

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15192

研究課題名（和文）脂質を介した物理刺激受容機構の解明

研究課題名（英文）Modulation of somatosensory functions by lipid molecules

研究代表者

水藤 拓人（Suito, Takuto）

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任助教

研究者番号：80847723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではエーテル脂質の物理刺激感覚受容における機能を解析した。ショウジョウバエ個体を用いた行動解析から新たにエーテル脂質合成遺伝子が感覚神経における正常な温度感覚受容及び物理感覚受容に必要であることを見出した。また、ショウジョウバエ培養細胞を用いたイメージング解析および受容体の電気生理学的機能解析からエーテルリン脂質が細胞膜の性状変化などを介して、温度受容体TRPA1および機械刺激受容体PIEZOチャネルの活性化制御を行う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

本研究では、脂質による細胞膜タンパク質の活性化制御のメカニズムとして、新たにエーテル脂質の役割を明らかにした。エーテル脂質は特定の組織に発現し、その機能に近年注目が集まる分子である。イオンチャネルを含む細胞膜タンパク質はさまざまな生理機能を制御することが知られており、エーテル脂質の細胞膜タンパク質の機能制御の役割をさらに探索することによって、生体機能や疾病の新規のメカニズムの解明につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the function of ether lipid in the somatosensation. Through the behavioral analysis using *Drosophila melanogaster*, we identified ether lipid synthesis gene is necessary for intrinsic thermosensation and mechanosensation in sensory neurons. The imaging analysis and electrophysiological recording of somatosensory receptors using cultured cells revealed that ether phospholipid regulates the activation of thermoreceptor TRPA1 channel and mechanoreceptor PIEZO channel through the modulation of cellular membrane properties.

研究分野：脂質生化学

キーワード：温度受容体 機械受容体 ショウジョウバエ 温度選好性 TRPチャネル エーテル脂質

## 5 様 式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感覚機能は外界の情報を取り入れ、危機に対する忌避や環境変化等に応じて生体恒常性の維持のための応答に不可欠な生体機能である。感覚受容の分子実体として、感覚神経の細胞膜上に発現する **Transient receptor potential (TRP)** チャンネルをはじめとする感覚受容体分子が同定されている。近年、細胞膜タンパク質の制御因子としての細胞膜脂質の機能が注目されている。脂質分子は細胞膜の状態変化や、直接的な結合を介して膜タンパク質の機能を制御することが示されており、我々はこれまでにショウジョウバエモデルを用いた行動解析実験から細胞膜脂質での多価不飽和脂肪酸量の増加が、温度感受性ニューロンの活性を変化させること、また個体の体温調節行動を変化させることを示してきた。これらの知見から脂質分子が実際に感覚受容機能を制御することが示されたが、生理的な環境においてどのような脂質代謝遺伝子や脂質分子が個体の感覚受容を制御しているかについては不明な点が多かった。

### 2. 研究の目的

本研究では近年、中枢神経系での機能やがん細胞におけるフェロトーシスの制御についての機能が大きく注目される脂質分子であるエーテルリン脂質に着目し、これまで明らかにされていない物理刺激受容に対する役割を明らかにすることを目的とした。特に本研究ではエーテルリン脂質の感覚受容における生理的な意義を明らかにするため、個体の感覚受容に対する表現系の解析から開始し、さらに培養細胞などを用いた分子生物学的な機能解析からエーテルリン脂質による物理刺激受容体の活性化制御の分子メカニズムを明らかにすることで、脂質を介した物理刺激受容の制御機構の全容を明らかにできると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ショウジョウバエ個体における感覚受容の表現系解析

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 3 齢幼虫における物理刺激に対する表現系解析を行った。野生型として  $w^{1118}$  系統を使用し、AGPS 変異株は CRISPR-Cas9 を用いて作成した。また、GAL4-UAS システムを用いた、感覚受容ニューロン特異的な RNA 干渉法によって、候補遺伝子の発現をノックダウンした、3 齢幼虫個体を用いた解析も実施した。温度選好性解析では、ショウジョウバエ幼虫が活動できる温度域 (8°C-35°C) を含んだ温度勾配を形成させた装置上での行動を撮影する装置を使用した<sup>2)</sup>。本装置では温度勾配上でのショウジョウバエ個体の選好温度を測定することで体温調節行動を解析する。機械刺激応答性については von Frey filament に対する忌避反応を指標に解析を行った。

