

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06746

研究課題名(和文) 冬眠哺乳動物は、何故、冬眠するときに体温を下げることができるのか？

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between the peripheral circadian clock and hibernation in a hibernating mammal

研究代表者

高松 信彦 (Takamatsu, Nobuhiko)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：40206876

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)：哺乳動物では、睡眠-覚醒リズム、体温変動や代謝などの様々な生命現象が体内時計によって制御されている。本研究では、冬眠哺乳動物における末梢の概日時計と冬眠との関連を調べるため、シマリス肝臓における時計遺伝子の発現を解析した。冬眠期には、Per2 mRNAは中途覚醒時の体温上昇により活性化されたHSF1により一過性に増加し、深冬眠-中途覚醒サイクルにおいて周期的な変動を示したが、Bmal1 mRNAには周期的な変動は観察されず、末梢の概日時計が機能していないと考えられた。従って、冬眠期には新たな遺伝子ネットワークの形成により冬眠に必要な遺伝子発現が行われている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

冬眠哺乳動物は、深冬眠中には、数日間-数週間、数の低体温で、丸まった固定した姿勢で過ごす。冬眠期の深冬眠-中途覚醒サイクルでは心拍数が大幅に変動するため、虚血-再灌流のような状態に晒される。また冬眠中のエネルギー源として脂肪を蓄積し、体重を大幅に増加させる種もいる。これらの観察から、冬眠哺乳動物は低体温症、廃用性筋萎縮、虚血-再灌流による細胞へのダメージや糖尿病に対して強い耐性を有していると考えられており、その分子基盤の解明は医療にも有用な知見をもたらすものと期待されている。本研究により、冬眠期に構築される遺伝子ネットワークの解析は、そのような分子基盤の解明に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In mammals, various physiological processes such as sleep-wake rhythms, body temperature fluctuations, and metabolism are regulated by the circadian clock. In this study, we analyzed the expression of clock genes in the liver of chipmunks to investigate the relationship between peripheral circadian clock and hibernation in a hibernating mammal. In the hibernation season, Per2 mRNA was transiently increased by HSF1, which was activated by elevated body temperature during interbout arousal, and showed periodic fluctuations in the torpor-arousal cycle, but no periodic fluctuations were observed in Bmal1 mRNA, suggesting that the peripheral circadian clock was not functioning. Therefore, it was suggested that in the hibernation season, gene expression necessary for hibernation may be carried out by the formation of a new gene network.

研究分野：冬眠

キーワード：転写制御 概日リズム 末梢時計 Per2 HSF1

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物では、睡眠-覚醒サイクル、体温、肝臓の代謝など、さまざまな生理・行動プロセスが概日リズムを示す。概日リズムは体内時計によって制御されている。体内時計は体内のほぼすべての細胞に存在するが、視床下部の視交叉上核 (SCN) に局在する体内時計が中枢時計として、ホルモンや神経信号、体温リズムなどを通じて、SCN 以外の細胞の体内時計 (末梢時計) に時間情報を伝達し、末梢時計を同期させている。体内時計は、時計遺伝子 *Bmal1*, *Clock*, *Cry*, *Per* とそのタンパク質産物が関わる転写-翻訳フィードバックループで構成されており、*BMAL1-CLOCK* ヘテロ二量体は転写活性化因子として、*CRY-PER* 複合体は転写抑制因子として機能している。

多くの哺乳動物はほぼ一定の高い体温を維持して生活する恒温動物であるが、小型の哺乳動物には環境温度が低下し、食料が乏しい冬季に冬眠する動物もいる。冬眠哺乳動物は夏季の活動期は恒温動物として過ごし、冬季の冬眠期は変温動物として過ごす。私達の研究対象である冬眠哺乳動物のシマリスは、活動期には1~2°Cの日内変動で37°Cの体温を維持し、冬眠期には5~6日の体温が5~7°Cの深冬眠と、熱産生により体温が37°Cまで回復する、20時間程度の中途覚醒を繰り返す (図1)。深冬眠に入るためには、代謝を抑制して、体温を低下させる必要がある。睡眠の際にも体温の低下が観察されるが、ジリスでは、脳波の測定から、睡眠に入る過程を利用して、冬眠に入っていると推察されている。睡眠-覚醒サイクル、体温、肝臓の代謝などの制御には概日リズムが関与しているが、冬眠哺乳動物で冬眠期に概日リズムが機能しているかはまだ結論が出ていない。また、冬眠哺乳動物の末梢時計についてはこれまでほとんど解析が行われていない。

