

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22390014

研究課題名（和文） エネルギー代謝と体温調節を連関する分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms linking energy metabolism and thermoregulation

研究代表者

梅田 真郷（UMEDA MASATO）

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10185069

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエ幼虫の温度選択行動を指標に、エネルギー代謝と体温調節とを結ぶ分子経路を明らかにすべく研究を行った。インスリン経路の阻害及び脂肪酸不飽和化酵素の発現抑制によって顕著なエネルギー代謝の抑制と高温選択行動の誘導が観察された。脂肪酸不飽和化酵素が環境温の変動を感知する温度センサーとして、また代謝レベルを調節するペースメーカーとして体温調節の鍵となる分子である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

For ectothermic animals, behavior plays a major role in thermoregulation; a wide variety of animals sense the environmental temperature and move towards to thermally comfortable zone. Although most ectothermic animals do not use metabolically produced heat to regulate body temperature, we found that thermoregulatory behavior of *Drosophila* is highly dependent on the level of energy metabolism; the increase in mitochondrial oxidative phosphorylation induced preference for the low temperature (*Science* **323**:1740-1743, 2009), while the suppression of energy metabolism by inhibiting insulin signaling caused a warm-seeking thermoregulatory behavior.

During the course of identifying molecules involved in the control of energy homeostasis, we found that delta-9 fatty acid desaturase (*desat1*) expressed in the fat body, a tissue equivalent to mammalian liver and adipose tissue, played a pivotal role in the control of energy metabolism as well as thermoregulatory behavior. Defective expression of *desat1* suppressed mitochondrial oxidative phosphorylation, causing a significant decrease in body size and warm-seeking phenotype. In contrast, induced expression of delta-12 fatty acid desaturase (*Caenorhabditis elegans* Fat-2) that produces linoleic acid caused the increase in body size and the low-temperature preference. These observations suggest that the changes in lipid desaturation coordinately regulate mitochondrial energy metabolism and thermoregulatory behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	3,200,000	960,000	4,160,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：体温調節・エネルギー代謝・脂質代謝・メタボリックシンドローム・ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

体温は、生物の体内環境を決定する重要な因子の1つであり、その調節は動物が進化の過程で獲得した食性やエネルギー代謝、環境温、気候風土とも密接に関連している。哺乳動物においては食物として摂取した総エネルギーの約60%を熱として放散することにより体温調節を行っており、エネルギー代謝系と体温調節系の連携の破綻が様々な代謝疾患を引き起こす可能性も指摘されている。しかし、エネルギー代謝と体温調節の両システムがいかに協調・連関して個体に適正な体温を設定しているのか、その分子レベルでの機構は未だ明らかではない。

我々は、動物の体温調節に関わる分子機構を探る目的で、ショウジョウバエ幼虫の温度選択行動を定量的に測定する装置を開発し、さらに温度選択行動に異常を来した変異体群の同定を行った。同定した変異体の中で、際立った低温選択性を示す変異体*atsugari*について原因遺伝子の同定と低温選択性誘導の分子機構の解析を進めた。その結果、*atsugari*変異体の低温選択行動は筋ジスロトフィー関連糖タンパク質ジストログリカンの発現低下を原因とし、その結果生じた細胞膜流動性の亢進と細胞内Ca²⁺濃度の上昇により惹起される一連のエネルギー代謝活性の亢進により、

低温選択行動が誘導されていることを見出した(*Science* **323**: 1740-1743, 2009)。さらに、*atsugari*変異体の一連の解析から、ショウジョウバエ幼虫は酸素濃度の変化を指標に体内のエネルギー代謝レベルを把握し、適正な温度環境を選択していることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、エネルギー代謝と体温調節を結ぶ分子経路を明らかにすべく、ショウジョウバエ幼虫のエネルギー代謝および膜流動性の温度選択行動に及ぼす影響についてさらに検討を進めた。

3. 研究の方法および成果

(1) インスリン経路の温度選択行動へ及ぼす影響

哺乳動物において、インスリン経路はエネルギー代謝、糖代謝、脂質代謝の制御において中心的な役割を果たすが、ショウジョウバエにおいてもインスリン経路が存在し、哺乳動物と同様の役割を果たすことが明らかとなっている。そこで、インスリン経路を介するエネルギー代謝制御において中心的な役割を果たすAkt (protein kinase B) に着目して検討を行った。まず、UAS-GAL4発現システムを用いたRNA干渉によりAktの発現を様々な組

