatgtcac	X染色体中央	Bsm I
KHR469	ctgtttggcatacttcttcagtgg		
KHR470	tgcttctggaagagagatatcag	X染色体右腕	Mnl I
KHR471	atgggagatagataggggatacgg		
KHR498	agattgatcgttgaggcgg	3番染色体左腕	BsmA I
KHR499	gaaattgtcgccacctcgg		
KHR500	tttctggaagtcttctcgggag	3番染色体中央	EcoRI-HF
KHR501	tgaggagcaaggacatgactg		
KHR502	aagagatggtgtaatgggagtcc	3番染色体右腕	Bsr I
KHR503	gccgaattccctgattgataatcac		
KHR504	atgctccttgcttaaacctagg	4番染色体左腕	Bgl II
KHR505	gatttgacgacacattctacgg		
KHR506	catgtgaattgtgacgagagacag	4番染色体中央	Pvu I
KHR507	caggttacgagaaaattggtggac		
KHR508	attatcgtacaggcaccacatcc	4番染色体右腕	Fok I
KHR509	gaagagtgttcaccccttctc		
KHR613	accatattcggatccaggagatgc	4番染色体_詳細マッピング用①	Bgl II
KHR614	ccagcaattccatctcctctatcag		
KHR615	cttaagtctactgaaatcggctgc	4番染色体_詳細マッピング用②	Pvu II
KHR616	ctatcacaactcgaaaatggctcc		
KHR760	ctcctcatggcaatatcattggtg	4番染色体_詳細マッピング用(direct sequence)①	
KHR761	cccaattttcaagttcggagacc		
KHR762	tgcttcaagaatcgacgataacc	4番染色体_詳細マッピング用(direct sequence)②	
KHR763	tcagcagagccgatattgattctc		
KHR778	gaagctaaagtctcggaaatcgga	4番染色体_詳細マッピング用(direct sequence)③	
KHR779	gctacaagcttctcaatgctttcg		
KHR811	aataataaaaacgcgcgcgaggg	4番染色体_詳細マッピング用③	Mbo II
KHR812	taatattctcagcagtagccgatcg		

## 本研究で使用したプライマー

### 変異検出primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR833	gcattgtttcatcgtttcca	ok3234変異検出
KHR834	cagtttcacgcaattgatttt	
KHR1311	caatgtcatcttctcgtcgttgag	
KHR400	cctctatgcctaactattgcc	ok3587変異検出
KHR401	gtaatctgtggctccattcc	
KHR2061	agagggggagagatgaagattctc	u38変異検出
KHR2062	tgtaattgccgtttatcttctgg	

### レスキュー実験用断片増幅primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR687	atctccactatcttctgaatgcc	flp-17遺伝子全長
KHR705	gtccttgacgctagtaacagtactc	
KHR791	gatttcagtgaagcatcccaaacg	irg-6遺伝子全長
KHR792	gaaagtgtgaactttgatgggtggg	
KHR1672	ttccgcgttgctatcttctctc	xdh-1 PCR1 forward primer
KHR1673	aaaaaacattttctgtttcagcg	xdh-1 PCR2 forward primer
KHR1674	gtttgtaaaatttttagtggttcggc	xdh-1 PCR3 forward primer
KHR1675	gtacggccgactagtaggaaacag	xdh-1 PCR1, 2, 3 reverse primer

### cDNAライブラリーより、xdh-1 cDNA作成primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR835	gctctagaatgaagaaagaagtaaccgaaattcatcg	xdh-1 cDNA作成
KHR836	agtggtagccttaaacagaagttatccatgggtgataagt	
KHR846	atgaagaaagaagtaaccgaaatttca	
KHR847	ttaaacagaagttatccatgggtgat	
KHR903	gtcattcattcctccctaaacgac	
KHR968	gctctagagtattcattcctccctaaacgacaacg	
KHR969	agtggtagccttaaacagaagttatccatgggtgataagt	
KHR970	cacattttaccggtgatatcagcg	
KHR1135	gtcattcattcctccctaaacgacaacg	
KHR1136	catcattcacacattgattactaattataatctc	
KHR1137	ctaaatacattcaaataatgtatccgc	
KHR1138	aaaaataaacaataagggttccgcg	
KHR1139	ctaaatacattcaaataatgtatccgctcatgag	
KHR1140	aaaaataaacaataagggttccgcgcac	