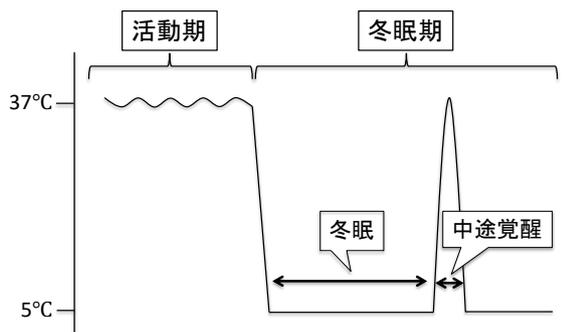


図1 冬眠に伴う体温の変化

2. 研究の目的

冬眠哺乳動物が冬眠に入るためには、代謝を抑制して体温を低下させることが必要である。概日リズムは睡眠-覚醒サイクル、体温、肝臓の代謝などの制御に関与しているが、冬眠哺乳動物で冬眠期に概日リズムが機能しているかはまだ明らかになっていない。そこで、本研究では、シマリス肝臓における時計遺伝子の発現について解析し、冬眠期に末梢時計が機能しているかを解析した。

3. 研究の方法

(1) シマリスの飼育と組織の採取

シマリス (*Tamias asiaticus*) (雄, 2-4ヶ月齢) はペットイージースペース (大阪) から購入し、標準的なネズミの餌と水を自由摂取できるようにして個別飼育した。活動期 (4月~9月) には、23°Cで、12時間:12時間の明:暗周期 (午前6時に点灯) で飼育した。ツァイトゲバータイム (ZT) 0 (ZT0) は、照明を点灯した午前6時に相当する。冬眠期 (10月~3月) には、5°Cの恒暗下で飼育した。冬眠期のシマリスの状態は、赤外線活動センサーを用いて監視した。シマリスの体温は、サーミスタプローブ (サーミスタ温度計 モデル KN-91-AD1687-R; 夏目製作所, 東京, 日本) で測定した直腸温度を用いた。シマリスの組織は、イソフルランで深麻酔状態にしてから採取し、液体窒素で凍結してから-80°Cで保存した。

(2) Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

シマリス肝臓の total RNA は Isogen (ニッポンジーン) を用いて調製し、RNase-free recombinant DNase I (タカラバイオ) で処理してから、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。精製した肝臓の total RNA を鋳型に PrimeScript First-strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。qPCR は SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus (東洋紡) を用いて行った。

(3) クロマチン免疫沈降 (ChIP)-qPCR

ChIP は、シマリス肝臓から調製したクロマチン試料と、正常ウサギ IgG, 抗 HSF1 抗体, 抗ヒストン H3 抗体を用いて行った。qPCR は SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus (東洋紡) を用いて行った。

(4) ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは、シマリス肝臓から調製した核抽出液と、抗 HSF1 抗体、抗 USF1 抗体を用いて行った。

4. 研究成果

冬眠哺乳動物は夏季の活動期は恒温動物として過ごし、冬季の冬眠期は変温動物として過ごしている。そこで、シマリス肝臓の末梢時計の発現について、活動期と冬眠期に分けてそれぞれ解析を行った。

(1) 活動期のシマリス肝臓の末梢時計の解析

活動期のシマリスの末梢の概日時計の発現を解析するため、肝臓を 6 時間ごとに ZT4, ZT10, ZT16, ZT22 で採取して total RNA を調製し、RT-qPCR により時計遺伝子 Bmal1 と Per2 mRNA の量を測定した (図 2)。その結果、Bmal1 mRNA は ZT16 で最大、ZT4 で最小になる概日性的変動を示した。Per2 mRNA は ZT4 で最大、ZT16 で最小になる、Bmal1 mRNA とは逆位相の概日性的変動を示した。この Bmal1 と Per2 mRNA の睡眠-覚醒サイクルにおける概日性的発現変動は、マウス肝臓における発現変動と一致していた。

