

令和 3 年 4 月 3 日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06495

研究課題名(和文) 温度受容において膜タンパク質機能を制御する機能性脂質の同定と解析

研究課題名(英文) Identification of lipid regulatory genes important for membrane protein functions

研究代表者

曾我部 隆彰 (Sokabe, Takaaki)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・准教授)

研究者番号：70419894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：環境からの刺激を受け取る感覚機能には、細胞膜にある膜タンパク質受容体が必須である。これらのセンサー分子は脂質に囲まれていることから、脂質成分がセンサー分子の機能制御に関わっていることが予測される。そこで、ショウジョウバエの感覚機能を指標にして、その個体応答に寄与する脂質関連遺伝子を検索した。その結果、温度受容、光受容、および味覚受容の温度制御において働く脂質関連遺伝子を複数見つけることができ、これまで明らかにされてこなかった脂質の新たな生理的役割を提唱することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去20年で感覚機能の分子メカニズムの理解は大きく進展したが、これまでは主に細胞膜に存在するタンパク質分子が研究のターゲットであった。一方で、脂質は遺伝子にコードされておらず、時空間的に流動的であるため、その重要性にも関わらず生理機能における役割は明らかになっていなかった。本研究によって、感覚受容に寄与する脂質関連遺伝子やその代謝産物が、感覚受容プロセスの制御や情報伝達に必須であることが明らかになり、脂質の持つ新たな機能が提唱されたとともに、ヒトを含む様々な生物にとって、脂質成分の生理的・機能的な重要性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Membrane receptors embedded in the plasma membrane play indispensable roles in sensory functions, which detect various environmental stimuli. Since these sensors directly interact with surrounding lipid components, lipids are expected to regulate the protein functions. In this project we employed *Drosophila melanogaster* as a model for studying the sensory functions and sought for lipid regulatory genes that may be important for their behaviors. We found multiple genes involved in lipid metabolisms contribute to sensory processes including temperature, light and gustatory sensations. Our findings shed a light on novel physiological roles of lipid components that function together with sensors.

研究分野：感覚生物学

キーワード：温度受容 光受容 味覚受容 ショウジョウバエ TRPチャンネル 脂質 感覚神経

1. 研究開始当初の背景

生物の感覚機能には、環境刺激の受容に関わる膜受容体がこれまでに多く同定されてきた。膜受容体は細胞膜に包埋されており、細胞膜を構成する脂質成分は、それらの足場として構造的な役割を担うとともに、細胞内の情報伝達因子や、膜受容体の修飾、温度依存的な物理特性変化といった機能を通して膜受容体の機能制御に関わる例がこれまでも知られてきた。したがって、膜タンパク質の働きや細胞機能を真に理解するには、物理的・機能的にリンクした機能性脂質を割り出し、その役割を分子、細胞、および個体レベルで検証しなければならない。そのためにはまず、どういった脂質が関わっているのかを知る必要がある。しかしながら、とくに脂質機能の生理的役割に関する研究は概して進んでいない。その理由として、脂質自身が遺伝子にコードされておらず、膜の全体像や構成脂質の存在が見えにくいこと、そして脂質の役割を検証する効果的な手段が乏しいことが大きい。

2. 研究の目的

本研究では、様々な環境入力に対して明確な誘引・忌避行動を示すショウジョウバエをモデルとして用いて、温度受容や光受容などの感覚機能に関わる脂質関連遺伝子とそれらが産生する脂質成分、および標的タンパク質の同定を目指す。ショウジョウバエの遺伝学と行動解析、RNA発現解析、イメージング技術を駆使し、脂質関連遺伝子の機能を分子から個体レベルまで検討することで、脂質によるタンパク質・細胞機能の制御機構を明らかにする。これにより、温度受容に関わる機能性脂質の包括的なプロファイルとその生理機能を実証する。

