

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14876

研究課題名(和文)冬眠動物に固有の新しい遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文)A novel hibernation-specific mechanism of regulation of gene expression.

研究代表者

志水 泰武(Shimizu, Yasutake)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：40243802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞保護作用のある低温ショックタンパク質CIRPに着目し、冬眠動物での発現調節機構を解明することを目的とした。冬眠動物であるハムスターの主要臓器において、平常体温時にPCR法で3本のバンドとして増幅されるCIRP mRNAが冬眠中には1本となること、このような選択的スプライシングは冬眠準備期ではなく体温低下期に起こった。スプライシング調節は、人為的な低体温でも確認できた。非冬眠動物(ラットとマウス)においてもCIRPのスプライシング調節が起こり、低体温に誘導できた。これらの成果は、冬眠の有用な特性を医療応用する基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this work was to clarify hibernation-specific regulatory mechanism of gene expression of a cold shock protein, CIRP, which protects cells against harmful cold temperature. Three major bands were amplified when RNA samples obtained from various organs of euthermic hamsters were applied to RT-PCR analysis. In contrast, one specific PCR product encoding functional CIRP was amplified when samples obtained from hibernating hamsters were used. The hibernation-specific alternative splicing was not occurred during acclimation period before entering hibernation, but became evident after dropping body temperature. The alternative splicing was also operated in hamsters, in which hypothermia was induced artificially. The alternative splicing of CIRP mRNA can be induced in rats and mice, and hibernation-like hypothermia was successfully established in these non-hibernators. These findings may provide a basis for the clinical application of valuable property of hibernating animals.

研究分野：神経生理学

キーワード：冬眠 低体温 転写後調節 低温ショックタンパク質 スプライシング ハムスター

1. 研究開始当初の背景

冬眠中の動物は、虚血再循環傷害や物理的・化学的侵襲に対する抵抗性が高いなど、さまざまな特性を持っている。この特性を医療応用するためには、冬眠動物が極度の低体温下で細胞機能を維持するメカニズムを解明する必要がある。低温に抵抗する仕組みについては細胞レベルで研究が進んでおり、低温ショックタンパク質の重要性が指摘されている。低温ショックタンパク質は、組換えタンパク質を哺乳動物の細胞で合成する場合、37℃よりも低い温度(32℃)で高い効率で得られる現象を分析する過程で発見されたタンパク質である。具体的に、RBM3 (RNA-binding motif protein 3) や CIRP (cold inducible RNA binding protein) が同定され、特定の mRNA と結合して安定性を高め翻訳効率を上げることが示されている。

培養細胞での低温ショックタンパク質の機能解析は進んでいるが、哺乳動物における生理機能に関する知見は乏しい。ようやく時計遺伝子の発現調節に寄与することが明らかになったばかりである。冬眠動物を対象とした DNA マイクロアレイによるスクリーニングにおいて、低温ショックタンパク質が冬眠中のクマとジリスで上昇することが明らかになっている。低温ショックタンパク質に細胞保護作用があることを考えると、これらのタンパク質が冬眠を可能にする基盤になっていることが予想される。

本研究は、低温ショックタンパク質のひとつである CIRP に着目し、冬眠動物での発現調節機構を解明すること、およびその成果を応用し非冬眠動物を冬眠様の低体温に誘導することを目指すものである。冬眠時の低温耐性機序の解明のみならず、冬眠時の低体温が保有する多くのメリット(例えば、虚血再循環傷害や物理的・化学的侵襲に対する抵抗性)を医学領域に応用し、様々な疾病に対する新しい解決法の提言に至ることが期待できる。

2. 研究の目的

(1) CIRP 遺伝子の冬眠時特異的な発現動態をスプライシングのレベルでの調節に着目して解明する。

(2) 人工的な冬眠様の低体温との比較から、CIRP 発現と低温耐性の関連性を明確にする。

(3) 冬眠しない動物に CIRP 発現を誘導し、低温耐性の獲得を実現する。

3. 研究の方法

(1) ハムスター心臓における CIRP および RBM3 遺伝子の発現調節

予備的な実験では、冬眠中のハムスターの心臓において、CIRP 発現がスプライシン

グの段階で制御を受けることを示す知見を得ている。この現象を確定的にするために例数を重ねる実験を始めに行う。RT-PCR 法により、スプライシングバリエーションを検出する。

