

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K06447
研究課題名（和文）哺乳動物の冬眠に特異的な遺伝子発現制御による末梢組織の低温耐性メカニズムの解明

研究課題名（英文）Gene expression regulation in hibernating chipmunks for elucidating cold tolerance mechanisms in peripheral tissues

研究代表者
塚本 大輔（Tsukamoto, Daisuke）

北里大学・理学部・助教

研究者番号：50598836
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類の冬眠は、冬眠哺乳動物に特異的な遺伝子やタンパク質が発見されていないことから、哺乳類に共通の遺伝子の発現や機能などを冬眠用に再調整することにより発動が制御されていると考えられている。本研究では、冬眠期の遺伝子発現は、深冬眠-中途覚醒の体温変動を利用して非冬眠期の概日性の遺伝子発現制御機構を再調整することで制御されているというモデルを検証し、肝臓が低温で健全な状態を保つ分子機構の解明を目指してきた。成果は、リファレンスデータが無いシマリスにおいて RNA-seq 解析のデータ解析環境を構築できたことであり、特徴的な遺伝子群の同定には至らなかったが、今後の研究に活用できる重要な基盤ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
小型冬眠哺乳動物シマリスの体温は、冬眠期には、約6℃にまで低下する約6日間の深冬眠と、約37℃に急激に上昇し覚醒する約1日の中途覚醒を繰り返している。なぜ冬眠哺乳動物が冬眠期の低体温でも全身の健全性が維持されているのかは学術的にもそして医療応用の点から社会的にも重要な謎である。本研究が、これまで誰も行ってこなかったシマリスでの遺伝子発現の網羅的解析の端緒となることで、新たな知見の獲得につながるものと期待される。

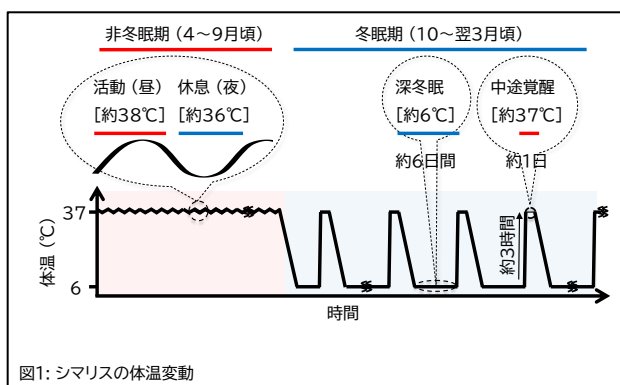
研究成果の概要（英文）：Mammalian hibernation is thought to be controlled by the readjustment of common genes' expression and functions for hibernation, as no genes or proteins specific to hibernating mammals have been discovered. This study tested the model that gene expression during hibernation is regulated by readjusting the mechanisms of circadian gene expression control from non-hibernating periods using the temperature variations between deep torpor and interbout arousals. The main achievement was the establishment of an RNA-seq data analysis environment for chipmunks, which lack reference data. Although this research did not lead to the identification of distinctive gene groups, it has created an important foundation for future research.

研究分野：冬眠分子生物学

キーワード：冬眠 シマリス 肝臓 遺伝子発現制御 体温変動

1. 研究開始当初の背景

冬眠は、冬季環境に適応するため、能動的にエネルギーを節約し、体温低下を生じる現象である。小型冬眠哺乳動物シマリスの体温は、非冬眠期（約4月～9月）の覚醒時は約38℃、睡眠時は約36℃の狭い範囲で変動しているが、冬眠期（約10月～翌3月）には、約6℃にまで低下する約6日間の深冬眠と、約37℃に急激に上昇し覚醒する約1日の中途覚醒を繰り返している（図1）。冬眠は遺伝子レベルで制御されているため、様々な冬眠動物で網羅的な遺伝子発現解析が行われ、冬眠期と非冬眠期で発現量に差がある遺伝子が明らかになってきた。しかし、冬眠に特別な遺伝子の発現制御機構や冬眠に特異な機能、そして冬眠動物特異的な遺伝子も明らかになっていないことから、冬眠の制御は、非冬眠哺乳動物にも共通に存在する特定の遺伝子の発現様式を調整することで行われているのではないかと考えられるようになってきた。



研究代表者は、冬眠に伴う遺伝子の発現制御機構に着目してきた結果、冬眠期の遺伝子の転写調節にも、非冬眠期と同様、ヒストン修飾の制御が働いていることを明らかにした。さらに、肝臓で、熱ショック転写因子 HSF1 が冬眠期中途覚醒の体温上昇に伴って活性化されることを明らかにした。マウス肝臓では、覚醒-睡眠に伴う体温変動で HSF1 の活性が調節され末梢時計が制御されていることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、なぜ冬眠哺乳動物が冬眠期に健全に生きていられるのかという問いの答えを得ることである。そのため本研究の目標は、シマリスの肝臓が冬眠期中途覚醒を繰り返しても健全性を保つ分子メカニズムを明らかにするため、冬眠期の遺伝子発現は、冬眠-中途覚醒サイクルの体温変動を利用して、非冬眠期の概日性の遺伝子発現制御機構を再調整することで制御されているというモデルを検証することである。

