HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	シマリスの冬眠の分子生物学的研究
Author(s)	塚本, 大輔; 高松, 信彦
Citation	低温科学, 81, 119-129
Issue Date	2023-03-20
DOI	10.14943/lowtemsci.81.119
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89104
Type	bulletin (article)
Note	第二章：恒温動物（哺乳類）
File Information	13_p119-129_LT81.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 119-129
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 119

シマリスの冬眠の分子生物学的研究

塚本　大輔[1)]，高松　信彦[2)]

2022 年 12 月 19 日受付，2023 年 1 月 21 日受理

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機能や発現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．我々は，シマリス（*Tamias asiaticus*）の冬眠関連タンパク質 HP の遺伝子発現の解析をきっかけに冬眠研究を開始し，*HP* 遺伝子の冬眠に伴う発現制御が転写レベルでエピジェネティックに制御されていることを明らかにした．さらに，哺乳類の概日性の体温変動による HSF1 の活性制御機構を利用することにより，シマリスの末梢組織において，概日リズムを形成する時計遺伝子 *Per2* の発現が冬眠期の中途覚醒時に一過性に活性化されることを明らかにした．本稿ではこれらの成果について報告する．

Molecular biological studies on hibernation in chipmunks (*Tamias asiaticus*), a mammalian hibernator

Tsukamoto Daisuke[1] and Takamatsu Nobuhiko[2]

Mammalian hibernation is thought to be regulated by readjusting the function and expression of genes common to mammals for hibernation, since no genes or proteins specific to hibernating animals have been found. We began our hibernation research by analyzing the expression of the *hibernation-related protein* (*HP*) genes in chipmunks (*Tamias asiaticus*), and found that *HP* gene expression is epigenetically regulated at the transcriptional level in association with hibernation. Furthermore, the expression of the clock gene *Per2* is regulated in the chipmunk liver during interbout arousal in the hibernation season, using the regulatory mechanism of HSF1 activity by circadian body temperature fluctuations in mammals.

キーワード：シマリス，遺伝子発現，体温，肝臓，概年リズム
chipmunk, gene expression regulation, body temperature, liver, circannual rhythm

連絡先
塚本　大輔
北里大学理学部生物科学科分子生物学講座
〒252-0373　神奈川県相模原市南区北里一丁目 15 番 1 号
S 号館 201
Tel. 042-778-9408
e-mail：tsukamot@kitasato-u.ac.jp
１）北里大学理学部生物科学科分子生物学講座
神奈川県相模原市南区北里一丁目 15 番 1 号 S 号館 201
Laboratory of Molecular Biology, Department of Biosciences, School of Science, Kitasato University・S201, 1-15-1 Kitasato, Minami, Sagamihara, Kanagawa 252-0373, Japan
２）北里大学理学部生物科学科分子生物学講座
神奈川県相模原市南区北里一丁目 15 番 1 号 S 号館 201
Laboratory of Molecular Biology, Department of Biosciences, School of Science, Kitasato University・S201, 1-15-1 Kitasato, Minami, Sagamihara, Kanagawa 252-0373, Japan

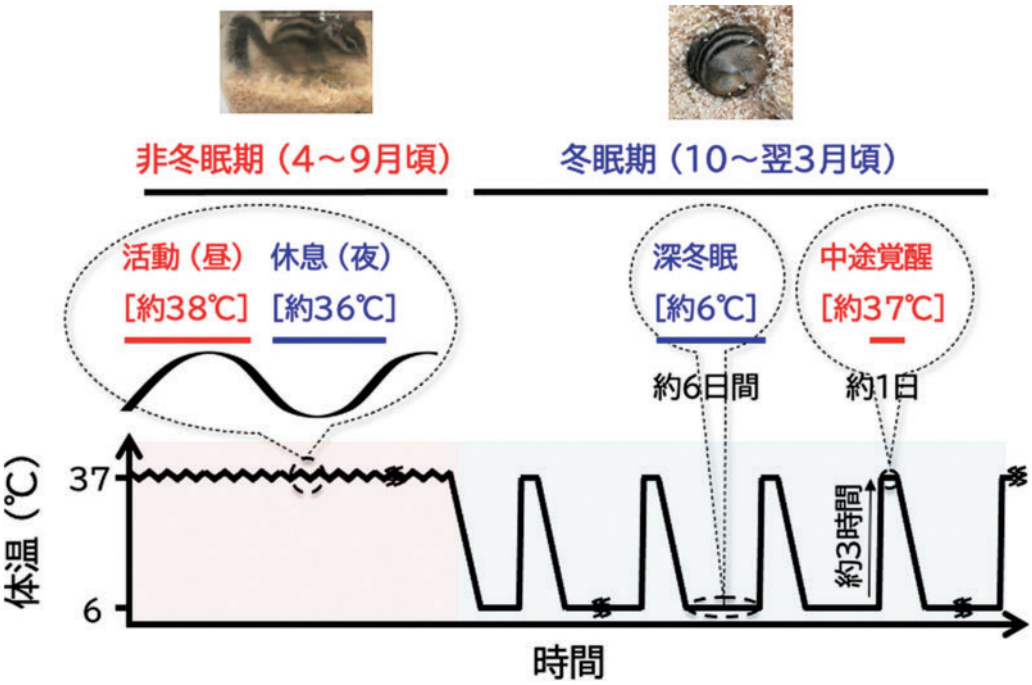

図 1：シマリスの非冬眠期と冬眠期の体温変動．非冬眠期は外気温約 23℃，明暗 12 時間サイクルで飼育した場合．冬眠期は外気温約 5℃，恒暗環境で飼育した場合．冬眠期には，約 6 日間の約 6℃の体温での深冬眠と，約 37℃にまで体温を上昇させる約 1 日の中途覚醒を繰り返す．深冬眠からの中途覚醒では，体温は約 6℃から 3 時間程度で約 37℃にまで上昇する．図の体温は，直腸体温と深部体温をそれぞれプローブ（エー・アンド・デイ社）および 1ch 体温測定テレメトリーシステム（スターメディカル社）を用いて測定した値をもとに作図している．Tsukamoto et al.（2019）をもとに引用改変．

1．リス科の小型冬眠哺乳動物シマリスの冬眠

1.1　シマリスについて

シマリスは齧歯目リス科シマリス属に属する成体体重が約 100 g の小型のリスである．シマリス属の多くの種は北米に生息しており，アジアに生息しているのはチョウセンシマリス，*Tamias asiaticus*（別名シベリアシマリス，*Tamias sibiricus*）の 1 種のみである．我々が研究に用いているシマリスもチョウセンシマリスである．リス科で冬眠するリスは，シマリス属の他に，ジリス属，マーモット属，プレーリードック属に含まれている（川道ほか，2000）．これら 3 属のリスはすべて地上で生活する地上性であるが，シマリスは地上と樹上の両方で生活する半地上半樹上性である．

