

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20636

研究課題名（和文）1細胞における自律的な温度制御が駆動する細胞現象の探索

研究課題名（英文）Biological phenomena that are driven by cell-autonomous control of intracellular temperature

研究代表者

村上 光（Murakami, Akira）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：50963518

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「細胞内局所における温度変動は細胞内シグナル伝達への作用を介して細胞現象を駆動する」との仮説のもと、細胞内の発熱源としてミトコンドリアに着目し、筋芽細胞の分化過程におけるミトコンドリア代謝変動と筋管形成の表現型との関連を調査した。その結果、細胞運命決定やエネルギー代謝の重要な制御因子であるミトコンドリア局在タンパク質MTCH2による筋管形成促進メカニズムを見出した。さらに、その過程では筋芽細胞株におけるミトコンドリア近傍タンパク質のラベル化法や細胞内温度計測法の構築にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究者のこれまでの研究により、1細胞レベルの能動的かつ自律的な温度制御が明らかになっていたが、その明確な意義は不明であった。今回、エネルギー代謝と筋管形成に焦点を絞った解析を展開することにより、筋芽細胞の分化に関連するシグナル伝達経路が細胞内温度変動の作用点である可能性が新たに示された。また、MTCH2依存的な筋管形成メカニズムが個体レベルで実証された暁には、筋疾患や筋機能不全の治療・改善法に新たな知見をもたらすことも期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we hypothesized that local temperature fluctuations at the sub-cellular level could trigger biological phenomena by affecting cell signaling. We focused on mitochondria as intracellular heat sources and investigated the relationship between mitochondrial metabolic activity and myoblast differentiation. Our findings revealed a regulatory mechanism for myotube formation mediated by MTCH2, a mitochondria-localized protein that plays a critical role in cell determination and energy metabolism. Additionally, we also succeeded in establishing a method for proximity labeling of cytosolic proteins near mitochondria and an intracellular temperature measurement technique in myoblast.

研究分野：生物物理学

キーワード：細胞内温度 ミトコンドリア 筋管形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

温度はあらゆる生化学反応を司る物理量の一つであり、動物にとっては自らの生命活動の駆動力である。この10年程度で開発が進んだ1細胞温度計測技術は、生命の最小単位である細胞の温度が細胞小器官の熱産生により変動することを示してきた。また、本研究者はこれまでに個々の細胞が環境温度の変化に応じてミトコンドリア熱産生を活性化させることを見出している (Murakami et al., *Cell Rep.* 2022)。これらの知見は温度と生体機能とが細胞レベルで相互作用することを示唆するものであったが、その実態は殆ど不明であった。

## 2. 研究の目的

「細胞内温度変動は細胞現象を誘導するトリガーとなる」との仮説の実証に向け、細胞小器官周辺の温度変動により機能・局在が制御される分子群の探索手法の構築と実践を達成目標とし、本研究を開始した。

## 3. 研究の方法

本研究における特筆すべき研究方法を以下に記載した。

- ・ 生体における最大の発熱器官である骨格筋では、古くから知られる温度療法が示すように、温度と生体機能との強い関連の存在が想定される。そこで、本研究ではマウス筋芽細胞株 C2C12、ならびにマウス骨格筋より単離した筋幹細胞由来の筋芽細胞を解析モデルとした。これらの細胞は低血清下で培養することにより分化および多核細胞（筋管）の形成を誘導することができる。
- ・ 筋幹細胞の単離は、マウス下肢より採取した筋組織をII型コラゲナーゼで処理後、蛍光活性化セルソーターにより VCAM-1 陽性かつ CD31/CD45/Sca-1 陰性細胞群を分取することにより行った。
- ・ 細胞内温度計測は、温度依存性の蛍光特性を示す合成高分子型温度センサー (FPT) (*Sci. Rep.* 2017) により行った。FPT は5%グルコース水溶液化で自発的に細胞膜を透過し細胞内に導入される。細胞内の FPT の蛍光強度を走査型レーザー共焦点顕微鏡によりレシオメトリックに解析した。
- ・ 細胞小器官周辺に局在するタンパク質分子群のプロファイリングのために、近接依存性ラベル化タンパク質 APEX2 (*Nat. Protoc.* 2016) によるプロテオーム手法を導入した。
- ・ 細胞内の主要な発熱源として知られるミトコンドリア (*PLOS Biol.* 2018, *Elife* 2023 等) の呼吸能は、細胞外フラックスアナライザーにて測定される酸素消費速度 (OCR; Oxygen Consumption Rate) により評価した。

