

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2021～2022

課題番号：20KK0355

研究課題名（和文）クマの冬眠における体内時計を介した代謝抑制機構の解明

研究課題名（英文）Understanding how bear serum slows down biological clock and metabolism for energy saving in skeletal muscle

研究代表者

中尾 玲子（NAKAO, Reiko）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：20582696

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,900,000円

渡航期間： 18ヶ月

研究成果の概要（和文）：冬眠動物の骨格筋におけるエネルギー代謝の適応メカニズムを明らかにすることを目的として、スウェーデンに生息する野生のヒグマから夏、または冬眠中に採取した血清を、C2C12マウス筋管細胞の培地に添加し酸素消費量を測定した。糖質を基質とした呼吸による酸素消費量は冬眠クマ血清添加により減少したが、脂肪酸を用いた呼吸には血清の影響は見られなかった。また、冬眠クマ血清は、骨格筋における時計遺伝子Per2発現の振幅を増大させ、位相を前進させた。冬眠中のクマ血清には、骨格筋の糖代謝を抑制し、体内貯蔵栄養素を節約する作用があること、体内時計機構の修飾が冬眠中の代謝制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、冬眠中のクマの血清に、骨格筋を始めとした末梢組織における体内時計の機能を改善し、無駄なエネルギー消費を抑制する成分が含まれる可能性があることを示すものである。近年、運動不足やバランスの悪い食事だけでなく、夜型生活や睡眠障害といった生体リズムの乱れが筋萎縮や代謝異常のリスク要因であると考えられるようになってきている。本研究の成果はこれらの疾患の予防・改善法開発のための新規ターゲット分子探索のみならず、臓器移植や救急搬送、長期宇宙フライトなどにおける人工的な低代謝の誘導法を開発するための糸口となり得る。

研究成果の概要（英文）：Hibernating brown bears do not develop muscle atrophy or debilitation although they stay torpid for 5-7 months without eating. The host lab in France has already shown that serum from hibernating brown bear could ameliorate protein degradation in human cultured myotubes. On the other hand, disruption of circadian rhythm in activity and clock gene expression is suggested to relate to the onset of excess muscle catabolism. However, potential effect of bear serum on circadian aspects have not been explored yet. In this study, I found that cells cultured with winter bear serum showed lower oxygen consumption induced by carbohydrate substrates compared with that in cells cultured with summer bear serum. The winter serum also had the effect on modulating circadian rhythm in mouse skeletal muscle, but not in master circadian clock, SCN. There results imply the potential of bear serum to improve metabolic efficiency via driving circadian rhythm in skeletal muscle.

研究分野：栄養学

キーワード：体内時計 骨格筋

## 1. 研究開始当初の背景

リス、ハムスター、クマなど一部の哺乳類は、低温環境や飢餓といった極限状態を、全身性の低代謝とそれに伴う低体温を誘導することで消費エネルギーを節約して乗り切ることができる。この積極的な低代謝・低体温は冬眠、休眠と呼ばれる。これらの動物では、冬眠・休眠中の低体温による組織傷害、不活動状態・絶食による廃用症候群や衰弱が観察されない。冬眠・休眠に対する各組織の適応メカニズムの解明は、ヒトの医学応用への可能性が期待される。

冬眠する哺乳類の中で最も大型であると言われるクマの冬眠は、リスやハムスター等の小動物の冬眠とは異なる特徴を呈する。夏期にはいずれの動物の体温も約 37 に維持されているが、冬眠中の小動物の体温は、4~10 程度にまで低下する。一方、30~34 の体温を維持したまま冬眠するのがクマの特徴である (Ruby J Biol Rhythms 2003, Geiser et al. Annu Rev Physiol 2004, Ruf & Geiser Biol Rev 2015, Tøien et al. Science 2011)。30 という体温は体内の酵素活性を抑制するには高すぎるため、代謝反応の進行により体内に貯蔵した栄養素を無駄に消費してしまう可能性がある。しかしながら冬眠中のクマの酸素消費量は夏期の 25% にまで抑制されており (Tøien et al. Science 2011)、小動物と同程度の酸素消費量の減少率を示すため、小動物よりも積極的に代謝を抑制するための何らかの仕組みが存在すると考えられる。

