

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850205

研究課題名(和文)なぜクマは冬眠中に骨格筋が萎縮しないのか？—冬眠中の筋蛋白同化/異化様式の解明—

研究課題名(英文)Changes in muscle protein metabolism during hibernation in Japanese black bears

研究代表者

下鶴 倫人(Shimozuru, Michito)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：50507168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではなぜツキノワグマは冬眠中に骨格筋の萎縮がほとんど生じないのかを明らかにするため、骨格筋における筋タンパク・アミノ酸分解に関わる遺伝子発現変化を解析するとともに、メタボローム解析を用いて代謝プロファイルの比較を行った。この結果、冬眠中の骨格筋ではアミノ酸分解や筋タンパク分解に関わる酵素群の遺伝子発現が低下していることが明らかとなった。また冬眠中では必須・非必須アミノ酸ともに骨格筋中の濃度が上昇していた。このように冬眠中の骨格筋では筋タンパク分解・アミノ酸異化を防ぐ機構が働いていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hibernation bears do not show severe muscle atrophy although they are nearly immobile throughout hibernation. In this study, we analyzed seasonal changes in mRNA expressions and metabolite levels in skeletal muscle by using real-time PCR and metabolomics analysis. During hibernation, there were significant reductions in some enzyme mRNA expressions involved in the amino-acid degradation and muscle proteolysis. In addition, the concentration of essential and non-essential amino acids in skeletal muscle was increased during hibernation. These alternations would contribute to the prevention of muscle atrophy in hibernation bears.

研究分野：野生動物学

キーワード：冬眠 クマ 代謝 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

冬眠は生体活動を低下させることで厳しい気候・食物状態である冬期を乗り切るべく進化した適応的生物現象である。クマ類が示す冬眠は、(1)中途覚醒を示さず、持続的に眠り続ける、(2)体温の降下度が小さい、(3)摂食・飲水、排糞・排尿を行わない、(4)メスは冬眠中に妊娠・出産・育子を行う、等の点で他の冬眠性哺乳類とは大きく異なる。また、長期の絶食・不活動状態にも関わらず、骨格筋タンパク量の減少が軽微であることが知られている。

骨格筋の萎縮を誘導する二大要因は「飢餓(栄養不足)」と「筋肉の不使用」である。クマ類における冬眠は両条件を十分すぎるほど満たすにもかかわらず、5-6ヶ月の冬眠期間中における筋タンパク量の減少は10%程度と低く抑えられることが知られている(Luhuis et al, 2007)。ヒトではたとえ十分に食事を摂取できる状態であっても、長期の筋肉の不使用(ベッドレスト)により一日に0.5%ほど筋タンパク量が減少する(5ヶ月で約50%減少する計算となる)ことから、クマ類は筋タンパク質の減少を防ぐなんらかの仕組みを冬眠中に発現させると考えられる。

この要因一つとして、冬眠中のエネルギー代謝様式の変化が挙げられる。通常、飢餓時は筋タンパクの分解により生じるアミノ酸を用いた糖新生が肝臓で活性化されるが、冬眠中のクマの肝臓ではアミノ酸の異化に関わる酵素群の発現量が冬眠中に減少していた(Shimozuru et al 2012)。また妊娠中のように、さらなるエネルギー産生を必要とされる状況下であっても、タンパク質分解の最終産物となる尿素窒素が血中に蓄積しないなど、筋タンパク質の分解に頼らずにエネルギーを産生する仕組みを有することを明らかにした(Shimozuru et al 2013)。

このような冬眠中に骨格筋の萎縮が生じない仕組みは注目されていたものの、これまで「骨格筋そのもので何が起きているのか」ということについて詳しく調べられていない。例えば、冬眠中の骨格筋ではタンパク質同化が活動期よりも活性化されるという報告(Fedrov et al, 2009)がある一方、タンパク質同化・異化の活性はそれぞれ活動期の70%ほどに低下するとの報告(Luhuis et al, 2007)もあり、一定の見解が示されていないのが現状であった。研究をさらに発展させるためには、冬眠中における骨格筋のタンパク質代謝様式や、タンパク質の同化/異化の制御メカニズムの変化をより詳細に解析する試みが必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、なぜツキノワグマは冬眠中に骨格筋の萎縮がほとんど生じないのか、その仕組みを知るため、筋タンパク合成/分解メ

