皮下組織のコラーゲンが体の温度適応に与える影響

甲南大学理工学部／統合ニューロバイオロジー研究所
久原　篤、太田　茜

Temperature is important environmental information. Animals therefore have acclimation and habituation mechanisms for changing environmental temperature. In this study, we used nematode *Caenorhabditis elegans* for studying temperature acclimation mechanisms. We found that a collagen known as a essential cortical component in many animsls involved in cold acclimation, implying that our experimental system is useful for studying fundamental cosmetology research.

1. 緒　言

温度は生物にとって重要な環境情報であるため、生物は環境温度の変化に適応し、生存するメカニズムをもっている。その中において、皮膚を構築する皮下組織の状態とその変化は、表皮の乾燥状態や柔軟性およびそれらによって起きる変化にとって重要なものである。本研究では、シンプルな実験動物である線虫*C. elegans*を用いて、低温適応を介した温度適応メカニズムに関わる分子をスクリーニングしたところ、皮質成分として知られているコラーゲンをコードする遺伝子が多数単離されたため、その解析の現状を記載する。

生物の環境への適応として、高温環境や低温環境に対する適応があげられる。そのうち、低温環境に対する適応（低温適応）の研究は、高等動物だけでなく、植物や昆虫等においても行われている。低温適応とは、通常の生育温度よりも低温の環境でも生存できる性質のことであり、植物にも昆虫にも共通してみられる低温に対する耐性機構として、生体膜の不飽和脂肪酸含有量が多いことや、細胞内にアミノ酸などの凍結しにくい物質をもつことなどがあげられる。温度適応に関して、温度受容とアウトプットの代謝等についての解析は進んできたが、皮下組織のコラーゲンの観点からは未開拓であった。その理由は、個体を構成する細胞数が多い場合、特定の組織の一部と体全体との関係性を明らかにするためには時間を要するためであった。そこで、本研究では、シンプルな実験系を使い、温度適応に関わる新規分子の同定を行った。その中で、皮下組織の重要因子として知られているコラーゲンが単離された。

線虫*C. elegans*は、959個の体細胞で構成され、体長が約1mmの土壌中に生育する非寄生性の線虫である[1)]。また、全塩基配列が決定されており、ゲノムサイズはモデル動物の中でも特に小さい約100Mbである。全遺伝子の約36%がヒトの相同遺伝子であるため、線虫で機能する遺伝子をヒトと対応付けしやすい。*C. elegans*の生活環は短く（野生型では20℃で約3.5日）、通常は雌雄同体で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、遺伝的解析にも適している。

*C. elegans*の高温に対する耐性のひとつとして、耐性幼虫形成機構があげられる。*C. elegans*の生育温度は約13～27℃で、それよりも高温になると大多数の個体が耐性幼虫になる[2)]。耐性幼虫では体は細く、活動が鈍くなりエネルギー状態も低くなる。一方、ある温度で飼育された*C. elegans*は低温でも生育できることが最近見つかってきた[3-5)]。具体的には、15℃で飼育した*C. elegans*は2℃で48時間の低温にも耐えられるが、25℃で飼育した*C. elegans*は低温に耐えられず、死滅してしまう（図1）。低温適応の分子生理機構がこれまでに解析されてきており、頭部に存在するASJ感覚ニューロンが温度を受容すると、ASJからインスリンが分泌され、腸や神経系がインスリンを受容し、低温適応が制御されていることが明らかとなっている（図2）[3)]。一方で、他の組織や分子機構については未知の点が多い。そこで、*C. elegans*の低温適応の実験系を利用して、新規の分子の同定を目指した。本研究では、その最新のスクリーニングのなかで、コラーゲンをコードする遺伝子が多数見つかってきた。

Collagen in hypodermis affects temperature acclimation of animal

Atsushi Kuhara, Akane Ohta
Faculty of Science and Engineering, & Institute for Integrative Neurobiology, Konan University

2. 実　験

2. 1. 低温適応テスト

20℃で飼育した野生型の*C. elegans*を、4個体ずつ新しいNGMプレートに植え継ぎ（P0）、各飼育温度（15、20、25℃）で5時間飼育し産卵させる。P0を除去し、卵（F1）を各飼育温度で飼育する。F1がadultまで成長したら、NGMプレートの蓋を上に向けた状態で、氷上に20分間置く。NGMプレートをタッパーに入れ、メディカルキャビネット内で48時間、低温刺激温度（2℃）で飼育する（cold

