

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05433

研究課題名（和文）生体膜脂質の恒常性維持機構の解析

研究課題名（英文）Regulation of lipid composition in cell membrane

研究代表者

長尾 耕治郎（Nagao, Kohjiro）

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：40587325

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）：生物にとって重要な生体膜の機能や構造は生体膜の構成成分である脂質から強い影響を受ける。このため、生物は生体膜の脂質組成を積極的に制御していると考えられるが、その分子機構はよくわかっていない。本研究では、生体膜の脂質組成が単純であり、尚且つ遺伝子重複が少ないショウジョウバエを用いて、生体膜脂質の制御機構の解析を行った。まず、脂質組成を改変したモデル細胞を作製するために、脂肪酸に二重結合を導入する 9脂肪酸不飽和化酵素DESAT1の欠損細胞を樹立した。さらに、DESAT1欠損細胞において、不飽和脂肪酸含量の変化にตอบสนองして発現変動する因子を数多く発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は“細胞は生体膜の脂質組成の変化をどのように感知し適応するのか”という疑問を明らかにすることで、生体膜脂質の恒常性維持機構の理解へ貢献する。

研究成果の概要（英文）：The function and structure of cell membranes are strongly influenced by lipids, the main constituents of cell membranes. Therefore, cells are thought to actively regulate their lipid composition, but the molecular mechanisms of this regulation are not well understood. In this study, we analyzed the regulatory mechanisms of cellular lipid composition using *Drosophila*, which has a simple lipid composition and few gene duplications. To generate model cell lines with altered lipid composition, we established cell lines deficient in DESAT1, an enzyme that introduces a cis-double bond into fatty acid moiety. Furthermore, we found a number of genes whose expression is altered in DESAT1-deficient cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：脂肪酸 リン脂質 脂肪酸不飽和化酵素 ショウジョウバエ DESAT1

### 1. 研究開始当初の背景

物質輸送や情報伝達、細胞分裂など生体膜を場とする細胞機能の多くは生体膜の脂質組成の変化の影響を強く受ける。これは生体膜を構成する脂質の組成が脂質二重膜構造からなる生体膜の物理化学的性質を決定すること、さらに細胞機能を執り行うタンパク質の構造や活性、細胞内局在が脂質との相互作用により調節されるためである。このため、細胞機能を維持するために、生体膜の脂質組成は積極的に制御されていると考えられている。例えば、リン脂質を構成する脂肪酸の二重結合の数は生体膜の物性を変化させるため、脂肪酸に二重結合を導入することで不飽和脂肪酸を生成する脂肪酸不飽和化酵素の発現や活性は厳密に制御される必要がある。しかしながら、細胞がどのように生体膜の脂質組成の変化を感知し、その変化に適応しているのかはよくわかっていなかった。

これまで生体膜脂質の研究に主に用いられてきた哺乳動物には複数の脂肪酸不飽和化酵素が存在する。さらに、食餌から多価不飽和脂肪酸など多様な脂質が供給されるため、哺乳動物が生体膜脂質を取り扱う過程は複雑である。一方、ショウジョウバエには脂肪酸不飽和化酵素が 9 脂肪酸不飽和化酵素の 1 つしか存在していない。また、ショウジョウバエには生体膜の物性に影響を与える多価不飽和脂肪酸やステロールがほとんど存在しないため、ショウジョウバエにおける生体膜脂質の制御は比較的シンプルであると想定される。このため、ショウジョウバエは生体膜の脂質組成の変化を感知し、適応する機構の解析に適した生物であると考えられた。

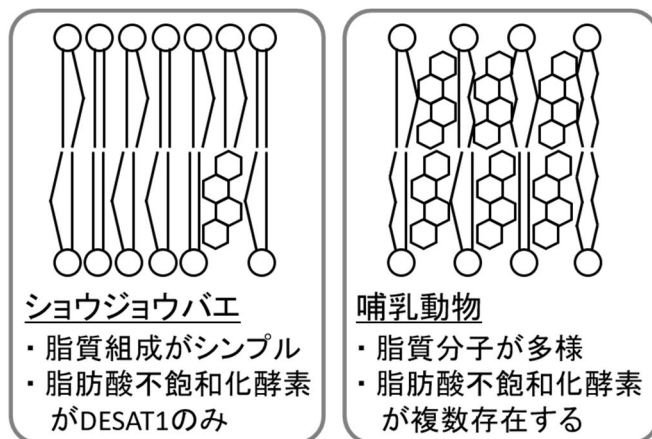


図1. 本研究におけるショウジョウバエの利点

### 2. 研究の目的

本研究では“細胞は生体膜の脂質組成の変化をどのように感知し適応するのか”という疑問を明らかにすることで、生体膜脂質の恒常性維持機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いて、S2 細胞の唯一の脂肪酸不飽和化酵素である DESAT1 をコードする DESAT1 遺伝子を破壊した。一価不飽和脂肪酸に対して、栄養要求性を示すことが予想されたことから、培養培地にオレイン酸を添加して DESAT1 欠損株の樹立を進めた。網羅的な遺伝子発現評価はマイクロアレイ解析により実施した。また、マイクロアレイ解析により見出された遺伝子の発現評価は定量的リアルタイム PCR 法により実施した。

