

冬眠生物学

～哺乳類の低代謝・低体温による生存戦略

領域番号:20B303

令和2年度～令和4年度

科学研究費助成事業(科学研究費補助金)

(学術変革領域研究(B))

研究成果報告書

令和5年5月

領域代表者 山口 良文

北海道大学・低温科学研究所・教授

領域の狙い

哺乳類の冬眠は、古くから現象として知られているにも関わらず、その生理機構の多くは未解明な魅惑的な現象である。哺乳類の多くは寒冷下でも体温を 37°C 付近に維持し活動が可能だが、これは体内で熱産生を行い体温を一定に保つ恒温性を有するためである。しかし、熱産生のエネルギー源である食料が枯渇し寒冷に見舞われる季節には、体温維持のためのエネルギーコストが問題となる。こうした寒冷・飢餓などの危機的環境下において、積極的に熱産生と代謝を抑制し消費エネルギーを削減し、通常の恒温性から逸脱した低体温となった状態で生き延びる現象を、休眠 (Torpor) と呼ぶ。この休眠が数ヶ月に渡り繰り返され厳しい季節を乗り越える現象が、冬眠 (Hibernation) である。ヒトはこうした冬眠・休眠は行えないが、冬眠・休眠現象自体は霊長類を含めた哺乳類で幅広く観察されることから、哺乳類が普遍的に備える恒温性機構のわずかな変更で冬眠・休眠状態が誘導されるとも考えられる。しかし、分子機構の手がかりや研究の方法論において、冬眠する哺乳類 (以降、本報告書では冬眠動物と記載) の解析には多くの困難があるため、冬眠・休眠の制御機構は未だほとんど不明である。本学術変革領域研究 B「冬眠生物学」では、分子機構・研究方法論いずれの側面からも突破口を得ることにより、哺乳類の冬眠・休眠の理解に向けた新しい一步を踏み出すことを狙った。

研究組織

計画研究

領域代表者 山口 良文 (北海道大学・低温科学研究所・教授)

(総括班)

研究代表者 山口 良文 (北海道大学・低温科学研究所・教授)

(A01:山口班)

研究代表者 山口 良文 (北海道大学・低温科学研究所・教授)

研究分担者 渡邊 正知 (福山大学・薬学部・准教授)

(A02:砂川班)

研究代表者 砂川 玄志郎 (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)

研究分担者 清成 寛 (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)

(A03:富永班)

研究代表者 富永 真琴 (自然科学研究機構・生命創成探究センター・教授)

(A04:榎木班)

研究代表者 榎木 亮介 (自然科学研究機構・生命創成探究センター・准教授)

研究分担者 金 尚宏 (名古屋大学・農学部・特任講師)

交付決定額 (配分額)

(単位：千円)

	合計	直接経費	間接経費
令和2年度	56,030	43,100	12,930
令和3年度	51,350	39,500	11,850
令和4年度	51,350	39,500	11,850
総計	158,730	122,100	36,630

研究発表

雑誌論文 (査読有)

- 1) Feng X, Takayama Y, Ohno N, Kanda H, Dai Y, Sokabe T, Tominaga M. Increased TRPV4 expression in non-myelinating Schwann cells is associated with demyelination after sciatic nerve injury. *Commun Biol.* 3 (1): 716, 2020.
- 2) Anegawa D, Sugiura Y, Matsuoka Y, Sone M, Shichiri M, Otsuka R, Ishida N, Yamada KI, Suematsu M, Miura M, Yamaguchi Y. Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived α -tocopherol. *Commun Biol.* 4(1):796. doi: 10.1038/s42003-021-02297-6, 2021.
- 3) Nguyen THD, Itoh GS, Okumura H, Tominaga M. Structural basis for promiscuous action of monoterpenes on TRP channels. *Commun Biol.* 4 (1): 293, 2021.
- 4) Nishimoto R, Derouiche S, Eto K, Deveci A, Kashio M, Kimori Y, Matsuoka Y, Morimatsu H, Nabekura J, Tominaga M. Thermosensitive TRPV4 channels mediate temperature-dependent microglia movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118 (17): e2012894118, 2021.
- 5) Maejima T, Tsuno Y, Miyazaki S, Tsuneoka Y, Hasegawa E, Islam MT, Enoki R, Nakamura TJ, Mieda M. GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 118 (6): e2010168118, 2021.
- 6) Kon N, Wang HT, Kato YS, Uemoto K, Kawamoto N, Kawasaki K, Enoki R, Kurosawa G, Nakane T, Sugiyama Y, Tagashira H, Endo M, Iwasaki H, Iwamoto T, Kume K, Fukada Y. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger mediates cold Ca^{2+} signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms. *Sci Adv.* 7 (18): eabe8132, 2021.
- 7) Zhang M, Kobayashi K, Atsumi H, Katada Y, Nakane Y, Chen J, Nagano R, Kadofusa N, Nishiwaki-Ohkawa T, Kon N, Hirota T, Sato A, Makino T, Yoshimura T. Modulation of circadian clock by crude drug extracts used in Japanese Kampo medicine. *Sci Rep.* 11 (1): 21038, 2021.
- 8) Yoshimatsu S, Yamazaki A, Edamura K, Koushige Y, Shibuya H, Qian E, Sato T, Okahara J, Kishi N, Noce T, Yamaguchi Y, Okano H. Step-by-step protocols for non-viral derivation of transgene-free induced pluripotent stem cells from somatic fibroblasts of multiple mammalian species. *Dev Growth Differ.* 64(6):325-341, 2022.
- 9) Derouiche S, Li T, Sakai Y, Uta D, Aoyagi S, Tominaga M. Inhibition of TRPV1 and