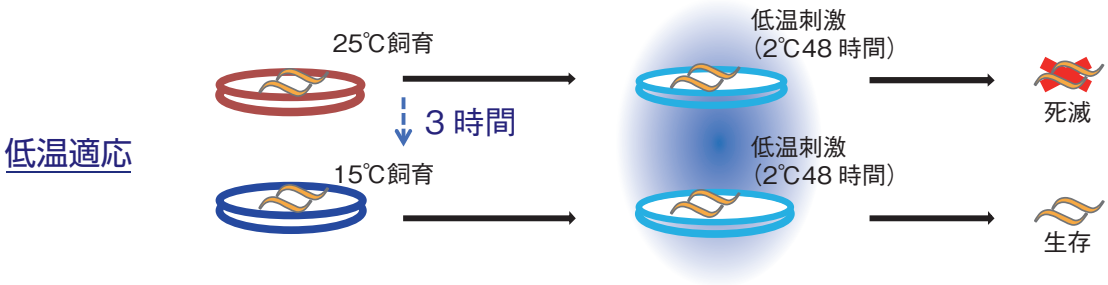

図 1　線虫の低温適応
15℃で飼育した *C. elegans* は 2℃で 48 時間の低温にも耐えられるが、25℃で飼育した *C. elegans* は低温に耐えられず、死滅する。

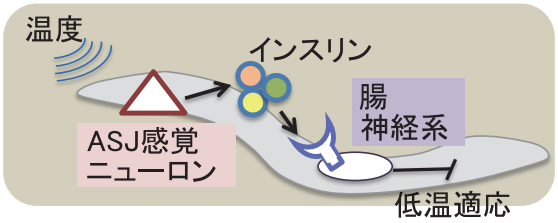

図 2　線虫の低温適応の分子組織ネットワーク
頭部に存在する ASJ 感覚ニューロンが温度を受容すると、ASJ からインスリンが分泌され、腸や神経系がインスリンを受容し、低温適応が制御されている。

shock)。cold shock 後、キャビネットからタッパーを取り出し、15℃で一晩置き、翌日生存個体と死滅個体を数え、生存率を算出する[6]。

変異体を使用したテストでも同様の条件で行った。

1 回のテストに、3 枚の NGM プレートを用意し、これを 3 回試行した。

2. 2. 温度適応細胞のトランスクリプトーム解析

温度受容に関わる細胞と温度を受容しない細胞それぞれから、mRNA を単離し、量を比較することで、温度受容に関わる細胞特異的に発現している遺伝子を同定する。

2. 3. Single cell mRNA 解析の方法

1 細胞からの mRNA 取得法の大部分は、杉らの方法に従った[7]。

温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞に遺伝子導入した個体を集収。成虫 4 個体を 6 ～ 8 時間産卵させてその後取り除き、各温度で飼育して成虫になった時点で M9 緩衝液で回収した。6cm NGM 1 プレートあたり 100 ～ 200 個体の成虫を回収した。

ホモジナイズ。回収して洗浄した線虫を固定後、液体窒素で凍結させてからホモジナイズした。

anti-FLAG のついた beads (anti-Flag M2 beads：SIGMA) で免疫沈降後、mRNA を採取 (RNeasy Min Elute Kit：QIAGEN)。

RNAseq 用の cDNA ライブラリー作製。SMARTseq v4 Ultra Low Input（タカラバイオ）にて cDNA 合成後、Agencourt AMPure XP kit（Beckman）にて cDNA 断片を精製した。

2. 4. 多段階温度シフト解析 (例:15℃→25℃ (3 時間)→2℃)

実験で使用する adult の *C. elegans* を、1 個体ずつ新しい NGM プレートに植え継ぎ（P0)、飼育温度 (15℃）で 24 ～ 30 時間飼育し産卵させた。P0 を除去し、卵 (F1）が adult になるまで、各飼育温度で飼育し続けた（15℃では約 6 日)。F1 が adult まで成長したら、25℃インキュベーター内で 3 時間静置した。その後、NGM プレートの寒天側を下にして、氷上に 20 分間おいた。NGM プレートをメディカルキャビネット内で 48 時間、各低温刺激温度 (2℃）で静置した (cold shock)。48 時間後、メディカルキャビネットから取り出し、15℃インキュベーター内で 1 日静置した後、生存個体と死個体を数え、生存率を算出した。