カニズムの変化を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1)冬眠中の骨格筋における代謝様式の変化をメタボローム解析により明らかにすること、(2)筋タンパク合成/分解に関わるシグナル伝達経路において鍵となる因子の発現量を解析することである。

3. 研究の方法

秋田県阿仁クマ牧場で飼育されているメスツキノワグマを実験に供試した。麻酔薬(ゾレチル(塩酸ゾラゼパムと塩酸チレタミンの混合薬)およびメデトミジンを併用)を吹き矢により投与し不動化処置を施した後、後肢を外科的に切開し骨格筋(外側広筋)を採取した。採取した骨格筋は瞬間冷凍し、以下の解析に供試した。サンプリングは活動期(6月)および冬眠期(2月後半)に実施した。

1)メタボローム解析による代謝プロファイルの解明:ヒューマン・メタボローム・テクノロジ社が提供している半網羅的メタボローム解析(C-SCOPE)を利用し、アミノ酸代謝、糖代謝、TCA サイクル、脂質代謝、核酸代謝などに関わる116代謝物の濃度を定量し、活動期・冬眠期の比較(各5頭ずつ)を行った。

2)筋タンパク合成/分解に関わる因子の発現定量:採取した骨格筋より Total RNA を抽出後、リアルタイム PCR 法を用いてタンパクおよびアミノ酸代謝に関わる酵素群の mRNA 発現量を比較した。

4. 研究成果

1)メタボローム解析による代謝プロファイルの解明

骨格筋中の代謝物を活動期と冬眠期で比較した結果、冬眠期において、解糖系の最終産物である乳酸が減少傾向にあった。また、TCA 回路の中間代謝物であるクエン酸、シスアコニット酸、フラス酸、リンゴ酸の濃度が有意に低下していた。このことから、冬眠中は炭水化物を原料としたエネルギー産生が抑制されていることが示唆された。

骨格筋中の20種のアミノ酸濃度を比較した所、セリン・アスパラギンの2種において低下が認められたものの、グルタミン・グルタミン酸・バリン・スレオニン・ロイシン・リシンの6種において有意な増加が認められ、結果として、総必須アミノ酸、総非必須アミノ酸ともに冬眠中に有意に濃度が増加した(下表)。このように、冬眠中の骨格筋中の必須アミノ酸濃度が上昇したことは、骨格筋タンパクの軽微な分解が生じていることを示しているが、同時に、これら必須アミノ酸

の異化が抑制されていることを示唆するものと考えられる。また、タンパク質合成を促進することが知られている必須アミノ酸である、分岐鎖アミノ酸（バリン・ロイシン・イソロイシン）が有意に増加しており、筋タンパク質の同化促進によっても筋萎縮が抑制されている可能性が示唆された。

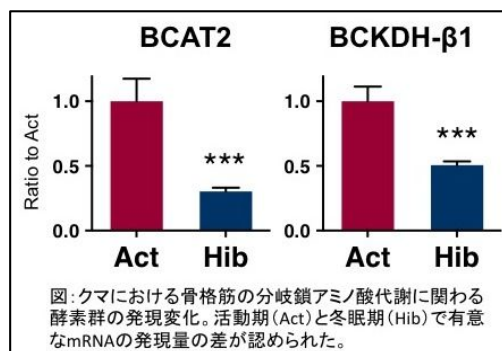
表：骨格筋中のアミノ酸濃度の変化 (nmol/g)

	活動期	冬眠期	P
Gly	969	780	
Ala	1645	1260	
Ser	478	246	*
Pro	N.D.	108	-
Cys/Cyt	N.D.	N.D.	-
Asn	114	68	*
Asp	390	386	
Gln	6148	9253	*
Glu	3102	7152	**
Arg	151	120	
Tyr	98	74	
Val	129	213	**
Thr	285	414	*
Ile	68	106	
Leu	153	206	**
Lys	339	621	**
Met	53	53	
His	351	416	
Phe	92	83	
Trp	24	24	
非必須	13,095	19,447	*
必須	1,495	2,135	**
総アミノ酸	14,590	21,582	**