(2) 心臓以外の臓器における CIRP 遺伝子の発現調節

CIRP 発現がスプライシングの段階で制御を受けることは、心臓を対象とした実験から明らかにした。心臓以外の臓器においても、CIRP の選択的スプライシングによる発現調節が起こるか検証する。特に、脳において転写後調節が確認できた場合には、視床下部や延髄、辺縁系、大脳皮質等、部位ごとでサンプリングし、比較検討する。免疫組織化学を併用する。

全ての臓器で均一に起こる反応であるのか、脳や心臓など低体温下でもある程度機能することが要求される臓器に限定されるのかに注目する。前者の場合は、細胞が低温にさらされることが選択的スプライシングの引き金となる可能性が高いので、強制的な低体温の実験により精査する。一方、後者の場合は、神経性、液性の調節因子が存在することを示唆するので、その因子を同定する方向へ展開する。

(3) 冬眠サイクル(準備期、入眠期、低体温維持期、覚醒期)における CIRP 遺伝子の挙動

冬眠を誘発するためには、環境温度や明期を段階的に下げ、給餌量を少なくするといった環境のコントロールが必要となる。この期間に冬眠に入るための適応性変化が起こると考えられている。このような準備期を含め、入眠期(体温が低下する時期)、低体温維持期、覚醒期それぞれについて、CIRP の選択的スプライシングを分析する。

準備期に CIRP の選択的スプライシングが起こる場合は、まだ体温が低下する前であるので、神経性、液性の調節因子を追究する方向へ展開する。体温が低下する時期に劇的な選択的スプライシングが起こるのであれば、温度低下が引き金になることを想定する。覚醒前に制御が解除されるかについても検証する。

(4) 人為的な低体温状態における CIRP 遺伝子の発現調節

麻酔剤と冷却を組み合わせる方法によってハムスターを冬眠と同等の低体温に誘導する方法を確立しているため、このような適応性変化がない状態で強制的に低体温を誘発した場合にも、CIRP の選択的スプライシングが起こるか検討する。

冬眠様の低体温を誘導するために、脳内アデノシン系を賦活化する方法を用いる。麻酔剤と冷却を組み合わせる方法では不整脈が発生するが、脳内アデノシン系の賦活

化では正常な洞律動が維持されるので、冬眠により近い低体温であると言える。脳室内へのアデノシン A1 アゴニスト投与により低体温を誘導し、CIRP の選択的スプライシングの有無を検討する。

(5) 非冬眠動物における低温ショックタンパク質遺伝子の発現

非冬眠動物であるマウスにおいても、麻酔剤と冷却を組み合わせる方法で低体温に誘導することができるので、これらの動物において CIRP の選択的スプライシングが起こるか検討する。

4. 研究成果

(1) ハムスター心臓における低温ショックタンパク質遺伝子の発現調節

予備的な実験により、CIRP 遺伝子の発現はスプライシングレベルで冬眠特異的な調節を受けることが明らかになっている。これを確定的にするために実験を重ねた。平常体温時と冬眠時のそれぞれのハムスターの心臓から RNA を抽出し、CIRP mRNA のスプライシングバリエーションの検出を行なった。平常体温時には3本のバンドが検出されたが、冬眠中のハムスターから採材したサンプルでは、CIRP mRNA は1本のバンドとして検出された(図1)。5例のサンプルで実験を繰り返したが、全て同じ結果が得られた。