#### (2) エーテル脂質解析

ショウジョウバエ個体もしくは神経組織、また培養細胞から総脂質を Bligh&Dyer 法もしくは MTBE 法を用いて抽出し、メタノールに再溶解した。エーテルリン脂質を含むホスファチジルエタノールアミン (PE) とホスファチジルコリン (PC) の LC-MS/MS による MRM 解析を実施した。また、プロダクトイオンスキャンによる主要なエーテルリン脂質の脂肪酸解析を実施した。

#### (3) 培養細胞の解析

ショウジョウバエ培養細胞である S2R+細胞を用いて解析を行った。培地中へのアルキルグリセロール (18-AG) の添加、もしくは AGPS の安定発現株に対するアルキルアルコール (18-OH) の添加によって、エーテル脂質を合成する S2R+細胞を作出した。dTRPA1 もしくは dPIEZO をこれらの細胞に発現させ、パッチクランプ法を用いて、活性化物質もしくは高温刺激や機械刺激に対する活性化を観察した。dTRPA1 の活性化温度閾値はアレニウスプロットから算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) ショウジョウバエにおけるエーテル脂質の解析

本研究ではまずショウジョウバエ個体においてもエーテル脂質が機能しているのかを探索するため、ショウジョウバエにおけるエーテル脂質の解析から開始した。エーテル脂質合成遺伝子である Alkylglyceronephosphate synthetase (AGPS) の発現解析から、AGPS は中枢神経および単離した表皮の感覚神経において高い発現が見られた。また、ショウジョウバエにおける主要な細胞膜リン脂質種である, Phosphatidylethanolamine (PE) および Phosphatidylcholine (PC) におけるエーテル脂質の割合を LC-MS を用いて解析したところ、全身での平均的な割合と比較し、中枢神経系においてエーテル PE の割合が高いことを見出した。また、プロダクトイオンスキャンを用いた炭化水素鎖の解析から、ショウジョウバエ中枢神経におけるエーテル PE はエーテル部に鎖長 18 もしくは 20 の不飽和結合を持たない炭化水素鎖が結合した、非プラズマローゲン型のエーテル PE が主に占めることが示唆された。

## (2) AGPS 変異体の物理感覚刺激に対する応答の解析

エーテル脂質の感覚受容に対する役割を明らかにするため、AGPS変異ショウジョウバエ個体を作成し、温度受容応答の行動解析を実施した。温度勾配上での選好温度分布を解析したところ AGPS 変異体では 25 度以上の高温域に分布する個体の割合が増加していた (図 1)。続いて、GAL4-UASsystem を用いてこれまでに明らかにされている温度受容や体温調節行動に影響を与える TRP チャンネル発現ニューロン特異的な AGPS の発現抑制を行ったところ、TRPA1 発現ニューロンでの AGPS 発現抑制のみによっても AGPS 変異体と同様の選好温度分布の変化が観察された (図 1)。これらの結果から、エーテル脂質は TRPA1 チャンネルの活性化に影響を与えているのではないかと考えられた。さらに機械刺激に対する応答を von Frey filament assay を用いて評価し、AGPS 変異ショウジョウバエ個体および機械受容体 PIEZO 発現細胞での AGPS の発現抑制において応答性の低下を観察した。

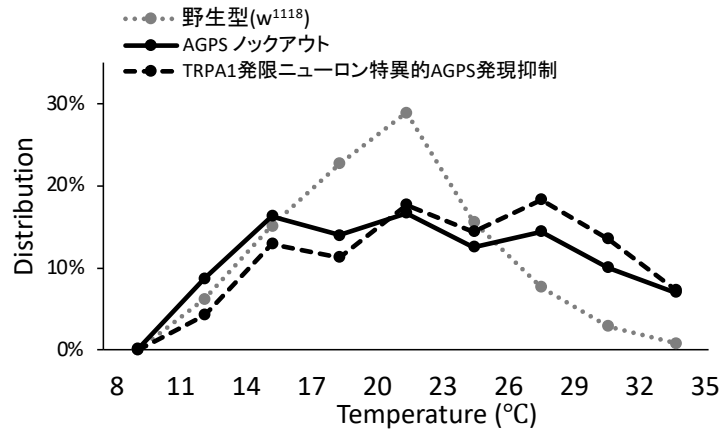


図 1. AGPSの選好温度における役割

野生型のショウジョウバエ 3 齢幼虫個体は 20 度付近をピークとする先王温度分布を示すが、AGPS の全身でのノックアウトおよび TRPA1 発現ニューロンにおける発現抑制によって 26 度以上の高温に分布する個体の割合が増加する。