3. 研究の方法

1: 冬眠期の体温変動が末梢組織の遺伝子発現制御に与える影響の解析

ChIP-qPCR は、シマリス肝臓から調製したクロマチンと転写因子 Usf や HSF1 などに対する抗体あるいはヒストン修飾酵素 CBP などに対する抗体を用いて行った。得られた DNA 断片を鋳型に *Rbm3* 遺伝子や *Per2* 遺伝子の転写調節領域を qPCR により増幅・定量することで、目的遺伝子の転写調節領域にリクルートされている転写因子やヒストン修飾酵素の量を非冬眠期と冬眠期で比較した。

mRNA 量の定量は、シマリス肝臓の Total RNA を調製し、DNase 処理後に cDNA を合成し、目的の遺伝子 *Per2* などを増幅できる primer を用いて qPCR を行い、非冬眠期の活動-休息サイクルや冬眠期の深冬眠-中途覚醒サイクルで比較した。

2: 非冬眠期の概日リズムと冬眠期の体温変動サイクルで制御されている遺伝子群の網羅的解析

非冬眠期の活動時と休息時、冬眠期の深冬眠時と中途覚醒時のそれぞれ各 6 個体ずつの肝臓から調製した total RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

1: 冬眠期の体温変動が末梢組織の遺伝子発現制御に与える影響の解析

非冬眠期に発現量が増加する遺伝子の発現制御機構の解析結果から、研究代表者は、冬眠期の

遺伝子の転写調節にも、非冬眠期と同様、ヒストン修飾の制御が働いていることを明らかにしていた。そして、冬眠期に発現量が増加する遺伝子、低温ショック RNA 結合 タンパク質 Rbm3 の遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾が深冬眠時に変化していることも明らかにしていたが、その修飾を制御する機構は未解明であった。本研究期間では、Rbm3 遺伝子のヒストン修飾を制御するヒストン修飾酵素およびそのヒストン修飾酵素のリクルートに関わる可能性のある転写因子を同定した。

また、体温変動で活性が制御される HSF1 が末梢時計の制御に与える影響についても解析した。その結果、非冬眠期の概日性の体温変動により活性が制御される HSF1 の機構を冬眠期においても利用することにより、時計遺伝子 *Per2* の発現が中途覚醒時に一過性に活性化されることを明らかにし、共著者として論文を 1 報発表した。

2: 非冬眠期の概日リズムと冬眠期の体温変動サイクルで制御されている遺伝子群の網羅的解析

非冬眠期の活動時と休息時、冬眠期の深冬眠時と中途覚醒時のそれぞれ各 3 個体ずつの肝臓から調製した total RNA を用いて RNA-seq 解析を行い、全データを用いて発現変動遺伝子を検出した。その結果、非冬眠期における発現変動遺伝子数よりも、冬眠期における発現変動遺伝子数が多いことなどが明らかになったが、両者において共通の特徴的な遺伝子群の存在はまだ同定できていない。その上、非モデル生物であるシマリスは野生動物であるため、同一状態と考えていたシマリス個体間でもバラつきが検出されたこともあり、得られるデータの信頼性を頑強なものにするため、追加で各 3 個体ずつの RNA-seq 解析を行い、現在 解析を進行しているところであるが(図 2)、まだ特徴的な遺伝子群の同定には至っていない。一方同時にシマリスはリファレンスデータが無いため、de novo アセンブリを行い、シマリス独自のトランスクリプトームデータベースを作成し、データ解析環境を整えることができたため、今後の研究に活用できる基盤ができたことは非常に意義がある。さらに、シマリス RNA-seq データ解析環境を応用したことで、シマリス microRNA-seq データの解析が可能になり、非冬眠期の活動時 2 個体と冬眠期の深冬眠時 2 個体の発現変動 microRNA を同定することを可能にした。