## 本研究で使用したプライマー

### Direct sequenceによる配列確認用primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR893	tcatcaagtaacaataactgccag	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第1エクソン
KHR894	aatgacactggcaacactacttgag	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第2エクソン
KHR895	tcagcagagccgatattgattctc	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第3, 4エクソン
KHR896	ggatgctcaagaaaagctagaagg	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第5, 6エクソン
KHR898	catgttcatgagatgctccattgg	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第7,8エクソン
KHR899	gtcacaggagcatttttggtgaagc	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第7,8エクソン
KHR900	tccatttgacggggagtaacaa	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第9エクソン
KHR901	gcacactacaggagaagctgtata	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第9エクソン
KHR902	ccagagtgttaaatacatgatagtgc	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第10エクソン
KHR903	gtcattcattcctccctaaacgac	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第10エクソン
KHR904	taagaaaaccacttgaacatgcg	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第11エクソン
KHR905	cgatgggtgcacaacttgatgc	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第12エクソン
KHR906	gggtttcagcatgaaaaccga	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第13, 14エクソン
KHR907	tctacaatgggaatgacgtcag	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第15エクソン
KHR908	ggatattcagtgtatggaacggca	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第15エクソン
KHR909	gtgcacattcatcaacttggtg	<i>xdh-1</i> 遺伝子 第16エクソン
KHR2315	tcttgaattagaaccctgttgc	<i>deg-1</i> cDNA No. 1
KHR2316	ggcttgcacagaatgttgttgc	<i>deg-1</i> cDNA No. 2
KHR2317	catacggtttggttaacttgatcg	<i>deg-1</i> cDNA No. 3
KHR2318	atagaagttgcttccaaatggac	<i>deg-1</i> cDNA No. 4
KHR2319	caaacatgaattattgaaatgtg	<i>deg-1</i> cDNA No. 5
KHR2320	gcacaacatcatcagacaaatggc	<i>deg-1</i> cDNA No. 6
KHR2321	aaaagaaaaaacccaaagttccc	<i>deg-1</i> cDNA No. 7

### カルシウムイメージング解析用プラスミド作成primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR2346	gaaatgaaataagctggtacctgccttgaataaattgttccc	<i>gcy-21</i> プロモーター
KHR2347	ccatggtttctaccggaattcagcagaataatatgaaaatgaaatttatttag	
KHR2795	gaaatgaaataagctgatgattatggaaccaaactc	<i>nmr-1</i> プロモーター
KHR2796	ccatggtttctaccgctgatattcggaacatatctg	
KHR1979	gaaatgaaataagctcgggtggtgctggagggactgatgc	<i>hlh-34</i> プロモーター
KHR1980	ccatggtttctaccgttctcaagtggttataagtcaagc	
KHR2030	gaaatgaaataagctgcatgcagcttgacaccttgaaaagtttg	<i>inx-17</i> プロモーター
KHR2031	ccatggtttctaccggcggccgcaaccagtatcgatcttcatctg	

## 本研究で使用したプライマー

### 特異的発現プラスミド作成用primer (プロモータ領域)

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR1224	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>ges-1</i> プロモーター
KHR1225	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1201	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>pgp-12</i> プロモーター
KHR1202	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1512	ataagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>xdh-1</i> プロモーター
KHR1513	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1514	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>unc-14</i> プロモーター
KHR1515	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1538	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>dat-1</i> プロモーター
KHR1539	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1551	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>osm-6</i> プロモーター
KHR1552	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1570	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>ncs-1</i> プロモーター
KHR1571	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1572	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>glr-1</i> プロモーター
KHR1573	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1574	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>unc-8</i> プロモーター
KHR1575	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHE1670	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>unc-47</i> プロモーター
KHE1671	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1713	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>eat-4</i> プロモーター
KHR1714	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1715	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>unc-42</i> プロモーター
KHR1716	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1721	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>unc-86</i> プロモーター
KHR1722	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1740	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>ocr-4</i> プロモーター
KHR1741	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1793	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>ceh-10</i> プロモーター
KHR1794	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1872	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>lim-4</i> プロモーター
KHR1873	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1880	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>ser-2</i> プロモーター
KHR1881	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1923	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>inx-17</i> プロモーター
KHR1924	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR1925	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>hlh-34</i> プロモーター
KHR1926	attctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	
KHR2448	attacccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>gcy-21</i> プロモーター
KHR2449	aggtagccggggatccatcagcagaataatgaaatgaaattatt	
KHR2049	ccaagcttgcacgcccctgcaggtcgaggctgacggatcgc	<i>gcy-5</i> プロモーター
KHR2050	cctctagagtcgacctctagacccggggatccccgggctgcagg	

## 本研究で使用したプライマー

### Cre/LoxPシステム プラスミド作成primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR2727	attacgccaagcttgcacgacttcggctcctcctgcc	pNTN143 <i>ceh-10p::nCre</i> 作成
KHR2728	ccatgggtaccgtcgaccacaagagaaaagtggctg	
KHR2732	tcgacggtaccatgggcgcac	
KHR2733	catgcaagcttggcgtaatcatgg	
KHR2729	acttgagaagcggccgataacttcgtatagcatac	pNTN144 作成 forward primer
KHR2730	gagtcgaccgcgccgataacttcgtataatgtatgc	pNTN144, 145 作成 reverse primer
KHR2731	acttccaggcggccgataacttcgtatagcatac	pNTN145 作成 forward primer