1.2　リス科の冬眠

リス科の冬眠は，季節性の冬眠である（Pengelley et al., 1978; Kondo et al., 2006）．ジリス属とマーモット属は冬眠前に脂肪を蓄えて体重を増加させ，冬眠期間中は食物をとらない．一方，シマリス属は冬眠前に脂肪の蓄積をせず，冬眠巣に食物を貯蔵し，冬眠期間中の覚醒時（中途覚醒時）に食物を摂取する（Broadbooks, 1958; Kawamichi, 1996）．そのため，野生のシマリスは貯蔵に適する餌が実る秋までは冬眠を開始しないようである（川道ほか，2000）．

1.3　シマリスの冬眠と体温変動

シマリスの冬眠期間は 10 月ごろ～翌 3 月ごろである．冬眠開始のきっかけとなる環境要因および冬眠を終了させる環境要因としては，生態研究から雪や気温などについて検討されてきたが，今でも明らかになっていない（Kawamichi and Kawamichi, 1993; Kawamichi, 1996）．シマリスはリス科の中では小型で飼育しやすいことから，その生態について，環境条件を整えた実験室での飼育により明らかになっていることも多い．我々も，非冬眠期（4 月～9 月）には，室温 23℃で，照明を午前 6 時に点灯し，午後 6 時に消灯する 12 時間-12 時間の明暗周期で飼育し，冬眠期（10 月～翌 3 月）には，室温 5℃での恒暗条件下で飼育している．昼行性のシマリスの体温は，非冬眠期には，1～2℃の範囲で概日性の変動を示し，昼の活動時に約 38℃に上昇し，夜の休息時（睡眠時）に約 36℃に低下する．一方，冬眠期には，4～5℃の外部環境温度の場合，約 6 日間の約 6℃の体温での深冬眠と，急速に体温を約 37℃にまで上昇させ，摂食したり排泄したりする約 1 日の中途覚醒を繰り返す（図 1）．シマリスを 5℃の恒暗条件下で飼育しても，約 10 年間，ほぼ 1 年

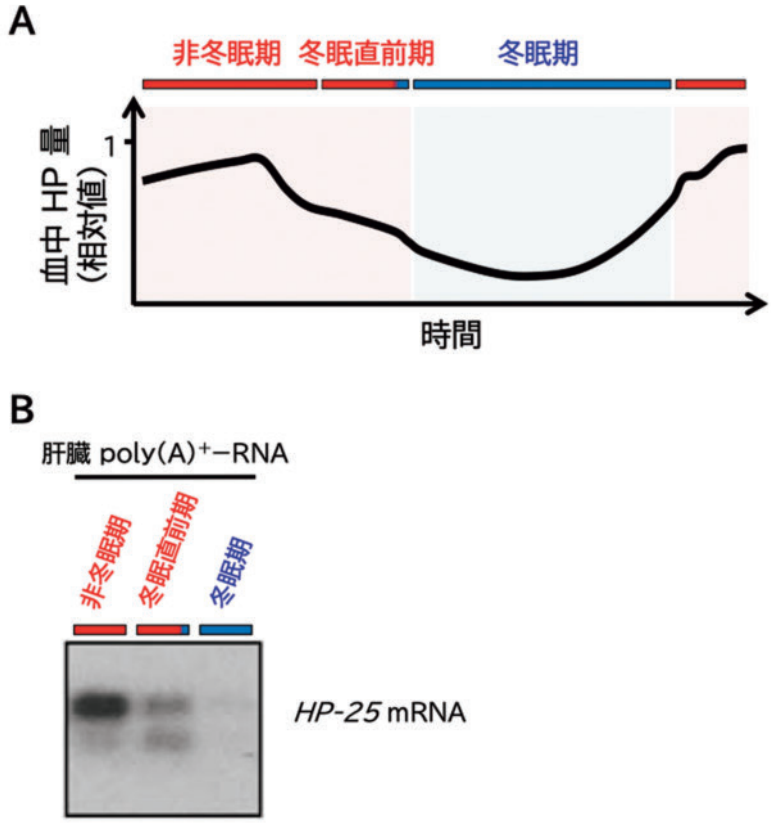

図 2：（A）シマリス血中における冬眠関連タンパク質 HP 複合体の量の変動．最大量を 1 とした相対値で示してある．（B）非冬眠期，非冬眠期の冬眠直前期，および冬眠期のシマリス肝臓から調製した poly（A）$^{+}$-RNA を用いた *HP-25* mRNA のノーザンブロット解析．Kondo et al.（2006）をもとに引用改変．

周期で冬眠を繰り返すことが観察されている（Kondo et al., 2006）．このことから，シマリスの冬眠は内在性の概年リズムによって制御されていると考えられるが，概年リズムの実体はまだ明らかになっていない．

2. シマリスの冬眠関連タンパク質（Hibernation-related Protein，HP）

2.1　シマリスの冬眠関連タンパク質の発見

1992 年に Kondo らのグループは，世界で初めて，冬眠の発動と強い相関を示す物質として，シマリスの血液中において，非冬眠期に比べて冬眠期に著しく減少する 140 kDa の冬眠関連タンパク質（Hibernation-related Protein，HP）複合体を発見した（Kondo and Kondo, 1992）．約 23℃で冬眠による体温低下を妨げた環境下で飼育しても，HP の血中量が年周性の変動を示したことから，体温低下の影響を受けない冬眠の新しい分子マーカーとして注目された．140 kDa の HP 複合体は，HP-20，HP-25，HP-27 および HP-55 で構成されている（Kondo and Kondo, 1992）．HP-20，HP-25，HP-27 はコラーゲンドメインと球状ドメインからなるタンパク質で，C1q/TNF スーパーファミリーに属し，ヘテロ三量体を形成している．血液中の HP 複合体の量は，冬眠期に先駆けて減少しはじめ，冬眠期の間は少なく保たれ，冬眠期の終わり頃から増加するという，冬眠の発動とは逆相関の年周性の変動を示している（Kondo et al., 2006）（図 2A）．

2.2　リス科の HP の機能

2006 年，脳脊髄液中に HP-20，HP-25，HP-27 のヘテロ三量体からなる複合体 HP20 c が存在し，その量は血中 HP 複合体の量とは逆に冬眠期に増加することが明らかになった．さらに，冬眠期のシマリス脳の脈絡叢に抗 HP20 c 抗体を投与すると深冬眠が中断されることから，HP20 c は深冬眠の発現に関与することが示唆された（Kondo et al., 2006）．冬眠するリス科のジュウサンセンジリスやキバラマーモットの血中においても抗 HP 抗体に反応するタンパク質として HP が検出されたが，冬眠しないリス科のタイワンリスでは検出されなかった（Kondo and Kondo, 1993）．この結果から，HP は冬眠する種に特異的なタンパク質であると期待されていたが，2013 年以降，ゲノム情報の蓄積などにより，非冬眠哺乳