地球上のほぼ全ての生物には体内時計が存在する。体内時計は内因性の自律振動体であり、外部からの光、食事摂取などの刺激やその周期に適應する性質を持つため、生物の行動、睡眠覚醒、エネルギー代謝、体温、ホルモン分泌など様々な生理機能の周期を約 24 時間に制御することができる。体内時計の中樞は視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在し、そこに発現する時計遺伝子の相互転写制御 (フィードバックループ) とその下流の分子の日周発現が体内時計の分子メカニズムである。時計遺伝子は骨格筋にも発現し、活動開始時間帯にグルコースを優先してエネルギー基質として選択し、食事から摂取した栄養素を効率的に利用することで骨格筋の代謝能や筋量を維持すると考えられている (Dyar et al. Mol Metab 2015, Hodge et al. Skeletal Muscle 2015, Dyar et al. PLoS Biol 2018)。一方、体内時計の中樞である SCN を除去したハムスターでは、冬眠中に著しい体重減少が起こるため、冬眠中も体内時計が無駄な代謝の抑制 (エネルギー利用効率の向上) に寄与すると考えられる (Ruby J Biol Rhythms 2003)。冬眠中のクマでは巣穴での寝返り等のわずかな自発活動が概日リズムを示すこと、飼育施設で冬眠させたクマに光照射を行うと活動時間帯がシフトすることを示す報告があり (Jansen et al. Front Zool 2016, Ware et al. J Biol Rhythms 2020)、冬眠中もクマの体内時計は約 24 時間周期で機能し、光に対する応答も維持していると考えられている。また、冬眠中のクマの筋量維持機構を調べた研究では、筋萎縮モデルとして汎用される坐骨神経切除術を夏期のクマに施すと、11 週間後には筋量が約 60% 減少したが、冬眠中のクマの坐骨神経を切除しても約 20% の減少に止まったことが示された (Lin et al. J Exp Biol 2012)。この結果は冬眠中の筋機能維持に神経入力とは必須ではなく、液性因子による何らかの筋機能保護機構が存在する可能性を示すものである。

## 2. 研究の目的

上記の先行研究より、冬眠中のクマの血中には末梢筋時計の制御を介して貯蔵エネルギーの無駄な消費を抑制し、骨格筋の異化を防ぐために作用する分子が存在するのではないかと考えた。そこで本研究では、冬眠中のクマの血清が骨格筋における代謝効率を向上させること、冬眠中のクマ血清には体内時計機構を制御する分子が含まれること、以上の 2 つの仮説を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) クマ血清の採取

スカンジナビア半島におけるヒグマの生態研究チーム (Scandinavian Brown Bear Research Project) に所属する獣医師の管理の下、スウェーデン中部に生息する 2~3 年 (亜成体期) の野生のヒグマを 6 月 (夏・活動期) 及び 2 月 (冬眠期) に捕獲し、麻酔下にて頸静脈から血液を採取した。夏と冬の個体は同一個体を用いた。分離した血清は解析まで -80 で保存した。

### (2) ミトコンドリア呼吸能の測定

C2C12 筋管細胞を、夏、または冬のクマ血清を 5% 濃度で含む培地にて 48 時間培養した。トリプシン処理により剥離した  $8 \times 10^5$  個の細胞を呼吸能測定装置 (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments) のチャンパーに入れ、 $8 \mu\text{g/mL}$  サポニンで膜透過処理を行ってから、下記に示すミトコンドリアの基質、阻害剤を順に添加しながら酸素消費量を測定した。

ステップ①. ピルビン酸とリンゴ酸 (クエン酸回路の基質)、またはパルミトイルカルニチンとオクタノイルカルニチン ( $\beta$ 酸化基質) の存在下で、Complex I のプロトンリークによる酸素消費量を測定

ステップ②. ADP (Complex V の基質)、グルタミン酸添加により、Complex I の酸化的リン酸化による酸素消費量を測定

ステップ③. コハク酸添加により、Complex I+II の酸化的リン酸化による酸素消費量を測定

ステップ④. FCCP (プロトンを強制的にミトコンドリア内に透過させる脱共役剤) 添加により、Complex I+II を促進、電子伝達系が最大となる際の酸素消費量を測定

ステップ⑤ .ロテノン添加により Complex I を阻害した状態で、電子伝達系が最大となるときの酸素消費量を測定

測定後の細胞を用いて測定したタンパク質量の値により、酸素消費量の値を補正した。

### (3) マウス骨格筋における体内時計遺伝子に対する冬眠クマ血清の効果

体内時計の評価には *Per2-Luciferase* ノックイン (*Per2-Luc*) マウスを用いた。*Per2-Luc* マウスは、時計遺伝子の一つである PERIOD2 にルシフェラーゼが融合したタンパク質を全身に発現するマウスである (Yoo et al. PNAS 2004)。このマウスから採取した組織を培養しながら、時計遺伝子の発現量を発光量としてリアルタイムでモニターすることができる。*Per2-Luc* マウスからヒラメ筋、体内時計の中核である視交叉上核 (SCN) を採取し、5%夏または冬クマ血清を含む培地で 5 日間、37 °C で培養しながら LumiCycle (ActiMetrix) を用いて発光量を測定した。対照には、組織培養に汎用される牛胎児血清 (FBS) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) マウス筋細胞のエネルギー代謝に対するクマ血清の効果