3. 結　果

3. 1. コラーゲン遺伝子の変異体が低温適応に異常をもつ

7 つのパターンの温度刺激や飼育温度の条件で飼育した個体を用いて、温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞のそれぞれから採取した mRNA サンプルを単離し、比較解析を行った。具体的な温度刺激のパターンとしては、①15℃飼育、②20℃飼育、③25℃飼育、④25℃を 3 時間経験後 15℃に温度シフト、⑤25℃を 18 時間経験後 15℃に温度シフトし、⑥15℃を 3 時間経験後 25℃に温度シフト、⑦15℃を 18 時間経験後 25℃に温度シフト、の 7 つの条件である。これらの mRNA を cDNA に逆転写し、次世代シークエンサー解析に用いる cDNA ライブラリーを作製し、それらの cDNA ライブラリーを用いて、次世代 DNA シークエンサーにより解析した（図 3)。その結果、20℃飼育個体の温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞を比較解析し、温度受容に関わる細胞で特異的

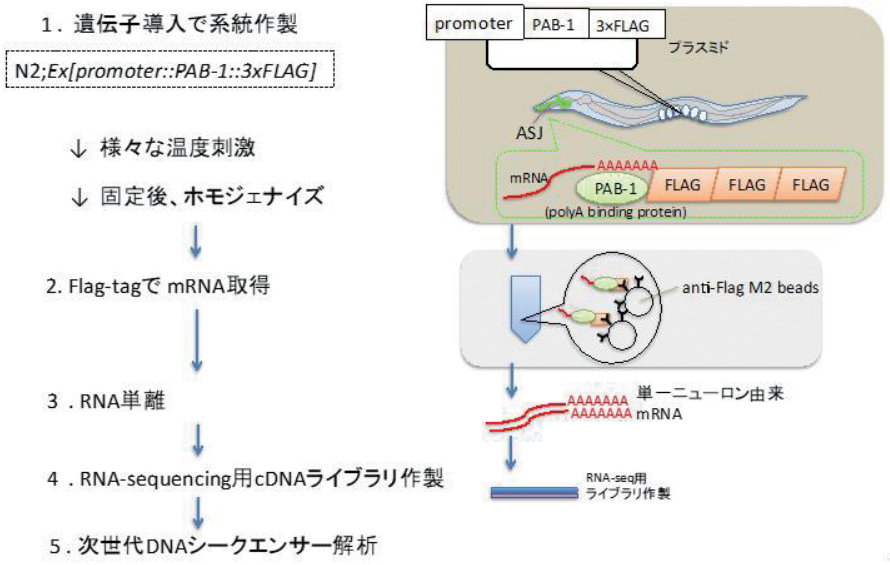

図 3　Single cell mRNA 解析方法

細胞特異的プロモーターを使い、mRNA のポリ A に結合するタンパク質である PAB-1（polyA binding protein）を発現させた。この PAB-1 には、FLAG タグを 3 つ つないだ。この系統に様々な温度刺激を与え、固定した後に、ホモジェナイズし、FLAG タグを用いて免疫沈降によって mRNA を単離した。それを基に、RNA-seq 用の cDNA ライブラリを作成し、次世代シークエンサーで解析した。

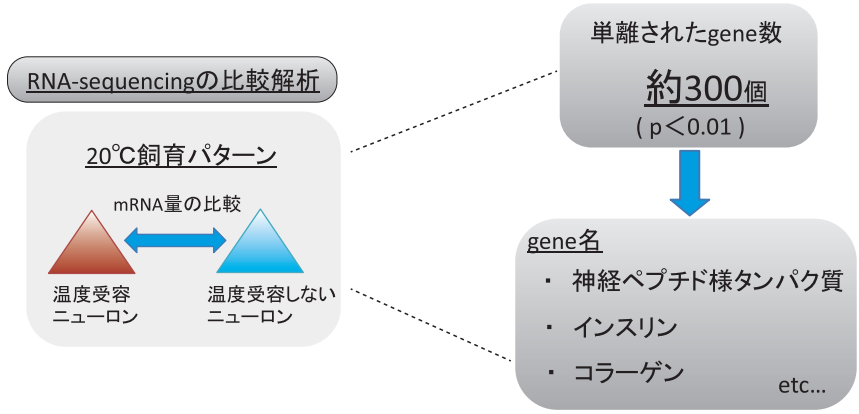

図 4　RNA-sequencing の比較解析

20℃飼育個体の温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞を比較解析し、温度受容に関わる細胞で特異的に発現変動の高い遺伝子として、約 613 個の遺伝子が単離された。