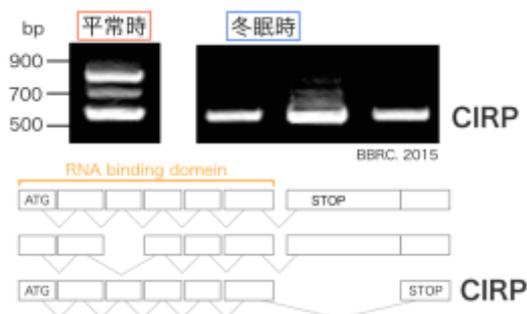


図1 心臓における CIRP 発現の冬眠特異的なスプライシング調節

塩基配列を読み、すでに明らかとなっているマウスの配列と比較したところ、冬眠時に検出されるバンドが CIRP タンパク質に翻訳されるべき mRNA であること、平常体温時に検出される他の2つのバンド(スプライシングバリエーション)は活性化部位を欠失したタンパク質に翻訳されることが予想された(図1)。後者はドミナントネガティブとして機能し、平常体温時には CIRP 機能を抑制する作用を持っていることが予測される。急速に体温低下する冬眠導入期に、スプライシングのレベルで切り替えを行うことで機能的な CIRP タンパク質を速やかに発現させる機序であると考えられる(図2)。

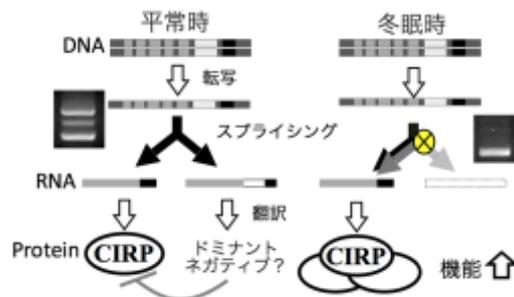


図2 CIRP 発現のスプライシング調節の意義(仮説)

(2) 心臓以外の臓器における CIRP 遺伝子の発現調節

心臓以外の臓器においても CIRP 発現のスプライシング調節が起こっているか RT-PCR 法を用いて解析した。平常体温時と冬眠時のそれぞれにおいて、脳、肺、腎臓、肝臓の RNA を抽出し、CIRP mRNA とスプライシングバリエーションの mRNA の検出を行なった。平常体温時には、いずれの臓器においても、CIRP mRNA とともにスプライシングバリエーションの mRNA が検出された。一方、冬眠時の RNA 発現は、CIRP mRNA のみであり、スプライシングバリエーションの mRNA の発現は消失していた(図3)。脳においては、大脳、小脳、延髄等の部位にわけて解析したが、部位による明らかな特異性は検出できなかった。また、精巣においても同様の解析を行なったところ、冬眠時のみならず平常時にもスプライシングバリエーションの発現が少ないことが判明した(図3)。

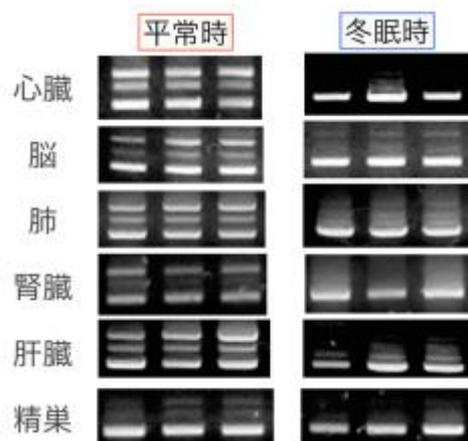


図3 さまざまな臓器の CIRP 発現

これらの結果から、CIRP における冬眠時特異的なスプライシング調節機構は、臓器特異的な機構ではないと考えられる。また、精巣において平常体温時に冬眠様のスプライシング発現様式を示すことは、精巣の温度は体温より常に数度低く 3-3°C 付近に保たれていることに起因すると思われる。つまり、冬眠様スプライシング調節は低温という因子により発現している可能性が示唆された。

