

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293012

研究課題名(和文)脂質代謝と体温調節を連携する分子経路の解明

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

研究代表者

梅田 真郷 (Umeda, Masato)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10185069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：体温調節の基本は熱の産生・吸収と放散の平衡であり、環境温の変化に応答した個体のエネルギー摂取・消費の微妙なバランスの上に成り立っている。ヒトを含む哺乳動物では、熱産生の約70%が脂質代謝に依存するが、体温調節と脂質代謝の両システムがいかなる分子機構で協調・連携して働いているのか、未だ明らかではない。

我々は、ショウジョウバエの Δ 9脂肪酸不飽和化酵素DESAT1がショウジョウバエの温度選択行動とエネルギー代謝に強く影響を及ぼすことを見出した。本研究では、DESAT1の発現制御について詳細な検討を加え、DESAT1結合タンパク質を同定し、ミトコンドリア機能及び個体サイズに及ぼす影響を解析した。

研究成果の概要(英文)：Temperature is a universal and pervasive physical characteristic, which affects the physiology, behavior and evolution of organisms. Animals have thermoregulatory systems to adapt their physiological functions, such as energy utilization, growth, reproduction and locomotion, in response to the wide range of changes in ambient temperature. We have shown that thermoregulatory behavior of *Drosophila melanogaster* is highly dependent on the level of energy metabolism and identified that Δ -9 fatty acid desaturase (DESAT1), whose expression is highly dependent on environmental temperature, plays a pivotal role in controlling thermoregulatory behavior as well as lipid metabolism of *Drosophila*. In this study, we elucidated the molecular mechanisms that regulate the expression of DESAT1 and identified the DESAT1-associated proteins. We also examined the effect of DESAT1 on mitochondrial function and the temperature-dependent control of body size.

研究分野：生化学

キーワード：脂質 細胞膜 温度 細胞・組織 昆虫

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳動物では、摂取した総エネルギーの60%以上を熱に変換することにより体温の調節が行われ、また熱産生の約70%が脂質代謝によることから、脂質代謝と体温調節の連携の破綻が様々な代謝疾患を引き起こす可能性が指摘されている。しかし、体温調節系と脂質代謝系の両システムがいかなる分子機構で協調・関連して働いているのか、この問題に対する取組みは未だ僅かである。

2. 研究の目的

アシル-CoAの $\Delta 9$ 位に二重結合を導入するステアロイル-CoA不飽和化酵素(SCD1)は、膜流動性の調節に重要な役割を果たすことが古くから知られていたが、その欠損マウスが抗肥満性を示すことが見出され、抗肥満薬の標的分子として注目されている。哺乳動物におけるSCD1は様々な組織に発現し、さらにSCD1欠損マウスで観察された抗肥満作用が皮脂バリアーの形成不全と体温調節の破綻に起因するエネルギー代謝亢進によるとの報告もなされ、SCD1固有の機能解析が難しいのが現状である。我々は、ショウジョウバエの温度選択行動を指標にした分子遺伝学的手法を駆使することにより体温調節に関わる分子群の同定を進める過程で、ショウジョウバエの $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素(DESAT1)がショウジョウバエの温度選択行動に強く影響を及ぼすことを見出した。

本研究では、DESAT1の発現制御機構とその作用メカニズムを解析することにより、脂質代謝と体温調節を連携する分子経路の解明を目的として研究を進めた。具体的には、DESAT1の発現制御機構について詳細な検討を加え、遺伝子改変型のアスコルビン酸ペルオキシダーゼを利用した近傍タンパク質バイオチン標識法を駆使してDESAT1と相互作用する分子群の検索を行った。さらに、DESAT1

の発現制御について詳細な検討を加えた。

3. 研究の方法と成果

低温曝露によるS2細胞のリン脂質を構成する脂肪酸組成の変化

温度変化がリン脂質を構成する脂肪酸組成へ与える影響を評価するために、25°Cで培養していたS2細胞を12°Cへ12時間または24時間曝露し、リン脂質を構成する脂肪酸組成を解析した(図.1)。低温曝露により一価の不飽和脂肪酸の増加と飽和脂肪酸の減少が観察され、特に炭素数16の脂肪酸であるパルミチン酸(C16:0)とパルミトレイン酸(C16:1)の変化が顕著であった。また、これらの変化は血清不含の条件でも起こったことから、 $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和化酵素であるDESAT1が温度変化に応答して一価の不飽和脂肪酸を産生し、膜流動性を制御していることが示唆された。

