

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19320

研究課題名（和文）冬眠哺乳類の季節性身体リモデリングを制御するエピジェネティック機構の解明

研究課題名（英文）Epigenetic mechanisms underlying seasonal body remodeling of a mammalian hibernator

研究代表者

曽根 正光（Sone, Masamitsu）

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：90599771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：シリアンハムスターは日長が短く低気温の環境に置かれると数ヶ月の準備期間を経て、代謝を極端に低下させる冬眠を発動する。冬眠期には10℃以下の低体温が数日続く深冬眠期と37℃程度の平常体温が半日程度続く中途覚醒を繰り返し、数ヶ月後、自発的に冬眠を終了して後冬眠期を迎える。このように異なる状態を遷移するメカニズムを調べるため、エピジェネティック修飾と呼ばれるクロマチンの化学修飾に着目し、その網羅的な解析手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物においては開花のような季節性の現象には、長期的な環境の情報に基づいて、クロマチンを構成するヒストンの化学修飾を変化させ、遺伝子発現を変化させるエピジェネティクス制御が重要な役割を果たすことが知られる。一方で哺乳類の冬眠など、動物の季節性行動にエピジェネティクス制御がどのように関わっているか不明である。本研究成果は、こうした謎に迫る足掛かりになるという点において重要である。さらにヒトにおいても冬うつと呼ばれる季節性の情動障害が知られており、その発症機構の解明につながる可能性も秘めている。

研究成果の概要（英文）：When exposed to cold and short-photoperiod environment, after a few-month latent period, Syrian hamsters start hibernation, in which they extremely reduce their metabolism. In hibernation, they repeat the cycles of deep torpor, in which their body temperature become below 10 degree C, and periodic arousal, in which they recover euthermic state or 37 degree C body temperature. After hibernation of a few month, they spontaneously cease hibernation and undergo post-hibernation. To address the mechanisms underlying such status shifts, I focused on chemical modification of chromatin called epigenetic modification, and established methods to analyze it globally.

研究分野：分子生物学

キーワード：冬眠 エピジェネティクス シリアンハムスター

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

繁殖をはじめ自然界に生きる動物の行動は季節と密接に結びついている。哺乳類の冬眠は、冬季に代謝・熱産生を能動的に抑制し消費エネルギーを節約するための典型的な季節性行動である。冬眠する哺乳類シリアンハムスター（以下、ハムスター）は、寒冷短日条件で飼育すると、数ヶ月の前冬眠期間に体を作り変えたのち、冬眠期に入る。冬眠期は 10 以下の低体温で不動状態が数日間持続する深冬眠と、約 35 の体温が半日程続く中途覚醒の繰り返しが数ヶ月続くが、その後は冬眠が自発的に停止し再び発動することのない後冬眠期に入る。この前冬眠期、冬眠期、後冬眠期の変化過程では全身組織で身体リモデリングが生じることを申請者の所属研究室は RNAseq 解析・形態学解析で見出していた。具体的には、前冬眠期から冬眠期にかけて、骨格筋量や筋繊維の組成変化、白色脂肪組織の褐色化・脂質代謝経路増強など組織レベルでの顕著な形態・機能変化が生じる。このような冬眠前の身体リモデリングを適切な季節に行うには、急変しうる日々の温度変化ではなく、長期的な気温変化や日長変化の傾向を正しく捉える必要がある。しかし、非冬眠期と冬眠期でのハムスターの身体リモデリングはもとより、哺乳類の季節適応の制御機構は何か、殆ど不明であった。

2. 研究の目的

植物には、低温に長期間晒されることで初めて開花が可能となり、温暖な季節に開花することを保証する春化という現象が存在するが、その背後に特定の遺伝子座に温度変化情報がエピゲノム修飾の形で蓄積する機構があることが近年明らかとなった。本研究は、このような植物のエピジェネティック制御を基盤とした季節適応を参考に、冬眠をモデルとして、哺乳類が長期的な気温や日長などの季節情報を正しく捉え、全身組織を作り変える身体リモデリングを可能とするエピジェネティックな分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

