

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780277

研究課題名(和文)クマはなぜ冬眠できるのか? —冬眠中のエネルギー代謝機構の解明—

研究課題名(英文)Changes in energy metabolism during hibernation in Japanese black bears

研究代表者

下鶴 倫人 (SHIMOZURU, Michito)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：50507168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではツキノワグマにおいて冬眠期に生じる代謝機構の変化を明らかにすることを目的し、肝臓・骨格筋・脂肪におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現解析を行った。この結果、冬眠中は糖新生に關与する酵素の遺伝子発現量が肝臓で増加し、一方ですべての組織において解糖および脂肪合成に關わる遺伝子発現量が低下することが明らかとなった。冬眠中の血糖値は活動期と同程度に維持されており、ケトシスなどの代謝障害は生じていなかった。このようにクマは各組織における代謝様式を調節することで冬眠中に効率良くエネルギーを産生する仕組みを有していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate how black bears maintain energy homeostasis during hibernation, we analyzed seasonal changes in mRNA expression of energy metabolism-related genes in liver, skeletal muscle, and white adipose tissue. Real-time qPCR analysis revealed up-regulation of gluconeogenesis-related genes in the liver, and down-regulation of glycolysis- and de novo lipogenesis-related genes in all three tissues, during hibernation, compared to the active period. The transcriptional modulation during hibernation represents a unique physiological adaptation to prolonged fasting in bears.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：冬眠 クマ 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

(1)冬眠は生体活動を低下させることで厳しい気候・食物状態である冬期を乗り切るべく進化した適応的生物現象である。クマ類が示す冬眠は、中途覚醒を示さず、持続的に眠り続ける、体温の降下度が小さい、摂食・飲水、排糞・排尿を行わない、等の点で他の冬眠性哺乳類とは大きく異なる。また、クマにとっての冬眠期は、絶食期を乗り切る手段としてだけでなく、出産・育子期間として重要な意味を有する。このため、冬眠前の秋期(過食期)に、如何に体脂肪を蓄えるかが個体の生存および繁殖成功の鍵を握ると言われている。

(2)クマ類は冬眠中も骨密度の低下や骨格筋の萎縮が生じず、冬眠前に蓄えた脂肪を唯一のエネルギー源として約5ヶ月にわたる絶食期において生命活動を維持している。ヒトをはじめとした他動物では絶食・低栄養状態が持続すると、低血糖や脂肪の過度の動員による血中遊離脂肪酸濃度の上昇、異常なケトン体の蓄積による体液の酸性化が起こるなどの障害が生じるが、クマではこのような代謝障害は起こらない。このようなクマの冬眠の特異性は古くから注目されていたものの、なぜ代謝異常を伴わずに長期間生命活動を維持できるのか、明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、クマが冬眠前の過食期において如何に効率良く体脂肪を蓄えるのか、また冬眠期においてはどのように脂肪のみをエネルギー源として冬眠期間を乗り切るのか、その仕組みを知るため、エネルギー産生/消費機構に焦点をあて、活動期と比較した過食期・冬眠期の代謝機構の差異を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

秋田県阿仁クマ牧場で飼育されているメスツキノワグマを実験に供試した。麻酔薬(ゾレチル(塩酸ゾラゼパムと塩酸チレタミンの混合薬)およびメドミジン併用)を吹き矢により投与し不動化処置を施した後、頸静脈より血液を採取した。その後、超音波画像診断装置のガイドのもと、ニードルバイオプシー法により肝臓を採取した。また、皮膚を切開し、骨格筋(縫工筋)および臀部の白色脂肪組織を採取した。採取した血液は実験室に持ち帰り、血液生化学検査(血糖値・中性脂肪値などの測定)に供試した。また各組織より Total RNA を抽出後、リアルタイム PCR を用いて、エネルギー代謝に関わる酵素などの mRNA 発現量を解析した。血液・組織の採材は通常活動期である6月、過食期である11月、冬眠期である1・3月に実施し、得

られたデータの比較解析を行った。また、冬眠期においては、腹部皮下に小型体温計を埋め込み、皮下体温の追跡を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 過食期における代謝機構の変化