動物のウシやヒツジなどにも HP が血中に存在することが明らかになってきた（Fujita et al., 2013; Seldin et al., 2014）．興味深いことに，ウシ HP の血中量も季節性の変動を示しており，冬眠とは異なる季節性の生理現象の調節に関与している可能性が考えられている（Seldin et al., 2014）．冬眠するシマリスやジュウサンセンジリスなどリス科の HP が，非冬眠哺乳動物の HP とは異なる冬眠に関する機能を進化の過程で獲得しているのか，あるいは哺乳類全般に共通する季節性の生理現象に関与しているのかを明らかにしていくため，リス科の動物種ではまだ遺伝学的操作が困難であったことから，現在我々は，ベルギー VIB の Claude Libert 博士と東海大学の阿部幸一郎博士らと共同研究で，リス科の HP タンパク質を発現するマウス個体を作出し，機能の解明を試みている．

3．シマリスの冬眠に伴う *HP* 遺伝子の発現制御機構

3.1　シマリス *HP* 遺伝子の発現

我々は 1993 年 Kondo らと共に，血中 HP 量の変動が遺伝子の発現レベルで制御されているかどうかを明らかにするため，HP20 c 複合体を構成する *HP-20*，*HP-25*，*HP-27* cDNA をクローニングし，これらの遺伝子が肝臓で特異的に発現していることを明らかにした（Takamatsu et al., 1993）．肝臓における *HP* mRNA 量は，血中 HP 複合体の量と同様，冬眠の発動と逆相関の年周性の変動を示した（図 2B）．つまり，血中 HP 量の年周性の変動は，*HP* 遺伝子群の発現によって制御されており，肝臓の *HP* 遺伝子群の発現は冬眠の発動に関与する年周リズム（概年リズム）によって制御されていると考えられた．

3.2　*HP* 遺伝子の発現制御機構

シマリス *HP* 遺伝子群の発現が冬眠に伴ってどのように制御されているかを明らかにするにあたり，我々はまず，*HP* 遺伝子群が肝臓特異的に発現していることから，*HP* 遺伝子群の肝臓特異的な発現制御機構について解析した．その結果，肝臓に豊富に存在する転写因子 Hepatocyte Nuclear Factor 1（HNF1）が *HP-20* 遺伝子の，Hepatocyte Nuclear Factor 4（HNF4）が *HP-25* 遺伝子の主要な転写活性化因子であることが培養細胞およびシマリス肝臓を用いた解析から明らかになった（Ono et. al., 2001; Kojima et al., 2000; Tsukamoto et al., 2017）．さらに，*HP-25* mRNA を発現していないリス科の非冬眠哺乳動物のタイワンリスにおいても，*HP-25* 遺伝子は存在するが，翻訳領域が挿入変異によって破壊され，偽遺伝子化しており，*HP-25* 遺伝子の転写活性化に必要なプロモーター領域の HNF4 結合配列も HNF4 が結合できない配列に変異していることが明らかになった（Kojima et al., 2001）．タイワンリス以外のリス科の非冬眠哺乳動物のキタリスなどにおいても同様の変異が見つかったことから（鎌田，2020），リス科の冬眠哺乳動物と非冬眠哺乳動物とで *HP* 遺伝子群の発現が進化の過程でどのように変化してきたのかを明らかにしていくことは興味深いことである．一方，*HP-27* 遺伝子の転写はユビキタスな転写因子 USF によって活性化されることが明らかになった（Fujii et al., 2006）．ユビキタスな転写因子 USF による *HP-27* 遺伝子の肝臓特異的な転写は，プロモーター領域の USF 結合配列（5'-CACGTG-3'）内の CpG 配列のメチル化によって制御されていた．肝臓以外の *HP-27* 遺伝子非発現組織では CpG 配列がメチル化され，USF が結合できなくなっていた（Fujii et al., 2006）．一方，シマリス肝臓において，*HP* 遺伝子群のプロモーター領域の CpG 配列のメチル化状態は非冬眠期と冬眠期とでほとんど変化しておらず，*HP* 遺伝子群の冬眠に伴う転写制御に CpG 配列のメチル化は関与していないと考えられた（Fujii et al., 2006; Tsukamoto et al., 2018）．

3.3　*HP* 遺伝子の冬眠に伴う発現制御機構の解明

シマリス肝臓における *HP* 遺伝子群の mRNA 量が非冬眠期の活動時に比べ，冬眠期の深冬眠時に著しく減少していることから，我々はまずその変動が転写レベルで制御されているのか，転写後の分解などにより制御されているのかを明らかにするために *HP* 遺伝子群の一次転写産物量について調べた．*HP* 遺伝子群の一次転写産物量を RT-qPCR により非冬眠期の活動時と冬眠期の深冬眠時で比較解析した結果，深冬眠時に著しく減少していることが明らかになり，*HP* 遺伝子群は冬眠に伴って転写レベルで制御され，深冬眠時には転写が抑制されていることが明らかになった（Tsukamoto et al., 2017, 2018）．そこで，*HP* 遺伝子群のプロモーター領域への転写因子の結合量をクロマチン免疫沈降法（Chromatin Immunoprecipitation, ChIP）により解析した結果，非冬眠期の活動時に比べ，深冬眠時には HNF1 の *HP-20* 遺伝子プロモーターへの結合量も，HNF4 の *HP-25* 遺伝子プロモーターへの結合量も著しく減少していた（Tsukamoto et al., 2017, 2018）．さらに，*HP-25* 遺伝子の場合には，冬眠期に発現が増加する DNA 結合ドメインをもたない転写抑制型の核内受容体 Nuclear

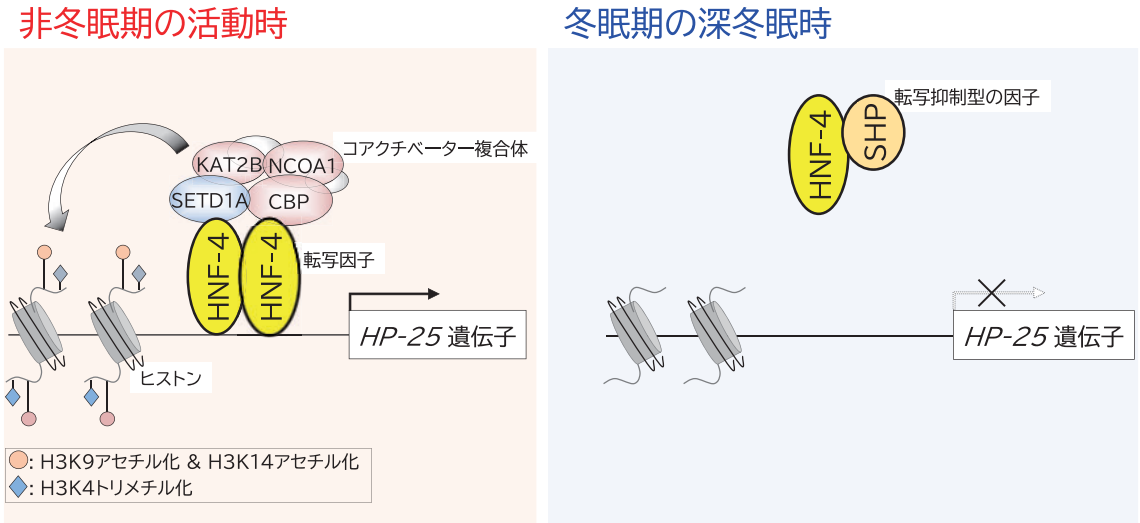

図 3：シマリス *HP-25* 遺伝子の非冬眠期と冬眠期における発現制御機構．非冬眠期の活動時では，*HP-25* 遺伝子は，プロモーター領域に転写因子 HNF-4 が結合し，コアクチベーター複合体がリクルートされ，転写活性化に関わるヒストン修飾が増加し，転写が活性化されている．一方，冬眠期の深冬眠時では，HNF-4 は転写抑制型の因子 SHP と相互作用することでプロモーター領域への結合量が低下し，コアクチベーター複合体も解離し，転写活性化に関わるヒストン修飾の量も減少することで，転写が抑制されている．H3K4，K9，K14：ヒストン H3 の 4 番目，9 番目，14 番目のリシン残基，KAT2B：Lysine acetyltransferase 2B，NCOA1：Nuclear receptor coactivator 1．Tsukamoto et al.（2017）をもとに引用改変．