哺乳類の冬眠においては、植物の春化のように季節性変化を実行させる分子実体は不明である。そこで網羅的なエピゲノム解析により、季節性のエピジェネティック変化が観察され、環境情報を身体リモデリングへと繋げることのできるような遺伝子座の同定を目指した。また、冬眠発動機構のエピゲノム解析を行うにあたりどの器官や組織に着目すれば良いか明白ではないが、本研究課題においては、(1) 全身の代謝を司る器官であり、多くの血中タンパク質の産生を担うことから冬眠における全身性の代謝変化を制御する可能性のある肝臓と(2) 季節性変動を伴うホルモンを産生する主要な器官である脳下垂体にまず着目して研究を進めた。ハムスターのこれらの器官を対象として、植物の春化で重要な役割を果たすエピジェネティック修飾であるヒストン H3K4me3 と H3K27me3 の季節性の変化について CUT&Tag 法を用いた網羅的な解析を目指した。CUT&Tag 法は、従来よく用いられてきた ChIP-seq 法に比べ少数の細胞で解析が可能であり、凍結した細胞や組織を対象とすることができるというメリットがある。

4. 研究成果

(1) まず、ハムスターの肝臓組織から CUT&Tag 法によるシーケンスライブラリー調製を行う実験条件を検討した。実験材料として温暖長日条件で飼育しているメスのハムスターを用いた。細胞を均一に分散することができること、また肝実質細胞を純度高く得ることが可能なことか

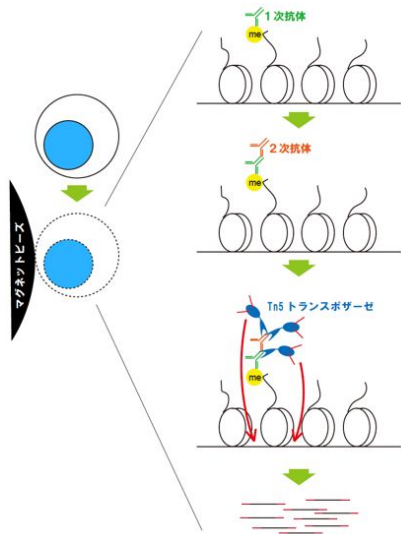


図1 CUT&Tag 法

ら、コラゲナーゼ灌流法を用いた。手順としては、ハムスターを麻酔下で開腹し、肝門脈よりコラゲナーゼを灌流したのち、肝臓の細胞を分散し、パーコール溶液を用いた遠心分離により死細胞を除去した。このようにして得られた肝実質細胞を細胞凍結用溶液であるセルバンカーに懸濁し、 -80°C で凍結保存した。続いて、溶解した細胞に、ヒストン H3K4me3 または H3K27me3 に対する 1 次抗体、2 次抗体、DNA タグを搭載した Tn5 トランスポザラーゼを順次結合させた (図 1)。そして、Tn5 トランスポザラーゼによるゲノム DNA の切断とタグ付加反応を行った。これらの反応中は細胞をコンカナバリン A マグネットビーズに結合させ、保持した。最後に、プロテナーゼ K 処理と DNA 抽出を行ったのちに PCR 反応によりタグが付加された、ライブラリーの増幅を行った。

(2) 次に、様々な状態、すなわち長日温暖条件(室温約 25°C 、明期:暗期 = 14 時間:10 時間)で飼育された夏様状態の個体と短日寒冷条件(室温 5°C 、明期:暗期 = 8 時間:16 時間)で飼育された、冬眠期中途覚醒状態の個体、冬眠を終えた後冬眠期の個体、さらに短日寒冷条件にあっても 8 ヶ月以上冬眠を発動しなかった不冬眠個体の 4 つの異なる状態のメスハムスターそれぞれ 2 個体ずつからコラゲナーゼ灌流法を用いて細胞を調製し凍結保存した (図 2)。

