

温度記憶に関わる神経細胞のメモリー動態の計測

甲南大学理工学部 特任研究准教授 太田 茜 *

1. はじめに

温度は生命維持にとって必須の環境情報であり、脳神経系に関わる温度情報の記憶に基づく体の生理的応答の原理の解明は地球温暖化社会において重要である。また、脳神経における温度記憶のメカニズムを理解することは、認識や記憶学習といった神経疾患等の医療面においても重要である。しかし、人間の脳は約 1000 億個の神経細胞をもつため、それらが組合わさってできる神経ネットワークの規模は天文学的なものとなる。そこで、本研究では、シンプルな神経系をもつ線虫 *C. elegans* をつかい、そのなかでも、10 個以下の神経細胞と筋肉などで構成される「温度耐性・馴化」を制御する神経・組織ネットワークを実験モデルにもちいる [1][2][3]。この神経・組織ネットワークにおいて、細胞活動の光学イメージング技術とオートマティック計測技術を導入し、温度耐性・馴化の制御にかかわる神経回路や関連組織の情報処理の基盤解析系の創出を目指す。特に最近、頭部の数個の温度受容ニューロン自身が温度を記憶する表現型を示したため、温度記憶の生理的動態の光学計測(イメージング)を行う。神経細胞の生理的・物理的性質は、人間から線虫まで広く保存されているため、本研究で得られる解析技術の基盤は、将来的に人間の脳情報処理の計測や、ブレインマシン インターフェイスの開発や、人工神経回路の開発も応用されることが期待される。

2. 実験方法

2.1. 系統

srh-40: ADL 温度受容ニューロンで機能する G タンパク質共役型受容体が欠損した変異体。*srh-*

40 遺伝子は ADL 特異的に発現している。

2.2. カルシウムイメージング用系統作成

野生株などの ADL 感覚ニューロンにカメレオン遺伝子である *yc3.60* とマーカー遺伝子として *ges-1p::tagRFP* をマイクロインジェクションによって導入した。遺伝子導入できたものは、腸に RFP の蛍光と ADL 感覚ニューロンにカメレオンの青色の蛍光が観察される。得られた個体(F1)を 1 個体ずつ NGM プレートに移し、15°C で飼育した。

2.3. カルシウムイメージング

24×24 カバーガラスの上に、10%アガロースパッドを作成する。上記で作成した、カルシウムイメージング用の系統(ADL 感覚ニューロンでカメレオン YC3.60 の蛍光が見られる線虫)を、1~数匹置き、医療用アロンアルファで線虫の側部を 2~3 点接着し固定する。M9 バッファーを滴下し、やさしくカバーガラスを掛ける。カルシウムイメージング中、温度制御装置により、13°C→27°C→13°Cの温度変化刺激を与えて、300 秒間 ADL 感覚ニューロンの細胞体内のカルシウム濃度の変化を測定する。細胞内カルシウム濃度の変化は、カメレオン YC3.60 の YFP と CFP の蛍光比の変化として計測される (Fig. 1)。

