

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：63905

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23790

研究課題名(和文) 感覚機能を調節する脂質制御遺伝子の探索

研究課題名(英文) Studies on the molecular mechanism of lipid mediated sensory system

研究代表者

水藤 拓人 (SUITO, Takuto)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・NIPSリサーチフェロー

研究者番号：80847723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、第一にキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、温度や機械刺激を受容する感覚神経細胞を対象とした網羅的な遺伝子発現解析を実施し、いくつかの脂質制御遺伝子群の発現が全身の平均的な発現量と比較して高いことを明らかにした。第二に、これらの遺伝子の中から発現変動が顕著に大きい約50遺伝子を標的にした、GAL4-UASシステムを用いたRNAiによる感覚神経特異的な遺伝子の体温調節行動に対する発現抑制スクリーニングを実施し、遺伝子発現抑制によってショウジョウバエ3齢幼虫個体の選好温度を変化させる数種類の脂質制御遺伝子を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では網羅的な遺伝子のスクリーニングから多様な脂質制御遺伝子が感覚神経において特異的に機能している可能性を見出した。さらに、機能的スクリーニングによって体温調節機構を制御する新規の脂質分子代謝機構の存在が明らかとなった。

これらの結果から、感覚を制御する新たな因子が明らかとなった。さらに温度受容だけでなく他の物理刺激受容との関連性やその分子基盤を明らかにすることで、感覚受容の分子メカニズムの包括的理解に繋げていきたい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the functional relationships between lipid regulation and sensory function of *Drosophila melanogaster*. Firstly, we performed transcriptome analysis of several types of thermo- and mechano-sensory neurons. We found that the expression of several types of lipid metabolic genes were upregulated in the sensory neurons. Secondary, we conducted an RNAi screening for thermoregulatory behavior targeting to about 50 genes whose expression are remarkably high in the peripheral sensory neurons. We have finally identified the several lipid regulatory genes which affect the thermoregulatory behavior in 3rd instar larvae.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ショウジョウバエ 感覚神経 感覚受容 脂質

1. 研究開始当初の背景

感覚機能は外界の情報を取り入れ、変化に応じた生体の恒常性の維持や適切な行動を発現させるために不可欠な生体機能である。感覚受容の分子機構として TRP チャネルをはじめとする膜タンパク質が外界刺激に対して活性化することが明らかにされている。しかしながら、感覚受容に必要な受容体タンパク質以外の因子に関する解析は進んでおらず、感覚受容の分子機構の全体像は未知な部分が多いのが現状であった。

そこで本研究では、感覚受容に必要な因子の候補として膜タンパク質と密接な関係にある脂質分子に着目した。脂質分子は細胞膜の状態変化や、直接的な結合を介して膜タンパク質の機能を制御することが示されている。我々はこれまでに、ショウジョウバエモデルを用いて、温度感受性ニューロンにおいて人為的に多価不飽和脂肪酸量を増加させることによって、温度感受性ニューロンの活性が変化すること、および個体の体温調節行動が変化することを示した¹⁾。これらの知見から脂質分子が実際に感覚受容機能を制御することが示されたが、生理的な環境においてどのような脂質代謝遺伝子や脂質分子が個体の感覚受容を制御しているかについては、ほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

近年、多価不飽和脂肪酸など特定の脂質分子がタンパク質の機能を制御する可能性が示唆されているが、実際に個体の感覚受容に寄与しているかについては知見が乏しかった。さらに、これらの結果は脂質分子に着目した、リバースジェネティクスを用いた解析から明らかにされたものであり、脂質がどのように生理的な条件下で利用され感覚受容機能に関わるのかについて、分子メカニズムの全体像は解明されていない。

そこで、本研究では、生理的に意味を持つ脂質分子と脂質代謝遺伝子の感覚受容に対する機能を明らかにすることを目的とした。そのために、本研究では、第一に、特定の脂質分子に着目するのではなく脂質代謝遺伝子の働きを、ショウジョウバエの感覚受容を指標にしたフォワードジェネティクス的なアプローチからまず明らかにすることで、生理的に意味を持つ脂質代謝遺伝子を同定する。その後、機能的な脂質分子を突き止め、脂質分子の機能的側面、とくに膜タンパク質の制御メカニズムについて解明することで、生理的に意味を持つ脂質を介した感覚受容の制御機構の全容を明らかにできると考えた。