シンプルな神経系を持ち、遺伝学の発達したショウジョウバエの系は、行動や感覚神経応答解析が容易であり、脂質の細胞および生理機能を評価する上で大きな優位性がある。個体の感覚応答に影響する遺伝子変異は、その遺伝子にリンクした脂質成分が感覚神経の応答性に寄与する可能性を示しており、本研究は感覚神経に局限したリポドミクスと *in vitro* 解析を組み合わせることで、脂質と標的膜タンパク質の機能的連関を明らかにしようとする。これにより、環境刺激応答メカニズムやそれに基づく生理応答を、タンパク質と脂質という複合的な視点から理解できるようになる。さらに、脂質組成に依存したタンパク質や生体機能の制御メカニズムへのアプローチなど、脂質に焦点を置いた研究への展開が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 温度刺激に応答するショウジョウバエの感覚神経を単離し、脂質代謝、修飾、あるいは制御に関連する遺伝子の発現を全身や神経間で比較解析した後、遺伝子のノックダウン株や変異体を用いた温度嗜好性を解析することにより、温度走性に寄与する遺伝子をスクリーニングする。候補として得られた脂質関連遺伝子の機能を細胞および個体レベルで解析し、温度走性における機能的役割を明らかにする。

(2) ショウジョウバエの光受容を担う視細胞において脂質成分の包括的解析を実施し、光刺激で増加する脂質を同定する。増加が確認された脂質成分について、視細胞への作用をカルシウムイメージング法を用いて明らかにする。さらに、視細胞の活性化に働く TRP イオンチャネルへの脂質の作用についても同様の手法を用いて解析する。これにより、光受容に関わる脂質成分と情報伝達経路を明らかにする。

(3) ショウジョウバエの味覚受容における温度環境の作用を明らかにするため、様々な温度条件におけるショウジョウバエ成虫の摂食行動を評価する。このとき、温度依存的な摂食行動の変化に関わる感覚神経とそこで機能する受容体遺伝子を探索し、さらに脂質関連遺伝子の寄与についても神経・個体レベルで検討する。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエの温度走性に寄与する脂質代謝遺伝子の探索と同定
ショウジョウバエ幼虫の温度走性を評価できる行動アッセイを用いて、脂質代謝に関わる遺伝子の変異体の温度走性をコントロールと比較した。コントロールの温度走性は孵化後 72 時間では 24 を中心とした分布を示し、120 時間後では 18 を中心とした分布を示す。これを指標に複数の変異体を解析したところ、モノアシルグリセロール (MAG) から不飽和脂肪酸を遊離する MAG リパーゼ遺伝子、および不飽和脂肪酸を MAG やジアシルグリセロール (DAG) に付加するトランスフェラーゼ遺伝子の変異体が、どの発生時期においてもコントロールより低温域に分布することを見いだした。さらに、内因性カンナビノイドから不飽和脂肪酸を遊離するリパーゼ遺伝子が、羽化後 120 時間でコントロールより温かい温度域に分布することも見いだした。これらの遺伝子が感覚神経に発現すること、RNA 干渉法による神経特異的なノックダウンにより低温集積の表現型が再現されることを確認した。これらの表現型は、既に温度走性に関わることが報告されている TRP チャネルの変異体の温度走性ともよく一致した。これらの遺伝子はいずれも多価不飽和脂肪酸のレベルを調節する機能を有していると推測されることから、多価不飽和脂肪酸が TRP チャネルの活性制御に関わっている可能性を示した。

また、ショウジョウバエ幼虫の温度走性に関与する脂質関連遺伝子を網羅的に検索するため、温度受容や機械刺激受容に関わる感覚ニューロンを単離回収し、RNA 発現解析を実施した。その結果、全身と比較して感覚神経で発現レベルが高い約 60 の脂質関連遺伝子を見いだした。これらの遺伝子は、脂肪酸の代謝や合成、DAG のリン酸化、リン脂質・糖脂質・エーテル脂質の合成、ステロールの代謝、脂質の輸送など、多岐にわたっていた。一部の遺伝子は、感覚神経の中でも特定のタイプに発現が多く、より特異的な機能が予測された。これらに候補遺伝子について、RNA 干渉法による神経特異的なノックダウンによる機能解析を実施したところ、いくつかの遺伝子について、幼虫の高温忌避に関わることを見いだした。この中には今まで機能がほとんど分かっていないエーテル脂質合成の律速酵素と脂質輸送に関わる遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は膜受容体と相互作用する膜脂質の成分を制御することで感覚神経の機能を調節している可能性が示唆された。これまでいくつかの脂質に関連した遺伝子が感覚機能に関わることは報告されているが、今回の発見で多くの遺伝子が候補として見つかった。今後、脂質とタンパク質の機能連関やその生理的な意義を解析する上で重要な情報となる。

