HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	村上, 光; 長尾, 耕治郎; 梅田, 眞郷
Citation	低温科学, 81, 27-36
Issue Date	2023-03-20
DOI	10.14943/lowtemsci.81.27
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89121
Type	bulletin (article)
Note	第一章：変温動物
File Information	04_p027-036_LT81.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 27-36
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 27

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

村上　光[1)]，長尾　耕治郎[2)]，梅田　眞郷[3, 4)]

2022 年 12 月 15 日受付，2023 年 1 月 10 日受理

温度は，生物にとって最も身近な環境因子の一つであり，生命活動に強く影響する．そのため，動物は自らの体温を調節する様々な手段を獲得することにより，環境に適応してきた．しかしながら，生命の最小単位である個々の細胞における温度制御の実態は長らく不明であった．我々は近年開発された細胞内温度計測技術を駆使し，ショウジョウバエ培養細胞内の温度がミトコンドリア熱産生により維持されていること，この現象に生体膜の流動性の制御に必須である Δ9 脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 が寄与することを見出した．今回の発見から，我々は「生体膜を介する細胞自律的な細胞内温度制御」という生命における温度制御の新規メカニズムを提唱した．

A novel membrane-mediated mechanism for cold adaptation through the cell-autonomous control of intracellular temperature

Akira Murakami[1], Kohjiro Nagao[2], Masato Umeda[3, 4]

Intracellular temperature can affect a wide range of cellular functions; however, it remains unclear whether or not the temperature of individual cells is controlled in response to fluctuations of the environmental temperature. Using two mechanistically independent intracellular thermometers, we found that the intracellular temperature of *Drosophila* cells is maintained by mitochondrial thermogenesis. Moreover, we determined that Δ9-fatty acid desaturase DESAT1, which is essential for regulating membrane fluidity in cold environments via biosynthesis of unsaturated fatty acids, plays a critical role in mitochondrial thermogenesis. Our findings shed light on a novel cell-autonomous mechanism for intracellular temperature control during environmental temperature changes.

キーワード：細胞内温度，リン脂質，Δ9 脂肪酸不飽和化酵素，ミトコンドリア熱産生
Intracellular temperature, Phospholipid, Δ9-fatty acid desaturase, Mitochondrial thermogenesis

1．はじめに

温度は，生化学反応や生体分子の動態を支配する物理化学的因子である．近年開発された細胞内温度計測技術は，定常状態の細胞内の温度が細胞外の温度とは異なっていることを実験的に示してきた（Zhou et al., 2020）．

連絡先
村上　光
静岡県立大学薬学部　統合生理学分野
〒422-8526　静岡県静岡市駿河区谷田 52-1
Tel. 054-264-5731
e-mail：murakami_a@u-shizuoka-ken.ac.jp
1）静岡県立大学薬学部
School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan
2）京都薬科大学　薬品物理化学分野
Department of Biophysical Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University, 5 Misasaginakauchi-cho, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan
3）ホロバイオ株式会社
HOLO BIO Co., Ltd, Katsura Innovation Park 1-36, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8245, Japan
4）同志社大学　メカノバイオロジー研究センター
Research Institute for Mechanobiology, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe-shi, Kyoto 610-0394, Japan

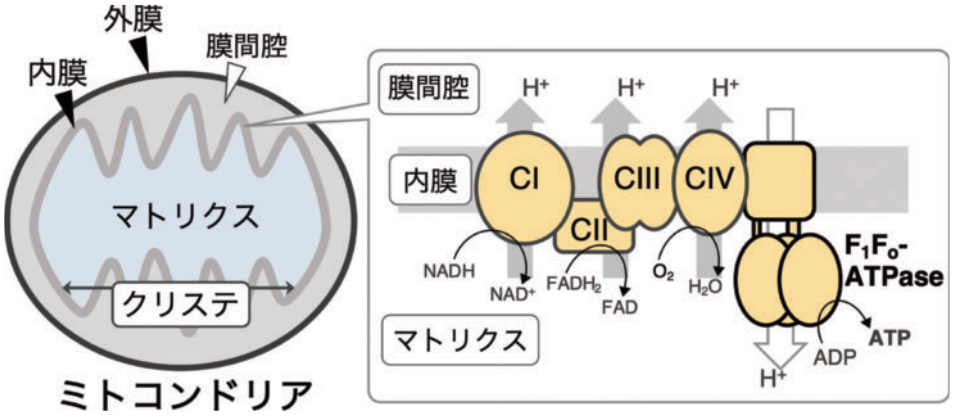

図 1：ミトコンドリアの構造と呼吸鎖複合体による ATP 産生．CI, NADH デヒドロゲナーゼ；CII，コハク酸デヒドロゲナーゼ；CIII，ユビキノール-シトクロム c レダクターゼ；CIV，シトクロム c オキシダーゼ．

さらに，細胞内の温度がエネルギー代謝や細胞内 Ca^{2+} 動態といった細胞内小器官の機能と連動して変動していること，細胞内のみならず細胞内小器官内のレベルで不均一な温度分布が存在していることも明らかになってきた（Kiyonaka et al., 2013; Okabe et al., 2012）．これらの発見は，単一細胞内の温度がこれまで考えられてきたよりも緻密に時空間的に制御されている可能性を強く示唆していた．また，仮に 1 細胞レベルの温度が生命現象に強く寄与しているとすると，環境温度の変化に対する細胞内温度の制御は変温動物の生命機能のみならず恒温動物においても末梢組織の機能の恒常性維持において必須であることが想定される．しかしながら，個々の動物細胞が環境温度の変化に応じて細胞内温度を自律的に制御するのかはよくわかっていなかった．