織で抑制した際の温度選択行動に及ぼす影響を解析した。その結果、脂肪体（哺乳動物の肝臓と脂肪組織に相当する臓器）で発現抑制した場合にのみ、選択温度が上昇することを見出した（図1）。この際、際立った個体サイズの減少も観察されたことから、Aktの発現抑制によるエネルギー代謝の低下により、高温選択性が誘導された可能性が高い。これらの知見は、*atsugari*変異体での解析により得られた、「ショウジョウバエ幼虫が個体のエネルギー代謝レベルに呼応して体温調節行動を調節する」という仮説をさらに裏付けるものであり、今後、脂肪体から神経系への情報伝達経路を含めた詳細な解析を進める計画である。

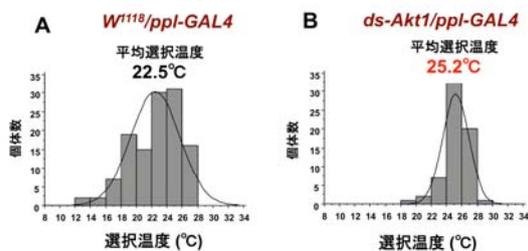


図1. Aktタンパク質発現抑制の温度選択行動に及ぼす影響

(A) 脂肪体特異的 GAL4 ドライバー pp1-GAL4 と標準系統 W¹¹¹⁸ を掛け合わせたコントロール個体の温度選択性。

(B) Akt1 に対する RNA 干渉系統と pp1-GAL4 系統を掛け合わせて、脂肪体での Akt1 の発現を抑制した個体の温度選択性。

脂肪体で Akt1 の発現を抑制すると顕著な高温選択性が誘導される。

(2) 細胞膜流動性の温度選択行動に及ぼす影響

これまでの筋ジストロフィーの発症機構に関する研究から、ジストロフィン・ジストログリカン複合体の発現低下による細胞膜流動性の亢進あるいは膜安定性の低下により、細胞内へのCa²⁺流入が惹起され、一連の筋損傷反応が誘発される可能性が示されている。そこで、本研究では、

- ① *atsugari*変異体において膜流動性の亢進が認められるか、
- ② 膜流動性の亢進により温度選択性の変化が誘導されるか、について検討を進めた。

① *atsugari*変異体における膜流動性の変化

ショウジョウバエ標準株 (Canton S) 並びに *atsugari*変異体の3齢幼虫から細胞膜画分を調製し、スピン標識脂肪酸

(N-oxy-4',4'-demethylloxazolidine derivative of 5-detostearate)を膜中に挿入し、電子スピン共鳴測定により様々な温度における膜流動性の測定を行った。本解析では2T₁値が減少するほど膜流動性が亢進していることを示すが、図2に示すようにいずれの測定温度においても *atsugari*変異体の膜流動性が顕著に亢進していることが明らかとなった。この *atsugari*変異体における膜流動性の亢進はジストログリカンタンパク質の強制発現により抑制されることが示された。また、食餌中に極長鎖脂肪酸 (C22:0) を添加し膜流動性を抑制することにより、*atsugari*変異体の低温選択性が抑制されることも明らかとなった。一方、不飽和脂肪酸 (C18:1, C18:2) あるいは飽和脂肪酸 (C18:0, C20:0) の添加による温度選択行動への影響は認められなかった。これらの知見は、膜流動性の亢進を引き金とした一連の生化学反応の亢進により *atsugari*変異体のエネルギー代謝の上昇と低温選択行動が惹起されていることを示唆している。

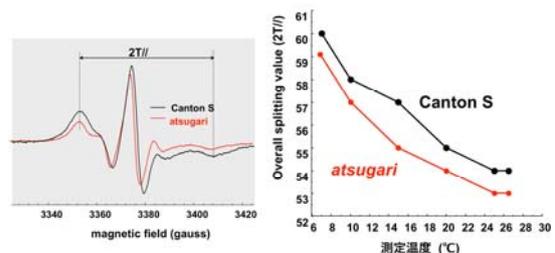


図2. 電子スピン共鳴(ESR)による膜流動性の測定。全ての測定温度において、*atsugari*変異体の膜脂質流動性が、標準個体 Canton S に比べて顕著に亢進している。

② 膜流動性の亢進による温度選択行動の変化

次に、膜脂質組成を変化させることにより膜流動性を亢進させた際に低温選択性が誘導されるか否か、検討を進めた。脂肪酸不飽和化酵素は、膜脂質に二重結合を挿入すること

により細胞膜脂質の流動性を調節する酵素である。ヒトを含めた哺乳動物あるいは線虫などは多種類の脂肪酸不飽和化酵素を有しているが、ショウジョウバエは脂肪酸の第9位に不飽和結合を挿入する $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素(*desat1*)1種のみを有する。従って、同酵素の発現抑制あるいは過剰発現により細胞膜流動性を変化させることが可能である。