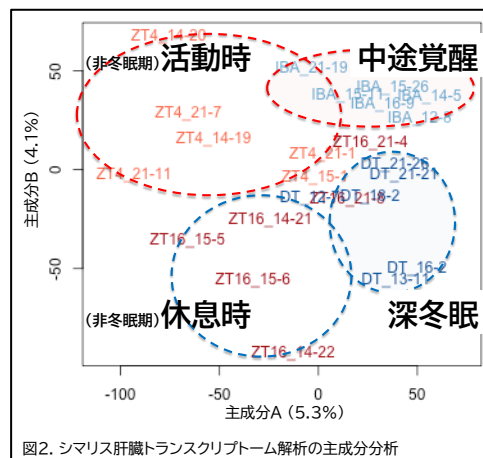


図2. シマリス肝臓トランスクリプトーム解析の主成分分析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shun Hayashi, Kei Tamura, Daisuke Tsukamoto, Yusaku Ogita, Nobuhiko Takamatsu, Michihiko Ito	4. 巻 98
2. 論文標題 Promoter generation for the chimeric sex-determining gene dm-W in <i>Xenopus</i> frogs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	6. 最初と最後の頁 53-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.22-00137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 塚本大輔	4. 巻 17
2. 論文標題 シマリスの冬眠：遺伝子発現制御の解析から紐（ひも）を解く	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Milsil：自然と科学の情報誌	6. 最初と最後の頁 12-14
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 -
1. 著者名 Takamatsu Nobuhiko, Shirahata Yuiho, Seki Kota, Nakamaru Erina, Ito Michihiko, Tsukamoto Daisuke	4. 巻 299
2. 論文標題 Heat shock factor 1 induces a short burst of transcription of the clock gene <i>Per2</i> during interbout arousal in mammalian hibernation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104576 ~ 104576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Shun, Suda Kosuke, Fujimura Fuga, Fujikawa Makoto, Tamura Kei, Tsukamoto Daisuke, Evans Ben J, Takamatsu Nobuhiko, Ito Michihiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Neofunctionalization of a Noncoding Portion of a DNA Transposon in the Coding Region of the Chimerical Sex-Determining Gene <i>dm-W</i> in <i>Xenopus</i> Frogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msac138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 塚本 大輔、高松 信彦	4. 巻 81
2. 論文標題 シマリスの冬眠の分子生物学的研究	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 119 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14943/lowtemsci.81.119	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 塚本 大輔、高松 信彦	4. 巻 93
2. 論文標題 冬眠哺乳動物シマリスの体温変動を利用した冬眠期の遺伝子発現制御機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 830 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930830	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 塚本大輔、高松信彦	4. 巻 38
2. 論文標題 冬眠動物シマリスの冬眠に伴う遺伝子発現制御機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 974 ~ 978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/6571-00002-0000902-00	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 坂部寧々、米山美羽、田村啓、伊藤道彦、松尾拓哉、塚本大輔
2. 発表標題 シマリスの冬眠に伴う低温誘導 RNA 結合タンパク質 Rbm3 遺伝子の発現増加機構の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塚本 大輔、坂部 寧々、関 皓太、白畠 由比穂、中丸 絵莉奈、伊藤 道彦、高松 信彦
2. 発表標題 シマリスの冬眠の低体温に伴う Rbm3 遺伝子の発現制御機構と機能の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白畠 由比穂、関 皓太、中丸 絵莉奈、岡村 瑠美、塚本 大輔、伊藤 道彦、高松 信彦
2. 発表標題 冬眠に伴うストレス応答遺伝子 GADD45A の FOXO1 による転写活性化機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関 皓太、白畠 由比穂、中丸 絵莉奈、塚本 大輔、伊藤 道彦、高松 信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスの肝臓の未梢時計の発現制御の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中丸 絵莉奈、安達 めぐみ、白畠 由比穂、関 皓太、塚本 大輔、伊藤 道彦、高松 信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスの肝臓における CREB1 バリエントの発現及び機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 道彦、林 舜、荻田 悠作、須田 皓介、奥山 ほのか、塚本 大輔、田村 啓、三浦 郁夫、高松 信彦
2. 発表標題 性&種多様性ワンダーランド：遺伝子間競合（新・性決定遺伝子の下克上）&異種ゲノム間競合
3. 学会等名 日本動物学会第93回早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関皓太、白鳥由比穂、塚本大輔、伊藤道彦、高松信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスのmiR-182-5pによる時計遺伝子CLOCKの発現制御の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白鳥由比穂、関皓太、岡村瑠美、塚本大輔、伊藤道彦、高松信彦
2. 発表標題 冬眠哺乳動物シマリスのmiR-182-5pによるFOXO1の発現制御とFOXO1による GADD45Aの転写制御の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間恵吾、中西晋也、田村啓、林舜、荻田悠作、塚本大輔、高松信彦、伊藤道彦
2. 発表標題 ツメガエル生殖巣形成におけるRSP01リガンドによる雌化機構~生殖細胞を介した雌デフォルト説~
3. 学会等名 第45回日本皮革内分泌学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本大輔、伊藤道彦、高松信彦
2. 発表標題 Impact of body temperature rhythm on gene expression during hibernation in the liver of chipmunk
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤村楓雅、荻田悠作、林舜、塚本大輔、田村啓、高松信彦、伊藤道彦
2. 発表標題 収斂重複型性決定遺伝子 ツメガエル <i>dm-W</i> とメダカ <i>dmy</i> の分子進化: 下剋上進化仮説の検証に向けて
3. 学会等名 第22回日本進化学会
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

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