3. 研究の方法

(1) 感覚受容ニューロンにおける脂質代謝遺伝子発現解析

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の感覚受容ニューロンにおける脂質代謝遺伝子の発現を解析するため、感覚受容ニューロンにおけるトランスクリプトーム解析を実施した。ショウジョウバエでは侵害的刺激 (光、温度や機械刺激) を感知する表皮の感覚受容ニューロンとして dendritic arborization neuron に分類される神経細胞群が同定されている。これらの神経細胞群に対して、異所的な遺伝子発現を可能にする GAL4-UAS システムを用いてエピトープタグを発現させ、抗体結合磁気ビーズをもちいて、機能的に異なる感覚受容ニューロンを回収した。感覚受容ニューロンの網羅的な遺伝子発現解析を RNA-seq により実施し、脂肪酸代謝、リン脂質代謝、脂質輸送、脂質シグナル分子代謝などに関与する遺伝子の発現を解析した。これらの遺伝子の全身での平均的な発現量や、抗体磁気結合ビーズの非結合画分との発現比較によって特異的な発現を示す遺伝子や感覚神経細胞において機能している脂質代謝経路を解析した。

(2) 体温調節行動解析による表現系スクリーニング

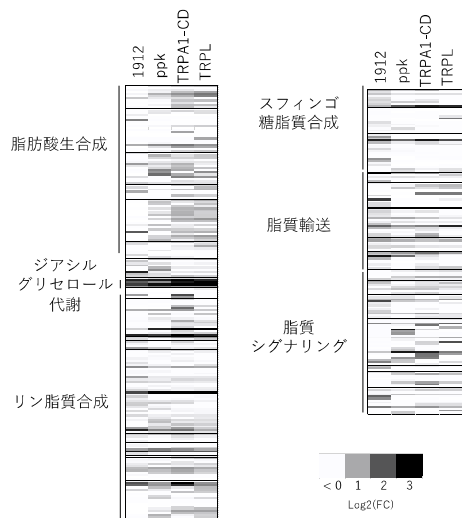
(1) の解析で明らかになった候補遺伝子の実際の生理的な機能を明らかにするため、ショウジョウバエにおける温度選好性解析を実施した。温度選好性解析では、ショウジョウバエ幼虫が活動できる温度域 (10 -30) を含んだ温度勾配を形成させた装置上での行動を撮影する装置を使用した。本装置では温度勾配上でのショウジョウバエ個体の選好温度を測定することで、体温調節行動を解析する。GAL4-UAS システムを用いた、感覚受容ニューロン特異的な RNA 干渉法によって、候補遺伝子の発現をノックダウンした、3 齢幼虫個体を用いて解析を実施した。

さらに赤色 LED と動画撮影が可能なカメラを組み込んだ行動追跡解析用のシステムを構築し、個体の温度勾配装置上での行動を逐次、詳細に解析するための装置を開発し、行動解析に使用した。

4. 研究成果

(1) 感覚受容ニューロンにおける脂質代謝遺伝子発現解析

本研究ではまず、ショウジョウバエ 3 齢幼虫の感覚神経の単離手法の確立を試みた。先行文献



(図1) 感覚受容ニューロンのトランスクリプトーム解析結果: class III 低温、機械感受性ニューロン (1912), class IV 機械受容体発現ニューロン (ppk), class IV 温度受容体発現ニューロン (TRPA1-CD, TRPL) の抗体結合磁気ビーズへの結合画分と非結合画分での脂質代謝遺伝子発現比較。

輸送、脂質シグナリングなどに関連する発現の高い遺伝子の存在を見出した(図1)。特にジアシルグリセロールの代謝は温度感受性 TRP チャネルの活性制御を介して、体温調節行動に影響を与えることが示されており³⁾、表皮感覚ニューロンでのジアシルグリセロール代謝酵素遺伝子の高い発現は温度などの感覚受容の機能と相関していると考えられた。これらの遺伝子のうちの多くは今回対象とした4種類の感覚神経で共通して発現が高かったが、特定のニューロンにおいて特異的に発現するいくつかの脂質代謝遺伝子存在についても明らかにした。

