

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05391

研究課題名(和文) 膜脂質リモデリングを介する細胞自律的な温度適応機構の解明

研究課題名(英文) Cell-autonomous mechanism for control of intracellular temperature

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：温度は生体分子の分子運動、構造、反応性を支配する根源的な物理量であり、細胞内外の温度変化は細胞増殖や物質代謝、情報伝達など幅広い細胞機能に影響を与える。このため、温度変化へと適切に適応することが細胞機能を維持するために重要である。本研究では、ショウジョウバエ培養細胞を用いて、リン脂質の化学構造と熱産生機構との関係について、解析を進めた。その結果、低温曝露時に脂肪酸不飽和化酵素がミトコンドリアにおける不飽和脂肪酸含有リン脂質を増加させることで、クリステ構造の再編を伴うATP合成酵素の多量体形成と酵素活性の制御を介して、ミトコンドリアにおける熱産生を細胞自律的に活性化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物にとって温度はその生存や機能に重要である。このため、生物が自身の温度を制御することはその恒常性を維持するために重要である。このため、本研究において明らかにした細胞自律的な細胞内温度の制御機構は幅広い生命機能や疾患の理解に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Temperature is a fundamental physical quantity that governs the molecular motion, structure, and reactivity of biomolecules, and temperature changes inside and outside the cell affect a wide range of cellular functions, including cell proliferation, metabolism, and signal transduction. For this reason, adapting to temperature changes is important for maintaining cellular functions. In this study, we used *Drosophila* cultured cells to analyze the relationship between the chemical structure of phospholipids and the mechanism of heat production. We found that fatty acid desaturase increases unsaturated fatty acid-containing phospholipids in mitochondria upon exposure to low temperatures, thereby cell-autonomously activating mitochondrial heat production through the formation of ATP synthase oligomers accompanied by the reorganization of cristae structures in mitochondria.

研究分野：Biochemistry

キーワード：Phospholipid

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温度は生体分子の分子運動、構造、反応性を支配する根源的な物理量であり、細胞内外の温度変化は細胞増殖や物質代謝、情報伝達など幅広い細胞機能に影響を与える。このため、温度変化を感知し、その変化へと適応することが細胞機能を維持するために重要である。

生体膜を構成するリン脂質は温度変化の影響を最も強く受ける生体分子の一つである。温度が低下するとリン脂質の分子運動が低下するため、生体膜は密に充填された流動性の低い状態へと変化する。しかし、細胞はリン脂質の脂肪酸鎖における不飽和脂肪酸(二重結合を含む脂肪酸)の割合を増加させることで、生体膜の流動性を高め、低温環境でも生体膜の物性と機能を維持することが出来る。このため、脂肪酸に二重結合を導入する脂肪酸不飽和化酵素は温度適応において重要な酵素であると考えられていた。しかし、脂肪酸不飽和化酵素が細胞内温度の制御において果たす役割については、不明であった。

2. 研究の目的

本研究では DESAT1 に依存した膜脂質のリモデリングが温度適応において果たす役割を明らかにすることにより、細胞が膜脂質のリモデリングを介して細胞自律的に温度変化へと適応する機構の全貌解明を目的とする。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ S2 細胞の細胞内温度を Fluorescent polymeric thermometer または tsGFP1-LP を用いて解析した。リン脂質組成は GC-FID または LC-MSMS により評価した。ミトコンドリア機能は OCR 測定および JC1 により評価した。ミトコンドリア内膜構造は透過型電子顕微鏡観察により評価した。ATP 合成酵素の複合体形成は Blue-native PAGE により評価した。

4. 研究成果

S2 細胞を DESAT1 阻害剤で 16 時間処理すると、リン脂質に含まれる一価不飽和脂肪酸の含量が低下した。そこで、S2 細胞の細胞内温度をポリマー型温度センサー Fluorescent polymeric thermometer を用いて測定したところ、DESAT1 を阻害すると S2 細胞の細胞内温度が約 4℃ 低下することが明らかになった(図 1)。また、CRISPR/Cas9 法により作製した Desat1 欠損細胞の細胞内温度も S2 細胞と比べて低下していた。また、測定原理の異なる温度センサーである tsGFP1-LP によっても、DESAT1 阻害により細胞内温度が低下することが示された。これらの結果から、DESAT1 による一価不飽和脂肪酸の産生が S2 細胞の細胞内温度の維持に必要であることが明らかになった。