- TRPA1 by mosquito and mouse saliva. *Pain* 163 (2): 299–307, 2022.
- 10) Ujisawa T, Sasajima S, Kashio M, Tominaga M. Thermal Gradient Ring Reveals Different Temperature-dependent Behaviors in Mice Lacking Thermosensitive TRP Channels. *J. Physiol. Sci.* 72: 11, 2022.
 - 11) Sasajima S, Kondo M, Ohno N, Ujisawa T, Motegi M, Hayami T, Asano S, Asano-Hayami E, Nakai-Shimoda H, Inoue R, Yamada Y, Miura-Yura E, Morishita Y, Himeno T, Tsunekawa S, Kato Y, Nakamura J, Kamiya H, Tominaga M. Thermal Gradient Ring Reveals Thermosensory Changes in Diabetic Peripheral Neuropathy in Mice. *Sci. Rep.* 12: 9724, 2022.
 - 12) Nguyen THD, Chapman S, Kashio M, Saito C, Strom T, Yasui M, Tominaga M. Single amino acids set apparent temperature thresholds for heat-evoked activation of mosquito transient receptor potential channel TRPA1. *J. Biol. Chem.* 102271, 2022.
 - 13) Kashio M, Masubuchi S and Tominaga M. Protein kinase C-mediated phosphorylation of transient receptor potential melastatin type 2 Thr738 counteracts the effect of cytosolic Ca²⁺ and elevates the temperature threshold. *J Physiol.* 600(19):4287–4302, 2022.
 - 14) Chang CP, Otomo K, Kozawa Y, Ishii H, Yamasaki M, Watanabe M, Sato S, Enoki R, Nemoto T. Single-scan volumetric imaging throughout thick tissue specimens by one-touch installable light-needle creating device. *Sci Rep.* 12 (1): 10468, 2022.
 - 15) Wang HT, Miyairi S, Kitamura M, Iizuka K, Asano Y, Yoshimura T, Kon N. Real time monitoring of cold Ca²⁺ dependent transcription and its modulation by NCX inhibitors. *Sci Rep.* 12 (1): 17325, 2022.
 - 16) Enoki R, Kon N, Shimizu K, Kobayashi K, Yamaguchi Y, Nemoto T. Cold-induced Suspension and Resetting of Ca²⁺ and Transcriptional Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *Biorxiv* , 2022.
 - 17) Yamanoi Y, **Lei** J, Takayama Y, Hosogi S, Marunaka Y, Tominaga M. TRPV3-AN01 interaction positively regulates wound healing in keratinocytes. *Commun Biol.* 6: 88, 2023.
 - 18) Ono D, Wang H, Hung CJ, Wang HT, Kon N, Yamanaka A, Li Y, Sugiyama T. Network-driven intracellular cAMP coordinates circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Sci Adv.* 9 (1): eabq70329, 2023

日本語総説 (著者、タイトル、雑誌名、号数、ページ、発行年月日)

- 1) 富永真琴, 辛いのを英語で hot と言うのはなぜですか?, *Clinical Neuroscience*, 38 (11): 1481, 2020 年
- 2) 砂川玄志郎、櫻井武, 休眠の科学, *時間生物学*, Vol. 27, No. 1, 2021 年
- 3) 砂川玄志郎, 人間は冬眠できるのか?, *生体の科学*, 72: 2, 181-186, 金原一郎記念医学医療振興財団, 2021 年
- 4) 砂川玄志郎, 能動的低代謝の臨床応用を目指して, 月刊「細胞」, 50:460-463, 株式会社北隆館, 2021 年
- 5) 富永真琴, 温度生物学研究の今, *細胞 The CELL*, 53 ; (4): 2-3, 2021 年
- 6) 富永真琴, 温度感受性 TRP チャネルと生理機能, *細胞 The CELL*, 53 (4): 4-7, 2021 年
- 7) 富永真琴, 物理刺激受容のメカニズムの解明 -2021 年ノーベル生理学・医学賞によせて-, *医学のあゆみ*, 279 (9): 912-915, 2021 年
- 8) 富永真琴, 2021 年ノーベル生理学・医学賞 温度と触刺激の受容体の発見, *現代化学*, 609 (12): 35-37, 2021 年
- 9) 富永真琴, 温度・機械刺激の受容体「TRP/PIEZO」発見の軌跡, *実験医学*, 39 (19) :3033-3035, 2021 年
- 10) 中川 哲、山口 良文, 冬眠モデル哺乳類としてのゴールデンハムスター, *LABIO21*, 85: 5-8, 2022 年
- 11) 山口 良文, 冬眠する哺乳類に学ぶ一代謝変化により飢餓・寒冷を乗り切る仕組み(前編), *臨床栄養*, 139(5): 628-632, 2022 年
- 12) 山口 良文, 冬眠する哺乳類に学ぶ一代謝変化により飢餓・寒冷を乗り切る仕組み(後編) *臨床栄養*, 139(6): 748-752, 2022 年
- 13) 山口良文, 蛍光タンパク質レポーターを利用した細胞死イメージング, *医学のあゆみ*, 283(5): 23451-23454, 2022 年
- 14) 砂川玄志郎, 代謝の能動的制御—冬眠と日内休眠, *実験医学*, 2022 年 12 月号, Vol. 40, No. 19, 羊土社, 2022 年
- 15) 富永真琴, 2021 年ノーベル生理学医学賞によせて, *生物の科学 遺伝*, 76 (1), 002-004, 2022 年
- 16) 富永真琴, 温度受容体と機械刺激受容体の発見, *科学 (岩波書店)*, 92 (2): 114-118, 2022 年
- 17) 富永真琴, 温度感受性 TRP チャネル, *生化学*, 94 (2): 236-257, 2022 年
- 18) 富永真琴, David Julius, Ardem Patapoutrian (2021), 温度と触覚の受容体の発見, *CLINICAL NEUROSCIENCE*, 40 (8): 1025-1027, 2022 年
- 19) 榎木 亮介, 哺乳類の概日時計中枢におけるカルシウムリズム, *生物物理*, 62:228-231, 2022年8月
- 20) 山内 彩加林、山口 良文, 冬眠する哺乳類と変温動物の低温適応機構, *BIO Clinica*, 38(4):

505(6-10), 2023年3月20日

- 21) 曾根 正光、山口 良文, 冬眠哺乳類の細胞はいかにして低温ストレスに対処するか?, 低温科学 81: 159-172, 2023年10.14943/lowtemsci.81.159, 2023年3月20日
- 22) 金 尚宏、榎木 亮介, 概日時計の温度補償性と Ca^{2+} シグナルの役割, 低温科学 81: 109-117, 2023年3月20日
- 23) 渡邊正知、田村豊, シリアンハムスターの冬眠を制御する中枢神経機構, 低温科学 81:149-158, 2023年3月20日
- 24) 金 尚宏、小野 大輔, 『時計遺伝子』脳科学辞典, 2023年5月7日
- 25) Naohiro Kon、Ryosuke Enoki、Hsin-tzu Wang、Takahiro Iwamoto and Yoshitaka Fukada, Roles of Ca^{2+} Signaling in Molecular Clocks. Circadian Clocks (Ken-ichi Honma & Sato Honma eds.), Hokkaido University Press (in press).

