

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21388

研究課題名（和文）細胞内温度を制御する分子群の網羅的同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of molecules that regulate intracellular temperature

研究代表者

梅田 眞郷（Umeda, Masato）

同志社大学・研究開発推進機構・嘱託研究員

研究者番号：10185069

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内温度は、生物の幅広い細胞機能に影響を与えるが、個々の動物細胞の温度が環境温度の変動に応じて自律的に制御されているかどうかは明らかではない。我々は、ショウジョウバエ細胞の細胞内温度がDelta-9脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 に依存して維持されていることを見出した。さらに、DESAT1 を介した細胞内温度の上昇は、F1Fo-ATPase 依存性のミトコンドリア呼吸の亢進、およびミトコンドリアのアクリスタ構造のリモデリングを通じてなされることを明らかにした。これらの発見から、我々は「細胞内微小空間における細胞自律的な温度制御」という温度制御の新たなメカニズムを提唱する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

温度は、分子の存在状態や反応性を規定する最も重要な物理量であり、生化学反応を始めとする全ての生命活動が温度により強く影響を受ける。従来、単培養した数十マイクロメートル程の細胞内温度は、早い熱拡散により細胞外溶液と熱平衡状態に達し、個々の細胞が自律的に細胞内温度の恒常性維持を図っているとは考えられて来なかった。本研究により、環境温の変動に対応して細胞内温度を制御する新たな分子機構が明らかにされ、「細胞内微小空間における細胞自律的な温度制御」という新たな概念を提出する点にその学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Intracellular temperature affects a wide range of cellular functions in living organisms. However, it remains unclear whether temperature in individual animal cells is controlled autonomously as response to fluctuations in environmental temperature. We find that the intracellular temperature of steady-state *Drosophila* S2 cells is maintained in a manner dependent on delta9-fatty acid desaturase DESAT1. The DESAT1-mediated increase of intracellular temperature is caused by the enhancement of F1Fo-ATPase-dependent mitochondrial respiration that is coupled with thermogenesis. We also reveal that F1Fo-ATPase-dependent mitochondrial respiration is potentiated by cold exposure through the remodeling of mitochondrial cristae structure via DESAT1-dependent unsaturation of mitochondrial phospholipid acyl chains. Based on these findings, we propose a cell-autonomous mechanism for intracellular temperature control during environmental temperature changes.

研究分野：生化学

キーワード：細胞内温度 脂肪酸不飽和化酵素 膜脂質 ミトコンドリア ショウジョウバエ 酸化的リン酸化 ATP 合成酵素

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

温度は、分子の存在状態や反応性を規定する最も重要な物理量であり、生化学反応を始めとする全ての生命活動が温度により強く影響を受ける。これまで、個々の培養細胞内の温度は、早い熱拡散により細胞外溶液と熱平衡にあり、細胞が自律的に細胞内温度を制御するとは考えられていなかった。しかし、申請者らは、ショウジョウバエ細胞が細胞内温度を感知し、自律的に細胞のエネルギー代謝を制御する未知の機構を有することを見出した。ショウジョウバエ細胞(S2)には、温度受容に關与する TRP チャネルを始めとするイオンチャネルは発現しておらず (*Curr. Opin. Neurobiol.* 34:8, 2015; *Insect Mol. Biol.* 27:1, 2018)、僅かに発現する TRPC も温度受容への寄与は認められない。これらの知見は、ショウジョウバエ細胞が、未知の温度センサーを介して、自律的に細胞のエネルギー代謝さらに細胞内温度の恒常性を図る未知の機構を有することを示唆していた。

ミトコンドリアは、エネルギー代謝、Ca²⁺恒常性、シグナル伝達などの幅広い生物学的プロセスにおいて必須の機能を持つ細胞小器官である。ミトコンドリアは、ミトコンドリア外膜と折り畳まれたクリステを持つミトコンドリア内膜の 2 つの膜により形成されている。ミトコンドリア内膜での酸化リン酸化による電子伝達を介して膜内外でプロトン勾配が形成され、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I-IV によるマトリクスから膜間腔へのプロトン輸送を介してミトコンドリア内膜を介したプロトンこの電気化学的ポテンシャル差を駆動力として F1Fo-ATPase がアデノシン 2 リン酸 (ADP) を ATP に変換している。一方で、プロトン勾配の形成プロセスが ATP 合成から脱共役した場合には熱が産生され得ることから、ミトコンドリアは動物個体における低温適応にも重要な役割を果たすと考えられてきたが、細胞内温度制御における役割とその分子機序は明らかではなかった。