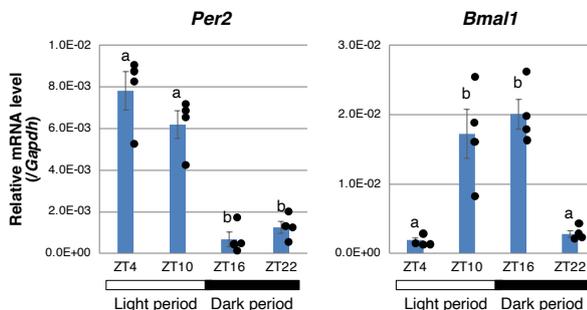


図2 活動期の時計遺伝子の発現解析

マウス肝臓では、Per2 遺伝子の覚醒時の転写は、体温上昇によって活性化された HSF1 によって活性化される。シマリス肝臓においても、覚醒時の体温上昇に伴い核の HSF1 の量が ZT4 で最大になっていた (図 3)。そこで、ChIP により、シマリス肝臓における、Per2 遺伝子の第 1 イントロン内の HSF1 結合配列 (HSE) への HSF1 の結合について解析したところ、Per2 遺伝子の HSE への HSF1 の結合も ZT4 で一過性に増加していた (図 4)。従って、シマリス肝臓においても、概日性的体温リズムによって覚醒時に上昇した体温によって活性化された HSF1 によって、Per2 遺伝子の転写が活性化されることが明らかになった。

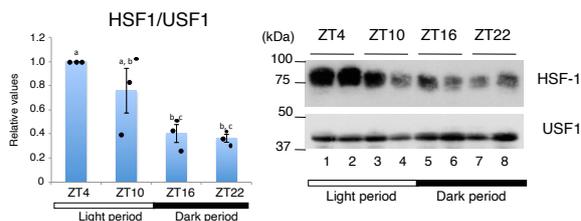


図3 活動期のHSF1の発現解析

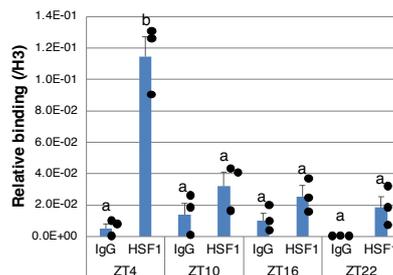


図4 活動期のPer2遺伝子へのHSF1の結合の解析

(2) 冬眠期のシマリス肝臓の末梢時計の解析

冬眠期の深冬眠-中途覚醒サイクルにおいても、中途覚醒時の体温上昇により HSF1 が活性化される。深冬眠時 (DT) には HSF1 は主に細胞質に局在しているが、中途覚醒し、体温が 30°C 以上になる (IA-1) と核に蓄

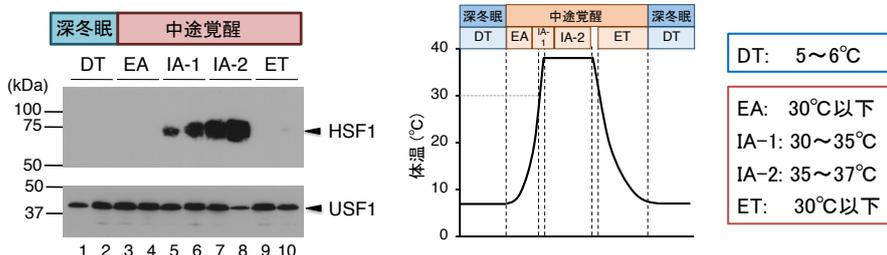


図5 冬眠期のHSF1の発現解析

積し始め、冬眠に入るために体温が低下してくる (ET) と核から消失する (図 5)。そこで、冬眠期においても中途覚醒時に Per2 遺伝子の転写が HSF1 によって活性化される可能性が考えられたので、Bmal1 と Per2 mRNA の量を RT-qPCR により解析した。その結果、Per2 mRNA は、深冬眠-中途覚醒サイクルにおいて、核に HSF1 が蓄積し始める IA-1 で一過性に増加する周期的な変動を示すことが明らかになった (図 6)。一方、Bmal1 mRNA には深冬眠-中途覚醒サイクルにおける周期的な変動は観察されなかった (図 6)。また、ChIP 解析の結果、Per2 遺伝子の HSE への HSF1 の結合も IA-1 で一過性に増加しており (図 7)、冬眠期においても、深冬眠-中途覚醒サイクルの体温リズムによって中途覚醒時に上昇した体温によって活性化された HSF1 によって、

Per2 遺伝子の転写が活性化されることが明らかになった。一方、概日リズムは、時計遺伝子 Bmal1, Clock, Cry, Per による転写-翻訳フィードバックループで構成されているので、Bmal1 mRNA には深冬眠-中途覚醒サイクルにおける周期的な変動は観察されなかったことから、冬眠期には概日リズムは機能していないと考えられた。哺乳動物では肝臓では10~15%の遺伝子の発現が概日リズムを示すと言われているが、冬眠期には概日リズムが発現しないため、新たに形成された遺伝子ネットワークを利用することにより、体温低下に必要な代謝抑制を行なっている可能性が考えられた。