学会発表 (発表者名、タイトル、学会名、場所、年月日)

- 1) 山口 良文, 冬眠する哺乳類が示す低温誘導性細胞死への耐性, 第一回細胞死コロキウム, 2020年11月10-11日
- 2) Yoshifumi Yamaguchi, Hibernator's hepatic cold resistance requires a diet-derived nutrient, The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, Japan (国際学会), 2020年12月3日
- 3) Genshiro A. Sunagawa, A hibernation-like condition in mice: the physiological aspects of Q neurons-induced hypometabolism, 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, Japan, 2020年12月3日
- 4) Naohiro Kon, Calcium Clock: Mechanism of Circadian Oscillator and. Environmental. Responses of Life., 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所セミナー, 名古屋, 2020年12月18日
- 5) 田中優太、門田麻由子、渡邊正知、田村豊, 虚血性脳障害における SUMO 化修飾を介した血液脳関門の低体温誘導保護作用, 第94回日本薬理学会年会, 札幌, 2021年3月8-10日
- 6) 榎木 亮介, Visualizing Neuronal Circuits Controlling Circadian and. Ultradian Ca^{2+} Rhythms in Mammals, 第10回 生理研—霊長研—新潟脳研 合同シンポジウム, 2021年3月13日
- 7) 田中優太、門田麻由子、渡邊正知、田村豊, 虚血性脳障害に対する低体温誘導 SUMO 化修飾によるマトリックスメタロプロテアーゼの活性抑制を介した血液脳関門の保護作用, 日本薬学会第141年会, 広島, 2021年3月26-29日
- 8) 原田涼平、門田麻由子、木村駿、田中優太、渡邊正知、田村豊, 遅発性神経細胞死に対する

- SUMO 化修飾によるミトコンドリアの断片化の抑制を介した低体温誘導脳保護効果, 日本薬学会第 141 年会, 広島, 2021 年 3 月 26-29 日
- 9) 山口良文, 冬眠する哺乳類シリアンハムスターが冬眠時に示す骨格筋変化, 日本体力医学学会(招待講演), 2021 年 5 月 14 日
- 10) 山口良文, 冬眠する哺乳類シリアンハムスターを用いた冬眠機構へのアプローチ, 日本実験動物学会総会(招待講演), 2021 年 5 月 19 日
- 11) 山口良文, 冬眠動物が示す低温誘導性フェロプトーシス様細胞死への耐性, 日本酸化ストレス学会(招待講演), 2021 年 5 月 20 日
- 12) 富永 真琴, 温度感受性 TRP チャネルを介した温度感知機構と生理的意義に関する研究, 第 58 回日本伝熱シンポジウム, オンライン, 2021 年 5 月 25 日
- 13) 金 尚宏, 表出リズムの温度補償性, 名古屋リズム研究会, 名古屋, 2021年6月11日
- 14) 山口良文, 冬眠する哺乳類シリアンハムスターのフェロプトーシス様低温誘導性細胞死への耐性とそのビタミンE依存性, 日本Cell Death学会(招待講演), 2021年年7月26日
- 15) Yoshifumi Yamaguchi, Hepatic cold resistance depends on the effective retention of Vitamin E in Syrian hamsters, The 16th International Hibernation Symposium, オンライン, Groningen, Netherland, 2021年8月1-5
- 16) Genshiro A. Sunagawa, The physiological aspects of Q neurons-induced hypometabolism (QIH), The 16th International Hibernation Symposium, オンライン、フローニンゲン、オランダ, 2021年8月3日
- 17) Makoto Tominaga, Physiological Function of TRPV4 in Glia Cells, The 8th International Ion Channel Conference, ハイブリッド開催(中国), 2021年8月8日
- 18) Yoshifumi Yamaguchi, Diet- and hibernation season- dependent enhancement of hepatic cold resistance in a mammalian hibernator Syrian hamster, Sapporo Symposium 2021, 2021年8月14日
- 19) 金 尚宏, 生物時計の温度補償性 -変化する外部環境の中で一定の内因リズムを刻む仕組み-, 生理学研究所 温熱生理研究会, 岡崎, 2021年8月31日
- 20) 富永 真琴, 皮膚、感覚神経に発現する温度感受性TRPチャネルと発汗, 第29回日本発汗学会総会スポンサードシンポジウム, オンライン, 2021年9月4日
- 21) 榎木 亮介, 廣 蒼太、根本 知己, 概日カルシウムリズムの源流を探る 生理研研究会「細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線」, 岡崎, 2021年9月17日
- 22) 富永 真琴, 温度感受性TRPチャネルの構造と生理機能、第11回名古屋大学医学系研究科・生理研合同シンポジウム, オンライン, 2021年9月25日
- 23) 富永 真琴, TRPチャネルを制御する蚊の生存戦略, 第4回感覚研究フロンティアシン

- ポジウム, オンライン, 2021年10月31日
- 24) Genshiro A. Sunagawa , Toward clinical application of torpor , 第94回日本生化学学会, 横浜, 日本, 2021年11月4日
 - 25) 金 尚宏、岩本 隆宏、深田 吉孝, 環境温度と生物時計, 第94回日本生化学会, オンライン, 2021年11月4日
 - 26) 金 尚宏, 分子時計の温度補償性 , 生理学研究所研究会 第1回極限環境適応, 岡崎, 2021年11月11日
 - 27) 榎木 亮介, 極低温環境における概日時計中枢のリズム発振 , 生理学研究所研究会 第1回極限環境適応 , 2021年11月12日
 - 28) 富永 真琴, 刺激感受性: 温度感受性TRPチャネルの生理機能 , 日本動物実験代替法学会 第34回大会 , 沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県国頭郡) , 2021年11月12日
 - 29) 金 尚宏、岩本 隆宏、深田 吉孝, 分子発振の起源をたどる, 第28回日本時間生物学会, 那覇, 2021年11月20日
 - 30) 榎木 亮介, 低温環境における概日時計中枢のリズム発振機構, 第28回日本時間生物学会学術大会, 那覇, 2021年11月21日
 - 31) Genshiro A. Sunagawa , Can torpor delay disease progression? , 第44回 分子生物学会年会, 横浜, Japan , 2021年12月3日
 - 32) Naohiro Kon、Takahiro Iwamoto、Yoshitaka Fukada, Biological Clock in. Cold World. , 第44回日本分子生物学会, 横浜, 2021年12月3日
 - 33) Yoshifumi Yamaguchi, A mammalian hibernator Syrian hamster exhibits hepatic cold resistance with the aid of superior ability in retaining vitamin E, The 43th annual meeting of Molecular Biology Society of Japan, 2021年12月2日
 - 34) 渡邊正知、門田麻由子、田村豊, シリアンハムスターの冬眠時の体温制御におけるSUO1化修飾の役割, 第4回冬眠休眠研究会, online, 2022年2月4-5日
 - 35) 宮崎充功、下鶴倫人、坪田敏男、渡邊正知、田村豊, 冬眠動物の骨格筋タンパク質代謝の制御機構と筋萎縮耐性の獲得, 第4回冬眠休眠研究会, online, 2022年2月4-5日
 - 36) 金 尚宏, 生物時計の温度補償性 -低温環境でも概日時計が一定の速度を保つ仕組み-, 第4回冬眠休眠研究会, オンライン, 2022年2月4日
 - 37) 榎木 亮介, 低温環境下で安定かつ柔軟な概日時計中枢カルシウムリズム, 第4回冬眠休眠研究会, オンライン, 2022年2月5日
 - 38) 金 尚宏、岩本 隆宏、深田 吉孝, 体内時計における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割とその創薬応用, 第95回日本薬理学会, 福岡, 2022年3月7日
 - 39) 榎木 亮介、金 尚宏、山口 良文、根本 知己, 概日リズム中枢における低温耐性カルシウムリズム, 第99回日本生理学会大会, 仙台, 2022年3月16日
 - 40) 金 尚宏, 低温適応を担う Ca^{2+} シグナリング: 概日時計の温度補償性, 第99回日本生理