そこで、ショウジョウバエより*desat1*を、線虫(*Caenorhabditis elegans*)よりリノール酸合成に関わる $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素をクローニングした。次に、UAS(upstream activator sequence)の下流に上記遺伝子を組み込んだコンストラクトを作製し、その遺伝子導入ショウジョウバエ系統を確立した。このUAS-標的遺伝子導入系統をGAL4ドライバー系統と掛け合わせることで、GAL4の発現する特定の細胞や組織で標的遺伝子を発現誘導することができる。また、種々の遺伝子の組織特異的発現抑制は、国立遺伝学研究所にて樹立されたUAS-RNA干渉配列を組み込んだRNA干渉系統群を用いた。*desat1*遺伝子の強制発現によつては、検討した限りいずれの組織・細胞で発現誘導した場合にも温度選択行動への有意な影響は観察されなかったが、*desat1*の発現抑制個体では、脂肪体(哺乳動物の肝臓と脂肪組織に相当する組織)における*desat1*発現抑制個体においてのみ、顕著な高温選択性と個体サイズの減少が観察された(図3)。一方、 $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素を脂肪体で発現誘導した場合に、顕著な低温選択性(選択温度:コントロール個体, 22.5°C; $\Delta 12$ 脂肪酸不飽和化酵素の発現誘導個体, 20.8°C)が観察された。神経細胞や筋肉組織等の組織での発現誘導では有意な温度選択性の変化は認められなかった。

これらの知見は、膜脂質の流動性変化がエネルギー代謝と密接に関連していることを示しており、脂肪酸不飽和化酵素*desat1*がエネルギー代謝の調節を介して個体サイズや温度選択性の制御に関わることを示唆して

いる。一方、*desat1*の発現レベルは、環境温の変化に強く影響を受けることも示されていることから、*desat1*が環境温の変動を感知する温度センサーとして働き、さらに個体内の代謝レベルを調節する「代謝のペースメーカー」として個体サイズや体温の調節を司る鍵となる分子である可能性が高い。現在、*desat1*を介するエネルギー代謝および体温調節の制御機構についてさらに詳細な解析を進めている。

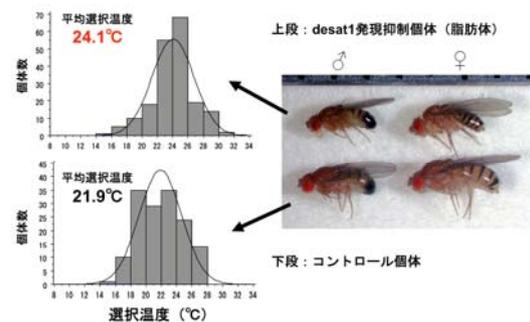


図3. 脂肪酸不飽和化酵素*desat1*の発現抑制個体の温度選択性
脂肪体での*desat1*の発現を抑制した個体(上段)と標準系統(下段)の個体サイズ(右写真)と温度選択性(左図)。

4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Ikenouchi, J., Hirata, M., Yonemura, S., Umeda, M.: Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. *J Cell Sci.* in press (2013). 査読有
2. Kobayashi, Y., Harada, A., Furuta, B., Asou, H., Kato, U., Umeda, M.: The role of nadrin, a Rho GTPase-activating protein, in the morphological differentiation of astrocytes. *J Biochem.* 153, 389-398 (2013). 査読有
DOI: 10.1093/jb/mvt005
3. Kato, U., Inadome, H., Emoto, K., Kobayashi, T., Umeda, M.: Role for phospholipid flippase complex of ATP8A1