2. 研究の目的

ショウジョウバエ培養細胞を低温暴露するとミトコンドリア代謝が亢進することを見出し、その鍵となる分子を検索した結果、脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 が低温での代謝亢進及び細胞内温度制御において中心的役割を担うことを見出した。脂肪酸不飽和化酵素は、環境温の変動に敏感に応答して発現が変化し、脂質分子の脂肪酸鎖に二重結合を挿入することにより細胞膜の流動性を一定に保つ恒流動性適応において中心的な役割を担うと考えられている酵素である。DESAT1 は、飽和アシル-CoA の -9 位にシス二重結合を挿入し、不飽和脂肪酸生合成の律速酵素であるが、そのミトコンドリアエネルギー代謝及び細胞内温度制御における役割は明らかではない。本研究では、DESAT1 を介するミトコンドリアエネルギー代謝及び細胞内温度制御における役割を詳細に解析することにより、「細胞内微小空間における温度勾配の形成と自律的な制御」の分子機序とその生物学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

近年、細胞内の温度がエネルギー代謝や細胞内 Ca²⁺動態といった細胞内小器官の機能と連動して変動していること、細胞内のみならず細胞内小器官内のレベルで不均一な温度分布が存在していることも明らかになってきた (Kiyonaka et al., 2013; Okabe et al., 2012)。これらの発見は、単一細胞内の温度がこれまで考えられてきたよりも緻密に時空間的に制御されている可能性を強く示唆しているが、その分子機序を明らかではない。

本研究では、

(1) Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9 システムを用いて、*Desat1* 遺伝子欠損 S2 細胞を樹立し、解析に供した。

(2) 細胞の細胞内温度を広く計測するために、合成高分子型の分子温度計である Fluorescent Polymeric Thermometer (FPT) を用い (図 1.A)、細胞内局所の温度計測は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をベースとした分子温度計である tsGFP を用いて行なった。tsGFP は GFP と *Salmonella* 由来 TlpA の Coiled-Coil 領域を遺伝子工学的に融合して作製されたものであり、温度依存的な TlpA の構造変化 (ダイマー形成) に伴い GFP の蛍光スペクトル特性が変化するように設計されている。哺乳動物における温度計測のために開発された tsGFP1 の温度応答領域は 37 付近であり、至適培養温度が 25 であるショウジョウバエ細胞の細胞内温度の測定には適さなかった。そこで、より低温域に応答するように TlpA 領域に Coiled-Coil 構造を不安定化させるプロリン変異 (L137P) が導入された変異体 (tsGFP1-LP) を用いた (図 1.B)。