## 4. 研究成果

### 1) 筋芽細胞における局所温度依存的なタンパク質局在プロファイリング手法の構築

熱産生による温度変動が報告されているミトコンドリア・小胞体に対して APEX2 を遺伝学的に導入する方法を、C2C12 細胞において検討した。今回、ミトコンドリア外膜上にてラベル化活性部位が細胞質側に向くように APEX2 を発現するコンストラクト (APEX2-OMM)、ならびに小胞体膜上に細胞質に対する同様の配向性にて APEX2 を発現するコンストラクト (ERM-APEX2) をそれぞれ用いた。当初、これらコンストラクトを汎用的なりポフェクション法により導入する

方針にて進めていたものの、導入量・効率ともに著しく低いことが課題となった。そこで、レトロウイルスを用いた発現系に切り替え、新たに条件検討を行ったところ、蛍光免疫染色・免疫プロットから示された高い発現効率のみならず、低細胞毒性も実現した良好な発現系に辿り着いた。続いて、C2C12 細胞に発現した APEX2 のラベル化

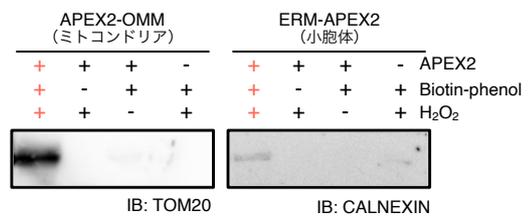


図1. APEX2は細胞小器官選択的にタンパク質をラベル化できる

の効率・局在選択性を検討し、最終的に内在性のミトコンドリア外膜局在タンパク質である TOM20 は APEX2-OMM に、同じく内在的に小胞体膜に発現するタンパク質である CALNEXIN は ERM-APEX2 にそれぞれ選択的にラベル化される条件の設定に成功した (図 1)。

以上、本研究の目標の一つである、タンパク質局在プロファイリング手法の構築を達成した。今後、本手法を駆使することで、ミトコンドリア・小胞体における熱産生活性の変化前後でラベル化度が変化する分子を探索・同定する。

## 2) ミトコンドリア局在タンパク質 MTCH2 による筋芽細胞分化促進機構の解明

他方で、ミトコンドリアにおける熱産生活性の変化が想定される筋芽細胞の分化に関する分子メカニズムの解析も進めた。筋芽細胞は、筋線維上に存在する組織幹細胞である筋幹細胞から派生した細胞であり、筋芽細胞の分化・融合による筋管形成は筋線維損傷時の修復に必須である。今回、細胞死やエネルギー代謝の機構における重要性が報告されているミトコンドリア局在タンパク質である MTCH2 (*Nat. Cell Biol.* 2010) に着目し、筋管形成機構における MTCH2 の関与を検証した。まず、C2C12 細胞の分化過程において *Mtch2* mRNA 発現量の有意な上昇を見出した。そこで、RNA 干渉法を用いて *Mtch2* の発現抑制を行ったところ、C2C12 細胞の分化・融合が顕著に抑制された。この際、筋芽細胞分化のマーカーとなる *Myog* や *Myh4* 等の mRNA 発現量に顕著な低下が認められた。これらの現象とミトコンドリア機能との関連を評価するために、ミトコンドリア形態や呼吸能を解析した。その結果、MTCH2 はミトコンドリアの融合・伸長、および酸化的リン酸化の活性の維持に寄与することが明らかとなった。ここまで C2C12 細胞で見られた MTCH2 依存的な筋分化、さらにミトコンドリア形態・機能制御は、マウス骨格筋より単離した筋幹細胞由来の筋芽細胞でも確認された。これらの結果から、MTCH2 は筋芽細胞の適切な分化・筋管形成における重要因子であることが示唆された (図 2)。現在、以上 4-2) の内容に関して論文投稿の準備を進めている。

