

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20621

研究課題名（和文）冬眠する哺乳類の高濃度ビタミンE蓄積・全身輸送機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of accumulation and transport mechanisms of vitamin E in a mammalian hibernator

研究代表者

山内 彩加林（Yamauchi, Akari）

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：00951394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：冬眠する哺乳類（冬眠哺乳類）であるシリアンハムスターは、ビタミンEの一種であるα-トコフェロール（α-T）を身体に高濃度に蓄積し低温耐性を獲得する。しかし、ハムスターの低温耐性に重要なα-Tの蓄積・全身分配の分子メカニズムは不明である。本研究ではこの点に迫るため、1) α-T輸送タンパク質（TTPA）に着目し、冬眠哺乳類と非冬眠哺乳類のTTPAの多量体形成能の違いを同定した、2) 遺伝子改変動物の準備を進めた、3) 遺伝子発現解析および脂質解析により、冬眠期におけるリポタンパク質分泌経路の亢進を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ハムスターの高濃度ビタミンEの蓄積・分配機構の理解のための基礎となる成果が得られた。本研究で見出された遺伝子について、細胞や個体における役割を検証していくことにより、低温耐性機構の理解に寄与すると予想される。また得られた知見により、低温耐性を持たないヒトの細胞・臓器の低温保存技術等、医療分野への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：A hibernating mammal, Syrian hamsters, accumulate high levels of α-tocopherol (α-T), a type of vitamin E, in their bodies and acquire cold tolerance. However, it is unclear that the molecular mechanism of accumulation and systemic transport of α-T, which is important for cold tolerance in hamsters. In this study, to approach this point, we 1) focused on alpha-tocopherol transfer protein (TTPA) and identified differences in the multimer size of TTPA between hibernating and non-hibernating mammals, 2) prepared for the production of genetically modified animals, and 3) found potential enhancement of the very low density lipoprotein secretion pathways during hibernation by gene expression analysis and lipidomics.

研究分野：生化学

キーワード：冬眠 低温耐性 シリアンハムスター ビタミンE α-トコフェロール輸送タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の冬眠は、寒冷や飢餓といった環境下で、体熱産生を抑制し能動的低代謝・低体温状態で乗りきる生存戦略である。通常、ヒトやマウス等の多くの哺乳類は長期間の低体温下では細胞死や臓器不全を生じ生存が困難となる。一方、ハムスター等の一部の哺乳類は、約5ヶ月の低体温でも長期間、生存可能な冬眠動物である。冬眠動物は、低体温でも細胞や臓器に障害が生じない驚異的な低温耐性を有しているが、その分子機構は殆ど不明のままである。この分子機構の解明の先駆けとして、所属研究室では、冬眠動物であるシリアンハムスター (*Mesocricetus auratus*) がビタミン E の一種である α T を高濃度に肝細胞に蓄積し、低温耐性を獲得することを独自に発見した。 α T は、低温下で生じる脂質酸化ストレスによる細胞死を抑制することにより、ハムスターの肝細胞に低温耐性を与えることが明らかとなった。 α T はハムスターの血中や他の臓器でもマウスに比して高濃度で確認されるため、ハムスターの全身の細胞・臓器に低温耐性を付与する役割を有する可能性がある。しかしながら、 α T がハムスターにおいてどのように肝臓に蓄積され、全身に分配されているのか？その分子メカニズムは不明である。 α T はヒト・マウスでは α T 輸送タンパク質 (alpha-tocopherol transfer protein: TTPA) により、肝臓から血流に分泌され全身に分配される。本研究では、ハムスターの低温耐性に重要な α T の蓄積・全身への輸送機構に迫るため、TTPA に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、ハムスターの高濃度 α T 蓄積・全身への輸送機構に着目し、TTPA が果たす役割を明らかにすることを目指した。そのためにまず、ハムスター TTPA と他の哺乳類の TTPA の分子性質の違いを同定することを目的とした。また、遺伝子改変動物の作出し、ハムスターの低温耐性に TTPA が果たす役割の理解に迫ることを目指した。