細胞内温度に影響を与える主要な細胞内小器官として，ミトコンドリアが挙げられる．ミトコンドリアは，エネルギー産生，Ca^{2+} 恒常性の維持，シグナル伝達といった，幅広い生物学的プロセスに不可欠な役割を担っており，中でもミトコンドリア呼吸（酸化的リン酸化）を介するアデノシン 3 リン酸（ATP）の産生は生命活動に極めて重要である（Detmer and Chan, 2007）．ミトコンドリアは内膜と外膜の 2 つの脂質膜からなっており，内膜はクリステと呼ばれる特徴的な折り畳み構造を有している（Formosa and Ryan, 2018）．このミトコンドリア内膜では，ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I–IV によるマトリクスから膜間腔へのプロトン輸送を介して膜を隔てたプロトン勾配が形成され，この電気化学的ポテンシャル差を駆動力として F_1F_o-ATPase がアデノシン 2 リン酸（ADP）を ATP に変換している（図 1）．一方で，プロトン勾配の形成プロセスが ATP 合成から脱共役した場合には熱が産生され得ることから，ミトコンドリアは動物個体における低温適応にも重要な役割を果たすと考えられてきた（Cannon and Nedergaard, 2004）．実際，寒冷刺激時には脱共役タンパク質を介したプロトン漏出の促進により，熱産生が亢進されることが知られている（Fedorenko et al., 2012）．また，最近では ATP 合成と共役したミトコンドリア呼吸の活性も熱産生に寄与していることが明らかになりつつある（Rahbani et al., 2021; Sun et al., 2021）．このような背景から，細胞内温度計測に関する先行研究としてミトコンドリアの熱産生能に着目したものが多数存在し，例えば哺乳動物細胞内においてミトコンドリアの温度は 50℃ 程度と見積もられている（Chretien et al., 2018）．このような個々の細胞におけるミトコンドリア熱産生の調節メカニズムを理解することが，細胞内温度の制御を解明する上で重要であると考えられる．

ミトコンドリア呼吸鎖複合体を介したミトコンドリア機能の制御因子として，ミトコンドリアの膜脂質が知られている（Ikon and Ryan, 2017）．膜脂質の主成分であるリン脂質は，グリセロール骨格にリン酸ジエステルを介して結合した親水性頭部，及びエステル結合した疎水性アシル鎖（脂肪酸）から成る構造を有しており（図 2A），ミトコンドリアリン脂質はアシル鎖に不飽和脂肪酸を豊富に含むことが知られてきた（Hoch, 1992）．リン脂質アシル鎖における不飽和脂肪酸の含量は，様々な細胞機能に重要であるタンパク質–脂質相互作用，及び流動性や張力といった生体膜の物理化学的特性を規定する因子である（Holthuis and Menon, 2014）．一方で，膜の物理化学的性質は環境温度にも強く影響を受けることから，リン脂質における不飽和脂肪酸含量の調節は環境の温度変化に対する細胞機能の恒常性維持（温度適応）に寄与することも想定されてきた（Los and Murata,

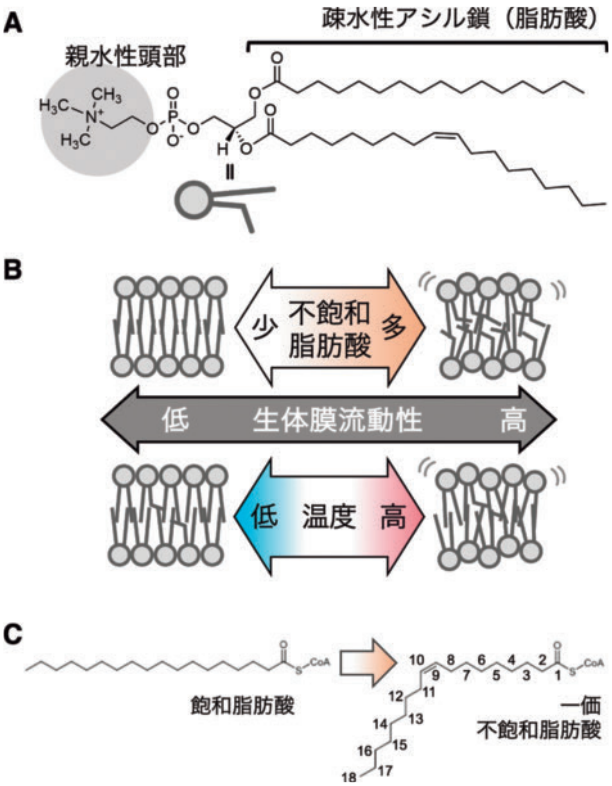

図 2：生体膜脂質における低温応答．A，生体膜の主要構成因子であるリン脂質の構造（**図はホスファチジルコリン（PC34：1）**）．B，生体膜の流動性を変化させる要因，C，Δ9 脂肪酸不飽和化酵素が触媒する化学反応．

2004）（図 2B）．特に，膜流動性が低下する低温環境では膜リン脂質中の不飽和脂肪酸含量が増加すること，この現象に，アシル CoA のΔ9 位に *cis*-二重結合を導入するΔ9 脂肪酸不飽和化酵素が関与することがよく知られている（Nakagawa et al., 2002; Tiku et al., 1996）（図 2C）．

我々は，これまでショウジョウバエ培養細胞 S2 を用いてΔ9 脂肪酸不飽和化酵素，並びに不飽和脂肪酸を含有した膜リン脂質と細胞機能との関連に関して研究を進めてきた（Nagao et al., 2019）．S2 細胞では，生体膜脂質の研究に従来用いられてきた哺乳動物細胞とは異なり，コレステロールや多価不飽和脂肪酸といった生体膜の物理化学的性質に強く影響を与える脂質分子の含量が低く，さらにΔ9 脂肪酸不飽和化酵素として唯一 DESAT1 しか発現していない．そのため，S2 細胞は膜リン脂質における脂肪酸組成の操作，並びにその細胞機能へのアウトプットを解釈し易いモデル細胞であると言える．本稿では，我々の最近の研究により明らかとなった，生体膜脂質と細胞内温度との関連について紹介する（Murakami et al., 2022）．