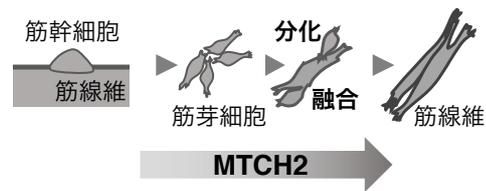


図2. MTCH2は筋芽細胞の分化・融合に寄与する

今後は、上記の筋管形成メカニズムにおけるミトコンドリア熱産生能の変化について、構築した細胞内温度計測法を用いて実証するとともに、温度依存的な細胞内シグナル伝達、およびこれに関与する分子群の存在を 4-1) の手法により明らかにする。

以上を含む研究成果は、下記のように学会・シンポジウムにて発表した。

- ・ 佐藤祐一, 平野航太郎, 村上 光, 原 雄二, 骨格筋再生におけるミトコンドリア局在タンパク質 MTCH2 の役割, 第 8 回日本筋学会学術集会 (東京大学本郷キャンパス), 2022 年 8 月 5 日

- 村上 光, 佐藤 佑, 岡部弘基, 船津高志, 哺乳動物細胞におけるコレステロール依存的な熱吸収機構, 第 60 回日本生物物理学会年会 (函館アリーナ), 2022 年 9 月 30 日
- 村上 光, 長尾耕治郎, 岡部弘基, 原田慶恵, 梅田眞郷, 膜脂質を介する細胞自律的な細胞内温度制御, 第 45 回日本分子生物学会年会 (幕張メッセ、招待講演), 2022 年 11 月 30 日
- 村上 光, 森島安美, 原 雄二, 筋芽細胞分化における脂肪酸不飽和化酵素の役割, 第 9 回骨格筋生物学研究会 (東海大学湘南キャンパス), 2023 年 3 月 3 日
- 村上 光, 佐野淳哉, 平野航太郎, 岡部弘基, 原 雄二, 骨格筋幹細胞の分裂に寄与する細胞膜物性の解析, 第 65 回日本脂質生化学会 (KKR ホテル熊本), 2023 年 6 月 9 日
- 森島安美, 村上 光, 佐藤友紀, 三浦進司, 原 雄二: 筋管形成機構における $\Delta 9$  脂肪酸不飽和化酵素の役割, 第 65 回日本脂質生化学会 (KKR ホテル熊本), 2023 年 6 月 9 日
- 村上 光, 1 細胞の温度を司る細胞熱特性とその意義の解明, 第 5 回冬眠休眠研究会 (北海道大学低温科学研究所、招待講演), 2023 年 10 月 10 日
- 村上 光, 鈴木陽也, 佐藤 佑, 岡部弘基, 船津高志, 1 細胞内における膜脂質依存的な熱散逸抑制機構の発見, 第 96 回日本生化学会大会 (福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 B 館), 2023 年 10 月 31 日
- 佐野淳哉, 村上 光, 平野航太郎, 原 雄二, 骨格筋幹細胞の分裂期における膜脂質分子動態の解析, 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2023 (名城大学薬学部 (八事キャンパス)), 2023 年 11 月 12 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 村上 光	4. 巻 95
2. 論文標題 リン脂質の不飽和化を介した細胞自律的な細胞内温度制御機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 234 ~ 237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950234	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 村上 光、長尾 耕治郎、梅田 眞郷	4. 巻 81
2. 論文標題 膜脂質を介する低温適応の新規メカニズムの発見：細胞自律的な細胞内温度制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 27 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943/lowtemsci.81.27	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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上 光、佐藤 佑、岡部弘基、船津高志
2. 発表標題 哺乳動物細胞におけるコレステロール依存的な熱吸収機構
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上 光、長尾耕治郎、岡部弘基、原田慶恵、梅田眞郷
2. 発表標題 膜脂質を介する細胞自律的な細胞内温度制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上 光、森島安美、原 雄二
2. 発表標題 筋芽細胞分化における脂肪酸不飽和化酵素の役割
3. 学会等名 第9回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上 光、佐野淳哉、平野航太郎、岡部弘基、原 雄二
2. 発表標題 骨格筋幹細胞の分裂に寄与する細胞膜物性の解析
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 村上 光
2. 発表標題 1細胞の温度を司る細胞熱特性とその意義の解明
3. 学会等名 第5回冬眠休眠研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上 光、鈴木陽也、佐藤 佑、岡部弘基、船津高志
2. 発表標題 1細胞内における膜脂質依存的な熱散逸抑制機構の発見
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
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
---------	---------