Receptor subfamily 0 group B member 2［NR0B2（Small Heterodimer Partner，SHP）］と HNF4 がヘテロ二量体を形成することにより，HNF4 のプロモーター領域への結合量が減少することが明らかになった（Tsukamoto et al., 2017）．プロモーター領域への転写因子の結合量の減少に伴い，深冬眠時にはヒストン修飾を制御するコアクチベーターの CREB binding protein（CBP）や SET Domain containing 1A, histone lysine methyltransferase（SETD1A）の結合量も減少し，転写活性化に関わるヒストン H3 の 9 番目や 14 番目のリシン残基のアセチル化，4 番目のリシン残基のトリメチル化なども減少していた（Tsukamoto et al., 2017, 2018）（図 3）．以上の結果から，*HP* 遺伝子群の非冬眠期の活動時の転写活性化と冬眠期の深冬眠時の転写抑制の制御には，転写因子の結合量とヒストン修飾のエピジェネティックな制御が重要であると考えられた．今後，この *HP* 遺伝子群の冬眠に伴うエピジェネティックな転写制御機構をもたらす上流のシグナル経路を明らかにしていくことがシマリスの内在性の概年リズムの解明に繋がっていくと期待できる．

4．シマリスの非冬眠期と冬眠期の体温変動に伴う遺伝子発現制御機構

4.1　冬眠の制御と遺伝子発現

近年の分子生物学の解析技術の著しい進歩によって，種々の冬眠哺乳動物の様々な組織において次世代シーケンスなどを用いた網羅的な遺伝子発現解析が行われ，冬眠に伴って発現量が変動している遺伝子が明らかになってきている（Hampton et al., 2013; Schwartz et al., 2013; Fu et al., 2021; Gillen et al., 2021）．その一方で，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，哺乳類の冬眠は，恒温動物に共通な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制御されていると考えられている（Yan et al., 2008; Morin and Storey, 2009; Breukelen and Martin, 2015）．したがって，冬眠の発現に関与している因子は，非冬眠期の約 37℃の体温下だけでなく，冬眠期の極端な低体温下でも機能できるように進化している可能性が考えられる．

4.2　シマリス肝臓における HSF1 による *Hsp70* 遺伝子の発現制御機構

我々は，*HP* 遺伝子群以外にも，シマリスの冬眠に伴って発現量が変動している遺伝子を探索するため，非冬眠期の活動時と冬眠期の深冬眠時の肝臓において，サブトラクション解析を行い，その結果をノーザンブロット解析および RT-qPCR 解析で確認し，*Heat Shock 70 kDa Protein*（*Hsp70*）遺伝子が非冬眠期の活動時に転写が活性化され，冬眠期の深冬眠時に抑制されていることを明らかにした（Tsukamoto et al., 2019）．シマリス *Hsp70* 遺伝子の転写調節機構について解析した結果，ヒトやマウス同様，*Hsp70* 遺伝子の転写を活性化する主要な転写調節因子は Heat Shock Factor 1（HSF1）であることが

明らかになった．シマリス肝臓における HSF1 の *Hsp70* 遺伝子プロモーター領域への結合を ChIP により解析した結果，*Hsp70* 遺伝子プロモーター領域への HSF1 の結合量は，非冬眠期の活動時に比べ，冬眠期の深冬眠時に著しく減少していることが明らかになった．さらに，HSF1 タンパク質の量と局在をウエスタンブロットと免疫組織化学により解析した結果，非冬眠期の活動時では HSF1 は主に核に存在しているが，冬眠期の深冬眠時では核ではなく主に細胞質に局在していることが明らかになった（Tsukamoto et al., 2019）．夜行性のマウスの肝臓では，夜間の活動量の増加による体温上昇に伴って HSF1 が活性化されて，細胞質から核へと移行し，*Hsp70* 遺伝子プロモーターに結合して，*Hsp70* 遺伝子の転写を活性化する（Reinke et al., 2008）．非冬眠期のシマリスでも体温は 1～2℃の範囲で概日性の変動を示すが，シマリスは昼行性なので，昼の活動時に約 38℃に上昇し，夜の休息時（睡眠時）に約 36℃に低下する．そこで，非冬眠期のシマリスの肝臓の HSF1 の局在を解析したところ，HSF1 は常に核に存在していたが，明期初期の活動量の増加による体温上昇に伴って核内の HSF1 の量が増加し，*Hsp70* 遺伝子の転写が一過性に活性化されることが明らかになった（Tsukamoto et al., 2019）（図 4A）．これらの結果から，非冬眠期のシマリス肝臓では，マウス同様，HSF1 は体温変動によって活性が制御される日周性（概日性）の転写因子として機能していると考えられた．

4.3　シマリスの冬眠期の体温変動に伴う遺伝子発現制御機構

小型冬眠哺乳動物の冬眠期の深冬眠時の低体温は，体温調節能が失われ環境温度に同調する外温性に変化した結果ではなく，体温調節能を保ったまま設定体温値を低下させて維持されている（川道ほか，2000）．深冬眠からの中途覚醒では，体温は約 6℃から 3 時間程度で約 37℃にまで上昇する（図 1）．そこで，シマリスの冬眠期の深冬眠－中途覚醒サイクルにおける体温変動が，シマリス肝臓における HSF1 の活性に及ぼす影響について解析した．深冬眠時には HSF1 は主に細胞質に存在し，*Hsp70* 遺伝子の転写は抑制されている（図 4B）が，中途覚醒して体温が 30℃以上に上昇すると HSF1 は核内へと移行し，*Hsp70* 遺伝子の転写が一過性に活性化されることが明らかになった（図 4B）（Tsukamoto et al., 2019）．これらの結果から，シマリスは，恒温動物に共通の非冬眠期の活動－休息サイクルの体温変動を利用した HSF1 の活性制御機構を，冬眠期の深冬眠－中途覚醒サイクルにおける遺伝子発現の制御にも活用していると考えられた．