(3) 冬眠準備期における CIRP 発現

冬眠前に必要な冬季への順応期間が CIRP 遺伝子の発現に影響するかを明らかにするために、ハムスターを低温及び短日条件下で飼育し CIRP 発現の解析を行った。4 匹のハムスターを同時に低温及び短日条件下での飼育し、3 匹のハムスターが冬眠を行なった時点で冬眠していない 1 匹を、冬眠の準備期間の完了したハムスターとした。脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓の RNA を抽出し、RT-PCR 法による CIRP mRNA 発現を解析した。6 例において、全ての臓器で CIRP mRNA 及びスプライシングバリエーションの mRNA が検出された (図 4)。この結果から、準備期間に冬眠に先行してスプライシングレベルの調節が起こるものではないことが判明した。冬眠に入るとスプライシング調節が完了しているため、この調節は冬眠導入期に引き起こされることが示唆された。

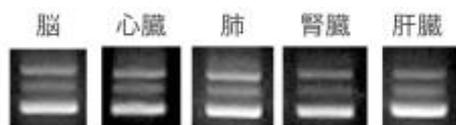


図 4 冬眠準備期における CIRP 発現

次に、冬眠導入期にスプライシングが変化するか検討した。自発的な冬眠において導入期を見極めるのは困難であるため、実験的に導入期を再現した。冬眠への導入に脳内アデノシン A1 受容体の賦活化が重要であることが明らかになっているので、A1 受容体アゴニストをハムスターの脳室内に投与し、2-8°C の低温環境下に置いた。直腸温が 10°C に達した時点で、脳、心臓、肺、肝臓及び腎臓を採材し、CIRP の mRNA 発現を解析したところ、全ての臓器において、スプライシングバリエーションの発現が少ないことがわかった (図 5)。アデノシン A1 受容体アゴニストを投与した後に、体温を 37°C 付近で維持したハムスターにおいては、スプライシングバリエーションの mRNA が検出されたので、低体温になることが必要であることも明らかとなった。

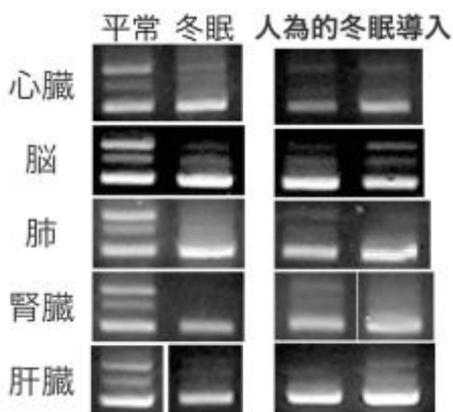


図 5 アデノシン A1 受容体アゴニストの脳内投与による低体温誘導時の CIRP 発現

(4) 人為的な低体温状態における CIRP 遺伝子の発現調節

CIRP の冬眠様スプライシング調節には、低温という条件が関与している可能性が示された。そこで人為的に低体温に誘導し、CIRP のスプライシング調節が起こるか調べた。実験には、通常の室温で飼育し冬眠しない状態のハムスターを用いた。吸入麻酔薬であるイソフルランにより体温調節中枢を抑制し、2-8°C に設定した冷蔵庫内で全身を冷却した。冬眠の低体温期を再現するため、ハムスターの直腸温が 10°C 付近となるように維持した。脳、心臓、肺、肝臓、腎臓の RNA を抽出し、RT-PCR 法によって各臓器における CIRP の mRNA 発現を解析した。いずれの臓器においても、人為的に誘導した冬眠様体温の場合には、CIRP mRNA およびスプライシングバリエーションの mRNA が検出された (図 6)。つまり、冬眠時に見られるようなスプライシングバリエーションの消失という現象は再現できなかった。したがって、冬眠時特異的なスプライシング調節機構は、単純な低体温によっては引き起こされないことが明らかとなった。