学会，仙台，2022年3月16日

- 41) Genshiro A. Sunagawa , Can torpor delay disease progression?, 第99回日本生理学会大会，仙台，日本,オンライン，発表日：2022年3月16日
- 42) 富永 真琴，冷刺激感受性と温度感受性TRPチャネル，第99回日本生理学会大会，東北大学ハイブリッド開催(仙台)，2022年3月17日
- 43) Yoshifumi Yamaguchi，モデル冬眠哺乳類シリアンハムスターから迫る哺乳類の冬眠を可能とする分子機構，日本生理学，2022年
- 44) Yoshifumi Yamaguchi，A food-storing facultative hibernator Syrian hamster as a model animal to comprehend the mysteries of mammalian hibernation from genetic and physiological aspect, Seminars at Wilhelminenberg Summer 2022, Vienna, Austria, 2022年
- 45) Makoto Tominaga，Structure and Function of Thermosensitive TRP Channels Ion Channel Modulation Symposium 2022, Clare College, Memorial Court Cambridge (UK) , 2022年6月23日
- 46) 金 尚宏，概日時計の温度補償性 -低温Ca²⁺シグナルによる生化学振動の制御-. Neuro 2022, 宜野湾, 2022年6月30日
- 47) 富永 真琴，温度感受性TRPチャネルの構造と機能 -2021年ノーベル生理学医学賞によせて- , 千里ライフサイエンスセミナー，山村雄一記念ライフホール（豊中市），2022年7月28日
- 48) 富永 真琴，Structure and Function of Thermosensitive TRP Channels 2nd TRP Conference in Wakayama, 和歌山県立医科大学（和歌山市），2022年7月30日
- 49) Naohiro Kon，Roles of Ca²⁺ Signaling in Molecular Clocks, Sapporo symposium, 札幌, 2022年8月14日
- 50) Genshiro A. Sunagawa , QRFP産生ニューロンからはじまるマウスの冬眠様状態, 日本動物学会 第93回 早稲田大会，東京，日本，2022年9月9日
- 51) 榎木 亮介、金 尚宏、山口 良文、根本 知己，低温環境下における概日時計中枢のリズム発振機構，生理学研究所研究会 温熱研究会，岡崎，2022年9月30日
- 52) 富永 真琴，カプサイシン受容体の発見：2021年ノーベル生理学医学賞受賞の意義，第75回日本自律神経学会総会，The Mark Grand Hotel（さいたま市），2022年10月27日
- 53) Genshiro A. Sunagawa , Toward clinical application of torpor , 第48回神経内分泌学会，栃木，日本，2022年10月30日
- 54) 榎木 亮介、金 尚宏、山口 良文、根本 知己，極低温環境下における概日リズム発振機構，生理学研究所研究会 第二回極限環境適応，岡崎，2022年11月11日
- 55) 金 尚宏，『リズムの無い細胞から紐解く概日時計の成立条件』，生理学研究所研究会，第二回極限環境適応，岡崎，2022年11月11日

- 56) 富永 真琴, カプサイシン受容体の発見と夢を麻酔科医に語る, 日本臨床麻酔学会第42回大会, 国立京都国際会館(京都市), 2022年11月12日
- 57) 榎木 亮介、金 尚宏、山口 良文、根本 知己, 極低温環境下における概日リズム発振機構, BIOTHERMOLOGY WORKSHOP 2022 &温度生物学若手の会 合同シンポジウム, 2022年12月27日
- 58) 富永 真琴, 温度感受性TRPチャンネルとかゆみ, 第83回東海小児アレルギー談話会, T KガーデンシティPREMIUM名古屋駅前(名古屋市), 2023年2月25日
- 59) Genshiro A. Sunagawa、Hidetoshi Masumoto, Warm hibernation enabled: revolutionizing hibernation research with QIH, BDR Symposium 2023, 神戸, 日本, 2023年3月9日
- 60) Ching Pu Chang、Yoshifumi YAMAGUCHI、Masatomo WATANABE、Tomomi NEMOTO、Ryosuke ENOKI, Identification of uncoupling protein 1 (UCP1) in the hypothalamus of Syrian hamster brain, 日本生理学会第100回記念大会, 京都, 2023年3月14-16日
- 61) 金 尚宏, カルシウムシグナルから紐解く概日リズムの生成原理, 第100回日本生理学会, 京都, 2023年3月14日
- 62) 中川 哲、山口良文, 冬眠に依存した体温概日リズムリセット機構の発見, 第17回日本生理学会環境生理プレコングレス, 2023年3月13日
- 63) 中川 哲、山口良文, Identification of hibernation-induced resetting of the circadian body temperature rhythm in Syrian golden hamster, 第100回日本生理学会, 京都, 2023年3月15日
- 64) Yoshifumi Yamaguchi, Autorecovery from hibernation period in Syrian hamsters involves a resetting of circadian body temperature rhythms, 100th Anniversary Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 京都, 2023年3月15日
- 65) Genshiro A Sunagawa、Hidetoshi Masumoto, A warm hibernation can protect organs from ischemia, 第100回日本生理学会, 京都, 2023年3月15日
- 66) 榎木 亮介、金 尚宏、山口 良文、根本 知己, Circadian Rhythms under Cold Temperature in the Master Clock Neurons. , 第100回日本生理学会, 2023年3月15日
- 67) 富永 真琴, Interaction of TRPV3 with ANO1 or TMEM79, 第19回国際シンポジウム味覚嗅覚の分子機構 (ISMNTOP2022/2023), 岡山大学鹿田会館(岡山市), 2023年3月19日
- 68) Sota Hiro、Tomomi Nemoto、Ryosuke Enoki, Long-term organellar Ca²⁺ imaging of master circadian clock neurons. , 生理研・韓国Korea大Yonsei大合同シンポジウム, 2023年3月30日