(2) 候補遺伝子の機能的スクリーニング

上記の感覚ニューロンのトランスクリプトーム解析から感覚受容ニューロンでの発現が顕著に高い55の脂質代謝遺伝子を標的にして、GAL4-UASシステムを用いたRNAiによる組織特異的な遺伝子の発現抑制スクリーニングを体温調節行動に対して実施した。現在、一次スクリーニングとして神経細胞全体における発現抑制時の温度選好性スクリーニングを実施しており、随時RNAseqを実施した4種類の感覚ニューロンに対する候補遺伝子の発現抑制スクリーニングを継続中している。これまでに、温度受容体発現細胞特異的な遺伝子発現抑制によってショウジョウバエ3齢幼虫個体の選好温度を変化させる数種類の遺伝子を同定している。さらに、選好温度のスクリーニングと並行して動画による行動解析実験も実施しており、各個体の移動速度や温度に依存した転回行動などを詳細に解析することで、体温調節行動に関与するどのような機能に障害があるのかを継続して観察する計画である。

(3) 総括と今後の展望

本研究成果から、実際に感覚神経において脂質代謝遺伝子が機能的な役割を果たしている可能性を見出すことができた。温度選好性スクリーニングをさらに進めることにより、感覚受容に必要な脂質代謝遺伝子の全容を明らかにできると考えている。さらに動画による行動追跡解析を組み合わせたスクリーニングから脂質代謝遺伝子がどのような感覚機能に影響を与えるのかについても同時に追求していく。さらに、これらのうちリン脂質代謝酵素について着目し、培養細胞を用いた実験についても進めており、感覚受容体タンパク質の活性化制御に対する解析から、脂質を介した感覚受容の分子機構についても解析を進めていく予定である。

さらに本研究を足掛かりとして、今後は温度受容だけでなく他の物理刺激受容との関連性や詳細な分子生物学的解析を通して、新たな感覚受容の分子機構の解明を目指していきたい。

< 引用文献 >

- 1) Suito T., et al., "Functional expression of 12 fatty acid desaturase modulates thermoregulatory behaviour in *Drosophila*." *Sci. Rep.* **10**: 11798 (2020).
- 2) Iyer E., et al., "Isolation and Purification of *Drosophila* Peripheral Neurons by Magnetic Bead Sorting" *J. Vis. Exp.* **34**: 1599 (2009)
- 3) Kwon Y., et al., "Control of thermotactic behavior via coupling of a TRP channel to a phospholipase C signaling cascade" *Nat. Neurosci.* **11**: 871 (2008)

2)の方法を参考に表皮感覚ニューロンの単離を実施したが、標的外細胞のコンタミネーションが顕著に見られた。そのため抜本的な手法の改良を行い、最終的に標的とする表皮感覚受容ニューロンを単離する手法を確立した。本改良手法を用い、ショウジョウバエの体温調節行動に関連する温度受容体タンパク質を発現する2種類の表皮の感覚受容ニューロン、機械受容体タンパク質を発現するニューロン1種類、および、低温や機械刺激などに感受性のある表皮感覚ニューロン1種類の合計4種類のclass III およびclass IV 樹状感覚神経細胞を単離し、RNAseqによるトランスクリプトーム解析を実施した。MDSプロットを用いた遺伝子発現の類似度解析から、これらの感覚ニューロンにおける遺伝子の発現パターンは個体の平均的な遺伝子の発現パターンとは大きく異なること、特にその中でも温度受容体タンパク質を発現する2種類の表皮の感覚ニューロンで抗体結合磁気ビーズ非結合画分との発現パターンの差異が大きく異なることを明らかにした。続いて脂質代謝に関与する遺伝子群の発現を全身の平均的な発現量および抗体結合磁気ビーズ非結合画分での発現量と比較した。その結果、脂肪酸生成、ジアシルグリセロール代謝、リン脂質合成、脂質

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水藤拓人
2. 発表標題 新規の感覚受容体制御因子の探索
3. 学会等名 第6回 温度生物学 若手の会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水藤 拓人
2. 発表標題 感覚受容を調節する細胞膜脂質制御遺伝子の同定
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回 日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021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
---------	---------