## (3) 電気生理学手法による物理感覚受容体の活性解析

エーテル脂質の物理感覚受容体の活性化に対する影響を明らかにするため、エーテル脂質の有無を制御したショウジョウバエ培養細胞を作成し、ショウジョウバエの温度受容体 TRPA1 および機械刺激受容体 PIEZO の活性をパッチクランプ法を用いて評価した。TRPA1 の活性制御に関して、エーテル脂質の有無によって活性化物質であるアリルイソチオシアネートや温度刺激に対する活性化強度に変化は見られなかったが、エーテル脂質存在下で TRPA1 の活性化温度閾値が低下することを見出した (図 2)。さらに、PIEZO の機能解析の結果、活性化物質である Yoda1 および機械刺激に対する応答性がエーテル脂質の存在の有無で変化することを観察した。

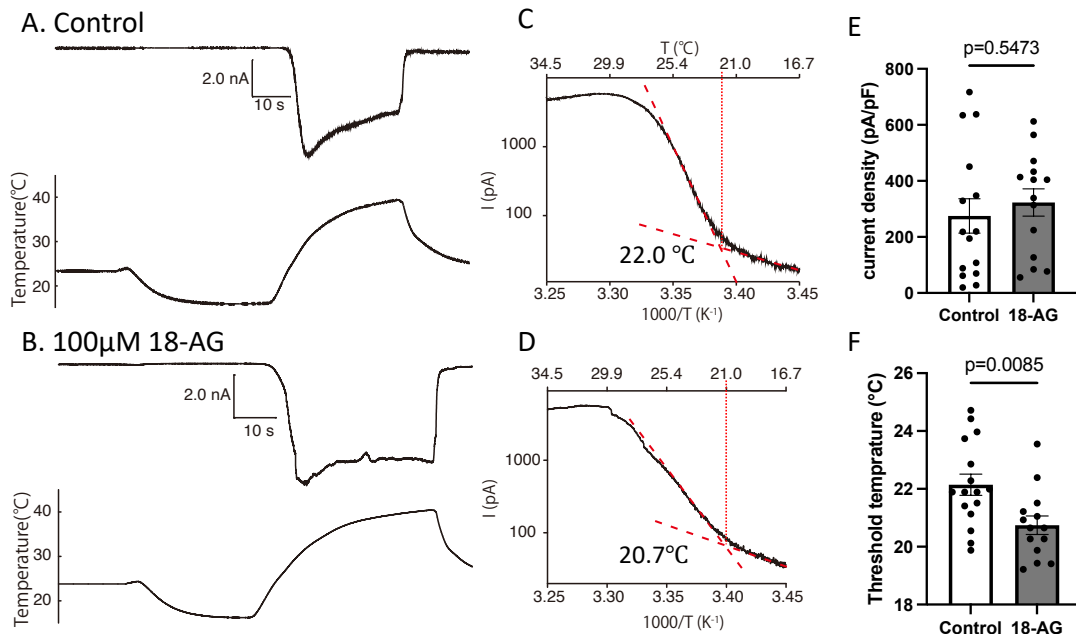


図 2. エーテル脂質の dTRPA1 の活性化温度閾値に対する影響

A, C はコントロール、B, D はエーテル脂質を合成するショウジョウバエ培養細胞における dTRPA1 のパッチクランプ法を用いた活性化温度閾値測定。C, D はアレニウスプロット。エーテル脂質を合成するショウジョウバエ培養細胞において dTRPA1 の活性化の強度 (E) は変化しないが、活性化の温度閾値が低下する (F)。

#### (4) 細胞膜性状変化の解析

エーテル脂質の有無を制御したショウジョウバエ培養細胞の細胞膜の性状変化を解析した。細胞膜張力を原子間力顕微鏡および膜張力イメージングプローブである FlipperTR を用いて測定した。その結果エーテル脂質によって細胞膜張力が低下することを見出した。さらに細胞膜の相状態をイメージングプローブ LipiORDER を用いて測定した結果、エーテル脂質の存在する細胞での相状態の変化を観察した。以上の結果から、エーテル脂質による物理刺激受容体の応答性の変化は細胞膜性状変化によって引き起こされることが示唆された。

#### (5) 総括と今後の展望

以上、本研究ではエーテル脂質合成遺伝子 AGPS が個体の物理感覚受容を制御すること、エーテルリン脂質が TRPA 1 や PIEZO といった物理感覚受容体の活性化を制御すること、そしてエーテルリン脂質が細胞膜の性状を変化させることを明らかにした。これらの結果から脂質による感覚受容体の機能制御の新たなメカニズムとしてエーテルリン脂質の関与を明らかにすることができた。本研究における成果は現在、査読論文への投稿中である<sup>3)</sup>。