### 4. 研究成果

DESAT1 の細胞機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 法を用いて S2 細胞の DESAT1 遺伝子を破壊した細胞株を樹立した(図 2 a)。他の動物が複数の脂肪酸不飽和化酵素を有することもあり、申請者が樹立した DESAT1 欠損細胞は脂肪酸不飽和化酵素活性を完全に欠損した世界で初めての動物細胞であ

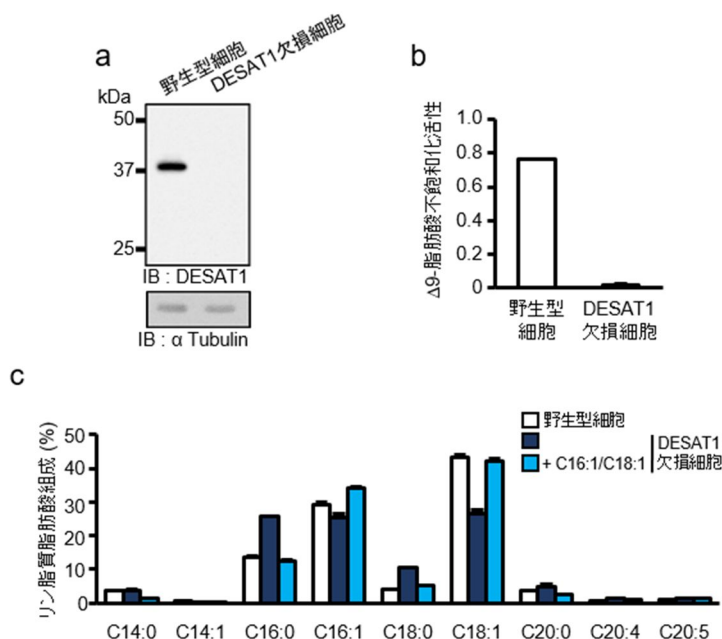


図2. DESAT1欠損細胞の樹立

ると考えられる (図 2 b)。

この DESAT1 欠損細胞では生体膜を構成するリン脂質に含まれる不飽和脂肪酸の含量が顕著に低下していた (図 2 c)。そこで、生体膜脂質の変化を感知し、適応する機構を解明するために、野生型細胞と DESAT1 欠損細胞における遺伝子発現量の変動をマイクロアレイ解析により評価した。その結果、DESAT1 欠損細胞において 5 倍以上に発現上昇する機能未知の遺伝子を 25 個見出した (図 3)。