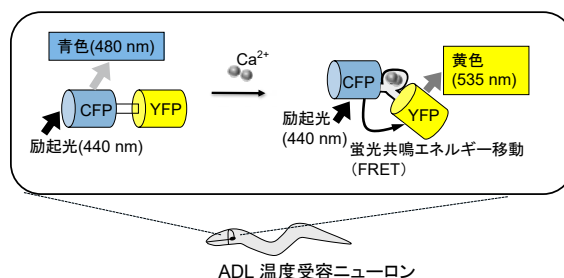


Fig. 1 細胞内カルシウムインジケータカメレオン:YC3.60 を使ったカルシウムイメージング

* (助成採択時) 甲南大学理工学部 特任研究講師

2.4. クリムゾン Chrimson を用いた神経活動の操作

これまで *C. elegans* の神経系には活動電位は存在せず、主に Ca^{2+} 濃度変化に依存したアナログな電位変化によって神経細胞の活性化が伝導されと考えられてきた。そのため、線虫の神経活動の測定には主に Ca^{2+} インディケーターであるカメレオンや GCaMP が使われてきた一方で、*C. elegans* にも活動電位が存在することが見つっている。神経回路活動の計測に加え、神経活動の光技術による操作もツールとして用いている。具体的には、特定の光を受容して活性化する微生物型ロドプシンを用いた人工的な神経活動の制御を行っている。これまで神経を活性化させる際には、*Chlamydomonas reinhardtii* の眼点から同定された非選択的陽イオンチャネル ChR2 が使用されてきた。ChR2 は青色光を受容すると開口し、細胞内に陽イオンを流入させる膜貫通型タンパク質である。しかし青色光は Ca^{2+} インディケーターとして主に用いられる Yellow カメレオンの蛍光(約 480nm)や GCaMP(約 475nm)の励起光が重複するため、ChR2 と Ca^{2+} インディケーターを併用すると任意のタイミングで神経を活性化させ、神経活動を計測するのは難しかった。それに対して、*Chlamydomonas noctigama* から同定されたチャネルロドプシン Chrimson は、約 590nm をピークとする橙色～赤色光によって励起することができるため、既存の ChR2 より長波長の光で活性化することが可能である。筆者らは現在、青色光の蛍光やで励起光をもつ Ca^{2+} インディケーターと Chrimson 併用し、温度馴化の神経回路の神経操作と Ca^{2+} イメージングを同時に行うことで、ニューロン内の神経活動制御の動態の解明を目指している。Chrimson を使うことで、主に神経細胞では Na^{+} イオンが流入して脱分極が引き起こさ

れるので、神経細胞の興奮を誘導できる (Fig. 2) (福本ら, アグリバイオ, 2021)。

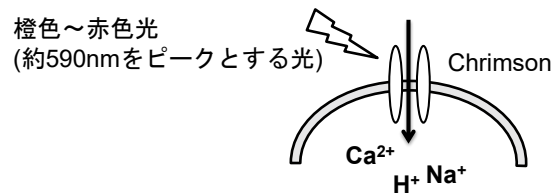


Fig. 2 Chrimson を用いた神経細胞の活性化制御: 特定の神経細胞の膜上に、橙色～赤色光(約 590nm ピーク)の照射によって開口する藻類由来の 7 回膜貫通型の陽イオンチャネル (Chrimson)を発現させることで神経活動を操作できる。実際の解析では、励起光源として LED や半導体レーザーを用いるため約 640nm 付近の赤色光を励起光に用いている。(福本ら, アグリバイオ, 2021 より改変引用)

2.5. クリムゾンをを用いた解析

ASJ ニューロンでクリムゾンを発現させた変異体を、2 個体ずつ新しい $5\mu\text{M}$ ATR 入り 35mmNGM プレートに植え継ぐ(P0)。赤色光を当て、PVQ の温度応答をカルシウムイメージングで解析した。

3. 結果

3.1. ADL 温度受容ニューロンにおける GPCR

srh-40 の変異体のカルシウムイメージング

従来、フェロモンを受容することで知られていた ADL 感覚ニューロンが温度の応答に関与し、ADL が飼育温度依存的な体内の温度記憶とリンクした個体の温度順化に関与することが分かってきた。本研究では、ADL で発現している G タンパク質共役型受容体(GPCR)である *srh-40* が個体の温度順化に関わるかを調べ、さらに *srh-40* が ADL の温度情報伝達に関与するかをカルシウムイメージング法で調べた。