5．シマリスの冬眠期の肝臓における時計遺伝子の発現制御機構

5.1　冬眠期の末梢時計

生体内の生理現象の日周リズムは概日時計によって制御されている（金の稿参照）．概日時計は全ての細胞が保持しているが，視床下部の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus，SCN）に存在する中枢時計から末梢組織に同調するように働きかけることで個体としてのリズムが統合されている．SCN の中枢時計は，外界の光周期と同調している．リス科の冬眠哺乳動物は，自然界では光が届きにくい地中で冬眠しており，冬眠期の中途覚醒－深冬眠サイクルや年周性の冬眠サイクルの発現に概日リズムがどのように関与しているかはわかっていない（川道ほか，2000；Kondo et al., 2006）．概日リズムは時計遺伝子である *Bmal1*，*Clock*，*Cry*，*Per* 遺伝子の転写と翻訳のフィードバックループにより形成される（Takahashi, 2017）．また，概日時計には温度補償性という特徴があり，外部温度がある程度の範囲で変化しても，概日時計の周期はほとんど変化しない（Narasimamurthy and Virshup, 2017）．しかし，冬眠期の深冬眠時の体温は数℃にまで低下し，転写や翻訳もほとんど停止していること（Storey and Storey, 2004）から，深冬眠時に概日時計が機能しているかどうかは興味深い問題である．深冬眠時の概日リズムは体温リズムの解析などによって行われているが，相反する複数の報告があり，まだ結論は出ていない（Grahn et al., 1994; Ruby et al., 2002; Gur et al., 2009; Williams et al., 2012）．ただし，SCN での時計遺伝子の発現の解析からは，深冬眠時には中枢時計は停止していると考えられている（Revel et al., 2007; Ikeno et al., 2017）．一方，冬眠哺乳動物の末梢時計についてはほとんど解析の報告がない．

5.2　非冬眠期のシマリスの肝臓における時計遺伝子 *Per2* の発現制御機構

マウスでは日周性の体温変動によって末梢組織の HSF1 の活性が制御されており（Reinke et al., 2008），活動時の体温上昇によって活性化された HSF1 によって *Per2* 遺伝子の転写が活性化され，末梢時計が日々リセットされる（Buhr et al., 2010）．*Per2* 遺伝子は主要な概日時計遺伝子の 1 つであり，末梢組織由来の培養細胞がリズムを同調させるときに初期にリセットされる遺伝子でもある（Tamaru et al., 2011; Saini et al., 2012）．非冬眠期

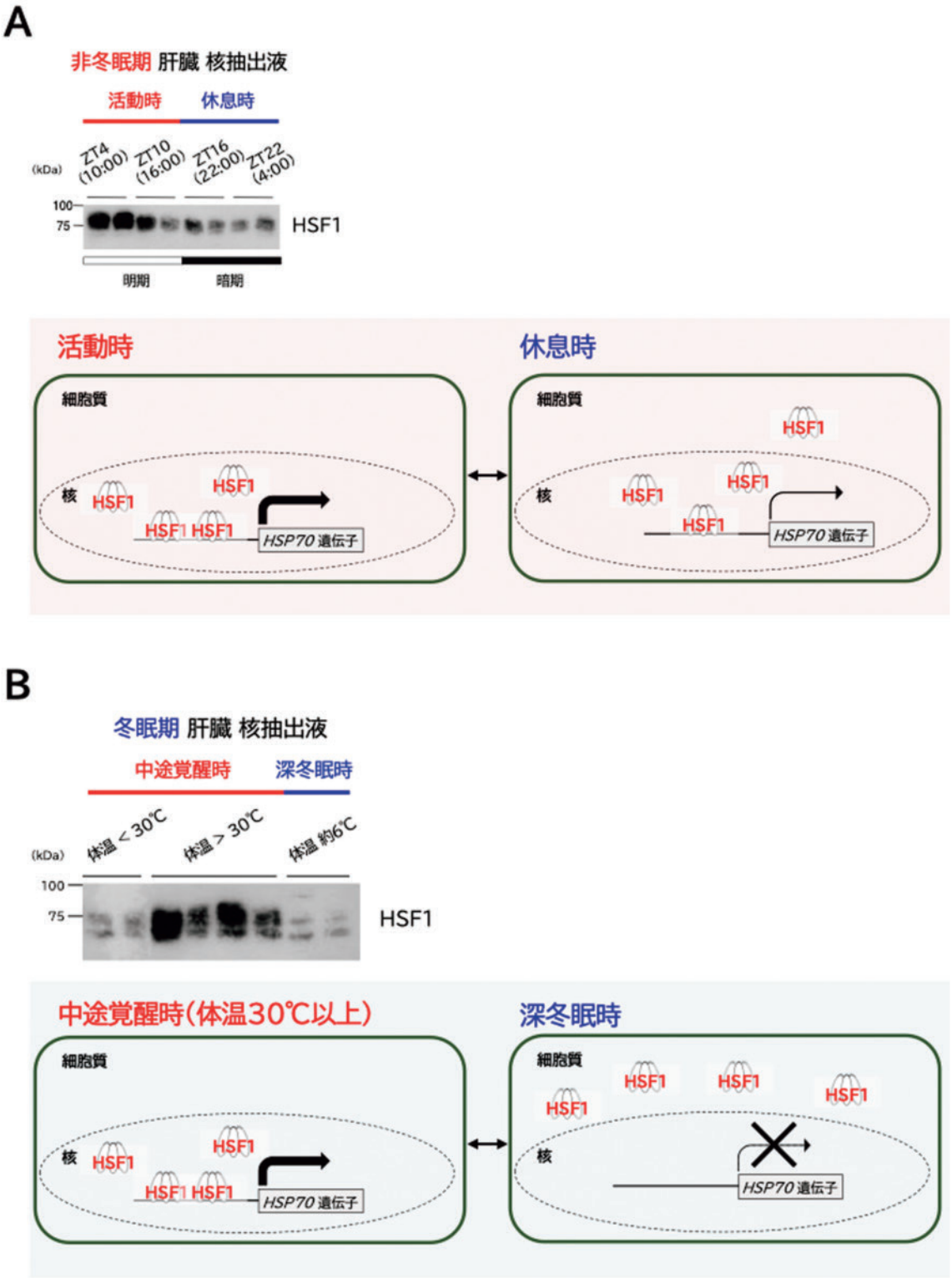

図 4：(A) 非冬眠期の各時間帯のシマリス 2 個体ずつのシマリスの肝臓核抽出液を用いた HSF1 のウエスタンブロット解析（上）．非冬眠期のシマリス *Hsp70* 遺伝子の HSF1 による発現制御機構（下）．非冬眠期では，HSF1 は常に核に存在するが，活動時の体温上昇に伴い活性化され，*Hsp70* 遺伝子の転写を活性化する．(B) 冬眠期の中途覚醒時と深冬眠時のシマリスの肝臓核抽出液を用いた HSF1 のウエスタンブロット解析．中途覚醒時で直腸体温 30℃ 以下の個体は深冬眠状態から中途覚醒し始めて 1 時間以内，中途覚醒時で直腸体温 30℃ 以上の個体は中途覚醒し始めてから 2 時間以上経過したときである（上）．冬眠期のシマリス *Hsp70* 遺伝子の HSF1 による発現制御機構（下）．冬眠期では，深冬眠時に HSF1 は主に細胞質に存在しているが，中途覚醒時の体温上昇に伴い活性化され，核へと移行し，*Hsp70* 遺伝子の転写を活性化する（下）．Tsukamoto et al.（2019）をもとに引用改変．