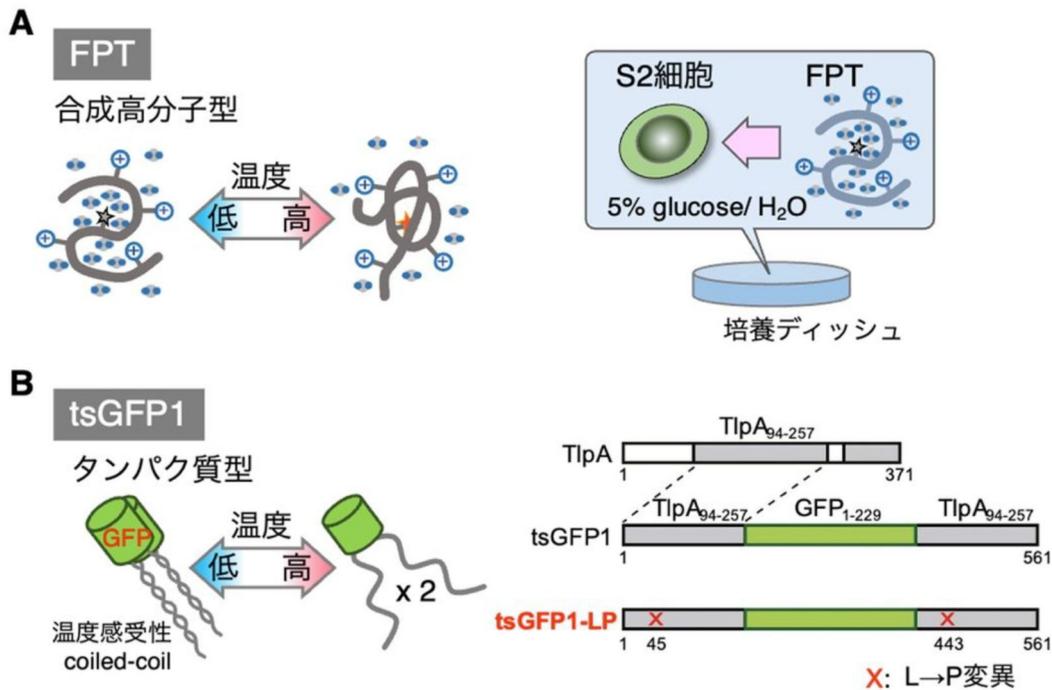


図1. 細胞内温度を計測する蛍光性ポリマー温度センサー (FPT) 及び 細胞内局所の温度を計測する蛍光性タンパク質温度センサー (tsGFP1)

4. 研究成果

(1) DESAT1 はミトコンドリア熱産生を介して細胞内温度の維持に寄与する

通常の培養条件である 25 の培養培地において、*Desat1* 遺伝子欠損細胞内の FPT の蛍光寿命を測定したところ、野生株の値と比較して有意に短いことを見出した。また、この FPT 蛍光寿命値の低下は培養培地への不飽和脂肪酸 (50 mM C16:1 及び 50 mM C18:1) の添加、もしくは *DESAT1* の強制発現により回復したことから、*Desat1* 遺伝子の欠損が細胞内温度の低下を引き起こすことが示された。続いて、*DESAT1* の薬理的阻害 (SCD1 阻害剤 "37c", 以下 *DESAT1* 阻害剤と呼称) が S2 細胞の細胞内温度に与える影響を解析した。S2 細胞を *DESAT1* 阻害剤で 16 時間処理するとリン脂質のアシル鎖における不飽和脂肪酸の含量が約 25%減少し、*Desat1* 遺伝子欠損の表現型と類似して生育が著しく抑制された。この *DESAT1* 阻害剤の処理により、S2 細胞内の FPT の蛍光寿命は有意に短縮した。この際の FPT の蛍光寿命値の変化から、*DESAT1* の阻害による細胞内の温度変化は 4 程度と見積もられた。また、この *DESAT1* 阻害剤による細胞内温度の低下は不飽和脂肪酸 (C16:1 もしくは C18:1) の培養培地への添加によって回復した一方で、飽和脂肪酸 (C16:0) の添加では同様の効果は得られず、*DESAT1* 阻害剤の高い特異性が強く示唆された。これらの結果から、定常状態の S2 細胞の細胞内温度が *DESAT1* の欠失、もしくは阻害により低下することが明らかとなった。

次に、ミトコンドリア移行型の tsGFP1-LP-mito を用いてミトコンドリア近傍の細胞内温度計測により同様の検討を行なった結果、*DESAT1* を介する不飽和脂肪酸の産生が、ミトコンドリア呼吸を介した細胞内温度維持のメカニズムに関与していることが明らかとなった。

(2) *DESAT1* はミトコンドリア膜脂質の制御によりミトコンドリア熱産生を制御する

ミトコンドリア呼吸の活性の指標であるミトコンドリア膜電位、及び酸素消費速度を解析したところ、*DESAT1* が ATP 合成と共役したミトコンドリア呼吸に寄与し、S2 細胞内のミトコンドリア膜電位、並びに細胞内温度が維持されていることが示された。