ポスター発表

- 1) 廣 蒼太、根本 知己、榎木 亮介、概日時計中枢における核-細胞質カルシウム動態の長期イメージング解析, 第 29 回日本バイオイメーキング学会学術集会, 2020 年 11 月 21 日
- 2) 榎木 亮介、平田 快洋、繁富-栗林 香織, マイクロパターン基盤上に培養した単一神経細胞における概日時計の光イメージング解析, 日本機械学会 2021 年度年次大会, 2021 年 9 月 6 日
- 3) Reo Otsuka, Yoshifumi Yamaguchi. Analysis of Vitamin E contents in plasma and tissues in a mammalian hibernator, Syrian hamster. , International Hibernation Symposium 2021. 2021 年 8 月
- 4) 大塚玲桜、山口良文, 冬眠哺乳類シリアンハムスターの血漿、組織における Vitamin E 量の解析, 第 126 回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第 98 回日本生理学会大会 合同大会, 2021 年 3 月 30 日
- 5) 宮入 栞、王 幸慈、吉村 崇、金 尚宏, 概日時計におけるミトコンドリアカルシウムユニポーター(MCU)の役割と MCU 制御化合物の開発, 第 28 回日本時間生物学会学術大会, 沖縄, 2021 年 11 月
- 6) 中川哲、山口良文, シリアンハムスターの前冬眠から冬眠期間にわたる活動量と活動パターンの解析, 第 4 回 冬眠休眠研究会, 2022 年 2 月 4 日
- 7) 廣 蒼太、根本 知己、榎木 亮介, 概日時計中枢におけるミトコンドリア Ca^{2+} 濃度動態の光計測, 冬眠休眠研究会, 2022 年 2 月 4 日
- 8) Ming-Liang LEE, Ching Pu CHANG, Tomomi NEMOTO, Ryosuke ENOKI, In vivo calcium imaging reveals dynamic neuronal glucose-sensing in the ventromedial hypothalamus, 冬眠休眠研究会, 2022 年 2 月 4 日
- 9) 大塚玲桜、山口良文, 冬眠哺乳動物シリアンハムスターは冬眠期に血漿中・組織中 α -Tocopherol 濃度を高める, 第 99 回日本生理学会, 2022 年 3 月 16 日
- 10) LEE Ming-Liang, CHANG Ching-Pu, NEMOTO Tomomi, ENOKI Ryosuke, In vivo calcium imaging reveals neuronal glucose-sensing regulated by body energy status, 第 99 回日本生理学会大会, 2022 年 3 月 16 日
- 11) CHANG Ching-Pu, Kohei OTOMO, Yuichi KOZAWA, Hirokazu ISHII, Miwako YAMASAKI, Masahiko WATANABE, Shunichi SATO, Ryosuke ENOKI, Tomomi NEMOTO, An easy-to-use light-needle creating device for single scan volumetric imaging in thick tissue specimens, 第 99 回日本生理学会大会, 2022 年 3 月 18 日
- 12) 廣 蒼太、根本 知己、榎木 亮介, Optical recording of mitochondrial Ca^{2+} dynamics in the central circadian clock, 第 99 回日本生理学会大会, 2022 年 3 月 18 日

- 13) 廣 蒼太、根本 知己、榎木 亮介、概日時計中枢における核-ミトコンドリア-細胞質の Ca^{2+} リズムの光イメージング解析、2022 年度日本分子生物学会、2022 年 12 月 1 日
- 14) 廣 蒼太、根本 知己、榎木 亮介、概日時計中枢における核-ミトコンドリア-細胞質の Ca^{2+} リズムの光イメージング解析、第 29 回 時間生物学会学術大会、宇都宮大学、2022 年 12 月 3 日
- 15) 榎木 亮介、金 尚宏、清水 貴美子、小林 憲太、山口 良文、根本 知己、視交叉上核の神経細胞における細胞内カルシウムおよび時計遺伝子転写のリズムは低温により停止しリセットする、第 29 回 時間生物学会学術大会、宇都宮大学、2022 年 12 月 3 日
- 16) 飯塚 康介、王 幸慈、浅野 吉政、野口 英樹、吉村 崇、金 尚宏、リズムを示す細胞株と示さない細胞株の比較解析による自律振動メカニズムの考察、第 29 回時間生物学会学術大会、宇都宮、2022 年 12 月
- 17) Sota Hiro、Tomomi Nemoto、Ryosuke Enoki、Optical Imaging of Organelle Ca^{2+} Rhythms in the Central Circadian Clock Neurons., 第12回 生理学研究所・新潟大学脳研究所・京都大学ヒト行動進化研究センター合同シンポジウム、2023年2月2日
- 18) 張 菁圃、山口 良文、渡邊 正知、根本 知己、榎木 亮介、Identification of uncoupling protein 1 (UCP1) in the hypothalamus of Syrian hamster brain., 日本生理学会 第 100 回記念大会、2023 年 3 月 14 日
- 19) 李 明亮、張 菁圃、根本 知己、榎木 亮介、A temperature-dependent diabetes-like metabolic state regulated by QIH., 日本生理学会 第 100 回記念大会、2023 年 3 月 14 日
- 20) 中川 哲、山口良文、Identification of hibernation-induced resetting of the circadian body temperature rhythm in Syrian golden hamster, 第 100 回日本生理学会、2023 年 3 月 15 日
- 21) 廣 蒼太、根本 知己、榎木 亮介、概日時計中枢におけるオルガネラ Ca^{2+} リズムの長期イメージング解析、日本生理学会 第 100 回記念大会、2023 年 3 月 15 日
- 22) Arisa Tobe、Mayo Shigeta、Ken-ichi Inoue、Takaya Abe、Hiroshi Kiyonari、Establishment of embryo manipulation techniques for generating genetically engineered Golden Syrian hamsters, The 36th International Mammalian Genome Conference, Tsukuba, Japan, 2023 年 3 月 30 日

アウトリーチ活動

・図書出版

- 1) 砂川 玄志郎 「人類冬眠計画」、岩波書店、2022. 4. 2
- 2) 山口 良文 その他編 低温科学第 81 巻「動物の寒冷適応戦略～生理生態と分子機構」 低温科学研究所, 2023. 3. 20

・一般向け講演・メディア

- 1) 榎木 亮介. 時を刻む脳～生命が時を刻む仕組み～. 岡崎市商工会議所 2023 年 2 月 9 日
- 2) 榎木 亮介. 時を刻む脳～生命が時を刻む仕組み～. 生命の海科学館、蒲郡 2022 年 11 月 3 日
- 3) 金 尚宏『睡眠病の遺伝子と体内時計の起源・製薬企業の仕事の紹介』, 富山大学薬学部セミナー 2021年12月7日
- 4) 榎木 亮介. 生理研一般公開 パネリスト 生理学研究所 2020 年 11 月 7 日
- 5) 榎木 亮介. 時を刻む脳:生命が 24 時間のリズムを生み出す仕組み. 生理学研究所, 矢作中学校出前授業 2020 年 10 月 6 日
- 6) 山口 良文, 「人間も冬眠できるようになる?冬眠のしくみとナゾ」、ホンダキッズ、2020 年 12 月
- 7) 砂川 玄志郎, 山口 良文, 『人類は冬眠できるのか 冬眠のメカニズムと人工冬眠の可能性』ガリレオ X、BS フジ、2023 年 1 月 8 日
- 8) 砂川玄志郎, 『もはや SF ではない! “人工冬眠” 研究最前線』、サイエンス Zero、NHK、2023 年 1 月 15 日

産業財産権

発明者：砂川玄志郎、櫻井武

発明の名称：疾患を有する対象において低代謝状態を誘発する方法およびそのための装置

出願人：理化学研究所／筑波大学

特許出願番号：2021-059600

出願日：2021 年 3 月 31 日

研究成果

(総括班)

研究課題名 哺乳類の低代謝・低体温による生存戦略の統合的理解

研究代表者 山口 良文 (北海道大学・低温科学研究所・教授)