肝臓に発現するエネルギー代謝関連遺伝子の発現量を過食期(11月前半)と通常活動期(6月)で比較した結果、過食期においては脂肪合成に關与する遺伝子群の発現の有意な増加が認められた。これらには解糖系に關与するグルコキナーゼ、脂肪酸合成に關与するクエン酸リアーゼ・アセチル CoA カルボキシラーゼ・脂肪酸合成酵素、また中性脂肪合成に關与するアシル CoA ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ などが含まれた。白色脂肪組織においても同様に、過食期において脂肪酸合成酵素およびアシル CoA ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ の増加が認められた他、ペントースリン酸経路に關与するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼやリンゴ酸酵素など、脂肪合成に促進的に働く酵素群の発現量が増加することが明らかとなった。実験期間を通して給餌量は一定に保たれていたことから、このような生理生化学的变化は、過食期における食物資源量の増加のみに起因するものではなく、季節的な代謝機構の調節により引き起こされることが示された。このようにクマは過食期において食物に含まれる炭水化物を効率良く肝臓で中性脂肪に変換することで VLDL(超低比重リポタンパク)として血中に放出し、一方白色脂肪組織においては VLDL に含まれる中性脂肪を回収するだけでなく脂肪酸合成を活発化させることにより、効率良く体脂肪を蓄積する仕組みを有することが示唆された。過食期におけるクマの体脂肪率は45%を超え、これはヒトでは重篤な臨床症状を伴う重度の肥満状態である。にも関わらず、血中の中性脂肪値は増加するどころかむしろ低下し、また肝臓においても脂肪の蓄積(脂肪肝)が生じる事はないことが確認された。今後さらにこの仕組みを調べることにより、ヒトにおける肥満の予防・改善に貢献しうるような成果に発展しうると期待できる。

### (2) 冬眠期における代謝機構の変化

血中エネルギー関連物質濃度を冬眠期(1・3月)と通常活動期(6月)で比較した結果、冬眠中も血糖値は一定に保たれていることが確認された。一方で中性脂肪や遊離脂肪酸、ケトン体濃度は軽度の上昇を示したことから、脂肪異化が亢進していることが示唆された。肝臓におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現量を比較解析した結果、冬眠期においては糖新生に關与する酵素群(ピルビン酸カルボキシラーゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ)や酸化に關連

する因子(脱共役タンパク質)が増加する一方で、解糖に關与する酵素群(グルコーストランスポーター・グルコキナーゼ・肝臟型ピルビン酸キナーゼ)や脂肪合成に關与する酵素群(アセチル CoA カルボキシラーゼ・脂肪酸合成酵素・アシル CoA ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ)タンパク質の異化に關与する遺伝子群(アラニンアミノトランスフェラーゼなど)の発現量が低下することが明らかとなった。白色脂肪組織においても同様に、解糖に關与する酵素群(グルコーストランスポーター・ヘキソキナーゼ)や脂肪合成に關与する酵素群(クエン酸リアーゼ・アセチル CoA カルボキシラーゼ・脂肪酸合成酵素・アシル CoA ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ)の発現量が低下していた。骨格筋においては、肝臟や脂肪組織に比べて変化は軽微であったものの、解糖に關与する酵素群(グルコーストランスポーター・筋肉型ピルビン酸キナーゼ)やタンパク質の異化に關与する遺伝子群(アラニンアミノトランスフェラーゼなど)の発現量が低下していることが明らかとなった。これらの結果より、冬眠中は各組織における主要なエネルギー源をグルコースから遊離脂肪酸・ケトン体に切り替えること(解糖の抑制・酸化の亢進)糖新生の材料としてはアミノ酸ではなく、中性脂肪の異化により生じるグリセロールを優先的に利用することで、骨格筋の異化を抑制していること、が示唆された。このように冬眠中はエネルギー産生器官である肝臟、エネルギー貯蓄器官である白色脂肪、そして最大のエネルギー消費器官である骨格筋が、協調してその代謝機構を変化させることで、長期の絶食期間を乗り切ることができるものと考えられた。