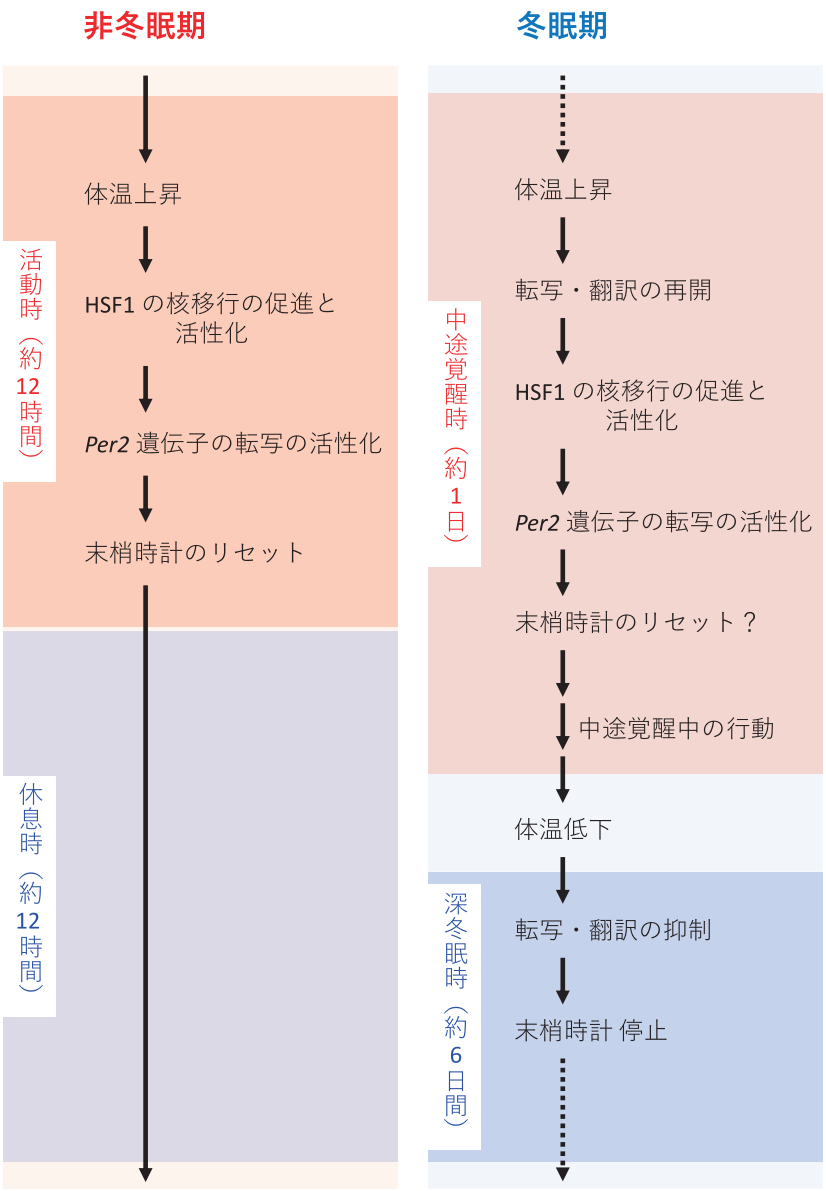

図 5：非冬眠期と冬眠期のシマリスにおける体温変動による HSF1 の活性制御機構を利用した末梢時計のモデル．非冬眠期では，体温の概日リズムによって，活動時に活性化された HSF1 によって *Per2* 遺伝子の転写が活性化され，末梢時計が日々リセットされる．冬眠期では，深冬眠の間は末梢時計は停止しているが，中途覚醒の体温上昇に伴い転写・翻訳が再開し，活性化された HSF1 によって *Per2* 遺伝子の転写が活性化され，増加した Per2 によって一部の遺伝子群の発現が制御される．再び深冬眠にはいるときの体温低下に伴い，転写・翻訳が抑制され，末梢時計は停止する．

のシマリスの肝臓においては，明期初期の活動量の増加に伴う体温上昇によって HSF1 が活性化され，標的遺伝子 *Hsp70* の転写が活性化されることから（Tsukamoto et al., 2019）（図 4A），我々はシマリス肝臓での *Per2* 遺伝子の転写も HSF1 によって制御されているかどうかを検討した．その結果，*Per2* 遺伝子の場合も，明期初期に HSF1 結合配列（Heat Shock Element，HSE）への HSF1 の結合量が増加し，転写が活性化される可能性が示唆された．これらの結果から，非冬眠期のシマリス肝臓においても，マウス同様，体温の概日リズムによって末梢時計がリセットされていると考えられた（図 5）．

5.3　シマリスの冬眠期の体温変動と末梢時計遺伝子の発現制御

冬眠期のシマリス肝臓において，HSF1 は中途覚醒に伴い体温が 30℃ 以上に上昇すると核へと移行し活性化される（Tsukamoto et al., 2019）（図 4B）．そこで，冬眠期の深冬眠－中途覚醒サイクルにおける肝臓での *Per2*

遺伝子の発現と体温との関係について解析した．その結果，*Per2* mRNA 量は，体温が約 6℃の深冬眠時では低レベルであるが，中途覚醒して体温が 30℃以上になると一過性に増加し，完全に中途覚醒した体温 35℃以上の個体では既に減少し始めることが明らかになった．さらに，*Per2* mRNA 量の変動と，*Per2* 遺伝子の HSE への HSF1 の結合も相関している可能性が示唆された．これらの結果から，冬眠期のシマリスの肝臓では，深冬眠への体温低下に伴い末梢時計は停止するが，中途覚醒の体温上昇により転写・翻訳が再開する中，HSF1 が一過性に活性化されることで，*Per2* 遺伝子の転写が活性化されると考えられた（図 5）．