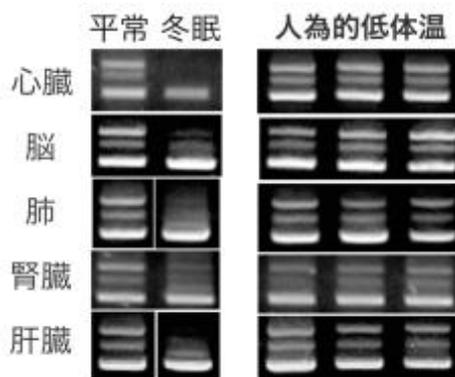


図 6 人為的な低体温下での CIRP 発現

アデノシン A1 受容体の賦活化及び冷却によって、CIRP の冬眠様スプライシング調節が引き起こされることが明らかとなった。一方、麻酔薬を用いた人工低体温ではスプライシングが調節されなかった。アデノシン A1 受容体の賦活化による体温低下は、その速度が非常に遅く、実際の冬眠導入の様子と類似していた。そこで、中枢を麻酔した状態で、冬眠時のようなゆっくりとした低体温誘導を行い、その間にスプライシングが変化するか調べた。吸入麻酔薬であるイソフルランを用いて中枢を麻酔し、30°C 付近に設定した恒温槽にハムスターを静置し、マイルドな低体温へと誘導した。マイルドな低体温でしばらく維持し、臓器から RNA を抽出した。RT-PCR 法の結果、解析対象とした全ての臓器において、CIRP mRNA のスプライシングバリエーションが減少することが明らかとなった (図 7)。

したがって、CIRP の冬眠様スプライシング調節は、冬眠導入期のゆっくりとした体温低下により引き起こされていることが明らかになった。

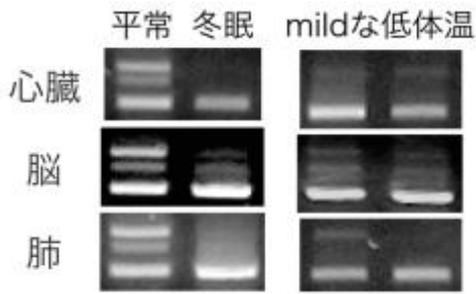


図7 マイルドな低体温時の CIRP 発現

(5) CIRP 発現のスプライシング調節と臓器傷害の関連

本研究では、CIRP のスプライシング調節によって、低体温耐性がもたらされると考えている。そこで、心臓の組織傷害に着目して、CIRP 発現のスプライシング調節と臓器傷害の関連を調べた。図6に示したスプライシング調節の起きない低体温と自然発生した冬眠（スプライシング調節が起こる）を比較した。採材した心臓を HE 染色し組織学的に解析したところ、人為的低体温では心臓の内面に水腫様変性、細胞質の好酸性の増加、核の濃縮好酸性の上昇が検出された。一方、冬眠時にはこのような組織障害が起こっていない（図8）。確証を得られる実験ではないが、スプライシング調節を起こすことが臓器障害を軽減させる可能性が示唆された。

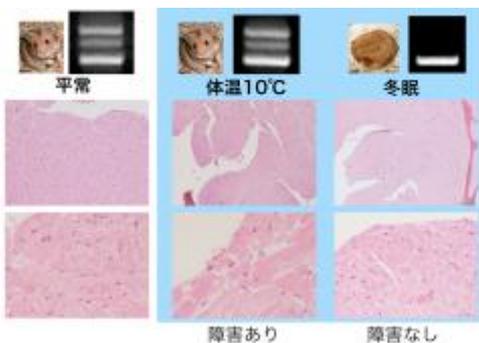


図8 心臓の組織学的解析

(6) 非冬眠動物における CIRP 遺伝子の発現

非冬眠動物であるマウスにおいて、平常体温時にスプライシングバリエーションが存在するか、人為的な低体温誘導法を適用したときにスプライシング調節が起こるかを調べた。

平常体温時にマウスにおいても、ハムスターと同様の CIRP mRNA スプライシングバリエーションが検出された（図9）。次に、マウスに対してイソフルランと冷却の組み合わせにより2種類の低体温を誘導した。急冷し直腸温を15℃に低下させた場合にはスプライシング調節は起こらなかったが、マイルドな

低体温とした場合には、冬眠中のハムスターと同じように機能的な CIRP をコードする mRNA に集約されることが明らかとなった（図9）。したがって、冬眠しない動物であるマウスにおいても、CIRP のスプライシング調節には、マイルドな低体温が重要であることが示唆された。