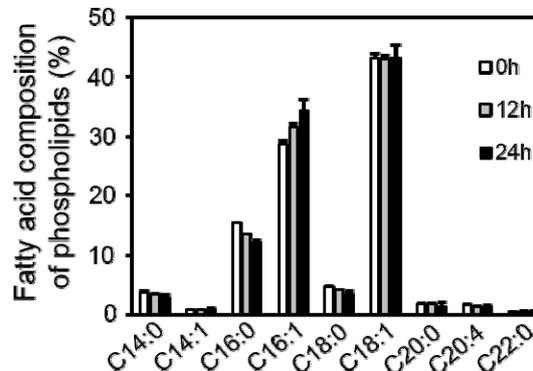


図1. 低温曝露によるリン脂質を構成する脂肪酸組成の変化

膜流動性の変化に応答したDESAT1の発現制御

膜流動性の変化がDESAT1へ与える影響を評価するため、培地中に不飽和脂肪酸を添加した。オレイン酸(C18:1)またはリノール酸(C18:2)の添加により、DESAT1タンパク質量は約70%低下した(図.2A)。また、DESAT1の酵素活性を阻害する2種類のDESAT1阻害剤(23, 37c)により、S2細胞のリン脂質を構成する不飽和脂肪酸が減少し、DESAT1タ

ンパク質量が約2倍に増加した(図.2B)。一方、*Desat1* 遺伝子発現量にはこれらの処理は影響しなかった。また DESAT1 タンパク質の半減期は約2時間と短いことから、DESAT1 の発現制御には脂質二重膜の流動性に応答したタンパク質分解経路が関与することが示唆された。

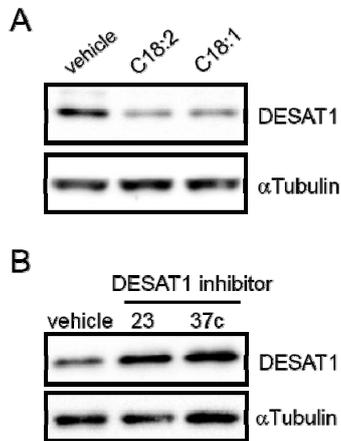


図 2. 脂肪酸の不飽和度の変化に応答した DESAT1 タンパク質の発現制御

続いて、タンパク質分解経路に着目した解析を行うため、Flag タグを付加した DESAT1 を S2 細胞に過剰発現させた。C 末端に Flag タグを付加した DESAT1-Flag タンパク質は内因性 DESAT1 タンパク質と同様の挙動を示したことから、膜流動性の変化に応答した DESAT1 の発現制御へのタンパク質分解制御機構の寄与が示された。一方、N 末端に Flag タグを付加した Flag-DESAT1 タンパク質は、DESAT1 阻害剤や不飽和脂肪酸へ応答しなかった。そして DESAT1 タンパク質は、N 末端 59 アミノ酸の欠失により、不飽和脂肪酸や DESAT1 の阻害剤への感受性が劇的に低下した。このことから、DESAT1 タンパク質の N 末端領域が膜流動性の変化に応答した DESAT1 タンパク質の分解制御機構に関与していることが示された。

温度変化によっても制御される概日リズムに Ca^{2+} 依存性プロテアーゼであるカルパインが関与することから (Tataroglu O. et al. *Nature* 2015)、この DESAT1 タンパク質分解経路へのカルパインの関与を検討した。 Ca^{2+} イオノフォアによる細胞内への Ca^{2+} の流入により DESAT1 タンパク質の分解が誘導された。また不飽和脂肪酸によって誘導される

