

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05767

研究課題名(和文) 能動的低代謝の分子機構：冬眠様低代謝の誘導による休眠省エネ機構の解明

研究課題名(英文) The molecular mechanisms of active hypometabolism

研究代表者

砂川 玄志郎 (Sunagawa, Genshiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：70710250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の冬眠休眠実行の分子ネットワーク解明のために冬眠様低代謝を呈するマウスを用いて休眠の省エネ機構の原理解明を目指した。まず、冬眠様モデルマウスを用いて複数臓器において休眠時と正常時の遺伝子発現の差を観察し、休眠省エネ機構の制御に関連する遺伝子のリストアップを行った。これらの遺伝子が実際に因果性を持って休眠の省エネ機構に寄与しているかを検証するために、Qrfp(cre/+)マウスの受精卵にCas9タンパクとgRNAを直接導入し、該当する遺伝子KOマウスを作成し、休眠表現型を観察した。さらに、季節性の冬眠における該当遺伝子の重要性を検証するために遺伝子改変ハムスターの作製技術の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果の学術的意義は、冬眠様モデルマウスを用いることで、季節性の冬眠動物では実現が難しい低代謝だが体温は高い状態、すなわち「温かい冬眠状態」を研究対象にしたことである。このアプローチにより、今後、これまでの冬眠動物の研究からは見出すことができなかった、休眠の省エネ機構に注目した遺伝子などが見つかることが期待される。本研究は基礎研究であるため、社会的意義を直に見出すことは難しい。しかし、休眠省エネ機構の理解の先には、人間を含めた冬眠をしない動物を冬眠させることで臨床を高品位化し、実生活をより豊かにすることが見込まれているため、長い目で見たときに本研究は大きな社会的意義を持つ可能性は十分にある。

研究成果の概要(英文)：The goal of this project was to elucidate the principles of energy conservation mechanisms during hibernation using mice exhibiting hibernation-like states, aiming to decipher the molecular networks that enable mammals' hibernation. Firstly, using a hibernation-like model mouse, differences in gene expression during hibernation and under normal conditions were observed in multiple organs, and a list of genes related to the control of the hibernation energy-saving mechanism was compiled. Next, to verify whether these genes actually contribute causally to the energy-saving mechanism, Cas9 protein and gRNA were directly introduced into the fertilized eggs of Qrfp(cre/+) mice, and the relevant gene knockout (KO) mice were created to observe the hibernation-like state phenotype. Furthermore, in order to verify the importance of these relevant genes in seasonal hibernation, the development of gene modification techniques for hamsters was carried out.

研究分野：冬眠生物学

キーワード：冬眠 休眠 遺伝子改変ハムスター 低代謝耐性 低温耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の冬眠休眠実行の分子ネットワーク解明のために、本計画研究では冬眠様低代謝を呈するマウスを用いて哺乳類における休眠の省エネ機構の原理を解明する。

哺乳類は恒温性を有し、環境が変化をしても、個体の体温を 37℃前後に保つ機構が備わっている。ところが冬眠（数ヶ月）や日内休眠（数時間）では酸素消費量が正常状態に比べ著しく低下した「能動的低代謝」状態となり低体温に陥る。正常状態の哺乳類であれば、低代謝・低体温のいずれも組織障害をもたらすが、休眠状態の哺乳類では低代謝・低体温状態でも細胞が生存できる。すなわち、正常時と比べて必要な酸素が減少し、必要な温度が低下する「省エネ機構」が働いている。このような休眠がもつ省エネ機構は急性疾患の進行緩徐化や、臓器の効率的な保存法、あるいは全身麻酔の安全化など、現在の医療が抱える様々な問題を解決できる可能性がある。そこで、本研究では哺乳類の休眠で働く組織・細胞の省エネ機構の原理を解明することで休眠の臨床応用につなげたいと考えた。

2. 研究の目的

休眠中の動物がなぜ省エネ化できるのか、という問いに答えるために、日内休眠を呈する代表的な哺乳類であるマウスを用いて、省エネ機構にどのような分子が寄与するのか明らかにすることを目的と定めた。マウスは飢餓により日内休眠を誘導できる（飢餓性休眠: FIT, fasting-induced torpor）。砂川は 2016 年に FIT を再現良く誘導できる方法を確立した (Sunagawa & Takahashi, *Sci Rep*, 2016)。さらに最近、砂川らはマウスの視床下部の QRFP 陽性神経を特異的に興奮させると数日間という長期に渡る低代謝 (QIH: Q neuron-induced hypothermia) を誘導できることを示した (Takahashi et al., *Nature*, 2020)。この手法は休眠しないラットでも低代謝を誘導できるため、QIH は哺乳類に一般的に備わっている低代謝機構である可能性がある。QIH では体温セットポイントの低下が認められることから、FIT などの日内休眠よりも冬眠に近い冬眠様低代謝と言える。本課題ではマウス QIH をモデルに休眠の基本原則である制御された省エネ機構の分子ネットワークを明らかにし、冬眠の臨床応用に向けて知的基盤を整備することを目指した。