夏、または冬に採取したクマの血清が骨格筋のエネルギー代謝に及ぼす影響を調べるために、クマ血清を添加した培地で培養した C2C12 筋管細胞を用いてミトコンドリア呼吸能を測定した。脂肪酸を呼吸基質として添加したときには、夏、冬クマ血清の効果に違いは見られなかった (図 1. 左)。一方、解糖系代謝産物であるピルビン酸及びリンゴ酸、さらに ADP、コハク酸を呼吸基質として添加すると、Complex I+II による酸化的リン酸化がもたらす酸素消費が冬クマ血清培養細胞で低値を示した (図 1. 右 ステップ ②)。ステップ②で測定した Complex I 由来の酸素消費量、及びステップ④、⑤で測定した最大酸素摂取量はクマ血清の影響を受けなかった。これらの結果から、冬クマ血清は、ミトコンドリアの最大呼吸能を維持したまま Complex II のコハク酸に対する活性を低下させることが示唆された。

夏、及び冬眠中に採取したヒグマの筋生検試料を解析した先行研究では、冬眠中の骨格筋ミトコンドリアの呼吸鎖複合体の活性が夏より低下したものの、これは骨格筋あたりのミトコンドリアの数の減少によるものであり、相対的なミトコンドリアの活性は冬眠中でも維持されることを報告している。一方で、冬眠中の骨格筋グリコーゲン含量が夏よりも高値を示したため、冬眠中のエネルギー基質を糖質から脂質へシフトすることで緊急時のエネルギー源としてグリコーゲンを維持する機構の存在が示唆されている (Chazarin et al. Front Zool 2019)。本研究では、冬眠クマ血清は筋細胞の酸素消費量を大きく抑制することはなかったが、糖質を基質として添加したときの筋細胞の応答、特に Complex II の活性を減弱させる傾向が見られた。冬眠クマ血清には骨格筋を標的として、好氣的解糖を抑制する液性因子が含まれる可能性があり、当該成分の同定、Complex II に対する作用点の解明が必要である。

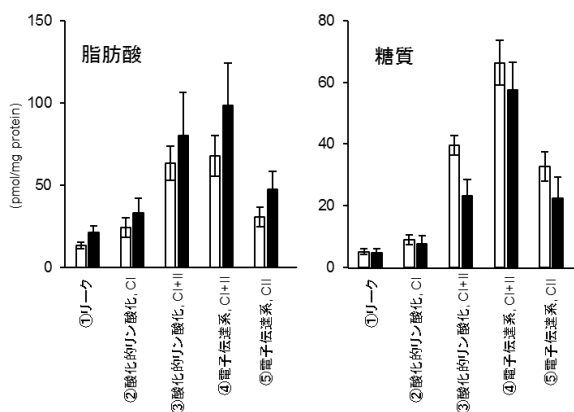


図1. 膜透過処理を行ったC2C12筋管細胞における酸素消費量

### (2) マウス骨格筋における体内時計遺伝子に対する冬眠クマ血清の効果

*Per2-Luc* マウスから抽出したヒラメ筋、視交叉上核における発光の周期、振幅、頂点位相は、LumiCycle Analysis ソフトウェアを用いて解析を行った (図 2)。夏、または冬に採取したクマの血清を含む培地でヒラメ筋を培養すると、いずれの季節の血清も頂点位相を前進させる効果が見られた。発光の概日リズムの振幅は、対照である FBS での培養と比較して夏クマ血清で 2.3 倍、冬クマ血清で 3.5 倍に増大した。周期には群間で差が見られず、いずれの

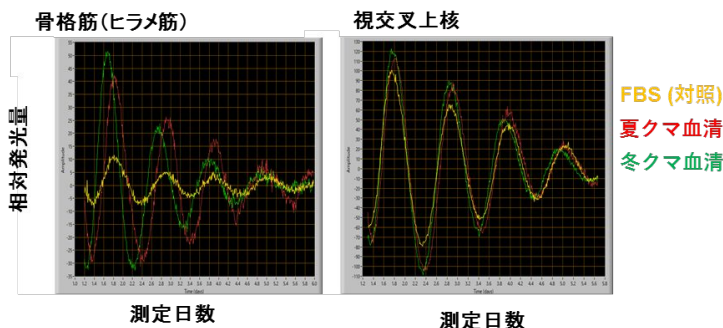


図2. クマ血清存在下で培養した*Per2-Luc*マウス組織由来の発光量

血清でも約 25 時間であった。一方、夏・冬いずれのクマ血清も視交叉上核における *Per2* 由来発光リズムのパラメーターには影響を及ぼさなかった。これらの結果から、クマの血中には骨格筋を含む末梢組織を標的として、体内時計を修飾する分子が存在すること、その機能は特に冬の血清において強く発揮されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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			
フランス	ストラスブール大学			