DESAT1 は、一価不飽和脂肪酸を産生する D9 脂肪酸不飽和化酵素であることから、*DESAT1* によるミトコンドリア膜脂質の制御について検討を加えた。ミトコンドリア画分の脂質分子組成を三連四重極型質量分析装置により解析したところ、不飽和脂肪酸を含有したホスファチジルコリン (PC) やホスファチジルエタノールアミン (PE) 分子種の含量が顕著に変化していた。特に、PC (32:2)、PC (34:2)、PC (36:2) のような 2 つの一価不飽和脂肪酸を含有した PC 分子種の量は *DESAT1* 阻害によりそれぞれ 90%、90%、86%減少した。同様に、PE (32:2)、PE (34:2)、PE (36:2) のような 2 つの一価不飽和脂肪酸を含有した PE 分子種の量も *DESAT1* 阻害剤により 52%、46%、44%それぞれ減少し、ミトコンドリアに特有のリン脂質分子種であるカルジオリピン (CL) については、S2 細胞における主要な CL 分子種の一つである CL (64:4) が *DESAT1* の阻害により有意に減少していた。これらの知見は、*DESAT1* がミトコンドリア膜脂質の不飽和化制御に中心的

な役割を果たし、膜脂質の制御によりミトコンドリア熱産生を制御することを示唆していた。

(3) 低温環境では DESAT1 依存的にミトコンドリア呼吸が活性化される

我々は DESAT1 の過剰発現が S2 細胞におけるクリステ含有ミトコンドリアの増加、並びにミトコンドリア呼吸の活性化を誘導するのみならず、ミトコンドリア温度を上昇させることを観察していた。そこで、低温環境では DESAT1 を介する不飽和脂肪酸の産生が亢進することにより F1Fo-ATPase 依存的なミトコンドリア呼吸が増強されるのではないかと仮説を立て検討を加えた。

まず、低温曝露時のミトコンドリア呼吸の活性を評価した結果、S2 細胞のミトコンドリア膜電位が低温曝露時に 2 倍に上昇することを見出した。さらに、この低温誘導性のミトコンドリア膜電位上昇は、DESAT1 阻害剤処理細胞や *Desat1* 遺伝子欠損細胞では有意に抑制された。また、低温誘導性の膜電位上昇が F1Fo-ATPase の活性に依存していること、F1Fo-ATPase によるプロトン勾配の消費が抑制されたことによるものではないことが示された。さらに、解析を進めた結果、低温曝露時のミトコンドリア膜電位の上昇は、F1Fo-ATPase 依存的なミトコンドリア呼吸が DESAT1 依存的に活性化することにより引き起こされていることが示された。また、低温曝露時の F1Fo-ATPase 複合体の形成、ミトコンドリア形態の透過化型電子顕微鏡観察により、DESAT1 はミトコンドリア内膜のクリステ構造の制御を介して F1Fo-ATPase 複合体形成を促進し、細胞内温度を制御することが明らかとなった(図 2)。