3. 研究の方法

まず、QIH や FIT を用いてマウスで自在に休眠状態を誘導できる強みを活かし、休眠状態にある動物の臓器をサンプリングし、オミックス解析を行い休眠省エネ制御分子を検索（目標①）する。次に、候補となった分子が、休眠の省エネ機構に及ぼす影響を遺伝子改変マウスと *in vitro* 代謝解析・機能解析を用いて、休眠省エネ制御分子を同定（目標②）する。最後にマウスの冬眠様低代謝モデルで見出した省エネ制御分子の機能を冬眠するシリアンハムスター（以下ハム）で検証し冬眠における省エネ制御分子の検証（目標③）を行う。

(1) 目標① 休眠省エネ制御分子の検索：省エネ機構の制御に関わる遺伝子を見出す。動物が受動的な低体温・低代謝に対して示す遺伝子発現と、能動的低代謝を実現する省エネ機構に特有の遺伝子発現をわけて評価するために、正常マウス、QIH 状態のマウス、受動的低代謝のマウス（全身麻酔をかけて体温コントロールが失われたマウス）の 3 群を外気温 20℃と 32℃にてサンプリングを行う。QIH 群で変化が見られた発現のうち、受動的低代謝によって低体温・低代謝となった群でも変化する遺伝子は除外したものを能動的低代謝に固有の変化として捉える。臓器は低酸素血症に弱い脳・腎臓に加えて冬眠動物でトランスクリプトームの報告がある肝臓を対象とする。

(2) 目標② 休眠省エネ制御分子の同定：省エネ制御分子の候補遺伝子を、高効率 CRISPR/Cas9 法を用いてマウス受精卵で KO を行い、迅速解析が可能な F0 マウス（10 週齢）で FIT や QIH の表現型を観察し休眠へ影響を及ぼす遺伝子・代謝経路を個体レベルでまず同定する。遺伝子改変動物のデザイン・作成は清成が担当する。なお、遺伝子 KO が致死性である場合は、コンディシ

ヨナル KO や下記の *in vitro* 系を用いる。次に、省エネ制御のメカニズムの詳細な解析は、siRNA や CRISPR/Cas9 系を用いて候補遺伝子の発現量を変化させた組織・細胞をフラックスアナライザーを用いて解糖系代謝と好気性代謝に変化が生じるか観察し、*in vivo* における表現型との相同性を検証する。砂川はマウスの ES 細胞から心筋や神経系を分化誘導する技術を有しており、心筋拍動や神経活動を *in vitro* で評価する。神経活動の評価は富永班と連携し電気生理解析を行う。これらに加え、省エネ制御分子の関わる経路を薬理的に摂動した際にも同様の解析を行い、細胞機能の可逆的省エネ化制御経路を同定する。

(3) 目標③ 冬眠における省エネ制御分子の検証： 休眠省エネ機構との関連が同定された遺伝子・代謝経路に対して、冬眠動物でこれらを摂動したときに冬眠表現型が変化することを確認する。現在、ハムの冬眠を誘導するための低温動物施設を建設中で 2020 年秋から稼働予定である。清成が投稿中であるマウス受精卵の特定の細胞周期に合わせて CRISPR/Cas9 を用いたマイクロインジェクションを行う事により高効率にノックインマウスを得る方法 (SPRINT-CRISPR 法) をハムへと応用し、ノックインハムを作製する。特にハムで QIH を誘導・検証するために *Qrfp* 遺伝子に *Cre* リコンビナーゼをノックインした動物を作成する。

4. 研究成果

(1) 休眠省エネ機構の制御に関連する遺伝子のリストアップ (砂川)