2)筋タンパク合成/分解に関わる因子の発現定量

エネルギー代謝および筋タンパク合成/分解経路に関わる因子の mRNA 遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。その結果、解糖系に関わる酵素であるグルコーストランスポーター、ヘキソキナーゼの発現が冬眠中に有意に低下しており、前述のメタボローム解析の結果を支持した。また、冬眠中の骨格筋ではアラニンアミノ基転移酵素やグルタミン酸デヒドロゲナーゼなどのアミノ酸分解に関わる酵素発現量が低下し

ており、加えて骨格筋における主要な筋タンパク分解経路であるユビキチン・プロテアソーム系に関わる因子群の一部 (atrogin-1 および MuRF1) が冬眠中に有意に低下していた。さらに、メタボローム解析において冬眠中の濃度の増加が認められた分岐鎖アミノ酸 (バリン・ロイシン・イソロイシン) の分解に関わる酵素群 (分岐鎖アミノ酸転移酵素:BCAT2 および分岐鎖 - ケト脱水素酵素複合体:BCKDH) の mRNA 発現量を比較したところ、いずれも冬眠中に有意な減少を認めた (下図)。このように、冬眠中の骨格筋は、筋タンパク分解・アミノ酸異化に関わる因子の発現が抑制されていることが明らかとなった。



3)まとめ

以上のように、本研究によりこれまであまり知られてこなかったクマの冬眠中の骨格筋における代謝状態の変化を、代謝物レベルおよび遺伝子発現レベル両面から明らかにすることができた。今後本研究を継続・発展させることにより、筋萎縮を防ぐ仕組みの詳細を明らかにし、他動物において再現することが可能になれば、ヒトにおけるサルコペニアの治療法の開発にも寄与できるだろう。このように本研究は、医学・獣医学分野に広く応用可能な研究基盤としてさらに発展可能であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Shimozuru, M., Nagashima, A., Tanaka, J. & Tsubota, T.: Seasonal changes in the expression of energy metabolism-related genes in white adipose tissue and skeletal muscle in female Japanese black bears. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 196-197, 38-47, 2016. 査読有
2. Moustafa, M. A. M., Lee, K., Taylor, K. R., Nakata, R., Sashika, M., Shimozuru, M. & Tsubota, T.: Molecular characterization and specific detection of *Anaplasma*