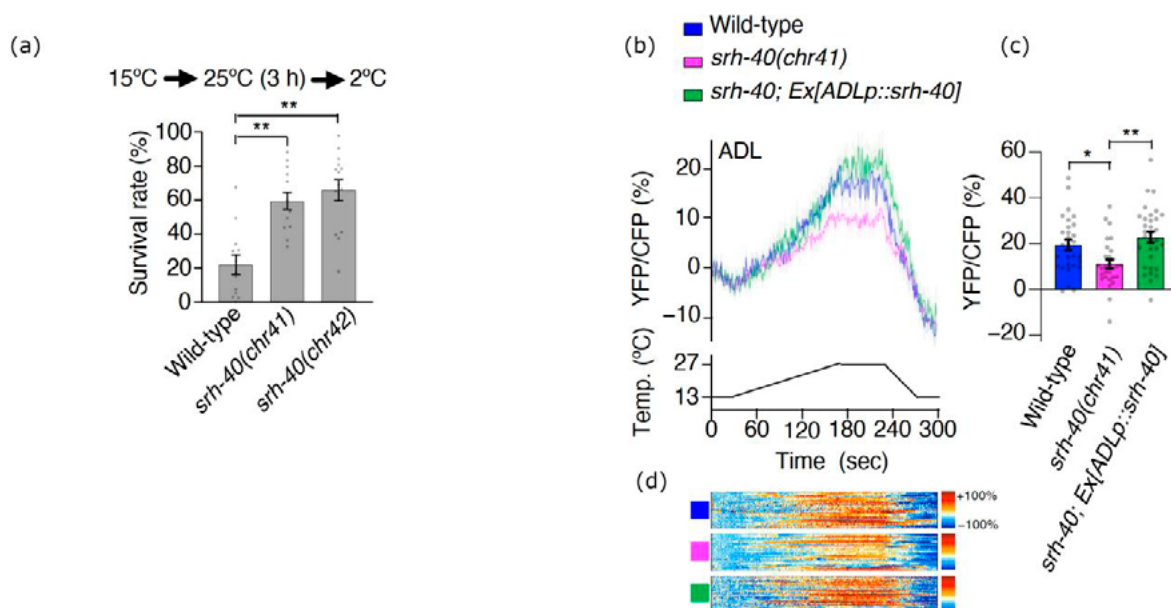
野生株を 15°C で飼育した後に 25°C で 3 時間静

置き、2 度に 48 時間おくと大部分の個体が死滅した (Fig. 3 a)。それに対して、*srh-40* が欠損した変異体は、約 60% の個体が生存していた。つまり、*srh-40* が欠損した変異体では、温度順化が増強する異常が見られた (Fig. 3 a)。

YC3.60 が ADL 温度受容ニューロンで発現する野生株個体を 15°C で飼育し、13 °C→27°C→13°C

の温度刺激を与えた時の YC3.60 の YFP/CFP の値を測定した結果、約 20% の変化が見られた (Fig. 3 b-d)。それに対して、*srh-40* が欠損した変異体では、約 10% の変化が見られた (Fig. 3 b-d)。

さらに、*srh-40* が欠損した変異体の異常は、ADL 温度受容ニューロンに特異的に *srh-40cDNA* を導入することで回復した (Fig. 3 b-d)。



a. *srh-40* 変異体は温度順化異常を示す (15°C→25°C(3 h)→2°C)。 *srh-40* 変異体は飼育温度をシフトした後の低温耐性異常が野生株よりも上昇していた。(アッセイ数 ≥ 9、平均±標準誤差)。飼育条件は 15°C→25°C (3 h)→2°C。統計処理は、Tukey-Kramer 検定を用いて多重比較を行った (**p < 0.01)。

b. 線虫頭部の感覚ニューロン ADL にカメレオンを発現させて、細胞内カルシウム濃度を測定した結果。温度変化刺激(13°C→27°C→13°C)を与えて、細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。15°C飼育の野生株は温度に対する反応がみられたが、*srh-40* 変異体では、反応が低下していた。この異常は ADL 特異的に *srh-40cDNA* を導入することで回復した。

c. b のグラフの 211-220 s を平均化した棒グラフ。ドットは各個体の生データを示す。統計処理は、Tukey-Kramer 検定を用いて多重比較を行った (**p < 0.01, *p < 0.1)。各グラフの色は b の系統に対応する。

d. b のグラフの生データをヒートグラフとして示したもの。横軸が時間(秒)、縦方向に各個体のデータを並べた。各グラフの左の四角の色は b の系統に対応する。(Ohnishi et al., Nature communication, 2024^[4] より引用(a-d))