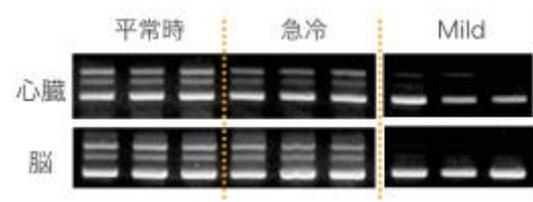


図9 マウスにおける CIRP 発現のスプライシング調節

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

- ① Sano Y, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Shimizu Y. Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 462(4): 322-325, 2015. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.135.
- ② 佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武 シリアンハムスターにおける冬眠特異的な cold-inducible RNA-binding protein の発現調節 *日本病態生理学会雑誌* 24(3): 18-25, 2015. 査読無

〔学会発表〕（計14件）

- ① 島岡弘樹、川口敬之、笹木かほり、佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、Establishment of methods for inducing hibernation-like hypothermia in rats. 第94回日本生理学会大会（浜松）2017.3.28
- ② 佐野有希、島岡弘樹、内藤清惟、中森裕之、堀井和広、椎名貴彦、志水泰武、Regulation of alternative splicing of cold-inducible RNA-binding protein in hypothermic animals. 第94回日本生理学会大会（浜松）2017.3.28
- ③ 佐野有希、島岡弘樹、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、非冬眠動物における cold-inducible RNA-binding protein の発現調節 第63回中部日本生理学会（岡崎）2016.11.4

- ④ 島岡弘樹、内藤清惟、中森裕之、佐野有希、椎名貴彦、志水泰武、哺乳動物の低体温耐性に対する TRPV1 の関与、第 159 回日本獣医学会学術集会(神奈川)2016.9.7
- ⑤ 佐野有希、島岡弘樹、服部峻佑、吉田侑真、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、非冬眠動物における cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) の冬眠様スプライシング調節の誘導、第 159 回日本獣医学会学術集会(神奈川)2016.9.7
- ⑥ 服部峻佑、佐野有希、島岡弘樹、内藤清惟、中森裕之、中川賢人、岡田和真、伊藤直人、杉山誠、椎名貴彦、志水泰武、狂犬病ウイルス感染マウスの症状に対する低体温の効果、第 159 回日本獣医学会学術集会(神奈川)2016.9.7
- ⑦ 島岡弘樹、佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、哺乳動物における低体温誘導法の確立、第 26 回日本病態生理学会大会(石川)2016.8.6
- ⑧ 佐野有希、島岡弘樹、服部峻佑、吉田侑真、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、非冬眠動物における cold-inducible RNA-binding protein の冬眠様発現調節の誘導、第 26 回日本病態生理学会大会(石川)2016.8.6
- ⑨ 佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、Splicing regulation of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) mRNA in hibernating Syrian hamsters. 第 93 回日本生理学会大会・(札幌)2016.3.23
- ⑩ 佐野有希、内藤清惟、中森裕之、吉田侑真、堀井和広、椎名貴彦、志水泰武、シリアンハムスターの冬眠特異的な遺伝子調節機構、第 11 回環境生理学プレコングレス(札幌)2016.3.23
- ⑪ 佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、シリアンハムスターにおける cold-inducible RNA-binding protein の発現調節機構、第 62 回中部日本生理学会(富山)2015.11.13
- ⑫ 吉田侑真、佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、冬眠動物であるシリアンハムスターの持つ低温耐性は冬眠時特有のものなのか、第 158 回日本獣医学会学術集会(十和田)2015.9.8
- ⑬ 佐野有希、吉田侑真、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、シリアンハムスターにおける低温ショックタンパク質遺伝子の冬眠時特異的な発現調節機構、第 158 回日本獣医学会学術集会(十和田)2015.9.8

- ⑭ 佐野有希、内藤清惟、中森裕之、椎名貴彦、志水泰武、シリアンハムスターにおける冬眠特異的な cold-inducible RNA-binding protein の発現調節、第 25 回日本病態生理学会大会(松山)2015.8.1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志水 泰武 (SHIMIZU, Yasutake)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：40243802

(2) 研究分担者

椎名 貴彦 (SHIINA, Takahiko)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：90362178