能動的低代謝を実現する省エネ機構の制御に関連する遺伝子を見つけるために、QIH 状態のマウスと正常状態のマウスの複数臓器における遺伝子発現の差を検出し、QIH 中に発現が上昇する遺伝子群は低代謝制御に関係する可能性があると考えた。ただし、QIH を 20 °C の環境温度で誘導すると体温が必ず 20 °C 台まで低下するため、低温ストレス応答遺伝子も検出されることが明らかである。この県級では低温に応答する遺伝子ではなく、低代謝に備えるための遺伝子を検出したい。そこで、環境温度を 32 °C に保った環境で QIH を誘導すると、酸素消費量は正常時よりも低下しながら、体温が 35°C 前後に保たれることを利用し、低代謝は誘導されているが、低体温は呈していない状態でも同様の遺伝子発現を比較し、両環境温度下で複数臓器にわたって遺伝子発現が上昇した遺伝子を低代謝制御遺伝子の候補とした。QIH は CNO を腹腔内投与するため、CNO による影響を免れない。そこで、比較対象となる正常群は QIH 誘導可能なマウスに生理食塩水を投与した群と、CNO を投与しても QIH を誘導できない群の両者を 1 つの対照群として暑かった。上記の条件下にて 31 匹のマウスから肝臓、腎臓、脳を合計 89 検体採取し、トランスクリプトームを読んだところ、各臓器において、環境温度に関係なく遺伝子発現が QIH と正常群で異なるクラスターを形成することがわかった。3 臓器・2 環境温度という異なる 6 つの比較条件の中で全てに共通して発現が上昇した遺伝子 29 個を候補遺伝子とし、次に、これらを用いて休眠表現型との因果性を検証した (図 1)。

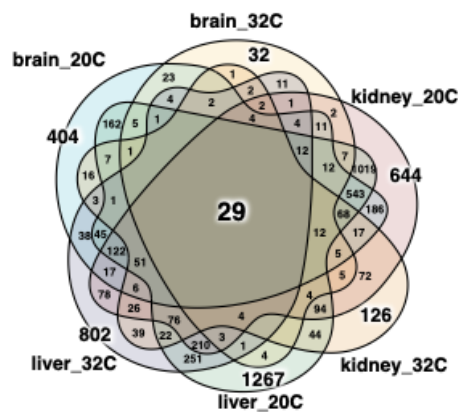


図 1 複数臓器・複数環境温度における QIH 中のトランスクリプトーム解析により 29 遺伝子の発現が常に上昇していることがわかった。

(2) 低代謝制御関連遺伝子の候補と休眠表現型の因果性の検証 (砂川・清成)

清成が *Qrfp(cre/+)* マウスの受精卵に Cas9 タンパクと gRNA を直接導入し、該当する遺伝子が破壊された *Qrfp(cre/+)* マウスを産出した。砂川が同マウスの視床下部に AAV9-hSyn-DIO-hM3Dq を感染させ、任意の遺伝子が KO された QIH 可能なマウスを作出した。29 個の低代謝制御関連遺伝子の候補について、各遺伝子 100 受精卵ずつ KO マウスを作出を試み、産出されたマウスは 4 週齢までに遺伝型解析を行った。両アレルとも該当遺伝子の破壊が確認された個体について、8 週齢で飢餓誘導性休眠の表現型解析を行い、その後、脳に AAV を投与し、12 週以降に

QIH の表現型解析を行った。表現型解析後に脳切片を作成し、AAV の感染が不十分なマウスは解析から除外した (図 2)。現在、候補となっている 29 遺伝子を順次検証しており、16 番目の遺伝子まで飢餓性休眠と QIH の 1 次スクリーニングが完了している。

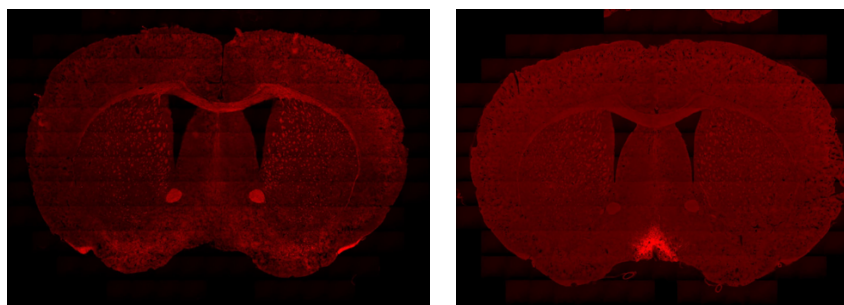


図 2 視床下部における AAV 感染エリアの確認

休眠表現型の変化が遺伝子導入の違いではないことを脳切片を観察することで行っている。左はマウスは QIH の表現型が弱かったが、AAV の感染が不十分なため、解析から除外した。右は十分に AAV が感染した例。