(2) 光刺激受容の情報伝達に関わる新規脂質成分の同定と機能解析

ショウジョウバエの光受容にはイノシトールリン脂質を代謝する酵素 (PLC) が必須であるが、その下流で産生される脂質がどのようにエフェクターである TRP チャネルを活性化するのかについては長い間議論されてきた。ハエ成虫に光照射した直後に液体窒素で凍結することで、光刺激によって誘導される脂質成分の同定を試みた。その結果、野生型ではリノール酸を結合した内因性カンナビノイドやアミノ酸など複数種の脂質成分のレベルが有意に上昇すること、さらに PLC 変異体ではそのような上昇が全く見られないことを見いだした。これらの成分について TRP チャネルへの作用をみたところ、いずれも強い活性化を誘導することが分かった。さらに、ハエの複眼から視細胞を単離し、これらの脂質成分で刺激したところ、視細胞が活性化されることを明らかにした。TRP チャネルを機能的に欠損した視細胞では活性化は有意に減弱していた。これらの結果は、視細胞において内因性カンナビノイドが TRP チャネル活性制御において中心的な役割を担っていることを強く示唆しており、ショウジョウバエの視細胞における光受容の情報伝達経路の一つの解を与えた。ヒトの視覚においても同様の情報伝達経路は保存されており、ヒトの光受容メカニズムの解明にも役立つ知見を提供した。

(3) 味覚受容への温度の作用とその分子メカニズムの解明

様々な生物では味覚受容や嗜好性が温度の影響を受けることがこれまでに知られているが、詳しいメカニズムは明らかでない。そこで、ショウジョウバエ成虫が好むショ糖溶液を与えたときに、環境温度によって摂食行動がどう変化するか解析したところ、室温 (23) に比べて低温 (17 以下) でショ糖の摂食行動が抑制されることを見いだした。口吻において温度刺激で活性の変化する感覚神経を解析したところ、苦味受容神経と機械刺激受容神経の活性化が見られた。これらの神経伝達を遮断したところ、低温による摂食低下は起こらなくなった。これらの神経で働く可能性のある膜受容体や脂質制御遺伝子の変異体を用いてショ糖摂食行動を比較したところ、光受容体としてよく知られるロドプシン 6 とイノシトールリン脂質の代謝酵素である PLC の変異体において、低温による摂食抑制が弱くなることが分かった。これらの遺伝子が特に苦味受容神経に発現しており、苦味受容神経の温度刺激による活性化が、変異体で減弱することを確認した。これらの結果は、味覚受容が苦味受容神経や機械刺激受容神経の温度による活性化を介して制御されていること、さらに温度情報は神経内の膜受容体とその下流の脂質代謝酵素が担っていることを示している。光受容体として知られるロドプシンと脂質代謝遺伝子の新たな機能を示すだけでなく、味覚機能の修飾を司る神経基盤を突き止めたことで、感覚機能の理解を促進した成果と言える。

参考文献

- Li, Q., DeBeaubien, N. A., Sokabe, T., & Montell, C. (2020). Temperature and Sweet Taste Integration in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 30(11), 2207-2209.
doi:10.1016/j.cub.2020.04.084

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu Jiangqu, Sokabe Takaaki, Montell Craig	4. 巻 136
2. 論文標題 A Temperature Gradient Assay to Determine Thermal Preferences of Drosophila Larvae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Xiangmei Deng, Takaaki Sokabe
2. 発表標題 Physiological functions of lipid enzymes involved in thermotaxis in Drosophila melanogaster.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuto Suito, Makoto Tominaga, Takaaki Sokabe
2. 発表標題 Identification of genes regulating sensory functions via modifications of membrane lipids in Drosophila.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takaaki Sokabe, Heather B. Bradshaw, Craig Montell
2. 発表標題 Light stimulation induces biosynthesis of endocannabinoids and N-acyl amide in photoreceptor cells in Drosophila.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 曾我部隆彰, 富永真琴
2. 発表標題 ショウジョウバエの温度嗜好性の基盤となる温度受容メカニズム Thermo-sensing mechanisms underlying temperature preference in fruit flies
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaaki Sokabe, Craig Montell
2. 発表標題 A unique switch in thermal preference in Drosophila larvae depends on rhodopsins/lipases/TRPA1 signal pathway.
3. 学会等名 59th Annual Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 曾我部隆彰
2. 発表標題 Rhodopsins, lipases and trpA1 channel contribute to a unique switch in thermal preference in Drosophila melanogaster larvae.
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------