6．今後のシマリスを用いた分子レベルからの冬眠研究

小型冬眠哺乳動物は，深冬眠時にはヒトなどの非冬眠哺乳動物では致死的な低体温にまで体温を低下させるが，全身の組織の健全性を保ったまま生命を維持している．なぜ低体温でも組織は健全なのか，またなぜ急激な復温や虚血からの再灌流に相当する中途覚醒にも耐えられるのか，これらの答えに向かう冬眠研究は医療への応用の可能性を大いに秘めている．哺乳類の冬眠は，哺乳類に共通の遺伝子の機能や発現などを冬眠用に再調整することにより制御されていると考えられている（Yan et al., 2008; Morin and Storey, 2009; Breukelen and Martin, 2015）．そして我々は実際に，シマリスにおいて，概日性の体温変動を利用した HSF1 による遺伝子発現制御のシステムが，冬眠期の遺伝子発現制御に利用されていることを明らかにした．さらに，このシステムは冬眠期の中途覚醒時において，肝臓における時計遺伝子 *Per2* の発現制御にも関与していると考えられた．この中途覚醒時の一過性の *Per2* 遺伝子の発現増加の生理学的意義は不明であるが，Per2 タンパク質により制御されている遺伝子群の発現を調節することで非冬眠期の覚醒－睡眠サイクルをある程度回復させ，睡眠時の体温低下機構を利用して体温を下げて深冬眠にはいっている可能性も考えられる．このような冬眠のための生体システムの再調整は個々の遺伝子（タンパク質）のレベルでも生じている可能性があり，冬眠に関わる遺伝子が非冬眠哺乳動物のオルソログとは異なる特徴を備えていることも考えられる．発見当初は冬眠哺乳動物に特有の遺伝子と期待された HP は非冬眠哺乳動物にも存在することが明らかになった（Fujita et al., 2013; Seldin et al., 2014）が，リス科では冬眠する種に特異的に発現していることから，冬眠するリス科の HP が冬眠に関わる何らかの機能を担っている可能性も大いに考えられる．小型冬眠哺乳動物の温度感受性 Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 8（TRPM8）チャネルでは，アミノ酸変異による温度感受性の低下が低温耐性に関与している可能性が報告されている（Matos-Cruz et al., 2017）（齋藤の稿参照）．さらに，冬眠哺乳動物が生まれながらに冬眠するために必要な能力を保持している可能性を示す結果も報告されている．ヒトとジュウサンセンジリスの iPS 細胞から分化させた神経細胞の低温耐性の比較や，シリアンハムスターとマウスの初代培養肝細胞の低温耐性の比較から，冬眠するジュウサンセンジリスやシリアンハムスターの細胞が低温耐性の能力を有していることが示されている（Ou et al., 2018; Anegawa et al., 2021）（曽根の稿参照）．これらのことから今後は，冬眠に伴う組織の保護や可逆的な代謝抑制のメカニズム解明のため，冬眠期の正確な体温変動の追跡だけでなく，冬眠期の体温調節システムがどのように制御されるのかを明らかにしていくことが重要であると考えられる．また，冬眠哺乳動物においても今後の技術改良等によりゲノム編集などの技術適用が容易になっていくことで，進化の過程で非冬眠哺乳動物と同じ遺伝子でも発現や機能を変化させて複雑に絡み合った機構により制御されている哺乳動物の冬眠の一端が解きほぐされていくことを期待している．

参考文献

雑誌

Anegawa, D., Sugiura, Y., Matsuoka, Y., Sone, M., Shichiri, M., Otsuka, R., Ishida, N., Yamada, K., Suematsu, M., Miura, M., & Yamaguchi, Y. (2021). Hepatic Resistance to Cold Ferroptosis in a Mammalian Hibernator Syrian Hamster Depends on Effective Storage of Diet-Derived α-Tocopherol. *Commun Biol*, **4**(796). https://doi.org/10.1038/s42003-021-02297-6

Breukelen, F. V., & Martin, S. L. (2015). The Hibernation Continuum: Physiological and Molecular Aspects of Metabolic Plasticity in Mammals. *Physiology*, **30**, 273-281. doi:10.1152/physiol.00010.2015

Buhr, E. D., Yoo, S., & Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. *Science*, **330**(6002), 379-385. doi:10.1126/science.1195262

Ono, M., Hosoe, Y., Azuma, S., Shoji, M., Nara, K., Kondo, N., … Takamatsu, N. (2001). HNF-1 Regulates the Liver-Specific Transcription of the Chipmunk HP-20 Gene. *Gene*, **277**,

121–127.

Ou, J., Ball, J. M., Luan, Y., Zhao, T., Miyagishima, K. J., Xu, Y., Zhou, H., Chen, J., Merriman, D. K., Xie, Z., Mallon, B. S., & Li, W. (2018). IPSCs from a Hibernator Provide a Platform for Studying Cold Adaptation and Its Potential Medical Applications. *Cell*, **173**(4), 851–863. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.010

Fu, R., Gillen, A. E., Grabek, K. R., Riemondy, K. A., Epperson, L. E., Bustamante, C. D., … Martin, S. L. (2021). Dynamic RNA Regulation in the Brain Underlies Physiological Plasticity in a Hibernating Mammal. *Front Physiol*, **11**, 624677. doi:10.3389/fphys.2020.624677

Fujii, G., Nakamura, Y., Tsukamoto, D., Ito, M., Shiba, T., & Takamatsu, N. (2006). CpG Methylation at the USF-Binding Site Is Important for the Liver-Specific Transcription of the Chipmunk HP-27 Gene. *Biochem J*, **395**, 203–209. doi:10.1042/BJ20051802

Fujita, S., Okamoto, R., Taniguchi, M., Ban-tokuda, T., Konishi, K., Goto, I., … Ito, M. (2013). Identification of Bovine Hibernation-Specific Protein Complex and Evidence of Its Regulation in Fasting and Aging. *J Biochem*, **153**(5), 453–461. doi:10.1093/jb/mvt008

Gillen, A. E., Fu, R., Riemondy, K. A., Jager, J., Fang, B., Lazar, M. A., & Martin, S. L. (2021). Liver Transcriptome Dynamics During Hibernation Are Shaped by a Shifting Balance Between Transcription and RNA Stability. *Front Physiol*, **12**, 662132. doi:10.3389/fphys.2021.662132

Grahn, D. A., Miller, J. D., Houng, V. S., & Heller, H. C. (1994). Persistence of Circadian Rhythmicity in Hibernating Ground Squirrels. *Am J Physiol*, **266**, R1251. doi:10.1152/ajpregu.1994.266.4. R1251

Gur, M. K., Refinetti, R., & Gur, H. (2009). Daily Rhythmicity and Hibernation in the Anatolian Ground Squirrel under Natural and Laboratory Conditions. *J Comp Physiol B*, **179**(2), 155–64. doi:10.1007/s00360-008-0298-0

Hampton, M., Melvin, R. G., & Andrews, M. T. (2013). Transcriptomic Analysis of Brown Adipose Tissue across the Physiological Extremes of Natural Hibernation. *PLOS ONE*, **8**(12), e85157. doi:10.1371/journal.pone.0085157

Ikeno, T., Williams, C. T., Buck, C. L., Barnes, B. M., & Yan, L. (2017). Clock Gene Expression in the Suprachiasmatic Nucleus of Hibernating Arctic Ground Squirrels. *J Biol Rhythms*, **32**(3), 246–256. https://doi.org/10.1177/0748730417702246

Kawamichi, M. (1996). Ecological Factors Affecting Annual Variation in Commencement of Hibernation in Wild Chipmunks (Tamias Sibiricus). *J Mammal*, **77**(3), 731–744. https://doi.org/10.2307/1382678

Kojima, M., Takamatsu, N., Ishii, T., Kondo, N., & Shiba, T. (2000). HNF-4 Plays a Pivotal Role in the Liver-Specific Transcription of the Chipmunk HP-25 Gene. *Eur J Biochem*, **267**, 4635–4641.