2．Δ9 脂肪酸不飽和化酵素はミトコンドリア熱産生を介して細胞内温度の維持に関与する

我々は研究にあたり Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9 システムを用いて，*Desat1* 遺伝子欠損 S2 細胞を樹立した．同細胞はΔ9 脂肪酸不飽和化酵素活性を欠失しており，パルミトレイン酸（C16：1）やオレイン酸（C18：1）といった不飽和脂肪酸に対する栄養要求性を示したため，血清由来の脂肪酸に加え過剰量の不飽和脂肪酸（50 μM C16：1 及び 50 μM C18：1）が添加された培養培地にて維持する必要があった．通常培地にて *Desat1* 遺伝子欠損 S2 細胞を 16 時間培養すると，リン脂質のアシル鎖において DESAT1 の産物である C16：1 及び C18：1 を中心とした不飽和脂肪酸の割合が減少し，飽和脂肪酸の割合は増加した．この脂肪酸組成の変化は C16：1 及び C18：1 を添加した培地で培養した際には完全に抑制された．

S2 細胞の細胞内温度を計測するために，合成高分子型の分子温度計である Fluorescent Polymeric Thermometer（FPT）を用いた（図 3A）（Hayashi et al., 2015; Okabe *et al.*, 2012）．今回用いた FPT は細胞膜透過性を有しており，5％グルコース水溶液に溶解すると S2 細胞内に 10 分以内で取り込まれた．まず，S2 細胞内の FPT の蛍光寿命が培養培地の温度上昇に伴い延長することが確認された（20℃–30℃）．そこで，通常の培養条件である 25℃の培養培地下において，*Desat1* 遺伝子欠損細胞内の FPT の蛍光寿命を測定したところ，野生株の値と比較して有意に短いことを見出した．また，この FPT 蛍光寿命値の低下は培養培地への不飽和脂肪酸（50 μM C16：1 及び 50 μM C18：1）の添加，もしくは DESAT1 の強制発現により回復したことから，*Desat1* 遺伝子の欠損が細胞内温度の低下を引き起こすことが示された．続いて，DESAT1 の薬理的阻害（SCD1 阻害剤 “37c”，以下 DESAT1 阻害剤と呼称）（Uto et al., 2009）が S2 細胞の細胞内温度に与える影響を解析した．S2 細胞を DESAT1 阻害剤で 16 時間処理するとリン脂質のアシル鎖における不飽和脂肪酸の含量が約 25％減少し（Murakami et al., 2017），*Desat1* 遺伝子欠損の表現型と類似して生育が著しく抑制された．この DESAT1 阻害剤の処理により，S2 細胞内の FPT の蛍光寿命は有意に短縮した．この際の FPT の蛍光寿命値の変化から，DESAT1 の阻害による細胞内の温度変化は 4℃程度と見積もられた．また，この DESAT1 阻害剤による細胞内温度の低下は不飽和脂肪酸（C16：1 もしくは C18：1）の培養培地への添加によって回復した一方で，飽和脂肪

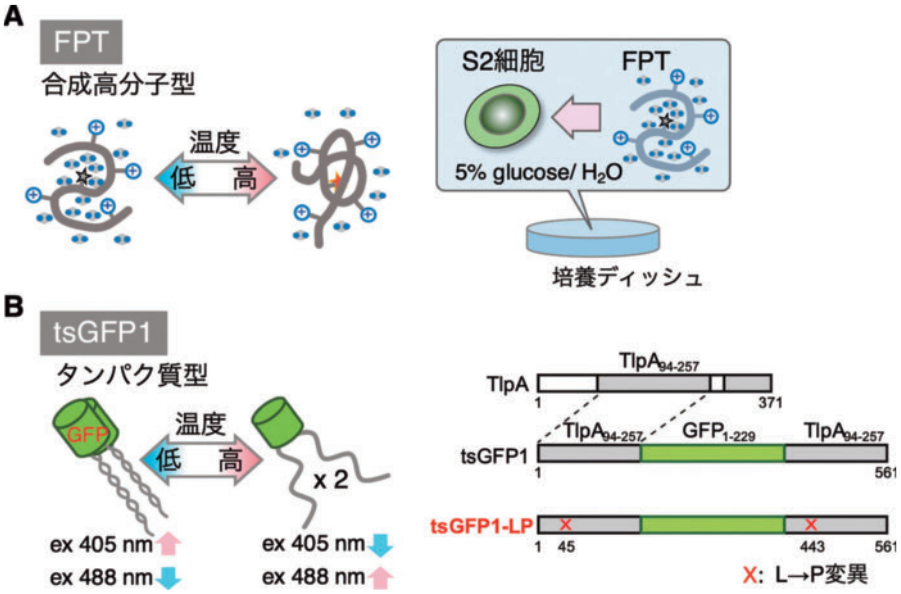

図 3：本稿で示した細胞内温度計．A，蛍光性ポリマー温度センサー FPT．B，蛍光性タンパク質温度センサー tsGFP1.

酸（C16：0）の添加では同様の効果は得られず，DESAT1 阻害剤の高い特異性が強く示唆された．これらの結果から，定常状態の S2 細胞の細胞内温度が DESAT1 の欠失，もしくは阻害により低下することが明らかとなった．