DESAT1 タンパク質の分解がカルパイン阻害剤 calpeptin によって抑制された(図.3)。

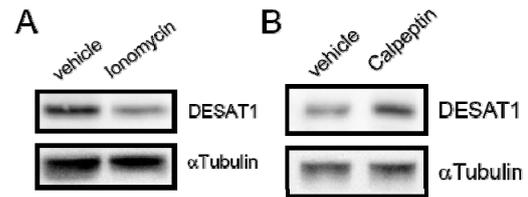


図 3. カルパインの DESAT1 タンパク質の分解経路への関与

DESAT1 のミトコンドリア機能へ与える影響

DESAT1 の酵素活性阻害によりミトコンドリアの機能異常に起因して細胞生育の悪化が引き起こされ、その影響は DESAT1 の酵素反応の産物であるオレイン酸などの不飽和脂肪酸により回復した(図.4)。ミトコンドリアは温度変化に応答して熱産生を行う細胞小器官であることから、DESAT1 がミトコンドリア機能の制御を通して熱産生にも関与しうる可能性が示された。

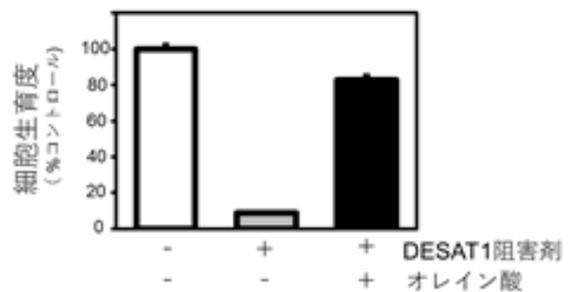


図 4. DESAT1 の阻害が細胞の成育へ与える影響

DESAT1 の制御因子の探索

DESAT1 を制御するタンパク質を同定するために、soybean 由来の ascorbate peroxidase を遺伝子改変した APEX2 (Lam S.S. et al. *Nature method* 2015) を用いた Proximity-dependent biotin labeling により DESAT1 の近傍に存在するタンパク質の同定を試みた(図 5)。

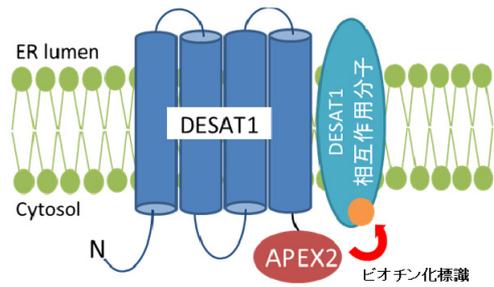


図 5. APEX2 を用いた DESAT1 の結合タンパク質の探索

DESAT1 の C 末端に APEX2 を融合させた DESAT1-APEX2 を発現させた S2 細胞において、ビオチンフェノールと過酸化水素に依存して細胞内のタンパク質がビオチン化標識される系を構築した (図.6A)。さらに、DESAT1 に依存してビオチン化標識されたタンパク質を選択するために、DESAT1 と同様に小胞体に局在する Syt2 の膜貫通ドメインと APEX2 の融合タンパク質 (Syt2-APEX2) を発現させた細胞も樹立した。ビオチンフェノールと過酸化水素を作用させたこれらの細胞から細胞質画分と膜画分を調製し、両画分から streptavidin agarose resin によりビオチン化タンパク質を精製した。DESAT1-APEX2 に依存してビオチン化標識される約 60 kDa のタンパク質を細胞質画分に見だし (図 6B)、MALDI-TOF MS 分析によりこのタンパク質がピルビン酸キナーゼであることを明らかにした。細胞が代謝状況にあわせて脂肪酸代謝と糖代謝を使い分けていることから、解糖経路の最終段階を触媒するピルビン酸キナーゼと DESAT1 の相互作用は細胞におけるエネルギー代謝の制御に関わると考えられる。