- species (AP-sd) in sika deer and its first detection in wild brown bears and rodents in Hokkaido, Japan. *Infection, Genetics and Evolution* 36: 268-274, 2015. 査読有
3. Paudel, S., Villanueva, M. A., Mikota, S. K., Nakajima, C., Gairhe, K. P., Subedi, S., Rayamajhi, N., Sashika, M., Shimozuru, M., Matsuba, T., Suzuki, Y. & Tsubota, T.: Development and evaluation of an interferon-release assay in Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Vet. Med. Sci.*, in press. 査読有
 4. Paudel, S., Mikota, S. K., Nakajima, C., Gairhe, K. P., Maharjan, B., Thapa, J., Poudel, A., Shimozuru, M., Suzuki, Y. and Tsubota, T.: Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates from elephants of Nepal. *Tuberculosis* 94(3): 287-292, 2014. 査読有
 5. Okuyama, M. W., Shimozuru, M. & Tsubota, T.: A genetic method for sex identification of raccoons (*Procyon lotor*) with using the ZFX and ZFY genes. *J. Vet. Med. Sci.* 76(5): 773-775, 2014. 査読有
 6. Okuyama, M. W., Shimozuru, M., Yanagawa, Y. & Tsubota, T.: Changes in the immunolocalization of steroidogenic enzymes and the androgen receptor in raccoon (*Procyon lotor*) testes in association with the seasons and spermatogenesis. *J. Reprod. Dev.* 60(2): 155-161, 2014. 査読有
 7. Lee K., Takano, A., Taylor, K., Sashika, M., Shimozuru, M., Konnai, S., Kawabata, H. & Tsubota, T.: A relapsing fever group Borrelia sp. Similar to Borrelia lonestari found among wild sika deer (Cervus nippon yesoensis) and Haemaphysalis spp. ticks in Hokkaido, Japan. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5: 841-847, 2014. 査読有
- [学会発表](計 22 件)
1. Shimozuru, M., Miyazaki, M. & Tsubota T. Changes in energy metabolism in hibernating black bears: an analysis of gene expression and metabolites in liver and skeletal muscle. 24th International Conference on Bear Research and Management, Anchorage, Alaska (USA), 14 June 2016, Oral presentation
 2. Shimozuru, M., Miyazaki, M. & Tsubota T. Summer food availability, body condition, and cub survival in female brown bears in the Rurua area, Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. 24th International Conference on Bear Research and Management, Anchorage, Alaska (USA), 14 June 2016, Poster presentation
 3. Miyazaki, M., Shimozuru, M. & Tsubota T. Regulation of protein metabolism and muscle mass in hibernating bears: an attractive model of muscle atrophy resistance. 24th International Conference on Bear Research and Management, Anchorage, Alaska (USA), 14 June 2016, Oral presentation
 4. Tsubota, T., Suzuki, S., Miyagi, D., Yamazaki, K., Sashika, M., & Shimozuru, M. 24th International Conference on Bear Research and Management, Anchorage, Alaska (USA), 14 June 2016, Oral presentation
 5. Moustafa, M. Jr., Taylor, K., Nakao, R., Sashika, M., Shimozuru, M. and Tsubota, T. Niche selection by microbes: Babesia and Ehrlichia exhibit host preference among rodents sharing ecosystems in Hokkaido, Japan. 5th International Wildlife Management Congress Program: 83, 28 July 2015, Sapporo Convention Center, (Sapporo, Hokkaido), Oral Presentation.
 6. Paudel, S., Mikota, S. K., Nakajima, C., Gairhe, K. P., Poudel, A., Sashika, M., Shimozuru, M., Suzuki, Y. and Tsubota, T. Tuberculosis in Asian elephants (*Elephas maximus*) of Nepal. 5th International Wildlife Management Congress Program: 62, 28 July 2015, Sapporo Convention Center, (Sapporo, Hokkaido), Oral Presentation.
 7. Shimozuru, M., Moriwaki, J., Yamanaka, M., Nakanishi, M., Ishinazaka, T., Kasai, S., Nose, T., Masuda, Y. and Tsubota, T. Reproductive parameters and male dispersal of brown bears in the Rurua area of Shiretoko National Park, Hokkaido, Japan. 5th International Wildlife Management Congress Program: 62, 28 July 2015, Sapporo Convention Center, (Sapporo, Hokkaido), Poster Presentation.
 8. Tsubota, T., Hirano, S., Nagano, N., Tsujino, M., Shimozuru, M., Sashika, M., Osada, M. and Fujimoto, Y. Cross-cluster genetic exchange of the brown bear population occurs at the base of Shiretoko Peninsula. 5th International Wildlife Management Congress Program: 62, 28 July 2015,