Kojima, M., Shiba, T., Kondo, N., & Takamatsu, N. (2001). The Tree Squirrel HP-25 Gene Is a Pseudogene. *Eur J Biochem*, **268**, 5997–6002.

Kondo, N., & Kondo, J. (1992). Identification of Novel Blood Proteins Specific for Mammalian Hibernation. *J Biol Chem*, **267**(1), 473–478.

Kondo, N., Sekijima, T., Kondo, J., Takamatsu, N., Tohya, K., & Ohtsu, T. (2006). Circannual Control of Hibernation by HP Complex in the Brain. *Cell*, **125**, 161–172. doi:10.1016/j.cell.2006.03.017

Matos-Cruz, V., Schneider, E. R., Mastrotto, M., Merriman, D. K., Bagriantsev, S. N., & Gracheva, E. O. (2017). Molecular Prerequisites for Diminished Cold Sensitivity in Ground Squirrels and Hamsters. *Cell Rep*, **21**(12), 3329–3337. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.083

Morin, P. Jr., & Storey, K. B. (2009). Mammalian Hibernation: Differential Gene Expression and Novel Application of Epigenetic Controls. *Int J Dev Biol*, **53**, 433–442. doi:10.1387/ijdb.082643pm

Narasimamurthy, R., & Virshup, D. M. (2017). Molecular Mechanisms Regulating Temperature Compensation of the Circadian Clock. *Front Neurol*, **8**, 161. doi:10.3389/fneur.2017.00161

Pengelley, E. T., Aloia, R. C., & Barnes, B. M. (1978). Circannual Rhythmicity in the Hibernating Ground Squirrel Citellus Lateralis under Constant Light and Hyperthermic Ambient Temperature. *Comp Biochem Physiol A*, **61**(4), 599–603. https://doi.org/10.1016/0300-9629(78)90135-4

Reinke, H., Saini, C., Fleury-olela, F., Dibner, C., Benjamin, I. J., & Schibler, U. (2008). Differential Display of DNA-Binding Proteins Reveals Heat-Shock Factor 1 as a Circadian Transcription Factor. *Genes Dev*, **22**, 331–345. doi:10.1101/gad.453808

Revel, F. G., Herwig, A., Garidou, M., Dardente, H., Menet, J. S., Masson-pevet, M., … Pevet, P. (2007). The Circadian Clock Stops Ticking during Deep Hibernation in the European Hamster. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **104**(34), 13816–20. doi:10.1073/pnas.0704699104

Ruby, N. F., Dark, J., Burns, D. E., Heller, H. C., & Zucker, I. (2002). The Suprachiasmatic Nucleus Is Essential for Circadian Body Temperature Rhythms in Hibernating Ground Squirrels. *J Neurosci*, **22**(1), 357–364. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-01-00357.2002

Saini, C., Morf, J., Stratmann, M., Gos, P., & Schibler, U. (2012). Simulated Body Temperature Rhythms Reveal the Phase-Shifting Behavior and Plasticity of Mammalian Circadian Oscillators. *Genes Dev*, **26**, 567–580. https://doi.org/10.1101/gad.183251.111

Schwartz, C., Hampton, M., & Andrews, M. T. (2013). Seasonal and Regional Differences in Gene Expression in the Brain of a Hibernating Mammal. *PLOS ONE*, **8**(3), e58427. doi:10.1371/journal.pone.0058427

Seldin, M. M., Byerly, M. S., Petersen, P. S., Swanson, R.,

Balkema-buschmann, A., Groschup, M. H., & Wong, G. W. (2014). Seasonal Oscillation of Liver-Derived Hibernation Protein Complex in the Central Nervous System of Non-Hibernating Mammals. *J Exp Biol*, **217**, 2667–2679. doi: 10.1242/jeb.095976

Storey, K. B., & Storey, J. M. (2004). Metabolic Rate Depression in Animals: Transcriptional and Translational Controls. *Biol Rev*, **79**, 207–233. doi:10.1017/S1464793103006195

Takahashi, J. S. (2017). Transcriptional Architecture of the Mammalian Circadian Clock. *Nat Rev Genet*, **18**, 164–179. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150

Takamatsu, N., Ohba, K., Kondo, J., Kondo, N., & Shiba, T. (1993). Hibernation-Associated Gene Regulation of Plasma Proteins with a Collagen-Like Domain in Mammalian Hibernators. *Mol Cell Biol*, **13**(3), 1516–1521.

Tamaru, T., Hattori, M., Honda, K., Benjamin, I., Ozawa, T., & Takamatsu, K. (2011). Synchronization of Circadian Per2 Rhythms and HSF1-BMAL1: CLOCK Interaction in Mouse Fibroblasts after Short-Term Heat Shock Pulse. *PLOS ONE*, **6**(9), e24521. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024521

Tsukamoto, D., Ito, M., & Takamatsu, N. (2017). HNF-4 Participates in the Hibernation-Associated Transcriptional Regulation of the Chipmunk Hibernation-Related Protein Gene. *Sci Rep*, **7**, 44279. https://doi.org/10.1038/srep44279

Tsukamoto, D., Ito, M., & Takamatsu, N. (2018). Epigenetic Regulation of Hibernation-Associated HP-20 and HP-27 Gene Transcription in Chipmunk Liver. *Biochem Biophys Res Commun*, **495**, 1758–1765. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.052

Tsukamoto, D., Hasegawa, T., Hirose, S., Sakurai, Y., Ito, M., & Takamatsu, N. (2019). Circadian Transcription Factor HSF1 Regulates Differential HSP70 Gene Transcription during the Arousal-Torpor Cycle in Mammalian Hibernation. *Sci Rep*, **9**, 832. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37022-7

Williams, C. T., Barnes, B. M., Richter, M., & Buck, C. L. (2012). Hibernation and Circadian Rhythms of Body Temperature in Free-Living Arctic Ground Squirrels. *Physiol Biochem Zool*, **85**(4). https://doi.org/10.1086/666509

Yan, J., Barnes, B. M., Kohl, F., & Marr, T. G. (2008). Modulation of Gene Expression in Hibernating Arctic Ground Squirrels. *Physiol Genom*, **32**, 170–181. doi: 10.1152/physiolgenomics.00075.2007

書籍

Broadbooks, H. E. (1958). *Life History and Ecology of the Chipmunk, Eutamias Amoenus, in Eastern Washington* (1st ed.). USA: University of Michigan.

Kawamichi, M., & Kawamichi, T. (1993). *Factors Affecting Hibernation Commencement and Spring Emergence in Siberian Chipmunks (Eutamias Sibiricus)* (1st Edition.). Boca Raton: CRC Press.

Kondo, N., & Kondo, J. (1993). *Identification and Characterization of Novel Types of Plasma Protein Specific for Hibernation in Rodents* (1st ed.). London: CRC Press.

川道武男，近藤宣昭，＆森田哲夫（Eds.）．（2000）．冬眠する哺乳類（初版.）．日本：東京大学出版会.

鎌田泰斗．（2020）．リス科における冬眠と冬眠特異的タンパク質（*HP*）の進化に関する研究．新潟大学大学院自然科学研究科博士論文.