Fig. 3 *srh-40* 変異体の表現型

3.2. ASJ でクリムゾンを発現させた系統の PVQ のカルシウムイメージング

現在までの研究で *C. elegans* の低温適応に ASJ 感覚ニューロンが関与している事が明らかになっており、ASJ 感覚ニューロンは温度依存的に細胞体内に Ca^{2+} が流入することにより、尾部の PVQ 介在ニューロンを活性化し、温度順化を制御することがわかっている^[3]。本研究では、ASJ に光駆動性チャネルであるクリムゾンを発現させた系統を用いて、ASJ の反応性の人工操作を行うことにより、PVQ の神経活動が変化するかをカルシウムイメージングで測定した。しかし、予測に反して、YC3.60 を用いたカルシウムイメージングのレベルでは、ASJ でクリムゾンを活性化させても PVQ の神経活動の変化は見られなかった。

4. 考察

4.1. ADL 感覚ニューロンによる GPCR による 温度の受容情報伝達

srh-40 変異体の温度順化の表現型や *srh-40* 変異体の ADL 温度受容ニューロンのカルシウムイメージングの結果などから、温度順化において ADL 温度受容ニューロンにおいて *srh-40* が温度受容体であることが示唆された。さらに、情報伝達に使われる分子も G タンパク質などが機能していることが示唆された。一方で、*srh-40* のノックアウトだけでは、ADL 温度受容ニューロンの温度応答性が完全に欠損しないため、他の温度受容体が存在する可能性が考えられるが、その温度受容体はまだ見つかっていないため、今後の興味深い課題である。

4.2. ASJ でクリムゾンを発現させた系統の解析

ASJ において Ca^{2+} の流入が起こることにより、ASJ のシナプスを介して下流の PVQ ニューロンを活性化していることがこれまでの研究で分

かっている。ASJ でクリムゾンを発現させた系統において、光刺激を与えて ASJ を強制的に活性化させる様々な条件検討をおこない、PVQ のカルシウムイメージングを行ったが、現在のところ PVQ の温度応答に変化は見られていない。この原因として、最近、クリムゾンがカメレオンの励起波長でも少し活性化することが報告されているため、カルシウムイメージングの励起光でクリムゾンが少し活性化しており、PVQ がすでに活性化状態になっている可能性が考えられる。そのため、他のアクチュエーターの利用も検討している。

5. 結論

本研究と本研究以外の結果を総合的に結びつけると、飼育温度依存的な温度メモリーを伴う温度順化において、GPCR が温度を感知することが明らかとなった。動物個体の温度適応を制御する GPCR の同定は初めてのものであり、新しい概念が見つかった^[4]。

6. 参考文献

- [1] Ohta A., Ujisawa T., Sonoda S., Kuhara A.; Light and pheromone-sensing neurons regulate cold habituation through insulin signaling in *C. elegans*, **Nature commun.**, 5 - 4412, (2014), 1-12.
- [2] Okahata M., Wei A. D., Ohta A., Kuhara A.; Cold acclimation via the KQT-2 potassium channel is modulated by oxygen in *Caenorhabditis elegans*, **Science Advances**, 5 - 2, (2019), 1-12.
- [3] Motomura H., Ioroi M., Murakami K., Kuhara A., Ohta A.; Head-tail-head neural wiring underlies gut fat storage in *Caenorhabditis elegans* temperature acclimation, **PNAS**, 119 - 32, (2022), 1-9.

- [4] Ohnishi K., Sokabe T., Miura T., Tominaga M., Ohta A.*, Kuhara A.; G protein-coupled receptor-based thermosensation determines temperature acclimatization of *Caenorhabditis elegans*, *Nature commun.*, 15 - 1660, (2024), 1-13.

7. 本研究にかかわる成果発表等

- Ohta, A.*, Yamashiro S., Kuhara, A.; Temperature acclimation: Temperature shift induces system conversion to cold tolerance in *C. elegans*, *Neurosci Res*, 194, (2023), 1-6.

- 太田 茜, 保井コノ賞、お茶の水女子大学, 2023年2月14日.
- 太田 茜, 奨励賞、日本神経科学学会, 2023年8月2日.
- 太田 茜, 奨励賞、日本動物学会, 2023年9月7日.

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 島津科学技術振興財団に深くお礼申し上げます。