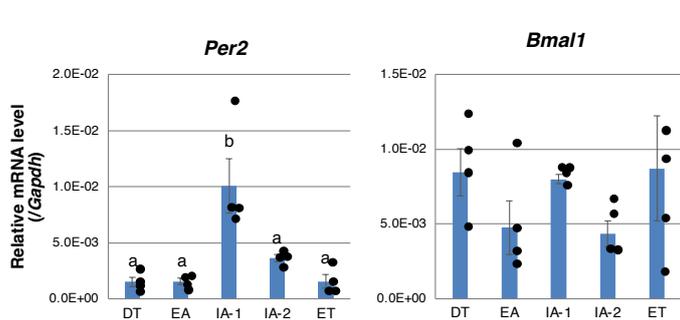


図6 冬眠期の時計遺伝子の発現解析

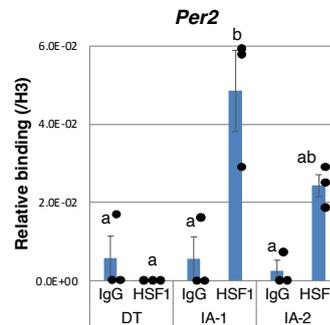


図7 冬眠期のPer2遺伝子へのHSF1の結合の解析

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 塚本 大輔, 高松 信彦	4. 巻 93
2. 論文標題 冬眠哺乳動物シマリスの体温変動を利用した冬眠期の遺伝子発現制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 830-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930830	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 該当する

1. 著者名 Takamatsu N, Shirahata Y, Seki K, Nakamaru E, Ito M, Tsukamoto D	4. 巻 299
2. 論文標題 Heat shock factor 1 induces a short burst of transcription of the clock gene Per2 during interbout arousal in mammalian hibernation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.104576	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚本大輔, 伊藤道彦, 高松信彦
2. 発表標題 Impact of body temperature rhythm on gene expression during hibernation in the liver of chipmunk
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関皓太, 白島由比穂, 塚本大輔, 伊藤道彦, 高松信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスのmiR-182-5pによる時計遺伝子CLOCKの発現制御の解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白鳥由比穂, 関皓太, 岡村瑠美, 塚本大輔, 伊藤道彦, 高松信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスのmiR-182-5pによるFOXO1の発現抑制とFOXO1によるGADD45Aの転写制御の解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本 大輔, 高松 信彦
2. 発表標題 シマリス肝臓における冬眠期の体温変動に伴った発現変動遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第4回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 皓太, 高松 信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスの miR-182-5p による時計遺伝子 CLOCK の発現制御の解析
3. 学会等名 第4回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白鳥 由比穂, 高松 信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスの miR-182-5p による FOXO1 の発現制御と FOXO1 による GADD45A の転写制御の解析
3. 学会等名 第4回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中丸 絵莉奈, 高松 信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスの肝臓における CREB1 の機能解析
3. 学会等名 第4回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本 大輔, 坂部 寧々, 関 皓太, 白島 由比穂, 中丸 絵莉奈, 伊藤 道彦, 高松 信彦
2. 発表標題 シマリス冬眠の低体温に伴う Rbm3 遺伝子の発現制御機構と機能の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白島 由比穂, 関 皓太, 中丸 絵莉奈, 岡村 瑠美, 塚本 大輔, 伊藤 道彦, 高松 信彦
2. 発表標題 冬眠に伴うストレス応答遺伝子 GADD45A の FOXO1 による転写活性化機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 皓太, 白島 由比穂, 中丸 絵莉奈, 塚本 大輔, 伊藤 道彦, 高松 信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスの肝臓の未梢時計の発現制御の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中丸 絵莉奈, 安達 めぐみ, 白鳥 由比穂, 関 皓太, 塚本 大輔, 伊藤 道彦, 高松 信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスの肝臓における CREB1 バリエーションの発現及び機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 塚本大輔, 高松信彦	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 5
3. 書名 冬眠動物シマリスの冬眠に伴う遺伝子発現制御機構	

1. 著者名 塚本 大輔, 高松 信彦	4. 発行年 2023年
2. 出版社 北海道大学 低温科学研究所	5. 総ページ数 11
3. 書名 シマリスの冬眠の分子生物学的研究	

〔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
---------	---------