また，緑色蛍光タンパク質（GFP）をベースとした分子温度計である tsGFP を用いた細胞内温度計測も行った（Kiyonaka *et al.*, 2013）．tsGFP は GFP と *Salmonella* 由来 TlpA の Coiled-Coil 領域を遺伝子工学的に融合して作製されたものであり，温度依存的な TlpA の構造変化（ダイマー形成）に伴い GFP の蛍光スペクトル特性が変化するよう設計されている．哺乳動物における温度計測のために開発された tsGFP1 の温度応答領域は 37℃付近であり，至適培養温度が 25℃であるショウジョウバエ細胞の細胞内温度の測定には適さなかった．そこで，より低温域に応答するように TlpA 領域に Coiled-Coil 構造を不安定化させるプロリン変異（L137P）が導入された変異体（tsGFP1-LP）を用いた（図 3B）．tsGFP1-LP を S2 細胞に発現させると，tsGFP1-LP は培養培地の温度変化に対する応答性を示し（20℃–30℃），温度上昇に伴い蛍光強度のレシオ値（ex405 nm/ex488 nm）が低下した．この tsGFP1-LP の蛍光強度レシオ値は DESAT1 阻害剤の処理により上昇したことから，FPT による実験結果，即ち DESAT1 の阻害による細胞内温度の低下が裏付けられた．また，細胞内熱産生に強く寄与すると報告されているミトコンドリア呼吸に着目し，ミトコンドリア呼吸の薬理的阻害が細胞内温度に与える影響を解析したところ，ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害剤であるロテノンにより S2 細胞内の tsGFP1-LP の蛍光強度レシオ値が上昇すること，つまり細胞内温度が低下することを見出した．このことから，S2 細胞内の温度制御にミトコンドリア呼吸活性が強く寄与していることが示された．さらに，ロテノンで処理した際の tsGFP1-LP の蛍光強度レシオ値に関して，DESAT1 の阻害の有無で有意な差は見られなかったため，DESAT1 はミトコンドリア呼吸鎖の活性に依存して細胞内温度に影響を与えていることも示唆された．

遺伝子工学ベースのセンサーを用いる長所として，標的化配列を付与することによりセンサータンパク質を容易かつ特異的に細胞内小器官に局在化できることが挙げられる．そこで，COXVIII 由来のミトコンドリア標的化配列を融合した tsGFP1-LP-mito を用いた．共焦点顕微鏡による観察により，tsGFP1-LP-mito とミトコンドリアマーカーである Mito Tracker Deep Red が共局在することが確認された．また，tsGFP1-LP と同様に tsGFP1-LP-mito の蛍光強度のレシオ値（ex405 nm/ex488 nm）は培養培地の温度変化（20℃–30℃）に応答した．そこで，S2 細胞におけるミトコンドリア熱産生とミトコンドリア呼吸活性との連関を検証した．まず，ロテノンにより tsGFP1-LP-mito 蛍光強度レシオ値が上昇することが示され，ミトコンドリアの温度がミトコンドリア呼吸により維持されていることが示された．また，DESAT1 阻害剤により tsGFP1-LP-mito の蛍光強度レシオ値は上昇し，これは培養培地への C18：1 の添加によ

り抑制されたことから，不飽和脂肪酸の生合成がS2細胞のミトコンドリアの温度を上昇させていることがわかった．以上，細胞内温度計測により，DESAT1を介する不飽和脂肪酸の産生が，ミトコンドリア呼吸を介した細胞内温度維持のメカニズムに関与していることが明らかとなった．

3．Δ9脂肪酸不飽和化酵素はミトコンドリア膜脂質の制御によりミトコンドリア熱産生を制御する

ここまでの結果から，ミトコンドリアにおける呼吸と熱産生との関連に焦点を絞り，これらに対するDESAT1の寄与を評価した．ミトコンドリア呼吸の活性の指標であるミトコンドリア膜電位，及び酸素消費速度を解析したところ，DESAT1がATP合成と共役したミトコンドリア呼吸に寄与すること，これによりS2細胞内のミトコンドリア膜電位，並びに細胞内温度が維持されていることが示された．さらに，タンパク質複合体を解析できるBlue native-polyacrylamide gel electrophoresis（BN-PAGE）により，DESAT1を阻害した細胞群においてミトコンドリアのATP合成を司るF_1F_o-ATPaseの複合体が崩壊することを見出した．また，この際にミトコンドリア画分におけるF_1F_o-ATPase活性が低下していることも明らかとなった．

F_1F_o-ATPaseの構造や機能は，ミトコンドリア膜構造と強く連関することが報告されている（Rabl et al., 2009）．そこで，透過型電子顕微鏡によりS2細胞内の微細構造を観察した．先行研究における観察結果と同様に（Abdelwahid et al., 2007），S2細胞において多くのミトコンドリアは秩序だったクリステ構造を有する伸長した形態（“クリステ含有ミトコンドリア”と呼称）を呈していた．一方で，乱れたクリステ構造や丸く膨潤した形態を有するミトコンドリアも見受けられた．このようなミトコンドリアの構造とDESAT1との関連を調査したところ，DESAT1阻害剤により処理した細胞群や*Desat1*遺伝子を欠損した細胞群ではクリステ含有ミトコンドリアの割合が低下することを見出した．これらの結果から，DESAT1はミトコンドリア内膜のクリステ構造の制御を介してF_1F_o-ATPaseを制御することが想定された．ミトコンドリア内膜の制御因子として膜融合に関与するOPA1が知られており，OPA1の過剰発現はミトコンドリアクリステ構造を強固にすることが報告されている（Civiletto et al., 2015; Varanita et al., 2015）．このOPA1を過剰発現したS2細胞では，DESAT1阻害剤の処理によるクリステ含有ミトコンドリアの低下が抑制された．さらに，DESAT1阻害剤により引き起こされるミトコンドリア呼吸活性の低下やF_1F_o-ATPase複合体の崩壊，さらには細胞内温度の低下も抑制されていた．一方で，OPA1の発現レベルはDESAT1の阻害による影響は見られなかったため，DESAT1を阻害した細胞群におけるクリステ形成の不全はOPA1の発現低下により生じたわけではないこともわかった．これらの結果から，DESAT1はミトコンドリア内膜のクリステ構造の制御を介してF_1F_o-ATPaseを制御することにより，定常状態のS2細胞の細胞内温度を制御することが示された（図4A）．