に発現変動の高い遺伝子として、約 300 個の遺伝子が単離された（図 4）。他の温度刺激条件においても多数の遺伝子の発現変動が観察された。これらの遺伝子には、コラーゲン、神経ペプチド様タンパク質、インスリンなどをコードする遺伝子が含まれていた。そこで、コラーゲンをコードする *bli-6* 変異体について低温適応を測定したところ、15℃で卵から成虫まで飼育後に 2℃で 48 時間の低温刺激を与えると、野生株と同様にほぼ全ての個体が生存した。また、25℃で卵から成虫まで飼育後に 2℃で 48 時間の低温刺激を与えると、野生株と同様にほぼ全ての個体が死滅した。これらの結果からは顕著な異常が観察されなかったため、15℃で卵から成虫まで飼育後に、25℃を 3 時間経験させるタイムコース解析を行った。その結果、この条件で温度刺激を与えた場合には、野生株は、ほぼ全ての個体が死滅したのに対して、*bli-6* 変異体は、大多数の個体が生存する異常が観察された（図 5）。

3. 2. 低温適応時の脂質構成率の変化

低温適応の制御に関して、神経系と腸以外に関与する組織が分かっていなかったため、DNA マイクロアレイ解析でインスリン経路の下流ではたらく遺伝子を同定し発現領域を調べた。その結果、生殖組織、特に精子で発現する遺伝子が多いことが明らかとなった。精子変異体の解析で低温適応異常が見られたことから、精子が低温適応に影響を

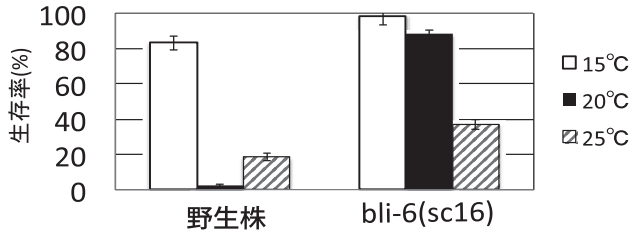

図 5　コラーゼン *bli-6* 変異体の低温適応
bli-6 変異体は、15℃で飼育後に 2℃で 48 時間の低温刺激を与えると、野生株と同様に生存した。25℃飼育後に低温刺激を与えると、野生株と同様に死滅した。15℃で飼育後に、25℃を 3 時間経験させた場合には、野生株は死滅したのに対して、*bli-6* 変異体は生存する異常が観察された。縦軸は生存率(%)。

与えることが明らかとなった[8]。

線虫を含む多くの生物において、体を構成する様々な脂肪酸の比率は低温適応に大きく影響することが知られていたため、野生株と精子特異的プロテインフォスファターゼPP1 を欠損する *gsp-4* 変異体の脂肪酸の脂質割合を測定した。野生株と *gsp-4* 変異体の脂肪酸組成を比較した結果、18:2n-6 や 18:3n-3 などの幾つかの脂肪酸において、野生株と *gsp-4* 変異体の間で弱いながらも優位な差が観察された[8]。つまり、精子の異常により、体内の膜脂質の構成が変化し、低温適応に影響を与えている可能性が考えられる。

4. 考　察

温度シフトにおいてのコラーゲンをコードする複数の遺伝子の発現量が変化していた。コラーゲンをコードする *bli-6* 変異体について低温適応を測定したところ、温度適応の異常が観察されたことから、コラーゲンの低温適応への関与が示唆される。この *bli-6* 遺伝子は、感覚ニューロンだけでなく、他の多くの細胞でも発現しているため、今回見つかった低温適応の異常がどの細胞の異常によるかについては、今後の細胞特異的な回復実験などで明らかになると考えられる。さらに、*bli-6* 以外のコラーゲンの遺伝子の変異体やRNAi処理系統において、低温適応を測定したところ、生存率がコントロールである野生株や、RNAi用のplasmid vectorをもつ大腸菌株HT115よりも上昇した。遺伝子発現量の増減と低温適応との相関性は、現在解析中である。

今回の解析から、線虫 *C. elegans* において、精子が低温適応に関わることが見つかった。さらに、他の解析から、最近、精子が頭部の温度受容ニューロンASJに影響を与えることで低温適応が調節されることを見つかってきた。これらの結果から、低温適応の組織ネットワークのメカニズムの一端が見えてきたと考えられる。