### その他プラスミド作成用primer

KHR No.	配列(5'-3')	用途
KHR839	cattatcgagtgtatgcaagaccg	pNTN020 <i>x dh-1p::x dh-1 genomic gene::gfp</i> 作成
KHR840	atacattgccatgacgaatccagg	
KHR841	ttcatccagttcaggagagacttgcc	
KHR842	ccgaatcgagttggtgtcaagtaaattcc	
KHR843	ctaaaaatgcgtacctcgtgtg	
KHR844	cgtgctcggcaaatttgagatttgc	
KHR933	cccagaatattcaggacgacaagac	
KHR934	cgccctgcaggttacttgtacagctcgtccatgccg	
KHR931	gctagccgacctgcagg attatTTTTaataactaattttcag	
KHR932	aacagaagttatccatggtgtataagtg	
KHR999	agcatggtgagcaagggcgaggagc	pNTN026 <i>x dh-1p::gfp</i> 作成
KHR1000	cttcatttctactgtaatttggc	pNTN058 <i>x dh-1p (3,346 bp)::x dh-1 cDNA::gfp</i> 作成
KHR1727	tggataacttctgttgctagcatgagtaaaggagaagaactt	
KHR1728	caataccatgggtaccgcgccctatttgtatagttcatccatg	
KHR1729	ggtaccatgggtattgatatctgag	
KHR1730	aacagaagttatccatggtgtataagtg	

## 本研究で使用したプラスミド

### 発現細胞解析

プラスミド番号
<i>pNTN020_xdh-1p::xdh-1 genomic gene::gfp</i>
<i>pNTN026_xdh-1p::gfp</i>
<i>pNTN032_pgp-12p::dsRedm</i>
<i>pNTN058_xdh-1p (3,346 bp)::xdh-1 cDNA::gfp</i>
<i>pNTN118_xdh-1p::dsRedm_unc-54UTR</i>

### 細胞特異的発現実験

プラスミド番号
<i>pNTN034_pgp-12p::xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN035_ges-1p::xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN036_xdh-1p::xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN046_unc-14p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN047_dat-1p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN048_osm-6p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN049_ncs-1p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN050_glr-1p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN051_unc-8p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN052_unc-47p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN053_acr-2p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN054_eat-4p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN055_unc-42p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN057_unc-86p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN058_xdh-1p (3,346 bp)::xdh-1 cDNA::gfp</i>
<i>pNTN059_ocr-4p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN060_ceh-10p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN061_sra-6p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN063_lim-4p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN064_ser-2p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN067_inx-17p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN068_hlh-34p_xdh-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN106_gcy-5p(Iino)::deg-1cDNA_unc-54UTR</i>
<i>pNTN143_ceh-10p::nCre_unc-54UTR</i>
<i>pNTN144_hlh-34p::LoxP::xdh-1cDNA::LoxP_unc-54UTR</i>
<i>pNTN145_inx-17p::LoxP::xdh-1cDNA::LoxP_unc-54UTR</i>

## 本研究で使用したプラスミド

### カルシウムイメージング解析

プラスミド番号
<i>pNTN075_hlh-34p::yc3.60_unc-54UTR</i>
<i>pNTN116_inx-17p::yc3.60_let-858UTR</i>
<i>pNTN123_gcy-21p::yc3.61_unc-54UTR</i>
<i>pNTN159_nmr-1p::yc3.60_unc-54UTR</i>
<i>pMIU34_flp-6p::CeG-CaMP8</i>
<i>pKOB006_gcy-5p::tag-RFP</i> (Kobayashi et al., 2016)

### アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理学的解析

プラスミド番号
<i>pNTN119_deg-1cDNA_in_pGEMHE</i>
<i>pNTN125_MDEGcDNA_in_pGEMHE</i>



## 公表論文リスト

### 副論文

1) Takagaki N., Ohta A., Ohnishi K., Kawanabe A., Minakuchi Y., Toyoda A., Fujiwara Y., Kuhara A.

The mechanoreceptor DEG-1 regulates cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*

*EMBO reports*, e48671, 1-14, 2020 (Article)

### 参考論文

1) Ohnishi K., Takagaki N., Okahata M., Fujita M., Ohta A., Kuhara A.

Molecular and Cellular Network Systems Underlying Cold Tolerance of *Caenorhabditis elegans*

*Cryobiology and Cryotechnology*, 64, 2, 53–59, 2019

2) Takeishi A., Takagaki N., Kuhara A.

Temperature signaling underlying thermotaxis and cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*

*Journal of Neurogenetics*, 2020 in press