DESAT1は，一価不飽和脂肪酸を産生するΔ9脂肪酸不飽和化酵素であることから，DESAT1によるミトコンドリア膜脂質の制御を調査した．まず，C末端にHAタグが付加されたDESAT1（DESAT1-HA）の細胞内局在を解析したところ，哺乳動物や酵母のΔ9脂肪酸不飽和化酵素に関する先行研究の結果と一致して（Kato et al., 2006; Tatzer et al., 2002），小胞体（ER）マーカー（Bip-GFP-KDEL）との共局在が観察された．一方で，DESAT1-HAは，ミトコンドリアマーカー（Mito-EGFP）にも極めて近接しているようにも見られた．これを裏付けるように，生化学的に細胞内小器官を分画すると，DESAT1はER画分というよりも粗ミトコンドリア画分に検出されることが判明した．続いて，この粗ミトコンドリア画分の脂質分子組成を三連四重極型質量分析装置により解析したところ，16時間のDESAT1阻害剤の処理では，不飽和脂肪酸を含有したホスファチジルコリン（PC）やホスファチジルエタノールアミン（PE）分子種の含量が顕著に変化していることがわかった．特に，PC（32：2），PC（34：2），PC（36：2）のような2つの一価不飽和脂肪酸を含有したPC分子種の量はDESAT1阻害によりそれぞれ90%，90%，86%減少した．また，PE（32：2），PE（34：2），PE（36：2）のような2つの一価不飽和脂肪酸を含有したPE分子種の量もDESAT1阻害剤により52%，46%，44%それぞれ減少した．ミトコンドリアに特有のリン脂質分子種であるカルジオリピン（CL）については，S2細胞における主要なCL分子種の一つであるCL（64：4）がDESAT1の阻害により有意に減少していた．

4．低温環境ではΔ9脂肪酸不飽和化酵素依存的にミトコンドリア呼吸が活性化する

DESAT1による細胞内温度制御の生物学的意義を検証する上で，環境温度の変化との生体膜脂質の制御との

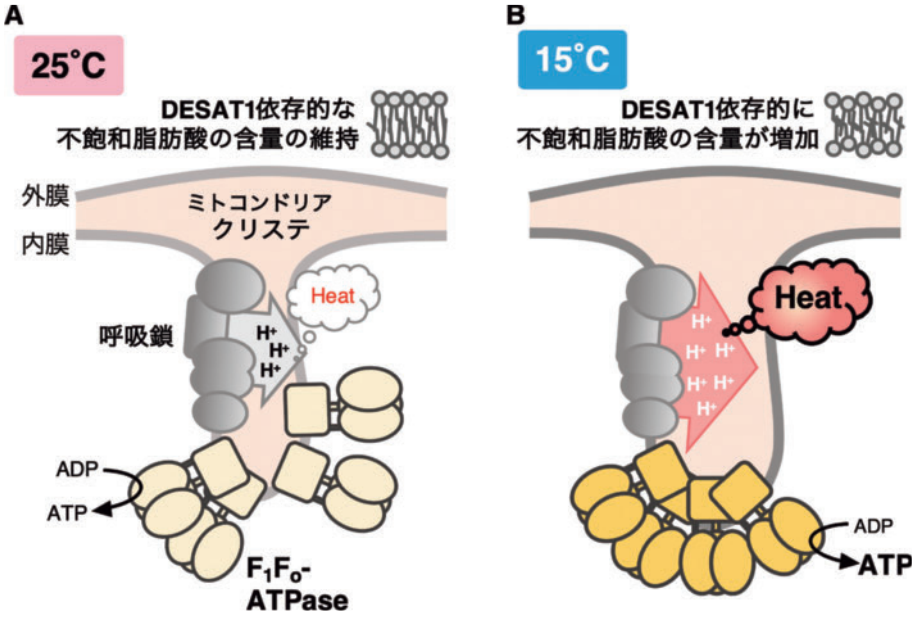

図 4：Δ9 脂肪酸不飽和化酵素による細胞内温度制御メカニズム．A，至適生育温度（25℃）におけるミトコンドリア呼吸を介する熱産生の維持．B，低温環境（15℃）におけるミトコンドリア呼吸の活性化．

関連に着目した．前述の通り，先行研究では低温曝露時にリン脂質のアシル鎖における不飽和脂肪酸の含量がΔ9 脂肪酸不飽和化酵素に依存して増加することが報告されている．他方，我々は DESAT1 の過剰発現が S2 細胞におけるクリステ含有ミトコンドリアの増加，並びにミトコンドリア呼吸の活性化を誘導するのみならず，ミトコンドリア温度を上昇させることを観察していた．そこで，低温環境では DESAT1 を介する不飽和脂肪酸の産生が亢進することにより F_1F_o-ATPase 依存的なミトコンドリア呼吸が増強されるのではないかと仮説を立てた．

S2 細胞を通常の培養条件よりも 10℃低い 15℃で 4 時間培養すると，リン脂質アシル鎖における C16：1 の割合が低温曝露時に DESAT1 依存的に増加した．この際の粗ミトコンドリア画分のリン脂質を詳細に解析すると，PC（32：2），PC（34：2），PE（32：2）のような 2 つの一価不飽和脂肪酸を含有した分子種の量が増加していた．これらの結果から，S2 細胞では DESAT1 を介するミトコンドリア膜脂質の不飽和化が低温曝露時に亢進されることが示された．

続いて，この低温曝露時のミトコンドリア呼吸の活性を評価した．まず，DESAT1 の過剰発現の効果と同様に，S2 細胞のミトコンドリア膜電位が低温曝露時に 2 倍に上昇することを見出した．この低温誘導性のミトコンドリア膜電位上昇は，DESAT1 阻害剤処理細胞や *Desat1* 遺伝子欠損細胞では有意に抑制された．加えて，低温誘導性の膜電位上昇は F_1F_o-ATPase 阻害剤であるオリゴマイシンにより抑制されたことから，低温誘導性の膜電位上昇が F_1F_o-ATPase の活性に依存していること，また，F_1F_o-ATPase によるプロトン勾配の消費が抑制されたことによるものではないことが示された．低温曝露におけるプロトン勾配形成の動態をさらに評価するために，ロテノン処理後のミトコンドリア膜電位の回復速度を解析した．まず，ミトコンドリア膜電位の回復が F_1F_o-ATPase 活性依存的であることを見出した．さらに，このミトコンドリア膜電位の回復速度が低温曝露により上昇すること，これが DESAT1 の阻害により抑制されることが示された．これらの結果から，低温曝露時のミトコンドリア膜電位の上昇は，F_1F_o-ATPase 依存的なミトコンドリア呼吸が DESAT1 依存的に活性化することにより引き起こされていることが示唆された．