- Sapporo Convention Center, (Sapporo, Hokkaido), Poster Presentation.
9. Paudel, S., Mikota, S.K., Nakajima, C., Gairhe, K.P., Maharjan, B., Poudel, A., Sashika, M., Shimozuru, M., Suzuki, Y., and Tsubota, T. Tuberculosis infection in Asian elephants of Nepal at human-elephant-wildlife interface. 第 21 回日本野生動物医学会大会講演要旨集: 8, 2015 年 8 月 1 日、酪農学園大学、(江別、北海道) 口頭発表
 10. Miyazaki, M., Shimozuru, M. and Tsubota, T. Altered signaling pathway governing protein metabolism in skeletal muscle of Japanese black bear during hibernation, Experimental Biology 2015, 29 March 2015, Boston (USA), Poster Presentation.
 11. Miyazaki, M., Shimozuru, M. and Tsubota, T. Hibernating bear muscle shows slow-fiber shifting and mitochondrial biogenesis despite prolonged physical inactivity Cell Symposium Exercise Metabolism, 13 July 2015, Amsterdam (the Netherlands), Poster Presentation.
 12. 鈴木信吾, 山崎晃司, 佐鹿万里子, 下鶴倫人, 坪田敏男. ツキノワグマにおける冬眠期の皮下体温、腹腔内体温および活動量測定を試み. 第 158 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 449, 2015 年 9 月 8 日、北里大学 (十和田、青森) 口頭発表.
 13. 佐鹿万里子, 阿部 豪, 郡山尚紀, 中井真理子, 島田健一郎, 前田 健, 下鶴倫人, 坪田敏男. 北海道のエゾタヌキとアライグマにおけるイヌジステンパーウイルス感染に関する疫学調査. 第 158 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 450, 2015 年 9 月 8 日、北里大学 (十和田、青森) 口頭発表.
 14. Paudel, S., Villanueva, M., Mikota, S. K., Nakajima, C., Gairhe, K. P., Subedi, S., Rayamajhi, N., Sashika, M., Shimozuru, M., Suzuki, Y. and Tsubota, T. Interferon-gamma release assay (IGRA) for the diagnosis of tuberculosis in Asian elephants (*Elephas maximus*). 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation Abstract: 24, 8 November 2014, Hanoi (Vietnam), Oral Presentation.
 15. Lee, K., Takano, A., Taylor, K., Sashika, M., Shimozuru, M., Konnai, S., Kawabata, H. and Tsubota, T. A relapsing fever group *Borrelia* sp. Similar to *Borrelia lonestari* found among wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) and *Haemaphysalis* spp. ticks in Hokkaido, Japan. 7th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation Abstract: 29-30, 8 November 2014, Hanoi (Vietnam), Oral Presentation.
 16. Moustafa, M., Lee, K., Taylor, K., Sashika, M., Shimozuru, M. and Tsubota, T. Molecular epidemiological study on *Anaplasma phagocytophilum* in sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido, Japan. 63rd Annual International Conference of the Wildlife Disease Association Abstract: 28, 30 July 2014, New Mexico (USA), Oral Presentation.
 17. 下鶴倫人: 知床半島ルシヤ地区におけるヒグマの行動特性と遺伝構造. 日本哺乳類学会 2014 年度大会プログラム・講演要旨: 56, 2014 年 9 月 6 日、京都大学(京都)、口頭発表
 18. 森真理子, 佐鹿万里子, 下鶴倫人, 坪田敏男: 腎周囲脂肪および大腿骨髄内脂肪を用いたヒグマの栄養状態評価. 日本哺乳類学会 2014 年度大会プログラム・講演要旨: 79, 2014 年 9 月 6 日、京都大学(京都)、口頭発表
 19. 高江洲 昇, 伊藤真輝, 菅原里沙, 柳川洋二郎, 永野昌志, 佐鹿万里子, 下鶴倫人, 坪田敏男: ネコ目動物 3 種における尿道カテーテル挿入による精子採取. 第 157 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 547, 2014 年 9 月 11 日、北海道大学 (札幌) 口頭発表
 20. 下鶴倫人, 森脇 潤, 山中正実, 中西将尚, 石名坂 豪, 葛西真輔, 能勢 峰, 増田 泰, 坪田敏男: 知床半島ルシヤ地区におけるヒグマの繁殖様式に関する研究. 第 157 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 548, 2014 年 9 月 11 日、北海道大学 (札幌) 口頭発表
 21. 李 景利, 高野 愛, Taylor Kyle, 佐鹿万里子, 下鶴倫人, 今内 覚, 川端寛樹, 坪田敏男: A RF *Borrelia* sp. found among wild sika deer and *Haemaphysalis* ticks in Hokkaido. 第 157 回日本獣医学会学術集会講演要旨集: 548, 2014 年 9 月 11 日、北海道大学 (札幌) 口頭発表
 22. 山中正実, 下鶴倫人, 中西将尚, 増田泰, 坪田敏男: 知床半島におけるヒグマの移動分散について - 知床半島ヒグマ保護管理方針に対する保護管理上の示唆 -. 「野生生物と社会」学会、第 20 回大会、2014 年 11 月 1 日、犬山市国際観光センター (愛知) 口頭発表

〔その他〕

ホームページ等

<http://wildlife.vetmed.hokudai.ac.jp>

6．研究組織

(1)研究代表者

下鶴 倫人 (SHIMOZURU, Michito)

北海道大学大学院・獣医学研究科・准教授

研究者番号：50507168