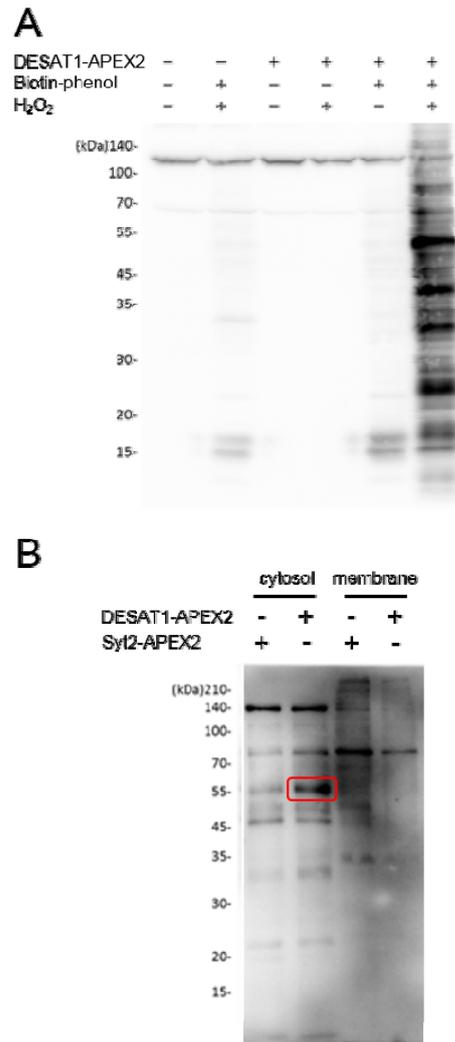


図 6. DESAT1-APEX2 に依存した近傍タンパク質のビオチン化標識

DESAT1 の個体サイズ制御における役割

DESAT1 の発現が温度によって制御されること、そして DESAT1 が関わる脂質代謝が個体におけるエネルギー代謝に関わることから、環境温度による個体サイズの制御における DESAT1 の役割を評価した。野生型ショウジョウバエを 18°C で飼育すると、25°C で飼育した場合よりもサナギの長さが有意に増加した (図 7)。一方、DESAT1 の発現を抑制すると、野生型よりも個体が小さくなり、25°C と 18°C で飼育した個体の大きさが有意に変化しなかった。これらの結果から、低温時に DESAT1 の機能が亢進することが、

温度変化に応答した個体サイズの制御に関与することが示唆された。

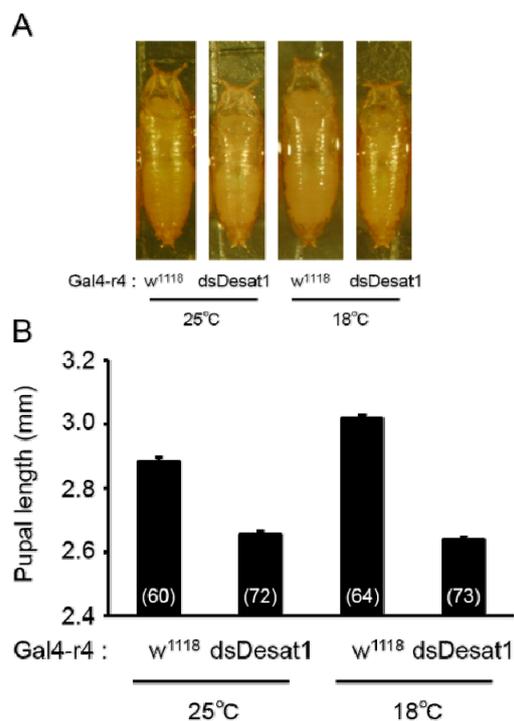


図7. DESAT1の発現がショウジョウバエ個体のサイズへ与える影響

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 9 件)

1. 長尾耕治郎・塩見晃史・梅田真郷：ショウジョウバエのリン脂質輸送タンパク質—ユニークな形質膜のリン脂質の組成と分布、生体の化学 67(3)、247-251 (2016). 査読無
2. Bhat, H. B., Ishitsuka, R., Inaba, T., Murate, M., Abe, M., Makino, A., Kohyama-Koganeya, A., Nagao, K., Kurahashi, A., Kishimoto, T., Tahara, M., Yamano, A., Nagamune, K., Hirabayashi, Y., Juni, N., Umeda, M., Fujimori, F., Nishibori, K., Yamaji-Hasegawa, A., Greimel, P., Kobayashi, T. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB.J.* 29(9), 3920-3934 (2015). 査読有 doi: 10.1096/fj.15-272112