最後に，低温環境下における F_1F_o-ATPase の機能や構造を調査した．S2 細胞を 15℃で 4 時間培養すると，複合体を形成した F_1F_o-ATPase の割合が約 2.2 倍増加し，ミトコンドリア画分にて検出される F_1F_o-ATPase 活性が 1.4 倍程度上昇した．また，これらはいずれも DESAT1 の阻害や欠損により抑制された．さらに，この低温曝露時にはクリステ含有ミトコンドリアが増加すること，これが DESAT1 阻害剤処理細胞群や *Desat1* 遺伝子欠損細胞では見られないこともわかった．以上，低温環境では DESAT1 によるクリステのリモデリングを介して F_1F_o-ATPase の活性が向上し，ミトコンドリア

呼吸が活性化することが示された．S2 細胞では熱産生と共役しているミトコンドリア呼吸鎖の活性が F_1F_o-ATPase 依存的に制御されているという実験結果を考慮すると，これらのデータは環境温度の変化における細胞内温度の細胞自律的な制御機構が存在することを強く示唆するものと考えられた（図 4B）．

5．考察　～膜脂質を介する細胞内温度制御～

今回，我々の研究により，Δ9 脂肪酸不飽和化酵素 DESAT1 がミトコンドリア呼吸を介した細胞内温度の細胞自律的な制御に関与することが明らかとなった．さらに，低温曝露時にはミトコンドリア呼吸活性が DESAT1 依存的に増強されることを発見した．このため，低温環境における不飽和脂肪酸を含有したリン脂質の産生は，生体膜の物理化学的な性質の制御のみならず，低温環境に応答したミトコンドリア呼吸の向上に関与している可能性が示された．

先行研究では，ミトコンドリアリン脂質はミトコンドリア呼吸活性の極めて重要な制御因子であることが示されてきた．例えば，CL 及び PE 分子種は，適切なミトコンドリア融合やミトコンドリア膜電位の維持に重要であることが知られている（Brandner et al., 2005; Joshi et al., 2012）．加えて，CL 分子は F_1F_o-ATPase に直接結合し，これが F_1F_o-ATPase の複合体形成に必須であることも報告されている（Duncan et al., 2016）．一方で，CL に関する先行報告では，哺乳動物細胞の CL はアシル鎖にリノール酸（C18：2）を多く含むこと，この C18：2 に富んだ成熟 CL がミトコンドリア機能に寄与することが示されている（Minkler and Hoppel, 2010）．今回，興味深いことに S2 細胞の主要な CL 分子種はこれらの先行研究とは対照的に C18：2 ではなく一価不飽和脂肪酸（C16：1 もしくは C18：1）を 4 つ含んでおり，C18：2 を含有した CL 分子は S2 細胞におけるミトコンドリア呼吸活性には必須でないことが想定された．また，S2 細胞は Δ9 脂肪酸不飽和化酵素を DESAT1 しか発現していない上に，細胞外から血清由来の脂肪酸を取り込む能力が低いため，リン脂質のアシル鎖に C18：2 を殆ど含有していない（Matsuo et al., 2019）．これらの観察から，S2 細胞は適切なミトコンドリア機能の制御において必須な脂肪酸を細胞外環境からの取り込みには依存せず新規合成のみで賄えることが窺える．また，ミトコンドリアリン脂質の組成は内膜と外膜で異なっており，内膜では CL 分子種が豊富であることが知られている（Paradies et al., 2014）．DESAT1 阻害は PC・PE 分子種と同様に CL 分子種のアシル鎖組成に影響していたことから，DESAT1 はミトコンドリア内膜のリン脂質組成の制御に関与することが強く示唆された．また，低温曝露や DESAT1 の過剰発現はミトコンドリア呼吸活性を上昇させた一方で，単に培養培地に一価不飽和脂肪酸を添加したのみではこのような効果は見られなかった．この結果と，DESAT1 はミトコンドリアに近接した ER 膜に局在することを併せて考慮すると，DESAT1 は ER とミトコンドリアのコンタクトサイト（接触場）に局在し，ミトコンドリアに効率よく不飽和脂肪酸を供給していることが想定される．以上，DESAT1 を介する不飽和脂肪酸合成はミトコンドリア呼吸活性を細胞自律的に制御し細胞内温度を調節することに適していると考えられた．

6．今後の展望

従来，ミトコンドリア熱産生の機構や生理的意義については，褐色脂肪細胞を含む，特異な熱産生機構を有するごく一部の細胞種で研究されてきた（Bal et al., 2012; Cannon and Nedergaard, 2004; Ikeda et al., 2017）．一方で，今回我々は熱産生に特化していない細胞において膜脂質を介する細胞内温度の制御機構を同定した．さらに，低温曝露下におけるミトコンドリア膜電位の細胞自律的な上昇は，ヒト由来の iPS 細胞より分化した培養神経細胞でも観察されている（Ou et al., 2018）．他生物種におけるさらなる解析は必要であるが，我々による研究成果は細胞内温度制御の骨組みを示したと考えられる．

我々が見出した細胞レベルでの温度調節メカニズムは，個体レベルでの体温調節と如何なる関係にあるのだろうか．生物は自身の体温を自律的体温調節と行動性体温調節により制御していることがよく知られている（Morrison and Nakamura, 2019）．自律性体温調節は不随意の自律的生理反応によるものであり，発汗や血管の収縮，非ふるえ熱産生，ふるえ熱産生が具体例として挙げられる．一方，行動性体温調節は随意の本能行動による体温調節メカニズムであり，至適温度環境への移動や衣類の着脱等により達成される．外温動物であるショウジョウバエにおいては，主にこの行動性体温調節によって体温が調節されている．我々は，これまでに人工的に作り出した温度勾配上でのショウジョウバエ 3 令幼虫の選好温度を指標として，行動性体温調節の分子メカニズムの解析を行なってきた．例えば，哺乳動物における肝臓と脂肪組織の機能を併せ持つ脂肪体における DESAT1 の発現を抑制すると，ショウジョウバエ個体の選好温度が高温側へシフトすることを見出している