以上の知見より、「細胞内微小空間における細胞自律的な温度制御」と言う、生物の環境温に対する新たな適応機構を提唱する。

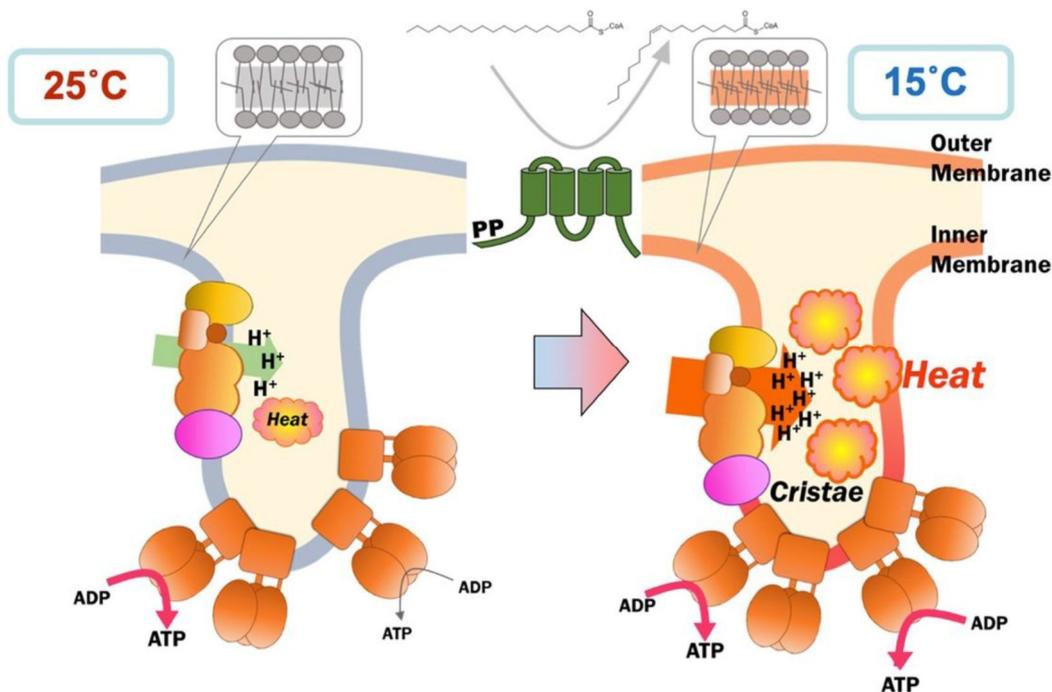


図 2. 低温曝露によるミトコンドリア機能の亢進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Murakami A, Nagao K, Sakaguchi R, Kida K, Hara Y, Mori Y, Okabe K, Harada Y, Umeda M.	4. 巻 38
2. 論文標題 Cell-autonomous control of intracellular temperature by unsaturation of phospholipid acyl chains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110487
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110487	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 -
1. 著者名 Nomura T, Nagao K, Shirai R, Gotoh H, Umeda M, Ono K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Temperature sensitivity of Notch signaling underlies species-specific developmental plasticity and robustness in amniote brains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27707-5	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 -
1. 著者名 Shiomi A, Nagao K, Yokota N, Tsuchiya M, Kato U, Juni N, Hara Y, Mori MX, Mori Y, Ui-Tei K, Murate M, Kobayashi T, Nishino Y, Miyazawa A, Yamamoto A, Suzuki R, Kaufmann S, Tanaka M, Tatsumi K, Nakabe K, Shintaku H, Yesylevsky S, Bogdanov M, Umeda M.	4. 巻 35
2. 論文標題 Extreme deformability of insect cell membranes is governed by phospholipid scrambling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109219
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109219	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
1. 著者名 塩見晃史, 長尾耕治郎, 梅田真郷	4. 巻 94
2. 論文標題 リン脂質輸送による細胞の変形能制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 108-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940108	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 塩見晃史, 長尾耕治郎, 梅田眞郷	4. 巻 39
2. 論文標題 リン脂質スクランブラーゼにより昆虫細胞は高い変形能を獲得する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2928-2931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akifumi Shiomii, Kohjiro Nagao, Hisae Kasai, Yuji Hara, Masato Umeda	4. 巻 84
2. 論文標題 Changes in the physicochemical properties of fish cell membranes during cellular senescence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 583-593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1695576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takuto Suito, Kohjiro Nagao, Kenichi Takeuchi, Naoto Juni, Yuji Hara, Masato Umeda	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional expression of 12 fatty acid desaturase modulates thermoregulatory behaviours in Drosophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68601-2	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 -

1. 著者名 原雄二, 土谷正樹, 平野航太郎, 梅田眞郷	4. 巻 60
2. 論文標題 リン脂質フリッパーゼを介するPIEZ01イオンチャネル制御と 筋管形態調節	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 222-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.60.222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 動物におけるエネルギー代謝と熱産生の制御機構に関する研究
3. 学会等名 第58回日本伝熱シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 生物の知、人間の知：Human Bumblebee
3. 学会等名 京都技術士会講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原雄二、平野航太郎、森泰生、梅田真郷
2. 発表標題 骨格筋再生における膜張力感知機構の役割
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅田真郷
2. 発表標題 膜脂質ダイナミクスの生物機能
3. 学会等名 日本脂質生化学会 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------