### (3) 妊娠が冬眠中の生理機構に与える影響

繁殖ステータスが如何にメスグマの冬眠生理機構に影響を与えるのかを明らかにするため、非妊娠個体・妊娠個体を用いて、冬眠中の体温変化および血中エネルギー代謝関連物質濃度の比較を行った。非妊娠個体における体温は冬眠の開始(11月末~12月頭)に伴い37度から33度程度へと低下した後、短期間の昇降を伴いながら推移し、3月末から4月頭にかけて上昇した。一方で妊娠個体の体温は着床(11月末~12月頭)から出産(1月末~2月頭)までの間、38度程度と高く維持されており、出産後は非妊娠個体と同程度まで急激に低下した。また妊娠中は、非妊娠個体に比べて血糖値が高く保たれていた。このことは、妊娠個体は胎子の發育環境を整えるために、さらなるエネルギー負担(産熱および糖新生)を強いられることを示している。今後は、プロジェステロンやプロラクチンなど妊娠・育子に關わる内分泌因子がどのように母体の代謝・産熱機構に影響を与えるのかという点について調べる必要が

あるだろう。

### (4) まとめ

以上のように、本研究によりこれまであまり知られてこなかったクマの冬眠前後の生理機構について、組織レベルでの代謝状態の変化を明らかにすることができた。クマは極度の飽食・肥満状態(過食期)と、絶食・不動化状態(冬眠期)という相反する生理状態を繰り返す動物である。今後本研究を継続・発展させることにより、もし他動物でもクマの冬眠中の代謝様式を再現することが可能になれば、安全かつ効率良くダイエットを行えるなど、ヒトにおける肥満の改善に大きく貢献できるのではないだろうか。また、糖質や脂質代謝の異常に起因する糖尿病やケトシスといった代謝性疾患の治療法の開発にも寄与できるだろう。このように本研究は、医学・獣医学分野に広く応用可能な研究基盤としてさらに発展可能であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Shimozuru, M., Kamine, A., and Tsubota, T. Changes in expression of hepatic genes involved in lipid metabolism during pre-hibernation period in captive adult female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Canadian Journal of Zoology*, 90 (8): 945-954, 2012, 査読有り

Shimozuru, M., Kamine, A., and Tsubota, T. Changes in expression of hepatic genes involved in energy metabolism during hibernation in captive, adult, female Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 163 (2): 254-261, 2012, 査読有り

Shimozuru, M., Iibuchi, R., Yoshimoto, T., Nagashima, A., Tanaka, J., and Tsubota, T. Pregnancy during hibernation in Japanese black bears: effects on body temperature and blood biochemical profiles. *Journal of Mammalogy*, 94 (3): 618-627, 2013, 査読有り

[学会発表](計4件)

Shimozuru, M., Kamine, A., and Tsubota, T., Changes in expression of hepatic genes involved in energy metabolism during the hibernation period in Japanese black bears. 20<sup>th</sup>

International Conference on Bear  
Research & Management, 19 July, 2011  
(Ottawa, Canada)

Tsubota, T., and Shimozuru, M., Body  
temperature and blood biochemical  
profiles during hibernation in the  
Japanese black bear. 14<sup>th</sup>  
International Hibernation Symposium,  
10 August, 2012 (Semmering, Austria)

Shimozuru, M., Nagashima, A., Kamine,  
A., and Tsubota, T., Seasonal change  
in expression of energy  
metabolism-related genes in the liver  
and white adipose tissue of captive,  
adult, female Japanese black bears.  
14<sup>th</sup> International Hibernation  
Symposium, 11 August, 2012( Semmering,  
Austria)

下鶴倫人、坪田敏男：妊娠ツキノワグ  
マにおける冬眠中の体温および血中代  
謝関連成分の変化、日本哺乳類学会 2012  
年 9 月 21 日 (相模原、神奈川)

〔その他〕

ホームページ

<http://wildlife.vetmed.hokudai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下鶴 倫人 (SHIMOZURU, Michito)

北海道大学大学院・獣医学研究科・准教授

研究者番号：50507168