(Suito et al., 2022)．この結果はDESAT1の発現抑制による体温の低下を直接示すものではないが，個体レベルの体温調節にDESAT1を介する膜脂質の制御が関与することを強く示唆している．また，Transient Receptor Potential Ankyrin 1（TRPA1）発現ニューロン等の特定の細胞においてC18：2の含量を増加させると，温度感受性イオンチャネルの活性の変化，さらにはショウジョウバエ個体の選好温度の変化が惹起されることも明らかにしている（Suito et al., 2020）．即ち，従来，低温環境における不飽和脂肪酸含量の増加は生体膜の物理化学的な性質の制御に寄与すると考えられてきたが，我々の発見から細胞レベルでの熱産生や温度感受性イオンチャネルの制御等，多様な機序による体温制御に関わる可能性が示されている．

今回の我々の研究では，ショウジョウバエ細胞をモデルとした解析によりΔ9脂肪酸不飽和化酵素依存的な細胞内温度メカニズムが同定された．その一方で，本メカニズムの構成因子は広い生物種の細胞に存在している．例えば，哺乳類における主要なΔ9脂肪酸不飽和化酵素ホモログであるSCD1は生体内にてユビキタスに発現し，不飽和脂肪酸生合成の中心を担う分子である．つまり，今回示されたようなΔ9脂肪酸不飽和化酵素依存的なミトコンドリア熱産生の制御は，ショウジョウバエ細胞のみならず哺乳動物細胞を含む幅広い細胞種における低温適応に寄与する可能性がある．しかしながら，哺乳動物細胞は1で述べた通り生体膜脂質の組成が複雑であり，生体膜組成と細胞機能との関連を解析することが困難である．今後，ショウジョウバエ以外の生物種の細胞において，膜脂質組成全体を注意深く観察しながらΔ9脂肪酸不飽和化酵素の機能を評価することができる実験系が開発された暁には，我々の発見の動物細胞における一般性が証明されることが期待できる．

参考文献

Abdelwahid, E., Yokokura, T., Krieser, R.J., Balasundaram, S., Fowle, W.H., and White, K. (2007). Mitochondrial disruption in Drosophila apoptosis. Dev Cell *12*, 793–806. 10.1016/j.devcel.2007.04.004.

Bal, N.C., Maurya, S.K., Sopariwala, D.H., Sahoo, S.K., Gupta, S.C., Shaikh, S.A., Pant, M., Rowland, L.A., Bombardier, E., Goonasekera, S.A., et al. (2012). Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. Nat Med *18*, 1575–1579. 10.1038/nm.2897.

Brandner, K., Mick, D.U., Frazier, A.E., Taylor, R.D., Meisinger, C., and Rehling, P. (2005). Taz1, an outer mitochondrial membrane protein, affects stability and assembly of inner membrane protein complexes: implications for Barth Syndrome. Mol Biol Cell *16*, 5202–5214. 10.1091/mbc.e05-03-0256.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev *84*, 277–359. 10.1152/physrev.00015.2003.

Chretien, D., Benit, P., Ha, H.H., Keipert, S., El-Khoury, R., Chang, Y.T., Jastroch, M., Jacobs, H.T., Rustin, P., and Rak, M. (2018). Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 degrees C. PLoS Biol *16*, e2003992. 10.1371/journal.pbio.2003992.

Civiletto, G., Varanita, T., Cerutti, R., Gorletta, T., Barbaro, S., Marchet, S., Lamperti, C., Viscomi, C., Scorrano, L., and Zeviani, M. (2015). Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. Cell Metab *21*, 845–854. 10.1016/j.cmet.2015.04.016.

Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 870–879. 10.1038/nrm2275.

Duncan, A.L., Robinson, A.J., and Walker, J.E. (2016). Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases. Proc Natl Acad Sci U S A *113*, 8687–8692. 10.1073/pnas.1608396113.

Fedorenko, A., Lishko, P.V., and Kirichok, Y. (2012). Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. Cell *151*, 400–413. 10.1016/j.cell.2012.09.010.

Formosa, L.E., and Ryan, M.T. (2018). Mitochondrial OXPHOS complex assembly lines. Nat Cell Biol *20*, 511–513. 10.1038/s41556-018-0098-z.

Hayashi, T., Fukuda, N., Uchiyama, S., and Inada, N. (2015). A cell-permeable fluorescent polymeric thermometer for intracellular temperature mapping in mammalian cell lines. PLoS One *10*, e0117677. 10.1371/journal.pone.0117677.

Hoch, F.L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. Biochim Biophys Acta *1113*, 71–133. 10.1016/0304-4157(92)90035-9.

Holthuis, J.C., and Menon, A.K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. Nature *510*, 48–57. 10.1038/nature13474.

Ikeda, K., Kang, Q., Yoneshiro, T., Camporez, J.P., Maki, H., Homma, M., Shinoda, K., Chen, Y., Lu, X., Maretich, P., et al. (2017). UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. Nat Med *23*, 1454–1465. 10.1038/nm.4429.

Ikon, N., and Ryan, R.O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. Biochim Biophys Acta Biomembr *1859*, 1156–1163. 10.1016/j.bbamem.2017.03.013.

Joshi, A.S., Thompson, M.N., Fei, N., Huttemann, M., and Greenberg, M.L. (2012). Cardiolipin and mitochondrial

phosphatidylethanolamine have overlapping functions in mitochondrial fusion in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *287*, 17589–17597. 10.1074/jbc.M111.330167.