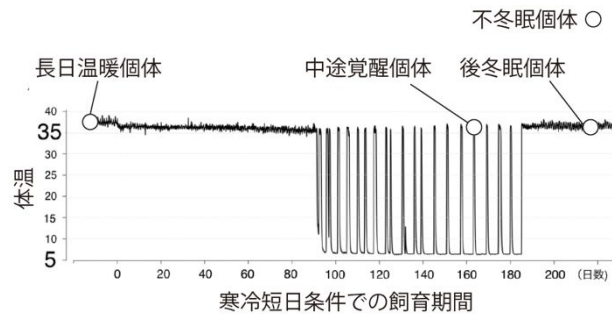


図2 CUT&Tag に用いる肝細胞サンプリング

(3) ハムスターの脳下垂体において冬眠期と非冬眠期の間で発現が変動するホルモンが存在するかどうかを調べる目的で *in situ* hybridization を行った (図 3)。発現がほとんど変動しないホルモン遺伝子が存在する一方で (図 3 緑)、冬眠期に大きく発現低下するホルモン遺伝子も存在した (図 3 赤)。

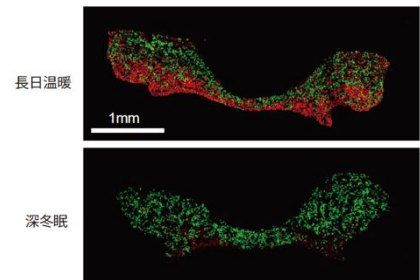


図3 *in situ* hybridization による脳下垂体におけるホルモン発現解析

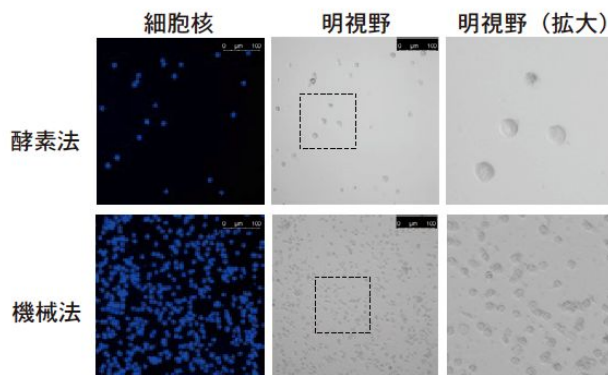


図4 凍結した脳下垂体の細胞分散法の検討

(4) ハムスターの脳下垂体より CUT&Tag 用の細胞を調製するため細胞の分散方法について検討した。凍結した脳下垂体組織を用いてタンパク質分解酵素による分散とホモジェナイザーによる機械的分散を比較したところ、細胞核を高い収量で得られることから後者が適していることが示唆された (図 4)。今後、様々な状態のハムスター個体の脳下垂体凍結組織から機械的に

分散した細胞核を用いて CUT&Tag を行い、ヒストン修飾の季節変動を解析する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sone Masamitsu, Yamashita Junpei, Shigenobu Shuji, Yamaguchi Yoshifumi	4. 巻 709
2. 論文標題 Slow decrease in temperature produces readthrough transcripts in mammalian hibernation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149837 ~ 149837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2024.149837	査読の有無 有
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 曽根 正光、山口 良文	4. 巻 81
2. 論文標題 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？	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 159 ~ 172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14943/lowtemsci.81.159	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 曽根 正光, 三橋 ののか, 岡橋 良仁, 山口 良文
2. 発表標題 Gpx4依存的なシリアンハムスターの低温細胞死回避メカニズム
3. 学会等名 第5回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 曽根 正光
2. 発表標題 冬眠哺乳類細胞の低温誘導性フェロトーシス回避メカニズム
3. 学会等名 レドックスR&D戦略委員会 第4回 春のシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masamitsu Sone, Yoshifumi Yamaguchi
2. 発表標題 Gpx4-dependent resistance against cold-induced ferroptosis in a mammalian hibernator, Syrian hamster
3. 学会等名 Japan Australia Meeting on Cell Death 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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	山口 良文 (Yamaguchi Yoshifumi) (10447443)	北海道大学・低温科学研究所・教授 (10101)	

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