3. Ogawa R, Nagao K., Taniuchi K, Tsuchiya M, Kato U, Hara Y, Inaba T, Kobayashi T, Sasaki Y, Akiyoshi K, Watanabe-Takahashi M, Nishikawa K, Umeda M. Development of a novel tetravalent synthetic peptide that binds to phosphatidic acid. *PLOS ONE*10(7), e0131668 (2015). 査読有 10.1371/journal.pone.0131668
4. Arita Y, Nishimura S, Ishitsuka R, Kishimoto T, Ikenouchi J, Ishii K, Umeda M., Matsunaga S, Kobayashi T, Yoshida M. Targeting cholesterol in a liquid-disordered environment by theonellamides modulates cell membrane order and cell shape. *Chem. Biol.* 22(5). 604-610 (2015). 査読有 doi: 10.1016/j.chembiol.2015.04.011.
5. Murate M, Abe M, Kasahara K, Iwabuchi K, Umeda M., Kobayashi T. Transbilayer lipid distribution in nano scale. *J Cell Sci.* 128(8), 1627-1638 (2015). 査読有 10.1242/jcs.163105
6. 梅田真郷：リン脂質フリッパーゼー構造、リン脂質特異性、機能、疾患とのかかわり、医学のあゆみ 248(13)、1105-1112 (2014). 査読無
7. Pujals S., Miyamae H., Afonin S., Murayama T., Hirose H., Nakase I., Taniuchi K., Umeda M., Sakamoto K., Ulrich AS., Futaki S.: Curvature engineering: positive membrane curvature induced by epsin N-terminal peptide boosts internalization of octaarginine. *ACS Chem Biol.* 8(9), 1894-1899 (2013). 査読有 10.1021/cb4002987
8. Ikenouchi, J., Hirata, M., Yonemura, S., Umeda, M.: Sphingomyelin clustering is essential for the formation of microvilli. *J Cell Sci.* 126, 3585-3592 (2013). 査読有 10.1242/jcs.122325.
9. 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 MOOK 24 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). 査読無

[学会発表] (計 11 件)

1. 梅田真郷：ショウジョウバエのユニークな膜構築と脂質代謝機構、2014 年日本農芸化学会大会、2014.3.30、川崎 (明治大学生田キャンパス) 招待講演
2. 梅田真郷：昆虫のユニークな膜脂質と脂質代謝機構、第 9 回スフィンゴセラピ研

究会、2014.7.18.加賀（山中温泉河鹿荘
ロイヤルホテル）

3. 梅田真郷：「脂質の比較生物学」、第1回 Integrated Lipidology Meeting、2015.2.25、静岡（日本平ホテル）招待講演
4. 梅田真郷：生物のロバスト制御と脂質生物学、第57回日本脂質生化学会、2015.5.29、東京（一橋大学一橋講堂）招待講演
5. 梅田真郷：生物の温度応答と生体膜システムの関係、第59回生物医工学サロン、2015.6.22、京都（京都大学再生医科学研究所）招待講演
6. Umeda, M.: Asymmetric transbilayer distribution of membrane phospholipids is disrupted by constitutive activation of phospholipid scramblase in insect cells. Lipids, Molecular & Cellular Biology of Gordon Research Conference, 2015.7.26-31, Waterville Valley USA
7. 梅田真郷：呼吸とエネルギー代謝：昆虫の秘密から学ぶ、第19回酵素ダイナミクス研究会、2015.9.12、東京（東京女子医科大学）、招待講演
8. 梅田真郷：生体膜におけるリン脂質分子の運動と機能、第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13、金沢（金沢大学）招待講演
9. 梅田真郷：生体膜脂質と温度感受性システム、第36回白金シンポジウム、2016.2.27、東京（北里大学薬学部）招待講演
10. 梅田真郷、村上光、従二直人、長尾耕治郎、原雄二：脂質を介するエネルギー代謝と温度調節行動の制御機構、第93回日本生理学会大会、2016.3.24、札幌（札幌コンベンションセンター）招待講演
11. 梅田真郷：膜脂質ダイナミクスを介する細胞機能の制御機構、日本膜学会「第38年会」、2016.5.10、東京（早稲田大学西早稲田キャンパス）招待講演

〔図書〕（計 3 件）

1. Nagao K, Juni N, Umeda M. Membrane lipid transporters in *Drosophila melanogaster*. "Bioactive Lipid Mediators: Current Reviews and Protocols" Springer. PP165-180

(2015).

2. 梅田真郷：レーニンジャーの新生化学6版（翻訳）「脂質」廣川書店、514-554 (2015).
3. 梅田真郷：脂質のダイナミクス、梅田真郷編「生体膜の分子機構ーリピッドワールドが先導する生命科学」化学同人、153-191 (2014).

〔その他〕

ホームページ等

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：1085069

(2) 連携研究者

原 雄二 (HARA, Yuji)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：60362456

長尾 耕治郎 (NAGAO, Kohjiro)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：40587325

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