- and CDC50A in cell migration. *J Biol Chem.* 288, 4922-4934 (2013). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M112.402701
4. Area-Gomez, E., Castillo, M., Tambini, M., Groofla, A., Madra, M., Ikenouchi, J., Umeda, M., Bird, T., Sturley, S., Schon, E.: Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBOJ.* 31, 4106-23 (2012). 査読有
DOI: 10.1038/emboj.2012.202
 5. Lee, S., Uchida, Y., Emoto, K., Umeda, M., Kuge, O., Taguchi, T., Arai, H.: Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis. *Genes to Cells.* 17, 728-36 (2012). 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01622.x
 6. Ikenouchi, J., Suzuki, M., Umeda, K., Ikeda, K., Taguchi, R., Kobayashi, T., Sato SB, Kobayashi, T, Stolz DB., Umeda, M.: Lipid polarity is maintained in absence of tight junctions. *J Biol Chem.* 287(12), 9525-33 (2012). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.327064
 7. Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K., Shin, H.W.: ATP9B, a P4-ATPase (a putative aminophospholipid translocase), localizes to the trans-Golgi network in a CDC50-independent manner. *J. Biol. Chem.* 286(44), 38159-67 (2011). 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.281006
 8. Nakayama, M., Sato, H., Okuda, T., Fujisawa, N., Kono, N., Arai, H., Suzuki, E., Umeda, M., Ishikawa, H.O., Matsuno, K.: *Drosophila* carrying *pex3* or *pex16* mutations are models of Zellweger syndrome that reflect its symptoms associated with the absence of peroxisomes. *PLoS One* 6, e22984 (2011). 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0022984
 9. Suzuki, J., Umeda, M., Sims, PJ., and Nagata, S.: Calcium-dependent phospholipids scrambling by TMEM16F. *Nature* 468, 834-838 (2010). 査読有
DOI: 10.1038/nature09583
 10. Ikenouchi, J., Umeda, M.: FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 748-753, (2010). 査読有
DOI: 10.1073/pnas.0908423107
 11. 山本真寿、加藤詩子、梅田真郷 : リン脂質フリッパーゼによる「脂質場」の形成と細胞膜ダイナミクス、*実験医学* 28(20)、3292-3299 (2010). 査読無
 12. 池ノ内順一、梅田真郷 : 上皮細胞の細胞膜における膜ドメイン、*実験医学* 28, 1212-1219 (2010). 査読無
- [学会発表] (計 17 件)
1. 梅田真郷 : 生体膜の形状変化を誘導、感知するタンパク質の機能、日本ペプチド学会第 16 回ペプチドフォーラム、2012.12.21、京都
 2. Masato Umeda : Role of fatty acid remodeling in the control of mitochondrial energy metabolism in *Drosophila melanogaster*, 第85回日本生化学会大会、2012.12.15、福岡
 3. 梅田真郷 : 虫のちえに学ぶ、第 25 回はんなり京都嶋臺塾、2012.12.14、京都
 4. 梅田真郷 : リン脂質フリッパーゼを介した膜脂質ドメインの形成とその細胞運動における役割、第 35 回日本分子生物学会年会、2012.12.11、福岡
 5. Masato Umeda : Lipid biology using *Drosophila melanogaster* as a model animal,

- 理研国際シンポジウム「Evolution of Lipids – Lipids in Evolution」2012.11.9, 和光
6. 梅田真郷: エネルギー代謝と体温調節行動を結ぶ分子機構: ショウジョウバエを用いたアプローチ、第 35 回日本神経科学大会、2012.9.21、名古屋
 7. 梅田真郷: 膜脂質による温度感知と代謝調節、岡崎統合バイオサイエンスセンターサマースクール 2012、2012.8.8、岡崎
 8. 梅田真郷: 温度と生命システム、理化学研究所基幹研究所 2012 年度コロキウム、2012.7.27、和光
 9. 梅田真郷: 脂質生物学から温度生物学へ、第 7 回スフィンゴセラピィ研究会、2012.7.13、石川
 10. Masato Umeda: Membrane lipid-mediated control of energy metabolism and body size in *Drosophila*、新学術領域研究「脂質マシナリー」主催国際シンポジウム *Machineries of bioactive lipids in homeostasis diseases*, 2012.6.6、福岡
 11. Masato Umeda: Membrane lipid control of behavioral thermoregulation and energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Gordon Research Conferences in 2012*, 2011.7.17-22, New Hampshire
 12. 梅田真郷: リン脂質フリッパーゼによる膜脂質ドメインの形成とその生物学的意義、第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会、2011.3.29、横浜
 13. Utako Kato: An approach for Lipid biology using *Drosophila melanogaster*、第 33 回分子生物学会年会、2010.12.7、神戸
 14. 梅田真郷: 膜リン脂質のダイナミズムとその生物機能、第 23 回植物脂質シンポジウム、2010.11.26、京都
 15. Masato Umeda: Phospholipid dynamics and membrane polarity formation、The 27th Naito Conference on “Membrane Dynamics and Lipid Biology”、2010.7.2、札幌
 16. 梅田真郷: Molecular mechanisms linking energy homeostasis to behavioral thermoregulation in *Drosophila*、第 87 回日本生理学会大会シンポジウム、2010.5.19、盛岡
- [図書] (計 1 件)
1. 山本真寿・従二直人・加藤詩子・梅田真郷: ショウジョウバエと脂質研究、遺伝子医学 MOOK24 号「最新生理活性脂質研究とその臨床・創薬応用研究」117-123 (2013).
5. 研究組織
- (1) 研究代表者

梅田 真郷 (UMEDA MASATO)
 京都大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号: 10185069
 - (2) 研究分担者

加藤 詩子 (KATO UTAKO)
 京都大学・大学院工学研究科・助教
 研究者番号: 90362392

従二 直人 (JUNI NAOTO)
 京都大学・大学院工学研究科・研究員
 研究者番号: 90572199