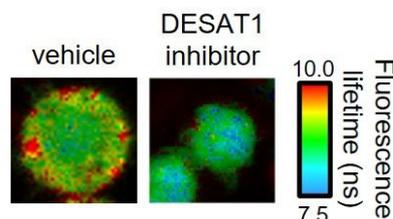


図 1. DESAT1 の阻害が細胞内温度に与える影響

DESAT1 による細胞内温度の制御機構を明らかにするために、細胞内温度制御において中心的な役割を担うミトコンドリアに着目した。そこで、ミトコンドリアの電子伝達経路を阻害した細胞における細胞内温度を計測したところ、電子伝達経路を阻害した細胞においては、DESAT1 を阻害しても細胞内温度が有意に低下しなかった。このことから、DESAT1 はミトコンドリアでの熱産生を制御している可能性が示唆された。そこで、ミトコンドリア温度を tsGFP1-LP を用いて測定すると、DESAT1 の阻害により、ミトコンドリア温度が低下することが示された。また、ミトコンドリア機能の生化学的、細胞生物学的解析により、DESAT1 の阻害は、ATP 産生の最終段階を担う F1Fo-ATPase (ATP 合成酵素) の酵素活性と複合体形成に影響を与えることが示された。さらに、透過型電子顕微鏡観察を用いてミトコンドリアの膜構造を観察したところ、DESAT1 の阻害によりクリステ構造が崩壊したミトコンドリアの割合が顕著に増加することが示された。また、ミトコンドリア内膜のクリステ構造の崩壊により ATP 合成酵素の複合体形成が抑制され、その結果として ATP 合成酵素の活性が低下していることが示された。つまり、DESAT1 による一価不飽和脂肪酸の産生に異常が生じると、クリステ構造の崩壊を通じて熱産生と共役した ATP 合成酵素の活性低下が引き起こされることが明らかになった。

これまでの解析は DESAT1 を阻害した場合の評価であったため、DESAT1 の機能を亢進した場合の評価を行った。アミノ末端に Flag タグを付加することでタンパク質分解への耐性を付与した Flag-DESAT1 を過剰発現させると、リン脂質の脂肪酸鎖における一価不飽和脂肪酸の割合が上昇し、ミトコンドリア内膜のクリステ構造の増強を通じて、ATP 合成酵素の活性が亢進し、さらにミトコンドリアの温度が上昇することが観察された。つまり、DESAT1 による一価不飽和脂肪酸の産生を亢進させると、細胞内温度の上昇に繋がることを示された。

一価不飽和脂肪酸の産生増加は環境温度が低下した際に観察される。そこで、S2 細胞を低温に曝露した際に、DESAT1 による一価不飽和脂肪酸の産生増加を介して、ミトコンドリアでの熱

産生が亢進するのかを検証した。S2 細胞を通常培養温度よりも 10 °C 低い温度へ 4 時間曝すと、リン脂質の脂肪酸鎖における一価不飽和脂肪酸の割合が DESAT1 に依存して増加した。さらに、この低温曝露により、クリステ構造が増強され、ATP 合成酵素の活性・複合体形成が亢進し、さらに熱産生と共役するプロトン濃度勾配の上昇が観察された (図 2)。これらの結果から、環境温度が低下すると、DESAT1 による一価不飽和脂肪酸の産生を増強することにより、ミトコンドリアでの熱産生を活性化する機構が存在することが示された。このため、環境温度低下時に一価不飽和脂肪酸の含量を増加させるといふ細胞応答は、脂質膜の流動性の維持だけでなく、細胞内温度の維持にも関わることが明らかになった。つまり、細胞には細胞自律的な温度変化への適応機構が存在することが明らかになった。

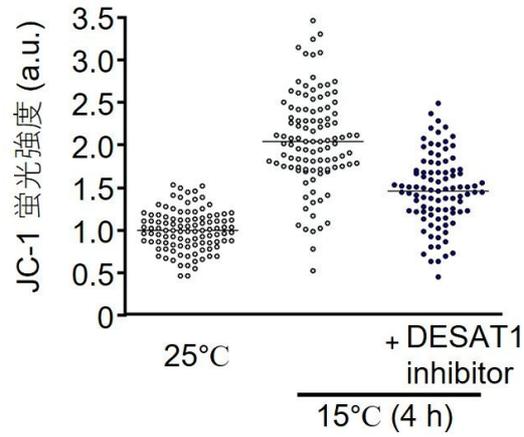


図 2. 低温曝露がミトコンドリア活性に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suito Takuto, Nagao Kohjiro, Juni Naoto, Hara Yuji, Sokabe Takaaki, Atomi Haruyuki, Umeda Masato	4. 巻 86
2. 論文標題 Regulation of thermoregulatory behavior by commensal bacteria in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1060 ~ 1070
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbac087	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 Nagao Kohjiro, Umeda Masato	4. 巻 7
2. 論文標題 Cellular function of (a)symmetric biological membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Topics in Life Sciences	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/ETLS20220029	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 Akira M, 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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾 耕治郎
2. 発表標題 ショウジョウバエ細胞におけるリン脂質の構造と分布の制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾 耕治郎
2. 発表標題 リン脂質分子を介する “しなやかな” 細胞応答
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長尾 耕治郎
2. 発表標題 リン脂質の構造と分布の制御を介した動物細胞における “しなやかさ” の発現機構
3. 学会等名 日本機械学会第36回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 長尾 耕治郎
2. 発表標題 リン脂質のリモデリング解析から迫る細胞機能の理解
3. 学会等名 日本膜学会「第45年会」・「膜シンポジウム2023」合同大会
4. 発表年 2023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
---------	---------