本研究領域「冬眠生物学」では、最先端の計測技術および遺伝子工学技術を駆使した分野横断型チームにより、哺乳類生理学に残された大きな課題である「冬眠・休眠実行を担う分子ネットワークの解明」を目的とした。総括班では、本領域の効果的な推進に向け、研究指針方策の検討、領域内調整による共同研究の推進、領域評価と助言、企画・広報を実行し、当該研究領域での国際的な学術連携と若手人材育成に取り組んだ。以下に具体的に行った施策とその成果をあげる。

- 1) 領域会議：領域内研究者間での情報交換・進捗報告、研究資材の相互利用など有機的な連携体制の構築強化を進めるため、キックオフ会議および領域会議を全5回開催した。
- 2) 広報・情報共有：領域ホームページおよび冬眠休眠研究フォーラムを作成し情報発信の基盤を整備した。また領域内だけでなく外部メンバーも含めて情報交換を行う hibernation biology seminar シリーズを開催した。
- 3) 学会企画・国際交流・若手育成：日本分子生物学会、日本生理学会において全4回、領域共催シンポジウムを開催する際に、オンライン・対面ふくめ冬眠休眠研究の第一線の研究者を招待し、日本の研究者コミュニティと情報交換等を行うことで国際交流を深めた。また若手育成のため、学生も含めて広く国内の冬眠休眠研究者が集う冬眠休眠研究会を開催した。
- 4) 冬眠研究用機器の開発：哺乳類の冬眠休眠研究に活用できる、体温・活動量の長期計測（1年以上）の同時計測を可能とするデバイスを企業と合同で開発を試みた。2段階の試作を行い、1年以上にわたるデータの長期取得に成功した。本領域終了後も、実用化に向けたさらなる改良に取り組む。
- 5) 学術変革領域 A への発展：本領域で生み出された科学的発見および人的ネットワークおよび物的リソースをさらに大きく発展させるため学術変革領域研究 A「冬眠生物学 2.0」発足に向けた情報収集と準備作業を行った。

(A01:山口班)

研究課題名 冬眠発動の分子機構：冬眠発動の分子機構:深冬眠実行の分子基盤と飢餓性休眠との共通性の解明

研究代表者 山口 良文 (北海道大学低温科学研究所・教授)

研究分担者 渡邊 正知 (福山大学薬学部・准教授)

哺乳類の冬眠・休眠は、寒冷下で体熱産生を抑制した能動的低代謝状態で乗り切る生存戦略である。季節性に生じる冬眠では、長時間の低体温・不動状態の「深冬眠」とそこから自発的に復温する「中途覚醒」を幾度も繰り返す。しかし、その制御機構は未だ殆ど明らかとなっていない。我々はこの点に迫るべく、小型冬眠動物シリアンハムスターの深冬眠の際に大幅に発現変動する遺伝子群 (DEGs) を、網羅的遺伝子発現解析から同定した。本研究では、DEGs の中でも全身性に発現変動が生じる DEG1 に関して、遺伝子欠損マウスおよびシリアンハムスターを作出し、代謝生理学的解析、分子生物学・生化学的解析等により、冬眠・休眠制御における DEG1 の機能を明らかにすることを目指した。

DEG1 が冬眠・休眠に果たす役割の解明のため、まず飢餓誘導性休眠および冬眠における表現型の解析を行った。A02 砂川班と連携して作出した DEG1 欠損マウスを絶食による飢餓にさらすと、野生型マウスでは発動するはずの飢餓誘導性休眠が発動しないことが判明した。そこで次に、理化学研究所・小倉淳郎博士・廣瀬美智子博士らと

の共同研究により GONAD 法によって作出した DEG1 欠損シリアンハムスターを作出し、これらを短日・寒冷条件下で長期間飼育し冬眠誘導実験を行った。その結果、野生型個体の多くが数ヶ月で冬眠を発動する短日・寒冷環境での長期飼育下でも、DEG1 欠損シリアンハムスターの約半数は冬眠を発動しなかった。のこり半数の個体は冬眠したが、短日・寒冷環境下に置かれてから冬眠を発動するまでの日数が延長、すなわち冬眠の発動が遅延した。すなわち、DEG1 遺伝子の機能は、短日・寒冷冬眠発動のタイミングや冬眠発動そのものに重要であることが示唆された。

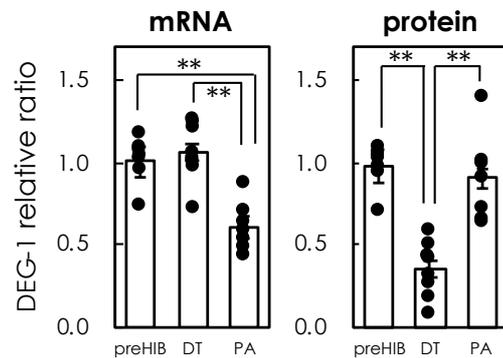


図1 冬眠サイクルにおけるDEG-1の発現レベル

これらの結果を受けて、冬眠期に DEG1 機能を操作するため、DEG-1 活性を薬理的に制御し冬眠行動におけるその役割を解析した。まず、冬眠期を前冬眠(prehibernation: preHIB)・深冬眠(deep torpor: DT)・中途覚醒(periodic arousal: PA)の3群に分け、体温調節中枢の視床下部組織における DEG-1 mRNA およびタンパク質を同一組織から抽出しその発現量を解析した。DEG-1 mRNA は中途覚醒期にのみ有意に減少したが、タンパク質は mRNA とは異なり深冬眠期にのみ有意に減少することが明らかとなった(図1)。次に、DEG-1 発現量と体温との関連性を検討した。冬眠導入時の低体温誘導に関連するアデノシン A₁ 受容体のアゴニストを側脳室より投与し寒冷環境下で擬似冬眠を誘導したところ、DEG-1 mRNA は変化しなかったがタンパク質の有意な減少が認められた。さらに、この DEG-1 タンパク質発現量変化は温熱的中性域では誘導されないこと、また、DEG-1 活性は体温制御に影響を与えないことから、体温低下に伴う発現量変化であることが明らかとなった(図2)。一方、冬眠中および中途覚醒時のハムスターに DEG-1 アゴニスト/アンタゴニストを側脳室より投与し冬眠行動への影響を検討したが、これまでのところその影響は認められていない。今後、直接的に遺伝子機能を操作するなどの検証が必要である。

以上一連の成果は、これまで機能解析がほぼ不可能だった哺乳類の冬眠研究に遺伝学的手法を導入することで、冬眠発動に関わる遺伝子を同定した初の事例として大きな意義があると言える。更なる研究により、その制御機構解明が期待される。