(3) 遺伝子改変ハムスターの作製技術の開発 (清成)

ハムスターの着床前の初期胚は、室内灯や顕微鏡等の人工光に晒されることでその発生が停止してしまうことから、生体外での胚の取扱いが難しい。従って遺伝子改変ハムスターの作製には生体外に初期胚を取り出すことなく遺伝子改変を可能とする GONAD 法が有効とされる。しかしながら、当該方法では、遺伝子ノックアウトやオリゴなどの小さな DNA の挿入は可能であるものの、GFP レポーターなど大きな遺伝子を挿入することはできず、生体外胚操作を伴うマイクロインジェクション法に頼らざるを得ない。そこで、本研究課題においては、まず生体外におけるハムスター初期胚操作基盤技術開発に取り組んだ。人工光 (特に低波長) を避けるため、操作室内に暗室を準備し、また、使用する顕微鏡類全ての光源に赤色フィルターを用い、本環境下において妊娠ハムスターより安定的に受精卵を得ることに成功した。また、採卵時およびその他胚操作時に使用する培地の開発にも取り組み、前核期胚から胚盤胞期胚まで、比較的高率に発生できる条件を確立することができた。更には、マイクロインジェクションおよび胚移植技術の確立により遺伝子改変ハムスター作製における一連の技術開発の確立に成功した。そこで、他の動物種

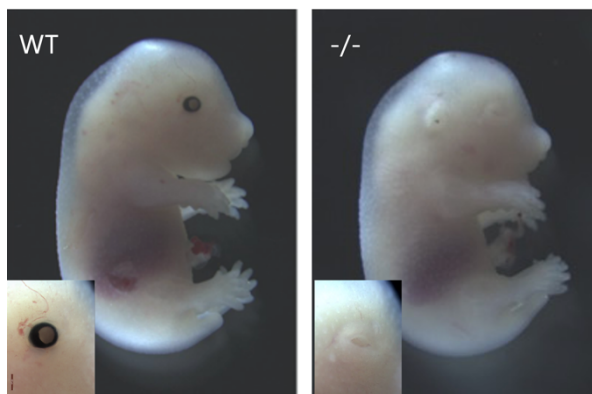


図 3 チロシナーゼ遺伝子ノックアウトが成功したハムスターの胎児

においてゲノム編集効率の評価によく使用されるチロシナーゼ遺伝子座をターゲットとする遺伝子ノックアウトハムスターの作製を試みた。結果、両染色体上のチロシナーゼ遺伝子座への変異導入を示す目のメラニン色素欠乏を伴う胎仔が得られた (図 3)。本研究成果により、今後、冬眠動物であるハムスターにおける低温耐性・低代謝耐性関連分子の検証に大きな発展をもたらすことが期待される。

(4) ハムスター冬眠施設の整備 (砂川・清成)

本研究においてマウス QIH の解析によって同定される省エネ制御分子は、あくまでも本来冬眠をしないマウスにてみつかるとは限らない遺伝子である。したがって、実際に冬眠する動物において同遺伝子が冬眠にどのような影響を及ぼすか検証することが重要である。そこで、今後、作出される遺伝子改変ハムスターの冬眠表現型を解析するために、常時 4 °C に保たれる低温動物室を整備し、ハムスターの冬眠を試みた。現時点で低温動物室に導入されたハムスターの半年以内の冬眠誘導率が約 30% にとどまっており、今後、条件検討を重ねて改善を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 砂川玄志郎	4. 巻 6
2. 論文標題 休眠とその医学応用可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 978-981
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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 Can torpor delay disease progression?
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 Can torpor delay disease progression?
3. 学会等名 第44回 分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 人工冬眠へ向けて；非冬眠動物における冬眠様状態の誘導
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第35回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 The physiological aspects of Q neurons-induced hypometabolism (QIH)
3. 学会等名 The 16th International Hibernation Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 A hibernation-like condition in mice: the physiological aspects of Q neurons-induced hypometabolism.
3. 学会等名 第43回 分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 冷たいことには理由がある ~冬眠から考える人類の未来~
3. 学会等名 日本神経科学大会 市民公開パネルディスカッション「2050年の脳科学と社会」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂川 玄志郎
2. 発表標題 A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents
3. 学会等名 Hibernation Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究 分担者	清成 寛 (Kiyonari Hiroshi) (40721048)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	

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
---------	---------