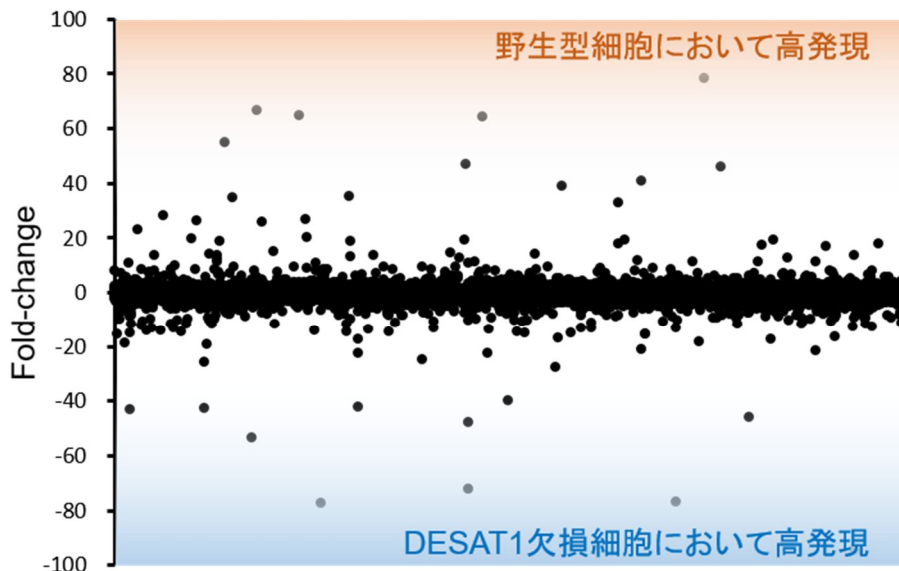


図3. マイクロアレイ解析

定量的リアルタイム PCR 法により、これらの遺伝子の発現量を再評価したところ、マイクロアレイ解析の結果と一致し、DESAT1 欠損細胞での発現上昇が観察された (図 4)。また、DESAT1 の再発現によりその発現上昇が抑制された。DESAT1 の欠損により生体膜の脂質組成が変化していることから、これらの遺伝子は生体膜の脂質組成の変化の感知やその変化への適応に関与することが予想される。

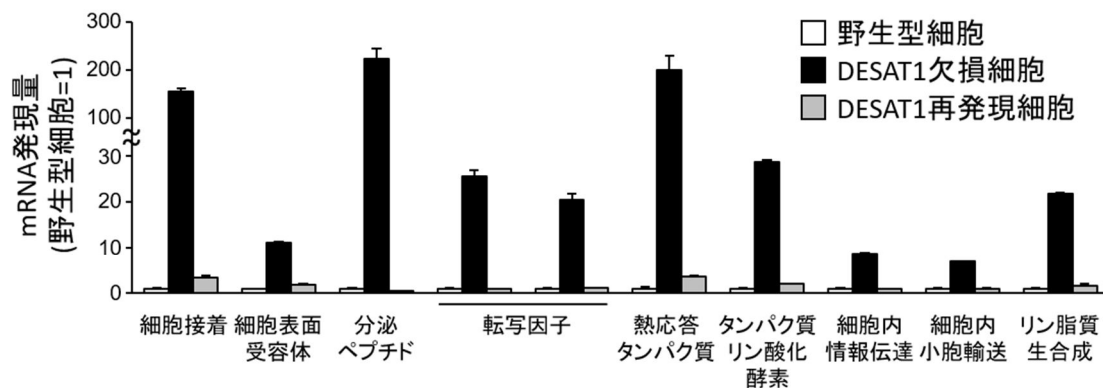


図4. mRNA発現量解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 3件）

1. 著者名 Suito T, Nagao K, Takeuchi K, Juni N, Hara Y, Umeda M	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional expression of 12 fatty acid desaturase modulates thermoregulatory behaviour in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11798
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 Nagao K, Murakami A, Umeda M	4. 巻 67
2. 論文標題 Structure and Function of 9-Fatty Acid Desaturase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 327-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c18-01001	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 Matsuo N, Nagao K, Suito T, Juni N, Kato U, Hara Y, Umeda M	4. 巻 60
2. 論文標題 Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 1199-1211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1194/jlr.M090779	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 Shiomi A, Nagao K, Kasai H, Hara Y, Umeda M	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 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 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

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 長尾 耕治郎, 村上 光, 岡部 弘基, 坂口 怜子, 原田 慶恵, 梅田 眞郷
2. 発表標題 膜脂質代謝を介する細胞内温度の制御機構
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長尾耕治郎, 大平直義, 石井隆太, 葭原啓, 小西翔, 従二直人, 原雄二, 梅田眞郷
2. 発表標題 CPT1に依存しないミトコンドリアへの脂肪酸輸送機構解析
3. 学会等名 第61回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohjiro Nagao, Naoyoshi Ohira, Ryuta Ishii, Keita Yoshihara, Sho Konishi, Naoto Juni, Yuji Hara, Masato Umeda
2. 発表標題 CPT1-Independent Fatty Acid Transport for Mitochondrial $\beta$ -Oxidation in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 60th ICBL (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長尾 耕治郎, 大平 直義, 石井 隆太, 葭原 啓太, 小西 翔, 従二 直人, 梅田真郷
2. 発表標題 ショウジョウバエにおけるミトコンドリアへの新規な脂肪酸輸送機構の発見
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長尾 耕治郎, 村上 光, 塩見 晃史, 梅田 真郷
2. 発表標題 ショウジョウバエ細胞を用いた生体膜の流動性制御機構の解析
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長尾 耕治郎, 梅田 真郷
2. 発表標題 新規なミトコンドリアへの脂肪酸輸送機構の発見
3. 学会等名 第15回トランスポーター研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長尾 耕治郎, 村上 光, 梅田 眞郷
2. 発表標題 脂肪酸不飽和化酵素に依存した細胞内温度の制御機構
3. 学会等名 日本膜学会第43年
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
---------	---------