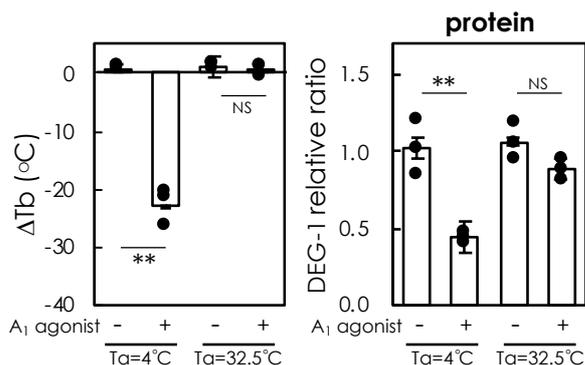


図2 擬似冬眠誘導時におけるDEG-1タンパクの発現レベル

(A02:砂川班)

研究課題名 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

研究代表者 砂川 玄志郎 (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)

研究分担者 清成 寛 (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)

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°C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て著しく低下した「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、休眠の臨床応用につなげるためにも、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を目指し、冬眠様低代謝を呈するマウスを用いた研究を行った。

具体的には、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。

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した。能動的な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℃の環境温度で誘導すると体温が必ず20℃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。この研究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℃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℃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解析を行ったところ、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個の候補遺伝子について、休眠表現型との因果性の検証を以下のように行った。

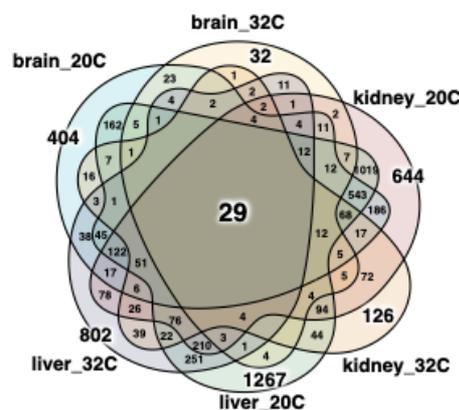


図3 複数臓器・複数環境温度におけるQIH中のトランスクリプトーム解析により同定された発現変動遺伝子群。数字は各群での変動遺伝子数を示す。

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。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 4)。

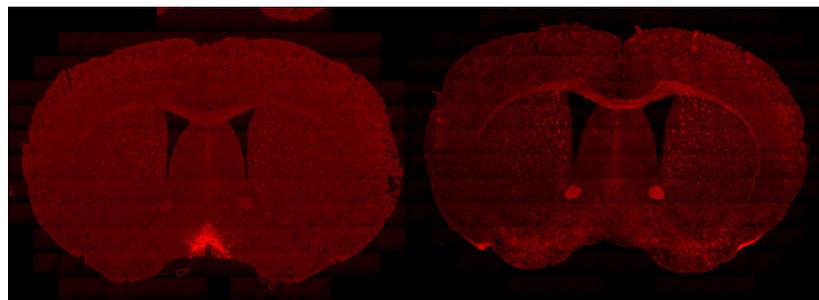


図 4 視床下部における AAV 感染エリアの確認

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た。左は十分に AAV が感染した個体。右は感染が不十分なため、解析から除外した個体。

スクリーニングが完了した。今後さらに解析を継続し、休眠表現型に関わる遺伝子を同定する。

以上の解析に加え、これら候補遺伝子の冬眠への関与を冬眠動物シリアンハムスターで検証するための実験系の構築にも取り組んだ。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光毒性により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。従って遺伝子改変シリアン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 法が有効である。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、Cre や GFP など大きな外来遺伝子挿入は困難である。本研究課題においてはこの点の達成を目指して、生体外におけるハムスター初期胚操作基盤技術の安定的な運用確立に取り組んだ。先行研究に基づき、光毒性回避の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シリアンハムスターより安定的に受精卵を得た。また、採卵時およびその他胚操作時に使用する培地の改良にも取り組み、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。またその後のマイクロインジェクションおよび胚移植技術の確立も、他の動物種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のノックアウトシリアンハムスター作製成功により確認された。今後、ノックインシリアンハムスター作出に向けたさらなる技術改良を行い、休眠省エネ機構の冬眠動物における検証を進める予定である。

(A03:富永班)

研究課題名 冬眠温度受容の分子機構:温度感受性 TRP チャンネルの意義の解明

研究代表者 富永 真琴 (自然科学研究機構生命創成探究センター・教授)

哺乳類の冬眠動物は冬季に外気温の低下に応じて代謝・体温を低下させる。体温は一般には感覚神経で感知され、哺乳動物では外気温の低下によって起こる体温低下に抗して産熱をおこなう体温を一定に保とうとする。感覚神経に発現して外気温を感知する分子として温度感受性 TRP チャンネルが知られており、また、温度感受性 TRP チャンネルは体温制御にも関わっていることが推定されている。そこで、A01 山口班・A04 金班と連携し、冬眠動物であるシリアンハムスターの視床下部から TRPA1 遺伝子をクローニングし、その温度応答を検証した (図 5)。興味深いことに、シリアンハムスター TRPA1 は熱刺激によって活性化し、その活性化温度閾値は平均 37.3 度と体温域であった。これまで、マウス TRPA1 は冷刺激感受性があると報告されていたが、一部のハムスター TRPA1 は冷刺激でも活性化して、その活性化温度閾値は平均 15.3 度であった。さらに、一部のマウスおよびラット TRPA1 (これらの遺伝子は感覚神経から単離された) は熱刺激に反応し、活性化温度閾値はそれぞれ平均 35.5 度、38.3 度であった。このシリアンハムスター TRPA1 の発現細胞を同定して、どのように体温制御に関わっているかを明らかにしていきたい。

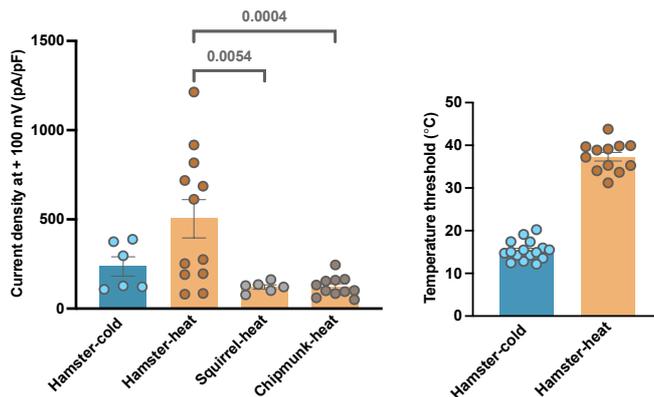


図 5. 各種冬眠動物における TRPA1 遺伝子の応答性
左: 熱 (heat) と冷 (cold) 刺激で活性化した電流
Syrian hamster (シリアンハムスター)・Squirrel (ジリス)・Chipmunk (シマリス)

(A04:榎木班)

研究課題名 冬眠動物の概日時計の分子機構:カルシウムを基軸とした低温リズム発振機構の
解明

研究代表者 榎木 亮介 (自然科学研究機構生命創成探究センター・准教授)

研究分担者 金 尚宏 (名古屋大学農学部・特任講師)