3. 研究の方法

冬眠動物と非冬眠動物との間での TTPA の分子性質の違いを同定するため、ハムスターおよびマウス TTPA の遺伝子組換え蛋白質を用いて、 α T 蓄積・輸送能に関わる分子性質を解析した。また、ハムスターの低温耐性に TTPA が果たす役割に迫るため、脂質ナノパーティクル(LNP)を用いた遺伝子改変動物の作出系の確立を試みた。さらに α T 分配の制御機構の理解を進めるため非冬眠期・冬眠期のハムスターの肝臓の遺伝子発現解析(RNA-seq)および脂質解析を行い、分子プロファイリングを得た。

4. 研究成果

TTPA は、マウスやヒトの知見では、肝細胞内で α T と結合し α T を格納した状態で細胞質内を輸送し、細胞膜脂質のフォスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP₂) との結合により立体構造を変化させて、 α T を血中に放出するとされる。またヒト TTPA は α T 存在下で多量体を形成し、単量体に比べ多量体で α T 輸送能が向上するという報告がある (Aeschmann, W. Sci. Rep, 2017)。興味深いことに、TTPA の一次配列をハムスターとマウスで比較すると、 α T 結合部位・脂質結合部位の周辺・多量体形成部位を構成する複数のアミノ酸で違いが認められた。ハムスターの等電点 (pI 6.8) は、マウス (pI 8.4) やヒト (pI 7.2) とも異なっていた。ハムスター TTPA の分子特性を明らかにするために、大腸菌発現系を用いて組換えハムスター TTPA およびマウス TTPA を作製し、TTPA の分子的性質の比較検証を行なった。精製過程で、組換えハムスター TTPA はマウス TTPA と比較して非常に封入体を形成しやすい性質が認められた。精製途中に α T を加えた場合には、封入体をより形成しやすい傾向がみられた。主に封入体は、発現したタンパク質の凝集によるものであるため、ハムスター TTPA はマウスと異なる α T 結合時の多量体形成能が高いことを反映していると予想された。多量体の分子サイズを調べるため、精製したハムスター・マウス TTPA を Native-PAGE およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーに供した。その結果、ハムスターとマウス TTPA では多量体のサイズが異なることが明らかとなった。ハムスター TTPA とマウス TTPA のアミノ酸配列を比較した結果、多量体形成部位を構成するアミノ酸に違いが認められた (L63V, V165I, E220G) ことから、これらのアミノ酸が多量体形成能の違いに寄与している可能性がある。以上より、TTPA の多量体形成能の違いが、ハムスターの α T の蓄積能や輸送量に影響する可能性が示唆された。

ハムスターの低温耐性に TTPA が果たす役割に迫るため、脂質ナノパーティクル(LNP)と

CRISPR/Cas9 システムを組み合わせた遺伝子改変動物/肝細胞の系の立ち上げを進めた。LNP システムは投薬後、即時 KO が可能であるため、冬眠期における TTPA 遺伝子の役割を精査する上で有用と考えられた。ハムスターはマウスの 5 倍以上の個体サイズを有し、必要となるゲノム編集試薬の量も多いため、Cas9 の組換え体を自作した。自作 Cas9 は、in vitro および in vivo (マウス) で市販品と同等の標的 DNA 切断活性を示した。自作 Cas9 を用い、LNP-CRISPR/Cas9 システムによるハムスター初代肝細胞の遺伝子ノックアウト (KO) を試みた結果、70% の KO 率が得られた。またハムスターで同様の実験を進めたが、まだ十分な KO 効率を得られておらず、適用したマウスの条件がハムスターには適していない可能性も考えられる。また遺伝子破壊ハムスター (ヘテロ個体) における血中 α T 量の測定を行った結果、室温飼育条件下では野生型と差は見られなかった。ハムスターにおける TTPA の機能解析については、今後改善と検証を継続していくことで、冬眠期における TTPA の役割に迫ることができると期待される。