Kato, H., Sakaki, K., and Mihara, K. (2006). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of mammalian ER stearoyl-CoA desaturase. J Cell Sci *119*, 2342–2353. 10.1242/jcs.02951.

Kiyonaka, S., Kajimoto, T., Sakaguchi, R., Shinmi, D., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Imamura, H., Yoshizaki, T., Hamachi, I., Morii, T., and Mori, Y. (2013). Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. Nat Methods *10*, 1232–1238. 10.1038/nmeth.2690.

Los, D.A., and Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. Biochim Biophys Acta *1666*, 142–157. 10.1016/j.bbamem.2004.08.002.

Matsuo, N., Nagao, K., Suito, T., Juni, N., Kato, U., Hara, Y., and Umeda, M. (2019). Different mechanisms for selective transport of fatty acids using a single class of lipoprotein in Drosophila. J Lipid Res *60*, 1199–1211. 10.1194/jlr.M090779.

Minkler, P. E., and Hoppel, C. L. (2010). Separation and characterization of cardiolipin molecular species by reverse-phase ion pair high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J Lipid Res *51*, 856–865. 10.1194/jlr.D002857.

Morrison, S., and Nakamura, K. (2019). Central mechanisms for thermoregulation. Annual review of physiology *81*, 285–308.

Murakami, A., Nagao, K., Juni, N., Hara, Y., and Umeda, M. (2017). An N-terminal di-proline motif is essential for fatty acid-dependent degradation of Δ9-desaturase in Drosophila. J Biol Chem *292*, 19976–19986. 10.1074/jbc.M117.801936.

Murakami, A., Nagao, K., Sakaguchi, R., Kida, K., Hara, Y., Mori, Y., Okabe, K., Harada, Y., and Umeda, M. (2022). Cell-autonomous control of intracellular temperature by unsaturation of phospholipid acyl chains. Cell Reports *38*, 110487.

Nagao, K., Murakami, A., and Umeda, M. (2019). Structure and Function of Delta9-Fatty Acid Desaturase. Chem Pharm Bull (Tokyo) *67*, 327–332. 10.1248/cpb.c18-01001.

Nakagawa, Y., Sakumoto, N., Kaneko, Y., and Harashima, S. (2002). Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. *291*, 707–713. 10.1006/bbrc.2002.6507.

Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T., and Uchiyama, S. (2012). Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. Nat Commun *3*, 705. 10.1038/ncomms1714.

Ou, J., Ball, J.M., Luan, Y., Zhao, T., Miyagishima, K.J., Xu, Y., Zhou, H., Chen, J., Merriman, D.K., Xie, Z., et al. (2018). iPSCs from a Hibernator Provide a Platform for Studying Cold Adaptation and Its Potential Medical Applications. Cell *173*, 851–863.e816. 10.1016/j.cell.2018.03.010.

Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. Biochim Biophys Acta *1837*, 408–417. 10.1016/j.bbabio.2013.10.006.

Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Korner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., et al. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. J Cell Biol *185*, 1047–1063. 10.1083/jcb.200811099.

Rahbani, J.F., Roesler, A., Hussain, M.F., Samborska, B., Dykstra, C.B., Tsai, L., Jedrychowski, M.P., Vergnes, L., Reue, K., Spiegelman, B.M., and Kazak, L. (2021). Creatine kinase B controls futile creatine cycling in thermogenic fat. Nature *590*, 480–485. 10.1038/s41586-021-03221-y.

Suito, T., Nagao, K., Kai, M., Juni, N., Sokabe, T., and Umeda, M. (2022). Measurement of Thermoregulatory Behavior in Drosophila melanogaster. In Behavioral Neurogenetics, (Springer), pp. 77–91.

Suito, T., Nagao, K., Takeuchi, K., Juni, N., Hara, Y., and Umeda, M. (2020). Functional expression of Δ 12 fatty acid desaturase modulates thermoregulatory behaviour in Drosophila. Scientific reports *10*, 1–17.

Sun, Y., Rahbani, J.F., Jedrychowski, M.P., Riley, C.L., Vidoni, S., Bogoslavski, D., Hu, B., Dumesic, P.A., Zeng, X., Wang, A.B., et al. (2021). Mitochondrial TNAP controls thermogenesis by hydrolysis of phosphocreatine. Nature *593*, 580–585. 10.1038/s41586-021-03533-z.

Tatzer, V., Zellnig, G., Kohlwein, S.D., and Schneiter, R. (2002). Lipid-dependent subcellular relocalization of the acyl chain desaturase in yeast. Mol Biol Cell *13*, 4429–4442. 10.1091/mbc.e02-04-0196.

Tiku, P.E., Gracey, A.Y., Macartney, A.I., Beynon, R.J., and Cossins, A.R. (1996). Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. Science *271*, 815–818. 10.1126/science.271.5250.815.

Uto, Y., Ogata, T., Kiyotsuka, Y., Miyazawa, Y., Ueno, Y., Kurata, H., Deguchi, T., Yamada, M., Watanabe, N., Takagi, T., et al. (2009). Novel and potent inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. Part II: Identification of 4-ethylamino-3-(2-hydroxyethoxy) -N-[5-(3-trifluoromethylbenzyl) thiazol-2-yl] benza mide and its biological evaluation. Bioorg Med Chem Lett *19*, 4159–4166. 10.1016/j.bmcl.2009.05.123.

Varanita, T., Soriano, M.E., Romanello, V., Zaglia, T., Quintana-Cabrera, R., Semenzato, M., Menabo, R., Costa, V., Civiletto, G., Pesce, P., et al. (2015). The OPA1-dependent mitochondrial cristae remodeling pathway controls atrophic, apoptotic, and ischemic tissue damage. Cell Metab *21*, 834–844.

10.1016/j.cmet.2015.05.007.
Zhou, J., Del Rosal, B., Jaque, D., Uchiyama, S., and Jin, D. (2020). Advances and challenges for fluorescence nanothermometry. Nature methods *17*, 967–980.