哺乳類の冬眠の開始や終了、中途覚醒のタイミングには、一日の中での時刻依存性が報告されており、体内には低温でも機能する計時機構が存在することが推察されていた。この最有力候補は脳深部に存在する概日時計中枢の視交叉上核であるが、冬眠中の哺乳類の視交叉上核において、時計遺伝子の転写リズムが継続するか否かは長く議論が続いている。これまで本研究班の代表者の榎木は、マウスの視交叉上核における細胞内 Ca^{2+} リズムおよび転写リズムの長期イメージング計測を行ってきた (Enoki et al., *PNAS*. 2012, 2017, 2018 など)。驚くべきことに、主要な時計遺伝子である *Cryptochrome 1/2* 遺伝子が欠損し、転写フィードバックループ (転写ループ) が停止した状態の視交叉上核でも、細胞内の概日 Ca^{2+} リズムは明瞭に継続することを見出した (Enoki et al., *Scientific Reports* 2017)。そのため、概日 Ca^{2+} 振動は転写ループに依存しない振動メカニズムを有する計時システムではないかとの着想に至った。本研究課題では、榎木が確立した長期光イメージング計測のアドバンテージを最大限活用し、低温環境下での視交叉上核の概日 Ca^{2+} リズムと転写リズムのダイナミクスを光イメージングにより解明することを試みた。また分担者の金は、培養細胞を用いたケミカルバイオロジーの手法を駆使して、概日時計における Ca^{2+} シグナリングの役割を追求した。本研究により、低温でのリズム発振メカニズムを解明し、冬眠休眠実行の分子ネットワークの核心に迫る結果を得た。

まず、低温環境下における概日時計中枢の Ca^{2+} リズムおよび転写リズムの光イメージング解析を行った。冬眠動物の視交叉上核の時計遺伝子の転写のリズム性の有無に対しては、計測時点ごとに異なった個体を用いて解析していた為、リズム解析の精度が低いという問題点があった。そこで本研究では、恒温恒湿器内に低温計測用の顕微鏡システムを設置し、低温条件下での視交叉上核培養スライスのタイムラプス計測法を確立した (図6)。マウスの視交叉上核の生細胞イメージングを行い、常温 (35 度) から低温 (15 度) へと段階的に温度を下げた際には、時計遺伝子の転写リズムおよび細胞内 Ca^{2+} リズムの振幅が温度低下に応じて減弱することが分かった。さらに 15 度の低温環境においては、転写リズムと細胞内 Ca^{2+} リズムともにリズム性が検出されないこと分かった。また 15 度から 35 度への復温により、転写リズムおよび細胞内 Ca^{2+}

リズムは再び検出可能となったが、この際、復温後のリズム位相はリセットされることを見いだした。重要なことに、この低温リセットの際には細胞内 Ca^{2+} リズムは直ちに安定な 24 時間周期のリズムを示すのに対し、*Per2* や *Bmal1* の転写リズムは、数日かけて安定な振動に至ることが分かった。これらの結果より、 Ca^{2+} リズムはリセットに際して即座に位相が安定し、それに追従して時計遺伝子の転写リズムの位相が安定状態になることが分かった (Enoki et al., *Biorxiv*, 2022)。A01 山口班・A02 砂川班と連携 しシリアンハムスターでの解析も進めている。

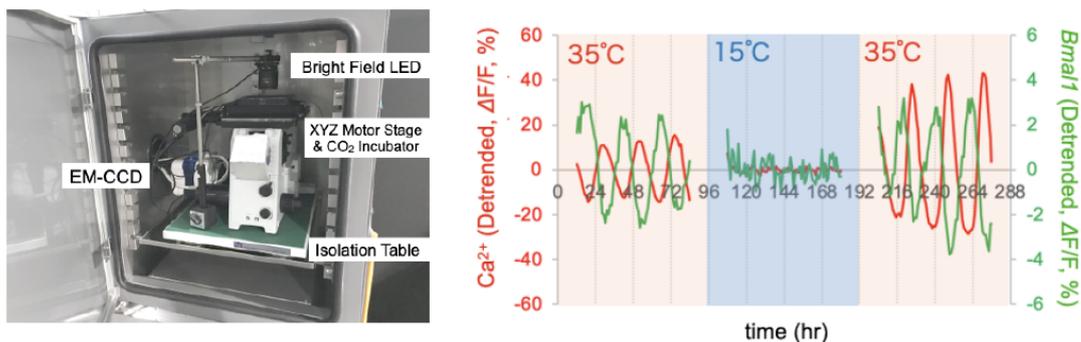


図 6. 低温環境における光イメージング解析

左：低温顕微鏡 右)マウス視交叉上核の Ca^{2+} リズムと *Bmal1* 転写リズムに対する低温の影響

並行して、概日リズムの温度補償性について解析した。これまでに、転写ループは細胞内 Ca^{2+} シグナルによって調節されていることを明らかにしてきた (*Genes and Development*, 2014)。本研究では、概日時計の特徴的な温度特性・温度補償性 (概日時計の発振速度が生理的温度範囲で保たれる性質) に着目し、概日振動体の実体解明に挑戦した。薬理的なランダムスクリーニングを行ったところ、

CaMKII 阻害剤、および細胞膜のイオン輸送タンパクである $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) 阻害剤の存在下では、転写リズムの温度補償性が破綻することを見出した。さらに解析を進めたところ、細胞内 Ca^{2+} -CaMKII シグナルは温度低下によって NCX 依存的に活性化し、転写ループの振動速度低下を補償することを突きとめた。すなわち温度補償性とは、低温で活性化する Ca^{2+} シグナルによって、本来であれば低温で速度低下する生化学反応が活性化されることで成立していた (Kon et al., *Science Advances*, 2021; 図 7)。そして、さらに解析を進めたところ、NCX や Ca^{2+} シグナルの役割は、哺乳類だけでなく、昆虫や植物、細菌に

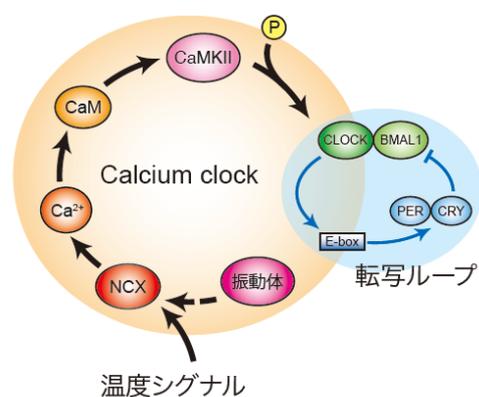


図 7. Ca^{2+} 振動による転写ループの制御 NCX は低温応答 Ca^{2+} 流入を担い、概日 Ca^{2+} リズム生成にも寄与している。

においても保存されていることが明らかとなった。そのため、概日性 Ca^{2+} 振動こそが、共通祖先から受け継がれた概日時計の振動本体ではないかとの着想を得た (図 7)。また、本研究では時計遺伝子が低温に応答する性質を利用して、細胞内の低温性 Ca^{2+} シグナルを、時計遺伝子 *Per2* の転写レポーターを用いて計測する検出系を構築した (Wang et al., *Scientific Reports*, 2022)。