さらに、 α T 分配の制御機構の理解を進めるため、オミクス解析 (RNA-seq・脂質解析) を行なった結果、ハムスターは寒冷短日条件下でホスファチジルイノシトール (TTPA が結合する膜脂質種である PIP₂ の元となる) の量が増加し、冬眠期に最も高くなることが分かった。さらに冬眠期のハムスターの肝臓では、リポタンパク質の分泌経路に関わる遺伝子 (ApoB 等) の発現上昇が認められ、本経路が亢進する可能性が示唆された。

以上の点は、ハムスターにおける α T 蓄積と全身への分配に重要な可能性が考えられる。本研究では、ハムスターの高濃度ビタミン E の蓄積・分配機構の理解のための基礎となる成果が得られた。本研究の成果は、今後、冬眠する哺乳類であるハムスターが有する全身性の低温耐性機構の理解に貢献するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 山内 彩加林、山口良文	4. 巻 38 (4)
2. 論文標題 冬眠する哺乳類と変温動物の低温適応機構	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 6 - 10
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 Arai Tatsuya, Yamauchi Akari, Yang Yue, Singh Shiv Mohan, Sasaki Yuji C., Tsuda Sakae	4. 巻 12
2. 論文標題 Adsorption of ice-binding proteins onto whole ice crystal surfaces does not necessarily confer a high thermal hysteresis activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19803-3	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 該当する
1. 著者名 山内 彩加林、津田 栄	4. 巻 81
2. 論文標題 昆虫由来不凍タンパク質の氷結晶結合機能と細胞保護機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 低温科学	6. 最初と最後の頁 37 - 49
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 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 Yang Yue, Yamauchi Akari, Tsuda Sakae, Kuramochi Masahiro, Mio Kazuhiro, Sasaki Yuji C., Arai Tatsuya	4. 巻 682
2. 論文標題 The ice-binding site of antifreeze protein irreversibly binds to cell surface for its hypothermic protective function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 343-348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.10.015	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 津田 栄、山内彩加林、新井達也	4. 巻 97(7)
2. 論文標題 不凍タンパク質の製品化	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 科学と工業	6. 最初と最後の頁 192-199
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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山内彩加林、山下純平、杉浦悠毅、松岡悠太、曾根正光、山口良文
2. 発表標題 冬眠哺乳類シリアンハムスターの脂質代謝関連組織における脂質プロファイリング
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 山内彩加林、山下純平、杉浦悠毅、松岡悠太、曾根正光、山口良文
2. 発表標題 シリアンハムスター の冬眠に向けた脂質代謝変化の網羅的リポドミクス解析
3. 学会等名 第101回日本生理学会 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山内彩加林
2. 発表標題 不凍タンパク質の氷結晶結合機能と細胞保護機能 ~生物の低温適応の分子メカニズムに迫る~
3. 学会等名 生物物理若手の会 北海道支部 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山内彩加林
2. 発表標題 哺乳類の冬眠の制御に関わる分子・遺伝子に迫る
3. 学会等名 文部科学省と附置研センターとの定例ランチミーティング
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Akari Yamauchi
2. 発表標題 The structure-function relationship of ice-binding proteins from cold-adapted organisms
3. 学会等名 IBP International seminar series 2021-2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内彩加林、新井達也、津田栄
2. 発表標題 日本産越冬性昆虫オオクワガタ由来不凍タンパク質の発見
3. 学会等名 第67回低温生物工学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内彩加林、近藤英昌、新井達也、津田栄
2. 発表標題 昆虫由来不凍タンパク質は哺乳動物細胞を -5 °C でも生存可能にする
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張陸岩、山内彩加林、津田栄、大山恭史、近藤英昌
2. 発表標題 不凍タンパク質と粘性物質を組み合わせた培養細胞の新規凍結保護剤
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田裕喜、新井達也、山内彩加林、津田栄、大山恭史、近藤英昌
2. 発表標題 オオクワガタ由来不凍タンパク質の特性評価
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022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