また、高等生物においてはビニルエーテル結合を持つプラズマローゲン型のエーテル脂質の機能が着目される一方で、本研究ではプラズマローゲン型ではないリン脂質が細胞膜タンパク質の機能を制御することを示した。エーテル脂質は神経細胞やグリア細胞に広く存在する脂質であることから、これらの細胞膜に発現するさまざまな膜タンパク質の機能も物理感覚受容体と同様に機能制御されている可能性がある。今後も脂質—細胞膜脂質の機能的連関を解析することで、エーテルリン脂質を含む細胞膜脂質の生体機能における普遍的な役割が明らかにされることが期待される。

#### <引用文献>

1. Suito T, Nagao K, Takeichi K, Juni N, Hara Y, and Umeda M, “Functional expression of  $\Delta 12$  fatty acid desaturase modulates thermoregulatory behaviour in *Drosophila*.” *Scientific Reports* 10: 11798 (2020).
2. Suito T, Nagao K, Kai M, Juni N, Sokabe T, and Umeda M, “Measurement of Thermoregulatory Behavior in *Drosophila melanogaster*” *Behavioral Neurogenetics, Neuromethods*, vol 181, 77-91 (2022)
3. Suito T, Nagao K, Deng X, Ganser C, Uchihashi T, Tsutsumi M, Nemoto T, Hara Y, Tominaga M and Sokabe T, “Ether phospholipids modulate somatosensory responses by tuning multiple receptor functions in *Drosophila*” *bioRxiv*; doi:10.1101/2023.09.12.556286 (2023)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suito Takuto, Nagao Kohjiro, Deng Xiangmei, Ganser Christian, Uchihashi Takayuki, Tsutsumi Motosuke, Nemoto Tomomi, Hara Yuji, Tominaga Makoto, Sokabe Takaaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Ether phospholipids modulate somatosensory responses by tuning multiple receptor functions in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.09.12.556286	査読の有無 無
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 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 水藤拓人、長尾耕治郎、梅田真郷	4. 巻 40
2. 論文標題 昆虫の体温調節行動を司る因子	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3085 ~ 3090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18958/7175-00001-0000315-00	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 Suito Takuto, Nagao Kohjiro, Kai Masahiro, Juni Naoto, Sokabe Takaaki, Umeda Masato	4. 巻 181
2. 論文標題 Measurement of Thermoregulatory Behavior in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Behavioral Neurogenetics	6. 最初と最後の頁 77 ~ 91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2321-3_6	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 水藤拓人、曾我部隆彰	4. 巻 57
2. 論文標題 ショウジョウバエの温度選好性を決める温度受容体と制御因子の解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 29-32
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水藤拓人
2. 発表標題 物理感覚受容体の機能を制御する細胞膜脂質の同定
3. 学会等名 学術変革領域研究A【冬眠生物学2.0】第1回 若手領域会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水藤拓人、鄧 香梅、長尾耕治郎、富永真琴、曾我部隆彰
2. 発表標題 エーテル脂質の温度受容体TRPA1の機能調節における役割
3. 学会等名 第18回TRPチャネル研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水藤拓人、長尾耕治郎、富永真琴、曾我部隆彰
2. 発表標題 エーテル脂質は物理感覚受容体の機能を制御する
3. 学会等名 第14回 リピッド合同コンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水藤拓人、長尾耕治郎、富永真琴、曾我部隆彰
2. 発表標題 エーテル脂質の温度感覚受容における役割とその分子機構の解明
3. 学会等名 第65回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水藤拓人、鄧 香梅、長尾耕治郎、富永真琴、曾我部隆彰
2. 発表標題 エーテルリン脂質は温度感受性TRPチャネルの機能を制御する
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水藤拓人、長尾耕治郎、富永真琴、曾我部隆彰
2. 発表標題 エーテル脂質による温度感覚受容の制御機構の解明
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 水藤拓人、鄧 香梅、富永真琴、曾我部隆彰
2. 発表標題 Regulatory role of ether phospholipid in TRP channel function and thermotactic behaviors
3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水藤拓人
2. 発表標題 細胞膜リン脂質による感覚受容体制御機構の解明
3. 学会等名 日本生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 水藤拓人	4. 発行年 2023年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 -
3. 書名 温度刺激による生体応答ダイナミクス 第2章 第4節 温度受容体と多様な因子による行動性体温調節の分子メカニズム	

〔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
---------	---------