5. 総　括

コスメトロジーにおいて、皮膚および皮下組織の状態変化は、表皮の乾燥や柔軟性の状態やそれに伴う恒久的な変化にも繋がる重要なファクターである。その中において、皮下組織のコラーゲンは、真皮などを構成するタンパクであり、その状態は細胞外基質の状態を変化させ、皮膚および皮下組織に大きな影響を与える重要分子である。コラーゲンは、複数のコラーゲン分子同士が、縄を作るようにお互いに巻き付き、それらが集合することで繊維状構造を作り、皮下組織を構築している。そのため、コラーゲンの状態を制御する分子を見つけることで、コスメトロジーにお

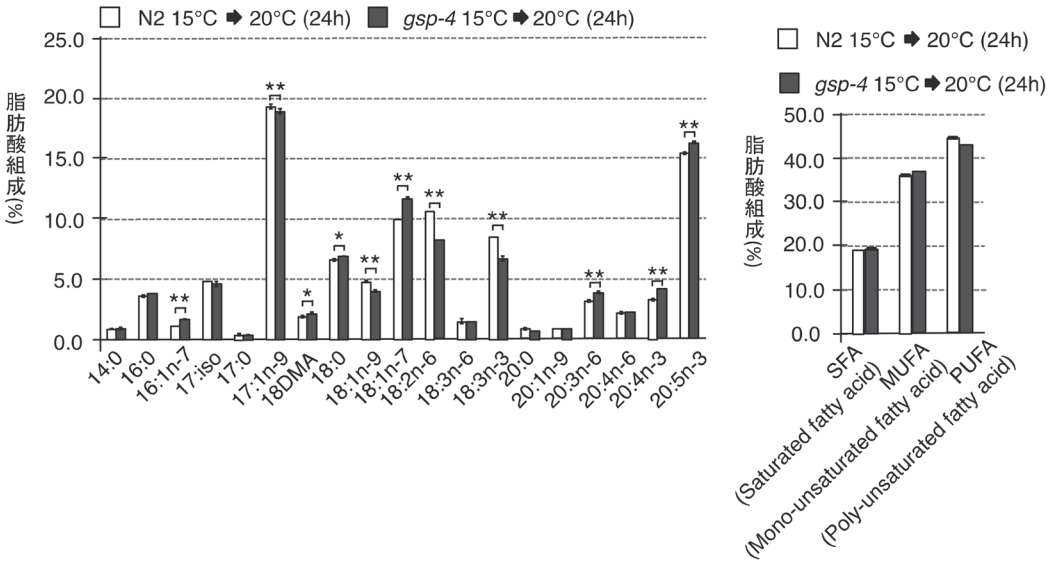

図 6　野生型と精子変異体 *gsp-4* との脂肪酸組成の比較解析
野生株と *gsp-4* 変異体の総脂質を比較。18:2n-6 や 18:3n-3 などにおいて、野生株と *gsp-4* 変異体の間で優位差。 文献[8]より引用一部改変。

いて大きな波及効果がある。

皮膚は温度に過敏であり、環境温度の状態により、表皮および皮下組織の状態は大きく変化する。その際にはコラーゲンの構成パターンの変化が必要であることは知られているが、これまでにコラーゲンと個体全体の温度の適応に関与することは知られていない。そのため、本研究から皮下組織のコラーゲンと温度適応の関係を明らかにすることで、将来的に、例えば、化粧品含有化学物質と皮下組織と体感温度との関係などが明らかになり、体に良い影響を与えながら、より快適に使用できる化粧品や皮膚薬成分の検証などに繋がることが期待される。

（引用文献）

1） S. Brenner, The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **77**, 71 (1974).

2） N. Fielenbach, A. Antebi, C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev* **22**, 2149 (Aug 15, 2008).

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

4） P. Murray, S. A. Hayward, G. G. Govan, A. Y. Gracey, A. R. Cossins, An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in Caenorhabditis elegans. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 5489 (Mar 27, 2007).

5） F. R. Savory, S. M. Sait, I. A. Hope, DAF-16 and Delta9 desaturase genes promote cold tolerance in long-lived Caenorhabditis elegans age-1 mutants. *PLoS One* **6**, e24550 (2011).

6） T. Ujisawa, A. Ohta, O. M., S. S., A. Kuhara, Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in C. elegans. *Protocol Exchange*, (2014).

7） T. Sugi, Y. Ohtani, Simplified method for cell-specific gene expression analysis in Caenorhabditis elegans. *Biochemical and biophysical research communications* **450**, 330 (Jul 18, 2014).

8） S. Sonoda, A. Ohta, A. Maruo, T. Ujisawa, A. Kuhara, Sperm affects head sensory neuron in temperature tolerance of Caenorhabditis elegans. *Cell Reports*, (2016).